

На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВА

Елена Андреевна

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

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2017

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

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

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

кандидат биологических наук
Маргарита Владимировна Глазова,
заведующая Лабораторией сравнительной биохимии
клеточных функций Института эволюционной физиологии
и биохимии имени И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Ведущая организация: Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова (МГУ), Москва.

Защита диссертации состоится « 2 » марта 2018 года в « » часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе ФГБУН Института цитологии РАН по
адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4.

Е-mail: cellbio@incras.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте
Института <http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2018 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, мочевого пузыря, карциноме почки, раке простаты, карциноме пищевода, раке шейки матки и раке груди [1,2]. 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 [3].

Белок Sam68 может подвергаться различным посттрансляционным модификациям, таким как фосфорилирование, убиквитинирование и метилирование, оказывающим различное влияние на его локализацию, стабильность и функцию. Однако, посттрансляционная 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 [4]. Белок Set7/9 изначально был идентифицирован в качестве специфической метилтрансферазы для гистона H3, метилирующей лизин K в положении 4 (H3K4) [5]. Впоследствии было идентифицировано большое количество негистонных белков-субстратов для метилтрансферазы Set7/9, включая такие мишени как: андрогеновый рецептор (androgen receptor, AR), β -катенин, метилтрансфераза DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1), фактор транскрипции E2F1 (E2F transcription factor 1), эстрогеновый рецептор α (estrogen receptor α , ER α), белок-онкосупрессор p53, p65/RelA субъединица NF κ B, коактиватор транскрипции PCAF (P300/CBP-associated factor), белок ретинобластомы pRb[2], активатор транскрипции STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), транскрипционный фактор TAF10 (Transcription initiation factor TFIID

subunit 10)[3], регуляторный белок TAT, транскрипционный регулятор Yap1 (yes-associated protein 1) [6] и другие, принимающие участие в самых разнообразных внутриклеточных процессах. В данной работе изучена роль метилтрансферазы Set7/9 в регуляции РНК-связывающего белка Sam68.

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 HEK293T и рака толстой кишки HCT116.
4. Определить роль Set7/9 в Sam68-опосредованной регуляции апоптоза и клеточного цикла.

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 HEK293T и HCT116. 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 HEK293T и HCT116.
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 HEK293T и HCT116

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

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 HEK293Т 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 HEK293Т и HCT116. Метилтрансфераза Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E, а также регуляции клеточного цикла в клетках линий HEK293Т и HCT116.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты проведенного исследования важны для фундаментального понимания внутриклеточных процессов, в которые вовлечен белок Sam68, а именно: сплайсинга, регуляции клеточного цикла и апоптоза. 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.

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).

Личный вклад автора

Экспериментальные данные, представленные в работе, были проведены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 98 источников, и благодарностей. Диссертация изложена на 111 страницах. Иллюстративный материал содержит 26 рисунков и 3 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии, использованные в работе. В работе были использованы клеточные линии эмбриональной почки человека HEK293T и рака толстой кишки человека HCT116, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт Цитологии РАН). В ходе работы с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas были получены изогенные стабильные клеточные линии с нокаутом Set7/9 путем специфического нокаутирования гена *SETD7*.

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

Трансфекция клеточных линий. Трансфекцию клеток линий HEK293T и HCT116, а также, клеток с нокаутом Set7/9 осуществляли реагентами для трансфекции TurboFect (ThermoScientific, USA) и X-tremeGENE (Roche, Швейцария). Эффективность трансфекции анализировали через 48-56 часов.

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 векторами lentiCRISPR v2.0-Set7/9KO, кодирующим gRNA для специфического нокаутирования гена *SETD7*, и lentiCRISPR v2.0, в качестве контроля. Селекция проводилась с использованием антибиотика пурамицина в концентрации 2 мкг/мл.

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Экстракцию РНК осуществляли с помощью реагента для выделения РНК (Ероген, Россия) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК осуществлялся с использованием набора реагентов для обратной транскрипции RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischerScientific, США) согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени проводили с использованием полученной с помощью обратной транскрипции кДНК с использованием коммерческой реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия).

Генетические конструкции Конструкции pGEX-Set7/9, pGEX-MORN, pGEX-Linker, pGEX-SET, а также pIRES-Set7/9 были любезно предоставлены к.б.н. О.Ю. Шуваловым (ЦИН РАН, Россия). Конструкции pCDNA3-Set7/9 и pCDNA3-Set7/9mut были любезно предоставлены д.б.н. Н.А. Барлевым (ИНЦ РАН, Россия). 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).

Сайт-направленный мутагенез. Конструкция, кодирующая полноразмерную форму белка Sam68 с тагом 6xHis, использовалась в качестве матрицы для получения конструкции с точечной мутацией K208R с помощью набора реагентов для сайт-направленного мутагенеза Q5 site directed mutagenesis kit (NEB, США).

Экспрессия рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки GST-Set7/9, GST-MORN, GST-SET, GST-Linker домены, а также нативный GST, в качестве контроля, как и рекомбинантные белки 6xHis-Sam68 и 6xHis-RG домен экспрессировались в клетках бактерий *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysSRosetta. Индукцию синтеза белка осуществляли с помощью добавления в питательную среду индуктора IPTG (isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside) в конечной концентрации 0,4 mM в течение 5-6 часов при 37 °C.

Очистка рекомбинантных белков с использованием глутатион-сефарозы. Осадок бактериальных клеток после индукции ресуспендировали на льду в фосфатно-солевом буфере PBS, содержащем 0,5% Triton X-100 и 1 mM PMSF, разрушали клетки ультразвуком и производили выделение рекомбинантных белков с использованием глутатион-сефарозы (General Electric, США) согласно инструкции производителя.

Очистка рекомбинантных белков с использованием Ni-агарозы. Осадок бактериальных клеток ресуспендировали на льду в фосфатно-солевом буфере PBS, содержащем 0,5% Triton X-100, 300 mM NaCl, 1 mM имидазол и PMSF, обрабатывали суспензию ультразвуком. Выделение рекомбинантных белков с использованием Ni-NTA-агарозы (Qiagen, США) проводили согласно инструкции производителя.

Разделение белков в ПААГ и иммуноблоттинг. 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. После этого белки переносили на предварительно активированную PVDF мембрану (Millipore, США) в буфере TGB, содержащем 10% метанол в течение 1 часа при напряжении 100 В и силе тока 250 мА.

GST-пулдаун. Имобилизованные на глутатион-сефарозе рекомбинантные белки: GST-Set7/9, GST-MORN, GST-SET и GST-Linker домены и GST в качестве контроля инкубировали с очищенными рекомбинантными белками 6xHis-Sam68 и 6xHis-RG. Связывание проводили в течение 4 часов при +4 °C и постоянном перемешивании. 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.

Ко-иммунопреципитация. Для экспериментов по ко-иммунопреципитации клетки HEK293T, трансфецировали 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. Ко-иммунопреципитацию с использованием анти-FLAG M2-агарозы (SigmaAldrich, США) проводили в соответствии с инструкцией изготовителя.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Клетки клеточных линий HEK293T и HCT116, а также клетки с нокаутом Set7/9 рассеивались в лунки 24 луночного планшета, содержащего стекла диаметром 13 мм. На следующие сутки клетки подвергались либо фиксации, либо трансфекции с последующей фиксацией 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 антителами и DAPI.

