**XXII Российская научная конференция школьников «Открытие»**

**Секция биологии**

**Дизайн гРНК и сборка плазмид для одновременной сверхэкспрессии генов MSH2 и MSH6 в клетках человека с помощью технологии CRISPRa**

***Исследовательская работа***

 **Фефилова Елизавета Алексеевна**,

 учащаяся 10 класса

 МАОУ «Лицей народной дипломатии»

 г. Сыктывкара Республики Коми

 Научный руководитель:

 **Велегжанинов Илья Олегович,**

 к.б.н, н.с.

 Института биологии

 Коми НЦ УрО РАН

 Научный консультант:

 **Константинова Татьяна Петровна,**

 педагог-организатор МАОУ «Лицей

 народной дипломатии» г. Сыктывкара

**г. Ярославль, 2019 г.**Содержание

Введение………………………………………………….…......................2

ГЛАВА 1. Обзор информационных источников...……………...............3

* 1. Генная инженерия………………………..........…..3
	2. Гены MSH2, MSH6……………………….......…....3
	3. Технология CRISPRa………………...…........….....4
	4. Искусственный dCas9……………………...........…5

ГЛАВА 2. Материалы и методы…………………………….............…....5

ГЛАВА 3. Результаты исследований и обсуждение.................................8

Заключение...................................................................................................11

Список использованных источников…………...………..........................11

**Введение**

Механизмы, запускаемые в ответ на стресс в клетках млекопитающих определяют клеточную устойчивость к стрессовым факторам. Понимание механизмов, регулирующих целостность генома и возможность управления ими, было в центре внимания биологических исследований в последние десятилетия. Это связано с высокой фундаментальной и прикладной ценностью таких знаний. Способность контролировать устойчивость клеток и организмов к стрессу будет иметь большое значение для совершенствования методов лечения рака, увеличения продолжительности жизни человека, создания более стабильных клеток-продуцентов и новых сельскохозяйственных сортов растений и пород животных, а также для защиты космонавтов от космической радиации. Возможность конструирования организмов с заданной специфической или универсальной устойчивостью/чувствительностью к стрессовым факторам позволит создавать ряды тестовых объектов одного вида с широким спектром чувствительности для токсикологических и экотоксикологических исследований, что является одной из актуальных задач современной экологии (Velegzhaninov et al,2018).

Любые мутации, возникающие в полинуклеотидной цепи, могут нести тяжелые или даже фатальные последствия для всей живой системы. Для предотвращения таких последствий в организме осуществляют работу несколько комплексов, способных быстро среагировать на возникшую угрозу, остановить ее развитие и тем самым предотвратить крах системы. В связи с этим мы предположили, что для достижения цели – повысить стрессоустойчивость – более перспективным будет подход, основанный на сверхэкспрессии генов-участников данных комплексов (Удоратина, 2018). Для достижения данной цели использовали последнее открытие в области редактирования генома CRISPR/Cas и транскрипционного программирования (CRISPRa и CRISPRi), которые открывают широкие возможности в управлении спектром клеточных функций, включая устойчивость к факторам стресса, таким как ионизирующее излучение (Velegzhaninov et al,2018).

**Перспективы исследования:** выявить изменения устойчивости клеток человека к радиации при одновременной сверхэкспрессии генов распознавания неправильно спаренных оснований в ДНК MSH2 и MSH6.

**Цель проекта:** выполнить дизайн и сборку плазмид, необходимых для сверхэкспрессии генов MSH2 и MSH6 в человеческих клетках с помощью технологии CRISPRa

**Задачи:**

1. выполнить дизайн последовательности гРНК для сверхэкспрессии генов MSH2 и MSH6 в человеческих клетках с помощью технологии CRISPRa

2. Собрать плазмиды, экспрессирующие гРНК, дизайн которых выполнен на этапе 1, на базе вектора gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2 и синтезированных олигонуклеотидов.

3.Трансформировать E. coli новыми плазмидами и верифицировать клоны с помощью ПЦР.

**Гипотеза:** путем сверхэкспрессии генов MSH2 и MSH6 можно увеличить устойчивость клеток человека к радиоактивному излучению.

