

**ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНОВ *ADAMTS1*, *RBFOX2* И *THBS1* НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ  
РЕГУЛЯЦИЮ И КЛОНАЛЬНУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК  
В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *IN VITRO***

А.А. Мурашкина<sup>1</sup>, Р.Р. Савченко<sup>2</sup>

Научный руководитель: с.н.с., к. б. н. С.А. Васильев

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

<sup>2</sup>НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Россия, г. Томск, ул. Наб. р. Ушайки, 10, 634050

E-mail: [anastasiya.murashkina.97@mail.ru](mailto:anastasiya.murashkina.97@mail.ru)

**EFFECTS OF KNOCKOUT OF *ADAMTS1*, *RBFOX2* AND *WHSC1* GENES ON TRANSCRIPTION  
REGULATION AND CLONOGENIC SURVIVAL IN THE MODEL SYSTEM *IN VITRO***

A.A. Murashkina<sup>1</sup>, R.R. Savchenko<sup>2</sup>

Scientific Supervisor: S.A. Vasilyev, PhD

<sup>1</sup>Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

<sup>2</sup>Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMC, Russia, Tomsk, Nab. r. Ushaiki, 10, 634050

E-mail: [anastasiya.murashkina.97@mail.ru](mailto:anastasiya.murashkina.97@mail.ru)

**Abstract.** *In this study, we evaluated the expression level and clonogenic survival of cell lines with a mutation of the ADAMTS1, RBFOX2, and THBS1 genes generated by CRISPR/Cas9 technology. The gene expression profile was analyzed by expression microarray. It was found that knockout of all analyzed genes leads to a decrease in their own expression. In addition, the knockout of these genes leads to significant changes in the expression of other genes in the cell lines. Clonogenic survival of the lines was decreased in the cell lines with knockout of ADAMTS1 and RBFOX2 genes after exposure to 2 Gy of  $\gamma$ -rays.*

**Введение.** Установление и изучение генов, определяющих индивидуальную радиочувствительность человека, является одной из приоритетных задач в современной терапии онкологических заболеваний. В наших предварительных исследованиях были выявлены гены, дифференциальная экспрессия которых оказалась связана с различной эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК, а именно: *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1*. Продукты генов *ADAMTS1* и *THBS1* являются металлопротеиназами межклеточного матрикса и принимают участие в передаче в клетку различных сигналов [1,2]. Продукт гена *RBFOX2* участвует в регуляции альтернативного сплайсинга [3]. Поэтому важным вопросом является выявление механизмов, по которым данные гены могут влиять на радиационно-индуцированный клеточный ответ и эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК. В связи с этим, целью настоящего исследования стал анализ влияния нокаута генов *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* на транскрипционный профиль и клональную выживаемость в модельной системе *in vitro*.

**Материалы и методы исследования.** В качестве материала в данном исследовании использовалась клеточная линия HeLa, на основе которой с помощью технологии CRISPR/Cas9 были созданы клеточные линии, нокаутные по генам *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1*. Линии культивировались до 3 пассажа, затем были подвергнуты воздействию ионизирующего  $\gamma$ -излучения в дозе 2-8 Гр для

оценки клональной выживаемости и 2 Гр для анализа экспрессии генов. Для оценки клональной выживаемости клетки выращивались в течение 2 недель, затем колонии фиксировались и окрашивались, после чего производился подсчёт и статистическая обработка полученных данных. Выделение и очистка РНК с помощью реагента «Лири» (БиоЛабМикс, Россия) и микроколонок RNeasy (Qiagen, США) из указанных линий была произведена через 30 мин после воздействия  $\gamma$ -излучения. Оценка качества РНК осуществлялась с использованием системы 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Анализ уровня экспрессии производился с помощью экспрессионного чипа SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8x60K (Agilent Technologies, США).

**Результаты.** Клональная выживаемость наиболее выражено отличалась в нокаутных клеточных линиях после воздействия в дозе 2 Гр: отмечалось снижение клональной выживаемости относительно исходной линии HeLa при нокауте генов *ADAMTS1* - в 1,9 раза ( $p = 0,014$ ) и *RBFOX2* - в 1,8 раза ( $p = 0,017$ ).

Полнотранскриптомный анализ показал, что нокаут генов *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* приводит к снижению их собственной экспрессии: экспрессия гена *ADAMTS1* снижалась при нокауте в 2,3 раза, а экспрессия гена *THBS1* при его нокауте снижалась в 2,1 раза. Кроме того, нокаут гена *RBFOX2* приводил к снижению экспрессии не только гена *RBFOX2* (в 2,1 раза), но и к снижению экспрессии гена *THBS1* (3,2-3,6 раза). Это указывает на возможную роль гена *RBFOX2* в транскрипционной регуляции экспрессии гена *THBS1*. Помимо этого, нокаут вышеуказанных генов приводит к значительным изменениям экспрессии других генов в клеточных линиях (табл. 1). Наиболее сильные изменения вызываются нокаутом гена *RBFOX2*, что может объясняться его известной ролью в регуляции альтернативного сплайсинга.

Таблица 1

Влияние нокаута генов *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* на экспрессию генов в клеточных линиях

Нокаутированный ген	Число генов со сниженной экспрессией в нокаутной клеточной линии ( $>2$ раз)	Число генов с повышенной экспрессией в нокаутной клеточной линии ( $>2$ раз)
<i>ADAMTS1</i>	42	50
<i>RBFOX2</i>	358	516
<i>THBS1</i>	83	79

**Выводы.** Нокаут генов *ADAMTS1* и *RBFOX2* приводит не только к повышению радиочувствительности клеточных линий, но и связан со значительными изменениями в транскрипционном профиле, что может указывать на возможную роль этих генов в реализации радиационно-индуцированного транскрипционного клеточного ответа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bourd-Boittin K., Bonnier D., Leyme A., et al. (2011) 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*, Vol. 54, no. 6, pp. 2173-2184.
2. Resovi A., Pinessi D., Chiorino G., et al. (2014) Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. *Matrix Biol*, Vol. 37, pp. 83-91.
3. Arya A.D., Wilson D.I., Baralle D., et al. (2014) RBFOX2 protein domains and cellular activities. *Biochem Soc Trans*, Vol. 42, no. 4, pp. 1180-1183.