

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА  
ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології

Нипорко Олексій Юрійович

Протокол №\_ засідання кафедри

від “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ЗМІНИ ЕКСПРЕСІЇ ПУХЛИНОАСОЦІЙОВАНИХ ГЕНІВ ТА  
РІВНІВ НЕКОДУЮЧИХ РНК ЯК ПОТЕНЦІЙНІ МАРКЕРИ  
РОЗВИТКУ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студента спеціальності 091 Біологія  
ОП «Молекулярні біотехнології»  
**Каряки Сергія Владиславовича**

Науковий керівник від кафедри  
доцент кафедри молекулярної біотехнології  
к.б.н., доцент **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана у відділі молекулярної онкогенетики  
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України  
під керівництвом к.б.н. **Маньковської Оксани Сергіївни**

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2024 р.

## АНОТАЦІЯ

Каряка С.В. Зміни експресії пухлиноасоційованих генів та рівнів некодуючих РНК як потенційні маркери розвитку раку сечового міхура. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Молекулярні біотехнології».

У роботі проведено збір клінічних зразків, аналіз експресії РНК ANRIL, PANDAR, PTEN, RASSF1A, ANRASSF1, SNHG1, GAS5 в пухлинних і парних нормальних тканинах сечового міхура, сечі пацієнтів і умовно здорових донорів. Встановлені такі статистично достовірні результати кореляцій досліджуваних днРНК в пухлинних тканинах: SNHG-PTEN, RASSF1A-PTEN, ANRIL-PTEN, SNHG- RASSF1A, ANRASSF1 -RASSF1A, ANRIL-RASSF1A, ANRIL-ANRASSF1, GAS5-PTEN, PANDAR-ANRIL, ANRIL-SNHG. Знайдено статистично достовірну різницю між нормальними та здоровими тканинами у рівнях експресії ANRIL, SNGH1, PANDAR та PTEN. У сечі отримано статистично достовірну різницю між здоровими та хворими на РСЧ донорами в експресії ANRASSF1 та SNGH1. Знайдено статистично достовірну кореляцію між рівнями експресії в сечі GAS5 та наявністю лікування. Отримані результати можуть бути використані у подальших дослідженнях шляхів взаємодії досліджуваних днРНК, а також дослідженнях нових методів діагностики пацієнтів.

**Ключові слова:** довгі некодуючі РНК; рак сечового міхура; біомаркери.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	5
1.1 Характеристика раку сечового міхура .....	5
1.2 Характеристика біомаркерів .....	7
1.3 Біомаркери раку.....	8
1.4 Метилювання ДНК.....	12
1.4.1 Метилювання ДНК в організмі людини.....	12
1.4.2 Порушення метилювання при РСЧ .....	17
1.5 Довгі некодуєчі РНК .....	18
1.5.1 Функції довгих некодуєчих РНК в організмі .....	19
1.5.2 Роль довгих некодуєчих РНК при розвитку РСЧ.....	20
1.6 Циркулюючі нуклеїнові кислоти.....	24
1.6.1 Рідинна біопсія при РСЧ .....	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	27
2.1 Забір клінічних зразків.....	27
2.2 Виділення ДНК та РНК з клінічних зразків пухлини.....	30
2.3 Кількісна ПЛР у реальному часі.....	32
2.4 Методи статистичної обробки .....	33
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	34
3.1 Результати отримані з тканин пухлин та парних УНТ.....	34
3.2 Результати отримані з сечі пацієнтів та умовно здорових донорів .	37
3.3 Обговорення отриманих результатів.....	41
ВИСНОВКИ .....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	47

## ВСТУП

Наразі рак сечового міхура становить 3-4% від всіх випадків онкології що зустрічаються у світі. Він є досить летальним саме через те, що його складно визначити на ранніх стадіях. Близько 50% пацієнтів хворих на рак сечового міхура виявляють у себе новоутворення вже на III–IV стадії. Тому важливу увагу у дослідженнях цього захворювання слід приділити саме тому, щоб діагностувати його на ранніх стадіях. Саме тому наша група обрала за основний пріоритет пошук та дослідження взаємодій неінвазивних (застосування яких значно спрощує процедуру діагностики та розширює її можливості у клінічній практиці), специфічних та ранніх біомаркерів для виявлення РСЧ. Під ці критерії підходять генетичні та епігенетичні біомаркери. З огляду на те, що широкі епігенетичні зміни дуже часто проявляються у РСЧ, а також те, що епігенетична складова в розвитку онкології недостатньо вивчена, що робить це поле досліджень новаторським та перспективним, ми вирішили шукати можливі біомаркери та досліджувати взаємодії між ними саме в цьому напрямі.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Характеристика раку сечового міхура

Рак сечового міхура (РСЧ) – це будь-яке злоякісне новоутворення, що виникає у сечовому міхурі. Це найбільш поширене новоутворення сечовивідних шляхів, при цьому уротеліальна карцинома (УС) є найпоширенішим гістологічним типом. РСМ – це пухлина, що притаманна людям похилого віку (> 60 років). Згідно даних Всесвітньої організації охорони здоров'я, РСМ становить 3-4% від загальної кількості випадків онкології, а також 46-72% від випадків онкології саме сечового міхура. За даними Національного канцер-реєстру, в Україні наразі кількість кейсів РСМ співвідноситься як 11,1 до 100 тис. населення. Більше ніж 50% хворих під час першої ж діагностики вже мають III–IV стадію онкології, при цьому смертність в рамках першого року лікування сягає 20%. Загальні симптоми включають: мікроскопічну гематурію, макрогематурію, інфекцію чи обструкцію. Інші менш поширені симптоми включають хворобливе сечовипускання, часті сечовипускання, конституційні симптоми, такі як стомлюваність, втрата ваги та новоутворення в ділянці тазу. Скринінг-тестів для раннього виявлення РМЗ немає. Макроскопічна гематурія корелює із занедбаною стадією захворювання [1, 2].

Карцинома 1 стадії являє собою плоску низько диференційовану пухлину, що обмежена слизовою оболонкою. Пухлини 2 стадії мають проникати в м'язовий шар поверхнево (T2a), або глибоко (T2b). пухлини T3 проникли за межі власної м'язової оболонки в перивезикальну жирову клітковину (інвазія T3a мікроскопічний, макроскопічний T3b). Пухлини T4a проникають у тканини передміхурової залози, матки, піхви та/або кишечника, тоді як пухлини T4b проростають в органи малого тазу або стінки живота (рис. 1.1).

Також РСМ класифікують як неінвазивний (NMIBC), та м'язово інвазивний (MIBC). Цікаво зазначити, що незважаючи на подібні мутаційні ознаки, мутаційне навантаження та загальні зміни в геномній архітектурі у двох групах різні. У середньому 169-195 мутацій на зразок було отримано в результаті секвенування NMIBC в порівнянні з 302 в MIBC [1, 3].

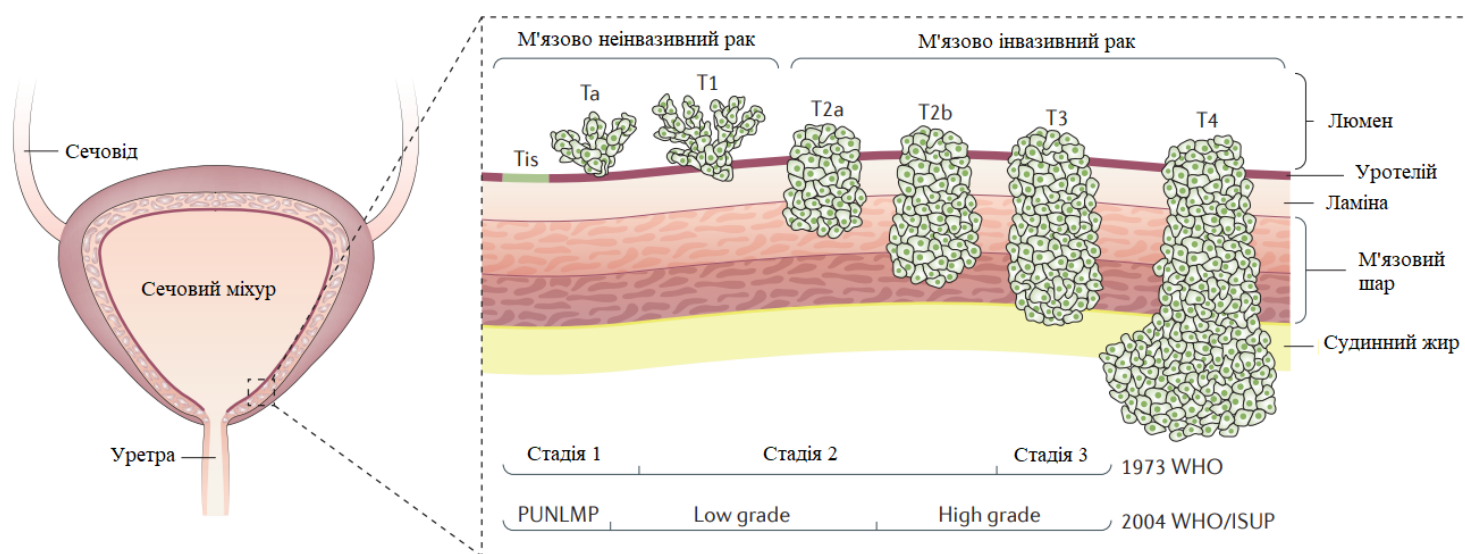


Рис.1.1 Загальний вигляд, топологія, класифікація стадій РСМ [3].

Були ідентифіковані мутаційні моделі ДНК раку сечового міхура, які складаються переважно з мутаційних сигнатур APOBEC (каталітичний поліпептид, що редагує мРНК аполіпропротеїну В).

Більшість NMIBC пухлин геномно стабільна, а найпоширеніша їх генетична зміна це делеція хромосоми 9 (приблизно 50% пухлин). Локус CDKN2A (9p21) кодує p16 та p14ARF, які є негативними регуляторами шляху RB та шляху p53 відповідно. Втрата хромосоми 9 також пов'язана з TSC1, супресором пухлини, який регулює механістичну мішень передачі сигналів рапаміцину (mTOR).

Більшість випадків NMIBC характеризується активацією точкової мутації у FGFR3. Експресія мутантного FGFR3 призводить до активації шляху RAS-мітоген-активована протеїнкіназа (MAPK). Активуючі мутації у сімействі

генів RAS також знаходяться у деяких NMIBC. Ці мутації та мутації FGFR3 є взаємовиключними. Отже, передбачається, що активація RAS-МАРК може сприяти розвитку >80% NMIBC.

Геном MIBC зазвичай являє собою складні зміни кількості копій та перестановок геному, а також синхронні та метахронні MIBC часто геномно розходяться, припускаючи швидку субклональну еволюцію. Багато повідомлялося про ділянки геномної ампліфікації, деякі з них містять гени з відомою онкогенною функцією, наприклад: E2F3, MDM2 та HER2 [3, 4].

Дуже частим і важливим критерієм для оцінки РСМ є шкала Глісона, яка за досить простим принципом базується на проівнянні пухлинної тканини та нормальної тканини, що її оточує. Шкала градується від 1 (тканина морфологічна повністю схожа на нормальну) до 5 (Повна розбіжність у морфологічних ознаках). Ця шкала досить часто корелює з злоякісністю та прогнозом пухлини [5].

## 1.2 Характеристика біомаркерів

Біомаркери – досить широкий термін, що об'єднує молекулярні, цитологічні та біохімічні показники що можуть бути допоміжними а іноді дуже необхідними інструментами при оцінці та ідентифікації стану здоров'я, з'ясуванні механізмів протікання хвороби, та прогнозування подальших процесів у організмі живої істоти [6].

Існує декілька типів класифікації біомаркерів. По-перше, це 0-1-2 Класифікація, що базується на молекулярно генетичних заставках:

А) Біомаркери типу 0, які ще називають біомаркерами натуральної історії Вони свідчать про стан пацієнта та вказують на стадії протікання різних процесів у організмі при типовій картині функціонування організму або розвитку хвороби.

Б) Біомаркери типу 1, або біомаркери лікування. Вони вказують на ефект лікування, якщо звісно лікування буде діяти за типовим механізмом. Біомаркери цього типу можна розділити ще на декілька типів біомаркерів.

В) Біомаркери типу 2, або сурогатні біомаркери, що можуть корелювати з якимись клінічними проявами тих чи інших станів але не вказувати на пряму про якийсь процес [7].

По-друге, це класифікація на прогностичні (маркери що прогнозують результат протікання хвороби у людини, що не проходить лікуванню), предиктивні (що вказують на позитивну відповідь пацієнтів на певне лікування), фармакодинамічні (аналогічно до біомаркерів типу 1) та сурогатні маркери (аналогічно до маркерів типу 2).

