

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

профессор РАН

Лебедев Игорь Николаевич

Томск – 2022

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Феномен индивидуальной радиочувствительности	13
1.2. Механизмы формирования радиационно-индуцированного клеточного ответа на повреждение ДНК	18
1.2.1. Внутриклеточные события, индуцированные воздействием ионизирующего излучения	18
1.2.2. Внеклеточный матрикс и радиочувствительность.....	29
1.3. Известные функции гена <i>THBS1</i>	32
1.4. Известные функции гена <i>ADAMTS1</i>	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1 Дизайн исследования	41
2.2 Материалы исследования	42
2.1 Создание модельных систем с нокаутом и сверхэкспрессией генов <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i> на базе опухолевой клеточной линии HeLa	43
2.1.1 Создание клеточных линий HeLa с нокаутом <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i>	43
2.1.2 Создание клеточных линий HeLa со сверхэкспрессией генов <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i>	47
2.2 Воздействие ионизирующим излучением	48
2.3 Анализ клональной выживаемости	49
2.4 Оценка уровня фокусов белков репарации ДНК	50
2.5 Микроядерный тест.....	51
2.6 Анализ экспрессионного профиля генов на фоне нокаута <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i> с помощью микроматричного анализа.....	52
2.6.1 Выделение РНК для микрочипового исследования.....	52
2.6.2 Очистка и анализ качества выделенной РНК	54
2.6.3 Микроматричный анализ экспрессии генов на фоне нокаута <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i>	54
2.7 Анализ экспрессионного профиля генов на фоне дифференциальной экспрессии <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i> с помощью количественной ПЦР в реальном времени	55
2.7.1 Выделение РНК для проведения ПЦР в реальном времени	55
2.7.2 Обратная транскрипция.....	56
2.7.3 Разработка олигонуклеотидных праймеров	56
2.7.4 Проверка эффективности праймеров	57

2.7.5	Проведение ПЦР в реальном времени	58
2.8	Статистический анализ данных	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		61
3.1.	Характеристика клеточных линий с дифференциальной экспрессией генов	61
3.1.1.	Характеристика клеточных линий с нокаутом <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i>	61
3.1.2.	Характеристика плазмидных векторов для обеспечения сверхэкспрессии <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i>	63
3.2.	Радиационно-индуцированные эффекты в клеточной линии HeLa на фоне дифференциальной экспрессии <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i>	64
3.2.1.	Влияние нокаута <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i> на выживаемость клеток.....	64
3.2.2.	Влияние нокаута и сверхэкспрессии <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i> на уровень фокусов белков репарации ДНК	66
3.2.3.	Влияние нокаута и сверхэкспрессии <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i> на частоту радиационно-индуцированных микроядер.....	68
3.3.	Радиационно-индуцированный профиль экспрессии генов на фоне нокаута и сверхэкспрессии <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i>	73
3.4.	Влияние экспрессии <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i> на уровень фокусов белков репарации ДНК и частоту микроядер в лимфоцитах периферической крови	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		91
ВЫВОДЫ		97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ		98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		100
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА		121
ПРИЛОЖЕНИЕ А		124
ПРИЛОЖЕНИЕ Б		131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Поддержание стабильности генома является одним из фундаментальных свойств всех живых организмов, определяющим защиту от мутагенного воздействия внешних и внутренних агрессивных факторов, что сказывается на здоровье и жизнеспособности организма и влияет на здоровье будущих поколений. В частности, одним из таких агрессивных факторов является ионизирующее излучение, способное вызывать повреждения генетического материала, приводящие к индукции мутаций и гибели клеток.

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. Радиочувствительность – это сложный признак, обусловленный как генетическими, так и средовыми факторами. С точки зрения генетической компоненты, феномен индивидуальной радиочувствительности долгое время связывали с вариациями на уровне последовательности ДНК или экспрессией генов репарации ДНК, метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной защиты [1]. Так, например, результаты экспериментов, выполненных с использованием модельных клеточных линий с нокаутом генов, вовлеченных в процессы репарации ДНК, показывают, что такие клеточные линии характеризуются повышенной радиочувствительностью [2]. В то же время очевидно, что выявленные на сегодняшний день полиморфизмы некоторых кандидатных генов позволяют объяснить лишь небольшую часть популяционной вариабельности индивидуальной радиочувствительности, как правило, характерной для определенных видов рака или наследственных синдромов [3–6]. Так, например, показано, что мутации в генах, вовлеченных в процессы репарации ДНК, значительно снижают жизнеспособность организма и приводят к гибели или формированию наследственных синдромов, таких как синдром Ниймеген, пигментная ксеродерма, атаксия-телеангиэктазия и некоторых других [7,8]. Поэтому, вероятно, индивидуальная радиочувствительность здоровых индивидов детерминирована генами с менее выраженным влиянием на жизнеспособность.

Проведенные в последние годы широкогеномные ассоциативные исследования (GWAS) показывают, что радиочувствительность также связана с генами, которые не имеют прямого отношения к процессам репарации ДНК, но выполняют различные сигнальные функции [2,9]. Полученные данные несколько ограничивают возможности кандидатного подхода для поиска генов, вовлеченных в формирование индивидуальной

радиочувствительности, и диктуют необходимость проведения полногеномных исследований. В связи с этим, в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ был проведен полнотранскриптомный анализ профилей экспрессии генов в лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов с различной радиочувствительностью. Такой подход позволил выявить более пятисот дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), большая часть которых не имела прямого отношения к репарации повреждений ДНК. Наиболее значимо между группами индивидов с различным спонтанным уровнем фокусов белков репарации γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер в лимфоцитах периферической крови человека отличалась экспрессия генов *ADAMTS1* и *THBS1*. Дифференциальная экспрессия данных генов была подтверждена с помощью альтернативных методов в двух различных типах клеток – с индуцированной *in vitro* пролиферацией (лимфоцитах периферической крови взрослых индивидов) и спонтанной пролиферацией в культурах (фибробласты экстраэмбриональной мезодермы) [10].

Вышеупомянутые гены кодируют белки внеклеточного матрикса (ВКМ) и участвуют в реализации различных сигнальных путей, таких как TGF β (трансформирующий ростовой фактор β), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), NO-сигнальный путь и некоторых других, а это особенно интересно в свете накопившихся в последнее время данных, свидетельствующих в пользу того, что компоненты матрикса могут влиять на радиочувствительность клеток [11,12]. ВКМ представляет собой сложную трехмерную сеть, состоящую из многодоменных макромолекул, регулирующую различные клеточные процессы, такие как выживание, рост, миграция, дифференцировка, пролиферация, поддержание гомеостаза и морфогенез. В исследованиях *in vitro* было показано, что взаимодействия клеток с компонентами ВКМ могут повышать радиорезистентность некоторых типов опухолей [13–15]. Тем не менее, механизмы влияния компонентов ВКМ на формирование радиочувствительности клеток остаются недостаточно изученными. Исследования, направленные на выявление компонентов ВКМ, влияющих на радиационно-индуцированный клеточный ответ, могут привести к выявлению новых молекулярных мишеней, воздействие на которые позволило бы изменять опухолевую радиочувствительность, повышая эффективность радиотерапии.

Известно, что и *ADAMTS1*, и *THBS1* в норме экспрессируются во всех тканях организма, а также в опухолевых клетках различного происхождения. На связь данных генов с радиочувствительностью указывает лишь несколько исследований. Белок тромбоспондин-1, кодируемый геном *THBS1*, может модулировать радиочувствительность клеток через взаимодействие с рецептором CD47. Так, мыши с нокаутом гена *Thbs1*

демонстрируют повышенную радиорезистентность фибробластов кожи, клеток костного мозга и мышечных клеток по сравнению с контрольной группой животных [16]. Кроме того, показана корреляция уровня экспрессии данного гена с выживаемостью больных, в частности, по данным базы The Human Protein Atlas, сниженная экспрессия *THBS1* в опухолевых тканях коррелирует с высокой выживаемостью больных раком головы и шеи. Наконец, согласно полученным нами ранее результатам, в лимфоцитах здоровых индивидов с низким уровнем микроядер также наблюдалась сниженная экспрессия *THBS1* [10].

ADAMTS1 кодирует белок семейства ADAMTS, содержащий несколько функциональных модулей, включая тромбоспондиновый мотив типа 1. Радиационно-индуцированное возрастание экспрессии *ADAMTS1* показано в трехмерной модели ткани, имитирующей структуру и функции эпидермиса человека [16]. Как и тромбоспондин-1, *ADAMTS1* участвует в процессах ангиогенеза [13]. Тем не менее, в отличие от гена *THBS1*, в предварительном исследовании в группе индивидов с низким уровнем микроядер экспрессия гена *ADAMTS1* была повышена как в необлученных клетках, так и после облучения. Таким образом, несмотря на наличие общих структурных доменов и участие в одних и тех же сигнальных путях, дифференциальная экспрессия генов *ADAMTS1* и *THBS1* обладает противоположным эффектом в реакциях лимфоцитов периферической крови человека на облучение [10].

Роль данных генов в формировании индивидуальной радиочувствительности в настоящее время остается неясной. Так, например, неизвестно связаны ли продукты *ADAMTS1* и *THBS1* с клеточным ответом на повреждение ДНК, и если связаны, то каким образом белки внеклеточного матрикса могут влиять на механизмы реализации такого ответа? Учитывая факт, что дифференциальная экспрессия *ADAMTS1* и *THBS1* была выявлена у индивидов с различной радиочувствительностью, возникает вопрос, возможно ли использовать данные гены в качестве генетических маркеров индивидуальной чувствительности человека к воздействию ионизирующего излучения?

Для ответа на поставленные вопросы возникает необходимость создания модельных систем, позволяющих оценить влияние данных генов на радиобиологические эффекты *in vitro*. Применительно к изучению радиочувствительности в качестве модельной системы можно использовать изогенные опухолевые клеточные линии с нокаутом или временной сверхэкспрессией *ADAMTS1* и *THBS1*. Проведение экспериментов на модельных системах дает возможность выявления причинно-следственных связей между нарушениями экспрессии отдельных генов и изменением

радиочувствительности клеток в целом и эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК в частности.

Степень научной разработанности темы исследования

Генетические аспекты, лежащие в основе формирования феномена индивидуальной радиочувствительности, являются предметом интереса многочисленных исследований отечественных и зарубежных авторов [17-38]. Результаты проведенных исследований показали, что повышенная радиочувствительность связана с нарушением работы систем репарации ДНК, антиоксидантной защиты и метаболизма ксенобиотиков [39–42], 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 [34,36,43–47]. Однако, проведенные в последние годы широкогеномные ассоциативные исследования (GWAS) позволили установить, что радиочувствительность может быть связана и с другими генами, не имеющими прямого отношения к репарации ДНК, но выполняющими различные сигнальные функции [2,48]. К примеру, в последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что на радиочувствительность клеток могут влиять компоненты внеклеточного матрикса [11,13,14,49–52]. Более того, некоторые исследователи считают, что изучение внеклеточного матрикса в контексте персональной чувствительности к воздействию ионизирующего излучения, является перспективным направлением радиобиологии [12]. На важность компонентов матрикса указывают и результаты проведенных нами ранее экспериментов. Полнотранскриптомный анализ профилей экспрессии генов в лимфоцитах периферической крови позволил установить, что индивиды с различной радиочувствительностью различаются экспрессией генов *ADAMTS1* и *THBS1* [10]. Данные гены кодируют белки внеклеточного матрикса, а их известные функции не связаны с репарацией двунитевых разрывов ДНК, антиоксидантной защитой или метаболизмом ксенобиотиков.

Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о значительном 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 генов *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*). Анализ с помощью инструмента STRING позволил установить, 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 .

В настоящей работе гены *ADAMTS1* и *THBS1* впервые изучены с точки зрения возможности использования в качестве экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности. Показано, что экспрессию изучаемых генов в лимфоцитах периферической крови нельзя использовать в качестве самостоятельного маркера радиочувствительности.

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* нельзя использовать в качестве экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности, однако данные гены могут быть интересны с точки зрения разработки таргетных молекулярных ингибиторов для повышения радиочувствительности опухолевых клеток.

Методология и методы научного исследования

Научная гипотеза настоящего исследования заключается в том, что гены *ADAMTS1* и *THBS1*, дифференциальная экспрессия которых ранее была выявлена в лимфоцитах индивидов с различным уровнем эндогенных фокусов белков репарации ДНК и радиационно-индуцированных микроядер, вовлечены в клеточный ответ на воздействие ионизирующего излучения. Проверка данной гипотезы осуществлялась в два этапа – в модельных системах с нокаутом и сверхэкспрессией изучаемых генов, созданных на основании изогенной опухолевой клеточной линии HeLa, и в лимфоцитах в расширенной выборке здоровых индивидов. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ и одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Клеточные линии HeLa с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1* были получены с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 совместно с коллегами из отдела молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН (заведующий – д.б.н, профессор Серов О.Л.). Сверхэкспрессия изучаемых генов в клеточной линии HeLa была обеспечена путем создания генно-инженерных конструкций, несущих кодирующие последовательности генов *ADAMTS1* и *THBS1* с последующим внесением их в опухолевые клетки методом транзientной трансфекции. Для идентификации и описания мутаций, внесенных в гены *ADAMTS1* и *THBS1* системой CRISPR/Cas9, а также для верификации правильной сборки генетических конструкций, созданных для обеспечения сверхэкспрессии изучаемых генов, в работе было использовано секвенирование нового поколения (NGS).

Облучение клеточных линий и культивируемых лимфоцитов здоровых индивидов было проведено на гамма-терапевтической установке “Theratron Equinox 100” совместно с коллегами из Томского областного онкологического диспансера и НИИ онкологии Томского НИМЦ, соответственно. Для оценки радиобиологических эффектов в работе использованы такие методы как анализ клональной выживаемости, анализ 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* был 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 данных, полученных в ходе выполнения настоящей работы, обеспечивается применением современных клеточных технологий, использованием молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов исследования, а также статистической обработкой полученных результатов. Лимфоциты периферической крови для анализа корреляции экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК и частотой микроядер были получены от 58 здоровых индивидов. Эксперименты по анализу уровня фокусов белков репарации ДНК и частоты микроядер в лимфоцитах периферической крови и в модельных системах включали три технических повторности. Фокусы белков репарации ДНК и микроядра оценивались визуально в 150-200 и 1000 клетках на препарате, соответственно. 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.

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 Института 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.

Апробация материалов диссертации

Материалы научно-квалификационной 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 (июнь, 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» (онлайн-конференция, 2022).

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РФФИ № 19-34-90143 и гранта Президента РФ № МК-5944.2018.4.

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 (из них 2 за первым авторством), 1 статья в журнале, индексируемом в базе данных РИНЦ, 12 публикаций – статьи в сборниках и тезисы конференций.

Объем и структура 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Феномен индивидуальной радиочувствительности

Термин «радиочувствительность» является ключевым понятием в радиобиологии. Согласно определению, предложенному С. П. Ярмоненко и А. А. Вайсоном, радиочувствительность – это мера восприимчивости клеток, тканей, органов или организмов к воздействию ионизирующего излучения [53]. Количественной оценкой радиочувствительности выступает доза облучения, при которой наблюдается регистрируемый эффект. Многочисленные исследования, направленные на изучение степени выраженности радиационно-индуцированного ответа биологических объектов, позволяют прийти к заключению, что радиочувствительность различных клеток, тканей и органов неодинакова. Известно, что наибольшая радиочувствительность характерна для клеток, находящихся в конце G0 и G1 фаз клеточного цикла, а также на протяжении всей стадии митотического деления. Кроме того, считается, что наиболее радиочувствительными являются недифференцированные клетки, которые активно пролиферируют, например, половые клетки, клетки костного мозга, эпителиальные клетки слизистой кишечника и др. Исключение составляют лимфоциты, являющиеся дифференцированными клетками, обладающими высокой радиочувствительностью. Таким образом, репродуктивная, кроветворная и иммунная системы являются наиболее чувствительными к воздействию ионизирующего излучения (ИИ), в то время как нервная, мышечная и костная системы являются относительно радиорезистентными [22]. Как правило, к радиочувствительным относят и опухолевые клетки из-за свойственных им генетической нестабильности и различных нарушений процессов репарации ДНК, контроля клеточного цикла и метаболизма. Однако, в реальных условиях, радиочувствительность опухолевых клеток модулируется рядом дополнительных факторов, таких как степень гипоксии и скорость пролиферации. Так, например, при гипоксии опухолевые клетки становятся менее радиочувствительными, поскольку в данных условиях значительно снижается повреждающее действие ИИ, опосредованное активными формами кислорода [54].

Степень радиочувствительности также варьирует между особями одного вида, формируя феномен индивидуальной радиочувствительности. Первое сообщение о человеке с экстремальной чувствительностью к ИИ было опубликовано в 1975 году и описывало пациента с синдромом атаксии-телеангиоэктазии, у которого развились тяжелые побочные реакции в ходе лучевой терапии. В экспериментах *in vitro* было показано, что фибробласты, полученные от этого пациента характеризовались

трехкратным возрастанием радиочувствительности (по показателям клональной выживаемости) по сравнению с фибробластами, полученными от здоровых индивидов [39]. Начиная с 1980-х годов стали накапливаться экспериментальные данные о существовании групп населения, различающихся по радиочувствительности, причем различия не были обусловлены генетическими синдромами [40,55–57]. Дополнительным доказательством послужили данные многолетнего опыта лучевой терапии, демонстрирующие, что среди группы онкологических пациентов, прошедших одинаковый курс лечения, для некоторых из них характерно развитие более тяжелых побочных реакций со стороны здоровых тканей [25].

В настоящее время существование феномена индивидуальной радиочувствительности у человека уже не вызывает сомнений. Это утверждение справедливо для детерминированных эффектов, возникающих после облучения в высоких дозах, стохастических эффектов после умеренных и, возможно, низких доз, и, вероятно, также для неопухолевых эффектов ИИ, таких как развитие сердечно-сосудистых заболеваний и катаракты. При этом, чувствительность по детерминированным эффектам не обязательно коррелирует с чувствительностью по стохастическим эффектам, поскольку в их основе лежат различные механизмы [58]. Согласно данным литературы, распределение особей по радиочувствительности в популяции человека соответствует нормальному закону. Так большая часть индивидов характеризуется средней чувствительностью к воздействию ИИ, 5-20 % являются наиболее чувствительными, и 15-20 % являются наиболее резистентными [21,59]. На сегодняшний день существует несколько подходов для оценки радиочувствительности. Классические методы оценки предполагают анализ клоногенной способности нормальных и опухолевых клеток, анализ частоты радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций, анеуплоидий, сестринских хроматидных обменов и микроядер в соматических клетках человека [38,44,60]. Так, например, одним из объективных, относительно простых и широко применяемых методов является цитогенетический анализ, проведенный на лимфоцитах периферической крови [20,22,60–62]. Другими чувствительными методиками являются иммунофлуоресцентный анализ белков репарации двунитевых разрывов ДНК [28] и молекулярно-генетический анализ, открывающий возможности для изучения генных мутаций в клетках человека. Кроме того, радиочувствительность оценивают по степени выраженности побочных реакций, развивающихся в здоровых тканях организма в ходе лучевой терапии [63], а также, в случае долгосрочных последствий облучения, по частоте наследственных заболеваний, врожденных пороков развития, и нарушений репродуктивной функции [22].

Формирование радиочувствительности связывают как с генетическими, так и со средовыми факторами. Так, например, в отчете консультативной группы по ионизирующему излучению (Advisory Group on Ionising Radiation, 2013) было отмечено, что помимо дозы облучения и генетической конституции, на радиочувствительность влияют пол, возраст, вес, курение и употребление алкоголя, а также наличие сопутствующих заболеваний, таких как сахарный диабет или коллагеновые болезни сосудов [25]. При этом, считается, что вклад генетической составляющей довольно велик и достигает по разным оценкам 60-80 % [27,59,64,65].

С одной стороны известно, что высокая радиочувствительность может быть обусловлена мутациями генов, вовлеченных в репарацию ДНК. В многочисленных исследованиях показано, что пациенты с синдромом атаксии-телеангиэктазии (гомозиготная мутация в гене *ATM*), синдромом Ниймеген (гомозиготная мутация в гене *NBS1*), синдромом, обусловленным гомозиготной мутацией в гене *LIG4*, пациенты с пигментной ксеродермой (гомозиготная мутация в гене *XPC*) и др. характеризуются повышенной радиочувствительностью по критерию развития побочных тканевых реакций после курса лучевой терапии [8,39,41,42]. С другой стороны, данные наследственные синдромы затрагивают небольшую часть населения (менее 1 на 10 000), поэтому, вероятно, большая часть генетического вклада в формирование популяционной радиочувствительности объясняется полигенной моделью, при которой наследование нескольких аллелей риска с низкой пенетрантностью может привести к возрастанию риска развития побочных радиационно-индуцированных эффектов [26,63]. Дальнейшие исследования радиочувствительности, связанные с анализом клональной выживаемости и частоты хромосомных aberrаций после облучения, позволили установить, что некоторые генетические синдромы, такие как синдромы Вернера, Коккейна, Ашера, Брутона, Хантингтона и др. ассоциированы с высокой клеточной радиочувствительностью *in vitro*. При этом, важно отметить, что некоторые из этих синдромов детерминированы мутациями в генах, кодирующих цитоплазматические или мембранные белки, что позволяет предположить, что радиочувствительность может быть связана не только с событиями, разворачивающимися в клеточном ядре [26]. Более того, проведенные в последние годы широкогеномные ассоциативные исследования (genome-wide association studies, GWAS), направленные на выявление полиморфных однонуклеотидных вариантов (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), ассоциированных с развитием побочных эффектов в ходе лучевой терапии, позволили выявить значимые ассоциации с SNPs в генах, продукты которых участвуют не только в репарации ДНК, но и в реализации различных сигнальных путей [9,66].

Понимание механизмов радиационно-индуцированного ответа нормальных и опухолевых клеток необходимо для поиска надежных прогностических биомаркеров индивидуальной радиочувствительности в части определения опухолевой радиорезистентности, потенциального риска развития побочных реакций со стороны здоровых тканей, а также разработки новых терапевтических подходов для радиосенсибилизации опухолей. До 2013 года большинство исследований, направленных на поиск корреляции клеточной радиочувствительности *in vitro* и реакцией здоровых тканей на радиотерапию, были сосредоточены на функциональных анализах, таких как анализ частоты радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций и анализ способности клеток к формированию колоний [25]. Позже фокус внимания исследователей сместился на молекулярные анализы, такие как оценка уровня фокусов белков репарации ДНК γ H2AX, позволяющих оценить динамику образования и восстановления двунитевых разрывов молекулы ДНК [67]. Однако, результаты как цитогенетических исследований, так и молекулярного анализа уровня фокусов были противоречивы, а в некоторых исследованиях корреляции отсутствовали [45,46,68,69]. Примерно с 2010 года начался период широкогеномных ассоциативных исследований, направленных на поиск SNPs, ассоциированных с риском развития побочных реакций лучевой терапии. Проведенные работы хоть и позволили выявить ряд полиморфных вариантов, ассоциированных с радиочувствительностью, полученные результаты не всегда удавалось подтвердить в независимых исследованиях. Таким образом, на сегодняшний день нет надежных и последовательно подтвержденных в независимых исследованиях биомаркеров индивидуальной радиочувствительности ни в области детерминированных, ни стохастических эффектов, а исследования функциональных анализов и кандидатных полиморфных вариантов оказались недостаточно информативными [58].

Еще одно направление поиска маркеров индивидуальной радиочувствительности может быть связано с анализом полнотранскриптомного профиля экспрессии генов у индивидов с различной радиочувствительностью. Развитие технологии полнотранскриптомного анализа с помощью микрочипов позволило проводить исследования радиационно-индуцированного транскрипционного профиля в нормальных и опухолевых клетках. Однако, несмотря на большое количество работ, направленных на изучение радиационно-индуцированного профиля экспрессии генов, мало исследований направлено на выявление генов, дифференциальная активность которых может обуславливать индивидуальные различия в чувствительности к воздействию ИИ. Такие исследования, как правило, проведены с использованием опухолевых клеточных линий, в

то время как радиационно-индуцированные профили экспрессии нормальных клеток организма остаются практически не изученными [28].

Таким образом, несмотря на накопленные данные, позволяющие объяснить природу повышенной радиочувствительности при ряде наследственных синдромов, механизмы, лежащие в основе формирования популяционной вариабельности индивидуальной чувствительности к воздействию ИИ остаются недостаточно изученными. Понимание данных механизмов, необходимо не только с теоретической точки зрения, но и имеет большое значение, главным образом, для клинической практики терапии онкологических заболеваний. В настоящее время, в ходе лечения многих типов опухолей используется стандартная схема радиотерапии с ежедневной дозой облучения около 2 Гр на протяжении 5-7 недель [70]. При этом, у 5 – 10% пациентов без каких-либо сопутствующих заболеваний или воздействия экзогенных факторов (например, хроническое облучение малыми дозами), развиваются ранние и/или тяжелые побочные реакции со стороны здоровых тканей, причины которых остаются неясными и не могут быть предсказанными из-за отсутствия надежных биомаркеров индивидуальной радиочувствительности [23]. Таким образом, побочные реакции, наблюдающиеся у меньшей части онкологических пациентов, ограничивают дозу, которую можно безопасно назначить большинству пациентов, что делает актуальным разработку методов тестирования, позволяющих выявлять радиочувствительных индивидов до начала лечения. Такой подход позволил бы смягчить радиационно-индуцированные повреждения здоровых тканей у чувствительных больных, например, снизив дозу облучения, и повысить эффективность радиотерапии для остальных пациентов, за счет увеличения дозы. Кроме того, известно, что разные опухоли в пределах одной и той же патологии характеризуются различной радиочувствительностью, которая может быть обусловлена локализацией, стадией развития, гистологическим типом, гипоксией, скоростью пролиферации и др. Если отобрать такие опухоли до начала лечения, можно повысить эффективность терапии, например, назначив альтернативный метод лечения [54].

1.2. Механизмы формирования радиационно-индуцированного клеточного ответа на повреждение ДНК

1.2.1. Внутриклеточные события, индуцированные воздействием ионизирующего излучения

Ионизирующее излучение (ИИ) представляет собой потоки фотонов, элементарных частиц или атомных ядер, способные ионизировать вещество. Воздействие ионизирующего излучения на любой биологический объект индуцирует ряд процессов, которые условно можно разделить на три фазы: физических, химических и биологических изменений [71].

Во время фазы физических изменений заряженные частицы взаимодействуют с атомами, входящими в состав тканей. Проходя через внутриклеточные молекулы, заряженные частицы сталкиваются с орбитальными электронами атомов, провоцируя их переход на более высокий энергетический уровень (процесс возбуждения) или «выбивая» их из атомной орбитали (процесс ионизации). При этом, электроны, обладающие достаточной энергией, продолжают движение и возбуждают или ионизируют соседние атомы, что приводит к возникновению каскада ионизации. Постепенно электроны замедляют скорость, и столкновения с другими клеточными молекулами становятся наиболее частыми, в результате чего образуются кластеры ионизации, являющиеся характерной особенностью ионизирующего излучения [72]. Процент повреждений, индуцируемых кластерами ионизации, невелик, однако, если они образуются в молекуле ДНК, репарация таких повреждений представляется особенно сложной.

Во время фазы химических изменений свободные радикалы, образовавшиеся на предыдущем этапе и обладающие высокой реакционной способностью, быстро взаимодействуют с другими компонентами клетки. Цепь свободнорадикальных реакций продолжается до тех пор, пока не восстановится равновесие зарядов и завершается примерно через 1 миллисекунду после прекращения воздействия ИИ [71].

Все процессы, происходящие в дальнейшем, относятся к фазе биологических изменений. Химически измененные молекулы, например поврежденные молекулы ДНК, становятся субстратом для ферментативных реакций. Большая часть повреждений ДНК успешно репарируется клеточными системами, однако, некоторые повреждения не восстанавливаются, что в конечном итоге может приводить клетку к гибели.

Продолжительность фаз физических, химических и биологических изменений сильно отличается. Так, физические и химические изменения занимают доли секунды, в то время как биологические могут занимать часы, дни и даже годы [73].

Ионизирующее излучение повреждает все внутриклеточные молекулы, однако многие из них, такие как мРНК или белки, представлены многочисленными копиями. Эти повреждения представляются наименее критичными, поскольку ограничиваются изменениями лишь нескольких одинаковых молекул. В то же время, молекулы ДНК представляют собой большую мишень, выполняющую ключевые функции и представленную в клетке только в двух копиях. Поэтому, повреждения ДНК являются критичными и, как правило, именно они служат причиной радиационно-индуцированной клеточной гибели [74].

Трек заряженной частицы может либо проходить сквозь молекулу ДНК и ионизировать ее напрямую (прямое действие ИИ), либо ионизировать воду или молекулы, находящиеся в непосредственной близости, что приводит к образованию высокореактивных радикалов $\text{OH}\cdot$, которые могут диффундировать к ДНК и реагировать с молекулой (непрямое действие ИИ) [75]. Прямое действие характерно для ИИ с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ). ЛПЭ отражает количество энергии, которое ионизирующая частица передает среде на единицу длины пробега при единице плотности вещества [76]. Для ИИ с низкой ЛПЭ характерно соотношение 3:1 (непрямое действие: прямое действие). При воздействии рентгеновским излучением в дозе 1 Гр в клетке образуется примерно 3000 поврежденных оснований, 1000 одностранных (ОР) и 40 двустранных разрывов (ДР) ДНК [77]. Повреждения оснований и ОР не имеют большого значения для выживаемости клетки, так как подавляющее большинство этих повреждений восстанавливается с помощью эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) и репарации ОР (Single-Strand Break Repair, SSBR) [78]. Большая часть ДР ДНК, индуцированных излучением с низкой ЛПЭ, тоже подлежит репарации, однако небольшая часть данных повреждений (менее 5%), не может быть восстановлена и приводит к мутациям или геномной нестабильности, гибели клеток или старению. Двустранные разрывы, индуцированные ИИ с высокой ЛПЭ, восстанавливаются не полностью [75].

Поскольку ДНК играет основополагающую роль в жизнедеятельности, клетки развили сложную систему, обеспечивающую поддержание правильной структуры и целостности молекулы ДНК в условиях постоянной атаки внутриклеточных и внеклеточных факторов, таких как метаболические окислители, алкилирующие агенты, химические агенты, ультрафиолет или ИИ. Эта система состоит из двух наборов компонентов: сенсоров, ответственных за распознавание повреждений ДНК, и эффекторов, определяющих дальнейшую судьбу клеток. Эффекторы представляют собой три основных группы: процессы программируемой клеточной гибели, процессы

репарации ДНК и процессы, вызывающие временный или постоянный блок клеточного цикла (контрольные точки клеточного цикла) [79].

Одним из наиболее ранних событий репарации ДНК является фосфорилирование гистона H2AX, расположенного в местах ДР и рядом с ними. Фосфорилирование гистона H2AX может осуществляться тремя близкими по свойствам киназами: ATM, каталитической субъединицей ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПКкс) и ATR. Фосфорилированный белок, обозначаемый γ H2AX, необходим для привлечения многих других белков с последующим образованием радиационно-индуцированных фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК. ATM и ДНК-ПКкс реагируют в основном на ДР ДНК, в то время как ATR реагирует на ОР ДНК и нарушения функционирования репликативной вилки [80,81].

Белок ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) является протеинкиназой, регулирующей активность широкого спектра белков, включая белки-супрессоры опухолей p53 и BRCA1, киназу контрольной точки клеточного цикла CHK2 и белки RAD17 и RAD9, белок репарации ДНК NBS1. Мутации в гене, кодирующем данный белок, приводят к развитию наследственного синдрома, проявляющегося в прогрессирующей мозжечковой атаксии и телеангиоэктазии кожи в периорбитальных областях [82]. Часто пациенты с данным синдромом характеризуются повышенной радиочувствительностью и склонны к развитию злокачественных опухолей [83]. Для распознавания ДР и активации ATM необходим белковый комплекс MRN, состоящий из трех белков: MRE11, RAD50 и NBS1 [84]. Мутации в гене *NBS1* приводят к развитию синдрома Ниймеген. Проявления данного синдрома схожи с таковыми при атаксии телеангиоэктазии, и больные также отличаются повышенной радиочувствительностью [85]. MRN – многофункциональный комплекс, который обнаруживает ДР, связывается с ДНК с помощью RAD50 и транспортирует к нему ATM (NBS1 напрямую связывается с ATM). Обычно ATM представлен в клетке в неактивной форме. После связывания с ДР белок активируется и фосфорилирует гистон H2AX. Далее, с ATM и γ H2AX связывается белок MDC1, что приводит к протяженному (порядка нескольких мегабаз) фосфорилированию гистонов H2AX в обоих направлениях от ДР. Распространение сигнала изменяет структуру хроматина, что в свою очередь облегчает доступ других белков репарации ДНК к месту разрыва. Протяженные области, содержащие γ H2AX и большое количество белков репарации ДНК, образуют так называемые радиационно-индуцированные фокусы репарации двунитевых разрывов ДНК, которые могут быть визуализированы с помощью иммуноокрашивания [86].

При отсутствии в клетках белка ATM фосфорилирование H2AX осуществляется с помощью ДНК-ПКкс. Данная киназа имеет схожую с ATM структуру и играет важную

роль в репарации двунитевых разрывов ДНК методом нехомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ). Механизм фосфорилирования H2AX с помощью ДНК-ПКкс аналогичен таковому для ATM. В данном случае, функцию распознавания ДР выполняет белковый комплекс Ku70-Ku80, который связывается с ДНК в месте разрыва и привлекает к нему ДНК-ПКкс [87].

Белок ATR является третьей киназой, которая может фосфорилировать H2AX. Так же, как и в случаях с ATM и ДНК-ПКкс, для привлечения ATR к месту повреждения необходим дополнительный белок, выполняющий функцию распознавания повреждений. Данный белок называется ATRIP (ATR interacting protein). В отличие от ATM и ДНК-ПКкс, ATR фосфорилирует H2AX в ответ на другие типы повреждений, такие как одностранные участки или нарушения функционирования вилки репликации [87]. Несмотря на это, ATR участвует в репарации ДР, так как она активируется участками одноцепочечной ДНК, в результате модификации молекулы комплексом ATM-MRN. Кроме того, от активации ATR зависят компоненты эффекторного пути репарации [87].

Активация ATM, ДНК-ПКкс и ATR приводит к фосфорилированию большого количества других белков [88], что в свою очередь служит сигналом к активации эффекторных процессов репарации. Так, активация ATM влечет за собой фосфорилирование белков p53 и MDM2. Белок p53 является супрессором опухолевого роста. У человека ген, кодирующий p53, мутирует примерно в 50% случаев онкологических заболеваний [89]. p53 – это транскрипционный фактор, наиболее важные функции которого заключаются в регуляции экспрессии генов, контролируемых контрольными точками клеточного цикла и апоптоз. Поэтому активация p53 после воздействия ИИ может приводить либо к блоку продвижения клетки по циклу и остановке пролиферации, либо к программируемой клеточной гибели [90]. В интактных клетках p53 образуется постоянно, но в отсутствии активирующего фосфорилирования киназой ATM, он связывается с белком MDM2, который приводит к убиквитинилированию и последующей деградации p53 [90]. Если в клетке присутствуют повреждения ДНК, киназа ATM фосфорилирует p53 и MDM2, в результате чего связь между данными белками разрушается и активный p53 не подвергается деградации. p53 активирует множество генов, вовлеченных в различные этапы сигнального пути апоптоза и его реализацию. К ним относятся проапоптотические белки, содержащие домен BH3 (PUMA, BAX, NOXA, BAD, BAK, p53AIP1), рецепторы смерти (Fas, Dr4, Killer/Dr5) и факторы, инициирующие апоптоз (Araf1, каспаза 6, Bnip3L) [90]. Таким образом, активация репарации ДНК может приводить к гибели клеток по механизму апоптоза.

Активация контрольных точек клеточного цикла является вторым эффекторным путем репарации повреждений ДНК и приводит к задержке прохождения через G_1 -, S- и G_2 -фазы клеточного цикла. Переход G_1 /S контролируется фактором транскрипции E2F. E2F регулирует экспрессию многих генов, ответственных за репликацию ДНК в S-фазе. В G_1 -фазе E2F связан с белком ретинобластомы (Rb) за счет чего поддерживается в неактивном состоянии. Фосфорилирование Rb комплексом G_1 -циклин – циклин-зависимые киназы приводит к его отщеплению и активации E2F, который, в свою очередь, инициирует переход в S-фазу клеточного цикла. Комплекс G_1 -циклин – циклин-зависимые киназы ингибируется белком p21, который, в свою очередь, активируется фактором транскрипции p53 [90]. Таким образом, задержка облученных клеток в G_1 -фазе индуцируется белками p53 и p21.

Остальные контрольные точки клеточного цикла (в S-фазе, ранней и поздней G_2 -фазах) контролируются киназами Chk1 и Chk2, которые, в свою очередь, активируются киназами ATR и ATM. Если во время облучения клетки находятся в S-фазе, то наблюдается дозозависимое снижение скорости синтеза ДНК, существенно увеличивающее продолжительность периода репликации. В G_2 -фазе существует две контрольных точки, одна из которых активируется при воздействии небольших доз излучения и останавливает продвижение клеток по циклу в конце фазы G_2 , в результате чего наблюдается кратковременное снижение количества митотических клеток. Активация контрольной точки поздней G_2 -фазы обеспечивает длительный блок в фазе G_2 . Данная клеточная точка активируется киназой ATR в случае предварительного облучения клеток в G_1 - или S-фазе, реагируя на повреждения, не восстановленные после репарации ДНК [91,92].

К третьей группе эффекторов относятся процессы репарации ДНК. Как было отмечено ранее, одонитевые разрывы и повреждения оснований являются самыми распространенными радиационно-индуцированными повреждениями ДНК, подлежащими успешной репарации с помощью механизмов BER и SSBR. Двунитевые разрывы возникают гораздо реже, но при этом они являются наиболее критичными для нормального функционирования клетки, поэтому, будут рассмотрены более детально. В литературе также описаны механизм репарации неправильно спаренных нуклеотидов (от англ. Mismatch Repair, MMR) и эксцизионной репарации нуклеотидов (от англ. Nucleotide Excision Repair, NER). Считается, что нарушения этих механизмов не влияют на радиочувствительность клеток, поэтому они не будут рассмотрены в данной главе.

Существует два основных пути репарация ДР ДНК: гомологичная рекомбинация (Homologous Recombination, HR) и негомологичное соединение концов (NonHomologous

End Joining, NHEJ). Механизм HR является более точным, поскольку использует в качестве матрицы для восстановления ДР неповрежденную гомологичную ДНК. После распознавания ДР системой ATM-MRN, с каждой стороны от ДР с помощью экзонуклеаз происходит удаление фрагмента одной цепи ДНК (размером 20 нуклеотидов и более), в результате чего образуются выступающие одонитевые 3'-концы, с которыми связывается белок RPA. Далее, белок RPA заменяется на RAD51 и образовавшийся нуклеопротеиновый комплекс узнает интактный двунитевой гомологичный участок ДНК и входит в него с образованием крестообразных структур. В данном процессе участвует ряд белков, среди которых RAD51B, -C, -D, а также XRCC2 и -3, а связывание RAD51 с одонитевыми участками ДНК, покрытыми RPA, регулируется белком BRCA1. Далее образовавшиеся крестообразные структуры расширяются (в данном процессе участвуют хеликазы и др. семейства белков) и ДНК-полимераза синтезирует утраченный фрагмент на базе неповрежденной матрицы ДНК. Специальные нуклеазы разрезают цепи ДНК и хроматин приобретает исходную организацию. Воссоединение смежных концов происходит с помощью лигазы [93]. Репарация ДНК по механизму HR происходит преимущественно в S- и G₂-фазах клеточного цикла, когда сестринские хроматиды доступны в качестве матрицы.

Основным механизмом репарации ДР ДНК на протяжении всего клеточного цикла, включая S- и G₂-фазы, является NHEJ. Процесс NHEJ занимает меньше времени, чем HR, однако является менее точным и нередко приводит к образованию небольших делеций или инсерций оснований в восстановленных сайтах ДНК [94]. ДР распознаются гетеродимером Ku70-Ku80, который предохраняет концы ДНК от экзонуклеазной активности и привлекает ДНК-ПКкс, осуществляющую фосфорилирование многих белков, участвующих в активации контрольных точек и репарации. Помимо активации других белков репарации, ДНК-ПКкс также выполняет функцию связующего звена, удерживающего вместе концы разрыва.

В зависимости от конфигурации концов ДР репарация по механизму NHEJ может проходить по разным сценариям. Как правило, большинство ДР имеют несовместимые концы, которые исключают прямое лигирование. Один из методов обеспечения совместимости концов — это резекция выступающих участков (обычно не более 4-х нуклеотидов) с помощью экзо- или эндонуклеаз. Так, ДНК-ПКкс может фосфорилировать белок Artemis или полинуклеотидкиназу (PNK), которые обладают нуклеазной активностью и подготавливают концы к лигированию. При образовании в местах разрыва липких концов, репарация осуществляется с участием полимераз, достраивающих тупые концы, которые впоследствии могут быть лигированы [94].

