

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – бакалавр

на тему «**ЦИРКУЛЮЮЧІ НЕКОДУЮЧІ РНК ЯК МАРКЕРИ ПУХЛИН
СЕЧОСТАТЕВОЇ СИСТЕМИ**»

Виконав: студент 4-го року навчання
спеціальність 091 — біологія
Савицький Андрій Леонідович

Керівники:

Кашуба В.І.,

доктор біологічних наук, зав. від.

Інституту молекулярної біології і
генетики. НАН України;

Єфіменко Т.С.,

кандидат біологічних наук, ст. викладач
кафедри біології НаУКМА

Рецензент к. б. н, с. Н. С. Арешков П. О.

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК

Пасічник Т.В.

«__» червня 20__ року

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Пухлини сечостатевої системи	8
1.1.1. Рак сечового міхура	8
1.1.2. Рак передміхурової залози	9
1.1.3. Рак нирок	9
1.2. Некодуючі РНК	11
1.2.1. Довгі некодуючі РНК	13
1.2.2. Мікро РНК	16
1.2.3. Довга некодуюча РНК PANDAR	20
1.2.4. Довга некодуюча РНК BC200	21
1.3. Шляхи поширення некодуючих РНК	22
1.3.1. Секреція некодуючих РНК в складі везикул	23
1.3.2. Спрямована секреція некодуючих РНК	24
1.4. Біомаркери пухлин	25
1.4.1. Некодуючі РНК як біомаркери пухлин	27
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	29
2.1. Об'єкт дослідження	29
2.2. Методи дослідження	30
2.3. Передбачення мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR та BC200	31

2.3.1. Передбачення мікро РНК з використанням TargetScan	31
2.3.2. Передбачення мікро РНК з використанням DIANA	32
2.3.3. Передбачення мікро РНК з використанням miRanda	33
2.4. Пошук передбачених мікро РНК в базах даних	34
2.5. Визначення мікро РНК, що можуть відігравати роль у розвитку раку сечового міхура, передміхурової залози, нирок	37
2.5.1. Визначення можливості мікро РНК відігравати роль у розвитку раку з використанням бази даних miRCancer	38
2.5.2. Визначення можливості мікро РНК відігравати роль у розвитку раку з використанням бази даних dbDEMOC 2.0	40
2.5.3. Визначення можливості мікро РНК відігравати роль у розвитку раку з використанням бази даних OncomiR	41
2.5.4. Зведення результатів порівняння з усіх баз даних	43
2.6. Передбачення генів які відіграють роль у розвитку раку	44
2.7. Аналіз взаємодії визначених генів та передбачених мікроРНК	47
2.7.1. Аналіз взаємодії визначених генів з передбачуваними мікро РНК за допомогою алгоритму TarBase v.8	48
2.7.2. Аналіз взаємодії визначених генів з передбачуваними мікро РНК за допомогою алгоритму TopMir	50
2.7.3. Аналіз взаємодії визначених генів з передбачуваними мікро РНК за допомогою алгоритму miRNet	53
2.8. Визначення функції генів	57
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	58
3.1. Передбачення мікро РНК, що можуть зв'язуватись з довгими некодуючими РНК інтересу	58
3.2. Визначення мікро РНК, які відіграють роль у розвитку раку сечового міхура, нирок та передміхурової залози	59

3.3. Визначення генів які відіграють роль у розвитку раку	62
3.4. Визначення можливості взаємодії передбачених генів та передбачених мікро РНК	62
3.4.1. Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за топомогою алгоритму DIANAtools	63
3.4.2. Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за топомогою алгоритму TorpMiR	66
3.4.3. Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за топомогою алгоритму miRNet	69
3.5. Визначення генів експресія яких регулюється передбаченими мікро РНК	71
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	73
ВИСНОВКИ	76
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	77

ВСТУП

Смертність від онкологічних захворювань займає 2 місце по летальності у світі. З кожним роком кількість випадків зростає, а летальність деяких з видів раку не зменшується [2]. Україна знаходиться серед держав з високим рівнем захворюваності на рак. Щорічно близько 65 тисяч осіб помирають від раку, а 140 тисяч дізнаються про свою хворобу [1]. За оцінками ВОЗ вважається, що можна запобігти більше ніж 50% летальних випадків якщо розробити надійну методику ранньої діагностики. Раніше для діагностики раку використовували здебільшого фізичні примітивні методи та звичайні біохімічні аналізи, що не могли надати вичерпної інформації про формування пухлини чи її стадію. В багатьох країнах досить використовують виключно ці методи. Проте для покращення діагностики багато дослідників почало працювати над пошуком біомаркерів раку [7, 8]. Вони є дуже специфічними і можуть вказувати не тільки на наявність певної пухлини а і на її стадію та молекулярний тип, що значно покращує подальше лікування пацієнта. Рак сечостатевої системи виділяється особливо пізньою появою симптомів, що призводить до його виявлення вже на стадіях метастазування пухлини. Це сильно ускладнює процес лікування і зменшує шанси пацієнта на одужання [13]. Саме через це робота нашого відділу сфокусована на розробці тест систем, які могли б виявляти біомаркери раку сечостатевої системи. Такі системи можуть вказувати на наявність пухлини на ранніх - безсимптомних стадіях, що збільшить шанси пацієнта на повне одужання. Виділяти біомаркери можна з будь-яких біологічних рідин, хоча для визначення раку сечостатевої системи краще використовувати сечу. Це робить процес збору біологічного зразка неінвазивним і більш сприйнятливим для проведення пацієнтом без наявних симптомів. Такі тест системи можна буде використовувати для проведення скринінгу населення з метою виявлення пухлин на ранніх стадіях. В якості біомаркерів в лабораторії були визначені

довгі некодуючі РНК, які можуть бути досить стабільними довгий час поза клітиною та є дуже інформативними щодо стану клітини. Проте визначення виключно довгих некодуючих РНК в аналізах дає не достатньо велику точність виявлення пухлини [7]. В свою чергу мікро РНК можуть також добре інформувати про стан клітини з яких вони походять і доволі довгий час залишаються інтактними в біологічних рідинах. Вони також характеризуються здатністю зв'язуватись з довгими некодуючими РНК і здатністю сильно впливати на профілі експресії різних генів. За рахунок цих якостей мікро РНК можна також розглядати як біомаркери пухлин. Задля максимального покращення результатів тесту можна використовувати дослідження вмісту мікро РНК та довгих некодуючих РНК у тандемі [51]. Але для формування точних теоретичних співвідношень їх концентрацій за патологічних станів треба розуміти як довгі некодуючі РНК взаємодіють. Раніше в лабораторії не проводили тестування за мікро РНК, через що було вирішено підібрати мікро РНК кандидати, експресія яких може залежати від експресії довгих некодуючих РНК інтересу та впливати на розвиток пухлини. Формування теоретичного профілю експресії, розуміння взаємодій різних типів РНК та їх впливу на клітину дозволить поглибити фундаментальні знання в цій галузі та розробити більш точні тест системи для діагностування будь - якого типу раку. При аналізі літературних джерел виявилось, що досі була проведена лише 1 робота з схожим вектором в 2020 році, проте вона привернула до себе багато уваги [2]. Також схожі ідеї виносились в тези різних конференцій пов'язаних з дослідженнями в галузі онкології. Раніше дослідники визначали лише окремі ролі мікро РНК та довгих некодуючих РНК, тому це дослідження є новітнім напрямком у розвитку розуміння ролі мікро РНК та довгих некодуючих РНК в тандемі у розвитку раку [7,8, 51].

У зв'язку з вищевикладеним, метою даної роботи було визначити за допомогою біоінформатичних інструментів, які саме з відомих для людини мікро РНК можуть взаємодіяти з довгими некодуючими РНК PANDAR та

BC200, визначити які з них і як приймають участь у розвитку раку передміхурової залози, сечового міхура та нирок.

Відповідно до мети було сформовано наступні завдання:

1. Визначити найімовірніші мікро РНК, які можуть зв'язуватись з PANDAR та BC200.
2. Виокремити передбачені мікро РНК, які можуть відігравати певну роль у розвитку раку передміхурової залози, сечового міхура, нирок.
3. Визначити мікро РНК які найімовірніше можуть слугувати біомаркерами раку сечостатевої системи у тандемі з PANDAR та BC200.
4. Визначити гени, що є мішенями опосередкованого впливу PANDAR та BC200.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Пухлини сечостатевої системи

На сьогоднішній день в Україні як і у всьому світі смертність від онкологічних захворювань займає 2 місце після серцево-судинних. Наразі на обліку щодо появи онкологічного рецидиву в Україні знаходиться близько мільйона людей, а 140 тисяч кожного року дізнається про виявлене онкозахворювання. Протягом 100 років кількість зафіксованих випадків в рік стабільно зростає, в той час як відсоток остаточно вилікуваних падає. Така динаміка у часовому перерізі є незмінною, хоча частота та летальність деяких видів раку почала знижуватись в останні роки. Онкології пов'язані з сечостатевою системою мають стабільний приріст кількості випадків в рік і доволі часто мають поганий прогноз, через пізню появу симптомів. В 20% випадків рак органів сечостатевої системи виявляють вже на метастатичних стадіях [1-3].

1.1.1. Рак сечового міхура. Ця онкологія посідає 9 місце в світі по кількості діагнозів серед інших онкологічних захворювань. За останній рік у світі зафіксовано 12 мільйонів випадків [4]. Дані статистики вказують на те, що майже 20 відсотків українців з цим діагнозом помирає протягом першого року перебігу захворювання [1]. Основною причиною розвитку цього раку є епітеліально-мезенхімальний перехід клітин слизової оболонки сечового міхура, але з часом первинна лінія пухлинних клітин мутує і пухлина стає дуже гетерогенною. На стадії розвитку його поділяють за такими критеріями як: розмір пухлини, ступінь інвазивності пухлини та формування метастазів. На перших двох стадіях пухлина локалізована виключно в епітелії. На III стадії пухлина інвазує в м'язовий шар, на IV в інші навколишні тканини. Перед лікуванням важливо визначити стадію розвитку пухлини задля вибору найбільш ефективної терапії. Саме для цього розробляються методи

молекулярного типування пухлин. Рак сечового міхура є небезпечним через те, що здебільшого пізно починає проявляти симптоми, у 60-90% в залежності від країни прогресує в рецидив після лікування, метастазує в легені та лімфатичні вузли [5,6].

1.1.2. Рак передміхурової залози. Частота виявлення цього захворювання має стабільну тенденцію до зростання, особливо на території України. За даними МОЗ смертність від раку простати в рік складає 41 випадок на 100 000 населення, хоча в світі цей показник в 2 рази менший. Це пов'язано з його безсимптомним протіканням та нехтуванням профілактичними обстеженнями населенням. Здебільшого симптоми починають проявлятися на етапі інвазії пухлини в сусідні тканини та на етапі формування метастаз. Здебільшого злоякісне переродження відбувається в секреторних клітинах. На першій стадії розвитку цього захворювання його можливо виявити виключно з використанням молекулярних тестів, на цій стадії лікування є найбільш ефективним. На другій стадії пухлина збільшується в розмірах і може детектуватись лікарем при пальпації залози. На третій стадії пухлина інвазує в сусідні тканини і з'являється ризик утворення метастаз. На четвертій стадії розвитку пухлина сильно вазкулізована та розповсюджує метастази [7]. В світі рак передміхурової залози посідає 4 місце серед усіх відомих типів раку по кількості випадків в рік. За 2018 рік зафіксовано 1.3 мільйони нових випадків [2]. Рання клінічна діагностика цього захворювання є критичною, через велику частоту розвитку агресивних форм раку які продукують метастази. Наявні на сьогодні тести для ранньої діагностики фокусуються на виявленні PSA (prostatespecificantigen) в сечі та плазмі крові, проте їх специфічність діагностично мала - 30% [8]. Наразі різні дослідні інститути розробляють та вивчають різноманітні альтернативні біомаркери для ранньої діагностики та типування пухлини, що може допомогти у лікуванні [2,7,8].

1.1.3. Рак нирок. Це захворювання є більш рідкісним, проте має позитивну динаміку збільшення випадків на рік - збільшення до +10% в рік в

Україні. У більш розвинених країнах частота летальних випадків при виявленні цієї патології падає, проте в Україні вона також стабільно зростає (Рис.1.1) [9].

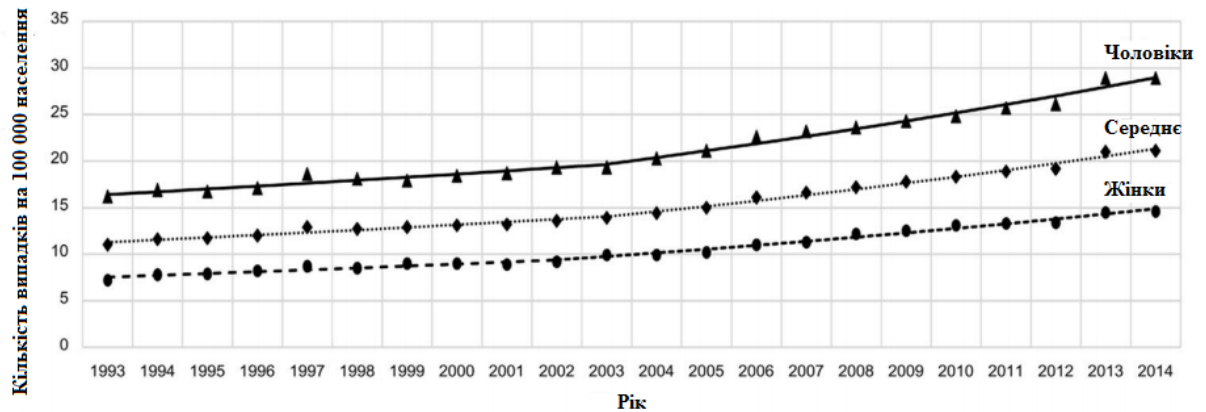


Рис.1.1. Кількість діагностованих випадків раку нирок на 100 000 населення в різні роки [3].

Здебільшого злоякісне переродження відбувається в клітинах нефрону, що дозволяє швидко налагодити стабільне кровопостачання до пухлини та певний час уникати імунної відповіді [10]. Через такі умови розвитку навколо пухлини швидко створюється сприятливий мікро-простір що зумовлює значний ризик метастазування - приблизно 30% випадків захворювання призводить до поширення метастаз по організму [11]. Здебільшого на ранніх етапах розвитку пухлини не пошкоджують стінки провідних каналців, а інвазують в сполучну тканину органу. Пошкодження стінок провідних каналців можуть спостерігатись вже на III або IV стадіях розвитку пухлини, також на цих стадіях пухлина проникає в прилеглі лімфатичні вузли. Саме з пошкодженням стінок провідних каналців нефрону з'являються перші симптоми захворювання, проте при його діагностуванні на пізніх стадіях шанси на повне одужання та реабілітацію значно менші [2,9,10]. Більшість сучасних методів діагностування цього захворювання фокусуються на біохімічному аналізу сечі та крові, при підозрі на дисфункцію нирок проводять додаткове ультразвукове дослідження нирки. Але ці методи не

мають специфічності і здебільшого не здатні визначити наявність захворювання на ранніх стадіях його розвитку.

Таким чином онкологічні захворювання сечостатевого шляху є однією з основних причин смертності населення. Кількість хворих кожного року стабільно збільшується, а відсоток летальності хоч і зменшується в розвинених країнах, досі є великим на території України. Основною проблемою в лікуванні цих захворювань є відсутність симптомів на ранніх стадіях розвитку коли лікування є найбільш ефективним. Навіть лабораторні дослідження не завжди можуть вказати на перебіг цього патологічного стану до критичного моменту. Більш сучасним методом, який розробляють по всьому світу для різних видів раку є пошук біомаркерів. Біомаркери - це молекули які можуть вказувати на перебіг певного патологічного процесу в організмі. Як біомаркери раніше використовували білки такі як PSA (prostate-specific antigen), а зараз все більше досліджень проводиться в напрямку виявлення нуклеїнових кислот. Виявилось що вони є більш стабільними в біологічних рідинах, краще детектуються за малих концентрацій та є більш інформативними за білки. Дослідники виділили некодуючі РНК як найбільш перспективні біомаркери для діагностики.

1.2. Некодуючі РНК

Некодуючі РНК це група РНК, які не транлюються в протеїни. Гени, що кодують ці РНК в літературі називають РНК - генами. В 2007 році в проєкті "FANTOM" дослідники визначили, що з усього пулу РНК з клітини лише п'ята частина є білок кодуючими [12]. Таким чином після більш детальних досліджень виявилось, що некодуючі РНК складають 90% транскриптів генетичної інформації. В останні роки наукова спільнота остаточно впевнилась у тому, що РНК займають чи не більшу роль за білки в процесах регулювання життєдіяльності клітини. З часів першого відкриття некодуючих РНК в 1965 році дослідники описали велике різноманіття цих

молекул, що в результаті призвело до формування спеціалізованої класифікації [13]. На сьогоднішній день основними некодуючими РНК є: транспортні РНК, рибосомальні РНК, мікроРНК, довгі некодуючі РНК, малі інтерферуючі РНК, малі ядерні РНК, позаклітинні РНК, шпилькові РНК, циклічні РНК та інші. Некодуючі РНК відіграють роль у багатьох молекулярних процесах в клітині, та за останніми дослідженнями навіть поза нею. В основному вчені приділяють увагу епігенетичним властивостям некодуючих РНК, оскільки вони можуть впливати на експресію як окремих генів так і цілих локусів використовуючи різноманітні механізми взаємодії з клітинним апаратом [12,14].

Некодуючі РНК поділяють на консервативні та варіабельні. Консервативні РНК - це ті молекули, які мають однакову послідовність нуклеотидів у більшості живих організмів. Вважається що вони були не змінними з часів останнього спільного предка. Здебільшого вони відіграють роль у переробці генетичної інформації з ДНК у білок. Прикладами таких РНК є рибосомальні РНК, що відповідають за процес трансляції, сплайсосомні РНК, що входять до складу сплайсосом, так звані Y-РНК, що входять до складу ORC (**O**rigi**n** **R**ecogni**t**ion **C**omplex) - ДНК зв'язуючого комплексу [15,16].

Варіабельні РНК - це молекули, що можуть сильно відрізнитись за своєю нуклеотидною послідовністю між видами. Вони здебільшого відповідають за регуляцію експресії генів. На сьогодні визначено та досліджено тисячі таких РНК лише для людини, проте біоінформатичний аналіз сиквенсів комплементарної ДНК вказує на те, що їх сотні тисяч. Основними типами таких РНК є: довгі некодуючі РНК, циклічні РНК, малі інтерферуючі РНК, шпилькові РНК та мікро РНК. Вплив цих регулюючих РНК дуже помітний, деякі з цих молекул можуть регулювати експресію до 100 генів, які в свою чергу можуть впливати на експресію інших генів і активувати певні сигнальні каскади. Саме через це зміни в експресії певних РНК можуть мати критичний вплив на функціонування клітини.

Особливо сильно розвинута функція регулювання експресії некодуючими РНК у багатоклітинних організмів, що може вказувати на досі не достатньо досліджену але важливу їх функцію - міжклітинне сигналювання [12,19,20].

1.2.1. Довгі некодуючі РНК. За останні 5 років визнання цього типу молекул як частини епігенетичного апарату клітини значно зросло. Було досліджено, що за інактивацію однієї з X хромосом в жіночому організмі відповідає лише 2 довгі некодуючі РНК [17]. Також виявилось, що експресія *Нох* генів регулюється цими молекулами [18].

Основною характеристикою цього типу РНК є довжина більше ніж 200 нуклеотидів. Ланцюг цієї нуклеїнової кислоти кепований, має полі А хвіст, що подовжує період його існування у клітині. Синтезуються здебільшого ДНК залежною РНК полімеразою другого типу, значно рідше третього [12,14].

Гени, що кодують довгі некодуючі РНК в геномі можуть мати досить різноманітне, іноді хаотичне положення. Послідовності некодуючих РНК, що знаходяться на віддалені від білок кодуючих генів в літературі називають поодинокими, хоча більшість досліджених на сьогодні РНК генів або локалізована поруч з білок-кодуючим геном, або накладається на нього. Часто РНК кодуючі гени формують невеликі локальні локуси, що можуть зчитуватись разом з білок-кодуючими генами. Через простоту дослідження в зв'язку з таким розташуванням довгі некодуючі РНК навіть класифікують за положенням у геномі відносно білок-кодуючих генів. Найбільш дослідженими на сьогоднішній день є довгі некодуючі РНК які з'являються внаслідок сплайсингу і локалізовані в довгих інтронах білок-кодуючих генів. Здебільшого вони відіграють роль регулювання експресії білкового продукту гену, в якому знаходяться завдяки механізму зворотного зв'язку [21,22].

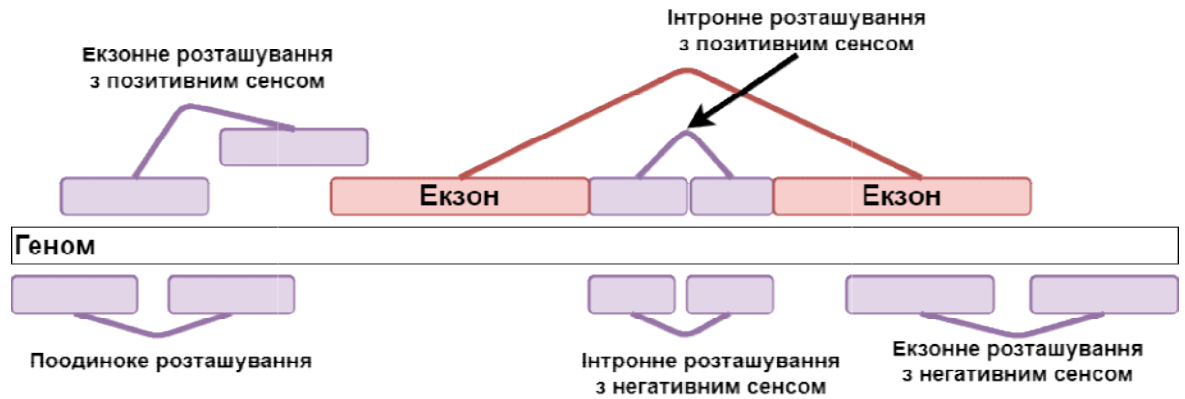


Рис.1.2. Варіанти розташування генів довгих некодуючих РНК в геномі.

Дослідники окремо виділяють РНК з подвійною функцією - вони одночасно відповідають за регуляцію експресії певних генів та можуть самі транслюватися в пептиди. Також дослідження показали, що майже 70% генів можуть зчитуватись у зворотньому напрямку і в результаті продукувати регулюючі РНК. Деякі довгі некодуючі РНК є продуктом зчитування псевдогенів, які раніше вважалися повністю неактивними [12,14].

Хоча дослідження ролі цих РНК за нормального функціонування клітини і проводяться, більшість всеж сфокусована на їх ролі у розвитку патологічних станів, особливо онкології. За рахунок своєї унікальної структури, можливості утворювати шпильки та іноді більш складні конформації довгі некодуючі РНК можуть взаємодіяти з великою кількістю різноманітних молекул [21].

Вже доведено, що довгі некодуючі РНК здатні зв'язувати мікро РНК, малі інтерферуючі РНК за рахунок спеціальних регіонів - зон взаємодії з мікроРНК. Ці зони здебільшого в довжину складають від 2 до 8 нуклеотидів. Кожна довга некодуюча РНК може зв'язувати до 20 мікро РНК і є молекулярно "губкою" для них [23]. Завдяки цій властивості довгі некодуючі РНК опосередковано впливають на трансляцію матричної РНК. Але, зв'язуючись з мікроРНК довга некодуюча РНК також частково втрачає свою активність, тобто регуляція є взаємною і потребує підтримання тонкого балансу для нормального функціонування. Порухення цього балансу може призводити до патологічних станів таких як рак [21]. Доведено, що дуплекси

довгих некодуючих РНК та мікроРНК відіграють важливу роль у альтернативному сплайсингу, експериментальні дослідження вказують на, що 21 000 з 24 500 білок кодуючих генів піддаються їх впливу [24].