Біомаркери зазвичай повинні відповідати таким критеріям:

- А) Безпечність
- Б) Простота діагностики
- В) Швидкість
- Г) Дешевість діагностики
- Г) Точність ідентифікації
- Д) Специфічність

### **1.3 Біомаркери раку**

Як вже було зазначено вище існує багато класифікацій біомаркерів. Такі ж самі класифікації застосовуються і для біомаркерів раку. Задля більш детального огляду біомаркерів раку ми класифікуємо їх за типами.

Біомаркери на основі біомолекул:

А) Маркери на основі ДНК. Рак перш за все, це генетичне захворювання і майже завжди для повної ідентифікації типу пухлини, прогнозування характеру поведінки пухлини та підбору дієвого лікування використовується купа генетичних маркерів. Маркери на основі ДНК бувають дуже різні: змінені послідовності, однонуклеотидні поліморфізми (найрозповсюдженіші

біомаркери), кількість генів відмінна від нормальної, втрата гомозиготності і навіть хромосомні аберації. У промоторах генів пухлини, генах супресорів пухлини та регуляторних генах клітинного циклу (наприклад: Ras, APC, p16, p53p19Rb цикліни XRCC) мутації нуклеотидів ДНК мають важливий вплив на прогноз і діагностику різних типів раку [8].

Б) Епігенетичні біомаркери. Новітні біомаркери зараз загалом є епігенетичними. Сама галузь епігенетики є дуже перспективною для вивчення і застосування її знань задля боротьби з раком. Епігенетичні зміни бувають такі: зміна метилювання промоторів, енхансерів, сайленсерів гену, модифікації гістонів і інших асоційованих з хроматином білків (слід зазначити що причиною епігенетичних змін дуже часто можуть бути генетичні зміни, що впливають на білки задіяні у епігенетичній регуляції клітини).

В) Маркери на основі РНК. Завдяки РНК можна визначити рівень експресії певних генів, тому також дуже часто для ідентифікації кількості певних РНК використовують кількісний ПЛР, що використовує зворотню транскриптазу, мікрочіпи, серійні аналізи експресії генів тощо, тобто загальні методи для з'ясування кількості РНК у матеріалі. Ступінь експресії певних генів можна визначити тільки за кількістю РНК. Наразі для швидкої ідентифікації наявності, а мабуть згодом і кількості РНК, в Україні розробляються біосенсори, що використовують наноплазмонний резонанс і зможуть застосовуватися для проточного рідинного аналізу [9].

Великий інтерес становлять мікро РНК (міРНК). міРНК (або малі некодуючі РНК) – це біомолекули, що активно беруть участь у багатьох видах регуляції процесів в наших клітинах. Наразі виявлена кореляція різних популяцій міРНК з прогнозами протікання хвороби. Новітні дослідження навіть почали виділяти деякі міРНК у групу названу «метастаміри», яка дуже сильно корелює з активністю метастазування пухлини [10].

Г) Білкові біомаркери. Білкові молекули набагато чіткіше та достовірніше вказують на певні процеси у клітинах, саме тому, що напряду залучені у

регуляціях клітинних циклів та специфічних процесів. Саме через це білки є наразі найкращими біомаркерами раку і активно використовуються задля ідентифікації.

Г) Вуглеводні біомаркери. Вуглеводні біомаркери більш стабільні ніж білкові або нуклеїнові маркери. Основою вуглеводних біомаркерів складають вуглеводи зі зміною О та N глікозилюванню, що зустрічаються при раку. Через стабільність таких маркерів їх можна використовувати для аналізу популяцій [11, 12].

#### Патогенні біомаркери:

А) Бактеріальні біомаркери. Бактеріальні біомаркери – це бактерії, які найчастіше пов'язані з виникненням раку, наприклад *H. Pylori*, що систематично подразнює стінки кишківника та підвищує ризик захворюваності раком шлунку.

Б) Вірусні біомаркери. Близько 15-20% випадків раку викликані вірусними захворюваннями. Віруси Епштейна-Бара, ВПЧ, Гепатит В та С, вірус герпесу тощо, є активними пухлиноутворювачами.

В) Маркери зображення. Іноді вищеперахованих маркерів буває недостатньо для визначення захворювання та точного прогнозу, цю проблему вирішують маркери зображення, що показують розмір, диференційованість, структуру і в принципі загальну анатомію пухлини. Зараз це допомагають зробити рентген, ультразвук, КТ, МРТ, біопсія с подальшими мікроскопічними, імуногістохімічними дослідженнями, які гарно допомагають візуалізувати пухлину та ступінь її диференційованості [15, 13, 14].

Епігенетичні біомаркери – біомаркери, що охоплюють складний набір різноманітних змін, які відбуваються без зміни самої послідовності ДНК. Наразі є дуже перспективними біомаркерами, саме через те, що у полі вивчення епігенетики існує багато білих плям, а також тому, що багато сучасних досліджень показує надважливу роль епігенетики у генетичному

регулюванні багатьох важливих процесів, що відносяться до онкогенезу. Наразі виділяють такі епігенетичні маркери раку:

А) Зміна метилювання. Метилювання CpG острівців промоторів генів супресорів пухлин призводить до замовчування таких генів, і сприяє канцерогенезу [16]. Метилом ракових пухлин дуже порушений, через це ракові пухлини можуть бути ідентифіковані завдяки порушенням метилювання. Дуже цікавим фактом, що робить метилом гарним біомаркером, є те, що його можна використовувати при рідинній біопсії, адже метилом зберігається у позаклітинній ДНК [17].

Б) Зміна структури хроматину. На хроматин та його щільність упаковки дуже сильно впливають багато факторів, від послідовності генів, що безпосередньо упаковуються, до гістонів та їх модифікацій, якими займаються спеціальні білки, активність яких знову регулюються генами, які кодують ці білки. А щільність упаковки в свою чергу впливає на експресію генів що були упаковані.

В) Модифікації гістонів та білки залучені у регуляції хроматину. За допомогою кількісних методів можна визначати аберантну активність білків, що залучені у модифікацію гістонів. Підвищене ацетилювання гістонів напряду вказує на атипovu надекспресію багатьох генів. Окрім кількісної оцінки модифікації гістонів, також важливу роль грає порушення нормальної експресії білків, що залучені у модифікації цих гістонів. Існують дослідження, що підтверджують кореляцію між прогнозом та вищеперерахованими показниками. [18].

Г) Структура хроматину. Всі вище перераховані маркери можуть вказувати на аберації в процесах регуляції хроматину, але більш точно вказати де саме ці аберації були утворені може лише моделювання тривимірної структури упаковки ДНК. Такий тип епігенетичних біомаркерів є дуже перспективним саме через те, що він напряду вказує на те, що не може точно визначити більшість інших біомаркерів [19].

Г) Некодуєчі РНК. Некодуєчі РНК довго вважалися сміттєвими, та не залученими у клітинні процеси, але за останні роки ця думка дуже кардинально змінилася. Було показано, що ці РНК дуже сильно впливали на модуляцію експресії генів, на специфічні взаємодії у матриксі між білками та на багато інших тонких та динамічних процесів. Було показано, що при раку дуже сильно порушується регуляція концентрації малих інтерферуючих, мікро та великих некодуєчих РНК, що активно можуть пригнічувати або підвищувати експресію деяких генів [20]. Ці маркери можуть бути дуже корисними саме через те, що такі НК можуть дуже часто знаходитися у позаклітинних рідинах, що дозволяє використовувати досить простий та швидкий, низько або навіть не інвазивний метод діагностики [21].

## **1.4 Метилування ДНК**

### **1.4.1 Метилування ДНК в організмі людини**

Метилування геному людини є дуже поширеним механізмом саме епігенетичної регуляції, що здійснюється завдяки перетворення цитозину (С) на 5-метилцитозин, що в свою чергу є здебільшого механізмом репресії.

Більшість випадків метилування трапляється у CpG острівцях, що передують промоторам генів та можуть бути частиною промоторних ділянок. Доведено, що CpG острівці дуже активно задіяні у рекрутингу факторів транскрипції, що мають високу спорідненість до цих послідовностей, і що ці ділянки досить рідко зв'язані з нуклеосомами у неметильованому стані [22].

Однак за останніми даними думка згідно якої метилування CpG острівців у області промотору гену замовчує ген ускладнилася через те, що накопичилося багато даних, що суперечать їй. Наприклад, у численних зразках раку передміхурової залози було знайдено велику кількість прикладів генів на експресію яких метилування не впливало, або навіть посилювало її, що вказує на більш складні та комплексні механізми метилування ніж вважалося раніше [23].

Також CpG острівці поза тілом гену і в промоторних ділянках можуть бути задіяні в утворенні петель завдяки білковому фактору CTCF, ці петлі можуть бути задіяні, як в наближенні енхансеру або сайленсеру до промоторної послідовності, так і в його ізолюванні від неї, що також вказує на більш неоднозначну роль метилювання у регуляції генів [24].

Однак, окрім метилювання CpG острівців у клітинах поза тілом гену відбувається метилювання самого тіла генів, це метилювання послідовності після першого екзону, бо метилювання промотору та першого екзону приводить просто до замовчування гену. Метилювання тіла гену здебільшого зустрічається у генах домашнього господарства аніж у високоваріабельних для експресії генах. Але не дивлячись на це ніякої явної функції таке метилювання не несло. Існує теорія згідно якої таке метилювання потрібно задля того щоб пригнічити аберантну транскрипцію з прихованих у самому гені промоторів, але поки що вона не була підтверджена [25].

Цікаво зазначити, що гіперметилювання CpG острівців, яке трапляється у тілі гена, навпаки корелює з його підвищеною експерсією, тому точно вказувати на те, що метилювання CpG вказує на репресію гену не можна [26].

Також трапляється метилювання в ділянках, що не є CpG острівцями, наприклад CpA та CpT, але його функції та призначення залишаються білою плямою у сучасних дослідженнях [27].

Сам механізм метилювання здійснюється завдяки білкам, що можна розділити на три категорії: білки, що пишуть, білки, що зчитують, та білки, що стирають:

А) Білки що пишуть. Це тип білків які здійснюють метилювання або *de novo*, або доводять до повністю метильованного стану геміметилований ланцюг. Білками, що метилюють *de novo* є Dnmt3a та Dnmt3b, що є дуже подібними за структурами та функціями, вони більш схильні до того, щоб метилювати ще не метильований ланцюг [28].

Точні механізми як Dnmt3a та Dnmt3b метилують саме специфічні ДНК послідовності наразі невідомі, але показана від’ємна кореляція між наявністю специфічних факторів транскрипції та метилуванням сайтів до яких споріднені ці фактори транскрипції. Ці ефекти можуть бути пов’язані з тим, що фактори транскрипції ізолюють CpG острівці від метилаз [29].

Навпаки білок Dnmt1 активно залучений у тому, щоб метилувати саме геміметильований ланцюг і може через це метилувати переважно тільки CpG сайти, на відміну від Dnmt3a/Dnmt3b, що можуть метилувати цитозин поза межами CpG острівців. Хоча можна зазначити, що іноді цей білок все одно може бути залучений у метилуванні *de novo*, однак через кінетику та концентрацію білку, така активність є дуже незначною по відношенню до нормальних його активностей. Також треба вказати, що Dnmt1 локалізується у реплікаційній веделці завдяки N-кінцевій послідовності, що є спорідненою до бета-галактозидази і направляє білок у ділянки реплікації, що має важливе значення у збереженні патернів метилування під час поділу клітини. Як можна зрозуміти там і використовується його вибіркова спорідненість до геміметильованих ланцюгів як на рис.1.2 [30, 31].

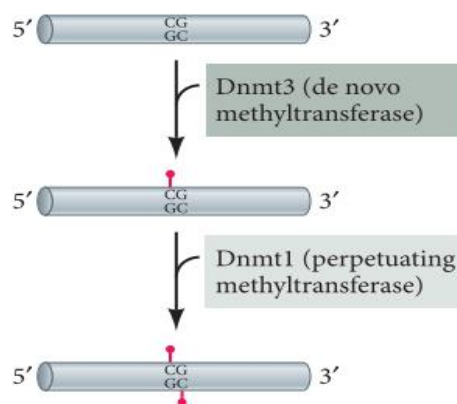


Рис.1.2 На данному рисунку (це рисунок, а не малюнок) показано яким чином Dnmt білки залучені у метилуванні геному [32].

Б) Білки, що стирають. Загалом існують два типи шляхів деметилювання ДНК. Пасивний шлях, механізм якого базований на явищі реплікації, і зниженій активності Dnmt1, завдяки якому новоутворений ланцюг, що звісно не містить метилцитозину, повинен би був метилюватися відповідно до патернів материнського.