Поскольку репарация ДНК по механизму HR реализуется в S- и G₂-фазах клеточного цикла, она является специфичной для делящихся клеток. Репарация ДНК по механизму NHEJ, напротив, может протекать на любой стадии клеточного цикла и является универсальной для любого типа клеток. Поэтому нарушения в процессе NHEJ являются наиболее критичными для облученных клеток.

Радиационно-индуцированный клеточный ответ не ограничивается событиями, вызванными повреждениями в молекуле ДНК. Ионизирующее излучение, как и множество других стрессовых факторов, может активировать или ингибировать различные клеточные сигнальные пути, что может приводить к аресту клеточного цикла, репарации ДНК, усилению пролиферации, клеточному старению или гибели.

Так, повреждение ДНК и генерация активных форм кислорода (АФК), индуцированные ИИ, приводят к активации мембранных рецепторов, таких как рецепторы смерти или семейство рецепторов факторов роста ERBB [95]. Активация рецепторов происходит в течение нескольких минут после облучения и приводит в действие трансдукторные молекулы, которые, в свою очередь, активируют множественные внутриклеточные митоген-активируемые протеинкиназные (МАРК) сигнальные каскады, а также зависимые от фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) сигнальные пути, которые определяют дальнейшую судьбу клетки (Рисунок 1.1) [96].

Сигнальные пути МАРК – это группа мультифункциональных внутриклеточных путей, активируемых различными внеклеточными сигналами, такими как факторы роста, гормоны или стресс и передающими сигналы от поверхности клеток к ядру. Данные сигнальные пути вовлечены в фундаментальные клеточные процессы, такие как рост, пролиферация, дифференцировка, миграция и апоптоз. Акроним МАРК (mitogen activated protein kinase) объединяет множество различных белков, являющихся протеинкиназами, активируемыми митогенами. Все сигнальные пути МАРК консервативны и имеют в своей основе трехкомпонентный протеинкиназный каскад, состоящий из белков МАРК, МАРК kinase (МАРКК, MAP2K или MEK) и МАРК kinase kinase (МАРККК, MAP3K или MEKK) [96]. Ближайшие к источнику сигнала киназы – MAP3K активируются вышестоящими трансдукторными молекулами (например, малыми ГТФазами, к которым относится семейство белков RAS) и фосфорилируют MAP2K (MEK), а те, в свою очередь активируют МАРК. Затем МАРК фосфорилируют и активируют транскрипционные факторы, присутствующие в цитоплазме или ядре, что в свою очередь приводит к экспрессии соответствующих генов-мишеней и вызывает биологический ответ (Рисунок 1.1). МАРК могут регулировать нижестоящие протеинкиназы, а также, обладают

перекрывающейся субстратной специфичностью, что делает MAPK-опосредованную регуляцию транскрипции чрезвычайно сложной [97].

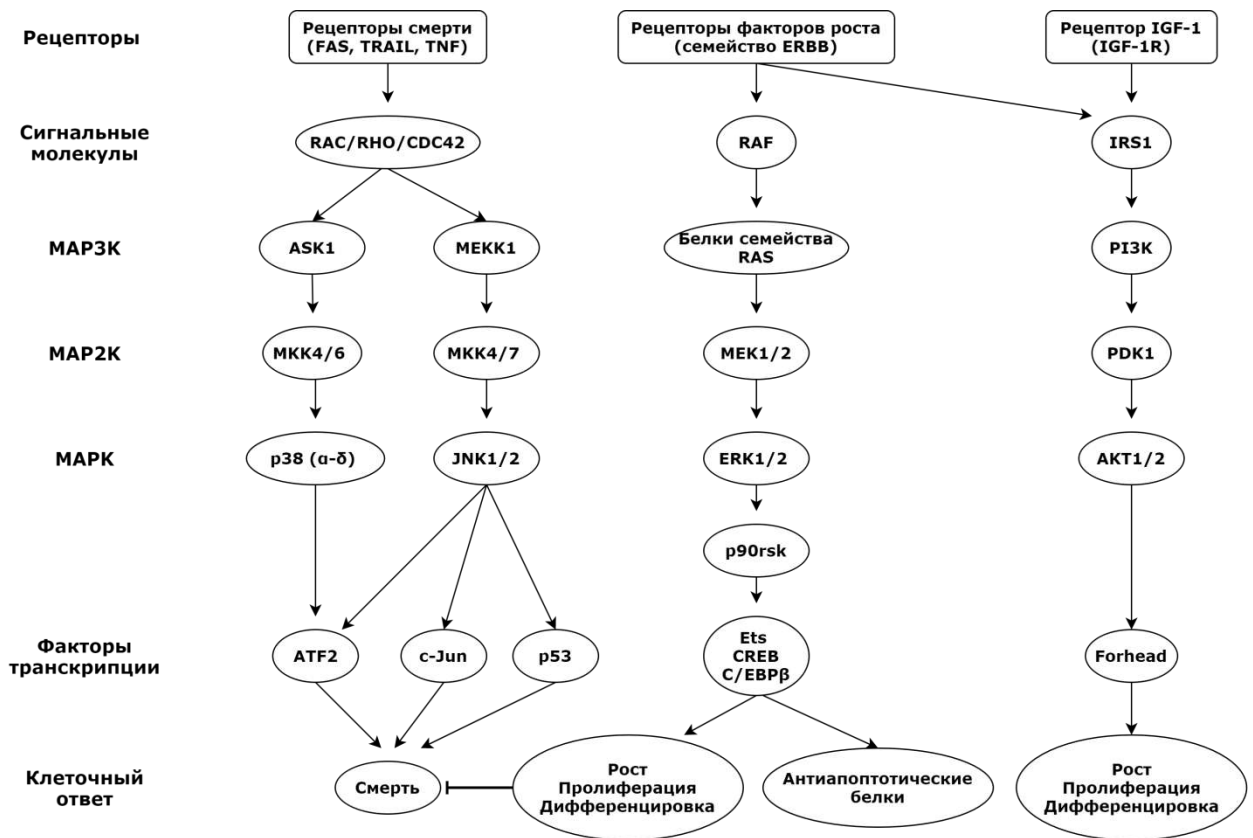


Рисунок 1.1 – Сигнальные пути MAPK и PI3K

У человека известно три основных сигнальных пути MAPK, лежащих в основе радиационно-индуцированного клеточного ответа. К ним относятся сигнальные пути киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2), N-терминальной киназы c-Jun (c-Jun N-terminal kinase, JNK) и p38 MAPK [97]. Данные сигнальные пути активируются после воздействия ИИ в широком диапазоне доз и инактивируются только при воздействии очень высокими дозами [98].

Сигнальный путь ERK1/2 очень быстро активируется в ответ на ИИ, гипоксию и химические сигналы, играя важную роль в пролиферации клеток, передаче молекулярных сигналов, способствующих росту и дифференцировке. Так, радиационно-индуцированная активация мембранных рецепторов ERBB приводит к фосфорилированию малых ГТФаз семейства RAS и как следствие, к активации протеинкиназ ERK1/2. Последние, в свою очередь, фосфорилируют протеинкиназу p90rsk, активирующую такие транскрипционные факторы как Ets (регулируют пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, ангиогенез

и др.), CREB (регулируют пролиферацию, выживание и дифференцировку) и C/EBP β (регулируют пролиферацию и дифференцировку) [96].

Сигнальный путь JNK индуцируется стрессовыми факторами, такими как ультрафиолетовое и γ -излучение, АФК, цитокины, церамид, фактор некроза опухоли TNF и цитотоксические препараты. Протеинкиназы JNK1 и JNK2 фосфорилируют транскрипционный фактор c-Jun и могут влиять на экспрессию генов, клеточную пролиферацию и гибель. Механизмы активации пути JNK ионизирующим излучением довольно разнообразны и в конечном итоге приводят к запуску апоптотической программы [97,99].

Индукция сигнального пути p38 MAPK осуществляется различными стрессовыми факторами, при этом, активация данного сигнального пути напоминает таковую для протеинкиназ JNK1/2. Существует по меньшей мере четыре изоформы p38 (p38 α , p38 β , p38 γ и p38 δ), которые активируются белками семейства Rho и Rac. Активация сигнального пути p38 MAPK может приводить как к стимуляции клеточного роста и выживания, так и к гибели клеток, в зависимости от типа клеток и природы стимула. Радиационно-индуцированная активация данного сигнального пути ассоциирована с апоптотической клеточной гибелью, опосредованной активацией фактора транскрипции ATF2 [97].

Таким образом, сигнальный путь ERK, активируемый митогенными стимулами и ИИ, играет важную роль в регуляции клеточного роста, выживания и дифференцировки. В то время как сигнальные пути JNK и p38 MAPK, напротив, реагируют, главным образом на стрессовые стимулы, включая ИИ, фактор некроза опухоли (TNF), интерлейкин-1 и др., и связаны с апоптотической гибелью клеток.

Одним из радиационно-индуцированных сигнальных каскадов, по структуре напоминающий MAPK, является сигнальный путь PI3K. Во многих типах клеток активация PI3K в ответ на воздействие ИИ, вносит основной вклад в выживание, пролиферацию, клеточный рост и формирование радиорезистентности. [100]. PI3K – это цитозольный белковый комплекс, состоящий из двух субъединиц: регуляторной p85 и каталитической p110. Комплекс p85- p110 является одной из основных нижестоящих мишеней семейства тирозинкиназных рецепторов ERBB и после активации индуцирует фосфорилирование субстратов белка АКТ в цитоплазме и ядре. Механизмы реализации радиационно-индуцированного клеточного ответа, опосредованного PI3K/АКТ могут включать регуляцию митохондриальных белков, транскрипционных факторов, а также регуляцию трансляции и клеточного цикла. Кроме того, важную роль может играть перекрестное взаимодействие между PI3K/АКТ-путем и митоген-активированными

протеинкиназами MAPK, протеинкиназой A и сигнальным путем протеинкиназы C [99–101]. В дополнение, показано, что сигнальный путь EGFR/PI3K/AKT может приводить к активации каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs), участвующей в репарации двунитевых разрывов ДНК по механизму негомولوجичного соединения концов в клетках с мутацией *KRAS* [102].

Помимо сигнальных путей MAPK и PI3K с радиационно-индуцированным клеточным ответом связывают и другие сигнальные пути, такие как Wnt/ β -катенин и сигнальный путь TGF β .

Сигнальный путь Wnt играет важную роль в развитии плода и формировании центральной нервной системы, а также росте, миграции и дифференцировке клеток. В то же время показано, что нарушения данного сигнального пути связаны с широким спектром патологических процессов, включая онкогенез [103–105]. Некоторые исследования продемонстрировали роль данного пути в восстановлении тканей после облучения [106–108]. Белки семейства Wnt являются секретируемыми гликопротеинами, участвующими в процессах межклеточной коммуникации. Они могут активировать два основных внутриклеточных пути: канонический (зависимый от β -катенина) и неканонический (независимый от β -катенина). С радиационно-индуцированным клеточным ответом связывают именно канонический сигнальный путь. В отсутствие Wnt β -катенин постоянно разрушается специализированным белковым комплексом по механизму убиквитин-протеасомной деградации белка. Активация Wnt после облучения приводит к диссоциации протеасомного комплекса, что влечет за собой накопление β -катенина в цитоплазме с последующим транспортом в ядро, активацией T-клеточного (Tcf) и лимфоидного энхансер-связывающего (Lef) транскрипционных факторов и ингибированию апоптоза [109].

Сигнальный путь TGF β регулирует несколько различных биологических процессов, включая рост клеток, дифференцировку, апоптоз, подвижность, ангиогенез, синтез компонентов внеклеточного матрикса, что в свою очередь может влиять на эмбриональное развитие и патогенез различных заболеваний, включая онкологические заболевания. Существует три изоформы TGF β (TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3), обладающих специфической и перекрывающейся активностью. При этом, наиболее распространенной изоформой является TGF β 1. Показано, что воздействие ИИ может приводить к возрастанию синтеза TGF β 1, что приводит к активации транскрипционных факторов Smad, аресту клеточного цикла на стадии G₁ и ингибированию пролиферации [110]. Кроме того, показано, что TGF β может играть важную роль в репарации двунитевых разрывов ДНК [111]. В ряде исследований установлено, что ингибирование сигнального

пути TGF β может приводить к нарушению фосфорилирования белка ATM, и как следствие, к снижению фосфорилирования его ключевых мишеней и нестабильности генома [112,113].

Наряду с радиационно-индуцированными разрывами ДНК, к активации различных сигнальных путей также могут приводить повреждения других внутриклеточных молекул. Так, например, перекисное окисление липидов, вызванное активными формами кислорода, может привести к активации сигнальных путей JNK, ERK и некоторых других [114].

Резюмируя данные литературы, описанные в настоящей главе, следует заключить, что радиационно-индуцированный клеточный ответ является сложным и комплексным процессом. Воздействие ИИ приводит к активации механизмов репарации ДНК и различных сигнальных путей, которые могут перекрываться между собой, и специфически активироваться в зависимости от многих факторов, включая природу и дозу облучения, тип клеток, стадию клеточного цикла, скорость пролиферации и др. Однако, важно отметить, что клеточный ответ на воздействие ИИ не ограничивается событиями, разворачивающимися непосредственно в облученных клетках. Так, например, показано, что активные формы кислорода и азота, образующиеся после воздействия ИИ, способствуют активации рецепторов факторов роста и сигнальных путей, что приводит к высвобождению во внеклеточный матрикс паракринных лигандов, которые активируют (реактивируют) рецепторы факторов роста и внутриклеточные сигнальные пути соседних клеток (и самой клетки, продуцирующей данные молекулярные сигналы) [96]. Это обстоятельство подчеркивает важность внеклеточного матрикса, как структуры, играющей ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза в глобальном смысле и в реализации межклеточной сигнализации, индуцированной воздействием ИИ, в частности.

1.2.2. Внеклеточный матрикс и радиочувствительность

В предыдущем разделе были описаны основные внутриклеточные события, индуцированные воздействием ИИ. Однако, взаимодействия с внеклеточным матриксом играют не менее важную роль в жизнедеятельности клетки. Внеклеточный матрикс (ВКМ, extracellular matrix, ECM) представляет собой сложную трехмерную сеть, состоящую из многодоменных макромолекул, секретируемых клетками. С одной стороны, ВКМ обеспечивает механические свойства тканей, с другой – является резервуаром для факторов роста и различных биоактивных молекул, и взаимодействуя с рецепторами клеточной поверхности, регулирует различные клеточные процессы, такие как выживание, рост, миграция, дифференцировка, пролиферация, гомеостаз и морфогенез [115]. ВКМ – это динамичная структура, которая подвергается постоянному ремоделированию, опосредованному специальными ферментами, разрушающими компоненты матрикса. Нарушение состава и структуры ВКМ связано с развитием и прогрессированием ряда патологических состояний, таких как фиброз и инвазивный рак [116].

Выделяют два основных типа ВКМ, которые различаются по составу и структуре: интерстициальный и перичеллюлярный матрикс. Интерстициальный матрикс – это молекулярная сеть, которая окружает клетки, перичеллюлярный матрикс находится в постоянном контакте с клетками (например, базальная мембрана).

Основу ВКМ составляют гиалуроновая кислота и различные белки (протеогликаны, коллагены, эластин и эластин-ассоциированные белки, фибронектин и ламинины); точный состав и структура ВКМ варьирует в разных тканях [117]. Гиалуроновая кислота или гиалуронан (ГК) – это высокомолекулярный полисахарид, синтезирующийся в плазматической мембране фибробластов и других клеток. Гиалуронан участвует в поддержании гомеостаза воды и белков плазмы, способствует передаче сигналов в клетки, важен для развития, миграции и других клеточных процессов [118]. Протеогликаны (ПГ) являются одними из наиболее важных структурных макромолекул в ткани. Это довольно большая группа белков, которая объединяет в себе внеклеточные ПГ (лектиканы и малые лейцин-богатые ПГ), протеогликаны перичеллюлярной мембраны (перлекан и аргин), ПГ клеточной поверхности (синдеканы, глипиканы, хондроитинсульфата протеогликан, бетагликан, также известный как рецептор TGF β типа III, фосфаканы) и внутриклеточные ПГ (серглицин). Протеогликаны взаимодействуют с многочисленными факторами роста, цитокинами и хемокинами, рецепторами клеточной поверхности, а также с другими молекулами ВКМ, тем самым участвуя в различных

клеточных процессах, таких как передача сигналов, пролиферация и миграция, дифференцировка, адгезия и апоптоз. Благодаря своей способности взаимодействовать с другими молекулами ВКМ, протеогликаны способствуют формированию каркаса ВКМ и встраиванию в него клеток [119]. Коллагены и эластины являются структурными белками, обеспечивающими прочность и эластичность ВКМ. Коллагены – одни из самых распространенных белков ВКМ. Коллагеновый каркас определяет архитектуру, форму и организацию ткани [120]. Фибронектин синтезируется в ВКМ в виде димеров, имеющих сайты связывания с другими димерами фибронектина, коллагенами, гепарином и рецепторами клеточной поверхности. Данный белок необходим для обеспечения адгезии и миграции клеток [121]. Семейство ламининов включает около 20 белков, образующих сети, переплетающиеся с сетями коллагена IV типа в базальных мембранах. Они взаимодействуют с рецепторами клеточной поверхности и необходимы для раннего эмбрионального развития и органогенеза [122].

ВКМ взаимодействует с клетками через различные рецепторы, такие как интегрины, синдицины, рецепторы дискоидинового домена, рецептор ГК и CD44 [117]. Одни из наиболее важных рецепторов – интегрины – действуют как двунаправленные каналы, передавая сигналы ВКМ в клетку и наоборот. Они активируют сигнальные пути, регулирующие экспрессию генов, дифференцировку, пролиферацию клеток и апоптоз, в то время как сигналы, поступающие от клетки, могут изменять конформацию и активность интегринов [115].

Как уже было упомянуто ранее, ВКМ подвергается постоянному ремоделированию, в результате чего компоненты ВКМ накапливаются, подвергаются деградации или модифицируются. Деградацию компонентов ВКМ обеспечивают различные белки из семейства протеаз (также называемых протеиназами, пептидазами или протеолитическими ферментами), представляющих собой ферменты, катализирующие расщепление белков на пептиды или аминокислоты, посредством гидролиза пептидных связей, отщепляя аминокислоты от конца полимера (экзопептидазы) или расщепляя связи внутри пептидной цепи (эндопептидазы) [123]. Коллагены и другие компоненты ВКМ являются субстратами для матриксных металлопротеиназ (MMP), дезинтегрин-металлопротеиназ (ADAM), дезинтегрин-металлопротеиназ содержащих мотив тромбоспондина (ADAMTS) и таких протеаз, как катепсин G и эластаза [115].

В последнее время внеклеточному матриксу отводится все большая роль в формировании клеточной радиочувствительности [11]. Интерес к этой теме связан с поиском новых подходов к терапии онкологических заболеваний и попытками повысить радиочувствительность опухолевых тканей. Более того, некоторые авторы определяют

исследования, связанные с изучением роли внеклеточного матрикса, как одно из ключевых направлений развития радиобиологии [12]. Внеклеточный матрикс – это один из ключевых факторов микроокружения опухоли, влияющий на выживаемость опухолевых клеток после облучения. Было показано, что интегрин-опосредованные взаимодействия клеток и ВКМ могут повышать устойчивость некоторых типов опухолей к радио- и химиотерапии [13–15]. Кроме того, адгезия опухолевых клеток к белкам ВКМ влияет на эффективность молекулярно-таргетной терапии [49, 50]. Явление возрастания радиорезистентности клеток при взаимодействии с белками ВКМ получило название радиорезистентности, опосредованной клеточной адгезией (от англ. cell adhesion-mediated radioresistance). В исследованиях *in vivo* было показано, что клетки глиобластомы, карциномы поджелудочной железы и легких, выращенные на белке ВКМ фибронектине, демонстрируют высокую выживаемость после облучения. Подобные результаты были показаны также и для нормальных клеток человека, таких как фибробласты и кератиноциты [125]. Адгезия к коллагену-1 снижает уровень радиационно-индуцированного апоптоза клеток карциномы почек [52]. Более того, согласно данным литературы, 3D-культивируемые во внеклеточном матриксе клетки, демонстрируют повышенную химио- и радиорезистентность по сравнению с 2D-культивируемыми клетками [51]. Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о значительном влиянии компонентов ВКМ на радиочувствительность клеток, однако механизмы такого влияния на сегодняшний день изучены недостаточно. Исследования, направленные на изучение биохимических сигнальных путей от ВКМ к клеткам, могут привести к выявлению новых молекулярных мишеней, воздействие на которые позволило бы изменять опухолевую радиочувствительность.

Результаты экспериментов, проведенных ранее на лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов, также указывают на важную роль межклеточного матрикса в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа. Проведение полнотранскриптомного анализа профилей экспрессии в лимфоцитах индивидов с различным уровнем эндогенных фокусов γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер позволило выявить более 500 дифференциально-экспрессирующихся генов, большая часть которых не имела прямого отношения к репарации повреждений ДНК, но была задействована в различных сигнальных путях. При этом наиболее значимо между группами индивидов отличалась экспрессия генов *ADAMTS1* и *THBS1*, кодирующих белки внеклеточного матрикса [10].

1.3. Известные функции гена *THBS1*

THBS1 кодирует белок тромбоспондин-1, принадлежащий к семейству тромбоспондинов (TSP). Тромбоспондины – это семейство кальций-связывающих гликопротеинов внеклеточного матрикса, насчитывающее пять известных белков, кодируемых генами *THBS1*, *THBS2*, *THBS3*, *THBS4*, *THBS5*. В зависимости от характера олигомеризации тромбоспондины подразделяют на две подгруппы (Рисунок 1.2). К подгруппе А относятся TSP-1 и TSP-2, образующие гомотримеры, а к подгруппе В – TSP-3, TSP-4 и TSP-5, образующие гомопентамеры. Известно, что белки данного семейства имеют доменную организацию. Консервативные карбокситерминальные области данных белков содержат домен, обеспечивающий взаимодействие с клеточной поверхностью, семь кальций-связывающих повторов тромбоспондина типа 3 и три-четыре повтора, подобных эпидермальному фактору роста (EGF-подобные домены или повторы тромбоспондина типа 2). Отличительной чертой подгруппы А является наличие повторов тромбоспондина типа 1. Аминоконцевые области тромбоспондинов разнообразны, но наиболее консервативным является ламинин G-подобный домен [126].

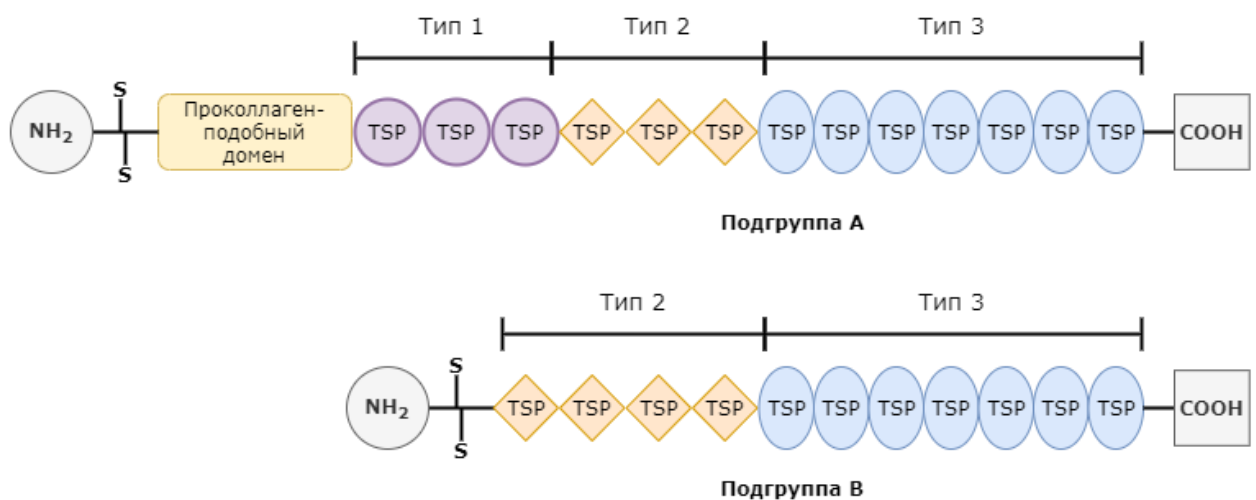


Рисунок 1.2 – Доменная организация тромбоспондинов.

TSP – повторы тромбоспондина типа 1, 2 и 3

Уникальные функции, характерные для всех известных тромбоспондинов, заключаются во взаимодействии с компонентами ВКМ и гликозаминогликанами, а также в поддержании кальций-зависимой клеточной адгезии [126]. Кроме того, у разных тромбоспондинов (TSP) есть специфические функции, такие как активация апоптоза в эндотелиальных клетках (TSP-1 и TSP-2) [127], поддержание адгезии, пролиферации и миграции гладкомышечных клеток *in vitro* (TSP-1 и TSP-2) и подавление данных

процессов в условиях повышения уровня оксида азота (NO) [126], регуляции передачи сигналов NO (TSP-1) [128], обеспечение взаимодействий между клетками и ВКМ в костной и хрящевой ткани (TSP-1 – TSP-5) [129], участие в процессах формирования нейрональных отростков [126] и др. Нарушения в структуре и функции генов, кодирующих данные белки, ассоциированы с развитием сердечно-сосудистых заболеваний [126,130,131] и патогенезом онкологических заболеваний [132,133].

Для генов, кодирующих данные белки, характерен специфический пространственно-временной паттерн экспрессии во время развития. В норме в организме взрослого человека один или несколько генов тромбоспондинов экспрессируются практически во всех тканях, однако в патофизиологических условиях в паттерне экспрессии наблюдаются существенные изменения. Так, экспрессия *THBS2* возрастает во время грануляции раны, повышенная экспрессия *THBS1* и *THBS2* регистрируется в стромальных фибробластах и эндотелиальных клетках опухолевых тканей, активность *THBS4* возрастает в скелетной мускулатуре пациентов с болезнью мышечной дистрофии Дюшенна, а экспрессию *THBS5* ассоциируют с остеоартритом [126].

Наиболее изученный член семейства тромбоспондинов кодируется геном *THBS1*. Данный ген расположен на 15 хромосоме (15q14) и насчитывает 22 экзона и 8 альтернативных транскриптов, 2 из которых являются белок-кодирующими. По данным базы The Human Protein Atlas [134], *THBS1* экспрессируется практически во всех тканях организма, включая опухолевые клетки различного происхождения, а кодируемый им белок участвует в реализации различных сигнальных путей, таких как TGF β [129,135–138], VEGF [139,140], NO-сигнальный путь [141,142] и некоторые другие. Согласно данным литературы, синтез мРНК тромбоспондина-1 возрастает в ответ на сигналы факторов роста тромбоцитов (Platelet-derived growth factor, PDGF), фибробластов (Basic fibroblast growth factor, bFGF), трансформирующего ростового фактора β 1 (transforming growth factor beta-1, TGF- β 1), тепловой шок и гипоксию и снижается в ответ на воздействие интерлейкина 1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β) и фактора некроза опухоли α (tumour necrosis factor α , TNF α) [143]. Кроме того, ряд онкогенов, таких как c-fos, c-jun, v-src и Ras, может ингибировать транскрипцию мРНК тромбоспондина-1 [144].

Структура TSP-1, начиная с N-конца, включает гепарин-связывающий домен, проколлаген-подобный домен, три повтора тромбоспондина типа 1, три повтора тромбоспондина типа 2 (EGF-подобные повторы), семь повторов типа 3 (кальций-связывающие повторы) и карбокситерминальный домен, обеспечивающий взаимодействие с рецепторами клеточной поверхности. Такая структура молекулы тромбоспондина детерминирует ее многочисленные функции и обеспечивает

взаимодействие с различными сайтами связывания клеток и молекул внеклеточного матрикса (Рисунок 1.3) [143].

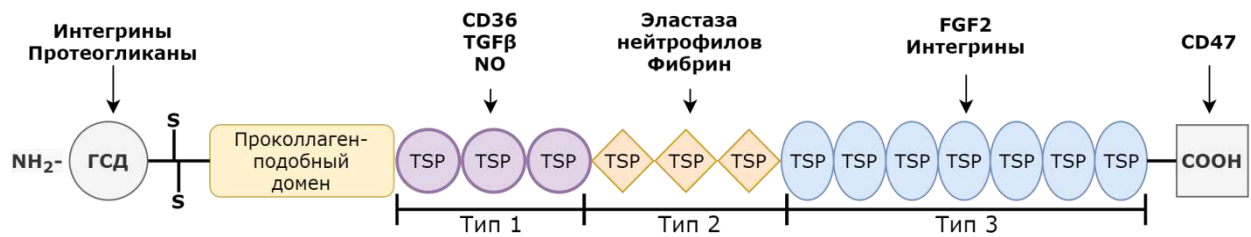


Рисунок 1.3 – Доменная организация тромбоспондина 1 и взаимодействие с различными молекулами клеток и ВКМ.

ГСД – гепарин-связывающий домен, TSP – повторы тромбоспондина типа 1, 2 и 3.

Так, благодаря наличию в структуре повторов тромбоспондина типа 1, данный белок может взаимодействовать с мембранным рецептором CD36, что влечет за собой ингибирование ангиогенеза и индукцию апоптоза в эндотелиальных клетках [143,145]. Настоящий домен также участвует в активации латентной формы TGFβ [143]. Повторы тромбоспондина типа 2 и 3 обеспечивают взаимодействия с эластазой нейтрофилов, и фактором роста фибробластов (FGF2), ингибируя его ангиогенный эффект [143].

С помощью карбокситерминального домена тромбоспондин 1 взаимодействует с рецептором CD47, выступая эндогенным ингибитором ангиогенеза через негативную регуляцию NO-опосредованной передачи сигналов в эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках кровеносных сосудов и тромбоцитах [128,146–148]. 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 [140,149].

Кроме влияния на ангиогенез, тромбоспондин-1 регулирует ряд процессов, связанных с поведением и устойчивостью опухолевых клеток к терапии. Среди них адгезия [150] и пролиферация опухолевых клеток [151], выживание или апоптоз [152–154], опухолевая инвазия и метастазирование [155,156], воспаление, иммунный ответ [157] и ответ опухоли на терапию [150,158]. Влияние тромбоспондина-1 на эти процессы является многогранным и часто противоположным в зависимости от его концентрации, происхождения опухоли, а также молекулярного и клеточного состава её микроокружения. Так, например, было показано, что связывание тромбоспондина-1 с

рецептором CD47 вызывает гибель опухолевых клеток при раке молочной железы [152], но блокирует апоптоз и способствует развитию лекарственной устойчивости клеток карциномы щитовидной железы [154]. Кроме того, описано селективное действие тромбоспондина-1 на здоровые и опухолевые ткани. В исследовании J.S. Isenberg с коллегами (2008 г.) 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 и минимальные радиационные повреждения кожных покровов и мышц через 2 месяца после воздействия радиацией [16]. Схожие эффекты были характерны и для мышей, лишенных рецептора CD47 [16].

1.4. Известные функции гена *ADAMTS1*

ADAMTS1 кодирует белок из семейства ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) – дезинтегрин-металлопротеиназ, содержащих мотивы тромбоспондина. Белки ADAMTS у млекопитающих входят в состав надсемейства из 26 членов, включающего два родственных семейства: белков ADAMTS и ADAMTS-подобных белков. В семейство ADAMTS входят 19 белков, пронумерованных от 1 до 20 (обозначение ADAMTS11 не используется), являющихся секретируемыми цинк-зависимыми металлоэндопептидазами, субстратами для которых преимущественно выступают компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ). Семейство ADAMTS-подобных белков состоит из 7 членов (ADAMTSL1-6 и молекула папилин), локализованных во внеклеточном матриксе и не имеющих металлопротеиназного домена. Данная группа молекул выполняет регулирующие функции в отношении сборки ВКМ и/или активности ADAMTS [159,160].

Все белки семейства ADAMTS синтезируются в виде функционально неактивных предшественников и имеют характерную структуру, включающую начиная с N-конца следующие домены: сигнальный пептид, продомен вариативной длины, каталитический (металлопротеиназный) домен, дезинтегрин-подобный домен, центральный мотив тромбоспондина типа 1 (TSR), домен богатый цистеином, спейсер и массив вариативных доменов. С-терминальный регион, находящийся за центральным мотивом тромбоспондина типа 1, называется вспомогательной областью. Именно в ней наблюдаются наибольшие структурные различия между членами семейства, которые заключаются в наличии от одного до четырнадцати повторов мотивов тромбоспондина типа 1, а также наличии или отсутствии некоторых специализированных доменов (GON-1,

PLAC и др). Тромбоспондиновые повторы играют ключевую роль во взаимодействии ферментов ADAMTS с компонентами ВКМ, регуляции активности и специфического узнавания субстрата [161]. Как упоминалось ранее, все протеазы ADAMTS синтезируются в виде неактивных предшественников и обычно требуют расщепления фурином или подобными ему пропротеин конвертазами, которое приводит к удалению пропептида, и последующей активации протеазы [162]. Поэтому, все белки семейства ADAMTS содержат минимум один сайт узнавания для фурин-подобных пропротеин конвертаз (Рисунок 1.4) [163].

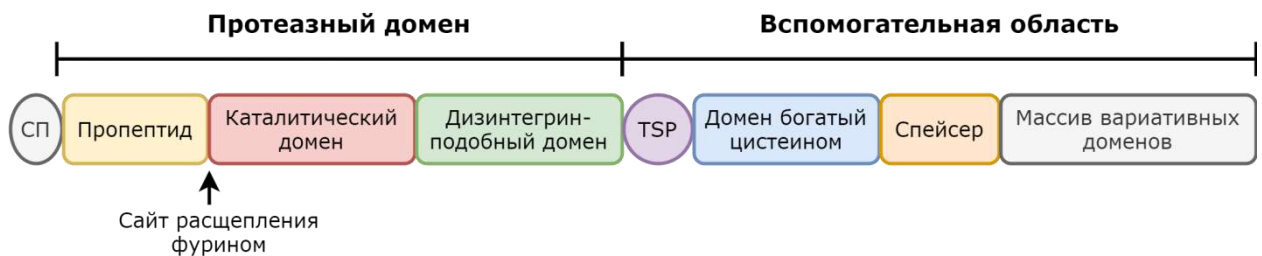


Рисунок 1.4 – Доменная организация белков семейства ADAMTS.

Продомен ADAMTS обеспечивает фолдинг и поддержание ферментативной латентности [164]. Каталитический домен белков ADAMTS является основной функциональной областью, протеолитически взаимодействующей с различными лигандами. Он имеет консервативную структуру и включает три гистидиновых остатка, связывающих ион цинка. На расстоянии 14-20 аминокислотных остатков от третьего гистидина располагается метионин, характерный для всех цинк-зависимых эндопептидаз. Дизинтегрин-подобный домен, по-видимому, необходим для процессов распознавания субстрата и специфической протеолитической активности [165]. Вспомогательная область ADAMTS необходима для ассоциации с компонентами ВКМ, регуляции активности белков ADAMTS и спецификации их субстрат-связывающей активности [165].

В зависимости от субстрата, белки ADAMTS можно разделить на пять групп, а именно: агреканызы или протеогликаназы (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 и 20), проколлаген-N-пропептидазы (ADAMTS2, 3 и 14), ферменты, расщепляющие олигомерный матриксный белок хрящевой ткани (ADAMTS7 и 12), протеиназа фактора фон Виллебранда (ADAMTS13) и ферменты, ассоциированные с патогенезом орфанных заболеваний (ADAMTS6, 10, 16, 17, 18 и 19). Их известные функции включают процессинг коллагена, расщепление матриксных протеогликанов, ингибирование ангиогенеза и поддержание гемостаза крови [164].

С одной стороны, ADAMTS-опосредованное расщепление субстратов необходимо для формирования, ремоделирования и физиологической адаптации ВКМ к потребностям отдельных тканей и органов. С другой стороны, протеазы данного семейства могут участвовать в процессах деградации тканей, что может приводить к развитию патологических процессов [162].

Мутации в генах, кодирующих белки семейства ADAMTS могут приводить к наследственным болезням, таким как синдромы Элерса-Данлоса, Хеннекама, Вейля-Маркезани, Апшоу-Шульман и др. [159]. Кроме того, белки ADAMTS ассоциированы с патогенезом остеоартрита [166], развитием сердечно-сосудистых заболеваний [167–169] и заболеваний центральной нервной системы [170], болезнями репродуктивной системы [171], а также с развитием онкологических заболеваний [172,173] (Таблица 1.1).

Таблица 1.1 Известные функции белков семейства ADAMTS и связь с патологическими процессами.

Белок	Известные субстраты	Биологическая роль/патологический процесс
ADAMTS1	Аггрекан, версикан V1, синдекан 4, ингибитор пути тканевого фактора 2 (TFPI2), нидоген-1 и -2, дистрогликан, мас-2, семафорин 3С, десмоколлин-3, желатин, амфирегулин, TGF- α , гепарин-связывающий EGF, VEGF	Канцерогенез (про- и противоопухолевая/антиметастатическая активность), ингибирование ангиогенеза [159,172]
ADAMTS2	N-терминальный пропептид проколлагена 1-го, 2-го и 3-го типов	Синдром Элерса-Данлоса (тип VIIC) [174]
ADAMTS3	N-терминальный пропептид проколлагена 2-го типа, рилин, бигликан, про- VEGF -C	Лимфангиогенез, ангиогенез в плаценте, функционирование мозга [162,174]
ADAMTS4	Аггрекан, бревикан, версикан V1, фибромодулин, декорин, трансферрин, рилин, матрилин-3, альфа-2 макроглобулин, олигомерный матриксный белок хряща	Остеоартрит [162]

Продолжение таблицы 1.1

Белок	Известные субстраты	Биологическая роль/патологический процесс
ADAMTS5	Агрекан, версикан, рилин, альфа-2 макроглобулин, бигликан, бревикан	Остеоартрит, канцерогенез (противоопухолевая активность, ингибирование ангиогенеза) [162]
ADAMTS6	Нет данных	Нет данных
ADAMTS7	Олигомерный матриксный белок хряща	Заболевания коронарных артерий, развитие атеросклероза [162,174]
ADAMTS8	Агрекан	Ингибирование ангиогенеза [159]
ADAMTS9	Версикан, агрекан	Канцерогенез [172,173]
ADAMTS10	Фибриллин-1	Синдром Вейля-Маркезани [174]
ADAMTS12	Олигомерный матриксный белок хряща	Клеточная адгезия, канцерогенез [172]
ADAMTS13	Фактор фон Виллебранда	Коагулопатия тромбоцитов, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура [162,174]
ADAMTS14	Н-терминальный пропептид проколлагена 1-го типа	Рассеянный склероз, остеоартрит у женщин [166]
ADAMTS15	Агрекан	Канцерогенез (противоопухолевая и антиметастатическая активность), ингибирование ангиогенеза [172,173]
ADAMTS16	Нет данных	Гипертония [159]
ADAMTS17	Нет данных	Вейля-Маркезани-подобный синдром [174]
ADAMTS18	Нет данных	Микрокорнея, миопическая хориоретинальная атрофия, телекантус [162]
ADAMTS19	Нет данных	Заболевания клапанов сердца [162]
ADAMTS20	Версикан	Колоректальный рак [173]

Гены, кодирующие данные белки, широко экспрессируются в нормальных тканях взрослого человека, и в меньшей степени в тканях плода [164]. *In vivo* активность ADAMTS регулируется на транскрипционном, и посттранскрипционном уровнях, а также на уровне трансляции. Некоторые посттранскрипционные и посттрансляционные механизмы, включая альтернативный сплайсинг и фурин-зависимую активацию ADAMTS, определяют тканеспецифический состав белков ADAMTS, изменяя их протеолитическую активность и/или субстрат. Несмотря на важную роль белков данного семейства в процессах развития и поддержания тканевого гомеостаза, об их транскрипционной регуляции известно немного. Показано, что количество мРНК

ADAMTS регулируется на уровне транскрипции или посредством микроРНК, однако регуляция экспрессии генов *ADAMTS* с помощью транскрипционных и эпигенетических механизмов, по-видимому, имеет специфический для разных типов клеток и тканей характер. Известно, что одни протеазы ADAMTS реагируют на провоспалительные цитокины, в то время как другие протеазы ADAMTS регулируются половыми гормонами во время овуляции [162].

Один из наиболее изученных белков данного семейства кодируется геном *ADAMTS1*. Данный ген локализуется на 21 хромосоме в регионе 21q21.3, включает 9 экзонов и 10 альтернативных транскриптов, 6 из которых являются белок-кодирующими [175]. Как и все белки семейства, ADAMTS1 включает протеазный домен, за которым следует центральный мотив тромбоспондина типа 1, домен богатый цистеином, спейсер и массив вариативных доменов, содержащий два мотива тромбоспондина типа 1 (Рисунок 1.5) [165].

