

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доцент, к.б.н. Нипорко Олексій Юрійович
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 2022 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ СИНТЕТИЧНИХ ЛЕТАЛЬНИХ ВЗАЄМОДІЙ МІЖ
ГЕНАМИ СИСТЕМИ РЕПАРАЦІЇ ДНК**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності
091 Біологія
ОП «Біоінформатика і структурна біологія»
Кириленко Лілії Олександрівни

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к.б.н. **Самофалова Дарія Олексіївна**

Робота виконана під керівництвом наук. спів. відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної Установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», к.б.н Самофалової Д.О.

Оцінка захисту роботи

АНОТАЦІЯ

Кириленко Л. О. - Дослідження синтетичних летальних взаємодій між генами системи репарації ДНК. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика та структурна біологія».

У роботі проведено дослідження синтетичних летальних взаємодій між генами системи репарації ДНК та регулятором клітинного циклу CDKN1A. За результатами високопропускового CRISPR/Cas9 скринінгу було виявлено 6 генів, що проявляють синтетичну летальність з CDKN1A. Отримані результати було вадідовано в незалежній клітинній моделі HCT15 (колоректальна аденокарцинома). Наступна частина аналізу була спрямована на пошук синтетичних летальних взаємодій між генами комплексу ремодуляції хроматину mSWI/SNF та CDKN1A. Було виявлені три найкращі кандидати, що демонструють синтетичну летальність з CDKN1A. Ці три кандидати будуть використані для подальшої валідації в тваринних моделях. Отримані результати можуть бути застосовані для розробки нових підходів таргетної терапії раку.

Ключові слова: синтетична летальність, синтетична дозована летальність, репарація ДНК, p21, mSWI/SNF.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Розпізнавання пошкоджень ДНК	7
1.1.1 Походження пошкодження ДНК.....	7
1.1.2 Від пошкодження ДНК до репарації ДНК	9
1.1.3. Механізми репарації дволанцюгових розривів.....	11
1.2. Синтетична летальність та синтетична дозована летальність	14
1.3. Зв'язок мутацій в генах репарації ДНК з розвитком онкологічних захворювань	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	23
2.1. Клітинні культури.....	23
2.2. Вестерн-блот.....	24
2.3. Комп'ютерний аналіз.....	24
2.4. Клоногенний аналіз.....	24
2.5. Кількісна ПЦР	25
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
3.1 Пошук генів, що належать до родини репарації ДНК та аналіз їх експресії.	26
3.2. Генерація стабільних клітинних ліній, що експресують Cas9.....	28
3.4 Інтерпретація синтетичних летальних взаємодій та їх валідація в додатковій клітинній моделі	31
3.5 Аналіз синтетичних летальних взаємодій між членами mSWI/SNF комплексу та CDKN1A.....	33
ВИСНОВКИ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	38

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
УФ – ультрафіолетове випромінювання;
АФК – активні форми кисню;
MMR – Mismatch Repair;
BER – Base Excision Repair;
NER – Nucleotide Excision Repair;
АТМ - Ataxia telangiectasia mutated;
АТР - Ataxia telangiectasia Rad3 related;
CHK – Checkpoint Kinase;
НАД – Нікотинамідаденіндинуклеотид;
ДНК-ПК – ДНК-залежна протеїнкіназа;
CDKN1A - Cyclin dependent kinase inhibitor 1A;
оцДНК - одноланцюгова ДНК;
SWI/SNF - SWItch/Sucrose Non-Fermentable.

ВСТУП

Рак – це діагноз, який змінює життя. Людство вже витратило мільярди доларів на пошуки нових способів і вдосконалення існуючих способів боротьби з раком, але проблема досі залишається невирішеною. Найбільш розповсюджені методи лікування онкологічних захворювань вимагають використання високих доз радіації або токсичних хімічних речовин, які завдають значної шкоди нормальній тканині. Щоб вирішити цю проблему, вчені нещодавно звернулися до фундаментальної біологічної концепції, відомої як синтетична летальність, яка використовує взаємодії між парами генів. Синтетична летальність - це генетична комбінація мутацій у двох генах, що призводить до загибелі клітини, тоді як мутація в будь-якому з генів поодиноці - ні. Отже, якщо один ген є специфічним для ракових клітин, то він забезпечує пухлинний контекст, у якому другий ген стає вразливою мішенню.

Наші клітини піддаються впливу безлічі екологічних та метаболічних стресових факторів, які викликають мутації та порушують цілісність нашого геному, що призводить до помилок у ДНК. На щастя, пошкоджені клітини можуть використовувати різноманітні механізми для полегшення відновлення як одноланцюгових, так і дволанцюгових розривів. Пошкодження ДНК необхідно спочатку розпізнати, перш ніж його можна буде виправити, і ця робота призначається генам репарації пошкоджень ДНК.

Комплекс ремоделювання хроматину mSWI/SNF (також відомий як BAF комплекс) бере участь у кількох біологічних функціях, включаючи диференціацію, проліферацію та репарацію ДНК. Втрата субодиниць SWI/SNF була показана в різних типах ракових клітин і значна кількість експериментальних даних свідчить про те, що цей комплекс працює як пухлинний супресор. Згідно з дослідженнями секвенування геному раку, мутації в генах, що кодують субодиниці комплексів ремоделювання хроматину mSWI/SNF, були виявлені приблизно в 25% усіх злоякісних новоутворень.

Відсутність нормальної регуляції клітинного циклу ссавців є одним з основних двигунів, що сприяє клітинній трансформації. У відповідь на різноманітні подразники інгібітор циклінзалежної кінази 1A (CDKN1A) викликає зупинку клітинного циклу. Некориговані ураження ДНК активують ген-супресор пухлини p53, який може блокувати циклінзалежні кінази CDK2 і CDK4, індукуючи експресію p21, що призводить до зупинки клітинного циклу в стадії G1 і запобіганню потенційної реплікації ДНК. Внаслідок його регуляторної ролі клітинного циклу та впливу на контроль росту CDKN1A розглядався переважно як пригнічувач пухлини з мутацією втрати функції (LOF), ідентифікованою при різних злоякісних пухлинах.

Метою цього дослідження є знайти такі синтетичні летальні взаємодії між генами CDKN1A і членами BAF комплексу, щоб при «вимкненні» обох генів це призводило до загибелі ракових клітин, але коли «вимкнено» тільки один ген, клітина залишалась здоровою і життєздатною. Ця робота є актуальною, адже виявлення синтетичних летальних взаємодій між членами BAF комплексу і CDKN1A забезпечить появу нових стратегій, які можна буде використовувати для лікування раку.

Відповідно до мети були поставлені наступні *завдання* до виконання магістерської кваліфікаційної дипломної роботи:

- Провести пошук та аналіз генів учасників репарації з використанням різноманітних шляхів відновлення пошкодження ДНК.
- Встановити рівень експресії кожного цільових генів у клітинних лініях.
- Створити Cas9-експресуючі HCT15 та HeLa клітинні лінії для застосування системи CRISPR/Cas9.
- З використанням високопропускового CRISPR/Cas9 скринінгу встановити гени пов'язані з репарацією ДНК.
- Валідувати результати високопропускового CRISPR/Cas9 скринінгу на незалежній клітинній моделі.
- Провести аналіз синтетичних летальних взаємодій.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Розпізнавання пошкоджень ДНК

Генетичний матеріал всередині наших клітин постійно піддається різним пошкодженням. Підраховано, що ДНК в клітинах людини може зазнавати до сотень тисяч уражень на день [1], які, якщо їх не виправити належним чином, можуть сприяти геномній нестабільності, одній із основних ознак раку [2].

1.1.1 Походження пошкодження ДНК

Пошкодження ДНК може виникнути як наслідок зовнішнього (екзогенного походження) або внутрішнього (ендогенного походження) клітинного стресу або нормальних клітинних процесів. Екзогенні джерела пошкодження ДНК включають фізичні та хімічні агенти. До фізичних агентів відносять ультрафіолетове (УФ) випромінювання та іонізуюче випромінювання, які можуть викликати різноманітні ураження ДНК. УФ-випромінювання може призвести до утворення димерів циклобутану піримідину і фотопродуктів піримідин 6-4 піримідону, які змінюють конформацію спіралі ДНК. УФ-промені також можуть викликати утворення активних форм кисню (АФК) всередині клітин. Ураження, викликані УФ-променями, можуть розвиватися в одноланцюгові і дволанцюгові розриви [3]. Іонізуюче випромінювання, таке як вплив рентгенівських променів, здатне створювати одно- та дволанцюгові розриви, а також генерувати АФК [4].

Хімічні агенти включають канцерогенні та мутагенні молекули. Хімічні частинки, отримані від куріння тютюну можуть призвести до утворення аддуктів [5] і окисного пошкодження, що пов'язують із підвищеною ймовірністю розвитку різноманітних видів раку, зокрема, але не обмежуючись [6-7] тих, які пов'язані з дихальною системою, яскравим прикладом є рак

легенів [8]. Важливо, що багато протипухлинних препаратів підпадають під цю категорію і функціонують на основі швидкої проліферації та низької здатності до відновлення ракових клітин. Деякі з цих сполук є зшиваючими агентами, такими як сполуки азотистого іприту, хіміотерапевтичні засоби на основі платини та мітоміцин С, які можуть індукувати внутрішньо- або міжланцюгові ковалентні зв'язки між основами ДНК [9]. Натомість інші молекули викликають алкілування ДНК, як, наприклад, темозоломід або метансульфонат [10 - 11], або індують пошкодження ДНК через інгібування топоізомерази, як це є механізмом дії етопозиду і камптотецину [12 - 13].

Пошкодження ДНК також може виникнути на основі ендogenous стресу, що виникає внаслідок нормального метаболізму в клітинах. Помилки, що виникають під час реплікації ДНК, що є важливим кроком на шляху до поділу клітини, можуть бути відповідальними за утворення невідповідності основ і зміщення в послідовності ДНК, зупинку реплікації та/або утворення дволанцюгових розривів. Інші ендogenous процеси, які можуть призвести до ураження ДНК, включають гідроліз, окислення, алкілування, індукцію дволанцюгових розривів для рекомбінації під час мейозу або рекомбінації V(D)J для виробництва імуноглобуліну, а також вплив АФК [14].

Різні пошкодження ДНК відновлюються за допомогою різних механізмів. Репарація помилково спарених нуклеотидів (Mismatch Repair, MMR) активується, щоб відновити неправильні основи та встановити правильну послідовність; ексцизійна репарація основ (Base Excision Repair, BER) використовується для корекції хімічних змін основ ДНК, таких як AP-сайти (AP site або abasic sites), ураження 8-охо-G (гуанін) або одноланцюгові розриви, що походять з ендogenous джерел, таких як АФК, або екзogenous, таких як алкілюючі агенти; і ексцизійна репарація нуклеотидів (Nucleotide-Excision Repair, NER) може коригувати піримідинові димери або внутрішньоланцюгові поперечні зшивки, що виникають внаслідок агресивних факторів, таких як вплив ультрафіолетового світла. Відновлення дволанцюгових розривів відбувається шляхом гомологічної рекомбінації або

негомологічного з'єднання кінців. Описані шляхи дуже важливі для підтримки цілісності геному, а дефіцит генів або білків, які в них задіяні, може призвести до розвитку патологій, часто пов'язаних із підвищеною чутливістю до пошкодження ДНК.

1.1.2 Від пошкодження ДНК до репарації ДНК

Щоб захистити себе від руйнівних наслідків некоригованих уражень ДНК, клітини задіють складний сигнальний каскад відповіді на пошкодження ДНК, що складається з датчиків пошкодження ДНК, перетворювачів сигналів та ефекторів [15]. Серед ключових компонентів у відповіді на пошкодження ДНК є АТМ (Ataxia telangiectasia mutated) і АТР (Ataxia telangiectasia Rad3 related), дві кінази, які активують ряд білків, щоб уповільнити прогресування клітинного циклу на різних контрольних точках або, якщо необхідно, тимчасово зупинити його, щоб дати клітині додатковий час, щоб її механізми відновлення ДНК могли виправити пошкодження та запобігти посиленню помилок або загибелі клітини. Одночасно ці кінази та їх мішені, такі як СНК1 (Checkpoint Kinase 1) і СНК2 (Checkpoint Kinase 2), беруть участь в активації та залученні інших білків, залучених до відновлення пошкодження ДНК. Зазвичай вважається, що АТР активується для відновлення одноланцюгових розривів і налагодження зупинених вилок реплікації, а АТМ активується для дволанцюгових розривів.