У активних механізмах деметилювання вже залучені білки, які якимось чином таргетно направляються на метильований цитозин. Найвідомішим сімейством білків, що залучені у деметилюванні CpG острівців є сімейство TET, яке було відкрито відносно нещодавно. Це сімейство налічує TET1, TET2, TET3, та TET білки, що здатні окиснювати 5-метилцитозин до 5-гідроксиметилцитозину, 5-формілцитозину та 5-карбокситозину, які у свою чергу були б замінені на звичайний цитозин завдяки механізму, який називається заміна окисненої основи і здійснюється за допомогою білку TDG [u]. Існує багато білих плям у механізмах того, як білки цього сімейства направленно деметилюють певні ділянки ДНК. Але існує декілька відомих механізмів, що підтверджують теорію великої ролі інших білків в рекрутингу TET. TET звісно може деметилювати деякі ділянки ДНК не специфічно, наприклад у місцях оксидативного стресу, якого сильно зазнають метильовані CpG острівці через велику кількість гуаніну, який стоїть поряд із метилцитозином, що суттєво зменшує його енергетичний бар'єр окиснення. Ці окисненні CpG є дуже спорідненими до OGG1, який їх і відновлює, однак це відновлення має повільну кінетику, і через це білок здатен рекрутувати TET, який неспецифічно деметилує ці ділянки [33].

Окрім цього існують відомі більш специфічні механізми деметилювання у яких задіяна топоізомераза та EGR1, що вже більш специфічно рекрутує деметилази на певні гени, які задіяні в утворенні пам'яті [34]. Схематичний механізм даного процесу зображено на рис. 1.3.



невідривним більш глибоким пластом інформації, що у собі зберігає геном. Саме тому ми вибрали цю область досліджень для знаходження і кращого вивчення біомаркерів, які були обрані з відомих на сьогодні епігенетичних маркерів раку.

#### **1.4.2 Порушення метилювання при РСЧ**

Широкі зміни епігенома супроводжують ініціацію та прогресування раку. Протягом десятиліть було відомо, що ракові клітини демонструють глобальну втрату метилювання CpG, включаючи області з низькою щільністю сайтів CpG, повторюваних елементів, ретротранспозонів та ламінін-асоційованих доменів (LAD), що спричинює сильну нестабільність геному. Це явище відбувається у поєднанні з супутнім локус-специфічним гіперметилюванням CpG-острівців. Найчастіше абнормальні гіперметилювання у ракових клітинах зустрічається у промоторних зонах [37].

Процес метилювання досить динамічний і залежить не тільки від утворень комплексів чи факторів транскрипції чи деметилаз, а й від їх концентрацій, саме тому у ракових клітинах так сильно порушений метилом, нестабільний геном, експресія багатьох білків, в тому числі білків що пов'язані з метилюванням. Порушення їх експресії веде до порушення їх концентрацій, що призводить до порушення патернів метилювання. Саме тому, ми не можемо кількісно порівнювати метилювання в повному геномі в ракових клітинах. Набагато більш інформативними є мішені, які таргетно метилюються/деметилюються [21].

Для раку сечового міхура були знайдені суттєві відмінності в патернах метилювання між м'язово інвазивними та неінвазивними формами. Більше того, виявлені патерни метилювання впливали на прогноз раку. Наприклад гіперметилювання таких генів-супресорів як CDH1, FHIT, LAMC2, RASSF1A, TIMP3, SFRP1, SOX9, PMF1, які гальмували клітинний цикл та проліферацію, було часто пов'язане з поганим прогнозом [38].

RASSF1A це білок-супресор пухлин, що згідно досліджень досить часто інактивується у різних типах пухлин. Більшість досліджень свідчить про те, що RASSF1A є білком, який запобігає ініціації проліферації, росту та онкогенезу за допомогою різних біологічних функцій. Він залучений у гомеостазі мікротрубочок, у активації апоптичних точок, регулюванні таких шляхів як Ras/Rho GTPases, а також приймає участь у регуляції шляху Hippo, який залучений до явища проліферації, яке тісно пов'язано з онкогенезом. RASSF1A зв'язує Ras-GTP, що є важливою рушійною силою при інгібуванні сигналів, яка призводять до великої низки експресійних явищ, що забезпечують виживаність клітин, їх ріст, проліферацію, ангіогенез, які передає активний комплекс Ras-GTP. Таким чином, вже на основі механізму інгібування RASSF1A сигналів від Ras-GTP він є важливим геном онкосупресором [39].

Згідно досліджень RASSF1A був більш метильований у тканинах пухлин сечового міхура, ніж у нормальних тканинах. Ступінь метильованості цього гену позитивно корелювала з низькою виживаністю, ступенем диференціації та більш пізньою стадією раку. Однак висока ступінь метильованості RASSF1A спостерігається при багатьох видах раку, що робить його недостатньо специфічним для власне РПЗ [40].

Активне поглиблення знань молекулярних механізмів, залучених до епігенетичної репресії RASSF1A, може привести до фундаментального розуміння онкогенезу за цим шляхом.

### **1.5 Довгі некодуючі РНК**

Довгі некодуючі РНК, є широким класом, який забезпечує багато функцій в організмі. Було показано, що велика кількість lncRNA, має у своїй структурі полі А хвіст, а також кеп, через що, довгий час їх вважали матричними.

У порівнянні з мРНК велика частина lncRNA локалізована в ядрі, що піднімає фундаментальне питання про те, що керує їх диференціальною

локалізацією. Статус фосфорилування карбокси-кінцевого домену PolII відповідає різним стадіям транскрипції, і значна частина lncRNAs транскрибується за допомогою PolII з порушенням регуляції фосфорилування. Такі днРНК піддаються слабкому транскрипційному сплайсингу, і термінація транскрипції в цих генах не залежить від сигналів поліаденілювання, що призводить до тимчасового накопичення днРНК на хроматині з наслідком їх швидкої деградації екзосоми 12 РНК. Ці дані проливають світло на те, чому lncRNAs часто є ядерними, і припускають, що функціональні lncRNAs повинні позбутися цього процесу ядерного контролю, щоб накопичуватися на високих рівнях у специфічних типах клітин [41][42].

Швидкість зміни концентрацій днРНК та їх реалізація відбувається значно швидше, аніж для РНК, що є матрицями синтезу білків. Наразі днРНК досі є слабо дослідженими через велику кількість їх функцій, швидкий характер зміни концентрацій та чергування з генами, а як наслідок через складність їх класифікувати та структурувати [41].

Звичайні рівні експресії lncRNA нижче проявляють тканинспецифічні патерни в непухлинних тканинах, але надекспресуються в ракових клітинах. В цілому ці біологічні особливості роблять актуальним дослідження lncRNAs у якості діагностичних і прогностичних маркерів, а також у якості терапевтичних мішеней.

### **1.5.1 Функції довгих некодуючих РНК в організмі**

Більшість днРНК є тканинспецифічними, регулюють велику кількість аспектів, таких як диференціація та експресія опосередкована організацією хроматину. Багато lncRNAs асоційовані з хроматин-модифікуючими комплексами і транскрибуються з енансерів та ядерних фаз поділу ядерних конденсатів та доменів, вказуючи на тісний зв'язок між експресією lncRNA та просторовим контролем експресії генів під час розвитку [41].

В процесі досліджень було показано, що некодуючі РНК залучені до альтернативного сплайсингу, зв'язків між білками різної кінетики та характеру. Наприклад днРНК asFGFR2 регулює сплайсинг FGFR2 завдяки чисельним зв'язкам з білками, такими як Polysomb та гістон-лізин специфічна деметилаза, що призводять до модифікацій гістонів, які якраз і впливають на сплайсинг [43] [44]. Більше того, сучасні дослідження показують тісний зв'язок між мобільними елементами та днРНК. І повністю ламають стару догму про еволюційну нейтральність більшості геному вищих організмів. Останні дані кажуть про те, що мобільні елементи активно дають початок більшості нових енхансерів, сайленсерів та довгим некодуючим РНК, а також активно залучені в загальних процесах регуляції геному [45].

Також вже давно відомим є факт, що днРНК активно впливають на DNMT1 при реплікації, коли його основна роль, така як відновлення метилювання у геміметилюваному ланцюзі, активно реалізується, тим самим також впливаючи на патерни метилювання [46].

### **1.5.2 Роль довгих некодуючих РНК при розвитку РСЧ**

У нормі, як зазначалося раніше, днРНК підтримують тонкий регуляторний баланс геномної експресії завдяки чисельним взаємодіям, але при раку цей тонкий баланс суттєво порушується, і тоді днРНК стають інструментом для реалізації пухлинного, абнормального розвитку тканин. Нещодавні відкриття наголошують, що днРНК сприяє регуляції множинних сигнальних шляхів при РСЧ. Все більше даних свідчать про те, що днРНК суттєво впливають на процеси пухлинної проліферації, онкогенезу, диференціювання, інвазії, апоптозу, міграції та стовбуровості. Наразі відомо більше 100 днРНК з порушеною експресією, які приймають участь в процесах розвитку РСЧ [47] [48].

У сигнальних шляхах GAS5 бере участь у трьох режимах дії. По-перше, GAS5 може служити сигнальним білком. Він специфічно транскрибується

відповідно до різних тригерів, а потім бере участь у передачі сигналу по ряду шляхів як сигнальний вузол. По-друге, GAS5 може діяти як пастка, що може поводитися як молекулярна губка, яка безпосередньо зв'язується з РНК-мішенню або білками, тим самим блокуючи їх функції. По-третє, GAS5 може виконувати пряму роль транспортного білка, коли після зв'язування він направляє білок до певної послідовності ДНК, де той може регулювати транскрипцію нижчестоячих молекул [49].

Також за допомогою моделі штучного інтелекту DeepLncCTCF, була висунута гіпотеза, що GAS5 може містити мотиви, що мають спорідненість до фактору моделювання хроматину CTCF, тобто існує поки експериментально неперевірена гіпотеза, що ця днРНК може приймати участь у моделюванні хроматину завдяки CTCF [50].

Також GAS5 може діяти як пастка для глюкокортикоїдного рецептора. GAS5 може зв'язуватися з ДНК-зв'язуючим доменом і знижувати кількість GR, яка доступна для зв'язування елементів відповіді глюкокортикоїдів у геномній ДНК. Хоча ця взаємодія РНК та білка між днРНК GAS5 та GR блокує зв'язування між GRE та GR у контексті затримки росту та голодування, його значущість для ракових клітин неясна.

У клітинах раку сечового міхура днРНК GAS5 може безпосередньо взаємодіяти з фактором транскрипції E2F4 та посилювати його зв'язування з промоторною областю ехансеру гомолога zeste 2 (EZH2), гена гістон-лізин-N-метилтрансферази.

Методами біоінформатичного аналізу було визначено, що GAS5 може діяти як молекулярна губка, зв'язувати чисельні міРНК, що пов'язані з раком, наприклад: miR-21, miR-221, miR-222, miR-135b, miR-23a та miR-103. Надмірна експресія GAS5 може пригнічувати проліферацію та інвазію клітин шляхом зв'язування з мікроРНК-196a та мікроРНК-205 при раку шийки матки, щоб придушити ріст клітин через аплазію гомологічного члена Ras I (ARHI) *сложночитаемое* [51][52].

Ген (GAS5) також вважається пухлинним супресором, оскільки нокдаун цього гена збільшує проліферацію клітин раку сечового міхура, тоді як його примусова надекспресія запобігає проліферації клітин. [53]

Зовсім нещодавно проведене дослідження показало, що форсована надекспресія GAS5 знижує резистентність до хіміотерапії доксорубіцином, посилює індукований доксорубіцином апоптоз і пригнічує експресію антиапоптозного білка Bcl-2, а також знижує резистентність до хіміотерапії доксорубіцином [54].

ANRASSF1, є онкогенною днРНК. Був підтверджений її вплив на RASSF1A, який являє собою ген-супресор пухлин, експресія якого здійснюється через епігенетичні події в широкому спектрі різних видів раку. Репресія здійснюється за рахунок гіперметилування ДНК промотора RASSF1A, який, у свою чергу, запускається за допомогою репресивних міток триметилування гістонів H3K9/H3K27. Додавання мітки H3K27me3 у промоторний локус RASSF1A включає полікомб-репресивний комплекс 2 (PRC2). Саме ANRASSF1 і рекрутує полікомб-репресивний комплекс поблизу промотора RASSF1A [55].

lncRNA ANRIL є нуклеїновою кислотою, що широко залучена у прогресування раку та корелює з поганими прогнозами при різних його видах, у тому числі і при РСЧ. Функції цієї днРНК досить багатогранні і часто залучають різні взаємодії в цитоплазмі, а також регуляцію експресії хроматину. При надмірній експресії в цитоплазмі ANRIL починає утворювати гібридні комплекси з різними міРНК (miR-125a, miR-125a-3p, miR-99a, let-7b-5p, miR-4440, miR-4458), таким чином знижуючи їх активність і виконуючи функцію РНК-губки [56].

