

На правах рукописи



**Шувалов
Олег Юрьевич**

**ЛИЗИН СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, MDM2 И SET7/9,
В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА
ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТРЕСС**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2016

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

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

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

доктор биологических наук **Галкин Алексей Петрович**, руководитель лаборатории генетического моделирования болезней человека Санкт-Петербургского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

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

Защита диссертации состоится “24” июня 2016 г. в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д.4.

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

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

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

Автореферат разослан “___” _____ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Белок p53 является основным онкосупрессором человека. Нормальное функционирование p53-опосредуемых сигнальных путей несовместимо с жизнедеятельностью раковых клеток. Одним из позитивных регуляторов p53 является метилтрансфераза SET7/9, повышающая его транскрипционную активность (Chuikov et al. 2004). Помимо регуляции p53 SET7/9 играет важную роль при генотоксическом стрессе, модулируя пролиферативную активность транскрипционного фактора E2F1 (Lezina et al. 2014). Таким образом, SET7/9 обладает как про-, так и антипролиферативными свойствами.

Протоонкоген MDM2 является главным негативным регулятором важнейшего онкосупрессора человека — белка p53 (Xu et al. 2003). MDM2 является p53-специфичной E3 убиквитин-лигазой, которая, убиквитинилируя p53, маркирует данный онкосупрессор для последующей его деградации в протеасоме (Fuchs, 1998). Данный биохимический процесс, предотвращающий p53-зависимую гибель нормальных клеток, часто служит раковым клеткам для защиты от p53-опосредованной регуляции (Jones et al. 1995). Ген, кодирующий MDM2, амплифицирован более чем в 19 типах раковых опухолей, что приводит к гиперэкспрессии соответствующего белка. На сегодняшний день убедительно показана клиническая роль MDM2 в онкогенезе (Товар et al. 2006), целый ряд ингибиторов MDM2-p53 взаимодействия проходят различные стадии клинических испытаний (Vassilev et al. 2004).

Помимо p53 MDM2 взаимодействует по меньшей мере с 200 различными белками (<http://thebiogrid.org>), являясь своеобразной точкой конвергенции различных сигнальных путей онкогенеза. Однако, помимо p53-зависимых и p53-независимых онкогенных функций, MDM2 обладает так же и онкосупрессорными свойствами (Manfredi, 2010). Например, MDM2 является негативным регулятором каталитической субъединицы фермента теломеразы (Zhao et al. 2005), препятствуя теломер-ассоциированному старению клеток, а так же транскрипционных факторов Snail (Lim et al., 2010) и Slug (Wang et al., 2009), ассоциированных с эпителиально-мезенхимальной транзицией и переходом к метастазированию. Кроме того, временная гиперэкспрессия MDM2 приводит к остановке клеточного цикла при переходе из G1 в S фазу (Frum et al. 2014).

По-видимому, противоречивость в понимании функциональной значимости MDM2

привносит также наличие целого ряда сплайс-изоформ MDM2, обнаруживаемых исключительно в раковых клетках и негативно регулирующих основную изоформу. В отличие от амплификации гена MDM2, наблюдаемой в среднем в 7% опухолей, сплайс-изоформы MDM2 обнаружены в самых различных типах рака с частотой встречаемости от 30 до 90% (Окого et al. 2012). При этом наличие сплайс-изоформ MDM2, как правило, ассоциируется с поздними стадиями развития опухолей (III и IV стадии), низкой степенью их дифференцировки и неблагоприятным прогнозом для пациентов (Rosso et al. 2014). Основными, помимо полноразмерного белка MDM2, являются изоформы MDM2-A, -B и -C. По большей части онкогенные свойства этих сплайс-изоформ MDM2 остаются неизученными.

В рамках данной работы впервые описано взаимодействие MDM2 и SET7/9 в структурно-функциональном контексте. Показано влияние MDM2 и SET7/9 на восприимчивость раковых клеток к действию ряда химиотерапевтических препаратов. С использованием протеомного подхода идентифицирован ряд интерактантов SET7/9 и сплайс-изоформ MDM2, принимающих участие в различных клеточных процессах, а также продемонстрирована потенциальная вовлечённость MDM2 и SET7/9 в контроль одноуглеродного метаболизма за счет влияния на экспрессию ряда ключевых ферментов цикла превращений фолата. Выявлено, что, в отличие от основной изоформы MDM2, экспрессия сплайс-изоформ не оказывает никакого влияния на восприимчивость раковых клеток к химиотерапевтическим препаратам.

Учитывая растущий интерес исследователей к созданию ингибиторов MDM2 как к потенциальным противоопухолевым препаратам, необходимо как можно глубже понимать функциональную роль и молекулярные механизмы участия в онкогенезе как полноразмерного белка MDM2, так и его основных сплайс изоформ. Дальнейшее изучение структурно-функциональной роли E3 убиквитин-лигазы MDM2 в модуляции устойчивости раковых клеток к важнейшим химиотерапевтическим препаратам, а так же в контроле одноуглеродного метаболизма и путей биосинтеза нуклеотидов, имеет важное практическое значение для разработки сочетанной терапии.

Цели и задачи исследования

Цель:

Целью данной работы является изучение функциональной роли E3 убиквитин-лигазы MDM2 и метилтрансферазы SET7/9 при генотоксическом и метаболическом стрессе.

Задачи:

1. Оценить взаимовлияние регуляторов p53 - метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2 на экспрессию друг друга как на транскрипционном, так и на белковом уровнях;
2. Оценить влияние экспрессии метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2, а так же её сплайс-изоформ, на восприимчивость раковых клеток к химиотерапевтическим препаратам, вызывающим генотоксический и метаболический стресс;
3. Идентифицировать спектр белков, ассоциированных как с E3 убиквитин-лигазой MDM2, так и метилтрансферазой SET7/9, используя протеомный подход;
4. Оценить влияние MDM2 и SET7/9 на экспрессию общих белков-интерактантов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В клетках существует петля отрицательной обратной связи метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2;
2. Экспрессия основной изоформы MDM2, в отличие от сплайс-изоформ, повышает устойчивость клеток к генотоксическому химиопрепарату доксорубину, в то же время повышает восприимчивость к другому генотоксическому препарату – цисплатину, а так же ингибитору одноуглеродного метаболизма – метатрексату;
3. Идентифицирован целый ряд интерактантов метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2, а так же её сплайс-изоформ. Многие из них играют важное значение в онкогенезе и указывают на вовлечённость MDM2 и SET7/9 в различные клеточные процессы, в том числе в контроль одноуглеродного метаболизма;
4. MDM2 и SET7/9 вовлечены в контроль одноуглеродного метаболизма за счет влияния на экспрессию серингидроксиметилтрансферазы SHMT2 и метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFD2 - ключевых ферментов цикла превращений фолата.

Научная новизна работы

В данной работе впервые показано существование в клетках потенциальной петли отрицательной обратной связи метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2. Так же продемонстрировано, что, в отличие от полноразмерной изоформы MDM2, экспрессия её основных сплайс-изоформ не модулирует устойчивость раковых клеток к важнейшим химиотерапевтическим препаратам. Идентифицирован целый ряд не известных ранее интерактантов метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2, а так же её основных сплайс-изоформ, участвующих в транскрипции, трансляции, процессинге РНК, метаболизме, образовании межклеточных контактов и играющих важную роль в онкогенезе. Кроме того, продемонстрирована потенциальная вовлечённость SET7/9 и MDM2 в контроль одноуглеродного метаболизма за счёт влияния на экспрессию ключевых ферментов цикла превращений фолата – серингидроксиметилтрансферазы SHMT2 и метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFD2. Показано, что MDM2 является E3 убиквитин-лигазой для серингидроксиметилтрансферазы SHMT2, приводя к её убиквитинилированию и последующей деградации.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты данной работы вносят значительный вклад в фундаментальное понимание механизмов MDM2-опосредованного онкогенеза. Исследование структурно-функциональной роли каждого конкретного, описанного в данной работе, взаимодействия MDM2 и SET7/9 с идентифицированными интерактантами представляет значительный интерес для понимания их роли в процессах злокачественного клеточного роста. Кроме того, данные о MDM2-опосредованной негативной регуляции SHMT2 актуальны в практическом плане в контексте разработки и применения ингибиторов MDM2 и одноуглеродного метаболизма при разработке принципов сочетанной терапии.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых международных и отечественных научных журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ, а так же 8 тезисов докладов на международных и отечественных конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертация содержит следующие разделы: введение; 4 главы - обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение; основные выводы и список цитируемой литературы, содержащий 164 наименования. Материалы диссертации изложены на 128 страницах машинописного текста и иллюстрированы 16 таблицами и 31 рисунком. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 14-50-00068 и 14-15-00816).