Іншим білком, який бере участь у залученні факторів репарації до місць пошкодження ДНК, є PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase). PARP-1 є основним членом сімейства білків PARP, доповнений іншими 17 білками. Хоча білки PARP були пов'язані з широким спектром клітинних функцій, лише PARP-1, PARP-2 і PARP-3 мають функцію у відповіді на пошкодження ДНК. Ці білки PARP синтезують PAR (polymers of ADP-ribose) з використанням НАД⁺ як субстрату, який служить як каркас для полегшення рекрутингу білків, і для передачі сигналів. PARP-1 може бути виявлений в місцях пошкодження протягом мілісекунд і бере участь у залученні комплексу

MRN (MRE11/RAD52/NSB1) [16 - 17], який потім сприяє активації ATR, ATM і ДНК-ПК. Протягом кількох хвилин ці три кінази фосфорилують білки, необхідні для передачі сигналів і відновлення пошкоджень ДНК. Однією з найважливіших модифікацій, здійснених на цьому етапі, є фосфорилування варіанту гістону H2AX за серином 139, який називають γ H2AX [18]. Це фосфорилування H2AX поширюється навколо дволанцюгового розриву в процесі, опосередкованому ATM і MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint) [15], і інгібується фосфорилуванням Tyr145 H2AX кіназою WSTF [19]. MDC1 не може зв'язати γ H2AX через свій фосфор-Ser139, поки залишок Tyr142 не буде дефосфорилований після пошкодження ДНК [20]. Це поширення γ H2AX важливо для підтримки таких факторів, як NBS1, 53BP1 і BRCA1 у дволанцюгових розривах [21].

Фосфорилування MDC1 за допомогою ATM також призводить до його асоціації з убіквітин-лігазою RNF8 [22 - 24] і, як наслідок, активує каскад убіквітинування, де ланцюги убіквітинування зв'язуються RNF168, убіквітин-лігазою E3 [25]. RNF8 і RNF168 посилюють каскад і разом з іншими факторами сприяють залученню 53BP1 і BRCA1 до місць пошкодження [26]. Деметилування MDC1 також впливає на залучення факторів репарації, таких як RNF8 і комплекс RAP80-BRCA1 [27]. Цікаво, що хоча BRCA1 традиційно пов'язується з посиленою резекцією та безпомилковою репарацією дволанцюгових пошкоджень за допомогою гомологічної рекомбінації, якщо його активність не контролюється взаємодіючим білком RAP80, це може призвести до гіперрекомбінації та важливих хромосомних аномалій [28]. 53BP1 і BRCA1 мають вирішальне значення в регуляції резекції розриву кінців та виборі шляху відновлення пошкодження ДНК [29 - 32].

Активація реакції на пошкодження ДНК, включаючи ATM і ATR, також впливає на прогресування клітинного циклу. Активація кількох кіназ, які беруть участь у репарації ДНК, призводить до фосфорилування, стабілізації та активації важливого пухлинного супресора p53 [27]. Цей фактор транскрипції може інгібувати циклінзалежні кінази CDK2 і CDK4 через

індуковану експресію p21, що призводить до зупинки клітинного циклу G1 [34] та запобігання потенційній реплікації пошкодженої ДНК. Аналогічно, ATM і ATR можуть через каскад фосфорилування, що включає CHK1 і CHK2, індукувати фосфорилування та протеасомну деградацію CDC25A. Втрата цієї фосфатази також призводить до пригнічення CDK2 і CDK4 інгібування переходу G1/S [35]. Ці затримки в прогресуванні клітинного циклу дають клітинам додатковий час для відновлення пошкодженої ДНК перед тим, як перейти до реплікації. У разі пошкодження під час стадії реплікації, ATM і ATR залежні шляхи можуть бути аналогічним чином активовані, щоб зупинити цикл у фазі S. Зрештою, клітинний цикл можна зупинити на G2/M, щоб запобігти входженню в мітоз, якщо виявлено пошкодження. У цьому випадку активація ATM, ATR і CHK1/2 призводить до накопичення WEE1 (Wee1-like protein), кінази, яка конкурує з CDC25A і інгібує CDK1, щоб зупинити прогресування клітинного циклу [36]. Прогресування клітинного циклу точно контролюється балансом активності кінази та фосфатази, і його контроль є важливим для підтримки цілісності геному. Однак, якщо пошкодження ДНК не відновлюються належним чином, клітини можуть вийти за межі зупинки клітинного циклу до апоптозу або старіння, щоб уникнути проліферації клітин, які несуть пошкодження, що може призвести до утворення пухлини. Отже, зміни в TP53, гені, який кодує пухлинний супресор p53, є одними з найпоширеніших мутацій, виявлених у пухлинах людини, часто пов'язаних із гіршим прогнозом [37 - 38].

1.1.3. Механізми репарації дволанцюгових розривів

З різних типів уражень ДНК, дволанцюгові розриви є особливо небезпечними для клітин, оскільки вони впливають на обидві нитки ДНК і, отже, можуть призвести до важливої втрати генетичної інформації. Недостатня репарація дволанцюгових розривів може призвести не тільки до мутацій, але й до хромосомних транслокацій або утворення токсичних продуктів [39]. Враховуючи важливість правильного поводження з цими

ураженнями, клітини мають кілька механізмів, які можна активувати для запобігання цих шкідливим ефектам. Використання того чи іншого шляху для відновлення пошкодження буде залежати від кількох факторів, включаючи фазу клітинного циклу, регуляцію резекції та наявність інших механізмів [31].

Двома основними механізмами, які стосуються відновлення дволанцюгових розривів, є негомологічне з'єднання кінців (Non-homologous end joining, NHEJ) і гомологічна рекомбінація (Homologous recombination, HR). Ці шляхи відрізняються як за основним механізмом, так і за часом у клітинному циклі, і за потенційним генетичним результатом. Одним із способів, за допомогою яких клітини обирають, яким шляхом продовжити, є регуляція резекції кінців ДНК. Коли дволанцюгове пошкодження ДНК виявлено, один з ланцюгів на кожній стороні розриву може бути перетравлений для створення одноланцюгової ДНК. Довжина цього травлення буде мати велике значення для вибору шляху відновлення, оскільки різні шляхи мають різні вимоги до резекції. У той час як білки, такі як 53BP1, RIF1, DYNLL1 і REV7, негативно регулюють резекцію [40 - 42], таким чином сприяючи репарації через NHEJ, інші, такі як BRCA1 і CtIP, сприяють обширній резекції та репарації шляхом гомологічної рекомбінації [43 - 45].

Негомологічне з'єднання кінців вважається мутагенним механізмом, схильним до помилок, активним протягом різних фаз клітинного циклу, особливо в G1, який не потребує великої резекції чи гомології послідовності [46 - 47]. Протягом кількох секунд після утворення розриву гетеродимерний комплекс Ku, утворений Ku70 і Ku80, розпізнає і стабілізує сайт дволанцюгового розриву, захищаючи його від деградації або зв'язування з іншими ділянками ДНК, і служить каркасом для інших білків репарації [48]. Ku безпосередньо рекрутує ДНК-залежну каталітичну субодиницю протеїнкінази до кінців ДНК, яка самоактивується шляхом аутофосфорилування, утворюючи разом з гетеродимером Ku комплекс ДНК-ПК (ДНК-залежна протеїнкіназа). ДНК-ПК може потім фосфорилувати кілька інших білків, щоб залучити та активувати їх для продовження вирівнювання

та відновлення пошкоджених кінців. DCLRE1C (DNA cross-link repair 1C), нуклеаза з екзо- та ендоактивністю, може деградувати обмежену кількість нуклеотидів на кінці розриву, щоб зробити їх сумісними [49], а полімерази λ і μ , які можуть взаємодіяти з комплексом ДНК-ПК за допомогою їхніх доменів BRCT можуть ресинтезувати певні нуклеотиди [50]. ДНК-ПК рекрутує лігазний комплекс, утворений XLF (XRCC4-подібний фактор), XRCC4 (X-ray Repair Cross-Complementing protein 4) і LIG4 (ДНК лігаза IV) [51], який відповідає за остаточне лігування кінців дволанцюгового розриву [52]. Таким чином, активуючи процес негомологічного з'єднання кінців, дволанцюговий розрив отримує пряму релігацію з потенційними змінами генетичної інформації. Також через неправильне з'єднання кількох одночасних розривів NHEJ може призвести до хромосомних транслокацій та перебудов [53].

Важливо, що NHEJ також відіграє фундаментальну роль в імунитеті та генерації різноманітності антитіл через свою участь у рекомбінації V(D)J, і недоліки цього механізму можуть призвести до таких патологій, як тяжкий комбінований імунодефіцит (SCID) [54].

З іншого боку, гомологічна рекомбінація вважається безпомилковим шляхом відновлення, враховуючи, що вона використовує неушкоджену сестринську хроматиду як шаблон для відновлення пошкодження, отже, точно відтворює генетичну інформацію в ній. Однак через цю вимогу до шаблону гомологічна рекомбінація обмежується фазами S/G2 клітинного циклу після того, як геном був реплікований. Маючи більш складний механізм, ніж негомологічне з'єднання кінців, гомологічна рекомбінація вимагає обширної кінцевої резекції навколо місця розриву та значно більше часу для завершення.

Після утворення дволанцюгового розриву, комплекс MRN, утворений MRE11, NBS1 і RAD50 зв'язує сайт розриву [55], що призводить до залучення ATM. MRE11 разом з CtIP (CtBP-Interacting Protein) створює початковий нік, який дозволяє нуклеазам EXO1 і ДНК2 генерувати довгий 3'-кінцевий хвіст одноланцюгової ДНК через 5'-3' резекції [50]. З цими нуклеазами співпрацюють гелікази BLM і DNA2, які розкручують ДНК, забезпечуючи

стабілізацію отриманої одноланцюгової ДНК [57]. На швидкість цієї обробки впливають пухлинний супресор BRCA1 та його взаємодія з CtIP, важливою для прискорення резекції [58]. Важливо, що суттєве залучення CtIP до місць пошкодження регулюється ATM, ATR та похідними фазовими подіями фосфорилування, отже, обмежуючи розширену резекцію S/G2 [59 - 61].

BRCA1 також бере участь у залученні PALB2 (партнер і локалізатор BRCA2), який потім залучає BRCA2 до місця пошкодження. Ці три білки сприятимуть залученню рекомбінази RAD51, витісненню RPA з ДНК та утворенню нуклеофіламенту RAD51-олДНК [62 - 63]. Ця структура відповідає за пошук гомології через інтактну сестринську хроматиду, щоб знайти відповідний шаблон для відновлення. PALB2 і BRCA2 сприяють як утворенню задньої петлі зміщення (D-петля), так і інвазії нуклеофіламентного ланцюга [58]. Інший набір білків, званий паралогами RAD51, співпрацює в цьому процесі і, як вважають, стабілізує нуклеофіламент RAD51-олДНК [59]. Нарешті, полімерази синтезують ДНК за матрицею сестринської хроматиди, і отримані вторинні структури можуть бути розділені за допомогою різних механізмів, які визначають, чи містить кінцевий продукт кросовер ДНК.

1.2. Синтетична летальність та синтетична дозована летальність

Серед найпоширеніших методів терапії раку провідне місце займають використання високих доз радіації або токсичних хімічних речовин, які крім безпосередньої дії на ракові клітини також завдають значної шкоди нормальним тканинам. Щоб подолати це, дослідники нещодавно вдалися до базової біологічної концепції під назвою «синтетична летальність», яка використовує взаємодії між парами генів. Ідентифікація синтетичних летальних взаємодій становить значний терапевтичний інтерес, оскільки якщо конкретний ген є синтетично летальним з пухлинною мутацією, то націлювання на цей ген має терапевтичні переваги. Відображення цих

взаємодій у контексті ракових клітин людини може стати ключем до ефективного, цілеспрямованого лікування раку.

Прагнучи сприяти розробці протипухлинних препаратів, спрямованих на конкретні молекули, багато дослідників звернулися до використання взаємодій між парами генів, які можуть виявити їх фенотипові відносини. Оскільки більшість фенотипових ознак раку спричинені генетичними змінами, такими як посилення функції (ампліфікація або надмірна активація протоонкогенів) та/або втрата функції (делеція або епігенетичне приглушення пухлинних супресорів), негативні генетичні взаємодії, які призводять до дефекту придатності, можна використовувати для цілеспрямованої терапії двома підходами, які називаються «синтетичною летальністю» і «синтетичною дозовою летальністю». Вважається, що два гени викликають синтетичну летальність, якщо інактивація мутацій в одному з генів робить клітину життєздатною, але разом вони викликають смерть. Навпаки, кажуть, що два гени виявляють синтетичну дозовану летальність, коли надмірна активація гена смертельна лише тоді, коли присутня інша, нелетальна мутація.

Не зважаючи на те що підхід синтетичної летальності є багатообіцяючим в теорії, основною перешкодою в цій області є недостатньо ефективні інструменти РНК-інтерференції, які переважно використовуються для ідентифікації синтетичних летальних взаємодій, такі як короткі РНК, що утворюють шпильки (short hairpin RNAs, shRNA) та малі інтерферуючі РНК (small interfering RNAs, siRNA). Обидва методи націлені на транскрипти мРНК і тому ефект нокдауну не завжди послідовний і точний, що є ключовими характеристиками для точної ідентифікації синтетичних летальних взаємодій. Крім цього, ці стратегії часто залежать від великомасштабних скринінгових аналізів, які зіштовхуються з високим рівнем помилково позитивних результатів. Проте, розробки в сфері редагування геному за допомогою CRISPR/Cas9 відродили інтерес до виявлення терапевтичних синтетичних летальних взаємодій. Короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами (Clustered regularly

interspersed short palindromic sequences, CRISPR) можуть редагувати геном так що певні гени можуть бути активовані або репресовані під керуванням направляючої РНК (guide RNA, gRNA).

