

DOI: 10.7868/S0041377118100041

МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА SET7/9 РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА NR4A1

© **O. A. Федорова^{1,*} A. A. Дакс¹ П. А. Юдичев¹ Т. С. Леонова¹ В. Харченко¹
E. A. Васильева¹ A. B. Петухов^{1,2} О. Ю. Шувалов¹ Н. А. Барлев¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова

Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197341;

* электронный адрес: fedorovaolgand@gmail.com

Ядерные рецепторы представляют собой большой класс транскрипционных факторов, участвующих в контроле метаболизма, пролиферации, воспаления, апоптоза и других клеточных процессов. Среди орфанных ядерных рецепторов (для которых лиганды не выявлены) выделяют особую группу белков — NR4A (NR4A1, NR4A2 и NR4A3), наиболее изученным среди которых является рецептор NR4A1. В ходе данного исследования мы показали влияние метилтрансферазы Set7/9 на экспрессию ядерного рецептора NR4A1. Лизин-специфическая метилтрансфераза Set7/9 (SETD7) является ферментом, который метилирует четвертый лизин канонического гистона H3 (H3K4me1). В представленной работе показано, что Set7/9 влияет на экспрессию NR4A1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Важно отметить, что катализитическая функция метилтрансферазы Set7/9 необходима для регуляции экспрессии NR4A1.

Ключевые слова: ядерный рецептор NR4A1, метилтрансфераза Set7/9, система геномного редактирования CRISPR/Cas9

Ядерные рецепторы представляют собой большой класс транскрипционных факторов, участвующих в контроле различных клеточных процессов, таких как метаболизм, пролиферация, воспаление и апоптоз. Среди ядерных рецепторов выделяют три семейства по их способности связываться с лигандами: гормональные рецепторы, экс-орфанные (лиганды которых были обнаружены после открытия самих рецепторов) и орфанные, или так называемые сиротские, рецепторы (для которых лиганды не выявлены). Орфанные рецепторы встречаются в различных тканях и клетках и играют важную роль в пролиферации, апоптозе, дифференцировке клеток, эмбриогенезе, метаболизме и иммунитете. Среди орфанных ядерных рецепторов выделяют особую группу белков — NR4A (NR4A1, NR4A2 и NR4A3), наиболее изученным среди которых является рецептор NR4A1. Показано, что NR4A1 влияет на выживаемость и усиление пролиферации клеток за счет активации экспрессии циклина D2 (Chen et al., 2012), E2F1 (Mu, Chang, 2003) и сурвивина (Lee et al., 2010). Однако дальнейшие эксперименты показали, что NR4A1 играет важную роль в апоптозе за счет как транскрипционной активности, так и белок-белковых взаимодействий (Beard et al., 2015). NR4A1 усиливает метастатический потенциал в случае рака мочевого пузыря (Inamoto et al., 2010), рака легкого (Lee et al., 2011) и молочной железы (Llopis et al., 2013 и Леонова и др., 2018). В связи с его ролью в развитии злокачественных новообразований осо-

бый интерес представляют механизмы регуляции экспрессии NR4A1.

Лизин-специфическая метилтрансфераза Set7/9 (SETD7) является ферментом, который метилирует четвертый лизин канонического гистона H3 (H3K4me1) (Wang et al., 2001). Метилирование лизина играет важную роль в регуляции как транскрипции, так и функций белков. Важно отметить, что Set7/9 может метилировать также и негистоновые белки, такие как p53, TAF10, ER, P65, STAT3 и т. д. (Kouskouti et al., 2004; Subramanian et al., 2008; Pradhan et al., 2009; Lezina et al., 2014, 2015, и др.). Кроме того, было показано, что Set7/9 влияет на уровень экспрессии различных генов, таких как E3-убиквитинлигаза MDM2 (Lezina et al., 2015), индуцируемая синтаза оксида натрия (NO-синтаза) (Fujimaki et al., 2015), ассоциированный с глиомой гомолог онкогена (Gli-1) (Song et al., 2016) и др.

В настоящей работе мы показываем влияние метилтрансферазы Set7/9 на экспрессию ядерного рецептора NR4A1.