Изучение клеточного цикла методом проточной цитометрии. Клеточные линии HEK293T и HCT116, а также клетки с нокаутом Set7/9 трансфецировали вектором, кодирующим белок слияния Sam68-GFP. В качестве контроля использовали пустой вектор pIRES-hr-1a. Промытые фосфатно-солевым буфером PBS клетки инкубировали в течение 20 мин в 500 мкл PBS, содержащего 200 мкг/мл сапонины при комнатной температуре. После инкубации клетки промывали PBS и осаждали центрифугированием. Клетки ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащим 250 мкг/мл РНКазу и 50 мкг/мл пропидий йодид, после чего инкубировали при 37 °C. Анализ проводили на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Beckman Coulter). Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью программы WinMDI, версия 2.8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

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 [17]. Интерактанты Set7/9 определялись с помощью масс-спектрометрического анализа. Среди идентифицированных интерактантов для дальнейшего изучения был выбран РНК-связывающий белок Sam68 (кодируется геном *KHDRBS1*), принимающий участие в различных внутриклеточных процессах, таких как альтернативный сплайсинг, регуляция экспрессии генов, контроль клеточного цикла и апоптоз.

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

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 с использованием M2-FLAG-агарозы. Было обнаружено, что как эндогенный, так и сверхэкспрессированный

белок слияния GFP-Sam68 иммунопреципитируются совместно с FLAG-Set7/9 (Рис. 1 — дорожки 5, 6). В контрольном эксперименте в отсутствии FLAG-Set7/9 как эндогенный, так и сверхэкспрессированный Sam68 не обнаруживались при вестерн-блот анализе (Рис. 1 — дорожка 4).

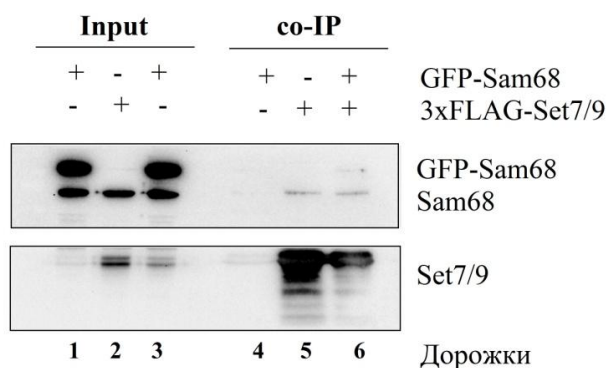


Рис.1. Sam68 взаимодействует с Set7/9 *in vivo*. Вестерн-блот анализ результатов ко-иммунопреципитации эндогенного Sam68 и GFP-Sam68 из лизата клеток HEK293T с использованием аффинной очистки белка FLAG-Set7/9.

Таким образом, было доказано, что полноразмерная форма Sam68 взаимодействует с полноразмерной формой метилтрансферазы Set7/9 *in vivo*.

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

Для изучения взаимодействия метилтрансферазы Set7/9 и РНК-связывающего белка Sam68, а также идентификации доменов, отвечающих за взаимодействие между этими белками, был предпринят эксперимент по связыванию иммобилизованных на глутатион сефарозе полноразмерной формы GST-Set7/9, изолированных доменов метилтрансферазы GST-MORN (1–128 а.о.), GST-Linker (128–214 а.о.), GST-SET (214–335 а.о.) (Рис.2 А), а также нативного GST белка в качестве отрицательного контроля с очищенным 6xHis-Sam68 в течение 2 часов. Было обнаружено, что связывание полноразмерной формы Sam68 происходит как с полноразмерной формой Set7/9 (Рис. 2 Б — дорожка 2), так и с изолированным MORN-доменом изучаемой метилтрансферазы (Рис. 2 Б — дорожка 3). Взаимодействия полноразмерной формы Sam68 с контрольным нативным GST белком, а также с каталитическим SET- и Linker-доменами не было обнаружено (Рис. 2 Б — дорожки 1, 4, 5). Таким образом, полноразмерная форма белка Sam68 напрямую взаимодействует с полноразмерной формой метилтрансферазы Set7/9, а именно с ее MORN- доменом в эксперименте по связыванию *in vitro*.

2.2 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 [17]. 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. Было обнаружено, что RG домен Sam68 способен связываться с полноразмерной формой Set7/9 (Рис. 2 В — дорожка 2), в частности, с ее MORN доменом (Рис.2 Г — дорожка 3). Взаимодействия RG домена Sam68 с контрольным GST-белком и каталитическим SET-доменом метилтрансферазы не было обнаружено (Рис. 2 В — дорожка 1, Г — дорожки 1, 2).