На жаль, ці широкомасштабні скринінгові аналізи часто стикаються з високими показниками хибнопозитивних результатів з обмеженою валідацією. На противагу об'єднаним скринінгам, індивідуальний аналіз генів є надійним методом, хоча нереальним для великих груп генів. Таким чином, хоча об'єднаний формат є найефективнішою системою для ідентифікації синтетичних летальних взаємодій, він все ще не настільки чутливий, як аналіз геному індивідуально ген за геном. Проте, високоточна CRISPR/Cas9 система, хоча й є чутливою, не є економічно вигідною та її неефективно використовувати для скринінгу всього геному. Щоб подолати цю проблему, було обрано скористатися невеликою підгрупою функціонально пов'язаних генів, де терапевтичне застосування синтетичних летальних взаємодій є успішним, тобто генів, які беруть участь у реакції на пошкодження ДНК.

1.3. Зв'язок мутацій в генах репарації ДНК з розвитком онкологічних захворювань

На центральну роль процесу відновлення пошкоджень в ДНК у фізіології людини вказує широкий спектр дефектів, що притаманний фенотипам, які несуть мутації в генах репарації ДНК. Такі порушення в першу чергу впливають на гомеостаз нервової, імунної та репродуктивної систем, а також можуть призвести до передчасного старіння або схильності до раку [66]. Існує зв'язок між онкологічними патологіями та дефектами в генах репарації ДНК.

Рак – це еволюційна хвороба, що розвивається через нестабільність геному [67]. Більшість типів раку демонструють хромосомну нестабільність, яка характеризується змінами числа хромосом та/або структури. Інші форми

геномної нестабільності включають накопичення мутацій основ ДНК і мікросателітну нестабільність, що призводить до скорочення або розширення кількості повторюваних мікросателітних послідовностей [67].

Підтримка геномної цілісності за допомогою репарації ДНК має вирішальне значення для запобігання розвитку пухлин, на що вказує схильний до раку фенотип кількох синдромів, спричинених порушеннями в репарації ДНК. Спадковий неполіпозний колоректальний рак (HNPCC), також відомий як синдром Лінча, спричинений гетерозиготними мутаціями генів MMR, таких як MLH1, MSH2, MSH6, і в меншій кількості випадків PMS2 [68]. HNPCC асоціюється з мікросателітною нестабільністю, що схиляє насамперед до розвитку колоректального раку, з додатковими можливими карциномами ендометрію, яєчників, шлунку та нирок.

Механізм, за допомогою якого дефіцит факторів MMR впливає на клітини кишечника, не встановлений. Натомість, як відомо, дефіцит факторів NER при синдромі пігментної ксеродерми значно підвищує ризик раку шкіри та меланоми через дефекти відновлення УФ-уражень у клітинах шкіри після впливу сонця [1].

Спадковий рак молочної залози становить приблизно 5-10% випадків раку молочної залози [69]. Найбільш поширені мутації, що призводять до спадкового раку грудей і яєчників, впливають на гени BRCA1 і BRCA2. Гетерозиготні особи, які несуть мутації генів BRCA1 або BRCA2, мають 40–80% ризик розвитку раку молочної залози [69]. Пацієнти з мутаціями BRCA2 мають підвищену захворюваність на рак грудей, підшлункової залози та рак простати серед чоловіків [70]. Пухлини з мутаціями BRCA1 або BRCA2 значною мірою асоціюються з низьким рівнем 53BP1. Ймовірно, це пов'язано з частковим відновленням гомологічної рекомбінації у мутантних пухлинах BRCA1. Нещодавно мутації в трьох додаткових генах гомологічної рекомбінації, BACH1, PALB2 і RAD51C, були виявлені приблизно у 3% хворих на рак молочної залози і були асоційовані з 2-кратним збільшенням ризику розвитку раку молочної залози [71]. Мутації CHK2, ATM, NBS1 і

RAD50 також асоціюються з подвоєним ризиком раку молочної залози, що вказує на важливість гомологічної рекомбінації для запобігання утворенню раку молочної залози [72].

Експерименти на мишах показали, що у мишей з дефектом механізму репарації шляхом негомологічного з'єднання кінців за відсутності p53 розвиваються В-клітинні лімфоми, що містять транслокації між локусом Ig і c-Myc, які залежать від розривів, створених RAG1/RAG2 під час рекомбінації V(D)J [73]. Крім того було показано, що дефіцит ATM призводить до стійких розривів, які можуть приєднуватись до інших дволанцюгових розривів для створення транслокацій та стимулювання розвитку пухлин [73].

Широкий спектр злоякісних новоутворень проявляється синдромом Блума та синдромом Лі-Фраумена. Високий рівень хромосомних нестабільностей в клітинах пацієнтів з синдромом Блума внаслідок гіперрекомбінації може призвести до розвитку лімфом, лейкозів та карцином [74]. Синдром Лі-Фраумена, який в першу чергу спричинений мутаціями зародкової лінії TP53, схиляє носіїв до раку молочної залози, пухлин головного мозку, лейкемії, саркоми, меланоми та раку шлунково-кишкового тракту [75].

Таким чином, координація процесів відновлення ДНК відіграє вирішальну роль у забезпеченні належного розвитку та виживання організмів. Вони відповідають за запобігання численним захворюванням і станам людини, включаючи рак і старіння.

1.4. Дуальна роль *CDKN1A* та білка p21 в клітинній диференціації, міграції та терапії раку

Cyclin dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*) функціонує як регулятор клітинного циклу з провідною роллю у відповіді ДНК на пошкодження. p21, що кодується геном *CDKN1A*, є одним з ключових інгібіторів циклінзалежної

кінази (Cdk) [76], головного регулятора клітинного циклу, що забезпечує стабільність гену та часто дерегулюється в [77]. Через відсутність визначеної третинної структури p21 здатний взаємодіяти з низкою білків, які беруть участь у багатьох ключових біологічних процесах [78].

Як важливий ефектор різноманітних внутрішньо- та позаклітинних сигналів стресу, p21 регулюється безліччю транскрипційних факторів [79], окремих посттранскрипційних регуляторів, таких як мікроРНК і РНК-зв'язуючі білки [80], а також різними посттрансляційними модифікаціями. Короткоживучий білок p21 деградується різними убіквітин-залежними та незалежними шляхами [81]. Оборотно фосфорилування білка різними кіназами служить додатковим посттрансляційним механізмом, що контролює функцію p21, локалізацію, партнерів зв'язування, стабільність та деградацію [82].

Зокрема, фосфорилування в різних ділянках різними кіназами може спричинити цитоплазматичну транслокацію p21, що сильно впливає на його функціональність та терапевтичну відповідь на хіміотерапевтичні втручання [83]. Важливо, що p21 діє не лише як пухлинний супресор, а й як онкоген, що в свою чергу залежить від клітинного контексту.

p21 часто дерегулюється в ракових клітинах. Мутації в гені p21 зустрічаються при онкологіях сечового міхура [84]. Гіперметилування та приглушення p21 спостерігали в недрібноклітинних раку легенів і простати [85], раку молочної залози високого ступеня тяжкості та гострого лімфобластного лейкозу, пов'язаного з поганим прогнозом [86]. Епігенетичне приглушення за допомогою довгих некодуючих РНК трапляється часто і нещодавно було виявлено при холангіокарциномі [87]. Крім того, повідомляється, що різноманітні однонуклеотидні поліморфізми p21 впливають на ризик розвитку раку, включаючи рак стравоходу, колоректальний та з естроген-залежний рак, асоційований з більш високим ризиком вторинних первинних злоякісних новоутворень при карциномі голови та шиї [88].

Експресія p21 часто знижується в ракових клітинах через втрату функціонального p53 або гіперактивних онкогенів, таких як c-Myc: мутації p53 були виявлені у більш ніж 50% злоякісних пухлин людини [89]. p53 та c-Myc призводять до зниження регуляції p21, що впливає на його пригнічуючу пухлину активність і пов'язано з поганим прогнозом у пацієнтів з колоректальним раком, недрібноклітинною карциномою легенів, раком молочної залози, шлунка та яєчників [85], а також раком підшлункової залози [90]. Відповідно до цих спостережень, (над)експресія p21 корелювала зі сприятливим прогнозом при карциномі мигдалин, раку шлунку, аденокарциномі шийки матки, раку підшлункової залози, а також при карциномі гортані та ротової порожнини [85].

Відповідно до антагоністичної дуальності p21 [51], його надмірна експресія, що призводить до його онкогенної активності, виявляється при різних видах раку людини, включаючи рак молочної залози, нирково-клітинний рак, рак яєчок, гепатоцелюлярну карциному, множинну мієлому, гліоми, рак передміхурової залози, рак шийки матки, карцинома, рак яєчників, гострий мієлоїдний рак, плоскоклітинний рак стравоходу та саркоми м'яких тканин [84]. Цитоплазматичний p21 спостерігається при раку молочної залози [91] та гепатоцелюлярній карциномі. Підвищення регуляції p21 та його часте переміщення цитоплазми позитивно корелюють із поганим прогнозом, ростом пухлини, інвазивністю та/або стійкістю до ліків. Незважаючи на суперечливу роль p21 у розвитку раку людини, збільшення цитоплазматичного p21, як правило, розглядається як стимулятор пухлини.

Враховуючи антагоністичну поведінку p21 у різних клітинних процесах, очевидно, що p21 може грати подвійну роль у розвитку та прогресуванні пухлини залежно від типу раку, статусу p53 та використовуваних хіміопрепаратів. Він може служити біомаркером для специфічної терапії або прогнозу, частково залежно від його субклітинної локалізації.

1.5. mSWI/SNF комплекс ремоделювання хроматину та його роль в підтриманні стабільності геному

Організація хроматину та ущільнення людського геному досягаються шляхом обгортання 146 пар основ ДНК навколо октамерів гістонового білка, утворюючи структури, які називаються нуклеосомами, таким чином дозволяючи приблизно 3 м ДНК поміститися в ядро із середнім діаметром лише 5 мкм. Крім того, нуклеосоми відіграють центральну роль у контролі експресії генів, оскільки їх присутність загалом перешкоджає зв'язуванню транскрипційних факторів, білків, відповідальних за активацію або інактивацію експресії специфічних генів. Отже, складний клітинний механізм, що працює разом з факторами транскрипції, щоб мобілізувати нуклеосоми для контролю експресії генів, називається ремоделюванням хроматину [92].

Сімейство комплексів ремоделювання хроматину SWI/SNF, також відоме як комплекс BRG1/BRM-асоційованого фактору (BAF) [93], є ключовими регуляторами позиціонування нуклеосом. Комплекси SWI/SNF використовують енергію, що утворюється в результаті гідролізу АТФ [93]. Враховуючи цю, здавалося б, просту роль, комплекси SWI/SNF є складними макромолекулярними механізмами, що складаються з багатьох різноманітних субодиниць. Комплекси SWI/SNF ссавців належать до трьох широких підродин: канонічний BAF (cBAF), полібром-асоційований BAF (pBAF), і комплекс, що містить GLTSCR1 або GLTSCR1L і BRD9 (GBAF), який був відкритий лише в 2018 році, що відомий як неканонічний BAF (ncBAF). Усі три комплекси містять основні субодиниці, включаючи SMARCC1, SMARCC2, SMARCD1 та будь-яку з АТФаз SMARCA4 або SMARCA2, але вони також містять численні варіативні субодиниці, які забезпечують кожному з комплексів чітку ідентичність. Додаткова гетерогенність виникає в кожній підродині через різне використання споріднених субодиниць.

Комплекси SWI/SNF еволюційно консервативні і були вперше відкриті в результаті піонерських досліджень на дріжджах, у яких було виявлено, що мутації, що впливають на різні субодиниці компонентів, призводять до дефектного контролю транскрипції перемикачів типу спарювання (фенотип

SWI) або, в незалежних дослідженнях, до ферментація сахарози (фенотип, що не ферментує сахарози, або SNF) [94]. Комплекси SWI/SNF ссавців відіграють широку роль у регуляції транскрипції і були залучені до конкретних програм контролю транскрипції, таких як ті, що опосередковують диференціацію клітин і специфікацію клітинних ліній. Ділянки геному, де комплекси відіграють чітку роль, включають енхансери, які утворюють сайти зв'язування для транскрипційних факторів і тим самим регулюють транскрипційну активність сусідніх генів. Енхансери становлять лише невеликий відсоток геному, але комплекси SWI/SNF дуже збагачені на цих ділянках і відіграють важливу роль у модуляції доступності енхансерів, яка необхідна для факторів транскрипції для активації експресії генів [95].

