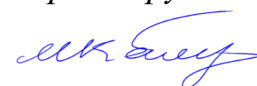


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Камынина Маргарита Игоревна

**Анализ роли белков-транспортеров цинка и марганца как прогностических
и диагностических маркеров в колоректальном раке**

1.5.3. Молекулярная биология

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН

Буздин Антон Александрович

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Секачева Марина Игоревна

Москва - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ИОНОВ ЦИНКА И МАРГАНЦА В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	16
1.1. Ионы переходных металлов в организме человека	16
1.2. Регуляция Zn/Mn гомеостаза.....	18
1.2.1. Zn, Mn и реакции детоксикации реактивных форм кислорода	19
1.2.2. Клеточное распределение Mn и его токсичность	22
1.2.3. Регуляция гомеостаза и токсичности Zn	25
1.2.4. Транспорт Zn и Mn.....	26
1.2.5. Транспорт Zn и Mn и канцерогенез.....	29
1.2.6. Регуляция транскрипции под действием Zn и Mn.....	31
1.2.7. Mn- и Zn-опосредованные пути передачи сигнала.....	33
1.2.8. Различия в воздействии Mn и Zn на нормальные и раковые клетки	36
1.3. Влияние Zn и Mn на путь cGAS-STING, иммунный ответ и канцерогенез.....	36
1.4. Роль гена KRAS в канцерогенезе при колоректальном раке.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1. Ведение клеточных линий.....	47
2.2. Получение мутантных клеток с нокаутом в изучаемых генах методом CRISPR/Cas9	47
2.3. Получение стабильных клеточных линий со сверхэкспрессией интересующих генов	51
2.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	55
2.5. Вестерн блоттинг.....	55
2.6. Флуоресцентная микроскопия	56
2.7. Измерение скорости роста клеток	56
2.8. Измерение восстанавливающего потенциала в клетках	57
2.9. Измерение концентраций полуингибирования IC ₅₀ препаратов.....	58
2.10. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла.....	59

2.11. Анализ накопления микроэлементов в клетках	59
2.12. Подготовка библиотек и секвенирование РНК	60
2.13. Обработка данных РНК-секвенирования	61
2.14. Статистический анализ	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	64
3.1. Оценка уровней экспрессии генов семейств SLC30A и SLC39A	64
3.2. Создание и характеристика клеточных линий с нокаутами генов <i>SLC39A8</i> и <i>SLC39A14</i>	67
3.3. Создание и характеристика клеточных линий, сверхэкспрессирующих гены <i>SLC39A8</i> , <i>SLC30A3</i> и <i>SLC30A10</i>	73
3.4. Визуализация накопления Zn при нокауте и сверхэкспрессии SLC генов	78
3.5. Анализ микроэлементного состава трансгенных линий клеток с нокаутом в генах, отвечающих за метаболизм Zn^{2+} и Mn^{2+}	81
3.6. Влияние измененной экспрессии генов семейства SLC30A и SLC39A на чувствительность раковых клеток к противоопухолевым препаратам	85
3.7. Профилирование экспрессии мРНК в клетках HCT-15 и HuTu80 с нокаутированными или сверхэкспрессированными генами семейства SLC30A и SLC39A	94
3.8. Анализ транскриптома при сверхэкспрессии <i>SLC30A3</i>	96
3.9. Анализ транскриптома при сверхэкспрессии <i>SLC30A10</i>	99
3.10. Анализ транскриптома при нокауте <i>SLC39A14</i>	101
3.11. Анализ транскриптома при нокауте и сверхэкспрессии гена <i>SLC39A8</i> в модельных клеточных линиях колоректального рака KRAS – дикого типа HuTu80	105
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121
ПРИЛОЖЕНИЕ А	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Среди регуляторов процессов, определяющих опухолевый фенотип, находится гомеостаз ионов металлов, прежде всего - цинка и марганца. Например, входя в состав фермента супероксиддисмутазы, в частности, Cu/Zn-SOD1 - в цитоплазме и Mn-SOD2 - в митохондриях, Zn^{2+} и Mn^{2+} могут участвовать в пути внутриклеточной детоксикации [1]. Влияние этих ионов проявляется в сигнальном пути апоптоза, индуцируемом активными формами кислорода, которые генерируются митохондриями, в регуляции транскрипции и модуляции сигнального пути cGAS-STING, который опосредует иммунный ответ. В недавних исследованиях было показано, что в ряде опухолей, включая колоректальный рак, наблюдается нарушение экспрессии генов-транспортеров, регулирующих внутриклеточные уровни Zn^{2+} и Mn^{2+} [2, 3, 4]. Это определяет немаловажную роль гомеостаза этих ионов в прогрессировании рака.

Согласно литературным и биоинформатическим данным транспортёры семейств SLC30A (ZnT-белки, отвечают за экспорт Zn^{2+}/Mn^{2+} во внеклеточное пространство) и SLC39A (ZIP-белки, отвечают за импорт Zn^{2+}/Mn^{2+} во внутриклеточное пространство), находятся среди наиболее изменённых генов в опухолях [5, 6]. А отдельные представители семейств (гены *SLC30A10*, *SLC30A3*, *SLC39A14*, *SLC39A8*) связаны с такими важными молекулярными процессами, как метаболическая перестройка, окислительный стресс, являются участниками в сигнальных путях EGFR/ERK и cGAS-STING, а также способны влиять на эпигенетические изменения. Тем не менее, функциональные последствия модификации этих транспортеров для опухолевой клетки, в особенности для её чувствительности к химиопрепаратам, так и остаются недостаточно изученными.

В данной работе впервые выполнено комплексное исследование эффектов сверхэкспрессии и нокаута четырёх ключевых транспортеров Zn^{2+}/Mn^{2+} в

модельных клеточных линиях колоректального рака. Показано, что изменение баланса импорта и экспорта цинка вызывает перестройку транскрипционного профиля, влияя на митохондриальное дыхание, окислительный стресс, регуляцию клеточного цикла и пути репарации ДНК. Сверхэкспрессия *SLC30A10* индуцирует устойчивость к токсичности цисплатина, тогда как повышение экспрессии гена *SLC30A3*, напротив, усиливает чувствительность клеток к терапии цисплатином. Нокауты ZIP-транспортёров приводят к компенсаторным метаболическим сдвигам, затрагивающим антиоксидантные системы и сигнальные пути выживания.

Таким образом, гены семейств SLC30A и SLC39A могут быть выделены как потенциальные диагностические маркеры и/или терапевтические мишени при злокачественных опухолях, локализующихся в толстом кишечнике или прямой кишке. В результате исследования можно предположить и дальнейшее изучение потенциальной возможности фармакологической коррекции цинкового гомеостаза для повышения эффективности химиотерапии. Предполагается, что модуляция цинкового гомеостаза — фармакологическая или диетическая — может усиливать действие химиотерапии лишь в тех случаях, когда она изменяет баланс активности соответствующих транспортеров, а не просто повышает доступность микроэлемента. Таким образом, перспективным направлением является персонализированная коррекция работы цинковых транспортеров, а не универсальное увеличение поступления цинка, которое широко исследуется в клинических испытаниях. Такой подход потенциально позволяет повысить результативность терапии и снизить риск лекарственной резистентности у пациентов с опухолями, характеризующимися нарушениями экспрессии генов семейств SLC30A/SLC39A.

Степень разработанности темы исследования

Транспортёры (переносчики) растворённых веществ (англ. Solute carrier family), сокращенно SLC – это второе по величине семейство мембранных белков в геноме человека, которое отвечает за транспорт широкого спектра субстратов,

таких как питательные вещества, органические и неорганические ионы. Представители этого суперсемейства присутствуют во всех клеточных мембранах и внутриклеточных мембранах органелл, за исключением ядерной мембраны [7]. Белки SLC контролируют ключевые физиологические функции, и их роль в канцерогенезе противоречива, так как они могут выступать в роли как супрессоров опухолей [2, 3], так и онкогенов [4]. Например, опухолеподавляющая функция SLC может быть связана с ингибированием деацетилазы гистонов (HDAC) и регуляцией внутриклеточного pH [8]. Онкогенная функция белков-транспортеров в основном касается переноса цинка, например, многие раковые клетки могут поглощать цинк из крови или опухолевого микроокружения, что способствует росту опухоли и ее метастазированию [9]. В последние годы роль генов семейства SLC в процессе канцерогенеза привлекает все больше внимания. Некоторые из представителей SLC значительно активируются в опухолевых клетках, что, по-видимому, связано с повышенными потребностями раковой клетки в энергии и питании [10].

Поддержание гомеостаза марганца и цинка в клетке регулируется белками-представителями семейств транспортеров SLC30A (белки ZnT) и SLC39A (белки Zip) вместе с металлопротеинами. Оба семейства транспортеров изначально считались специфичными только для переноса ионов цинка, причем ZnT транспортеры отвечают за перенос ионов из клетки во внеклеточное пространство, а Zip белки – за транспорт ионов внутрь клеток [11]. Из 14 представителей семейства SLC39A, были идентифицированы переносчики, особенно специфичные не только к ионам цинка, но и марганца: *SLC39A8*, *SLC39A14* [12]. Семейство SLC30 состоит из 10 представителей. Среди них, для *SLC30A10* и *SLC30A3* (в виде гетеродемера) было также показано участие в транспорте не только ионов Zn, но и Mn [13]. Эти ионы играют важную роль во многих видах рака, поскольку, являясь элементами, входящими в состав белков, клеточных ферментов и факторов транскрипции, они регулируют клеточный цикл, реакцию на окислительный стресс, процесс репликации и восстановления ДНК, а также апоптоз [8, 14, 15]. Известно, что ионы марганца могут ингибировать ацетилирование гистонов H3 и H4, повышая активность HDAC и понижая активность гистоновых

ацетилтрансфераз (НАТ) в клетках нейронов. Деацетилирование гистонов в конечном итоге приводит к репрессии транскрипции и индукции апоптоза [16]. Тем не менее, механизмы участия Zn и Mn в прогрессии, инвазии, росте, метастазировании и реакции опухоли на терапию сравнительно мало изучены, роль этих ионов в процессе канцерогенеза требует дальнейшего внимания со стороны научного сообщества [1].

Молекулярная функция белка *SLC30A10* - ZnT10 заключается в выведении ионов Zn^{2+} и Mn^{2+} из клетки. Кроме того, он участвует в предотвращении марганец-индуцированной апоптотической гибели клеток через вызванную реактивными формами кислорода (РФК) дисфункцию митохондрий. А также обеспечивает транспорт цинка в ранние эндосомы и рециркуляцию эндосом для предотвращения токсичности соединений цинка [13, 17, 18, 19, 20].

Следует отметить, что при раке шейки матки экспрессия известного паралога *SLC30A10* - гена *SLC30A1*, который также опосредует выведение ионов Zn и, возможно, кальция, но не Mn [21], положительно коррелирует с экспрессией *SLC30A10* [9].

Еще одной важной функцией *SLC30A10* является обусловленная транспортером цинка регуляция пути передачи сигнала через регуляторный путь EGFR/ERK в эндосомах путем гетеродимеризации с другим белком-транспортером цинка - *SLC30A3* [22, 23, 24]. Важно отметить, что профиль экспрессии *SLC30A3* при колоректальном раке (КРР) (экспрессия понижена в 92% образцов) коррелирует с *SLC30A10* [1]. Механизм подавления экспрессии *SLC30A3* при КРР в настоящее время мало изучен. В отличие от гена *SLC30A10*, для которого в большинстве случаев КРР показана модификация в виде метилирования основной части гена, и в меньшей степени – CpG-островков его промотора [25, 26], согласно базе данных COSMIC (COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. URL: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (дата обращения: 31.05.2024)), его можно объяснить метилированием только в ~7 % случаев, что, вероятно, подразумевает наличие других, не связанных с метилированием, механизмов подавления экспрессии.

Обнаружение нарушений в экспрессии или мутаций в генах, кодирующих ионные переносчики, и соответствующих изменений уровней накопления Mn^{2+} и Zn^{2+} в опухолях позволяет предположить, что эти ионы играют важную роль в прогрессировании рака. В исследованиях было выявлено, что изменения экспрессии генов, кодирующих белки-транспортеры ионов цинка и марганца, происходят координированно в некоторых видах рака (простаты, шейки матки) [27, 28, 29, 30]. Эти изменения указывают на то, что в регуляции роста раковых клеток, их метастазирования и уклонения от иммунного ответа существуют некоторые специфические механизмы, на которые влияют оба этих иона. Как упоминалось ранее, влияние цинка и марганца проявляется в сигнальном пути апоптоза, индуцируемом активными формами кислорода, которые генерируются митохондриями, и в регуляции транскрипции и модуляции сигнального пути cGAS-STING, который опосредует иммунный ответ [31]. Оба элемента влияют на прогрессирование рака и оказывают воздействие на эффективность лечения в животных моделях, а в клинических испытаниях уже активно изучается эффективность добавок Zn и Mn [32, 33, 34, 35].

Цель и задачи исследования

Основной целью данной диссертации является исследование роли инактивации и принудительной сверхэкспрессии генов семейств SLC30A/SLC39A в клетках KPP. В соответствии с целью исследования были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Создать векторы для сверхэкспрессии на основе лентивирусов и для нокаута генов с помощью CRISPR/Cas9 по генам *SLC30A10*, *SLC30A3*, *SLC39A8* и *SLC39A14* в модельных клеточных линиях KPP – HCT-15 и HuTu80;
2. Провести трансдукцию/трансфекцию модельных линий KPP векторами для сверхэкспрессии и нокаута генов *SLC30A10*, *SLC30A3*, *SLC39A8* и *SLC39A14* и валидацию успешно внесенных мутаций;

3. Провести РНК-секвенирование образцов модельных клеточных линий KPP с/без активирующих и инактивирующих изменений в экспрессии генов *SLC30A/SLC39A*;

4. Проанализировать результаты транскриптомного профилирования модельных линий KPP со сверхэкспрессией/нокаутом в генах *SLC30A10*, *SLC30A3*, *SLC39A8* и *SLC39A14*, установить дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ), термины Генных Онтологий (GO), уровни активации молекулярных путей (PAL) в ответ на внесенные изменения;

5. Проанализировать микроэлементный состав образцов модельных клеточных линий KPP с/без активирующих и инактивирующих изменений в экспрессии генов *SLC30A/SLC39A*;

6. Провести скрининг жизнеспособности образцов модельных клеточных линий KPP с/без измененной регуляции генов *SLC30A3*, *SLC30A10*, *SLC39A8*, *SLC39A14* и охарактеризовать их рост, распределение клеток по фазам клеточного цикла, измерить активность митохондрий, исследовать распределение цинка внутри клеток;

7. Исследовать влияние принудительной сверхэкспрессии или инактивации генов семейств *SLC30A/SLC39A* на чувствительность раковых клеток к терапии, установить концентрации полуингибирования роста препаратов для модельных клеточных линий с внесенными мутациями;

8. Провести статистический анализ пула выявленных биомаркеров относительно прогноза заболевания.

Научная новизна

В данной работе впервые было исследовано, влияет ли сверхэкспрессия или инактивация генов семейства *SLC30A* и *SLC39A* на фенотип раковых клеток и их чувствительность к противораковым препаратам. В клеточных линиях аденокарциномы толстой кишки человека HCT-15 с *KRAS*-мутацией и клеточной линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu80 с мутацией

CTNNB1 были получены клоны с нокаутами генов *SLC39A8* и *SLC39A14* и принудительной сверхэкспрессией генов *SLC30A3*, *SLC30A10* и *SLC39A8*. Экспрессию генов в мутантных и контрольных клетках оценивали с помощью секвенирования РНК. Скорость роста клеток, метаболическая активность, накопление цинка и чувствительность к препаратам цетуксимаб, винкристин, иматиниб и цисплатин были исследованы в функциональных тестах. Было обнаружено, что сверхэкспрессия или инактивация генов семейства *SLC30A* или *SLC39A* приводит к перестройке внутриклеточной сигнализации и провоцирует увеличение восстанавливающего потенциала в клетке. Изменения уровней экспрессии генов *SLC30A/SLC39A* оказывали различающееся в зависимости от клеточных линий влияние на изменение чувствительности к цетуксимабу, винкристину и иматинибу, но одинаково значимо изменяли чувствительность к цисплатину: сверхэкспрессия *SLC30A10* приводила к увеличению концентрации полуингибирования (IC_{50}) цисплатина в $\sim 2,7-4$ раза, а сверхэкспрессия *SLC30A3* - к снижению IC_{50} цисплатина в $\sim 3,3$ раза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные на основе обработки данных РНК-секвенирования результаты об изменении активации молекулярных путей и экспериментальные данные об изменении чувствительности к препарату цисплатин в следствии внесения мутаций в гены семейств *SLC30A/SLC39A* позволяют рассматривать гены *SLC30A/SLC39A* как потенциальные биомаркеры устойчивости к противораковым препаратам и предполагаемые терапевтические мишени в КРР. Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертации внедрены в учебный процесс кафедры медицинской генетики и постгеномных технологий Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин «Медицинская генетика», «Генетика», «Общая и медицинская генетика», читаемых студентам по направлениям подготовки 31.05.01. Лечебное дело, 32.05.01. Медико-

профилактическое дело, 30.05.01. Медицинская биохимия, 06.05.01. Биоинженерия и биоинформатика. Акт 597 от 24.02.2025 (Акт о внедрении результатов диссертации в учебный процесс).

Методология и методы исследования

Методическую базу диссертационной работы составили методы: CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования генома, изменения экспрессии генов лентивирусной трансдукцией, проточной цитофлуориметрии, высокопроизводительного секвенирования РНК, биоинформатического анализа транскриптомных данных, тестов по определению жизнеспособности и количества клеток, флуоресцентной микроскопии, иммуноблоттинга и статистического анализа.

Данные методы были использованы для создания изогенных клеточных моделей аденокарциномы кишечника человека (линии HCT-15 и HuTu80) с нокаутом или стабильной сверхэкспрессией генов-переносчиков цинка и марганца. В ходе исследования были охарактеризованы пролиферативная активность, восстановительный потенциал клеток, жизнеспособность в сравнении с клетками без внесенных мутаций и в ответ на препараты (расчет IC50), распределение клеточного цикла и внутриклеточная локализация ионов цинка в полученных линиях. Для исследования влияния нокаута/сверхэкспрессии целевых генов на трансформацию сигнальных путей был проведен сравнительный анализ транскриптомных профилей (RNA-seq) с последующей биоинформатической обработкой. Результаты обрабатывали и анализировали с использованием методов статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Изменение экспрессии генов семейств SLC30A и SLC39A приводит к нарушению внутриклеточного гомеостаза цинка, сопровождающегося его

перераспределением между цитоплазмой и внутриклеточными мембранными компартментами.

2. Изменение экспрессии генов семейств SLC30A и SLC39A сопровождается усилением восстанавливающего потенциала в клетках колоректального рака, что отражает перестройку их метаболической активности.

3. На основании биоинформатического анализа транскриптомных данных выявлена дифференциальная экспрессия генов семейств SLC30A и SLC39A между клетками с внесёнными генетическими изменениями и клетками дикого типа. Показана связь выявленных изменений с молекулярными путями регуляции апоптоза, клеточного стресс-ответа и с изменениями чувствительности клеток к лекарственным препаратам, что обосновывает возможность использования профилей экспрессии данных генов в качестве кандидатных диагностических маркеров.

4. Сверхэкспрессия гена *SLC30A10* снижает чувствительность клеток колоректального рака к цисплатину, тогда как сверхэкспрессия *SLC30A3*, напротив, усиливает чувствительность клеток к терапии цисплатином.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют направлениям исследований Паспорта научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология (отрасль науки – биологические, медицинские) пунктов 3, 11 и 13: п. 3 «Структура геномов, геномика, эпигеномика и транскриптомика. Биоинформатические методы анализа баз данных последовательностей ДНК, РНК и белков, в том числе при патологии у человека», п. 11 «Молекулярные основы патологий, в том числе канцерогенеза, иммунодефицитов, аутоиммунных, нейродегенеративных и других заболеваний животных и человека», п. 13 «Генная, белковая и клеточная инженерия, геномное конструирование».

Также научные положения диссертации соответствуют Паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследований

пункта 2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)».

Степень достоверности и апробация результатов

Все экспериментальные данные были получены с использованием современного и высокоточного оборудования, что позволяет считать полученные результаты исследования достоверными. Статистическая обработка результатов проводилась в программе GraphPad Prism 8.0.1 по расчету критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием теста Тьюки для сравнения переменных и расчета р-значений для определения статистически значимых различий в средних значениях. Для анализа данных транскриптома была применена среда R, что также подтверждает современный подход к статистической обработке. Также экспериментальные данные согласуются с уже опубликованными статьями в данной области исследования об участии белков-транспортеров цинка и марганца в канцерогенезе, характеристике локализации этих белков и способности к переносу цинка. В диссертационной работе были использованы современные методики сбора и обработки исходной информации в специализированных программах, таких как GraphPad Prism и среда программирования R, что обеспечивает высокую степень научной обоснованности. Экспериментальные методы, зарекомендовавшие себя в многочисленных научных трудах, выбирались в зависимости от поставленной задачи и проводились с достаточным числом биологических повторений, что гарантирует репрезентативность и воспроизводимость полученных результатов.

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании Института персонализированной онкологии и Института трансляционной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.

Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), зафиксирована под протоколом № 85.03.01/2025-09 от 18.09.2025 г.

Результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены в рамках X Всероссийской научной молодежной школы-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, 2024), на XV Международной научной конференции SCIENCE4HEALTH (Москва, 2024), на XX Международной (XXIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2025).

Личный вклад автора

Автор данной работы активно участвовал в поиске и анализе литературных источников, на основе которых разрабатывалась исследовательская стратегия. Автор осуществлял разработку и создание экспериментальных моделей клеточных линий колоректального рака, включая проектирование CRISPR/Cas9-конструкций, проведение трансфекции клеток, а также молекулярно-генетическую валидацию полученных линий. Автор принимал участие в экспериментах по оценке экспрессии генов, транскриптомному профилированию и биоинформатическому анализу данных с определением дифференциально экспрессированных генов, анализом генных онтологий и уровней активации молекулярных путей. Автором проведены исследования функциональных характеристик опухолевых клеток *in vitro*, включая анализ пролиферации, распределения по фазам клеточного цикла, митохондриальной активности, внутриклеточного распределения ионов цинка, а также оценку чувствительности к противоопухолевым препаратам с расчётом показателей IC_{50} и статистической обработкой результатов. Автор занимался теоретическим анализом, подготовкой и написанием публикаций по теме исследования, выступлением на конференциях, осуществлял написание текста диссертации.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования опубликовано 7 работ, в том числе 3 научные статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, PubMed, 4 публикации в сборниках материалов всероссийских и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук изложена на 163 страницах и состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, а также одиннадцати глав с результатами собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения А. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 11 таблицами. Список литературы содержит 257 литературных источника, из которых 253 зарубежных источника и 4 источника отечественной литературы.

ГЛАВА 1. РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ИОНОВ ЦИНКА И МАРГАНЦА В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Ионы переходных металлов в организме человека

Переходные металлы, включая железо, марганец и цинк, участвуют в многочисленных биохимических реакциях. Согласно периодической таблице, Mn находится рядом с Fe, имея схожий размер атомов и электронную конфигурацию внешних орбиталей (Mn: 127 пм, 3d⁵ 4s² и Fe: 128 пм, 3d⁶ 4s²), что позволяет предположить схожие, но не идентичные химические свойства. В биологически значимом состоянии ионизации 3⁺, ионные радиусы и электронные конфигурации также схожи: Mn³⁺: 72 пм 3d⁴ и Fe³⁺: 69 пм, 3d⁵. Напротив, Zn (нейтральный атом цинка, который не имеет заряда): 134 пм, 3d¹⁰ 4s² имеет самую высокую энергию ионизации среди переходных металлов того же периода, а Zn²⁺, имеющий электронную конфигурацию 3d¹⁰, по распространенности в биологических системах среди переходных элементов и элементов II группы уступает только железу. Он присутствует во всех формах жизни и незаменим для них [36, 37, 38]. В природе низкая энергия окисления переходных металлов используется для облегчения биохимических реакций, включающих перенос электронов или восстановление молекул в таких процессах, как дезактивация РФК и продуцирование энергии митохондриями. Цинк играет ключевую роль в митохондриальном транспорте пирувата, а также в процессах окислительного фосфорилирования, углеводного и липидного обмена, способствуя тем самым оптимизации энергетического обмена клетки [39]. Белки взаимодействуют с переходными металлами путем так называемых координационных связей: кислые аминокислотные остатки образуют нековалентные взаимодействия с ионами переходных металлов, создавая тем самым стабильные структуры, такие как гем в гемоглобине и цинковые пальцы факторов транскрипции. В целом, поскольку Fe³⁺ и Mn³⁺ гораздо более электрофильны, чем Zn²⁺, первые (Fe³⁺ и Mn³⁺) часто используются в качестве акцепторов электронов, тогда как Zn²⁺ преимущественно

используется как координационный металл и редко как кофактор [40]. Fe^{3+} более распространенный ион металлов на Земле [40], и, возможно, поэтому гораздо больше ферментов человека используют Fe^{3+} в качестве координирующего металла; однако нескольким ферментам требуется именно Zn^{2+} или Mn^{2+} [41].

Для нормального функционирования клеткам необходима определенная, функционально «правильная» комбинация микроэлементов [42]. Так, избыток Mn^{2+} приводит к цитотоксичности из-за накопления в митохондриях [43], это связано с ингибированием митохондриальных ферментов [44, 45] и перепроизводством H_2O_2 митохондриальной супероксиддисмутазой [46]. Подобно Mn^{2+} , Zn^{2+} накапливается в митохондриях [47, 48], внутриклеточных везикулах [49], эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи [50, 51]. Соответственно, воздействие высоких концентраций Zn^{2+} перегружает внутриклеточные депо и вызывает дисфункцию митохондрий и апоптоз через индуцирование связывания белка DRP1 в митохондриях [52, 53, 54, 55]. Напротив, показано, что уменьшение внутриклеточной концентрации Zn^{2+} в нормальных клетках может оказывать антиоксидантное и даже антиапоптотическое действие [56, 57, 58].

Низкие концентрации Mn и Zn необходимы для нормального функционирования клеток, в том числе для их пролиферативной активности [57], как ингибирования клеточной гибели [58], так и индукции клеточной гибели [53], регуляции транскрипции [16], гомеостаза РФК [46, 59, 60], более того, показано влияние Mn и Zn на процессы дифференцировки для кератиноцитов [61]. Для поддержания и регулирования концентраций Mn и Zn существует множество механизмов, основные из них: специализированные ионные каналы [62, 63], металлотионеины и глутатионовые буферные системы [64], а также накопление ионов в везикулах, для их последующего выведения из клеток [49, 65, 66].

Доказано, что изменения в гомеостазе Mn и Zn связаны с такими патологическими состояниями, как сердечно-сосудистые заболевания [32, 67], нейродегенеративные расстройства [68] и расстройства аутистического спектра [69, 70]. И только недавно стало очевидно, что изменения уровней Zn и Mn могут быть фактором, влияющим на канцерогенез, например, при раке простаты [71, 72],

колоректальном раке [30, 73], раке легкого [27], глиобластоме [74] и других нозологиях [39]. Мутации и измененная экспрессия ионных переносчиков, регулирующих гомеостаз Zn и Mn, являются отличительными признаками многих видов рака [9, 75, 76]. Интересно, что в раковых опухолях часто наблюдаются скоординированные изменения в переносчиках ионов Zn^{2+} и Mn^{2+} [9, 31], хотя то, как это влияет на ионный гомеостаз или способствует росту рака, еще предстоит изучить. Кроме того, изменения уровней Mn и Zn влияют на эффективность противораковой терапии, и в настоящее время проводится несколько клинических испытаний [53, 77, 78, 79]: комбинация приема хлорида марганца с терапией анти-PD-1 антителами при лечении пациентов с нерезектабельными/метастатическими солидными опухолями или лимфомами (clinical trial.gov: NCT03991559. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03991559> (дата обращения: 03.03.2022)); и оценка терапевтического потенциала цинка в комбинации с темозоломидом при глиобластоме (NCT04488783. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04488783> (дата обращения: 03.03.2022)). Далее мы рассмотрим механизмы Zn- и Mn-опосредованных взаимодействий, которые влияют на клеточный метаболизм при развитии рака и связаны с новыми диагностическими и терапевтическими приложениями [80, 81, 82].

1.2. Регуляция Zn/Mn гомеостаза

Как уже говорилось во Введении, изменение концентрации Mn и Zn влияет на жизнеспособность клеток. Теперь будет рассмотрено подробнее, как устроено поддержание гомеостаза ионов на основе регуляции концентраций Mn и Zn. Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо проанализировать несколько эффектов, связанных с гомеостазом Mn и Zn. В первую очередь, каково внутриклеточное распределение Mn и Zn, каков диапазон свободных и связанных с белками концентраций этих ионов в клетках, и как эти концентрации регулируются? Во-вторых, что известно о биофизических механизмах Mn- и Zn-регулируемой биологической активности внутри клеток, таких как сродство белков к Mn или Zn

и константы скорости реакций. Наконец, что известно о влиянии Mn и Zn на биологические процессы, связанные с канцерогенезом.

1.2.1. Zn, Mn и реакции детоксикации реактивных форм кислорода

Митохондриальное дыхание играет ключевую роль в прогрессии рака, в первую очередь за счет избыточного образования реактивных форм кислорода (РФК) в раковых клетках. Это чрезмерное накопление РФК не только способствует нестабильности генома, но и изменению экспрессии генов и участвует в важнейших сигнальных путях, способствующих развитию опухоли [83]. Как известно, митохондрии являются важнейшими метаболическими органеллами. Посредством окислительного фосфорилирования в них производится энергия для клетки, при этом одновременно генерируется РФК в качестве побочного продукта [84]. При участии митохондрий также осуществляется контроль апоптоза, в том числе с помощью индукции поры неспецифической проницаемости (mPTP) в митохондриях [85]. Чрезмерное количество РФК оказывает значительное влияние на ферменты дыхательной цепи и повреждает или разрушает митохондриальную антиоксидантную систему. Эти изменения могут способствовать активации онкогенных путей, подавлению апоптоза и увеличению мутационной нагрузки на клетку, создавая тем самым условия для прогрессии рака [86, 87]. Кроме того, окислительное повреждение, вызванное РФК, может привести к мутациям как в митохондриальной, так и в ядерной ДНК, что приводит к нарушениям процессов окислительного фосфорилирования [88]. Это нарушение приводит к последующему образованию РФК, таким образом, замыкается «круг», в котором взаимосвязаны дисфункция митохондрий, нестабильность генома и развитие рака. Этот цикл губительно воздействует на организм, поскольку повышенный уровень РФК может способствовать изменению метилирования ДНК и модификации гистонов в раковых клетках [89, 90]. РФК могут вызывать сайт-специфическое гиперметилирование ДНК за счет увеличения экспрессии ДНК-метилтрансфераз, либо гипометилирование ДНК за счет ингибирования метилирования ДНК в

соседних цитозиновых остатках окисленной формой ДНК - 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозином, в то время как другая окисленная форма ДНК – 5-гидроксиметилцитозин – может способствовать процессам активного деметилирования ДНК [91]. Гипометилирование ведет к активации онкогенов, которые в метилированом состоянии неактивны в клетке, тогда как гиперметилирование (обычно CpG островков промоторов) выводит из транскрипционно активного состояния гены-супрессоры опухолей [25, 92, 93]. Кроме того, в недавних исследованиях мы показали значимость изучения митохондриальной активности в контексте канцерогенеза, так как лечение ингибиторами тирозинкиназ, такими как лапатиниб, может приводить к повышению уровня белков, связанных с функцией митохондрий и метаболическими путями, связанными с циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) [94].

Важно отметить, что Zn^{2+} и Mn^{2+} могут катализировать восстановление супероксида до H_2O_2 с помощью супероксиддисмутазы, Cu/Zn-СОД1 - в цитоплазме и Mn-СОД2 - в митохондриях [95], представляя собой основной путь детоксикации в клетках (рисунок 1) [36, 42, 46].

Супероксиддисмутаза
(СОД)

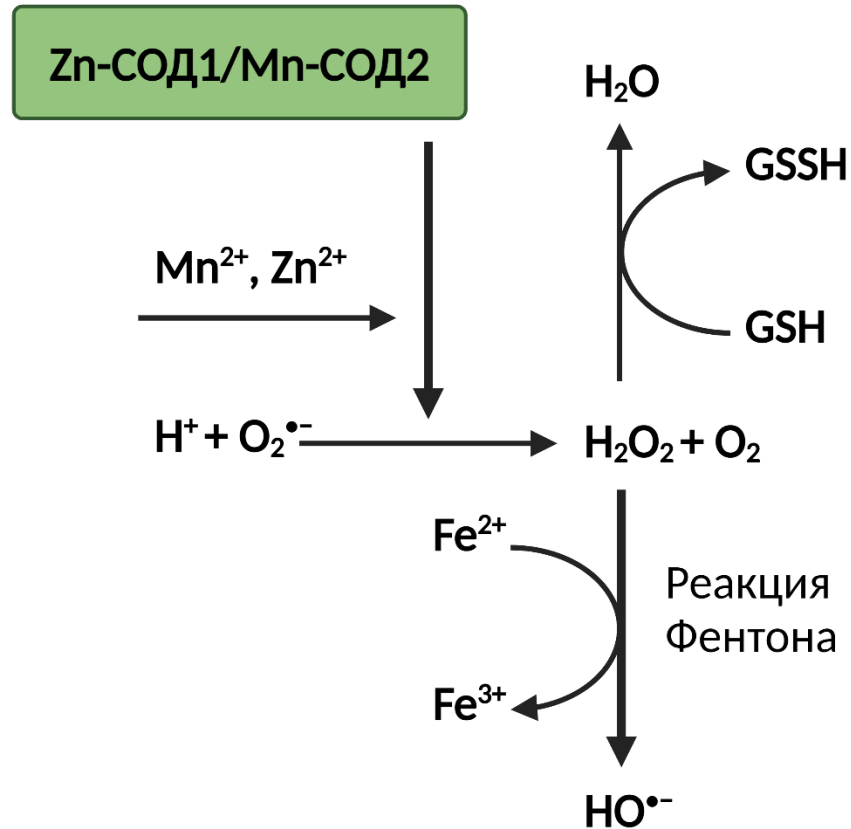


Рисунок 1 – Супероксиддисмутаза с помощью ионов Cu^{2+} или Zn^{2+} и Fe^{3+} или Mn^{2+} катализируют восстановление супероксида $\text{O}_2^{\bullet-}$ до перекиси водорода H_2O_2 [46, 96]. В свою очередь, в реакции Фентона перекись водорода преобразуется в гидроксильный радикал $\bullet\text{OH}$ и гидроксид-ионы OH^- [97]. Кроме того, перекись водорода превращается в воду под действием восстановленного глутатиона (GSH), пероксиредоксинов (антиоксидантных ферментов) и каталазы

Одно из важных различий между Mn^{2+} и Fe^{2+} заключается в том, что Fe^{2+} катализирует реакцию Фентона с образованием свободного радикала $\text{HO}^{\bullet}$ [98, 99], тогда как Mn^{2+} этого не делает. Таким образом, конкуренция Mn^{2+} с Fe^{2+} может частично обеспечить защиту от деградации рибосомальной РНК, вызванной окислением [100]. Однако митохондрии содержат около 16 мкМ свободного Fe^{2+} , который может участвовать в реакции Фентона, способствуя токсичности от избыточного образования H_2O_2 в митохондриях под действием Mn^{2+} , хотя избыточное образование РФК в митохондриях под действием обоих

двухвалентных ионов Mn^{2+} и Fe^{2+} является спорным [46, 97, 101, 102]. Недавно было обнаружено, что концентрация низкомолекулярных комплексов Mn^{2+} с ортофосфатами или пептидами является доминирующим фактором, предсказывающим выживаемость и эффективность репарации двунитевых разрывов после гамма-облучения бактерий, грибов, архей, а также клеток человека [103].

1.2.2. Клеточное распределение Mn и его токсичность

В литературе описано несколько методов измерения внутриклеточных концентраций Mn. Интересно, что добавление Mn в среду приводит к увеличению концентрации Mn в клетке, в некоторых случаях значительно превышающей концентрацию в среде, что свидетельствует об активном внутриклеточном транспорте марганца [46, 104, 105, 106, 107]. С помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) было показано, что внутриклеточная общая концентрация Mn в клетках рака простаты составляет около 1 мкМ и увеличивается при инкубации с 1 мМ марганца в течение 48 ч в клетках PC3 ($38,2 \pm 14,3$ мкМ), LNCaP ($34,6 \pm 0,7$ мкМ) и DU145 ($12,2 \pm 0,4$ мкМ) [104]. По данным измерений с помощью энергодисперсионной рентгеновской флуоресценции, общая концентрация Mn в клетках микроглии, культивируемых из коры головного мозга цыплят, составляла 45 мкМ в присутствии 0,4 мкМ Mn и увеличивалась до 100 мкМ при добавлении 2 мкМ Mn [106]. При помощи измерения содержания Mn в клетках человеческой крови с помощью атомно-абсорбционной спектрофотометрии на графитовой печи с коррекцией фона по Зейнану была выявлена концентрация Mn, равная 0,3 мкМ в эритроцитах, 0,006 мкМ в полиморфноядерных и мононуклеарных лейкоцитах, и 0,016 мкМ - в плазме [108]. Было показано, что, при попадании в организм, Mn^{2+} накапливается в основном в митохондриях [43]; однако Mn^{2+} также связывается с ДНК с $K_d = 33$ мкМ [109], и накапливается в ядрах, в основном в гетерохроматине [110]. В соответствии с накоплением Mn^{2+} в митохондриях при добавлении марганца в среду

культивирования клеток, именно митохондрии способны всасывать подавляющее большинство экзогенно добавленного Mn^{2+} из среды [43].

В настоящее время не существует индикаторов, позволяющих измерять количество свободного Mn в живых клетках в базовых физиологических концентрациях [111]. Было идентифицировано несколько Mn-специфических молекул, имеющих свойства переносить Mn в клетки или из клеток, что позволяет измерять выделенный в среду Mn после предварительной инкубации Mn с клетками; однако трудно интерпретировать, идет ли речь о митохондриальном или ядерном Mn^{2+} или о свободном цитоплазматическом Mn^{2+} [108]. Поскольку Mn^{2+} накапливается в митохондриях при попадании в клетку [43], можно предположить, что концентрация свободного Mn^{2+} в необогащенных марганцем клетках очень низка. Неясно, может ли Mn^{2+} высвобождаться из митохондрий или других марганцевых депо, как это происходит с Zn^{2+} в ответ на окислительный стресс [49].

Клетки обычно переносят до 10 мкМ Mn, а добавление в среду культивирования клеток 50 мкМ марганца или более в течение 24 часов является токсичным для клеток [46, 104, 105]. Примечательно, что добавление марганца в составе $MnCl_2$ к клеткам нейробластомы человека оказалось доминирующим фактором, стимулирующим выработку H_2O_2 митохондриальной Mn-СОД2 в диапазоне внеклеточной концентрации $MnCl_2$ 1-100 мкМ [46]. При добавлении внеклеточного Mn, доля клеточного Mn в общей массе белка увеличивалась в диапазоне $6,4-50 \times 10^{-6}$, что, по оценке авторов, соответствует как нормальному физиологическому ($6,4-36 \times 10^{-6}$), так и патологическому (50×10^{-6}) диапазонам. Добавление всего 1 мкМ Mn увеличивало скорость потребления кислорода митохондриями, продукцию H_2O_2 и активность СОД2. Было показано, что сверхэкспрессия Mn-СОД2 подавляет рост клеток рака молочной железы *in vitro* и в моделях ксенотрансплантатов [112], а миметики Mn-СОД2 проявляют противораковую активность [113], что позволяет предположить, что Mn, участвующий в активации СОД, обладает противоопухолевым действием. С другой стороны, напротив, недавние исследования продемонстрировали увеличение накопления Mn-СОД2 при трижды негативном раке молочной железы.

Повышение внутриклеточной концентрации Mn-SOD2 способствует увеличению стволовости и инвазивности клеток рака молочной железы, а также инфильтрации опухоли M2-макрофагами, демонстрирующими онкогенные свойства [114].

По-видимому, высокая концентрация поступающего Mn^{2+} (400 мкМ, 24 ч) индуцирует высвобождение цитохрома С из митохондрий и апоптоз, опосредованный каспазой-8, в В-клетках [42, 115]. Было показано, что 10-50 мкМ Zn^{2+} предотвращает Mn-индуцированную гибель клеток, в то время как концентрация Zn^{2+} выше 100 мкМ потенцирует гибель В-клеток лимфомы Беркитта человека (рисунок 2) [116]. Аналогичные данные были получены на мышинных фоторецепторных клетках [117]. Влияние Zn на жизнеспособность клеток обсуждается в следующих разделах.

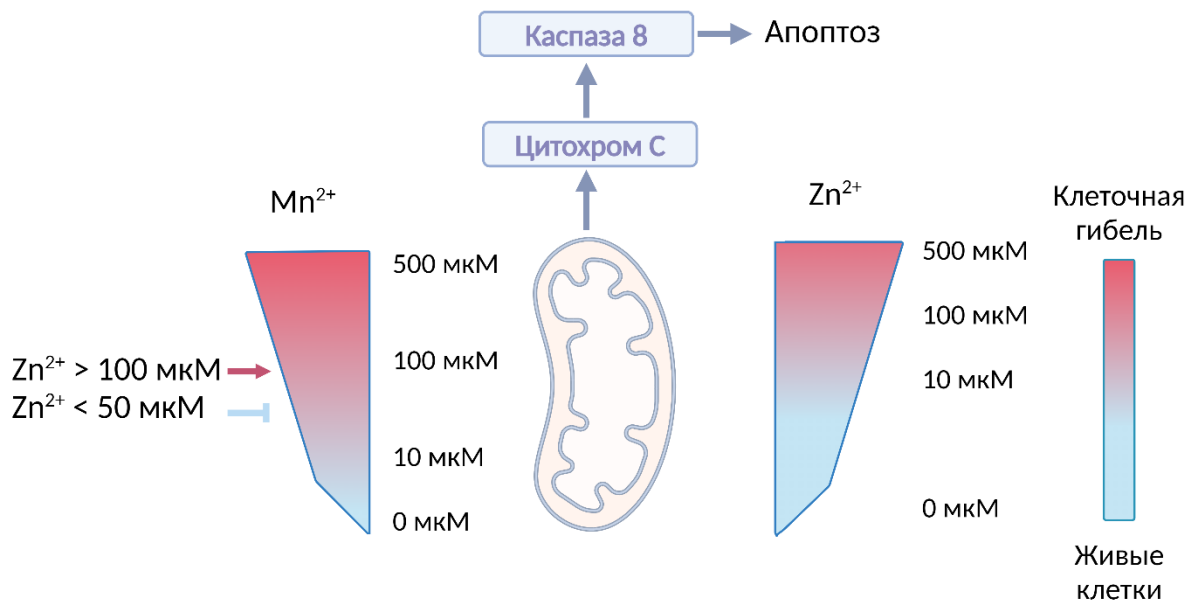


Рисунок 2 – Примерные диапазоны токсичности Mn^{2+} и Zn^{2+} (подробнее см. текст). Низкие концентрации Mn^{2+} и Zn^{2+} не являются токсичными. Примечательно, что Zn^{2+} в концентрациях ниже 50 мкМ подавляет Mn^{2+} -индуцированную токсичность, а Zn^{2+} в концентрациях выше 100 мкМ потенцирует токсичность Mn^{2+} [116]

1.2.3. Регуляция гомеостаза и токсичности Zn

В отличие от Mn, концентрацию свободного Zn в клеточных органеллах можно измерить с помощью нескольких индикаторов [50, 118, 119, 120, 121], и она обычно невелика, например, составляет порядка 5-10 пМ в клетках PC12 [118] и 400 пМ в бета-клетках поджелудочной железы [121]. Большая часть Zn в клетках связывается белками, и было подсчитано, что примерно 3000 различных белков в клетках связывают Zn [122, 123, 124]. Среди них примечателен металлотионеин, который связывает Zn^{2+} , хотя несколько других белков выполняют те же функции [64, 125, 126].

Гель-фильтрационная хроматография выявила три пула связанных с Zn^{2+} молекул разной молекулярной массы: металлотионеин, другие белки и восстановленный глутатион (GSH) [127, 128]. Сравнение сродства Zn^{2+} к различным пулам белков показало, что апо-металлотионеин (не содержащий металла белок) способен конкурировать за 13% Zn^{2+} , связанного с белками, GSH - за 10% Zn^{2+} , а синтетические хелаторы - за 32-38% Zn^{2+} . Таким образом, сродство металлотионеина к Zn^{2+} относительно низкое по сравнению с другими Zn-белками, однако, благодаря своей распространенности, он связывает около трети клеточного Zn^{2+} . Таким образом, Zn^{2+} , доступный для связывания с белками в клетках, существует в форме, связанной с металлотионеином. Было показано, что активность базального фактора транскрипции TFIIIE зависит от концентрации цинка, из-за ДНК-связывающего мотива «цинковые пальцы», в которых каждый палец содержит по два остатка аминокислот цистеина и гистидина, координирующих ион Zn^{2+} [127]. Соответственно, истощение запасов Zn подавляет активность факторов транскрипции, а добавление свободного Zn^{2+} или Zn^{2+} в комплексе с металлотионеином восстанавливает ее [38, 129].

Еще одна треть клеточного Zn связана с другими белками, не относящимися к металлотионеинам, а остальная часть Zn находится в комплексе с глутатионом [127, 128, 130, 131]. Также было показано, что добавление глутатиона в

восстановленной форме GSH увеличивает скорость связывания Zn^{2+} с белками, отличными от металлотионеина [128, 130].

Zn-индикаторы могут измерять внутриклеточное распределение Zn^{2+} [51], и было обнаружено, что при умеренном воздействии Zn^{2+} переносится *TRPM7* и его гомологом *TRPM6* (белковый канал, относящийся к семейству транзиентных каналов рецепторного потенциала меластатинового типа 7 и 6) или в составе димера *TRPM6/TRPM7* [49, 132, 133] в специфические везикулы, которые высвобождают Zn^{2+} в ответ на окислительный стресс [49] или в ответ на агонисты *TRPM7*, способствуя гибели клеток меланомы путем ингибирования аутофагии [53, 132].

При воздействии высоких концентраций Zn^{2+} клетки выводят Zn^{2+} путем лизосомального экзоцитоза [65] и накапливают цинк в митохондриях [47, 48], в которых затем индуцируется гибель клеток [44, 54]. Было показано, что добавление Zn^{2+} к первичным астроцитам и клеткам глиомы крысы вызывало истощение восстановленного глутатиона, индукцию РФК и лактатдегидрогеназы, деполяризацию мембраны митохондрий и апоптоз [131]. Добавление Zn^{2+} или металлотионеина в качестве переносчика Zn^{2+} или Cd^{2+} , ингибирует мембранный потенциал, производство АТФ и потребление кислорода митохондриями [54, 134, 135, 136, 137].

1.2.4. Транспорт Zn и Mn

Транспорт и распределение цинка и марганца внутри клетки регулируется специализированными транспортными белками (таблица 1 и рисунок 3). Условно их разделяют на семейства импортеров цинка ZIP/SLC39 и экспортеров цинка ZNT/SLC30 [31, 50].

