

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

На правах рукописи

**КУЧУР ОЛЕГ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ ГИБЕЛИ P53-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ  
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ КОМБИНИРОВАНИИ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ИНГИБИТОРОВ CDK8/19-  
ЗАВИСИМОГО ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИИ**

1.5.4. – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Химико-биологическом кластере Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

**Научный руководитель:**

**Штиль Александр Альбертович**, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Официальные оппоненты:**

**Шаройко Владимир Владимирович**, PhD, доктор биологических, доцент, профессор кафедры общей и биорганической химии, ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинского материаловедения научно-образовательного института биомедицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Калинина Елена Валентиновна**, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования РФ.

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» (ИБМХ)

Защита состоится: «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский пр., 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (109240, г. Москва, Устьинский пр., 2/14) и на сайте <http://www.ion.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н.

Шумакова Антонина Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** С накоплением знаний о механизмах регуляции клеточного цикла, репарации макромолекул и гибели (или выживания) опухолевых клеток при действии ионизирующего излучения, развиваются представления о молекулярных процессах, лежащих в основе указанных феноменов. Общеизвестным сенсором ионизирующего излучения в клетке является транскрипционный фактор p53 (Haffty, Glazer, 2003). Этому белку принадлежит ключевая роль в ответе клеток на многие стрессовые воздействия. Повреждение целостности ДНК при облучении стабилизирует p53, следствием чего является задержка смены фаз клеточного цикла и/или гибель клеток (Вуков, Eriksson et al., 2018). Однако опухолевые клетки способны активировать механизмы защиты – усиливать репарацию повреждений, смещать баланс окисления-восстановления, повышать экспрессию антиапоптотических генов и др. В этих ситуациях клетки, выжившие после облучения, поддерживают жизнеспособность соседних клеток (паракринная регуляция). Кроме того, в выживших клетках изменяется профиль экспрессии генов: такие клетки существенно отличаются от первичных. Все эти изменения создают условия для прогрессии опухоли.

В последние годы предметом исследований становится механизм адаптации клеток эукариот к стрессовым воздействиям – перепрограммирование транскрипции с участием протеинкиназы CDK8 и ее паралога CDK19 – компонентов мультибелкового транскрипционного комплекса Mediator (Chen et al., 2017). Этот особенный механизм затрагивает глобальные изменения экспрессии генов. Перепрограммируется транскрипция не любых, а лишь активно экспрессирующихся генов (в частности, генов ответа на ряд экзогенных стимулов: цитокины, факторы роста и др.). Перепрограммирование транскрипции имеет место не в любых клетках (тканеспецифичность). Такая селективность механизма перепрограммирования транскрипции означает, что в конкретной ситуации важными являются определенный транскрипционный фактор и определенный стрессовый раздражитель.

Известна роль транскрипционного фактора NFκB (nuclear factor kappa B) в срочной активации ряда генов (Chen et al., 2017). NFκB - не единственный кофактор перепрограммирования транскрипции. Так, перепрограммирование регулирует становление лекарственной устойчивости рака молочной и предстательной желез (McDermott et al., 2017; McClelland et al., 2015), но эти феномены не описываются ролью NFκB. Может ли перечень кофакторов перепрограммирования транскрипции быть пополнен за счет p53?

Здесь объединяются фундаментальный и практический аспекты исследования: является ли индукция p53 при облучении перепрограммируемым процессом и можно ли повысить эффективность воздействия ингибированием перепрограммирования транскрипции?

Первый аспект проблемы – p53-зависимая и -независимая регуляция выживания/гибели. Задержка смены фаз клеточного цикла в клетках с интактным (“дикий тип”) p53 зависит от трансактивации гена, кодирующего белок p21. Последний ингибирует формирование комплексов циклин-зависимых протеинкиназ с циклинами, предотвращая или замедляя переход G<sub>1</sub>/S. Отсюда следует, что ответ на облучение зависит от нормально функционирующего p53. Однако p53 может способствовать и восстановлению повреждений; клетки приобретают фенотип(ы) «старения», что позволяет им выжить и дать начало агрессивной опухоли (Mardi et al., 2017; Yosef et al., 2017). Можно ли предотвратить p53-зависимую выживаемость облученных клеток воздействием на перепрограммирование транскрипции? Как регулируется выживаемость облученных клеток при нефункционирующем p53?

В настоящей работе впервые исследуется роль CDK8/19 в регуляции выживаемости/гибели опухолевых клеток человека в зависимости от статуса p53.

**Цель исследования** – установление молекулярных механизмов гибели опухолевых клеток человека с различным статусом p53 при действии ионизирующего излучения и ингибировании CDK8/19.

#### **Задачи исследования:**

1. Установить механизмы гибели клеток колоректального рака человека (линия HCT116) с интактным p53 и изогенных сублиний с нефункционирующим p53 (HCT116p53KO) и CDK8 (HCT116\_CDK8KO) при воздействии рентгеновскими фотонами и ингибировании CDK8/19.

2. Выявить особенности регуляции p53-зависимых ответов в облученных клетках при инактивации CDK8/19.

3. Исследовать влияние химической либо генетической супрессии CDK8/19 на активность p53

4. Изучить роль фактора транскрипции NFκB в регуляции p53 с участием CDK8/19.

5. Установить возможность снижения эффективных доз облучения при ингибировании CDK8/19 в опухолях с интактным p53.

**Научная новизна работы.** Впервые выявлен феномен регуляции выживания опухолевых клеток человека, подвергнутых воздействию терапевтических доз ионизирующего излучения, в зависимости от статуса p53

(интактный или нефункционирующий) и активности циклинзависимых протеинкиназ 8/19 (CDK8/19).

Впервые установлен механизм повышения гибели облученных клеток с интактным p53 при ингибировании CDK8/19: предотвращение индукции гена *TP53*. Ингибирование CDK8/19 в облученных клетках с интактным p53 функционально сходно с нокаутом гена *TP53*.

Впервые выявлены механизмы регуляции p53-зависимых событий через ядерный фактор NFκB при ингибировании CDK8/19 и определены белки-партнеры p53, чувствительные и нечувствительные к ингибиторам CDK8/19.

Впервые показана возможность повысить эффективность лучевого воздействия его комбинированием с нетоксичными ингибиторами CDK8/19.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Нетоксичные селективные низкомолекулярные ингибиторы циклинзависимых транскрипционных протеинкиназ 8 и 19 (CDK8/19) или генетическая инактивация CDK8/19 снижают индукцию гена *TP53* и накопление белка p53 в ответ на облучение в терапевтических дозах.

2. Ингибирование CDK8/19 во время облучения повышает гибель опухолевых клеток по p53-зависимым механизмам. Эффект ингибирования CDK8/19 в клетках с интактным p53 эквивалентен генетическому нокауту *TP53*.

3. Комбинации лучевого воздействия с ингибиторами перепрограммирования транскрипции перспективны для элиминации p53-положительных опухолевых клеток.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Значимость работы для фундаментальной биологии определяется важностью установления молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов эукариот в ответ на внешние воздействия. Выявление связи транскрипционного фактора p53 и циклинзависимых протеинкиназ 8/19 - модуляторов перепрограммирования транскрипции - имеет общебиологическое значение. Практические аспекты диссертации важны для разработки рациональных подходов к оптимизации консервативной терапии опухолей с использованием нетоксичных селективных ингибиторов перепрограммирования транскрипции.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Результаты исследований, представленные в работе, получены на современном оборудовании, с использованием общепринятых биологических моделей. Достоверность полученных результатов подтверждается первичными данными, а также статистической обработкой данных.

Основные положения работы были представлены на 7 всероссийских и международных конференциях, материалы вошли в соответствующем количестве в сборники тезисов.

По результатам исследований, вошедших в диссертацию, зарегистрирован патент №2777869 на изобретение «Способ усиления гибели опухолевых клеток при комбинации ионизирующего излучения и ингибитора CDK», Роспатент, а также опубликованы 3 печатные работы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных исследований входящих в международные реферативные базы данных (Web of Science/Scopus):

1. Кучур О.А., Кучур П.Д., Кузьмина Д.О., Забирский А.В., Штиль А.А. Дифференциальная регуляция ВВС3/PUMA и PMAIP1/Noxa при ионизирующем излучении: роль p53 // Цитология. – 2021. - Т.63, №4. - С. 363-372. DOI: 10.31857/S0041377121040039.

2. Кучур О.А., Кузьмина Д.О., Духинова М.С., Штиль А.А. Белки семейства p53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение: развитие проблемы // Acta Naturae. – 2021. - Т.13, №3. - С. 65-76. DOI: 10.32607/actanaturae.11247.

3. Кучур О.А., Забирский А.В., Штиль А.А. Перепрограммирование транскрипции в регуляции выживания опухолевых клеток при ионизирующем излучении: роль p53 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. - Т.174, №11. - С. 621-627. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-11-621-627.