Транскрипція — не єдиний клітинний процес, який вимагає доступу до певних ділянок ДНК, і відомо що комплекси mSWI/SNF були залучені до кількох механізмів відновлення пошкоджень ДНК [96]. Було показано, що різні члени сімейства mSWI/SNF відіграють різні ролі в регуляції відповіді на пошкодження ДНК, починаючи від модифікації структури хроматину навколо місць пошкодження ДНК до безпосереднього залучення білків, необхідних для активації відповіді на ураження [97]. Комплекси cBAF і PBAF були залучені як до негомологічного кінцевого з'єднання, так і до процесів репарації гомологічної рекомбінації [98 - 99]. Дійсно, було показано, що як SMARCA4, так і cBAF-специфічна субодиниця ARID1A залучаються до місць пошкодження ДНК і сприяють репарації ДНК, опосередкованій гомологічною рекомбінацією, і негомологічним кінцевим з'єднанням при дволанцюгових розривах [100 - 101]. Крім того, втрата експресії SMARCA4 або ARID1A була пов'язана із затримкою мітозу та аномальною хромосомною сегрегацією [102]. Крім того, було показано, що приблизно 50% клітинних карцином яєчників містять інактивуючі мутації ARID1A [103].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Клітинні культури

HCT15 (колоректальна аденокарцинома), HeLa (аденокарцинома шийки матки), HeLa CDKN1A-knockout (CDKN1A-KO) були отримані з Американської колекції типових культур (American Type Culture Collection, ATCC). Для роботи необхідно було згенерувати такі клітинні лінії як HeLa Cas9, HeLa Cas9 CDKN1A-KO, HCT15 Cas9, HCT15 Cas9 CDKN1A-KO. HCT15 та її похідні клітинні лінії вирощувались в Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco) середовищі з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (ФБС) та 1% Пеніциліну/Стрептоміцину (П/С); селекційним маркером для Cas9 слугував гідроміцин (200 мкг/мл), для селекції CDKN1A-KO використовувався бластицидин (8 мкг/мл). HeLa та її похідні клітинні лінії вирощувались в Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) середовищі з додаванням 10% ФБС та 1% П/С, селекційним маркером для Cas9 був гідроміцин (200 ug/ml). Ці клітинні лінії підтримували при атмосферному O₂ у зволоженому інкубаторі з 5% CO₂ при 37°C. Усі лінії клітин регулярно перевіряли на мікоплазмову інфекцію.

Лентивірусні частинки були отримані шляхом трансфекції клітин HEK293T сумішшю плазмід psPAX2, pMD2.G та pLKO.1-shRNA у співвідношенні 9:1:10 з використанням трансфекційного реагенту Xtremegene 9 (Sigma) та середовища без сироватки Optimem (Gibco). Середовище Optimem було замінено середовищем DMEM, що містить 2% бичачого сироваткового альбуміну (БСА) через 18 годин після трансфекції.

Клітини HCT15 і HeLa, що експресують Cas9, були отримані шляхом трансдукції HCT15 і HeLa частинками Cas9 лентивірусу, зміни лентивірусного середовища через 24 години та додавання 5 мкг/мл селекційного маркеру бластицидину через 48 годин після трансдукції для селекції впродовж 21 дня.

2.2. Вестерн-блот

Лізати білків були кількісно визначені за допомогою аналізу біцинхіонової кислоти (Thermo Scientific). Лізати клітин, що містять 30 мкг білка, піддавали електрофорезу для аналізу. Антитіла GAPDH і p21 були придбані від Санта-Круз, а Cas9 від Abscam. Мембрани блокували розчином 5% молока у тріс-буферному сольовому розчині з додаванням Tween-20 (TBST), а первинні антитіла розводили у співвідношенні 1:1000 у блокуючому розчині. Первинні антитіла виявляли за допомогою кон'югованого з пероксидазою вторинного антитіла, розведеного 1:10000 у блокуючому розчині, та виявляли з використанням ECL Western Blotting хемолюмісцентного субстрату (Thermo Scientific).

2.3. Комп'ютерний аналіз

Для літературного пошуку генів використовувалась база даних GeneCards та база даних наукових публікацій PubMed. Експресію генів визначали на основі даних TCGA Genomic Data Commons, створеної дослідницькою мережею TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), даних експресії мРНК (секвенування мРНК, секвенування загальної РНК та microarray). Профіль експресії генів із бази даних CCLE (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>) використовувався для ранжування клітинних ліній за експресією CDKN1A, щоб класифікувати їх на дві групи – ті, які надмірно або недостатньо експресують CDKN1A.

2.4. Клоногенний аналіз

Клітини HCT15 Cas9 і HCT15 Cas9 CDKN1A-KO та HeLa Cas9 і HeLa Cas9 CDKN1A-KO вирощували в 6-лункових плашках в концентрації 300 000 клітин на лунку з додаванням 8 мкг/мл поліброну та 500 мкл гРНК-лентивірусних частинок (2 гРНК для кожного гена) в загальному об'ємі 3 мл.

Через 24 години середовище з лентивірусними частинками замінювали середовищем, що містить 2 мкг/мл пуроміцину. Після 48-годинної селекції пуроміцином клітини повторно вирощували в низькій щільності (1000 клітин на лунку) впродовж 10 днів при 37°C під 5% CO₂, замінюючи середовище кожні 3 дні. Після 10-денної інкубації кожну лунку промивали PBS, фіксували розчином 4% формальдеду і фарбували 0,5% розчином кристалічного фіолетового. Колонії підраховували за допомогою програмного забезпечення ImageJ, а зображення колоній були відскановані.

2.5. Кількісна ПЦР

РНК було ізольовано з клітин з використанням RNeasy mini kit (Qiagen) відповідно до протоколу виробника, включаючи опціональний крок обробки ДНКазою (Qiagen). Кількісне визначення та цілісність РНК перевіряли спектрофотометрично. Шаблони кДНК для кількісної ПЦР були підготовлені за допомогою High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific). Кількісна полімеразна ланцюгова реакція була проведена за допомогою CFX96 Real-Time PCR Thermocycler (Bio-Rad Laboratories) за такою програмою: 95°C 10 хвилин, 45 циклів: 94°C 30 секунд, 60°C 90 секунд, 98°C 10 хвилин після циклів, 4°C на утриманні. Аналіз даних проводили за допомогою методу $\Delta\Delta CT$, як описано на веб-порталі виробника (SABiosciences). Для кількісної ПЦР використовувались праймери:

CDKN1A FWD: TTTCTACCACTCCAAACGCC; REV: CGGCCAGGGTATGTACATGAG; BRD7 FWD: AAGCACACGCCTTCAAGAGT; REV: TTCCTTCACGATGCGGTCAA; GAPDH FWD: GGAGCAGATCCAAGCACTGT; REV: GACTGCCACAGACACATGAAG.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Пошук генів, що належать до родини репарації ДНК та аналіз їх експресії.

Використовуючи базу даних GeneCards та PubMed було встановлено перелік генів, що беруть участь в процесах репарації ДНК. Було складено список з 370 генів, що або модулюють або грають ключову роль у виправленні одноланцюгових або дволанцюгових розривів з використанням різноманітних шляхів відновлення пошкодження ДНК (Рис. 3.1).

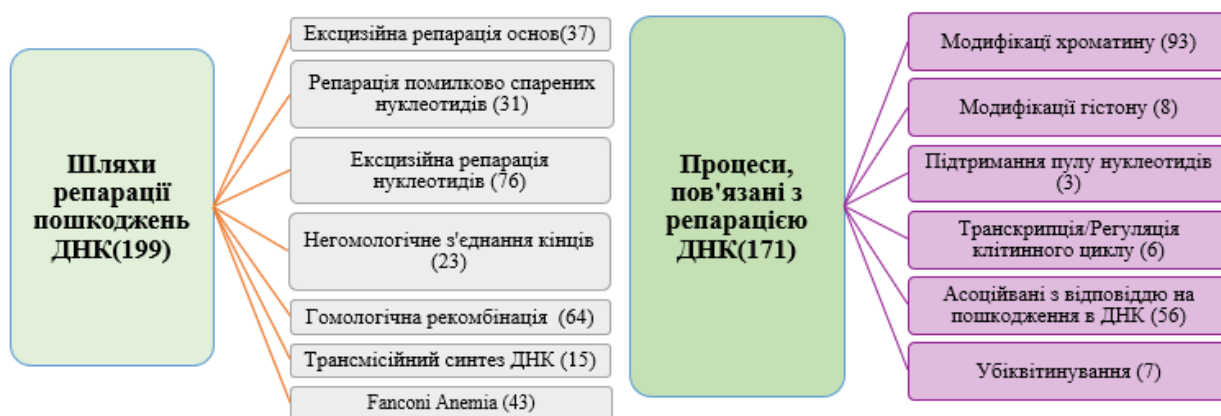


Рис. 3.1 - Схематичне зображення генів, що беруть участь безпосередньо в передачі сигналів про пошкодження ДНК і відновлення ДНК (схема 1) та генів, периферично асоційованих з відповіддю ДНК на пошкодження.

Наступним завданням було проаналізувати рівень експресії кожного з цих генів в трьох видах раку, а саме раку простати, раку молочної залози та раку товстої кишки. Було виявлено що 27 генів з цього списку втрачають експресію у всіх трьох проаналізованих прикладах раку (Рис. 3.2). Це важливо, оскільки самі ці 3 види раку є одними з найпоширеніших. Оскільки експресія втрачається при порівнянні ракових і неракових тканин, це забезпечує специфічний пухлинний контекст, на який можна націлити експерименти, щоб уникнути загибелі нормальних клітин.

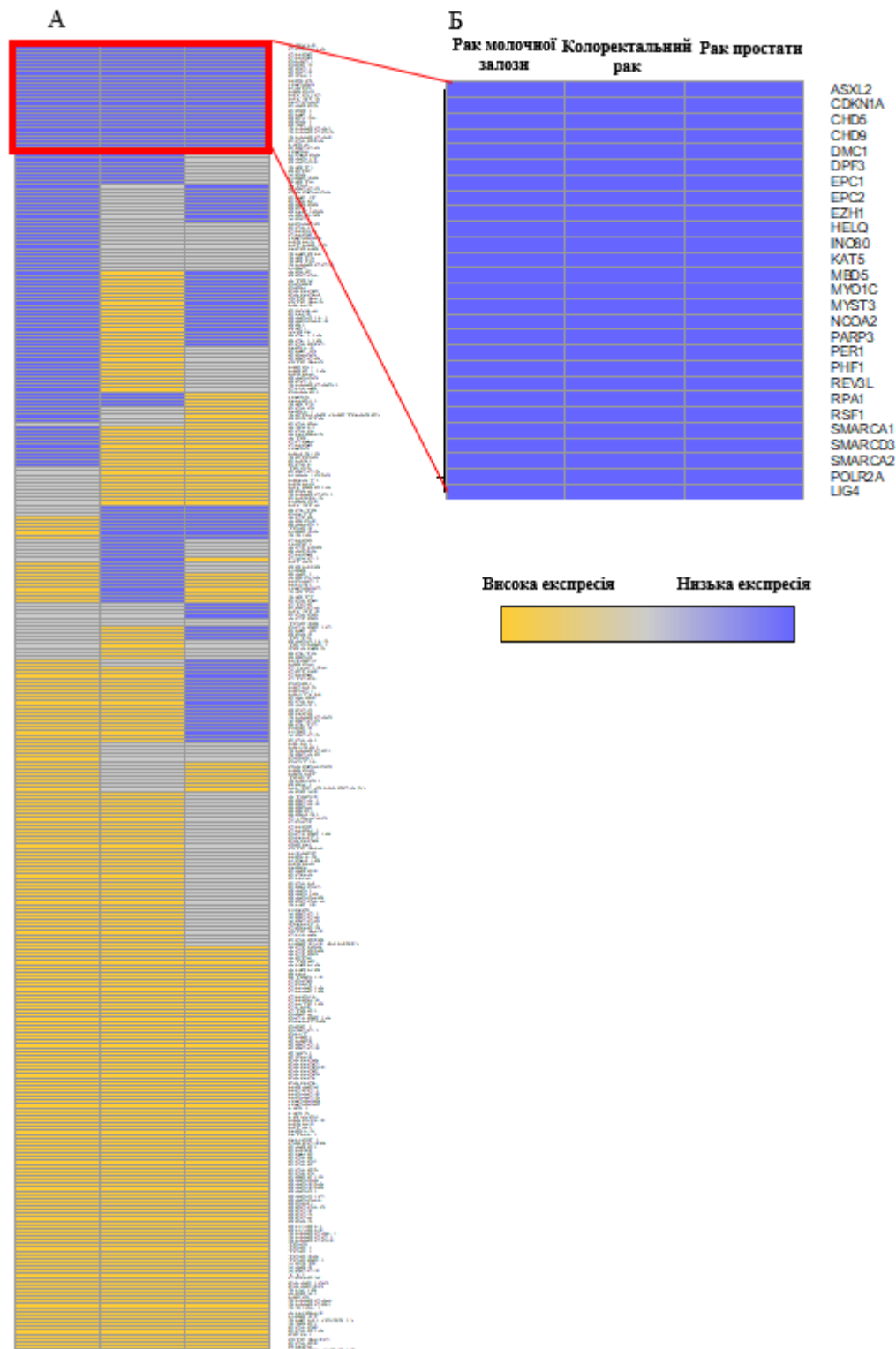


Рис 3.2 - Аналіз експресії генів 349 генів, пов'язаних з відповіддю ДНК на пошкодження. А. Експресію окремих генів досліджували у сотень пацієнтів, доступних у TCGA як у злоякісних, так і в незлоякісних контрольних групах. Були обчислені та представлені статистично значущі ($p < 0,01$, Mann Whitney)

зміни експресії між нормальними та пухлинними зразками. Б. Збільшена область, що показує 27 генів, які втрачають експресію в більшості видів раку

Між всіма шляхами репарації ДНК виникає багато пререкресних перешкод, тому для початку було розпочато аналіз генів, що беруть участь у відповіді на пошкодження ДНК, а саме CDKN1A, EPC1, EZH1, PER1, RHF1 і RPA1. Першим для аналізу було обрано CDKN1A, так як його експресія втрачається у багатьох типах раку (Рис. 3.3).

