

ВЛИЯНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *ADAMTS1* НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HeLa

© 2021 г. Р. Р. Савченко^{1, *}, А. А. Мурашкина², В. С. Фишман³, Е. С. Сухих^{4, 5},
А. В. Вергинский^{4, 5}, Л. Г. Сухих⁵, О. Л. Серов³, И. Н. Лебедев¹, С. А. Васильев¹

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

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

³Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

⁴Томский областной онкологический диспансер, Томск, 634063 Россия

⁵Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, 634050 Россия

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

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 18.02.2021 г.

Проведен анализ влияния дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* на радиационно-индуцированный ответ в клеточных линиях HeLa с нокаутом и сверхэкспрессией гена *ADAMTS1*. Клеточная линия с нокаутом гена была получена с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Сверхэкспрессия гена *ADAMTS1* обеспечивалась с помощью временной трансфекции плазмиды, содержащей кодирующую последовательность изучаемого гена. После воздействия на клеточные линии γ -излучением в диапазоне доз 2–8 Гр оценена клonalная выживаемость, уровень микроядер и фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1. Показано, что клеточная линия HeLa с нокаутом гена *ADAMTS1* характеризуется снижением клonalной выживаемости в 1.9 раз ($p < 0.05$) после облучения в дозе 2 Гр и повышенной частотой микроядер ($55.3 \pm 8.3\%$) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa ($36.0 \pm 4.2\%$, $p < 0.05$), но не отличается по уровню фокусов белков репарации ДНК. Трансфекция клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* плазмидой, несущей кодирующую последовательность изучаемого гена, приводит к снижению частоты радиационно-индуцированных микроядер с 55.3 ± 8.3 до $28.7 \pm 10.3\%$ ($p < 0.05$), что сопоставимо с частотой микроядер в исходной клеточной линии HeLa после облучения ($36.0 \pm 7.2\%$). Полученные данные свидетельствуют об участии *ADAMTS1* в формировании радиационно-индуцированного ответа в данном типе клеток.

Ключевые слова: *ADAMTS1*, HeLa, CRISPR/Cas9, сверхэкспрессия, радиочувствительность.

DOI: 10.31857/S0016675821070122

Воздействие ионизирующего излучения, применяемое в разные периоды противоопухолевой терапии для более чем половины пациентов с онкологическими заболеваниями, является эффективным методом лечения, однако влечет за собой развитие ряда побочных реакций в здоровых тканях организма [1–3]. Спектр данных реакций велик и при одинаковой схеме лечения может варьировать от легких и умеренных до жизнеугрожающих и летальных [4, 5]. Известно, что данные различия обусловлены индивидуальной радиочувствительностью пациентов, в связи с чем, одним из актуальных направлений радиационной онкологии является поиск генетических маркеров, позволя-

ющих предсказать вероятность развития осложнений в нормальных тканях [5, 6]. Выявленный на сегодняшний день полиморфизм некоторых кандидатных генов объясняет лишь небольшую часть популяционной вариабельности индивидуальной радиочувствительности, как правило, характерной для определенных видов рака или наследственных синдромов [7–10]. При этом предполагают, что оставшийся генетический вклад в формирование индивидуальной радиочувствительности обеспечивается вариациями в нуклеотидной последовательности множества других генов, распространенных в популяции, но имеющих менее выраженный эффект [5]. Инте-

Таблица 1. Олигонуклеотиды для создания химерных направляющих РНК для гена *ADAMTS1* и анализа введенных мутаций с помощью секвенирования

Олигонуклеотид	Последовательность
ADAMTS1_sgRNA1_F	5'-CACCGGCTTGTGGCAGACCAGTCCGAGTT-3'
ADAMTS1_sgRNA1_R	5'-CTAAAACTCGACTGGTCTGCCACAAGCC-3'
ADAMTS1_sgRNA2_F	5'-CACCGGGTTCCACATAGCGGTGACGTT-3'
ADAMTS1_sgRNA2_R	5'-CTAAAACGTCACCGCTATGTGGAAACCC-3'
ADAMTS1_F	5'-GCCACCGAAAACAACGTGAG-3'
ADAMTS1_R	5'-ACTGGAAGCATAAGAAAGAAGCG-3'

Примечание. Последовательности химерных направляющих РНК выделены полужирным курсивом.

