

АБЕРРАНТНАЯ ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ КАК ФАКТОР РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК ЛИНИИ HT-29

Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г., Габричидзе П.Н., Донцов В.А., Легостаев В.М., Шляхова О.В., Лиман Н.А., Солнцева А.А., Крохмаль Ю.Н.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: k.denees@yandex.ru

Лучевая терапия играет важную роль в лечении колоректального рака, однако полного клинического ответа удается достичь далеко не во всех случаях. Основная проблема, в которой заключается не полный ответ опухолей на лечение, – радиорезистентность опухолевых клеток. И, хотя ряд молекулярных маркеров был предложен в качестве предикторов ответа на лучевую терапию, ни один из них так и не вошел в клиническую практику. Поэтому целью исследования стал скрининг предикторов радиорезистентности колоректального рака в модельном эксперименте на основании данных по aberrантной экспрессии генов, регулирующих систему сигнальных каскадов, вовлеченных в репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла и апоптоза. В исследовании использовалась культура клеток человека HT-29. Методом RT-qPCR определяли величины транскрипционной активности 32 генов (*ATM, AKT, BRCA1, BRCA2, BRIP, CDK1, CDKN1B, CCND1, CCND3, FGFR2, HIST1, H2AX, KU70, EXO1, PTEN, RAD50, RAP80, RNF168, TOPB1, RIF1TP53, MDM2, XRCC4, BAX, BCL2, CASP8, CASP3, CASP9, RBBP8, EP300, LIG4, C-FLIP*). В клетках, подвергнутых облучению в дозах 5 и 7 Гр, наблюдались статистически значимое ($p < 0,05$) повышение экспрессии *BRCA2, H2AX, CASP9* и *RBBP8* и снижение экспрессии *BCL2* относительно интактных клеток. В клетках, подвергнутых облучению в дозе 7 Гр, также наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) повышение экспрессии гена *RIF1*. В ходе исследования было установлено, что клеточная линия HT-29 исходно гетерогенна по экспрессии ряда генов и лучевая терапия приводит к селективному выживанию определенного пула клеток, обладающих более мощной системой репарации ДНК (*BRCA2, H2AX* и *RBBP8*) и более эффективной системой регуляции апоптоза (*CASP9, BCL2*).

Ключевые слова: лучевая терапия, колоректальный рак, культура клеток, экспрессия генов, апоптоз, репарация ДНК.

ABERRANT TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF GENES AS A FACTOR OF HT-29 CELLS RADIORESISTANCE

Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G., Gabrichidze P.N., Dontsov V.A., Legostaev V.M., Shlyakhova O.V., Liman N.A., Solntseva A.A., Krokhmal Yu.N.

National Medical Research Oncology Center, Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: k.denees@yandex.ru

Radiotherapy plays an important role in colorectal cancer treatment, but a complete clinical response is far from being achieved in all cases. The main problem is the tumor cell radioresistance. Although a number of molecular markers have been proposed as predictors of the response to radiotherapy, not one of them has ever entered clinical practice. Therefore, the aim of the study was to screen for predictors of radioresistance of colorectal cancer in a model experiment based on aberrant expression of genes that regulate signaling cascades of DNA repair, cell cycle regulation, and apoptosis. Cell culture HT-29 was used in the study. The RT-qPCR method was used to determine the relative expression of 32 genes (*ATM, AKT, BRCA1, BRCA2, BRIP, CDK1, CDKN1B, CCND1, CCND3, FGFR2, HIST1, H2AX, KU70, EXO1, PTEN, RAD50, RAP80, RNF168, TOPB1, RIF1TP53, MDM2, XRCC4, BAX, BCL2, CASP8, CASP3, CASP9, RBBP8, EP300, LIG4, C-FLIP*). In cells subjected to irradiation at doses of 5 and 7 Gy, a statistically significant ($p < 0.05$) increase in expression of *BRCA2, H2AX, CASP9* and *RBBP8* and decrease in *BCL2* expression relative to intact cells were observed. Also in cells subjected to 7 Gy irradiation a statistically significant ($p < 0.05$) increase in *RIF1* gene expression was observed. The study showed that the HT-29 cell is initially heterogeneous in the expression of certain genes and that five-day radiotherapy leads to selective survival of specific pool of cells with a more powerful DNA repair system (*BRCA2, H2AX, RBBP8*) and a more efficient apoptosis regulation system (*CASP9, BCL2*).

Keywords: radiation therapy, colorectal cancer, cell culture, gene expression, apoptosis, DNA repair.

Во всем мире среди онкологических заболеваний рак толстой и прямой кишок занимает 4-е место по числу летальных исходов. Так, в 2018 г. было зарегистрировано более 310 000 смертей от рака прямой кишки [1].

По причине высокой распространенности разработка методов и подходов для лечения данных нозологий является одним из актуальных вопросов онкологии. Лучевая терапия (ЛТ) при колоректальном раке играет важную роль как в облегчении симптомов, так и в локальном контроле заболевания. ЛТ снижает риск возникновения локального рецидива и вызывает уменьшение размеров опухоли. Однако полного клинического ответа удается достичь в крайне малом числе случаев. Основная проблема, в которой заключается столь низкий ответ опухолей на лечение, – радиорезистентность опухолевых клеток. Хотя ряд маркеров был предложен в качестве предикторов ответа на химиолучевую терапию, ни один из них пока не используется в клинической практике. Поскольку данная группа заболеваний является гетерогенной, очень сложно найти универсальный молекулярный маркер для прогнозирования результата лечения. Эксперименты *in vitro* с использованием клеточных линий выявили потенциал некоторых генетических локусов (*XRCC3*, *XRCC2*, *FGFR4* и *NF-KB*) в отношении чувствительности к ЛТ, однако все равно остается необходимость в дальнейшем изучении радиорезистентности опухолевых клеток [2, 3, 4].

