

## ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ микроРНК В КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ ПОСЛЕ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2017 г. Д. А. Масленникова, А. В. Хохлова, В. В. Саенко, Е. А. Белобородов, Д. А. Зажом, С. Н. Ворсина, Ю. В. Саенко\*

Ульяновский государственный университет, Ульяновск

\*E-mail: saenkoyv@yandex.ru

Поступила в редакцию 8.09.2016 г.

Цель исследования – анализ динамики микроРНК радиочувствительной и радиорезистентной раковых клеточных линий после радиационного воздействия и биоинформационная оценка влияния микроРНК на активность сигнальных путей. В эксперименте использовались радиорезистентная K562 и радиочувствительная HL-60 клеточные линии. Клетки подвергли однократному воздействию рентгеновского излучения в дозе 4 Гр. Оценивали выживаемость клеток и спектр микроРНК через 1, 4 и 24 ч после облучения. Оценку спектра микроРНК выполняли с помощью секвенирования на платформе MiSeq, биоинформационный анализ полученных данных выполняли с использованием сервиса GenXpro и базы данных KEGG. Анализ динамики микроРНК продемонстрировал, что экспрессия более половины всех микроРНК в клетках K562 и HL-60 изменяется после радиационного воздействия в дозе 4 Гр. Биоинформационная оценка влияния микроРНК на активность сигнальных путей продемонстрировала потенциальные различия в пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов, входящих в состав 40 сигнальных путей между радиочувствительной и радиорезистентной клеточными линиями HL-60 и K562. Исследование продемонстрировало, что радиорезистентность является комплексным явлением и связана не только с изменением экспрессии генов и мутациями, но и с изменениями посттранскрипционной регуляции экспрессии генов на уровне микроРНК.

**Ключевые слова:** радиорезистентность, радиочувствительность, микроРНК, сигнальные пути, экспрессия генов

DOI: 10.7868/S0869803117040026

Важной задачей современной медицины является борьба с онкологическими заболеваниями. Наиболее действенным методом лечения злокачественных новообразований считается лучевая терапия [1]. Но радиорезистентность раковых клеток является большой проблемой при лечении и является причиной возникновения рецидивов и метастазов. Радиорезистентность – это устойчивость организмов к ионизирующему излучению, которая формируется в результате генетических мутаций и нарушений экспрессии генов. При нарушении экспрессии генов происходят изменения в метаболизме клеток через клеточные сигнальные пути, в том числе связанные с программируемой клеточной смертью. Раковые клетки способны избежать запрограммированной клеточной гибели, генерируя генетические мутации или эпигенетические изменения в ключевых запрограммированных путях клеточной смерти [2, 3]. В нормальных клетках механизмы программируемой клеточной смерти включаются при невозможности репарации молекул ДНК. Запуск программируемой клеточной смерти при стрессовых воздействиях, в том числе

при радиационном облучении, связан не только с повреждением молекул ДНК, но и с участием большого количества других сигнальных механизмов и зависит от их взаимодействия [4].

Основным механизмом регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне является регуляция деградации матричной РНК посредством микроРНК. МикроРНК представляют собой небольшие, 20–25 пар нуклеотидов (п.н.), не кодирующие РНК, влияющие на транскрипционную и посттранскрипционную регуляцию генов через подавление экспрессии [5]. Более тысячи микроРНК обнаружены в геноме человека, каждая из которых потенциально может регулировать сотни мРНК, поэтому они играют определяющую роль во многих клеточных процессах, в том числе радиоустойчивости и радиорезистентности клеток. Было показано, что микроРНК регулируют экспрессию порядка 60% всех белок-кодирующих генов [6]. Исследования последних лет показали, что микроРНК играют большую роль в патогенезе рака [7, 8]. Экспрессия микроРНК изменяется под влиянием радиации, что может означать их участие

в клеточном ответе на воздействие ионизирующего излучения [9]. Проведенные исследования продемонстрировали связь некоторых микроРНК с радиорезистентностью раковых клеток [10–12]. В результате было выявлено несколько десятков микроРНК, дифференциально экспрессирующихся в радиорезистентных и радиочувствительных клеточных линиях. Так, например, показано, что miR-125a, miR-150, miR-425 [13], miR-324–3p [14], miR-205 [15], Lin28-let7 [16], miR-21 [17] дифференциально экспрессируются в радиочувствительных и радиорезистентных раковых клетках. Однако не обнаружено одинаковых микроРНК, которые были бы характерны для всех радиорезистентных клеточных линий. Это связано с тем, что регуляция экспрессии генов посредством микроРНК является сложным процессом, при этом одна микроРНК может регулировать экспрессию многих генов, и экспрессию одного гена может регулировать много разных микроРНК. В этом случае более перспективным подходом является изучение влияния микроРНК на сигнальные пути.

