

Дакс

Александра Александровна

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург.

Научный руководитель: доктор биологических наук **Барлев Николай Анатольевич**, руководитель лаборатории регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН **Имянитов Евгений Наумович**, руководитель лаборатории молекулярной онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

доктор медицинских наук, профессор **Зарицкий Андрей Юрьевич**, директор Института гематологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Защита диссертации состоится “ _____ ” _____ 2017 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д.4.

E-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте Института.

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2017 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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-домен-содержащих E3-убиквитинлигаз. 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 и 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), Pol η – 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 (Duan et al., 2004) и 89% случаев рака предстательной железы (Logan et al., 2006) у человека. 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 убиквитинлигазной 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.

Цели и задачи исследования

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

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 гистон 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 доксорубицину.

Научная новизна работы

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

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.

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.

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

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты настоящего исследования важны для фундаментального понимания клеточных процессов, в которые вовлечен белок Pirh2, а именно: регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и апоптоза. 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.

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)

Объем и структура диссертации

Диссертация содержит следующие разделы: введение; 4 главы - обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение; основные выводы и список цитируемой литературы, содержащий 264 наименования. Материалы диссертации изложены на 148 страницах машинописного текста и иллюстрированы 4 таблицами и 35 рисунками. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (гранты 14-50-00068 и 14-15-00816) и РФФИ (грант 16-34- 00869 мол_a).

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток. В работе были использованы следующие культуры клеток человека: HEK293T (эмбриональные клетки почки человека), H1299 (клетки немелкоклеточной карциномы легкого человека) и изогенные клеточные линии с повышенной экспрессией и нокдауном белка Pirh2 (H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 Pirh2 shRNA, соответственно), HCT116 (клетки рака прямой кишки человека) и HCT116 с нокаутом по гену p53 (HCT116 p53^{-/-}), Saos2 (остеосаркома человека) с тетрациклин-зависимой индуцибельной экспрессией (tet-on система) двух изоформ белка p63 с HA-эпитопом Saos2 TAp63 и Saos2 ΔNp63.

Культивирование клеточных линий. Линии HEK293T, HCT116 и HCT116 p53^{-/-} культивировали в среде DMEM (Lonza, США), дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 2мМ L-глутамином (Биолот, Россия) и смесью антибиотиков пенициллин (100 МЕ/мл)/стрептомицин (100 мкг/мл) (Биолот, Россия). Линии H1299 и ее производные, а также Saos2 TAp63 и Saos2 ΔNp63 культивировали в среде RPMI 1640 (Lonza, США) в аналогичных условиях.

Трансфекция клеток. Трансфекцию клеток линии HEK293T осуществляли реагентом TurboFect (ThermoScientific, USA), трансфекцию клеток линии H1299 - реагентом X-tremeGENE HP (Roche, Швейцария), согласно инструкциям производителей.

Получение стабильных клеточных линий. Стабильные клеточные линии H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 Pirh2 shRNA получали методом лентивирусной трансдукции. Для создания вируса использовали пакующую систему второго поколения, состоящую из psPAX2 и pMD2.G (предоставленную D.Trono, École polytechnique fédérale de Lausanne, Швейцария). Оценку эффективности проводили с помощью проточной цитофлуориметрии в случае наличия в экспрессионной плазмиде репортерного гена eGFP и вестерн-блот анализа.

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Экстракцию РНК осуществляли с помощью TRI реагента (Sigma Aldrich, США). Синтез кДНК осуществляли с использованием набора реагентов RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischerScientific, США). ПЦР 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). Все этапы осуществлялись согласно инструкциям производителей.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки Pirh2-GST, Elav11-GST, H2A.Z-GST, а также нативный GST в качестве контроля, экспрессировались в клетках бактерий *E.coli* штамма BL21(de3)pLysSRosetta с помощью индуктора IPTG в концентрации 0,4 мМ. Очистку проводили с использованием глутатион-сефарозы (General Electric, США) согласно инструкции производителя.

Метод GST-pulldown. Имобилизованные на глутатион-сефарозе очищенные рекомбинантные белки инкубировали в течение 3 ч с ядерным экстрактом, полученным из клеток НЕК293Т, после чего 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 окрашивали Кумасси и проводили масс-спектрометрический анализ, либо осуществляли вестерн-блот и детекцию связавшихся белков с помощью специфических антител

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 $p < 0.01$.

Ко-иммунопреципитация. Клетки НЕК293Т через 24 ч после трансфекции вектором, кодирующим Elav11/HuR с 3×FLAG-эпитопом, лизировали и полученный экстракт использовали для ко-иммунопреципитации с использованием анти-FLAG M2 агарозы (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя.

Убиквитинилирование *in vivo*. Убиквитинилирование проводилось по стандартной методике. Клетки линии НЕК293Т трансфецировали конструкциями, кодирующими белки Pirh2 и убиквитин, с 6His-эпитопом - Ub-6His и опционально субстрат. Очистку убиквитинированных белков проводили с помощью никелевой агарозы (Ni-NTA Agarose, Thermofisher Scientific, США) согласно стандартной методике.

Разделение белков в ПААГ и иммуноблоттинг. Электрофорез белков осуществляли в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Laemmli (Laemmli, 1970). Для вестерн-блот анализа переносили на PVDF мембрану и окрашивали специфическими антителами.

Тест на заращение царапины. В монослое клеток с помощью наконечника дозатора на 1 мл проводили прямые царапины. Фоторегистрация царапины осуществлялась на временных точках 0, 24 и 48 ч после проведения царапин с помощью инвертированного светового микроскопа TS100 (Nikon, Япония) и цифровой фотокамеры PowerShot A1100 IS (Canon, Япония).

МТТ-тест. Оценку цитотоксического действия доксорубицина и цисплатина на клетки

проводили по стандартной методике с использованием реагента МТТ. Оптическую плотность измеряли при длинах волн 570 и 630 нм с помощью анализатора Fluorofot «Charity» (Россия).

