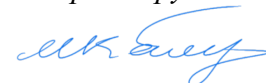


На правах рукописи



Камынина Маргарита Игоревна

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

1.5.3. Молекулярная биология

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор РАН

Буздин Антон Александрович

доктор медицинских наук, доцент

Секачева Марина Игоревна

Официальные оппоненты:

Ерохин Максим Максимович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, группа биологии хроматина, ведущий научный сотрудник, руководитель группы

Любченко Людмила Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел молекулярной генетики и клеточных технологий, заведующая отделом

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»

Защита диссертации состоится «11» сентября 2026 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.003.03 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва,

Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.003.03
кандидат биологических наук, доцент



Шпичка Анастасия Иосифовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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 исследованиях показано, что в ряде опухолей, в том числе в колоректальном раке (КРР), наблюдается нарушение экспрессии генов-транспортеров, регулирующих внутриклеточные уровни Zn^{2+} и Mn^{2+} . 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 измененных генов в опухолях. 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 колоректальном раке. 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.

Следовательно, перспективным направлением является персонализированная коррекция работы цинковых транспортеров, а не универсальное увеличение поступления цинка, которое широко исследуется. 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

Поддержание гомеостаза марганца и цинка в клетке регулируется белками-представителями семейств транспортеров SLC30A (ZnT) и SLC39A (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 [Huang, Teraamondech, 2013]. Из 14 представителей семейства SLC39A, идентифицированы переносчики, особенно специфичные не только к ионам цинка, но и марганца: *SLC39A8*, *SLC39A14* [Barresi et al., 2018]. Семейство SLC30A состоит из 10 представителей. Среди них, для *SLC30A10* и *SLC30A3* (в виде гетеродимера) было также показано участие в транспорте не только Zn^{2+} , но и Mn^{2+} [Fujishiro, Kambe, 2022]. 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 [Chen et al., 2015]. Известно, что ионы марганца могут ингибировать ацетилирование гистонов H3 и H4, повышая активность деацетилазы гистонов (HDAC) и понижая активность гистоновых ацетилтрансфераз (HAT) в клетках нейронов. Деацетилирование гистонов в конечном итоге приводит к репрессии транскрипции и индукции апоптоза [Guo et al., 2018]. Тем не менее, механизмы участия цинка и марганца в прогрессии, инвазии, росте, метастазировании и реакции опухоли на терапию сравнительно мало изучены, роль этих ионов в канцерогенезе требует дальнейшего внимания со стороны научного сообщества.

Молекулярная функция белка SLC30A10 – ZnT10 – заключается в выведении 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 [Fujishiro, Kambe, 2022]. Другой 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* [Zhao et al., 2016]. Важно отметить, что профиль экспрессии *SLC30A3* при КРП (экспрессия понижена в 92% образцов) коррелирует с *SLC30A10* [Rozenberg et al., 2022].

Механизм подавления экспрессии *SLC30A3* при КРП в настоящее время мало изучен. В отличие от гена *SLC30A10*, для которого в большинстве случаев КРП показана модификация в виде метилирования основной части гена, и в меньшей степени – CpG-островков его промотора [Kerachian et al., 2020], 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 выявлено, что изменения экспрессии генов, кодирующих белки-транспортеры ионов цинка и марганца, происходят координированно в некоторых видах рака (простаты, шейки матки) [Zabłocka-Słowińska et al., 2018]. 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 [Singh et al., 2016]. Оба элемента влияют на прогрессирование рака и оказывают воздействие на эффективность лечения в животных моделях, а эффективность добавок цинка и марганца активно изучается и в клинических испытаниях [Mercadante et al., 2019].

Цель и задачи исследования

Основной целью данной диссертации является исследование роли инактивации и принудительной сверхэкспрессии генов семейств *SLC30A/SLC39A* в клетках КРП. 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 генов *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 семейств 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 семейств SLC30A/SLC39A;
6. Провести скрининг жизнеспособности образцов модельных клеточных линий KPP с/без изменения 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 исследовано, влияет ли сверхэкспрессия или инактивация генов семейств 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*. Обнаружено, что сверхэкспрессия или инактивация генов семейств SLC30A или SLC39A

приводит к перестройке внутриклеточной сигнализации и провоцирует гиперактивацию восстанавливающего потенциала в клетке. Изменения уровней экспрессии генов семейств 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. Таким образом, впервые установлено, что гены семейств SLC30A и SLC39A являются не только регуляторами ионного гомеостаза, но и модуляторами лекарственной чувствительности клеток аденокарциномы кишечника.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые получены и исследованы в функциональных тестах модельные клеточные линии с мутациями в генах SLC30A/SLC39A. 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 семейств SLC30A/SLC39A как потенциальные биомаркеры устойчивости к противораковым препаратам и предполагаемые терапевтические мишени.

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 использованы для создания изогенных клеточных моделей аденокарциномы кишечника человека (линии HCT-15 и HuTu80) с нокаутом или стабильной сверхэкспрессией генов белков-переносчиков цинка и марганца. В ходе исследования охарактеризованы пролиферативная активность, восстановительный потенциал клеток, жизнеспособность в сравнении с клетками без внесенных мутаций и в ответ на препараты (расчет IC_{50}), распределение клеточного цикла и внутриклеточная локализация ионов цинка в полученных линиях. Для исследования влияния нокаута/сверхэкспрессии целевых генов на

трансформацию сигнальных путей проведен сравнительный анализ транскриптомных профилей 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 увеличением 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.

Внедрение результатов исследования

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).

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 IC₅₀ и статистической обработкой результатов. Автор занимался теоретическим анализом, подготовкой и написанием публикаций по теме исследования, осуществлял написание текста диссертации.

