

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



ДАКС

Александра Александровна

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УБИКВИТИНЛИГАЗЫ
PIRN2 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

03.01.03 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

Барлев Николай Анатольевич

Санкт-Петербург

2016

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AR (androgen receptor) – андрогеновый рецептор

BER (base excision repair) – эксцизионная репарация оснований

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) — питательная среда Игла в модификации Дульбекко

EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота

HCC (hepatocellular carcinoma) - гепатоклеточная карцинома

HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) - плоскоклеточный рак головы и шеи

HR (homologous recombination) – гомологичная рекомбинация

NER (nucleotide excision repair) - эксцизионная репарация нуклеотидов

NHEJ (non-homologous end joining) – негомологичное соединение концов

PBS (phosphate buffered saline) — фосфатно-солевой буфер

PSA (prostate-specific antigen) – простат-специфический антиген

shRNA (small hairpin RNA) – малая шпилечная РНК

TNM (tumor, nodus, metastasis) — международная классификация стадий злокачественных новообразований.

Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) — 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол

ВПЧ ВКР – вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска

кДНК — комплементарная ДНК

НМККЛ – немелкоклеточная карцинома легкого

ОТ ПЦР в РВ - полимеразная цепная реакция в режиме «реального времени»

ПААГ — полиакриламидный гель

РМЖ – рак молочной железы

УПС – убиквитин-протеасомная система

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
1. Актуальность исследования.....	6
2. Цели и задачи работы	8
3. Основные положения, выносимые на защиту	8
4. Научная новизна полученных результатов	9
5. Теоретическое и практическое значение работы.....	9
6. Апробация работы.....	10
7. Личный вклад автора	10
8. Список опубликованных по теме диссертации печатных работ	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Убиквитин-протеасомная система деградации белков (УПС)	13
1.1.1 Структура протеасомы	14
1.1.2 Убиквитинирование белков	16
1.1.3 Заболевания, ассоциированные с нарушением функции УПС	18
1.2 RING-домен содержащая убиквитинлигаза Pirh2	24
1.2.1 Структура белка Pirh2	24
1.2.2 Изоформы белка Pirh2	25
1.2.3 Регуляция активности белка Pirh2	26
1.3 Белки-мишени убиквитинлигазы Pirh2.....	28
1.3.1 Семейство транскрипционных факторов p53	28
1.3.2 Ингибитор циклин-зависимой киназы 1B – p27 ^{kip1}	33
1.3.3 Транскрипционный фактор c-Myc	34
1.3.4 ДНК-полимераза (Pol η)	34
1.3.5 Серин/треониновая протеинкиназа Chk2	35
1.3.6 Деацетилаза гистонов HDAC1	36
1.4 Участие убиквитинлигазы Pirh2 в канцерогенезе.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1 Клеточные культуры.....	41
2.1.1 Клеточные линии, использованные в работе	41
2.1.2 Условия культивирования.....	41

2.1.3 Обработка клеток химическими агентами	42
2.1.4 Трансфекция клеток.....	42
2.1.5 Получение стабильных клеточных линий.....	43
2.2 Генетические конструкции и молекулярное клонирование	44
2.3 Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени	46
2.4 Экспрессия и очистка рекомбинантных белков.....	48
2.5 GST-пулдаун.....	49
2.6 Масс-спектрометрия	50
2.7 Ко-иммунопреципитация	50
2.8 Убиквитинирование <i>in vivo</i>	51
2.9 Разделение белков в ПААГ и вестерн-блот.....	52
2.10 Мониторинг пролиферации и миграции клеток в режиме реального времени.....	54
2.11 Тест на застывание царапины.....	54
2.12 МТТ-тест	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	56
3.1 Транскрипционный фактор p63 активирует экспрессию убиквитинлигазы Pirh2	56
3.1.1 P53 активирует экспрессию Pirh2 в клетках линии рака толстой кишки человека HCT116	56
3.1.2 Транскрипционный фактор p63 активирует экспрессию Pirh2 на уровне белка	57
3.1.3 Транскрипционный фактор p63 активирует экспрессию Pirh2 на уровне мРНК	59
3.2 Определение новых белков-интерактантов убиквитинлигазы Pirh2.....	60
3.2.1 Масс-спектрометрический анализ интерактома Pirh2	60
3.2.2 Белок Pirh2 физически взаимодействует с гистоном H2A.Z и убиквитинирует его	81
3.2.3 Белок Pirh2 – убиквитинлигаза белка Elavl1/HuR, направляющая его на деградацию	85
3.3 Белок Pirh2 усиливает канцерогенные свойства клеток немелкоклеточной карциномы легкого H1299	89

3.3.1 Влияние временной трансфекции Pirh2 на пролиферативный потенциал клеток H1299	90
3.3.2 Получение стабильных клеточных линий с эктопической экспрессией Pirh2 и shRNA Pirh2 на основе линии H1299	92
3.3.3 Влияние Pirh2 на пролиферативный потенциал изогенных линий H1299 с различным статусом экспрессии Pirh2.....	93
3.3.4 Pirh2 усиливает миграционный потенциал клеток H1299.....	94
3.3.5 Pirh2 повышает устойчивость клеток H1299 к доксорубину.....	99
3.3.6 Pirh2 повышает уровень экспрессии онкогенного белка c-Myc в клетках H1299	101
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	104
4.1 Убиквитинлигаза Pirh2 – новая транскрипционная мишень белка p63	104
4.2 Pirh2 участвует в регуляции неканонического гистона H2A.Z	107
4.3 РНК-связывающий белок Elav1/HuR – новая мишень убиквитинлигазы Pirh2	111
4.4 Pirh2 усиливает туморогенный потенциал клеток H1299.....	117
ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	122

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность исследования

Направленная деградация белков является одним из важнейших процессов, необходимых для нормального функционирования клеток. Известно, что в отличие от аутофагии, ответственной в основном за деградацию долгоживущих белков, а также агрегированных белков и клеточных органелл (таких как митохондрии, рибосомы и пероксисомы), убиквитин-протеасомная система (УПС), обеспечивает деградацию 80-90% белков клетки, включая множество короткоживущих, мутированных, денатурированных и поврежденных белков (Rock et al., 1994).

Протеасомы узнают цепочки убиквитинов, которые ковалентно связываются с лизинами белков-мишеней с помощью ферментов E3-убиквитинлигаз. Соответственно, E3-убиквитинлигазы играют важнейшую роль в регуляции протеостаза клетки. Белок Pirh2 – продукт гена *RCHY1* человека – относится к семейству RING-доменов содержащих E3-убиквитинлигаз. Pirh2 был впервые идентифицирован как белок, взаимодействующий с аминоконцевым участком андрогенового рецептора (ARNIP) (Beitel et al., 2002; Leng et al., 2003). Белок Pirh2 включает три основных функциональных домена – аминоконцевой домен NTD (N-terminal domain), ответственный за белок-белковые взаимодействия и необходимый для самоубиквитинирования, центральный домен RING finger (RING, really interesting new gene), обеспечивающий убиквитинлигазную активность, и карбоксиконцевой домен CTD (C-terminal domain), также вовлеченный во взаимодействие с другими белками и самоубиквитинирование (Zeinab et al., 2013).

Одним из наиболее изученных аспектов функционирования Pirh2 в клетке является убиквитин-зависимая протеасомная деградация главного онкосупрессора клетки – p53. Повреждение ДНК приводит к активации p53 за счет фосфорилирования данного белка по сайту Ser15. При этом данная модификация препятствует взаимодействию p53 с его главным негативным

регулятором – Mdm2. Это приводит к накоплению активированного p53 и реализации его функций в ответ на повреждения ДНК. Показано, что в отличие от Mdm2, белок Pirh2 способен модифицировать данную активированную форму p53 и направлять ее на деградацию (Tai, 2010). Таким образом, Pirh2 снижает количество p53 в клетке и подавляет экспрессию генов, регулируемых p53, ответственных за остановку клеточного цикла и апоптоз (Lee et al., 2012). При этом, транскрипционный фактор p53 активирует экспрессию самого гена *RCHY1*, формируя тем самым замкнутый цикл обратной регуляции (Leng et al., 2003; Feng et al., 2007; Sheng et al., 2008).

Известно, что помимо p53, мишенями Pirh2 являются другие белки, участвующие в регуляции клеточного цикла, запуске апоптоза и ответе на повреждение ДНК, например, p63, серин/треониновая протеинкиназа Chk2 и белок p27, отвечающие за продвижение клетки по клеточному циклу (Shimada et al., 2009; Bohgaki et al., 2013), Polη – полимеразы, участвующая в репарации пиримидиновых димеров и двуцепочечных разрывов (Jung et al., 2010). Однако роль белка Pirh2 в данных процессах остается недостаточно изученной.

На сегодняшний день ряд исследований демонстрирует онкогенную роль Pirh2 в опухолевых клетках различных типов. Так, например, повышенная экспрессия Pirh2 была показана в 82% случаев рака легкого человека (Duan et al., 2004) и 89% случаев рака предстательной железы человека (Logan et al., 2006). Повышение уровня Pirh2 при гепатоклеточной карциноме коррелирует с ускоренным ангиогенезом в опухоли, повышением количества опухолевых узлов и снижением продолжительности жизни пациентов (Huang et al., 2011). Соответственно, Pirh2 рассматривается как мишень для разработки направленной противоопухолевой терапии (Hattori et al., 2007, Jung et al., 2012). Однако, при этом показано, что Pirh2 может также играть роль онкосупрессора. Например, мишенью убиквитин-лигазной активности Pirh2 является такой онкоген как c-Myc, а пониженный уровень экспрессии Pirh2 ассоциирован со снижением выживаемости пациентов при раке молочной железы, раке яичников, и плоскоклеточном раке легкого (Hakem et al., 2011).

Таким образом, исследование новых механизмов регуляции экспрессии гена *RCHY1*, определение новых белков-интерактантов и выявление

онкогенного потенциала Pirh2 является актуальным не только с точки зрения приобретения фундаментальных знаний, но также является необходимым для разработки новых эффективных подходов в терапии рака.

2. Цели и задачи работы

Цель:

Целью данной работы является изучение регуляции экспрессии, белок-белковых взаимодействий и функциональной роли белка Pirh2 в канцерогенезе.

Задачи:

1. Определить механизм регуляции экспрессии гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2, в отсутствие транскрипционного фактора p53.
2. Идентифицировать спектр белков, ассоциированных с E3-убиквитинлигазой Pirh2
3. Оценить функциональную значимость взаимодействия Pirh2 с белками-интерактантами, играющими важную роль в канцерогенезе
4. Определить влияние белка Pirh2 на опухолевый потенциал клеток

3. Основные положения, выносимые на защиту

1. Транскрипционный фактор p63, а именно его полноразмерная изоформа TAp63, активирует экспрессию гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2, в клетках с отсутствием p53.
2. Идентифицировано более 200 не известных ранее интерактантов E3-убиквитинлигазы Pirh2, участвующих в транскрипции, организации генома, процессинге РНК, метаболизме, репарации и играющих важную роль в онкогенезе, что свидетельствует о вероятном участии Pirh2 в данных процессах.
3. Убиквитинлигаза Pirh2 функционально взаимодействует с гистоном H2A.Z и осуществляет его моноубиквитинирование.

4. Pirh2 функционально взаимодействует с РНК-связывающим белком Elavl1/HuR, полиубиквитинирует его и направляет на протеасомную деградацию.
5. Белок Pirh2 усиливает онкогенный потенциал клеток линии немелкоклеточной карциномы легкого человека H1299, повышая их миграционную способность, пролиферацию и устойчивость к химиотерапевтическому препарату доксорубину.

4. Научная новизна полученных результатов

В данной работе впервые было показано, что ген *RCHY1*, кодирующий белок Pirh2, является транскрипционной мишенью белка p63, а именно его полноразмерной изоформы, имеющей трансактивационный домен – TAp63.

Также было выявлено более 200 ранее неизвестных интерактантов белка Pirh2. Идентифицированные интерактанты участвуют в таких клеточных процессах как регуляция транскрипции, репарация ДНК, ремоделирование хроматина, сплайсинг и процессинг мРНК.

Было подтверждено физическое взаимодействие Pirh2 с такими белками, как ku70, Elavl1/HuR и гистон H2A.Z. Было показано, что Pirh2 является убиквитинлигазой для белков Elavl1/HuR и H2A.Z. При этом Pirh2 моноубиквитинирует гистон H2A.Z и полиубиквитинирует Elavl1/HuR с его последующей протеасомной деградацией.

Было показано, что Pirh2 способствует повышению пролиферативной активности, миграционного потенциала и устойчивости к доксорубину клеток линии немелкоклеточной карциномы легкого человека H1299.

5. Теоретическое и практическое значение работы

Результаты настоящего исследования важны для фундаментального понимания клеточных процессов, в которые вовлечен белок Pirh2, а именно: регуляция клеточного цикла, репарация ДНК и апоптоз. Кроме того, выявление туморогенной роли Pirh2 в клетках H1299 позволяет рассматривать его как

потенциальную мишень для разработки таргетной терапии опухолей легкого с негативным статусом p53.

6. Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на трех международных конференциях «FEBS» (Париж, 2014), «Advances in Oncology» (Афины, 2015) и «12th International Congress of Cell Biology» (Прага, 2016), а также на четырех отечественных конференциях: «IV Конференции молодых ученых ИНЦ РАН» (СПб, 2014), XVII Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (СПб, 2014), Онкологическом форуме «Петровские чтения» (СПб, 2015), «V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии» (СПб, 2016)

7. Личный вклад автора

Автор активно участвовал в определении направлений исследования и постановке конкретных задач, а также выборе методов и подходов для их решения, анализе результатов и формулировании выводов. Все основные эксперименты были выполнены автором лично, отдельные эксперименты – с его участием. Исследование Pirh2 как транскрипционной мишени p63 проводилось совместно с Федоровой О.А. (ИНЦ РАН). Идентификация белков, ассоциированных с рекомбинантным белком GST-Pirh2, была осуществлена с помощью метода масс-спектрометрии совместно с Andrew Bottrill (Университет Лестера, Англия). Полученные результаты обсуждались и публиковались совместно с научным руководителем и соавторами.

8. Список опубликованных по теме диссертации печатных работ

По результатам диссертации опубликовано 15 печатных работ, включая 4 статьи в Российских и зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК:

Перечень опубликованных статей:

Дакс, А. А., Д. Мелино, Н. А. Барлев. "Роль различных Е3-убиквитинлигаз в регуляции активности онкосупрессора p53" Цитология. 55(10). С. 673–687. (2013).

Shuvalov, O., Petukhov, A., Daks, A., Fedorova, O., Ermakov, A., Melino, G., Barlev, N. Current genome editing tools in gene therapy: new approaches to treat cancer. Current gene therapy. 15. P. 511-529. (2015).

Шувалов, О. Ю., Федорова, О. А., Петухов, А. В., Дакс, А. А., Васильева, Е. А., Григорьева, Т. А., Барлев, Н. А. Негативные регуляторы онкосупрессора p53 в контексте направленной противоопухолевой терапии. Цитология, 57(12), С. 847-854. (2015).

Дакс, А. А., Петухов, А. В., Шувалов, О. Ю., Васильева, Е. А., Мелино, Д., Барлев, Н. А., Федорова, О. А. Онкосупрессор p63 регулирует экспрессию убиквитинлигазы Pirh2. Цитология, 57(12). С. 876-879. (2015).

Перечень опубликованных тезисов:

А.А. Дакс, О.Ю. Шувалов, О.А. Федорова, Н.А. Барлев. Определение домена убиквитинлигазы PIRH2, взаимодействующего с MDM2 // Цитология, 2014. Т. 56, № 5, С.365 – 366.

A. A. Daks, O. A. Fedorova, N. A. Barlev. Detection of Pirh2-interacting proteins using GST-pulldown followed MALDI-TOF mass spectrometry // FEBS Journal. 2014. V. 281 (Suppl. 1). P. 454.

O. Fedorova, A. A. Daks, A. Petukhov, O. Shuvalov, N. Barlev. Transcriptional factors p53 and p63 regulate expression of orphan nuclear receptors NR4A // FEBS Journal. 2014. V. 281 (Suppl. 1). P. 514 – 515.

Дакс А.А., Федорова О.А., Петухов А.А., Шувалов О.Ю., Барлев Н.А. Идентификация белков, взаимодействующих с Е3-убиквитинлигазой Pirh2 // Цитология. 2014. Т. 56. № 9. С.652

A.V.Petukhov, A. A. Daks, O. Y. Shuvalov, N. A. Barlev. Detection of COP1-interacting proteins using coimmunoprecipitation followed MALDI-TOF mass spectrometry. EJC supplements 13. 2015. P. 42.

Дакс А.А., Федорова О.А., Петухов А.В., Шувалов О.Ю., Васильева Е.А.,

Барлев Н.А. Биологическая оценка низкомолекулярных активаторов белка p53. Сборник тезисов Петербургского онкологического форума «Белые Ночи 2015». С. 414.

A. Daks, O. Fedorova, A. Petukhov, O. Shuvalov, E. Vasileva and N. Barlev. Elucidation of Pirh2 interactome within the context of cancer -associated pathways. International Journal of Molecular Medicine, 2015. V.36. S1. P.35.

O. Fedorova, A. Daks, A. Petukhov, O. Shuvalov, E. Vasileva and N. Barlev. Biological evaluation of novel small - molecule activators of p53. International Journal of Molecular Medicine, 2015. V.36. S1. P.39 .

A. Daks, O. Fedorova, A. Petukhov, O. Shuvalov, E. Vasileva and N. Barlev. Novel interactions of Pirh2 protein and their potential significance in cancer. Цитология. 2015. V.57. P. 609.

A. Daks, V. Merkulov, O. Fedorova, A. Petukhov, O. Shuvalov, E. Vasileva, N. Barlev. RNA-binding protein HuR is a novel target of ubiquitin ligase Pirh2. Abstract book of 12th Interanational Congress of Cell Biology. 2016. P. 147.

А.А. Дакс, О.А. Федорова, В.О. Меркулов, А.В. Петухов, О.Ю. Шувалов, Е.А. Васильева, Н.А. Барлев. РНК-связывающий белок HuR – новая мишень убиквитинлигазы Pirh2. Сборник тезисов V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии. 2016. С. 8.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ (УПС)

Как известно, постоянство протеома клетки строго регулируется и зависит как от условий среды, так и от внутренних стимулов. Количество того или иного белка в клетке определяется активностью множества процессов и факторов, таких как синтез РНК и белка, посттранскрипционные и посттрансляционные модификации, активность различных ферментов, а также деградация белков. На сегодняшний день принято считать, что в эукариотической клетке для большинства клеточных белков существует два главных механизма деградации: убиквитин-протеасомная система (УПС) и аутофагия. Две данные системы не только осуществляют деградацию белков до олигопептидов, но также обеспечивают пул аминокислот и энергетический баланс клетки во время острой нехватки питательных веществ (за счет УПС) (Vabulas and Hartl, 2005) и во время хронического голодания (за счет аутофагии) (Scherz-Shouval et al., 2010). Так как синтез аминокислот *de novo* требует больших энергозатрат, повторное использование клеткой аминокислот, полученных в результате деградации белков, обеспечивает сохранение гомеостаза с меньшими затратами энергии. Кроме того, два данных механизма являются важной частью системы контроля качества белков, которая узнает неправильно свернутые или поврежденные белки, маркирует их и в конечном итоге обеспечивает их деградацию (Lilienbaum, 2013).

Обе системы деградации белков являются высококонсервативными и гомологи ключевых участников данных процессов имеются у представителей практически всех групп эукариотических организмов от дрожжевых грибов до млекопитающих (Kominami and Toda, 1997; Levine and Klionsky, 2004; Moon et al., 2004). У человека нарушение функционирования данных систем деградации белков приводят к развитию множества тяжелых заболеваний, таких как нейродегенерация, аутоиммунные заболевания, миопатии и рак (Mizushima et al., 2008; Schmidt and Finley, 2014).

Известно, что в отличие от аутофагии, ответственной в основном за деградацию долгоживущих белков, а также агрегированных белков и клеточных органелл (таких как митохондрии, рибосомы и пероксисомы), убиквитин-протеасомная система (УПС), обеспечивает деградацию 80-90% белков клетки, включая множество короткоживущих, мутированных, денатурированных и поврежденных белков (Rock et al., 1994).

1.1.1 Структура протеасомы

Убиквитин-зависимая протеасомная деградация обеспечивает регуляцию множества клеточных процессов, включая сохранение клеточного гомеостаза, транскрипцию, продвижение по клеточному циклу, рецепторно-опосредованный эндоцитоз, ответ клетки на стрессовые воздействия и апоптоз (запрограммированную клеточную гибель).

Деградация большинства клеточных белков осуществляется 26S протеасомой - немембранной клеточной органеллой, которая включает два субкомплекса: коровую частицу 20S (около 700 кДа) и одну или две регуляторные частицы 19S (около 900 кДа) (Groll and Huber, 2003). Схематическое изображение структуры 26S протеасомы представлено на рисунке 1. Коровая 20S частица представляет собой цилиндрическую структуру с центральной полостью диаметром около 2 нм. Коровая частица включает два кольца, состоящих из 7 альфа-субъединиц, и два кольца, состоящих из 7 бета-субъединиц. Альфа-субъединицы обеспечивают прикрепление регуляторных частиц, а также предотвращают неспецифический протеолиз, в то время как бета-субъединицы формируют внутреннюю полость и непосредственно осуществляют протеазную активность. Кольца альфа-субъединиц фланкируются бета-гептамерами, и субстраты могут попасть во внутреннюю протеолитическую полость только через поры, формируемые альфа-субъединицами. Данные поры являются слишком узкими для прохождения правильно свернутых белков, поэтому субстратные белки подвергаются локальной денатурации. Коровые частицы активируются 19S регуляторными частицами, которые прикрепляются к альфа-гептамерам и индуцируют

конформационные изменения, способствующие открытию пор. 19S частицы включают в состав 19 белков, организованных в два субкомплекса: 9-субъединичное основание, соединенное с альфа-кольцом коровой частицы, и 10-субъединичную «крышку» (сар, англ.). Основание включает 6 АТФазных субъединиц (RPT1-6), обеспечивающих продвижение субстрата в протеолитическую полость, а также белки RPN1, 2, 10 и 13 (рис. 1). RPN1 и 2 отвечают за взаимодействие субстратов и регуляторных субъединиц с АТФазным кольцом, а RPN10 и 13 представляют собой рецепторы и распознают убиквитинированные субстраты.

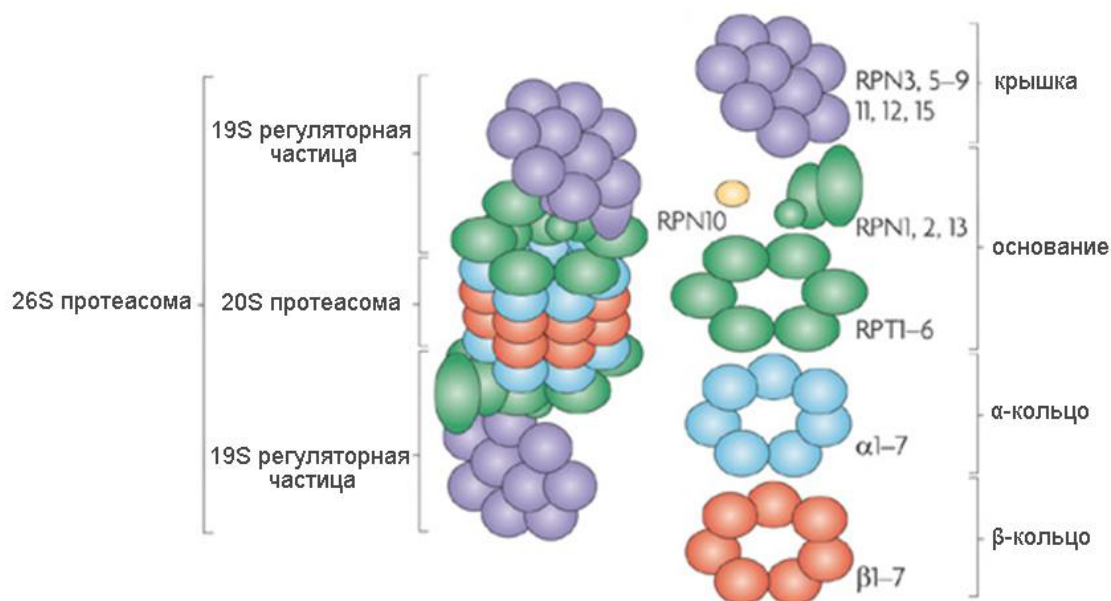


Рисунок 1. Схематическое изображение структуры 26S протеасомы. (Murata et al., 2009) с изменениями автора.

Регуляторные частицы отвечают за распознавание субстрата и активацию протеолитической активности протеасомы (Inobe and Matouschek, 2014). Несмотря на то, что существуют примеры альтернативного убиквитин-независимого протеолиза белков в 20S протеасомах, чаще всего, перед тем, как подвергнуться деградации в протеасоме белок-субстрат должен быть маркирован убиквитином – высококонсервативным полипептидом, состоящим из 76 аминокислот (Hershko, 1998).

1.1.2 Убиквитинирование белков

Ковалентная модификация белковых субстратов остатками убиквитина является маркером для узнавания данного субстрата другими белками, а также сигналом для изменения функции или судьбы данного белка-субстрата в клетке. При этом убиквитинирование не всегда является сигналом для протеасомной деградации. Так, например, у дрожжей известно более тысячи белков, подвергающихся убиквитинированию, но почти половина из них не подвергаются деградации в протеасомах (Kim et al., 2011). На сегодняшний день принято считать, что убиквитиновые цепи, образованные по 48 лизину (K48), направляют белок в протеасому. При этом для эффективного распознавания данного белка протеасомой цепь должна включать не менее четырех убиквитиновых остатков (Pickart and Fushman, 2004; Komander and Rape, 2012). Модификация белков моноубиквитинами, полиубиквитиновыми цепями, связанными через 63 лизин (K63), либо моноубиквитинами одновременно нескольких сайтов (т.н. мультиубиквитинирование) в свою очередь могут играть роль в клеточных процессах, не задействующих протеасомы, таких как реорганизация хроматина, мембранный транспорт и передача сигнала. При этом данное правило не является абсолютным, и перечисленные модификации также могут направлять белки на протеасомную деградацию (Saeki et al., 2009; Shabek et al., 2012). Кроме того, на сегодняшний день показано, что удлинение цепей убиквитина может также осуществляться через лизины K6, K11, K27, K29 и K33, однако именно лизины K48 и K63 являются наиболее часто встречающимися сайтами элонгации убиквитиновых цепей (Lilienbaum, 2013).

Ковалентное присоединение убиквитина к субстрату осуществляется путем последовательного действия трех этапов ферментативного каскада (рис.2). На первом этапе убиквитин присоединяется к цистеиновому остатку активирующего фермента E1. В ходе данной реакции происходит расщепление молекулы АТФ. Затем активированный убиквитин переносится на конъюгирующий фермент E2 с образованием сложной тиоэфирной связи. На третьем этапе происходит присоединение убиквитина к субстрату,

распознаваемому ферментом E3-убиквитинлигазой (Hershko and Ciechanover, 1992). Как показано на рисунке 2, в случае, если E3-лигаза относится к семейству убиквитинлигаз, содержащих RING-домен¹, перенос убиквитина на субстрат осуществляется непосредственно с фермента E2. В альтернативном случае, если убиквитинирование, осуществляется при участии НЕСТ-доменсодержащей² убиквитинлигазы, переносу убиквитина на субстрат предшествует образование промежуточного комплекса E3-убиквитин (Ciechanover, 2005). На сегодняшний день известно 2 гена, кодирующих E1-ферменты, около 35 генов, кодирующих E2 и более 1000 генов, кодирующих E3-убиквитинлигазы. Данное разнообразие объясняется тем фактом, что именно E3-ферменты определяют специфичность реакции, т.е. какой именно белок будет подвергнут модификации убиквитином (Pickart and Eddins, 2004). Недавно было показано, что для мультиубиквитинирования субстрата может требоваться дополнительный конъюгирующий фермент. Факторы, которые наряду с E1, E2 и E3 способствуют сборке мультиубиквитиновых цепей получили название E4-ферменты (Koegl et al., 1999).

Как и другие посттрансляционные модификации, убиквитинирование белков является обратимым. В геноме человека имеется около 100 генов, кодирующих деубиквитиназы (DUB) - ферменты, обеспечивающие деубиквитинирование субстратов и участвующие в тонкой регуляции процессов убиквитин-опосредованных клеточных процессов. Деубиквитиназы представляют собой разнородную группу протеаз, относящихся к 6 различным белковым семействам (Fraile et al., 2012). Наиболее многочисленным семейством являются убиквитин-специфичные протеазы (USP), насчитывающим более 60 деубиквитиназ, которые имеют в составе одноименный USP домен, отвечающий за протеолитическую активность (Quesada et al., 2004). Деубиквитиназы осуществляют гидролиз изопептидной связи убиквитин-белкового комплекса между убиквитином и субстратом (Turcu et al., 2009), в результате чего свободный убиквитин снова может быть активирован ферментом E1 и использован для модификации других субстратов.

¹ RING, really interesting new gene – действительно интересный новый ген (англ.).

² НЕСТ, homologous to the E6AP carboxy terminus – гомологичный карбоксильному концу E6AP (англ.).

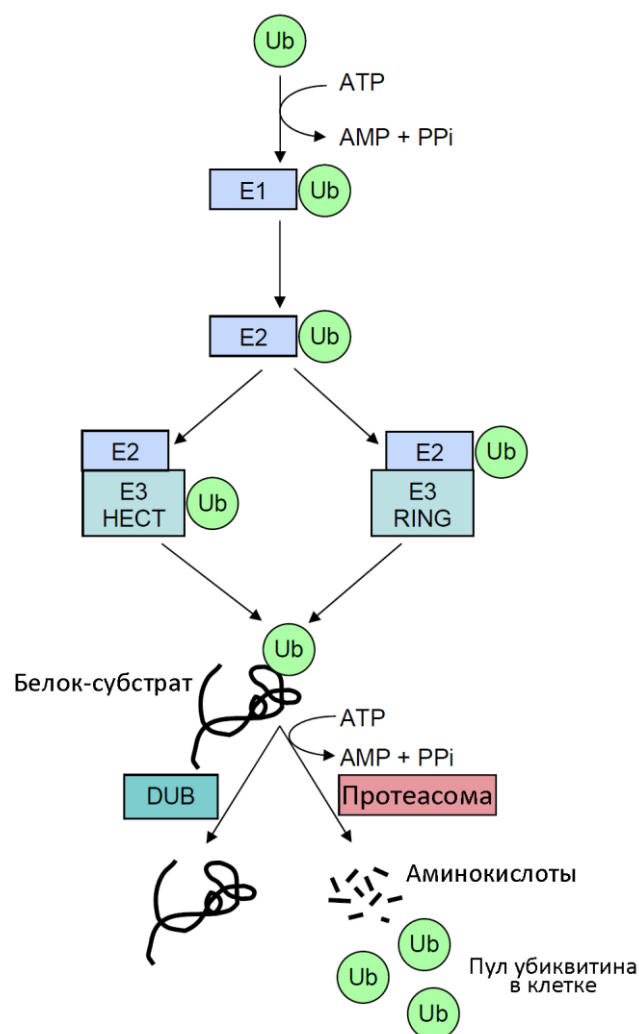


Рисунок 2. Схема процесса убиквитинирования белков эукариотической клетки (адаптировано из Lilienbaum, 2013).

E1 – активирующий фермент; E2 – конъюгирующий фермент; E3 HECT - HECT-доменсодержащая убиквитинлигаза; E3 RING – RING-доменсодержащая убиквитинлигаза; Ub – убиквитин; DUB – деубиквитиназа.

1.1.3 Заболевания, ассоциированные с нарушением функции УПС

Так как убиквитин-протеасомная деградация белков регулирует широкий спектр клеточных процессов, включая репарацию ДНК, пролиферацию и дифференцировку, продвижение по клеточному циклу, контроль качества белков, а также регуляцию мембранных рецепторов и ионных каналов, неудивительно, что нарушения в данной системе вовлечены в патогенез множества заболеваний человека.

Патологические состояния, ассоциированные с УПС можно разделить на две функциональные группы: 1) заболевания, связанные со стабилизацией определенных белков, вызванной мутацией субстрата или потерей функции ферментов УПС, и 2) заболевания, связанные с усиленной функцией УПС и чрезмерно активной деградацией субстрата.

Одним из примеров заболевания, связанного с чрезмерным накоплением субстрата является генетически синдром Лиддла, проявляющийся в артериальной гипертензии, гипокалиемии, и метаболическом алкалозе. Данный синдром был описан в 1960х годах, но только в 1994 году выяснилось, что его причиной является мутация в гене, кодирующим β -субъединицу натриевого канала почечного эпителия *EnaC* (Shimkets et al., 1994). Позже, в 1997 году, группа исследователей Staub с соавт. показала, что стабильность и функция Na^+ -каналов *EnaC* регулируется убиквитин-протеасомной системой, и что E3-лигазой, ответственной за эту регуляцию, является *Nedd4* (Staub et al., 1997). Мутация, ассоциированная с синдромом Лиддла, локализуется в участке взаимодействия β -*EnaC* и *Nedd4*, что приводит к нарушению убиквитин-зависимой деградации канала, его накоплению, и, соответственно, усиленной реабсорбции ионов Na^+ и воды, приводящей к развитию тяжелой формы ранней гипертензии.

Накопление белков, конъюгированных с убиквитином также характерно для различных нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, прионные инфекции, латеральный амиотрофический склероз, а также болезни, связанные с экспансией полиглутаминовых повторов (Ciechanover and Brundin, 2003). Для некоторых из этих заболеваний, например, для болезни Паркинсона, было показано, что нарушение функционирования УПС является причиной развития патологических процессов. В других же случаях ингибирование УПС является результатом агрегирования специфических для конкретного заболевания белков, и, соответственно, играет вторичную роль в патогенезе. Так, за развитие наследственной болезни Паркинсона ответственны мутации в нескольких генах, включая ген *PARK2* (Kitada et al., 1998; Lücking et al., 2000). Белок паркин, продукт гена *PARK2*, несущего различные мутации у приблизительно

50% пациентов, является E3-лигазой, функция которой нарушена при всех типах выявленных у пациентов мутаций. Нарушение функции паркина приводит к аккумуляции его белов-мишеней, скапливающихся в тельцах Леви, что вызывает нейротоксический эффект в допаминэргических нейронах (Kitada et al., 1998; Zhang et al., 2000; Chung et al., 2001; Imai et al., 2001; Shimura et al., 2001).

Многие вирусные заболевания также ассоциированы с изменением функционирования УПС. Классическим примером является рак шейки матки, вызванный вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР). Так, было показано, что в клетках, зараженных ВПЧ ВКР, уровень белка p53 очень низкий (Scheffner et al., 1991). Причиной этого является взаимодействие вирусного белка E6 с p53-специфичной E3-лигазой E6-AP, обеспечивающего возможность связывания E6-AP с p53, что приводит к убиквитинированию и деградации онкосупрессора p53 в клетках эпителия шейки матки и развитию онкогенного фенотипа клеток (Scheffner et al., 1990). Еще одним примером оккупации УПС вирусами является действие вирусных белков US2 и US11, экспрессирующихся в клетках, инфицированных цитомегаловирусом. Данные белки способны убиквитинировать молекулы МНС класса I и направлять их на деградацию в протеасомах, препятствуя таким образом презентации вирусных антигенов цитотоксическим CD8⁺ Т-лимфоцитам и развитию иммунной реакции (Shamu et al., 1999; Furman and Ploegh, 2002).

Безусловно, огромную часть заболеваний, ассоциированных с нарушением функционирования УПС, представляют злокачественные новообразования. Убиквитин-зависимая деградация как онкосупрессорных, так и онкогенных белков является предметом активного изучения в контексте исследований механизмов возникновения раковых заболеваний и поиска мишеней и стратегий эффективной терапии.

В качестве одного из примеров можно привести роль убиквитинлигазного комплекса VHL в развитии рака почки человека. Показано, что в нормальных условиях VHL убиквитинирует и направляет на деградацию белок HIF-1 (индуцируемый при гипоксии фактор 1) (Maxwell et al., 1999).

Транскрипционный фактор HIF-1 опосредует физиологический ответ на гипоксию, активируя гены, способствующие ангиогенезу, таких как фактор роста эндотелия сосудов *VEGF* (Semenza, 2000). В нормальных условиях HIF-1 гидроксiliрован, что обеспечивает его распознавание убиквитинлигазным комплексом VHL (Jaakkola et al., 2001). Мутации белка VHL приводят к тому, что он не способен взаимодействовать с фактором HIF-1, убиквитинировать его, и, соответственно, направлять на протеасомную деградацию (Gnagna, 1994). Повышенная стабильность белка HIF-1 в клетках карциномы почки обуславливает усиление экспрессии *VEGF* и других факторов ангиогенеза, что приводит к гиперваскуляризации и развитию опухолей. Обнаружив данный молекулярный механизм, исследователи начали рассматривать HIF-1 и *VEGF* как мишень для разработки терапии рака почки, ассоциированного с мутациями VHL (Semenza, 2012).

Еще одним примером роли нарушения УПС в патогенезе раковых заболеваний служит колоректальный рак, ассоциированный с мутациями в гене *APC* (adenomatous polyposis coli) (Rubinfeld et al., 1993). Помимо колоректального рака мутации гена *APC* являются причиной развития аденоматозного полипоза толстой кишки (Spirio et al., 1993). Известно, что *APC* мутирован в более 70% случаев колоректального рака человека (Mori et al., 1992; Powell et al., 1992). Большинство известных мутаций *APC* связаны с возникновением стоп-кодона в центральной части гена, что является причиной экспрессии белка с делецией С-концевого участка (Mori et al., 1992). Онкосупрессорная функция *APC* заключается в том, что данный белок способствует фосфорилированию β -катенина киназой CK1, что обеспечивает его убиквитинирование E3 лигазой SCF E3 и последующую протеасомную деградацию. β -катенин является транскрипционным ко-фактором и активирует экспрессию таких белков как с-Мyc (He et al., 1998), циклин D (Tetsu and McCormick, 1999) и MMP7 (Ougolkov et al., 2002), обеспечивающих прогрессию колоректального рака. При возникновении мутаций в *APC*, он не способен опосредовать фосфорилирование β -катенина (необходимый этап для взаимодействия данного онкогена с убиквитинлигазой), что приводит к повышенной экспрессии онкогенных транскрипционных мишеней β -катенина.

Стоит отметить, что в случаях, когда клетки колоректального рака экспрессируют нормальный белок APC, сам β -катенин зачастую оказывается мутирован по сайтам фосфорилирования в аминоконцевом домене, что также препятствует убиквитинированию β -катенина и способствует активации его мишеней (Sparks et al., 1998).

Белок p53 является одним из самых изучаемых в контексте канцерогенеза. Известно, что уровень p53 в клетке в нормальных условиях является низким, что необходимо для продвижения по клеточному циклу и деления. В ответ на повреждение ДНК и другие стрессовые стимулы p53 стабилизируется и запускает экспрессию генов-мишеней, ответственных за репарацию ДНК, остановку клеточного цикла и апоптоз. Благодаря этим свойствам, p53 считается главным онкосупрессорным белком клетки. Регуляция экспрессии p53 осуществляется как на уровне транскрипции, так и на уровне белка. Деградация белка p53 обеспечивается УПС. На сегодняшний день известно более 15 E3-лигаз, направляющих p53 на деградацию, основными из которых являются Mdm2, Pirh2 и COP1. Стоит отметить, что на сегодняшний день одним из наиболее активно развивающихся направлений разработки таргетных противораковых препаратов является поиск ингибиторов взаимодействия p53 и Mdm2.

Убиквитинлигаза Mdm2 содержит RING-домен и является одной из основных E3-лигаз, направляющей белок p53 на деградацию. При этом экспрессия гена *HDM2*, кодирующего Mdm2, активируется белком p53, в результате чего образуется петля обратной регуляции (Freedman et al., 1999). Неудивительно, что в результате нарушения тонкого баланса между экспрессией и регуляцией двух данных белков и смещения равновесия в сторону Mdm2 клетки приобретают опухолевый фенотип. Действительно, на сегодняшний день известно, что ген *HDM2* амплифицирован в клетках многих типов раковых опухолей (Momand et al., 1998), а для трансгенных мышей, в геноме которых присутствует повышенное число копий данного гена, характерна повышенная частота образования опухолей (Jones et al., 1998). Так, повышенная экспрессия Mdm2 характерна для трети сарком, включая саркому Юинга, а также наблюдается при лейомиосаркомах, липомах, липосаркомах,

злокачественных фиброзных гистиоцитомах, злокачественных шванномах, рабдомиосаркомах и др. (Momand et al., 1998).

Уровень Mdm2 в клетке также зависит от активности *HDM2*-специфичных малых шпилечных РНК (siRNA) (Hoffman et al., 2014; Zhao et al., 2014), кроме того, для *HDM2* было показано наличие сайтов однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), вариабельность которых влияет на степень связывания транскрипционных факторов с промотерной областью Mdm2. Так SNP309 T>G в первом интроне второго промотора *HDM2* способствует более прочному связыванию транскрипционного фактора Sp1, что вызывает повышение экспрессии Mdm2 и, соответственно, дестабилизацию p53 в клетках (Bond et al., 2004; Post et al., 2010).

