

УДК 575.224.46

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *THBS1* НА ФОРМИРОВАНИЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *in vitro*

© 2020 г. Р. Р. Савченко^{1, *}, С. А. Васильев¹, В. С. Фишман², Е. С. Сухих^{3, 4},
Л. Г. Сухих⁴, А. А. Мурашкина⁵, И. Н. Лебедев¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

³Томский областной онкологический диспансер, Томск, 634050 Россия

⁴Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, 634050 Россия

⁵Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: renata.savchenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 06.05.2019 г.

После доработки 25.07.2019 г.

Принята к публикации 30.07.2019 г.

Проведен анализ влияния нокаута гена *THBS1* на выживаемость опухолевых клеток человека, частоту спонтанных и радиационно-индуцированных микроядер, а также на профиль экспрессии генов в модельной системе *in vitro*. Показано, что клеточная линия HeLa, нокаутная по гену *THBS1*, характеризуется снижением способности к образованию колоний до и после облучения (в 1.4 раза, $p = 0.0002$ и в 1.7 раз, $p = 0.00009$ соответственно), повышением частоты спонтанных и радиационно-индуцированных микроядер (в 1.9 раз, $p = 0.02$ и в 2.5 раза, $p = 0.01$ соответственно) и дифференциальной экспрессией генов, участвующих в процессах апоптоза, репарации ДНК и контроле клеточного цикла на стадии G2/M. Таким образом, нокаут гена *THBS1* приводит к повышению радиочувствительности клеток HeLa в модельной системе *in vitro*, что свидетельствует о возможной роли данного гена в регуляции радиационно-индуцированного клеточного ответа.

Ключевые слова: радиочувствительность, CRISPR/Cas9, *THBS1*, HeLa, репарация ДНК.

DOI: 10.31857/S0016675820050124

Воздействие ионизирующего излучения на клетки человека вызывает значительные повреждения генетического материала, приводящие к гибели клеток и индукции мутаций. Способность клеток восстанавливать поврежденные молекулы ДНК, обеспечивать нормальное функционирование сигнальных путей, контрольных точек клеточного цикла и запуск программы апоптоза варьирует на уровне различных типов клеток, тканей и целых организмов, составляя феномен индивидуальной радиочувствительности. Известно, что в основе данного феномена лежат генетические причины, такие как вариации на уровне последовательности ДНК или экспрессии генов репарации ДНК, а также метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной защиты [1]. Известно, что клетки, нокаутные по генам, продукты которых участвуют в процессах репарации ДНК, характеризуются повышенной радиочувствительностью [2], однако нарушение работы данных генов значительно

снижает жизнеспособность организма и приводит к гибели или формированию наследственных синдромов, в частности синдрома Ниймегена, пигментной ксеродермы, атаксии-телеангиэктазии и ряда других [3, 4]. Поэтому, вероятно индивидуальные радиочувствительность здоровых индивидов определяют гены с менее выраженным влиянием на жизнеспособность, например косвенные участники радиационно-индуцированного ответа, преимущественно обеспечивающие сигнальные функции.

Проведенные нами ранее эксперименты позволили выявить связь дифференциальной экспрессии гена *THBS1* у индивидов с различным спонтанным уровнем фокусов белков репарации γH2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер в лимфоцитах периферической крови человека [5]. Ген *THBS1* кодирует тромбоспондин-1 – гомотримерный гликопротеин внеклеточного матрикса, C-терминальный домен

которого обеспечивает связывание с рецептором CD47 [6]. По данным базы The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), *THBS1* экспрессируется практически во всех тканях организма, включая опухолевые клетки различного происхождения, а кодируемый им белок участвует в реализации сигнальных путей, таких как пути TGF β [7–11], VEGF [12, 13], NO-сигнальный путь [14, 15] и некоторые другие. Так, взаимодействуя с рецепторами CD47 и CD36, тромбоспондин-1 выступает эндогенным ингибитором ангиогенеза через негативную регуляцию NO-опосредованной передачи сигналов в эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках кровеносных сосудов и тромбоцитах [16–19]. Кроме того, связывание тромбоспондина-1 с рецептором CD47 может ингибировать как ранние активирующие сигналы эндотелиальной синтазы оксида азота, так и независимую от оксида азота передачу сигналов через рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), что также приводит к подавлению ангиогенеза [12, 13]. Помимо эффектов, реализуемых через взаимодействие с CD47, центральная область тромбоспондина-1, называемая 3TSR, может связываться с мембранным рецептором CD36, что также влечет за собой ингибирование ангиогенеза [20].

Кроме влияния на ангиогенез, тромбоспондин-1 регулирует ряд процессов, связанных с поведением и устойчивостью опухолевых клеток к терапии. Среди них адгезия [21] и пролиферация опухолевых клеток [22], выживание или апоптоз [23–25], опухолевая инвазия и метастазирование [26, 27], воспаление, иммунный ответ [28] и ответ опухоли на терапию [21, 29]. Влияние тромбоспондина-1 на эти процессы является многогранным и часто противоположным в зависимости от его концентрации, происхождения опухоли, а также молекулярного и клеточного состава ее микроокружения. Так например было показано, что связывание тромбоспондина-1 с рецептором CD47 вызывает гибель опухолевых клеток при раке молочной железы [23], но блокирует апоптоз и способствует развитию лекарственной устойчивости клеток карциномы щитовидной железы [25]. Кроме того, описано селективное действие тромбоспондина-1 на здоровые и опухолевые ткани. В исследовании J.S. Isenberg с соавт. отмечалось, что мыши с нокаутом гена *Thbs1*, сохраняли радиочувствительность опухолевых тканей, демонстрируя при этом снижение гибели мышечных клеток и клеток костного мозга через 12 часов после облучения, а также минимальные радиационные повреждения кожных покровов и мышц через два месяца после воздействия радиацией [30]. Схожие эффекты были характерны и для мышей, лишенных рецептора CD47 [30]. В связи с этим, целью настоящего исследования был анализ влияния нокаута гена *THBS1* на выживаемость, частоту спонтанных и радиационно-индуцирован-

