

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Федеральный исследовательский центр химической физики

им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

На правах рукописи

Вевиорский Александр Петрович

Поиск биомаркеров чувствительности опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии онкологических заболеваний на основе данных об их молекулярной гетерогенности и эффективности репарации ДНК

1.5.1. Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор РАН Осипов Андреян Николаевич

кандидат физико-математических наук, Озеров Иван Витальевич

Москва - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность темы и степень разработанности.....	6
Цель и задачи исследования.....	8
Методология и методы исследования.....	9
Научная новизна и практическая значимость работы.....	10
Положения, выносимые на защиту.....	11
Соответствие паспорту научной специальности.....	12
Степень достоверности.....	12
Личный вклад автора.....	12
Апробация результатов.....	13
Публикации.....	13
Структура и объем работы.....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Роль лучевой терапии в лечении рака.....	14
1.1.1. Развитие методов лучевой терапии: исторический обзор.....	14
1.1.2. Эффективность и ограничения использования лучевой терапии для терапии различных типов рака.....	15
1.1.3. Персонализированные подходы в лучевой терапии.....	16
1.2. Молекулярные механизмы радиорезистентности и радиочувствительности.....	17
1.2.1. Сигнальные пути, связанные с радиорезистентностью.....	17
1.2.2. Влияние программируемой клеточной смерти и репарации ДНК на результаты лучевой терапии.....	18
1.2.3. Роль иммунного ответа в радиотерапии.....	20
1.3. Генетические нарушения в механизмах восстановления ДНК и их связь с онкогенезом.....	21

1.3.1. Обзор редких заболеваний, связанных с дефектами репарации ДНК.	21
1.3.2. Влияние генетических нарушений на предрасположенность к раку...	23
1.3.3. Потенциальные биомаркеры для стратификации пациентов.....	24
1.4. Мультиомиксные подходы в онкологии.....	25
1.4.1. Применение мультиомиксных исследований для идентификации биомаркеров.....	25
1.4.2. Использование искусственного интеллекта и биоинформатических платформ в биомедицинских исследованиях.....	27
1.4.3. Примеры успешного применения мультиомиксных подходов в онкологии.....	28
1.5. Поиск и применение низкомолекулярных соединений в онкотерапии....	29
1.5.1. История и развитие использования низкомолекулярных соединений в лечении рака.....	29
1.5.2. Методы <i>in silico</i> для поиска новых терапевтических агентов.....	31
1.5.3. Примеры успешного применения низкомолекулярных соединений для таргетной терапии.....	33
1.6. Синтетическая летальность как стратегия таргетной терапии.....	34
1.6.1. Концепция синтетической летальности и её применение в онкологии.....	34
1.6.2. Примеры синтетически летальных пар генов и их терапевтический потенциал.....	36
1.6.3. Перспективы и вызовы в использовании синтетической летальности для лечения рака.....	37
ГЛАВА 2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В РАБОТЕ.....	39

2.1. Эксперименты <i>in silico</i>	39
Сбор данных.....	39
Анализ дифференциальной экспрессии генов.....	41
Анализ активации и обогащения сигнальных путей.....	42
Анализ выживаемости и стратификация пациентов.....	44
Иерархическая кластеризация.....	45
Алгоритм ранжирования терапевтических мишеней.....	45
Алгоритм поиска низкомолекулярных модуляторов ответа на повреждение ДНК.....	47
<i>In silico</i> анализ результатов выживаемости клеток.....	48
<i>In silico</i> анализ результатов нокдауна генов в высокопроизводительном скрининге.....	49
2.2. Эксперименты <i>in vitro</i>	50
Клеточные культуры.....	50
Высокопроизводительный скрининг нокдауна генов.....	51
Анализ выживаемости клеток.....	52
Метод ДНК-комет.....	54
Иммуноцитохимия.....	54
Выделение гистонов.....	55
Иммунопреципитация.....	56
Анализ стабильности мишеней, чувствительных к аффинности мепакрина (DARTS).....	57
Иммуноблоттинг.....	58
Анализ ферментативной активности DYRK2.....	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
3.1. Анализ вариабельности результатов лучевой терапии: Сравнение глиомы низкой степени злокачественности и глиобластомы.....	61

3.2. Поиск низкомолекулярных модуляторов репарации ДНК: Идентификация синтетически летальных пар генов для таргетной терапии.	72
3.3. Идентификация биомаркеров для стратификации пациентов: Мультиомиксное исследование заболеваний, связанных с нарушением репарации ДНК.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110
БЛАГОДАРНОСТИ.....	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень разработанности

Лучевая терапия (ЛТ) является одним из основных методов лечения злокачественных новообразований, применяемым более чем у 50% пациентов в течение их болезни, как с лечебной, так и с паллиативной целью [1,2]. ЛТ играет ключевую роль в комплексном лечении рака, значительно увеличивая выживаемость при различных злокачественных новообразованиях [3]. Однако, несмотря на свою эффективность, ЛТ может вызывать значительные побочные эффекты, так как воздействует не только на опухолевые клетки, но и на здоровые ткани организма [3].

Одной из основных проблем ЛТ является радиорезистентность опухолевых клеток, которая ограничивает эффективность лечения и требует более глубокого понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе этого явления [4]. Важную роль в формировании радиорезистентности играют нарушения в системах репарации ДНК, которые позволяют опухолевым клеткам выживать после воздействия радиации. Генетические изменения, влияющие на механизмы репарации ДНК, играют ключевую роль в прогрессировании рака. Дефекты в функционировании механизмов репарации ДНК приводят к геномной нестабильности, то есть к накоплению мутаций и хромосомных нарушений в клетках. Геномная нестабильность является характерной чертой опухолевых клеток и связана с различными наследственными видами онкологических заболеваний [5].

Понимание этих генетических изменений, влияющих на механизмы репарации ДНК и способствующих развитию геномной нестабильности, имеет решающее значение для разработки новых видов таргетной терапии. Одним из перспективных подходов таргетной терапии является использование механизма синтетической летальности (synthetic lethality) - явления, при котором одновременное нарушение двух определённых генов

приводит к гибели клетки, тогда как нарушение каждого из них по отдельности не является летальным [6]. В контексте онкологии синтетическая летальность часто реализуется за счёт одновременного ингибирования различных компонентов системы репарации ДНК, однако данный механизм может быть связан и с другими клеточными путями. Такой подход позволяет избирательно уничтожать опухолевые клетки с определенными дефектами репарации, минимально затрагивая здоровые клетки. Для успешного применения таких подходов необходимо глубокое понимание молекулярных особенностей опухолей, что стало возможным благодаря развитию современных мультиомиксных технологий. В этом контексте мультиомиксные подходы произвели революцию в онкологии, предоставляя всестороннее понимание молекулярных взаимодействий и сигнальных путей, лежащих в основе патогенеза онкологических заболеваний [7].

Полученные с помощью мультиомиксных исследований результаты открывают возможности для разработки новых классов лекарственных препаратов. Низкомолекулярные соединения в качестве противоопухолевых агентов демонстрируют высокую эффективность благодаря способности избирательно воздействовать на ключевые молекулярные мишени, такие как белки сигнальных путей, регуляторы клеточного цикла и компоненты систем репарации ДНК. Терапевтические агенты на основе малых молекул (small molecules - низкомолекулярные органические соединения с молекулярной массой обычно менее 1000 Дальтон) в настоящее время рассматриваются как эффективные и новые противоопухолевые препараты [8]. Малые молекулы способны проникать внутрь клеток и избирательно взаимодействовать с различными белками-мишенями, такими как ферменты, рецепторы и регуляторы сигнальных путей.

Степень разработанности вопроса отражена в многочисленных исследованиях, посвященных молекулярным механизмам

радиорезистентности, роли репарации ДНК и применению мультиомиксных подходов в онкологии. Однако, несмотря на значительный прогресс в области мультиомиксных исследований и таргетной терапии, до сих пор остается недостаточно изученным вопрос о том, как молекулярная гетерогенность опухолей и индивидуальные различия в эффективности репарации ДНК влияют на чувствительность опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии. В частности, недостаточно изучены биомаркеры, позволяющие прогнозировать эффективность лучевой терапии и таргетных препаратов, а также механизмы, лежащие в основе различий в чувствительности опухолей к этим видам терапии [9,10].

Таким образом, данное исследование направлено на решение актуальных задач современной онкологии, связанных с поиском биомаркеров чувствительности опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии. Изучение молекулярной гетерогенности опухолей и механизмов репарации ДНК позволит выявить новые биомаркеры и терапевтические мишени, что станет основой для разработки более эффективных и персонализированных подходов к лечению онкологических заболеваний.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы является разработка интегрированного подхода для выявления биомаркеров чувствительности опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии, а также идентификации перспективных терапевтических мишеней на основе изучения молекулярной гетерогенности опухолей и механизмов репарации ДНК.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать вариабельность результатов радиотерапии в зависимости от молекулярных характеристик и типа злокачественных новообразований, выявить опухоли с различным ответом выживаемости на лучевую терапию. Разработать подход для поиска биомаркеров радиорезистентности и радиочувствительности злокачественных новообразований различных типов

на основе их молекулярных характеристик, применить его для опухолей с относительно высокой летальностью пациентов, прошедших курс лучевой терапии;

2. Разработать методологию поиска молекул - модуляторов репарации ДНК на основе сравнения профилей генной экспрессии клеток после воздействия ионизирующего излучения и физиологически активных веществ из библиотеки СМАР. Исследовать механизм действия обнаруженных модуляторов репарации ДНК, на основе него предложить и валидировать молекулярную мишень для лечения онкологических заболеваний, а также связанный с ней биомаркер чувствительности опухолевых клеток;

3. На основе данных генной экспрессии по редким наследственным заболеваниям, ассоциированным с нарушениями в механизмах репарации ДНК и повышенным риском развития онкологических заболеваний, идентифицировать биомаркеры чувствительности опухолей к существующим таргетным препаратам.

Методология и методы исследования

В работе использованы современные подходы и методы молекулярной онкологии, радиационной биологии и биоинформатики. Анализ научной литературы проводился с использованием международных баз данных (PubMed, Scopus, Web of Science, Elibrary).

Биоинформатическая часть исследования включала сбор и обработку данных о генной экспрессии, вариациях числа копий генов (CNV), точечных мутациях и выживаемости пациентов из баз данных TCGA, GEO и ArrayExpress. Для анализа дифференциальной экспрессии генов использовался алгоритм limma. Анализ активации и обогащения сигнальных путей проводился с помощью алгоритмов iPANDA и gseapy на основе базы данных Reactome. Для оценки выживаемости пациентов применялся метод Каплана–Майера с использованием log-rank теста. Также была проведена иерархическая кластеризация фенотипических признаков и экспрессионных

профилей редких наследственных заболеваний. Для идентификации потенциальных терапевтических мишеней использовался интегративный подход, объединяющий омиксные и текстовые данные, а также экспертные оценки. Разработан алгоритм поиска низкомолекулярных соединений, модулирующих процессы репарации ДНК, и подход для выявления синтетически летальных пар генов на основе интеграции данных о мутациях и экспрессии генов.

Экспериментальная часть работы включала культивирование 129 линий опухолевых и нормальных клеток человека, высокопроизводительный скрининг с использованием малых интерферирующих РНК (siRNA) для 582 генов с последующей оценкой фокусов γ H2AX и 53BP1, анализ повреждений ДНК методом ДНК-комет (Comet-Chip), иммуноцитохимическое изучение кинетики репарации ДНК, иммуноблоттинг для анализа уровней белков и оценку ферментативной активности белков. Статистическая обработка и визуализация данных проводились с использованием открытых библиотек языка программирования Python.

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые установлена роль гена CEP135 как прогностического биомаркера для стратификации пациентов с саркомой. Показано, что его высокая экспрессия коррелирует с неблагоприятным прогнозом, а связанная с ним активация сигнального пути PLK1/G2-M открывает новые возможности для таргетной терапии. Разработан алгоритм поиска низкомолекулярных модуляторов репарации ДНК. Экспериментально подтвержден механизм действия идентифицированного низкомолекулярного соединения (мепакрин) как ингибитора репарации двунитевых разрывов ДНК, заключающийся в нарушении рекрутирования белка 53BP1 к местам повреждения ДНК посредством подавления активности убиквитин-лигаз RNF8/RNF168 через NDRG1 зависимый путь, что ранее не было описано в литературе. Разработан алгоритм поиска биомаркеров чувствительности, обладающих свойством

синтетической летальности. Предложенный алгоритм позволил идентифицировать новые синтетически летальные пары генов NDRG1-PARP3 и NDRG1-MLH1. NDRG1 предложена как новая терапевтическая мишень для лечения пациентов с колоректальной карциномой, у которых нарушены функции генов PARP3 и MLH1, что было подтверждено экспериментально в экспериментах на модельных клеточных линиях.

Внедрение биомаркера CEP135 в клиническую практику позволит проводить предварительную стратификацию пациентов с саркомой и выделять подгруппу, наиболее чувствительную к терапии, направленной на ингибирование PLK1, что может повысить эффективность лечения. Предложенный подход, основанный на анализе транскриптомных и генетических данных, ускоряет процесс идентификации новых биомаркеров чувствительности и новых терапевтических мишеней, а также может быть адаптирован для широкого спектра онкологических заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Подходы, основанные на сравнительном анализе транскриптомных и генетических данных больных, прошедших и не прошедших курс лучевой терапии, позволяют идентифицировать биомаркеры радиорезистентности и радиочувствительности. С помощью предложенного подхода было показано, что увеличенное количество копий гена EGFR ассоциировано с радиорезистентностью, а мутации в гене ATRX с радиочувствительностью у больных с глиомой низкой степени злокачественности;
2. Сравнение транскриптомных ответов на ионизирующее излучение и низкомолекулярные соединения является эффективной стратегией для идентификации новых модуляторов репарации ДНК, которые могут использоваться как инструменты для поиска новых терапевтических мишеней. С помощью предложенной методологии был найден мепакрин как модулятор процессов репарации ДНК, использованный для выявления новой

перспективной терапевтической мишени NDRG1 и ассоциированных с ней биомаркеров чувствительности MLH1 и PARP3 для колоректальной карциномы;

3. Анализ транскриптомных профилей при наследственных заболеваниях, сопровождающихся нарушением репарации ДНК и высоким риском развития опухолей, позволяет находить биомаркеры чувствительности к таргетной терапии онкологических заболеваний. Применение такого подхода позволило выявить высокий уровень экспрессии гена CEP135 как прогностический биомаркер для саркомы и обосновать PLK1 как перспективную мишень для терапии этой подгруппы больных.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.1 Радиобиология по области исследований: Исследование биологического ответа на воздействие ионизирующих излучений; Механизмы формирования молекулярных и клеточных изменений при облучении; Радиобиология опухолей и индивидуальная радиочувствительность.

Степень достоверности

Достоверность результатов работы обеспечивается проведением экспериментов с высокой воспроизводимостью и тщательной статистической обработкой полученных данных. Для достижения заданной вероятности и необходимого уровня статистической достоверности использовалось достаточное количество повторных испытаний. В процессе исследования результаты вычислительных экспериментов подтверждались экспериментальными данными, что усиливает уверенность в их достоверности. Результаты, полученные различными методами, были сопоставлены друг с другом и аналогичными данными, представленными в литературе. Такой подход обеспечивает высокую степень уверенности в полученных результатах и их значимость для научного сообщества.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании всех экспериментов, а также в обработке, анализе и интерпретации полученных данных. Весь биоинформатический анализ, включая разработку алгоритмов и статистическую обработку экспериментальных данных, был выполнен автором лично. Автор также активно участвовал в написании научных статей и тезисов, представляющих результаты исследования. Личный вклад автора в совместные публикации основополагающий.

Апробация результатов

Основные положения и результаты диссертационной работы представлялись и докладывались на следующих российских и международных научных конференциях: Юбилейная международная научно-практическая конференция "ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России: 75 лет на страже здоровья людей", Россия, Москва, Ноябрь, 2021; MENA Organization for Rare Diseases Annual Meeting, UAE, Dubai, March, 2023; Abu Dhabi Global Healthcare Week (ADGHW), UAE, Abu Dhabi, May, 2024; Международный научно-практический форум молодых ученых и специалистов "Ильинские Чтения 2025", Москва, Февраль, 2025; Abu Dhabi Global Healthcare Week (ADGHW), UAE, Abu Dhabi, May, 2025; 2nd MENA Congress for Preventive Medicine 2025, UAE, Abu Dhabi, May, 2025; RAP 2025 Conference, Greece, Crete, May, 2025; Международная научно-практическая конференция «Генетика и физиология: прошлое, настоящее, будущее» (IGPH2025), Казахстан, Алматы, Май, 2025.

Публикации

Основные результаты, положения и выводы диссертации изложены в 8 научных работах автора, в том числе 4 публикациях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в МГУ имени М.В.Ломоносова по специальности и отрасли наук общим объемом 4 п.л.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 129 страницах печатного текста и содержит 13 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, основных методов и подходах, используемых в работе, результатов и обсуждений, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 209 наименования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль лучевой терапии в лечении рака

1.1.1. Развитие методов лучевой терапии: исторический обзор

Лучевая терапия берет свое начало в конце XIX века, когда были сделаны важнейшие открытия: в 1895 году Вильгельм Рентген открыл рентгеновские лучи, в 1896 году Анри Беккерель обнаружил естественную радиоактивность, а в 1898 году супруги Мария и Пьер Кюри выделили радиоактивный элемент - радий. Уже в 1896 году в таких странах, как Франция, США и Швеция, началось применение терапевтического облучения. Первая задокументированная радиотерапия злокачественной опухоли была проведена в Январе 1896 года Эмилем Груббе, который лечил язвенную форму рака груди [11].

С момента открытия цитотоксического действия радиации на клетки, лучевая терапия стала важным методом лечения онкологических заболеваний, обеспечивая значительные преимущества как при внешнем, так и при внутреннем облучении [12]. Историю развития радиотерапии можно условно разделить на несколько периодов: это эпоха киловольтного излучения (1900–1939), когда еще было возможно эффективно лечить только поверхностные и радиочувствительные опухоли, эпоха мегавольтного излучения (1950–1995), когда телекобальтовые аппараты и линейные ускорители позволили доставлять высокие дозы радиации в глубокие ткани организма, а в настоящее время - эпоха вычислительно -опосредованной

радиотерапии, при которой появилась возможность оптимизировать распределение дозы в трехмерном пространстве [13].

В течение XX века совершенствовались методы планирования и проведения лучевой терапии, что сделало ее эффективным и экономически выгодным методом паллиативного лечения [14]. Развитие радиотерапии тесно связано с достижениями в клинической радиационной онкологии, компьютерных технологиях, медицинской физике и методов визуализации [15]. Современная радиотерапия включает сложные процедуры подготовки, планирования и проведения лечения, требующие участия множества специалистов: врачей-онкологов, медицинских физиков и техников [16]. Технологические достижения способствовали разработке новых методов, позволяющих доставлять радиацию с высокой точностью, минимизируя повреждение здоровых тканей [17]. Введение радиотерапии с модуляцией интенсивности (IMRT) значительно улучшило точность доставки терапевтической дозы в опухоли [18]. Новые методы визуализации, такие как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ-КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ), значительно улучшили возможности контроля за эффективностью лучевой терапии [19].

Таким образом, развитие лучевой терапии характеризуется постоянными технологическими инновациями, междисциплинарными подходами и стремлением повысить эффективность лечения при минимизации побочных эффектов.

1.1.2. Эффективность и ограничения использования лучевой терапии для терапии различных типов рака

Лучевая терапия является важным компонентом лечения многих видов онкологических заболеваний. Ее эффективность подтверждена многочисленными клиническими исследованиями и рекомендациями, основанными на доказательной медицине [20]. Однако важно отметить, что

эффективность лучевой терапии зависит от типа опухоли, стадии заболевания и индивидуальных особенностей пациента. Например, опухоли головы и шеи, такие как плоскоклеточный рак гортани, обычно хорошо отвечают на лучевую терапию, особенно на ранних стадиях заболевания. В то же время, некоторые опухоли, такие как глиобластома, характеризуются высокой радиорезистентностью, что ограничивает эффективность данного метода лечения [9].

Несмотря на значительные достижения в области применения, лучевая терапия имеет ряд ограничений. Основным из них является повреждение окружающих здоровых тканей, что часто приводит к нежелательным побочным эффектам и осложнениям [21]. Также стоит отметить что лучевая терапия обычно применяется локально, что ограничивает ее эффективность при метастатическом распространении опухоли [22]. В добавок к этому, некоторые опухоли обладают врожденной радиорезистентностью, а некоторые, такие как глиобластома или немелкоклеточный рак легкого, могут приобретать устойчивость к лучевой терапии со временем, что требует разработки комбинированных подходов и новых стратегий лечения [23]. Дополнительными ограничениями широкого применения лучевой терапии являются ограниченная доступность современного высокотехнологичного оборудования и необходимость использования методов высокоточной визуализации для эффективного планирования и контроля лечения [24].

1.1.3. Персонализированные подходы в лучевой терапии

В последние годы активно развивается персонализированная лучевая терапия, основанная на индивидуальных особенностях пациента и биологических характеристиках опухоли. Основная цель такого подхода — это повысить эффективность лучевой терапии и снизить количество побочных реакций вызванных повреждением здоровых тканей [25].

Персонализация лучевой терапии основана на интеграции современных методов доставки дозы облучения и молекулярно-генетических особенностей опухоли конкретного пациента [9]. Так, использование молекулярно-генетических биомаркеров позволяет прогнозировать чувствительность опухоли к радиации и адаптировать дозу и режим облучения [26,27]. В тоже время, адаптивная радиотерапия (ART) позволяет корректировать план лечения в зависимости от ежедневных изменений анатомии пациента и опухоли, что повышает точность и безопасность лечения [28,29]. Ожидается, что четырехмерная адаптивная радиотерапия (4D-ART), учитывающая динамические изменения опухоли и окружающих органов в процессе лечения, станет стандартом лечения [30].

Перспективным направлением является интеграция радиотерапии с другими широко применяемыми методами, такими как таргетная терапия и иммунотерапия, что позволяет преодолевать радиорезистентность опухоли и, как итог, приводит к улучшению результатов лечения. Примерами таких подходов являются комбинация лучевой терапии с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (например, анти-PD-1/PD-L1 терапия) при немелкоклеточном раке легкого [31], а также сочетание радиотерапии с ингибиторами EGFR при лечении плоскоклеточного рака головы и шеи [32]. Таким образом, персонализированная лучевая терапия является перспективным направлением современной онкологии, позволяющим улучшить результаты лечения и снизить риск осложнений за счет индивидуального подхода к каждому пациенту.

1.2. Молекулярные механизмы радиорезистентности и радиочувствительности

1.2.1. Сигнальные пути, связанные с радиорезистентностью

Молекулярные механизмы, лежащие в основе радиорезистентности и радиочувствительности опухолей, являются сложными и многогранными.

Одним из ключевых факторов, способствующих радиорезистентности, является активация определенных сигнальных путей.

Например, сигнальный путь АКТ/Bcl-2 вовлечен в радиорезистентность нозофарингеальной карциномы через снижение активности каспазы-3 и прямого взаимодействия белка RBM3 с субъединицей PI3K p85. Было показано, что ингибирование сигнального пути АКТ приводит к понижению уровня RBM3-зависимой радиорезистентности, что подчеркивает потенциал этого пути как терапевтической мишени [33].

Другим важным путем является сигнальный путь Wnt/ β -катенин, активация которого связана с радиорезистентностью при различных типах онкологических заболеваний [34]. Сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR также часто дисрегулирован в опухолях, что приводит к увеличению и пролиферации клеток [35]. Было показано, что ингибирование PI3K/АКТ/mTOR сигналинга повышает чувствительность опухолевых клеток к ионизирующему излучению [36].

Стоит упомянуть также сигнальный путь Notch, который играет важную роль в радиорезистентности клеток глиомы, активируя PI3K/Akt и увеличивая экспрессию антиапоптотического белка Mcl-1. Было показано, что его ингибирование делает клетки глиомы более чувствительными к клинически допустимым дозам радиации [37]. Аналогично, сигнальный путь ERK влияет на радиорезистентность в клетках колоректального рака [38]. Сигнальный путь Hedgehog также рассматривается как потенциальная мишень для преодоления радиорезистентности при раке шейки матки [39].

1.2.2. Влияние программируемой клеточной смерти и репарации ДНК на результаты лучевой терапии

Программируемая клеточная смерть и механизмы репарации ДНК являются одними из ключевых факторов, определяющих эффективность лучевой терапии. Ионизирующее излучение вызывает повреждения ДНК и других

молекулярных структур, что приводит к различным формам клеточной гибели, таким как апоптоз, некроз (включая его регулируемые формы — некроптоз и пироптоз), митотическая катастрофа и ферроптоз [40]. Апоптоз является наиболее изученной формой программируемой клеточной смерти, характеризующейся активацией каспазного каскада и межнуклеосомной фрагментацией ДНК. Однако существуют также каспаза-независимые механизмы апоптоза, которые могут быть активированы в ответ на повреждения ДНК и другие стрессовые воздействия [41]. Многие опухолевые клетки приобретают устойчивость к апоптозу, что ограничивает эффективность лучевой терапии и стимулирует изучение и использование альтернативных механизмов клеточной гибели, таких как митотическая катастрофа, ферроптоз и некроптоз [42,43].

Митотическая катастрофа возникает из-за повреждений ДНК, которые не были устранены системой репарации до начала митоза, что приводит к нарушению сегрегации хромосом и гибели клетки. Ферроптоз представляет собой недавно описанный механизм клеточной смерти, связанный с накоплением перекисного окисления липидов и зависимый от концентрации внутриклеточного железа. В последние годы митотическая катастрофа и ферроптоз рассматриваются как перспективные мишени для повышения радиочувствительности опухолевых клеток [44,45].

Эффективность лучевой терапии во многом зависит от способности опухолевых клеток восстанавливать повреждения ДНК. Основными путями репарации двухцепочечных разрывов ДНК, наиболее цитотоксичных повреждений, вызванных радиацией, являются негомологичное соединение концов (НГС) и гомологичная рекомбинация (ГР). НГС является быстрым, но часто неточным механизмом репарации, который может приводить к геномной нестабильности и мутациям. В свою очередь, ГР является более точным механизмом, однако требует наличия гомологичной

последовательности ДНК и активен преимущественно в S- и G2-фазах клеточного цикла [46].

Нарушения в работе механизмов репарации ДНК, например, вследствие мутаций в генах BRCA1/2, ATM или DNA-PK, могут существенно влиять на чувствительность опухолевых клеток к радиации. Например, опухоли молочной железы и яичников с мутациями в генах BRCA1/2 демонстрируют повышенную чувствительность к лучевой терапии и ингибиторам PARP, что используется в клинической практике для улучшения результатов лечения [47]. Также, опухоли с дефицитом ATM, такие как некоторые формы лимфом и рак предстательной железы, характеризуются повышенной радиочувствительностью и могут быть перспективными кандидатами для комбинированной терапии с ингибиторами репарации ДНК [48]. В частности, ингибирование сигнальных путей репарации ДНК, таких как таргетирование ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK), является перспективным подходом для повышения радиочувствительности опухолей и улучшения результатов лечения [49].

Таким образом, баланс между повреждением ДНК и её репарацией, а также способность опухолевых клеток активировать различные механизмы программируемой клеточной смерти, определяют судьбу облученных клеток и, следовательно, успех лучевой терапии. Более глубокое понимание этих процессов открывает возможности для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на преодоление радиорезистентности и повышение эффективности радиотерапии.

1.2.3. Роль иммунного ответа в радиотерапии

Эффективность работы иммунной системы играет важную роль в определении эффективности лучевой терапии. Радиация может вызывать как иммуностимулирующие, так и иммуносупрессивные эффекты, что влияет на исход лечения [50]. Иммунный ответ, в свою очередь, зависит от

множества факторов, включая мощность дозы радиации, режима фракционирования и исходного иммунного статуса пациента [51].

Сочетание лучевой терапии с иммунотерапией является перспективным подходом, способным усилить противоопухолевый иммунный ответ и преодолеть радиорезистентность [52]. Однако результаты клинических исследований неоднозначны, и оптимальные параметры такого сочетания, такие как доза, фракционирование, последовательность облучения еще до конца не определены [53]. Было показано, что иммунные реакции, опосредованные лимфоцитами, играют положительную роль в клиническом ответе на лучевую терапию при некоторых типах рака, например, при раке прямой кишки [54] и немелкоклеточном раке легкого [55]. Кроме того, было показано что активация интерферонового сигналинга в комбинации с радиотерапией способствует усилению противоопухолевого иммунного ответа и повышению эффективности лечения [56].

Таким образом, понимание иммуномодулирующих эффектов лучевой терапии и их взаимодействия с иммунотерапией является важной задачей современной онкологии. Дальнейшие исследования помогут оптимизировать сочетание этих методов и повысить эффективность лечения пациентов с различными типами рака.

1.3. Генетические нарушения в механизмах восстановления ДНК и их связь с онкогенезом

1.3.1. Обзор редких заболеваний, связанных с дефектами репарации ДНК

Генетические изменения в механизмах репарации ДНК играют важную роль в онкогенезе, влияя на предрасположенность к онкологическим трансформациям и их прогрессии. Дефекты в системе репарации ДНК приводят к множеству наследственных заболеваний, характеризующихся нейродегенерацией, иммунодефицитом и повышенным риском развития рака. Существуют множество редких заболеваний, характеризующиеся дефектами

репарации ДНК. Среди них можно выделить атаксия-телеангиэктазия, синдром Неймегена, синдром Вернера, синдром Блума, анемия Фанкони, пигментная ксеродерма, синдром Коккейна, трихотиодистрофия и другие [57]. Эти синдромы, как правило, возникают из-за патогенных нарушений в генах, кодирующих белки, необходимые для успешной репликации ДНК и клеточного ответа на повреждение ДНК, что приводит к различным клиническим проявлениям характерным для заболевания [58]. Ранняя и точная диагностика этих заболеваний затруднена из-за фенотипической гетерогенности, однако комплексный геномный анализ может помочь в постановке диагноза [59]. Врожденные дефекты репарации ДНК связаны с нарушениями развития организма, механизмы которых до конца не изучены [60].