Мониторинг пролиферации и миграции клеток в режиме реального времени. Анализ изменения клеточного индекса осуществляли с помощью системы xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Для мониторинга пролиферации клетки помещали в планшет E-plate 16 (ACEA Biosciences, США). Для оценки миграции клеток в реальном времени использовали планшет CIM-Plate® 16 (ACEA Biosciences, США). Тесты осуществлялись согласно инструкциям производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Транскрипционный фактор p63 регулирует экспрессию Pirh2

Помимо онкосупрессора p53, в семейство белков p53 входят также белок p63, который кодируется геном *TP63*, и p73 - продукт гена *TP73*. Данные белки являются структурными гомологами и способны образовывать гетеродимеры, связываться с общими генами-мишенями и участвовать в регуляции таких ключевых клеточных процессов, как апоптоз, остановка клеточного цикла и ответ на генотоксический стресс. Для трех белков данного семейства известны такие общие мишени как проапоптотические гены PUMA и NOXA (Kerr et al., 2012), а также p21^{Waf-1} и GADD45, ответственные за остановку клеточного цикла и репарацию ДНК (Lee, La Thangue, 1999). Все три белка семейства p53 имеют множество изоформ, образующихся за счет альтернативного сплайсинга и наличия нескольких промотеров. Белок p63 имеет две N-концевые изоформы: полноразмерная изоформа TAp63 и изоформа с отсутствующим трансактивационным доменом - Δ Np63. Показано, что изоформа TAp63 выполняет в клетках типичные для семейства p53 функции проапоптотического транскрипционного фактора, а именно индуцирует апоптоз (Gressner et al., 2005; Suh et al., 2006) и препятствует продвижению клетки по клеточному циклу (Galleos et al., 2008). Изначально считалось, что Δ Np63 является транскрипционно неактивной по причине отсутствия аминоконцевого трансактивационного домена (Yang et al., 1998), однако позже было показано, что именно данная изоформа способна активировать экспрессию генов-мишеней в кератиноцитах и является ключевым регулятором развития и дифференцировки эпителиальных тканей (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). Также на сегодняшний день известно, что RING-домен содержащая E3-убиквитинлигаза Pirh2, продукт гена *RCHY1* человека, способна модифицировать не только p53, но также p63 (Jung et al., 2013; Yan et al., 2013) и p73 (Jung et al., 2011) и, тем самым, способствовать их протеасомной деградации. Мы поставили перед собой задачу выяснить, является ли транскрипционный фактор p63 регулятором экспрессии белка Pirh2.

1.1. TAp63 стабилизирует Pirh2 на уровне белка.

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. 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.

С помощью вестерн-блот анализа мы показали, что при индукции полноразмерной изоформы TAp63 экспрессия белка Pirh2 усиливается, при этом в случае индукции изоформы Δ Np63 изменений в количестве клеточного Pirh2 не наблюдается (рис. 1).

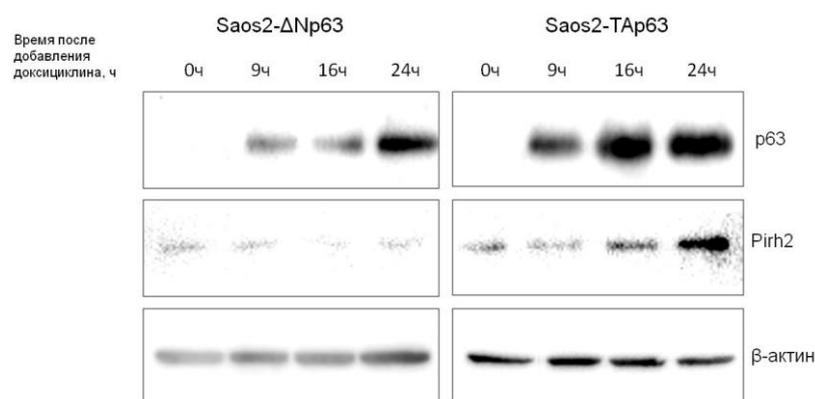


Рисунок 1. Стабилизация белка Pirh2 под влиянием транскрипционного фактора p63. Вестерн-блот анализ изоформ Δ Np63, TAp63 и Pirh2 в клетках линий Saos2 tet-on после индукции экспрессии изоформ с помощью обработки клеток 4 мкг/мл доксициклина в течение 9, 16 и 24 часов. Контроль нагрузки – β -актин.

Таким образом, мы продемонстрировали, что транскрипционный фактор p63, а именно его полноразмерная изоформа, имеющая трансактивационный домен – TAp63, способствует увеличению уровня белка Pirh2 в клетках.

1.2 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 TAp63 и Saos2 Δ Np63, 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 также праймеров, специфичных для кодирующей последовательности референсного гена GAPDH, мы оценили уровень относительной экспрессии *RCHY1* (рис. 2).

Как видно на рисунке 2, повышение уровня экспрессии гена *RCHY1* в результате

доксициклин-зависимой индукции р63 наблюдается только в линии Saos2 TAp63, а в линии Saos2 ΔNp63 относительное количество мРНК Pirh2, напротив, существенно не меняется.

Таким образом, мы сделали вывод о том, что ген *RCHY1*, кодирующий Pirh2, является транскрипционной мишенью белка р63. При этом мы показали, что аминоконцевой трансактивационный домен р63 необходим для активации экспрессии убиквитинлигазы Pirh2.

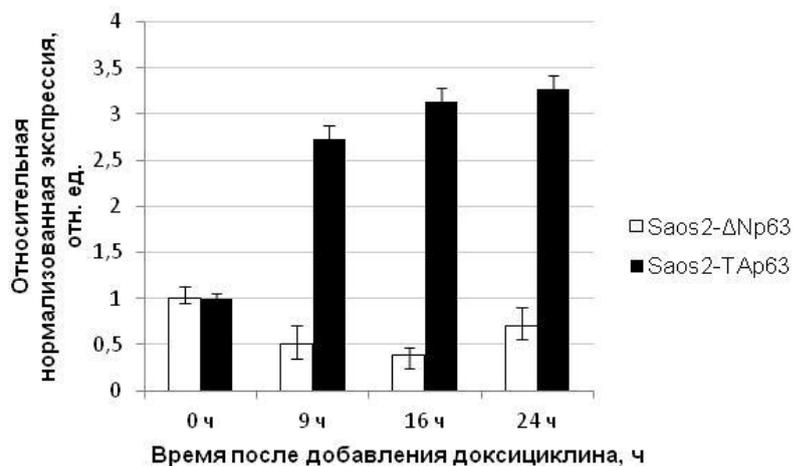


Рисунок 2. Анализ влияния индукции двух изоформ белка р63 - TAp63 и ΔNp63 - на уровень экспрессии гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2 ОТ ПЦР в РВ, демонстрирующая уровень относительной экспрессии гена *RCHY1* человека при тетрациклин-зависимой индукции TAp63 и ΔNp63 в клетках остеосаркомы Saos2. Нормализация относительно экспрессии гена *GAPDH* с использованием метода ΔΔ-Ст. Вертикальные отрезки обозначают величину стандартного отклонения. Ч – часы.