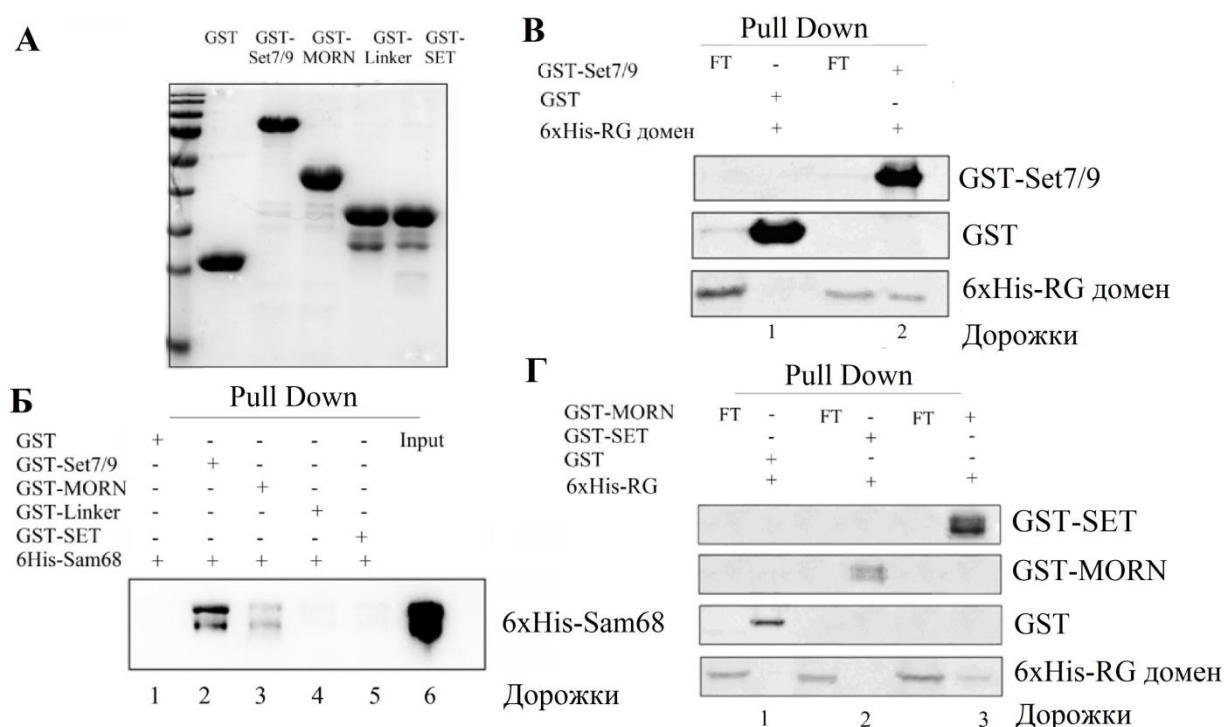


Рис.2 Полноразмерная форма Sam68 напрямую взаимодействует с Set7/9 через свои RG- и MORN-домены *in vitro*. А — Белковый электрофорез выделенных полноразмерной формы метилтрансферазы Set7/9 и ее GST-MORN, GST-SET и GST-Linker доменов, а также нативного GST-белка. Б — Проведение связывания *in vitro* 6xHis-Sam68 с GST-Set7/9, GST-MORN, GST-SET и GST-Linker доменами. GST белок использовался в качестве контроля. В — Проведение связывания *in vitro* полноразмерной формы GST-Set7/9 с выделенным 6xHis-RG доменом Sam68. Г — 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.

Таким образом, мы впервые идентифицировали домены, отвечающие за межбелковое взаимодействие метилтрансферазы Set7/9 и РНК-связывающего белка Sam68, продемонстрировав, что MORN-домен метилтрансферазы Set7/9 взаимодействует с RG-доменом Sam68. Сравнение известных в литературе белков интерактантов и

субстратов Set7/9 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 [7]. Однако, если белок напрямую взаимодействует с метилтрансферазой Set7/9, то он, в большинстве случаев, является субстратом метилирования Set7/9. По всей видимости, устойчивое взаимодействие между MORN-доменом метилтрансферазы и отдельными доменами белков-субстратов может способствовать осуществлению метилирования.

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.

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

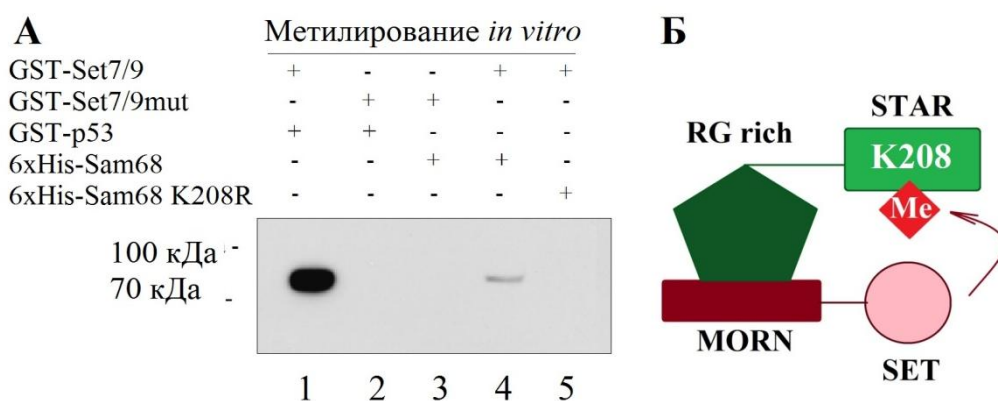
3.1 Биоинформатический поиск потенциального сайта метилирования Sam68

С целью идентификации потенциального сайта метилирования Sam68, нами были проанализированы аминокислотные последовательности 45 известных белков-субстратов метилтрансферазы Set7/9. Выровненные аминокислотные последовательности были проанализированы на наличие консенсусных мотивов с помощью программы Protein BLAST. Мы обнаружили два типа консервативных последовательностей, которые обычно метилируются Set7/9. Первый сайт метилирования представляет собой последовательность вида K/R-S/A-**K**-K/S/R (где K — сайт метилирования), 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. Обнаруженные нами сайты метилирования несколько отличаются от ранее описанного консенсусного мотива K/R-S/T/A-**K**-D/N/Q/K (где K — сайт метилирования), идентифицированного в результате сравнения аминокислотных последовательностей трех субстратов Set7/9 белков TAF10, p53 и гистона H3 [7, 8]. Идентифицированные нами последовательности были получены в результате сравнения 45 известных белков-субстратов метилтрансферазы Set7/9, и, тем самым, являются уточненными сайтами метилирования. Последовательность Типа 2, нами описана впервые.

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

3.2 Метилтрансфераза Set7/9 метилирует Sam68 в положении K208

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). Чтобы определить, действительно ли РНК-связывающий белок Sam68 является субстратом метилтрансферазы Set7/9, нами была проведена реакция метилирования *in vitro* с использованием радиоактивно-меченного донора метильных групп S-аденозилметионина. Белок GST-p53, представляющий собой известный субстрат Set7/9 [7], был использован в качестве положительного контроля. Мы обнаружили, что наряду с p53 (Рис. 3 — дорожка 1), Set7/9 метилирует РНК-связывающий белок Sam68 дикого типа (Рис. 3 — дорожка 4). В присутствии каталитически-неактивной формы GST-Set7/9 H293A, метилирования субстратов не наблюдалось (Рис. 3 — 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. 3 — дорожка 5). Таким образом, нами было доказано, что Sam68 метилируется метилтрансферазой Set7/9



по остатку лизину в положении 208 (K208).

Рис.3 Метилирование Sam68 метилтрансферазой Set7/9. А – метилирование *in vitro* с использованием радиоактивно-меченного донора метильных групп S-аденозилметионина. Б - Схематичное изображение процесса метилирования белка Sam68 метилтрансферазой Set7/9.

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

4. Особенности локализации Sam68 в клетках HEK293T и рака толстой кишки HCT116

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 [1,2]. Считается, что Sam68 является преимущественно ядерным белком, однако особенности его внутриклеточной локализации до сих пор недостаточно хорошо изучены. При иммуноцитохимическом окрашивании Sam68 преимущественно обнаруживается в ядре. Нами были описаны особенности внутриклеточной локализации эндогенного и сверхэкспрессированного Sam68 в клетках HEK293T и клетках рака толстой кишки человека HCT116. Эндогенный, как и сверхэкспрессированный Sam68 преимущественно локализуется в ядре, однако, белок также обнаруживается в цитоплазме. Особенности внутриядерной локализации Sam68 достаточно хорошо освещены в ряде работ, в то время как цитоплазматическая локализация недостаточно изучена. По этой причине обнаруженные нами цитоплазматические паттерны были охарактеризованы более подробно.

4.2 Цитоплазматический Sam68 ассоциирован с α -тубулином микротрубочек

Нами были более подробно изучены длинные протяженные структуры, формируемые GFP-Sam68 в цитоплазме клеток HEK293T (Рис. 4).

