

На правах рукописи



САВЧЕНКО РЕНАТА РЕНАТОВНА

**РОЛЬ ГЕНОВ *ADAMTS1* И *THBS1* В РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОМ
ОТВЕТЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК**

1.5.7 – Генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», в Научно-исследовательском институте медицинской генетики, г. Томск.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН
Лебедев Игорь Николаевич

Официальные оппоненты:

Дружинин Владимир Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет», профессор кафедры генетики и фундаментальной медицины (г. Кемерово)

Абдуллаев Серажутдин Абдуллаевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства, заведующий лабораторией молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов Отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины (г. Москва)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (г. Москва).

Защита состоится «___» _____ 2022 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г.Томск, Московский тр., 3, Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <https://www.tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Хитринская И.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Воздействие ионизирующего излучения на организм человека вызывает значительные повреждения генетического материала, приводящие к индукции мутаций и гибели клеток. Способность 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. Поиск генов, вовлеченных в формирование данного феномена, является актуальной научно-практической задачей современной радиационной генетики и медицины (Tamaddondoust R.N. et al., 2022).

Долгое время повышенную радиочувствительность связывали с мутациями и полиморфизмом кандидатных генов, вовлеченных в репарацию ДНК, метаболизм ксенобиотиков и антиоксидантную защиту (Andreassen C.N., 2010). Однако, проведенные широкогеномные ассоциативные исследования позволили выявить ряд значимых ассоциаций с SNPs в генах, не имеющих прямого отношения к репарации ДНК (Kerns S.L. et al., 2010, 2013; Barnett G.C. et al., 2014; Fachal L.A. et al., 2014; Guo Z. et al., 2014).

Данное исследование направлено на изучение роли генов *ADAMTS1* и *THBS1*, дифференциальная экспрессия которых была выявлена нами ранее с помощью микроматричного анализа экспрессионного профиля в лимфоцитах здоровых индивидов с различной радиочувствительностью (Васильев С.А., 2018) в радиационно-индуцированном ответе соматических клеток на повреждение ДНК. Оба гена кодируют белки внеклеточного матрикса, известные функции которых не связаны с формированием радиочувствительности. Неизвестно, связаны ли продукты *ADAMTS1* и *THBS1* с клеточным ответом на повреждение ДНК, и каким образом белки внеклеточного матрикса могут влиять на механизмы реализации такого ответа. Учитывая факт, что *ADAMTS1* и *THBS1* были выявлены у индивидов с различной радиочувствительностью, возникает вопрос о возможности использования данных генов в качестве генетических маркеров индивидуальной чувствительности человека к воздействию ионизирующего излучения.

Степень научной разработанности темы исследования. Генетические аспекты, лежащие в основе формирования феномена индивидуальной радиочувствительности, являются предметом интереса многочисленных исследований отечественных и зарубежных авторов (Гончарова И.А. и др., 2003; Schnarr K. et al., 2007; Литвяков Н.В. и др., 2011; Кузьменко Е.В., 2011; Минина В.И., 2012; Domina E.A. et al., 2018; Vozilova A.V. et al., 2019; Фильченков А.А., 2021; El-Nachef L. et al., 2021; Subedi P. et al., 2021). Результаты исследований показали, что повышенная радиочувствительность связана с нарушением работы систем репарации ДНК, антиоксидантной защиты и метаболизма ксенобиотиков (Arlett C.F. et al., 2006; Andreassen C.N., 2010), поэтому долгое время основные усилия по поиску генетической основы индивидуальной радиочувствительности были направлены на идентификацию мутаций и полиморфных вариантов в кандидатных генах, связанных с функционированием данных систем (Podhorecka M. et al., 2010; Chua M.L.K. et al., 2013; Mumbrekhar K.D. et al., 2014; Granzotto A. et al., 2016; El-Nachef L. et al., 2021). Однако проведенные в последние годы широкогеномные ассоциативные исследования позволили установить, что радиочувствительность может быть связана и с

другими генами, не имеющими прямого отношения к репарации ДНК, но выполняющими различные сигнальные функции (*FSHR*, *TANC1*, *IFNK*, *SLC36A4*, *KCND3* и др.) (Guo Z. et al., 2014; Andreassen C.N. et al., 2016). К примеру, в последнее время накапливаются данные, свидетельствующие о том, что на радиочувствительность клеток могут влиять компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) (Andreassen C.N. et al., 2016; Lei X. et al., 2020; Hanson I. et al., 2022). Более того, некоторые исследователи считают, что изучение ВКМ в контексте персональной чувствительности к воздействию ионизирующего излучения, является перспективным направлением радиобиологии (Kirsch D.G. et al., 2018). Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о влиянии компонентов ВКМ на радиочувствительность клеток, однако возможные участники и механизмы реализации такого влияния на сегодняшний день изучены недостаточно.

Цель исследования: установить влияние дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК.

Задачи исследования:

1. Создать модельные системы для изучения влияния нокаута и сверхэкспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* на эффективность репарации ДНК в соматических клетках человека *in vitro*.
2. Изучить влияние нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* на клональную выживаемость, уровень фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК и частоту микроядер в клеточной линии HeLa при воздействии ионизирующего γ -излучения в диапазоне высоких доз.
3. Выявить и охарактеризовать гены, транскрипционная активность которых изменяется вследствие нокаута *ADAMTS1* и *THBS1* в необлученных соматических клетках человека и после воздействия радиации.
4. Определить связь нормальной вариабельности экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* с эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови.

Научная новизна. В данной работе впервые исследованы гены-кандидаты (*ADAMTS1* и *THBS1*), выявленные в результате сравнения радиационно-индуцированного транскрипционного профиля нормальных соматических клеток индивидов с различной радиочувствительностью. Впервые созданы модельные системы с дифференциальной экспрессией *ADAMTS1* и *THBS1* для изучения радиочувствительности соматических клеток человека. Проведение исследования в модельных системах позволило установить, что нокаут *ADAMTS1* и *THBS1* влияет на жизнеспособность клеток, частоту радиационно-индуцированных микроядер и уровень экспрессии многих других генов, в том числе связанных с клеточным ответом на облучение (*PRKDC*, *XRCC5*, *XRCC6*, *RFC3*, *GAGE7*, *LIF*, *SEPP1*, *POPDC3*, *POU3F2*, *DLG5*, *LXN*, *SMIM3*, *ALPK2*). Показано, что гены, изменяющие уровень экспрессии на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1*, имеют значимые функциональные связи на уровне белков с генами, вовлеченными в репарацию ДНК, контроль клеточного цикла, апоптоз и сигнальный путь TGF β .

Теоретическая и практическая значимость. В работе показано участие генов *ADAMTS1* и *THBS1* в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа.

Созданные модельные системы обладают потенциалом к использованию в дальнейших исследованиях клеточных и молекулярных механизмов формирования радиочувствительности. Показано, что *ADAMTS1* и *THBS1* имеют ограниченную информативность в качестве экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности, однако данные гены могут представлять интерес с точки зрения разработки таргетных молекулярных ингибиторов для повышения радиочувствительности опухолевых клеток.

Методология и методы исследования. Научная гипотеза исследования заключается в том, что гены *ADAMTS1* и *THBS1*, дифференциальная экспрессия которых выявлена в лимфоцитах индивидов с различной радиочувствительностью, вовлечены в клеточный ответ на воздействие ионизирующего излучения (ИИ). Проверка гипотезы осуществлялась в два этапа – в модельных системах с нокаутом и сверхэкспрессией изучаемых генов, созданных на основании опухолевой клеточной линии HeLa, и в лимфоцитах в выборке здоровых индивидов. Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол № 4 от 21.11.2017).

Клеточные линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1* получены с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. Сверхэкспрессия изучаемых генов в клеточной линии HeLa обеспечивалась методом транзientной трансфекции генно-инженерных конструкций, несущих кодирующие последовательности *ADAMTS1* и *THBS1*. Для идентификации и описания мутаций, внесенных системой CRISPR/Cas9, а также для верификации правильной сборки генетических конструкций для обеспечения сверхэкспрессии генов, использовано секвенирование нового поколения.

Облучение клеточных линий и культивируемых лимфоцитов здоровых индивидов проведено на гамма-терапевтической установке “Theratron Equinox 100”. Для оценки радиобиологических эффектов использованы анализ клональной выживаемости, уровня фокусов белков репарации ДНК и микроядерное тестирование в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ*. Для оценки уровня экспрессии генов в клеточных линиях с нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1* проведен транскриптомный анализ на экспрессионных микрочипах с последующей верификацией полученных данных с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

Положения, выносимые на защиту:

1. Гены *ADAMTS1* и *THBS1* влияют на радиационно-индуцированный ответ на повреждение ДНК и клоногенную способность опухолевых клеток.
2. Нокаут *ADAMTS1* и *THBS1* в опухолевой клеточной линии HeLa приводит к изменению транскрипционного профиля генов, связанных с радиационно-индуцированным ответом.
3. Нормальная вариабельность экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* в лимфоцитах периферической крови человека не связана со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и радиационно-индуцированной частотой центромеро-негативных микроядер, являющихся маркерами эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК.