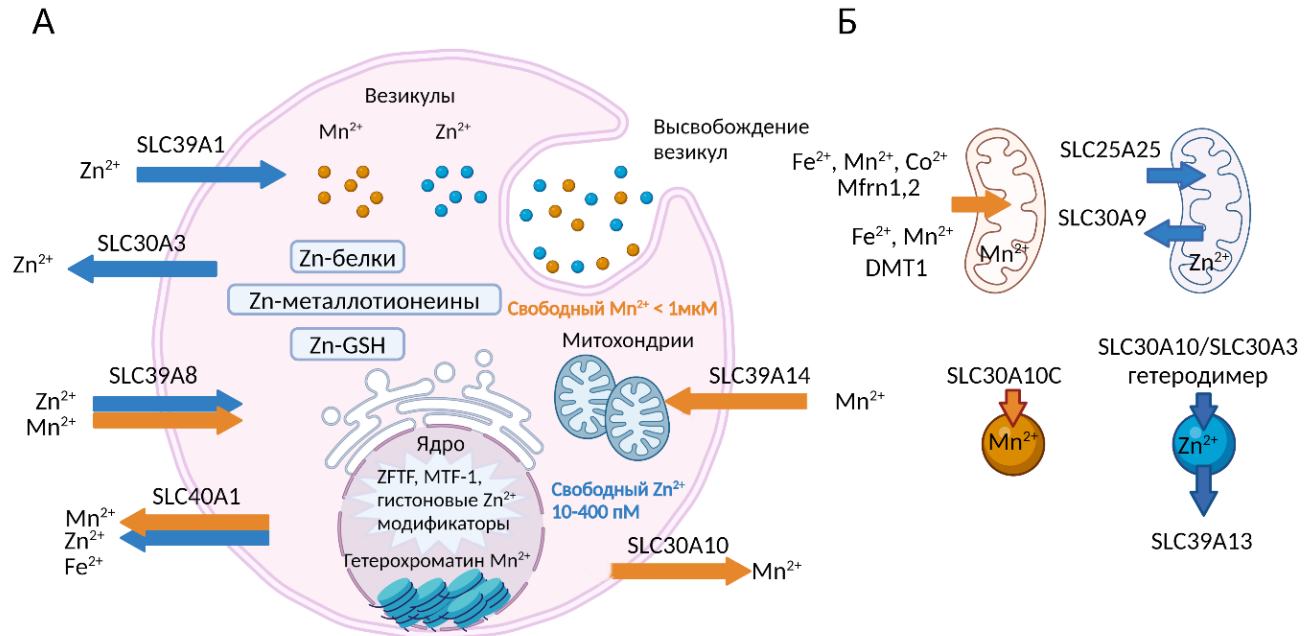


Рисунок 3 – Гомеостаз Mn^{2+} и Zn^{2+} . А – Репрезентативная схема транспорта Mn^{2+} и Zn^{2+} в клеточных компартментах. Синими стрелками обозначены переносчики, специализированные больше на Zn^{2+} (*SLC39A1*, *SLC30A3*), оранжевыми стрелками – переносчики сродство которых выше для Mn^{2+} (*SLC39A14*, *SLC30A10*). Двойными стрелками обозначены белки, переносящие как Mn^{2+} , так и Zn^{2+} (*SLC39A8*, *SLC40A1*). В клетке Zn^{2+} распределяется между металлотионеинами, другими белками и GSH [127, 128]. В ядрах Zn^{2+} связывает *MTF1* [64] и служит координирующим металлом для большинства гистон-модифицирующих ферментов [138, 139] и факторов транскрипции с цинковыми пальцами (ZFTFs) [140]. В свою очередь, Mn^{2+} накапливается в гетерохроматине [110]. И Mn^{2+} , и Zn^{2+} могут накапливаться в митохондриях [47, 110], а также в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме [37, 50, 51, 141] (не показано). Как Mn^{2+} , так и Zn^{2+} могут быть изолированы в специфических везикулах, которые могут высвобождаться из клетки [49, 65, 66]. Б – Переносчики ионов переносят Mn^{2+} в митохондрии с помощью *Mfrn1* [5] и *DMT1* [142], а в клеточные везикулы - с помощью *SLC30A10* [143]. В свою очередь, Zn^{2+} накапливается в митохондриях с помощью *SLC25A25* и выводится *SLC30A9* [47, 63]. В везикулах Zn^{2+} накапливается гетеродимером *SLC30A3-SLC30A10* [24], а выводится - *SLC39A13* [144]

Таблица 1 – Гены переносчиков ионов Mn^{2+} и Zn^{2+}

Название гена	Название белка	Специфичность	Тип переносчика	Источники
<i>SLC30A10</i>	ZNT10	Mn^{2+}/Ca^{2+} обмен, Zn^{2+} везикулярный транспорт в составе димера SLC30A3	Экспортер	[35, 145]
<i>SLC30A3</i>	ZNT3	Zn^{2+}	Экспортер	[15, 39, 40, 146]
<i>SLC39A14</i>	ZIP14	Двувалентные катионы металлов Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}	Импортер (симпорт)	[13, 29, 147, 148]
<i>SLC39A8</i>	ZIP8	Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}	Импортер (симпорт)	[29, 149, 150]
<i>TP2C1</i>		Ca^{2+} or Mn^{2+}	Внутри митохондрий	[151]

Прежде всего, известные экспортеры цинка используют протонный градиент для переноса Zn^{2+} [152]; напротив, активный транспорт Mn^{2+} , опосредованный *SLC30A10*, осуществляется за счет импорта Ca^{2+} вдоль электрохимического градиента в обмен на Mn^{2+} через электрохимический градиент [145]. Более того, *SLC30A10* способен переносить Mn^{2+} , но не Zn^{2+} [145, 153]. Напротив, *SLC30A10* в виде гетеродимера *SLC30A3-SLC30A10* может переносить Zn^{2+} и Mn^{2+} в эндосомы и активировать передачу сигнала внутри клетки по пути EGFR/MEK/ERK1,2. Активация этой сигнальной оси, как было установлено, снижается под действием хелатора Zn^{2+} - TPEN [24]. В отличие от данных Леви [145], Чжао продемонстрировал, что сверхэкспрессия *SLC30A10* влияет на транспорт Zn^{2+} [24].

После чрезмерного воздействия Mn^{2+} клетки гибридных гепатоцитов человека и крысы WIF-B поглощают Mn^{2+} из цитоплазмы с помощью *SLC30A10* в

везикулы, которые сливаются с апикальной клеточной мембраной и высвобождают свое содержимое в среду [143]. Последние данные свидетельствуют о том, что, подобно Zn^{2+} [65], Mn^{2+} высвобождается из раковых клеток с помощью внеклеточных везикул [66].

В то время как *SLC30A10* транспортирует Ca^{2+} и Mn^{2+} в противоположных направлениях, *ATP2C1* транспортирует Ca^{2+} или Mn^{2+} в аппарат Гольджи, предотвращая Mn^{2+} -индуцированную нейротоксичность [151]. То, как поступление Ca^{2+} , опосредованное *SLC30A10*, в клетки, влияет на Zn -регулируемую клеточную физиологию, до сих пор не изучалось. Примечательно, что поступление Ca^{2+} в моноциты приводит к образованию свободного цитоплазматического Zn^{2+} в ядерной и перинуклеарной областях эндоплазматического ретикулума [154] или в митохондриях нейронов [48].

Индукция высвобождения Zn^{2+} , по-видимому, предшествует генерации РФК в митохондриях в ответ на гипоксию [60, 155]. Сообщалось, что активация *Hif1a* необходима для индукции экспрессии *SLC30A10* при воздействии Mn^{2+} [156]. *Hif1a* индуцируется гипоксией и РФК, и было бы интересно выяснить, индуцируется ли *SLC30A10* в раковых опухолях с помощью аналогичных механизмов [9].

1.2.5. Транспорт Zn и Mn и канцерогенез

Основные сведения о функциях цинковых транспортеров в канцерогенезе получены в результате исследований генетики рака [39, 157]. Так, при изучении генов, участвующих в канцерогенезе, было обнаружено снижение экспрессии генов-импортеров и повышенная экспрессия генов-экспортеров цинка, а также соответствующее снижение уровня Zn в различных видах рака [157].

При раке простаты дефицит цинка возникает из-за снижения активности цинковых транспортеров [158], а обработка клеток рака простаты физиологическими концентрациями цинка вызывает их апоптоз [8]. В частности, сверхэкспрессия белка RREB1 (Ras-responsive element-binding protein 1) – фактора транскрипции с доменом «цинковые пальцы», получающего сигнал от ERK,

активированного в каскаде сигнального пути Ras-Raf-MEK-ERK, подавляет экспрессию *SLC39A1* (ZIP1), что приводит к снижению уровня цинка [159, 160]. Доклинические исследования подтверждают применение ионофора Zn^{2+} - клиохинола в комбинации с агонистом дофамина для лечения рака простаты [34, 76]. Напротив, было обнаружено, что RREB1/*SLC39A3*(ZIP3)/Zn снижены в аденокарциноме поджелудочной железы [161], а низкий уровень Zn ассоциируется с гиперпролиферацией *in vitro*. При раке яичников сверхэкспрессия *SLC39A13* (ZIP13) и ZIP5, ZIP10, ZIP12, ZIP14 была связана с неблагоприятным прогнозом заболевания, а нокаут *SLC39A13* продемонстрировал подавление злокачественного фенотипа *in vitro* и *in vivo* и более высокий уровень везикулярного цинка в нокаутных клетках [162]. Экспрессия 10 членов семейства SLC30 была измерена в карциноме шейки матки и была показана постепенная индукция выводящего Mn^{2+} транспортера *SLC30A10* с увеличением стадии рака; полное истощение везикулярного транспортера Zn^{2+} *SLC30A8*; и индукция экспортеров Zn^{2+} *SLC30A1*, *SLC30A6* и *SLC30A7* [9].

В свою очередь, благодаря свойствам Mn^{2+} как поглотителя супероксидных радикалов [103], высокий уровень марганца в раковых опухолях ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и низкой радиочувствительностью опухолей. Например, при радиорезистентных опухолях: меланоме и глиобластоме уровень Mn, измеренный в срезах тканей был выше, по сравнению с чувствительными к радиотерапии тканями классической семиномы, рака молочной железы и рака простаты [74]. Распределение Mn в тканевых срезах в этом исследовании измеряли с помощью масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Для элементов Zn, Cu и Fe такой корреляции в этом исследовании не наблюдалось. Сканирование срезов тканей из мышинной модели метастазов карциномы легкого Льюиса с использованием аналогичного подхода выявило накопление Mn в нескольких очагах в первичной опухоли или в тканях не подвергавшихся лечению животных, тогда как распределение Zn было равномерным. Интересно, что более высокая концентрация Mn была обнаружена в органах мышей, имеющих опухоль. Кроме того, субтоксические уровни Mn^{2+} в концентрации 5 мкМ способствуют миграции

клеток, и было обнаружено выделение экзосомального Mn^{2+} [66]. Являются ли эти области с высоким содержанием Mn в органах мышей, имеющих опухоль, местами метастазирования или только накопления Mn, требует дальнейшего изучения.

В этой связи было показано, что Mn^{2+} является основным субстратом для *SLC39A14 in vivo* в исследованиях на мышах [163] и у людей [29, 164], и это связано с накоплением Mn в крови и большинстве других органов на фоне истощения его запасов в печени, так как печень и поджелудочная железа, как известно, активно участвуют в выведении Mn^{2+} из организма [143]. Низкая экспрессия *SLC39A14* приводила к нарушению выведения Mn^{2+} , и к накоплению Mn^{2+} в большинстве других внепеченочных тканей и мозге. Снижение экспрессии *SLC39A14* было связано с агрессивностью и рецидивированием рака простаты [165], а альтернативный сплайсинг *SLC39A14* - с колоректальным раком [166, 167]. Однако, в некоторых исследованиях было обнаружено увеличение содержания как Zn, так и Mn в тканях колоректального рака, в то время как в других тканях наблюдалась лишь незначительная разница в уровне Zn у мужчин [168, 169].

1.2.6. Регуляция транскрипции под действием Zn и Mn

Как Zn^{2+} , так и Mn^{2+} участвуют в регуляции транскрипции. В нейрональных клетках PC12 было показано, что Mn^{2+} индуцирует апоптоз, из-за усиления транскрипции каспазы-3. А активация транскрипции каспазы-3, в свою очередь, вызывается связыванием Sp1 с промотором каспазы-3, опосредованным фосфорилированием цинковых пальцев транскрипционного фактора Sp1 [170]. Кроме того, в клетках PC12 Mn^{2+} потенцирует активность гистондеацетилазы (HDAC) и репрессирует активность гистондеацетилтрансферазы (HAT), что приводит к ингибированию ацетилирования основных гистонов [16], что согласуется с локализацией Mn^{2+} в гетерохроматиновых компартментах [110]. Было обнаружено, что ингибирование активности HDAC уменьшает гибель клеток, а ингибирование HAT потенцирует Mn^{2+} -индуцированную гибель клеток, что

позволяет предположить немаловажную роль ацетилирования гистонов в Mn-индуцированной дофаминергической нейротоксичности [16].

Примерно 10% всего протеома человека (что составляет около 2800 белков) потенциально связано с цинком [124]. Цинк может регулировать транскрипцию, поскольку он является компонентом многих, если не всех, модификаторов хроматина, включая HDAC и HAT [138, 139] и гистоновых деметилаз [171, 172]. В составе факторов транскрипции, ферментов и ДНК-связывающих белков цинк выполняет важную структурную функцию, обеспечивая стабильность белковых доменов «цинковые пальцы». Структурное разнообразие цинковых пальцев позволяет им участвовать в широком спектре биологических процессов, включая репликацию и репарацию ДНК, транскрипцию и трансляцию генетической информации, метаболизм и клеточную сигнализацию, а также в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза [127, 173]. Эти домены обычно действуют как функциональные единицы, участвующие во взаимодействии с различными молекулами: такими как нуклеиновые кислоты, другие белки и низкомолекулярные соединения [127, 140, 174]. В отличие от марганца в клетках PC12, Zn^{2+} и цинковый транспортер ZIP10 активируют HAT в кератиноцитах, способствуя дифференцировке и экспрессии генов металлотионеина [61]. Механистически, цинк напрямую регулирует индукцию металл-зависимого транскрипционного фактора-1 (*MTF-1*) генов металлотионеина, тем самым создавая больше запасов Zn^{2+} в ответ на увеличение содержания Zn^{2+} во внеклеточном пространстве [64].

В новейших публикациях сообщается, что активность HDAC8 может регулироваться конкуренцией между различными ионами, в частности, Zn^{2+} и Fe^{2+} [138]. Активный сайт HDAC8 имеет схожую структуру с Mn^{2+} сайтом аргиназы – фермента, катализирующего гидролиз L-аргинина с образованием L-орнитина и мочевины, в результате реакции снижающим синтез оксида азота, в котором один каталитический ион Zn^{2+} координируется двумя аспартатными остатками и гистидином [138, 175]. HDAC8 обладает в 106 раз более высоким сродством (аффинностью) к Zn^{2+} , чем к Fe^{2+} (Zn^{2+} ($K_d = 9$ пМ); Fe^{2+} ($K_d = 1,1$ мкМ)), что объясняет более высокую концентрацию Fe^{2+} в клетках и более высокую

каталитическую активность HDAC8 в присутствии Fe^{2+} . Кроме того, HDAC8 может связывать Mn^{2+} и Cu^{2+} , но сравнение аффинности или каталитической активности не проводилось [138, 175].

В соответствии с ролями Zn [61] и метилирования ДНК в дифференцировке кератиноцитов [92, 176], было обнаружено, что активность ДНК-метилтрансферазы-1 индуцируется истощением цинкового транспортера *SLC39A13* (ZIP13) в дерме, и этот эффект отменяется при добавлении Zn к нокаутным по *SLC39A13* первичным клеткам мышинных фибробластов [177].

В соответствии с высоким сродством большинства белков к Zn, сродство 3 домена типа “цинковые пальцы” фактора транскрипции Sp1 к Zn характеризовалось $K_d = 6 \times 10^{-10}$, что значительно выше, чем для металлотионеина [140]. Активность транскрипционного фактора Zn-Sp1 оценивали при истощении запасов клеточного цинка с помощью ряда лигандов, включая апо-металлотионеин, глутатион, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), этиленгликоль тетрауксусную кислоту (EGTA) и хелатора цинка TPEN [127]. Из них только проникаемый для клеток TPEN в концентрации 30 мкМ был способен ингибировать связывание Sp1 с ДНК в ядерных фракциях после 24 ч обработки и полностью подавлять связывание ДНК *in vitro*. Напротив, цинк ингибировал активность NF-κB, что могло быть ослаблено повышением уровня металлотионеина [178]. В то же время Zn^{2+} -опосредованное ингибирование NF-κB оказывает глубокое влияние на прогрессирование рака, подавляя пролиферацию и воспаление [33, 179, 180].

1.2.7. Mn- и Zn-опосредованные пути передачи сигнала

В попытке воспроизвести Zn-опосредованный каскад передачи сигнала, были измерены уровни экспрессии генов в ответ на добавление Zn^{2+} в клетках CaCo-2 кишечника человека с удаленным *MTF1* [64]. Интересно, что большинство генов, регулируемых Zn^{2+} , активизировали свой ответ, и только металлотионеины и выводящий цинк ZnT1 были менее чувствительны к Zn^{2+} в условиях отсутствия *MTF1*. Это указывает на то, что содержание Zn^{2+} в клетках стало выше из-за

уменьшенной буферной способности металлотионинов и снижения эффективности транспорта Zn^{2+} из клеток. Это ставит *MTF1* на первое место в Zn -опосредованном сигнальном пути, за которым следуют металлотионеины и другие Zn -регулируемые гены. Была сформулирована математическая модель, описывающая гомеостаз Zn^{2+} в клетках [128].

Как известно, цинк регулирует сигнальные пути, связанные с развитием рака. Внеклеточный Zn^{2+} активирует сигнальные каскады ERK и Ras [181]. В другом исследовании было показано, что сывороточный Zn^{2+} подавляет проапоптотические сигналы p38 и JNK, которые активируются при воздействии измененного hRas G12V [182]. Nf1 является классическим репрессором Ras [183, 184], а связывание Zn^{2+} закрывает домены Nf1 и подавляет активность Ras-ГТФазы дикого типа *in vitro* [185].

Существует несколько публикаций, свидетельствующих о том, что Mn^{2+} индуцирует апоптоз или процесс старения с помощью p53-зависимых механизмов [186, 187, 188]. Интересно, что в клетках нейронов токсичность, вызванная Mn^{2+} , сопровождалась увеличением p53 и митохондриальной локализацией p53, а увеличение РФК и митохондриальной продукции H_2O_2 ослаблялось ингибиторами p53 [186]. Аналогично, в клетках колоректального рака сверхэкспрессия Mn-СОД2 индуцирует p53-зависимое старение [188]. Кроме того, Mn^{2+} -индуцированный апоптоз подавлялся изоформой DNp73 члена семейства p53 - p73 [187, 189].

Механизм, по которому Mn^{2+} регулирует активность p53, до сих пор неизвестен. Одним из возможных участников такой регуляции является металл-зависимая белковая фосфатаза PP2C α , активирующая p53 [190], для которой характерна константа Михаэлиса Mn^{2+} , $K_m = 3,3$ мМ, что намного выше типичных суммарных концентраций в клетках, а замена Mg^{2+} на Mn^{2+} снижает активность фермента в 30 раз [191]. В контексте p53-зависимого апоптоза было бы интересно изучить, происходит ли фосфорилирование p53 ниже по каскаду реакций от активации PP2C и какова роль соотношения ионов Mg/Mn в апоптозе при изменении активности фермента PP2C α в клетках.

Помимо активации p53, о которой говорилось выше, Mn^{2+} индуцирует апоптоз путем активации каспазы-8 ниже по сигнальному пути p38-MSK1 в В-клетках человека [115]. В заключение следует отметить, что Mn^{2+} и Zn^{2+} влияют на несколько сигнальных путей (p38 и регуляцию ацетилирования гистонов) в противоположных направлениях, однако в других случаях они воздействуют на клетки сходным образом, в частности, на индукцию p53 под действием Mn^{2+} , ингибирование Nf-κB-индуцированной пролиферации [33, 179, 192] и индукцию дифференцировки кератиноцитов под действием ионов Zn^{2+} (рисунок 4).

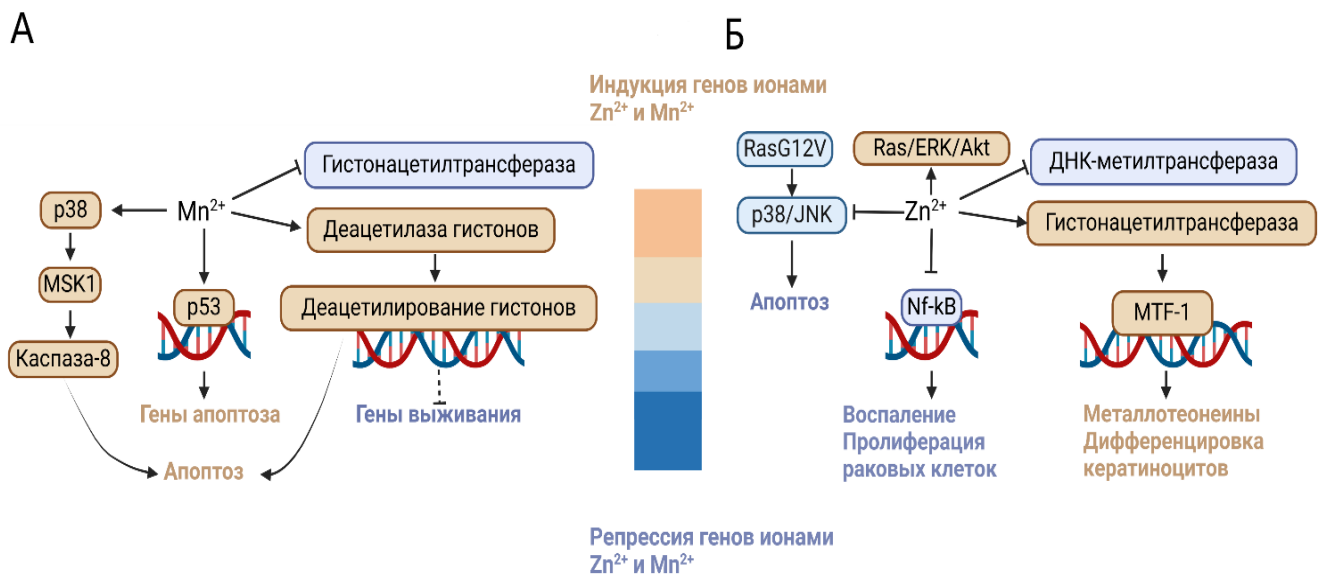


Рисунок 4 – Mn^{2+} - и Zn^{2+} -регулируемые сигнальные пути. А – Mn^{2+} подавляет системное ацетилирование гистонов, усиливая активность HDAC и подавляя активность HAT, что приводит к апоптозу, предположительно из-за репрессии ключевых генов жизнеспособности [16]. Кроме того, Mn^{2+} активирует p53 [186, 187, 188] и сигнализацию p38/MSK1 [115], что приводит к апоптозу. Б – В клетках Ras дикого типа Zn^{2+} активирует ERK/AKT-сигнализацию [179]. Напротив, в клетках с мутацией Ras G12V Zn^{2+} ингибирует p38 и JNK, подавляя апоптоз [182]. Zn^{2+} ингибирует Nf-κB, что приводит к снижению пролиферации раковых клеток и подавлению воспаления [33, 179, 192]. В отличие от Mn^{2+} , Zn^{2+} активирует HAT, что приводит к активации металлотионеина и экспрессии генов, специфичных для дифференцировки кератиноцитов [61]. Соответственно, Zn^{2+} репрессирует активность ДНК-метилтрансферазы в immortalized фибробластах мыши [177]. Zn^{2+} напрямую регулирует MTF1-опосредованную индукцию генов металлотионеина [64], а индукция генов металлотионеина приводит к экспрессии генов дифференцировки кератиноцитов [61]

1.2.8. Различия в воздействии Mn и Zn на нормальные и раковые клетки

Было обнаружено, что сульфат цинка не токсичен для нормальных клеток при концентрации 100 мкМ и ниже после четырех дней культивирования, но значительно снижает жизнеспособность раковых клеток миелогенной лейкемии K562 при концентрации 40 мкМ и выше [193]. Было показано, что сульфат цинка защищает нормальные лимфоциты от H_2O_2 -индуцированного повреждения ДНК и усиливает H_2O_2 -индуцированное повреждение ДНК в раковых клетках K562 [193]. Тот же эффект был продемонстрирован в недавнем исследовании на клетках острого миелоидного лейкоза [6]. Аналогично, применение темозоломида и $ZnCl_2$ в концентрации 100 мкМ повышало эффективность лечения клеток и ксенотрансплантационной модели глиобластомы и не влияло на нормальные астроциты человека [78]. В настоящее время проводятся клинические испытания добавления Zn при глиобластоме параллельно с лечением темозоломидом (clinical trial.gov: NCT04488783. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04488783> (дата обращения: 01.12.2022)). Было обнаружено, что соединение марганца Adpa-Mn преимущественно индуцирует аутофагию и гибель глиобластомы и других линий раковых клеток, но не астроцитов или незлокачественных клеток [194, 195, 196, 197].

1.3. Влияние Zn и Mn на путь cGAS-STING, иммунный ответ и канцерогенез

Помимо согласованной регуляции ответа на изменение уровня РФК, транскрипции и метаболизма, Zn^{2+} и Mn^{2+} вместе регулируют один из компонентов врожденного иммунитета - путь cGAS-STING («циклическая ГМФ-АМФ синтаза-стимулятор интерфероновых генов»), который активируется цитоплазматической двухцепочечной ДНК, например, вызванной вирусной инфекцией [198] (рисунок 5). В цитоплазме раковой клетки могут находиться цитоплазматические фрагменты хроматина и свободная теломерная ДНК клетки из-за нестабильности ее генома [1]. Путь cGAS-STING также участвует в p21-опосредованном ответе на повреждение

ДНК [199] и стабилизации хроматина во время митоза при лечении генотоксическими препаратами [200, 201]. Для активации cGAS-STING требуется высвобождение Mn^{2+} из внутриклеточных органелл, предположительно митохондрий [107]. Mn^{2+} связывается с циклической ГМФ-АМФ синтазой (cGAS) и усиливает ее чувствительность к двуцепочечной ДНК и выработку вторичного мессенджера циклического ГМФ-АМФ (cGAMP), что приводит к активации Nf-kB и противовирусному ответу [107, 202, 203, 204, 205]. Недавно было показано, что Mn^{2+} участвует в противоопухолевом иммунном ответе, активируемом cGAS-STING-путем [77]. Mn^{2+} активировал как врожденное, так и адаптивное (приобретенное) звено иммунной системы, подавлял метастазирование и потенцировал терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета у мышей. В настоящее время проводится клиническое испытание первой фазы с увеличением дозы для оценки безопасности и предварительной эффективности Mn^{2+} -праймированной анти-PD-1 терапии и химиотерапии (clinical trial.gov: NCT03991559. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03991559> (дата обращения: 30.10.2024)) [77].

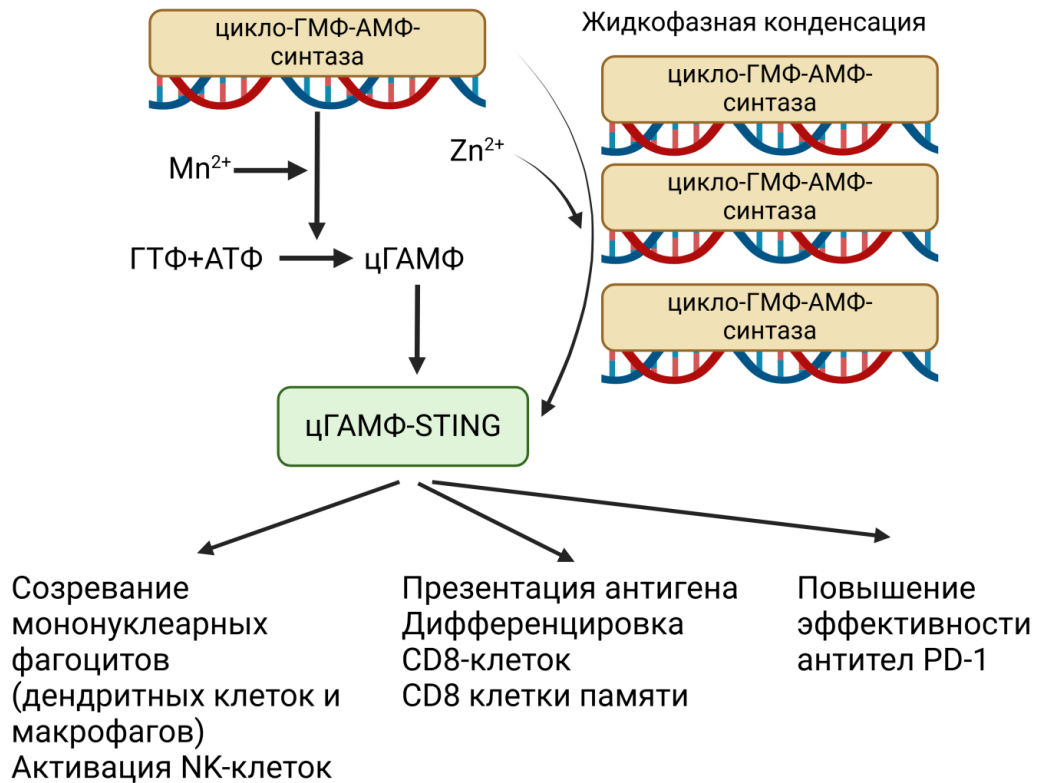


Рисунок 5 – Сигнальный путь cGAS-STING активируется как Mn^{2+} , так и Zn^{2+} . Mn^{2+} необходим для эффективного связывания с ДНК, синтеза циклического динуклеотида цГАМФ и образования комплекса цГАМФ-STING [107], в то время как Zn^{2+} требуется для фолдинга цГАМФ и жидкофазного разделения комплексов цГАМФ-ДНК [206, 207, 208]. Mn^{2+} потенцирует противоопухолевый ответ cGAS-STING, стимулируя созревание дендритных клеток и макрофагов, активацию NK-клеток, презентацию антигена и дифференцировку CD8-клеток [77]. В результате Mn^{2+} повышает эффективность терапевтических антител [209]

Кроме того, Mn^{2+} потенцирует действие биспецифического YM101 антитела, направленного на TGF- β /PD-L1, против нескольких моделей рака *in vivo*, активируя путь STING и способствуя созреванию дендритных клеток мыши и человека, сдвигая микроокружение опухоли в сторону воспаленного фенотипа. Это усиливает результативность презентации антигена, инфильтрацию опухоли и функцию Т-лимфоцитов [209]. Терапевтическая активность YM101 при введении Mn^{2+} была продемонстрирована на мышинных моделях гепатоцеллюлярной карциномы (H22), меланомы (B16), рака толстой кишки (CT26) и рака молочной железы (EMT-6) [209]. Применение самособирающихся наночастиц, состоящих из циклических динуклеотидных агонистов STING с пэгилированным фосфолипидом

и Mn^{2+} вызвало противоопухолевый иммунитет и стойкий терапевтический эффект в нескольких моделях опухолей [210].

В свою очередь, Zn^{2+} также участвует в регуляции cGAS-STING. Zn^{2+} координирует структуру цикло-ГМФ-АМФ-синтазы, которая необходима для продукции интерферона при иммунном ответе. Координация Zn^{2+} также необходима для жидкофазной конденсации cGAS-ДНК и выработки цГАМФ [206, 207, 208], а связывание cGAS с ДНК усиливается цинковым пальцем CCH-типа - ZCCHC3 [211].

В заключение следует отметить, что последние исследования подтверждают противораковую роль Zn и Mn через модуляцию воспалительных путей и иммунных реакций [77, 80, 212].

1.4. Роль гена KRAS в канцерогенезе при колоректальном раке

Злокачественные новообразования прямой кишки, объединённые с опухолями ободочной кишки в единую группу (код по МКБ-10 – C18), принято обозначать как колоректальный рак. Мутации гена *KRAS* обнаруживаются приблизительно у 30–40% пациентов с КРР. Эти мутации играют ключевую роль в прогрессировании заболевания, а также в определении эффективности подобранной терапии [213, 214]. Такие генетические изменения ассоциируются с ухудшением специфической и общей выживаемости пациентов с КРР по сравнению с пациентами КРР с опухолями дикого типа по *KRAS/BRAF*, за исключением случаев заболевания на поздних стадиях [215, 216, 217]. Ген *KRAS* состоит из 4 кодирующих и 1 некодирующего экзонов. Экзон 2 гена *KRAS* имеет самую высокую частоту мутаций. Так, наиболее распространенной точечной мутацией гена *KRAS* является мутация глицина в положении 12 (G12), глицина в положении 13 (G13) и глутамина в положении 61 (Q61). Мутации Q61H, Q61L и A146T имеют меньшую частоту встречаемости при КРР (0,5-4%), но также могут оказывать влияние на прогрессирование заболевания. Тогда как точечные мутации G12D, G12V, G12C, G13D — наиболее распространённые при КРР. G12D - это

мутация в 12-ом кодоне (глицин заменяется на аспарагин), она является одной из самых частых мутаций *KRAS* при КРР, и составляет около 30-40% всех мутаций в *KRAS* у пациентов с КРР. Мутация G12V представляет собой замену глицина в 12-ом кодоне на валин. Эта мутация также часто выявляется у онкологических пациентов и составляет около 20-30% случаев всех *KRAS* мутаций при КРР. Точечная мутация G12C также обнаруживается в 12 кодоне (глицин заменяется на цистеин), она менее распространена, но всё же встречается при КРР. И мутация в 13-ом кодоне - G13D, при которой происходит замена глицина на аспарагин в 13-ом кодоне, также является одной из распространённых мутаций при КРР и встречается примерно в 15-20% случаев (таблица 2).

Таблица 2 – Наиболее часто выявляемые мутации *KRAS* при КРР [213, 218, 219]

Гистологический тип	Кодон	Замена нуклеотида	Замена аминокислоты	Частота мутаций при КРР, %
Аденома	12	GGT → GAT	G12D	39.1
		GGT → TGT	G12C	4.3
Аденокарцинома	12	GGT → GAT	G12D	39.1
		GGT → GTT	G12V	24.2
	13	GGC → GAC	G13D	19.6

Выявление мутации *KRAS* является предиктором резистентности терапии, направленной против рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), включающей препараты цетуксимаб и панитумумаб [214]. Эти препараты нацелены на блокирование активности EGFR путем подавления индукции пролиферативного сигнального каскада, что в норме приводит к остановке деления

опухолевых клеток. Однако мутации в *KRAS* чаще всего приводят к конститутивной активации нижележащего сигнального каскада, позволяя обходить это воздействие. Сигнал передаётся независимо от активности EGFR по основным путям BRAF-MEK-ERK/PI3K-AKT-mTOR и также по другим путям, регулируемым *KRAS*, что делает блокаду рецептора EGFR в таком случае неэффективной [220]. ГТФазная активность суперсемейства белков RAS строго регулируется в клетке. Белки находятся в "активной" форме и проводят сигналы, когда они связаны с ГТФ, и "неактивны", когда связаны с ГДФ. В норме *KRAS* активируется белковой молекулой GEF (осуществляющей активацию замещения ГДФ на ГТФ), и дезактивируется молекулой GAP (ГТФ-связанная форма медленно переходит в ГДФ-связанную форму за счет присущей белку способности гидролизовать ГТФ) [221]. Одним из важных эффекторов *KRAS* является стимулятор диссоциации гуанин-нуклеотидов Ral - RalGDS. Этот сигнальный белок функционирует как фактор обмена ГТФ/ГДФ, способствуя активации RAS-подобных белков RAL путём замены ГДФ на ГТФ. RAL, в свою очередь, взаимодействуют с различными нижележащими в каскаде передачи сигнала эффекторами, такими как: Rac/Cdc42 ГТФазы, которые связаны с процессами клеточной миграции и морфогенеза; TANK-связывающей киназой 1 (TBK1), участвующей в активации противовирусного иммунного ответа; фосфолипазы D (PLD), регулирующей эндоцитоз и везикулярный транспорт.

Кроме того, *KRAS* может активировать PIAM1 и RAC1-специфические факторы обмена гуанин-нуклеотидов, стимулируя сигнальный путь RAC1. Этот путь критически важен для формирования актинового цитоскелета, контроля клеточной адгезии и миграции, а также имеет значение для эндоцитоза и мембранного переноса веществ.

KRAS также регулирует фосфатидилинозитоловый сигнальный путь, активируя фосфолипазу C ϵ (PLC ϵ), которая участвует в гидролизе фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата с образованием вторичных мессенджеров, таких как диацилглицерол и инозитолтрифосфат, способствующих кальциевой сигнализации и активации протеинкиназ [220] (рисунок 6).

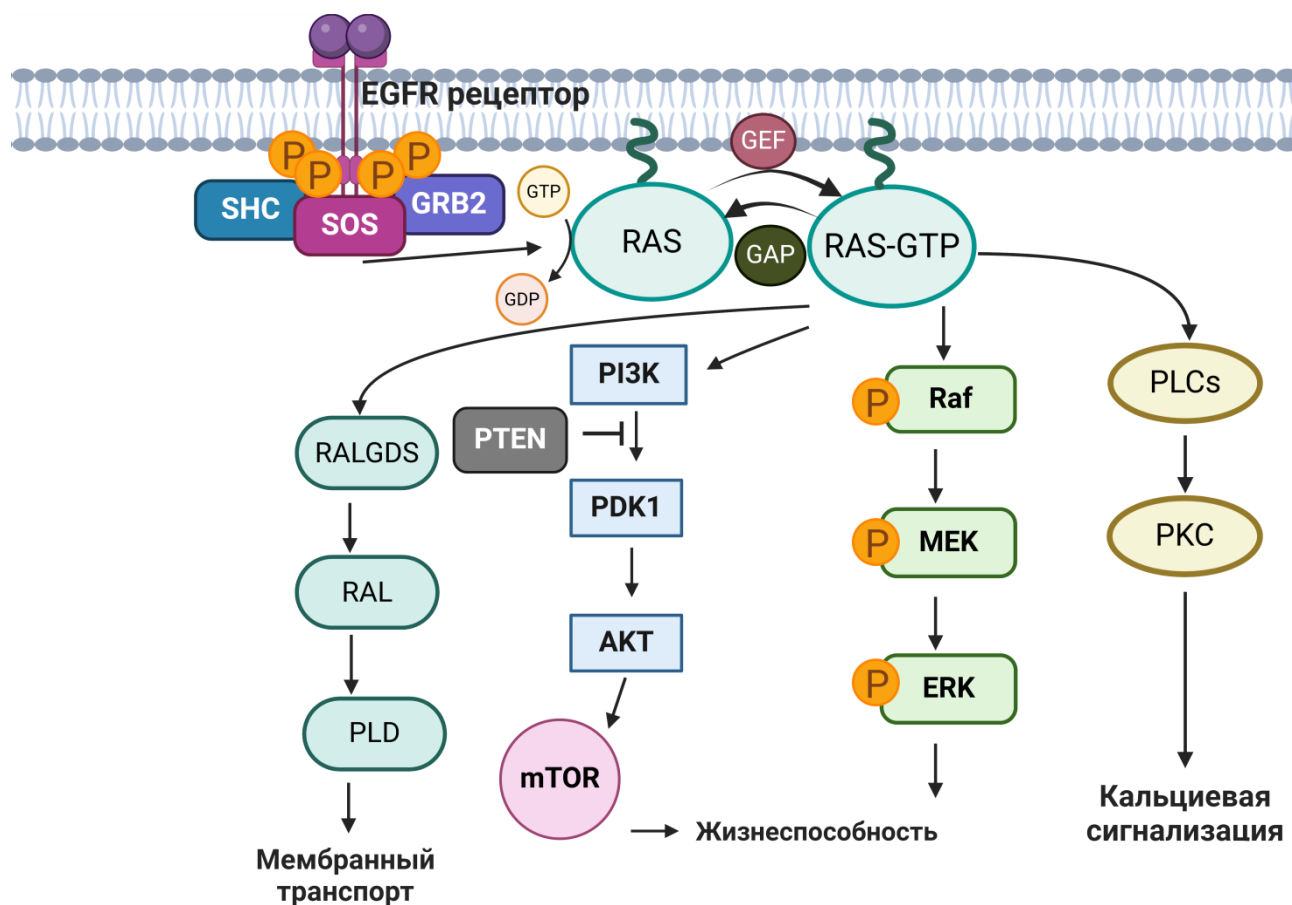


Рисунок 6 – Основные процессы, регулируемые *KRAS* в клетке

Таким образом, *KRAS* опосредует множество сигнальных сетей, которые тесно взаимосвязаны и участвуют в регуляции различных биологических процессов, включая цитоскелетную динамику, клеточный морфогенез, иммунный ответ и внутриклеточный транспорт. Сети этих сигнальных путей делают *KRAS* центральным узлом регуляции клеточной активности, а их дисфункция, как правило, связана с патологическими состояниями, такими как опухолевая трансформация клеток. В связи с этим, стандартом клинической практики является обязательное тестирование статуса *KRAS* перед началом лечения EGFR-таргетными препаратами.

Недавно появились данные, что влияние мутаций *KRAS* на резистентность может быть усложнено взаимодействием с другими генетическими и эпигенетическими факторами. Например, сопутствующие мутации в гене *PIK3CA*

или амплификация *MET*-генов могут дополнительно способствовать активации альтернативных сигнальных путей, усиливая устойчивость к терапии EGFR-ингибиторами [222].

Кроме того, кишечная микрофлора может влиять на потребление энергии и метаболизм рака по-разному у пациентов с КРР с мутцией *KRAS* и *KRAS* дикого типа. Исследования показали, что у пациентов с КРР, у которых ген *KRAS* дикого типа, имеются различия в составе микрофлоры между восходящей и нисходящей ободочной кишкой. Однако у больных КРР с мутацией *KRAS* эти различия исчезают, что позволяет предположить, что мутация *KRAS* может менять состав и соотношение микроорганизмов в кишечной микрофлоре, а преобладание патогенных микроорганизмов, например, рода *Staphylococcus* и их продуктов распада оказывают влияние на рост опухоли толстой кишки [213, 217, 220].

Выводы к главе 1

Ионы переходных металлов Mn^{2+} и Zn^{2+} обладают выраженным противораковым действием (таблица 3). Однако их биохимические и физиологические свойства различны, хотя и имеют определенную степень сходства в отношении регулируемых белков и метаболических путей. Учитывая, что транспортные белки Mn^{2+} также переносят Zn^{2+} и другие двухвалентные ионы, и что существует несколько Mn^{2+} - или Zn^{2+} -специфичных транспортеров, можно предположить, что существуют общие механизмы, которые регулируют эти ионы. Среди немногих механизмов, на которые обычно влияют Mn и Zn, встречаются: воздействие на функцию митохондрий, включая детоксикацию РФК и индукцию апоптоза, регуляция транскрипции и динамики хроматина, cGAS-STING-опосредованный апоптоз и иммунный ответ (таблица 4).

Таблица 3 – Важнейшие открытия о роли Mn^{2+} и Zn^{2+} в физиологии рака *in vivo*

При некоторых видах рака наблюдаются координированные изменения в переносчиках Zn^{2+} и Mn^{2+} .	[9, 31]
Высокий уровень Mn в раковых опухолях ассоциируется с худшей выживаемостью пациентов и низкой радиочувствительностью опухолей, например, при меланоме и глиобластоме.	[74]
Модели в доклинических исследованиях подтверждают применение ионофора в комплексе с Zn^{2+} - клиохинола в сочетании с агонистом дофамина для лечения рака простаты.	[34, 76]
Mn^{2+} усиливает врожденный и адаптивный противораковый иммунный ответ и повышает результативность иммунотерапии анти PD-1.	[77]
Терапевтическая активность анти-TGF-бета/PD-L1 антитела YM101 в комбинации с Mn^{2+} была продемонстрирована на мышинных моделях гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы, рака толстой кишки и рака молочной железы.	[209]
Zn^{2+} повышает эффективность темозоломида в модели ксенотрансплантата глиобластомы.	[78]

Таблица 4 – Важнейшие открытия о роли Mn^{2+} и Zn^{2+} в физиологии рака *in vitro*

Mn^{2+} -СОД2 стимулирует производство H_2O_2 в митохондриях в широком диапазоне внеклеточных концентраций.	[46]
Mn^{2+} в высоких концентрациях вызывает митохондриально-зависимую гибель клеток.	[115, 186]
Zn^{2+} в высоких концентрациях вызывает митохондриально-зависимую гибель клеток.	[53, 117]
Zn^{2+} в низких концентрациях ингибирует Mn-индуцированную митохондриально-зависимую гибель клеток.	[116]
Низкомолекулярные комплексы Mn^{2+} позволяют прогнозировать выживаемость клеток и эффективность репарации двунитевых разрывов после гамма-облучения.	[103]
Высвобождение Zn^{2+} необходимо для генерации РФК в митохондриях в ответ на гипоксию и предшествует ей.	[60, 155]
Mn^{2+} активирует p38/MSK1-регулируемый апоптоз.	[115]
В клетках мутантного G12V RAS Zn^{2+} ингибирует p38 и JNK, подавляя апоптоз.	[182]
Zn^{2+} активирует сигнальный каскад RAS.	[181]
Mn^{2+} индуцирует апоптоз или процесс старения с помощью p53-зависимых механизмов.	[186, 187, 188]
Zn^{2+} подавляет активность NF-κB и делает клетки рака простаты чувствительными к цитотоксическим препаратам.	[33, 179, 192]

Продолжение Таблицы 4

Mn ²⁺ подавляет ацетилирование гистонов, угнетая активность НАТ и усиливая HDAC, что приводит к апоптозу.	[16]
Zn ²⁺ активирует НАТ и MTF1-опосредованную транскрипцию, что приводит к индукции металлотионеина и дифференцировке кератиноцитов.	[61]
Mn ²⁺ незаменим для активации cGAS-STNG и защиты организма от ДНК-вирусов.	[107]
Координация Zn ²⁺ также необходима для жидкофазной конденсации cGAS-ДНК и выработки цГАМФ.	[206, 207, 208]

Многие интригующие вопросы еще предстоит решить в будущих исследованиях. Во-первых, противоречивые данные о концентрации Zn и Mn в раковых клетках требуют более детальных исследований, в которых следует изучить уровни микроэлементов цинка и марганца в раковых клетках, а также в различных типах иммунных и стромальных клеток из микроокружения опухоли. Для изучения функций Mn²⁺ в клеточной физиологии необходимо разработать внутриклеточные Mn²⁺ зонды, чтобы иметь возможность контролировать уровень Mn²⁺ во время исследований в живых клетках, подобно тому, как это делается для Zn²⁺. В будущих экспериментах было бы интересно более детально изучить, как взаимосвязаны Mn²⁺- и Zn²⁺-опосредованные эффекты. Так, например, на активацию сигнального пути cGAS-STING двухвалентные цинк и марганец влияют по разным механизмам, и было бы интересно исследовать их относительное влияние на апоптоз и прогрессию рака.

Недавние исследования подчеркивают важность поддержания гомеостаза цинка для развития и прогрессирования КРР. Так, изменения в экспрессии цинковых транспортеров, особенно ZnT1, который регулирует отток цинка из клетки, могут приводить к дисбалансу внутриклеточного уровня цинка, что наблюдается в раковых клетках [223]. Это, в свою очередь, может способствовать нарушению нормальных клеточных процессов и усилению опухолевого роста. Транскриптомный анализ образцов тканей КРР продемонстрировал повышенную экспрессию как транспортных белков группы ZnT (которые обеспечивают выведение цинка из клетки), так и группы ZIP (которые участвуют в поступлении

цинка в клетку). Эти изменения могут отражать возможность опухолевых клеток изменять гомеостаз цинка, необходимого для поддержания высоких темпов клеточной пролиферации и выживания в условиях окислительного стресса в гипоксических состояниях [12].

