

**РОЛЬ ГЕНОВ *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* И *RBFOX2* В РЕПАРАЦИИ
РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ
ОПУХОЛЕВОЙ ЛИНИИ HELA**

В.С. Климова¹, А.В. Агаб², В.С. Фишман³

Научный руководитель: к.б.н. С.А. Васильев²

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

² НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН,
Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки 10, 634050

³ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Россия, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: klimovavs42@gmail.com

**ROLE OF *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* AND *RBFOX2* GENES IN THE RADIATION-INDUCED DNA
DOUBLE STRAND BREAK REPAIR IN HELA TUMOR CELL LINE**

V.S. Klimova¹, A.V. Agab², V.S. Fishman³

Scientific Supervisor: S.A. Vasilyev, PhD²

¹ National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina str. 36, 634050

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
of Russian Academy of Science, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki str. 10, 634050,

³ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Science, Russia, Novosibirsk,
Lavrentyev av. 10, 630090

E-mail: klimovavs42@gmail.com

Abstract. *It is well known that inter-individual differences of radiosensitivity have genetic causes, such as variations in the level of DNA or expression of DNA repair genes. However, differentially expressed genes which could lead to inter-individual differences in the level of DNA damage remain largely unidentified. In our study we have induced knock-out of *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* and *RBFOX2* genes in HeLa cell line to clarify the effects of these genes on DNA repair and radiosensitivity.*

Введение. Действие ионизирующего излучения на клетки вызывает развитие у них ряда эффектов. Наиболее опасным последствием действия радиации является образование двунитевых разрывов ДНК. В качестве маркеров количества двунитевых разрывов ДНК могут быть использованы фокусы белков γ H2AX и 53BP1 [1, 2]. Сборка фокусов белков γ H2AX и 53BP1, как одно из ключевых событий развития ответа на действие радиации, контролируется большим количеством генетических факторов. Однако, на данный момент гены, дифференциальная экспрессия которых может приводить к изменению уровня повреждений ДНК, изучены слабо. Поэтому проблемой, на решение которой было направлено настоящее исследование, является выявление генов, дифференциальная экспрессия которых может быть связана с различной эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК в соматических клетках человека.

Ранее нами в результате полнотранскриптомного анализа в лимфоцитах периферической крови и фибробластах экстраэмбриональной мезодермы человека была впервые выявлена корреляция экспрессии отдельных генов (*THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2*) со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX. Однако, неясно, является ли нарушение функций этих генов причиной изменения радиочувствительности клеток, или, наоборот, их дифференциальная экспрессия является следствием различий в радиочувствительности клеток. Поэтому целью настоящего исследования являлся анализ влияния генов *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2* на репарацию радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования были использованы 4 опухолевые клеточные линии, нокаутные по генам *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2*, созданные на основе опухолевой клеточной линии HeLa. В последовательность каждого из изучаемых генов была внесена мутация, которая привела к нарушению нормального функционирования продукта исследуемого гена. Внесение мутаций в клетки было осуществлено с помощью использования компонентов системы CRISPR/Cas9, а именно генетического вектора, экспрессирующего белок Cas9, и малой некодирующей РНК (гРНК). Для каждого из генов было получено 96 субклонов, для которых был проведен ПЦР-анализ с помощью праймеров, фланкирующих сайты, комплементарные гРНК. Все дальнейшие эксперименты были проведены с одним субклоном для каждого из генов. В качестве такого субклона выбиралась гетерозигота по делеции и дупликации в целевой области. Для всех линий, включая исходную линию HeLa, были проведены эксперименты по воздействию γ -излучения. Часть клеток оставалась контрольной, другую часть клеток подвергали воздействию 2 Гр γ -облучения при комнатной температуре (мощность дозы – 1 Гр/мин). Облучение клеток было проведено на базе онкологического отделения Томского областного клинического диспансера.

Для анализа временной динамики фокусов γ H2AX и 53BP1 (маркеров двунитевых разрывов) фиксации клеток были проведены через 5, 15 и 30 мин, 2, 4, 8, 24 и 48 ч после облучения. Для выявления фокусов белков γ H2AX и 53BP1 проводили иммунофлюоресцентное окрашивание фиксированного материала. Кроме того, с помощью ПЦР в реальном времени был проведен анализ экспрессии генов *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2* во всех нокаутных линиях и исходной клеточной линии HeLa.