**Объект исследования**: клетки человека HEK293T.

**Глава 1. Обзор информационных источников**

**1.1 Генетическая инженерия**

Генетическая инженерия - со­во­куп­ность ме­то­дов био­хи­мии и мо­ле­ку­ляр­ной ге­не­ти­ки, с по­мо­щью ко­то­рых осу­ще­ст­в­ля­ет­ся на­прав­лен­ное ком­би­ни­ро­ва­ние ге­не­тической ин­фор­ма­ции лю­бых ор­га­низ­мов (Большая российская энциклопедия. URL:<https://bigenc.ru>). Генно-инженерные исследования вносят уникальный вклад в изучение структурно-функциональной организации геномов различных организмов. Методология генетической инженерии постоянно совершенствуется и все больше исследователей используют ее при решении самых разных задач биологической науки. Методами генетической инженерии созданы штаммы бактерий, дрожжей, линии клеток, с высокой эффективностью продуцирующих биологически активные белки человека и животных. Это позволяет получать эукариотические полипептиды в огромных по сравнению с недавним прошлым количествах, что упрощает процедуру их очистки вплоть до индивидуального состояния. Работы по созданию штаммов-продуцентов имеют очень важное значение для медицины и ветеринарии и революционизируют бурно развивающуюся отрасль промышленности- биотехнологию. Чрезвычайно интересны исследования по созданию трансгенных животных и растений, содержащих и экспрессирующих чужеродную генетическую информацию. (Щелкунов С. Н.,1999). Из всего вышеперечисленного можно сделать вывод, что генная инженерия является перспективной областью науки. В своей работе мы использовали различные новейшие методы генной инженерии, такие как рестрикция, лигирование, трансформация, скрининг и другие.

**1.2 Гены MSH2, MSH6**

Гены MSH2 и MSH6 участвуют в репарации неспаренных нуклеотидов ДНК. Это значит, что при неправильном спаривании оснований продукты генов MSH2 и MSH6 находят ненужные выпетливания ДНК и посылают сигнал белкам, кодируемым генами MLH1, PMS2, которые в свою очередь устраняют данную ошибку. (Раскин Г.А. et al,2015). В случае мутации в генах MSH2 и MSH6 человек приобретает предрасположенность к онкологическим заболеваниями или болезнь Линча. Продукты генов MSH2 и MSH6 работают единым комплексом (Fishel, 2015; [Keränen A](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ker%C3%A4nen%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=30572730). et al, 2018). Несмотря на их важнейшую роль в стрессоустойчивости клеток одновременную сверхэкспрессию данных генов никто ранее не осуществлял. Мы предположили, что одновременная сверхэкспрессия генов MSH2 и MSH6 может увеличить стрессоустойчивость (устойчивость к ионизирующему излучению и окислительному стрессу) клеток человека.

**1.3 Технология CRISPRa**



**Рис.1** Структура CRISPR-системы

Бактерии и археи, в отличие от людей, не имеют иммунитета, поэтому у них есть своя система защиты от вирусов, называемая системой Crispr-Cas. Данная система состоит из двух основных блоков: CRISPR-кассеты и прилегающего к ней кластера генов cas. Кассета — это блок взаимокомплементарных последовательностей - повторов размером 24–48 пар нуклеотидов. Эти повторы перемежаются спейсерами — уникальными вставками примерно такой же длины. Спейсеры идентичны различным участкам фагов и других мобильных элементов, когда-либо проникавших в эту клетку или ее предков. (рис.1).

Таким образом, CRISPR можно считать коллекцией кусочков ДНК различных фагов, когда-либо проникавших в клетку. Для того, чтобы эта коллекция могла регулярно обновляться и просматриваться, существует лидерная последовательность, предшествующая череде повторов. Гены cas кодируют белки, встраивающие спейсеры и уничтожениющие агентов с идентичными спейсерам последовательностями. Функцию уничтожения выполняют Cas-белки, называемые эффекторными.

Crispr-система выполняет свои функции следующим образом.Для поиска повторно вторгающихся агентов CRISPR-кассета должна экспрессироваться. В результате ее транскрипции образуется длинная молекула crispr-РНК. С помощью РНКазы и Cas-белков транскрипт нарезается по повторам на отдельные молекулы РНК, содержащие один спейсер и кусочки окружающих его повторов, для этого процесса необходим еще один участник — транспортная РНК.