Було показано, що через взаємодію ANRIL з let-7 miRNA, miR-181a та miR-122-5p, ця РНК сприяла проліферації, а також епітеліально-мезенхімальному переходу різних типів раку, завдяки впливу на деякі осьові

шляхи, один з яких був досить розповсюджений для РСЧ, а саме MAPK/ERK [57, 58].

Також останні данні вказують на те, що ANRIL може бути залучена до виникнення резистентності до хіміотерапії доскорубіцином, завдяки стимуляції експресії енолази ENO1, через зв'язування з інгібуючою експресією енолази miR-125a, що у свою чергу посилює інтенсивність гліколізу. Так само ANRIL показав свою залученість у хеморезистентність до цисплатину при остеосаркомі завдяки модуляції сигнальних шляхів, таких як miR-328/ABCG2/MDR1 [59, 60]. ANRIL також активно залучена у регулювання експресії генів через взаємодії у ядрі та поблизу хроматину. Цис-ядерна активність цієї днРНК сконцентрована у 9p21 локусі, куди вона активно може рекрутувати білки Polycomb, що призводить до репресії гену CDKN2B за рахунок утворення гістонових міток у промоторній зоні гену, таким чином впливаючи на регуляцію клітинного циклу [61]. Окрім усього перерахованого вище, за допомогою методу RNA-FISH, було показано, що при надекспресії ANRIL ця днРНК стає залучена у замовчуванні близько 708 та активації 219 генів, з яких велика кількість генів відповідні за такі функції як: апоптоз, розвиток кого чого? Та адгезію, які є дуже важливими у процесі розвитку та утворення раку [62].

днРНК PANDAR також за даними досліджень приймала участь у прогресуванні раку. Було показано, що великі клітинні концентрації цієї днРНК асоційовані з більш пізньою стадією раку, та гіршим прогнозом. Також надекспресія PANDAR асоційована з пригніченням апоптозу, підвищенням проліферативної активності та частоти клітинної міграції [63]. Було покзано, що днРНК PANDAR зв'язується з білком p53, який в свою чергу залучений у регулювання клітинного циклу та у вертикаль сигнального шляху систем клітинної репарації. У свою чергу зниження доступу p51 до промотора CDKN1A знижувало експресію цього білку [64]. Також був показаний вплив PANDAR на експресію p16<sup>INK4A</sup> діючи як ко-супресор разом з Bmi1, що

стимулює перехід G1/S у клітинах раку молочної залози, що також було пов'язано з гіршим прогнозом у пацієнтів [65]. Однак доступна інформація по функціях цієї днРНК при недрібноклітинному раку легень вказує на те, що вона є також і онкосупресором, і її надекспресія сприяє апоптозу. Головним чином підвищена експресія PANDAR сприяє апоптозу підвищуючи експресію проапоптичних білків (Bax та Bad) та знижуючи експресію антиапоптичного білку Bcl-2. Експресію Bcl-2 PANDAR пригнічував завдяки взаємодії з транскрипційними факторами NF- $\kappa$ B, нокдаун якого інгібує експресію Bcl-2, а отже механізм дії PANDAR базується на зменшенні взаємодії NF- $\kappa$ B з промоторною ділянкою Bcl-2 [66].

Також, PANDAR був залучений у агресивній хеморезистентності раку яєчок до цисплатину. Було показано, що за рахунок екзосомної передачі, а також внутрішньої експресії PANDAR рекрутував фактор сплайсингу SRSF9 у ядерцеві тільця, що підвищувало резистентність до цисплатину [67].

Надексперсія іншої днРНК SNHG1 була пов'язана з багатьма різними раковими захворюваннями, такими як рак молочної залози, гепатоцеллюлярна карцинома, рак простати та рак сечового міхура. Ця днРНК також приймала участь в міжклітинній комунікації завдяки екзосомам [68]. При РСМ SNHG1 може приймати участь у зв'язуванні miR-9-3p, яка у свою чергу інгібує експресію протоонкогену MDM2. Через що, надмірна експерсія SNHG1 сприяла проліферації та прогресуванні РСМ [69].

## 1.6 Циркулюючі нуклеїнові кислоти

Циркулюючі НК – це НК, що присутні в біологічних рідинах незалежно від клітин. Перші вони були описані Манделем і Метаїсом в 1948 році. Походження цДНК повністю не вивчене, але існує безліч механізмів, за допомогою яких ДНК може потрапити до кровообігу. Фрагменти цДНК містять сигнали по яких може бути визначене тканинне або клітинне походження цієї ДНК. За допомогою аналізу цих сигналів було доведено, що

цДНК у плазмі крові здорових осіб має переважно лімфоїдне та мієлоїдне походження. Це узгоджується з тим фактом, що основним джерелом цДНК є апоптоз гемопоетичних клітин, а внесок інших тканин мінімальний.

У онкологічних хворих основна частина цДНК утворюється в результаті апоптозу та некрозу пухлинних клітин, але вивільнення ДНК з некротизованих клітин відбувається лише за допомогою фагоцитозу. Однак ракові хворі на ранній стадії також містять цДНК плазми, і тому цілком ймовірно, що апоптотичні або некротичні клітини пухлини не є єдиним їх джерелом. Дослідження *in vitro* показали, що живі пухлинні клітини, такі як лімфоцити, можуть безперервно і автоматично вивільняти ДНК, що може пояснити наявність цДНК, що виявляється у пацієнтів з раком на ранній стадії.

цНК, стають все більш популярними через їх потенціал для використання в якості маркерів для рідкої біопсії, яка є інструментом неінвазивної діагностики та моніторингу захворювань, таких як рак, інсульт, травма, інфаркт міокарда, аутоімунні захворювання та ускладнення, пов'язані з вагітністю [70][71][72].

### **1.6.1 Рідинна біопсія при РСЧ**

Рідкі біопсії складаються з виділення утворень, що походять з пухлини, таких як циркулюючі пухлинні клітини, циркулююча пухлинна ДНК, пухлинні позаклітинні везикули і т. д., присутніх в рідинах організму пацієнтів з раком, з подальшим аналізом даних, що містяться в них. Рідкі біопсії ракових хворих відкрили нові можливості для виявлення і безперервного моніторингу, лікування, заснованого на прецизійній медицині та скринінгу маркерів терапевтичної резистентності. Хоча технологія рідинної біопсії все ще розвивається, її неінвазивний характер обіцяє відкрити нову еру в клінічній онкології. Дуже важливими перевагами рідинної біопсії є її неінвазивний характер, дешевизна, придатність до ругулярного моніторингу динаміки

пухлин, а також здатність охарактеризовувати цілу пухлину, а не тільки її ділянки [73].

Основним складовими позаклітинної рідини, на якій базується метод рідинної біопсії зазвичай є кільцеві РНК, позаклітинні ДНК, циркулюючі пухлинні клітини й позаклітинні везикули. Останні найчастіше представлені екзосомами, які можуть містити ДНК, РНК і білки. Екзосоми являють собою невеликі (30-100 нм) мембранні везикули, секретовані різними типами клітин, що мають тісний генетичний зв'язок з ендотеліальними клітинами. Вони транспортують різні речовини: білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти (наприклад, мРНК, міРНК, днРНК), присутні в «батьківській» клітині. Було показано позитивну кореляцію між кількістю екзосом і стадією захворювання, що підтверджує їх важливість у прогресуванні пухлини. Також дуже цікавими є кільцеві РНК: через свою кільцеву структуру, у якій відсутні 5'- і 3'-кінці, вони є дуже стійкими до дії РНКаз, і відповідно в рідинних біопсіях перебувають у відносно високих концентраціях. До того ж кільцеві РНК часто експресуються у специфічних тканинах та на специфічних стадіях розвитку раку. Аналіз експресії довгих нкРНК і метилювання генів для рідинної біопсії майже ідентичний до такого ж при твердій біопсії [74][75][76][77].

Гіперметилювання ДНК у промоторних областях генів-супресорів пухлин може призводити до їх інактивації та сприяти розвитку раку. Гіперметилювання ДНК вважається однією з ранніх подій епітеліального канцерогенезу сечовивідних шляхів, тому його аналіз є перспективним інструментом для оперативного виявлення РСЧ. Вчені підтвердили тест двох маркерів та модель стратифікації у пацієнтів з гематурією та підозрою на РСЧ. Для цих двох когорт були отримані результати з чутливістю 88,1% та 91,2%, специфічністю 89,7% та 85,7% відповідно. Цей тест також перевершив цитологію та флуоресцентну гібридизацію *in situ* (FISH) щодо чутливості при виявленні злоякісності пухлини.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Забір клінічних зразків

Зразки пухлини та парної умовно нормальної тканини (УНТ) сечового міхура заморожували в рідкому азоті негайно після видалення пухлини, проведеного в Національному інституті раку (Київ, Україна). Отримані зразки транспортували в рідкому азоті і зберігали у кельвінаторі за температури  $-80^{\circ}\text{C}$  до виділення матеріалу, що містить НК для подальшого дослідження. Усі зразки були зібрані відповідно до Гельсінської декларації та вказівок, виданих Національним інститутом раку, Етичним комітетом Інституту урології та Етичним комітетом Інституту молекулярної біології та генетики.

У роботу було включено 13 зразків пухлин і 13 парних умовно нормальних тканин пацієнтів з РПЗ. Клініко-патологічні характеристики (КПХ) зразків тканин раку сечового міхура представлені у табл. 2.1.

Також в роботу було включено зразки сечі умовно здорових донорів та 14 зразків сечі пацієнтів з РПЗ, КПХ яких наведені в таб. 2.2.

Таблиця 2.1

Клініко-патологічні характеристики зразків тканин РСЧ

Пацієнт	Вік	Стадія	TNM	Діагноз	Резистентність
B354	60	IV	T4 N2 M0 G3	Рак сечового міхура	ні
B334	66	III	T3b Nx M0 G2	Рак сечового міхура	ні
B345	53	III	T3b Nx M0 G3	Рак сечового міхура	ні

				міхура, стан після комбінованого лікування	
B331	55	III	T3a Nx M0 G2	Рак сечового міхура, стан після хірургічного лікування, гематурія	ні
B348	65	II	T2b Nx M0 G3	Рак сечового міхура, стан після комбінованого лікування	ні
B343	-	III	T3b Nx M0 G2	Рак сечового міхура	ні
B356	67	I	T1 Nx M0 G2	Рак сечового міхура	ні
B357	56	III	pT2b pNO MO G2	Рак сечового міхура	ні
B358	64	III	pT3a pNO MO G3	Рак сечового міхура	ні
B359	-	-	-	-	-
B360	84	IV	T3b Nx M1 G1	Рак сечового	так

				міхура	
B361	66	IV	T4a N1 M0 G2	Рак сечового міхура, комбіноване лікування	ні
B362	-	-	-	-	-

Таблиця 2.2

## Клініко-патологічні характеристики зразків сечі РСЧ

Пацієнт	Вік	Стадія	TNM	Діагноз	Резистентність
B312	40	II	pT2a N0 M0 G2	Рак сечового міхура після комбінованого лікування	так
B334	66	III	T3b Nx M0 G2	Рак сечового міхура	ні
B350	-	II	T2 Nx M0 Gx	Рак сечового міхура	-
B331	55	III	T3a Nx M0 G2	Рак сечового міхура, стан після хірургічного лікування, гематурія	ні
B348	65	II	T2b Nx M0 G3	Рак сечового міхура, стан	ні

				після комбінованого лікування	
B314	-	-	-	-	-
B304	-	-	-	-	-
B340	60	III	pT3b pNO MO G2	Рак сечового міхура	-
B324	53	II	pT3b pN0 M0 G2.	Рак сечового міхура	-
B384	-	-	-	-	-
B375	57	III	cT3a Nx MO G1	Рак сечового міхура	-
B326	55	IV	pT3b pN2 M0 G3	Рак сечового міхура	ні
B355	59	III	T3 Nx M0 G1	Рак сечового міхура	ні
B357	56	III	pT2b pNO MO G2	Рак сечового міхура	ні

## 2.2 Виділення ДНК та РНК з клінічних зразків пухлини

Виділення матеріалу, а саме ДНК та РНК, з зібраних зразків проводили за протоколом, Що був наданий виробником реагентів, що ми використовували, а саме тризолу (TRIzol Reagent). Протокол: 30-50 мг тканинного метріалу гомогенізували у рідкому азоті до стану порошку та транспортували в пробірки з 1 мл тризолу. Інкубували у тризолі 5 хвилин, щоб встигла пройти

повна дисоціація нуклеопротеїнових комплексів. Самплером додавали 200 мкл хлороформу та закривали пробірку. Через 3 хвилини центрифугували пробірку 15 хвилин на швидкості 12000g за 4°C. Вміст пробірки розділявся на верхню, прозору фазу, що містить РНК, інтерфазу, що містить ДНК, і нижню червону фенол-хлороформну фазу, що містила білок, який нас в дослідженнях не цікавив.