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Высокая степень достоверности полученных данных обеспечивается применением современных клеточных технологий, использованием молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и

биоинформационных методов исследования, а также статистической обработкой полученных результатов. Лимфоциты периферической крови получены от 58 здоровых индивидов. Эксперименты по анализу уровня фокусов белков репарации ДНК и частоты микроядер включали три технические повторности. Фокусы белков репарации ДНК оценивались визуально в 150-200 клетках на препарате, микроядра оценивались в 1000 облученных и 2000 необлученных клеток. Анализ клональной выживаемости в клеточных линиях с нокаутом изучаемых генов был проведен в трех экспериментальных повторностях. Статистический анализ данных, полученных с помощью полнотранскриптомного анализа профиля экспрессии генов, был проведен с помощью модифицированного t-критерия Стьюдента с поправкой на множественность сравнений по методу Бенджамини-Хохберга (False Discovery Rate – FDR). Экспрессия генов была выборочно верифицирована с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

Апробация материалов диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены на международной научной конференции «Хромосомы и митоз» (Новосибирск, 2017), XV международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2018), Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2018), 23 международном Коллоквиуме по вопросам цитогенетики и геномики животных (Санкт-Петербург, 2018 г), международной конференции «Хромосома 2018» (Новосибирск, 2018), Российской конференции с международным участием «Современные вопросы радиационной генетики» (Дубна, 2019), XII Научной конференции «Генетика человека и патология: Актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики» (Томск, 2019), Европейской конференции по генетике человека (Вена, 2020), IX Съезде Российского общества медицинских генетиков (Москва, 2021), VIII Съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2021), I Международном форуме геномных и биомедицинских технологий (Сургут, 2021), Симпозиуме "Клиническая и трансляционная онкология" DNA-EVOLUTION (онлайн-симпозиум, 2022), Всероссийском Конгрессе молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2022).

Публикации. По теме исследования опубликовано 16 работ, в том числе 4 статьи в журналах Перечня ВАК РФ, из них 3 статьи в журналах, реферируемых в базе данных Web of Science и Scopus. 12 публикаций – статьи в сборниках и тезисы конференций.

Личный вклад автора. Основные результаты настоящего исследования получены автором либо самостоятельно, либо в ходе совместной работы с коллегами из лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и Отдела молекулярных механизмов онтогенеза ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН». Изучение литературы по теме, экспериментальная работа, анализ и обобщение результатов, написание диссертационной работы выполнены лично автором. Автор участвовал во всех этапах обсуждения полученных результатов и их опубликования.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы, список сокращений, список литературы, список иллюстративного материала и 2 приложения. Работа иллюстрирована

32 рисунками и 10 таблицами. Библиография включает 252 литературных источника, из них 19 источников отечественной литературы, 227 источников зарубежной литературы и 6 интернет-ресурсов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн диссертационного исследования представлен на рисунке 1.

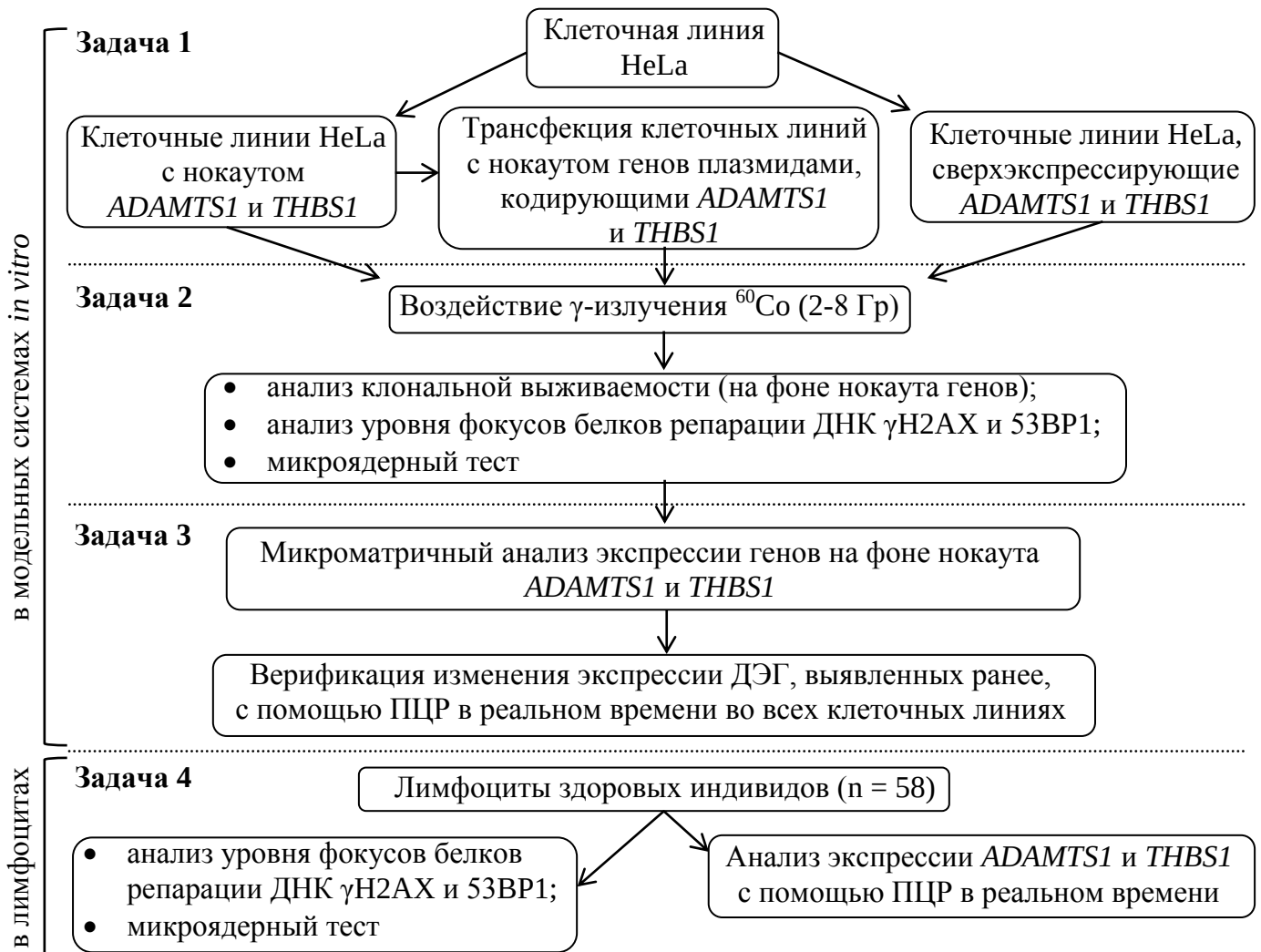


Рисунок 1 – Дизайн исследования.

Материалом для исследования послужили опухолевая клеточная линия HeLa (карцинома шейки матки), любезно предоставленная к.б.н. Булдаковым М.А. (НИИ онкологии Томского НИМЦ), и лимфоциты периферической крови, полученные от 58 здоровых индивидов (20 мужчин и 38 женщин). Возраст мужчин варьировал от 21 до 59 ($32,80 \pm 9,69$) лет, возраст женщин находился в диапазоне от 21 до 62 ($37,42 \pm 14,22$) лет. Группы мужчин и женщин не различались статистически значимо между собой по возрасту ($p = 0,20$).

В ходе первого этапа исследования с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 и плазмидной трансфекции на основании опухолевой клеточной линии HeLa были получены модели для изучения радиационно-индуцированных эффектов нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*.

На втором этапе исследования после воздействия ионизирующего γ -излучения ^{60}Co на гамма-терапевтической установке “Theratron Equinox 100” (Best Theratronics, Канада) в диапазоне доз 2-8 Гр в полученных клеточных моделях были проведены анализ клональной выживаемости (на фоне нокаута генов), анализ уровня фокусов белков репарации ДНК с помощью иммуноокрашивания и микроядерный тест.

На третьем этапе работы с помощью экспрессионных микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8×60K (Agilent Technologies, США) проведен сравнительный анализ изменения транскрипционного профиля генов в ответ на воздействие ИИ на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1*. Экспрессия дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) была выборочно верифицирована с помощью ПЦР в реальном времени.

Для того чтобы проверить, сохраняются ли наблюдаемые радиобиологические эффекты дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* в нормальных клетках организма, а также оценить возможность использования изучаемых генов в качестве экспрессионных маркеров, на следующем этапе работы был проведен анализ корреляции экспрессии изучаемых генов с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК и частотой радиационно-индуцированных микроядер в лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов.

Статистический анализ данных, полученных в радиобиологических экспериментах на клеточных линиях, был проведен с помощью t-критерия Стьюдента в программном пакете «Statistica 8.0». Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Числовые данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая обработка результатов микроматричного экспрессионного анализа проведена с помощью программной среды для статистического анализа R с использованием программы limma от «Bioconductor» на $\log_2$ -трансформированных данных при условии фоновой коррекции необработанных данных чипов и межчиповой квантильной нормализации. 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. Корреляционный анализ данных, полученных в ходе экспериментов на лимфоцитах здоровых индивидов, проведен с помощью непараметрического критерия Спирмана. Сравнение частоты микроядер в облученных и необлученных клетках проведено с помощью критерия Вилкоксона.