Известно, что около половины всех злокачественных новообразований человека характеризуются инактивирующими мутациями в гене, кодирующем белок p53 (Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991). При этом в случае 50% опухолей, экспрессирующих дикий тип p53, активация p53 и восстановление его функций в клетке является перспективным направлением направленной противораковой терапии. Наиболее прямой и распространенной на сегодняшний день стратегией является поиск молекул, способных предотвратить связывание p53 с его главным негативным регулятором – Mdm2. Сообщения о новых ингибиторах p53-Mdm2 взаимодействия появляются каждый год (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Так, на сегодняшний день на разных стадиях доклинических и клинических испытаний находятся более 15 потенциальных низкомолекулярных ингибиторов данного взаимодействия. Кроме того, разрабатываются молекулы более широкого действия, направленные на ингибирование убиквитинлигазной функции Mdm2 (Wade et al., 2013).

Помимо приведенных примеров в патогенез раковых заболеваний, связанных с нарушениями функционирования УПС, также вовлечены такие белки как MDMX (Karni-Schmidt et al., 2016), различные циклины (Nakayama and Nakayama, 2006), Skp1, β TrCP и многие другие. Таким образом, данная область является очень перспективной и активно развивающейся контексте разработки таргетных противоопухолевых препаратов.

1.2 RING-ДОМЕН СОДЕРЖАЩАЯ УБИКВИТИНЛИГАЗА PIRH2

1.2.1 Структура белка Pirh2

Белок Pirh2 (p53-induced RING-H2 protein) с альтернативным названием RCHY1 (RING-finger and CHY-zinc-finger domain-containing protein 1) был впервые идентифицирован как белок, взаимодействующий с аминоконцевым доменом андрогенового рецептора ARNIP (N-terminal interacting protein) (Beitel et al., 2002). Pirh2 является продуктом гена человека *RCHY1*, имеющим в составе 9 экзонов и локализующимся на 4 хромосоме в локусе 4p21.1.

Белок Pirh2 человека включает в себя 261 аминокислоту и является классическим представителем RING-доменсодержащих убиквитинлигаз. Помимо центрального RING домена, отвечающего за убиквитинлигазную активность, Pirh2 имеет amino- и карбоксиконцевой домены (NTD и CTD), обеспечивающие белок-белковые взаимодействия (рис. 3).

Молекулярная масса данного белка составляет около 30 кДа, и его структура координируется девятью ионами цинка, что обеспечивается высоким содержанием цистеина (11%) и гистидина (8%) (Sheng et al., 2008).

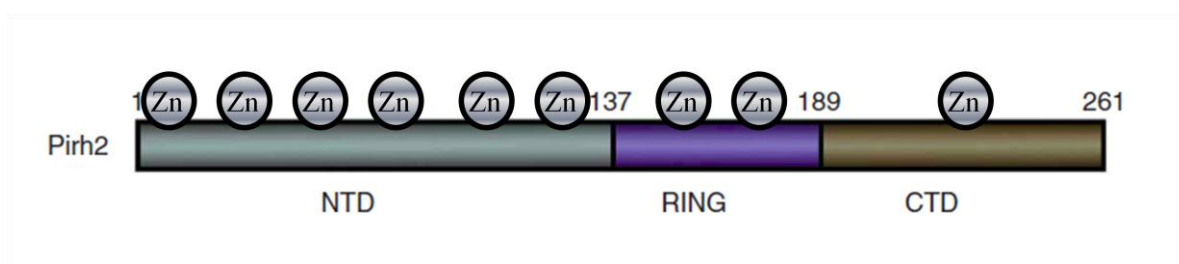


Рисунок 3. Доменная структура белка Pirh2. (Sheng et al., 2008) с изменениями автора.

NTD – аминоконцевой домен (N-terminal domain); RING – RING-домен, CTD – карбоксиконцевой домен (C-terminal domain).

RING-домен Pirh2 содержит RING-H2 мотив (Cys₃His₂Cys₃), характерный для таких убиквитинлигаз как c-Cbl (Joazeiro et al., 1999), комплекс APC

(anaphase-promoting complex) (Zachariae et al., 1998) и SCF (Joazeiro et al., 1999). Как упоминалось выше, данный домен обеспечивает функциональную активность Pirh2, и мутации в 176 и 186 положении приводят к потере способности присоединять убиквитин к субстратам (Sheng et al., 2008). Аминоконцевой домен NTD, содержащий мотив «цинковые пальцы» СНУ типа (zinc finger motif CHY-type) , и карбоксиконцевой домен CTD обеспечивают связывание Pirh2 с другими белками. При этом, делеционный мутант Pirh2 с отсутствующим NTD способен связываться с белками-мишенями и убиквитинировать их, а мутант с отсутствующим CTD сохраняет способность к автоубиквитинированию (Sheng et al., 2008).

1.2.2 Изоформы белка Pirh2

На сегодняшний день известно о существовании по меньшей мере пяти изоформ белка Pirh2, образующихся в результате альтернативного сплайсинга: Pirh2A (полноразмерная изоформа), B, b, C и D (рис. 4).

Первыми описанными альтернативными изоформами Pirh2 были Pirh2B и Pirh2C (Corcoran et al., 2009). Так, в результате альтернативного сплайсинга в мРНК изоформы Pirh2B отсутствует 7 экзон, кодирующий 171-179 аминокислоты. Изоформа Pirh2C в свою очередь образуется благодаря использованию альтернативного донорного сайта в 7 интроне и образованию преждевременного стоп-кодона, что приводит к отсутствию 180-186 аминокислот RING-домена и всего CTD (рис. 4). Было показано, что данные изоформы экспрессируются в различных типах раковых клеток (HCT116, RKO, H1299) и, несмотря на делеции, обладают способностью негативно регулировать белки-мишени Pirh2 (Corcoran et al., 2009).

При анализе библиотеки кДНК клеток печени человека была обнаружена еще одна изоформа Pirh2 – Pirh2b (Wu et al., 2010). Данная изоформа образуется в результате альтернативного сайта сплайсинга в 8 экзоне, 38-нуклеотидной делеции в 5'-области 8 экзона и образованию преждевременного стоп-кодона. Таким образом, 1-179 аминокислоты Pirh2b совпадают с изоформой Pirh2C, но Pirh2b имеет 9 дополнительных уникальных аминокислот в карбоксиконцевом участке (Wu et al., 2010). Стоит отметить, что данная изоформа способна

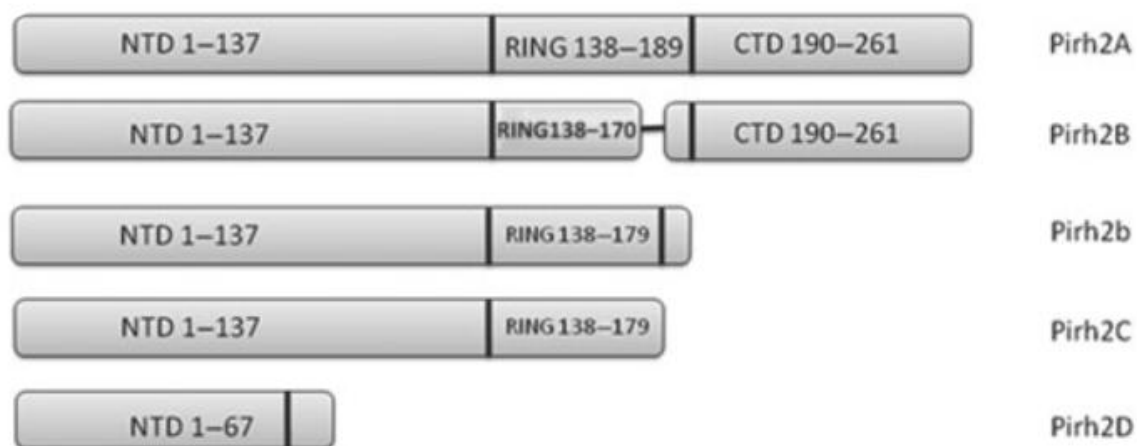


Рисунок 4. Сплайсинговые изоформы белка Pirh2 (Wang et al., 2011b).

NTD – аминоконцевой домен (*N-terminal domain*); *RING* – *RING*-домен, *CTD* – карбоксиконцевой домен (*C-terminal domain*).

взаимодействовать с белками-мишенями Pirh2, но не обладает способностью к их убиквитинированию. Также известно, что экспрессия данной изоформы снижена в клетках гепатоклеточной карциномы по сравнению с нормальными клетками печени (Wu et al., 2010).

Изоформа Pirh2D была обнаружена при анализе базы данных экспрессирующихся последовательностей (EST, expressed sequence tags). Pirh2D состоит из 75 аминокислот и образуется в результате инсерции аденина, сдвига рамки считывания и образования преждевременного стоп-кодона. В результате Pirh2D включает 67 аминокислот, совпадающих со всеми остальными изоформами и 8 уникальных аминокислот. На сегодняшний день роль изоформы в клетках не известна (Shi et al., 2010).

Стоит отметить, что все перечисленные изоформы белка Pirh2 экспрессируются в различных тканях, и, по-видимому, влияют на различные клеточные процессы, однако, их роль на сегодняшний день не выяснена и требует дальнейших исследований.

1.2.3 Регуляция активности белка Pirh2

На сегодняшний день известен только один транскрипционный фактор, активирующий экспрессию гена, кодирующего Pirh2, а именно - p53 (Leng et

al., 2003). Ранее предполагалось, что благодаря структурной гомологии с p53 два других члена данного белкового семейства – p63 и p73 – способны активировать экспрессию гена RCHY1, однако, это предположение так и не было подтверждено экспериментальными данными (Jung et al., 2012).

Помимо регуляции на уровне транскрипции и альтернативного сплайсинга, белок Pirh2 также подвергается посттрансляционным модификациям. Для Pirh2 характерны такие модификации как фосфорилирование, убиквитинирование и сUMOилирование (<http://www.phosphosite.org>) (рис. 5). Однако, не для всех данных модификаций известны осуществляющие их ферменты.

Одним из известных ферментов, осуществляющих фосфорилирование Pirh2, является кальмодулин-зависимая киназа II (CamK II). CamK II фосфорилирует Pirh2 по сайтам Thr154 и Ser155 (рис. 5). Было показано, что данные модификации способствуют автоубиквитинированию Pirh2 и таким образом ингибируют его убиквитинлигазную активность в отношении белков-мишеней, а именно p53 (Duan et al., 2007).

Еще одной Pirh2-специфической киназой является циклин-зависимая киназа Cdk9. Фосфорилирование белка Pirh2 киназой Cdk9 также приводит к автоубиквитинированию Pirh2 и ингибированию его убиквитинлигазной функции (Bagashev et al., 2013).

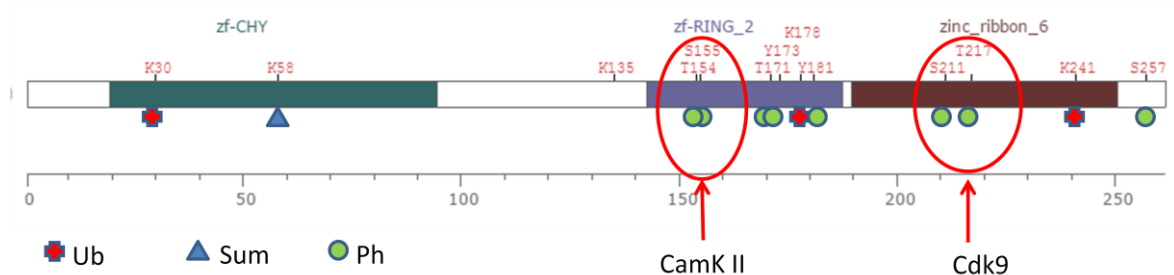


Рисунок 5. Посттрансляционные модификации белка Pirh2.

Ub – убиквитинирование, Sum – сUMOилирование, Ph – фосфорилирование.

Показано, что убиквитинирование Pirh2 происходит по трем сайтам:

Lys30, Lys178 и Lys241, однако по каким конкретно сайтам происходит его автоубиквитинирование до сих пор не известно. Также до сих пор не были показаны другие убиквитинлигазы и сумолигазы, модифицирующие Pirh2.

Кроме того, в регуляции посттрансляционных модификаций Pirh2 также участвует транскрипционный фактор PLAGL2 (Pleomorphic Adenoma Gene Like 2) (Zheng et al., 2007). PLAGL2 представляет собой онкогенный белок, принимающий участие в развитии различных типов раковых заболеваний, таких как глиобластома, гепатокарцинома, острый миелоидный лейкоз и др. Было показано, что PLAGL2 взаимодействует с Pirh2 и предотвращает его убиквитинирование и протеасомную деградацию (Zheng et al., 2007).

Еще одним белком, регулирующим стабильность Pirh2, является гистонацетилаза Tip60 (Tat-interactive protein of 60 kDa) с альтернативным названием KAT5. Tip60 представляет собой мультифункциональный белок, регулирующий транскрипцию (Kim et al., 2005), а также активности различных белков, включая онкосупрессор p53 (Tang et al., 2006), киназу ATM (Sun et al., 2005), андрогеновый рецептор (Gaughan et al., 2002) и др., за счет ацетилирования. Изменение экспрессии Tip60 характерно для рака предстательной железы, колоректального рака, меланомы и других типов злокачественных опухолей (Bassi et al., 2016). Белок Tip60 взаимодействует с Pirh2, предотвращая его автоубиквитинирование и, соответственно, способствуя его стабилизации (Logan et al., 2004). Кроме того, это взаимодействие приводит к накоплению Pirh2 в ядре и колокализации с Tip60 в ядерных межхроматиновых гранулах. Предполагается, что взаимодействие с Tip60 может модулировать ферментативную активность Pirh2 в отношении таких субстратов как p53 (Logan et al., 2004), однако эта гипотеза требует экспериментального подтверждения.

1.3 БЕЛКИ-МИШЕНИ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2

1.3.1 Семейство транскрипционных факторов p53

Онкосупрессорный белок p53 является ключевым регулятором

клеточного ответа на такие стрессовые стимулы как повреждение ДНК, активация онкогенов и гипоксия. В ответ на повреждение ДНК p53 активирует множество транскрипционных мишеней, вовлеченных в остановку клеточного цикла и запуск апоптоза: p21, Puma, Bax, Noxa и др. (Bell and Ryan, 2007). Количество и активность p53 в клетке строго регулируется в том числе с помощью посттрансляционных модификаций, таких как метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и убиквитинирование.

Как уже упоминалось, модификации остатками убиквитинов различаются по количеству, сайтам и последствиям для белка-мишени. Известно, что моноубиквитинирование p53 является сигналом для его экспорта из ядра. В цитоплазме p53 не может выполнять функции транскрипционного фактора, однако, способен активировать митохондриальный путь апоптоза (Marchenko et al., 2007).

В нормальных условиях уровень белка p53 достаточно низкий, что обеспечивает возможность продвижения клетки по клеточному циклу и пролиферации. Кроме того, p53 является короткоживущим белком, и его период полужизни составляет от 6 до 30 минут (Esrig et al., 1993). Регуляция количества p53 в клетке осуществляется главным образом с помощью протеасомной деградации, которой предшествует полиубиквитинирование. На сегодняшний день известно около 20 убиквитинлигаз, модифицирующих p53, например, Mdm2, COP1, ARF-BP1, синовиолин, E4F1 и в том числе Pirh2 (Дакс с соавт., 2013). На сегодняшний день принято считать, что основным негативным регулятором p53 в клетке является Mdm2 (Lee and Gu, 2010).

Как и в случае с Mdm2, ген, кодирующий Pirh2, является транскрипционной мишенью p53, и таким образом формируется обратная регуляторная связь (Leng et al., 2003; Marine and Lozano, 2010). Стоит отметить, что Mdm2 в основном осуществляет моноубиквитинирование p53, после чего E4 лигазы, например p300/CBP, полиубиквитинируют p53 с его последующей протеасомной деградацией (Grossman et al., 2003). Pirh2, в свою очередь, способен полиубиквитинировать p53 напрямую, без промежуточных этапов (Corcoran et al., 2004).

Было показано, что при ответе на генотоксический стресс белки p53 и

Mdm2 диссоциируют от p53, приводя к его стабилизации (Shieh et al., 1997). В результате повреждения ДНК, p53 подвергается активирующему фосфорилированию киназой АТМ по сайту Ser15 (Canman et al., 1998), и данная модификация предотвращает связывание Mdm2 и p53 (Shieh et al., 1997). Фосфорилирование p53 по Ser15 является необходимой модификацией для осуществления трансактивационной функции p53 и запуска апоптоза (Sluss et al., 2004). Таким образом, Mdm2 по-видимому является основным регулятором уровня p53 в клетке в условиях отсутствия стресса (Maya et al., 2001; O'Leary et al., 2004). При этом Pirh2 способен убиквитинировать активированную форму p53 – p53(Ser15) - и направлять ее на протеасомную деградацию (Tai, 2010).

Действительно, мыши, нокаутные по гену *RCHY1*, кодирующему Pirh2, жизнеспособны и нормально развиваются, в отличие от летального нокаута Mdm2 (de Oca Luna et al., 1995; Nakem et al., 2011). Уровень p53 в клетках Pirh2^{-/-} мышей не является повышенным. Однако, после обработки ионизирующим излучением, в клетках различных тканей Pirh2^{-/-} мышей наблюдалось значительное увеличение количества p53(Ser15), а также уровня экспрессии его генов-мишеней (таких как p21) и уровня апоптоза по сравнению с клетками мышей дикого типа. Кроме того, Pirh2^{-/-} клетки являются более чувствительными к ионизирующему излучению, благодаря повышенной активности p53 (Nakem et al., 2011). Эти данные свидетельствуют о ключевой роли Pirh2 в регуляции p53 в условиях генотоксического стресса.

К семейству белков p53 относятся три транскрипционных фактора: непосредственно p53, а также его структурные гомологи p63 и p73. Все три данных белка имеют в составе такие общие домены как ДНК-связывающий домен DBD, олигомеризационный домен OD и трансактивационный домен TA (рис. 6).

Для всех белков семейства p53 характерно наличие множества изоформ. Так, транскрипция p63 и p73 может осуществляться с двух альтернативных промоторов P1 и P2 (рис. 6, а). Изоформы, транскрипция которых начинается с промотора P1, имеют в составе аминоконцевой трансактивационный домен TA, который имеет высокую гомологию с TA-доменом белка p53. Данные изоформы обозначают TAp63 и TAp73 (рис. 6,б). В свою очередь,

транскрипции с промотора P2 образуются изоформы $\Delta Np63$ и $\Delta Np73$ с отсутствующим ТА-доменом (Murray-Zmijewski et al., 2006) (рис. 6,б).

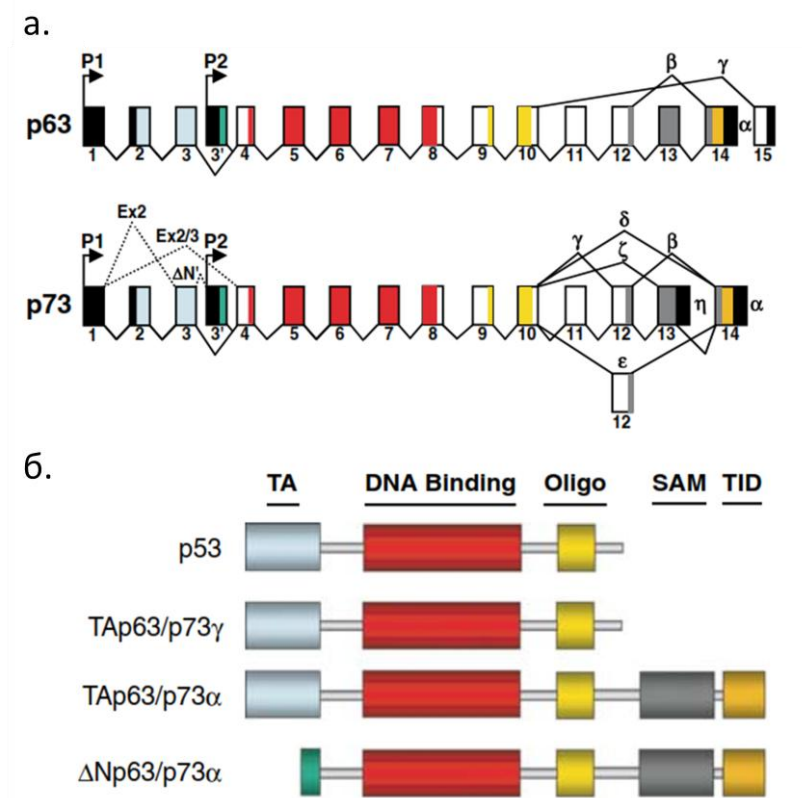


Рисунок 6. Структура генов и белков семейства p53.

(а.) Интрон-экзонная структура генов, кодирующих p63 и p73. Цифрами обозначены экзоны. (б.) Домены белков p53, p63 и p73 характерные для разных изоформ. TA – транскрипционный домен, DNA binding – ДНК-связывающий домен, Oligo – олигомеризационный домен, SAM – стерильный альфа-мотив (sterile alpha motif), TID – ингибиторный домен (transactivational inhibitory domain) (Deyoung and Ellisen, 2007).

Кроме того, в результате альтернативного сплайсинга образуется большое количество С-концевых изоформ белков: p63 α , p63 β , p63 γ , p73 α – η , сочетающихся с каждым из вариантов N-концевых участков (Deyoung and Ellisen, 2007). Разнообразие изоформ p73 также обеспечивается альтернативным сплайсингом в 5'-концевом участке, кодирующем домен ТА, при транскрипции с промотора P1 (рис. 6, а).

Как и p53, белки p63 и p73 являются онкосупрессорными

транскрипционными факторами, активирующими проапоптотические белки и регуляторы клеточного цикла в ответ на генотоксический стресс (McKeon and Melino, 2007). Благодаря гомологии трансактивационных доменов белков семейства p53, p63 и p73 способны связываться с участками промотерных областей генов-мишеней p53 (p53RE, p53 response elements) и активировать экспрессию данных генов. Кроме того, показано, что белки p63 и p73 играют важную роль в эмбриональном развитии (McKeon and Melino, 2007). Так, p63 участвует в формировании конечностей и всех органов, образующих многослойный эпителий, таких как кожа, молочные железы и слюнные железы (Mills et al., 1999). P73 в свою очередь является ключевым регулятором развития нейрональных тканей. Для мышей нокаутных по гену, кодирующему p73, характерны недоразвитие гиппокампа и отсутствие некоторых типов нейронов центральной и периферической нервной системы (Yang et al., 2000). Интересным является тот факт, что в основном, за функции в эмбриогенезе отвечают ΔN -изоформы белков p63 и p73 (Yang and McKeon, 2000).

На сегодняшний день известно, что белок p63 является мишенью Pirh2-зависимого убиквитинирования. При этом Pirh2 способен модифицировать остатками убиквитина как полноразмерный белок p63, так и его изоформу $\Delta Np63$, и направлять их на протеасомную деградацию (Jung et al., 2013). Изоформа $\Delta Np63$ способствует пролиферации недифференцированных кератиноцитов, а их дифференцировке предшествует снижение пролиферативной активности (Jung et al., 2013). Группой исследователей Jung с соавт. было показано, что эктопическая—экспрессия Pirh2 в клетках линии кератиноцитов человека HaCaT способствует их дифференцировке за счет негативной регуляции $\Delta Np63$ (Jung et al., 2013). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что Pirh2 играет важную роль в регуляции пролиферации при дифференцировке клеток.

Позже было показано, что Pirh2 также способен убиквитинировать белок p73, приводя к его протеасомной деградацией (Jung et al., 2011b; Wu et al., 2011). При этом убиквитинлигазная активность Pirh2 в отношении p73 снижалась в результате генотоксического стресса. Подавление активности Pirh2 приводило к повышению уровня p73-индуцированного апоптоза в клетках,

обработанных ДНК-повреждающим агентом доксорубицином, и данный эффект наблюдался в отсутствие белка p53 (Jung et al., 2011b; Wu et al., 2011).

Таким образом, Pirh2 участвует в таких клеточных процессах, как регуляция клеточного цикла, запуск апоптоза, дифференцировка и ответ на повреждения ДНК, не только за счет взаимодействия с p53, но также с его структурными гомологами – p63 и p73.

1.3.2 Ингибитор циклин-зависимой киназы 1В – p27^{kip1}

Онкосупрессор p27^{kip1} представляет собой ингибитор циклин-зависимой киназы, регулирующий переход клетки из G0/G1 в S фазу клеточного цикла (Chu et al., 2008). Уровень p27^{kip1} в пролиферирующей клетке является максимальным на стадиях G0 и G1 и резко снижается перед переходом в S-фазу (Lu and Hunter, 2010). Регуляция уровня p27^{kip1} осуществляется как на уровне транскрипции, так и на посттрансляционном уровне за счет фосфорилирования и убиквитинирования (Chu et al., 2008; Lu and Hunter, 2010). Кроме того p27^{kip1} стабилизируется при ответе на генотоксический стресс, способствуя остановке клеточного цикла, что обеспечивает возможность осуществить репарацию поврежденной ДНК (Cuadrado et al., 2009).

Первой обнаруженной убиквитинлигазой, осуществляющей негативную регуляцию p27^{kip1}, является E3-лигаза Skp2 (Carrano et al., 1999). Однако эксперименты показали, что в клетках нокаутных по Skp2 белок p27^{kip1} также направляется на деградацию, и, соответственно, было выдвинуто предположение, что существуют и другие p27^{kip1}-специфические убиквитинлигазы. Одной из таких убиквитинлигаз оказался белок Pirh2 (Halaby et al., 2013). Группой Hattori с соавт. было показано, что Pirh2 осуществляет полиубиквитинирование p27^{kip1} с последующей деградацией последнего (Hattori et al., 2007). При этом при нокдауне Pirh2 клетки, находившиеся в условиях недостаточного количества сыворотки, не могут преодолеть блок в G0 фазе даже после добавления сыворотки в среду (Hattori et al., 2007). Соответственно, Pirh2 участвует в регуляции пролиферативной активности клеток.

1.3.3 Транскрипционный фактор с-Мус

Несмотря на то, что в клетках мышей, нокаутных по гену *RCHY1*, обнаруживается повышенный уровень онкосупрессорного белка p53 в условиях генотоксического стресса, было также показано, что у около 25% *Pirh2*^{-/-} мышей наблюдается спонтанное образование твердых (солидных) опухолей (Hakem et al., 2011). Данное наблюдение объяснялось авторами исследования тем, что в клетках различных тканей *Pirh2*^{-/-} мышей был выявлен повышенный уровень экспрессии онкогена с-Мус. Кроме того, было показано, что *Pirh2* способен полиубиквитинировать с-Мус и направлять его на деградацию.

Интересно, что повышенная экспрессия с-Мус у *Pirh2*^{-/-} мышей приводила к повышенной пролиферации Т- и В-лимфоцитов и спленомегалии, вызванной накоплением в селезенке плазматических клеток. При этом, в ходе данного исследования было показано, что в активированных *Pirh2*^{-/-} Т- и В-лимфоцитах наблюдается повышенный уровень апоптоза, вызванный, как полагают авторы, аккумуляцией проапоптотических белков p19/ARF и p53 (Hakem et al., 2011).

Таким образом, E3-лигаза *Pirh2* способна убиквитинировать и направлять на деградацию не только онкосупрессорные, но и онкогенные белки, что свидетельствует о его неоднозначной роли в развитии опухолевых заболеваний.

1.3.4 ДНК-полимераза (Pol η)

ДНК-полимераза η (Pol η) участвует в репарации пиримидиновых димеров, 4-6-фотопродуктов (McCulloch et al., 2004; Guo et al., 2009), образующихся в результате ультрафиолетового облучения, а также в репарации двуцепочечных разрывов ДНК с помощью гомологичной рекомбинации (Kawamoto et al., 2005; McIlwraith et al., 2005). Мутации в гене, кодирующем Pol η , у человека являются причиной пигментной ксеродермы – заболевания, характеризующегося повышенной фоточувствительностью и повышенным риском развития рака кожи. На клеточном уровне нарушения функции Pol η

вызывают повышение частоты образования мутаций при облучении ультрафиолетом и задержку репликации (Cruet-Hennequart et al., 2010).

Jung с соавт. показали, что Pirh2 моноубиквитинирует полимеразу η (Jung et al., 2010). При этом моноубиквитинирование Pol η препятствует ее взаимодействию с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA, proliferating cell nuclear antigen) – ключевым фактором, осуществляющим активацию процесса пострепликативной репарации. Pirh2-опосредованное нарушение взаимодействия Pol η с PCNA приводит к тому, что полимераза η не может выполнять функцию заполнения пропусков напротив пиримидиновых димеров, что повышает чувствительность клеток к ультрафиолетовому облучению (Jung et al., 2011a).

1.3.5 Серин/треониновая протеинкиназа Chk2

Протеинкиназа Chk2 является серин/треониновой протеинкиназой, отвечающей за регуляцию контрольных точек клеточного цикла. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что Chk2 является онкосупрессорным белком, нарушение функций которого ассоциировано с различными типами раковых заболеваний (Iacobucci et al., 2013; Wang et al., 2013; Ta et al., 2015).

В ответ на образование двуцепочечных разрывов ДНК киназа ATM фосфорилирует и таким образом активирует Chk2 (Matsuoka et al., 1998). Активированная киназа Chk2 в свою очередь фосфорилирует различные белки-субстраты, принимающие участие в остановке клеточного цикла, репарации ДНК и запуске запрограммированной клеточной гибели, например, p53, E2F1, PML и BRCA1 (Hirao et al., 2000; Yang et al., 2002; Stevens et al., 2003; Zhang et al., 2004). Кроме того, при ответе на повреждение ДНК Chk2 регулирует контрольные точки клеточного цикла на стадиях G1-S, S и G2-M (Falck et al., 2001; Falck et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2002).

Было показано, что уровень Chk2 в клетках Pirh2^{-/-} мышей повышен как в нормальных условиях, так и в условиях генотоксического стресса (Bohgaki et al., 2013). В ходе дальнейших исследований подтвердилось, что Pirh2 является

убиквитинлигазой, модифицирующей Chk2, и направляет данный белок на протеасомную деградацию. При этом активирующее фосфорилирование по сайту Ser456 (у мышей по сайту Ser460) предотвращает убиквитинирование протеинкиназы Chk2 (Bohgaki et al., 2013). Также был обнаружен дополнительный механизм стабилизации Chk2 при ответе на генотоксический стресс: было показано, что деубиквитиназа USP28, являющаяся транскрипционной мишенью киназы ATM, осуществляет удаление остатков убиквитина с Chk2 при повреждении ДНК (Zhang et al., 2006).

1.3.6 Деацетилаза гистонов HDAC1

Андрогеновый рецептор (AR) представляет собой белок семейства гормон-зависимых ядерных рецепторов с альтернативным названием NR3C4. Белок AR является ключевым медиатором сигнальных путей, запускаемых стероидными половыми гормонами андрогеновой группы: тестостероном, дигидротестостероном, андростероном, андростендионом и андростендиолом, и отвечает за формирование мужского фенотипа в ходе эмбриогенеза, половое созревание, а также за функционирование мужской репродуктивной системы. Кроме того, AR является основным фактором, участвующим в развитии и прогрессии гормон-зависимого и гормон-независимого рака предстательной железы (Lonergan and Tindall, 2011).

Основной функцией AR в клетке является регуляция транскрипции генов, имеющих в промотерной области последовательность ARE (androgen response element), с которой связывается AR после активации в результате взаимодействия с лигандом. Одна из наиболее известных и изученных транскрипционных мишеней AR - простатспецифический антиген (PSA), повышенная экспрессия которого является важным диагностическим и прогностическим маркером при раке предстательной железы (Gao et al., 1997). Также AR регулирует транскрипцию множества других генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, пролиферации, в том числе TGF- β 1, VEGF, CDK 2 и 4, p21 и EGFR (Culig et al., 2000).

Функциональная активность AR как транскрипционного фактора

регулируется множеством кофакторов, как активаторов, так и репрессоров, образующих вместе с AR белковые регуляторные комплексы на промотерных участках генов-мишеней. Так, ко-активаторами AR являются такие белки как p300/CBP и Tip60, а в качестве репрессоров помимо прочих выступают гистондеацетилазы HDAC (Chmelar et al., 2007). Было показано, что гистондеацетилаза HDAC1 и гистонацетилаза Tip60 регулируют активность андрогенового рецептора за счет изменения статуса его ацетилирования и осуществляют свои противоположные функции в составе данного белкового комплекса (Gaughan et al., 2002).

Как упоминалось ранее, Pirh2 был впервые описан, как белок, взаимодействующий с андрогеновым рецептором (ARNIP) (Beitel et al., 2002). Спустя 4 года после первого описания другой группой исследователей было показано, что Pirh2 рекрутируется к ARE-последовательности PSA, образует комплекс с AR и усиливает действие AR как транскрипционного фактора (Logan et al., 2006). Кроме того, Logan с соавт. обнаружили, что Pirh2 убиквитинирует и направляет на протеасомную деградацию один из главных негативных регуляторов активности AR – гистондеацетилазу HDAC1 (Logan et al., 2006). Таким образом, Pirh2 усиливает функцию AR двумя различными путями – активируя его действие в промотерных областях и подавляя активность его негативного регулятора.

Вместе эти данные позволяют рассматривать Pirh2 не только в качестве одного из ключевых активаторов AR-ассоциированных клеточных процессов, но также как регулятора экспрессии генов за счет его способности ингибировать функцию гистондеацетилазы HDAC1.

1.4 УЧАСТИЕ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2 В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Как было описано в главе 1.3, Pirh2 регулирует активность ключевых участников таких процессов, как продвижение клетки по клеточному циклу, пролиферация, опухолевая трансформация и апоптоз, а именно белков семейства p53, ингибитора циклин-зависимой киназы p27^{kip1}, киназы Chk2,

андрогенового рецептора и других. Кроме того, активируя убиквитин-зависимую деградацию p53, Pirh2 опосредованно подавляет экспрессию таких транскрипционных мишеней, участвующих в запуске апоптоза и остановке клеточного цикла как Puma, Bax, p21^{Waf1} и др. (Lee et al., 2012).

На сегодняшний день имеется ряд сообщений о повышенной экспрессии Pirh2 в клетках различных типов раковых опухолей. Так, например, Duan с соавт. осуществили анализ экспрессии Pirh2 в клинических образцах злокачественных новообразований легкого человека по сравнению с экспрессией в нормальных тканях легкого. В результате было показано, что экспрессия Pirh2 повышена в 84% (27 из 32) клинических образцов. Эти данные также подтвердились при анализе образцов опухолей легкого мышей (Duan et al., 2004). Кроме того в ходе данного исследования было показано, что повышенная экспрессия Pirh2 в опухолевых клетках ассоциирована с подавлением активности онкосупрессора p53 (Duan et al., 2004).

Logan с соавт. показали, что Pirh2 повышает активность андрогенового рецептора как за счет усиления его функции при связывании с промотерными областями, так и путем негативной регуляции репрессора AR – гистондеацетилазы HDAC1 (Logan et al., 2006). Данной группой была исследована роль Pirh2 в образовании рака предстательной железы. Так, повышенная экспрессия Pirh2 была выявлена в 89% образцов биопсии опухолей рака предстательной железы человека. Кроме того, была обнаружена устойчивая корреляция повышенного уровня Pirh2 и агрессивности опухолей, определенной по шкале Глисона и наличию метастазов (Logan et al., 2006).

Сверхэкспрессия Pirh2 при гепатоклеточной карциноме (hepatocellular carcinoma, HCC) ассоциирована с венозной инвазией, стадией TNM и количеством опухолевых узлов (Wang et al., 2009). В результате данного исследования было показано, что у пациентов с HCC с повышенной экспрессией Pirh2, наблюдалась худшая выживаемость после оперативного лечения, по сравнению с пациентами с нормальной или пониженной экспрессией Pirh2. Позже другая группа исследователей подтвердила эти данные на клинических образцах, полученных от пациентов с HCC, и культурах клеток. Huang с соавт. также показали обратную корреляцию

уровней Pirh2 и онкосупрессорного белка p27^{kip1} в клетках HCC (Huang et al., 2011).

Обратное соотношение количеств Pirh2 и p27^{kip1} также было показано для плоскоклеточного рака головы и шеи человека (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) (Shimada et al., 2009). Shimada с соавт. продемонстрировали, что повышение экспрессии Pirh2 характерно для 60% случаев HNSCC, в то время как в нормальных тканях повышения Pirh2 не наблюдалось. При этом 80% образцов с повышенным уровнем Pirh2 характеризовалось снижением уровня p27^{kip1} (Shimada et al., 2009).

По данным Yang с соавт. повышенным уровнем Pirh2 характеризуется 63% случаев рака молочной железы (PMЖ) человека (Yang et al., 2016). При этом экспрессия Pirh2 не зависела от PR- (progesterone receptor) и HER2-статуса исследованных опухолей, но находилась в прямой корреляции с размером опухоли, экспрессией ki-67 и ER- (estrogen receptor) статусом образцов PMЖ (Yang et al., 2016). Кроме того было показано, что повышенный уровень Pirh2 ассоциирован с неблагоприятным прогнозом исхода заболевания (Yang et al., 2016).

Описанные выше примеры свидетельствуют об онкогенной роли белка Pirh2, и позволяют рассматривать его в качестве потенциальной мишени при разработке противоопухолевой терапии. Однако имеются данные, свидетельствующие о противоположной роли Pirh2.

Так, Nakem с соавт. проанализировали многочисленные данные по корреляции экспрессии различных генов в образцах опухолей с выживаемостью пациентов и выяснили, что сниженный уровень экспрессии Pirh2 ассоциирован со сниженной выживаемостью пациентов с PMЖ, раком яичников и плоскоклеточным раком легкого (Nakem et al., 2011). Также было показано, что Pirh2 способен убиквитинировать и направлять на деградацию один из главных онкогенных белков клетки – c-Мус, а мыши, нокаутные по Pirh2, демонстрировали повышенный уровень c-Мус, усиление пролиферации Т- и В-лимфоцитов и спленомегалию (Nakem et al., 2011).

Соответственно, роль Pirh2 в канцерогенезе является амбивалентной и, по-видимому, зависит от клеточного контекста. Исследование участия Pirh2 в

таких клеточных процессах как ответ на повреждение ДНК, пролиферация, апоптоз и опухолевая трансформация представляется актуальным как с точки зрения приобретения фундаментальных знаний, так и для более глубокого понимания механизмов опухолеобразования в контексте поиска новых стратегий борьбы с раковыми заболеваниями.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

2.1.1 Клеточные линии, использованные в работе

В работе были использованы следующие клеточные линии, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт Цитологии РАН): клетки немелкоклеточной карциномы легкого человека H1299 и клетки эмбриональной почки человека HEK293T.

В ходе работы на основе линии H1299 были получены изогенные стабильные клеточные линии, полученные путем трансдукции лентивирусными частицами, несущими векторы LeGO и pLKO, кодирующие кДНК Pirh2 и малые шпилечные РНК, специфические для мРНК Pirh2 (shRNA Pirh2) соответственно. В качестве контролей использовались линии H1299, трансдуцированные лентивирусными частицами, несущими исходный вектор LeGO и вектор pLKO shRNA scrambled, кодирующий неспецифические shRNA.

Также в работе использовались изогенные клеточные линии рака прямой кишки человека HCT116 и HCT116 с нокаутом по гену p53 (HCT116 p53^{-/-}), полученные ранее сотрудниками нашей лаборатории и любезно предоставленные Н.А. Барлевым. Изогенные клеточные линии остеосаркомы человека Saos2 с тетрациклин-зависимой индуцибельной экспрессией (tet-on система) двух изоформ белка p63 с НА-эпитопом Saos2 TAp63 и Saos2 ΔNp63 были любезно предоставлены проф. Gerry Melino, Университет г. Лейстер, Великобритания.

2.1.2 Условия культивирования

Клетки культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Адгезионные клеточные линии HEK293T, HCT116 и HCT116 p53^{-/-} культивировали в среде DMEM (Lonza, США), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Gibco, США), 2мМ L-глутамином

(Биолот, Россия) и смесью антибиотиков пенициллин (100 МЕ/мл)/стрептомицин (100 мкг/мл) (Биолот, Россия). Адгезионные клеточные линии H1299 и ее производные, а также Saos2 TAp63 и Saos2 ΔNp63 культивировали в среде RPMI 1640 (Lonza, США) в аналогичных условиях.

2.1.3 Обработка клеток химическими агентами

Для индукции экспрессии TAp63 и ΔNp63 в клетках Saos2 использовали доксициклин (Белмедпрепараты, Россия) в концентрации 4 мкг/мл. Обработку осуществляли 9, 16 и 24 часа.

Для стабилизации белка p53 в клетках HCT166 в среду для культивирования добавляли доксорубин (Sigma Aldrich, США) до конечной концентрации 0,5 мкМ. Обработку осуществляли в течение 9 часов.

Для инактивации протеасомной деградации белков клетки обрабатывали ингибитором протеасом MG132 (Sigma Aldrich, США) в конечной концентрации 1 мкМ в течение 16 часов.

Для определения периода полужизни белков клетки обрабатывали ингибитором элонгации трансляции циклогексимидом (Sigma Aldrich, США) в конечной концентрации 50 мкМ в течение 4, 8 и 16 часов.