**Личный вклад автора.** Все описанные в работе экспериментальные процедуры, за исключением опытов по воздействию радиации на клетки, были проведены автором лично. Эксперименты с радиотерапевтической установкой РУМ-17 проводились на кафедре военной токсикологии и медицинской защиты Военно-Медицинской Академии им. С.М. Кирова под контролем Забирского А.В. и Башарина В.А. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно со всеми соавторами и научным руководителем.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из 7 глав: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение результатов собственных исследований, обсуждение, заключение и выводы, список литературы. Работа изложена на 133 страницах текста, включая 49 рисунков и 1 таблицу. Список цитируемой литературы содержит 243 источника.

**Финансирование.** Диссертационная работа была выполнена при финансовой поддержке мегагранта Минобрнауки Российской Федерации № 14.W03.31.0020 (руководитель Ронинсон И.Б.) и гранта РФФИ «Аспиранты» № 20-34-90046 (руководитель Штиль А.А.).

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены преимущества лучевой терапии и проблемы, связанные с её использованием – описаны молекулярные каскады, активирующиеся в ответ на ионизирующее излучение, причины гибели и выживания клеток, возникновение радиорезистентности и роль опухолевого супрессора p53 в этих процессах. Проанализированы современные данные по использованию комбинаций, направленных на усиление лучевой чувствительности опухолевых клеток, включающие воздействия на p53 и p53-ассоциированные молекулярные пути через циклин-зависимые киназы, включая CDK8/19.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Клеточные культуры.** Использованы следующие линии трансформированных клеток человека: НСТ116 (рак толстой кишки) с диким типом *TP53*; НСТ116p53КО - сублиния НСТ116 с делецией обоих аллелей гена *TP53*<sup>-/-</sup> (получена в лаборатории В. Vogelstein, Johns Hopkins University, США). сублиния НСТ16CDK8КО с инактивированным (технология CRISPR/Cas9) геном *CDK8*<sup>-/-</sup> (получена в лаборатории И. Ронинсона, Университет Южной Каролины, США). Для независимой валидации использован эпителий почки эмбриона человека (линия НЕК293 и сублиния с нокаутом *CDK8*). Во всех случаях использовали клетки в логарифмической фазе роста не выше 15 пассажа.

**Низкомолекулярные модуляторы перепрограммирования транскрипции и внутриклеточного сигналинга.** Ингибиторы CDK8/19: 1) сенексин Б (СенБ) в конечных концентрациях 0,5-1 мкМ; 2) В11347 в конечной концентрации 200 нМ; 3) система PROTAC – комбинированная молекула, которая вызывает селективный протеолиз CDK8. Ингибитор протеинкиназ ТВК1 и ИККε MRT67307 – в концентрации 200 нМ. Препараты добавляли в культуральную среду за 3 ч до облучения. Ингибиторы присутствовали в среде только во время облучения.

**Воздействие ионизирующего излучение на клетки.** Для воздействия на опухолевые клетки рентгеновским излучением использовали радиотерапевтический аппарат РУМ-17, предоставленный для работы Военно-Медицинской Академией имени С.М. Кирова. Использовались следующие параметры: напряжение на трубке 180 кВ, ток 10 мА, фокусное расстояние – 50 см, фильтр – 1 мм Al; 0.5 мм Cu, мощность дозы – 0,32 Гр/мин. Для валидации

значений использовался дозиметрический контроль – дозиметр ИД-11, показания доз с прибора ГО-32.

### **В работе были использованы следующие методики:**

*Исследование жизнеспособности клеток (МТТ-тест).* Для исследования влияния на клеточную метаболическую активность ингибитора CDK8/19 и/или ионизирующего излучения, был использован МТТ- тест. Количество выживших клеток определяли по оптической плотности раствора восстановленного МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил) -2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид) красителя НАДФ-Н-зависимыми оксидоредуктазами при длине волны 570 нм.

*Проточная цитофлуориметрия.* Распределение фаз клеточного цикла (по плоидности ДНК) после воздействий анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFlex B2-R2-V0 (США) в каналах PE или Rhodamine. Для исключения агрегации клеток использовали двухмерную диаграмму PE-W против PE-A. Накапливали 20000 событий для каждого образца. Анализировали показатели в областях SubG<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>/M.

*Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени (ОТ-qПЦР).* Тотальную РНК выделяли гуанидин-фенол-хлороформной экстракцией с помощью реактивов Extract RNA по стандартному протоколу. Для обратной транскрипции использовали протокол компании “Евроген” (Россия; обратная транскриптаза MMLV). Анализ экспрессии генов проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR+LowROX в соответствии с протоколом производителя. Для нормализации экспрессии использовали праймеры для детекции мРНК *GAPDH* или *RPLA*. Для количественного определения экспрессии использовали метод  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , принимая за единицу нормализованный уровень соответствующей мРНК в контрольных образцах и рассчитывая относительные изменения для обработанных образцов.

*ПААГ-ДСН электрофорез и анализ белков методом иммуноблоттинга.* Для приготовления проб клетки собирали, трижды промывали холодным PBS, центрифугировали при 800 g в течение 10 мин. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер (RIPA буфер). Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэммли в 10-14 %-ном ПААГ. Перенос разделенного тотального белка из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Hybond, США), размер пор 0.45 мкм, проводили, используя аппарат TransBlot (BioRad). Зоны интересующих белков выявляли с использованием первичных моноклональных антител и вторичных антител против иммуноглобулина (IgG) мыши или кролика, меченных пероксидазой хрена. Пероксидазную реакцию



визуализировали при помощи метода усиленной хемилюминесценции. Все первичные антитела, за исключением CDK8, были приобретены в Abscam, США. CDK8 АТ были получены в лаборатории И. Ронинсона университета Южной Каролины, США. В работе использовали вторичные антитела против иммуноглобулина (IgG) мыши или кролика, меченные пероксидазой (фирмы Sigma, титр 1:5000). В качестве контроля нанесения использовали антитела к бета-актину и GAPDH.

*Клоногенный анализ.* Для анализа колониеобразования 200 клеток вносили в 100 мм чашки Петри с 10 мл культуральной среды и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 14 дней без смены среды. Колонии фиксировали 10% метанолом в физиологическом буфере и окрашивали 0.5% водным раствором кристаллического фиолетового. С использованием гель-документирующей системы ChemiDoc Touch (BioRad, США) подсчитывали количество колоний в чашках с необлученными (100%) и облученными клетками.

*Цитохимическое выявление маркера клеточного старения.* Для выявления β-галактозидазы (senescence associated β-galactosidase; SA-β-Gal) - маркера “старения” - клетки фиксировали в растворах формальдегида (2%) и глутаральдегида (0.2%) в физиологическом буфере и окрашивали в буфере, содержащем 40 мМ лимонной кислоты/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.0, 5 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.15 М NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (ПанЭко) и 2.5 мМ бромхлориндолилгалактопиранозида (X-gal, Sigma-Aldrich, США) в течение 48-72 ч при 37°C. Подсчитывали 100 клеток в нескольких произвольно выбранных полях зрения и вычисляли процент SA-β-Gal-положительных клеток.

*Статистическая обработка результатов.* Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерных программ Excel (Microsoft) и GraphPad PRISM 7.0. Полученные значения представлены в виде среднего ± стандартное отклонение. Для данных ПЦР использовали одно- либо двухфакторный ANOVA тест. Разницу считали статистически значимой при p < 0.05 (\*).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

**3.1. Выживаемость клеток линии HCT116 при комбинации облучения и ингибирования CDK8/19.** С помощью оптической микроскопии были оценены морфологические изменения в клетках, происходящих через 3 дня после воздействия дозами 0-10 Гр ± Сенексин Б (рис. 1). В контрольной группе и в группе с добавлением 1мкМ СенБ морфологических изменений не наблюдалось. У облученных дозой 4 Гр клеток на 3 день выражены нарушение формы и размеров клеток, блеббинг, фрагментация цитоплазмы - признаки апоптоза. Сен Б

значительно усиливал эффекты. При облучении дозой 10 Гр - в случае комбинации облучения и ингибитора - в поле зрения микроскопа практически не оставалось живых клеток. Интересно, что если при облучении без добавления ингибитора CDK8/19 клетки с нокаутным p53 гибнут сильнее, то при комбинации означенных воздействий клеточная гибель более выражена у клеток с диким типом p53, что и являлось предпосылкой к анализу регуляции p53 через CDK8/19.