Интересным аспектом является роль металлотионеинов (МТ), которые при обычных условиях имеют низкую активность, но могут оказывать значительное влияние на чувствительность раковых клеток к препаратам, используемых в химиотерапии. Повышение экспрессии МТ в ответ на изменение уровня цинка может способствовать усилению эффекта химиотерапии, особенно при использовании препаратов оксалиплатин и 5-фторурацила. МТ могут связывать и выводить токсичные металлы, но в условиях сверхэкспрессии они также могут усиливать цитотоксичность этих препаратов, повышая чувствительность опухолевых клеток к лечению [224]. Введение цинка совместно с препаратами химиотерапии (оксалиплатина и 5-фторурацила) может усиливать эффект этих препаратов, способствуя ресенсибилизации клеток, устойчивых к химиотерапевтическому воздействию, что открывает перспективы для разработки новых терапевтических стратегий в лечении КРР [224].

Таким образом, нарушение гомеостаза цинка и изменение активности металлопротеинов в раковых клетках могут оказывать влияние на прогрессирование колоректального рака и его ответ на терапию химиотерапевтическими препаратами. Эти данные могут стать основой для разработки новых, более эффективных терапевтических подходов, направленных на восстановление нормального уровня цинка и модификацию экспрессии металлотионеинов в раковых клетках. Наконец, детали таких экспериментов приведут к доклиническим исследованиям и, в случае успеха, к клиническим испытаниям, изучающим влияние комбинированной добавки Mn и Zn на эффективность классической противоопухолевой терапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Ведение клеточных линий

Для проведения экспериментов *in vitro* в исследовании были выбраны модельные клеточные линии рака кишечника так, чтобы в одной из линий была *KRAS* мутация: аденокарцинома толстой кишки человека HCT-15 с *KRAS*-мутацией в 13 кодоне 2-го экзона *KRAS* — Gly13Asp, и клеточная линия аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu80. Согласно электронной энциклопедии клеточных линий Cellosaurus (URL: <https://www.cellosaurus.org/> (дата обращения: 09.10.2022)) HCT-15 несет мутацию *KRAS* в дополнение к мутациям в генах *APC*, *B2M*, *CHEK2*, *BRCA2*, *PIK3CA* и *TP53*, а HuTu80 имеет мутацию в экзоне 3 гена бета-катенина *CTNNB1*. Эти линии были предоставлены доктором Борисом Маргулисом и доктором Ириной Гужовой из Института цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург. Клетки HCT-15 культивировали в среде RPMI (Панэко, Россия), а клетки HuTu80 - в среде DMEM-F12 (Панэко, Россия). Обе среды были дополнены 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Biosera, Франция), 2 mM L-глутамином и растворенным пенициллин-стрептомицином в конечной концентрации 1% от объема среды (Панэко, Россия). Клетки инкубировали в культуральных флаконах или культуральных планшетах при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Когда клеточный слой занимал от 80% до 90% культуральной поверхности, проводили процедуру пересева с использованием раствора Версена (Панэко, Россия) в соотношении 1:6, каждые 3 дня.

2.2. Получение мутантных клеток с нокаутом в изучаемых генах методом CRISPR/Cas9

Для получения мутантных клеток с нокаутами изучаемых генов мы сначала создали моноклональные гомогенные клеточные линии, выведенные из единичной

клетки, методом клонирования в предельном разведении. Одиночные клетки высевали в 96-луночные планшеты (в концентрации 4 клетки/мл – для НСТ-15, и 8 клеток/мл – для HuTu80), по мере достижения культур клеток физических пределов в лунках культуральных планшетов, клетки переносили в 24-луночные планшеты, а затем переносили в 6-луночные планшеты и далее в флаконы Т-25 для дальнейшего ведения клеточной линии.

CRISPR/Cas9-опосредованную биаллельную мутацию гена *SLC39A14* проводили как в клеточных линиях НСТ-15, так и HuTu80, а нокаут гена *SLC39A8* - только в клетках HuTu80. Для подбора гидовых РНК (гРНК) мы использовали последовательности, предоставленные библиотекой Human CRISPR Knockout Pooled Library (URL: <https://www.addgene.org/pooled-library/broadgpp-human-knockout-brunello/> (дата обращения: 02.11.2021)) и сервисом Crispick (URL: <https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public> (дата обращения: 10.11.2021)). Экспериментальные гРНК были выбраны таким образом, чтобы направлять эндонуклеазу Cas9 на области, расположенные ближе к стартовому кодону кодирующей последовательности. Такая тактика облегчала нокаут гена путем введения мутации со сдвигом рамки считывания в обоих аллелях. Мы разработали три вектора для каждого гена, поскольку эффективность разных гРНК может существенно различаться.

Для экспрессии гРНК использовали специализированные векторные конструкции. Так, для экспрессии гРНК, нацеленных на *SLC39A14* или *SLC39A8*, в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (плазмида Addgene #48138) [225] были клонированы следующие олигонуклеотидные дуплексы:

- *SLC39A14*: прямая последовательность:

5'-CACCGCTAATACATCGGTATGGCGA-3';

обратная последовательность: 5'-AAACTCGCCATACCGATGTATTAGC-3'.

- *SLC39A8*: прямая последовательность:

5'-CACCGTGCTTGGCCGATCCTCACA-3';

обратная последовательность: 5'-AAACTGTGAGGATCGGCCCAAGCAC-3'.

Плазмиды трансформировали в компетентные клетки штамма DH5α *E. coli*. Культуры бактериальных колоний (ночные культуры), полученные в результате плазмидной трансформации, растили в течение ночи в 10 мл лизогенной среды (LB) с селективным для плазмиды рх458 антибиотиком – ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C и интенсивном перемешивании. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора GeneGet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США). Концентрацию полученной плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop (США) при длине волны 260 нм. Рестриктивный анализ полученных плазмид проводили по сайту рестрикции BbsI (контроли: разрезанный по BbsI вектор рх458 и цельный вектор рх458). Плазмиды со вставкой были отобраны по ориентиру на цельный вектор рх458. Далее отобранные со вставкой плазмиды проверяли секвенированием по Сэнгеру на точность и правильность вставки гРНК.

Трансфекцию клеточных линий НСТ-15 и HuTu80 конструкциями gRNA-Cas9 проводили с помощью Липофектамина 3000 (ThermoFisher, МА, США) в среде OPTI-MEM (Thermo Scientific, США). После трансфекции клетки, экспрессирующие GFP, отбирали с помощью флуоресцентной селекции. А именно, GFP-позитивные клетки сортировали на приборе CytoFLEX SRT (Beckman Coulter, СА, США) в 12-луночные планшеты. После образования отсортированными клетками монослоев в лунках культуральных планшетов, единичные клетки переклонировали в 96-луночные планшеты, используя клонирование в предельных разведениях для создания гомогенных клонов.

Подтверждение внесенных нокаутов проводилось в два этапа. Для проверки наличия мутаций в целевых локусах геномную ДНК выделяли из клеток НСТ-15 и HuTu80 с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Область, окружающую целевые сайты гРНК, амплифицировали методом ПЦР (таблица 5 и таблица 6), полученные продукты далее секвенировали по методу Сэнгера в компании Евроген (Москва, Россия). Данные секвенирования анализировали с помощью программы SnapGene 1.1.3, а мутации подтверждали с помощью автоматизированного инструмента TIDE, имеющего функции для разделения последовательностей секвенированных цепей ДНК с мутациями [226]. На втором

этапе, изогенные клоны, в которых подтвердилось наличие мутаций, впоследствии подвергались РНК-секвенированию - валидации всех РНК-транскриптов клетки для оценки уровня экспрессии генов. РНК-секвенирование, как второй этап подтверждения внесенных мутаций, в данном приложении является независимым методом подтверждения функционального нарушения экспрессии выбранных генов на уровне мРНК. Существенное снижение уровня транскрипта рассматривается как индикатор нестабильности мутантной мРНК. Детальный анализ уровней экспрессии изучаемых генов представлен в разделе «Результаты».

Таблица 5 – Праймеры для амплификации области вокруг сайта-мишени в ДНК (включает в себя протоспейсер и примыкающий к нему РАМ-мотив)

Ген	Последовательность протоспейсера	Праймер 5'-3'	Праймер 3'-5'
<i>SLC39A8</i>	TGCTTGGGCCGATC CTCACA	GAGGCATATTAAC TTCATTTTCAACAATG GT	CAGCTCCAAATTCTC TGTCATCTGT
<i>SLC39A14</i>	СТААТАСАТССГТА TGGCGA	ATCCCTGGGTGCA CCAGCTAT	TACCGTGGAGAGGTT CCTGTGT

Таблица 6 – Протоколы для проведения ПЦР

	Компоненты	Программа
<i>SLC39A8</i>	Вода до 25мкл Прямой праймер – 0,5 мкл (500мкМ) Обратный праймер – 0,5 мкл (500мкМ) 10xEncyclo буфер – 2,5 мкл (5x) dNTPs – 0,5 мкл (10мкМ) 50x Encyclo полимеразы – 0,5мкл (5000 ед/мл) Образец – 2 мкл	95°C – 2 минуты 45 циклов: 95°C – 20 секунд 67-63°C – 30 секунд 72°C – 15 секунд Окончание циклов 72°C – 2 минуты

Продолжение Таблицы 6

<i>SLC39A14</i>	Вода до 25мкл Прямой праймер – 0,5 мкл (500мкМ) Обратный праймер – 0,5 мкл (500мкМ) 10xEncyclo буфер – 2,5 мкл (5x) dNTPs – 0,5 мкл (10мкМ) 50x Encyclo полимеразы – 0,5мкл (5000 ед/мл) Образец – 3 мкл	95°C – 2 минуты 45 циклов: 95°C – 20 секунд 67-63°C – 30 секунд 72°C – 15 секунд Окончание циклов 72°C – 2 минуты
-----------------	---	---

2.3. Получение стабильных клеточных линий со сверхэкспрессией интересующих генов

В данном исследовании использовали 5 лентивирусных конструкций: рCDH-SLC30A3, экспрессирующую *SLC30A3*, рCDH-SLC30A10, экспрессирующую *SLC30A10*, рCDH-SLC39A8, экспрессирующую *SLC39A8*, рCDH-SLC39A14, экспрессирующую *SLC39A14* и контрольную рCDH-GFP, не несущую гена интереса. Для конструирования лентивирусных векторов создали конструкцию на основе плазмиды рCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP (SBI, США) (рисунок 7), в которой GFP был заменен на селекционный маркер устойчивости к пуромицину, и *SLC39A8* (NM_022154.5), *SLC30A3* (NM_003459.5), *SLC30A10* (NM_018713.3), *SLC39A14* (NM_015359.6) ORF-клоны (Origene). Гены *SLC39A14*, *SLC39A8*, *SLC30A3* и *SLC30A10* были амплифицированы с помощью высокоэффективной ДНК-полимеразы с праймерами (Origene):

Прямая последовательность с праймером VP1.5 (Origene):

5'-GGACTTTCCAAAATGTCG-3'

Обратная последовательность с праймером XL39 (Origene):

3'-GGGTGGTCGGAACAGGATTA-5'

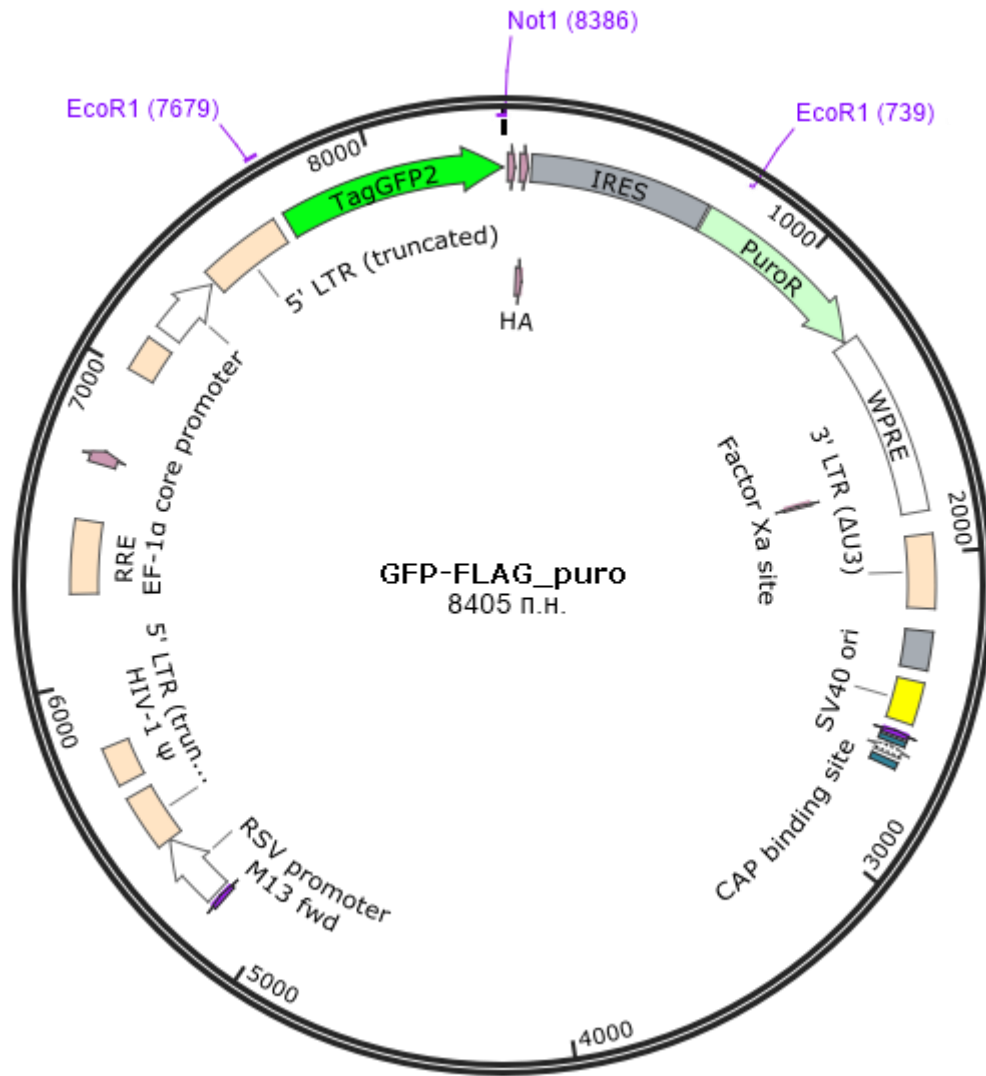


Рисунок 7 – Структура лентивирусной конструкции GFP с селекцией пурамицином, не содержащей последовательности генов семейств SLC30A/SLC39A

Конструкции для экспрессии генов *SLC39A8*, *SLC30A3*, *SLC39A14*, *SLC30A10* получали перестановкой соответствующих фрагментов амплифицированных ORF-клонов вместо GFP. Структурные элементы плазмиды (рисунок 7): **EF-1α Core Promoter** - это промотор, происходящий от гена фактора элонгации 1 альфа, который обеспечивает высокий уровень экспрессии для интересующего гена, встраиваемого в плазмиду; **FLAG и HA тэги** - это эпитопные метки, которые можно использовать для очистки и обнаружения белков, с их помощью можно идентифицировать и выделять экспрессированный белок с помощью

специфических антител; **IRES** (участок внутренней посадки рибосомы) - позволяет транслировать второй белок (например, сорGFP или ген интереса) с того же транскрипта мРНК, что используется при задаче бицистронной экспрессии, когда два белка производятся из одной мРНК; **WPRE** (посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков) - повышает стабильность и экспрессию мРНК, что приводит к повышению уровня производства белка; **Factor Xa Site** (сайт фактора Ха) - сайт распознавания протеазы фактора Ха, который может быть использован для гидролиза с целью высвобождения интересующего белка; **3'LTR** (длинный терминальный повтор) ретровирусного вектора способствует интеграции и стабильности трансгена в геноме хозяина; **SV40 Poly(A) Signal** (Сигнал поли(А) SV40) - обеспечивает правильную терминацию транскрипции и полиаденилирование мРНК, что имеет решающее значение для стабильности мРНК и эффективности трансляции; **SV40 ori** – точка начала репликации SV40 позволяет воспроизводить плазмиду в SV40-позитивных клетках; **прямые и обратные праймеры M13** – последовательности, используемые для секвенирования и амплификации; **Lac оператор и промотор** – являются частью системы оперона lac, которая может быть использована для контроля экспрессии генов в бактериальных системах; **CAP Binding Site** - сайт связывания КЭП - участвует в регуляции экспрессии генов у прокариот, способствуя связыванию белка КЭП в ответ на изменение уровня цАМФ; **RSV** (вирус саркомы Рауса) **промотор**, который может управлять экспрессией генов в эукариотических клетках; **5' LTR (усеченный)** - содержит регуляторные элементы, необходимые для инициации транскрипции; **элементы ВИЧ-1: RRE** (Rev Response Element) - участвует в переносе несплайсированных и частично сплайсированных вирусных мРНК из ядра в цитоплазму, **пептид gp41** - часть белка оболочки ВИЧ, которая может участвовать в процессах слияния мембран, **cPPT/CTS** (центральный полипуриновый тракт/центральная терминальная последовательность) - важны для процессов обратной транскрипции и интеграции в ретровирусные векторы; **TagGFP2** - зеленый флуоресцентный белок, который можно использовать в

качестве репортера или для мониторинга эффективности трансфекции и уровня экспрессии [224].

ПЦР-амплификация генов проводилась в следующих условиях: начальная денатурация при 95 °C в течение 5 мин, затем 30 циклов: 95 °C в течение 30 с, отжиг в течение 30 с, элонгация при 72 °C в течение 1 мин, завершающая элонгация при 72 °C в течение 10 мин. Полученные ПЦР-продукты были гидролизированы с помощью рестриктаз EcoRI и NotI (Thermo Fisher, MA, США) для получения свободных концов. Далее, после проведения агарозного гель-электрофореза, продукты были разделены и очищены с помощью экстракции из геля. Очищенные вставки лигировали в вектор pCDH-GFP, имеющий сайты рестрикции EcoRI и NotI, с помощью ДНК-лигазы T4 при оптимальных условиях, и трансформировали в культуру штамма DH5 α E. coli. Плазмидную ДНК высокого качества выделяли с помощью набора GeneGet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США). Концентрацию полученной плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop (США) при длине волны 260 нм. Полученные плазмиды были проверены методом ПЦР.

Затем клетки HEK293T котрансфецировали рекомбинантной плазмидой вместе с упаковочными плазмидами (psPAX2 и pMD2.G) с помощью трансфецирующего реагента Липофектамина 2000 (ThermoFisher, MA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Вирусные супернатанты собирали через 48-72 ч после трансфекции. Клетки-мишени (HCT-15 и HuTu80) трансдуцировали вирусными супернатантами в присутствии полибрена в концентрации 5 мкг/мл в течение 24-48 ч. После трансдукции клетки отбирали селекцией на пуромицине (6,6 мкг/мл в клеточной среде) в течение 5-10 дней, с заменой среды каждые 2-3 дня. Клоны, в которых наличие трансгена подтвердили с помощью детекции FLAG-тэга антителами к FLAG с помощью Вестерн-блоттинга, далее отправляли на РНК-секвенирование. Аналогично, в качестве контроля проводили котрансфекцию клеток HEK293T вектором pCDH-EF1a-MCS-IRES-copGFP, не содержащим последовательности генов SLC30A/SLC39A. Полученные таким образом клетки HCT-15 и HuTu80 несут GFP-метку, и далее

используются как контрольные клетки в сравнении с клеточными линиями со сверхэкспрессиями.

2.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Клетки промывали PBS и выделяли белки с помощью стандартного буфера RIPA (Tris-HCl pH 8, 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%) на льду и ультразвукового воздействия в течение 30 с для выделения белков. Концентрацию белка определяли с помощью набора BCA (бицинхониновая кислота) (Thermo Fisher Scientific, США), а электрофорез в полиакриламидном геле с использованием натрия додецилсульфата (SDS-PAGE) проводили в соответствии с рекомендациями производителя (Bio-Rad Laboratories, США). Белки по их молекулярным массам разделяли с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле (источник питания PowerPac HC, 90 мин: 30 мин 200В, 60 мин 150В, Bio-Rad, США) и переносили на ПВДФ (поливинилиденфторидную) мембрану (Bio-Rad, США, пора 0,2 мкм) с использованием системы Mini TransBlot Cell и источника питания PowerPac HC (Bio-Rad, США).

2.5. Вестерн блоттинг

Полученные мембраны с белками инкубировали в растворе для блокирования неспецифических сайтов связывания антител, состоящем из 5% молока в TBS 0,1% Tween 20. Далее мембраны помещали на ночь при комнатной температуре в раствор первичных антител. Для иммуноблоттинга использовали первичные антитела против FLAG (GTX115043, GeneTech, США и GAPDH (GTX100118, GeneTech, США) в разведении 1:10 000. Далее блоты отмывали в растворе TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) и инкубировали с соответствующими вторичными антителами против мышиных IgG (Bio-Rad, США) в блокировочном растворе при комнатной температуре в течение 1 часа. Для выявления белковых полос использовали субстрат для вестерн-блоттинга Pierce

ECL (Thermo Fisher Scientific, США) и визуализировали в системе геле-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

2.6. Флуоресцентная микроскопия

Для визуализации внутриклеточного Zn использовали витальный коммерческий краситель FluoZin-3 AM (Thermo Fisher Scientific, США), который добавляли в клетки в соответствии с инструкцией производителя. А именно, 2 мМ исходный раствор FluoZin-3 AM был приготовлен путем растворения 100 мкг FluoZin-3 AM в соответствующем объеме ДМСО – 50,85 мкл. Затем этот исходный раствор разводили до конечной концентрации 2 мкМ в среде Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки для эксперимента рассеивали в 96-луночные планшеты для флуоресценции (Greiner Bio One, Австрия). Перед добавлением красителя клетки промывали бесфосфатным буфером Хэнкса (HNBSS). Затем клеточные линии инкубировали с Opti-MEM, содержащем 3 мкМ FluoZin-3 AM и 2 мкМ ядерного красителя Hoechst 33342 (Servicebio, Китай), в течение 1 ч при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. После инкубации клетки снова промывали буфером HNBSS. Изображения снимали сразу после окончательной промывки.

Изображения иммунофлуоресцентного окрашивания культивируемых клеток получали с помощью системы визуализации EVOSM7000 (Thermo Fisher Scientific, США) под объективом с 20-кратным увеличением. При визуализации использовали специальные наборы фильтров: DAPI (357/447 нм) для ядер, окрашенных Hoechst 33342, и GFP (470/525 нм) – для цинка, связанного с FluoZin-3 AM. Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ZEISS ZEN 3.2 (blue edition).

2.7. Измерение скорости роста клеток

Скорость удвоения клеток определяли путем моделирования экспоненциального роста с помощью программы GraphPad PRISM версии 8.0.1. В

лунку 96-луночного планшета высевали клетки плотностью 16 000 клеток на лунку в 0,15 мл культуральной среды. Начиная со следующего после посева дня, каждые 24 ч проводили измерения относительных флуоресцентных единиц (ОФЕ) клеток. Количество клеток определяли в ОФЕ с помощью флуоресцентного красителя нуклеиновых кислот SYTO 62 (Thermo Fisher Scientific, США). Перед окрашиванием клетки промывали фосфатно-буферным солевым раствором (PBS), а повышение проницаемости клеточных мембран достигалось с помощью инкубации клеток в течение 10 минут в растворе 70% этанола. После еще одного промывания PBS клетки инкубировали со средой, содержащей 3 мкМ ядерного красителя SYTO, в течение 30 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Детекцию сигнала проводили сразу после финального промывания образцов, на сухих клетках в 96-луночных планшетах с помощью микропланшетного ридера Varioskan (Thermo Scientific, США). По полученным значениям ОФЕ строили график зависимости интенсивности флуоресценции от времени детекции сигнала после первого дня посева клеток (24 ч, 48 ч, 72 ч и 96 ч). Для количественного анализа пролиферации клеток из получившегося графика зависимости в программе GraphPad PRISM версии 8.0.1 выводили время удвоения из уравнения экспоненциального роста.

2.8. Измерение восстанавливающего потенциала в клетках

Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности примерно 12000 клеток на лунку в 0,15 мл ростовой среды. Планшеты инкубировали в течение 24 ч, чтобы обеспечить прикрепление клеток. После этого периода инкубации каждые 24 ч проводили измерения ОФЕ для живых клеток перед окрашиванием SYTO. Для измерения ОФЕ ростовую среду удаляли, и в каждую лунку добавляли 10% раствор резазурина в PBS (0,1 мл на лунку). Затем планшеты инкубировали в темноте при 37 °С в течение 3 ч для накопления продукта восстановления резазурина – резоруфина [94]. Интенсивность флуоресценции резоруфина измеряли с помощью микропланшетного ридера

Varioskan Flash при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны эмиссии 590 нм. Значения ОЕФ, полученные при измерении сигнала всех клеток после добавления резазурина для каждой клеточной линии, были нормализованы на число клеток для получения коэффициента митохондриального дыхания путем соотношения сигнала резорфуфина с сигналом SYTO [227].

2.9. Измерение концентраций полуингибирования IC_{50} препаратов

Винкристин (Selleck, США) был приготовлен в виде исходного раствора с концентрацией 21,7 мМ в ДМСО и хранился при -20°C . Иматиниб мезилат (Selleck, США) в исходной форме 25 мг сухого порошка был переведен и хранился при -20°C в виде 28,3 мМ раствора в ДМСО. Цисплатин (Teva, Нидерланды) в виде 1,66 мМ раствора хранился при комнатной температуре, а цетуксимаб (Merck, Германия) в виде раствора 5 мг/мл хранился при температуре 4°C .

Жизнеспособность клеток для расчета IC_{50} оценивали с помощью набора MTT Cell Proliferation Kit (Roche, Швейцария) в соответствии с протоколом производителя. Клетки сеяли в 96-луночные планшеты при низкой плотности и инкубировали с 0,5 мкг/мл раствором 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (MTT) в культуральной среде в течение 3-4 ч до образования фиолетовых кристаллов соли формаза. Затем добавляли буфер для солюбилизации и планшеты инкубировали в течение ночи в увлажненной атмосфере при 37°C с 5% CO_2 . Измерение светопоглощения проводили при длинах волн 570 и 650 нм на спектрофотометре Varioskan Microplate Reader. Увеличение абсорбции прямо коррелировало с количеством живых клеток и их метаболической активностью.

Значения IC_{50} рассчитывали с помощью программы GraphPad PRISM версии 8.0.1. Данные нормировали на контроль (необработанные препаратами клетки, обозначали как 100% жизнеспособность) и строили кривую «доза-ответ», в зависимости: концентрация препарата – ОФЕ при измерении МТТ. Использовали четырехпараметрическую логистическую модель, и определяли концентрацию

препарата, необходимую для подавления жизнеспособности клеток на 50% (IC_{50}). Все эксперименты проводились в трех биологических повторностях, а результаты представлены как среднее значение $IC_{50} \pm$ стандартное отклонение.

2.10. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла

Анализ клеточного цикла проводился согласно следующему протоколу: клетки высевали в 6-луночные культуральные планшеты при плотности 50 000 клеток на лунку и инкубировали в течение 3 дней. Клетки отделяли от поверхности лунок с помощью раствора Версена. Для анализа содержания ДНК методом проточной цитофлуориметрии проводили выделение ядер из клеток и их окрашивание с помощью красителя пропидия йодида (PI), флуоресценция которого служит количественным показателем содержания ДНК. Снятые клетки дважды промывали PBS путём центрифугирования при 100g. Полученный клеточный осадок фиксировали в 70% этаноле при $-20^{\circ}C$ в течение 30 минут. Далее клетки центрифугировали в течение 10 минут при 1000g, промывали PBS и ресуспендировали в 0,2 мл PBS, содержащего 10 мкг/мл RNase A II и 2 мкг/мл PI. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте. Для оценки распределения клеточного цикла проводили проточный цитометрический анализ на приборе BD Accuri C6 Plus.

2.11. Анализ накопления микроэлементов в клетках

Микроэлементный состав образцов клеточных линий анализировали в Лаборатории молекулярной диетологии Сеченовского Университета по протоколу, разработанному группой А. В. Скального [228]. Нокаутные клоны и клетки дикого типа из трех разных пассажей снимали с культуральных планшетоов с помощью раствора Версена, промывали PBS, осаждали и убирали надосадочную жидкость. Полученные клеточные осадки хранили при $-70^{\circ}C$ до дальнейшего анализа. Перед анализом образцы высушивали до стабильного веса в лабораторном вытяжном

шкафу. Затем высушенные образцы подвергались микроволновому перевариванию с использованием прибора Berghof SpeedWave-4 DAP-40 (Berghof Products & Instruments, Германия) в концентрированной азотной кислоте (HNO_3 ; Sigma-Aldrich, Co., МО, США). Содержание микроэлементов и минералов оценивали с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) на приборе NexION 300D (PerkinElmer Inc., Шелтон, США), оснащённом автодозатором ESI SC-2 DX4 (Elemental Scientific Inc., Омаха, США). Результаты накопления 25 микроэлементов, представленные в ppm (миллионная доля, число частей на миллион), были обработаны в среде программирования R.

2.12. Подготовка библиотек и секвенирование РНК

Библиотеки РНК были сгенерированы и секвенированы в соответствии с методом, описанным в публикации [229]. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Micro Kit (Qiagen). Концентрацию РНК измеряли флуориметрически с помощью набора Qubit 4 и Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Для измерения числа целостности РНК (RNA Integrity Number, RIN) и показателя DV200 (% содержания РНК-фрагментов с размером больше, чем 200 п.н.) использовали прибор TapeStation 4150 с набором RNA ScreenTapes and Reagents (Agilent). Истощение рибосомальной РНК и создание библиотек проводили с помощью набора KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase HMR (Roche). Уникальные праймеры KAPA (UDI Primer Mixes) с двойной индексацией (Roche) использовались для мультиплексирования образцов в одном цикле секвенирования. Концентрацию библиотек измеряли с помощью Qubit 4 с набором Qubit ds DNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific). Для распределения длины фрагментов использовали TapeStation 4150 с набором D1000 ScreenTapes and Reagents (Agilent). Секвенирование РНК проводили в лаборатории клинической и геномной биоинформатики Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет, Москва, Россия) на оборудовании Illumina NextSeq 550 для одноконцевого секвенирования, длина

чтения 50 п.н., приблизительно 20 млн необработанных чтений на образец. Проверка качества данных проводилась с помощью программы Illumina SAV. Демультиплексирование проводили с помощью программного обеспечения Illumina Bcl2fastq2 версии 2.17.

2.13. Обработка данных РНК-секвенирования

Качество сырых чтений секвенирования оценивали с помощью программы Illumina Sequencing Analysis Viewer и затем демультиплексировали с помощью программного обеспечения Illumina Bcl2fastq2 версии 2.17. Полученные FASTQ-файлы были обработаны и выравнены с помощью программы STAR в режиме «GeneCounts» с использованием аннотации транскриптома человека Ensembl (версия GRCh38.89). Идентификаторы генов Ensembl были преобразованы в символы генов международной организации по изучению генома человека (HGNC) с помощью полного набора данных HGNC (версия от 13 июля 2017 г.), что позволило определить уровень экспрессии для 36 596 аннотированных генов с идентификаторами HGNC.

Для анализа известных экспрессионных данных профили секвенирования РНК были получены из проекта атлас ракового генома (TCGA) с помощью пакета TCGAAbiolinks. Кроме того, была использована собственная база данных, содержащая около 1300 оригинальных профилей секвенирования РНК из образцов опухолей человека, включающая 154 профиля KPP, из которых в 25 образцах подтверждена активирующая мутация *KRAS*. Информация о молекулярных путях была получена из базы данных OncoboxPD Web (URL: <https://open.oncobox.com> (дата обращения 29.05.2023)) [230].

Уровни активации путей (PALs) рассчитывали по методу Oncobox [231], используя натуральный логарифм для расчетов. Значение p-value определялось как квантиль PAL в исследуемом образце относительно распределения PAL в нормальных образцах. Как положительные, так и отрицательные значения PAL

считались потенциальными прогностическими биомаркерами колоректального рака.

Логарифмически преобразованное количество прочтений, нормализованное с помощью программного обеспечения DESeq2 (версия 1.44.0), облегчало иерархический кластерный анализ транскриптомных профилей. Гены, которые считались дифференциально экспрессированными, должны были соответствовать пороговому значению коэффициента ложного обнаружения Бенджамина-Хохберга (FDR), скорректированному на $p\text{-value} < 0,05$. Диаграммы дифференциально экспрессируемых генов строили с помощью пакета R EnhancedVolcano (версия 1.16.0), статистические анализы проводили в среде программирования R. Анализ обогащения терминов генных онтологий (GO) проводили с помощью пакетов R clusterProfile (версия 4.2.1) и org.Hs.eg.db (версия 3.8.2). Анализ главных компонент (PCA) и визуализацию лог-трансформированных подсчетов для всех генов выполняли с помощью программ pca2d R (версия 3.6.2) и prcomp (из пакета «stats» версии 4.4.0). Построение диаграмм Венна осуществлялось с помощью пакетов R ggVennDiagram (версия 1.5.2) и R Venn (версия 1.1.0).

Полные данные секвенирования депонированы под ID: GSE276849 в электронной открытой базе GEO Publications (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE276849> (дата обращения 29.11.2024)).

2.14. Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad PRISM 8.0.1. Статистически значимым считалось p -значение менее 0,05. Результаты представлялись следующим образом: $p > 0,05$ (незначимо, ns), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) и $p \leq 0,0001$ (****). Данные двух групп анализировались с помощью непарного t -теста, а данные более чем двух групп - с помощью одностороннего или двустороннего ANOVA с последующим вторичным (post-hoc) анализом данных для определения специфических различий

между группами. Регрессивная линия определялась с помощью GraphPad Prism, а углы наклона линий сравнивались с помощью линейного регрессионного анализа. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение на основе не менее трех независимых экспериментов, проведенных в разные дни.

Значимость PAL оценивалась с помощью метода анализа путей Онкобокс [231] с использованием OncoboxPD (Oncobox Pathway Databank) [230]. Для расчета PAL каждый профиль экспрессии нормировался на среднегеометрический уровень экспрессии всех генов в исследуемом наборе данных.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Оценка уровней экспрессии генов семейств *SLC30A* и *SLC39A*

На основе биоинформатического анализа данных транскриптомов из базы данных GEO, ген *SLC30A10* был ранее определен как один из десяти генов-кандидатов, маркирующих колоректальный рак (КРР). Чаще всего, его экспрессия снижена из-за метилирования промотора гена [231]. Данные РНК-секвенирования показали, что экспрессия *SLC30A10* при КРР отрицательно коррелирует с его функциональными антагонистами *SLC39A14* и *SLC39A8* [1]. Их белковые продукты, в свою очередь, опосредуют внутриклеточный захват двухвалентных ионов марганца, цинка, железа и кадмия [232, 233, 234].

Поэтому для изучения взаимосвязи между генами *SLC39A8*, *SLC39A14*, *SLC30A3*, *SLC30A10* и колоректальным раком нами была проанализирована экспрессия этих генов по известным данным в нормальных тканях и тканях аденокарциномы толстой кишки (COAD) и рака прямой кишки (READ). Данные были получены из проекта атлас ракового генома (TCGA) и из нашей базы данных Oncobox pathway databank (OncoboxPD). Контрольными образцами в базе OncoboxPD служили нормальные ткани от здоровых доноров, в отличие от нормальных тканей в базе TCGA, которые являются условно нетронутыми опухолью тканями онкобольных [229].

Из анализа набора данных COAD-READ из базы TCGA (рисунок 8А) мы видим, что экспрессия мРНК *SLC30A10* в колоректальном раке с мутацией гена *KRAS* ($n = 143$, $P = 3,45 \times 10^{-22}$) и в колоректальном раке без мутации *KRAS* ($n = 261$, $P = 3,05 \times 10^{-24}$) значительно понижена по сравнению с нормальными тканями ($n = 41$). В наборе данных о колоректальном раке из базы OncoboxPD (рисунок 8Б) не было обнаружено статистически значимого различия в экспрессии мРНК *SLC30A10* между колоректальным раком с мутацией *KRAS* ($n = 25$) и без мутации ($n = 30$) по сравнению с нормальными тканями ($n = 6$). В результате анализа набора данных COAD-READ из базы TCGA (рисунок 8А) не было обнаружено

статистически значимого различия в экспрессии мРНК *SLC30A3* между колоректальным раком с мутацией гена *KRAS* ($n = 143$) и без мутации ($n = 261$) по сравнению с нормальными тканями ($n = 41$). Анализ набора данных о колоректальном раке из базы Онкобокс (рисунок 8Б) показал, что экспрессия мРНК *SLC30A3* в колоректальном раке без мутации *KRAS* ($n = 30$, $P = 0,017$) значительно понижена по сравнению с нормальными тканями ($n = 6$), тогда как статистически значимого различия в уровнях экспрессии мРНК *SLC30A3* в колоректальном раке с мутацией *KRAS* ($n = 25$) по сравнению с нормальными тканями ($n = 6$) не обнаружено. Анализ набора данных COAD-READ из базы TCGA (рисунок 8А) показал, что экспрессия мРНК *SLC39A14* в колоректальном раке с мутацией гена *KRAS* ($n = 143$, $P = 0,002$) и в колоректальном раке без мутации *KRAS* ($n = 261$, $P = 0,001$) значительно понижена по сравнению с нормальными тканями ($n = 41$). Анализ набора данных о колоректальном раке из базы ОнкобоксPD (рисунок 8Б) показал статистически значимое увеличение экспрессии мРНК *SLC39A14* в колоректальном раке без мутации *KRAS* ($n = 30$, $P = 0,026$) по сравнению с нормальными тканями ($n = 6$). Анализ набора данных COAD-READ из базы TCGA (рисунок 8А) показал, что экспрессия мРНК *SLC39A8* в колоректальном раке с мутацией гена *KRAS* ($n = 143$, $P = 0,007$) и в колоректальном раке без мутации *KRAS* ($n = 261$, $P = 0,000167$) значительно понижена по сравнению с нормальными тканями ($n = 41$). В то же время, по результатам анализа набора данных о колоректальном раке из базы ОнкобоксPD (рисунок 8Б), было обнаружено значительное повышение экспрессии мРНК *SLC39A8* как в колоректальном раке без мутации *KRAS* ($n = 30$, $P = 0,02$), так и в колоректальном раке с мутацией гена *KRAS* ($n = 25$, $P = 0,005$) по сравнению с нормальными тканями ($n = 6$).

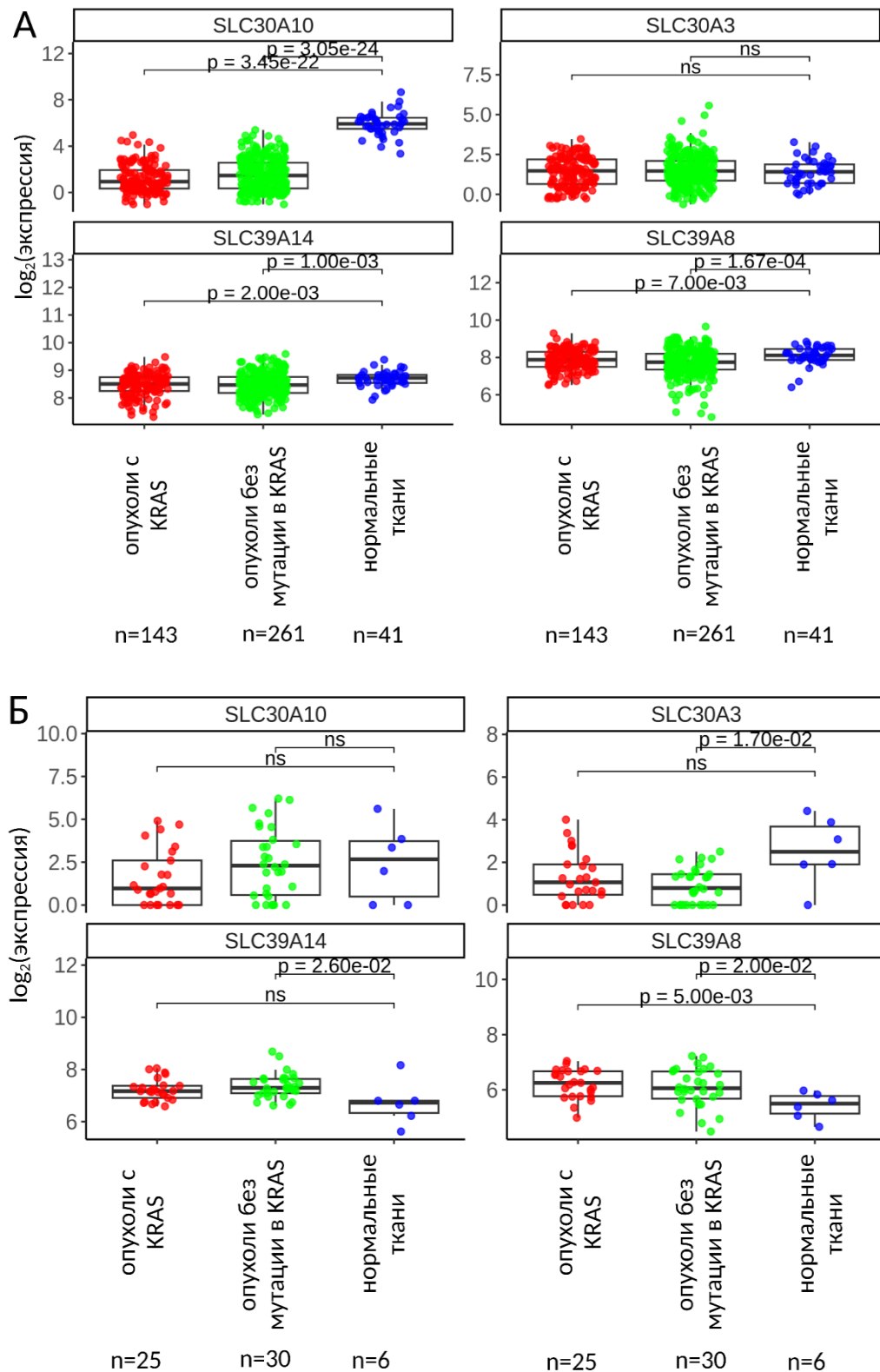


Рисунок 8 – Сравнительный анализ экспрессии генов семейств SLC30A и SLC39A в тканях колоректального рака. Специфические профили экспрессии мРНК генов *SLC30A10*, *SLC30A3*, *SLC39A8* и *SLC39A14* были получены из наборов данных: А – TCGA. Б – Онкобокс. Экспрессия генов представлена в логарифмической форме. Для анализа был применен U-критерий Манна — Уитни и скорректированные р-значения по FDR ($p < 0,1$)

Тем не менее, в данных, доступных через браузер COSMIC, показано, что у небольшой группы пациентов с КРР (~6%) наблюдается повышенная экспрессия *SLC30A10*. Это также может быть связано с активацией *SLC30A3* (~1,5% случаев в данных COSMIC). Таким образом, механизм модуляции *SLC30A10*, связанный с канцерогенезом, может быть более сложным, чем просто подавление активности этого гена. Например, он может быть связан с функцией транспортера Mn, а также с димеризацией белков *SLC30A3/SLC30A10*, которые влияют на сигнальную ось EGFR/ERK. Ранее было обнаружено, что экспрессия *SLC30A10* отрицательно коррелирует с его функциональными антагонистами *SLC39A14* и *SLC39A8*. И альтернативный сплайсинг *SLC39A14* фиксировался при колоректальном раке [167].

Интересно, что гены, образующие гетеродимеры белков *SLC30A3* и *SLC30A10*, имеют относительно высокую нормализованную частоту мутаций и входят в топ-20-25% наиболее мутированных генов [235]. Другие гены SLC, упомянутые в контексте данного исследования, а именно *SLC39A14* и *SLC39A8*, имеют в 2-5 раз меньшую частоту мутаций [236].

Таким образом, профили экспрессии из обоих наборов данных показывают, что уровень мРНК генов *SLC30A10*, *SLC30A3*, *SLC39A8* и *SLC39A14* изменен в тканях колоректального рака по сравнению с нормальными тканями толстой кишки. Неоднозначность направлений изменений генных экспрессий указывает на необходимость экспериментального изучения этих генов и их роли в канцерогенезе.

3.2. Создание и характеристика клеточных линий с нокаутами генов

SLC39A8* и *SLC39A14

SLC39A8- и *SLC39A14*-мутантные клетки были получены методом редактирования генов CRISPR/Cas9. Для гена *SLC39A8* мишенью был выбран 3 экзон. С использованием нацеленной на такую мишень гРНК, направление эндонуклеазы Cas9 привело к делециям 17 и 20 п.н., инактивирующим оба аллеля

гена *SLC39A8* в изогенном клоне NuTu80 (рисунок 9А). В клетках НСТ-15 не удалось получить нокаутную по гену *SLC39A8* линию клеток. Для гена *SLC39A14* мишенью был выбран экзон 2, что привело к делециям на 2 и 7 п.н., инактивирующим оба аллеля в изогенном клоне NuTu80 (рисунок 9Б) и к делеции на 2 п.н. и вставке на 1 п.н., инактивирующим оба аллеля в изогенном клоне НСТ-15 (рисунок 9В).

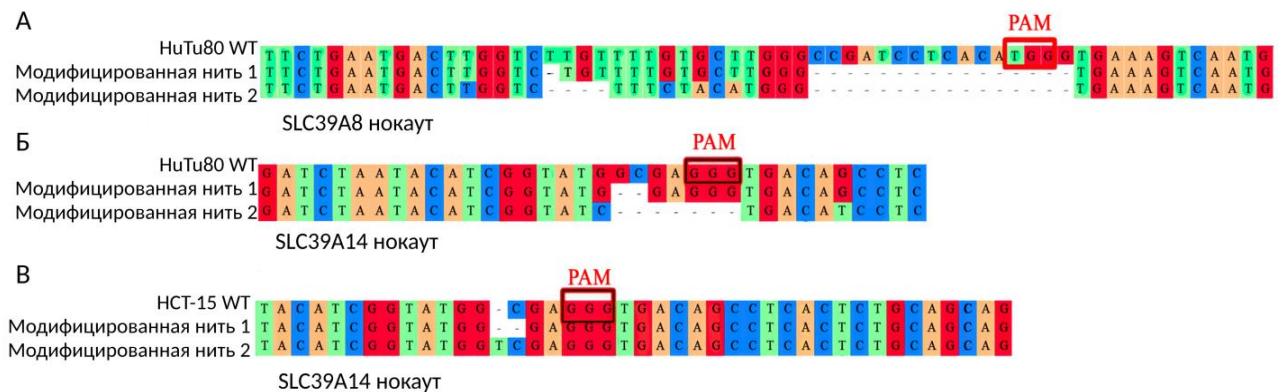


Рисунок 9 – Выровненные декодированные последовательности мутантных клонов в сравнении с последовательностями клеток дикого типа. А – Нокаут клеток NuTu80 путем нацеливания на экзон 3 гена *SLC39A8*. Б – Нокаут клеток NuTu80 путем нацеливания на экзон 2 гена *SLC39A14*. В – Нокаут клеток НСТ-15 путем нацеливания на экзон 2 гена *SLC39A14*

При анализировании кривых клеточного роста были продемонстрированы сопоставимые темпы роста нокаутных и исходных диких клеточных линий NuTu80 и НСТ-15, с примерно одинаковым временем удвоения (рисунок 10). Время удвоения клеточной популяции для клеток NuTu80 дикого типа (WT) составило 1,3 дня, в то время как для нокаутных вариантов *SLC39A8* и *SLC39A14* время удвоения составило 1,5 и 1,2 дня, соответственно (рисунок 10А, Б). В клетках НСТ-15 WT время удвоения составило 1,1 дня, тогда как нокаут *SLC39A14* привел к удвоению в 1,3 дня (рисунок 10В). При сравнении клеточного роста нокаутных клеток и клеток дикого типа линий NuTu80 и НСТ-15 было установлено, что, в целом, время удвоения популяции клеток между мутантными клетками и клеток дикого типа различается незначительно. Для линии NuTu80 в клетках дикого типа время удвоения составило 1,3 дня, тогда как у нокаутных по генам *SLC39A8* и *SLC39A14*

— 1,5 и 1,2 дня соответственно. В клеточной линии НСТ-15 аналогичное время удвоения составило 1,1 дня - для дикого типа, и 1,3 дня - для клеток с нокаутом по гену *SLC39A14*.