Для виділення РНК верхню фазу, що її містить, відбирали до окремих пробірок і додавали 750–1000 мкл ізопропанолу. Зразки ретельно перемішували і залишали інкубуватись за температури -20°C приблизно на 12 год.

Наступного дня пробірки з відібраною верхньою фазою центрифугували і осаджували РНК. Супернатант зливали і відмивали осад від домішок 75% етиловим спиртом, повторювали цю процедуру двічі. Після цього сушили РНК (за кімнатної температури) аби позбавитися домішок у виді залишку етилового спирту і розчиняли у безнуклеазній воді.

Концентрацію виділеної РНК аналізували спектрофотометром (NanoDrop Tech Experimental Technologies Inc., США).

Для виділення ДНК до пробірки, з якої було відібрано верхню фазу з РНК, додавали 300 мкл 96% етанолу, перемішували шляхом легкого перевертання пробірок. Далі інкубували 3 хвилини, потім центрифугували 5 хвилин на швидкості 2000g за 4°C. ДНК осаджувалася, а супернатант відбирали мікропіпеткою аби зменшити вірогідність втрати матеріалу.

Наступним кроком було очищення ДНК. У пробірку з осадженою ДНК додавали 1 мл 0,1 М цитрату натрію в 10% етанолі. Інкубували 30 хвилин, протягом цього часу декілька разів перемішували повільними перевертаннями пробірок. Центрифугували 5 хвилин на швидкості 2000g за 4°C і відбирали супернатант мікропіпеткою. Цю процедуру повторювали двічі.

До очищеної й осадженої ДНК додавали 2 мл 75% етанолу. Інкубували 20 хвилин, час від часу обережно перевертаючи. Центрифугували 5 хвилин на

2000g за 4°C. Відбирали надосадову рідину і залишали осад у відкритій пробірці сушитися протягом 10 хвилин. Потім додавали до пробірки з осадом 100 мкл 1xTBE буфер (Tris – 90 мМ, борна кислота – 90 мМ борної кислоти, ЕДТА – 2 мМ, рН 8,3) і залишали на зберігання в холодильнику за температури 4°C до подальших досліджень.

### 2.3 Кількісна ПЛР у реальному часі

Рівні експресії визначались за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі з використанням HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Естонія) на приладі CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) з наступними умовами реакції: 95°C — 12 хвилин, 40 циклів: 95°C — 15 секунд, 60°C — 20 секунд, 72°C — 20 секунд. Beta Actin та U6 використовувались у якості референсних генів, які мають конститутивно експресуватися. Для підрахунку результатів використовували методи 2-ΔCT і 2-ΔΔCT, описані у [Schmit]. Послідовності праймерів, використаних для проведення кількісної ПЛР у реальному часі, наведені у табл. 2.3.

Аби провести кількісну ПЛР у реальному часі готували суміші об'ємом 20 мкл що склалися з прямого праймера (10 мкМ) — 0,5 мкл, зворотнього праймера — 0,5 мкл, води — 11 мкл, зразоку ДНК — 4 мкл, HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus — 4 мкл.

Таблиця 2.3

Послідовності праймерів, що використовувалися для звичайної та кількісної ПЛР у реальному часі

RASSF1A	Прямий 5' CTCGTCTGCCTGGACTGTTG 3'
	Зворотний 5' CAGGTGTCTCCCACTCCACAG 3'
ANRASSF1	Прямий 5' CGCGCAGAATTAGCCTCTCT 3'
	Зворотний 5' ACCCACTGAGATAGGTCTGGG 3'

GAS5	Прямий 5' ATTGGGTTTTGGTCTGGACA 3'
	Зворотний 5' GCTCTGCCATCAGAATCGTT3 '
ANRIL	Прямий TGCTCTATCCGCCAATCAGG
	Зворотний GGGCCTCAGTGGCACATACC
PTEN	Прямий 5'-ACCAGGACCAGAGGAAACCT-3'
	Зворотний 5'-GCTAGCCTCTGGATTTGACG-3'
SNHG1	Прямий 5'-AGGCTGAAGTTACAGGTC-3'
	Зворотний 5'-TTGGCTCCCAGTGTCTTA-3'
PANDAR	Прямий 5'-CTGTAAAGGTGGTGGCATTG-3'
	Зворотний 5'-GGAGGCTCATACTGGCTGAT-3'
Beta-Actin	Прямий 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'
	Зворотний 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'
U6	Прямий 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	Зворотний 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

#### 2.4 Методи статистичної обробки

Тест Вілкоксона для попарних порівнянь використовували для порівняння пар пухлина/умовно нормальна тканина. Критерій Пірсона використовували для перевірки результатів на нормальність розподілу. Тест рангової кореляції Спірмена використовували для виявлення передбачуваних кореляційних зв'язків. Для порівняння незалежних виборок використовували тест Манна-Вітні. Тести виконувались і візуалізовувалися за допомогою Microsoft Excel та Prism GraphPad.

## РОЗДІЛ 3

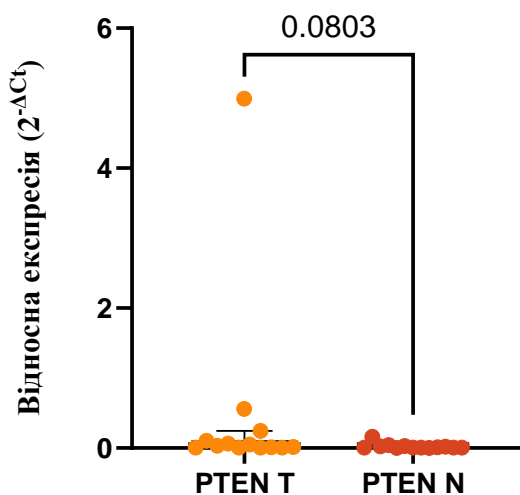
### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Результати отримані з тканин пухлин та парних УНТ

Було проаналізовано експресію довгих некодуючих РНК PANDAR, ANRASSF, ANRIL, GAS5, SNGH1 та генів *RASSF1A* і *PTEN* у тканинах злоякісних пухлин раку сечового міхура і парних умовно нормальних тканин.

Результати було оцінено на нормальність розподілу. Оскільки розподіл даних не відповідав критеріям нормального розподілу, для їх аналізу було використано непараметричні критерії.

За результатом аналізу методом попарних порівнянь Вілкоксона, достовірна у довірчому інтервалі 90% різниця була виявлена у експресії гена *PTEN*, з вищими показниками у тканинах пухлин, ніж у нормальних тканинах, що можна побачити на рис. 3.1.



Також експресія довгих некодуючих РНК SNHG і PANDAR була вищою у пухлинних тканинах, ніж в умовно нормальних тканинах, що продемонстровано відповідно на рис. 3.2 та рис. 3.3.

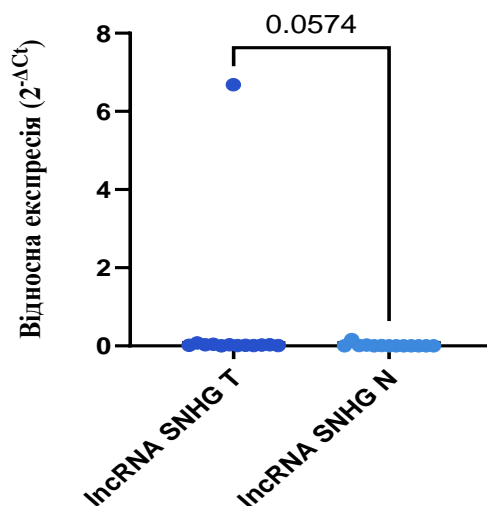


Рис. 3.2. Відносні рівні експресії SNHG в пухлинній та умовно нормальній тканинах

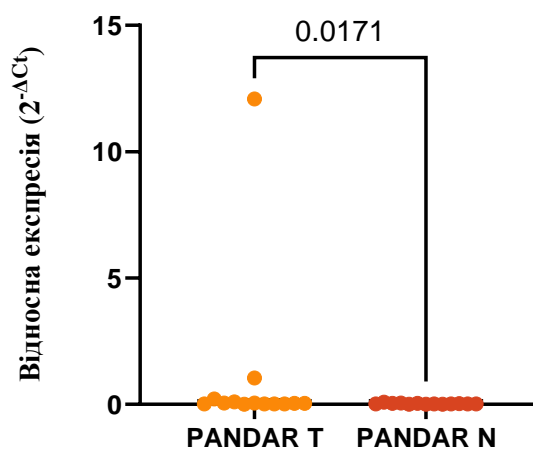


Рис. 3.3. Відносні рівні експресії PANDAR в пухлинній та умовно нормальній тканинах

Експресія довгої некодууючої РНК ANRIL навпаки, у нормальних тканинах перевищувала таку у пухлинних. Див. рис. 3.4.

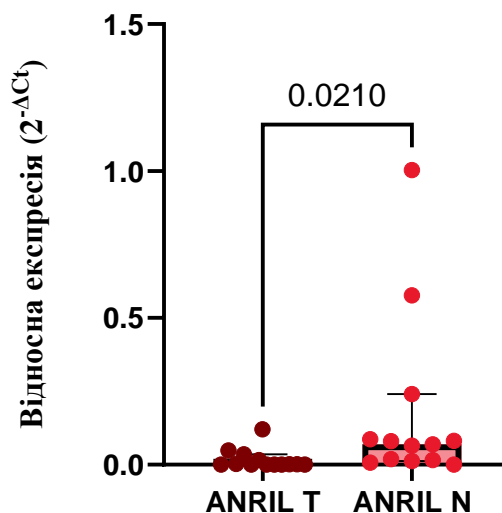


Рис. 3.4. Відносні рівні експресії ANRIL в пухлинній та умовно нормальній тканинах.

Співробітниками Національного інституту раку було надано клініко-патологічні характеристики пацієнтів, які ми включили у аналіз результатів. Серед них: вік пацієнтів, стать, наявність лікування, стадія пухлини та TNM. Було перевірено, чи корелюють показники експресії днРНК та досліджуваних генів між собою і з клініко-патологічними характеристиками пацієнтів. Для аналізу результатів було використано критерій Спірмана (для виборок, де відсутній нормальний розподіл). На рис. 3.5 Представлено кореляцію експресії і КПК для пухлинних та нормальних тканин.

Серед знайдених кореляцій експресій в пухлинних тканинах статистично достовірними виявились: SNHG-PTEN  $p=0,003$ , RASSF1A-PTEN  $p=0,058$ , ANRIL-PTEN  $p=0,033$ , SNHG-RASSF1A  $p=0,058$ , ANRASSF1-RASSF1A  $p=0,033$ , ANRIL-RASSF1A  $p=0,033$ , ANRIL-ANRASSF1  $p=0,058$ , GAS5-PTEN  $p=0,045$ , PANDAR-ANRIL  $p=0,069$ , ANRIL-SNHG  $p=0,0002$ . При цьому

кореляцій з клініко-патологічними характеристиками пацієнтів виявлено не було, що показано на рисунку 3.5.

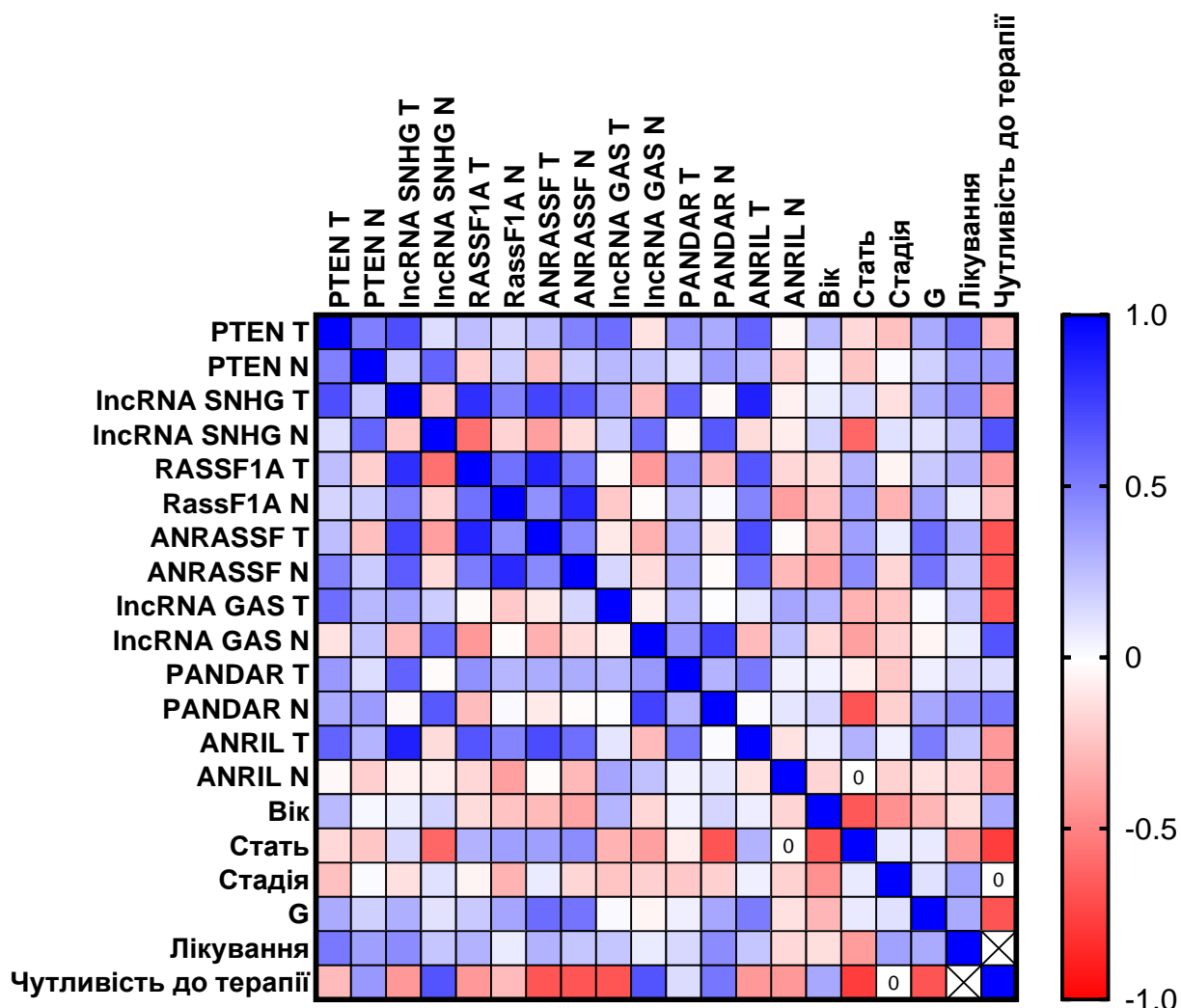


Рис. 3.5. Кореляція експресії і КПК для пухлинних та нормальних тканин.

