

# ВЛИЯНИЕ МИКРО-РНК НА АКТИВНОСТЬ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И РАДИОРЕЗИСТЕНТНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ПОСЛЕ РАДИАЦИОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

DOI: 10.17691/stm2017.9.2.03

УДК 577.217:575.22

Поступила 8.06.2016 г.



**Д.А. Масленникова**, инженер-исследователь лаборатории молекулярной и клеточной биологии научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;

**А.В. Хохлова**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;

**Е.С. Погодина**, инженер-исследователь лаборатории молекулярной и клеточной биологии научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;

**Д.А. Зажома**, студент;

**С.Н. Ворсина**, студент;

**Е.А. Белобородов**, студент;

**В.В. Саенко**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;

**Ю.В. Саенко**, д.б.н., начальник лаборатории молекулярной и клеточной биологии научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, 432017, ул. Л. Толстого, 42

**Цель исследования** — оценка экспрессии микро-РНК в радиорезистентных и радиочувствительных раковых клеточных линиях после радиационного облучения и изучение ее влияния на активность сигнальных путей.

**Материалы и методы.** В работе использовались радиорезистентная клеточная линия K562 и радиочувствительные клеточные линии HL-60 и Raji. Оценивали выживаемость клеток после облучения гамма-излучением 4 Гр. Изучали состав микро-РНК через 1, 4 и 24 ч после облучения с использованием метода параллельного массового секвенирования. Биоинформационную обработку полученных данных выполняли с использованием сервиса GenXPro и базы данных PANTHER.

**Результаты.** После однократного облучения клеток в дозе 4 Гр количество клеток с признаками некроза в радиочувствительных клеточных линиях увеличивается в несколько раз по сравнению с контролем. Микро-РНК hsa-miR-590-3p была найдена во всех исследуемых клеточных линиях на всех этапах эксперимента. Наиболее значительные отличия между радиорезистентной и радиочувствительными клеточными линиями наблюдаются в динамике влияния микро-РНК на сигнальные пути Integrin signaling pathway и General transcription by RNA polymerase I.

**Заключение.** Динамика и величина экспрессии микро-РНК hsa-miR-590-3p коррелируют с радиочувствительностью раковых клеток. Влияние ее на сигнальные пути радиорезистентных и радиочувствительных клеточных линий не одинаково: в радиорезистентной клеточной линии K562 ослаблено ингибирующее действие микро-РНК на Integrin signaling pathway и усилено — на General transcription by RNA polymerase I.

**Ключевые слова:** микро-РНК; hsa-miR-590-3p; экспрессия генов; радиочувствительность раковых клеток; Integrin signaling pathway; General transcription by RNA polymerase I.

**Как цитировать:** Maslennikova D.A., Khokhlova A.V., Pogodina E.S., Zazhoma D.A., Vorsina S.N., Beloborodov E.A., Saenko V.V., Saenko Y.V. The influence of microRNA on signaling pathways activity in radiosensitive and radioresistant cancer cell lines after radiation exposure. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 29–36, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.03>

English

## The Influence of microRNA on Signaling Pathways Activity in Radiosensitive and Radioresistant Cancer Cell Lines after Radiation Exposure

**D.A. Maslennikova**, Research Engineer, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

**Для контактов:** Саенко Юрий Владимирович, e-mail: saenko.y.v@yandex.ru

**A.V. Khokhlova**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;  
**E.S. Pogodina**, Research Engineer, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;  
**D.A. Zazhoma**, Undergraduate Student;  
**S.N. Vorsina**, Undergraduate Student;  
**E.A. Beloborodov**, Graduate Student;  
**V.V. Saenko**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;  
**Y.V. Saenko**, DSc, Head of Laboratory of Molecular and Cellular Biology, S.P. Kapitsa Technological Research Institute

Ulyanovsk State University, 42 Leo Tolstoy St., Ulyanovsk, 432017, Russian Federation

**The aim of the investigation** was to study microRNA expression and its influence on signaling pathways activity in radioresistant and radiosensitive cell lines exposed to radiation.

**Materials and Methods.** Radioresistant K562 cell line and radiosensitive HL-60 and Raji cell lines were used in the study. Cell survival was estimated after exposure to 4 Gy gamma radiation. MicroRNA composition was studied 1, 4 and 24 h after radiation exposure using massively parallel sequencing method. Bioinformatics analysis was performed using GenXpro and PANTHER database.

**Results.** After single 4 Gy radiation exposure, the number of cells with the signs of necrosis increased several times in radiosensitive cell lines as compared to control samples. MicroRNA hsa-miR-590-3p was found in each studied cell line at every stage of the experiment. The most significant differences between radioresistant and radiosensitive cell lines were observed in dynamics of microRNA influence on Integrin signaling pathway and General transcription by RNA polymerase I pathway.