Материал и методика

В работе использовали следующие клеточные линии: эмбриональной почки человека HEK293T, рака толстой кишки человека HCT116, остеосаркомы человека

U2OS и остеосаркомы человека U2OS, в которой с помощью малых шпилечных РНК (shRNA) был осуществлен нокаут белка Set7/9 (Lezina et al., 2015). Клетки культивировали в среде DMEM (Lonza, США), содержащей 10 % сыворотки, 2 mM L-глутамина (Биолот, Россия) и смесь антибиотиков пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Биолот, Россия), при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂.

Трансфекцию клеток HEK293T осуществляли с помощью реагентов для трансфекции TurboFect (ThermoScientific, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Эффективность трансфекции анализировали через 48 ч.

Получение клеточных линий с нокаутом гена *setd7*. В ходе работы в линиях HEK293T и HCT116 с использованием системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 был осуществлен нокаут гена *setd7*, кодирующего метилтрансферазу Set7/9. Клеточные линии HEK293T и HCT116 с нокаутом Set7/9 были получены с помощью трансфекции вектора lentiCRISPRv2.0, в который была клонирована специфическая для *setd7* последовательность направляющей РНК (guide RNA, gRNA). Для получения контрольных линий осуществляли

трансфекцию исходным вектором lentiCRISPRv2.0. Через 1 сут после трансфекции проводили селекцию с использованием антибиотика пуромицина в концентрации 2 мкг/мл в течение 1 нед.

Экстракция РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР). РНК выделяли с помощью набора реагентов (Ероген, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Синтез кДНК осуществляли с использованием набора реагентов для обратной транскрипции RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischerScientific, США) согласно инструкции фирмы-производителя. ПЦР в реальном времени проводили с использованием коммерческой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Для анализа экспрессии генов *setd7*, *NR4A1*, *CDKN1A* (*p21*) и *GAPDH* использовали следующие праймеры: для *setd7* прямой 5'-TCATTGATGTGCCTGAGCCCTA-3' и обратный 5'-TCAGGGTGCGGATGCATTGAT-3', для *NR4A1* прямой 5'-CACATTGTTGCCAAGACCTG-3' и обратный 5'-TGCTGGTGTCCCATATTGG-3'; для *CDKN1A* прямой 5'-CATGGGTTCTGACGGACAT-3' и обратный 5'-AGT-