Серед статистично значимих кореляцій в нормальних тканинах були кореляції: SNHG1-PTEN, SNHG1-GAS5, SNHG1-PANDAR, GAS5-PANDAR.

### 3.2 Результати отримані з сечі пацієнтів та умовно здорових донорів

Ми визначили рівні днРНК GAS5, SNHG і ANRASSF1 у сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура і в умовно здорових осіб.

Результат аналізу показав, що в межах даної вибірки спостерігаються більші показники рівнів довгої некодуючої РНК ANRASSF1 у здорових донорів ніж у пацієнтів з раком сечовго міхура, що показано на рис. 3.6.

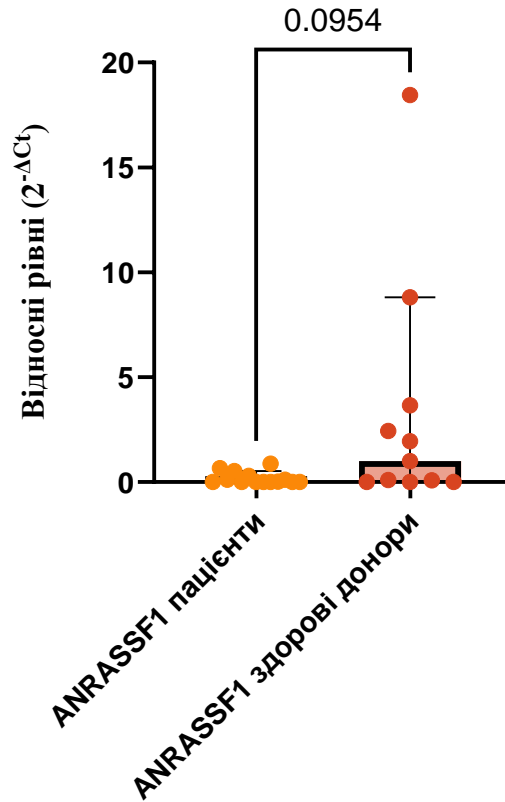


Рис. 3.6. Рівні експресії ANRASSF1 в сечі здорових та хворих донорів.

Для довгої некодуючої РНК SNHG ми спостерігали протилежну ситуацію. Її рівні майже не детектувались у здорових донорів, у той час як серед пацієнтів були особи з досить високими рівнями її у сечі, що представлено на рисунку 3.7.



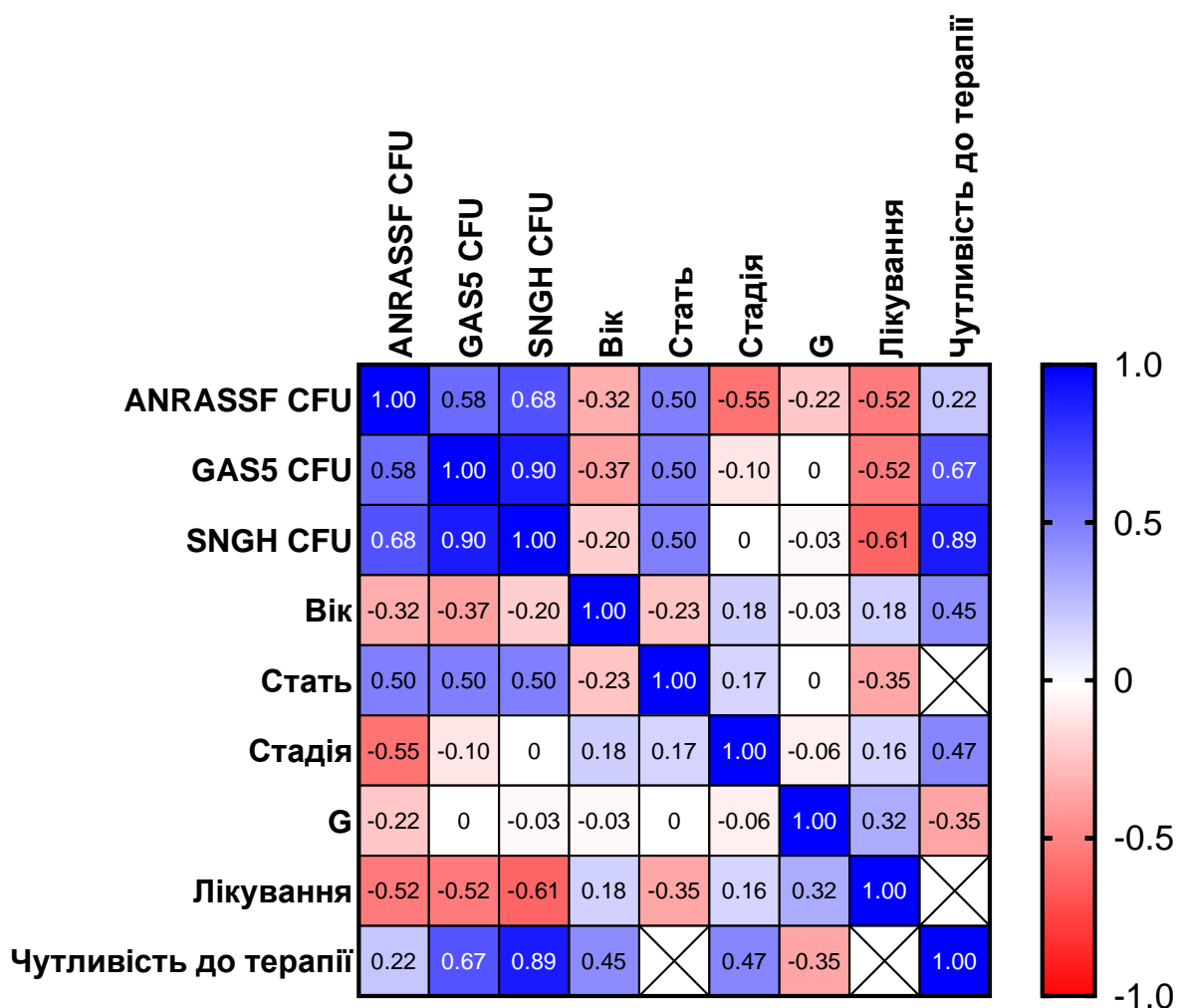


Рис. 3.8 Кореляція експресії РНК і КПХ для зразків сечі.

Таким чином, ми вирішили розділити пацієнтів на групи, які отримували лікування і які його не отримували. Слід зазначити, що розподіл значень у отриманих групах відповідав нормальному розподілу, тож для аналізу був використаний параметричний тест ANOVA. В результаті аналізу ми виявили менші рівні днРНК GAS5 у пацієнтів, які проходили лікування гемцитабіном і цисплатином у порівнянні з пацієнтами, які не отримували неоадьювантної терапії. Для днРНК SNGH різниці між групами не було, див. рис.3.9.

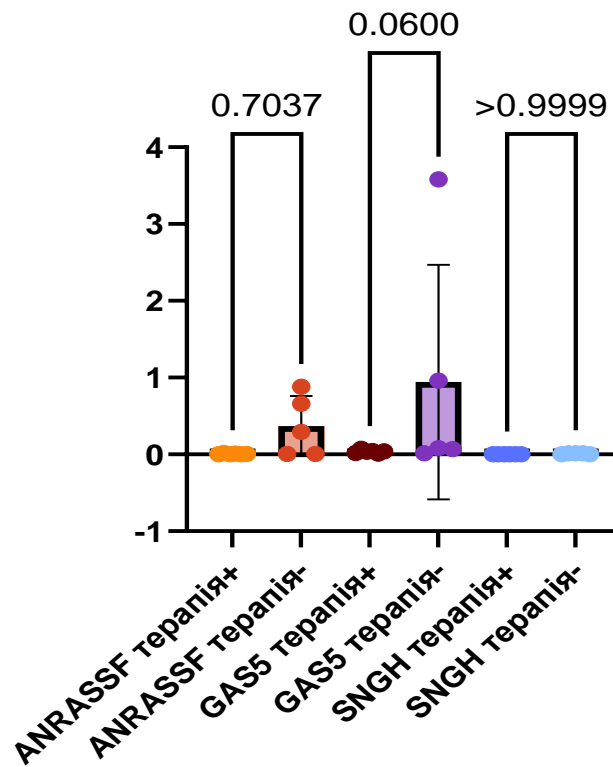


Рис. 3.9. Рівні експресії досліджуваних РНК у сечі груп пацієнтів що проходили і не проходили лікування.

### 3.3 Обговорення отриманих результатів

Загалом показано велику кількість статистично-достовірних результатів, що в якомусь сенсі суперечать проаналізованій літературі. В пухлинних тканинах показана позитивна кореляція SNHG1-PTEN, хоча в літературі зазначено те, що SNHG1 рекрутує комплекси що залучені у процеси деградації PTEN. Це може вказувати, як на проблеми кореляційного методу при вивченні рівнів експресії РНК на невеликих вибірках ракових пухлин, і те, що при можливості треба віддавати перевагу коваріаційним методам досліджень змін концентрацій РНК, так і на те, що можливо сам білок PTEN, або продукти реакцій в які він залучений формують негативну зворотню петлю зв'язку, і пригнічують транскрипцію РНК PTEN, утворення яких у свою чергу SNHG1 пригнічує якраз деградацією PTEN.

Отримані нові данні, що вказують на позитивну кореляцію між SNHG1 та RASSF1A. Враховуючи, що це онкоген та онкосупресор відповідно, не можливо сказати однозначно чим обумовлена така кореляція. Однак такі результати вірогідно є обумовленими в принципі дисрегульованістю процесів на які впливають досліджувані РНК та білки. Наприклад шляхи утворення та деградації Е-кадгерину, у які залучені *RASSF1A* та SNHG1, якщо припустити, що підвищення/зниження Е-кадгерину має негативний зворотній зв'язок пов'язаний з експресією відповідних досліджуваних сполук, то тоді результати того, що концентрації цих сполук позитивно корелюють виглядають логічно. З цієї точки зору, є сенс у подальших дослідженнях впливу продуктів, таких як Е-кадгерин на рівні експресії RASSF1A та SNHG1.

Також досить незвичними та новими даними виявилися кореляція RASSF1A-ANRASSF1. В досліджуваній літературі було не раз показані негативні кореляції експресій цих РНК і навіть розкриті механізми метилювання гістонів, які вказують на те, що ANRASSF1 інгібує транскрипцію RASSF1A. Основними причинами такої невідповідності скоріш за все, є те, що зв'язок експресії цих РНК досліджувався на малій виборці та знову кореляційними а не коваріаційними методами. Скоріш за все також дані у майбутньому можуть бути покращені правильним сортуванням зразків у виборці, бо враховуючи наприклад механізми дії SNGH1 в клітині яка потребує EZH2 для репресії шляхом метилювання гістонів, який у свою чергу залучений у репресію RASSF1A завдяки рекрутингу за допомогою ANRASSF1, такі конкуруючі РНК, можуть знижувати вільну концентрацію EZH2, доступну для рекрутингу ANRASSF1, через що може відбуватися часткова дисрегуляція відносин RASSF1A-ANRASSF1 яка особливо сильно відчутна на невеликих вибірках. Деякі з інших днРНК теж конкурують за EZH2, що може пояснювати, чому при відносно високих експресіях кожної з цих днРНК, ефект взагалі не проявляється, та пояснювати їх попарні позитивні кореляції.