**Conclusion.** MicroRNA hsa-miR-590-3p dynamics and expression level were found to correlate with cancer cell radiosensitivity. Its influence on radioresistant and radiosensitive cell lines was different: in radioresistant K562 cell line, the inhibitory effect of microRNA on Integrin signaling pathway was reduced and this effect on General transcription by RNA polymerase I pathway was increased.

**Key words:** microRNA; hsa-miR-590-3p; gene expression; cancer cell radiosensitivity; gamma radiation; Integrin signaling pathway; General transcription by RNA polymerase I.

Радиорезистентность злокачественных опухолей является серьезной проблемой радиотерапии и служит основным препятствием для достижения максимальной эффективности лучевой терапии при лечении рака.

Радиорезистентность раковых клеток — это свойство, в основе которого лежит ряд генетических мутаций и нарушений нормальной экспрессии генов, что в свою очередь изменяет чувствительность раковых клеток к радиотерапии. Нарушения в экспрессии генов приводят к нарушениям в метаболизме клетки и изменениям регуляции клеточных процессов, в частности связанных с программируемой клеточной смертью. Феномен радиорезистентности формируется на надмолекулярном уровне и связан со способностью раковых клеток abortировать запуск механизмов программируемой клеточной смерти, индуцированных радиационным излучением [1, 2]. Механизмы программируемой клеточной смерти — апоптоз и аутофагия — в нормальных клетках запускаются при невозможности репарации клеточных повреждений, в основном повреждений ДНК. Индукция программируемой клеточной смерти при стрессовых воздействиях не только связана со степенью повреждения ДНК, но и включает большое количество других сигнальных механизмов, а также зависит от их взаимодействия [3, 4]. Функционирование сигнальных и метаболических механизмов связано с

регуляцией экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях.

Основным механизмом регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне является регуляция деградации матричной РНК (мРНК) посредством микро-РНК. Микро-РНК представляют собой небольшие (20–25 пар нуклеотидов) некодирующие РНК, влияющие на транскрипционную и посттранскрипционную регуляцию генов через подавление экспрессии [5, 6]. В геноме человека обнаружены более тысячи микро-РНК, каждая из которых потенциально может регулировать сотни мРНК, поэтому они играют определяющую роль во многих клеточных процессах, в том числе радиочувствительности и радиорезистентности клеток. Установлено [7], что микро-РНК регулируют экспрессию около 60% всех генов, кодирующих белок.

Исследования последних лет показали, что микро-РНК играют большую роль в патогенезе рака [8, 9]. Экспрессия их меняется под действием ионизирующего облучения, что может означать их участие в клеточном ответе на ионизирующее облучение [10]. Проведенные исследования [11–14] продемонстрировали связь некоторых микро-РНК с радиорезистентностью раковых клеток, что позволило выявить несколько десятков микро-РНК, дифференциально экспрессирующихся в радиорезистентных и радиочувствительных клеточных линиях. Однако не обнару-

жено таких микро-РНК, которые были бы характерны для всех радиорезистентных клеточных линий. Это связано с тем, что регуляция экспрессии генов посредством микро-РНК является сложным процессом, при котором одна микро-РНК может регулировать экспрессию многих генов, а экспрессию одного гена могут регулировать много разных микро-РНК. В этом случае более перспективным подходом в исследовании роли микро-РНК является изучение их влияния на сигнальные пути.

**Цель исследования** — оценка экспрессии микро-РНК в радиорезистентных и радиочувствительных раковых клеточных линиях после радиационного облучения и изучение ее влияния на активность сигнальных путей.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили на клеточных линиях HL-60 — промиелоцитарный лейкоз человека, K562 — радиорезистентная суспензионная линия хронической миелоидной лейкемии человека, Raji — линия лимфобластоидных клеток человека.

Клетки культивировали при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и при 98% влажности с использованием среды RPMI-1640, которая содержала L-глутамин с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина.

Облучение клеточных линий проводили гамма-излучением во время логарифмической фазы роста на линейном ускорителе Elekta Synergy (Elekta, Швеция) в дозе 4 Гр (энергия фотонов 10 мэВ). Длительность облучения составляла 55 с при температуре 21–22°C. Поле облучения — 16×20 мм. Клетки находились в 6-луночных планшетах в количестве 5·10<sup>5</sup>/мл среды, объем среды с клетками в каждой лунке составлял 2,5 мл.

Контрольные группы клеток не подвергались каким-либо воздействиям.

Выживаемость оценивали путем окраски клеток смесью флюоресцентных красителей акридинового оранжевого и пропидиум иодида. Окрашенные клетки анализировали на флюоресцентном микроскопе. Клетки с признаками некроза были окрашены в оранжевый цвет, живые клетки — в зеленый [15].