Завдяки комп'ютерному моделюванню було визначено, що довгі некодуючі РНК можуть на пряму зв'язуватись з ДНК і утворювати потрійний ланцюг. Потрійні ланцюги є не дуже стабільними, утримуються невеликою кількістю слабких водневих зв'язків, проте впливають на геномний апаратклітини. Ці структури здебільшого відіграють роль інгібіторів експресії, можуть знаходитись на різних ділянках білок кодуєчого гена. Наприклад, якщо розташування гена на промоторі, то ген повністю інактивований, проте при розташуванні в інших регіонах ген може бути частково реалізований [25, 26].

Через варіації у розмірі та наявності додаткових конформаційних структур ці молекули можуть ефективно взаємодіяти з різноманітними білками. У живій клітині довгі некодуючі РНК в більшості випадків знаходяться у комплексі білок-РНК. РНК можуть мати свою специфічність, так молекула lnc-NOTAIR може взаємодіяти різними ділянками з майже 100 білків, а lnc-DC лише з 1 [27, 28]. Дослідження останніх років вказують на те, що білкові комплекси з довгими некодуючими РНК впливають на такі процеси як: транскрипція, сплайсинг, експресія генів, посттрансляційні модифікації білків. Також довгі некодуючі РНК можуть направляти білки до різних мішеней [27, 28, 29].

Виявилось, що довгі некодуючі РНК можуть зв'язуватись з пептидами, та модифікуватись іншими молекулами. Для цього у них є спеціалізовані ділянки які в літературі називають карманами. За рахунок зв'язування з малими молекулами та пептидами довгі некодуючі РНК змінюють свою конформацію а таким чином і функцію. Показано, що деякі РНК при взаємодії з певними пептидами просто інактивуються, а деякі навпаки активуються перебувавши у клітині в неактивній формі [30].

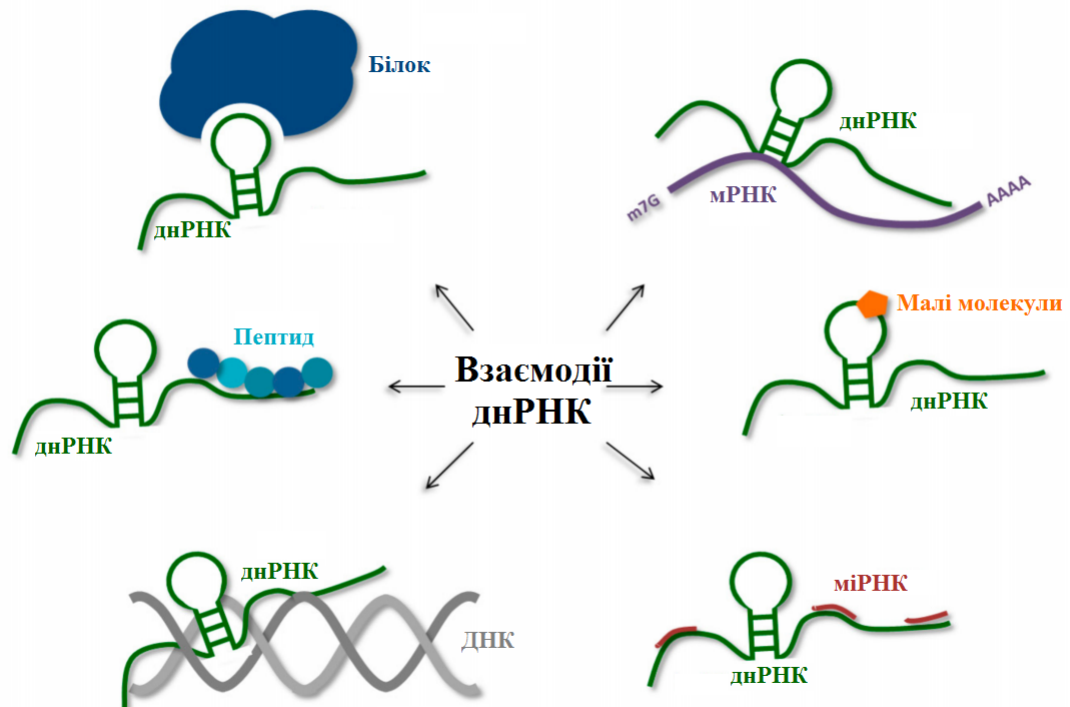


Рис.1.3. Варіанти взаємодії довгих некодуючих РНК в клітині [31].

При дослідженні молекулярного складу клітин різних типів та підтипів виявилось, що різниця в експресії саме довгих некодуючих РНК є більш значною ніж різниця у білковому складі. Саме через цю особливість було запропоновано використовувати цей тип РНК в якості біомаркерів та для типування пухлин.

1.2.2. Мікро РНК. МікроРНК– це клас некодуючих РНК, довжина яких в середньому складає 21-25 нуклеотидів. Основною дослідженою роллю в клітині є посттранскрипційна регуляція експресії та сайленсинг інших видів РНК [33].

Вперше детально дослідили мікроРНК в 1990-х роках. Було відкрито ген, що не кодував білку, проте з нього експресувались короткі РНК. При більш ретельному вивченні цих РНК виявилось, що за їх наявності в клітині кількість певного білку зменшується без зменшення кількості відповідної матричної РНК [32]. Після цього відкриття дослідники почали шукати мікроРНК в усіх інших модельних організмів і в дуже короткий термін почали їх виявляти [34].

Більшість мікро РНК транскрибуються з ДНК за рахунок роботи ДНК залежної РНК полімерази другого типу, в рідших випадках третього. Генетична послідовність більше половини відомих на сьогодні мікро РНК розміщена в вже відомих білок-кодуючих генах, менша кількість зустрічається в інтронах і в вигляді виключення послідовності можуть розташовуватись поодинокі. Часто мікро РНК транскрибується довгими транскриптами - так званими кластерами розміром до 4 тисяч нуклеотидів. Якраз за відношенням до певного кластеру їх і класифікують [35]. Дослідники виділяють 2 шляхи синтезу мікро РНК: канонічний і неканонічний.

Канонічний шлях відповідає за синтез більшості мікро РНК в клітині. Після транскрипції з ДНК формується про-мікро РНК, яка є 2 ланцюговою і має специфічну структуру - шпильку. Також одразу після трансляції в послідовності присутній кеп на 5' кінці та полі А хвіст на 3' кінці. Шпилька розпізнається спеціальним білковим комплексом Drosha та DGCR8 (**D**i **G**eorge **c**ritical **r**egion **8** – білок, що відповідає за зв'язування дволанцюгові РНК), від молекули відрізається кеп та полі А хвіст, з утворенням пре-мікро РНК, що експортуються в цитоплазму. Пре мікро РНК в середньому складається з 70 нуклеотидів. Вихід з ядра забезпечується спеціалізованим білком - експортином-5. Він є Ran-ГТФ-залежним протеїном. Після розпізнавання 2 нуклеотидного виступу на кінці пре-мікро РНК Експортин-5 приєднує її до себе. В цитоплазмі пре-мікро РНК сполучається з комплексом DICER який розрізає кінцеве кільце. Таким чином з 1 про-мікро РНК утворюється 2 молекули мікро РНК а саме: 5' і 3'. Ці позначення відповідають тому кінцю про-мікро РНК на якому знаходилась мікро РНК до дозрівання. Після цього мікро РНК зв'язується з білками з утворенням комплексу (Рис.1.4.) [36, 37].

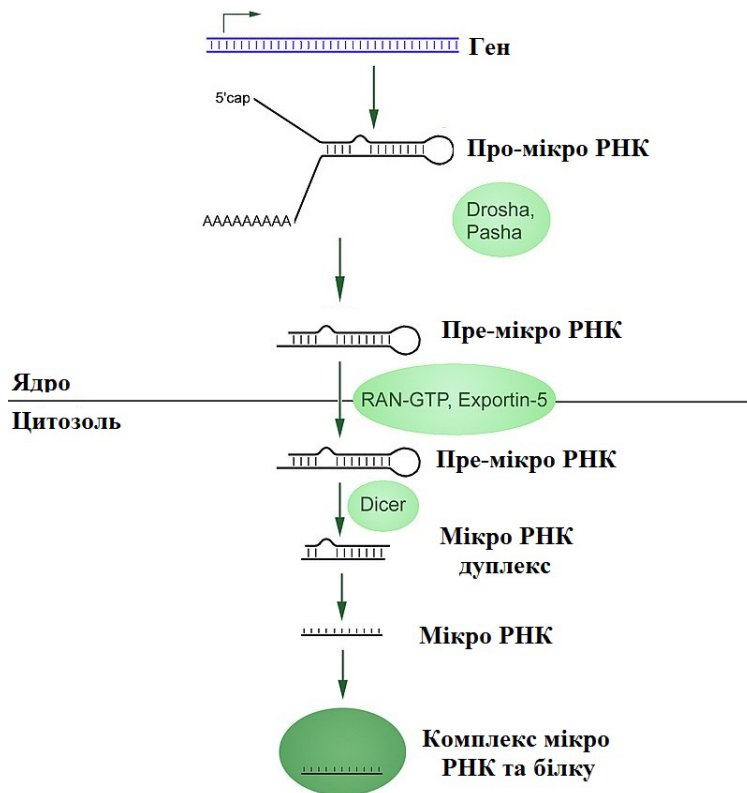


Рис.1.3. Канонічний шлях дозрівання мікро РНК [38].

Неканонічні шляхи синтезу РНК відрізняються тим, що можуть бути незалежними від певних білків канонічного шляху. Найбільш дослідженим є шлях синтезу мікроРНК з інтронів після сплайсингу.

Більшість сучасних досліджень вказує на те, що мікро РНК зв'язуються з специфічною послідовністю - мішенню в 3' нетрансльованій ділянці цим самим індукуючи репресію трансляції і руйнацію матричної РНК [39]. Проте літературні дані також вказують на те, що мікро РНК можуть приєднуватись до матричної РНК і в інших ділянках, що спричиняє такий самий ефект [40]. Вважається, що процес взаємодії мікро РНК з матричною РНК відбувається після завершення трансляції, хоча деякі дослідження довели, що вони можуть взаємодіяти і під час неї [41]. Увесь функціонал мікро РНК реалізується у комплексі з білком AGO(Argonaute), що входить в комплекс RISC. AGO зв'язується з кепом за рахунок спеціалізованого домену, що структурно дуже подібний до фактору ініціації трансляції еукаріот. В свою чергу мікро РНК зв'язується з комплементарною їй ділянкою матричної РНК. Інгібування процесу трансляції при цьому варіанті взаємодії відбувається за рахунок

закриття точки приєднання матричної РНК до трансляційного апарату. При альтернативному шляху інгібування взаємодії між AGO та кепом не відбувається. Здебільшого така інактивація відбувається у тих матричних РНК, що вже почали транслюватись [42,43].

Для більш зручного визначення потенційного впливу мікро РНК на функціонування клітини було введено поняття MRE (**miRNA response elements dose**) дози елементів взаємодії мікро РНК. Це поняття описує кількість потенційних точок взаємодії усіх активних центрів мікроРНК з усіма іншими РНК. Так в дослідженнях зустрічались мікро РНК з мінімальною дозою - 1 точкою взаємодії, і з багатьма точками взаємодії у різних матричних РНК [47].

У живій клітині більшість зв'язків матричної РНК з мікро РНК є не повністю комплементарними. Досліджено, що більшість мікро РНК мають спеціальні регіони не відповідності, що при зв'язуванні з матричною РНК утворюють шпильку. Ця шпилька запобігає ендонуклеазній активності білкуAGO [42].

Окрім сайленсингу генів мікро РНК здатні і активувати трансляцію деяких з них. На сьогодні точний механізм досі не описано, проте існують експериментальні підтвердження цієї теорії [44]. Короткі мікро РНК здатні проходити в ядро і там впливати на структуру хроматину зв'язуючись з ДНК. Також існують дослідження, що вказують на можливу участь мікро РНК у процесах метилювання ДНК [45].

Мікро РНК можуть локалізуватись у будь-яких компартментах клітини, від ядра до лізосом [46]. Пул мікро РНК в клітинах різних типів є так само специфічним як і пул довгих некодуючих РНК. Виявилось, що для клітин певного типу властива експресія свого унікального коду мікро РНК в значних кількостях, всі інші мікро РНК властиві організму також експресуються, але в значно менших кількостях [34]. Саме через це їх розглядають як потенційні біомаркери.

1.2.3. Довга некодуюча РНК PANDAR. PANDAR (promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA) - це довга некодуюча РНК, що була описана в 2011 році і зараз ретельно досліджується. В довжину складає 1506 нуклеотидів. Ген, що її кодує локалізований на 6p21.2 ділянці геному а саме в гені CDKN1A. Зчитується вона в негативному напрямку [48]. В процесі синтезу PANDAR не піддається сплайсингу, має полі А хвіст та кап на 5' кінці. Досліджено, що експресія цієї РНК активується в процесі відповіді клітини на пошкодження ДНК за рахунок роботи p53 [49]. Досліджено, що PANDAR є прямим антагоністом CDKN1A таким чином регулюючи його активність. Основний функціонал PANDAR полягає в тому, щоб інгібувати перехід клітини до сенесцентного стану. Це відбувається за рахунок зв'язування PANDAR з промоторними ділянками генів, що відповідають за цей перехід. У деяких роботах доведено, що збільшена експресія PANDAR індукує епітеліально-мезенхімальний перехід що відповідає за злоякісне переродження клітини. Через значну довжину цієї РНК та комплексність регулювання її синтезу досі недостатньо досліджені можливі точки взаємодії з клітинним апаратом. На сьогодні описані виключно взаємодії з ДНК та білками, проте взаємодії з іншими РНК ще не досліджені [50-53].

У багатьох дослідженнях показано, що у багатьох пухлин різного походження експресія PANDAR значно збільшена і саме це при типуванні пухлин вказує на поганий прогноз у лікуванні. Збільшена експресія PANDAR часто пов'язана з здатністю пухлини до метастазування [51,54].

Наукова спільнота сходиться в думці про те, що PANDAR відіграє критичну роль у розвитку раку і може слугувати потенційним біомаркером для виявлення патології. Окрім цього враховуючи функції цієї довгої некодуючої РНК та її не досить досліджений проте уже широкий спектр взаємодій її розглядають як потенційну мішень для лікування онкології [51, 52, 54].

1.2.4. Довга некодуюча РНК BC200. BC200 (**B**rain **C**ytoplasmic **200** RNA) вперше була відкрита в 1987 році. Вона складається з 200 нуклеотидів, має 5' Alu домен, внутрішній збагачений аденіном домен та специфічний 3' полі С хвіст. За рахунок наявності Alu домену, що утворює вторинні структури ця РНК добре піддається направленому транспорту. Кодується геном BCYRN1, що знаходиться на хромосомі 2p16 [55]. Ген має спеціальні регулятивні домени такі як: 2 визначених домени для транскрипційних факторів, ТАТА-бокс та сусідні регуляторні ділянки позитивного та негативного сенсу, що дозволяє клітині чітко контролювати його експресію. Синтезується в основному за рахунок роботи ДНК залежної РНК полімерази третього типу [55, 56].

В нормі ця РНК експресується виключно в нейронах де регулюють процеси трансляції. Після експресії вони швидко пересуваються в дендрити. В основному збільшення кількості цієї РНК послаблює процеси трансляції за рахунок її здатності зв'язуватись з ферментами, що за них відповідають. На сьогодні добре досліджена її взаємодія з факторами ініціації трансляції такими як: PABP (**p**oly **A**binding **p**rotein), eIF4A (**e**ukaryotic translation **i**nitiation **f**actor **4A**) та eIF4B. Такі взаємодії результують у нейроні пластичність [55, 57].

Окрім своєї нормальної нейронної функції вона може відігравати значну роль у розвитку пухлин. Дослідження показали, що у багатьох видів пухлин дуже посилена експресія BC200. В багатьох роботах показано, що BC200 значно сильніше експресується у пухлинах які здатні метастазувати. Показано, що BC200 взаємодіє з матричними РНК багатьох білків що виконують функцію інгібування поділу і міграції клітин та індукування апоптозу [55, 58].

Саме через те, що в нормі ні в яких клітинах окрім нейронів BC200 не експресується а при онкологічних станах її концентрації сильно зростають її розглядають як потенційний біомаркер. Окрім цього її активна участь у процесах метастазування та інвазії роблять її перспективною мішенню для

лікування та типування пухлин. Хоч взаємодії з матричними РНК та білками досить досліджені здатність BC200 впливати на мікроРНК ще не достатньо вивчена [59, 60].

Некодуючі РНК мають колосальний вплив на регуляцію процесів в клітині. Лише за оптимального балансу вони можуть оптимізувати її роботи, проте при втраті цього балансу відіграють значну роль у розвитку патологічних станів. Більшість досліджень сьогодні сфокусована на визначенні взаємодії некодуючих РНК з ДНК або білками, проте вони оминають великий локус знань який полягає у взаємодії некодуючих РНК з некодуючими РНК [55, 60]. Знання цих взаємодій є критичним для розуміння динаміки розвитку патологічних станів а як наслідок для формування новітніх методів їх лікування та аналізу.

1.3. Шляхи поширення некодуючих РНК

Хоч некодуючі РНК здебільшого знаходяться в клітині, все більше досліджень вказує на те, що вони можуть з неї виходити. В 2008 році вперше довели, що некодуючі РНК можуть знаходитись в крові і на той момент це асоціювали з патологічним станом, проте з проведенням більш ретельних досліджень виявилось що і за нормального функціонування організму некодуючі РНК можуть циркулювати по кровообігу [61, 62, 63]. З часом виявилось, що майже з усі типи клітин продукують та виділяють некодуючі РНК в міжклітинний матрикс з якого вони вже можуть потрапляти до інших біологічних рідин. До останнього часу вважалось, що цей процес обумовлений тим, що клітини просто позбуваються непотрібних молекул викидаючи їх з себе, але роботи за останні 3 роки показали, що скоріше за все певна частина цих РНК відіграє роль у міжклітинному сигналюванні. З моменту відкриття у 2008 році позаклітинні некодуючі РНК виявили в усіх біологічних рідинах. Багато досліджень вказують на те, що склад позаклітинних РНК за патологічних станів відрізняється від складу здорових

людей, з чого зробили висновок, що виділення некодуючих РНК з клітини не є випадковим, а є направленим та регульованим [63, 64].

Вважається, що найбільш стабільною та інформативною фракцією позаклітинних некодуючих РНК є мікро РНК. Саме через це багато досліджень сфокусовано на розробку діагностичних систем спрямованих на визначення їх вмісту.

Позаклітинні РНК відрізняються від клітинних неймовірною стабільністю за різноманітних умов. Дослідники визначили, що вони не піддаються дії позаклітинних РНКаз, нормально реагують на зміни рН і температури, та можуть зберігатись в розчині без пошкоджень аж до 4 діб за кімнатної температури. Проте вони руйнуються при дії протеїназ та детергентів, що може вказувати на те, що поза клітиною вони знаходяться у комплексі з білком або в везикулах. При ретельному дослідженні можна визначити, що вони є дуже інформативними і мають потенціал у використанні в якості біомаркерів [65, 66].

На сьогоднішній день відомо декілька механізмів виділення некодуючих РНК з клітини. Основним механізмом є спрямована секреція. Також нещодавно визначили, що некодуючі РНК можуть виділятись з клітини у везикулах. Вони можуть потрапляти в позаклітинний простір при руйнації клітини - особливо в випадках апоптозу який асоційований з утворенням везикул - апоптичних тілець[62, 67].

1.3.1. Секреція некодуючих РНК в складі везикул. Зараз відомо, що позаклітинні везикули виробляються усіма без винятку клітинами нашого організму. Це крихітні - розміром від 30 до 5000 нм - структури, в яких знаходяться функціональні ліпіди, білки і РНК. Вміст цих структур оточений двошаровою ліпідної оболонкою, яка є похідною клітинної мембрани. В цій мембрані наявні інтегровані протеїни з поверхні клітини продуцента, та спеціалізовані білки, що наявні виключно у везикул. Ці спеціалізовані білки відповідають за подальше зв'язування везикули з клітиною реципієнтом.

Також в мембрані усіх везикул наявні білки - транспортери специфічні саме для цих структур [67].

Дослідження 2008 року довело, що додавання певних везикул з некодуючими РНК може впливати на метаболізм та життєдіяльність культури. Це було перше дослідження, що довело роль везикул та некодуючих РНК в них у міжклітинному сигналінгу [68].

Класифікація позаклітинних везикул базується на їх походженні і на їх розмірах. Так, екзосоми зазвичай варіюють в розмірі від 30 до 100 нм, утворюються в мультивезикулярних тільцях. Мікровезикули варіюють від 100 до 1000 нм проте формуються шляхом простого відокремлення від клітинної мембрани і виходять в позаклітинний простір. Апотільця здебільшого більше 1000 нм, вони є клітинними фрагментами, що утворюються в результаті апоптозу [69]. Протягом десятиліть переважала думка, що для клітин позаклітинні везикули - всього лише спосіб позбутися від внутрішньоклітинного сміття. Проте зараз дослідження вказують на їх грандіозну функціональну роль у міжклітинному сигналюванні. За рахунок везикул клітини можуть передавати сигнали як сусіднім клітинам, якщо везикули мігрують виключно через міжклітинний матрикс, або віддаленим клітинам, якщо везикули потрапляють у систему циркуляції крові або лімфи.

Дослідники визначили, що клітини можуть наведено накопичувати некодуючі РНК у везикулах перед їх від'єднанням, проте механізм за рахунок якого це відбувається поки не досліджений [70].

1.3.2. Спрямована секреція некодуючих РНК. Раніше дослідники вважали, що секреція некодуючих РНК відбувається здебільшого за рахунок везикул, проте дослідження 2011 року визначило, що близько 90% некодуючих РНК виділяється з клітин в комплексі з білками [71]. Більшість з досліджених некодуючих РНК у позаклітинному стані знаходяться у комплексі з AGO. Також існують свідчення виходу некодуючих РНК з клітини у складі ліпопротеїнів високої щільності (Рис 1.4.) [69, 72].

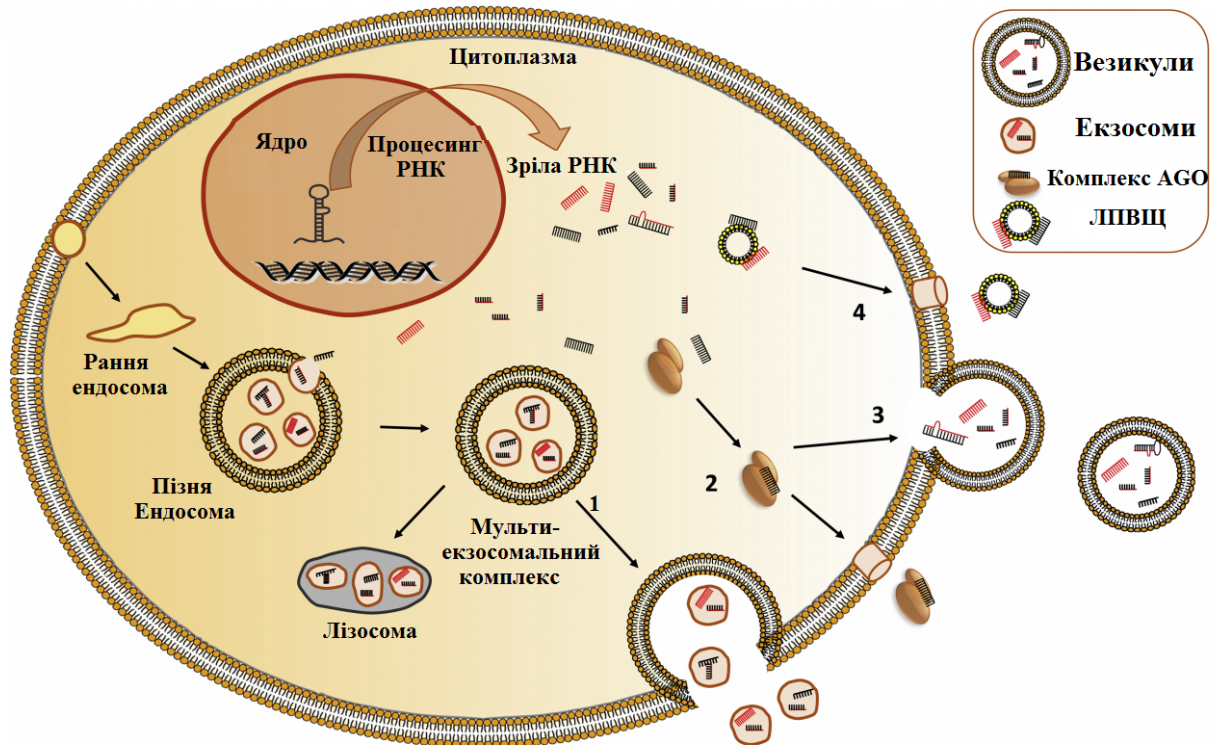


Рис.1.4. Шляхи виділення некодуючих РНК з клітини [69].