ных микроядер, а также полнотранскриптомный профиль экспрессии генов в модельной системе *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание нокаутной клеточной линии

Клеточная линия с нокаутом гена *THBS1* была получена на основании исходной линии HeLa, любезно предоставленной к.б.н. М.А. Булдаковым (НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН). Нокаутная клеточная линия была создана с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 путем введения в последовательность гена *THBS1* мутации, приводящей к отсутствию нормального продукта транскрипции. Олигонуклеотиды, содержащие целевую последовательность sgRNA и липкие концы для встраивания в плазмиду, были синтезированы в ООО “Биоссет” (г. Новосибирск). Подбор последовательностей sgRNA производился с помощью биоинформационного ресурса sgRNAScorer (<https://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer/>). Для повышения эффективности введения мутаций были одновременно использованы две последовательности sgRNA, представленные в табл. 1. В качестве вектора для клонирования был использован gRNA cloning vector BsmBI.

Последовательность фрагментов гена, содержащих мутации, была установлена с помощью таргетного секвенирования нового поколения на секвенаторе MiSeq с использованием олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) и набора секвенирующих реагентов MiSeq Nano v2 (Illumina, США). Полученные риды картировались на исходную последовательность ампликонов на базе геномной сборки hg38.

Воздействие ионизирующим излучением

Воздействие γ -излучением проводилось с мощностью дозы 1 Гр/мин при комнатной температуре в дозах 2, 4, 6 и 8 Гр для оценки способности клеток к образованию колоний, а также в дозе 2 Гр для оценки частоты микроядер и уровня экспрессии генов. Облучение проводили на базе Областного онкологического диспансера (г. Томск) на гамма-терапевтическом аппарате Theratron Equinox (Best Theratronics, Канада). Транспортировка клеток осуществлялась на льду.

Анализ способности клеток к образованию колоний

Клеточную линию HeLa и линию с нокаутом гена *THBS1* культивировали в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C в условиях

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для создания и анализа клеточной линии с нокаутом гена *THBS1*

Наименование	Последовательность
<i>THBS1_gRNA1_F</i>	5'-CACCGTGACATCTTTGAACTCACCGGTT-3'
<i>THBS1_gRNA1_R</i>	5'-СТААААСССГТГАГТТСАААГАТГТСАС-3'
<i>THBS1_gRNA2_F</i>	5'-CACCGTCTGGGCGCCGACTGGTGAAGTT-3'
<i>THBS1_gRNA2_R</i>	5'-СТААААСТТСАССАГТССГССССАГАСС-3'
<i>THBS1_F</i>	5'-АСТТТГТГТТСТСТССТГТСТАА-3'
<i>THBS1_R</i>	5'-GCATCCTCGATGCGGAAA-3'
<i>THBS1_exp_F</i>	5'-ССААТGCCACAGТТССТГА-3'
<i>THBS1_exp_R</i>	5'-ТТGCCACAGТССГТАГААСА-3'
<i>ACTB_F</i>	5'-GAGAAGATGACCCAGATCATGTT-3'
<i>ACTB_R</i>	5'-АТАGCACAGCCTGGATAGCAA-3'
<i>GAPDH_F</i>	5'-GCCAGCCGAGCCACATC-3'
<i>GAPDH_R</i>	5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'

Примечание. *THBS1_gRNA* – последовательности sgRNA прямой и обратной цепи (два варианта), полужирным шрифтом выделены последовательности sgRNA; *THBS1_F(R)* – праймеры, фланкирующие сайты редактирования, использованные для таргетного массового параллельного секвенирования; *THBS1_exp_F(R)*, *ACTB_F(R)* и *GAPDH_F(R)* – праймеры для оценки экспрессии гена *THBS1* и референсных генов *ACTB* и *GAPDH* в нокаутной клеточной линии с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

5%-ного CO₂. Для оценки способности клеток к образованию колоний клеточные культуры растили во флаконах Т-25 (ТРР, Швейцария) в течение двух пассажей до 70% площади покрытия, после чего производили пересев в шестилуночные планшеты (ТРР, Швейцария) в количестве 0,6 × 10⁶ клеток/мл. Затем клетки подвергали воздействию γ-излучения, после которого клетки снимались трипсином с последующим подсчетом и посевом в новые шести-луночные планшеты. Далее клеточные линии культивировали в CO₂-инкубаторе (Panasonic, Япония) при 37°C со сменой среды каждые трое суток. По истечении двух недель колонии фиксировались метанол-уксусной кислотой (3 : 1) с последующей инкубацией с красителем Гимза (ПанЭко, Россия). Число колоний оценивалось визуально, после чего по следующей формуле вычислялась эффективность посева (ЭП):

$$\text{ЭП} = \frac{\text{Кол-во колоний на 14-й день}}{\text{Исходное кол-во клеток}} \times 100\%.$$

Анализ частоты микроядер

Для оценки частоты микроядер для каждой клеточной линии было подготовлено по два флакона Т-25 (ТРР, Швейцария), содержащих 1 × 10⁶ клеток. После облучения была проведена смена питательной среды, после чего флаконы с клеточными культурами были перенесены в CO₂-инкубатор на 24 ч при 37°C. По истечении 24 ч клетки фиксировались с использованием метанол-уксусной кислоты (3 : 1).

