

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВА

Елена Андреевна

**РОЛЬ ЛИЗИН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9
В РЕГУЛЯЦИИ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА SAM68**

03.01.03 – Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Барлев Николай Анатольевич

Санкт-Петербург

2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1. Актуальность исследования.....	7
2. Цели и задачи работы	8
3. Основные положения, выносимые на защиту.....	9
4. Научная новизна полученных результатов	10
5. Теоретическое и практическое значение работы.....	10
6. Апробация работы	11
7. Список опубликованных по теме диссертации печатных работ.....	11
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Метилтрансфераза Set7/9 — важный регулятор внутриклеточных процессов.....	13
1.1.1 Структура и каталитический механизм метилтрансферазы Set7/9	14
1.1.2 Многообразие регуляторных функций Set7/9	16
1.1.3 Метилтрансфераза Set7/9 — важный регулятор клеточного цикла и апоптоза ..	22
1.2 Биологическая роль РНК-связывающего белка Sam68.....	23
1.2.1 Структура РНК-связывающего белка Sam68.....	24
1.2.2 РНК - мишени белка Sam68.....	26
1.2.3 Внутриклеточная локализация Sam68	27
1.2.4 Механизмы регуляции РНК-связывающего белка Sam68.....	29
1.2.5 Биологические функции Sam68	31
1.2.6 Роль белка Sam68 в контроле клеточного цикла и апоптоза.....	33
1.2.7 Роль белка Sam68 в онкогенезе	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1 Клеточные культуры	38
2.1.1 Клеточные линии, использованные в работе	38

2.1.2 Условия культивирования	38
2.1.3 Обработка клеток химическими агентами	38
2.1.4 Трансфекция клеточных линий.....	39
2.1.5 Получение стабильных клеточных линий.....	40
2.2 Очистка, выделение и анализ нуклеиновых кислот.....	40
2.2.1 Выделение РНК и обратная транскрипция	40
2.2.2 ПЦР в реальном времени	41
2.2.3 Выделение плазмидной ДНК	42
2.2.4 Электрофорез в агарозном геле.....	42
2.2.5 Выделение ДНК из агарозного геля	43
2.3 Генетические конструкции.....	43
2.3.1 Сайт-направленный мутагенез.	43
2.3.2 Молекулярное клонирование	44
2.4 Экспрессия, очистка и анализ рекомбинантных белков.....	45
2.4.1 Трансформация <i>E. coli</i> методом теплового шока	45
2.4.2 Экспрессия рекомбинантных белков.....	46
2.4.3 Очистка рекомбинантных белков с использованием глутатион-сефарозы	46
2.4.4 Очистка рекомбинантных белков с использованием Ni-агарозы.....	47
2.4.5 Получение цитоплазматического и ядерного экстрактов.....	48
2.4.6 Разделение белков в ПААГ и иммуноблоттинг (вестерн-блот анализ)	48
2.5 Изучение белок-белковых взаимодействий.....	50
2.5.1 GST-пулдаун	50
2.5.2 Ко-иммунопреципитация.....	51
2.6 Иммуноцитохимическое окрашивание	51
2.7 Изучение клеточного цикла методом проточной цитометрии	52
ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ.....	54
3.1 Определение белков-интерактантов метилтрансферазы Set7/9.....	54
3.2 Подтверждение взаимодействия между метилтрансферазой Set7/9 и РНК-связывающим белком Sam68.....	55

3.2.1 Полноразмерная форма метилтрансферазы Set7/9 взаимодействует с полноразмерной формой Sam68 <i>in vivo</i>	55
3.2.2 Полноразмерная форма Sam68 напрямую взаимодействует с MORN-доменом метилтрансферазы Set7/9 <i>in vitro</i>	57
3.2.3 MORN-домен метилтрансферазы Set7/9 напрямую взаимодействует с RG доменом Sam68 <i>in vitro</i>	58
3.3 Метилтрансфераза Set7/9 метилирует РНК-связывающий белок Sam68 в положении K208.	61
3.3.1 Биоинформатический поиск потенциального сайта метилирования Sam68	61
3.3.2 Сайт-направленный мутагенез потенциального сайта метилирования Sam68 ...	63
3.3.3 Метилтрансфераза Set7/9 метилирует Sam68 в положении K208	64
3.4 Особенности локализации Sam68 в клетках НЕК293Т и рака толстой кишки НСТ116 65	
3.4.1 Локализация эндогенного Sam68 в клеточных линиях НЕК293Т и НСТ116.....	65
3.4.2 Локализация сверхэкспрессированного Sam68 в клетках НЕК293Т и клетках рака толстой кишки НСТ116	68
3.4.3 Цитоплазматический Sam68 ассоциирован с α -тубулином микротрубочек	70
3.4.4 Sam68 ассоциирован с формированием апоптотической сети микротрубочек. .	71
3.5 Роль Set7/9 в регуляции РНК-связывающего белка Sam68	74
3.5.1 Влияние Set7/9 на белковый уровень Sam68	74
3.5.2 Нокаут Set7/9 приводит к снижению уровня Sam68 в цитоплазме.....	74
3.5.3 Set7/9 оказывает влияние на Sam68-опосредованный сплайсинг Bcl-x.....	78
3.5.4 Метилтрансфераза Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E	80
3.5.5 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованной регуляции клеточного цикла.....	85
3.5.6 Влияние белков Set7/9 и Sam68 на выживаемость пациентов с раком толстой кишки	86
ГЛАВА IV ОБСУЖДЕНИЕ	88
4.1 MORN домен метилтрансферазы Set7/9 отвечает за межбелковое взаимодействие с РНК-связывающим белком Sam68.....	88

4.2	Sam68 – новый субстрат метилирования метилтрансферазы Set7/9	89
4.3	Цитоплазматическая локализация Sam68 зависит от наличия Set7/9	91
4.4	Set7/9 новый регулятор Sam68-опосредованного сплайсинга Bcl-x	93
4.5	Метилтрансфераза Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной регуляции клеточного цикла.....	94
4.6	Низкий уровень Set7/9 оказывает негативное влияние на выживаемость пациентов с раком толстой кишки.....	96
	ВЫВОДЫ	98
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	100
	БЛАГОДАРНОСТИ	111

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BSA — бычий сывороточный альбумин

DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид

DMEM — (англ. Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium)

клеточная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко

kDa —килодальтон

PBS — фосфатно-солевой буфер

PI — йодистый пропидий

PMSF — (англ. phenylmethane sulfonyl fluoride) фенилметансульфонил
фторид

PVDF (англ. polyvinylidene difluoride) — поливинилидендифторид

SNBs (англ. Sam68 associated nuclear bodies) — Sam68-ассоциированные
ядерные тельца

TAE (англ. Tris-acetate-EDTA) — трис-ацетатный буфер с
этилендиаминтетрауксусной кислотой

а.о. — аминокислотный остаток

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

п.н. — пар нуклеотидов

ПААГ — полиакриламидный гель

ПТМ — пострансляционная модификация

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РНК — рибонуклеиновая кислота

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность исследования

Белок Sam68 (SRC associated in mitosis of 68 kDa) относится к STAR-семейству (signal transduction and activation of RNA metabolism) РНК-связывающих белков. Ряд работ посвящен роли белка Sam68 при раке толстой кишки [1], мочевого пузыря [2], карциноме почки [3], раке простаты [4], карциноме пищевода [5], раке шейки матки [6] и раке груди [7]. Экспрессия Sam68 повышена в клетках рака толстой кишки человека, что достоверно коррелирует со степенью туморогенности и наличием отдаленных метастаз у пациентов. Пациенты с высоким уровнем экспрессии или ядерной локализацией Sam68 демонстрируют худшие показатели по общей выживаемости [1]. Известно, что Sam68 вовлечен в несколько этапов метаболизма мРНК, играя важную роль в процессах транскрипции, альтернативного сплайсинга и последующего экспорта мРНК из ядра. В частности, нарушение регуляции Sam68-опосредованного сплайсинга является ключевым этапом в неопластической трансформации и развитии рака. Кроме того, Sam68 вовлечен в регуляцию экспрессии ряда генов, является регулятором клеточного цикла и апоптоза [8].

Белок Sam68 может подвергаться различным постраницсионным модификациям, таким как фосфорилирование, убиквитинирование и метилирование, которые оказывают различное влияние на его локализацию, стабильность и функцию. Однако, постраницсионная регуляция Sam68 еще недостаточно хорошо изучена, что делает ее изучение актуальным вопросом в контексте фундаментальной науки и прикладной медицины.

Посттрансляционные модификации, такие как метилирование, фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование и АДФ-рибозилирование, играют важную роль в регуляции функции белков, оказывая влияние на их стабильность, локализацию, способность взаимодействовать с белками-партнерами, выполнять свои биологические функции [9]. Белок Set7/9 изначально был идентифицирован в качестве специфической метилтрансферазы для гистона H3, метилирующей лизин K в положении 4 (H3K4) [10]. Впоследствии было идентифицировано большое количество негистонных белков-субстратов для метилтрансферазы Set7/9, включая такие мишени как: андрогеновый рецептор (androgen receptor, AR) [11, 12], β -катенин [13], метилтрансфераза DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1) [14], фактор транскрипции E2F1 (E2F transcription factor 1) [15], эстрогеновый рецептор α (estrogen receptor α , ER α) [16], белок-онкосупрессор p53 [17], p65/RelA субъединица NF κ B [18], коактиватор транскрипции PCAF (P300/CBP-associated factor) [19], белок ретинобластомы pRb [20], активатор транскрипции STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) [21], транскрипционный фактор TAF10 (Transcription initiation factor TFIID subunit 10) [22], регуляторный белок TAT [23], транскрипционный регулятор Yap1 (yes-associated protein 1) [24] и другие, принимающие участие в самых разнообразных внутриклеточных процессах. В данной работе изучена роль метилтрансферазы Set7/9 в регуляции РНК-связывающего белка Sam68.

2. Цели и задачи работы

Целью данной работы является исследование особенностей регуляции РНК-связывающего белка Sam68 посредством лизин-специфичной метилтрансферазы Set7/9.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Показать физическое взаимодействие метилтрансферазы Set7/9 и РНК-связывающего белка Sam68 *in vivo* и *in vitro*, а также выявить домены, отвечающие за данное взаимодействие.

2. Продемонстрировать Set7/9-опосредованное метилирование Sam68 и идентифицировать сайт метилирования.

3. Охарактеризовать особенности внутриклеточной локализации белка Sam68 в клеточных линиях НЕК293Т и рака толстой кишки НСТ116.

4. Определить роль Set7/9 в Sam68-опосредованной регуляции апоптоза и клеточного цикла.

3. Основные положения, выносимые на защиту

1. РНК-связывающий белок Sam68 взаимодействует с метилтрансферазой Set7/9 *in vivo* и *in vitro*. За данное взаимодействие отвечают RG-домен Sam68 и MORN-домен метилтрансферазы Set7/9.

2. Метилтрансфераза Set7/9 метилирует КН-домен РНК-связывающего белка Sam68 по лизину К в положении 208 (K208).

3. РНК-связывающий белок Sam68 локализуется преимущественно в ядре, и, в меньшей степени, в цитоплазме клеток НЕК293Т и НСТ116. Sam68 может ассоциироваться с α -тубулином в процессе формирования апоптотической сети микротрубочек.

4. Отсутствие метилтрансферазы Set7/9 приводит к снижению белкового уровня Sam68 в цитоплазме клеток НЕК293Т и НСТ116.

5. Метилтрансфераза Set7/9 вовлечена в регуляцию сплайсинга Bcl-x. Нокаут Set7/9 приводит к продукции анти-апоптотической изоформы Bcl-x(L).

6. Set7/9 вовлечена в Sam68-опосредованную регуляцию клеточного цикла. Наличие метилтрансферазы Set7/9 необходимо для Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E. Сверхэкспрессия Sam68 в клеточных линиях НЕК293Т и НСТ116 приводит к существенному укорочению

G2–M фазы клеточного цикла, в то время как в отсутствие Set7/9 в раковых клетках HCT116 Sam68 не оказывает значительного влияния на продолжительность G2–M фазы.

4. Научная новизна полученных результатов

В работе впервые было доказано наличие физического взаимодействия между метилтрансферазой Set7/9 и РНК-связывающим белком Sam68 *in vivo* и *in vitro*. Также были идентифицированы домены белков, отвечающие за их взаимодействие. Предложены и проверены новые подходы к поиску потенциальных сайтов метилирования в белках-субстратах метилтрансферазы Set7/9. Путем проведения метилирования *in vitro* с использованием радиоактивно-меченого донора метильных групп S-аденозилметионина, впервые было показано, что фермент Set7/9 способен метилировать РНК-связывающий белок Sam68 по остатку лизина К в положении 208. Мутантный Sam68 с заменой остатка лизина в положении 208 на аргинин не метилировался метилтрансферазой Set7/9. Были охарактеризованы особенности локализации эндогенного и сверхэкспрессированного Sam68 в клетках HEK293T и рака толстой кишки человека HCT116. В частности, была обнаружена способность Sam68 ассоциироваться с α -тубулином в процессе формирования апоптотической сети микротрубочек. Впервые было показано, что отсутствие Set7/9 снижает уровень белка Sam68 в цитоплазме клеток HEK293T и HCT116. Метилтрансфераза Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E, а также регуляции клеточного цикла в клетках линий HEK293T и HCT116.

5. Теоретическое и практическое значение работы

Результаты проведенного исследования важны для фундаментального понимания внутриклеточных процессов, в которые вовлечен белок Sam68, а именно: сплайсинг, регуляцию клеточного цикла и апоптоз. Выявление роли Set7/9 в регуляции Sam68 на примере клеток рака толстой кишки HCT116,

позволяет рассматривать оба этих белка как потенциальные мишени для разработки таргетной противоопухолевой терапии.

6. Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на двух международных конгрессах «ICCB» (Прага, 2016) и «Advances in Oncology» (Афины, 2015), а также на трех отечественных конференциях: VII международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология живых систем» (Звенигород, 2016), Неделя науки СПбПУ с международным участием (Санкт-Петербург, 2015), «Конференции молодых ученых ИНЦ РАН» (Санкт-Петербург, 2014).

7. Список опубликованных по теме диссертации печатных работ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Vasileva E.**, Barlev N. The world of SET-containing lysine methyltransferases// eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2017 DOI: 10.1002/9780470015902.a0026791
2. Rada M., **Vasileva E.**, Lezina L., Marouco D., Antonov A., Macip S., Melino G., Barlev N. Human EHMT2/G9a activates p53 through methylation-independent mechanism// Oncogene. 2017. Т. 16. №36(7). С. 922-932. DOI: 10.1038/onc.2016.258. (IF 8.459)
3. **Vasileva E.**, Shuvalov O., Garabadgiu A., Melino G., Barlev N. Genome Editing Tools For Stem Cell Biology// Cell Death Dis. 2015. Т. 6. № 7. С. e1831; doi:10.1038/cddis.2015.167 (IF 5.014).
4. **Васильева Е.А.**, Мелино Д., Барлев Н.А. Применение системы направленного геномного редактирования CRISPR/Cas к плюрипотентным стволовым клеткам// Цитология. 2015. Т. 57. № 1. С. 19–30.

Тезисы конференций:

1. **Васильева Е.А.**, Федорова О.А., Дакс А.А., Шувалов О.Ю., Петухов А.В., Лялина Т.А., Барлев Н.А. Биологическая роль взаимодействия метилтрансферазы Set7/9 и РНК-связывающего белка Sam68// VII международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология живых систем», Звенигород 2016
2. **Vasileva E.**, Fedorova O, Daks A., Shuvalov O., Petuhov A., Lyalina T., Barlev N.. Biological consequences of lysine methyltransferase Set7/9 interaction with RNA-binding protein Sam68// ICCB Abstract book 2016
3. **Vasileva E.**, Fedorova O., Shuvalov O., Daks A., Petukhov A. and Barlev N. The role of methyltransferase Set7/9 interaction with RNA -binding protein Sam68// Abstract book.20th World Congress onAdvances in Oncology and 18th International Symposium on Molecular Medicine. 2015 (IF 2.088).
4. **Vasileva E.**, Fedorova O., Shuvalov O., Daks A., Petukhov A. and Barlev N. The role of methyltransferase Set7/9 in paraspeckle and Sam68 nuclear bodies formation// Цитология. 2015. 57(8)
5. **Васильева Е.А.**, Федорова О.А., Дакс А.А., Петухов А.В., Шувалов О.Ю., Барлев Н.А. Роль метилтрансферазы Set7/9 в формировании Sam69-ассоциированных ядерных телец// В сборнике: Неделя науки СПбПУ материалы научного форума с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций; В.Э. Гасумянц, Д.Д. Каров - ответственные редакторы. 2015. С. 420-422.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Метилтрансфераза Set7/9 — важный регулятор внутриклеточных процессов

Пост-трансляционные модификации (ПТМ), такие как метилирование, фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование и АДФ-рибозилирование, играют важную роль в регуляции функции белков, оказывая влияние на их стабильность, локализацию и способность взаимодействовать с другими белками-партнерами [9]. В 2001 и 2002 годах две исследовательские группы независимо друг от друга сообщили об очистке, молекулярной идентификации и функциональной характеристике одного и того же фермента, получившего разные названия Set7 и Set9. Этот фермент, кодируемый геном *SETD7* (4q31.1), получил название Set7/9. Было показано, что Set7/9 специфически метилирует остаток лизина (K) в положении 4 гистона H3 [10, 25]. Позже было показано, что Set7/9 метилирует не только гистоны, но и негистонные субстраты, включая: андрогеновый рецептор (androgen receptor, AR) [11, 12], β -катенин [13], метилтрансфераза DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1) [14], фактор транскрипции E2F1 (E2F transcription factor 1) [15], эстрогеновый рецептор α (estrogen receptor α , ER α) [16], белок-онкосупрессор p53 [17], p65/RelA субъединица NF κ B [18], коактиватор транскрипции PCAF (P300/CBP-associated factor) [19], белок ретинобластомы pRb [20], активатор транскрипции STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) [21], транскрипционный фактор TAF10 (Transcription initiation factor TFIID subunit 10) [22], регуляторный белок TAT [23], транскрипционный регулятор Yap1 (yes-associated protein 1) [24] и другие, принимающие участие в самых разнообразных внутриклеточных процессах (Таблица 1).

1.1.1 Структура и каталитический механизм метилтрансферазы Set7/9

Метилтрансфераза Set7/9 относится к семейству SET-доменов содержащих белков. Помимо SET-домена (214–336 а.о.) в структуре Set7/9 можно выделить также последовательность из трех MORN-доменов (36–58 а.о., 59–81 а.о., 106–128 а.о.) (Рис.1 А). Структурные исследования показали, что SET домен необходим для каталитической функции Set7/9. Для определения механизма распознавания таргетного лизина и его последующего метилирования был кристаллизован большой фрагмент Set7/9 (52–344 а.о.) в комплексе с AdoMet (S-adenosyl-L-methionine) [26]. Согласно полученным данным, структура Set7/9 состоит в основном из бета-листов. В частности, 140 N-концевых аминокислотных остатков организованы в виде 12 антипараллельных бета-листов, в то время как карбокси-(С)-концевые 155 аминокислотных остатка высококонсервативного домена SET состоят преимущественно из бета-листов и расширенных петель, вовлеченных в формирование глобулярного домена. Согласно другой кристаллической структуре высокого разрешения, определенной для тройного комплекса Set7/9 с гистоновым пептидом H3 и кофактором AdoMet (Рис.1 Б), расположение белковых боковых цепей и молекул воды в активном сайте Set7/9 определяет добавление только одной метильной группы к лизину гистонового пептида [27]. Другими словами, Set7/9 является исключительно монометилтрансферазой. Тем не менее, несколько исследований показывают процессированное участие Set7/9 в реакциях диметилирования и триметилирования гистона H3 по остатку лизина K4 [28]. Наконец, согласно структуре Set7/9 в комплексе с пептидом p53 и производным AdoHcy, среди пяти остатков Set7/9, создающих полярные контакты с пептидом p53, четыре из них (N256, R258, T266 и S268) расположены в пределах варибельной области Set-I, а шестой (Y335) — расположен в С-фланкирующем домене [17].

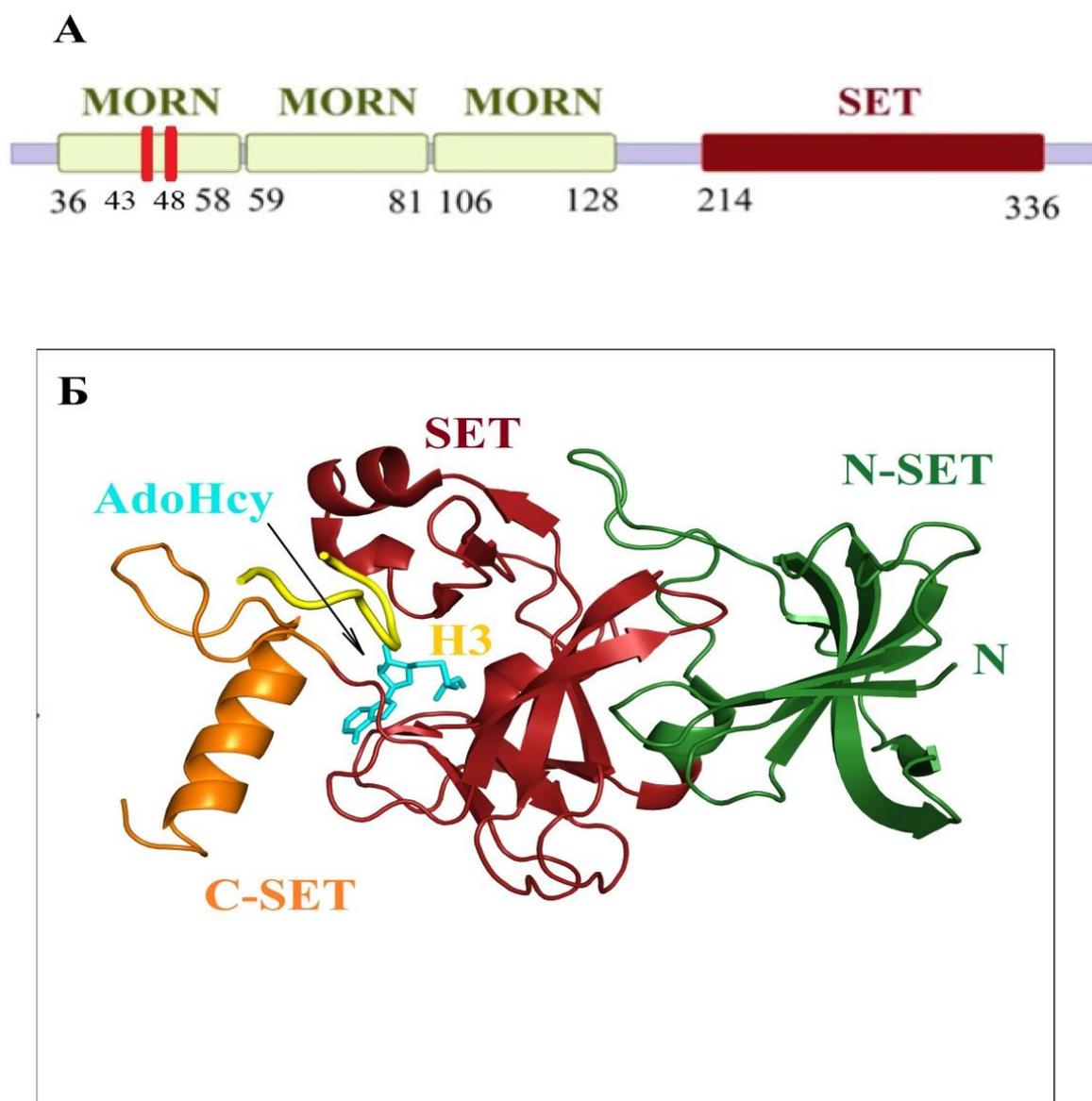


Рис. 1 Структура метилтрансферазы Set7/9 **А** — Схематичное изображение доменной структуры Set7/9. **Б** — Структура каталитического домена Set7/9 в комплексе с пептидом H3 (желтый) и AdoHcy (голубой) (PDB 1O9S) [29]

Другими словами, вариабельный Set-I и C-фланкирующий регион определяют специфичность Set7/9. Кроме того, было предположено, что специфичность также может определяться фланкирующей N-SET областью, предшествующей SET-домену.

Метилирование представляет собой Set7/9-опосредованное присоединение метильной группы к остатку лизина белка-субстрата. Сравнение последовательностей TAF10, p53 и гистона H3, подвергающихся метилированию Set7/9, позволило выявить консервативную последовательность

K/R-S/T/A-K-D/N/Q/K (где K — сайт метилирования) [17, 30]. Отметим, что с большинством из своих субстратов Set7/9 может взаимодействовать физически, хотя устойчивое взаимодействие не является абсолютно необходимым условием для осуществления ферментативной реакции метилирования (Таблица 1), как было показано на примере p53 [17].

1.1.2 Многообразие регуляторных функций Set7/9

Метилирование субстратов метилтрансферазой Set7/9 оказывает различный эффект на стабильность, белок-белковые взаимодействия, локализацию и биологическую функцию белков (Таблица 1).

Таблица 1 Белки-интерактанты и субстраты лизин-специфической метилтрансферазы Set7/9

	Название белка	Взаимодействие с Set7/9	Последствия метилирования	Сайт метилирования	Ссылка
1.	PARP1 (ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like 1)	-	Регуляция функциональной активности PARP1 при действии генотоксического стресса	K508	[31]
2.	AR (Андрогеновый рецептор)	In vivo/in vitro	Усиление транскрипционной активности рецептора путем стабилизации взаимодействия между N- и С-концевыми доменами рецептора, а также за счет усиления рекрутирования к генам-мишеням.	K632	[11]
		-	Усиление транскрипционной активности AR	K630	[12]

Продолжение Таблицы 1

3.	β-катенин	In vivo/in vitro	Узнавание киназой (GSK)-3b и последующая деградация в протеасомах	K180	[13]
4.	DNMT1 (DNA cytosine methyltransferases)	In vivo/in vitro	Регуляция стабильности DNMT1	K142	[14]
		-	Регуляция стабильности DNMT1. Деметилаза LSD1 может деметилировать DNMT1, способствуя стабилизации белка	K1094	[14]
5.	Еra (Эстрогеновый рецептор α)	In vitro	Стабилизация рецептора EРа, усиление рекрутирования EРа к элементам отклика генов-мишеней	-	[16]
6.	FoxO3 (Forkhead Box O3)	-	Уменьшение белковой стабильности FoxO3, регуляция транскрипционной активности фактора	K271	[32]
7.	Гистон H1.4	-	Связь между метилированием и АДФ-рибозилированием гистонов H1.4 и H3	K121, K129, K159, K171, K177, K192	[33]
8.	Гистон H2A	In vitro	Физиологическая роль не известна	K5, K13, K15	[28]
9.	Гистон H2B	In vitro.	Физиологическая роль не известна	K15	[28]

Продолжение Таблицы 1

10.	Гистон H3	In vitro	Предотвращение ассоциации NuRD-комплекса с гистоном H3, нарушение SUV39H1-опосредованного метилирования остатка лизина в положении K9	K4	[10, 25]
11.	LIN28A (Lin-28 Homolog A)	In vivo/in vitro	Аккумуляция LIN28A в ядре, повышение стабильности белка и усиление связывания LIN28A с pri-let-7	K135	[34]
12.	E3 убикитин-лигаза MDM2	In vitro	Регуляция экспрессии Mdm2	-	[35]
13.	NFE2L2 (Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2)	In vivo/in vitro	Регуляция стабильности и функции NFE2L2 в ответ на оксидативный стресс	-	[36]
14.	Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1)	In vivo/in vitro	Обеспечение активности Pdx1	K131	[37]
15.	RelA	-	Аккумуляция RelA в ядре и регуляция способности связываться с промотерами генов-мишеней	K37	[18]

Продолжение Таблицы 1

16.	pRb (Retinoblastoma protein)	-	Ингибирование фосфорилирования соседних остатков S807 и S811 киназой CDKs.	K810	[38]
		-	Усиление взаимодействия pRb с белком HP1, репрессия транскрипции, pRb-обусловленная остановка клеточного цикла.	K873	[39]
17.	STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)	In vivo	Диссоциация фактора транскрипции от промоторных элементов, ослабление транскрипции генов-мишеней STAT3	K140	[40]
18.	SIRT 1 (Sirtuin 1)	In vivo/in vitro	Регуляция белок-белкового взаимодействия SIRT1-p53, приводящая к ацетилированию p53 и диссоциации p53 и SIRT1	K233, K235, K236, K238	[41]
19.	SUV39H1 (Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1 (Drosophila))	In vivo/in vitro	Ослабление SUV39H1 метилтрансферазной активности, релаксация гетерохроматина, уменьшение триметилирования гистона H3 по остатку лизина 9	K105, K123	[42]
20.	TAF7 (Transcription initiation factor TFIID subunit 7)	In vitro	Регуляция белок-белковых взаимодействий	K5	[30]

Продолжение Таблицы 1

21.	TAF10 (TBP-associated factor)	In vivo	Увеличение аффинности TAF10 к РНК полимеразе II, усиление транскрипции TAF10-зависимых генов	K189	[22]
22.	TAT	In vivo/in vitro	Активация функции белка Tat и усиление репликации HIV	K51	[43]
23.	p53	-	Аккумуляция p53 в ядре, стабилизация, увеличение времени полужизни и транскрипционного потенциала белка	K372	[17]
24.	Yap1 (Yes-Associated Protein 1)	In vivo	Удерживание Yap1 в цитоплазме	K494	[24]

Как упоминалось выше, метилтрансфераза Set7/9 изначально была идентифицирована, как фермент, специфически метилирующий остаток лизина (K) в положении 4 гистона H3. Такая модификация способствует привлечению транскрипционных активаторов путем вытеснения репрессивного комплекса NuRD, что приводит к утрате HDAC-опосредованной (histone deacetylase NuRD complex) транскрипционной репрессии [25] (Рис.2 А). Более того, было показано, что метилирование H3-K4 *in vitro* приводит к снижению уровня метилирования гистона H3 в положении K9 (H3-K9), опосредованного метилтрансферазой SUV39H1, тем самым способствуя активации транскрипции. Отметим, что метилирование гистона H3 метилтрансферазой SUV39H1, способствует последующему рекрутированию белка гетерохроматина HP1, что, в свою очередь, приводит к транскрипционной репрессии (Рис.2 Б) [44]. Кроме того, метилирование гистона H3 по лизину K4 метилтрансферазой Set7/9 и H3 по лизину K9 метилтрансферазой SUV39H1 имеет различные эффекты на последующее ацетилирование гистонов: так, метилирование K9 ингибирует ацетилирование гистонов, тогда как

метилование К4 усиливает этот процесс [10]. Позднее было показано, что Set7/9 также может стабильно взаимодействовать с SUV39H1, являясь его уникальным регулятором активности [42]. Set7/9 специфично метилирует SUV39H1, что приводит к релаксации гетерохроматина и нестабильности генома в ответ на повреждение ДНК в раковых клетках (Рис.2 В) [45]. Таким образом, метилирование Set7/9 оказывает влияние на динамику хроматина, что, в свою очередь, изменяет на степень доступности факторам транскрипции [25].