Однако, при анализе динамики клеточного роста по дням, были выявлены значимые отличия в отдельных временных точках. В линии HuTu80 при нокауте *SLC39A8* наблюдалось достоверное снижение числа клеток на 3-й и 4-й день по сравнению с клетками дикого типа ($p < 0,05$). При нокауте гена *SLC39A14* количество клеток на 3-й день также было статистически значимо ниже, чем в контрольной популяции ($p < 0,05$). Для линии НСТ-15 значимых различий в числе клеток между диким типом и нокаутом *SLC39A14* не обнаружено.

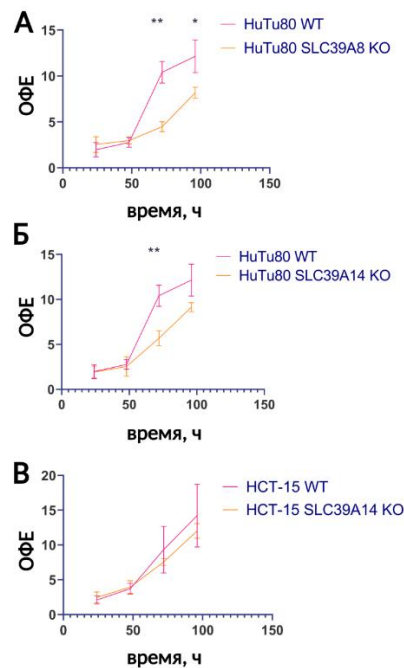


Рисунок 10 – Кривые роста, отражающие скорость роста исходных дикого типа и мутантных клеточных линий в течение 4 дней ежедневных измерений. А – Сравнение клеточной линии HuTu80 WT и клеточной линии HuTu80 с нокаутом гена *SLC39A8*. Значительная разница в количестве клеток (измеряется в относительных единицах флуоресценции, ОФЕ) через 72 ч и 96 ч инкубации. Б – Сравнение клеточной линии HuTu80 WT и клеточной линии HuTu80 с нокаутом гена *SLC39A14*. Значимая разница в количестве клеток (измерено в ОФЕ через 72 ч инкубации). В – Сравнение клеточной линии НСТ-15 WT и клеточной линии НСТ-15 с нокаутом гена *SLC39A14*. Количество клеток определяли в ОФЕ с помощью флуоресцентного красителя нуклеиновых кислот SYTO 62. Представлены данные (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM)) из трех или более независимых экспериментов. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Исходя из этих наблюдений, можно предположить, что гены *SLC39A8* и *SLC39A14* могут оказывать влияние на пролиферацию клеток HuTu80 в определённые временные промежутки, тогда как в клетках НСТ-15 влияние этих генов на скорость роста минимально.

Распределение фаз клеточного цикла не было изменено в нокаутных клетках по сравнению с контрольными WT (рисунок 11А, Б). Для НСТ-15 процент клеток в фазах G1, S и G2/М составлял 41%, 20% и 35% соответственно для клеток дикого типа, и 42%, 19% и 34% - для клеток с нокаутом гена *SLC39A14* соответственно. Для HuTu80 процент клеток в фазах G1, S и G2/М составлял 57%, 13% и 27% для клеток дикого типа, 55%, 13% и 27% - для клеток с нокаутом гена *SLC39A8*, и 57%, 13% и 27% - для клеток с нокаутом гена *SLC39A14* соответственно.

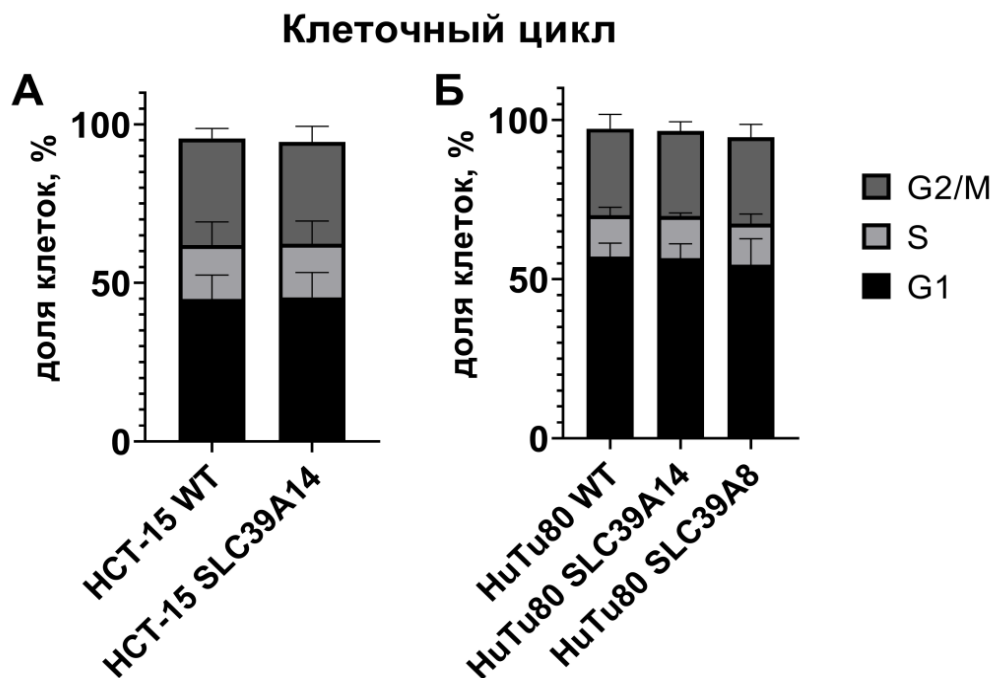


Рисунок 11 – Анализ клеточного цикла нокаутных мутантных клеток. А – анализ клеточного цикла нокаутных и клеток дикого типа HuTu80 в стандартных условиях. Б – анализ клеточного цикла нокаутных и клеток дикого типа НСТ-15 в стандартных условиях. Представлены данные (среднее $\pm$ SEM) из трех или более независимых экспериментов

При биоинформатическом анализе результатов РНК-секвенирования – количественном анализе экспрессии генов – было выявлено снижение уровня

экспрессии *SLC39A8* в соответствующей нокаутной линии клеток HuTu80 в ~16,4 раз по сравнению с клетками дикого типа (рисунок 12А), а также снижение экспрессии *SLC39A14* в ~5,6 и 6,1 раз, соответственно, в созданных нокаутных линиях клеток HuTu80 и НСТ-15 для гена *SLC39A14* (рисунок 12А, Б). Полученные данные свидетельствуют об успешно достигнутом методом CRISPR-Cas9 функциональном нокауте генов *SLC39A14* и *SLC39A8*. Поскольку экспрессия гена *SLC39A14* снижена более чем в 5 раз в обеих линиях, а экспрессия гена *SLC39A8* – более, чем в 15 раз, и это снижение статистически значимо.

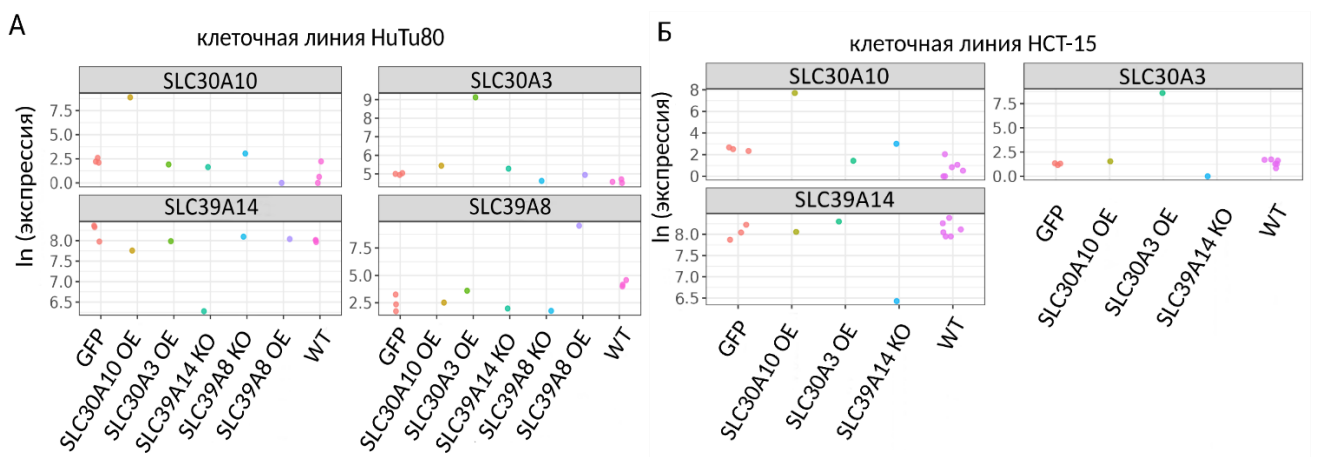


Рисунок 12 – Точечные диаграммы, отражающие уровни экспрессии генов SLC в контрольных и мутантных клеточных линиях. Цвет указывает на принадлежность к функциональной группе образцов. Группы сравнения: нокаутные клоны с WT-контролем, а также клоны со сверхэкспрессией против контролей, трансдуцированных вектором pCDH-EF1a-MCS-IRES-copGFP, не содержащим последовательности генов SLC30A/SLC39A. А – Анализ дифференциальной экспрессии клеток HuTu80. Б – Анализ дифференциальной экспрессии клеток НСТ-15

Полученные данные согласуются с результатами таргетного секвенирования сайтов CRISPR/Cas9-редактирования и анализа внесенных мутаций при выравнивании последовательностей в программном обеспечении TIDE, подтверждающими мутации в кодирующей области изучаемых генов и последующее нарушение их экспрессии. Это указывает на эффективно внесенную мутацию и подавление экспрессии целевых генов – *SLC39A8* и *SLC39A14* на уровне мРНК.

Мы также оценили влияние нокаутов этих генов на восстановительный потенциал клеток с помощью резазуринового анализа (рисунок 13). Этот анализ, заключающийся в измерении сигнала от восстановления резазурина до флуоресцентного резорубина в результате активности в основном митохондриальных окислительно-восстановительных ферментов (при нормировании сигнала на клетку), служит индикатором митохондриальной активности в клетках млекопитающих. В отличие от МТТ (теста на основе 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид), резазурин восстанавливается с помощью более разнообразного набора ферментов в флуоресцентный резорубин. Помимо митохондриальных дегидрогеназ, его также восстанавливают цитохромы и цитоплазматические дегидрогеназы. Эта ферментативная реакция поддерживается восстановленной формой кофермента НАД(Ф)⁺ – НАД(Ф)Н (никотинамида-дениндинуклеотид-фосфатом) [237]. Таким образом, активность митохондрий в передаче электронов в метаболических процессах связана с окислением НАД(Ф)Н до НАД(Ф)⁺ и восстановлением резазурина до резорубина [94, 238]. По сравнению с клетками дикого типа, наши результаты показали увеличение концентрации коферментов НАД(Ф)Н в 2,2 раза ($p \leq 0,05$ (*)) и 2,3 раза ($p \leq 0,01$ (**)) в клетках HuTu80 с нокаутом гена *SLC39A14* после 24 и 72 ч инкубации, соответственно (рисунок 13 А). В клетках НСТ-15 с нокаутом *SLC39A14* сигнал увеличивался в 1,5 раза после 72 ч инкубации ($p \leq 0,05$ (*)) (рисунок 13Б). Для мутанта с нокаутом гена *SLC39A8* в клетках HuTu80 через 72 ч наблюдалось увеличение концентрации НАД(Ф)Н в 1,3 раза ($p \leq 0,05$ (*)) (рисунок 13А). Таким образом, резазуриновый анализ показал усиление восстановительных процессов в клетках с обоими типами нокаутов генов семейства SLC39A.

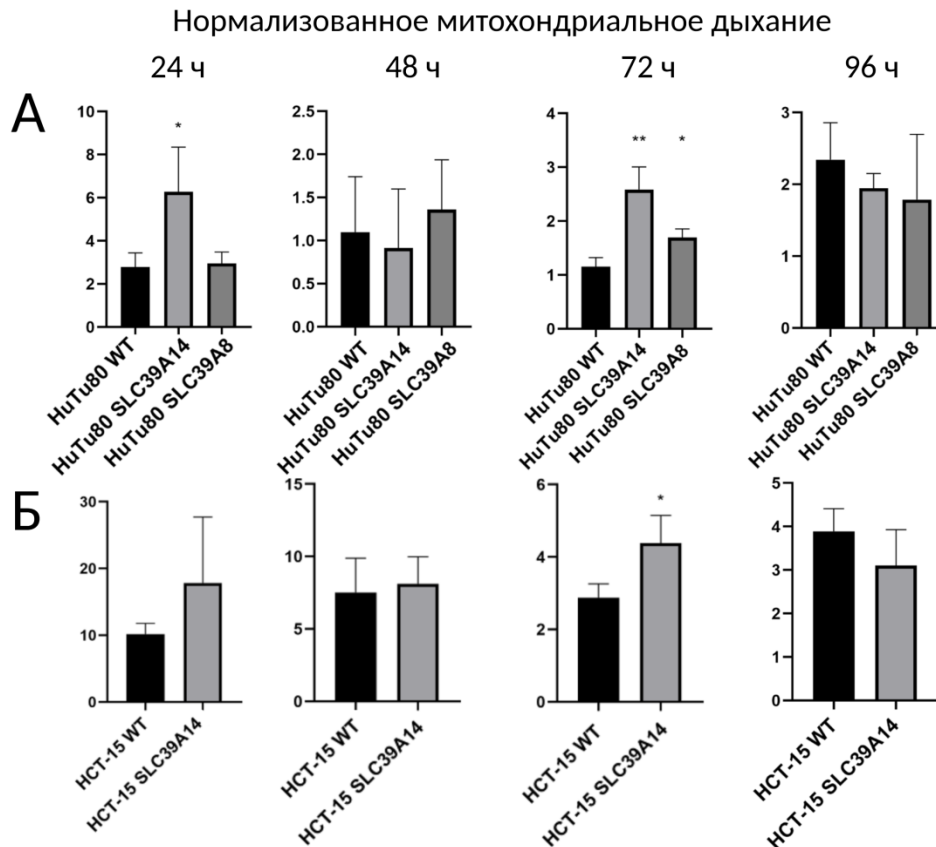


Рисунок 13 – Измерение метаболизма в клетках дикого типа и мутантных клеточных линиях в течение 4 дней инкубации. А – клетки HuTu80. Б – клетки HCT-15. Флуоресценция резоруфина нормирована на ОФЕ окрашивания ядер с помощью SYTO 62. Представлены данные (среднее $\pm$ SEM) из трех или более независимых экспериментов. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3.3. Создание и характеристика клеточных линий, сверхэкспрессирующих гены *SLC39A8*, *SLC30A3* и *SLC30A10*

Для получения стабильных клеточных линий, сверхэкспрессирующих гены *SLC39A8*, *SLC30A3* и *SLC30A10*, мы использовали лентивирусный вектор pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP, в котором маркер GFP был заменен на селекционный маркер устойчивости к пурамицину, а в вектор были включены FLAG-тегированные открытые рамки считывания генов SLC, что позволило отбирать успешно трансдуцированные клетки. После трансдукции стабильные клеточные линии отбирали среди клеток, выживших на ростовой среде с добавлением пурамицина (6,6 мкг/мл в клеточной среде). Отбор пурамицином позволил

получить стабильные популяции клеток с эффективностью трансдукции более 90%, что подтверждено иммуноблоттингом наличия соответствующих флаг-меченых белков (*SLC30A3*, *SLC30A10*, *SLC39A8*). В клетках дикого типа белки не детектировались, что свидетельствует о специфичности экспрессии белков. Мы продемонстрировали успешную сверхэкспрессию (OE) генов *SLC39A8*, *SLC30A3* и *SLC30A10* в соответствующих клеточных линиях с помощью вестерн-блот анализа с использованием FLAG-специфических антител и GAPDH в качестве контроля загрузки белков (рисунок 14А, Б). Тем не менее, для клеточной линии НСТ-15 не удалось получить клон, сверхэкспрессирующий *SLC39A8*.

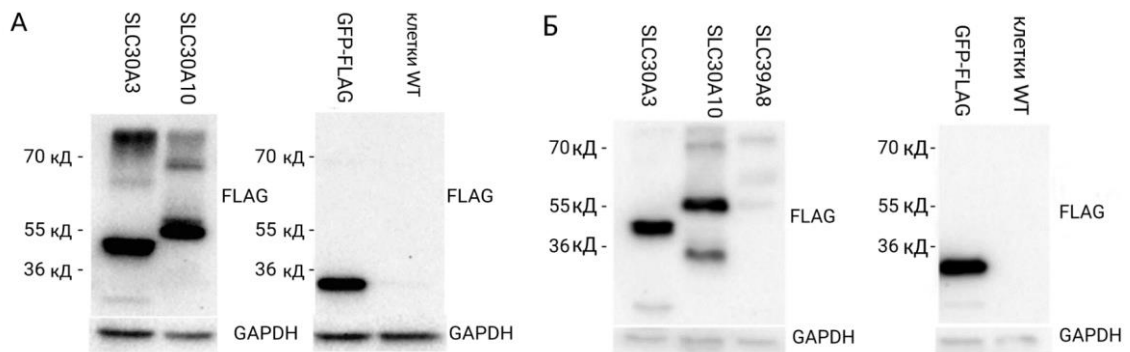


Рисунок 14 – Вестерн-блот анализ клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором: А – клетки НСТ-15, трансдуцированные конструкциями с последовательностями *SLC30A3* и *SLC30A10*. Контрольные клетки НСТ-15 с GFP-FLAG и клетки WT. Б – клетки HuTu80, трансдуцированные конструкциями с последовательностями *SLC30A3*, *SLC30A10* и *SLC39A8*. Контрольные клетки HuTu80 с GFP-FLAG и клетки WT. В качестве контроля загрузки использовали GAPDH

В устойчивых к пурамицину клетках НСТ-15, трансдуцированных супернатантами лентивирусов pCDH-SLC30A3 и pCDH-SLC30A10, молекулярная масса окрашенных полос составляла 44 кД и 55 кД, соответственно (рисунок 14А). Молекулярная масса полос, обнаруженных в устойчивых к пурамицину клетках HuTu80, трансдуцированных лентивирусными супернатантами pCDH-SLC30A3, pCDH-SLC30A10 и pCDH-SLC39A8, составила 44 кД, 55 кД и 52 кД, соответственно (рисунок 14Б). В клетках WT сверхэкспрессированные белки отсутствовали, поскольку эти клетки не были трансдуцированы лентивирусным

вектором, содержащим FLAG-меченные открытые рамки считывания генов *SLC39A8*, *SLC30A3* или *SLC30A10*. Это является подтверждением сверхэкспрессии *SLC30A3*, *SLC30A10* и *SLC39A8* в соответствующих клеточных линиях, что проявляется появлением специфичных полос ожидаемой молекулярной массы (44 кДа, 55 кДа и 52 кДа). Отсутствие этих полос в клетках дикого типа указывает на то, что обнаруженные белки являются продуктами введенных лентивирусных конструкций и подтверждает корректность проведенной трансдукции и селекции клеток.

При биоинформатическом анализе результатов РНК-секвенирования было выявлено повышение уровня экспрессии генов по сравнению с контрольными клетками, трансдуцированных вектором GFP-FLAG. В частности, уровни транскриптов генов *SLC39A8*, *SLC30A3* и *SLC30A10* в клетках HuTu80, трансдуцированных соответствующими конструкциями для сверхэкспрессии, были увеличены в ~1024-, 62- и 512 раз, соответственно (рисунок 12 А). В клетках НСТ-15, трансдуцированных соответствующими конструкциями для сверхэкспрессии, уровни транскриптов *SLC30A3* и *SLC30A10* были увеличены по сравнению с GFP-трансдуцированным контролем в ~2240 и 202 раза, соответственно (рисунок 12 Б).

Анализ кривых клеточного роста продемонстрировал сопоставимые темпы роста клеток со сверхэкспрессиями изучаемых генов в сравнении с контрольными клеточными линиями HuTu80 GFP и НСТ-15 GFP, с примерно одинаковым временем удвоения (рисунок 15). В клетках HuTu80 GFP время удвоения составило 1,5 дня, тогда как в клетках со сверхэкспрессией генов *SLC30A3*, *SLC30A10* и *SLC39A8* время удвоения составило 1.3, 1.3 и 1.7 дня, соответственно (рисунок 15 А-В). Время удвоения клеток НСТ-15 GFP составило 1.1 дня, в то время как в клетках со сверхэкспрессией генов *SLC30A3* и *SLC30A10* установлено время удвоения 1.2 и 1.5 дня соответственно (рисунок 15 Г, Д).

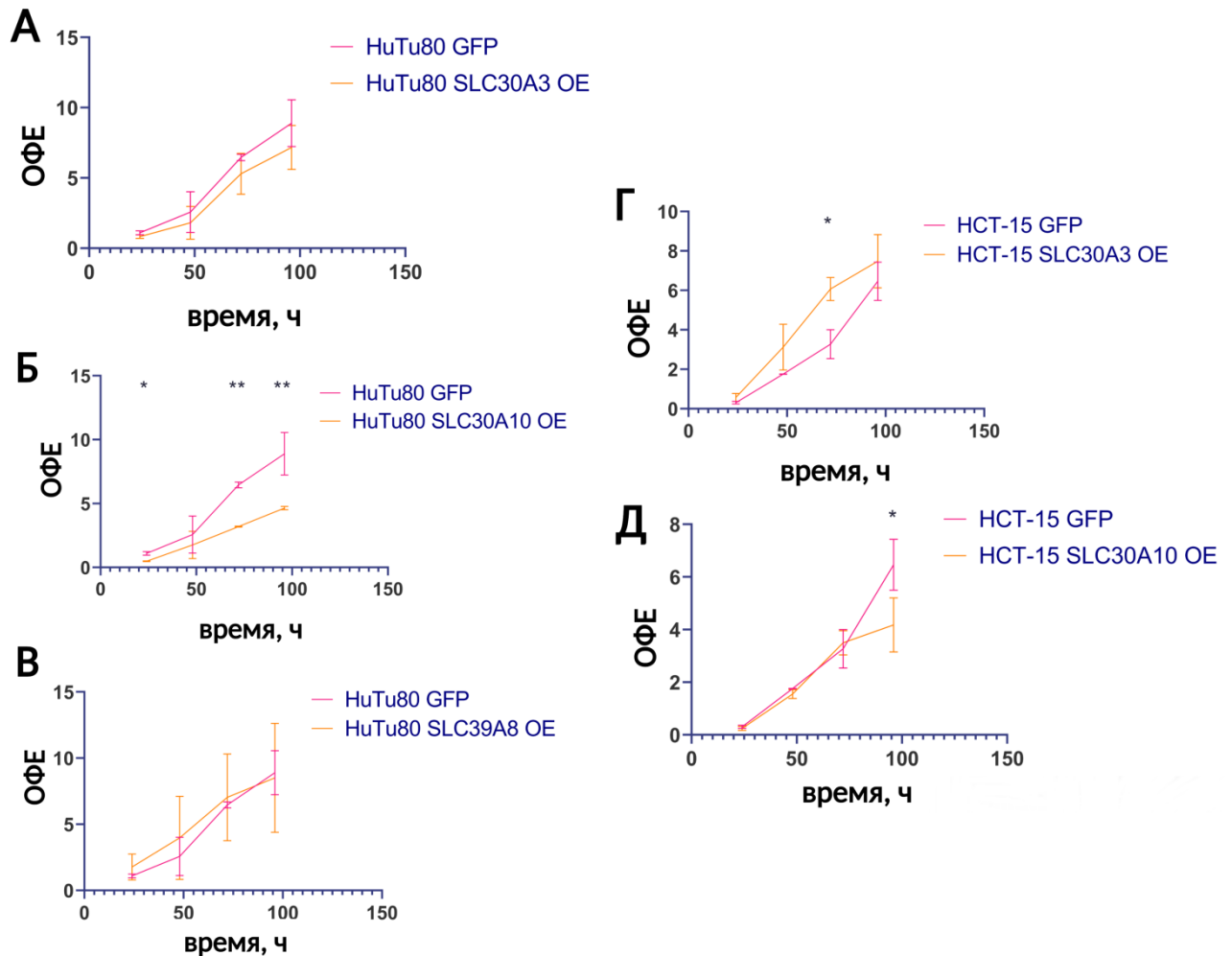


Рисунок 15 – Кривые роста, показывающие скорость роста контрольных с GFP и мутантных клеточных линий со сверхэкспрессией генов SLC30A/SLC39A в течение 4 дней ежедневных измерений. А – Сравнение контрольной клеточной линии HuTu80 GFP и клеточной линии HuTu80 со сверхэкспрессией (OE) гена *SLC30A3*. Б – Сравнение контрольной линии клеток HuTu80 GFP и линии клеток HuTu80 со сверхэкспрессией гена *SLC30A10*. Значимая разница в количестве клеток (измеряется в ОФЕ) через 24 ч, 72 ч и 96 ч инкубации. В – Сравнение контрольной клеточной линии HuTu80 GFP и клеточной линии HuTu80 со сверхэкспрессией гена *SLC39A8*. Г – Сравнение контрольной линии клеток HCT-15 GFP и линии клеток HCT-15 со сверхэкспрессией гена *SLC30A3*. Значимая разница в количестве клеток (измеряется в ОФЕ) через 72 ч инкубации. Д – Сравнение контрольной клеточной линии HCT-15 GFP и клеточной линии HCT-15 со сверхэкспрессией гена *SLC30A10*. Количество клеток определяли в ОФЕ с помощью флуоресцентного красителя нуклеиновых кислот SYTO 62. Представлены данные (среднее $\pm$ SEM) из трех или более независимых экспериментов. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

При сравнении скорости роста клеток со сверхэкспрессией исследуемых генов с соответствующими контрольными линиями HuTu80 и HCT-15 было

установлено, что общее время удвоения популяции существенно не различалось между группами. Однако детальный анализ динамики пролиферации выявил статистически значимые отличия в отдельных временных точках. Для клеток со сверхэкспрессией гена *SLC30A10* наблюдалось достоверное снижение числа жизнеспособных клеток на 96-м часу инкубации (HuTu80: $p < 0,01$; НСТ-15: $p < 0,05$). В линии HuTu80 снижение количества клеток относительно контроля фиксировалось также на 24-м и 72-м часах ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно). В линии НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A3*, напротив, на 72-ом часу наблюдалось статистически значимое увеличение числа клеток по сравнению с контрольной популяцией ($p < 0,05$). Следовательно, сверхэкспрессия *SLC30A10* ассоциируется с временной задержкой пролиферации, тогда как сверхэкспрессия *SLC30A3* — с умеренным ускорением роста в отдельной фазе.

Оценка уровня НАД(Ф)Н с помощью резазуринового теста, показала $\sim 1,8$ -кратное увеличение митохондриального дыхания в клетках НСТ-15, сверхэкспрессирующих *SLC30A10*, после 96 ч инкубации – $p < 0,05$ (рисунок 16 А). Кроме того, наблюдалось $\sim 1,5$ -кратное увеличение активности митохондриального дыхания в клетках HuTu80, сверхэкспрессирующих *SLC30A10*, через 72 ч и $\sim 1,3$ -кратное увеличение через 96 ч инкубации ($p < 0,05$ в обоих промежутках времени). Клетки HuTu80, сверхэкспрессирующие *SLC39A8*, демонстрировали $\sim 1,6$ -кратное увеличение митохондриального дыхания через 72 ч ($p < 0,01$) и $\sim 1,3$ -кратное увеличение через 96 ч ($p < 0,05$) (рисунок 16 Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия генов *SLC39A8* и *SLC30A10* усиливает аэробное дыхание в клеточных линиях с их измененной экспрессией (рисунок 16 А, Б).

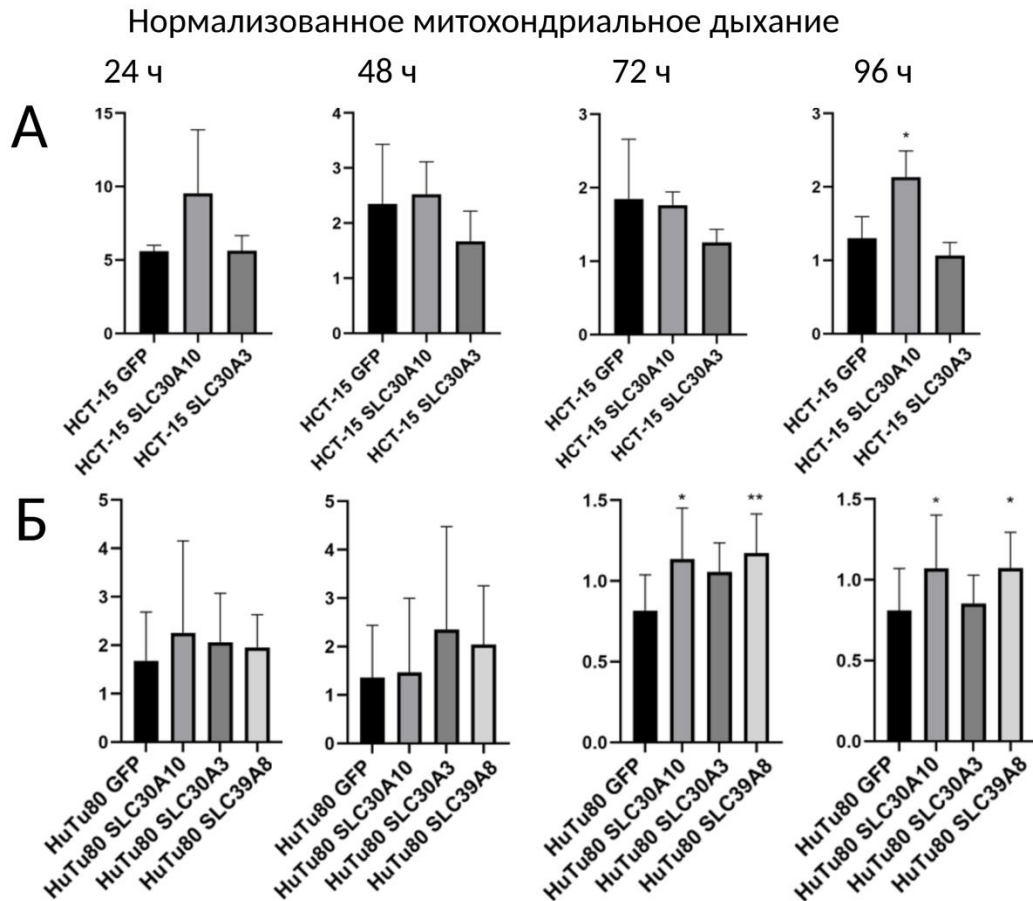


Рисунок 16 – Измерение метаболизма в контрольных с GFP и мутантных клеточных линий со сверхэкспрессией в течение 4 дней инкубации. А – клетки HCT-15. Б – клетки HuTu80. Флуоресценция резорурфина нормирована на ОФЕ окрашивания ядер с помощью SYTO 62. Представлены данные (среднее $\pm$ SEM) из трех или более независимых экспериментов. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

3.4. Визуализация накопления Zn при нокауте и сверхэкспрессии SLC генов

Чтобы оценить, могут ли изменения экспрессии, вызванные нокаутом или сверхэкспрессией генов *SLC39A8*, *SLC39A14*, *SLC30A3* и *SLC30A10*, влиять на внутриклеточные концентрации цинка, мы использовали прижизненный флуоресцентный цинк-специфический зонд FluoZin-3 AM для измерения уровня свободного цинка в экспериментальных и контрольных линиях клеток. К ним относились клеточные линии HuTu80 и HCT-15 дикого типа (WT), нокаутные (KO; для генов *SLC39A8* и *SLC39A14*) и сверхэкспрессирующие (OE; для генов *SLC39A8*, *SLC30A3* и *SLC30A10*).

В обеих клеточных линиях с нокаутом гена *SLC39A14* и со сверхэкспрессией гена *SLC30A10*, а также в клетках HuTu80 с нокаутом гена *SLC39A8* мы наблюдали снижение внутриклеточной концентрации цинка по сравнению с клетками WT (рисунок 17 и рисунок 18). Напротив, в обеих клеточных линиях, сверхэкспрессирующих ген *SLC30A3*, мы наблюдали значительное повышение уровня внутриклеточного цинка с гранулярным флуоресцентным свечением (рисунок 17 и рисунок 18). Это позволяет предположить, что *SLC30A3* способствует транспорту цинка из цитоплазмы в специфические внутриклеточные мембранные компартменты, что согласуется с его известной ролью в транспорте цинка в синаптические везикулы в нейронах [239]. Кроме того, в клетках HuTu80, сверхэкспрессирующих *SLC39A8*, наблюдалось заметное увеличение уровня цитоплазматического цинка (рисунок 18), что тоже согласуется с его известной функциональной ролью переноса цинка в цитоплазму [240].

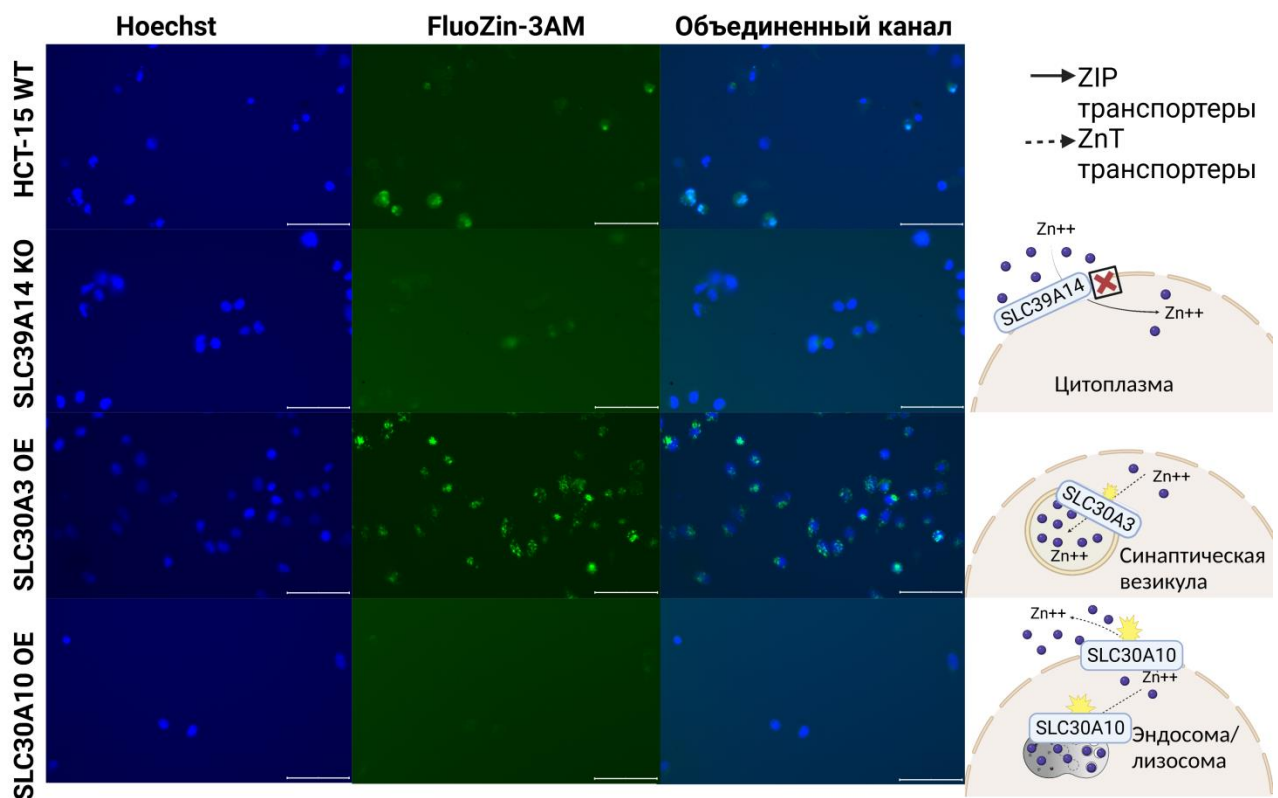


Рисунок 17 – Измерение уровня свободного цинка в мутантных клетках и клетках дикого типа HCT-15. Клетки HCT-15 окрашивали FluoZin-3 AM и Hoechst 33342. Масштабная линейка, 100 мкм

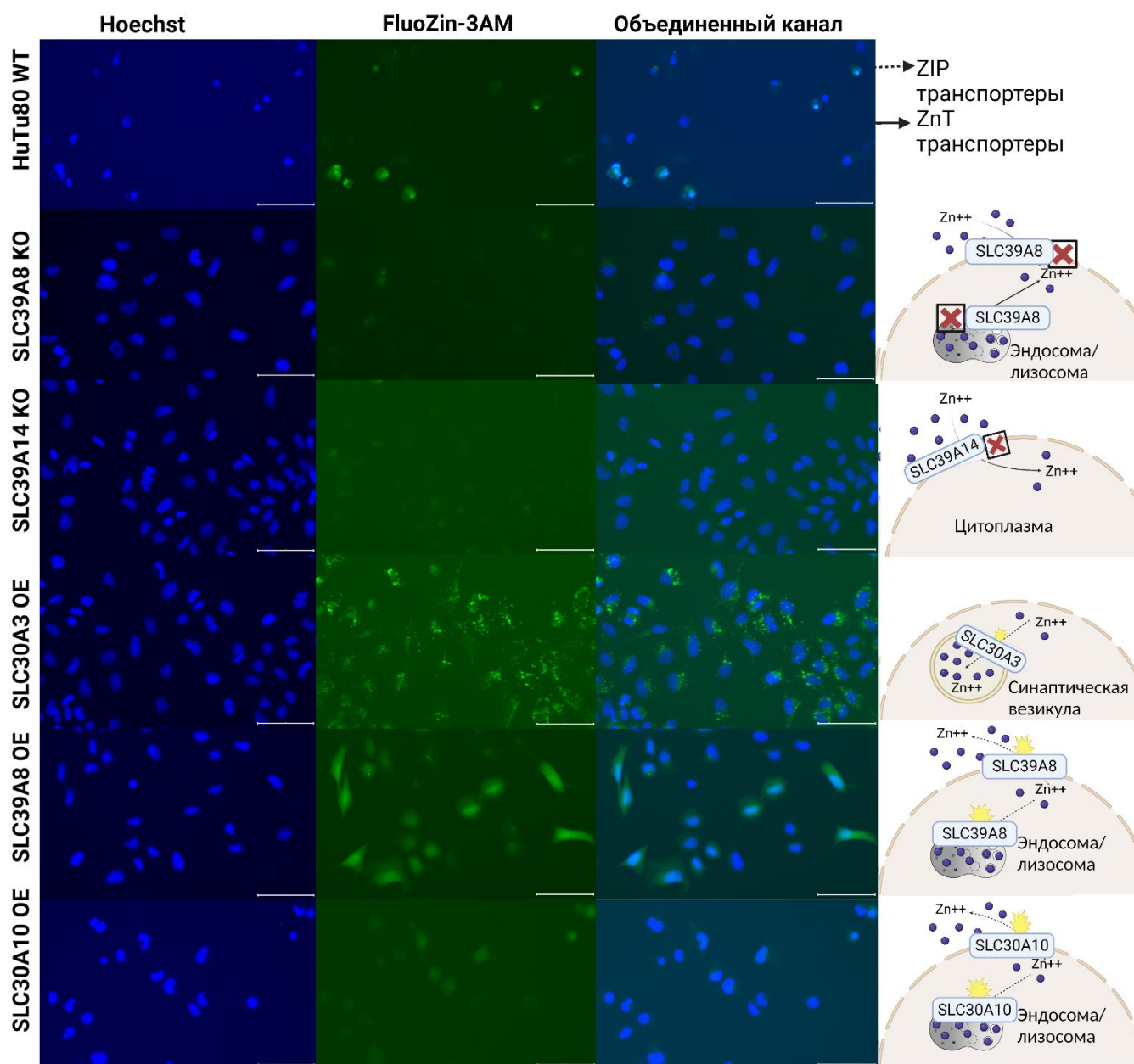


Рисунок 18 - Измерение уровня свободного цинка в мутантных клетках и клетках дикого типа HuTu80. Клетки HuTu80 окрашивали FluoZin-3 AM и Hoechst 33342. Масштабная линейка, 100 мкм

В свою очередь, в клетках с нокаутами генов *SLC39A8* и *SLC39A14*, которые участвуют в переносе ионов цинка в цитоплазму [241], мы наблюдали снижение флуоресценции. В совокупности эти результаты подтверждают известную по литературным данным роль генов *SLC30A3*, *SLC30A10*, *SLC39A8* и *SLC39A14* во внутриклеточном метаболизме цинка. Эти функциональные тесты также подтверждают обоснованность экспериментальных клеточных моделей, использованных в данном исследовании.

3.5. Анализ микроэлементного состава трансгенных линий клеток с нокаутом в генах, отвечающих за метаболизм Zn^{2+} И Mn^{2+}

Анализ микроэлементного состава в клеточных клонах с нокаутом генов *SLC39A8*, *SLC39A14* позволяет выявить изменения в уровнях конкретных микроэлементов, вызванные отсутствием соответствующего гена. Для нокаутных клонов и клонов дикого типа с помощью масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИМСП-МС) было измерено содержание 25 микроэлементов [242]. На рисунке 19 представлены диаграммы размаха для тех элементов, различия по содержанию которых между мутантными клетками и клетками дикого типа имели статистически значимые показатели ($p < 0,05$). Было взято по 3 независимых нокаутных клона для каждой линии, и три независимых моноклональных линий дикого типа (выведенных из единой гетерогенной линии до начала всех экспериментов по нанесению мутаций). В клеточных линиях с нокаутом генов *SLC39A8* и *SLC39A14* зафиксированы различия в накоплении ионов в зависимости от конкретной линии. В частности, в клеточных линиях НСТ-15 наблюдается незначительное изменение накопления двухвалентных ионов, включая цинк, по сравнению с линиями без нокаута (рисунок 19А). Однако для клеточных линий НuTu80 наблюдается увеличение ($p < 0,05$) накопления ионов Zn^{2+} в 10 раз для линий с нокаутом гена *SLC39A14* (рисунок 19Б).

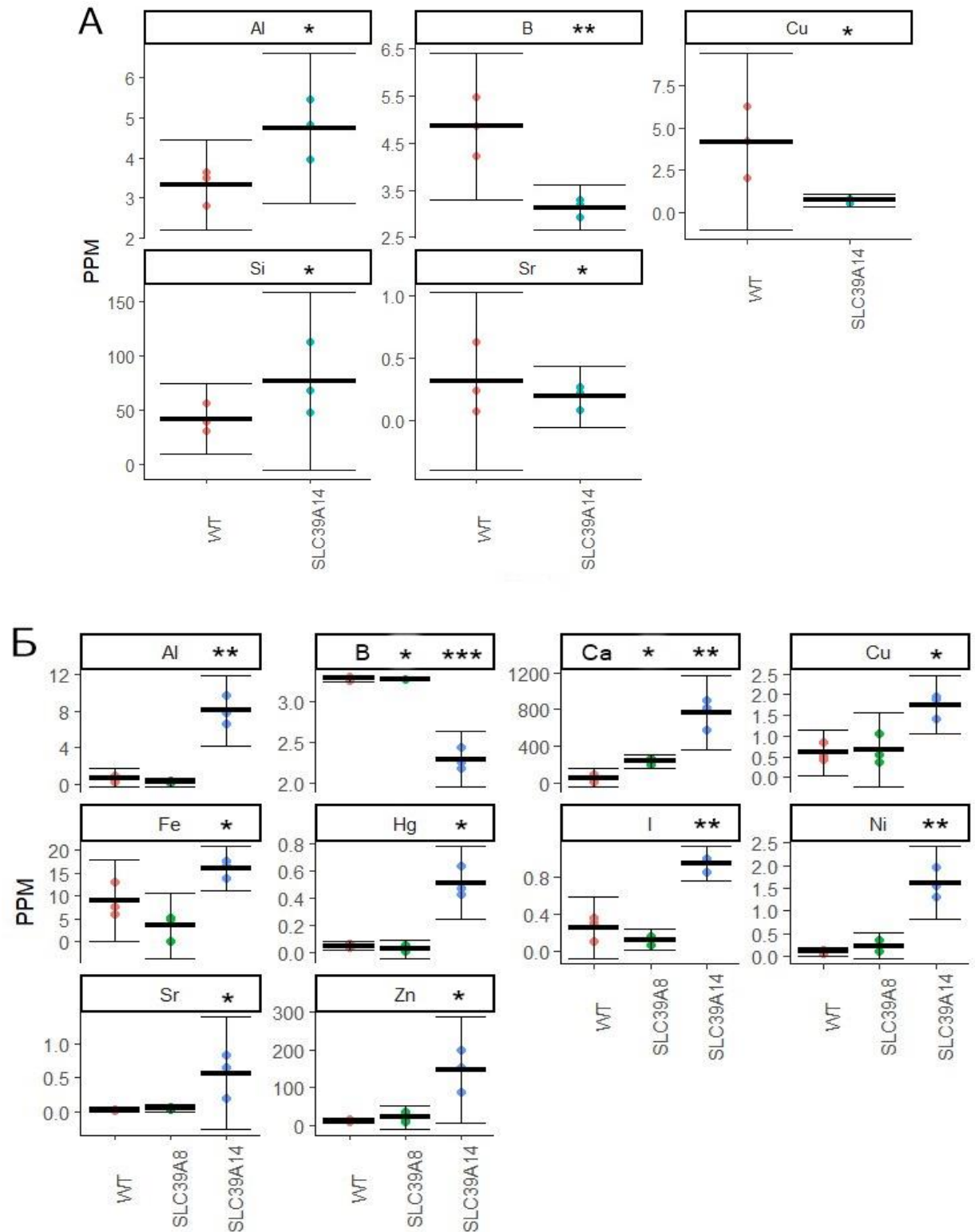


Рисунок 19 – Статистически значимые данные различий в накоплении микроэлементов между мутантными клонами и клетками дикого типа. А – НСТ-15. Б – НuТu80. Концентрации микроэлементов измерены в ppm (миллионных долях). Представлены данные (среднее $\pm$ SEM) из трех независимых измерений. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Значительное увеличение в накоплении ионов цинка в клетках с нокаутом по гену *SLC39A14*, валидируемое ИСП-МС, вызывает интерес, так как функция гена *SLC39A14* – транспорт двухвалентных ионов цинка внутрь клетки, должна быть нарушена при нокауте этого гена.

Предположительно, функциональная роль гена компенсируется дополнительной мутационной нагрузкой. Так, при биоинформатическом анализе данных РНК-секвенирования, при нокауте *SLC39A14* в линии НСТ-15 была выявлена повышенная экспрессия другого транспортера цинка – *SLC30A10* (Таблица А.1). Стоит отметить, что сверхэкспрессия *SLC30A10*, как и нокаут *SLC39A14* должны способствовать выведению цинка из клетки.