Поэтому целью исследования стал скрининг предикторов радиорезистентности колоректального рака в модельном эксперименте на основании данных по aberrантной экспрессии генов, регулирующих систему сигнальных каскадов, вовлеченных в репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла и апоптоза.

Материалы и методы исследования

В исследовании использовалась культура клеток человека HT-29. С применением набора COrDIS Sprint проводилось генотипирование клеток для проверки соответствия стандартному генотипу данной клеточной линии и отсутствия контаминации. Культивирование клеток проводилось в стерильных флаконах (RPMI-1640, 10%-ная фетальная телячья сыворотка, гентамицин 50 мкг/мл) при 5% CO₂, 95% влажности и 37⁰C в CO₂-инкубаторе CB-150 [5].

Для модельного эксперимента облучение проводили 5 раз через каждые 24 часа на линейном ускорителе Novalis TX (Varian, США) в дозах 5 и 7 Гр. Томограф Somatom Definition AS Siemens использовали на этапе топометрии [5].

Общее количество клеток, а также соотношение живых и мертвых клеток оценивали в камере Горяева, используя 0,4%-ный раствор трипанового синего. После пятого облучения клеточную линию снимали с подложки стерильного флакона раствором Трипсин/Версена. Количество клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза, определяли на

цитофлюориметре FACS Canto II (BD, USA) с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit [5].

Клеточную массу (культуру клеток HT-29) отмывали от среды фосфатно-солевым буферным раствором Дюльбекко (DPBS) и осаждали центрифугированием, к осадку добавляли 900 мкл реагента QIAzol (QIAGEN). Дальнейшее выделение и очистку фракции тотальной РНК производили с помощью набора RNeasy Plus Universal Kits (QIAGEN) согласно протоколу производителя. Препараты готовой РНК обрабатывали ДНКазой I для устранения следов геномной ДНК. В конечный препарат тотальной РНК добавляли РНКазин до конечной концентрации в растворе 1 ед. акт./мкл.

Качество полученной РНК проверяли электрофоретическим методом в агарозном геле по соотношению интенсивности свечения полос 28S и 18S рРНК (рис. 1).

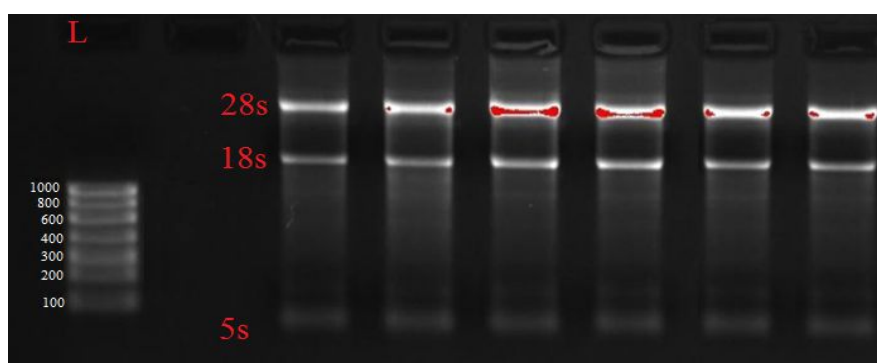


Рис. 1 Электрофореграмма РНК, выделенной из свежесзамороженных тканей опухоли прямой кишки. Для визуализации использована система гель-документирования Gel Doc XR PLUS (BioRad, USA)

Концентрацию полученных препаратов РНК измеряли на флюориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США).

Для наработки кДНК готовили реакцию смесь, содержащую 5 мкМ случайных праймеров, 1x RT буфер, 0,5мМ dNTP микс, 0,5 ед. акт./мкл RNase Inhibitor (Thermo scientific), 5 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV (Синтол, Россия) и выделенную РНК в качестве матрицы. Полученную смесь инкубировали при 44°C в течение 1 часа, обратную транскриптазу инактивировали при 92°C в течение 10 минут.

Методом количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) определяли величины транскрипционной активности 32 генетических локусов (*ATM*, *AKT*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP*, *CDK1*, *CDKN1B*, *CCND1*, *CCND3*, *FGFR2*, *HIST1*, *H2AX*, *KU70*, *EXO1*, *PTEN*, *RAD50*, *RAP80*, *RNF168*, *TOPBP1*, *RIF1TP53*, *MDM2*, *XRCC4*, *BAX*, *BCL2*, *CASP8*, *CASP3*, *CASP9*, *RBBP8*, *EP300*, *LIG4*, *C-FLIP*). Стабильность референсных генов оценивали с помощью алгоритма geNorm. В итоге в качестве референсных генов использовали *GAPDH*, *ACTB* и *B2M*. Дизайн специфических олигонуклеотидных праймеров осуществляли с

использованием NCBI GenBank и программы Primer-BLAST Последовательность праймеров представлена в таблице 1.