Общую РНК, обогащенную микро-РНК, выделяли из клеток с использованием набора Absolutely RNA miRNA Kit (Agilent Technologies, США) через 1, 4 и 24 ч после облучения. Качество выделенной РНК проверяли по соотношению 18S/28S РНК с использованием прибора для капиллярного электрофореза Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Для дальнейшей работы отбирали образцы с показателем целостности RIN>8,0. Получение библиотеки комплементарной ДНК (кДНК) микро-РНК, легирование с адаптерами и бар-кодирование проводили с использованием набора NEBNext Small RNA Library Prep Set (NEB, Великобритания). Очистку библиотек кДНК микро-РНК выполняли с помощью электрофореза с 6% полиакриламидным гелем. Фрагменты кДНК между 145 и 160 п.н., соответствующие микро-РНК, вы-

резали из геля, затем элюировали и осаждали 80% этанолом. Осадок кДНК высушивали на воздухе и ресуспендировали в 10 мкл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC). Количество кДНК в каждой из финальных библиотек микро-РНК оценивали с использованием флюорометра Qubit (Invitrogen, США). Эквимольные количества (2 нмоль) каждой библиотеки были объединены и секвенированы с помощью системы Illumina MiSeq (Illumina, США) с использованием набора для одноконцевого чтения 150 п.н.

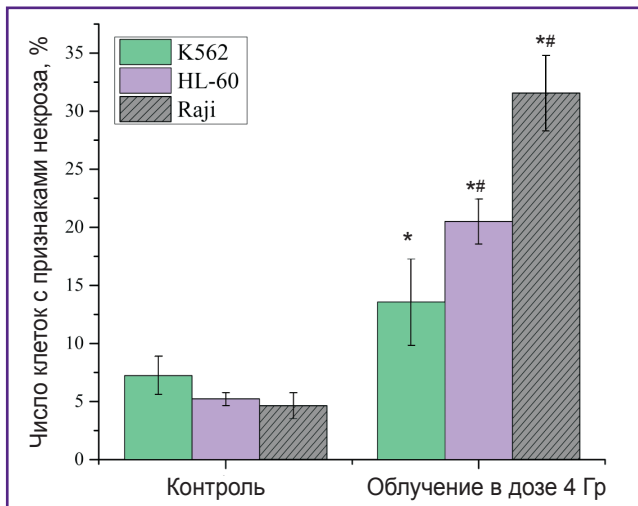
В результате секвенирования были получены файлы формата FASTQ по каждой клеточной линии. Их биоинформационную обработку проводили на платформе GenXPro omiRas (Германия) [16], в результате чего получены данные в виде таблиц, содержащих нормализованное на 10<sup>5</sup> прочтений количество микро-РНК наименования.

Поиск генов, экспрессия которых регулируется микро-РНК, также проводили с использованием платформы GenXPro omiRas (Германия) [16]. Для дальнейшей работы были отобраны микро-РНК с нормализованной экспрессией (>100 штук на образец). В результате формировался список генов для каждой клеточной линии и экспериментальной точки, экспрессию которых регулируют микро-РНК.

Поиск сигнальных путей, в которые включены данные гены, проводили в базе данных PANTHER (США) (<http://www.pantherdb.org/>). Так как каждая микро-РНК с равной вероятностью участвует в каждом сигнальном пути, то нормализованное количество транскриптов каждой микро-РНК делили на количество сигнальных путей. Затем суммировали полученные значения по нормализованной экспрессии микро-РНК каждого сигнального пути и получали сумму нормализованных экспрессий (СНЭ) всех микро-РНК, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, включенных в этот сигнальный путь. Суммы нормализованных экспрессий опыта и контроля сравнивали и представляли в виде log<sub>2</sub> FC (двоичный логарифм отношения СНЭ опыта к контролю). На основе полученных данных были построены графики. Для их построения брали те сигнальные пути, значения log<sub>2</sub> FC СНЭ которых были больше 0,5 или меньше -0,5 хотя бы в одном из экспериментов (log<sub>2</sub> FC>0,5 и log<sub>2</sub> FC<-0,5).

**Результаты.** На рис. 1 для всех трех клеточных линий K562, HL-60, Raji представлено количество клеток с признаками некроза в контроле и после воздействия ионизирующего излучения в дозе 4 Гр. В клеточной линии K562 в контроле число клеток с признаками некроза составляет 7,23%, после однократного облучения в дозе 4 Гр — возрастает до 13,56%. В радиочувствительной клеточной линии HL-60 количество клеток с признаками некроза после облучения в дозе 4 Гр увеличивается в несколько раз по отношению к контролю и составляет 20,5% вместо 5,23%. В клеточной линии Raji доля клеток с признаками некроза после облучения составляет 31,56%.