Примерами заболеваний, при которых дефекты репарации ДНК приводят к высокому риску развития онкологических заболеваний, являются пигментная ксеродерма и анемия Фанкони, синдром Блума и атаксия-телеангиэктазия. Пациенты с пигментной ксеродермой имеют повышенный риск развития рака кожи вследствие неспособности эффективно устранять повреждения ДНК, вызванные ультрафиолетовым излучением [5]. Аналогично, пациенты с анемией Фанкони характеризуются высоким риском развития острого миелоидного лейкоза и солидных опухолей из-за нарушений в механизмах репарации межцепочечных сшивок ДНК [61]. Синдром Блума, вызванный мутациями в гене BLM, характеризуется выраженной геномной нестабильностью и высоким риском развития различных типов онкологических заболеваний, включая лимфомы, лейкозы и солидные опухоли [62]. Атаксия-телеангиэктазия, обусловленная мутациями в гене ATM, также ассоциирована с повышенным риском развития лимфом и других злокачественных новообразований [63].

Знания, полученные при изучении этих редких заболеваний, уже активно используются для разработки новых терапевтических подходов в онкологии.

Например, изучение механизмов репарации ДНК при анемии Фанкони привело к разработке ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), которые успешно применяются для лечения опухолей с дефектами гомологичной рекомбинации, таких как рак яичников и молочной железы с мутациями BRCA1/2 [47]. Аналогично, исследования атаксии-телеангиэктазии и роли гена ATM в репарации ДНК способствовали разработке ингибиторов ATM и ATR, которые в настоящее время проходят клинические испытания в качестве радиосенсибилизаторов и агентов для комбинированной терапии различных опухолей [64,65].

Таким образом, изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе дефектов репарации ДНК, является важной задачей современной биомедицины. Более глубокое понимание этих процессов позволит не только улучшить диагностику и лечение редких наследственных заболеваний, но и разработать новые подходы к профилактике и терапии онкологических заболеваний, связанных с нарушениями репарации ДНК.

1.3.2. Влияние генетических нарушений на предрасположенность к раку

Неэффективная работа механизмов репарации ДНК приводит к накоплению мутаций, перестройкам хромосом и геномной нестабильности, что способствует канцерогенезу [5]. Дефекты в системе репарации ошибочно спаренных нуклеотидов и прямого устранения повреждений ДНК повышают уровень мутаций и способствуют развитию онкологических заболеваний, классическим примером чего является синдром Линча, характеризующийся высоким риском развития колоректального рака и других злокачественных новообразований [66]. Открытие дефектов в механизмах репарации ДНК в редких наследственных заболеваниях, таких как пигментная ксеродерма, подтвердило связь между молекулярными дефектами и клиническими фенотипами [67].

Генетические изменения влияют на предрасположенность к онкологическим заболеваниям. Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA) предоставляет комплексные геномные данные по множеству типов рака, помогая выявлять генетические мутации и изменения, связанные с онтогенезом [68]. Аналогично, портал cBioPortal for Cancer Genomics позволяет исследовать многомерные геномные данные, облегчая идентификацию значимых генетических изменений и их связь с клиническими исходами [69].

Идентификация генов предрасположенности к развитию онкологических заболеваний является важной задачей исследований. Например, ген ретинобластомы (RB1) был одним из первых идентифицированных генов, подтвердивших важность генетических изменений в развитии онкологических заболеваний [70]. Масштабные исследования выявили характерные генетические изменения возникающие у человека при различных типах онкологических заболеваний, что позволило лучше понять их роль в предрасположенности к онкологическим заболеваниям и прогрессировании опухолей [71].

Таким образом, дальнейшее изучение генетических нарушений и механизмов репарации ДНК является ключевым для понимания молекулярных основ онкогенеза и может способствовать разработке новых подходов к диагностике, профилактике и терапии онкологических заболеваний.

1.3.3. Потенциальные биомаркеры для стратификации пациентов

Использование комбинации клинических и генетических биомаркеров позволяет более точно стратифицировать пациентов по риску и оптимизировать тактику их ведения [72]. Предсказательные биомаркеры играют ключевую роль в реализации подходов прецизионной медицины, облегчая индивидуализацию терапии и прогнозирование ее эффективности [73].

Вместо универсальных наборов биомаркеров более эффективным может быть стратифицированный подход, при котором оптимальные биомаркеры подбираются для конкретных групп пациентов с учетом их клинических и молекулярных особенностей. Например, молекулярный стратификационный тест Blueprint позволяет идентифицировать группы пациентов с значимо различающимися клиническими исходами по сравнению со стандартной клинической классификацией [74].

Идентификация биомаркеров, способных прогнозировать тяжесть заболевания, эффективность терапии или риск осложнений, имеет важное значение для принятия клинических решений и улучшения исходов лечения [75]. В этом контексте фармакогеномика является перспективным направлением, способным выявить новые генетические маркеры для персонализации терапии и снижения риска нежелательных реакций [76].

Оценка индивидуального риска на основе генетических данных позволяет выделить подгруппы пациентов с высоким риском неблагоприятных клинических исходов [77]. Однако точная интерпретация генетических вариантов в клиническом контексте остается сложной задачей, что затрудняет разработку надежных диагностических тестов и алгоритмов ведения пациентов [78].

Использование экспрессионных и протеомных данных также является перспективным подходом для идентификации биомаркеров и стратификации пациентов. Например, экспрессия генов из панели Oncotype DX (21-генная сигнатура) успешно применяется для оценки риска рецидива и выбора тактики лечения у пациентов с раком молочной железы, позволяя выделить группы с высоким и низким риском и оптимизировать терапевтические решения [79]. Аналогично, протеомный анализ позволил идентифицировать белковые биомаркеры, такие как PD-L1, которые используются для стратификации пациентов с немелкоклеточным раком легкого и выбора иммунотерапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа [80].

Таким образом, дальнейшие исследования и клиническая валидация генетических биомаркеров необходимы для повышения точности стратификации пациентов и успешного внедрения персонализированных подходов в клиническую онкологию.

1.4. Мультиомиксные подходы в онкологии

1.4.1. Применение мультиомиксных исследований для идентификации биомаркеров

Мультиомиксные подходы произвели революцию в изучении биологических систем, предоставляя интегративный взгляд на сложные молекулярные взаимодействия и механизмы заболеваний. В онкологии такие подходы объединяют данные различных омиксных уровней, включая генетические данные, транскриптомику, протеомику и метаболомику, что позволяет выявлять надежные биомаркеры и терапевтические мишени, а также разрабатывать персонализированные стратегии лечения [10].

Использование мультиомиксных подходов существенно улучшило идентификацию биомаркеров в различных областях медицины. Например, интеграция данных экспрессии генов, данных о метилировании ДНК и генетических профилей позволила улучшить возможности выявления биомаркеров для аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого [81]. Также, при гепатоцеллюлярной карциноме мультиомиксный анализ привел к созданию надежных прогностических моделей, демонстрируя таким образом потенциал подхода для прогнозирования течения заболевания [82].

Мультиомиксные исследования также успешно применялись не только в области онкологии. Так, например, в области репродуктивной биологии, биоинформатические подходы с использованием мультиомиксных данных позволили выявить биомаркеры фертильности у быков [83]. Другим показательным примером является разработка панели состоящей из 28 биомаркеров с высокой диагностической точностью для посттравматического

стрессового расстройства, связанного с боевыми действиями [84]. Эти примеры подчеркивают универсальность и эффективность мультиомиксных подходов в идентификации биомаркеров.

Несмотря на значительные успехи, интеграция мультиомиксных данных остается сложной задачей, требующей разработки новых биоинформатических инструментов и алгоритмов анализа данных. Кроме того, для успешного внедрения мультиомиксных подходов в клиническую практику необходима тщательная валидация выявленных биомаркеров в независимых когортах пациентов.

1.4.2. Использование искусственного интеллекта и биоинформатических платформ в биомедицинских исследованиях

Современные биомедицинские исследования сталкиваются с необходимостью анализа огромных объемов мультиомиксных данных, что делает применение искусственного интеллекта и специализированных платформ особенно актуальным. Одним из примеров таких платформ является платформа DeepMind AlphaFold, которая использует алгоритмы глубокого обучения для предсказания пространственной структуры белков на основе аминокислотной последовательности. AlphaFold значительно ускорила идентификацию потенциальных терапевтических мишеней и разработку новых лекарственных препаратов, предоставляя исследователям точные структурные модели белков, ранее недоступные экспериментальными методами [85].

Помимо AlphaFold, в настоящее время существует ряд других платформ, использующих алгоритмы искусственного интеллекта и интеграцию омиксных данных для поиска биомаркеров и терапевтических мишеней. Например, платформа IPA (Ingenuity Pathway Analysis) от компании QIAGEN позволяет проводить комплексный анализ омиксных данных и выявлять ключевые сигнальные пути и биомаркеры, связанные с различными

заболеваниями [86]. Другая платформа, cBioPortal, предоставляет возможность интегративного анализа геномных и клинических данных, облегчая идентификацию генетических изменений и биомаркеров в онкологии [69]. Также стоит отметить платформу DepMap (Cancer Dependency Map), в которой собраны данные геномных скринингов с помощью CRISPR-Cas9, транскриптомные и протеомные данные для выявления генетических зависимостей опухолевых клеток и идентификации новых терапевтических мишеней [87].

Таким образом, использование подобного рода биоинформатических платформ на основе искусственного интеллекта и интегративного анализа омиксных данных существенно расширяет возможности биомедицинских исследований, ускоряя процесс идентификации и валидации биомаркеров и терапевтических мишеней.

1.4.3. Примеры успешного применения мультиомиксных подходов в онкологии

Онкологические заболевания характеризуются высокой молекулярной и клинической гетерогенностью, что делает мультиомиксные подходы особенно актуальными для их изучения. Использование мультиомиксных подходов в онкологии обеспечивает комплексное понимание биологических особенностей опухолей. Например, важным проектом является Атлас генома рака (TCGA), который предоставил геномные, эпигеномные, транскриптомные, протеомные и клинические данные полученные от более чем 10 тысяч больных 33 видами рака пациентов, существенно продвинув прецизионную онкологию [88]. Интеграция мультиомиксных данных с клиническими и эпидемиологическими факторами риска позволяет точнее понимать сложность биологических систем при онкологических и других заболеваниях [89].

Дифференциальный анализ мультиомиксных данных, направленный на выявление молекулярных различий между опухолевыми и нормальными тканями, требует адаптированных алгоритмов, учитывающих индивидуальную гетерогенность опухолей [90]. Интеграция мультиомиксных данных с электронными медицинскими записями пациентов способствует открытию новых биомаркеров и терапевтических мишеней, формируя инновационную основу для анализа данных из исследовательских лабораторий и систем здравоохранения [91]. Подобные подходы помогают врачам-клиницистам принимать более эффективные терапевтические решения [92].

Кроме того, интеграция радиомических и метаболомных данных позволила разработать диагностический классификатор с высокой чувствительностью и специфичностью, что подтверждает эффективность мультиомиксных подходов в выявлении онкологических заболеваний [93]. Использование мультиомиксных подходов в исследовании рака молочной железы, включающих интеграцию протеомных и метаболомных данных с другими омиксными уровнями, позволило создать комплексные модели молекулярных взаимодействий и приблизиться к реализации персонализированной терапии [94]. Комбинация мультиомиксных данных и релевантных *in vitro* моделей позволяет моделировать внутреннюю гетерогенность опухолей, улучшая понимание механизмов заболевания и способствуя разработке более эффективных терапевтических стратегий. [95].

Таким образом, мультиомиксные подходы, усиленные современными биоинформатическими методами с применениями алгоритмов искусственного интеллекта значительно расширили наше понимание сложных биологических систем и механизмов заболеваний. Эти интегративные методологии доказали свою эффективность в идентификации биомаркеров, разработке персонализированных терапевтических стратегий и улучшении клинических исходов в онкологии и других областях медицины.

Несмотря на достигнутые успехи, дальнейшее развитие интеграции мультиомиксных подходов является важным направлением биоинформатики.

1.5. Поиск и применение низкомолекулярных соединений в онкотерапии

1.5.1. История и развитие использования низкомолекулярных соединений в лечении рака

Появление первых химиотерапевтических агентов в 1940-х годах стало важным этапом в лечении онкологических заболеваний. Начало этому направлению положило применение азотистых ипритов, которые первоначально использовались в качестве химического оружия во время Второй Мировой Войны. Именно тогда было обнаружено, что эти соединения обладают цитотоксическим действием. Это открытие привело к разработке первых противоопухолевых препаратов и ознаменовало начало эры химиотерапии для лечения различных гематологических и солидных опухолей [96]. В последующие семьдесят лет подходы к терапии рака существенно эволюционировали. До конца 1990-х годов большинство химиотерапевтических препаратов представляли собой низкомолекулярные соединения с неспецифическим механизмом действия и сильно-выраженной токсичностью [97]. Однако, несмотря на токсичность, эти препараты стали основой для дальнейших исследований и разработок в области онкологии.

Классический подход к идентификации и разработке противоопухолевых агентов был ориентирован на низкомолекулярные соединения, которые зачастую характеризовались высокой токсичностью. Ранние клинические исследования проводились на небольших группах пациентов и были направлены на определение максимально переносимых доз и выявление основных дозолимитирующих токсических эффектов [98]. Эффективность препаратов, в свою очередь, оценивалась по ответу опухоли после минимального количества введений вещества в рамках клинических испытаний II фазы. Со временем подходы к клиническим исследованиям

стали более систематизированными и масштабными, что позволило значительно ускорить процесс разработки и внедрения новых препаратов. В 2008 году Всемирная организация здравоохранения официально признала рак одной из четырех главных угроз для здоровья и развития человечества [99]. С момента первых сообщений о применении алкилирующих химиотерапевтических агентов в 1940-х годах, индустрия разработки противоопухолевых препаратов превратилась в многомиллиардную отрасль [99].

Таким образом, историческое развитие низкомолекулярных соединений в онкологии заложило основу для современных подходов к лечению рака, способствуя появлению новых классов препаратов и улучшению клинических исходов для пациентов [100].

1.5.2. Методы *in silico* для поиска новых терапевтических агентов

В последние десятилетия рост заболеваемости раком и появление опухолей, устойчивых к традиционным методам лечения, приводят к необходимости активно искать новые терапевтические подходы [101]. В этом контексте разработка низкомолекулярных соединений в качестве противоопухолевых агентов обладает серьезным потенциалом [8]. За последнее десятилетие произошла трансформация подходов в онкологии благодаря появлению и широкому распространению низкомолекулярных таргетных препаратов. Были созданы соединения, способные избирательно воздействовать практически на любой значимый компонент клеточного аппарата опухолевых клеток [102].

Однако традиционные подходы к поиску и разработке новых лекарств характеризуются высокой стоимостью и продолжительностью исследования, что ограничивает скорость появления новых терапевтических агентов [103]. В связи с этим особую актуальность приобрели вычислительные (*in silico*) методы, позволяющие значительно ускорить и удешевить процесс разработки лекарств [104]. Современные подходы, основанные в том числе на

применении методов машинного обучения, позволяют значительно повысить точность и эффективность процесса поиска потенциальных терапевтических агентов [105]. Например, разработка алгоритма AtomNet PoseRanker позволила улучшить качество предсказания пространственного расположения (поз) лигандов при взаимодействии с белками в рамках виртуального высокопроизводительного скрининга. Это, в свою очередь, повысило точность прогнозирования связывания лигандов с мишенями и ускорило процесс поиска новых лекарств [106].

Кроме того, применение методов поиска молекулярного сходства на основе анализа атомного окружения, а также использование информационного отбора признаков и наивного байесовского классификатора значительно улучшили идентификацию перспективных кандидатов в лекарственные препараты [107]. Такой вычислительный подход позволяет более эффективно анализировать и прогнозировать молекулярные взаимодействия. Также широкое распространение получили специализированные программные инструменты, такие как AutoDock Vina, которые существенно повысили скорость и точность молекулярного докинга за счет использования новых функций оценки, эффективных алгоритмов оптимизации и многопоточной обработки данных [108].

Примером успешного применения интегративного подхода с использованием омиксных данных является исследование, в котором на основе анализа транскриптомных данных был проведен виртуальный скрининг низкомолекулярных соединений для лечения гепатоцеллюлярной карциномы. В результате были идентифицированы и экспериментально подтверждены соединения, эффективно подавляющие рост опухолевых клеток, что демонстрирует потенциал интеграции омиксных данных и вычислительных методов для поиска новых терапевтических агентов [109].

Таким образом, современные вычислительные подходы позволяют преодолеть традиционные ограничения, связанные с длительностью и

высокой стоимостью разработки лекарств, и значительно ускорить процесс поиска новых терапевтических агентов. Несмотря на достигнутые успехи, дальнейшее развитие *in silico* методов требует решения ряда задач, таких как повышение точности прогнозирования биологической активности соединений, улучшение интеграции вычислительных и экспериментальных данных, а также разработка новых алгоритмов и программных решений [110].

1.5.3. Примеры успешного применения низкомолекулярных соединений для таргетной терапии

Таргетная терапия, основанная на применении низкомолекулярных соединений, направленных на конкретные молекулярные мишени опухолевых клеток, стала одним из наиболее значимых достижений современной онкологии. Разработка низкомолекулярных соединений привела к появлению целого ряда препаратов, которые широко применяются в клинической практике. Одним из первых и наиболее известных примеров является иматиниб, ингибитор тирозинкиназы BCR-ABL, который произвел революцию в лечении хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ). Применение иматиниба позволило значительно улучшить прогноз и качество жизни пациентов с ХМЛ, превратив ранее смертельное заболевание в хронически контролируемое состояние [111].

Другим ярким примером является эрлотиниб, низкомолекулярный ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), который успешно применяется для лечения немелкоклеточного рака легкого с мутациями в гене EGFR. Применение эрлотиниба позволило значительно увеличить продолжительность жизни пациентов и снизить токсичность терапии по сравнению с традиционной химиотерапией [112].

Также стоит отметить вемурафениб, ингибитор мутантной формы киназы BRAF (мутация V600E), который показал высокую эффективность при лечении метастатической меланомы. Вемурафениб стал одним из первых

препаратов, продемонстрировавших значительное улучшение выживаемости пациентов с таким агрессивным заболеванием как метастатическая меланома [113].

Еще одним успешным примером является олапариб, ингибитор фермента PARP1, который применяется для лечения опухолей с дефектами в гомологичной рекомбинации, одном из основных путей репарации двунитевых разрывов ДНК, таких как рак яичников и рак молочной железы с мутациями в генах BRCA1/2. Олапариб продемонстрировал значительное улучшение клинических исходов для пациентов и его успешное применение стало важным шагом в ускорении развития подходов связанных с персонализированной терапией [114].

Таким образом, успешные примеры применения низкомолекулярных соединений в таргетной терапии подтверждают перспективность данного направления и стимулируют дальнейшие исследования и разработки новых препаратов для лечения онкологических заболеваний. Несмотря на достигнутые успехи, поиск новых молекулярных мишеней и разработка эффективных низкомолекулярных соединений остаются важными задачами современной онкологии.

1.6. Синтетическая летальность как стратегия таргетной терапии

1.6.1. Концепция синтетической летальности и её применение в онкологии

Синтетическая летальность представляет собой перспективный подход в терапии онкологических заболеваний, основанный на том, что одновременное нарушение функции двух генов или сигнальных путей приводит к гибели клетки, тогда как нарушение каждого из них по отдельности не является летальным [6]. Используя эту концепцию, можно избирательно воздействовать на опухолевые клетки, несущие определённые генетические дефекты (мутации), не затрагивая при этом нормальные клетки

организма, не имеющих подобные мутации [115]. Благодаря этому синтетическая летальность стала привлекательной стратегией для разработки таргетных препаратов, позволяющих минимизировать побочные эффекты и повысить эффективность лечения [47].

В онкологии концепция синтетической летальности получила широкое распространение, поскольку опухолевые клетки часто характеризуются специфическими генетическими изменениями, отсутствующими в нормальных клетках. Это открывает возможность для разработки препаратов, которые будут избирательно воздействовать на раковые клетки, используя их уникальные генетические уязвимости [116].

В настоящее время активно ведутся исследования, направленные на поиск новых пар генов и сигнальных путей, нарушение которых приводит к активации механизма синтетической летальности. Для этого используются высокопроизводительные генетические скрининги, технологии редактирования генома (например, CRISPR-Cas9) и вычислительные подходы, позволяющие идентифицировать новые терапевтические мишени и разрабатывать эффективные комбинации препаратов [117,118].

Особый интерес представляет использование концепции синтетической летальности в контексте радиотерапии. Повреждения ДНК, вызванные ионизирующим излучением, требуют активации механизмов репарации ДНК, таких как гомологичная рекомбинация и нехомологичное соединение концов. Опухолевые клетки с дефектами в одном из этих путей репарации становятся особенно чувствительными к ингибированию альтернативных механизмов репарации, что может быть использовано для повышения эффективности лучевой терапии. Например, опухоли с мутациями в генах BRCA1/2 или ATM демонстрируют повышенную радиочувствительность при использовании ингибиторов PARP или ATM/ATR, что подтверждается результатами доклинических и клинических исследований [119,120]. Интеграция синтетической летальности и радиотерапии открывает перспективы для

разработки новых комбинированных терапевтических стратегий, направленных на преодоление радиорезистентности и улучшение клинических исходов.

Таким образом, концепция синтетической летальности представляет собой мощный инструмент для разработки новых таргетных препаратов, способных избирательно уничтожать опухолевые клетки с минимальным воздействием на здоровые ткани. Дальнейшие исследования в этой области могут привести к созданию новых эффективных стратегий лечения различных типов рака.

1.6.2. Примеры синтетически летальных пар генов и их терапевтический потенциал

Одним из наиболее известных примеров успешного применения концепции синтетической летальности является использование ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) для лечения опухолей с мутациями в генах BRCA1 и BRCA2. В норме белки BRCA участвуют в репарации двунитевых разрывов ДНК путём гомологичной рекомбинации. При их мутации опухолевые клетки становятся зависимыми от альтернативных путей репарации, таких как PARP-зависимая репарация одонитевых разрывов ДНК. Ингибирование PARP в таких клетках приводит к накоплению повреждений ДНК и последующей гибели опухолевых клеток, в то время как нормальные клетки, сохранившие функциональные гены BRCA, остаются жизнеспособными [47].

Другим примером является синтетическая летальность между генами KRAS и STK33. Мутации гена KRAS часто встречаются в различных типах рака и долгое время считались трудными для терапевтического воздействия. Однако было показано, что подавление активности серин-треониновой киназы STK33 приводит к гибели клеток с мутантным KRAS. Это открывает новые возможности для таргетной терапии опухолей, характеризующихся такими мутациями [121].

Также перспективным направлением является синтетическая летальность между генами MYC и CDK1. Повышенная экспрессия онкогена MYC характерна для многих агрессивных опухолей, однако прямое ингибирование MYC затруднено, поскольку MYC является транскрипционным фактором и не обладает ферментативной активностью, необходимой для традиционного подхода к разработке низкомолекулярных ингибиторов. В то же время было установлено, что опухолевые клетки с гиперэкспрессией MYC становятся крайне чувствительными к ингибированию циклин-зависимой киназы CDK1. Это позволяет использовать ингибиторы CDK1 для избирательного уничтожения таких опухолевых клеток [122].

Таким образом, идентификация синтетически летальных пар генов открывает новые возможности для разработки эффективных и селективных противоопухолевых препаратов.

1.6.3. Перспективы и вызовы в использовании синтетической летальности для лечения рака

Несмотря на значительный потенциал, применение концепции синтетической летальности в клинической практике сталкивается с рядом сложностей. Прежде всего, идентификация новых синтетически летальных взаимодействий требует крупных исследований и высокопроизводительных скринингов, что связано с большими временными и финансовыми затратами [123,124]. Кроме того, опухолевые клетки способны развивать устойчивость к препаратам, в механизме действия которых лежит использование концепции синтетической летальности, что приводит к необходимости поиска новых молекулярных мишеней и комбинированных терапевтических подходов для преодоления резистентности [125].

Ещё одним важным аспектом является необходимость разработки биомаркеров, позволяющих точно прогнозировать ответ опухоли на терапию, основанную на синтетической летальности [126]. Понимание молекулярных

механизмов, лежащих в основе синтетически летальных взаимодействий, также является ключевым фактором для успешного внедрения данных терапий в клиническую практику [127,128].

Несмотря на указанные сложности, перспективы применения синтетической летальности в лечении онкологических заболеваний остаются многообещающими. Современные достижения в области молекулярного профилирования опухолей, а также разработка новых низкомолекулярных соединений и биологических препаратов, направленных на синтетически летальные мишени, создают основу для разработки персонализированных и высокоэффективных терапевтических стратегий [129–131]. Кроме того, развитие вычислительных методов и создание комплексных баз данных, интегрирующих геномные, транскриптомные и протеомные данные, значительно ускоряют процесс идентификации новых синтетически летальных пар генов [132].

В заключение, синтетическая летальность представляет собой перспективную стратегию таргетной терапии рака, позволяющую избирательно воздействовать на опухолевые клетки с определенными генетическими дефектами. Дальнейшие исследования, развитие вычислительных методов, создание комплексных баз данных и проведение масштабных скрининговых проектов будут способствовать выявлению новых синтетически летальных пар генов и ускорению внедрения этой стратегии в клиническую практику [133].

ГЛАВА 2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В РАБОТЕ

2.1. Эксперименты *in silico*

Сбор данных

Для анализа вариабельности результатов лучевой терапии у пациентов с различными типами рака были собраны данные о генной экспрессии, фенотипах и выживаемости пациентов для 33 видов рака из базы данных TCGA - UCSC Xena. Среди доступных типов рака в базе данных: TCGA-GBM (мультиформная глиобластома), TCGA-THYM (тимомы), TCGA-BRCA (инвазивная карцинома молочной железы), TCGA-CESC (плоскоклеточная карцинома шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома), TCGA-KIRP (папиллярная карцинома почки), TCGA-SKCM (кожная меланома), TCGA-DLBC (диффузная крупноклеточная лимфома лимфоидных новообразований), TCGA-THCA (карцинома щитовидной железы), TCGA-PRAD (аденокарцинома предстательной железы), TCGA-PCPG (феохромочитома и параганглиома), TCGA-MESO (мезотелиома), TCGA-READ (аденокарцинома прямой кишки), TCGA-SARC (саркома), TCGA-LUSC (плоскоклеточная карцинома легкого), TCGA-TGCT (герминогенные опухоли яичка), TCGA-LIHC (гепатоцеллюлярная карцинома печени), TCGA-UCEC (карцинома эндометрия тела матки), TCGA-ESCA (пищеводная карцинома), TCGA-STAD (аденокарцинома желудка), TCGA-ACC (адренокортикальная карцинома), TCGA-COAD (аденокарцинома ободочной кишки), TCGA-KIRC (светлоклеточная карцинома почки), TCGA-BLCA (уротелиальная карцинома мочевого пузыря), TCGA-OV (серозная цистаденокарцинома яичников), TCGA-CHOL (холангиокарцинома), TCGA-UVM (увеальная меланома), TCGA-LUAD (аденокарцинома легкого), TCGA-KICH (хромофобная карцинома почки), TCGA-PAAD (аденокарцинома поджелудочной железы), TCGA-LGG (глиома низкой степени злокачественности), TCGA-UCS (карциносаркома матки),

TCGA-HNSC (плоскоклеточная карцинома головы и шеи). Дополнительно, из этой же базы данных были собраны данные о числе вариаций копий (CNV) генов, а также данные о точечных мутациях для всех пациентов из доступных типов рака.

Для изучения редких заболеваний связанных с нарушениями в репарации ДНК, данные о генной экспрессии были собраны из репозиторий Gene Expression Omnibus (GEO) и ArrayExpress. Среди собранных наборов данных (датасеты) были экспрессионные данные полученные из фибробластов и/или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) больных пациентов таких заболеваний как синдром Вернера (GSE48761), синдром Неймегена (GSE94707) и синдром атаксии-телеангиэктазии (GSE35347, GSE152287). Также были собраны данные о генной экспрессии для 13 редких заболеваний, связанных с преждевременным старением и/или нарушениями в репарации ДНК: атаксия-телеангиэктазия (GSE75852, E-MTAB-1217, GSE142842, GSE61019, GSE152287, GSE35347), синдром Блума (GSE54502, GSE123447), синдром Коккейна (GSE144557, GSE36648), дискеротозная врожденная анемия (GSE64023, GSE77525, GSE83501), синдром Хатчинсона-Гилфорда (E-MEXP-2597, GSE28863, GSE113957, GSE137083, GSE3860), синдром Нестора-Гильермо (GSE65170, GSE65172), синдром Неймегена (GSE83686, GSE94707, GSE13909), синдром Секеля (GSE121384), синдром Вернера (GSE48761), пигментная ксеродерма группа А (GSE55484), пигментная ксеродерма группа С (GSE119501, GSE133084), пигментная ксеродерма группа V (GSE70818).

Для анализа изменений воздействия ионизирующего излучения на экспрессионном уровне в контексте поиска низкомолекулярных модуляторов процессов репарации ДНК был собран 21 датасет из базы данных GEO: GSE65292, GSE45626, GSE64375, GSE20173, GSE50004, GSE57059, GSE113611, GSE140746, GSE59861, GSE42172, GSE63952, GSE120805, GSE102971, GSE85570, GSE26143, GSE21748, GSE111437, GSE20549,

GSE138650, GSE26841 и GSE144296. Среди собранных датасетов были экспрессионные данные полученные из клеточных культур человека после воздействия редко-ионизирующего излучения в различных дозах и мощностях, а также с различным временными точками.

Все экспрессионные датасеты полученные с помощью технологии микрочипов были обработаны в соответствии с протоколами, специфичными для платформы производителя. Все экспрессионные датасеты полученные с помощью технологии РНК-секвенирования были обработаны с использованием нормализации с помощью алгоритма верхне-квартильной нормализации. После предварительной обработки все экспрессионные датасеты были нормализованы с помощью процедуры логарифмирования по основанию 2 для дальнейшего анализа.