Все экспериментальные работы, за исключением специально оговоренных случаев, были проведены на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Клеточные линии с нокаутом гена были получены на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН и ЦКП «Проточной цитометрии» (ФИЦ ИЦиГ СО РАН). Секвенирование для верификации правильной сборки генетических конструкций для создания клеточных линий с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1* проведено на базе ЦКП «Молекулярная и клеточная биология» (ИМКБ СО РАН). Воздействие ионизирующим излучением на клеточные линии и лимфоциты периферической крови было проведено на базе ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» и НИИ онкологии Томского НИМЦ, соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика клеточных линий с нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1*. С помощью таргетного секвенирования нового поколения (NGS) установлено, что полученные клеточные линии являются компаундными гетерозиготами по разным мутациям. Во 2-й экзон *ADAMTS1* внесено две делеции размером 7 и 17 нуклеотидов, приводящие к сдвигу рамки считывания. Мутации *THBS1* затрагивали экзон 3: один из аллелей характеризовался делецией нуклеотида, приводящей к сдвигу рамки считывания на протяжении 37 п.н., после чего инсерция другого нуклеотида выравнивала рамку считывания; второй аллель характеризовался делецией 39 п.н. Внесенные мутации приводили к изменению и потере последовательности из 13 аминокислотных остатков (37-49), соответственно. По результатам моделирования с помощью ресурса «Mutation Tester» показано, что данные мутации приводят к нарушениям структуры и функции белковых продуктов изучаемых генов.

Характеристика плазмидных векторов для обеспечения сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*. Сверхэкспрессия изучаемых генов обеспечивалась методом транзientной трансфекции плазмид, несущих кодирующие последовательности генов *ADAMTS1* (Addgene plasmid #53807) и *THBS1* (плазмида *THBS1*_pcDNA3.1, получена самостоятельно). Трансфекция генетических конструкций осуществлялась в исходную клеточную линию HeLa и в клеточные линии с нокаутом соответствующих генов (для оценки возможности нормализации фенотипа после восстановления экспрессии).

С помощью NGS установлено, что плазмида *THBS1*_pcDNA3.1 содержит три SNPs, локализованных в кодирующей последовательности изучаемого гена:

- rs35248254 (chr15:39581891; GRCh38.p12) – синонимичная замена С на Т. Частота встречаемости Т=0.002972 (747/251358, GnomAD_exome).
- rs41515347 (chr15:39582195; GRCh38.p12) – синонимичная замена Т на G. Частота встречаемости G=0.010049 (2365/235344, GnomAD_exome).
- rs2228263 (chr15:39593100; GRCh38.p12) – синонимичная замена Т на С. Частота встречаемости С=0.127045 (29838/234862, GnomAD_exome).

Возрастание экспрессии изучаемых генов после трансфекции верифицировано методом количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 2).

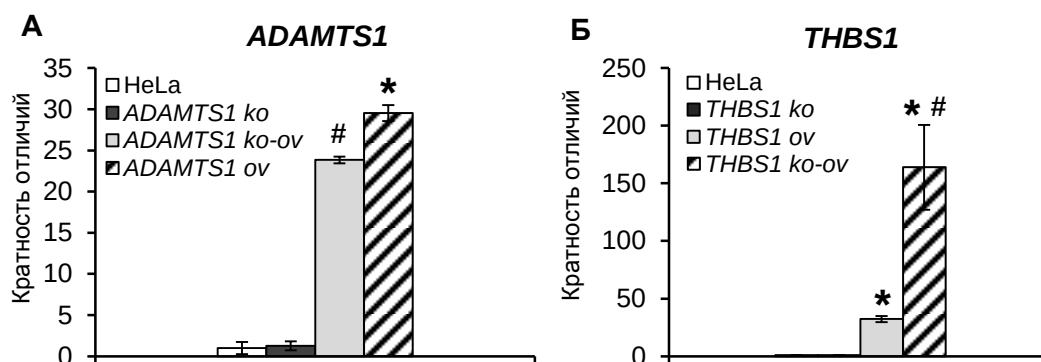


Рисунок 2 – Экспрессия *ADAMTS1* (А) и *THBS1* (Б) в клеточной линии HeLa после трансфекции. ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом; */# – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa/клеточной линией с нокаутом гена, $p < 0,05$.

Радиационно-индуцированные эффекты в клеточной линии HeLa на фоне дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*

Влияние нокаута *ADAMTS1* и *THBS1* на выживаемость клеток. Классическим методом анализа радиочувствительности клеточных линий является оценка их способности к формированию колоний до облучения (эффективность посева) и после воздействия ионизирующего излучения (клональная выживаемость). Показано, что эффективность посева, характеризующая базовую способность клеток к делению и формированию колоний, не изменялась в необлученных клетках с нокаутом гена *ADAMTS1*, но статистически значимо снижалась в 1,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению с интактной клеточной линией HeLa при нокауте гена *THBS1* (Рисунок 3 А).

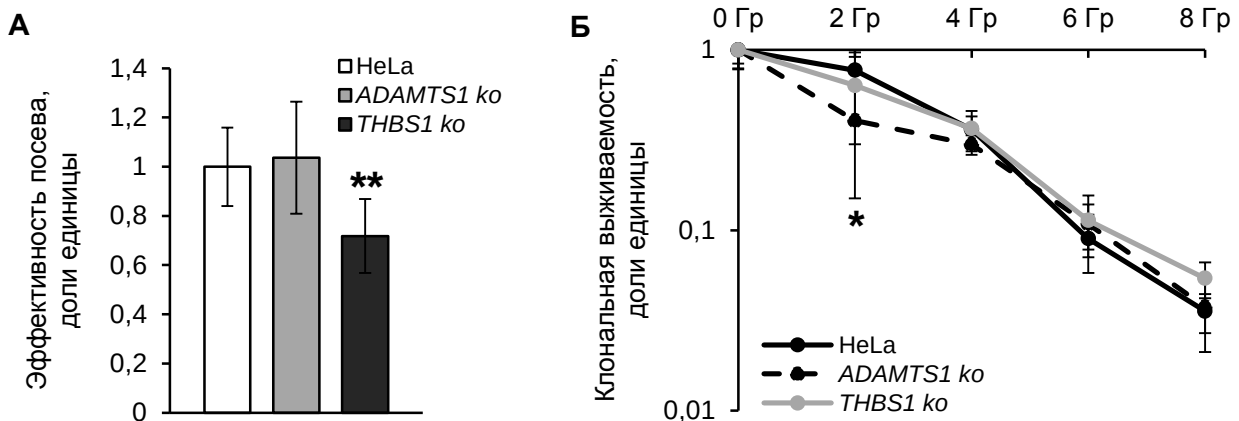


Рисунок 3 – Эффективность посева в необлученных клетках (А) и клональная выживаемость клеточной линии HeLa с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1* после облучения в диапазоне доз 2-8 Гр (Б); */** – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa, $p < 0,05$ / $p < 0,001$. ko – нокаут гена.

Статистически значимые различия в клональной выживаемости наблюдались после облучения в дозе 2 Гр (Рисунок 3 Б). Возможно, отсутствие отличий после облучения в дозах 4-8 Гр может быть связано с тем, что при воздействии большими дозами ИИ белковые продукты изучаемых генов не играют значительной роли в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа. После воздействия в дозе 2 Гр клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* характеризовалась снижением способности к формированию колоний в 1,9 раз ($p < 0,05$) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa (Рисунок 4).

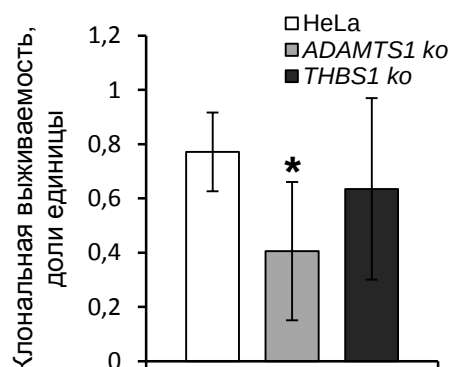


Рисунок 4 – Клональная выживаемость после облучения в дозе 2 Гр; ko –нокаут гена.
* – статистически значимые различия по сравнению с клеточной линией HeLa, $p < 0,05$.

Снижение эффективности посева, характерное для клеточной линии HeLa с нокаутом *THBS1*, и снижение клональной выживаемости, наблюдаемое на фоне нокаута *ADAMTS1*, свидетельствуют о том, что белки, кодируемые данными генами, важны для выживаемости клеток и их способности к делению, однако их роль в данных процессах остается неясной. Кроме того, по-видимому, роль данных белков неодинакова для выживаемости необлученных и облученных клеток.