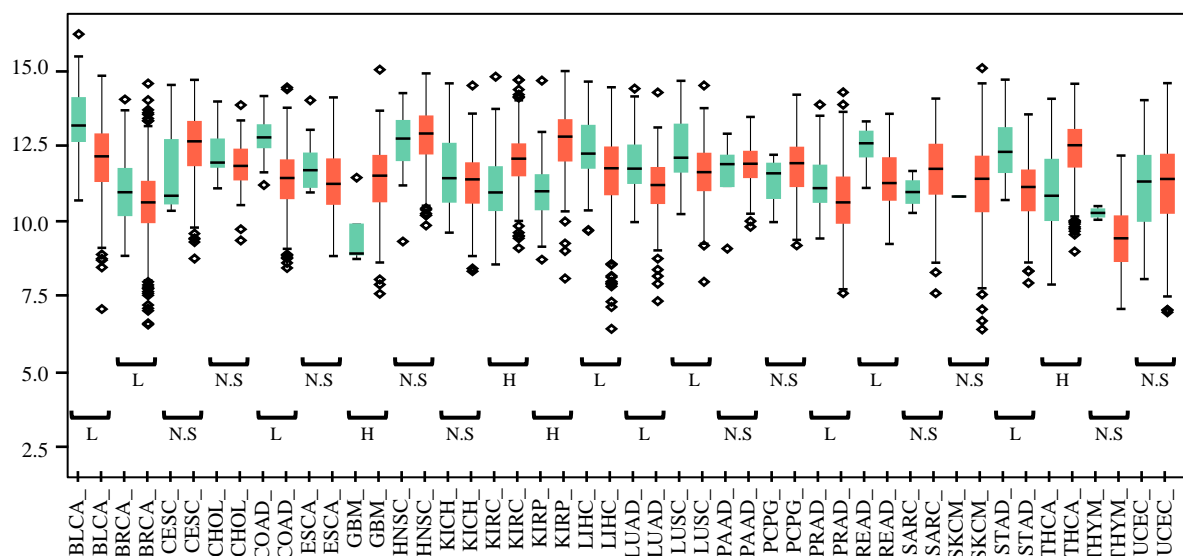


Рис. 3.3 - Оцінки експресії CDKN1A в межах 24 різних типів раку та нормальної тканини від TCGA. Цифри на мітках по осі X позначають кількість зразків пацієнтів для кожного типу раку. Статистична значимість різниці в експресії між нормальними та пухлинними зразками зображена для кожного типу раку. N.S. (non-significant) означає незначущий. Аббревіатура кожного раку по осі Y представлена, як описано на порталі TCGA

3.2. Генерація стабільних клітинних ліній, що експресують Cas9

З метою застосування системи CRISPR/Cas9 для дослідження синтетичних летальних взаємодій, було успішно згенеровано Cas9-

експресуючі НСТ15 та HeLa клітинні лінії. Експресію Cas9 було перевірено за допомогою вестерн блоту.

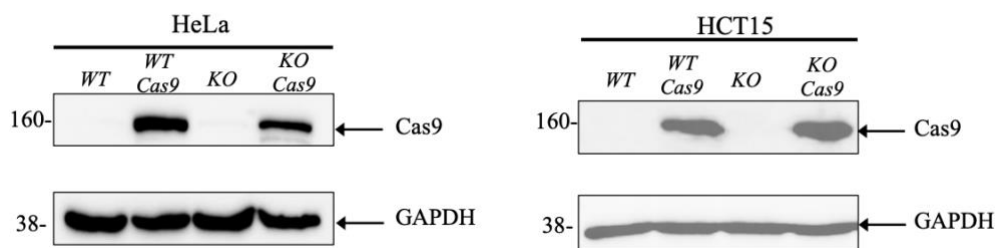


Рис.3.4 - Вестерн-блот, що демонструє експресію Cas9 у HeLa та НСТ15 клітинних моделях

3.3 Ідентифікація синтетичних летальних взаємодій з використанням високоточної CRISPR/Cas9 системи.

Для проведення високопропусного CRISPR/Cas9 скринінгу було відібрано набір потрібних коротких направляючих РНК (single guide RNA, sgRNA) (2 на кожен ген), що експресують синій флуоресцентний білок (blue fluorescent protein, BFP). Ізоляція плазмідної ДНК з рекомбінантної культури *E. coli* була проведена використовуючи високопропусний протокол екстракції, в результаті було отримано 698 зразків плазмідної ДНК.

Для виробництва лентивирусу кожна плашка з 96 лунками була поділений на 4 квадранти таким чином, щоб кожній з 96-лункових плашок відповідали 4 супровідні 24-лункові плашки. Для трансфекції використовували клітинну лінію HEK293T (5×10^4).

Клітини були вирощені в 0,5 мл DMEM в 24-лункових плашках, після чого було додавано суміш для трансфекції. Збір лентивирусу відбувався через 24 та 48 годин, після чого віруси були розподілені на аліквоти в 96-лункові плашки для тривалого зберігання. Цей 3-місячний високопродуктивний

процес дозволив створити 698 лентівірусів, націлених на 349 генів репарації ДНК.

Cas9-експресуючі +/- CDKN1A клітини були трансдуковані отриманими вірусними частинками в 96-лункових плашках та в подальшому аналізовані за допомогою мікроскопу (Рис. 3.5).

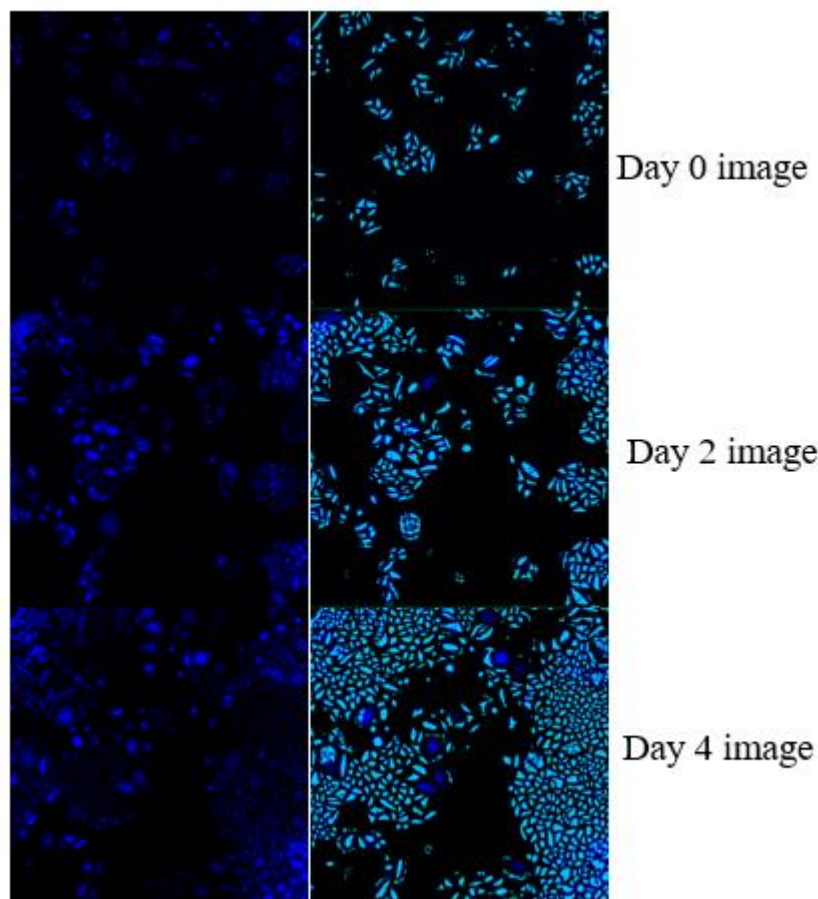


Рис. 3.5 - Приклад зображень клітин HeLa, отриманих на день 0, день 2 та день 4 аналізу відповідно

Клітини аналізувались впродовж п'яти днів, зображення були отримані в день 0, день 2 та день 4. Материнська клітинна лінія (HeLa), що не експресує Cas9, використовувалась як контроль, щоб перевірити якість вірусу, оскільки ці клітини не зможуть пройти селекційний відбір пуроміцином. Успішним результатом експерименту вважалось, що потенційні синтетичні летальні взаємодії повинні вибірково вбивати лише клітини з дефіцитом CDKN1A (подвійні нокауті), але не клітини, які мають CDKN1A в нормі (Рис. 3.6).

Для ідентифікації синтетичних летальних взаємодій була використана мультиплікативна модель, де добуток балів здатності до нокауту одного гена перевищує добуток подвійного нокауту. Таким чином було ідентифіковано 9 генів, що при сайленсингу викликають загибель лише CDKN1A-KO клітин.

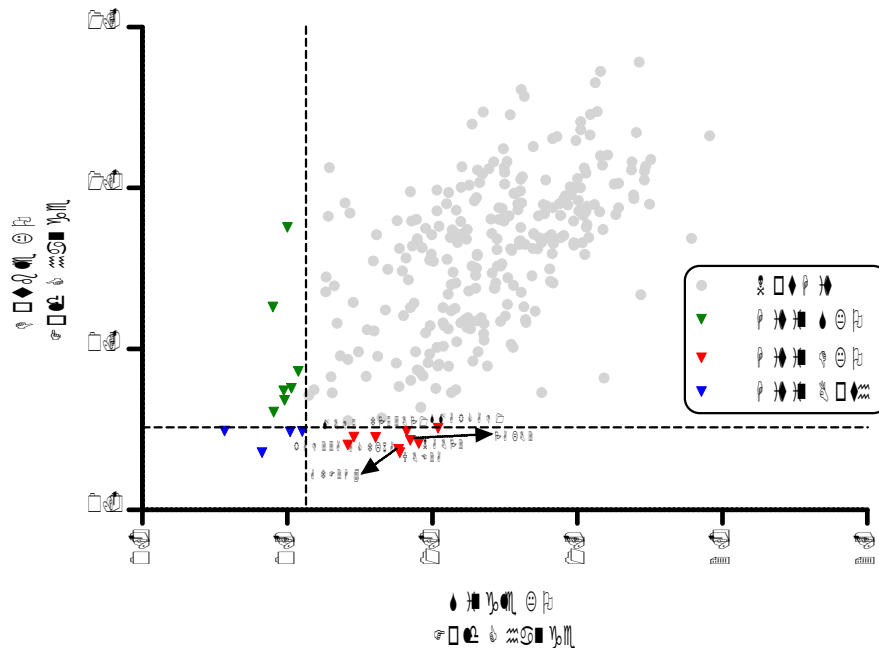


Рис. 3.6. Результати високопропускового CRISPR скринінгу, представлені у вигляді діаграми розсіювання. Гени, виділені червоним кольором, викликають селективну летальність у CDKN1A-KO клітинах.

3.4 Інтерпретація синтетичних летальних взаємодій та їх валідація в додатковій клітинній моделі

Було ідентифіковано 9 генів, які, якщо їх нокаутувати, викликають загибель клітин лише в клітинах CDKN1A-KO. Наступним кроком була валідація синтетичних летальних взаємодій підтверджено SLI в незалежній моделі корорестальної аденокарциноми - клітинах HCT15 (Рис. 3.7). Для перевірки клітини HCT15 трансдукували Cas9 і лентівірусом, націленим на

CDKN1A. Були відібрані моноклональні популяції, оцінка ефективності генетичного нокауту була підтверджена за допомогою вестерн блоту.