Анализ дифференциальной экспрессии генов

Анализ дифференциальной экспрессии генов для различных наборов данных, включая экспрессионные данные из базы данных TCGA - UCSC Xena, а также экспрессионные данные полученные с помощью технологий микрочипов и RNA-seq из баз данных GEO/ArrayExpress был проведен с использованием алгоритма анализа дифференциально экспрессируемых генов *limma*, написанного на языке программирования R, находящегося в открытом программном обеспечении. При расчете дифференциальной экспрессии в качестве входных данных использовались нормализованные и логарифмированные экспрессионные данные (датасеты), а также метаданные о группах сравнения. Во всех описанных случаях анализ дифференциальной экспрессии проводился путем сравнения исследуемой группы против контрольной группы, причем определения исследуемой и контрольной группы различаются в зависимости от задачи: так, анализ дифференциальной экспрессии с использованием датасетов TCGA-GBM и TCGA-LGG проводился путем сравнения экспрессионных данных группы пациентов

прошедших курс радиотерапии (исследуемая группа) против группы пациентов не прошедших радиотерапию (контрольная группа). При анализе экспрессионных данных связанных с заболеваниями в качестве исследуемой группы таковыми рассматриваются образцы от больных пациентов/клеточные культуры, а в качестве контрольной группы рассматриваются образцы от здоровых пациентов/клеточных культур. В случае анализа дифференциальной экспрессии для поиска низкомолекулярных модуляторов процессов репарации ДНК в качестве исследуемой группы были определены экспрессионные данные полученные от облученных образцов, а в качестве контрольной группы - не облученные. Важно отметить, что в случаях анализа экспрессионных данных болезней связанных с преждевременным старением и/или нарушениями в репарации ДНК, для некоторых болезней было доступно несколько датасетов. В таком случае, для таких заболеваний результаты дифференциальной экспрессии агрегировались в объединенную экспрессионную подпись заболевания с помощью подхода, который включает в себя усреднение значений логарифмированных значений изменения экспрессии (LFC, Log2 Fold Change) между исследуемой и контрольной группами, а также объединения значений p-value, полученных для данных значений изменения экспрессии, с помощью метода Фишера с последующей поправкой на множественное тестирование получившегося объединенного значения p-value с помощью метода Беньямини-Хохберга.

Анализ активации и обогащения сигнальных путей

Анализ активации и обогащения сигнальных путей был проведен с использованием алгоритма iPANDA и алгоритма *gseapy* написанных на языке программирования python и находящихся в открытом программном обеспечении. Для анализа активации путей использовался алгоритм iPANDA. Данный алгоритм применялся для сравнения пациентов с саркомой с

высоким уровнем экспрессии гена CEP135 и пациентов с низким уровнем экспрессией гена CEP135 из набора экспрессионных данных TCGA-SARC. В качестве базы данных сигнальных путей для алгоритма iPANDA использовалась база данных Reactome. Алгоритм iPANDA оценивает направление и интенсивность активации пути, используя линейную комбинацию логарифмических изменений экспрессии между исследуемой и контрольной группами, статистических и топологических весов, применяемых к каждому гену-участнику сигнального пути. Результат работы алгоритма iPANDA показывает, как изменения в экспрессии генов между исследуемой и контрольной группами влияют на уровни активации сигнальных путей, и для каждого пути определяется значение iPANDA-оценки. Высокое значение iPANDA-оценки соответствует активации сигнального пути, в то время как низкое значение указывает на подавление. Визуализации iPANDA-оценки сигнального пути “Регуляция активности PLK1 при переходе G2-M” представлена с помощью изображения топологической схемы сигнального пути где каждый узел окрашен в соответствии со средними значений изменения экспрессии между генам являющимися участниками данного узла.

Анализ обогащения сигнальных путей был выполнен с использованием алгоритма gseapy и функции enrichr(), следуя стандартным протоколам. В качестве источника наборов генов для анализа обогащения сигнальных путей была использована база данных Reactome. Гены, которые были статистически достоверно активированы в TCGA-GBM и одновременно подавлены в TCGA-LGG, и наоборот, использовались в качестве входных данных для анализа обогащения путей. Также, гены, потеря функции которых из-за уменьшения числа копий гена была связана со статистически значимой стратификацией пациентов с LGG, получивших курс радиотерапии, также использовались в качестве входных данных для анализа обогащения путей. 20 наиболее статистически достоверно возмущенных сигнальных путей были

визуализированы на точечной диаграмме с использованием функции `gseapy.plot`.

Анализ выживаемости и стратификация пациентов

Анализ выживаемости и стратификации был проведен с использованием алгоритма `KaplanMeierFitter` из открытого программного обеспечения `lifelines`, написанного на языке Python. Анализ выживаемости заключается в оценке вероятности выживания пациентов с течением времени. Этот метод позволяет сравнивать группы пациентов, например, получавших и не получавших определенное лечение, и визуализировать различия в их выживаемости на графиках, а также позволяет оценить статистическую значимость различий между группами с помощью лог-рангового теста. В данном исследовании был проведен анализ выживаемости пациентов для 33 типов рака доступных в базе данных TCGA - UCSC Xena. В зависимости от поставленной задачи, группы пациентов для анализа формировались по разному. Так, при анализе различий в выживаемости пациентов прошедших и не прошедших курс радиотерапии, группы сравнения были сформированы в зависимости от описанного статуса. Также, анализ выживаемости пациентов проводился в зависимости от уровня экспрессии определенного гена. В таком случае группы пациентов разделялись на: 1) пациентов, у которых уровень экспрессии определенного гена $\geq$ медианного значения экспрессии этого гена и на группу пациентов, у которых уровень экспрессии определенного гена $<$ медианного значения экспрессии этого гена. Аналогичное разделение пациентов на группы сравнения в зависимости от уровня экспрессии определенного гена проводилось для отсечек по квантилей: $\geq 75\%$ и $< 25\%$, а также $\geq 90\%$ и $< 10\%$. Дополнительная под стратификация исследуемых групп пациентов осуществлялась в зависимости от статуса потери или увеличения вариаций числа копий определенного гена. В данном случае пациенты разделялись на две группы сравнения: пациенты, у которых наблюдалось уменьшение (потеря функции гена) или увеличение (усиление

функции гена) вариаций числа копий генов и группа пациентов, у которых число вариаций копий этого гена было в норме. Визуализация как индивидуальных результатов анализа выживаемости пациентов, так и групповых осуществлялась с помощью программного обеспечения matplotlib и функции pyplot, написанной на языке программирования python.

Иерархическая кластеризация

Иерархическая кластеризация была проведена двумя способами: на основе фенотипических признаков и на основе данных о генной экспрессии.

Кластеризация на основе фенотипических признаков: этот метод использовался для группировки редких заболеваний, основываясь на сходстве их клинических признаков в соответствии с описанием в [134]. Дендрограмма, полученная в результате кластеризации, показывает, как заболевания с похожими фенотипами связаны друг с другом.

Кластеризация на основе данных о генной экспрессии: для данного анализа использовались векторы сигнатур экспрессии генов редких заболеваний, связанных с преждевременным старением. Гены, не экспрессируемые сразу во всех 13 прогероидных синдромах, были исключены из анализа. Иерархическая кластеризация была выполнена с использованием программного обеспечения scipy написанного на языке Python и функции cluster.hierarchy.linkage, где в качестве параметров были выбраны евклидова метрика и метод средней связи. Результаты кластеризации визуализировались с помощью программного обеспечения ete3, с использованием функций Tree, TreeStyle, NodeStyle, и TextFace написанных на языке Python.

Алгоритм ранжирования терапевтических мишеней

Для идентификации новых молекулярных мишеней был применен алгоритм, основанный на интегративном биоинформатическом анализе данных, объединяющий информацию из различных источников, таких как омиксные

данные и текстовые ресурсы (научные публикации, патенты, клинические исследования и экспертные заключения). Алгоритм сочетает в себе несколько типов оценок (скоринговых оценок), которые можно условно разделить на текстовые и омиксные. Текстовые оценки формируются на основе анализа научной литературы, данных о грантах, патентах, клинических испытаниях и мнений экспертов, отражая степень изученности и связи конкретной мишени с заболеванием. Омиксные оценки основаны на экспериментальных данных, таких как дифференциальная экспрессия генов, результаты полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), данные о соматических и герминальных мутациях, топология интерактома, анализ возмущений сигнальных путей, а также результаты экспериментов по нокауту или сверхэкспрессии генов. Эти оценки отражают связь между потенциальной мишенью и заболеванием на уровне экспериментальных данных и рассчитываются на основе математических моделей, среди которых есть как классические биоинформатические подходы, так и сложные модели на основе машинного обучения. Все используемые модели формируют ранжированные списки потенциальных терапевтических мишеней. Комбинация текстовых и омиксных оценок позволяет получить объединенный ранжированный список мишеней, который может быть дополнительно отфильтрован по различным критериям, таким как наличие кристаллической структуры белка или возможность разработки низкомолекулярных соединений.

В рамках данного исследования ранжирование мишеней проводилось путем сравнения данных о генной экспрессии у стратифицированных подгруппы пациентов с саркомой, характеризующихся низким прогнозом выживаемости и высокой экспрессией гена CEP135, с данными здоровых образцов. Для выявления новых молекулярных мишеней для этой группы пациентов учитывались только омиксные оценки. Из анализа были исключены мишени, для которых невозможно разработать низкомолекулярные соединения (например, отсутствует кристаллическая структура или класс мишени не

подходит для разработки малых молекул), а также мишени, таргетирование которых может быть небезопасным для пациентов. Целью применения данного алгоритма было выявление потенциальных терапевтических мишеней для определенной группы пациентов с саркомой. Результаты анализа были представлены в виде ранжированного списка мишеней с оценками на тепловой карте.

Алгоритм поиска низкомолекулярных модуляторов ответа на повреждение ДНК

Для поиска малых молекул, нацеленных на активацию сигнальных пути ответа на повреждение ДНК, мы использовали набор данных LINCS L1000 (CMAP) [135], чтобы найти малые молекулы, которые демонстрируют схожие профили экспрессии генов с профилями экспрессии генов после облучения ионизирующим излучением. LINCS L1000 — это база данных, содержащая профили экспрессии генов в человеческих клетках, обработанных различными соединениями, с фокусом на 978 ключевых генов, которые используются для анализа и сравнения биологических ответов на воздействие малых молекул. Мы использовали данные LINCS уровня 5 (modZ-оценки) для низкомолекулярных соединений, которые инкубировались с клетками в течение 24 часов при концентрации 10 мкМ.

Чтобы найти соединения с наиболее схожими паттернами активации ответа клетки на повреждения ДНК, для оценки рассматривались только гены, которые присутствовали в списке ключевых генов LINCS и генов, связанных с ответом на повреждение ДНК. Сходство между экспрессионными профилями образцов, подвергнутыми облучению (значений логарифмированных значений изменения экспрессии), и образцами с данными о малых молекулах из набора LINCS (modZ-оценки) оценивалось на основе количества генов с одинаковым паттерном изменения направления экспрессии. Чем больше генов имели одинаковый знак изменения

экспрессии, тем выше был показатель сходства для каждой пары. Статистическая значимость рассчитывалась с использованием биномиального теста с параметрами: k = оценка, n = количество генов в наборе данных, p = 0.5, альтернатива = "двусторонняя". Кроме того, гены, входящие в основные пути репарации ДНК (база данных Reactome: R-HSA-5696398, R-HSA-73884, R-HSA-5685942, R-HSA-5693571, R-HSA-5685938, R-HSA-5358508, R-HSA-5685939), которые имели одинаковый знак изменения экспрессии, получали двойную оценку. Показатели сходства для малых молекул из базы данных LINCS, представленные несколькими образцами, агрегировались в средние значения. P-value значения, полученные с помощью биномиального теста, объединялись в объединенные p-value значения с использованием метода Фишера.

Наконец, информация о прохождении клинических испытаний, механизме действия, мишенях, терапевтической области применения для малых молекул была собрана из Drug Repurposing Hub. Малые молекулы с неизвестным механизмом действия были исключены из финального списка. Для визуализации агрегированные показатели сходства преобразованы с использованием функции `zscore` из пакета `stats` написанного на языке Python, а p-value значения представлены в виде $-\log_{10}(\text{объединенное p-value})$. Результаты оценки были визуализированы на точечной диаграмме с использованием библиотеки `matplotlib.pyplot` написанной на языке Python.

In silico анализ результатов выживаемости клеток

Для каждой протестированной клеточной линии в высокопроизводительном скрининге были рассчитаны значения IC50, отражающие концентрацию вещества, при которой достигается элиминирование 50% клеток. Клеточные линии были сгруппированы по типам рака на основе аннотаций типов рака из базы данных DepMap Public 23Q2 Primary Files, а значения IC50 для каждого типа клеточной линии визуализированы на точечной диаграмме с

использованием пакета `scanpy` написанного на языке программирования Python. Также, для каждой клеточной линии была собрана информация о мутационном статусе девяти генов (MLH1, RAD18, BHLHE40, SETMAR, FANCD2, PARP3, PCBP4, WDR48 и OGG1) из вышеупомянутой базы данных DepMap. Клеточные линии с мутациями хотя бы в одном из этих генов были обозначены красными ромбами на диаграмме. Различия в значениях IC50 между клеточными линиями с мутациями и без мутаций в указанных генах были визуализированы с помощью рисунка ящика с усами, построенного с помощью открытого программного обеспечения `matplotlib` и функции `boxplot`, а статистическая значимость этих различий была рассчитана с использованием двустороннего теста Манна-Уитни-Уилкоксона. Также различия между клеточными линиями с мутациями хотя бы в одном из девяти генов, линиями без мутаций в этих генах совсем и нераковыми клеточными линиями были визуализированы с помощью ящика с усами, а статистическая достоверность была рассчитана с помощью двустороннего теста Манна-Уитни-Уилкоксона и Крускала-Уоллиса.

In silico анализ результатов нокдауна генов в высокопроизводительном скрининге

В качестве анализируемых показателей после обработки клеток соответствующей малой интерферирующей молекулой РНК и мепакрином использовались маркеры двухцепочечных разрывов, такие как количество фокусов gH2AX и 53BP1, а также общее количество клеток (DAPI). Для каждого показателя были определены гены, которые либо усиливали, либо ослабляли эффект мепакрина. Нормализованные значения исследуемых показателей из трех экспериментальных повторов использовались для идентификации генов усиливающих или ослабляющих эффекты мепакрина. Логарифмические значения изменений исследуемых показателей рассчитывались при сравнении между геометрическими средними

значениями экспериментальных и контрольных образцов. Для расчета p-value значений использовался двусторонний U-тест Манна–Уитни. Затем полученные результаты исследуемых показателей агрегировались путем усреднения логарифмированных значений изменения исследуемых показателей и комбинирования p-value значений с использованием метода Фишера для каждого гена. Для каждого исследуемого показателя статистически достоверно влияющие на эффект мепакрина гены (усиливающие или ослабляющие) визуализировались на графиках по типу вулкана с использованием пакета `visuz` написанного на языке программирования Python. Те гены, нокдаун которых ослаблял действие мепакрина рассматривались как потенциальные мишени мепакрина. Пересечение выявленных мишеней визуализировалось на диаграмме Венна с использованием пакета `matplotlib_venn` написанного на языке программирования Python.

2.2. Эксперименты *in vitro*

Клеточные культуры

Для экспериментов использовались следующие линии клеток: U2OS, MCF-7, L56BRC1, HCT116 и HCT116+Cr3. Клетки U2OS были приобретены в ATCC (Американская коллекция типовых культур, HTB96TM), остальные линии клеток были предоставлены Департаментом клеточной и молекулярной медицины Университета Копенгагена. Клетки культивировались в питательной среде DMEM-GlutaMAX с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) (Gibco, США), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma-Aldrich, США) и 100 Ед/мл пенициллина-стрептомицина (Gibco, США). Культивирование проводилось в стандартных условиях CO₂-инкубатора (37°C, 5% CO₂) с пересевом клеток каждые 2-3 дня при поддержании плотности 70-90%. Всего было исследовано 129 линии клеток для определения значений IC₅₀ (значение концентрации мепакрина в нМ при

которой достигается 50% элиминирование клеток) после инкубации с мепакрином с использованием высокопроизводительного скрининга. Линии нормальных (не раковых) клеток печени человека LX-2 и нормальных клеток легких IMR-90 были получены из ATCC и культивировались в среде DMEM (ThermoFisher, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки (Gibco, США) и 1% пенициллина-стрептомицина. Линии клеток колоректальной карциномы человека SW48, SW620, HCT-15, DLD-1, HCT-116 и RKO были получены из ATCC, CW-2 из RCB (Японская коллекция типовых культур). Линии клеток рака молочной железы HCC1395, HCC1569 и MCF-7, линии клеток рака предстательной железы 22RV1 и LNCap-Clone-FGC, линии клеток остеосаркомы U2OS и линии клеток рака поджелудочной железы Mia Pasa-2 были получены из ATCC. Линии клеток гематопоэтических и лимфоидных опухолей KMS-11, Jurkat и Molt-4 были получены из ATCC, OCI-AML-3 из DSMZ (Немецкая коллекция типовых культур). Линии клеток рака легких NCI-H520 и NCI-H1792 были получены из ATCC. Линия клеток рака яичников RMG-1 была получена из JCRB (Японская коллекция типовых культур). Линия клеток рака желудка SNU-1 была получена из ATCC, IM-95 из JCRB. Линия клеток плоскоклеточной карциномы пищевода KYSE-30 была получена из JCRB. Все линии клеток поддерживались в условиях 5% CO₂ при 37°C и культивировались в соответствии с рекомендациями производителя. Все линии клеток регулярно тестировались на контаминацию микоплазмой и аутентифицировались с помощью STR-анализа.

Высокопроизводительный скрининг нокдауна генов

Потенциальные мишени мепакрина были выявлены при анализе изображений полученных с помощью высокопроизводительного скрининга на основе анализа фенотипических проявлений нокдауна генов с использованием библиотеки малых интерферирующих РНК Silencer Select Human DNA Damage Response siRNA (A30089, Thermo Scientific). Клетки U2OS были

трансфицированы малыми интерферирующими молекулами РНК siRNA, нацеленные на 582 гена (по 3 индивидуальные интерферирующие молекулы РНК на каждый ген), в течение 48 часов при конечной концентрации 10 нМ каждой siRNA, после чего проводилось 8-часовое воздействие на клетки мепакрином в концентрации 10 мкМ. В качестве положительных контролей оценки уровня выживаемости клеток и эффективности трансфекции использовались поло-подобная киназа 1 (PLK1) и контрольная киназа 1 (CHEK1) (4390824, Thermo Scientific). Клетки фиксировались в растворе 4% параформальдегида. После однократного промывания в PBS клетки подвергались пермеабиллизации в течение 10 минут в PBS-0,1% Triton X-100 и блокировались в 1% BSA-PBS-0,1% Tween 20 при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки инкубировались с первичными антителами (γ H2AX, 1:1000, Millipore, 05-636; 53BP1, 1:2000, Novus, NB100-304) в течение 1 часа при комнатной температуре, трижды промывались в PBS-T и инкубировались с вторичными антителами (1:200 Alexa Fluor 488, Invitrogen, 10424752; 1:200 Alexa Fluor 568, Invitrogen, 10348072) в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки инкубировались с раствором DAPI (AppliChem, A4099) в течение 10 минут, однократно промывались в PBS и хранились в PBS до анализа. Изображения получали с использованием микроскопии высокого разрешения INcell analyzer 2200 при увеличении 20X.

Анализ выживаемости клеток

Для экспериментов по устойчивости к радиации клетки U2OS высевали в 24-луночные планшеты, после чего проводили обработку мепакрином в указанном диапазоне концентраций в течение 24 часов. После обработки мепакрином клетки дважды промывали 1X PBS для удаления соединения, а затем подвергали облучению ионизирующей радиацией в дозе 16 Гр. Клетки собирали в указанные временные точки после облучения и подсчитывали с использованием счетчика клеток CASY (CASY Model TT, Innovatis AG).

Данные визуализировались как кратные изменения по сравнению с соответствующими контрольными образцами.

Для экспериментов по чувствительности к мепакрину клетки MCF-7, L56BRC1, HCT116 и HCT116+Cr3 высевали в 96-луночные планшеты (Corning, 3340). На следующий день клетки обрабатывали мепакрином в указанных концентрациях в течение 48 часов. Выживаемость оценивали путем подсчета ядер, окрашенных DAPI. Клетки промывали теплым PBS, затем фиксировали в 4% растворе параформальдегида (Santa-Cruz, sc-281692) в течение 15 минут. Клетки несколько раз промывали PBS и окрашивали DAPI (PanReac AppliChem, A4099) в течение 10 минут. После однократного промывания PBS клетки хранили при +4 °C до анализа. Ядра, окрашенные DAPI, визуализировали с использованием микроскопии высокого разрешения INcell analyzer 2200 при увеличении 20X.

Для высокопроизводительного скрининга выживаемости 129 клеточных линий клетки высевали в 384-луночные планшеты. Начальная концентрация мепакрина составляла 10 мкМ, после чего проводилось трехкратное разведение, и клетки инкубировали с 9 различными дозами препарата в течение 48 часов. Для *in vitro* экспериментов по анализу выживаемости клеток после нокдауна генов с использованием малых интерферирующих молекул РНК клетки высевали в 96-луночные планшеты с трансфекцией siRNA на 72 часа. После культивирования жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Люминесцентный сигнал определяли с использованием мультимодального микропланшетного ридера Envision (PerkinElmer).

Метод ДНК-комет

Уровни повреждения ДНК анализировались с использованием платформы для анализа комет (Comet-Chip) [136], которая представляет собой высокопроизводительную модификацию стандартного метода ДНК-комет. Клетки U2OS высевали в 96-луночные планшеты. На следующий день клетки обрабатывали указанными концентрациями мепакрина или доксорубина, известного ДНК-повреждающего агента, в течение 3, 8 и 24 часов. После завершения инкубации с препаратом клетки снимали и переносили в систему для анализа комет на 96 лунок. Каждая лунка в системе содержала более 500 микролунок, что позволяло одновременно анализировать сотни комет для каждого условия эксперимента. После загрузки микрочип промывали PBS и покрывали агарозой с низкой температурой плавления на 5 минут. После затвердевания чип инкубировали в лизирующем буфере в течение 1 часа при +4°C и уравнивали в щелочном растворе, содержащем 200 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, еще 20 минут при +4°C. Электрофорез проводили при +4°C, 22 В в течение 50 минут, после чего следовал этап нейтрализации, где чип инкубировали в течение 15 минут при +4°C в 0,4 M Tris, pH 7,4. Последний этап включал ночное окрашивание ДНК с использованием 0,2X SYBR Gold. На следующий день чип обесцвечивали, инкубируя в 20 mM Tris, pH 7,4, в течение 1 часа. Лунки визуализировались с использованием флуоресцентной микроскопии высокого разрешения с увеличением 4X. Данные рассчитывались и визуализировались как процент детектируемых молекул ДНК в хвосте.

Иммуноцитохимия

Для изучения кинетики образования фокусов радиационно-индуцированных повреждений ДНК после обработки мепакрином клетки U2OS высевали в 96-луночные планшеты (Corning, 3340). На следующий день клетки обрабатывали указанными концентрациями мепакрина в течение 24 часов.

После обработки препаратом клетки однократно промывали 1X PBS, а затем подвергали облучению в дозах 2 или 4 Гр. Клетки фиксировались в указанные временные точки после облучения. Клетки промывали теплым PBS, затем фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 15 минут. Далее клетки пермеабилizировали в течение 10 минут в PBS-0,1% Triton X-100 и блокировали в 1% BSA-PBS-0,1% Tween 20 при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки инкубировали с первичными антителами (γ H2AX, 1:1000, Millipore, 05-636; 53BP1, 1:2000, Novus, NB100-304; MDC-1, 1:2000, A300-053A, Bethyl Laboratories; RNF-8, 1:200, Santa Cruz, sc-271462; RNF-168, 1:50, Millipore, ABE367; RAD51, 1:500, Santa Cruz, sc-53428; BRCA1, 1:200, Santa Cruz, sc-6954) в течение 1 часа при комнатной температуре, трижды промывали PBS-T и инкубировали с вторичными антителами (1:200 Alexa Fluor 488, Invitrogen, 10424752; 1:200 Alexa Fluor 568, Invitrogen, 10348072) в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки инкубировали с раствором DAPI (AppliChem, A4099) в течение 10 минут, однократно промывали PBS и хранили в PBS при 4°C до последующего анализа.

Выделение гистонов

Экстракция гистонов проводилась в соответствии с ранее описанным методом [137]. Клетки U2OS высевали в чашки петри диаметром 10 см и на следующий день обрабатывали указанными концентрациями мепакрина. После обработки препаратом клетки облучали дозой 2 Гр. Через 30 минут восстановления после облучения клетки собирали и осаждали центрифугированием при 300 g в течение 10 минут. Супернатант удаляли, а осадок клеток промывали один раз PBS и снова центрифугировали при 300 g в течение 10 минут. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в ледяном гипотоническом лизирующем буфере, содержащем 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ и 1 mM DTT с добавлением ингибиторов

протеаз (Roche, 11873580001) и фосфатаз (Roche, 4906845001), и вращали в течение 30 минут при 4°C. Ядра осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 10 минут при 4°C, супернатант полностью удаляли, ядра ресуспендировали в 0.4 N серной кислоте и инкубировали на ротаторе еще 30 минут. Остатки ядер удаляли центрифугированием при 16000 g в течение 10 минут, супернатант переносили в новую пробирку и добавляли трихлоруксусную кислоту (ТСА), пробирки переворачивали и инкубировали на льду в течение 30 минут. Гистоны осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 10 минут при 4°C. Супернатант удаляли, а осадок промывали дважды ледяным ацетоном и центрифугировали при 16000 x g в течение 5 минут при 4°C. Осадок гистонов высушивали на воздухе в течение 20 минут при комнатной температуре, растворяли в ультрарасовой воде и хранили при -20°C до последующего анализа.

Иммунопреципитация

Для проведения исследований связанных с иммунопреципитацией, клетки U2OS высевали в чашки площадью 15 см² и обрабатывали мепакрином в указанных концентрациях в течение 3 часов. После обработки препаратом клетки дважды промывали ледяным PBS и собирали в лизирующем буфере, содержащем 25 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40 и 2 mM EDTA, с добавлением ингибиторов протеаз (Roche, 11873580001) и фосфатаз (Roche, 4906845001), а также 0.025 единиц/мкл нуклеазы GENIUS™ (Santa Cruz, sc-202391). Затем клетки центрифугировали при 20000 g в течение 15 минут при 4°C, супернатант собирали, и общую концентрацию белка измеряли с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225). Клеточный лизат затем равномерно разделяли на образцы для аликвоты для входного контроля (input), контроля IgG и иммунопреципитации исследуемого образца (IP). Контрольные образцы IgG инкубировали с 5 мкг нормального IgG антитела (Santa Cruz, sc-2025), в то

время как образцы IP инкубировали с 5 мкг антитела к NDRG1 (Santa Cruz, sc-398291) в течение 1 часа при 4°C на ротаторе. Последующая иммунопреципитация проводилась путем инкубации образцов с агарозными шариками (beads) A/G PLUS (SantaCruz; sc-2003) в течение ночи при 4°C. На следующий день шарики трижды промывали лизирующим буфером и инкубировали с буфером Лэммли в течение 5 минут при 95°C. Образцы затем использовались для иммуноблоттинга.

Анализ стабильности мишеней, чувствительных к аффинности мепакрина (DARTS)

Метод DARTS (Drug Affinity Responsive Target Stability) использовался для изучения взаимодействия мепакрина с белковыми мишенями [138]. Метод DARTS (Drug Affinity Responsive Target Stability) основан на принципе, что связывание низкомолекулярного соединения с белком может стабилизировать его структуру, делая его менее подверженным протеолизу. В этом методе белковые лизаты обрабатываются препаратом, после чего подвергаются частичному перевариванию протеазами. Сравнивая степень протеолиза в присутствии и отсутствии препарата, можно выявить белки, которые взаимодействуют с препаратом, так как они будут более устойчивы к протеолитическому расщеплению. Этот метод позволяет идентифицировать потенциальные белковые мишени для лекарственных соединений. Клетки U2OS однократно промывали ледяным PBS и собирали с использованием лизирующего буфера M-PER (Thermo Scientific, 78501), содержащего ингибиторы протеаз (Roche, 11873580001) и фосфатаз (Roche, 4906845001). Клеточный лизат охлаждали на льду в течение 30 минут, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 18000 g и 4°C. Супернатант собирали и смешивали с буфером TNC, содержащим 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂. Концентрацию белка в конечном клеточном лизате измеряли с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo

Scientific, 23225). Инкубация с препаратом проводилась путем равномерного разделения белкового лизата и добавления указанных концентраций мепакрина, после чего проводилась 1-часовая инкубация на ротаторе при комнатной температуре. Протеолиз осуществляли путем добавления к образцам коктейля протеаз (Roche, 10165921001) в течение 10 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением буфера Лэммли и нагреванием в течение 5 минут при 95°C. Образцы затем использовались для иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг

Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в буфере Tris/Glycine, содержащем 25 mM Tris, 192 mM глицина и 0,1% SDS, при напряжении 120 В. Затем белки переносили на мембраны из поливинилиденфторида (PVDF) (Millipore, IPVH00010). Мембраны блокировали либо в 5% обезжиренном сухом молоке, растворенном в Tris-солевом буфере с 0,1% Tween® 20 (TBS-T), либо в 5% фетальной сыворотке крупного рогатого скота (FBS), растворенной в TBS-T, с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C или в течение 1 часа при комнатной температуре с соответствующими первичными антителами (ALKBH2, 1:1000, Abcam, EPR6177(2); DYRK2, 1:1000, Cell Signaling, 11921; MDC1, 1:500, Abcam, ab11169; EYA1, 1:1000, Thermo Scientific, 703582; VCP, 1:1000, Thermo Scientific, MA3-004; NDRG1, 1:1000, Cell Signaling, 9485; PP4R2, 1:2000, Biosite, NP_777567.1; RNF8, 1:500, Proteintech, 14112-1-AP). Далее, мембраны промывали трижды в TBS-T в течение 10 минут, затем инкубировали с соответствующими вторичными антителами в течение часа при комнатной температуре, после чего снова промывали трижды в TBS-T в течение 10 минут. Мембраны хранили в TBS до детекции. Сигнал детектировали с использованием усиленного хемилюминесцентного

субстрата (Millipore, WBKLS0500) и системы визуализации BioRad ChemiDoc MP.

Анализ ферментативной активности DYRK2

Влияние мепакрина на ферментативную активность DYRK2 оценивали с использованием системы DYRK2 Kinase Enzyme System (Promega, V5090). Метод анализа активности фермента DYRK2 основан на измерении способности фермента катализировать фосфорилирование специфического пептида-мишени, DYRKtide, в присутствии АТФ. После реакции уровень оставшегося АТФ определяется с помощью люминесцентного теста ADP-GLO, который позволяет косвенно оценить активность фермента по интенсивности люминесцентного сигнала. Готовили мастер-смесь, содержащую 10 мкМ АТФ и 0,2 мкг/мкл пептида DYRKtide, после чего добавляли различные концентрации мепакрина. В качестве положительного контроля использовали селективный ингибитор DYRK2 - LDN-192960 (Cauman, 19089). Реакцию инициировали добавлением 8 нг рекомбинантного DYRK2. Реакция проводилась путем инкубации экспериментальных планшетов при комнатной температуре в течение 60 минут, после чего применяли тест ADP-GLO Kinase assay (Promega, V6930). Люминесценцию детектировали с временем интеграции 0,5 секунды.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой части главы рассматривается анализ вариабельности результатов лучевой терапии, с акцентом на сравнение глиомы низкой степени злокачественности (LGG) и глиобластомы (GBM). Исследование выявляет различия в молекулярных механизмах, таких как программируемая клеточная смерть и репарация ДНК, которые могут объяснять различия в ответах на лечение. Особое внимание уделяется важности иммунного ответа и его влиянию на радиочувствительность и радиорезистентность. Эти результаты подчеркивают необходимость персонализированного подхода к лечению и могут способствовать разработке новых стратегий терапии.