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. 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. Экспериментальные методы, 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 (Сеченовский Университет), протокол № 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).

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, списка литературы и приложения А. Работа проиллюстрирована

31 рисунком и 11 таблицами. Список литературы содержит 257 литературных источника, из которых 253 зарубежных источника и 4 источника отечественной литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовались клеточные линии аденокарциномы толстой кишки человека HCT-15 с *KRAS*-мутацией, и клеточная линия аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu80 с мутацией *CTNNB1*. CRISPR/Cas9-опосредованную биаллельную мутацию гена *SLC39A14* проводили как в клеточных линиях HCT-15, так и HuTu80, а нокаут гена *SLC39A8* - только в клетках HuTu80. Для экспрессии гРНК, нацеленных на *SLC39A14* или *SLC39A8*, олигонуклеотидные дуплексы клонировали в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). Для проверки наличия мутаций в целевых локусах, область, окружающую целевые сайты гРНК, амплифицировали методом ПЦР, полученные продукты далее секвенировали по методу Сэнгера. Данные секвенирования анализировали с помощью программы SnapGene, а мутации подтверждали с помощью автоматизированного инструмента TIDE. Изогенные клоны, в которых подтвердилось наличие мутаций, впоследствии подвергались РНК-секвенированию.

Для получения стабильных клеточных линий со сверхэкспрессией интересующих генов использовали 5 лентивирусных конструкций: для конструирования лентивирусных векторов использовали плазмиду pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP, в которой GFP был заменен на селекционный маркер устойчивости к пурамицину, и *SLC39A8* (NM_022154.5), *SLC30A3* (NM_003459.5), *SLC30A10* (NM_018713.3) и *SLC39A14* (NM_015359.6) ORF-клоны (Origene). Клетки HEK293T котрансфецировали рекомбинантной плазмидой вместе с упаковочными плазмидами (pSPAX2 и pMD2.G) и далее клетки-мишени (HCT-15 и HuTu80) трансдуцировали вирусными супернатантами. Клоны, в которых наличие трансгена подтвердили с помощью детекции FLAG-тэга антителами к FLAG с помощью Вестерн-блоттинга, далее отправляли на РНК-секвенирование. Для визуализации внутриклеточного Zn^{2+} в живых клетках использовали краситель FluoZin-3 AM и ядерный краситель Hoechst 33342. Изображения иммунофлуоресцентного окрашивания культивируемых клеток получали с помощью системы визуализации EVOSM7000. Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ZEISS ZEN 3.2. Скорость удвоения клеток определяли путем моделирования экспоненциального роста с помощью программы GraphPad PRISM. Количество клеток определяли в относительных флуоресцентных единицах (ОФЕ) с помощью флуоресцентного красителя нуклеиновых кислот. С целью измерения митохондриального дыхания в ОФЕ для живых клеток использовали раствор резазурина. Значения ОФЕ, полученные при измерении сигнала всех клеток после добавления резазурина для каждой клеточной линии, были

нормализованы для получения нормализованного коэффициента митохондриального дыхания путем соотношения сигнала резорфуфина с сигналом красителя нуклеиновых кислот.

Значения IC_{50} рассчитывали с помощью построения кривых зависимости числа живых клеток (в ОФЕ) от концентрации препаратов. Эксперименты по изучению жизнеспособности клеток проводили с помощью набора MTT Cell Proliferation Kit в соответствии с протоколом производителя. Измерение светопоглощения проводили на спектрофотометре Varioskan Microplate Reader.

Для оценки распределения клеточного цикла проводили проточный цитометрический анализ на приборе BD Accuri C6 Plus по оценке содержания ДНК методом проточной цитофлуориметрии с выделением ядер из клеток и их окрашиванием с помощью красителя пропидия йодида (PI).

Библиотеки РНК были сгенерированы и секвенированы в соответствии с методом, описанным в публикации [Suntsova et al., 2019]. 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. Полученные FASTQ-файлы обрабатывали и выравнивали с помощью программы STAR в режиме «GeneCounts» с использованием аннотации транскриптома человека Ensembl. Для анализа известных экспрессионных данных профили секвенирования РНК были получены из проекта атлас ракового генома (TCGA) с помощью пакета TCGAbiolinks. Кроме того, была использована собственная база данных Oncobox. Значимость P_{AL} оценивалась с помощью метода анализа путей Онкобокс [Borisov et al., 2020] с использованием OncoboxPD (Oncobox Pathway Databank). Для статистического анализа использовали программное обеспечение GraphPad PRISM. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание и характеристика клеточных линий с нокаутами генов *SLC39A8* и *SLC39A14*

SLC39A8- и *SLC39A14*-мутантные клетки были получены методом CRISPR/Cas9: для *SLC39A8* (мишень – экзон 3) направление Cas9 привело к делециям размером 17 и 20 п. н., инактивировавшим оба аллеля в клоне HuTu80 (для линии НСТ-15 нокаут *SLC39A8* получить не удалось); для *SLC39A14* (мишенью являлся экзон 2) – к делециям 2 и 7 п. н. в клоне HuTu80 и к делеции 2 п. н. со вставкой 1 п. н. в клоне НСТ-15.

Темпы роста нокаутных и исходных линий были сопоставимы. Однако в отдельных точках выявлены значимые отличия: в HuTu80 при нокауте *SLC39A8* число клеток было

достоверно ниже на 3-и и 4-е сутки, при нокауте *SLC39A14* – на 3-й день ($p < 0,05$); в НСТ-15 значимых различий не обнаружено (рисунок 1). Распределение фаз клеточного цикла в нокаутных клетках практически не отличалось от контроля (для НСТ-15 доли клеток в G1/S/G2-M — 41/20/35 % у дикого типа и 42/19/34 % у клеток с нокаутом *SLC39A14*; для HuTu80 — 57/13/27 % у дикого типа и близкие значения у обоих нокаутов).