Для определения чувствительности клеток к ДНК-повреждающим агентам использовали доксорубин (Sigma Aldrich, США) в концентрациях 0,5 и 1 мкМ и цисплатин (Тева, Израиль) в концентрациях 60 и 100 мкг/мл.

Для селекции клеток, трансдуцированных вектором pLKO использовали пурамицин в концентрации 2 мкг/мл. Селекцию проводили в течение одной недели.

2.1.4 Транфекция клеток

Транфекцию клеток линии HEK293T осуществляли реагентом TurboFect (ThermoScientific, USA), согласно инструкции производителя. За сутки до трансфекции клетки рассаживали с таким расчетом, чтобы к моменту трансфекции плотность составляла 50-60%. Трансфецирующая смесь

составляла 10% от общего объема среды и включала бессывороточную среду, плазмидную ДНК, воду и трансфецирующий агент. Для трансфекции клеток, посаженных на 100 мм культуральную чашку Петри: общий объем среды – 9 мл, объем трансфецирующей смеси – 900 мкл. В данном случае трансфецирующая смесь включала 10-12 мкг плазмидной ДНК, растворенной в воде, бессывороточную среду и 15 мкл TurboFect.

Трансфецирующую смесь инкубировали 15 минут при комнатной температуре, каждые 5 минут перемешивая на вортексе. После инкубации трансфецирующую смесь по каплям добавляли к клеткам. Эффективность трансфекции анализировали через 24-48 часов.

Трансфекцию клеток линии H1299 осуществляли реагентом XtremeGENE HP (Roche, Швейцария), согласно инструкции производителя с модификациями. За сутки до трансфекции клетки рассаживали с таким расчетом, чтобы к моменту трансфекции плотность составляла 50-60%. Перед трансфекцией питательную среду меняли на среду OptiMEM (Gibco, США). Трансфецирующая смесь составляла 10% от общего объема среды и включала среду OptiMEM, плазмидную ДНК, воду и трансфецирующий агент. Для трансфекции клеток, посаженных на 12-луночный культуральный планшет: общий объем среды в лунке – 1 мл, объем трансфецирующей смеси – 100 мкл. В данном случае трансфецирующая смесь включала 2 мкг плазмидной ДНК, растворенной в воде, среду OptiMEM и 2 мкл X-tremeGENE. Эффективность трансфекции анализировали через 24-48 часов.

2.1.5 Получение стабильных клеточных линий

Для создания вируса использовали пакующую систему второго поколения, состоящую из psPAX2 и pMD2.G (предоставленную D.Trono, École polytechnique fédérale de Lausanne, Швейцария). pMD2.G кодирует VSV-G белок вируса везикулярного стоматита, нахождение которого в составе вирусной оболочки обеспечивает высокую эффективность заражения различных типов клеток. Производство лентивирусных частиц осуществляли в клетках линии HEK293T. За день до трансфекции клетки рассеивали в

концентрации $2,5-3,0 \cdot 10^6$ клеток на 100 мм чашку в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2мМ глутамина и 20мкг/мл гентамицина. На следующий день за час до трансфекции среду меняли на 9мл свежей с добавлением 25мкМ хлорохина. Трансфекцию проводили кальций-фосфатным методом; смесь плазмид (из расчета 15мкг вектора с трансгеном, 9,35мкг psPAX2 и 5,32мкг pMD2.G на одну чашку) ресуспендировали в Tris-EDTA буфере, содержащем CaCl_2 , и добавляли к 2X HEPES буферу. Через 10-15 минут смесь с образовавшимися комплексами ДНК и фосфатов кальция добавляли к клеткам. Через 16 часов клеткам меняли среду, после чего каждые 24 часа с чашек собирали супернатанты, содержащие вирусные частицы. Концентрирование вирусных частиц осуществляли ультрацентрифугированием на сахарозной подложке в течение 2 часов при 72.000g. Полученный осадок вирусных частиц ресуспендировали в DMEM и хранили при температуре -80°C . Измерение количества трансдукционных единиц осуществлялось по серийному разведению растворов с лентивирусами и последующему заражению известного количества клеток HEK293T. В случае использования вектора LeGO iG2 через 72 часа методом проточной цитометрии, измерялось количество клеток, экспрессирующих eGFP. В случае использования вектора pLKO клетки подвергали пурамициновой селекции. Все эксперименты по трансдукции проводились в условиях $\text{MZ}=10$ (множественности заражения). Для увеличения эффективности трансдукции в среду, содержащую вирус добавляли полибрен (гексадиметрина бромид) до 8мкг/мл.

2.2 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ

Конструкция pcDNA3, содержащая кДНК полноразмерной формы Pirh2 (GeneBank ID NM_015436.3) была любезно предоставлена проф. S. Benchimol (Торонто, Канада). С использованием данной конструкции в качестве матрицы методом ПРЦ были получены генетические конструкции на основе векторов pGEX-5X-1 и pIRES-hrGFP-1a, кодирующие Pirh2-GST (в случае pGEX-5X-1) и

Pirh2-3×FLAG (в случае PIRE5-hrGFP-1a).

Праймеры, использованные для амплификации с последующим клонированием:

Pirh GST F(BamHI) 5'-ATAGGATCCCGATGGCGGCGACGGCCCGGGAA - 3'

Pirh GST R(EcoRI) 5'- TATGAATTCTCATTGCTGATCCAGTGAAAG - 3'

Pirh2 Pires F(EcoRI) 5'- TATGAATTCTTATGGCGGCGACGGCCCGGGAA - 3'

Pirh2 Pires R(XhoI) – 5'- TATCTCGAGTTGCTGATCCAGTGAAATTCTAC - 3'

Включение в праймеры последовательностей, распознающихся эндонуклеазами рестрикции, обеспечило возможность получения указанных генетических конструкций.

Также методом «вырезания» из pIRE5-hrGFP-1a и «вставки» в LeGO-iG2 по рестрикционным сайтам EcoRI и PmlI был получен лентивирусный вектор Pirh2- LeGO-iG2.

Вектор pLKO.1-TRC использовался для получения лентивирусных конструкций, кодирующих малые шпилечные РНК (shRNA), специфичные к Pirh2. Последовательности олигонуклеотидов, кодирующих shRNA, специфических к Pirh2:

Pirh2 shF

5'-CCGGAATGTAAC TTATGCCTAGCTACTCGAGTAGCTAGGCATAAGTTACATTTTTTTG-3'

Pirh2 shR

5'-AATTCAAAAAAATGTAAC TTATGCCTAGCTACTCGAGTAGCTAGGCATAAGTTACATT-3'

В качестве контроля использовались неспецифические scrambled shRNA:

Scr F

5'-CCGGCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTTG-3'

Scr R

5'-AATTCAAAAACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG-3'

Данные олигонуклеотиды включают сайты распознавания эндонуклеазами рестрикции AgeI и EcoRI, по которым осуществлялось клонирование.

Конструкция pGEX-H2A.Z была любезно предоставлена проф. О. Binda (университет г. Ньюкасл, Великобритания).

Конструкция pGEX-Elavl1 была любезно предоставлена О.А. Федоровой

(ИНЦ РАН). С использованием данной конструкции в качестве матрицы методом ПРЦ был получен экспрессионный вектор pIRES-hrGFP-1a-Elavl1, кодирующий рекомбинантный белок Elavl1-3×FLAG.

Праймеры, использованные для амплификации с последующим клонированием:

Elavl1 pIRES F 5' – TATGAATTCCACCATGTCTAATGGTTATGAAGACC – 3'

Elavl1 pIRES R 5' – TATCTCGAGTTTGTGGGACTTGTTGGTTTTGAAG – 3'

Клонирование проводилось по сайтам EcoRI и XhoI, включенным в последовательности указанных праймеров.

Конструкция pGEX-ku70 была любезно предоставлена Н.А. Барлевым (ИНЦ РАН).

2.3 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК, ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Экстракцию РНК осуществляли с помощью TRI реагента (Sigma Aldrich, США) согласно инструкции производителя с модификациями. Клетки промывали PBS и добавляли к ним TRI реагент из расчета 1 мл на 10⁷ клеток. После этого к 1 мл TRI реагента добавляли 200 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали с помощью вортекса и инкубировали на льду 5 минут. Затем осуществляли центрифугирование при 13.000g при температуре +4°C, отбирали верхнюю прозрачную фазу и добавляли к ней 500 мкл изопропилового спирта, аккуратно перемешивали и инкубировали на льду в течение 10 минут, после чего осуществляли центрифугирование при 13.000g при температуре +4°C. Супернатант отбирали, а осадок РНК дважды промывали 75% этиловым спиртом, высушивали на комнатной температуре и растворяли в деионизированной воде.

Для удаления остаточных количеств ДНК проводили обработку ДНКазой (ThermoFischerScientific, США) согласно инструкции производителя.

Синтез кДНК осуществляли с использованием набора реагентов RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischerScientific, США) согласно инструкции производителя с модификациями. На одну реакцию брали

2 мкг тотальной РНК. На первом этапе производили отжиг oligodT праймеров при температуре 65°C в течение 5 минут. После этого в реакцию смесь добавляли 1 mM dNTP, 20 ед. ингибитора РНКаз Ribolock, 100 ед. обратной транскриптазы в 1× реакционном буфере. Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 2 часов при температуре 42°C, после чего ферменты подвергались температурному инактивированию в течение 5 минут при 75°C. Полученную кДНК хранили при температуре -20°C и использовали в качестве матрицы для количественной ПРЦ в реальном времени (ПЦР в РВ).

ПРЦ в РВ проводили с использованием полученной с помощью обратной транскрипции кДНК, праймеров, специфических к исследуемым генам и коммерческой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), включающей реакционный буфер, Taq-полимеразу Hot Start, смесь dNTP, Mg^{2+} и интеркалирующий краситель SYBR Green I.

Амплификацию проводили по универсальной программе: предварительная денатурация и активация полимеразы 95°C 5 мин → (денатурация 95°C 20 сек → отжиг праймеров 60°C 20 сек → элонгация 72°C 20 сек → считывание флуоресцентного сигнала)×40 циклов. После проведения ПРЦ в РВ проводили плавление продукта с высоким разрешением (high resolution melting, HRM) для получения кривых плавления.

Нормализацию экспрессии проводили по методу $\Delta\Delta Ct$. В качестве референсного гена использовали GAPDH. Праймеры, использованные в работе приведены в таб. 1.

Таблица 1. Список праймеров для ПРЦ в РВ, использованных в работе.

Ген	Последовательность праймера 5'-3'
<i>RCHY1</i> (Pirh2)	Forward: TATGACCAGGTATTGGAGACAGC
	Reverse: CAGTGAAATTCTACGTCCTCCAG
<i>GAPDH</i>	Forward: GAGGTCAATGAAGGGGTCAT
	Reverse: AGTCAACGGATTTGGTCGTA
<i>VIM</i> (Виментин)	Forward: TGTCCAAATCGATGTGGATGTTTC
	Reverse: TTGTACCATTCTTCTGCCTCCTG

<i>CDH1</i> (Е-кадгерин)	Forward: CTTCTGCTGATCCTGTCTGATG
	Reverse: TGCTGTGAAGGGAGATGTATTG
<i>MYC</i> (с-Myc)	Forward: CTCCTCCTCGTCGCAGTAGA
	Reverse: GCTGCTTAGACGCTGGATTT
<i>RELA</i> (p65)	Forward: CGAATGGCTCGTCTGTAGTG
	Reverse: TGGTGGTATCTGTGCTCCTC

2.4 ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Рекомбинантные белки Pirh2-GST, Elavl1-GST, H2A.Z-GST, ku70-GST, а также нативный GST в качестве контроля, экспрессировались в клетках бактерий *E.coli* штамма BL21(de3)pLysSRosetta. Для этого клетки бактерий трансформировались генетическими конструкциями, кодирующими указанные рекомбинантные белки, стандартным методом теплового шока. Индукцию синтеза белка осуществляли при достижении оптической плотности бактериальной суспензии 0,4-0,5 при длине волны 535 нм с помощью добавления в питательную среду IPTG в концентрации 0,4 мМ. Синтез проводили в течение 3 часов, после чего бактериальную массу осаждали центрифугированием при 5000g. Осадок хранили при температуре -80°C.

Для выделения и очистки рекомбинантных белков бактериальный осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере PBS, содержащем 0,5% TritonX-100 и 1мМ PMSF на льду. Затем суспензию подвергали обработке ультразвуком по программе (30 сек. УЗ, амплитуда 60% - 1 мин. инкубация на льду)×5 р. для разрушения клеточных стенок бактерий. Затем суспензию центрифугировали при 15.000g при температуре +4°C и отбирали супернатант. К супернатанту добавляли глутатион-сефарозу (General Electric, США), предварительно промытую PBS, и инкубировали при температуре +4°C при постоянном перемешивании в течение 2 ч. После инкубации глутатион-сефарозу со связавшимися белками осаждали центрифугированием при 1000g при температуре +4°C, и осадок трижды промывали фосфатно-солевым буфером PBS, содержащим 0,5% TritonX-100 и 1мМ PMSF на льду. Глутатион-сефарозу

со связавшимися белками хранили в промывочном буфере не более 3 дней.

Нормализацию количества выделенных белков осуществляли с помощью электрофореза в ПААГ с последующей окраской геля Кумасси R-250 (Applichem, Германия) и денситометрией на основании сравнения с серийными разведениями известной концентрации BSA.

2.5 GST-ПУЛДАУН

Для проведения GST-пулдауна с целью определения белков-интерактантов Pirh2, а также для подтверждения выявленных взаимодействий методом реципрокного (обратного) GST-пулдауна, использовался ядерный экстракт клеток линии HEK293T. Для получения ядерной фракции клетки собирали, промывали PBS и ресуспендировали в буфере А, содержащем 10 mM HEPES-KOH pH 8.0, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM и 1× раствор ингибиторов протеаз (Roche, США), после чего инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем суспензию помещали в стеклянный шариковый гомогенизатор с зазором 0,06 мм и гомогенизировали суспензию на льду в течение 2 мин, после чего центрифугировали при 2000g в течение 13 мин при +4°C. Супернатант отбирали, а осадок, состоящий из ядер клеток, ресуспендировали в буфере С, содержащем 20 mM HEPES-KOH pH 8.0, 25% глицерин, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA и 1× раствор ингибиторов протеаз (Roche, США). Суспензию инкубировали на льду в течение 15 мин после чего центрифугировали при 15.000g в течение 15 мин при +4°C. Супернатант, представляющий собой растворимую ядерную фракцию отбирали и хранили при температуре -80°C.

Для проведения GST-пулдауна ядерный экстракт доводили буфером С без NaCl до концентрации NaCl 100 mM и осуществляли преинкубацию с нативным GST, иммобилизованным на глутатион-сефарозе с целью предотвращения неспецифического связывания в течение 2 часов при +4°C при постоянном перемешивании. После этого GST отбирали центрифугированием и к ядерному экстракту добавляли очищенные рекомбинантные белки на глутатион-сефарозе. В качестве контроля специфического связывания

использовали избыток GST и инкубировали его с тем же количеством ядерного экстракта. Связывание проводили в течение 3 часов при +4°C при постоянном перемешивании, после чего иммобилизованные на глутатион-сефарозе белки промывали 5 раз PBS на льду. Рекомбинантные белки, а также белки, связавшиеся с ними, элюировали нагреванием в денатурирующих условиях с буфером Laemmli и проводили электрофорез в ПААГ, после чего осуществляли вестерн-блот и детекцию связавшихся белков с помощью специфических антител. Для последующей масс-спектрометрии использовали градиентный (4 – 20%) ПААГ, который затем окрашивали Кумасси К-250, после чего белки в геле разделяли на 3 фракции в зависимости от молекулярной массы (меньше 25 кДа, 25-75 кДа и больше 75 кДа), для упрощения последующей процедуры идентификации исследуемых белков.

2.6 МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Фрагменты ПААГ с белками-интерактантами отмывали от Кумасси и осуществляли трипсинолиз в геле с использованием аппарата Multiprobe II Plus EX (Perkin Elmer, Великобритания). Перед масс-спектрометрией проводили жидкостную хроматографию на обращенно-фазовой колонке, содержащей матрикс Acclaim PepMap (Dionex, Великобритания), с последующим элюированием на обращенно-фазовой колонке Waters Symmetry C18 100E (Waters, Великобритания). Анализ полученных фракций проводился с помощью масс-спектрометра 4000 Q-Trap (Applied Biosystems, Великобритания). Спектр ионов, полученный в результате LC-MS/MS, обрабатывали, используя поисковую программу MASCOT49 и базы данных UniProtKB/Swiss-Prot⁵⁰. Рассматривались белки, для которых было обнаружено 3 и более пептидов с $p < 0.01$.

2.7 КО-ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ

Клетки НЕК293Т, трансфицированные генетической конструкцией Elavl1 pIRES-hr-1a, кодирующей белок Elavl1/HuR с 3×FLAG-эпитопом, а также

исходным вектором pIRES-hr-1a в качестве контроля, собирали и промывали PBS. После этого клетки ресуспендиорвали в гипотоническом буфере, содержащем 10 mM Tris (pH 7.4), 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM NaF, 0,25% Triton X-100 и 1× раствор ингибиторов протеаз (Roche, США), и инкубировали суспензию на льду в течение 15 минут. К суспензии добавляли буфер, содержащий 50 mM Tris (pH 7.5), 140-150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 и 1× раствор ингибиторов протеаз (Roche, США) в количестве, необходимом для доведения молярности NaCl до физиологического значения 100 mM, и инкубировали на льду в течение 15 минут. Затем леточную суспензию подвергали центрифугированию при 5000g в течение 1 часа при +4°C. К отобранному супернатанту добавляли анти-FLAG M2 агарозе (Sigma-Aldrich, США) промытую в буфере TBS, содержащем 50 mM Tris (pH 7.5) и 150 mM NaCl и инкубировали в течение 4 часов при +4°C при постоянном перемешивании. Затем анти-FLAG M2 агарозу со связавшимися белками промывали буфером TBS. Связавшиеся белки элюировали раствором FLAG-пептида (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 минут при +4°C при постоянном перемешивании, после чего анти-FLAG M2 агарозу осаждали центрифугированием при 5000g при +4°C. Супернатант, содержащий белковые комплексы Elavl-3×FLAG, хранили при температуре -80°C. Ко-иммунопреципитированные белки детектировали с помощью электрофореза в ПААГ и вестерн-блот анализа с окраской специфическими антителами.

2.8 УБИКВИТИНИРОВАНИЕ *IN VIVO*

Для проведения убиквитинирования *in vivo* белка Elavl1 осуществлялась трансфекция клеток линии HEK293T конструкциями, кодирующими белки Elavl1-3×FLAG (pIRES-hr-1a-Elavl1), убиквитин, с 6His-эпитопом - Ub-6His (pcDNA3-Ub-6His) и Pirh2 (pcDNA3-Pirh2). В качестве негативных контролей использованы клетки, трансфецированные Elavl1-3×FLAG (без Pirh2 и убиквитина), а также Elavl1-3×FLAG и Ub-6His (без Pirh2). Общее количество смеси плазмид для трансфекции 10 см культуральной чашки Петри составляло 12 мкг. Количество каждой из трех плазмид в трансфекционной смеси

составляло 4 мкг. При трансфекции одной или двумя плазмидами в случае контролей, общее количество плазмидной ДНК доводилось до 12 мкг пустой плазмидой pcDNA3.

Спустя 24 часа после трансфекции клетки обрабатывали реагентом MG132, блокирующим работу протеасом, для накопления убиквитинированного белка в течение 16 часов. Затем клетки собирали, промывали PBS и лизировали в буфере с pH 8.0, содержащем 8 М мочевины, 10 mM Tris и 100 mM NaH₂PO₄. Затем полученный лизат 4-5 раз пропускали через иглу медицинского шприца 2 мл для разрушения вязкой высокомолекулярной ДНК. Затем клеточный лизат центрифугировали при 15.000g при +4°C, собирали супернатант и добавляли к нему никелевую агарозу (Ni-NTA Agarose, Thermofisher Scientific, США) предварительно промытую лизирующим буфером. Инкубацию с Ni-NTA агарозой проводили в течение 2 ч при +4°C при постоянном перемешивании. Ni-NTA агарозу со связавшимися белками осаждали центрифугированием и промывали буфером с pH 6.3, содержащим 8 М мочевины, 10 mM Tris и 100 mM NaH₂PO₄, три раза. Элюцию связавшихся белков осуществляли в денатурирующих условиях, добавляя к осадку буфер Laemmli и нагревая до 95°C, после чего осуществляли ПААГ и вестерн-блоттинг. Результаты убиквитинирования *in vivo* анализировали, окрашивая мембрану антителами, специфическими к FLAG-эпиту для детекции убиквитинированного Elavl1-3×FLAG.

В убиквитинировании *in vivo* гистона H2A.Z осуществляли аналогичным способом, но с аффинной хроматографией убиквитинированного эндогенного белка. Результаты анализировали, окрашивая мембрану антителами, специфическими к гистону H2A.Z.

2.9 РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ПААГ И ВЕСТЕРН-БЛОТ

Электрофорез белков осуществляли в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Laemmli (Laemmli, 1970). Разделение белков для последующего масс-спектрометрического анализа осуществляли в градиентном геле (4 – 20%). Заливку градиентных гелей осуществляли с помощью

градиентатора PROTEAN II xi Multi-Gel Casting Chamber (BioRad, США). Для других целей использовался комбинированный ПААГ, состоящий из концентрирующего (4% смеси акриламид/бис 37,5:1; pH 6.8) и разделяющего (8 – 16 % смеси акриламид/бис 37,5:1; pH 8.8) гелей. Процент акриламид/бис в разделяющем геле выбирался в зависимости от молекулярной массы анализируемых белков.

Для дальнейшего анализа белков в геле осуществляли окраску геля раствором красителя Кумасси К-250, содержащим 10% уксусной кислоты и 40% этилового спирта и последующую отмывку в 8% растворе уксусной кислоты. Анализ проводили с помощью системы гель-документации ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (Bio-Rad, США).

Для вестерн-блот анализа гель инкубировали в трис-глициновом буфере TGB, содержащем 10% метанола для отмывки от SDS в течение 15 минут. После этого белки переносили на PVDF мембрану (Millipore, США) в буфере TGB, содержащем 10% метанола в течение 1 часа при напряжении 100 В и силе тока 250 А при +4°C с использованием установки Mini-PROTEAN (BioRad, США).

Для дальнейшей окраски антителами мембрану промывали в буфере PBS, содержащем 0,1% Tween-20 и блокировали в 5% растворе обезжиренного коровьего молока в PBS, содержащем 0,1% Tween-20 в течение часа.

Раствор первичных антител готовили с использованием 5% раствора обезжиренного коровьего молока в PBS, содержащего 0,1% Tween-20. Инкубацию мембраны с первичными антителами осуществляли от 1 до 16 часов. Отмывки проводили в буфере PBS, содержащем 0,1% Tween-20 три раза по 5 мин. После этого мембрану инкубировали в растворе соответствующих вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в течение часа. Отмывки проводили в буфере PBS, содержащем 0,1% Tween-20 три раза по 5 мин. Детекцию пероксидазной активности осуществляли с помощью набора реагентов Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, США) согласно инструкции производителя и системы гель-документации ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (Bio-Rad, США).

В работе использовались антитела к следующим белкам: Pirh2

(разведение 1:1000, EPR14980, Abcam, США); GAPDH (1:2000, ab9484, Abcam, США); β -актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США); NF- κ B p65 (1:1000, sc-8008, Santa Cruz, США); c-Myc (1:300, 9E10, Santa Cruz, США); Виментин (1:5000, RV202, BD Biosciences, США); Е-кадгерин (1:1000, 36/E, BD Biosciences, США), FLAG (1:5000, F3165, Sigma-Aldrich, США), ku70 (1:2000, A9, Santa Cruz, США), H2A.Z (1:1000, ab4174, Abcam), Elavl1/HuR (1:2000, 3A2, Santa Cruz, США). Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: к IgG мыши и IgG кролика (1:10,000; Sigma-Aldrich, США).

2.10 МОНИТОРИНГ ПРОЛИФЕРАЦИИ И МИГРАЦИИ КЛЕТОК В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Анализ пролиферации и миграции клеток в режиме реального времени осуществляли с помощью системы xCELLigence (ACEA Biosciences, США).

Для мониторинга пролиферации клетки помещали в планшет E-plate 16 (ACEA Biosciences, США) (2×10^4 клеток на лунку). После чего с помощью прибора xCELLigence регистрировали клеточный индекс, являющийся параметром, зависящим от изменения электрического сопротивления (импеданса) металлической подложки планшета. Клеточный индекс представляет собой числовое выражение количества клеток, прикрепленных к подложке, в определенный момент времени. Таким образом, регистрируя показатели прибора каждые 5-15 минут в течение 45 часов, получали кривые, отражающие скорость деления клеток в режиме реального времени.

Для мониторинга миграции клеток в реальном времени использовали планшет CIM-Plate® 16 (ACEA Biosciences, США), имеющий 2 камеры, которые разграничены мембраной с микропорами. В нижнюю камеру помещали полную питательную среду для культивирования, а в нижнюю – среду без сыворотки и исследуемые клетки (3×10^4 на лунку). Сопротивление, изменяющееся при прохождении клеток через поры, и регистрировали в реальном времени каждые 15 минут в течение 25 часов.

2.11 ТЕСТ НА ЗАРАСТАНИЕ ЦАРАПИНЫ

Для проведения теста клетки рассаживали на 12-луночный культуральный планшет таким образом, чтобы плотность клеток составляла около 80% общей площади. На следующий день в монослое клеток с помощью наконечника дозатора на 1 мл проводили прямые царапины. Фоторегистрация царапины осуществлялась на временных точках 0 ч, 24 ч и 48 ч после проведения царапин с помощью инвертированного светового микроскопа TS100 (Nikon, Япония) и цифровой фотокамеры PowerShot A1100 IS (Canon, Япония).

2.12 МТТ-ТЕСТ

Колориметрический тест для оценки цитотоксического действия доксорубицина и цисплатина на клетки с различным статусом Pirh2 проводили с использованием реагента МТТ. Для проведения теста клетки через 24 часа после трансфекции рассаживали на 96-луночный культуральный планшет с плоским дном (около 5×10^3 клеток на лунку), на следующий день клетки обрабатывали генотоксическими агентами доксорубицином и цисплатином в различных концентрациях. Через 24 часа после начала обработки в каждую лунку добавляли 20 мкл 5 мг/мл раствора МТТ в PBS и помещали в CO₂-инкубатор на 4 часа. После этого среду отбирали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл солюбилизатора (0,3% раствор HCl в изопропанол) и инкубировали при постоянном перемешивании до полного растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность измеряли при длинах волн 570 и 630 нм с помощью анализатора Fluorofot «Charity» (Россия). Жизнеспособность клеток рассчитывали как относительную величину, принимая за 100% значения оптической плотности раствора в лунках с контрольными клетками, не подвергавшимися обработке.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР P53 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2

3.1.1 P53 активирует экспрессию Pirh2 в клетках линии рака толстой кишки человека HCT116

В большинстве работ, посвященных исследованию активности и регуляции убиквитинлигазы Pirh2, данный белок рассматривается в контексте его взаимодействия с главным онкосупрессором человека - транскрипционным фактором p53. На сегодняшний день не вызывает сомнений то, что способность Pirh2 убиквитинировать p53 и направлять его на протеасомную деградацию проявляется в клетках различных типов тканей, т.е. является универсальной. Так, например, Pirh2-опосредованная деградация p53 была показана в клетках остеосаркомы человека Saos2 и мышинных эмбриональных фибробластах (MEF) (Leng et al., 2003), а также в клетках рака прямой кишки человека RKO (Jung et al., 2010), клетках рака легкого человека H1299 (Wang et al., 2011a), клетках рака поджелудочной железы человека (Yan et al., 2014) и др. При этом p53-индуцированная активация экспрессии Pirh2 была показана только на трех линиях мышинных клеток и всего на одной линии фибробластов человека BJT (Leng et al., 2003).

Для подтверждения способности p53 активировать экспрессию белка Pirh2 человека были использованы две изогенные клеточные линии рака толстой кишки человека, различающиеся по статусу p53: клеточная линия HCT116 p53^{+/+}, экспрессирующая белок p53 дикого типа и клеточная линия HCT116 p53^{-/-}, в которой был осуществлен нокаут гена, кодирующего p53. Для активации экспрессии p53 клетки подвергались обработке доксорубицином в концентрации 0,5 мкМ, после чего уровень белков p53 и Pirh2 оценивался с помощью вестерн-блот анализа (рис. 7).

Из рисунка 7 видно, что и более высокий начальный уровень Pirh2, и значительная активация его экспрессии в результате обработки

доксорубицином наблюдается в клетках НСТ116 p53^{+/+} по сравнению с клетками НСТ116, нокаутными по p53 (НСТ p53^{-/-}).

Таким образом, мы подтвердили данные о том, что p53 активирует экспрессию белка Pirh2 в клетках рака толстой кишки человека, а также убедились в эффективности и специфичности поликлональных антител против белка Pirh2 человека (EPR14980, Abcam, США) использованных в дальнейшей работе.

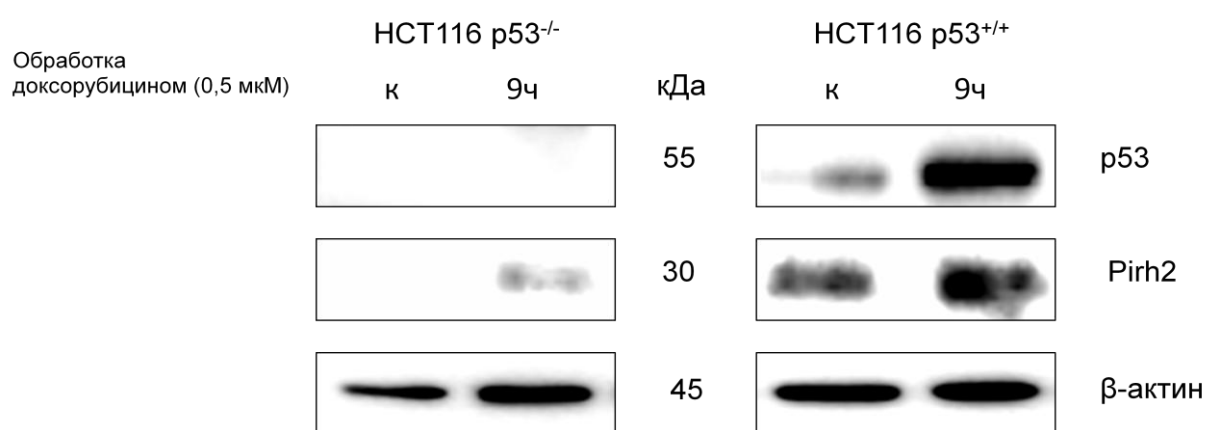


Рисунок 7. Экспрессия белка Pirh2 активируется при стабилизации транскрипционного фактора p53 в клетках НСТ116.

Вестерн-блот анализ экспрессии белков p53 и Pirh2 в клетках изогенных линий НСТ116 p53^{+/+} и НСТ116 p53^{-/-} до и после обработки 0,5 мкМ доксорубицином. К – отсутствие обработки. Контроль нагрузки – β-актин.

3.1.2 Транскрипционный фактор p53 активирует экспрессию Pirh2 на уровне белка

Как было упомянуто ранее, на сегодняшний день показано, что Pirh2 способен модифицировать остатками убиквитина и направлять на протеасомную деградацию все члены белкового семейства p53, включая p53, p63 и p73. При этом данных о том, является ли Pirh2 транскрипционной мишенью p63, ранее получено не было. Стоит отметить, что, несмотря на структурную гомологию и наличие общих транскрипционных мишеней с p53,

белки p63 и p73 также выполняют уникальные функции, например, активируя гены, ответственные за развитие и дифференцировку определенных типов тканей (Leviero et al., 2000). Кроме того, для белков семейства p53 характерно наличие транскрипционных изоформ, которые способны активировать экспрессию различных генов-мишеней (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Для того чтобы подтвердить наше предположение о том, что транскрипционный фактор p63 способен активировать экспрессию белка Pirh2 мы использовали изогенные линии остеосаркомы человека Saos2 с тетрациклин-зависимой индуцибельной экспрессией (tet-on) двух изоформ белка p63 с HA-эпитопом: линию Saos2 TAp63, экспрессирующую полноразмерную изоформу p63, и Saos2 Δ Np63, экспрессирующую альтернативную транскрипционную изоформу с отсутствующим трансактивационным доменом (рис. 8). Стоит отметить, что в клетках линии Saos2 отсутствует эндогенный белок p53, что делает данные клеточные линии удобной моделью для изучения p53-независимой активации экспрессии генов.

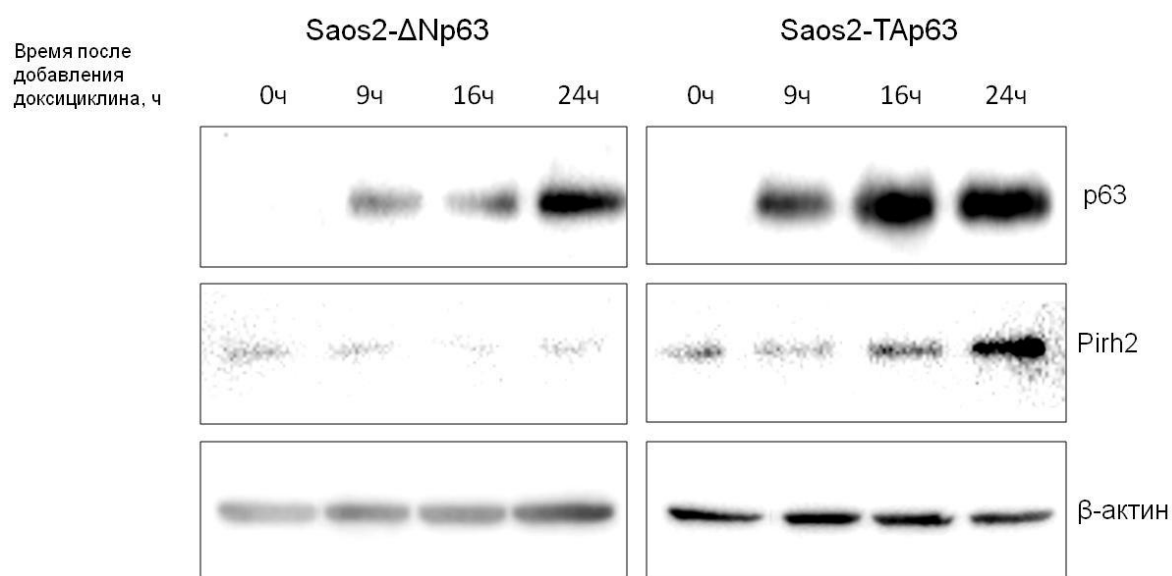


Рисунок 8. Анализ влияния индукции двух изоформ белка p63 - TAp63 и Δ Np63 - на экспрессию Pirh2 на уровне белка.

Вестерн-блот анализ тетрациклин-зависимой индукции TAp63 и Δ Np63 на экспрессию Pirh2 в клетках остеосаркомы Saos2. Белок p63 детектирован с помощью антител против HA-эпитопа. Контроль нагрузки – β -актин.

С помощью вестерн-блот анализа мы показали, что при индукции полноразмерной изоформы TAr63 экспрессия белка Pirh2 усиливается, при этом в случае индукции изоформы ΔNr63 изменений в количестве клеточного Pirh2 не наблюдается (рис. 8).

Таким образом, мы продемонстрировали, что транскрипционный фактор p63, а именно его полноразмерная изоформа, имеющая трансактивационный домен – TAr63, способствует увеличению белка Pirh2 в клетках.

3.1.3 Транскрипционный фактор p63 активирует экспрессию Pirh2 на уровне мРНК

Для того, чтобы определить, активирует ли фактор p63 транскрипцию гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2, мы осуществили ОТ-ПЦР в РВ. Для этого мы выделили тотальную мРНК из клеток линий Saos2 TAr63 и Saos2 ΔNr63, обработанных доксициклином для индукции экспрессии двух изоформ p63, синтезировали кДНК и использовали ее в качестве матрицы. В результате, осуществив ПЦР в РВ с использованием праймеров, специфичных для кодирующей последовательности *RCHY1*, а так же праймеров, специфичных для кодирующей последовательности референсного гена GAPDH, мы оценили уровень относительной экспрессии *RCHY1* (рис. 9).

Как видно из рисунка 9, повышение уровня экспрессии гена *RCHY1* в результате доксициклин-зависимой индукции p63 наблюдается только в линии Saos2 TAr63, а в линии Saos2 ΔNr63 относительное количество мРНК Pirh2, напротив, существенно не меняется.

Таким образом, мы сделали вывод о том, что ген *RCHY1*, кодирующий Pirh2, является транскрипционной мишенью белка p63. При этом мы показали, что аминоконцевой трансактивационный домен p63 необходим для активации экспрессии убиквитинлигазы Pirh2.

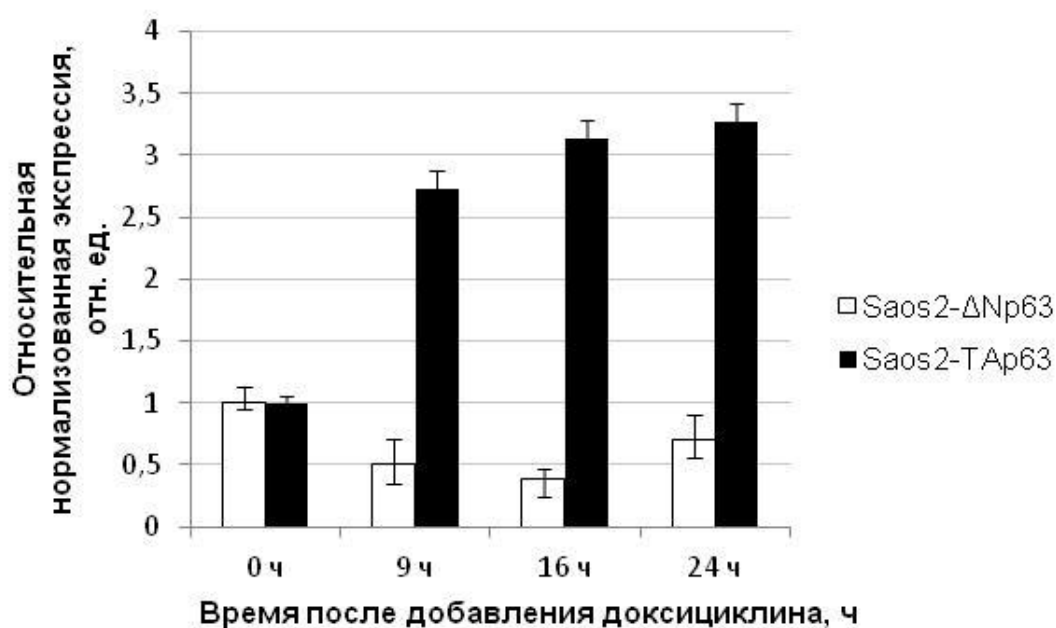


Рисунок 9. Анализ влияния индукции двух изоформ белка p63 - TAp63 и ΔNp63 - на уровень экспрессии гена RCHY1, кодирующего белок Pirh2

ОТ ПЦР в РВ, демонстрирующая уровень относительной экспрессии гена RCHY1 человека при тетрациклин-зависимой индукции TAp63 и ΔNp63 в клетках остеосаркомы Saos2. Нормализация относительно экспрессии гена GAPDH с использованием метода ΔΔ-Ct. Вертикальные отрезки обозначают величину стандартного отклонения.

3.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОВЫХ БЕЛКОВ-ИНТЕРАКТАНТОВ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2

3.2.1 Масс-спектрометрический анализ интерактома Pirh2

Несмотря на то, что для белка Pirh2 показано участие в таких важнейших клеточных процессах, как ответ на генотоксический стресс, репарация ДНК и апоптоз, белков, физически взаимодействующих с Pirh2, известно достаточно мало.

Для того чтобы получить информацию о межбелковых взаимодействиях, в которые вовлечен Pirh2, мы осуществили GST-пулдаун с использованием

ядерного экстракта клеток эмбриональной почки человека линии HEK293T и рекомбинантного белка Pirh2-GST. Для выявления неспецифического связывания в качестве контроля мы использовали нативный белок GST. Белки Pirh2-GST и GST были наработаны в бактериальных продуцентах *E. coli* (штамм Rosetta™(DE3)), полученных в результате трансформации вектором pGEX-5X-1-Pirh2 (кодирует Pirh2-GST) и контрольным вектором pGEX-5X-1 (кодирует нативный GST) и очищены с помощью аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе. После инкубации иммобилизованных на глутатион-сефарозе белков с ядерным экстрактом, образовавшиеся белок-белковые комплексы были подвергнуты денатурации и разделению в ПААГ. Далее связавшиеся белки были идентифицированы с помощью жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (LC-ESI-MS/MS). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Mascot49 и Scaffold.

Значимым считали взаимодействующий белок, для которого было идентифицировано не менее 3 пептидов ($\text{score} \geq 3$), и который не связывается с GST, либо связывается с GST в значительно меньшей степени чем Pirh2-GST.