2. Определение новых белков-интерактантов E3-убиквитинлигазы Pirh2

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. После обработки данных, полученных в результате масс-спектрометрии, мы выявили 225 белков-интерактантов

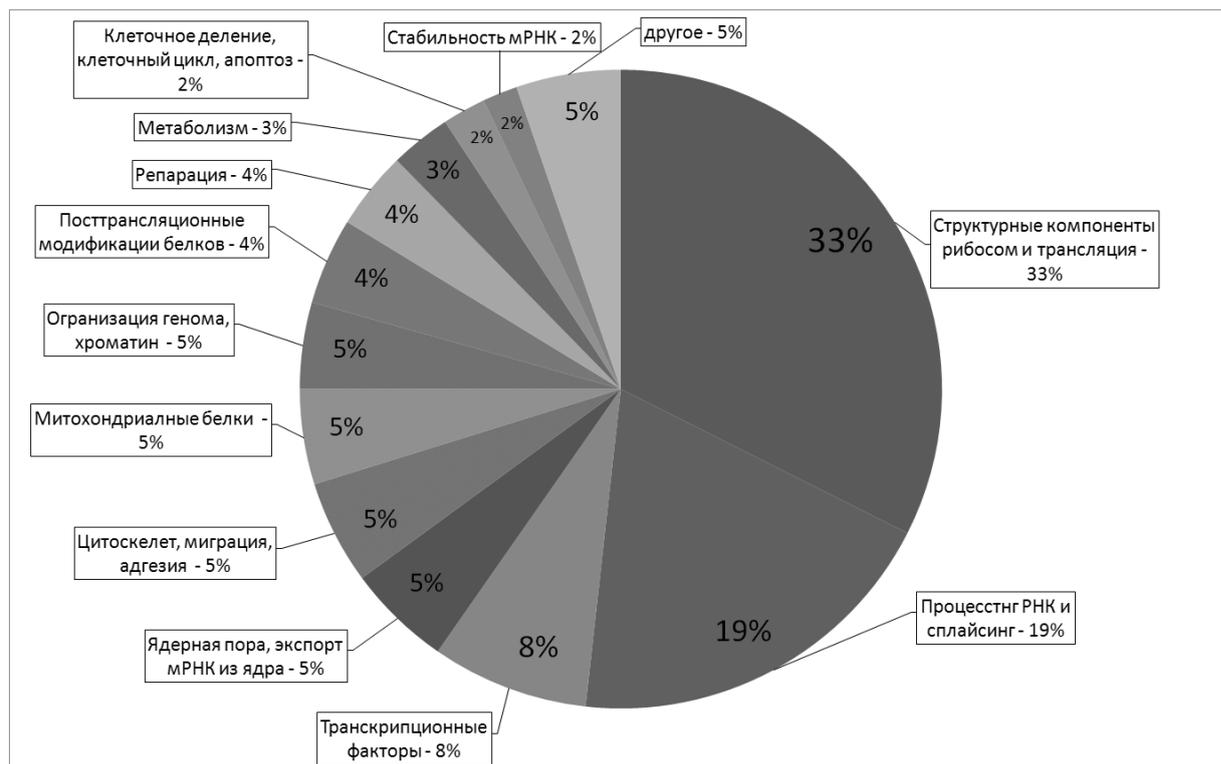


Рисунок 3. Распределение белков-интерактантов Pirh2 по функциям и клеточным процессам.

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.3). Наиболее интересными для нас являлись белки, участвующие в репарации, контроле клеточного цикла и деления, а также в запуске апоптоза.

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. Стоит отметить, что практически все перечисленные участники процессов

репарации обладают антиапоптотическим эффектом.

Кроме того, мы показали, что с Pirh2 взаимодействуют следующие белки, участвующие в регуляции клеточного цикла, пролиферации и апоптоза: 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).

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

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 ¹
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.

¹ 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.

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. 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.

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. 4).

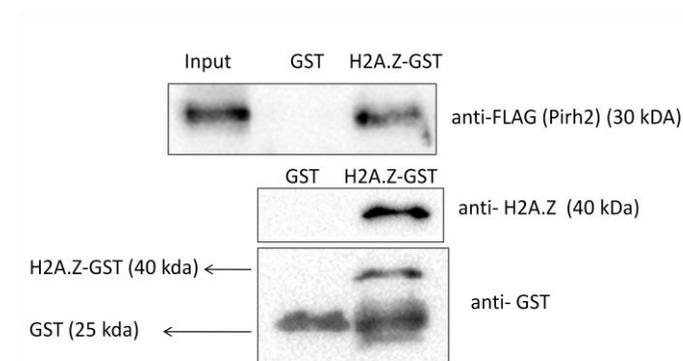


Рисунок 4. Подтверждение физического взаимодействия белков Pirh2 и H2AZ-GST. Вестерн-блот анализ GST-пулдауна с использованием химерного белка H2A.Z-GST и экстракта клеток HEK293T, экспрессирующих Pirh2-3×FLAG. Контроль нагрузки - окраска антителами против GST.

Известно, что гистоны, в том числе и гистон H2A.Z, подвергаются посттрансляционным модификациям. Так, для H2A.Z было показано лизин-специфическое метилирование, ацетилирование, сумоилирование и 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 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. 5).

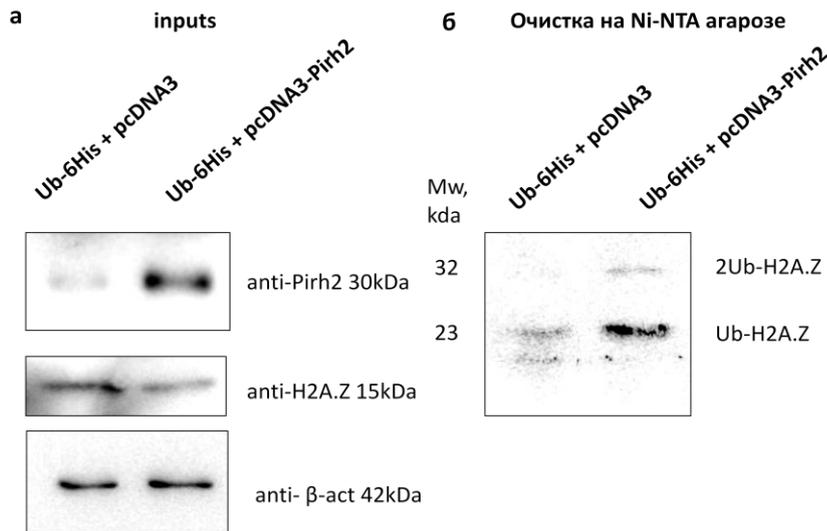


Рисунок 5. Подтверждение способности Pirh2 убиквитинировать гистон H2A.Z *in vivo*.