Препараты микроядер были изготовлены путем раскапывания на предметные стекла 20 мкл полученной клеточной суспензии с последующим заключением в среду Vectashield, содержащую краситель DAPI (VectorLab, США), под покровные стекла. Частота микроядер оценивалась с помощью микроскопа Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия) с автоматической системой регистрации препаратов Metafer (Metasystems, Германия) при увеличении 630×. Для каждой клеточной линии была оценена частота микроядер в 1000 облученных и 2000 необлученных клеток.

Анализ экспрессии генов

Культивирование клеточных линий для эксперимента по оценке экспрессии генов было проведено в тех же условиях, что и в описанных выше экспериментах. После облучения клеточные линии помещали в CO₂-инкубатор на 30 мин при 37°C. По истечении 30 мин из флаконов с клеточными линиями удаляли среду для культивирования, проводили отмывку в фосфатном буфере (1 × PBS), лизировали клетки с помощью реагента “Лира” (Биолабмикс, Россия) и проводили выделение РНК по протоколу, рекомендованному производителем. После выделения образцы РНК были очищены с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) с последующей оценкой качества на биоанализаторе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США).

Полученная РНК была использована для оценки экспрессии генов в исходной клеточной линии HeLa и в линии с нокаутом гена *THBS1* до облучения и через 30 мин после воздействия γ-из-

лучения в дозе 2 Гр. Мечение и гибридизация на экспрессионных микрочипах SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8×60 K (Agilent Technologies, США) были проведены по протоколу, рекомендованному производителем (версия 6.9.1 от декабря 2015 г.).

Для анализа экспрессии гена *THBS1* в нокаутной клеточной линии HeLa с помощью ПЦР в реальном времени была проведена обратная транскрипция с использованием набора реактивов OT-M-MuLV-RH (Биолабмикс, Россия) по протоколу, рекомендованному производителем. Реакция ПЦР в реальном времени проводилась на амплификаторе AriaMx (Agilent Technologies, США) с использованием синтезированных праймеров (табл. 1) и буфера для проведения количественной ПЦР в реальном времени БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс, Россия) по протоколу производителя. В качестве референсных генов были использованы гены домашнего хозяйства *ACTB* и *GAPDH* (табл. 1).

Исследование было выполнено на базе Центра коллективного пользования “Медицинская геномика” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Статистическая обработка

Статистический анализ данных, полученных в экспериментах по оценке способности клеток к формированию колоний и частоты микроядер, был проведен с помощью *t*-критерия Стьюдента в программном пакете Statistica 10 (Statsoft). Статистическая обработка результатов полнотранскриптного экспрессионного анализа была проведена с помощью программной среды R для статистического анализа с использованием программы Limma от Bioconductor на \log_2 -трансформированных данных при условии фоновой коррекции необработанных данных чипов и межчиповой квантильной нормализации. Статистический анализ различий уровня экспрессии в каждой группе сравнения был проведен с помощью модифицированного *t*-критерия Стьюдента с оценкой значений доли ложноположительного предсказания (False Discovery Rate – FDR) и поправкой на множественность сравнения по методу Бенджамини–Хохберга. Были сформированы списки генов, экспрессия которых статистически значимо ($p \leq 0.05$) изменялась более чем в два раза по сравнению с исходной линией HeLa, а также два списка, полученных после применения поправки на множественность сравнения Бенджамини–Хохберга ($FDR < 0.4$ и $FDR < 0.05$). Кроме того, с помощью инструмента STRING (<https://string-db.org/>) для дифференциально экспрессирующихся генов были построены сети функциональных взаимодействий на уровне белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящем исследовании была получена клеточная линия HeLa с нокаутом гена *THBS1*. Применение таргетного секвенирования нового поколения позволило установить характер мутаций, внесенных в ген *THBS1* с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. Было установлено, что полученная клеточная линия HeLa является компаундной гетерозиготой по различным мутациям в экзоне 3 гена *THBS1* (рис. 1,а). Так, один из аллелей характеризовался делецией нуклеотида, приводящей к сдвигу рамки считывания на протяжении 37 пн, после чего инсерция другого нуклеотида выравнивала рамку считывания (49.3% прочтений, среднее покрытие – 73 прочтения на нуклеотид). В результате внесения данных мутаций была изменена последовательность из 13 аминокислотных остатков (37–49). Второй аллель характеризовался делецией 39 пн, что приводило к потере тех же 13 аминокислотных остатков в конечном белковом продукте (45.2% прочтений). Полногеномное секвенирование с целью поиска нецелевых мутаций не проводилось, что оставляет потенциальную возможность введения дополнительных неохарактеризованных мутаций.

Анализ мутаций в гене *THBS1* с помощью ресурса MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) показал прогнозируемую потерю домена, связывающего гепарин, а также возможную потерю функций остальных доменов вследствие изменения сайта сплайсинга. Таким образом, мутации в гене *THBS1* в нокаутной клеточной линии HeLa вероятно приводят к существенным изменениям функции кодируемого белка. Кроме того, с помощью ПЦР в реальном времени было показано, что полученная нокаутная клеточная линия характеризуется снижением экспрессии гена *THBS1* в 5.6 раз ($p = 0.000002$) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa (рис. 1,б).

Эффективность посева, характеризующая способность клеток к формированию колоний, в необлученных клетках с нокаутом гена *THBS1* была снижена в 1.4 раза ($p = 0.0002$) по сравнению с интактной линией HeLa и в 1.7 раз ($p = 0.00009$) после облучения в дозе 2 Гр, но не отличалась от эффективности посева в контроле при облучении более высокими дозами (рис. 1,в).