1 - виділення через екзосоми, 2 - виділення у комплексі з білком, 3- виділення в складі везикули, 4- виділення у складі ліпопротеїнів високої щільності.

Так як некодуючі РНК можуть потрапляти у біологічні рідини і залишатись там певний час не втрачаючи своєї цілісності їх можна ефективно застосовувати в якості біомаркерів. Наша лабораторія працює над розробкою діагностичних наборів, які здатні визначати вміст певних некодуючих РНК в сечі. Цей метод лімітований тим, що можливо типувати та аналізувати виключно біомаркери пухлин сечостатевої системи, проте він є не інвазивним.

1.4. Біомаркери пухлин

Біомаркер - це певний вимірюваний індикатор, який може вказувати на певний біологічний стан. Використання молекулярних біомаркерів для діагностики це новітній метод в медицині і для багатьох патологічних станів

він є революційним. Через його новизну він є досі не достатньо розробленим для впевненого масового медичного застосування. Хоча певні біомаркери вже використовують у діагностиці, більшість з розроблених систем досі знаходиться на етапі клінічних досліджень [62].

Біомаркером при онкології здебільшого є якась молекула, що продукується пухлиною, або в рідших випадках молекули які тіло продукує у відповідь на появу пухлин. До нещодавна біомаркерами вважали виключно білки, але після відкриття некодуючих циркулюючих РНК багато дослідників почали працювати саме з ними. Протягом певного часу виявилось, що за певних патологій некодуючі РНК можуть слугувати більш ефективними біомаркерами ніж білки [62, 73].

Основним вектором застосування біомаркерів є діагностика. Хоча на цьому імплементації не завершуються. За останні 5 років сильно розвинувся напрямок типування пухлин. Виявилось, що в 90% випадків пухлини різного походження можна класифікувати за їх молекулярним складом. Завдяки точному типуванню пухлини можливо розробити найбільш ефективний план хіміотерапії. Також за рахунок детального типування можливо передбачити динаміку росту та розвитку пухлини, її інвазивний потенціал та здатність до метастазування [62, 74].

Основним плюсом використання біомаркерів є можливість виявлення злоякісних утворень до появи клінічних симптомів [75]. На ранніх стадіях пухлини добре піддаються лікуванню. Результатом розробки систем скринінгу на рак грудей є вагоме зниження летальності від цієї патології у розвинених країнах. Пухлини сечостатевої системи виділяються довгим періодом безсимптомного розвитку, що посилює потребу людства у розробці методів ранньої діагностики цих захворювань.

Деякі дослідники вважають, що на сьогодні процвітає не правильний метод пошуку біомаркерів. Основою для більшості пошуків є аналіз вмісту біологічних рідин чи біопсій у хворих та у здорових людей. При їх порівнянні дослідники намагаються статистично визначити різницю в

концентраціях певних речовин у цих зразках. Таким чином було виявлено декілька дієвих біомаркерів, таких як PSA (**P**rostate **S**pecific **A**ntigen) або CEA (**C**arcinoembryonic antigen), проте більш ефективним методом виявлення біомаркерів є фундаментальні дослідження та комп'ютерне моделювання [76].

1.4.1. Некодуючі РНК як біомаркери пухлин. Незважаючи на раніше переважаючу думку, що некодуючі РНК є просто побічними продуктами клітинного пошкодження та апоптозу без реальних біологічних функцій, з'являється все більше доказів, що вивільнення некодуючі РНК у позаклітинне середовище є регульованим процесом і некодуючі РНК можуть представляти собою сигнальні молекули, що мають певну роль у клітинно-клітинному зв'язку [62, 77].

Оскільки виявлено, що клітинні некодуючі РНК беруть участь у регулюванні різноманітних фізіологічних та клітинних процесів, їх абераційна експресія потенційно вказує на можливе порушення регуляції та захворювання, такі як рак. Фактично, доведено, що ряд некодуючих РНК розташований у вразливому фрагменті ДНК, експресія якого асоційована з розвитком онкології. Некодуючі позаклітинні РНК - це субпопуляція клітинних некодуючих РНК, тому логічно думати, що вони також можуть представляти стан клітини. Багато досліджень продемонстрували зв'язок раку та дисрегульованої експресії некодуючих РНК які виявляли у біологічних рідинах [77,78].

На сьогоднішній день існує велика кількість досліджень, що сфокусовані на розробці нових молекулярних біомаркерів для різноманітних типів раку. Вже існують молекулярні маркери на основі некодуючих РНК, з точністю більше 90% [79]. Проте дослідження біомаркерів пов'язаних с патологіями сечостатевої системи поки не дали таких гарних результатів. Саме через це для більш точного та комплексного аналізу розробляються тест системи на основі кількісної ПЛР. В цих системах аналізують співвідношення багатьох некодуючих РНК для отримання більш точного діагностичного результату.

Основним плюсом використання молекулярних біомаркерів є можливість проведення скринінгу населення, так як ця діагностика не потребує інвазивних методів.

Доведено, що мікро РНК мають більшу клітинну специфічність ніж довгі некодуючі РНК, проте участь у розвитку пухлин для довгих некодуючих РНК досліджена краще. Знаючи як взаємодіють довгі некодуючі РНК нашого інтересу з мікро РНК ми дізнаємось більше про механізми їх роботи при розвитку раку, але окрім цього можливо буде спланувати діагностичний набір на основі довгих некодуючих РНК та мікро РНК, який буде значно точнішим за існуючі аналоги.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В зв'язку з малодослідженістю цієї теми експериментальним лабораторним шляхом та відсутністю літературних даних дослідження потребує біоінформатичного аналізу. Дослідження має проводитись з використанням багатоетапного аналізу, що краще виконувати використовуючи різні доступні на сьогодні методи. Відповідно до поставлених завдань було вирішено розпочати з визначення мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR та BC200. Після отримання та групування цих результатів провести літературне дослідження ролі та функцій передбачених мікро РНК, за відсутності літературних даних провести додаткове передбачення можливих функцій мікро РНК.

За отримання достатньо вірогідних результатів їх можливо буде імплементувати у фундаментальних дослідженнях механізмів розвитку онкологічних захворювань, у розробці препаратів для лікування патологічних станів та у розробці діагностичних тест систем з більшою точністю.

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження є мікро РНК, що здатні взаємодіяти з PANDAR та BC200. У результаті дослідження ми маємо визначити найбільш імовірні мікро РНК, що можуть взаємодіяти з довгими некодуючими РНК інтересу та відігравати роль у розвитку раку нирок, сечового міхура та передміхурової залози.

2.2. Методи дослідження

До початку дослідження була проведена робота з літературними даними та розробка схеми роботи відповідно до її завдання. Після опрацювання робіт, що мали схожий вектор досліджень була створена схема експерименту [80, 81, 82,83].



Рис.2.1. Схема роботи

Першим етапом у дослідженні є передбачення мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR та BC200. Це реалізується за рахунок аналізу з використанням декількох алгоритмів передбачення, що є у відкритому доступі. Отримані результати порівнюються і виділяються мікро РНК які мають найбільшу імовірність взаємодіяти з довгими некодуючими РНК. Після цього проводиться робота з літературними даними по пошуку робіт, що описують участь цих мікро РНК в розвитку раку. За наявності таких робіт мікро РНК включається в остаточні результати. За відсутності проводиться передбачення взаємодії мікро РНК з генами, для визначення генів на експресію яких можуть впливати дані мікро РНК. Отримані гени перевіряються по базі даних COSMIC [84], що зберігає усі гени участь яких показана при розвитку пухлин. Якщо результат позитивний мікро РНК включається в остаточні результати. За негативного результату мікро РНК відсіюється.

2.3. Передбачення мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR та BC200

Це перший етап дослідження. Для його реалізації проводились пошуки існуючих алгоритмів в відкритому доступі, що мали відповідати таким параметрам: можливість аналізу баз даних, термодинамічне моделювання сайтів зв'язування, отримання результатів у вигляді імовірності зв'язування мікро РНК довгою некодуючою РНК інтересу [80].

Для ґрунтового дослідження усіх можливих мікро РНК, що здатні взаємодіяти з довгою некодуючою РНК інтересу алгоритм має мати доступ до бази даних усіх відомих мікроРНК людини. Термодинамічне моделювання сайтів зв'язування надає більш вагомі результати при аналізі взаємодій нуклеїнових кислот, саме з потребою отримання найбільш вагомих результатів цей фактор був виділений як критерій вибору алгоритму. Отримання результатів у вигляді імовірності має надати можливість порівняти результати отримані різними алгоритмами для виділення з усіх передбачених мікро РНК тих, що з найбільшою вірогідністю зможуть взаємодіяти з довгою некодуючою РНК інтересу [80,82].

Через новизну досліджень у цьому напрямку існує мала кількість алгоритмів для аналізу, більшість з яких досить знаходиться у розробці. Аналіз взаємодії мікро РНК з довгими некодуючими РНК - новітній метод досліджень, що може покращити розуміння процесів в клітині в яких задіяні довгі некодуючі РНК.

Провевши роботу з літературою було виділено групу алгоритмів кандидатів, що могли б задовільнити параметри інтересу. Перед проведенням експерименту ми аналізували параметри алгоритмів та їх можливості на відповідність до встановлених раніше умов.

2.3.1. Передбачення мікро РНК з використанням TargetScan. Здебільшого цей алгоритм використовують для передбачення взаємодій мікроРНК у хребетних тварин. За основ аналізу в цьому алгоритмі

використовується процес локального вирівнювання. Під час цього процесу послідовності діляться на фрагменти, що перевіряються на здатність до взаємодії. Після цього вирівнювання алгоритм здатний виділити ті сайти цільової довгої некодуєчої РНК до яких може приєднуватись активний цент мікроРНК. При проведенні розрахунків алгоритм будує термодинамічну модель взаємодії РНК з урахуванням вторинних структур. Після проведення аналізу для кожного передбаченого РНК дуплексу виводиться його імовірність. За рахунок отримання імовірності можна виділити групу РНК, що є найбільш перспективними для подальшого аналізу. На сайті ресурсу вказано, що алгоритм здатний працювати з базою даних Ensembl, яка включає в себе більшість досліджених та передбачених мікроРНК людини. Алгоритм відповідає усім попередньо сформованим вимогам і через це ми приступили до тестового аналізу взаємодій [85, 86].

На жаль при використанні алгоритму виявилось, що він мав доступ до бази даних Ensembl 75 видання, хоча на момент проведення аналізу існувало 100 видання цієї бази даних. Через відсутність контролю за функціонуванням відкритого алгоритму та відсутності його оновленої версії з невідомих причин його подальше використання в проведенні есперименту є неможливим.

2.3.2. Передбачення мікро РНК з використанням DIANA. Цей комплекс включає в себе групу алгоритмів одним з яких є алгоритм передбачення взаємодії довгої некодуєчої РНК з мікро РНК. Він представлений на різних ресурсах і постійно оновлюється. Основною особливістю цього алгоритму є побудова термодинамічної моделі взаємодії з наступною її візуалізацією. Також при роботі з цим алгоритмом можна одразу порівнювати свої результати з літературними даними щодо експресії мікро РНК та довгих некодуєчих РНК у різних тканинах. На офіційному сайті алгоритму вказана інформація про наявність доступу до декількох баз даних мікроРНК та довгих некодуєчих РНК, що накопичили в собі більше 500 000 сиквенсів. Алгоритм в результаті своєї роботи надає інформацію що

до імовірності взаємодії передбачених мікро РНК з довгими некодуючими РНК інтересу. За попереднім аналізом різних платформ розміщення алгоритму виявилось, що він повністю відповідає параметрам сформульованим перед початком роботи [87, 88].

При спробі працювати з обраним алгоритмом виявилось, що на більшості доступних платформ хоч і існує доступ до бази даних мікро РНК, можливо провести передбачення взаємодій лише для обраних з цієї бази мікро РНК. Через наявність в базі 500 000 сиквенсів вибір окремих для аналізу є фізично неможливим. Було знайдено альтернативну платформу яка має можливість провести аналіз з використанням даного алгоритму усіх наявних в базі даних мікро РНК. Проте при спробах провести аналіз виявилось що в коді існують технічні проблеми. Для їх вирішення потребувалось зв'язатися з головним офісом платформи де нам повідомили, що її функціонування припинене з 2019 року [89]. Саме через це використання цього алгоритму для передбачення виявилось неможливим.

2.3.3. Передбачення мікро РНК з використанням miRanda. Цей алгоритм є відносно старим, проте досі використовується в деяких дослідженнях. На сьогоднішній день цей алгоритм має доступ до баз даних мікро РНК таких видів як: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Drosophila melanogaster* та *Caenorhabditis elegans*. Він є менш точним за аналоги, проте також враховує термодинамічну модель взаємодії. Особливим є те, що він може визначати більш короткі ділянки взаємодії ніж інші алгоритми. В результатах після аналізу також вказується імовірність цих взаємодій, що дозволяє виділити з результатів найкращі [90].

На різноманітних платформах наданий відкритий доступ до алгоритму, проте використовувати його можна виключно при введенні мікро РНК в ручну. Це унеможливорює метааналіз усіх можливих РНК. На платформі Omictools наявний алгоритм, який має прямий доступ до бази даних, проте платформа є платною [89]. Заяву на тимчасове її використання в цілях

навчання не підтвердили, тому ми не отримали доступ до алгоритму, що діє у купі з базою даних.

Окрім перерахованих вище алгоритмів розглядалися також такі як: NONCODE, LncTar, StarBase 2.0, LncMAP, NPInter 3.0, DeepBase v2.0, LncReg, RNAhybrid, GenCode. Проте вони були відсіяні до етапу проведення експерименту, через різноманітні причини або невідповідність раніше сформованим параметрам цільового алгоритму.

Після невдачі на цьому етапі було вирішено змінити схему експерименту.

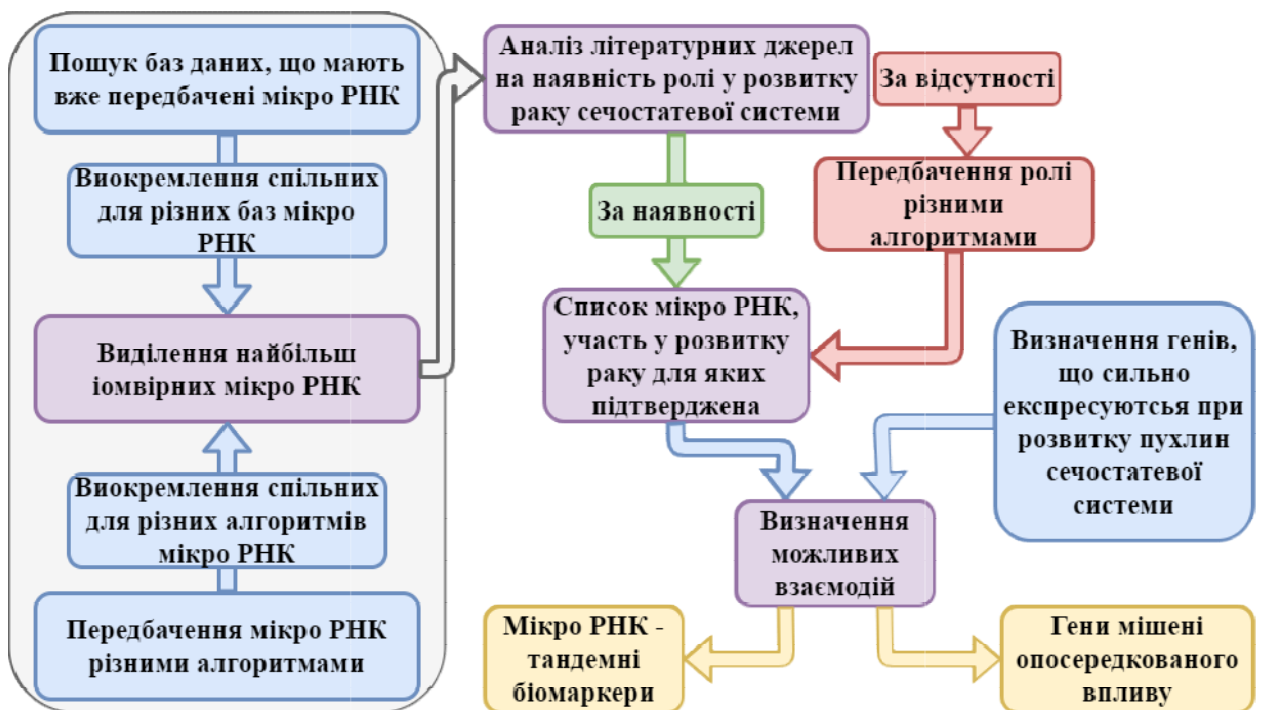


Рис. 2.2. Друга версія схеми роботи.

2.4. Пошук передбачених мікро РНК в базах даних

Починали аналіз з перевірки існуючих баз даних мікро РНК, яких в вільному доступі виявилось багато. Хоч їх і існує значна кількість в них немає інформації щодо взаємодії з довгими некодуючими РНК. Усі механізми взаємодії сфокусовані на мРНК або білках. Це ще раз доводить новітність досліджуваної теми.

Другим етапом був аналіз існуючих баз даних довгих некодуючих РНК. Як виявилось у відкритому доступі знаходяться здебільшого лише бази, що вже певний час не піддаються модерації. При аналізі найбільш розвинених та популярних серед дослідників баз виявилось, що більшість з них не має інформації щодо взаємодії з матричними РНК. В дослідженні використовувались такі бази як: GENCODE, NONCODE, LncRNASNP2, DIANA-LncBase, LncDisease, deepBase, LncRNAWiki, LncBook, LNCipedia, lncRNome, CLC, Ensembl, NCBI, lncnamap, HGNC, EVLncRNAs, LncCeDB, LNCipedia.

З усіх вище перерахованих баз лише LncBook має інформацію щодо мікро РНК, які можуть взаємодіяти з довгою некодуючою РНК інтересу. Робота з цією базою починається з головної сторінки, на яку можна потрапити за посиланням: <https://bigd.big.ac.cn/lncbook/index>.

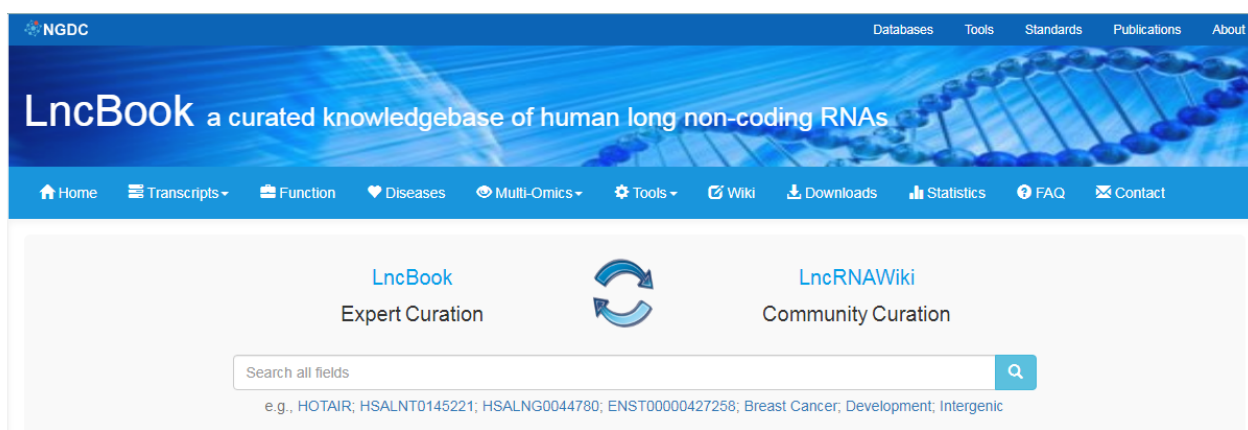
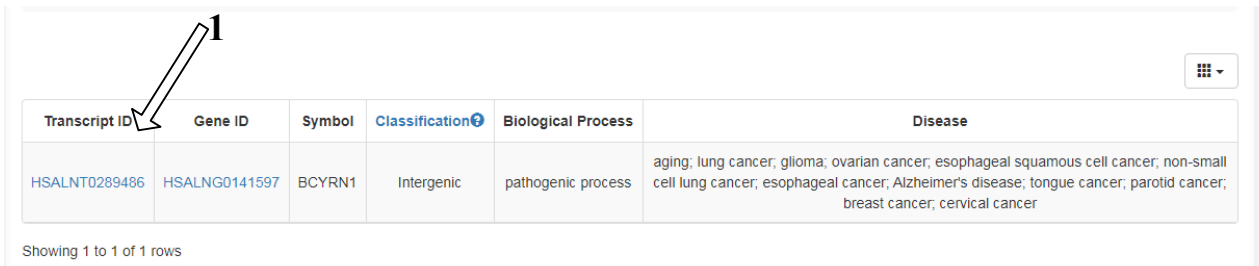


Рис. 2.3. Головна сторінка LncBook

На цій сторінці є 1 пошукове поле, яке може сприймати різноманітні типи пошукових запитів. В нашому випадку ми вводимо загально-прийняту назву довгої некодуючої РНК (Рис 2.3.). Провівши пошук ми отримуємо результати пошуку у вигляді таблиці, що включає в себе таку інформацію як: Ідентифікаційний номір транскрипту у базі, ідентифікаційний номер гену у базі, загально-прийнята назва гену, класифікацію, біологічну роль, та доведені патологічні стани в розвитку яких може приймати участь (Рис 2.4.).