ресно, что наряду с генами, продукты которых связаны с репарацией двунитевых разрывов ДНК, контролем клеточного цикла и метаболизмом ксенобиотиков, с радиочувствительностью связывают и гены, не имеющие прямого отношения к данным процессам и преимущественно обеспечивающие сигнальные функции [11]. Это обстоятельство делает актуальными полногеномные исследования для выявления белков-участников радиационно-индуцированного клеточного ответа [11, 12]. Так, проведенный нами ранее полнотранскриптомный анализ профиля экспрессии генов в лимфоцитах периферической крови здоровых людей показал, что индивиды с различным уровнем фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер характеризуются дифференциальной экспрессией гена *ADAMTS1* [13]. Данный ген кодирует белок из семейства ADAMTS и содержит несколько функциональных модулей, включая тромбоспондиновый (TS) мотив 1-го типа. Согласно данным литературы, экспрессию данного гена связывают с воспалительными процессами [14, 15], гипоксией [16–18], стимуляцией ангиогенеза [19] и ремоделированием тканей во время развития и прогрессирования рака [20–24], однако роль *ADAMTS1* в онкогенезе неоднозначна, и его повышенная экспрессия ассоциирована как с про-, так и с противоопухолевыми эффектами [20, 21, 25]. Насколько известно, ген *ADAMTS1* не связывают с механизмами формирования индивидуальной радиочувствительности, однако согласно полученным нами ранее данным, клетки здоровых индивидов с низким уровнем микроядер в лимфоцитах периферической крови (как до, так и после облучения *in vitro*) характеризуются повышенной экспрессией *ADAMTS1* [13]. В связи с этим, мы предполагаем, что *ADAMTS1* может быть вовлечен в процесс формирования клеточного ответа на воздействие ионизирующего излучения. Поэтому целью настоящей исследования явился анализ влияния дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа в культуре клеток *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужила радиочувствительная клеточная линия карциномы шейки матки HeLa. Интактную клеточную линию HeLa, а также полученные на ее основе модельные клеточные линии с нокаутом и сверхэкспрессией гена *ADAMTS1* культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10%-ной телячьей эмбриональной сыворотки (FBS; Thermo, США) и эритромицина (ПанЭко, Россия) в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C.

Создание клеточной линии с нокаутом гена *ADAMTS1*

Клеточная линия HeLa с нокаутом гена *ADAMTS1* была получена путем внесения мутации сдвига рамки считывания с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Химерные направляющие РНК на экзон 2 гена *ADAMTS1* были получены с помощью инструмента sgRNA Scorer (https://crispr.med.harvard.edu/sgRNA_Scorer/). Олигонуклеотиды, соответствующие смысловой и антисмысловой цепям химерных направляющих РНК (табл. 1), клонировались в плазмидный вектор с помощью рестриктазы *BsmBI* (NEB, Великобритания).

Трансфекцию двух плазмид с направляющими РНК и плазмиды с генами *Cas9* и *GFP* (Addgene plasmid, 48138) осуществляли с использованием Липофектамина 3000 (Thermo, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Через 24 ч после трансфекции GFP-позитивные клетки отбирали на клеточном сортере FACS ARIA (BD, США) и культивировали в течение двух недель для образования колоний. Анализ присутствия мутаций в сайте редактирования осуществляли с помощью таргетного массового параллельного секвенирования. Амплификацию участков экзона 2 гена *ADAMTS1* проводили с помощью ПЦП с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1). Приготовление библиотек проводили с помощью набора Nextera XT (Illumina, США) в соответствии с протоколом

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для проведения количественной ПЦР в реальном времени

Олигонуклеотид	Последовательность
ADAMTS1-F	5'-ACATGATGGCGTCAATGC-3'
ADAMTS1-R	5'-ATCAAACATTCCTCCCATGACC-3'
ACTB-F	5'-GAGAAGATGACCCAGATCATGTT-3'
ACTB-R	5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'

производителя. Секвенирование осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 kit (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Создание клеточной линии со сверхэкспрессией гена ADAMTS1

Создание клеточной линии HeLa со сверхэкспрессией гена *ADAMTS1* осуществляли с помощью временной трансфекции плазмиды ADAMTS1_rCSdest, содержащей кодирующую последовательность изучаемого гена, любезно предоставленной Roger Reeves (Addgene plasmid, 53807) [26]. Трансфекцию осуществляли с помощью Липофектамина 3000 (Thermo, США) по протоколу производителя.