Тогда как для нокаутированной по гену *SLC39A14* линии HuTu80 был обнаружен ген, также отвечающий за транспорт цинка, экспрессия которого была повышена в связи с нокаутом *SLC39A14* – *TRPM6* (Таблица А. 1). *TRPM6* – представитель суперсемейства трансмембранных белков TRP (Transient Receptor Potential) каналов переменного рецепторного потенциала – отвечает за транспорт двухвалентных ионов [243]. Примечательно, что *TRPM6* может образовывать гетеромерные комплексы с *TRPM7*, изменяя транспортные свойства ионного канала и его регуляцию через изменение ионной селективности канала, его электрофизиологических характеристик и чувствительности к внутриклеточным регуляторным факторам (двухвалентных ионов Zn^{2+} и Mg^{2+} и АТФ), тем самым модифицируя транспорт ионов и сопряжённые сигнальные пути. Эти гетеромерные комплексы играют роль в транспорте в основном Mg^{2+} и Zn^{2+} , особенно в эпителиальных клетках кишечника и почек [244]. Отдельно *TRPM6* является каналом, проницаемым для двухвалентных ионов, включая Zn^{2+} , а его основная функция заключается в транспорте этих ионов через клеточную мембрану внутрь клетки [245]. Следовательно, при сверхэкспрессии *TRPM6* может ожидать увеличение количества функциональных каналов на поверхности клетки, что, в свою очередь, увеличит поток Zn^{2+} внутрь клетки.

Таким образом, в данном эксперименте, нокаут *SLC39A14* и в линии HuTu80, и в НСТ-15 запустил механизмы в клетке, приводящие к повышению активности

других транспортеров цинка. И если в НСТ-15 это была сверхэкспрессия *SLC30A10*, способная лишь в некоторой степени компенсировать эффект от нокаута *SLC39A14*, то в NuTu80 – это сверхэкспрессия *TRPM6*, значительно компенсирующая эффект в накоплении ионов, вызванный нокаутом *SLC39A14*.

Сверхэкспрессия *TRPM6* может привести к увеличению накопления цинка на внутриклеточном уровне. При оценке накопления цинка в живых клетках (в отличие от ИСП-МС, где клетки разрушаются) флуоресцентным красителем FluoZin-3 АМ, мы наблюдали соответствие наблюдаемых уровней цинка функциональным изменениям - инактивирующим мутациям внесенными по гену *SLC39A14*. Это может быть связано различием методик оценки накопления микроэлементов: в ИСП-МС измеряется общее содержание цинка, который в живой клетке мог быть связан с белками, а визуализация с FluoZin-3 – показывает свободный цинк в живых метаболически активных клетках. С биологической точки зрения это означает, что функционально значимым для клеточного фенотипа является не общее содержание цинка, а его внутриклеточная биодоступная (лабильная) фракция. Поэтому при изучении функций генов важно валидировать процессы разными экспериментальными методами и учитывать дополнительные генетические изменения клетки после внесенных мутаций: офф-таргеты. На основании данных, полученных при изучении микроэлементного состава, было установлено, что линии с нокаутом генов *SLC39A8* и *SLC39A14* демонстрируют различные тенденции в накоплении ионов металлов. Изменения в уровнях накопления микроэлементов указывают на участие нокаутированного гена в регуляции или транспорте этих элементов. Эта информация может быть ценной для дальнейших дополнительных исследований механизмов действия и функций нокаутированного гена или белка, а также для разработки и оптимизации потенциальных терапевтических стратегий.

3.6. Влияние измененной экспрессии генов семейства SLC30A и SLC39A на чувствительность раковых клеток к противоопухолевым препаратам

Устойчивость раковых клеток к химиотерапии - широко известное терапевтическое препятствие в медицинской онкологии. В данном исследовании мы хотели выяснить, влияет ли измененная экспрессия основных генов переноса цинка и марганца на чувствительность к противоопухолевым препаратам. Прежде всего, мы изучили влияние нокаута или сверхэкспрессии генов семейства SLC30A и SLC39A на цитотоксическую активность терапевтического антитела цетуксимаба, таргетирующего EGFR и препарата, повреждающего ДНК - цисплатина. Последний препарат является платиносодержащим препаратом, который используется в качестве основного компонента многочисленных схем лечения различных видов рака [246, 247, 248], включая КРР. При КРР с немутированным *KRAS* цетуксимаб является препаратом выбора, который показал высокую эффективность и оказывает значительное положительное влияние на выживаемость пациентов [249]. Однако при наличии активирующих мутаций онкогена *KRAS* цетуксимаб оказывается неэффективным, так как происходит аберрантная активация пролиферативной сигнализации [250].

Одна из модельных клеточных линий в наших экспериментах (HCT-15) представляет собой аденокарциному толстой кишки человека и несет мутацию *KRAS* в дополнение к мутациям в генах *APC*, *B2M*, *CHEK2*, *BRCA2*, *PIK3CA* и *TP53*. Таким образом, теоретически она должна быть нечувствительна к цетуксимабу и высокочувствительна к препаратам платины, поскольку инактивирующие мутации *BRCA2* и *CHEK2* вызывают дефицит репарации ДНК и повышают эффективность платиновых ДНК-повреждающих терапевтических препаратов [251]. Вторая модельная клеточная линия - HuTu80, имеет мутацию в экзоне 3 гена бета-катенина *CTNNB1*. Эта мутация также связана с низкой чувствительностью к препарату цетуксимаб [252].

В недавнем исследовании ген *SLC30A10* был определен как наиболее информативный биомаркер для выявления и скрининга КРР. В большинстве

проанализированных образцов КРР этот ген был метилирован [25]. Поэтому мы изучили, может ли измененная экспрессия этого гена, а также его функционального гомолога *SLC30A3* и их функциональных антагонистов - генов семейства *SLC39A* - *SLC39A8* и *SLC39A14* - быть связана с изменением чувствительности к лекарственной терапии при КРР.

Во всех нокаутных или сверхэкспрессионных по генам интереса мутантных клеточных линиях мы не обнаружили статистически значимых различий в чувствительности к цетуксимабу, а концентрация полуингибирования (IC_{50}) цетуксимаба во всех экспериментах оставалась очень высокой (>300 нМ против $0,3-2$ нМ для клеточных линий, являющихся чувствительными к цетуксимабу [253]).

При добавлении к клеткам цисплатина наблюдалась иная картина. В клетках HuTu80 концентрация полумаксимального ингибирования IC_{50} для цисплатина была в $\sim 2,7$ раза выше в клетках со сверхэкспрессией *SLC30A10*, чем в контрольных GFP-экспрессирующих клетках (рисунок 20Г, таблица 7). В клетках НСТ-15 IC_{50} цисплатина была увеличена еще сильнее: $\sim$ в 4 раза (рисунок 20А, таблица 7). Это явно указывает на устойчивость к химиотерапии, связанную с повышенной экспрессией *SLC30A10*.

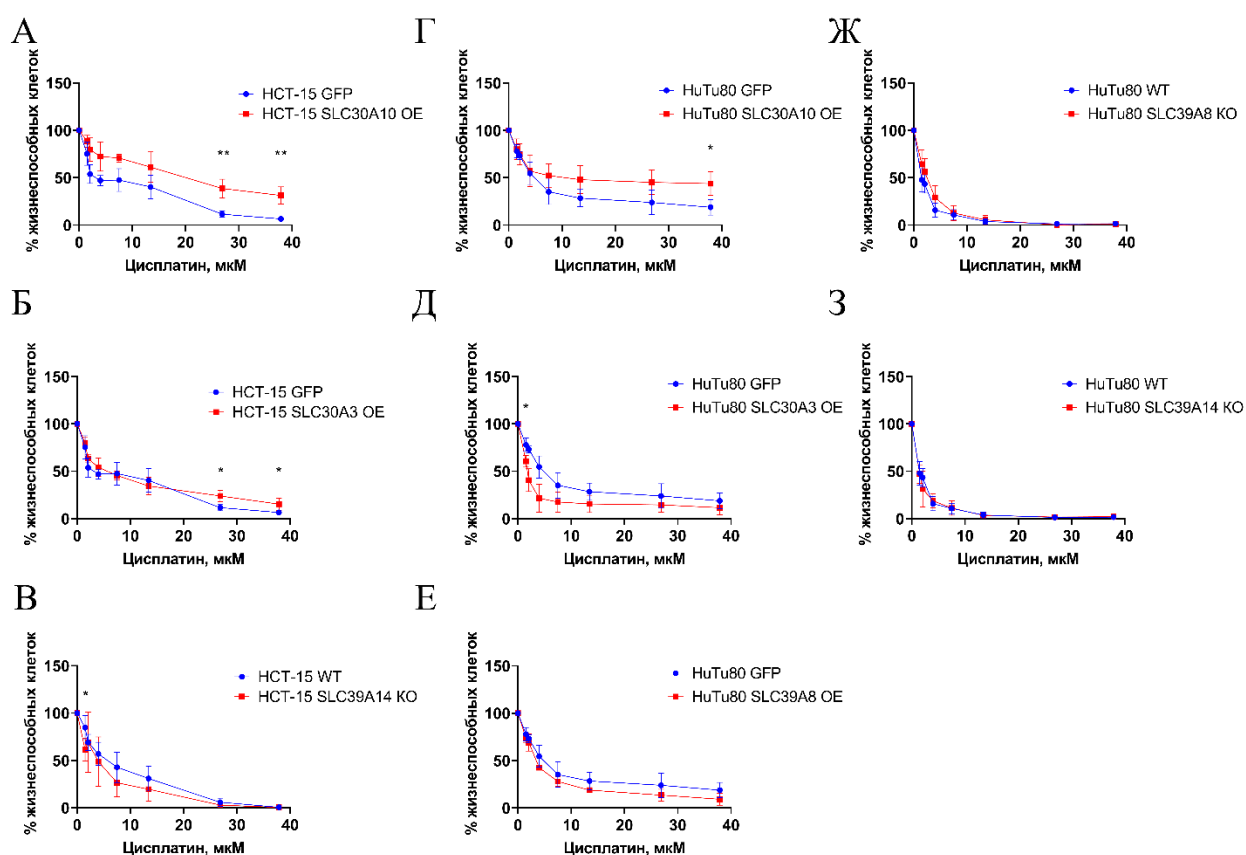


Рисунок 20 – Ингибирование пролиферации раковых клеток цисплатином. Группы сравнения: А – НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A10* против контроля НСТ-15 GFP. Б – НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A3* против контроля НСТ-15 GFP. В – клетки НСТ-15 с нокаутом *SLC39A14* против контроля НСТ-15 WT. Г – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A10* против контроля HuTu80 GFP. Д – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A3* против контроля HuTu80 GFP. Е – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC39A8* против контроля HuTu80 GFP. Ж – Клетки HuTu80 с нокаутом *SLC39A8* против контроля HuTu80 WT. З – клетки HuTu80 с нокаутом *SLC39A14* против контроля HuTu80 WT. Клетки растили в 96-луночных культуральных планшетах и обрабатывали различными концентрациями препарата цисплатин (0-37 мкмоль/л). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Таблица 7 - Значения IC_{50} цисплатина для контрольных и мутантных клеток HuTu80 и НСТ-15. Представлены данные (среднее $\pm$ SEM) из трех и более независимых экспериментов. Средние различия IC_{50} по сравнению с контрольными клетками. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Клеточная линия	Цисплатин IC_{50} , мкМ	p-value
HuTu80 WT	1.52	контроль
HuTu80 <i>SLC39A8</i> KO	2.3	***

Продолжение Таблицы 7

HuTu80 <i>SLC39A14</i> KO	1.3	незначимо
HuTu80 GFP	5.3	контроль
HuTu80 <i>SLC30A3</i> OE	1.6	***
HuTu80 <i>SLC30A10</i> OE	14.5	***
HuTu80 <i>SLC39A8</i> OE	3.6	**
HCT-15 WT	5	контроль
HCT-15 <i>SLC39A14</i> KO	2.9	**
HCT-15 GFP	4.3	контроль
HCT-15 <i>SLC30A3</i> OE	4.8	незначимо
HCT-15 <i>SLC30A10</i>	17.35	***

Напротив, сверхэкспрессия *SLC30A3* в клетках HuTu80 приводила к снижению IC50 цисплатина в ~3,3 раза, что говорит о большей чувствительности раковых клеток к химиотерапии, связанной с экспрессией этого гена (рисунок 20 Д, таблица 7).

Такой контраст во влиянии на чувствительность к химиотерапевтическому препарату между двумя членами семейства *SLC30A* может напрямую отражать их противоположную функциональную активность. Речь идет об оттоке цинка и других переходных элементов из цитоплазмы наружу клетки (функция *SLC30A10*; сверхэкспрессия ассоциируется с лучшей выживаемостью раковых клеток при лечении цисплатином) и отток из цитоплазмы и накоплении этих элементов в мембранных структурах клетки (функция *SLC30A3*; сверхэкспрессия ассоциируется с плохой выживаемостью раковых клеток при лечении цисплатином). Ведь одной из наиболее заметных характеристик клеточной устойчивости к цисплатину является снижение накопления препарата в клетке. Можно предположить гипотезу, что вследствие уменьшения поглощения препарата цисплатина или удержания в мембранных структурах, образование координационной связи платины с азотистыми основаниями макромолекулы ДНК

соответственно снижается, уменьшая цитотоксичность, что приводит к повышению устойчивости к платиновому соединению [254].

Помимо EGFR-таргетирующего терапевтического антитела цетуксимаба и ДНК-повреждающего препарата цисплатина, мы протестировали препарат, являющийся препаратом выбора при КРР из других фармацевтических групп: тирозинкиназный ингибитор иматиниб [255], а также винкристин – препарат, мешающий функционированию микротрубочек в процессе митоза.

Хотя в клетках с *KRAS* мутацией действие одного винкрестина скорее не влияет на выживаемость клеток, в недавнем исследовании было показано, что сочетание винкрестина с ингибиторами митоген-активируемой киназы (МЕК), в частности, с траметинибом демонстрирует синергетический эффект в моделях *KRAS*-мутированного КРР. Эта комбинация усиливает апоптоз, снижает рост опухоли и ингибирует оба пути выживания RAS-RAF-MEK и PI3K-AKT-mTOR [256]. Мы решили проверить, будет ли изменена чувствительность к винкрестину в клетках HCT-15 (с *KRAS* мутацией) и клетках HuTu80 (с мутацией *CTNNB1*) с измененными экспрессиями генов *SLC30A/SLC39A*.

В клетках HCT-15 мы наблюдали понижение чувствительности к винкрестину в 1,7 раза ($p\text{-value} < 0,001$) при нокауте гена *SLC39A14* (137.4 нМ в мутантных клетках и 81.2 нМ в клетках дикого типа). При сверхэкспрессии гена *SLC30A10* клетки теряли чувствительность к винкрестину ($p\text{-value} < 0,001$) (648 нМ в мутантных клетках и 90.2 нМ в контрольных GFP-клетках) (рисунок 21А, В, таблица 8). Тогда как в клетках HuTu80 мы наблюдали сравнительно небольшие, но противоположные эффекты изменениям в клетках HCT-15 с нокаутом *SLC39A14* и сверхэкспрессией *SLC30A10*. Увеличение чувствительности к винкрестину в 1,2 раза ($p\text{-value} < 0,05$), при сверхэкспрессии гена *SLC30A10* (1.33 нМ в мутантных клетках и 1.57 нМ в контрольных GFP-клетках), и значимое ($p\text{-value} < 0,001$) повышение чувствительности при нокауте гена *SLC39A14* (1.7 нМ в мутантных клетках и 2.16 нМ в клетках дикого типа) (рисунок 21Г,З, таблица 8). Полученные на клетках HuTu80 результаты демонстрируют статистически значимые различия мутантных линий относительно контрольных, превышающие установленный

порог p -value, что свидетельствует о наличии влияния генов *SLC39A14* и *SLC30A10* на чувствительность клеток к винкрестину. Тем не менее, следует отметить, что величина этих эффектов относительно невелика. Это подчеркивает необходимость осторожной интерпретации данных о направленности этих эффектов (резистентности или чувствительности).

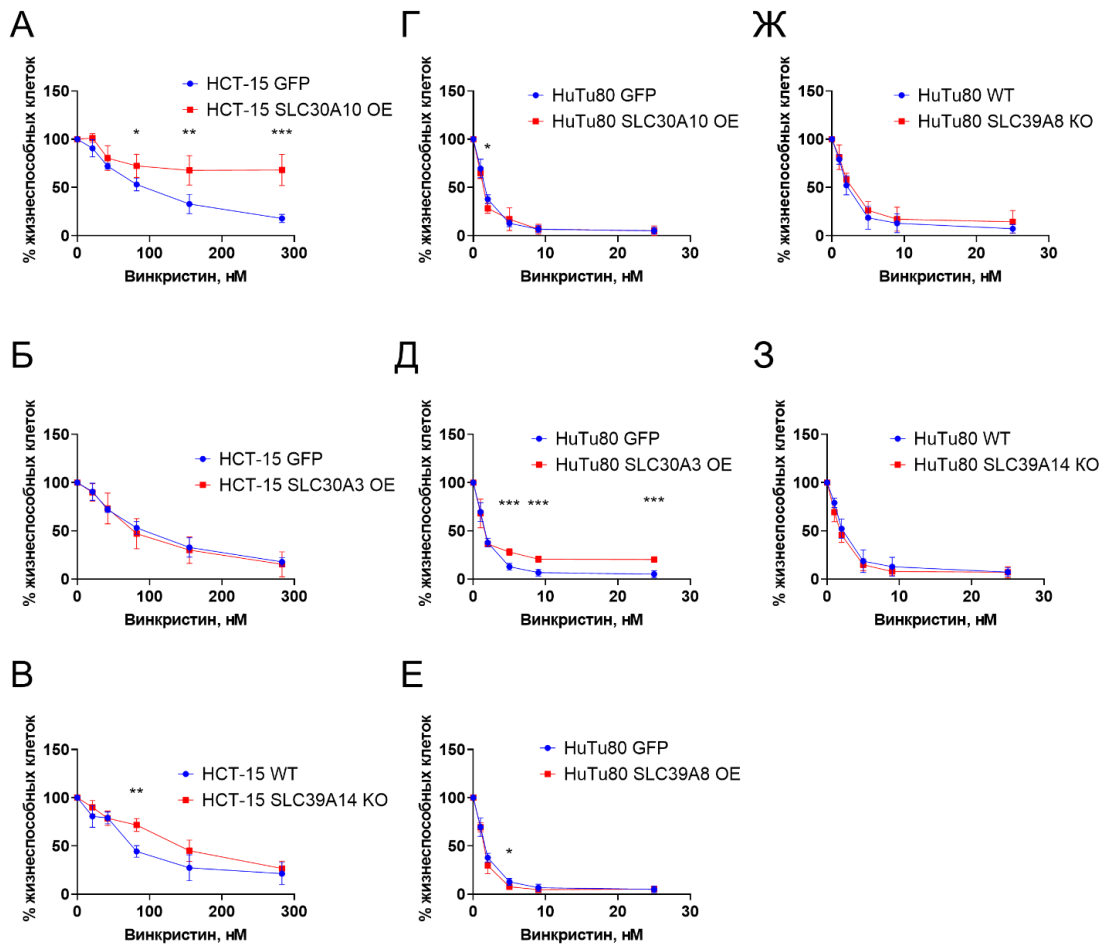


Рисунок 21 – Ингибирование пролиферации раковых клеток винкрестином. Группы сравнения: А – НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A10* против контроля НСТ-15 GFP. Б – НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A3* против контроля НСТ-15 GFP. В – клетки НСТ-15 с нокаутом *SLC39A14* против контроля НСТ-15 WT. Г – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A10* против контроля HuTu80 GFP. Д – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A3* против контроля HuTu80 GFP. Е – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC39A8* против контроля HuTu80 GFP. Ж – Клетки HuTu80 с нокаутом *SLC39A8* против контроля HuTu80 WT. З – клетки HuTu80 с нокаутом *SLC39A14* против контроля HuTu80 WT. Клетки растили в 96-луночных культуральных планшетах и обрабатывали различными концентрациями препарата винкрестин (0-25 нмоль/л для HuTu80 и 0-283 нмоль/л для НСТ-15). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Таблица 8 – Значения IC₅₀ винкристина для контрольных и мутантных клеток HuTu80 и HCT-15. Представлены данные (среднее $\pm$ SEM) из трех и более независимых экспериментов. Средние различия IC₅₀ по сравнению с контрольными клетками. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Клеточная линия	Винкристин IC ₅₀ , нМ	p-value
HuTu80 WT	2.17	контроль
HuTu80 <i>SLC39A8</i> KO	2.6	незначимо
HuTu80 <i>SLC39A14</i> KO	1.7	***
HuTu80 GFP	1.57	контроль
HuTu80 <i>SLC30A3</i> OE	1.62	незначимо
HuTu80 <i>SLC30A10</i> OE	1.33	*
HuTu80 <i>SLC39A8</i> OE	1.4	незначимо
HCT-15 WT	81.2	контроль
HCT-15 <i>SLC39A14</i> KO	137.4	***
HCT-15 GFP	90.2	контроль
HCT-15 <i>SLC30A3</i> OE	82.2	незначимо
HCT-15 <i>SLC30A10</i>	648.1	***

При добавлении иматиниба, клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A10* становились чувствительнее к препарату в 2,1 раза ($p\text{-value} < 0,001$) - 16.9 нМ в мутантных клетках и 36 нМ в контрольных GFP-клетках (рисунок 22 Г, таблица 9). Небольшое, но значимое увеличение чувствительности к иматинибу в 1,6 раза ($p\text{-value} < 0,001$), было отмечено при сверхэкспрессии гена *SLC30A3* (21.5 нМ в мутантных клетках и 36 нМ в контрольных GFP-клетках) (рисунок 22 Д, таблица 9). Напротив, клетки HCT-15 со сверхэкспрессией *SLC30A10* становились менее восприимчивы к препарату иматиниб - в 2 раза ($p\text{-value} < 0,001$) – 51.61 нМ в мутантных клетках и 26 нМ в контрольных GFP-клетках (рисунок 22 А, таблица 9). Так же, небольшое, но значимое уменьшение чувствительности к иматинибу в 1,6 раза ($p\text{-value} < 0,001$), было отмечено при нокауте гена *SLC39A14* (35 нМ в мутантных клетках и 27.5 нМ в контрольных клетках дикого типа) (рисунок 22 В, таблица 9).

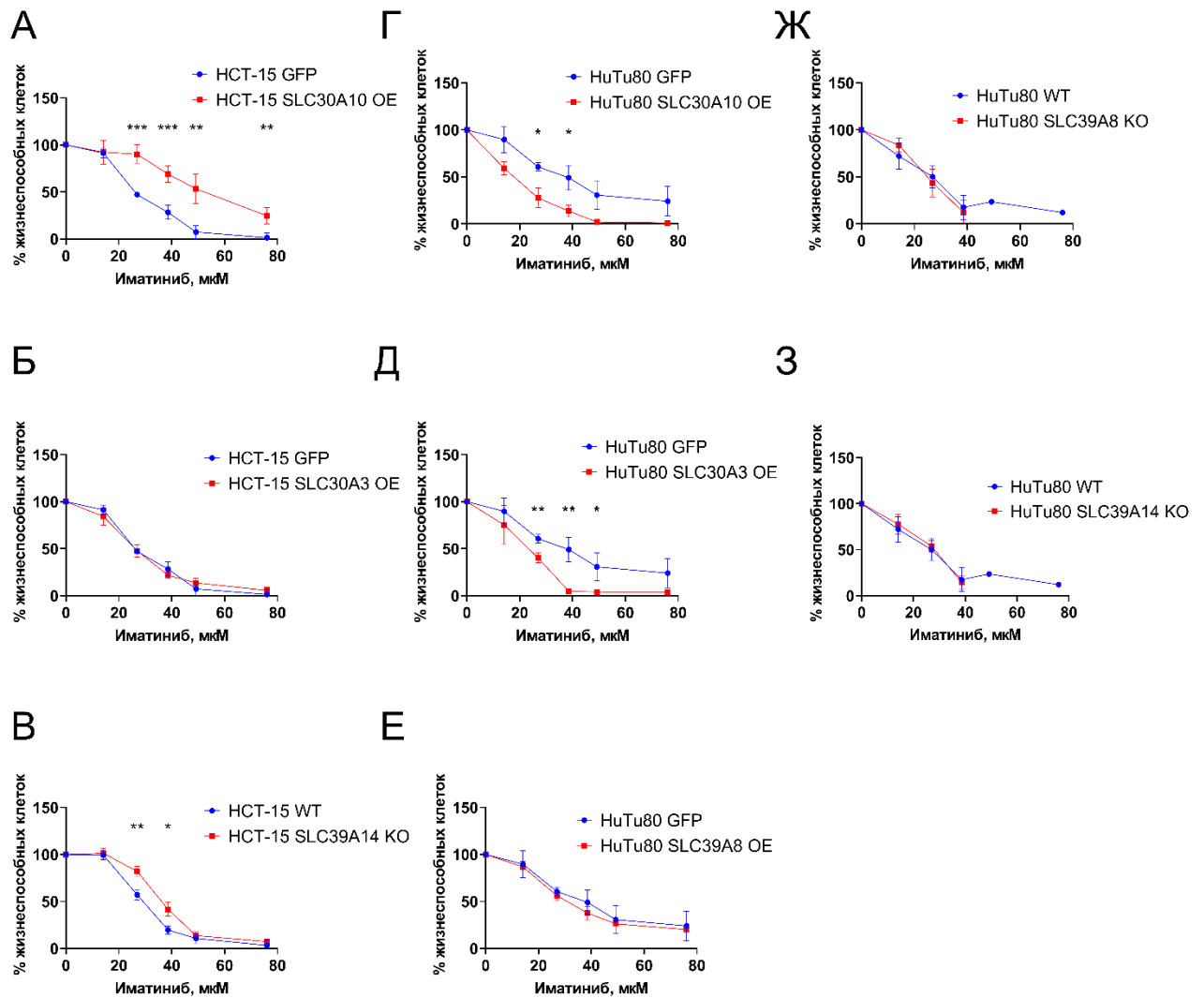


Рисунок 22 – Ингибирование пролиферации раковых клеток иматинибом. Группы сравнения: А – НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A10* против контроля НСТ-15 GFP. Б – НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A3* против контроля НСТ-15 GFP. В – клетки НСТ-15 с нокаутом *SLC39A14* против контроля НСТ-15 WT. Г – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A10* против контроля HuTu80 GFP. Д – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A3* против контроля HuTu80 GFP. Е – Клетки HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC39A8* против контроля HuTu80 GFP. Ж – Клетки HuTu80 с нокаутом *SLC39A8* против контроля HuTu80 WT. З – клетки HuTu80 с нокаутом *SLC39A14* против контроля HuTu80 WT. Клетки растили в 96-луночных культуральных планшетах и обрабатывали различными концентрациями препарата иматиниб (0-76 мкмоль/л). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Таблица 9 – Значения IC₅₀ иматиниба для контрольных и мутантных клеток HuTu80 и HCT-15. Представлены данные (среднее $\pm$ SEM) из трех и более независимых экспериментов. Средние различия IC₅₀ по сравнению с контрольными клетками. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Клеточная линия	Иматиниб IC ₅₀ , мкМ	p-value
HuTu80 WT	23.6	Контроль
HuTu80 <i>SLC39A8</i> KO	24	незначимо
HuTu80 <i>SLC39A14</i> KO	25	незначимо
HuTu80 GFP	36	Контроль
HuTu80 <i>SLC30A3</i> OE	21.5	***
HuTu80 <i>SLC30A10</i> OE	16.9	***
HuTu80 <i>SLC39A8</i> OE	31.3	незначимо
HCT-15 WT	27.5	Контроль
HCT-15 <i>SLC39A14</i> KO	35	***
HCT-15 GFP	26	Контроль
HCT-15 <i>SLC30A3</i> OE	24.9	незначимо
HCT-15 <i>SLC30A10</i>	51.61	***

Реакция на препараты винкристина и иматиниба согласуется с функциями транспортеров внутри каждой клеточной линии (нокаут *SLC39A14* и сверхэкспрессия *SLC30A3*, *SLC30A10* – уменьшение накопления цинка внутри цитоплазмы клетки), но различается в контексте сравнений линий HCT-15 и HuTu80. В клеточной линии HuTu80 сверхэкспрессия генов *SLC30A10* и *SLC30A3* сопровождалась повышением чувствительности к иматинибу, тогда как в клетках HCT-15 сверхэкспрессия *SLC30A10* и нокаут *SLC39A14* приводили к снижению чувствительности к данному препарату. В клетках HCT-15 нокаут гена *SLC39A14* и сверхэкспрессия гена *SLC30A10* приводили к снижению чувствительности к препарату, тогда как в клетках HuTu80 наблюдались статистически значимые, но менее выраженные и противоположные по направленности изменения. Можно предположить, что роль генов *SLC30A10* и *SLC39A14* различна в клетках с мутациями *KRAS* и *CTNNB1*. Наблюдаемые различия в реакции клеточных линий HCT-15 и HuTu80 на модуляцию экспрессии генов *SLC30A10* и *SLC39A14* могут

быть обусловлены различиями в их молекулярно-генетическом фоне. Клеточная линия HCT-15 характеризуется наличием мутации в гене *KRAS*, приводящей к конститутивной активации RAS-зависимых сигнальных путей, тогда как в клетках HuTu80 доминирующей является мутация в гене *CTNNB1* и, следовательно, активируется WNT/ β -катенин-зависимый транскрипционный путь. В таких клеточных моделях изменение внутриклеточного гомеостаза ионов цинка и марганца, опосредованное экспрессией транспортеров семейств SLC30A и SLC39A, может по-разному интегрироваться в сигнальные сети клеток, находящихся под контролем различных онкогенных драйверов. Это, в свою очередь, может определять различия в чувствительности к противоопухолевым препаратам и направлении наблюдаемых эффектов. Однако для прямого установления причинно-следственной связи между конкретными мутациями и фармакологическим ответом требуются дополнительные исследования.

Клетки HCT-15, несущие мутацию *KRAS*, демонстрировали в целом более высокие значения IC₅₀ для всех тестируемых препаратов по сравнению с клетками HuTu80 с *KRAS* дикого типа, что свидетельствует о более широкой лекарственной резистентности клеток с *KRAS* мутацией. В совокупности, экспериментальные данные по чувствительности клеток к препаратам позволяют предположить, что уровни экспрессии и метилирования генов *SLC30A10* и *SLC30A3* могут иметь прогностическое значение для чувствительности раковых клеток к препарату цисплатин, в том числе и в случае *KRAS*-мутированных клеток KPP.

3.7. Профилирование экспрессии мРНК в клетках HCT-15 и HuTu80 с нокаутированными или сверхэкспрессированными генами семейства SLC30A и SLC39A

Мы проанализировали уровни экспрессии генов с помощью секвенирования РНК для всех контрольных, нокаутных и сверхэкспрессионных клеточных линий, полученных в этом исследовании. Все контрольные клетки профилировали в трех повторностях образцов. Полные данные секвенирования депонированы с

присвоением уникального идентификационного номера GSE276849 в электронной открытой базе GEO Publications (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE276849>). В результате анализа главных компонент (PCA) лог-трансформированных уровней экспрессии генов, была выявлена значительная кластеризация образцов по типу клеток (HuTu80 или НСТ-15) вдоль первой компоненты, объясняющей 73,73% дисперсии (рисунок 23). Это подтверждает, что доминирующие транскриптомные различия между образцами объясняются различиями между типами клеточных линий. Кластеризация по типу конструкций, то есть, внесенных мутаций по генам семейств SLC30A/SLC39A, составляет относительно меньшую долю дисперсии – 7,49% и означает, что внесённые мутации не приводят к глобальной перестройке транскриптома, а формируют специфические регуляторные эффекты в рамках уже заданной клеточной программы. Дифференциальная экспрессия генов была установлена с использованием следующих критериев: FDR-adjusted p-value < 0.1; fold change > 2.

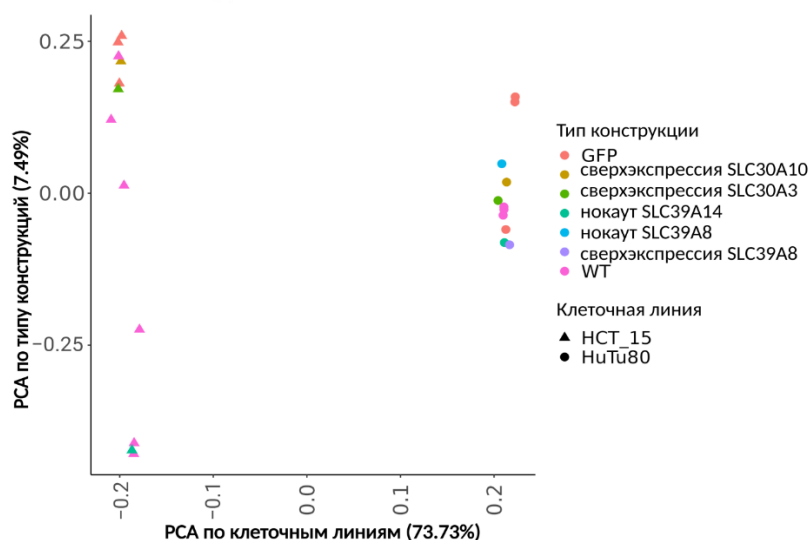


Рисунок 23 – PCA лог-трансформированных профилей экспрессии генов. В анализе сравнивались нокаутные клоны с контрольными WT, а также клоны со сверхэкспрессией с клетками с контрольным GFP-вектором. Разными цветами обозначены функциональные группы образцов. В скобках указана доля стандартного отклонения для соответствующей компоненты

3.8. Анализ транскриптома при сверхэкспрессии *SLC30A3*

Сверхэкспрессия гена *SLC30A3* привела к повышению экспрессии 11 генов и понижению экспрессии 61 гена в клеточной линии НСТ-15, и к повышению экспрессии 93 и понижению экспрессии 68 генов в клеточной линии HuTu80 по сравнению с GFP-экспрессирующим контролем (таблица А.1, рисунок 24).

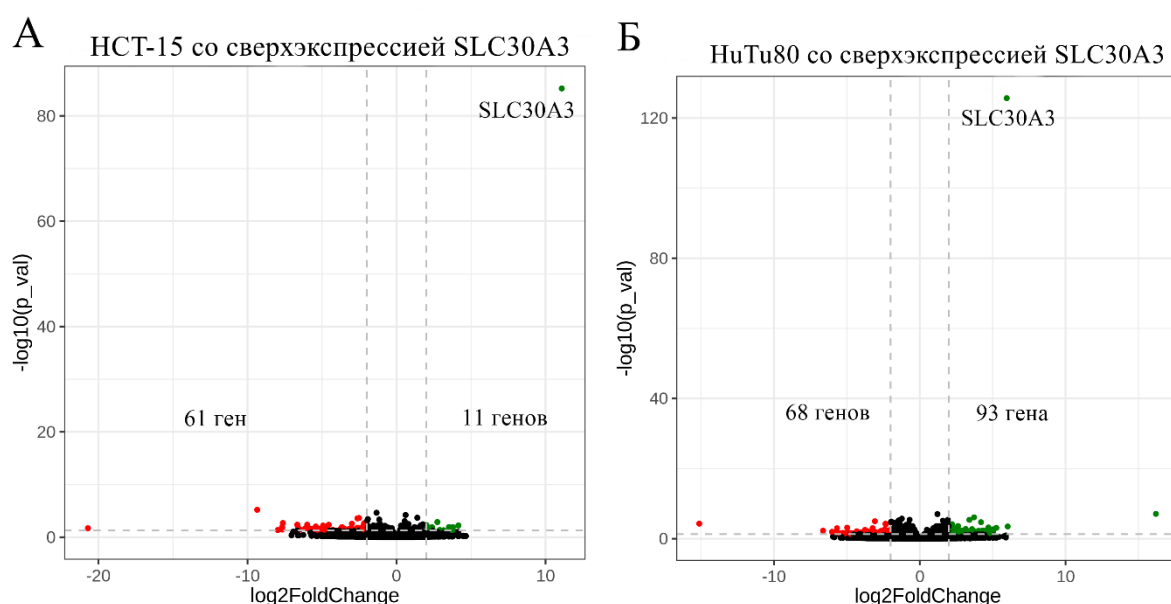


Рисунок 24 – Диаграмма дифференциально экспрессируемых генов для мутантов со сверхэкспрессией гена *SLC30A3*. А – клеточная линия НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A3* в сравнении с НСТ-15 GFP. Б – клеточная линия HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A3* в сравнении с HuTu80 GFP. По оси x - $\log_2\text{FoldChange}$: показывает изменение экспрессии генов. Значения > 0 указывают на увеличение экспрессии в экспериментальной группе по сравнению с контролем, а значения < 0 — на снижение. По оси y - отрицательный логарифм p-value, чем выше значение по оси y – тем значимее результат. Красным цветом показаны гены с пониженной экспрессией, зеленым - с повышенной (для учета дифференциально экспрессированных генов были установлены параметры $p\text{-value} < 0,05$ и $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$)

Среди генов с измененной экспрессией был только один дифференциально экспрессирующийся ген, часто регулируемый в обоих типах клеток, - была повышена экспрессия самого гена *SLC30A3* (рисунок 25).

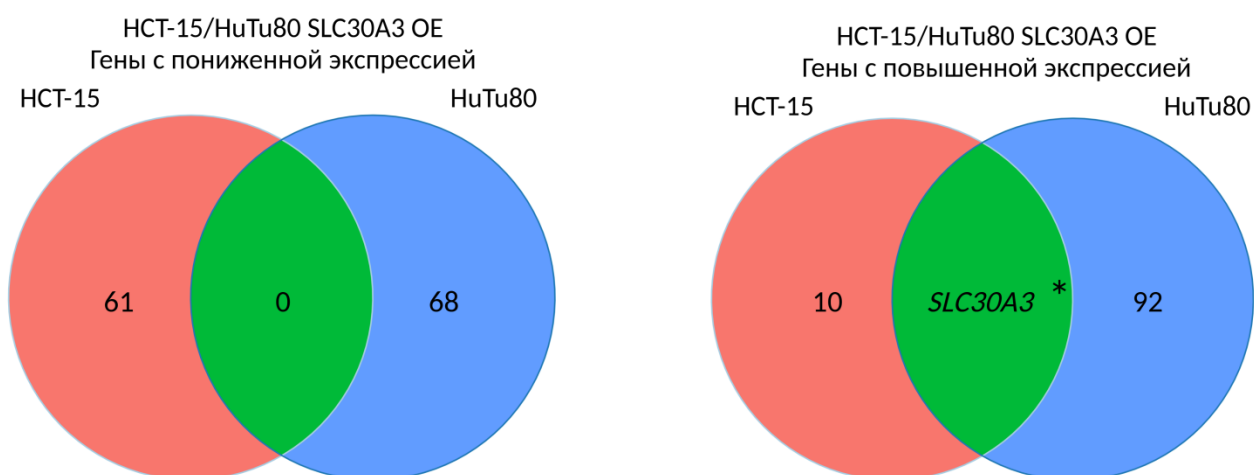


Рисунок 25 – Диаграммы Венна, иллюстрирующие пересечения дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в клеточных линиях HuTu80 и HCT-15, ассоциированные с избыточной экспрессией гена *SLC30A3*

Также был рассчитан уровень активации путей (PAL) для 3044 внутриклеточных молекулярных путей с помощью Oncobox pathway databank [262]. Мы обнаружили 26/127 и 89/125 значительно различающихся по степени повышения/понижения уровня активации путей для типов клеток HCT-15 и HuTu80, соответственно (таблица А.2). Девять из них были активированы в обеих клеточных линиях. Среди них: каспазный каскад, клеточный апоптоз, сигнальный путь PI3K/Akt, GSK3 и путь адгезионного соединения. И были 29 общих для обеих клеточных линий путей с пониженным уровнем активации. Среди них: пути KEGG при раке, RAS, mTOR, JAK-STAT и путь репарации ДНК (таблица А.2). Оба этих общих пересечения PAL были неслучайными согласно пермутационному статистическому тесту [202], $p\text{-value} < 0,001$.

Кроме того, было проведено аннотирование геномов с использованием терминов Генной онтологии (GO), включающие словари «молекулярные функции», «биологические процессы» и «клеточные компоненты».

Для группы сравнения генов HCT-15 со сверхэкспрессией *SLC30A3* наиболее значимо GO-термины обогатились в генах с повышенной экспрессией, и, следовательно, функции, которые были усилены, связаны с метаболизмом и ответом на стресс. А для генов с пониженной экспрессией были выделены процессы со снизившейся активностью они аннотированы как связанные с

нейронной активностью и синаптической передачей сигнала, в основном в организации мембраны синаптических пузырьков. Учитывая, что исследуемые клеточные линии не являются нейрональными и не формируют синаптических структур, данные GO-термины следует интерпретировать не в контексте нейротрансмиссии, а как отражение изменений в системах везикулярного транспорта, мембранной организации и эндомембранной компартментализации. Выявленные изменения отражают перестройку везикулярно-мембранной архитектуры клетки, что соответствует функции *SLC30A3* как интегрального компонента мембраны синаптических пузырьков. Обогащение GO-терминов, связанных с путем метаболизма простагландинов и простаноидов указывает на возможное изменение в воспалительных процессах или в регуляции клеточного метаболизма. Изменения могут быть связаны с адаптацией клеток к условиям стресса в ходе мутации или изменениями в микроокружении опухоли. Увеличение экспрессии генов, связанных с ответом на осмотический стресс, может свидетельствовать о том, что клетки HCT-15 со сверхэкспрессией *SLC30A3* адаптируются к изменениям в окружающей среде.

Стоит отметить, что именно для мутации с *SLC30A3* в GO-анализе выявлена повышенная экспрессия генов, связанных с транспортом цинка и активностью оксидоредуктаз, что может указывать на изменения в клеточном метаболизме и взаимодействии с металлами, что также может иметь значение для клеточной физиологии и патологии и имеет прямую связь с изменениями, которые запускает мутация гена *SLC30A3*, основная функция которого – перенос ионов цинка во внутриклеточные везикулы.

Тем не менее GO-термины для генов с пониженной экспрессией в меньшей степени связаны с канцерогенезом.

Для линии HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A3* GO-термины, обогащенные в генах с повышенной экспрессией, в основном были сосредоточены на процессах, связанных с РНК и сплайсингом, а для генов с пониженной экспрессией – с транспортом органических анионов и кислот. Таким образом, пониженная экспрессия генов, связанных с активностью транспортеров, может быть связана с

нарушениями в метаболизме, и может способствовать накоплению токсичных метаболитов или снижению доступности необходимых для клеток соединений в клетках HuTu80 со сверхэкспрессией гена *SLC30A3*. В то время как повышенная экспрессия генов, связанных со сплайсингом и сборкой белок-РНК комплексов, может свидетельствовать о том, что клетки адаптируются к изменениям, вызванным сверхэкспрессией *SLC30A3* и влияющим на механизмы, связанные с обработкой РНК.

3.9. Анализ транскриптома при сверхэкспрессии *SLC30A10*

Сверхэкспрессия гена *SLC30A10* привела к повышению уровня экспрессии 28 генов и понижению экспрессии 47 генов в клетках НСТ-15. В клетках HuTu80 была повышена экспрессия 62, и понижена – экспрессия 126 генов (Таблица А.1, рисунок 26).

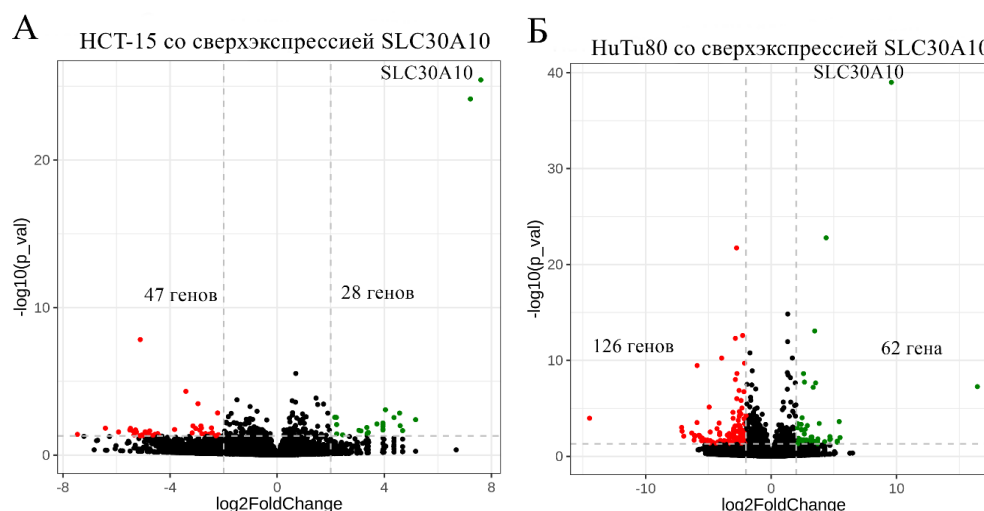


Рисунок 26 – Диаграмма дифференциально экспрессируемых генов для мутантов со сверхэкспрессией гена *SLC30A10*. А – клеточная линия НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A10* в сравнении с НСТ-15 GFP. Б – клеточная линия HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A10* в сравнении с HuTu80 GFP. По оси x - $\log_2\text{FoldChange}$: показывает изменение экспрессии генов. Значения > 0 указывают на увеличение экспрессии в экспериментальной группе по сравнению с контролем, а значения < 0 — на снижение. По оси y - отрицательный логарифм p-value, чем выше значение по оси y – тем значимее результат. Красным цветом показаны гены с пониженной экспрессией, зеленым - с повышенной (для учета дифференциально экспрессированных генов были установлены параметры p-value $< 0,05$ и $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$

Среди пересекающихся в обеих линиях генов с повышенной экспрессией единственным геном был сам *SLC30A10*, а единственным геном с пониженной экспрессией - ген *HIST1H4J*, кодирующий белок семейства гистона H4 (рисунок 27). Как и другие гистоны, он участвует в упаковке ДНК в нуклеосомы и регулирует доступ к хроматину, соответственно, влияет на транскрипцию.

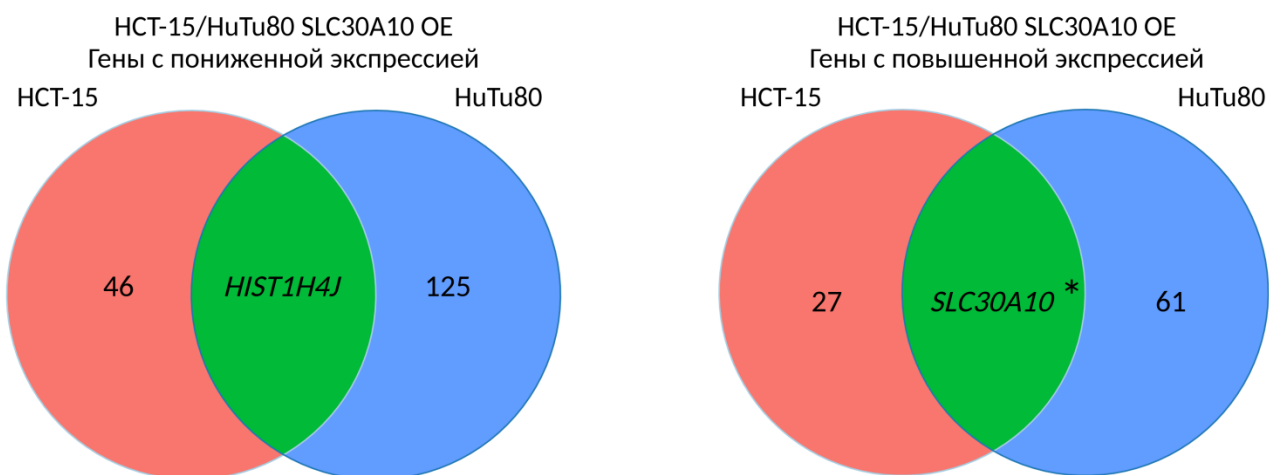


Рисунок 27 – Диаграммы Венна, иллюстрирующие пересечения дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в клеточных линиях HuTu80 и HCT-15, ассоциированные с избыточной экспрессией гена *SLC30A10*

При анализе путей мы обнаружили 32/35 и 146/192 путей с повышенным/пониженным уровнем активации для клеток HCT-15 и HuTu80, соответственно (таблица А.2). Среди них было пять встречающихся в обеих линиях путей с повышенным уровнем активации. Среди этих путей были: сигнализация VEGFR2, взаимодействие интегрин бета-3 с клеточной поверхностью (из базы данных Национального института рака (NCI)). И пять общих для обеих клеточных линий путей с пониженным уровнем активации. Включая сигнализацию Akt, сигнализацию ERK, регуляцию TGF/WNT и путь вирусного канцерогенеза. Однако для данного сравнения оба взаимодействия не прошли статистический пермутационный тест на случайность (p-value превысило 0,05).