На рисунке 10,а представлен ПААГ с окраской Кумасси образцов после осуществления GST-пулдауна перед анализом с помощью LC-ESI-MS/MS. Из рисунка 10,а видно, что для анализа было взято адекватное количество рекомбинантного белка Pirh2-GST и контроля GST. На рисунке 10 представлены количественные данные масс-спектрометрического анализа до детальной обработки. Таким образом, в результате анализа было выявлено 346 белков: 50 интерактантов GST, 256 интерактантов Pirh2-GST и 40 общих интерактантов (рис. 10,б). Детальная обработка данных заключалась в исключении из списка прокариотических белков, кератинов, белков Pirh2 и глутатион-S-трансферазы.

После обработки данных, полученных в результате масс-спектрометрии, мы выявили 225 белков-интерактантов Pirh2, определенных нами как значимые (таб. 2).

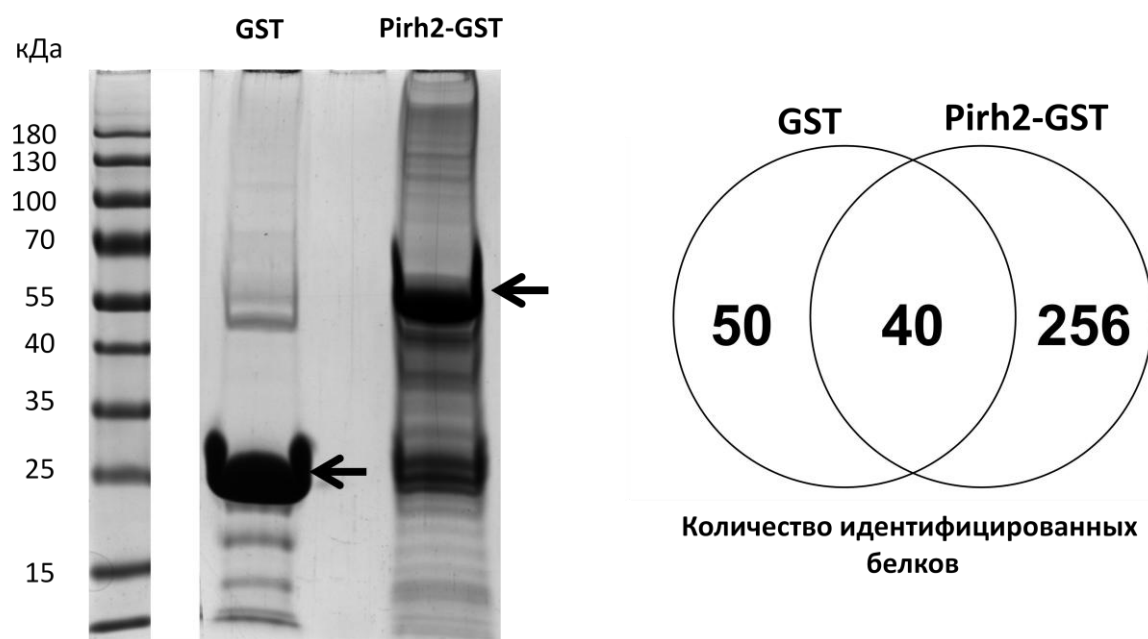


Рисунок 10. GST-пулдаун и масс-спектрометрического анализа интерактома Pirh2

(а.) Градиентный ПААГ, окрашенный Кумасси, образцов GST и Pirh2-GST после проведения пулдауна до масс-спектрометрического анализа (стрелками обозначены белки GST и Pirh2-GST в соответствующих дорожках). (б.) Диаграмма Эйлера-Венна, иллюстрирующая количество общих и уникальных для каждого образца белков, идентифицированных в результате масс-спектрометрического анализа.

Таблица 2. Список интерактантов рекомбинантного белка Pirh2-GST. Цифрами в столбцах GST и Pirh2-GST обозначено количество выявленных пептидов, соответствующих конкретному белку (score). GN – название гена, Mw – молекулярная масса белка.

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
1	Cluster of Lamin-B1 GN=LMNB1	P20700	66 kDa	0	51
2	60 kDa heat shock protein, mitochondrial GN=HSPD1	P10809	61 kDa	2	47
3	ATP-dependent RNA helicase A GN=DHX9	Q08211	141 kDa	4	46

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
4	Cluster of Tubulin beta chain GN=TUBB	Q5JP53	48 kDa	3	45
5	Cluster of Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF- X GN=USP9X	Q93008	292 kDa	0	44
6	Splicing factor 3B subunit 1 GN=SF3B1	O75533	146 kDa	0	42
7	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase GN=SNRNP200	O75643	245 kDa	2	39
8	HIV Tat-specific factor 1 GN=HTATSF1	O43719	86 kDa	0	34
9	Nuclear pore complex protein Nup133 GN=NUP133	F5H5C2	127 kDa	0	32
10	Nuclear pore complex protein Nup160 GN=NUP160	Q12769	162 kDa	0	31
11	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 GN=PARP1	P09874	113 kDa	0	29
12	Cluster of Nucleolar RNA helicase 2 GN=DDX21	Q9NR30	87 kDa	0	29
13	Splicing factor 3B subunit 3 GN=SF3B3	Q15393	136 kDa	0	28
14	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component GN=EFTUD2	Q15029	109 kDa	0	28
15	Cluster of Tubulin alpha-1B chain GN=TUBA1B	P68363	50 kDa	0	27
16	DNA damage-binding protein 1 GN=DDB1	Q16531	127 kDa	0	27
17	FACT complex subunit SPT16 GN=SUPT16H	Q9Y5B9	120 kDa	0	26
18	Transcription elongation factor SPT6 GN=SUPT6H	Q7KZ85	199 kDa	0	26
19	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U GN=HNRNPU	Q00839	91 kDa	5	26
20	Cluster of Interleukin enhancer- binding factor 3 GN=ILF3	Q12906	95 kDa	0	25
21	Protein VPRBP GN=VPRBP	Q9Y4B6	169 kDa	0	25
22	General transcription factor II-I GN=GTF2I	P78347	112 kDa	0	24
23	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 GN=DHX30	H7BXY3	131 kDa	0	24
24	Matrin-3 GN=MATR3	A8MXP9	100 kDa	0	23

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
25	Cluster of Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3 GN=PPP6R3	E9PKF6	94 kDa	0	22
26	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 GN=PRPF8	Q6P2Q9	274 kDa	0	22
27	Nucleolin GN=NCL	P19338	77 kDa	0	21
28	Cluster of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M GN=HNRNPM	P52272	78 kDa	0	21
29	Lamin B2, isoform CRA_a GN=LMNB2	J9JID7	70 kDa	0	20
30	Splicing factor 3B subunit 2 GN=SF3B2	Q13435	100 kDa	0	20
31	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform GN=PPP2R1A	P30153	65 kDa	0	20
32	Cluster of Cohesin subunit SA-2 GN=STAG2	F8WAK8	134 kDa	0	20
33	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 GN=NUP98	P52948	198 kDa	0	18
34	E3 SUMO-protein ligase RanBP2 GN=RANBP2	P49792	358 kDa	0	18
35	Splicing factor 3A subunit 1 GN=SF3A1	Q15459	89 kDa	0	17
36	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial GN=HADHA	P40939	83 kDa	0	17
37	Nuclear pore complex protein Nup205 GN=NUP205	Q92621	228 kDa	0	17
38	FACT complex subunit SSRP1 GN=SSRP1	Q08945	81 kDa	0	15
39	Nuclear pore complex protein Nup107 GN=NUP107	P57740	106 kDa	0	15
40	Cluster of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R GN=HNRNPR	O43390	71 kDa	0	15
41	Cluster of Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 GN=CHD4	F5GWX5	217 kDa	0	15
42	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 GN=SART3	Q15020	110 kDa	0	15
43	Myb-binding protein 1A GN=MYBBP1A	Q9BQG0	149 kDa	0	14

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
44	ATP-dependent RNA helicase DDX1 GN=DDX1	Q92499	82 kDa	2	13
45	Vimentin GN=VIM	P08670	54 kDa	0	13
46	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 GN=DDX5	J3KTA4	69 kDa	0	13
47	Cluster of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H GN=HNRNPH1	G8JLB6	51 kDa	0	13
48	Nucleolar transcription factor 1 GN=UBTF	E9PKP7	87 kDa	0	13
49	Cluster of Protein SET GN=SET	Q01105	33 kDa	0	12
50	Nucleophosmin GN=NPM1	P06748	33 kDa	0	12
52	60S ribosomal protein L3 GN=RPL3	P39023	46 kDa	0	12
53	Endoribonuclease Dicer GN=DICER1	Q9UPY3	219 kDa	0	12
54	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 GN=DDX17	H3BLZ8	80 kDa	1	11
55	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F GN=HNRNPF	P52597	46 kDa	0	11
56	Cluster of Nuclear pore complex protein Nup85 GN=NUP85	B4DMQ3	70 kDa	0	11
57	Staphylococcal nuclease domain- containing protein 1 GN=SND1	Q7KZF4	102 kDa	0	11
58	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 GN=HNRNPA1	F8W6I7	34 kDa	1	10
59	Cluster of ADP/ATP translocase 2 GN=SLC25A5	P05141	33 kDa	0	10
60	Nucleolar GTP-binding protein 1 GN=GTPBP4	Q9BZE4	74 kDa	0	10
61	40S ribosomal protein S18 GN=RPS18	P62269	18 kDa	0	10
62	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 GN=DHX15	O43143	91 kDa	0	10
63	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 GN=PELP1	I3L3A8	125 kDa	0	10
64	Pentatricopeptide repeat domain- containing protein 3, mitochondrial GN=PTCD3	Q96EY7	79 kDa	0	10

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
65	RuvB-like 2 GN=RUVBL2	Q9Y230	51 kDa	0	10
66	DnaJ homolog subfamily A member 1 GN=DNAJA1	P31689	45 kDa	0	9
68	60S ribosomal protein L15 GN=RPL15	P61313	24 kDa	0	9
69	40S ribosomal protein S3a GN=RPS3A	D6RG13	26 kDa	0	9
70	Cell division cycle protein 27 homolog GN=CDC27	B4DL80	85 kDa	0	9
71	Calumenin GN=CALU	O43852	37 kDa	0	9
72	60S ribosomal protein L5 GN=RPL5	P46777	34 kDa	0	9
73	40S ribosomal protein S9 GN=RPS9	P46781	23 kDa	0	9
74	60S ribosomal protein L6 GN=RPL6	Q02878	33 kDa	0	9
75	Cluster of 40S ribosomal protein SA (Fragment) GN=RPSA	C9J9K3	30 kDa	0	9
76	60S ribosomal protein L4 GN=RPL4	P36578	48 kDa	0	9
77	Cluster of 40S ribosomal protein S4, X isoform GN=RPS4X	P62701	30 kDa	0	9
78	Nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1 GN=URB1	O60287	254 kDa	0	9
79	Polypyrimidine tract-binding protein 1 GN=PTBP1	P26599	57 kDa	0	9
80	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 GN=ATP1A1	P05023	113 kDa	0	9
81	E3 ubiquitin-protein ligase RAD18 GN=RAD18	Q9NS91	56 kDa	0	9
82	Ribosomal biogenesis protein LAS1L GN=LAS1L	Q9Y4W2	83 kDa	0	9
83	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R GN=HNRNPR	O43390	71 kDa	0	8
84	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform GN=PPP2CA	P67775	36 kDa	0	8
85	Cluster of Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 GN=ATP2A2	P16615	115 kDa	0	8

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
86	Double-strand-break repair protein rad21 homolog GN=RAD21	O60216	72 kDa	0	8
87	Cluster of 60S ribosomal protein L26 GN=RPL26	P61254	17 kDa	0	8
88	40S ribosomal protein S19 GN=RPS19	P39019	16 kDa	0	8
89	DBIRD complex subunit ZNF326 GN=ZNF326	Q5BKZ1	66 kDa	0	8
90	Interleukin enhancer-binding factor 2 GN=ILF2	Q12905	43 kDa	0	8
91	Stress-70 protein, mitochondrial GN=HSPA9	P38646	74 kDa	0	8
92	60S ribosomal protein L7a GN=RPL7A	P62424	30 kDa	0	8
93	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 GN=HNRNPUL1	B7Z4B8	86 kDa	0	8
94	Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2 GN=NOP2	P46087	89 kDa	0	8
95	40S ribosomal protein S15a GN=RPS15A	I3L3P7	11 kDa	0	7
96	60S ribosomal protein L10a GN=RPL10A	P62906	25 kDa	0	7
97	40S ribosomal protein S8 GN=RPS8	P62241	24 kDa	0	7
98	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 GN=DDX46	Q7L014	117 kDa	0	7
99	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K GN=HNRNPK	P61978	51 kDa	0	7
100	40S ribosomal protein S6 GN=RPS6	P62753	29 kDa	0	7
101	Cluster of 40S ribosomal protein S17 GN=RPS17	P08708	16 kDa	0	7
102	Ran GTPase-activating protein 1 GN=RANGAP1	P46060	64 kDa	0	7
103	Cluster of Splicing factor 3A subunit 3 GN=SF3A3	Q12874	59 kDa	0	7
104	60S ribosomal protein L10 GN=RPL10	P27635	25 kDa	0	6
105	60S ribosomal protein L7 GN=RPL7	A8MUD9	24 kDa	0	6
106	28S ribosomal protein S7, mitochondrial GN=MRPS7	J3QLS3	32 kDa	0	6

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
107	60S ribosomal protein L13 GN=RPL13	P26373	24 kDa	0	6
108	60S ribosomal protein L18a GN=RPL18A	M0R117	18 kDa	0	6
109	Cluster of RNA-binding protein FUS GN=FUS	P35637	53 kDa	0	6
110	40S ribosomal protein S5 (Fragment) GN=RPS5	M0R0F0	22 kDa	0	6
111	Membrane-associated progesterone receptor component 1 GN=PGRMC1	O00264	22 kDa	0	6
112	Reticulocalbin-1 GN=RCN1	Q15293	39 kDa	0	6
113	40S ribosomal protein S10 GN=RPS10	P46783	19 kDa	0	6
114	40S ribosomal protein S16 GN=RPS16	M0R210	14 kDa	0	6
115	60S ribosomal protein L12 GN=RPL12	P30050	18 kDa	0	6
116	ATP-binding cassette sub-family F member 1 GN=ABCF1	Q8NE71	96 kDa	0	6
117	GrpE protein homolog 1, mitochondrial GN=GRPEL1	Q9HAV7	24 kDa	0	6
118	3-ketoacyl-CoA thiolase GN=HADHB	B4E2W0	49 kDa	0	6
119	DNA topoisomerase 2-alpha GN=TOP2A	P11388	174 kDa	0	6
120	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L GN=HNRNPL	P14866	64 kDa	0	6
121	SHC SH2 domain-binding protein 1 GN=SHCBP1	Q8NEM2	76 kDa	0	6
122	RuvB-like 1 GN=RUVBL1	Q9Y265	50 kDa	0	6
123	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B GN=ANP32B	Q92688	29 kDa	0	5
124	60S ribosomal protein L18 (Fragment) GN=RPL18	J3QQ67	22 kDa	0	5
125	Small nuclear ribonucleoprotein- associated protein GN=SNRPN	B3KVR1	25 kDa	0	5
126	Cluster of Histone H2A type 1 GN=HIST1H2AG	P0C0S8	14 kDa	0	5
127	40S ribosomal protein S2 GN=RPS2	P15880	31 kDa	0	5

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
128	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 GN=KHDRBS1	Q07666	48 kDa	0	5
129	Cluster of Zinc finger protein 24 GN=ZNF24	P17028	42 kDa	0	5
130	60S ribosomal protein L24 GN=RPL24	C9JNW5	18 kDa	0	5
131	40S ribosomal protein S12 GN=RPS12	P25398	15 kDa	0	5
132	40S ribosomal protein S7 GN=RPS7	P62081	22 kDa	0	5
133	40S ribosomal protein S13 GN=RPS13	P62277	17 kDa	0	5
134	Serine/arginine-rich splicing factor 9 GN=SRSF9	Q13242	26 kDa	0	5
135	U2 small nuclear ribonucleoprotein B" GN=SNRPB2	P08579	25 kDa	0	5
136	Cluster of RNA-binding protein 14 GN=RBM14	Q96PK6	69 kDa	0	5
137	28S ribosomal protein S27, mitochondrial GN=MRPS27	B4DRT2	49 kDa	0	5
138	UPF0568 protein C14orf166 GN=C14orf166	G3V4C6	23 kDa	0	5
139	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit GN=U2AF2	K7ENG2	34 kDa	0	5
140	RNA-binding protein 25 GN=RBM25	P49756	100 kDa	0	5
141	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 GN=HSD17B10	Q5H928	17 kDa	0	5
142	Cluster of Transcriptional repressor protein YY1 GN=YY1	P25490	45 kDa	0	5
143	5'-3' exoribonuclease 2 GN=XRN2	B4DZC3	102 kDa	0	5
144	5'-nucleotidase domain-containing protein 2 GN=NT5DC2	C9J TZ6	61 kDa	0	5
145	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit GN=PPP6C	O00743	35 kDa	0	5
146	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 GN=SMARCA5	O60264	122 kDa	0	5

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
147	Cell division cycle protein 16 homolog GN=CDC16	Q13042	72 kDa	0	5
148	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1 GN=SIRT1	Q96EB6	82 kDa	0	5
149	Cluster of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 GN=HNRNPD	B4DTC3	34 kDa	0	5
150	Cluster of 60S ribosomal protein L13a (Fragment) GN=RPL13A	M0QYS1	24 kDa	0	5
151	ADP/ATP translocase 2 GN=SLC25A5	P05141	33 kDa	0	4
153	60S ribosomal protein L17 (Fragment) GN=RPL17	J3KRX5	20 kDa	0	4
154	Histone H4 GN=HIST1H4A	P62805	11 kDa	0	4
155	Cluster of Histone H3.1 GN=HIST1H3A	P68431	15 kDa	0	4
156	Ribosomal protein L19 GN=RPL19	J3KTE4	23 kDa	0	4
157	60S ribosomal protein L27 GN=RPL27	P61353	16 kDa	0	4
158	60S ribosomal protein L11 GN=RPL11	P62913	20 kDa	0	4
159	60S ribosomal protein L36 GN=RPL36	Q9Y3U8	12 kDa	0	4
160	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial GN=AIFM1	O95831	67 kDa	0	4
161	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 GN=SNRPD2	P62316	14 kDa	0	4
162	60S ribosomal protein L32 (Fragment) GN=RPL32	D3YTB1	16 kDa	0	4
163	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B GN=HNRNPAB	D6R9P3	30 kDa	0	4
164	60S ribosomal protein L30 GN=RPL30	P62888	13 kDa	0	4
165	28S ribosomal protein S26, mitochondrial GN=MRPS26	Q9BYN8	24 kDa	0	4
166	Cluster of Proliferation-associated protein 2G4 GN=PA2G4	F8VR77	31 kDa	0	4
167	40S ribosomal protein S14 GN=RPS14	E5RH77	14 kDa	0	4

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
168	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 GN=RPN1	P04843	69 kDa	0	4
169	60S ribosomal protein L28 GN=RPL28	P46779	16 kDa	0	4
170	60S ribosomal protein L37a GN=RPL37A	P61513	10 kDa	0	4
171	ELAV-like protein 1 GN=ELAVL1	B4DVB8	39 kDa	0	4
172	RNA-binding protein 39 GN=RBM39	E1P5S2	41 kDa	0	4
173	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic GN=MTHFD1	F5H2F4	111 kDa	0	4
174	pre-rRNA processing protein FTSJ3 GN=FTSJ3	Q8IY81	97 kDa	0	4
175	Cluster of Polyadenylate-binding protein 1 GN=PABPC1	E7EQV3	66 kDa	0	4
176	Cluster of 40S ribosomal protein S23 GN=RPS23	P62266	16 kDa	0	4
177	Serine/arginine-rich-splicing factor 1 (Fragment) GN=SRSF1	J3KSR8	16 kDa	0	4
178	NF-kappa-B-repressing factor GN=NKRF	O15226	78 kDa	0	4
179	ATP synthase subunit beta, mitochondrial GN=ATP5B	P06576	57 kDa	0	4
180	28S ribosomal protein S9, mitochondrial GN=MRPS9	P82933	46 kDa	0	4
181	Angiomotin GN=AMOT	Q4VCS5	118 kDa	0	4
182	DnaJ homolog subfamily A member 2 GN=DNAJA2	O60884	46 kDa	0	4
183	RNA-binding motif protein, X chromosome GN=RBMX	P38159	42 kDa	0	4
184	40S ribosomal protein S11 GN=RPS11	M0QZC5	14 kDa	0	4
185	60S ribosomal protein L23 GN=RPL23	P62829	15 kDa	0	4
186	60S ribosomal protein L23a GN=RPL23A	P62750	18 kDa	0	4
187	60S ribosomal protein L14 GN=RPL14	P50914	23 kDa	0	4
188	Tubulin beta-2B chain GN=TUBB2B	Q9BVA1	50 kDa	0	3

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
189	Tubulin beta-6 chain GN=TUBB6	Q9BUF5	50 kDa	0	3
190	RNA-binding protein EWS GN=EWSR1	B0QYK0	65 kDa	0	3
191	Gamma-secretase C-terminal fragment 59 GN=APP	E9PG40	81 kDa	0	3
192	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa), isoform CRA_b GN=XRCC6	B1AHC8	65 kDa	0	3
193	28S ribosomal protein S29, mitochondrial GN=DAP3	P51398	46 kDa	0	3
194	Cullin-7 GN=CUL7	Q14999	191 kDa	0	3
195	ATP-binding cassette sub-family F member 2 GN=ABCF2	Q75MJ1	72 kDa	0	3
196	Nuclear pore complex protein Nup93 GN=NUP93	H3BVG0	100 kDa	0	3
197	Pre-mRNA-processing factor 6 GN=PRPF6	O94906	107 kDa	0	3
198	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 GN=HNRNPA0	Q13151	31 kDa	0	3
199	60S ribosomal protein L8 GN=RPL8	P62917	28 kDa	0	3
200	60S ribosomal protein L27a GN=RPL27A	E9PLL6	12 kDa	0	3
201	40S ribosomal protein S25 GN=RPS25	P62851	14 kDa	0	3
202	40S ribosomal protein S21 GN=RPS21	P63220	9 kDa	0	3
203	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A GN=PRPF40A	O75400	109 kDa	0	3
204	40S ribosomal protein S24 GN=RPS24	E7ETK0	15 kDa	0	3
205	60S acidic ribosomal protein P1 GN=RPLP1	P05386	12 kDa	0	3
206	60S ribosomal protein L9 (Fragment) GN=RPL9	D6RAN4	21 kDa	0	3
207	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 GN=NOLC1	Q14978	74 kDa	0	3
208	28S ribosomal protein S22, mitochondrial GN=MRPS22	G5E9V5	41 kDa	0	3
209	Nucleolar complex protein 2 homolog GN=NOC2L	Q9Y3T9	85 kDa	0	3

	Название белка, название гена	Идентификатор	Mw	GST	PIRH2-GST
210	tRNA-splicing ligase RtcB homolog GN=C22orf28	Q9Y3I0	55 kDa	0	3
211	Emerin GN=EMD	P50402	29 kDa	0	3
212	Translocon-associated protein subunit delta GN=SSR4	P51571	19 kDa	0	3
213	28S ribosomal protein S15, mitochondrial GN=MRPS15	P82914	30 kDa	0	3
214	60S ribosomal protein L35 GN=RPL35	P42766	15 kDa	0	3
215	Superkiller viralicidic activity 2-like 2 GN=SKIV2L2	F5H7E2	107 kDa	0	3
216	Transcription elongation regulator 1 GN=TCERG1	G3V220	116 kDa	0	3
217	Guanine nucleotide-binding protein-like 3 GN=GNL3	Q9BVP2	62 kDa	0	3
218	60S ribosomal protein L35a GN=RPL35A	P18077	13 kDa	0	3
219	60S ribosomal protein L34 GN=RPL34	P49207	13 kDa	0	3
220	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 1 GN=PPP6R1	Q9UPN7	97 kDa	0	3
221	General transcription factor 3C polypeptide 1 GN=GTF3C1	Q12789	239 kDa	0	3
222	Nuclear cap-binding protein subunit 1 GN=NCBP1	Q09161	92 kDa	0	3
223	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog GN=BRIX1	Q8TDN6	41 kDa	0	3
224	Cell growth-regulating nucleolar protein GN=LYAR	Q9NX58	44 kDa	0	3
225	40S ribosomal protein S15 GN=RPS15	K7ELC2	18 kDa	0	3

Для подтверждения эффективности выбранного нами подхода определения интерактантов Pirh2, мы выбрали белок ku70, выявленный при масс-спектрометрическом анализе с минимальным количеством пептидов, которое мы брали в анализ (score = 3). При этом, данный белок вместе с ku80 участвует в негомологичной репарации двуцепочечных разрывов ДНК, присоединяясь к концам разрывов и привлекая к ним другие компоненты

репарационной системы.

Для того чтобы подтвердить выявленное взаимодействие мы провели «обратный» GST-пуллдаун с использованием химерного белка ku70-GST и клеточного экстракта HEK293T после трансфекции вектором pIRES, кодирующим Pirh2-3×FLAG. На рисунке 11 представлены результаты данного эксперимента. Видно, что Pirh2-3×FLAG связывается с ku70-GST, но не связывается с GST. Таким образом, мы подтвердили, что даже те белки, для которых в результате масс-спектрометрии выявлено небольшое количество пептидов, тем не менее, с высокой достоверностью являются интерактантами Pirh2.

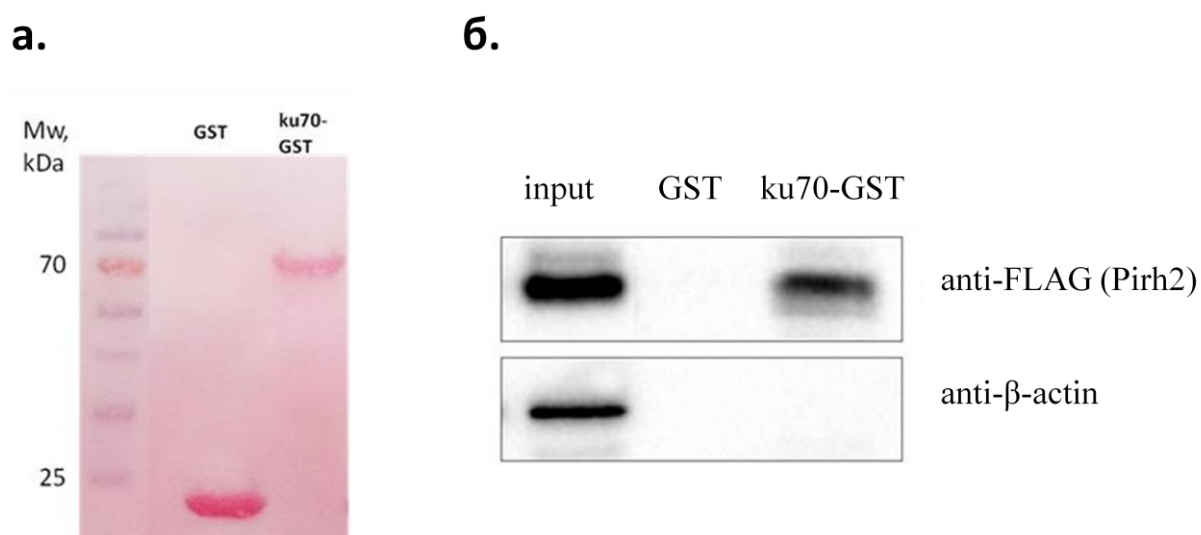


Рисунок 11. Подтверждение физического взаимодействия белков Pirh2 и ku70.

(а.) Контроль нагрузки, окраска мембраны Ронсеаи. (б.) Вестерн-блот анализ GST-пуллдауна с использованием химерного белка ku70-GST и экстракта клеток HEK293-T, экспрессирующих Pirh2-3×FLAG.

Проанализировав список интерактантов, мы распределили их по группам в зависимости от функции в клетке или процесса, в котором тот или иной белок принимает участие (рис.12). Наиболее интересными для нас являлись белки, участвующие в репарации, контроле клеточного цикла и деления, а также в запуске апоптоза.

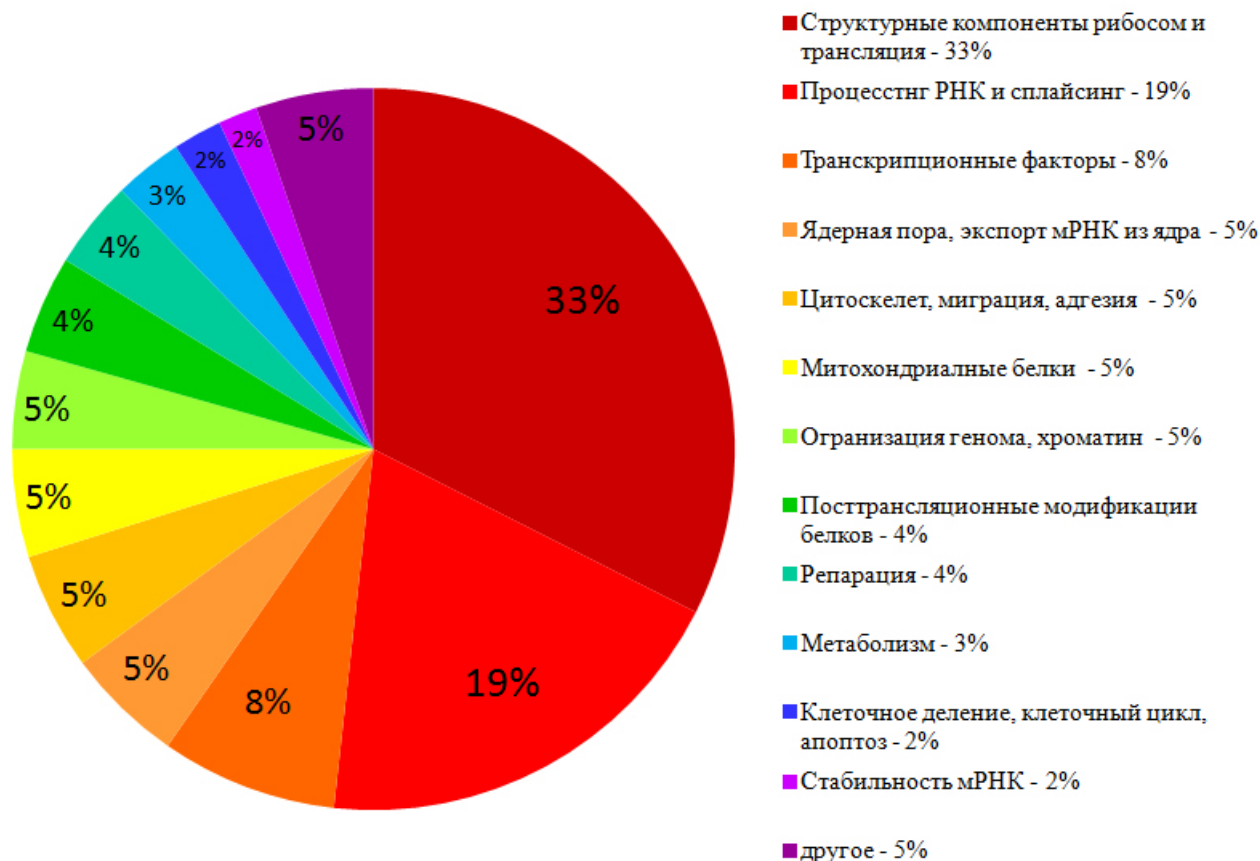


Рисунок 12. Распределение белков-интерактантов Pirh2 по функциям и клеточным процессам.

Среди интерактантов были выявлены следующие участники различных типов репарации Поли(АДФ-рибозо)-полимераза **PARP1**, белок, связывающийся с повреждением ДНК **DDB1**, АТФ-зависимая РНК-геликаза **DDX1**, ядрышковая РНК-геликаза **DDX21**, убиквитинлигаза **RAD18**, субъединица 70 кД-антигена **ku70**, АТФ-зависимые ДНК-геликазы **RUVBL1** и **RUVBL2**, нуклеофозмин **NPM1**, геликаза **SMARCA5** и транскрипционный фактор **YY1**, связывающийся со структурами Холлидея и играющий ключевую роль в гомологичной рекомбинации.

В таблице 3 представлены данные о конкретных типах репарации, в которых участвуют указанные белки.

Таблица 3. Интерактанты Pirh2, участвующие в репарации.

Название белка	Score	Тип репарации	Функция	Ссылки
Поли(АДФ-рибозо)-полимераза PARP1	29	Эксцизионная репарация оснований (BER)	Связывается с повреждением и привлекает факторы репарации	(Liu et al., 2007), (Matsumoto and Kim, 1995), (Masson et al., 1998)
		Гомологичная рекомбинация (HR)	ПолиАДФ-рибозилирует хроматин-ассоциированные белки, что обеспечивает привлечение других факторов репарации	(Haince et al., 2008)
		Негомологичное соединение концов (NHEJ)	Конкурирует с кД антигеном за связывание с местами двуцепочечных разрывов, обеспечивая альтернативных механизм NHEJ	(Wang et al., 2006)
DDB1	27	Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER)	В составе комплекса с белками DDB2 и куллин 4 убиквитинирует белок ХРС, который обеспечивает привлечение факторов NER, осуществляющих дальнейшие этапы репарации	(Sugasawa et al., 2005)

DDX1	13	Гомологичная рекомбинация (HR)	Привлекается в места двуцепочечных разрывов ДНК. Образует фокусы при повреждениях в активно транскрибируемых районах, обеспечивая удаление одноцепочечных РНК и доступ факторам репарации.	(Li et al., 2008)
Нуклеофозмин (NPM1)	12	Экцизионная репарация оснований (BER)	Активирует белок APE1 – важный регулятор BER.	(Vascotto et al., 2009)
		Гомологичная рекомбинация (HR)	Предположительная мишень убиквитинлигазы BRCA1. Предположительно действует на завершающих этапах HR, выполняя функцию гистонового шаперона.	(Koike et al., 2010)
		Синтез ДНК на поврежденной матрице (TLS)	Стабилизирует ДНК-полимеразу η , ответственную за синтез ДНК на поврежденной матрице.	(Ziv et al., 2014)
RUVBL2	10	Гомологичная рекомбинация (HR)	Входит в состав комплексов INO80 и NuA4. осуществляющих перестройку хроматина при повреждении ДНК. В составе комплекса INO80 обеспечивает убиквитинирование гистона H2A – необходимого этапа HR.	(Herr et al., 2015)

Rad18	9	Гомологичная рекомбинация (HR)	Обеспечивает формирование фокусов Rad51.	(Kobayashi et al., 2015)
RUVBL1	6	Гомологичная рекомбинация (HR)	Входит в состав комплексов INO80 и NuA4. осуществляющих перестройку хроматина при повреждении ДНК. В составе комплекса NuA4 обеспечивает дефосфорилирование гистона γ H2A.X.	(Jha et al., 2008)
YY1	5	Гомологичная рекомбинация (HR)	Взаимодействует с комплексом перестойки хроматина INO80. Также участвует в образовании структур Холлидея.	(Wu et al., 2007)
SMARCA5	5	Гомологичная рекомбинация (HR) и нехомологичное соединение концов (NHEJ)	Входит в состав комплекса перестройки хроматина ISWI. Активирует фактор репарации RNF168, который в свою очередь запускает дальнейшие этапы репарации двуцепочечных разрывов.	(Smeenk et al., 2013)
антиген ku70	3	Нехомологичное соединение концов (NHEJ)	Присоединяется к концам двуцепочечных разрывов ДНК в составе гетеродимера ku70-ku80. Запускает процесс репарации, привлекая к местам разрывов протеинкиназы DNA-PK.	(Boulton and Jackson, 1996)

Как видно из таблицы 3, среди интерактантов Pirh2 нами был обнаружены участники различных типов репарации, но при этом большинство выявленных белков обеспечивают репарацию двуцепочечных разрывов. Стоит отметить, что практически все перечисленные участники процессов репарации обладают антиапоптотическим эффектом.

Кроме того, мы показали, что в регуляции клеточного цикла, пролиферации и апоптоза участвуют следующие партнеры Pirh2: активатор пролиферации и ингибитор апоптоза АТФ/АДФ-транслоказа 2 **SLC25A5** (score = 10), белки **Cdc27** (score = 9) и **Cdc16** (score = 5), обеспечивающие прохождение клеткой митоза и G1 фазы клеточного цикла, каталитическая субъединица фосфатазы 6 **PPP6C**, обеспечивающая продвижение по клеточному циклу в ответ на активацию интерлейкинового рецептора (score = 5), активатор каспазозависимого пути апоптоза **AIFM1** (score = 4) и фактор пролиферации стволовых клеток нуклеостемин **GNL3** (score = 3).

Как видно из рисунка 12, интерактом Pirh2 на 19% состоит из белков, участвующих в слайсинге и процессинге РНК. Кроме того среди интерактантов нами были выявлены следующие РНК-связывающие белки: **RPL13A** (ингибирует экспрессию генов, участвующих в воспалении; score = 5), **Elavl1/HuR** (регулирует экспрессию ключевых факторов клеточного цикла, апоптоза, ангиогенеза и опухолевой трансформации, таких как p53, c-Мус, циклины и др.; score = 4), **PABPC1** (регулирует экспрессию c-FOS, связываясь с поли(А)-последовательностью его мРНК; score = 4). Данные белки влияют на стабильность мРНК указанных генов и, соответственно, регулируют их экспрессию.

К нашему удивлению, в результате анализа данных мы обнаружили, что с Pirh2 взаимодействуют все типы канонических гистонов - как коровых, так и линкерных, а также ключевые факторы реорганизации хроматина (chromatin remodeling factors) (таб. 4, и таб. 3).

Таблица 4. Интерактанты Pirh2, участвующие в организации и перестройке хроматина.

Название белка	Score	Функция
Гистон H2B	8	Канонический коровый гистон
Гистон H2A.1	6	Канонический коровый гистон
Гистон H3.1	6	Канонический коровый гистон
Гистон H4	4	Канонический коровый гистон
Гистон H1.3	3	Линкерный гистон
SPT16	27	Субъединица FACT-комплекса ³
SUPT6H	26	Наряду с комплексом FACT участвует в смене гистонов нуклеосомы (Chiang et al., 1996)
SSRP1	15	Субъединица FACT-комплекса ¹
UBTF	12	Заменяет гистон H1, связываясь с линкерной ДНК, активатор транскрипции генов рРНК (Kermekchiev et al., 1997).

На сегодняшний день известно, что нуклеосомы, включающие четыре типа канонических коровых гистонов (H2A, H2B, H3 и H4), являются динамическими структурами и постоянно собираются и разбираются в активно транскрибируемых участках. При этом с помощью гистоновых шаперонов канонические варианты H2A и H3 могут заменяться на варианты H2A.Z и H3.3, являющиеся маркерами «лабильных нуклеосом», характерных для активно транскрибируемых областей генома (Jin and Felsenfeld, 2007).

Мы обратили внимание, на то, что Pirh2 взаимодействует с такими гистоновыми шаперонами, как комплексы FACT и INO80, а также Spt60, участвующими в замене гистона H2A.Z на канонический вариант H2A (рис. 13).

³ FACT-комплекс (facilitates chromatin transcription) – комплекс, обеспечивающий дестабилизацию димеров H2A-H2B и тетрамеров H2A-H2B-H3-H4 в составе нуклеосомы, реорганизуя ее структуру (Saunders et al., 2003). FACT-комплекс задействован в таких процессах, как активация транскрипции, элонгация мРНК, репликация и репарация. Комплекс FACT включает две субъединицы: Spt16 и SSRP1.

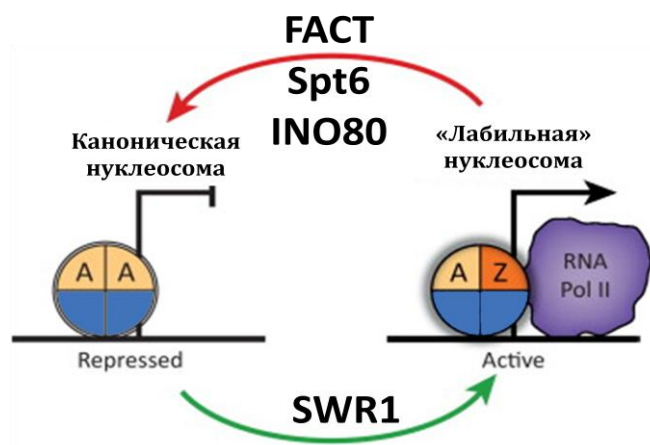


Рисунок 13. Схематическое изображение реорганизации нуклеосомы путем смены гистонов H2A и H2A.Z. По Soboleva et al. с модификациями автора (Soboleva et al., 2014).

3.2.2 Белок Pirh2 физически взаимодействует с гистоном H2A.Z и убиквитинирует его

Известно, что гены, кодирующие канонический гистон H2A и вариантный гистон H2A.Z, произошли от одного анцестрального гена, и аминокислотные последовательности данных гистонов различаются не очень значительно (Malik and Henikoff, 2003). На рисунке 14 представлены консенсусные аминокислотные последовательности данных гистонов (рис. 14,а) и их доменная структура (рис. 14,б). Основываясь на гомологии данных гистонов, а также на полученных нами данных масс-спектрометрии, свидетельствующих о взаимодействии Pirh2 как с гистоном H2A, так и с гистоновыми шаперонами, участвующими в смене гистонов H2A и H2A.Z, мы предположили, что белок Pirh2 способен связываться с вариантным гистоном H2A.Z.