Облучение клеточных линий

Клеточные линии подвергали воздействию ионизирующего γ -излучения ^{60}Co на гамма-терапевтической установке "Theratron Equinox 100" (Best Theratronics, Канада) в дозе 2–8 Гр (для оценки клональной выживаемости на фоне нокаута *ADAMTS1*) и в дозе 2 Гр (для анализа фокусов белков репарации ДНК на фоне нокаута *ADAMTS1* и проведения микроядерного теста в обеих модельных клеточных линиях). Облучение проводили на базе Томского областного онкологического диспансера. Транспортировку клеток осуществляли на льду.

Анализ экспрессии ADAMTS1

Для анализа экспрессии гена *ADAMTS1* РНК из клеточных линий выделяли с использованием реагента "Лира" для выделения РНК, ДНК и белков (Биолабмикс, Россия) по протоколу производителя. Далее полученная РНК была конвертирована в кДНК с использованием набора для обратной транскрипции ОТ-М-MuLV-RN (Биолабмикс, Россия), после чего проводили ПЦР в реальном времени с помощью набора БиоМастер HS-qPCR (2×) (Биолабмикс, Россия) на амплификаторе AgiMx (Agilent Technologies, США). Для анализа экспрессии изучаемого гена после трансфекции протокол был дополнен этапом обработки РНК с ис-

пользованием фермента ДНКазы и 10× буфера MgCl_2 (Thermo, США) для исключения плазмидной контаминации образцов РНК. Анализ экспрессии осуществляли с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров (табл. 2). В качестве референсного гена для оценки экспрессии использовали ген домашнего хозяйства *ACTB* (табл. 2). Уровень экспрессии каждого целевого гена оценивали относительно уровня экспрессии референсного гена, рассчитывая показатель $\Delta\Delta C_t$ [27].

Клональная выживаемость

После облучения исходной клеточной линии HeLa и клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* определенное число клеток высевали в 6-луночные планшеты (TPP, Швейцария). Для доз 0, 2, 4, 6 и 8 Гр производился посев 1200, 3000, 7500, 30000 и 60000 клеток соответственно. Через 14 дней была проведена фиксация клеток с помощью инкубации в 1 мл раствора метанол-уксусная кислота (3 : 1) в течение 5 мин и окрашивание клеток с использованием красителя Гимза (ПанЭко, Россия) в течение 10 мин. Далее была проведена оценка доли выживших клеток, сформировавших колонии.

Микроядерный тест

Через 24 ч после облучения клетки фиксировали в течение 20 мин при -20°C в растворе метанол-уксусная кислота (3 : 1). После фиксации клетки наносили на предметные стекла и окрашивали красителем DAPI. Частоту микроядер оценивали в 1000 клеток на препарате с помощью микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтром для DAPI.

Иммуноокрашивание фокусов белков репарации ДНК

Для проведения иммуноокрашивания фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК клетки HeLa выращивали на покровных стеклах (20 × 20 мм), после чего подвергали воздействию γ -излучения. Через 30 мин, 2, 4, 6, 8 и 24 ч после облучения клетки фиксировали в течение 20 мин при 4°C в растворе 3%-ного параформальдегида

(Sigma, США). После фиксации покровные стекла с клетками инкубировали в 0.2%-ном Triton X-100 (Sigma, США) в течение 10 мин при 4°C, отмывали в трех сменах фосфатного буфера (PBS) по 5 мин и инкубировали в 3%-ном FBS в течение 30 мин при 4°C. Затем на покровные стекла нанесли 100 мкл раствора первичных антител: моноклональных антител мыши к белку γ H2AX (Novus Biologicals, США) и поликлональных антител кролика к белку RAD51 (Novus Biologicals, США), разведенных в 3%-ном FBS (1 : 400). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего покровные стекла отмывали в трех сменах PBS по 5 мин при комнатной температуре. Затем проводили инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре с раствором вторичных антител: антитела козы к антителам мыши, конъюгированные с родамином, и антитела козы к антителам кролика, конъюгированные с FITC (Novus Biologicals, США), разведенные 1 : 400 в 3%-ном FBS. После трехкратной отмывки в PBS по 5 мин клетки окрашивали DAPI и заключали в среду для микроскопирования Vectashield (Vector Labs, США) на предметных стеклах.