Частота спонтанных микроядер в нокаутной клеточной линии была в 1.9 раз ($p = 0.02$) выше, чем в интактной линии HeLa. Кроме того, после облучения в дозе 2 Гр в линии с нокаутом гена *THBS1* частота радиационно-индуцированных микроядер в 2.5 раза превышала таковую в интактной клеточной линии HeLa ($p = 0.01$) (рис. 1,г).

Анализ транскрипционного профиля позволил зарегистрировать в нокаутной клеточной линии значимые изменения экспрессии 43 генов до облучения (23 гена повышали и 20 генов снижали

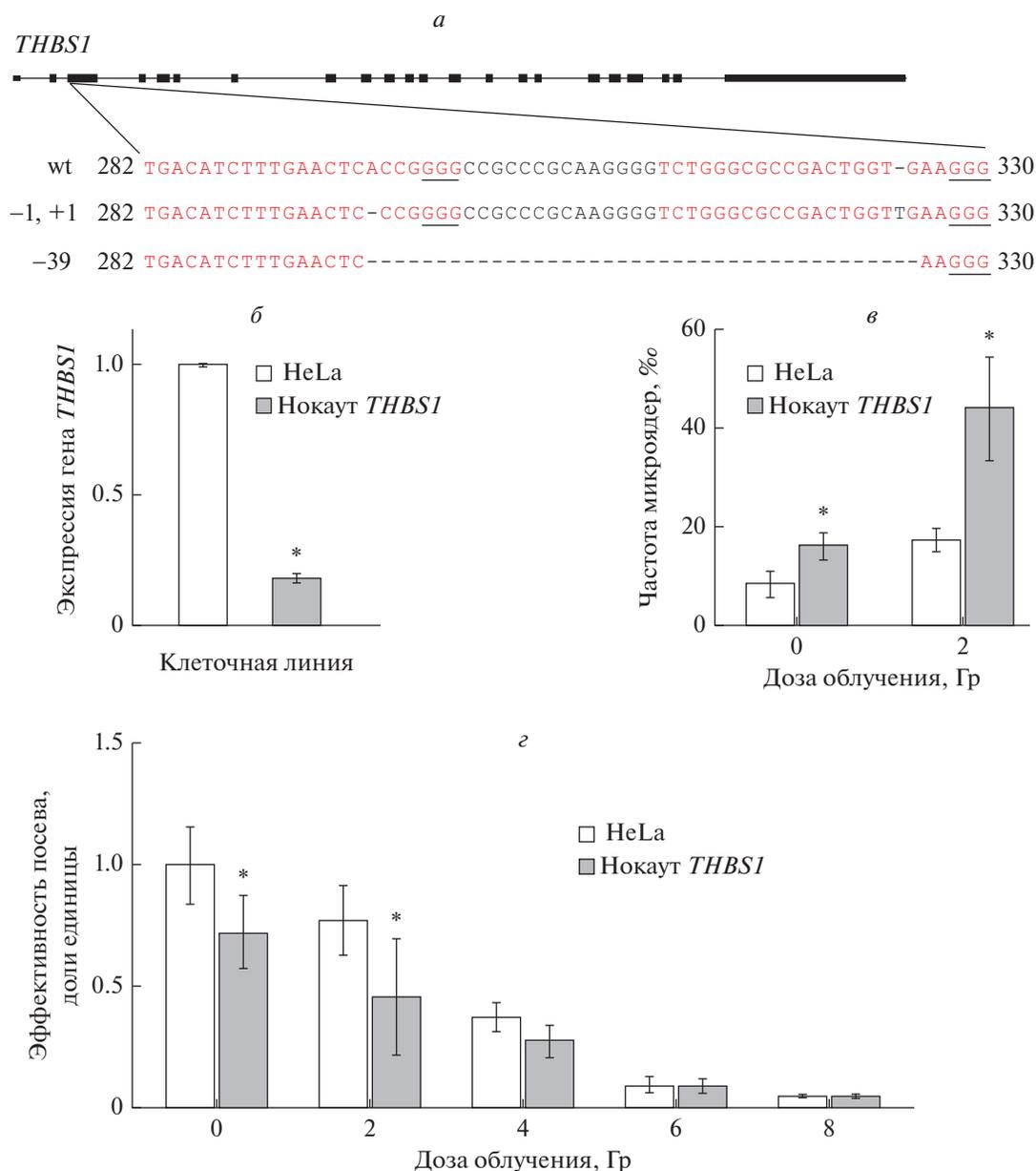


Рис. 1. Нокаут *THBS1* и его влияние на способность клеток к формированию колоний и частоту радиационно-индуцированных микроядер в клеточной линии HeLa. *a* – последовательность мутаций, введенных в ген *THBS1*, wt – референсная последовательность, красным шрифтом выделены направляющие РНК, подчеркнуты участки мотива смежного с протоспейсером (protospacer adjacent motif, PAM); *б* – экспрессия гена *THBS1* в исходной и нокаутной клеточной линии HeLa; *в* – частота микроядер в клеточной линии с нокаутом гена *THBS1* по сравнению с исходной клеточной линией HeLa до и после облучения, $p < 0.05$; *г* – эффективность посева в клеточной линии с нокаутом *THBS1* по сравнению с исходной клеточной линией HeLa до и после облучения, $p < 0.01$.

уровень экспрессии), и 69 генов после облучения в дозе 2 Гр (36 гена повышали и 33 гена снижали уровень экспрессии) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa ($p < 0.05$). После применения поправки на множественность сравнения оба списка были сокращены до семи генов (FDR < 0.40) (табл. 2).