Личный вклад автора

Автор активно участвовал в определении направлений и постановках задач исследований, выборе и обосновании методик экспериментов, анализе полученных результатов и формулировании выводов. Все основные эксперименты были выполнены автором лично, отдельные эксперименты – с его участием. Масс-спектрометрический анализ выполнен А. Ботрилом (Университет Лестера, Англия). Полученные результаты обсуждались и публиковались совместно с научным руководителем и соавторами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток. В работе использовались следующие культуры клеток человека: HEK293T (эмбриональные клетки почки), U2OS (остеосаркома, p53⁺), MCF7 (карцинома молочной железы, p53⁺), H1299 (лёгочная карцинома, p53⁻), а так же клетки U2OS(SET7/9KD), индуцибельно экспрессирующие малые шпилечные РНК (shРНК) против SET7/9 и U2OS(KHD), индуцибельно экспрессирующие неспецифические shРНК.

Культивирование клеточных линий. Клетки линий HEK293T, H1299, U2OS, U2OS(SET7/9KD) и U2OS(KHD) культивировались в среде, содержащей DMEM, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 mM глутамина, 50 ME/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Gibco). Клетки линии MCF7 культивировались в аналогичных условиях с добавлением 10 мкг/мл инсулина (Акропид®).

Трансфекция клеток. Для трансфекции клеточной линии HEK293T использовался реагент TurboFect (ThermoScientific, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Для трансфекции клеток H1299 использовался Lipofectamin 2000® (Invitrogen, USA).

Получение клеток с нокдауном SET7/9. Клетки U2OS(KHD) и U2OS(KDSET7/9) являются стабильно трансфицированными векторами pSuperior и pSuperior-shRNA-SET7/9, соответственно. Данные вектора представляют тетрациклин-зависимую систему индуцибельной экспрессией соответствующих shРНК. Для индукции нокдауна в клетках U2OS(KDSET7/9) и U2OS(KHD) в культуральную среду добавляли доксициклин (стабильный аналог тетрациклина) до концентрации 5 мкг/мл. Спустя 72ч клетки лизировались и эффективность нокдауна оценивалась путём вестерн-блоттинга.

Обработка клеток химиотерапевтическими препаратами. Конфлуентность клеток перед началом обработки составляла не более 30%. На каждую пробу использовались 4 биологические повторности. С целью индукции генотоксического стресса в культуральную среду добавлялись доксорубин (Sigma-Aldrich, США) и цисплатин (Эбеве, Австрия) до концентрации 0,5 мкМ и 33 мкМ, соответственно. Ингибитор одноуглеродного метаболизма метатрексат (Эбеве, Австрия) добавлялся в культуральную среду до концентрации 100 мкг/мл. Выживаемость клеток оценивали спустя 24 ч.

Выделение РНК и синтез кДНК. Для выделения РНК клетки культивировались на 100мм (60см²) культуральных чашках. Выделение производилось с использованием реагента TRIZOL® (ThermoFischerScientific, USA), согласно инструкции производителя. Для синтеза кДНК использовался коммерческий набор RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischerScientific, USA).

ПЦР в режиме «реального времени». Для проведения количественной ПЦР использовался EvaGreen®. Температуры плавления праймеров были оценены с использованием программы Oligo7®, а так же подобраны экспериментально.

Клонирование ДНК-последовательностей основной, а так же сплайс-изоформ MDM2. ДНК-последовательность, кодирующая основную изоформу MDM2, была получена с использованием кДНК линии U2OS. С целью амплификации последовательностей изоформ (MDM2-A, -B, -C и -D) был применен ПЦР-метод «сплайсинг путем амплификации перекрывающихся концов» (Ho et al. 1988).

Создание векторных конструкций, несущих делеционные варианты SET7/9, SHMT2 и MDM2. ДНК-последовательности, кодирующие полноразмерные белки SHMT2 и SET7/9, были получены путем амплификации с кДНК линии U2OS. Затем, на основе полученных амплификатов, были созданы 3 делеционных варианта, соответствующих отдельным доменам SHMT2 (1-133 а.к., 133-323 а.к. и 323-504 а.к.), а так же 3 делеционных варианта, соответствующих доменам SET7/9 (1-128 а.к., 128-214 а.к. и 214-366 а.к.). Помимо этого, были созданы 4 делеционных мутанта MDM2 (1-491, 1-332, 1-102, 61-491). Все последовательности, кодирующие полноразмерные белки и их делеционные мутанты, были клонированы в вектора для про- и эукариотической экспрессии (pGEX-5X-1 и PIREShr-1a, соответственно).

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков. Вектора, кодирующие GST-варианты MDM2 и SET7/9, а так же нативный GST (контроль), были экспрессированы в бактериальной системе на основе *E. coli*, продуцирующем штамме *BL21(de3)pLysSGold*. Индукция проводилась в течение 6 часов при концентрации IPTG 0,4 мМ. Очистка рекомбинантных белков проводилась с использованием 4G глутатион-сефарозы.

Метод GST-pulldown. Очищенные рекомбинантные белки были проинкубированы в течение 3ч с клеточными экстрактами, полученными из клеточных линий человека U2OS и HEK293T без и после обработки генотоксическим агентом доксорубицином (1 мкМ, 6ч). Связавшиеся с GST-вариантами белки были элюированы нагреванием в денатурирующих условиях, после чего разделены в ПААГ.

Масс-спектрометрия. Вырезанные куски геля, содержащие белки, подвергались трипсинолизу. Масс-спектрометрии (MS) предшествовала жидкостная хроматография (LC)

на обращенно-фазовой колонке (Dionex, Великобритания), с последующим элюированием на обращенно-фазовой колонке Waters Symmetry C18 100E (Waters, Великобритания). Анализ полученных фракций проводился с помощью масс-спектрометра 4000 Q-Trap (Applied Biosystems, Великобритания). В результате получался спектр ионов, который обрабатывался с использованием поисковой программы MASCOT49 и базы данных UniProtKB/Swiss-Prot50. Рассматривались белки, для которых было обнаружено 2 и более пептидов с $p < 0.05$.

Ко-иммуннопреципитация. Спустя 24 ч клетки HEK293T, трансфицированные векторами, несущими варианты SHMT2 в слиянии с 3xFlag-эпитопом, были лизированы. Ко-иммуннопреципитация проводилась с использованием Flag-агарозы (Sigma) по стандартной методике (Sahr et al. 2013).

Убиквитинилирование *in vivo*. Убиквитинилирование проводилось по стандартной методике. Клетки линии HEK293T были ко-трансфицированы смесью векторов, кодирующих MDM2, SHMT2 и 6xHis. Спустя сутки добавлялся ингибитор протеасомной деградации MG132 до концентрации 5 мкМ. Через 16 ч клетки лизировались и полученный из них экстракт инкубировался с 6His-агарозой. Связавшиеся белки были элюированы нагреванием и анализировались с использованием иммуноблоттинга.

Оценка выживаемости клеток после обработки химиотерапевтическими препаратами. Для оценки доли живых клеток после обработки химиотерапевтическими препаратами использовался проточный цитометр Muse® Cell Analyzer (Millipore) и набор для подсчета клеток и определения их жизнеспособности Muse™ Count & Viability Kit (Millipore).

Разделение белков в ПААГ и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводился в ПААГ по стандартному методу Лэммли. С целью иммуноблоттинга разделённые в ПААГ белки переносились на ПВДФ мембрану и анализировались с использованием специфических антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. SET7/9 и MDM2 образуют петлю отрицательной обратной связи

1.1 Нокдаун SET7/9 повышает экспрессию MDM2 при генотоксическом стрессе

Проведена оценка уровня экспрессии MDM2 в клетках с нокдауном SET7/9 и контрольных клетках методом ПЦР в РВ после обработки доксорубицином в течении 8 и 16 часов. Для этого была использована ранее полученная в лаборатории клеточная линия U2OS (остеосаркома человека), индуцибельно экспрессирующая малые шпилечные РНК (shРНК) против SET7/9 (линия U2OS(SET7/9НД) - нокдаун SET7/9). Контрольной линией послужили клетки U2OS, индуцибельно экспрессирующие неспецифические shРНК (линия U2OS(КНД)).