Микрофотографии получали на микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с автоматической системой анализа препаратов Metafer (Meta-Systems, Германия) с использованием фильтров для DAPI, родамина и FITC. Изображения получали с 15 фокальных плоскостей с шагом 0.5 мкм с последующим слиянием в одно результирующее изображение. Число фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК анализировали в 150–200 клетках на каждом препарате. Распределение числа фокусов в клетках аппроксимировали с помощью распределения Пуассона, как описано в [28], и в дальнейшем анализе вместо среднего числа фокусов использовали λ из распределения Пуассона.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета STATISTICA 8.0 (StatSoft, США). Для сравнений клеточных линий использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Числовые данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Медицинская геномика” Томского НИМЦ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученная клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* была компаундной гетерозиготой по двум делециям, которые приводили к сдвигу рам-

ки считывания (рис. 1,а). Анализ потенциальной функциональной значимости введенных мутаций с помощью инструмента Mutation Taster [29] показал, что введенные делеции приводят к значительному укорочению белкового продукта гена *ADAMTS1* в результате преждевременного появления стоп-кодона. Помимо потенциального воздействия на структуру белка, введенные делеции приводили к снижению (в 1.7 раз) экспрессии гена *ADAMTS1* на уровне мРНК (рис. 1,б).

Клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* характеризовалась снижением способности к формированию колоний в 1.9 раз ($p < 0.05$) после воздействия γ -излучением в дозе 2 Гр по сравнению с исходной клеточной линией HeLa (рис. 1,в). Кроме того, нокаут гена *ADAMTS1* приводил к повышению частоты микроядер относительно исходной клеточной линии HeLa (55.3 ± 8.3 и $36.0 \pm 4.2\%$ соответственно, $p < 0.05$) после облучения (рис. 2,з). Однако уровни фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК γ H2AX и RAD51 после нокаута гена *ADAMTS1* статистически значимо не повышались (рис. 2,д, е).

Анализ экспрессии гена *ADAMTS1* в клеточной линии HeLa после трансфекции показал, что экспрессия данного гена возрастала в 30 раз на фоне трансфекции исходной клеточной линии HeLa и в 32 раза на фоне трансфекции клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* (рис. 1,б).

Частота микроядер в клеточных линиях после трансфекции не отличалась от таковой в контрольных клеточных линиях до облучения (рис. 1,з), однако статистически значимые различия были выявлены после облучения в дозе 2 Гр. Примечательно, что после трансфекции клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* частота микроядер снижалась с 55.3 ± 8.3 до $28.7 \pm 10.3\%$ ($p < 0.05$) и не отличалась статистически значимо от исходной клеточной линии HeLa ($36.0 \pm 7.2\%$) (рис. 1,з).

ОБСУЖДЕНИЕ

Статистически значимое снижение клональной выживаемости в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* относительно исходной клеточной линии HeLa после облучения в дозе 2 Гр свидетельствует о том, что белок, кодируемый данным геном, по-видимому участвует в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа, однако его роль в данном процессе остается неясной. Возможно данный белок вовлечен в процессы контроля клеточного цикла или механизмы клеточной гибели, но не связан с процессами репарации ДНК, поскольку в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* наблюдается повышение частоты радиационно-индуцированных микроядер, но не фокусов белков репарации ДНК. Связь гена *ADAMTS1* с механизмами контроля клеточного цикла была