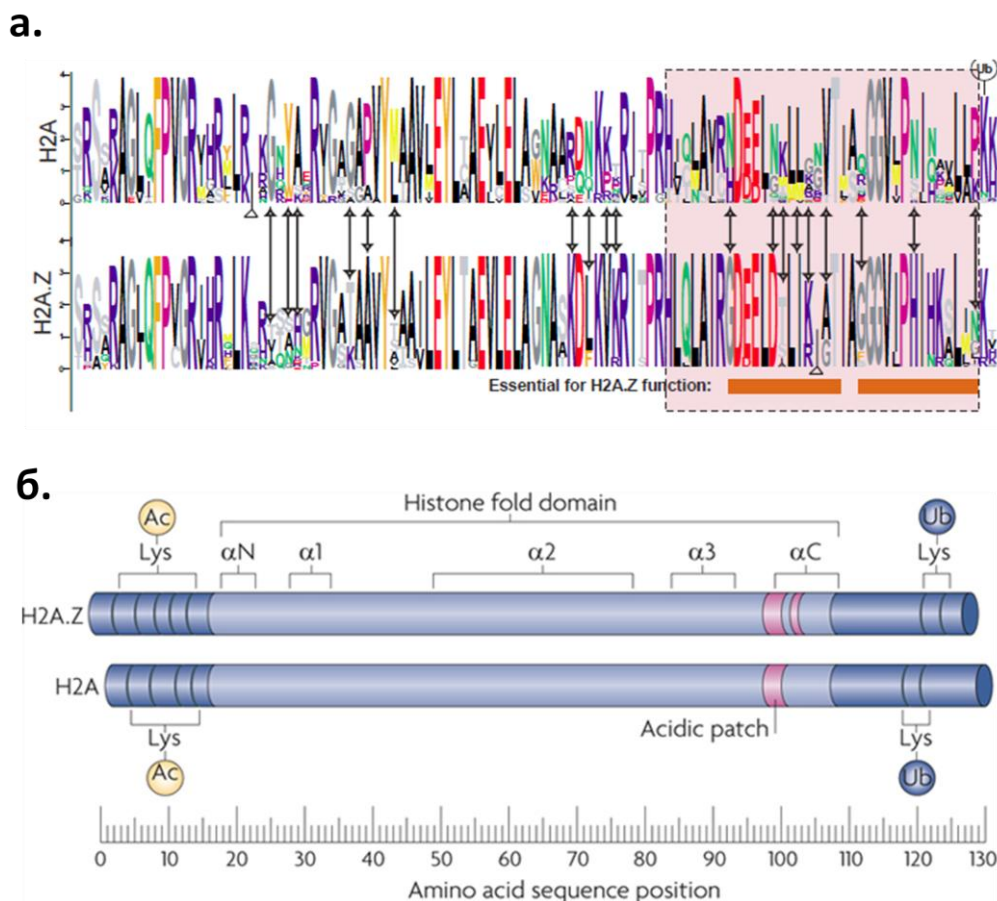


Рисунок 14. Сравнение аминокислотной структуры гистонов H2A и H2A.Z

(а.) Консенсусная аминокислотная последовательность гистонов H2A и H2A.Z. Красным прямоугольником выделен участок, определяющий специфические функции гистона H2A.Z по (Malik and Henikoff, 2003). (б.) Доменная структура гистонов H2A и H2A.Z, а также сайты модификации – ацетилирования и убиквитинирования по (Talbert and Henikoff, 2010).

Для подтверждения нашей гипотезы о физическом взаимодействии Pirh2 с данным гистоном мы осуществили «реципрокный» GST-пулдаун с использованием химерного белка H2A.Z-GST и клеточного экстракта HEK293T после трансфекции вектором pIRES, кодирующим Pirh2-3×FLAG (рис. 15).

Как уже упоминалось, гистоны, в т.ч. и гистон H2A.Z, подвергаются посттрансляционным модификациям. Так, для H2A.Z было показано лизин-специфическое метилирование, ацетилирование, сумоилирование и

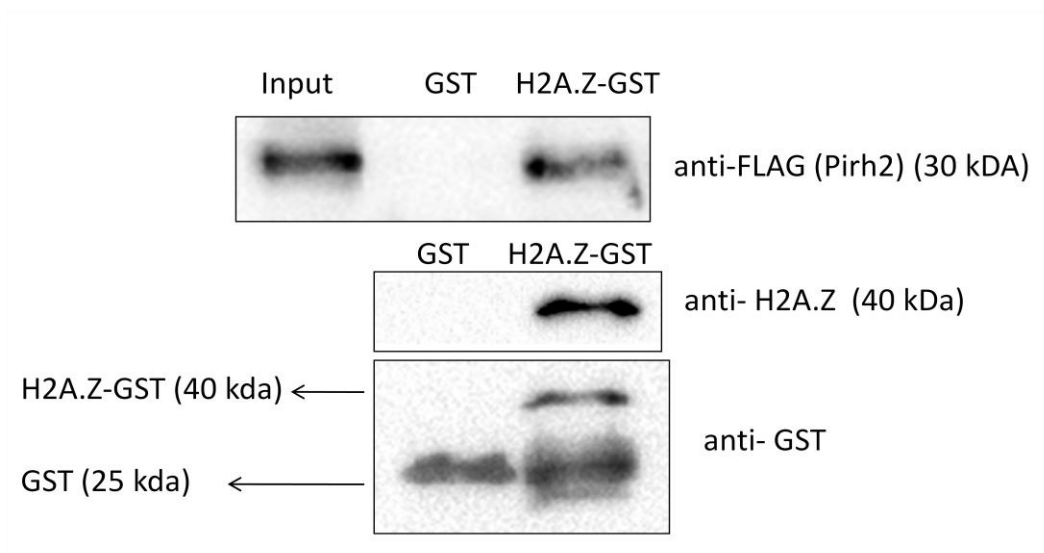


Рисунок 15. Подтверждение физического взаимодействия белков Pirh2 и H2AZ-GST.

Вестерн-блот анализ GST-пулдауна с использованием химерного белка H2A.Z-GST и экстракта клеток HEK293T, экспрессирующих Pirh2-3×FLAG. Контроль нагрузки - окраска антителами против GST.

убиквитинирование. Данные модификации различным образом влияют на функцию и нуклеосомную локализацию H2A.Z, а также на активность экспрессии участков хроматина, включающих модифицированный гистон (Sevilla and Binda, 2014). Было показано, что H2A.Z подвергается моноубиквитинированию E3-лигазой RING1B по сайтам K120, K121 и K125. При этом моноубиквитинирование H2A.Z не является сигналом для его протеасомной деградации. Было показано, что убиквитинированный H2A.Z в составе нуклеосом является маркером транскрипционно-неактивного хроматина (Sarcinella et al., 2007).

Исходя из этого, мы предположили, что Pirh2 может являться убиквитинлигазой, специфической для вариантного гистона H2A.Z. Для этого мы осуществили убиквитинирование *in vivo* эндогенного белка H2A.Z путем трансфекции вектора, кодирующего Ub-6His в клетки HEK293T с котрансфекцией вектором Pirh2-pcDNA3 и pcDNA3 в качестве контроля (рис. 16).

В результате мы показали, что гистон H2A.Z в гораздо большей степени моноубиквитинируется в присутствии Pirh2. Моноубиквитинированный гистон H2A.Z имеет молекулярную массу около 23 кДа (рис. 16,б). Помимо этого, мы предположили, что Pirh2, по-видимому, также обеспечивает мультиубиквитинирование H2A.Z. Диубиквитинированная форма выявляется на уровне около 32 кДа (рис. 16,б).

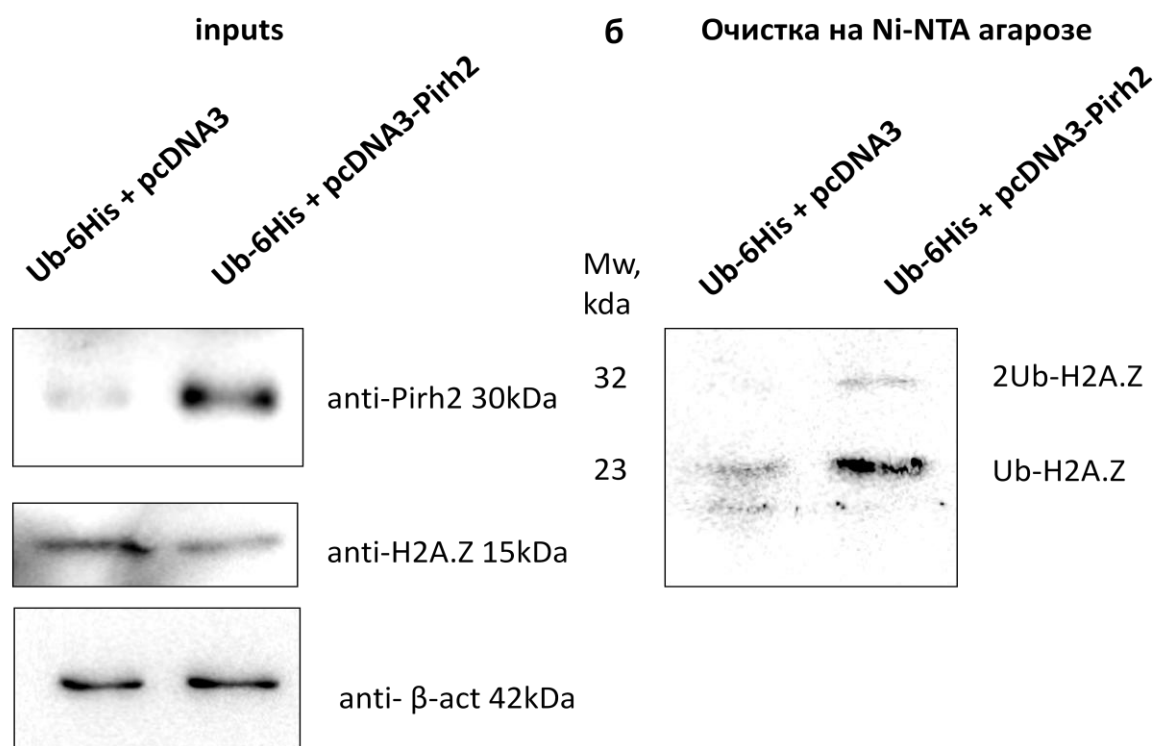


Рисунок 16. Подтверждение способности Pirh2 убиквитинировать гистон H2A.Z *in vivo*.

(а.) Вестерн-блот анализ инпутов. Контроль нагрузки – β-актин. (б.) Результаты очистки на Ni-NTA агарозе убиквитинированной формы гистона H2A.Z.

Для того, чтобы определить, влияет ли Pirh2 на стабильность H2A.Z, мы оценили изменение периода полужизни H2A.Z при сверхэкспрессии белка Pirh2 в клетках H1299. Из рисунка 17 видно, что белок Pirh2 не влияет на стабильность H2A.Z. Это свидетельствует о том, что Pirh2-опосредованное убиквитинирование белка H2AZ не приводит к протеасомной деградации

последнего, а, по-видимому, играет регуляторную роль.

Таким образом мы показали, что белок Pirh2 способен взаимодействовать с вариантным гистоном H2A.Z и модифицировать его остатками убиквитина. При этом данная модификация не является сигналом для протеасомной деградации гистона H2A.Z, а, по-видимому, имеет регуляторное значение.

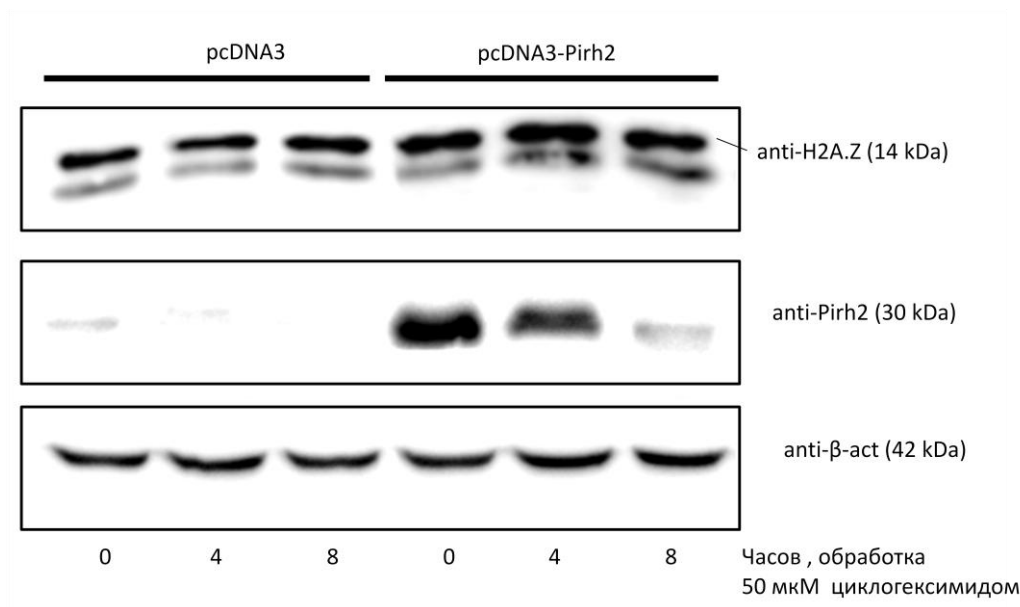


Рисунок 17. Pirh2 не направляет гистон H2A.Z на протеасомную деградацию.

Определение стабильности H2A.Z при обработке ингибитором синтеза белка циклогексимидом (50 мкМ) в клетках H1299, сверхэкспрессирующих Pirh2, по сравнению с контролем. Вестерн-блот анализ. Контроль нагрузки – β-актин.

3.2.3 Белок Pirh2 – убиквитинлигаза белка Elavl1/HuR, направляющая его на деградацию

Анализируя полученные данные по интерактому Pirh2, особое внимание мы обратили на РНК-связывающий белок Elavl1 (с альтернативным названием HuR, human antigen R), являющийся продуктом гена *ELAVL1* (Elav-like protein 1) человека. На сегодняшний день известно, что белок Elavl1/HuR, способен

связываться с AU-богатыми участками мРНК (AREs) некоторых генов, препятствовать их деградации и, таким образом, стабилизировать соответствующие белки. В качестве мишеней действия Elavl1/HuR можно привести стабилизацию мРНК таких ключевых генов как p21 (остановка клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК) (Wang et al., 2000b), циклинов A и B1 (Wang et al., 2000a), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов, транскрипционный фактор) (Levy et al., 1998) и COX-2 (циклооксигеназа, фактор воспаления) (Kurosu et al., 2011). Кроме того, связываясь с РНК, Elavl1 может привлекать к ней другие регуляторные комплексы. Так, например, Elavl1/HuR подавляет экспрессию онкогена с-Мус, рекрутируя к его мРНК комплекс RISC (RNA-induced silencing complex) (Kim et al., 2009).

Мы подтвердили взаимодействие Elavl1 и Pirh2 методами реципрокного пулдауна с использованием химерного белка Elavl1-GST и клеточного экстракта HEK293T после трансфекции вектором pIRES, кодирующим Pirh2-3×FLAG (рис. 18а), а также методом коиммунопреципитации эндогенного Pirh2 из клеток HEK293T с Elavl-3×FLAG (рис. 18б).

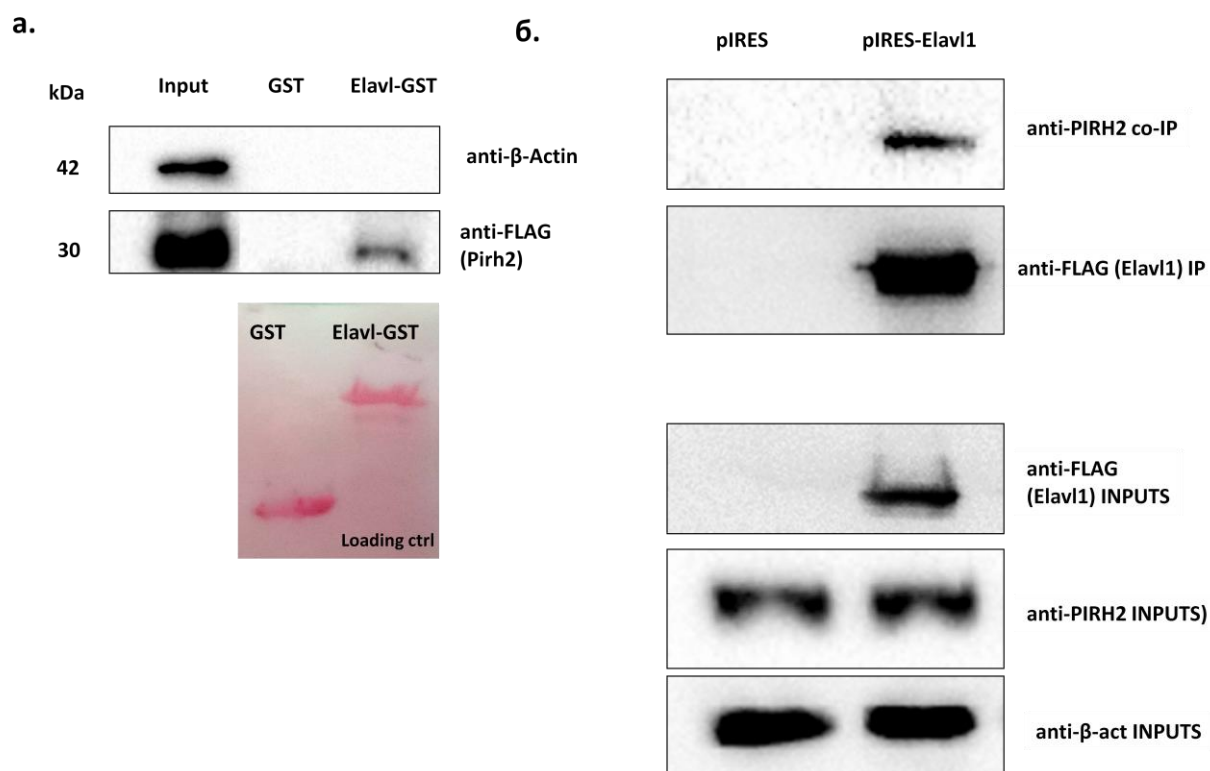


Рисунок 18. Подтверждение физического взаимодействия белков Elavl1 и Pirh2.

(а.) GST-пулдаун Pirh2-3 $\times$ FLAG с использованием химерного белка Elavl1-GST. Контроль нагрузки, окраска мембраны Ронсеау.**(б.)** Коиммунопреципитация эндогенного белка Pirh2 из клеток HEK293T с Elavl-3 $\times$ FLAG. Контроль нагрузки – β -актин.

Для определения способности Pirh2 убиквитинировать Elavl1 мы осуществили убиквитинирование *in vivo* белка Elavl-3 $\times$ FLAG путем трансфекции вектора, кодирующего Ub-6His, в клетки HEK233T с котрансфекцией Elavl-pIRES, Pirh2-pcDNA3 и pcDNA3 в качестве контроля (рис.19). В результате мы показали, что Pirh2 способен полиубиквитинировать белок Elavl1.

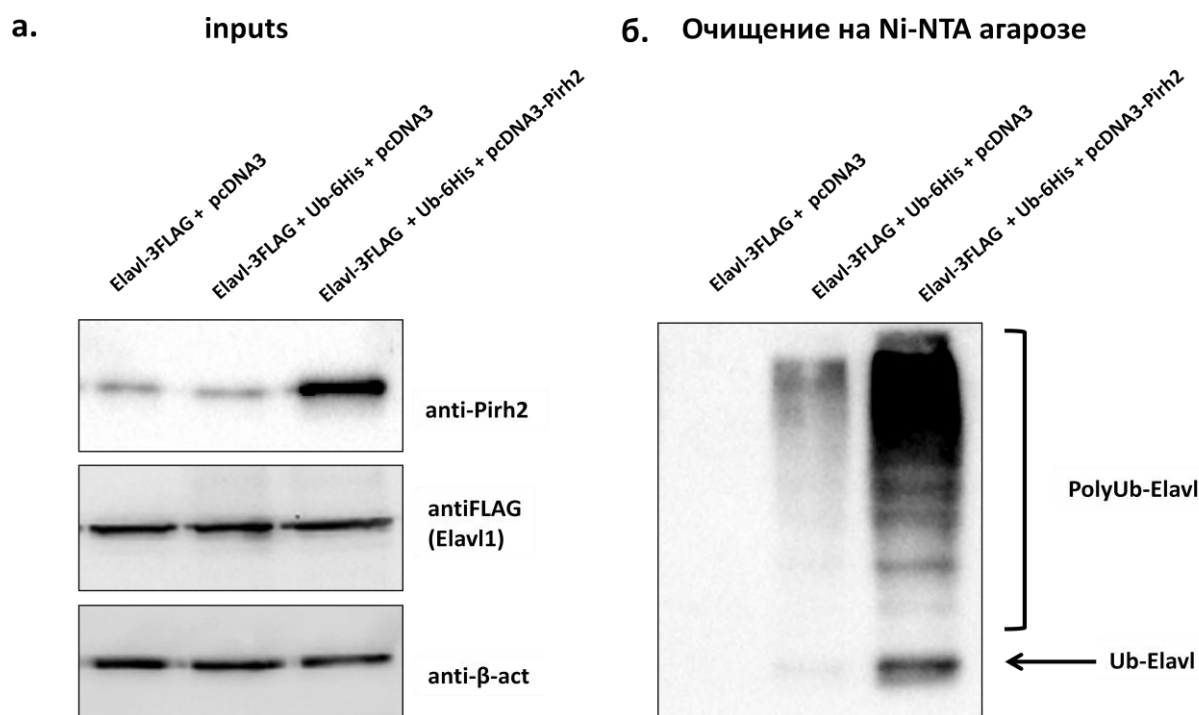


Рисунок 19. Pirh2-опосредованное убиквитинирование *in vivo* белка Elavl1-3×FLAG

(а.) Вестерн-блот анализ инпутов, взятых в эксперимент. **(б.)** Вестерн-блот анализ убиквитинирования Elavl1-3FLAG. Контроль нагрузки – β-актин.

Для того, чтобы определить влияние белка Pirh2 на стабильность Elavl1 мы осуществили трансфекцию белка Pirh2 в количестве 0, 3 и 10 мкг (доводя при необходимости общее количество векторной ДНК до 10 мкг пустым вектором pcDNA3), после чего проанализировали уровень белка Elavl1 в клетках. Как видно из рисунка 20а, количество Elavl1 находится в обратной зависимости с количеством Pirh2.

Мы также оценили изменение периода полужизни Elavl1 при сверхэкспрессии Pirh2 в клетках H1299 в присутствии ингибитора синтеза белка циклогексимида (50 мкМ). Из рисунка 20,б видно, что белок Pirh2 способствует деградации Elavl1.

Таким образом, нами обнаружена еще одна мишень убиквитинлигазы Pirh2. Стоит отметить, что роль Elavl1 в онкогенезе до конца не изучена, и он может выступать как в роли онкогена, так и в роли онкосупрессора. Мы планируем дальнейшее изучение влияния Pirh2-опосредованного

убиквитинирования Elavl1/HuR на ключевые клеточные процессы: репарацию ДНК, запуск апоптоза и опухолевую трансформацию.

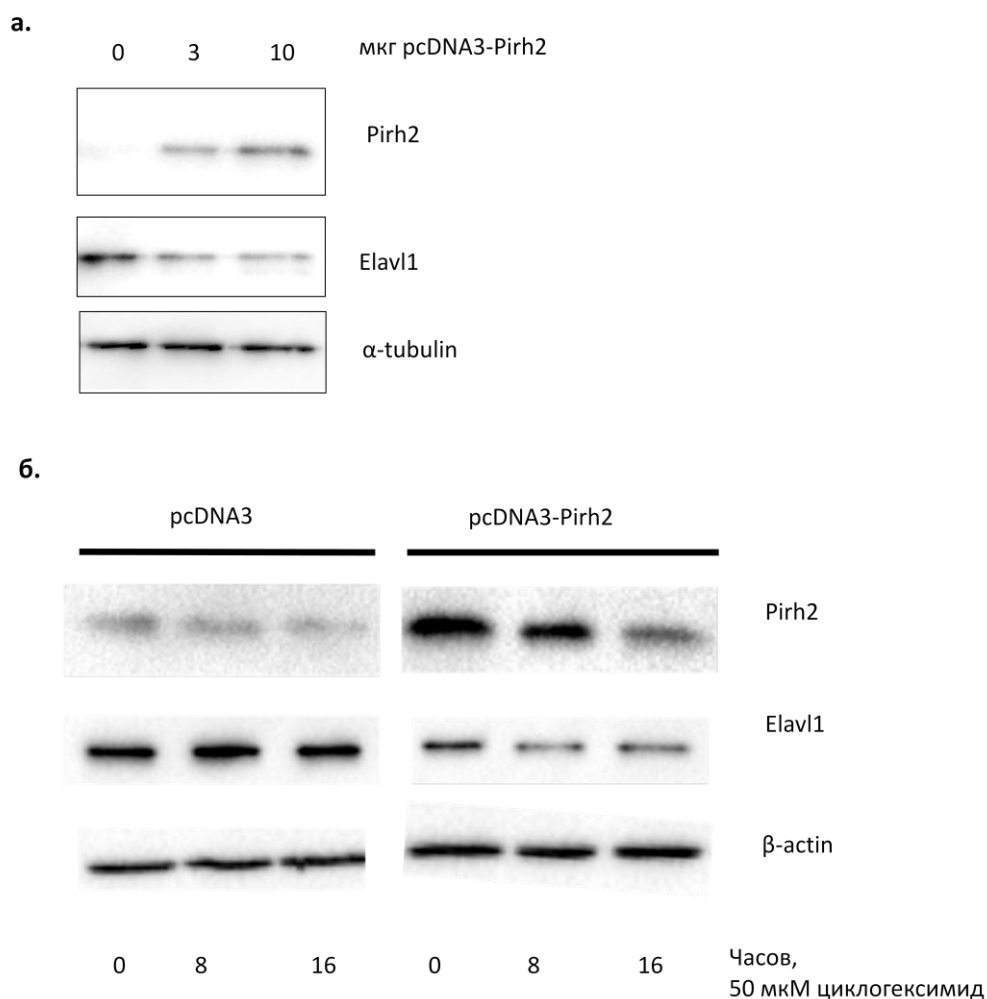


Рисунок 20. Pirh2 негативно регулирует уровень белка Elavl1 в клетке

(а.) Влияние на стабильность Elavl1 эктопической экспрессии Pirh2 в клетках линии HEK293T. Контроль нагрузки – α-тубулин. **(б.)** Определение стабильности Elavl1 при обработке ингибитором синтеза белка циклогексимидом в клетках H1299, сверхэкспрессирующих Pirh2, по сравнению с контролем. Контроль нагрузки – β-актин.

3.3 БЕЛОК PIRH2 УСИЛИВАЕТ КАНЦЕРОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО H1299

Для определения p53-независимой роли белка Pirh2 в формировании опухолевого фенотипа клеток мы приняли решение оценить влияние

экспрессии Pirh2 на такие клеточные характеристики туморогенности как скорость пролиферации, миграционный потенциал и устойчивость к генотоксическим агентам. В качестве клеточной модели нами была выбрана линия немелкоклеточной карциномы легкого человека (НМККЛ) H1299, в клетках которой отсутствует белок p53, а экспрессия Pirh2 является относительно низкой. Таким образом, данная клеточная линия является удобной моделью для изучения p53-независимого влияния Pirh2 на туморогенный потенциал клеток. Кроме того ранее было показано, что сверхэкспрессия Pirh2 наблюдается в 84% случаев злокачественных новообразований легкого человека (Duan et al., 2004), что также говорит об актуальности выбранной нами клеточной модели.

3.3.1 Влияние временной трансфекции Pirh2 на пролиферативный потенциал клеток H1299

Для оценки потенциального влияния белка Pirh2 на пролиферативные свойства клеток линии H1299 мы осуществили временную трансфекцию вектором pcDNA3-Pirh2 и исходным вектором pcDNA3 в качестве контроля, после чего осуществили мониторинг клеточного роста трансфицированных клеток в режиме реального времени с помощью системы xCELLigence (рис.21) (здесь и далее). Данная система позволяет определять клеточный индекс – параметр, являющийся производным величины импеданса (комплексного сопротивления) металлической подложки, на которой растут адгезионные клетки. Импеданс зависит от количества клеток, прикрепленных к подложке. Соответственно, при измерении импеданса через определенные промежутки времени (от 5 до 15 минут) в течение нескольких часов или суток возможно детектировать изменение числа клеток (рост или гибель) и получать результат в виде графика, отражающего клеточный индекс (рис.21). Кроме того, среднее значение наклона кривой между двумя соседними временными точками (slope) также является отражением скорости деления клеток.

На рисунке 21 представлены кривые изменения клеточного индекса клеток H1299 через 24 часа после временной трансфекции векторами pcDNA3

и pcDNA3-Pirh2 (21,а) и числовые выражения среднего угла наклона кривых между соседними точками (slope) (21,б). Контроль эффективности трансфекции осуществлялся с помощью вестерн-блот анализа (рис. 21,в).

Как видно из рисунка 21, клетки линии H1299, сверхэкспрессирующие трансфецированный Pirh2, обладают повышенным пролиферативным потенциалом по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, мы предположили, что белок Pirh2 способен усиливать способность клеток к делению.

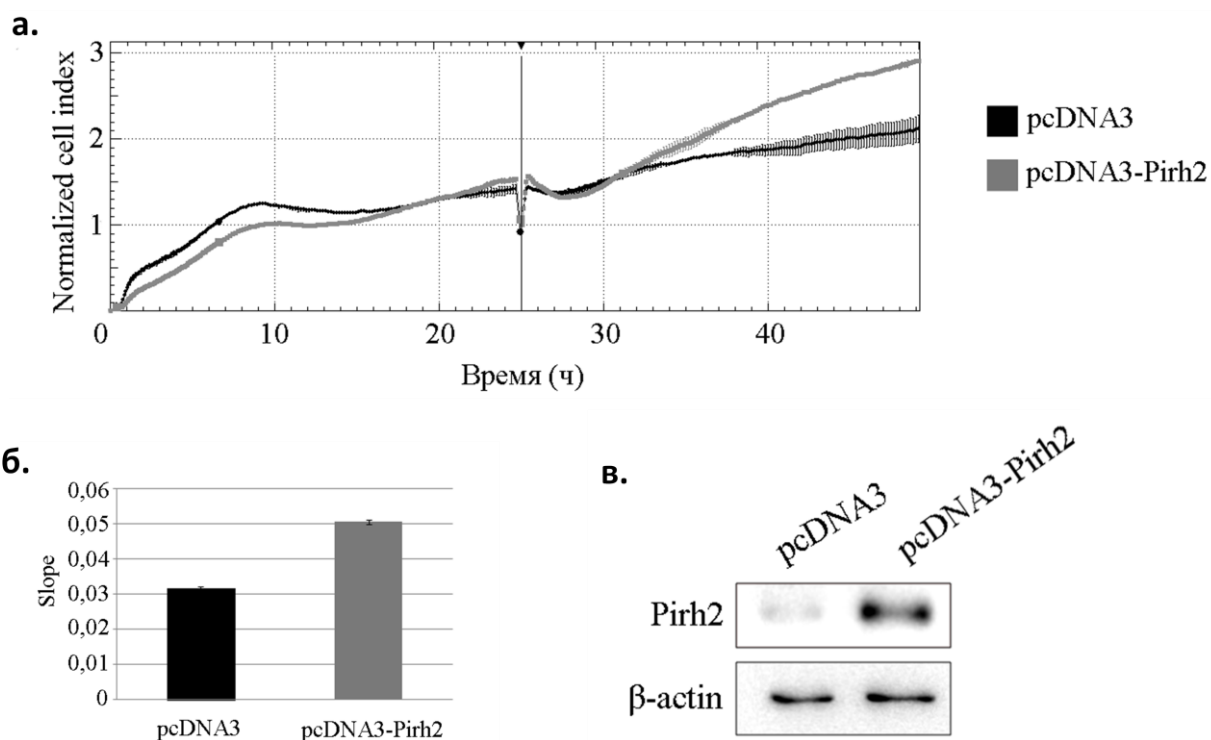


Рисунок 21. Изменение клеточного индекса клеток H1299 после временной трансфекции вектором pcDNA3-Pirh2.

(а.) Кривые изменения клеточного индекса в реальном времени. **(б.)** Числовые выражения среднего угла наклона данных кривых между соседними временными точками (slope). Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. **(в.)** Вестерн-блот анализ для подтверждения эффективности трансфекции. Контроль нагрузки – β -актин.

3.3.2 Получение стабильных клеточных линий с эктопической экспрессией Pirh2 и shRNA Pirh2 на основе линии H1299

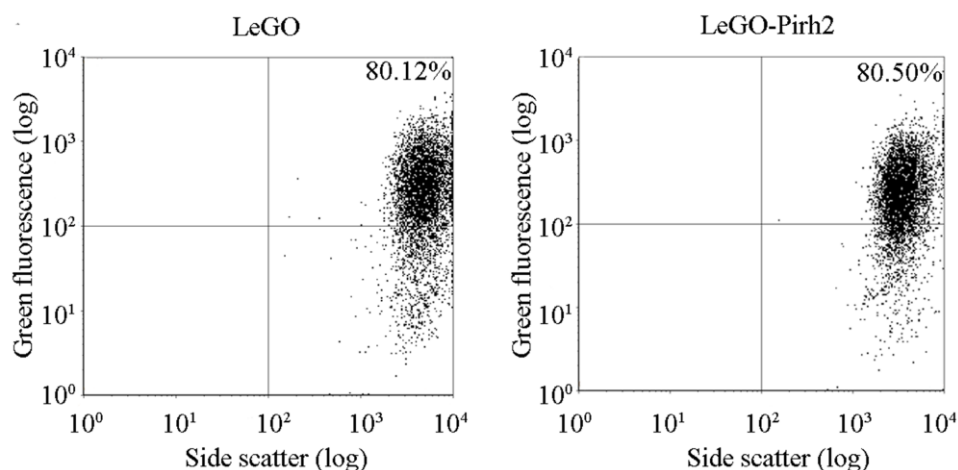
Для более детального исследования влияния Pirh2 на туморогенные свойства клеток мы создали изогенные клеточные линии на основе линии H1299 с различным статусом экспрессии белка Pirh2.

Для получения стабильных клеточных линий с различным статусом Pirh2, мы осуществили трансдукцию клеток лентивирусными частицами, несущими векторы LeGO и pLKO, кодирующие кДНК Pirh2 и малые шпилечные РНК, специфические для мРНК Pirh2 (shRNA Pirh2) соответственно. Исходный вектор LeGO, а также pLKO, содержащий неспецифические scrambled shRNA, были использованы для получения контрольных клеточных линий.

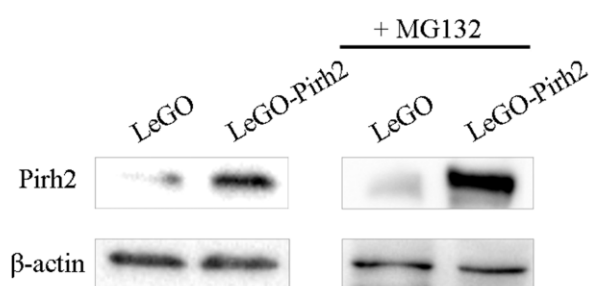
Оценка эффективности трансдукции клеток линии H1299 лентивирусными векторами LeGO-Pirh2 и LeGO осуществлялась на основании детекции репортерного сигнала GFP методом проточной цитофлуориметрии (FACS-анализ) (рис. 22,а) и с помощью вестерн-блот анализа с окраской антителами против Pirh2 (рис.22,б). Также на рисунке 22,б представлен вестерн-блот анализ клеток H1299 LeGO-Pirh2 и LeGO после обработки ингибитором протеасом MG132. Известно, что Pirh2 способен к аутоубиквитинированию, соответственно, ингибирование протеасом позволило детектировать большее количество белка Pirh2 в полученной стабильной линии.

Лентивирусный вектор pLKO содержит ген устойчивости к пурамицину, соответственно, клетки, трансдуцированные данным вектором, кодирующим последовательности shRNA Pirh2 и shRNA scrambled подвергались пурамициновой селекции. Эффективность нокдауна Pirh2 оценивалась методом вестерн-блот с окраской антителами против Pirh2. Как видно из рисунка 22,в, уровень Pirh2 в клетках стабильной клеточной линии H1299 shRNA Pirh2 значительно ниже по сравнению с клетками линии H1299 shRNA scrambled.

a.



б.



в.

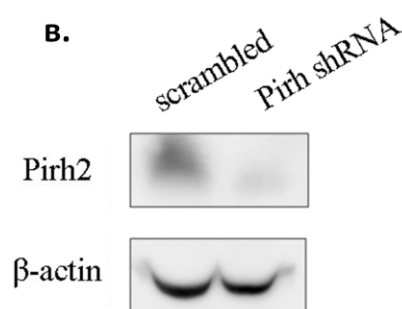


Рисунок 22. Получение стабильных клеточных линий, различных по статусу Pirh2 на основе линии H1299.

(а.) Результаты детекции GFP-положительных клеток, трансдуцированных лентивирусными векторами LeGO и LeGO-Pirh2. (б.) Вестерн-блот анализ количества Pirh2 в стабильных клеточных линиях H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 LeGO (левая панель), а также в данных клеточных линиях после обработки клеток ингибитором протеасом MG132 (правая панель). (в.) Вестерн-блот анализ количества Pirh2 в стабильных клеточных линиях H1299 shRNA Pirh2 и H1299 shRNA scrambled. Контроль нагрузки – β -актин.

3.3.3 Влияние Pirh2 на пролиферативный потенциал изогенных линий H1299 с различным статусом экспрессии Pirh2

Для определения скорости пролиферации клеток стабильных линий H1299 с различным статусом Pirh2 мы осуществили мониторинг клеточного роста в режиме реального времени с помощью системы xCELLigence (рис.23).

Используя полученные стабильные клеточные линии, мы подтвердили, что экзогенная экспрессия Pirh2 (линия LeGO-Pirh2) способствует увеличению скорости пролиферации клеток H1299. Кроме того мы показали, что нокдаун Pirh2 (линия shRNA Pirh2), напротив, снижает пролиферативный потенциал исследуемых клеток (рис.23). Стоит особо отметить тот факт, что контрольные линии LeGO и shRNA scrambled демонстрировали одинаковую способность к пролиферации, что также свидетельствует в пользу Pirh2-опосредованного эффекта, не являющегося специфической реакцией клеток на трансдукцию различными лентивирусными векторами.

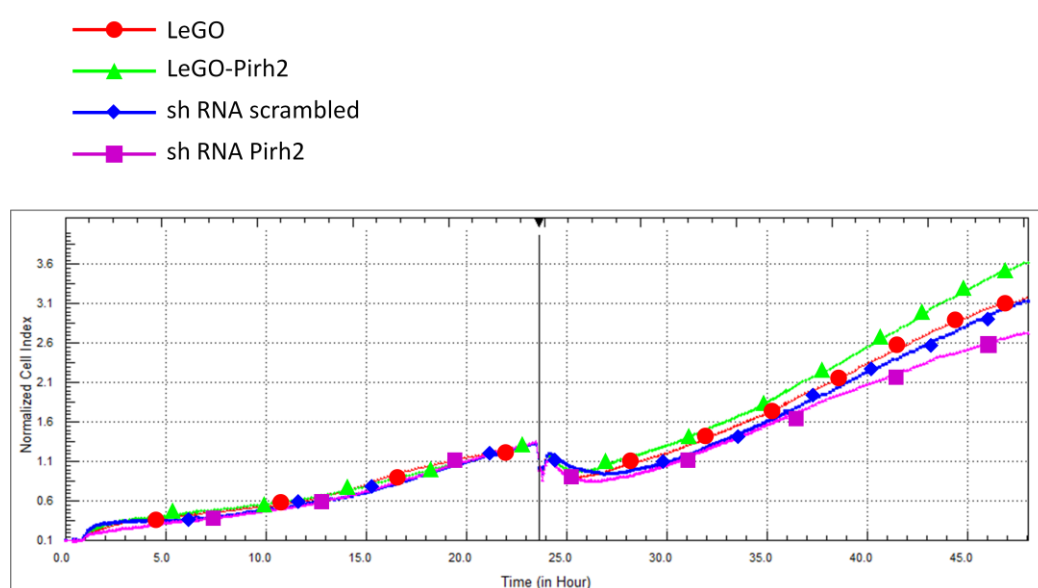


Рисунок 23. Результаты измерения клеточного индекса клеток H1299 с различным статусом Pirh2: LeGO-Pirh2 (с эктопической экспрессией Pirh2), shRNA Pirh2(с нокдауном Pirh2) и контрольных линий LeGO и shRNA scrambled.