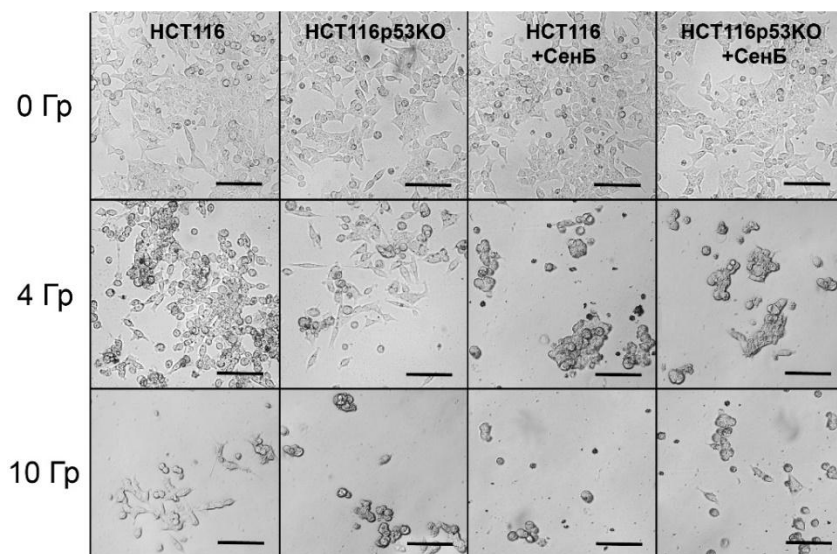
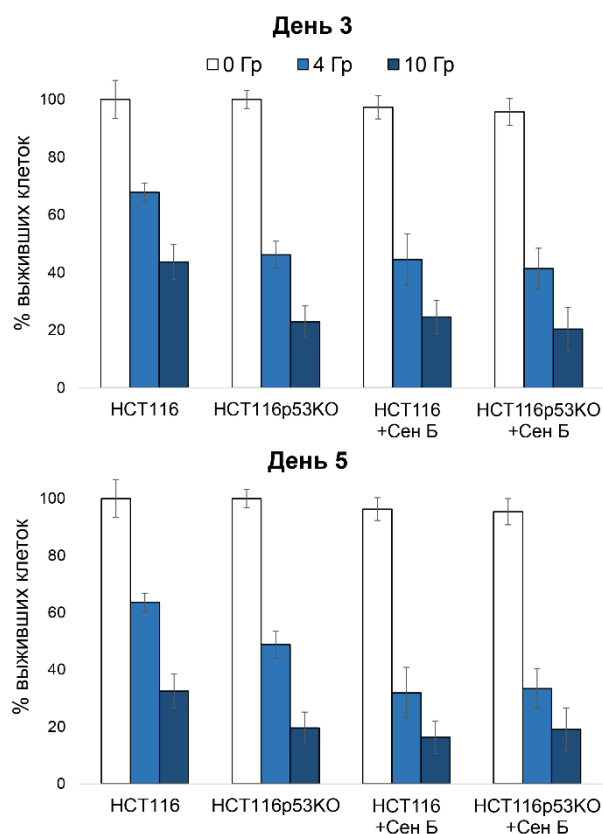


Рисунок 1 – Фотография клеток HCT116 с различным статусом p53 на 3 день после облучения дозами 0, 4 и 10 Гр ± 1мкМ СенБ. Масштабная линейка – 100 мкм.

Анализ цитотоксичности комбинации с помощью теста МТТ (рис. 2) позволил подтвердить предположения, что препарат Сен Б сам по себе не влияет на выживаемость клеток с различным статусом p53. На 5 день выживаемость клеток HCT116 после облучения составила 63.6% (4 Гр) и 33.5% (10 Гр), а клеток с нефункционирующим p53 – 38.8% и 19.6%, соответственно. Комбинация радиации с 1мкМ СенБ усиливала эффект гибели линии HCT116 с p53 дикого типа на 30-40%, но не влияла на морфологию клеток HCT116p53KO. Это предполагает наличие неизвестного CDK8/19-зависимого механизма регуляции выживаемости / гибели в клетках с функциональным p53.

Рисунок 2 – Выживаемость (%) клеток линии HCT116 при облучении дозами 0, 4 и 10 Гр ± 1 мкМ СенБ на 3 и 5 день после



облучения

**3.2. Анализ клеточного цикла линии НСТ116 с различным статусом р53 после комбинации облучения с ингибитором CDK8/19.** С помощью проточной цитофлуориметрии оценивали распределение фаз SubG<sub>1</sub> (апоптоз), G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>/M (остановка в контрольной точке, полиплоидия). По диаграммам распределения видно (рис. 3), что в клетках НСТ116 WT хорошо выражен арест в фазе G<sub>2</sub>/M при облучении дозами 4-10 Гр. В это же время, нокаутная по р53 фракция клеток находится преимущественно в SubG<sub>1</sub>. Так, при облучении дозой 4 Гр НСТ116 WT доля ареста составляла 46% при относительно небольшой доле клеток в SubG<sub>1</sub> (23%). Облучение дозой 10 Гр снимало этот эффект: фаза G<sub>2</sub>/M падала, росла SubG<sub>1</sub>. Добавление ингибитора 1 мкМ СенБ за 3 часа до облучения усиливало эффекты гибели клеток НСТ116, индуцируя апоптоз и снимая арест клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M. В случае нокаутной по р53 линии добавление препарата практически не оказывало эффектов, усиление гибели зависело лишь от воздействия радиацией. При облучении НСТ116p53KO дозой 4 Гр значение SubG<sub>1</sub> составляло 39.5%, а G<sub>2</sub>/M – 16.8%. При добавлении препарата распределение фаз было равно 41% и 20%, соответственно.

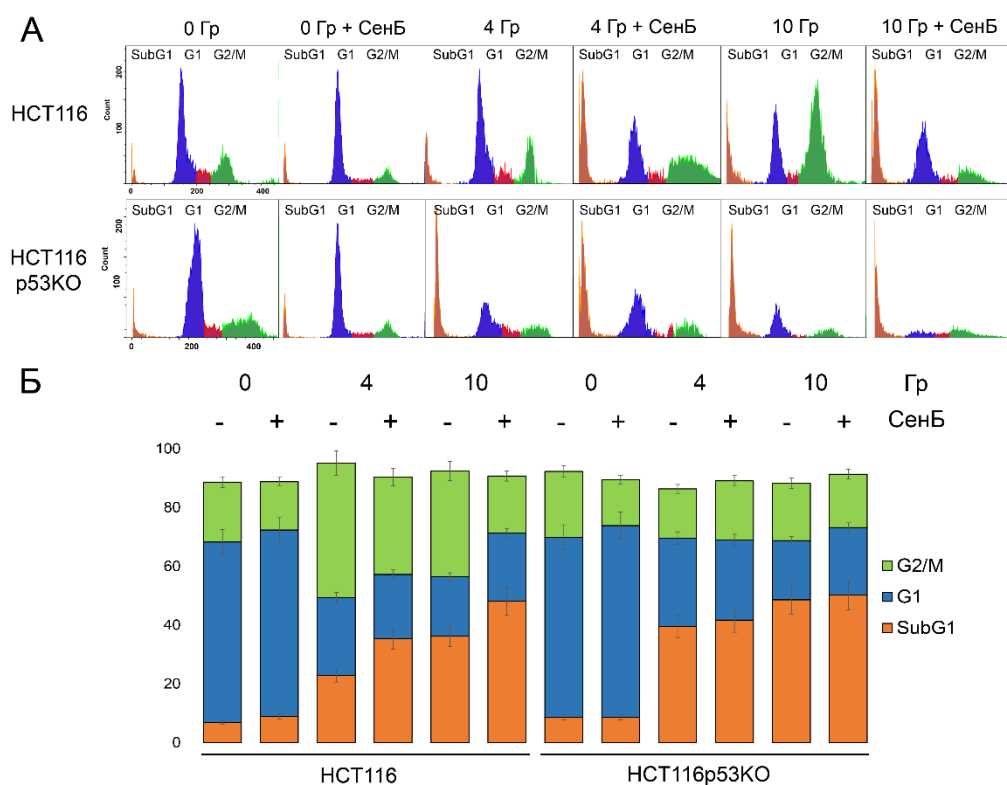


Рисунок 3 – Распределение фаз клеточного цикла линии НСТ116 и сублинии НСТ116p53KO при облучении 0-10 Гр ± 1 мкМ сенексина Б. Представлены результаты на 3-й день. А – гистограммы, полученные на проточном цитофлуориметре. Б – расчетные диаграммы (% фаз)

**3.3. Цитохимическое выявление маркера клеточного старения.** Для исследования клеточного старения (сенесенса) использовали метод окраски внутриклеточных SA-бета-галактозидаз, включающий специфический краситель X-gal (рис. 4). Без воздействия излучения окраски в обеих субклинах практически не наблюдалось (не больше 5%), препарат СенБ отдельно также не вызывал наработку клеточных бета-галактозидаз. При облучении дозой 4 Гр наблюдается заметный процесс сенесенса, более выраженного в клетках с активным p53: для НСТ116 процент окрашенных клеток был ~30%, для НСТ116p53КО – 25%. При добавлении 1 мкМ препарата СенБ эффект практически втрое снижался в НСТ116 WT: 10-12% клеток с окрашенными SA-β-Gal. В НСТ116p53КО он также снижался, однако не столь существенно. Наконец, при облучении дозой 10 Гр процесс сенесенса усиливался в 1.5-2 раза, оставаясь ниже на 10-15% при комбинации с препаратом.