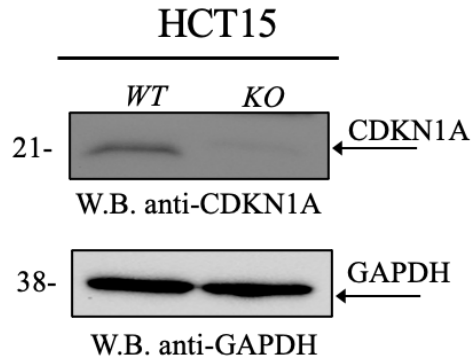
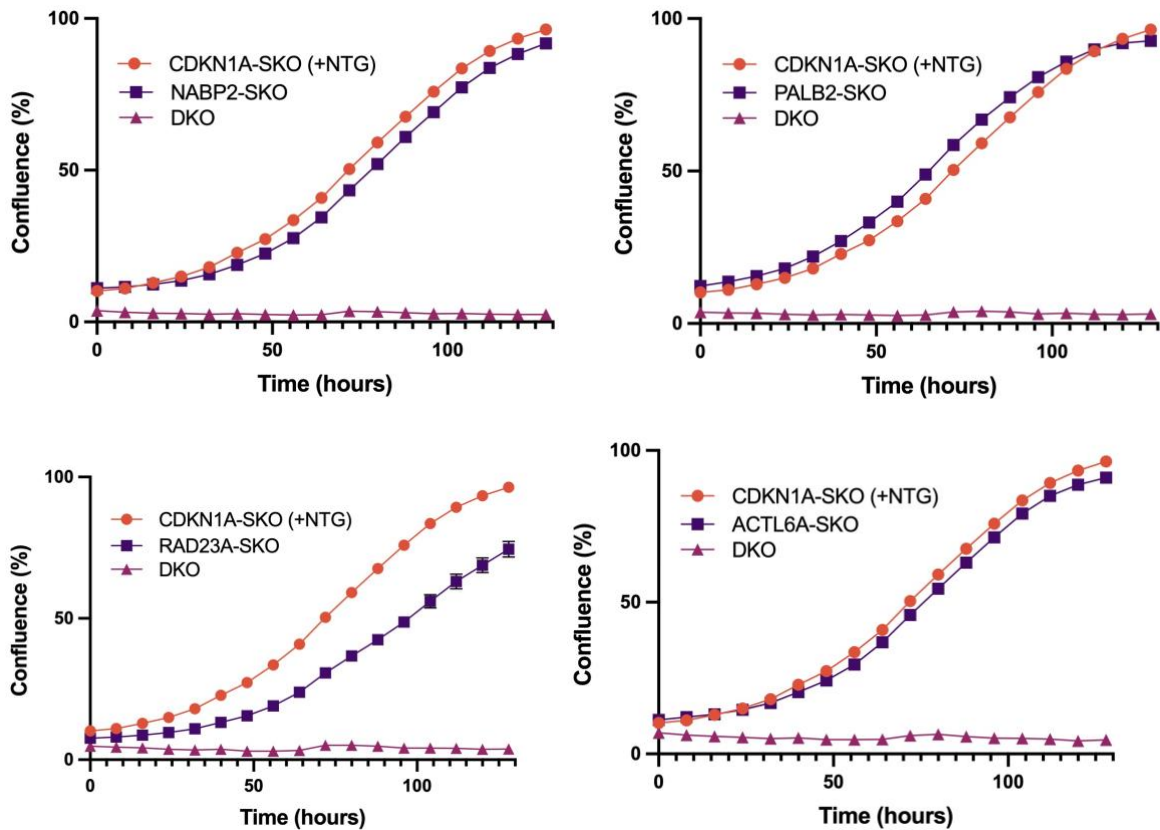


Рис. 3.7. Вестерн-блот, що показує рівень білка CDKN1A в HCT15 клітинній моделі

Після генерування стабільної клітинної лінії CDKN1A-KO клітини трансдукували лентивірусом, націленим на раніше ідентифіковані таргетні гени, і швидкість росту клітин оцінювали в S3-Incucyte® спродовж п'яти днів.



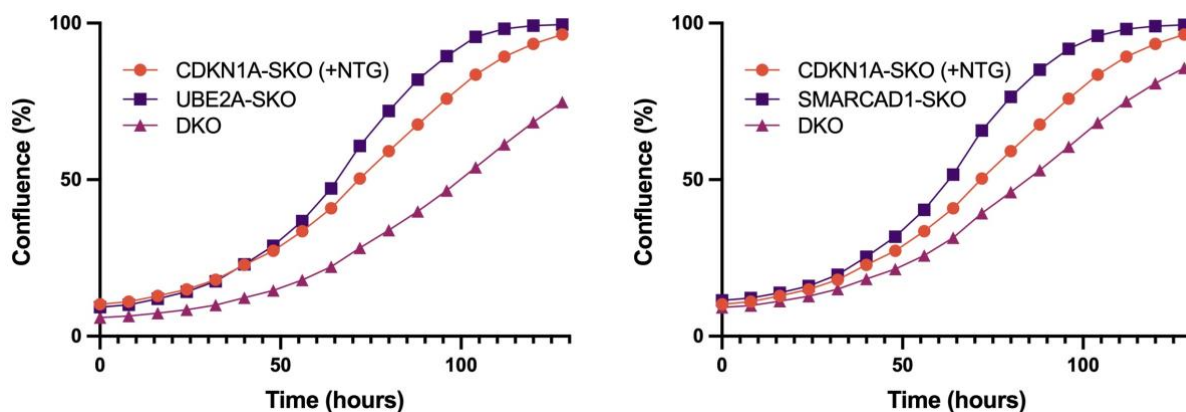


Рис. 3.8. Валідація NABP2, RAD23A, UBE2A, PALB2, ACTL6A та SMARCAD1 генів в додатковій моделі колоректальної аденокарциноми HCT15.

В попередньому високопропусковому скринінгу було ідентифіковано 9 генів, які, якщо їх нокаутувати, викликають загибель клітин лише в клітинах CDKN1A-KO. Було підтверджено 6 з 9 цих синтетичних летальних взаємодій в клітинах HCT15.

3.5 Аналіз синтетичних летальних взаємодій між членами mSWI/SNF комплексу та *CDKN1A*

Серед 6 з 9 раніше ідентифікованих таргетів були встановлені синтетичні летальні взаємодії між ACTL6A та SMARCAD1, членами комплексу ремоделювання хроматину mSWI/SNF. Подальша увага була зосереджена на індивідуальному аналізі генів комплексу mSWI/SNF у клітинних лініях, що експресують CDKN1A та тих, де експресія цього гену відсутня. Аналіз індивідуальних синтетичних летальних взаємодій проводився за в клітинних моделях HeLa та HCT15.

За допомогою трансдукції лентивірусними гРНК, націленими на кожен індивідуальний ген mSWI/SNF комплексу в клітинних лініях HCT15 Cas9 +/-

CDKN1A та HeLa Cas9 +/- CDKN1A було проведено CRISPR/Cas9 скринінг синтетичних летальних взаємодій генів mSWI/SNF комплексу з CDKN1A.

Після селекції пуроміцином впродовж 48 годин, клітини кожного нокауту були проаналізовані на здатність формувати колонії. Було використано клоногенний аналіз для оцінки впливу нокаутів компонентів mSWI/SNF комплексу в HCT15 та HeLa CRISPR/Cas9 в +/- CDKN1A клітинних лініях (одиначні нокауту та подвійні нокауту відповідно). Контролем кожної пари експерименту слугували гРНК, що були націлені на NTG (non-targetin guide). Клоногенний аналіз дозволяє оцінити здатність кожної індивідуальної клітина утворювати колонію (зазвичай 50 і більше клітин). Успішним проявом синтетичної летальності вважається переважна загибель клітин при подвійному нокауті.

Після аналізу всіх 30 компонентів mSWI/SNF комплексу, було встановлено що найбільш успішними в контексті синтетичної летальності є BRD7, ACTL6A, ARID2. Ген BRD7 продемонстрував майже повну втрату своєї функції.

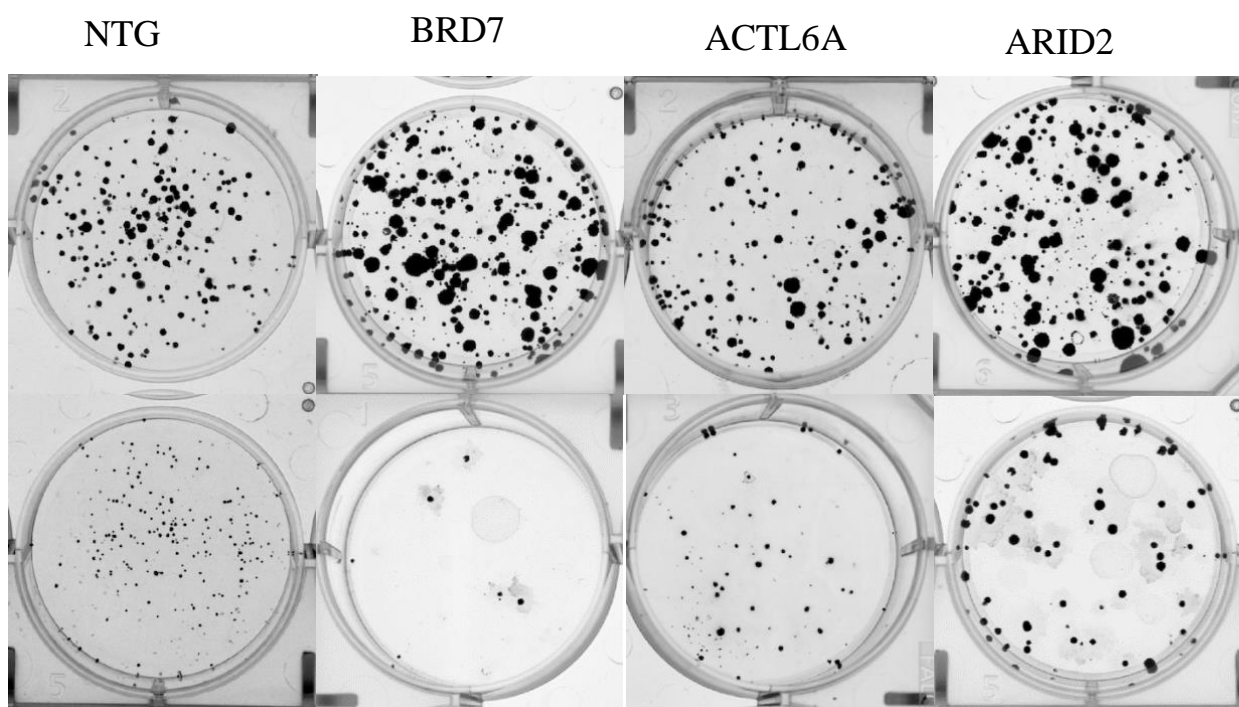


Рис. 3.9 - Клоногенний аналіз в моделях з клонами НСТ15 Cas9 (верхній ряд) і НСТ15 Cas9 CDKN1A-КО (нижній ряд). На рисунку зображені гени, що проявили найбільшу синтетичну летільність з CDKN1A (N=3)

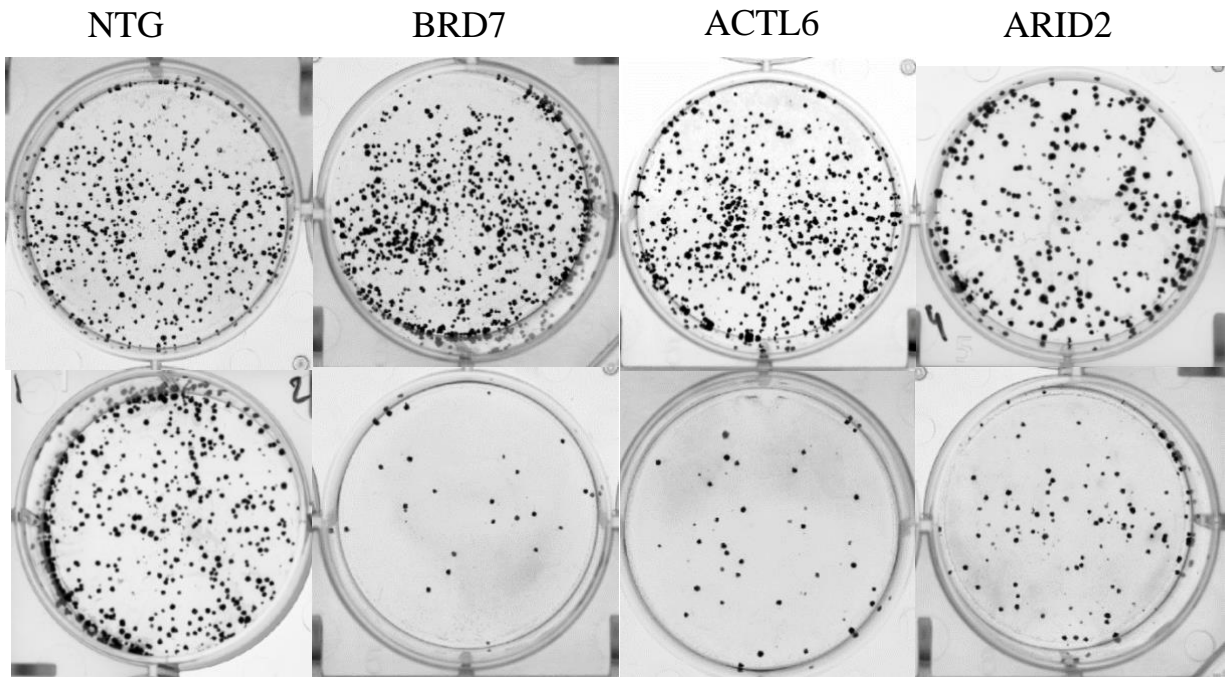


Рис. 3.10 - Клоногенний аналіз в моделях з клонами HeLa Cas9 (верхній ряд) і HeLa Cas9 CDKN1A-КО (нижній ряд). На рисунку зображені гени, що проявили найбільшу синтетичну летільність з CDKN1A (N=3)

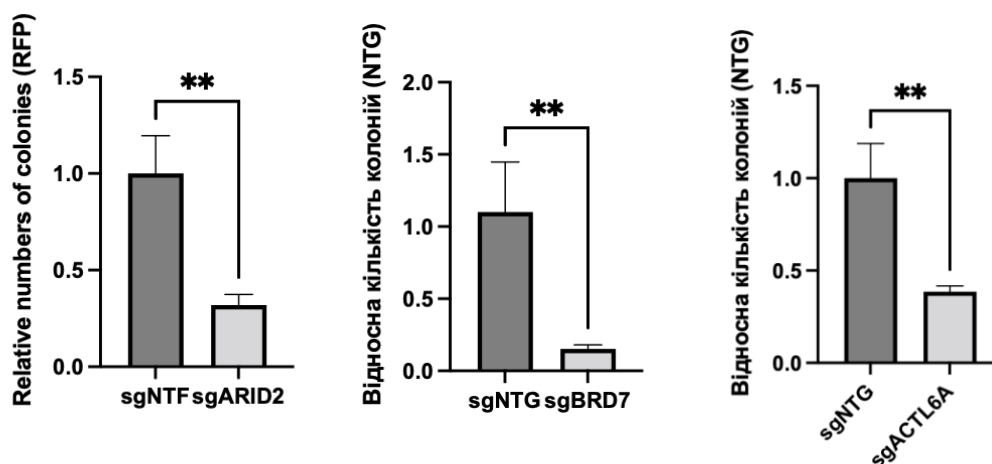


Рис. 3.11 - Графіки результатів клоногенного аналізу для генів, що проявили найбільшу синтетичну летальність з CDKN1A

Таким чином, в результаті індивідуального скринінгу генів mSWI/SNF було встановлено, що синтетична летальна взаємодія має місце між ARID2, BRD7 та ACTL6A компонентами mSWI/SNF і CDKN1A. Цікаво, що результати, отримані для гену ACTL6A співпадають з результатами, отриманими в попередніх експериментах.