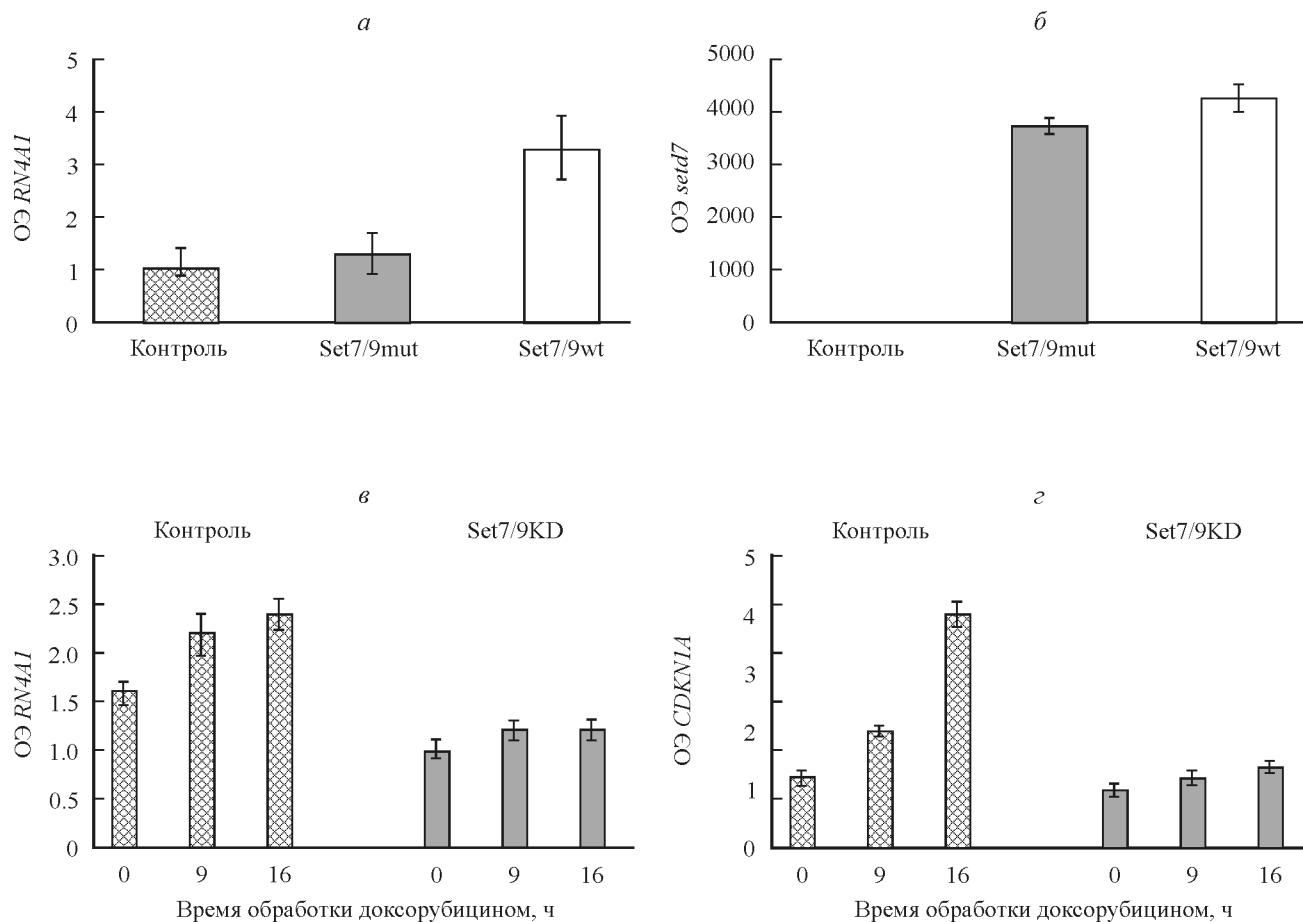


Рис. 1. Влияние метилтрансферазы Set7/9 на уровень мРНК ядерного рецептора NR4A1: оверэкспрессия Set7/9 дикого типа (Set7/9wt, *a*, *b*) и нокаут Set7/9 (*c*, *d*). ОЭ — относительная экспрессия генов *NR4A1* и *setd7* в клетках HEK293T после трансфекции векторами pcDNA3 (контроль), pcDNA3-Set7/9wt, несущей последовательность белка Set7/9 дикого типа (Set7/9wt), и pcDNA3-Set7/9mut, несущей последовательность мутантной формы Set7/9, не обладающей каталитической активностью (Set7/9mut). *c*, *d* — снижение уровня мРНК рецептора в нормальных условиях и при обработке доксорубицином; показана ОЭ генов *NR4A1* и *CDKN1A* в клетках U2OS (контроль) и клетках U2OS с нокаутом Set7/9 (Set7/9KD) в нормальных условиях (точка 0 ч) и при обработке доксорубицином в течение 9 и 16 ч. Даны средние значения и величины стандартного отклонения (вертикальные отрезки). ОЭ рассчитывали на основе изменения экспрессии гена *GAPDH*.

a, б — повышение уровня мРНК рецептора; показана относительная экспрессия генов *NR4A1* и *setd7* в клетках HEK293T после трансфекции векторами pcDNA3 (контроль), pcDNA3-Set7/9wt, несущей последовательность белка Set7/9 дикого типа (Set7/9wt), и pcDNA3-Set7/9mut, несущей последовательность мутантной формы Set7/9, не обладающей каталитической активностью (Set7/9mut). *в*, *г* — снижение уровня мРНК рецептора в нормальных условиях и при обработке доксорубицином; показана ОЭ генов *NR4A1* и *CDKN1A* в клетках U2OS (контроль) и клетках U2OS с нокаутом Set7/9 (Set7/9KD) в нормальных условиях (точка 0 ч) и при обработке доксорубицином в течение 9 и 16 ч. Даны средние значения и величины стандартного отклонения (вертикальные отрезки). ОЭ рассчитывали на основе изменения экспрессии гена *GAPDH*.