Влияние нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* на уровень фокусов белков репарации ДНК и частоту микроядер. Для того чтобы оценить, связана ли экспрессия изучаемых генов с эффективностью репарации ДНК, в модельных клеточных системах был проведен анализ фокусов белков репарации ДНК и частоты микроядер после облучения. Уровень фокусов белков репарации ДНК и частота радиационно-индуцированных микроядер характеризуют эффективность процессов репарации ДНК. Однако, уровень фокусов белков репарации γ H2AX и 53BP1 отражает процесс распознавания двухцепочечных разрывов ДНК, в то время как частота микроядер свидетельствует о результатах их репарации. Изменения экспрессии *ADAMTS1* не приводили к статистически значимым различиям в уровне фокусов белков γ H2AX и 53BP1 до облучения (Рисунок 5 А), однако после воздействия γ -излучением в дозе 2 Гр уровень фокусов γ H2AX возрастал на фоне сверхэкспрессии *ADAMTS1* на уровне тенденции (Рисунок 5 Б).

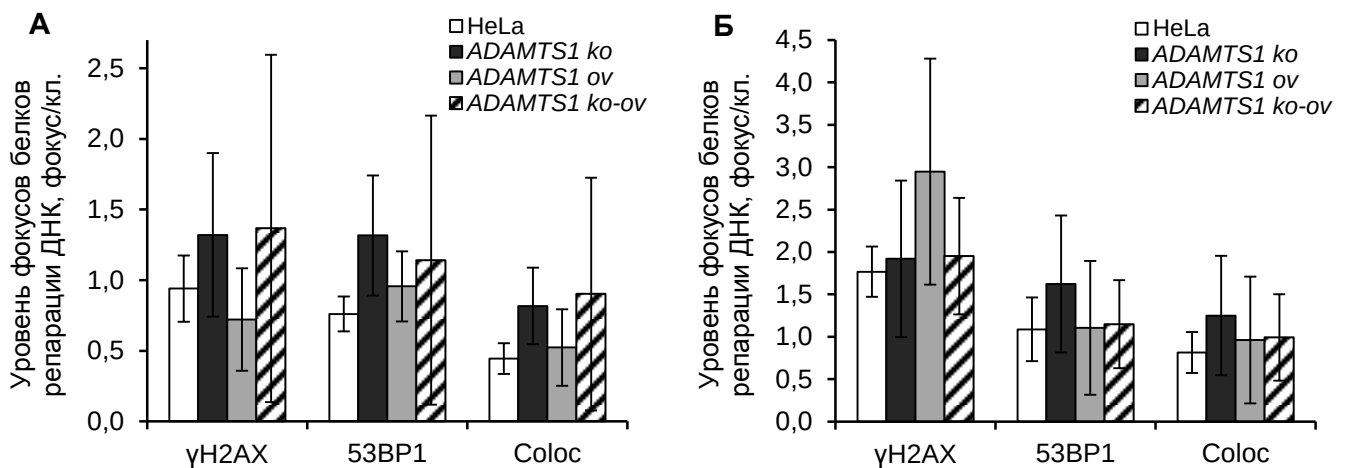


Рисунок 5 – Уровень фокусов белков репарации γ H2AX и 53BP1 на фоне нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* в необлученных клетках (А) и после облучения в дозе 2 Гр (Б).

ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом.

Сверхэкспрессия гена *THBS1* в клеточной линии HeLa приводила к небольшому, но статистически значимому возрастанию уровня фокусов белка 53BP1 с $0,8 \pm 0,1$ до $1,1 \pm 0,1$ фокусов на клетку ($p = 0,02$) и колокализованных фокусов 53BP1 и γ H2AX с $0,4 \pm 0,1$ до $0,7 \pm 0,1$ фокусов на клетку ($p = 0,03$) в необлученных клетках по сравнению с контрольной клеточной линией HeLa (Рисунок 6А). После облучения уровень фокусов 53BP1, γ H2AX и колокализованных фокусов также возрастал в клеточной линии, сверхэкспрессирующей *THBS1*, но статистически значимых различий не наблюдалось (Рисунок 6 Б).

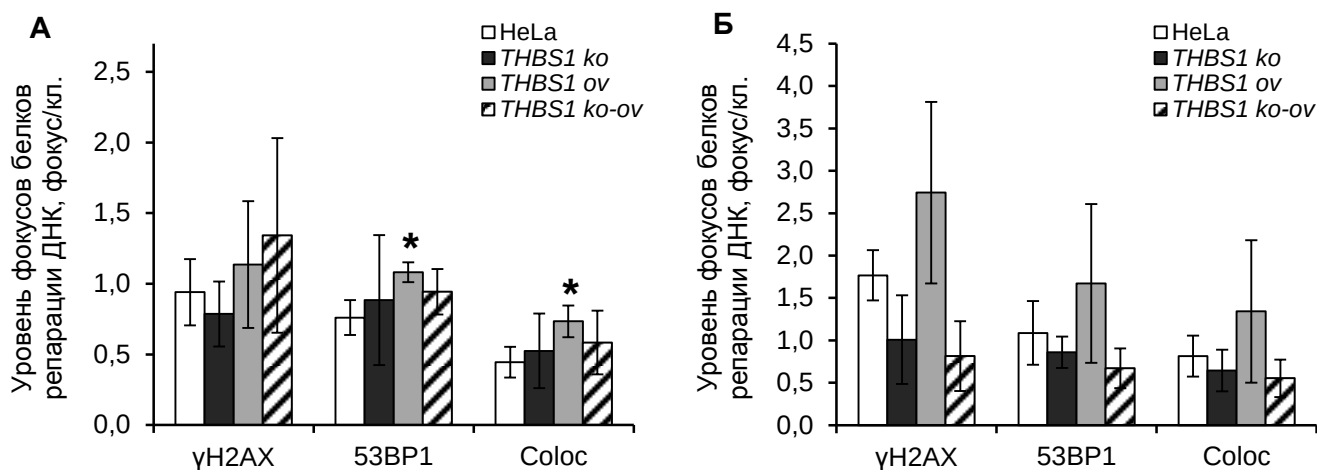


Рисунок 6 – Уровень фокусов белков репарации γ H2AX и 53BP1 на фоне нокаута и сверхэкспрессии *THBS1* в необлученных клетках (А) и после облучения в дозе 2 Гр (Б). ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом; * – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa, $p < 0,05$.

Влияние нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* на частоту радиационно-индуцированных микроядер. Дифференциальная экспрессия гена *ADAMTS1* приводила к изменению частоты микроядер только после облучения в дозе 2 Гр. Показано, что клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* характеризовалась повышенной частотой микроядер по сравнению с контрольной клеточной линией HeLa ($55,3 \pm 8,3 \%$ и $36,0 \pm 7,2 \%$, соответственно, $p < 0,05$) (Рисунок 7 А). Примечательно, что трансфекция клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* плазмидой, несущей кодирующую последовательность изучаемого гена, приводила к снижению частоты микроядер с $55,3 \pm 8,3 \%$ до $28,7 \pm 10,3 \%$ ($p < 0,05$), что сопоставимо с частотой, характерной для контрольной клеточной линии HeLa ($36,0 \pm 7,2 \%$) (Рисунок 7 А).

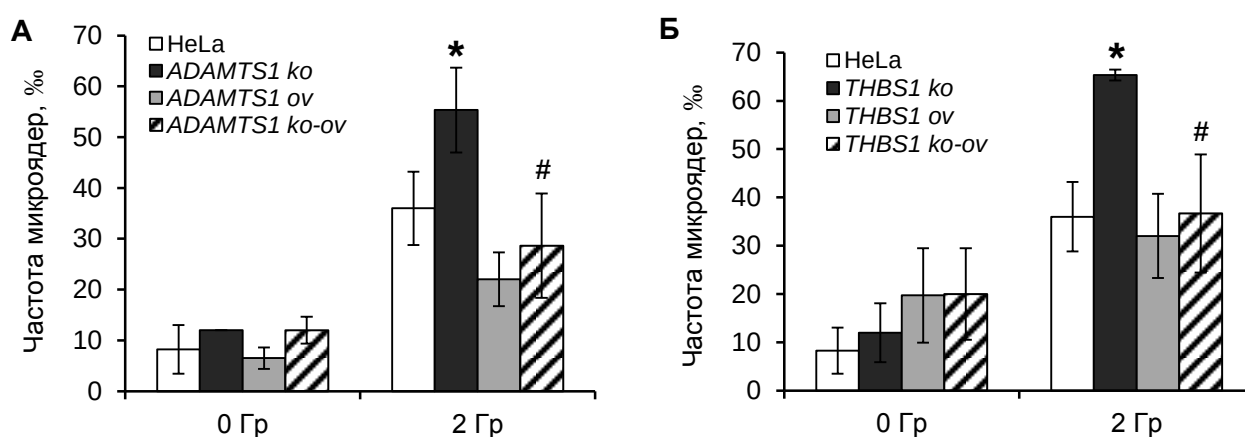


Рисунок 7 – Частота спонтанных и радиационно-индуцированных микроядер на фоне нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* (А) и *THBS1* (Б). ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом; * – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa, $p < 0,05$, # – статистически значимые различия по сравнению с клеточной линией HeLa с нокаутом гена, $p < 0,05$.