Далее дуплексы транспортной РНК и crispr-РНК связываются с одним белком-эффектором- Cas9. Так образуется интерференционный функциональный модуль — рабочая иммунная единица, состоящая из направляющей РНК и эффекторного белка (или комплекса). Совокупность таких единиц «сканирует» клетку в поисках внедрившихся фагов.

При обнаружении комплементарной crispr-РНК последовательности модуль «слипается» с ней и определяет, не помечена ли она как «своя», клеточная. Если нет, и если к ней прилегает тот самый PAM, то эффекторный белок разрезает обе цепи ДНК в строго определенных местах. В результате атакованные фаги выводятся из строя, а в клетке появляются спейсеры, характерные фагам. (Биомолекула.URL: https://biomolecula.ru)

**1.4 Искусственный dCas9**

Наряду с обычным «природным» Cas9, который делает двухцепочечные разрывы в ДНК, ученые применяют и его измененные формы. Наш опыт предполагает использование одной из них, а именно мутантного белка dCas9. Он находит ДНК-мишень и связывается с ней, но не способен ее разрезать. Белок dCas9 применяют для инактивации генов на стадии транскрипции — он блокирует продвижение РНК-полимеразы, того самого фермента, который синтезирует РНК на матрице ДНК. Этот способ называется CRISPR- интерференцией, или CRISPRi. Аналогичным способом можно не полностью выключать транскрипцию, а избирательно менять ее активность. Для этого к dCas9 добавляют домен белка – фактора транскрипции, который увеличивает или подавляет активность генов, а затем снабжают его sgРНК, которая доставит эту конструкцию на регуляторный участок – промотор нужного гена. (Элементы. URL: <http://elementy.ru>).

**Глава 2. Материалы и методы**

Практическая часть работы была условно разделена на 3 этапа:

Этап 1. Дизайн гидовых РНК, которые будут направлять dCas9 с активатором транскрипции на промоторы генов MSH2 и MSH6. Дизайн коротких двунитевых молекул ДНК, которые нужно вставить в специальный вектор (gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2).

Этап 2. Вставка синтезированных коротких молекул ДНК, дизайн которых выполнен в первой части работы, в gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2, для экспрессии нужной нам гидовой РНК в клетках человека.

Этап 3. Трансфекция человеческих клеток и оценка сверхэкспресии генов MSH2 и MSH6, и оценка устойчивости клеток к гамма излучению и действию прооксиданта параквата.

**Этап 1.**

1. Мы выделили последовательности промотров гена MSH2, и 3 сплайс-вариантов гена MSH6. Нам был необходим фрагмент последовательности на 800-1000 нуклеотидов выше старта транскрипции гена, для этого мы использовали онлайн интерфейс базы данных Gene NCBI (Национальный центр биотехнологической информации).

2. Из выделенных ранее 800-1000 нуклеотидов при помощи онлайн-инструмента Casdesigner мы находим последовательности из 20 нуклеотидов, которые заканчиваются на PAM последовательность- nGG. PAM представляет собой последовательность ДНК из 3 пар оснований, следующую непосредственно за последовательностью ДНК, на которую нацелена нуклеаза Cas9 в бактериальной системе CRISPR.

3. Из всех найденных последовательностей мы ищем те, которые максимально специфичны с нашей мишенью и не имеют никаких схожих мишеней (мишени которые отличаются от искомой менее чем на 3 нуклеотида) в геноме человека. Такой поиск осуществляли с помощью онлайн-инструмента Casoffinder. Кроме того, мы исключали те последовательности, в которых были более 4 идущих подряд аденина, так как такая последовательность является стоп кодоном для полимеразы, которая будет производить гидовую РНК в клетках человека. Мы выбирали подходящие последовательности, которые находятся максимально близко к старту транскрипции, так как максимальная сверхэкспрессия достигается только в таком случае (Chavez et al., 2015). Для гена MSH2 мы выбрали 5 последовательностей нуклеотидов. Для первого сплайс-варианта гена MSH6 было выбрано также 5 последовательностей, а для двух ругих по одной последовательности из-за наложения сплайс- вариантов данного гена друг на друга. (Таблица 1)

4. Делаем парные комплиментарные олигонуклеотиды, и с 5' концов обоих добавляем "липкие концы" (САСС и АААС), для вставки в плазмиду. Липкие концы - это выступающие однонитевые последовательности, комплиментарные аналогичным на концах разрезанной плазмиды. Их последовательность зависит от рестриктазы, которую мы используем для клонирования (Таблица 1).