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

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. 5,б). Помимо этого, мы предположили, что Pirh2, по-видимому, также обеспечивает мультиубиквитинирование H2A.Z. Диубиквитинированная форма выявляется на уровне около 32 кДа (рис. 5,б).

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. На рисунке 6 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.

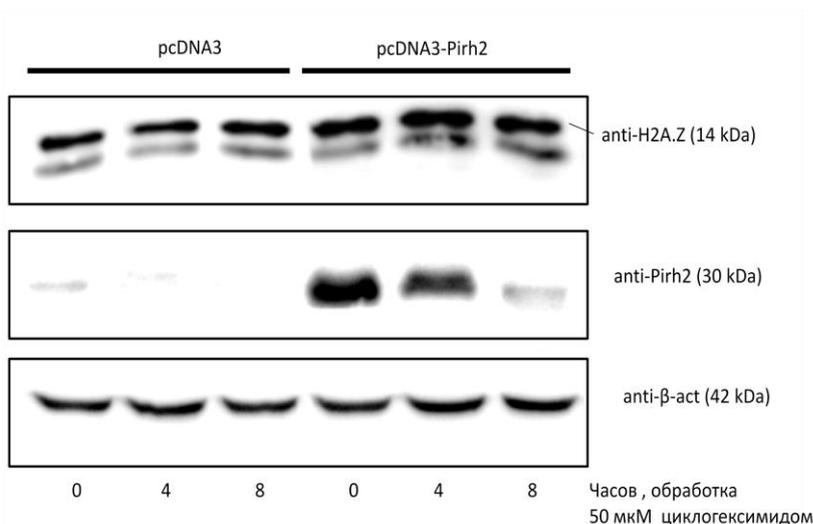


Рисунок 6. Pirh2 не направляет гистон H2A.Z на протеасомную деградацию. Определение стабильности H2A.Z при обработке ингибитором синтеза белка циклогексимидом (50 мкМ) в клетках H1299, сверхэкспрессирующих Pirh2, по сравнению с контролем. Вестерн-блот анализ. Контроль нагрузки – β -актин.

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, кодирующих такие ключевые белки как p21 (остановка клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК) (Wang et al., 2000b), циклины А и В1 (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 HEK293Т после трансфекции вектором pIRES, кодирующим Pirh2-3×FLAG (рис. 7,а), а также методом ко-иммунопреципитации эндогенного Pirh2 из клеток HEK293Т с Elavl-3×FLAG (рис. 7,б).

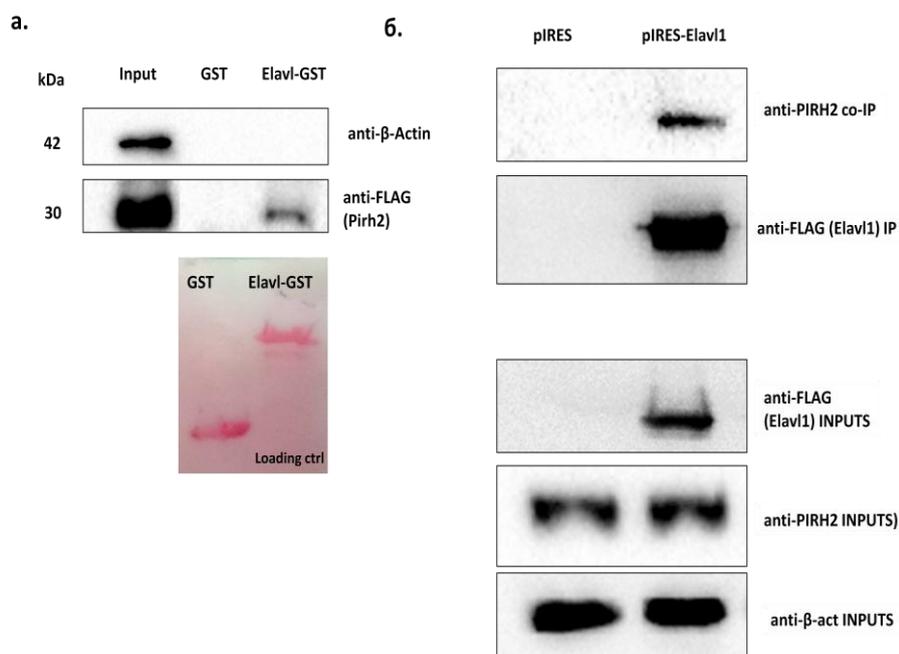


Рисунок 7. Подтверждение физического взаимодействия белков Elavl1 и Pirh2

(а) GST-пулдаун Pirh2-3×FLAG с использованием химерного белка Elavl1-GST. Контроль нагрузки – окраска мембраны Ронсеаи.
(б) Ко-иммунопреципитация эндогенного белка Pirh2 из клеток HEK293Т с Elavl-3×FLAG. Контроль нагрузки – β-актин.

Для определения способности Pirh2 убиквитинировать Elavl1 мы осуществили убиквитинирование *in vivo* белка Elavl-3×FLAG путем трансфекции вектора, кодирующего Ub-6His, в клетки HEK233Т с ко-трансфекцией Elavl-pIRES, Pirh2-pcDNA3 и pcDNA3 в качестве

контроля (рис.8). В результате мы показали, что Pirh2 способен полиубиквитинировать белок Elavl1.

Для того чтобы определить влияние белка Pirh2 на стабильность Elavl1 мы осуществили трансфекцию белка Pirh2 в количестве 0, 3 и 10 мкг, после чего проанализировали уровень белка Elavl1 в клетках. Как видно на рисунке 9а, количество Elavl1 находится в обратной зависимости от количества Pirh2. Мы также оценили изменение периода полужизни Elavl1 при сверхэкспрессии Pirh2 в клетках H1299 в присутствии ингибитора синтеза белка циклогексимида (50 мкМ). На рисунке 9,б видно, что белок Pirh2 способствует деградации Elavl1.

Таким образом, нами обнаружена еще одна мишень убиквитинлигазы Pirh2. Стоит отметить, что роль Elavl1/HuR 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.