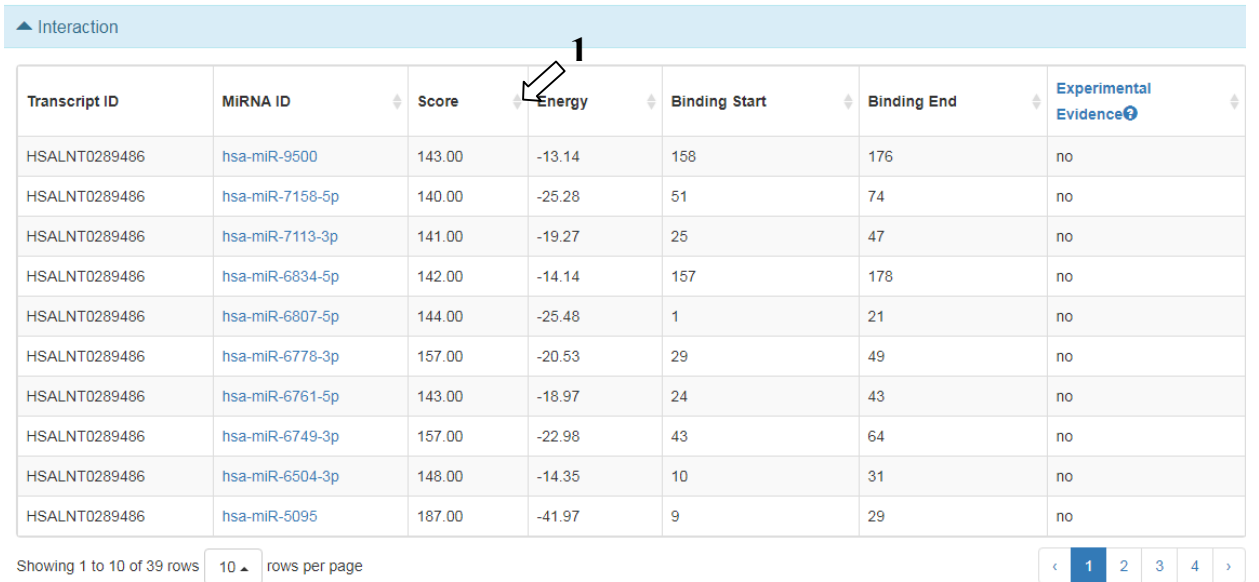
Transcript ID	Gene ID	Symbol	Classification	Biological Process	Disease
HSALNT0289486	HSALNG0141597	BCYRN1	Intergenic	pathogenic process	aging; lung cancer; glioma; ovarian cancer; esophageal squamous cell cancer; non-small cell lung cancer; esophageal cancer; Alzheimer's disease; tongue cancer; parotid cancer; breast cancer; cervical cancer

Showing 1 to 1 of 1 rows

Рис. 2.4. Результати пошуку довгої некодуючої РНК в базі: 1 - Посилання на сторінку з характеристикою довгої некодуючої РНК.

Для продовження роботи з потрібною довгою некодуючою РНК потрібно натиснути на її ідентифікаційний номер. При відкритті характеристик цікавлячої нас довгої некодуючої РНК ми отримаємо таку інформацію як: загальну характеристику та номенклатуру, сиквенс, кодуєчий потенціал, посилання на літературу, рівні експресії, рівні метилювання, варіації, взаємодії, функції, участь у розвитку патологічних станів.

Після розгорнення вкладки "Interaction" ми отримуємо інформацію щодо передбачених мікро РНК, які здатні взаємодіяти з довгою некодуючою РНК інтересу. Всі передбачені мікро РНК розташовані в таблиці, в якій також зазначена така інформація як: ідентифікаційний номер в базі даних, імовірність можливості зв'язування довгою некодуючою РНК інтересу цієї мікро РНК, енергія зв'язку, координати ділянок зв'язування (Рис 2.5.).



Interaction

Transcript ID	MIRNA ID	Score	Energy	Binding Start	Binding End	Experimental Evidence
HSALNT0289486	hsa-miR-9500	143.00	-13.14	158	176	no
HSALNT0289486	hsa-miR-7158-5p	140.00	-25.28	51	74	no
HSALNT0289486	hsa-miR-7113-3p	141.00	-19.27	25	47	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6834-5p	142.00	-14.14	157	178	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6807-5p	144.00	-25.48	1	21	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6778-3p	157.00	-20.53	29	49	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6761-5p	143.00	-18.97	24	43	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6749-3p	157.00	-22.98	43	64	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6504-3p	148.00	-14.35	10	31	no
HSALNT0289486	hsa-miR-5095	187.00	-41.97	9	29	no

Showing 1 to 10 of 39 rows 10 rows per page

Рис. 2.5. Список мікро РНК, які можуть взаємодіяти з довгою некодуючою РНК інтересу: 1 - сортування за імовірністю взаємодії.

Після отримання цієї інформації, бази даних можна відсортувати за імовірністю взаємодії. Сортуємо від більшого до меншого та експортуємо перші 50 результатів. Експортування даних треба проводити в ручну, через відсутність даної функції у базі даних. Експорт даних проводили у робочі файли формату xls [91].

Через відсутність потрібної інформації всіх інших відкритих базах даних для подальшого аналізу використовували виключно інформацію отриману з LncBook.

2.5. Визначення мікро РНК, що можуть відігравати роль у розвитку раку сечового міхура, передміхурової залози, нирок

Для визначення мікро РНК що можуть відігравати роль у розвитку раку потрібно проаналізувати літературні дані. Пошук робіт в яких згадується участь кожної з попередньо передбачених мікро РНК зайняла б неумісну кількість часу. Найбільш ефективним методом аналізу великої кількості РНК є використання існуючих баз даних. На сьогоднішній день існує безліч баз даних мікро РНК. Серед усіх наявних баз даних в першу чергу треба виділити ті, які можуть надати вичерпну інформацію щодо участі мікро РНК інтересу в розвитку пухлини [92]. Це є основним критерієм для вибору інструменту для подальшої роботи. В аналізі на відбір баз даних, що відповідають попередньо поставленим умовам ми розглянули: tools4mirs, miRCancer, OMCD, oncomir, dbDEMC 2.0, COSMIC, miRCancerdb, SomamiR DB, abcam, BioXpress, KEGG, CCDB, miREC, microRNA, microna, miRBase, miRDB, HMTA, miRmine, MIR-TV та HMDD v3.2.

З усіх обраних баз даних робочими та відповідаючими критеріям поставленим до проведення роботи виявились лише: Oncomir [93], dbDEMC [94] 2.0 та miRCancer [95]. Більшість з проаналізованих баз даних не надає вичерпної інформації з приводу ролі мікро РНК у розвитку раку. Деякі з баз були закриті, велика кількість з проаналізованих баз довгий час не

оновлювались, через що урахування їх результатів буде давати найменший практичний результат. Саме через це було вирішено виключити їх з робочого плану.

2.5.1. Визначення можливості мікро РНК відігравати роль у розвитку раку з використанням бази даних miRCancer. Ця база була створена в 2010 році і досі активно підтримується науковим товариством. В неї вносяться усі експериментальні результати досліджень профілів експресії мікро РНК у пухлинах. Усього на момент використання в базі описано близько 58 000 мікроРНК та їх ролі у розвитку раку. Останнє оновлення бази відбулося в 2019 році. Особливістю цієї бази є наявність профілю експресії мікро РНК відносно норми, що дозволяє побачити зниження експресії чи її підвищення викликає певну патологію. Враховуючи, що більшість пухлин має посилену експресію досліджуваних довгих некодуючих РНК PANDAR та BC200 в подальші результати будуть включатись виключно випадки розвитку раку при зниженні експресії аналізованої мікроРНК.

Ресурс є загальнодоступним за посиланням:
<http://mirccancer.ecu.edu/index.jsp>

При переході за посиланням потрапляємо на головну сторінку бази даних. Потрібним нам елементом на цій сторінці є поле вводу назви мікро РНК. Вводити досліджуване мікро РНК можна різними шляхами, ми будемо використовувати назву отриману з минулого етапу досліджень (Рис. 2.6.).

Search

Search for miRNA and cancer associations

miRNA name

 Example: mir-145, hsa-mir-21, let-7

☒ Or ☐ And

cancer name

 Example: lung, breast cancer

Mailing List

To get announcements about miRNA cancer database updates, new available functionality and more, please [subscribe](#) to our mailing list.

miRCancer : microRNA Cancer Association Database

miRCancer provides comprehensive collection of microRNA (miRNA) expression profiles in various human cancers which are automatically extracted from published literatures in [PubMed](#). It utilizes text mining techniques for information collection. Manual revision is applied after auto-extraction to provide 100% precision.

User can search the database by miRNA and/or cancer names in the [miRCancer Search](#) page. Our website also provides two [sequence analysis](#) tools: clustering and chi-square analysis which can perform analysis on all or selected pool of miRNA sequences.

Reference

If you make use of the information presented here, please cite the following references:

[miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature](#)
 Boya Xie; Qin Ding; Hongjin Han; Di Wu
 Bioinformatics, Vol. 29, Issue 5, pp.638-644, 2013

[Text Mining on Big and Complex Biomedical Literature](#), Big Data Analytics in Bioinformatics and Healthcare, IGI Global, 2014.
 Boya Xie; Qin Ding; Di Wu

Latest Counts

miRNA: 57984
 Cancer: 196
 miR-Cancer: 8609
 Paper: 6862

Update: May 24, 2020

News

According to [Google Scholar](#), By 2020 May, our journal paper has been cited 323 times.

The latest miRCancer data are updated with:

Literatures from PubMed (queried on May 1, 2019)

miRNA from miRBase (Release 22)

Рис. 2.6. Головна сторінка бази даних miRCancer: 1 - поле вводу назви досліджуваної РНК, 2 - кнопка початку пошуку в базі даних

Після вводу назви мікроРНК нажимаємо на кнопку пошуку. Після проведення пошуку по базі даних ми отримуємо результат у вигляді таблиці з вказаним профілем експресії відносно норми, типом раку в розвитку якого задіяна досліджувана мікро РНК та посиланням на джерело літератури (Рис. 2.7.).

Search by miRNA name:

☒ Or ☐ And

cancer name:

Search

Example: mir-145, hsa-mir-21, let-7

Example: breast cancer, lung

1

2

3

4

Search result for miRNA = 'hsa-miR-4487' and cancer = " Total: 1 relation found.

miRId	Family/Cluster	Cancer	Profile	PubMed Article
hsa-mir-4487		colorectal cancer	down	Decreased expression of fecal miR-4478 and miR-1295b-3p in early-stage colorectal cancer.

Рис. 2.7. Результати отримані в результаті використання бази даних miRCancer: 1 - ідентифікаційний номер мікро РНК в базі даних, 2 - тип раку в розвитку якого приймає участь, 3- профіль експресії в пухлині, 4 - посилання на роботу в якій це досліджено.

Отримані результати вносимо в попередньо створену таблицю, у результати включаємо виключно мікро РНК які відіграють роль у розвитку раку передміхурової залози, нирок, сечового міхура. Також не включаємо в результати мікро РНК, які мають підвищений профіль експресії за розвитку пухлин. Перевіряємо таким методом усі отримані раніше мікро РНК.

2.5.2. Визначення можливості мікро РНК відігравати роль у розвитку раку з використанням бази даних dbDEMC 2.0. Ця база даних є значно меншою за минулу, проте модерується і має деякі структурні різниці відносно miRCancer. До бази на даний момент внесено лише 2224 мікроРНК, що відіграють роль у розвитку раку. Через її малі розміри результати отримані при цьому аналізі не будуть пріоритетними у подальшому порівнянні. Ця база була створена в 2010 році і вона досі модерується. Головною особливістю є те, що в неї включають профілі експресії з різних медичних досліджень, які сфокусовані на розробці новітніх біомаркерів раку. Через це при роботі з базою можна отримати інформацію що до джерела виділення мікро РНК, як результат можна передбачити майбутнє використання перевірених мікро РНК як потенційних біомаркерів раку нирок, сечового міхура та передміхурової залози.

Цей ресурс є загальнодоступним за посиланням:
<https://www.picb.ac.cn/dbDEMC/search.html>

При переході за цим посиланням ми потрапляємо на головну сторінку. Основними потрібними елементами на цій сторінці є поле вводу досліджуваної мікро РНК та елементи керування аналізу. Для проведення аналізу потрібно ввести ідентифікаційний код або послідовність мікро РНК у форматі FASTA, також можна використовувати загальноприйняту назву мікро РНК. Після цього потрібно почати аналіз натиснувши кнопку "Submit".

Після проведення аналізу нас переносить на сторінку результатів. На сторінці результатів представлені усі типи раку на які впливає мікро РНК інтересу. Результати представлені у вигляді таблиці в якій зазначені такі параметри як: ідентифікаційний код досліджуваної мікро РНК у базі даних,

тип раку для якого показана участь досліджуваної мікро РНК, об'єкт з якого виділено мікро РНК, зміна профілю експресії відносно норми, посилання на роботу в якій це було досліджено (Рис. 2.8).

dbDEMC 2.0 A Database of Differentially Expressed miRNAs in Human Cancers (version 2.0)

Differentially Expressed miRNAs List

miRNA ID	GEO ID	Cancer Type	Cancer Subtype	Cell Line	Design	logFC	Expression Status	Experiment ID
hsa-miR-6893-5p	GSE59856	pancreatic cancer	-	-	blood	-1.36	DOWN	EXP00334
hsa-miR-6893-5p	GSE59856	biliary tract cancer	-	-	blood	-1.42	DOWN	EXP00335
hsa-miR-6893-5p	GSE59856	colon cancer	-	-	blood	-0.89	DOWN	EXP00336
hsa-miR-6893-5p	GSE59856	gastric cancer	-	-	blood	-0.76	DOWN	EXP00337
hsa-miR-6893-5p	GSE59856	esophageal cancer	-	-	blood	-1.12	DOWN	EXP00338
hsa-miR-6893-5p	GSE59856	liver cancer	-	-	blood	-1.17	DOWN	EXP00339

Page 1 Total Page:1 Total amount:6

Display 15 items per page Go!

<< | < | 1 | > >>

Рис. 2.8. Панель результатів аналізу по базі даних dbDEMC 2.0: 1 - ідентифікаційний код в базі даних Ensembl, 2 - ідентифікаційний код в базі даних dbDEMC 2.0, 3 - тип раку участь мікро РНК в якому показано, 4 - біологічний об'єкт з якого виділено мікроРНК при дослідженні розвитку раку, 5 - профіль експресії відносно норми.

Таким чином аналізуємо усі раніше отримані мікро РНК, враховуючи виключно мікроРНК у яких експресія зменшена.

2.5.3. Визначення можливості мікро РНК відігравати роль у розвитку раку з використанням бази даних OncomiR. Ця база даних має в собі багато інструментів для аналізу. Вона сфокусована на ролі мікро РНК в розвитку пухлин. Основною різницею від раніше використаних баз є використання статистичної оцінки методом Ст'юдента при порівнянні профілів експресії мікро РНК в пухлинах та нормальних тканинах. Позначення log2 вказує на те, що мікро РНК експресується як при патологічних станах так і в нормальних тканинах. Перед проведенням аналізу можна налаштовувати статистичну значущість бажаних результатів, що значно оптимізує процес аналізу. База працює з 2014 році і досі модерується.

База і інструменти для аналізу наявні в ній є загальнодоступними за посиланням: http://www.oncomir.org/oncomir/search_miR_tumor.html

Для початку роботи, після входу на головну сторінку треба обрати бажаний метод аналізу. В нашому випадку це 2 методи, а саме: "Tumor Development" - що дає можливість визначити вплив мікро РНК на розвиток пухлини та "Tumor Stage and Grade" - що слугує свого роду базою для порівнянь результатів тесту на біомаркери, при визначенні стадії розвитку пухлини. Для початку роботи обираємо пункт "Tumor development" Та в відкрите поле "Input miRNA using full 3p/5p name" вводимо загальноприйняту назву мікро РНК інтересу. Після цього обираємо статистичну значущість - в нашому випадку $P < 0.05$, для отримання найбільш вірогідних результатів аналізу (Рис. 2.9).

Рис. 2.9. Стартова сторінка бази даних OncomiR з відкритим інструментом "Tumor Development": 1 - поле для вводу загальноприйнятої назви мікро РНК, 2 - Поле для введення очікуваної статистичної значущості результатів, 3 - кнопка початку аналізу.

Після проведення аналізу нас перенаправляє на сторінку результатів. Результати представлені в вигляді таблиці. В таблиці наведені такі дані: ідентифікаційний код мікро РНК, тип раку в розвитку якого приймає участь, статистична імовірність результатів, рівень експресії в пухлині, рівень експресії в нормі (Рис.2.10.).

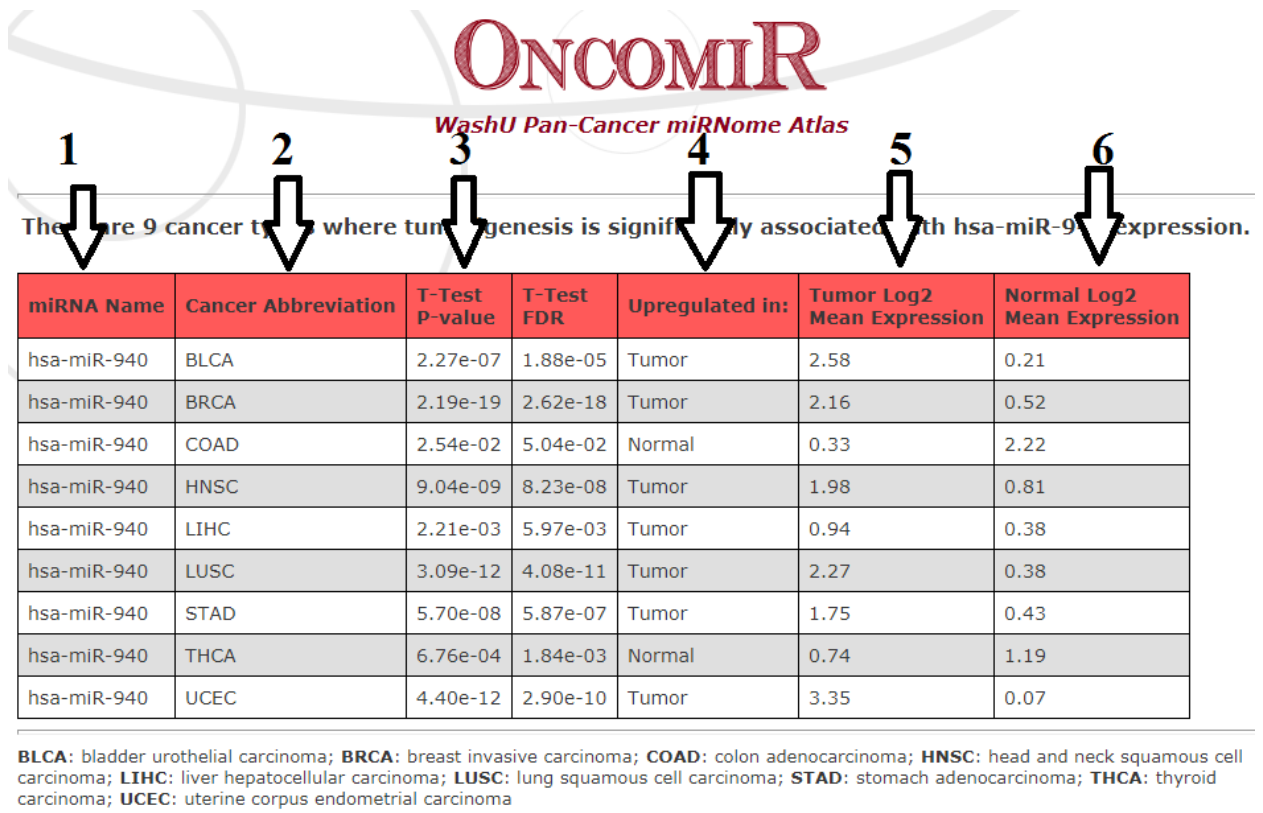


Рис. 2.10. Результати проведення аналізу в базі даних OncomiR: 1 - загальноприйнята назва мікроРНК, 2 - тип раку участь в розвитку якому показана, 3 - статистична імовірність результатів, 4 - тканина з якої виділено мікро РНК у дослідженні, 5 - рівень експресії в пухлині, 6 - рівень експресії в нормальній тканині.

Після проведення аналізу беремо до уваги виключно результати, що стосуються досліджуваних пухлин. Таким чином перевіряємо усі отримані в попередніх етапах мікро РНК.

2.5.4. Зведення результатів порівняння з усіх баз даних. Результати зводимо в таблицях в форматі xls. Через різницю між базами та інструментами які вони мають було вирішено не надавати жодній з баз найвищого пріоритету. Так як дані в базах отримані з реальних експериментів, а література що наявна в базах відрізняється було вирішено включати в остаточні результати усі отримані свідчення про участь мікро РНК у розвитку раку передміхурової залози, нирок та сечового міхура.

2.6. Передбачення генів які відіграють роль у розвитку раку

Після минулих етапів аналізу ми змогли виділити мікро РНК які точно відіграють роль у розвитку раку сечостатевої системи. Для визначення їх ролі в розвитку пухлин треба дослідити їх функції та можливі взаємодії в клітині. В випадку розвитку раку сечостатевої системи, через збільшення концентрації довгих некодуючих РНК інтересу концентрація мікро РНК, що з ними взаємодіють падає. Основною функцією мікро РНК є інгібування експресії певних генів, якщо концентрація мікро РНК в клітині падає, то ген мішень має сильніше експресуватись. Через відсутність прямих інструментів визначення потрібно було розробити альтернативні схеми дослідження. Задля оптимізації пошуку було вирішено визначити, які гени починають експресуватись сильніше за розвитку певної паталогії і далі проаналізувати можливість їх взаємодії з попередньо передбаченими мікро РНК. Після виявлення найбільш можливих генів - мішеней передбачених мікро РНК визначити їх функцію в клітині використовуючи наявні бази даних.

На сьогоднішній день існують відкриті бази даних, які надають інформацію щодо генів, які відіграють роль у розвитку раку. Також існують інструменти та алгоритми, які дають можливість передбачити участь певного гену у розвитку раку з певною імовірністю. Задля отримання найбільш імовірних результатів був вирішено аналізувати бази даних, що мають експериментально підтверджену інформацію про задіяння певного гену у розвитку раку. Найбільш оптимальною з усіх відкритих баз в нашому випадку була база даних COSMIC [96]. Ця база постійно оновлюється та модерується, має найбільший вибір експериментальних статей, які проходять попередній аналіз алгоритмами бази перед включенням в неї. За рахунок цього уся інформація що стосується генів або типів раку є гарно систематизованою. Основною особливістю бази є можливість доступу до списку генів, які відіграють роль у розвитку цікавлячого нас типу раку.

Ця база є загальнодоступною за посиланням : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

Після переходу за посиланням потрапляємо на головну сторінку бази, на якій зазначена велика кількість інформації та є посилання на усі доступні в ній інструменти аналізу даних.

На головній сторінці є пошукове поле, яке можна використовувати для пошуку різноманітної інформації наявної в базі даних, короткі посилання на усю наявну інформацію, список інструментів, та посилання на усі інші схожі проекти. Для продовження роботи нажимаємо на кнопку "Tools", в списку інструментів обираємо "Cancer browser".

Після переходу за цим посиланням ми отримуємо доступ до інструменту "Cancer Browser" в якому наявна інформація щодо залученості генів в усіх типах раку. Інструмент представлений таблицею, що має різні поля для відсіювання інформації, за рахунок підбирання фільтрів можна отримати найбільш точний результат при аналізі певних форм раку (Рис.2.11).

Tissue selection	Sub-tissue selection	Histology selection	Sub-histology selection
Type to filter	Type to filter	Type to filter	Type to filter
- Adenocarcinoma (273) - Perineum (1 / 3) - Peritoneum (289 / 688) - Pituitary (1050 / 4664) - Placenta (4 / 56) - Pleura (845 / 2414) - Prostate (3675 / 22963) - Retroperitoneum (1 / 1) - Salivary gland (633 / 2962) - Skin (19031 / 48030)	- Include all - NS (3675)	- Include all - Adenoma (64) - Carcinoma (3578) - Hyperplasia (9) - In situ neoplasm (24)	- Include all - Adenocarcinoma (2611) - Glandular intraepithelial neoplasia Grade III (24) - Intraductal carcinoma (7) - NS (1012) - Small cell carcinoma (21)

Рис. 2.11. Інструмент "Cancer browser": 1 - кнопка початку аналізу

Для продовження роботи обираємо цікавлящий нас тип раку а у всіх доступних фільтрах обираємо "Include all" для отримання найширшого спектру результатів. Після завершення вибору фільтрів починаємо аналіз.