**Рис. 1.** Доля клеток с признаками некроза в контроле и после воздействия 4 Гр в клеточных линиях K562, HL-60, Raji

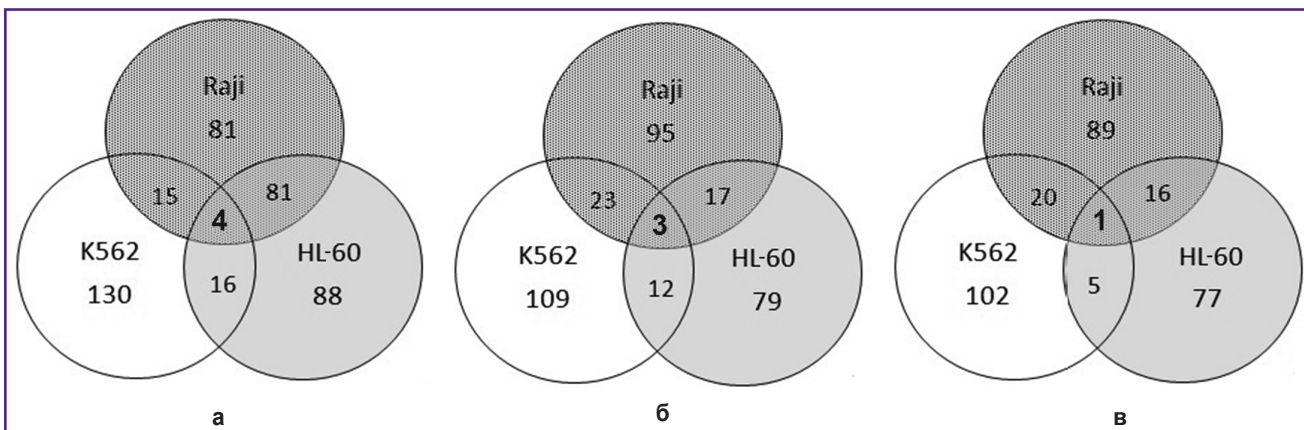
\* — статистически значимое различие значений с контролем; # — с клеточной линией K562; p<0,05

В результате секвенирования микро-РНК и последующего анализа были выявлены дифференциально-экспрессирующиеся микро-РНК в каждой из линий через 1, 4 и 24 ч после облучения рентгеновским излучением в дозе 4 Гр. Диаграмма Венна (рис. 2) демонстрирует пересечение множеств микро-РНК всех клеточных линий. Через 1 ч после облучения было найдено 4 дифференциально-экспрессирующихся микро-РНК, характерных для всех трех исследуемых линий, — hsa-miR-5701, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-5010-3p, hsa-miR-3607-5p (рис. 2, а). Через 4 ч в области пересечения множеств дифференциально-экспрессирующихся микро-РНК оказались только hsa-miR-590-3p, hsa-miR-5010-3p, hsa-miR-3607-5p, а через 24 ч — только одна микро-РНК hsa-miR-590-3p (рис. 2, б, в).

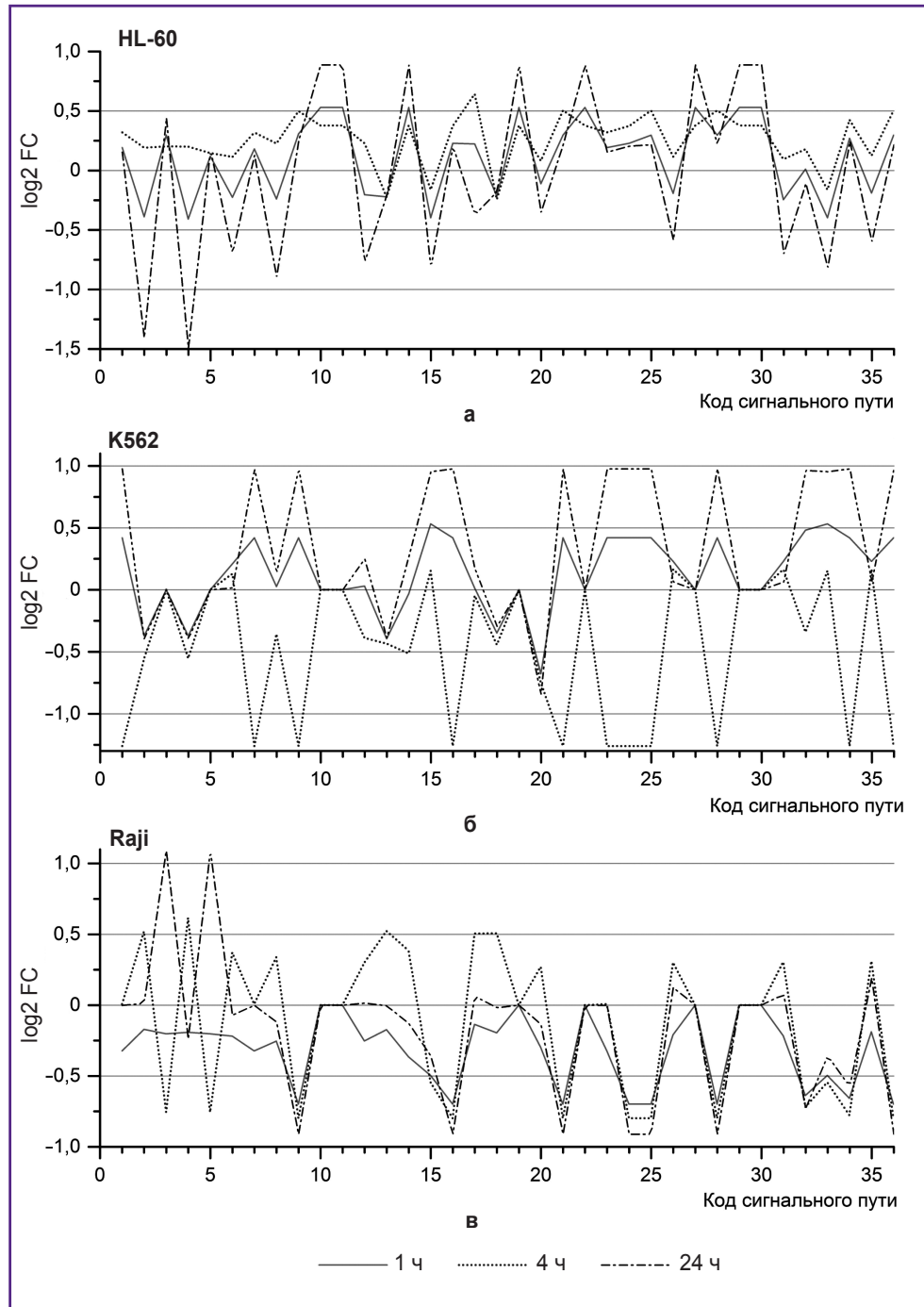
Посттранскрипционная регуляция экспрессии ге-