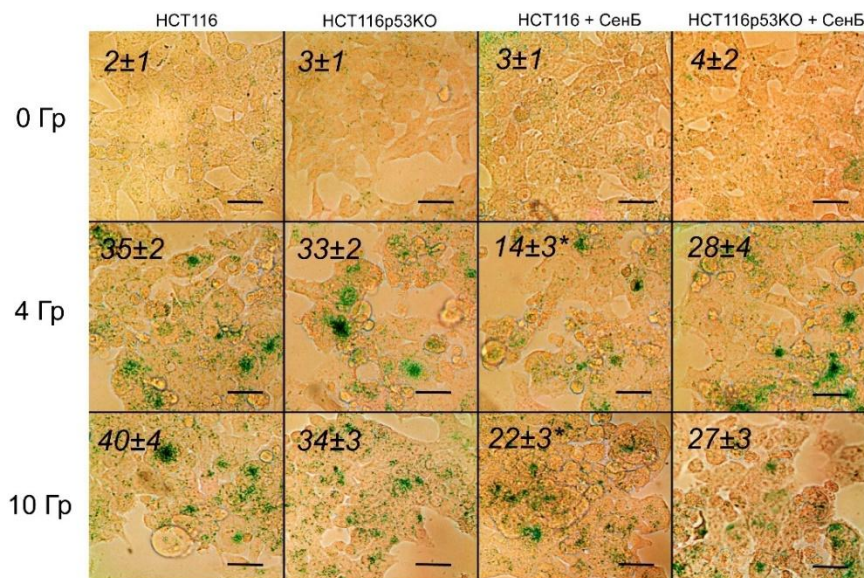


Рисунок 4 – Выявление β-галактозидазы через 3 дня после облучения 4 Гр с или без 1 мкМ сенексина Б. Показаны репрезентативные участки после просмотра не менее 100 клеток в 6 произвольно выбранных полях зрения. Линейка 100 мкм

**3.4. Активность p53-ассоциированных генов и белков при комбинации облучения и ингибитора CDK8/19.** Анализ мРНК проводился с помощью ПЦР в реальном времени, на изображениях (рис. 5) представлены средние значения из 3-х экспериментов и доверительные интервалы (вертикальные отрезки). Нормализация проводилась по гену *GAPDH*.

Активация *TP53* в клетках НСТ116 происходит в первые часы после облучения и достигает максимума через 12 часов – усиление приблизительно в 9 раз при облучении 4 Гр и в 13 раз в ответ на 10 Гр по сравнению с необлученными клетками. Через 24 ч после облучения экспрессия *TP53* снижалась: выше контроля приблизительно в 7 (4 Гр) и 9 раз (10 Гр). Ингибитор CDK8/19 в количестве 1 мкМ существенно снижал активацию *TP53* на

протяжении всего эксперимента приблизительно на 30-40%. Так, на пиковой точке 12 часов при воздействии излучения 4 Гр показано снижение активации гена до 6.5 (4 Гр) и до 10 (10 Гр) раз. Сублиния НСТ116р53КО давала незначительный сигнал.

Характер активации *CDKN1A* в облученных клетках НСТ116 схож с таковым для *TP53*: максимум достигается к 12 ч. В это время увеличение мРНК *CDKN1A* достигает 4-6 раз. Комбинация ионизирующего излучения и препарата Сенексин Б снижала экспрессию этого гена, однако не так выражено, как в случае *TP53* (15-20%).

Относительное количество мРНК *BBC3* в ответ на облучение увеличивалось одновременно с повышением мРНК *TP53*, достигая 3-4-кратного подъёма к 12 ч. К 24 ч мРНК *BBC3* снижалась, однако превышала контрольные значения в ~2-3 раза. Ген *BBC3* практически не экспрессируется в сублинии НСТ116р53КО.

Наконец, индукция гена *PMAIP1* в клетках выражена слабее, чем индукция *BBC3*. В линии НСТ116, *PMAIP1* практически не отвечает на облучение в дозе 4 Гр; даже при действии дозы 10 Гр активация этого гена не превышает 2-кратный уровень. В сублинии НСТ116р53КО зависимости относительного содержания мРНК *PMAIP1* от времени и дозы не наблюдается. Не было замечено каких-либо статистически значимых эффектов при добавлении препарата Сенексин Б.

Белок р53 активируется дозозависимым образом на протяжении всех 24 часов: при облучении дозой 4 Гр максимум индукции достигается к 6-12 часам и превышает контроль

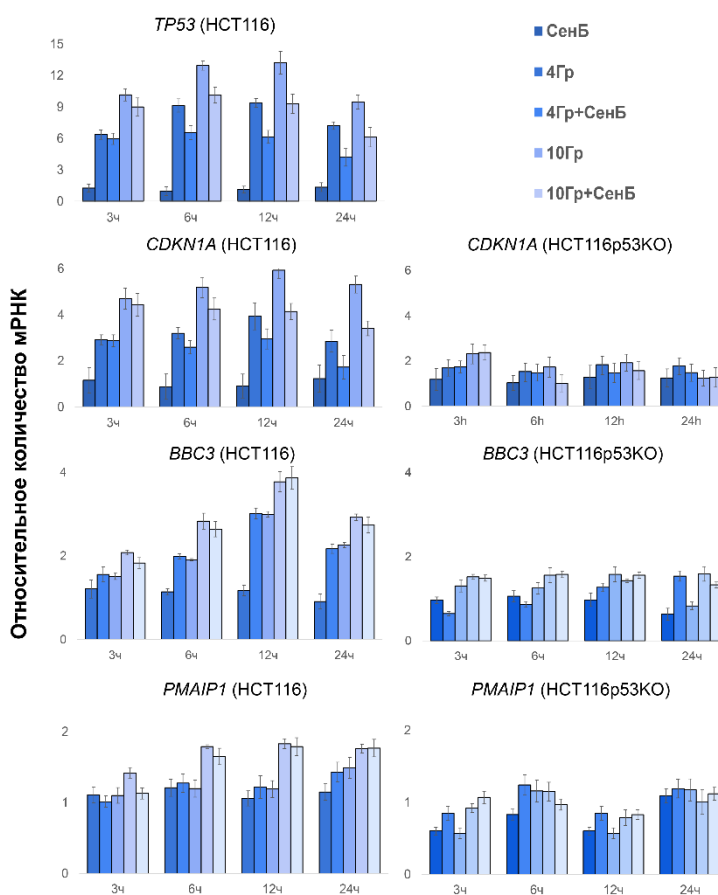


Рисунок 5 – Результаты ПЦР-анализа: экспрессия генов *TP53*, *CDKN1A*, *BBC3* и *PMAIP1* в клетках НСТ116 (WT и р53КО) после облучения дозами 0-10 Гр и при комбинации с препаратом 1 мкМ СенБ. По оси X – время после облучения, ч.



в 3.5-4 раза. 1 мкМ Сенексин Б с первых часов заметно снижал индукцию p53, на протяжении 12 часов индукция белка при комбинированном воздействии не превышала 2-2.5 относительно контроля, лишь к 24 часам эффект ингибирования ослабевал и количество относительно контроля выравнивалось (рис. 6).

Изменения p21 схожи с таковыми для p53, однако общее количество белка в ~2 раза ниже p53. Активация происходит в первые часы после облучения дозой 4 Гр, к 24 часам снижается, не отличаясь от контроля. Препарат СенБ также влиял на индукцию p21: на 3-6 часах она была в 2 раза ниже, чем при воздействии только радиацией. В НСТ116p53КО активность белка была ослабленной и практически не выявлялась.

Количество белка PUMA в облученных клетках НСТ116 изменяется в соответствии с нарастанием p53 и имеет количественное сходство с p21; Сенексин Б снижал активность PUMA. К 24 часам индукция падает. В сублинии НСТ116p53КО выявлены лишь следовые количества PUMA. Наконец, несмотря на p53-зависимую регуляцию, количество Noxa практически не зависело от доз облучения, синергетического эффекта и статуса p53.