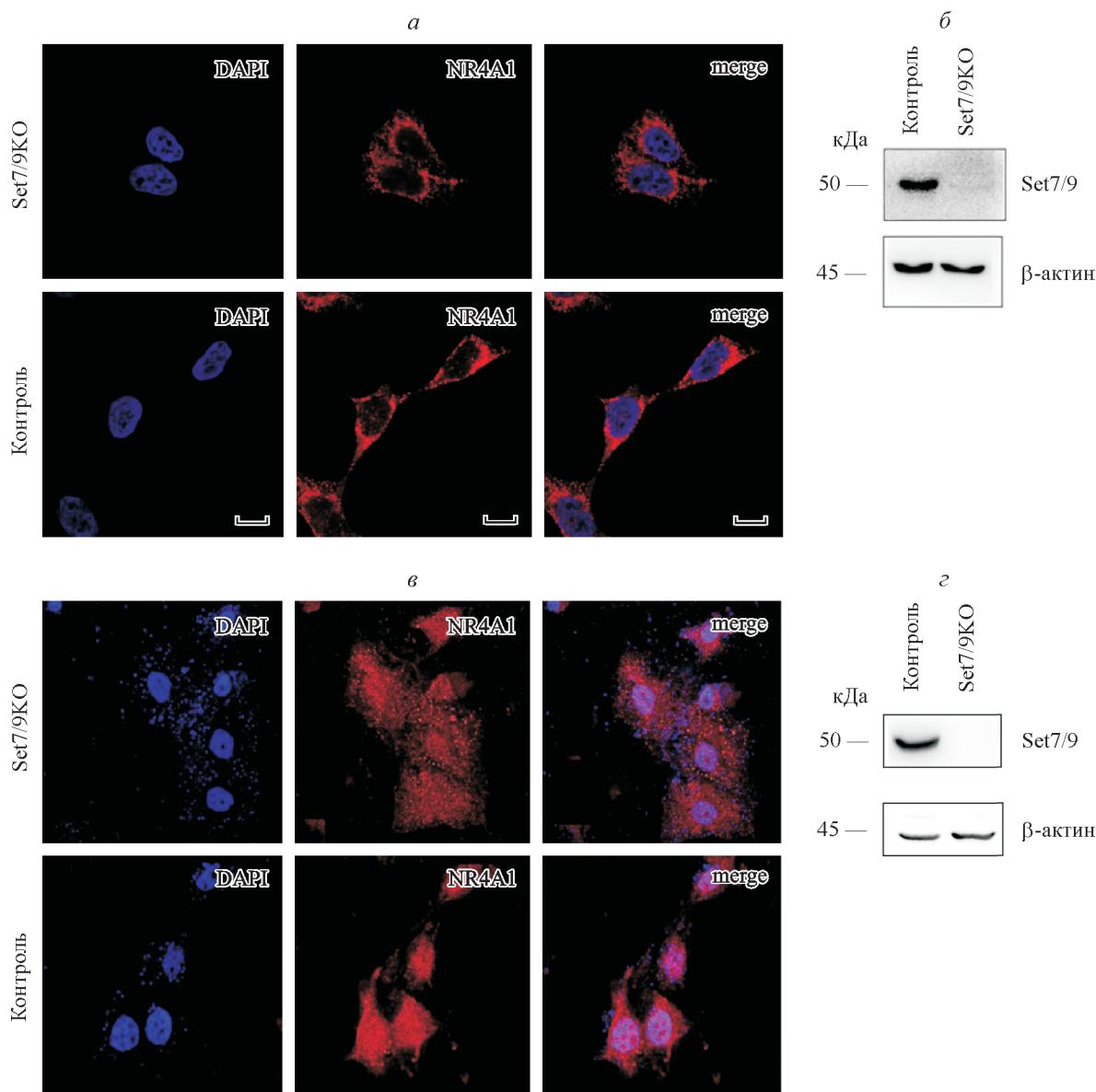


Рис. 2. Влияние Set7/9 на уровень белка NR4A1 в клетках: нокаяут Set7/9 (Set7/9KO) в клетках HEK293T (*а, б*) и HCT116 (*в, г*) приводит к снижению уровня белка NR4A1 по сравнению с контролем.