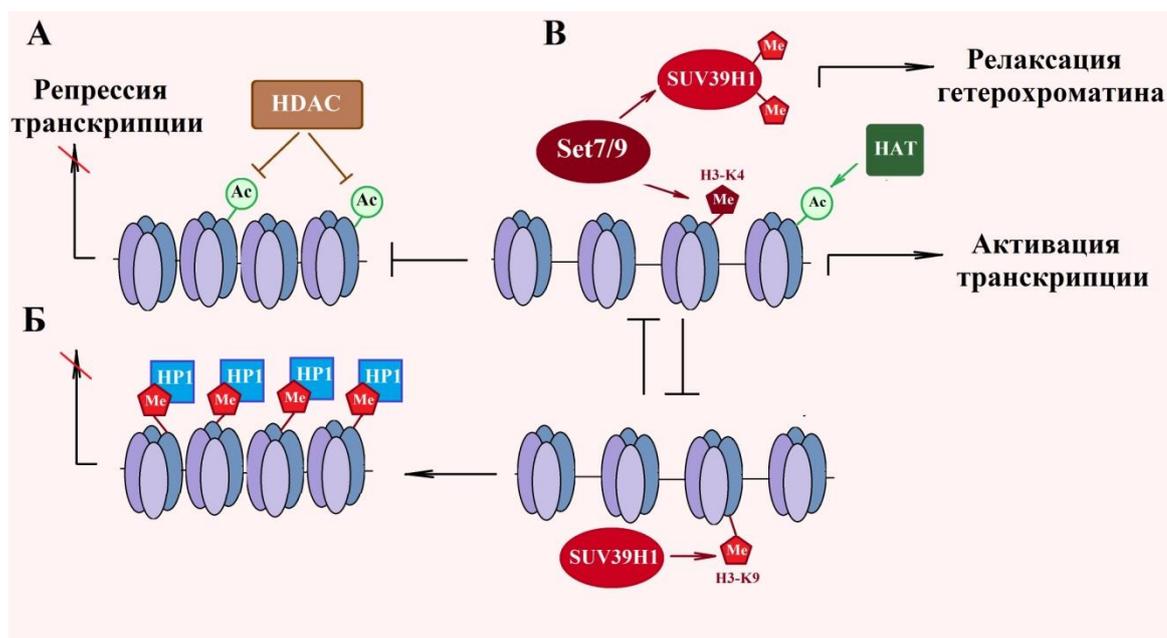


Рис. 2 Роль метилтрансферазы Set7/9 в метилировании гистона H3
А — Метилирование гистона H3K4 способствует привлечению транскрипционных активаторов путем вытеснения репрессивного комплекса NuRD, что приводит к утрате HDAC-опосредованной транскрипционной репрессии. **Б** — Метилирование гистона H3 метилтрансферазой SUV39H1 способствует последующему рекрутированию белка гетерохроматина HP1, что, в свою очередь, приводит к транскрипционной репрессии. **В** — Set7/9 специфично метилирует SUV39H1, что приводит к релаксации гетерохроматина и нестабильности генома в ответ на повреждение ДНК в раковых клетках.

Следует отметить, что метилтрансфераза Set7/9 может оказывать влияние на глобальное метилирование ДНК и модулировать экспрессию генов путем метилирования ДНК-метилтрансферазы DNMT1. Показано, что метилирование

способствует деградации DNMT1, что приводит к десятипроцентному снижению глобального метилирования в клетках [14].

Как упоминалось выше, Set7/9 является регулятором большого количества негистонных белков. В частности, метилтрансфераза Set7/9 также может регулировать транскрипцию путем модификации транскрипционных факторов. Set7/9 регулирует активность важного белка-онкосупрессора p53, который является центральным транскрипционным фактором, активирующим экспрессию ряда генов-мишеней, участвующих в процессах ареста клеточного цикла и апоптозе [46, 47]. Лизин-специфическое метилирование p53 в положении K372 метилтрансферазой Set7/9 важно для активации и стабилизации белка p53 [17]. Более того, метилирование p53 оказывает существенную роль на последующее ацетилирование, что также способствует стабилизации белка p53 (Рис.3) [48].

Наконец, Set7/9 является коактиватором транскрипции вируса иммунодефицита человека. Set7/9 непосредственно взаимодействует с промотором HIV *in vivo* и монометилюет остаток лизина в положении 51, находящийся в РНК-связывающем домене белка Tat. Set7/9 связывает TAR РНК, образуя комплекс с Tat и фактором элонгации транскрипции Р-TEFb, демонстрирующим положительную роль метилирования Tat на ранних этапах трансактивационного цикла Tat [23].

1.1.3 Метилтрансфераза Set7/9 — важный регулятор клеточного цикла и апоптоза

Белок ретинобластомы (pRb) играет важную роль в регуляции клеточного цикла. pRb взаимодействует и контролирует транскрипционную активность фактора E2F (E2 промотор-связывающий фактор) [49], вовлечен в процессы дифференцировки, старения и апоптоза [50, 51]. Было показано, что Set7/9 регулирует активность белка pRb путем его метилирования по сайту K873, способствуя взаимодействию между метилированным pRb и белком

гетерохроматина HP1. Метилирование pRb метилтрансферазой Set7/9 необходимо для pRb-обусловленной репрессии транскрипции, остановки клеточного цикла и дифференцировки [39]. С другой стороны, pRb также может регулироваться с помощью фосфорилирования киназой Cdk [50, 51]. Фосфорилирование способствует инактивации pRb, что приводит к высвобождению E2F1 и прогрессированию клеточного цикла [52]. Метилирование pRb в положении K810 препятствует связыванию этого белка с киназой Cdk и последующему фосфорилированию остатков серина [20]. Таким образом, метилтрансфераза Set7/9 важна для остановки клеточного цикла.

Более того, Set7/9 является коактиватором E2F1-опосредованной транскрипции в ответ на повреждение ДНК [53]. Интересно, что Set7/9 способствует пролиферации клеток через экспрессию гена *CCNE1*. Уровень экспрессии как E2F1, так и Set7/9 определяет прохождение опухолевых клеток при повреждении ДНК через контрольную точку G1/S клеточного цикла. Метилирование E2F1 по остатку лизина K185 метилтрансферазой Set7/9 предотвращает накопление E2F1 при повреждении ДНК и активацию его гена-мишени p73 [53]. Более того, метилирование E2F1 по остатку лизина в положении 185 ингибирует ацетилирование и фосфорилирование этого белка в ближайших положениях, стимулируя деградацию белка, вызванного убиквитинированием [15].

1.2 Биологическая роль РНК-связывающего белка Sam68

В 1988 году Дэвид Шалловей и Исаак Хакалапарампил стали первыми, кто показал, что тирозин-киназная активность c-Src необходима для регуляции митоза фибробластов [54]. Конформационные особенности и наличие ферментативной активности киназы c-Src во время митоза способствовали поиску белков-субстратов этой киназы. В 1994 году впервые несколькими независимыми исследовательскими группами был идентифицирован белок p68, как взаимодействующий с c-Src киназой и родственной GAP-ассоциированному белку p62 [55, 56]. Этот идентифицированный белок был

назван Sam68 (Src-associated in mitosis 68 kDa). Оказалось, что Sam68 может связываться с гомополимерной поли(У) РНК (homopolymeric poly(U) RNA) и, в меньшей степени, с поли(А) РНК (homopolymeric poly(A) RNA), что позволило охарактеризовать этот белок, как РНК-связывающий [56].

1.2.1 Структура РНК-связывающего белка Sam68

РНК-связывающий белок Sam68 является, вероятно, наиболее изученным и хорошо охарактеризованным членом STAR-семейства (Signal Transduction and Activation of RNA metabolism domain) белков. Этот белок преимущественно имеет ядерную внутриклеточную локализацию и экспрессируется во всех тканях организма. Ген *KHDRBS1*, кодирующий Sam68 (1437 п.н.), у человека содержит девять экзонов и расположен на хромосоме 1p32. Аминокислотная последовательность белка состоит из 443 аминокислотных остатков.

На настоящий момент известно несколько десятков белков STAR-семейства, к которому относится Sam68. Принадлежность к семейству определяется наличием STAR или GSG (GRP33/Sam68/GLD-1) домена, размером около 200 аминокислотных остатков. GSG домен представляет собой единственный домен гомологии КН-гетерогенному ядерному рибонуклеопротеину К (hnRNP К), который фланкирован QUA1 (около 80 а.о.) и QUA2 (около 30 а.о.) последовательностями [57] (Рис. 3). Кроме перечисленных выше доменов, Sam68 содержит обогащенные аргининами и глицинами RG-области (RG домены), 6 обогащенных пролинами мотивов (P0–P5) и кластер из 16 тирозинов ((YY)16) на С-конце белка. Наличие сигнала ядерной локализации в С-концевом участке белка делает возможным перемещение Sam68 из цитоплазмы в ядро.

КН домен представляет собой РНК-связывающий модуль, первоначально идентифицированный как повторяющаяся последовательность в белке hnRNP К [58]. Этот домен консервативен среди широкого спектра прокариотических и

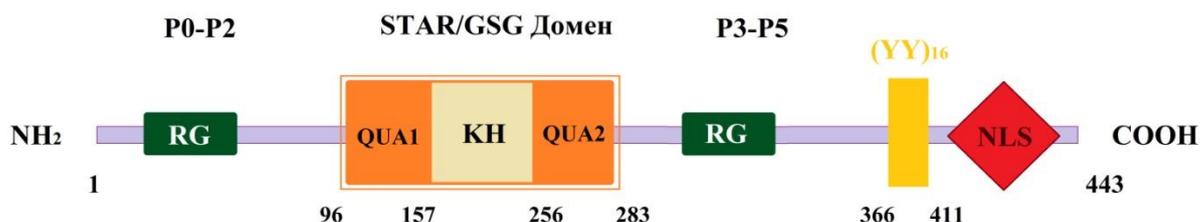


Рис. 3 Доменная структура РНК-связывающего белка Sam68. Sam68 содержит GSG домен, состоящий из КН-домена, фланкированного QUA1 и QUA2 последовательностями, шесть обогащенных пролинами мотивов (P0–P5), RG последовательности, кластер из 16 тирозинов ((YY)16) и сигнал ядерной локализации NLS.

эукариотических РНК-связывающих белков и обычно состоит из 60–100 аминокислот. Наиболее консервативной последовательностью в домене КН является мотив GXXXGXXG. Считается, что аминокислотные остатки глицина непосредственно взаимодействуют с РНК [59]. Было показано, что замена центрального глицина в этом мотиве на глутамин (G178E) приводит к неспособности Sam68 связывать РНК [60]. КН домен также важен для олигомеризации Sam68 и правильной внутриклеточной локализации белка [61]. Интересно, что мутации Sam68 Δ КН, Sam68:КН, Sam68 Δ 198–225 и Sam68:2G–R также приводили к нарушениям олигомеризации [61]. Отметим, олигомеризация Sam68 возможна только в присутствии РНК. Интересно, что фосфорилирование Sam68 также приводит к нарушению олигомеризации, возможно, путем ингибирования способности Sam68 связывать РНК [61]. Было показано, что QUA1 последовательность, фланкирующая КН-домен, также важна для олигомеризации белка [62]. Интересно, QUA2 область Sam68 не участвует в связывании РНК и в олигомеризации. Это поразительно отличается от других белков STAR семейства, где домен QUA2 играет решающую роль для связывания РНК и олигомеризации [63]. Важно отметить, что особенности

олигомеризации имеют решающее значение для регуляции Sam68-опосредованного альтернативного сплайсинга и выбора своих мишеней в транскриптом [63].

Кроме полноразмерной формы белка Sam68, в клетках обнаружена его изоформа Sam68ΔКН, лишенная значительной части КН домена (с 170 по 208 а.о.), отвечающей за взаимодействие с РНК. Этот продукт альтернативного сплайсинга экспрессируется при остановке клеточного цикла при высокой плотности клеток. В нормальных условиях эта изоформа активно экспрессируется в клетках скелетных мышц и печени [64].

Анализ структурных особенностей Sam68 позволил выявить область, обогащенную остатками аргинина и глицина (RG-домен). Было показано, что RG-богатые последовательности могут способствовать связыванию неспецифической РНК с доменом GSG [65].

Как упоминалось выше, в белке Sam68 выделяют также 6 консенсусных полипролин-богатых областей (P0–P5). Именно эти области отвечают за взаимодействие с белками, содержащими SH3- и WW-домены. Еще одной ключевой особенностью белковой структуры Sam68 является наличие обогащенной остатками тирозина С-концевой области (Рис. 3). Sam68 имеет, в общей сложности, 22 тирозиновых остатка, 16 из которых сгруппированы на С-конце белка. Тирозины в этом кластере представляют собой потенциальные сайты фосфорилирования для тирозинкиназ. Фосфорилирование этих сайтов может способствовать взаимодействию Sam68 с белками, содержащими SH2-домены.

1.2.2 РНК - мишени белка Sam68

Наличие у Sam68 РНК-связывающих свойств подтолкнуло исследователей к поиску специфических РНК-мишеней для этого белка путем изучения его связывания с синтетическими полирибонуклеотидами [56]. Оказалось, что Sam68 предпочтительно связывается с гомополимерной

поли (У) РНК и, в меньшей степени, с поли (А) РНК. Использование SELEX-подхода (systemic evolution of ligands by exponential enrichment) позволило выявить наличие мотива UAAA в последовательностях РНК, к которым Sam68 имеет наибольшую аффинность. В данном исследовании авторы также продемонстрировали важность КН домена для РНК-связывающих свойств белка [60]. Анализ РНК-транскриптов, связывающихся с КН-доменом Sam68 в клетках линии рака шейки матки HeLa, позволил определить 10 новых мРНК. Среди этих транскриптов были, в том числе, обнаружены последовательности РНК, кодирующие белки hnRNPA2/B1 и β -актин. Анализ нуклеотидных последовательностей, с которыми связывается Sam68, позволило выявить два мотива: UAAA в мРНК hnRNP A2/B1 и протяженные UUUUUU в мРНК β -актина [66]. Несмотря на идентифицированные консенсусные последовательности РНК, с которыми может связываться Sam68, молекулярные механизмы распознавания этих транскриптов пока еще недостаточно изучены.

1.2.3 Внутриклеточная локализация Sam68

Считается, что Sam68 является преимущественно ядерным белком, однако особенности его внутриклеточной локализации до сих пор недостаточно хорошо изучены. Поскольку Sam68 имеет сигнал ядерной локализации (Рис.3), расположенный на С-концевом участке белка, при иммуноцитохимическом окрашивании, белок, как правило, обнаруживается в ядре. Однако тот факт, что Sam68 ассоциирует с различными сигнальными белковыми молекулами, имеющими цитоплазматическую локализацию, также свидетельствует о наличии цитоплазматической функции Sam68, отличной от его роли в ядре. К примеру, Sam68 может фосфорилироваться киназой Fyn, но только при наличии у последней домена, отвечающего за ее «заякоривание» в мембране. Непосредственно фосфорилирование происходит вне ядра, после чего фосфорилированная форма белка Sam68 может транспортироваться обратно в ядро [67]. Было высказано предположение, что Sam68, как и многие другие связывающие РНК молекулы, может являться так называемым челночным

белком. В 1996 было впервые продемонстрировано, что инфицирование клеток полиовирусом вызывает релокализацию Sam68 в цитоплазму [68]. Позднее оказалось, что заражение риновирусом, как и вирусом EV71, приводит к аналогичным эффектам перелокализации [69, 70].

Как упоминалось выше, КН домен является важным для правильной локализации Sam68. Делеционный мутант Sam68, лишенный всего домена КН (Δaa157–256), локализуется в отдельных ядерных «пятнах», в отличие от типичной диффузной нуклеоплазматической локализации [71]. Интересно, что для диффузного распределения Sam68 в нуклеоплазме требуется непрерывная транскрипция. Инкубация клеток с циклогексимидом, являющимся ингибитором трансляции, не меняла локализацию Sam68, что, по всей видимости, указывает на то, что диффузная локализация Sam68 в нуклеоплазме связана с участием Sam68 в процессах транскрипции. Также возможно, что это ранние события процессинга РНК [71]. Отметим, что замена высококонсервативного центрального глицина в мотиве GXXXGXXG на глутамин (G178E) также приводит к локализации Sam68 в отдельных «пятнах» в ядре [71]. По картине распределения это напоминает распределение Sam68 в клетках, обработанных ингибиторами транскрипции.

В 1999 году было показано, что Sam68 локализуется в ранее не идентифицированных внутриядерных структурах, которые преимущественно обнаруживаются в ядрах трансформированных клеток [72]. Новые структуры были названы Sam68-ассоциированными ядерными тельцами (SNBs, Sam68 associated nuclear bodies). Белок слияния GFP-Sam68 имел локализацию, схожую с эндогенным Sam68 в клетках линии HeLa. В работе по изучению двадцати мутантных форм Sam68, были описаны шесть типов локализации этого белка в зависимости от различных мутаций в аминокислотной последовательности белка [72]. Sam68 и его ортолог SLM-1 исключительно локализируются в SNBs, в то время как SLM-2 может быть также обнаружен в ядрышках. Поскольку SNBs были обнаружены в непосредственной близости от

ядрышек, было высказано предположение, что они также могут участвовать в ядрышкообразовании [72]. Таким образом, ядерная локализация Sam68 требует как С-концевого участка белка с наличием сигнала внутриядерной локализации, так и наличия STAR домена. Интересно, что SNBs в большом количестве были обнаружены в раковых клетках, что, вероятно, может быть связано с трансформацией клеток. Распространенность SNBs коррелировала со степенью злокачественности трех модельных клеточных линий рака молочной железы [72]. Тем не менее, еще предстоит определить, способствуют ли SNBs трансформации клеток или являются следствием этого.

Недавно было показано, что метилирование Sam68 необходимо для его накопления в ядре. В частности, метилирование аргинина необходимо для локализации Sam68 в нуклеоплазме [73]. Белок Sam68, лишенный всех RG-повторов и, следовательно, неспособный подвергаться аргининовому метилированию, был диффузно локализован по всей клетке. Инкубация клеток с ингибитором метилазы AdOx также приводила к накоплению Sam68 в цитоплазме [73].

1.2.4 Механизмы регуляции РНК-связывающего белка Sam68

Очевидно, что Sam68 является объектом тонкой регуляции со стороны посттрансляционных модификаций. Это белок подвергается фосфорилированию, ацетилированию, сумоилированию и метилированию, что существенным образом влияет на его локализацию, стабильность, РНК-связывающую способность и выполняемые им функции.

Как упоминалось выше, тирозиновое фосфорилирование белка Sam68 отрицательно регулирует его РНК-связывающую способность [61]. Показано, что фосфорилирование Sam68 по остаткам тирозина стимулирует его ассоциацию с различными белками, содержащими SH2-домен [74]. Например, стимулированное инсулином фосфорилирование тирозина в белке Sam68 приводит к увеличению ассоциации Sam68 с субъединицей p85

фосфатидилинозитол-3-киназы PI3K через взаимодействие между фосфорилированным тирозином белка Sam68 и SH2-доменом p85 [75]. РНК-связывающая способность Sam68 также отрицательно регулируется опухолевой киназой молочной железы человека BRK и ее ортологом Sik (мышинная Src-ассоциированная киназа). Было обнаружено, что BRK и Sam68 колокализуются в SNBs и показано, что трансфецированный Sik фосфорилирует Sam68 в составе SNBs. Интересно, что это был первый пример тирозинкиназы, способной фосфорилировать Sam68 в ядре, приводя к ингибированию связывания с РНК [76]. Позднее было обнаружено, что BRK также фосфорилирует Sam68 по трем остаткам тирозина в области сигнала ядерной локализации [77]. В частности, остаток тирозина Y440 был охарактеризован как модулятор локализации Sam68 в клетках рака молочной железы. Кроме того, Sam68 супрессирует BRK-индуцированную пролиферацию клеток [77]. Наконец, Sam68 фосфорилируется киназой Fyn, что приводит к перелокализации Sam68 из нуклеоплазмы в SNBs [78].

Sam68 также может быть фосфорилирован по остаткам серина и треонина. Sam68, выделенный с помощью иммунопреципитации из клеток HeLa и NIH3T3, был фосфорилирован киназой Cdc2 по остаткам серина во время интерфазы и митоза, в то время как фосфорилирование по остаткам треонина наблюдалось только при митозе [79]. Было также показано, что Sam68 является мишенью внеклеточной сигнальной киназы ERK, способной фосфорилировать Sam68 по сайтам S58, T71 и T84. Данные модификации белка оказывают регуляторное влияние на Sam68-опосредованный сплайсинг антигена CD44. Сверхэкспрессия Sam68 способствует ERK-опосредованному включению последовательности v5-экзона при сплайсинге мРНК CD44. Этот эффект не наблюдался при сайт-направленном мутагенезе сайта фосфорилирования в белке Sam68. Интересно, что Ras-индуцированное включение экзона v5-CD44 при альтернативном сплайсинге может быть ингибировано за счет подавления экспрессии Sam68 [80]. Так как мутации по

описанным сайтам фосфорилирования не влияют непосредственно на РНК-связывающие свойства Sam68, то фосфорилирование этих серинов/треонинов, по-видимому, влияет на способность Sam68 связывать другие белки-участники сплайсинга. Это, в свою очередь, может способствовать выбору сайта при сплайсировании [80].

Сумоилирование — это посттрансляционная модификация, которая заключается в ковалентном присоединении небольших белков SUMO (Small Ubiquitin-Like Modifier) к другим белкам, что может изменять их локализацию, стабильность и функцию. Sam68 может быть модифицирован SUMO в положении K96 SUMO-E3 лигазой PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated STAT1). Интересно, что замена лизина в положении 96 на аргинин увеличивала способность Sam68 индуцировать апоптоз, но ингибировала способность Sam68 подавлять экспрессию циклина D1 [81].

Как упоминалось ранее, Sam68 содержит множественные повторы аргинина и глицина — RG-последовательности. В 2003 году было показано, что Sam68 ассоциирует и метилируется *in vivo* белковой аргинин-N-метилтрансферазой 1 PRMT1 (Protein Arginine N-methyltransferase 1). Sam68 содержит асимметричные диметиларгинины вблизи пролинового мотива P3. Устранение сайтов метилирования путем сайт-направленного мутагенеза по остаткам аргинина, как и использование ингибиторов метилтрансфераз приводило к накоплению Sam68 в цитоплазме и, как следствие, к нарушению способности Sam68 экспортировать РНК. Таким образом, метилирование Sam68 имеет важное значение для правильной локализации белка и его функции [73].

1.2.5 Биологические функции Sam68

Sam68 принимает участие в различных внутриклеточных процессах, таких как ответ на повреждение ДНК, регуляция экспрессии генов, альтернативный сплайсинг, контроль клеточного цикла и апоптоза [78, 80-82].

Sam68 является регулятором альтернативного сплайсинга гена *SMN2*, рецептора *Nrxn1* [83], протеин киназы *mTOR* [84], циклина *D1* [81], трансмембранного митохондриального белка *Bcl-x* [78], ингибитора апоптоза белка сурвивина [85], фактора сплайсинга *SF2/ASF* [86], трансмембранного гликопротеина *CD44* [80] и ряда других.

Спинальная мышечная атрофия (*Spinal Muscular Atrophy, SMA*) представляет собой нейродегенеративное заболевание, вызванное потерей моторных нейронов у пациентов с мутациями в гене *SMN1* (*SMAΔ7*) [87]. Почти идентичный ген *SMN2* не может компенсировать этот дефицит из-за отсутствия в своей последовательности экзона 7. Хотя несколько факторов сплайсинга могут модулировать сплайсинг *SMN2 in vitro*, физиологические регуляторы этого процесса неизвестны. На молекулярном уровне Sam68 связывается с пре-мРНК *SMN2*, способствуя рекрутированию репрессора сплайсинга *hnRNP A1* и мешая взаимодействию с *U2AF65* на 3'-сайте сплайсинга экзона 7 [88]. Интересно, что нокаут Sam68 частично увеличивал массу тела и жизнеспособность мышцей с мутацией *SMAΔ7*, что коррелировало с улучшением *SMA*-ассоциированных дефектов в моторных нейронах и скелетных мышцах [88].

В другой работе было продемонстрировано, что Sam68 является одним из ключевых регуляторов сплайсинга в центральной нервной системе. Активация киназы *CaMKIV* (*Calcium/calmodulin-dependent kinase IV*) в нейронах регулирует альтернативный сплайсинг рецептора *Nrxn1* [83]. Авторами было показано, что Sam68 является ключевым регулятором динамического контроля молекулярного разнообразия рецептора *Nrxn1* [83].

Также Sam68 является регулятором альтернативного сплайсинга при адипогенезе, регулируя сплайсинг *mTOR*. Мыши с нокаутом Sam68 не были подвержены ожирению, резистентности инсулину и интолерантности глюкозе при жировой диете [84].

В 1999 году была продемонстрирована роль Sam68 в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Как упоминалось выше, заражение вирусом Ev71 вызывает передислокацию Sam68 из ядра в цитоплазму. Исследователи показали, что нокаут Sam68 приводит к ингибированию репликации вируса [70]. Другим примером является регуляция белком Sam68 репликации ретровирусов. Геном ретровирусов кодирует важнейшие регуляторные белки Rev, которые специфически взаимодействуют с последовательностью RRE (Rev response element) и облегчают ядерный экспорт неполностью сплайсированных вирусных РНК. Sam68 может специфично связываться с RRE мотивом вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) *in vitro* и *in vivo* и способствовать Rev в RRE-опосредованной экспрессии генов и вирусной репликации ВИЧ [89]. Более того, было показано, что Sam68 является ключевым участником репликации и других сложных ретровирусов [90].

1.2.6 Роль белка Sam68 в контроле клеточного цикла и апоптоза

Известно, что Sam68 может выступать в качестве транскрипционного репрессора. Сверхэкспрессия Sam68 в фибробластах приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу. Арест в G1 фазе клеточного цикла связан с уменьшением уровня экспрессии циклинов D1 и E, приводя к существенному снижению уровня фосфорилированной формы белка ретинобластомы pRb. Интересно, что остановка клеточного цикла не зависит от РНК-связывающей активности Sam68. В то же время индукция апоптоза Sam68 была невозможна без РНК-связывающих свойств Sam68 [8].

РНК-связывающий белок Sam68 играет важную роль в апоптозе. Sam68 связывает мРНК, кодирующую трансмембранный митохондриальный белок Bcl-x, и регулирует ее альтернативный сплайсинг [78]. Нокаут Sam68 вызывает накопление антиапоптотической изоформы Bcl-x(L), тогда как его сверхэкспрессия приводит к усиленной продукции короткой проапоптотической Bcl-x(s) изоформы. Тирозинное фосфорилирование Sam68

киназой Fyn способствует продукции длинной Bcl-x(L) изоформы в результате альтернативного сплайсинга. Следует отметить, что точечная мутация в РНК-связывающей области Sam68 V229F приводит к невозможности выбора 5'-сайта Bcl-x(s) для сплайсинга, приводя, тем самым, к повышенной продукции Bcl-x(L) изоформы [78]. Таким образом, Sam68, а также его посттрансляционные модификации, играют роль в регуляции альтернативного сплайсинга Bcl-x и регуляции апоптоза.

Позднее было показано, что в регуляции сплайсинга Bcl-x также участвует длинная некодирующая РНК (lncRNA), названная *INXS* (Intronic BCL-XS-inducing lncRNA) [91]. Описанная lncRNA длиной 1903 нуклеотидов транскрибируется с *BCL-X* геномного локуса в противоположном направлении. Оказалось, что *INXS* может активно связываться с Sam68, однако это не влияет на способность Sam68 участвовать в сплайсинге. Длинная некодирующая РНК *INXS* сдвигает альтернативный сплайсинг Bcl-x в сторону продукции короткой проапоптотической изоформы, в конечном итоге способствуя индукции апоптоза [91].

Наконец, в 2016 году было показано, что Sam68 является коактиватором опухолевого супрессора белка p53 в ответ на повреждение ДНК [92]. В клеточных линиях рака толстой кишки HCT116 Sam68 необходим для эффективной трансактивации генов-мишеней p53. Sam68 физически взаимодействует с p53, но только в присутствии РНК, и данное взаимодействие необходимо для коактиваторных свойств Sam68 [92].

Недавно появились данные о том, что Sam68 также является регулятором сплайсинга белка сурвивина (Survivin), относящегося к белкам-ингибиторам апоптоза [26]. Sam68 отвечает за продукцию изоформы DEx3, лишенной экзона 3 и имеющей специфичную антиапоптотическую функцию. Нужно заметить, что эта изоформа экспрессируется на поздних стадиях рака груди и рака шейки матки [85]. Интересно, что белок Sam68 протеолитически расщепляется в

иммунных клетках, подвергающихся апоптозу, вызванному γ -излучением. Активированные каспазы 3, 7, 8 и 9 могут расщеплять белок Sam68 *in vitro* [93].

1.2.7 Роль белка Sam68 в онкогенезе

Достаточно большое количество экспериментальных данных свидетельствует о роли Sam68 в онкогенезе. Целый ряд работ посвящен роли белка Sam68 при раке толстой кишки [1], мочевого пузыря [2], карциноме почки [3], раке простаты [4], карциноме пищевода [5], раке шейки матки [6] и раке груди [7].

Уровень экспрессии Sam68 повышен в клетках рака толстой кишки, что достоверно коррелирует со степенью туморогенности и наличием отдаленных метастаз у пациентов. Пациенты с высоким уровнем экспрессии или ядерной локализацией Sam68 имели худшие показатели по общей выживаемости в сравнении с пациентами с низким уровнем экспрессии Sam68 [1]. Роль Sam68 в процессе инициации метастазирования опухолей, который известен как эпителиально-мезенхимный переход (EMT), была продемонстрирована на клетках аденокарциномы толстой кишки SW480 [86]. Уровень экспрессии Sam68 и статус фосфорилирования играют роль в опухолеобразовании и указывают на то, что Sam68 является протоонкогеном. Sam68 может способствовать злокачественной трансформации эпителиальных раков путем повышения регуляции альтернативного сплайсинга протоонкогена SF2/ASF и индуцирования EMT [86].