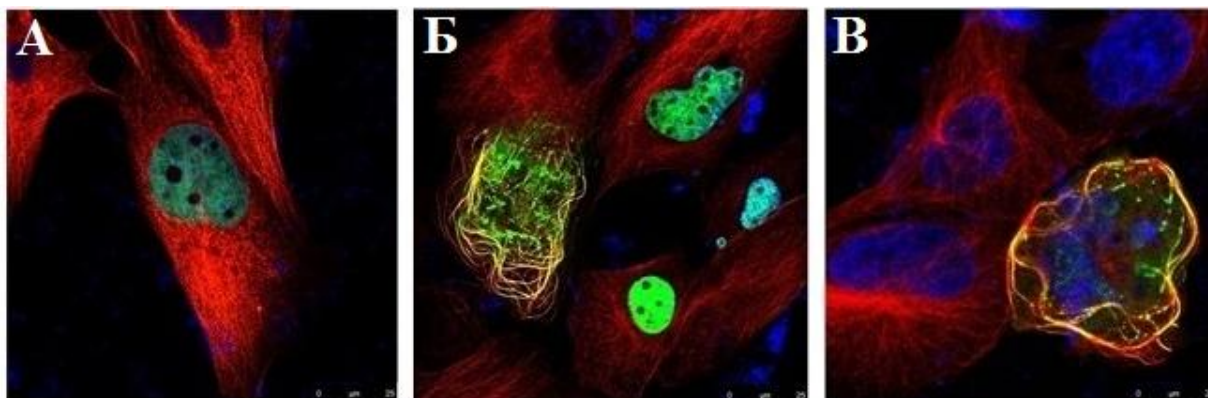


Рис.4 Sam68 ассоциирован с α -тубулином микротрубочек в HEK293T. А — Белок GFP-Sam68 при ядерной локализации не ассоциирован с α -тубулином. **Б** — GFP-Sam68 ассоциирован с α -тубулином. **В** — Sam68 ассоциирован с α -тубулином в

клетках с округленной формой и микронуклеированным ядром. DAPI — синий, GFP-Sam68 — зеленый, α -тубулин — красный.

Было обнаружено, что в случае формирования белком GFP-Sam68 протяженных линейных структур, сигнал колокализовался с α - тубулином (Рис. 4 — Б, В), в то время как в клетках с ядерной локализацией Sam68, ассоциации этого белка с микротрубочками не наблюдалось (Рис. 4 А).

4.3 Sam68 ассоциирован с формированием апоптотической сети микротрубочек

Нами было показано, что Sam68 может формировать длинные протяженные структуры в цитоплазме клеток (Рис. 4). 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 [9]. Однако, в наших экспериментах проводилась сверхэкспрессия рекомбинантного GFP-Sam68 дикого типа. Окраска клеток антителами против α -тубулина, продемонстрировала, что Sam68 ассоциирует с микротрубочками. Нужно отметить, что клетки, в которых были обнаружены вышеописанные протяженные структуры GFP-Sam68, ассоциированные с α -тубулином микротрубочек, имели дефектные или микронуклеированные ядра (Рис. 4 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. Апоптотическая сеть микротрубочек 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. 5). Мы обнаружили, что в клетках с преимущественной локализацией Sam68 в ядре, митохондрии выглядят обычным образом (Рис.5 - верхний ряд), в то время как в клетках, в которых Sam68 ассоциирован с микротрубочками, сигнал от митохондрий не детектировался, что является свидетельством клеточной гибели (Рис. 5 – нижний ряд).

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

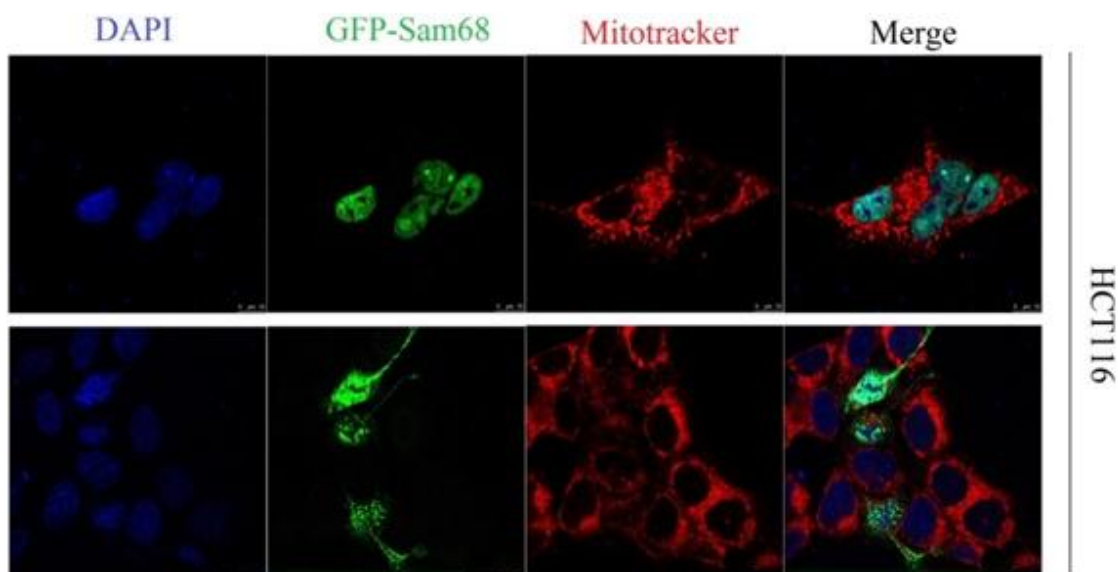


Рис.5. Окраска клеток HCT116 с сверхэкспрессией GFP-Sam68 набором реагентов MitoTracker™ Red CMXRos. DAPI — синий, GFP-Sam68 — зеленый, MitoTracker™ Red CMXRos — красный. Окраска антителами: Sam68 (1:500, Abcam ab109197, США).

потенциала митохондрий совпадает с открытием митохондриальной поры, приводящим к высвобождению цитохрома С в цитозоль, что, в свою очередь, вызывает последующие события в апоптозном каскаде. Оказалось, что в тех клетках, где Sam68 имел цитоплазматическую локализацию и был ассоциирован с тубулином, митохондриальный сигнал после окраски TMRE отсутствовал (Рис. 6). Это наблюдение позволило подтвердить тот факт, что Sam68 в процессе клеточной гибели способен ассоциировать с микротрубочками в процессе формирования апоптотической сети микротрубочек.