а, в — иммуноцитохимическое окрашивание клеток контрольных и с нокаутом Set7/9 (Set7/9KO) линий HEK293T (*а*) и HCT116 (*в*). Окрашивание специфическими антителами к ядерному рецептору NR4A1 (красный цвет), красителем DAPI (ядра, синий цвет), merge — совмещение изображений. *б, г* — Вестерн-блот-анализ уровня белка Set7/9 в клетках контрольных и с нокаутом Set7/9 (Set7/9KO) линий HEK293T (*б*) и HCT116 (*г*), слева — молекулярная масса, кДа. В качестве контроля нагрузки использовали β-актин.

CAGTTCTTGAGGCC-3'; для GAPDH прямой 5'-GAGTCATGAAGGGTCAT-3' и обратный 5'-AGTCAA-
CGGATTGGTCGTA-3'.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Клетки HEK293T и HCT116, а также клетки с нокаутом *set7/9* рассеивали в 24-луночный планшет со стеклами диаметром 13 мм. Через 1 сут клетки промывали PBS с последующей фиксацией 4%-ным раствором парформальдегида в PBS в течение 20 мин. Фиксированные клетки обрабатывали блокирующим буфером (5 % BSA в PBS, содержащем 0.3 % Тритона X-100) в течение 1 ч, после чего окрашивали антителами, специфическими к NR4A1

(Cell Signaling, США, разведение 1 : 100). Препараты заключали в среду ProLong Gold Antifade Mountant, содержащую краситель DAPI (ThermoScientific, США), и анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5.

Для проведения иммуноблотинга белки разделяли в ПААГ в денатурирующих условиях. Затем белки переносили на предварительно активированную PVDF-мембрану (Millipore, США) и инкубировали ее с антителами против Set7/9 (Santa Cruz Biotechnology, США; разведение 1 : 1000) или против β-актина (Sigma-Aldrich, США; разведение 1 : 5000).

Результаты и обсуждение

Влияние Set7/9 на экспрессию NR4A1 на уровне мРНК. Для того чтобы изучить влияние метилтрансферазы Set7/9 на экспрессию ядерного рецептора NR4A1 в клеточной линии эмбриональной почки человека HEK293T, осуществляли сверхэкспрессию метилтрансферазы Set7/9 и ее мутантной формы Set7/9mut, лишенной каталитической активности. Клеточную линию HEK293T трансфицировали векторами pcDNA3-Set7/9wt (кодирующими белок Set7/9 дикого типа), pcDNA3-Set7/9mut (кодирующими белок Set7/9 мутантный по сайту и не обладающий метилтрансферазной активностью) либо пустым вектором pcDNA3 в качестве контроля. Наличие оверэкспрессии Set7/9 верифицировали с помощью ОТ-ПЦР (рис. 1, *a*). Оказалось, что она приводит к увеличению экспрессии гена, кодирующего NR4A1, на уровне мРНК более чем в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 1, *a*). Интересно, что оверэкспрессия мутантной формы (Set7/9mut) не оказывает влияния на экспрессию NR4A1 на уровне мРНК (рис. 1, *a*). Это может говорить о том, что метилтрансферазная активность Set7/9 необходима для регуляции факторов, влияющих на экспрессию NR4A1.

Полученный эффект мы подтвердили, используя линию остеосаркомы человека U2OS, в которой был осуществлен нокаут, т. е. частичное подавление, белка Set7/9. Клетки U2OS с нокаутом Set7/9 (Set7/9KD), а также контрольные немодифицированные клетки U2OS (с неизмененным эндогенным уровнем Set7/9) подвергали обработке ДНК-повреждающим агентом доксорубицином (0.5 мкМ) в течение 0, 9 и 16 ч. Оказалось, что нокаут Set7/9 приводит к снижению уровня мРНК NR4A1 в клетках U2OS (рис. 1, *b*). Интересно, что в отсутствие Set7/9 при обработке доксорубицином уровень экспрессии NR4A1 существенно не изменялся, в то время как в контрольных клетках доксорубицин вызывал увеличение уровня экспрессии ядерного рецептора (рис. 1, *b*).