Во второй части главы обсуждается идентификация биомаркеров для стратификации пациентов с использованием мультиомиксного исследования редких заболеваний, связанных с нарушениями в системе репарации ДНК. Исследование фокусируется на выявлении генов, которые могут служить биомаркерами для прогнозирования выживаемости пациентов с различными типами онкологических заболеваний. Особое внимание уделяется гену CEP135, который демонстрирует высокую корреляцию с выживаемостью пациентов с саркомой. Эти результаты могут быть использованы для разработки более точных методов диагностики и лечения, а также для определения новых терапевтических мишеней.

В заключительной части главы описывается поиск низкомолекулярных модуляторов репарации ДНК и идентификация синтетически летальных пар генов для таргетной терапии. Исследование выявляет низкомолекулярное соединение мепакрин как потенциальный ингибитор ответа на повреждение ДНК и его взаимодействие с геном NDRG1. Обсуждается механизм действия мепакрина и результаты высокопроизводительного скрининга, показывающие чувствительность различных раковых клеток к этому соединению, особенно клеточные линии колоректального рака. Особое внимание уделяется идентифицированным парам генов, потенциально обладающим

синтетической летальностью с NDRG1, таким как PARP3 и MLH1. Эти результаты открывают новые возможности для разработки персонализированной терапии и подчеркивают потенциал прецизионной медицины в онкологии.

Таким образом, глава 3 содержит всесторонний обзор и анализ ключевых аспектов исследования, подчеркивая значимость каждого из них для будущих разработок в области онкологии.

3.1. Анализ варибельности результатов лучевой терапии: Сравнение глиомы низкой степени злокачественности и глиобластомы

Общая схема подхода, использованного для анализа варибельности результатов лучевой терапии представлена на рисунке 1.

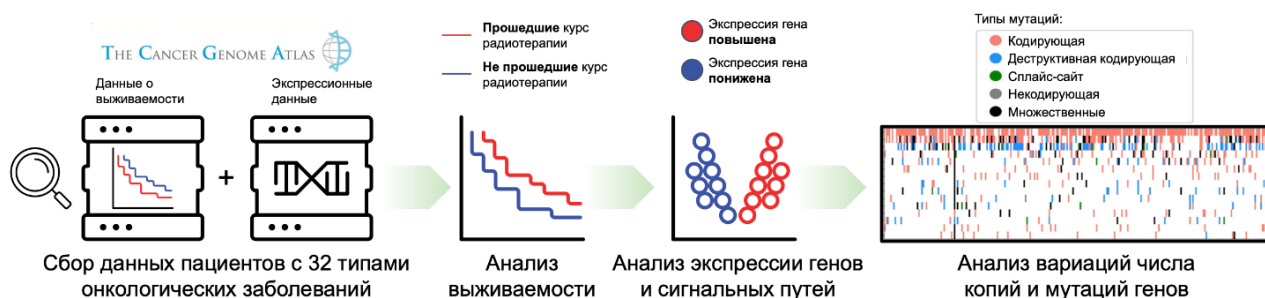


Рисунок 1. Общая схема иллюстрирует этапы исследования: сбор данных о выживаемости и экспрессии генов, анализ выживаемости, анализ экспрессии генов и сигнальных путей, а также анализ вариаций числа копий и мутаций генов

Характеристики пациентов и опухолей в данных TCGA

Данные о фенотипах лучевой терапии были собраны для 32 типов рака из базы данных UCSC Xena. Датасет TCGA-LAML (острый миелоидный лейкоз) был исключен из анализа, так как среди пациентов не было тех, кто получал лучевую терапию. Общее количество образцов варьировалось от 1194 для TCGA-BRCA (инвазивная карцинома молочной железы) до 45 для TCGA-CHOL (холангиокарцинома). Аналогично, процент пациентов,

получивших лучевую терапию, варьировал от 82 % для TCGA-GBM (мультиформная глиобластома) до 0 % для TCGA-KIRC (светлоклеточная карцинома почки), TCGA-CHOL (холангиокарцинома), TCGA-KICH (хромофобная карцинома почки) и TCGA-KIRP (папиллярная карцинома почки). Было отмечено, что TCGA-GBM (мультиформная глиобластома) и TCGA-LGG (глиома низкой степени злокачественности) являются типами рака с наибольшим процентом пациентов, получивших лучевую терапию — 82 % и 54 % соответственно (Рисунок 2).

Количество образцов

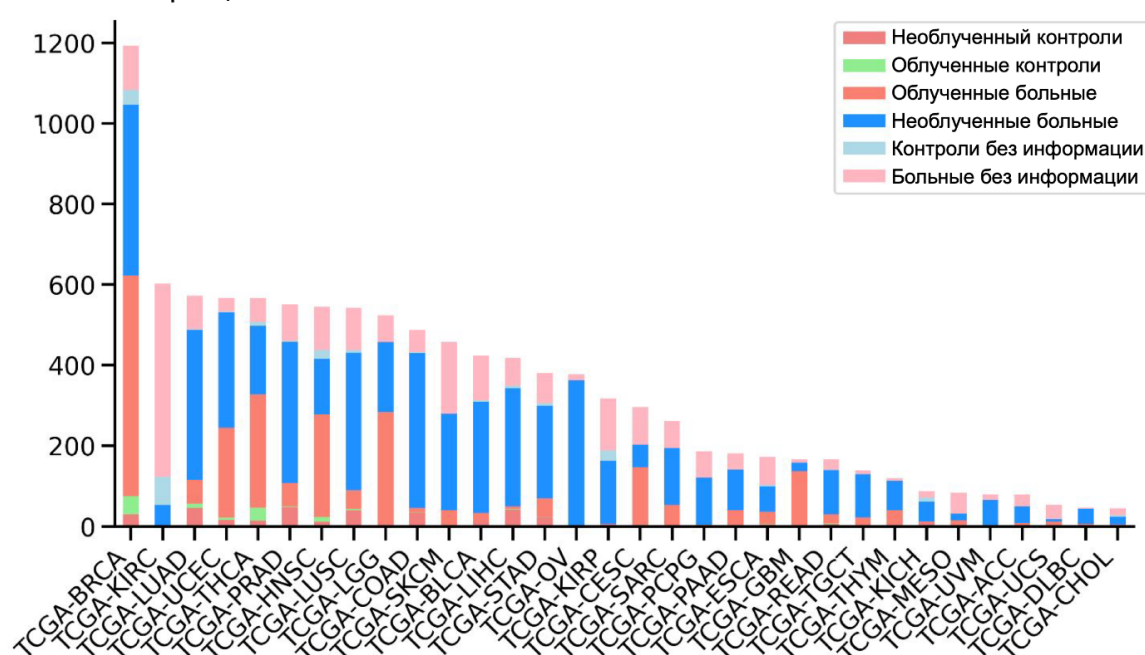


Рисунок 2. Обзор образцов пациентов, полученных из базы данных TCGA. Представлено количество образцов для каждого типа опухоли, отсортированное по общему числу образцов. Цветом обозначены категории образцов: контрольные образцы без облучения, контрольные образцы после облучения, образцы пациентов с облучением, образцы пациентов без облучения, а также контрольные образцы и образцы пациентов, для которых информация о проведении лучевой терапии отсутствует.

Анализ общей выживаемости пациентов, получавших и не получавших лучевую терапию

Для изучения возможности использования лучевой терапии в качестве признака, способного стратифицировать пациентов с раком по выживаемости, мы провели анализ общей выживаемости для 32 типов рака из набора данных TCGA. Анализ общей выживаемости был проведен отдельно для пациентов, получавших лучевую терапию, и для тех, кто её не получал (Рисунок 3, А). В некоторых случаях пациенты, получавшие лучевую терапию, демонстрировали более высокие показатели выживаемости, в то время как в других случаях наблюдалась обратная ассоциация. Так, было обнаружено, что пациенты с типами рака GBM (мультиформная глиобластома), BRCA (инвазивная карцинома молочной железы), READ (аденокарцинома прямой кишки), UCEC (карцинома эндометрия тела матки), STAD (аденокарцинома желудка) и HNSC (плоскоклеточная карцинома головы и шеи), получавшие лучевую терапию, жили дольше по сравнению с пациентами, которые её не получали. В противоположность этому было отмечено, что пациенты с типами рака UVM (увеальная меланома), LUAD (аденокарцинома легкого) и LGG (глиома низкой степени злокачественности), получавшие лучевую терапию, имели более короткую продолжительность жизни по сравнению с теми, кто её не получал (Рисунок 3, Б). Это наблюдение побудило нас сосредоточиться на различиях между пациентами с GBM (мультиформная глиобластома) (Рисунок 3, В, слева) и LGG (глиома низкой степени злокачественности) (Рисунок 3, В, справа), получавшими и не получавшими лучевую терапию, поскольку GBM может развиваться из LGG. В большинстве случаев пациенты с GBM и LGG, получали стандартную внешнюю фракционированную лучевую терапию с использованием фотонного (рентгеновского) излучения, что соответствует современным клиническим протоколам для этих опухолей. Точные параметры облучения (доза, режим фракционирования) в базе данных представлены не для всех пациентов, однако, вероятнее всего, они соответствовали принятым стандартам лечения на момент включения в исследование. Однако следует

учитывать, что выявленные различия могут быть обусловлены не только эффектом самой лучевой терапии, но и исходными клиническими характеристиками пациентов, такими как тяжесть заболевания и критерии отбора для проведения терапии. Для пациентов с LGG был проведен дополнительный статистический анализ распределения по полу, возрасту и исходам первичной терапии (χ^2 -тест), который не выявил значимых различий между группами пациентов, получавшими и не получавшими лучевую терапию ($p\text{-value} > 0,05$).

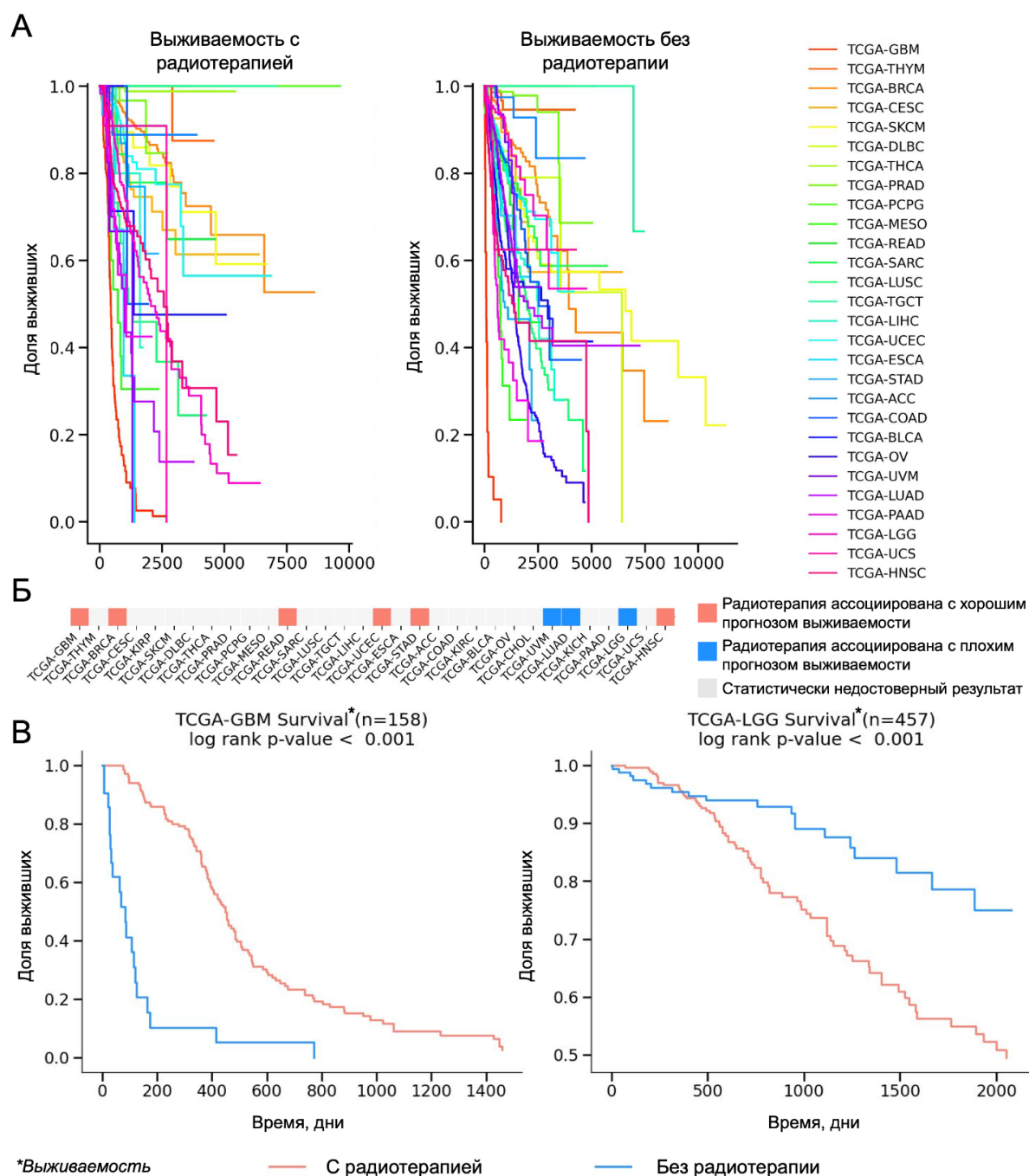


Рисунок 3. Анализ выживаемости пациентов с 32 типами опухолей из базы данных TCGA. А – Кривые выживаемости (Каплана–Майера) для пациентов, получавших и не получавших лучевую терапию, для 32 типов опухолей TCGA. Б – Тепловая карта значимости различий в выживаемости пациентов после лучевой терапии. Красным цветом обозначены случаи, когда лучевая терапия ассоциирована с улучшением выживаемости, синим – с ухудшением выживаемости. Белым цветом обозначены статистически незначимые

различия ($p\text{-value} > 0,05$). Статистическая значимость рассчитана с помощью log-rank теста. В – Кривые выживаемости (Каплана–Майера) для пациентов с глиобластомой (TCGA-GBM, слева) и глиомой низкой степени злокачественности (TCGA-LGG, справа), получавших и не получавших лучевую терапию.

Анализ обогащения сигнальных путей у пациентов с GBM и LGG и их генетические профили

Для выявления различий на уровне транскрипции между пациентами с GBM (мультиформная глиобластома) и LGG (глиома низкой степени злокачественности), прошедшими лучевую терапию и не получавшими её, мы собрали данные о генной экспрессии этих пациентов. Затем мы провели сравнение между пациентами, получавшими лучевую терапию, и пациентами, которые её не получали, и определили дифференциально экспрессируемые гены. После этого были составлены списки генов, которые были статистически достоверно подавлены у пациентов с GBM и одновременно статистически достоверно активированы у пациентов с LGG, и наоборот. Эти списки генов были использованы для анализа обогащения сигнальных путей с целью выявления биологических процессов, которые могут способствовать наблюдаемым различиям в результатах лучевой терапии (Рисунок 4). Целью анализа обогащения сигнальных путей было выявление специфических биологических процессов и молекулярных путей, дифференциально регулируемых в ответ на лучевую терапию у пациентов с GBM и LGG, что может дать представление о механизмах, лежащих в основе различий в ответе на лечение, и потенциально выявить мишени для терапевтического вмешательства.

Было отмечено, что сигнальные пути, связанные с программируемой клеточной смертью и репарацией ДНК, такие как «Нарушения программируемой клеточной смерти» и «Эксцизионная репарация

оснований», были подавлены у пациентов с GBM, но активированы у пациентов с LGG. Это может указывать на возможный механизм, благодаря которому клетки пациентов с GBM оказываются более восприимчивыми к повреждениям, вызванным лучевой терапией. Также было выявлено, что сигнальные пути, связанные с поддержанием теломер и конденсацией хромосом, такие как «Упаковка концов теломер» и «Конденсация хромосом в профазе», были возмущены, что предполагает их возможную роль в различиях результатов лучевой терапии между GBM и LGG (Рисунок 4, А). Более того, сигнальные пути, связанные с противовирусными ответами и интерфероновым сигналингом, включая «Антивирусный механизм ISG15» и «Интерфероновый сигналинг», были активированы у пациентов с GBM и подавлены у пациентов с LGG. Это может свидетельствовать об ослабленном иммунном ответе против опухолевых клеток у LGG, который потенциально способствует устойчивости опухоли к лучевой терапии. Наконец, пути, связанные с экспрессией генов и метаболизмом белков, такие как «Экспрессия генов (транскрипция)» и «Метаболизм белков», были активированы у GBM и подавлены у LGG, что предполагает более высокую метаболическую и транскрипционную активность у GBM, которая может быть ассоциирована с повышенной радиочувствительностью опухолевых клеток (Рисунок 4, Б).

Далее мы провели подстратификацию пациентов с GBM и LGG, получавших лучевую терапию, на основе статуса вариаций числа копий генов (CNV). Для каждого гена, у которого увеличение или уменьшение числа копий наблюдалось как минимум у 10% пациентов, мы сравнивали выживаемость пациентов с измененным числом копий и пациентов с нейтральным статусом. Увеличение числа копий гена рассматривалось как усиление его функции, а уменьшение числа копий — как снижение функции гена. Было выявлено, что как усиление, так и снижение функции определенных генов ассоциированы с ухудшением выживаемости пациентов после лучевой терапии (Рисунок 4, В).

В частности, у пациентов с GBM усиление функции гена KIT и снижение функции гена SPTBN5 были связаны с ухудшением прогноза по сравнению с пациентами, имеющими нейтральный статус этих генов. Для пациентов с LGG единственным геном, усиление функции которого статистически достоверно ухудшало выживаемость, оказался EGFR. В то же время снижение функции 30 генов (CDKN2B, CDKN2A, MTAP, ELAVL2, IZUMO3, DMRTA1, IFNA8, IFNE, IFNA1, IFNA2, KLHL9, IFNA13, IFNA5, IFNA6, IFNW1, IFNA21, IFNA14, IFNA4, IFNA17, IFNA10, IFNA7, IFNA16, FOCAD, IFNB1, HACD4, MLLT3, NGEF, GBX2, ASB18 и AGAP) было связано с ухудшением прогноза у пациентов с LGG, получавших лучевую терапию. Анализ обогащения сигнальных путей для этих генов показал, что основные обогащенные пути связаны с иммунным ответом и клеточными процессами, включая «Интерфероновый сигналинг» и другие иммунные и клеточные процессы (Рисунок 4, Г). Эти результаты согласуются с ранее полученными нами данными на уровне генной экспрессии и подтверждают важную роль иммунной модуляции в определении выживаемости пациентов с LGG. Наконец, был получен профиль мутаций образцов пациентов с LGG, получавших лучевую терапию. Пятнадцать генов с наибольшим количеством мутаций среди пациентов с LGG, получавших лучевую терапию, представлены на тепловой карте (Рисунок 4, Д). Среди этих генов выделяются IDH1 и TP53 из-за их хорошо известных ролей в биологии глиом. ATRX оказался геном с наибольшим числом нарушающих мутаций в кодирующих белок областях. EGFR также вошел в список 15 наиболее мутированных генов среди пациентов с LGG, подвергшихся облучению.

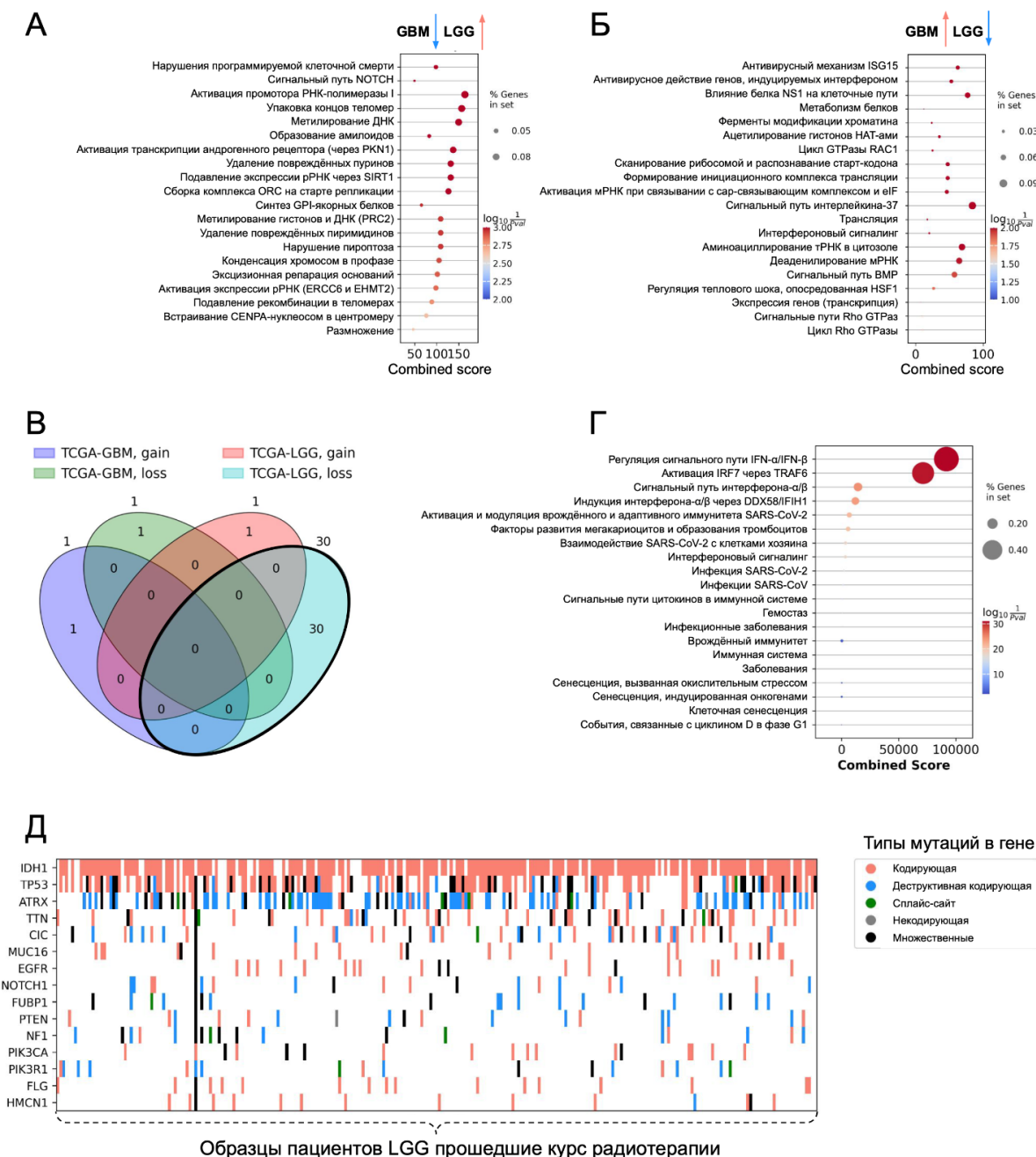


Рисунок 4. Результаты анализа обогащения сигнальных путей и генетические профили пациентов. А – Сигнальные пути, обогащенные генами, экспрессия которых статистически достоверно снижена у пациентов с GBM после лучевой терапии и одновременно статистически достоверно повышена у пациентов с LGG после лучевой терапии. Б – Сигнальные пути, обогащенные генами, экспрессия которых статистически достоверно повышена у пациентов с GBM после лучевой терапии и одновременно статистически достоверно снижена у пациентов с LGG после лучевой терапии. В –

Диаграмма Венна, показывающая пересечение генов, чей статус потери (на рисунке - loss) или увеличения (на рисунке - gain) числа копий генов статистически достоверно стратифицирует пациентов, получавших лучевую терапию. Г – Сигнальные пути, обогащенные генами, потеря которых у пациентов с LGG, получавших лучевую терапию, ассоциирована с ухудшением прогноза. Д – Профиль мутаций в образцах опухолевых тканей пациентов с глиомой низкой степени злокачественности, получавших лучевую терапию.

В данном исследовании мы продемонстрировали вариабельность результатов лучевой терапии среди различных типов рака, уделив особое внимание глиобластоме (GBM) и глиомам низкой степени злокачественности (LGG). Одним из ключевых аспектов нашей работы является анализ различий в результатах лучевой терапии между GBM и LGG на генетическом и транскрипционном уровнях. Наши результаты показывают, что пациенты с GBM, получавшие лучевую терапию, демонстрируют улучшение показателей выживаемости по сравнению с теми, кто её не получал. Напротив, пациенты с LGG, получавшие лучевую терапию, имели худшие показатели выживаемости по сравнению с пациентами без лучевой терапии. Однако следует учитывать, что эти различия могут быть обусловлены исходными клиническими характеристиками пациентов и критериями отбора для проведения терапии.

Известно, что GBM и LGG имеют общую линию происхождения, причем GBM часто развивается из LGG [139]. Наши данные показывают, что различия в регуляции сигнальных путей, связанных с программируемой клеточной смертью, репарацией ДНК, поддержанием теломер, конденсацией хромосом, противовирусными ответами и интерфероновым сигналингом, могут частично объяснять наблюдаемые различия в ответе на лучевую терапию. В частности, мы обнаружили подавление путей репарации ДНК у пациентов с

GBM и их активацию у пациентов с LGG. Эти результаты согласуются с литературными данными, согласно которым подавление путей репарации ДНК может приводить к повышению радиочувствительности опухолевых клеток, в то время как их активация способствует развитию радиорезистентности [140]. Наши результаты также показывают, что сигнальные пути, связанные с антивирусными ответами и интерфероновым сигналингом, были активированы у пациентов с GBM и подавлены у пациентов с LGG. Это может свидетельствовать о более выраженном иммунном ответе у GBM, который, согласно современным данным, способствует повышению чувствительности опухоли к лучевой терапии и формированию эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Полученные результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными исследованиями, демонстрирующими важную роль интерферонового сигналинга и иммунного ответа в повышении эффективности радиотерапии и контроле опухолевого роста [52].

Кроме того, мы выявили, что потеря функции гена ATRX связана с повышенной радиочувствительностью у пациентов с GBM и LGG. В частности, пациенты с LGG, получавшие лучевую терапию и имевшие мутации в гене ATRX, демонстрировали более продолжительную выживаемость по сравнению с пациентами без таких мутаций. Эти результаты подтверждаются литературными данными, указывающими на ATRX как на потенциальный биомаркер радиочувствительности при глиомах [141,142].

Также мы обнаружили, что амплификация гена EGFR у пациентов с LGG ассоциирована с ухудшением прогноза выживаемости после лучевой терапии. Это согласуется с ранее опубликованными данными о роли EGFR в радиорезистентности различных видов рака, включая глиобластому и рак головы и шеи [32,143,144]. Таким образом, статус EGFR может быть полезным для стратификации пациентов перед назначением терапии.

Наши результаты подчеркивают важность персонализированных подходов к лечению. Например, учитывая активацию путей репарации ДНК у LGG, сочетание лучевой терапии с ингибиторами репарации ДНК (например, ингибиторами PARP) может повысить эффективность лечения [47]. Аналогично, подавление интерферонового сигналинга у LGG предполагает, что сочетание лучевой терапии с иммуномодуляторами (например, интерферонами или ингибиторами контрольных точек иммунитета) может усилить иммунный ответ и улучшить результаты лечения [31].

Несмотря на полученные результаты, важно отметить возможные ограничения нашего исследования. В частности, гетерогенность наборов данных, различия в демографических характеристиках пациентов, режимах лечения и методах сбора данных могут влиять на наблюдаемые результаты и их интерпретацию. Поэтому необходимы дальнейшие исследования с учетом этих факторов для подтверждения наших выводов.

В заключение, наше исследование предоставляет новые сведения о вариабельности результатов лучевой терапии среди различных типов рака, с особым акцентом на GBM и LGG. Идентификация ключевых сигнальных путей и генетических изменений, связанных с устойчивостью и чувствительностью к лучевой терапии, открывает перспективы для разработки новых терапевтических стратегий и персонализированных подходов к лечению пациентов с опухолями мозга.

3.2. Поиск низкомолекулярных модуляторов репарации ДНК: Идентификация синтетически летальных пар генов для таргетной терапии

Общая схема подхода, использованного для поиска низкомолекулярных модуляторов репарации ДНК и идентификация синтетически летальных пар генов для таргетной терапии представлена на Рисунке 5.

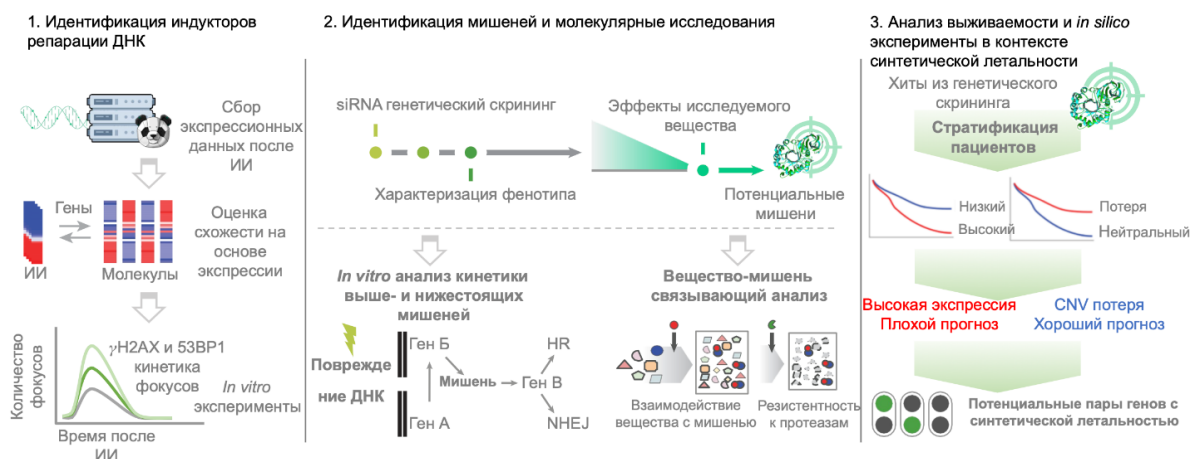


Рисунок 5. Биоинформатический скрининг и экспериментальная характеристика низкомолекулярных модуляторов ответа на повреждение ДНК. Схема эксперимента: (1) идентификация низкомолекулярных соединений, модулирующие процессы репарации ДНК, (2) идентификация белков - мишеней, (3) выявление чувствительных типов опухолей и пар генов обладающих синтетической летальностью.