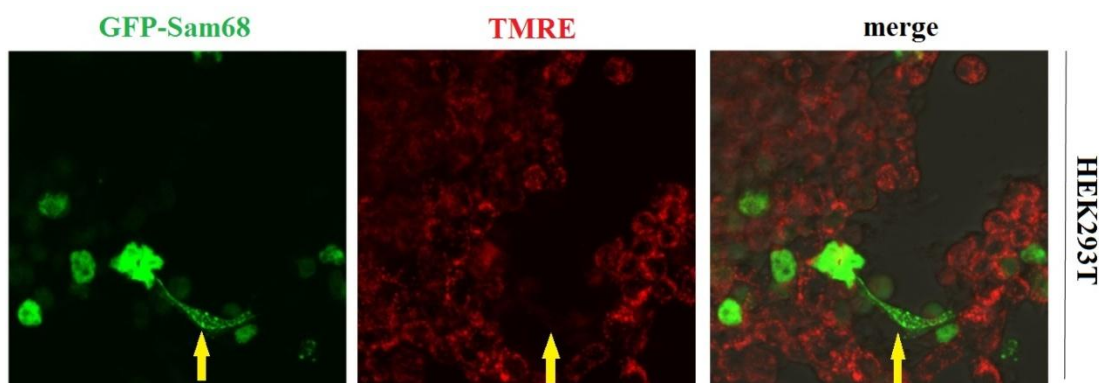


Рис.6 Окраска клеток HEK293T со сверхэкспрессией GFP-Sam68 набором реактивов для детекции апоптоза TMRE. GFP-Sam68 — зеленый, TMRE — красный

5. Роль Set7/9 в регуляции РНК-связывающего белка Sam68

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 HEK293T и HCT116 с нокаутом Set7/9 [10,11]. Вестерн-блот анализ показал, что в клетках HEK293T при нокауте Set7/9 белковый уровень Sam68 оказался существенно снижен со 100.0% до 65.8% (N=3, $p=0.014$) (Рис. 7 А). Однако, в клетках рака толстой кишки HCT116 с нокаутом Set7/9 белковый уровень Sam68 снижался всего на 10.4% по сравнению с контролем (N=3, $p=0.013$) (Рис. 7 В). Нужно отметить, что отсутствие Set7/9 в клетках HEK293T и HCT116 не приводило к снижению Sam68 на уровне РНК (Рис. 7 Б, Г), что косвенно свидетельствует о том, что Set7/9 регулирует уровень экспрессии Sam68 на пост-транскрипционном уровне.

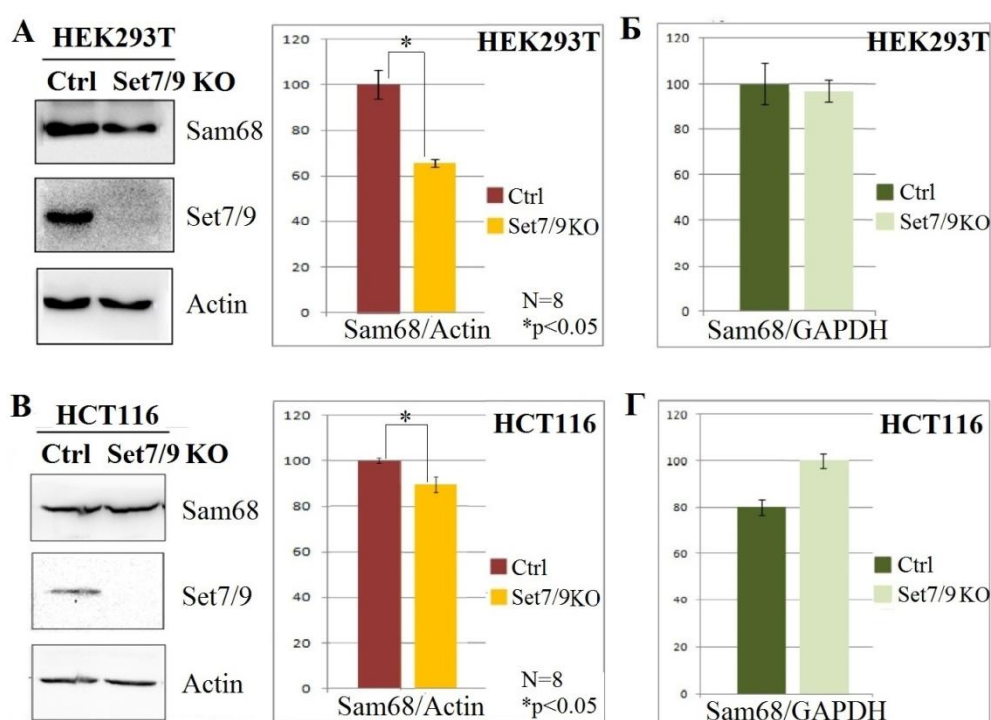


Рис.7 Влияние Set7/9 на экспрессию Sam68 на уровне белка и РНК.
А — Нокаут Set7/9 приводит к снижению белкового уровня Sam68 в клетках HEK293T. **Б** — Нокаут Set7/9 приводит к снижению белкового уровня Sam68 в клетках HCT116. **В, Г** — Нокаут Set7/9 не приводит к снижению Sam68 на уровне РНК в клетках HEK293T и HCT116.

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

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 опухоленности и наличием отдаленных метастаз у пациентов [1]. 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]. Как было показано выше, нокаут Set7/9 приводит к статистически значимому снижению белкового уровня Sam68 в клетках HEK293T и HCT116. 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 клеточных линий HEK293T и HCT116, а также линий HEK293T и HCT116 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 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. 8 А) и HCT116 (Рис. 8 Б), в то время как в ядерной фракции значительного изменения белкового уровня Sam68 обнаружено не было (Рис. 8 А, Б). 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.8 А). 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. 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 обнаруживался в лизомах [12]. Таким образом, снижение уровня белка Sam68 в цитоплазме может быть связано с перелокализацией белка из цитоплазмы в ядро в клетках с нокаутом Set7/9.

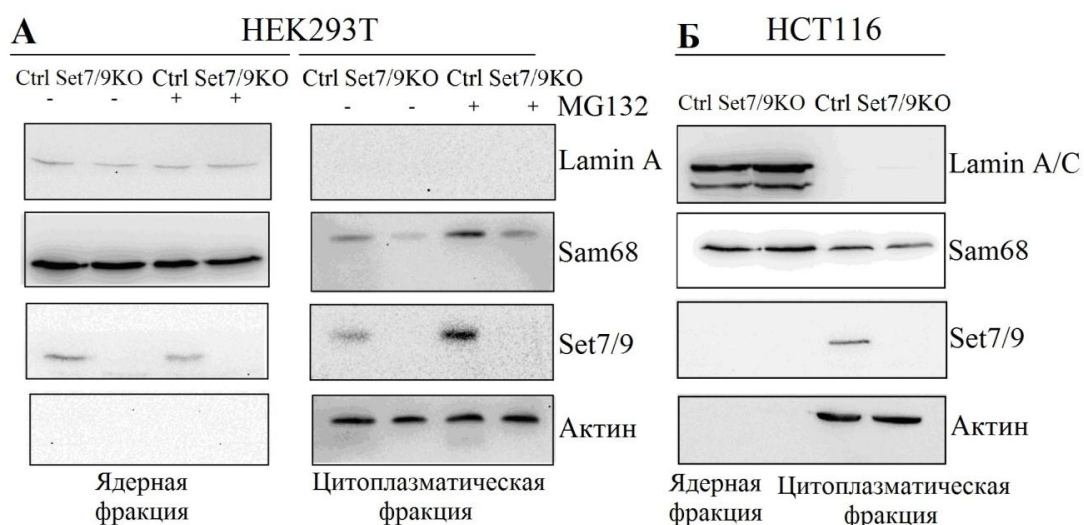


Рис. 8 Белковый уровень Sam68 в ядерной и цитоплазматической фракциях. А — В клетках HEK293Т и HEK293Т с нокаутом Set7/9 до и после добавления MG132. **Б** - В клетках HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9

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

Sam68 является ключевым регулятором сплайсинга Bcl-x [13]. 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. 9 А).