ARID2 та BRD7 є компонентами PBAF субодиниці BAF комплексу, і існують певні наукові дослідження, що показують успішне використання компонентів PBAF комплексу для таргетної терапії раку [104]. Отримані результати скринінгу будуть використані для подальшої валідації в тваринних моделях.

Виявлені синтетичні взаємодії можуть знайти широке застосування для лікування як пацієнтів з мутаціями в гені CDKN1A, так і для тих, хто має мутації в генах, що входять до складу BAF комплексу, використовуючи відповідні інгібітори. Таким чином це дозволить значно розширити спектр використання отриманих результатів даного дослідження.

Оскільки ракові клітини накопичують шкідливі ураження, їхня залежність від генів пов'язаних з відповіддю на пошкодження ДНК значно збільшується, роблячи їх ефективною мішенню для лікування раку. Інше цікаве застосування цього дослідження полягає в тому, що ця робота не обмежується лише раком з мутацією в CDKN1A і дефіцитом p21. Оскільки деякі члени комплексу BAF часто мутують у множинних видах раку, включаючи рак яєчників [103] або рабдоїдні пухлини [96], синтетичні летальні взаємодії між p21 і членами комплексу BAF можна розширити шляхом інгібування p21 у цих пухлинах. Фактично, інгібітори p21, такі як UC2288, доступні, і вони будуть активно тестуватися в майбутніх дослідженнях. Таким чином, отримані результати цього дослідження можуть допомогти в розробці орієнтованої на генотип терапії для використання в персоналізованій медицині.

ВИСНОВКИ

- Проаналізовано літературні джерела та встановлено перелік генів з 370 генів, що або модулюють або грають ключову роль у репарації з використанням різноманітних шляхів відновлення пошкодження ДНК;
- Проаналізовано рівень експресії кожного з цих генів в трьох типах раку, а саме раку простати, раку молочної залози та раку товстої кишки. Було виявлено що 27 генів з цього списку втрачають експресію у всіх трьох прикладах раку;
- Для застосування системи CRISPR/Cas9 для дослідження синтетичних летальних взаємодій, було успішно згенеровано Cas9-експресуючі HCT15 та HeLa клітинні лінії;
- З використанням високопропускового CRISPR/Cas9 скринінгу було встановлено, що серед 370 генів, пов'язаних з репарацією ДНК та відповіддю ДНК на пошкодження, 9 виявляли синтетичні летальні взаємодії з CDKN1A;
- 6 з 9 генів отриманих з результатів високопропускового CRISPR/Cas9 скринінгу було валідовано в незалежній клітинній моделі HCT15 (колоректальна аденокарцинома);
- Було проведено аналіз синтетичних летальних взаємодій індивідуальних компонентів mSWI/SNF комплексу та встановлено синтетичну летальність між ARID2, BRD7 та ACTL6A компонентами mSWI/SNF і CDKN1A.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] J. H. J. Hoeijmakers, “DNA damage, aging, and cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 15, pp. 1475–1485, Oct. 2009, doi: 10.1056/NEJMra0804615.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] J. Cadet, E. Sage, and T. Douki, “Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA,” *Mutat. Res.*, vol. 571, no. 1–2, pp. 3–17, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.09.012.
- [4] G. Borrego-Soto, R. Ortiz-López, and A. Rojas-Martínez, “Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer,” *Genet. Mol. Biol.*, vol. 38, no. 4, pp. 420–432, Dec. 2015, doi: 10.1590/S1415-475738420150019.
- [5] D. H. Phillips, A. Hewer, C. N. Martin, R. C. Garner, and M. M. King, “Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking,” *Nature*, vol. 336, no. 6201, pp. 790–792, Dec. 1988, doi: 10.1038/336790a0.
- [6] A. Macacu, P. Autier, M. Boniol, and P. Boyle, “Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 154, no. 2, pp. 213–224, Nov. 2015, doi: 10.1007/s10549-015-3628-4.
- [7] M. M. Heinen, B. A. J. Verhage, R. A. Goldbohm, and P. A. van den Brandt, “Active and passive smoking and the risk of pancreatic cancer in the Netherlands Cohort Study,” *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.*, vol. 19, no. 6, pp. 1612–1622, Jun. 2010, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0121.
- [8] K. C. Thandra, A. Barsouk, K. Saginala, J. S. Aluru, and A. Barsouk, “Epidemiology of lung cancer,” *Contemp. Oncol. Poznan Pol.*, vol. 25, no. 1, pp. 45–52, 2021, doi: 10.5114/wo.2021.103829.
- [9] Y. H. Kang, K.-A. Lee, J.-H. Kim, S.-G. Park, and D.-Y. Yoon, “Mitomycin C modulates DNA-double strand break repair genes in cervical carcinoma cells,”

- Amino Acids*, vol. 39, no. 5, pp. 1291–1298, Nov. 2010, doi: 10.1007/s00726-010-0568-5.
- [10] B. Kaina and M. Christmann, “DNA repair in personalized brain cancer therapy with temozolomide and nitrosoureas,” *DNA Repair*, vol. 78, pp. 128–141, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.04.007.
- [11] C. Ryk *et al.*, “Influence of DNA repair gene polymorphisms on the initial repair of MMS-induced DNA damage in human lymphocytes as measured by the alkaline comet assay,” *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 49, no. 9, pp. 669–675, Dec. 2008, doi: 10.1002/em.20415.
- [12] T. Lerksuthirat *et al.*, “A DNA repair player, ring finger protein 43, relieves etoposide-induced topoisomerase II poisoning,” *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.*, vol. 25, no. 11, pp. 718–729, Nov. 2020, doi: 10.1111/gtc.12808.
- [13] C. Mei *et al.*, “The role of single strand break repair pathways in cellular responses to camptothecin induced DNA damage,” *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.*, vol. 125, p. 109875, May 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.109875.
- [14] A. Tubbs and A. Nussenzweig, “Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer,” *Cell*, vol. 168, no. 4, pp. 644–656, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.002.
- [15] J. W. Harper and S. J. Elledge, “The DNA damage response: ten years after,” *Mol. Cell*, vol. 28, no. 5, pp. 739–745, Dec. 2007, doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.015.
- [16] C. Lukas *et al.*, “Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention,” *EMBO J.*, vol. 23, no. 13, pp. 2674–2683, Jul. 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600269.
- [17] J.-F. Haince *et al.*, “PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 2, pp. 1197–1208, Jan. 2008, doi: 10.1074/jbc.M706734200.
- [18] E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner, “DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139,”

- J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5858–5868, Mar. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.10.5858.
- [19] A. Xiao *et al.*, “WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity,” *Nature*, vol. 457, no. 7225, pp. 57–62, Jan. 2009, doi: 10.1038/nature07668.
- [20] P. J. Cook, B. G. Ju, F. Telese, X. Wang, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld, “Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions,” *Nature*, vol. 458, no. 7238, pp. 591–596, Apr. 2009, doi: 10.1038/nature07849.
- [21] A. Celeste *et al.*, “Genomic instability in mice lacking histone H2AX,” *Science*, vol. 296, no. 5569, pp. 922–927, May 2002, doi: 10.1126/science.1069398.
- [22] M. S. Y. Huen *et al.*, “RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly,” *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 901–914, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.09.041.
- [23] N. K. Kolas *et al.*, “Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase,” *Science*, vol. 318, no. 5856, pp. 1637–1640, Dec. 2007, doi: 10.1126/science.1150034.
- [24] N. Mailand *et al.*, “RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins,” *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 887–900, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.09.040.
- [25] C. Doil *et al.*, “RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins,” *Cell*, vol. 136, no. 3, pp. 435–446, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2008.12.041.
- [26] Y. Galanty, R. Belotserkovskaya, J. Coates, S. Polo, K. M. Miller, and S. P. Jackson, “Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks,” *Nature*, vol. 462, no. 7275, pp. 935–939, Dec. 2009, doi: 10.1038/nature08657.
- [27] S. Watanabe *et al.*, “JMJD1C demethylates MDC1 to regulate the RNF8 and BRCA1-mediated chromatin response to DNA breaks,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 12, pp. 1425–1433, Dec. 2013, doi: 10.1038/nsmb.2702.

- [28] J. Vohhodina *et al.*, “RAP80 and BRCA1 PARsylation protect chromosome integrity by preventing retention of BRCA1-B/C complexes in DNA repair foci,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 4, pp. 2084–2091, Jan. 2020, doi: 10.1073/pnas.1908003117.
- [29] R. Ceccaldi, B. Rondinelli, and A. D. D’Andrea, “Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break,” *Trends Cell Biol.*, vol. 26, no. 1, pp. 52–64, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
- [30] C. Escribano-Diaz and D. Durocher, “DNA repair pathway choice--a PTIP of the hat to 53BP1,” *EMBO Rep.*, vol. 14, no. 8, pp. 665–666, Aug. 2013, doi: 10.1038/embor.2013.99.
- [31] D. A. Ronato, S. Y. Mersaoui, F. F. Busatto, E. B. Affar, S. Richard, and J.-Y. Masson, “Limiting the DNA Double-Strand Break Resectosome for Genome Protection,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 45, no. 9, pp. 779–793, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.tibs.2020.05.003.
- [32] M. H. Yun and K. Hiom, “CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle,” *Nature*, vol. 459, no. 7245, pp. 460–463, May 2009, doi: 10.1038/nature07955.
- [33] W. S. el-Deiry *et al.*, “WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression,” *Cell*, vol. 75, no. 4, pp. 817–825, Nov. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90500-p.
- [34] J. Bartek and J. Lukas, “DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 19, no. 2, pp. 238–245, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.009.
- [35] T. Shen and S. Huang, “The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis,” *Anticancer Agents Med. Chem.*, vol. 12, no. 6, pp. 631–639, Jul. 2012, doi: 10.2174/187152012800617678.
- [36] C. H. McGowan and P. Russell, “Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15,” *EMBO J.*, vol. 12, no. 1, pp. 75–85, Jan. 1993, doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05633.x.

- [37] C. Kandoth *et al.*, “Mutational landscape and significance across 12 major cancer types,” *Nature*, vol. 502, no. 7471, pp. 333–339, Oct. 2013, doi: 10.1038/nature12634.
- [38] T. A. Knijnenburg *et al.*, “Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas,” *Cell Rep.*, vol. 23, no. 1, pp. 239–254.e6, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.076.
- [39] J. R. Chapman, M. R. G. Taylor, and S. J. Boulton, “Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice,” *Mol. Cell*, vol. 47, no. 4, pp. 497–510, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.029.
- [40] J. R. Chapman *et al.*, “RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection,” *Mol. Cell*, vol. 49, no. 5, pp. 858–871, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.002.
- [41] M. Zimmermann, F. Lottersberger, S. B. Buonomo, A. Sfeir, and T. de Lange, “53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5’ end resection,” *Science*, vol. 339, no. 6120, pp. 700–704, Feb. 2013, doi: 10.1126/science.1231573.
- [42] S. Findlay *et al.*, “SHLD2/FAM35A co-operates with REV7 to coordinate DNA double-strand break repair pathway choice,” *EMBO J.*, vol. 37, no. 18, p. e100158, Sep. 2018, doi: 10.15252/embj.2018100158.
- [43] N. L. Batenburg, J. R. Walker, Y. Coulombe, A. Sherker, J.-Y. Masson, and X.-D. Zhu, “CSB interacts with BRCA1 in late S/G2 to promote MRN- and CtIP-mediated DNA end resection,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 20, pp. 10678–10692, Nov. 2019, doi: 10.1093/nar/gkz784.
- [44] A. Cruz-García, A. López-Saavedra, and P. Huertas, “BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection,” *Cell Rep.*, vol. 9, no. 2, pp. 451–459, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.076.
- [45] R. Anand, L. Ranjha, E. Cannavo, and P. Cejka, “Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection,” *Mol. Cell*, vol. 64, no. 5, pp. 940–950, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.017.