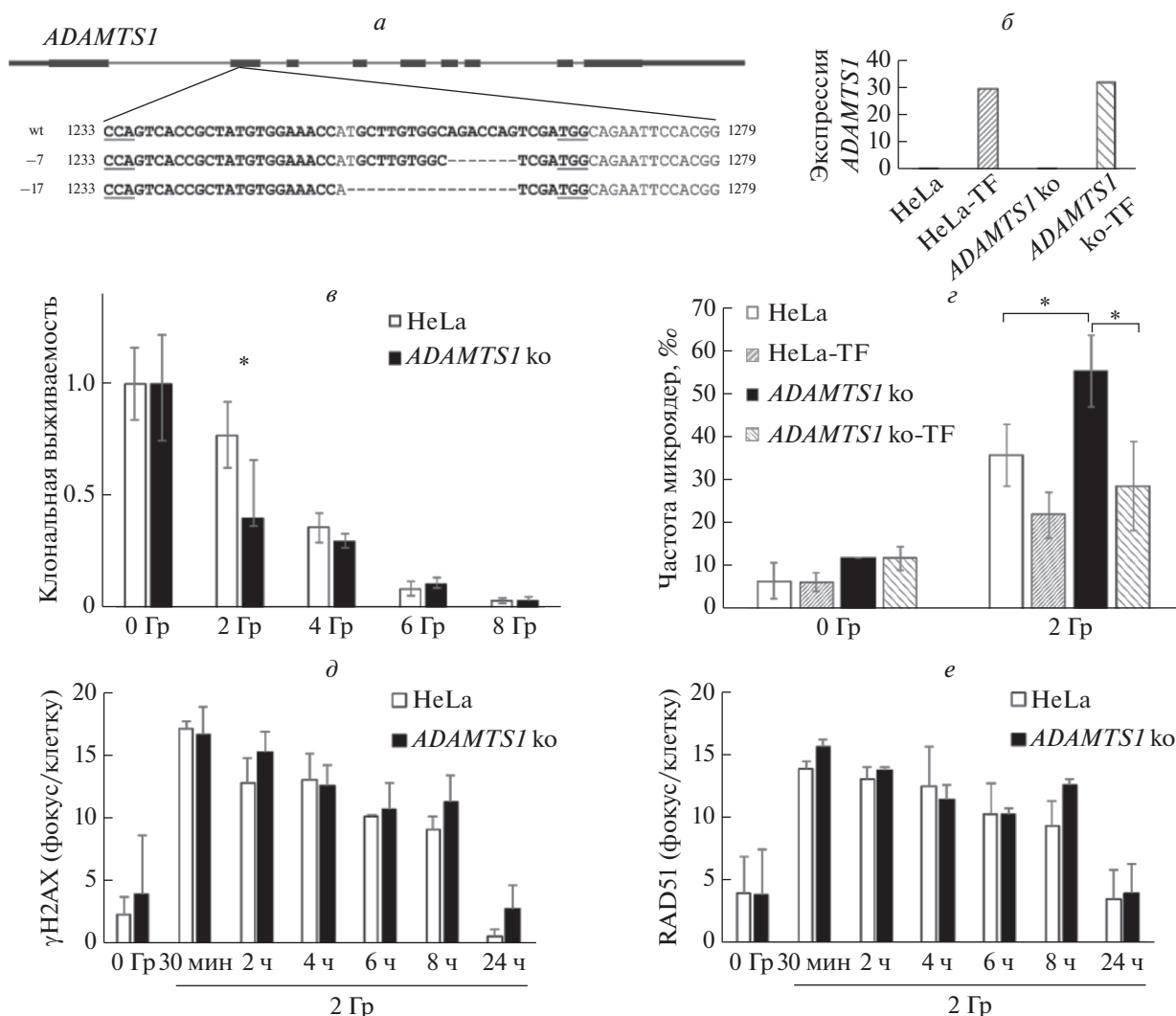


Рис. 1. Эффекты дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* в клеточной линии HeLa. *ADAMTS1* ko – клеточная линия HeLa с нокаутом *ADAMTS1*, HeLa-TF – клеточная линия HeLa после трансфекции плазмиды, кодирующей *ADAMTS1*, *ADAMTS1* ko-TF – клеточная линия HeLa с нокаутом гена *ADAMTS1* после трансфекции плазмиды, кодирующей *ADAMTS1*. а – делеции в экзоне 2 гена *ADAMTS1*, введенные с помощью системы CRISPR/Cas9, wt – референсная последовательность; полужирным начертанием выделены последовательности химерных направляющих РНК, подчеркнуты участки мотива, смежного с протоспейсером (protospacer adjacent motif, PAM); б – экспрессия гена *ADAMTS1* в клеточных линиях на фоне нокаута и после трансфекции; в – клональная выживаемость после воздействия γ -излучения в дозах 2–8 Гр в клеточной линии с нокаутом гена *ADAMTS1*; г – частота микроядер на фоне дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* после воздействия γ -излучения в дозах 2 Гр; д, е – динамика уровней фокусов белков γ H2AX (д) и RAD51 (е) в клеточной линии с нокаутом гена *ADAMTS1* после воздействия γ -излучения в дозах 2 Гр, данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение ($n = 4$), * $p < 0.05$.

отмечена в исследовании М. Li с соавт. [30]. Было показано, что вызванное активацией микроРНК miR-362-3р снижение экспрессии *ADAMTS1* приводит к аресту клеточного цикла на стадии G1/S и ингибированию пролиферации в культуре гладкомышечных клеток сосудов человека [30].