Отримані нові дані щодо позитивних кореляцій GAS5-SNHG1 та GAS5-PANDAR в нормі. Однак таких самих кореляцій в пухлинних тканинах отримано не було, що вказує на сильні зміни зв'язків між цими РНК при злоякісній трансформації клітин. Не інтуїтивним знову здається те, що високі концентрації онкосупресора були пов'язані з високими концентраціями онкогенів. Однак при більш детальному літературному аналізі онкосупресорних механізмів GAS5 було знайдено, що GAS5 завдяки E2F4 інгібує EZH2, який є необхідним для реалізації частини онкогенних шляхів PANDAR та SNHG1. Це дає підстави вважати, що можливо продукти гілок PANDAR/SNHG1-EZH2 можуть регулювати експресію PANDAR та SNHG1, і через те, що концентрація EZH2 перестає бути достатньою аби реалізувати ефекти пов'язані з надекспресією PANDAR та SNHG1, їх експресія підвищується. Ці дані можуть бути використані для того, щоб сформувавши вектор подальших досліджень, або покращити методики сортування зразків на основі експресій вже відомих днРНК, аби зменшити вплив сторонніх факторів та покращити аналітичні методики дослідження ефекту певних РНК на клітини.

Показані нові дані, що кажуть про позитивну кореляцію онкогенних днРНК ANRIL та PANDAR. Скоріш за все, їх синтез може бути індукований пересіченими шляхами, або мати спільні фактори, що відкриває нове поле для досліджень взаємодії між шляхами цих днРНК.

Отримані нові дані, що вказують на позитивну кореляцію ANRIL-PTEN. Що відрізняється від навпаки негативної кореляції досліджуваних сполук у клітинах міеломи, де навіть було показано, що ANRIL епігенетично пригнічує експресію PTEN це може вказувати на можливі зміни зв'язків між ANRIL та PTEN від пухлини до пухлини, та вказувати на те, що в РСЧ шляхи якими ANRIL пригнічує експресію PTEN не є актуальними. Формуючи нові напрямки досліджень цих взаємодій, та є підставою для пошуку нових зв'язків між ANRIL та PTEN в клітинах РСЧ.

Отримані нові дані, що вказують на позитивну кореляцію ANRIL-SNHG1. Скоріш за все, їх синтез може бути індукований пересічними шляхами, або мати спільні фактори, що відкриває нове поле для досліджень взаємодії між шляхами цих днРНК.

Також було продемонстровано, що SNHG1, PTEN, PANDAR та ANRIL виявилися достатньо статистично значимими показниками аби розрізнити здорову та пухлинну тканину.

Також були проаналізовані концентрації досліджуваних днРНК в сечі пацієнтів і показано, що SNHG1 і ANRASSF1 відрізнялися у здорових та хворих і можуть бути прогностичними маркерами в сечі. Дивними однак виявилися показники ANRASSF1, що був вищий у здорових донорів ніж у пацієнтів. Одним з пояснень цих даних може бути різна виживаність ракових та нормальних клітин, через що, апоптоз злоякісних клітин насичених ANRASSF1, відбувається набагато рідше і через що співвідношення у сечі хворих пацієнтів має низькі відносно референсного гену концентрації ANRASSF1. Однак чому такі ефекти діяли б на клітини багаті ANRASSF1, але не діяли на SNHG1 залишаються незрозумілими, знову відкриваючи новий можливий напрям досліджень, особливо досліджень екзосомального транспорту SNHG1, з яким може бути пов'язане те, що показники в сечі гарно корелюють з тим хвора людина на рак, чи ні.

Також було показано нові дані, що GAS5, SNHG1, ANRASSF1 позитивно корелюють між собою в сечі. Можливим припущенням є те, що такі кореляції обумовлені просто інтенсивностями екзосомального транспорту днРНК клітинами. Тобто, якщо транспорт інтенсивний, то закономірно збільшуються концентрації всіх днРНК, що приймають участь в екзосомальному транспорті.

При виділенні частини вибірки сечі у підвибірки на основі наявності/відсутності лікування, було знайдено те, що GAS5 негативно корелювала з наявністю лікування, що проте може бути пояснене декількома способами. По-перше, це те, що у вибірку пацієнтів, які вже пройшли

лікування, потрапляли пацієнти, що переважно пройшли хірургічне видалення пухлини з сечового міхура. По-друге, тим, що завдяки відбору лишилися клітини, що мають резистивність до лікування і тому мають менші концентрації GAS5. По-третє, ті пацієнти, які мали високі концентрації GAS5 не потребували хіміотерапії, а обмежувалися лише хірургічним втручанням через низьку агресивність пухлин. Однак це все ж таки залишає рівням GAS5 їх прогностичну цінність.

## ВИСНОВКИ

1. Показано позитивну кореляцію SNHG1-PTEN, хоча в літературі зазначено те, що SNHG1 рекрутує комплекси, що залучені у процеси деградації PTEN.

2. Отримані нові данні, що вказують на позитивну кореляцію між SNHG1 та RASSF1A.

3. Також досить незвичними та новими даними виявилася кореляція RASSF1A-ANRASSF1.

4. Отримані нові дані щодо позитивних кореляцій GAS5-SNHG1 та GAS5-PANDAR в нормі. Однак таких самих кореляцій в пухлинних тканинах отримано не було, що вказує на сильні зміни звичних зв'язків між цими РНК при злоякісній трансформації клітин.

5. Показні нові дані, що кажуть про позитивну кореляцію онкогенних днРНК ANRIL та PANDAR.

6. Отримані нові дані, що вказують на позитивну кореляцію між ANRIL-PTEN та ANRIL-SNHG1.

8. Також було продемонстровано, що SNHG1, PTEN, PANDAR та ANRIL виявилися достатньо статистично значимими показниками аби розрізнити здорову та пухлинну тканину.

9. Також були проаналізовані концентрації досліджуємих днРНК в сечі пацієнтів, та показано, що SNGH1 та ANRASSF1 відрізнялися поміж здорових і хворих і могли бути прогностичними маркерами в сечі.

10. Також було показано нові дані, що GAS5, SNHG1, ANRASSF1 позитивно корелюють один між одним в сечі.

11. При виділенні частини вибірки сечі у підвибірці на основі наявності/відсутності лікування, було знайдено те, що GAS5 негативно корелювала з наявністю лікування.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Стаховський О. “ОПТИМІЗАЦІЯ ТАКТИКИ КОМБІНОВАНОГО ЛІКУВАННЯ ІНВАЗИВНИХ ФОРМ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА.”, (2021).
2. H. Kaseb, S.W. Leslie, T.L. Soon-Sutton, and N.R. Aeddula, “Bladder Cancer,” StatPearls - NCBI Bookshelf, (2024).
3. O. Sanli, J. Dobruch, M.A. Knowles, M. Burger, M. Alemozaffar, M.E. Nielsen, and Y. Lotan, “Bladder cancer,” Nature Reviews. Disease Primers 3(1), (2017).
4. T. Hayashi, K. Fujita, Y. Hayashi, K. Hatano, A. Kawashima, D.J. McConkey, and N. Nonomura, “Mutational Landscape and Environmental Effects in Bladder Cancer,” International Journal of Molecular Sciences 21(17), 6072 (2020).
5. D.F. Gleason, and G.T. Mellinger, “Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging,” the Journal of Urology/the Journal of Urology 111(1), 58–64 (1974).
6. S. Naylor, “Biomarkers: current perspectives and future prospects,” Expert Review of Molecular Diagnostics 3(5), 525–529 (2003).
7. [https://ajpsonline.com/ShowPDF\\_Paper.aspx](https://ajpsonline.com/ShowPDF_Paper.aspx)
8. M. Verma, and U. Manne, “Genetic and epigenetic biomarkers in cancer diagnosis and identifying high risk populations,” Critical Reviews in Oncology/Hematology 60(1), 9–18 (2006).
9. M.S. Rajeevan, I.M. Dimulescu, S.D. Vernon, M. Verma, and E.R. Unger, “Global amplification of sense RNA: a novel method to replicate and archive mRNA for gene expression analysis,” Genomics 82(4), 491–497 (2003).
10. J. Lu, G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R.

Horvitz, and T.R. Golub, “MicroRNA expression profiles classify human cancers,” *Nature* 435(7043), 834–838 (2005).

11. P.A. Everley, J. Krijgsveld, B.R. Zetter, and S.P. Gygi, “Quantitative Cancer Proteomics: Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture (SILAC) as a Tool for Prostate Cancer Research,” *Molecular & Cellular Proteomics* 3(7), 729–735 (2004).

12. Y. Misonou, K. Shida, H. Korekane, Y. Seki, S. Noura, M. Ohue, and Y. Miyamoto, “Comprehensive Clinico-Glycomic Study of 16 Colorectal Cancer Specimens: Elucidation of Aberrant Glycosylation and Its Mechanistic Causes in Colorectal Cancer Cells,” *Journal of Proteome Research* 8(6), 2990–3005 (2009).

13. S. Srivastava, M. Verma, and R. Gopal-Srivastava, “Proteomic Maps of the Cancer-Associated Infectious Agents,” *Journal of Proteome Research* 4(4), 1171–1180 (2005).

14. S. Suerbaum, and P. Michetti, “*Helicobacter pylori* Infection,” *New England Journal of Medicine/the New England Journal of Medicine* 347(15), 1175–1186 (2002).

15. A. Mishra, and M. Verma, “Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time?,” *Cancers* 2(1), 190–208 (2010).

16. M.T. McCabe, J.C. Brandes, and P.M. Vertino, “Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications,” *Clinical Cancer Research* 15(12), 3927–3937 (2009).

17. W.J. Locke, D. Guanzon, C. Ma, Y.J. Liew, K.R. Duesing, K.Y.C. Fung, and J.P. Ross, “DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic,” *Frontiers in Genetics* 10, (2019).

18. Chervona, Y., & Costa, M. (2012). Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis?. *American journal of cancer research*, 2(5), 589–597.

19. S. Deng, Y. Feng, and S. Pauklin, “3D chromatin architecture and transcription regulation in cancer,” *Journal of Hematology & Oncology* 15(1), (2022).

20. P. Le, G. Romano, P. Nana-Sinkam, and M. Acunzo, “Non-Coding RNAs in Cancer Diagnosis and Therapy: Focus on Lung Cancer,” *Cancers* 13(6), 1372 (2021).
21. S. Toden, and A. Goel, “Non-coding RNAs as liquid biopsy biomarkers in cancer,” *British Journal of Cancer* 126(3), 351–360 (2022).
22. L.D. Moore, T. Le, and G. Fan, “DNA Methylation and Its Basic Function,” *Neuropsychopharmacology* 38(1), 23–38 (2012).
23. I. Rauluseviciute, F. Drabløs, and M.B. Rye, “DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation,” *BMC Medical Genomics* 13(1), (2020).
24. W. Soochit, F. Sleutels, G. Stik, M. Bartkuhn, S. Basu, S.C. Hernandez, S. Merzouk, E. Vidal, R. Boers, J. Boers, M. Van Der Reijden, B. Geverts, W.A. Van Cappellen, M. Van Den Hout, Z. Ozgur, W.F.J. Van IJcken, J. Gribnau, R. Renkawitz, T. Graf, A. Houtsmuller, F. Grosveld, R. Stadhouders, and N. Galjart, “CTCF chromatin residence time controls three-dimensional genome organization, gene expression and DNA methylation in pluripotent cells,” *Nature Cell Biology* 23(8), 881–893 (2021).
25. D. Zilberman, “An evolutionary case for functional gene body methylation in plants and animals,” *Genome Biology* 18(1), (2017).
26. H. Jang, W. Shin, J. Lee, and J. Do, “CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function,” *Genes* 8(6), 148 (2017).
27. Z.D. Smith, and A. Meissner, “DNA methylation: roles in mammalian development,” *Nature Reviews. Genetics* 14(3), 204–220 (2013).
28. M. Okano, D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li, “DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development,” *Cell* 99(3), 247–257 (1999).
29. P.A. Ginno, D. Gaidatzis, A. Feldmann, L. Hoerner, D. Imanci, L. Burger, F. Zilbermann, A.H.F.M. Peters, F. Edenhofer, S.A. Smallwood, A.R. Krebs, and D. Schübeler, “A genome-scale map of DNA methylation turnover identifies site-

specific dependencies of DNMT and TET activity,” *Nature Communications* 11(1), (2020).

30. S. Pradhan, A. Bacolla, R.D. Wells, and R.J. Roberts, “Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase,” *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry* 274(46), 33002–33010 (1999).