нов посредством микро-РНК обладает рядом особенностей, основной из которых является способность регулировать экспрессию многих генов одной микро-РНК и экспрессию одного гена множеством микро-РНК. Поэтому изучение только дифференциальной экспрессии микро-РНК является недостаточным для понимания различий радиорезистентных и радиочувствительных клеточных линий. Для более глубокого выявления причин радиорезистентности раковых клеток и роли микро-РНК в этом процессе нами был выполнен биоинформационный анализ взаимодействия микро-РНК внутриклеточных сигнальных и метаболических путей (рис. 3). Графики отражают «давление» микро-РНК на функционирование того или иного сигнального пути. Величина давления представлена в виде log<sub>2</sub> FC СНЭ. Отрицательные значения log<sub>2</sub> FC СНЭ означают, что давление микро-РНК на сигнальный путь возрастает, положительные значения — что давление падает.

Из рис. 3 видно, что для клеточной линии K562 характерна нестабильность динамики влияния микро-РНК на активность сигнальных путей. Эта нестабильность проявляется в колебании от отрицательных до положительных значений log<sub>2</sub> FC (рис. 3, б). В клеточной линии K562 11 сигнальных путей подвержены таким колебаниям, в клеточной линии Raji — 3 (рис. 3, в), а в клеточной линии HL-60 не обнаружено ни одного такого сигнального пути (рис. 3, а). Наиболее значительные отличия между радиорезистентной клеточной линией K562 и радиочувствительными клеточными линиями HL-60 и Raji наблюдаются в динамике давления микро-РНК на сигнальные пути Integrin signaling pathway (рис. 3, код 20) и General transcription by RNA polymerase I (рис. 3, код 15). Давление микро-РНК на сигнальный путь General transcription by RNA polymerase I в клеточной линии K562 в ходе эксперимента постепенно ослабевает и достигает значения log<sub>2</sub> FC=0,9 через 24 ч после облучения (см. рис. 3, б). В клеточных линиях HL-60 и Raji давление микро-



**Рис. 2.** Количество дифференциально-экспрессирующихся микро-РНК в клеточных линиях K562, HL-60, Raji: а — через 1 ч после облучения; б — через 4 ч после облучения; в — через 24 ч после облучения