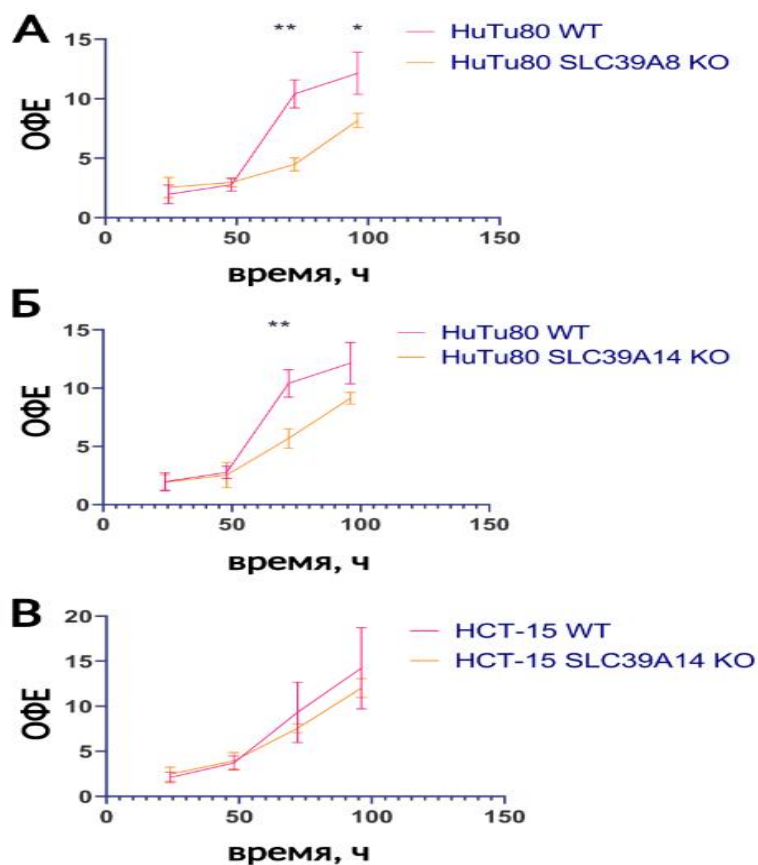


Рисунок 1 – Кривые роста исходных линий дикого типа и нокаутных линий за 4 дня ежедневных измерений. А – HuTu80 WT и HuTu80 с нокаутом *SLC39A8*; Б – HuTu80 WT и HuTu80 с нокаутом *SLC39A14*; В – НСТ-15 WT и НСТ-15 с нокаутом *SLC39A14*. Данные представлены как среднее \pm SEM (≥ 3 независимых эксперимента). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

При биоинформатическом анализе данных РНК-секвенирования подтвердились мутации: экспрессия *SLC39A8* в нокаутной линии HuTu80 снижена в $\sim 16,4$ раза, экспрессия *SLC39A14* — в $\sim 5,6$ и $6,1$ раза в нокаутных HuTu80 и НСТ-15 соответственно (рисунок 2); снижение статистически значимо и согласуется с данными таргетного секвенирования и анализа мутаций в TIDE.

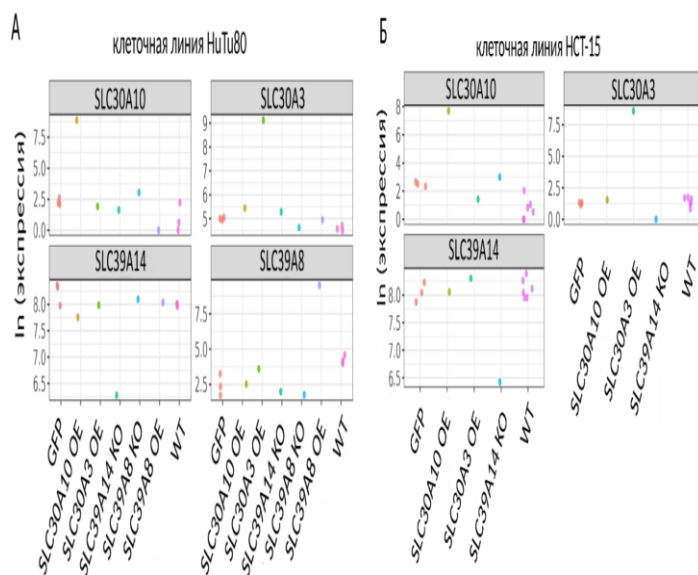


Рисунок 2 – Точечные диаграммы уровней экспрессии генов SLC в контрольных и мутантных линиях (ln экспрессии). Группы сравнения: нокаутные клоны против WT-контроля и клоны со сверхэкспрессией против контролей, трансдуцированных вектором без последовательностей SLC30A/SLC39A. А – клетки HuTu80; Б – клетки HCT-15

С использованием резазуринового анализа выявили усиление восстановительных процессов в нокаутных клетках: относительно дикого типа концентрация НАД(Ф)Н возрастала в HuTu80 с нокаутом *SLC39A14* в 2,2 и 2,3 раза через 24 и 72 ч, соответственно, в HCT-15 с тем же нокаутом – в 1,5 раза (72 ч), в HuTu80 с нокаутом *SLC39A8* – в 1,3 раза (72 ч) (рисунок 3).