Для изучения влияния Set7/9 на Sam68-опосредованный сплайсинг Bcl-x клетки HEK293Т были трансфицированы векторами, кодирующими полноразмерные белки Sam68 и Set7/9. Вектор pIRES использовался в качестве контрольного вектора (Рис.9 Б).

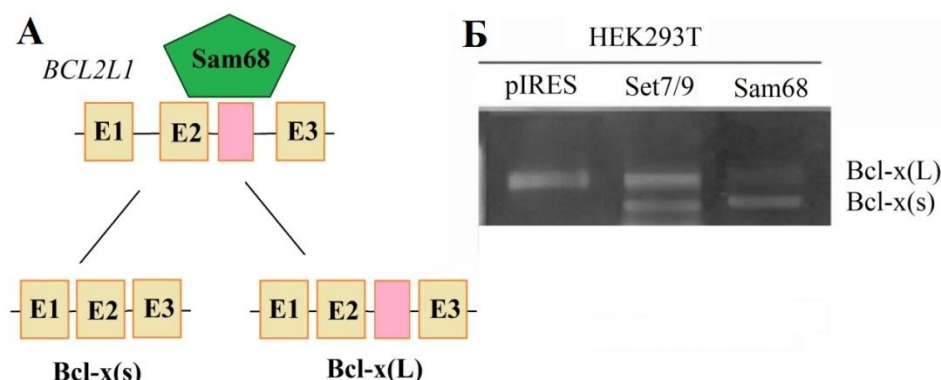


Рис.9 Set7/9 оказывает влияние на сплайсинг Bcl-x **А** — Схематичное изображение роли Sam68 в образовании длинной Bcl-x(L) и короткой Bcl-x(s) изоформ при сплайсинге Bcl-x. **Б** — Влияние Sam68 и Set7/9 на сплайсинг Bcl-x.

Методом полимеразной цепной реакции было показано, что сверхэкспрессия Sam68 в клетках HEK293Т действительно приводит к продукции про-апоптотической короткой Bcl-x(s) изоформы (Рис. 9 Б). Отметим, что сверхэкспрессия Set7/9 также приводит к увеличению продукции короткой про-апоптотической изоформы Bcl-x(s) (Рис. 9 Б). Кроме того, мы сверхэкспрессировали полноразмерный белок Sam68 в клетках HEK293Т с нокаутом Set7/9 (Рис. 10 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. 10 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. 10 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. 10 Б.). Такой эффект может быть

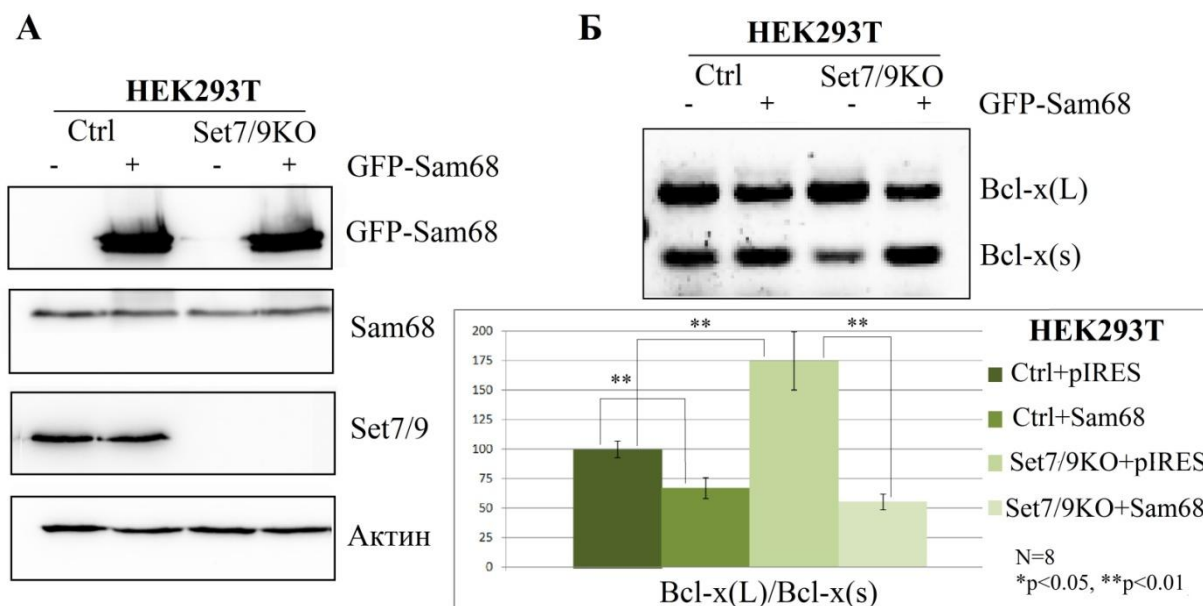


Рис.10 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованном сплайсинге Bcl-x. А — сверхэкспрессия Sam68 в клетках HEK293T и HEK293T с нокаутом Set7/9. Б — Влияние Set7/9 и Sam68 на сплайсинг Bcl-x.

связан с тем, что нокаут Set7/9 приводит к снижению белкового уровня Sam68 на 34.2% в клетках HEK293T (см. главу 5.1), что влечет за собой увеличенную продукцию длинной анти-апоптотической изоформы Bcl-x(L). Учитывая тот факт, что при нокауте Set7/9 сверхэкспрессия Sam68 не приводила к изменению сплайсинга Bcl-x по сравнению с контролем (Рис. 10 Б.), можно предположить, что сильная сверхэкспрессия Sam68 может компенсировать эффект снижения Sam68 в отсутствие Set7/9 в HEK293T. Таким образом, в данном исследовании Set7/9 выступает в качестве нового регулятора Sam68-опосредованного сплайсинга Bcl-x.

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

Из литературных источников известно, что белок Sam68 является репрессором транскрипции генов *CCND1* и *CCNE1*, кодирующих циклины D1 и E [14]. 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 HEK293T 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

Е на 25,4% (N=3, $p=0.023$) в клетках HEK293T с нокаутом Set7/9 (Рис.11 А). Интересно, что в клетках HEK293T с нокаутом Set7/9 сверхэкспрессия Sam68 приводит не к репрессии циклинов D1 и Е, а к увеличению их экспрессии на уровне РНК (Рис. 11 А). По всей видимости, метилтрансфераза Set7/9 необходима для Sam68-опосредованной регуляции репрессии циклинов D1 и Е на уровне транскрипции. Интересно, 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. 11 Б). По всей видимости, существуют дополнительные механизмы регуляции экспрессии циклинов на белковом уровне в клетках HEK293T.