Для генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *THBS1* (отли-

чия более чем в 2 раза, $p < 0.05$) с помощью инструмента STRING был проведен анализ значимых функциональных взаимодействий (score > 0.9) с генами, участвующими в процессах репарации ДНК, апоптоза и в работе G2/M контрольной точки клеточного цикла (база данных Molecular Signatures Database v6.2, <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>). Было показано, что ряд генов, дифференциально экспрессиру-

Таблица 2. Дифференциально экспрессирующиеся гены в клеточной линии с нокаутом гена *THBS1* по сравнению с исходной клеточной линией HeLa

0 Гр		2 Гр	
повышение экспрессии (FDR < 0.4)	снижение экспрессии (FDR < 0.4)	повышение экспрессии (FDR < 0.4)	снижение экспрессии (FDR < 0.4)
<i>SEPP1</i>	<i>Inc-MRPL39-4</i>	<i>LOC100506178</i>	<i>FAM124A</i>
<i>TESC</i>	<i>FAM124A</i>	<i>LIF*</i>	<i>ENST00000549261*</i>
<i>LIF*</i>	<i>ENST00000549261*</i>	<i>TESC</i>	<i>EPB41L3</i>
	<i>GAGE7*</i>		<i>GAGE7*</i>

* – FDR < 0.05.

Таблица 3. Дифференциально экспрессирующиеся гены в клеточной линии с нокаутом гена *THBS1*, связанные с процессами репарации ДНК, апоптозом и работой контрольной точки клеточного цикла на стадии G2/M

Апоптоз		Репарация ДНК		Контрольная точка G2/M	
0 Гр	2 Гр	0 Гр	2 Гр	0 Гр	2 Гр
<i>CDK14</i> ↓	<i>CDK14</i> ↓	<i>CEP83</i> ↑	<i>CSTF2T</i> ↓	<i>CDK14</i> ↓	<i>CDK14</i> ↓
<i>ESR2</i> ↓	<i>COG5</i> ↓	<i>CSTF2T</i> ↓	<i>NXF1</i> ↓	<i>CSTF2T</i> ↓	<i>CSTF2T</i> ↓
<i>HBS1L</i> ↓	<i>HLA-DPA1</i> ↓	<i>HIF3A</i> ↑	<i>PRKDC</i> ↓	<i>HBS1L</i> ↓	<i>NXF1</i> ↓
<i>HIF3A</i> ↑	<i>HLA-DPB1</i> ↓	<i>HLA-DPA1</i> ↓	<i>RFC3</i> ↓	<i>HIF3A</i> ↑	<i>PRKDC</i> ↓
<i>HLA-DPA1</i> ↓	<i>HLA-DQB1</i> ↓	<i>HLA-DPB1</i> ↓			<i>RFC3</i> ↓
<i>HLA-DRA</i> ↓	<i>HLA-DRA</i> ↓	<i>HLA-DQB1</i> ↓			
<i>NCALD</i> ↑	<i>IFI44L</i> ↓	<i>HLA-DRA</i> ↓			
<i>NGEF</i> ↑	<i>NGEF</i> ↑	<i>RNASET2</i> ↑			
<i>SEPP1</i> ↑	<i>NXF1</i> ↓				
	<i>PRKDC</i> ↓				
	<i>RFC3</i> ↓				
	<i>SEPP1</i> ↑				
	<i>SPTBN1</i> ↓				

Примечание. Стрелками показано изменение экспрессии в клеточной линии с нокаутом гена *THBS1* по сравнению с исходной клеточной линией HeLa: ↑ – повышение экспрессии, ↓ – снижение экспрессии.

щихся при нокауте гена *THBS1*, имеют значимые связи с данными процессами на уровне белков (табл. 3, рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение эффективности посева в линии с нокаутом гена *THBS1*, наблюдаемое нами до облучения и после воздействия γ -излучения только в дозе 2 Гр, свидетельствует о влиянии нокаута данного гена на способность клеток к образованию колоний. Однако остается неясным, реализуется ли этот эффект через механизмы клеточной гибели или через нарушение процесса клеточного деления.

Среди генов, повышающих экспрессию при нокауте гена *THBS1*, были *SEPP1*, *LIF* и *TESC* (табл. 2), потенциально связанные с радиочувствительностью и выживаемостью клеток. Ген

SEPP1 кодирует селенопротеин – антиоксидантный белок, активирующийся в ответ на воздействие радиации. Было показано, что нокаут *SEPP1* приводит к окислительному стрессу и снижению жизнеспособности миофибробластов, в то время как сверхэкспрессия данного гена влечет за собой снижение уровня поздних активных форм кислорода [31]. Повышенная экспрессия гена *LIF*, кодирующего цитокин из семейства ИЛ-6, способствовала росту и развитию радиорезистентности опухолевых клеток карциномы носоглотки *in vitro* [32]. Ген *TESC*, высоко экспрессирующийся в некоторых опухолевых клетках, кодирует Ca^{2+} -связывающий белок, участвующий в процессах клеточного роста и дифференцировки [33]. Ген *GAGE7*, характеризующийся снижением экспрессии в нокаутной клеточной линии в нашем исследовании, кодирует опухолевый антиген 7. Повышенная экспрессия данного