Клеточная линия с нокаутом *THBS1* также характеризовалась возрастанием частоты радиационно-индуцированных микроядер с $36,0 \pm 7,2 \%$ в контроле до $65,3 \pm 1,2 \%$ ($p < 0,05$) (Рисунок 7 Б). Последующее восстановление экспрессии *THBS1* в клеточной линии с нокаутом гена приводило к снижению частоты радиационно-индуцированных микроядер с $65,3 \pm 1,2 \%$ до $36,7 \pm 12,2 \%$ ($p < 0,05$) (Рисунок 7 Б).

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что несмотря на отсутствие статистически значимых различий в уровне радиационно-индуцированных фокусов γH2AX , являющихся маркерами двухцепочечных разрывов ДНК, частота микроядер после облучения была повышена в обеих клеточных линиях с нокаутом генов. Считается, что двухцепочечные разрывы ДНК предшествуют образованию большинства микроядер, поэтому наблюдаемое повышение частоты радиационно-индуцированных микроядер в отсутствие возрастания уровня фокусов γH2AX вызывает интерес. По-видимому, продукты генов *ADAMTS1* и *THBS1* не связаны с процессом распознавания радиационно-индуцированных двухцепочечных разрывов ДНК. Однако, нельзя исключать возможность косвенного участия *ADAMTS1* и тромбоспондина-1 в репарации ДНК, поскольку они могут проявлять свое действие на более поздних этапах данного процесса, не связанных с фосфорилированием гистона H2AX.

Примечательно, что обеспечение сверхэкспрессии *ADAMTS1* или *THBS1* в исходной клеточной линии HeLa не приводило к возникновению статистически значимых различий в частоте радиационно-индуцированных микроядер. По-видимому, существует определенный диапазон экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*, в рамках которого реализуется действие белковых продуктов изучаемых генов. При этом, превышение данного диапазона (как в клеточных линиях со сверхэкспрессией генов) не влияет на степень выраженности биологической реакции, то есть в данном случае не приводит к статистически значимому снижению частоты микроядер.

Это предположение также объясняет снижение частоты радиационно-индуцированных микроядер в клеточных линиях с нокаутом генов после восстановления экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*. В действительности, трансфекция плазмид, несущих кодирующие последовательности изучаемых генов, в клеточные линии с нокаутом приводит не к восстановлению экспрессии до исходного уровня нативной клеточной линии HeLa, а к многократному ее возрастанию. Поэтому наблюдается снижение частоты радиационно-индуцированных микроядер относительно клеточных линий с нокаутом генов (так как уровень экспрессии достигает функционального диапазона), но не относительно исходной HeLa, так как превышение функционального диапазона экспрессии не влияет на степень выраженности клеточного ответа, и не приводит к еще большему снижению частоты микроядер.

Радиационно-индуцированный профиль экспрессии генов на фоне нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*

В попытке приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе наблюдаемых радиобиологических эффектов, в клеточных линиях с нокаутом изучаемых генов был проведен анализ профиля экспрессии генов с помощью микрочипов. Количество выявленных ДЭГ представлено в таблице 1.

Таблица 1 – ДЭГ в клеточных линиях с нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1* относительно исходной клеточной линии HeLa

Уровень значимости	Клеточная линия	Нокаут <i>ADAMTS1</i>		Нокаут <i>THBS1</i>	
	Доза ИИ	0 Гр	2 Гр	0 Гр	2 Гр
$p < 0,05$	Повышение экспрессии	35	55	31	50
	Снижение экспрессии	26	47	35	43
	Общее число ДЭГ	61	102	66	93
$FDR < 0,05$	Повышение экспрессии	7	9	1	1
	Снижение экспрессии	5	7	2	2
	Общее число ДЭГ	12	16	3	3

Дифференциальная экспрессия большей части генов была общей для необлученных и облученных клеток, что свидетельствует в пользу того, что изменения активности генов обусловлены нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1*, а не дополнительным воздействием ИИ. На рисунке 8 представлен редуцированный список ДЭГ после применения поправки на множественность сравнения ($FDR < 0,05$). Примечательно, что 53 % выявленных ДЭГ (*GAGE7*, *LIF*, *SEPP1*, *POPDC3*, *DLG5*, *POU3F2*, *LXN*, *SMIM3*, *ALPK2*), согласно данным литературы, связаны с радиочувствительностью здоровых и опухолевых клеток (Yoshida Y. et al., 2012; Liu S.C. et al., 2013; Eckers J.C. et al., 2013; You Y. et al., 2014; Liu J. et al., 2019; Herbert K. et al., 2019; Yamaguchi M. et al., 2020; Sun Z. et al., 2021). Кроме того, *ALPK2* и *POU3F2*, связаны с репарацией ДНК. В частности, сниженная экспрессия *ALPK2* может подавлять активность генов репарации (Yoshida Y. et al., 2012).

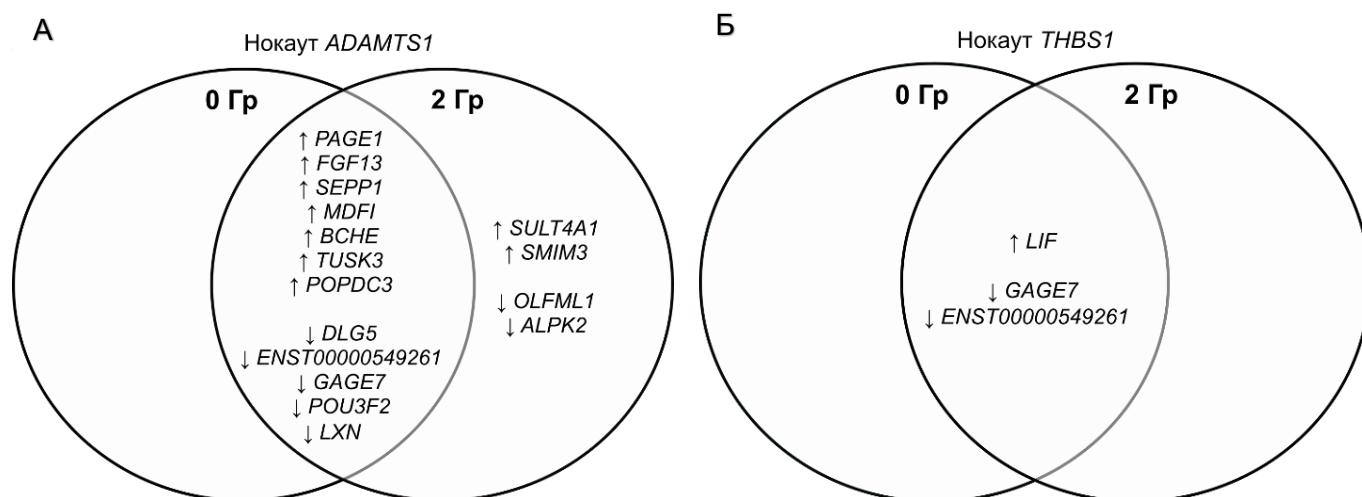


Рисунок 8 – Гены, изменяющие экспрессию в клеточных линиях HeLa с нокаутом *ADAMTS1* (А) и *THBS1* (Б) по сравнению с интактной клеточной линией HeLa ($FDR < 0,05$) в необлученных клетках (0 Гр) и после воздействия ионизирующего излучения в дозе 2 Гр; ↑ – гиперэкспрессирующиеся гены, ↓ – гипозэкспрессирующиеся гены.

Экспрессия некоторых генов была верифицирована с помощью ПЦР в реальном времени, что позволило подтвердить результаты микрочипового анализа, а также оценить экспрессию выявленных генов в клеточных линиях после плазмидной трансфекции (Рисунок 9, 10). При этом показано, что экспрессия *LXN*, *SEPP1* и *EPB41L3* статистически значимо изменяется в зависимости от того, нокаутированы или сверхэкспрессированы *ADAMTS1* или *THBS1*.