Согласно данным литературы, металлопротеиназы, участвующие в ремоделировании внеклеточного матрикса, играют ключевую роль в регуляции биодоступности цитокинов и факторов роста [31, 32]. В частности было показано, что металлопро-

теиназа *ADAMTS1* может активировать трансформирующий ростовой фактор β (TGF β) [33, 34]. В то же время известно, что экспрессия гена *ADAMTS1* повышается после ингибирования TGF β [35], что свидетельствует о возможной регуляции *ADAMTS1*-TGF β по механизму отрицательной обратной связи. Это особенно важно, учитывая, что TGF β является важным компонентом ответа клетки на повреждение ДНК [36]. Известно, что нокаут TGF β в клетках мыши или ингибирование сигнального пути TGF β в клетках человека приводит

к нарушению активности и автофосфорилирования белка АТМ, что влечет за собой снижение уровня фосфорилирования его ключевых мишеней, включая белок p53, нарушение активации контрольных точек клеточного цикла и, как следствие, повышенную радиочувствительность клеток [37–39].

Использование системы редактирования генома CRISPR/Cas9 может приводить к внесению нецелевых мутаций в геном объекта исследования, что затрудняет интерпретацию результатов экспериментов [40–44]. В данном исследовании не проводилось полногеномное секвенирование полученной клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* с целью поиска нежелательных мутаций, внесенных системой CRISPR/Cas9, однако полученная клеточная линия была трансфицирована плазмидой, кодирующей ген *ADAMTS1*. Нормализация фенотипа (снижение частоты микроядер до уровня исходной клеточной линии HeLa) в нокаутной клеточной линии после трансфекции свидетельствует в пользу того, что наблюдаемые эффекты обусловлены непосредственно дифференциальной экспрессией гена *ADAMTS1*, а не потенциально возможными не выявленными мутациями.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии *ADAMTS1* в формировании радиационно-индуцированного ответа в клеточной линии HeLa, причем повышенная экспрессия данного гена связана с уменьшением неблагоприятных радиационно-индуцированных эффектов.

В свете активного развития радиогеномики и поиска генов, ассоциированных с формированием радиочувствительности нормальных и опухолевых клеток, представляется целесообразным дальнейшее изучение гена *ADAMTS1* в качестве потенциального биомаркера индивидуальной радиочувствительности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 19-34-90143 и 16-34-50178.

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. Foray N., Bourguignon M., Hamada N. Individual response to ionizing radiation // *Mutat Res*. 2016. V. 770. P. 369–386. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.001>
2. Rajaraman P., Hauptmann M., Bouffler S. et al. Human individual radiation sensitivity and prospects for prediction // *Annals ICRP*. 2018. V. 47. № 3–4. P. 126–141. <https://doi.org/10.1177/0146645318764091>
3. Seibold P., Auvinen A., Averbek D. et al. Clinical and epidemiological observations on individual radiation sensitivity and susceptibility // *Int. J. Radiation Biol.* 2020. V. 96. № 3. P. 324–339. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1665209>
4. Ferlazzo M.L., Bourguignon M., Foray N. Functional assays for individual radiosensitivity: a critical review // *Seminars in Radiation Oncology*. WB Saunders. 2017. V. 27. № 4. P. 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.003>
5. Gomolka M., Blyth B., Bourguignon M. et al. Potential screening assays for individual radiation sensitivity and susceptibility and their current validation state // *Int. J. Radiation Biol.* 2020. V. 96. № 3. P. 280–296. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1642544>
6. Kirsch D.G., Diehn M., Kesarwala A.H. et al. The future of radiobiology // *J. Natl. Cancer Inst.* 2018. V. 110. № 4. P. 329–340. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx231>
7. Barnett G.C., Thompson D., Fachal L. et al. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity // *Radiotherapy and Oncology*. 2014. V. 111. № 2. P. 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.02.012>
8. Fachal L., Gomez-Caamano A., Barnett G.C. et al. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1 // *Nat. Genetics*. 2014. V. 46. № 8. P. 891–894. <https://doi.org/10.1038/ng.3020>
9. Talbot C.J., Tanteles G.A., Barnett G.C. et al. A replicated association between polymorphisms near TNF α and risk for adverse reactions to radiotherapy // *Br. J. Cancer*. 2012. V. 107. № 4. P. 748–753. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.290>
10. Seibold P., Behrens S., Schmezer P. et al. XRCC1 polymorphism associated with late toxicity after radiation therapy in breast cancer patients // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2015. V. 92. № 5. P. 1084–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.04.011>
11. Andreassen C.N., Schack L.M., Laursen L.V. et al. Radiogenomics—current status, challenges and future directions // *Cancer Letters*. 2016. V. 382. № 1. P. 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.035>
12. 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>
13. Васильев С.А. Особенности спонтанного 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.
14. Rodríguez-Baena F.J., Redondo-García S., Peris-Torres C. et al. ADAMTS1 protease is required for a balanced immune cell repertoire and tumour inflammatory re-