В раковых клетках HCT116 сверхэкспрессия Sam68 не приводила к репрессии циклинов D1 и Е на транскрипционном уровне (Рис.12 А), однако, наблюдалось снижение экспрессии циклина D1 на уровне белка (Рис. 12 Б). Под действием генотоксического стресса, индуцируемого добавлением 0,1 мкМ доксорубина в течение 8 часов, в клетках HCT116 наблюдалась репрессия транскрипции циклинов D1 и Е 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 Е на 33,2% (N=3, $p=0.051$) на уровне РНК (Рис.12 А). Повышение экспрессии циклинов D1 и Е

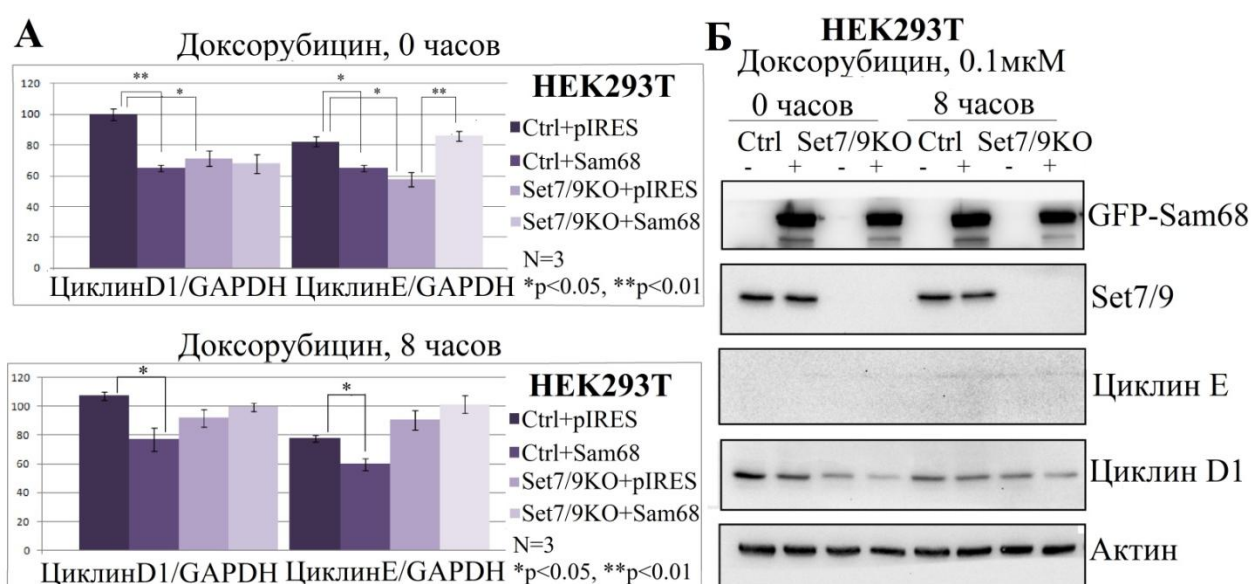


Рис.11 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и Е в клетках HEK293T и HEK293T с нокаутом Set7/9 до и после обработки 0,1 мкМ доксорубином. А — На уровне РНК методом ПЦР в реальном времени. Б — На белковом уровне методом вестерн-блот анализа.

в отсутствие Set7/9 также наблюдалось на белковом уровне (Рис.12 Б). Однако, снижения уровня экспрессии циклинов Е и D1 на уровне РНК в клетках с нокаутом Set7/9 при сверхэкспрессии Sam68 не было обнаружено.

Можно заключить, что в отсутствие Set7/9 в клетках HEK293T и HCT116 сверхэкспрессия Sam68 не вызывает снижение уровня экспрессии циклинов D1 и E на транскрипционном уровне до и после обработки доксорубицином (Рис. 11 А, 12 А), что говорит о роли Set7/9 в Sam68-опосредованной транскрипционной репрессии циклинов E и D1.

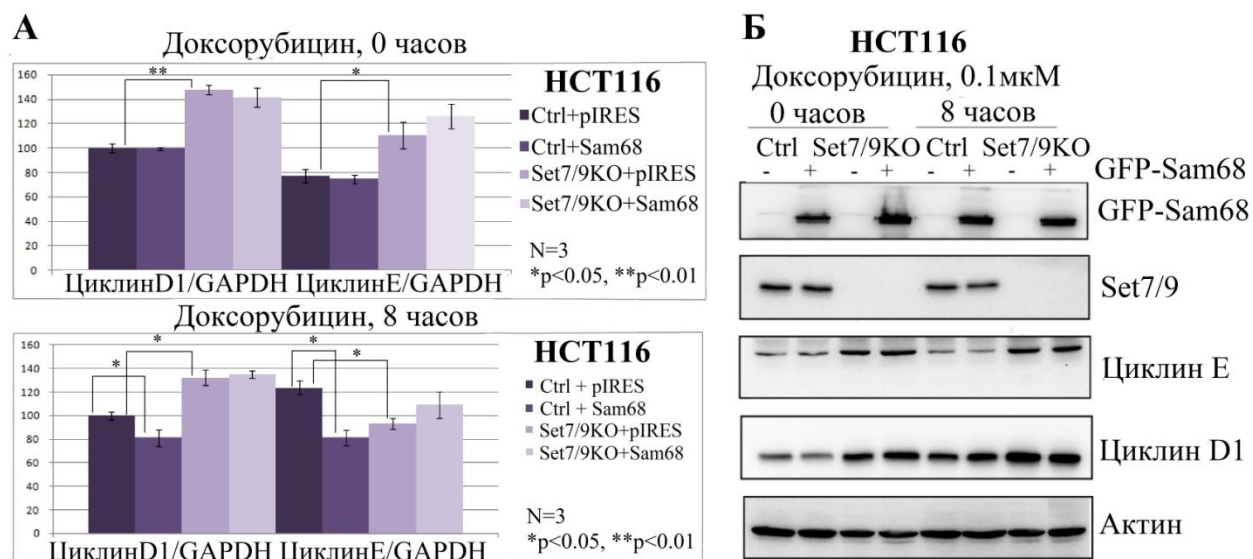


Рис.12 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованной репрессии циклинов D1 и E в клетках HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9 до и после обработки 0.1мкМ доксорубицином. А — на уровне РНК методом ПЦР в реальном времени. Б — на белковом уровне методом вестерн-блот анализа.

5.6 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 [15]. 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. 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. 13 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 (Рис. 13 Б). Снижение белкового уровня циклина D1 при сверхэкспрессии Sam68 говорит о том, что Sam68 может оказывать влияние на уровень циклинов на пост-транскрипционном уровне. Однако, в отсутствие Set7/9 белок Sam68 не приводит к укорочению G2-M фазы клеточного цикла. Это объясняется 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 (Рис.12 А, Б).