5. В позитивную нить последовательности с 5' конца добавляем букву G, а в негативную с 3’ конца букву C, в тех случаях, когда их там нет. Это значительно увеличивает эффективность экспрессии гидовой РНК с U6 промотора, встроенного в плазмиду.

6. Заказываем синтез получившихся олигонуклеотидов (табл. 1).

**Этап 2.**

Пошаговый план сборки плазмид:

1.Размножаем E. coli, производящие плазмиду «gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2» в ночной культуре.

2. Выделяем из массы клеток плазмиды с помощью набора реактивов Plasmid Midiprep (Евроген, Россия) по протоколу производителя.

3. Анализируем концентрацию плазмиды в полученном растворе (с помощью флуориметра и интеркалирующего красителя PicoGreen).

4. Режем плазмиду с помощью BbsI (рестрикция) по протоколу производителя фермента (New England Biolabs, США).

5. Продукт рестрикции отделяем от неразрезанной плазмиды с помощью электрофореза в присутствии интеркалирующего красителя бромистый этидий.

6. Выделяем ДНК из геля с помощью набора реактивов Cleanup Standard (Евроген, Россия) по протоколу производителя.

7. Анализируем концентрацию ДНК в полученном растворе

8. Синтезированные олигонуклеотиды из этапа 1, объединяем в двунитевые ДНК и фосфорилируем концы с помощью фермента полинуклеотидкиназы (PNK) в одной реакции. Реакцию проводили по протоколу, доступному на онлайн ресурсе Flycrispr (FlyCRISPR.URL: http://flycrispr.molbio.wisc.edu/protocols/gRNA).

9. Лигируем фосфорилированные двунитевые олигонуклеотиды, полученные на шаге 8 с очищенной разрезанной плазмидой, полученной в шагах 1-7 с помощью T4-ДНК-лигазы (Евроген, Россия) по протоколу производителя. За счёт липких концов олигонуклеотид сшивается с концами резанной плазмиды, вновь замыкая её в кольцо. Лигаза восстанавливает сахарофосфатный остов ДНК вместе сшивки.

10. Полученную смесь, содержащую продукт лигирования и несшитые молекулы, трансформируем в кишечную палочку стандартным методом с помощью CaCl2. При этом, только те бактерии, в которые попадает замкнутая плазмида (сшитая) могут реплицировать её, и приобретают, таким образом, устойчивость к антибиотику ампициллину, ген устойчивости к которому тоже закодирован в плазмиде.

11. Сажаем трансформированные бактерии на среду с ампициллином. Выживают только те, что содержат правильно собранную плазмиду. Так как липкие концы, остающиеся после рестриктазы BbsI не симметричны, то лигирование концов плазмиды друг с другом, а также лигирование олигонуклеотида в плазмиду в неправильной ориентации, исключены. Однако сохраняется вероятность попадания целых плазмид, оставшихся на этапах очистки 5-6.

12. Для исключения колоний, содержащих плазмиду без вставки тестируем отдельные колонии выживших бактерий с помощью ПЦР, в качестве одного из праймеров используем однонитевый олигонуклеотид, полученный на первом этапе работы, а в качестве второго – стандартный праймер M13. Нумеруем остатки колоний, чтобы использовать для следующего шага.

13. Наращиваем ночную культуру из колонии, оказавшейся позитивной по результатам ПЦР на шаге 12.

14. Стерильно выделяем плазмидную ДНК.

**Этап 3.**

1. С помощью реактива Lipofectamine 3000 трансфецируем человеческие клетки HEK293T смесью плазмид, полученных на шаге 14, кодирующих гидовые РНК к промоторам генов MSH2 и MSH6 (по 3-5 гидовых РНК на каждый ген), а так же плазмиду pXPR120, кодирующую dCas9 с активатором VPR.

2. Через двое суток часть клеток рассаживаем для оценки выживаемости в ответ на действие ионизирующего излучения или параквата, а из оставшейся части клеток выделяем РНК для анализа уровня экспрессии генов MSH2 и MSH6. Рассадку осуществляем в 12-луночные планшеты по 50 и 200 клеток на лунку, для анализа выживаемости с помощью классического метода формирования колоний.