**Рис. 3.** Динамика влияния микро-РНК на активность сигнальных путей через 1, 4, 24 ч после облучения клеточной линии HL-60 (а); клеточной линии K562 (б); клеточной линии Raji (в):

log<sub>2</sub> FC — двоичный логарифм; код сигнального пути: 1 — Adrenaline and noradrenaline biosynthesis; 2 — Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin; 3 — Axon guidance mediated by netrin; 4 — Axon guidance mediated by semaphorins; 5 — Axon guidance mediated by Slit/Robo; 6 — B cell activation; 7 — Blood coagulation; 8 — Cadherin signaling pathway; 9 — *de novo* purine biosynthesis; 10 — *de novo* pyrimidine ribonucleotides; 11 — Endogenous cannabinoid signaling; 12 — Endothelin signaling pathway; 13 — Enkephalin release; 14 — GABA-B receptor II signaling; 15 — General transcription by RNA polymerase I; 16 — General transcription regulation; 17 — Hedgehog signaling pathway; 18 — Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway; 19 — Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction; 20 — Integrin signaling pathways; 21 — N-acetylglucosamine metabolism; 22 — Nicotine pharmacodynamics pathway; 23 — Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway; 24 — O-antigen biosynthesis; 25 — Pyridoxal-5-phosphate biosynthesis; 26 — Ras pathway; 27 — Salvage pyrimidine ribonucleotides; 28 — Serine/glycine biosynthesis; 29 — Sulfate assimilation; 30 — Synaptic vesicle trafficking; 31 — T cell activation; 32 — Transcription regulation by bZIP transcription factor; 33 — Tryptophan biosynthesis; 34 — Ubiquitin proteasome pathway; 35 — VEGF signaling pathway; 36 — Vitamin B6 metabolism

РНК на этот сигнальный путь постепенно увеличивается и достигает значений  $\log_2 FC = -0,4 \dots -0,5$  через 24 ч после облучения. Давление микро-РНК на Integrin signaling pathway в клеточной линии K562 через 1 ч после облучения снижается ( $\log_2 FC = 0,51$ ), через 4 ч возвращается к контрольным значениям, а через 24 ч опять снижается и достигает значения  $\log_2 FC = 1,01$  (рис. 3, б). В клеточных линиях HL-60 и Raji давление на этот сигнальный путь увеличено практически на всем протяжении эксперимента и колеблется в районе  $\log_2 FC = -0,5$  (см. рис. 3, а, в).

**Обсуждение.** Для эксперимента были выбраны три раковые клеточные линии, отличающиеся радиочувствительностью к гамма-излучению. Самую низкую радиочувствительность демонстрирует клеточная линия K562 — суспензионной хронической миелоидной лейкемии человека, средней радиочувствительностью обладает линия промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 и самой высокой — линия лимфобластных клеток человека Raji. Смертность клеток линии Raji после однократного облучения гамма-излучением дозой 4 Гр в 2 раза больше, чем смертность клеток линии K562 по сравнению с контролем (31,56 против 13,56% соответственно), а смертность клеток линии HL-60 выше, чем линии K562, на 35% (см. рис. 1). Таким образом, использованные клеточные линии имели сходное происхождение и различную радиочувствительность.

Анализ микро-РНК показал, что микро-РНК hsa-miR-590-3p дифференциально экспрессируется во всех трех клеточных линиях (см. рис. 2), причем в линии K562 значительно слабее, чем в линиях HL-60 и Raji (4–16 случаев на  $10^5$  прочтений в K562 против 30–69 случаев на  $10^5$  прочтений в HL-60 и Raji). Микро-РНК hsa-miR-590-3p ингибирует митохондриальную дисфункцию и окислительный стресс в обработанных клетках 1-метил-4-фенил-пиридином линий MES23.5 и SH-SY5Y [17]. Показано, что данная микро-РНК тесно связана со многими нейродегенеративными расстройствами, в том числе играет важную роль при болезни Паркинсона [18–20]. Кроме того, ген *JMJD1C* идентифицирован в качестве целевого гена hsa-miR-590-3p в организме человека. Подавление экспрессии через hsa-miR-590-3p или нокаун гена *JMJD1C* увеличивают экспрессию генов *PGC-1-alpha*, *CPH-1* и *TFAM*, которые являются ключевыми генами, регулирующими митохондриальную функцию [17]. Ген *JMJD1C* также играет важную роль в клеточном ответе на повреждение ДНК и необходим для выживания клеток острой миелоидной лейкемии [21, 22]. Радиационное облучение индуцирует увеличение количества hsa-miR-590-3p во всех клеточных линиях, однако в клеточной линии K562 количество такой микро-РНК все равно остается в 2–3 раза меньше, чем в клеточных линиях HL-60 и Raji. Таким образом, динамика и величина экспрессии hsa-miR-590-3p коррелируют с радиочувствительностью раковых клеток.