Таблица 1

Панель праймеров для определения относительной экспрессии генов

№	Ген	Последовательности праймеров 5'→3'
1	BRCA1	F: ACC TGT CTC CAC AAA GTG TGA
		R: ACA CTG TGA AGG CCC TTT CT
2	BRCA2	F: AGT TGG CTG ATG GTG GAT GG
		R: GGA TCC ACA CCT GGA GTG TC
3	PTEN	F: GGC ACA AGA GGC CCT AGA TA
		R: CTT AGC GCC TCT GAC TGG G
4	CASP3	F: CTG GAA TAT CCC TGG ACA ACA TT
		R: TCA ACA TCT GTA CCA GAC CGA
5	CASP8	F: CTG AAG CAA ACA GCC AGT GG
		R: GAT CTC AAT TCT GAT CTG CTC AC
6	GAPDH	F: GTC AAG GCT GAG AAC GGG AA
		R: TCG CCC CAC TTG ATT TTG GA
7	BAX	F: GGG ACG AAC TGG ACA GTA ACA
		R: GCT GCC ACT CGG AAA AAG AC
8	B2M	F: AGA TGA GTA TGC CTG CCG TG
		R: CTA TGA TGC TGC TTA CAT GTC TC
9	BCL2	F: GGA TCC AGG ATA ACG GAG GC
		R: GAA ATC AAA CAG AGG CCG CA
10	CASP9	F: TGA GAC CCT GGA CGA CAT CT
		R: TCC CTT TCA CCG AAA CAG CA
11	P53	F: TTG GAA CTC AAG GAT GCC CA
		R: CGG GAG GTA GAC TGA CCC T
12	MDM2	F: TAG GAG ATT TGT TTG GCG TGC
		R: CCT GCT GAT TGA CTA CTA CCA A
13	AKT1_V1	F: AGCTGGTGCATCAGAGGCTG
		R: TGTAGCCAATGAAGGTGCCA
14	ATM	F: TGC GTGGCTAACGGAGAAAA
		R: ATCACTGTCCTGCACTCGG
15	BRIP1	F: TTACCCGTCACAGCTTGCTA
		R: CTCATCTGCTGGTTTCCCACT
16	CDK1	F: AAGCCGGGATCTACCATAACC
		R: CATGGCTACCACTTGACCTGT
17	CDKN1B	F: TAATTGGGGCTCCGGCTAAC
		R: GAAGAATCGTCGGTTGCAGGT
18	CCND1	F: GATCAAGTGTGACCCGGACT
		R: CTTGGGGTCCATGTTCTGCT
19	CCND3	F: GTGGAGACTGGCTCTGTTTCG
		R: TCACATACCTCCTCGTCAGGT
20	FGFR2	F: AACAGTCATCCTGTGCCGAA
		R: TGGACTCAGCCGAAACTGTTA
21	KU70	F: ACGTAGAGGGCGTTGATTGG
		R: TGGCTACTGCTCACTTTGGC
22	RAD50	F: GCGTGCGGAGTTTTGGAATAG
		R: TTGAGCAACCTTGGGATCGT
23	RAP80	F: GAGTGAGCAGGAAGCTAGGG
		R: AGAAGGCCGGCAACTATCA
24	EXO1	F: GAACAAGCCGGGGTTACAGA
		R: AGGAGGAAGCTTTTCAGAATTTTT
25	Rif1	F: GGCTGTTTCCATCGGTCCT
		R: CATACGACTGGTCAGAGTCAGG
26	RNF168	F: GCCAGTTCGTCTGCTCAGTA
		R: CTGCCGCCACCTTGCTTAT

27	HIST1	F: AAGAGCCTGGTAAGCAAGGG
		R: TGCACCCGTTGCCTTAGTTT
28	TopBP1	F: CCAACGAGTTCAGAAATGTCCAG
		R: AACGCCACTAAAAGGGTCACA
29	ACTB	F: AACCGCGAGAAGATGACCC
		R: AGCACAGCCTGG TAGCAAC
30	H2AX	F: GGCCTCCCAGGAGTACTAAGA
		R: CTCTTTCCATGAGGGCGGTG
31	XRCC4	F: TTGATCTGTGAAAGCGGGCG
		R: TCTCCATTTCTTAATACCTCTCCGT
32	RBBP8	F: CGAGGATTTGGCACTCTGGT
		R: ACAGGTCAAATACCGCCTCC
33	EP300	F: GCCCTTACCTGACCCAAGT
		R: ATAGCCCATAGGCGGGTTG
34	LIG4	F: GGCTTGACGTCAGGAAACCAT
		R: GAAGTTTGTGAGGCAGCCAT
35	C-FLIP	F: GTGACAGCTGAGACAACAAGG
		R: TGGGGGAGTTCGTCCTGT

Примечание: F – прямой праймер, R – обратный праймер

Постановку каждого локуса проводили в трех технических повторах. Для амплификации использовали реакционную смесь, содержащую 1x PCR буфер, 1,5 mM MgCl₂, смесь 0,2 mM dNTP, по 500 нМ праймеров, 0,05 U/мкл Taq-полимеразы, 10 нг кДНК. Для внутреннего контроля использовали NTC и NRT пробы. Полученные смеси амплифицировали в термоциклере CFX 96 (Bio-Rad, США) в соответствии с температурным режимом: t=95°C – 240 сек; 40 циклов: t=95°C – 10 сек, t=58°C – 30 сек, t=72°C – 30 сек.

Относительную экспрессию генов (RE) рассчитывали по формуле $RE=2^{-\Delta\Delta C_t}$. Нормализацию результатов проводили по 3 референсным генам (*GAPDH*, *ACTB* и *B2M*) и уровню экспрессии соответствующих генов-мишеней в образцах контрольной группы, последовательно по схеме, приведенной ниже.

1. Нормализация по среднему геометрическому референсных локусов: $\Delta C(t)=C(t)_{\text{target}} - \text{среднее геометрическое } C(t)_{\text{reference}}$.