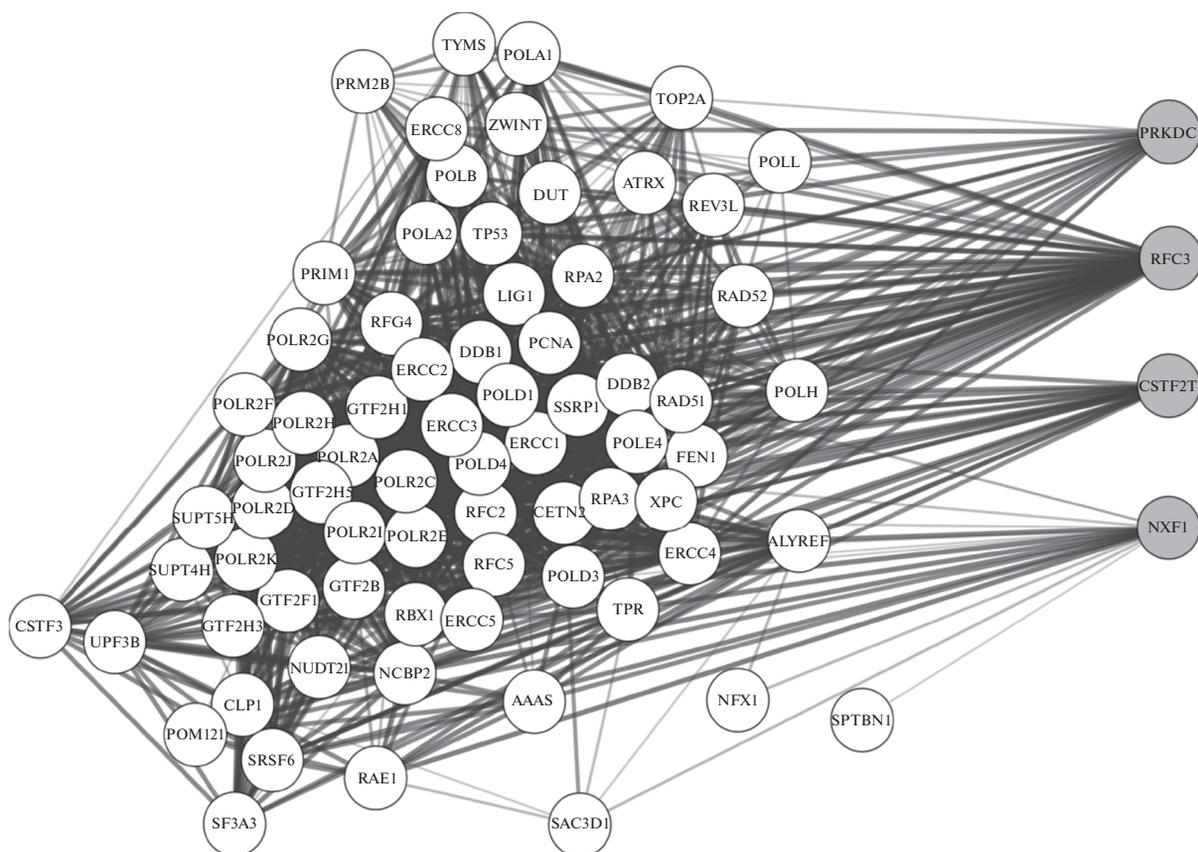


Рис. 2. Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом гена *THBS1*, с кластером белков репарации ДНК. Толщина линий пропорциональна силе связи. Серой заливкой обозначены продукты генов, дифференциально экспрессирующиеся в клеточной линии с нокаутом *THBS1*; белой заливкой обозначены белки, участвующие в процессах репарации ДНК.

гена в клетках HeLa вызывает устойчивость к апоптозу, индуцированному fas-лигандом [34].

Нокаут гена *THBS1* приводил не только к снижению способности клеток к образованию колоний, но и к повышению частоты спонтанных и радиационно-индуцированных микроядер по сравнению с исходной клеточной линией HeLa. Наблюдаемый фенотип может быть обусловлен нарушением процессов репарации ДНК или нарушением работы G2/M контрольной точки клеточного цикла в нокаутной клеточной линии. Так например ген *PRKDC*, снижающий экспрессию в линии с нокаутом *THBS1* в нашем исследовании, кодирует каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы – фермента, играющего ключевую роль в процессах репарации двунитевых разрывов ДНК и регуляции клеточной радиочувствительности [35]. Согласно литературным данным, нокаут гена *PRKDC* приводит к нарушению функции ДНК-зависимой протеинкиназы и фенотипу, характерному для клеточного старения после облучения опухолевых клеток человека [36]. Кроме того, мутации данного гена были обнаружены у пациентов с нарушениями репарации двухцепочечных

разрывов ДНК и процессов рекомбинации [37]. Обращают на себя внимание также гены *NXF1*, *RFC3*, *CDK14* и *ESR2*, характеризующиеся сниженной экспрессией при нокауте *THBS1*. Так продукт гена *NXF1* участвует в процессе экспорта зрелой мРНК из ядра в цитоплазму [38], ген *RFC3* – кодирует субъединицу фактора репликации С, нокаут данного гена ингибирует пролиферацию опухолевых клеток при аденокарциноме пищевода [39]. *CDK14* кодирует белок из семейства циклин-зависимых киназ, участвующих в регуляции клеточного цикла [40], а через активацию рецептора эстрогена 2, кодируемого геном *ESR2*, реализуется антиапоптотическое действие в клетках медуллобластомы [41, 42].