3. Измеряем концентрацию выделенной на шаге 16 РНК на флуориметре с помощью флуоресцентного РНК-специфичного красителя RiboGreen (Thermo Fisher, США) по протоколу производителя красителя.

4. Нормализуем концентрацию РНК между пробами и выполняем обратную транскрипцию с помощью набора реагентов MMLV RT kit (Евроген, Россия) по протоколу производителя.

5. Используя кДНК, полученную на шаге 18 анализируем уровень экспрессии генов MSH2 и MSH6 относительно генов «домашнего хозяйства» ACTB и GAPDH с помощью количественного ПЦР в реальном времени. Для этого используем набор qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) и протокол производителя. Реакцию амплификации проводим со следующими параметрами: 95°С - 5 мин, затем 40 циклов: 95°С – 15 сек, 58°С – 15 сек, 72°С – 30 сек. Анализ результатов осуществляем по методу 2ΔΔCt.

6. Часть клеток, рассаженную на анализ устойчивости к ионизирующему излучению и параквату (шаг 16) подвергаем соответствующему воздействию через 6 часов после рассадки.

7. Через 7 суток после облучения, или воздействия паракватом, фиксируем и окрашиваем клетки и оцениваем выживаемость по количеству сформировавшихся колоний. Сравниваем выживаемость клеток, сверхэкспрессирующих гены MSH2 и MSH6 в сравнении с клектами без сверхэкспрессии обоих генов, либо сверхэспрессирующих только один из двух указанных генов. Делаем вывод об изменениях стрессоустойчивости клеток человека при одновременной сверхэкспрессии генов распознавания и репарации мисматчей MSH2 и MSH6.

**Глава 3. Результаты исследований и обсуждение**

Результатом работы являются штаммы бактерии *Escherichia coli,* производящие плазмиды, которые могут экспрессировать гидовую РНК к промоторам генов MSH2, MSH6 в клетках млекопитающих. Если расписывать результаты поэтапно то:

1. Выполнен дизайн гидовых РНК к промоторам генов MSH2 и MSH6. (олигонуклеотиды для клонирования векторэкспрессирующей гидовой РНК в клетках человека). Результаты представлены в табл. 1.

**Таблица 1**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Гены | Расстояние от старта транскрипции гена | Комплиментарные ДНК фрагменты с липкими концами |
| MSH2 | 36 | 1)CACCGCAACCAATCATAAGCAGACG 2)AAACCGTCTGCTTATGATTGGTTGC |
| 67 | 1)CACCGCTAAAGTCACCAGCGTGCGC 2) AAACGCGCACGCTGGTGACTTTAGC |
| 99 | 1)CACCGATGCCTGCGCCTAGGTCGCG 2) AAACCGCGACCTAGGCGCAGGCATC |
| 187 | 1)CACCGCTTGCATACACCCCACCCAG 2)AAACCTGGGTGGGGTGTATGCAAGC |
| 218 | 1)CACCGCCGGAAATCTCCCACCTGG 2)AAACCCAGGTGGGAGATTTCCGGC |
| MSH6(1 сплайc-вариант) | 137 | 1)CACCGAGCTCAGCAGTTCCCCGCG 2)AAACCGCGGGGAACTGCTGAGCTC |
| 185 | 1)CACCGCGGGTCGGAGTGTTCCGGCC 2) AAACGGCCGGAACACTCCGACCCGC |
| 236 | 1)CACCGCTCGGAAAGCCCTGCCTCTC 2)AAACGAGAGGCAGGGCTTTCCGAGC |
| 292 | 1)CACCGCCCGGGCGGGGATAACCGGG 2)AAACCCCGGTTATCCCCGCCCGGGC |
| 438 | 1)CACCGATCTTGAGAATACAACGTGA 2)AAACTCACGTTGTATTCTCAAGATC |
| MSH6 (2 сплайс-вариант) | 133 | 1)CACCGCAACGGAGGGCTGCGGAGAT 2)AAACATCTCCGCAGCCCTCCGTTGC |
| MSH6 (3 сплайс-вариант) | 325 | 1)CACCGCGAGGGGAGGCTCGCACAG 2)AAACCTGTGCGAGCCTCCCCTCGC |

2. Выполнена рестрикции и очистка линиаризованной плазмиды «gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2»

****

**Рис.2** Электрофорез продуктов рестрикции плазмиды gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2 с помощью рестриктазы BbsI

3. Выполнено клонирование(сборка) олигонуклеотидов, кодирующих гидовые РНК, к промоторам генов MSH2 и MSH6 в вектор «gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2». Выполнена селекция и ПЦР-верефикация клонов E-coli (линия XL1blue, продуцирующие гидовые РНК интереса).