При проведенні аналізу ми отримаємо велику кількість різноманітних результатів з приводу участі генів у розвитку раку. Більшість з цих результатів сфокусована на визначенні та описанні мутацій, які призводять до раку. Проліставши в кінець результатів можна помітити опис генів зміна

експресії яких зафіксована в пухлинах. Для продовження роботи потрібно відкрити цей елемент нажавши на кнопку "CNV and Expression" (Рис. 2.12).

Variants

Mutations **Fusions** **Methylation** **CNV & Expression** ← 1

This table lists the number of samples (according to the tissue/histology selections made) which have a copy number gain/loss and under/over expression for each gene. Clicking a CNV count links to a page where the CNV data can be explored and viewed graphically for each sample counted. Read more on our [help pages](#).

Table Information Hide

The results shown in this table are derived from **high value (numeric)** copy number data. Data where the copy number and minor allele information is unknown are excluded.

Click [here](#) to include all copy number data. For more detailed information about copy number data and gain/loss definitions click [here](#).

Show 10 entries Export: **CSV** TSV Search:

Gene	Copy Number			Expression		
	Gain	Loss	Tested	Over	Under	Tested
FAM182B	1	-	948	133	1	498
ZNF706	27	-	948	100	-	498
INTS8	28	-	948	99	4	498
MAL2	24	-	948	96	8	498
PABPC1	26	-	948	95	1	498
COPS5	18	-	948	93	6	498
ELOC	26	-	948	90	-	498
DCAF13	26	-	948	89	2	498
YWHAZ	26	-	948	86	2	498
TMEM70	26	-	948	84	2	498

Showing 1 to 10 of 26,259 entries

First Previous **1** 2 3 4 5 ... 2626 Next Last

Рис. 2.12. Характеристика змін експресії генів при розвитку раку: 1 - інструмент "CNV and Expression", 2 - сортування за кількістю зразків в яких виявлена оверекспресія гену, 3 - експорт даних у вигляді таблиці.

При роботі з цим елементом ми отримуємо інформацію що до змін експресії генів при розвитку раку, з різних експериментальних статей. Для виділення кращих генів кандидатів - тих в яких відмічено підвищення експресії при розвитку раку треба сортувати отримані дані за зменшенням кількості зразків з оверекспресією гена. Для цього нажимаємо на кнопку

"Over" 2 рази. Як ми бачимо описано дуже багато генів, через це експортуємо отримані дані нажавши на кнопку "CSV", після загрузки ми отримаємо відсортовану таблицю з усіма генами, у яких змінюється експресія при розвитку раку.

Для подальших досліджень ми відбираємо 50 найкращих генів кандидатів - для яких показане значне збільшення експресії при розвитку раку і зберігаємо їх.

2.7. Аналіз взаємодії визначених генів та передбачених мікроРНК

Для того, щоб визначити мікро РНК, які з найбільшою імовірністю відіграють роль у розвитку раку сечостатевої системи і при цьому взаємодіють з довгими некодуючими РНК інтересу треба перевірити чи можуть отримані в попередніх дослідках мікро РНК взаємодіяти з тими генами, експресія яких значно зростає при розвитку онкології. На сьогоднішній день існує деяка кількість алгоритмів, які можуть передбачати такі взаємодії, проте більшість з доступних алгоритмів на має здатності інтегрувати в аналіз одразу базу даних мікро РНК та генів, через що кожен досліджуваний елемент треба перевіряти окремо. Через наявність значної кількості досліджуваних елементів для подальшого аналізу портійно підібрати базу яка могла б передбачити шляхи взаємодії передбачених мікро РНК та генів інтересу. При аналізі наявних в вільному доступі алгоритмів виявилось, що існує лише декілька сучасних сукупностей алгоритмів які можуть впоратись з аналізом великої кількості даних інтересу. Найбільш перспективними з усіх інструментів виявились: TarBase v.8 [96], ToppMir [97], mirNET [98] Альтернативним методом аналізу є використання алгоритмів, що передбачають мішені мікро РНК для передбачених РНК і подальше порівняння отриманих результатів з наявною в дослідженні базою даних генів в ручну.

Для отримання найкращих специфічних результатів було вирішено аналізувати мікроРНК для окремих видів раку, задля подальшого включення їх у тест системи.

2.7.1. Аналіз взаємодії визначених генів з передбачуваними мікро РНК за допомогою алгоритму TarBase v.8. Цей алгоритм є у вільному доступі і його особливістю є використання найбільш релевантної моделі термодинамічних взаємодій між ланцюгами РНК. Також цей алгоритм передбачає взаємодію по усім можливим ділянкам матрично РНК, що розширює поле результатів. Даний алгоритм має унікальну модель аналізу, що робить результати його роботи не схожими на інші. Також даний алгоритм має доступ до баз даних як мікро РНК так і генів, що дозволяє йому аналізувати масиви даних а не окремі взаємодії. Через ці особливості цей алгоритм був обраний для подальшої роботи. Цей алгоритм входить до пакету інструментів DIANAtools, що дозволяє йому використовувати альтернативні шляхи аналізу іншими інструментами без втручання користувача. Також цей алгоритм має доступ до бази даних експериментально підтверджених взаємодій, яку ми і будемо використовувати в аналізі для покращення отриманих результатів [96].

Алгоритм є загальнодоступним за посиланням: http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?

Після переходу за посиланням ми потрапляємо на головну сторінку алгоритму, що містить багато налаштувань. У алгоритмі наявні 2 поля для різного типу інформації. Перше поле призначене для вводу загальноприйнятої назви мікро РНК, або її ідентифікаційного коду з будь-якої бази. Друге поле призначене для вводу назви гена інтересу, або його ідентифікаційного коду з бази даних Ensembl. Також у інструмента найвний доступ до різноманітних фільтрів, з налаштуванням яких можна отримувати результати взаємодії в тканинах інтересу. Так як алгоритм працює з декількома іншими модельними організмами, як: *Mus musculus*, *Rattus*

norvegicus, *Drosophila melanogaster* та *Caenorhabditis elegans*, в полі фільтру потрібно обрати аналіз для *Homo sapiens*.

Після переходу на сторінку вводимо по 1 цікавлячі нас мікро РНК та гени, аналіз проводиться автоматично і не потребує активації додатковими кнопками. Результати формуються у вигляді таблиці, яка має дані про мікро РНК, ген, якість їх взаємодії, посилання на публікацію в якій ця взаємодія доведена, та інформацію щодо імовірності передбаченої взаємодії алгоритмом. (Рис.2.13)

miRNAs: hsa-miR-1976 ✕, hsa-miR-6761-5p ✕, hsa-miR-6893-5p ✕, Show all, Clear all

Genes: PTK2 ✕, NUDCD1 ✕, DECR1 ✕, Show all, Clear all

Interactions: 3, Experiments: 3 (low: 0, high: 3, unknown: 0) Cell lines: 1, Tissues: 1, Publications: 1

Gene name	miRNA name	Experiments	Publications	Cell lines	Tissues	Pred. Score
SCRIB	hsa-miR-1976	low: 0 high: 1	1	1	1	0.531
ZNF7	hsa-miR-940	low: 0 high: 1	1	1	1	-
OSGIN2	hsa-miR-940	low: 0 high: 1	1	1	1	0.451

Рис. 2.13. Результати аналізу алгоритмом TarBase v.8: 1 - назва гену, 2 - назва мікро РНК, 3 - якість взаємодії в експерименті, 4 - посилання на публікації, 5 - клітинні лінії на яких проводилось дослідження, 6 - тканини в яких проводилось дослідження, 7 - імовірність взаємодії передбачена алгоритмом DIANAtools.

При роботі з цим інструментом не існує можливості експортувати результати, це виконували в ручну. Результати отримані таким аналізом є

дуже вагомими для побудови тест-системи через наявність експериментального підтвердження взаємодії.

2.7.2. Аналіз взаємодії визначених генів з передбачуваними мікро РНК за допомогою алгоритму TorppMir. Для наступного порівняння та уточнення результатів минулого аналізу було вирішено використати альтернативні алгоритми передбачення взаємодії мікро РНК та матричних РНК. Цей алгоритм був попередньо відібраний для аналізу і має ряд унікальних функцій. Створений в 2015 році він досі модерується та база даних з якою він працює постійно оновлюється. Останнє оновлення пройшло в 2020 році, через що результати отримані з аналізу цим алгоритмом мають бути максимально релевантними. Його особливістю є використання альтернативної бази даних - torppGene, яка має 22000 генів та отримує доступ до 5 альтернативних баз даних мікро РНК. Це дозволяє алгоритму інтегрувати максимально широкий спектр інформації перед аналізом. Він може аналізувати вже експериментально підтверджені взаємодії, та передбачати взаємодії базуючись на алгоритмі TargetScan який є загальноприйнятим в колі дослідників [97].

Алгоритм є загальнодоступним за посиланням: <https://toppmir.cchmc.org/>

При переході за посиланням ми потрапляємо на головну сторінку алгоритму, що має усі елементи управління аналізом. Ми отримуємо доступ для вводу аналізованих генів та мікро РНК у різноманітних форматах: загальноприйнята назва, ідентифікаційні коди різних баз даних (Рис. 2.19.).

Для проведення аналізу в першу чергу обираємо потрібний формат вводу даних, як для мікро РНК так і для генів. Після цього імпортуємо попередньо отримані результати для аналізу - передбачені мікро РНК та гени інтересу. Після імпортування інформації нажимаємо на "Load miRs" та "Load genes" відповідно задля передання інформації серверам алгоритму. Після цього нижче на сторінці нажимаємо кнопку "Next" для переходу на наступний етап аналізу. Алгоритм працює у 2 етапи, спочатку він визначає в загальному які мікро РНК можуть взаємодіяти з генами інтересу, потім

опрацьовує отримані попередньо мікро РНК та визначає з якими саме генами взаємодія може відбуватись.

Результати аналізу ми отримуємо у вигляді 2 таблиць: перша таблиця зображає можливі взаємодії мікроРНК та генів, друга таблиця вказує на неможливі взаємодії. Через відсутність можливості експортувати результати файлом це треба виконувати вручну (Рис.2.14).

Input Gene Set

Putative target mRNAs of candidate microRNAs			
16 known genes			
Original	Human Symbol	Entrez ID	miRNAs
INTS8	INTS8	55656	MIR1976
YWHAZ	YWHAZ	7534	MIR1976;MIR940
ATP6V1C1	ATP6V1C1	528	MIR940
POLR2K	POLR2K	5440	MIR1976
C8orf76	C8orf76	84933	MIR940
NSMCE2	NSMCE2	286053	MIR940
ZFP41	ZFP41	286128	MIR1976
ZNF7	ZNF7	7553	MIR940
ZNF16	ZNF16	7564	MIR1976
UBE2V2	UBE2V2	7336	MIR1976
RMDN1	RMDN1	51115	MIR940
TBC1D31	TBC1D31	93594	MIR940
OSGIN2	OSGIN2	734	MIR940
ARHGAP39	ARHGAP39	80728	MIR1976
DECR1	DECR1	1666	MIR1976
PTK2	PTK2	5747	MIR940

1

Input genes not regulated by candidate MicroRNAs		
34 known genes		
Original	Human Symbol	Entrez ID
COP55	COP55	10987
RNF139	RNF139	11236
MAL2	MAL2	114569
TMEM65	TMEM65	157378
ANKRD46	ANKRD46	157567
SCRIB	SCRIB	23513
DCAF13	DCAF13	25879
VIRMA	VIRMA	25962
PABPC1	PABPC1	26986
GRINA	GRINA	2907
MRPL15	MRPL15	29088
MTERF3	MTERF3	51001
ZNF706	ZNF706	51123
OTUD6B	OTUD6B	51633
ESRP1	ESRP1	54845
TMEM70	TMEM70	54968
TRMT12	TRMT12	55039
KIF16B	KIF16B	55614
ENY2	ENY2	56943
ZNF250	ZNF250	58500
KCNK15	KCNK15	60598
TCEA1	TCEA1	6917
ELOC	ELOC	6921
TPD52	TPD52	7163
FAM182B	FAM182B	728882
DERL1	DERL1	79139

2

Рис. 2.14. Результати аналізу алгоритму ТоррMiR: 1 - Список можливих взаємодій мікро РНК та генів, 2 - список генів які не регулюються заданими мікро РНК.

Також цей інструмент має додатковий доступ до баз даних доведених взаємодій, що робить його ідеальним для проведення експерименту. Ми переходимо до наступного етапу аналізу. За рахунок цього аналізу можна перевірити участь цих взаємодій в розвитку певних патологічних процесів, які вже експериментально доведені (Рис.2.15).

Functional Enrichment Analysis on Entire Gene Set (Putative Targets & Non-regulated mRNAs)

Gene Set Functional Analysis Options

Feature	Correction	p-Value cutoff	Gene Limits
☐ All	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ GO: Molecular Function	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ GO: Biological Process	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ GO: Cellular Component	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ Human Phenotype	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☐ Mouse Phenotype	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☐ Domain	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ Pathway	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ Pubmed	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ Interaction	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☐ Cytoband	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ Transcription Factor Binding Site	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☐ Gene Family	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ Coexpression	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ Coexpression Atlas	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☐ Computational	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ MicroRNA	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☐ Drug	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500
☒ Disease	Bonferroni	0.05	1 ≤ n ≤ 1500

Рис. 2.15. Другий етап проведення аналізу методом ТоррMiR: 1 - функції за яких можна провести аналіз, 2 - метод статистичної оцінки результатів, 3 - рівень оцінки статистичних результатів.

Цей етап аналізу може надати вичерпну експериментально підтверджену інформацію щодо взаємодій мікро РНК та генів. Для продовження аналізу ми обираємо "Human phenotype", "Pathway", "Pubmed". "TFBS", "coexpression", "MircoRNA", "Disease". Методи статистичного аналізу залишаємо незмінними з тією самою статистичною оцінкою очікуваного результату. Після обрання бажаних налаштувань аналізу нажимаємо на кнопку "Proceed". Нас перенаправляє на сторінку з результатами аналізу яка має в собі багато елементів.

Задля уточнення раніше отриманих результатів перевіряємо типи взаємодій, особливо коекспресію генів в різноманітних патологіях. Нас цікавить коекспресія в розвитку раку. У остаточні результати ми виносимо виключно взаємодії для яких показана участь у розвитку раку. Це робиться задля покращення остаточного результату та визначення найкращих мікро

РНК кандидатів для створення тест системи. Ці результати також неможливо експортувати файлом, тому отриманні дані переносимо в таблиці результатів вручну.

2.7.3. Аналіз взаємодії визначених генів з передбачуваними мікро РНК за допомогою алгоритму miRNet. Цей інструмент є найбільшою базою алгоритмів для аналізу молекулярних взаємодій в клітинах. Його особливістю є можливість побудови карт взаємодій. Він створений у 2017 році і досі модерується, постійно оновлюючи інформацію. Цей алгоритм має доступ до найбільшої кількості баз даних з усіх проаналізованих, що робить його результати найбільш обширними. За рахунок доступу до великої кількості баз даних використовуючи цей алгоритм можна аналізувати одразу велику кількість взаємодій, що дуже оптимізує роботу. Окрім експериментально підтверджених взаємодій цей алгоритм автоматично визначає можливість інших інтеракцій та моделює їх. Для побудови точної карти взаємодій алгоритм використовує найбільш просунуті технології моделювання, що дозволяє покращити вихідний результат аналізу. Також плюсом використання цього інструменти є проведення аналізу на віддалених серверах. Це дає можливість пришвидшити роботу алгоритму та в разі виникнення проблем автоматично їх вирішити [98].

Алгоритм є загальнодоступним за посиланням:
<https://www.mirnet.ca/miRNet/home.xhtml>

При переході за посиланням ми потрапляємо на головну сторінку і основну панель вибору інструментів. На цій сторінці можна обрати модель взаємодії яку ми хочемо досліджувати, або перейти до налаштування власної моделі. Також тут знаходяться усі необхідні для роботи посилання та цитовані ресурси які використовуються алгоритмом.

Після переходу на головну сторінку в випадку нашого аналізу потрібно обрати пункт "Multiple query types". Це дасть змогу аналізувати взаємодії обраних мікро РНК та генів.

При переході за цим інструментом ми потрапляємо на сторінку з усіма елементами управління побудови алгоритму аналізу. На цій сторінці є можливість обрати біологічний об'єкт взаємодії в якому мають аналізуватися, також існує можливість обрати тканини, в яких ці взаємодії мають відбуватися. Існує також вибір елементів взаємодію яких ми маємо проаналізувати.

Після переходу на сторінку налаштування обираємо організм - людину. Також обираємо тканину взаємодію в якій будемо аналізувати, та помічаємо галочкою елементи взаємодії яких ми маємо визначити, в нашому випадку передбачені мікро РНК та гени інтересу. Після цього для продовження натискаємо на кнопку "ОК". Нас перенаправляє в зону вводу досліджуваних послідовностей. Введення даних для мікро РНК та генів розділені, алгоритм сприймає інформацію різних форматів, наприклад можна задавати як назви мікро РНК чи генів так і їх ідентифікаційні коди з різних баз. Також треба обирати мішені взаємодії які потрібно проаналізувати окремо для генів і для мікро РНК.

Для початку роботи обираємо тип вводу даних в вкладці "ID type" - загально прийняті назви. Обираємо мішені взаємодії, в нашому випадку гени для мікро РНК і мікро РНК для генів. Вводимо вручну увесь список аналізованих мікро РНК та генів в окремих полях. Останнім етапом є відсилання наданої інформації до серверу аналізу. Для проведення аналізу нажимаємо на кнопку "Proceed", що знаходиться в правому нижньому кутку налаштувань.

Після цього нас переносить на сторінку попереднього аналізу, на якій зазначена потрібна для додаткового налаштування інформація. Вона вказує на кількість знайдених генів та мікро РНК в базах даних, кількість їх теоретично можливих зв'язків. Також наявний список фільтрів аналізу, які дозволяють максимально специфікувати отримані результати (Рис.2.16.).

Interaction Tables

The pair-wise interaction tables together with the supporting information are listed below. You can click the table name to download the complete table, or browse the interaction tables (max. 1000 entries). Click the **Proceed** button at the bottom to directly explore the results in a network context.

±	mir2gene	[miRNA:6, gene: 1612]	↗ Browse	1
±	gene2mir	[gene:45, miRNA: 698]	↗ Browse	2

Networks

In some cases, multiple isolated networks will be generated, with a big 'continent' containing most of queries, and several small 'islands' containing one or a few queries. These networks will be available for visual analysis in the next step.

Networks	Queries	Nodes	Edges
± mirnet1	Gene: 45; miRNA: 6;	Gene: 1652; miRNA: 699;	3492

Network Tools

- Degree Filter
- Betweenness Filter
- Shortest Path Filter
- Manual Batch Filter
- Minimum Network
- Steiner Forest Network
- Update Network
- Reset Network

Previous Downloads Proceed

Рис. 2.16. Сторінка попереднього аналізу алгоритму miRNet: 1 - Кількість знайдених в базі даних мікро РНК, 2 - кількість знайдених в базі даних генів, 3 - кількість теоретично можливих взаємодій, 4 - фільтр на якість побудованих взаємодій, 5 - фільтр на взаємозв'язок передбачених взаємодій для мікро РНК та генів інтересу, 6 - кнопка початку остаточного аналізу.

Для продовження роботи і отримання максимально якісних результатів ми миємо налаштувати фільтри аналізу. В нашому випадку ми маємо налаштувати фільтр імовірності на оцінку 0.95 з 1, та обрати максимальний ступінь пов'язаності взаємодії 1 з 1. Після проведення налаштувань фільтрів відправляємо остаточні дані для аналізу та побудови карти взаємодії. Після налаштування остаточних фільтрів аналізу нажимаємо на кнопку "Proceed" для переходу до остаточного етапу аналізу та побудови карти взаємодії мікро РНК та генів.

Нас переносить на сторінку результатів та інструменту їх візуалізації. Тут у вигляді таблиці зазначені усі можливі взаємодії. Доступні різні елементи налаштувань та взаємодії з графічною частиною (Рис.2.17.).

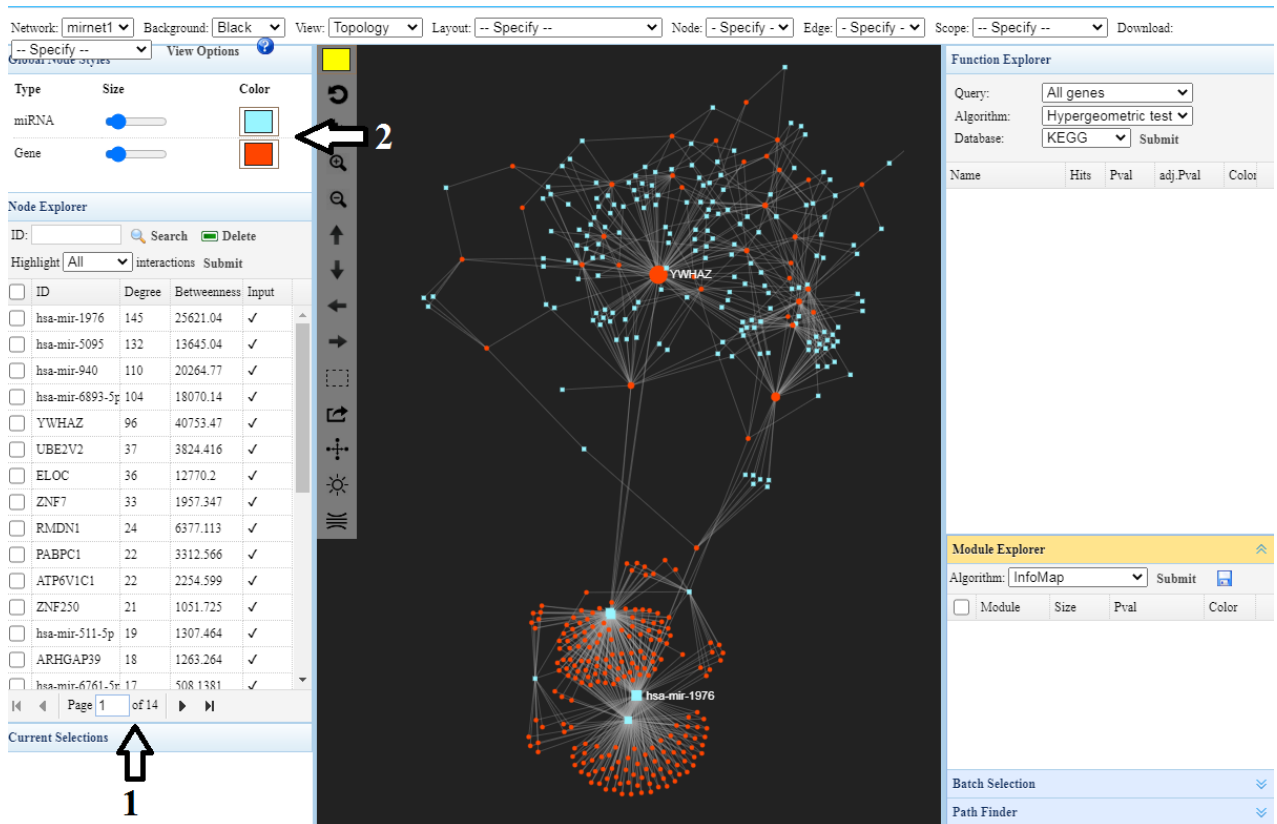


Рис. 2.17. Остаточні результати аналізу алгоритмом miRNet: 1 - таблиця результатів, 2 - елементи управління візуалізацією взаємодій.

На цій сторінці ми можемо побачити таблицю з усіма можливими взаємодіями мікро РНК та генів інтересу, які характеризуються імовірністю. За рахунок попереднього використання фільтрів усі взаємодії є дуже імовірними, деякі з них мають експериментальне підтвердження. У центрі сторінки побудована карта взаємодій мікро РНК та генів яка досить вдало візуалізує характер їх регулювання. Дані з таблиці можна експортувати в ручну, експорт карти взаємодій виконується через елементи управління редактором у різноманітних форматах. Більшість результатів експортується у вигляді нотування та аналізу карти, це дає розуміння усіх можливих взаємодій та взаємопов'язаності елементів.