Таким образом, тромбоспондин-1 является важным компонентом клеточного микроокружения. На основании полученных нами данных, можно предположить, что данный белок играет роль в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа, участвуя в процессах, приводящих к изменению эффективности репарации поврежденных ДНК, нарушениям в контроле клеточного

цикла на стадии G2/M и запуску программы апоптоза.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-5944.2018.4.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Andreassen C.N.* Searching for genetic determinants of normal tissue radiosensitivity – are we on the right track? // *Radiotherapy and Oncol.* 2010. V. 97. № 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.07.018>
2. *Guo Z., Shu Y., Zhou H. et al.* Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment // *Carcinogenesis.* 2015. V. 36. № 3. P. 307–317. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv007>
3. *Surrallés J., Jackson S.P., Jasin M. et al.* Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes // *Genes & Development.* 2004. V. 18. № 12. P. 1359–1370. <https://doi.org/10.1101/gad.1216304>
4. *Chrzanowska K.H., Gregorek H., Dembowska-Bagińska B. et al.* Nijmegen breakage syndrome (NBS) // *Orphanet J. Rare Diseases.* 2012. V. 7. № 1. P. 13. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-13>
5. *Васильев С.А.* Особенности спонтанного и индуцированного мутагенеза в соматических клетках человека с различным эпигенетическим фоном: Дис. ... д-ра биол. наук. Томск: ФГБНУ “Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук”, 2018. 332 с.
6. *Isenberg J.S., Annis D.S., Pendrak M.L. et al.* Differential interactions of thrombospondin-1, -2, and -4 with CD47 and effects on cGMP signaling and ischemic injury responses // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 2. P. 1116–1125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804860200>
7. *Murphy-Ullrich J.E., Poczatek M.* Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology // *Cytokine & Growth Factor Rev.* 2000. V. 11. № 1–2. P. 59–69.
8. *Daniel C., Wiede J., Krutzsch H.C. et al.* Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β in fibrotic renal disease in the rat *in vivo* // *Kidney International.* 2004. V. 65. № 2. P. 459–468.
9. *Nör J.E., DiPietro L., Murphy-Ullrich J.E. et al.* Activation of latent TGF- β 1 by Thrombospondin-1 is a major component of wound repair // *Oral Biosci. & Med.: OBM.* 2005. V. 2. № 2. P. 153.
10. *Sweetwyne M.T., Murphy-Ullrich J.E.* Thrombospondin-1 in tissue repair and fibrosis: TGF- β -dependent and independent mechanisms // *Matrix Biol.* 2012. V. 31. № 3. P. 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.matbio>
11. *Daubon T., Léon C., Clarke K. et al.* Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development // *Nature Communications.* 2019. V. 10. № 1. P. 1146. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08480-y>
12. *Kaur S., Martin-Manso G., Pendrak M.L. et al.* Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47 // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 50. P. 38923–38932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172304>
13. *Soto-Pantoja D.R., Kaur S., Roberts D.D.* CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress // *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2015. V. 50. № 3. P. 212–230. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1014024>
14. *Zhao H., Han Z., Ji X. et al.* Epigenetic regulation of oxidative stress in ischemic stroke // *Aging Disease.* 2016. V. 7. № 3. P. 295. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.1009>
15. *Roberts D.D., Kaur S., Isenberg J.S.* Regulation of cellular redox signaling by matricellular proteins in vascular biology, immunology, and cancer // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2017. V. 27. № 12. P. 874–911. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7140>
16. *Isenberg J.S., Frazier W.A., Roberts D.D.* Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling // *Cell Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. № 5. P. 728–742. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7488-x>
17. *Isenberg J.S., Martin-Manso G., Maxhimer J.B. et al.* Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin-1: Implications for anti-angiogenic therapies // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. V. 9. № 3. P. 182. <https://doi.org/10.1038/nrc2561>
18. *Isenberg J.S., Shiva S., Gladwin M.* Thrombospondin-1–CD47 blockade and exogenous nitrite enhance ischemic tissue survival, blood flow and angiogenesis via coupled NO–cGMP pathway activation // *Nitric Oxide.* 2009. V. 21. № 1. P. 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.05.005>
19. *Zhang X., Kazerounian S., Duquette M. et al.* Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level // *The FASEB Journal.* 2009. V. 23. № 10. P. 3368–3376. <https://doi.org/10.1096/fj.09-131649>
20. *Jeanne A., Schneider C., Martiny L. et al.* Original insights on thrombospondin-1-related antireceptor strategies in cancer // *Frontiers in Pharmacology.* 2015. V. 6. P. 252. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00252>