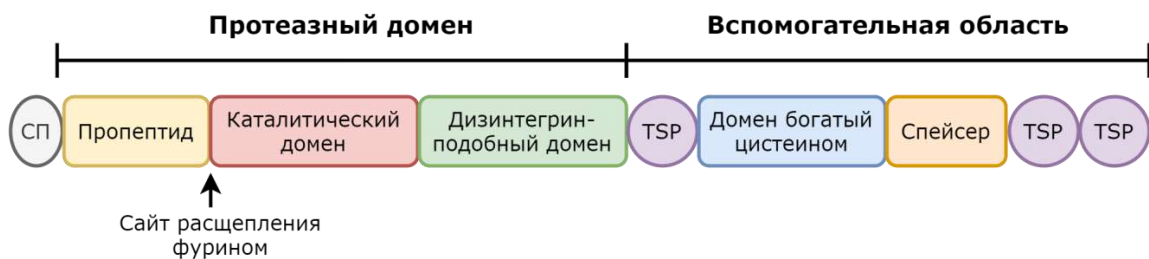


Рисунок 1.5 – Доменная организация протеазы ADAMTS1.

Максимальная экспрессия *ADAMTS1* характерна для яичников, плаценты, желчного пузыря, предстательной железы и мочевого пузыря. Кроме того, *ADAMTS1* также экспрессируется в органах желудочно-кишечного тракта, мозге, костном мозге, сердце, легких, печени, коже и других тканях [176]. Согласно данным литературы, экспрессию данного гена связывают с воспалительными процессами [163,177], гипоксией [178–180], стимуляцией ангиогенеза [163] и ремоделированием тканей во время развития и прогрессирования рака [172,181,182], однако роль *ADAMTS1* в онкогенезе неоднозначна, и его повышенная экспрессия ассоциирована как с про-, так и с противоопухолевыми эффектами [181–183]. Упоминание о связи *ADAMTS1* с радиочувствительностью встречается лишь в одном исследовании. Авторы сообщают, что ген *ADAMTS1* статистически значимо изменяет экспрессию в ответ на воздействие низкими дозами ИИ в трехмерной модели ткани, имитирующей структуру и функции эпидермиса человека [184]. Согласно полученным нами ранее данным, здоровые индивиды с низким

уровнем микроядер в лимфоцитах периферической крови (как до, так и после облучения) характеризуются повышенной экспрессией *ADAMTS1* [10]. В связи с этим, было выдвинуто предположение, что *ADAMTS1* может быть вовлечен в процесс формирования клеточного ответа на воздействие ионизирующего излучения.

Таким образом, индивидуальная радиочувствительность зависит от структуры и функции многих генов, связанных с клеточным ответом на повреждение ДНК, и различными внутриклеточными сигнальными путями, обеспечивающими как активацию ядерных транскрипционных факторов, приводящих к индукции экспрессии генов-мишеней и реализации биологического ответа, так и межклеточную коммуникацию посредством ВКМ. Несмотря на растущее количество работ, направленных на изучение компонентов ВКМ с точки зрения их возможного влияния на радиочувствительность клеток, ключевые игроки и механизмы реализации такого влияния остаются недостаточно изученными. Так, например, в предварительном исследовании, проведенном нами ранее, было показано, что индивиды с различной радиочувствительностью характеризуются дифференциальной экспрессией генов *ADAMTS1* и *THBS1*. Данные гены кодируют белки ВКМ, и при этом их известные функции не связаны с клеточным ответом на воздействие ионизирующим излучением. В связи с этим, в настоящем исследовании проверена гипотеза о вовлеченности *ADAMTS1* и *THBS1* в формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа на повреждения ДНК, а также оценена возможность использования данных генов в качестве экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Цель настоящего исследования заключалась в установлении влияния дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК. Для этого на первом этапе работы с использованием 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*.

В полученных клеточных моделях были проанализированы способность клеток к формированию колоний, анализ уровня фокусов белков репарации ДНК и частота микроядер до облучения и после воздействия ионизирующего излучения в диапазоне доз от 2 до 8 Гр. Выполнение данного блока работы позволило установить влияние дифференциальной экспрессии изучаемых генов на радиационно-индуцированный ответ клеточной линии HeLa, однако механизмы реализации такого влияния оставались неясными. Потенциально, оно может осуществляться через продукты промежуточных генов на пути передачи сигнала. Поэтому на следующем этапе работы был проведен сравнительный полнотранскриптомный анализ изменения транскрипционного профиля генов в ответ на воздействие радиации на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1*.

Для того чтобы проверить, сохраняются ли наблюдаемые радиобиологические эффекты дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* в нормальных клетках организма, на следующем этапе работы был проведен анализ экспрессии изучаемых генов, эндогенного уровня фокусов белков репарации ДНК и частоты радиационно-индуцированных микроядер в лимфоцитах периферической крови на расширенной выборке здоровых индивидов. Такой подход позволил не только проанализировать связь дифференциальной экспрессии изучаемых генов с радиационно-индуцированными эффектами в нормальных клетках организма, но и оценить возможность использования *ADAMTS1* и *THBS1* в качестве потенциальных экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности нормальных клеток.

Таким образом, в настоящем исследовании было изучено влияние дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК. Схема дизайна данной работы представлена на рисунке 2.1.

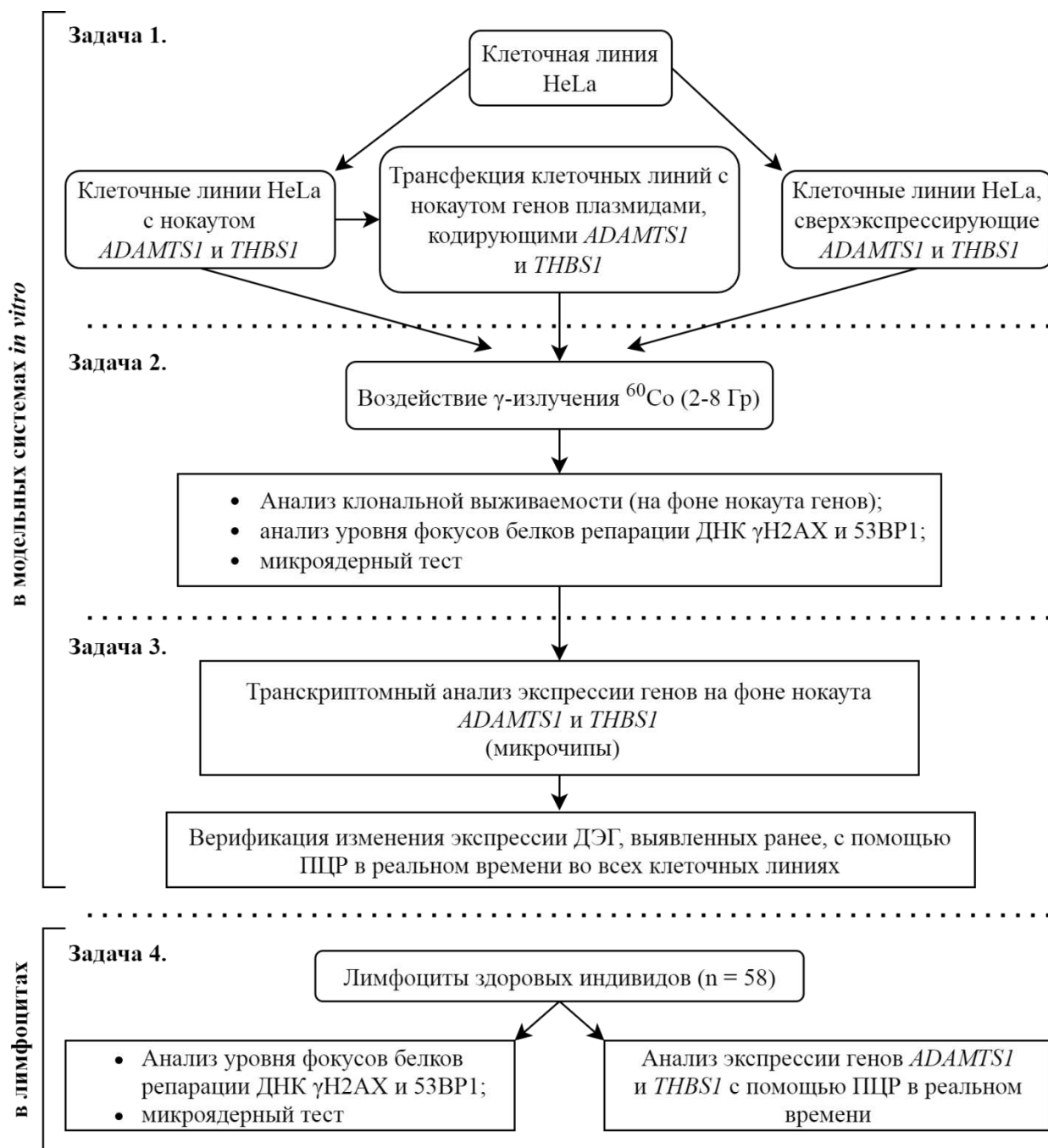


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования.

2.2 Материалы исследования

В качестве материалов для данного исследования были использованы опухолевая клеточная линия HeLa, послужившая основой для создания модельных систем дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1*, и лимфоциты здоровых индивидов. Клеточная линия карциномы шейки матки HeLa была любезно предоставлена к.б.н. Булдаковым М.А. (НИИ онкологии Томского НИМЦ).

Лимфоциты периферической крови человека были получены от 58 здоровых индивидов (20 мужчин и 38 женщин). Возраст мужчин варьировал от 21 до 59 (среднее значение $32,80 \pm 9,69$ года), возраст женщин находился в диапазоне от 21 до 62 (среднее значение $37,42 \pm 14,22$ лет). Группы мужчин и женщин не различались между собой по возрасту статистически значимо ($p = 0,20$). Забор крови для последующего культивирования лимфоцитов и анализа частоты микроядер производился из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки с натриевой солью гепарина объемом 6 мл (Vacuette, Greiner), а для выделения РНК – в стерильные вакуумные пробирки с калиевой солью ЭДТА объемом 8 мл (Vacuette, Greiner). От всех доноров было получено информированное согласие на проведение генетического исследования.

2.1 Создание модельных систем с нокаутом и сверхэкспрессией генов *ADAMTS1* и *THBS1* на базе опухолевой клеточной линии HeLa

2.1.1 Создание клеточных линий HeLa с нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1*

Две клеточные линии с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1* были созданы на основании исходной опухолевой клеточной линии HeLa на базе Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Для этого с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 в нуклеотидные последовательности изучаемых генов были внесены мутации, приводящие к отсутствию нормального продукта транскрипции.

Создание клеточных линий с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9 включает в себя следующие основные этапы: создание генетических конструкций, несущих направляющие РНК (от англ. single guide RNA, далее – sgRNA), наработка и очистка плазмидных векторов, трансфекция компонентов системы CRISPR/Cas9 в целевые клетки, отбор субклонов, определение нуклеотидной последовательности внесенных мутаций.

Создание генетических конструкций, несущих sgRNA. Олигонуклеотиды, содержащие целевую последовательность sgRNA и липкие концы для встраивания в плазмиду, были разработаны с использованием биоинформационного ресурса sgRNA Scorer [185] и синтезированы в ООО «Биоссет» (г. Новосибирск). Для каждого изучаемого гена было разработано по две последовательности sgRNA, представленные в таблице 2.1. В качестве вектора для клонирования sgRNA был использован gRNA cloning vector BsmBI, любезно предоставленный к.б.н. Фишманом В. С. (Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск).

Таблица 2.1. Олигонуклеотиды, использованные для создания нокаутных линий

Наименование	Последовательность	Экзон
<i>ADAMTS1_sgRNA 1_F</i>	5'-CACCGGCTTGTGGCAGACCAGTCGAGTT-3'	Экзон 2
<i>ADAMTS1_sgRNA 1_R</i>	5'-CTAAAACTCGACTGGTCTGCCACAAGCC-3'	
<i>ADAMTS1_sgRNA 2_F</i>	5'-CACCGGGTTTCCACATAGCGGTGACGTT-3'	
<i>ADAMTS1_sgRNA 2_R</i>	5'-CTAAACGTCACCGCTATGTGGAAACCC-3'	
<i>ADAMTS1_F</i>	5'-GCCACCGAAAACAACGTGAG-3'	
<i>ADAMTS1_R</i>	5'-ACTGGAAGCATAAGAAAGAAGCG-3'	
<i>THBS1_sgRNA 1_F</i>	5'-CACCGTGACATCTTTGAACTCACCGGTT-3'	Экзон 3
<i>THBS1_sgRNA 1_R</i>	5'-CTAAACCGGTGAGTTCAAAGATGTCAC-3'	
<i>THBS1_sgRNA 2_F</i>	5'-CACCGTCTGGGCGCCGACTGGTGAAGTT-3'	
<i>THBS1_sgRNA 2_R</i>	5'-CTAAACTTCACCAGTCGGCGCCCAGAC-3'	
<i>THBS1_F</i>	5'-ACTTTGTGTTCTCTCCTGTCTAA-3'	
<i>THBS1_R</i>	5'-GCATCCTCGATGCGGAAA-3'	

Примечание: ген_sgRNA – последовательности sgRNA прямой и обратной цепи; ген_F(R) – праймеры для ПЦР, фланкирующие сайты вставок. Полужирным курсивом выделены нуклеотидные последовательности sgRNA.

В ходе киназной реакции с использованием фермента T4 полинуклеотидкиназы (NEB, США) к синтезированным олигонуклеотидам присоединялись фосфаты с последующей гибридизацией олигонуклеотидов друг на друга и формированием двунитевой структуры ДНК. Далее в ходе реакции лигирования полученные двунитевые олигонуклеотиды встраивались в плазмидный вектор gRNA cloning vector BsmBI. Реакционная смесь для киназной реакции включала следующие компоненты: 0,5 мкл T4 полинуклеотидкиназы, 1 мкл 10× буфера, по 1 мкл олигонуклеотидов (100 мкМ каждый), ddH₂O до 10 мкл. Кинирование осуществлялось при 37 °С в течение 30 мин, после чего была проведена инактивация фермента 5 мин при 95 °С с последующим снижением температуры до 25 °С по 5 °С в минуту для гибридизации праймеров друг на друга. Состав реакционной смеси для сборки плазмиды был следующим: 1 мкл 10× буфер (NEB, США), 0,1 мкл 1% BSA, 0,5 мкл рестриктазы BsmBI (NEB, США), 0,5 мкл T4 ДНК-лигазы (NEB, США), 0,4 мкл полученных двунитевых олигонуклеотидов, 1 мкл плазмиды, ddH₂O до 10 мкл. Реакционная смесь инкубировалась в амплификаторе 35 циклов по 5 мин при температуре 37 °С для рестрикции и 5 мин при 20 °С для лигирования.

Наработка и очистка плазмидных векторов. Полученные на предыдущем этапе рекомбинантные плазмидные векторы были использованы для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli*. Для трансформации был использован метод электропорации с использованием прибора MicroPulser (Bio-Rad, США) с параметрами 1,8 кВ, 25 мкФ, 200 Ом (время импульса – 4,5-6,0 мс). Для этого электрокомпетентные

клетки размораживали на льду в течение 5-10 мин и добавляли к ним раствор, содержащий полученные генетические конструкции. Полученную суспензию переносили в заранее охлажденные на льду кюветы для электропорации с зазором 1 мм (Bio-Rad, США) и проводили электропорацию. Сразу после воздействия электрического импульса к клеткам в кювете добавляли 1 мл теплой (37°C) жидкой среды LB, содержащей 1 г бактотриптона, 1 г NaCl, 0,5 г дрожжевого экстракта в 100 мл дистиллированной воды. Далее ресуспендированные в среде клетки переносили в 1,5 мл-пробирки с круглым дном и инкубировали при постоянном перемешивании (200 об./мин) и 37°C в течение 1 часа. По истечении времени инкубации клеточную суспензию центрифугировали 1 минуту при 4000 g, удаляли супернатант и ресуспендировали клеточный осадок в 100 мкл среды LB. Полученную суспензию равномерным слоем наносили на твердую селективную среду LB (с добавлением 1,5 г агара), содержащую канамицин, и инкубировали в закрытых перевернутых чашках Петри при 37°C в течение ночи. На следующий день выращенные единичные бактериальные колонии переносили в 15 мл стеклянные пробирки, содержащие 4 мл жидкой питательной среды и инкубировали при постоянном перемешивании (200 об./мин) и 37 °C в течение ночи для наращивания биомассы бактерий. Полученные клеточные суспензии использовали для выделения клонированных плазмидных векторов с помощью спин-микроколонок по протоколу, рекомендованному производителем (BioSilica, Россия).

Оценка эффективности встраивания. Встраивание двунитевых олигонуклеотидов в плазмидный вектор было подтверждено с помощью ПЦР и секвенирования. Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала (в расчете на 1 образец) 10× ПЦР-буфер, dNTPs (10 мМ) – 0,5 мкл, прямой и обратный праймеры – по 1 мкл, ДНК исследуемого образца – 4 мкл, фермент Taq-полимераза – 0,5 мкл и ddH₂O – 15,5 мкл. Амплификация была проведена в следующих условиях: 94°C – 4 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 55 °C – 35 с, 72 °C – 30 с (35 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл), 10 °C (∞). В качестве прямых праймеров использовались последовательности sgRNA (Таблица 2), в качестве обратного праймера использовался универсальный праймер M13, нуклеотидная последовательность которого комплементарна участку плазмидного вектора gRNA cloning vector BsmBI. Результаты встраивания sgRNA в плазмиду оценивались помощью гелелектрофореза.

Реакционная смесь для проведения секвенирования содержала: 5X Big Dye buffer – 5 мкл, BigDye™ Terminators v1.1 – 2 мкл; соответствующий праймер (10 мМ) – 0,7 мкл; исследуемый образец ДНК – 500 нг, ddH₂O – до 20 мкл. Полученная реакционная смесь инкубировалась в амплификаторе при следующем температурном режиме: 96 °C – 10 с

(1 цикл); 96 °C – 10 с, 50 °C – 10 с, 60 °C – 4 мин (35 циклов); 10 °C (∞). Полученный продукт реакции был очищен на колонках с сорбентом Sephadex G50 (Sigma, США).

Для очистки продуктов 1 реакции секвенирования ДНК было использовано около 50 мг Sephadex G50. К сорбенту добавлялась ddH₂O из расчета: $M \times 20 = X$, где M – вес сорбента, г, X – количество ddH₂O, мл. После перемешивания полученная суспензия была оставлена на 12-18 часов при температуре 4 °C. 700 мкл подготовленной суспензии Sephadex G50 переносили в пустой чистый корпус колонки и центрифугировали 5 мин при 900 g. Воду из пробирки-приемника удаляли, после чего добавляли на колонки вторую 700 мкл-аликвоту суспензии, и повторно центрифугировали в пробирках в течение 5 мин при 900 g. Далее на столбик сорбента добавлялось 200 мкл ddH₂O, после чего колонку центрифугировали 5 мин при 900 g. Подготовленные колонки были помещены в чистые пробирки-приемники. Образец реакции секвенирования в объеме 20 мкл переносился на центр столбика сорбента после чего было проведено центрифугирование в течение 5 мин при 900 g. Собранную в пробирки-приемники жидкость высушивали центрифугированием в течение 35 минут при 40 °C с ускорением 10000 g.

Секвенирование было проведено на базе Центра коллективного пользования Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН.

Трансфекция и отбор субклонов. Трансфекция двух плазмид с направляющими РНК и плазмиды с генами Cas9 и GFP (Addgene plasmid, 48138) в целевые клетки осуществлялась с использованием Липофектамина 3000 (Thermo, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Через 24 ч после трансфекции GFP-позитивные клетки отбиралась на клеточном сортере FACS ARIA (BD, США) и культивировались в 96-луночных планшетах для образования колоний. После двух недель культивирования производился пересев. Для этого клетки промывались 100 мкл раствора версена, после чего производилась 5-минутная инкубация в 50 мкл 0,35 % трипсина. По истечении времени инкубации в каждую лунку было добавлено по 350 мкл среды и после тщательного пипетирования, 200 мкл клеточной суспензии переносилось во второй 96-луночный планшет.

После достижения монослоя клетки в одном планшете использовались для оценки наличия инсерций и делеций в целевом сайте, в то время как второй планшет служил для наращивания клонов. Для выделения ДНК среда из лунок удалялась и клетки промывались 100 мкл PBS. Затем на клетки было нанесено 10 мкл лизирующего раствора (17 мкМ SDS, 500 нг/мкл протеиназы K) с последующей двухчасовой инкубацией при 55 °C и пятнадцатиминутной инактивацией при 98 °C.

ПЦР-смесь для оценки наличия мутаций в целевом гене содержала 25 мкл мастер-микса БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×) (БиоЛабМикс, Россия), 5 мкл ДНК, по 2 мкл праймеров и 16 мкл ddH₂O. Амплификация проводилась в следующих условиях: 95 °С – 5 мин, 40 циклов: 95 °С – 30 с, 62 °С – 1 мин, 72 °С – 45 с. Праймеры, использованные для каждого из генов, приведены в таблице 2.1. Детекция фрагментов осуществлялась с помощью электрофореза в 4 % агарозном геле. В качестве субклонов для дальнейшего анализа были выбраны образцы, гетерозиготные по делеции и дупликации в целевом регионе. Для каждого нокаутированного гена было выбрано по одному субклону.

Определение нуклеотидной последовательности внесенных мутаций.

Последовательность фрагментов гена, содержащих мутации, была установлена с помощью таргетного секвенирования нового поколения. Для этого с помощью олигонуклеотидных праймеров (таблица 2) были амплифицированы участки ДНК, фланкирующие сайты внесения двунитевых разрывов ДНК системой CRISPR/Cas9. Полученные ампликоны были использованы для создания библиотеки с использованием набора Nextera XT (Illumina, США), после чего с помощью набора секвенирующих реагентов MiSeq Reagent Nano Kit v2 kit (Illumina, США) было проведено секвенирование нового поколения на приборе MiSeq (Illumina, США). Все манипуляции были проведены в соответствии с протоколами производителя. Картирование полученных ридов на исходную нуклеотидную последовательность ампликонов было проведено на базе геномной сборки hg38.

2.1.2 Создание клеточных линий HeLa со сверхэкспрессией генов *ADAMTS1* и *THBS1*

Сверхэкспрессия изучаемых генов обеспечивалась методом временной трансфекции (transient transfection) плазмид, несущих кодирующие последовательности генов *ADAMTS1* и *THBS1* в клетки HeLa.

Плазида *ADAMTS1_pCSdest*, кодирующая ген *ADAMTS1* была любезно предоставлена Roger Reeves (Addgene plasmid, 53807) [186], в то время как плазида *THBS1_pcDNA3.1* была получена самостоятельно с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Медицинская геномика” Томского НИМЦ.

В первую очередь для создания плазмиды *THBS1_pcDNA3.1* была получена кодирующая последовательность гена *THBS1*. Для этого РНК, выделенная из клеток HeLa с помощью реагента «Лира» для выделения РНК, ДНК и белков (Биолабмикс, Россия), была конвертирована в кДНК с использованием набора реактивов для обратной транскрипции ОТ М-MuLV –RH (Биолабмикс, Россия). Полученная кДНК послужила

матрицей для реакции ПЦР длинных фрагментов с использованием ДНК-полимеразы высокой точности Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Англия). Прямой (5'-ACAGTGGCGGCCGCTCGAGCCACCATGGGGCTGGCCTGGG-3') и обратный (5'-AGCGGGTTTAAACGGGCCTTAGGGATCTCTACATTCGTATTTTCAGG-3') праймеры для проведения ПЦР длинных фрагментов были синтезированы в ООО «Биосет» (Россия).

Полученная кодирующая последовательность гена *THBS1* (3649 п.н.) была интегрирована в плазмидный вектор pcDNA3.1 (5412 п.н.). Поскольку фрагмент кодирующей последовательности гена не всегда встраивается в нужной ориентации, на следующем этапе работы было проведено встраивание плазмид в бактериальные клетки для наращивания биомассы и отбора рекомбинантных плазмид нужной конфигурации. Трансформация компетентных клеток (входят в состав набора) была проведена с помощью набора Gibson Assembly® Cloning Kit (NEB, Англия). Бактерии выращивались в среде LB (ПанЭко, Россия) с добавлением ампициллина, поскольку pcDNA3.1 кодирует ген устойчивости к данному антибиотику. Выделение плазмидной ДНК было проведено с использованием набора для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток (Биолабмикс, Россия). Для контроля правильной сборки плазмиды были проведены реакция рестрикции ферментом BsmBI (NEB, Англия) и секвенирование нуклеотидной последовательности плазмиды с помощью NGS. Рекомбинантная плаزمида THBS1_pcDNA3.1 (8939 п.н.) имеет 3 сайта рестрикции ферментом BsmBI, с ожидаемыми длинами фрагментов 820, 27, 935 и 7157 п.н. Для разделения фрагментов проводили электрофорез в 1%-агарозном геле. Лишь одна плазмиды из 10 проверенных демонстрировала фрагменты нужной длины после рестрикции. Последовательность данной плазмиды была секвенирована с помощью NGS (среднее покрытие 1072, 9 прочтений на нуклеотид). Все описанные выше методики выполнялись по протоколам производителей реактивов, использованных в работе.

2.2 Воздействие ионизирующим излучением

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 *THBS1*), и в дозе 2 Гр (для анализа фокусов белков репарации ДНК и проведения микроядерного теста) при комнатной температуре. Мощность дозы в обоих случаях составила 1 Гр/мин. Облучение проводили на базе Томского областного онкологического диспансера. Транспортировку клеток осуществляли на льду.

Образцы цельной крови, полученные от здоровых индивидов, подвергали воздействию ионизирующего γ -излучения ^{60}Co на гамма-терапевтической установке “Theratron Equinox 100” (Best Theratronics, Канада) в дозе 2 Гр с мощностью дозы 1 Гр/мин (для проведения микроядерного теста) при комнатной температуре. Облучение было проведено на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ, транспортировка образцов крови осуществлялась на льду.

2.3 Анализ клональной выживаемости

Исходную клеточную линию HeLa и линии с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1* культивировали в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C в условиях 5% CO_2 . Для оценки способности клеток к образованию колоний клеточные культуры растили во флаконах Т-25 (TPP, Швейцария) в течение 2 пассажей до 70% площади покрытия, после чего производили пересев в 6-луночные планшеты (TPP, Швейцария) в количестве $0,6 \times 10^6$ клеток/мл. Затем клетки подвергали воздействию γ -излучения, после которого клетки снимали трипсином с последующим подсчётом и посевом в новые 6-луночные планшеты. Далее клеточные линии культивировали в CO_2 -инкубаторе (Panasonic, Япония) при 37°C со сменой среды каждые 3 суток. По истечении 2 недель колонии фиксировали метанол-уксусным фиксатором (3:1) с последующей инкубацией с красителем Гимза (ПанЭко, Россия). Число колоний оценивали визуально, после чего по следующей формуле вычисляли эффективность посева (ЭП):

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

После облучения исходной клеточной линии HeLa и клеточных линий с нокаутом генов 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.

2.4 Оценка уровня фокусов белков репарации ДНК

Наиболее чувствительными современными методами для оценки эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК являются анализ уровня фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК (γ H2AX и 53BP1) и микроядерный тест в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) с панцентромерными ДНК-зондами [187].

Методика работы с клеточными линиями. 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 после облучения клетки фиксировали в течение 20 мин при 4°C в растворе 3% параформальдегида (Sigma, США). После фиксации покровные стекла с клетками инкубировали в 0,2 % 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 % FBS в течение 30 мин при 4°C. Затем на покровные стекла наносили 100 мкл раствора первичных антител: моноклональных антител мыши к белку γ H2AX (Novus Biologicals, США) и поликлональных антител кролика к белку 53BP1 (Novus Biologicals, США), разведенных в 3 % 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% 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 (MetaSystems, 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 [188], и в дальнейшем анализе вместо среднего числа фокусов использовали λ из распределения Пуассона.

Методика работы с лимфоцитами здоровых индивидов. Для оценки уровня фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК было проведено центрифугирование цельной крови в градиенте фиколл-верографина ($\rho = 1,077$) (ПанЭко, Россия) после чего лимфоцитарный слой был отобран для изготовления препаратов. Суспензия лимфоцитов наносилась на предметные стекла, покрытые полилизинном (Menzel, Германия). Затем полученные препараты накрывались покровными стеклами и инкубировались в течение 10 минут для прикрепления клеток. После удаления покровных стекол была проведена фиксация препаратов в 3 % параформальдегиде в PBS в течение 20 минут при 4 °C. Затем раствор параформальдегида был заменен на PBS и в таком виде препараты хранились до проведения процедуры иммуноокрашивания при 4°C.

Пермеабиллизация клеток была проведена в 0,2 % Triton X-100 (Sigma, США) в течение 10 минут при 4 °C, после чего препараты отмывались в трех сменах PBS по 5 минут. Затем следовала 30-минутная инкубация в 3 % FBS (HyClone, США) при 4 °C.

Для иммуноокрашивания были использованы первичные моноклональные антитела мыши к белку γ H2AX (1:400, #NB100-78356, Novus Biologicals, Канада) и поликлональные антитела кролика к белку 53BP1 (1:400, #NB100-304, Novus Biologicals, Канада). 50 мкл раствора первичных антител в 3 % FBS были нанесены на предметные стекла в концентрации 1:400 с последующей инкубацией во влажной камере в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки в трех сменах PBS по 5 мин была проведена инкубация с вторичными антителами в темной камере в течение 1 ч. В качестве вторичных антител были использованы антитела козы к иммуноглобулинам кролика (Novus, Канада), конъюгированные с флуоресцеин изотиоционатом (FITC), и антитела козы к иммуноглобулинам мыши (Novus, Канада), конъюгированные с родамином. После отмывки в трех сменах PBS по 5 мин на препараты наносили среду Vectashield (VectorLabs, США), содержащую DAPI, накрывали покровными стеклами и хранили в темноте при 4°C до микроскопирования.

Визуализация и подсчет фокусов был проведен аналогичным образом, как и в случае экспериментов на клеточных линиях.

2.5 Микроядерный тест

Методика работы с клеточными линиями. Через 24 часа 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.

Для оценки частоты микроядер для каждой клеточной линии было подготовлено по 2 флакона Т-25 (TPP, Швейцария), содержащих 1×10^6 клеток. После облучения была проведена смена питательной среды, после чего флаконы с клеточными культурами были перенесены в CO₂-инкубатор на 24 часа при 37°C. По истечении 24 часов клетки фиксировали с использованием метанол-уксусного фиксатора (3:1).

Препараты микроядер были изготовлены путём раскапывания на предметные стекла 20 мкл полученной клеточной суспензии с последующим заключением в среду Vectashield, содержащую краситель DAPI (VectorLab, США), под покровные стекла. Частоту микроядер оценивали 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 клетках. К микроядрам были отнесены структуры округлой или овальной формы с гладким непрерывным краем, не превышающие 1/3 размера ядра, лежащие вблизи ядра отдельно от него.

Методика работы с лимфоцитами здоровых индивидов. Образцы крови после облучения, а также необлученный контроль, культивировали при температуре 37°C в питательной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, USA) и 200 мкл фитогемагглютинаина (ФГА) (ПанЭко, Россия) для стимуляции деления лимфоцитов. Через 44 часа в культуру клеток был добавлен цитокинез-блокирующий агент цитохалазин В (Sigma, США) до конечной концентрации 5 мкг/мл (Fenech, 2006). На 72-м часу культивирования была проведена процедура фиксации с помощью раствора метанол-уксусная кислота (3:1). Далее, полученные препараты двухъядерных лимфоцитов были использованы для проведения микроядерного теста в комбинации с флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) с панцентромерными ДНК-зондами по протоколу, описанному нами ранее [189].

2.6 Анализ экспрессионного профиля генов на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1* с помощью микроматричного анализа

2.6.1 Выделение РНК для микрочипового исследования

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 минут при 37°C. По истечении 30 минут из флаконов с клеточными линиями удаляли среду для культивирования, проводили отмывку в фосфатном буфере (1×PBS) и приступали к выделению РНК с использованием реагента «Ли́ра» для выделения РНК, ДНК и белков (Биолабмикс, Россия) по протоколу, рекомендованному производителем. Основные этапы работы представлены ниже.

Подготовка образца. После удаления среды для культивирования и отмывки в растворе PBS образцы лизировали в течение 15 минут в реагенте «Ли́ра» из расчёта 1 мл «Ли́ры» на 1 млн. клеток. Полученную смесь перемешивали пипетированием и переносили в чистые пробирки.

Разделение фаз и выделение РНК. К полученной смеси добавляли 1/5 объёма хлороформа от исходного объёма «Ли́ры» и перемешивали с помощью центрифуги-вортекс Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия) до образования однородной суспензии. После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре проводили центрифугирование со скоростью 10000 об./мин в течение 10 мин при 4 °C. После центрифугирования смесь разделялась на три фазы. Половину объёма водной фазы, содержащей РНК, переносили в чистые пробирки и добавляли 3М ацетат натрия до конечной концентрации 0,3-0,6 М для увеличения выхода и улучшения качества РНК. Затем, к водной фазе добавляли равный объём изопропанола, охлаждённого до -20 °C и после аккуратного перемешивания переворачиванием пробирки инкубировали образцы в течение 10 мин при -20 °C. После центрифугирования в течение 10 мин при 12000 g и 4 °C полностью отбирали супернатант и добавляли к осадку 70%-этанол в количестве 1-1,5 объёма от объёма водной фазы. Далее аккуратно перемешивали образцы, переворачивая пробирку, и повторяли центрифугирование при 12000 g и 4 °C в течение 5 мин. После полного удаления супернатанта осадок сушили на воздухе в течение 10-15 мин, добавляли 1 мкл ингибитора РНКаз «RiboLock» (Thermo Fisher Scientific, США) и водой, очищенной от РНКаз, доводили объём до 40 мкл. Далее растворы инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 мин, перемешивали на вортексе 3-5 с и измеряли концентрацию РНК с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Nanodrop, США). Хранение РНК обеспечивалось при температуре -70°C.

2.6.2 Очистка и анализ качества выделенной РНК

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).

Очистка образцов РНК была произведена по стандартному протоколу производителя. Образец с выделенной РНК доводили до объема 100 мкл водой, очищенной от РНКаз, добавляли 350 мкл буфера RLT и тщательно пипетировали. Затем добавляли 250 мкл этанола (96-100%), переносили образец (700 мкл) в колонку, помещенную в пробирку (2 мл), и центрифугировали 15 с при 8000 g. После этого всю жидкость из пробирки удаляли. На следующем этапе в колонку с суспензией РНК добавляли 500 мкл буфера RPE и центрифугировали при тех же условиях. Затем вновь добавляли 500 мкл буфера RPE и центрифугировали 2 мин при 8000 g. Для очистки от этанола мембрану колонки тщательно высушивали путём центрифугирования в течение 1 мин. Колонку с суспензией РНК переносили в новую пробирку типа эппендорф (1,5 мл), добавляли 50 мкл воды, очищенной от РНКаз, на мембрану колонки, и центрифугировали 1 мин при 8000 g для элюции РНК.

Оценка качества выделенной и очищенной РНК была произведена с помощью биоанализатора Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Особенность данного метода заключается в автоматическом направленном разделении нуклеиновых кислот под действием электромагнитного поля. Детекция осуществляется посредством фотоэмиссии. Для оценки качества РНК использовали параметр RIN (RNA Integrity Number – показатель целостности РНК). Оценку качества РНК осуществляли по стандартному протоколу производителя. Анализ данных производили в программе 2100 Expert (Agilent Technologies, США). Все образцы РНК имели RIN 9-10.

2.6.3 Микроматричный анализ экспрессии генов на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1*

Полученная РНК была использована для оценки экспрессии генов в исходной клеточной линии HeLa и в клеточных линиях с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1* до облучения и через 30 минут после воздействия γ -излучения в дозе 2 Гр. Мечение и гибридизация на экспрессионных микрочипах SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8×60K (Agilent Technologies, США) были проведены по протоколу, рекомендованному производителем (версия 6.9.1 от декабря 2015 года).

2.7 Анализ экспрессионного профиля генов на фоне дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* с помощью количественной ПЦР в реальном времени

Анализ экспрессии генов с помощью ПЦР в реальном времени использовался для:

- а.* оценки уровня экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* в клеточных линиях на фоне нокаута и сверхэкспрессии изучаемых генов;
- б.* верификации данных, полученных в результате полнотранскриптомного анализа для некоторых дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ);
- в.* оценки уровня экспрессии ДЭГ в клеточных линиях на фоне сверхэкспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1*;
- г.* оценки уровня экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* в лимфоцитах здоровых индивидов.

2.7.1 Выделение РНК для проведения ПЦР в реальном времени

Подготовка образцов для последующего выделения РНК с помощью реагента «Лира» была проведена по протоколам, представленным ниже:

а. Подготовка клеточных линий. После удаления среды для культивирования и отмывки в растворе PBS, образцы лизировали в течение 15 мин в реагенте «Лира» из расчёта 1 мл «Лир» на 1 млн. клеток. Полученную смесь перемешивали пипетированием и переносили в чистые пробирки.

б. Подготовка образцов цельной крови. Немедленно после забора 4 мл цельной крови центрифугировали в течение 5 мин при 4 °C и 10000 g в водном растворе для лизиса эритроцитов (155 мМ NH₄Cl, 12 мМ NaHCO₃, 0,1 мМ ЭДТА-Na₂ на 1 литр) с последующей отмывкой в фосфатно-солевом буфере (1× PBS). Полученный клеточный осадок был ресуспендирован в 4 мл реагента «Лира» (Биолабмикс, Россия), после чего проводили инкубацию в течение 15 мин.

Дальнейшие этапы выделения РНК одинаковы для клеточных линий и лимфоцитов периферической крови и описаны более подробно в главе 2.6.1 «Выделение РНК для микрочипового исследования», начиная с процедуры разделения фаз. Для определения концентрации и качества полученных образцов РНК использовали оптического волоконный спектрофотометр NanoDrop ND-1000 (США).

2.7.2 Обратная транскрипция

Обратная транскрипция была проведена с помощью набора реактивов ОТ М-MuLV –РН (Биолабмикс, Россия). В стерильных, свободных от нуклеаз пробирках во льду смешивали по 1000 нг РНК-матрицы, 1 мкл Олиго(dT) праймера и 0,5 мкл ингибитора РНКаз «RiboLock» (Thermo Fisher Scientific, США). При необходимости объем реакционной смеси доводили водой, свободной от РНКаз, до 12 мкл. После аккуратного перемешивания смесь подогревали для расплавления вторичных структур 3 мин при 70 °С в амплификаторе T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Великобритания) и убирали пробирки в лёд. Во время нагревания была приготовлена реакционная смесь, содержащая в расчёте на один образец 4 мкл 5×реакционного буфера, 2 мкл 0,1М ДТТ, 1 мкл 10 мМ смеси dNTP и 1 мкл М-MuLV –РН ревертазы (100 ед./мкл). В пробирки, содержащие РНК-матрицы, после нагревания добавляли по 8 мкл реакционной смеси и после аккуратного перемешивания инкубировали в течение 60 мин при 42 °С для синтеза кДНК в амплификаторе T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Великобритания). Останавливали реакцию нагреванием реакционной смеси до 70 °С в течение 10 мин. Продукт реакции обратной транскрипции хранился при -20 °С.

Для анализа экспрессии генов в клеточных линиях на фоне сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* перед проведением реакции обратной транскрипции образцы РНК были обработаны ферментом ДНКазой (Thermo, США) для исключения плазмидной контаминации образцов РНК.

2.7.3 Разработка олигонуклеотидных праймеров

Начальным этапом при подготовке к проведению ПЦР является подбор праймеров к целевому гену, а также выбор референсного гена и подбор праймеров к нему. В качестве референсных генов для оценки экспрессии использовали ген домашнего хозяйства *RPS18* (Таблица 2.2). Ген *RPS18* кодирует субъединицу рибосомы S18, соответственно, является одним из важнейших составляющих клеточного аппарата трансляции. Уровень экспрессии каждого целевого гена оценивали относительно уровня экспрессии референсного гена, рассчитывая показатель $\Delta\Delta C_t$ [190]. Праймеры высокой степени очистки для целевых генов и референсного гена *RPS18* (таблица 2.2) были синтезированы в ООО «Биоссет» (Россия).

Таблица 2.2. Последовательности праймеров для оценки экспрессии генов с помощью ПЦР в реальном времени.