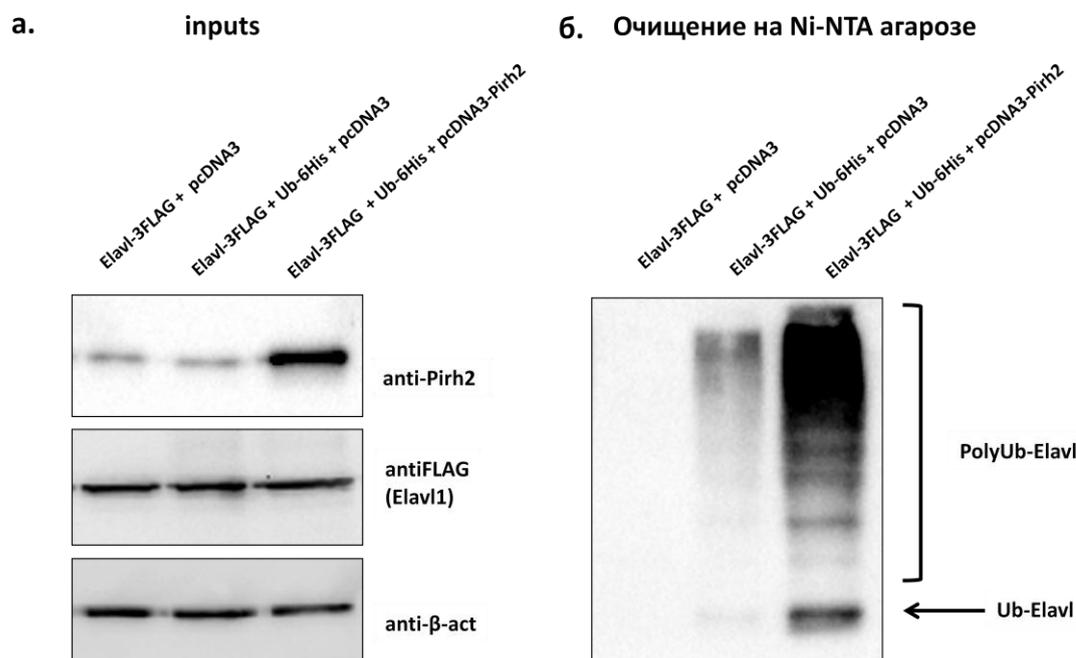


Рисунок 8. Pirh2-опосредованное убиквитинирование *in vivo* белка Elavl1-3×FLAG
(а) Вестерн-блот анализ инпутов, взятых в эксперимент. (б) Вестерн-блот анализ убиквитинирования Elavl1-3FLAG. Контроль нагрузки – β-актин.

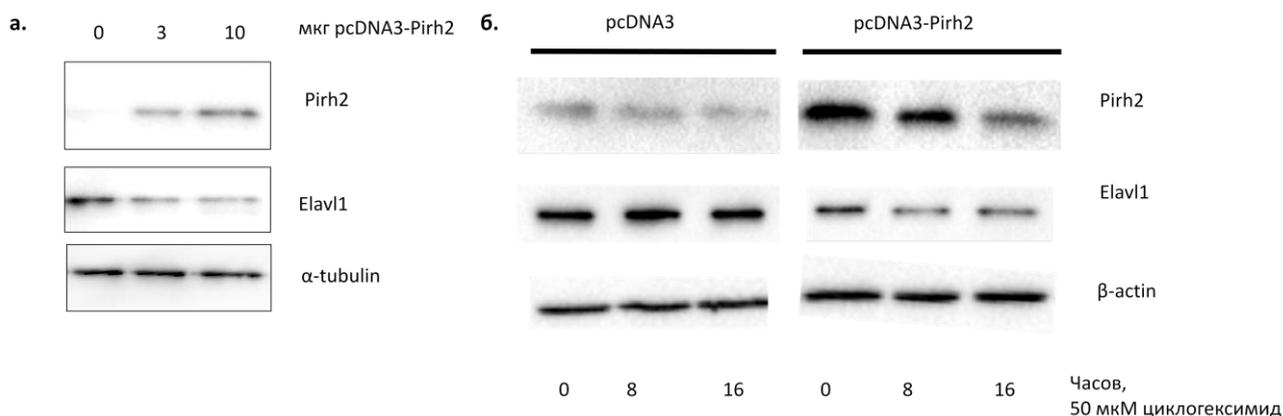


Рисунок 9. Pirh2 негативно регулирует уровень белка Elavl1 в клетке (а) Влияние на стабильность Elavl1 эктопической экспрессии Pirh2 в клетках линии HEK293T. Контроль нагрузки – α-тубулин. (б) Определение стабильности Elavl1 при обработке ингибитором синтеза белка циклогексимидом в клетках H1299, сверхэкспрессирующих Pirh2, по сравнению с контролем. Контроль нагрузки – β-актин.

3. 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. 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.

3.1 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.10) (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 мин) в течение нескольких часов или суток возможно детектировать изменение числа клеток (рост или гибель) и получать результат в виде графика, отражающего клеточный индекс (рис.10). Кроме того, среднее значение наклона кривой между двумя соседними временными точками (slope) также является отражением скорости деления клеток.

На рисунке 6 представлены кривые изменения клеточного индекса клеток H1299 через 24 ч после временной трансфекции векторами pcDNA3 и pcDNA3-Pirh2 (рис. 10,а) и числовые выражения среднего угла наклона кривых между соседними точками (slope) (рис. 10,б). Контроль эффективности трансфекции осуществлялся с помощью вестерн-блот анализа (рис. 10,в).

Как видно на рисунке 10, клетки линии H1299, сверхэкспрессирующие трансфецированный Pirh2, обладают повышенным пролиферативным потенциалом по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, мы предположили, что белок Pirh2 усиливает способность клеток к делению.

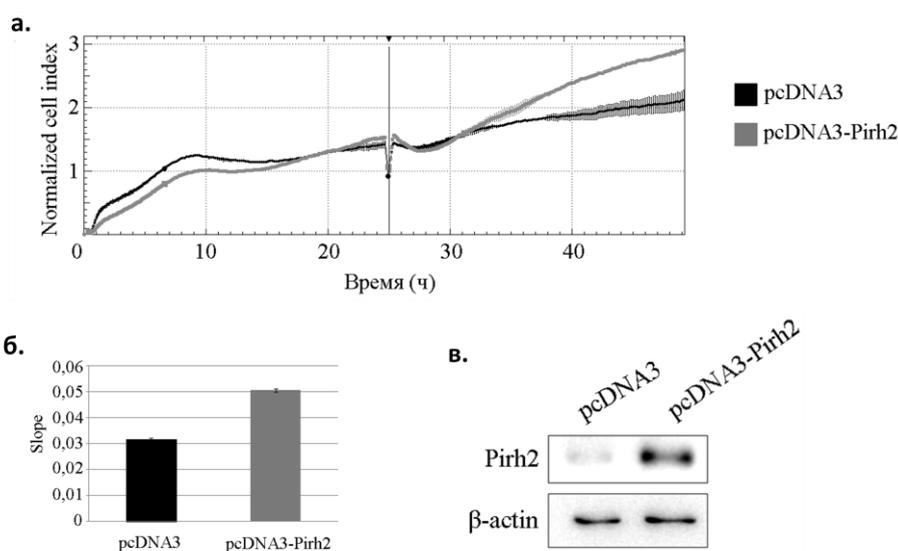


Рисунок 10.
Изменение клеточного индекса клеток H1299 после временной трансфекции вектором pcDNA3-Pirh2. (а) Кривые изменения клеточного индекса в реальном времени. **(б)** Числовые выражения среднего угла наклона данных кривых между соседними временными точками