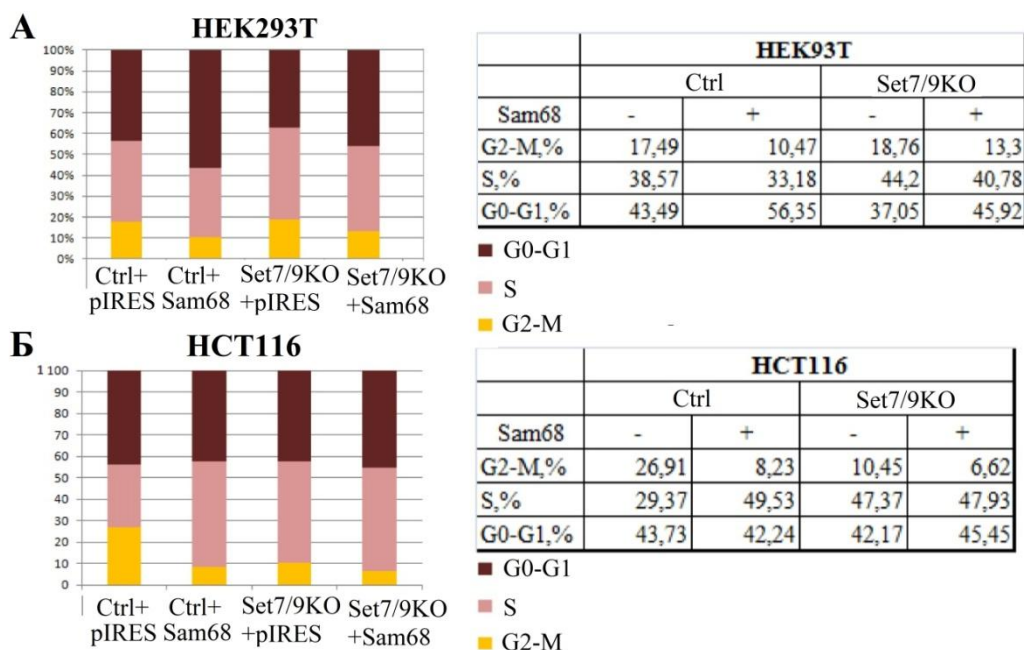


Рис.13 Роль Set7/9 в Sam68-опосредованной регуляции клеточного цикла
А — в клетках HEK293T и HEK93T с нокаутом Set7/9. **Б** — в клетках рака толстой кишки HCT116 и HCT116 с нокаутом Set7/9.

5.7 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. 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]. Для проведения биоинформатического анализа нами был использован ресурс DRUGSURV — база данных, содержащая информацию о выживаемости пациентов, больных онкологическими заболеваниями [16]. 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 ($p=0.677$) (Рис. 14 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. 14 Б), вторая группа являлась контрольной (N=337). Третья группа пациентов имела низкий уровень экспрессии Set7/9 и высокий уровень экспрессии Sam68 (N=133) (Рис. 14 В), четвертая группа пациентов также была контрольной (N=326).

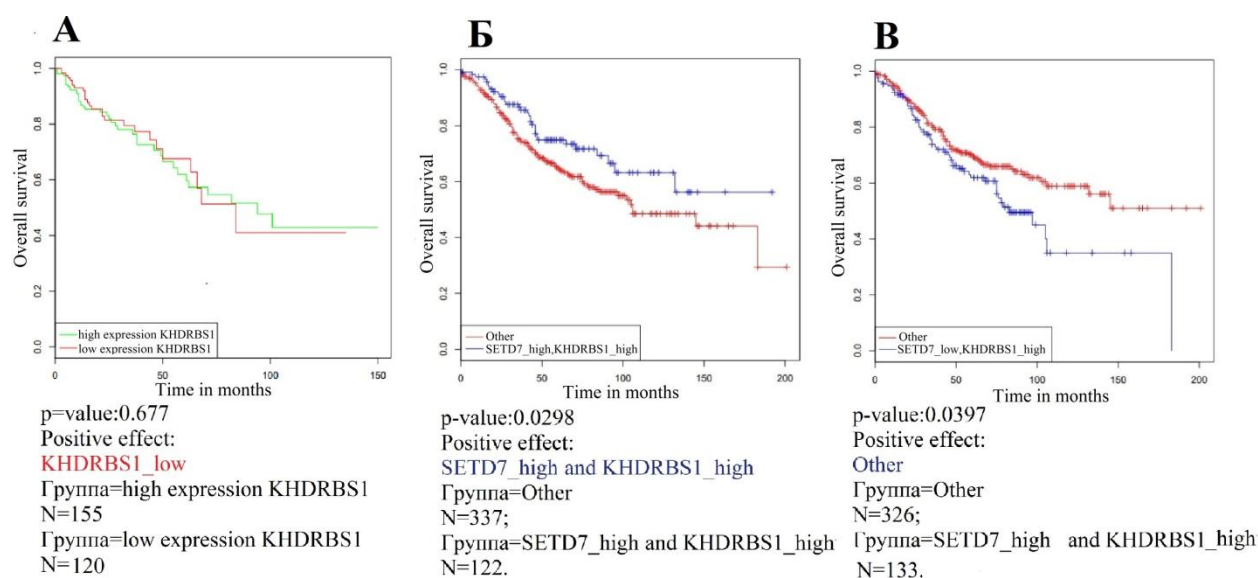


Рис. 14 Кривые выживаемости пациентов с раком толстой кишки в зависимости от уровней экспрессии белков Sam68 и Set7/9 А — высокий и низкий уровни экспрессии Sam68. Б — высокие уровни экспрессии Sam68 и Set7/9. В — высокий уровень экспрессии Sam68 и низкий уровень экспрессии Set7/9.

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, $p=0.0397$). Это может быть объясняться 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 выживаемости пациентов. Вероятно, ключевую роль в лучшей выживаемости пациентов с цитоплазматической локализацией Sam68 играет пока еще плохо изученная цитоплазматическая функция этого белка. 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 HEK293T и клеток рака толстой кишки HCT116. 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 HEK293T на 34,3% (N=3, p=0.014) и в клетках HCT116 на 10,4% по сравнению с контролем (N=3, p=0.013). Отсутствие Set7/9 приводит к снижению белкового уровня Sam68 в цитоплазме клеток HEK293T и HCT116. 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 HEK293T и HCT116 приводит к существенному укорочению G2-M фазы клеточного цикла, в то время как в отсутствие Set7/9 в раковых клетках HCT116 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 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. Feb 16;36(7):922-932. DOI: 10.1038/onc.2016.258. (IF 8.459)
3. **Vasileva E.**, Shuvalov O., Garabadiu A., Melino G., Barlev N. Genome Editing Tools For Stem Cell Biology// Cell Death Dis. 2015. 6, 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. 57 (1) : 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.

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. 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.
3. 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.
4. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell.* – 2007. – Т. 128, № 4. – С. 693-705.
5. 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. – Т. 8, № 6. – С. 1207-17.
6. Rizzo D., Trievel R. C., Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases. // *Epigenetics.* – 2011. – Т. 6, № 9. – С. 1059-1067.
7. 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. – Т. 432, № 7015. – С. 353-60.
8. 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. – Т. 13, № 2. – С. 140-6.
9. 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. – Т. 10, № 9. – С. 3015-33.
10. Vasileva E., Shuvalov O., Garabadgiu A., Melino G., Barlev N. Genome Editing Tools For Stem Cell Biology // *Cell Death Dis.* – 2015. – Т. 6, №7. -: e1831
11. 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.
12. 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. – Т. 10, № 9.– С. 3015-33.
13. 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. – Т. 176, № 7. – С. 929-39.
14. 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. – Т. 25, № 36. – С. 4955-64.
15. 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.
16. 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.
17. Шувалов О.Ю. Лизин специфические ферменты, MDM2 и SET7/9, в регуляции клеточного ответа на генотоксический и метаболический стресс // - С.1-128.