- [46] C. Escribano-Díaz *et al.*, “A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice,” *Mol. Cell*, vol. 49, no. 5, pp. 872–883, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.001.
- [47] S. K. Radhakrishnan, N. Jette, and S. P. Lees-Miller, “Non-homologous end joining: emerging themes and unanswered questions,” *DNA Repair*, vol. 17, pp. 2–8, May 2014, doi: 10.1016/j.dnarep.2014.01.009.
- [48] N. Ishida *et al.*, “Ubiquitylation of Ku80 by RNF126 Promotes Completion of Nonhomologous End Joining-Mediated DNA Repair,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 37, no. 4, pp. e00347-16, Feb. 2017, doi: 10.1128/MCB.00347-16.
- [49] J. Wang *et al.*, “PTIP associates with Artemis to dictate DNA repair pathway choice,” *Genes Dev.*, vol. 28, no. 24, pp. 2693–2698, Dec. 2014, doi: 10.1101/gad.252478.114.
- [50] J.-P. Capp *et al.*, “The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 10, pp. 2998–3007, 2006, doi: 10.1093/nar/gkl380.
- [51] P.-O. Mari *et al.*, “Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 49, pp. 18597–18602, Dec. 2006, doi: 10.1073/pnas.0609061103.
- [52] J. Gu, H. Lu, A. G. Tsai, K. Schwarz, and M. R. Lieber, “Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 17, pp. 5755–5762, 2007, doi: 10.1093/nar/gkm579.
- [53] C. Richardson and M. Jasin, “Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks,” *Nature*, vol. 405, no. 6787, pp. 697–700, Jun. 2000, doi: 10.1038/35015097.
- [54] S. Difilippantonio *et al.*, “53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination,” *Nature*, vol. 456, no. 7221, pp. 529–533, Nov. 2008, doi: 10.1038/nature07476.

- [55] L. R. Myler *et al.*, “Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair,” *Mol. Cell*, vol. 67, no. 5, pp. 891-898.e4, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.002.
- [56] R. S. Williams, J. S. Williams, and J. A. Tainer, “Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template,” *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.*, vol. 85, no. 4, pp. 509–520, Aug. 2007, doi: 10.1139/O07-069.
- [57] A. V. Nimonkar *et al.*, “BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair,” *Genes Dev.*, vol. 25, no. 4, pp. 350–362, Feb. 2011, doi: 10.1101/gad.2003811.
- [58] K. Nakamura *et al.*, “Collaborative action of Brca1 and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair,” *PLoS Genet.*, vol. 6, no. 1, p. e1000828, Jan. 2010, doi: 10.1371/journal.pgen.1000828.
- [59] P. Huertas and S. P. Jackson, “Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 14, pp. 9558–9565, Apr. 2009, doi: 10.1074/jbc.M808906200.
- [60] J. Han *et al.*, “ATM controls the extent of DNA end resection by eliciting sequential posttranslational modifications of CtIP,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, no. 12, p. e2022600118, Mar. 2021, doi: 10.1073/pnas.2022600118.
- [61] F. Mejías-Navarro, G. Rodríguez-Real, J. Ramón, R. Camarillo, and P. Huertas, “ALC1/eIF4A1-mediated regulation of CtIP mRNA stability controls DNA end resection,” *PLoS Genet.*, vol. 16, no. 5, p. e1008787, May 2020, doi: 10.1371/journal.pgen.1008787.
- [62] E. I. Golub, R. C. Gupta, T. Haaf, M. S. Wold, and C. M. Radding, “Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 23, pp. 5388–5393, Dec. 1998, doi: 10.1093/nar/26.23.5388.

- [63] M. E. Stauffer and W. J. Chazin, “Physical interaction between replication protein A and Rad51 promotes exchange on single-stranded DNA,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 24, pp. 25638–25645, Jun. 2004, doi: 10.1074/jbc.M400029200.
- [64] W. Zhao *et al.*, “BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing,” *Nature*, vol. 550, no. 7676, pp. 360–365, Oct. 2017, doi: 10.1038/nature24060.
- [65] J. Chun, E. S. Buechelmaier, and S. N. Powell, “Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 2, pp. 387–395, Jan. 2013, doi: 10.1128/MCB.00465-12.
- [66] S. P. Jackson and J. Bartek, “The DNA-damage response in human biology and disease,” *Nature*, vol. 461, no. 7267, pp. 1071–1078, Oct. 2009, doi: 10.1038/nature08467.
- [67] S. Negrini, V. G. Gorgoulis, and T. D. Halazonetis, “Genomic instability--an evolving hallmark of cancer,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 220–228, Mar. 2010, doi: 10.1038/nrm2858.
- [68] T. J. Whelan *et al.*, “Regional Nodal Irradiation in Early-Stage Breast Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 4, pp. 307–316, Jul. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1415340.
- [69] J. D. Fackenthal and O. I. Olopade, “Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 12, pp. 937–948, Dec. 2007, doi: 10.1038/nrc2054.
- [70] M. E. Moynahan and M. Jasin, “Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 196–207, Mar. 2010, doi: 10.1038/nrm2851.
- [71] E. Levy-Lahad, “Fanconi anemia and breast cancer susceptibility meet again,” *Nat. Genet.*, vol. 42, no. 5, pp. 368–369, May 2010, doi: 10.1038/ng0510-368.
- [72] T. Walsh and M.-C. King, “Ten genes for inherited breast cancer,” *Cancer Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 103–105, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.010.

- [73] A. Nussenzweig and M. C. Nussenzweig, "Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer," *Cell*, vol. 141, no. 1, pp. 27–38, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.016.
- [74] W. K. Chu and I. D. Hickson, "RecQ helicases: multifunctional genome caretakers," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 9, pp. 644–654, Sep. 2009, doi: 10.1038/nrc2682.
- [75] J. A. D'Orazio, "Inherited cancer syndromes in children and young adults," *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 32, no. 3, pp. 195–228, Apr. 2010, doi: 10.1097/MPH.0b013e3181ced34c.
- [76] Y. Xiong, G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, and D. Beach, "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases," *Nature*, vol. 366, no. 6456, pp. 701–704, Dec. 1993, doi: 10.1038/366701a0.
- [77] T. Abbas and A. Dutta, "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 6, pp. 400–414, Jun. 2009, doi: 10.1038/nrc2657.
- [78] A. V. Follis, C. A. Galea, and R. W. Kriwacki, "Intrinsic protein flexibility in regulation of cell proliferation: advantages for signaling and opportunities for novel therapeutics," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 725, pp. 27–49, 2012, doi: 10.1007/978-1-4614-0659-4_3.
- [79] A. L. Gartel and A. L. Tyner, "Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene," *Exp. Cell Res.*, vol. 246, no. 2, pp. 280–289, Feb. 1999, doi: 10.1006/excr.1998.4319.
- [80] Y.-S. Jung, Y. Qian, and X. Chen, "Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity," *Cell. Signal.*, vol. 22, no. 7, pp. 1003–1012, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.01.013.
- [81] N. G. Starostina and E. T. Kipreos, "Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors," *Trends Cell Biol.*, vol. 22, no. 1, pp. 33–41, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.tcb.2011.10.004.
- [82] E. S. Child and D. J. Mann, "The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability," *Cell Cycle*

- Georget. Tex*, vol. 5, no. 12, pp. 1313–1319, Jun. 2006, doi: 10.4161/cc.5.12.2863.
- [83] L. A. Stivala, O. Cazzalini, and E. Prosperi, “The cyclin-dependent kinase inhibitor p21CDKN1A as a target of anti-cancer drugs,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 12, no. 2, pp. 85–96, Feb. 2012, doi: 10.2174/156800912799095126.
- [84] W. S. El-Deiry, “p21(WAF1) Mediates Cell-Cycle Inhibition, Relevant to Cancer Suppression and Therapy,” *Cancer Res.*, vol. 76, no. 18, pp. 5189–5191, Sep. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2055.
- [85] S. R. J. Bott, M. Arya, R. S. Kirby, and M. Williamson, “p21WAF1/CIP1 gene is inactivated in metastatic prostatic cancer cell lines by promoter methylation,” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 8, no. 4, pp. 321–326, 2005, doi: 10.1038/sj.pcan.4500822.
- [86] M. Askari, R. C. Sobti, M. Nikbakht, and S. C. Sharma, “Aberrant promoter hypermethylation of p21 (WAF1/CIP1) gene and its impact on expression and role of polymorphism in the risk of breast cancer,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 382, no. 1, pp. 19–26, Oct. 2013, doi: 10.1007/s11010-013-1696-5.
- [87] Y. Yu *et al.*, “Epigenetic silencing of tumor suppressor gene CDKN1A by oncogenic long non-coding RNA SNHG1 in cholangiocarcinoma,” *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0768-6.
- [88] Z. Wang *et al.*, “Genetic variants of p27 and p21 as predictors for risk of second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of head and neck,” *Mol. Cancer*, vol. 11, p. 17, Mar. 2012, doi: 10.1186/1476-4598-11-17.
- [89] F. Perri, S. Pisconti, and G. Della Vittoria Scarpati, “P53 mutations and cancer: a tight linkage,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 4, no. 24, p. 522, Dec. 2016, doi: 10.21037/atm.2016.12.40.
- [90] Y. Sun, S. Yang, N. Sun, and J. Chen, “Differential expression of STAT1 and p21 proteins predicts pancreatic cancer progression and prognosis,” *Pancreas*, vol. 43, no. 4, pp. 619–623, May 2014, doi: 10.1097/MPA.0000000000000074.

- [91] Z. E. Winters *et al.*, “Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21WAF1/CIP1 in breast cancer: association with prognosis,” *Eur. J. Cancer*, vol. 37, no. 18, pp. 2405–2412, Dec. 2001, doi: 10.1016/S0959-8049(01)00327-6.
- [92] R. Bajpai *et al.*, “CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation,” *Nature*, vol. 463, no. 7283, pp. 958–962, Feb. 2010, doi: 10.1038/nature08733.
- [93] S. He *et al.*, “Structure of nucleosome-bound human BAF complex,” *Science*, vol. 367, no. 6480, pp. 875–881, Feb. 2020, doi: 10.1126/science.aaz9761.
- [94] B. R. Cairns, Y. J. Kim, M. H. Sayre, B. C. Laurent, and R. D. Kornberg, “A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 5, pp. 1950–1954, Mar. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.5.1950.
- [95] X. Wang *et al.*, “SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation,” *Nat. Genet.*, vol. 49, no. 2, pp. 289–295, Feb. 2017, doi: 10.1038/ng.3746.
- [96] C. Hodges, J. G. Kirkland, and G. R. Crabtree, “The Many Roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF Complexes in Cancer,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 8, p. a026930, Aug. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a026930.
- [97] Y. Chen *et al.*, “A PARP1-BRG1-SIRT1 axis promotes HR repair by reducing nucleosome density at DNA damage sites,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 16, pp. 8563–8580, Sep. 2019, doi: 10.1093/nar/gkz592.
- [98] P. M. Brownlee, C. Meisenberg, and J. A. Downs, “The SWI/SNF chromatin remodelling complex: Its role in maintaining genome stability and preventing tumorigenesis,” *DNA Repair*, vol. 32, pp. 127–133, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.04.023.
- [99] R. M. Chabanon, D. Morel, and S. Postel-Vinay, “Exploiting epigenetic vulnerabilities in solid tumors: Novel therapeutic opportunities in the treatment of SWI/SNF-defective cancers,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 61, pp. 180–198, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.018.

- [100] W. Qi *et al.*, “BRG1 promotes the repair of DNA double-strand breaks by facilitating the replacement of RPA with RAD51,” *J. Cell Sci.*, vol. 128, no. 2, pp. 317–330, Jan. 2015, doi: 10.1242/jcs.159103.
- [101] R. Watanabe *et al.*, “SWI/SNF factors required for cellular resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 9, pp. 2465–2475, May 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3608.
- [102] B. Zhao *et al.*, “ARID1A promotes genomic stability through protecting telomere cohesion,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 4067, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12037-4.
- [103] K. Takahashi, M. Takenaka, A. Okamoto, D. D. L. Bowtell, and T. Kohno, “Treatment Strategies for ARID1A-Deficient Ovarian Clear Cell Carcinoma,” *Cancers*, vol. 13, no. 8, p. 1769, Apr. 2021, doi: 10.3390/cancers13081769.
- [104] R. M. Chabanon *et al.*, “PBRM1 Deficiency Confers Synthetic Lethality to DNA Repair Inhibitors in Cancer,” *Cancer Res.*, vol. 81, no. 11, pp. 2888–2902, Jun. 2021, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0628.