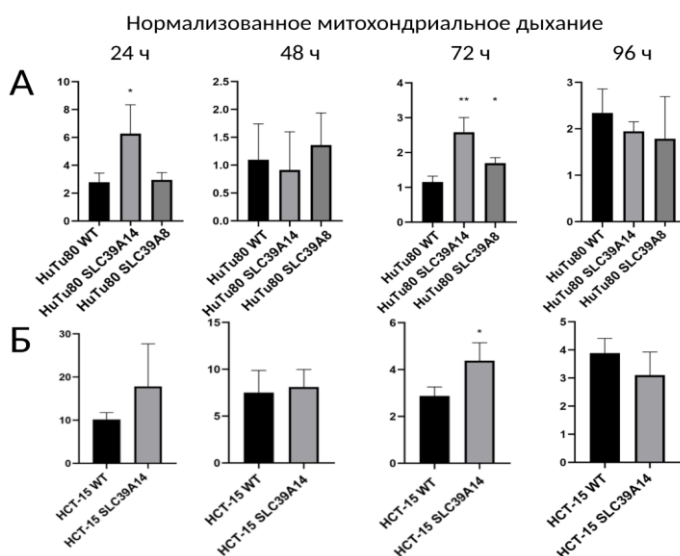


Рисунок 3 – Измерение метаболизма в клетках дикого типа и нокаутных линиях за 4 суток инкубации. А – клетки HuTu80; Б – клетки HCT-15. Флуоресценция резорурфина нормирована на ОФЕ окрашивания ядер (SYTO 62). Данные — среднее \pm SEM (≥ 3 экспериментов). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

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

Для получения стабильных линий со сверхэкспрессией использовали лентивирусный вектор с FLAG-тегированными открытыми рамками считывания. Отбор пурамицином позволил получить стабильные популяции с эффективностью трансдукции более 90%. Иммуноблоттинг с использованием FLAG-специфических антител подтвердил сверхэкспрессию генов *SLC39A8*, *SLC30A3* и *SLC30A10*, при этом клон НСТ-15 со сверхэкспрессией *SLC39A8* получить не удалось (рисунок 4).

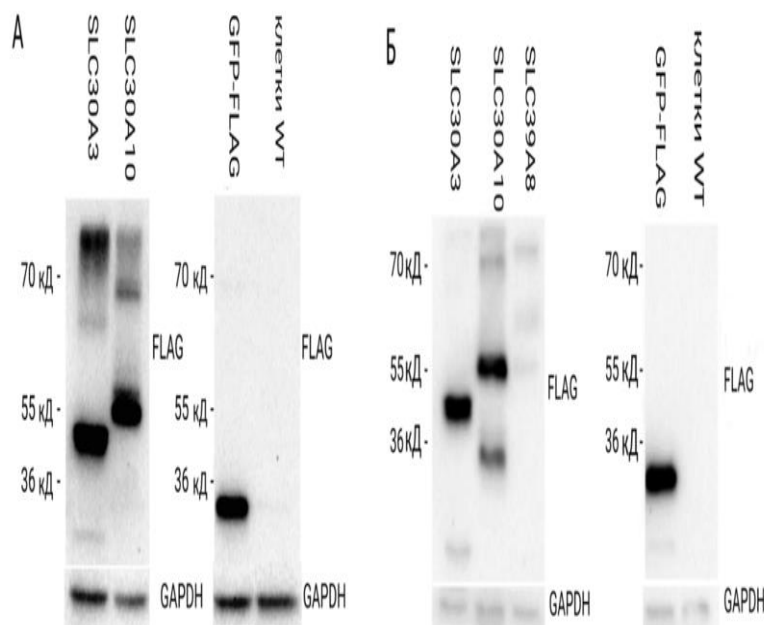


Рисунок 4 – Вестерн-блот анализ клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором: А – клетки НСТ-15, трансдуцированные конструкциями с последовательностями *SLC30A3* и *SLC30A10*. Контрольные клетки НСТ-15 с GFP-FLAG и клетки WT. Б – клетки HuTu80, трансдуцированные конструкциями с последовательностями *SLC30A3*, *SLC30A10* и *SLC39A8*. Контрольные клетки HuTu80 с GFP-FLAG и клетки WT. В качестве контроля загрузки использовали GAPDH

При биоинформатическом анализе транскриптома выявлено повышение уровня экспрессии генов по сравнению с контрольными клетками, трансдуцированных вектором GFP-FLAG. В клетках HuTu80 уровни транскриптов *SLC39A8*, *SLC30A3* и *SLC30A10* увеличены в ~1024, 62 и 512 раз соответственно, в НСТ-15 уровни *SLC30A3* и *SLC30A10* — в ~2240 и 202 раза (рисунок 2). Темпы роста были сопоставимы с контролем (время удвоения 1,3–1,7 дней), однако сверхэкспрессия *SLC30A10* сопровождалась достоверным снижением числа клеток на

96-м часу инкубации (HuTu80 – $p < 0,01$; НСТ-15 – $p < 0,05$; в HuTu80 также на 24-м и 72-м часах), а сверхэкспрессия *SLC30A3* в НСТ-15 – умеренным увеличением на 72-м часу инкубации ($p < 0,05$) (рисунок 5).