Анализ СНЭ всех микро-РНК, которые участвуют

в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, включенных в отдельные сигнальные пути, позволил выявить различия в давлении микро-РНК на сигнальные пути. В ходе биоинформационного анализа установлены значительные отличия в динамике изменения давления микро-РНК на пути Integrin signaling pathway (см. рис. 3, код 20) и General transcription by RNA polymerase I (см. рис. 3, код 15) между радиорезистентной клеточной линией K562 и радиочувствительными клеточными линиями HL-60 и Raji. Передача сигналов через Integrin signaling pathway тесно связана с развитием, прогрессированием и терапией раковых опухолей [23]. В ряде работ продемонстрирована также взаимосвязь ряда ключевых компонентов Integrin signaling pathway с радиочувствительностью раковых клеток. Так, активация этого пути через адгезию бета-1-интегрина с внеклеточным матриксом способствует увеличению устойчивости к развитию радиационно-индуцированного повреждения генома [24]. Ингибирование передачи сигнала через бета-1-интегрин с использованием антител, наоборот, увеличивает чувствительность раковых клеток к ионизирующей радиации [25]. Наше исследование влияния микро-РНК на сигнальные пути продемонстрировало, что в радиорезистентной клеточной линии K562 ингибирование Integrin signaling pathway после радиационного воздействия ослабевает (см. рис. 3, б, код 15). В клеточных линиях HL-60 и Raji, которые отличаются большей радиочувствительностью, ингибирование Integrin signaling pathway присутствует (см. рис. 3, а, в, код пути 15). Таким образом, анализ влияния микро-РНК на сигнальные пути радиорезистентных и радиочувствительных клеточных линий показал, что в радиорезистентной клеточной линии ослаблено ингибирующее действие микро-РНК на Integrin signaling pathway.

Второй сигнальный путь, найденный нами в результате проделанной работы, на который по-разному влияют микро-РНК в радиорезистентных и радиочувствительных клеточных линиях, это — General transcription by RNA polymerase I. РНК-полимераза I в эукариотических клетках ответственна за синтез рибосомальных РНК (кроме 5S рРНК). Регуляция синтеза рибосомальных РНК связана с синтезом белка. Ингибирование РНК-полимеразы I приводит к активации р53-зависимого апоптоза [26]. В наших экспериментах мы использовали радиорезистентную клеточную линию K562 с нокаутированным геном *TP53*. Запуск р53-индуцированного апоптоза в этой клеточной линии невозможен. Генотип клеточной линии K562 позволяет, чтобы этот сигнальный путь находился под сильным давлением микро-РНК без негативных последствий для клетки по сравнению с более радиочувствительными клеточными линиями HL-60 и Raji, у которых есть ген *TP53*. Отсутствие гена *TP53* в клеточной линии K562 позволяет этой линии более эффективно, по нашему мнению, перераспределять энергию в пользу репарационных процессов.



**Заключение.** Радиорезистентные и радиочувствительные клеточные линии имеют отличие в регуляции сигнальных путей посредством микро-РНК. Динамика и величина экспрессии микро-РНК hsa-miR-590-3p коррелируют с радиочувствительностью раковых клеток. Анализ влияния микро-РНК на сигнальные пути радиорезистентных и радиочувствительных клеточных линий показал, что в радиорезистентной клеточной линии K562 ослаблено ингибирующее действие микро-РНК на сигнальные пути Integrin signaling pathway и усилено — на General transcription by RNA polymerase I.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания 6.1617.2014/К, программы «УМНИК» и РФФИ №16-04-00504.

