Влияние дифференциальной экспрессии генов ADAMTS1, RBFOX2, THBS1 и WHSC1 на формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа

Савченко Р.Р.¹, Васильев С.А.¹, Фишман В.С.², Сухих Е.С.³, Грибова О.В.⁴, Старцева Ж.А.⁴, Мурашкина А.А.⁵, Дорофеева А.В.⁶, Шункова Д.М.⁶, Лебедев И.Н.¹

- НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН 634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10
- Институт цитологии и генетики СО РАН 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева,10г
- ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» 634050, г. Томск, пр. Ленина, 115
- 4 НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5
- 5 Томский государственный университет 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36
- 6 Сибирский государственный медицинский университет 634050, г.ТомскМосковский тракт, 2

Проведен анализ выживаемости клеток, оценка уровня фокусов белков репарации ДНК и частоты радиационно-индуцированных микроядер в условиях дифференциальной экспрессии генов ADAMTS1, RBFOX2, THBS1 и WHSC1 в модельных системах in vitro и в лимфоцитах периферической крови человека. Полученные результаты указывают на потенциальную возможность использования уровня экспрессии данных генов для выявления индивидов с повышенной радиочувствительностью.

Ключевые слова: ADAMTS1, RBFOX2, THBS1, WHSC1

Для цитирования: Савченко Р.Р., Васильев С.А., Фишман В.С., Сухих Е.С., Грибова О.В., Старцева Ж.А., Мурашкина А.А., Дорофеева А.В., Шункова Д.М., Лебедев И.Н. Влияние дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1*, *RBFOX2*, *THBS1* и *WHSC1* на формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа. *Медицинская генетика* 2020; 19(9): 85-87. **DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.09.85-87

Автор для корреспонденции: Савченко Р.Р.; e-mail: renata.savchenko@medgenetics.ru

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Гранта Президента МК-5944.2018.4 и гранта РФФИ № 19-34-90143.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

The effect of ADAMTS1, RBFOX2, THBS1, and WHSC1 gene expression on the formation of a radiation-induced cellular response

Savchenko R.R.¹, Vasilyev S.A.¹, Fishman V.S.², Sukhikh E.S.³, Gribova O.V.⁴, Startseva Z.A.⁴, Murashkina A.A.⁵, Dorofeeva A.V.⁶, Shunkova D.M.⁶, Lebedev I.N.¹

- 1 Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Science Nab. Ushaiki str. 10, Tomsk, 634050, Russia
- Institute of Cytology and Genetics Lavrentyeva Prospekt 10, Novosibirsk, 630090, Russia
- 3 Tomsk Regional Oncology Center Lenin Ave. 115., Tomsk, 634050, Russia
- 4 Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Science Kooperativny Street 5, Tomsk, 634009, Russia
- 5 National Research Tomsk State University Lenin Ave. 36, Tomsk, 634050, Russia,
- 6 Siberian State Medical University
 Moskovsky trakt 2, Tomsk, 634055, Russia

In this study, we investigated the cell survival, the DNA repair foci level and the radiation-induced micronuclei frequency in the model systems in vitro and in the human peripheral blood lymphocytes with differential expression of ADAMTS1, RBFOX2, THBS1

and WHSC1 genes. The results indicate the potential opportunity of using these genes expression level to identify the individuals with increased radiosensitivity.

Key words: ADAMTS1, RBFOX2, THBS1, WHSC1

For citation: Savchenko R.R., Vasilyev S.A., Fishman V.S., Sukhikh E.S., Gribova O.V., Startseva Z.A., Murashkina A.A., Dorofeeva A.V., Shunkova D.M., Lebedev I.N. The effect of *ADAMTS1*, *RBFOX2*, *THBS1*, and *WHSC1* gene expression on the formation of a radiation-induced cellular response. *Medical genetics*. 2020; 19(9): 85-87. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.85-87

Corresponding author: Savchenko R.R.; e-mail: renata.savchenko@medgenetics.ru

Funding. This work was supported by the grant of the President of the Russian Federation MK-5944.2018.4 and RFBR grant №19-34-90143.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020