2. Расчет среднего арифметического $\Delta C(t)$ по каждому гену для контрольной (интактной) и облученной групп.

3. Нормализация по контрольной (интактной) группе: $\Delta\Delta C(t)= \text{среднее арифметическое } \Delta C(t)_{\text{облученной группы}} - \text{среднее арифметическое } \Delta C(t)_{\text{контрольной группы}}$.

4. Окончательный результат (кратное различие): $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ [6].

Статистическую обработку данных проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) в программе Statistica 8.0 (StatSoft Inc.). Для проведения кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) и построения тепловых карт (heat map) использовали собственные скрипты на языке R (R-Studio 8.10.173.987). Для построения диаграмм Эдвардса–Венна применяли алгоритм сравнения большего числа множеств, реализованный на JavaScript. Кластеризацию генов по функции

проводили с помощью алгоритма FMD (Functional module detection). Значение Q каждого члена, связанного с функциональными модулями, рассчитывали с использованием одностороннего точного критерия Фишера и поправки Бенджамини–Хохберга для корректировки множественного сравнения [7].

Результаты исследования и их обсуждение

Ионизирующее излучение вызывает двухцепочечные разрывы в ДНК опухолевых клеток, но некоторые клоны опухолевых клеток обладают способностью повышать активность системы репарации двухцепочечных разрывов для преодоления цитотоксичности от излучения, а также иных сигнальных путей, не являющихся компонентами репарационных систем клетки [8].

После нашего модельного эксперимента только определенный пул клеток HT-29 сохранил жизнеспособность. Для дозы 5 Гр доля таких клеток составила 32%, а для дозы 7 Гр – порядка 20% от изначального количества клеток, взятых в эксперимент. Данный эффект может быть связан с повышенной устойчивостью этих клеток к облучению, сформировавшейся благодаря определенным молекулярно-генетическим особенностям. Так, в результате эксперимента по облучению клеток HT-29 были получены данные о дифференциальном показателе экспрессии 32 генов в интактных (контрольных) и облученных клетках (рис. 2).

По особенностям экспрессии в интактных и облученных образцах было выделено 3 основных кластера генов: **1** – *BRCA2*, *C-FLIP*, *CASP3*, *XRCC4*, *KU70*, *CDK1*, **2** – *AKT*, *RBBP8*, *RAP80*, *EP300*, *BCL2*, *RAD50*, *FGFR2*, *H2AX*, *CCND3*, *CCND1* и **3** – *TOPB1*, *ATM*, *RNF168*, *PTEN*, *BRIP*, *EXO1*, *BAX*, *TP53*, *CASP9*, *RIF1*, *CASP8*, *BRCA1*, *CDKN1B*, *HIST1*, *LIG4*.

При этом сами интактные и облученные группы клеток по идентичности экспрессии генов объединяются в кластеры (рис. 2, 3). Сходство по уровню экспрессии некоторых генов в интактных и облученных клетках на разных уровнях кластеризации (рис. 2, 3 и табл. 2) можно объяснить изначальным наличием в линии HT-29 клонов с определенным уровнем экспрессии рассматриваемых генов, который в условиях облучения обеспечил их селективное выживание.