Після проведення усіх типів аналізу взаємодій передбачених мікро РНК з генами інтересу ми порівнюємо результати різних алгоритмів базуючись на різних факторах: Імовірності результатів, експериментальне підтвердження можливих взаємодій, схожість взаємодій за результатами різних алгоритмів і

групуємо їх на найбільш імовірні та найменш імовірні в таблицях. Після проведення відбору найбільш імовірних кандидатів ми визначаємо гени, що більше всього регулюються передбаченими мікро РНК, та мікро РНК які мають найширший спектр впливу. Після виділення цільових генів та мікро РНК ми сумуємо отриману інформацію у вигляді таблиць. Також додатково створюємо нову карту взаємодій яка буде найбільш точно зображати участь передбачених мікро РНК з генами.

2.8. Визначення функції генів

Після цього аналізу, визначаємо функції генів, які більше всього піддаються регуляції передбачених мікро РНК. Для аналізу визначаємо 10 найбільш регульованих генів алгоритмом miRNet [98]. Таким чином ми дізнаємось експресія яких генів більше всього регулюється довгими некодуючими РНК інтересу через передбачені для них мікро РНК. І визначимо новітні функції довгих некодуючих РНК в клітині, які раніше не були описані. Всі ці аналізи проводяться паралельно для різних типів раку, що надасть вичерпну інформацію щодо можливих взаємодій довгих некодуючих РНК, мікро РНК та генів у пухлинах. Розуміння функцій всіх цих елементів в пухлинах надасть розуміння їх функціонування, новітні перспективні мішені для ліків, новий фундаментальний вектор досліджень молекулярних процесів в онкології та найбільш важливо - передбачені перспективні біомаркери раку певних типів.

Визначення функцій проводимо з використанням баз даних. Найбільш ефективною для швидкої роботи виявилась база даних GeneCards. Вона має доступ до багатьох інших баз, що надає їй високу ефективність. Після визначення функцій генів усю інформацію сумуємо та аналізуємо в 1 таблиці [99].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати отримані в ході аналізів є багатоетапними і процесуються, фільтруються при переході на кожен зі стадій дослідження. Таким чином точність остаточного результату максимізується.

3.1. Передбачення мікро РНК, що можуть зв'язуватись з довгими некодуючими РНК інтересу

Для передбачення мікро РНК, що можуть зв'язуватись з довгими некодуючими РНК інтересу - PANDAR, BC200 спочатку використовували різноманітні алгоритми аналізу. Робота з цими алгоритмами не дала бажаних результатів, через що для подальшого аналізу вирішили використовувати результати з існуючих баз даних. Після вибору бази даних, яка могла надати вичерпну потрібну нам інформацію почали роботу з нею.

Результатом проведення аналізу бази даних LncBook було отримання списку мікро РНК, які потенційно могли взаємодіяти з довгими некодуючими РНК інтересу. Для довгої некодуючої РНК PANDAR було отримано 448 потенційних мікро РНК, які вона може зв'язувати. Для довгої некодуючої РНК BC200 було отримано лише 39 мікро РНК, які вона потенційно може зв'язувати. Через те, що усі отримані мікро РНК є передбаченими було вирішено брати на подальший розгляд виключно мікро РНК, що мають найбільшу імовірність зв'язуватись з довгими некодуючими РНК інтересу. Для PANDAR було обрано 50 найімовірніших мікро РНК, для BC200 було взято усі 39 наданих базою даних мікро РНК, через їх високу імовірність. Список визначених мікро РНК цим методом наданий у Додатках A1 та A2 відповідно для довгої некодуючої РНК PANDAR та BC200.

3.2. Визначення мікро РНК, які відіграють роль у розвитку раку сечового міхура, нирок та передміхурової залози

Отримані в минулому етапі мікро РНК були проаналізовані з використанням баз даних Oncomir, dbDEMС 2.0 та miRCancer. Усі бази у яких проводився аналіз накопичили архів інформації стосовно участі різноманітних мікро РНК в розвитку раку. Уся інформація, щодо участі мікро РНК у розвитку раку отримана експериментально у дослідженнях останніх років, проте через відмінність в джерелах які використовують бази результати, аналізу по різних базам також відрізняються. Також через використання саме експериментальної літератури інформація щодо участі мікро РНК у розвитку раку може бути не повною, через недостатню дослідженість.

Отримані результати при аналізі баз даних вбудованими інструментами одразу проходили відбір за певними критеріями. Через те, що в досліджуваних в лабораторії пухлинах показано збільшення експресії довгих некодуючих РНК PANDAR та BC200 для подальшого аналізу ми відбирали виключно ті випадки онкології, в яких експресія передбачених мікро РНК зменшена відносно норми. Більшість з отриманих на попередньому етапі мікро РНК мають експериментальні свідчення про відігравання ролі в розвитку раку різних типів. Виявилось, що лише 8 мікро РНК для яких передбачена взаємодія з BC200 мають експериментальне підтвердження зменшення експресії при раку нирок, передміхурової залози та сечового міхура. Результати дослідження мікро РНК, що можуть зв'язуватись з довгою некодуючою РНК BC200 наведені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Список мікро РНК, що відіграють роль у розвитку таких типів раку як рак нирок, передміхурової залози, сечового міхура та можуть зв'язуватись з BC200

Назва мікро РНК	Участь у розвитку раку		
	Нирок	Передміхурової залози	Сечового міхура
hsa-miR-5095	-	+	-
hsa-miR-940	+	+	+
hsa-miR-511-5p	+	+	+
hsa-miR-6893-5p	-	+	-
hsa-miR-1343-3p	+	-	-
hsa-miR-612	+	-	+
hsa-miR-6761-5p	-	+	+
hsa-miR-1976	+	+	+

При дослідженні виявилось, що більшість з визначених мікро РНК відіграють роль у розвитку усіх типів раку інтересу. Скоріше за все ці мікро РНК відіграють роль у розвитку і інших типів раку, в яких показана гіперекспресія BC200, через це отримані результати можна імпламентувати і у інші дослідження.

При дослідженні мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR виявилось, що участь у розвитку раку нирок, передміхурової залози та сечового міхура доведена лише для 14 мікро РНК. Результати дослідження наведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Список мікро РНК, що відіграють роль у розвитку таких типів раку як рак нирок, передміхурової залози, сечового міхура, що можуть взаємодіяти з PANDAR.

Назва мікро РНК	Участь у розвитку раку		
	Нирок	Передміхурової залози	Сечового міхура
hsa-miR-3934-3p	+	-	+
hsa-miR-3619-5p	-	+	+
hsa-miR-493-3p	+	+	+
hsa-miR-599	+	-	-
hsa-miR-612	+	-	-
hsa-miR-708-5p	+	+	+
hsa-miR-139-3p	+	+	+
hsa-miR-10b-3p	+	+	+
hsa-miR-28-5p	+	+	-
hsa-miR-376c-3p	+	+	+
hsa-miR-1827	+	-	-
hsa-miR-497-3p	+	+	+
hsa-miR-584-5p	+	+	+
hsa-miR-7-5p	+	+	+

При аналізі результатів пошуку в базах даних виявилось, що хоча не має свідчень про участь великої кількості передбачених мікро РНК у розвитку раку нирок, сечового міхура та передміхурової залози, більшість з передбачених мікро РНК відіграють роль у розвитку інших типів раку. Після додаткового аналізу літературних даних виявилось, що в тих типах раку, при

яких рівні експресії визначених мікро РНК падають значно збільшені профілі експресії PANDAR та BC200, що свідчить про їх потенційну роль. Таким чином, скоріше за все усі передбачені мікро РНК відіграють роль у розвитку раку, проте їх участь у розвитку раку сечостатевої системи ще малодосліджена.

Для продовження роботи треба було визначити які гени регулюються визначеними мікро РНК. Проте при спробах проаналізувати це методом передбачення виявилось, що кожна мікро РН може впливати на сотні генів. Саме через це вирішили додатково визначити основні гени, що гіперекспресують при різних типах раку, і потім визначити здатність їх взаємодії з передбаченими мікро РНК.

3.3. Визначення генів які відіграють роль у розвитку раку

При передбаченні генів, гіперекспресія яких відіграє роль у розвитку раку виявилось, що у наявних базах даних їх є значна кількість. Для оптимізації проведення основного завдання було вирішено виділити найкращі гени кандидати з досліджень. Після виділення генів кандидатів вони були відсортовані по ролям у розвитку різних видів раку. Таким чином для подальших досліджень була створена власна база даних цих генів для кожного окремого досліджуваного типу раку. Бази даних які були сформовані наведені окремо в додатках В1, В2, В3 відповідно до типів раку в яких їх гіперекспресія відіграє роль: нирки, передміхурова залоза, сечовий міхур.

3.4. Визначення можливості взаємодії передбачених генів та передбачених мікро РНК

При аналізі генів, які можуть взаємодіяти з передбаченими мікро РНК та відіграють роль у розвитку певних типів раку використовували 3

альтернативні методи. Через різницю між алгоритмами результати в кожному аналізі відрізняються і потребують ретельного порівняння для верифікації. В ході роботи окремо досліджувалась взаємодія мікро РНК передбачених для PANDAR з генами, експресія яких зростає при різних типах раку, та окремо взаємодію мікро РНК передбачених для BC200. Такий підхід використовувався для кращого розуміння механізмів впливу різних довгих некодуючих РНК на розвиток та функціонування пухлин через посередника у ролі мікро РНК.

3.4.1. Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за допомогою алгоритму DIANAtools. Використання цього методу надало вичерпну інформацію щодо експериментально підтверджених взаємодій мікро РНК та генів. Саме через наявність експериментального підтвердження взаємодій результати з цього методу надалі будуть братися за основу для порівняння з іншими методами аналізу. Всього було проаналізовано 50 генів окремо передбачених для кожного виду раку.

Окремо досліджувались мікро РНК, що взаємодіють з PANDAR та BC200. Результати дослідження цим методом наведені в таблицях 3.3 та 3.4 відповідно до здатності мікро РНК взаємодіяти з різними довгими некодуючими РНК. При дослідженні виявилось, що більшість мікро РНК мають багато альтернативних мішеней, що робить їх вплив більш вагомим. Враховуючи, що довгі некодуючі РНК мають велику кількість мікро РНК з якими вони можуть зв'язуватись, а мікро РНК в свою чергу мають далеко не 1 мішень, можна припустити що зміна в експресії 1 довгої некодуючої РНК може призвести до змін в експресії сотень генів опосередкованим шляхом.

Таблиця 3.3.

Експериментально доведені взаємодії генів та мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR при розвитку різних типів раку.

Передміхурова залоза		Нирки		Сечовий міхур	
<i>MRPL15</i>	hsa-miR-7-5p	<i>CANX</i>	hsa-miR-7-5p	<i>BCL2L1</i>	hsa-miR-7-5p
<i>TPD52</i>	hsa-miR-7-5p	<i>DIAPH1</i>	hsa-miR-28-5p	<i>ANP32E</i>	hsa-miR-708-5p
<i>TMEM65</i>	hsa-miR-7-5p	<i>RARS</i>	hsa-miR-7-5p	<i>POGZ</i>	hsa-miR-7-5p
<i>YWHAZ</i>	hsa-miR-708-5p	<i>ERGIC1</i>	hsa-miR-7-5p	<i>BLCAP</i>	hsa-miR-3619-5p
<i>PTK2</i>	hsa-miR-7-5p	<i>CANX</i>	hsa-miR-376c-3p	<i>APH1A</i>	hsa-miR-10b-3p
<i>TMEM65</i>	hsa-miR-497-3p	<i>RARS</i>	hsa-miR-493-3p	<i>AMOT</i>	hsa-miR-3619-5p
<i>MAL2</i>	hsa-miR-28-5p	<i>CANX</i>	hsa-miR-493-3p	<i>SF3B4</i>	hsa-miR-3619-5p
<i>PABPC1</i>	hsa-miR-3619-5p	<i>THG1L</i>	hsa-miR-497-3p	<i>NECAB3</i>	hsa-miR-497-3p
<i>YWHAZ</i>	hsa-miR-497-3p	<i>SMAD5</i>	hsa-miR-497-3p	<i>PI4KB</i>	hsa-miR-708-5p
<i>ESRP1</i>	hsa-miR-7-5p	<i>CANX</i>	hsa-miR-708-5p	<i>BLCAP</i>	hsa-miR-708-5p
<i>NUDCD1</i>	hsa-miR-7-5p	<i>DIAPH1</i>	hsa-miR-708-5p	<i>AMOT</i>	hsa-miR-7-5p
<i>POLR2K</i>	hsa-miR-7-5p	<i>UBE2D2</i>	hsa-miR-7-5p	<i>ZNF337</i>	hsa-miR-7-5p
<i>OTUD6B</i>	hsa-miR-7-5p			<i>PI4KB</i>	hsa-miR-7-5p
<i>RNF139</i>	hsa-miR-7-5p			<i>DEDD</i>	hsa-miR-7-5p
<i>ANKRD46</i>	hsa-miR-376c-3p			<i>NDUFS2</i>	hsa-miR-376c-3p
<i>KIF16B</i>	hsa-miR-7-5p			<i>HIST2H2BE</i>	hsa-miR-7-5p
				<i>SKP2</i>	hsa-miR-7-5p
				<i>SF3B4</i>	hsa-miR-7-5p
				<i>SLC35C2</i>	hsa-miR-7-5p
				<i>PAK4</i>	hsa-miR-7-5p

Виходячи з цього аналізу можна визначити, що найбільш перспективними біомаркерами можуть слугувати мікро РНК у тандемі з

PANDAR, які можуть з ним взаємодіяти і мають найбільшу кількість генів мішеней, збільшена експресія яких підтверджена для різних типів раку. Такими мікро РНК при раку передміхурової залози є hsa-miR-7-5p, при раку нирок - hsa-miR-7-5p, hsa-miR-497-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-493-3p, при раку сечового міхура - hsa-miR-7-5p, hsa-miR-3619-5p, hsa-miR-708-5p. Спільною мікро РНК для усіх типів раку сечостатевої системи виявилась hsa-miR-7-5p.

Таблиця 3.4.

Експериментально доведені взаємодії генів та мікро РНК, що можуть взаємодіяти з BC200 при розвитку різних типів раку

Передміхурова залоза		Нирки		Сечовий міхур	
<i>SCRIB</i>	hsa-miR-1976	<i>ERGIC3</i>	hsa-miR-511-5p	<i>BLCAP</i>	hsa-miR-940
<i>ZNF7</i>	hsa-miR-940	<i>FAF2</i>	hsa-miR-940	<i>SLC35C2</i>	hsa-miR-1976
<i>OSGIN2</i>	hsa-miR-940	<i>WNK3</i>	hsa-miR-940	<i>RAD1</i>	hsa-miR-1976
		<i>TIMP4</i>	hsa-miR-1343-3p	<i>APH1A</i>	hsa-miR-1976
				<i>POGZ</i>	hsa-miR-940

Найбільш перспективними маркерами усіх типів раку сечостатевої системи, що можуть взаємодіяти з BC200 виявились: hsa-miR-1976, hsa-miR-940.

Вже за результатами цього аналізу помітно, що PANDAR має значно ширший опосередкований вплив на розвиток пухлин ніж BC200. За результатами досліджень виявилось, що PANDAR має як мінімум 16 експериментально доведених опосередкованих генів мішеней при розвитку раку передміхурової залози, 12 при розвитку раку нирок і 20 при розвитку раку сечового міхура. В той час як BC200 має 3 опосередкованих мішені при розвитку раку передміхурової залози, 4 при розвитку раку нирок та 5 при розвитку раку сечового міхура. Проте ці результати є виключно

експериментально підтвердженими і не всі з цих взаємодій при передбаченні мали високу оцінку імовірності, з чого можна зробити висновок, що існує значно більша кількість ще не досліджених взаємодій які можна передбачити.

3.4.2. Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за допомогою алгоритму TorpMiR.

Аналіз з використанням цього алгоритму надав більш об'ємні результати через залученість в аналізі більшої кількості баз даних. Більшість з отриманих результатів також має експериментальне підтвердження, що робить отримані висновки більш цінними. Аналіз також продовився окремо для мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR та BC200. Результати наведені у відповідних таблицях 3.5. для PANDAR та 3.6. для BC200.

Таблиця 3.5.

Експериментально доведені взаємодії генів та мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR при розвитку різних типів раку

Передміхурова залоза		Нирки		Нирки		Сечовий міхур	
<i>COPS5</i>	MIR285P	<i>SLU7</i>	MIR1827; MIR612	<i>KIAA1755</i>	MIR1827; MIR612	<i>REMI</i>	MIR1393P
<i>YWHAZ</i>	MIR285P	<i>RARS</i>	MIR599	<i>MAOA</i>	MIR1827; MIR612		
<i>DERL1</i>	MIR285P	<i>CANX</i>	MIR1827	<i>UBE2D2</i>	MIR285P; MIR599		
<i>PTDSSI</i>	MIR285P	<i>DCTN4</i>	MIR1827	<i>WNK3</i>	MIR1827		
		<i>TLL9</i>	MIR1827; MIR599; MIR612	<i>THG1L</i>	MIR599		
		<i>HAUS7</i>	MIR599	<i>ERGIC3</i>	MIR1827; MIR612		
		<i>ANKHD1</i>	MIR612	<i>JADE2</i>	MIR1393P; MIR1827; MIR612		
		<i>MAPK9</i>	MIR599	<i>ADIG</i>	MIR1827		

Продовження табл. 3.5.

<i>NPM1</i>	MIR1827	<i>CLK4</i>	MIR612
<i>YIPF5</i>	MIR599	<i>RIOK2</i>	MIR1393P; MIR1827
<i>ZNF346</i>	MIR1827; MIR599; MIR612	<i>RACK1</i>	MIR1393P; MIR1827; MIR612
<i>HARS</i>	MIR1827	<i>PRELID2</i>	MIR599
<i>ERGIC1</i>	MIR285P; MIR612	<i>TBC1D9 B</i>	MIR599;M IR612
<i>GALNT1 5</i>	MIR612	<i>SMAD5</i>	MIR1827
<i>CAMLG</i>	MIR1827; MIR612	<i>TIMP4</i>	MIR1827
<i>WDR55</i>	MIR1827; MIR599; MIR612		

Виходячи з цих результатів для виділення найкращих мікро РНК кандидатів біомаркерів потрібно визначити які з них впливають на більшу кількість генів експресія яких пов'язана з кансерогенезом.

При раку передміхурової залози, найкращою тандемною мікро РНК, яка впливає на експресію генів пов'язаних з раком та може взаємодіяти з PANDAR є MIR285P. Для раку нирок такими мікро РНК є MIR1827;MIR599;MIR612. Для раку сечового міхура такими мікро РНК є MIR1393P.

Таблиця 3.6.

Експериментально доведені взаємодії генів та мікро РНК, що можуть взаємодіяти з BC200 при розвитку різних типів раку

Передміхурова залоза		Нирки		Сечовий міхур	
<i>INTS8</i>	MIR1976	<i>SLU7</i>	MIR612;MIR940	<i>ZNF34 1</i>	MIR1976;MIR6 12
<i>YWHAZ</i>	MIR1976;MIR9 40	<i>TTL 9</i>	MIR1976;MIR612;MIR9 40	<i>PI4KB</i>	MIR940
<i>ATP6VIC 1</i>	MIR940	<i>FAF2</i>	MIR940	<i>APH1A</i>	MIR1976;MIR9 40

Продовження табл. 3.6.

<i>POLR2K</i>	MIR1976	<i>ANKHD1</i>	MIR612	<i>SLC35C2</i>	MIR1976;MIR940
<i>C8orf76</i>	MIR940	<i>MAPK9</i>	MIR1976	<i>DEDD</i>	MIR940
<i>NSMCE2</i>	MIR940	<i>YIPF5</i>	MIR1976	<i>BLCAP</i>	MIR940
<i>ZFP41</i>	MIR1976	<i>ZNF346</i>	MIR1976;MIR612;MIR940	<i>LYSMD1</i>	MIR940
<i>ZNF7</i>	MIR940	<i>CDC23</i>	MIR1976	<i>TDRKH</i>	MIR612
<i>ZNF16</i>	MIR1976	<i>LARS</i>	MIR1976	<i>CDK5RAP1</i>	MIR612
<i>UBE2V2</i>	MIR1976	<i>ERGIC1</i>	MIR612	<i>DYNLRB1</i>	MIR612
<i>RMDN1</i>	MIR940	<i>GALNT15</i>	MIR612	<i>PFDN4</i>	MIR612
<i>TBC1D31</i>	MIR940	<i>CAMLG</i>	MIR612	<i>AMOT</i>	MIR612
<i>OSGIN2</i>	MIR940	<i>KIAA1755</i>	MIR612	<i>REM1</i>	MIR612
<i>ARHGAP39</i>	MIR1976	<i>MAOA</i>	MIR612	<i>FAM104B</i>	MIR940
<i>DECRI</i>	MIR1976	<i>FAM114A2</i>	MIR1976	<i>NDUFS2</i>	MIR612;MIR940
<i>PTK2</i>	MIR940	<i>UBE2D2</i>	MIR1976	<i>TUFT1</i>	MIR1976;MIR612
		<i>ERGIC3</i>	MIR612	<i>CRNKL1</i>	MIR1976
		<i>JADE2</i>	MIR612	<i>ENSA</i>	MIR1976
		<i>CLK4</i>	MIR1976;MIR612;MIR940	<i>CEP250</i>	MIR1976
		<i>RIOK2</i>	MIR1976;MIR940	<i>COMMD7</i>	MIR612
		<i>RACK1</i>	MIR612;MIR940	<i>PAK4</i>	MIR940
		<i>PRELID2</i>	MIR1976	<i>CATSPERG</i>	MIR1976;MIR612
		<i>TBC1D9B</i>	MIR612;MIR940		
		<i>TIMP4</i>	MIR940		
		<i>WDR55</i>	MIR612;MIR940		

Виходячи з цих результатів можна визначити, що найкращими перспективними мікро РНК, які впливають на експресію генів, що задіяні в канцерогенезі та можуть взаємодіти з BC200 є: для раку передміхурової залози MIR1976;MIR940, для раку нирок MIR1976;MIR612;MIR940, для раку сечового міхура MIR1976;MIR940.

Також використання цього методу дало шанс перевірити експериментально доведену участь усіх передбачених взаємодій в розвитку

різноманітних патологій. Виявилось, що більшість з передбачених взаємодій має доведені факти участі в розвитку інших типів раку, проте ще немає робіт, що доводили б їх участь у розвитку раку сечостатевої системи. Це потребує додаткової перевірки.

3.4.3. Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за допомогою алгоритму miRNet. Результати аналізу цим алгоритмом мають специфічну візуалізацію, і для визначення цікавлящих нас мікро РНК треба аналізувати карту взаємодій. Цей алгоритм будує усі можливі взаємодії з передбаченими генами та передбаченими мікро РНК, і для визначення найбільш перспективних біомаркерів - мікро РНК потрібно використовувати ручний аналіз карти взаємодій. Приклад результату який надає цей інструмент наведений на Рис. 3.1.

Такий аналіз був проведений окремо для всіх передбачених мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR та BC200 у різних типах раку. Результати аналізу наведені у таблиці 3.7. та 3.8. відповідно до мікро РНК.

Таблиця 3.7.

Мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR та мають найбільшу роль у розвитку різних типів раку

Передміхурова залоза	Нирки	Сечовий міхур
hsa-mir-1976	hsa-mir-1976	hsa-mir-612
hsa-mir-5095	hsa-mir-940	hsa-mir-1976
hsa-mir-940	hsa-mir-1343-3p	hsa-mir-940
hsa-mir-6893-5p	hsa-mir-612	hsa-mir-511-5p

Таблиця 3.8.