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

## Литература/References

- Guo L., Xiao Y., Fan M., Li J., Wang Y. Profiling global kinome signatures of the radioresistant MCF-7/C6 breast cancer cells using MRM-based targeted proteomics. *J Proteome Res* 2015; 14(1): 193–201, <https://doi.org/10.1021/pr500919w>.
- Kim W.-Y., Oh S.H., Woo J.-K., Hong W.K., Lee H.-Y. Targeting heat shock protein 90 overrides the resistance of lung cancer cells by blocking radiation-induced stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* 2009; 69(4): 1624–1632, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0505>.
- Tang Y., Cui Y., Li Z., Jiao Z., Zhang Y., He Y., Chen G., Zhou Q., Wang W., Zhou X., Luo J., Zhang S. Radiation-induced miR-208a increases the proliferation and radioresistance by targeting p21 in human lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; 35: 7, <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0285-3>.
- Li J.Y., Li Y.Y., Jin W., Yang Q., Shao Z.M., Tian X.S. ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 102, <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-102>.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9(2): 102–114, <https://doi.org/10.1038/nrg2290>.
- Zheng L., Zhang Y., Liu Y., Zhou M., Lu Y., Yuan L., Zhang C., Hong M., Wang S., Li X. MiR-106b induces cell radioresistance via the PTEN/PI3K/AKT pathways and p21 in colorectal cancer. *J Transl Med* 2015; 13: 252, <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0592-z>.
- Ma R., Jiang T., Kang X. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 38–47, <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-38>.
- Suzuki H., Maruyama R., Yamamoto E., Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. *Front Genet* 2013; 4: 258, <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00258>.
- Drakaki A., Iliopoulos D. MicroRNA-gene signaling pathways in pancreatic cancer. *Biomed J* 2013; 36(5): 200–208, <https://doi.org/10.4103/2319-4170.119690>.
- Methetrairut C., Slack F.J. MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23(1): 12–19, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.01.002>.
- Li G., Qiu Y., Su Z., Ren S., Liu C., Tian Y., Liu Y. Genome-wide analyses of radioresistance-associated miRNA expression profile in nasopharyngeal carcinoma using next generation deep sequencing. *PLoS One* 2013; 8(12): e84486, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084486>.
- Zhang B., Chen J., Ren Z., Chen Y., Li J., Miao X., Song Y., Zhao T., Li Y., Shi Y., Ren D., Liu J. A specific miRNA signature promotes radioresistance of human cervical cancer cells. *Cancer Cell Int* 2013; 13(1): 118, <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-118>.
- Su H., Jin X., Zhang X., Xue S., Deng X., Shen L., Fang Y., Xie C. Identification of microRNAs involved in the radioresistance of esophageal cancer cells. *Cell Biology Int* 2014; 38(3): 318–325, <https://doi.org/10.1002/cbin.10202>.
- Qu C., Liang Z., Huang J., Zhao R., Su C., Wang S., Wang X., Zhang R., Lee M.H., Yang H. MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. *Cell Cycle* 2012; 11(4): 785–796, <https://doi.org/10.4161/cc.11.4.19228>.
- Mascotti K., McCullough J., Burger S.R. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion* 2000; 40(6): 693–696, <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40060693.x>.
- Müller S., Rycak L., Winter P., Kahl G., Koch I., Rotter B. omiRas: a Web server for differential expression analysis of miRNAs derived from small RNA-Seq data. *Bioinformatics* 2013; 29(20): 2651–2652, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt457>.
- Wang J., Le T., Wei R., Jiao Y. Knockdown of JMJD1C, a target gene of hsa-miR-590-3p, inhibits mitochondrial dysfunction and oxidative stress in MPP<sup>+</sup>-treated MES23.5 and SH-SY5Y cells. *Cell Mol Biol* 2016; 62(3): 39–45.
- Villa C., Fenoglio C., De Riz M., Clerici F., Marcone A., Benussi L., Ghidoni R., Gallone S., Cortini F., Serpente M., Cantoni C., Fumagalli G., Martinelli Boneschi F., Cappa S., Binetti G., Franceschi M., Rainero I., Giordana M.T., Mariani C., Bresolin N., Scarpini E., Galimberti D. Role of hnRNP-A1 and miR-590-3p in neuronal death: genetics and expression analysis in patients with Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Rejuvenation Res* 2011; 14(3): 275–281, <https://doi.org/10.1089/rej.2010.1123>.
- Vaishnavi V., Manikandan M., Tiwary B.K., Munirajan A.K. Insights on the functional impact of microRNAs present in autism-associated copy number variants. *PLoS One* 2013; 8(2): e56781, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056781>.
- Spencer P., Fry R.C., Kisby G.E. Unraveling 50-year-old clues linking neurodegeneration and cancer to cycad toxins: are microRNAs common mediators? *Front Genet* 2012; 3: 192, <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00192>.
- Chen M., Zhu N., Liu X., Laurent B., Tang Z., Eng R., Shi Y., Armstrong S.A., Roeder R.G. JMJD1C is required for the survival of acute myeloid leukemia by functioning as a coactivator for key transcription factors. *Genes Dev* 2015; 29(20): 2123–2139, <https://doi.org/10.1101/gad.267278.115>.
- Zhu N., Chen M., Eng R., DeJong J., Sinha A.U., Rahnamay N.F., Koche R., Al-Shahrour F., Minehart J.C., Chen C.W., Deshpande A.J., Xu H., Chu S.H., Ebert B.L., Roeder R.G., Armstrong S.A. MLL-AF9- and HOXA9-mediated acute myeloid leukemia stem cell self-renewal requires JMJD1C. *J Clin Invest* 2016; 126(3): 997–1011, <https://doi.org/10.1172/jci82978>.

23. Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(1): 9–22, <https://doi.org/10.1038/nrc2748>.

24. Cordes N., Seidler J., Durzok R., Geinitz H., Brakebusch C.  $\beta$ 1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene* 2006; 25(9): 1378–1390, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209164>.

25. Eke I., Deuse Y., Hehlhans S., Gurtner K., Krause M., Baumann M., Shevchenko A., Sandfort V., Cordes N.  $\beta$ 1

integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy. *J Clin Invest* 2012; 122(4): 1529–1540, <https://doi.org/10.1172/jci61350>.

26. Bywater M.J., Poortinga G., Sanij E., Hein N., Peck A., Cullinane C., Wall M., Cluse L., Drygin D., Anderes K., Huser N., Proffitt C., Bliesath J., Haddach M., Schwaebe M.K., Ryckman D.M., Rice W.G., Schmitt C., Lowe S.W., Johnstone R.W., Pearson R.B., McArthur G.A., Hannan R.D. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell* 2012; 22(1): 51–65, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.019>.