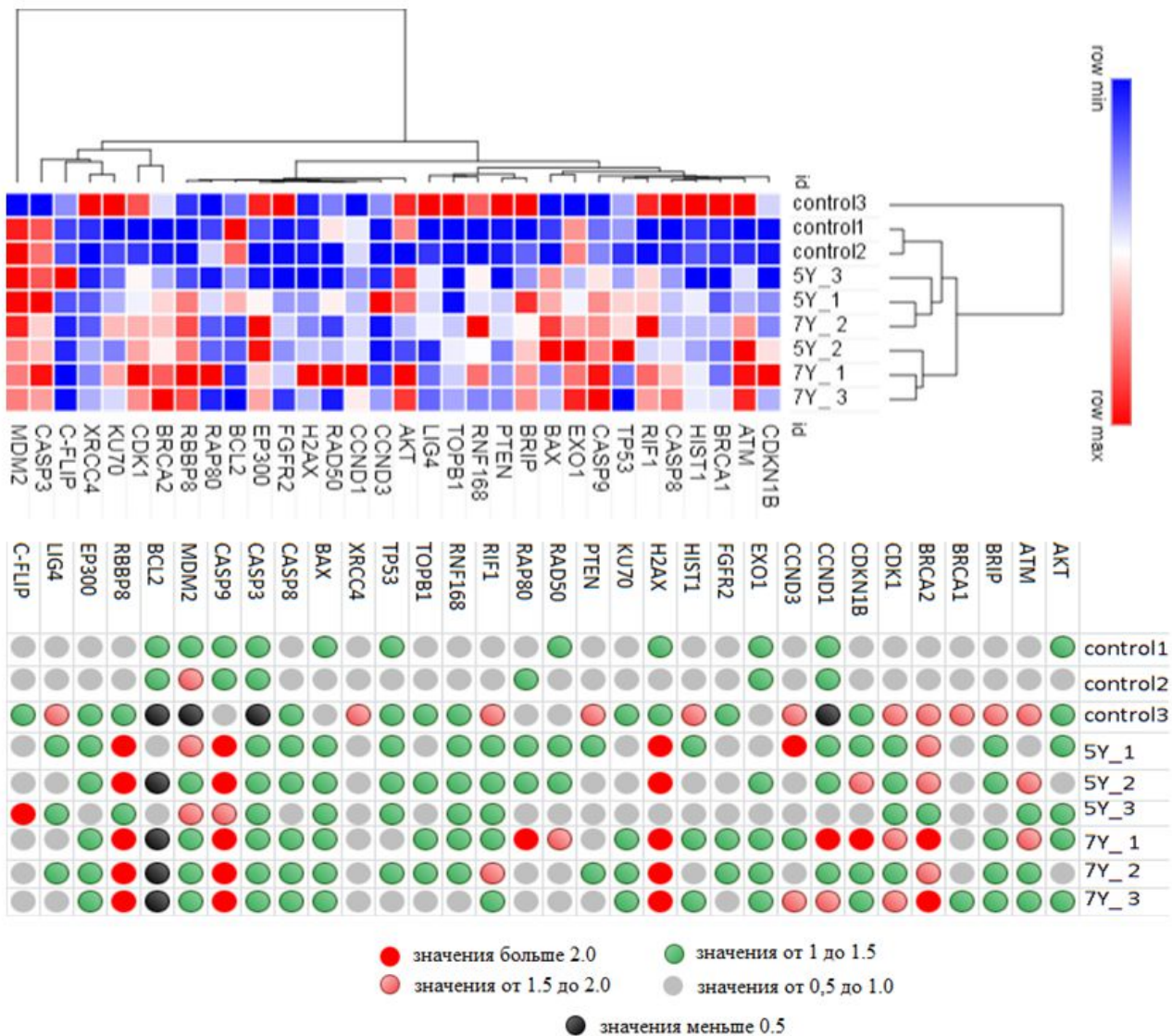


Рис. 2. Heatmap и кластерный анализ дифференциальной экспрессии 32 генов в интактных (контрольных) и облученных клетках HT-29

Таблица 2

Сходства и различия в показателе экспрессии генов между кластерами

Ген	Количество групп, в которых повышена экспрессия	Наименование групп
<i>BRCA2</i>	6	control3, 5Y_1, 5Y_2, 7Y_1, 7Y_2, 7Y_3
<i>CASP9</i>	6	5Y_1, 5Y_2, 5Y_3, 7Y_1, 7Y_2, 7Y_3
<i>H2AX</i>	5	5Y_1, 5Y_2, 7Y_1, 7Y_2, 7Y_3
<i>RBBP8</i>	5	5Y_1, 5Y_2, 7Y_1, 7Y_2, 7Y_3
<i>ATM</i>	3	control3, 5Y_2, 7Y_1
<i>CCND3</i>	3	control3, 5Y_1, 7Y_3
<i>CDK1</i>	3	control3, 7Y_1, 7Y_3
<i>MDM2</i>	3	control2, 5Y_1, 5Y_3
<i>CCND1</i>	2	7Y_1, 7Y_3
<i>CDKN1B</i>	2	5Y_2, 7Y_2
<i>RIF1</i>	2	control3, 7Y_2

Стоит отметить, что 4 гена (*BRCA2*, *CASP9*, *H2AX*, *RBBP8*) имели повышенную экспрессию в более чем в 5 исследуемых группах, при этом повышенная экспрессия гена *BRCA2* наблюдалась и у части интактных клеток (табл. 2).

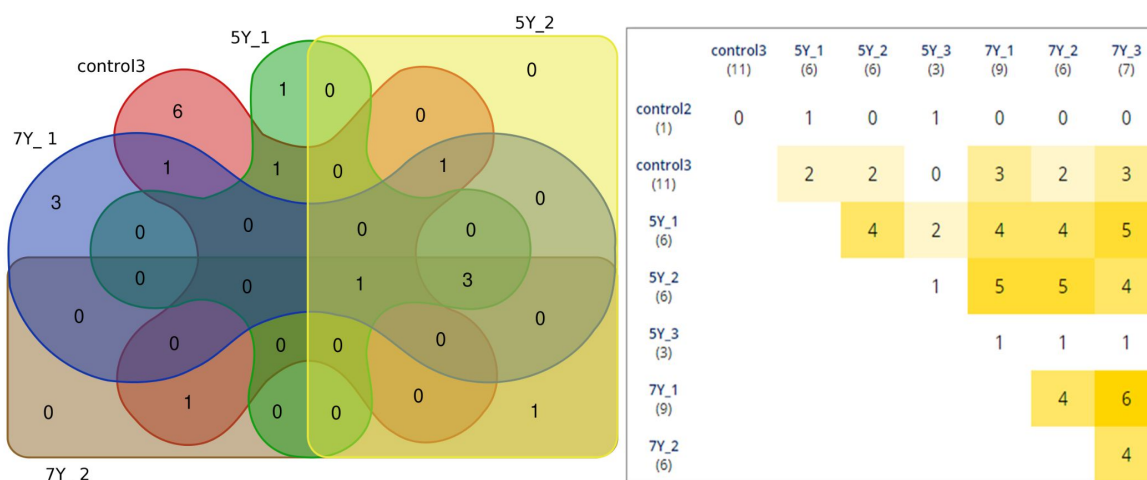


Рис. 3. Диаграмма Эдвардса–Венна (показано сходство по количеству генов с повышенной экспрессией в 9 группах – 3 контрольных, 3 облученных в дозе 5 Гр и 3 – в дозе 7 Гр)

После нормализации показателей относительной экспрессии в клетках, подвергнутых облучению 5 и 7 Гр, были получены следующие данные: статистически значимо была повышена экспрессия гена *RBBP8* – в 1,7 и 2,2 раза, *BRCA2* – в 1,7 и 2,3 раза, *H2AX* – в 2,3 и 4,5 раза и *CASP9* – в 2,0 и 2,4 раза соответственно, снижена экспрессия гена *BCL2* – в 1,6 и 3,0 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно интактных клеток. В клетках, подвергнутых облучению 7 Гр, также наблюдалось статистически значимое повышение экспрессии гена *RIF1* – в 1,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 4).