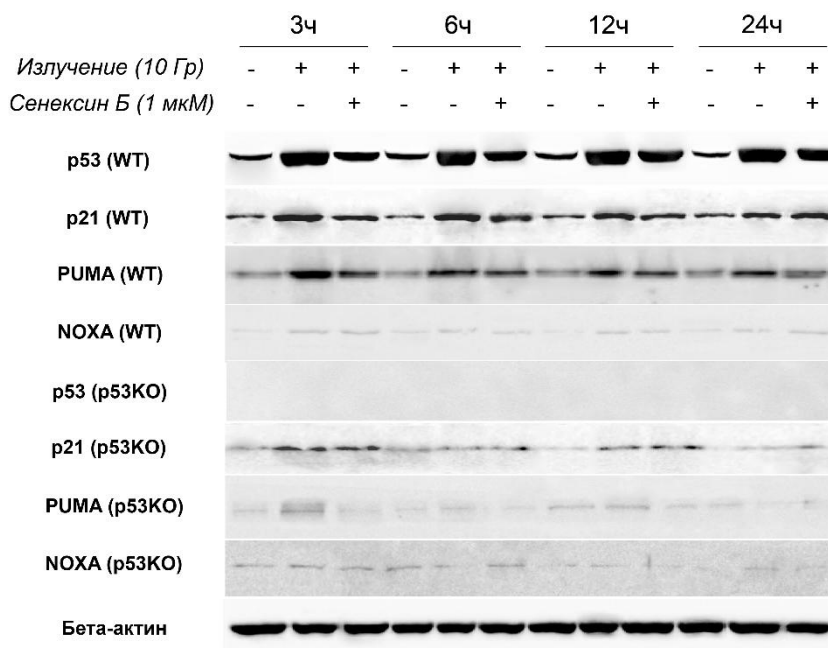


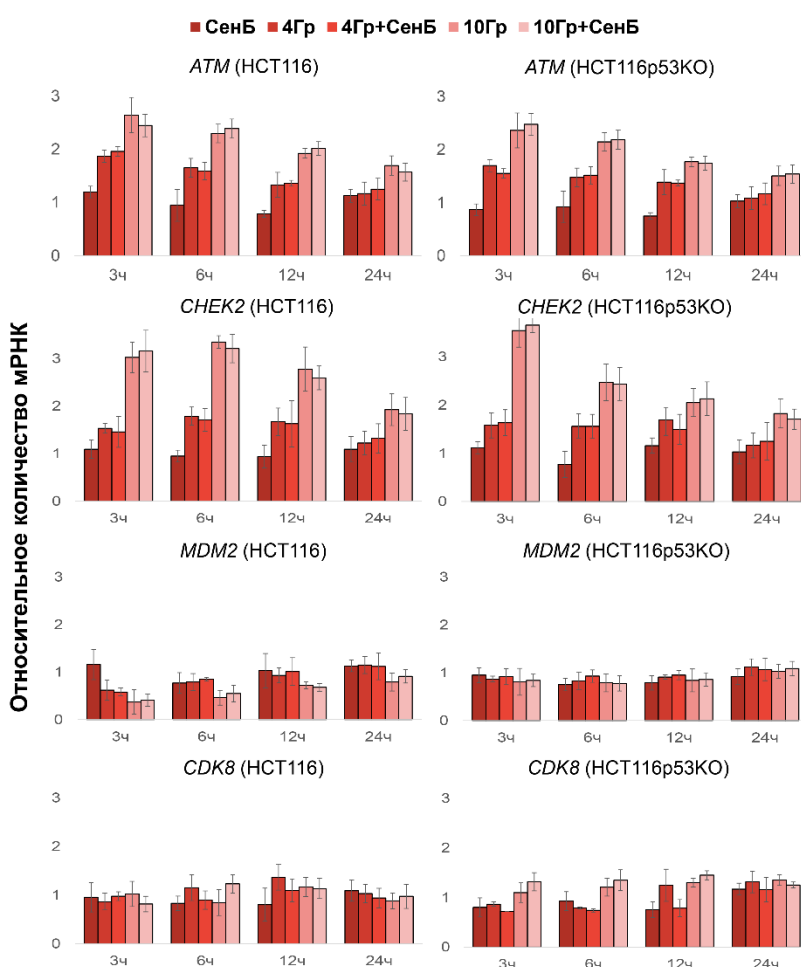
Рисунок 6 – Результаты иммуноблоттинга: индукция белков p53, p21, PUMA и Noxa в клетках НСТ116 (WT и p53КО) после облучения дозами 0-4 Гр и при комбинации с препаратом 1 мкМ СенБ. Вверху указано время после облучения, ч. Контроль - β-актин

**3.5. Влияние облучения и ингибитора CDK8/19 на активность генов и белков, регулирующих p53.** Анализ экспрессии гена *ATM*, продукт которого является первым звеном в каскаде, активируемом при двунитевых повреждениях ДНК, показал зависимость индукции гена исключительно от ионизирующего излучения (рис. 7). Через 3-6 часов после облучения дозой 4 Гр относительный уровень экспрессии гена в 1.9 раз превышал значения контроля, при облучении дозой 10 Гр – в 2.8 раз; далее активность гена спадала к контрольному значению.

В линии, нокаутной по р53, значения были схожими. Добавление СенБ никак не влияло на экспрессию гена.

Экспрессия *CHEK2* схожа с таковой для *ATM* – максимум активации происходит в первые часы после облучения. На 3 часа после облучения дозой 4 Гр относительный уровень экспрессии был равен 1.5, а для 10 Гр – 3.1. К 6 часам этот показатель незначительно вырос, после этого снижался и к 24 часам. Показатели характерны как для НСТ116 WT, так и для НСТ116p53КО.

Ионизирующее излучение заметно снижает транскрипционную активность гена *MDM2* в клетках с нормально-функционирующим р53. Через 3 часа после



облучения клеток НСТ116 WT дозами 4 и 10 Гр экспрессия гена падает до 0.5 и 0.35, соответственно. После этого, с 6 до 24 часов она восстанавливается и практически не отличается от контрольной. И снова – препарат Сенексин Б значительно не влиял на экспрессию этого гена.

Рисунок 7 – Результаты ПЦР-анализа: экспрессия генов *ATM*, *CHEK2*, *MDM2* и *CDK8* в клетках НСТ116 (WT и p53KO) после облучения дозами 0-10 Гр и при комбинации с препаратом 1 мкМ СенБ. По оси X – время после облучения, ч.

Наконец, роста или падения экспрессии *CDK8* не происходит как минимум на протяжении 24 часов после облучения клеток НСТ116 WT. К 12 часам экспрессия относительно контроля была равна 1.3 и 1.2 после облучения дозами 4 Гр и 10 Гр, эти данные не являлись статистически значимыми.

Следующим этапом был анализ изменений на трансляционном уровне. Индукция белка АТМ изменялась дозозависимым образом как в клетках с функционирующим p53, так и в нокаутной линии (рис. 8), максимум наблюдался к 3 часам и, по данным денситометрии, был равен 2-2.5 относительно интактного контроля. К 24 часам, индукция нормализовалась и была практически неотличима от контроля. Комбинация с 1 мкМ СенБ не влияла на индукцию.

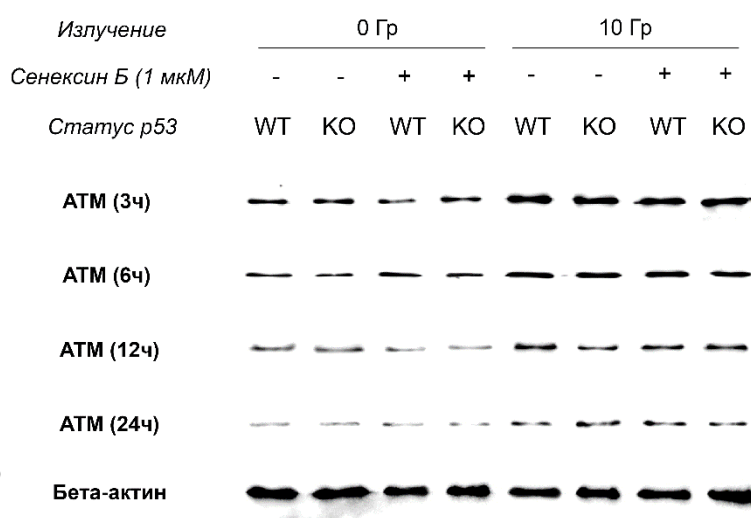


Рисунок 8 – Индукция белка АТМ в клетках НСТ116 после облучения дозами 0-4 Гр ± 1 мкМ СенБ. Иммуноблоттинг. Контроль – β-актин.

Индукция Chk2 полностью повторяла таковую у АТМ – селективный ингибитор CDK8/19 не влиял на активность белка, однако облучение дозой 4 Гр усиливало его активность в ~2.5 раза, этот эффект пропадал к 24 часам. Такой же профиль индукции наблюдается в НСТ116 с инактивированным p53. На рисунке 9 представлены результаты блоттинга с антителами к Chk2.