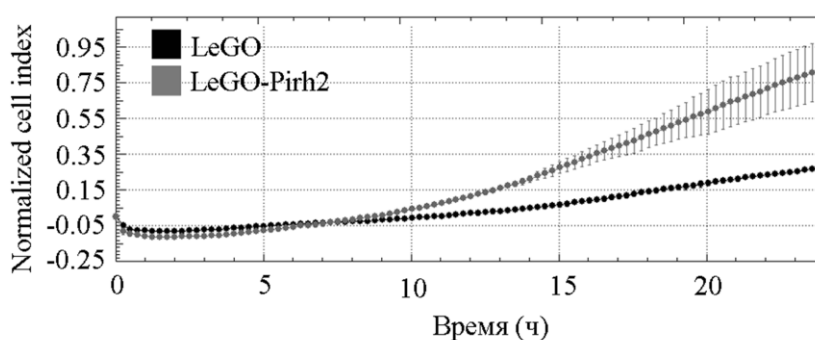
3.3.4 Pirh2 усиливает миграционный потенциал клеток H1299

Далее мы поставили перед собой задачу определить, влияет ли Pirh2 на способность клеток H1299 к миграции. Для этого мы использовали систему xCELLigence в сочетании с платами CIM-plate (Cell Invasion and Migration), состоящими из двух камер, разделенных металлической мембраной с порами

диаметром 8 нм, к которой присоединены электроды для детекции импеданса. В нижнюю камеру помещают полную питательную среду для культивирования, а в верхнюю— среду без сыворотки и исследуемые клетки. Импеданс изменяется при прохождении клеток через поры и регистрируется в реальном времени каждые 15 минут в течение 24 часов.

Мы провели миграционные тесты для полученных изогенных стабильных клеточных линий H1299: LeGO-Pirh2 и LeGO, а также shRNA Pirh2 и shRNA scrambled. Как видно из рисунка 24, при эктопической экспрессии Pirh2 миграционный потенциал клеток

а.



б.

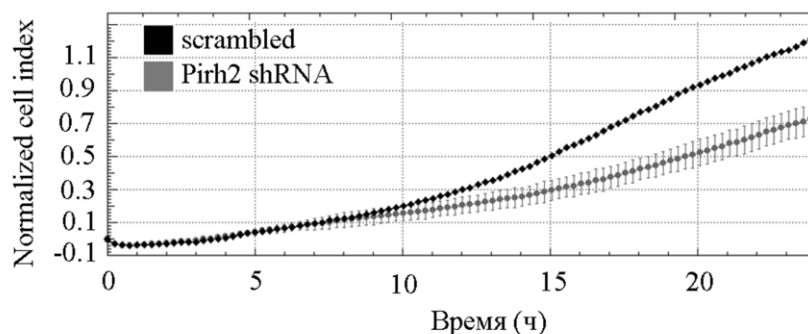


Рисунок 24. Влияние статуса экспрессии белка Pirh2 на миграционный потенциал клеток H1299.

(а.) Миграционный тест, осуществленный с использованием стабильных клеточных линий H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 LeGO в качестве контроля. (б.) Миграционный тест, осуществленный с использованием стабильных клеточных линий H1299 shRNA Pirh2 и H1299 shRNA scrambled в качестве контроля.

H1299 увеличивается (24,а), при этом нокдаун белка Pirh2 оказывает

негативное влияние на способность клеток H1299 к миграции (рис. 24,б).

Мы также провели анализ влияния экзогенной экспрессии Pirh2 на миграцию клеток, применив метод «зарастания царапины» (wound-healing assay). Мы осуществили данный тест с использованием изогенных стабильных клеточных линий H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 LeGO в качестве контроля (рис.25).

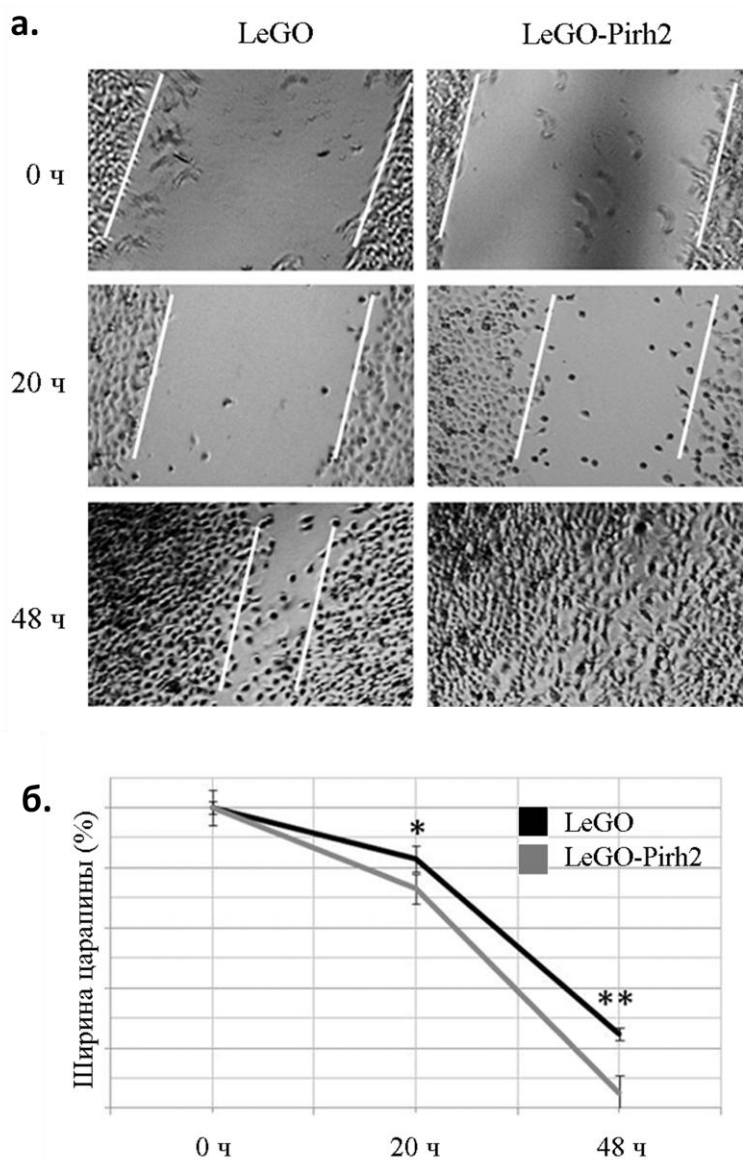


Рисунок 25. Тест на «заращение царапины» с использованием стабильных клеточных линий H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 LeGO в качестве контроля.

(а.) Микрофотографии царапины на временных точках 20 и 48 часов. **(б.)** Графическое изображение расстояния между краями царапины. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, t-критерий Стьюдента).

Мы показали, что «заращение царапины» в монослое клеток, сверхэкспрессирующих Pirh2, происходит значительно эффективнее. Как видно из рисунка 25, спустя 48 часов после начала эксперимента, царапина на монослое клеток H1299 LeGO-Pirh2, в отличие от контроля, зарастает практически полностью, делая невозможным измерение расстояние между краями. При этом даже на 24 часовой точке видно, что просвет между краями царапины в случае экзогенной экспрессии Pirh2 меньше, и в нем располагается больше одиночных клеток.

Кроме того, мы исследовали уровень маркеров эпителиально-мезенхимного перехода виментина и Е-кадгерина в полученных нами изогенных клеточных линиях с различным статусом Pirh2.

С помощью ОТ-ПЦР в РВ мы определили, каким образом уровень белка Pirh2 в клетках влияет на экспрессию мРНК Е-кадгерина и виментина (рис. 26).

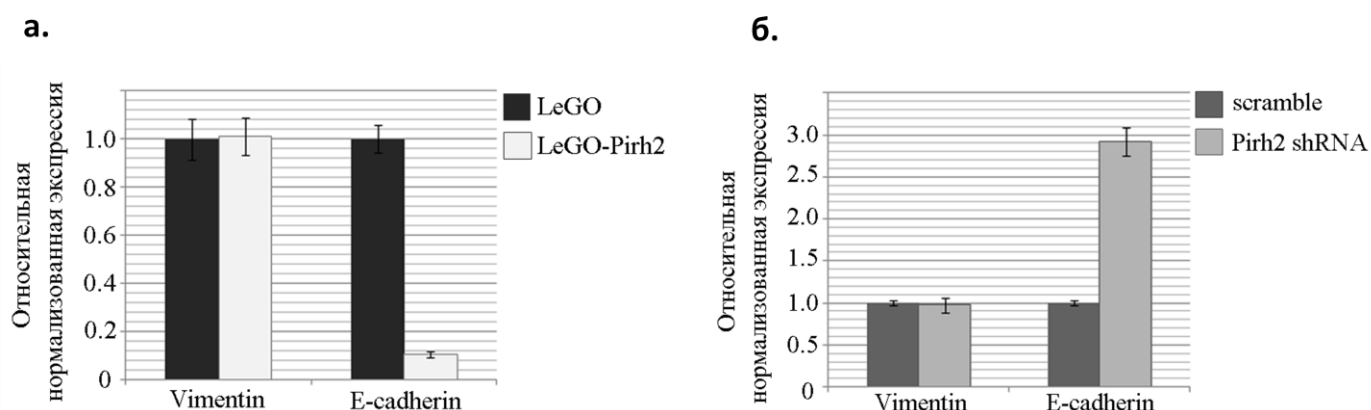


Рисунок 26. Определение влияния Pirh2 на относительную экспрессию генов CDH1 и VIM, кодирующих белки Е-кадгерин и виментин, с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

(а.) Экспрессия CDH1 и VIM в клетках линий H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 LeGO в качестве контроля. (б.) Экспрессия CDH1 и VIM в клетках линий H1299 shRNA Pirh2 и H1299 shRNA scrambled в качестве контроля. Нормализация относительно экспрессии GAPDH.

В результате проведенного анализа мы показали, что экзогенная экспрессия Pirh2 способствует снижению экспрессии гена CDH1, кодирующего

маркер эпителиального морфотипа клеток Е-кадгерин (рис. 26,а), при этом нокдаун Pirh2 (рис. 26,б), вызывает обратный эффект. При этом уровень мРНК мезенхимного маркера виментина по нашим данным остается неизменным в обоих случаях (рис.26, а, б).

С помощью вестерн-блот анализа мы определили экспрессию белков Е-кадгерин и виментин в указанных изогенных линиях и получили результат, полностью согласующийся с данными ОТ-ПЦР (рис. 27).

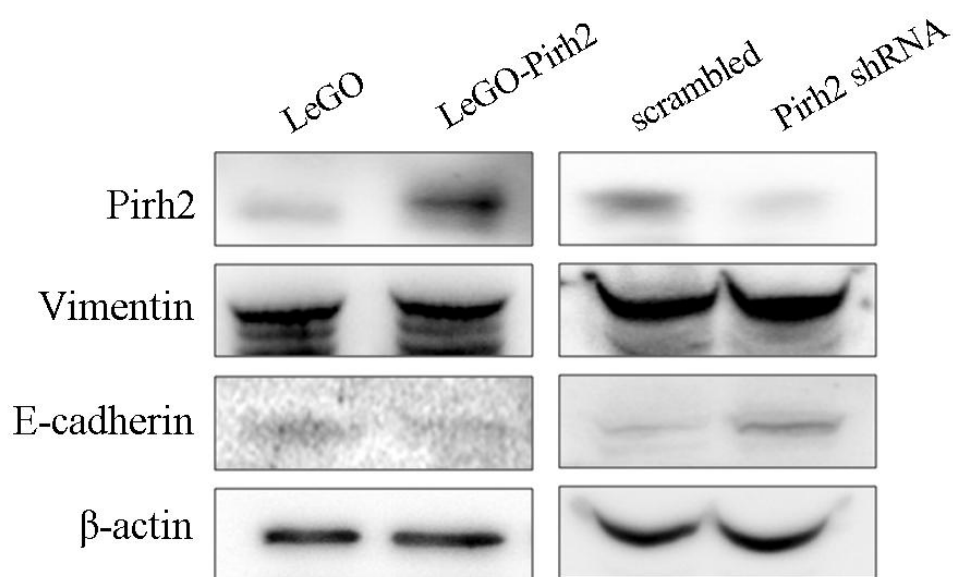


Рисунок 27. Влияние Pirh2 на уровень белков виментин и Е-кадгерин.

Вестерн-блот анализ белков Е-кадгерин и виментин в клетках изогенных стабильных линий H1299 LeGO-Pirh2, LeGO, shRNA Pirh2 и shRNA scrambled. Контроль нагрузки – β-актин.

Как видно из рисунка 27, уровень Е-кадгерина в исследуемых клетках находится в обратной зависимости от уровня Pirh2. При этом количество виментина не зависит от экспрессии Pirh2 и практически не меняется.

Таким образом, мы предполагаем, что влияние Pirh2 на миграционный потенциал клеток H1299 может частично объясняться Pirh2-опосредованным подавлением экспрессии маркеров эпителиального морфотипа клеток Е-кадгерина.

3.3.5 Pirh2 повышает устойчивость клеток H1299 к доксорубину

Принимая во внимание полученные нами данные о способности Pirh2 влиять на пролиферативный и миграционный потенциал клеток, а также тот факт, что среди интерактантов Pirh2 было выявлено значительное количество белков, участвующих в репарации ДНК, мы предположили, что Pirh2 может также влиять и на устойчивость клеток к генотоксическим агентам.

Для определения возможного влияния белка Pirh2 на устойчивость клеток к ДНК-повреждающим агентам были выбраны два химиотерапевтических препарата, широко используемые в современной противоопухолевой терапии. Известно, что доксорубин является ингибитором лигирующей активности ДНК-топоизомеразы II, но не влияет на никирующую активность фермента, что и вызывает двуцепочечные разрывы ДНК. Повреждения в ДНК являются причиной активации систем гомологичной рекомбинации (HR) и негомологичного соединения концов (NHEJ), апоптоза и гибели клетки. Данный препарат в нормальных клетках вызывает активацию белка p53, который запускает такие клеточные процессы как остановка клеточного цикла, репарация и апоптоз. Цисплатин в свою очередь образует сшивки пуриновых оснований ДНК, что также приводит к активации p53, запуску эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), апоптозу и гибели клетки. Мы поставили перед собой задачу выяснить, влияет ли Pirh2 на устойчивость клеток к данным препаратам при отсутствии p53.

Мы осуществили МТТ-тест (колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток) с использованием клеток H1299, трансфицированных векторами pcDNA3 и Pirh2-pcDNA3. Для этого были выбраны следующие концентрации препаратов: доксорубин 0,5 мкМ и 1 мкМ и цисплатина 60 мкг/мл и 100 мкг/мл. Обработку проводили в течение 48 часов. Как видно из рисунка 28, выживаемость клеток при обработке доксорубином при сверхэкспрессии Pirh2 увеличивается на 10-14 % по сравнению с контролем (28,а). При этом Pirh2 не влияет на устойчивость клеток к цисплатину (28,б). Данный результат свидетельствует в пользу того, что

Pirh2 вносит вклад в повышение устойчивости клеток к генотоксическим агентам, вызывающим двуцепочечные разрывы ДНК, но не влияет на их чувствительность к препаратам, вызывающим повреждения одно цепи.

Для подтверждения влияния Pirh2 на устойчивость клеток к доксорубину мы осуществили определение клеточного индекса с использованием линий H1299 различным статусом Pirh2: LeGO-Pirh2 (с эктопической экспрессией Pirh2), shRNA Pirh2(с нокдауном Pirh2) и контрольных линий LeGO и shRNA scrambled после обработки 2мкМ доксорубином. В результате мы показали, что при сверхэкспрессии Pirh2 клеточный индекс клеток H1299, обработанных 2 мкМ доксорубином, выше по сравнению с контролем, в то время как нокдаун Pirh2 обладает противоположным эффектом (рис. 29).

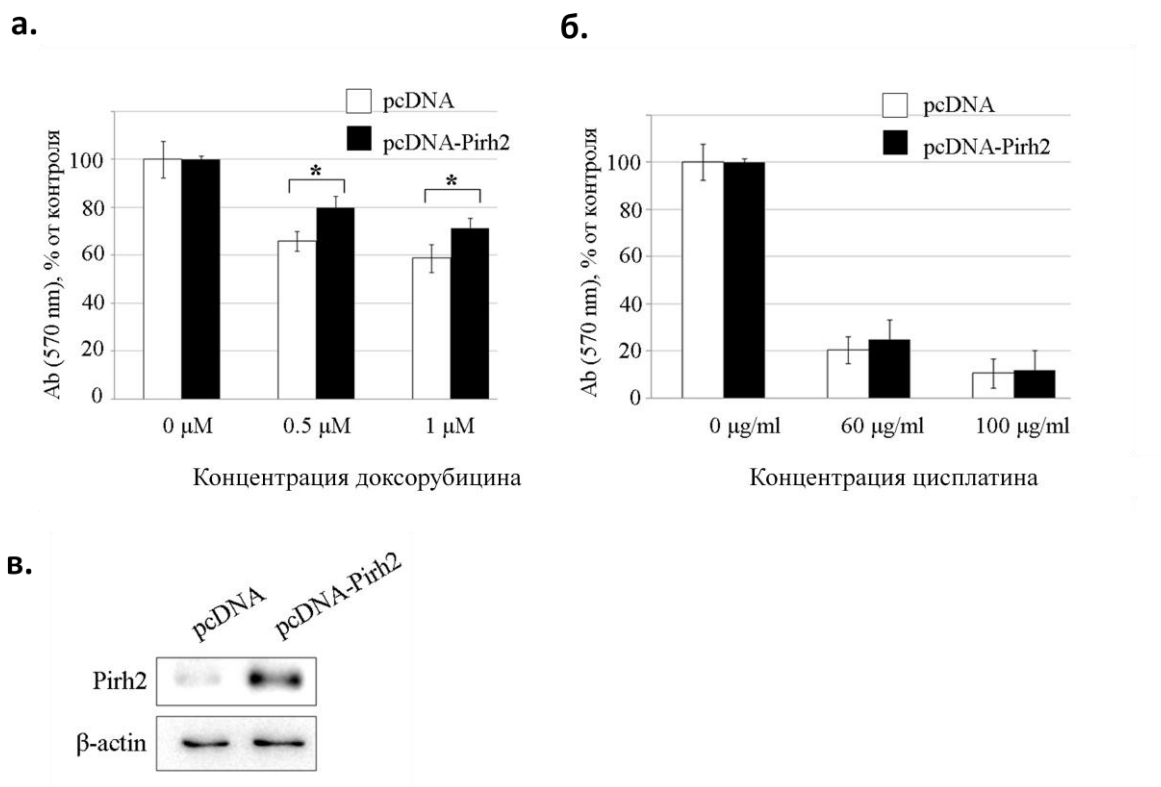


Рисунок 28. Результаты МТТ-теста для клеток H1299 после временной трансфекции вектором Pirh2-pcDNA3 и вектором pcDNA в качестве контроля, обработанных (а.) доксорубином и (б.) цисплатином. (* $p \leq 0,05$; t-критерий Стьюдента). Контроль нагрузки – β -актин.

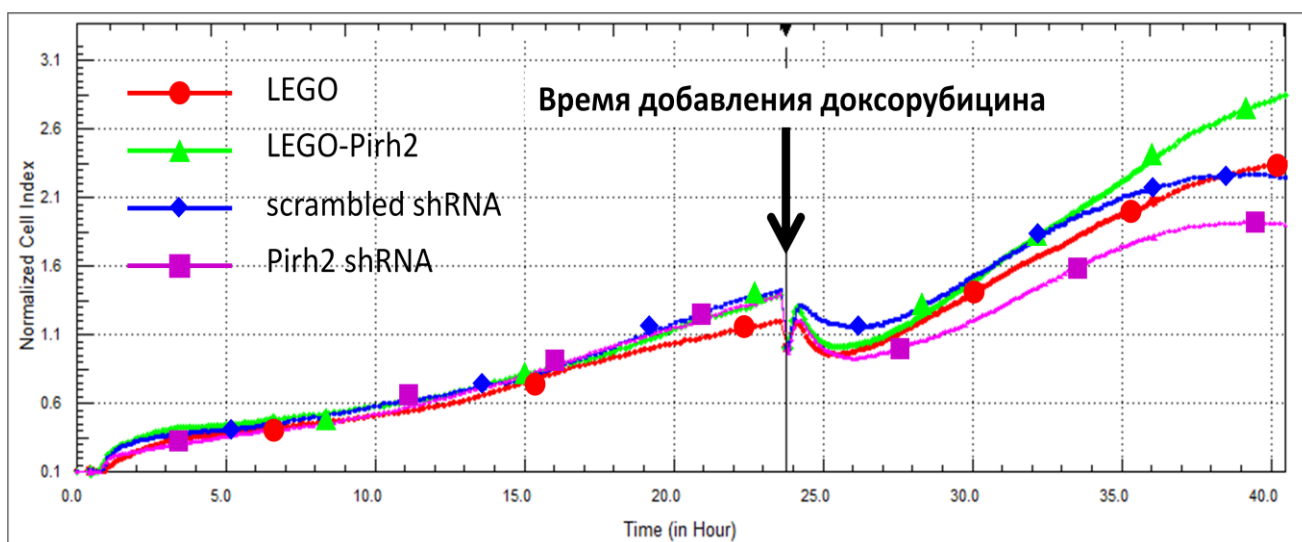


Рисунок 29. Результаты измерения клеточного индекса клеток H1299 с различным статусом Pirh2: LeGO-Pirh2, shRNA Pirh2 и контрольных линий LeGO и shRNA scrambled после добавления 2 мкМ доксорубина.

Таким образом, мы подтвердили, что уровень экспрессии Pirh2 в клетках влияет на их восприимчивость к генотоксическому агенту доксорубину, вызывающему двуцепочечные разрывы ДНК.

3.3.6 Pirh2 повышает уровень экспрессии онкогенного белка с-Мус в клетках H1299

Для того, чтобы выявить потенциальный механизм влияния Pirh2 на туморогенный потенциал клеток, мы проанализировали уровень экспрессии двух наиболее важных позитивных регуляторов клеточной пролиферации - NF-κB и с-Мус. Мы оценили уровень данных белков в клетках линии H1299 LeGO-Pirh2 и линии H1299 LeGO в качестве контроля (рис.111). Как видно из рис. 30,а, уровень p65 (активной субъединицы NF-κB) не отличается в двух данных клеточных линиях, при этом уровень белка с-Мус заметно повышен в клетках с эктопической экспрессией Pirh2.

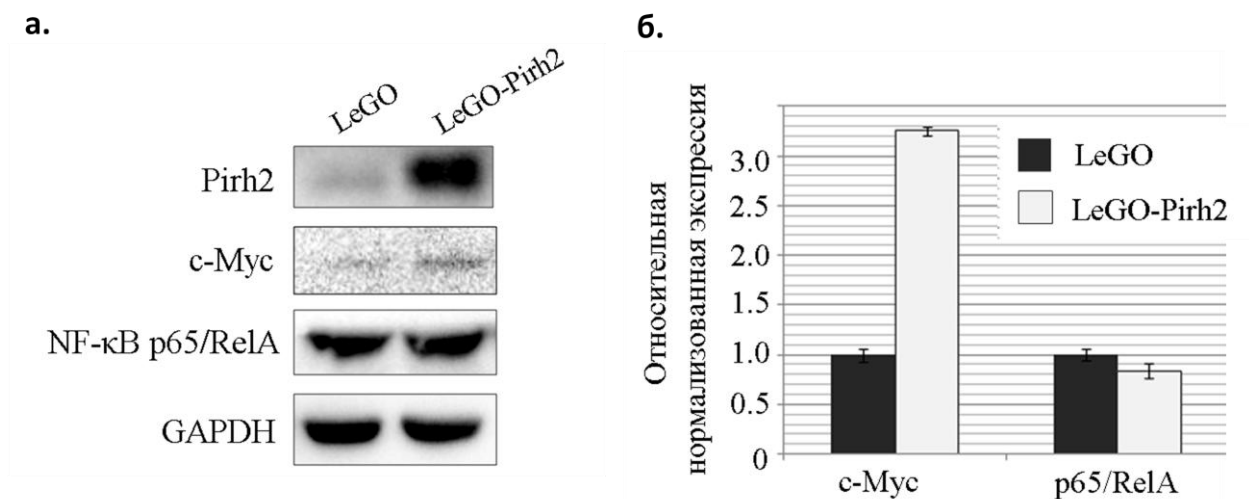


Рисунок 30. Влияние эктопической экспрессии Pirh2 на уровень белка (а.) и мРНК (б.) регуляторов клеточной пролиферации c-Myc и p65 (активной субъединицы NF-κB). Контроль нагрузки и нормализация экспрессии – GAPDH.

Чтобы выяснить, наблюдается ли данный эффект на уровне транскрипции, мы осуществили ОТ-ПРЦ в РВ с праймерами, специфичными к транскриптам генов, кодирующих p65/RelA субъединицу NF-κB и c-Myc. В результате мы показали, что уровень мРНК p65/RelA в двух исследуемых изогенных линиях практически не отличается, в то время как уровень мРНК c-Myc повышен в клетках линии H1299 LeGO-Pirh2 более чем в 3 раза по сравнению с контролем, что согласуется с данными вестерн-блот анализа.

Выявив корреляцию между экспрессией Pirh2 и онкогена c-Myc в клетках НМККЛ H1299, мы осуществили биоинформатический анализ зависимости выживаемости пациентов с раком легкого от ко-экспрессии данных генов. Биоинформатический анализ данных по экспрессии генов и выживаемости пациентов (база данных Omnibus), находящихся в свободном доступе, осуществлялся с помощью ресурса SynTarget (Antonov, 2011; Amelio et al., 2016). На рисунке 31 представлены кривые Каплана-Мейера, демонстрирующие выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком легкого (31,а) и I-II стадией аденокарциномы легкого (31,б) в зависимости от ко-экспрессии Pirh2 и c-Myc. Мы обнаружили, что повышенная экспрессия двух

данных генов снижает вероятность благоприятного исхода при плоскоклеточном раке легкого (31,а), в то время как пониженная экспрессия обоих генов является благоприятным прогностическим признаком для пациентов с аденокарциномой (31,б).

Таким образом, мы предполагаем, что одним из возможных механизмов, обуславливающих способность белка Pirh2 активировать пролиферацию и миграционную способность клеток H1299, а также повышать их устойчивость к доксорубину является Pirh2-опосредованная активация экспрессии онкогенного белка с-Мус, участвующего в формировании перечисленных свойств.

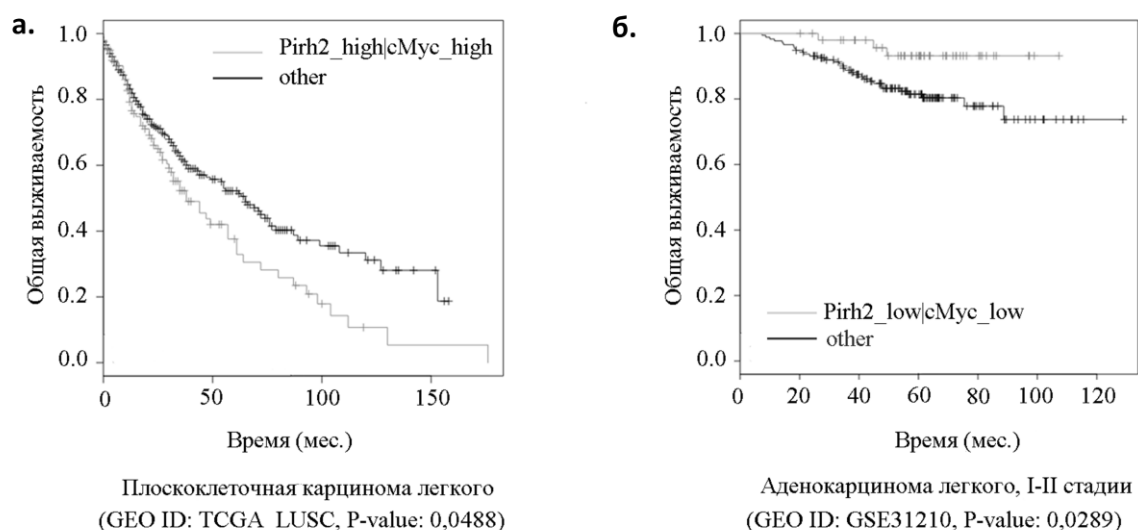


Рисунок 31. Влияние ко-экспрессии Pirh2 и с-Мус на выживаемость пациентов с раком легкого.

(а.) Кривые Каплана-Мейера, демонстрирующие выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком легкого при одновременно повышенной экспрессии генов, кодирующих Pirh2 и с-Мус (Pirh2_high|cMyc_high) и пациентов, не входящих в данную группу (other). **(б.)** Кривые Каплана-Мейера, демонстрирующие выживаемость пациентов с I-II стадией аденокарциномы легкого при одновременно сниженной экспрессии генов, кодирующих Pirh2 и с-Мус (Pirh2_low|cMyc_low) и пациентов, не входящих в данную группу (other). GEO ID – идентификатор базы данных Omnibus. P-value – статистическая достоверность (F-критерий).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 УБИКВИТИНЛИГАЗА Pirh2 – НОВАЯ ТРАНСКРИПЦИОННАЯ МИШЕНЬ БЕЛКА p63

Как было описано в главе «Обзор литературы», транскрипционные факторы p53, p63 и p73 имеют большое количество общих генов-мишеней. Также было показано, что данные белки способны распознавать сайты связывания p53 в промотерных областях генов. Однако, несмотря на структурную и функциональную гомологию, белки p63 и p73 имеют уникальные функции и транскрипционные программы.

Ранее было показано, что ген *RCHY1*, кодирующий Pirh2, является транскрипционной мишенью фактора p53 (Leng et al., 2003). Однако способен ли белок p63 активировать транскрипцию *RCHY1* до сих пор оставалось неизвестным.

Группой ученых Lin с соавт. (Lin et al., 2009) было проведено исследование, целью которого была идентификация уникальных транскрипционных мишеней p63 и p73. Исследование заключалось в определении изменения транскриптомов мышечных эмбриональных фибробластов (MEF) после осуществления нокаута генов, кодирующих p53, p63 и p73 (по отдельности и в комбинации) после индукции повреждения ДНК доксорубицином. В результате, наряду с общими генами-мишенями, чей транскрипционный статус снижался во всех типах нокаутов, для каждого из трех транскрипционных факторов было выявлено большое количество уникальных генов-мишеней (рис. 32) (Lin et al., 2009).

Таким образом, нашей целью было определить, относится ли ген, кодирующий Pirh2, к группе p53-активируемых генов (обозначена красным цветом на рис. 32), или его транскрипция регулируется также фактором p63. В результате нашей работы мы впервые показали, что фактор p63 активирует транскрипцию Pirh2 в отсутствие его основного транскрипционного регулятора p53.

Известно, что более 50% всех злокачественных новообразований

характеризуется отсутствием или мутациями p53. При этом инактивирующие мутации p63 и p73 в опухолевых клетках встречаются сравнительно редко. Учитывая тот факт, что уровень экспрессии p63 и p73 в различных тканях значительно различается (см., например, genevestigator.com), есть основания предполагать, что при потере функции p53, в зависимости от типа ткани, либо p63, либо p73 способны осуществлять компенсаторную активацию экспрессии Pirh2.

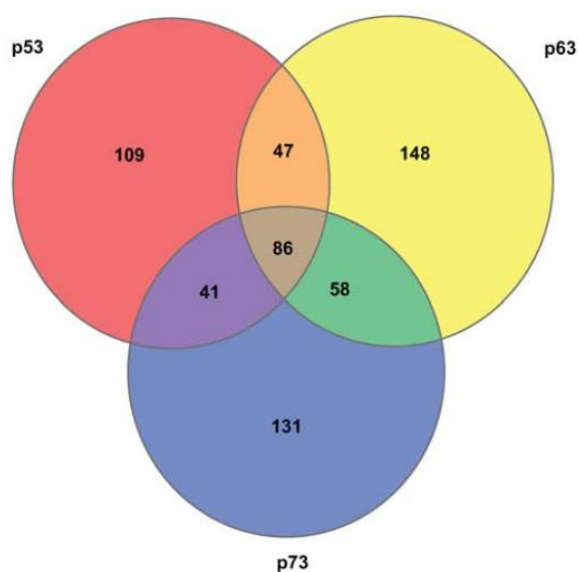


Рисунок 32. Диаграмма Эйлера-Венна, демонстрирующая количество генов, экспрессия которых была снижена при нокауте транскрипционных факторов p53, p63 и p73 по отдельности и в сочетании.

Экспрессия 86 генов (коричневый) снижается в отсутствие всех трех членов семейства p53. Количество генов, экспрессия которых снижается в отсутствие каждого члена семейства p53 по отдельности: 109 в p53^{-/-} клетках (красный), 148 в p63^{-/-} клетках (желтый), и 131 в p73^{-/-} (синий). Количество генов, экспрессия которых снижается в отсутствие двух членов семейства p53: 47 в p53^{-/-} / p63^{-/-} клетках (оранжевый), 58 в p63^{-/-} / p73^{-/-} (зеленый), и 41 в p53^{-/-} / p73^{-/-} клетках (фиолетовый). (Lin et al., 2009)

Для фактора p63 (как и для p73) показано наличие нескольких транскрипционных и сплайсинговых изоформ, различающихся амино- и карбоксиконцевыми доменами. Основные функциональные различия

характерны для двух групп N-концевых изоформ: изоформ TAr63, имеющих в составе трансактивационный (ТА) домен, и изоформ ΔNr63 с отсутствующим ТА-доменом. Изоформы ΔNr63 образуются в результате транскрипции, начинающейся с альтернативного промотора (Yang et al., 1998). Ранее предполагалось, что способностью активировать транскрипцию обладают только полноразмерные ТА-изоформы p63, наиболее известные гены-мишени которых, как и в случае p53, вовлечены в активацию апоптоза, ответ на генотоксический стресс и остановку клеточного цикла. Однако впоследствии выяснилось, что ΔNr63 способен регулировать экспрессию генов, вовлеченных в морфогенез и дифференцировку эпителиев, и играет важную роль в формировании эпителиальных тканей (Yang et al., 1999).

Современная парадигма подразумевает, что TAr63 является онкосупрессором, оказывая на клетки сходное с p53 действие - способствует остановке клеточного цикла и апоптозу за счет активации p53-зависимых мишеней (таких как p21, Puma, Bax и др.), в то время как, ΔNr63 обладает доминантно-негативным действием и ингибирует активность p53, p73, а также TAr63, усиливая пролиферацию, дифференцировку и предотвращая клеточную гибель (Yang et al., 1998; Bergholz and Xiao, 2012). Соответственно, из-за своего доминантно-негативного действия на белки семейства p53, а также повышенной экспрессии во многих типах опухолей, например, раке молочной железы (Leong et al., 2007), раке легкого (Massion et al., 2003; Massion et al., 2004), раке предстательной железы (Grisanzio and Signoretti, 2008) и др., изоформы ΔNr63 принято считать онкогенами.

Таким образом, вопрос, какая именно изоформа p63 – TAr63 или ΔNr63 - способна активировать Pirh2 является принципиальным. В результате нашего исследования мы показали, что TAr63α – онкосупрессорная полноразмерная изоформа белка p63 является активатором экспрессии Pirh2 как на уровне белка, так и на уровне РНК, что говорит в пользу участия Pirh2 процессах, регулируемых данной изоформой, а именно: регуляции клеточного цикла, клеточном старении и клеточной гибели.

4.2 PIRH2 УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ НЕКАНОНИЧЕСКОГО ГИСТОНА H2A.Z

Основу хроматина составляют нуклеосомы, в классическом варианте представленные белковыми октамерами, включающими гистоны H2A, H2B, H3 и H4, на которые «намотаны» участки ДНК длиной 146 пар оснований (Luger et al., 1997). При этом хроматин имеет крайне динамичную структуру, регуляция которой осуществляется несколькими механизмами, включая ремоделирование (перестройка), посттрансляционные модификации, а также включение в состав нуклеосомы неканонических (вариантных) гистонов.

Семейство гистонов H2A является наиболее многочисленным из всех семейств коровых гистонов. Так, у человека оно включает 19 белков, большая часть которых относится к каноническим гистонам H2A, имеющим очень высокую степень гомологии. Хроматин млекопитающих также включает неканонические варианты H2A.X, H2A.Z, macroH2A, H2A.B, H2A.J и их сплайс-изоформы, которые различающиеся в значительно большей степени (Bönisch and Hake, 2012). Стоит отметить, что канонические гистоны H2A, а также варианты формы H2A.X и H2A.Z являются высококонсервативными и присутствуют в клетках практически всех живых организмов (Talbert and Henikoff, 2010).

Известно, что гистоновый вариант H2A.X принимает участие в ответе на повреждение ДНК. Его фосфорилированная форма γ H2A.X является одним из компонентов фокусов репарации (Rogakou et al., 1999), образующихся в местах двуцепочечных разрывов, и обеспечивающим маркирование поврежденных сайтов, а также привлечение факторов ремоделирования хроматина (Pinto and Flaus, 2010).

Гистон H2A.Z в свою очередь оказывает разнообразные эффекты на клеточные процессы и события, такие как регуляция транскрипции, формирование эпигенетической памяти (Brickner et al., 2007), распространение гетерохроматина (Meneghini et al., 2003), обеспечение стабильности генома (Rangasamy et al., 2003; Greaves et al., 2007; Kelly et al., 2010) и сегрегация хромосом (Rangasamy et al., 2004). Кроме того при генотоксическом стрессе

H2A.Z встраивается в нуклеосому в местах двуцепочечных разрывов ДНК, обеспечивая формирование «развернутой» конформации хроматина, что способствует модификации других гистонов и привлечению поврежденным сайтам таких факторов репарации как BRCA1 и ku70/80 (Xu et al., 2012).

Уже несколько десятилетий активно исследуется участие гистонов в регуляции экспрессии генов. Так, в 1986 году группа ученых C.D. Allis с соавт. показала, что данный гистон присутствует исключительно в хроматине макронуклеуса *T. thermophila*, в котором, в отличие от микронуклеуса, протекает транскрипция генов, и предположила исключительную роль H2A.Z в организации активного хроматина (Allis et al., 1986). Более поздние исследования, основанные на методиках ChIP (хроматиновая иммунопреципитация) и ChIP-Seq (хроматиновая иммунопреципитация с последующим секвенированием) подтвердили данное предположение. Действительно, промотерные области генов дрожжей (Guillemette et al., 2005; Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005) и высших эукариот (Barski et al., 2007; Schones et al., 2008), а также регуляторные области, такие как энхансеры и инсуляторы, обогащены гистоном H2A.Z (Barski et al., 2007; Schones et al., 2008; Zlatanova and Thakar, 2008). Несмотря на то, что в основном H2A.Z является позитивным регулятором экспрессии, он также способен оказывать негативное влияние на транскрипцию определенных генов, например, гена *CDKN1A*, кодирующего белок p21 (Gévry et al., 2007).

Особое внимание стоит обратить на опухолевую роль H2A.Z. Так повышенная экспрессия данного вариантного гистона показана для колоректального рака (Dunican et al., 2002), различных типов рака молочной железы, где H2A.Z является положительным регулятором экспрессии мишеней эстрогенового рецептора (ER) и c-Мyc (Zucchi et al., 2004; Hua et al., 2008; Svtelis et al., 2010), меланомы (Karpoor et al., 2010) и рака предстательной железы (Dryhurst et al., 2012; Valdés-Mora et al., 2012).

Данная функциональная многогранность по крайней мере частично объясняется наличием посттрансляционных модификаций гистона H2A.Z и их различным влиянием на функцию данного гистона.

Как показано на рисунке 33, гистон H2A.Z подвергается таким

модификациям, как ацетилирование, метилирование и убиквитинирование.

Ацетилирование H2A.Z, по-видимому, обеспечивается белком Tip60 - субъединицей Nu4A комплекса, участвующего в модификации и замене гистонов семейства H2A – и предшествует его встраиванию в нуклеосому (Sevilla and Binda, 2014). Показано, что ацетилированная форма данного гистона локализуется в активнотранскрибируемых участках хроматина клеток рака предстательной железы LNCaP PrEC (Valdés-Mora et al., 2012), а также играет важную роль на определенных стадиях эмбрионального развития млекопитающих

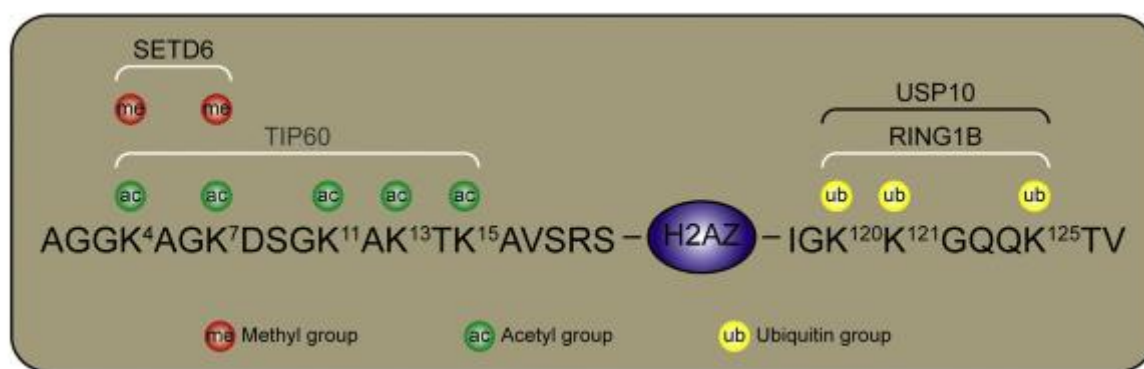


Рисунок 33. Основные модификации гистона H2A.Z. (Sevilla and Binda, 2014).