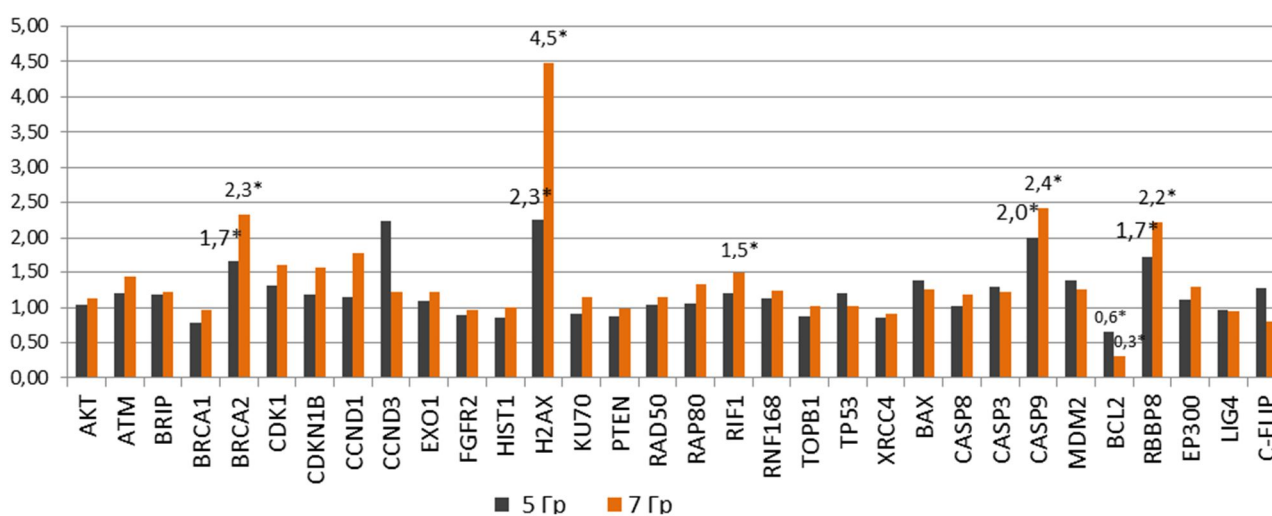


Рис. 4. Относительная экспрессия генов в клетках HT-29 с повышенной радиорезистентностью (после облучения в дозах 5 и 7 Гр в течение 5 дней)

*– статистически значимые отличия относительно интактных (контрольных) клеток
($p < 0,05$)

С помощью алгоритма FMD исследованные нами гены *ATM*, *AKT*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP*, *CDK1*, *CDKN1B*, *CCND1*, *CCND3*, *FGFR2*, *HIST1*, *H2AX*, *KU70*, *EXO1*, *PTEN*, *RAD50*, *RAP80*, *RNF168*, *TOPB1*, *RIF1TP53*, *MDM2*, *XRCC4*, *BAX*, *BCL2*, *CASP8*, *CASP3*, *CASP9*, *RBBP8*, *EP300*, *LIG4*, *C-FLIP* были разделены на 6 функциональных модулей и визуально представлены на рисунке 5.

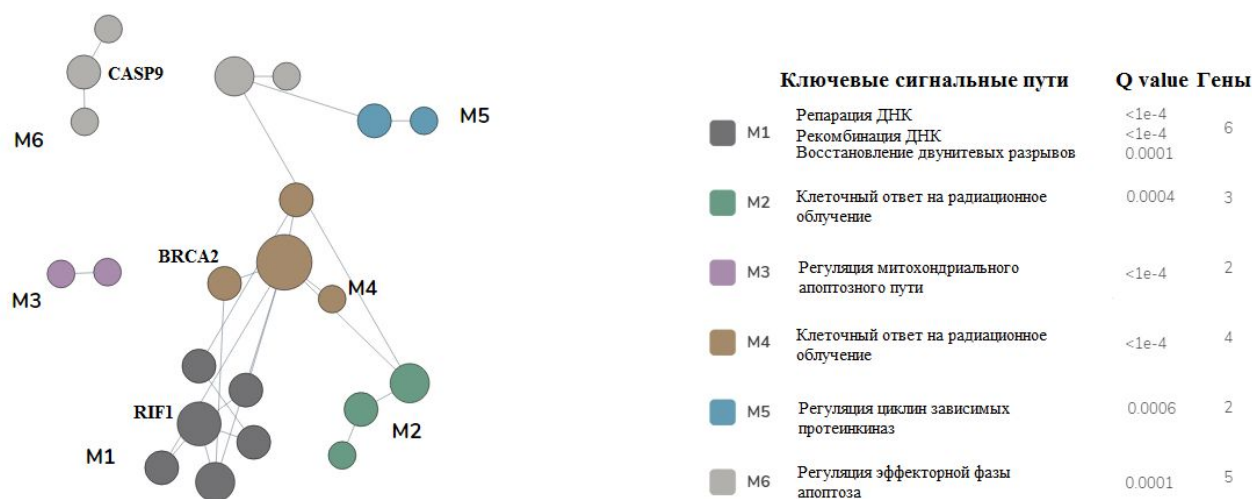


Рис. 5. Функциональная классификация сигнальных путей, включающих 32 генетических локуса

Из данных, представленных на рисунке 5, видно, что изменение экспрессии генов *BRCA2*, *CASP9* и *RIF1* затрагивает 3 функциональных модуля, объединяющих группу сигнальных клеточных каскадов, таких как регуляция апоптоза (M6, $Q=0,0001$), клеточный ответ на радиационное облучение (M4, $Q < 1e^{-4}$) и репарация ДНК (M1, $Q < 1e^{-4}$).