Виртуальный скрининг модуляторов репарации ДНК выявил, что мепакрин подавляет образование фокусов 53BP1

Для выявления соединений, способных модулировать сигнальные пути репарации ДНК, мы провели *in silico* анализ, сравнив транскриптомные профили клеток после воздействия ионизирующего излучения с профилями клеток, обработанных различными низкомолекулярными соединениями (Рисунок 6А). С помощью этого подхода были выявлены несколько известных противоопухолевых препаратов, включая кабозантиниб (ингибитор тирозинкиназ) и митоксантрон (ингибитор топоизомеразы и интеркалятор ДНК, вызывающий повреждения ДНК и влияющий на её репарацию) [166,167]. Интересно, что среди других высоко-ранжированных соединений был обнаружен противомаларийный препарат мепакрин (Рисунок 6А). Недавно мепакрин был предложен в качестве кандидата для перепрофилирования в онкологии [168], а предполагаемый механизм его действия связан с интеркаляцией в ДНК [169].

В наших экспериментах обработка клеток U2OS мепакрином в концентрации 10 мкМ в течение 24 часов приводила к статистически достоверному снижению их выживаемости (Рисунок 6Б). Однако, вопреки ожиданиям, предварительная обработка мепакрином не усиливала цитотоксический эффект высоких доз ионизирующего излучения (Рисунок 6Б). В первичных фибробластах человека мепакрин также статистически достоверно увеличивал время удвоения популяции, приводя к преждевременному репликативному старению.

Затем мы оценили уровни повреждений ДНК после обработки клеток различными концентрациями мепакрина с помощью высокопроизводительного чип-анализа, позволяющего количественно оценивать двухцепочечные разрывы ДНК. В качестве положительного контроля использовали доксорубин, известный ДНК-повреждающий агент. Как и ожидалось, доксорубин значительно увеличивал повреждения ДНК в клетках U2OS как после кратковременной (3 часа), так и после длительной инкубации (24 часа) (Рисунок 6В). В отличие от доксорубина, мепакрин лишь незначительно увеличивал повреждения ДНК при концентрации 10 мкМ после 8 часов инкубации (Рисунок 6В).

Для более детального изучения механизмов, лежащих в основе цитотоксичности мепакрина, мы проанализировали количество фокусов двух широко используемых маркеров повреждений ДНК: γ H2AX и 53BP1 (Рисунок 6Г). Как и ожидалось, низкая доза радиации (2 Гр) приводила к значительному увеличению числа фокусов повреждений ДНК. Однако обработка мепакрином в концентрации 10 мкМ полностью подавляла образование фокусов 53BP1, при этом количество фокусов γ H2AX увеличивалось (Рисунок 6Г). Эти изменения были особенно заметны при длительной инкубации клеток с мепакрином (до 24 часов). При изучении кинетики образования фокусов повреждений ДНК мы наблюдали аналогичную картину: обычно фокусы повреждений ДНК исчезают через 24

часа после облучения, однако при обработке мепакрином фокусы 53BP1 полностью исчезали, а количество фокусов γ H2AX продолжало увеличиваться (Рисунок 6Д). Подобный эффект наблюдался и при увеличении дозы радиации.

Интересно, что при обработке мепакрином в концентрации 10 мкМ уровень белка 53BP1 был повышен, что сопровождалось увеличением фосфорилированной формы 53BP1 - маркера активации ответа на повреждение ДНК (Рисунок 6Е). Подобные изменения уровня белка наблюдались и при более низких концентрациях мепакрина. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что мепакрин эффективно ингибирует образование фокусов 53BP1, что может быть связано с его цитотоксическим эффектом.

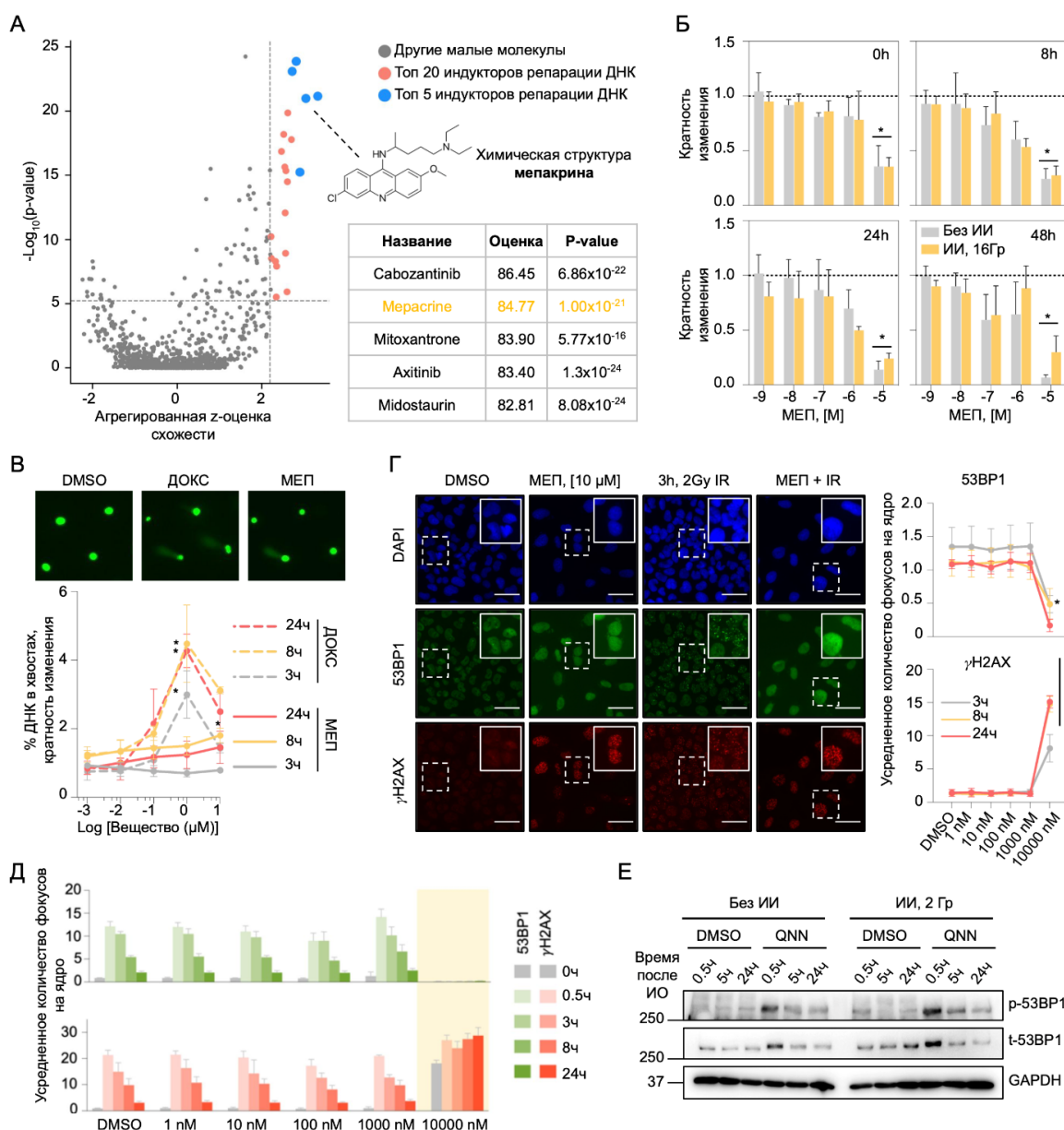


Рисунок 6. Биоинформатический скрининг и экспериментальная характеристика низкомолекулярных модуляторов ответа на повреждение ДНК. А – Вулканический график сходства профилей экспрессии генов после обработки низкомолекулярными соединениями и после воздействия ионизирующего излучения. Б – Выживаемость клеток U2OS после 24-часовой предварительной обработки мепакрином и последующего воздействия ионизирующего излучения. В – Повреждения ДНК, измеренные с помощью comet-chip анализа после обработки клеток мепакрином и доксорубицином (представлены стандартные изображения comet-chip анализа

и количественные данные, $n=3$, среднее $\pm$ стандартное отклонение). Г – Репрезентативные иммуофлюоресцентные изображения и количественный анализ фокусов γ H2AX и 53BP1 в клетках U2OS после 24-часовой обработки мепакрином. Д – Кинетика репарации ДНК после облучения клеток U2OS дозой 2 Гр, оцененная по количеству фокусов γ H2AX и 53BP1 в клетках, предварительно обработанных мепакрином. Е – Вестерн-блот анализ общего и фосфорилированного белка 53BP1 и контрольного белка GAPDH в клетках после обработки мепакрином с облучением и без него.

Уровень убиквитинлигаз RNF8 и RNF168 падает при обработке клеток мепакрином

Чтобы лучше понять механизм действия мепакрина, мы включили в анализ дополнительные маркеры ответа на повреждение ДНК. Фосфорилирование гистона H2AX, опосредованное ATM, и его взаимодействие с белком MDC1 являются одними из первых событий в активации каскада сигнальных путей в ответ на повреждение ДНК [170]. Примечательно, что образование фокусов MDC1 в клетках U2OS после обработки мепакрином в концентрации 10 мкМ было аналогично наблюдаемому для γ H2AX, а также статистически достоверное увеличение фокусов MDC1 наблюдалось после облучения клеток (Рисунок 7А).

Связь между MDC1 и последующим привлечением белков ответа на повреждения ДНК, таких как BRCA1, RAD51 и 53BP1, включает убиквитинирование гистонов, опосредованное убиквитинлигазами RNF8 и RNF168 [171]. Мы обнаружили, что количество фокусов RNF8 и RNF168 статистически достоверно уменьшается в клетках, обработанных мепакрином (Рисунок 7Б). Предобработка клеток U2OS мепакрином в концентрации 10 мкМ привела к отмене радиационно-индуцированного рекрутирования RNF8 и RNF168, что было показано с помощью иммуоцитохимического окрашивания (Рисунок 7Б). Интересно, что обработка самим мепакрином

также снижала уровни обеих убиквитинлигаз, что согласуется с ранее наблюдаемым уменьшением образования фокусов 53BP1. Кроме того, эффект снижения количества фокусов 53BP1, наблюдаемый как после воздействия мепакрина, так и после нокдауна убиквитинлигаз с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA), дополнительно усиливался при комбинированном лечении мепакрином и нокдауне этих генов (Рисунок 7В).

Мы также оценили уровни белков MDC1, RNF8 и RNF168 после кратковременной (8 часов) или длительной (24 часа) инкубации клеток с мепакрином (Рисунок 7Г). Было отмечено увеличение количества белка MDC1 и снижение уровней белков RNF8 и RNF168, что согласуется с данными иммуноцитохимического окрашивания, где 24-часовая инкубация с мепакрином приводила к аналогичному эффекту. Помимо RNF8 и RNF168, предобработка клеток мепакрином в течение 24 часов также повлияла на кинетику других белков ответа на повреждение ДНК, включая снижение уровней убиквитинлигазы RNF126, взаимодействующей с RNF168 [172], и XRCC1, одного из ключевых белков со множеством функций в репарации ДНК (Рисунок 7Д).

Дальнейший анализ показал, что снижение уровня RNF8 после инкубации с мепакрином также влияет на рекрутирование белков, связанных с гомологичной рекомбинацией, таких как BRCA1 и RAD51 (Рисунок 7Е). Это предполагает снижение активности сигнальных путей ответа на повреждение ДНК, расположенных ниже по каскаду относительно RNF8. Интересно, что влияние мепакрина на убиквитинирование гистонов также было подтверждено при анализе другого известного маркера — убиквитинирования по 119 лизину гистона H2A (H2A-Ub) (Рисунок 7Ж).

Чтобы выяснить, оказывает ли мепакрин прямое воздействие на RNF8, мы провели тест на его сродство к мишени (DARTS), однако не обнаружили прямой связи между RNF8 и мепакрином (Рисунок 7З).

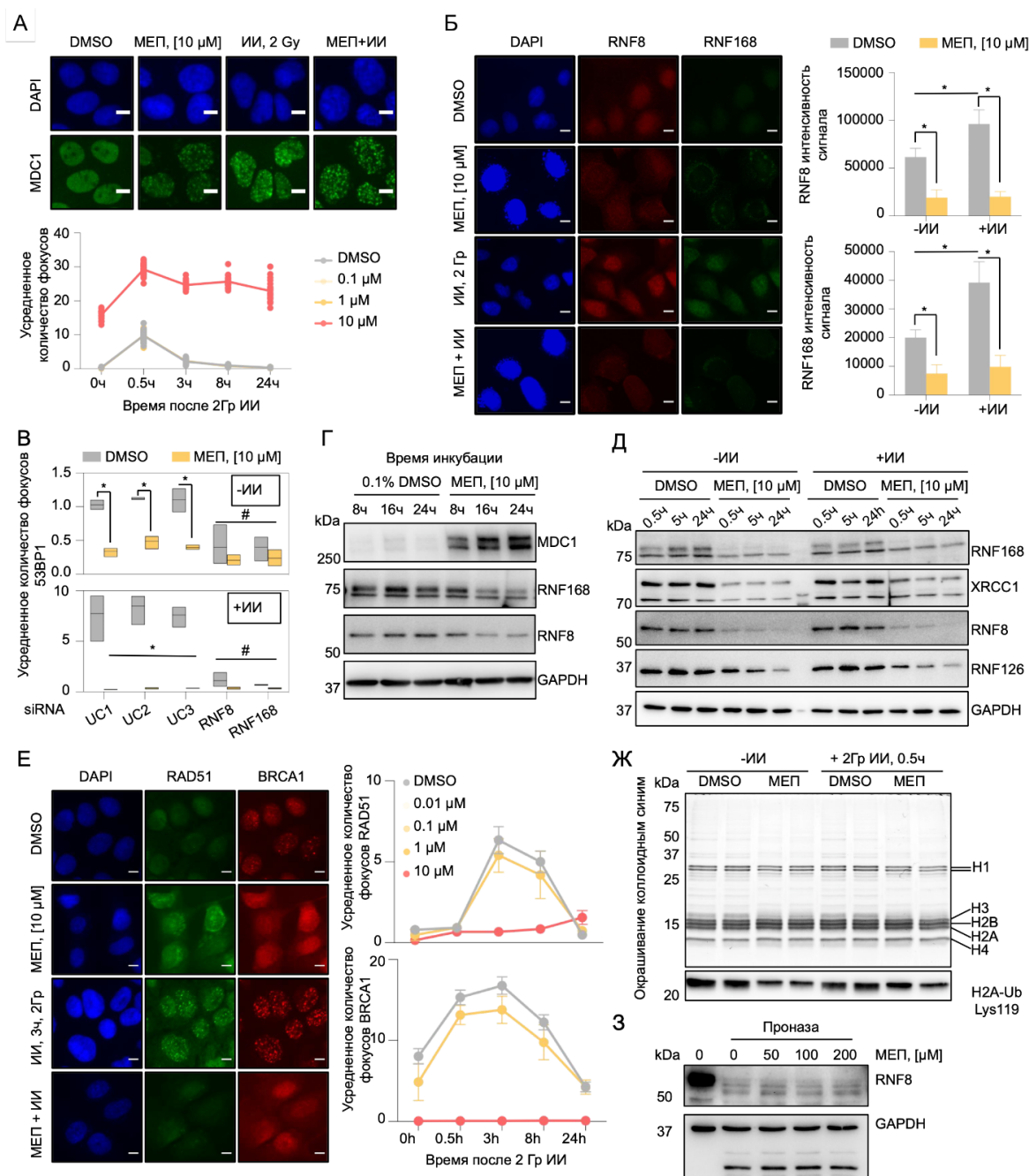


Рисунок 7. Влияние мепакрина на канонические белки ответа на повреждение ДНК. А – Репрезентативные изображения и количественный анализ радиационно-индуцированных фокусов MDC1 после обработки клеток мепакрином. Б – Репрезентативные изображения и количественный анализ уровней RNF8 и RNF168 после обработки клеток мепакрином и облучения (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим множественным сравнением Тьюки). В – Изменения количества фокусов 53BP1 после обработки клеток мепакрином и после нокдауна убиквитинлигаз

RNF8 и RNF168 с помощью siRNA с облучением и без него (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим множественным сравнением Тьюки; * – сравнение между DMSO и мепакрином, # – сравнение между негативным контролем и соответствующими siRNA). Г – Изменения уровней белков MDC1, RNF168 и RNF8 после инкубации клеток U2OS с мепакрином в разные временные интервалы, измеренные методом вестерн-блоттинга. GAPDH использован в качестве контроля. Д – Изменения уровней белков RNF168, XRCC1, RNF8 и RNF126 после обработки клеток U2OS мепакрином и ионизирующим излучением (2 Гр). GAPDH использован в качестве контроля. Е – Кинетика образования фокусов RAD51 и BRCA1 после облучения клеток (2 Гр), предварительно обработанных мепакрином в течение 24 часов. Ж – Анализ уровня убиквитинирования гистона H2A по лизину 119 после обработки клеток мепакрином и облучения. З – Анализ взаимодействия RNF8 с мепакрином методом DARTS с использованием вестерн-блоттинга.

NDRG1-VCP комплекс как новая мишень для мепакрина в лечении онкологических заболеваний

Для определения новых мишеней мепакрина, связанных с репарацией ДНК, мы провели генетический скрининг на основе нокдауна генов с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA), используя библиотеку, состоящую из 582 генов, участвующих в метаболизме ДНК. В качестве анализируемых показателей после обработки клеток соответствующими siRNA и мепакрином использовались маркеры двухцепочечных разрывов ДНК (количество фокусов γ H2AX и 53BP1), а также общее количество клеток (окрашивание по DAPI) (Рисунок 8 А). Для каждого показателя были определены гены, которые либо усиливали, либо ослабляли эффект мепакрина (Рисунок 8 А). Чтобы выявить гены, которые статистически достоверно ослабляют эффект мепакрина сразу по всем трем анализируемым показателям (количество

фокусов γ H2AX и 53BP1, количество клеток), мы построили диаграмму Венна (Рисунок 8 Б). Среди обнаруженных мишеней были выявлены три гена: EYA1, MDC1 и NDRG1, которые статистически достоверно изменяли количество фокусов 53BP1, γ H2AX и общее количество клеток после воздействия соответствующих siRNA с последующей обработкой мепакрином (Рисунок 8 Б).

Хотя ранее мы уже показали, что уровень фокусов MDC1 увеличивается после инкубации с мепакрином, две другие мишени ранее не ассоциировались с этим соединением. EYA1 является тирозинфосфатазой, связанной с γ H2AX, и её активность важна для привлечения MDC1 и последующих белков для запуска каскада ответа на повреждение ДНК [173]. С другой стороны, NDRG1 является многофункциональным белком, участвующий в клеточном цикле, ответе на стресс и репарации ДНК. Его роль в онкологических заболеваниях ранее была описана как супрессора опухолей, однако также известно, что он высоко экспрессируется в определенных типах злокачественных новообразований [174].

Анализ на связывание мишеней с мепакрином не показал изменений в стабильности белка EYA1 после инкубации клеток с различными концентрациями мепакрина, а также других мишеней из скрининга siRNA, включая ALKBH2, PP4R2 и DYRK2. Это свидетельствует об отсутствии прямого связывания мепакрина с перечисленными мишенями. Данные мишени мепакрина были выбраны на основе пересечения результатов изменений двух анализируемых параметров из скрининга siRNA (Рисунок 12Б). DYRK2 был особенно интересен из-за его недавно обнаруженной роли в привлечении 53BP1 и прямом взаимодействии с RNF8 [175]. В наших экспериментах DYRK2 не показал взаимодействия с мепакрином. Хотя применение селективного ингибитора DYRK2 (LDN-192960) показало аналогичный паттерн изменений фокусов 53BP1 и γ H2AX, как и после

воздействия мепакрина, ферментативная активность DYRK2 не была изменена мепакрином.

С другой стороны, NDRG1 оказался единственной мишенью, белковый уровень которой увеличивался в клетках, обработанных протеазой и мепакрином, что указывает на прямое взаимодействие соединения с этой мишенью (Рисунок 8B). Наши эксперименты также выявили прямое взаимодействие между NDRG1 и белком VCP (Рисунок 8Г). VCP образует комплекс с атаксином 3 (ATXN3), который отвечает за протеасомно-зависимую деградацию убиквитинлигазы RNF8 [176]. Мы показали, что обработка клеток мепакрином нарушает взаимодействие между VCP и NDRG1 (Рисунок 8Г), что потенциально способствует образованию комплекса VCP с атаксином 3 и последующей деградации RNF8, наблюдаемой после обработки мепакрином (Рисунок 8Д).

Далее мы обнаружили, что уровень экспрессии VCP высокий в опухолях с высокой экспрессией NDRG1, в то время как уровень экспрессии атаксина 3 низкий у этой же группы пациентов. И наоборот, в опухолях с низким уровнем экспрессии NDRG1 уровень экспрессии VCP понижен, а уровень экспрессии ATXN3 повышен, что может указывать на наличие обратной связи. Важно отметить, что NDRG1 является единственной мишенью, нокдаун которой ослабляет эффекты, вызванные мепакрином. Анализ выживаемости пациентов на основе уровня экспрессии NDRG1 показал, что пациенты с высоким и низким уровнем экспрессии NDRG1 имеют разные паттерны выживаемости (Рисунок 8E). Пациенты с высокой экспрессией NDRG1 обладают менее благоприятным прогнозом выживаемости.

Далее мы отобрали группу пациентов с высоким уровнем экспрессии NDRG1 для идентификации генов, потеря функции которых могла бы привести к улучшению прогноза выживаемости. Это могло бы указывать на синтетическую летальность при ингибировании NDRG1 мепакрином, аналогично ингибированию PARP при отсутствии гена BRCA. Анализ

выживаемости группы пациентов с высоким уровнем экспрессии NDRG1 позволил выявить новые мишени, потеря функции которых на уровне изменения вариаций числа копий (CNV) гена приводит к улучшению прогноза выживаемости. Среди таких генов были обнаружены MLH1, RAD18, BHLHE40, SETMAR, FANCD2, PARP3, PCBP4, WDR48 и OGG1 (Рисунок 8Ж).

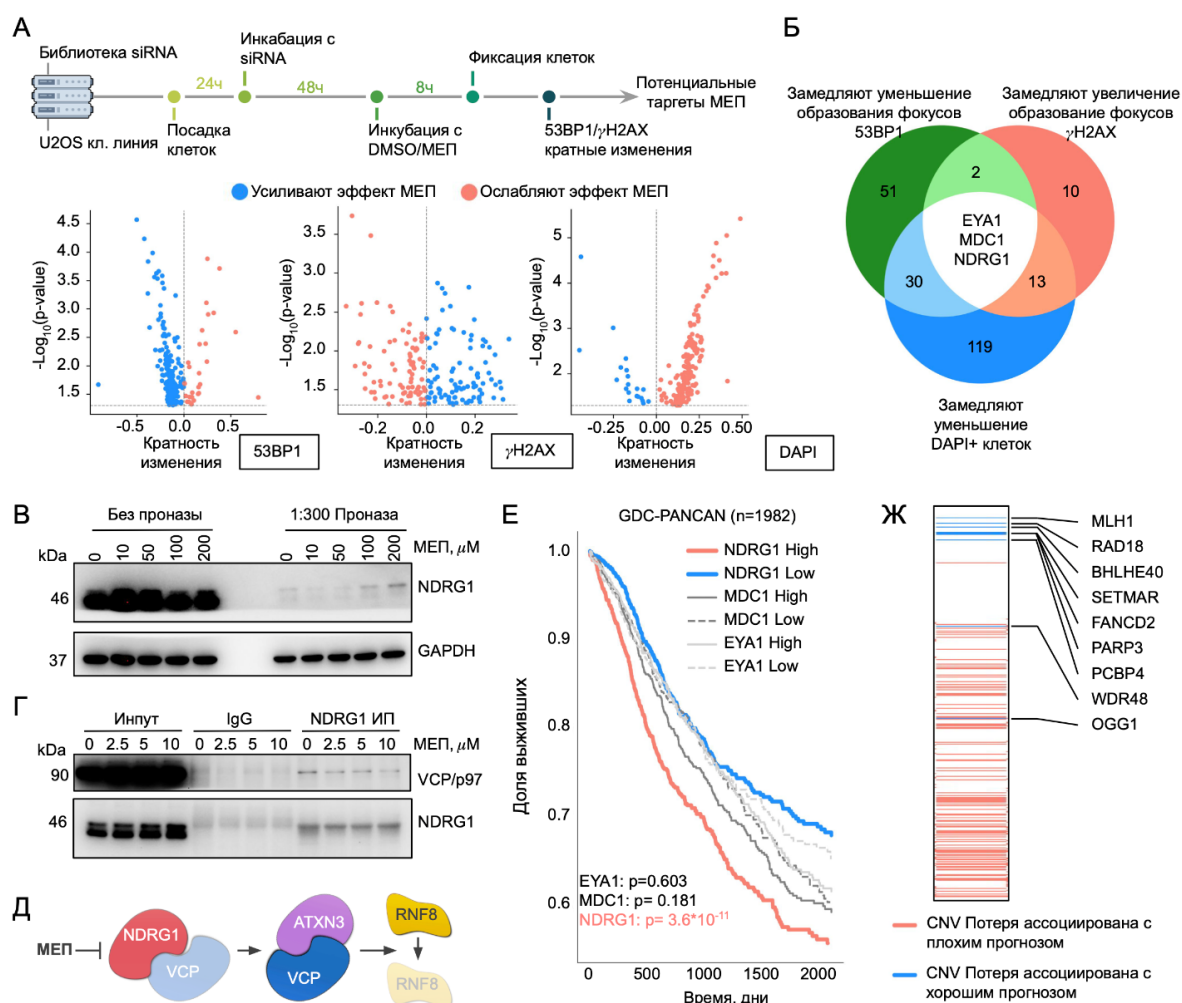


Рисунок 8. Идентификация белков-мишеней мепакрина и выявление синтетически летальных пар генов при онкологических заболеваниях. А – Схема эксперимента по генетическому скринингу с использованием малых интерферирующих молекул РНК (siRNA) для выявления мишеней мепакрина и вулканические графики, демонстрирующие гены, усиливающие или ослабляющие эффект мепакрина по изменению количества фокусов γH2AX,

53BP1 и DAPI-позитивных клеток. Б – Диаграмма Венна, показывающая пересечение генов, выявленных по трем параметрам (фокусы γ H2AX, 53BP1 и DAPI). В – Анализ стабильности белка NDRG1 методом DARTS в клетках, обработанных мепакрином. Г – Иммунопреципитация NDRG1 и последующее выявление его взаимодействия с белком VCP/p97, которое снижается после обработки клеток мепакрином. Д – Предлагаемый механизм деградации RNF8, опосредованный мепакрином через воздействие на NDRG1. Е – Анализ выживаемости пациентов с различными типами опухолей из датасета TCGA GDC-PANCAN в зависимости от уровня экспрессии генов. Красным цветом обозначены гены, высокая экспрессия которых статистически достоверно ассоциирована с плохим прогнозом, синим – гены, низкая экспрессия которых статистически достоверно ассоциирована с хорошим прогнозом. Серым цветом обозначены гены, для которых различия в выживаемости незначимы (log-rank тест $p > 0,05$). Представлены кривые выживаемости для генов EYA1, MDC1 и NDRG1. Статистическая значимость рассчитана с помощью log-rank теста. Ж – Подстратификация пациентов с высоким уровнем экспрессии NDRG1 (плохой прогноз) на основе вариаций числа копий генов (CNV). Гены, выделенные синим цветом, предсказаны как синтетически летальные пары для комбинации с NDRG1. Статистическая значимость рассчитана с помощью log-rank теста.

Колоректальный рак особенно чувствителен к лечению мепакрином

Чтобы проверить гипотезу о том, что снижение функций найденных нами генов может влиять на чувствительность опухолевых клеток к мепакрину, мы провели высокопроизводительный скрининг 129 различных линий опухолевых клеток, представляющих 28 различных типов опухолей, включая опухоли желудочно-кишечного тракта (колоректальный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома), опухоли легких

(мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого), опухоли репродуктивной системы (рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак эндометрия), опухоли нервной системы (глиобластома, нейробластома), опухоли мочевыделительной системы (рак мочевого пузыря), опухоли головы и шеи, мезотелиому, остеосаркому, рабдоидные опухоли, а также опухоли гематопозитического и лимфоидного происхождения (острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, В- и Т-клеточные неходжкинские лимфомы, лимфома Беркитта, Т-лимфобластный лейкоз) (Рисунки 9А и 9Б). Интересно, что различные виды лейкозий и лимфом оказались наиболее чувствительными к лечению мепакрином (Рисунок 9Б). Также стоит отметить, что многие солидные опухоли также были чувствительны к мепакрину, при этом колоректальный рак оказался одним из наиболее чувствительных типов опухолей. Наиболее устойчивыми к лечению мепакрином оказались глиобластомы и нейробластомы (Рисунок 9Б). Было показано, что среднее значение IC50 (значение концентрации мепакрина в нМ при которой достигается 50% элиминирование клеток) для клеточных линий с мутациями в генах, которые могут увеличивать чувствительность к ингибированию NDRG1, было статистически достоверно ниже, чем для клеточных линий без мутаций в описанных ранее генах, что свидетельствует о более высокой чувствительности данных клеточных линий к мепакрину (Рисунок 9Б). Далее, корреляционный анализ выявил положительную корреляцию между значениями IC50 и экспрессией NDRG1 для каждой линии опухолевых клеток, при этом коэффициент корреляции оказался наибольшим для клеточных линий колоректального рака (Рисунок 9В)

Анализ точечных мутаций в опухолевых клетках выявил два гена, MLH1 и RARP3, мутации в которых статистически достоверно ассоциировались с более низкими значениями IC50, особенно в клеточных линиях колоректальной карциномы (Рисунок 9Г). Поэтому мы протестировали

выживаемость клеточной линии колоректального рака HCT116 с мутантным вариантом гена MLH1 и обнаружили более высокую чувствительность к мепакрину по сравнению с клетками HCT116 с нормальным вариантом гена MLH1 (Рисунок 9Д). Примечательно, что не было разницы в чувствительности к ингибированию PARP1 между клетками с делецией MLH1 и клетками с нормальной функцией MLH1.