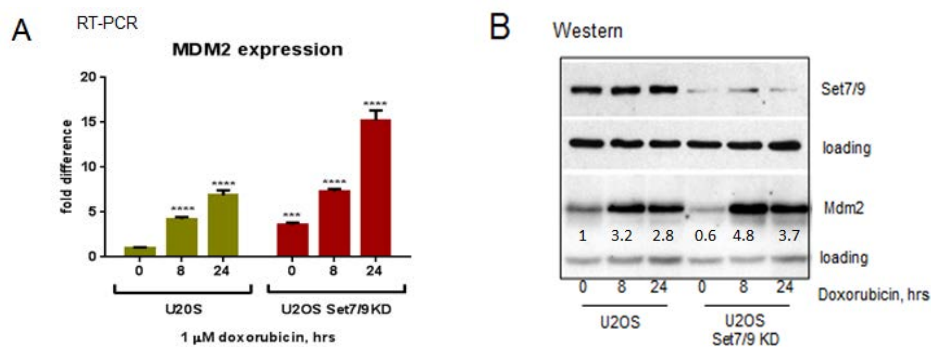


Рис. 1. SET7/9 регулирует уровень экспрессии MDM2 при генотоксическом стрессе

А. Анализ экспрессии MDM2 методом ПЦР в РВ в клетках U2OS(SET7/9НД) и U2OS(КНД) при обработке доксорубицином. **В.** Иммуноблоттинг экспрессии SET7/9 и MDM2 в клетках U2OS(SET7/9НД) и U2OS(КНД) при обработке доксорубицином.

**** Уровень достоверности $P < 0.0001$

Согласно полученным результатам (Рис. 1А), уровень экспрессии MDM2 был достоверно выше в клетках U2OS(SET7/9НД), то есть при пониженной экспрессии SET7/9. При этом важно, что наблюдаемая разница в уровне экспрессии MDM2 подтвердилась так же на уровне белка с использованием иммуноблоттинга (Рис. 1В)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что нокдаун метилтрансферазы SET7/9 вызывает повышение экспрессии E3 убиквитин-лигазы MDM2 как на уровне транскрипции, так и на белковом уровне.

1.2 Экспрессия изоформ MDM2 по-разному влияет на восприимчивость клеток к генотоксическим агентам доксорубицину и цисплатину

С целью оценки влияния экспрессии MDM2 на устойчивость раковых клеток к генотоксическим препаратам клетки линий H1299 (карцинома лёгких, p53⁻) и HEK293T (эмбриональные клетки почки) были трансфицированы векторами, кодирующими последовательности изоформ MDM2 (FL – основная изоформа, А – изоформа А, В – изоформа В и С – изоформа С). Спустя двое суток после трансфекции инициировался генотоксический стресс добавлением в культуральную среду доксорубицина (5 мкМ) или цисплатина (33 мкМ). Через 24 часа был оценён процент живых клеток.

Результаты, отображенные на Рис. 2А, свидетельствуют о том, что экспрессия полноразмерной (основной) изоформы MDM2, в отличие от сплайс-изоформ, повышала устойчивость клеток к генотоксическому стрессу, вызванному доксорубицином. При этом экспрессия сплайс-изоформ MDM2 не вызывала какого-либо эффекта.

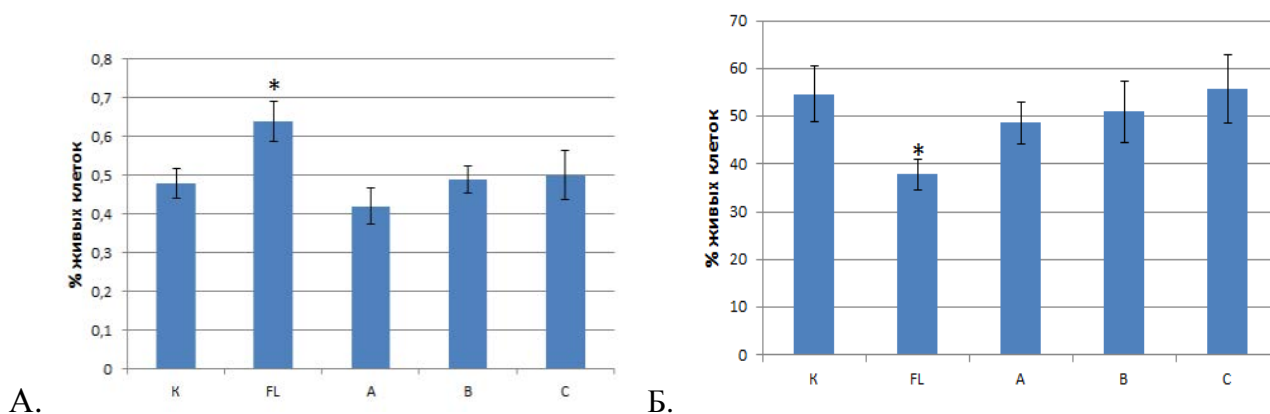


Рис. 2. Влияние сверхэкспрессии изоформ MDM2 на устойчивость клеток:

А. H1299 к доксорубицину и **Б.** HEK293T к цисплатину.

K – контроль (вектор PIRES-hr-1a), *FL* – основная изоформа MDM2, *A* – изоформа MDM2-A, *B* – изоформа MDM2-B, *C* – изоформа MDM2-C.

* Уровень достоверности $P < 0.05$

Иначе обстоит дело с устойчивостью к цисплатину. Как видно из Рис. 2Б, в отличие от обработки клеток доксорубицином, экспрессия основной изоформы MDM2 повышала восприимчивость клеток к цисплатину. При этом экспрессия сплайс-изоформ MDM2 не оказывала никакого влияния на цитотоксичность данного химиотерапевтического препарата.

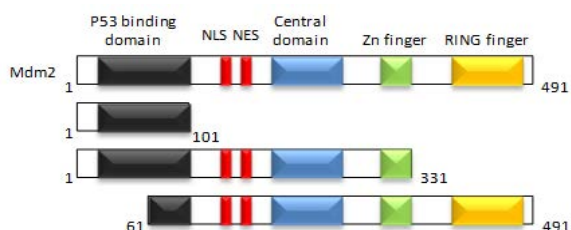
Таким образом, экспрессия основной изоформы MDM2 по-разному влияет на восприимчивость изученных клеточных линий к двум генотоксическим агентам – доксорубицину и цисплатину.

1.3 MDM2 физически взаимодействует с метилтрансферазой SET7/9, а так же контролирует уровень её экспрессии

Поскольку из литературных данных известно, что MDM2 физически взаимодействует с рядом хроматин-ассоциированных белков, было решено проверить возможность физического взаимодействия MDM2 и SET7/9. Для этого, наряду с полноразмерным MDM2 (1-491 а.к.), была создана серия делеционных мутантов MDM2 (61-491 а.к., 1-102 а.к., 1-332 а.к.), слитых с последовательностью, кодирующей глутатион-трансферазу (GST) (Рис. 3А). Далее в продуцирующем бактериальном штамме были экспрессированы рекомбинантные белки и очищены с использованием 4G глутатион-сефарозы. Затем все экспрессированные рекомбинантные белки были проинкубированы с клеточным экстрактом, полученным из клеточной линии HEK293T.

Из полученных результатов (Рис. 3Б) следует, что эндогенный SET7/9 связался с полноразмерным MDM2. К тому же значительно более слабое связывание было детектировано в случае делеционного варианта MDM2, включающего в себя 61-491 а.к. (соответствует изоформе p76). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о физическом взаимодействии метилтрансферазы SET7/9 и убиквитин-лигазы MDM2.

А.



Б.

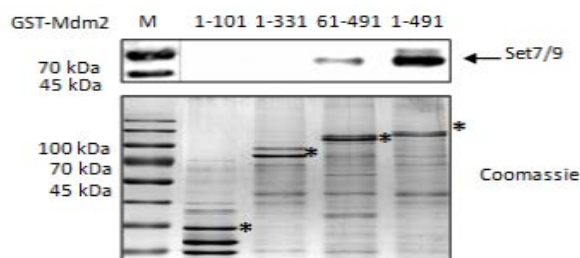


Рис 3. Эндогенный SET7/9 взаимодействует с GST-MDM2.