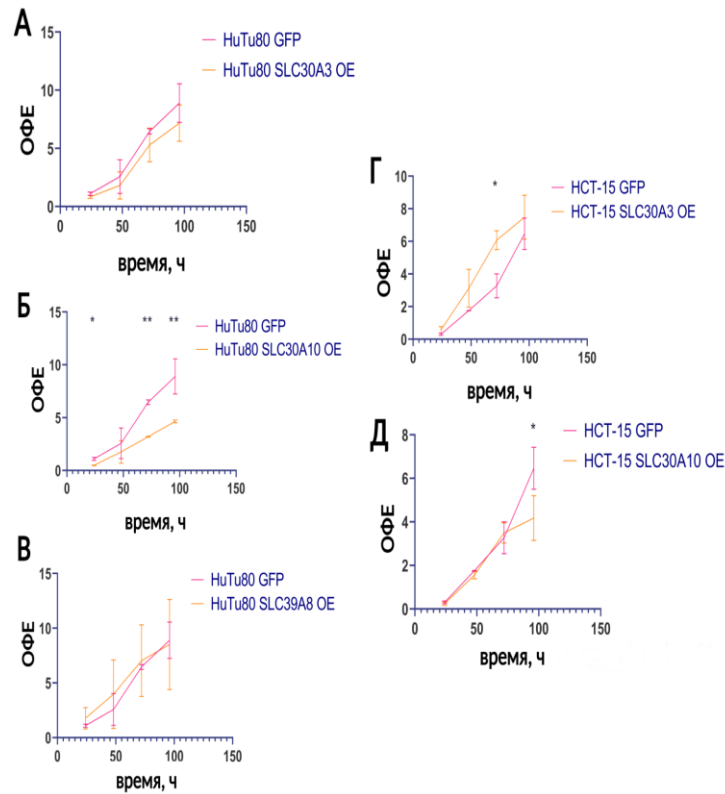


Рисунок 5 – Кривые роста контрольных (GFP) и мутантных линий со сверхэкспрессией генов *SLC30A/SLC39A*. А – HuTu80 GFP и HuTu80 SLC30A3 OE; Б – HuTu80 GFP и HuTu80 SLC30A10 OE; В – HuTu80 GFP и HuTu80 SLC39A8 OE; Г – НСТ-15 GFP и НСТ-15 SLC30A3 OE; Д – НСТ-15 GFP и НСТ-15 SLC30A10 OE. Число клеток (ОФЕ, краситель SYTO 62), среднее \pm SEM (≥ 3 экспериментов). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

По данным резазуринового теста для линий со сверхэкспрессией наблюдалось увеличение митохондриального дыхания: в НСТ-15 *SLC30A10* – примерно в 1,8 раза после 96 ч инкубации, в HuTu80 *SLC30A10* – в 1,5 раза через 72 ч и в 1,3 раза через 96 ч, в HuTu80 *SLC39A8* – в 1,6 раза через 72 ч и в 1,3 раза через 96 ч (рисунок 6). Как инактивация ZIP-транспортёров, так и сверхэкспрессия отдельных SLC-генов связаны с перестройкой восстановительного потенциала опухолевых клеток.

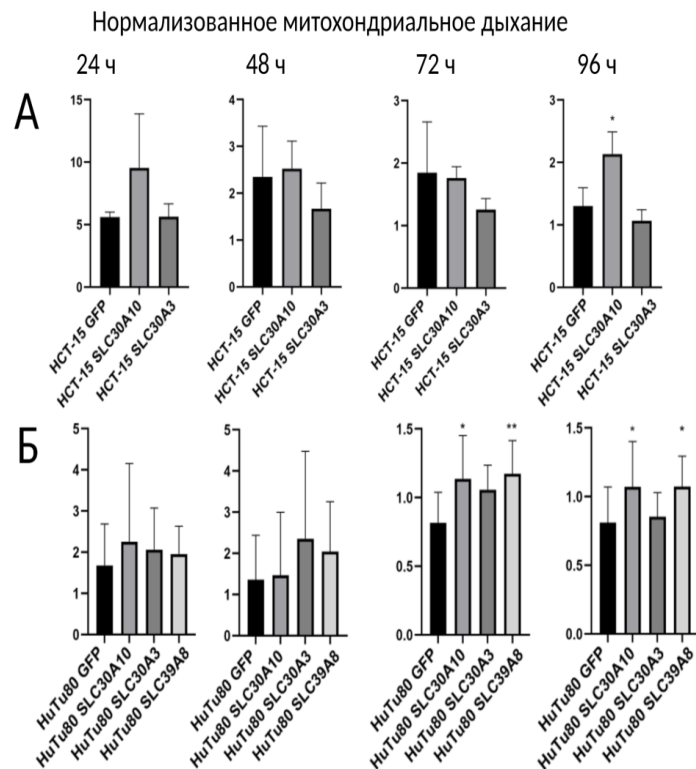


Рисунок 6 – Измерение метаболизма в контрольных с GFP и мутантных клеточных линиях со сверхэкспрессией в течение 4 дней инкубации. А – клетки HCT-15. Б – клетки HuTu80. Флуоресценция резорурфина нормирована на ОФЕ окрашивания ядер с помощью SYTO 62. Представлены данные (среднее \pm SEM) из трех или более независимых экспериментов. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Визуализация накопления Zn при нокауте и сверхэкспрессии SLC-генов

Уровень свободного цинка в живых клетках оценивали зондом FluoZin-3 AM. В обеих линиях с нокаутом *SLC39A14* и со сверхэкспрессией *SLC30A10*, а также в HuTu80 с нокаутом *SLC39A8* наблюдали снижение внутриклеточной концентрации цинка относительно дикого типа (рисунки 7, 8). Напротив, при сверхэкспрессии *SLC30A3* в обеих линиях уровень внутриклеточного цинка значительно повышался с гранулярным рисунком флуоресценции, что согласуется с ролью *SLC30A3* в транспорте цинка в синаптические везикулы нейронов [Jelen et al., 2022]; в HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC39A8* заметно возрастал цитоплазматический цинк, что отвечает его функции импорта цинка в цитоплазму [Zang, Xu, Lau, 2016]. Эти данные подтверждают известную роль *SLC30A3*, *SLC30A10*, *SLC39A8* и *SLC39A14* в метаболизме цинка и валидируют использованные клеточные модели.