Methyl group – метильная группа; *acethyl group* – ацетильная группа; *ubiquitin group* – убиквитиновая группа. SETD6- метилтрансфераза, USP10- деубиквитиниза, TIP60 - ацетилтрансфераза, RING1B – убиквитинлигаза.

(Bošković et al., 2012). Ранее было показано, что Pirh2 взаимодействует с ацетилтрансферазой Tip60, которая стабилизирует его и способствует его ядерной локализации (Logan et al., 2004). При этом полученные нами данные свидетельствуют о взаимодействии Pirh2 с другими субъединицами комплекса Nu4A: RUVBL1 и RUVBL2. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что Pirh2 принимает участие в модификации и замене гистонов семейства H2A, в частности H2A.Z.

Метилирование H2A.Z является модификацией, конкурирующей за сайты K4 и K7 с ацетилированием, и осуществляется метилтрансферазами

SETD6 и SET7. Являясь негативным регулятором экспрессии генов, метилированный H2AZ играет важнейшую роль в сохранении свойств стволовости эмбриональными стволовыми клетками млекопитающих (Binda et al., 2013). Так, подавление H2A.Z-специфичных метилтрансфераз в стволовых клетках мыши приводит к дифференцировке, подавлению самообновления снижению способности образовывать колонии (Binda et al., 2013).

Помимо ацетилирования и метилирования для гистонов семейства H2A показана модификация остатками убиквитинов (Wang et al., 2004; Cao et al., 2005). В частности, на сегодняшний день известно, что гистон H2A.Z убиквитинируется по трем остаткам лизина в карбоксиконцевом участке: K120, K121 и K125 RING-домен содержащей убиквитинлигазой RING1B (Sarcinella et al., 2007). При этом данная модификация удаляется деубиквитиной USP10 (Draker et al., 2011).

Убиквитинированный H2A.Z, по всей видимости, является маркером молчащих генов и факультативного гетерохроматина, так как им обогащена инактивированная X хромосома (Sarcinella et al., 2007). При этом удаление убиквитинированного H2A.Z с промотерных областей генов *PSA* и *KLK3* приводит к активации их экспрессии (Draker et al., 2011).

Мы показали, что убиквитинлигаза Pirh2 физически взаимодействует с гистоном H2A.Z (рис. 15), убиквитинирует его (рис. 16), но при этом данная модификация не является сигналом для протеасомной деградации данного гистона (рис. 17). Соответственно, мы предполагаем, что белок Pirh2, как убиквитинлигаза H2A.Z, принимает участие в H2A.Z-опосредованном подавлении экспрессии генов, и, соответственно в таких процессах как сохранение стабильности генома, клеточное деление и опухолевая трансформация клеток.

Как и E3-лигаза RING1B, убиквитинирующая гистоны H2A.Z, H2A.X и канонический гистон H2A (Sarcinella et al., 2007), (Leung et al., 2014), Pirh2 является RING-домен содержащей убиквитинлигазой. Основываясь на данных GST-пулдауна и масс-спектрометрии о том, что Pirh2 взаимодействует с гистоном H2A, мы предполагаем, что данная убиквитинлигаза может также модифицировать гистоны H2A.X и H2A, и влиять на их функции. Кроме того,

мы показали, что в интерактоме Pirh2 представлены такие белки, участвующие в смене гистонов семейства H2A, как обе субъединицы комплекса FACT, субъединицы комплекса INO80, а также белок Spt6 (Таб. 2 и 4, рис.13), что также свидетельствует об участии Pirh2 в данных процессах. Безусловно, роль белка Pirh2 в процессах модификации и смены гистонов H2A требует дальнейшего исследования, однако, мы предполагаем, что эта роль является очень значительной.

4.3 РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК ELAV1/HUR – НОВАЯ МИШЕНЬ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2

Белок Elavl1/HuR – продукт гена человека *ELAVL1* (embryonic lethal abnormal vision) – был впервые обнаружен как ключевой участник нейронального развития (Campos and White, 1985). Elavl1/HuR представляет собой РНК-связывающий белок семейства ELAV, также включающего белки HuB, HuC и HuD, которые в отличие от HuR экспрессируются только в нейрональных тканях (Robinow et al., 1988).

В структуре белка Elavl1/HuR имеется три РНК-связывающих мотива (RRM), с помощью которых происходит взаимодействие с РНК-мишенями. Как правило, это AU-богатые 3'- и 5'-нетранслируемые элементы (de Silanes et al., 2004). Связываясь с данными участками, Elavl1/HuR стабилизирует мРНК генов, кодирующих p21 (Wang et al., 2000b), c-fos (Shyu et al., 1989), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) (Levy et al., 1998), сиртуин 1 (Sirt1) (Abdelmohsen et al., 2007), p53 (Mazan-Mamczarz et al., 2003), фактор некроза опухолей TNF α (Atasoy et al., 2003), Bcl-2 (Ishimaru et al., 2009), циклооксигеназу COX-2 (Sengupta et al., 2003), циклины A2, B1, E, D1 (Wang et al., 2000a; Lal et al., 2004; Guo and Hartley, 2006) и другие белки. Механизм, за счет которого Elavl1/HuR выполняет функцию стабилизатора мРНК исследован недостаточно. По-видимому, Elavl1/HuR конкурирует с другими РНК-связывающими белками, которые, взаимодействуя с теми же РНК-мишенями, направляют их в клеточные структуры, ответственные за деградацию мРНК, такие как экзосомы и Р-тельца (Chen et al., 2001; Butler, 2002; Cougot et al.,

2004; Kedersha et al., 2005).

Помимо стабилизации мРНК, Elavl1/HuR также способен ингибировать трансляцию ряда генов-мишеней, кодирующих ключевые регуляторы клеточного цикла и пролиферации, например, p27 (Kullmann et al., 2002), c-Мус (Kim et al., 2009), BRCA1 (Saunus et al., 2008) и Wnt5a (Leandersson et al., 2006). Известно, что Elavl1/HuR взаимодействует с участками внутренней посадки рибосомы (IRES элементами) в 5'-нетранслируемой области, подавляя инициацию трансляции (Leandersson et al., 2006; Kurosu et al., 2011). Кроме того, было показано, что Elavl1/HuR ингибирует экспрессию c-Мус, привлекая к его мРНК комплекс RISC (Kim et al., 2009). Стоит отметить, что функцию регуляции экспрессии генов за счет стабилизации мРНК и модуляции активности трансляции белок Elavl1/HuR выполняет в цитоплазме клетки. При этом локализуется он как в цитоплазме, так и в ядре.

Еще одной ключевой функцией белка Elavl1/HuR (а именно его ядерной фракции) является экспорт мРНК из ядра. Более конкретно, Elavl1/HuR выполняет функцию адаптера между мРНК, связываясь с нетранслируемыми участками, и экспортином CRM1, образуя единый РНК-белковый комплекс, подлежащий экспорту через ядерный поровый комплекс (Gallouzi et al., 2001). В составе Elavl1/HuR присутствует шарнирный домен HNS (nucleocytoplasmic shuttling sequence), обеспечивающий данному белку курсировать сквозь ядерную пору (Fan and Steitz, 1998).

Анализируя список мишеней, экспрессию которых регулирует Elavl1/HuR, можно предположить его противоречивую роль в канцерогенезе. Так, в качестве онкогенных свойств можно перечислить, например, стабилизацию мРНК c-fos, циклинов, Bcl-2? Циклооксигеназы COX-2 и подавление трансляции p27, BRCA1 и Wnt5a. При этом, Elavl1/HuR усиливает экспрессию таких белков, как p53, p21, а также подавляет c-Мус, что позволяет его рассматривать в качестве потенциального онкосупрессора.

Действительно, повышенное содержание Elavl1/HuR в цитоплазме клеток аденокарциномы легкого является прогностическим фактором неблагоприятного исхода и риска метастазирования (Lauriola et al., 2012). Однако, для рака поджелудочной железы наличие цитоплазматического

Elavl1/HuR служит благоприятным признаком при прогнозе исхода заболевания и чувствительности опухоли к гемцитабину (Costantino et al., 2009; Richards et al., 2010). Большая часть исследований Elavl1/HuR в качестве прогностического маркера демонстрирует отсутствие влияния ядерной фракции данного белка на исход заболевания, агрессивность, метастазирование и чувствительность к препаратам, однако, Yi с соавт. показали, что повышенное содержание Elavl1/HuR в ядре коррелирует со сниженной выживаемостью пациентов с раком яичника (Yi et al., 2009). Исследование 560 образцов рака предстательной железы с помощью микрочипов и количественного анализа иммунофлуоресценции выявили связь повышенной экспрессии Elavl1/HuR с неблагоприятным прогнозом (Yoo et al., 2009), в то время как в результате исследования клинических образцов рака молочной железы были сделаны обратные выводы (Yuan et al., 2011).

Описанные примеры демонстрируют, что, несмотря на то, что Elavl1/HuR является позитивным регулятором таких процессов как ангиогенез, пролиферация, инвазия и т.д., его роль в канцерогенезе, по-видимому, мультифункциональна, и зависит от клеточного контекста, локализации и модификаций Elavl1/HuR.

На сегодняшний день известно, что Elavl1/HuR подвергается таким посттрансляционным модификациям, как фосфорилирование, метилирование и убиквитинирование (рис. 34). Так, фосфорилирование Elavl1/HuR по сайтам S88 и S100 киназой Chk2 способствует его диссоциации с мРНК Sirt1 и с-Мус, в результате чего экспрессия Sirt1 снижается, а с-Мус, соответственно, повышается (Abdelmohsen et al., 2007; Liu et al., 2009). Протеинкиназа PKC фосфорилирует Elavl1/HuR по сайтам S158 и S221, что является сигналом для экспорта из ядра и способствует его взаимодействию с мРНК (Doller et al., 2007). Метилирование метилтрансферазой CARM1 по сайту R217 является активирующей модификацией, способствующей связыванию Elavl1/HuR с мРНК генов-мишеней (Li et al., 2002), при этом нокдаун данного фермента в клетках приводит к подавлению мРНК-стабилизирующей функции Elavl1/HuR (Pang et al., 2013).

Кроме того, было показано, что РНК-связывающий белок Elavl1/HuR

подвергается убиквитинированию по сайту K182 (рис. 34) в ответ на тепловой шок, и данная модификация способствует его протеасомной деградации (Abdelmohsen et al., 2009). При этом, на сегодняшний день не было данных о том, какой именно E3-лигазой осуществляется убиквитинирование.

Учитывая значимость роли белка Elavl1/HuR в таких ключевых клеточных процессах как пролиферация, миграция и опухолевая трансформация, выявив его среди интерактантов Pirh2, мы продолжили исследование данного взаимодействия.

Удостоверившись в том, что данные белки физически взаимодействуют путем реципрокного GST-пулдауна и ко-иммунопреципитации (рис. 18), мы исследовали Pirh2-зависимое убиквитинирование Elavl1/HuR. В результате, нами было показано, что Pirh2 является E3-лигазой Elavl1/HuR и обеспечивает его полиубиквитинирование *in vivo* (рис. 19). При этом, с помощью экспериментов с циклогексимидом, блокирующим синтез белка в клетке, мы показали, что данная модификация является сигналом для деградации Elavl1/HuR (рис. 20). Таким образом, нами был обнаружен новый ключевой регулятор РНК-связывающего белка Elavl1/HuR, и, соответственно, процессов, в которых он принимает участие.

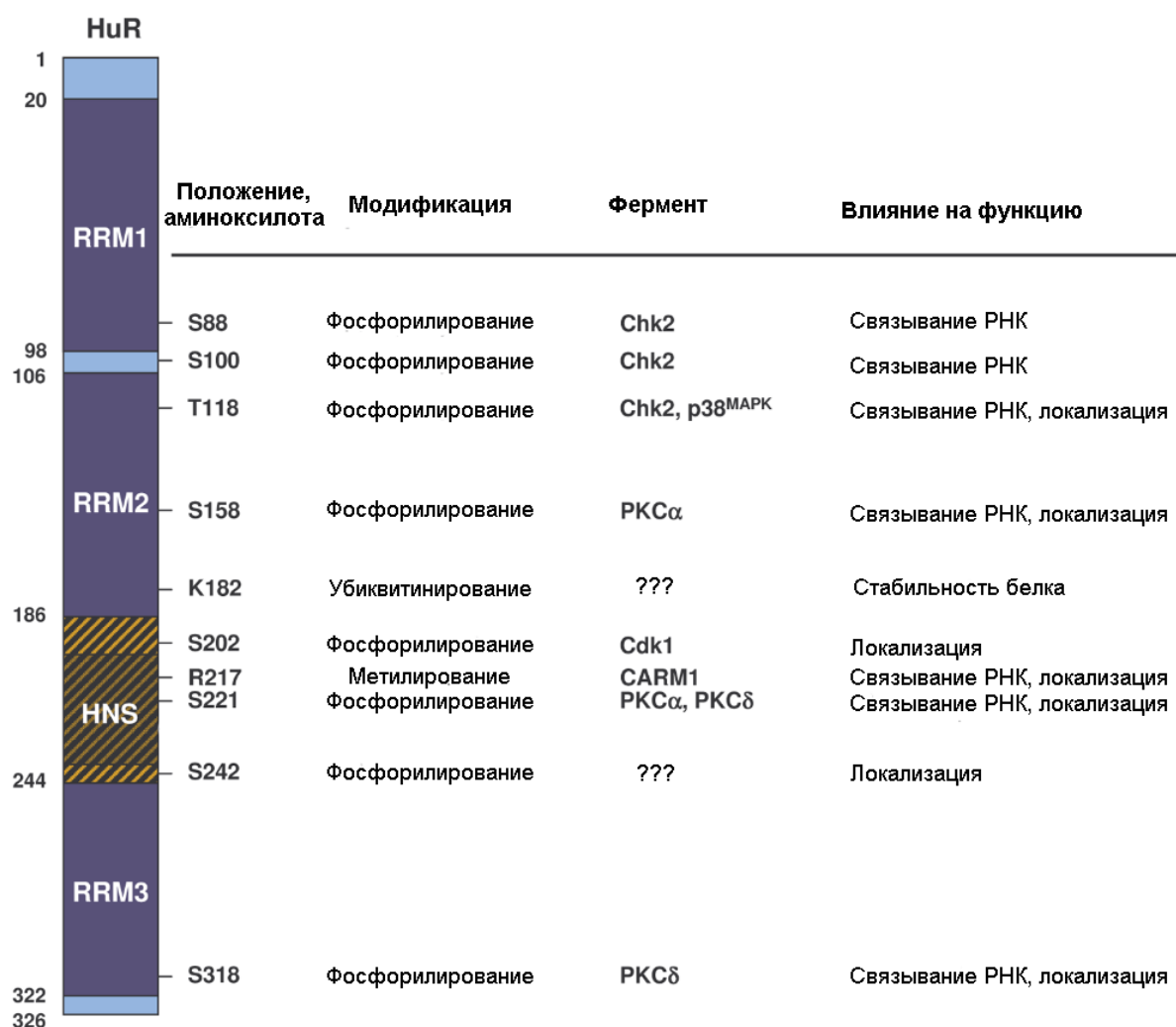


Рисунок 34. Посттрансляционные модификации белка Elavl1/HuR. RRM – РНК-связывающий мотив; HNS – nucleocytoplasmic shuttling sequence. По (Abdelmohsen and Gorospe, 2010).

Анализируя данные масс-спектрометрического анализа интерактома Pirh2, мы также обратили внимание на группу белков, участвующих в экспорте РНК из ядра. На рисунке 35 представлена схема CRM1-зависимого ядерно-цитоплазматического транспорта РНК из ядра с выделенными интерактантами Pirh2, для которых указаны названия генов и количество выявленных пептидов.

Известно, что с помощью CRM1-зависимого механизма из ядра экспортируются рРНК, мРНК U, а также мРНК. Белок CRM1 относится к семейству импортинов-бета и для экспорта РНК из ядра ему требуются

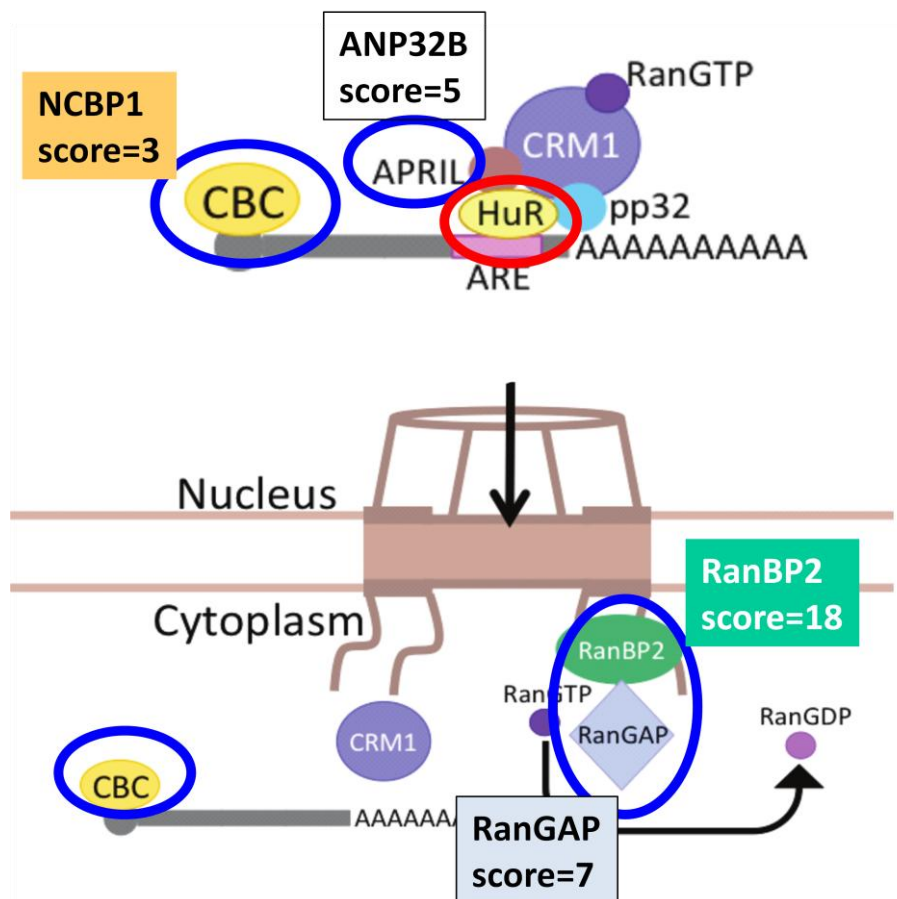


Рисунок 35. Схематическое изображение экспорта РНК из ядра (Okamura et al., 2015) с модификациями автора.

CBC – cap binding complex. Синим цветом выделены интерактанты Pirh2, определенные с помощью GST-пулдауна с последующей масс-спектрометрией. Красным выделен белок Elavl1/HuR – подтвержденная нами мишень убиквитинлигазы Pirh2.

адаптерные белки. В случае мРНК, содержащей ARE-элементы такими адаптерами служат Elavl1/HuR, APRIL и pp32, два из которых (Elavl1/HuR и APRIL) являются интерактантами Pirh2 (рис.35). Как известно, способность кариоферринов, в том числе белка CRM1, удерживать субстрат регулируется белком Ran. RanGTP способствует прочной связи CRM1 и РНК-белкового комплекса, которая должна быть разрушена после попадания данного комплекса в цитоплазму. Гидролиз GTP с образованием RanGDP обеспечивает разрушение комплекса CRM1 с грузом и осуществляется комплексом белков RanBP2 и RanGAP (Bernad et al., 2004), которые также являются

интерактантами Pirh2 (рис. 35). Стоит отметить, что на этапе выхода в цитоплазму и гидролиза RanGTP ключевую роль играют нуклеопорины Nup358, Nup88 и Nup 214 (Bernad et al., 2004), также выявленные в интерактоме Pirh2.

Соответственно, мы считаем, что белок Pirh2 играет важную роль в экспорте мРНК из ядра, и это направление, несомненно, требует дальнейших исследований.

4.4 PIRH2 УСИЛИВАЕТ ТУМОРОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК H1299

Недавние исследования E3-лигазы Pirh2 выявили ее участие в таких клеточных процессах как запуск апоптоза, пролиферация, продвижение по клеточному циклу и репарация ДНК как в p53-зависимом, так и p53-независимом клеточном контексте. Так, среди мишеней Pirh2 можно выделить все три члена белкового семейства p53 (p53, p63, p73), Chk2, p27, Polη (Leng et al., 2003; Hattori et al., 2007; Jung et al., 2010; Jung et al., 2011b; Wu et al., 2011; Bohgaki et al., 2013; Jung et al., 2013). При этом роль Pirh2 в канцерогенезе достаточно противоречива: литературные данные свидетельствуют как об отрицательном, так и о положительном влиянии повышенной экспрессии Pirh2 на исход раковых заболеваний (Duan et al., 2004; Logan et al., 2006; Nakem et al., 2011).

Данные, полученные нами в ходе исследования свидетельствуют об онкогенной роли Pirh2 в НМККЛ человека. Так, эктопическая экспрессия Pirh2 в клетках линии H1299 повышает их пролиферативный потенциал, способность к миграции а также устойчивость к ДНК-повреждающему агенту доксорубину. Полученные нами результаты согласуются с предыдущими исследованиями. Например, группа Yuan с соавт. показала, что нокдаун Pirh2 с помощью малых шпилечных РНК (shRNA) вызывает снижение пролиферативной активности и повышает p53-индуцированный апоптоз в клетках НМККЛ A549 (Yuan et al., 2008). Авторы данной работы предполагают, что наблюдаемые эффекты вызваны подавлением убиквитинлигазной

активности Pirh2 в отношении ингибитора циклин-зависимой киназы p27, однако данное предположение никак требует экспериментального подтверждения.

Еще одно исследование, проведенное на линии H1299, демонстрирует, что в результате нокдауна Pirh2 с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) наблюдается снижение способности клеток образовывать колонии (Jung et al., 2011b). Jung с соавт. также показали, что эктопическая экспрессия Pirh2 вызывает уменьшение количества клеток H1299, находящихся в субG1-фазе, после обработки доксорубицином, что свидетельствует о сниженном уровне апоптоза (Jung et al., 2011b).

Повышенная устойчивость к фармакологическим препаратам также является отличительной чертой агрессивных опухолей. Проанализировав влияние Pirh2 на чувствительность клеток к двум фармакологическим агентам с различным механизмом действия - доксорубицину и цисплатину, мы показали, что экзогенная экспрессия Pirh2 повышает устойчивость клеток к доксорубицину, но не цисплатину (рис. 28). Мы также подтвердили данный эффект, подавив экспрессию Pirh2 с помощью малых шпилечных РНК (shRNA) и показав, что нокдаун Pirh2 способствует повышенной чувствительности клеток H1299 к доксорубицину по сравнению с контролем (рис. 29).

Известно, что доксорубин вызывает двуцепочечные разрывы ДНК, ингибируя ДНК-топоизомеразу II. В ответ на обработку доксорубицином в клетках активируются таких репаративные механизмы, как гомологичная рекомбинация (HR) и нехомологичное соединение концов (NHEJ). Цисплатин же образует сшивки пуриновых оснований одной цепи и индуцирует в основном эксцизионную репарацию (BER и NER) (Furuta et al., 2002). Основываясь на наших данных, мы предполагаем, что Pirh2 способствует репарации двуцепочечных разрывов, однако участие в данных процессах убиквитинлигазы Pirh2 требует дополнительных исследований.

Известно, что способность клеток к миграции и инвазии обеспечивает возможность образовывать опухолевые метастазы. Данный процесс включает этап эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП) клеток, на котором помимо прочего происходит подавление экспрессии эпителиального маркера E-

кадгерина и активация мезенхимного фактора виментина (Mani et al., 2008). Мы показали, что Pirh2 способствует повышению миграционного потенциала клеток H1299, а также подавляет уровень Е-кадгерина как на уровне белка, так и на уровне мРНК. При этом нокдаун Pirh2 оказывает обратный эффект на Е-кадгерин (рис. 26 и 27). Мы предполагаем, что Pirh2-зависимое снижение уровня кадгерина не является результатом прямого взаимодействия, а происходит опосредованно через транскрипционные факторы, однако данный феномен требует дальнейших исследований. Нужно отметить, что поскольку клетки линии H1299 представляют собой карциному легкого, то они уже претерпели эпителиально-мезенхимный переход. Тем не менее, дальнейшее снижение экспрессии Е-кадгерина в этих клетках способствует их подвижности и заполнению новых ниш в пораженных органах.

Для того, чтобы приблизиться к пониманию молекулярных механизмов, ответственных за влияние Pirh2 на опухолевые свойства клеток, мы решили проанализировать уровень ключевых регуляторов пролиферации и миграции с-Мус и NF-κB (Higgins et al., 1993; Schmidt, 1999; Waikel et al., 2001; Karin, 2006) в клетках с эктопической экспрессией Pirh2. В результате мы показали, что уровень Pirh2 не влияет на количество NF-κB, но с удивлением обнаружили, что повышенная экспрессия Pirh2 ассоциирована со стабилизацией с-Мус на уровне белка, а также с повышением количества его мРНК (рис. 30).

При этом важно отметить, что Pirh2 является E3-лигазой, убиквитинирующей белок с-Мус и направляющей его на протеасомную деградацию (Nakem et al., 2011). Мы склонны объяснить данный феномен непрямой регуляцией белка с-Мус белком Pirh2. Так, например, белок p73, экспрессирующийся в клетках H1299 и направляемый на деградацию убиквитинлигазой Pirh2, способен репрессировать с-Мус (Kartasheva et al., 2003; Jung et al., 2011b). Соответственно, при повышении уровня Pirh2, уровень p73 может снижаться, что, возможно, влечет за собой подавление репрессорного действия p73 на с-Мус. Однако данное предположение требует экспериментальных подтверждений.

Кроме того, было показано, что с-Мус способен подавлять экспрессию Е-кадгерина путем активации Е-кадгерин-специфичной микроРНК miR-9 (Ma et

al., 2010), что согласуется с полученными нами данными.

В заключение необходимо отметить, что данное исследование свидетельствует в пользу p53-независимой онкогенной роли Pirh2 в клетках НМККЛ, заключающейся в Pirh2-опосредованном повышении пролиферативного и миграционного потенциала клеток, а также их устойчивости к химиотерапевтическому препарату доксорубицину. Таким образом, Pirh2 может рассматриваться как потенциальная мишень для разработки противоопухолевых препаратов в p53-негативных типах опухолей.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Полноразмерная изоформа транскрипционного фактора p63 активирует экспрессию гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2.
2. Идентифицировано более 200 ранее не известных белков, взаимодействующих с убиквитинлигазой Pirh2. Многие из них регулируют такие клеточные процессы, как экспрессия генов, реорганизация хроматина, сплайсинг и процессинг РНК, репарация ДНК, и играют важную роль в канцерогенезе.
3. Убиквитинлигаза Pirh2 взаимодействует с неканоническим гистоновым вариантом H2A.Z и осуществляет его моноубиквитинирование.
4. Pirh2 полиубиквитинирует и направляет на деградацию РНК-связывающий белок Elavl1/HuR.
5. Белок Pirh2 способствует повышению пролиферативной активности, способности к миграции и устойчивости к доксорубину клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека H1299.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdelmohsen K., Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR // Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2010.- V.1.-№ 2.- P. 214-229.
2. Abdelmohsen K., Pullmann R., Lal A., Kim H.H., Galban S., Yang X., Blethrow J.D., Walker M., Shubert J., Gillespie D.A. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression // Mol Cell. 2007.- V.25.-№ 4.- P. 543-557.
3. Abdelmohsen K., Srikantan S., Yang X., Lal A., Kim H.H., Kuwano Y., Galban S., Becker K.G., Kamara D., de Cabo R. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock // The EMBO journal. 2009.- V.28.-№ 9.- P. 1271-1282.
4. Allis C.D., Richman R., Gorovsky M., Ziegler Y., Touchstone B., Bradley W., Cook R. hv1 is an evolutionarily conserved H2A variant that is preferentially associated with active genes // Journal of Biological Chemistry. 1986.- V.261.-№ 4.- P. 1941-1948.
5. Amelio I., Tsvetkov P., Knight R., Lisitsa A., Melino G., Antonov A. SynTarget: an online tool to test the synergetic effect of genes on survival outcome in cancer // Cell Death & Differentiation. 2016.- V.-№.- P.
6. Antonov A.V. BioProfiling. de: analytical web portal for high-throughput cell biology // Nucleic acids research. 2011.- V.-№.- P. gkr372.
7. Atasoy U., Curry S.L., de Silanes I.L., Shyu A.-B., Casolaro V., Gorospe M., Stellato C. Regulation of eotaxin gene expression by TNF- α and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR // The Journal of Immunology. 2003.- V.171.-№ 8.- P. 4369-4378.
8. Bagashev A., Fan S., Mukerjee R., Paolo Claudio P., Chabrashvili T., Leng R.P., Benchimol S., Sawaya B.E. Cdk9 phosphorylates Pirh2 protein and prevents degradation of p53 protein // Cell Cycle. 2013.- V.12.-№ 10.- P. 1569-1577.
9. Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.-Y., Schones D.E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome // Cell. 2007.- V.129.-№ 4.- P. 823-837.
10. Bassi C., Li Y., Khu K., Mateo F., Baniyadi P., Elia A., Mason J., Stambolic V., Pujana M., Mak T. The acetyltransferase Tip60 contributes to mammary tumorigenesis by modulating DNA repair // Cell Death & Differentiation. 2016.- V.-

№.- P.

11. Beitel L., Elhaji Y., Lumbroso R., Wing S., Panet-Raymond V., Gottlieb B., Pinsky L., Trifiro M. Cloning and characterization of an androgen receptor N-terminal-interacting protein with ubiquitin-protein ligase activity // *Journal of molecular endocrinology*. 2002.- V.29.-№ 1.- P. 41-60.
12. Bell H.S., Ryan K.M. Targeting the p53 family for cancer therapy: 'big brother' joins the fight // *Cell Cycle*. 2007.- V.6.-№ 16.- P. 1995-2000.
13. Bergholz J., Xiao Z.-X. Role of p63 in development, tumorigenesis and cancer progression // *Cancer microenvironment*. 2012.- V.5.-№ 3.- P. 311-322.
14. Bernad R., van der Velde H., Fornerod M., Pickersgill H. Nup358/RanBP2 attaches to the nuclear pore complex via association with Nup88 and Nup214/CAN and plays a supporting role in CRM1-mediated nuclear protein export // *Mol Cell Biol*. 2004.- V.24.-№ 6.- P. 2373-2384.
15. Binda O., Sevilla A., LeRoy G., Lemischka I.R., Garcia B.A., Richard S. SETD6 monomethylates H2AZ on lysine 7 and is required for the maintenance of embryonic stem cell self-renewal // *Epigenetics*. 2013.- V.8.-№ 2.- P. 177-183.
16. Bohgaki M., Hakem A., Halaby M., Bohgaki T., Li Q., Bissey P., Shloush J., Kislinger T., Sanchez O., Sheng Y. The E3 ligase PIRH2 polyubiquitylates CHK2 and regulates its turnover // *Cell Death & Differentiation*. 2013.- V.20.-№ 6.- P. 812-822.
17. Bond G.L., Hu W., Bond E.E., Robins H., Lutzker S.G., Arva N.C., Bargonetti J., Bartel F., Taubert H., Wuerl P. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans // *Cell*. 2004.- V.119.-№ 5.- P. 591-602.
18. Bönisch C., Hake S.B. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? // *Nucleic acids research*. 2012.- V.40.-№ 21.- P. 10719-10741.
19. Bošković A., Bender A., Gall L., Ziegler-Birling C., Beaujean N., Torres-Padilla M.-E. Analysis of active chromatin modifications in early mammalian embryos reveals uncoupling of H2A. Z acetylation and H3K36 trimethylation from embryonic genome activation // *Epigenetics*. 2012.- V.7.-№ 7.- P. 747-757.
20. Boulton S.J., Jackson S.P. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone

- DNA repair pathways // The EMBO journal. 1996.- V.15.-№ 18.- P. 5093.
21. Brickner D.G., Cajigas I., Fondufe-Mittendorf Y., Ahmed S., Lee P.-C., Widom J., Brickner J.H. H2A. Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state // PLoS Biol. 2007.- V.5.-№ 4.- P. e81.
22. Butler J.S. The yin and yang of the exosome // Trends in cell biology. 2002.- V.12.-№ 2.- P. 90-96.
23. Campos A.R., White K. Mutant alleles at the locus *elav* in *Drosophila melanogaster* lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis // Journal of neurogenetics. 1985.- V.2.-№ 3.- P. 197-218.
24. Canman C.E., Lim D.-S., Cimprich K.A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M.B., Siliciano J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53 // Science. 1998.- V.281.-№ 5383.- P. 1677-1679.
25. Cao R., Tsukada Y.-i., Zhang Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing // Mol Cell. 2005.- V.20.-№ 6.- P. 845-854.
26. Carrano A.C., Eytan E., Hershko A., Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27 // Nature cell biology. 1999.- V.1.-№ 4.- P. 193-199.
27. Chen C.-Y., Gherzi R., Ong S.-E., Chan E.L., Raijmakers R., Pruijn G.J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M., Karin M. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs // Cell. 2001.- V.107.-№ 4.- P. 451-464.
28. Chiang P.-W., Wang S., Smithivas P., Song W.-J., Ramamoorthy S., Hillman J., Puett S., Van Keuren M.L., Crombez E., Kumar A. Identification and Analysis of the Human and Murine Putative Chromatin Structure Regulator SUPT6H and Supt6h // Genomics. 1996.- V.34.-№ 3.- P. 328-333.
29. Chmelar R., Buchanan G., Need E.F., Tilley W., Greenberg N.M. Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer // International Journal of Cancer. 2007.- V.120.-№ 4.- P. 719-733.
30. Chu I.M., Hengst L., Slingerland J.M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy // Nature reviews Cancer.

2008.- V.8.-№ 4.- P. 253-267.

31. Chung K.K., Zhang Y., Lim K.L., Tanaka Y., Huang H., Gao J., Ross C.A., Dawson V.L., Dawson T.M. Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease // Nat Med. 2001.- V.7.-№ 10.- P. 1144-1150.

32. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting // Cell Death & Differentiation. 2005.- V.12.-№ 9.- P. 1178-1190.

33. Ciechanover A., Brundin P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg // Neuron. 2003.- V.40.-№ 2.- P. 427-446.

34. Corcoran C.A., Huang Y., Sheikh M.S. The p53 paddy wagon: COP1, Pirh2, and MDM2 are found resisting apoptosis and growth arrest // Cancer biology & therapy. 2004.- V.3.-№ 8.- P. 721-725.

35. Corcoran C.A., Montalbano J., Sun H., He Q., Huang Y., Sheikh M.S. Identification and characterization of two novel isoforms of Pirh2 ubiquitin ligase that negatively regulate p53 independent of RING finger domains // Journal of Biological Chemistry. 2009.- V.284.-№ 33.- P. 21955-21970.

36. Costantino C.L., Witkiewicz A.K., Kuwano Y., Cozzitorto J.A., Kennedy E.P., Dasgupta A., Keen J.C., Yeo C.J., Gorospe M., Brody J.R. The role of HuR in gemcitabine efficacy in pancreatic cancer: HuR Up-regulates the expression of the gemcitabine metabolizing enzyme deoxycytidine kinase // Cancer Res. 2009.- V.69.-№ 11.- P. 4567-4572.

37. Cougot N., Babajko S., Séraphin B. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells // The Journal of cell biology. 2004.- V.165.-№ 1.- P. 31-40.

38. Cruet-Hennequart S., Gallagher K., Sokòl A.M., Villalan S., Prendergast Á.M., Carty M.P. DNA polymerase η , a key protein in translesion synthesis in human cells. Genome Stability and Human Diseases //.-2010.-.-№ Issue.- P. 189-209.

39. Cuadrado M., Gutierrez-Martinez P., Swat A., Nebreda A.R., Fernandez-Capetillo O. p27Kip1 stabilization is essential for the maintenance of cell cycle arrest in response to DNA damage // Cancer Res. 2009.- V.69.-№ 22.- P. 8726-8732.

40. Culig Z., Hobisch A., Bartsch G., Klocker H. Androgen receptor—an update of

- mechanisms of action in prostate cancer // Urological research. 2000.- V.28.-№ 4.- P. 211-219.
41. de Oca Luna R.M., Wagner D.S., Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53 // Nature. 1995.- V.378.-№ 6553.- P. 203-206.
 42. de Silanes I.L., Zhan M., Lal A., Yang X., Gorospe M. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR // Proc Natl Acad Sci U S A. 2004.- V.101.-№ 9.- P. 2987-2992.
 43. Deyoung M., Ellisen L. p63 and p73 in human cancer: defining the network // Oncogene. 2007.- V.26.-№ 36.- P. 5169-5183.
 44. Doller A., Huwiler A., Müller R., Radeke H.H., Pfeilschifter J., Eberhardt W. Protein kinase C α -dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 // Molecular biology of the cell. 2007.- V.18.-№ 6.- P. 2137-2148.
 45. Draker R., Sarcinella E., Cheung P. USP10 deubiquitylates the histone variant H2A. Z and both are required for androgen receptor-mediated gene activation // Nucleic acids research. 2011.- V.-№.- P. gkq1352.
 46. Dryhurst D., McMullen B., Fazli L., Rennie P.S., Ausió J. Histone H2A. Z prepares the prostate specific antigen (PSA) gene for androgen receptor-mediated transcription and is upregulated in a model of prostate cancer progression // Cancer Lett. 2012.- V.315.-№ 1.- P. 38-47.
 47. Duan S., Yao Z., Hou D., Wu Z., Zhu W.g., Wu M. Phosphorylation of Pirh2 by Calmodulin-dependent kinase II impairs its ability to ubiquitinate p53 // The EMBO journal. 2007.- V.26.-№ 13.- P. 3062-3074.
 48. Duan W., Gao L., Druhan L.J., Zhu W.-G., Morrison C., Otterson G.A., Villalona-Calero M.A. Expression of Pirh2, a newly identified ubiquitin protein ligase, in lung cancer // Journal of the National Cancer Institute. 2004.- V.96.-№ 22.- P. 1718-1721.
 49. Dunican D.S., McWilliam P., Tighe O., Parle-McDermott A., Croke D.T. Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization // Oncogene. 2002.- V.21.-№ 20.- P. 3253-3257.

50. Esrig D., Spruck 3rd C., Nichols P.W., Chaiwun B., Steven K., Groshen S., Chen S.C., Skinner D.G., Jones P.A., Cote R.J. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer // *The American journal of pathology*. 1993.- V.143.-№ 5.- P. 1389.
51. Falck J., Mailand N., Syljuåsen R.G., Bartek J., Lukas J. The ATM–Chk2–Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis // *Nature*. 2001.- V.410.-№ 6830.- P. 842-847.
52. Falck J., Petrini J.H., Williams B.R., Lukas J., Bartek J. The DNA damage-dependent intra–S phase checkpoint is regulated by parallel pathways // *Nature genetics*. 2002.- V.30.-№ 3.- P. 290-294.
53. Fan X.C., Steitz J.A. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998.- V.95.-№ 26.- P. 15293-15298.
54. Feng Z., Hu W., de Stanchina E., Teresky A.K., Jin S., Lowe S., Levine A.J. The regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways // *Cancer Res*. 2007.- V.67.-№ 7.- P. 3043-3053.
55. Fernandez-Capetillo O., Chen H.-T., Celeste A., Ward I., Romanienko P.J., Morales J.C., Naka K., Xia Z., Camerini-Otero R.D., Motoyama N. DNA damage-induced G2–M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1 // *Nature cell biology*. 2002.- V.4.-№ 12.- P. 993-997.
56. Fraile J., Quesada V., Rodriguez D., Freije J., López-Otín C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options // *Oncogene*. 2012.- V.31.-№ 19.- P. 2373-2388.
57. Freedman D., Wu L., Levine A. Functions of the MDM2 oncoprotein // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 1999.- V.55.-№ 1.- P. 96-107.
58. Furman M.H., Ploegh H.L. Lessons from viral manipulation of protein disposal pathways // *J Clin Invest*. 2002.- V.110.-№ 7.- P. 875-879.
59. Furuta T., Ueda T., Aune G., Sarasin A., Kraemer K.H., Pommier Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells // *Cancer Res*. 2002.- V.62.-№ 17.- P. 4899-4902.
60. Gallouzi I.-E., Brennan C.M., Steitz J.A. Protein ligands mediate the CRM1-

- dependent export of HuR in response to heat shock // *Rna*. 2001.- V.7.-№ 9.- P. 1348-1361.
61. Gao X., Porter A.T., Grignon D.J., Edson Pontes J., Honn K.V. Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer // *Prostate*. 1997.- V.31.-№ 4.- P. 264-281.
62. Gaughan L., Logan I.R., Cook S., Neal D.E., Robson C.N. Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor // *Journal of Biological Chemistry*. 2002.- V.277.-№ 29.- P. 25904-25913.
63. Gévry N., Chan H.M., Laflamme L., Livingston D.M., Gaudreau L. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A. Z // *Genes & development*. 2007.- V.21.-№ 15.- P. 1869-1881.
64. Gnarra I. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal // *Nat genet*. 1994.- V.7.-№.- P. 85-90.
65. Greaves I.K., Rangasamy D., Ridgway P., Tremethick D.J. H2A. Z contributes to the unique 3D structure of the centromere // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007.- V.104.-№ 2.- P. 525-530.
66. Grisanzio C., Signoretti S. p63 in prostate biology and pathology // *Journal of cellular biochemistry*. 2008.- V.103.-№ 5.- P. 1354-1368.
67. Groll M., Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle // *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003.- V.35.-№ 5.- P. 606-616.
68. Grossman S.R., Deato M.E., Brignone C., Chan H.M., Kung A.L., Tagami H., Nakatani Y., Livingston D.M. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300 // *Science*. 2003.- V.300.-№ 5617.- P. 342-344.
69. Guillemette B., Bataille A.R., Gévry N., Adam M., Blanchette M., Robert F., Gaudreau L. Variant histone H2A. Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning // *PLoS Biol*. 2005.- V.3.-№ 12.- P. e384.
70. Guo C., Kosarek-Stancel J.N., Tang T.-S., Friedberg E.C. Y-family DNA polymerases in mammalian cells // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009.- V.66.-№ 14.- P. 2363-2381.