Эти данные предполагают, что ингибирование NDRG1 может влиять на выживаемость опухолевых клеток. Чтобы проверить эту гипотезу, мы выбрали две линии клеток колоректальной карциномы, HCT116 и DLD1, которые имели мутации в MLH1 и PARP3 соответственно, и обнаружили небольшое, но статистически достоверное уменьшение количества клеток после нокдауна NDRG1. Также было показано, что пациенты, характеризующиеся высоким уровнем экспрессии NDRG1 и потерей функции MLH1 или PARP3 имели выживаемость, схожую с пациентами с низким уровнем экспрессии NDRG1 (Рисунок 9Е).

В совокупности наши результаты указывают на то, что идентифицированная мишень мепакрина, NDRG1, связана с ответом на повреждение ДНК и может выступать в качестве биомаркера для стратификации пациентов с онкологическими заболеваниями на основе их выживаемости. Кроме того, индивидуализированный подход к лечению опухолей с высоким уровнем экспрессии NDRG1 с помощью селективных ингибиторов, может представлять собой новое терапевтическое направление.

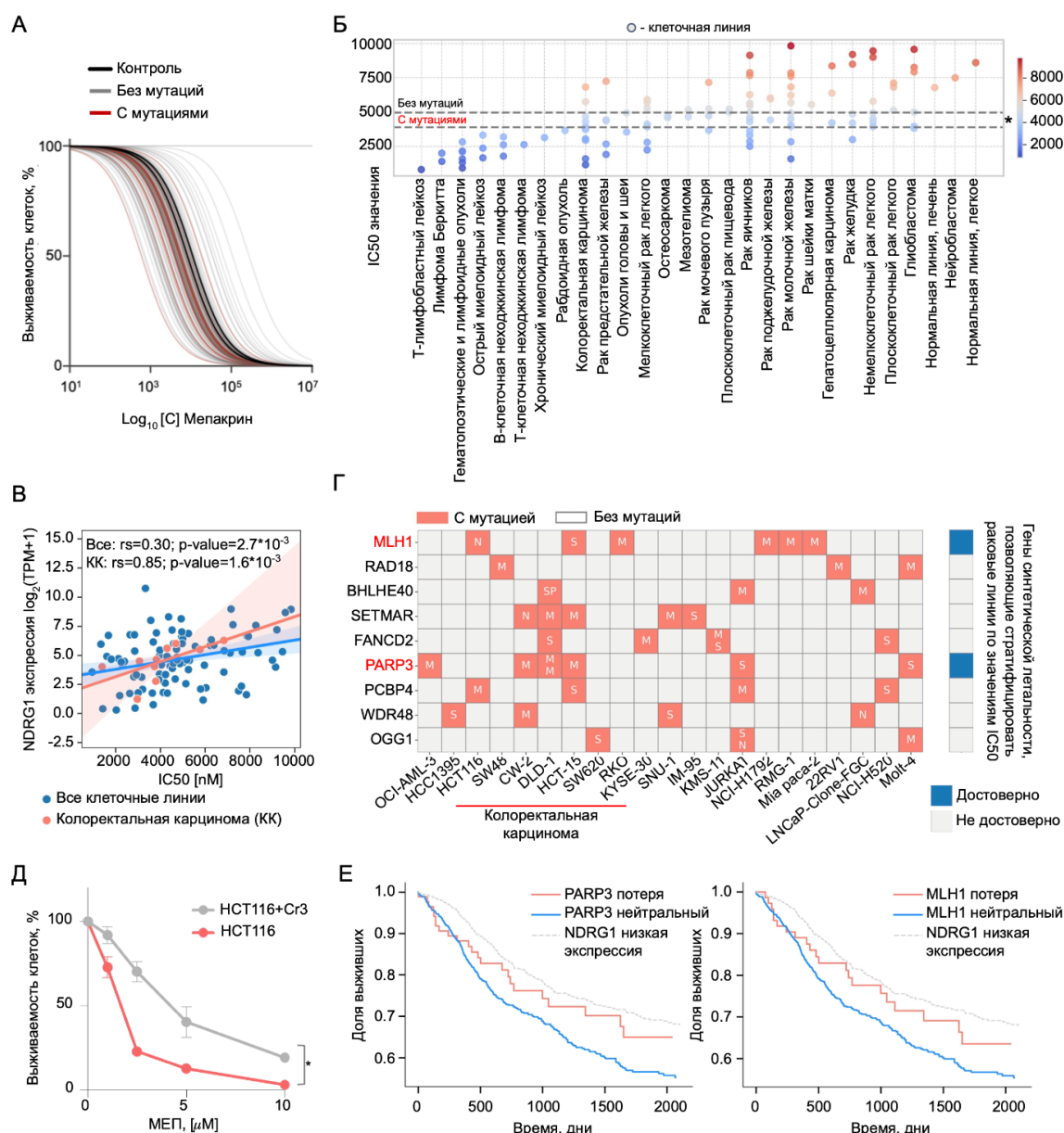


Рисунок 9. Идентификация типов опухолей с синтетической летальностью, ассоциированной с геном NDRG1. А, Б – Высокопроизводительный скрининг 129 клеточных линий для определения чувствительности к мепакрину (значения IC50). (А) Визуализация кривых выживаемости для каждой клеточной линии; красным цветом обозначены клеточные линии с мутациями в генах, предсказанных как синтетически летальные пары к NDRG1. (Б) Клеточные линии сгруппированы по типам опухолей; каждая точка соответствует отдельной клеточной линии, цвет точки отражает значение IC50 (от 0 до 10000). Пунктирными линиями обозначены различия между

средними значениями IC50 для клеточных линий с мутациями в генах потенциально обладающих синтетической летальностью с геном NDRG1 (красный цвет) и без таких мутаций (синий цвет), *p-value < 0,05, двусторонний U-критерий Манна–Уитни. В – Корреляция между уровнем экспрессии NDRG1 и значениями IC50 для всех клеточных линий (синий цвет) и отдельно для клеточных линий колоректального рака (красный цвет); расчеты выполнены с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Г – Тепловая карта, демонстрирующая клеточные линии с наличием хотя бы одной мутации в генах, предсказанных как синтетически летальные с NDRG1: MLH1, RAD18, BHLHE40, SETMAR, FANCD2, PARP3, PCBP4, WDR48 и OGG1. Каждая точка на тепловой карте соответствует типу мутации: М – миссенс-мутация, S – синонимичная мутация, N – нонсенс-мутация, SP – мутация сайта сплайсинга. Серым цветом обозначено отсутствие мутации в соответствующем гене для данной клеточной линии. Правая часть тепловой карты показывает стратификацию клеточных линий по чувствительности к мепакрину в зависимости от наличия мутации в конкретном гене по сравнению с клеточными линиями без мутации в этом гене. Например, клеточные линии с мутациями в генах MLH1 или PARP3 имеют статистически значимо более низкие значения IC50 (*p-value < 0,05, двусторонний U-критерий Манна–Уитни). Д – Выживаемость клеточных линий колоректального рака с дефектным геном MLH1 (HCT116) и с нормальным геном MLH1 (HCT116+Chr3) после 48-часовой обработки мепакрином (*p-value < 0,05, парный двусторонний t-тест). Е – Анализ выживаемости пациентов с высоким уровнем экспрессии NDRG1 из базы данных GDC-PANCAN TCGA, подстратифицированных по статусу вариаций числа копий генов (CNV) PARP3 и MLH1. Статистическая значимость рассчитана с помощью log-rank теста.

Персонализированная терапия является важным направлением современной онкологии [177]. Большинство типов опухолей подвергаются генетическому секвенированию, и целенаправленное лечение становится мощным инструментом для увеличения выживаемости пациентов. В настоящем исследовании мы описали новый механизм воздействия на опухолевые клетки путем ингибирования сигнальных путей репарации ДНК, связанных с рекрутированием 53BP1, с помощью низкомолекулярного соединения - мепакрина. Мы обнаружили, что белок NDRG1 является прямой мишенью мепакрина, а уровень экспрессии его гена может служить биомаркером выживаемости пациентов при различных типах опухолей. Понимание молекулярных и генетических изменений в конкретных типах опухолей является ключевым для разработки индивидуализированных терапий [178]. Это особенно важно в свете того, что достижения в области разработки лекарств позволяют воздействовать на ранее недоступные терапевтические мишени [179–182].

Мепакрин — низкомолекулярное соединение, способное влиять на процессы репарации ДНК. Ранее уже было показано, что он обладает противоопухолевыми свойствами, особенно в комбинации с другими химиотерапевтическими препаратами [183–186]. Его связь с ответом на повреждение ДНК включает ингибирование NF-κB, активацию функции p53 [186,187], снижение активности топоизомеразы, арест клеточного цикла и увеличение уровня повреждений ДНК [188]. В нашей работе мы впервые показали влияние мепакрина на канонические пути репарации ДНК и ключевые белки ответа на повреждение ДНК на более ранних этапах. В частности, мы обнаружили снижение уровней убиквитинлигаз RNF8 и RNF168, что сопровождалось подавлением рекрутирования ключевых белков, связанных с гомологичной рекомбинацией и нехомологичным соединением концов, таких как 53BP1, RAD51 и BRCA1. Хотя ранее уже сообщалось об изменениях в гомологичной рекомбинации через аномальное рекрутирование

RAD51 [185] или снижение активности сигнального пути репарации оснований [183,189], наши результаты раскрывают механизмы действия мепакрина на более ранних этапах сигнального каскада.

Среди генов, выявленных нами в генетическом скрининге с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA), NDRG1 оказался единственным белком, непосредственно взаимодействующим с мепакрином. Это позволило нам более подробно изучить механизмы возмущений сигнальных путей, зависящих от RNF8, в рекрутировании последующих мишеней ответа на повреждение ДНК. Известно, что белок VCP, отвечающий за деградацию множества белков ответа на повреждение ДНК, включая RNF8 [190], взаимодействует с NDRG1 [191]. В наших экспериментах мы показали, что мепакрин нарушает взаимодействие между VCP и NDRG1. С другой стороны, VCP образует комплекс с деубиквитиназой атаксином 3, способствуя деградации RNF8 [176]. Наши наблюдения о противоположных корреляциях между уровнями VCP и ATXN3 у пациентов с высокой и низкой экспрессией NDRG1 позволяют предположить, что подавление NDRG1 мепакрином может способствовать образованию комплекса между VCP и ATXN3, что, в свою очередь, приводит к протеасом-зависимой деградации RNF8.

Связь между высокой экспрессией NDRG1 и неблагоприятными исходами выживаемости зависит от конкретного типа опухоли [192,193]. Анализ данных о выживаемости пациентов с различными типами опухолей из базы данных TCGA-PANCAN показал, что уровень экспрессии NDRG1 статистически достоверно разделяет пациентов по показателям выживаемости, что подтверждает клинический потенциал NDRG1 в качестве диагностического биомаркера. Мы использовали это наблюдение для поиска генов, связанных с репарацией ДНК, потеря функции которых может улучшить выживаемость пациентов. Подобные подходы с использованием различных вычислительных алгоритмов и высокопроизводительных

скринингов ранее успешно применялись для изучения взаимодействий между лекарствами и генами в различных типах опухолей в контексте поиска пар генов обладающих синтетической летальностью [194–196].

Далее мы сосредоточились на выявлении тех типов опухолей, для которых совместное воздействие на NDRG1 и его потенциальные синтетически летальные пары генов могло бы обеспечить максимальный терапевтический эффект. Хотя ранее уже проводился скрининг опухолевых клеточных линий различного происхождения [197–200], в нашей работе мы провели высокопроизводительный анализ 129 клеточных линий, представляющих 28 различных типов опухолей. Важно отметить, что обнаружение высокой чувствительности к подавлению NDRG1 мепакрином у опухолевых клеток гематопозитического происхождения согласуется с опубликованными исследованиями, показывающими либо повышенную экспрессию NDRG1 в этих опухолях [195], либо эффективность мепакрина в сочетании с другими терапевтическими средствами [201–203].

Кроме того, большинство клеточных линий, чувствительных к мепакрину или имеющих мутации в выявленных нами генах, связанных с потенциальной синтетической летальностью с NDRG1, принадлежали к группе колоректального рака. Хотя ранее уже сообщалось о прогностической роли NDRG1 и его пониженной экспрессии в колоректальном раке [204], потеря функций одного из двух генов, определенных нами как синтетически летальные пары к NDRG1 (MLH1 и PARP3), была связана с улучшением выживаемости у пациентов с высокой экспрессией NDRG1. Связь между MLH1 и фенотипом микросателлитной нестабильности, обусловленной дефектами репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, ранее была описана в спорадических колоректальных карциномах [205,206], тогда как для PARP3 это ранее не было показано. Хотя ранее уже обсуждалась эффективность мепакрина в комбинации с другими агентами в моделях колоректального рака, включая клеточные линии с мутацией в MLH1 [207–209], его связь с

NDRG1 ранее не была выявлена. Наши данные показывают, что нокдаун NDRG1 в клетках DLD-1 с мутациями в PARP3 приводит к снижению выживаемости клеток, что открывает перспективы для разработки новых терапевтических подходов в лечении колоректального рака.

В заключение, в нашей работе были выявлены терапевтические мишени, определяющие чувствительность клеток колоректального рака к мепакрину, что открывает перспективы для разработки персонализированных подходов к лечению. С помощью анализа *in silico* и *in vitro*, а также последующих валидационных экспериментов, мы раскрыли механизмы действия мепакрина, связанные с ответом на повреждение ДНК. Идентификация NDRG1 как прямой мишени мепакрина создает основу для дальнейшего изучения его противоопухолевых свойств и разработки новых терапевтических стратегий. Кроме того, обнаружение мутаций в выявленных нами генах не только в клетках колоректального рака, но и в чувствительных к мепакрину лейкозных и лимфоидных клетках, позволяет предположить, что предложенные подходы могут быть полезны для лечения более широкого спектра онкологических заболеваний.

3.3. Идентификация биомаркеров для стратификации пациентов: Мультиомиксное исследование заболеваний, связанных с нарушением репарации ДНК

Общая схема подхода, использованного для поиска биомаркеров и идентификации терапевтических мишеней представлена на Рисунке 10.

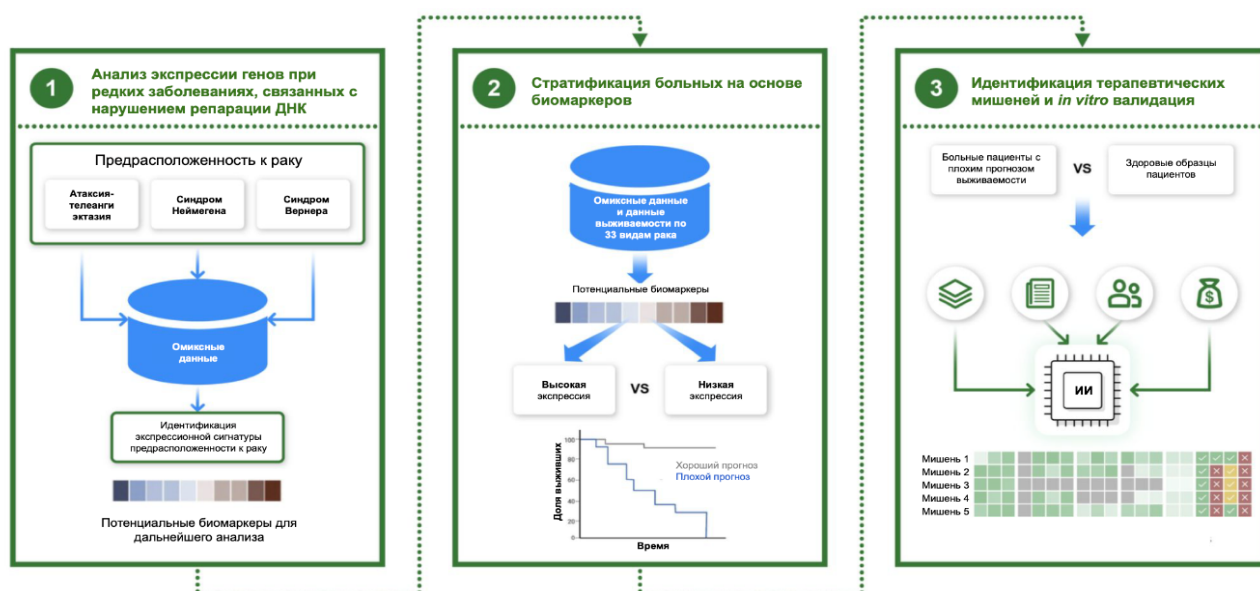


Рисунок 10. На первом этапе были проанализированы профили экспрессии генов редких заболеваний, связанных с нарушениями репарации ДНК и повышенным риском развития рака (1). Далее наиболее статистически достоверно измененные гены были исследованы как потенциальные биомаркеры для стратификации пациентов по показателям выживаемости (2). На заключительном этапе для группы пациентов с пониженной выживаемостью был проведен анализ с целью выявления потенциальных терапевтических мишеней (3). Для генерации гипотез о терапевтических мишенях использовались омиксные данные, текстовые источники, экспертные оценки и данные о финансировании исследований.

Кластеризация на основе фенотипических признаков выявила заболевания с нарушением репарации ДНК и высокой предрасположенностью пациентов к раку

Для выбора заболеваний для последующего анализа генной экспрессии и идентификации новых биомаркеров рака мы провели иерархическую кластеризацию известных заболеваний, ассоциированных с нарушениями механизмов репарации ДНК, на основе анализа общих клинических фенотипов, которые распространены при различных заболеваниях, связанных

с нарушением репарации ДНК (Рисунок 11А). Примечательно, что мы обнаружили три основных кластера заболеваний, охватывающих разнообразные фенотипы. Первый кластер включает заболевания репарации ДНК, для которых нейродегенерация является наиболее распространенной клинико-фенотипической характеристикой (Рисунок 11А, отмечено красным). В частности, сюда входит спиноцеребеллярная атаксия с аксональной нейропатией (SCAN1) с мутациями в гене тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDP1); атаксия-телеангиэктазия-подобное расстройство 1 с мутациями в гене MRE11A; синдром Коккейна с мутациями в гене ERCC6 и десять других заболеваний, для которых основным поражаемым органом является мозг и нарушается функция нейронов. Среди этих заболеваний пигментная ксеродерма часто связана с раком кожи, полости рта и ротоглотки [145], в то время как у пациентов с атаксия-телеангиэктазией наблюдалось развитие как солидных опухолей, так и опухолей крови и лимфоидного происхождения [146]. Второй кластер соответствует заболеваниям с микроцефалией, низким ростом и иммунодефицитом как основными клиническими фенотипами (Рисунок 11А, отмечено зеленым). Увеличенная частота злокачественных перерождений (как гематопоезических, так и солидных злокачественных новообразований) в этой группе наблюдалась у пациентов с синдромом Неймегена, вызванным мутациями в гене NBS1 [147]. Третья группа включает нарушения репарации ДНК с выраженными прогероидными признаками, такими как сердечно-сосудистые заболевания и преобладание рака (Рисунок 11А, отмечено фиолетовым). Тип злокачественных новообразований в этих кластерах варьируется в зависимости от мутации гена и синдрома. Например, группы пигментной ксеродермы В, Е, F, G, V были подкластеризованы вместе и известны своей предрасположенностью к раку кожи. Интересно, что синдром Вернера с мутациями в гене WRN также был идентифицирован в третьем кластере. В отличие от других белков, участвующих в специфических механизмах репарации ДНК, белок WRN

играет важную роль в регуляции множества сигнальных путей ответа на повреждение ДНК, в частности в репарации двухцепочечных разрывов. У пациентов с синдромом Вернера развиваются саркомы, рак кожи и другие виды солидных опухолей. Важно ответить, что анализ данных генной экспрессии данных заболеваний показал, что атаксия-телеангиэктазия, синдром Вернера и синдром Неймегена формируют также независимые кластеры на экспрессионном уровне [148]. Примечательно, что несмотря на выраженные фенотипические различия между описанными выше редкими заболеваниями, все три ассоциированных с ними гена — NBS1, ATM и WRN — критически задействованы в репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Сравнивая эти три заболевания, мы, таким образом, предполагаем, что можем обнаружить важные сигнальные пути, связанные с образованием опухолей. Поэтому атаксия-телеангиэктазия, синдром Неймегена и синдром Вернера были выбраны для дальнейшего анализа (Рисунок 11А).

Экспрессия CEP135 изменена при заболеваниях, связанных с нарушениями репарации ДНК

Для выявления сигнальных путей, связанных с риском возникновения рака при этих заболеваниях, мы проанализировали изменения в профилях их генной экспрессии по сравнению с контролем. Анализ транскриптомных профилей в больных и здоровых образцах выявил гены, которые значимо либо повышены, либо понижены в фибробластах, полученных от пациентов с атаксия-телеангиэктазией, синдромом Неймегена и синдромом Вернера (Рисунок 11Б). Среди наиболее статистически достоверно возмущенных генов были выявлены гены, связанные с прогрессией клеточного цикла и цитокинезом, такие как CEP192, PAXIP1 и CNTRL (Рисунок 11В). Примечательно, что CEP135 оказался наиболее подавленным на транскриптомном уровне геном с аналогичным паттерном экспрессии при всех трех заболеваниях, связанных с репарацией ДНК, что может указывать

на его связь с общим раковым фенотипом (Рисунок 11Г). Известно, что CEP135 играет важную роль в регуляции сборки центриолей и биогенеза центросом [149]. Таким образом, снижение экспрессии CEP135 вместе с другими выявленными генами (Рисунок 11В) может способствовать нарушению регуляции клеточного цикла при редких заболеваниях, связанных с нарушениями в репарации ДНК [150–154]. Кроме того, изменения уровня экспрессии этого гена также связаны с амплификацией центросом, что часто наблюдается в раковых клетках [155]. На основе этих наблюдений было предложено использовать количественное определение CEP135 в отдельных клетках для отслеживания аномалий центросом в процессе прогрессирования опухоли [156]. Мы предполагаем, что CEP135 может быть использован в качестве прогностического биомаркера для стратификации пациентов на подгруппы с различными исходами.

CEP135 как биомаркер для стратификации пациентов с саркомой с неблагоприятным прогнозом выживаемости

Для оценки возможности использования уровня экспрессии CEP135 в качестве биомаркера пациенты с раком были разделены на группы с высоким и низким уровнем экспрессии этого гена, после чего был проведен анализ различий в общей выживаемости между этими группами. Примечательно, что девять из десяти генов, экспрессия которых была статистически достоверно изменена при заболеваниях, связанных с дефектами в репарации ДНК (Рисунок 11В), статистически достоверно стратифицируют пациентов по показателям общей выживаемости как минимум в трех типах рака (Рисунок 12А). В частности, по уровню экспрессии CEP135 можно стратифицировать пациентов с уротелиальной карциномой мочевого пузыря (BLCA), глиомой низкой степени злокачественности (LGG) и саркомой (SARC) (Рисунок 12А, Б), при этом самый статистически значимый результат был получен для пациентов с LGG. Пациенты с высокой экспрессией CEP135 имели статистически достоверно более низкую выживаемость по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии CEP135 (Рисунок 12Б). Однако из-за трудностей, связанных с получением образца ткани при раке мозга, регулярный мониторинг уровня экспрессии CEP135 в динамике для оценки ответа на лечение может быть затруднен. Поэтому в случае LGG CEP135 целесообразнее использовать как прогностический биомаркер, позволяющий оценить исход заболевания на основе однократного анализа образца опухоли, а не как маркер для оценки реакции на терапию, требующий повторных биопсий. Интересно, что у пациентов с BLCA наблюдается противоположная тенденция, при которой высокий уровень экспрессии CEP135 соответствует лучшему исходу выживания. Примечательно, что уровень экспрессии CEP135 в саркоме статистически достоверно стратифицирует пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозами выживаемости на основе

полученного значения p-value (Рисунок 12Б). Таким образом, CEP135 может быть потенциально использован в качестве прогностического биомаркера для пациентов с саркомой с меньшей выживаемостью, что позволит разработать персонализированные подходы к терапии для этой группы пациентов. В связи с этим мы далее сфокусировались на анализе группы пациентов с саркомой с высоким уровнем экспрессии CEP135 и плохим прогнозом выживаемости для поиска персонализированных терапевтических мишеней.

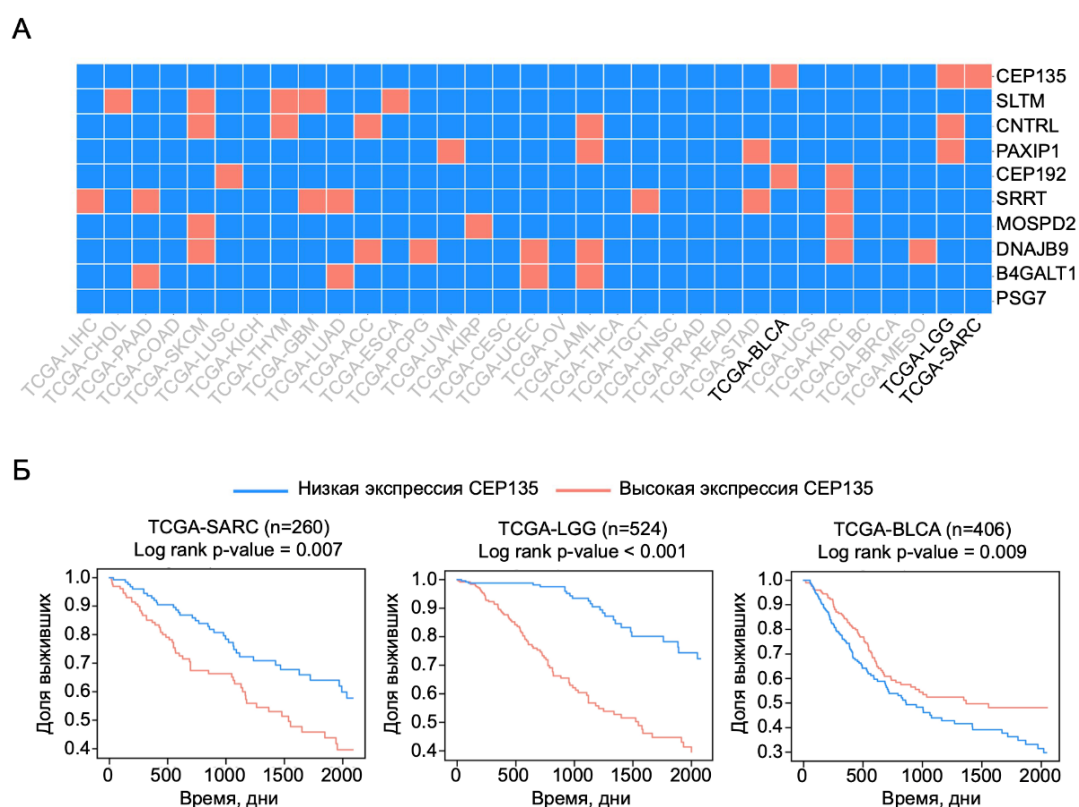


Рисунок 12. Рисунок. А – Анализ выживаемости пациентов для десяти наиболее значимо измененных генов среди всех доступных типов опухолей TCGA. Результаты представлены на тепловой карте и окрашены в зависимости от статистической значимости различий в выживаемости. Красным цветом обозначены статистически значимые различия ($p\text{-value} < 0,05$, log-rank тест) между группами пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии анализируемого гена, синим – статистически незначимые различия. Б – Кривые выживаемости (Каплана–Майера) для пациентов с саркомой (TCGA-SARC), глиомой низкой степени злокачественности

(TCGA-LGG) и уротелиальной карциномой мочевого пузыря (TCGA-BLCA) в зависимости от уровня экспрессии гена CEP135.

PLK1 как потенциальная терапевтическая мишень у пациентов с саркомой

Для анализа различий между данными транскрипции, полученными от пациентов с саркомой с высоким уровнем экспрессии CEP135, и образцами здоровой ткани, а также идентификации новых терапевтических мишеней мы применили алгоритм ранжирования терапевтических мишеней, основанный на интегративном биоинформатическом анализе данных, объединяющий информацию из различных источников, таких как омиксные данные и текстовые ресурсы. Среди двадцати ранжированных кандидатов в терапевтические мишени были выявлены несколько известных генов, играющих важную роль в выживании раковых клеток и апоптозе, такие как TP53, CCNE1, FEN1, STAT3 и другие (Рисунок 13А). Примечательно, что поло-подобная киназа 1 (PLK1), один из ключевых белков, связанных с делением клеточного цикла и цитокинезом, была определена как одна из возможных терапевтических мишеней (Рисунок 13А). Эти группы были далее использованы для исследования различий на уровне активации сигнальных путей с использованием алгоритма iPANDA (Рисунок 13В). Сигнальный путь «Регуляция активности PLK1 при переходе G2-M» (R-HSA-2565942) оказался среди 5% наиболее статистически достоверно активированных сигнальных путей у пациентов с саркомой с неблагоприятным прогнозом выживаемости (Рисунок 13В). Примечательно, что согласно топологии сигнального пути, CEP135 является важным регулятором фосфорилирования ключевых участников контрольной точки G2-M, опосредованного PLK1 (Рисунок 13В, узлы обведены красным). Активация PLK1 и усиление активности сигнального пути, опосредованного PLK1, у пациентов с саркомой может быть обусловлена высоким уровнем экспрессии CEP135. Экспериментальная

проверка была проведена путем генетического подавления потенциальных терапевтических мишеней с использованием siRNA в клеточной линии остеосаркомы человека U2OS (Рисунок 13С). Всего было выбрано пять генов для проверки: TP53, FEN1, PLK1, CDK2 и PCNA. Через 48 часов после трансфекции ядра клеток были количественно оценены. Из пяти мишеней только нокдаун PLK1 показал статистически достоверное снижение уровня роста клеток (Рисунок 13С), что делает PLK1 перспективной терапевтической мишенью для подгруппы пациентов с саркомой с высоким уровнем экспрессии CEP135 и плохим прогнозом выживаемости.