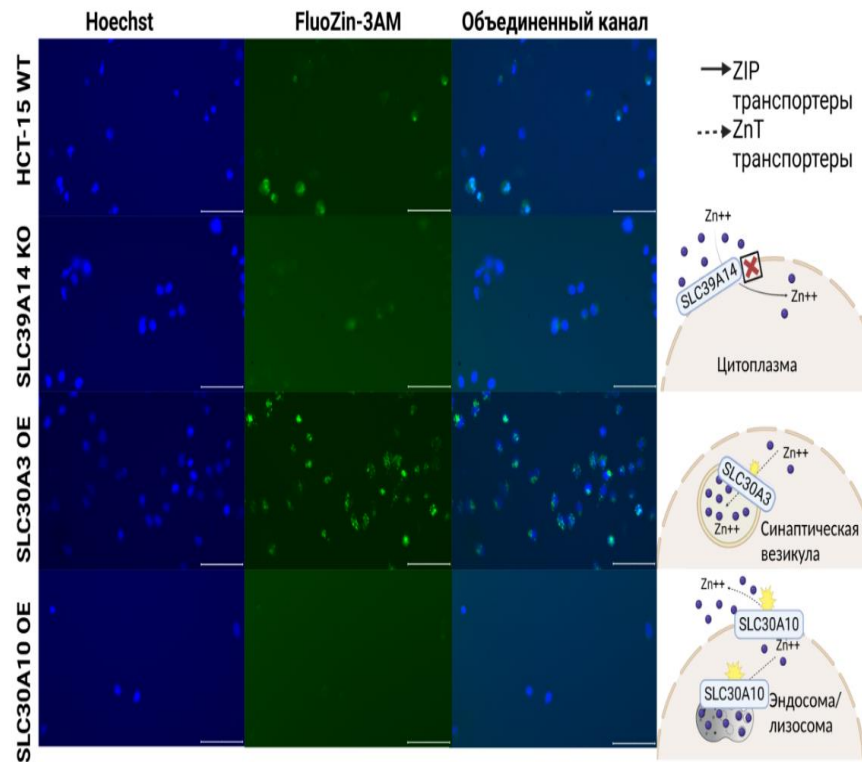


Рисунок 7 – Уровень свободного цинка в мутантных клетках и клетках дикого типа HCT-15. Окрашивание FluoZin-3 AM и Hoechst 33342. Масштабная линейка — 100 мкм

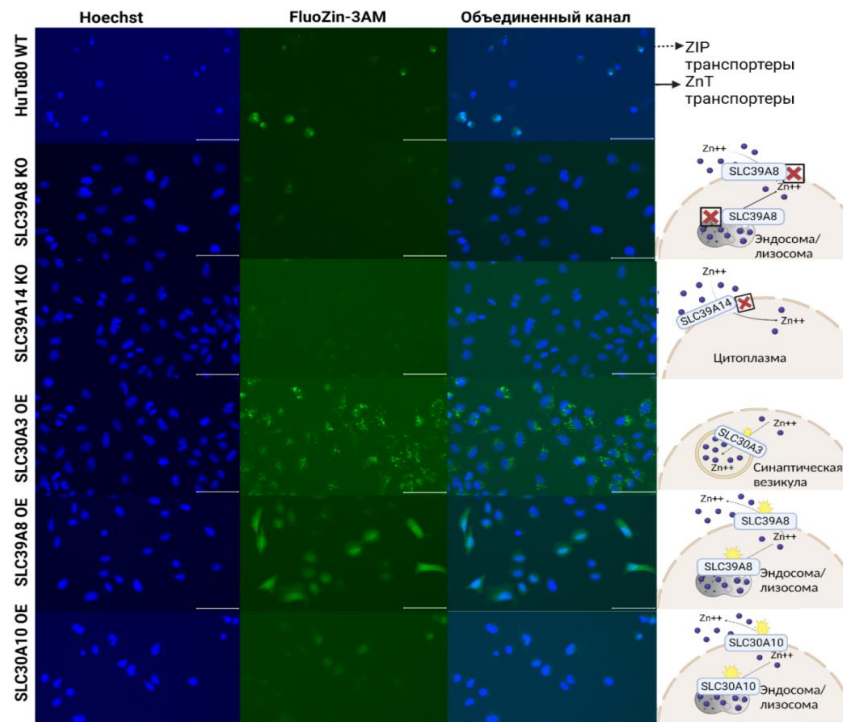


Рисунок 8 – Уровень свободного цинка в мутантных клетках и клетках дикого типа HuTu80. Окрашивание FluoZin-3 AM и Hoechst 33342. Масштабная линейка — 100 мкм

Влияние изменённой экспрессии генов семейств SLC30A и SLC39A на чувствительность раковых клеток к противоопухолевым препаратам

Мы оценили, изменяет ли модификация транспортёров Zn^{2+}/Mn^{2+} чувствительность опухолевых клеток к препаратам. Цетуксимаб не вызывал статистически значимых различий между мутантными и контрольными линиями: IC50 оставалась высокой, что соответствует молекулярным особенностям использованных клеточных моделей. Для винкристина и иматиниба наблюдались умеренные, клеточно-специфические изменения IC50, величина которых была существенно ниже, чем для цисплатина.

Наиболее выраженный эффект выявлен при обработке цисплатином. В клетках HuTu80 со сверхэкспрессией *SLC30A10* IC50 цисплатина была примерно в 2,7 раза выше по сравнению с GFP-контролем, а в клетках HCT-15 - примерно в 4 раза выше. Это указывает на формирование устойчивости к препарату при повышении экспрессии *SLC30A10*. Напротив, сверхэкспрессия *SLC30A3* в HuTu80 приводила к снижению IC50 цисплатина примерно в 3,3 раза, что свидетельствует об усилении чувствительности опухолевых клеток к терапии (рисунок 9).