Для группы сравнения генов НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC30A10* отсутствовали значимо обогащенные GO-термины в генах с повышенной экспрессией, но для генов с пониженной экспрессией был один значимый GO-термин - регуляция сосудистой проницаемости. Пониженная экспрессия генов, связанных с регуляцией сосудистой проницаемости, может указывать на потенциальные нарушения в процессе кровоснабжения и обмена веществ в тканях. Этот процесс имеет клинические последствия, особенно в контексте опухолевой биологии, где сосудистая проницаемость играет ключевую роль в метастазировании и дальнейшей прогрессии опухолей.

Для HuTu80 было выявлено три значимых GO-термина, обогащенных в генах с повышенной экспрессией, и отсутствовали значимые термины для генов с пониженной экспрессией. Повышенная экспрессия генов, связанных с внеклеточным матриксом, указывает на активное участие этих генов в поддержании структурной целостности и механических свойств тканей. Это может быть связано с изменениями в клеточной адгезии, миграции и взаимодействии клеток с окружающей средой. Увеличение экспрессии генов, связанных с протеинкиназами, может отражать активизацию сигнальных путей, связанных с пролиферацией и выживаемостью клеток. Кроме того, протеинкиназы играют ключевую роль в передаче сигналов внутри клетки и могут быть вовлечены в регуляцию клеточного цикла и метаболизма.

3.10. Анализ транскриптома при нокауте *SLC39A14*

Нокаут гена *SLC39A14* привел к повышению уровней экспрессии 60 и понижению экспрессии 150 генов в клеточной линии НСТ-15, и к повышению экспрессии 153 и понижению экспрессии 180 генов в клеточной линии HuTu80 по сравнению с контрольными клетками дикого типа (таблица А.1, рисунок 28).

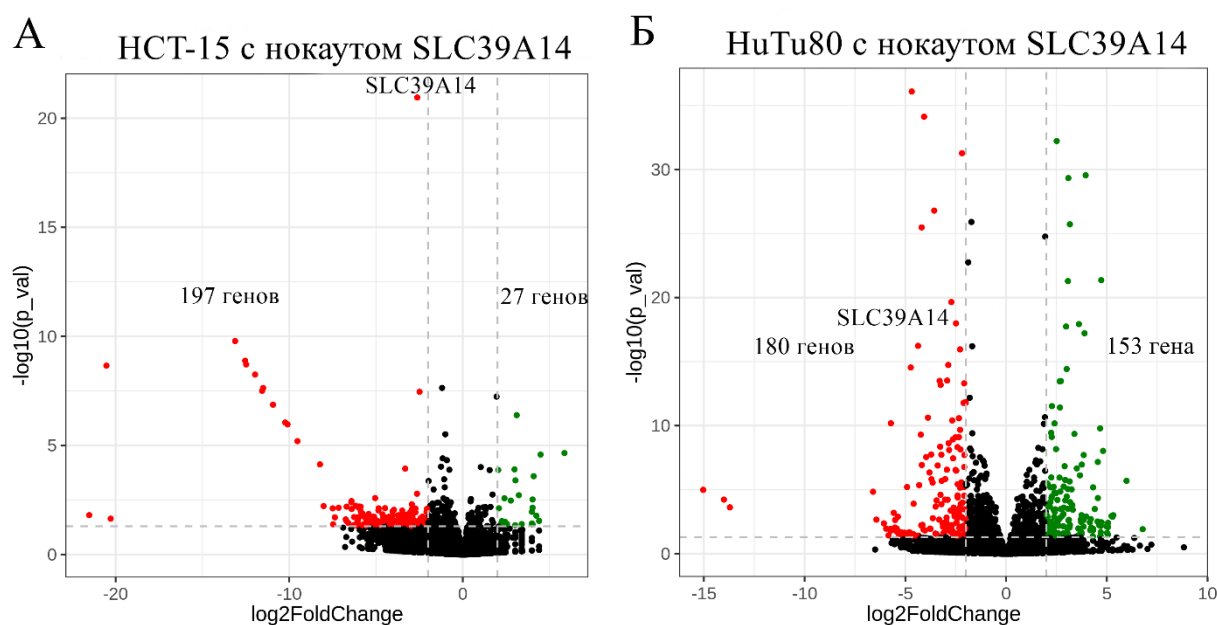


Рисунок 28 – Диаграмма дифференциально экспрессируемых генов для мутантов с нокаутом гена *SLC39A14*. А – клеточная линия HCT-15 с нокаутом *SLC39A14* в сравнении с HCT-15 дикого типа. Б – клеточная линия HuTu80 с нокаутом *SLC39A14* в сравнении с HuTu80 дикого типа. По оси x - $\log_2\text{FoldChange}$: показывает изменение экспрессии генов. Значения > 0 указывают на увеличение экспрессии в экспериментальной группе по сравнению с контролем, а значения < 0 — на снижение. По оси y - отрицательный логарифм p-value, чем выше значение по оси y – тем значимее результат. Красным цветом показаны гены с пониженной экспрессией, зеленым - с повышенной (для учета дифференциально экспрессированных генов были установлены параметры $p\text{-value} < 0,05$ и $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$

Причем пять генов с пониженной экспрессией были общими для обеих клеточных линий (пермутационный тест $p\text{-value} < 0,01$): *SLC39A14*, *DHRS3*, *KCNN4*, *MB* и *ZBTB20* (рисунок 29).

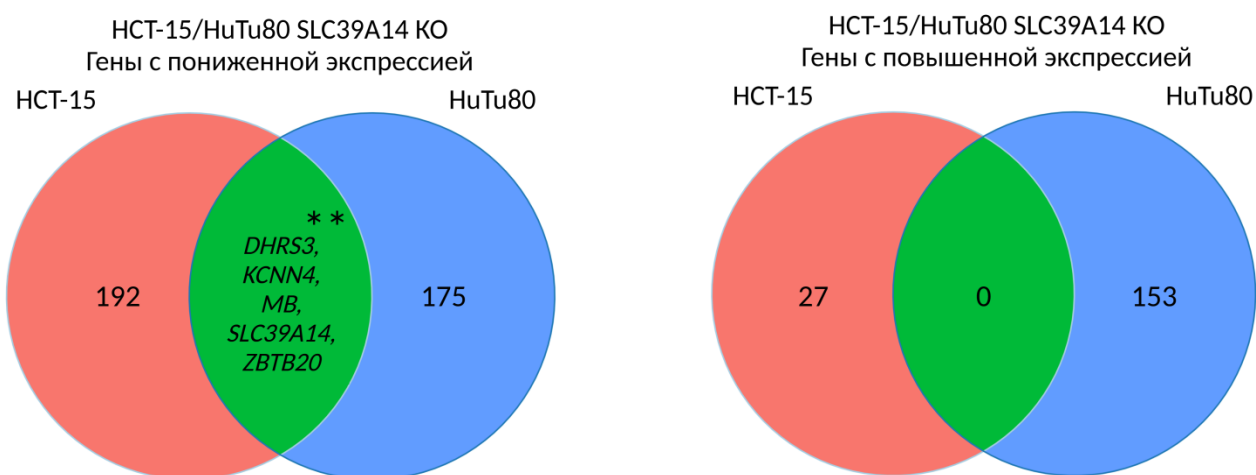


Рисунок 29 – Диаграммы Венна, иллюстрирующие пересечения ДЭГ в клеточных линиях HuTu80 и HCT-15, ассоциированные с пониженной экспрессией гена *SLC39A14*

На уровне молекулярных путей в клетках HCT-15 и HuTu80 было выявлено 27/125 и 182/294 путей с повышенным/пониженным уровнем экспрессии генов, соответственно (таблица А.2). Причем для обеих клеточных линий найдены три общих активированных пути (статистический пермутационный тест не пройден): пути биосинтеза гепарансульфата, молекул клеточной адгезии и пути биосинтеза гликозаминогликанов. И было обнаружено 42 общих пути с пониженным уровнем экспрессии генов (пермутационный тест $p\text{-value} < 0,001$). В эту группу вошли сигнальные пути Akt, цАМФ, пути с интегрин-связанной киназой, фосфатазы и гомолога тензина PTEN, сигнальные пути рецептора фактора некроза опухоли (TNF) в базе NCI, регуляции RhoA, клеточной адгезии, регулируемой кадгеринами, взаимодействия интегринов с клеточной поверхностью, эпителиально-мезенхимальный переход и другие пути.

Был проведен анализ GO для дифференциально экспрессированных генов в ответ на нокаут *SLC39A14*. Для клеточной линии HCT-15 с нокаутом *SLC39A14* статистически значимые GO-термины – пути, активированные генами с повышенной экспрессией, были связаны с процессами развития артерий, регуляцией костной ткани и отбором Т-клеток в тимусе. Данные GO-термины отражают активацию универсальных сигнальных каскадов, которые исторически были описаны в контексте указанных выше тканей, но функционально

представлены в широком спектре клеточных типов. Так, процессы, аннотированные как «регуляция костной ткани», преимущественно ассоциированы с NF-κB-, TNF-, MAPK- и цитокин-зависимыми сигнальными путями, характерными для клеток моноцитарно-макрофагальной линии и для воспалительных реакций. Аналогично, термины, связанные с «отбором Т-клеток в тимусе», отражают активацию программ клеточной селекции, апоптоза, стресс-ответа и контроля клеточного цикла. Следовательно, выявленные GO-термины указывают на перестройку иммунорегуляторных, воспалительных и стресс-ассоциированных сигнальных сетей в опухолевых клетках, что биологически согласуется с функцией *SLC39A14* как транспортёра Zn^{2+} , поскольку цинк является ключевым регулятором активности NF-κB, MAPK, редокс-чувствительных транскрипционных факторов и цитокиновых каскадов [39, 115]. Среди процессов, связанных с генами с пониженной экспрессией в результате нокаута *SLC39A14* в линии НСТ-15 были процессы, сопряженные со структурными компонентами клеток, в частности, с апикальными участками и мембранами. Наличие изменений в этих процессах может указывать на нарушение клеточной структуры из-за изменений в организации цитоскелета (например, актина) и нарушения функций взаимодействия клеток с окружающей средой. Снижение экспрессии генов, связанных с микроворсинками, может также свидетельствовать о нарушении адгезии клеток и их способности к межклеточным взаимодействиям.

В результате GO-анализа статистически значимо измененные гены с пониженной экспрессией в линии HuTu80 с нокаутом гена *SLC39A14* в основном связаны с процессами дифференцировки мышечных клеток, развитием тканей и органов, а также с клеточными взаимодействиями. Пониженная экспрессия генов, связанных с дифференцировкой мышечных клеток и развитием мышечной ткани, может указывать на нарушения в миогенезе, что в основном не влияет напрямую на канцерогенез, но может привести к функциональным дефектам в мышцах и соответственно негативно сказаться на целостности тканей. Однако гены с повышенной экспрессией в линии HuTu80 с нокаутом *SLC39A14* в основном

связаны с морфогенезом сердца и положительной регуляцией роста сердечной мышечной ткани.

3.11. Анализ транскриптома при нокауте и сверхэкспрессии гена *SLC39A8* в модельных клеточных линиях колоректального рака KRAS–дикого типа HuTu80

В клетках HuTu80 мы смогли получить как клеточные линии с нокаутом, так и со сверхэкспрессией гена *SLC39A8*. Далее мы сравнили гены и молекулярные пути, которые взаимно регулировались в нокаутных по *SLC39A8* и сверхэкспрессирующих *SLC39A8* клетках HuTu80. Мы обнаружили 320/223 генов с повышенной/пониженной экспрессией в нокаутных по *SLC39A8* клетках и 39/157 генов с повышенной/пониженной экспрессией, соответственно, в *SLC39A8*-сверхэкспрессирующих HuTu80 клетках (таблица А.1, рисунок 30).

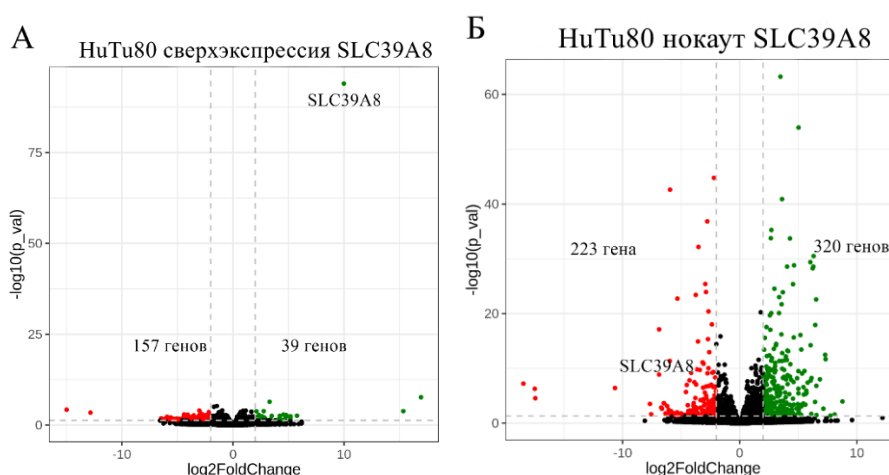


Рисунок 30 – Диаграмма дифференциально экспрессируемых генов для мутантов HuTu80 со сверхэкспрессией и нокаутом гена *SLC39A8*. А – клеточная линия HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC39A8* в сравнении с HuTu80 GFP. Б – клеточная линия HuTu80 с нокаутом *SLC39A8* в сравнении с HuTu80 дикого типа. По оси x - $\log_2\text{FoldChange}$: показывает изменение экспрессии генов. Значения > 0 указывают на увеличение экспрессии в экспериментальной группе по сравнению с контролем, а значения < 0 — на снижение. По оси y - отрицательный логарифм p-value, чем выше значение по оси y – тем значимее результат. Красным цветом показаны гены с пониженной экспрессией, зеленым - с повышенной (для учета дифференциально экспрессированных генов были установлены параметры $p\text{-value} < 0,05$ и $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$

Среди клеток с нокаутом и сверхэкспрессией HuTu80 было четыре общих гена (*DRP2*, *FOXJ1*, *RGS6* и сам *SLC39A8*), экспрессия которых была понижена в нокаутных и повышена в сверхэкспрессирующих клеточных линиях (пермутационный тест $p\text{-value} < 0,001$) (рисунок 31). Среди них ген *FOXJ1*, о котором ранее сообщалось как о факторе, способствующем развитию KPP [133].

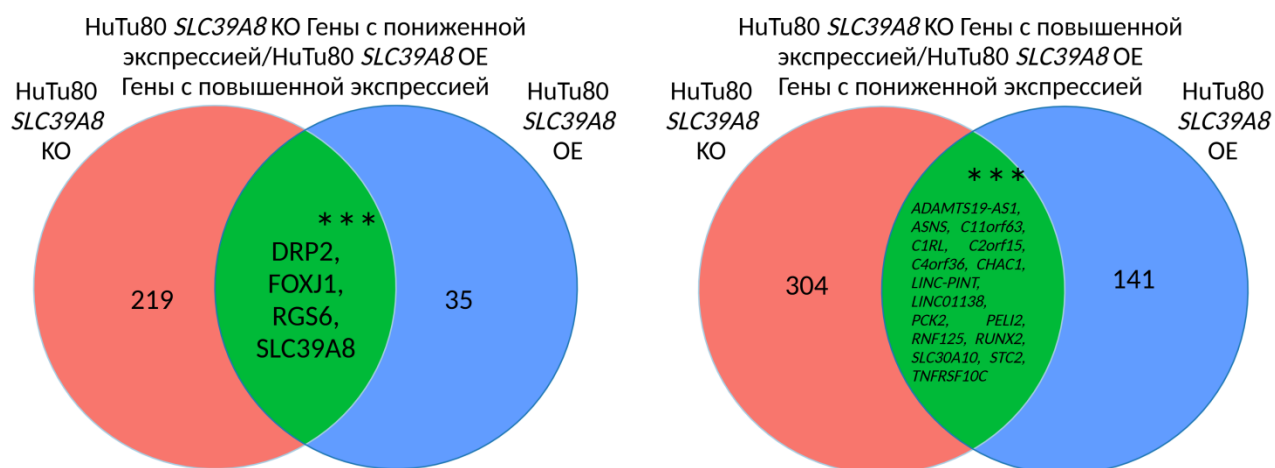


Рисунок 31 – Диаграммы Венна, иллюстрирующие пересечения ДЭГ в клеточных линиях HuTu80 с нокаутом *SLC39A8* и HuTu80 с сверхэкспрессией *SLC39A8*

Более того, было обнаружено 16 общих генов между клетками HuTu80 с нокаутом и сверхэкспрессией *SLC39A8*, экспрессия которых была повышена в нокаутных и понижена в сверхэкспрессирующих клеточных линиях (пермутационный тест $p\text{-value} < 0,001$, (таблица А.1, рисунок 31): *ADAMTS19-AS1*, *ASNS*, *C11orf63*, *C1RL*, *C2orf15*, *C4orf36*, *CHAC1*, *LINC-PINT*, *LINC01138*, *PCK2*, *PELI2*, *RNF125*, *RUNX2*, *SLC30A10*, *STC2*, *TNFRSF10C*; интересно, что среди них был ген *SLC30A10*, что свидетельствует о согласованном противоположном характере экспрессии членов семейства генов *SLC30A* и *SLC39A*.

Кроме того, на уровне молекулярных путей в клетках HuTu80 с нокаутом по *SLC39A8*, и HuTu80 со сверхэкспрессией по *SLC39A8* было выявлено 582/186 и 89/203 путей с повышенным/пониженным уровнем экспрессии генов, соответственно (таблица А.2). Было обнаружено 89 общих путей, уровни активаций которых были повышены в клетках с нокаутом гена *SLC39A8* и понижены в клетках HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC39A8* ($p\text{-value} < 0,01$). Среди

них были пути каспазного каскада в апоптозе, TNF-сигналикации, сигнализации активируемой митогеном протеинкиназы (MAPK-сигналикации), Ras-сигналикации, ErbB-сигналикации, Wnt-сигналикации, трансформирующего фактора роста β (TGF- β), мишени рапамицина млекопитающих (mTOR), хемотаксиса под действием интерлейкина 8 (IL-8) и лейкотриена B4 (LTB4), клеточной адгезии, регулируемой кадгеринами, Notch-сигналикации, белков сигнальной трансдукции и активаторов транскрипции (STAT3), протеогликанов в раке, развития иммунного синапса, сигнализации фактора роста гепатоцитов (HGF-сигналикации), p38-сигналикации и JNK-сигналикации. Эти пути представляют собой критические узлы в интерактивной сети, определяющей эволюцию раковых клеток.

Еще 12 общих молекулярных путей, уровни активации которых были понижены в клетках с нокаутом гена *SLC39A8* и повышены в клетках HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC39A8* не прошли пермутационный тест на случайность.

На основе представленных данных GO были выявлены статистически значимо обогащенные процессы для генов с повышенной и пониженной экспрессией в линии HuTu80 с нокаутом гена *SLC39A8*. А в линии со сверхэкспрессией этого гена - только для генов с пониженной регуляцией экспрессии (статистически значимых обогащенных GO путей для генов с повышенной регуляцией выявлено не было). Гены с пониженной экспрессией в линии HuTu80 в результате нокаута *SLC39A8* связаны с процессами аксоногенеза (формирования аксонов нейронов), развития почечной системы и клеточной адгезией. Пониженная экспрессия этих генов функционально может негативно отражаться на целостности тканей. Более того, важно отметить, что были выявлены гены, также связанные с детоксикацией и ответом на изменения уровней ионов металлов. Это функционально выражается в возможных нарушениях в метаболизме металлов, особенно цинка, что может быть критически важным для функционирования клеток и напрямую связано с нокаутом гена *SLC39A8*. Гены с повышенной экспрессией в основном связаны с развитием костной и соединительной ткани, а также с регуляцией важных клеточных сигнализационных

путей, например, каскада MAPK. Эти изменения в ходе нокаута гена *SLC39A8* соотносятся с его функциями как ионного переносчика, и подтверждают косвенное участие в каскаде MAPK передачи сигнала.

В линии HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC39A8* были выявлены пути, связанные с пониженной экспрессией генов. Они связаны с процессами катаболизма низкомолекулярных соединений и углеводов. Из всех процессов с негативной регуляцией, важно отметить процесс активации сигнальных путей апоптоза (рецепторы TRAIL). В процессах канцерогенеза уменьшение представления рецептора TRAIL на поверхности опухолевых клеток может мешать их распознаванию и уничтожению клетками иммунной системы, способствуя прогрессии опухоли.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании были впервые использованы генетически модифицированные линии раковых клеток человека для изучения влияния аномально регулируемых генов семейств SLC39A и SLC30A, которые опосредуют транспорт цинка и марганца в цитоплазму и за ее пределы, соответственно, на процесс канцерогенеза и его связь с микроэлементом цинком и марганцем. Используя две модельные линии клеток рака человека (HCT-15 – аденокарциномы толстой кишки и HuTu80 - аденокарциномы двенадцатиперстной кишки), были созданы линии клеток HCT-15 и HuTu80, нокаутные по гену *SLC39A14*, и линия клеток HuTu80, нокаутная по гену *SLC39A8*. Однако не удалось создать нокаут гена *SLC39A8* в клетках HCT-15 и нокауты генов *SLC30A3* и *SLC30A10* в клетках HCT-15 и HuTu80 из-за критического снижения жизнеспособности трансфицированных клеток.

Кроме того, были созданы трансдуцированные лентивирусом клеточные линии HuTu80 и HCT-15 со стабильной сверхэкспрессией генов *SLC30A3* и *SLC30A10*. Также была получена клеточная линия HuTu80 со стабильной сверхэкспрессией гена *SLC39A8*. Однако из-за снижения жизнеспособности трансдуцированных клеток мы не смогли создать клеточные линии, стабильно сверхэкспрессирующие *SLC39A8* в клетках HCT-15, а также *SLC39A14* в обоих типах клеток. Этот факт может свидетельствовать о том, что принудительная избыточная/недостаточная экспрессия генов семейства SLC30A или SLC39A способна сильно влиять на жизнеспособность клеток. Известно, что как дефицит, так и избыток цинка могут запускать апоптоз [8, 58, 116], и, вероятно, при сочетании определенных мутаций с мутациями в генах белков-переносчиков ионов клетки не способны компенсировать вызванный дисбаланс. Это предположение подкрепляется нашими данными о дифференциальной регуляции множества основных путей выживания, дифференцировки и пролиферации раковых клеток в ответ на изменение экспрессии генов SLC30A или SLC39A.

Это также подтверждается наблюдением о том, что изменения в экспрессии генов *SLC30A/SLC39A* повышали восстановительный потенциал клеток, о чем свидетельствовало увеличение уровня внутриклеточного НАД(Ф)Н. Митохондриальное дыхание, определяющее восстановительный потенциал клетки, является неотъемлемой частью выработки энергии в клетке и окислительно-восстановительного баланса - процессов, которые могут влиять на реакцию клеток на стресс, в том числе на химиотерапию. Сверхэкспрессия или нокаут генов семейства *SLC30A/SLC39A* может модулировать внутриклеточный ионный гомеостаз (в частности, цинка и марганца) [2, 162], что, в свою очередь, может влиять на функцию митохондрий. Эти сдвиги в митохондриальной активности могут изменить способность клетки справляться с индуцированным цисплатином повреждением ДНК и окислительным стрессом, тем самым влияя на чувствительность к этому препарату.

Хотя изменение экспрессии генов *SLC30A/SLC39A* не увеличивало чувствительность *KRAS*- и *CTNNB1*-мутированных клеточных линий к цетуксимабу, и разнонаправленно менялась чувствительность между разными линиями с одинаковыми мутациями по генам семейств *SLC30A/SLC39A* для препаратов иматиниб и винкристин, оно значительно изменяло чувствительность клеток к цисплатину. В экспериментах мы обнаружили, что сверхэкспрессия гена *SLC30A10*, который выполняет функцию выведения цинка и марганца и, вероятно, других ионов переходных элементов, из цитоплазмы во внешнее пространство, приводит к увеличению полуингибирующей концентрации цисплатина в ~2,7-4 раза. Интересно, что сверхэкспрессия гена *SLC30A3* - еще одного члена семейства *SLC30A* - приводит к противоположному эффекту: IC_{50} цисплатина снижается в ~3,3 раза [257]. Такой противоположный ответ на терапию цисплатином для мутантных по генам семейства *SLC30A* линий можно объяснить различиями в механизмах действия белков *ZnT3* и *ZnT10*. Как было установлено здесь и в предыдущих работах главные функции генов в том, что *SLC30A10* выводит цинк и другие ионы переходных элементов из клеток, тогда как *SLC30A3* накапливает их в клетке, перенося также из цитоплазмы, но в мембранные везикулы и, возможно,

другие мембранные структуры внутри клетки. Хотя сверхэкспрессия *SLC39A8* в клетках HuTu80 значительно снизила IC₅₀ для цисплатина в ~1,5 раза, это изменение может быть недостаточно сильным, чтобы предположить, что сверхэкспрессия *SLC39A8* сама по себе является ключевым фактором, определяющим ответ на цисплатин в клетках аденокарциномы двенадцатиперстной кишки. Также, нокаут *SLC39A8* не оказал существенного влияния на чувствительность к цисплатину. Механизмы резистентности к цисплатину многообразны и включают в себя снижение внутриклеточной концентрации препарата, усиление репарации ДНК, инактивацию активных форм препарата тиолсодержащими соединениями и подавление апоптотических сигналов [246, 247, 254]. И немаловажно, что практически все эти процессы способны модулировать цинк и марганец. Так цинк, являясь кофактором Cu/Zn-супероксиддисмутазы (SOD1), ключевого фермента антиоксидантной защиты, при дефиците может усиливать окислительный стресс, индуцированный химиотерапией [112, 113]. С другой стороны, цинк участвует в регуляции активности p53, влияя на его способность запускать апоптоз в ответ на повреждение ДНК [148]. Предполагается, что наблюдаемая резистентность при сверхэкспрессии *SLC30A10* может быть связана с двумя механизмами. Первый – это то, что активное выведение цинка из клетки способно снижать его доступность для антиоксидантных ферментов, что парадоксальным образом может активировать альтернативные пути защиты от окислительного стресса. Второй – выведение ионов марганца через ZnT10 может модулировать активность митохондриальной супероксиддисмутазы (MnSOD), изменяя устойчивость митохондрий к повреждению [188]. Противоположный эффект — повышение чувствительности к цисплатину при сверхэкспрессии *SLC30A3* — может быть связан с накоплением цинка в эндосомально-лизосомальных компартментах. Депонирование цинка в везикулах может снижать доступность цинка и изменять сигнализацию, связанную с аутофагией, которая играет двойственную роль в ответе на платиновые препараты [177, 196, 247, 254]. Дальнейшие исследования помогут выяснить точную причину устойчивости к химиотерапии на основе платины, связанной с мутациями в гене ионного канала, обусловлена ли она

конкуренцией между ионами за поглощение клетками или же устойчивость спровоцирована повышенной способностью митохондрий справляться с окислительным стрессом в результате сверхэкспрессии *SLC30A10*.

Увеличение чувствительности клеток HuTu80 к иматинибу при сверхэкспрессии *SLC30A10* и *SLC30A3* подчеркивает потенциальные возможности для применения этих транспортеров в качестве терапевтических мишеней. Напротив, наблюдаемое снижение чувствительности клеток HCT-15 к иматинибу и винкристину при сверхэкспрессии *SLC30A10* и, согласно балансу цинка - снижению его внутриклеточной концентрации - нокауте *SLC39A14*, подчеркивает необходимость дальнейшего изучения механизмов, лежащих в основе этих эффектов. Наблюдались противоположные реакции на терапию винкристином и иматинибом при сверхэкспрессии *SLC30A10* – уменьшение чувствительности - для *KRAS* мутированной линии, и, напротив, усиление эффективности лекарственной терапии – для линии HuTu80 *KRAS* дикого типа. Можно предположить, что исходная мутация (*KRAS* в HCT-15 и *CTNNB1* в HuTu80) создает различный «метаболический ландшафт», в котором дисрегуляция транспортеров цинка и марганца приводит к разнонаправленным последствиям. Это подчеркивает важность учета генетического контекста при интерпретации роли ионного гомеостаза в лекарственной чувствительности.

Таким образом, взаимодействие, связанное с выведением/накоплением цинка из/в клеточном пространстве, опосредованное SLC30A, вероятно, играет роль в механизмах клеточной чувствительности к химиотерапии на основе платины. Данные некоторых других исследований подтверждают, что введение цинка в схемы химиотерапии способствует увеличению противоопухолевой активности противораковых препаратов как в моделях ксенотрансплантатов [67, 142], так и в клинических испытаниях на людях [58]. Кроме того, цинк демонстрирует повышение цитотоксичной эффективности препарата в отношении химиорезистентных клеток [49]. В связи с этим мы предполагаем, что статус экспрессии членов семейства SLC30A и их функциональных антагонистов, генов

SLC39A, может быть информативным для предсказания реакции опухолей на препарат цисплатин.

Кроме того, выявленные транскриптомные изменения в молекулярных процессах и установленная связь измененных в клетках сигнальных каскадов с механизмами опухолевой прогрессии, адаптации к стрессовым условиям микроокружения могут отражать функционально значимые перестройки опухолевого фенотипа. Следовательно, экспрессионные профили генов SLC30A и SLC39A потенциально способны характеризовать биологические особенности опухолевых клеток и их адаптацию к факторам стресса. Выявленные изменения экспрессии других генов, связанных с изменениями экспрессии транспортеров цинка, могут иметь значение не только как отражение внутриклеточных перестроек, но и как молекулярные индикаторы состояния опухолевого процесса. Полученные данные позволяют предположить, что профили экспрессии генов семейств SLC30A и SLC39A могут рассматриваться в качестве кандидатных диагностических маркеров в колоректальном раке.

Описанные результаты указывают на то, что биологические эффекты цинка в клетках колоректального рака в значительной степени определяются его внутриклеточным распределением и активностью транспортеров семейств SLC30A и SLC39A, а не только суммарным содержанием микроэлемента в клетке в свободной или связанной форме. Поэтому, в клиническом контексте, неспецифическое повышение уровня цинка во внеклеточной среде, в том числе в форме пищевых добавок, не обязательно приведет к воспроизведению наблюдаемых клеточных эффектов. Выявленная зависимость лекарственной чувствительности опухолевых клеток от экспрессии белков-транспортеров цинка свидетельствует о потенциальной перспективности направленной модуляции систем ионного транспорта как более селективного подхода к управлению опухолевым фенотипом. Для подтверждения клинической значимости данного механизма необходимы дальнейшие исследования на расширенных модельных системах и в клинических выборках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведено систематическое исследование функциональной роли четырех генов-транспортеров — *SLC30A3*, *SLC30A10*, *SLC39A8* и *SLC39A14* — в клетках аденокарциномы кишечника человека. Выбранной модельной системой стали две линии: НСТ-15, происходящая из толстой кишки и несущая мутацию *KRAS*, и HuTu80, происходящая из двенадцатиперстной кишки с мутацией *CTNNB1*. Использование двух генетически различных линий позволило не только оценить эффекты модуляции экспрессии целевых генов, но и выявить возможную зависимость этих эффектов от исходного мутационного статуса клеток. С использованием методов CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута и лентивирусной трансдукции были созданы панели изогенных клеточных линий с нокаутом и стабильной сверхэкспрессией целевых генов.

При анализе результатов транскриптомного профилирования полученных линий было продемонстрировано, что изменения экспрессии генов семейств *SLC30A* и *SLC39A* вызывают глубокую перестройку внутриклеточной сигнализации, затрагивающую пути, ассоциированные с апоптозом, стресс-ответом и метаболической адаптацией. Функциональные тесты показали, что эти изменения сопровождаются усилением восстановительного потенциала клеток, что выражается в гиперреактивации митохондриального дыхания. Важно отметить, что наблюдаемые эффекты не ограничивались прямым влиянием на ионный транспорт, но затрагивали более широкие регуляторные сети, о чем свидетельствует выявленная обратная зависимость экспрессии генов *SLC30A10* и *SLC39A8*, указывающая на существование компенсаторных механизмов, позволяющих опухолевым клеткам поддерживать ионный гомеостаз при нарушениях в работе отдельных транспортеров.

Было отмечено разнонаправленное влияние исследуемых генов на чувствительность модельных клеточных линий к химиотерапевтическим препаратам. Ключевым результатом стало обнаружение того, что модуляция

экспрессии генов семейства SLC30A оказывала воспроизводимое значимое влияние на ответ клеток к цисплатину. Сверхэкспрессия гена *SLC30A10*, кодирующего белок, который обеспечивает выведение ионов из клетки, приводила к развитию резистентности к препарату. Напротив, сверхэкспрессия гена *SLC30A3*, ассоциированная с накоплением цинка во внутриклеточных компартментах, усиливала чувствительность к препарату. Полученные данные свидетельствуют о том, что биологические эффекты цинка в опухолевых клетках определяются не столько его суммарным содержанием, сколько внутриклеточным распределением и активностью специфических транспортеров.

Полученные результаты позволяют рассматривать гены семейств SLC30A и SLC39A в качестве кандидатных молекулярных маркеров, ассоциированных с метаболическим статусом и лекарственной чувствительностью клеток аденокарциномы кишечника человека. Выявленная зависимость терапевтического ответа от экспрессии транспортеров цинка открывает перспективы для разработки новых подходов в диагностике и персонализированной терапии. В клиническом контексте неспецифическая коррекция уровня цинка, например, в форме пищевых добавок, вряд ли сможет воспроизвести наблюдаемые клеточные эффекты, тогда как направленная модуляция активности конкретных транспортеров может стать более обоснованной и результативной стратегией управления опухолевым фенотипом.

Дальнейшие исследования в этом направлении следует сфокусировать на валидации выявленных закономерностей на расширенных панелях клеточных линий, включая трехмерные культуры и модели, получаемые из клеток пациентов, животных моделях, а также на клинических выборках пациентов с колоректальным раком. Углубленное понимание молекулярных механизмов, связывающих компартментализацию ионов с регуляцией сигнальных путей, определяющих чувствительность к препаратам, может создать основу для разработки новых терапевтических стратегий, нацеленных на систему ионного транспорта опухолевых клеток.

ВЫВОДЫ

1. Инактивация и сверхэкспрессия генов семейств SLC30A и SLC39A в клетках колоректального рака приводят к нарушению внутриклеточного распределения ионов цинка в живых клетках. Установлена обратная регуляция экспрессии генов *SLC30A10* и *SLC39A8*, свидетельствующая о существовании компенсаторных механизмов поддержания ионного гомеостаза.

2. Нокаут и сверхэкспрессия генов семейств SLC30A и SLC39A сопровождается усилением восстановительного потенциала опухолевых клеток, что указывает на перестройку метаболического статуса клеток с внесенными мутациями.

3. При транскриптомном профилировании модельных клеточных линий было выявлено вовлечение генов семейств SLC30A и SLC39A в регуляцию сигнальных путей, связанных с апоптозом и клеточным стресс-ответом, что отражает их участие в формировании адаптационного фенотипа опухолевых клеток.

4. Изменение экспрессии отдельных представителей исследуемых семейств оказывает дифференцированное влияние на лекарственную чувствительность: сверхэкспрессия *SLC30A10* ассоциирована с повышением устойчивости к цисплатину, тогда как сверхэкспрессия *SLC30A3* приводит к усилению чувствительности клеток к данному препарату.

5. Продемонстрирована перспективность использования экспрессионных профилей генов SLC30A/SLC39A в качестве кандидатных молекулярных маркеров, отражающих особенности метаболического состояния и терапевтического ответа клеток колоректального рака.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

гРНК – гидовая (направляющая) РНК

ДМСО – диметилсульфоксид

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (англ. differentially expressed genes (DEGs))

ИСП-МС – Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (англ. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

КРР – колоректальный рак

НАД(Ф)Н – восстановленный никотинамид-β-аденин динуклеотид фосфат (англ. β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

МЕК – митоген-активируемая киназа, регулируемая внеклеточным сигналом

МТ – металлотioneины (англ. Metallothioneins)

ОФЕ – относительная единица флуоресценции (англ. Relative Fluorescent Units)

ПВДФ – поливинилиденфторидная мембрана

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РФК – реактивные формы кислорода

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ВСА – анализ бицинхониновой кислоты (англ. Bicinchoninic acid assay)

Cas9 – (англ. CRISPR-associated protein 9)

сРРТ – центральный полипуриновый тракт (англ. Central Polypurine Tract)

CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

CTS – центральная терминальная последовательность (англ. Central Terminal Sequence)

DOC – деоксихолат натрия (англ. Sodium deoxycholate)

ErbB – гомолог В вирусного онкогена эритробластной лейкемии птиц (синоним EGFR/HER)

FDR – коэффициент ложного обнаружения (англ. False discovery rate)

GAP – активирующий ГТФазу белок (англ. GTPase activating protein)

- GEF – фактор обмена гуанидина (англ. guanine nucleotide exchange factor)
- GFP – зеленый флуоресцентный белок (англ. Green Fluorescent Protein)
- GO – генные онтологии (англ. Gene ontology)
- GSH – глутатион восстановленный
- HAT – гистоновые ацетилтрансферазы (англ. Histone acetyltransferases)
- HDAC – деацетилазы гистонов (англ. Histone deacetylases)
- HGF – фактор роста гепатоцитов (англ. Hepatocyte growth factor)
- HGNC – номенклатура генов в соответствии с международной организацией по изучению генома человека (англ. HUGO Gene Nomenclature Committee)
- HHBSS – сбалансированный солевой раствор Хэнкса (англ. HEPES-buffered Hank's Balanced Salt Solution)
- HIV-1 – вирус иммунодефицита человека 1 типа (англ. Human immunodeficiency virus type 1)
- HUGO – международная организация по изучению генома человека (англ. The Human Genome Organisation)
- IC50 – концентрации полуингибирования (англ. Inhibitory Concentration 50%)
- IL-8 – интерлейкин 8 (англ. Interleukin 8)
- IRES – участок внутренней посадки рибосомы (англ. Internal Ribosome Entry Site)
- JNK – с-Jun-N-концевые протеинкиназы (англ. C-Jun N-terminal kinase)
- KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов (англ. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
- KO – нокаут (англ. knockout)
- LB – лизогенная среда (англ. Lysogeny broth)
- LTB4 – лейкотриен B4 (англ. Leukotriene B4)
- LTR – длинный терминальный повтор (англ. Long Terminal Repeat)
- MAPK – Активируемая митогеном протеинкиназа (англ. Mitogen-Activated Protein Kinase)
- mPTP – пора неспецифической проницаемости в митохондриях (англ. mitochondrial permeability transition pore)
- mTOR – мишень рапамицина млекопитающих (англ. mammalian target of rapamycin)

Nf-kB – ядерный фактор транскрипции каппа-B

NCI – национальный институт рака (англ. National Cancer Institute)

OE – сверхэкспрессия (англ. overexpression)

ORF – открытая рамка считывания (англ. Open Reading Frame)

Ori – точка начала репликации (англ. Origin of Replication)

PAL – уровень активации молекулярного пути (англ. Pathway activation levels)

PAM – примыкающий к протоспейсеру мотив (англ. Protospacer Adjacent Motif)

PBS – натрий-фосфатный буфер (англ. Phosphate buffered saline)

PCA – анализ главных компонент (англ. Principal component analysis)

PI – йодистый пропидий (англ. Propidium Iodide)

PLC ϵ – фосфолипаза C ϵ (англ. Phospholipase C ϵ)

PLD – Фосфолипаза D (англ. Phospholipase D)

Ppm – миллионная доля, число частей на миллион (англ. Parts per million)

PTEN – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью (англ. Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten)

RALGDS – стимулятор диссоциации гуанин-нуклеотидов (англ. Ral guanine nucleotide dissociation stimulator)

RRE – элемент ответа Rev (англ. Rev Response Element)

RSV – вирус саркомы Рауса (англ. Rous Sarcoma Virus)

SDS – натрий додецилсульфат (англ. Sodium dodecyl sulfate)

SEM – стандартная ошибка среднего (англ. the standard error of the mean)

SLC – переносчики растворённых веществ (англ. Solute carrier family)

SOD – супероксиддисмутаза (англ. Superoxide dismutase)

STAT – белки сигнальной трансдукции и активаторы транскрипции

TBK1 – TANK-связывающая киназа 1 (англ. TANK binding kinase 1)

TCGA – атлас ракового генома (англ. The Cancer Genome Atlas)

TGF- β – трансформирующий фактор роста β (англ. The transforming growth factor)

TNF – фактор некроза опухоли (англ. Tumor necrosis factor)

TNF – фактор некроза опухоли (англ. Tumor necrosis factor)

TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз (англ. TNF alpha Related Apoptosis Inducing Ligand)

TRP – суперсемейство трансмембранных белков каналов переменного рецепторного потенциала (англ. Transient Receptor Potential)

WPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (англ. Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element)

WT – дикий тип (англ. Wild Type)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Role of the Metabolism of Zinc and Manganese Ions in Human Cancerogenesis. / J. M. Rozenberg, M. Kamynina, M. Sorokin [et al.] // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10. – № 5. – 1072.
2. SLC transporters as a novel class of tumour suppressors: identity, function and molecular mechanisms. / Y. D. Bhutia, E. Babu, S. Ramachandran [et al.] // The Biochemical journal. – 2016. – Vol. 473. – № 9. – P. 1113-1124.
3. A Call for Systematic Research on Solute Carriers. / A. César-Razquin, B. Snijder, T. Frappier-Brinton [et al.] // Cell. – 2015. – Vol. 162. – № 3. – P. 478-487.
4. Panda, S. Solute carrier proteins and c-Myc: a strong connection in cancer progression. / S. Panda, N. Banerjee, S. Chatterjee // Drug discovery today. – 2020. – Vol. 25. – № 5. – P. 891-900.
5. Christenson, E. T. In vitro reconstitution, functional dissection, and mutational analysis of metal ion transport by mitoferrin-1 / E. T. Christenson, A. S. Gallegos, A. Banerjee // Journal of Biological Chemistry. – 2018. – Vol. 293. – № 10. – P. 3819-3828.
6. Zinc prevents DNA damage in normal cells but shows genotoxic and cytotoxic effects in acute myeloid leukemia cells / M. I. Costa, B. S. Lapa, J. Jorge [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 5. – P. 25-37.
7. He, L. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. / L. He, K. Vasiliou, D. W. Nebert // Human genomics. – 2009. – Vol. 3. – № 2. – P. 195-206.
8. Direct effect of zinc on mitochondrial apoptogenesis in prostate cells. / P. Feng, T.-L. Li, Z.-X. Guan [et al.] // The Prostate. – 2002. – Vol. 52. – № 4. – P. 311-318.
9. The correlation and role analysis of SLC30A1 and SLC30A10 in cervical carcinoma / J. Zhang, X.-W. Chen, L.-S. Shu, C.-D. Liu // Journal of Cancer. – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 1031-1043.
10. Solute carriers (SLCs) in cancer. / S. El-Gebali, S. Bentz, M. A. Hediger, P. Anderle // Molecular aspects of medicine. – 2013. – Vol. 34. – № 2-3. – P. 719-734.

11. Huang, L. The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. / L. Huang, S. Tapaamorndech // *Molecular aspects of medicine*. – 2013. – Vol. 34. – № 2-3. – P. 548-560.
12. Transcriptome analysis reveals an altered expression profile of zinc transporters in colorectal cancer / V. Barresi, G. Valenti, G. Spampinato [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2018. – Vol. 119. – № 12. – P. 9707-9719.
13. Fujishiro, H. Manganese transport in mammals by zinc transporter family proteins, ZNT and ZIP / H. Fujishiro, T. Kambe // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2022. – Vol. 148. – № 1. – P. 125-133.
14. SLC30A10: A novel manganese transporter / P. Chen, A. B. Bowman, S. Mukhopadhyay, M. Aschner // *Worm*. – 2015. – Vol. 4. – № 3. – P. 42-48.
15. Huang, L. The SLC30 family of zinc transporters-A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles / L. Huang, S. Tapaamorndech // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2013. – Vol. 34. – № 2-3. – P. 548-560.
16. Manganese chloride induces histone acetylation changes in neuronal cells: Its role in manganese-induced damage. / Z. Guo, Z. Zhang, Q. Wang [et al.] // *Neurotoxicology*. – 2018. – Vol. 65. – P. 255-263.
17. SLC30A10 Is a Cell Surface-Localized Manganese Efflux Transporter, and Parkinsonism-Causing Mutations Block Its Intracellular Trafficking and Efflux Activity / D. Leyva-Illades, P. Chen, C. E. Zogzas [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 34. – № 42. – P. 79-95.
18. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. / M. Quadri, A. Federico, T. Zhao [et al.] // *American journal of human genetics*. – 2012. – Vol. 90. – № 3. – P. 467-477.
19. Syndrome of Hepatic Cirrhosis, Dystonia, Polycythemia, and Hypermanganesemia Caused by Mutations in SLC30A10, a Manganese Transporter in Man. / K. Tuschl, P. T.

- Clayton, S. M. J. Gospe [et al.] // American journal of human genetics. – 2016. – Vol. 99. – № 2. – P. 521-534.
20. Zogzas, C. E. Structural Elements in the Transmembrane and Cytoplasmic Domains of the Metal Transporter SLC30A10 Are Required for Its Manganese Efflux Activity / C. E. Zogzas, M. Aschner, S. Mukhopadhyay // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – Vol. 291. – № 31. – P. 15940-15957.
21. A role for ZnT-1 in regulating cellular cation influx / D. Segal, E. Ohana, L. Besser [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2004. – Vol. 323. – № 4. – P. 1145-1150.
22. Patrushev, N. Angiotensin II Requires Zinc and Downregulation of the Zinc Transporters ZnT3 and ZnT10 to Induce Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells / N. Patrushev, B. Seidel-Rogol, G. Salazar // PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 3. – P. 33-41.
23. Efflux function, tissue-specific expression and intracellular trafficking of the Zn transporter ZnT10 indicate roles in adult Zn homeostasis / H. J. Bosomworth, J. K. Thornton, L. J. Coneyworth [et al.] // Metallomics. – 2012. – Vol. 4. – № 8. – P. 771-779.
24. Differential Targeting of SLC30A10/ZnT10 Heterodimers to Endolysosomal Compartments Modulates EGF-Induced MEK/ERK1/2 Activity. / Y. Zhao, R. G. Feresin, J. M. Falcon-Perez, G. Salazar // Traffic (Copenhagen, Denmark). – 2016. – Vol. 17. – № 3. – P. 267-288.
25. Crosstalk between DNA methylation and gene expression in colorectal cancer, a potential plasma biomarker for tracing this tumor / M. A. Kerachian, A. Javadmanesh, M. Azghandi [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-13.
26. Comparison of four next generation sequencing platforms for fusion detection: Oncomine by ThermoFisher, AmpliSeq by illumina, FusionPlex by ArcherDX, and QIAseq by QIAGEN. / X. Qu, C. Yeung, I. Coleman [et al.] // Cancer genetics. – 2020. – Vol. 243. – P. 11-18.
27. Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relation to redox status in lung cancer patients / K. Zabłocka-Słowińska, S. Płaczowska, A. Prescha [et al.] //

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2018. – Vol. 45. – № September 2017. – P. 78-84.