Применение алгоритма «сетевой интеграции с несколькими ассоциациями» позволило установить взаимодействия между генами *BCL2*, *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *RBBP8*, *RIF1* и *APAF1* (apoptotic peptidase activating factor 1), *SPO11* (initiator of meiotic double stranded breaks), *PALB2* (partner and localizer of BRCA2), *APPL1* (adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1), *PSIP1* (PC4 and SFRS1 interacting protein 1), *DIABLO* (diablo IAP-binding mitochondrial protein), *DMC1* (DNA meiotic recombinase 1) *BIK*, (*BCL2* interacting killer), *BAZ1B* (bromodomain adjacent to zinc finger domain 1B), *FKBP8* (FK506 binding protein 8), *BAG1* (*BCL2* associated athanogene 1), *RAD51*, *VDAC1* (voltage dependent anion channel 1), *XRCC3* (*X-ray* repair cross complementing 3), *DCC* (*DCC* netrin 1 receptor) *RAD50* (*RAD50* double strand break repair protein), *PSMC3IP* (*PSMC3* interacting protein), *TEX15* (testis expressed 15), *MND1* (meiotic nuclear divisions 1) и *AIFM1* (apoptosis

inducing factor, mitochondria associated 1) (рис. 6). Данный алгоритм предсказывает функцию гена в составе сложной сети из множества генов посредством использования одного из методов машинного обучения, основанного на распределении меток гауссовых полей. Алгоритм присваивает оценку каждому узлу-точке построенной сети, отражающую вычисленную силу связи [9]. Соответственно *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2*, *CASP9* и *RBBP8* являются компонентами различных сигнальных путей опухолевых клеток, изменение их транскрипционной активности приводит к модуляции активности целого ряда других генов (рис. 6).

Так, в ответ на двухцепочечные разрывы в ДНК, вызванные ионизирующим излучением, *H2AX* (гистоновый белок, кодируемый геном *H2AX*) становится фосфорилированным по серину (γ *H2AX*). Из-за этого ДНК становится менее конденсированной, и освобождается место для присоединения белковых комплексов, например MRN (состоящего из Mre11, Rad50 и Nbs1), RAD51 и ATM), необходимых для реализации процесса репарации [10, 11].

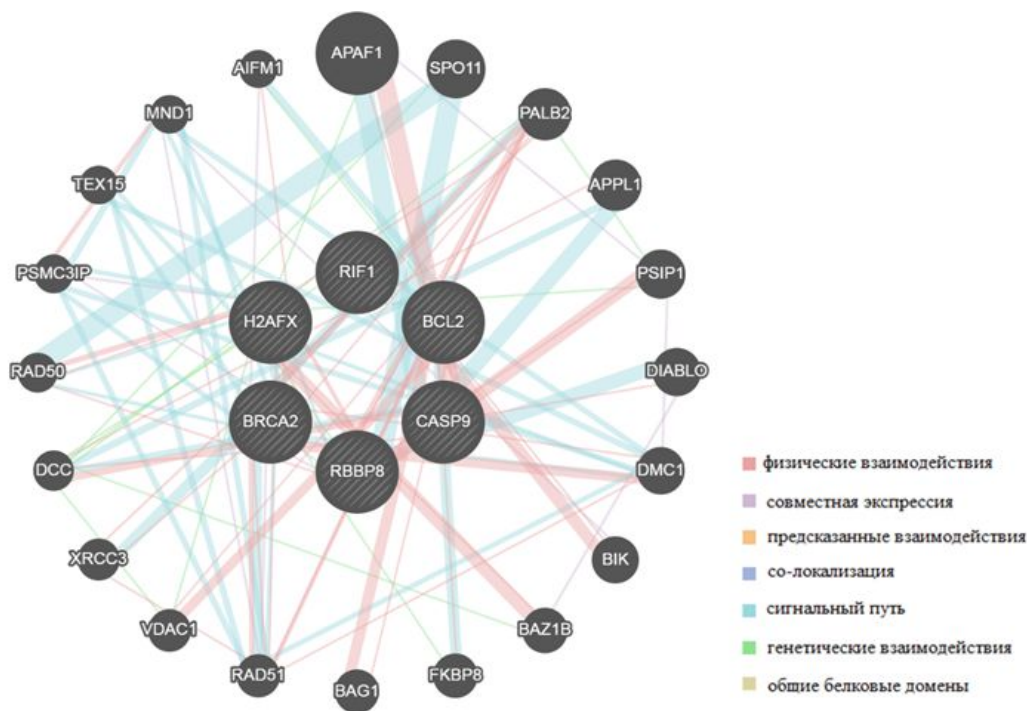


Рис. 6. Взаимодействия генов, вычисленные с помощью алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями

Белок, кодируемый геном *BRCA2*, также необходим для восстановления поврежденной излучением ДНК (напрямую взаимодействует с рекомбиназой RAD51, стимулируя важный этап гомологичной рекомбинации) [12]. *RBBP8* кодирует белок, который регулирует пролиферацию клеток [13]. Соответственно повышенная экспрессия генов *BRCA2*, *H2AX* и *RBBP8* в отдельных клонах клеточной линии HT-29, вероятно, обеспечивает

большую эффективность системы репарации ДНК, что дает им преимущество и обеспечивает выживание при воздействии лучевой терапии.