Описана роль Sam68 при раке простаты. В частности, Sam68 взаимодействует с андрогеновым рецептором AR *in vivo* в клетках LNCaP и рекрутируется к промотерному региону гена, кодирующего специфичный для простаты антиген PSA (prostate-specific antigen). Как Sam68 дикого типа, так и мутантный Sam68 V229F, лишенный РНК-связывающих свойств, являются лиганд-зависимыми активаторами AR [4].

Уровень Sam68 также повышен в клетках карциномы почки на транскрипционном и трансляционном уровнях [3]. Пациенты с высоким уровнем экспрессии Sam68 и его цитоплазматической локализацией имеют значительно меньшую общую выживаемость по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии этого белка. Исследование продемонстрировало, что сверхэкспрессия и цитоплазматическая локализация являются независимыми прогностическими маркерами выживаемости пациентов с карциномой почки [3].

Белковый уровень Sam68 похожим образом повышен при карциноме пищевода, коррелируя со степенью инвазии опухолевых клеток, также являясь независимым прогностическим индикатором общей выживаемости пациентов [5]. Экспрессия Sam68 способствует пролиферации клеток карциномы пищевода, в то время как нокдаун по Sam68 приводил к замедлению роста клеток и остановке клеточного цикла в G1/S фазе клеточного цикла [5].

Нейробластома (NB) является солидной злокачественной опухолью симпатической нервной системы. Нокдаун Sam68 ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток нейробластомы [94]. Сверхэкспрессия miR-203 приводит к супрессии пролиферации, миграции и инвазии клеток нейробластомы. miR-203 негативно регулирует экспрессию Sam68 путем связывания с его 3'-UTR последовательностью, действуя как опухолевый супрессор путем таргетирования Sam68. Таким образом, miR-203/Sam68 могут рассматриваться как новые диагностические мишени при нейробластоме [94].

Совсем недавно было показано, что Sam68 является новым специфичным для раковых стволовых клеток модулятором сигнального пути Wnt/b-catenin [95]. Sam68 важен для индукции в раковых стволовых клетках дифференцировки и апоптоза [95].

Таким образом, Sam68 играет важную роль в онкогенезе и может рассматриваться как перспективная мишень при терапии опухолевых заболеваний.

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 эмбриональной почки человека HEK293T и клетки рака толстой кишки HCT116. В ходе работы на основе исходных клеточных линий HEK293T и HCT116 с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas были получены изогенные стабильные клеточные линии с нокаутом Set7/9 путем специфического нокаутирования гена *SETD7*.

2.1.2 Условия культивирования

Адгезионные клеточные линии HEK293T, HEK293T с нокаутом Set7/9, HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9 культивировали в среде DMEM (Lonza, США), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Gibco, США), 2 mM L-глутамином (Биолот, Россия) и смесью антибиотиков пенициллин (100 ME/мл)/стрептомицин (100 мкг/мл) (Биолот, Россия). Культивирование клеток проводилось при температуре 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

2.1.3 Обработка клеток химическими агентами

Для проведения экспериментов по изучению экспрессии циклинов, клеточные линии HEK293T, HEK293T с нокаутом Set7/9, HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9 обрабатывались ДНК-повреждающим агентом доксорубицином (Sigma Aldrich, США) в концентрации 0,1 мкМ в течение 0 и 8 часов. Для селекции клеток, трансфицированных вектором lentiCRISPR v2.0 при создании клеточных линий HEK293T и HCT116, нокаутных по гену *SETD7*, использовали антибиотик пурамицин в концентрации 2 мкг/мл. Для

ингибирования процесса деградации белков использовали ингибитор протеасом MG132 в концентрации 10 мкМ в течение 16 часов.

2.1.4 Трансфекция клеточных линий

Трансфекцию клеток линий НЕК293Т, НЕК293Т с нокаутом Set7/9, НСТ116 и НСТ116 с нокаутом Set7/9 осуществляли реагентом для трансфекции TurboFect (ThermoScientific, USA), согласно инструкции производителя. Для этого за сутки до трансфекции клетки пассажировали таким образом, чтобы к моменту трансфекции плотность составляла 60-70%. Трансфецирующая смесь (10% от общего объема среды) включала в себя бессывороточную среду DMEM, плазмидную ДНК, растворенную в воде и трансфецирующий агент TurboFect (ThermoScientific, USA). Для трансфекции клеток, культивируемых на одной лунке 12-луночного планшета, общий объем культуральной среды составлял 1 мл, а объем трансфецирующей смеси — 100 мкл, соответственно. Трансфецирующая смесь состояла из 1-2 мкг плазмидной ДНК, растворенной в воде, бессывороточной среды и 2-3 мкл трансфецирующего реагента TurboFect (ThermoScientific, USA). Трансфецирующую смесь инкубировали 20 минут при комнатной температуре, после чего добавляли к клеткам. Эффективность трансфекции анализировали через 48-56 часов. Трансфекцию клеток линии НСТ116 и НСТ116 с нокаутом Set7/9 осуществляли реагентом XtremeGENE HP (Roche, Швейцария), согласно инструкции производителя. За сутки до трансфекции клетки пассажировали таким образом, чтобы к моменту трансфекции плотность составляла 60-70%. Непосредственно перед трансфекцией питательная среда DMEM заменялась на среду Opti-MEM (Gibco, США). Трансфецирующая смесь составляла 10% от общего объема среды и включала в себя среду Opti-MEM, плазмидную ДНК, растворенную в воде и трансфецирующий реагент. Для трансфекции клеток, культивируемых на одной лунке 12-луночного планшета, общий объем культуральной среды составлял 1 мл, а объем трансфецирующей смеси — 100 мкл, соответственно. Трансфецирующая смесь включала 2 мкг плазмидной ДНК, растворенной в

воде, среду Opti-MEM и 2 мкл трансфецирующего агента X-tremeGENE (Roche, Швейцария). Эффективность трансфекции анализировали через 48-56 часов после трансфекции.

2.1.5 Получение стабильных клеточных линий

В ходе работы на основе линий HEK293T и HCT116 с помощью CRISPR/Cas-системы геномного редактирования были получены изогенные стабильные клеточные линии с нокаутом Set7/9 путем трансфекции вектором lentiCRISPR v2.0-Set7/9KO, кодирующим gRNA для специфического нокаутирования гена *SETD7*:

Setd7KO_fwd: 5' CACCgTAGCGACGACGAGATGGTGG

Setd7KO_rev: 5' AAACCCACCATCTCGTCGTCGCTAC

В качестве контролей использовались линии HEK293T и HCT16, трансфецированные исходным вектором lentiCRISPR v2/0. После селекции в течение двух суток с использованием антибиотика пурамицина в концентрации 2 мкг/мл, клетки были пассажированы для изоляции моноклональных линий для последующего скрининга клонов.

2.2 Очистка, выделение и анализ нуклеиновых кислот

2.2.1 Выделение РНК и обратная транскрипция

Экстракцию РНК осуществляли с помощью реагента для выделения РНК (Ероген, Россия) согласно инструкции производителя. Для удаления остаточных количеств геномной ДНК проводили обработку ДНКазой I (ThermoFischerScientific, США), согласно инструкции производителя. Синтез кДНК осуществлялся с использованием набора реагентов для обратной транскрипции RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischerScientific, США) согласно инструкции производителя. На одну реакцию синтеза первой цепи кДНК добавляли 1.5 мкг общей выделенной РНК.

Синтез первой цепи осуществлялся с использованием случайного декануклеотидного праймера согласно инструкции производителя. Синтезированную кДНК хранили при температуре -20 °С и использовали в качестве матрицы для количественной ПРЦ в реальном времени.

2.2.2 ПЦР в реальном времени

ПРЦ в реальном времени проводили с использованием полученной с помощью обратной транскрипции кДНК, коммерческой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) для ПЦР в реальном времени и специфических праймеров к исследуемым генам (Таблица 2):

Таблица 2 Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени, использованных в настоящей работе.

Ген	Последовательность праймера	Длина амплифицированного фрагмента, п.н.
<i>CCND1</i>	Fwd: 5'GGCGGATTGGAAATGAACTT Rev: 5'TCCTCTCCAAAATGCCAGAG	109
<i>CCNE1</i>	Fwd: 5'TCTTTGTCAGGTGTGGGGA Rev: 5'GAAATGGCCAAAATCGACAG	110
<i>GAPDH</i>	Fwd: 5'GAGGTCAATGAAGGGGTCAT Rev: 5'AGTCAACGGATTTGGTCGTA	100
<i>KHDRBS1</i>	Fwd: 5'GTGGAGACCCCAAATATGCCCA Rev: 5'AAACTGCTCCTGACAGATATCA	161

Амплификацию проводили по стандартной программе:
Денатурация и активация полимеразы: 95 °С — 5 мин;
Денатурация: 95 °С — 20 сек;
Отжиг праймеров: 60 °С — 15 сек;
Элонгация: 72 °С — 20 сек;
Считывание флуоресцентного сигнала; ×40 циклов.

Для получения кривых плавления после завершения ПЦР в реальном времени проводили плавление продукта с высоким разрешением (high resolution melting, HRM). В качестве референсного гена использовали *GAPDH*. Нормализацию экспрессии проводили по методу $\Delta\Delta C_t$.

2.2.3 Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК проводилось с помощью набора реактивов GeneJET Plasmid Midiprep Kit (Thermo Scientific, США). Для этого колонию, полученную в результате трансформации клеток штамма *E. coli* DH5a, инокулировали в 200 мл жидкой LB-среды, содержащей соответствующий антибиотик, и культивировали при температуре +37 °С в течение ночи. Бактериальные клетки осаждались центрифугированием. Выделение плазмидной ДНК осуществлялось согласно инструкциям производителя. Концентрация выделенной ДНК определялась спектрофотометрическим методом по поглощению при 260 нм с помощью анализатора Shimadzu Biospec nano (Япония).

2.2.4 Электрофорез в агарозном геле

Для анализа длин фрагментов ДНК образцы смешивали с коммерческим буфером для нанесения и переносили в лунку в геле. Для осуществления электрофореза использовался 1%-ный агарозный гель с лунками нужного

объема. Электрофорез проводился в буфере TAE (40 mM Трис-ацетат pH 7,6, 1 mM ЭДТА) в камере для агарозного электрофореза при напряжении 120 В в течение 30 минут. В качестве маркера длин ДНК использовали GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, США).

2.2.5 Выделение ДНК из агарозного геля

Необходимые фрагменты ДНК детектировали при облучении УФ-светом с помощью транс-иллюминатора, вырезали соответствующие фрагменты геля скальпелем и помещали в 1,5 мл-пробирки. Выделение ДНК из геля проводилось с использованием набора реактивов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с методикой фирмы-производителя.

2.3 Генетические конструкции

Конструкции pGEX-Set7/9 (1–366 а.о.), pGEX-MORN (1–128 а.о), pGEX-Linker (128–214 а.о), pGEX-SET (15–335 а.о), а также pIRES-Set7/9 были любезно предоставлены к.б.н. О.Ю. Шуваловым (Институт Цитологии РАН, Россия). Конструкции pCDNA3-Set7/9 и pCDNA3-Set7/9mut были любезно предоставлены д.б.н. Н.А. Барлевым (Институт Цитологии РАН). Конструкция, кодирующая белок слияния полноразмерной формы Sam68 с GFP, а также конструкции, кодирующие полноразмерную форму Sam68 и RG-домен Sam68 с тагом 6xHis, были любезно предоставлены доктором Cyril Dominguez (Лестер, Великобритания).

2.3.1 Сайт-направленный мутагенез.

Конструкция, кодирующая полноразмерную форму белка Sam68 с тагом 6xHis, использовалась в качестве матрицы для получения конструкции с точечной мутацией K208R. Мутантная плаزمида была получена с помощью кита для сайт-направленного мутагенеза Q5 site directed mutagenesis kit (NEB, США). Праймеры, использованные для сайт-направленного мутагенеза, были подобраны с помощью компьютерной программы NEBChanger:

Sam68 K208R_fwd 5' AGACAAAGCCaggGAGGAAGAGC

Sam68 K208R_rev: 5' CTCATTGAGCCCTTTCCC

Сайт-направленный мутагенез осуществлялся согласно инструкции производителя, и включал в себя этапы ПЦР с вышеуказанными праймерами, ферментативные реакции фосфорилирования и лигирования, после чего кольцевая плазмидная ДНК трансформировалась в клетки DH5a. Наличие мутации в гене было подтверждено с помощью секвенирования полученной генетической конструкции.

2.3.2 Молекулярное клонирование

Конструкции, кодирующие 6xHis-Sam68 дикого типа и 6xHis-Sam68 с мутацией K208R, использовались в качестве матриц для создания генетических конструкций на основе векторов pIRES-hrGFP-1a, кодирующих, соответственно 3xFLAG-Sam68 и 3xFLAG-Sam68K208R. Праймеры, использованные для осуществления молекулярного клонирования:

pIRES-Sam68_fwd 5' TATGCGGCCGCAACCATGCAGCGCCGGGACGA

pIRES-Sam68_rev 5' TTAGAATTCAATAACGTCCATATGGGTGCTC.

С использованием праймеров осуществлялась ПЦР-амплификация последовательности, кодирующей Sam68. Реакционная смесь содержала буфер для ПЦР, смесь четырех dNTPs (0,2 мМ каждого), праймерные олигонуклеотиды (до конечной концентрации 0,5–1 мкМ), матричную ДНК (1–10 нг) и полимеразу iProof (iProof™ High-Fidelity PCR Kit, Bio-Rad). Условия ПЦР:

Предварительная денатурация 98 °С — 30 сек;

Денатурация 98 °С — 20 сек;	}	25 циклов.
Отжиг 65 °С — 30 сек;		
Элонгация 72 °С — 60 сек;		

Далее проводили рестрикцию линейных фрагментов ДНК и плазмиды pIRES-hrGFP-1a. Рестрикцию проводили в буфере для рестрикции FastDigest (Thermo Scientific, США) рестриктазами *EcoRI* с двойным избытком фермента *NotI* в течение 1 ч при 37 °С. В качестве контроля проводили рестрикцию плазмиды каждым из ферментов по отдельности. Далее осуществляли лигирование линейных фрагментов ДНК и линейризованной плазмиды pIRES-hrGFP-1a. Реакционная смесь (30 мкл) содержала: 3 мкл 10× буфера для лигирования, 10 мМ АТФ, 100 нг плазмиды, рестрицированной по сайтам *EcoRI* и *NotI*, 100 нг линейных фрагментов ДНК, рестрицированных по тем же сайтам, и 1 мкл раствора ДНК-лигазы фага T4 (Thermo Scientific, США). Лигазную смесь инкубировали в течение 18 часов при температуре 16 °С на водяной бане, после чего трансформировали в штамм *E. coli* DH5a для изоляции плазмидной ДНК. Наличие вставки подтверждалось рестрикционным анализом с помощью эндонуклеаз *EcoRI* и *NotI* и последующим секвенированием.

2.4 Экспрессия, очистка и анализ рекомбинантных белков

2.4.1 Трансформация *E. coli* методом теплового шока

Компетентные клетки, размороженные на льду, смешивали с вектором (50-100 нг) или лигазной смесью (200 нг), инкубировали 20 минут на льду и одну минуту при 42 °С. После инкубации на льду в течение 10 минут к компетентным клеткам добавляли 900 мкл LB без антибиотика и культивировали при 37 °С в течение 45 минут. По истечении указанного времени клетки центрифугировали, и осадок ресуспендировали в небольшом объеме LB и распределяли по поверхности LB-агара с соответствующим антибиотиком.

2.4.2 Экспрессия рекомбинантных белков

Рекомбинантные белки GST-Set7/9, GST-MORN, GST-SET, GST-Linker домены, а также нативный GST в качестве контроля, как и 6xHis-Sam68, 6His-RG домен 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, описанным выше. Отдельно изолированную колонию инокулировали в 4 мл LB-среды с соответствующим антибиотиком и культивировали в течение ночи при 37 °С. Ночную культуру переносили (1:100) в 400 мл LB-среды с антибиотиком и культивировали до достижения оптической плотности бактериальной суспензии 0,4-0,5 о.е. при длине волны 535 нм. Индукцию синтеза белка осуществляли с помощью добавления в питательную среду индуктора IPTG (isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside) в конечной концентрации 0,4 мМ. Синтез проводили в течение 5-6 часов при 37 °С, после чего бактериальную массу осаждали центрифугированием при 5000 g. Осадок хранили при температуре -80 °С.

2.4.3 Очистка рекомбинантных белков с использованием глутатион-сефарозы

Для выделения и очистки рекомбинантных белков бактериальный осадок ресуспендировали на льду в фосфатно-солевом буфере PBS, содержащим 0,5% Triton X-100 и 1 мМ PMSF. Для разрушения клеток производили обработку суспензии ультразвуком по программе (15 сек ультразвук амплитудой 60%, 15 сек. инкубация на льду)×10 циклов. Затем суспензию центрифугировали при 12.000 g при температуре +4 °С и отбирали супернатант. К супернатанту добавляли предварительно промытую фосфатно-солевым буфером глутатион-сефарозу (General Electric, США) и инкубировали при температуре +4 °С при постоянном перемешивании в течение 3 ч. После инкубации глутатион-

сефарозу со связавшимися белками осаждали центрифугированием при 1000 g при температуре +4 °С. Для очистки от неспецифически связавшихся белков смолу трижды промывали фосфатно-солевым буфером PBS, содержащим 0,5% Triton X-100 и 1 мМ PMSF на льду. Глутатион-сефарозу со связавшимися белками хранили в промывочном буфере не более трех дней при температуре +4 °С. Оценку количества выделенных белков осуществляли с помощью электрофореза в ПААГ с последующей окраской геля Кумасси R-250 (Applichem, Германия) и дальнейшего денситометрического анализа путем сравнения с серийными разведениями известной концентрации бычьего сывороточного альбумина BSA.

2.4.4 Очистка рекомбинантных белков с использованием Ni-агарозы

Для выделения и очистки рекомбинантных белков бактериальный осадок после индукции ресуспендировали на льду в фосфатно-солевом буфере PBS, содержащем 0,5% Triton X-100, 300 мМ NaCl, 1 мМ имидазол и PMSF. Для разрушения клеток производили обработку суспензии ультразвуком по программе (15 сек ультразвук амплитудой 60%, 15 сек инкубация на льду)×10 циклов. Затем суспензию центрифугировали при 12000 g при температуре +4 °С и отбирали супернатант. К супернатанту добавляли предварительно промытую фосфатно-солевым буфером Ni(2+)-NTA-агарозу (Qiagen, США) и инкубировали при температуре +4 °С при постоянном перемешивании в течение 1 ч. После инкубации никель-агарозу со связавшимися белками осаждали центрифугированием при 1000g при температуре +4°С. Для очистки от неспецифически связавшихся белков смолу трижды промывали фосфатно-солевым буфером PBS, содержащим 0,5% Triton X-100, 300 мМ NaCl, 1 мМ PMSF и 30 мМ имидазол на льду. Элюцию проводили фосфатно-солевым буфером PBS, содержащим 0,5% Triton X-100, 300 мМ NaCl и 1 мМ PMSF и 150 мМ имидазол.

2.4.5 Получение цитоплазматического и ядерного экстрактов

Для анализа белкового уровня Sam68 в цитоплазматической и ядерной фракциях клеток НЕК293Т и НСТ116 использовалась методика получения ядерного и цитоплазматического экстрактов. Для получения ядерной фракции клетки собирали, промывали фосфатно-солевым буфером PBS и ресуспендировали в буфере А, содержащем 10 мМ Tris-HCL pH 8.0, 10 мМ KCl, 1.5 мМ MgCl₂ и 1x раствор ингибиторов протеаз (Roche, США), после чего клеточную суспензию инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем суспензию гомогенизировали с помощью вортекса в течение 15 сек, после чего центрифугировали при 2000 g в течение 13 мин при +4 °С. Супернатант отбирали и повторно центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин для получения цитоплазматического экстракта, а осадок, состоящий из ядер клеток, ресуспендировали в буфере С, содержащем 20 мМ Tris-HCL pH 8.0, 25% глицерин, 420 мМ NaCl, 1.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ EDTA и 1x раствор ингибиторов протеаз (Roche, США). Суспензию инкубировали на льду в течение 15 мин, после чего центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин при +4 °С. Супернатант, представляющий собой растворимую ядерную фракцию, отбирали и хранили при температуре -80 °С.

2.4.6 Разделение белков в ПААГ и иммуноблоттинг (вестерн-блот анализ)

Электрофорез белков осуществляли в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Laemmli. Для этих целей использовался комбинированный ПААГ, состоящий из концентрирующего (4% смеси акриламид/бис-акриламид 37.5:1; pH 6.8) и разделяющего (8–16 % смеси акриламид/бис-акриламид 37.5:1; pH 8.8) гелей. Процент акриламида/бис-акриламида в разделяющем геле подбирался в зависимости от спектра молекулярных масс анализируемых белков. Разделение белков производили путем электрофореза при напряжении

100 В в трис-глициновом буфере TGB, содержащем 0,1% SDS. Для дальнейшего анализа белков в геле осуществляли окраску геля раствором красителя Кумасси К-250, содержащим 10% уксусную кислоту и 40% этиловый спирт, и последующую отмывку в 8% растворе уксусной кислоты. Оцифровку гелей 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% метанол для отмывки от SDS в течение 10 мин. После этого белки переносили на предварительно активированную 100% метанолом в течение одной минуты PVDF мембрану (Millipore, США) в буфере TGB, содержащем 10% метанол в течение 1 часа при напряжении 100 В и силе тока 250 мА при +4 °С с использованием установки для блоттинга Mini-PROTEAN (BioRad, США).

Для окраски антителами мембрану промывали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% Tween-20, и блокировали в течение часа в 5% растворе обезжиренного коровьего молока в PBS, содержащем 0,1% Tween-20. Приготовленный 5% раствор обезжиренного коровьего молока в PBS, содержащий 0,1% Tween-20, использовался для приготовления раствора первичных антител в концентрации, заявленной в инструкции производителя. Инкубацию мембраны с первичными антителами осуществляли от 2 до 18 часов в зависимости от антител и рекомендаций производителя. Отмывки проводили в фосфатно-солевом буфере PBS, содержащем 0,1% Tween-20, три раза в течение 5 мин. Раствор вторичных антител в концентрации, заявленной производителем, готовили с использованием 5% раствора обезжиренного коровьего молока в PBS, содержащего 0,1% Tween-20. Мембрану инкубировали в течение одного часа в растворе соответствующих вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Отмывки проводили в фосфатно-солевом буфере PBS, содержащем 0,1% Tween-20, три раза в течение 5 мин. Набор реагентов Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore,

США) использовали для детекции пероксидазной активности согласно инструкции производителя и системы гель-документации ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (Bio-Rad, США). В работе использовались антитела к следующим белкам: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США); Set7/9 (разведение 1:1000, Cell Signaling #2813s, США); β -актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США); Cyclin E (1:1000, Millipore 07-687, США), Cyclin D1 (1:1000, Thermo Scientific RB-9041-P1, США). Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: к IgG мыши и IgG кролика (1:10000; Sigma-Aldrich, США).

2.5 Изучение белок-белковых взаимодействий

2.5.1 GST-пулдаун

Для подтверждения выявленных взаимодействий с помощью метода GST-пулдаун, нами были экспрессированы, выделены и очищены следующие рекомбинантные белки: GST-Set7/9, GST-MORN, GST-SET, GST-Linker домены, 6xHis-Sam68, 6xHis-RG домен, а также GST в качестве контроля. Предварительно, осуществляли преинкубацию 6xHis-Sam68 и 6xHis-RG домен с нативным GST белком, иммобилизованным на глутатион-сефарозе, с целью предотвращения неспецифического связывания в течение 2 часов при +4 °C при постоянном перемешивании. После центрифугирования супернатант с рекомбинантными белками 6xHis-Sam68 и 6xHis-RG-домен отбирали и добавляли к очищенным рекомбинантным белкам GST-Set7/9, GST-MORN, GST-SET, GST-Linker, иммобилизованным на глутатионовой смоле. В качестве контроля специфического связывания использовали избыток GST, который инкубировали с тем же количеством рекомбинантных белков 6xHis-Sam68 и 6xHis-RG. Связывание проводили в течение 4 часов при +4 °C и постоянном перемешивании, после чего иммобилизованные на глутатион-сефарозе белки 5 раз промывали буфером PBS на льду. Рекомбинантные белки с GST-тагом, а также белки, связавшиеся с ними, элюировали нагреванием при 95 °C в денатурирующих условиях с буфером Laemmli и проводили электрофорез в

ПААГ, после чего детектировали связывание с помощью окраски Кумасси, а также путем вестерн-блот анализа и детекции связавшихся белков с помощью специфических антител к исследуемым белкам.

2.5.2 Ко-иммунопреципитация

Для экспериментов по ко-иммунопреципитации клетки HEK293T, трансфицированные генетической конструкцией pIRES-hr-1a-Set7/9, кодирующей белок Set7/9 с 3×FLAG-эпитопом, а также исходным вектором pIRES-hr-1a в качестве контроля, промывали PBS. После этого клетки ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 15 мМ Tris (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, 1 мМ NaF, 0,25% Triton X-100 и 1x раствор ингибиторов протеаз (Roche, США), и инкубировали суспензию в течение 40 минут при +4 °С при постоянном перемешивании. Затем клеточный лизат подвергали центрифугированию при 10000 g в течение 20 минут при +4 °С. К отобранному супернатанту добавляли анти-FLAG M2-агарозу (SigmaAldrich, США), предварительно промытую в буфере TBS (150 мМ Tris pH 7,5, 150 мМ NaCl) и инкубировали в течение 4 часов при +4 °С и постоянном перемешивании. Затем анти-FLAG M2-агарозу со связавшимися белками трижды промывали буфером TBS и связавшиеся белки элюировали раствором FLAG-пептида (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 минут при +4 °С и постоянном перемешивании. Анти-FLAG M2-агарозу осаждали центрифугированием при 5000 g при +4 °С. Супернатант, содержащий белковые комплексы Set7/9-3×FLAG и ко-иммунопреципитированные белки, хранили при температуре -80 °С. Ко-иммунопреципитированные белки детектировали с помощью электрофореза в ПААГ и вестерн-блот анализа с окраской специфическими антителами к исследуемым белкам.

2.6 Иммуноцитохимическое окрашивание

Для проведения иммуноцитохимического окрашивания, клетки клеточных линий HEK293T и HEK293T с нокаутом Set7/9, HCT116 и HCT116 с

нокаутом Set7/9 предварительно рассеивались в лунки 24 луночного планшета, содержащие стекла диаметром 13 мм. На следующие сутки клетки подвергались либо фиксации, либо трансфекции (см.п. 2.1.4) с последующей фиксацией клеток в планшетах 4% раствором параформальдегида в PBS в течение 20 минут. Фиксированные клетки обрабатывали блокирующим буфером, содержащим 5% BSA, растворенный в PBS, и 0.3% Triton X-100, в течение 1 часа, после чего производили окраску первичными антителами в течение 16 часов. Окраску вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами, производили в течение 2 часов, после чего осуществляли окраску ядер при помощи красителя DAPI и заключали препараты с использованием раствора для заключения с последующей монтировкой на предметные стекла.

В работе использовались антитела к следующим белкам: Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США); α -Tubulin (1:1000, Sigma F2168, США), ELAVL1/HuR (D9W7E) (1:500, Cell Signalling 12582S, США). Вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами: Chicken anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1:1000; ThermoFisher, США); Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546 (1:1000; ThermoFisher, США).

2.7 Изучение клеточного цикла методом проточной цитометрии

Для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла, клеточные линии HEK293T и HEK293T с нокаутом Set7/9, HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9 трансфицировали вектором, кодирующим белок слияния Sam68-GFP. В качестве контроля использовали пустой вектор pIRES (см. 2.1.4). Через 48–56 часов после трансфекции клетки снимали с чашек фосфатно-солевым буфером PBS, осаждали центрифугированием и трижды промывали раствором PBS. Затем клетки инкубировали в течение 20 мин в 500 мкл PBS, содержащего 200 мкг/мл сапонины при комнатной температуре в темноте. После инкубации

клетки промывали фосфатно-солевым буфером и осаждали центрифугированием. Клетки ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащим РНКазу в концентрации 250 мкг/мл и пропидий йодид в концентрации 50 мкг/мл, после чего инкубировали при 37 °С. Анализ проводили на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Becton Dickinson). Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью программы WinMDI, версия 2.8.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Определение белков-интерактантов метилтрансферазы Set7/9

С целью определения спектра белков, ассоциированных с рекомбинантной метилтрансферазой человека Set7/9, был применен метод GST-pull down [97]. Для этого были использованы вектора, кодирующие полноразмерный белок GST-Set7/9 (1–366 а.о.), а так же отдельные его домены GST-MORN (1–128 а.о.), GST-Linker (128–214 а.о.), GST-SET (214–366 а.о.). В качестве контроля использовали нативный белок GST. Для определения белков-партнеров рекомбинантный полноразмерный белок Set7/9 или его домены, иммобилизованные на глутатион-сефарозе, инкубировались с клеточным лизатом, полученным из клеток HEK293Т. После серии промывок от неспецифически-связавшихся белков, проводили разделение проб с помощью электрофореза в ПААГ. Интерактанты Set7/9 определялись с помощью масс-спектрометрического анализа. Идентифицированные белки-интерактанты Set7/9 были классифицированы в соответствии с выполняемой ими функцией и сведены в таблицу [98]. Перечень идентифицированных белков представлен в Таблице 3.

Полученные данные демонстрируют, что метилтрансфераза Set7/9 принимает участие (предположительно, за счет пост-трансляционных модификаций белков-партнеров) в широком спектре внутриклеточных процессов. Среди идентифицированных интерактантов для дальнейшего изучения был выбран РНК-связывающий белок Sam68 (кодируется геном *KHDRBS1*) (Таблица 3). Этот белок принимает участие в различных внутриклеточных процессах, таких как альтернативный сплайсинг, регуляция экспрессии генов, контроль клеточного цикла и апоптоз.