Наименование	Последовательность праймеров
<i>ADAMTS1-F</i>	5'-ACATGATGGCGTCAATGC-3'
<i>ADAMTS1-R</i>	5'-ATCAAACATTCCCCATGACC-3'
<i>THBS1-F</i>	5'-CCAATGCCACAGTTCCTGA-3'
<i>THBS1-R</i>	5'-TTGCCACAGCTCGTAGAACA-3'
<i>RPS18-F</i>	5'-GAGGATGAGGTGGAACGTGT-3'
<i>RPS18-R</i>	5'-GGCTAGGACCTGGCTGTATTT-3'
<i>SEPP1-F</i>	5'-ACTGCTCTCTCACGACTCTC-3'
<i>SEPP1-R</i>	5'-TGGTAATGAGGCGATGGAGT-3'
<i>LXN-F</i>	5'-GAGGATATTCCAGGAAGAGGACA-3'
<i>LXN-R</i>	5'-TTCTTGTCCCGTTGAAGGGT-3'
<i>EPB41L3-F</i>	5'-GACCCTTGCCCAACTATCTGA -3'
<i>EPB41L3-R</i>	5'-ACACGATGTCATCTCGCAAC -3'
<i>ALPK2-F</i>	5'-CCATAGCCCAAGTGCAGAGA-3'
<i>ALPK2-R</i>	5'-TTCCGTAGCTGCTGTTCTTGATGC-3'

Подбор праймеров на целевые гены осуществлялся с помощью базы данных NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Проверка выбранных праймеров на комплементарность другим участкам генома была проведена с помощью программы Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Проверка на наличие димеров и шпилек осуществлялась с помощью программы VectorNTI Advance®11.5.4 (Invitrogen, США). При подборе праймеров учитывались следующие условия:

1. Длина праймера – 18-23 п.н.
2. Размер продукта – 70-120 п.н.
3. Температура плавления (T_m) – 58-60°C, причем T_m праймеров, работающих в паре, отличалась не более, чем на 2°C.
4. Содержание C/G – 40-60%.
5. Четыре и более 3'-концевых нуклеотида не были комплементарны самому праймеру и праймеру в паре.
6. Отсутствовали четыре и более подряд расположенных одинаковых нуклеотида.
7. Один из праймеров должен связываться с кДНК-матрицей на стыке двух экзонов.

2.7.4 Проверка эффективности праймеров

Для оценки специфичности подобранных праймеров была проведена ПЦР в реальном времени с использованием РНК- и кДНК-матриц, а также отрицательного

контроля (деионизованная вода). РНК и кДНК для отработки были получены из интактной клеточной линии HeLa. Лиофилизированные праймеры были растворены в деионизованной воде до концентрации 100 мкмоль/л, а затем до 1 мкмоль/л для получения рабочей концентрации растворов праймеров. Затем праймеры были раскапаны в 96-луночный планшет по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров на один образец. Каждый праймер занимал по три лунки в планшете. Далее в двух пробирках смешивали из расчёта на один образец по 12,5 мкл буфера для проведения количественной ПЦР в реальном времени БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) (Биолабмикс, Россия), 1 мкл кДНК или РНК и доводили объём до 20 мкл деионизованной водой. Для отрицательного контроля смешивали только 12,5 мкл буфера для проведения количественной ПЦР в реальном времени БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) (Биолабмикс, Россия) и 7,5 мкл деионизованной воды. Затем в 96-луночный планшет с праймерами добавляли по 20 мкл смеси. Таким образом, для каждого праймера была проведена ПЦР в реальном времени с РНК, кДНК и отрицательным контролем.

Все манипуляции проводили на льду. Планшет накрывали оптически прозрачной пленкой Microseal 'B' Adhesive Sealing Films (Bio-Rad, Великобритания). Центрифугировали планшет в центрифуге Concentrator (Eppendorf, США) в течение 1 мин со скоростью 1000 об./мин. Проводили ПЦР в режиме реального времени в амплификаторе AriaMx (Agilent Technologies, США). В результате выполнения данного этапа работы были получены специфичные ПЦР-продукты для всех тестируемых пар праймеров.

2.7.5 Проведение ПЦР в реальном времени

Для каждого образца было проведено три повторности ПЦР в реальном времени с каждой из указанных выше пар праймеров. Постановка реакции проходила аналогично таковой при оценке эффективности праймеров. Сначала в 96-луночный планшет раскапывали по 2,5 мкл прямого и обратного рабочих растворов праймеров, а затем к ним добавляли по 20 мкл смеси, содержащей 12,5 мкл буфера для проведения количественной ПЦР в реальном времени БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) (Биолабмикс, Россия), 6,5 мкл деионизованной воды и 1 мкл соответствующего образца кДНК. Все манипуляции были проведены на льду. Затем планшет накрывали оптически прозрачной пленкой Microseal 'B' Adhesive Sealing Films (Bio-Rad, Великобритания). Центрифугировали планшет в центрифуге Concentrator (Eppendorf, США) в течение 1 мин со скоростью

1000 об./мин. Проводили ПЦР в режиме реального времени в амплификаторе AriaMx (Agilent Technologies, США).

2.8 Статистический анализ данных

Статистический анализ данных, полученных в радиобиологических экспериментах на клеточных линиях, был проведен с помощью t-критерия Стьюдента в программном пакете Statistica 8.0 (Statsoft, США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Числовые данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение.

Статистическая обработка результатов полнотранскриптомного экспрессионного анализа была проведена с помощью программной среды для статистического анализа R с использованием программы limma от Bioconductor на log2-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 2 раза по сравнению с исходной линией HeLa, и списки генов, полученных после применения поправки на множественность сравнения Бенджамини-Хохберга ($FDR < 0,05$). Кроме того, с помощью инструмента STRING [191] для дифференциально-экспрессирующихся генов были построены сети функциональных взаимодействий на уровне белков.

Проверка распределения в экспериментах на лимфоцитах периферической крови человека на соответствие с нормальным законом, была проведена с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение изучаемых величин отличалось от нормального закона, для корреляционного анализа использовали непараметрический критерия Спирмана. Сравнение частоты микроядер в облученных и необлученных клетках производили с помощью критерия Вилкоксона.

Проведение данного исследования было одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. 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» (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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика клеточных линий с дифференциальной экспрессией генов *ADAMTS1* и *THBS1*

Проведение экспериментов на модельных системах дает возможность выявления причинно-следственных связей между нарушениями экспрессии отдельных генов и изменением радиочувствительности клеток в целом и эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК в частности. В качестве модельных систем в настоящей работе выступают клеточные линии HeLa с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1*, созданные с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9, и клеточные линии HeLa с транзientной экспрессией изучаемых генов, обеспеченной с помощью трансфекции плазмид, несущих кодирующие последовательности *ADAMTS1* и *THBS1*.

3.1.1. Характеристика клеточных линий с нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1*

Для идентификации и описания мутаций, внесенных в гены *ADAMTS1* и *THBS1* системой редактирования генома CRISPR/Cas9, было проведено таргетное секвенирование нового поколения (NGS). Установлено, что обе клеточные линии являются компаундными гетерозиготами по разным мутациям. Так, в экзон 2 гена *ADAMTS1* было внесено две делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания (Рисунок 3.1).

ADAMTS1

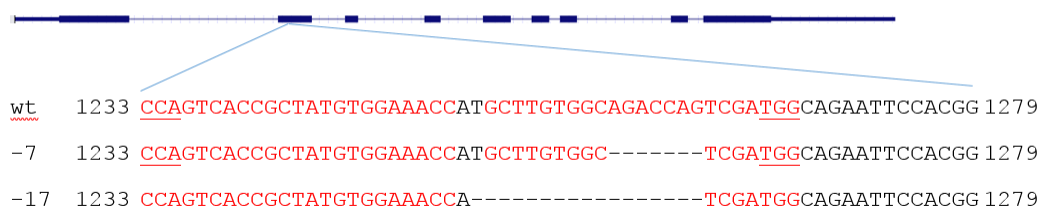


Рисунок 3.1 – Делеции в экзоне 2 гена *ADAMTS1*, внесенные с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. wt – референсная последовательность; красным шрифтом выделены последовательности химерных направляющих РНК, подчеркнуты участки мотива, смежного с протоспейсером (protospacer adjacent motif, PAM).

Анализ функциональной значимости с помощью инструмента MutationTaster [192], показал, что введенные делеции приводят к значительному укорочению белкового продукта гена *ADAMTS1* в результате преждевременного появления стоп-кодона.

Мутации в гене *THBS1* затрагивали экзон 3 (Рисунок 3.2). Так, один из аллелей характеризовался делецией нуклеотида, приводящей к сдвигу рамки считывания на протяжении 37 п.н., 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 п.н., что приводило к потере тех же 13 аминокислотных остатков в конечном белковом продукте (45,2 % прочтений).

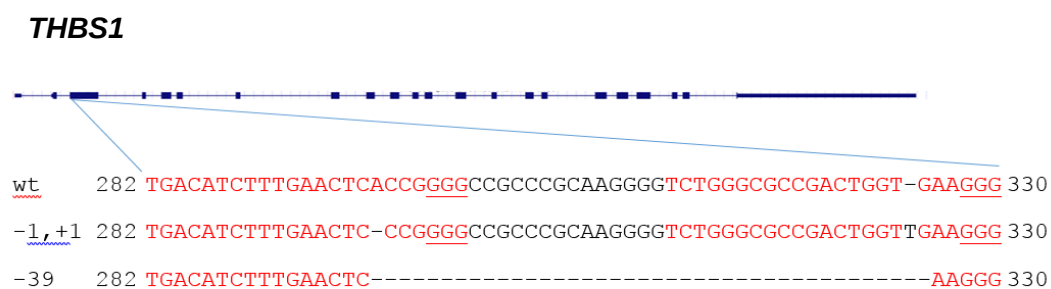


Рисунок 3.2 – Мутации в экзоне 3 гена *THBS1*, внесенные с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. wt – референсная последовательность; красным шрифтом выделены последовательности химерных направляющих РНК, подчеркнуты участки мотива, смежного с протоспейсером (protospacer adjacent motif, PAM).

Анализ мутаций в гене *THBS1* с помощью ресурса MutationTaster [192] показал прогнозируемую потерю домена, связывающего гепарин, а также возможную потерю функций остальных доменов вследствие изменения сайта сплайсинга.

Таким образом, были получены клеточные линии HeLa с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1*. Мутация сдвига рамки считывания в гене *ADAMTS1* с высокой долей вероятности приводит к полной потере функции белкового продукта. Мутации в гене *THBS1* не приводили к сдвигу рамки считывания на протяжении всего транскрипта, однако были достаточно протяженными, чтобы приводить к существенным изменениям функции кодируемого белка.

3.1.2. Характеристика плазмидных векторов для обеспечения сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*

Сверхэкспрессия изучаемых генов обеспечивалась методом транзientной трансфекции в клетки HeLa плазмид, несущих кодирующие последовательности генов *ADAMTS1* (плазида ADAMTS1_pCSdest, Addgene plasmid #53807) и *THBS1* (плазида THBS1_pcDNA3.1, получена самостоятельно). Трансфекция генетических конструкций осуществлялась в исходную клеточную линию HeLa для обеспечения сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*, и в клеточные линии с нокаутом соответствующих генов, для оценки возможности нормализации фенотипа после восстановления экспрессии.

Возможность использования созданной генетической конструкции THBS1_pcDNA3.1 для обеспечения сверхэкспрессии *THBS1* была оценена с помощью секвенирования нового поколения (NGS). Было установлено, что плазида THBS1_pcDNA3.1 не содержит мутаций, которые могли бы повлиять на функцию белкового продукта *THBS1*, но характеризуется тремя однонуклеотидными заменами (SNP), локализованными в кодирующей последовательности изучаемого гена. Все выявленные SNP встречались у здоровых индивидов:

- 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 было верифицировано методом количественной ПЦР в реальном времени. Было показано, что экспрессия гена *ADAMTS1* в клеточной линии HeLa после трансфекции возрастала в 30 раз по сравнению с исходным уровнем экспрессии в интактной клеточной линии HeLa ($p < 0,05$), а после восстановления экспрессии в клеточной линии с нокаутом гена *ADAMTS1* – в 24 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 3.3 А). Экспрессия гена *THBS1* в клеточной линии HeLa после трансфекции возрастала в 32 раза по сравнению с интактной HeLa ($p < 0,05$), а после восстановления экспрессии в клеточной линии с нокаутом гена *THBS1* – в 163 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 3.3 Б).

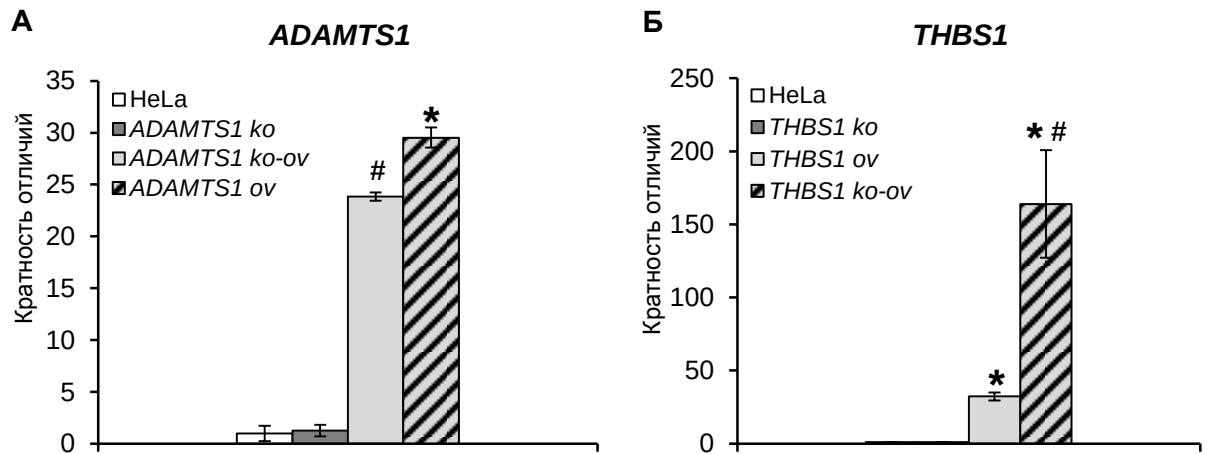


Рисунок 3.3 – Подтверждение возрастания экспрессии генов *ADAMTS1* (А) и *THBS1* (Б) после трансфекции с помощью количественной ПЦР в реальном времени. ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом; * – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa, $p < 0,05$; # – статистически значимые различия по сравнению с клеточной линией HeLa с нокаутом гена, $p < 0,05$.

Таким образом, трансфекция клеточной линии HeLa плазмидами, несущими кодирующие последовательности генов *ADAMTS1* и *THBS1*, обеспечивала сверхэкспрессию изучаемых генов.

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

3.2.1. 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). Оценка эффективности посева и клональной выживаемости требует длительного культивирования клеток, что делает невозможным проведение анализа в клеточных линиях, временно экспрессирующих целевые гены. Ввиду данного ограничения, способность клеток к формированию колоний оценивалась исключительно в клеточных линиях с нокаутом гена. Так, было 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 3.4 А).

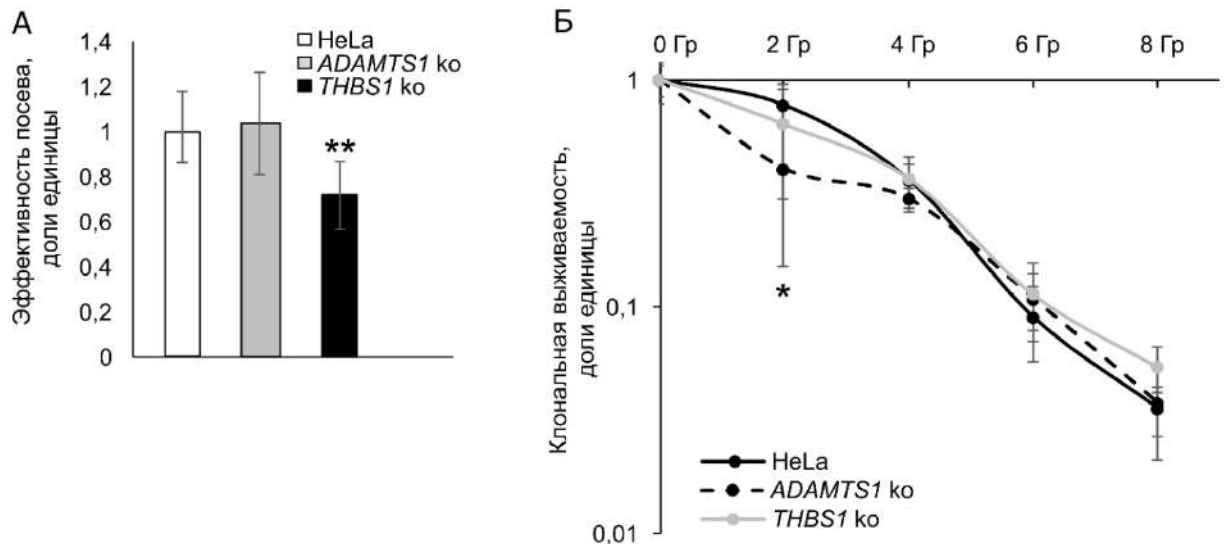


Рисунок 3.4 – Эффективность посева в необлученных клетках (А) и клональная выживаемость клеточной линии HeLa с нокаутом генов *ADAMTS1* и *THBS1* после облучения в диапазоне доз 2-8 Гр (Б); */** – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa, $p < 0,05$ / $p < 0,001$. ko – нокаут гена.

Статистически значимые различия в клональной выживаемости наблюдались только после облучения в дозе 2 Гр (Рисунок 3.4 Б). Возможно, отсутствие отличий после облучения в дозах 4-8 Гр может быть связано с тем, что при воздействии большими дозами излучения 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 3.5).

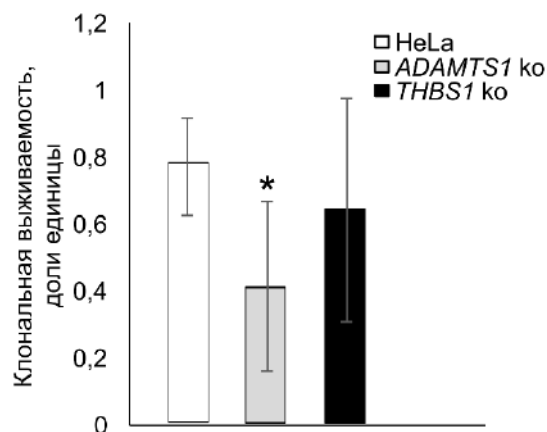


Рисунок 3.5 – Клональная выживаемость после облучения в дозе 2 Гр; ko –нокаут гена.

* – статистически значимые различия по сравнению с интактной 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 гена *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 клеток и клеток после воздействия ионизирующим излучением. Так, нокаут гена *THBS1* приводил к снижению базовой выживаемости клеток HeLa до облучения. Этот факт косвенно подтверждает данные литературы, согласно которым низкая экспрессия *THBS1* в опухолевых клетках *in vivo* коррелирует с наиболее благоприятным прогнозом для пациентов с плоскоклеточным раком клеток пищевода [193]. В то же время, в ряде исследований сообщается, что снижение экспрессии *THBS1* в опухолевых тканях при инвазивной карциноме шейки матки и карциноме полости рта [147], аденокарциноме поджелудочной железы [194] и карциноме легких [195] коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациентов. Таким образом, по-видимому, экспрессия *THBS1* влияет на выживаемость различных типов клеток неодинаково.

Снижение клональной выживаемости после облучения на фоне нокаута *ADAMTS1* свидетельствует о вовлеченности продукта данного гена в формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа. В исследовании Oller J. с коллегами было показано, что нокаут *Adamts1* приводит к активации киназы Akt, транскрипционного фактора NF-κB и синтазы оксида азота Nos2 в культивируемых гладкомышечных клетках сосудов мышей [196]. Интересно, что NF-κB – один из ключевых транскрипционных факторов, активирующийся в клетках в ответ на воздействие ионизирующего излучения [114]. Поэтому, возможно, влияние нокаута *ADAMTS1* на выживаемость клеток после воздействия ионизирующего излучения может быть связано с активацией NF-κB.

3.2.2. Влияние нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* на уровень фокусов белков репарации ДНК

Анализ уровня фокусов белков репарации ДНК γH2AX и 53BP1 является одним из наиболее чувствительных современных методов для оценки эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК. Изменения экспрессии гена *ADAMTS1* не приводили к статистически значимым различиям в уровне фокусов белков γH2AX и 53BP1 до облучения (Рисунок 3.6 А), однако после воздействия γ-излучением в дозе 2 Гр уровень фокусов γH2AX возрастал на фоне сверхэкспрессии *ADAMTS1* на уровне тенденции (Рисунок 3.6 Б).

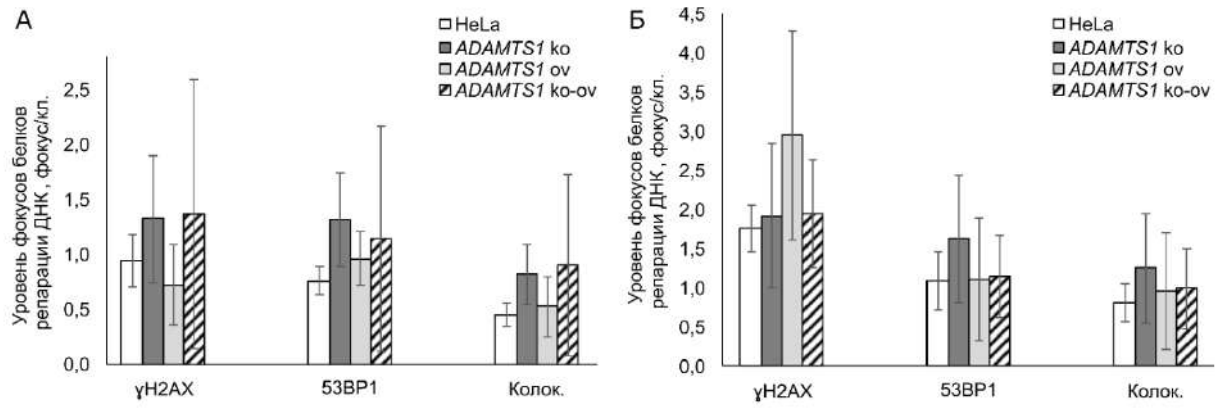


Рисунок 3.6 – Уровень фокусов белков репарации γ H2AX и 53BP1 на фоне нокаута и сверхэкспрессии гена *ADAMTS1* в необлученных клетках (А) и после облучения в дозе 2 Гр (Б). ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом.

Однако, 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 $1,1 \pm 0,1$ ($p = 0,02$) и колокализованных фокусов 53BP1 и γ H2AX с $0,4 \pm 0,1$ до $0,7 \pm 0,1$ ($p = 0,03$) в необлученных клетках по сравнению с контрольной клеточной линией HeLa (Рисунок 3.7 А). После облучения уровень фокусов 53BP1, γ H2AX и колокализованных фокусов также возрастал в клеточной линии с транзиторной сверхэкспрессией *THBS1*, но статистически значимых различий не наблюдалось из-за высокой вариабельности результатов в данной клеточной линии (Рисунок 3.7 Б).

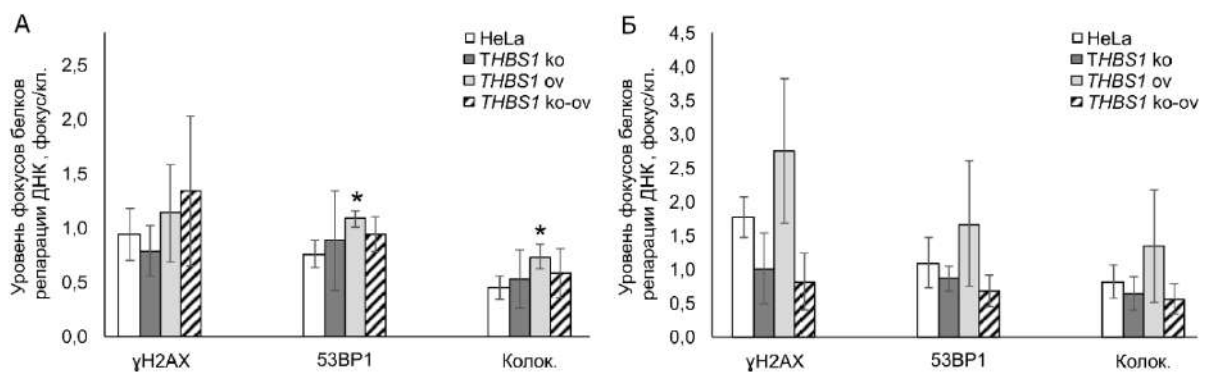


Рисунок 3.7 – Уровень фокусов белков репарации γ H2AX и 53BP1 на фоне нокаута и сверхэкспрессии гена *THBS1* в необлученных клетках (А) и после облучения в дозе 2 Гр (Б). ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом; * – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa, $p < 0,05$.

В наших предварительных исследованиях дифференциальная экспрессия генов *ADAMTS1* и *THBS1* была выявлена в лимфоцитах индивидов с различным уровнем эндогенных фокусов γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер, однако, было неясно, с каким из этих показателей коррелирует экспрессия генов. Полученные на клеточных линиях результаты свидетельствуют о том, что экспрессия изучаемых генов не связана с уровнем фокусов γ H2AX ни до, ни после облучения. Поскольку фосфорилирование гистона H2AX является наиболее ранним событием репарации двунитевых разрывов ДНК, необходимым для привлечения белков репарации к очагам повреждения, отсутствие отличий в уровне фокусов γ H2AX между контрольными и экспериментальными клеточными линиями свидетельствует в пользу того, что продукты генов *ADAMTS1* и *THBS1*, по-видимому, не связаны с процессом распознавания радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК. Однако, нельзя исключать возможность косвенного участия *ADAMTS1* и тромбоспондина-1 в репарации двунитевых разрывов ДНК, поскольку они могут проявлять свое действие на более поздних этапах данного процесса, не связанных с фосфорилированием гистона H2AX.

Интересно, что сверхэкспрессия гена *THBS1* в клеточной линии HeLa приводила к возрастанию уровня спонтанных фокусов 53BP1 ($p < 0,05$). Нокаут *THBS1* также приводил к возрастанию уровня спонтанных фокусов 53BP1, но на уровне тенденции (Рисунок 3.7). В то же время, как было показано ранее, клеточная линия с нокаутом *THBS1* характеризовалась снижением эффективности посева в необлученных клетках ($p < 0,001$) (Рисунок 3.4 А). Согласно данным литературы, в некоторых опухолевых клеточных линиях уровень эндогенных фокусов 53BP1 коррелирует с эффективностью посева ($R = -0,62$, $p < 0,05$) [197]. Если подобная негативная корреляция имеет место и в клеточной линии HeLa, то возможно предположить, что для нормального функционирования клеток экспрессия гена *THBS1* должна находиться в определенном диапазоне значений. Изменение уровня экспрессии в большую или меньшую сторону приводит к возрастанию уровня эндогенных фокусов 53BP1, что, в свою очередь, приводит к снижению эффективности посева в необлученных клетках.

3.2.3. Влияние нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* на частоту радиационно-индуцированных микроядер

Почти за 40 лет использования микроядерный тест стал одним из самых популярных и надежных методов оценки генотоксичности различных химических и физических факторов, включая радиационно-индуцированное повреждение ДНК. В рамках настоящего исследования было показано, что дифференциальная экспрессия гена

ADAMTS1 не приводила к изменению частоты микроядер до облучения (Рисунок 3.8 А), однако статистически значимые различия были выявлены после облучения в дозе 2 Гр. Так, 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 3.8 А). Примечательно, что трансфекция клеточной линии HeLa 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 интактной клеточной линии HeLa ($36,0 \pm 7,2 \%$) (Рисунок 3.8 А).

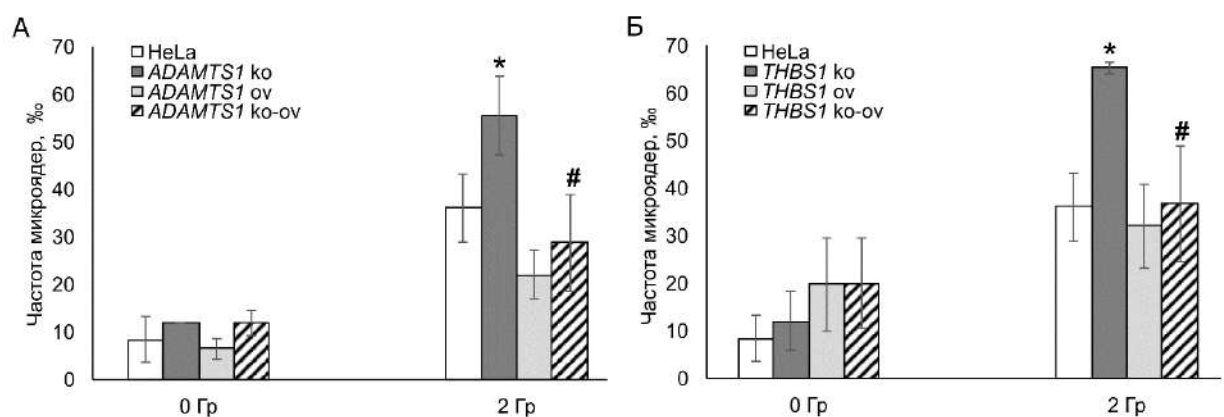


Рисунок 3.8 – Частота спонтанных и радиационно-индуцированных микроядер на фоне нокаута и сверхэкспрессии генов *ADAMTS1* (А) и *THBS1* (Б). ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом; * – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa, $p < 0,05$, # – статистически значимые различия по сравнению с клеточной линией HeLa с нокаутом гена, $p < 0,05$.

Изменения экспрессии гена *THBS1* не приводили к статистически значимым различиям частоты спонтанных микроядер, однако, как и в случае дифференциальной экспрессии *ADAMTS1*, эффекты нокаута *THBS1* наблюдались после облучения в дозе 2 Гр. Было показано, что клеточная линия с нокаутом *THBS1* характеризовалась возрастанием частоты радиационно-индуцированных микроядер с $36,0 \pm 7,2 \%$ в контроле до $65,3 \pm 1,2 \%$ ($p < 0,05$) (Рисунок 3.8 Б). Последующее восстановление экспрессии *THBS1* в клеточной линии с нокаутом гена путем трансфекции клеток плазмидой *THBS1*_pcDNA3.1 приводило к снижению частоты радиационно-индуцированных микроядер с $65,3 \pm 1,2 \%$ до $36,7 \pm 12,2 \%$ ($p < 0,05$) (Рисунок 3.8 Б).

Примечательно, что обеспечение сверхэкспрессии *ADAMTS1* или *THBS1* в нативной клеточной линии HeLa не приводило к возникновению статистически значимых различий в частоте радиационно-индуцированных микроядер (Рисунок 3.8). 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* (Рисунок 3.8). 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 нативной клеточной линии HeLa, так как превышение функционального диапазона экспрессии не влияет на степень выраженности клеточного ответа, и не приводит к еще большему снижению частоты микроядер.

К недостаткам использования системы редактирования генома CRISPR/Cas9 относят риск внесения нецелевых мутаций в геном объекта исследования, что затрудняет интерпретацию результатов экспериментов [198–202]. В данном исследовании не проводилось полногеномное секвенирование полученных клеточных линий HeLa с нокаутом *ADAMTS1* и *THBS1* с целью поиска нежелательных мутаций, внесенных системой CRISPR/Cas9. Однако полученные клеточные линии были трансфицированы плазмидами, несущими кодирующие последовательности генов *ADAMTS1* и *THBS1*. Нормализация фенотипа (снижение частоты микроядер до уровня исходной клеточной линии HeLa) в обеих нокаутных клеточных линиях после трансфекции свидетельствует в пользу того, что наблюдаемые эффекты обусловлены непосредственно дифференциальной экспрессией генов *ADAMTS1* и *THBS1*, а не потенциально возможными не выявленными мутациями в других регионах генома.

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что несмотря на отсутствие статистически значимых различий в уровне радиационно-индуцированных фокусов белков репарации γ H2AX, являющихся маркерами двунитевых разрывов ДНК, частота микроядер после облучения была повышена в обеих клеточных линиях с нокаутом генов.

Считается, что двунитевые разрывы ДНК предшествуют образованию большинства микроядер, поэтому, наблюдаемое повышение частоты радиационно-индуцированных микроядер в отсутствие возрастания уровня фокусов γ H2AX вызывает интерес. Согласно данным литературы, микроядра – это патологические структуры, образующиеся во время анафазы клеточного деления из ацентрических фрагментов хромосом или хроматид (центромеро-негативные микроядра), или в результате отставания целых хромосом (центромеро-позитивные микроядра). Отстающие ацентрические фрагменты хромосом или хроматид возникают в результате ошибок репарации ДНК или неполной репарации, в то время как отставание целых хромосом может быть обусловлено дефектами белков кинетохора или ошибками сборки кинетохора, гипометилирования повторяющихся последовательностей ДНК в центромерной и перичентромерной областях, а также дисфункции веретена деления и нарушений в генах, необходимых для нормального функционирования контрольной точки веретена деления [187].

Как правило, основной вклад в общую частоту радиационно-индуцированных микроядер вносят центромеро-негативные микроядра [22,60]. Тогда, на основании результатов настоящего исследования, можно предположить, что клетки HeLa с нокаутом изучаемых генов стремятся восстановить двунитевые разрывы ДНК, возникающие после облучения, в пользу чего свидетельствует наблюдаемое фосфорилирование гистона H2AX. Однако, двунитевые разрывы в клеточных линиях с нокаутом генов могут либо репарироваться неправильно, что может приводить к образованию дицентрических хромосом и ацентрических фрагментов, либо не восстанавливаться вовсе, в случае если повреждающая ДНК нагрузка превышает репарационные возможности клетки. Если такие клетки входят в митоз, то из-за отсутствия центромеры ацентрические фрагменты хроматид или хромосом не могут прикрепиться к микротрубочкам веретена деления в анафазе, и, следовательно, не могут быть включены в дочерние ядра, что приводит к образованию микроядер, возрастание частоты которых наблюдается на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1*. В этом случае, продукты изучаемых генов могут быть связаны с процессами репарации двунитевых разрывов ДНК, с нарушениями функционирования контрольных точек клеточного цикла или его регуляцией, поскольку клетки с неправильно репарированными или нерепарированными двунитевыми разрывами ДНК входят в митоз, а также с нарушениями программы апоптоза, поскольку клетки с двунитевыми разрывами ДНК не элиминируются из популяции и продолжают пролиферировать.

Менее вероятно, что основной вклад в возрастание радиационно-индуцированных микроядер в клеточных линиях с нокаутом генов вносят центромеро-позитивные

микроядра, образующиеся в результате отставания целых хромосом. Однако, если предположить, что данный вариант возможен, это могло бы объяснить, почему наблюдаемое возрастание частоты радиационно-индуцированных микроядер не сопровождается возрастанием уровня фокусов γ H2AX, так как данный механизм формирования микроядер не связан с репарацией двунитевых разрывов ДНК. В этом случае, продукты генов *ADAMTS1* и *THBS1* могут быть связаны с дефектами формирования кинетохора и веретена деления или с нарушениями в функционировании контрольной точки веретена деления.

Ранее связь с механизмами контроля клеточного цикла была отмечена для гена *ADAMTS1* в исследовании Li M. с соавторами [203]. Было показано, что вызванное активацией микроРНК miR-362-3p снижение экспрессии *ADAMTS1* приводит к аресту клеточного цикла на стадии G1/S и ингибированию пролиферации в культуре гладкомышечных клеток сосудов человека [203]. В настоящем исследовании, ареста клеточного цикла, по-видимому, не происходит, поскольку в облученных клетках наблюдается возрастание частоты микроядер, образующихся в ходе клеточного деления. Однако сопоставление результатов, полученных в ходе данной работы, с результатами исследования Li M. с коллегами не представляется возможным ввиду использования различных клеточных культур и различных механизмов подавления экспрессии *ADAMTS1*.

Согласно данным литературы, металлопротеиназы, участвующие в ремоделировании внеклеточного матрикса, играют ключевую роль в регуляции доступности цитокинов и факторов роста [204,205]. В частности, было показано, что металлопротеиназа *ADAMTS1* может активировать трансформирующий ростовой фактор β (TGF β) [118,206]. В то же время, известно, что экспрессия гена *ADAMTS1* повышается после ингибирования TGF β [207], 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 [208]. Известно, что нокаут TGF β в клетках мыши или ингибирование сигнального пути TGF β в клетках человека приводит к нарушению активности и автофосфорилирования белка ATM, 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 [112,209,210].

Таким образом, результаты проведенных радиобиологических экспериментов позволяют сделать вывод, что продукты генов *ADAMTS1* и *THBS1* вовлечены в

радиационно-индуцированный клеточный ответ, который выражается в снижении клональной выживаемости, характерной для клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*, и возрастании частоты радиационно-индуцированных микроядер в обеих клеточных линиях с нокаутом генов. Более того, последующее снижение частоты радиационно-индуцированных микроядер после восстановления экспрессии в клеточных линиях с нокаутом генов, является дополнительным аргументом в пользу того, что наблюдаемые эффекты обусловлены изменениями уровня экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*. Механизм реализации такого ответа на сегодняшний день остается неясным. Однако, на основании наблюдаемого возрастания частоты радиационно-индуцированных микроядер в обеих клеточных линиях с нокаутом генов, можно предположить, что продукты *ADAMTS1* и *THBS1* связаны с репарацией двунитевых разрывов ДНК, контролем клеточного цикла или с процессами апоптотической гибели клеток.

3.3. 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 на фоне изменения активности *ADAMTS1* и *THBS1*, в клеточных линиях с нокаутом изучаемых генов был проведен транскриптомный анализ профиля экспрессии генов с помощью микрочипов. Анализ транскрипционного профиля в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* позволил зарегистрировать значимые изменения экспрессии 61 гена до облучения (35 генов повышали и 26 генов снижали уровень экспрессии) и 102 генов после облучения в дозе 2 Гр (55 генов повышали и 47 генов снижали уровень экспрессии) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa ($p < 0,05$) (таблица A1 приложения A). После применения поправки на множественность сравнения оба списка были сокращены до 12 генов (7 генов повышали и 5 генов снижали уровень экспрессии) до облучения и 16 генов (9 генов повышали и 7 генов снижали уровень экспрессии) после облучения ($FDR < 0,05$) (Рисунок 3.9, таблица A1).

Анализ транскрипционного профиля в клеточной линии с нокаутом *THBS1* позволил зарегистрировать значимые изменения экспрессии 66 генов до облучения (возрастание экспрессии – 31 ген, снижение экспрессии – 35 генов) и 93 генов после облучения в дозе 2 Гр (50 генов повышали и 43 гена снижали уровень экспрессии) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa ($p < 0,05$) (Таблица A2 приложения A). После применения поправки на множественность сравнения оба списка были сокращены до 3 генов (возрастание экспрессии – 1 ген, снижение экспрессии – 2 гена) ($FDR < 0,05$) (Рисунок 3.9, таблица A2).

Большая часть ДЭГ, статистически значимо изменяющих уровень экспрессии ($FDR < 0,05$), были общими для облученных и необлученных клеток. Поэтому, вероятно, наблюдаемые изменения скорее обусловлены нарушением экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*, чем дополнительным воздействием ионизирующего излучения. Примечательно, что многие ДЭГ связаны с репарацией ДНК, радиочувствительностью и апоптозом. Так, например, сверхэкспрессию *GAGE7* связывают с устойчивостью к таксолу, γ -облучению, а также апоптотическим сигналам, индуцированным интерфероном-гамма или активацией рецептора смерти Fas. Более того, показано, что выжившие клетки, гиперэкспрессирующие *GAGE7*, активно пролиферируют и демонстрируют повышенную клональную выживаемость [148, 149]. В настоящем исследовании, *GAGE7* гипоекспрессировался в обеих клеточных линиях с нокаутом генов. При этом, было показано, что клональная выживаемость после воздействия γ -излучения статистически значимо снижалась в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* и на уровне тенденции – в клеточной линии с нокаутом *THBS1*, что согласуется с данными зарубежных коллег (Рисунок 3.9).

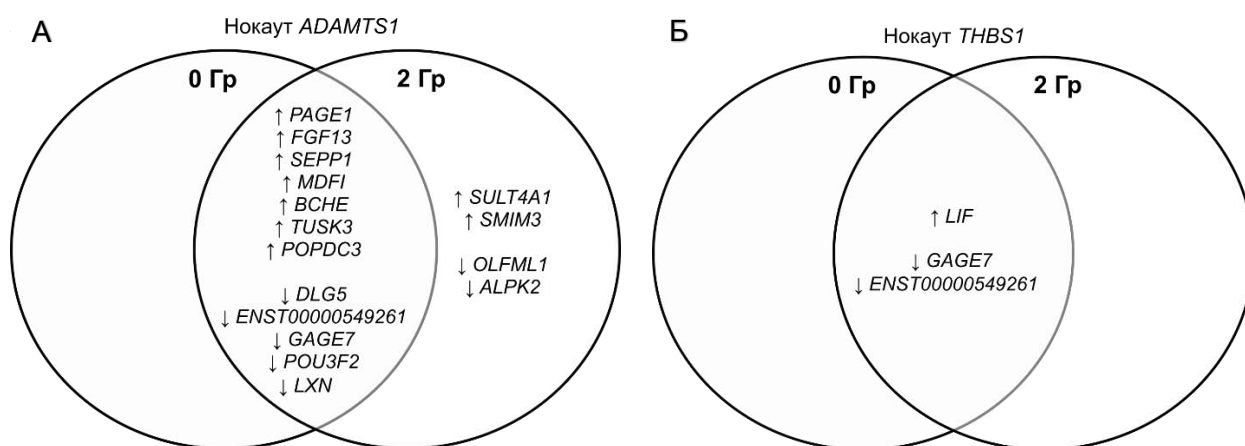


Рисунок 3.9 – Гены, изменяющие экспрессию в клеточных линиях HeLa с нокаутом *ADAMTS1* (А) и *THBS1* (Б) по сравнению с интактной клеточной линией HeLa ($FDR < 0,05$) в необлученных клетках (0 Гр) и после воздействия ионизирующего излучения в дозе 2 Гр; ↑ – гиперэкспрессирующиеся гены, ↓ – гипоекспрессирующиеся гены.