Мікро РНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR та мають найбільшу роль у розвитку різних типів раку

Передміхурова залоза	Нирки	Сечовий міхур
hsa-miR-28-5p	hsa-miR-708-5p	hsa-mir-7-5p
hsa-miR-7-5p	has-miR-1827	hsa-mir-3619-5p

Після порівняння усіх представлених вище результатів ми склали таблицю найбільш імовірних біомаркерів для різних типів раку, які можуть працювати у тандемі з довгими некодуючими РНК інтересу (Таблиця 3.9.).

Таблиця 3.9.

Найімовірніші мікро РНК, що можуть зв'язуватися з довгими некодуючими РНК інтересу і стимулювати розвиток пухлин

PANDAR			BC200		
Передміхурова залоза	Нирки	Сечовий міхур	Передміхурова залоза	Нирки	Сечовий міхур
hsa-miR-28-5p	hsa-miR-1827	hsa-mir-708-5p	hsa-mir-1976	hsa-mir-1976	hsa-mir-1976
hsa-miR-7-5p	hsa-miR-7-5p	hsa-miR-7-5p	hsa-mir-940	hsa-mir-940	hsa-mir-940
	hsa-miR-599	hsa-mir-3619-5p		hsa-mir-612	hsa-mir-612
	hsa-miR-612				

Рожевим позначені мікро РНК, які є спільними для усіх типів раку і можуть точно вказувати на наявність раку в сечостатеовій системі.

За рахунок багаточисловості проведеного аналізу та використанні різних методик ми досягли найбільш точного результату. Представлені в таблиці вище довгі некодуючі РНК можуть опосередковано впливати на розвиток пухлин сечостатевої системи через передбачені мікро РНК. Усі наявні в таблиці мікро РНК мають експериментально підтверджену роль при розвитку раку і найбільш широкий спектр дії на велику кількість генів, експресія яких відіграє роль у розвитку раку сечостатевих шляхів.

3.5. Визначення генів експресія яких регулюється передбаченими мікро РНК

Задля повного розуміння мішеней опосередкованої взаємодії довгих некодуючих РНК треба було визначити які гени більше всього піддаються регулюванню через мікро РНК. В цьому дослідженні ми вирішили визначити по 10 генів для кожного типу раку, для кожної окремої довгої некодуючої РНК інтересу, що грають роль у розвитку пухлин певних елементів сечостатевої системи і більше за інші гени регулюються передбаченими мікро РНК. Після проведення аналізу виявилось, що далеко не усі передбачені гени керуються передбаченими мікро РНК. В таблицю були віднесені виключно ті гени, які регулюються більше ніж 2 передбаченими мікро РНК, що посилює опосередкований вплив довгих некодуючих РНК інтересу на їх експресію (Табл. 3.10). Ці гени є найбільш вагомими при регуляції експресії довгими некодуючими РНК, проте в реальності генів, експресія яких модулюється при змінах кількості довгих некодуючих РНК значно більша. Ці гени є мішенями опосередкованого впливу, але довгі некодуючі РНК можуть впливати на експресію ще і на пряму. Для повного розуміння механізму впливу мають бути дослідженні усі ланки взаємодій які розгорнуть картину інтеракцій довгих некодуючих РНК через усі опосередковані мішені.

Таблиця 3.10.

Гени експресія яких регулюється передбаченими мікро РНК.

Фіолетовим позначено спільні гени для PANDAR та BC200.

Сечовий міхур		Нирки		Передміхурова залоза	
PANDAR	BC200	BC200	PANDAR	BC200	PANDAR
<i>PAK4</i>	<i>PAK4</i>	<i>ERGIC1</i>	<i>MRNIP</i>	<i>YWHAZ</i>	<i>YWHAZ</i>
<i>ANP32E</i>	<i>ANP32E</i>	<i>MRNIP</i>	<i>CAMLG</i>	<i>UBE2V2</i>	<i>UBE2V2</i>
<i>ENSA</i>	<i>ENSA</i>	<i>CAMLG</i>	<i>JADE2</i>	<i>ELOC</i>	<i>ELOC</i>
<i>SKP2</i>	<i>TARS2</i>	<i>CANX</i>	<i>TBC1D9E</i>	<i>ZNF7</i>	<i>ZNF7</i>
<i>RNF11</i>	<i>SLC35C2</i>	<i>MAPK9</i>		<i>NSMCE2</i>	<i>RMDN1</i>
				<i>RDMN</i>	<i>GRINA</i>
				<i>PTDSS</i>	<i>PTK2</i>
				<i>SUSD</i>	<i>SLC7A5</i>

З наведеної таблиці стає зрозуміло, що PANDAR та BC200 в основному опосередковано через мікро РНК впливають на експресію схожих генів. За кожного типу раку, який аналізувався в дослідженні половина або більше генів спільно регулюються як PANDAR так і BC200. Через попередні етапи відбору остаточно результати не є повними, проте мають найбільшу теоретичну можливість та експериментальні підтвердження взаємодій у інших типах раку. Такі дані можна використовувати в подальших дослідженнях, але бажано експериментально підтвердити ці взаємодії в пухлинах сечовстатевої системи.

Задля більш глибокого розуміння шляхів впливу довгих некодуючих РНК в клітині додатково провели визначення функцій усіх попередньо перерахованих генів (Додаток Г).

Виходячи з результатів аналізу стає очевидно, що гіперекспресія усіх зазначених вище генів тим чи іншим шляхом сприяє розвитку раку.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Участь довгих некодуючих РНК у розвитку онкологічних та інших захворювань вже доведена. Проте досліджується здебільшого їх прямий вплив на елементи клітини, зокремово на білки та ДНК. Існує багато доведених фактів взаємодії мікроРНК та довгих некодуючих РНК, в свою чергу мікро РНК можуть впливати на експресію деяких генів. Таким чином довгі некодуючі РНК опосередковано впливають на експресію деяких генів, що раніше не було достатньо досліджено. Довгими некодуючими РНК інтересу в роботі були PANDAR та BC200.

Під час дослідження виявилось, що PANDAR має значно більше можливих проміжних агентів у вигляді мікро РНК - 448, а BC200 має лише 40. Деякі з визначених для різних двох некодуючих РНК мікро РНК повторюються, що може вказувати на схожі механізми регуляції клітини. Для ретельного дослідження було обрано мікро РНК, що мають експериментально підтверджену роль у розвитку раку певних органів сечостатевої системи.

Для кожного типу раку, що аналізувався в роботі були відібрані гени експресія яких частіше за інших збільшується при пухлиноутворенні. При порівнянні мікро РНК, що відіграють роль у розвитку певних пухлин та генів які збільшуються в експресії при пухлино утворенні визначили можливі взаємодії - тобто гени мішені опосередкованого впливу довгих некодуючих РНК. При розвитку пухлин сечостатевої системи експресія довгих некодуючих РНК інтересу значно зростає, в свою чергу вони зв'язують з передбаченими мікро РНК. Зв'язані мікро РНК не можуть більше регулювати експресію генів мішеней, що призводить до її посилення. Таким чином, знаючи молекулярні мішені мікро РНК можна визначити як тандемні профілі експресії мікро РНК та довгих некодуючих РНК впливають на клітину.

Завдяки визначенню можливих взаємодій передбачених мікро РНК з генами, експресія яких зростає при пухлиноутворенні ми змогли виділити мікро РНК, що мають найбільш сильний та широкий вплив на онкогени. Ці мікро РНК можна використовувати як біомаркери у тандемі з довгими некодуючими РНК інтересу. Виявилось, що більшість мікро РНК не є специфічними до типу раку, проте точно вказують на пухлиноутворення в сечостатевої системі. Так для BC200 для усіх типів раку тандемними біомаркерними мікро РНК визначені: hsa-mir-1976, hsa-mir-940, hsa-mir-612. Для PANDAR тандемним маркером, що вказують на пухлини сечостатевої системи може слугувати hsa-miR-7-5p. Лише для PANDAR були визначені окремі тандемні біомаркерні мікро РНК, що є специфічними до типу раку. Так для раку передміхурової залози передбачено hsa-miR-28-5p, для раку нирок - hsa-miR-1827, hsa-miR-599, hsa-miR-612, для раку сечового міхура - hsa-mir-708-5p, hsa-mir-3619-5p. Мікро РНК, що визначені цим методом можуть використовуватись як біомаркери через найбільшу імовірність їх участі у розвитку пухлин. Такі результати були досягнуті за рахунок багатоетапності аналізу і великій кількості фільтрування попередніх результатів.

При проведенні цього аналізу виявилось, що основні гени мішені для PANDAR та BC200 однакові, що вказує на їх схожу роль при розвитку пухлин сечостатевої системи. Спільними генами мішенями для PANDAR та BC200 при розвитку раку нирок є - *MRNIP*, *CAMLG*, при розвитку раку передміхурової залози - *YWHAZ*, *UBE2V2*, *ELOC*, *ZNF7*, при розвитку раку сечового міхура - *PAK4*, *ANP32E*, *ENSA*. Також були визначені окремі мішені при різних типах раку. Після проведення аналізу функцій цих генів виявилось, що збільшення їх експресії сприяє розвитку пухлин. Більшість з цих генів відповідає за різні сигнальні каскади, посттрансляційну модифікацію білків, звільнення ДНК від гістонів, посилюють експресію та регулюють клітинний цикл. Деякі з генів мішеней відповідають за більш специфічні функції - інгібування p53, руйнування міжклітинного матриксу,

посилення абсорбції поживних речовин, адаптація клітини до кисневого голодування, та секреція імуносупресантів. Усі ці функції при гіперекспресії посилюються, що сприяє пухлино-утворенню.

Поставлені завдання були виконані у повному обсязі. Дані отримані в ході роботи мають максимальну імовірність через особливість структури роботи. Усі отримані в ході аналізу гени та мікро РНК мають експериментально доведені ролі у розвитку інших типів пухлин. Завдяки цій роботі стало відомо якими можуть бути мішені опосередкованого впливу довгих некодуючих РНК інтересу. У опублікованих роботах досліджувались лише прямі мішені впливу цих довгих некодуючих РНК. Як результат дана робота розширює розуміння механізмів впливу довгих некодуючих РНК на клітину та їх участь у розвитку пухлин. Робіт з схожими аналізами поки у вільному доступі немає, тому отримані результати треба експериментально підтвердити. Результати цієї роботи можна екстраполювати на динаміку розвитку інших типів пухлин. Мікро РНК для яких передбачена участь у цих процесах можна використовувати як мішені для протипухлинних ліків. Отриманні знання також є фундаментальними, результати вказують на молекулярні механізми регуляції експресії в пухлинах які раніше не були досліджені.

Окрім цього були визначені найбільш імовірні комаркери для довгих некодуючих РНК у вигляді мікро РНК для кожного типу раку. Ці результати можна використати для побудови більш точних тест-систем.

Існує значна кількість довгих некодуючих РНК, участь яких показана в розвитку різноманітних пухлин. В основному дослідники фокусуються на визначенні прямих мішеней впливу, проте дослідження опосередкованих мішеней не проводять. Для більш чіткого розуміння динаміки розвитку пухлин треба продовжувати визначати опосередковані мішені для усіх інших відкритих довгих некодуючих РНК. Бажано розробити алгоритм, який зможе робити це автоматично, враховуючи якомога більшу кількість баз даних .

ВИСНОВКИ

1. Найімовірніші мікро РНК, що можуть зв'язуватись з PANDAR та BC200 відповідно представлені списком у додатках A1 та A2

2. Найімовірнішими мікро РНК, що можуть відігравати роль у розвитку пухлин сечостатевої системи є hsa-miR-3934-3p, hsa-miR-3619-5p, hsa-miR-493-3p, hsa-miR-599, hsa-miR-612, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-10b-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-1827, hsa-miR-497-3p, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-5095, hsa-miR-940, hsa-miR-511-5p, hsa-miR-6893-5p, hsa-miR-1343-3p, hsa-miR-612, hsa-miR-6761-5p, hsa-miR-1976.

3. для BC200 для усіх типів раку тандемними біомаркерними мікро РНК є: hsa-mir-1976, hsa-mir-940, hsa-mir-612. Для PANDAR тандемним маркером, що вказують на пухлини сечостатевої системи може слугувати hsa-miR-7-5p. Для раку передміхурової залози тандменм маркером PANDAR є hsa-miR-28-5p, для раку нирок - hsa-miR-1827, hsa-miR-599, hsa-miR-612, для раку сечового міхура - hsa-mir-708-5p, hsa-mir-3619-5p.

4. Спільними генами мішенями для PANDAR та BC200 при розвитку раку нирок є - *MRNIP*, *CAMLG*, при розвитку раку передміхурової залози - *YWHAZ*, *UBE2V2*, *ELOC*, *ZNF7*, при розвитку раку сечового міхура - *PAK4*, *ANP32E*, *ENSA*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Міністерство охорони здоров'я України [Internet]. Міністерство охорони здоров'я України. [cited 2020May29]. Available from: <https://moz.gov.ua/>
2. Chakraborty, Tulshi & Saini, Vipin. (2018). FOUR MOST LIFE THREATENING UROGENITAL CANCER AND ITS MANAGEMENT. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 9. 3166-3174. 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(8).3166-74. DOI: 10.1007/s00345-018-2286-7
3. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. European Urology. 2017;71(1):96-108.
4. Mpanga, A. Y., Struck-Lewicka, W., Bujak, R., Markuszewski, M., Roslan, M., Kaliszan, R., & Markuszewski, M. J. (2017). Metabolomic heterogeneity of urogenital tract cancers analyzed by complementary chromatographic techniques coupled with mass spectrometry. Current Medicinal Chemistry, 24. doi:10.2174/0929867324666171006150326
5. Siracusano, S., Rizzetto, R., & Porcaro, A. B. (2020). Bladder cancer genomics. Urologia Journal, 039156031989901. doi:10.1177/0391560319899011
6. Miyahira, A. K., Sharp, A., Ellis, L., Jones, J., Kaochar, S., Larman, H. B., ... Soule, H. R. (2019). Prostate cancer research: The next generation; report from the 2019 Coffey-Holden Prostate Cancer Academy Meeting. The Prostate. doi:10.1002/pros.23934
7. Paiva, R. M., Zauli, D. A. G., Neto, B. S., & Brum, I. S. (2020). Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review. Clinical and Translational Oncology. doi:10.1007/s12094-020-02349-z
8. Wong, M. C. S., Goggins, W. B., Yip, B. H. K., Fung, F. D. H., Leung, C., Fang, Y., ... Ng, C. F. (2017). Incidence and mortality of kidney

cancer: temporal patterns and global trends in 39 countries. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-15922-4

9. Wolf, M. M., Kimryn Rathmell, W., & Beckermann, K. E. (2020). Modeling clear cell renal cell carcinoma and therapeutic implications. *Oncogene*. doi:10.1038/s41388-020-1234-3

10. Hsiang, W. R., Kenney, P. A., & Leapman, M. S. (2020). Redefining the Role of Surgical Management of Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Current Oncology Reports*, 22(4). doi:10.1007/s11912-020-0895-y

11. Hon, C.-C., Ramilowski, J. A., Harshbarger, J., Bertin, N., Rackham, O. J. L., Gough, J., ... Forrest, A. R. R. (2017). An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature*, 543(7644), 199–204. doi:10.1038/nature21374

12. Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., ... Zamir, A. (1965). Structure of a Ribonucleic Acid. *Science*, 147(3664), 1462–1465. doi:10.1126/science.147.3664.1462

13. Christov, C. P., Gardiner, T. J., Szuts, D., & Krude, T. (2006). Functional Requirement of Noncoding Y RNAs for Human Chromosomal DNA Replication. *Molecular and Cellular Biology*, 26(18), 6993–7004. doi:10.1128/mcb.01060-06

14. Zhu, Y. (2006). Sequence analysis of RNase MRP RNA reveals its origination from eukaryotic RNase P RNA. *RNA*, 12(5), 699–706. doi:10.1261/rna.2284906

15. Fica, S. M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N.-S., Lu, J., Koodathingal, P., ... Piccirilli, J. A. (2013). RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature*, 503(7475), 229–234. doi:10.1038/nature12734

16. Cech, T. R., & Steitz, J. A. (2014). The Noncoding RNA Revolution—Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell*, 157(1), 77–94. doi:10.1016/j.cell.2014.03.008

17. Zhao, J., Ohsumi, T. K., Kung, J. T., Ogawa, Y., Grau, D. J., Sarma, K., ... Lee, J. T. (2010). Genome-wide Identification of Polycomb-Associated

- RNAs by RIP-seq. *Molecular Cell*, 40(6), 939–953. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.011
18. Ma, L., Cao, J., Liu, L., Du, Q., Li, Z., Zou, D., ... Zhang, Z. (2018). LncBook: a curated knowledgebase of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gky960
 19. Goyal, N., Kesharwani, D., & Datta, M. (2018). Lnc-ing non-coding RNAs with metabolism and diabetes: roles of lncRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(10), 1827–1837. doi:10.1007/s00018-018-2760-9
 20. Samudiyata, Castelo-Branco, G., & Bonetti, A. (2018). Birth, coming of age and death: The intriguing life of long noncoding RNAs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 79, 143–152. doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.012
 21. Isoda, T., Morio, T., & Takagi, M. (2019). Noncoding RNA transcription at enhancers and genome folding in cancer. *Cancer Science*. doi:10.1111/cas.14107
 22. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell*, 146(3), 353–358. doi:10.1016/j.cell.2011.07.014
 23. Romero-Barrios, N., Legascue, M. F., Benhamed, M., Ariel, F., & Crespi, M. (2018). Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 46(5), 2169–2184. doi:10.1093/nar/gky095
 24. Bacolla, A., Wang, G., & Vasquez, K. M. (2015). New Perspectives on DNA and RNA Triplexes As Effectors of Biological Activity. *PLOS Genetics*, 11(12), e1005696. doi:10.1371/journal.pgen.1005696
 25. Vance, K. W., & Ponting, C. P. (2014). Transcriptional regulatory functions of nuclear long noncoding RNAs. *Trends in Genetics*, 30(8), 348–355. doi:10.1016/j.tig.2014.06.001
 26. Wang, P., Xue, Y., Han, Y., Lin, L., Wu, C., Xu, S., ... Cao, X. (2014). The STAT3-Binding Long Noncoding RNA lnc-DC Controls Human Dendritic Cell Differentiation. *Science*, 344(6181), 310–313. doi:10.1126/science.1251456

27. Chen, L.-L. (2016). Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(9), 761–772. doi:10.1016/j.tibs.2016.07.003
28. Sun, X., Haider Ali, M. S. S., & Moran, M. (2017). The role of interactions of long non-coding RNAs and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in regulating cellular functions. *Biochemical Journal*, 474(17), 2925–2935. doi:10.1042/bcj20170280
29. Choi, S.-W., Kim, H.-W., & Nam, J.-W. (2018). The small peptide world in long noncoding RNAs. *Briefings in Bioinformatics*. doi:10.1093/bib/bby055
30. Kazimierczyk, Marek, Kasproicz, K. M, Kasprzyk, E. M, et al. Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function [Internet]. MDPI. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020 [cited 2020May29]. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21031027>
31. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281–297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5
32. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00402
33. De Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., ... Burroughs, A. M. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, 35(9), 872–878. doi:10.1038/nbt.3947
34. Tanzer, A., & Stadler, P. F. (2004). Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *Journal of Molecular Biology*, 339(2), 327–335. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.065
35. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. doi:10.1038/nrm3838

36. Meijer, H. A., Smith, E. M., & Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 1135–1140. doi:10.1042/bst20140142
37. By Narayanese at English Wikipedia, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=17936768>
38. Ipsaro, J. J., & Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), 20–28. doi:10.1038/nsmb.2931
39. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00402
40. Stefani G. Small non-coding RNAs in animal development / Giovanni Stefani, Frank J. Slack // NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY. - 2008. - Vol.9 - P. 219-230.
41. Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 16(7), 421–433. doi:10.1038/nrg3965
42. Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), 368–376. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.009
43. Vasudevan, S., & Steitz, J. A. (2007). AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128(6), 1105–1118. doi:10.1016/j.cell.2007.01.038
44. Xiao, M., Li, J., Li, W., Wang, Y., Wu, F., Xi, Y., ... Yu, W. (2016). MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biology*, 14(10), 1326–1334. doi:10.1080/15476286.2015.1112487
45. Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., & Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature Cell Biology*, 11(9), 1143–1149. doi:10.1038/ncb1929

46. Chou, C.-H., Shrestha, S., Yang, C.-D., Chang, N.-W., Lin, Y.-L., Liao, K.-W., ... Huang, H.-D. (2017). miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D296–D302. doi:10.1093/nar/gkx1067
47. Hung, T., Wang, Y., Lin, M. F., Koegel, A. K., Kotake, Y., Grant, G. D., ... Chang, H. Y. (2011). Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature Genetics*, 43(7), 621–629. doi:10.1038/ng.848
48. Chen, D., Lu, T., Tan, J., Li, H., Wang, Q., & Wei, L. (2019). Long Non-coding RNAs as Communicators and Mediators Between the Tumor Microenvironment and Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 9. doi:10.3389/fonc.2019.00739
49. Li, J., Li, Z., Zheng, W., Li, X., Wang, Z., Cui, Y., & Jiang, X. (2017). PANDAR: a pivotal cancer-related long non-coding RNA in human cancers. *Mol. BioSyst.*, 13(11), 2195–2201. doi:10.1039/c7mb00414a
50. Jiang, Y., Feng, E., Sun, L., Jin, W., You, Y., Yao, Y., & Xu, Y. (2017). An increased expression of long non-coding RNA PANDAR promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 685–691. doi:10.1016/j.biopha.2017.08.124
51. Han, L., Wang, B., Wang, R., Wang, Z., Gong, S., Chen, G., ... Xu, W. (2019). Prognostic and Clinicopathological Significance of Long Non-coding RNA PANDAR Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*, 9. doi:10.3389/fonc.2019.01337
52. Zou, Y., Zhong, Y., Wu, J., Xiao, H., Zhang, X., Liao, X., ... Zhang, F. (2017). Long non-coding PANDAR as a novel biomarker in human cancer: A systematic review. *Cell Proliferation*, 51(1), e12422. doi:10.1111/cpr.12422
53. Zhan, Y., Lin, J., Liu, Y., Chen, M., Chen, X., Zhuang, C., ... Huang, W. (2016). 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). doi:10.1186/s13046-016-0354-7

54. Shin H, Kim Y, Kim M, Lee Y. BC200 RNA: An Emerging Therapeutic Target and Diagnostic Marker for Human Cancer [Internet]. Digital Object Identifier System. Korean Society for Molecular and Cellular Biology; 2018 [cited 2020May29]. Available from: <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0425>
55. Briggs, J. A., Wolvetang, E. J., Mattick, J. S., Rinn, J. L., & Barry, G. (2015). Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Mammalian Nervous System Development, Plasticity, Disease, and Evolution. *Neuron*, 88(5), 861–877. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.045
56. Jang, S., Shin, H., Lee, J., Kim, Y., Bak, G., & Lee, Y. (2017). Regulation of BC200 RNA-mediated translation inhibition by hnRNP E1 and E2. *FEBS Letters*, 591(2), 393–405. doi:10.1002/1873-3468.12544
57. Tsagakis, I., Douka, K., Birds, I., & Aspden, J. L. (2020). Long non-coding RNAs in development and disease: conservation to mechanisms. *The Journal of Pathology*. doi:10.1002/path.5405
58. Cao, X.-G., Zhao, R., Zhu, C., Li, X., Cao, W., Zong, H., & Hu, H. (2016). BC200 LncRNA a potential predictive marker of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients. *OncoTargets and Therapy*, 2221. doi:10.2147/ott.s99401
59. Sosińska, P., Mikuła-Pietrasik, J., & Książek, K. (2015). The double-edged sword of long non-coding RNA: The role of human brain-specific BC200 RNA in translational control, neurodegenerative diseases, and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 58–67. doi:10.1016/j.mrrev.2015.08.002
60. Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., ... Marsh, C. B. (2008). Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS ONE*, 3(11), e3694. doi:10.1371/journal.pone.0003694
61. Sohel, M. M. H. (2020). Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis. *Life Sciences*, 117473. doi:10.1016/j.lfs.2020.117473

62. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., ... Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
63. Sohel M. Choice of samples in extracellular microRNA research: Which fraction is better- exosomal or nonexosomal? *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 2018;1(1):11. doi:10.5455/jabet.d3.
64. Long, W., Zhao, C., Ji, C., Ding, H., Cui, Y., Guo, X., ... Liu, J. (2014). Characterization of Serum MicroRNAs Profile of PCOS and Identification of Novel Non-Invasive Biomarkers. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(5), 1304–1315. doi:10.1159/000358698
65. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7223–7233. doi:10.1093/nar/gkr254
66. Zhao, C., Sun, X., & Li, L. (2019). Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA*, 1(1). doi:10.1186/s41544-019-0039-4
67. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. doi:10.1038/ncb1596
68. Maas, S. L. N., Breakefield, X. O., & Weaver, A. M. (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology*, 27(3), 172–188. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.003
69. Schwarzenbach, H., & Gahan, P. (2019). MicroRNA Shuttle from Cell-To-Cell by Exosomes and Its Impact in Cancer. *Non-Coding RNA*, 5(1), 28. doi:10.3390/ncrna5010028
70. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7223–7233. doi:10.1093/nar/gkr254

71. Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., ... Weber, C. (2009). Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection. *Science Signaling*, 2(100), ra81–ra81. doi:10.1126/scisignal.2000610
72. Zhang W, Zhang XJ, Chao SY, Chen SJ, Zhang ZJ, Zhao J, et al. Update on urine as a biomarker in cancer: a necessary review of an old story. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2020;20(5):477–88.
73. Aslan ES. Use of miRNA as a Biomarker in Prostate Cancer and New Approaches. *Turkish Journal of Oncology*. 2020; 10.5505/tjo.2019.2202
74. Zhang, X., Hong, R., Chen, W., Xu, M., & Wang, L. (2019). The role of long noncoding RNA in major human disease. *Bioorganic Chemistry*, 103214. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103214
75. Zaenker, P., & Ziman, M. R. (2013). Serologic Autoantibodies as Diagnostic Cancer Biomarkers--A Review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 22(12), 2161–2181. doi:10.1158/1055-9965.epi-13-0621
76. ALLEGRA, A., ALONCI, A., CAMPO, S., PENNA, G., PETRUNGARO, A., GERACE, D., & MUSOLINO, C. (2012). Circulating microRNAs: New biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 41(6), 1897–1912. doi:10.3892/ijo.2012.1647
77. Gu W. Expression and Significance of Circulating MicroRNA-31 in Lung Cancer Patients. *Medical Science Monitor*. 2015;21:722–6. doi:10.12659/MSM.893213.
78. Powrózek, T., Krawczyk, P., Kowalski, D. M., Kuźnar-Kamińska, B., Winiarczyk, K., Olszyna-Serementa, M., ... Milanowski, J. (2015). Application of plasma circulating microRNA-448, 506, 4316, and 4478 analysis for non-invasive diagnosis of lung cancer. *Tumor Biology*, 37(2), 2049–2055. doi:10.1007/s13277-015-3971-4

79. Cao M-X, Jiang Y-P, Tang Y-L, Liang X-H. The crosstalk between lncRNA and microRNA in cancer metastasis: orchestrating the epithelial-mesenchymal plasticity. *Oncotarget*. 2016;8(7):12472–83.
80. Jalali, S., Bhartiya, D., Lalwani, M. K., Sivasubbu, S., & Scaria, V. (2013). Systematic Transcriptome Wide Analysis of lncRNA-miRNA Interactions. *PLoS ONE*, 8(2), e53823. doi:10.1371/journal.pone.0053823
81. Zhang, W., Tang, G., Zhou, S., & Niu, Y. (2019). LncRNA-miRNA interaction prediction through sequence-derived linear neighborhood propagation method with information combination. *BMC Genomics*, 20(S11). doi:10.1186/s12864-019-6284-y
82. Zheng, Y., Sun, S., Yu, M., & Fu, X. (2019). Identification of potential hub-lncRNAs in ischemic stroke based on Subpathway-LNCE method. *Journal of Cellular Biochemistry*. doi:10.1002/jcb.28554
83. Cosmic. Cancer Gene Census [Internet]. Cancer Gene. 2020 [cited 2020May29]. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/census>
84. Homo sapiens - Ensembl genome browser 100. [cited 2020May29]. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens
85. TargetScanHuman 7.2. [cited 2020May29]. Available from: http://www.targetscan.org/vert_72/
86. Paraskevopoulou, M. D., Karagkouni, D., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., & Hatzigeorgiou, A. G. (2018). microCLIP super learning framework uncovers functional transcriptome-wide miRNA interactions. *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-06046-y
87. DIANA TOOLS. [cited 2020May29]. Available from: <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>
88. daily Fbusiness, magazine Ftop monthly science, site Anew technology news, start-up Aspecialist. Leveraging life science data to reveal exciting new insights [Internet]. omicX. omicX; [cited 2020May29]. Available from: <https://omictools.com/>

89. Witkos T. M. Practical Aspects of microRNA Target Prediction / T.M Witkos, E Koscianska, W.J Krzyzosiak // Curr Mol Med. - 2011. - Vol. 11(2) - P. 93–109.
90. LncBook a curated knowledgebase of human long non-coding RNAs [Internet]. LncBook - BIG Data Center. [cited 2020May29]. Available from: <https://bigd.big.ac.cn/lncbook>
91. Xie, B., Ding, Q., Han, H., & Wu, D. (2013). miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature. *Bioinformatics*, 29(5), 638–644. doi:10.1093/bioinformatics/btt014
92. Wong N, Chen Y, Chen S, Wang X (2018) OncomiR: an online resource for exploring pan-cancer microRNA dysregulation. *Bioinformatics*, 34(4):713-715.
93. Zhen Yang, Liangcai Wu, Anqiang Wang, et al. "dbDEMC 2.0: updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers". *Nucleic Acids Research*. 2017; 45(D1):D812-D818.
94. Xie, B., Ding, Q., Han, H., & Wu, D. (2013). miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature. *Bioinformatics*, 29(5), 638–644. doi:10.1093/bioinformatics/btt014
95. Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., ... Forbes, S. A. (2018). COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gky1015
96. Dimitra Karagkouni, Maria D. Paraskevopoulou, Serafeim Chatzopoulos, Ioannis S. Vlachos, Spyros Tastsoglou, Ilias Kanellos, Dimitris Papadimitriou, Ioannis Kavakiotis, Sofia Maniou, Giorgos Skoufos, Thanasis Vergoulis, Theodore Dalamagas, Artemis G. Hatzigeorgiou; DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions, *Nucleic Acids Research*, gkx1141, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>
97. Wu C, Bardes EE, Jegga AG, and Aronow BJ. ToppMiR: ranking of microRNAs and their mRNA targets based on biological functions and context. doi:10.1093/nar/gku409

98. Chang, L., Zhou, G., Soufan, O. and Xia, J. (2020) miRNet 2.0 - network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. Nucl. Acids Res. doi: 10.1093/nar/gkaa467
99. Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Iny Stein T, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan - Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, and Lancet D. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis , Current Protocols in Bioinformatics(2016), 54:1.30.1 - 1.30.33.doi: 10.1002 / cpbi.5.

ДОДАТОК А1

Мікро РНК що можуть потенційно зв'язуватись довгою некодуючою РНК BC200

Transcript ID	MiRNA ID	Score	Energy	Binding Start	Binding End	Experimental Evidence
HSALNT0289486	hsa-miR-619-5p	192.00	-42.14	15	36	no
HSALNT0289486	hsa-miR-5095	187.00	-41.97	9	29	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4673	167.00	-31.64	76	97	no
HSALNT0289486	hsa-miR-940	159.00	-20.83	75	95	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6749-3p	157.00	-22.98	43	64	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6778-3p	157.00	-20.53	29	49	no
HSALNT0289486	hsa-miR-2682-3p	155.00	-25.04	38	57	no
HSALNT0289486	hsa-miR-511-5p	154.00	-12.40	131	151	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4437	153.00	-20.44	56	76	no
HSALNT0289486	hsa-miR-670-5p	152.00	-20.56	28	46	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6893-5p	152.00	-20.94	75	95	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4514	152.00	-20.29	79	96	no
HSALNT0289486	hsa-miR-939-3p	151.00	-22.41	59	79	no
HSALNT0289486	hsa-miR-1343-3p	150.00	-21.06	60	80	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4531	150.00	-14.58	106	123	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6781-3p	148.00	-21.41	38	57	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4487	148.00	-20.38	20	39	no
HSALNT0289486	hsa-miR-5089-5p	148.00	-14.13	13	35	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6504-3p	148.00	-14.35	10	31	no

HSALNT0289486	hsa-miR-4674	147.00	-22.85	57	77	no
HSALNT0289486	hsa-miR-378g	146.00	-14.70	60	78	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4692	145.00	-19.16	74	96	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4670-3p	145.00	-10.18	152	173	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4736	145.00	-22.66	78	94	no
HSALNT0289486	hsa-miR-612	144.00	-33.19	75	97	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6506-5p	144.00	-13.78	14	36	no
HSALNT0289486	hsa-miR-7151-3p	144.00	-16.51	9	29	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6807-5p	144.00	-25.48	1	21	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6761-5p	143.00	-18.97	24	43	no
HSALNT0289486	hsa-miR-9500	143.00	-13.14	158	176	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4324	142.00	-15.63	25	44	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4645-5p	142.00	-13.51	79	97	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6834-5p	142.00	-14.14	157	178	no
HSALNT0289486	hsa-miR-516b-5p	141.00	-13.58	104	125	no
HSALNT0289486	hsa-miR-7113-3p	141.00	-19.27	25	47	no
HSALNT0289486	hsa-miR-6808-5p	140.00	-25.03	74	95	no
HSALNT0289486	hsa-miR-1976	140.00	-23.97	44	62	no
HSALNT0289486	hsa-miR-4680-5p	140.00	-14.86	64	84	no
HSALNT0289486	hsa-miR-7158-5p	140.00	-25.28	51	74	no

ДОДАТОК А2

Мікро РНК що можуть потенційно зв'язуватись довгою некодуючою РНК PANDAR

Transcript ID	MiRNA ID	Score	Energy	Binding Start	Binding End	Experimental Evidence
HSALNT0105595	hsa-miR-4732-5p	169.00	-33.45	346	368	no
HSALNT0105595	hsa-miR-4742-5p	169.00	-24.62	663	686	no
HSALNT0105595	hsa-miR-8073	168.00	-28.76	830	851	no
HSALNT0105595	hsa-miR-4684-5p	167.00	-24.61	1382	1404	no
HSALNT0105595	hsa-miR-3187-5p	167.00	-27.43	801	824	no
HSALNT0105595	hsa-miR-8057	166.00	-20.74	160	180	no
HSALNT0105595	hsa-miR-6860	165.00	-27.90	804	824	no
HSALNT0105595	hsa-miR-8089	165.00	-36.33	841	866	no
HSALNT0105595	hsa-miR-4667-5p	164.00	-26.14	845	866	no
HSALNT0105595	hsa-miR-6857-5p	164.00	-29.65	846	865	no
HSALNT0105595	hsa-miR-450b-3p	164.00	-17.37	658	679	no
HSALNT0105595	hsa-miR-3934-3p	164.00	-31.45	942	963	no
HSALNT0105595	hsa-miR-4647	164.00	-23.09	874	897	no
HSALNT0105595	hsa-miR-6503-5p	164.00	-30.61	1119	1143	no
HSALNT0105595	hsa-miR-6877-5p	163.00	-34.53	485	507	no
HSALNT0105595	hsa-miR-3619-5p	163.00	-26.32	1004	1028	no
HSALNT0105595	hsa-miR-493-3p	163.00	-24.96	246	268	no
HSALNT0105595	hsa-miR-599	163.00	-16.98	1206	1229	no
HSALNT0105595	hsa-miR-4700-5p	162.00	-26.54	845	866	no

HSALNT0105595	hsa-miR-518c-5p	162.00	-19.44	156	177	no
HSALNT0105595	hsa-miR-612	162.00	-25.06	800	824	no
HSALNT0105595	hsa-miR-3064-5p	162.00	-23.46	286	306	no
HSALNT0105595	hsa-miR-4254	162.00	-25.67	982	1003	no
HSALNT0105595	hsa-miR-708-5p	161.00	-18.61	474	494	no
HSALNT0105595	hsa-miR-6780a-5p	161.00	-25.30	476	498	no
HSALNT0105595	hsa-miR-139-3p	161.00	-26.64	781	803	no
HSALNT0105595	hsa-miR-1226-5p	161.00	-23.36	1147	1172	no
HSALNT0105595	hsa-miR-5705	160.00	-24.82	1321	1343	no
HSALNT0105595	hsa-miR-5189-5p	160.00	-28.36	796	824	no
HSALNT0105595	hsa-miR-4696	159.00	-13.83	1141	1163	no
HSALNT0105595	hsa-miR-5572	159.00	-25.12	200	219	no
HSALNT0105595	hsa-miR-7155-5p	159.00	-25.21	186	203	no
HSALNT0105595	hsa-miR-10b-3p	159.00	-21.44	993	1014	no
HSALNT0105595	hsa-miR-28-5p	159.00	-19.33	474	494	no
HSALNT0105595	hsa-miR-6779-5p	159.00	-24.94	478	498	no
HSALNT0105595	hsa-miR-376c-3p	159.00	-18.43	1400	1420	no
HSALNT0105595	hsa-miR-449c-3p	159.00	-17.14	1093	1115	no
HSALNT0105595	hsa-miR-558	159.00	-18.41	1022	1040	no
HSALNT0105595	hsa-miR-6726-5p	159.00	-37.05	1318	1338	no
HSALNT0105595	hsa-miR-1827	159.00	-20.21	1449	1467	no
HSALNT0105595	hsa-miR-3166	159.00	-20.41	1296	1317	no

HSALNT0105595	hsa-miR-6858-5p	158.00	-28.15	929	952	no
HSALNT0105595	hsa-miR-497-3p	158.00	-18.92	571	593	no
HSALNT0105595	hsa-miR-584-5p	158.00	-24.47	1124	1146	no
HSALNT0105595	hsa-miR-887-5p	158.00	-20.25	1456	1477	no
HSALNT0105595	hsa-miR-3194-5p	158.00	-21.16	777	797	no
HSALNT0105595	hsa-miR-3928-5p	158.00	-20.30	858	880	no
HSALNT0105595	hsa-miR-3974	158.00	-16.50	244	267	no
HSALNT0105595	hsa-miR-4459	158.00	-29.65	834	858	no
HSALNT0105595	hsa-miR-7-5p	157.00	-17.19	331	353	no

ДОДАТОК Б1

Передбачені мікро РНК що відіграють роль у розвитку раку та можуть зв'язуватись довгою некодуючою РНК PANDAR

[illegible]

[illegible]

[illegible]

ДОДАТОК В1

Гени гіперекспресія яких відіграє роль у розвитку раку нирок

Ген	Кількість копій			Експресія		
	Ріст	Втрати	Перевірено	Овер	Гіпо	Перевірено
SLU7	5	-	514	153	8	534
RARS	7	-	514	151	-	534
CANX	5	-	514	134	3	534
ZNF257	1	-	514	124	52	534
IK	5	-	514	120	4	534
ASIP	1	-	514	119	-	534
DCTN4	5	-	514	117	2	534
MST1	-	6	514	117	-	534
TTLL9	1	-	514	114	-	534
FAF2	5	-	514	114	7	534
TNIP1	5	-	514	113	8	534
HAUS7	-	4	514	107	-	534
ANKHD1	5	-	514	106	4	534
FOXS1	1	-	514	105	-	534
MRNIP	5	-	514	104	1	534
PWWP2						
A	5	-	514	104	6	534
MAPK9	5	-	514	99	4	534
NPM1	5	-	514	99	-	534
PHYKPL	5	-	514	96	3	534
YIPF5	5	-	514	95	9	534
TREX2	-	4	514	95	-	534
ZNF346	5	-	514	94	6	534
CDC23	5	-	514	93	5	534
HARS	5	-	514	93	4	534
LARS	5	-	514	92	1	534
ERGIC1	5	-	514	90	-	534
RUFY1	5	-	514	90	6	534
C20orf2						
03	1	-	514	90	-	534
RBM22	5	-	514	90	6	534
GALNT1						
5	-	5	514	89	-	534
CAMLG	5	-	514	89	1	534
KIAA175						
5	1	-	514	88	-	534
MAOA	-	4	514	88	-	534
FAM114						
A2	5	-	514	87	7	534
UBE2D2	5	-	514	87	1	534

WNK3	1	4	514	87	-	534
THG1L	5	-	514	86	1	534
ERGIC3	1	-	514	86	8	534
JADE2	5	-	514	85	9	534
ADIG	1	-	514	84	-	534
CLK4	5	-	514	84	-	534
RIOK2	3	-	514	84	8	534
DMXL1	4	-	514	83	3	534
RACK1	4	-	514	82	2	534
PRELID2	5	-	514	82	-	534
DIAPH1	5	-	514	81	4	534
TBC1D9						
B	5	-	514	80	11	534
SMAD5	5	-	514	79	8	534
TIMP4	-	5	514	79	-	534
WDR55	5	-	514	79	4	534

ДОДАТОК В2

**Гени гіперекспресія яких відіграє роль у розвитку раку
передміхурової залози**

Ген	Кількість копій			Експресія		
	Ріст	Втрати	Перевірено	Овер	Гіпо	Перевірено
FAM182B	1	-	948	133	1	498
ZNF706	27	-	948	100	-	498
INTS8	28	-	948	99	4	498
MAL2	24	-	948	96	8	498
PABPC1	26	-	948	95	1	498
COPS5	18	-	948	93	6	498
ELOC	26	-	948	90	-	498
DCAF13	26	-	948	89	2	498
YWHAZ	26	-	948	86	2	498
TMEM70	26	-	948	84	2	498
DERL1	21	-	948	84	9	498
ATP6V1C	25	-	948	83	8	498
CHMP4C	27	-	948	83	5	498
ESRP1	29	-	948	83	8	498
TRMT12	25	-	948	83	7	498
TMEM65	25	-	948	82	-	498
POLR2K	26	-	948	82	2	498
C8orf76	21	-	948	81	2	498
ANKRD46	26	-	948	81	5	498
KCNK15	1	-	948	81	-	498
MTERF3	28	-	948	80	1	498
UTP23	21	-	948	80	6	498
PTDSS1	28	-	948	80	5	498
NSMCE2	27	-	948	80	-	498
EMC2	23	-	948	79	12	498
ZFP41	7	-	948	79	10	498
ZNF696	7	-	948	78	4	498
ZNF7	7	-	948	77	7	498
KIF16B	-	2	948	76	17	498
ZNF16	7	-	948	76	15	498
UBE2V2	6	-	948	76	20	498
SCRIB	7	-	948	75	9	498
RIPK2	28	-	948	75	2	498
GRINA	7	-	948	75	-	498
TPD52	28	-	948	75	3	498
RMDN1	24	-	948	74	21	498
TBC1D31	21	-	948	74	-	498

ABCC11	3	-	948	74	-	498
MRPL15	10	-	948	73	1	498
ENY2	24	-	948	72	1	498
OSGIN2	28	-	948	72	7	498
RNF139	25	-	948	72	6	498
TCEA1	10	-	948	71	14	498
ARHGAP3						
9	7	-	948	71	1	498
ZNF250	7	-	948	71	8	498
VIRMA	29	-	948	70	1	498
OTUD6B	29	-	948	70	5	498
DECR1	28	-	948	70	3	498
NUDCD1	24	-	948	69	5	498
PTK2	12	-	948	69	19	498

ДОДАТОК В3

Гени гіперекспресія яких відіграє роль у розвитку раку сечового міхура

Ген	Кількість копій			Експресія		
	Ріст	Втрати	Перевірено	Овер	Гіпо	Перевірено
BCL2L1	12	-	399	260	-	408
ZNF341	10	-	399	204	1	408
CHMP4B	11	-	399	199	-	408
FXD4	1	-	399	196	-	408
MYLK2	11	-	399	180	-	408
PAGE2B	-	4	399	176	-	408
PI4KB	9	-	399	174	20	408
C20orf144	10	-	399	154	-	408
APH1A	6	-	399	154	3	408
NECAB3	10	-	399	153	1	408
ABHD12	2	-	399	144	-	408
HIST2H2BE	4	-	399	143	-	408
SLC35C2	3	-	399	143	3	408
ZNF337	1	-	399	142	-	408
POGZ	11	-	399	140	3	408
ZNF706	55	-	399	140	1	408
RALY	10	-	399	140	-	408
DEDD	46	-	399	137	-	408
CCM2L	11	-	399	136	12	408
BLCAP	3	-	399	136	2	408
SF3B4	5	-	399	136	2	408
LYSMD1	9	-	399	136	3	408
ANP32E	6	-	399	135	6	408
TDRKH	13	-	399	135	-	408
CDK5RAP1	9	-	399	134	1	408
B4GALT3	45	-	399	133	-	408
SKP2	25	-	399	132	-	408
SETDB1	12	-	399	131	11	408
DYNLRB1	6	-	399	130	1	408
PFDN4	4	-	399	130	-	408
DCAF13	33	-	399	129	4	408
RAD1	24	-	399	128	-	408
DDX27	6	-	399	128	-	408
DNTTIP1	3	-	399	128	1	408
TARS2	10	-	399	127	2	408
E2F1	10	-	399	126	15	408

AMOT	1	13	399	126	-	408
FOXSI	11	-	399	125	-	408
NETO2	4	1	399	124	-	408
REM1	9	-	399	123	-	408
FAM104B	-	4	399	123	-	408
NDUFS2	45	-	399	123	16	408
TUFT1	11	-	399	123	9	408
VPS45	6	-	399	121	9	408
CRNKL1	3	-	399	121	28	408
ENSA	13	-	399	120	30	408
CEP250	5	-	399	120	1	408
COMMD7	7	-	399	118	2	408
PAK4	14	-	399	118	4	408
CATSPERG	16	-	399	118	-	408

ДОДАТОК Г

Функції генів опосередковане регулювання яких передбачено для довгих некодуючих РНК інтересу

PAK4	Активатор p21 - відповідь на пошкодження ДНК
ANP32E	Зв'язує гістони - звільняє від них велику кількість ДНК - неконтрольована експресія, інгібує фосфатазу
ENSA	Регулятор клітинного циклу
MRNIP	Звільняє ДНК від гістонів
CAMLG	Імуносупресант - виділяється з клітини
YWHAZ	Збільшує чутливість до інсуліну
UBE2V2	Контроль клітинного циклу, стимул для ділення
ELOC	Транскрипційний фактор, посилює транскрипцію усіх генів
ZNF7	Транскрипційний фактор
SKP2	Сигналінг, убіквітинування білків
RNF11	Сигналінг, убіквітинування білків
TARS2	tРНК синтетаза - пришвидшення біосинтезу
SLC35C2	Відповідь клітини на гіпоксію
ERGIC1	Посттрансляційна модифікація білків
CANX	Білковий шаперон, посттрансляційна модифікація білків
MAPK9	Основний елемент сигнального каскаду з широким спектром дії, інактивує p53
JADE2	Ацетилювання гістонів - звільнення ДНК
NSMCE2	Посилення транскрипції та ядерного транспорту
RMDN1	Регулювання побудови цитоскелету
GRINA	Зв'язування заліза, сигнальні каскади
PTK2	Міжклітинне сигналювання, руйнування міжклітинного матриксу - метастазування
SLC7A5	Посилює поглинання клітиною амінокислот