Таблица 3 Распределение по функциям ассоциированных с Set7/9 белков, идентифицированных в клеточной линии HEK293T [98]

Функция	Ассоциированные с Set7/9 белки
Клеточный цикл	RCC2, MKI67, BUB3
Рибосомальные белки и трансляция	RPL8, RPS3, RPS3A, RPL11, RPL23A, RPL27, RPL5
Цитоскелет и адгезия	DSP, JUP, FLG, KIFC1, KPRP, CKAP2
Транскрипция	DDX17, DDX5, MAZ, DDX3X, DDX21, PSIP1, TFAM
Метаболизм	MTHFD2, CMAS, PYCR2, SLC25A5, PYCR1, AZGP1, SLC25A6, SHMT2, ATP5A1, BCKDK, SLC25A3
Шапероны	HSPA1A, HSPA5, HSPA9
Процессинг РНК и сплайсинг	SFPQ, NONO, ALYREF, SERBP1, EWSR1, FUS, KHDRBS1 , RBMX, HNRNPA2B1, PSPC1, HNRNPA1, G3BP1, FBL, PABPC1, PRRC2A, RBM14, HNRNPA3, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPC, NOP56, PRRC2C
Репарация ДНК	APEX1, FEN1, MPG
Другое	HMGB1, UBB, LTF, NOLC1, IGHA1, ANXA1, HMGB2, HIST2H2BC, SBSN

3.2 Подтверждение взаимодействия между метилтрансферазой Set7/9 и РНК-связывающим белком Sam68

3.2.1 Полноразмерная форма метилтрансферазы Set7/9 взаимодействует с полноразмерной формой Sam68 *in vivo*

Первой задачей настоящего исследования являлось подтверждение физического взаимодействия между лизин-специфической метилтрансферазой Set7/9 и идентифицированным белком-интерактантом Sam68. Подтверждение взаимодействия *in vivo* осуществлялось с помощью метода ко-иммунопреципитации. Для этого клеточная линия HEK293T была

трансфецирована вектором, кодирующим полноразмерную форму метилтрансферазы Set7/9 с тагом 3xFLAG. Помимо этого, была произведена ко-экспрессия полноразмерной формы белка слияния Sam68 с GFP и 3xFLAG-Set7/9. В качестве контроля осуществлялась ко-трансфекция пустыми векторами, не несущими гены интереса. Через 48 часов после трансфекции клеточный лизат использовался для проведения эксперимента по ко-иммунопреципитации с использованием M2-FLAG-агарозы. Элюированные ко-иммунопреципитированные белки разделялись с помощью ПААГ-электрофореза, а затем детектировались с помощью вестерн-блот анализа путем окраски специфичными антителами к исследуемым белкам: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США) и Set7/9 (разведение 1:1000, Cell Signaling #2813s, США) (Рис. 4).

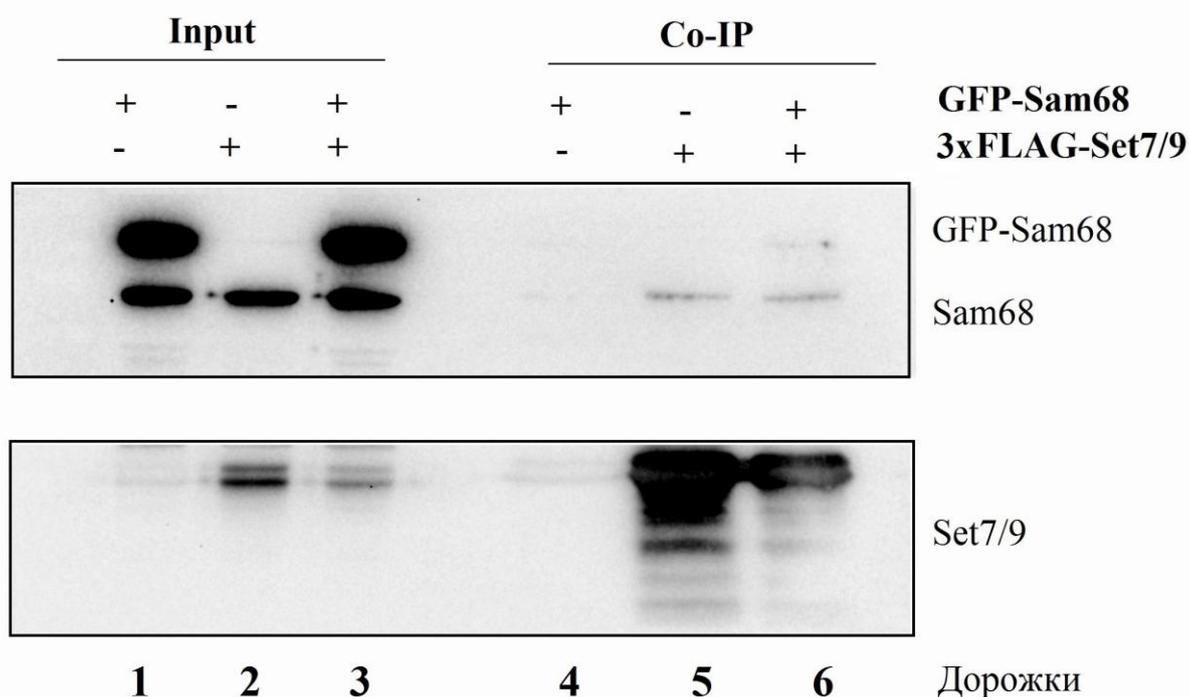


Рис. 4. Sam68 взаимодействует с Set7/9 *in vivo*. Вестерн-блот анализ результатов ко-иммунопреципитации эндогенного Sam68 и GFP-Sam68 из лизата клеток HEK293T с использованием аффинной очистки белка FLAG-Set7/9. Окраска антителами: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США) и Set7/9 (1:1000, Cell Signaling #2813s, США)

Было обнаружено, что как эндогенный, так и сверхэкспрессированный белок слияния GFP-Sam68 иммунопреципитируются совместно с FLAG-Set7/9 (Рис. 4 — дорожки 5, 6). В контрольном эксперименте в отсутствие FLAG-Set7/9 как эндогенный, так и сверхэкспрессированный Sam68 не обнаруживались при вестерн-блот анализе (Рис. 4 — дорожка 4). Таким образом, было доказано, что полноразмерная форма Sam68 взаимодействует с полноразмерной формой метилтрансферазы Set7/9 *in vivo*.

3.2.2 Полноразмерная форма Sam68 напрямую взаимодействует с MORN-доменом метилтрансферазы Set7/9 in vitro

Как упоминалось выше, доменная структура Set7/9 (Uniprot Q8WTS6) имеет три повторяющихся MORN-домена (36–58 а.о., 59–81 а.о., 106–128 а.о.), а также каталитический SET домен (214–336 а.о.) (Рис.1 А). В свою очередь, РНК-связывающий белок Sam68 (Uniprot Q07666) содержит GSG-домен (96–279 а.о.), RG домен (305–331 а.о.), пролин-богатые участки (P0–P5), тирозин-богатую YY последовательность (366–411 а.о.) и сигнал ядерной локализации NLS (Рис.3).

Для изучения взаимодействия метилтрансферазы Set7/9 и РНК-связывающего белка Sam68, а также идентификации доменов, отвечающих за взаимодействие между белками, был предпринят эксперимент по связыванию выделенных рекомбинантных белков *in vitro*. Для этого с использованием стандартных методик были экспрессированы, выделены и очищены на Ni-агарозе и глутатион-сефарозе следующие рекомбинантные белки: полноразмерная форма Sam68 с тагом 6xHis, полноразмерная форма Set7/9 с GST-тагом; отдельные изолированные домены метилтрансферазы GST-MORN (1–128 а.о.), GST-Linker (128–214 а.о.), GST-SET (214–335 а.о.), а также нативный GST. Чистота выделения белков оценивалась с помощью белкового электрофореза и окраской Кумасси (Рис. 5 А). Для проведения связывания *in vitro* одинаковые количества иммобилизованных на глутатион-сефарозе белков GST-Set7/9, GST-MORN, GST-Linker, GST-SET (Рис.5 А), а также нативного

GST белка в качестве отрицательного контроля, инкубировались с очищенным 6xHis-Sam68 в течение 2 часов. После серии отмывок от неспецифически связавшихся белков и элюции белки разделялись с помощью белкового ПААГ-электрофореза с последующим проведением вестерн блот анализа (Рис. 5 Б). Окрашивание производилось с применением специфических антител к исследуемым белкам: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США). Было обнаружено, что связывание полноразмерной формы Sam68 происходит как с полноразмерной формой Set7/9 (Рис. 5 Б — дорожка 2), так и с изолированным MORN-доменом изучаемой метилтрансферазы (Рис. 5 Б — дорожка 3). Взаимодействия полноразмерной формы Sam68 с контрольным нативным GST белком, а также каталитическим SET-доменом и Linker-доменом не было обнаружено (Рис. 5 Б — дорожки 1, 4, 5). Таким образом, нами было доказано, что полноразмерная форма белка Sam68 напрямую взаимодействует с полноразмерной формой метилтрансферазы Set7/9, а именно с ее MORN-доменом в эксперименте по связыванию *in vitro*.

3.2.3 MORN-домен метилтрансферазы Set7/9 напрямую взаимодействует с RG доменом Sam68 in vitro

Для идентификации домена РНК-связывающего белка Sam68, отвечающего за взаимодействие с Set7/9, был произведен анализ аминокислотных последовательностей белков, взаимодействующих с MORN доменом Set7/9 согласно результатам масс-спектрометрического анализа [98]. Оказалось, что все обнаруженные белки-интерактанты Set7/9 содержали RG-богатые домены. По этой причине, были проведены эксперименты по связыванию *in vitro* 6xHis-RG домена Sam68 с полноразмерной формой метилтрансферазы GST-Set7/9, а также с ее GST-MORN и GST-SET доменами. Полноразмерная форма белка GST-Set7/9, а также домены GST-MORN, GST-SET и нативный GST, в качестве контроля, были экспрессированы, выделены и очищены с помощью стандартных методик выделения белков с использованием Ni-агарозы и глутатион-сефарозы (Рис. 6 А, Б).

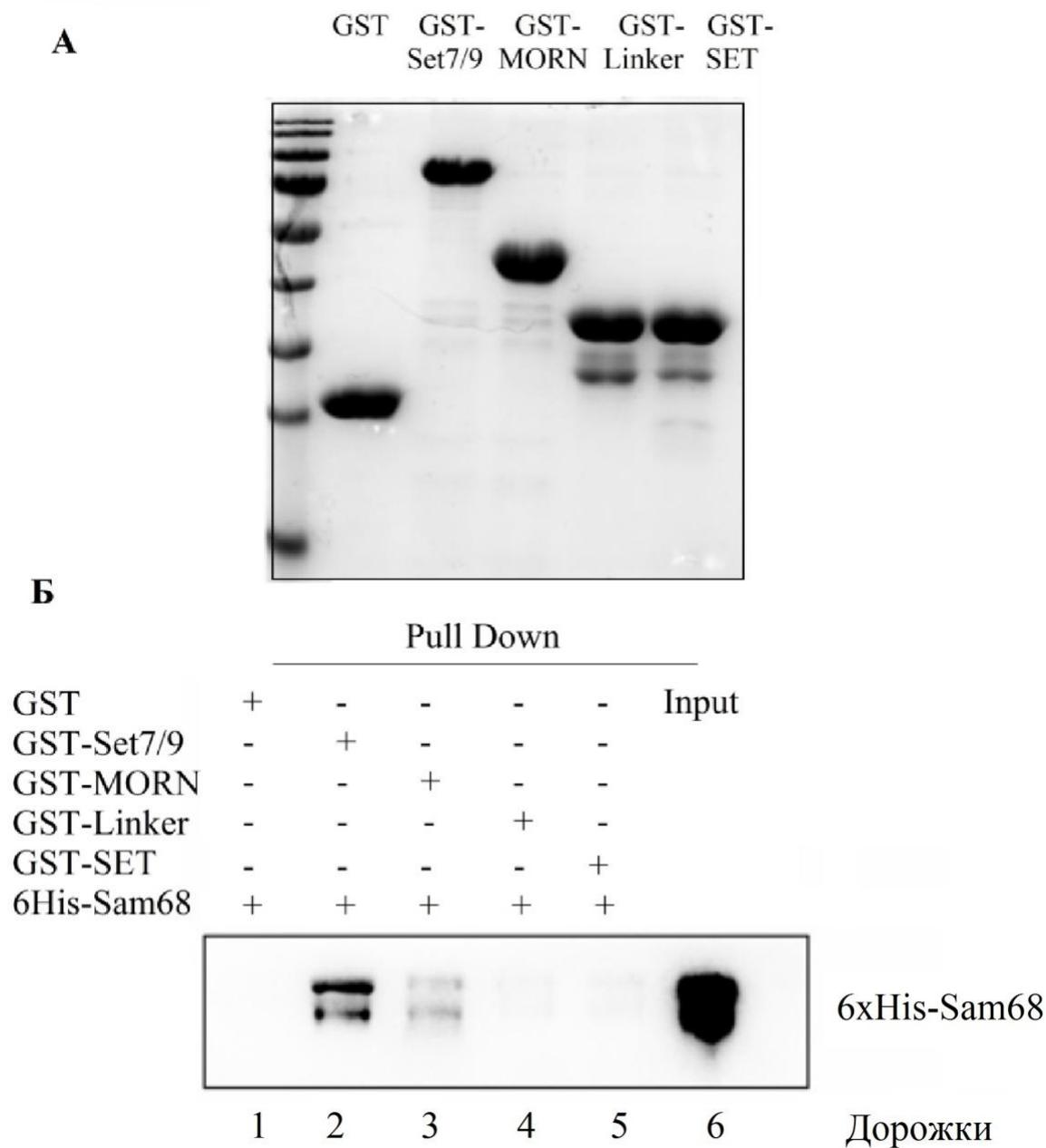


Рис. 5 Полноразмерная форма Sam68 напрямую взаимодействует с MORN-доменом метилтрансферазы Set7/9 *in vitro*. **А** — Белковый электрофорез выделенных полноразмерной формы метилтрансферазы GST-Set7/9, ее GST-MORN, GST-SET и GST-Linker доменов, а также нативного GST-белка. **Б** — Проведение связывания *in vitro* полноразмерной формы 6xHis-Sam68 с полноразмерной формой метилтрансферазы GST-Set7/9, а также с ее GST-MORN, GST-SET и GST-Linker доменами. GST белок использовался в качестве контроля. Окраска антителами: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США).

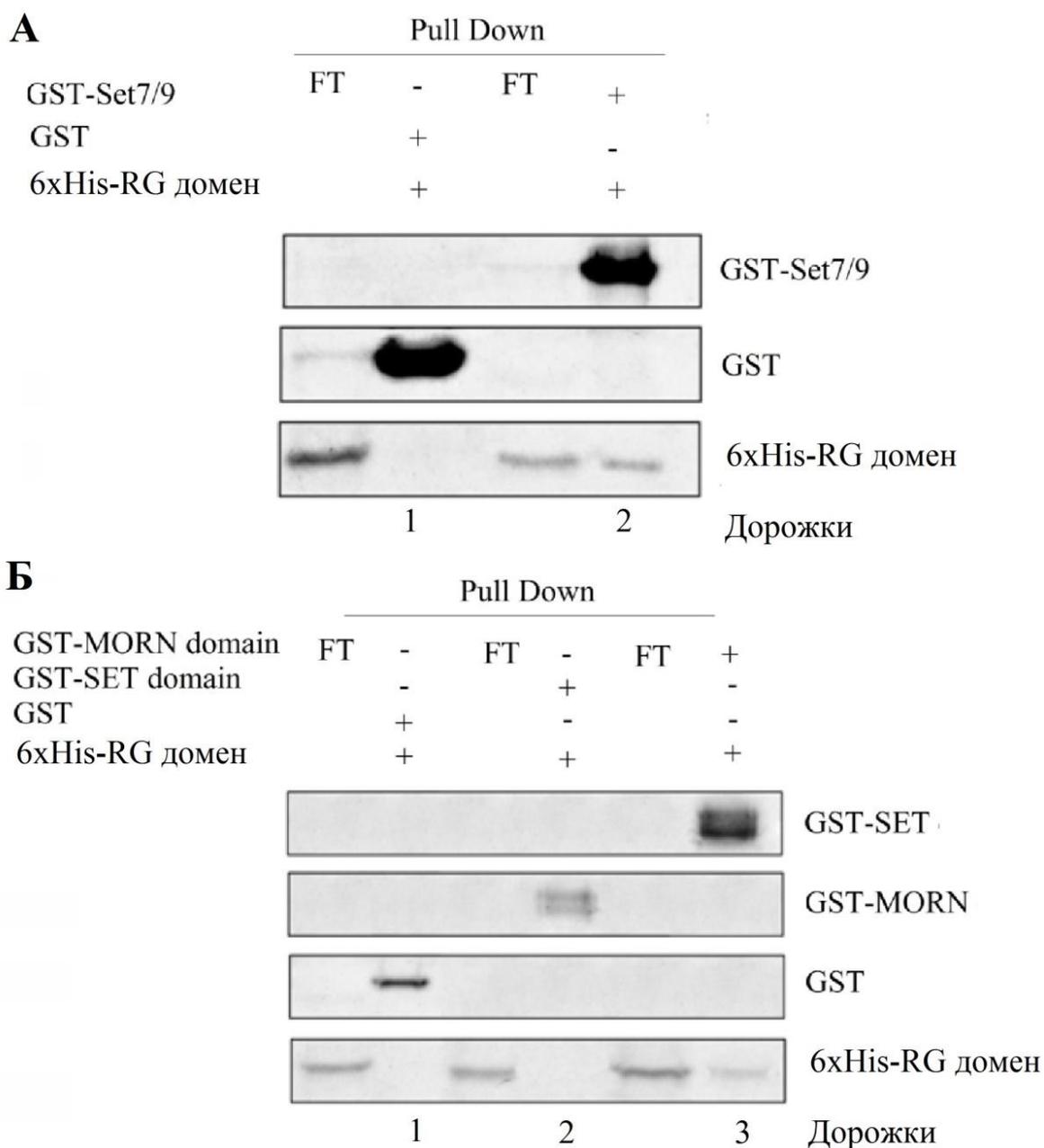


Рис. 6 MORN-домен метилтрансферазы *Set7/9* напрямую взаимодействует с RG доменом *Sam68 in vitro*. **А** — Проведение связывания *in vitro* полноразмерной формы GST-*Set7/9* с выделенным 6xHis-RG доменом *Sam68*. **Б** — Проведение связывания *in vitro* 6xHis-RG домена *Sam68* с GST-MORN и GST-SET доменами *Set7/9*. GST белок использовался в качестве контроля. FT — несвязавшаяся фракция.

Для проведения связывания *in vitro* одинаковые количества иммобилизованных на глутатион-сефарозе белков GST-*Set7/9*, GST-MORN, GST-SET и GST, в качестве контроля, инкубировались с очищенным 6xHis-RG доменом *Sam68* (Рис. 6 А, Б). После серии отмывок от неспецифически

связанных белков и элюции белки разделялись с помощью белкового электрофореза с последующей окраской Кумасси. Было обнаружено, что RG домен Sam68 способен связываться с полноразмерной формой Set7/9 (Рис. 6 А — дорожка 2) и, в частности, с ее MORN доменом (Рис.6 Б — дорожка 3). Взаимодействия RG домена Sam68 с контрольным GST-белком и каталитическим SET-доменом метилтрансферазы не было обнаружено (Рис. 6 А — дорожка 1, Б — дорожки 1, 2).

Таким образом, нами было показано, что метилтрансфераза Set7/9 и РНК-связывающий белок Sam68 стабильно взаимодействуют друг с другом через свои MORN- и RG- домены соответственно.

3.3 Метилтрансфераза Set7/9 метилирует РНК-связывающий белок Sam68 в положении K208.

3.3.1 Биоинформатический поиск потенциального сайта метилирования Sam68

С целью идентификации потенциального сайта метилирования Sam68, нами были проанализированы известные аминокислотные последовательности белков-субстратов метилтрансферазы Set7/9 (Рис. 7 А). Для этого выровненные аминокислотные последовательности были проанализированы на наличие консенсусных последовательностей с помощью программы Protein BLAST. В результате анализа 45 последовательностей были идентифицированы два типа консервативных последовательностей, которые обычно метилируются Set7/9 (Рис. 7 Б). Первый сайт метилирования представляет собой последовательность вида K/R-S/A-K-K/S/R, в то время как второй тип имеет менее выраженный вид и характеризуется наличием основных аминокислотных остатков, фланкирующих центральный лизин, а также наличием пролина в положении +12 (Рис. 7 Б). Затем был осуществлен анализ аминокислотной последовательности белка Sam68, который позволил выявить консервативный

мотив Типа 1 в КН домене РНК-связывающего белка Sam68 (Рис. 7 В). Таким образом, был идентифицирован лизин в положении 208 (K208), который потенциально мог являться сайтом метилирования метилтрансферазы Set7/9.

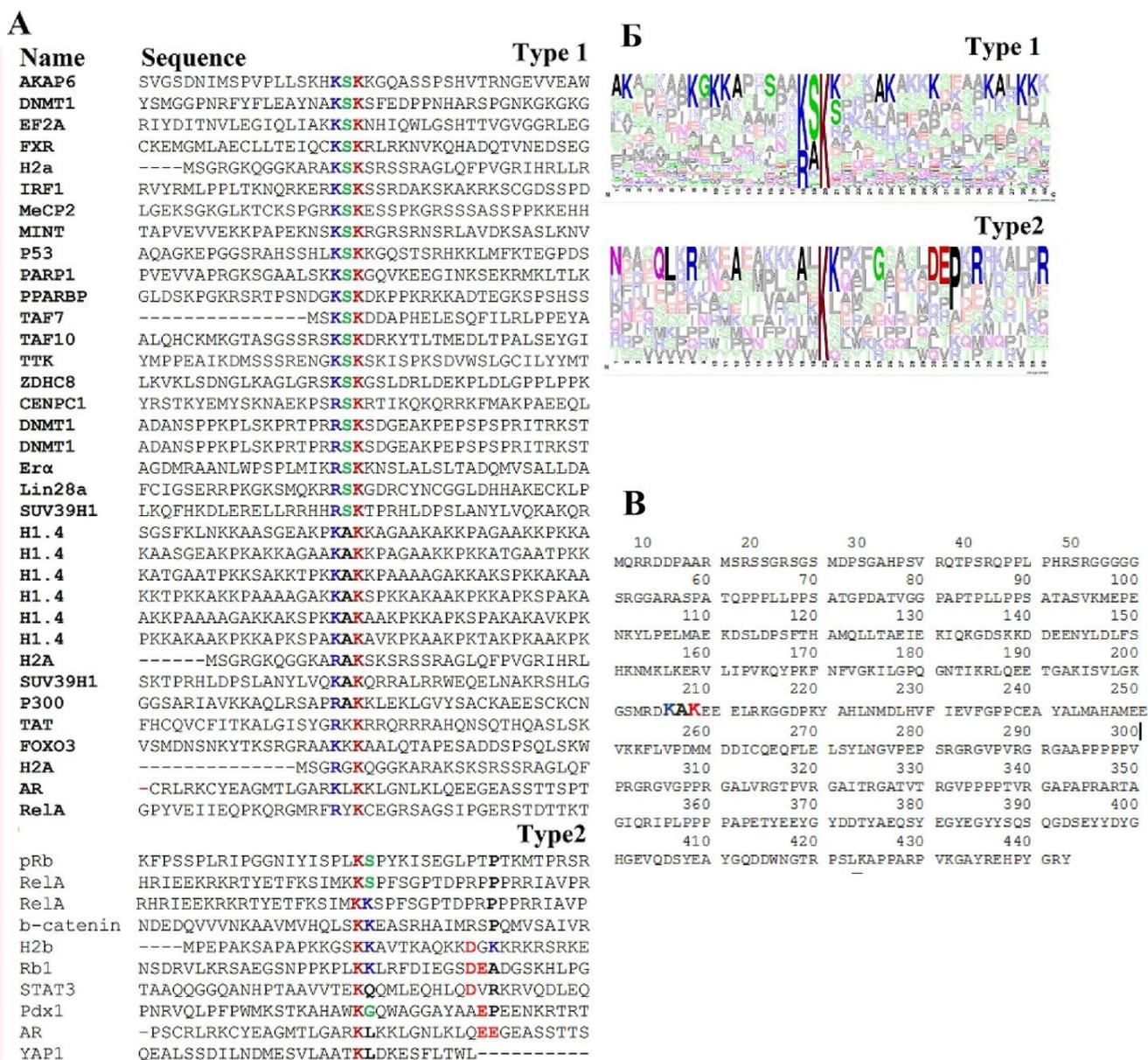


Рис.7 Поиск потенциального сайта метилирования Sam68 метилтрансферазой Set7/9

А — поиск консервативных последовательностей среди сайтов метилирования субстратов Set7/9. Б — Два типа консервативных последовательностей, метилируемых Set7/9. В — Поиск и идентификация консервативной для метилирования Set7/9 последовательности в белке Sam68 (K208).

3.3.2 Сайт-направленный мутагенез потенциального сайта метилирования Sam68

Как упоминалось выше, проведенный анализ последовательностей позволил нам выявить лизин в положении 208, расположенный в КН-домене белка Sam68, который может подвергаться метилированию метилтрансферазой Set7/9. Для проверки полученных нами биоинформатических данных о потенциальном сайте метилирования (K208) нами был проведен сайт-направленный мутагенез с целью замены аминокислотного остатка лизина на аргинин в положении 208 (K208R) (Рис. 8). Полученная конструкция, несущая ген мутантного белка Sam68, была секвенирована с целью верификации успешности сайт-направленного мутагенеза.

Сайт-направленный мутагенез Sam68 K208R

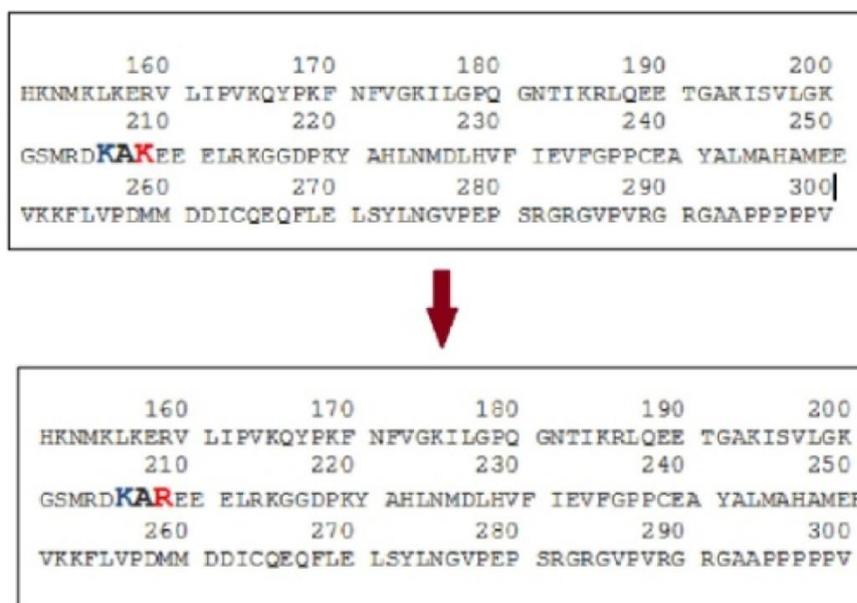


Рис. 8 Сайт-направленный мутагенез РНК-связывающего белка Sam68: аминокислотные последовательности белка Sam68 дикого типа и Sam68 с заменой лизина К в положении 208 на аргинин R.

3.3.3 Метилтрансфераза Set7/9 метилирует Sam68 в положении K208

Чтобы определить, действительно является ли РНК-связывающий белок Sam68 субстратом метилтрансферазы Set7/9, нами была проведена реакция метилирования *in vitro* с использованием радиоактивно-меченного донора метильных групп S-аденозилметионина. Для этого были экспрессированы, выделены и очищены следующие рекомбинантные белки: метилтрансфераза GST-Set7/9, каталитический мутант, лишенный метилтрансферазной активности GST-Set7/9 H293A, а также субстраты метилирования: 6xHis-Sam68 и 6xHis-Sam68 K208R. Белок GST-p53, представляющий собой известный субстрат Set7/9 [16], был использован в качестве положительного контроля. Как упоминалось выше, Set7/9 метилирует p53 в положении K272. Мы обнаружили, что наряду с p53 (Рис. 9 — дорожка 1), Set7/9 метилирует РНК-связывающий белок Sam68 дикого типа (Рис. 9 — дорожка 4). В присутствии каталитически-неактивной формы Set7/9 метилирования субстратов не наблюдалось (Рис. 9 — дорожки 2, 3). Наконец, в соответствии с результатами биоинформатического анализа, нами было обнаружено, что белок Sam68 с точечной мутацией K208R не способен метилироваться Set7/9 (Рис. 9 — дорожка 5). Таким образом, нами было доказано, что Sam68 метилируется метилтрансферазой Set7/9 по остатку лизину в положении 208 (K208).

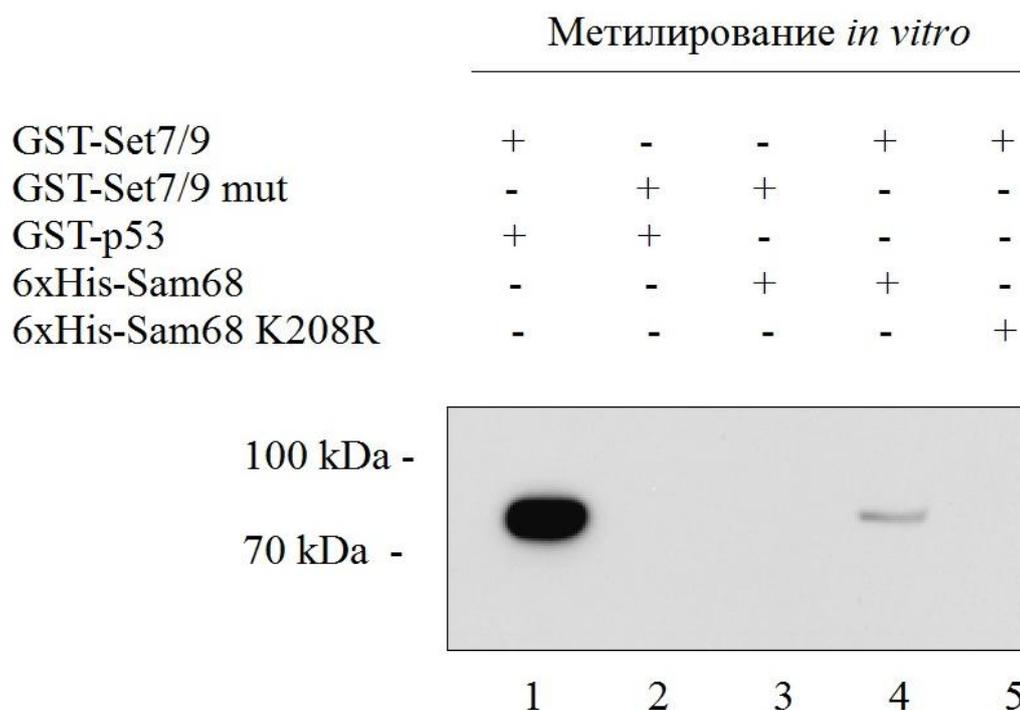


Рис. 9 Метилирование Sam68 метилтрансферазой Set7/9 *in vitro* с использованием радиоактивно-меченного донора метильных групп S-аденозилметионина. В эксперименте проводилось метилирование белка онкосупрессора p53 функционально активной метилтрансферазой Set7/9 (положительный контроль) и метилтрансферазой с точной заменой Set7/9 H293A (Set7/9mut), приводящей к потере метилтрансферазной активности (отрицательный контроль). Кроме того, осуществлялось метилирование РНК-связывающего белка Sam68 дикого типа и Sam68 с точечной заменой K208R в присутствии каталитически активной и неактивной форм Set7/9.