Внутриклеточный белок p21, ингибитор циклинзависимой киназы 1A, играет критическую роль в клеточном ответе на повреждение ДНК, являясь одной из известных мишней белка онкосупрессора p53. В контрольных клетках U2OS обработка доксорубицином приводила к значительной активации экспрессии гена CDKN1A, кодирующего белок p21, в ответ на действие доксорубицина. Однако при нокауте Set7/9 увеличение экспрессии p21 оказалось незначительным (рис. 1, *c*). Данные о влиянии Set7/9 на экспрессию p21 подтверждаются данными из литературы (Lezina et al., 2015).

Влияние Set7/9 на активацию экспрессии NR4A1 на уровне белка. Для изучения влияния Set7/9 на уровень экспрессии белка NR4A1 были получены клеточные линии HEK293T и рака толстой кишки человека HCT116 с нокаутом (т. е. полным выключением) гена, кодирующего Set7/9 (рис. 2, *b*, *г*). Система CRISPR/Cas9 является новой технологией быстрого и точного редактирования генома. Подход основан на действии направляемой эндонуклеазы Cas9, способной производить направленное расщепление ДНК в интересующих сайтах-мишениях. Клеточные линии HEK293T и HCT116 с нокаутом Set7/9 (Set7/9KO) и соответствующие контрольные клетки мы использовали для экспериментов по иммуноцитохимическому окрашиванию с целью детекции внутриклеточной локализации NR4A1 (рис. 2, *a*, *в*). Мы показали, что нокаут Set7/9 в обеих клеточных линиях

приводит к снижению уровня белка NR4A1 в клетках, что хорошо видно по падению интенсивности флуоресцентного сигнала (рис. 2, *a*, *в*).

Таким образом, метилтрансфераза Set7/9 влияет на уровень экспрессии ядерного рецептора NR4A1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Важно отметить, что этот эффект обусловлен активностью Set7/9, так как оверэкспрессия мутантной формы Set7/9, лишенной каталитической активности, не оказывала влияния на уровень экспрессии NR4A1. Точные механизмы влияния Set7/9 на уровень и активность NR4A1 требуют дальнейшего изучения, однако на основании настоящего исследования можно сделать вывод о том, что каталитическая функция метилтрансферазы Set7/9 необходима для регуляции экспрессии NR4A1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 18-75-10076; проведение ОТ-ПЦР, данные о влиянии Set7/9 на уровень экспрессии NR4A1 с помощью ОТ-ПЦР, данные о влиянии Set7/9 на уровень экспрессии NR4A1 с помощью иммуноцитохимии) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60228 мол_а_дк; получение стабильных клеточных линий с нокаутом Set7/9).

Список литературы

- Леонова Т. С., Дакс А. А., Шувалов О. Ю., Петухов А. В., Васильева Е. А., Барлев Н. А., Федорова О. А. 2018. Ядерные рецепторы NR4A и их роль в поддержании клеточного гомеостаза и развитии заболеваний. Цитология. 60 (5) : 330—337. (Leonova T. S., Dax A. A., Shuvakov O. Y., Petukhov A. V., Vasilyeva E. A., Barlev N. A., Fedorova O. A. 2018. NR4A nuclear receptors and their role in support of cellular homeostasis and development of diseases. Tsitologiya. 60 (5) : 330—337.)
- Beard J. A., Tenga A., Chen T. 2015. The interplay of NR4A receptors and the oncogene—tumor suppressor networks in cancer. Cell Signal. 27 : 257—266.
- Chen B. B., Glasser J. R., Coon T. A., Zou C., Miller H. L., Fenton M., McDyer J. F., Boyiadzis M., Mallampalli R. K. 2012. F box protein FBXL2 targets cyclin D2 for ubiquitination and degradation to inhibit leukemic cell proliferation. Blood. 119 : 3132—3141.
- Fujimaki K., Ogihara T., Morris D. L., Oda H., Iida H., Fujitani Y., Mirmira G. R., Evans-Molina C., Watada, H. 2015. Set7/9 regulates cytokine-induced expression of inducible nitric oxide synthase through methylation of lysine 4 at histone 3 in the islet β cell. J. Biol. Chem. 290 : 16 607—16 618.
- Inamoto T., Czerniak B. A., Dinney C. P., Kamat A. M. 2010. Cytoplasmic mislocalization of the orphan nuclear receptor Nur1 is a prognostic factor in bladder cancer. Cancer: Interdisc. Int. J. Amer. Cancer Soc. 116 : 340—346.
- Kouskouti A., Scheer E., Staub A., Tora L., Talianidis I. 2004. Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. Mol. Cell. 14 : 175—182.
- Lee S. O., Abdelrahim M., Yoon K., Chinharlapalli S., Pappinen S., Kim K., Wang H., Safe S. 2010. Inactivation of the orphan nuclear receptor TR3/Nur77 inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth. Cancer Res. 70 : 6824—6836.
- Lee S. O., Li X., Khan S., Safe S. 2011. Targeting NR4A1 (TR3) in cancer cells and tumors. Expert Opin. Ther. Targets. 15 : 195—206.
- Lezina L., Aksanova V., Fedorova O., Malikova D., Shuvakov O., Antonov A. V., Tentler D., Garabadgiu A. V., Melino G., Barlev N. A. 2015. KMT Set7/9 affects genotoxic stress response via the Mdm2 axis. Oncotarget. 6 : 25 843—25 855.
- Lezina L., Aksanova V., Ivanova T., Purmessur N., Antonov A., Tentler D., Fedorova O., Garabadgiu A., Talianidis I., Melino G.