****

**Рис. 3** Селекция клонов, трансформированных продуктами лигирования

~~~~

**Рис.4** Результат проверки отобранных колоний на наличие в них собранной плазмиды, экспрессирующей gRNA

**Заключение**

Результатом работы явилось создание штамма бактерии *Escherichia coli,* производящего плазмиды, которые могут экспрессировать гидовую РНК к промоторам генов MSH2, MSH6 в клетках млекопитающих. Нами был выполнен дизайн гидовых РНК к промоторам генов MSH2 и MSH6 (олигонуклеотиды для клонирования векторэкспрессирующей гидовой РНК в клетках человека).

Проделаны рестрикция и очистка линиаризованной плазмиды «gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2», а затем клонирование(сборка) олигонуклеотидов, кодирующих гидовые РНК, к промоторам генов MSH2 и MSH6 в вектор «gRNA Cloning Vector Bbs I ver. 2».

 Выполнена селекция и ПЦР-верефикация клонов E-coli (линия XL1blue, продуцирующая гидовые РНК интереса). В дальнейшем планируется произвести вставку получившихся плазмид в клетки человека, после которой появится возможность ответить на вопрос, действительно ли сверхэкспрессия генов MSH2 и MSH6 увеличивает стрессоустойчивость клеток.

**Список использованных источников**

1. Биомолекула [Электронный ресурс]/Режим работы: https://biomolecula.ru

2. Большая российская энциклопедия [Электронный ресурс]/Режим работы: <https://bigenc.ru>

3. Раскин Г.А., Петров С.В., Орлова Р.В. Иммуногистохимическое исследование MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 в определении степени злокачественности аденокарциномы толстой кишки//2015.c 80-83

4. Удоратина Анна. Cверхэкспрессия генов репарации ДНК при помощи системы Сrispr/Сas//2018.с 1-44

5. Щелкунов С. Н..Генетическая инженерия//1999.c. 1-506

6. Элементы [Электронный ресурс]/Режим работы: <http://elementy.ru>

7. Fishel, R. Mismatch repair. J Biol Chem. 2015, 290, 26395-26403.
Gilbert, L.A.; Larson, M.H.; Morsut, L.; Liu, Z.; Brar, G.A.; Torres, S.E.; Stern-Ginossar, N.; Brandman, O.; Whitehead, E.H.; Doudna, J.A.; et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcriptionin Eukaryotes. Cell 2013, 154, 442–451.

8. FlyCRISPR[Электронный ресурс]/Режим работы: http://flycrispr.molbio.wisc.edu/protocols/gRNA

11. Ilya Velegzhaninov, Yana Pylina, Anna Rybak, Dmitry Shadrin, Elena Belykh, Dmitry Klokov. Increasing cellular radioresistance by simultaneous CRISPR/dCas9-driven overexpression of XPC and HR23B genes//2018.c.1-11

# 13. [Keränen A](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ker%C3%A4nen%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=30572730)., [Ghazi S](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ghazi%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=30572730)., [Carlson J](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Carlson%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=30572730)., [Papadogiannakis N](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Papadogiannakis%20N%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=30572730)., [Lagerstedt-Robinson K](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lagerstedt-Robinson%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=30572730)., [Lindblom A](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lindblom%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=30572730). Testing strategies to reduce morbidity and mortality from Lynch syndrom//2018

 15. Velegzhaninov, I. O.; Ievlev, V. A.; Pylina, Y. I.; Shadrin, D. M.; Vakhrusheva, O. M. Programming of Cell Resistance to Genotoxic and Oxidative Stress. Biomedicines 2018, 6, doi: 10.3390/biomedicines6010005.