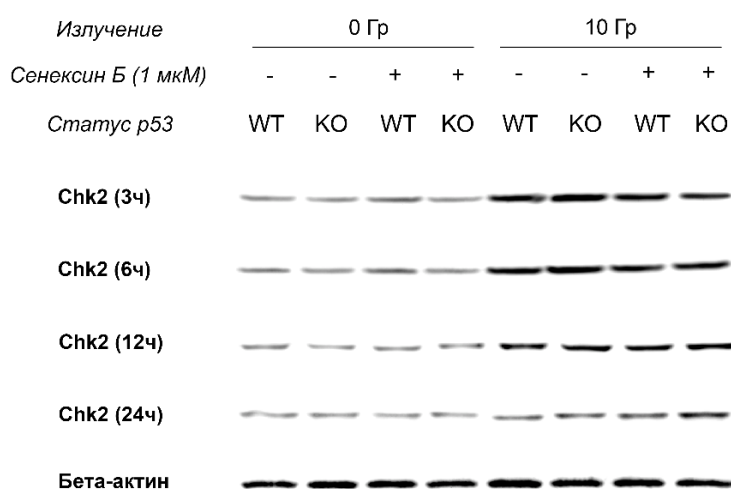


Рисунок 9 – Индукция белка Chk2 в клетках НСТ116 после облучения дозами 0-4 Гр ± 1 мкМ СенБ. Иммуноблоттинг. Контроль – β-актин.



Напротив, воздействие дозой 4 Гр подавляло активность Mdm2 на протяжении всех 24 часов (рис. 10). Через 12 часов после облучения, количество белка Mdm2 в НСТ116 WT было в 2 раза ниже, чем у необлучённых контролей. Сенексин Б реактивировал белок, при комбинации с излучением индукция возвращалась до уровня 0.75-0.8 от контрольной. К 24 часам эффект препарата ослаблялся. В клетках НСТ116p53КО Mdm2 не отвечал на облучение (не происходило регуляции через белок p53) и препарат.

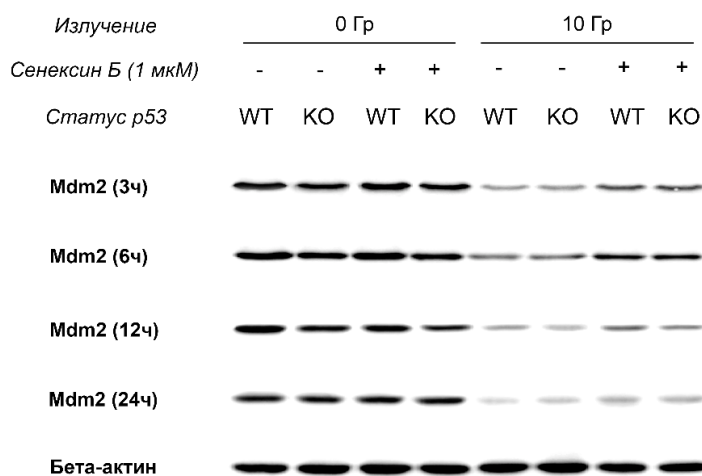


Рисунок 10 – Индукция белка Mdm2 в клетках НСТ116 после облучения дозами 0-4 Гр ± 1 мкМ СенБ. Иммуноблоттинг. Контроль – β-актин.

Исследование экспрессии *TP53* на клетках с нокаутом гена *CDK8* показало результаты, схожие с нокаутом *p53*: в линии НСТ116CDK8КО *TP53* практически не активировался в ответ на 10 Гр: относительный уровень мРНК *TP53* был в 4-5 раз ниже по сравнению с показателями в клетках с интактным *CDK8* (рис. 11).

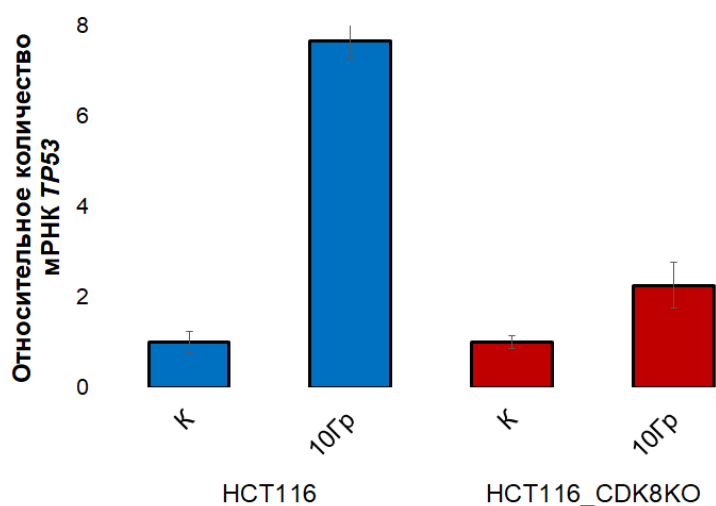


Рисунок 11 – Относительные уровни мРНК *TP53* в облученных клетках НСТ116 с различным статусом гена *CDK8*. Контроль (К) – необлученные клетки/ Представлены средние значения 3-х экспериментов и доверительные интервалы.

По аналогии с результатами экспрессии, проведена оценка индукции белка p53 при комбинации облучения с сенексином Б в клетках с нокаутом *CDK8*. Результаты представлены на рисунке 12. Индукция p53 подавляется в сублинии НСТ116CDK8КО, эффект не регулируется ингибитором *CDK8/19*.

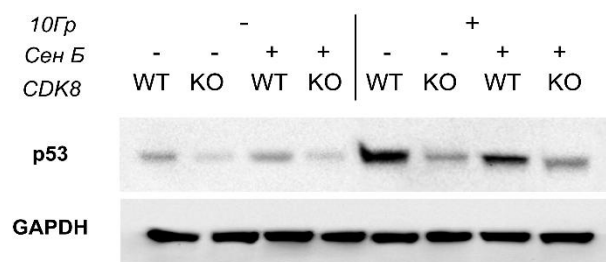


Рисунок 12 – Иммуноблоттинг p53 в клетках HCT116 с различным статусом CDK8. В качестве контроля нанесения белков использовали β-

### 3.6. Взаимодействия NFκB, p53 и CDK8/19.

Для выявления связи CDK8/19, NFκB и p53 в ответах на облучение использованы ингибиторы CDK8/19: сенексин Б и BI1347, а также MRT67307 - ингибитор NFκB их комбинации без облучения и при облучении 10 Гр. На рисунке 13 показано, что ингибиторы и их комбинация не влияют на экспрессию *TP53* и *CDKN1A* без облучения. При облучении, как ожидалось, активировались исследуемые гены, а ингибиторы CDK8/19 снижали этот эффект на 35-40% относительно облучения без ингибиторов. Ингибиторы NFκB дали схожий ответ – экспрессия *TP53* снизилась с 7.6 (10 Гр) до 4.5 (10 Гр + MRT67307), а *CDKN1A* с 4.5 (10 Гр) до 2.6 (10 Гр + MRT67307) раз. Однако, при комбинации двух ингибиторов разных механизмов – сенексин Б + MRT67307 или BI1347 + MRT67307 – экспрессия генов в облученных клетках практически восстанавливалась. Эксперимент независимо воспроизведен на нетрансформированных клетках эмбриона почки человека HEK293, эффекты подтверждены: восстановление активности генов *TP53* и *CDKN1A* при одновременном ингибировании CDK8/19 и NFκB во время лучевого воздействия.

Наконец, вышеописанные данные подтвердились с помощью исследования ответов на трансляционном уровне. Результаты представлены на рисунке 14. В то время как облучение клеток HCT116 или HEK293 в присутствии одного из ингибиторов (CDK8/19 или NFκB) подавляет индукцию p53, комбинация ингибиторов практически полностью восстанавливает уровень p53.

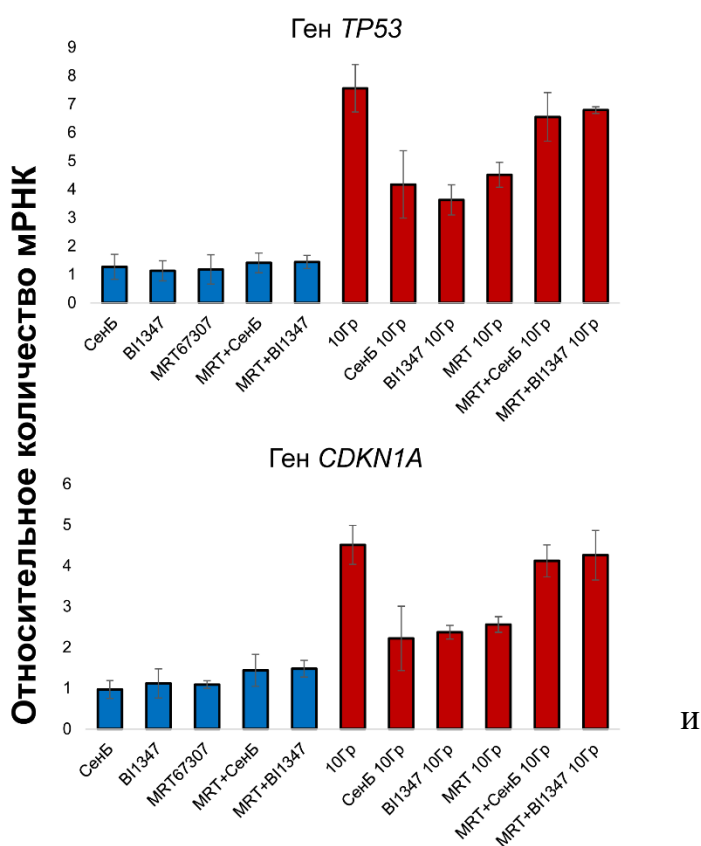


Рисунок 13 – мРНК *TP53* в клетках HCT116 в зависимости от статуса CDK8, облучения и ингибирования