адиационно-индуцированные повреждения ДНК влекут за собой ряд событий, приводящих к индукции мутаций и гибели клеток, что позволяет использовать ионизирующее излучение, как один из наиболее эффективных инструментов в терапии онкологических заболеваний. Поскольку радиационно-индуцированный ответ варьирует на уровне различных типов клеток, тканей и целых организмов, поиск биологических маркеров для прогнозирования индивидуальной радиочувствительности представляет особенный интерес [1]. Проведение экспериментов по оценке полнотранскриптомного профиля экспрессии генов в лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов с различной радиочувствительностью позволило нам выявить гены ADAMTS1, RBFOX2, THBS1 и WHSC1, дифференциальная активность которых коррелировала со спонтанным уровнем фокусов үН2АХ и 53ВР1 и частотой радиационно-индуцированных микроядер. В связи с этим, цель данного исследования заключалась в анализе влияния дифференциальной экспрессии генов ADAMTS1, RBFOX2, THBS1 и WHSC1 на формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа и оценке возможности прогнозирования индивидуальной радиочувствительности, используя анализ уровня метилирования Ср G-островков в промоторах генов ADAMTS1, RBFOX2 и THBS1.

Материалы и методы

В качестве материала были использованы клеточные линии HeLa с нокаутом генов *ADAMTS1*, *RBFOX1*, *THBS1* и *WHSC1*, созданные с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9, и образцы лимфоцитов периферической крови здоровых индивидов (n=58), полученные от 20 мужчин (32,80 \pm 9,69 лет) и 38 женщин (37,42 \pm 14,22 лет). Облучение материала было проведено на γ -терапевтическом аппарате Theratron Equinox (Best Theratronics, Канада) в дозах 2-8 Гр. Оценка уровня фокусов белков репарации ДНК была проведена путём

иммунноокрашивания с антителами к γ H2AX и 53BP1. Для оценки частоты микроядер был использован микроядерный тест в комбинации с флуоресцентной in situ гибридизацией с панцентромерными ДНК-зондами, выполненный на цитокинез-блокированных интерфазных ядрах. Анализ уровня экспрессии генов осуществлялся методом ПЦР в реальном времени. Уровень метилирования СрG-островков в промоторах генов *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* оценивался методом таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования.

Результаты

Снижение эффективности посева было показано для клеточных линий с нокаутом генов *THBS1* (в 1,4, p<0,001) и WHSC1 (в 1,7 раз, p<0,001), в то время как клональная выживаемость была снижена при нокауте генов ADAMTS1, RBFOX2 и WHSC1 (в 1,9; 1,8 и 1,6 раз, соответственно, р < 0,001). Уровень фокусов γ H2AX и 53ВР1 не отличался от такового в интактной клеточной линии HeLa, однако частота радиационно-индуцированных микроядер возрастала в 2,5 раза при нокауте гена THBS1 (p=0,01). В лимфоцитах здоровых индивидов были показаны корреляции уровня экспрессии *ADAMTS1* со спонтанной частотой центромеро-негативных микроядер (R = -0.52, p = 0.033, в группе мужчин), THBS1 (R = -0,52, p=0,03, в группе мужчин) и WHSC1(R = -0.37, p = 0.032, в группе женщин) с частотой центромеро-позитивных микроядер. После облучения уровень экспрессии THBS1 коррелировал с частотой центромеро-позитивных микроядер в группе мужчин (R = -0,53, p = 0,033) и в объединенной группе (R= -0,40, р=0,010), а уровень экспрессии *RBFOX2* в объединенной группе индивидов коррелировал с частотой центромеро-негативных микроядер (R = -0.30, p=0.027). Одновременное использование уровней экспрессии четырех анализируемых генов позволяло классифицировать исследуемую выборку индивидов, выявляя лиц с повышенной частотой радиационно-индуцированных микроядер в группе мужчин (р=0,00026), женщин (p=0,048) и в объединенной выборке (p=0,0009). Уровень метилирования проанализированных участков промоторов изучаемых генов преимущественно не превышал 10%, что характерно для активно экспрессирующихся генов. Уровень метилирования CpG-островка вблизи промотора RBFOX2 коррелировал с экспрессией данного гена (R = -0.58; p = 0.009).

Выводы

Нокаут генов *ADAMTS1*, *RBFOX2*, *THBS1* и *WHSC1* может влиять на жизнеспособность клеток до и по-

сле воздействия ионизирующего излучения. В отличие от уровня метилирования ДНК в промоторах изучаемых генов, анализ уровня экспрессии позволяет выявить индивидов с повышенной частотой радиационно-индуцированных микроядер, однако полученная модель требует проверки на независимой выборке с учетом пола индивидов.

Литература/References

1. Kirsch D. G. et al. The future of radiobiology. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 2018 Apr; 110 (4): 329–340.