Цель данной работы заключалась в анализе динамики микроРНКма радиочувствительной и радиорезистентной раковых клеточных линий после радиационного облучения и биоинформационная оценка влияния микроРНК на активность сигнальных путей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Эксперимент проводили на следующих клеточных линиях: K562 – радиорезистентная суспензионная линия хронической миелоидной лейкемии человека и HL-60 – радиочувствительная клеточная линия промиелоцитарного лейкоза человека. Культивирование клеток проводили при температуре 37 °С, 98%-ной влажности и 5% CO<sub>2</sub> с использованием среды RPMI-1640 с L-глутамином (“ПанЭко”, Россия), которая содержала 50 мкг/мл гентамицина (“ПанЭко”, Россия), и 10% эмбриональной бычьей сывороткой (“РАА Laboratories GmbH”, Австрия).

Клеточные линии подвергали воздействию рентгеновского излучения на линейном ускорителе Elekta Synergy (“Elekta”, Швеция) в дозе 4 Гр (энергия фотонов 10 МэВ). Длительность облучения составляла 55 с при температуре 21–22 °С. Поле облучения 16 × 20. Клетки находились в 6 луночных планшетах. Транспортировку культуральных планшетов до места облучения и обратно осуществляли в термостатируемом контейнере при температуре 37 °С. Эксперименты с клетками проводили во время логарифмической фазы роста.

Выживаемость клеток оценивали путем окраски смесью флуоресцентных красителей акридинового оранжевого и этидиум бромид [18].

Общую РНК, обогащенную микроРНК, 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 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies”, США). Для дальнейшей работы отбирали образцы с показателем RIN > 8.0. Получение библиотеки кДНК микроРНК, лигирование с адапторами и бар-кодирование проводили с использованием набора NEBNext Small RNA Library Prep Set (“NEB”, Великобритания). Очистку библиотек кДНК микроРНК проводили электрофорезом с использованием 6%-го полиакриламидного геля. Фрагменты кДНК, между 145 и 160 п.н., соответствующих микроРНК, вырезали из геля, затем элюировали и осаждали 80%-ным этанолом. Осадок кДНК высушили на воздухе и растворили в 10 мкл воды, обработанной DEPC. Количество кДНК в каждой из финальных библиотек микроРНК оценивали с использованием флуориметра Qubit “Invitrogen”, США). Эквимольные количества (2 нмоль/л) каждой библиотеки были объединены и секвенированы с помощью системы высокопроизводительного секвенирования MiSeq System (“Illumina”, США) с использованием набора для одноконцевого чтения 150 п.н. (“Illumina”).

В результате секвенирования были получены файлы формата FASTQ. Биоинформационную обработку данных проводили с использованием платформы GenXPro omiRas [19]. Это позволило получить данные, представленные в виде таблиц, которые содержали наименование микроРНК и нормализованное на 10<sup>5</sup> прочтений количество микроРНК.

Поиск генов, экспрессия которых регулируется микроРНК, проводили на платформе GenXPro omiRas [19]. Для дальнейшего исследования были отобраны микроРНК с нормализованной экспрессией > 100 шт. на образец. В результате формировался список генов для каждой клеточной линии и экспериментальной точки, экспрессию которых регулируют данные микроРНК.

Поиск сигнальных путей, в которые включены данные гены, проводили в базе данных KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>). Так как каждая микроРНК с равной вероятностью может участвовать в регуляции активности каждого гена, то нормализованное количество транскриптов каждой микроРНК делили на число генов, в регуляции которых она принимает участие, и получали нормализованную экспрессию микроРНК по каждому гену (НЭГ). Перечень генов, в регуляции экспрессии которых принимает участие каждая отдельная микроРНК, получали с помощью сервиса GenXPro omiRas. Затем суммировали полученные значения НЭГ по

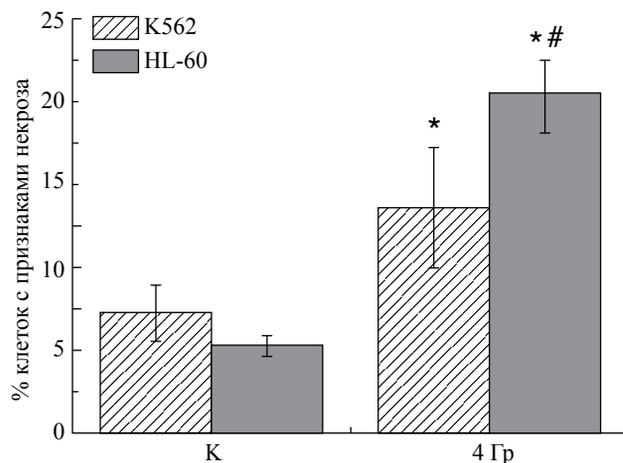
каждому сигнальному пути и получали сумму нормализованных экспрессии (СНЭ) всех микроРНК, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, включенных в этот сигнальный путь (СНЭ =  $NЭГ_1 + NЭГ_2 + \dots + NЭГ_i$ ). Суммы нормализованных экспрессий опыта (облученные клетки) и контроля (необлученные клетки) сравнивали и представляли в виде  $\log_2fc$  (двоичный логарифм отношения СНЭ опыта к контролю). В результате на основе полученных данных были построены графики. Для построения графиков были отобраны сигнальные пути, значения  $\log_2fc$  СНЭ которых были больше 0.5 или меньше -0.5 хотя бы в одном из экспериментов ( $\log_2fc > 0.5$  и  $\log_2fc < -0.5$ ).