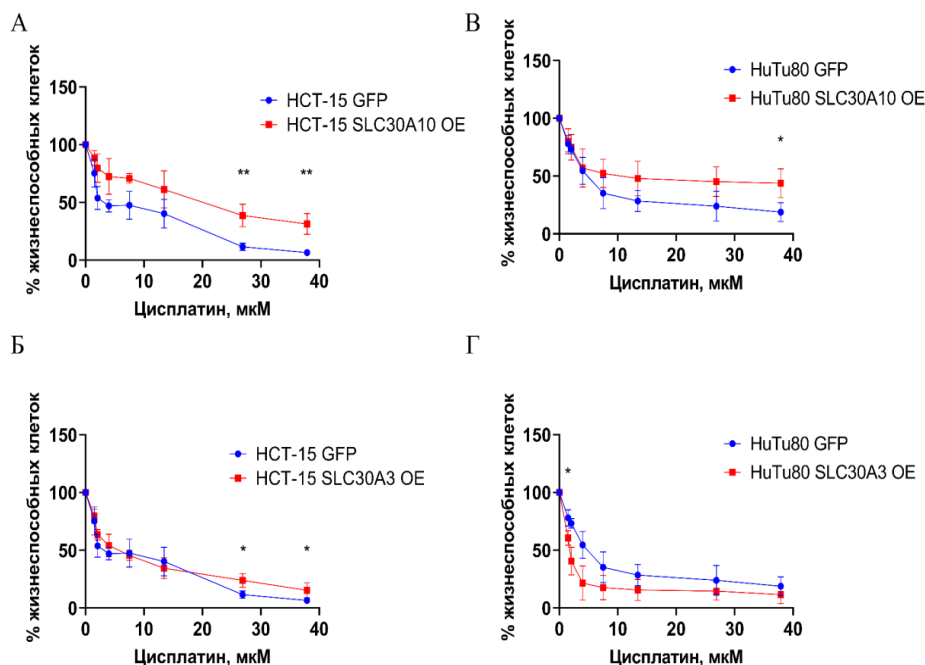


Рисунок 9 – Кривые жизнеспособности раковых клеток при обработке цисплатином (0–37 мкмоль/л, 96-луночные планшеты). А – HCT-15 SLC30A10 OE против HCT-15 GFP; Б – HCT-15 SLC30A3 OE против HCT-15 GFP; В – HuTu80 SLC30A10 OE против HuTu80 GFP; Г – HuTu80 SLC30A3 OE против HuTu80 GFP. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Такой контраст между двумя представителями семейства SLC30A отражает их функции: *SLC30A10* выводит цинк и другие переходные элементы из цитоплазмы наружу клетки (сверхэкспрессия ассоциирована с лучшей выживаемостью при цисплатине), а *SLC30A3* накапливает их в мембранных структурах (сверхэкспрессия — с худшей выживаемостью). Возможно, снижение накопления препарата и его удержание в мембранных компартментах уменьшают образование координационных связей платины с ДНК и, соответственно, цитотоксичность, повышая устойчивость к платиновому соединению [Shen et al., 2012].

Профилирование экспрессии мРНК в клетках НСТ-15 и НуТу80 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. Был рассчитан PAL (уровни активации молекулярных путей) для 3044 внутриклеточных молекулярных путей с помощью OncoBox pathway databank [Zolotovskaia et al., 2022]. Кроме того, было проведено аннотирование геномов с использованием терминов Генной онтологии (GO-термины), включающие словари «молекулярные функции», «биологические процессы» и «клеточные компоненты».

Транскриптомные изменения при сверхэкспрессии SLC30A3. Сверхэкспрессия *SLC30A3* приводила к изменению экспрессии 72 генов в НСТ-15 и 161 гена в НуТу80. На уровне молекулярных путей выявлено повышение активации каспазного каскада, клеточного апоптоза, PI3K/Akt, GSK3 и пути адгезионного соединения, а также снижение активации путей KEGG при раке, RAS, mTOR, JAK-STAT и репарации ДНК. GO-анализ указал на изменения процессов ответа на стресс, метаболизма, везикулярного транспорта, мембранной организации и эндомембранной компартментализации. Эти данные согласуются с функцией *SLC30A3* как транспортёра цинка во внутриклеточные везикулы.

Транскриптомные изменения при сверхэкспрессии SLC30A10. Сверхэкспрессия *SLC30A10* сопровождалась изменением экспрессии 75 генов в НСТ-15 и 188 генов в НуТу80. Единственным общим геном с повышенной экспрессией в обеих линиях был сам *SLC30A10*, а единственным общим геном с пониженной экспрессией — *HIST1H4J*, кодирующий белок семейства гистона H4. Анализ путей показал изменения VEGFR2-сигнализации и взаимодействия интегрин $\beta 3$ с клеточной поверхностью, а GO-анализ

для HuTu80 указал на перестройку процессов, связанных с внеклеточным матриксом, клеточной адгезией и активностью протеинкиназ.

Транскриптомные изменения при нокауте SLC39A14. Нокаут *SLC39A14* привел к повышению экспрессии 60 и снижению экспрессии 150 генов в HCT-15, а также к повышению экспрессии 153 и снижению экспрессии 180 генов в линии HuTu80. В обеих линиях выявлены общие гены с пониженной экспрессией: *SLC39A14*, *DHRS3*, *KCNN4*, *MB* и *ZBTB20*. На уровне молекулярных путей обнаружено 42 общих пути с пониженной активацией, включая Akt-, cAMP-, TNF-сигнализацию, регуляцию RhoA, клеточную адгезию и эпителиально-мезенхимальный переход. Эти данные указывают на участие *SLC39A14* в поддержании сигнальных программ, связанных с адгезией, стресс-ответом и взаимодействием клетки с микроокружением.