2014. KMTase Set7/9 is a critical regulator of E2F1 activity upon genotoxic stress. *Cell Death Differ.* 21 : 1889—1899.

Llopis S., Singleton B., Duplessis T., Carrier L., Rowan B., Williams C. 2013. Dichotomous roles for the orphan nuclear receptor NURR1 in breast cancer. *BMC Cancer.* 13 : 139.

Mu X., Chang C. 2003. TR3 orphan nuclear receptor mediates apoptosis through up-regulating E2F1 in human prostate cancer LNCaP cells. *J. Biol. Chem.* 278 : 42 840—42 845.

Pradhan S., Chin H. G., Esteve P. O., Jacobsen S. E. 2009. SET7/9 mediated methylation of non-histone proteins in mammalian cells. *Epigenetic.* 4 : 383—387.

Song Y., Zhang J., Tian T., Fu X., Wang W., Li S., Shi T., Suo A., Ruan Z., Guo H., Yao Y. 2016. SET7/9 inhibits oncogenic activities through regulation of Gli-1 expression in breast cancer. *Tumor Biol.* 37 : 9311—9322.

Subramanian K., Jia D., Kapoor-Vazirani P., Powell D. R., Collins R. E., Sharma D., Peng J., Cheng X., Vertino P. 2008. Regulation of estrogen receptor α by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol. Cell.* 30 : 336—347.

Wang H., Cao R., Xia L., Erdjument-Bromage H., Borchers C., Tempst P., Zhang Y. 2001. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell.* 8 : 1207—1217.

Поступила 16 VII 2018

METHYLTRANSFERASE Set7/9 REGULATES EXPRESSION OF NUCLEAR RECEPTOR NR4A1

*O. A. Fedorova,¹, * A. A. Daks,¹ P. A. Yudichev,¹ T. S. Leonova,¹ V. Kharchenko,¹ E. A. Vasilyeva,¹ A. V. Petukhov,^{1, 2} O. Yu. Shuvalov,¹ N. A. Barlev¹*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² V. A. Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of Russian Federation, St. Petersburg, 197341;

* e-mail: fedorovaolgand@gmail.com

Nuclear receptors form a large class of transcription factors involved into control of various cellular processes such as metabolism, proliferation, inflammation, apoptosis. Among the orphan nuclear receptors (ligands are not discovered) there is a special group of proteins called NR4A (NR4A1, NR4A2, NR4A3), and the most studied one is the NR4A1 receptor. This study demonstrates the effect of methyltransferase Set7/9 on expression of the nuclear receptor NR4A1. Lysine-specific methyltransferase Set7/9 (SETD7) is an enzyme that methylates the fourth lysine of the canonical histone H3 (H3K4me1). In this study it was shown that Set7/9 affects the expression of NR4A1 both at the mRNA level and at the protein level. It is important to note that the catalytic function of the methyltransferase Set7/9 is necessary for the regulation of NR4A1 expression.

Key words: nuclear receptor NR4A1, methyltransferase Set7/9, expression of the setd7 gene, CRISPR/Cas9 genomic editing system