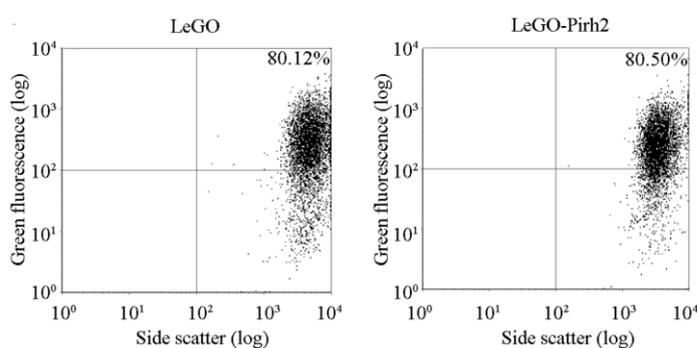
(slope). Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. **(в)** Вестерн-блот анализ для подтверждения эффективности трансфекции. Контроль нагрузки – β -актин.

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

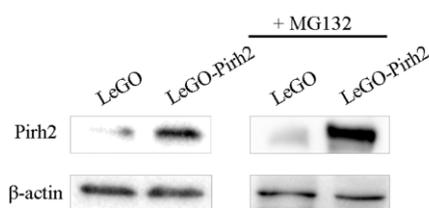
Для более детального исследования влияния Pirh2 на туморогенные свойства клеток мы создали изогенные клеточные линии на основе линии H1299 с различным статусом экспрессии белка Pirh2. Для получения стабильных клеточных линий с различным статусом Pirh2 мы осуществили трансдукцию клеток лентивирусными 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. 11,а) и с помощью вестерн-блот анализа с окраской антителами против Pirh2 (рис. 11,б). На рисунке 11,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 пуромицину, соответственно, клетки, трансдуцированные данным вектором, кодирующим последовательности shRNA Pirh2 и shRNA scrambled подвергались пуромициновой селекции. Эффективность нокдауна Pirh2 оценивалась методом вестерн-блот с окраской антителами против Pirh2. Как видно на рисунке 11,в, уровень Pirh2 в клетках стабильной клеточной линии H1299 shRNA Pirh2 значительно ниже по сравнению с клетками линии H1299 shRNA scrambled.

а.



б.



в.

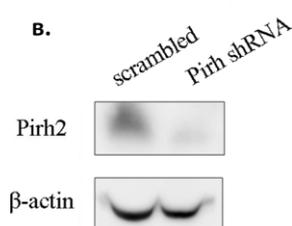


Рисунок 11. Получение стабильных клеточных линий, различных по статусу Pirh2 на основе линии H1299. (а) Результаты детекции GFP-положительных клеток, трансдуцированных лентивирусными векторами LeGO и LeGO-Pirh2. (б) Вестерн-блот анализ количества Pirh2 в стабильных клеточных линиях H1299 LeGO-Pirh2 и 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.

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. 12).

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 Pirh2 shRNA), напротив, снижает пролиферативный потенциал исследуемых клеток (рис. 12). 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.

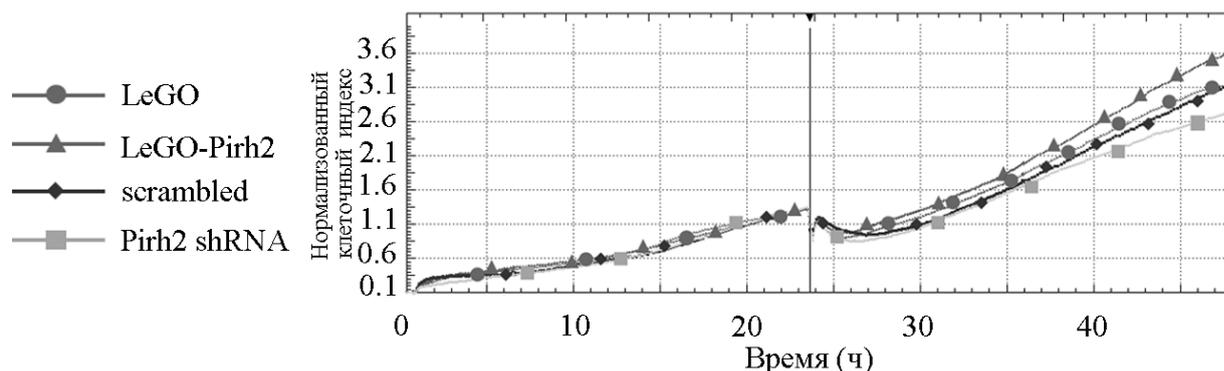


Рисунок 12. Результаты измерения клеточного индекса клеток H1299 с различным статусом Pirh2: LeGO-Pirh2 (с эктопической экспрессией Pirh2), shRNA Pirh2 (с нокдауном Pirh2) и контрольных линий LeGO и shRNA scrambled.

3.3 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 мин в течение 24 ч. Мы провели миграционные тесты для полученных изогенных стабильных клеточных линий H1299: LeGO-Pirh2 и LeGO, а также shRNA Pirh2 и shRNA scrambled. Как видно на рисунке 13, при эктопической экспрессии Pirh2 миграционный потенциал клеток H1299 увеличивается (рис. 13,а), при этом нокдаун белка Pirh2 оказывает негативное влияние на способность клеток H1299 к миграции (рис. 13,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.14,а). Мы показали, что «заращение царапины» в монослое клеток,

сверхэкспрессирующих Pirh2, происходит значительно эффективнее. Как видно на рисунке 14, а,б, спустя 48 ч после начала эксперимента царапина на монослое клеток H1299 LeGO-Pirh2, в отличие от контроля, зарастает практически полностью, делая невозможным измерение расстояния 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.