Все эксперименты и определения параметров были выполнены с 3-кратным повторением. Результаты выражали как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Для оценки статистической значимости различий применяли  $t$ -критерий Стьюдента для парных переменных. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлен график, отражающий долю клеток с признаками некроза в необлученных и облученных клеточных линиях K562 и HL-60. В радиорезистентной клеточной линии K562 в контроле процент клеток с признаками некроза составляет 7.23%. После однократного радиационного воздействия в дозе 4 Гр количество клеток с признаками некроза возрастает и составляет 13.56%. В радиочувствительной клеточной линии HL-60 отмечено большее число клеток с признаками некроза по сравнению с клеточной линией K562. Радиационное воздействие в дозе 4 Гр приводит к возрастанию в несколько раз доли клеток HL-60 с признаками некроза, которая составила 20.5% (в контроле – 5.23%).

Секвенирование микроРНК, выделенных из клеточных линий K562 и HL-60, проводили через 1, 4 и 24 ч после облучения в дозе 4 Гр и осуществляли с использованием платформы MiSeq System (“Illumina”, США), что позволило узнать качественный и количественный состав микроРНК в исследуемых образцах. В результате анализа полученных данных были обнаружены дифференциально экспрессирующиеся микроРНК. На рис. 2 изображена диаграмма Венна, которая показывает количество дифференциально экспрессирующихся микроРНК в двух исследуемых клеточных линиях по отношению к контролю (значение под названием клеточной линии) и количество одноименных дифференциально экспрессирующихся микроРНК в линиях K562 и HL-60 (значение в пересечении кругов). Через 1 ч после облучения клеток



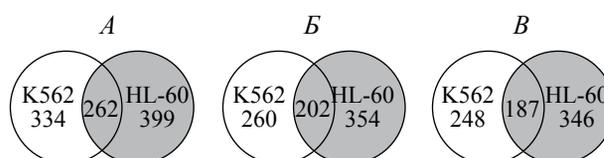
**Рис. 1.** Доля клеток с признаками некроза в контроле и после однократного воздействия в дозе 4 Гр в клеточных линиях K562 и HL-60.

\* Статистически значимое отличие по отношению к контролю,  $p < 0.05$ ;

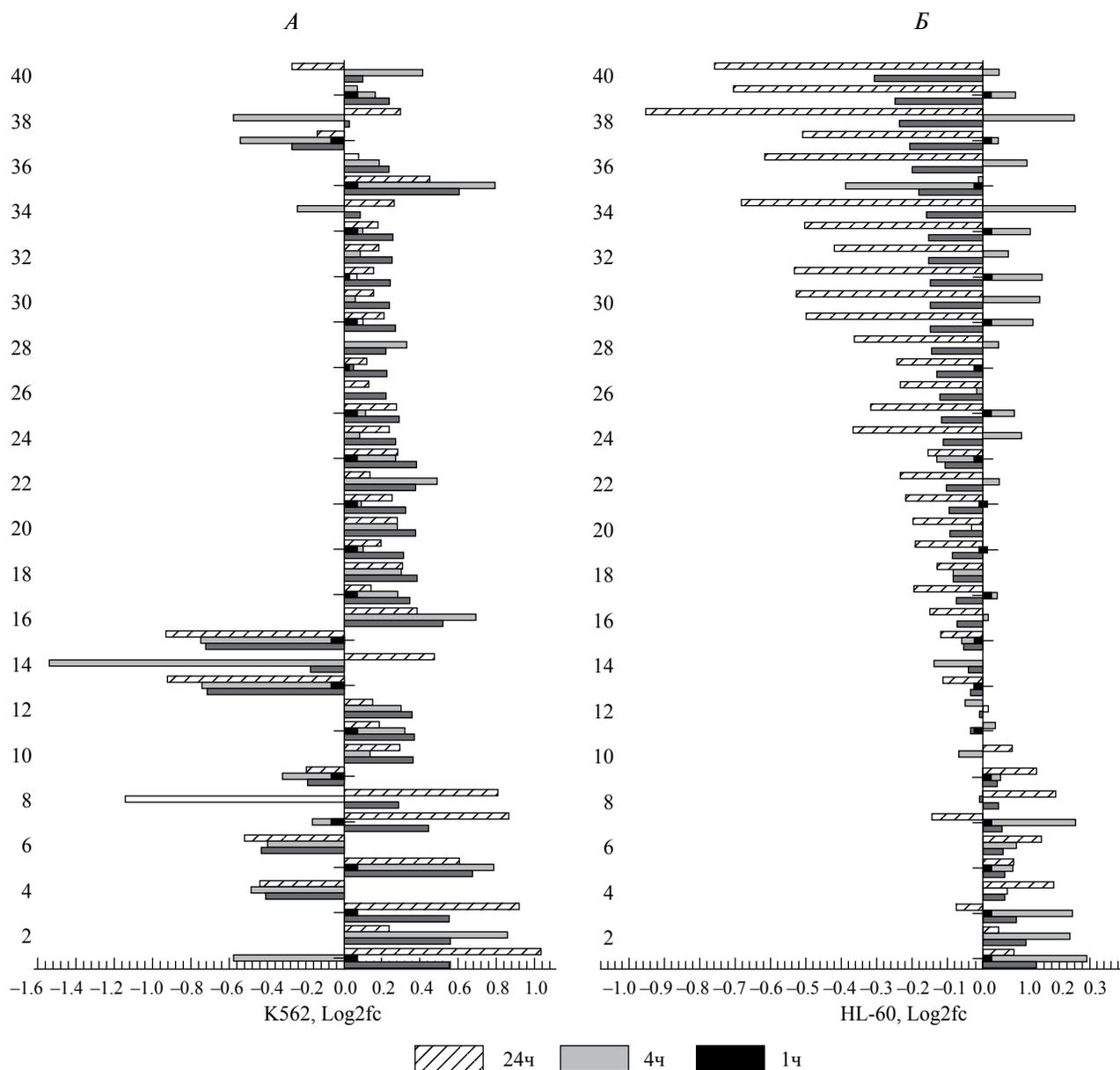
# – статистически значимые отличия по отношению к клеточной линии K562.