- sponse // *Sci. Reports*. 2018. V. 8. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31288-7>
15. *Karakose M., Demircan K., Tatal E. et al.* Clinical significance of ADAMTS1, ADAMTS5, ADAMTS9 aggrecanases and IL-17A, IL-23, IL-33 cytokines in polycystic ovary syndrome // *J. Endocrinol. Invest.* 2016. V. 39. № 11. P. 1269–1275. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0472-2>
 16. *Hatipoglu O.F., Hirohata S., Cilek M.Z. et al.* ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 24. P. 16325–16333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001313>
 17. *Tayman M.A., Kurgan S., Onder C. et al.* A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin-1 (ADAMTS-1) levels in gingival crevicular fluid correlate with vascular endothelial growth factor-A, hypoxia-inducible factor-1 α , and clinical parameters in patients with advanced periodontitis // *J. Periodontol.* 2019. V. 90. № 10. P. 1182–1189. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0195>
 18. *Armutcu F., Demircan K., Yildirim U. et al.* Hypoxia causes important changes of extracellular matrix biomarkers and ADAMTS proteinases in the adriamycin-induced renal fibrosis model // *Nephrology*. 2019. V. 24. № 8. P. 863–875. <https://doi.org/10.1111/nep.13572>
 19. *Kelwick R., Desanlis I., Wheeler G.N. et al.* The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family // *Genome Biology*. 2015. V. 16. № 1. P. 113. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0676-3>
 20. *Wen Y.C., Lin Y.W., Chu C.Y. et al.* Melatonin triggered post-transcriptional and post-translational modifications of ADAMTS1 coordinately retard tumorigenesis and metastasis of renal cell carcinoma // *J. Pineal Res.* 2020. V. 69. № 2. P. e12668. <https://doi.org/10.1111/jpi.12668>
 21. *Ham S.A., Yoo T., Lee W.J. et al.* ADAMTS1-mediated targeting of TSP-1 by PPAR δ suppresses migration and invasion of breast cancer cells // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 55. P. 94091. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21584>
 22. *Cal S., López-Otín C.* ADAMTS proteases and cancer // *Matrix Biology*. 2015. V. 44. P. 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.013>
 23. *Rocks N., Paulissen G., El Hour M. et al.* Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer // *Biochimie*. 2008. V. 90. № 2. P. 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.008>
 24. *Lee N.V., Sato M., Annis D.S. et al.* ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2 // *The EMBO J.* 2006. V. 25. № 22. P. 5270–5283. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601400>
 25. *Branaccio M., Natale F., Falco T. et al.* Cell-Free DNA Methylation: The new frontiers of pancreatic cancer biomarkers' *Discovery* // *Genes*. 2020. V. 11. № 1. P. 14. <https://doi.org/10.3390/genes11010014>
 26. *Eddie S., Zaghoul N.A., Leitch C.C. et al.* Survey of human chromosome 21 gene expression effects on early development in *Danio rerio* // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2018. V. 8. № 7. P. 2215–2223. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200144>
 27. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta CT$ method // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 28. *Martin O.A., Ivashkevich A., Choo S. et al.* Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity // *DNA Repair (Amst)*. 2013. V. 12. № 10. P. 844–855. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.07.002>
 29. *Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M. et al.* MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 4. P. 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
 30. *Li M., Liu Q., Lei J. et al.* MiR-362-3p inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis by targeting ADAMTS1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 493. № 1. P. 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.031>
 31. *Apte S.S.* A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: Functions and mechanisms // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 46. P. 31493–31497. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.052340>
 32. *Egeblad M., Werb Z.* New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression // *Nat. Rev. Cancer*. 2002. V. 2. № 3. P. 161–174. <https://doi.org/10.1038/nrc745>
 33. *Bourd-Boittin K., Bonnier D., Leyme A. et al.* Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta // *Hepatology*. 2011. V. 54. № 6. P. 2173–2184. <https://doi.org/10.1002/hep.24598>
 34. *Laurent M.A., Bonnier D., Théret N. et al.* *In silico* characterization of the interaction between LSKL peptide, a LAP-TGF-beta derived peptide, and ADAMTS1 // *Comput. Biol. Chem.* 2016. V. 61. P. 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.01.012>
 35. *Le Bras G.F., Taylor C., Koumangoye R.B.* TGF β loss activates ADAMTS-1-mediated EGF-dependent invasion in a model of esophageal cell invasion // *Exp. Cell Res.* 2015. V. 330. № 1. P. 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.021>
 36. *Barcellos-Hoff M.H., Cucinotta F.A.* New tricks for an old fox: impact of TGF β on the DNA damage response and genomic stability // *Sci. Signal*. 2014. V. 7. № 341. P. re5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005474>
 37. *Ewan K.B., Henshall-Powell R.L., Ravani S.A.* Transforming growth factor-beta1 mediates cellular response to DNA damage *in situ* // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 20. P. 5627–5631.
 38. *Kirshner J., Jobling M.F., Pajares M.J. et al.* Inhibition of transforming growth factor-beta1 signaling attenuates ataxia telangiectasia mutated activity in response to genotoxic stress // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 22. P. 10861–10869. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2565>
 39. *Wiegman E.M., Blaese M.A., Loeffler H. et al.* TGFbeta-1 dependent fast stimulation of ATM and p53 phosphorylation following exposure to ionizing radiation