Повышенная экспрессия гена *LIF*, кодирующего цитокин из семейства интерлейкинов-6, наблюдается в сыворотке крови у пациентов с назофаренгиальной карциномой (НФК) и коррелирует с местным рецидивом опухоли. Более того, исследования клеток НФК *in vitro*, а также ксенотрансплантационные исследования на

мышцах *in vivo* показывают, что повышенная экспрессия *LIF* способствует росту НФК и развитию радиорезистентности. Наблюдаемые эффекты реализуются через активацию сигнального пути mTORC1/p70S6K, приводящую к ингибированию клеточного ответа на повреждение ДНК, усилению пролиферации и повышению радиорезистентности [211]. В данном исследовании возрастание экспрессии *LIF* наблюдалось в клеточной линии с нокаутом *THBS1* после облучения в дозе 2 Гр.

Ген *SEPP1* кодирует селенопротеин, выполняющий антиоксидантные и транспортные функции. Согласно данным литературы, повышенная экспрессия данного гена подавляет накопление поздних АФК и снижает уровень радиационно-индуцированного повреждения в культуре нормальных фибробластов человека [212].

Ген *POPDC3* ассоциирован с радиорезистентностью назофарингеальной карциномы, а также рассматривается в качестве прогностического биомаркера радиочувствительности и неблагоприятного терапевтического исхода для пациентов с раком головы и шеи [213,214].

Экспрессия гена *DLG5* снижена в тканях резистентных к тамоксифену опухолей молочной железы. Индуцированное снижение экспрессии *DLG5* в клеточной линии MCF7 (инвазивная аденокарцинома протоков молочной железы) также приводило к возрастанию резистентности к тамоксифену, в то время как сверхэкспрессия *DLG5* влекла за собой противоположные эффекты [215].

Ген *POU3F2* (*BRN2*) кодирует нейрональный транскрипционный фактор, участвующий в процессе дифференцировки нейронов и патогенезе некоторых видов рака. Однако было показано, что белок, кодируемый данным геном, может не взаимодействовать с кофакторами транскрипции, а напрямую связываться с белками, вовлеченными в ответ на повреждение ДНК (Ku70/Ku80, PARP1). Так, быстрая PARP1-зависимая ассоциация BRN2 с местами разрывов ДНК облегчает привлечение Ku80 и репрограммирует репарацию ДНК, способствуя Ku-зависимому негомологичному соединению концов (NHEJ). Кроме того, *BRN2* также связывают с подавлением апоптоза [216].

Эктопическая экспрессия *LXN* в клеточной линии FDC-P1 (острый миелоидный лейкоз) не только подавляет опухолевый рост *in vitro*, но и приводит к возрастанию частоты радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК после облучения γ -излучением в дозе 2 Гр, остановке клеточного цикла и массовому некрозу [217].

По-видимому, экспрессия гена *SMIM3* может дозозависимо изменяться после облучения ИИ, на что указывают данные исследования, направленного на поиск маркеров оценки дозы после воздействия ИИ, проведенного на животной модели. Так, показано, что

экспрессия мРНК *Smim3* в цельной крови мышей линейно возрастает в зависимости от дозы рентгеновского излучения, воздействию которой подвергали животных. Авторы утверждают, что экспрессия *Smim3* и ряда других генов (13 генов) в цельной крови является чувствительным и специфичным биомаркером радиационного воздействия и может быть использована в качестве быстрого и надежного проспективного молекулярного биомаркера в радиологических чрезвычайных ситуациях [218].

Согласно данным литературы, снижение экспрессии гена *ALPK2*, обусловленное онкогеном *KRAS*, связано с ингибированием апоптоза и подавлением экспрессии генов репарации ДНК в трехмерной модели крипт толстой кишки [219]. Кроме того, *ALPK2* напрямую регулируется микроРНК-214, которая широко экспрессируется в опухолевых клетках исключительно при радиорезистентных формах немелкоклеточного рака легкого [220].

Экспрессия некоторых из этих генов была верифицирована с помощью ПЦР в реальном времени, а также оценена в клеточных линиях со сверхэкспрессией *ADAMTS1* и *THBS1* (Рисунок 3.10, 3.11). Результаты анализа с помощью количественной ПЦР в реальном времени подтвердили данные, полученные с использованием микрочипов, для генов *ALPK2*, *LXN* и *SEPP1*. Было показано, что нокаут *ADAMTS1* действительно приводит к снижению экспрессии данных генов ($p < 0,05$) (Рисунок 3.10). Интересно, что сверхэкспрессия *ADAMTS1* в HeLa приводила к противоположному эффекту для гена *LXN* ($p < 0,05$). Более того, последующее восстановление экспрессии *ADAMTS1* в нокаутной клеточной линии HeLa привело к увеличению экспрессии *LXN* как в необлученных, так и в облученных клетках ($p < 0,05$) (Рисунок 3.10 Б).

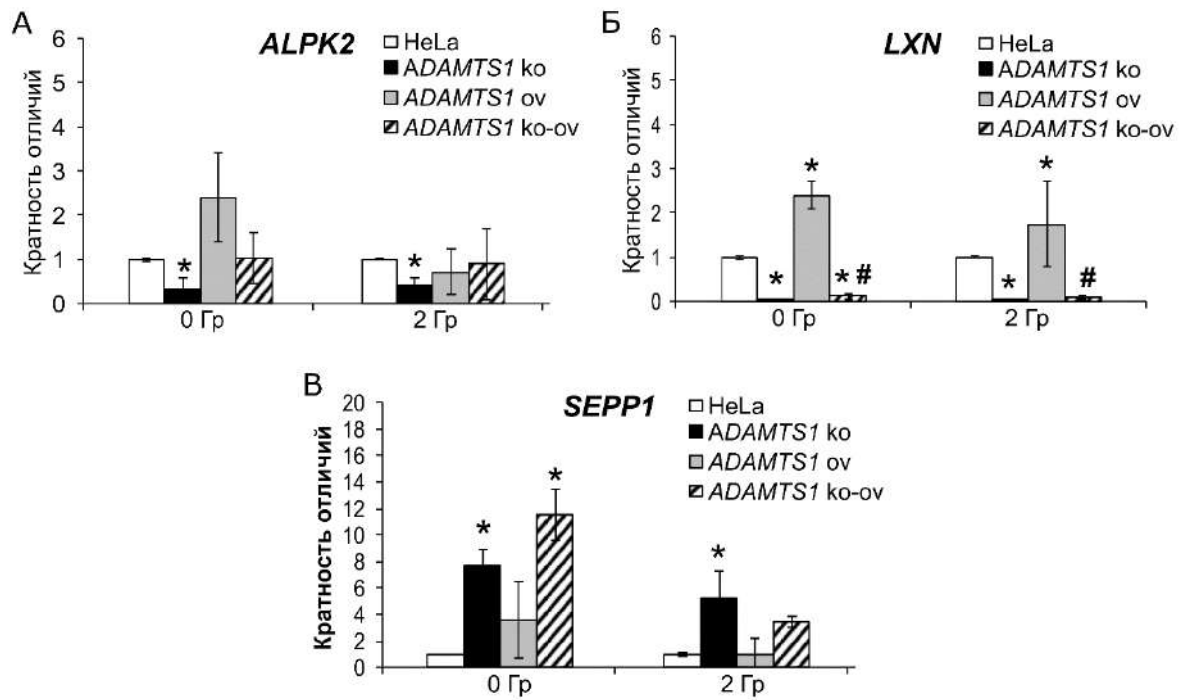


Рисунок 3.10 – Гены, изменяющие экспрессию на фоне нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1*. (А) уровень экспрессии гена *ALPK2*, (Б) уровень экспрессии гена *LXN*, (В) уровень экспрессии гена *SEPP1*. ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с 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, $p < 0,05$.

Анализ с помощью количественной ПЦР в реальном времени в клеточной линии с нокаутом *THBS1* был выполнен для генов *EPB41L3* и *SEPP1* (Рисунок 3.11). Было показано, что экспрессия *EPB41L3* и *SEPP1* действительно снижается на фоне нокаута *THBS1* как в необлученных клетках, так и после воздействия в дозе 2 Гр, а сверхэкспрессия *THBS1* приводит к возрастанию экспрессии данных генов. Для гена *SEPP1* также показано возрастание экспрессии после восстановления экспрессии *THBS1* в клеточной линии с нокаутом как до, так и после облучения (Рисунок 3.11 Б).

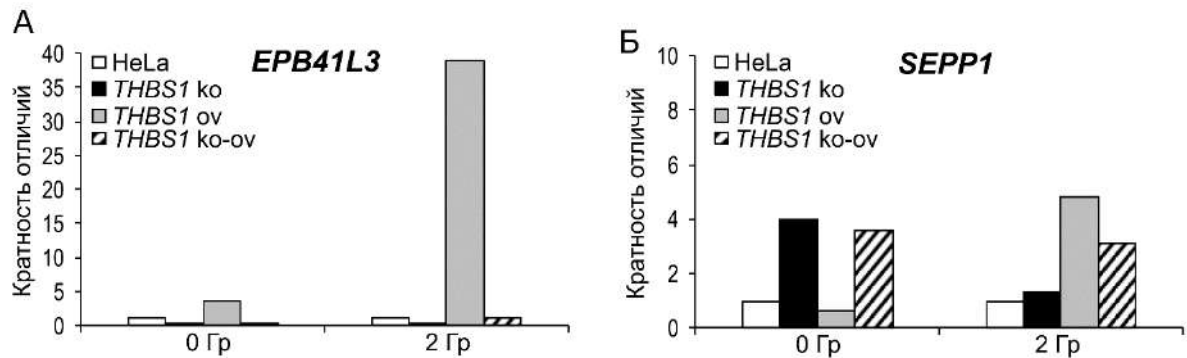


Рисунок 3.11 – Гены, изменяющие экспрессию на фоне нокаута и сверхэкспрессии *THBS1*.

(А) уровень экспрессии гена *EPB41L3*, (Б) уровень экспрессии гена *SEPP1*. ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом.

Таким образом, изменение экспрессии ДЭГ в зависимости от экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*, по-видимому, свидетельствует о том, что данные гены могут напрямую или косвенно влиять на транскрипционную активность других генов. Примечательно, что 53 % ДЭГ (9 из 17), изменяющих уровень экспрессии при $FDR < 0,05$, связаны с радиочувствительностью, репарацией ДНК или апоптозом. Согласно данным базы The Human Protein Atlas, белковые продукты выявленных ДЭГ локализуются в межклеточных контактах (*DLG5*, *EPB41L3*), на поверхности клеточной мембраны (*EPB41L3*), в цитоплазме (*LIF*, *POPDC3*, *LXN*, *ALPK2*) или ядре (*SEPP1*, *POU3F3*, *LXN*). Возможно, они могут быть вовлечены в общие пути передачи радиационно-индуцированного сигнала от ВКМ к клеточному ядру, в которых *ADAMTS1* и тромбоспондин-1 являются вышестоящими регуляторами.

Анализ списков дифференциально экспрессирующихся генов в клеточных линиях с нокаутом *ADAMTS1* или *THBS1* с помощью инструмента WebGestalt не выявил статистически значимо обогащенных групп при использовании баз данных Gene Ontology и KEGG как в необлученных клетках, так и после воздействия в дозе 2 Гр.

Однако принимая во внимание наблюдаемые в модельных клеточных линиях эффекты дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* (изменение частоты микроядер и снижении клоногенной способности клеток), можно предположить, что ДЭГ, выявленные в работе, также могут быть связаны с процессами репарации ДНК, контролем клеточного цикла, апоптозом и функционированием сигнального пути TGF β . Поэтому, с помощью инструмента STRING был проведен дополнительный анализ функциональных взаимодействий ДЭГ, выявленных в работе, с генами, вовлеченными в упомянутые ранее процессы. Такой подход позволил выявить связи белковых продуктов ДЭГ и генов,

вовлеченных в сигнальные пути апоптоза (GO:0072332, 75 генов; GO:0097191, 217 генов) и TGF β (KEGG M2642, 86 генов), репарацию двунитевых разрывов ДНК (GO:0006302, 268 генов) и регуляцию перехода клеток из G₂- в М-фазу клеточного цикла (GO:0044839, 276 генов) (Таблицы 3.1, 3.2; рисунки Б1-Б10 приложения Б). В STRING каждому взаимодействию между белками присваивается определенный балл (interaction score). Этот балл отражает вероятность того, что взаимодействие является истинным с учетом имеющихся доказательств. Баллы ранжируются от 0 до 1, где 1 отражает наивысшую степень уверенности в истинности взаимодействия. В работе представлены только высокосignимые белковые взаимодействия (interaction score $\geq 0,9$). Для анализа с помощью инструментов WebGestalt и STRING были отобраны ДЭГ, статистически значимо изменяющие уровень экспрессии более, чем в 2 раза, без учета поправки на множественность сравнения.

Таблица 3.1 – ДЭГ в клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1*, взаимодействующие на уровне белковых продуктов с генами, вовлеченными в процессы репарации двунитевых разрывов ДНК, перехода из G₂ в М-стадию клеточного цикла, сигнальные пути апоптоза и TGF β (interaction score $\geq 0,9$).

	Сигнальные пути апоптоза (GO:0072332; 0097191)	Репарация двунитевых разрывов ДНК (GO:0006302)	G ₂ /М переход клеточного цикла (GO:0044839)	Сигнальный путь TGF β (KEGG M2642)
0 Гр	<i>HBS1L, RPL21, PRICKLE1, COPS7A, MYLIP, SQSTM1, HLA-DPA1, FGF13, IL11, ESR2, ADAMTS1, COL18A1, STK3, POT1, NKX2-1</i>	<i>HLA-DPA1, POT1, PRICKLE1, MYLIP, COPS7A</i>	<i>CDK14, COPS7A, PRICKLE1, MYLIP, POT1, RPL21, HBS1L, ESR2, HLA-DPA1, OPTN, SQSTM1</i>	<i>PRICKLE1, ADAMTS1, SQSTM1, RPL21, COPS7A, ESR2, MYLIP</i>
2 Гр	<i>RFC3, MSH2, MSH6, ARID3A, HLA-DPA1, COL18A1, FGF13, IER3, NMU, TRPV2, SPON2, PRICKLE1</i>	<i>HLA-DPA1, PRICKLE1, SETD2, ARID3A, MSH2, MSH6, RFC3</i>	<i>RAP2C, HLA-DPA1, COG5, CDK14, MSH6, RFC3, PRICKLE1, ARID3A, NMU, IER3</i>	<i>PRICKLE1, SRGAP2, IER3, RFC3, SPON2</i>

Примечание: для данного анализа использованы ДЭГ ($p \leq 0,05$) без учета поправки на множественность сравнения.

Таблица 3.2 – ДЭГ в клеточной линии HeLa с нокаутом *THBS1*, взаимодействующие на уровне белковых продуктов с генами, вовлеченными в процессы репарации двунитевых разрывов ДНК, перехода из G₂ в М-стадию клеточного цикла, сигнальные пути апоптоза и TGFβ (interaction score ≥ 0,9).

	Сигнальные пути апоптоза (GO:0072332; 0097191)	Репарация двунитевых разрывов ДНК (GO:0006302)	G ₂ /М переход клеточного цикла (GO:0044839)	Сигнальный путь TGFβ (KEGG M2642)
0 Гр	<i>HBS1L, HLA-DRA, HLA-DPB1, CSTF2T, HIF3A, NGEF, ESR2</i>	<i>HIF3A, HLA-DRA, HLA-DPB1, CSTF2T</i>	<i>HIF3A, CDK14, HLA-DRA, HLA-DPB1, ESR2</i>	<i>NGEF, ESR2, HIF3A</i>
2 Гр	<i>CSTF2T, HLA-DRA, HLA-DPB1, HLA-DPA1, PRKDC, RFC3</i>	<i>CSTF2T, HLA-DRA, HLA-DPB1, HLA-DPA1, PRKDC, RFC3, XRCC5, XRCC6</i>	<i>CDK14, RFC3, COG5, HLA-DRA, HLA-DPB1, HLA-DPA1, RAP2C</i>	<i>RFC3, NGEF</i>

Примечание: для данного анализа использованы ДЭГ ($p \leq 0,05$) без учета поправки на множественность сравнения.

Среди ДЭГ, изменяющих экспрессию на фоне нокаута изучаемых генов, представленных в таблицах 3.1 и 3.2, особое внимание привлекают *PRKDC*, *XRCC5*, *XRCC6*, *MSH2* и *MSH6*. Ген *PRKDC* кодирует каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы, которая участвует в фосфорилировании гистона H2AX и вместе с комплексом белков Ku70-Ku80 играет ключевую роль в репарации двунитевых разрывов ДНК по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ) [221]. Белки Ku70 и Ku80, выполняющие функцию сенсоров повреждений ДНК и непосредственно связывающиеся с концами двунитевых разрывов молекулы, кодируются генами *XRCC6* и *XRCC5*, соответственно [222]. Гены *MSH2* и *MSH6* играют ключевую роль в репарации неправильно спаренных нуклеотидов в ДНК (mismatch repair, MMR) [223].

В настоящем исследовании гены *PRKDC* и *XRCC5* были статистически значимо гипозэкспрессированы в клеточной линии с нокаутом *THBS1* после облучения, а экспрессия *XRCC6* практически не отличалась от таковой в клеточной линии HeLa. По-видимому, этот факт может объяснить наблюдаемую тенденцию к снижению уровня радиационно-индуцированных фокусов γH2AX и статистически значимое возрастание радиационно-индуцированных микроядер в клеточной линии с нокаутом *THBS1*. Вероятно, из-за снижения экспрессии *PRKDC* и *XRCC5*, радиационно-индуцированные двунитевые разрывы ДНК в клеточной линии с нокаутом *THBS1* репарируются не

полностью, однако, несмотря на это, клетки входят в митоз, в результате чего возрастает частота радиационно-индуцированных микроядер. Возможно, наблюдаемые радиационно-индуцированные эффекты в клеточной линии HeLa с нокаутом *THBS1*, отчасти объясняются снижением экспрессии некоторых ключевых генов репарации двунитевых разрывов ДНК (*PRKDC* и *XRCC5*), в то время как в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*, по-видимому, действуют иные механизмы.

Таким образом, нокаут генов *ADAMTS1* и *THBS1* приводит к изменению экспрессии ряда других генов. При этом 53 % выявленных ДЭГ (*SEPP1*, *POPDC3*, *DLG5*, *GAGE7*, *POU3F2*, *LXN*, *ALPK2*, *LIF*, *SMIM3*) ($FDR < 0,05$) согласно данным литературы связаны с радиочувствительностью, репарацией ДНК или апоптозом. По-видимому, *ADAMTS1* и *THBS1* являются вышестоящими регуляторами в общих радиационно-индуцированных сигнальных путях (относительно выявленных в работе ДЭГ), берущих начало во внеклеточном матриксе и оканчивающихся на ядерных факторах транскрипции.

3.4. Влияние экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* на уровень фокусов белков репарации ДНК и частоту микроядер в лимфоцитах периферической крови

В экспериментах по оценке транскриптомного профиля экспрессии генов, проведенных нами ранее в лимфоцитах периферической крови с помощью микрочипов, было установлено, что индивиды с различным уровнем эндогенных фокусов γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер отличаются экспрессией генов *ADAMTS1* и *THBS1*. При этом, снижение экспрессии *ADAMTS1* и возрастание экспрессии *THBS1* было характерно для лиц с низким уровнем фокусов γ H2AX и высокой частотой микроядер [10]. Для того чтобы проверить, коррелирует ли экспрессия изучаемых генов с каким-либо из этих показателей, а также оценить возможность использования *ADAMTS1* и *THBS1* в качестве экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности, в лимфоцитах периферической крови, полученных от расширенной выборки здоровых индивидов (n=58), был проведен анализ корреляции экспрессии изучаемых генов с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК и частотой радиационно-индуцированных микроядер.

Экспрессия *ADAMTS1* и *THBS1* была оценена с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Показано, что уровень экспрессии изучаемых генов не отличался значительно между мужчинами и женщинами (Рисунок 3.12 А). Кроме того, в лимфоцитах здоровых индивидов не выявлено статистически значимых различий в уровне эндогенных фокусов γ H2AX и 53BP1 между группами мужчин и женщин (Рисунок 3.12 Б).

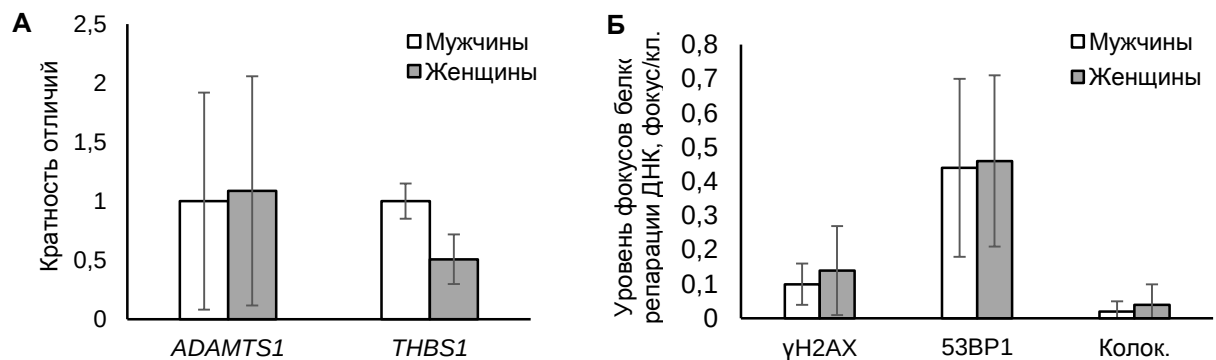


Рисунок 3.12 – уровни экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* и фокусов белков репарации ДНК в необлученных лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов;

А – уровень экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*, референсный ген – *RPS18*;

Б – уровень эндогенных фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1.

Проведение экспериментов на лимфоцитах в расширенной выборке индивидов позволило установить, что экспрессия изучаемых генов не коррелирует с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1 (Рисунок 3.13, 3.14).

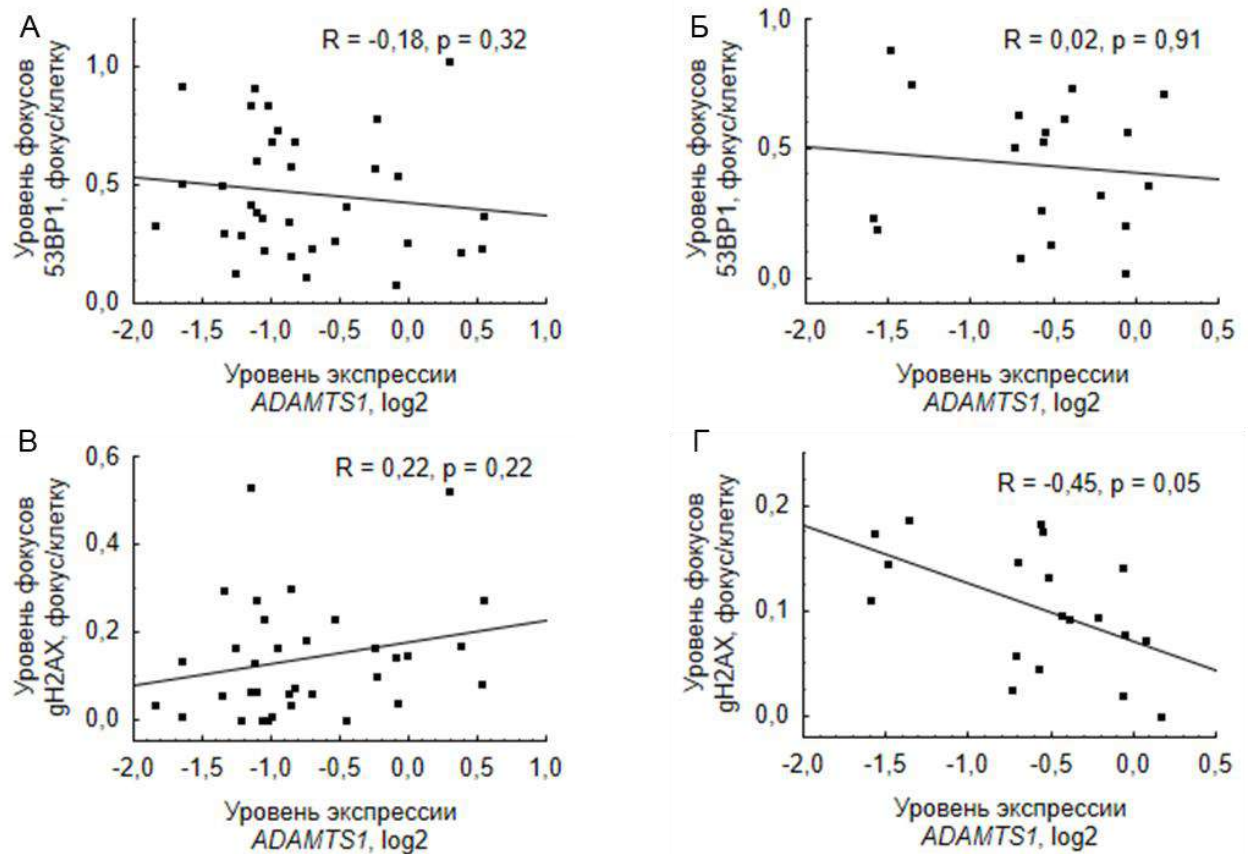


Рисунок 3.13 – Корреляция уровня экспрессии *ADAMTS1* с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1 у женщин (А, В) и мужчин (Б, Г).

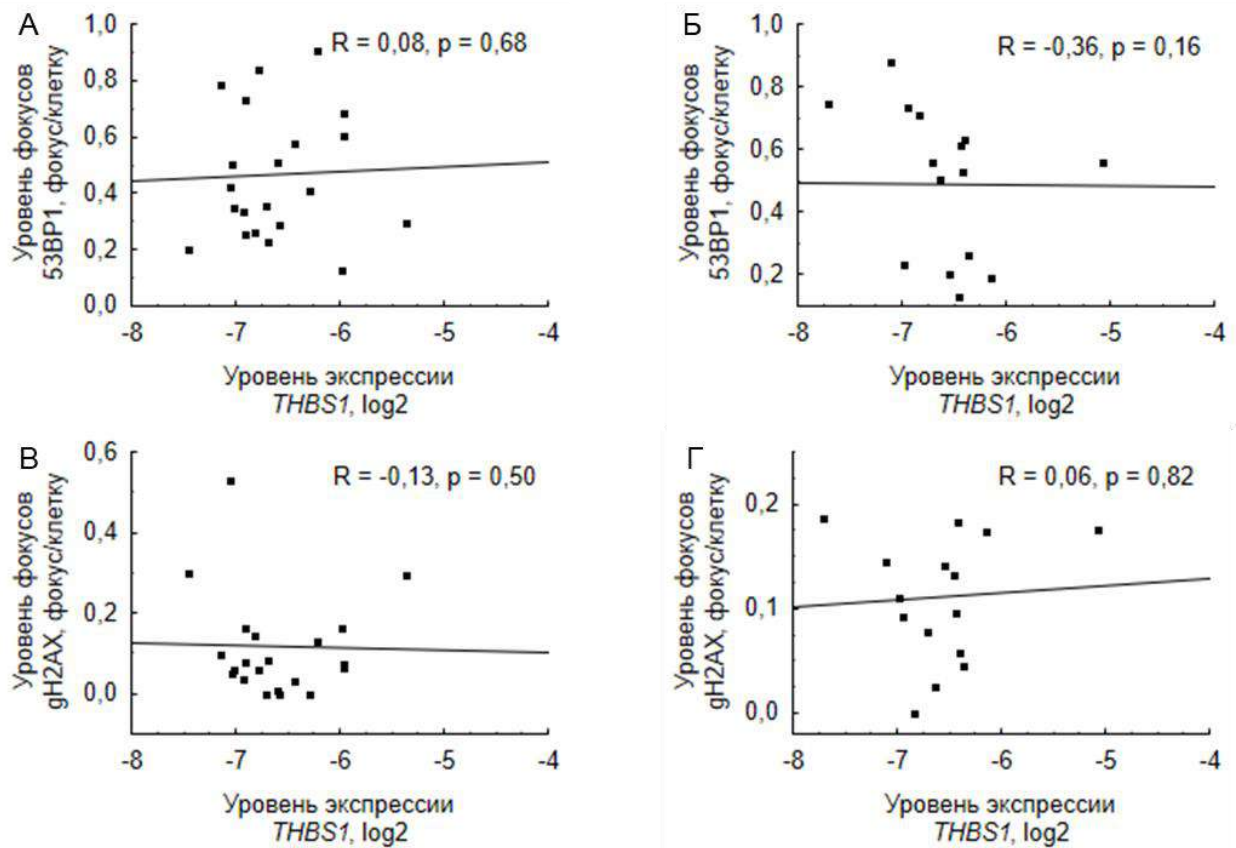


Рисунок 3.14 – Корреляция уровня экспрессии *THBS1* с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК γH2AX и 53BP1 у женщин (А, В) и мужчин (Б, Г).

Схожие результаты были получены и в экспериментах на клеточных линиях: на фоне нокаута и сверхэкспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* не было выявлено изменения уровня эндогенных фокусов γH2AX и 53BP1 (за исключением повышения частоты уровня спонтанных фокусов 53BP1 на фоне сверхэкспрессии *THBS1*).

Проведение микроядерного тестирования в комбинации с FISH с панцентромерными зондами позволило установить, что частота центромеро-позитивных микроядер до облучения была статистически значимо выше у мужчин, чем у женщин ($4,3 \pm 4,1$ % и $1,4 \pm 1,6$ %, соответственно, $p < 0,05$) (Рисунок 3.15). Однако, после облучения у женщин возрастала частота центромеро-негативных микроядер по сравнению с мужчинами ($81,1 \pm 23,6$ % и $63,9 \pm 25,4$ %, соответственно, $p < 0,05$) и суммарная частота микроядер ($82,4 \pm 23,8$ % и $65,4 \pm 25,8$ %, соответственно, $p < 0,05$) (Рисунок 3.15).

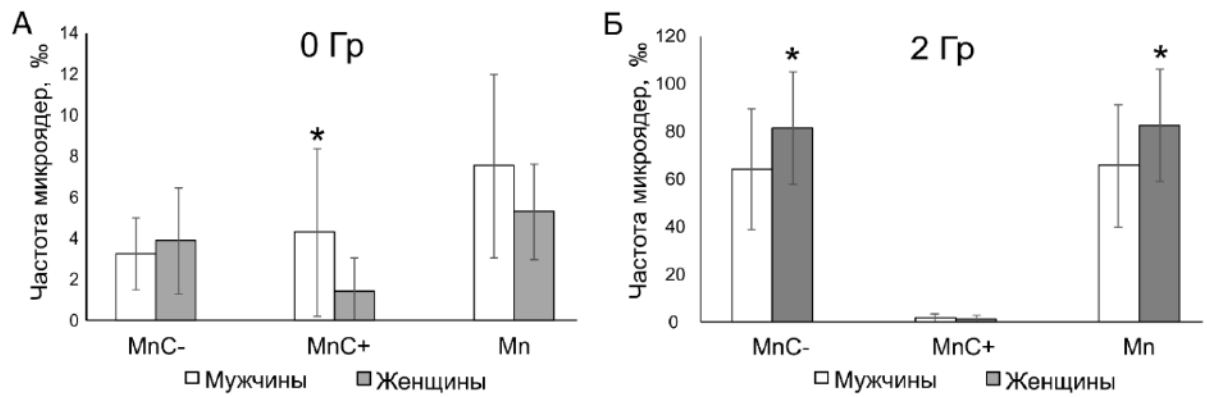


Рисунок 3.15 – Частота центромеро-негативных (MnC-), центромеро-позитивных (MnC+) и суммарная частота микроядер (Mn) в лимфоцитах мужчин и женщин в контроле (А) и после воздействия ионизирующим излучением в дозе 2 Гр (Б);

* – статистически значимые различия $p < 0,05$.

Эксперименты, проведенные в необлученных клетках позволили выявить корреляцию частоты центромеро-негативных микроядер с уровнем экспрессии гена *ADAMTS1* у мужчин ($R = -0,52$, $p < 0,05$) (Рисунок 3.16).

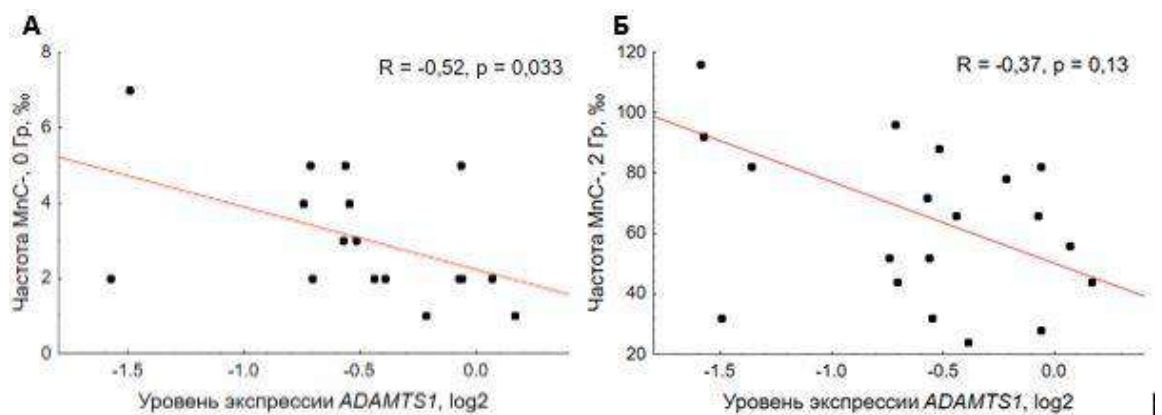


Рисунок 3.16 – Корреляция экспрессии гена *ADAMTS1* и частоты центромеро-негативных микроядер до облучения (А) и после воздействия ионизирующим излучением (Б) в лимфоцитах индивидов мужского пола.

Частота центромеро-позитивных микроядер до облучения статистически значимо коррелировала с уровнем экспрессии гена *THBS1* в группе мужчин ($R = -0,59$, $p = 0,027$). Суммарная частота микроядер не коррелировала с уровнем экспрессии анализируемых генов. Кроме того, не было обнаружено ни одной значимой корреляции в объединенной группе мужчин и женщин (Таблица 3.3).

Таблица 3.3. Корреляция между уровнями экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* и частотами микроядер в лимфоцитах периферической крови в группах мужчин, женщин и в объединенной выборке.

Доза	Экспрессия гена	Маркер	Мужчины		Женщины		Все	
			R	p	R	p	R	p
0 Гр	<i>ADAMTS1</i>	MnC-	-0,52	0,033	0,32	0,062	0,12	0,405
		MnC+	0,09	0,724	-0,15	0,391	-0,04	0,786
		Mn	-0,12	0,640	0,30	0,077	0,20	0,155
	<i>THBS1</i>	MnC-	0,26	0,361	0,09	0,664	0,13	0,419
		MnC+	-0,59	0,027	-0,25	0,220	-0,30	0,056
		Mn	-0,42	0,136	-0,01	0,972	-0,09	0,592
2 Гр	<i>ADAMTS1</i>	MnC-	-0,37	0,122	0,02	0,888	-0,13	0,347
		MnC+	-0,02	0,951	0,04	0,821	0,00	0,977
		Mn	-0,35	0,139	0,04	0,820	-0,12	0,381
	<i>THBS1</i>	MnC-	0,11	0,672	0,14	0,509	0,12	0,468
		MnC+	-0,53	0,033	-0,35	0,077	-0,40	0,010
		Mn	0,09	0,744	0,13	0,528	0,09	0,563

Примечание: MnC- – частота центромеро-негативных микроядер, MnC+ – частота центромеро-позитивных микроядер, Mn – суммарная частота микроядер. Полужирным начертанием выделены статистически значимые корреляции.

После облучения частота центромеро-негативных микроядер, вносящая основной вклад в суммарную частоту радиационно-индуцированных микроядер, не коррелировала с экспрессией ни одного из изучаемых генов. Частота центромеро-позитивных микроядер коррелировала с уровнем экспрессии гена *THBS1* у мужчин ($R = -0,53$, $p = 0,033$) и в объединенной группе мужчин и женщин ($R = -0,40$, $p = 0,010$) (Таблица 3.3).

Привлекает внимание, что согласно результатам, полученным в данной работе, корреляция экспрессии изучаемых генов с частотой микроядер наблюдалась в группе мужчин, но не в группе женщин. В исследованиях зарубежных авторов было показано, что экспрессия генов *ADAMTS1* и *THBS1* зависит от фазы эстрального цикла у лабораторных животных [171,224–226]. мРНК *ADAMTS1* образуется в гранулезных клетках преовуляторных фолликулов у мышей и крыс под действием лютеинизирующего гормона через прогестерон-рецепторно-зависимый механизм [224,225]. Так, у мышей дикого типа, после выброса лютеинизирующего гормона, инициирующего овуляцию, было зарегистрировано десятикратное возрастание количества белка, кодируемого *ADAMTS1*, в то время как у мышей, нокаутных по гену, кодирующему рецептор прогестерона, такого эффекта не наблюдается [171]. Кроме того, в гранулезных клетках крысы было зарегистрировано повышение уровня мРНК *THBS1* в ответ на стимуляцию

лютеинизирующим гормоном *in vivo* [227]. В исследовании, проведенном на приматах, было показано, что уровни мРНК *THBS1* и кодируемого белка в гранулезных клетках преовуляторного фолликула у яванских макаков возрастают после введения хорионического гонадотропина человека и достигают пика непосредственно перед ожидаемым временем овуляции [226]. 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. Данное предположение могло бы объяснить отсутствие корреляции уровня экспрессии данных генов с частотой микроядер у женщин.

Интересно, что экспрессия гена *ADAMTS1* в лимфоцитах периферической крови коррелировала со спонтанной частотой центромеро-негативных микроядер. Эти наблюдения согласуются с результатами, полученными на клеточных линиях. Ранее было показано, что клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* характеризуется возрастанием суммарной частоты радиационно-индуцированных микроядер, преобладающий вклад в формирование которой, по-видимому, вносят центромеро-негативные микроядра. Как было отмечено ранее в главе 3.2.3 «Влияние нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* на частоту радиационно-индуцированных микроядер», центромеро-негативные микроядра образуются в результате неправильной или неполной репарации двунитевых разрывов ДНК. Таким образом, негативная корреляция экспрессии гена *ADAMTS1* со спонтанной частотой центромеро-негативных микроядер, выявленная в лимфоцитах периферической крови, служит дополнительным аргументом в пользу того, что продукт гена *ADAMTS1* может быть вовлечен в фундаментальные процессы, направленные на поддержание стабильности генома. Экспрессия гена *THBS1* в лимфоцитах периферической крови, напротив, коррелировала с частотой спонтанных и радиационно-индуцированных центромеро-позитивных микроядер, в то время как в модельных системах показано, что экспрессия данного гена влияет на суммарную частоту микроядер после облучения. По-видимому, это может означать, что эффекты продукта гена *THBS1* в лимфоцитах периферической крови и модельных клеточных линиях реализуются с помощью различных механизмов.

В предварительных исследованиях, выполненных на лимфоцитах здоровых индивидов с различной радиочувствительностью, было показано, что индивиды со сниженным уровнем эндогенных фокусов γ H2AX и повышенной частотой радиационно-индуцированных микроядер, характеризуются снижением экспрессии *ADAMTS1* и возрастанием экспрессии *THBS1*. Соответственно, в экспериментах, проведенных на

лимфоцитах, полученных от расширенной выборки здоровых индивидов, ожидалось увидеть положительную корреляцию экспрессии *ADAMTS1* с уровнем фокусов γ H2AX, и негативную с частотой микроядер после облучения, а для гена *THBS1*, наоборот, отрицательную корреляцию с уровнем фокусов γ H2AX, и положительную – с частотой микроядер. Однако, было установлено, что ни один из данных показателей не коррелирует с экспрессией изучаемых генов (кроме корреляции экспрессии *THBS1* с частотой центромеро-позитивных микроядер, вносящих небольшой вклад (< 3 %) в суммарную частоту радиационно-индуцированных микроядер) (Таблица 3.4). Таким образом, уровень экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* в лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов невозможно использовать в качестве маркера индивидуальной радиочувствительности.