28. Reczek, C. R. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer / C. R. Reczek, N. S. Chandel // *Annu Rev Cancer Biol.* – 2017. – Vol. 1. – № 3. – P. 79-98.

29. Winslow, J. W. W. The functions of ZIP8, ZIP14, and ZnT10 in the regulation of systemic manganese homeostasis / J. W. W. Winslow, K. H. Limesand, N. Zhao // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – Vol. 21. – № 9. – P. 87-99.

30. Trace Element and Heavy Metal Levels in Colorectal Cancer: Comparison Between Cancerous and Non-cancerous Tissues / M. Sohrabi, A. Gholami, M. H. H. Azar [et al.] // *Biological Trace Element Research.* – 2018. – Vol. 183. – № 1. – P. 1-18.

31. Analysis of Zinc-Exporters Expression in Prostate Cancer / C. K. Singh, K. M. Malas, C. Tydrick [et al.] // *Nature Publishing Group.* – 2016. – № November. – P. 1-13.

32. A clinical evaluation of the alterations in the level of serum zinc, copper, iron, and manganese in the ischemic heart disease patients of Bangladesh-A case-control study / S. N. Anonna, S. K. Ahamed, M. G. Uddin [et al.] // *Heliyon.* – 2020. – Vol. 6. – № 10. – P. 54-66.

33. Zinc inhibits nuclear factor- κ B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents / R. G. Uzzo, P. Leavis, W. Hatch [et al.] // *Clinical cancer research.* – 2002. – Vol. 8. – № 11. – P. 3579-3583.

34. Costello, L. C. A Proposed Efficacious Treatment with Clioquinol (Zinc Ionophore) and Cabergoline (Prolactin Dopamine Agonist) for the Treatment of Terminal Androgen-independent Prostate Cancer. Why and How? / L. C. Costello, R. B. Franklin // *Journal of clinical research in oncology.* – 2019. – Vol. 2. – № 1. – P. 14-27.

35. Manganese transporter Slc30a10 controls physiological manganese excretion and toxicity / C. J. Mercadante, M. Prajapati, H. L. Conboy [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2019. – Vol. 129. – № 12. – P. 5442-5461.

36. Manganese influx and expression of ZIP8 is essential in primary myoblasts and contributes to activation of SOD2 / S. J. V Gordon, D. E. Fenker, K. E. Vest, T. Padilla-Benavides // *Metallomics.* – 2019. – Vol. 11. – № 6. – P. 1140-1153.

37. Environmental manganese compounds accumulate as Mn (II) within the Golgi apparatus of dopamine cells: relationship between speciation, subcellular distribution, and cytotoxicity / A. Carmona, S. Roudeau, L. Perrin [et al.] // *Metallomics*. – 2014. – Vol. 6. – № 4. – P. 822-832.
38. Cano-Gauci, D. F. Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger / D. F. Cano-Gauci, B. Sarkar // *FEBS Letters*. – 1996. – Vol. 386. – № 1. – P. 1-4.
39. Zinc dysregulation in cancers and its potential as a therapeutic target / J. Wang, H. Zhao, Z. Xu, X. Cheng // *Cancer Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 17. – № 3. – P. 612-625.
40. The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer / E. Bafaro, Y. Liu, Y. Xu, R. E. Dempski // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2017. – Vol. 2. – № 2. – P. 1-12.
41. Cotruvo Jr, J. A. Metallation and mismetallation of iron and manganese proteins in vitro and in vivo: the class I ribonucleotide reductases as a case study / J. A. Cotruvo Jr, J. Stubbe // *Metallomics*. – 2012. – Vol. 4. – № 10. – P. 1020-1036.
42. Redox dynamics of manganese as a mitochondrial life-death switch / M. R. Smith, J. Fernandes, Y.-M. Go, D. P. Jones // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2017. – Vol. 482. – № 3. – P. 388-398.
43. Gunter, T. E. The case for manganese interaction with mitochondria / T. E. Gunter, C. E. Gavin, K. K. Gunter // *Neurotoxicology*. – 2009. – Vol. 30. – № 4. – P. 727-743.
44. Differential cytotoxicity of Mn (II) and Mn (III): special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes / J.-Y. Chen, G. C. Tsao, Q. Zhao, W. Zheng // *Toxicology and applied pharmacology*. – 2001. – Vol. 175. – № 2. – P. 160-168.
45. Zheng, W. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity / W. Zheng, S. Ren, J. H. Graziano // *Brain research*. – 1998. – Vol. 799. – № 2. – P. 334-342.
46. From the cover: manganese stimulates mitochondrial H₂O₂ production in SH-SY5Y human neuroblastoma cells over physiologic as well as toxicologic range / J.

Fernandes, L. Hao, K. M. Bijli [et al.] // *Toxicological Sciences*. – 2017. – Vol. 155. – № 1. – P. 213-223.

47. A pair of transporters controls mitochondrial Zn²⁺ levels to maintain mitochondrial homeostasis / T. Ma, L. Zhao, J. Zhang [et al.] // *Protein & cell*. – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 180-202.

48. Sensi, S. L. Mitochondrial sequestration and Ca²⁺-dependent release of cytosolic Zn²⁺ loads in cortical neurons / S. L. Sensi, D. Ton-That, J. H. Weiss // *Neurobiology of disease*. – 2002. – Vol. 10. – № 2. – P. 100-108.

49. TRPM7 senses oxidative stress to release Zn²⁺ from unique intracellular vesicles / S. A. Abiria, G. Krapivinsky, R. Sah [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 30. – P. 79-88.

50. Sensors for measuring subcellular zinc pools / P. Chabosseau, J. Woodier, R. Cheung, G. A. Rutter // *Metallomics*. – 2018. – Vol. 10. – № 2. – P. 229-239.

51. Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus / Q. Lu, H. Haragopal, K. G. Slepchenko [et al.] // *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. – 2016. – Vol. 8. – № 1. – P. 35-43.

52. Comparing the influence of high doses of different zinc salts on oxidative stress and energy depletion in IPEC-J2 cells / L. Chen, X. Yu, H. Ding [et al.] // *Biological trace element research*. – 2020. – Vol. 196. – P. 481-493.

53. Lysosomal Zn²⁺ release triggers rapid, mitochondria-mediated, non-apoptotic cell death in metastatic melanoma / W. Du, M. Gu, M. Hu [et al.] // *Cell reports*. – 2021. – Vol. 37. – № 3. – P. 18-28.

54. Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition / I. G. Gazaryan, I. P. Krasinskaya, B. S. Kristal, A. M. Brown // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 33. – P. 24373-24380.

55. Senft, D. crosstalk underlies the ER stress response / D. Senft, Z. A. Ronai // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2015. – Vol. 4. – № Box 1. – P. 1-8.

56. Prasad, A. S. Molecular mechanisms of zinc as a pro-antioxidant mediator: clinical therapeutic implications / A. S. Prasad, B. Bao // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – № 6. – P. 164-177.
57. Rudolf, E. Increases in intracellular zinc enhance proliferative signaling as well as mitochondrial and endolysosomal activity in human melanocytes / E. Rudolf, K. Rudolf // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Vol. 43. – № 1. – P. 1-16.
58. Inhibition of apoptosis by Zn^{2+} in renal tubular cells following ATP depletion / Q. Wei, J. Wang, M.-H. Wang [et al.] // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. – 2004. – Vol. 287. – № 3. – P. F492-F500.
59. Bonke, E. Manganese ions induce H_2O_2 generation at the ubiquinone binding site of mitochondrial complex II / E. Bonke, K. Zwicker, S. Dröse // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2015. – Vol. 580. – P. 75-83.
60. Slepchenko, K. G. Cross talk between increased intracellular zinc (Zn^{2+}) and accumulation of reactive oxygen species in chemical ischemia / K. G. Slepchenko, Q. Lu, Y. V Li // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2017. – Vol. 313. – № 4. – P. C448-C459.
61. The epithelial zinc transporter ZIP10 epigenetically regulates human epidermal homeostasis by modulating histone acetyltransferase activity / B. Bin, S. Lee, J. Bhin [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2019. – Vol. 180. – № 4. – P. 869-880.
62. Zinc homeostasis alters zinc transporter protein expression in vascular endothelial and smooth muscle cells / A. I. Abdo, H. B. Tran, S. Hodge [et al.] // *Biological Trace Element Research*. – 2021. – Vol. 199. – P. 2158-2171.
63. SLC30A9 is required for Zn^{2+} homeostasis, Zn^{2+} mobilization, and mitochondrial health / H. Deng, X. Qiao, T. Xie [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – № 35. – P. 99-118.
64. Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc / J. E. J. Hardyman, J. Tyson, K. A. Jackson [et al.] // *Metallomics*. – 2016. – Vol. 8. – № 3. – P. 337-343.

65. Kukic, I. Zn²⁺ efflux through lysosomal exocytosis prevents Zn²⁺-induced toxicity / I. Kukic, S. L. Kelleher, K. Kiselyov // *Journal of cell science*. – 2014. – Vol. 127. – № 14. – P. 3094-3103.
66. Manganese systemic distribution is modulated in vivo during tumor progression and affects tumor cell migration and invasion in vitro / M. P. Stelling, M. A. Soares, S. C. Cardoso [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 15-33.
67. Choi, S. Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases / S. Choi, X. Liu, Z. Pan // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2018. – Vol. 39. – № 7. – P. 1120-1132.
68. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases / L. Mezzaroba, D. F. Alfieri, A. N. C. Simão, E. M. V. Reiche // *Neurotoxicology*. – 2019. – Vol. 74. – P. 230-241.
69. Metal and essential element levels in hair and association with autism severity / M. Fiore, R. Barone, C. Copat [et al.] // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2020. – Vol. 57. – P. 26-40.
70. The metallome as a link between the “omes” in autism spectrum disorders / J. E. Stanton, S. Malijauskaite, K. McGourty, A. M. Grabrucker // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2021. – Vol. 14. – P. 65-73.
71. Association between serum heavy metals and prostate cancer risk—A multiple metal analysis / J. T. Lim, Y. Q. Tan, L. Valeri [et al.] // *Environment international*. – 2019. – Vol. 132. – P. 105-109.
72. Growth modulatory role of zinc in prostate cancer and application to cancer therapeutics / P. K. To, M. H. Do, J.-H. Cho, C. Jung // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 8. – P. 29-39.
73. Tissue and serum trace elements concentration among colorectal patients: A systematic review of case-control studies / A. M. Nawi, S. F. Chin, S. Azhar Shah, R. Jamal // *Iranian Journal of Public Health*. – 2019. – Vol. 48. – № 4. – P. 632-643.
74. Doble, P. A. Distributions of manganese in diverse human cancers provide insights into tumour radioresistance / P. A. Doble, G. L. G. Miklos // *Metallomics*. – 2018. – Vol. 10. – № 9. – P. 1191-1210.

75. Novel role for the Golgi membrane protein TMEM165 in control of migration and invasion for breast carcinoma / P. Murali, B. P. Johnson, Z. Lu [et al.] // *Oncotarget*. – 2020. – Vol. 11. – № 28. – P. 27-47.
76. Evidence that human prostate cancer is a ZIP1-deficient malignancy that could be effectively treated with a zinc ionophore (clioquinol) approach / L. C. Costello, R. B. Franklin, J. Zou, M. J. Naslund // *Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 4. – № 2. – P. 61-79.
77. Manganese is critical for antitumor immune responses via cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy / M. Lv, M. Chen, R. Zhang [et al.] // *Cell research*. – 2020. – Vol. 30. – № 11. – P. 966-979.
78. Zinc enhances temozolomide cytotoxicity in glioblastoma multiforme model systems / A. Toren, T. Pismenyuk, M. Yalon [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 46. – P. 74-86.
79. Hgg-04. zinc enhances temozolomide cytotoxicity in pediatric glioblastoma multiforme model system / A. Toren, M. Yalon, A. Dafni, R. Mehrian-Shai // *Neuro-Oncology*. – 2020. – Vol. 22. – № Suppl 3. – P. 34-44.
80. Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity. Vol. 145 / C. Wang, R. Zhang, X. Wei [et al.]. – 1. – Elsevier Inc., 2020. – P. 187-241.
81. Lossow, K. Are trace element concentrations suitable biomarkers for the diagnosis of cancer? / K. Lossow, M. Schwarz, A. P. Kipp // *Redox biology*. – 2021. – Vol. 42. – P. 101-109.
82. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis / D. N. Ekoue, C. He, A. M. Diamond, M. G. Bonini // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2017. – Vol. 1858. – № 8. – P. 628-632.
83. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. / Y. Yang, S. Karakhanova, W. Hartwig [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2016. – Vol. 231. – № 12. – P. 2570-2581.
84. Nissanka, N. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. / N. Nissanka, C. T. Moraes // *FEBS letters*. – 2018. – Vol. 592. – № 5. – P. 728-742.

85. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. / S. A. Andrabi, I. Sayeed, D. Siemen [et al.] // *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2004. – Vol. 18. – № 7. – P. 869-871.
86. Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. / J. S. Bhatti, A. Sehrawat, J. Mishra [et al.] // *Free radical biology & medicine*. – 2022. – Vol. 184. – P. 114-134.
87. Mitochondrial oxidative stress in the tumor microenvironment and cancer immunoescape: foe or friend? / C.-L. Kuo, A. Ponneri Babuharisankar, Y.-C. Lin [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2022. – Vol. 29. – № 1. – P. 74-87.
88. Liu, X. The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases / X. Liu, Z. Chen // *Journal of Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 207-214.
89. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. / J. Ellinger, P. Kahl, J. von der Gathen [et al.] // *The Prostate*. – 2010. – Vol. 70. – № 1. – P. 61-69.
90. Epigenetic Regulation of miRNA Expression in Malignant Mesothelioma: miRNAs as Biomarkers of Early Diagnosis and Therapy / M. Tomasetti, S. Gaetani, F. Monaco [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 193-206.
91. Role of key micronutrients from nutrigenetic and nutrigenomic perspectives in cancer prevention / A. I. Irimie, C. Braicu, S. Pasca [et al.] // *Medicina (Lithuania)*. – 2019. – Vol. 55. – № 6. – P. 44-58.
92. CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP α binding sites that activate some tissue-specific genes / V. Rishi, P. Bhattacharya, R. Chatterjee [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 47. – P. 20311-20316.
93. Antioxidant enzymes change in different non-metastatic stages in tumoral and peritumoral tissues of colorectal cancer / A. Gaya-Bover, R. Hernández-López, M. Alorda-Clara [et al.] // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2020. – Vol. 120. – № July 2019. – P. 56-68.

94. Lapatinib-induced enhancement of mitochondrial respiration in HER2-positive SK-BR-3 cells: mechanism revealed by analysis of proteomic but not transcriptomic data / D. Kamashev, N. Shaban, G. Zakharova [et al.] // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2024. – Vol. 11. – 1470496.
95. Fukai, T. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases / T. Fukai, M. Ushio-Fukai // *Antioxidants & redox signaling*. – 2011. – Vol. 15. – № 6. – P. 1583-1606.
96. Direct detection of coupled proton and electron transfers in human manganese superoxide dismutase / J. Azadmanesh, W. E. Lutz, L. Coates [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 20-59.
97. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation / C. Thomas, M. M. Mackey, A. A. Diaz, D. P. Cox // *Redox Report*. – 2009. – Vol. 14. – № 3. – P. 102-108.
98. Gupta, P. A free radical primer / P. Gupta, A. Lakes, T. Dziubla // *Oxidative stress and biomaterials*. – Elsevier, 2016. – P. 1-33.
99. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions: the deoxyguanosine family / E. S. Henle, Y. Luo, W. Gassmann, S. Linn // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 35. – P. 21177-21186.
100. Iron-mediated degradation of ribosomes under oxidative stress is attenuated by manganese / D. G. J. Smethurst, N. Kovalev, E. R. McKenzie [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295. – № 50. – P. 17200-17214.
101. Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities / U. Rauen, A. Springer, D. Weisheit [et al.] // *ChemBioChem*. – 2007. – Vol. 8. – № 3. – P. 341-352.
102. Is there still any role for oxidative stress in mitochondrial DNA-dependent aging? / G. Zsurka, V. Peeva, A. Kotlyar, W. S. Kunz // *Genes*. – 2018. – Vol. 9. – № 4. – P. 175-187.
103. Across the tree of life, radiation resistance is governed by antioxidant Mn²⁺, gauged by paramagnetic resonance / A. Sharma, E. K. Gaidamakova, O. Grichenko [et

al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – Vol. 114. – № 44. – P. E9253-E9260.

104. Manganese inhibits viability of prostate cancer cells / B. Hernroth, I. Holm, A. Gondikas, H. Tassidis // *Anticancer Research*. – 2018. – Vol. 38. – № 1. – P. 137-145.

105. Determination of the detectable concentration of manganese used in neuronal MEMRI and its effect on cortical neurons in vitro. / Y. Liu, R. Zhang, P. Li [et al.] // *Neurological research*. – 2013. – Vol. 35. – № 9. – P. 895-902.

106. Concentrations of physiologically important metal ions in glial cells cultured from chick cerebral cortex / G. Tholey, M. Ledig, P. Mandel [et al.] // *Neurochemical research*. – 1988. – Vol. 13. – P. 45-50.

107. Manganese Increases the Sensitivity of the cGAS-STING Pathway for Double-Stranded DNA and Is Required for the Host Defense against DNA Viruses. / C. Wang, Y. Guan, M. Lv [et al.] // *Immunity*. – 2018. – Vol. 48. – № 4. – P. 675-687.

108. Cellular manganese content is developmentally regulated in human dopaminergic neurons / K. K. Kumar, J. Lowe Edward W., A. A. Aboud [et al.] // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 68-91.

109. Kennedy, S. D. Manganese-deoxyribonucleic acid binding modes. Nuclear magnetic relaxation dispersion results / S. D. Kennedy, R. G. Bryant // *Biophysical Journal*. – 1986. – Vol. 50. – № 4. – P. 669-676.

110. Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats: An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study / M. Morello, A. Canini, P. Mattioli [et al.] // *NeuroToxicology*. – 2008. – Vol. 29. – № 1. – P. 60-72.

111. Engineering an effective Mn-binding MRI reporter protein by subcellular targeting / B. B. Bartelle, M. D. Mana, G. A. Suero-Abreu [et al.] // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 2015. – Vol. 74. – № 6. – P. 1750-1757.

112. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth / C. J. Weydert, T. A. Waugh, J. M. Ritchie [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 41. – № 2. – P. 226-237.

113. H₂O₂-Driven Anticancer Activity of Mn Porphyrins and the Underlying Molecular Pathways / I. Batinic-Haberle, A. Tovmasyan, Z. Huang [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2021. – Vol. 2021. – № 1. – P. 66-79.
114. Targeting prooxidant MnSOD effect inhibits triple-negative breast cancer (TNBC) progression and M2 macrophage functions under the oncogenic stress / A. T. Al Haq, H.-Y. Tseng, L.-M. Chen [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 49-58.
115. p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death. / B. El Mchichi, A. Hadji, A. Vazquez, G. Leca // *Cell death and differentiation*. – 2007. – Vol. 14. – № 10. – P. 1826-1836.
116. Zinc-mediated regulation of caspases activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in the human Burkitt lymphoma B cells (Ramos). / N. Schrantz, M. T. Auffredou, M. F. Bourgeade [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 2001. – Vol. 8. – № 2. – P. 152-161.
117. Excessive zinc chloride induces murine photoreceptor cell death via reactive oxygen species and mitochondrial signaling pathway. / H. Wang, B. Liu, X. Yin [et al.] // *Journal of inorganic biochemistry*. – 2018. – Vol. 187. – P. 25-32.
118. Measuring picomolar intracellular exchangeable zinc in PC-12 cells using a ratiometric fluorescence biosensor. / R. A. Bozym, R. B. Thompson, A. K. Stoddard, C. A. Fierke // *ACS chemical biology*. – 2006. – Vol. 1. – № 2. – P. 103-111.
119. Carter, K. P. Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems / K. P. Carter, A. M. Young, A. E. Palmer // *Chemical Reviews*. – 2014. – Vol. 114. – № 8. – P. 4564-4601.
120. Measuring zinc in living cells.: A new generation of sensitive and selective fluorescent probes / K. R. Gee, Z.-L. Zhou, D. Ton-That [et al.] // *Cell Calcium*. – 2002. – Vol. 31. – № 5. – P. 245-251.
121. Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn²⁺ homeostasis. / J. L. Vinkenborg, T. J. Nicolson, E. A. Bellomo [et al.] // *Nature methods*. – 2009. – Vol. 6. – № 10. – P. 737-740.

122. Tran, J. B. InterMetalDB: A Database and Browser of Intermolecular Metal Binding Sites in Macromolecules with Structural Information / J. B. Tran, A. Krężel // *Journal of Proteome Research*. – 2021. – Vol. 20. – № 4. – P. 1889-1901.
123. Ireland, S. M. Zincbindpredict—Prediction of Zinc Binding Sites in Proteins / S. M. Ireland, A. C. R. Martin // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 4. – P. 996-1001.
124. Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome / C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato // *Journal of Proteome Research*. – 2006. – Vol. 5. – № 1. – P. 196-201.
125. An Integrated Mass Spectrometry and Molecular Dynamics Simulations Approach Reveals the Spatial Organization Impact of Metal-Binding Sites on the Stability of Metal-Depleted Metallothionein-2 Species. / M. D. Peris-Díaz, R. Guran, C. Domene [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2021. – Vol. 143. – № 40. – P. 16486-16501.
126. Thompson, M. W. Regulation of zinc-dependent enzymes by metal carrier proteins. / M. W. Thompson // *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. – 2022. – Vol. 35. – № 2. – P. 187-213.
127. Zinc binding ligands and cellular zinc trafficking: apo-metallothionein, glutathione, TPEN, proteomic zinc, and Zn-Sp1. / U. Rana, R. Kothinti, J. Meeusen [et al.] // *Journal of inorganic biochemistry*. – 2008. – Vol. 102. – № 3. – P. 489-499.
128. Petering, D. H. Proteomic High Affinity Zn²⁺ Trafficking: Where Does Metallothionein Fit in? / D. H. Petering, A. Mahim. – 2017. – Vol. 18. – P. 375-389.
129. Modulation of DNA Binding of a Tramtrack Zinc Finger Peptide by the Metallothionein-Thionein Conjugate Pair* / G. Roesijadi, R. Bogumil, M. Vasák, J. H. R. Kägi // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 28. – P. 17425-17432.
130. Mahim, A. Zinc trafficking 1. Probing the roles of proteome, metallothionein, and glutathione / A. Mahim, M. Karim, D. H. Petering // *Metallomics*. – 2021. – Vol. 13. – № 10. – P. 55-67.
131. Depletion of intracellular glutathione mediates zinc-induced cell death in rat primary astrocytes / J. R. Ryu, C. Y. Shin, J.-W. Choi [et al.] // *Experimental Brain Research*. – 2002. – Vol. 143. – № 2. – P. 257-263.

132. Stimulating TRPM7 suppresses cancer cell proliferation and metastasis by inhibiting autophagy / Y. Xing, X. Wei, M. Wang [et al.] // *Cancer Letters*. – 2022. – Vol. 525. – P. 179-197.
133. Anderson, K. J. Role of ion channels in gastrointestinal cancer / K. J. Anderson, R. T. Cormier, P. M. Scott // *World Journal of Gastroenterology*. – 2019. – Vol. 25. – № 38. – P. 5732-5772.
134. Pyruvate inhibits zinc-mediated pancreatic islet cell death and diabetes. / I. Chang, N. Cho, J.-Y. Koh, M.-S. Lee // *Diabetologia*. – 2003. – Vol. 46. – № 9. – P. 1220-1227.
135. Terminal oxidation and the effects of zinc in prostate versus liver mitochondria. / L. C. Costello, Z. Guan, B. Kukoyi [et al.] // *Mitochondrion*. – 2004. – Vol. 4. – № 4. – P. 331-338.
136. Kukoyi, B. I. The effect of exogenous zinc ions on the pattern of oxygen consumption of the hepatic mitochondria of albino rats. / B. I. Kukoyi, L. C. Costello, R. B. Franklin // *African journal of medicine and medical sciences*. – 2004. – Vol. 33. – № 4. – P. 361-363.
137. Simpkins, C. Mitochondrial oxygen consumption is synergistically inhibited by metallothionein and calcium. / C. Simpkins, S. Balderman, E. Mensah // *The Journal of surgical research*. – 1998. – Vol. 80. – № 1. – P. 16-21.
138. Structures of metal-substituted human histone deacetylase 8 provide mechanistic inferences on biological function / D. P. Dowling, S. G. Gattis, C. A. Fierke, D. W. Christianson // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49. – № 24. – P. 5048-5056.
139. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor / A. Vannini, C. Volpari, G. Filocamo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – № 42. – P. 15064-15069.
140. Posewitz, M. C. Properties of the Sp1 zinc finger 3 peptide: coordination chemistry, redox reactions, and metal binding competition with metallothionein / M. C. Posewitz, D. E. Wilcox // *Chemical research in toxicology*. – 1995. – Vol. 8. – № 8. – P. 1020-1028.

141. Manganese redistribution by calcium-stimulated vesicle trafficking bypasses the need for P-type ATPase function / N. García-Rodríguez, J. Manzano-López, M. Muñoz-Bravo [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 290. – № 15. – P. 9335-9347.
142. A role for divalent metal transporter (DMT1) in mitochondrial uptake of iron and manganese / N. A. Wolff, M. D. Garrick, L. Zhao [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 211-222.
143. Manganese transport and toxicity in polarized WIF-B hepatocytes / K. J. Thompson, J. Hein, A. Baez [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2018. – Vol. 315. – № 3. – P. G351-G363.
144. Promotion of vesicular zinc efflux by ZIP13 and its implications for spondylocheiro dysplastic Ehlers–Danlos syndrome / J. Jeong, J. M. Walker, F. Wang [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 51. – P. E3530-E3538.
145. Zinc transporter 10 (ZnT10)-dependent extrusion of cellular Mn^{2+} is driven by an active Ca^{2+} -coupled exchange / M. Levy, N. Elkoshi, S. Barber-Zucker [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2019. – Vol. 294. – № 15. – P. 5879-5889.
146. Manganese transporter Slc30a10 controls physiological manganese excretion and toxicity / C. J. Mercadante, M. Prajapati, H. L. Conboy [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129. – № 12. – P. 5442-5461.
147. Development of the first fluorescence screening assay for the slc39a2 zinc transporter / M. C. Franz, A. Simonin, S. Graeter [et al.] // *Journal of Biomolecular Screening*. – 2014. – Vol. 19. – № 6. – P. 909-916.
148. The tumor suppressor, P53, decreases the metal transporter, ZIP14 / N. Zhao, A. S. Zhang, A. M. Wortham [et al.] // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 9. – № 12. – P. 92-113.
149. ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading / C.-Y. Wang, S. Jenkitkasemwong, S. Duarte [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 41. – P. 34032-34043.

150. Fujishiro, H. Manganese transport in mammals by zinc transporter family proteins, ZNT and ZIP / H. Fujishiro, T. Kambe // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2022. – Vol. 148. – № 1. – P. 125-133.
151. Mukhopadhyay, S. Identification of a gain-of-function mutation in a Golgi P-type ATPase that enhances Mn²⁺ efflux and protects against toxicity / S. Mukhopadhyay, A. D. Linstedt // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – № 2. – P. 858-863.
152. Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter / E. Ohana, E. Hoch, C. Keasar [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – № 26. – P. 17677-17686.
153. Direct Comparison of Manganese Detoxification/Efflux Proteins and Molecular Characterization of ZnT10 Protein as a Manganese Transporter. / Y. Nishito, N. Tsuji, H. Fujishiro [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2016. – Vol. 291. – № 28. – P. 14773-14787.
154. Zinc is a novel intracellular second messenger / S. Yamasaki, K. Sakata-Sogawa, A. Hasegawa [et al.] // *The Journal of cell biology*. – 2007. – Vol. 177. – № 4. – P. 637-645.
155. Slepchenko, K. G. Zinc wave during the treatment of hypoxia is required for initial reactive oxygen species activation in mitochondria / K. G. Slepchenko, Q. Lu, Y. V Li // *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. – 2016. – Vol. 8. – № 1. – P. 44-56.
156. Up-regulation of the manganese transporter SLC30A10 by hypoxia-inducible factors defines a homeostatic response to manganese toxicity / C. Liu, T. Jursa, M. Aschner [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – № 35. – P. 27-36.
157. Zinc transporters and dysregulated channels in cancers / Z. Pan, S. Choi, H. Ouadid-Ahidouch [et al.] // *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. – 2017. – Vol. 22. – P. 623-644.

158. Costello, L. C. Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer / L. C. Costello, R. B. Franklin, P. Feng // *Mitochondrion*. – 2005. – Vol. 5. – № 3. – P. 143-153.
159. hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer / R. B. Franklin, P. Feng, B. Milon [et al.] // *Molecular cancer*. – 2005. – Vol. 4. – P. 1-13.
160. Ras responsive element binding protein-1 (RREB-1) down-regulates hZIP1 expression in prostate cancer cells / B. C. Milon, A. Agyapong, R. Bautista [et al.] // *The Prostate*. – 2010. – Vol. 70. – № 3. – P. 288-296.
161. Franklin, R. B. The cytotoxic role of RREB1, ZIP3 zinc transporter, and zinc in human pancreatic adenocarcinoma / R. B. Franklin, J. Zou, L. C. Costello // *Cancer Biology & Therapy*. – 2014. – Vol. 15. – № 10. – P. 1431-1437.
162. Zinc transporter SLC39A13/ZIP13 facilitates the metastasis of human ovarian cancer cells via activating Src/FAK signaling pathway / X. Cheng, J. Wang, C. Liu [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2021. – Vol. 40. – P. 1-15.
163. SLC39A14 deficiency alters manganese homeostasis and excretion resulting in brain manganese accumulation and motor deficits in mice / S. Jenkitkasemwong, A. Akinyode, E. Paulus [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 115. – № 8. – P. E1769-E1778.
164. Himeno, S. Roles of zinc transporters that control the essentiality and toxicity of manganese and cadmium / S. Himeno, H. Fujishiro // *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. – 2021. – Vol. 141. – № 5. – P. 695-703.
165. Decreased expression of SLC 39A14 is associated with tumor aggressiveness and biochemical recurrence of human prostate cancer / X.-M. Xu, C.-G. Wang, Y.-D. Zhu [et al.] // *OncoTargets and therapy*. – 2016. – P. 41-49.
166. Alternative splicing of SLC39A14 in colorectal cancer is regulated by the Wnt pathway / K. Thorsen, F. Mansilla, T. Schepeler [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2011. – Vol. 10. – № 1. – P. 12-18.

167. The exon-level biomarker SLC39A14 has organ-confined cancer-specificity in colorectal cancer / A. Sveen, A. C. Bakken, T. H. Ågesen [et al.] // International journal of cancer. – 2012. – Vol. 131. – № 6. – P. 1479-1485.
168. Colorectal cancer and trace elements alteration / J. T. Juloski, A. Rakic, V. V. Ćuk [et al.] // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2020. – Vol. 59. – P. 83-87.
169. Elemental fingerprinting of tumorous and adjacent non-tumorous tissues from patients with colorectal cancer using ICP-MS , ICP-OES and chemometric analysis / I. Lavilla, M. Costas, P. S. Miguel [et al.]. – 2009. – P. 863-875.
170. Manganese regulates caspase-3 gene promoter activity by inducing Sp1 phosphorylation in PC12 cells / A. Uchida, K. Oh-hashii, K. Kiuchi, Y. Hirata // Toxicology. – 2012. – Vol. 302. – № 2-3. – P. 292-298.
171. Zinc metalloproteins in epigenetics and their crosstalk / A. P. Yusuf, M. B. Abubakar, I. Malami [et al.] // Life. – 2021. – Vol. 11. – № 3. – P. 186.
172. Zinc and its transporters in epigenetics / S. Brito, M.-G. Lee, B.-H. Bin, J.-S. Lee // Molecules and cells. – 2020. – Vol. 43. – № 4. – P. 323-330.
173. Structural Alterations Driving Castration-Resistant Prostate Cancer Revealed by Linked-Read Genome Structural Alterations Driving Castration-Resistant Prostate Cancer Revealed by Linked-Read Genome Sequencing / S. R. Viswanathan, G. Ha, A. M. Hoff [et al.] // Cell. – 2018. – P. 1-15.
174. Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation / C. Hogstrand, P. Kille, R. I. Nicholson, K. M. Taylor // Trends in Molecular Medicine. – 2009. – Vol. 15. – № 3. – P. 101-111.
175. Gantt, S. L. Catalytic activity and inhibition of human histone deacetylase 8 is dependent on the identity of the active site metal ion / S. L. Gantt, S. G. Gattis, C. A. Fierke // Biochemistry. – 2006. – Vol. 45. – № 19. – P. 6170-6178.
176. Combinatorial recruitment of CREB, C/EBP β and c-Jun determines activation of promoters upon keratinocyte differentiation. / J. M. Rozenberg, P. Bhattacharya, R. Chatterjee [et al.] // PloS one. – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. 78-89.

177. Loss of the dermis zinc transporter ZIP13 promotes the mildness of fibrosarcoma by inhibiting autophagy / M.-G. Lee, M.-A. Choi, S. Chae [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 15-32.
178. Zinc-induced NF- κ B inhibition can be modulated by changes in the intracellular metallothionein level / C. H. Kim, J. H. Kim, J. Lee, Y. S. Ahn // *Toxicology and applied pharmacology*. – 2003. – Vol. 190. – № 2. – P. 189-196.
179. Metallothionein 2A inhibits NF- κ B pathway activation and predicts clinical outcome segregated with TNM stage in gastric cancer patients following radical resection / Y. Pan, J. Huang, R. Xing [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2013. – Vol. 11. – P. 1-14.
180. Taniguchi, K. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age / K. Taniguchi, M. Karin // *Nature Reviews Immunology*. – 2018. – Vol. 18. – № 5. – P. 309-324.
181. Anson, K. J. Zn²⁺ influx activates ERK and Akt signaling pathways / K. J. Anson, G. A. Corbet, A. E. Palmer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – № 11. – P. 57-68.
182. Edamatsu, H. Zinc ions negatively regulate proapoptotic signaling in cells expressing oncogenic mutant Ras / H. Edamatsu // *Biometals*. – 2022. – Vol. 35. – № 2. – P. 349-362.
183. Neurofibromin level directs RAS pathway signaling and mediates sensitivity to targeted agents in malignant peripheral nerve sheath tumors / E. J. Kahen, A. Brohl, D. Yu [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 32. – P. 22571.
184. Kiuru, M. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma / M. Kiuru, K. J. Busam // *Laboratory investigation*. – 2017. – Vol. 97. – № 2. – P. 146-157.
185. The structure of neurofibromin isoform 2 reveals different functional states / A. Naschberger, R. Baradaran, B. Rupp, M. Carroni // *Nature*. – 2021. – Vol. 599. – № 7884. – P. 315-319.
186. Pivotal roles of p53 transcription-dependent and-independent pathways in manganese-induced mitochondrial dysfunction and neuronal apoptosis / C. Wan, X. Ma,

- S. Shi [et al.] // *Toxicology and applied pharmacology*. – 2014. – Vol. 281. – № 3. – P. 294-302.
187. p73 gene in dopaminergic neurons is highly susceptible to manganese neurotoxicity / D.-S. Kim, H. Jin, V. Anantharam [et al.] // *Neurotoxicology*. – 2017. – Vol. 59. – P. 231-239.
188. Manganese Superoxide Dismutase Induces p53-Dependent Senescence in Colorectal Cancer Cells / L. Behrend, A. Mohr, T. Dick, R. M. Zwacka. – 2005. – Vol. 25. – № 17. – P. 7758-7769.
189. The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response / J. M. Rozenberg, S. Zvereva, A. Dalina [et al.] // *Biology direct*. – 2021. – Vol. 16. – P. 1-21.
190. Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C α / P. Ofek, D. Ben-Meir, Z. Kariv-Inbal [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 16. – P. 14299-14305.
191. Binding of a third metal ion by the human phosphatases PP2C α and Wip1 is required for phosphatase activity / K. Tanoue, L. M. Miller Jenkins, S. R. Durell [et al.] // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52. – № 34. – P. 5830-5843.
192. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling / M. Jarosz, M. Olbert, G. Wyszogrodzka [et al.] // *Inflammopharmacology*. – 2017. – Vol. 25. – P. 11-24.
193. Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells / T. Sliwinski, A. Czechowska, M. Kolodziejczak [et al.] // *Cell biology international*. – 2009. – Vol. 33. – № 4. – P. 542-547.
194. A novel manganese complex selectively induces malignant glioma cell death by targeting mitochondria / J. Geng, J. Li, T. Huang [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2016. – Vol. 14. – № 3. – P. 1970-1978.
195. Oncolytic Virus-Induced Autophagy in Glioblastoma / M. Kamynina, S. Tskhovrebova, J. Fares [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol.13. – P. 1360-1376.
196. Tumor-targeting novel manganese complex induces ROS-mediated apoptotic and autophagic cancer cell death / J. I. A. Liu, W. Guo, J. Li [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2015. – Vol. 35. – № 3. – P. 607-616.

197. The IL13 α 2R paves the way for anti-glioma nanotherapy / I. V Ulasov, A. Borovjagin, A. Laevskaya [et al.] // *Genes & Diseases*. – 2023. – Vol. 10. – № 1. – P. 89-100.
198. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway / L. Sun, J. Wu, F. Du [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 339. – № 6121. – P. 786-791.
199. DNA damage-triggered activation of cGAS-STING pathway induces apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells / C. Li, W. Liu, F. Wang [et al.] // *Molecular immunology*. – 2021. – Vol. 131. – P. 180-190.
200. Flynn, P. J. Chromatin bridges, not micronuclei, activate cGAS after drug-induced mitotic errors in human cells / P. J. Flynn, P. D. Koch, T. J. Mitchison // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – № 48. – P. 35-51.
201. The cGAS/STING/TBK1/IRF3 innate immunity pathway maintains chromosomal stability through regulation of p21 levels / A. Basit, M.-G. Cho, E.-Y. Kim [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 52. – № 4. – P. 643-657.
202. Cutting edge: activation of STING in T cells induces type I IFN responses and cell death / B. Larkin, V. Ilyukha, M. Sorokin [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2017. – Vol. 199. – № 2. – P. 397-402.
203. Balance between short and long isoforms of cFLIP regulates Fas-mediated apoptosis in vivo / D. R. Ram, V. Ilyukha, T. Volkova [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – Vol. 113. – № 6. – P. 1606-1611.
204. Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis / J. Sarhan, B. C. Liu, H. I. Muendlein [et al.] // *Cell Death & Differentiation*. – 2019. – Vol. 26. – № 2. – P. 332-347.
205. Mn²⁺ directly activates cGAS and structural analysis suggests Mn²⁺ induces a noncanonical catalytic synthesis of 2' 3'-cGAMP / Z. Zhao, Z. Ma, B. Wang [et al.] // *Cell reports*. – 2020. – Vol. 32. – № 7. – P. 23-41.
206. Human cGAS catalytic domain has an additional DNA-binding interface that enhances enzymatic activity and liquid-phase condensation / W. Xie, L. Lama, C. Adura

- [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Vol. 116. – № 24. – P. 11946-11955.
207. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity / P. J. Kranzusch, A. S.-Y. Lee, J. M. Berger, J. A. Doudna // Cell reports. – 2013. – Vol. 3. – № 5. – P. 1362-1368.
208. Du, M. DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling / M. Du, Z. J. Chen // Science. – 2018. – Vol. 361. – № 6403. – P. 704-709.
209. Combine and conquer: manganese synergizing anti-TGF- β /PD-L1 bispecific antibody YM101 to overcome immunotherapy resistance in non-inflamed cancers / M. Yi, M. Niu, J. Zhang [et al.] // Journal of Hematology & Oncology. – 2021. – Vol. 14. – P. 1-21.
210. Amplifying STING activation by cyclic dinucleotide–manganese particles for local and systemic cancer metalloimmunotherapy / X. Sun, Y. Zhang, J. Li [et al.] // Nature nanotechnology. – 2021. – Vol. 16. – № 11. – P. 1260-1270.
211. ZCCHC3 is a co-sensor of cGAS for dsDNA recognition in innate immune response / H. Lian, J. Wei, R. Zang [et al.] // Nature communications. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 33-49.
212. Skrajnowska, D. Role of zinc in immune system and anti-cancer defense mechanisms / D. Skrajnowska, B. Bobrowska-Korczak // Nutrients. – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 27-35.
213. The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer / M. Meng, K. Zhong, T. Jiang [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 140. – P. 117-123.
214. Treatment Patterns and Outcomes in Patients with KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Treated in First Line with Bevacizumab- or Cetuximab-Containing Regimens / A. C. Houts, S. Ogale, N. Sommer [et al.] // Journal of Gastrointestinal Cancer. – 2019. – Vol. 50. – № 1. – P. 69-77.
215. Comprehensive Clinical and Molecular Characterization of KRAS (G12C)-Mutant Colorectal Cancer. / J. T. Henry, O. Coker, S. Chowdhury [et al.] // JCO precision oncology. – 2021. – Vol. 5. – P. 8813-8825.

216. Comprehensive pan-cancer genomic landscape of KRAS altered cancers and real-world outcomes in solid tumors / J. K. Lee, S. Sivakumar, A. B. Schrock [et al.] // *npj Precision Oncology*. – 2022. – Vol. 6. – № 1. – P. 91-112.
217. KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers / A. I. Phipps, D. D. Buchanan, K. W. Makar [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2013. – Vol. 108. – № 8. – P. 1757-1764.
218. Targeting KRAS G12C Mutation in Colorectal Cancer, A Review: New Arrows in the Quiver. / J. Ros, C. Vaghi, I. Baraibar [et al.]. – 2024. – Vol. 25. – P. 73-81.
219. Activation of MEK1/2-ERK1/2 signaling during NNK-induced lung carcinogenesis in female A/J mice / K. Yamakawa, M. Yokohira, Y. Nakano [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2016. – Vol. 5. – № 5. – P. 903-913.
220. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer / L. Huang, Z. Guo, F. Wang, L. Fu // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 386-401.
221. Boguski, M. S. Proteins regulating Ras and its relatives. / M. S. Boguski, F. McCormick // *Nature*. – 1993. – Vol. 366. – № 6456. – P. 643-654.
222. Перспективные гены-мишени таргетной терапии и прогностические биомаркеры рака желудка / Кипкеева Ф.М., Музаффарова Т.А., Никулин М.П. [et al.] // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2018. – Vol. 73. – № 4. – P. 262-272.
223. Alterations in ZnT1 expression and function lead to impaired intracellular zinc homeostasis in cancer / A. I. Lehy, G. Horev, Y. Golan [et al.] // *Cell Death Discovery*. – 2019. – Vol. 5. – № 1. – P. 144.
224. Metallothionein 1G and Zinc Sensitize Human Colorectal Cancer Cells to Chemotherapy / J. M. Arriaga, A. Greco, J. Mordoh, M. Bianchini // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2014. – Vol. 13. – № 5. – P. 1369-1381.
225. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. / F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright [et al.] // *Nature protocols*. – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. 2281-2308.

226. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition / E. K. Brinkman, T. Chen, M. Amendola, B. Van Steensel // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – № 22. – P. 1-8.
227. Forced Overexpression and Knockout Analysis of SLC30A and SLC39A Family Genes Suggests Their Involvement in Establishing Resistance to Cisplatin in Human Cancer Cells. / M. Kamynina, J. M. Rozenberg, A. S. Kushchenko [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 22. – 12049.
228. Hair trace element concentrations in autism spectrum disorder (ASD) and attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). / A. V Skalny, A. L. Mazaletskaya, O. P. Ajsuvakova [et al.] // *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. – 2020. – Vol. 61. – P. 126-139.
229. Atlas of RNA sequencing profiles for normal human tissues / M. Suntsova, N. Gaifullin, D. Allina [et al.] // *Scientific Data*. – 2019. – Vol. 6. – № 1. – P. 36-48.
230. OncoboxPD: human 51 672 molecular pathways database with tools for activity calculating and visualization / M. A. Zolotovskaia, V. S. Tkachev, A. A. Guryanova [et al.] // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2022. – Vol. 20. – P. 2280-2291.
231. Quantitation of Molecular Pathway Activation Using RNA Sequencing Data BT - *Nucleic Acid Detection and Structural Investigations: Methods and Protocols* / N. Borisov, M. Sorokin, A. Garazha, A. Buzdin // Springer US. – 2020. – P. 189-206.
232. Quantification of manganese in human hand bones: a feasibility study / Aslam, A. Pejović-Milić, D. R. Chettle [et al.] // *Physics in Medicine and Biology*. – 2008. – Vol. 53. – №15. – P. 4081–4092.
233. Mycobacterium bovis BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. / N. A. Begum, M. Kobayashi, Y. Moriwaki [et al.] // *Genomics*. – 2002. – Vol. 80. – № 6. – P. 630-645.
234. Autosomal-Recessive Intellectual Disability with Cerebellar Atrophy Syndrome Caused by Mutation of the Manganese and Zinc Transporter Gene SLC39A8. / K. M.

- Boycott, C. L. Beaulieu, K. D. Kernohan [et al.] // American journal of human genetics. – 2015. – Vol. 97. – № 6. – P. 886-893.
235. Pathway Instability Is an Effective New Mutation-Based Type of Cancer Biomarkers / M. A. Zolotovskaia, M. I. Sorokin, S. A. Roumiantsev [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2019. – Vol. 8. – P. 118-127.
236. Mutation Enrichment and Transcriptomic Activation Signatures of 419 Molecular Pathways in Cancer. / M. A. Zolotovskaia, V. S. Tkachev, A. P. Seryakov [et al.] // Cancers. – 2020. – Vol. 12. – № 2. – P. 223-235.
237. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. / D. Lavogina, H. Lust, M.-J. Tahk [et al.] // Biosensors. – 2022. – Vol. 12. – № 4. – P. 94-112.
238. Mitochondrial Impairment May Increase Cellular NAD(P)H: Resazurin Oxidoreductase Activity, Perturbing the NAD(P)H-Based Viability Assays. / V. A. Aleshin, A. V. Artiukhov, H. Oppermann [et al.] // Cells. – 2015. – Vol. 4. – P. 42-51.
239. Variants in the zinc transporter-3 encoding gene (SLC30A3) in schizophrenia and bipolar disorder: Effects on brain glutamate—A pilot study / L. A. Jelen, M. S. Green, S. King [et al.] // Frontiers in Psychiatry. – 2022. – Vol. 13. – P. 72-100.
240. Zang, Z.-S. Molecular and pathophysiological aspects of metal ion uptake by the zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) / Z.-S. Zang, Y.-M. Xu, A. T. Y. Lau // Toxicology Research. – 2016. – Vol. 5. – № 4. – P. 987-1002.
241. SLC39A8/Zinc Suppresses the Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. / L. Liu, Y. Hou, J. Hu [et al.] // Frontiers in oncology. – 2021. – Vol. 11. – P. 65-92.
242. Камынина, М. И. Анализ микроэлементного состава трансгенных линий клеток с нокаутом в генах, отвечающих за метаболизм Zn^{2+} и Mn^{2+} / М. И. Камынина, А. А. Буздин. — Текст : электронный // Сборник тезисов докладов X Всероссийской научной молодежной школы-конференции. — Москва, 2024. — С. 147–148. — URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=69185586>.
243. TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. / K. P. Schlingmann, S. Waldegger, M. Konrad [et al.] // Biochimica et biophysica acta. – 2007. – Vol. 1772. – № 8. – P. 813-821.