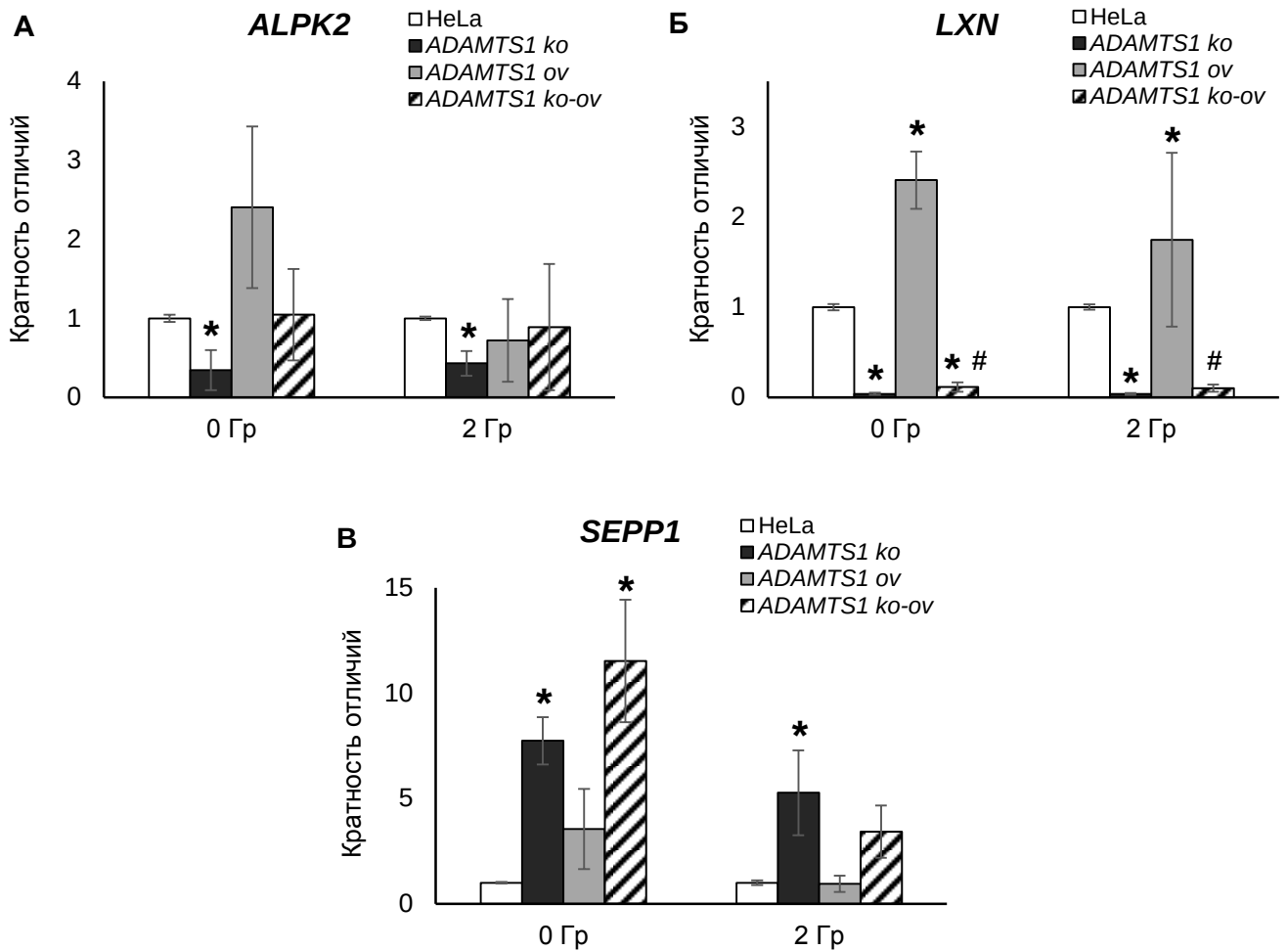


Рисунок 9 – Гены, изменяющие экспрессию на фоне нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1*. (А) уровень экспрессии гена *ALPK2*, (Б) уровень экспрессии гена *LXN*, (В) уровень экспрессии гена *SEPP1*. ко – нокаут гена, ов – сверхэкспрессия гена, ко-ов – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом; */# – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa / клеточной линией HeLa с нокаутом гена, $p < 0,05$.

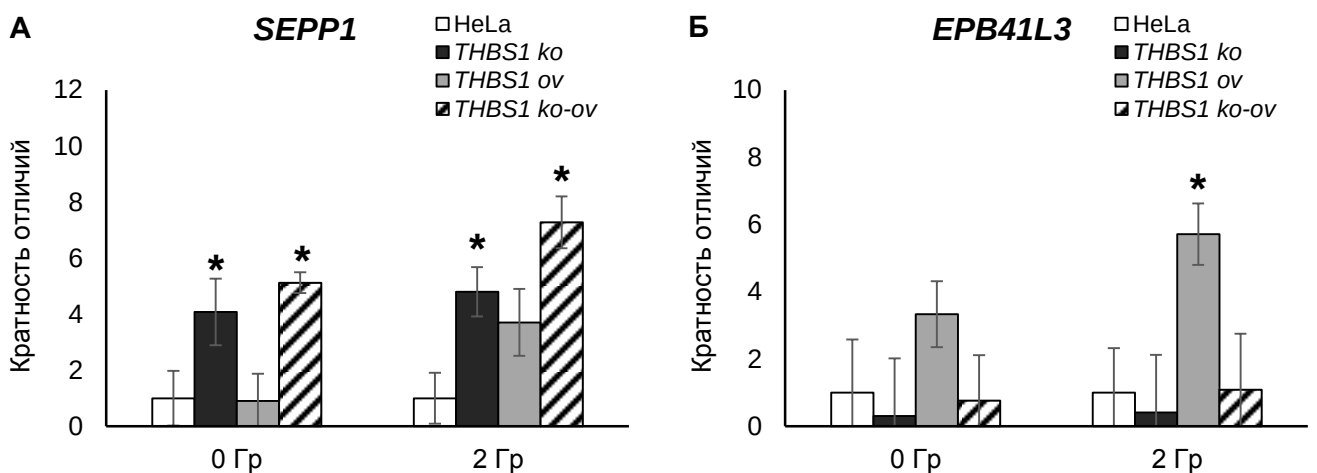


Рисунок 10 – Гены, изменяющие экспрессию на фоне нокаута и сверхэкспрессии *THBS1*. (А) уровень экспрессии гена *EPB41L3*, (Б) уровень экспрессии гена *SEPP1*. ко – нокаут гена, ов – сверхэкспрессия гена, ко-ов – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом.

Анализ списков ДЭГ (без учета поправки на множественность сравнения) с помощью инструмента «WebGestalt» не выявил статистически значимо обогащенных групп при использовании баз данных «Gene Ontology» и «KEGG» ни до, ни после облучения. Принимая во внимание наблюдаемые в модельных системах радиобиологические эффекты (изменение частоты микроядер, снижение клоногенной способности клеток), было выдвинуто предположение, что выявленные ДЭГ могут быть связаны с процессами репарации ДНК, контролем клеточного цикла, апоптозом и функционированием сигнального пути TGF β . Поэтому с помощью инструмента «STRING» списки ДЭГ, выявленных в работе, были сопоставлены с известными списками генов, вовлеченных в данные процессы (GO:0072332; 0097191; 0006302; 0044839; KEGG M2642). Такой подход позволил установить, что выявленные ДЭГ имеют функциональные связи на уровне белков с генами, вовлеченными в репарацию ДНК, контроль клеточного цикла, апоптоз и сигнальный путь TGF β . К примеру, показано, что на фоне нокаута *ADAMTS1* изменяется экспрессия *RFC3*, *MSH2*, *MSH6*. Известно, что *RFC3* участвует в репликации ДНК, а гены *MSH2*, *MSH6* вовлечены в репарацию неправильно спаренных оснований (Edelbrock M.A. et al., 2013). Нокаут *THBS1* приводит к изменению экспрессии *RFC3*, *PRKDC*, *XRCC3* и *XRCC5*. *PRKDC* кодирует субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы, являющейся ключевым ферментом репарации двунитевых разрывов ДНК (Falck J. et al., 2005). Гены *XRCC3* и *XRCC5* кодируют белки Ku70 и Ku80, непосредственно связывающиеся с концами ДНК в местах двухцепочечных разрывов (Thacker J. et al., 2003).

Таким образом, по-видимому, *ADAMTS1* и *THBS1* являются генами-модификаторами, не связанными напрямую с репарацией ДНК, но вовлеченными в радиационно-индуцированный ответ и изменяющими экспрессию ряда нижестоящих генов-мишеней, которые могут влиять на радиочувствительность и эффективность репарации ДНК.

Связь экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* с уровнем фокусов белков репарации ДНК и частотой микроядер в лимфоцитах периферической крови

Для того чтобы проверить, сохраняются ли наблюдаемые в модельных системах радиобиологические эффекты дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* в нормальных клетках организма, а также оценить возможность использования изучаемых генов в качестве экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности, в лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов (n=58) был проведен анализ корреляции экспрессии изучаемых генов с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК и частотой радиационно-индуцированных микроядер.

Проведенный анализ не выявил корреляции экспрессии исследуемых генов с эндогенным уровнем фокусов γ H2AX и суммарной частотой радиационно-индуцированных микроядер. Дальнейший анализ литературы показал, что экспрессия *ADAMTS1* и *THBS1* зависит от стадии менструального цикла у лабораторных животных (Robker R.L. et al., 2000; Bender H.R. et al., 2019). Принимая во внимание, что *ADAMTS1* и *THBS1* экспрессируются в лимфоцитах, можно предположить, что активность данных генов может изменяться в зависимости от изменения уровня половых гормонов в сыворотке крови, и как следствие, зависит от стадии менструального цикла у женщин. Поэтому был проведен анализ корреляции экспрессии генов с уровнем фокусов и частотой

микроядер в зависимости от пола индивидов (Рисунок 11). Такой подход позволил выявить негативную корреляцию экспрессии *ADAMTS1* с частотой спонтанных центромерно-негативных микроядер в группе мужчин.