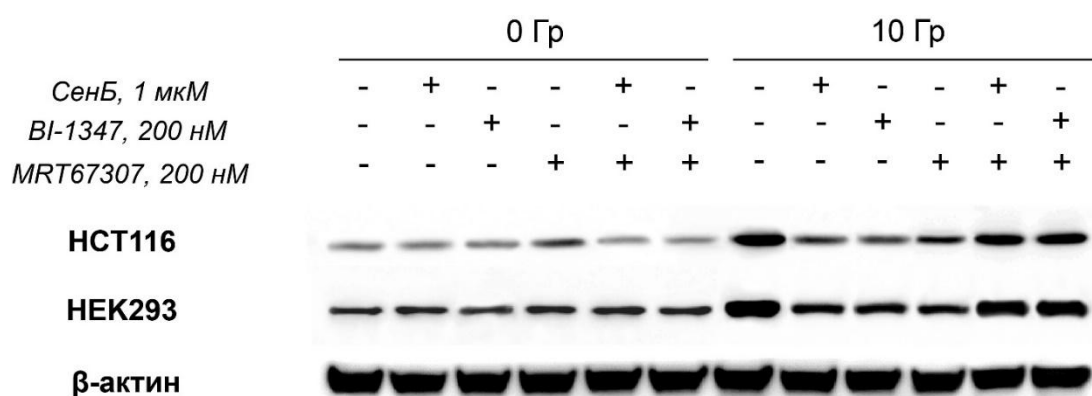


Рисунок 14 – Иммуноблоттинг p53 в клетках НСТ116 и НЕК293 через 24 ч после комбинированного воздействия облучения и ингибиторов CDK8/19 (сенексин Б, В11347) и NFκB (MRT67307)

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Фактор транскрипции p53 регулирует многочисленные функции, главным образом - баланс выживания/гибели клеток посредством модуляции активности генов, продукты которых модулируют смену фаз клеточного цикла и репарацию ДНК (Joerger, Fersht, 2007; Muller et al., 2011). Активность p53 в клетках контролируется в основном за счет регуляции его стабильности посредством Mdm2, Wip1, p53BP (Chen et al., 1994; Bouvard et al., 2011; Lu et al., 2008; Mirza-Aghazadeh-Attari et al., 2019). Стабильность регулируется и посредством фосфорилирования/дефосфорилирования аминокислотных остатков p53 протеинкиназами АТМ, АТР, Chk1/2 в ответ на повреждения ДНК, в частности, при ионизирующем излучении (Canman et al., 1998; Saito et al., 2002). Таким образом, p53 – важнейший сенсор ответов клеток на стресс.

Очевидно, p53 как регулятор экспрессии генов функционирует во взаимосвязи с другими компонентами транскрипционного аппарата. Есть основания полагать, что это компоненты быстрой адаптации экспрессии генов – циклинзависимые транскрипционные протеинкиназы: CDK7, CDK8/19, CDK9, CDK11 и др (Sun et al., 2020; Rimel et al., 2020; Dannappel et al., 2019; Mazan et al., 2019; Thieme et al., 2021; Zhang et al., 2018; Kwiatkowski et al., 2014).

В настоящей работе впервые показан и проанализирован механизм, через который протеинкиназа CDK8 и ее паралог CDK19 могут влиять на процессы выживаемости и гибели опухолевых клеток через модуляцию p53.

Изучение метаболической активности клеток и распределение фаз клеточного цикла в присутствии селективного ингибитора CDK8/19 сенексина Б позволило установить факт радиосенситизации клеток НСТ116, НЕК293 (интактный p53). Ингибитор не только на 30-40% эффективнее запуская гибель

клеток при комбинации с облучением (по сравнению с облучением без сенексина Б), но и препятствовал задержке в  $G_2/M$ , не позволяя клеткам «избегать» апоптоза посредством остановки клеточного цикла с последующей репарацией. Принимая во внимание отсутствие подобного эффекта на клетках с нокаутным p53, логично связать активность CDK8/19- и p53-зависимых процессов.

Важной для апробации и применения на практике деталью оказалось полное отсутствие цитостатических и цитотоксических эффектов 1 мкМ сенексина Б в течение минимум 14 дней независимо от статуса p53. Негативные для опухолевых клеток эффекты ингибирования CDK8/19 проявляются только как синергия при генотоксических воздействиях, например при химио- и лучевом воздействии.

Метод колониеобразования (клоногенный анализ) используется как «золотой стандарт» для определения способности отдельной опухолевой клетки к выживанию и формированию потомства. Этот метод первоначально был использован для оценки изменений в механизмах пролиферации клеток после ионизирующего излучения и химиотерапии, что позволяло оценить радиорезистентность опухолей различных локализаций и сенсibiliзирующие эффекты при скрининге различных соединений (Rajendran, Jain, 2018). Нами выявлены дозозависимые эффекты подавления формирования колоний клетками НСТ116, которые значительно усиливались при комбинировании ионизирующего излучения и воздействия ингибитором CDK8/19. Что касается нокаутных по p53 клеток, то тут – как и в случае теста МТТ на выживаемость опухолевой популяции – НСТ116p53КО были намного более чувствительны к облучению даже средними (4 Гр) дозами, в то время как добавление 1 мкМ сенексина Б практически не усиливало цитотоксичность. Это говорит, с одной стороны, о важности p53 для выживаемости и восстановления клеток, подвергшихся генотоксическому стрессу; с другой стороны – о существовании CDK8/19-зависимого механизма, реализующегося только в p53-положительных клетках колоректального рака, что, безусловно, важно для клиники.

Ещё один цитологический метод, позволяющий оценить вклад означенной выше комбинации в процесс долговременной выживаемости и гибели клеток, является окраска на внутриклеточные  $\beta$ -галактозидазы – маркеры клеточного «старения». Известно, что большинство клеток человека претерпевают клеточное старение после накопления фиксированного количества клеточных делений или при воздействии различных стрессовых стимулов в культуре. Важно, что опухолевые клетки способны приобретать подобный старению фенотип не погибнув в результате химиолучевого воздействия. Облучение дозами 4 и 10 Гр приводит к росту количества «стареющих» клеток НСТ116, и – в меньшей мере – клеток с неактивным p53. Интересно, что лечение клеток Сенексином Б снижало количество окрашенных клеток в 2-3 раза для обеих сублиний, однако полностью

не предотвращало их старение. Поскольку считается, что стареющие клетки вносят вклад в развитие возрастных патологий и понижают эффективность противоопухолевой терапии, уменьшение их количества потенциально может помочь в лечении таких случаев (Itahana et al., 2007). Более того, процессы клеточного старения связывают непосредственно с p53-зависимым механизмом избегания опухолями апоптоза (Mijit et al., 2020), поэтому подавление наработки SA-бета-галактозидаз через ингибирование CDK8/19 выглядит привлекательным для дальнейших исследований.

Наконец, изучение двух групп генов (p53-регулирующих и p53-регулируемых) и кодируемых ими белков позволило выяснить – на каких уровнях происходит эта регуляция и каким образом реализуются механизмы радиосенситизации клеток НСТ116 при действии препаратов-ингибиторов CDK8/19: Сенексина Б, В1-1347. Важно, что ответ на комбинацию препарата и ионизирующего излучения наблюдался только в клетках с функционирующим p53 и только на уровне регуляции *TP53* и ниже по молекулярному каскаду (подавление экспрессии p53-зависимых генов и белков). Сенсор двунитевых повреждений ДНК - АТМ, также как и зависящая от него киназа контрольной точки Chk2, отвечали исключительно на радиотерапевтическое воздействие. На транскрипционном и трансляционном уровне CDK8 оказался индифферентен как к воздействию терапевтических доз облучения, так и к 1 мкМ препарата СенБ. Это не удивительно, поскольку соединение является ингибитором киназной активности CDK8 и CDK19, а не их синтеза. Несмотря на обнаружение конкретных участников описанного каскада оставалось неясным - существуют ли промежуточные факторы регуляции p53 через CDK8/19?