244. Bouron, A. Permeation, regulation and control of expression of TRP channels by trace metal ions. / A. Bouron, K. Kiselyov, J. Oberwinkler // *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. – 2015. – Vol. 467. – № 6. – P. 1143-1164.
245. TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg^{2+} and $Mg \cdot ATP$ / S. Ferioli, S. Zierler, J. Zaißerer [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 80-86.
246. Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway / I. W. Achkar, N. Abdulrahman, H. Al-Sulaiti [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2018. – Vol. 16. – № 1. – P. 96-104.
247. Dasari, S. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. / S. Dasari, P. B. Tchounwou // *European journal of pharmacology*. – 2014. – Vol. 740. – P. 364-378.
248. Yao, H. miR-1271 enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to cisplatin / H. Yao, Q. Sun, J. Zhu // *Exp Ther Med*. – 2019. – Vol. 17. – № 6. – P. 4363-4370.
249. Chemotherapeutic Effectiveness of Combining Cetuximab for Metastatic Colorectal Cancer Treatment: A System Review and Meta-Analysis / R. Li, M. Liang, X. Liang [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 28-44.
250. Zhou, J. Resistance to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer: underlying mechanisms and reversal strategies / J. Zhou, Q. Ji, Q. Li // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2021. – Vol. 40. – № 1. – P. 32-38.
251. Correlation of homologous recombination deficiency induced mutational signatures with sensitivity to PARP inhibitors and cytotoxic agents / Á. Póti, H. Gyergyák, E. Németh [et al.] // *Genome Biology*. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – P. 240.
252. Identification of AKT1/ β -catenin mutations conferring cetuximab and chemotherapeutic drug resistance in colorectal cancer treatment. / G. Hasbal-Celikok, P. Aksoy-Sagirli, G. Altiparmak-Ulbeği, A. Can // *Oncology letters*. – 2021. – Vol. 21. – № 3. – P. 209.
253. Inhibitory activity of cetuximab on epidermal growth factor receptor mutations in non small cell lung cancers. / J. F. Doody, Y. Wang, S. N. Patel [et al.] // *Molecular cancer therapeutics*. – 2007. – Vol. 6. – № 10. – P. 2642-2651.

254. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. / D.-W. Shen, L. M. Pouliot, M. D. Hall, M. M. Gottesman // *Pharmacological reviews*. – 2012. – Vol. 64. – № 3. – P. 706-721.
255. Dhiman, D. K. Imatinib exhibit synergistic pleiotropy in the prevention of colorectal cancer by suppressing proinflammatory, cell survival and angiogenic signaling. / D. K. Dhiman, S. N. Sanyal, V. Vaish // *Cellular signalling*. – 2020. – Vol. 76. – P. 10-18.
256. Vincristine Enhances the Efficacy of MEK Inhibitors in Preclinical Models of KRAS-mutant Colorectal Cancer. / S. Ghosh, F. Fan, R. T. Powell [et al.] // *Molecular cancer therapeutics*. – 2023. – Vol. 22. – № 8. – P. 962-975.
257. Камынина, М. И. Изучение роли генов семейств SLC30A и SLC39A в процессе канцерогенеза колоректального рака / М. И. Камынина. — Текст : непосредственный // Сборник тезисов XX Международной (XXIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. — Москва, 2025. — С. 123. — ISBN 978-5-88458-738-0.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Таблица с ДЭГ по экспериментальным линиям с измененными экспрессиями генов семейств SLC30A и SLC39A

линия/контроль	Гены с повышенной экспрессией	Гены с пониженной экспрессией
HCT-15 SLC30A10 OE/HCT-15 GFP	SLC30A10, H19, NXNL2, L1CAM, NRXN3, PRAME, RGS20, PCDHA10, ID4, DOC2B, LYNX1, SGCE, RYR2, PTGS2, UBA52P6, PCDHB3, BARX1-AS1, SPARC, SCRT1, IKZF3, TRIML2, RFLNB, ACHE, C14orf132, DPYSL5, PRSS35, CRISPLD1, KCNJ4	PTPRD, PRRX1, ANKRD1, HIST1H4J, SH2D5, FBXL22, STK24-AS1, COL13A1, ARMC4, MYLK3, DCLK1, C1DP1, HERC2P10, LDHC, MIR589, MIR503HG, KCNJ2, DNMT1P38, LINC01776, PET117, GABRA2, LUCAT1, RNF128, RN7SL396P, RNU5A-1, VCAN, EMB, GOLGA8UP, HIF1A-AS2, ATRIP, RBP4, ZBBX, APOE, SNORA30, C17orf49, ANKRD20A2, C2CD4A, LINC00957, ZNF223, LONRF2, MIRLET7I, MIR320E, PPP4R1-AS1, RPL23AP72, COX6B2, MIR148B, RN7SL153P
HCT-15 SLC30A3 OE/HCT-15 GFP	STK4-AS1, TMEM156, CNTNAP3B, NRXN3, TRIML2, PTGS2, DOC2B, AKR1B1, MED12L, SLC30A3, ROBO1	POLR2F, SLC7A9, RPEP3, ZNF30-AS1, PHBP13, MIR106B, MIR505, DGKI, THUMP3P1, MIR597, WDR49, HDAC1P1, MIR601, CFAP99, RPL23AP18, ZNF223, GRK5-IT1, CFAP126, IFITM10, CHRNE, CCDC173, CAMKV, ZBBX, B4GALNT2, TDO2, RAB9B, TTLL9, HIF1A-AS2, RN7SKP79, CXorf57, APLN, C7orf57, DNAH5, SIRT4, LRRC46, CD70, SAXO2, PHOSPHO1, ABCA10, RNF128, SCARNA9, KIAA0319, PRRX1, ARMC4, ZMYND10, FAM84A, NEXN, APCDD1, RN7SKP203, EGF, GRIK2, GABRA2, NECTIN3, VCAN, CCNO, EMB, DACT1, ARL10, PTPRD, COL3A1, ALDH1A1

Продолжение Таблицы А. 1

HCT-15 SLC39A14 KO/HCT-15 WT	C1QTNF6, LCN12, TAS2R3, BBC3, SSSCA1-AS1, ANKRD24, ARHGEF19, SPNS2, LRRC46, SLC16A5, DNAH5, NRXN3, NTN5, SLC7A7, PBX1, TSSK3, TTC21A, FAM83E, ANXA9, CACNA1H, CD99P1, SEMA3C, FAM71F2, RPL17P50, ZNF710-AS1, RASSF4, DPP4, SLC39A14, MEGF6, PILRA, SCG5, DMGDH, SULT2B1, MYRF, SLC6A20, SEMA4G, GDF15, ADAMTSL4, MIR573, KCNH3, PPP1R32, MYO15B, GRHL3, COL18A1, MUC3A, PPFIA4, ANGPTL4, PAQR8, NOXA1, TNNT2, TFPI, ELF3, TCP11L2, AGBL2, FCGRT, PADI2, MUC20, CAP2P1, FOXN4, RPS20P22, RSPH4A, MTCO3P11, RN7SL220P, PTP4A3, CBX5P1, SBK3, KCNN4, MPRIPP1, SNORA14A, RPL34P6, EEF1DP7, HSPG2, NDUFA4L2, PSPC1-AS2, LINC01431, LINC00665, ZMYND10, LINC02298, TNXB, ZNF423, CLIC3, ZBTB20, ASH1L-IT1, SH3TC1, YPEL1, NOTUM, CELF5, CYCSP34, MYO16, TNFSF4, CACNG4, CCDC146, DHRS3, WNT9A, CSF2RA, ARHGEF33, LRRC75B, CDH7, FAM84A, CCDC154, GRM4, LINC01389, RPL12P25, C1orf228, FANK1, NECTIN4, PRTN3, RNU4ATAC18P, PCDHB13, CCDC183, ESPN, MAOA, NKX3-2, RNU1-16P, TMEM74B, DDIT4, DLX4, LDB3, GLIPR1L2, SLC16A4, EIF5AP3, KNDC1, P3H2, LRRC29, TMSB4XP4, DRAIC, MIR3189, CFL1P5, HYAL1, TOX, OLFM2, SLC38A8, DIO3OS, GAS7, CFAP57, LINC00862, INPP4B, FAXDC2, LINC00278, GPR179, HNRNPA1P12, RNF128, PRKG2, MYCN, PAXBP1-AS1, PTPRM, PROM2, CTSO, DCLK1, PDE4A, NRSN2, TTTY14, WNT4, CALD1, FAM133DP, UBE2F-DNAJB13, ASCL5, CFAP99, VIL1, SCLY, ACKR2, GLI3, LOX, CYP4F3, LCN15, DLX3, EDAR, FSBP, MIR550A2, THAP12P3, SYNPO, NUPR1, ENTPD8, CYP4F12, HOXA1, LGR5, C4orf19, NUDT16P1, SAMD11, CFAP157, C21orf33, NECTIN3, TMPRSS4, C7orf57, PRR29, ANOS2P, SLC30A10, KRTAP3-1, TMSB4Y, PRKY, TTTY15, ZFY, HS6ST3, TBX1, RAB32, CPA4, EIF1AY, UTY, KDM5D, USP9Y, PKIB, CCND2, RPL7AP73, TXLNGY, DDX3Y, CFAP126, MB, ADAM23, IQGAP2	C1QTNF6, LCN12, TAS2R3, BBC3, SSSCA1-AS1, ANKRD24, ARHGEF19, SPNS2, LRRC46, SLC16A5, DNAH5, NRXN3, NTN5, SLC7A7, PBX1, TSSK3, TTC21A, FAM83E, ANXA9, CACNA1H, CD99P1, SEMA3C, FAM71F2, RPL17P50, ZNF710-AS1, RASSF4, DPP4, SLC39A14, MEGF6, PILRA, SCG5, DMGDH, SULT2B1, MYRF, SLC6A20, SEMA4G, GDF15, ADAMTSL4, MIR573, KCNH3, PPP1R32, MYO15B, GRHL3, COL18A1, MUC3A, PPFIA4, ANGPTL4, PAQR8, NOXA1, TNNT2, TFPI, ELF3, TCP11L2, AGBL2, FCGRT, PADI2, MUC20, CAP2P1, FOXN4, RPS20P22, RSPH4A, MTCO3P11, RN7SL220P, PTP4A3, CBX5P1, SBK3, KCNN4, MPRIPP1, SNORA14A, RPL34P6, EEF1DP7, PSPC1-AS2, LINC01431, LINC00665, ZNF423, CLIC3, ZBTB20, ASH1L-IT1, CELF5, CYCSP34, MYO16, TNFSF4, WNT9A, CSF2RA, ARHGEF33, CCDC154, GRM4, LINC01389, NECTIN4, PRTN3, RNU4ATAC18P, ESPN, MAOA, NKX3-2, RNU1-16P, GLIPR1L2, SLC16A4, EIF5AP3, DRAIC, MIR3189, SLC38A8, DIO3OS, GAS7, LINC00278, GPR179, PAXBP1-AS1, PTPRM, NRSN2, TTTY14, WNT4, CFAP99, VIL1, CYP4F3, LCN15, DLX3, EDAR, FSBP, ENTPD8, CYP4F12, SAMD11, CFAP157, PRKY, TTTY15, ZFY, KDM5D, USP9Y, DDX3Y, CFAP126, MB, FPR3
---------------------------------------	---	--

Продолжение Таблицы А. 1

HuTu80 SLC30A10 OE/HuTu80 GFP	FAT3, MAMDC2, BASP1, NDST3, CADM1, EGF, SOSTDC1, DPPA4, COBLL1, CSF1, MME, PTPRC, MKX, RND3, ADAM2, FGD5, CDS1, CDH8, GPAT3, MAP1B, ITGAX, MBNL2, POU3F2, HIST1H4J, ADM2, ALDH1L2, MFAP5, FAM110C, LINC01836, TMEM100, INPP4B, SFRP4, CHRDL1, SUN3, HRK, NRP2, EFEMP1, C1orf229, UPP1, TPTEP1, INPP5J, TXNIP, TNFSF13B, PDE1A, SLC30A10, SPP1, PFKFB4, PLXDC2, SNHG18, COL4A2, VGLL3, PRKAR2B, AK4, COL1A2, LAMP3, TMSB4X, CASP8, TRIB3, RGS6, MAP3K5, SOX9, GRB14, GYG2, RN7SL577P, CAV1, C4orf19, TBC1D8B, RASEF, ANXA3, ARHGAP9, CDK18, SERTAD4, PRELID2, ALDOC, PPM1E, CD36, FOXA3, ATF3, STK31, PCK2, TM4SF1, ATP6V1C2, GHDC, ARRDC4, LINC01376, LRIT3, FAM160A1, ANKRD37, LINC01748, CCDC144NL-AS1, CARD14, CXorf57, IGFL2, SLC7A11, SLC23A3, RAPGEF3, HNRNPCP3, NOS2, GCNT1, POF1B, NRXN3, ANKDD1B, C16orf74, KRTAP3-1, GUSBP5, PDK4, CPA6, CA14, TMEM106A, FAM13A, DSG1, GAPDHP40, FAR2, SLC6A9, KIAA1456, LINC02387, TEN1-CDK3, CTSZ, MOCOS, CFAP43, SH2D6, CRB3, MIR210HG, ETV7, COL6A3, HLF, RPL12P21, SLC25A48, EPN3, GPR146, RAB27B, SERTAD4-AS1, MYO16, LGALS3BP, MIR3671, RNU6-767P, MAOA, MXRA5, HDAC1P2, AIFM3, LYPD5, TMPRSS2, RNF128, SLC7A7, S100A4, FRMD4A, SNORD59A, RPS3AP5, C17orf105, RRH, APOL6, SLC25A45, XRCC6P1, CASS4, GSTM2, FOXB1, SPATA6L, KCNK1, UPF3AP2, COLQ, HSH2D, CYB5R2, ZNF559, CRYM, RNU2-35P, SLC22A4, IFITM1, GOLGA7B, ICA1, TPRG1, SLC11A1, UPK3B, TAPBPL, DOK7, ST14, NAIP, SLC1A3, LINC02331, EVPL, FAM167A, CHAC1, ZNF488, C4orf47, TPM3P8, MTCO3P2, ALPK1, TOB2P1, SLC2A14	FAT3, MAMDC2, BASP1, NDST3, CADM1, EGF, SOSTDC1, DPPA4, COBLL1, CSF1, MME, PTPRC, MKX, RND3, ADAM2, FGD5, CDS1, CDH8, GPAT3, MAP1B, ITGAX, MBNL2, POU3F2, HIST1H4J, ADM2, ALDH1L2, MFAP5, FAM110C, LINC01836, TMEM100, INPP4B, SFRP4, CHRDL1, SUN3, HRK, NRP2, EFEMP1, C1orf229, UPP1, TPTEP1, INPP5J, TXNIP, TNFSF13B, PDE1A, SLC30A10, SPP1, PFKFB4, PLXDC2, SNHG18, COL4A2, VGLL3, PRKAR2B, AK4, COL1A2, LAMP3, TMSB4X, CASP8, TRIB3, RGS6, MAP3K5, SOX9, GRB14, GYG2, RN7SL577P, CAV1, C4orf19, TBC1D8B, RASEF, ANXA3, ARHGAP9, CDK18, SERTAD4, PRELID2, ALDOC, PPM1E, CD36, FOXA3, ATF3, STK31, PCK2, TM4SF1, ATP6V1C2, GHDC, ARRDC4, LINC01376, LRIT3, FAM160A1, ANKRD37, LINC01748, CCDC144NL-AS1, CARD14, CXorf57, IGFL2, SLC7A11, SLC23A3, RAPGEF3, HNRNPCP3, NOS2, GCNT1, POF1B, NRXN3, ANKDD1B, C16orf74, KRTAP3-1, GUSBP5, PDK4, CPA6, CA14, TMEM106A, FAM13A, DSG1, GAPDHP40, FAR2, SLC6A9, KIAA1456, LINC02387, TEN1-CDK3, CTSZ, MOCOS, CFAP43, SH2D6, CRB3, MIR210HG, ETV7, COL6A3, HLF, RPL12P21, SLC25A48, EPN3, GPR146, RAB27B, SERTAD4-AS1, MYO16, LGALS3BP, MIR3671, RNU6-767P, MAOA, MXRA5, HDAC1P2, AIFM3, LYPD5, TMPRSS2, RNF128, SLC7A7, S100A4, FRMD4A, SNORD59A, RPS3AP5, C17orf105, RRH, APOL6, SLC25A45, XRCC6P1, CASS4, GSTM2, FOXB1, SPATA6L, KCNK1, UPF3AP2, COLQ, HSH2D, CYB5R2, ZNF559, CRYM, RNU2-35P, SLC22A4, IFITM1, GOLGA7B, ICA1, TPRG1, SLC11A1, UPK3B, TAPBPL, DOK7, ST14, NAIP, SLC1A3, LINC02331, EVPL, FAM167A, CHAC1, ZNF488, C4orf47, TPM3P8, MTCO3P2, ALPK1, TOB2P1, SLC2A14
--	--	--

Продолжение Таблицы А. 1

HuTu80 SLC30A3 OE/HuTu80 GFP	SLC30A3, RGS6, RNU1-1, RNU1-2, GLMP, ALPK3, IL17RE, MIR4727, RNVU1-7, RNU5A-8P, OVGP1, ISG20, TSPOAP1, RNVU1-18, FSCN3, LCT, DOC2GP, GUCA1B, CDKL2, RNU5B-1, FAM46C, RNVU1-6, YPEL3, DOK7, TBR1, RNU4-1, MAP7, CST6, CCDC168, RNU4ATAC, MARCH3, TC2N, RNU5E-4P, MIR3198-1, MIR5087, MIR194-2HG, MYO1G, PPIEL, ITGB7, IL17RB, ZNF488, RPL39P5, RNU4-2, CD27-AS1, RNU1-3, AMH, EPN3, MTFP1, RHBG, TBC1D29, TMEM249, RNF217, C9orf153, BTBD19, RNU5D-1, P2RY1, RNU5A-1, AOC4P, HRH4, RAB25, PAK6, PSMB8, TBC1D8B, RPL12P38, LY6G6C, UCN2, CASS4, NRADDP, RBP7, CARD14, GRK7, UBA7, LINC02365, RNU1-4, HOXA10, SAMD12, CBLC, RNU6-1201P, GPBAR1, RSPH10B2, CCL28, ARL9, LGALS4, CDC42P4, LIG2, LPAR5, EIF4A2P4, LINC00847, EEF1A1P39, HS3ST1, MIR544B, CLCN1, TAS1R3	HIST1H4J, ITGAX, MET, HIST1H4K, ARRDC4, IGF1, TXNIP, CD36, TRIB3, AKNA, SCN9A, SMAD9-IT1, CASP8, DSC1, HERC6, CES3, TPRG1, SERPINF1, TRIM2, ADM2, SLC6A9, LINC01748, TTC28, C1RL, LINC00173, RNU4-24P, IFIT1, PCSK5, SLC7A11, ICAM1, TRIQK, RPL12P21, NAP1L5, LINC00853, FSIP2-AS1, PPP1R1C, BTC, FAM157B, FRMD4A, CCDC144NL-AS1, IGFL4, TEX45, FAM189A1, TLE6, RNU6-375P, SPTSSB, PDE1A, RABGAP1L-IT1, MIR186, BEST1, RNU7-170P, SLC7A7, MACROD2, SOWAHB, RNU2-7P, GTF2IRD1P1, CCDC144NL, PCK2, KCNH8, SPARC, ALDH1L2, FHIT, HECW2, MTCO2P11, MIR4713HG, SMARCA5- AS1, SH2D3A
---------------------------------------	---	---

Продолжение Таблицы А. 1

HuTu80 SLC39A8 OE/HuTu80 GFP	SLC39A8, RGS6, COL1A2, SFRP4, FOXJ1, EMP1, P2RY1, ZSCAN12P1, DOK7, EIF4A2P4, FAM83B, RPS3AP5, MTCYBP18, MEF2C, MIR4727, NOS2, MICALCL, GAPDHP40, ACTBP2, DIRAS2, CERNA3, HNRNPCP3, TACSTD2, PA2G4P1, DRP2, CCT6P2, ADH5P4, SYK, RPL7P26, RNF217, HSPA8P5, RPL39P5, UCN2, HNRNPLP1, SNORD59A, STYK1, FAAHP1, EXOSC3P1, HSP90AA2P	DRC7, HRK, MET, MB, KRT8P46, STC2, GOT1, TRIB3, ALDH2, ACBD4, IRF7, ALDH1L2, ADM2, AKNA, LINC-PINT, GSTO2, PHLDB2, ZNF781, C2orf15, CES3, ARRDC4, ATF3, RNF125, MTUS1, LINC01138, FAR2P1, MOCOS, MST1, FAM157C, NEXN-AS1, C1orf229, GNRHR2, HESX1, CHAC1, FOXP1-IT1, DDIT3, C16orf96, TLE6, APOBEC3F, TOMM20L, ARHGAP9, NRG2, PCK2, LINC01431, RRS1-AS1, OGDHL, FAM228B, CFL1P1, CASP8, SH2D6, MAP4K1, ENO3, UNC13D, LINC00173, HSD17B6, ASNS, LINC00638, OSGEPL1-AS1, TPTE2P1, CBR3-AS1, GAPDHP22, CYSRT1, FNDC4, VPS37D, CACNG8, VLDLR-AS1, LRRN1, SLC30A10, AMDHD1, ITGB2, LINC00858, ADAMTS19-AS1, C4orf36, FRRS1, FAM166A, CEBPB, SLC9A4, TIGD4, APOL6, TBX6, WASIR2, CCDC110, TXNIP, PRKAR2A-AS1, RASSF6, C11orf63, RPS3AP38, WEE2-AS1, CA14, ZNF93, FHDC1, WDFY3-AS2, STH, TNFRSF10C, CA13, CCDC144NL-AS1, TXK, ERAP2, TUBB8, TEX38, TAPT1-AS1, ZNF197-AS1, C1RL, BTC, TOB2P1, CDRT4, TDO2, C15orf65, SULT2B1, PCDHGA5, MID1IP1-AS1, HS6ST3, SLC25A45, SETBP1, SPAG8, GABARAP, VMAC, FAM21FP, TCEAL3-AS1, TNNC2, MX1, PCDHB11, PTH1R, MORN3, RPS4XP16, MIR421, LINC02387, TPRG1, BCDIN3D-AS1, DRC3, RN7SKP56, PELI2, VLDLR, ANO9, OXCT2, NDUFA4L2, ITGB6, ATL1, GAS5-AS1, MCOLN3, RUNX2, MEI1, RPS26P21, SKAP1-AS1, RPSAP36, EIF5AP3, PKD1P1, ARHGAP19-SLIT1, GPD1, PBX1, HOXA11-AS, MYRIP, TMEM86A, MIRLET7F1, CREBRF, RDH5, RFESDP1
---------------------------------------	---	--

Продолжение Таблицы А. 1

HuTu80 SLC39A14 KO/HuTu80 WT	FLRT2, DLC1, DIO2, PPM1H, MPPED2, ABLIM1, SORL1, NDST4, CHGB, FAM46A, LIX1, PRICKLE1, ALCAM, SERPINI1, KCTD12, FAM84A, TBX2, LEF1, FMN2, GNAI1, SPX, ISM1, IRX2, PLXDC2, COL3A1, ADAMTS19, OGDHL, HOXA5, GALT, MAGEL2, FIGN, SLITRK5, DACT1, SUSP1, GHDC, DCHS2, MAP3K21, ONECUT3, CALCRL, MIR100HG, GRB14, WNT16, NREP, PAGE4, RUNX2, PDE5A, NR2F2- AS1, DNMT3, HOXA-AS3, SEMA6A, HAGLR, CNTNAP3, HEY2, PREX2, CD36, FAM19A2, GATA4, GPC5, CLDN4, CLDN11, TNFSF13B, SDK1, TMEM100, SLC9A7P1, , CD226, SCN3A, GYS2, NAV3, PRRX1, DIRAS2, IGSF10, ST3GAL1, LEF1- AS1, GEM, S100A11, ADAMTS19-AS1, FMO4, FAM155A, LINC01508, FAM13A, TPTEP1, LINC00461, SLC25A48, LAMA2, HSPB6, ADGRB3, BMPT1B, CDH7, PAG1, CNTNAP3P2, MEF2C, EMX1, LIG3, RNU6-1285P, SMPDL3A, SP6, TECRL, HAS2, SPTSSB, ST8SIA1, LINC02253, PLSCR4, GOLGA2P8, MCTP2, FAM110B, SLC46A3, SP3P, KLHL41, SLC4A4, PHYHD1, ZNF215	ANOS1, MAMDC2, SNCA, CAVIN2, LINC01468, OSBPL10, SLC39A14, PRKG1, PI15, COL12A1, FOXG1, GPM6A, GREM1, ADAMTS1, GALNT3, CHRM3, ZNF462, HOXB5, ZNF540, MMRN1, DMD, CLDN6, CARMIL1, NLGN1, PAX6, PLCB4, NKX6-1, WDR17, FMN1, INTU, HSPA4L, ZNF738, HDAC9, COBL, ACSL4, MYD88, DKK1, ADAM2, ZNF860, GATA6, LINC01021, AREG, EREG, THAP12P3, POU3F2, LINC02024, PTGER3, FRMD5, MIR31HG, PHLDA2, EGF, SP8, ALDH1A3, PGM5P2, RGS6, OTX2, SPATS2L, CLDN1, TEK, FAM26D, MB, FGD5, ITGA2, LRRTM4, RGS20, CCDC144NL-AS1, ZNF571, PAPLN, SLC39A8, DRC7, CAV1, LHX9, TUBB2A, RPL24P8, MFSD6, SMOC2, TMEM170B, RBP4, ITGB8, ZNF404, PRKG1-AS1, CHRD1, PTGFRN, RSU1P3, PLEKHG1, PPP1R14C, RBM24, TUBA4A, KCNN4, STX1B, CAV2, ZBTB20, COLCA1, SLC2A1-AS1, KCNK6, CA2, TES, IL1RAP, CPM, MARK1, ATP2C2-AS1, C5orf63, PARM1, ADAM32, TNK1, ZNR2P1, NRP2, GRIN2B, ZNF781, PRKAR2B, ZFP30, MOCOS, ROR1, CCDC110, PDCL3P5, AKAP2, MYO1B, RORA-AS1, LGR5, RPEP4, ALS2CL, SNORD70, OSMR, TPRKBP2, C1orf61, GYG2, ANKRD37, ACTBP7, ATP6V1G1P4, ADGRF2, TRIB2, DTX2P1-UPK3BP1- PMS2P11, BIK, SNORD121A, NAALADL2, LINC01429, PRKCQ-AS1, IFNE, TRIP6, RN7SL37P, RPS4XP17, GRIK2, CD44, C15orf52, ZGLP1, RN7SL473P, RPS15AP6, SCEL, TMOD1, ASAH2, DEF6, SLC15A2, SPTBN5, BMS1P7, PKD1L1, MIR553, GDPD2, RNU6-118P, SYNE1, CARNS1, TNC, ANXA3, DHRS3, RNU6-1157P, SHH, GPX1, SNORA58, LMCD1-AS1
---	---	--

Продолжение Таблицы А. 1

HuTu80 SLC39A8 KO/HuTu80 WT	GCG, SH3RF2, DIO2, EFNB2, WLS, KSR2, RASEF, WNT16, ARFGEF3, KCTD12, PRELID2, COL1A2, DACT1, PALLD, BACE2, ALPK2, PTPN13, TIMP1, MED30, FAS, F2RL1, GRIA1, PCDH7, MBIP, GNAI1, ABCC2, ANK3, NR4A2, GLUL, COL11A1, GNG12, SERPINI1, FAM13A, IFT57, LEF1, COL3A1, GPR63, TBC1D8B, ZIC2, NFIA, BCL11A, EPS8, KRT20, NREP, EMP1, NHSL1, GCA, ATP10D, C14orf37, ARHGAP24, IFIH1, DLC1, HTR7P1, SLC16A6, PTGFRN, TGFB2, NKX2-1, NRP1, DCBLD2, TNIK, STAMBPL1, ANKH, CHST7, HAS2, DLX1, PDE4B, RUNX2, ABRACL, CHGB, DDX60L, VIM, FAM107B, MPPED2, LIPA, DNMT3, PPM1E, CPED1, FAM19A2, FSTL1, CXorf57, RHOB1, EPB41L4A, CUBN, CDC42EP3, MEF2C, ANTXR1, SLC7A11-AS1, ASPH, TFPI2, RGS5, BEND4, SPP1, HOXA11, SYK, FKBP7, CCND2, C1RL-AS1, ODF2L, HECA, CH25H, FZD8, ADAMTS19, TFAP2A, EXPH5, C1orf21, MCOLN2, FAM155A, COL6A3, PITX2, ISM1, EMILIN2, ACTA2, LINC01508, KCNMA1, LINC01138, PRRG1,	TPBG, GPM6A, ID4, KLHL14, FAT3, PKP2, SAMD5, WDR17, GALNT3, ZNF462, FRMD4B, COL12A1, MYD88, COBL, PTGER3, NDST3, PCDH11X, SLC2A1, KRT8, GPAT3, NKX6-1, FOXG1, KIAA1217, ALDH1A3, LINC02024, DMKN, CDH8, SLC39A8, RGS6, LHX9, PGM5P2, EGF, C10orf113, RND3, POU3F2, CSF1, SLC30A1, TUBA4A, OTX2, MB, EDNRA, RBP4, PNMA2, ZNF540, EPHB1, SORL1, ROR1, FOXJ1, PLCE1, MT1F, FAM26D, MROH6, ID1, MEG3, FRAS1, RPL24P8, ADAMTS18, LGR5, BACH2, CPA6, SCHIP1, FAM50B, GTF2F2P1, CA2, HIST1H4J, MCTP1, FGD5, CAP2P1, RSPO3, ITGB3, KCNK2, NPIP12, KLK10, S1PR1, NUA2, NRCAM, CLU, UQCERS1P3, ISL1, E2F3-IT1, MC5R, COL4A2, ANXA3, PDCL3P4, PPIAP2, ITGA10, PRR5-ARHGAP8, CLEC4A, RNU6-130P, SLC2A1-AS1, CRYAB, KLF4, DRP2, STXBP6, MT1X, ATP2C2-AS1, PLXDC2, CADPS, ID3, TMSB4X, F3, SLC16A14, KRT18, CYP4F35P, ANKRD1, NDUFA9P1, EFCAB13, PAX5, MOCOS, SLC01B3, NPR1, RPEP4, ACTG1P3, STEAP1, SLC52A3, MT2A, SLC2A14, TOGARAM2, HPSE, RNU4-9P, HNRNP1P5, KCNK1, SNORD70, PLXNA2, SLC34A2, EVA1A, RN7SL788P, ARHGAP22, PBX1, NACAD, MAP3K21, UPK3B, ACTBP7, GOLGA8UP, MLKL, MTHFD1P1, RN7SL441P, RN7SKP288, CHST13, RDH16, EVPL, SNORA80E, RPL23AP43, CHSY3, ITGB7, PCSK5, CPT1B, KCTD9P1, BTBD19, EFCAB8, DSG1, IGSF11, COL4A1, PLK5, CPM, CDKL2, AIFM3, ASLP1, NEFL, MIR648, FOXL2NB, CARNIS1, PRKCQ-AS1, GPX3, MIR619, MTND4P32, RNU6-1327P, SLC25A2, MFAP1P1, RNU6-890P, SYNJ2-IT1, TVP23CP2, MYO5B, AKAP2,
--	---	--

Продолжение Таблицы А. 1

HuTu80 SLC39A8 KO/HuTu80 WT	EOMES, BSPRY, PDGFC, TRIM56, SHOX2, C1RL, CDCP1, SLC18B1, HEY2, IGFL2, MDFIC, PARP11, L3MBTL3, NEGR1, FYN, VASH2, ATXN1, PSAT1, BCL11B, PDE8B, LINC00623, SALL1, CALCRL, SULF1, EN2, FUT1, SERPINE1, DDX60, TSPAN12, CCDC28A, BNC2, PHGDH, PLD1, KCNMB4, FILIP1L, HOXA-AS3, IL20RA, BCAT1, DGKB, FAP, TLR6, ETNPPL, ZNF704, TRIM2, MACC1, HIVEP2, PCLO, CARD8-AS1, CAMK4, GMPR, LEF1-AS1, LINC-PINT, CLDN4, ADAMTS19-AS1, MAP9, FAAH2, DIRAS2, GEM, HOTAIRM1, LAMA4, LINC00869, TRIM38, C2orf15, SUN3, TMEM45A, RNF125, RTN4RL2, MAP3K5, CD36, GATA4, EGFEM1P, INHBA, SLC30A10, IGFBP7, B3GALT1, C4orf36, HMG5, KRT40, MAOB, ADAM23, ASNS, MAPK10, SMPDL3A, SLC43A1, TPTEP1, ESRP1, FIGN, MSX2, MYLIP, MIR640, RNU6-37P, SLC4A9, RNU7-SLC35D3, MAPRE2, RTBDN, 124P, RPS14P8, RASA2-IT1, RNU6-316P, TMEM156, APOLD1, LAMA2, RN7SL566P, CATSPER3, RN7SL472P, SATB1, CACNA2D1, INHBC, RN7SL364P, RNU6-975P, TC2N, GAPLINC, KRBA2, S100A11, MIR4435-1, RNU4ATAC11P, TMEM95, NTN5, PLEKHG6, SCEL, UCA1, BCLAF1P1, LAMC2, KCNH7, ASS1, TFPI, EHD3, CARD6, DAP3P1, TMEM173, SPIB, GRK5-IT1, THSD7A, NFATC4, CLDN11, IGHEP2, LRRC17, SHISA9, MIR3918, SYBU, MGST1, QPRT, NTN4, KCNC4-AS1, IPO9-AS1, LINC01814, MYH15, HERC6, HSD17B8, RPS14P4, MIR548AU, MYPN, GABRB1, TAS2R6P	PPP1R11P2, RAPGEF5, E2F3P2, RRN3P1, DSC2, TPM3P6, CAGE1, MIR640, RNU6-37P, SLC4A9, RNU7-SLC35D3, MAPRE2, RTBDN, 124P, RPS14P8, RASA2-IT1, RNU6-316P, TMEM156, APOLD1, LAMA2, RN7SL566P, CATSPER3, RN7SL472P, SATB1, CACNA2D1, INHBC, RN7SL364P, RNU6-975P, TC2N, GAPLINC, KRBA2, S100A11, MIR4435-1, RNU4ATAC11P, TMEM95, NTN5, PLEKHG6, SCEL, UCA1, BCLAF1P1, LAMC2, KCNH7, ASS1, TFPI, EHD3, CARD6, DAP3P1, TMEM173, SPIB, GRK5-IT1, THSD7A, NFATC4, CLDN11, IGHEP2, LRRC17, SHISA9, MIR3918, SYBU, MGST1, QPRT, NTN4, KCNC4-AS1, IPO9-AS1, LINC01814, MYH15, HERC6, HSD17B8, RPS14P4, MIR548AU, MYPN, GABRB1, TAS2R6P
--------------------------------------	---	---

Продолжение Таблицы А. 1

HuTu80 SLC39A8 KO/HuTu80 WT	MAML3, SLC7A11, SH2D3A, TCHH, FGF14, KLF14, SH3BGRL, FMO4, EBF3, C18orf65, LOX, HECW2, SLC16A6P1, MUM1L1, KIAA1324, MAML2, GPER1, LINC00963, HIST1H1D, SPTSSB, LINC00616, KLHL41, LURAP1L, TNFRSF10C, PPFIA2, C1QTNF1, MYO3B, CHAC1, CCDC85A, PLAG1, TEX41, ACOT4, GPR15, NAV3, PELI2, KLHL24, GPR39, AK7, GAP43, ZNF280A, PRKAA2, RPS6KA2, PSMB8, GRAMD1C, DPP4, NKPD1, AKR1C3, STC2, PLSCR4, CPA4, CASC15, CDA, RAG1, C11orf63, ACSL5, SPTLC3, PCSK2, HAS2-AS1, MXRA5, DEPTOR, PCK2, MTNR1A, SDAD1P1, LHB, ARHGAP36, ZHX1-C8orf76, CFAP54, MANSC4, RNU6- 26P, CTSO, CXXC4, INHBE, C1orf143, RAB9B, TCP11L2, ATP6V1C2, TRIM9	
--------------------------------------	---	--

Таблица А.2 – Общие для клеток с измененными экспрессиями генов семейств SLC30A и SLC39A пути с повышенной/пониженной активацией

Клеточные линии	Пересекающиеся пути с повышенной активацией	Пересекающиеся пути с пониженной активацией
SLC30A10 OE (HuTu80 и HCT- 15)	KEGG Leishmaniasis Main Pathway KEGG Platelet Activation Main Pathway NCI Beta3 Integrin Cell Surface Interactions Main Pathway Role of NTN1 in Axon Pathfinding VEGFR2 Signaling	Akt Signaling Pathway Cytoskeleton Reorganization ERK Signaling Pathway KEGG Viral carcinogenesis Main Pathway Regulation of Cytoskeleton Remodeling by TGF and WNT

Продолжение Таблицы А. 2

SLC30A3 (HuTu80 HCT-15)	OE и		cAMP Pathway
			CREB Pathway
			DNA Repair Mechanisms Pathway
			Estrogen Pathway
			Integrins Function in Carcinoma Progression
			IP3 Pathway
			JAK STAT Pathway
			JAK STAT Pathway Nml SOCS BCL XL p21 Myc Nos2 Gene Expression via STAT2
			KEGG Focal adhesion Main Pathway
			KEGG Glioma Main Pathway
			KEGG HIF 1 signaling Main Pathway
			KEGG Melanoma Main Pathway
			KEGG Pathways in cancer Main Pathway
			KEGG Platelet activation Main Pathway
			KEGG Prostate cancer Main Pathway
			KEGG Ras signaling Main Pathway
			mTOR Pathway
			NCI a6b1 and a6b4 Integrin signaling Main Pathway
			NCI Arf6 signaling events Main Pathway
			NCI ErbB receptor signaling network Main Pathway
		Caspase Cascade Pathway	Main Pathway
		Cellular Apoptosis Pathway	NCI Integrins in angiogenesis Main Pathway
		GSK3 Signaling Pathway	Pathway
		KEGG Adherens Junction Main Pathway	NCI Posttranslational regulation of adherens junction stability and disassembly Main Pathway
		KEGG FoxO Signaling Main Pathway	NCI Posttranslational regulation of adherens junction stability and disassembly Pathway (axonogenesis)
		KEGG Galactose Metabolism Main Pathway	NCI SHP2 signaling Main Pathway
		KEGG PI3K Akt Signaling Main Pathway	NCI Syndecan 1 mediated signaling events Main Pathway
		NCI Stabilization and Expansion of the E-cadherin Adherens Junction Main Pathway	p38 Signaling Pathway
			PAK Pathway
			PLAU mediated Signaling Events During Cell Adhesion
			Ras Pathway

SLC39A14 (HuTu80 HCT-15)	KO	Heparan Sulfate Biosynthesis Stages	CAMs	Akt Signaling Pathway
				cAMP Pathway Cell Proliferation
				cAMP Pathway Degradation of Cell Cycle Regulators
				cAMP Pathway eNOS Signaling Cardiovascular Homeostasis
				cAMP Pathway Gene Expression via NFkB2 CREBBP ELK1
				cAMP Pathway Glycogen Synthesis
				cAMP Pathway Lipolysis
				cAMP Pathway Oncogenesis
				cAMP Pathway Protein Retention
				cAMP Pathway Regulation of Cytoskeleton
				Cell Adhesion Regulated by CDHs
				ILK Signaling Pathway
				ILK Signaling Pathway Cytoskeletal Adhesion Complexes
				ILK Signaling Pathway Epithelial Mesenchymal Transition Tubulo Interstitial Fibrosis
				KEGG Arachidonic Acid Metabolism Main Pathway
				KEGG Arginine and Proline Metabolism Main Pathway
				KEGG cAMP Signaling Main Pathway
				KEGG Circadian Entrainment Main Pathway
				KEGG Histidine Metabolism Main Pathway
				KEGG Olfactory Transduction Main Pathway
				KEGG Phenylalanine Metabolism Main Pathway
				KEGG Regulation of Lipolysis in Adipocytes Main Pathway
				KEGG Retinol Metabolism Main Pathway
				KEGG Salivary Secretion Main Pathway
				KEGG Tyrosine Metabolism Main Pathway
				NCI Alpha9 Beta1 Integrin Signaling Events
				KEGG Cell Adhesion Main Pathway
				NCI Regulation of RhoA Activity Main Pathway

Продолжение Таблицы А. 2

		NCI Syndecan 4 Mediated Signaling Events Main Pathway NCI TNF Receptor Signaling Pathway Main Pathway PPAR Pathway PTEN Pathway Angiogenesis and Tumorigenesis Reactome Amyloids Main Pathway Reactome DARPP 32 Events Main Pathway Reactome Integrin Cell Surface Interactions Main Pathway Reactome Laminin Interactions Main Pathway Reactome O-Linked Glycosylation of Mucins Main Pathway Reactome Retinoid Metabolism and Transport Main Pathway Reactome Striated Muscle Contraction Main Pathway Reactome Vasopressin Regulates Renal Water Homeostasis via Aquaporins Main Pathway Retinol Biosynthesis The Visual Cycle I Vertebrates The Visual Cycle I Vertebrates
SLC39A14 KO (HuTu80 и HCT-15)	HS GAG Biosynthesis Main Pathway	

Продолжение Таблицы А. 2

Клеточные линии	Пересекающиеся пути
HuTu80 (SLC39A8); повышенная активация в нокаутных клетках и пониженная – в клетках со сверхэкспресс ией	Biocarta Agrin in Postsynaptic Differentiation Main Pathway
	Biocarta HIV-1 Nef Negative Effector of Fas and TNF Main Pathway
	Biocarta HIV-1 Nef Negative Effector of Fas and TNF Pathway
	Pathway Degradation of CASP8 BIRC2 APAF1
	cAMP Pathway
	Cell Adhesion Regulated by CDHs
	Chemokine Pathway
	Chemotaxis Driven by CCR4
	Chemotaxis Driven by IL-8 and LTB4
	Chemotaxis of Immune Cells During Allergic Asthma and Eczema
	Driven by CCR4
	CREB Pathway
	Development of Immune Synapse
	Ephrin B Pathway
	ERK Signaling Pathway
	Estrogen Pathway
	Gamma-Aminobutyric Acid A Receptor Pathway
	Glutathione Mediated Detoxification
	Growth Hormone Signaling Pathway
	Growth Hormone Signaling Pathway Gene Expression via SRF ELK1
	STAT5B CEBPD STAT1 STAT3
	HGF Pathway Gene Expression via JUN STAT3 FOS ELK1 ETS2
	IGF1R Signaling Pathway
	ILK Signaling Pathway
	ILK Signaling Pathway Cytoskeletal Adhesion Complexes
	ILK Signaling Pathway Epithelial Mesenchymal Transition Tubulo
	Interstitial Fibrosis
	JNK Pathway
	KEGG Adrenergic Signaling in Cardiomyocytes Main Pathway
	KEGG Alanine Aspartate and Glutamate Metabolism Main Pathway
	KEGG Apoptosis Main Pathway
	KEGG Arginine and Proline Metabolism Main Pathway
	KEGG Bacterial Invasion of Epithelial Cells Main Pathway
	KEGG Citrate Cycle TCA Cycle Main Pathway
	KEGG ErbB Signaling Main Pathway
	KEGG Glycerolipid Metabolism Main Pathway
	KEGG Glycerophospholipid Metabolism Main Pathway
	KEGG Hepatitis C Main Pathway
	KEGG Leukocyte Transendothelial Migration Main Pathway
	KEGG MAPK Signaling Main Pathway
	KEGG Proteoglycans in Cancer Main Pathway

Продолжение Таблицы А. 2

	KEGG Natural Killer Cell Mediated Cytotoxicity Main Pathway
	KEGG Neuroactive Ligand Receptor Interaction Main Pathway
	KEGG Non-Alcoholic Fatty Liver Disease NAFLD Main Pathway
	KEGG Protein Processing in Endoplasmic Reticulum Main Pathway
	KEGG Proteoglycans in Cancer Main Pathway
	KEGG Pyruvate Metabolism Main Pathway
	KEGG Ras Signaling Main Pathway
	KEGG RIG-I Like Receptor Signaling Main Pathway
	KEGG Steroid Hormone Biosynthesis Main Pathway
	KEGG TNF Signaling Main Pathway
	KEGG Toll Like Receptor Signaling Main Pathway
	KEGG Transcriptional Misregulation in Cancer Main Pathway
	KEGG Tryptophan Metabolism Main Pathway
	KEGG Valine Leucine and Isoleucine Degradation Main Pathway
	KEGG Wnt Signaling Main Pathway
	MAPK Family Pathway
	MAPK Signaling Pathway
	mTOR Pathway
	NAD De Novo Biosynthesis
	NCI BCR Signaling Main Pathway
	NCI Caspase Cascade in Apoptosis Main Pathway
	NCI Caspase Cascade in Apoptosis Pathway Neuron Apoptosis
	NCI Ceramide Signaling Main Pathway
	NCI ErbB4 Signaling Events Main Pathway
	NCI HIV-1 Nef Negative Effector of Fas and TNF Alpha Main Pathway
HuTu80 (SLC39A8); повышенная активация в нокаутных клетках и пониженная – в клетках со сверхэкспресс ией	NCI HIV-1 Nef Negative Effector of Fas and TNF Alpha Pathway
	Pathway Degradation of CASP3 CASP7 CASP6
	NCI Notch Mediated HES HEY Network Main Pathway
	NCI Regulation of Nuclear SMAD2/3 Signaling Main Pathway
	NCI Regulation of Nuclear SMAD2/3 Signaling Pathway Muscle Cell
	Differentiation
	NCI Regulation of Nuclear SMAD2/3 Signaling Pathway Pathway
	Degradation of SMAD3
	NCI Signaling Events Mediated by Hepatocyte Growth Factor
	Receptor c-Met Main Pathway

Продолжение Таблицы А. 2

HuTu80 (SLC39A8); повышенная активация в нокаутных клетках и пониженная – в клетках со сверхэкспресс ией	NCI Signaling Events Mediated by TCPTP Main Pathway				
	p38 Signaling Pathway				
	p38 Signaling Pathway Gene Expression Cell Motility Inflammation				
	Apoptosis Osmoregulation via MEF2D TP53 CREB1 ATF2 JUND				
	ETV1 NFKB2 AP2A1 MAX FOSL1 CEBPG ELK1 CDC25C JUNB				
	STAT1 SP1 DDIT3 ELK4 CEBPA				
	PAK Pathway				
	PAK Pathway Actin Organization				
	PAK Pathway Lamellipodia and Filopodia Outgrowth				
	PRL Pathway				
	Ras Pathway				
	Reactome FCERI Mediated Ca ²⁺ Mobilization Main Pathway				
	Reactome Gluconeogenesis Main Pathway				
	Reactome Rho GTPase Cycle Main Pathway				
	Reactome Senescence Associated Secretory Phenotype SASP Main Pathway				
	Reactome Striated Muscle Contraction Main Pathway				
	Reactome TRP Channels Main Pathway				
	Regulation of Repulsive Axonal Pathfinding				
HuTu80 (SLC39A8); пониженная активация в нокаутных клетках и повышенная – в клетках со сверхэкспресси ей	Slit Robo Pathway				
	STAT3 Pathway Growth Arrest and Differentiation				
	Superpathway of Tryptophan Utilization				
	TGF Beta Pathway				
	WNT Pathway				
	WNT Pathway Cell Fate Proliferation Differentiation Adhesion and Survival				
	Cellular Apoptosis Pathway				
	Glucocorticoid Receptor Signaling Pathway Inflammatory Cytokines				
	GSK3 Signaling Pathway				
	KEGG Adherens Junction Main Pathway				
HuTu80 (SLC39A8); пониженная активация в нокаутных клетках и повышенная – в клетках со сверхэкспресси ей	PTEN Pathway Cell Cycle				
	PTEN Pathway Differentiation				
	PTEN Pathway DNA Repair				
	PTEN Pathway Genomic Stability				
	PTEN Pathway Migration				
	PTEN Pathway Proliferation				
	PTEN Pathway Synaptic Transmission				