было выявлено 262 дифференциально экспрессирующихся микроРНК, характерных для двух исследуемых клеточных линий (рис. 2, А). В области пересечения множеств дифференциально экспрессирующихся микроРНК через 4 ч после того, как раковые клетки были подвергнуты радиационному воздействию, оказались 202 микроРНК (рис. 2, Б), а через 24 ч выявлено 182 микроРНК, характерных для двух клеточных линий (рис. 2, В). Таким образом, анализ динамики микроРНКoma продемонстрировал, что больше половины всех микроРНК, характерных как для радиочувствительной, так и для радиорезистентной клеточной линии, претерпевают изменение экспрессии после радиационного воздействия.

Регуляция экспрессии генов посредством микроРНК является сложным процессом, при этом одна микроРНК может регулировать экспрессию многих генов, а экспрессию одного гена может



**Рис. 2.** Число дифференциально экспрессирующихся микроРНК в клеточных линиях K562 и HL-60 (число дифференциально экспрессирующихся микроРНК по отношению к контролю указано под названием клеточной линии, в пересечении окружностей указано число одноименных микроРНК с измененной экспрессией в обеих клеточных линиях): А – через 1 ч после облучения; Б – через 4 ч после облучения; В – через 24 ч после облучения.



**Рис. 3.** Динамика влияния микроРНК на активность сигнальных путей через 1, 4, 24 ч после облучения клеточной линии K562 (А) и клеточной линии HL-60 (Б). Log2fc – двоичный логарифм отношения СНЭ сигнального пути в облученных клетках к необлученным клеткам. Код сигнального пути: 1 – Neuroactive ligand-receptor interaction (hsa04080); 2 – Longevity regulating pathway – multiple species (hsa04213); 3 – Ubiquitin mediated proteolysis (hsa04120); 4 – Pertussis (hsa05133); 5 – NF-kappa B signaling pathway (hsa04064); 6 – Regulation of actin cytoskeleton (hsa04810); 7 – Fanconi anemia pathway (hsa03460); 8 – Amoebiasis (hsa05146); 9 – PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151); 10 – Epstein-Barr virus infection (hsa05169); 11 – AMPK signaling pathway (hsa04152); 12 – Salmonella infection (hsa05132); 13 – Shigellosis (hsa05131); 14 – Type II diabetes mellitus (hsa04930); 15 – Bacterial invasion of epithelial cells (hsa05100); 16 – Leukocyte transendothelial migration (hsa04670); 17 – Bladder cancer (hsa05219); 18 – Toll-like receptor signaling pathway (hsa04620); 19 – Acute myeloid leukemia (hsa05221); 20 – NOD-like receptor signaling pathway (hsa04621); 21 – Hepatitis C (hsa05160); 22 – HIF-1 signaling pathway (hsa04066); 23 – RIG-I-like receptor signaling pathway (hsa04622); 24 – ErbB signaling pathway (hsa04012); 25 – Neurotrophin signaling pathway (hsa04722); 26 – Oxytocin signaling pathway (hsa04921); 27 – cGMP-PKG signaling pathway (hsa04022); 28 – Rap1 signaling pathway (hsa04015); 29 – Insulin signaling pathway (hsa04910); 30 – Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection (hsa05120); 31 – GnRH signaling pathway (hsa04912); 32 – Phospholipase D signaling pathway (hsa04072); 33 – Choline metabolism in cancer (hsa05231); 34 – VEGF signaling pathway (hsa04370); 35 – Cell adhesion molecules (CAMs) (hsa04514); 36 – Fc epsilon RI signaling pathway (hsa04664); 37 – Melanogenesis (hsa04916); 38 – Calcium signaling pathway (hsa04020); 39 – Renal cell carcinoma (hsa05211); 40 – Long-term depression (hsa04730).