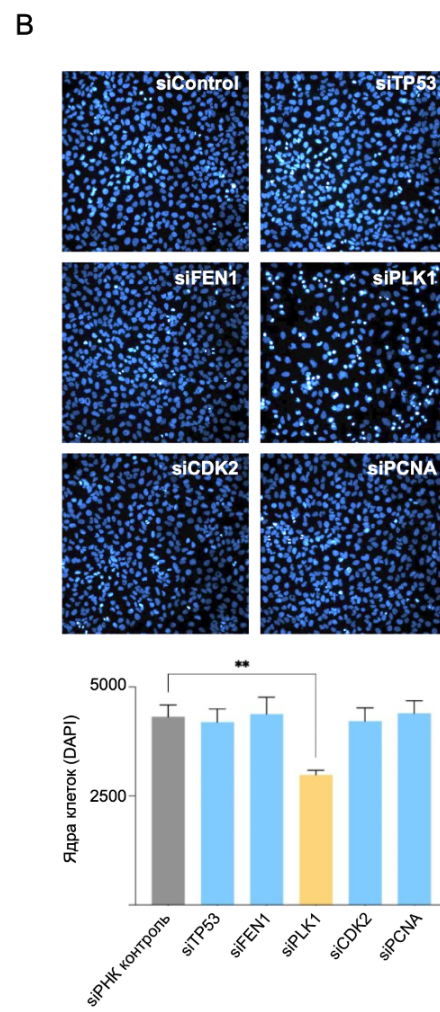
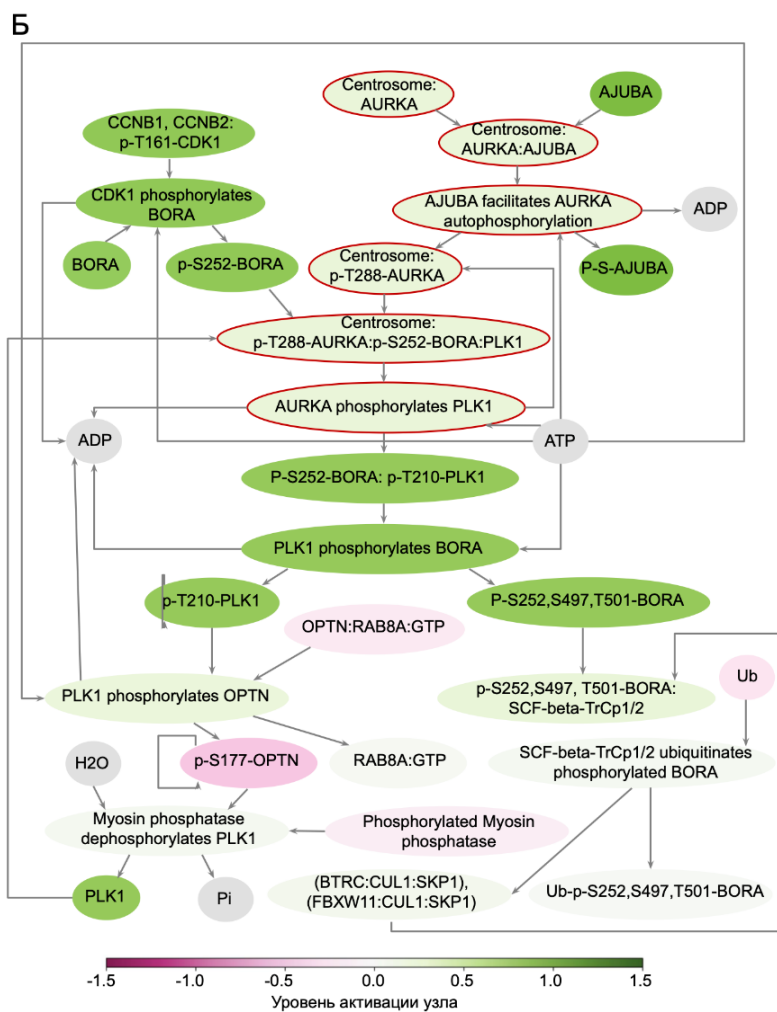
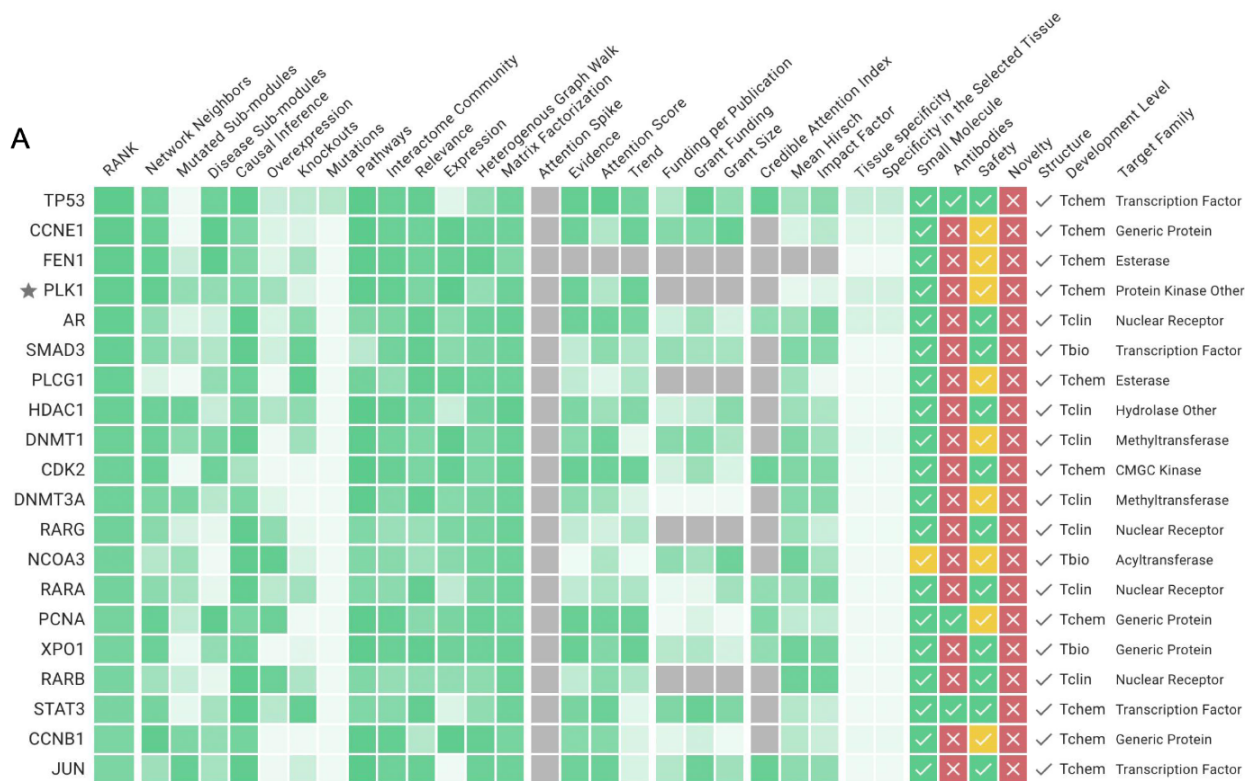


Рисунок 13. А – Двадцать предложенных наиболее перспективных терапевтических мишеней для пациентов с саркомой и высоким уровнем экспрессии CEP135. Б – Визуализация анализа активации сигнального пути «Регуляция активности PLK1 при переходе G2-M» (R-HSA-2565942) для пациентов с саркомой с высоким уровнем экспрессии CEP135. Узлы, в которых присутствует CEP135, обведены красными кругами. Цвет узлов соответствует изменению экспрессии генов: красный – понижение активации, зеленый – увеличение активации. В – Клетки U2OS инкубировали с соответствующими малыми интерферирующими РНК (siRNA) с последующим окрашиванием по DAPI для подсчета ядер. Данные представлены как абсолютное количество DAPI-позитивных клеток для трех независимых повторов. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего (**p-value < 0.01, двусторонний критерий Манна–Уитни).

Процесс вывода нового лекарства на рынок занимает более 10 лет, стоит около 2 миллиардов долларов США (с учетом всех неудач и провалов на разных этапах разработки) и терпит неудачу более чем в 90% случаев. Большинство неудач происходит на ранних стадиях доклинических исследований, где терапевтические мишени идентифицируются и проверяются в экспериментальных моделях, а также на этапе II фазы клинических исследований, где проверяется эффективность лекарства на больных пациентах. На этом этапе клинических исследований в основном проверяется эффективность препарата, а основными причинами возможных неудач являются неверные гипотезы о заболевании, неправильный выбор терапевтической мишени, неудачный выбор биомаркеров и ошибки в дизайне клинических испытаний. В среднем более 66% исследований на этапе II фазы терпят неудачу. Идентификация потенциальной терапевтической мишени является самым важным и критическим шагом в процессе разработки лекарств [103]. Поэтому выбор мишени для доклинических исследований

обычно осуществляется экспертами-биологами, полагающимися на различные подходы. Эти подходы, как правило, включают в себя анализ данных из исследований на животных, клинических данных пациентов, генетических мутаций, связанных с заболеванием, экспрессии генов и/или уровня белков и другие методы. Однако не существует универсального метода для идентификации терапевтической мишени.

В нашей работе мы начали с анализа редких заболеваний, связанных с нарушениями в работе системы репарации ДНК, из-за их связи с развитием рака и нестабильностью генома. Известно, что нарушения репарации ДНК приводят к накоплению мутаций и геномной нестабильности, что является ключевым фактором канцерогенеза. В частности, пациенты с такими синдромами как атаксия-телеангиэктазия, синдром Неймегена и синдром Вернера характеризуются повышенным риском развития различных злокачественных новообразований, включая саркомы, лимфомы и другие типы опухолей [146,147,157]. Ответ на повреждение ДНК нарушен во многих типах раковых клеток, где подавление одних сигнальных путей делает раковые клетки более чувствительными к агентам, повреждающим ДНК, в то время как активация других обеспечивает устойчивость к химио- и радиотерапии [158]. Используя иерархическую кластеризацию, мы выбрали редкие заболевания, связанные с нарушением репарации ДНК, для которых предрасположенность к онкологическим заболеваниям является общим клиническим фенотипом. Мы идентифицировали гены, уровень экспрессии которых статистически достоверно возмущен и которые могут быть также связаны с предрасположенностью к раку. Поскольку разные пациенты с одним и тем же типом рака показывают различные паттерны чувствительности к терапии, т.е. демонстрируют гетерогенность, стратификация больных пациентов на основе биомаркеров позволит увеличить эффективность индивидуализированных терапий [159].

В результате нашего анализа CEP135 был идентифицирован как один из наиболее статистически достоверно измененных генов среди проанализированных заболеваний, связанных с нарушениями репарации ДНК. Мы показали, что уровень экспрессии CEP135 коррелирует с выживаемостью пациентов с саркомой, где высокий уровень экспрессии CEP135 связан с меньшей продолжительностью жизни. Снижение уровня экспрессии CEP135 в заболеваниях, связанных с нарушениями репарации ДНК, вероятно, связано с изменениями в работе клеточного цикла, происходящими при преждевременном старении, в то время как его повышенная экспрессия при раке соответствует известной функции CEP135 в биогенезе centrosом и связанных с раком аномалиях, включая амплификацию centrosом и прогрессирование опухоли [155]. Интересно, что такие двойственные роли были показаны и для других генов, например, для трансформирующего фактора роста-бета (TGF-beta), который может действовать как опухолевый супрессор и как онкоген [160,161]. Эти результаты подчеркивают важность рассмотрения CEP135 как нового маркерного гена для дальнейших исследований, поскольку его связь с саркомой еще не была хорошо изучена. Помимо CEP135, наше исследование предоставляет данные для исследования других генов, которые статистически достоверно коррелируют с выживаемостью среди 33 типов рака и могут быть использованы для идентификации и проверки новых биомаркеров.

Выявление новых терапевтических мишеней, которые, с одной стороны, связаны с выживаемостью пациентов с саркомой, а с другой - могут участвовать в прогрессии опухоли, представляет особый интерес. Используя алгоритм ранжирования терапевтических мишеней, мы выявили молекулярные гипотезы, которые могут быть рассмотрены как потенциальные терапевтические мишени для пациентов с саркомой. Среди предложенных терапевтических мишеней была выбрана киназа PLK1, роль которой в выживании клеток была впоследствии подтверждена нами в

экспериментах *in vitro*. PLK1 играет ключевую роль в дупликации центриолей и переходе G2/M в клеточном цикле [162,163]. Нахождение PLK1 этом же сигнальной каскаде вместе с CEP135 (нами было показано что данный сигнальный путь статистически достоверно активирован в подгруппе сарком с высокой экспрессией CEP135), поддерживает PLK1 как перспективную терапевтическую мишень. Недавно PLK1 был предложен в качестве мишени для лечения 5 типов солидных опухолей, включая саркому мягких тканей, где применение ингибитора PLK1 показало ограниченную противоопухолевую активность у привлеченных к клиническому испытанию пациентов [164]. Возможно, неудачная стратегия отбора пациентов была причиной того, что клиническое испытание не достигло своих целей. Это подчеркивает важность использования молекулярных биомаркеров для улучшения критериев отбора пациентов. Таким образом, CEP135 может быть предложен как новый прогностический биомаркер для стратификации пациентов с саркомой.

В заключение, наше исследование продемонстрировало возможности разработки подходов к применению индивидуализированных терапий для потенциального улучшения терапевтического эффекта у пациентов с саркомой. Эти выводы основаны на анализе стратификации пациентов с использованием соответствующих маркерных генов. Применение подходов, основанных на экспериментах *in silico*, может ускорить этот процесс и последующую идентификацию терапевтических мишеней не только для различных типов рака, но и для более широкого спектра заболеваний, связанных, в том числе, с возрастом. Ранее нами был реализован аналогичный мультиомиксный подход для поиска терапевтических мишеней при глиобластоме, что позволило выявить новые потенциальные гены-мишени, связанные как с опухолевым процессом, так и со старением [165].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были изучены молекулярные механизмы, определяющие чувствительность опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии, с учетом их молекулярной гетерогенности и эффективности репарации ДНК. Проведенный нами анализ выявил статистически достоверную вариабельность ответа на лучевую терапию среди различных типов опухолей, с особым акцентом на глиобластома (GBM) и глиомы низкой степени злокачественности (LGG). В частности, были предложены биомаркеры чувствительности к лучевой терапии, такие как ATRX и EGFR, которые могут быть использованы для стратификации пациентов и персонализации терапии. С помощью биоинформатического анализа и последующего высокопроизводительного скрининга мы идентифицировали низкомолекулярное соединение мепакрин и его ранее не идентифицированную мишень - белок NDRG1. Мы показали, что ингибирование NDRG1 мепакрином приводит к нарушению сигнальных путей репарации ДНК и повышению чувствительности опухолевых клеток, особенно в случае колоректального рака. Кроме того, выявленные нами синтетически летальные пары генов MLH1 и PARP3 могут быть использованы для персонализированного подхода к таргетной терапии пациентов с высоким уровнем экспрессии NDRG1.

Используя мультиомиксные подходы и биоинформатический анализ данных пациентов с редкими наследственными синдромами, связанными с дефектами в системе репарации ДНК, мы идентифицировали новые биомаркеры и потенциальные терапевтические мишени, связанные с предрасположенностью к онкологическим заболеваниям. В частности, был выявлен ген CEP135, уровень экспрессии которого статистически достоверно возмущен в редких синдромах с нарушением репарации ДНК и коррелирует с выживаемостью пациентов с саркомой, что позволяет рассматривать его в качестве нового прогностического биомаркера. Кроме того, мы предполагаем,

что PLK1 может быть перспективной терапевтической мишенью для пациентов с саркомой, характеризующихся высоким уровнем экспрессии CEP135, что открывает возможности для дальнейших исследований и разработки новых подходов к таргетной терапии опухолей, ассоциированных с нарушениями репарации ДНК.

Таким образом, результаты нашей работы расширяют понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе чувствительности опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии, и открывают перспективы для разработки новых персонализированных терапевтических стратегий в онкологии. Дальнейшие исследования, направленные на клиническую валидацию выявленных биомаркеров чувствительности и терапевтических мишеней, позволят повысить эффективность лечения и улучшить прогноз пациентов с различными типами опухолей.

ВЫВОДЫ

1. Анализ данных из базы TCGA по 32 типам злокачественных новообразований выявил вариабельность результатов выживаемости после радиотерапии в зависимости от типа опухоли и её молекулярных характеристик.
2. Предложенный подход для поиска биомаркеров радиочувствительности, основанный на сравнении транскриптомных и генетических профилей, позволил идентифицировать индивидуальные биомаркеры радиочувствительности (ATRX) и радиорезистентности (EGFR), которые могут быть использованы для поиска оптимальных схем радиотерапии глиом.
3. На основе сравнения транскриптомных ответов на ионизирующее излучение и низкомолекулярные соединения разработана методология, позволившая выявить мепакрин как эффективный модулятор репарации ДНК.
4. Экспериментально установлен новый механизм действия мепакрина через NDRG1-опосредованное снижение уровней убиквитинлигаз RNF8 и RNF168.
5. Предложенный подход позволил идентифицировать биомаркеры чувствительности (PARP3 и MLH1) опухолевых клеток к ингибированию NDRG1. Эффективность биомаркеров была подтверждена экспериментально.
6. В результате анализа данных генной экспрессии по редким заболеваниям, связанным с нарушениями в механизмах репарации ДНК и повышенным риском развития онкологических заболеваний, идентифицирован ген CEP135 как перспективный биомаркер чувствительности саркомы к существующим ингибиторам киназы PLK1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Delaney G., Jacob S., Featherstone C., Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines // *Cancer*. 2005. Vol. 104, № 6. P. 1129–1137.
2. Palata O., Hradilova Podzimkova N., Nedvedova E., Umprecht A., Sadilkova L., Palova Jelinkova L., et al. Radiotherapy in combination with cytokine treatment // *Front. Oncol.* 2019. Vol. 9. P. 367.
3. Citrin D.E. Recent developments in radiotherapy // *N. Engl. J. Med.* 2017. Vol. 377, № 11. P. 1065–1075.
4. Wu Y., Song Y., Wang R., Wang T. Molecular mechanisms of tumor resistance to radiotherapy // *Mol. Cancer*. 2023. Vol. 22, № 1. P. 96.
5. Jeggo P.A., Pearl L.H., Carr A.M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective // *Nat. Rev. Cancer*. 2016. Vol. 16, № 1. P. 35–42.
6. O’Neil N.J., Bailey M.L., Hieter P. Synthetic lethality and cancer // *Nat. Rev. Genet.* 2017. Vol. 18, № 10. P. 613–623.
7. Olivier M., Asmis R., Hawkins G.A., Howard T.D., Cox L.A. The need for multi-omics biomarker signatures in precision medicine // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 19. P. 4781.
8. Zhong L., Li Y., Xiong L., Wang W., Wu M., Yuan T., et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021. Vol. 6, № 1. P. 201.
9. Baumann M., Krause M., Overgaard J., Debus J., Bentzen S.M., Daartz J., et al. Radiation oncology in the era of precision medicine // *Nat. Rev. Cancer*. 2016. Vol. 16, № 4. P. 234–249.
10. Hasin Y., Seldin M., Lusk A. Multi-omics approaches to disease // *Genome Biol.* 2017. Vol. 18, № 1. P. 83.
11. Bernier J., Hall E.J., Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements // *Nat. Rev. Cancer*. 2004. Vol. 4, № 9. P. 737–747.
12. Baskar R., Dai J., Wenlong N., Yeo R., Yeoh K.-W. Biological response of cancer cells to radiation treatment // *Front. Mol. Biosci.* 2014. Vol. 1. P. 24.
13. Gérard J.-P., Thariat J., Giraud P., Cosset J.-M. Histoire de l’évolution des techniques de radiothérapie // *Bull. Cancer*. 2010. Vol. 97, № 7. P. 743–751.

14. Lutz S.T. Palliative radiotherapy: history, recent advances, and future directions // *Ann. Palliat. Med.* 2019. Vol. 8, № 3. P. 240–245.
15. Thariat J., Hannoun-Levi J.-M., Sun Myint A., Vuong T., Gérard J.-P. Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013. Vol. 10, № 1. P. 52–60.
16. Bonaparte I., Fragnoli F., Gregucci F., Carbonara R., Di Guglielmo F.C., Surgo A., et al. Improving quality assurance in a radiation oncology using ARIA Visual Care Path // *J. Pers. Med.* 2024. Vol. 14, № 4. P. 416.
17. Macià I Garau M. Radiobiology of stereotactic body radiation therapy (SBRT) // *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* 2017. Vol. 22, № 1. P. 86–95.
18. Nutting C.M., Morden J.P., Harrington K.J., Urbano T.G., Bhide S.A., Clark C., et al. Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial // *Lancet Oncol.* 2011. Vol. 12, № 2. P. 127–136.
19. Jaffray D.A. Image-guided radiotherapy: from current concept to future perspectives // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 9, № 12. P. 688–699.
20. Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions // *Int. J. Med. Sci.* 2012. Vol. 9, № 3. P. 193–199.
21. Barnett G.C., West C.M.L., Dunning A.M., Elliott R.M., Coles C.E., Pharoah P.D.P., et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. Vol. 9, № 2. P. 134–142.
22. Weichselbaum R.R., Hellman S. Oligometastases revisited // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011. Vol. 8, № 6. P. 378–382.
23. Barker H.E., Paget J.T.E., Khan A.A., Harrington K.J. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence // *Nat. Rev. Cancer.* 2015. Vol. 15, № 7. P. 409–425.
24. Chen H.H.W., Kuo M.T. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 37. P. 62742–62758.
25. Manem V.S., Taghizadeh-Hesary F. Advances in personalized radiotherapy // *BMC Cancer.* 2024. Vol. 24, № 1. P. 556.
26. Eschrich S.A., Pramana J., Zhang H., Zhao H., Boulware D., Lee J.-H., et al. A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction of response and prognosis after chemoradiation // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009. Vol.

75, № 2. P. 489–496.

27. Torres-Roca J.F., Fulp W.J., Caudell J.J., Servant N., Bollet M.A., van de Vijver M., et al. Integration of a radiosensitivity molecular signature into the assessment of local recurrence risk in breast cancer // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2015. Vol. 93, № 3. P. 631–638.

28. Eustace N., Ladbury C., Liu Y., Amini A., Sampath S., Watkins T., et al. Use of personalized ultra-fractionated stereotactic adaptive radiotherapy for oligometastatic lung adenocarcinoma: Leveraging CT-guided online adaptive radiotherapy // *Cureus*. 2024. Vol. 16, № 9. P. e66877.

29. Riou O., Prunaretty J., Michalet M. Personalizing radiotherapy with adaptive radiotherapy: Interest and challenges // *Cancer Radiother.* 2024. Vol. 28, № 7. P. 603–609.

30. Tsang Y.M., Routsis D.S. Adapting for Adaptive Radiotherapy (ART): The need to evolve our roles as Therapeutic Radiographers // *Radiography (Lond)*. 2021. Vol. 27, Suppl. 1. P. S39–S42.

31. Herrera F.G., Bourhis J., Coukos G. Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice: Radiation-Immunotherapy Combinations // *CA Cancer J. Clin.* 2017. Vol. 67, № 1. P. 65–85.

32. Bonner J.A., Harari P.M., Giralt J., Azarnia N., Shin D.M., Cohen R.B., et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 354, № 6. P. 567–578.

33. Ma R., Zhao L.-N., Yang H., Wang Y.-F., Hu J., Zang J., et al. RNA binding motif protein 3 (RBM3) drives radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by reducing apoptosis via the PI3K/AKT/Bcl-2 signaling pathway // *Am. J. Transl. Res.* 2018. Vol. 10, № 12. P. 4130–4140.

34. Zhan Y., Fan S. Multiple mechanisms involving in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma // *J. Cancer*. 2020. Vol. 11, № 14. P. 4193–4204.

35. Jain S.M., Nagainallur Ravichandran S., Murali Kumar M., Banerjee A., Sun-Zhang A., Zhang H., et al. Understanding the molecular mechanism responsible for developing therapeutic radiation-induced radioresistance of rectal cancer and improving the clinical outcomes of radiotherapy - A review // *Cancer Biol. Ther.* 2024. Vol. 25, № 1. P. 2317999.

36. Yu C.-C., Hung S.-K., Lin H.-Y., Chiou W.-Y., Lee M.-S., Liao H.-F., et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as an effectively radiosensitizing strategy for treating human oral squamous cell carcinoma in vitro

and in vivo // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 40. P. 68641–68653.

37. Wang J., Wakeman T.P., Lathia J.D., Hjelmeland A.B., Wang X.-F., White R.R., et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells // *Stem Cells*. 2010. Vol. 28, № 1. P. 17–28.

38. Ma Y., Zhan S., Lu H., Wang R., Xu Y., Zhang G., et al. B7-H3 regulates KIF15-activated ERK1/2 pathway and contributes to radioresistance in colorectal cancer // *Cell Death Dis.* 2020. Vol. 11, № 9. P. 824.

39. Liu C., Wang R. The roles of Hedgehog signaling pathway in radioresistance of cervical cancer // *Dose Response*. 2019. Vol. 17, № 3. P. 1559325819885293.

40. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ.* 2018. Vol. 25, № 3. P. 486–541.

41. Tait S.W.G., Green D.R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut // *Oncogene*. 2008. Vol. 27, № 50. P. 6452–6461.

42. Lei G., Zhuang L., Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer // *Nat. Rev. Cancer*. 2022. Vol. 22, № 7. P. 381–396.

43. Sia J., Szmyd R., Hau E., Gee H.E. Molecular mechanisms of radiation-induced cancer cell death: A primer // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. Vol. 8. P. 41.

44. Lang X., Green M.D., Wang W., Yu J., Choi J.E., Jiang L., et al. Radiotherapy and immunotherapy promote tumoral lipid oxidation and ferroptosis via synergistic repression of SLC7A11 // *Cancer Discov.* 2019. Vol. 9, № 12. P. 1673–1685.

45. Chen Y., Li L., Lan J., Cui Y., Rao X., Zhao J., et al. CRISPR screens uncover protective effect of PSTK as a regulator of chemotherapy-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma // *Mol. Cancer*. 2022. Vol. 21, № 1. P. 11.

46. Chang H.H.Y., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18, № 9. P. 495–506.

47. Lord C.J., Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic // *Science*. 2017. Vol. 355, № 6330. P. 1152–1158.

48. Choi M., Kipps T., Kurzrock R. ATM mutations in cancer: Therapeutic implications // *Mol. Cancer Ther.* 2016. Vol. 15, № 8. P. 1781–1791.

49. Mohiuddin I.S., Kang M.H. DNA-PK as an emerging therapeutic target in cancer // *Front. Oncol.* 2019. Vol. 9. P. 635.
50. Demaria S., Formenti S.C. Radiation as an immunological adjuvant: current evidence on dose and fractionation // *Front. Oncol.* 2012. Vol. 2. P. 153.
51. Demaria S., Guha C., Schoenfeld J., Morris Z., Monjazebe A., Sikora A., et al. Radiation dose and fraction in immunotherapy: one-size regimen does not fit all settings, so how does one choose? // *J. Immunother. Cancer.* 2021. Vol. 9, № 4. P. e002038.
52. 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.
53. Ko E.C., Formenti S.C. Radiation therapy to enhance tumor immunotherapy: a novel application for an established modality // *Int. J. Radiat. Biol.* 2019. Vol. 95, № 7. P. 936–939.
54. Kitayama J., Yasuda K., Kawai K., Sunami E., Nagawa H. Circulating lymphocyte is an important determinant of the effectiveness of preoperative radiotherapy in advanced rectal cancer // *BMC Cancer.* 2011. Vol. 11, № 1. P. 64.
55. Theelen W.S.M.E., Peulen H.M.U., Lalezari F., van der Noort V., de Vries J.F., Aerts J.G.J.V., et al. Effect of pembrolizumab after stereotactic body radiotherapy vs pembrolizumab alone on tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer: Results of the PEMBRO-RT phase 2 randomized clinical trial: Results of the PEMBRO-RT phase 2 randomized clinical trial // *JAMA Oncol.* 2019. Vol. 5, № 9. P. 1276–1282.
56. Deng L., Liang H., Xu M., Yang X., Burnette B., Arina A., et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors // *Immunity.* 2014. Vol. 41, № 5. P. 843–852.
57. Knoch J., Kamenisch Y., Kubisch C., Berneburg M. Rare hereditary diseases with defects in DNA-repair // *Eur. J. Dermatol.* 2012. Vol. 22, № 4. P. 443–455.
58. Walsh M.F., Chang V.Y., Kohlmann W.K., Scott H.S., Cunniff C., Bourdeaut F., et al. Recommendations for childhood cancer screening and surveillance in DNA repair disorders // *Clin. Cancer Res.* 2017. Vol. 23, № 13. P. e23–e31.
59. Kashimada A., Hasegawa S., Nomura T., Shiraku H., Moriyama K., Suzuki T., et al. Genetic analysis of undiagnosed ataxia-telangiectasia-like disorders // *Brain Dev.* 2019. Vol. 41, № 2. P. 150–157.

60. O'Driscoll M. Diseases associated with defective responses to DNA damage // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. Vol. 4, № 12. P. a012773.
61. Niraj J., Färkkilä A., D'Andrea A.D. The fanconi anemia pathway in cancer // Annu. Rev. Cancer Biol. 2019. Vol. 3. P. 457–478.
62. Cunniff C., Bassetti J.A., Ellis N.A. Bloom's syndrome: Clinical spectrum, molecular pathogenesis, and cancer predisposition // Mol. Syndromol. 2017. Vol. 8, № 1. P. 4–23.
63. Rothblum-Oviatt C., Wright J., Lefton-Greif M.A., McGrath-Morrow S.A., Crawford T.O., Lederman H.M. Ataxia telangiectasia: a review // Orphanet J. Rare Dis. 2016. Vol. 11, № 1. P. 159.
64. Jin M.H., Oh D.-Y. ATM in DNA repair in cancer // Pharmacol. Ther. 2019. Vol. 203. P. 107391.
65. Weber A.M., Ryan A.J. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer // Pharmacol. Ther. 2015. Vol. 149. P. 124–138.
66. Baretti M., Le D.T. DNA mismatch repair in cancer // Pharmacol. Ther. 2018. Vol. 189. P. 45–62.
67. Menck C.F., Munford V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? // Genet. Mol. Biol. 2014. Vol. 37, № 1. P. 220–233.
68. Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein J.N., Collisson E.A., Mills G.B., Shaw K.R.M., Ozenberger B.A., et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project // Nat. Genet. 2013. Vol. 45, № 10. P. 1113–1120.
69. Cerami E., Gao J., Dogrusoz U., Gross B.E., Sumer S.O., Aksoy B.A., et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data // Cancer Discov. 2012. Vol. 2, № 5. P. 401–404.
70. Rahman N. Realizing the promise of cancer predisposition genes // Nature. 2014. Vol. 505, № 7484. P. 302–308.
71. Bailey M.H., Tokheim C., Porta-Pardo E., Sengupta S., Bertrand D., Weerasinghe A., et al. Comprehensive characterization of cancer driver genes and mutations // Cell. 2018. Vol. 173, № 2. P. 371–385.e18.
72. Ashley E.A. Towards precision medicine // Nat. Rev. Genet. 2016. Vol. 17, № 9. P. 507–522.
73. Vargas A.J., Harris C.C. Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a case study // Nat. Rev. Cancer. 2016. Vol. 16, № 9. P. 525–537.