А. Серия делеционных вариантов GST-MDM2, проинкубированных с клеточным лизатом HEK293T (описание в тексте).

Б. Иммуноблот на SET7/9, визуализирующий взаимодействие с GST-MDM2 вариантами.

Поскольку MDM2 является E3убиквитин-лигазой, способствующей протеасомной деградации ряда белков, то, учитывая физическое взаимодействие MDM2 и SET7/9, было решено оценить влияние экспрессии MDM2 на уровень SET7/9. Для этого в клетках HEK293T были экспрессированы вектора, несущие последовательности полноразмерной и основных сплайс изоформ MDM2 (MDM2-A, MDM2-B и MDM2-C), после чего эндогенный уровень SET7/9 был оценён с использованием иммуноблоттинга. Согласно полученным результатам (Рис. 4), при сверхэкспрессии полноразмерного MDM2 значительно понижается эндогенный уровень SET7/9. При этом экспрессия сплайс-изоформ MDM2 не приводила к каким-либо количественным изменениям метилтрансферазы SET7/9.

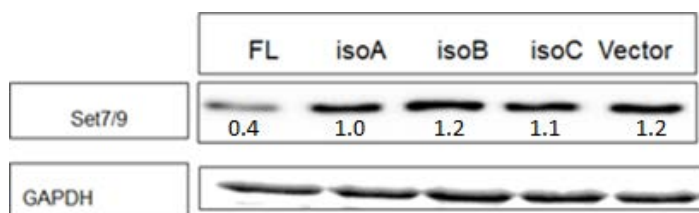


Рис. 4. MDM2 контролирует уровень экспрессии SET7/9

Экспрессия полноразмерной изоформы MDM2 ведет к снижению количества SET7/9.

Vector – контроль (вектор PIRE5-hr-1a), FL – основная изоформа MDM2, isoA – изоформа MDM2-A, isoB – изоформа MDM2-B, isoC – изоформа MDM2-C.

Полученные данные свидетельствуют о наличии в клетках петли отрицательной обратной связи (Рис. 5), в соответствии с которой повышение уровня экспрессии MDM2 ведет к снижению уровня SET7/9. В свою очередь, снижение количества SET7/9 приводит к повышению экспрессии MDM2.

При этом из литературных данных известно, что MDM2 снижает интенсивность репарации ДНК путем физического взаимодействия с двумя ключевыми участниками «репарации путем негомологичного воссоединения концов» - белками NBS1 и Ku70 (Ait et al. 2005), приводя к снижению их активности и протеасомной деградации.

Таким образом, если в раковых клетках, сверхэкспрессирующих MDM2, имеет место одновременно ингибирование репарации двунитевых разрывов ДНК с подавлением механизмов клеточной гибели, то потенциально генотоксический стресс будет стимулировать у таких клеток геномную нестабильность, что является одним из основных факторов развития опухолей и приобретения ими множественной устойчивости к химиотерапевтическим препаратам.



Рис. 5. Потенциальная петля обратной связи метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2

2. Определение интерактома MDM2 и SET7/9

2.1. Выявление спектра белков, ассоциированных с рекомбинантной метилтрансферазой SET7/9

С целью определения спектра белков, ассоциированных с рекомбинантной метилтрансферазой человека SET7/9, был применен метод GST-pull down. Для этого были использованы вектора, кодирующие полноразмерный белок GST-SET7/9 (1-366 а.к.), а так

же отдельные его домены GST-MORN (1-128 а.к.), GST-linker (128-214 а.к.), GST-SET (214-366 а.к.) и нативный белок GST (контроль).

Поскольку при проведении анализа использовалось эквимольное количество всех GST-вариантов SET7/9, то по значению «score», указанному в Табл. 6 диссертации автора, можно косвенно судить об интенсивности взаимодействия конкретных идентифицированных белков с определенным рекомбинантным доменом белка SET7/9.

Перечень идентифицированных белков представлен в Табл. 1

Табл. 1 Распределение по функциям белков клеточной линии HEK293T, ассоциированных с SET7/9

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

2.2 Выявление спектра белков, ассоциированных с рекомбинантной E3 убиквитин-лигазой MDM2

2.2.1 Белки клеточной линии U2OS, ассоциированные с MDM2 в нормальных условиях и при генотоксическом стрессе

При использовании клеточного экстракта линии U2OS (остеосаркома) были идентифицированы 119 белков, ассоциированных с рекомбинантной основной изоформой MDM2. Их распределение по функциям в клетке представлено в Табл. 2. Интересно, что большая часть ассоциированных с MDM2 белков (по 16%) осуществляют метаболические функции, а так же контролируют процессинг мРНК и сплайсинг.

После генотоксического стресса спектр ассоциированных с MDM2 белков существенно изменился. Как видно из Табл. 3, при генотоксическом стрессе самые многочисленные группы составили белки, вовлеченные в трансляцию, а так же белки везикулярного транспорта и шапероны.

Табл. 2. Распределение по функциям белков клеточной линии U2OS, ассоциированных с MDM2

Функция в клетке	Ассоциированные с MDM2 белки
Обеспечение трансляции	EEF1A1, EEF1G, EEF1A2, EIF2S2, EIF2S3
Рибосомальные белки	RPL4, RSL1D1, RPSA, EMG1, RPS10, NCL, RPLP0, RPS12, BRIX1, NIP7, RPL7L1
Цитоскелет и адгезия	ACTB, CKAP4, TUBB, MAP4, TUBA1B, TUBA3C, IQGAP1, DSG1, DSC1, HCA90, CDC42
Транскрипция	DDX5, DDX17, DHX9, HCFC1, RUVBL1, DDX47, SND1, SUPT16H, SSRP1, CHTOP
Метаболизм	ATP5A1, GAPDH, SLC25A5, ATP5B, SLC25A6, SLC25A4, ATP5C1, SHMT2, ATP5O, SLC25A10, ALDOA, CYCS, PTPLAD1, ACADVL, SLC16A1, SLC25A22, ATP5H, PFKM, MT-CO2
Процессинг РНК и сплайсинг	HNRNPU, HNRNPA3, SFPQ, HNRNPF, FBL, NONO, HNRNPH1, ALYREF, NRNPA2B1, HNRNPK, PTBP1, POLDIP3, U2AF1, HNRNPR, U2AF2, SFRS3, FRG1, FUS, C22orf28
Белки ЭПР	RNP1, RPN2, DDOST, DPM1, STT3A, EMC2
Репарация	PARP1, XRCC6, FEN1, APEX1
Шапероны	HSPA6, HSPA8, HSPA2, DNAJB1, HSPA5, HSPA1L
Другое	HIST1H1D, DCD, PRDX1, DRG1, SEMG2, SEMG1, DHRS2, RAB10, CXorf67, ZC3H15, H1FX, S100A8, NTPCR, ATAD3B, ATAD3A, LTF, NOLC1, KPNA2, LRRC59, MYL6, RFC3, MCM5, PRDX3, MAGEB2, RFC2, LANCL1, AFG3L2, GNB2

В соответствии с литературными данными (Xu et al. 2003), генотоксический стресс вызывает специфические пост-трансляционные модификации белка MDM2, которые приводят к неспособности MDM2 участвовать в ряде белков-белковых взаимодействий (в первую очередь, с онкосупрессором p53). Это, в свою очередь, ведет к стабилизации p53, увеличению его транскрипционной активности и, как следствие, к аресту клеточного цикла и апоптозу в случае неисправимых ДНК-повреждений.

По-видимому, выявленное в данной работе изменение спектра ассоциированных с MDM2 белков при обработке доксорубицином отражает функциональную роль MDM2 при генотоксическом стрессе и требует отдельного изучения.

Табл. 3. Распределение по функциям белков клеточной линии U2OS, ассоциированных с MDM2, при обработке доксорубицином

Функция в клетке	Ассоциированные с MDM2 белки
Рибосомальные белки	EMG1, RPS4X, RPS7, RPL11, RPS10, RPS14, MRPS7
Транскрипция	HCFC1, SLTM, TRIM28, PTRF
Метаболизм	SHMT2, ACADVL
Везикулярный транспорт	RAB11B, RAPIA, GIPC1, RAB10, RAB7A
Шапероны	GRPEL1, HSPB1, DNAJB1, DNAJA3
Гистоны	HIST1H1D, H1FX, H2AFV, HIST1H1A
Другое	NTPCR, HTATIP2, HP1BP3, MAP4, EEF1B2, GSTP1, RPS14, DHRS2, SRP14, MCM5

2.2.2 Белки клеточной линии MCF7, ассоциированные с изоформами MDM2

Согласно результатам GST pull-down анализа, при использовании клеточного экстракта линии MCF7, были идентифицированы 172 белка, ассоциированных с изоформами MDM2 (Табл. 13 диссертации автора). Их относительное распределение по функциям в различных клеточных процессах представлено в Табл 4.