71. Guo X., Hartley R.S. HuR contributes to cyclin E1 deregulation in MCF-7 breast cancer cells // *Cancer Res.* 2006.- V.66.-№ 16.- P. 7948-7956.
72. Haince J.-F., McDonald D., Rodrigue A., Déry U., Masson J.-Y., Hendzel M.J., Poirier G.G. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites // *Journal of Biological Chemistry.* 2008.- V.283.-№ 2.- P. 1197-1208.
73. Hakem A., Bohgaki M., Lemmers B., Tai E., Salmena L., Matysiak-Zablocki E., Jung Y.-S., Karaskova J., Kaustov L., Duan S. Role of Pirh2 in mediating the regulation of p53 and c-Myc // *PLoS Genet.* 2011.- V.7.-№ 11.- P. e1002360.
74. Halaby M.-j., Hakem R., Hakem A. Pirh2: an E3 ligase with central roles in the regulation of cell cycle, DNA damage response, and differentiation // *Cell Cycle.* 2013.- V.12.-№ 17.- P. 2733-2737.
75. Hattori T., Isobe T., Abe K., Kikuchi H., Kitagawa K., Oda T., Uchida C., Kitagawa M. Pirh2 promotes ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 // *Cancer Res.* 2007.- V.67.-№ 22.- P. 10789-10795.
76. He T.-C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway // *Science.* 1998.- V.281.-№ 5382.- P. 1509-1512.
77. Herr P., Lundin C., Evers B., Ebner D., Bauerschmidt C., Kingham G., Palmai-Pallag T., Mortusewicz O., Frings O., Sonnhhammer E. A genome-wide IR-induced RAD51 foci RNAi screen identifies CDC73 involved in chromatin remodeling for DNA repair // *Cell Discovery.* 2015.- V.1.-№.- P.
78. Hershko A. The ubiquitin system. Ubiquitin and the Biology of the Cell //.-1998.-.-№ Issue.- P. 1-17.
79. Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation // *Annual review of biochemistry.* 1992.- V.61.-№ 1.- P. 761-807.
80. Higgins K.A., Perez J.R., Coleman T.A., Dorshkind K., McComas W.A., Sarmiento U.M., Rosen C.A., Narayanan R. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1993.- V.90.-№ 21.- P. 9901-9905.
81. Hirao A., Kong Y.-Y., Matsuoka S., Wakeham A., Ruland J., Yoshida H., Liu D.,

- Elledge S.J., Mak T.W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2 // *Science*. 2000.- V.287.-№ 5459.- P. 1824-1827.
82. Hoffman Y., Bublik D., Pilpel Y., Oren M. miR-661 downregulates both Mdm2 and Mdm4 to activate p53 // *Cell Death & Differentiation*. 2014.- V.21.-№ 2.- P. 302-309.
83. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. p53 mutations in human cancers // *Science*. 1991.- V.253.-№ 5015.- P. 49-53.
84. Hua S., Kallen C.B., Dhar R., Baquero M.T., Mason C.E., Russell B.A., Shah P.K., Liu J., Khramtsov A., Tretiakova M.S. Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A. Z associated with breast cancer progression // *Molecular systems biology*. 2008.- V.4.-№ 1.- P. 188.
85. Huang X., Qian X., Cheng C., He S., Sun L., Ke Q., Zhang L., Pan X., He F., Wang Q. Expression of Pirh2, a p27 Kip1 ubiquitin ligase, in hepatocellular carcinoma: correlation with p27 Kip1 and cell proliferation // *Human pathology*. 2011.- V.42.-№ 4.- P. 507-515.
86. Iacobucci I., Di Rorà A.G.L., Falzacappa M.V.V., Derenzini E., Ferrari A., Imbrogno E., Papayannidis C., Venturi C., Lonetti A., Guadagnuolo V. Inhibition of Checkpoint Kinase 1 (Chk1) and 2 (Chk2) is a novel therapeutic strategy in B-and T-Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) // *Cancer Res*. 2013.- V.73.-№ 8 Supplement.- P. 705-705.
87. Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y., Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin // *Cell*. 2001.- V.105.-№ 7.- P. 891-902.
88. Inobe T., Matouschek A. Paradigms of protein degradation by the proteasome // *Current opinion in structural biology*. 2014.- V.24.-№.- P. 156-164.
89. Ishimaru D., Ramalingam S., Sengupta T.K., Bandyopadhyay S., Dellis S., Tholanikunnel B.G., Fernandes D.J., Spicer E.K. Regulation of Bcl-2 expression by HuR in HL60 leukemia cells and A431 carcinoma cells // *Molecular Cancer Research*. 2009.- V.7.-№ 8.- P. 1354-1366.
90. Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.-M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation

// Science. 2001.- V.292.-№ 5516.- P. 468-472.

91. Jha S., Shibata E., Dutta A. Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage // Mol Cell Biol. 2008.- V.28.-№ 8.- P. 2690-2700.

92. Jin C., Felsenfeld G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3. 3 and H2A. Z // Genes & development. 2007.- V.21.-№ 12.- P. 1519-1529.

93. Joazeiro C.A., Wing S.S., Huang H.-k., Leverson J.D., Hunter T., Liu Y.-C. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase // Science. 1999.- V.286.-№ 5438.- P. 309-312.

94. Jones S.N., Hancock A.R., Vogel H., Donehower L.A., Bradley A. Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998.- V.95.-№ 26.- P. 15608-15612.

95. Jung Y.-S., Hakem A., Hakem R., Chen X. Pirh2 E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates DNA polymerase eta to suppress translesion DNA synthesis // Mol Cell Biol. 2011a.- V.31.-№ 19.- P. 3997-4006.

96. Jung Y.-S., Liu G., Chen X. Pirh2 E3 ubiquitin ligase targets DNA polymerase eta for 20S proteasomal degradation // Mol Cell Biol. 2010.- V.30.-№ 4.- P. 1041-1048.

97. Jung Y.-S., Qian Y., Chen X. The p73 tumor suppressor is targeted by Pirh2 RING finger E3 ubiquitin ligase for the proteasome-dependent degradation // Journal of Biological Chemistry. 2011b.- V.286.-№ 41.- P. 35388-35395.

98. Jung Y.-S., Qian Y., Chen X. Pirh2 RING-finger E3 ubiquitin ligase: Its role in tumorigenesis and cancer therapy // FEBS Lett. 2012.- V.-№.- P.

99. Jung Y.-S., Qian Y., Yan W., Chen X. Pirh2 E3 ubiquitin ligase modulates keratinocyte differentiation through p63 // Journal of Investigative Dermatology. 2013.- V.133.-№ 5.- P. 1178-1187.

100. Kapoor A., Goldberg M.S., Cumberland L.K., Ratnakumar K., Segura M.F., Emanuel P.O., Menendez S., Vardabasso C., LeRoy G., Vidal C.I. The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8 // Nature. 2010.- V.468.-№ 7327.- P. 1105-1109.

101. Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression // *Nature*. 2006.- V.441.-№ 7092.- P. 431-436.
102. Karni-Schmidt O., Lokshin M., Prives C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2016.- V.11.-№.- P. 617-644.
103. Kartasheva N.N., Lenz-Bauer C., Hartmann O., Schäfer H., Eilers M., Dobbelstein M. Δ Np73 can modulate the expression of various genes in a p53-independent fashion // *Oncogene*. 2003.- V.22.-№ 51.- P. 8246-8254.
104. Kawamoto T., Araki K., Sonoda E., Yamashita Y.M., Harada K., Kikuchi K., Masutani C., Hanaoka F., Nozaki K., Hashimoto N. Dual roles for DNA polymerase η in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis // *Mol Cell*. 2005.- V.20.-№ 5.- P. 793-799.
105. Kedersha N., Stoecklin G., Ayodele M., Yacono P., Lykke-Andersen J., Fritzler M.J., Scheuner D., Kaufman R.J., Golan D.E., Anderson P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling // *The Journal of cell biology*. 2005.- V.169.-№ 6.- P. 871-884.
106. Kelly T.K., Miranda T.B., Liang G., Berman B.P., Lin J.C., Tanay A., Jones P.A. H2A. Z maintenance during mitosis reveals nucleosome shifting on mitotically silenced genes // *Mol Cell*. 2010.- V.39.-№ 6.- P. 901-911.
107. Kermekchiev M., Workman J.L., Pikaard C.S. Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1 // *Mol Cell Biol*. 1997.- V.17.-№ 10.- P. 5833-5842.
108. Kim H.H., Kuwano Y., Srikantan S., Lee E.K., Martindale J.L., Gorospe M. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression // *Genes & development*. 2009.- V.23.-№ 15.- P. 1743-1748.
109. Kim J.H., Kim B., Cai L., Choi H.J., Ohgi K.A., Tran C., Chen C., Chung C.H., Huber O., Rose D.W. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and β -catenin complexes // *Nature*. 2005.- V.434.-№ 7035.- P. 921-926.
110. Kim W., Bennett E.J., Huttlin E.L., Guo A., Li J., Possemato A., Sowa M.E., Rad R., Rush J., Comb M.J. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome // *Mol Cell*. 2011.- V.44.-№ 2.- P. 325-340.
111. Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S.,

- Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism // *Nature*. 1998.- V.392.-№ 6676.- P. 605-608.
112. Kobayashi S., Kasaishi Y., Nakada S., Takagi T., Era S., Motegi A., Chiu R., Takeda S., Hirota K. Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining // *Oncogene*. 2015.- V.34.-№ 33.- P. 4403-4411.
113. Koegl M., Hoppe T., Schlenker S., Ulrich H.D., Mayer T.U., Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly // *Cell*. 1999.- V.96.-№ 5.- P. 635-644.
114. Koike A., Nishikawa H., Wu W., Okada Y., Venkitaraman A.R., Ohta T. Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates // *Cancer Res*. 2010.- V.70.-№ 17.- P. 6746-6756.
115. Komander D., Rape M. The ubiquitin code // *Annual review of biochemistry*. 2012.- V.81.-№.- P. 203-229.
116. Kominami K.-i., Toda T. Fission yeast WD-repeat protein pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18 // *Genes & development*. 1997.- V.11.-№ 12.- P. 1548-1560.
117. Kullmann M., Göpfert U., Siewe B., Hengst L. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5' UTR // *Genes & development*. 2002.- V.16.-№ 23.- P. 3087-3099.
118. Kurosu T., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Akiyama K., Kakuguchi W., Kuroshima T., Kondo M., Akino T., Totsuka Y. HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium // *British journal of cancer*. 2011.- V.104.-№ 5.- P. 819-829.
119. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970.- V.227.-№.- P. 680-685.
120. Lal A., Mazan-Mamczarz K., Kawai T., Yang X., Martindale J.L., Gorospe M. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs // *The EMBO journal*. 2004.- V.23.-№ 15.- P. 3092-3102.
121. Lauriola L., Granone P., Ramella S., Lanza P., Ranelletti F.O. Expression of the

- RNA-binding protein HuR and its clinical significance in human stage I and II lung adenocarcinoma // *Histol Histopathol.* 2012.- V.27.-№ 5.- P. 617-626.
122. Leandersson K., Riesbeck K., Andersson T. Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells // *Nucleic acids research.* 2006.- V.34.-№ 14.- P. 3988-3999.
123. Lee J., Gu W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination // *Cell Death & Differentiation.* 2010.- V.17.-№ 1.- P. 86-92.
124. Lee S.W., Seong M.W., Jeon Y.J., Chung C.H. Ubiquitin E3 ligases controlling p53 stability // *Animal Cells and Systems.* 2012.- V.16.-№ 3.- P. 173-182.
125. Leng R.P., Lin Y., Ma W., Wu H., Lemmers B., Chung S., Parant J.M., Lozano G., Hakem R., Benchimol S. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation // *Cell.* 2003.- V.112.-№ 6.- P. 779-791.
126. Leong C.-O., Vidnovic N., DeYoung M.P., Sgroi D., Ellisen L.W. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers // *J Clin Invest.* 2007.- V.117.-№ 5.- P. 1370-1380.
127. Leung J.W., Agarwal P., Canny M.D., Gong F., Robison A.D., Finkelstein I.J., Durocher D., Miller K.M. Nucleosome acidic patch promotes RNF168-and RING1B/BMI1-dependent H2AX and H2A ubiquitination and DNA damage signaling // *PLoS Genet.* 2014.- V.10.-№ 3.- P. e1004178.
128. Levine A.J., Momand J., Finlay C.A. The p53 tumour suppressor gene // *Nature.* 1991.- V.351.-№ 6326.- P. 453.
129. Levine B., Klionsky D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy // *Developmental cell.* 2004.- V.6.-№ 4.- P. 463-477.
130. Levrero M., De Laurenzi V., Costanzo A., Gong J., Wang J., Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions // *Journal of cell science.* 2000.- V.113.-№ 10.- P. 1661-1670.
131. Levy N.S., Chung S., Furneaux H., Levy A.P. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR // *Journal of Biological Chemistry.* 1998.- V.273.-№ 11.- P. 6417-6423.
132. Li H., Park S., Kilburn B., Jelinek M.A., Henschen-Edman A., Aswad D.W., Stallcup M.R., Laird-Offringa I.A. Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR,

- an mRNA-stabilizing protein, by CARM1 // Journal of Biological Chemistry. 2002.- V.277.-№ 47.- P. 44623-44630.
133. Li L., Monckton E.A., Godbout R. A role for DEAD box 1 at DNA double-strand breaks // Mol Cell Biol. 2008.- V.28.-№ 20.- P. 6413-6425.
134. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy // Int J Biochem Mol Biol. 2013.- V.4.-№ 1.- P. 1-26.
135. Lin Y.-L., Sengupta S., Gurdziel K., Bell G.W., Jacks T., Flores E.R. p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair // PLoS Genet. 2009.- V.5.-№ 10.- P. e1000680.
136. Liu L., Rao J.N., Zou T., Xiao L., Wang P.-Y., Turner D.J., Gorospe M., Wang J.-Y. Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2-dependent HuR phosphorylation // Molecular biology of the cell. 2009.- V.20.-№ 23.- P. 4885-4898.
137. Liu Y., Prasad R., Beard W.A., Kedar P.S., Hou E.W., Shock D.D., Wilson S.H. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β // Journal of Biological Chemistry. 2007.- V.282.-№ 18.- P. 13532-13541.
138. Logan I.R., Gaughan L., McCracken S.R., Sapountzi V., Leung H.Y., Robson C.N. Human PIRH2 enhances androgen receptor signaling through inhibition of histone deacetylase 1 and is overexpressed in prostate cancer // Mol Cell Biol. 2006.- V.26.-№ 17.- P. 6502-6510.
139. Logan I.R., Sapountzi V., Gaughan L., Neal D.E., Robson C.N. Control of Human PIRH2 Protein Stability INVOLVEMENT OF TIP60 AND THE PROTEASOME // Journal of Biological Chemistry. 2004.- V.279.-№ 12.- P. 11696-11704.
140. Lonergan P.E., Tindall D.J. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression // Journal of carcinogenesis. 2011.- V.10.-№ 1.- P. 20.
141. Lu Z., Hunter T. Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21Cip1, p27Kip1 and p57Kip2 CDK inhibitors // Cell Cycle. 2010.- V.9.-№ 12.- P. 2342-2352.
142. Lücking C.B., Dürr A., Bonifati V., Vaughan J., De Michele G., Gasser T., Harhangi B.S., Meco G., Denèfle P., Wood N.W. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene // New England Journal of

Medicine. 2000.- V.342.-№ 21.- P. 1560-1567.

143. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // Nature. 1997.- V.389.- № 6648.- P. 251-260.

144. Ma L., Young J., Prabhala H., Pan E., Mestdagh P., Muth D., Teruya-Feldstein J., Reinhardt F., Onder T.T., Valastyan S. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis // Nature cell biology. 2010.- V.12.-№ 3.- P. 247-256.

145. Malik H.S., Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome // Nature structural & molecular biology. 2003.- V.10.-№ 11.- P. 882-891.

146. Mani S.A., Guo W., Liao M.-J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells // Cell. 2008.- V.133.-№ 4.- P. 704-715.

147. Marchenko N.D., Wolff S., Erster S., Becker K., Moll U.M. Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation // The EMBO journal. 2007.- V.26.-№ 4.- P. 923-934.

148. Marine J.-C., Lozano G. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond // Cell Death & Differentiation. 2010.- V.17.-№ 1.- P. 93-102.

149. Massion P.P., Taflan P.M., Rahman S.J., Yildiz P., Shyr Y., Carbone D.P., Gonzalez A.L. Role of p63 amplification and overexpression in lung cancer development // CHEST Journal. 2004.- V.125.-№ 5_suppl.- P. 102S-102S.

150. Massion P.P., Taflan P.M., Rahman S.J., Yildiz P., Shyr Y., Edgerton M.E., Westfall M.D., Roberts J.R., Pietenpol J.A., Carbone D.P. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis // Cancer Res. 2003.- V.63.-№ 21.- P. 7113-7121.

151. Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage // Mol Cell Biol. 1998.- V.18.-№ 6.- P. 3563-3571.

152. Matsumoto Y., Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair // Science. 1995.- V.269.-№ 5224.- P. 699.

153. Matsuoka S., Huang M., Elledge S.J. Linkage of ATM to cell cycle regulation

by the Chk2 protein kinase // *Science*. 1998.- V.282.-№ 5395.- P. 1893-1897.

154. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.-W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis // *Nature*. 1999.- V.399.-№ 6733.- P. 271-275.

155. Maya R., Balass M., Kim S.-T., Shkedy D., Leal J.-F.M., Shifman O., Moas M., Buschmann T., Ronai Z.e., Shiloh Y. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage // *Genes & development*. 2001.- V.15.-№ 9.- P. 1067-1077.

156. Mazan-Mamczarz K., Galbán S., de Silanes I.L., Martindale J.L., Atasoy U., Keene J.D., Gorospe M. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003.- V.100.-№ 14.- P. 8354-8359.

157. McCulloch S.D., Kokoska R.J., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F., Kunkel T.A. Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelity // *Nature*. 2004.- V.428.-№ 6978.- P. 97-100.

158. McIlwraith M.J., Vaisman A., Liu Y., Fanning E., Woodgate R., West S.C. Human DNA polymerase η promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination // *Mol Cell*. 2005.- V.20.-№ 5.- P. 783-792.

159. McKeon F., Melino G. Fog of war: the emerging p53 family // *Cell Cycle*. 2007.- V.6.-№ 3.- P. 229-232.

160. Meneghini M.D., Wu M., Madhani H.D. Conserved histone variant H2A. Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin // *Cell*. 2003.- V.112.-№ 5.- P. 725-736.

161. Mills A.A., Zheng B., Wang X.-J., Vogel H., Roop D.R., Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis // *Nature*. 1999.- V.398.-№ 6729.- P. 708-713.

162. Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion // *Nature*. 2008.- V.451.-№ 7182.- P. 1069-1075.

163. Momand J., Jung D., Wilczynski S., Niland J. The MDM2 gene amplification

- database // Nucleic acids research. 1998.- V.26.-№ 15.- P. 3453-3459.
164. Moon J., Parry G., Estelle M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development // The Plant Cell. 2004.- V.16.-№ 12.- P. 3181-3195.
 165. Mori Y., Nagse H., Ando H., Horii A., Ichii S., Nakatsuru S., Aoki T., Miki Y., Mori T., Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene // Human molecular genetics. 1992.- V.1.-№ 4.- P. 229-233.
 166. Murata S., Yashiroda H., Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2009.- V.10.-№ 2.- P. 104-115.
 167. Murray-Zmijewski F., Lane D., Bourdon J. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress // Cell Death & Differentiation. 2006.- V.13.-№ 6.- P. 962-972.
 168. Nakayama K.I., Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer // Nature reviews Cancer. 2006.- V.6.-№ 5.- P. 369-381.
 169. O'Leary K.A., Mendrysa S.M., Vaccaro A., Perry M.E. Mdm2 regulates p53 independently of p19ARF in homeostatic tissues // Mol Cell Biol. 2004.- V.24.-№ 1.- P. 186-191.
 170. Okamura M., Inose H., Masuda S. RNA Export through the NPC in Eukaryotes // Genes. 2015.- V.6.-№ 1.- P. 124-149.
 171. Ougolkov A.V., Yamashita K., Mai M., Minamoto T. Oncogenic β -catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer // Gastroenterology. 2002.- V.122.-№ 1.- P. 60-71.
 172. Pang L., Tian H., Chang N., Yi J., Xue L., Jiang B., Gorospe M., Zhang X., Wang W. Loss of CARM1 is linked to reduced HuR function in replicative senescence // BMC molecular biology. 2013.- V.14.-№ 1.- P. 1.
 173. Pickart C.M., Eddins M.J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2004.- V.1695.-№ 1.- P. 55-72.
 174. Pickart C.M., Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals // Current opinion in chemical biology. 2004.- V.8.-№ 6.- P. 610-616.
 175. Pinto D.M.S., Flaus A. Structure and function of histone H2AX. Genome Stability and Human Diseases //.-2010.-.-№ Issue.- P. 55-78.

176. Post S.M., Quintás-Cardama A., Pant V., Iwakuma T., Hamir A., Jackson J.G., Maccio D.R., Bond G.L., Johnson D.G., Levine A.J. A high-frequency regulatory polymorphism in the p53 pathway accelerates tumor development // *Cancer cell*. 2010.- V.18.-№ 3.- P. 220-230.
177. Powell S.M., Zilz N., Beazer-Barclay Y., Bryan T.M., Hamilton S.R., Thibodeau S.N., Vogelstein B., Kinzler K.W. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis // *Nature*. 1992.- V.359.-№ 6392.- P. 235-237.
178. Quesada V., Díaz-Perales A., Gutiérrez-Fernández A., Garabaya C., Cal S., López-Otin C. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases // *Biochem Biophys Res Commun*. 2004.- V.314.-№ 1.- P. 54-62.
179. Raisner R.M., Hartley P.D., Meneghini M.D., Bao M.Z., Liu C.L., Schreiber S.L., Rando O.J., Madhani H.D. Histone variant H2A. Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin // *Cell*. 2005.- V.123.-№ 2.- P. 233-248.
180. Rangasamy D., Berven L., Ridgway P., Tremethick D.J. Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A. Z during early mammalian development // *The EMBO journal*. 2003.- V.22.-№ 7.- P. 1599-1607.
181. Rangasamy D., Greaves I., Tremethick D.J. RNA interference demonstrates a novel role for H2A. Z in chromosome segregation // *Nature structural & molecular biology*. 2004.- V.11.-№ 7.- P. 650-655.
182. Richards N.G., Rittenhouse D.W., Freydin B., Cozzitorto J.A., Grenda D., Rui H., Gonye G., Kennedy E.P., Yeo C.J., Brody J.R. HuR status is a powerful marker for prognosis and response to gemcitabine-based chemotherapy for resected pancreatic ductal adenocarcinoma patients // *Annals of surgery*. 2010.- V.252.-№ 3.- P. 499-506.
183. Robinow S., Campos A.R., Yao K.-M., White K. The elav gene product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motifs // *Science*. 1988.- V.242.-№ 4885.- P. 1570-1572.
184. Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A.L. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules // *Cell*. 1994.- V.78.-№ 5.- P. 761-771.
185. Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. Megabase chromatin domains

- involved in DNA double-strand breaks in vivo // *The Journal of cell biology*. 1999.- V.146.-№ 5.- P. 905-916.
186. Rubinfeld B., Souza B., Albert I., Muller O., Chamberlain S.H., Masiarz F.R., Munemitsu S., Polakis P. Association of the APC gene product with beta-catenin // *Science*. 1993.- V.262.-№ 5140.- P. 1731-1734.
187. Saeki Y., Kudo T., Sone T., Kikuchi Y., Yokosawa H., Toh-e A., Tanaka K. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome // *The EMBO journal*. 2009.- V.28.-№ 4.- P. 359-371.
188. Sarcinella E., Zuzarte P.C., Lau P.N., Draker R., Cheung P. Monoubiquitylation of H2A. Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin // *Mol Cell Biol*. 2007.- V.27.-№ 18.- P. 6457-6468.
189. Saunus J.M., French J.D., Edwards S.L., Beveridge D.J., Hatchell E.C., Wagner S.A., Stein S.R., Davidson A., Simpson K.J., Francis G.D. Posttranscriptional regulation of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 by the RNA binding protein HuR // *Cancer Res*. 2008.- V.68.-№ 22.- P. 9469-9478.
190. Scheffner M., Münger K., Byrne J.C., Howley P.M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991.- V.88.-№ 13.- P. 5523-5527.
191. Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J., Howley P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53 // *Cell*. 1990.- V.63.-№ 6.- P. 1129-1136.
192. Scherz-Shouval R., Weidberg H., Gonen C., Wilder S., Elazar Z., Oren M. p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010.- V.107.-№ 43.- P. 18511-18516.
193. Schmidt E.V. The role of c-myc in cellular growth control // *Oncogene*. 1999.- V.18.-№ 19.- P.
194. Schmidt M., Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014.- V.1843.-№ 1.- P. 13-25.
195. Schones D.E., Cui K., Cuddapah S., Roh T.-Y., Barski A., Wang Z., Wei G., Zhao K. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome // *Cell*.

2008.- V.132.-№ 5.- P. 887-898.

196. Semenza G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia // Journal of applied physiology. 2000.- V.88.-№ 4.- P. 1474-1480.

197. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy // Trends in pharmacological sciences. 2012.- V.33.-№ 4.- P. 207-214.

198. Sengupta S., Jang B.-C., Wu M.-T., Paik J.-H., Furneaux H., Hla T. The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2 // Journal of Biological Chemistry. 2003.- V.278.-№ 27.- P. 25227-25233.

199. Sevilla A., Binda O. Post-translational modifications of the histone variant H2AZ // Stem cell research. 2014.- V.12.-№ 1.- P. 289-295.

200. Shabek N., Herman-Bachinsky Y., Buchsbaum S., Lewinson O., Haj-Yahya M., Hejjaoui M., Lashuel H.A., Sommer T., Brik A., Ciechanover A. The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation // Mol Cell. 2012.- V.48.-№ 1.- P. 87-97.

201. Shamu C.E., Story C.M., Rapoport T.A., Ploegh H.L. The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate // The Journal of cell biology. 1999.- V.147.-№ 1.- P. 45-58.

202. Sheng Y., Laister R.C., Lemak A., Wu B., Tai E., Duan S., Lukin J., Sunnerhagen M., Srisailam S., Karra M. Molecular basis of Pirh2-mediated p53 ubiquitylation // Nature structural & molecular biology. 2008.- V.15.-№ 12.- P. 1334-1342.

203. Shi J., Huang Y., Sheikh M.S. Identification of Pirh2D, an additional novel isoform of Pirh2 ubiquitin ligase // Molecular and cellular pharmacology. 2010.- V.2.-№ 1.- P. 21.

204. Shieh S.-Y., Ikeda M., Taya Y., Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2 // Cell. 1997.- V.91.-№ 3.- P. 325-334.

205. Shimada M., Kitagawa K., Dobashi Y., Isobe T., Hattori T., Uchida C., Abe K., Kotake Y., Oda T., Suzuki H. High expression of Pirh2, an E3 ligase for p27, is associated with low expression of p27 and poor prognosis in head and neck cancers //

Cancer Sci. 2009.- V.100.-№ 5.- P. 866-872.

206. Shimkets R.A., Warnock D.G., Bositis C.M., Nelson-Williams C., Hansson J.H., Schambelan M., Gill J.R., Ulick S., Milora R.V., Findling J.W. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel // Cell. 1994.- V.79.-№ 3.- P. 407-414.

207. Shimura H., Schlossmacher M.G., Hattori N., Frosch M.P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K.S., Selkoe D.J. Ubiquitination of a new form of α -synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease // Science. 2001.- V.293.-№ 5528.- P. 263-269.

208. Shyu A.-B., Greenberg M.E., Belasco J.G. The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways // Genes & development. 1989.- V.3.-№ 1.- P. 60-72.

209. Sluss H.K., Armata H., Gallant J., Jones S.N. Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice // Mol Cell Biol. 2004.- V.24.-№ 3.- P. 976-984.

210. Smeenk G., Wiegant W.W., Marteijn J.A., Luijsterburg M.S., Sroczynski N., Costelloe T., Romeijn R.J., Pastink A., Mailand N., Vermeulen W. Poly (ADP-ribosyl) ation links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling // J Cell Sci. 2013.- V.126.-№ 4.- P. 889-903.

211. Soboleva T.A., Nekrasov M., Ryan D.P., Tremethick D.J. Histone variants at the transcription start-site // Trends in Genetics. 2014.- V.30.-№ 5.- P. 199-209.

212. Sparks A.B., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer // Cancer Res. 1998.- V.58.-№ 6.- P. 1130-1134.

213. Spirio L., Olschwang S., Groden J., Robertson M., Samowitz W., Joslyn G., Gelbert L., Thliveris A., Carlson M., Otterud B. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis // Cell. 1993.- V.75.-№ 5.- P. 951-957.

214. Staub O., Gautschi I., Ishikawa T., Breitschopf K., Ciechanover A., Schild L., Rotin D. Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination // The EMBO journal. 1997.- V.16.-№ 21.- P. 6325-6336.

215. Stevens C., Smith L., La Thangue N.B. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage // Nature cell biology. 2003.- V.5.-№ 5.- P. 401-409.

216. Sugasawa K., Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., Tanaka K. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex // *Cell*. 2005.- V.121.-№ 3.- P. 387-400.
217. Sun Y., Jiang X., Chen S., Fernandes N., Price B.D. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005.- V.102.-№ 37.- P. 13182-13187.
218. Svotelis A., Gévry N., Grondin G., Gaudreau L. H2A. Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells // *Cell Cycle*. 2010.- V.9.-№ 2.- P. 364-370.
219. Ta H.Q., Ivey M.L., Frierson H.F., Conaway M.R., Dziegielewska J., Lerner J.M., Gioeli D. Checkpoint kinase 2 is a novel regulator of prostate cancer cell growth // *Cancer Res*. 2015.- V.75.-№ 15 Supplement.- P. 5049-5049.
220. Tai E. Characterization of the E3 Ubiquitin Ligase Pirh2. //.-2010.-.-№ Issue.
221. Talbert P.B., Henikoff S. Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010.- V.11.-№ 4.- P. 264-275.
222. Tang Y., Luo J., Zhang W., Gu W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis // *Mol Cell*. 2006.- V.24.-№ 6.- P. 827-839.
223. Tetsu O., McCormick F. β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells // *Nature*. 1999.- V.398.-№ 6726.- P. 422-426.
224. Turcu F.E.R., Ventii K.H., Wilkinson K.D. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes // *Annual review of biochemistry*. 2009.- V.78.-№.- P. 363.
225. Vabulas R.M., Hartl F.U. Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function // *Science*. 2005.- V.310.-№ 5756.- P. 1960-1963.
226. Valdés-Mora F., Song J.Z., Statham A.L., Strbenac D., Robinson M.D., Nair S.S., Patterson K.I., Tremethick D.J., Stirzaker C., Clark S.J. Acetylation of H2A. Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer // *Genome research*. 2012.- V.22.-№ 2.- P. 307-321.
227. Vascotto C., Fantini D., Romanello M., Cesaratto L., Deganuto M., Leonardi A., Radicella J.P., Kelley M.R., D'Ambrosio C., Scaloni A. APE1/Ref-1 interacts with

- NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process // *Mol Cell Biol.* 2009.- V.29.-№ 7.- P. 1834-1854.
228. Wade M., Li Y.-C., Wahl G.M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy // *Nature reviews Cancer.* 2013.- V.13.-№ 2.- P. 83-96.
229. Waikel R.L., Kawachi Y., Waikel P.A., Wang X.-J., Roop D.R. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells // *Nature genetics.* 2001.- V.28.-№ 2.- P. 165-168.
230. Wang H., Wang L., Erdjument-Bromage H., Vidal M., Tempst P., Jones R.S., Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing // *Nature.* 2004.- V.431.-№ 7010.- P. 873-878.
231. Wang L., He G., Zhang P., Wang X., Jiang M., Yu L. Interplay between MDM2, MDMX, Pirh2 and COP1: the negative regulators of p53 // *Mol Biol Rep.* 2011a.- V.38.-№ 1.- P. 229-236.
232. Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways // *Nucleic acids research.* 2006.- V.34.-№ 21.- P. 6170-6182.
233. Wang W.-J., Wu S.-P., Liu J.-B., Shi Y.-S., Huang X., Zhang Q.-B., Yao K.-T. MYC regulation of CHK1 and CHK2 promotes radioresistance in a stem cell-like population of nasopharyngeal carcinoma cells // *Cancer Res.* 2013.- V.73.-№ 3.- P. 1219-1231.
234. Wang W., Caldwell M.C., Lin S., Furneaux H., Gorospe M. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation // *The EMBO journal.* 2000a.- V.19.-№ 10.- P. 2340-2350.
235. Wang W., Furneaux H., Cheng H., Caldwell M.C., Hutter D., Liu Y., Holbrook N., Gorospe M. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light // *Mol Cell Biol.* 2000b.- V.20.-№ 3.- P. 760-769.
236. Wang X.M., Yang L.Y., Guo L., Fan C., Wu F. p53-induced RING-H2 protein, a novel marker for poor survival in hepatocellular carcinoma after hepatic resection // *Cancer.* 2009.- V.115.-№ 19.- P. 4554-4563.
237. Wang Z., Yang B., Dong L., Peng B., He X., Liu W. A novel oncoprotein Pirh2: rising from the shadow of MDM2 // *Cancer Sci.* 2011b.- V.102.-№ 5.- P. 909-917.
238. Wu G., Sun M., Zhang L., Zhou J., Wang Y., Huo K. A novel hPirh2 splicing

variant without ubiquitin protein ligase activity interacts with p53 and is down-regulated in hepatocellular carcinoma // FEBS Lett. 2010.- V.584.-№ 13.- P. 2772-2778.

239. Wu H., Abou Z.R., Flores E.R., Leng R.P. Pirh2, a ubiquitin E3 ligase, inhibits p73 transcriptional activity by promoting its ubiquitination // Molecular Cancer Research. 2011.- V.9.-№ 12.- P. 1780-1790.

240. Wu S., Shi Y., Mulligan P., Gay F., Landry J., Liu H., Lu J., Qi H.H., Wang W., Nickoloff J.A. A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair // Nature structural & molecular biology. 2007.- V.14.-№ 12.- P. 1165-1172.

241. Xu Y., Ayrapetov M.K., Xu C., Gursoy-Yuzugullu O., Hu Y., Price B.D. Histone H2A. Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair // Mol Cell. 2012.- V.48.-№ 5.- P. 723-733.

242. Yan W., Jung Y.-S., Zhang Y., Chen X. Arsenic trioxide reactivates proteasome-dependent degradation of mutant p53 protein in cancer cells in part via enhanced expression of Pirh2 E3 ligase // PLoS One. 2014.- V.9.-№ 8.- P. e103497.

243. Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M.D., Dötsch V., Andrews N.C., Caput D., McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities // Mol Cell. 1998.- V.2.-№ 3.- P. 305-316.

244. Yang A., McKeon F. P63 and P73: P53 mimics, menaces and more // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2000.- V.1.-№ 3.- P. 199-207.

245. Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R.T., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development // Nature. 1999.- V.398.-№ 6729.- P. 714-718.

246. Yang A., Walker N., Bronson R., Kaghad M., Oosterwegel M., Bonnin J., Vagner C., Bonnet H., Dikkes P., Sharpe A. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours // Nature. 2000.- V.404.-№ 6773.- P. 99-103.

247. Yang S., Chen Y., Sun F., Ni Q., Wang H., Huang Y., Zhang C., Liu K., Wang S., Qiu J. Downregulated PIRH2 Can Decrease the Proliferation of Breast Cancer

Cells // Archives of Medical Research. 2016.- V.47.-№ 3.- P. 186-195.

248. Yang S., Kuo C., Bisi J.E., Kim M.K. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2 // Nature cell biology. 2002.- V.4.-№ 11.- P. 865-870.

249. Yi X., Zhou Y., Zheng W., Chambers S.K. HuR expression in the nucleus correlates with high histological grade and poor disease-free survival in ovarian cancer // Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2009.- V.49.-№ 1.- P. 93-98.

250. Yoo P.S., Sullivan C.A., Kiang S., Gao W., Uchio E.M., Chung G.G., Cha C.H. Tissue microarray analysis of 560 patients with colorectal adenocarcinoma: high expression of HuR predicts poor survival // Ann Surg Oncol. 2009.- V.16.-№ 1.- P. 200-207.

251. Yuan S., Liping Z., Yang J. Effect of Pirh2 shRNA on Chemosensitivity of Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 to Cisplatin // Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong. 2008.- V.2.-№.- P. 010.

252. Yuan Z., Sanders A.J., Ye L., Wang Y., Jiang W.G. Prognostic value of the human antigen R (HuR) in human breast cancer: high level predicts a favourable prognosis // Anticancer Res. 2011.- V.31.-№ 1.- P. 303-310.

253. Zachariae W., Shevchenko A., Andrews P.D., Ciosk R., Galova M., Stark M.J., Mann M., Nasmyth K. Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins // Science. 1998.- V.279.-№ 5354.- P. 1216-1219.

254. Zeinab R.A., Wu H., Sergi C., Leng R.P. Residues 240–250 in the C-terminus of the Pirh2 protein complement the function of the RING domain in self-ubiquitination of the Pirh2 protein // PLoS One. 2013.- V.8.-№ 12.- P. e82803.

255. Zhang D., Zaugg K., Mak T.W., Elledge S.J. A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response // Cell. 2006.- V.126.-№ 3.- P. 529-542.

256. Zhang H., Roberts D.N., Cairns B.R. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss // Cell. 2005.- V.123.-№ 2.- P. 219-231.

257. Zhang J., Willers H., Feng Z., Ghosh J.C., Kim S., Weaver D.T., Chung J.H.,

- Powell S.N., Xia F. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair // *Mol Cell Biol*. 2004.- V.24.-№ 2.- P. 708-718.
258. Zhang Y., Gao J., Chung K.K., Huang H., Dawson V.L., Dawson T.M. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin–protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000.- V.97.-№ 24.- P. 13354-13359.
259. Zhao Y., Yu H., Hu W. The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers // *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2014.- V.-№.- P. gmt147.
260. Zheng G., Ning J., Yang Y.-C. PLAGL2 controls the stability of Pirh2, an E3 ubiquitin ligase for p53 // *Biochem Biophys Res Commun*. 2007.- V.364.-№ 2.- P. 344-350.
261. Ziv O., Zeisel A., Mirlas-Neisberg N., Swain U., Nevo R., Ben-Chetrit N., Martelli M.P., Rossi R., Schiesser S., Canman C.E. Identification of novel DNA-damage tolerance genes reveals regulation of translesion DNA synthesis by nucleophosmin // *Nature communications*. 2014.- V.5.-№.- P.
262. Zlatanova J., Thakar A. H2A. Z: view from the top // *Structure*. 2008.- V.16.-№ 2.- P. 166-179.
263. Zucchi I., Mento E., Kuznetsov V.A., Scotti M., Valsecchi V., Simionati B., Vicinanza E., Valle G., Pilotti S., Reinbold R. Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004.- V.101.-№ 52.- P. 18147-18152.
264. Дакс А., Мелино Д., Барлев Н. Роль различных Е3-убиквитинлигаз в регуляции активности онкосупрессора p53 // *Цитология*. 2013.- V.55.-№ 10.- P. 673-687.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю Николаю Анатольевичу Барлеву за возможность принимать участие в актуальных и интересных научных исследованиях, за знания и опыт, которыми он щедро делится, а так же за моральную поддержку и грамотное руководство с первых дней совместной работы.

Автор благодарит сотрудников Лаборатории регуляции экспрессии генов ИИЦ РАН, в особенности Алексея Петухова, Ольгу Федорову, Елену Васильеву, Олега Шувалова и Валерия Меркулова, неоценимые помощь и поддержка которых сделали возможным осуществление данной работы. Спасибо!

Автор признателен Dr. Andrew R. Bottrill (Университет Лейстера, Великобритания) за масс-спектрометрическую идентификацию белков.

Автор выражает искреннюю благодарность Елене Романовне Гагинской и Светлане Анатольевне Галкиной за превосходный пример отношения к науке и к людям.

Автор благодарит свою семью и близких друзей за огромную поддержку, неиссякаемое терпение и за то, что они прошли этот путь со мной.