регулировать множество разных микроРНК. Поэтому изучение дифференциальной экспрессии микроРНК дает мало информации для понимания механизмов радиорезистентности. Для более углубленного выявления причин радиорезистентности мы проанализировали распределение СНЭ микроРНК по внутриклеточным сигнальным путям. На рис. 3 показано влияние микроРНК на активность того или иного сигнального пути. Степень влияния микроРНК на сигнальные пути представлена в виде  $\log_2fc$  СНЭ (двоичный логарифм отношения суммы нормализованных экспрессий микроРНК опыта к контролю). Отрицательные значения  $\log_2fc$  СНЭ обозначают, что “давление” микроРНК на тот или иной сигнальный путь повышается, т.е. активность сигнального пути должна уменьшаться, положительные значения – “давление” микроРНК уменьшается, а активность сигнального пути должна возрастать. Для удобства каждому сигнальному пути был присвоен код. Анализировали сигнальные пути, в которых хотя бы в одной экспериментальной точке  $\log_2fc$  СНЭ был больше или меньше 0.5. Анализируемые сигнальные пути были разделены на три группы: 1) сигнальные пути с одинаковой динамикой изменения, но отличающиеся по величине  $\log_2fc$  СНЭ; 2) сигнальные пути с противоположной динамикой изменения  $\log_2fc$  СНЭ; 3) сигнальные пути с частично противоположной динамикой изменения  $\log_2fc$  СНЭ.

В первую группу вошли четыре сигнальных пути (рис. 3, код 2, 5, 13, 15). “Давление” микроРНК на сигнальные пути Longevity regulating pathway – multiple species (hsa04213) (рис. 3, код 2) и NF-kappa B signaling pathway (hsa04064) (рис. 3, код 5) на протяжении всего эксперимента снижено, при этом в радиорезистентной клеточной линии K562 “давление” уменьшено в 2–3 раза по сравнению с клеточной линией HL-60. В сигнальных путях Shigellosis (hsa05131) (рис. 3, код 13) и Bacterial invasion of epithelial cells (hsa05100) (рис. 3, код 15) наблюдается противоположная картина. А именно, “давление” микроРНК на эти сигнальные пути увеличено, причем в клеточной линии K562 имеется разница в значениях  $\log_2fc$  в 2–3 раза в отличие от радиочувствительной клеточной линии HL-60.

Ко второй группе отнесли 12 сигнальных путей (рис. 3, код 4, 6, 9, 18, 19–23, 26, 27, 35). Сигнальные пути Pertussis (hsa05133) (рис. 3, код 4), Regulation of actin cytoskeleton (hsa04810) (рис. 3, код 6) и PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151) (рис. 3, код 9) в клеточной линии HL-60 имеют положительные значения  $\log_2fc$ , что означает снижение “давления” микроРНК на сигнальные пути в результате облучения (по сравнению с контролем); в клеточной линии K562 “давление” микроРНК на данные сигнальные пути увеличено. В остальных сигнальных путях (рис. 3, код 18, 19–23, 26, 27, 35), включенных

в эту группу, отмечено увеличение “давления” микроРНК в клеточной линии HL-60 и уменьшение “давления” микроРНК в клеточной линии K562. Наибольшее отличие в значениях  $\log_2fc$  между двумя исследуемыми клеточными линиями наблюдается в сигнальном пути Cell adhesion molecules (CAMs) (hsa04514) (рис. 3, код 35). Наиболее заметные различия отмечаются через 4 ч после облучения: в клеточной линии HL-60  $\log_2fc = -0.39$ , в клеточной линии K562  $\log_2fc = 0.78$ .

В третью группу, с частично противоположной динамикой изменения давления микроРНК, вошли 24 сигнальных пути (рис. 3, код 1, 3, 7, 8, 10–12, 14, 16, 17, 24, 25, 28–34, 36–40). Наиболее значительные отличия в динамике изменения “давления” микроРНК наблюдаются в 15 сигнальных путях. В сигнальных путях Amoebiasis (hsa05146) (рис. 3, код 8) и Type II diabetes mellitus (hsa04930) (рис. 3, код 14) значения  $\log_2fc$  составляют  $-1.68$  и  $-1.52$  соответственно в клеточной линии K562 через 4 ч после облучения, в клеточной линии HL-60 эти значения являются незначительными. В 13 сигнальных путях (рис. 3, код 28–40) имеются достаточно заметные отличия в “давлении” микроРНК через 24 часа после облучения клеточных культур. В клеточной линии HL-60 через 24 ч после облучения “давление” микроРНК резко увеличено и имеет значения от  $-0.38$  до  $-0.9$ , а в клеточной линии K562 рассматриваемый показатель не является существенным, но уменьшен по сравнению с контролем.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Различные сигнальные пути играют огромную роль в возникновении метастазов, химио- и радиорезистентности через изменение экспрессии генов или возникновение мутаций, делеций и полного подавления экспрессии некоторых генов. Выявление сигнальных путей, которые могут стать причиной радиорезистентности раковых клеток, имеет важное значение для выбора соответствующих методов лечения пациентов и разработки новых средств для повышения радиочувствительности злокачественных опухолей.