Транскрипционный фактор NFκB регулирует выживаемость клеток при стрессовых воздействиях (Ryazantseva et al., 2010; Wu, Lozano, 1994). Группой И. Ронинсона установлена способность CDK8/19 усиливать индукцию транскрипции ряда генов с участием NFκB (Chen et al., 2017). Наши исследования подтвердили участие этого транскрипционного фактора в регуляции p53 в ответ на лучевые воздействия. Добавление MRT67307 - ингибитора ТВК1 и ИККε – за 1-3 часа до облучения приводит к трансляционному и транскрипционному подавлению p53. Этот эффект можно объяснить следующим образом: ДНК-повреждающие стимулы, в частности, ионизирующее излучение, могут активировать фермент ИκВ-киназу (ИККε). ИКК, в свою очередь, фосфорилирует белок ИκВα, что приводит к диссоциации ИκВα от NFκB и протеасомной деградации последнего (Brasier, 2006; Perkins, 2007; Concetti, Wilson, 2018). Это, в свою очередь, приводит к активации p53 (Pal et al., 2014; Carrà, 2020). Ингибирование ИККε приводит к стабилизации NFκB и подавлению p53, что и подтверждено нами методами ПЦР и иммуноблоттинга. Иная картина наблюдается при

одновременном ингибировании CDK8/19 и ИКК $\epsilon$ : индукция TP53 и его продукта почти полностью восстанавливается - эффекты супрессии каждым ингибитором в отдельности снимаются при их комбинации. Вероятное объяснение состоит в следующем: CDK8/19 и NF $\kappa$ B кооперируют в индукции провоспалительных цитокинов; ингибирование сенексином Б или инактивация shRNA CDK8/19 подавляет NF $\kappa$ B-опосредованные сигналы, но не влияет на его стабильность или транслокацию (Chen et al., 2017).

В литературе описаны и другие факторы, способные создать схожий с описанным в диссертации транскрипционный профиль. Опухолевый супрессор FBXO31 способен влиять на уровень p53 через подавление активности Mdm2 (Malonia et al., 2015), при этом опосредуя деградацию циклина D1, вызывая задержку клеточного цикла на границе G<sub>1</sub>/S (Santra et al., 2009). Ингибирование CDK8/19 повышает чувствительность клеток HER2-положительного рака молочной железы к препаратам, нацеленным на HER2, и влияет на связывание ряда сигнальных белков с рецепторами эпидермального фактора роста, преодолевая лекарственную устойчивость (Ding et al., 2022). Требуется дальнейший анализ молекулярных взаимодействий и путей регуляций CDK8/19, что выходит за пределы настоящего исследования.

В практическом отношении установленные в работе эффекты снижения активации p53 при ингибировании CDK8/19 могут найти применение в онкологической клинике: ингибиторы CDK8/19 нетоксичны при длительном применении *in vivo* (клинические испытания отдельных классов этих соединений начаты). Фактически ингибиторы CDK8/19 функционируют как нокаут p53, отменяя задержку клеточного цикла и усиливая лучевые повреждения. Требуются детальный систематический анализ механизмов и доклинические испытания. Однако необходимо учитывать возможность видоспецифической регуляции перепрограммирования транскрипции, в частности, различной чувствительности клеток человека и грызунов к ингибиторам CDK8/19.

## **ВЫВОДЫ:**

1. Низкомолекулярные селективные ингибиторы циклинзависимых протеинкиназ 8 и 19 (CDK8/19) повышают гибель клеток колоректального рака человека с интактным p53 (линия НСТ116) в ответ на ионизирующее излучение (диапазон терапевтических доз 2-10 Гр). Этот эффект сопровождается снижением доли клеток с фенотипом «старения» и предотвращением задержки клеточного цикла. В изогенной сублинии НСТ116p53КО (отсутствует p53) ингибирование CDK8/19 не влияет на жизнеспособность облученных клеток.

2. Облучение клеток НСТ116 вызывает срочную (в первые часы) активацию экспрессии р53-зависимых генов и белков *TP53* (p53), *CDKN1A* (p21) и *BBC3* (PUMA). В облученных клетках НСТ116р53КО эти гены не активируются.

3. В регуляции выживания в ответ на облучение ингибирование CDK8/19 при интактном р53 эквивалентно нокауту гена *TP53*: ингибитор CDK8/19 повышает радиочувствительность клеток.

4. Ингибиторы CDK8/19 и делеция генов обеих протеинкиназ снижают срочную активацию гена *TP53* в ответ на облучение. Установлена роль перепрограммирования транскрипции в индукции р53-зависимых ответов.

5. Кофактор перепрограммирования транскрипции NFκB частично опосредует срочную активацию *TP53* в облученных клетках. При облучении с одновременным применением ингибиторов NFκB и CDK8/19 уровень мРНК р53 восстанавливается, предполагая сложный механизм регуляции гена *TP53*.

6. Нетоксичные селективные ингибиторы перепрограммирования транскрипции перспективны как компоненты сочетанных режимов терапии р53-зависимых опухолей.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Научные статьи, опубликованные в изданиях, рецензируемых в базах данных Scopus, Web of Science и рекомендованных ВАК РФ**

1. **Кучур О.А.**, Кучур П.Д., Кузьмина Д.О., Завирский А.В., Штиль А.А. Дифференциальная регуляция BBC3/PUMA и RMAIP1/Noxa при ионизирующем излучении: роль р53 // Цитология. – 2021. - Т.63, №4. - С. 363-372. DOI: 10.31857/S0041377121040039.

2. **Кучур О.А.**, Кузьмина Д.О., Духинова М.С., Штиль А.А. Белки семейства р53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение: развитие проблемы // Acta Naturae. – 2021. - Т.13, №3. - С. 65-76. DOI: 10.32607/actanaturae.11247.

3. **Кучур О.А.**, Завирский А.В., Штиль А.А. Перепрограммирование транскрипции в регуляции выживания опухолевых клеток при ионизирующем излучении: роль р53 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. - Т.174, №11. - С. 621-627. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-11-621-627.

**Материалы научных конференций, опубликованные в других изданиях**

4. **Кучур О.А.**, Платонова Е.Ю., Завирский А.В., Зацепин В.В., Ронинсон И.Б., Штиль А.А. Ингибирование CDK8/19-зависимого перепрограммирования транскрипции - новый механизм радиосенситизации р53-положительных опухолевых клеток. XIII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Казахстан. – 2022 - С. 916.

5. **Кучур О.А.**, Штиль А.А. Ингибирование р53 через CDK8/19 повышает чувствительность опухолевых клеток к ионизирующему излучению. VIII

международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, Новосибирск. – 2021 - С. 379.

6. **Kuchur O.**, Zavriskiy A., Shtil A. Attenuation of p53 signaling by CDK8/19 sensitizes tumor cells to ionizing radiation. MAP Virtual Congress-2021, ESMO. – 2021 - S1358.

7. **Кучур О.А.**, Штиль А.А. Роль статуса p53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение при ингибировании CDK8/19». XXXIII зимняя международная молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва. – 2021 - С. 208.

8. **Кучур О.А.**, Завирский А.В., Штиль А.А. Молекулярные механизмы чувствительности опухолевых клеток к терапевтическому ионизирующему излучению: p53 и CDK8/19. 24-ая Международная Пуцинская школа-конференция «Биология – наука XXI века», Пушкино. – 2020 - С. 218.

9. **Кучур О.А.**, Штиль А.А. Роль статуса p53 в ответ на ионизирующее излучение в линии клеток колоректального рака HCT116. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020», Москва. – 2020 - С. 1.

10. **Kuchur O.**, Zavriskiy A., Basharin V., Shtil A. The role of p53 status in response to ionizing radiation. International Conference on Radiation Applications (RAP 2020), Греция. – 2020 - С. 32.

## **Патент**

11. Пат. 2777869 РФ. «Способ усиления гибели опухолевых клеток при комбинации ионизирующего излучения и ингибитора CDK» / Кучур О.А., Завирский А.В., Башарин В.А., Духинова М.С., Штиль А.А. // Заявка: 2020131326, регистрация патента RU 2777 869 С2 на изобретение от 11.08.2022; Роспатент.

## **БЛАГОДАРНОСТЬ**

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю, Штилю Александру Альбертовичу за руководство работой, наставничество, советы по постановке экспериментов и интерпретации результатов, Ронинсону И.Б. (Университет Южной Каролины, США) за предоставление материалов и обсуждение результатов.

Автор благодарит всех соавторов статей и коллег по работе над проектами, сотрудников Химико-Биологического кластера ИТМО - к.б.н. Духинову М.С., к.б.н. Фахардо А.Ф. за кураторство и советы по выпускной работе, отдельная благодарность кафедре военной токсикологии и медицинской защиты Военно-Медицинской Академии им. С.М. Кирова в лице Завирского А.В. и Башарина В.А. за помощь в проведении экспериментов с радиотерапевтической установкой РУМ-17.