Важная роль в регуляцию апоптоза отведена белкам BCL2 и CASP9. BCL2 подавляет апоптоз, изменяя проницаемость митохондриальной мембраны, что предотвращает выход цитохрома С из митохондрий и ингибирует каспазы (также ингибирование реализуется за счет связывания BCL2 – фактора, активирующего апоптоз APAF1). Наоборот, инициаторная каспаза 9 является критическим белком для запуска апоптоза, который активируется APAF1 путем расщепления про-каспазы-9 [14]. Соответственно повышенная экспрессия CASP9 и сниженная экспрессия BCL2 могут способствовать более эффективному протеканию процесса апоптоза, чем в интактных клетках. Можно предположить, что данная особенность способна оказывать определенное регулирующее воздействие на численность клонов HT-29, обладающих описанными выше молекулярно-генетическими особенностями.

Заключение

Таким образом, данное исследование позволило установить исходную гетерогенность клеток HT-29 по транскрипционной активности ряда генов, регулирующих систему репарации и апоптоз. Эта гетерогенность лежит в основе селективного выживания клеток в условиях лучевой терапии при 5 и 7 Гр: выжившие клетки обладают более эффективной системой репарации ДНК (повышенная транскрипционная активность генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*) и более эффективной системой регуляции апоптоза (повышенная транскрипционная активность проапоптозного гена *CASP9* и сниженная транскрипционная активность антиапоптозного гена *BCL2*).

Исследование выполнено в рамках гос. задания «Поиск предикторов радиорезистентности рака прямой кишки и разработка персонализированных неоадьювантных терапевтических подходов».

Список литературы

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018. Vol. 68(6). P. 394-424.
2. Agostini M., Zangrando A., Pastrello C., D'Angelo E., Romano G., Giovannoni R., Giordan M., Maretto I., Bedin C., Zanon C., Digito M., Esposito G., Mescoli C., Lavitrano M., Rizzolio F., Jurisica I., Giordano A., Pucciarelli S., Nitti D. A functional biological network centered on XRCC3: a new possible marker of chemoradiotherapy resistance in rectal cancer patients. *Cancer Biol. Ther.* 2015. Vol. 16(8). P.1160-71.

3. Qin C.J., Song X.M., Chen Z.H., Ren X.Q., Xu K.W., Jing H., He Y.L. XRCC2 as a predictive biomarker for radioresistance in locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative radiotherapy. *Oncotarget*. 2015. Vol. 6(31). P. 32193-32204.
4. Voboril R., Rychterova V., Voborilova J., Kubecova M., Fanta J., Dvorak J. NF- κ B/p65 expression before and after treatment in rectal cancer patients undergoing neoadjuvant (chemo)radiotherapy and surgery: prognostic marker for disease progression and survival. *Neoplasma*. 2016. Vol. 63(3). P.462-470.
5. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Максимов А.Ю., Гусарева М.А., Бондаренко Е.С., Сагакянц А.Б., Донцов В.А., Габричидзе П.Н., Черняк М.Н., Гречкин Ф.Н., Мезенцев С.С., Ульянова Е.П., Полуэктов С.И. Влияние различных доз лучевой терапии на выживаемость клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29 // *Современные проблемы науки и образования*. 2019. №3. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28918> (дата обращения: 12.05.2020).
6. Кутилин Д.С., Могушкова Х.А. Влияние противоопухолевых антибиотиков антрациклинового ряда на транскрипционную активность раково-тестикулярных антигенов в модельном эксперименте на клеточной линии HeLa // *Медицинская иммунология*. 2019. Т.21(3).С. 539-546.
7. Krishnan A., Zhang R., Yao V., Theesfeld C.L., Wong A.K., Tadych A., Volfovsky N., Packer A., Lash A., Troyanskaya O.G. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience*. 2016. Vol. 19(11). P.1454-1462.
8. Weichselbaum R.R., Liang H., Deng L., Fu Y-X. Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2017. Vol. 14(6). P. 365-379.
9. Warde-Farley D., Donaldson S.L., Comes O., Zuberi K., Badrawi R., Chao P., Franz M., Grouios Ch., Kazi F., Lopes Ch. T., Maitland A., Mostafavi S., Montojo J., Shao Q., Wright G., Bader G. D., Morris Q. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38 (2). P. 214-220.
10. Ayoub N., Jeyasekharan A.D., Bernal J.A., Venkitaraman A.R. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature*. 2008. V.453 (7195). P. 682-6.
11. Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R., Melander F., Kastan M.B., Bartek J., Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol*. 2006. V.173 (2). P. 195-206.
12. Wang C.X., Jimenez-Sainz J., Jensen R.B., Mazin A.V. The Post-Synaptic Function of Brca2. *Scientific Reports*. 2019. V.9 (1). P. 4554.

13. Sartori A.A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S.P. .Human CtIP promotes DNA end resection. Nature. 2007. V. 450 (7169). P. 509-514.
14. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Гусарева М.А., Потемкин Д.С., Полуэктов С.И., Дашков А.В., Каймакчи Д.О., Носов В.А., Газиев У.М., Легостаев В.М. Копийность генов как фактор радиорезистентности клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29 // Современные проблемы науки и образования. 2019. №5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29224> (дата обращения: 12.05.2020).