Для данного исследования были отобраны две клеточные линии лейкемии, которые имеют разную чувствительность к радиационному воздействию. Клеточная линия K562 является менее радиочувствительной, клеточная линия HL-60 обладает умеренной радиочувствительностью, что видно из экспериментов по определению выживаемости раковых клеток линий K562 и HL-60 после однократного облучения в дозе 4 Гр (рис. 1).

Изучение динамики микроРНК выявило, что радиационное воздействие вызывает существенное изменение экспрессии микроРНК и, следовательно, оказывает существенное влияние на посттранскрипционную регуляцию экспрессии

генов. По данным наших экспериментов, более половины всех микроРНК в клетках K562 и HL-60 изменяют свою экспрессию после радиационного воздействия в дозе 4 Гр (рис. 2).

Анализ “давления” микроРНК на сигнальные пути показал, что все рассмотренные сигнальные пути можно разделить на три группы. В первую группу вошли сигнальные пути с одинаковой динамикой изменения  $\log_2fc$  СНЭ, но отличающиеся по величине  $\log_2fc$  СНЭ (рис. 3, код 2, 5, 13, 15). Наиболее интересным в этой группе, с нашей точки зрения, являются различия в “давлении” микроРНК на сигнальный путь NF-каппа В signaling pathway (hsa04064) (рис. 3, код 5). NF-каппа В – транскрипционный фактор, который играет ключевую роль в устойчивости опухолевых клеток к радио- и химиотерапии, а также принимает участие в регуляции воспаления и дифференцировки клеток [20–23]. Было показано, что облучение индуцирует активность фактора NF-каппа В, но при блокировании активации данного сигнального пути увеличивается апоптотическая реакция и снижаются рост и выживаемость раковых клеток [24]. “Давление” микроРНК на сигнальный путь NF-каппа В signaling pathway (рис. 3, код 25) в радиорезистентной клеточной линии снижено на всем протяжении эксперимента, а в радиочувствительной клеточной линии имеет значения близкие к контролю, что согласуется с ранее проведенными исследованиями [20–24]. Другой сигнальный путь, на который “давление” микроРНК в радиорезистентной клеточной линии K562 снижено, по сравнению с линией HL-60 – это Longevity regulating pathway – multiple species (рис. 3, код 2). Этот сигнальный путь отвечает за продолжительность жизни клеток и описан для вида *C. Elegans*. В его состав входят 70 генов, часть из которых относятся к другим сигнальным путям, таким как Insulin signaling, mTOR, HIF-1, Autophagy, PI3K-Akt [25]. В нашей работе мы впервые отмечаем, что снижение “давления” микроРНК на этот сигнальный путь ассоциируется с радиорезистентностью раковых клеток.

Во вторую группу сигнальных путей с противоположной динамикой изменения  $\log_2fc$  СНЭ включено 12 сигнальных путей (рис. 3, код 4, 6, 9, 18, 19–23, 26, 27, 35). Наиболее сильные различия между радиорезистентной линией K562 и радиочувствительной линией HL-60 мы наблюдали в давлении микроРНК на сигнальный путь Cell adhesion molecules pathway (рис. 3, код 35). В клеточной линии K562 радиационное воздействие индуцирует снижение количества микроРНК, регулирующих экспрессию генов этого сигнального пути по сравнению с контролем, тогда как в клеточной линии HL-60 количество микроРНК немного увеличивается. Этот сигнальный путь объединяет около 140 белков и отвечает за широкий спектр биологических процессов, в частности за гомеостаз, иммунный ответ, воспаление и апоптоз. Ранее было продемонстрировано, что эндотелиальные

клетки с низким количеством молекул адгезии демонстрируют низкую активность Cell adhesion molecules pathway и более подвержены ненормальной пролиферации и апоптозу [26]. При исследовании причин радиорезистентности рака предстательной железы было продемонстрировано, что подавление активности Cell adhesion molecules pathway увеличивает химио- и радиорезистентность раковых клеток [27]. В клеточной линии K562 количество микроРНК, регулирующих экспрессию данного сигнального пути, снижено в сравнении с контролем и по сравнению с клеточной линией HL-60, что может служить одной из причин радиорезистентности клеток линии K562 (рис. 3, код 35).