Табл. 4. Распределение по функциям белков клеточной линии MCF7, ассоциированных с MDM2

Функция в клетке	Ассоциированные с изоформами MDM2 белки
Трансляция	EEF1G, EEF1A2, TUFM, EEF2, RARS, EIF2S3, EEF1B, EIF2S2, EIF4G1
Рибосомальные белки	RPL4, RPS9, RPL7A, RPS2, RPL18, RPLP0, RPS19, RPL15, RPS23, RPS13, RPL11, RPS14, RPS25, RPS10, RPL12, RPL10, RPL27A, RPL23A, RPL18A, RPL17, RPS15A, RPS7, RPS17, RPS12, RPL22, RPL38, RPS11, RPL27, RPL24, RPL21, RPL19, RPS27, RPS27L, RPL34, RPL30, RPL36, RPL32, RPS24, RPL23
Цитоскелет и адгезия	TUBB4A, DSP, ACTB, TUBB8, CAND1, PLEC, TUBAL3, EPPK1, CFL1, EMD
Транскрипция	CRIP2, HMGB1, TRIM28, DDX5, DDX39A, PHB, YBX1, EWSR1, DDX1, RUVBL1, PHB2, RUVBL2
Метаболизм	FASN, GAPDH, ATP5A1, PFKF, HADHA, MTHFD1, IMPDH2, SHMT2, CYC1, ATP5B, PFKL, ATP5O, SORD, CKMT1A, MCCC2, GFPT1, G6PD, ASS1, PAICS, UQCRC2, IDH2, ACADVL, PCK2, MDH2, ATP5F1, CS, SCCPDH, GK1
Шапероны	HSP90AB1, HSP90AA1, HSPA8, HSPA1A, HRNR, HSPA9, HSP90B1
Сплайсинг	NONO, HNRNPF, HNRNPH1, SFPQ, HNRNPK, HNRNPM, SRSF3, HNRNPA1, HNRNPA2B1
Переносчики и ионные каналы	VDAC1, SLC3A2, VDAC2, SLC25A3, ATP1A1, ARL6IP5, SLC25A11, SLC7A5
Белки ЭПР	RPN2, HSPA5, PDIA6, RPN1, CCT3, DDOST, SERPINH1, CCT5, SEC22B, PPIB, CCT7, TCP1, COPA, PDIA3, ATL3, CCT6A, SEC61B,
Другое	C16ORF13, GNB2L1, NPM1, LANCL1, UBB, PRDX1, C6orf211, SFXN1, AIFM1, LTF, LYZ, S100A8, LCN1, HIST1H2AB, IST1H2BD, H1FX, GSTM4, VAPA, HIST1H4A, MGST1, LRRC59, MYO6, CSTA, DCD, H3F3A, MTDH, PABPC1, CSRP1, YWHAZ, CAPN1, XRCC6 RAB1A, SURF4

2.2.3 Анализ результатов GST pull down и отбор белков, играющих важную роль в онкогенезе.

При анализе результатов GST-pull down выявлено неожиданно большое количество интерактантов, играющих важную роль в тех или иных метаболических путях. Всего были идентифицированы 28 белков, принимающих участие в метаболизме. Их распределение по метаболическим путям представлено в Табл. 5 и на Рис. 6.

Табл. 5. Распределение по метаболическим функциям белков, ассоциированных с MDM2

Функция	Ассоциированные с изоформами MDM2 белки
Гликолиз	GAPDH, PFKP, PFKL, PGK1, ALDOA
Цикл Кребса	IDH2, MDH2, CS
Окислительное фосфорилирование	ATP5A1, CYC1, ATP5B, ATP5O, UQCRC2, ATP5F1, MT-CO2
Метаболизм жирных кислот	FASN, HADHA, ACADVL, PTPLAD1
Биосинтез пуринов	IMPDH2, MTHFD1, SHMT2, PAICS
Метаболизм аминокислот	GFPT1, ASS1, MCCC2
Другое	SORD, CKMT1A, PCK2, SCCPDH, G6PD

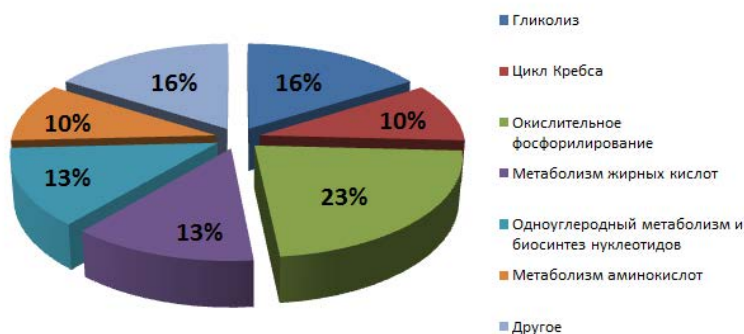


Рис. 6. Процентное распределение по метаболическим функциям белков, ассоциированных с MDM2

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют об ассоциации MDM2 с ключевыми процессами раково-ассоциированного метаболизма.

2.2.4 Верификация данных масс-спектрометрической идентификации ассоциированных с MDM2 белков с использованием иммуноблоттинга.

На следующем этапе было решено верифицировать данные масс-спектрометрической идентификации белков, ассоциированных с MDM2, методом иммуноблоттинга, используя антитела, специфичные к нескольким идентифицированным белкам – IQGAP1, CDC42 и MTHFD2 (митохондриальная изоформа MTHFD1).

Для этого использовались пробы после пулл-дауна изоформ MDM2 с клеточным экстрактом линии MCF7. Результаты этого эксперимента, приведенные на Рис. 7, подтверждают взаимодействие IQGAP1, CDC42 и MTHFD2 с MDM2, при этом только с основной (полноразмерной) изоформой, что полностью согласуется с результатами GST-pull down анализа.

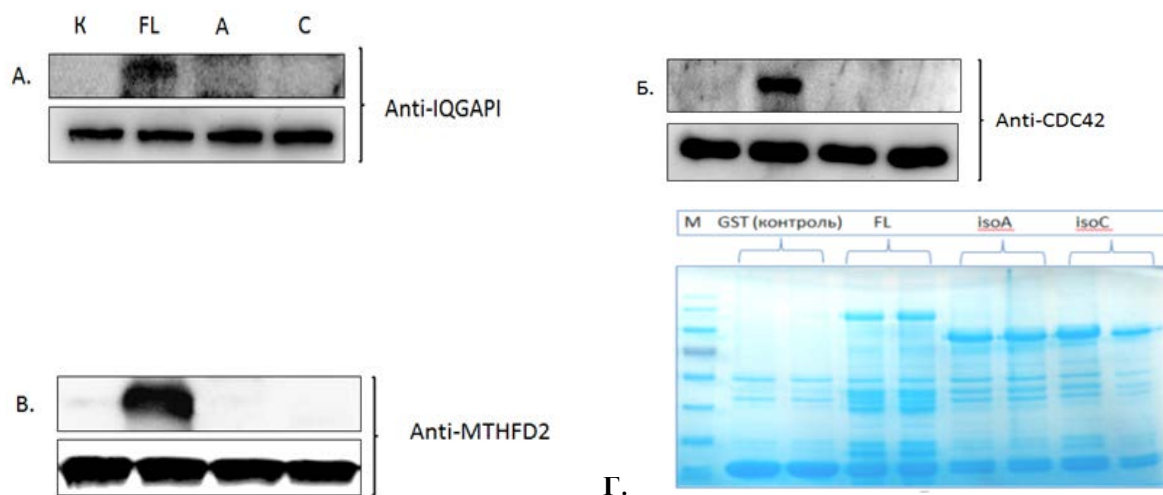


Рис. 7. IQGAPI, CDC42 и MTHFD2 взаимодействуют с рекомбинантной E3-лигазой MDM2

А. верх – IQGAPI взаимодействует с основной изоформой MDM2, низ – эквивалентное количество IQGAPI в пробах, использованных для связывания с MDM2