31. H. Leonhardt, A.W. Page, H.-U. Weier, and T.H. Bestor, “A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei,” *Cell* 71(5), 865–873 (1992).

32. R.L. Tiedemann, H.E. Eden, Z. Huang, K.D. Robertson, and S.B. Rothbart, “Distinguishing Active Versus Passive DNA Demethylation Using Illumina MethylationEPIC BeadChip Microarrays,” in *Methods in Molecular Biology*, (2021), pp. 97–140.

33. X. Zhou, Z. Zhuang, W. Wang, L. He, H. Wu, Y. Cao, F. Pan, J. Zhao, Z. Hu, C. Sekhar, and Z. Guo, “OGG1 is essential in oxidative stress induced DNA demethylation,” *Cellular Signalling* 28(9), 1163–1171 (2016).

34. C. Bernstein, “DNA Methylation and Establishing Memory,” *Epigenetics Insights* 15, 251686572110724 (2022).

35. R.L. Tiedemann, H.E. Eden, Z. Huang, K.D. Robertson, and S.B. Rothbart, “Distinguishing Active Versus Passive DNA Demethylation Using Illumina MethylationEPIC BeadChip Microarrays,” in *Methods in Molecular Biology*, (2021), pp. 97–140.

36. T. Shimbo, and P.A. Wade, “Proteins That Read DNA Methylation,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (2016), pp. 303–320.

37. R. Lakshminarasimhan, and G. Liang, “The Role of DNA Methylation in Cancer,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (2016), pp. 151–172.

38. R. Kandimalla, A.A. Van Tilborg, and E.C. Zwarthoff, “DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer,” *Nature Reviews. Urology* 10(6), 327–335 (2013).

39. F. Dubois, E. Bergot, G. Zalzman, and G. Levallet, “RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis—an updated review,” *Cell Death and Disease* 10(12), (2019).

40. L. Zhan, B. Zhang, Y. Tan, C. Yang, C. Huang, Q. Wu, Y. Zhang, X. Chen, M. Zhou, and A. Shu, “Quantitative assessment of the relationship between RASSF1A gene promoter methylation and bladder cancer (PRISMA),” *Medicine* 96(7), e6097 (2017).

41. J.S. Mattick, P.P. Amaral, P. Carninci, S. Carpenter, H.Y. Chang, L.-L. Chen, R. Chen, C. Dean, M.E. Dinger, K.A. Fitzgerald, T.R. Gingeras, M. Guttman, T. Hirose, M. Huarte, R. Johnson, C. Kanduri, P. Kapranov, J.B. Lawrence, J.T. Lee, J.T. Mendell, T.R. Mercer, K.J. Moore, S. Nakagawa, J.L. Rinn, D.L. Spector, I. Ulitsky, Y. Wan, J.E. Wilusz, and M. Wu, “Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations,” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 24(6), 430–447 (2023).

42. L. Statello, C.-J. Guo, L.-L. Chen, and M. Huarte, “Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions,” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 22(2), 96–118 (2020).

43. H. Wu, Q.-F. Yin, Z. Luo, R.-W. Yao, C.-C. Zheng, J. Zhang, J.-F. Xiang, L. Yang, and L.-L. Chen, “Unusual Processing Generates SPA LncRNAs that Sequester Multiple RNA Binding Proteins,” *Molecular Cell* 64(3), 534–548 (2016).

44. G. Pisignano, and M. Ladomery, “Epigenetic Regulation of Alternative Splicing: How LncRNAs Tailor the Message,” *Non-Coding RNA* 7(1), 21 (2021).

45. R. Fueyo, J. Judd, C. Feschotte, and J. Wysocka, “Roles of transposable elements in the regulation of mammalian transcription,” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 23(7), 481–497 (2022).

46. A. Di Ruscio, A.K. Ebralidze, T. Benoukraf, G. Amabile, L.A. Goff, J. Terragni, M.E. Figueroa, L.L. De Figueiredo Pontes, M. Alberich-Jorda, P. Zhang, M. Wu, F. D’Alò, A. Melnick, G. Leone, K.K. Ebralidze, S. Pradhan, J.L. Rinn, and

D.G. Tenen, “DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation,” *Nature* 503(7476), 371–376 (2013).

47. Y. Zhang, and L. Tang, “The Application of lncRNAs in Cancer Treatment and Diagnosis,” *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 13(3), 292–301 (2018).

48. H.-J. Li, X. Gong, Z.-K. Li, W. Qin, C.-X. He, L. Xing, X. Zhou, D. Zhao, and H.-L. Cao, “Role of Long Non-coding RNAs on Bladder Cancer,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9, (2021).

49. 35 Y. Zhou, and B. Chen, “GAS5-mediated regulation of cell signaling (Review),” *Molecular Medicine Reports*, (2020).

50. S. Kuang, and L. Wang, “Identification and analysis of consensus RNA motifs binding to the genome regulator CTCF,” *NAR Genomics and Bioinformatics* 2(2), (2020).

51. J. Ji, X. Dai, S.-C.J. Yeung, and X. He, “<p>The role of long non-coding RNA GAS5 in cancers</p>,” *Cancer Management and Research* Volume 11, 2729–2737 (2019).

52. W. Yang, L. Hong, X. Xu, Q. Wang, J. Huang, and L. Jiang, “LncRNA GAS5 suppresses the tumorigenesis of cervical cancer by downregulating miR-196a and miR-205,” *Tumor Biology* 39(7), 101042831771131 (2017).

53. M. Taheri, M.D. Omrani, and S. Ghafouri-Fard, “Long non-coding RNA expression in bladder cancer,” *Biophysical Reviews* 10(4), 1205–1213 (2017).

54. H. Zhang, Y. Guo, Y. Song, and C. Shang, “Long noncoding RNA GAS5 inhibits malignant proliferation and chemotherapy resistance to doxorubicin in bladder transitional cell carcinoma,” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 79(1), 49–55 (2016).

55. F.C. Beckedorff, A.C. Ayupe, R. Crocci-Souza, M.S. Amaral, H.I. Nakaya, D.T. Soltys, C.F.M. Menck, E.M. Reis, and S. Verjovski-Almeida, “The Intronic Long Noncoding RNA ANRASSF1 Recruits PRC2 to the RASSF1A Promoter,

Reducing the Expression of RASSF1A and Increasing Cell Proliferation,” *PLOS Genetics* 9(8), e1003705 (2013).

56. M. Li, L. Qu, F. Chen, and X. Zhu, “Propofol upregulates miR-320a and reduces HMGB1 by downregulating ANRIL to inhibit PTC cell malignant behaviors,” *Pathology, Research and Practice* 216(4), 152856 (2020).

57. Y. Ma, N. Shen, M.S. Wicha, and M. Luo, “The Roles of the Let-7 Family of MicroRNAs in the Regulation of Cancer Stemness,” *Cells* 10(9), 2415 (2021).

58. Y.-R. Hao, D.-J. Zhang, Z.-M. Fu, Y.-Y. Guo, and G.-F. Guan, “Long non-coding RNA ANRIL promotes proliferation, clonogenicity, invasion and migration of laryngeal squamous cell carcinoma by regulating miR-181a/Snai2 axis,” *Regenerative Therapy* 11, 282–289 (2019).

59. J. Ma, W. Zhao, H. Zhang, Z. Chu, H. Liu, X. Fang, and D. Tang, “Long non-coding RNA ANRIL promotes chemoresistance in triple-negative breast cancer via enhancing aerobic glycolysis,” *Life Sciences* 306, 120810 (2022).

60. G. Li, and Y. Zhu, “Effect of lncRNA ANRIL knockdown on proliferation and cisplatin chemoresistance of osteosarcoma cells in vitro,” *Pathology, Research and Practice* 215(5), 931–938 (2019).

61. Y. Kotake, T. Nakagawa, K. Kitagawa, S. Suzuki, N. Liu, M. Kitagawa, and Y. Xiong, “Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene,” *Oncogene* 30(16), 1956–1962 (2010).

62. L.M. Holdt, S. Hoffmann, K. Sass, D. Langenberger, M. Scholz, K. Krohn, K. Finstermeier, A. Stahringer, W. Wilfert, F. Beutner, S. Gielen, G. Schuler, G. Gäbel, H. Bergert, I. Bechmann, P.F. Stadler, J. Thiery, and D. Teupser, “Alu Elements in ANRIL Non-Coding RNA at Chromosome 9p21 Modulate Atherogenic Cell Functions through Trans-Regulation of Gene Networks,” *PLOS Genetics* 9(7), e1003588 (2013).

63. Y. Zhan, J. Lin, Y. Liu, M. Chen, X. Chen, C. Zhuang, L. Liu, W. Xu, Z. Chen, A. He, Q. Zhang, X. Sun, G. Zhao, and W. Huang, “Up-regulation of long

non-coding RNA PANDAR is associated with poor prognosis and promotes tumorigenesis in bladder cancer,” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35(1), (2016).

64. J. Liu, Q. Ben, E. Lu, X. He, X. Yang, J. Ma, W. Zhang, Z. Wang, T. Liu, J. Zhang, and H. Wang, “Long noncoding RNA PANDAR blocks CDKN1A gene transcription by competitive interaction with p53 protein in gastric cancer,” *Cell Death and Disease* 9(2), (2018).

65. Y. Sang, J. Tang, S. Li, L. Li, X. Tang, C. Cheng, Y. Luo, X. Qian, L.-M. Deng, L. Liu, and X.-B. Lv, “LncRNA PANDAR regulates the G1/S transition of breast cancer cells by suppressing p16INK4A expression,” *Scientific Reports* 6(1), (2016).

66. L. Han, E. Zhang, D. Yin, R. Kong, T. Xu, W. Chen, R. Xia, Y. Shu, and W. De, “Low expression of long noncoding RNA PANDAR predicts a poor prognosis of non-small cell lung cancer and affects cell apoptosis by regulating Bcl-2,” *Cell Death and Disease* 6(2), e1665 (2015).

67. H. Wang, Y. Li, Y. Wang, X. Shang, Z. Yan, S. Li, and W. Bao, “Cisplatin-induced PANDAR-Chemo-EVs contribute to a more aggressive and chemoresistant ovarian cancer phenotype through the SRSF9-SIRT4/SIRT6 axis,” *Journal of Gynecologic Oncology* 35(2), (2024).

68. H. Zeng, S. Zhou, W. Cai, M. Kang, and P. Zhang, “LncRNA SNHG1: role in tumorigenesis of multiple human cancers,” *Cancer Cell International* 23(1), (2023).

69. H. Cai, H. Xu, H. Lu, W. Xu, H. Liu, X. Wang, G. Zhou, and X. Yang, “LncRNA SNHG1 Facilitates Tumor Proliferation and Represses Apoptosis by Regulating PPAR $\gamma$  Ubiquitination in Bladder Cancer,” *Cancers* 14(19), 4740 (2022).

70. O. Pös, O. Biró, T. Szemes, and B. Nagy, “Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications,” *European Journal of Human Genetics* 26(7), 937–945 (2018).

71. F. Cheng, L. Su, and C. Qian, “Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer,” *Oncotarget* 7(30), 48832–48841 (2016).
72. S. Suraj, C. Dhar, and S. Srivastava, “Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies,” *Biomedical Reports* 6(1), 8–14 (2016).
73. S.N. Lone, S. Nisar, T. Masoodi, M. Singh, A. Rizwan, S. Hashem, W. El-Rifai, D. Bedognetti, S.K. Batra, M. Haris, A.A. Bhat, and M.A. Macha, “Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments,” *Molecular Cancer* 21(1), (2022).
74. M. Matuszczak, A. Kiljańczyk, and M. Salagierski, “A Liquid Biopsy in Bladder Cancer—The Current Landscape in Urinary Biomarkers,” *International Journal of Molecular Sciences* 23(15), 8597 (2022).
75. S. Wang, K. Zhang, S. Tan, J. Xin, Q. Yuan, H. Xu, X. Xu, Q. Liang, D.C. Christiani, M. Wang, L. Liu, and M. Du, “Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies,” *Molecular Cancer* 20(1), (2021).
76. P. Li, S. Liu, L. Du, G. Mohseni, Y. Zhang, and C. Wang, “Liquid biopsies based on DNA methylation as biomarkers for the detection and prognosis of lung cancer,” *Clinical Epigenetics* 14(1), (2022).
77. I. Amelio, R. Bertolo, P. Bove, O.C. Buonomo, E. Candi, M. Chiochi, C. Cipriani, N. Di Daniele, C. Ganini, H. Juhl, A. Mauriello, C. Marani, J. Marshall, M. Montanaro, G. Palmieri, M. Piacentini, G. Sica, M. Tesauro, V. Rovella, G. Tisone, Y. Shi, Y. Wang, and G. Melino, “Liquid biopsies and cancer omics,” *Cell Death Discovery* 6(1), (2020).