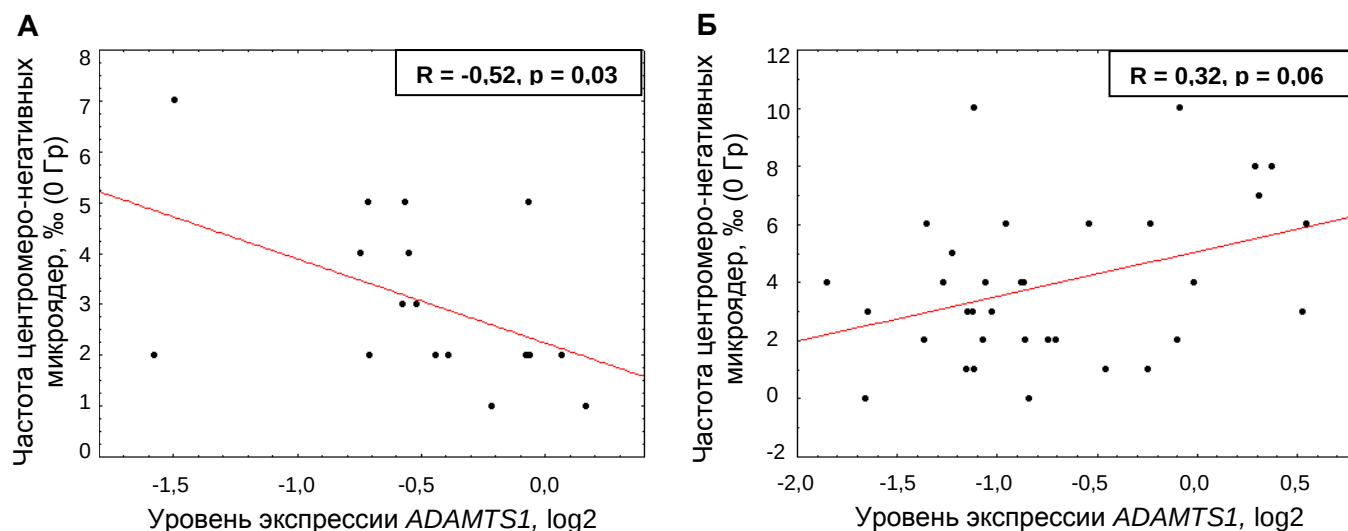


Рисунок 11 – Корреляция экспрессии *ADAMTS1* с частотой спонтанных микроядер в группе мужчин (А) и женщин (Б).

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показывают, что нормальная вариабельность экспрессии изучаемых генов в лимфоцитах периферической крови человека не связана со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и радиационно-индуцированной частотой центромерно-негативных микроядер, поэтому *ADAMTS1* и *THBS1* имеют ограниченную информативность в качестве самостоятельных экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для проверки гипотезы о вовлеченности генов *ADAMTS1* и *THBS1* в формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа в работе были использованы модельные системы нокаута и транзientной сверхэкспрессии изучаемых генов. На сегодняшний день моделирование является одним из основных методов функциональной геномики, позволяющим перейти от ассоциативного и корреляционного анализа к установлению причинно-следственных связей между нарушением экспрессии целевых генов и наблюдаемым фенотипом (Shalem O. et al., 2015; Przybyla L. et al., 2022). Проведение экспериментов в модельных системах позволило установить, что нокаут изучаемых генов приводит к снижению выживаемости клеток как после облучения (на фоне нокаута *ADAMTS1*), так и в отсутствии воздействия ИИ (на фоне нокаута *THBS1*). Показано, что в клеточных линиях с нокаутом генов значительно возрастает частота радиационно-индуцированных микроядер, являющихся хорошо изученным маркером радиочувствительности. Более того, установлено, что последующее восстановление экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* в клеточных линиях с нокаутом генов приводит к снижению частоты радиационно-индуцированных микроядер до уровня, сопоставимого с таковым в контрольной клеточной линии HeLa. Результаты экспериментов, проведенных в модельных системах, подтверждают гипотезу исследования и являются убедительным

доказательством того, что *ADAMTS1* и *THBS1* вовлечены в формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа. Таким образом, настоящая работа позволила выявить новые эффекты *ADAMTS1* и *THBS1*, связанные с радиочувствительностью клеток и не описанные ранее в литературе, а также установить, что гены, кодирующие белки внеклеточного матрикса (ВКМ), могут быть связаны с формированием радиационно-индуцированного ответа на повреждение ДНК.

В настоящее время работы, направленные на изучение функций ВКМ и его компонентов, являются особенно актуальными и представляют большой интерес для исследователей в области онкологии, кардиологии, фармакологии и некоторых других научных направлений (Ju H. et al., 1996; Järveläinen H. et al., 2009; Gialeli C. et al., 2011; Howard C.M. et al., 2014; Venning F.A. et al., 2015; Keeratichamroen S. et al., 2018; Di Modugno F. et al., 2019). К примеру, можно встретить работы, уделяющие особое внимание роли сигнальных путей, включающих взаимодействия с ВКМ и паракринную межклеточную сигнализацию, в ответе на повреждение ДНК (Valerie K. et al., 2007; Eke I. et al., 2011). Более того, некоторые авторы считают, что изучение роли ВКМ с точки зрения его возможности модулировать радиочувствительность клеток является одним из наиболее перспективных направлений, определяющих будущее радиобиологии (Kirsch D.G. et al., 2018). В этом аспекте результаты настоящего исследования представляют особенный интерес. Микроматричный анализ экспрессионного профиля, проведенный в клеточных линиях с нокаутом генов, позволяет предположить, что продукты *ADAMTS1* и *THBS1* являются регуляторами сигнальных путей, передающих информацию от ВКМ к ядру клетки. При этом белковые продукты ДЭГ, выявленных в работе, могут являться участниками данных сигнальных каскадов. Вероятно, в норме, замыкаясь на ядерных факторах транскрипции, активация данных сигнальных путей может влиять на процессы репарации ДНК и радиационно-индуцированный клеточный ответ. В условиях нокаута изучаемых генов, синтез функциональных белковых продуктов и экскреция в ВКМ нарушаются, что в свою очередь влечет нарушение работы сигнальных путей и процессов репарации ДНК, возрастание частоты микроядер, репродуктивную гибель и снижение выживаемости клеток. Принимая во внимание, что *ADAMTS1* и *THBS1* являются секретлируемыми белками ВКМ, по-видимому, любое действие, затрагивающее данные белки, будет сказываться и на других клетках ткани, что в свою очередь, позволяет предположить, что данные гены могут быть связаны с радиационно-индуцированным эффектом свидетеля. В связи с этим, перспективы продолжения данного исследования могут быть связаны с исследованием возможной роли *ADAMTS1* и *THBS1* в формировании данного феномена.

Кроме того, с помощью микроматричного анализа профиля экспрессии удалось установить, что ДЭГ, выявленные в работе, имеют функциональные связи на уровне белков с генами, вовлеченными в сигнальные пути апоптоза, процесс репарации двухцепочечных разрывов ДНК и переход клеточного цикла из стадии G₂ в М. Известно, что данные процессы являются одними из основных механизмов поддержания стабильности генома – фундаментального свойства живых организмов. Поддержание стабильности генома имеет важное значение в онтогенетическом (предотвращение возникновения злокачественных новообразований, являющихся следствием мутационных

изменений в геноме клетки), филогенетическом аспектах (передача неповрежденного генетического материала в ряду поколений), а также с точки зрения устойчивости к мутагенному воздействию внешних агрессивных факторов, включая ИИ. Таким образом, изменения транскрипционного профиля ДЭГ, связанных с репарацией ДНК, контролем клеточного цикла и апоптозом, наблюдаемые нами в клеточных линиях с нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1*, а также показанное ранее влияние нокаута генов на жизнеспособность не только облученных, но и необлученных клеток, позволяет предположить, что продукты изучаемых генов связаны с фундаментальными клеточными механизмами, направленными на поддержание стабильности генома. Это, в свою очередь, позволяет рассматривать *ADAMTS1* и *THBS1* не только как участников радиационно-индуцированного клеточного ответа, но и в качестве генов, связанных с реакцией на многие стрессовые стимулы.

Принимая во внимание, что отличия в экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* были выявлены у индивидов с различной радиочувствительностью, одной из задач данного исследования являлась оценка возможности использования данных генов в качестве экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности человека. В экспериментах, проведенных на лимфоцитах периферической крови, полученных от выборки здоровых индивидов, не показано статистически-значимых корреляций экспрессии изучаемых генов с частотой радиационно-индуцированных центромеро-негативных микроядер. Результаты этих экспериментов в совокупности с данными, полученными в модельных системах, свидетельствуют о том, что, хотя *ADAMTS1* и *THBS1* вовлечены в формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа, их экспрессия в лимфоцитах периферической крови не является определяющим фактором в формировании индивидуальной радиочувствительности. Поэтому, в настоящее время нет убедительных оснований рекомендовать использовать *ADAMTS1* и *THBS1* в качестве самостоятельных экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности нормальных клеток организма. Однако, поскольку данные гены кодируют белки ВКМ, они могут быть интересны с точки зрения разработки специфических молекулярных ингибиторов для повышения радиочувствительности опухолевых клеток.