Таблица 3.4. Схематичное изображение результатов экспериментов, проведенных в лимфоцитах периферической крови в предварительном исследовании и на расширенной выборке индивидов.

	Экспрессия <i>ADAMTS1</i>	Экспрессия <i>THBS1</i>
Предварительные исследования (микрочипы)	↓ γ H2AX (0 Гр) и ↑ микроядра (2 Гр) – ↓ экспрессии <i>ADAMTS1</i> ; ↓ γ H2AX (0 Гр) и ↑ микроядра (2 Гр) – ↑ экспрессии <i>THBS1</i>	
Ожидание	Положительная корреляция с γ H2AX (0 Гр) и/или негативная с частотой микроядер (2 Гр)	Негативная корреляция с γ H2AX (0 Гр) и/или положительная с частотой микроядер (2 Гр)
Расширенная выборка (n=58)	Корреляции не выявлены	Негативная корреляция с МпС+ (2 Гр)*

Примечание: ↓ (↑) – снижение (возрастание), «МпС+» – частота центромеро-позитивных микроядер; * – согласно полученным результатам, вклад МпС+ в суммарную частоту радиационно-индуцированных микроядер не превышает 3 %.

В то же время, в экспериментах, проведенных в модельных системах, установлено, что дифференциальная экспрессия *ADAMTS1* и *THBS1* влияет на радиационно-индуцированный клеточный ответ. Было показано, что частота радиационно-индуцированных микроядер зависит от экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* (возрастание частоты на фоне нокаута генов, и снижение до уровня, сопоставимого с контрольной клеточной линией HeLa после восстановления экспрессии), в то время как в экспериментах, проведенных на расширенной выборке лимфоцитов здоровых индивидов корреляция экспрессии изучаемых генов с частотой центромеро-негативных микроядер после облучения отсутствует. (Таблица 3.5).

Таблица 3.5. Эффекты дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1* в модельных системах и лимфоцитах периферической крови.

	Модельные системы			Лимфоциты	
	Выживаемость	Фокусы γ H2AX (0 Гр)	Микроядра (2 Гр)	Фокусы γ H2AX (0 Гр)	Микроядра (2 Гр)
<i>ADAMTS1</i>	↓ в 1,9 раз (2 Гр)	-	↑ в 1,5 раза (2 Гр)	-	-
<i>THBS1</i>	↓ в 1,4 раза (0 Гр)	-	↑ в 1,8 раз (2 Гр)	-	MnC+ у мужчин (R = -0,53, p = 0,033)*

Примечание: ↓ (↑) – снижение (возрастание), «-» – отсутствие эффекта/корреляции, «MnC+» – частота центромеро-позитивных микроядер. * – согласно полученным результатам, вклад MnC+ в суммарную частоту радиационно-индуцированных микроядер не превышает 3 %.

С одной стороны, полученные результаты могут объясняться различиями в механизмах формирования радиационно-индуцированного ответа нормальных и опухолевых клеток человека. С другой стороны, они могут быть обусловлены диапазоном изменения уровней экспрессии в выбранных объектах исследования. Так обеспечение нокаута или транзientной сверхэкспрессии – это моделирование экстремальных уровней активности генов, при которых функция белковых продуктов либо утрачивается полностью, либо, наоборот, возрастает до уровней, нехарактерных для данного типа клеток. В исследованиях, проведенных на лимфоцитах здоровых индивидов, напротив, наблюдается нормальный диапазон изменения уровня экспрессии изучаемых генов, который значительно уже, чем в модельных системах. Возможно колебание уровня экспрессии *ADAMTS1* и *THBS1*, характерное для лимфоцитов здоровых индивидов является недостаточным для значимого влияния на частоту радиационно-индуцированных микроядер.

Таким образом, результаты данного исследования показывают, что гены *ADAMTS1* и *THBS1* связаны с формированием клеточного ответа на воздействие ионизирующего излучения, однако экспрессию данных генов невозможно использовать в качестве самостоятельного маркера индивидуальной радиочувствительности нормальных клеток организма. В экспериментах, проведенных на клеточных линиях, было показано, что продукты генов *ADAMTS1* и *THBS1*, действительно, вовлечены в формирование радиационно-индуцированного ответа опухолевых клеток, что выражается в снижении способности клеток к формированию колоний и изменению частоты радиационно-

индуцированных микроядер на фоне дифференциальной экспрессии изучаемых генов. Механизмы реализации такого влияния остаются неясными, однако, результаты анализа радиационно-индуцированного транскрипционного профиля на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1* с помощью микрочипов, позволяют предположить, что продукты изучаемых генов являются регуляторами сигнальных путей, передающих информацию от внеклеточного матрикса 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 во внеклеточный матрикс 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 секретируемыми белками ВКМ, по-видимому, любое действие, затрагивающее данные белки, будет сказываться и на других клетках ткани, что открывает возможности по использованию молекулярных ингибиторов, которые могли бы блокировать активность изучаемых генов на уровне белков в межклеточном матриксе, способствуя радиосенсибилизации опухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индивидуальная радиочувствительность – это сложный признак, формирование которого зависит от генетических и средовых факторов. При этом, проведенные исследования показывают, что вклад генетической компоненты велик и достигает примерно 60-80 % [27,59,64,65]. Долгое время радиочувствительность человека связывали с мутациями в генах, продукты которых вовлечены в репарацию двунитевых разрывов ДНК, механизмы антиоксидантной защиты и метаболизм ксенобиотиков [1,28,37]. Так, например, некоторые работы показывают, что пациенты с тяжелыми наследственными синдромами, обусловленными гомозиготными мутациями в генах репарации ДНК (атаксия-телеангиэктазия, пигментная ксеродерма, синдром Ниймеген и др.) характеризуются повышенной радиочувствительностью [8,39,41,42]. Однако, данные мутации встречаются довольно редко и не могут объяснить популяционную вариабельность индивидуальной радиочувствительности. Более того, многолетний опыт лечения онкологических заболеваний показывает, что среди пациентов, проходящих одинаковый курс лучевой терапии, встречаются наиболее чувствительные индивиды, которые не имеют генетических заболеваний, но страдают от тяжелых побочных реакций облучения, сопоставимых с таковыми у лиц с упомянутыми ранее наследственными синдромами [25,228]. В связи с этим было выдвинуто предположение, что радиочувствительность носит полигенный характер наследования, при котором носители нескольких аллелей с низкой пенетрантностью могут характеризоваться повышенной радиочувствительностью, и фокус исследований сместился на поиск однонуклеотидных вариаций (SNPs) в кандидатных генах (связанных с репарацией ДНК и антиоксидантной защитой) ассоциированных с радиационно-индуцированной токсичностью. Данные исследования хотя и позволили выявить значимые ассоциации некоторых SNPs с риском развития побочных реакций в ходе лучевой терапии, были ограничены малым объемом выборки, а полученные результаты не всегда подтверждались в независимых исследованиях [229].

Развитие технологий и снижение стоимости полногеномных исследований послужило толчком к проведению широкогеномных ассоциативных исследований (GWAS), направленных на поиск ранее неизвестных SNPs, ассоциированных с развитием побочных реакций лучевой терапии у онкологических пациентов. Основным результатом таких исследований стало выявление значимых ассоциаций с SNPs в генах, не имеющих прямого отношения к репарации ДНК, но выполняющих различные сигнальные функции (*FSHR*, *TANC1*, *IFNK*, *SLC36A4*, *KCND3* и др.) [1,2,48]. Эти данные обнаружили

ограниченность наших знаний о молекулярных механизмах, лежащих в основе клеточного ответа на воздействие ионизирующего излучения, и привели к пониманию того, что выявление важных участников такого ответа невозможно исключительно в рамках кандидатного подхода и требует проведения дополнительных исследований.

Помимо вариабельности на уровне последовательности ДНК значительный вклад в формирование фенотипических особенностей организма вносят эпигенетические механизмы, обеспечивающие регуляцию экспрессии генов. В связи с этим, дополнительная возможность выявления генов, вовлеченных в формирование индивидуальной чувствительности к воздействию ионизирующего излучения у человека, заключается в использовании полнотранскриптомного анализа экспрессии генов в клетках индивидов с различной радиочувствительностью. Полнотранскриптомный анализ профиля экспрессии генов, проведенный нами ранее в лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов с различной радиочувствительностью, позволил выявить более пятисот дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), не связанных с процессами репарации ДНК [10]. Так было показано, что индивиды с различным уровнем фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер характеризуются дифференциальной экспрессией генов *ADAMTS1* и *THBS1*.

Анализ транскрипционного профиля для выявления генов, изменяющих активность после воздействия ионизирующим излучением, применялся ранее и в других исследованиях. В основном, подобный подход использовали с целью поиска экспрессионных генетических маркеров, ассоциированных с радиочувствительностью нормальных [29,230] и опухолевых клеток [31,50,231–236], а также пациентов с тяжелыми побочными реакциями после лучевой терапии [237]. Дизайн большинства таких исследований включал либо оценку радиационно-индуцированного транскрипционного клеточного ответа, либо, в редких случаях, сравнение профилей экспрессии генов в условно чувствительных и резистентных опухолевых линиях. При этом, большинство исследований демонстрировали значимые изменения уровней экспрессии генов, связанных с репарацией двунитевых разрывов ДНК, контролем клеточного цикла и реакцией на стрессовые стимулы. Экспрессия некоторых генов, многие из которых связаны с реализацией сигнального пути TGF β (*FBN2*, *FST*, *GPRC5B*, *NOTCH3*, *PLCB1*, *DPT*, *DDIT4L* и *SGCG*), была ассоциирована с развитием радиационно-индуцированного фиброза [237]. Кроме того, ряд работ позволил выявить потенциальные экспрессионные маркеры для оценки радиационной дозовой нагрузки (*TNFSF4*, *FDXR*, *MYC*, *ZMAT3* и *GADD45A*) [30,238–240]. Однако, несмотря на активное изучение радиационно-индуцированного профиля экспрессии, немногие работы были направлены на выявление

генов, дифференциальная активность которых обуславливала бы индивидуальную чувствительность к воздействию ИИ. Более того, такие работы были проведены на опухолевых клеточных линиях, но не в нормальных клетках организма. Таким образом, изучение ДЭГ, выявленных ранее в лимфоцитах здоровых индивидов с различной радиочувствительностью, является отличительной чертой настоящего исследования.

В предварительных экспериментах, проведенных нами ранее, было показано, что индивиды с низким уровнем фокусов γ H2AX и высокой частотой радиационно-индуцированных микроядер характеризуются снижением экспрессии гена *ADAMTS1* и возрастанием экспрессии гена *THBS1* [10]. Оба выявленных гена кодируют белки внеклеточного матрикса (ВКМ), что особенно интересно в свете накопившихся данных, демонстрирующих роль компонентов матрикса в формировании радиочувствительности клеток [11,12]. Известные функции белковых продуктов данных генов связаны с участием в различных сигнальных путях, а также с формированием и моделированием ВКМ. Связь данных генов с радиочувствительностью отмечалась ранее лишь в нескольких исследованиях. В работе А. Mezentsev с коллегами (Mezentsev A, Amundson S. A., 2011) было показано, что ген *ADAMTS1* статистически значимо изменяет экспрессию в ответ на воздействие низкими дозами ИИ в трехмерной модели ткани, имитирующей структуру и функции эпидермиса человека [184]. В другом исследовании показано, что мыши с нокаутом гена *Thbs1* характеризуются повышенной радиорезистентностью здоровых тканей [16]. Таким образом, роль данных генов в формировании индивидуальной радиочувствительности остается неясной. Неизвестно связаны ли продукты *ADAMTS1* и *THBS1* с клеточным ответом на повреждение ДНК, и если связаны, то каким образом белки внеклеточного матрикса могут влиять на механизмы реализации такого ответа? В связи с этим, цель настоящего исследования заключалась в установлении влияния дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК.

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 [241,242]. 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*). Более того, показано, что в клеточных линиях с нокаутом генов значительно возрастает частота радиационно-индуцированных микроядер, являющаяся хорошо изученным маркером радиочувствительности. 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 интактной клеточной линии HeLa. Полученные данные являются дополнительным аргументом, подтверждающим, что частота радиационно-индуцированных микроядер в опухолевой клеточной линии HeLa зависит от экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1*. Результаты экспериментов, проведенных в модельных системах, подтверждают гипотезу исследования и являются убедительным доказательством того, что гены *ADAMTS1* и *THBS1* вовлечены в формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа. Таким образом, настоящая работа позволила выявить новые эффекты генов *ADAMTS1* и *THBS1*, связанные с радиочувствительностью клеток и не описанные ранее в литературе, а также установить, что гены, кодирующие белки внеклеточного матрикса могут быть связаны с формированием радиационно-индуцированного ответа на повреждение ДНК.

В настоящее время, работы, направленные на изучение функций внеклеточного матрикса и его компонентов, являются особенно актуальными и представляют большой интерес для исследователей, работающих в области онкологии, кардиологии, фармакологии и некоторых других научных направлений [243–249]. В этом смысле генетика и радиобиология не являются исключением. Так, например, можно встретить работы, которые уделяют особенное внимание роли сигнальных путей, включающих взаимодействия с ВКМ и паракринную межклеточную сигнализацию, в ответе на повреждение ДНК [51,96]. 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 [12]. В этом аспекте, результаты настоящего исследования представляют особенный интерес, поскольку гены *ADAMTS1* и *THBS1* кодируют белки ВКМ. Возможно, продукты данных генов могут выступать в качестве сигнальных молекул, вовлеченных в каскады передачи сигналов, индуцированных повреждениями ДНК, возникающими под воздействием ИИ. Согласно данным литературы и результатам проведенного нами анализа транскрипционного профиля в клеточных линиях с нокаутом генов (выявление ряда ДЭГ, вовлеченных в сигнальный путь $TGF\beta$) *ADAMTS1* и *THBS1* вовлечены в сигнальные пути оксида азота и $TGF\beta$, имеющие непосредственное отношение к репарации двунитевых разрывов ДНК [112,113,208,250]. Принимая во внимание, что

ADAMTS1 и *THBS1* кодируют белки ВКМ, их действие, по-видимому, не ограничивается облученными клетками, и может затрагивать другие клетки ткани, что в свою очередь, позволяет предположить, что данные гены могут быть связаны с радиационно-индуцированным эффектом свидетеля. Эффект свидетеля – это феномен, который заключается в радиационно-индуцированной гибели клеток, не попадающих под прямое воздействие ИИ, но расположенных вблизи облученных клеток [251,252]. В связи с этим, перспективы продолжения данного исследования могут быть связаны с исследованием возможной роли генов *ADAMTS1* и *THBS1* в формировании радиационно-индуцированного эффекта свидетеля. Более того, созданные в рамках работы модельные системы обладают потенциалом к использованию в исследовании такого рода.

Проведение экспериментов в модельных клеточных линиях позволило установить причинно-следственные связи между изменением экспрессии изучаемых генов и частотой радиационно-индуцированных микроядер, а также выживаемостью клеток. Однако дизайн такого исследования не позволяет идентифицировать механизмы, лежащие в основе реализации данных причинно-следственных связей. Поэтому, в попытке приблизиться к пониманию механизмов, приводящих к наблюдаемым радиобиологическим эффектам, в клеточных линиях с нокаутом изучаемых генов был проведен полнотранскриптомный анализ экспрессионного профиля. Было показано, что нокаут *ADAMTS1* и *THBS1* приводит к изменению активности многих других генов. Анализ обогащения с помощью инструмента WebGestalt не выявил значимо обогащенных групп генов, однако анализ функциональных взаимодействий с помощью инструмента STRING позволил выявить связь белковых продуктов генов, дифференциально экспрессирующихся на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1*, с белками, вовлеченными в сигнальные пути апоптоза, процесс репарации двунитевых разрывов ДНК и переход клеточного цикла из стадии G₂ в M. Известно, что данные процессы являются одними из основных механизмов поддержания стабильности генома. Поддержание стабильности генома является фундаментальным свойством живых организмов, важным в онтогенетическом (предотвращение возникновения злокачественных новообразований, являющихся следствием мутационных изменений в геноме клетки) и филогенетическом аспектах (передача неповрежденного генетического материала в ряду поколений). Кроме того, поддержание стабильности генома имеет важное значение с точки зрения сопротивления мутагенному воздействию внешних агрессивных факторов, включая ИИ. Таким образом, изменения транскрипционного профиля ДЭГ, связанных с репарацией ДНК, контролем клеточного цикла и апоптозом, наблюдаемое 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. А 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 *ADAMTS1* и *THBS1* были выявлены у индивидов с различной радиочувствительностью, дополнительной задачей данного исследования являлась оценка возможности использования данных генов в качестве экспрессионных маркеров индивидуальной радиочувствительности человека. В экспериментах, проведенных на лимфоцитах периферической крови, полученных от расширенной выборки здоровых индивидов, не было выявлено 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 не является определяющим фактором в формировании индивидуальной радиочувствительности в лимфоцитах периферической крови. 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 СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГК – гиалуроновая кислота

Гр – Грей

ДНК-ПКкс – каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы

ДР – двунитевые разрывы

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

ИИ – ионизирующее излучение

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная РНК

ЛПЭ – линейная передача энергии

НФК – назофаренгиальная карцинома

ОР – одностранные разрывы

ПГ – протеогликаны

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

BER – (от англ. Base Excision Repair) – эксцизионная репарация оснований

CRISP/Cas – (от англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – кластеризованные, регулярно разделенные, короткие палиндромные повторы

ERK – (от англ. Extracellular Signal-Regulated Kinase) – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами

FBS – (от англ. Fetal Bovine Serum) – эмбриональная телячья сыворотка

FDR – (от англ. False Discovery Rate) – вероятность ложноположительного результата

FISH – (от англ. Fluorescence *in-situ* Hybridization) – флуоресцентная гибридизация *in situ*

GFP – (от англ. Green Fluorescent Protein) – зеленый флуоресцентный белок

GWAS – (от англ. Genome-Wide Association Studies) - полногеномные ассоциативные исследования

HR – (от англ. Homologous Recombination) – гомологичная рекомбинация

JNK – (от англ. c-Jun N-terminal Kinase) - N-терминальная киназа c-Jun

MAPK (MEK) – (от англ. Mitogen-Activated Protein Kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа

MMR – (от англ. Mismatch Repair) – репарация неправильно спаренных нуклеотидов

p90rsk – (от англ. p90 ribosomal S6 kinase) - S6 рибосомальная киназа p90

NGS – (от англ. Next Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения

NER – (от англ. Nucleotide Excision Repair) – эксцизионная репарация нуклеотидов
NHEJ – (от англ. Non-Homologous End Joining) – нехомологичное соединение концов
NO – (от англ. Nitric Oxide) – оксид азота
PAM – (от англ. Protospacer Adjacent Motif) – мотив, прилежащий к протоспейсеру
PBS – (от англ. Phosphate Buffered Saline) – фосфатно-солевой буфер
PI3K – (от англ. Phosphoinositide 3-Kinase) - фосфоинозитид-3-киназа
sgRNA – (от англ. Single Guide RNA) – направляющая РНК
SNP(s) – (от англ. Single Nucleotide Polymorphism(s)) – однонуклеотидный полиморфизм(ы)
SSBR – (от англ. Single-Strand Break Repair) – репарация однонитевых разрывов
TSR – (от англ. Thrombospondin Repeat) – повтор тромбоспондина

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreassen C.N. Editorial: Searching for genetic determinants of normal tissue radiosensitivity - Are we on the right track? // *Radiotherapy and Oncology*. – 2010. – Vol. 97. – № 1. – P. 1–8.
2. Guo Z., Shu Y., Zhou H., Zhang W., Wang H. Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment // *Carcinogenesis*. – 2014. – Vol. 36. – № 3. – P. 307–317.
3. 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 // *Radiother. Oncol.* – 2014. – Vol. 111. – № 2. – P. 178–185.
4. Fachal L., Gómez-Caamaño 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. Genet.* – 2014. – Vol. 46. – № 8. – P. 891–894.
5. 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. – Vol. 107. – № 4. – P. 748–753.
6. 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. – Vol. 92. – № 5. – P. 1084–1092.
7. Surrallés J., Jackson S.P., Jasin M., Kastan M.B., West S.C., Joenje H. Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes // *Genes and Development*. – 2004. – Vol. 18. – № 12. – P. 1359–1370.
8. Hiel J.A., Krajewska-Walasek M., Bialecka M. et al. Nijmegen breakage syndrome // *Arch. Dis. Child*. – 2000. – Vol. 82. – № 5. – P. 400–406.
9. Andreassen C.N., Schack L.M.H., Laursen L.V., Alsner J. Radiogenomics – current status, challenges and future directions // *Cancer Letters*. – 2016. – Vol. 382. – № 1. – P. 127–136.
10. Васильев С.А. Особенности спонтанного и индуцированного мутагенеза в соматических клетках человека с различным эпигенетическим фоном : дис. ... д-ра биол. наук / С.А. Васильев. – Томск, 2018. – 332 с.
11. Hodgkinson P.S., Elliott T., Wong W.S., Rintoul R.C., Mackinnon A.C., Haslett C., Sethi T. ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through β 1 integrin-dependent activation of PI3-kinase // *Cell Death Differ.* – 2006. – Vol. 13. – № 10. – P. 1776–1788.

12. Kirsch D.G., Diehn M., Kesarwala A.H. et al. The future of radiobiology // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2018. – Vol. 110. – № 4. – P. 329–340.
13. Park C.C., Zhang H.J., Yao E.S., Park C.J., Bissell M.J. $\beta 1$ integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – № 11. – P. 4398–4405.
14. Nam J.M., Onodera Y., Bissell M.J., Park C.C. Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin $\alpha 5\beta 1$ and fibronectin // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – № 13. – P. 5238–5248.
15. Eke I., Zscheppang K., Dickreuter E., Hickmann L., Mazzeo E., Unger K., Krause M., Cordes N. Simultaneous $\beta 1$ integrin-EGFR targeting and radiosensitization of human head and neck cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2015. – Vol. 107. – № 2. – P. 11.
16. Isenberg J.S., Maxhimer J.B., Hyodo F., Pendrak M.L., Ridnour L.A., DeGraff W.G., Tsokos M., Wink D.A., Roberts D.D. Thrombospondin-1 and CD47 limit cell and tissue survival of radiation injury // *Am. J. Pathol.* – 2008. – Vol. 173. – № 4. – P. 1100–1112.
17. Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Тахауов Р.М., Карпов А.Б. Молекулярно-генетические подходы, применяемые для оценки воздействия радиации на геном, и индивидуальная радиочувствительность человека // *Сибирский Медицинский Журнал*. – 2003. – Т. 18. – № 5. – С. 78–83.
18. Фильченков А.А. Постлучевой апоптоз лимфоцитов периферической крови как маркер индивидуальной радиочувствительности: краткий обзор // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2021. – Т. 61. – № 5. – С. 471–479.
19. Минина В.И. Генетический полиморфизм и хромосомные aberrации, индуцированные радиацией // *Сибирский Медицинский Журнал*. – 2012. – Т. 3. – № 2002. – С. 5–7.
20. Vozilova A. V., Akhmadullina Y.R. Study of the Individual Radiosensitivity in Humans Based on the Assessment of the Frequency of Chromosome Aberrations and Micronuclei in Peripheral Blood T Lymphocytes // *Russ. J. Genet.* – 2019. – Vol. 55. – № 10. – P. 1234–1241.
21. Кузьменко Е.В. Современные подходы к определению групповой и индивидуальной радиочувствительности организма // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*. – 2011. – Т. 24. – № 1(63). – С. 109–122.
22. Литвяков Н.В., Карпов А.Б., Тахауов Р.М., Фрейдин М.Б., Сазанов А.Э., Халюзова М.В. Генетические маркеры индивидуальной радиочувствительности человека / под ред. Р.М. Тахауова // *Томск : Изд-во Том. ун-та*, 2011. – 180 с.

23. Foray N., Colin C., Bourguignon M. 100 Years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence // *Radiology*. – 2012. – Vol. 264. – № 3. – P. 627–631.
24. Schnarr K., Dayes I., Sathya J., Boreham D. Individual Radiosensitivity and its Relevance to Health Physics // *Dose-Response*. – 2007. – Vol. 5. – № 4. – P. 333–348.
25. Taylor A.M., Wakeford R. Human radiosensitivity: report of the independent advisory group on ionising radiation. – 2013.
26. El-Nachef L., Al-Choboq J., Restier-Verlet J. et al. Human radiosensitivity and radiosusceptibility: What are the differences? // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 13. – P. 7158.
27. Bouffler S.D. Evidence for variation in human radiosensitivity and its potential impact on radiological protection // *Ann. ICRP*. – 2015. – Vol. 45. – P. 280–289.
28. Васильев С.А., Лебедев И.Н. Цитогенетические и экспрессионные маркеры индивидуальной радиочувствительности // *Медицинская генетика*. – 2018. – Т. 17. – № 1. – С. 3–8.
29. Amundson S.A., Do K.T., Shahab S., Bittner M., Meltzer P., Trent J., Fornace J. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation // *Radiat. Res.* – 2000. – Vol. 154. – № 3. – P. 342–346.
30. Marchetti F., Coleman M.A., Jones I.M., Wyrobek A.J. Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2006. – Vol. 82. – № 9. – P. 605–639.
31. Torres-Roca J.F., Eschrich S., Zhao H. et al. Prediction of radiation sensitivity using a gene expression classifier // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – № 16. – P. 7169–7176.
32. Fernet M., Hall J. Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity // *DNA Repair (Amst)*. – 2004. – Vol. 3. – № 8–9. – P. 1237–1243.
33. Domina E.A., Philchenkov A., Dubrovskaya A. Individual Response to Ionizing Radiation and Personalized Radiotherapy // *Crit. Rev. Oncog.* – 2018. – Vol. 23. – № 1–2. – P. 69–92.
34. Hall J., Jeggo P.A., West C. et al. Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies – An update // *Mutat. Res. Mutat. Res.* – 2017. – Vol. 771. – P. 59–84.
35. Forker L.J., Choudhury A., Kiltie A.E. Biomarkers of Tumour Radiosensitivity and Predicting Benefit from Radiotherapy // *Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 27. – № 10. – P. 561–569.
36. Subedi P., Gomolka M., Moertl S., Dietz A. Ionizing Radiation Protein Biomarkers in Normal Tissue and Their Correlation to Radiosensitivity: A Systematic Review // *J. Pers. Med.* – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 140.

37. Greve B., Bölling T., Amler S. et al. Evaluation of Different Biomarkers to Predict Individual Radiosensitivity in an Inter-Laboratory Comparison-Lessons for Future Studies // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – № 10. – P. 1–12.
38. Ferlazzo M.L., Bourguignon M., Foray N. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review // Seminars in Radiation Oncology. – 2017. – Vol. 27. – № 4. – P. 310–315.
39. Taylor A.M.R., Harnden D.G., Arlett C.F., Harcourt S.A., Lehmann A.R., Stevens S., Bridges B.A. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity // Nature. – 1975. – Vol. 258. – № 5534. – P. 427–429.
40. Plowman P.N., Bridges B.A., Arlett C.F., Hinney A., Kingston J.E. An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia // Br. J. Radiol. – 1990. – Vol. 63. – № 752. – P. 624–628.
41. Ben-Omran T.I., Cerosaletti K., Concannon P., Weitzman S., Nezarati M.M. A patient with mutations in DNA Ligase IV: Clinical features and overlap with Nijmegen breakage syndrome // Am. J. Med. Genet. Part A. – 2005. – Vol. 137A. – № 3. – P. 283–287.
42. Arlett C.F., Plowman P.N., Rogers P.B. et al. Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum // Br. J. Radiol. – 2006. – Vol. 79. – № 942. – P. 510–517.
43. Chua M.L.K., Rothkamm K. Biomarkers of Radiation Exposure: Can They Predict Normal Tissue Radiosensitivity? // Clin. Oncol. – 2013. – Vol. 25. – № 10. – P. 610–616.
44. Васильев С.А., Тимошевский В.А., Лебедев И.Н. Цитогенетические механизмы генерации анеуплоидии в соматических клетках профессионалов ядерно-химического производства с инкорпорированным плутонием-239 // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 11. – С. 1565–1570.
45. Granzotto A., Benadjaoud M.A., Vogin G. et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity // Int. J. Radiat. Oncol. – 2016. – Vol. 94. – № 3. – P. 450–460.
46. Mumbrekar K.D., Fernandes D.J., Goutham H.V., Sharan K., Vадhiraja B.M., Satyamoorthy K., Bola Sadashiva S.R. Influence of double-strand break repair on radiation therapy-induced acute skin reactions in breast cancer patients // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2014. – Vol. 88. – № 3. – P. 671–676.
47. Podhorecka M., Skladanowski A., Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy // J. Nucleic Acids. – 2010. – Vol. 2010. – 9 p.
48. Andreassen C.N., Schack L.M.H., Laursen L.V., Alsner J. Radiogenomics – current status,

- challenges and future directions // *Cancer Lett.* – 2016. – Vol. 382. – № 1. – P. 127–136.
49. Eke I., Schneider L., Förster C., Zips D., Kunz-Schughart L.A., Cordes N. EGFR/JIP-4/JNK2 signaling attenuates cetuximab-mediated radiosensitization of squamous cell carcinoma cells // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – № 1. – P. 297–306.
 50. Otomo T., Hishii M., Arai H., Sato K., Sasai K. Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes // *J. Radiat. Res.* – 2004. – Vol. 45. – № 1. – P. 53–60.
 51. Eke I., Cordes N. Radiobiology goes 3D: How ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation // *Radiotherapy and Oncology.* – 2011. – Vol. 99. – № 3. – P. 271–278.
 52. Krasny L., Shimony N., Tzukert K., Gorodetsky R., Lecht S., Nettelbeck D.M., Haviv Y.S. An in-vitro tumour microenvironment model using adhesion to type I collagen reveals Akt-dependent radiation resistance in renal cancer cells // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2010. – Vol. 25. – № 2. – P. 373–380.
 53. Ярмоненко С.П., Вайсон А.А. Радиобиология человека и животных / М. : Высш. шк., 2004. – 549 с.
 54. Джойнер М.С., ван дер Когель О.Д. Основы клинической радиобиологии / пер. с англ. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 600 с.
 55. Woodws W.G., Byrne T.D., Kim T.H. Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity // *Canser.* – 1988. – Vol. 62. – № 11. – P. 2341–2345.
 56. Gentner N.E., Morrison D.P. Determination of the proportion of persons in the population-at-large who exhibit abnormal sensitivity to ionizing radiation // 14th L H Gray Conference. – 1989. – P. 253–262.
 57. Little J.B., Nove J. Sensitivity of human diploid fibroblast cell strains from various genetic disorders to acute and protracted radiation exposure // *Radiat Res.* – 1990. – Vol. 123. – № 1. – P. 87–92.
 58. Rajaraman P., Hauptmann M., Bouffler S., Wojcik A. Human individual radiation sensitivity and prospects for prediction // *Ann. ICRP.* – 2018. – Vol. 47. – № 3–4. – P. 126–141.
 59. Mossman K.L. Radiation protection of radiosensitive populations // *Health Phys.* – 1997. – Vol. 72. – № 4. – P. 519–523.
 60. Мельников А.А., Васильев С.А., Смольникова Е.В. et al. Динамика хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах больных злокачественными новообразованиями при нейтронной терапии // *Сибирский онкологический журнал.*

– 2012. – № 4. – С. 52–56.

61. Ахматьянова В.Р., Минина В.И., Дружинин В.Г., Тимофеева А.А., Головина Т.А., Глушков А.Н. Индуцированные радоном хромосомные aberrации в лимфоцитах крови у детей в связи с полиморфизмом генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков // Медицина в Кузбассе. – 2012. – Т. 11. – № 2. – С. 45–49.
62. Дружинин В.Г., Ахматьянова В.Р., Головина Т.А., Волков А.Н., Минина В.И., Ларионов А.В., Макеева Е.А. Чувствительность генома и особенности проявления генотоксических эффектов у детей-подростков, подвергающихся воздействию радона в учебных и жилых помещениях школы-интерната // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49. – № 5. – С. 568–573.
63. Barnett G.C., West C.M.L., Dunning A.M., Elliott R.M., Coles C.E., Pharoah P.D.P., Burnet N.G. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype // Nat. Rev. Cancer. – 2009. – Vol. 9. – № 2. – P. 134–142.
64. Roberts S.A., Spreadborough A.R., Bulman B., Barber J.B.P., Evans D.G.R., Scott D. Heritability of cellular radiosensitivity: a marker of low-penetrance predisposition genes in breast cancer? // Am. J. Hum. Genet. – 1999. – Vol. 65. – № 3. – P. 784.
65. Wu X., Spitz M.R., Amos C.I. et al. Mutagen Sensitivity Has High Heritability: Evidence from a Twin Study // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66. – № 12. – P. 5993–5996.
66. Kerns S.L., Ostrer H., Rosenstein B.S. Radiogenomics: using genetics to identify cancer patients at risk for development of adverse effects following radiotherapy // Cancer Discov. – 2014. – Vol. 4. – № 2. – P. 155–165.
67. Sedelnikova O.A., Pilch D.R., Redon C., Bonner W.M. Histone H2AX in DNA damage and repair // Cancer Biol. Ther. – 2003. – Vol. 2. – № 3. – P. 233–235.
68. Pereira S., Bodgi L., Duclos M. et al. Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the Theory of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2018. – Vol. 100. – № 2. – P. 353–360.
69. Marková E., Somsedíková A., Vasilyev S., Pobijaková M., Lacková A., Lukačko P., Belyaev I. DNA repair foci and late apoptosis/necrosis in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients undergoing radiotherapy // Int. J. Radiat. Biol. – 2015. – Vol. 91. – № 12. – P. 934–945.
70. Adjemian S., Oltean T., Martens S. et al. Ionizing radiation results in a mixture of cellular outcomes including mitotic catastrophe, senescence, methuosis, and iron-dependent cell death // Cell Death Dis. – 2020. – Vol. 11. – № 11. – P. 1–15.
71. Boag J.W. The time scale in radiobiology. 12th Fialia memorial lecture. // Radiation

- Research. Proceedings of the 5th International Congress of Radiation research / ed. Nygaard O.F., Adler H.I. S.W.K. – 1972. – P. 9–29.
72. Goodhead D.T. Energy deposition stochastics and track structure: What about the target? // Radiation Protection Dosimetry. – 2006. – Vol. 122. – № 1–4. – P. 3–15.
 73. Chapman J.D., Gillespie C.J. Radiation-Induced Events and Their Time Scale in Mammalian Cells. – 1981. – Vol. 9. – P. 143–198.
 74. Wartens R.L., Hofer K.G., Harris C.R. S.J.M. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: elucidation of the primary site of radiation damage // Curr Top Radiat Res Q. – 1978. – Vol. 12. – P. 389–407.
 75. Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17. – № 1.
 76. Seltzer S.M., Bartlett D.T., Burns D.T., Dietze G., Menzel H.G., Paretzke H.G., Wambersie A. Fundamental quantities and units for ionizing radiation // J. ICRU. – 2011. – Vol. 11. – № 1. – P. 1–41.
 77. Hall E.J. G.A.J. Radiobiology for the Radiologist. 7th ed. / ed. Mitchel C.W. – 2012. – 576 p.
 78. Prasad R., Beard W.A., Batra V.K., Liu Y., Shock D.D., Wilson S.H. A review of recent experiments on step-to-step “hand-off” of the DNA intermediates in mammalian base excision repair pathways. // Molekuliarnaia biologii. – 2011. – Vol. 45. – № 4. – P. 586–600.
 79. Harper J.W., Elledge S.J. The DNA Damage Response: Ten Years After // Molecular Cell. – 2007. – Vol. 28. – № 5. – P. 739–745.
 80. Falck J., Coates J., Jackson S.P. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage // Nature. – 2005. – Vol. 434. – № 7033. – P. 605–611.
 81. Babushkina N.P., Postrigan A.E., Kucher A.N. Involvement of Variants in the Genes Encoding BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex (BASC) in the Development of Human Common Diseases // Mol. Biol. (Mosk). – 2021. – Vol. 55. – № 2. – P. 318–337.
 82. O’Driscoll M., Jeggo P.A. The role of double-strand break repair - Insights from human genetics // Nature Reviews Genetics. – 2006. – Vol. 7. – № 1. – P. 45–54.
 83. McKinnon P.J. Ataxia-telangiectasia: an inherited disorder of ionizing-radiation sensitivity in man - Progress in the elucidation of the underlying biochemical defect // Human Genetics. – 1987. – Vol. 75. – № 3. – P. 197–208.
 84. Vignard J., Mirey G., Salles B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A

- direct and indirect lighting up // *Radiotherapy and Oncology*. – 2013. – Vol. 108. – № 3. – P. 362–369.
85. Gatti R.A. The Inherited Basis of Human Radiosensitivity // *Acta Oncol. (Madr)*. – 2001. – Vol. 40. – № 6. – P. 702–711.
 86. Van Veelen L.R., Cervelli T., Van De Rakt M.W.M.M., Theil A.F., Essers J., Kanaar R. Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins // *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2005. – Vol. 574. – № 1-2 SPEC. ISS. – P. 22–33.
 87. Baretic D., Maia de Oliveira T., Niess M. et al. Structural insights into the critical DNA damage sensors DNA-PKcs, ATM and ATR // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 147. – P. 4–16.
 88. Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage // *Science (80-.)*. – 2007. – Vol. 316. – № 5828. – P. 1160–1166.
 89. Stein Y., Rotter V., Aloni-Grinstein R. Gain-of-function mutant p53: All the roads lead to tumorigenesis // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 24.
 90. Chen J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. – 2016. – Vol. 6. – № 3.
 91. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints // *Annual Review of Biochemistry*. – 2004. – Vol. 73. – P. 39–85.
 92. Deckbar D., Jeggo P.A., Löbrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 46. – № 4. – P. 271–283.
 93. Sung P., Klein H. Mechanism of homologous recombination: Mediators and helicases take on regulatory functions // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2006. – Vol. 7. – № 10. – P. 739–750.
 94. Chang H.H.Y., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2017. – Vol. 18. – № 8. – P. 495–506.
 95. Dent P., Yacoub A., Contessa J. et al. Stress and Radiation-Induced Activation of Multiple Intracellular Signaling Pathways Linked references are available on JSTOR for this article : Stress and Radiation-Induced Activation of Multiple Intracellula Signaling Pathways // *Radiat. Res*. – 2003. – Vol. 159. – № 3. – P. 283–300.
 96. Valerie K., Yacoub A., Hagan M.P., Curiel D.T., Fisher P.B., Grant S., Dent P. Radiation-

- induced cell signaling: Inside-out and outside-in // *Mol. Cancer Ther.* – 2007. – Vol. 6. – № 3. – P. 789–801.
97. Munshi A., Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. // *Genes Cancer.* – 2013. – Vol. 4. – № 9–10. – P. 401–408.
 98. Мазурик В.К. Роль регуляторных сетей ответа клеток на повреждения в формировании радиационных эффектов // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2005. – Т. 45. – № 1. – С. 26–45.
 99. Dent P., Yacoub A., Fisher P.B., Hagan M.P., Grant S. MAPK pathways in radiation responses // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – № 37. – P. 5885–5896.
 100. Zhan M., Han Z.C. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT in radiation responses // *Histol. Histopathol.* – 2004. – Vol. 19. – № 3. – P. 915–923.
 101. Schuurbijs O.C.J., Kaanders J.H.A.M., Van Der Heijden H.F.M., Dekhuijzen R.P.N., Oyen W.J.G., Bussink J. The PI3-K/AKT-Pathway and Radiation Resistance Mechanisms in Non-small Cell Lung Cancer // *J. Thorac. Oncol.* – 2009. – Vol. 4. – № 6. – P. 761–767.
 102. Toulany M., Kasten-Pisula U., Brammer I., Wang S., Chen J., Dittmann K., Baumann M., Dikomey E., Rodemann H.P. Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – № 13. – P. 4119–4126.
 103. Komiya Y., Habas R. Wnt signal transduction pathways // *Organogenesis.* – 2008. – Vol. 4. – № 2. – P. 68.
 104. Klaus A., Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – № 5. – P. 387–398.
 105. Huang D., Du X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 14. – № 12. – P. 1823–1827.
 106. Thotala D.K., Geng L., Dickey A.K., Hallahan D.E., Yazlovitskaya E.M. A new class of molecular targeted radioprotectors: GSK-3beta inhibitors // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2010. – Vol. 76. – № 2. – P. 557–565.
 107. Hai B., Yang Z., Shangguan L., Zhao Y., Boyer A., Liu F. Concurrent transient activation of Wnt/ β -catenin pathway prevents radiation damage to salivary glands // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2012. – Vol. 83. – № 1. – P. e109–e116.
 108. Zhao J., Kim K.A., De Vera J., Palencia S., Wagle M., Abo A. R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/ β -catenin pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – Vol. 106. – № 7. – P. 2331–

2336.