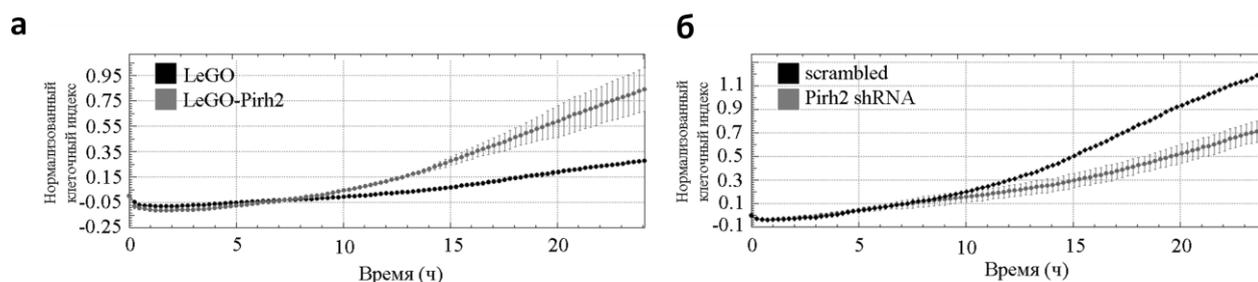


Рисунок 13. Влияние статуса экспрессии белка Pirh2 на миграционный потенциал клеток H1299. (а) Миграционный тест, выполненный с использованием стабильных клеточных линий H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 LeGO в качестве контроля. **(б)** Миграционный тест, осуществленный с использованием стабильных клеточных линий H1299 shRNA Pirh2 и H1299 shRNA scrambled в качестве контроля.

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. 14,в,г). В результате проведенного анализа мы показали, что экзогенная экспрессия Pirh2 способствует снижению экспрессии гена CDH1, кодирующего маркер эпителиального морфотипа клеток Е-кадгерин (рис. 14,в), при этом нокдаун Pirh2 (рис. 14,г), вызывает обратный эффект. При этом уровень мРНК мезенхимного маркера виментина по нашим данным остается неизменным в обоих случаях (рис. 14,в,г). 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. 14,д). Как видно на рисунке 14,д, 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.

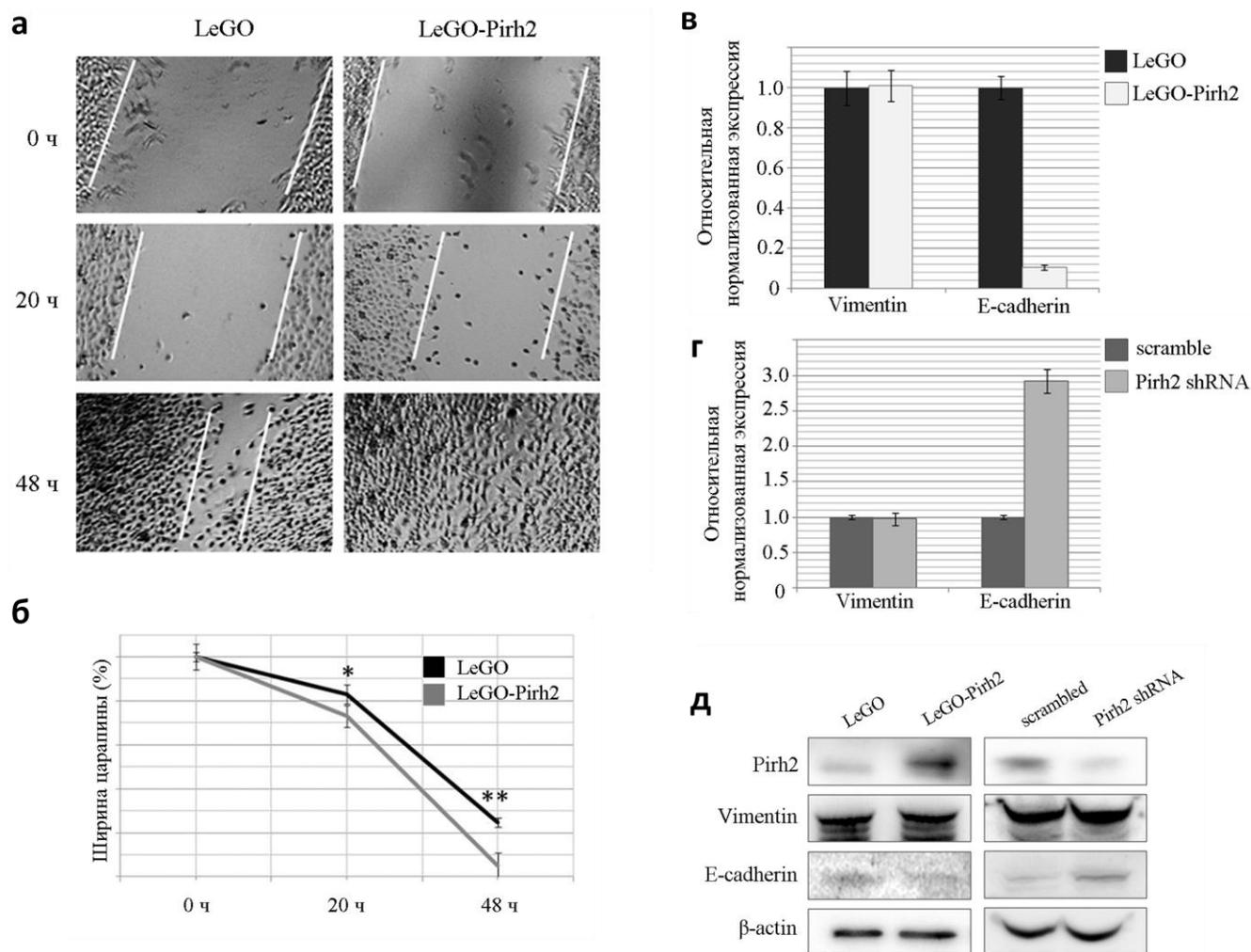


Рисунок 14. Влияние Pirh2 на миграционную способность клеток H1299 и на уровень экспрессии E-кадгерина и виментина

(а) Микрофотографии царапины на временных точках 20 и 48 ч. (б) Графическое изображение расстояния между краями царапины. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *t*-критерий Стьюдента). Экспрессия CDH1 и VIM в клетках линий H1299 LeGO-Pirh2 и H1299 LeGO в качестве контроля. (в),(г) Экспрессия CDH1 и VIM в клетках линий H1299 LeGO-Pirh2, LeGO, shRNA Pirh2 и shRNA scrambled. Нормализация относительно экспрессии GAPDH. (д) Вестерн-блот анализ белков E-кадгерин и виментин в клетках изогенных стабильных линий H1299 LeGO-Pirh2, LeGO, shRNA Pirh2 и shRNA scrambled. Контроль нагрузки – β -актин.