74. Yao K., Goldschmidt R., Turk M., Wesseling J., Stork-Sloots L., de Snoo F., et al. Molecular subtyping improves diagnostic stratification of patients with primary breast cancer into prognostically defined risk groups // *Breast Cancer Res. Treat.* 2015. Vol. 154, № 1. P. 81–88.
75. Méndez Hernández R., Ramasco Rueda F. Biomarkers as prognostic predictors and therapeutic guide in critically ill patients: Clinical evidence // *J. Pers. Med.* 2023. Vol. 13, № 2. P. 333.
76. Milan N., Navarria F., Cecchin E., De Mattia E. Somatic pharmacogenomics in the treatment prognosis of locally advanced rectal cancer patients: a narrative review of the literature // *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2024. Vol. 17, № 7. P. 683–719.
77. Torkamani A., Wineinger N.E., Topol E.J. The personal and clinical utility of polygenic risk scores // *Nat. Rev. Genet.* 2018. Vol. 19, № 9. P. 581–590.
78. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genet. Med.* 2015. Vol. 17, № 5. P. 405–424.
79. Sparano J.A., Gray R.J., Makower D.F., Pritchard K.I., Albain K.S., Hayes D.F., et al. Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer // *N. Engl. J. Med.* 2018. Vol. 379, № 2. P. 111–121.
80. Herbst R.S., Baas P., Kim D.-W., Felip E., Pérez-Gracia J.L., Han J.-Y., et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial // *Lancet.* 2016. Vol. 387, № 10027. P. 1540–1550.
81. Park M.-K., Lim J.-M., Jeong J., Jang Y., Lee J.-W., Lee J.-C., et al. Deep-learning algorithm and concomitant biomarker identification for NSCLC prediction using multi-omics data integration // *Biomolecules.* 2022. Vol. 12, № 12. P. 1839.
82. Liu X., Xiao C., Yue K., Chen M., Zhou H., Yan X. Identification of multi-omics biomarkers and construction of the novel prognostic model for hepatocellular carcinoma // *Sci. Rep.* 2022. Vol. 12, № 1. P. 12084.
83. Costes V., Sellem E., Marthey S., Hoze C., Bonnet A., Schibler L., et al. Multi-omics data integration for the identification of biomarkers for bull fertility // *PLoS One.* 2024. Vol. 19, № 4. P. e0298623.

84. Dean K.R., Hammamieh R., Mellon S.H., Abu-Amara D., Flory J.D., Guffanti G., et al. Multi-omic biomarker identification and validation for diagnosing warzone-related post-traumatic stress disorder // *Mol. Psychiatry*. 2020. Vol. 25, № 12. P. 3337–3349.
85. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. 2021. Vol. 596, № 7873. P. 583–589.
86. Krämer A., Green J., Pollard J. Jr., Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, № 4. P. 523–530.
87. Tsherniak A., Vazquez F., Montgomery P.G., Weir B.A., Kryukov G., Cowley G.S., et al. Defining a cancer dependency map // *Cell*. 2017. Vol. 170, № 3. P. 564–576.e16.
88. Hoadley K.A., Yau C., Hinoue T., Wolf D.M., Lazar A.J., Drill E., et al. Cell-of-origin patterns dominate the molecular classification of 10,000 tumors from 33 types of cancer // *Cell*. 2018. Vol. 173, № 2. P. 291–304.e6.
89. Gallo Cantafio M.E., Grillone K., Caracciolo D., Scionti F., Arbitrio M., Barbieri V., et al. From single level analysis to multi-omics integrative approaches: A powerful strategy towards the precision oncology // *High Throughput*. 2018. Vol. 7, № 4. P. 33.
90. Li J., Tian J., Liu Y., Liu Z., Tong M. Personalized analysis of human cancer multi-omics for precision oncology // *Comput. Struct. Biotechnol. J*. 2024. Vol. 23. P. 2049–2056.
91. Ye Q., Guo N.L. Inferencing bulk tumor and single-cell multi-omics regulatory networks for discovery of biomarkers and therapeutic targets // *Cells*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 101.
92. Subramanian I., Verma S., Kumar S., Jere A., Anamika K. Multi-omics data integration, interpretation, and its application // *Bioinform. Biol. Insights*. 2020. Vol. 14. P. 1177932219899051.
93. Cicalini I., Chiarelli A.M., Chiacchiaretta P., Perpetuini D., Rosa C., Mastrodicasa D., et al. Multi-omics staging of locally advanced rectal cancer predicts treatment response: a pilot study // *Radiol. Med*. 2024. Vol. 129, № 5. P. 712–726.
94. Mo H., Breitling R., Francavilla C., Schwartz J.-M. Data integration and mechanistic modelling for breast cancer biology: Current state and future directions // *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res*. 2022. Vol. 24. P. None.

95. Pfohl U., Pflaume A., Regenbrecht M., Finkler S., Graf Adelman Q., Reinhard C., et al. Precision oncology beyond genomics: The future is here-it is just not evenly distributed // *Cells*. 2021. Vol. 10, № 4. P. 928.
96. Goodman L.S., Wintrobe M.M., Dameshek W., Goodman M.J., Gilman A., McLennan M.T. Landmark article Sept. 21, 1946: Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. By Louis S. Goodman, Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman and Margaret T. McLennan // *JAMA*. 1984. Vol. 251, № 17. P. 2255–2261.
97. Chabner B.A., Roberts T.G. Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer // *Nat. Rev. Cancer*. 2005. Vol. 5, № 1. P. 65–72.
98. Le Tourneau C., Lee J.J., Siu L.L. Dose escalation methods in phase I cancer clinical trials // *J. Natl. Cancer Inst*. 2009. Vol. 101, № 10. P. 708–720.
99. Bray F., Jemal A., Grey N., Ferlay J., Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study // *Lancet Oncol*. 2012. Vol. 13, № 8. P. 790–801.
100. Falzone L., Salomone S., Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium // *Front. Pharmacol*. 2018. Vol. 9. P. 1300.
101. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J. Clin*. 2021. Vol. 71, № 3. P. 209–249.
102. Hamilton A., Gallipoli P., Nicholson E., Holyoake T.L. Targeted therapy in haematological malignancies: Targeted therapy in haematological malignancies // *J. Pathol*. 2010. Vol. 220, № 4. P. 404–418.
103. Paul S.M., Mytelka D.S., Dunwiddie C.T., Persinger C.C., Munos B.H., Lindborg S.R., et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2010. Vol. 9, № 3. P. 203–214.
104. Macalino S.J.Y., Gosu V., Hong S., Choi S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery // *Arch. Pharm. Res*. 2015. Vol. 38, № 9. P. 1686–1701.
105. Vamathevan J., Clark D., Czodrowski P., Dunham I., Ferran E., Lee G., et al. Applications of machine learning in drug discovery and development // *Nat. Rev*.

Drug Discov. 2019. Vol. 18, № 6. P. 463–477.

106. Wallach I., Dzamba M., Heifets A. AtomNet: A deep convolutional neural network for bioactivity prediction in structure-based drug discovery // arXiv [cs.LG]. 2015. Available: <http://arxiv.org/abs/1510.02855>

107. Cereto-Massagué A., Ojeda M.J., Valls C., Mulero M., Garcia-Vallvé S., Pujadas G. Molecular fingerprint similarity search in virtual screening // Methods. 2015. Vol. 71. P. 58–63.

108. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // J. Comput. Chem. 2010. Vol. 31, № 2. P. 455–461.

109. Chen B., Garmire L., Calvisi D.F., Chua M.-S., Kelley R.K., Chen X. Harnessing big "omics" data and AI for drug discovery in hepatocellular carcinoma // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2020. Vol. 17, № 4. P. 238–251.

110. Schneider G. Automating drug discovery // Nat. Rev. Drug Discov. 2018. Vol. 17, № 2. P. 97–113.

111. Druker B.J., Talpaz M., Resta D.J., Peng B., Buchdunger E., Ford J.M., et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia // N. Engl. J. Med. 2001. Vol. 344, № 14. P. 1031–1037.

112. Shepherd F.A., Rodrigues Pereira J., Ciuleanu T., Tan E.H., Hirsh V., Thongprasert S., et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 353, № 2. P. 123–132.

113. Chapman P.B., Hauschild A., Robert C., Haanen J.B., Ascierto P., Larkin J., et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation // N. Engl. J. Med. 2011. Vol. 364, № 26. P. 2507–2516.

114. Moore K., Colombo N., Scambia G., Kim B.-G., Oaknin A., Friedlander M., et al. Maintenance olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer // N. Engl. J. Med. 2018. Vol. 379, № 25. P. 2495–2505.

115. Setton J., Zinda M., Riaz N., Durocher D., Zimmermann M., Koehler M., et al. Synthetic lethality in cancer therapeutics: The next generation // Cancer Discov. 2021. Vol. 11, № 7. P. 1626–1635.

116. Topatana W., Juengpanich S., Li S., Cao J., Hu J., Lee J., et al. Advances in synthetic lethality for cancer therapy: cellular mechanism and clinical translation // J. Hematol. Oncol. 2020. Vol. 13, № 1. P. 118.

117. Behan F.M., Iorio F., Picco G., Gonçalves E., Beaver C.M., Migliardi G., et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens // *Nature*. 2019. Vol. 568, № 7753. P. 511–516.
118. Huang A., Garraway L.A., Ashworth A., Weber B. Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2020. Vol. 19, № 1. P. 23–38.
119. Carrassa L., Damia G. DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy // *Cancer Treat. Rev*. 2017. Vol. 60. P. 139–151.
120. Jette N., Lees-Miller S.P. The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis // *Prog. Biophys. Mol. Biol*. 2015. Vol. 117. P. 194–205.
121. Scholl C., Fröhling S., Dunn I.F., Schinzel A.C., Barbie D.A., Kim S.Y., et al. Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells // *Cell*. 2009. Vol. 137, № 5. P. 821–834.
122. Goga A., Yang D., Tward A.D., Morgan D.O., Bishop J.M. Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC // *Nat. Med*. 2007. Vol. 13, № 7. P. 820–827.
123. Shaheen M., Allen C., Nickoloff J.A., Hromas R. Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair // *Blood*. 2011. Vol. 117, № 23. P. 6074–6082.
124. Lord C.J., Tutt A.N.J., Ashworth A. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors // *Annu. Rev. Med*. 2015. Vol. 66. P. 455–470.
125. Porcelli L., Quatralè A.E., Mantuano P., Silvestris N., Brunetti A.E., Calvert H., et al. Synthetic lethality to overcome cancer drug resistance // *Curr. Med. Chem*. 2012. Vol. 19, № 23. P. 3858–3873.
126. Fang B. Development of synthetic lethality anticancer therapeutics: Miniperspective // *J. Med. Chem*. 2014. Vol. 57, № 18. P. 7859–7873.
127. Kaelin W.G. Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy // *Nat. Rev. Cancer*. 2005. Vol. 5, № 9. P. 689–698.
128. Herter-Sprie G.S., Kung A.L., Wong K.-K. New cast for a new era: preclinical cancer drug development revisited // *J. Clin. Invest*. 2013. Vol. 123, № 9. P. 3639–3645.

129. Guo J., Liu H., Zheng J. SynLethDB: synthetic lethality database toward discovery of selective and sensitive anticancer drug targets // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № D1. P. D1011–D1017.
130. Srihari S., Singla J., Wong L., Ragan M.A. Inferring synthetic lethal interactions from mutual exclusivity of genetic events in cancer // *Biol. Direct.* 2015. Vol. 10, № 1. P. 57.
131. Benstead-Hume G., Chen X., Hopkins S.R., Lane K.A., Downs J.A., Pearl F.M.G. Predicting synthetic lethal interactions using conserved patterns in protein interaction networks // *PLoS Comput. Biol.* 2019. Vol. 15, № 3. P. e1006888.
132. Wang J., Zhang Q., Han J., Zhao Y., Zhao C., Yan B., et al. Computational methods, databases and tools for synthetic lethality prediction // *Brief. Bioinform.* 2022. Vol. 23, № 2. P. bbac106.
133. Astsaturov I. Future clinical trials: Genetically driven trials // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2017. Vol. 26, № 4. P. 791–797.
134. Scheibye-Knudsen M., Scheibye-Alsing K., Canugovi C., Croteau D.L., Bohr V.A. A novel diagnostic tool reveals mitochondrial pathology in human diseases and aging // *Aging (Albany NY)*. 2013. Vol. 5, № 3. P. 192–208.
135. Subramanian A., Narayan R., Corsello S.M., Peck D.D., Natoli T.E., Lu X., et al. A next generation Connectivity Map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles // *Cell*. 2017. Vol. 171, № 6. P. 1437–1452.e17.
136. Sykora P., Witt K.L., Revanna P., Smith-Roe S.L., Dismukes J., Lloyd D.G., et al. Next generation high throughput DNA damage detection platform for genotoxic compound screening // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 2771.
137. Shechter D., Dormann H.L., Allis C.D., Hake S.B. Extraction, purification and analysis of histones // *Nat. Protoc.* 2007. Vol. 2, № 6. P. 1445–1457.
138. Lomenick B., Hao R., Jonai N., Chin R.M., Aghajan M., Warburton S., et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106, № 51. P. 21984–21989.
139. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., et al. The 2016 World Health Organization Classification of tumors of the Central Nervous System: A summary // *Acta Neuropathol.* 2016. Vol. 131, № 6. P. 803–820.
140. Carruthers R., Ahmed S.U., Strathdee K., Gomez-Roman N., Amoah-Buahin E., Watts C., et al. Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by

inhibition of ATM kinase // *Mol. Oncol.* 2015. Vol. 9, № 1. P. 192–203.

141. Jiao Y., Killela P.J., Reitman Z.J., Rasheed A.B., Heaphy C.M., de Wilde R.F., et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas // *Oncotarget*. 2012. Vol. 3, № 7. P. 709–722.

142. Koschmann C., Calinescu A.-A., Nunez F.J., Mackay A., Fazal-Salom J., Thomas D., et al. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma // *Sci. Transl. Med.* 2016. Vol. 8, № 328. P. 328ra28.

143. Lo H.-W., Hsu S.-C., Hung M.-C. EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization // *Breast Cancer Res. Treat.* 2006. Vol. 95, № 3. P. 211–218.

144. Chakravarti A., Chakladar A., Delaney M.A., Latham D.E., Loeffler J.S. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner // *Cancer Res.* 2002. Vol. 62, № 15. P. 4307–4315.

145. Lehmann A.R., McGibbon D., Stefanini M. Xeroderma pigmentosum // *Orphanet J. Rare Dis.* 2011. Vol. 6, № 1. P. 70.

146. Hecht F., Hecht B.K. Cancer in ataxia-telangiectasia patients // *Cancer Genet. Cytogenet.* 1990. Vol. 46, № 1. P. 9–19.

147. Wolska-Kuśnierz B., Gregorek H., Chrzanowska K., Piątosza B., Pietrucha B., Heropolitańska-Pliszka E., et al. Nijmegen Breakage Syndrome: Clinical and immunological features, long-term outcome and treatment options - a retrospective analysis // *J. Clin. Immunol.* 2015. Vol. 35, № 6. P. 538–549.

148. Worm C., Schambye M.E.R., Mkrtchyan G.V., Veviorskiy A., Shneyderman A., Ozerov I.V., et al. Defining the progeria phenome // *Aging (Albany NY)*. 2024. Vol. 16, № 8. P. 2026–2046.

149. Ohta T., Essner R., Ryu J.-H., Palazzo R.E., Uetake Y., Kuriyama R. Characterization of Cep135, a novel coiled-coil centrosomal protein involved in microtubule organization in mammalian cells // *J. Cell Biol.* 2002. Vol. 156, № 1. P. 87–99.

150. Yang Y., Herrup K. Loss of neuronal cell cycle control in ataxia-telangiectasia: a unified disease mechanism // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25, № 10. P. 2522–2529.

151. Musich P.R., Zou Y. DNA-damage accumulation and replicative arrest in

Hutchinson-Gilford progeria syndrome // *Biochem. Soc. Trans.* 2011. Vol. 39, № 6. P. 1764–1769.

152. Nalepa G., Clapp D.W. Fanconi anemia and the cell cycle: new perspectives on aneuploidy // *F1000Prime Rep.* 2014. Vol. 6. P. 23.

153. Wang Y., Chakravarty P., Raney M., Kelly G., Brooks P.J., Neilan E., et al. Dysregulation of gene expression as a cause of Cockayne syndrome neurological disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111, № 40. P. 14454–14459.

154. Cleaver J.E., Hefner E., Laposa R.R., Karentz D., Marti T. Cockayne syndrome exhibits dysregulation of p21 and other gene products that may be independent of transcription-coupled repair // *Neuroscience.* 2007. Vol. 145, № 4. P. 1300–1308.

155. Ganapathi Sankaran D., Stemm-Wolf A.J., Pearson C.G. CEP135 isoform dysregulation promotes centrosome amplification in breast cancer cells // *Mol. Biol. Cell.* 2019. Vol. 30, № 10. P. 1230–1244.

156. Wang M., Knudsen B.S., Nagle R.B., Rogers G.C., Cress A.E. A method of quantifying centrosomes at the single-cell level in human normal and cancer tissue // *Mol. Biol. Cell.* 2019. Vol. 30, № 7. P. 811–819.

157. Oshima J., Sidorova J.M., Monnat R.J. Jr. Werner syndrome: Clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions // *Ageing Res. Rev.* 2017. Vol. 33. P. 105–114.

158. Huang R., Zhou P.-K. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021. Vol. 6, № 1. P. 254.

159. Zou J., Wang E. Cancer biomarker discovery for precision medicine: New progress // *Curr. Med. Chem.* 2019. Vol. 26, № 42. P. 7655–7671.

160. Pardali K., Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1775, № 1. P. 21–62.

161. Datta N., Chakraborty S., Basu M., Ghosh M.K. Tumor suppressors having oncogenic functions: The double agents // *Cells.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 46.

162. Kong D., Farmer V., Shukla A., James J., Gruskin R., Kiriya S., et al. Centriole maturation requires regulated Plk1 activity during two consecutive cell cycles // *J. Cell Biol.* 2014. Vol. 206, № 7. P. 855–865.

163. Nigg E.A., Holland A.J. Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Vol. 19, № 5. P. 297–312.
164. Schöffski P., Blay J.-Y., De Greve J., Brain E., Machiels J.-P., Soria J.-C., et al. Multicentric parallel phase II trial of the polo-like kinase 1 inhibitor BI 2536 in patients with advanced head and neck cancer, breast cancer, ovarian cancer, soft tissue sarcoma and melanoma. The first protocol of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Network Of Core Institutes (NOCI) // *Eur. J. Cancer.* 2010. Vol. 46, № 12. P. 2206–2215.
165. Olsen A., Harpaz Z., Ren C., Shneyderman A., Veviorskiy A., Dralkina M., et al. Identification of dual-purpose therapeutic targets implicated in aging and glioblastoma multiforme using PandaOmics - an AI-enabled biological target discovery platform // *Aging (Albany NY).* 2023. Vol. 15, № 7. P. 2863–2876.
166. Evison B.J., Sleebs B.E., Watson K.G., Phillips D.R., Cutts S.M. Mitoxantrone, more than just another topoisomerase II poison: Mitoxantrone, more than just a topoisomerase ii poison // *Med. Res. Rev.* 2016. Vol. 36, № 2. P. 248–299.
167. Smart D.J., Halicka H.D., Schmuck G., Traganos F., Darzynkiewicz Z., Williams G.M. Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone // *Mutat. Res.* 2008. Vol. 641, № 1-2. P. 43–47.
168. Oien D.B., Sarkar Bhattacharya S., Chien J., Molina J., Shridhar V. Quinacrine has preferential anticancer effects on mesothelioma cells with inactivating NF2 mutations // *Front. Pharmacol.* 2021. Vol. 12. P. 750352.
169. Ehsanian R., Van Waes C., Feller S.M. Beyond DNA binding - a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers // *Cell Commun. Signal.* 2011. Vol. 9. P. 13.
170. Stucki M., Clapperton J.A., Mohammad D., Yaffe M.B., Smerdon S.J., Jackson S.P. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks // *Cell.* 2005. Vol. 123, № 7. P. 1213–1226.
171. Thorslund T., Ripplinger A., Hoffmann S., Wild T., Uckelmann M., Villumsen B., et al. Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage // *Nature.* 2015. Vol. 527, № 7578. P. 389–393.
172. Zhang L., Wang Z., Shi R., Zhu X., Zhou J., Peng B., et al. RNF126 quenches RNF168 function in the DNA damage response // *Genomics Proteomics*

Bioinformatics. 2018. Vol. 16, № 6. P. 428–438.

173. Panier S., Durocher D. Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. Vol. 14, № 11. P. 661–672.

174. Sun J., Zhang D., Bae D.-H., Sahni S., Jansson P., Zheng Y., et al. Metastasis suppressor, NDRG1, mediates its activity through signaling pathways and molecular motors // *Carcinogenesis*. 2013. Vol. 34, № 9. P. 1943–1954.

175. Yamamoto T., Taira Nihira N., Yogosawa S., Aoki K., Takeda H., Sawasaki T., et al. Interaction between RNF8 and DYRK2 is required for the recruitment of DNA repair molecules to DNA double-strand breaks // *FEBS Lett.* 2017. Vol. 591, № 6. P. 842–853.

176. Singh A.N., Oehler J., Torrecilla I., Kilgas S., Li S., Vaz B., et al. The p97-Ataxin 3 complex regulates homeostasis of the DNA damage response E3 ubiquitin ligase RNF8 // *EMBO J.* 2019. Vol. 38, № 13. P. e102361.

177. Jackson S.E., Chester J.D. Personalised cancer medicine: Personalised Cancer Medicine // *Int. J. Cancer*. 2015. Vol. 137, № 2. P. 262–266.

178. Ashworth A., Lord C.J. Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors? // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2018. Vol. 15, № 9. P. 564–576.

179. Gong X., Liu C., Tang H., Wu S., Yang Q. Application and research progress of synthetic lethality in the development of anticancer therapeutic drugs // *Front. Oncol.* 2024. Vol. 14. P. 1460412.

180. Ren F., Ding X., Zheng M., Korzinkin M., Cai X., Zhu W., et al. AlphaFold accelerates artificial intelligence powered drug discovery: efficient discovery of a novel CDK20 small molecule inhibitor // *Chem. Sci.* 2023. Vol. 14, № 6. P. 1443–1452.

181. Ivanenkov Y.A., Polykovskiy D., Bezrukov D., Zagribelnyy B., Aladinskiy V., Kamyra P., et al. Chemistry42: An AI-driven platform for molecular design and optimization // *J. Chem. Inf. Model.* 2023. Vol. 63, № 3. P. 695–701.

182. Pun F.W., Leung G.H.D., Leung H.W., Rice J., Schmauck-Medina T., Lautrup S., et al. A comprehensive AI-driven analysis of large-scale omic datasets reveals novel dual-purpose targets for the treatment of cancer and aging // *Aging Cell.* 2023. Vol. 22, № 10. P. e14017.

183. Nayak D., Tripathi N., Kathuria D., Siddharth S., Nayak A., Bharatam P.V., et al. Quinacrine and curcumin synergistically increased the breast cancer stem cells

death by inhibiting ABCG2 and modulating DNA damage repair pathway // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2020. Vol. 119. P. 105682.

184. Das B., Sethy C., Chatterjee S., Dash S.R., Sinha S., Paul S., et al. Quinacrine inhibits cMET-mediated metastasis and angiogenesis in breast cancer stem cells // *J. Cell Commun. Signal.* 2023. Vol. 17, № 4. P. 1371–1388.

185. Oien D.B., Ray U., Pathoulas C.L., Jin L., Thirusangu P., Jung D., et al. Quinacrine induces nucleolar stress in treatment-refractory ovarian cancer cell lines // *Cancers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 18. P. 4645.

186. Pineda B. Quinacrine, an old drug with potentially usefull in the treatment for COVID-19 // *Arch. Med. Res.* 2021. Vol. 52, № 8. P. 858–859.

187. Gurova K.V., Hill J.E., Guo C., Prokvolit A., Burdelya L.G., Samoylova E., et al. Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-kappaB-dependent mechanism of p53 suppression in tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102, № 48. P. 17448–17453.

188. Preet R., Mohapatra P., Mohanty S., Sahu S.K., Choudhuri T., Wyatt M.D., et al. Quinacrine has anticancer activity in breast cancer cells through inhibition of topoisomerase activity // *Int. J. Cancer.* 2012. Vol. 130, № 7. P. 1660–1670.

189. Preet R., Siddharth S., Satapathy S.R., Das S., Nayak A., Das D., et al. Chk1 inhibitor synergizes quinacrine mediated apoptosis in breast cancer cells by compromising the base excision repair cascade // *Biochem. Pharmacol.* 2016. Vol. 105. P. 23–33.

190. Torrecilla I., Oehler J., Ramadan K. The role of ubiquitin-dependent segregase p97 (VCP or Cdc48) in chromatin dynamics after DNA double strand breaks // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017. Vol. 372, № 1732. P. 20160282.

191. Tu L.C., Yan X., Hood L., Lin B. Proteomics analysis of the interactome of N-myc downstream regulated gene 1 and its interactions with the androgen response program in prostate cancer cells // *Mol. Cell. Proteomics.* 2007. Vol. 6, № 4. P. 575–588.

192. Xu S., Gao R., Zhou Y., Yang Y., Zhang Y., Li Q., et al. Clinical diagnostic and prognostic potential of NDRG1 and NDRG2 in hepatocellular carcinoma patients // *Front. Oncol.* 2022. Vol. 12. P. 862216.

193. Dai T., Dai Y., Murata Y., Husni R.E., Nakano N., Sakashita S., et al. The prognostic significance of N-myc downregulated gene 1 in lung adenocarcinoma // *Pathol. Int.* 2018. Vol. 68, № 4. P. 224–231.

194. Lee J.S., Das A., Jerby-Arnon L., Arafeh R., Auslander N., Davidson M., et al. Harnessing synthetic lethality to predict the response to cancer treatment // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 2546.
195. Apaolaza I., San José-Eneriz E., Tobalina L., Miranda E., Garate L., Agirre X., et al. An in-silico approach to predict and exploit synthetic lethality in cancer metabolism // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. P. 459.
196. Srivas R., Shen J.P., Yang C.C., Sun S.M., Li J., Gross A.M., et al. A network of conserved synthetic lethal interactions for exploration of precision cancer therapy // *Mol. Cell.* 2016. Vol. 63, № 3. P. 514–525.
197. Gruener R.F., Ling A., Chang Y.-F., Morrison G., Geeleher P., Greene G.L., et al. Facilitating drug discovery in breast cancer by virtually screening patients using in vitro drug response modeling // *Cancers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 4. P. 885.
198. Cortés-Ciriano I., van Westen G.J.P., Bouvier G., Nilges M., Overington J.P., Bender A., et al. Improved large-scale prediction of growth inhibition patterns using the NCI60 cancer cell line panel // *Bioinformatics*. 2016. Vol. 32, № 1. P. 85–95.
199. Silva V.A.O., Rosa M.N., Tansini A., Oliveira R.J.S., Martinho O., Lima J.P., et al. In vitro screening of cytotoxic activity of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer-derived cell lines // *Exp. Ther. Med.* 2018. Vol. 16, № 1. P. 557–566.
200. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines // *J. Natl. Cancer Inst.* 1991. Vol. 83, № 11. P. 757–766.
201. Eriksson A., Chantzi E., Fryknäs M., Gullbo J., Nygren P., Gustafsson M., et al. Towards repositioning of quinacrine for treatment of acute myeloid leukemia - Promising synergies and in vivo effects // *Leuk. Res.* 2017. Vol. 63. P. 41–46.
202. Jing B., Jin J., Xiang R., Liu M., Yang L., Tong Y., et al. Vorinostat and quinacrine have synergistic effects in T-cell acute lymphoblastic leukemia through reactive oxygen species increase and mitophagy inhibition // *Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9, № 6. P. 589.
203. Wu L., Chatla S., Lin Q., Chowdhury F.A., Geldenhuys W., Du W. Quinacrine-CASIN combination overcomes chemoresistance in human acute lymphoid leukemia // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 6936.
204. Mao Z., Sun J., Feng B., Ma J., Zang L., Dong F., et al. The metastasis suppressor, N-myc downregulated gene 1 (NDRG1), is a prognostic biomarker for

human colorectal cancer // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 7. P. e68206.

205. Ahmed D., Eide P.W., Eilertsen I.A., Danielsen S.A., Eknæs M., Hektoen M., et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines // *Oncogenesis*. 2013. Vol. 2, № 9. P. e71.

206. Sinicrope F.A. DNA mismatch repair and adjuvant chemotherapy in sporadic colon cancer // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 7, № 4. P. 174–177.

207. Gallant J.-N., Allen J.E., Smith C.D., Dicker D.T., Wang W., Dolloff N.G., et al. Quinacrine synergizes with 5-fluorouracil and other therapies in colorectal cancer // *Cancer Biol. Ther.* 2011. Vol. 12, № 3. P. 239–251.

208. Islam M., Anvarbatcha R., Kunnathodi F., Athar M.T., Tariq M. Quinacrine enhances the efficacy of cisplatin by increasing apoptosis and modulating cancer survival proteins in a colorectal cancer cell line // *J. Cancer Res. Ther.* 2023. Vol. 19, № 8. P. 1988–1997.

209. Mohapatra P., Preet R., Das D., Satapathy S.R., Choudhuri T., Wyatt M.D., et al. Quinacrine-mediated autophagy and apoptosis in colon cancer cells is through a p53- and p21-dependent mechanism // *Oncol. Res.* 2012. Vol. 20, № 2-3. P. 81–91.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность своим научным руководителям - Осипову Андреяну Николаевичу и Озерову Ивану Витальевичу за ценные советы, постоянную поддержку, внимание к деталям и неоценимую помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Автор выражает благодарность сотрудникам Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН - Каменцевой Ольге Владимировне, Кострову Андрею Николаевичу и Надточенко Виктору Андреевичу за помощь в учебном процессе, консультации по научным вопросам и всестороннюю поддержку.

Автор искренне благодарит учёного секретаря диссертационного совета МГУ.014.6 Северина Александра Валерьевича за помощь в подготовке документов к защите, а также членов диссертационного совета за предоставленную возможность представить результаты диссертационной работы в стенах Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Отдельная благодарность выражается коллегам и соавторам публикаций за плодотворное сотрудничество, обмен опытом и совместную работу над научными проектами.

Автор также сердечно благодарит свою семью и друзей за неизменную поддержку, понимание и веру в успех, которые были важнейшей опорой на протяжении всего периода работы над диссертацией.