3.4 Особенности локализации Sam68 в клетках HEK293T и рака толстой кишки HCT116

3.4.1 Локализация эндогенного Sam68 в клеточных линиях HEK293T и HCT116

Внутриклеточная локализация РНК-связывающего белка Sam68 в раковых клетках является важным фактором, который коррелирует со степенью инвазии раковых клеток и общей выживаемостью пациентов [1]. Для изучения особенностей локализации РНК-связывающего белка Sam68 в клетках

НЕК293Т и рака толстой кишки НСТ116 было проведено иммуноцитохимическое окрашивание клеток с использованием антител к изучаемому белку Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США). Эндогенный Sam68 преимущественно локализуется в ядре (Рис. 10 — 1, 2: Рис. 11 — 1, 2).

НЕК293Т

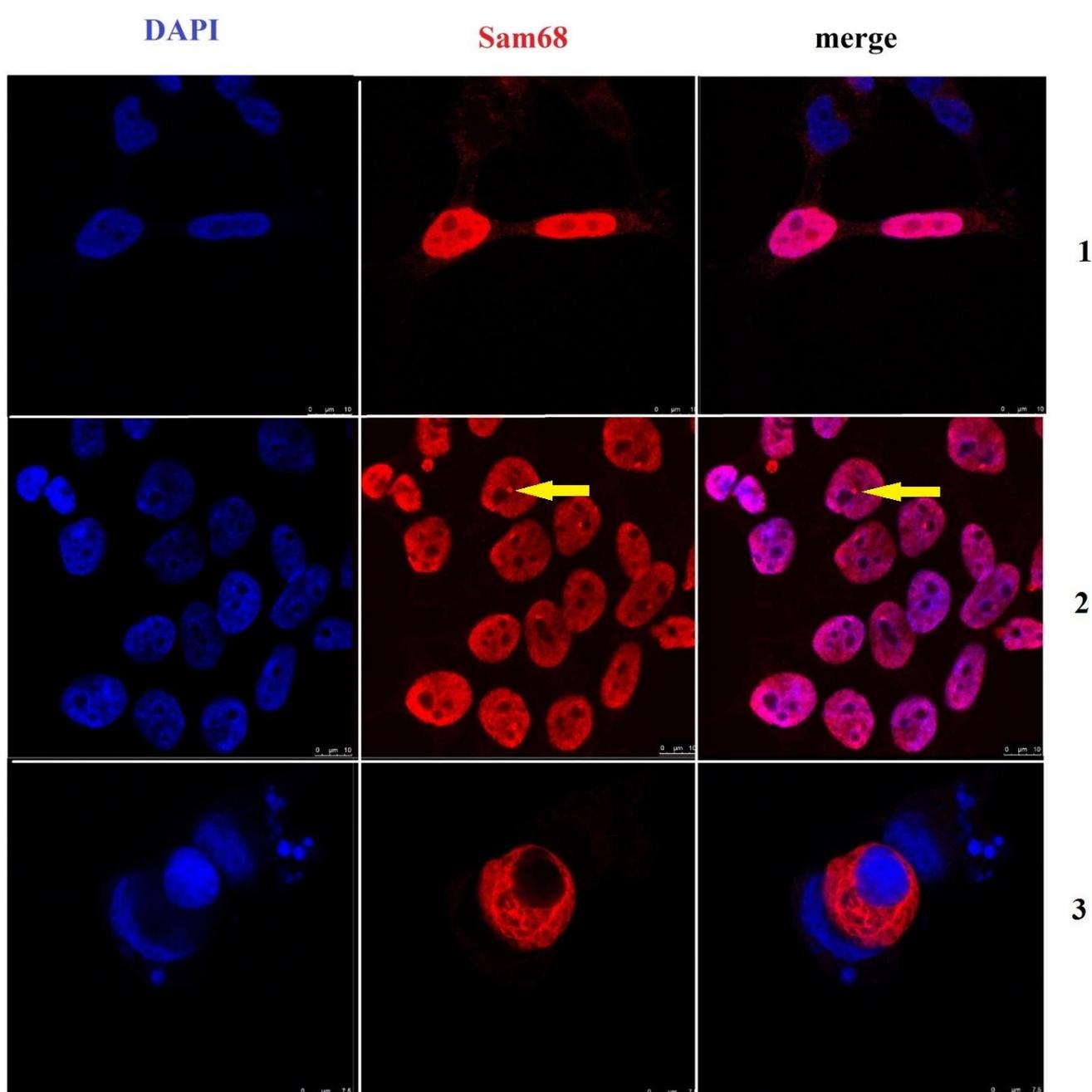


Рис. 10 Особенности локализации эндогенного Sam68 в клетках НЕК293Т DAPI — синий, Sam68 — красный. Окрашка антителами к изучаемому белку Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США).

HCT116

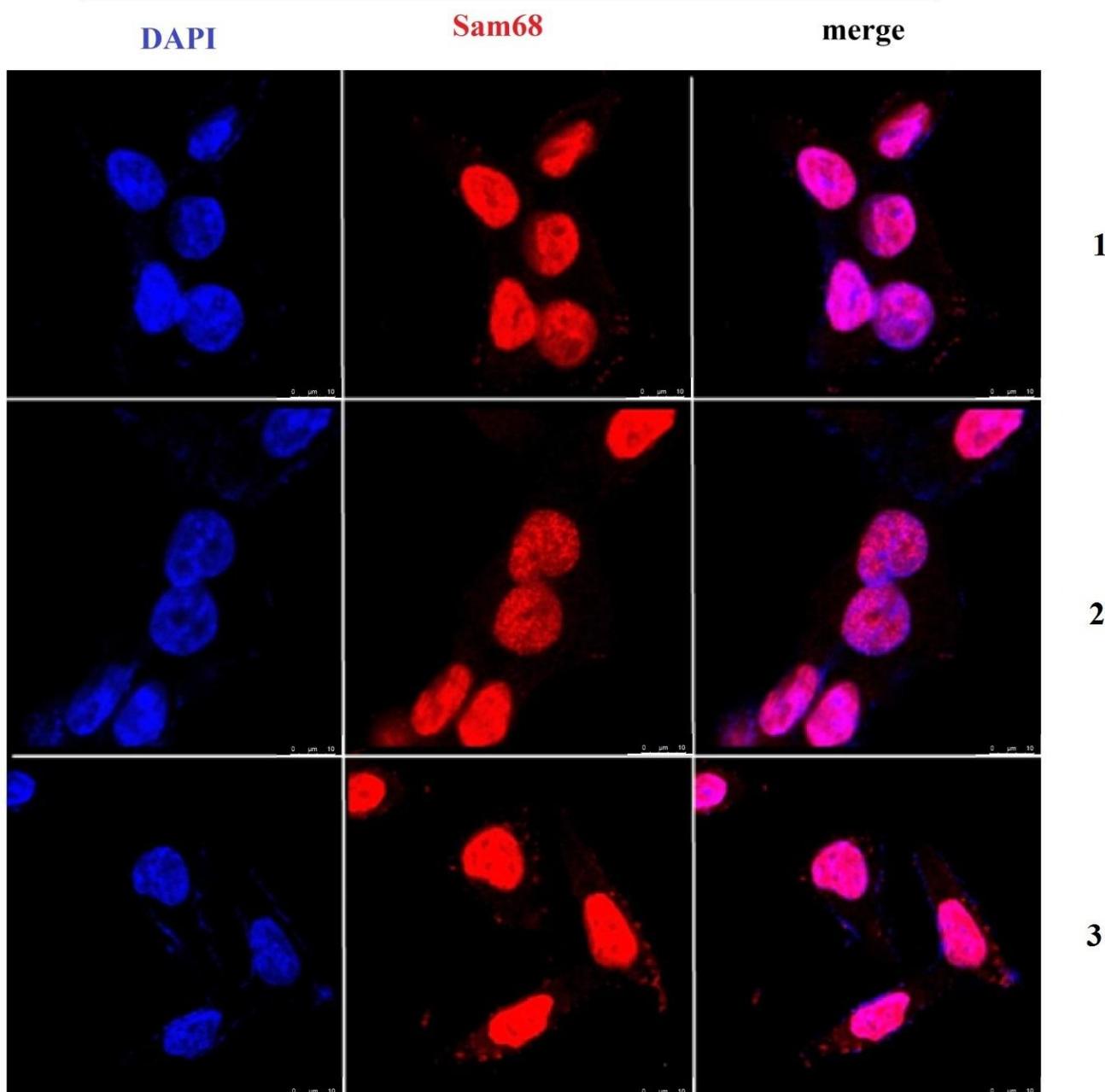


Рис.11 Особенности локализации эндогенного Sam68 рака толстой кишки HCT116
DAPI — синий, Sam68 — красный. Окраска антителами к изучаемому белку Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США).

В частности, в клетках HEK293T хорошо различимы Sam68-ассоциированные ядерные тельца (SNBs) (Рис. 10 — 2), которые локализуются вблизи ядрышек. Интересно, что отчетливых SNBs, формируемых Sam68 в клетках HCT116 обнаружено не было (Рис. 11 — 3). Кроме локализации в ядре, Sam68

обнаруживается в цитоплазме клеток НЕК293Т (Рис. 10 — 1, 3). и НСТ116 (Рис. 11 — 3). Отметим, что в цитоплазме Sam68 может находиться в составе протяженных линейных структур (Рис. 10 — 3).

3.4.2 Локализация сверхэкспрессированного Sam68 в клетках НЕК293Т и клетках рака толстой кишки НСТ116

Для более детального изучения внутриклеточной локализации Sam68, нами был сверхэкспрессирован флуоресцентно-меченый белок слияния GFP-Sam68. Согласно литературным данным, внутриклеточное распределение такого белка в клетках HeLa соответствует локализации эндогенного [72]. Нами была осуществлена трансфекция клеток НЕК293Т и НСТ116 конструкцией, кодирующей GFP-Sam68. После фиксации клетки также были окрашены антителами к изучаемому белку Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США) (Рис.12, Рис.13).

Было обнаружено, что GFP-Sam68 может иметь различную внутриклеточную локализацию. Во-первых, белок может находиться исключительно в ядре, что характеризуется его диффузным окрашиванием (Рис. 12 — 1, Рис. 13 — 1). Кроме того, GFP-Sam68 может быть обнаружен в цитоплазме в виде цитоплазматических гранул (Рис. 12 — 2, Рис. 13 — 2), а также формировать протяженные структуры в цитоплазме (Рис. 12 — 3, 4; Рис. 13 — 3, 4). Особенности внутриядерной локализации Sam68 достаточно хорошо освещены в ряде работ, в то время как цитоплазматическая локализация недостаточно изучена. По это причине обнаруженные нами цитоплазматические паттерны были охарактеризованы более подробно.

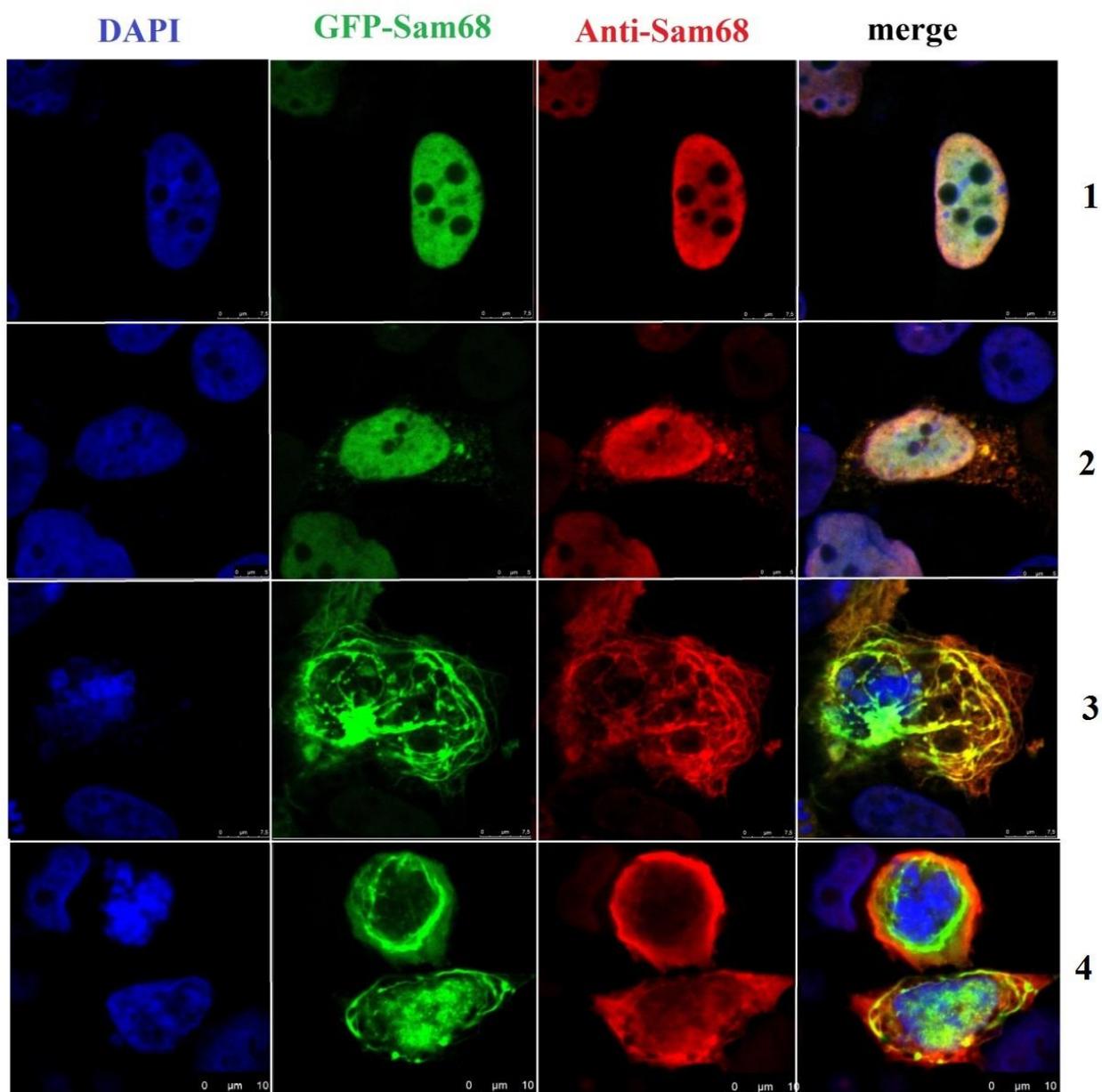
A**HEK293T**

Рис.12 Особенности локализации белка GFP-Sam68 в клетках HEK293T DAPI — синий, GFP-Sam68 — зеленый, эндогенный Sam68 — красный. Окраска антителами к изучаемому белку Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США).

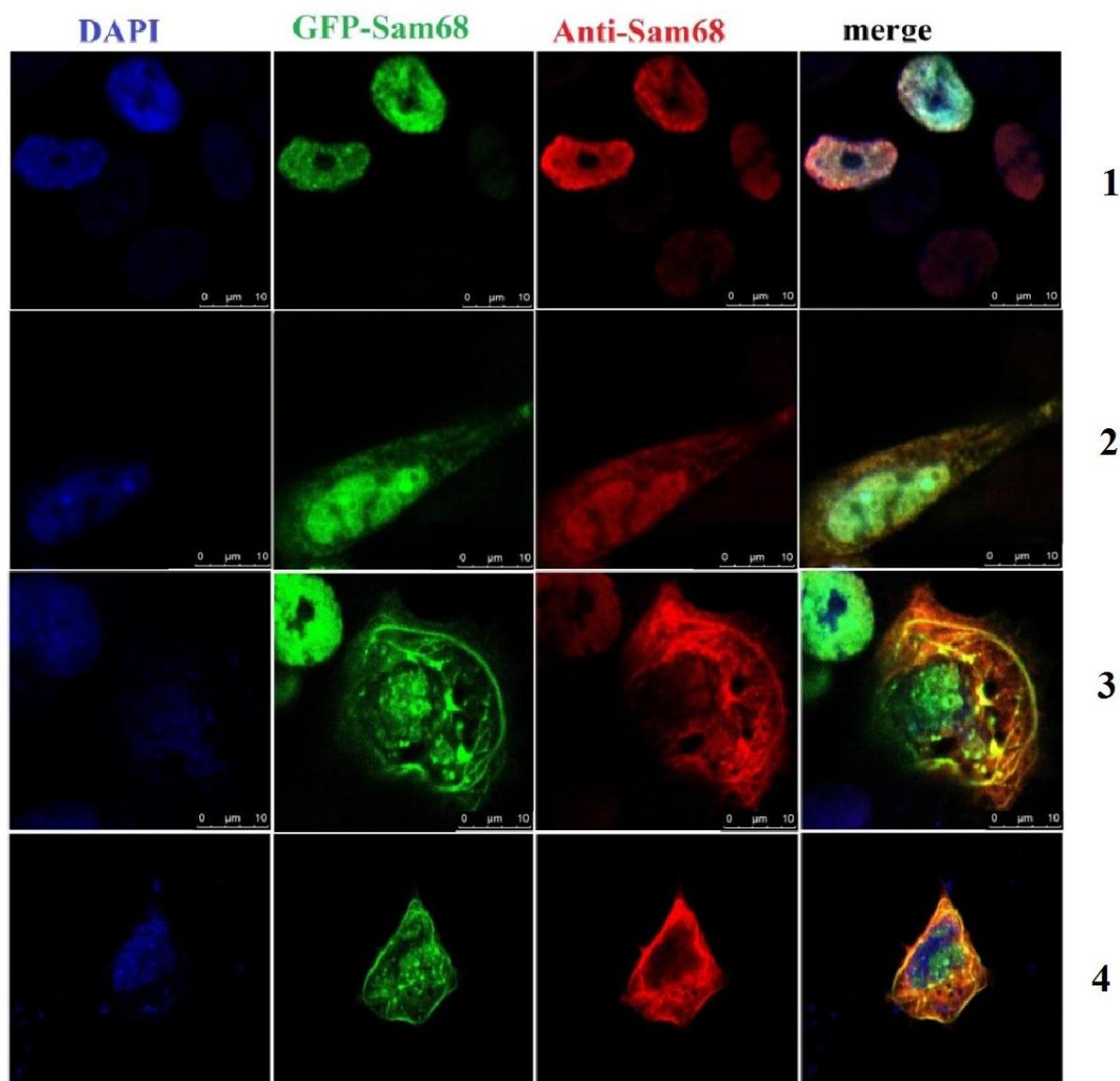
Б**НСТ116**

Рис. 13 Особенности локализации белка GFP-Sam68 в клетках рака толстой кишки НСТ116. DAPI — синий, GFP-Sam68 — зеленый, эндогенный Sam68 — красный. Окраска антителами к изучаемому белку Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США).

3.4.3 Цитоплазматический Sam68 ассоциирован с α -тубулином микротрубочек

Нами было показано, что Sam68 способен формировать несколько типов паттернов в клетках НЕК293Т и НСТ116. В частности, нами были более подробно изучены длинные протяженные структуры, формируемые GFP-Sam68

в цитоплазме клеток НЕК293Т (Рис. 14). Для этого, клетки НЕК293Т были трансфицированы конструкцией, кодирующей белок слияния GFP-Sam68. Спустя 48 часов после трансфекции клетки были зафиксированы и окрашены антителами к белку α -Tubulin (1:1000, Sigma F2168, США) для детекции микротрубочек (Рис. 14). Было обнаружено, что в случае формирования белком GFP-Sam68 протяженных линейных структур, сигнал колокализовался с α -тубулином (Рис. 14 — Б, В), в то время как в клетках с ядерной локализацией Sam68, ассоциации этого белка с микротрубочками не наблюдалось (Рис. 14 А). Таким образом, было показано, что GFP-Sam68 может ассоциироваться и выявляться в составе единых структур с α -тубулином микротрубочек (Рис.14).

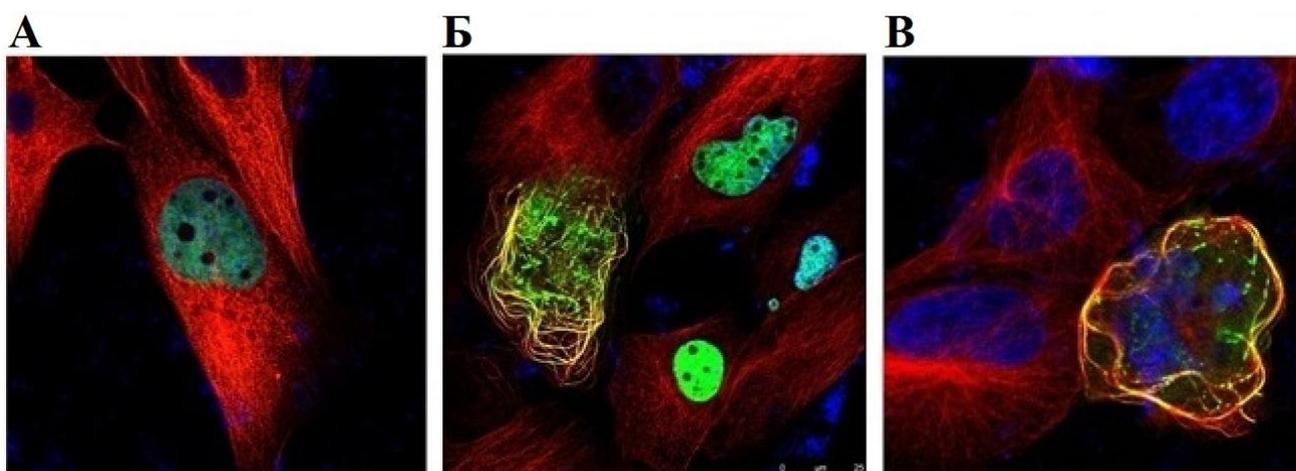


Рис.14 Sam68 ассоциирован с α -тубулином микротрубочек в НЕК293Т А — Белок GFP-Sam68 при ядерной локализации не ассоциирован с α -тубулином. Б — GFP-Sam68 ассоциирован с α -тубулином (увеличенное изображение). В — Sam68 ассоциирован с α -тубулином (увеличенное изображение) в клетках с округленной формой и микронуклеированным ядром. DAPI — синий, GFP-Sam68 — зеленый, α -тубулин — красный. Окраска антителами: α Tubulin (1:1000, Sigma F2168, США), Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США).

3.4.4 Sam68 ассоциирован с формированием апоптотической сети микротрубочек

Нужно отметить, что клетки, в которых были обнаружены вышеописанные протяженные структуры GFP-Sam68, ассоциированные с α -

тубулином микротрубочек, имели дефектные или микронуклеированные ядра (Рис. 14 В). Помимо этого, на поздних стадиях в подобных клетках отмечалось значительное уменьшение размеров и округление формы с формированием подмембранного кольца микротрубочек. Мы предположили, что Sam68 может принимать участие в формировании апоптотической сети микротрубочек (microtubule apoptotic network, MAN) — особой структуры, которая формируется микротрубочками при вхождении клеток в апоптоз. MAN представляет собой подмембранное кольцо микротрубочек, формируемое в процессе клеточной гибели для защиты мембраны от действия каспаз. Мы окрасили клетки HCT116 после экспрессии GFP-Sam68 набором реагентов MitoTracker™ Red CMXRos, который позволяет локализовать митохондрии в живых клетках (Рис. 15). Мы обнаружили, что в клетках с преимущественной локализацией Sam68 в ядре, митохондрии выглядят обычным образом, в то время как в клетках, в которых Sam68 ассоциирован с микротрубочками, сигнал от митохондрий не детектировался, что является свидетельством клеточной гибели (Рис. 15).

Для того, чтобы подтвердить, что клетки, в которых Sam68 ассоциируется с тубулином, находятся в состоянии клеточной гибели, мы произвели окраску клеток набором реагентов TMRE (Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit). Данный набор для детекции апоптоза позволяет детектировать митохондриальный трансмембранный потенциал — важнейший параметр нормального функционирования митохондрий, отсутствие которого является индикатором клеточной смерти. Коллапс трансмембранного потенциала митохондрий совпадает с открытием митохондриальной поры, приводящим к высвобождению цитохрома С в цитозоль, что, в свою очередь, вызывает последующие события в апоптотическом каскаде. Оказалось, что в тех клетках, где Sam68 имел цитоплазматическую локализацию и был ассоциирован с тубулином, митохондриальный сигнал после окраски TMRE отсутствовал (Рис. 16).

HCT116

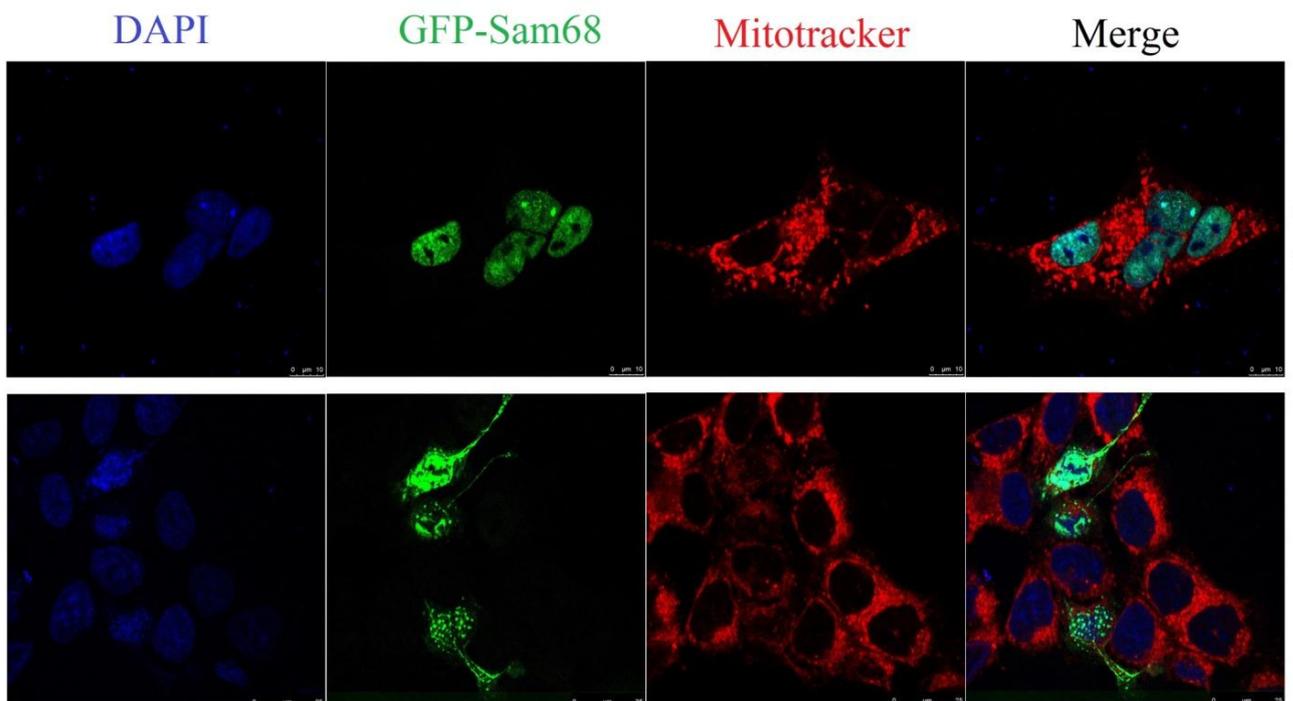


Рис. 15. Окраска клеток HCT116 с сверхэкспрессией GFP-Sam68 набором реагентов MitoTracker™ Red CMXRos. DAPI — синий, GFP-Sam68 — зеленый, MitoTracker™ Red CMXRos — красный. Окраска антителами: Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США).

HEK293T

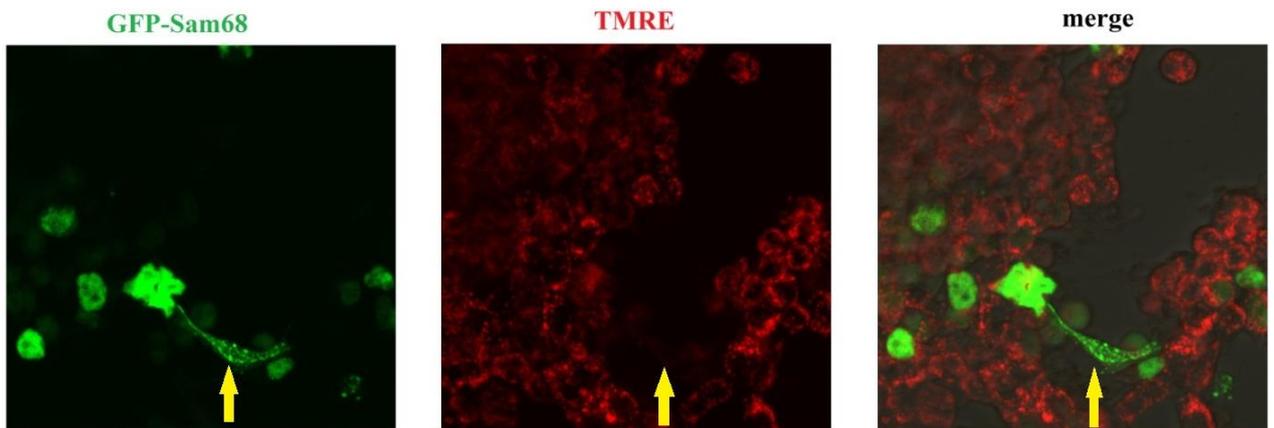


Рис.16 Окраска клеток HEK293T с сверхэкспрессией GFP-Sam68 набором реактивов для детекции апоптоза TMRE. GFP-Sam68 — зеленый, TMRE — красный

Это наблюдение позволило подтвердить тот факт, что Sam68 в процессе клеточной гибели способен ассоциировать с микротрубочками в процессе формирования апоптотической сети микротрубочек.

3.5 Роль Set7/9 в регуляции РНК-связывающего белка Sam68

3.5.1 Влияние Set7/9 на белковый уровень Sam68

Для того, чтобы изучить влияние Set7/9 на белковый уровень Sam68, с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 нами были созданы линии НЕК293Т и НСТ116 с нокаутом Set7/9. Вестерн-блот анализ показал, что в клетках НЕК293Т при нокауте Set7/9 белковый уровень Sam68 оказался существенно снижен со 100.0% до 65.8% (N=3, p=0.014) (Рис. 17 А). Однако, в клетках рака толстой кишки НСТ116 с нокаутом Set7/9 белковый уровень Sam68 снижался всего на 10.4% по сравнению с контролем (N=3, p=0.013) (Рис. 17 Б). Нужно отметить, что отсутствие Set7/9 в клетках НЕК293Т и НСТ116 не приводило к снижению Sam68 на уровне РНК (Рис. 17 В, Г), что косвенно свидетельствует о том, что Set7/9 регулирует уровень экспрессии Sam68 на пост-транскрипционном уровне.