109. Wang J.F., Liu C., Zhang Q., Huang G.H. Research progress in the radioprotective effect of the canonical Wnt pathway // *Cancer Biol. Med.* – 2013. – Vol. 10. – № 2. – P. 61.
110. Rodemann H.P., Blaese M.A. Responses of normal cells to ionizing radiation // *Semin. Radiat. Oncol.* – 2007. – Vol. 17. – № 2. – P. 81–88.
111. 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 // *Science Signaling.* – 2014. – Vol. 7. – № 341.
112. Ewan K.B., Henshall-Powell R.L., Ravani S.A., Pajares M.J., Arteaga C., Warters R., Akhurst R.J., Barcellos-Hoff M.H. Transforming growth factor- β 1 mediates cellular response to DNA damage in situ // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – № 20. – P. 5627–5631.
113. Kirshner J., Jobling M.F., Pajares M.J., Ravani S.A., Glick A.B., Lavin M.J., Koslov S., Shiloh Y., Barcellos-Hoff M.H. Inhibition of transforming growth factor- β 1 signaling attenuates ataxia telangiectasia mutated activity in response to genotoxic stress // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – № 22. – P. 10861–10869.
114. Criswell T., Leskov K., Miyamoto S., Luo G., Boothman D.A. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – № 37 REV. ISS. 3. – P. 5813–5827.
115. Yue B. Biology of the extracellular matrix: An overview // *Journal of Glaucoma.* – 2014. – Vol. 23. – № 8. – P. S20–S23.
116. Bonnans C., Chou J., Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2014. – Vol. 15. – № 12. – P. 786–801.
117. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., Karamanos N.K. Extracellular matrix structure // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2016. – Vol. 97. – P. 4–27.
118. Laurent M.A., Bonnier D., Théret N., Tufféry P., Moroy G. In silico characterization of the interaction between LSKL peptide, a LAP-TGF- β derived peptide, and ADAMTS1 // *Comput. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 61. – P. 155–161.
119. Iozzo R. V., Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans // *Matrix Biology.* – 2015. – Vol. 42. – P. 11–55.
120. Ricard-Blum S. The Collagen Family // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – Vol. 3. – № 1. – P. 1–19.
121. Schwarzbauer J.E., DeSimone D.W. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* – 2011. – Vol. 3. – № 7. – P. 1–

- 19.
122. Durbeej M. Laminins // *Cell and Tissue Research*. – 2010. – Vol. 339. – № 1. – P. 259–268.
123. Turk B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2006. – Vol. 5. – № 9. – P. 785–799.
124. Lin C.H., Pelissier F.A., Zhang H., Lakins J., Weaver V.M., Park C., LaBarge M.A. Microenvironment rigidity modulates responses to the HER2 receptor tyrosine kinase inhibitor lapatinib via YAP and TAZ transcription factors // *Mol. Biol. Cell*. – 2015. – Vol. 26. – № 22. – P. 3946–3953.
125. Cordes N., Meineke V. Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR): Extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells in vitro // *Strahlentherapie und Onkol.* – 2003. – Vol. 179. – № 5. – P. 337–344.
126. Adams J.C., Lawler J. The thrombospondins // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – Vol. 3. – № 10. – P. 1–29.
127. Dawson D.W., Pearce S.F.A., Zhong R., Silverstein R.L., Frazier W.A., Bouck N.P. CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells // *J. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 138. – № 3. – P. 707–717.
128. Isenberg J.S., Martin-Manso G., Maxhimer J.B., Roberts D.D. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: Implications for anti-angiogenic therapies // *Nature Reviews Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – № 3. – P. 182–194.
129. Hankenson K.D., Sweetwyne M.T., Shitaye H., Posey K.L. Thrombospondins and novel TSR-containing proteins, R-spondins, regulate bone formation and remodeling // *Current Osteoporosis Reports*. – 2010. – Vol. 8. – № 2. – P. 68–76.
130. Chistiakov D.A., Melnichenko A.A., Myasoedova V.A., Grechko A. V., Orekhov A.N. Thrombospondins: A role in cardiovascular disease // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – № 7. – P. 1540.
131. Wu X., Luo X., Zhu Q., Zhang J., Liu Y., Luo H., Cheng Y., Xie Z. The roles of thrombospondins in hemorrhagic stroke // *BioMed Research International*. – 2017. – Vol. 2017.
132. Kazerounian S., Yee K.O., Lawler J. Thrombospondins: From structure to therapeutics - Thrombospondins in cancer // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – Vol. 65. – № 5. – P. 700–712.
133. Carminati L., Taraboletti G. Thrombospondins in bone remodeling and metastatic bone disease // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* – 2020. – Vol. 319. – № 6. – P. C980–C990.
134. The Human Protein Atlas [Electronic resource]. URL: <https://www.proteinatlas.org/>

(accessed: 13.06.2021).

135. Murphy-Ullrich J.E., Poczatek M. Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: Mechanisms and physiology // *Cytokine and Growth Factor Reviews*. – 2000. – Vol. 11. – № 1–2. – P. 59–69.
136. Daniel C., Wiede J., Krutzsch H.C., Ribeiro S.M.F., Roberts D.D., Murphy-Ullrich J.E., Hugo C. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β in fibrotic renal disease in the rat in vivo // *Kidney Int.* – 2004. – Vol. 65. – № 2. – P. 459–468.
137. Nör J.E., Dipietro L., Murphy-Ullrich J.E., Hynes R.O., Lawler J., Polverini P.J. Activation of Latent TGF- β 1 by Thrombospondin-1 is a Major Component of Wound Repair. // *Oral Biosci. Med.* – 2005. – Vol. 2. – № 2. – P. 153–161.
138. Daubon T., Léon C., Clarke K. et al. Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1–15.
139. Kaur S., Bronson S.M., Pal-Nath D., Miller T.W., Soto-Pantoja D.R., Roberts D.D. Functions of thrombospondin-1 in the tumor microenvironment // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 4570.
140. Soto-Pantoja D.R., Kaur S., Roberts D.D. CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 50. – № 3. – P. 212–230.
141. Zhao H., Han Z., Ji X., Luo Y. Epigenetic regulation of oxidative stress in ischemic stroke // *Aging and Disease*. – 2016. – Vol. 7. – № 3. – P. 295–306.
142. Roberts D.D., Kaur S., Isenberg J.S. Regulation of cellular redox signaling by extracellular proteins in vascular biology, immunology, and cancer // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2017. – Vol. 27. – № 12. – P. 874–911.
143. Gutierrez L.S., Gutierrez J. Thrombospondin 1 in Metabolic Diseases // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. – № March. – P. 1–12.
144. Adams J.C., Lawler J. The thrombospondins // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36. – № 6. – P. 961.
145. Jeanne A., Schneider C., Martiny L., Dedieu S. Original insights on thrombospondin-1-related antireceptor strategies in cancer // *Frontiers in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 252.
146. Isenberg J.S., Frazier W.A., Roberts D.D. Thrombospondins: From structure to therapeutics - Thrombospondin-1: A physiological regulator of nitric oxide signaling // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – Vol. 65. – № 5. – P. 728–742.
147. 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 - Biol. Chem. – 2009. – Vol. 21. – № 1. – P. 52–62.
148. Zhang X., Kazerounian S., Duquette M., Perruzzi C., Nagy J.A., Dvorak H.F., Parangi S., Lawler J. Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level // FASEB J. – 2009. – Vol. 23. – № 10. – P. 3368–3376.
 149. Kaur S., Martin-Manso G., Pendrak M.L., Garfield S.H., Isenberg J.S., Roberts D.D. Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47 // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – № 50. – P. 38923–38932.
 150. Li S.S., Liu Z., Uzunel M., Sundqvist K.G. Endogenous thrombospondin-1 is a cell-surface ligand for regulation of integrin-dependent T-lymphocyte adhesion // Blood. – 2006. – Vol. 108. – № 9. – P. 3112–3120.
 151. Sick E., Jeanne A., Schneider C., Dedieu S., Takeda K., Martiny L. CD47 update: A multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest // British Journal of Pharmacology. – 2012. – Vol. 167. – № 7. – P. 1415–1430.
 152. Manna P.P., Dimitry J., Oldenborg P.A., Frazier W.A. CD47 augments fas/CD95-mediated apoptosis // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – № 33. – P. 29637–29644.
 153. Saumet A., Slimane M. Ben, Lanotte M., Lawler J., Dubernard V. Type 3 repeat/C-terminal domain of thrombospondin-1 triggers caspase-independent cell death through CD47/ $\alpha v \beta 3$ in promyelocytic leukemia NB4 cells // Blood. – 2005. – Vol. 106. – № 2. – P. 658–667.
 154. 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 - Mol. Cell Res. – 2006. – Vol. 1763. – № 10. – P. 1125–1134.
 155. Jayachandran A., Anaka M., Prithviraj P. et al. Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5. – № 14. – P. 5782–5797.
 156. 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. – Vol. 28. – № 1. – P. 73–81.
 157. Grimbart 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. – Vol. 177. – № 6. – P. 3534–3541.
 158. Bi J., Bai Z., Ma X., Song J., Guo Y., Zhao J., Yi X., Han S., Zhang Z. Tsr1: An important factor in oxaliplatin resistance in gastric cancer // Med. Oncol. – 2014. – Vol. 31. – № 2.

159. Mead T.J., Apte S.S. ADAMTS proteins in human disorders // *Matrix Biology*. – 2018. – Vol. 71–72. – P. 225–239.
160. Apte S.S. ADAMTS Proteins: Concepts, Challenges, and Prospects // *Methods Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 2043. – P. 1–12.
161. Zhong S., Khalil R.A. A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease // *Biochem. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 164. – P. 188–204.
162. Rose K.W.J., Taye N., Karoulias S.Z., Hubmacher D. Regulation of ADAMTS Proteases // *Front. Mol. Biosci.* – 2021. – Vol. 8.
163. Kelwick R., Desanlis I., Wheeler G.N., Edwards D.R. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family // *Genome Biol.* – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 1–16.
164. Porter S., Clark I.M., Kevorkian L., Edwards D.R. The ADMTS metalloproteinases // *Biochemical Journal*. – 2005. – Vol. 386. – № 1. – P. 15–27.
165. Kelwick R., Desanlis I., Wheeler G.N., Edwards D.R. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family // *Genome Biol.* – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 1–16.
166. Yang C.Y., Chanalaris A., Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis – looking beyond the ‘usual suspects’ // *Osteoarthritis and Cartilage*. – 2017. – Vol. 25. – № 7. – P. 1000–1009.
167. Salter R.C., Ashlin T.G., Kwan A.P.L., Ramji D.P. ADAMTS proteases: Key roles in atherosclerosis? // *Journal of Molecular Medicine*. – 2010. – Vol. 88. – № 12. – P. 1203–1211.
168. Rienks M., Barallobre-Barreiro J., Mayr M. The emerging role of the ADAMTS family in vascular diseases // *Circulation Research*. – 2018. – Vol. 123. – № 12. – P. 1279–1281.
169. Zhong S., Khalil R.A. A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease // *Biochemical Pharmacology*. – 2019. – Vol. 164. – P. 188–204.
170. Mohamedi Y., Fontanil T., Cobo T., Cal S., Obaya A.J. New insights into adamts metalloproteases in the central nervous system // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – № 3.
171. Russell D.L., Brown H.M., Dunning K.R. ADAMTS proteases in fertility // *Matrix Biology*. – 2015. – Vol. 44–46. – P. 54–63.
172. Cal S., López-Otín C. ADAMTS proteases and cancer // *Matrix Biology*. – 2015. – Vol. 44–46. – P. 77–85.
173. Sun Y., Huang J., Yang Z. The roles of ADAMTS in angiogenesis and cancer // *Tumor*

Biology. – 2015. – Vol. 36. – № 6. – P. 4039–4051.

174. Dancevic C.M., McCulloch D.R., Ward A.C. The ADAMTS hyaluronanase family: biological insights from diverse species // *Biochem. J.* – 2016. – Vol. 473. – № 14. – P. 2011–2022.
175. Ensembl genome browser 106 [Electronic resource]. URL: <https://www.ensembl.org/index.html> (accessed: 16.05.2022).
176. Home - Gene - NCBI [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (accessed: 16.05.2022).
177. Karakose M., Demircan K., Tural 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. – Vol. 39. – № 11. – P. 1269–1275.
178. Hatipoglu O.F., Hirohata S., Cilkek M.Z. et al. ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – № 24. – P. 16325–16333.
179. Tayman M.A., Kurgan Ş., Önder C., Güney Z., Serdar M.A., Kantarcı A., Günhan M. 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. – Vol. 90. – № 10. – P. 1182–1189.
180. Armutcu F., Demircan K., Yildirim U., Namuslu M., Yagmurca M., Celik H.T. Hypoxia causes important changes of extracellular matrix biomarkers and ADAMTS proteinases in the adriamycin-induced renal fibrosis model // *Nephrology.* – 2019. – Vol. 24. – № 8. – P. 863–875.
181. Wen Y.C., Lin Y.W., Chu C.Y., Yang Y.C., Yang S.F., Liu Y.F., Hsiao M., Lee W.J., Chien M.H. Melatonin-triggered post-transcriptional and post-translational modifications of ADAMTS1 coordinately retard tumorigenesis and metastasis of renal cell carcinoma // *J. Pineal Res.* – 2020. – Vol. 69. – № 2.
182. 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. – Vol. 8. – № 55. – P. 94091–94103.
183. Brancaccio M., Natale F., Falco G., Angrisano T. Cell-free dna methylation: The new frontiers of pancreatic cancer biomarkers' discovery // *Genes.* – 2020. – Vol. 11. – № 1.
184. Mezentssev A., Amundson S.A. Global Gene Expression Responses to Low- or High-Dose Radiation in a Human Three-Dimensional Tissue Model // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175. – № 6. – P. 677–688.

185. sgRNA Scorer 2.0 [Electronic resource]. URL: <https://sgnascorer.cancer.gov/sgRNAScorer/> (accessed: 17.05.2021).
186. Edie S., Zaghoul N.A., Leitch C.C., Klinedinst D.K., Lebron J., Thole J.F., McCallion A.S., Katsanis N., Reeves R.H. Survey of human chromosome 21 gene expression effects on early development in *Danio rerio* // *G3 Genes, Genomes, Genet.* – 2018. – Vol. 8. – № 7. – P. 2215–2223.
187. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells // *Mutagenesis.* – 2011. – Vol. 26. – № 1. – P. 125–132.
188. Martin O.A., Ivashkevich A., Choo S., Woodbine L., Jeggo P.A., Martin R.F., Lobachevsky P. 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. – Vol. 12. – № 10. – P. 844–855.
189. Васильев С.А., Величевская А.И., Вишневская Т.В., Беленко А.А., Грибова О.В., Плаксин М.Б., Старцева Ж.А. Л.И.Н. Фоновое количество фокусов γ H2AX в клетках человека как фактор индивидуальной радиочувствительности // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2015. – Т. 55. – № 4. – С. 402–410.
190. 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. – Vol. 25. – № 4. – P. 402–408.
191. STRING: functional protein association networks [Electronic resource]. URL: <https://string-db.org/> (accessed: 19.05.2021).
192. MutationTaster [Electronic resource]. URL: <http://www.mutationtaster.org/> (accessed: 15.06.2021).
193. Zhou Z.Q., Cao W.H., Xie J.J., Lin J., Shen Z.Y., Zhang Q.Y., Shen J.H., Xu L.Y., Li E.M. Expression and prognostic significance of THBS1, Cyr61 and CTGF in esophageal squamous cell carcinoma // *BMC Cancer.* – 2009. – Vol. 9. – № 1. – P. 291.
194. Nakao T., Kurita N., Komatsu M., Yoshikawa K., Iwata T., Utsunomiya T., Shimada M. Expression of thrombospondin-1 and Ski are prognostic factors in advanced gastric cancer // *Int. J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 16. – № 2. – P. 145–152.
195. Rouanne M., Adam J., Goubar A. et al. Osteopontin and thrombospondin-1 play opposite roles in promoting tumor aggressiveness of primary resected non-small cell lung cancer // *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16. – № 1.
196. Oller J., Méndez-Barbero N., Ruiz E.J. et al. Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease Adamts1 and in a mouse model of Marfan syndrome //

- Nat. Med. – 2017. – Vol. 23. – № 2. – P. 200–212.
197. Markova E., Vasilyev S., Belyaev I. 53BP1 foci as a marker of tumor cell radiosensitivity // *Neoplasma*. – 2015. – Vol. 62. – № 5. – P. 770–776.
 198. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 31. – № 9. – P. 822–826.
 199. Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., Ma E., Doudna J.A., Liu D.R. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 31. – № 9. – P. 839–843.
 200. 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 // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – № 11. – P. 7473–7485.
 201. Tsai S.Q., Zheng Z., Nguyen N.T. et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases // *Nat. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 33. – № 2. – P. 187–198.
 202. 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. – Vol. 35. – № 1. – P. 95–104.
 203. Li M., Liu Q., Lei J., Wang X., Chen X., Ding Y. MiR-362-3p inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis by targeting ADAMTS1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 493. – № 1. – P. 270–276.
 204. Apte S.S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: Functions and mechanisms // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – № 46. – P. 31493–31497.
 205. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression // *Nature Reviews Cancer*. – 2002. – Vol. 2. – № 3. – P. 161–174.
 206. Bourd-Boittin K., Bonnier D., Leyme A., Mari B., Tuffery P., Samson M., Ezan F., Baffet G., Theret N. 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. – Vol. 54. – № 6. – P. 2173–2184.
 207. Le Bras G.F., Taylor C., Koumangoye R.B., Revetta F., Loomans H.A., Andl C.D. TGFβ loss activates ADAMTS-1-mediated EGF-dependent invasion in a model of esophageal cell invasion // *Exp. Cell Res.* – 2015. – Vol. 330. – № 1. – P. 29–42.
 208. Barcellos-Hoff M.H., Cucinotta F.A. New tricks for an old fox: Impact of TGFβ on the DNA damage response and genomic stability // *Science Signaling*. – 2014. – Vol. 7. –

№ 341.

209. Kirshner J., Jobling M.F., Pajares M.J., Ravani S.A., Glick A.B., Lavin M.J., Koslov S., Shiloh Y., Barcellos-Hoff M.H. Inhibition of transforming growth factor- β 1 signaling attenuates ataxia telangiectasia mutated activity in response to genotoxic stress // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – № 22. – P. 10861–10869.
210. Wiegman E.M., Blaese M.A., Loeffler H., Coppes R.P., Rodemann H.P. TGF β -1 dependent fast stimulation of ATM and p53 phosphorylation following exposure to ionizing radiation does not involve TGF β -receptor I signalling // *Radiother. Oncol.* – 2007. – Vol. 83. – № 3. – P. 289–295.
211. Liu S.C., Tsang N.M., Chiang W.C., Chang K.P., Hsueh C., Liang Y., Juang J.L., Chow K.P.N., Chang Y.S. Leukemia inhibitory factor promotes nasopharyngeal carcinoma progression and radioresistance // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123. – № 12. – P. 5269–5283.
212. Eckers J.C., Kalen A.L., Xiao W., Sarsour E.H., Goswami P.C. Selenoprotein P inhibits radiation-induced late reactive oxygen species accumulation and normal cell injury // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2013. – Vol. 87. – № 3. – P. 619–625.
213. Sun Z., Wang X., Wang J. et al. Key radioresistance regulation models and marker genes identified by integrated transcriptome analysis in nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Med.* – 2021. – Vol. 10. – № 20. – P. 7404–7417.
214. Huang T., Sun L., Yuan X., Qiu H. Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – № 48. – P. 84546–84558.
215. Liu J., Li J., Li P., Jiang Y., Chen H., Wang R., Cao F., Liu P. DLG5 suppresses breast cancer stem cell-like characteristics to restore tamoxifen sensitivity by inhibiting TAZ expression // *J. Cell. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 23. – № 1. – P. 512–521.
216. Herbert K., Binet R., Lambert J.P. et al. BRN2 suppresses apoptosis, reprograms DNA damage repair, and is associated with a high somatic mutation burden in melanoma // *Genes Dev.* – 2019. – Vol. 33. – № 5–6. – P. 310–332.
217. You Y., Wen R., Pathak R., Li A., Li W., St Clair D., Hauer-Jensen M., Zhou D., Liang Y. Latexin sensitizes leukemogenic cells to gamma irradiation-induced cell-cycle arrest and cell death through Rps3 pathway // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol. 5. – № 10. – P. 273–283.
218. Yamaguchi M., Nishida T., Sato Y., Nakai Y., Kashiwakura I. Identification of Radiation-Dose-Dependent Expressive Genes in Individuals Exposed to External Ionizing Radiation // *Radiat. Res.* – 2020. – Vol. 193. – № 3. – P. 274–285.
219. Yoshida Y., Tsunoda T., Doi K. et al. ALPK2 is Crucial for luminal apoptosis and DNA

- repair-related gene expression in a three-dimensional colonic-crypt model // *Anticancer Res.* – 2012. – Vol. 32. – № 6. – P. 2301–2308.
220. Salim H. Identification of novel tumor biomarkers for sensitivity to radio-and chemotherapy of lung cancer based on genomic analyses // *Karolinska Institutet.* – 2013. – P. 1–14.
 221. Falck J., Coates J., Jackson S.P. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage // *Nature.* – 2005. – Vol. 434. – № 7033. – P. 605–611.
 222. Thacker J., Zdzienicka M.Z. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability // *DNA Repair (Amst).* – 2003. – Vol. 2. – № 6. – P. 655–672.
 223. Edelbrock M.A., Kaliyaperumal S., Williams K.J. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* – 2013. – Vol. 743–744. – P. 53–66.
 224. Robker R.L., Russell D.L., Espey L.L., Lydon J.P., O'Malley B.W., Richards J.S. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – Vol. 97. – № 9. – P. 4689–4694.
 225. Espey L.L., Yoshioka S., Russell D.L., Robker R.L., Fujii S., Richards J.A.S. Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat // *Biol. Reprod.* – 2000. – Vol. 62. – № 4. – P. 1090–1095.
 226. Bender H.R., Campbell G.E., Aytoda P., Mathiesen A.H., Duffy D.M. Thrombospondin 1 (THBS1) Promotes Follicular Angiogenesis, Luteinization, and Ovulation in Primates // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2019. – Vol. 10. – P. 727.
 227. Petrik J.J., Gentry P.A., Feige J.J., LaMarre J. Expression and localization of thrombospondin-1 and -2 and their cell-surface receptor, CD36, during rat follicular development and formation of the corpus luteum // *Biol. Reprod.* – 2002. – Vol. 67. – № 5. – P. 1522–1531.
 228. Tilton S.C., Markillie L.M., Hays S., Taylor R.C., Stenoien D.L. Identification of Differential Gene Expression Patterns after Acute Exposure to High and Low Doses of Low-LET Ionizing Radiation in a Reconstituted Human Skin Tissue // *Radiat. Res.* – 2016. – Vol. 186. – № 5. – P. 531–538.
 229. West C.M., Barnett G.C. Genetics and genomics of radiotherapy toxicity: Towards prediction // *Genome Med.* – 2011. – Vol. 3. – № 8. – P. 1–15.
 230. Warters R.L., Packard A.T., Kramer G.F., Gaffney D.K., Moos P.J. Differential gene expression in primary human skin keratinocytes and fibroblasts in response to ionizing

- radiation // *Radiat. Res.* – 2009. – Vol. 172. – № 1. – P. 82–95.
231. Tewari D., Monk B.J., Al-Ghazi M.S., Parker R., Heck J.D., Burger R.A., Fruehauf J.P. Gene expression profiling of in vitro radiation resistance in cervical carcinoma: a feasibility study // *Gynecol. Oncol.* – 2005. – Vol. 99. – № 1. – P. 84–91.
 232. Amundson S.A., Do K.T., Vinikoor L.C. et al. Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – № 2. – P. 415–424.
 233. Eschrich S.A., Pramana J., Zhang H. et al. A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction of response and prognosis after chemoradiation // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2009. – Vol. 75. – № 2. – P. 489–496.
 234. Eschrich S.A., Fulp W.J., Pawitan Y. et al. Validation of a radiosensitivity molecular signature in breast cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 18. – № 18. – P. 5134–5143.
 235. Hall J.S., Iype R., Senra J. et al. Investigation of Radiosensitivity Gene Signatures in Cancer Cell Lines // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. e86329.
 236. Yang H.J., Kim N., Seong K.M., Youn H.S., Youn B.H. Investigation of Radiation-induced Transcriptome Profile of Radioresistant Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells Using RNA-seq // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 3. – P. e59319.
 237. Forrester H.B., Li J., Leong T., McKay M.J., Sprung C.N. Identification of a radiation sensitivity gene expression profile in primary fibroblasts derived from patients who developed radiotherapy-induced fibrosis // *Radiother. Oncol.* – 2014. – Vol. 111. – № 2. – P. 186–193.
 238. Paul S., Amundson S.A. Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2008. – Vol. 71. – № 4. – P. 1236.
 239. Kabacik S., MacKay A., Tamber N., Manning G., Finnon P., Paillier F., Ashworth A., Bouffler S., Badie C. Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2011. – Vol. 87. – № 2. – P. 115–129.
 240. Lacombe J., Sima C., Amundson S.A., Zenhausern F. Candidate gene biodosimetry markers of exposure to external ionizing radiation in human blood: A systematic review // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13. – № 6. – P. e0198851.
 241. Shalem O., Sanjana N.E., Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9 // *Nat. Rev. Genet.* – 2015. – Vol. 16. – № 5. – P. 299–311.
 242. Przybyla L., Gilbert L.A. A new era in functional genomics screens // *Nat. Rev. Genet.* – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 89–103.
 243. Ju H., Dixon I.M.C. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. // *Can. J. Cardiol.* –

1996. – Vol. 12. – № 12. – P. 1259–1267.
244. Howard C.M., Baudino T.A. Dynamic cell–cell and cell–ECM interactions in the heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2014. – Vol. 70. – P. 19–26.
 245. Venning F.A., Wullkopf L., Erler J.T. Targeting ECM disrupts cancer progression // *Front. Oncol.* – 2015. – Vol. 5.
 246. Keeratichamroen S., Lirdprapamongkol K., Svasti J. Mechanism of ECM-induced dormancy and chemoresistance in A549 human lung carcinoma cells // *Oncol. Rep.* – 2018. – Vol. 39. – № 4. – P. 1765–1774.
 247. Di Modugno F., Colosi C., Trono P., Antonacci G., Ruocco G., Nisticò P. 3D models in the new era of immune oncology: focus on T cells, CAF and ECM // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2019. – Vol. 38. – № 1. – P. 1–14.
 248. Järveläinen H., Sainio A., Koulu M., Wight T.N., Penttinen R. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy // *Pharmacol. Rev.* – 2009. – Vol. 61. – № 2. – P. 198–223.
 249. Gialeli C., Theocharis A.D., Karamanos N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – № 1. – P. 16–27.
 250. Wiegman E.M., Blaese M.A., Loeffler H., Coppes R.P., Rodemann H.P. TGF β -1 dependent fast stimulation of ATM and p53 phosphorylation following exposure to ionizing radiation does not involve TGF β -receptor I signalling // *Radiother. Oncol.* – 2007. – Vol. 83. – № 3. – P. 289–295.
 251. Azzam E.I., Little J.B. The radiation-induced bystander effect: Evidence and significance // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2004. – Vol. 23. – № 2. – P. 61–65.
 252. Najafi M., Fardid R., Hadadi G., Fardid M. The Mechanisms of Radiation-Induced Bystander Effect // *J. Biomed. Phys. Eng.* – 2014. – Vol. 4. – № 4. – P. 163.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1	Рис. 1.1 – Сигнальные пути MAPK и PI3K.	С. 25
2	Рис. 1.2 – Доменная организация тромбоспондинов.	С. 32
3	Рис. 1.3 – Доменная организация тромбоспондина 1 и взаимодействие с различными молекулами клеток и ВКМ.	С. 34
4	Рис. 1.4 – Доменная организация белков семейства ADAMTS.	С. 36
5	Рис. 1.5 – Доменная организация протеазы ADAMTS1.	С. 39
6	Рис. 2.1 – Дизайн исследования.	С. 42
7	Рис. 3.1 – Делеции в экзоне 2 гена ADAMTS1, внесенные с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9.	С. 61
8	Рис. 3.2 – Мутации в экзоне 3 гена THBS1, внесенные с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9.	С. 62
9	Рис. 3.3 – Подтверждение возрастания экспрессии генов ADAMTS1 (А) и THBS1 (Б) после трансфекции с помощью количественной ПЦР в реальном времени.	С. 64
10	Рис. 3.4 – 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).	С. 65
11	Рис. 3.5 – Клональная выживаемость после облучения в дозе 2 Гр.	С. 66
12	Рис. 3.6 – Уровень фокусов белков репарации γ H2AX и 53BP1 на фоне нокаута и сверхэкспрессии гена ADAMTS1 в необлученных клетках (А) и после облучения в дозе 2 Гр (Б).	С. 67
13	Рис. 3.7 – Уровень фокусов белков репарации γ H2AX и 53BP1 на фоне нокаута и сверхэкспрессии гена THBS1 в необлученных клетках (А) и после облучения в дозе 2 Гр (Б).	С. 67
14	Рис. 3.8 – Частота спонтанных и радиационно-индуцированных микроядер на фоне нокаута и сверхэкспрессии генов ADAMTS1 (А) и THBS1 (Б).	С. 69
15	Рис. 3.9 – 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.	С. 74
16	Рис. 3.10 – Гены, изменяющие экспрессию на фоне нокаута и сверхэкспрессии ADAMTS1. (А) уровень экспрессии гена ALPK2, (Б) уровень экспрессии гена LXN, (В) уровень экспрессии гена SEPP1.	С. 77
17	Рис. 3.11 – Гены, изменяющие экспрессию на фоне нокаута и сверхэкспрессии THBS1. (А) уровень экспрессии гена EPB41L3, (Б) уровень экспрессии гена SEPP1.	С. 78
18	Рис. 3.12 – уровни экспрессии генов ADAMTS1 и THBS1 и фокусов белков репарации ДНК в необлученных лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов.	С. 82
19	Рис. 3.13 – Корреляция уровня экспрессии ADAMTS1 с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1 у женщин (А,	С. 83

Продолжение списка иллюстративного материала

	В) и мужчин (Б, Г).	
20	Рис. 3.14 – Корреляция уровня экспрессии <i>THBS1</i> с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1 у женщин (А, В) и мужчин (Б, Г).	С. 84
21	Рис. 3.15 – Частота центромеро-негативных (MnC-), центромеро-позитивных (MnC+) и суммарная частота микроядер (Mn) в лимфоцитах мужчин и женщин в контроле (А) и после воздействия ионизирующим излучением в дозе 2 Гр (Б).	С. 85
22	Рис. 3.16 – Корреляция экспрессии гена <i>ADAMTS1</i> и частоты центромеро-негативных микроядер до облучения (А) и после воздействия ионизирующим излучением (Б) в лимфоцитах индивидов мужского пола.	С. 85
23	Рис. Б1 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>ADAMTS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь апоптоза, индуцированного белком p53 (GO:0072332, 75 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 131
24	Рис. Б2 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>ADAMTS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь апоптоза, индуцированного сигналом, передающимся с поверхности клетки (GO: 0097191, 217 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 132
25	Рис. Б3 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>ADAMTS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в процесс репарации двунитевых разрывов ДНК (GO:0006302, 268 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 133
26	Рис. Б4 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>ADAMTS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в процесс перехода из G ₂ в М-стадию клеточного цикла (GO:0044839, 276 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 134
27	Рис. Б5 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>ADAMTS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь TGF β (KEGG M2642, 86 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 135
28	Рис. Б6 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>THBS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь апоптоза, индуцированного белком p53 (GO:0072332, 75 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 136
29	Рис. Б7 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>THBS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь апоптоза, индуцированного сигналом, передающимся с поверхности клетки (GO: 0097191, 217 генов) (score > 0,9) до облучения	С. 137

Продолжение списка иллюстративного материала

	(А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	
30	Рис. Б8 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>THBS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в процесс репарации двунитевых разрывов ДНК (GO:0006302, 268 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 138
31	Рис. Б9 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>THBS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в процесс перехода из G ₂ в М-стадию клеточного цикла (GO:0044839, 276 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 139
32	Рис. Б10 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом <i>THBS1</i> , с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь TGFβ (KEGG M2642, 86 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б).	С. 140

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Гены, изменяющие экспрессию в клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* ($p < 0,05$)

Доза	Возрастание экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value	Снижение экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value
0 Гр	POPDC3	1,9	0,001	DLG5	2,0	0,027
	<i>ATP8B3</i>	2,0	0,148	ENST00000549261	2,0	0,001
	<i>ACTL8</i>	2,0	0,103	<i>lnc-CTNNA2-1</i>	2,1	0,069
	<i>SORBS2</i>	2,0	0,011	<i>A_33_P3374215</i>	2,1	0,121
	<i>LOC100132874</i>	2,0	0,014	<i>lnc-DDX20-4</i>	2,3	0,017
	<i>SPINK1</i>	2,1	0,257	<i>CDK14</i>	2,3	0,004
	<i>GSTA4</i>	2,1	0,013	<i>C17orf53</i>	2,3	0,091
	<i>CFH</i>	2,1	0,242	<i>ANKRD2</i>	2,3	0,120
	<i>COPS7A</i>	2,1	0,048	<i>OLFML1</i>	2,3	2,37E-05
	TUSC3	2,2	4,49E-08	<i>PRICKLE1</i>	2,3	0,062
	<i>BOC</i>	2,2	0,056	<i>ADAMTS1</i>	2,3	0,091
	<i>MYLIP</i>	2,2	0,001	<i>lnc-SERPINA12-1</i>	2,4	0,126
	<i>GAGE2B</i>	2,2	0,037	<i>DPPA2</i>	2,4	0,002
	<i>RPL21</i>	2,3	0,062	<i>DPEP3</i>	2,4	0,084
	<i>SMIM3</i>	2,3	0,000	<i>ESR2</i>	2,4	0,037
	<i>STARD3</i>	2,3	0,040	<i>SLC25A43</i>	2,4	0,081
	<i>SYT13</i>	2,4	0,001	<i>COL18A1</i>	2,5	0,018
	<i>HLA-DPA1</i>	2,4	0,020	<i>LOC339685</i>	2,8	0,034
	<i>SQSTM1</i>	2,4	0,070	<i>POT1</i>	2,8	0,050
	<i>IL11</i>	2,5	0,170	<i>EEF1A2</i>	3,8	0,006
	<i>LINC01082</i>	2,5	0,000	GAGE7	3,8	2,40E-06
	BCHE	2,6	1,35E-09	<i>PLAGL2</i>	5,1	0,037
	<i>GBAS</i>	2,7	0,080	POU3F2	5,8	5,44E-06
	<i>LINC01540</i>	2,7	0,000	<i>HBS1L</i>	7,7	0,050
	<i>PLCE1-AS2</i>	2,8	0,028	<i>OR51B5</i>	12,5	0,047
	<i>KCNJ12</i>	2,8	0,002	LXN	14,2	5,65E-07

Продолжение таблицы А1

Доза	Возрастание экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value	Снижение экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value
0 Гр	<i>SULT4A1</i>	3,0	4,10E-05			
	<i>SNORD115-27</i>	3,3	0,045			
	<i>FAM133A</i>	3,6	2,90E-05			
	MDFI	3,8	6,34E-06			
	SEPP1	5,8	5,13E-07			
	<i>LINC01103</i>	6,7	0,053			
	<i>ZNF772</i>	10,8	0,052			
	FGF13	20,1	1,17E-11			
	PAGE1	22,5	1,26E-06			
2 Гр	POPODC3	1,5	0,053	DLG5	2,01	5,22E-06
	<i>ENST00000512521</i>	2,0	0,062	<i>IFI44L</i>	2,05	0,147
	<i>KCNJ18</i>	2,0	0,000	<i>TMEM47</i>	2,08	0,012
	<i>ITIH4</i>	2,0	0,005	<i>FEZ2</i>	2,08	0,078
	<i>CSF1R</i>	2,0	0,099	<i>MAMDC2</i>	2,11	0,005
	<i>ARID3A</i>	2,0	0,033	<i>NMU</i>	2,17	0,000
	<i>TBC1D10B</i>	2,0	0,010	<i>PRY2</i>	2,18	0,072
	<i>TRPV2</i>	2,1	0,036	<i>SPOCK1</i>	2,20	0,057
	<i>SPON2</i>	2,1	0,028	<i>LOC100996324</i>	2,21	0,002
	<i>FBLIM1</i>	2,1	0,010	<i>HSPB3</i>	2,21	0,266
	<i>A_33_P3366493</i>	2,1	0,189	<i>PEG10</i>	2,23	0,169
	<i>lnc-OVGP1-2</i>	2,1	0,060	<i>MYLK3</i>	2,26	0,063
	<i>lnc-IQCG-2</i>	2,1	0,060	<i>COL18A1</i>	2,27	0,029
	<i>ENST00000624628</i>	2,1	0,172	<i>LAMP3</i>	2,27	0,049
	TUSC3	2,1	1,80E-07	<i>PPP2R3A</i>	2,29	0,121
	<i>LINC00092</i>	2,1	0,089	ALPK2	2,33	3,03E-05
	<i>SPTB</i>	2,1	0,054	ENST00000549261	2,34	1,71E-09
	<i>lnc-MBOAT4-1</i>	2,2	0,054	<i>RAP2C</i>	2,39	0,014
	<i>ACTG2</i>	2,2	0,084	<i>NXF1</i>	2,42	0,037
	<i>RNA5-8S5</i>	2,2	0,342	<i>DPPA2</i>	2,43	0,002
	<i>ENST00000504735</i>	2,2	0,098	<i>PDE5A</i>	2,53	0,000
	<i>SYT7</i>	2,2	9,88E-06	<i>CDK14</i>	2,58	0,001

Продолжение таблицы А1

Доза	Возрастание экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value	Снижение экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value
2 Гр	<i>ATP8B3</i>	2,2	0,108	<i>OLFML1</i>	2,61	4,50E-06
	<i>B3GNT3</i>	2,2	0,001	<i>PRICKLE1</i>	2,77	0,026
	<i>IER3</i>	2,2	0,019	<i>EEF1A2</i>	3,57	0,009
	<i>HLA-DPA1</i>	2,2	0,034	<i>RFC3</i>	4,08	0,026
	<i>ENST00000532228</i>	2,2	0,008	<i>S100A5</i>	4,24	0,034
	<i>BCHE</i>	2,2	2,83E-08	<i>lnc-CD226-2</i>	4,27	0,049
	<i>lnc-ALDH7A1-2</i>	2,3	0,046	<i>GAGE7</i>	4,45	6,02E-07
	<i>RNF222</i>	2,3	0,082	<i>RBPJL</i>	4,66	0,048
	<i>SRPK3</i>	2,3	0,002	<i>lnc-C9orf79-1</i>	4,70	0,029
	<i>SYT13</i>	2,3	0,001	<i>LOC400620</i>	5,08	0,018
	<i>lnc-ROBO2-6</i>	2,3	0,046	<i>lnc-GPD2-1</i>	5,73	0,050
	<i>LOC100192426</i>	2,3	0,042	<i>THC2551759</i>	5,92	0,041
	<i>LINC01540</i>	2,4	0,001	<i>SLC22A7</i>	6,06	0,090
	<i>ACTL8</i>	2,4	0,051	<i>ENST00000438499</i>	6,09	0,048
	<i>ENST00000434541</i>	2,5	0,028	<i>COG5</i>	6,42	0,045
	<i>SPINK1</i>	2,5	0,177	<i>ZNF112</i>	6,43	0,053
	<i>IL11</i>	2,5	0,180	<i>POU3F2</i>	6,69	1,98E-06
	<i>GAGE2B</i>	2,5	0,017	<i>INA</i>	7,00	0,026
	<i>ENST00000523150</i>	2,7	0,031	<i>SPTBN1</i>	7,88	0,051
	<i>LINC01082</i>	2,7	0,000	<i>LOC440117</i>	9,48	0,042
	<i>MIEF1</i>	2,7	0,066	<i>ENST00000560503</i>	12,12	0,048
	<i>KCNJ12</i>	2,7	0,003	<i>ENST00000519159</i>	12,67	0,064
	<i>SMIM3</i>	2,7	1,65E-05	<i>lnc-CXorf56-2</i>	14,86	0,060
	<i>lnc-TMEM132C-7</i>	2,9	0,194	<i>lnc-TOB1-1</i>	15,35	0,050
	<i>FAM133A</i>	2,9	0,000	<i>LXN</i>	17,32	2,08E-07
	<i>SRGAP2</i>	3,6	0,031			
	<i>SULT4A1</i>	4,0	2,08E-06			
	<i>SEPP1</i>	4,2	6,49E-06			
	<i>MDFI</i>	4,6	1,24E-06			
	<i>ENST00000565199</i>	9,3	0,052			
	<i>MSH6</i>	14,1	0,047			

Продолжение таблицы А1

Доза	Возрастание экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value	Снижение экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value
2 Гр	PAGE1	20,5	1,86E-06			
	FGF13	21,1	9,03E-12			

Примечание: полужирным начертанием выделены гены, изменяющие экспрессию при FDR < 0,05.