- does not involve TGFbeta-receptor I signalling // *Radiother. Oncol.* 2007. V. 83. № 3. P. 289–295.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.05.013>
40. *Fu Y., Foden J.A., Khayter C. et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // *Nature Biotechnology.* 2013. V. 31. № 9. P. 822–826.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
41. *Pattanayak V., Lin S., Guilinger J. et al.* High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity // *Nature Biotechnology.* 2013. V. 31. № 9. P. 839–843.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2673>
42. *Lin Y., Cradick T.J., Brown M.T. et al.* CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences // *Nucl. Ac. Res.* 2014. V. 42. № 11. P. 7473–7485.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku402>
43. *Tsai S.Q., Zheng Z., Nguyen N.T. et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases // *Nature Biotechnology.* 2015. V. 33. № 2. P. 187–197.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3117>
44. *Zischewski J., Fischer R., Bortesi L.* Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases // *Biotechnology Advances.* 2017. V. 35. № 1. P. 95–104.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.003>

Effect of *ADAMTS1* Differential Expression on the Radiation-Induced Response of HeLa Cell Line

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

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

^bNational Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

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

^dTomsk Regional Oncology Center, Tomsk, 634063 Russia

^eNational Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634050 Russia

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

The effect of knockout and overexpression of *ADAMTS1* on the radiation-induced response in HeLa cell line was analyzed. The cell line with *ADAMTS1* gene knockout was created using the CRISPR/Cas9 genome editing technology. *ADAMTS1* gene overexpression was ensured by transient transfection of the plasmid containing gene of interest. Clonogenic survival, micronuclei frequency and the γ H2AX and 53BP1 foci level after irradiation with 2–8 Gy of γ -rays were assessed. It was shown that the HeLa cell line with *ADAMTS1* gene knockout is characterized by a 1.9-fold decrease in clonogenic survival after 2 Gy irradiation dose ($p < 0.05$) and an increase in micronuclei frequency ($55.3 \pm 8.3\%$) in comparison with intact HeLa ($36.0 \pm 4.2\%$, $p < 0.05$), but does not differ in the DNA repair foci level. Transfection of plasmid carries the *ADAMTS1* gene into HeLa cell line with *ADAMTS1* gene knockout led to a decrease in the radiation-induced micronuclei frequency from 55.3 ± 8.3 to $28.7 \pm 10.3\%$ ($p < 0.05$), which is comparable to the micronuclei frequency in the original HeLa cell line after irradiation ($36.0 \pm 7.2\%$). Our results indicate that *ADAMTS1* gene are involved in radiation-induced cellular response in HeLa cell line.

Keywords: *ADAMTS1*, HeLa, CRISPR/Cas9, gene overexpression, radiosensitivity.