В третью группу, с частично противоположной динамикой изменения давления микроРНК, вошли 24 сигнальных пути (рис. 3, код 1, 3, 7, 8, 10–12, 14, 16, 17, 24, 25, 28–34, 36–40). В этой группе наиболее интересной является роль микроРНК в регуляции сигнальных путей: Fanconi anemia pathway (рис. 3, код 7); Leukocyte transendothelial migration (рис. 3, код 16); VEGF signaling pathway (рис. 3, код 34); Calcium signaling pathway (рис. 3, код 38); Renal cell carcinoma (рис. 3, код 39) и Long-term depression (рис. 3, код 40). Сигнальный путь Leukocyte transendothelial migration является частью сигнального пути Cell adhesion molecules pathway. В наших экспериментах эти два сигнальных пути ведут себя практически идентично (рис. 3, код 16, код 35). Передача сигналов по сигнальному пути VEGF в опухолевых клетках заметно влияет на функцию опухоли, что не зависит от VEGF-опосредованного ангиогенеза и проницаемости сосудов. Эта передача сигналов способствует онкогенезу, в том числе инициации опухоли, и поддерживает самообновление клеток [28, 29]. Было показано, что ингибирование сигнального пути VEGF способствует прекращению роста опухоли, а радиационное воздействие вызывает гибель опухолевых клеток. Это говорит о том, что данный сигнальный путь участвует в возникновении и поддержании радиорезистентности раковых клеток [30]. В радиочувствительной клеточной линии HL-60 через 4 ч после облучения “давление” микроРНК на сигнальный путь VEGF снижено, а через 24 ч резко увеличено. В радиорезистентной клеточной линии K562 “давление” микроРНК на исследуемый сигнальный путь изменяется незначительно. Анемия Фанкони является аутомно-рецессивным синдромом, который связан с мутацией в одном или нескольких генах, приводящей к геномной нестабильности и предрасположенности к развитию рака [31]. Сигнальный путь Fanconi anemia pathway играет роль в ответе на окислительный стресс и обеспечивает антиоксидантную защиту, что приводит к радиорезистентности клеток. При ингибировании Fanconi anemia pathway в опухолевых клетках их радиочувствительность повышается [31, 32]. В нашем исследовании “давление” микроРНК на сигнальный путь Fanconi anemia pathway (рис. 3, код 7) в радиорезистентной клеточной линии K562

через 1 ч после облучения снижено, а через 24 ч “давление” микроРНК снижается в 2 раза по сравнению со значением  $\log_2 f_c$  через 1 ч после облучения. В радиочувствительной клеточной линии HL-60 через 4 ч после облучения “давление” микроРНК снижено, а через 24 ч после облучения “давление” микроРНК чуть больше по сравнению с контролем.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа динамики микроРНКoma радиочувствительной и радиорезистентной раковых клеточных линий после радиационного воздействия было выявлено, что более половины всех микроРНК в клетках K562 и HL-60 изменяет свою экспрессию. Биоинформационная оценка влияния микроРНК на активность сигнальных путей продемонстрировала потенциальные различия между радиочувствительной и радиорезистентной клеточными линиями HL-60 и K562 в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, входящих в состав 40 сигнальных путей.

Таким образом, наше исследование продемонстрировало, что радиорезистентность является комплексным явлением и связана не только с изменением экспрессии генов и мутациями, но также и с изменениями в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов на уровне микроРНКoma.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaliberov S., Buchsbaum D. Cancer Treatment with Gene Therapy and Radiation Therapy // *Adv. Cancer Res.* 2012. № 115. P. 221–263.
2. Poos K., Smida J., Nathrath M. et al. How MicroRNA and Transcription Factor Co-regulatory Networks Affect Osteosarcoma Cell Proliferation // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9. № 8.
3. Su Z., Yang Z., Xu Y. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis // *Mol. Cancer.* 2015. V. 14. P. 48.
4. Fuchs Y., Steller H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease // *Cell.* 2011. V. 147. № 4. P. 742–758.
5. Guo L., Xiao Y., Fan M. et al. Profiling Global Kinome Signatures of the Radioresistant MCF-7/C6 Breast Cancer Cells Using MRM-based Targeted Proteomics // *J. Proteome Res.* 2015. V. 14. № 1. P. 193–201.
6. Metheerairut C., Slack F.J. MicroRNAs in the Ionizing Radiation Response and in Radiotherapy // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. V. 23. № 1. P. 12–19.
7. Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 2. P. 102–114.
8. Zheng L., Zhang Y., Liu Y. et al. MiR-106b induces cell radioresistance via the PTEN/PI3K/AKT pathways and p21 in colorectal cancer // *J. Transl. Med.* 2015. № 13. P. 252.
9. Drakaki A., Iliopoulos D. MicroRNA Gene Signaling Pathways in Pancreatic Cancer // *Biomed. J.* 2013. V. 36. № 5. P. 200–208.
10. Li G., Qiu Y., Su Z. et al. Genome-wide analyses of radioresistance-associated miRNA expression profile in nasopharyngeal carcinoma using next generation deep sequencing // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. 19–25.
11. Zhang B., Chen J., Ren Z. et al. A specific miRNA signature promotes radioresistance of human cervical cancer cells // *Cancer Cell Int.* 2013. V. 13. № 1. P. 118.
12. Su H., Jin X., Zhang X. et al. Identification of microRNAs involved in the radioresistance of esophageal cancer cells // *Cell Biol. Int.* 2014. V. 38. № 3. P. 318–325.
13. Chen C.C., Moskwa P., Zinn P.O. et al. A Functional Screen Identifies miRNAs that Induce 334 Radioresistance in Glioblastomas // *Neurosurgery.* 2016. V. 63. № 1. P. 197–198.
14. Li G., Liu Y., Su Z. et al. MicroRNA-324-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by directly targeting WNT2B // *Eur. J. Cancer.* 2013. V. 49. № 11. P. 2596–2607.
15. Qu C., Liang Z., Huang J. et al. MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN // *Cell Cycle.* 2012. V. 11. № 4. P. 785–796.
16. Oh J.S., Kim J.J., Byun J.Y. et al. Lin28-let7 modulates radiosensitivity of human cancer cells with activation of K-Ras // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010. V. 76. № 1. P. 5–8.
17. Song L., Liu S., Zhang L. et al. MiR-21 modulates radiosensitivity of cervical cancer through inhibiting autophagy via the PTEN/Akt/HIF-1 $\alpha$  feedback loop and the Akt-mTOR signaling pathway // *Tumour. Biol.* 2016.
18. Mascotti K., McCullough J., Burger S.R. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide // *Transfusion.* 2000. V. 40 № 6. P. 693–696.
19. Muller S., Rycak L., Winter P. et al. OmiRas: a Web server for differential expression analysis of miRNAs derived from small RNA-Seq data // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 20. P. 2651–2652.
20. He D., Xu Q., Yan M. et al. The NF-kappa B inhibitor, celastrol, could enhance the anti-cancer effect of gambogic acid on oral squamous cell carcinoma // *BMC Cancer.* 2009. V. 9. № 343.
21. Sughra K., Birbach A., Martin R. et al. Interaction of the TNFR-Receptor Associated Factor TRAF1 with I-Kappa B Kinase-2 and TRAF2 Indicates a Regulatory Function for NF-Kappa B Signaling // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 9.
22. Fu C., Chen D., Chen R. et al. The Schizophrenia-Related Protein Dysbindin-1A Is Degraded and Facilitates