Б. верх – CDC42 взаимодействует с основной изоформой MDM2, низ – эквивалентное количество CDC42 в пробах, использованных для связывания с MDM2

В. верх – MTHFD2 взаимодействует с основной изоформой MDM2, низ – эквивалентное количество MTHFD2 в пробах, использованных для связывания с MDM2

К – контроль (GST), FL – полноразмерная (основная) изоформа MDM2, А – изоформа MDM2-А, С – изоформа MDM2-С

Г. Гель, окрашенный кумасси, демонстрирующий эквивалентное количество изоформ MDM2 при связывании с клеточным экстрактом

3. Влияние SET7/9 и MDM2 на ключевые факторы одноуглеродного метаболизма

Общими интерактантами MDM2 и SET7/9, идентифицированными в данной работе посредством протеомного подхода, являются серингидроксиметилтрансфераза SHMT2 и метилентетрагидрофолатредуктаза MTHFD2 - ключевые участники одноуглеродного метаболизма (Amelio et al. 2014). Экспрессия SHMT2 и MTHFD2 регулярно нарушена в различных типах раковых опухолей (Antonov et al. 2014). Поэтому было решено далее сосредоточиться на исследовании влияния SET7/9 и MDM2 на экспрессию SHMT2 и MTHFD2.

3.1 Нокдаун SET7/9 повышает экспрессию MTHFD2 и SHMT2, а так же их транскрипционного регулятора c-Мус

С использованием клеток U2OS(НДSET7/9) и U2OS(КНД), описанных ранее, было оценено влияние нокдауна SET7/9 на экспрессию MTHFD2 и SHMT2. Согласно полученным результатам ОТ-ПЦР в РВ, показанным на Рис. 8А, при нокдауне SET7/9 экспрессия MTHFD2 и SHMT2 повышена в 2,2 и в 3 раза, соответственно.

Далее было оценено влияние нокдауна SET7/9 на экспрессию MTHFD2 и SHMT2 посредством иммуноблоттинга со специфичными антителами. Как видно из Рис. 9, экспрессия MTHFD2 и SHMT2 несколько повышена в U2OSНДSET7/9 клетках, что, в целом, соответствует результатам ПЦР в РВ. Особенно четко повышена экспрессия SHMT2-alpha, представляющей ядерную изоформу SHMT2.

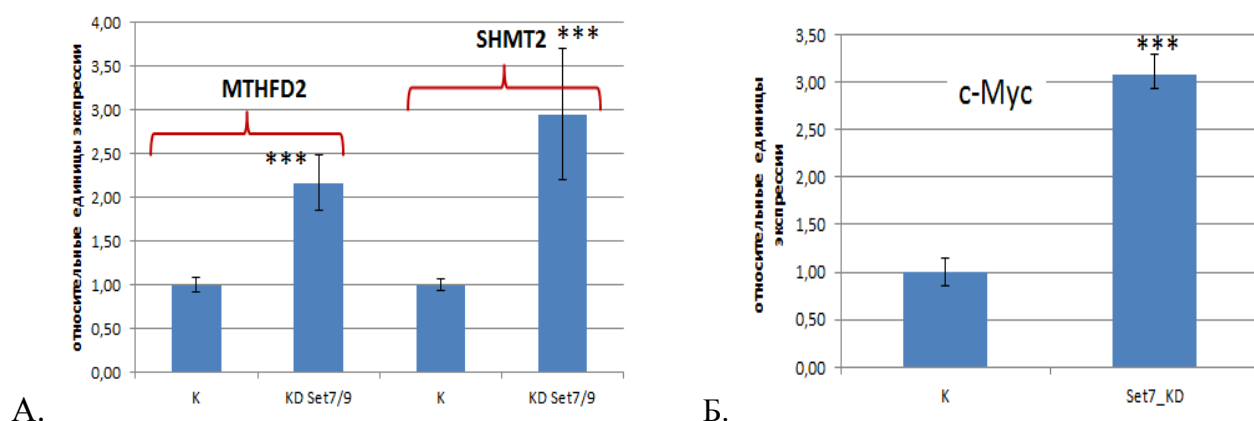


Рис. 8. Нокдаун SET7/9 повышает экспрессию (А) MTHFD2 и SHMT2, а так же (Б) c-Мус на транскрипционном уровне

KD_SET7/9 – клетки U2OS с нокдауном SET7/9

K – контрольные клетки (U2OS_K)

**** Уровень достоверности $P < 0.001$;*

Поскольку известным транскрипционным регулятором экспрессии SHMT2 и MTHFD2 является ТФ c-Мус, то так же было решено оценить влияние нокдауна SET7/9 на его экспрессию посредством ПЦР в РВ. Как можно видеть на Рис. 8Б, экспрессия c-Мус повышена в 3 раза в случае нокдауна SET7/9, что согласуется с повышенным уровнем SHMT2 и MTHFD2.

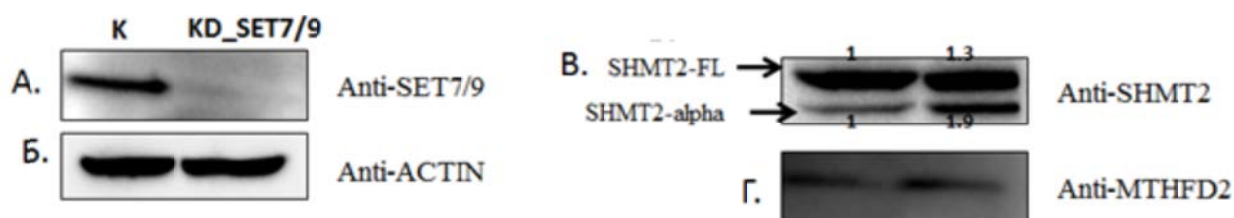


Рис. 9. Влияние нокдауна SET7/9 на экспрессию белков SHMT2 и MTHFD2

К - контрольные клетки (U2OSКНД); *KD_SET7/9* – клетки U2OS с нокдауном SET7/9. Числовые значения соответствуют интенсивностям полос, рассчитанным с использованием программного обеспечения ImageLab 5.2.1

3.2 Структурно-функциональная роль взаимодействия E3 убиквитин-лигазы MDM2 с серингидроксиметилтрансферазой SHMT2

3.2.1 MDM2 физически взаимодействует с серингидроксиметилтрансферазой SHMT2 и негативно контролирует уровень ее экспрессии

Для верификации физического взаимодействия MDM2 и SHMT2 клетки линии HEK293Т были трансфицированы векторами, кодирующими изоформу SHMT2-alpha (не имеющую сигнала митохондриальной локализации), а так же три её делеционных варианта, соответствующих трем доменам данного белка (1-133 а.к., 133-323 а.к., 323-504 а.к.) (Рис. 10Б). Затем была проведена ко-иммунопреципитация с последующим вестерн-блоттингом с антителами, специфичными к MDM2.

На Рис. 10А видно, что эндогенный MDM2 взаимодействует с полноразмерным белком SHMT2-alpha и, в меньшей степени, с делеционным вариантом, соответствующим карбокси-концевому домену SHMT2 (323-504 а.к.). Таким образом, были подтверждены данные GST pull down анализа, а так же идентифицирован карбоксильно-концевой участок SHMT2 в качестве ответственного за взаимодействие с MDM2.

С целью оценки влияния изоформ MDM2 на экспрессию эндогенного SHMT2 клетки линии HEK293Т были трансфицированы векторами, кодирующими полноразмерную и основные сплайс изоформы MDM2 с последующим иммуноблоттингом с антителами, специфичными к SHMT2. Полученные результаты (Рис 10В) отчётливо указывают на снижение уровня эндогенного SHMT2 при оверэкспрессии полноразмерной изоформы MDM2, в отличие от сплайс-изоформ и контрольного вектора.