3.3.5 Pirh2 повышает устойчивость клеток H1299 к доксорубицину

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 цисплатин 60 мкг/мл и 100 мкг/мл. Обработку проводили в течение 48 ч. Как видно на рисунке 15, выживаемость клеток при обработке доксорубином при сверхэкспрессии Pirh2 увеличивается на 10-14 % по сравнению с контролем (рис. 15,а). При этом Pirh2 не влияет на устойчивость клеток к цисплатину (рис. 15,б). Для подтверждения влияния Pirh2 на устойчивость клеток к доксорубину мы осуществили определение клеточного индекса с использованием линий H1299 с различным статусом Pirh2: LeGO-Pirh2 (с эктопической экспрессией Pirh2), shRNA Pirh2 (с нокдауном Pirh2) и контрольных линий LeGO и shRNA scrambled после обработки 2 мкМ 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. 16).

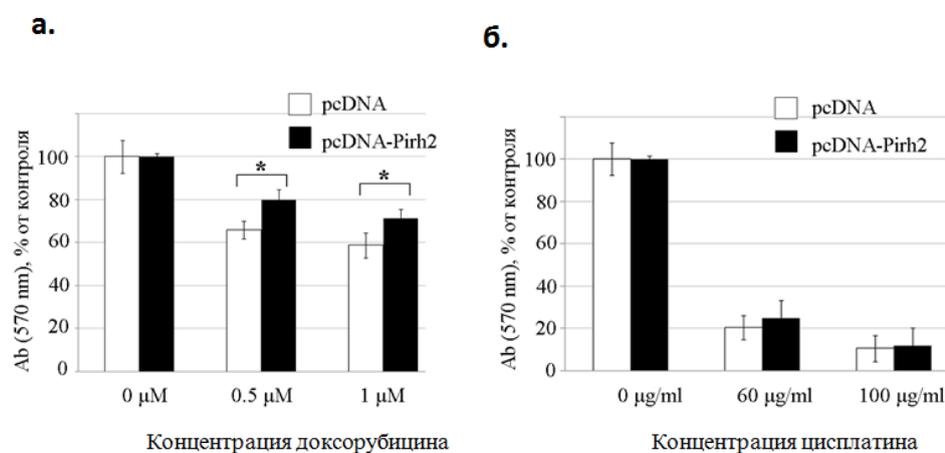


Рисунок 15.
Результаты МТТ-теста для клеток H1299 после временной трансфекции вектором Pirh2-pcDNA3 и вектором pcDNA в

качестве контроля, обработанных (а) доксорубином и (б) цисплатином. (* $p \leq 0,05$; t-критерий Стьюдента).

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

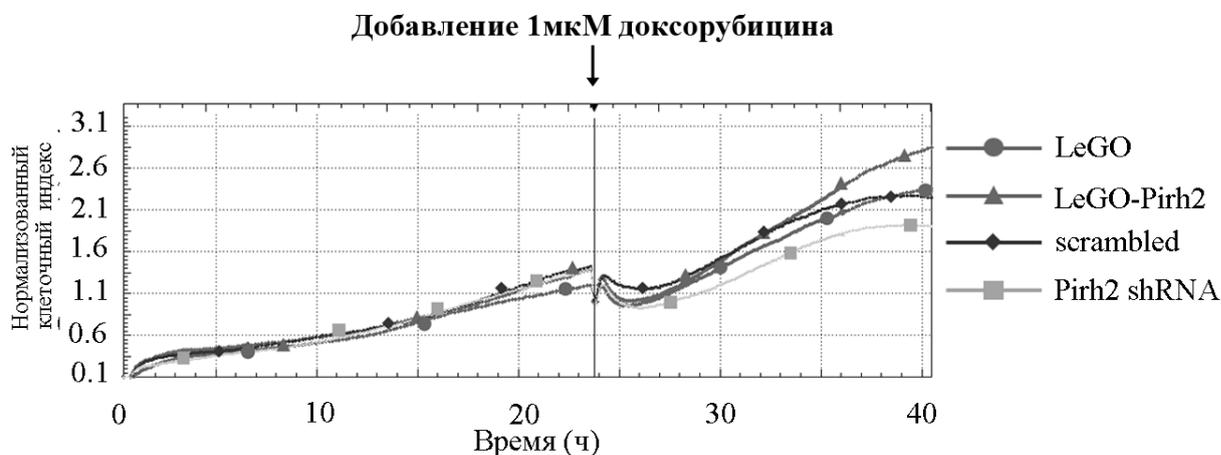


Рисунок 16. Результаты измерения клеточного индекса клеток H1299 с различным статусом Pirh2: LeGO-Pirh2, shRNA Pirh2 и контрольных линий LeGO и shRNA scrambled после добавления 2 мкМ доксорубина.

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

Для того, чтобы выявить возможный механизм влияния Pirh2 на опухолевый 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.17,а). Как видно на рисунке 17,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.

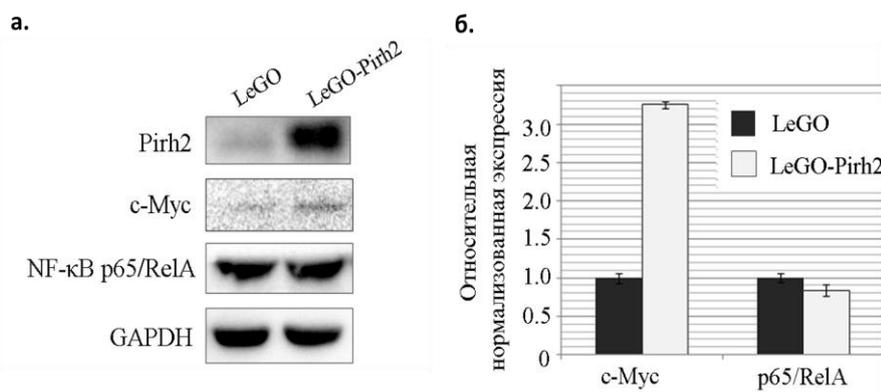


Рисунок 17. Влияние эктопической экспрессии Pirh2 на уровень белка (а) и мРНК (б) регуляторов клеточной пролиферации с-Мус и p65 (активной субъединицы NF-κB).

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 (рис. 17,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 c-Myc, участвующего в формировании перечисленных свойств.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

Дакс А. А., Мелино Д., Барлев Н. А. "Роль различных E3-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).

Тезисы конференций

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

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

Fedorova O.A., Daks A. A., Petukhov A.V., Shuvalov O.Y., Barlev N.A.. Transcriptional factors p53 and p63 regulate expression of orphan nuclear receptors NR4. 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 E3-убиквитинлигазой Pirh2. Цитология. 2014. Т. 56. № 9. С.652

Petukhov A.V., Daks A.A., Shuvalov O.Y., Barlev N.A.. 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.

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

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

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

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

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