- NF-Kappa B Activity in the Nucleus // PLoS One. 2015. V. 10. № 7.
23. Luo J., Kamata H., Karin M. IKK/NF- $\kappa$ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy // J. Clin. Invest. 2005. V. 115. № 10. P. 2625–2632.
  24. Ahmed K.M., Li J.J. NF- $\kappa$ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation // Free Radic. Biol. Med. 2008. V. 44. № 1. P. 1–13.
  25. Toth M., Timea S., Borsos E. et al. Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans* // Autophagy. 2008. V. 4. № 3. P. 330–338.
  26. Truneki M., Madri J. Adhesion Molecule-Mediated Hippo Pathway Modulates Hemangioendothelioma Cell Behavior // Mol. Cell. Biol. 2014. V. 34. № 24. P. 4485–4499.
  27. Ni J., Cozzi P., Beretov J. et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2013. V. 45. № 12. P. 2736–2749.
  28. Goel H.L., Mercurio A.M. VEGF targets the tumour cell // Nat. Rev. Cancer. 2013. V. 13. № 12. P. 871–882.
  29. Tian Y., Xie Q., Tian Y. et al. Radioactive  $^{125}\text{I}$  Seed Inhibits the Cell Growth, Migration, and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma by Triggering DNA Damage and Inactivating VEGF-A/ERK Signaling // PLoS One. 2013. V. 8. № 9.
  30. Knizetova P., Ehrmann J., Hlobilkova A. et al. Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay // Cell Cycle. V. 7. № 16. P. 2553–2561.
  31. Berhane H., Epperly M.W., Goff J. et al. Radiologic Differences between Bone Marrow Stromal and Hematopoietic Progenitor Cell Lines from Fanconi Anemia (*Fancd2*<sup>-/-</sup>) Mice // Radiat. Res. 2014. V. 181. № 1. P. 76–89.
  32. Jenkins C., Kan J., Hoatlin M.E. Targeting the Fanconi Anemia Pathway to Identify Tailored Anticancer Therapeutics // Anemia. 2012. 2012:481583.

## MicroRNA Dynamics Study in the Leukemia Cells after Radiation Exposure

D. A. Maslennikova, A. V. Khokhlova, V. V. Saenko, E. A. Beloborodov,  
D. A. Zazhoma, S. N. Vorsina, Yu. V. Saenko\*

*Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia*

\*E-mail: saenkoyv@yandex.ru

Our research goal is studying the microRNAome dynamics of the radiosensitive and radioresistant cancer cell lines after radiation exposure and evaluation of the microRNA influence on the signaling pathway activity. We used a radioresistant leukemia cell line (K562) and radiosensitive leukemia cell line (HL-60) in the experiment. The cells were irradiated once with X-radiation of 4 Gy. The cell survival and microRNA spectrum were evaluated 1, 4 and 24 hours after irradiation. MicroRNA spectrum evaluation was conducted with MiSeq System (Illumina, USA) sequencing. Bioinformatics analysis of the received data was carried out with the GenXpro service and the KEGG database. MicroRNAome dynamics analysis has revealed that more than half of the microRNAs in K562 and HL-60 cells change their expression after X-rays irradiation of 4 Gy. Bioinformatics estimation of microRNA influence on signaling pathways activity between radiosensitive and radioresistant cell lines HL-60 and K562 has shown potential differences in the post-transcriptional regulation of the expression of genes, which have been reported to be part of 40 signaling pathways. Our study shows that radioresistance is a complex phenomenon, which is due not only to gene expression changes and mutations but also to post-transcriptional gene expression regulation at the microRNA level.