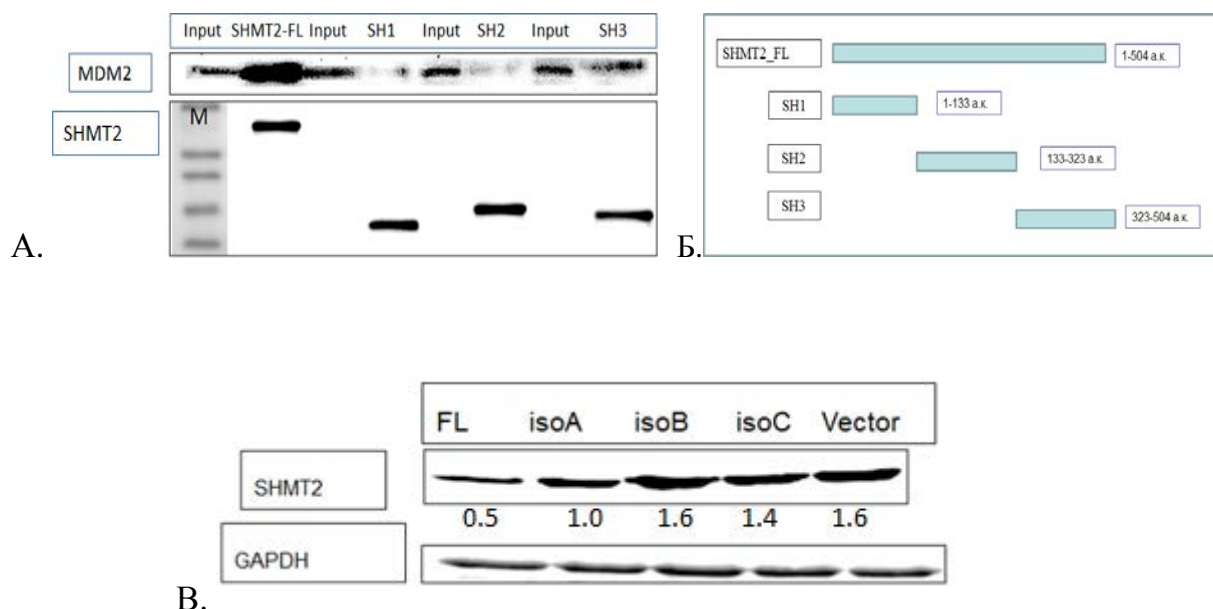


Рис. 10. MDM2 физически взаимодействует с серингидроксиметилтрансферазой SHMT2 и негативно контролирует уровень ее экспрессии.

А. Ко-иммунопреципитация эндогенного MDM2 с использованием полноразмерного белка SHMT2-alpha (SHMT2-FL) и трех его делеционных вариантов (SH1, SH2, SH3).

Б. Схема делеционных мутантов SHMT2, использованных в ко-иммунопреципитации.. SHMT2-FL – полноразмерный белок SHMT2-alpha.

В. Иммуноблоттинг на эндогенный белок SHMT2 после оверэкспрессии основных изоформ MDM2

3.2.2. MDM2 убиквитинилирует *in vivo* SHMT2

С целью выяснения механизма негативного влияния MDM2 на белковый уровень SHMT2 было использовано убиквитинилирование *in vivo*. Для этого линия HEK293T была ко-трансфицирована тремя векторами, кодирующими 6xHis-убиквитин, 3xFlag-SHMT2 и полноразмерную изоформу MDM2. Контрольные клетки были трансфицированы только векторами, кодирующими 6xHis-убиквитин и 3xFlag-SHMT2. Всего использовались две повторности. В клетки первой повторности через сутки после трансфекции добавлялся MG132 – ингибитор протеасомной деградации (5мкМ, 24 ч). Вторая повторность использовалась в качестве контроля. Далее клетки лизировались с последующей очисткой всех убиквитинилированных белков клеток за счет аффинного взаимодействия 6xHis-убиквитина с Ni-агарозой. Состояние SHMT2 было проанализировано посредством иммуноблоттинга полученных проб и последующей визуализацией с анти-SHMT2 антителами.

Анализ полученных результатов показал (Рис. 11), что экспрессия полноразмерной изоформы MDM2 вызывает убиквитинилирование SHMT2, причем оно значительно интенсивнее при использовании ингибитора протеасомной деградации MG132. Таким

образом, полноразмерная изоформа MDM2 физически взаимодействует с SHMT2, вызывает ее убиквитинилирование и ведет к протеасомной деградации.

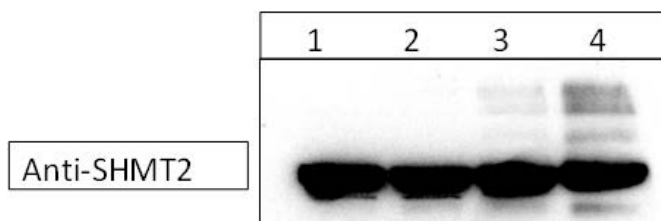


Рис. 11. Иммуноблоттинг результатов убиквитинилирования *in vivo* SHMT2 при ко-трансфекции с MDM2

Обозначения дорожек: 1 – 6His-Ub + 3xFlag-SHMT2; 2 - 6His-Ub + 3xFlag-SHMT2+MDM2
3 - 6His-Ub + 3xFlag-SHMT2 (+MG132); 4 - 6His-Ub + 3xFlag-SHMT2+MDM2 (+MG132)

3.3 SET7/9 и MDM2 модулируют восприимчивость к ингибитору одноуглеродного метаболизма - метатрексату

Поскольку в данной работе было показано влияние SET7/9 и MDM2 на экспрессию ключевых регуляторов одноуглеродного метаболизма – MTHFD2 и SHMT2, то так же важно было оценить влияние SET7/9 и MDM2 на восприимчивость к метатрексату – ингибитору одноуглеродного метаболизма, широко применяемому в клинической онкологии. Для этого клетки U2OSH Δ SET7/9 и U2OS p53⁺, а так же клетки HEK293T, временно экспрессирующие изучаемые изоформы MDM2, были обработаны метатрексатом (100 мкг/мл). Спустя 24ч был оценён процент живых клеток.

Как видно из Рис. 12, клетки U2OSH Δ SET7/9 оказались почти на треть более восприимчивы к метатрексату, чем контрольные клетки (43% против 65% выживших). Полученные результаты свидетельствуют о том, что нокадаун SET7/9 способствует восприимчивости клеток к метатрексату.

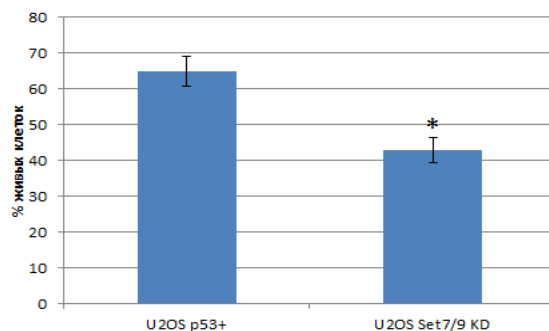


Рис. 12 Влияние нокадауна SET7/9 на восприимчивость клеточной линии U2OS к метатрексату.

U2OS p53⁺ - контрольные клетки; U2OSH Δ SET7/9 – клетки U2OS с нокадауном SET7/9; * Уровень достоверности $P < 0.05$

Как видно из Рис. 13, сверхэкспрессия полноразмерного белка MDM2, в отличие от сплайс-изоформ, повышала восприимчивость клеток к метатрексату почти в 2,5 раза. Таким образом, убиквитин лигаза MDM2 вовлечена в контроль одноуглеродного метаболизма.

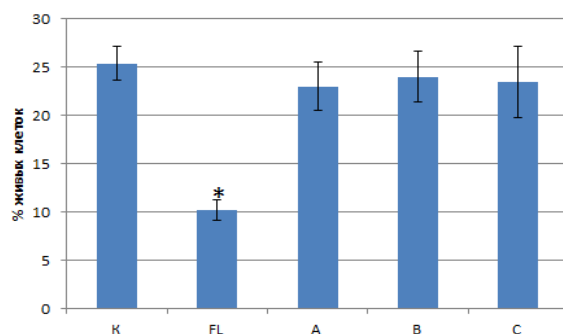


Рис. 13. Влияние экспрессии изоформ MDM2 на восприимчивость клеточной линии HEK293T к метатрексату. K – контроль (вектор PIRES-h r-1a), FL – основная изоформа MDM2, A – изоформа MDM2-A, B – изоформа MDM2-B, C – изоформа MDM2-C. * Уровень достоверности $P < 0.05$

Суммируя полученные результаты, можно подвести итог, что убиквитин-лигаза MDM2 и метилтрансфераза SET7/9 взаимодействуют физически с рядом основных факторов одноуглеродного метаболизма, контролируют их экспрессию и являются модуляторами клеточного ответа на широко применяемый химиотерапевтический препарат метатрексат (Рис. 14).