21. *Li S.S., Liu Z., Uzunel M. et al.* Endogenous thrombospondin-1 is a cell-surface ligand for regulation of integrin-dependent T-lymphocyte adhesion // *Blood*. 2006. V. 108. № 9. P. 3112–3120.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016832>
22. *Sick E., Jeanne A., Schneider C. et al.* CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest // *Brit. J. Pharmacol.* 2012. V. 167. № 7. P. 1415–1430.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02099.x>
23. *Manna P.P., Dimitry J., Oldenborg P.A., Frazier W.A.* CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 33. P. 29637–29644.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M500922200>
24. *Saumet A., Slimane M.B., Lanotte M. et al.* Type 3 repeat/C-terminal domain of thrombospondin-1 triggers caspase-independent cell death through CD47/ $\alpha\beta 3$ in promyelocytic leukemia NB4 cells // *Blood*. 2005. V. 106. № 2. P. 658–667.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3585>
25. *Rath G.M., Schneider C., Dedieu S. et al.* The C-terminal CD47/IAP-binding domain of thrombospondin-1 prevents camptothecin- and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* 2006. V. 1763. № 10. P. 1125–1134.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.001>
26. *Jayachandran A., Anaka M., Prithviraj P. et al.* Thrombospondin-1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma // *Oncotarget*. 2014. V. 5. № 14. P. 5782.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2164>
27. *Borsotti P., Ghilardi C., Ostano P. et al.* Thrombospondin-1 is part of a Slug-independent motility and metastatic program in cutaneous melanoma, in association with VEGFR-1 and FGF-2 // *Pigment Cell & Melanoma Res.* 2015. V. 28. № 1. P. 73–81.
<https://doi.org/10.1111/pcmr.12319>
28. *Grimbert P., Bouguermouh S., Baba N. et al.* Thrombospondin/CD47 interaction: A pathway to generate regulatory T cells from human CD4⁺ CD25⁻ T cells in response to inflammation // *J. Immunol.* 2006. V. 177. № 6. P. 3534–3541.
29. *Bi J., Bai Z., Ma X. et al.* Txr1: An important factor in oxaliplatin resistance in gastric cancer // *Med. Oncol.* 2014. V. 31. № 2. P. 807.
<https://doi.org/10.1007/s12032-013-0807-1>
30. *Isenberg J.S., Maxhimer J.B., Hyodo F. et al.* Thrombospondin-1 and CD47 limit cell and tissue survival of radiation injury // *Am. J. Pathol.* 2008. V. 173. № 4. P. 1100–1112.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080237>
31. *Eckers J.C., Kalen A.L., Xiao W. et al.* Selenoprotein P inhibits radiation-induced late reactive oxygen species accumulation and normal cell injury // *Inter. J. Rad. Oncol.* Biol.* Physics.* 2013. V. 87. № 3. P. 619–625.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.06.2063>
32. *Liu S.C., Tsang N.M., Chiang W.C. et al.* Leukemia inhibitory factor promotes nasopharyngeal carcinoma progression and radioresistance // *J. Clin. Investig.* 2013. V. 123. № 12. P. 5269–5283.
<https://doi.org/10.1172/JCI63428>
33. *Kolobynina K.G., Solovyova V.V., Levay K. et al.* Emerging roles of the single EF-hand Ca²⁺ sensor tescalcin in the regulation of gene expression, cell growth and differentiation // *J. Cell Sci.* 2016. V. 129. № 19. P. 3533–3540.
<https://doi.org/10.1242/jcs.191486>
34. *Cilensek Z.M., Yehiely F., Kular R.K., Deiss, L.P.* A Member of the GAGE Family of Tumor Antigens is an Anti-Apoptotic Gene that Confers Resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon-g, Taxol and g-irradiation // *Cancer Biol. & Therapy.* 2002. V. 1. № 4. P. 379–386.
<https://doi.org/10.4161/cbt.1.4.11>
35. *Ihara M., Ashizawa K., Shichijo K., Kudo T.* Expression of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is associated with the radiosensitivity of human thyroid cancer cell lines // *J. Rad. Res.* 2018. V. 60. № 2. P. 171–177.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rry097>
36. *Azad A., Jackson S., Cullinane C. et al.* Inhibition of DNA-dependent protein kinase induces accelerated senescence in irradiated human cancer cells // *Mol. Cancer Res.* 2011. V. 9. № 12. P. 1696–1707.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0312>
37. *Mathieu A.L., Verronese E., Rice G.I. et al.* PRKDC mutations associated with immunodeficiency, granuloma, and autoimmune regulator-dependent autoimmunity // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015. V. 135. № 6. P. 1578–1588.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.040>
38. *Heath C.G., Viphakone N., Wilson S.A.* The role of TREX in gene expression and disease // *Biochem. J.* 2016. V. 473. № 19. P. 2911–2935.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160010>
39. *Lockwood W.W., Thu K.L., Lin L. et al.* Integrative genomics identified RFC3 as an amplified candidate oncogene in esophageal adenocarcinoma // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. № 7. P. 1936–1946.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1431>
40. *Malumbres M.* Cyclin-dependent kinases // *Genome Biol.* 2014. V. 15. № 6. P. 122.
41. *Wen Y., Perez E.J., Green P.S. et al.* nNOS is involved in estrogen mediated neuroprotection in neuroblastoma cells // *Neuroreport.* 2004. V. 15. № 9. P. 1515–1518.
42. *Cookman C.J., Belcher S.M.* Estrogen receptor- β up-regulates IGF1R expression and activity to inhibit apoptosis and increase growth of medulloblastoma // *Endocrinology.* 2015. V. 156. № 7. P. 2395–2408.
<https://doi.org/10.1210/en.2015-1141>

Effect of *THBS1* Gene Knockout on the Radiation-Induced Cellular Response in a Model System *in vitro*

R. R. Savchenko^{a, *}, S. A. Vasilyev^a, V. S. Fishman^b, E. S. Sukhikh^{c, d},
L. G. Sukhikh^d, A. A. Murashkina^e, and I. N. Lebedev^a

^aResearch Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

^bThe Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^cState Regional Autonomous Budget Health Care Institution "Tomsk Regional Oncology Center", Tomsk, 634050 Russia

^dNational Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634050 Russia

^eNational Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: renata.savchenko@medgenetics.ru

In this study, we investigated the effect of the *THBS1* gene knockout on the human tumor cell survival, the spontaneous and radiation-induced micronucleus frequency, and the gene expression profile in HeLa cell line. It was shown that the *THBS1* gene knockout lead to decrease in the plating efficiency before and after irradiation (1.4-fold, $p = 0.0002$ and 1.7-fold, $p = 0.00009$ respectively), increasing the spontaneous and radiation-induced micronucleus frequency (1.9-fold, $p = 0.02$ and 2.5-fold, $p = 0.01$ respectively). In addition, the genes involved in the DNA repair processes, apoptosis and G2/M cell cycle checkpoint changed the expression after *THBS1* knockout in comparison with intact HeLa cell line. Thus, *THBS1* gene knockout leads to an increase in the radiosensitivity of HeLa cell line. This indicates the possible role of *THBS1* gene in the regulation of a radiation-induced cellular response.

Keywords: radiosensitivity, CRISPR/Cas9, *THBS1*, HeLa, DNA repair processes.