Таблица А2 – Гены, изменяющие экспрессию в клеточной линии HeLa с нокаутом *THBS1* ($p < 0,05$)

Доза	Возрастание экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value (FDR)	Снижение экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value (FDR)
0 Гр	LIF	1,9	0,006	<i>TMEM200C</i>	2,0	0,111
	<i>SQSTM1</i>	2,0	0,133	<i>lnc-HDDC3-1</i>	2,0	0,230
	<i>EEF1A2</i>	2,0	0,125	<i>HLA-DPA1</i>	2,0	0,054
	<i>STARD3</i>	2,1	0,053	<i>IRX3</i>	2,0	0,060
	<i>FAM105A</i>	2,1	0,014	<i>XLOC_l2_003400</i>	2,0	0,034
	<i>LOC100507002</i>	2,1	0,01	<i>HLA-DQB1</i>	2,0	0,074
	<i>HSPA2</i>	2,2	0,065	<i>UCP3</i>	2,0	0,158
	<i>SSC4D</i>	2,3	0,012	<i>GAGE2B</i>	2,0	0,050
	<i>NGEF</i>	2,4	0,018	<i>RNF222</i>	2,1	0,134
	<i>ARHGDIB</i>	2,4	0,152	<i>ENST00000511579</i>	2,1	0,088
	<i>WDR6</i>	2,5	0,137	<i>lnc-OST4-2</i>	2,1	0,055
	<i>XLOC_l2_015938</i>	2,7	0,026	<i>XLOC_l2_000038</i>	2,1	0,064
	<i>HIF3A</i>	2,7	0,026	<i>C17orf53</i>	2,1	0,119
	<i>SEPP1</i>	3,2	8,95E-05	<i>HLA-DPB1</i>	2,1	0,016
	<i>lnc-TRAPPC8-1</i>	3,3	0,034	<i>EPB41L3</i>	2,2	0,000
	<i>RNASET2</i>	3,4	0,053	<i>ENST00000549261</i>	2,2	6,81E-09
	<i>lnc-TTC7A-1,</i>	4,1	0,055	<i>HIF3A</i>	2,2	0,055
	<i>LOC728613</i>	5,3	0,055	<i>lnc-LRGUK-1</i>	2,2	0,236
	<i>ROBO3</i>	5,4	0,048	<i>H19</i>	2,3	0,114
	<i>lnc-NAA35-1</i>	5,6	0,051	<i>IFI44L</i>	2,3	0,103
	<i>lnc-TRAF3IP2-1</i>	7,6	0,051	<i>CSTF2T</i>	2,3	0,001
	<i>LOC100506207</i>	7,7	0,051	<i>PABPC4L</i>	2,4	0,000
	<i>lnc-RAP1GDS1-3</i>	7,7	0,049	<i>ESR2</i>	2,4	0,037
	<i>ENST00000535936</i>	9,1	0,051	<i>SLC25A43</i>	2,6	0,066
	<i>CEP83</i>	9,1	0,055	<i>LOC339685</i>	2,8	0,032
	<i>NCALD</i>	9,2	0,043	<i>HLA-DRA</i>	3,1	0,008
	<i>KRTAP19-1</i>	9,8	0,034	<i>CDK14</i>	3,4	0,000
	<i>A_33_P3368303</i>	9,8	0,051	<i>ENST00000419694</i>	4,1	0,004
	<i>ENST00000531157</i>	10,6	0,053	<i>ENST00000534518</i>	5,4	0,027

Продолжение таблицы А2

Доза	Возрастание экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value (FDR)	Снижение экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value (FDR)
0 Гр	<i>TMIGD3</i>	10,8	0,051	<i>GAGE7</i>	5,5	8,70E-08
	<i>ENST00000469806</i>	14,4	0,043	<i>PLAGL2</i>	6,0	0,023
				<i>PAGE1</i>	6,5	0,000
				<i>HBS1L</i>	7,9	0,047
				<i>OR51B5</i>	12,3	0,049
				<i>PRKDC</i>	2,0	0,031
2 Гр	<i>PERM1</i>	2,0	0,003	<i>ATRX</i>	2,0	0,264
	<i>LOC101928000</i>	2,0	0,045	<i>TPR</i>	2,0	0,265
	<i>lnc-CTD-2054N24.2.1-3</i>	2,0	0,052	<i>TOP2A</i>	2,1	0,219
	<i>LIF</i>	2,0	4,49E-08	<i>CSTF2T</i>	2,1	0,002
	<i>lnc-EXOC2-8</i>	2,0	0,074	<i>H19</i>	2,2	0,129
	<i>lnc-STARD4-1</i>	2,1	0,06	<i>HLA-DQB1</i>	2,2	0,054
	<i>LOC101927668</i>	2,1	0,055	<i>PRY2</i>	2,2	0,073
	<i>ABHD8</i>	2,1	0,049	<i>HLA-DPB1</i>	2,2	0,012
	<i>LOC100507002</i>	2,1	0,013	<i>GOLGB1</i>	2,2	0,187
	<i>LOC100506178</i>	2,3	1,10E-05	<i>RAP2C</i>	2,3	0,018
	<i>ENST00000505494</i>	2,4	0,055	<i>ENST00000549261</i>	2,4	1,48E-09
	<i>ENST00000433065</i>	2,4	0,030	<i>OAS2</i>	2,4	0,150
	<i>MIEF1</i>	2,4	0,106	<i>IRX3</i>	2,4	0,023
	<i>TOX3</i>	2,4	0,049	<i>HLA-DPA1</i>	2,4	0,018
	<i>RNA5-8S5</i>	2,5	0,277	<i>lnc-GCSH-1</i>	2,6	0,078
	<i>SSC4D</i>	2,6	0,006	<i>PABPC4L</i>	2,8	9,94E-05
	<i>SEPP1</i>	2,7	0,000	<i>NXF1</i>	2,8	0,016
	<i>ENST00000423149</i>	2,7	0,075	<i>EPB41L3</i>	2,9	5,15E-06
	<i>ARSH</i>	2,7	0,054	<i>IFI44L</i>	2,9	0,036
	<i>GDI2</i>	2,8	0,141	<i>HLA-DRA</i>	3,1	0,008
	<i>lnc-AC136604.1-1</i>	2,8	0,065	<i>CDK14</i>	3,2	0,000
	<i>AK9</i>	2,9	0,049	<i>RFC3</i>	3,4	0,048
	<i>NGEF</i>	2,9	0,006	<i>ENST00000419694</i>	4,2	0,003
	<i>lnc-PCDH20-2</i>	2,9	0,038	<i>lnc-CD226-2</i>	4,3	0,047
	<i>TONSL</i>	3,0	0,064	<i>S100A5</i>	4,6	0,026

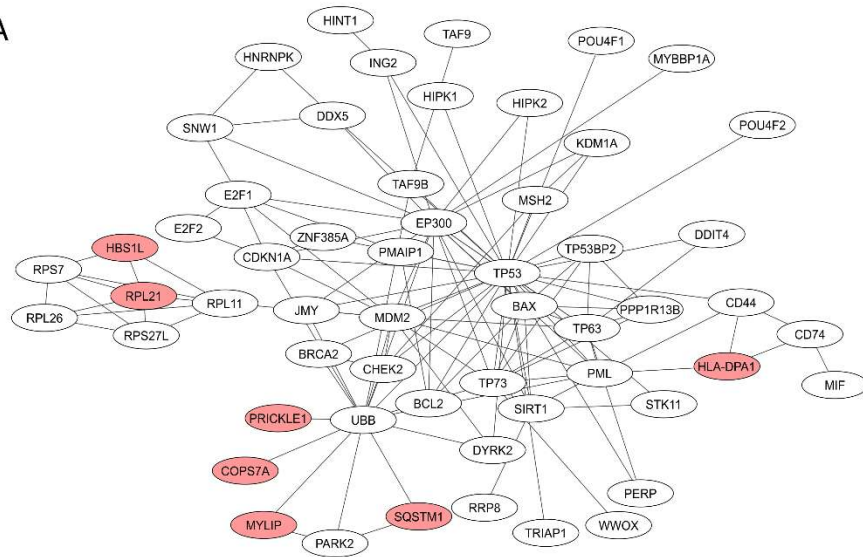
Продолжение таблицы А2

Доза	Возрастание экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value (FDR)	Снижение экспрессии	Уровень экспрессии (кратность отличий)	p-value (FDR)
2 Гр	<i>lnc-TMEM132C-7</i>	3,1	0,166	<i>lnc-C9orf79-1</i>	4,7	0,030
	<i>ENST00000447198</i>	3,2	0,059	<i>RBPJL</i>	4,7	0,048
	<i>LOC101928416</i>	3,4	0,058	<i>LOC400620</i>	5,1	0,017
	<i>ENST00000430064</i>	3,6	0,064	<i>PAGE1</i>	5,8	0,001
	<i>ZIC1</i>	3,6	0,048	<i>ENST00000438499</i>	5,9	0,052
	<i>ENST00000428118</i>	3,7	0,048	<i>THC2551759</i>	6,2	0,037
	<i>GUCY2C</i>	3,7	0,059	<i>COG5</i>	6,2	0,048
	<i>A_33_P3295932</i>	4,8	0,037	<i>lnc-GPD2-1</i>	6,2	0,042
	<i>ENST00000453808</i>	5,1	0,050	<i>ZNF112</i>	6,2	0,057
	<i>lnc-CLCN3-1</i>	5,8	0,049	<i>INA</i>	6,6	0,030
	<i>PTPLAD2</i>	6,0	0,041	<i>GAGE7</i>	7,1	1,14E-08
	<i>lnc-NLRP3-1</i>	6,1	0,053	<i>SLC22A7</i>	7,3	0,063
	<i>SGSM3</i>	6,4	0,048	<i>SPTBN1</i>	7,7	0,054
	<i>TYW5</i>	7,6	0,060	<i>LOC440117</i>	9,7	0,041
	<i>MST1P2</i>	9,0	0,035	<i>ENST00000560503</i>	11,4	0,053
	<i>ENST00000444862</i>	9,7	0,052	<i>ENST00000519159</i>	13,0	0,062
	<i>ENST00000508719</i>	10,3	0,041	<i>lnc-TOB1-1</i>	16,1	0,047
	<i>TSIX</i>	10,4	0,048	<i>lnc-CXorf56-2</i>	17,2	0,049
	<i>LOC101928696</i>	10,7	0,046			
	<i>DCAF4L2</i>	11,1	0,044			
	<i>LOC101929341</i>	12,2	0,046			
	<i>lnc-NPIPL2-2</i>	12,3	0,045			
	<i>lnc-TUFM-3</i>	12,6	0,046			
	<i>NEBL-AS1</i>	16,1	0,045			
	<i>ZNF582</i>	18,0	0,047			

Примечание: полужирным начертанием выделены гены, изменяющие экспрессию при FDR < 0,05.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

А



Б

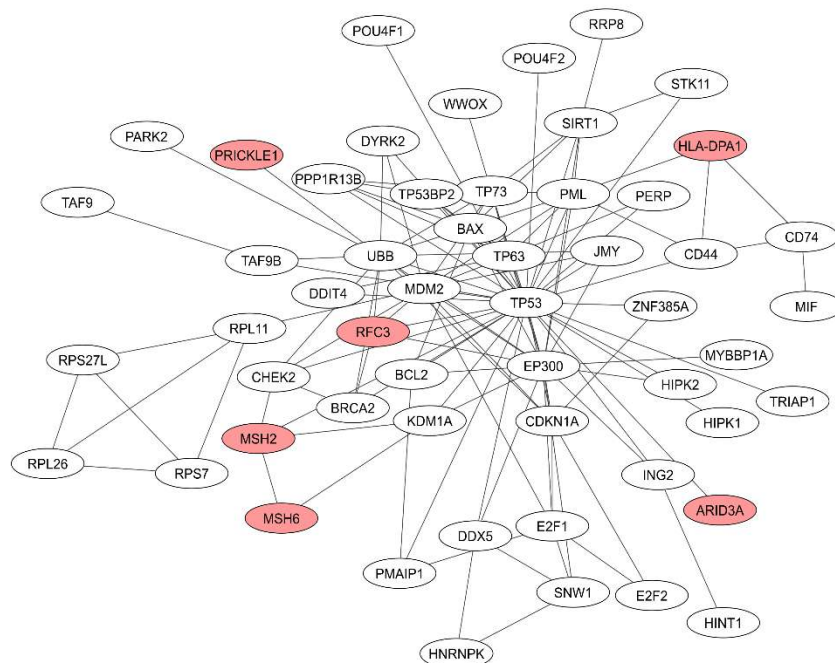
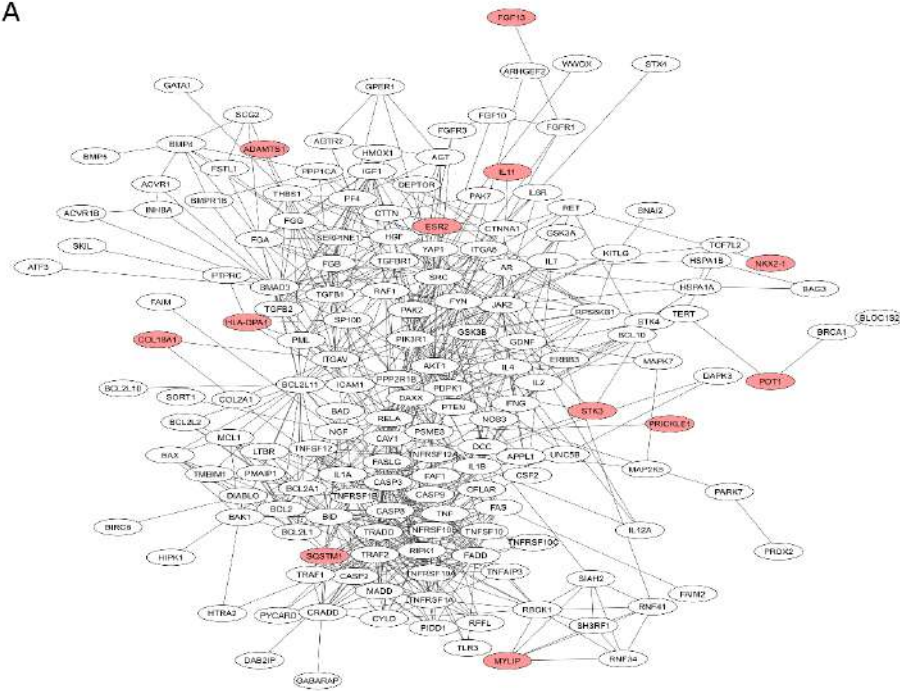


Рисунок Б1 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*, с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь апоптоза, индуцированного белком р53 (GO:0072332, 75 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б). Красной заливкой обозначены белковые продукты генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*; белой заливкой обозначены белки, вовлеченные в сигнальный путь апоптоза.

A



Б

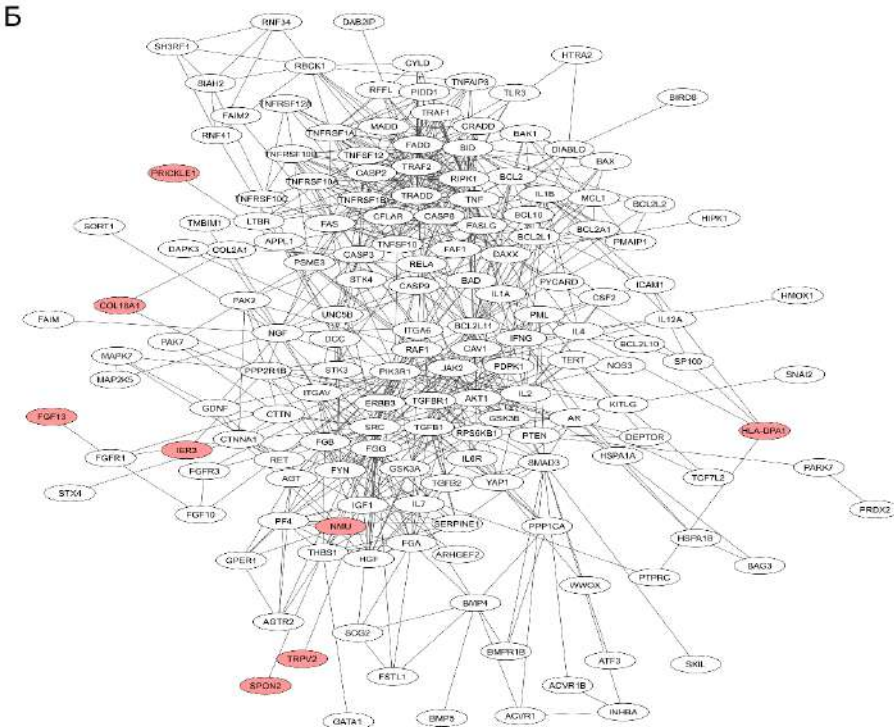


Рисунок Б2 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*, с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь апоптоза, индуцированного сигналом, передающимся с поверхности клетки (GO: 0097191, 217 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б). Красной заливкой обозначены белковые продукты генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*; белой заливкой обозначены белки, вовлеченные в сигнальный путь апоптоза.

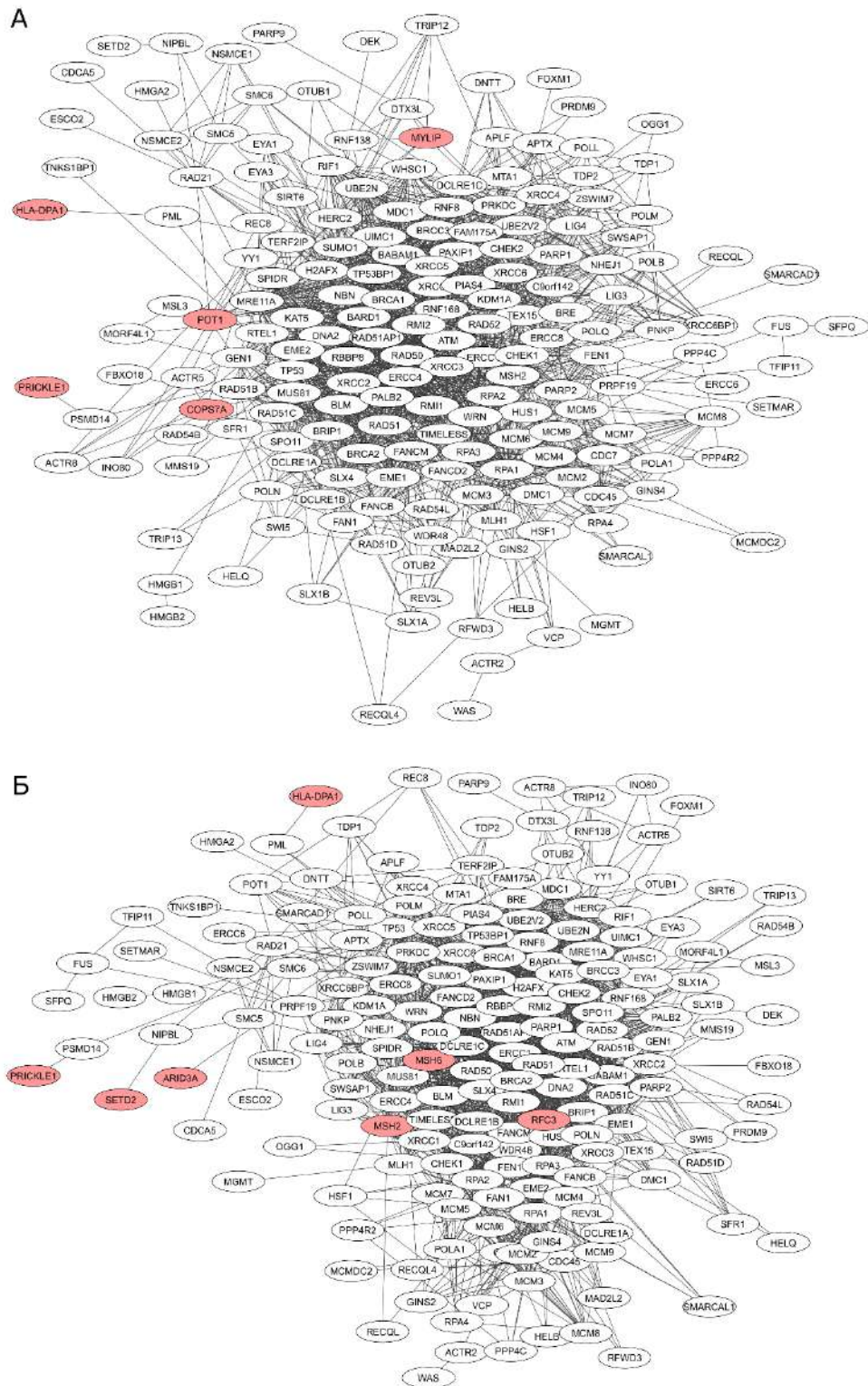
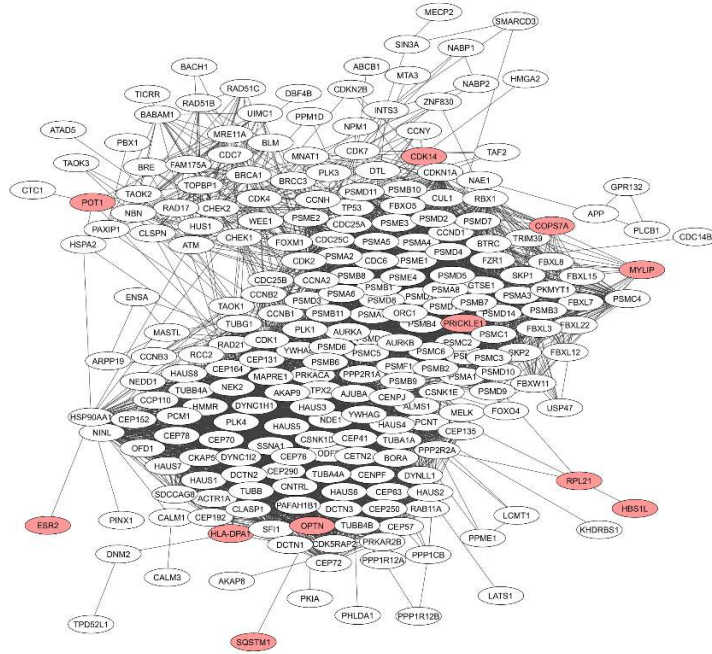


Рисунок Б3 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*, с кластером белков, вовлеченных в процесс репарации двунитевых разрывов ДНК (GO:0006302, 268 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б). Красной заливкой обозначены белковые продукты генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*; белой заливкой обозначены белки, вовлеченные в процесс репарации ДНК.

А



Б

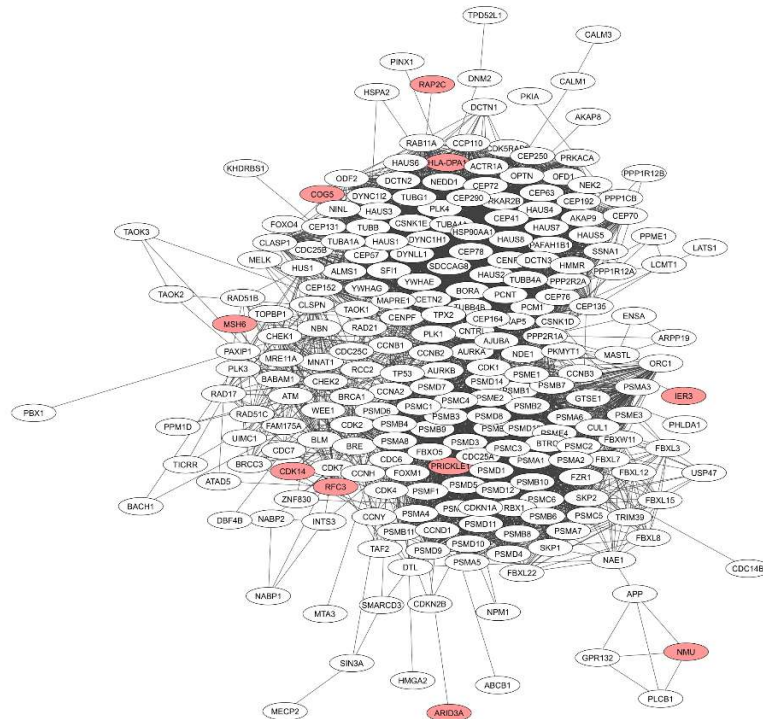
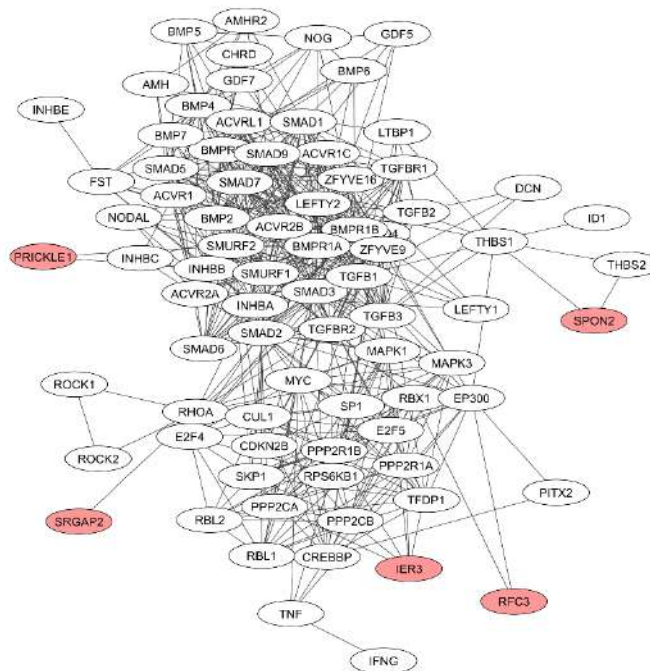


Рисунок Б4 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*, с кластером белков, вовлеченных в процесс перехода из G_2 в М-стадию клеточного цикла (GO:0044839, 276 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б). Красной заливкой обозначены белковые продукты генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*; белой заливкой обозначены белки, вовлеченные в процесс перехода из G_2 в М.



Красной заливкой обозначены белковые продукты генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1*; белой заливкой обозначены белки, вовлеченные в сигнальный путь TGF β .

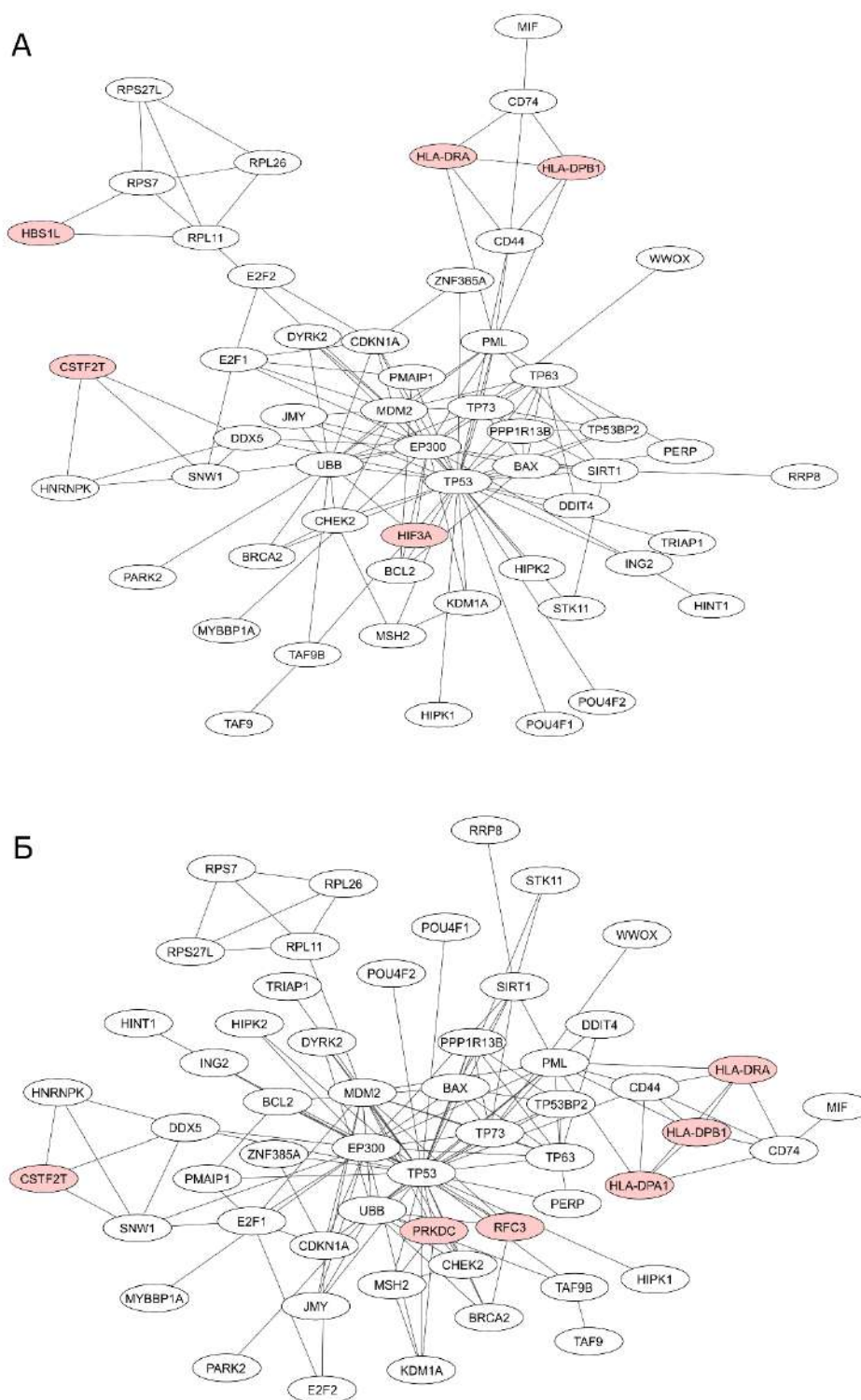


Рисунок Б6 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом *THBS1*, с кластером белков, вовлеченных в сигнальный путь апоптоза, индуцированного белком р53 (GO:0072332, 75 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б). Красной заливкой обозначены белковые продукты генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *THBS1*; белой заливкой обозначены белки, вовлеченные в сигнальный путь апоптоза.

A

B

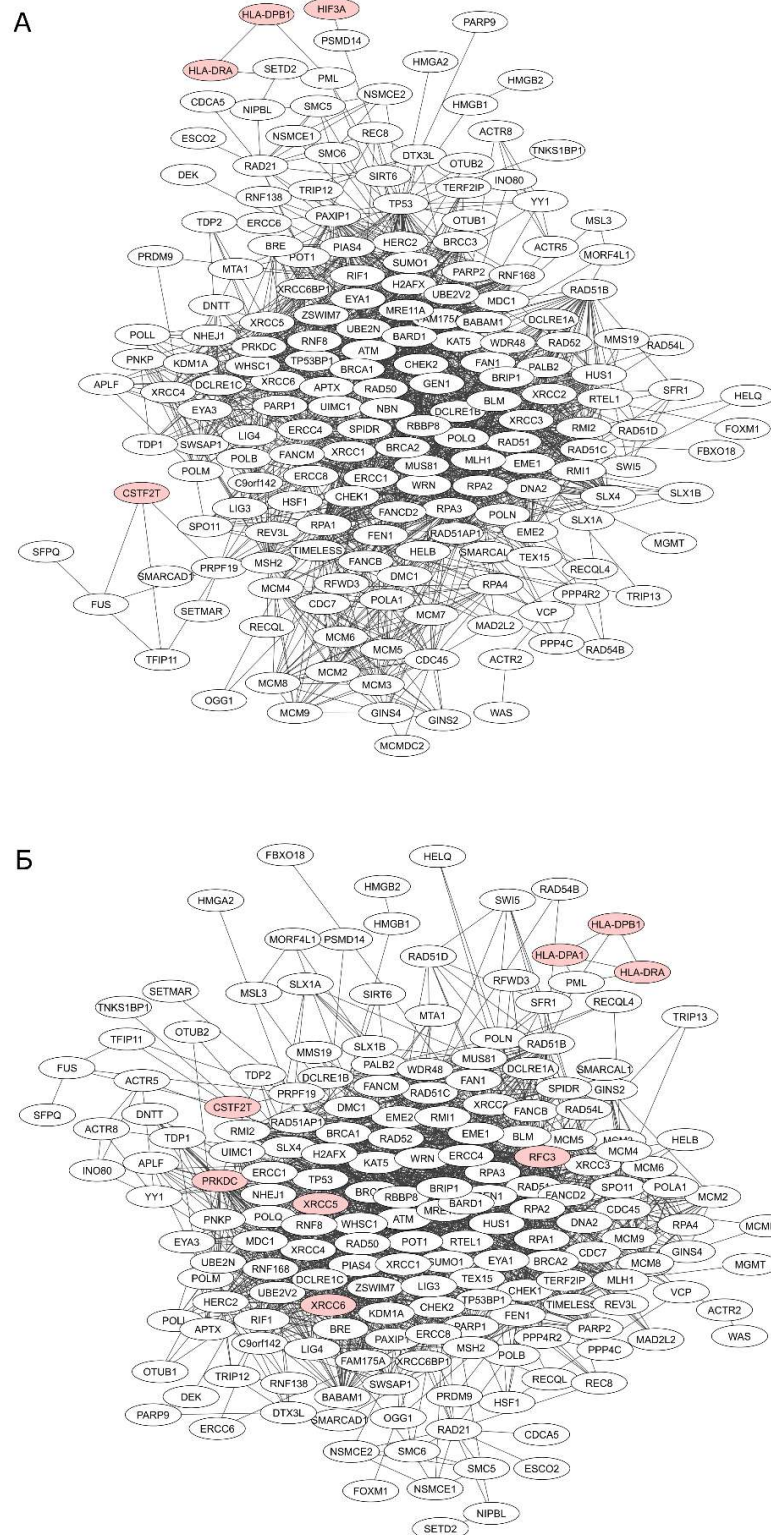


Рисунок Б8 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом *THBS1*, с кластером белков, вовлеченных в процесс репарации двунитевых разрывов ДНК (GO:0006302, 268 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б). Красной заливкой обозначены белковые продукты генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *THBS1*; белой заливкой обозначены белки, вовлеченные в процесс репарации ДНК

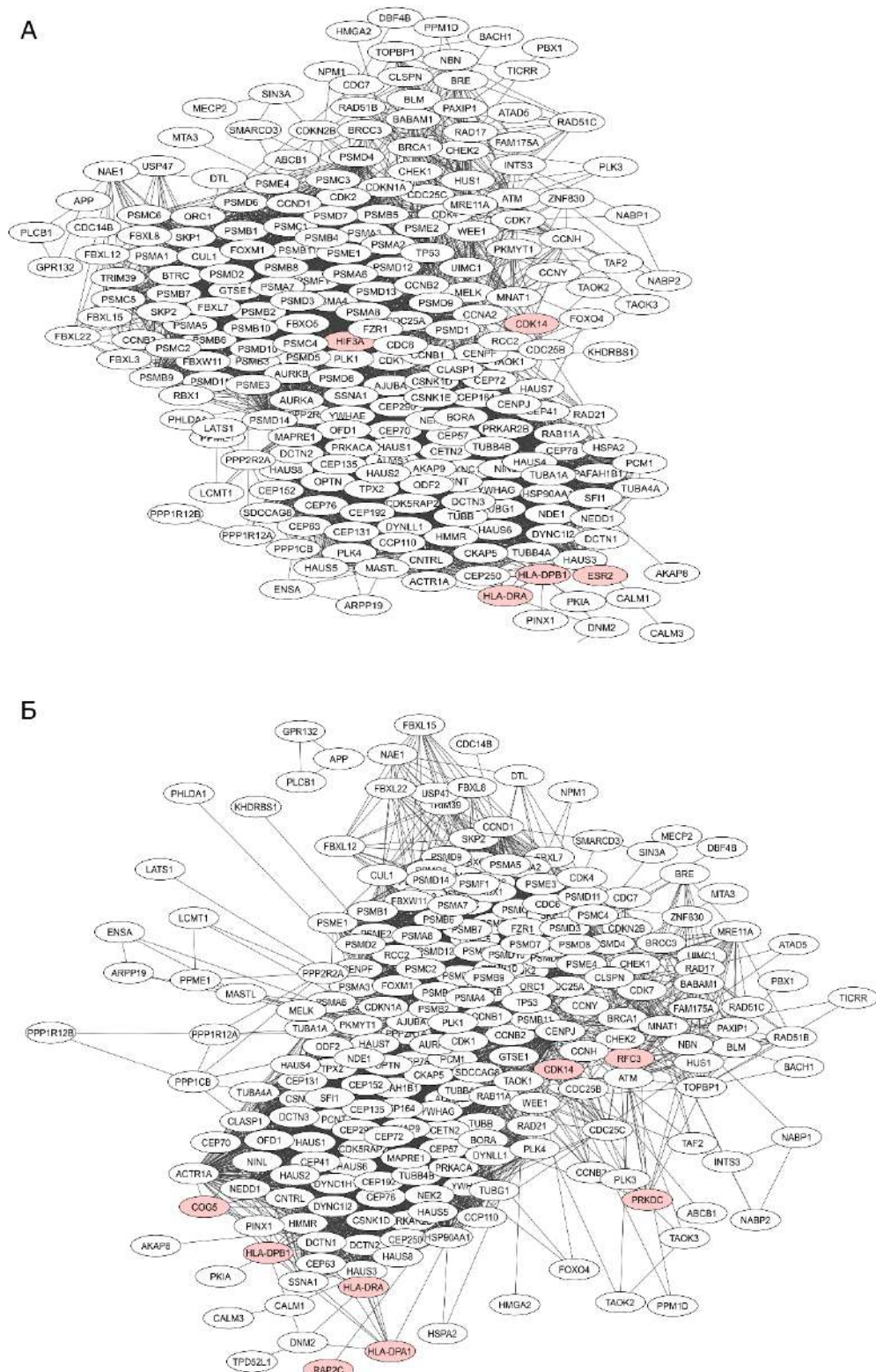


Рисунок Б9 – Связи продуктов генов, изменяющих экспрессию в клеточной линии с нокаутом *THBS1*, с кластером белков, вовлеченных в процесс перехода из G_2 в М-стадию клеточного цикла (GO:0044839, 276 генов) (score > 0,9) до облучения (А) и после воздействия в дозе 2 Гр (Б). Красной заливкой обозначены белковые продукты генов, дифференциально экспрессирующихся в клеточной линии с нокаутом *THBS1*; белой заливкой обозначены белки, вовлеченные в процесс перехода из G_2 в М.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю научного руководителя, доктора биологических наук, профессора РАН Лебедева Игоря Николаевича и директора НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук, профессора Степанова Вадима Анатольевича за предоставленную возможность выполнения диссертационной работы. Отдельно выражаю глубокую признательность Лебедеву Игорю Николаевичу за помощь в планировании исследования, терпение, критические замечания и ценные советы при работе над диссертацией.

Выражаю искреннюю благодарность своему наставнику, доктору биологических наук, Васильеву Станиславу Анатольевичу за всестороннюю помощь и поддержку на протяжении всех этапов выполнения работы, мудрые советы, конструктивную критику, помощь в анализе и интерпретации полученных результатов.

Благодарю коллег из НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, в особенности, сотрудников лаборатории цитогенетики, а также Бабушкину Надежду Петровну, Скрыбина Николая Алексеевича и Кучер Аксану Николаевну за доброжелательную и конструктивную критику, участие в обсуждении результатов исследования, а также поддержку на протяжении всего обучения в аспирантуре.

Выражаю особую признательность сотрудникам института цитологии и генетики СО РАН Олегу Леонидовичу Серову и Вениамину Семеновичу Фишману, сотруднику НИИ онкологии Томского НИМЦ Булдакову Михаилу Александровичу, сотруднику Томского политехнического университета Сухих Леониду Григорьевичу, сотрудникам Томского онкологического диспансера в лице Сухих Евгении Сергеевны и Вертинского Андрея Владимировича, а также сотрудникам НИИ онкологии Томского НИМЦ в лице Грибовой Ольги Вячеславовны и Старцевой Жанны Александровны за помощь в организации ряда экспериментальных процедур. Искренне благодарю Мурашкину Анастасию Александровну, Дорофеевых Анастасию Валерьевну и Геннадия Витальевича, Шункову Дарью Михайловну, Гатауллина Никиту Константиновича и Шевцова Даниила Геннадьевича за помощь в выполнении ряда экспериментальных работ.

Благодарю ученого секретаря диссертационного совета, кандидата биологических наук Ирину Юрьевну Хитринскую за методическую помощь в процессе обучения в аспирантуре и подготовке документов к защите.

Наконец, выражаю глубокую благодарность своим близким за понимание, терпение, помощь и безграничную поддержку.