Рис. 14. Схема, демонстрирующая потенциальные механизмы участия MDM2 и SET7/9 в регуляции восприимчивости клеток к ингибитору одноуглеродного метаболизма – метатрексату

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют об участии лизин-специфичных регуляторов p53 – E3 убиквитин-лигазы MDM2 и метилтрансферазы SET7/9 в различных биохимических процессах независимо от p53, в первую очередь - в клеточном ответе на генотоксический и метаболический стресс. Определено, что MDM2 и SET7/9 образуют потенциальную петлю отрицательной обратной связи и контролируют экспрессию друг друга. При этом выявлено, что экспрессия MDM2, в отличие от её сплайс-изоформ, повышает устойчивость p53-негативных клеток к доксорубину, но при этом снижает устойчивость к цисплатину – двум широко применяемым генотоксическим препаратам.

Идентифицированные в ходе протеомного анализа интерактанты MDM2 и SET7/9 указывают на участие этих ферментов в таких клеточных процессах как транскрипция, редактирование РНК и сплайсинг, трансляция, репарация ДНК, а так же в различных метаболических путях и т.д. Поэтому изучение функциональной роли данных взаимодействий важно для понимания роли MDM2 и SET7/9 в онкогенезе.

Поскольку в данной работе в качестве общих интерактантов MDM2 и SET7/9 были идентифицированы SHMT2 и MTHFD2 – ключевые ферменты одноуглеродного метаболизма, то было решено сосредоточиться на изучении влияния MDM2 и SET7/9 на их экспрессию, а так же чувствительность клеток к ингибитору одноуглеродного метаболизма – метатрексату. Показано, что SET7/9 на транскрипционном уровне влияет на экспрессию SHMT2 и MTHFD2, а так же их основного регулятора – транскрипционного фактора c-Myc. В то же время выявлено, что MDM2 является E3 убиквитин-лигазой для SHMT2, вызывая её протеасомную деградацию.

Таким образом, впервые показано участие MDM2 и SET7/9 в ответе на генотоксический и метаболический стресс. Полученные в данной работе результаты актуальны как для фундаментального понимания механизмов онкогенеза, так и для разработки методов сочетанной терапии рака, включающих в себя генотоксические препараты и ингибиторы одноуглеродного метаболизма.

ВЫВОДЫ

1. В клетках существует петля отрицательной обратной связи метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2;
2. Экспрессия основной изоформы MDM2, в отличие от сплайс-изоформ, повышает устойчивость клеток к генотоксическому химиопрепарату доксорубину, в то же время повышает восприимчивость к другому генотоксическому препарату – цисплатину, а так же ингибитору одноуглеродного метаболизма метатрексату;
3. Идентифицирован целый ряд интерактантов метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2, а так же её сплайс-изоформ. Многие из них играют важное значение в онкогенезе и указывают на вовлечённость MDM2 и SET7/9 в различные клеточные процессы, в том числе в контроль одноуглеродного метаболизма;
4. MDM2 и SET7/9 вовлечены в контроль одноуглеродного метаболизма за счет влияния на экспрессию серингидроксиметилтрансферазы SHMT2 и метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFD2 - ключевых ферментов цикла превращений фолата;
5. MDM2 является E3 убиквитин-лигазой для серингидроксиметилтрансферазы SHMT2, вызывая её протеасомную деградацию.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Lezina, L., Aksenova, V., Fedorova, O., Malikova, D., **Shuvalov, O.**, Antonov, A. V., ... & Barlev, N. A. (2015). KMT SET7/9 affects genotoxic stress response via the Mdm2 axis. *Oncotarget*, 6(28), 25843-25855.
2. Vasileva, E. A., **Shuvalov, O. U.**, Garabadgiu, A. V., Melino, G., & Barlev, N. A. (2015). Genome-editing tools for stem cell biology. *Cell death & disease*, 6(7), e1831.
3. **Shuvalov, O.**, Petukhov, A., Daks, A., Fedorova, O., Ermakov, A., Melino, G., & A Barlev, N. (2015). Current Genome Editing Tools in Gene Therapy: New Approaches to Treat Cancer. *Current gene therapy*, 15(5), 511-529.
4. **О.Ю. Шувалов**, О.А. Федорова, А.В. Петухов, А.А. Дакс, Е.А. Васильева, Т.А. Григорьева, Г.С. Иванов, Н.А. Барлев. Негативные регуляторы онкосупрессора p53 в контексте направленной противоопухолевой терапии (2015). *Цитология*. 57 (12) : 847–854

Тезисы докладов международных и отечественных конференций:

1. **Shuvalov O.Y.**, Fedorova O.A., Ivanov G.S., Lesina L., Barlev N.A. P53 specific E3 ubiquitin ligase MDM2 interacts with lysine methyltransferase SET7/9. *FEBS JOURNAL*, 281 (Suppl.1), p.589-590;

2. Olga Fedorova, Alexandra Daks, Alexey Petukhov, **Oleg Shuvalov**, G. Melino and Nikolai Barlev NR4A3 as a novel transcriptional target of p53 International scientific conference "Science of the Future"
3. Olga Fedorova, Alexandra Daks, Alexey Petukhov, **Oleg Shuvalov**, Nikolai A. Barlev. Transcriptional factors p53 and p63 regulate expression of orphan nuclear receptors NR4A. FEBS JOURNAL, 281 (Suppl.1), p.514-515;
4. **О.Ю. Шувалов**, Г.С. Иванов, О.А.Федорова, Н.А.Барлев. Изучение белок-белкового взаимодействия MDM2 и SET7/9. Цитология. Т. 56, No 5, с.390.
5. А.А.Дакс, **О.Ю. Шувалов**, О.А. Федорова, Н.А.Барлев. Определение домена убиквитинлигазы PIRH2, взаимодействующего с MDM2. Цитология. Т. 56, N9, с. 365 – 366. 2014.
6. Петухов А.В., **Шувалов О.Ю.**, Иванов Г.С., Федорова О.А., Барлев Н.А. V Конференция молодых ученых, ИНЦ РАН Санкт-Петербург, 18.03.2014 – 20.03.2014. Изучение белок-белкового взаимодействия E3-убиквитин лигаз COP1 и MDM2. Стендовый доклад.
7. Дакс А.А., Федорова О.А., Петухов А.А., **Шувалов О.Ю.**, Барлев Н.А. VII Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, 28.10.2014 – 30.10.2014. Идентификация белков, взаимодействующих с E3-убиквитинлигазой Pirh2. Стендовый доклад.
8. **О. Ю. Шувалов**, А. В. Петухов, А. С. Ермаков, Н. А. Барлев. VII Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, 28.10.2014 – 30.10.2014. Создание химерных белков на основе CRISPR/Cas9 для направленного подавления экспрессии генов. Стендовый доклад.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Chuikov S. et al. 2004.** Nature. 432: 353-360. 2. **Lezina. et al. 2014.** Cell Death & Differentiation. 21(12): 1889-1899. 3. **Jones S. et al. 1995.** Nature. 378: 206-208. 4. **Fuchs S. et al. 1998.** Oncogene. 17(19): 156-163. 5. **Tovar et al. 2006.** PNAS. 103: 1888-1893. 6 **Manfredi J. et al. 2010.** Genes & development, 24(15): 1580-1589. 7. **Vassilev L. et al. 2004.** Science. 303: 844-848. 8. **Zhao J. et al. 2010.** BMC cancer, 5: 156-169. 9. **Lim S. et al. 2010.** FEBS letters, 584: 2231-2236. 10. **Wang S. et al. 2010.** Nature cell biology, 11: 694-704. 11. **Okoro D. et al. 2012.** Genes & cancer. 3: 311-319. 12. **Frum et al. 2014.** Nucleic acids research, 42: 926-940. 13. **Ho S. et al. 1988.** Gene. 77: 51-59. 14. **Sahr T. et al. 2013.** Methods and Protocols. 583-593. 15. **Alt J. et al. 2005.** Journal of Biological Chemistry. 280: 18771-18781. 16. **Amelio I. et al. 2014.** Trends in biochemical sciences. 39(4): 191-198. 17. **Antonov A. et al. 2014.** Oncotarget. 5(22): 11004-11013. 18. **Xu Y. 2003.** Cell Death & Differentiation. 10(4): 400-403.