Транскриптомные изменения при нокауте и сверхэкспрессии SLC39A8. В линии HuTu80 были получены клетки как с нокаутом, так и со сверхэкспрессией *SLC39A8*. При сравнении выявлено 16 генов, экспрессия которых повышалась при нокауте и снижалась при сверхэкспрессии; среди них был *SLC30A10*, что указывает на компенсаторную обратную регуляцию между транспортёрами семейств SLC39A и SLC30A. На уровне молекулярных путей выявлено 89 общих путей, противоположно регулируемых при нокауте и сверхэкспрессии *SLC39A8*, включая каспазный каскад, TNF-, MAPK-, Ras-, ErbB-, Wnt-, TGF- β -, mTOR-, Notch-, STAT3-, p38- и JNK-сигнализацию. Эти пути являются ключевыми узлами регуляции выживания, адаптации и эволюции опухолевых клеток.

В совокупности полученные данные демонстрируют, что направленное изменение экспрессии SLC30A/SLC39A влияет не только на распределение ионов цинка, но и на системную перестройку транскрипционного профиля опухолевых клеток. Изменения затрагивают апоптоз, редокс-регуляцию, митохондриальную активность, клеточную адгезию, сигнальные пути выживания и лекарственную чувствительность. Это подтверждает перспективность дальнейшего изучения транспортёров цинка и марганца как молекулярных маркеров и потенциальных мишеней персонализированной терапии колоректального рака.

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 увеличением восстанавливающего потенциала в опухолевых клетках, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Forced Overexpression and Knockout Analysis of SLC30A and SLC39A Family Genes Suggests Their Involvement in Establishing Resistance to Cisplatin in Human Cancer Cells, November 2024 / **M. Kamynina**, J. M. Rozenberg, A. S. Kushchenko, S. E. Dmitriev, A. Modestov, D. Kamashev, N. Gaifullin, N. Shaban, M. Suntsova, A. Emelianova, A. A. Buzdin // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2024. – Vol. 25. – № 22. – 12049. [Electronic resource]. [Scopus]

2. Lapatinib-induced enhancement of mitochondrial respiration in HER2-positive SK-BR-3 cells: mechanism revealed by analysis of proteomic but not transcriptomic data, September 2024 / D. Kamashev, N. Shaban, G. Zakharova, A. Modestov, **M. Kamynina**, S. Baranov, A. Buzdin // **Frontiers in Molecular Biosciences**. – 2024. – Vol. 11. – 1470496. [Electronic resource]. [Scopus]

3. The Role of the Metabolism of Zinc and Manganese Ions in Human Cancerogenesis, May 2022 / J. M. Rozenberg, **M. Kamynina**, M. Sorokin, M. Zolotovskaia, E. Koroleva, K. Kremenchutckaya, A. Gudkov, A. Buzdin, N. Borisov // **Biomedicines**. – 2022. – Vol. 10. – № 5. – 1072. [Electronic resource]. [Scopus]

4. **Камынина, М. И.** Создание трансгенных линий клеток НСТ-15 с нокаутом в генах, отвечающих за метаболизм Zn^{2+} и Mn^{2+} // Материалы XIII Российской (итоговой) научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2022», посвященная 95-летию со дня рождения члена-корреспондента РАМН, профессора И.Г. Урсова / – Новосибирск : ИПЦ НГМУ, 2022. – Т. 1. – С. 236-237.

5. **Камынина, М. И.** Изучение трансгенных линий клеток с нокаутом в генах, отвечающих за метаболизм Zn^{2+} и Mn^{2+} / М. И. Камынина, Ю. М. Розенберг, А. А. Буздин. – Текст: непосредственный // Успехи молекулярной онкологии. Приложение: материалы VIII Всероссийской конференции по молекулярной онкологии / ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; под общей редакцией М. А. Красильникова. – Москва: ООО «ИД «АБВ-пресс», 2023. – № 4. – Т. 10. – С. 17.

6. **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: непосредственный // Сборник тезисов докладов X Всероссийской научной молодежной школы-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» / Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН). – Москва: ФИЦ ХФ РАН, 2024. – С. 147-148.

7. **Камынина, М. И.** Изучение роли генов семейств SLC30A и SLC39A в процессе канцерогенеза колоректального рака // Сборник тезисов XX Международной (XXIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых / РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Пироговский Университет); Студенческое научное общество Пироговского Университета. – Москва : ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 2025. – С. 123.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

гРНК – гидовая (направляющая) РНК

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)

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

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РФК – реактивные формы кислорода

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

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

GFP – зеленый флуоресцентный белок (англ. Green Fluorescent Protein)

GO – генные онтологии (англ. Gene ontology)

HAT – гистоновые ацетилтрансферазы (англ. Histone acetyltransferases)

HDAC – деацетилазы гистонов (англ. Histone deacetylases)

HGNC – номенклатура генов в соответствии с международной организацией по изучению генома человека (англ. HUGO Gene Nomenclature Committee)

IC50 – концентрации полуингибирования (англ. Inhibitory Concentration 50%)

KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов (англ. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

КО – нокаут (англ. knockout)

ОЕ – сверхэкспрессия (англ. overexpression)

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

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

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

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

PI – йодистый пропидий (англ. Propidium Iodide)

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

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

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

WT – дикий тип (англ. Wild Type)