Результаты. Спонтанный уровень фокусов γ H2AX был повышен в нокаутных линиях по генам *ADAMTS1* ($1,8 \pm 0,12$ фокусов на клетку), *THBS1* ($3,4 \pm 0,6$ фокусов на клетку), *RBFOX2* ($0,81 \pm 0,09$ фокусов на клетку) и *WHSC1* ($4,91 \pm 0,43$ фокусов на клетку) по сравнению с исходной линией HeLa ($0,8 \pm 0,1$ фокусов на клетку) ($p < 0,05$). Также в нокаутных линиях был повышен и уровень фокусов 53BP1 (*ADAMTS1* – $5,9 \pm 0,2$ и *THBS1* – $7,0 \pm 0,8$, *RBFOX2* – $2,49 \pm 0,15$ и *WHSC1* – $7,21 \pm 4,85$ фокусов на клетку) по сравнению с исходной линией HeLa ($1,2 \pm 0,1$ фокусов на клетку) ($p < 0,05$). Пиковый уровень фокусов γ H2AX и 53BP1 отмечался через 2 ч после облучения. При этом максимальное количество фокусов γ H2AX и 53BP1 наблюдалось в линии, нокаутной по гену *THBS1* ($48,2 \pm 1,9$ и $30,1 \pm 0,9$ фокусов на клетку, соответственно). Это может быть свидетельством повышенной эффективности распознавания двунитевых разрывов ДНК, их репарации и активации контрольных точек клеточного цикла. Напротив, наименьший уровень фокусов γ H2AX и 53BP1 через 2 часа после облучения отмечался в линии, нокаутной по гену *ADAMTS1* ($18,6 \pm 0,6$ и $14,6 \pm 0,4$ фокусов на клетку, соответственно), по сравнению с исходной линией HeLa ($30,6 \pm 0,7$ и $21,9 \pm 0,5$ фокусов на клетку, соответственно). Эффективность

исчезновения фокусов γ H2AX к 48 ч после облучения по сравнению с 2 ч после облучения в нокаутной линии по гену *WHSC1* составила 104,41 %, в нокаутной линии по гену *RBFOX2* – 102,88 %, в нокаутной линии по гену *THBS1* – 103,73 %, в нокаутной линии по гену *ADAMTS1* – 106,18 %, в исходной линии – 102,40 %. Эффективность исчезновения фокусов 53BP1 к 48 ч после облучения по сравнению с 2 ч после облучения в нокаутной линии по гену *WHSC1* составила 90,04 %, в нокаутной линии по гену *RBFOX2* – 108,34 %, в нокаутной линии по гену *THBS1* – 120,51 %, в нокаутной линии по гену *ADAMTS* – 87,57 %, в исходной линии – 113,22 %.

Выявленное влияние нокаута исследованных генов на эффективность репарации ДНК указывает на участие их продуктов в радиационно-индуцированном ответе. Кроме того, ранее, нами были выявлены отрицательные корреляции между уровнем экспрессии гена *ADAMTS1* и радиочувствительностью (в терминах радиационно-индуцированной частоты микроядер) и положительная корреляция между уровнем экспрессии гена *THBS1* и радиочувствительностью. Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение об ассоциации высокой экспрессии гена *THBS1* с повышенной радиочувствительностью, и высокой экспрессии гена *ADAMTS1* с радиорезистентностью соматических клеток человека.

Анализ ПЦР в реальном времени не выявил существенных изменений экспрессии генов в нокаутных линиях. Исключение составил ген *RBFOX2*, экспрессия которого была повышена в линии, нокаутной по гену *ADAMTS1*, в 5,5 раз, а в линии, нокаутной по гену *THBS1*, в 3 раза, по сравнению с исходной линией HeLa ($p=0,018$ и $p=0,05$, соответственно). Таким образом, мутации, внесенные с помощью системы CRISPR/Cas9, не привели к подавлению экспрессии генов *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2*. Это объяснимо, так как они не затрагивали промоторы генов. Нокаут генов *THBS1*, *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2*, как и предполагалось, привел к изменению радиочувствительности клеточных линий. Выявленное влияние нокаута исследованных генов на радиочувствительность клеток указывает на участие их продуктов в формировании фокусов γ H2AX и 53BP1 и репарации двунитевых разрывов ДНК.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-50178.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belyaev, I. Y. (2010). Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, no. 704(1), pp. 132-141.
2. Sharma, A., Singh, K., & Almasan, A. (2012). Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol.*, no. 920, pp. 613-626.