ВЫВОДЫ

1. С использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 и плазмидной трансфекции получены клеточные модели для изучения влияния нокаута и сверхэкспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа в опухолевой клеточной линии HeLa.
2. Нокаут *THBS1* снижает способность клеток HeLa к формированию колоний до облучения (в 1,4 раза, $p < 0,05$), а нокаут гена *ADAMTS1* – после воздействия γ -излучения в дозе 2 Гр (в 1,9 раз, $p < 0,05$).
3. Нокаут *ADAMTS1* и *THBS1* не влияет на уровень фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1. Сверхэкспрессия *THBS1* приводит к возрастанию уровня эндогенных фокусов 53BP1 на клетку с $0,8 \pm 0,1$ до $1,1 \pm 0,1$ ($p = 0,02$) и колокализованных фокусов 53BP1 и γ H2AX с $0,4 \pm 0,1$ до $0,7 \pm 0,1$ ($p = 0,03$). Сверхэкспрессия *ADAMTS1* не влияет на уровень фокусов белков репарации ДНК ни до, ни после облучения.

4. Частота радиационно-индуцированных микроядер возрастает с $36,0 \pm 7,2 \%$ в исходной клеточной линии HeLa до $55,3 \pm 8,3 \%$ ($p = 0,04$) и $65,3 \pm 1,2 \%$ ($p = 0,002$) при нокауте *ADAMTS1* и *THBS1*, соответственно. Восстановление экспрессии исследуемых генов в клеточных линиях с нокаутом приводит к снижению частоты микроядер до значений, характерных для контрольной клеточной линии HeLa ($28,7 \pm 10,3 \%$ ($p = 0,03$) и $36,7 \pm 12,2 \%$ ($p = 0,02$), соответственно).
5. Нокаут гена *ADAMTS1* приводит к изменению экспрессии 12 генов до облучения и 16 генов после облучения в дозе 2 Гр ($FDR < 0,05$), а нокаут гена *THBS1* – к изменению экспрессии 3 генов до облучения и 3 генов после облучения в дозе 2 Гр ($FDR < 0,05$). Среди выявленных дифференциально экспрессирующихся генов 53 % генов связаны с радиационно-индуцированным клеточным ответом.
6. В лимфоцитах здоровых индивидов экспрессия *ADAMTS1* коррелирует с частотой спонтанных центромеро-негативных микроядер в группе мужчин ($R = -0,52$, $p = 0,03$). Экспрессия *THBS1* не коррелирует с частотой центромеро-негативных микроядер ни до, ни после облучения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Савченко Р.Р.**, Васильев С.А., Фишман В.С., Сухих Е.С., Сухих Л.Г., Мурашкина А.А., Дорофеева А.А., Лебедев И.Н. Влияние нокаута гена *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа в модельной системе *in vitro* // Генетика. – 2020. – Т. 56. – № 5. – С. 592-601.
2. **Савченко Р.Р.**, Васильев С.А., Фишман В.С., Сухих Е.С., Грибова О.В., Старцева Ж.А., Мурашкина А.А., Дорофеева А.В., Шункова Д.М., Лебедев И.Н. Влияние дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1*, *RBFOX2*, *THBS1* и *WHSC1* на формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа // Медицинская генетика. – 2021. – Т. 19. – № 9. – С. 85-87.
3. **Савченко Р.Р.**, Мурашкина А.А., Фишман В.С., Сухих Е.С., Вертинский А.А., Сухих Л.Г., Серов О.Л., Лебедев И.Н. Васильев С.А. Влияние дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* на радиационно-индуцированный ответ клеточной линии HeLa // Генетика. – 2021. – Т. 57. – № 7. – С. 842-849.
4. Васильев С.А., **Савченко Р.Р.**, Беленко А.А., Скрябин Н.А., Слепцов А.А., Фишман В.С., Мурашкина А.А., Грибова О.В., Старцева Ж.А., Сухих Е.С., Вертинский А.В., Сухих Л.Г., Серов О.Л., Лебедев И.Н. *ADAMTS1* дифференциально экспрессируется в лимфоцитах индивидов с различным уровнем эндогенных фокусов γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер // Генетика. – 2022. – Т. 58. – 10. – С. 1185–1196.

Статьи в сборниках и материалах конференций:

5. **Savchenko R.R.**, Vasilyev S.A., Skryabin N.A., Fishman V.S., Serov O.L., Lebedev I.N. The role of the *ADAMTS1*, *THBS1*, *WHSC1*, *RBFOX2* genes in the radiation-induced human somatic cellular response to DNA damage // Chromosomes and Mitosis: International Miniconference. Novosibirsk, Russia: Abstracts. – Novosibirsk, 2017. – P. 13.
6. **Savchenko R.R.**, Vasilyev S.A., Fishman V.S., Murashkina A.A., Dorofeeva A.V., Lebedev I.N. Knockout of *ADAMTS1* gene by CRISPR/Cas9 affect the micronucleus frequency but not the DNA repair signaling in HeLa cell line // Comparative Cytogenetics. – 2018. – V.12(3). – P. 348-349.

7. Васильев С.А., **Савченко Р.Р.**, Фишман В.С., Мурашкина А.А., Зарубин А.А., Вилкова М.Ю., Лопаткина М.Е., Лебедев И.Н. Влияние протеиназы межклеточного матрикса *ADAMTS1* на регуляцию радиационно-индуцированного ответа в нокаутной модельной системе *in vitro* // Гены и клетки – 2018. – Приложение, № 2. – С. 61.

8. **Савченко Р.Р.**, Васильев С.А., Фишман В.С. Уровень метилирования гистона H3 в клеточных линиях с нокаутом *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник трудов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 2018 г.): в 7 т. Т. 4: Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2018 г. – С. 137-139.

9. Мурашкина А.А., **Савченко Р.Р.** Влияние нокаута генов *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* на транскрипционную регуляцию и клональную выживаемость клеток в модельной системе *in vitro* // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник научных трудов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Томск, 2018 г. Т. 4: Биология и фундаментальная медицина.—Томск, 2018. – Издательский Дом Томского государственного университета, 2018. – Т. 4. – С. 108-109.

10. **Савченко Р.Р.**, Васильев С.А., Фишман В.С., Мурашкина А.А., Дорофеева А.В., Сухих Е.С., Лебедев И.Н. Влияние нокаута генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа клеток на повреждение ДНК // Хромосома 2018: Материалы Междунар. конф. Новосибирск, Россия / Ин-т молекулярной и клеточной биологии СО РАН ; Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск, 2018. – С. 171-172.

11. **Савченко Р.Р.**, Васильев С.А., Фишман В.С., Мурашкина А.А., Дорофеева А.В., Лебедев И.Н. Влияние продуктов генов *RBFOX2* и *THBS1* на метилирование гистонов в нокаутных клеточных линиях // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых [Электронный ресурс] / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.А. Степанова, В.В. Жданова; Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томский государственный университет. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2018. – С. 124-126.

12. **Савченко Р.Р.**, Васильев С.А., Фишман В.С., Мурашкина А.А., Лебедев И.Н. Влияние нокаута генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* на частоту хромосомных нарушений и радиационно-индуцированный ответ в опухолевых клетках // Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики: сборник научных трудов / под ред. В.А. Степанова. Вып.12. – Томск: Литературное бюро, 2019. – С. 54-55.

13. **Савченко Р.Р.**, Васильев С.А., Фишман В.С., Сухих Е.С., Сухих Л.Г., Мурашкина А.А., Дорофеева А.А., Лебедев И.Н. Роль белков межклеточного матрикса в формировании радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК // Современные вопросы радиационной генетики: Материалы российской конференции с международным участием, Дубна, 2019 г.– Дубна: ОИЯИ, 2019. – С. 97-98.

14. Мурашкина А.А., **Савченко Р.Р.** Влияние нокаута генов *ADAMTS1* и *THBS1* на транскрипционный профиль в опухолевой линии HeLa//МНСК-2019: Биология.– 2019.– С. 153.

15. Мурашкина А.А., **Савченко Р.Р.**, Васильев С.А. Изменение транскрипционного профиля в линиях, нокаутных по генам *ADAMTS1* и *THBS1* // Гены и Клетки. – 2020. – Т. 15. – № 3. – С. 142-143.

16. Гатауллин Н.К., **Савченко Р.Р.**, Фишман В.С., Сухих Е.С., Вертинский А.В., Сухих Л.Г., Васильев С.А., Лебедев И.Н. Анализ влияния дифференциальной экспрессии гена *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа // Физиология, биотехнология и биоинформатика растений и микроорганизмов - путь в будущее: к 85-летию Р.А. Карначук: материалы Всероссийской научной конференции / отв. ред. О.В. Карначук. – Томск: ООО "Дельтаплан", 2022. – С. 38-41.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

Гр – Грей

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

ИИ – ионизирующее излучение

ПЦР – полимеразная цепная реакция

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – кластеризованные, регулярно разделенные, короткие палиндромные повторы

FDR (False Discovery Rate) – вероятность ложноположительного результата

SNP(s) (Single Nucleotide Polymorphism(s)) – однонуклеотидный полиморфизм(ы)

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10
Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03
канд. биол. наук Хитринской И.Ю.
e-mail: khitrinskaya@tnimc.ru