3.5.2 Нокаут Set7/9 приводит к снижению уровня Sam68 в цитоплазме

Как было показано выше, нокаут Set7/9 приводил к статистически значимому снижению белкового уровня Sam68 в клетках НЕК293Т и НСТ116. Учитывая тот факт, что основная часть белка находится в ядре, и разница в уровне цитоплазматического Sam68 может быть плохо детектируема при анализе общей белковой фракции, мы провели разделение лизатов из клеточных линий НЕК293Т и НСТ116, а также из линий НЕК293Т и НСТ116 с нокаутом Set7/9 на ядерную и цитоплазматическую фракции для проведения последующего вестерн-блот анализа. Разделение ядерной и цитоплазматической фракций контролировалось путем окраски антителами к

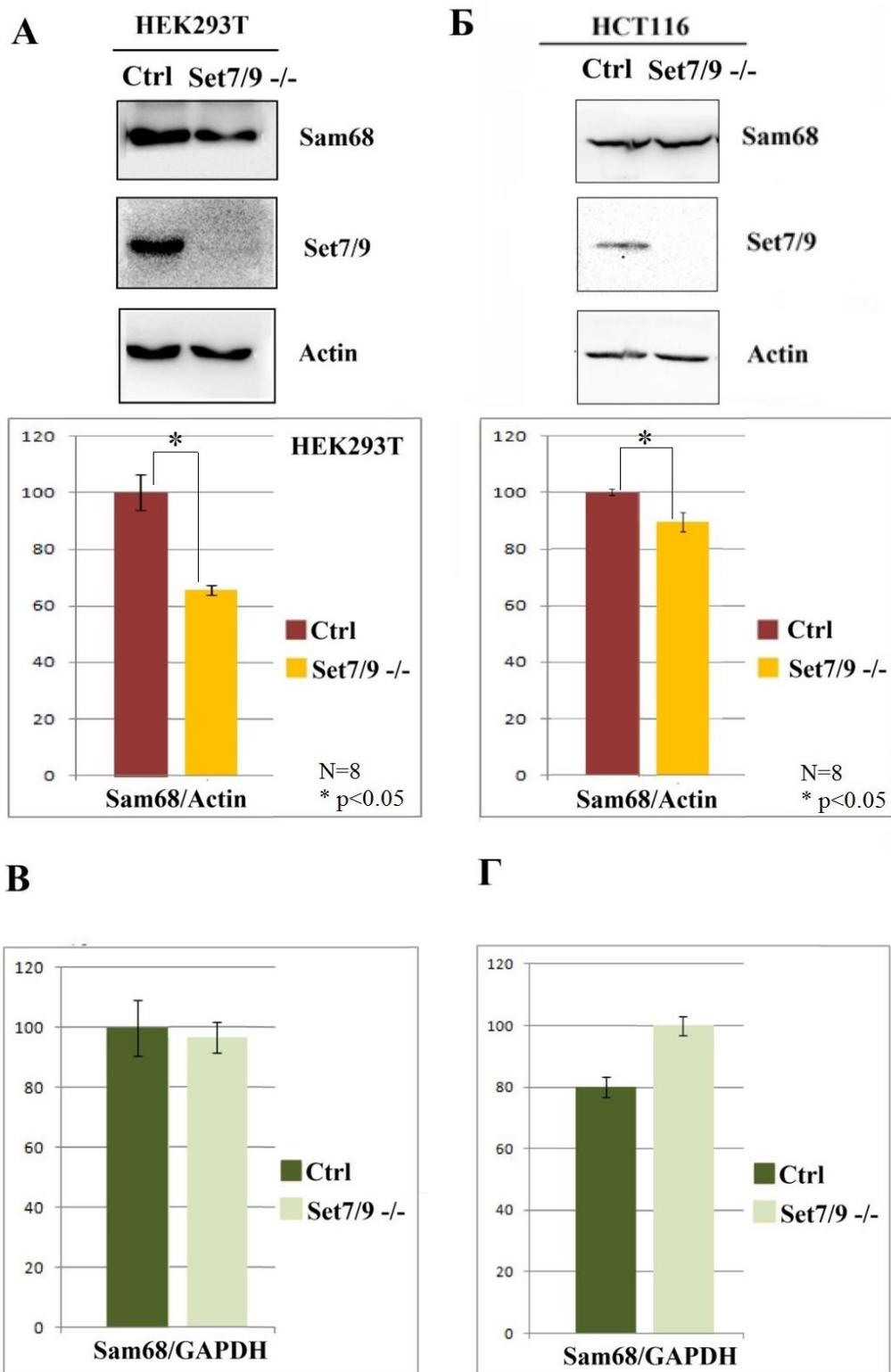


Рис. 17 Влияние *Set7/9* на экспрессию *Sam68* на уровне белка и РНК
А — Нокаут *Set7/9* приводит к снижению белкового уровня *Sam68* в клетках HEK293T. **Б** — Нокаут *Set7/9* приводит к снижению белкового уровня *Sam68* в клетках HCT116. **В, Г** — Нокаут *Set7/9* не приводит к снижению *Sam68* на

уровне РНК в клетках HEK293T и HCT116. Окраска антителами: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США); Set7/9 (1:1000, Cell Signaling #2813s, США); β -актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США).

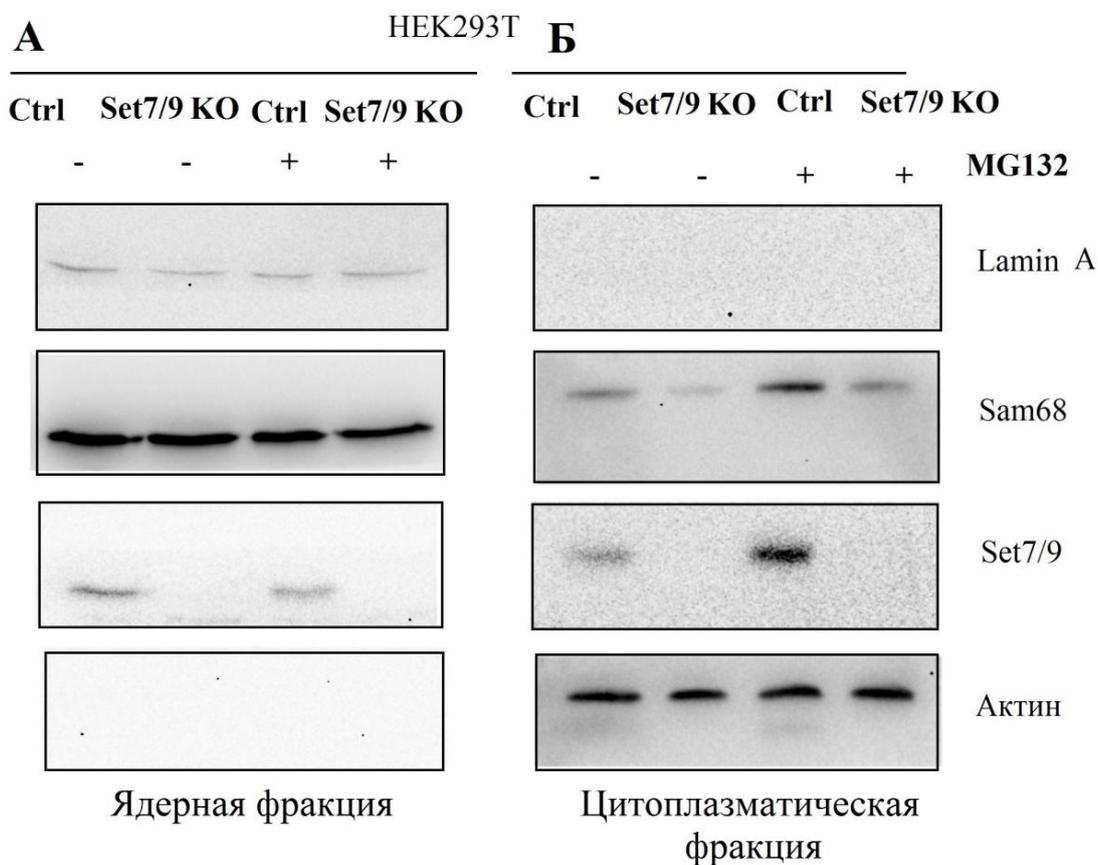


Рис. 18 Белковый уровень Sam68 до и после обработки MG132 в клетках HEK293T и HEK293T с нокаутом Set7/9. А — ядерная фракция Б — цитоплазматическая фракция. Окраска антителами: Lamin A/C (1:1000, MA1-06102, ThermoFisher, США), Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США), Set7/9 (1:1000, Cell Signaling #2813s, США), β -актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США)

маркерным белкам Lamin A/C (1:1000, MA1-06102, Thermo Fisher, США) и β -актину (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США), соответственно. Мы обнаружили, что отсутствие Set7/9 приводит к снижению белкового уровня Sam68 в цитоплазматической фракции в клетках HEK293T (Рис. 18 Б) и HCT116 (Рис. 19), в то время как в ядерной фракции значительного изменения белкового уровня Sam68 обнаружено не было (Рис. 18 А, Рис. 19).

Поскольку уровень Sam68 в цитоплазме, скорее всего, регулируется на пост-транскрипционном уровне, мы провели обработку клеток HEK293T и клеток HEK293T с нокаутом Set7/9 соединением-ингибитором протеасом, MG132 (Рис.18). В случае, если уменьшение белка связано с деградацией в протеасомах, обработка клеток MG132 приводит к стабилизации белка и повышению его содержания в клетках. Мы обнаружили, что MG132 не приводит к элиминации эффекта от нокаута Set7/9.

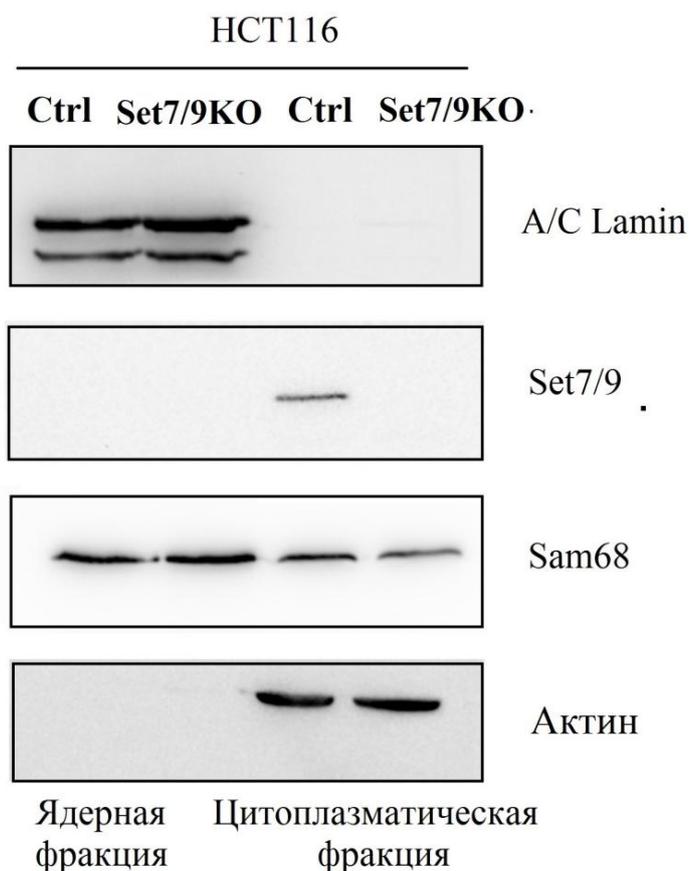


Рис. 19 Белковый уровень Sam68 в клетках HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9 в ядерной и цитоплазматической фракциях. Окраска антителами: Lamin A/C (1:1000, MA1-06102, ThermoFischer, США), Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США), Set7/9 (разведение 1:1000, Cell Signaling #2813s, США), β -актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США)

3.5.3 *Set7/9* оказывает влияние на *Sam68*-опосредованный сплайсинг *Bcl-x*

Как упоминалось выше, *Sam68* является ключевым регулятором сплайсинга *Bcl-x*. Было показано, что снижение уровня экспрессии *Sam68* способствует аккумуляции анти-апоптотической длинной *Bcl-x(L)* изоформы, в то время как сверхэкспрессия *Sam68* приводит к продукции короткой про-апоптотической изоформы *Bcl-x(s)* (Рис. 20 А).

Для изучения влияния *Set7/9* на *Sam68*-опосредованный сплайсинг *Bcl-x* клетки НЕК293Т были трансфицированы векторами, кодирующими полноразмерные белки *Sam68* и *Set7/9*. Вектор pIRES использовался в качестве контрольного вектора (Рис.20 Б).

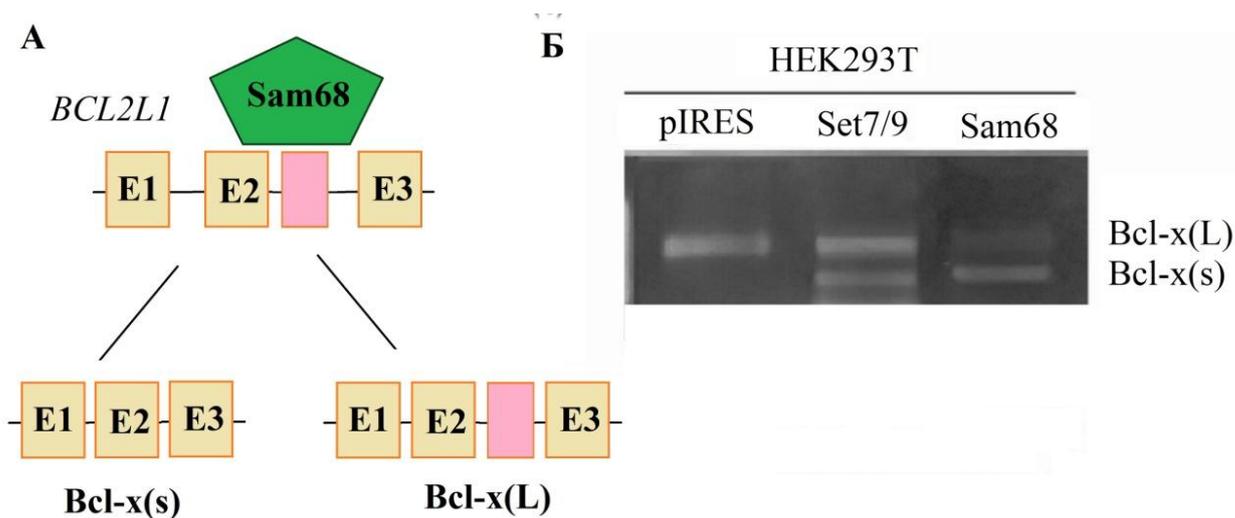


Рис. 20 *Set7/9* оказывает влияние на сплайсинг *Bcl-x* **А** — Схематичное изображение роли *Sam68* в образовании *Bcl-x(L)* и *Bcl-x(s)* изоформ при сплайсинге *Bcl-x*. **Б** — Влияние *Sam68* и *Set7/9* на сплайсинг *Bcl-x*.

Методом полимеразной цепной реакции было показано, что сверхэкспрессия *Sam68* в клетках НЕК293Т действительно приводит к продукции про-апоптотической короткой *Bcl-x(s)* изоформы (Рис. 20. Б). Важно отметить, что сверхэкспрессия *Set7/9* приводит к увеличению продукции короткой про-апоптотической изоформы *Bcl-x(s)* (Рис. 20 Б). Кроме того, мы сверхэкспрессировали полноразмерный белок *Sam68* в клетках НЕК293Т с

нокаутом *Set7/9* (Рис. 21. А) и оценили влияние *Sam68* на продукцию короткой изоформы *Bcl-x(s)* в отсутствие *Set7/9*. Для этого, продукты ПЦР анализировались с помощью системы гель-документации ChemiDoc™, после чего подсчитывались количественные отношения длинной изоформы *Bcl-x(L)* к короткой *Bcl-x(s)*. Мы обнаружили, что, в соответствии с литературными данными, сверхэкспрессия *Sam68* приводит к продукции короткой изоформы *Bcl-x(s)*, что отражается в уменьшении соотношения *Bcl-x(L)/Bcl-x(s)* на 18,6% (N=8, p=0.010) (Рис. 21 Б). Более того, нокаут *Set7/9* оказывает сильное влияние на образование длинной анти-апоптотической изоформы *Bcl-x(L)*, что приводит к увеличению соотношения *Bcl-x(L)/Bcl-x(s)* на 42,1% (N=8, p=0.010) по сравнению с контролем (Рис. 21 Б). В то же время, отсутствие *Set7/9* не приводило к изменению эффекта продукции короткой *Bcl-x(s)* изоформы при сверхэкспрессии *Sam68* по сравнению с контролем (Рис. 21 Б).

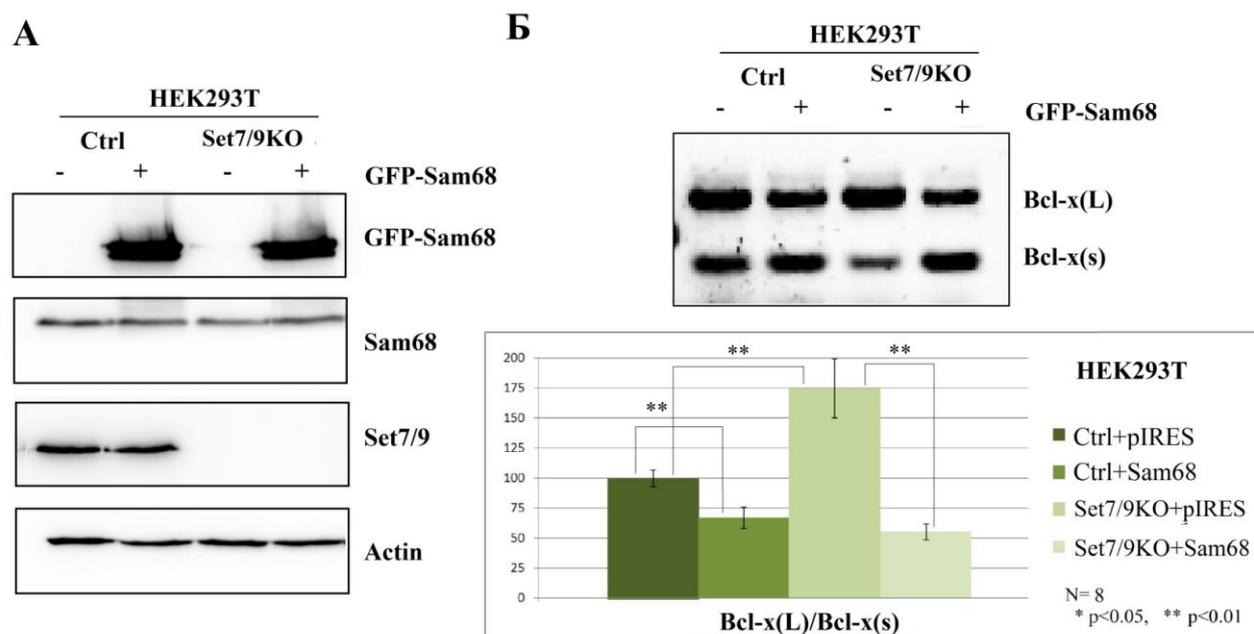


Рис. 21 Роль *Set7/9* в *Sam68*-опосредованном сплайсинге *Bcl-x* А — сверхэкспрессия *Sam68* в клетках HEK293T и HEK293T с нокаутом *Set7/9*. Б — Влияние *Set7/9* и *Sam68* на сплайсинг *Bcl-x*. Окраска антителами: *Sam68* (1:1000, Abcam ab109197, США), *Set7/9* (разведение 1:1000, Cell Signaling #2813s, США), β -актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США).

3.5.4 Метилтрансфераза Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E

Ранее было показано, что Sam68 является репрессором транскрипции циклинов D1 и E [81]. Циклины D1 и E являются белками, которые специфически регулируют переход из G1 в S-фазу клеточного цикла. Чтобы изучить роль Set7/9 в Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E, мы оверэкспрессировали белок Sam68 в клеточных линиях HEK293T и HCT116, а также в линиях HEK293T и HCT116 с нокаутом Set7/9. Через 48 часов после трансфекции, клетки обрабатывались доксорубицином в концентрации 0,1 мкМ в течение 0 и 8 часов. Доксорубин является генотоксическим агентом, останавливающим клетки в S-фазе, что облегчает изучение экспрессии белков клеточного цикла. Экспрессия циклинов на уровне РНК оценивалась с помощью ПЦР в реальном времени. Уровни белковой экспрессии анализировались с помощью вестерн-блот анализа с использованием антител к изучаемым белкам: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США); Set7/9 (разведение 1:1000, Cell Signaling #2813s, США); β -актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США); Cyclin E (1:1000, Millipore 07-687, США), Cyclin D1 (1:1000, Thermo Scientific RB-9041-P1, США).

Мы обнаружили, что, в соответствии с литературными данными, оверэкспрессия Sam68 в клетках HEK293T достоверно приводит к репрессии транскрипции циклина D1 на 35,2% (N=3, p=0.002) и циклина E на 17,3% (N=3, p=0.020) (Рис. 22 А). Отметим, что в клетках HEK293T нокаут Set7/9 приводил к снижению экспрессии циклина D1 на 29,1% (N=3, p=0.020) и циклина E на 25,4% (N=3, p=0.023) (Рис. 22 А), что также соответствует литературным данным. Однако, мы обнаружили, что в клетках HEK293T с нокаутом Set7/9 оверэкспрессия Sam68 не приводила к репрессии циклинов D1 и E на уровне РНК (Рис. 23 А). В противоположность этому, сверхэкспрессия Sam68 в клетках HEK293T с нокаутом Set7/9 приводила к увеличению экспрессии циклина E на уровне РНК на 28,4% (N=3, p= 0.010). Таким образом, в

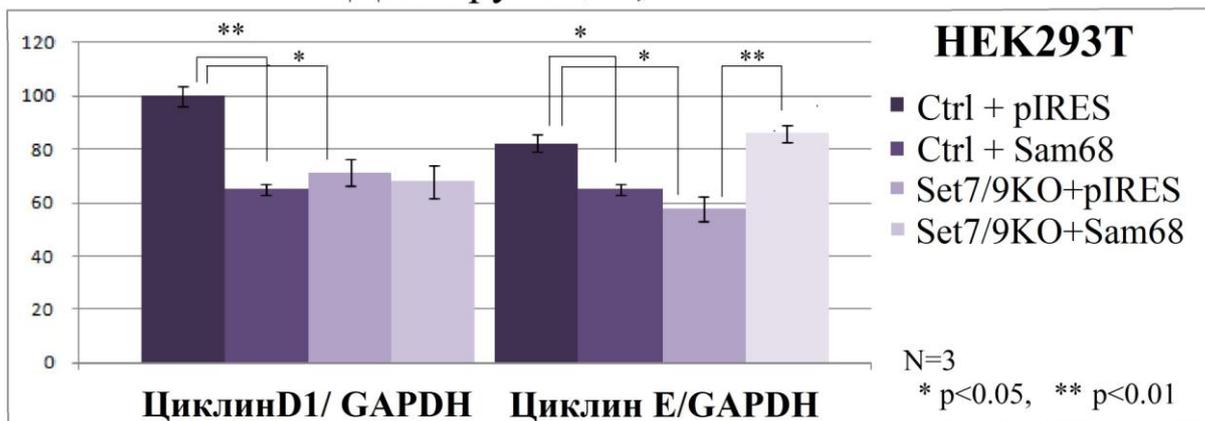
отсутствие Set7/9 Sam68 не оказывает репрессирующего влияния на уровень мРНК циклинов D1 и E. После обработки клеток доксорубицином в течение 8 часов, наблюдался аналогичный эффект отсутствия Sam68-опосредованной репрессии транскрипции циклинов D1 и E в отсутствие Set7/9 на уровне РНК в клетках HEK293T.

Отметим, что при сверхэкспрессии Sam68 на белковом уровне наблюдается снижение экспрессии циклина D1 как в клетках HEK293T, так и в клетках HEK293T с нокаутом Set7/9 (Рис. 22 Б). В целом, можно заключить, что при нормальном уровне Set7/9 сверхэкспрессия Sam68 оказывает общий репрессирующий эффект на уровень циклинов D1 и E, в то время как при отсутствии Set7/9 сверхэкспрессированный Sam68 не оказывает репрессирующего влияния на транскрипцию циклинов D1 и E.

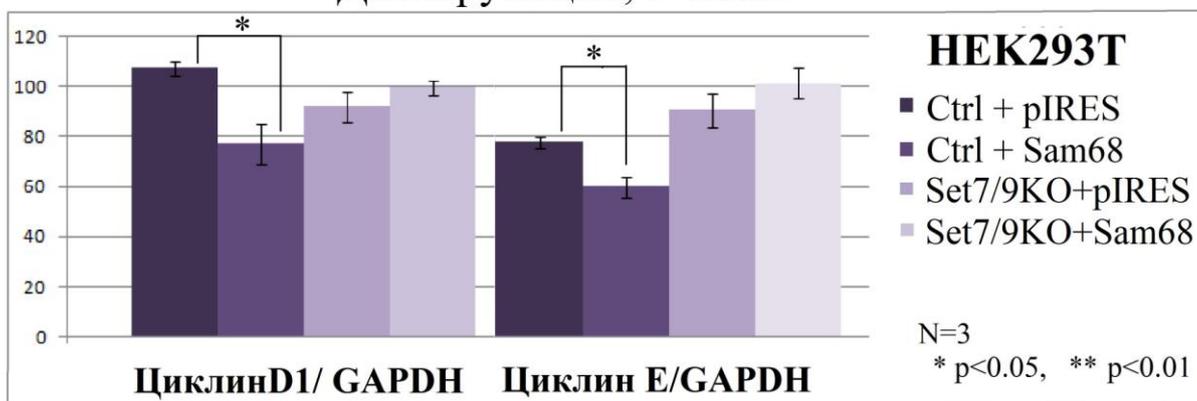
С другой стороны, мы решили изучить влияние Set7/9 на Sam68-опосредованную регуляцию циклинов D1 и E на модельной клеточной линии рака толстого кишечника HCT116. В отличие от нераковых клеток HEK293T, нокаут Set7/9 в раковых клетках HCT116 приводит к повышению экспрессии циклинов D1 на 47,8% (N=3, p= 0.002) и циклина E на 33,2% (N=3, p= 0.051) как на уровне РНК (Рис. 23 А), так и на белковом уровне (Рис. 22 Б, Рис. 23 Б). В клетках HCT116 оверэкспрессия Sam68 не приводила к репрессии циклинов D1 и E на транскрипционном уровне (Рис. 23 А), однако, наблюдалось снижение экспрессии циклина D1 на уровне белка (Рис. 23 Б). Под действием генотоксического стресса, индуцированного добавлением 0,1 мкМ доксорубицина в течение 8 часов, в клетках HCT116 наблюдалась репрессия транскрипции циклинов D1 и E при сверхэкспрессии Sam68. В присутствии доксорубицина сверхэкспрессия Sam68 в клетках HCT116 с нокаутом Set7/9 также не приводила к транскрипционной репрессии циклинов D1 и E (Рис. 23 А).

А

Доксорубицин, 0 часов



Доксорубицин, 8 часов



Б **НЕК293Т**

Доксорубицин, 0.1 мкМ

0 часов

8 часов

Ctrl

Set7/9^{-/-}

Ctrl

Set7/9^{-/-}

GFP-Sam68

-

+

-

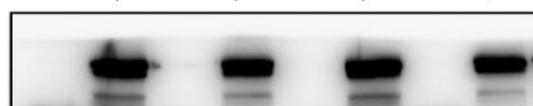
+

-

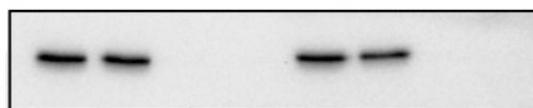
+

-

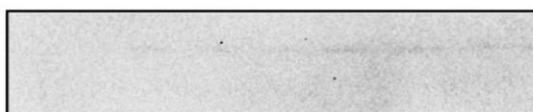
+



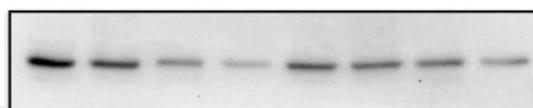
GFP-Sam68



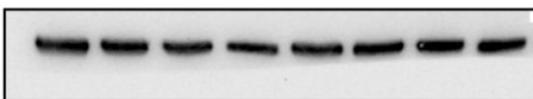
Set7/9



Циклин E

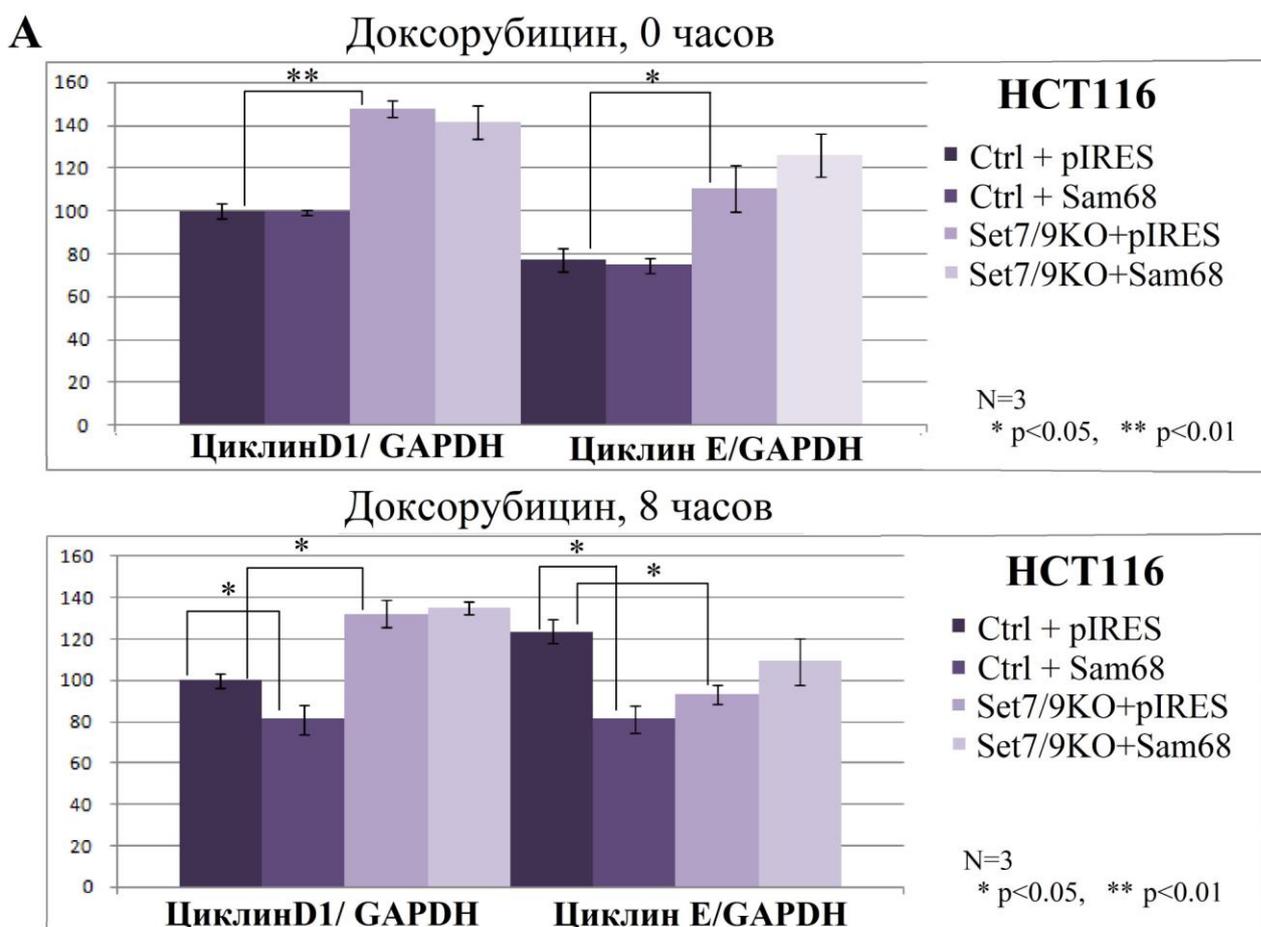


Циклин D1



Актин

Рис. 22 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E в клетках HEK293T и HEK293T с нокаутом Set7/9 до и после обработки 0,1 мкМ доксорубицином.
А — На уровне РНК методом ПЦР в реальном времени. **Б** — На белковом уровне методом вестерн-блот анализа. Окраска антителами: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США); Set7/9 (разведение 1:1000, Cell Signaling #2813s, США); β-актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США); Cyclin E (1:1000, Millipore 07-687, США), Cyclin D1 (1:1000, Thermo Scientific RB-9041-P1, США).



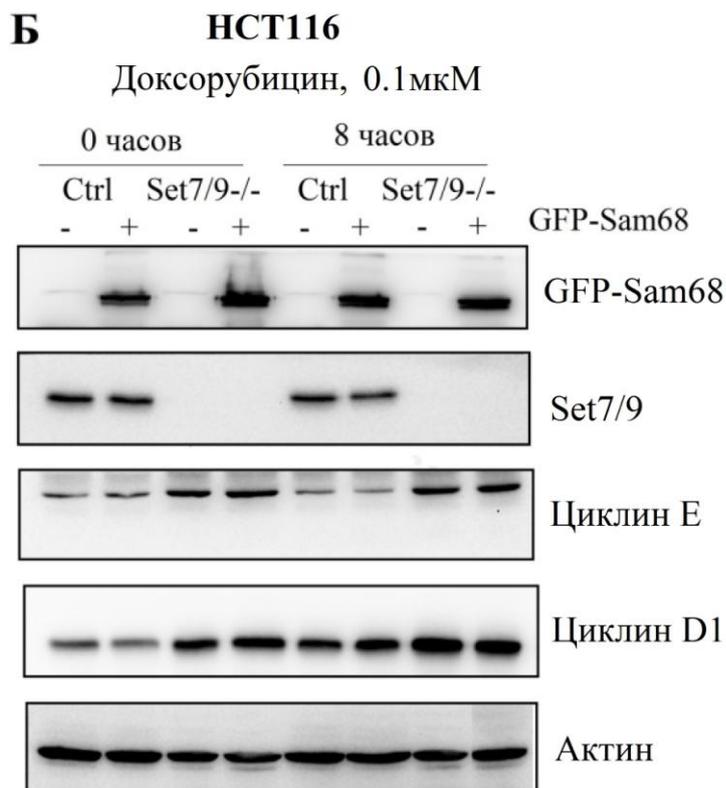


Рис.23 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E в клетках НСТ116 и НСТ116 с нокаутом Set7/9 до и после обработки 0.1мкМ доксорубицином. А — На уровне РНК методом ПЦР в реальном времени. Б — На белковом уровне методом вестерн-блот анализа. Окраска антителами: Sam68 (1:1000, Abcam ab109197, США); Set7/9 (разведение 1:1000, Cell Signaling #2813s, США); β-актин (1:5000, A3854, Sigma-Aldrich, США); Cyclin E (1:1000, Millipore 07-687, США), Cyclin D1 (1:1000, Thermo Scientific RB-9041-P1, США).

Отметим, что на белковом уровне, сверхэкспрессия Sam68 в клетках НСТ116 и НСТ116 с нокаутом Set7/9 не приводила к снижению уровня экспрессии циклинов D1 и E. Таким образом, мы показали, что Set7/9 необходим для Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E в клетках НЕК293Т и НСТ116.

3.5.5 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованной регуляции клеточного цикла

Известно, что Sam68 является регулятором клеточного цикла. В частности, было показано, что нокаут Sam68 приводит к удлинению G2-M фазы [96]. В свете продемонстрированной выше Set7/9-зависимой регуляции уровня циклинов белком Sam68, представляется важным изучить роль Set7/9 в Sam68-опосредованной регуляции клеточного цикла (Рис.24).

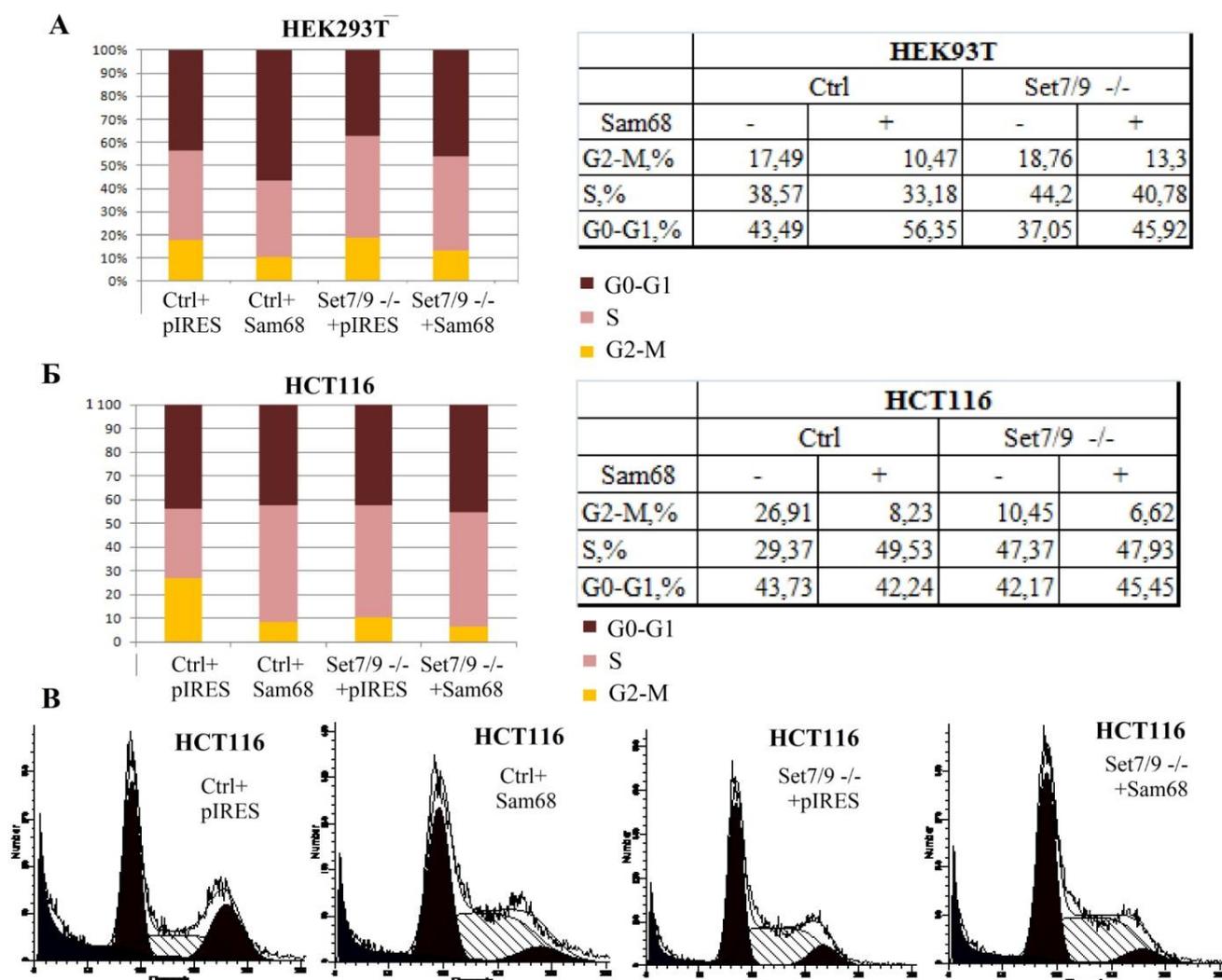


Рис. 24 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованной регуляции клеточного цикла
А — в клетках HEK293T и HEK93T с нокаутом Set7/9. **Б** — в клетках рака толстой кишки HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9. **В** — Распределение фаз клеточного цикла в клетках HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9, в зависимости от сверхэкспрессии Sam68.

Для этого мы сверхэкспрессировали Sam68 в клетках НЕК293Т и клетках рака толстого кишечника НСТ116, а также в клетках НЕК293Т и НСТ116 с нокаутом Set7/9. Через 48 часов после трансфекции анализ клеточного цикла был проведен методом проточной цитофлуометрии. Мы обнаружили, что в соответствии с литературными данными оверэкспрессия Sam68 приводила к укорочению G2-M фазы клеточного цикла на 7.0% в НЕК293Т (Рис.24 А) и на 18,7% в раковых клетках НСТ116 (Рис.24 Б), что соответствует литературным данным [6]. Кроме того, в клетках НСТ116 наблюдалось соответственное удлинение S-фазы клеточного цикла на 20,2%. Сверхэкспрессия Sam68 в клетках НЕК293Т с нокаутом Set7/9 приводила к незначительному укорочению G2-M фазы на 5.5%. Однако, в раковых клетках НСТ116 в отсутствие Set7/9 белок Sam68 не оказывал статистически значимого влияния на продолжительность G2-M и S фаз клеточного цикла (Рис. 24 Б, В).

3.5.6 Влияние белков Set7/9 и Sam68 на выживаемость пациентов с раком толстой кишки

Ранее было показано, что уровень экспрессии Sam68 повышен в клетках рака толстой кишки, что достоверно коррелирует со степенью туморогенности и наличием отдаленных метастаз у пациентов. Пациенты с высоким уровнем экспрессии или ядерной локализацией Sam68 имели худшие показатели по общей выживаемости [1]. Для проведения биоинформатического анализа нами был использован ресурс DRUGSURV — база данных, содержащая информацию о выживаемости пациентов, больных онкологическими заболеваниями [97]. Анализ кривых выживаемости пациентов с высоким (N=155) и низким (N=120) уровнями Sam68 при раке толстой кишки не показал статистически достоверной разницы в выживаемости пациентов (Рис. 25 А). Для оценки выживаемости пациентов с раком толстой кишки в зависимости от уровня экспрессии как Sam68, так и Set7/9, пациенты были разбиты на четыре группы. Первая группа включала пациентов с высокими уровнями экспрессии обоих исследуемых белков Set7/9 и Sam68 (N=122) (Рис. 25 Б), вторая группа являлась

контрольной (N=337). Третья группа пациентов имела низкий уровень экспрессии Set7/9 и высокий уровень экспрессии Sam68 (N=133) (Рис. 24 В), четвертая группа пациентов также была контрольной (N=326).

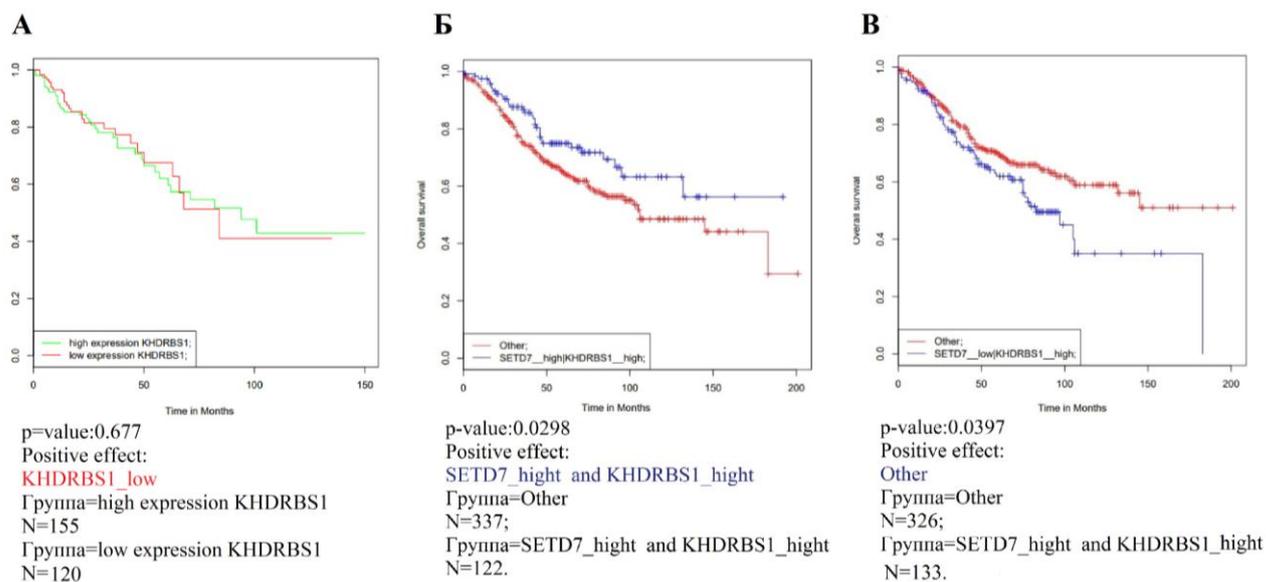


Рис. 25 Кривые выживаемости пациентов с раком толстой кишки в зависимости от уровней экспрессии белков Sam68 и Set7/9. **А** — высокий и низкий уровни экспрессии Sam68. **Б** — высокие уровни экспрессии Sam68 и Set7/9. **В** — высокий уровень экспрессии Sam68 и низкий уровень экспрессии Set7/9.

Оказалось, что высокие уровни экспрессии двух белков Set7/9 и Sam68 коррелировали с лучшей выживаемостью у пациентов (N=122, p=0.0298), в то время как пациенты с низким уровнем экспрессии Set7/9 и высоким уровнем экспрессии Sam68 демонстрировали худшую выживаемость (N=133, p=0.0397).

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 MORN домен метилтрансферазы Set7/9 отвечает за межбелковое взаимодействие с РНК-связывающим белком Sam68

Масс-спектрометрический анализ позволил идентифицировать новые белки-интерактанты метилтрансферазы Set7/9 [98]. Около 95% идентифицированных белков взаимодействовали непосредственно с MORN-доменом метилтрансферазы Set7/9 [98]. В нашем исследовании мы впервые доказали, что метилтрансфераза Set7/9 может напрямую взаимодействовать с одним из обнаруженных в результате масс-спектрометрического анализа белков Sam68 *in vivo* и *in vitro*. РНК-связывающий белок Sam68 принимает участие в различных внутриклеточных процессах, таких как альтернативный сплайсинг, регуляция экспрессии генов, контроль клеточного цикла и апоптоза. Мы идентифицировали домены, отвечающие за межбелковые взаимодействия, продемонстрировав, что MORN-домен Set7/9 взаимодействует с RG-доменом Sam68. Биоинформатический анализ белков, идентифицированных с помощью масс-спектрометрического анализа и взаимодействующих с MORN доменом Set7/9, выявил практически во всех из них RG-богатые домены, что говорит о том, что MORN- и RG-домены могут взаимодействовать вне зависимости от белкового контекста. По всей видимости, устойчивое взаимодействие между MORN-доменом метилтрансферазы и отдельными доменами белков-субстратов может способствовать осуществлению метилирования.

Сравнение 24 различных белков интерактантов и субстратов Set7/9 (Таблица 1) позволяет сделать вывод о том, что прямое взаимодействие между метилтрансферазой Set7/9 и ее субстратом не является обязательным условием для осуществления метилирования. Например, Set7/9 метилирует белок онко-супрессор p53, в то время как физического взаимодействия между этими белками не наблюдается [17]. Однако, из таблицы видно, что если белок напрямую взаимодействует с метилтрансферазой Set7/9, то он, в большинстве

случаев, является субстратом метилирования Set7/9. Таким образом, на основании полученных нами данных, оказывается возможным с высокой долей вероятности предсказать наличие межбелкового взаимодействия двух белков по наличию в них MORN и RG последовательностей. Более того, MORN-обусловленное взаимодействие метилтрансферазы Set7/9 с белком-партнером может являться веской предпосылкой для наличия метилирования.

4.2 Sam68 – новый субстрат метилирования метилтрансферазы Set7/9

В данной работе впервые было показано, что метилтрансфераза Set7/9 метилирует РНК-связывающий белок Sam68 в экспериментах *in vitro*. Важно отметить, что нам удалось идентифицировать потенциальный сайт метилирования Sam68 путем биоинформатического анализа известных последовательностей белков-субстратов, метилируемых метилтрансферазой Set7/9. В результате анализа 45 аминокислотных последовательностей (Рис. 7 А) белков-субстратов Set7/9, нами были идентифицированы два типа консервативных сайтов, подвергающихся метилированию Set7/9 (Рис. 7 Б.). Первый сайт метилирования представляет собой последовательность вида K/R-S/A-K-K/S/R, в то время как второй тип имеет менее выраженный вид и характеризуется наличием основных аминокислотных остатков, фланкирующих центральный лизин, а также наличием пролина в положении +12 (Рис. 7 Б). Обнаруженные нами сайты метилирования несколько отличаются от ранее описанного консенсусного мотива K/R-S/T/A-K-D/N/Q/K (где К — сайт метилирования), идентифицированного в результате сравнения аминокислотных последовательностей трех белков TAF10, p53 и гистона H3 [17, 30]. Идентифицированные нами последовательности были получены в результате сравнения гораздо большего количества белков-субстратов метилтрансферазы Set7/9 (45 белков), и, тем самым, являются уточненными сайтами метилирования. Более того, последовательность Типа 2, нами описана впервые.

Нами был осуществлен анализ аминокислотной последовательности белка Sam68, который позволил выявить консервативный мотив Типа 1 в КН домене РНК-связывающего белка Sam68 (Рис. 7 В). Таким образом, был идентифицирован лизин в положении 208 (K208), который потенциально мог являться сайтом метилирования метилтрансферазы Set7/9.

Путем проведения реакции метилирования *in vitro* с использованием радиоактивно-меченного донора метильных групп S-аденозилметионина и последующего вестерн-блот анализа, нами был идентифицирован сайт метилирования белка Sam68: остаток лизина в положении 208 (K208). Отметим, что в присутствии каталитически-неактивной формы Set7/9 метилирования Sam68 не наблюдалось. Наконец, в соответствии с результатами биоинформатического анализа, мы обнаружили, что белок Sam68 с точечной заменой K208R не способен метилироваться Set7/9. В результате, нами была идентифицирована новая пост-трансляционная модификация белка Sam68 — метилированный остаток лизина в положении K208. По-всей видимости, устойчивое взаимодействие между MORN- и RG- доменами Set7/9 и Sam68 способствует осуществлению метилирования КН-домена Sam68 каталитическим доменом SET- метилтрансферазы Set7/9 (Рис. 26).

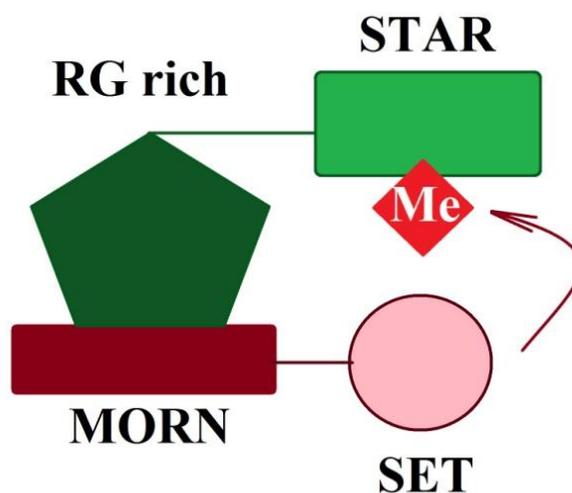


Рис. 26 Схематичное изображение процесса метилирования белка Sam68 метилтрансферазой Set7/9. MORN-домен метилтрансферазы Set7/9

взаимодействует с RG-доменом Sam68, в то время как SET-домен метилтрансферазы Set7/9 метилирует КН-домен Sam68 по остатку лизина в положении 208 (K208)

Таким образом, использование *in silico* биоинформатического подхода, может являться удобным инструментом для выявления потенциальных сайтов метилирования в потенциальных белках-субстратах.

4.3 Цитоплазматическая локализация Sam68 зависит от наличия Set7/9

Считается, что Sam68 является преимущественно ядерным белком, однако особенности его внутриклеточной локализации до сих пор недостаточно хорошо изучены. Как упоминалось выше, Sam68 имеет сигнал ядерной локализации (Рис. 3), который расположен на С-концевом участке белка. При иммуноцитохимическом окрашивании Sam68 преимущественно обнаруживается в ядре.

Нами были описаны особенности внутриклеточной локализации эндогенного и сверхэкспрессированного Sam68 в клетках НЕК93Т и клетках рака толстой кишки человека НСТ116. Эндогенный (Рис.10, Рис.11), как и сверхэкспрессированный (Рис.12, Рис.13) Sam68 преимущественно локализуется в ядре, однако, белок может быть также обнаружен в цитоплазме.

Нами было показано, что Sam68 может формировать длинные протяженные структуры в цитоплазме клеток (Рис.14). Интересно, что подобная локализация белка Sam68 была описана в литературе в условиях сверхэкспрессии мутантного белка слияния Sam68 с GFP: в 25,2 % случаев подобные структуры наблюдались при экспрессии мутанта G178D и в 7,1 % случаев при мутации I184N в клетках HeLa [72]. Однако, в наших экспериментах проводилась сверхэкспрессия рекомбинантного GFP-Sam68 дикого типа. Окраска клеток антителами против α -тубулина, продемонстрировала, что Sam68 ассоциирует с микротрубочками. Наличие в

клетках, в которых Sam68-ассоциирован с микротрубочками, микронуклеированного ядра, а также изменение формы и размеров клетки, позволило сделать предположение, что такие клетки находятся в состоянии апоптоза. Окраска клеток наборами реактивов для детекции апоптоза TMRE и MitoTracker позволила подтвердить факт клеточной смерти. Набор для детекции апоптоза TMRE позволяет детектировать митохондриальный трансмембранный потенциал, важнейший параметр нормального функционирования митохондрий, отсутствие которого является индикатором клеточной смерти. В тех клетках, в которых Sam68 имел цитоплазматическую локализацию и был ассоциирован с тубулином, митохондриальный сигнал после окраски TMRE отсутствовал (Рис.16). Это наблюдение позволило подтвердить тот факт, что Sam68 в процессе клеточной гибели способен ассоциировать с микротрубочками в цитоплазме и принимать участие в процессе формирования апоптотической сети микротрубочек (microtubule apoptotic network, MAN) — особой структуры, которая формируется микротрубочками при вхождении клеток в апоптоз. MAN представляет собой подмембранное кольцо микротрубочек, формируемое в процессе клеточной гибели для защиты мембраны от действия каспаз. Вероятно, исследователи, описавшие мутантный Sam68, способный ассоциировать с микротрубочками [72], могли наблюдать не эффект от мутации, а клетки подвергающиеся клеточной гибели в результате сверхэкспрессии мутантных форм белка.

Вопросы, связанные с особенностями локализации Sam68, являются важными в контексте онкогенеза. Напомним, что уровень экспрессии Sam68 повышен в клетках рака толстой кишки, что достоверно коррелирует со степенью туморогенности и наличием отдаленных метастаз у пациентов. Пациенты с высоким уровнем экспрессии или ядерной локализацией Sam68 имели худшие показатели по общей выживаемости по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии Sam68 или его цитоплазматической локализацией [1]. Мы проанализировали влияние Set7/9 на уровень экспрессии и на внутриклеточную локализацию Sam68. В наших экспериментах было показано,

что нокаут Set7/9 приводил к снижению уровня белка Sam68 в цитоплазме клеток НЕК293Т и НСТ116, не оказывая значительного влияния на ядерный уровень белка.

Чтобы проверить, связано ли снижение белкового уровня Sam68 в цитоплазме с деградацией в протеасомах, мы провели обработку клеток ингибитором протеасом MG132. Обработка MG132, как правило, приводит к стабилизации белка и повышению его содержания в клетках. Мы обнаружили, что MG132 не приводит к стабилизации белка Sam68 в цитоплазме клеток НЕК293Т с нокаутом Set7/9 (Рис.18). По всей видимости, снижение белкового уровня Sam68 в цитоплазме не связано с деградацией в протеасомах. Альтернативным вариантом является деградация белка в лизомах. Однако, как было продемонстрировано ранее, иммуноцитохимически Sam68 не выявлялся в составе лизосом [72]. Таким образом, снижение уровня белка Sam68 в цитоплазме может быть связано с перелокализацией белка из цитоплазмы в ядро в клетках с нокаутом Set7/9.

4.4 Set7/9 — новый регулятор Sam68-опосредованного сплайсинга Bcl-x

Sam68 является ключевым регулятором сплайсинга Bcl-x. Снижение уровня экспрессии Sam68 приводит к аккумуляции длинной анти-апоптотической Bcl-x(L) изоформы, в то время, как сверхэкспрессия Sam68 приводит к продукции короткой про-апоптотической изоформы Bcl-x(s) [78]. Мы убедились, что сверхэкспрессия Sam68 действительно приводит к продукции короткой про-апоптотической изоформы Bcl-x(s) в клетках НЕК293Т, что отражается в уменьшении соотношения Bcl-x(L)/Bcl-x(s) на 18,6% (N=8, p=0.011). Более того, оказалось, что нокаут Set7/9 оказывает сильное влияние на продукцию длинной анти-апоптотической изоформы Bcl-x(L), что приводит к увеличению соотношения Bcl-x(L)/Bcl-x(s) на 42,1% (N=8, p=0.011). Такой эффект может быть связан с тем, что нокаут Set7/9 приводит к снижению белкового уровня Sam68 на 34.2% в клетках НЕК293Т. Согласно

литературным данным, снижение уровня экспрессии Sam68 приводит к продукции Bcl-x(L) изоформы [78]. Учитывая тот факт, что при нокауте Set7/9 сверхэкспрессия Sam68 не приводила к изменению сплайсинга Bcl-x по сравнению с контролем (Рис. 21 Б.), можно предположить, что сильная сверхэкспрессия Sam68 может компенсировать эффект снижения Sam68 в отсутствие Set7/9 в НЕК293Т. Таким образом, в данном исследовании Set7/9 выступает в качестве нового регулятора Sam68-опосредованного сплайсинга Bcl-x.

4.5 Метилтрансфераза Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной регуляции клеточного цикла

Из литературных источников известно, что белок Sam68 является репрессором транскрипции генов *CCND1* и *CCNE1*, кодирующих циклины D1 и E [8]. Циклины D1 и E являются белками, которые специфически регулируют переход из G1 в S-фазу клеточного цикла. Мы обнаружили, что, в соответствии с литературными данными, сверхэкспрессия Sam68 в клетках НЕК293Т приводит к репрессии транскрипции циклина D1 на 35,2% (N=3, p=0.002) и циклина E на 17,3% (N=3, p=0.020). Кроме того, мы обнаружили эффект снижения экспрессии циклина D1 на 29,1% (N=3, p=0.020) и циклина E на 25,4% (N=3, p=0.023) в клетках НЕК293Т с нокаутом Set7/9. Известно, что Set7/9 способствует пролиферации клеток через экспрессию гена *CCNE1* [78]. Однако, оказалось, что в клетках НЕК293Т с нокаутом Set7/9 сверхэкспрессия Sam68 приводит не к репрессии циклинов D1 и E, а к увеличению их экспрессии на уровне РНК (Рис. 22 А). По всей видимости, метилтрансфераза Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной регуляции репрессии циклинов D1 и E на уровне транскрипции. Интересно, что при сверхэкспрессии Sam68 на белковом уровне наблюдается снижение экспрессии циклина D1, как в клетках НЕК293Т, так и в клетках НЕК293Т с нокаутом Set7/9 (Рис. 22 Б). По всей видимости, существуют дополнительные уровни регуляции экспрессии циклинов D1 и E в клетках НЕК293Т.

В раковых клетках HCT116 сверхэкспрессия Sam68 не приводила к репрессии циклинов D1 и E на транскрипционном уровне (Рис. 23 А), однако, наблюдалось снижение экспрессии циклина D1 на уровне белка (Рис. 23 Б). Под действием генотоксического стресса, индуцируемого добавлением 0,1 мкМ доксорубина в течение 8 часов, в клетках HCT116 наблюдалась репрессия транскрипции циклинов D1 и E при сверхэкспрессии Sam68. Интересно, что в отличие от HEK293T нокаут Set7/9 в раковых клетках HCT116 приводил к повышению экспрессии циклинов D1 на 47,8% (N=3, p= 0.002) и циклина E на 33,2% (N=3, p=0.051) на уровне РНК (Рис.23 А). Повышение экспрессии циклинов D1 и E в отсутствие Set7/9 также наблюдалось на белковом уровне (Рис.23 Б). Можно заключить, что в раковых клетках HCT116 системы регуляции не способны компенсировать увеличенную продукцию мРНК циклинов D1 и E, вызванную нокаутом Set7/9. В клетках HCT116 с нокаутом Set7/9 сверхэкспрессия Sam68 не вызывала снижение циклинов D1 и E на транскрипционном и трансляционных уровнях до и после обработки доксорубином (Рис. 23 А, Б).

Известно, что нокаут Sam68 приводит к удлинению G2-M фазы [96]. Кроме того, сверхэкспрессия Sam68 в фибробластах приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу. Арест в G1 фазе клеточного цикла связан с уменьшением уровня экспрессии циклинов D1 и E, приводя к существенному снижению уровня фосфорилированной формы белка ретинобластомы pRb [8].

С помощью метода проточной цитофлуометрии для анализа клеточного цикла, мы обнаружили, что сверхэкспрессия Sam68 приводила к укорочению G2-M фазы клеточного цикла на 7.0% в HEK293T (Рис. 24 А). По всей видимости, эффект остановки в G1 фазе и укорочение G2-M фазы клеточного цикла при сверхэкспрессии Sam68 в клетках HEK293T связан с транскрипционной репрессией циклинов D1 и E. Сверхэкспрессия Sam68 в клетках HEK293T с нокаутом Set7/9 приводила к менее значительному укорочению G2-M фазы на 5.5%, что может быть связано с тем, что, несмотря

на отсутствие репрессии циклинов D1 и E на уровне РНК, на уровне белка наблюдалось снижение уровня экспрессии циклина D1.

Особенно интересно, что в раковых клетках HCT116 сверхэкспрессия Sam68 приводила к укорочению G2-M фазы клеточного цикла на 18,7% и соответственному удлинению S-фазы клеточного цикла на 20,2%, на фоне отсутствия существенного влияния Sam68 на репрессию транскрипции циклинов D1 и E. Снижение белкового уровня циклина D1 при сверхэкспрессии Sam68 говорит о том, что Sam68 может оказывать влияние на белковый уровень циклинов на пост-транскрипционном уровне. Однако, в отсутствие Set7/9 белок Sam68 не приводит к укорочению G2-M фазы клеточного цикла (Рис.24 Б, В). Это может быть связано с тем, что при нокауте Set7/9 в клетках HCT116 сверхэкспрессия Sam68 не приводит к репрессии циклинов D1 и E как на уровне РНК, так и на уровне белка.

4.6 Низкий уровень экспрессии Set7/9 оказывает негативное влияние на выживаемость пациентов с раком толстой кишки

Известно, что уровень экспрессии Sam68 повышен в клетках рака толстой кишки, что достоверно коррелирует со степенью туморогенности и наличием отдаленных метастаз у пациентов [1]. Как было отмечено ранее, пациенты с высоким уровнем экспрессии или ядерной локализацией Sam68 имеют худшие показатели по общей выживаемости по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии Sam68 или его цитоплазматической локализацией. Пациенты с высоким уровнем экспрессии Sam68 имели больший риск возникновения рецидивов, по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии Sam68 [1]. Отметим, что в исследовании высокий уровень Sam68 выявлялся у 53.6% пациентов с раком толстой кишки [1]. Проведенный нами биоинформатический анализ выживаемости пациентов не показал статистической значимого результата при проверке гипотезы о влиянии Sam68 на выживаемость пациентов с раком толстой кишки ($p=0.677$). При этом,

проведенный биоинформатический анализ показал, что высокий уровень экспрессии двух генов, кодирующих белки Set7/9 и Sam68, достоверно коррелирует с лучшей выживаемостью у пациентов с раком толстой кишки (N=122, p=0.029), в то время как пациенты с низким уровнем экспрессии Set7/9 и высоким уровнем экспрессии Sam68, демонстрировали худшую выживаемость (N=133, p=0.039). Это может быть объясняется несколькими причинами. Прежде всего, в клетках HCT116 с нокаутом Set7/9 уровень белка Sam68 в цитоплазматической фракции снижен по отношению к контролю, а как упоминалось выше, ядерная локализация Sam68 является негативным прогностическим фактором по отношению к долгосрочной выживаемости пациентов. Вероятно, ключевую роль в лучшей выживаемости пациентов с цитоплазматической локализацией пациентов играет пока еще плохо изученная цитоплазматическая функция белка Sam68.

Известно, что продукция про-апоптотической Bcl-x(s) изоформы является положительным фактором для проведения противоопухолевой терапии. Нокаут Set7/9 вызывает изменения в альтернативном сплайсинге и приводит к образованию преимущественно длинной анти-апоптотической изоформы Bcl-x(L), что может иметь негативные последствия у пациентов с раком толстой кишки. Таким образом, низкий уровень Set7/9 при раке толстой кишки человека может рассматриваться как негативный прогностический маркер в контексте выживаемости пациентов.

ВЫВОДЫ

1. РНК-связывающий белок Sam68 взаимодействует с метилтрансферазой Set7/9 *in vivo* и *in vitro*. За данное взаимодействие отвечают RG-домен Sam68 и MORN-домен метилтрансферазы Set7/9.
2. Метилтрансфераза Set7/9 метилирует КН-домен РНК-связывающего белка Sam68 по остатку лизина К в положении 208 (K208). Метилирование белка Sam68 с заменой остатка лизина в положении 208 на аргинин (K208R) не было обнаружено.
3. Sam68 локализуется преимущественно в ядре, и, в меньшей степени, в цитоплазме клеток НЕК293Т и клеток рака толстой кишки НСТ116. Сверхэкспрессированный Sam68 может ассоциировать с α -тубулином в процессе формирования апоптотической сети микротрубочек.
4. Отсутствие метилтрансферазы Set7/9 приводит к снижению общего белкового уровня Sam68 в клетках НЕК293Т на 34,3% (N=3, p=0.014) и в клетках НСТ116 на 10,4% по сравнению с контролем (N=3, p=0.013). Отсутствие Set7/9 приводит к снижению белкового уровня Sam68 в цитоплазме клеток НЕК293Т и НСТ116. Такое снижение белкового уровня Sam68 в цитоплазме в отсутствие Set7/9 не связано протеасомной деградацией белка.
5. Метилтрансфераза Set7/9 вовлечена в регуляцию сплайсинга Bcl-x. Нокаут Set7/9 приводит к продукции анти-апоптотической изоформы Bcl-x(L), в то время как сверхэкспрессия Set7/9 способствует образованию короткой про-апоптотической Bcl-x(s) изоформы.
6. Метилтрансфераза Set7/9 вовлечена в Sam68-опосредованную регуляцию клеточного цикла. Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E. Сверхэкспрессия Sam68 в клеточных линиях НЕК293Т и НСТ116 приводит к существенному укорочению G2-M фазы клеточного цикла, в то время как в отсутствие Set7/9 в раковых клетках

НСТ116 Sam68 не оказывает влияния на продолжительность G2-M фазы клеточного цикла.

7. Низкий уровень экспрессии метилтрансферазы Set7/9 является негативным прогностическим маркером для пациентов с раком толстой кишки и высоким уровнем экспрессии Sam68.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liao W. T., Liu J. L., Wang Z. G., Cui Y. M., Shi L., Li T. T., Zhao X. H., Chen X. T., Ding Y. Q., Song L. B. High expression level and nuclear localization of Sam68 are associated with progression and poor prognosis in colorectal cancer // *BMC Gastroenterol.* – 2013. – Т. 13. – С. 126.
2. Zhang Z., Yu C., Li Y., Jiang L., Zhou F. Utility of SAM68 in the progression and prognosis for bladder cancer // *BMC Cancer.* – 2015. – Т. 15. – С. 364.
3. Zhang Z., Li J., Zheng H., Yu C., Chen J., Liu Z., Li M., Zeng M., Zhou F., Song L. Expression and cytoplasmic localization of SAM68 is a significant and independent prognostic marker for renal cell carcinoma // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2009. – Т. 18, № 10. – С. 2685-93.
4. Elliott D. J., Rajan P. The role of the RNA-binding protein Sam68 in mammary tumorigenesis // *J Pathol.* – 2010. – Т. 222, № 3. – С. 223-6.
5. Wang Y., Liang L., Zhang J., Li M., Zhu J., Gong C., Yang L., Zhu J., Chen L., Ni R. Sam68 promotes cellular proliferation and predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma // *Tumour Biol.* – 2015. – Т. 36, № 11. – С. 8735-45.
6. Li Z., Yu C. P., Zhong Y., Liu T. J., Huang Q. D., Zhao X. H., Huang H., Tu H., Jiang S., Zhang Y., Liu J. H., Song L. B. Sam68 expression and cytoplasmic localization is correlated with lymph node metastasis as well as prognosis in patients with early-stage cervical cancer // *Ann Oncol.* – 2012. – Т. 23, № 3. – С. 638-46.
7. Locatelli A., Lofgren K. A., Daniel A. R., Castro N. E., Lange C. A. Mechanisms of HGF/Met signaling to Brk and Sam68 in breast cancer progression // *Horm Cancer.* – 2012. – Т. 3, № 1-2. – С. 14-25.
8. Taylor S. J., Resnick R. J., Shalloway D. Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis // *BMC Cell Biol.* – 2004. – Т. 5. – С. 5.
9. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell.* – 2007. – Т. 128, № 4. – С. 693-705.

10. Wang H., Cao R., Xia L., Erdjument-Bromage H., Borchers C., Tempst P., Zhang Y. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase // *Mol Cell*. – 2001. – T. 8, № 6. – C. 1207-17.
11. Gaughan L., Stockley J., Wang N., McCracken S. R., Treumann A., Armstrong K., Shaheen F., Watt K., McEwan I. J., Wang C., Pestell R. G., Robson C. N. Regulation of the androgen receptor by SET9-mediated methylation // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – T. 39, № 4. – C. 1266-79.
12. Ko S., Ahn J., Song C. S., Kim S., Knapczyk-Stwora K., Chatterjee B. Lysine methylation and functional modulation of androgen receptor by Set9 methyltransferase // *Mol Endocrinol.* – 2011. – T. 25, № 3. – C. 433-44.
13. Shen C., Wang D., Liu X., Gu B., Du Y., Wei F. Z., Cao L. L., Song B., Lu X., Yang Q., Zhu Q., Hou T., Li M., Wang L., Wang H., Zhao Y., Yang Y., Zhu W. G. SET7/9 regulates cancer cell proliferation by influencing beta-catenin stability // *FASEB J.* – 2015. – T. 29, № 10. – C. 4313-23.
14. Esteve P. O., Chin H. G., Benner J., Feehery G. R., Samaranyake M., Horwitz G. A., Jacobsen S. E., Pradhan S. Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – T. 106, № 13. – C. 5076-81.
15. Kontaki H., Talianidis I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death // *Mol Cell.* – 2010. – T. 39, № 1. – C. 152-60.
16. Subramanian K., Jia D., Kapoor-Vazirani P., Powell D. R., Collins R. E., Sharma D., Peng J., Cheng X., Vertino P. M. Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase // *Mol Cell.* – 2008. – T. 30, № 3. – C. 336-47.
17. Chuikov S., Kurash J. K., Wilson J. R., Xiao B., Justin N., Ivanov G. S., McKinney K., Tempst P., Prives C., Gamblin S. J., Barlev N. A., Reinberg D. Regulation of p53 activity through lysine methylation // *Nature.* – 2004. – T. 432, № 7015. – C. 353-60.
18. Ea C. K., Baltimore D. Regulation of NF-kappaB activity through lysine monomethylation of p65 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – T. 106, № 45. – C. 18972-7.

19. Masatsugu T., Yamamoto K. Multiple lysine methylation of PCAF by Set9 methyltransferase // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – T. 381, № 1. – C. 22-6.
20. Carr S. M., Munro S., Kessler B., Oppermann U., La Thangue N. B. Interplay between lysine methylation and Cdk phosphorylation in growth control by the retinoblastoma protein // *EMBO J.* – 2011. – T. 30, № 2. – C. 317-27.
21. Yang J., Huang J., Dasgupta M., Sears N., Miyagi M., Wang B., Chance M. R., Chen X., Du Y., Wang Y., An L., Wang Q., Lu T., Zhang X., Wang Z., Stark G. R. Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – T. 107, № 50. – C. 21499-504.
22. Kouskouti A., Scheer E., Staub A., Tora L., Talianidis I. Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation // *Mol Cell.* – 2004. – T. 14, № 2. – C. 175-82.
23. Pagans S., Sakane N., Schnolzer M., Ott M. Characterization of HIV Tat modifications using novel methyl-lysine-specific antibodies // *Methods.* – 2011. – T. 53, № 1. – C. 91-6.
24. Oudhoff M. J., Freeman S. A., Couzens A. L., Antignano F., Kuznetsova E., Min P. H., Northrop J. P., Lehnertz B., Barsyte-Lovejoy D., Vedadi M., Arrowsmith C. H., Nishina H., Gold M. R., Rossi F. M., Gingras A. C., Zaph C. Control of the hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap // *Dev Cell.* – 2013. – T. 26, № 2. – C. 188-94.
25. Nishioka K., Chuikov S., Sarma K., Erdjument-Bromage H., Allis C. D., Tempst P., Reinberg D. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation // *Genes Dev.* – 2002. – T. 16, № 4. – C. 479-89.
26. Wilson J. R., Jing C., Walker P. A., Martin S. R., Howell S. A., Blackburn G. M., Gamblin S. J., Xiao B. Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9 // *Cell.* – 2002. – T. 111, № 1. – C. 105-15.
27. Xiao B., Jing C., Wilson J. R., Walker P. A., Vasisht N., Kelly G., Howell S., Taylor I. A., Blackburn G. M., Gamblin S. J. Structure and catalytic mechanism of

- the human histone methyltransferase SET7/9 // *Nature*. – 2003. – T. 421, № 6923. – C. 652-6.
28. Dhayalan A., Kudithipudi S., Rathert P., Jeltsch A. Specificity analysis-based identification of new methylation targets of the SET7/9 protein lysine methyltransferase // *Chem Biol*. – 2011. – T. 18, № 1. – C. 111-20.
29. Vasileva E., Barlev N. *The World of SET-Containing Lysine Methyltransferases* // eLSJohn Wiley & Sons, Ltd, 2017.
30. Couture J. F., Collazo E., Hauk G., Trievel R. C. Structural basis for the methylation site specificity of SET7/9 // *Nat Struct Mol Biol*. – 2006. – T. 13, № 2. – C. 140-6.
31. Kassner I., Andersson A., Fey M., Tomas M., Ferrando-May E., Hottiger M. O. SET7/9-dependent methylation of ARTD1 at K508 stimulates poly-ADP-ribose formation after oxidative stress // *Open Biol*. – 2013. – T. 3, № 10. – C. 120173.
32. Calnan D. R., Webb A. E., White J. L., Stowe T. R., Goswami T., Shi X., Espejo A., Bedford M. T., Gozani O., Gygi S. P., Brunet A. Methylation by Set9 modulates FoxO3 stability and transcriptional activity // *Aging (Albany NY)*. – 2012. – T. 4, № 7. – C. 462-79.
33. Kassner I., Barandun M., Fey M., Rosenthal F., Hottiger M. O. Crosstalk between SET7/9-dependent methylation and ARTD1-mediated ADP-ribosylation of histone H1.4 // *Epigenetics Chromatin*. – 2013. – T. 6, № 1. – C. 1.
34. Kim S. K., Lee H., Han K., Kim S. C., Choi Y., Park S. W., Bak G., Lee Y., Choi J. K., Kim T. K., Han Y. M., Lee D. SET7/9 methylation of the pluripotency factor LIN28A is a nucleolar localization mechanism that blocks let-7 biogenesis in human ESCs // *Cell Stem Cell*. – 2014. – T. 15, № 6. – C. 735-49.
35. Lezina L., Aksenova V., Fedorova O., Malikova D., Shuvalov O., Antonov A. V., Tentler D., Garabadgiu A. V., Melino G., Barlev N. A. KMT Set7/9 affects genotoxic stress response via the Mdm2 axis // *Oncotarget*. – 2015. – T. 6, № 28. – C. 25843-55.

36. He S., Owen D. R., Jelinsky S. A., Lin L. L. Lysine Methyltransferase SETD7 (SET7/9) Regulates ROS Signaling through mitochondria and NFE2L2/ARE pathway // *Sci Rep.* – 2015. – T. 5. – C. 14368.
37. Francis J., Chakrabarti S. K., Garmey J. C., Mirmira R. G. Pdx-1 links histone H3-Lys-4 methylation to RNA polymerase II elongation during activation of insulin transcription // *J Biol Chem.* – 2005. – T. 280, № 43. – C. 36244-53.
38. Carr S. M., La Thangue N. B. Cell cycle control by a methylation-phosphorylation switch // *Cell Cycle.* – 2011. – T. 10, № 5. – C. 733-4.
39. Munro S., Khaire N., Inche A., Carr S., La Thangue N. B. Lysine methylation regulates the pRb tumour suppressor protein // *Oncogene.* – 2010. – T. 29, № 16. – C. 2357-67.
40. Yang X. D., Huang B., Li M., Lamb A., Kelleher N. L., Chen L. F. Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit // *EMBO J.* – 2009. – T. 28, № 8. – C. 1055-66.
41. Liu X., Wang D., Zhao Y., Tu B., Zheng Z., Wang L., Wang H., Gu W., Roeder R. G., Zhu W. G. Methyltransferase Set7/9 regulates p53 activity by interacting with Sirtuin 1 (SIRT1) // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – T. 108, № 5. – C. 1925-30.
42. Wang D., Zhou J., Liu X., Lu D., Shen C., Du Y., Wei F. Z., Song B., Lu X., Yu Y., Wang L., Zhao Y., Wang H., Yang Y., Akiyama Y., Zhang H., Zhu W. G. Methylation of SUV39H1 by SET7/9 results in heterochromatin relaxation and genome instability // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – T. 110, № 14. – C. 5516-21.
43. Pagans S., Kauder S. E., Kaehlcke K., Sakane N., Schroeder S., Dormeyer W., Trievel R. C., Verdin E., Schnolzer M., Ott M. The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription // *Cell Host Microbe.* – 2010. – T. 7, № 3. – C. 234-44.
44. Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins // *Nature.* – 2001. – T. 410, № 6824. – C. 116-20.

45. Wang D. D., Yan H. Transcriptional protein-protein cooperativity in POU/HMG/DNA complexes revealed by normal mode analysis // *Comput Math Methods Med.* – 2013. – T. 2013. – C. 854710.
46. Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage // *Cancer Res.* – 1991. – T. 51, № 23 Pt 1. – C. 6304-11.
47. Rada M., Vasileva E., Lezina L., Marouco D., Antonov A. V., Macip S., Melino G., Barlev N. A. Human EHMT2/G9a activates p53 through methylation-independent mechanism // *Oncogene.* – 2017. – T. 36, № 7. – C. 922-932.
48. Ivanov G. S., Ivanova T., Kurash J., Ivanov A., Chuikov S., Gizatullin F., Herrera-Medina E. M., Rauscher F., 3rd, Reinberg D., Barlev N. A. Methylation-acetylation interplay activates p53 in response to DNA damage // *Mol Cell Biol.* – 2007. – T. 27, № 19. – C. 6756-69.
49. Stevens C., La Thangue N. B. E2F and cell cycle control: a double-edged sword // *Arch Biochem Biophys.* – 2003. – T. 412, № 2. – C. 157-69.
50. Classon M., Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – T. 2, № 12. – C. 910-7.
51. Giacinti C., Giordano A. RB and cell cycle progression // *Oncogene.* – 2006. – T. 25, № 38. – C. 5220-7.
52. Sherr C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited // *Cancer Res.* – 2000. – T. 60, № 14. – C. 3689-95.
53. Lezina L., Aksenova V., Ivanova T., Purmessur N., Antonov A. V., Tentler D., Fedorova O., Garabadgiu A. V., Talianidis I., Melino G., Barlev N. A. KMTase Set7/9 is a critical regulator of E2F1 activity upon genotoxic stress // *Cell Death Differ.* – 2014. – T. 21, № 12. – C. 1889-99.
54. Chackalaparampil I., Shalloway D. Altered phosphorylation and activation of pp60c-src during fibroblast mitosis // *Cell.* – 1988. – T. 52, № 6. – C. 801-10.
55. Fumagalli S., Totty N. F., Hsuan J. J., Courtneidge S. A. A target for Src in mitosis // *Nature.* – 1994. – T. 368, № 6474. – C. 871-4.

56. Taylor S. J., Shalloway D. An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis // *Nature*. – 1994. – T. 368, № 6474. – C. 867-71.
57. Vernet C., Artzt K. STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA // *Trends Genet.* – 1997. – T. 13, № 12. – C. 479-84.
58. Siomi H., Matunis M. J., Michael W. M., Dreyfuss G. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – T. 21, № 5. – C. 1193-8.
59. Musco G., Stier G., Joseph C., Castiglione Morelli M. A., Nilges M., Gibson T. J., Pastore A. Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome // *Cell*. – 1996. – T. 85, № 2. – C. 237-45.
60. Lin Q., Taylor S. J., Shalloway D. Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains // *J Biol Chem.* – 1997. – T. 272, № 43. – C. 27274-80.
61. Chen T., Damaj B. B., Herrera C., Lasko P., Richard S. Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain // *Mol Cell Biol.* – 1997. – T. 17, № 10. – C. 5707-18.
62. Meyer N. H., Tripsianes K., Vincendeau M., Madl T., Kateb F., Brack-Werner R., Sattler M. Structural basis for homodimerization of the Src-associated during mitosis, 68-kDa protein (Sam68) Qual domain // *J Biol Chem.* – 2010. – T. 285, № 37. – C. 28893-901.
63. Feracci M., Foot J. N., Grellscheid S. N., Danilenko M., Stehle R., Gonchar O., Kang H. S., Dalglish C., Meyer N. H., Liu Y., Lahat A., Sattler M., Eperon I. C., Elliott D. J., Dominguez C. Structural basis of RNA recognition and dimerization by the STAR proteins T-STAR and Sam68 // *Nat Commun.* – 2016. – T. 7. – C. 10355.
64. Barlat I., Maurier F., Duchesne M., Guitard E., Tocque B., Schweighoffer F. A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain // *J Biol Chem.* – 1997. – T. 272, № 6. – C. 3129-32.

65. Chen T., Cote J., Carvajal H. V., Richard S. Identification of Sam68 arginine glycine-rich sequences capable of conferring nonspecific RNA binding to the GSG domain // *J Biol Chem.* – 2001. – T. 276, № 33. – C. 30803-11.
66. Itoh M., Haga I., Li Q. H., Fujisawa J. Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68 // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – T. 30, № 24. – C. 5452-64.
67. Lang V., Semichon M., Michel F., Brossard C., Gary-Gouy H., Bismuth G. Fyn membrane localization is necessary to induce the constitutive tyrosine phosphorylation of Sam68 in the nucleus of T lymphocytes // *J Immunol.* – 1999. – T. 162, № 12. – C. 7224-32.
68. McBride A. E., Schlegel A., Kirkegaard K. Human protein Sam68 relocation and interaction with poliovirus RNA polymerase in infected cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – T. 93, № 6. – C. 2296-301.
69. Gustin K. E., Sarnow P. Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus // *J Virol.* – 2002. – T. 76, № 17. – C. 8787-96.
70. Zhang H., Cong H., Song L., Tien P. The nuclear protein Sam68 is redistributed to the cytoplasm and is involved in PI3K/Akt activation during EV71 infection // *Virus Res.* – 2014. – T. 180. – C. 1-11.
71. McBride A. E., Taylor S. J., Shalloway D., Kirkegaard K. KH domain integrity is required for wild-type localization of Sam68 // *Exp Cell Res.* – 1998. – T. 241, № 1. – C. 84-95.
72. Chen T., Boisvert F. M., Bazett-Jones D. P., Richard S. A role for the GSG domain in localizing Sam68 to novel nuclear structures in cancer cell lines // *Mol Biol Cell.* – 1999. – T. 10, № 9. – C. 3015-33.
73. Cote J., Boisvert F. M., Boulanger M. C., Bedford M. T., Richard S. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1 // *Mol Biol Cell.* – 2003. – T. 14, № 1. – C. 274-87.

74. Fusaki N., Iwamatsu A., Iwashima M., Fujisawa J. Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling // *J Biol Chem.* – 1997. – T. 272, № 10. – C. 6214-9.
75. Sanchez-Margalet V., Najib S. p68 Sam is a substrate of the insulin receptor and associates with the SH2 domains of p85 PI3K // *FEBS Lett.* – 1999. – T. 455, № 3. – C. 307-10.
76. Derry J. J., Richard S., Valderrama Carvajal H., Ye X., Vasioukhin V., Cochrane A. W., Chen T., Tyner A. L. Sik (BRK) phosphorylates Sam68 in the nucleus and negatively regulates its RNA binding ability // *Mol Cell Biol.* – 2000. – T. 20, № 16. – C. 6114-26.
77. Lukong K. E., Larocque D., Tyner A. L., Richard S. Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression // *J Biol Chem.* – 2005. – T. 280, № 46. – C. 38639-47.
78. Paronetto M. P., Achsel T., Massiello A., Chalfant C. E., Sette C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x // *J Cell Biol.* – 2007. – T. 176, № 7. – C. 929-39.
79. Resnick R. J., Taylor S. J., Lin Q., Shalloway D. Phosphorylation of the Src substrate Sam68 by Cdc2 during mitosis // *Oncogene.* – 1997. – T. 15, № 11. – C. 1247-53.
80. Matter N., Herrlich P., Konig H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68 // *Nature.* – 2002. – T. 420, № 6916. – C. 691-5.
81. Babic I., Cherry E., Fujita D. J. SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis // *Oncogene.* – 2006. – T. 25, № 36. – C. 4955-64.
82. Sun X., Fu K., Hodgson A., Wier E. M., Wen M. G., Kamenyeva O., Xia X., Koo L. Y., Wan F. Sam68 Is Required for DNA Damage Responses via Regulating Poly(ADP-ribosyl)ation // *PLoS Biol.* – 2016. – T. 14, № 9. – C. e1002543.
83. Iijima T., Wu K., Witte H., Hanno-Iijima Y., Glatter T., Richard S., Scheiffele P. SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1 // *Cell.* – 2011. – T. 147, № 7. – C. 1601-14.

84. Huot M. E., Vogel G., Zabarauskas A., Ngo C. T., Coulombe-Huntington J., Majewski J., Richard S. The Sam68 STAR RNA-binding protein regulates mTOR alternative splicing during adipogenesis // *Mol Cell*. – 2012. – T. 46, № 2. – C. 187-99.
85. Gaytan-Cervantes J., Gonzalez-Torres C., Maldonado V., Zampedri C., Ceballos-Cancino G., Melendez-Zajgla J. Protein Sam68 regulates the alternative splicing of survivin DEx3 // *J Biol Chem*. – 2017. – T. 292, № 33. – C. 13745-13757.
86. Valacca C., Bonomi S., Buratti E., Pedrotti S., Baralle F. E., Sette C., Ghigna C., Biamonti G. Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene // *J Cell Biol*. – 2010. – T. 191, № 1. – C. 87-99.
87. Le T. T., Pham L. T., Butchbach M. E., Zhang H. L., Monani U. R., Covert D. D., Gavriline T. O., Xing L., Bassell G. J., Burghes A. H. SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN // *Hum Mol Genet*. – 2005. – T. 14, № 6. – C. 845-57.
88. Pagliarini V., Pelosi L., Bustamante M. B., Nobili A., Berardinelli M. G., D'Amelio M., Musaro A., Sette C. SAM68 is a physiological regulator of SMN2 splicing in spinal muscular atrophy // *J Cell Biol*. – 2015. – T. 211, № 1. – C. 77-90.
89. Reddy T. R., Xu W., Mau J. K., Goodwin C. D., Suhasini M., Tang H., Frimpong K., Rose D. W., Wong-Staal F. Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev // *Nat Med*. – 1999. – T. 5, № 6. – C. 635-42.
90. Reddy T. R., Xu W. D., Wong-Staal F. General effect of Sam68 on Rev/Rex regulated expression of complex retroviruses // *Oncogene*. – 2000. – T. 19, № 35. – C. 4071-4.
91. DeOcesano-Pereira C., Amaral M. S., Parreira K. S., Ayupe A. C., Jacysyn J. F., Amarante-Mendes G. P., Reis E. M., Verjovski-Almeida S. Long non-coding RNA INXS is a critical mediator of BCL-XS induced apoptosis // *Nucleic Acids Res*. – 2014. – T. 42, № 13. – C. 8343-55.

92. Li N., Richard S. Sam68 functions as a transcriptional coactivator of the p53 tumor suppressor // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Т. 44, № 18. – С. 8726-8741.
93. Cho S. J., Choi M. H., Nam S. Y., Kim J. Y., Kim C. S., Pyo S., Yang K. H. Sam68 is cleaved by caspases under apoptotic cell death induced by ionizing radiation // *J Radiat Res.* – 2015. – Т. 56, № 2. – С. 287-93.
94. Zhao D., Tian Y., Li P., Wang L., Xiao A., Zhang M., Shi T. MicroRNA-203 inhibits the malignant progression of neuroblastoma by targeting Sam68 // *Mol Med Rep.* – 2015. – Т. 12, № 4. – С. 5554-60.
95. Benoit Y. D., Mitchell R. R., Risueno R. M., Orlando L., Tanasijevic B., Boyd A. L., Aslostovar L., Salci K. R., Shapovalova Z., Russell J., Eguchi M., Golubeva D., Graham M., Xenocostas A., Trus M. R., Foley R., Leber B., Collins T. J., Bhatia M. Sam68 Allows Selective Targeting of Human Cancer Stem Cells // *Cell Chem Biol.* – 2017. – Т. 24, № 7. – С. 833-844 e9.
96. Li Q. H., Haga I., Shimizu T., Itoh M., Kurosaki T., Fujisawa J. Retardation of the G2-M phase progression on gene disruption of RNA binding protein Sam68 in the DT40 cell line // *FEBS Lett.* – 2002. – Т. 525, № 1-3. – С. 145-50.
97. Amelio I., Gostev M., Knight R. A., Willis A. E., Melino G., Antonov A. V. DRUGSURV: a resource for repositioning of approved and experimental drugs in oncology based on patient survival information // *Cell Death Dis.* – 2014. – Т. 5. – С. e1051.
98. Шувалов О.Ю. Лизин специфические ферменты, MDM2 и SET7/9, в регуляции клеточного ответа на генотоксический и метаболический стресс// - С.1-128.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. Николаю Анатольевичу Барлеву за предоставленную возможность заниматься интересной темой, помощь и внимательное отношение. Автор искренне благодарит своих коллег к.б.н. Федорову Ольгу Андреевну, к.б.н. Шувалова Олега Юрьевича и к.б.н. Александру Александровну Дакс за помощь в освоении молекулярно-биологических методов, поддержку, ценные советы и создание теплой, дружественной атмосферы. Особую благодарность автор выражает Петухову Алексею Вячеславовичу за помощь и консультации при создании клеточных линий с нокаутом Set7/9.

Автор безгранично благодарна своему мужу Жемкову Владимиру Андреевичу за любовь и поддержку, помощь в оформлении диссертации, и, конечно, своим любимым родителям, Пашковской Марине Всеволодовне и Ивановой Людмиле Ивановне за любовь, понимание, терпение и сопереживание.