

DOI: 10.7868/S0041377118100053

НОКАУТ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ Set7/9 ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО К ГЕНОТОКСИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

© В. А. Мамонтова,¹ А. В. Петухов,^{1, 2} О. А. Федорова,¹ О. Ю. Шувалов,¹
Н. А. Барлев,¹ А. А. Дакс^{1, *}

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: alexandra.daks@gmail.com

Лизин-специфическая метилтрансфераза Set7/9 впервые описана как фермент, метилирующий четвертый лизин канонического гистона H3. Позже показано, что Set7/9 способен метилировать около 30 негистоновых мишней, участвующих в таких клеточных процессах, как регуляция экспрессии генов, дифференцировка, ответ на повреждение ДНК и др. Мы предположили, что от статуса Set7/9 может зависеть восприимчивость клеток к генотоксическим агентам. С помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 мы создали клеточную линию рака легкого человека A549 с нокаутом Set7/9. С использованием полученной клеточной модели мы показали, что нокаут Set7/9 повышает чувствительность клеток рака легкого к генотоксическим агентам доксорубицину и цисплатину, что достигается за счет повышение уровня апоптоза.

Ключевые слова: Set7/9, CRISPR/Cas9, нокаут, доксорубицин, этопозид, цисплатин

Принятые сокращения: НМККЛ — немелкоклеточная карцинома легкого.

Лизин-специфическая метилтрансфераза Set7/9 впервые описана как фермент, метилирующий четвертый лизин канонического гистона H3 (Wang et al., 2001). На сегодняшний день принято считать, что данная модификация гистона H3 является одним из маркеров активно экспрессирующегося хроматина (Ting et al., 2006).

Позже показано, что Set7/9 является ферментом, способным метилировать и негистоновые мишени, такие как p53, PARP1, TAF10, эстрогеновый рецептор ERα, E2F1 и др. (Pradhan et al., 2009; Kassner et al., 2013; Lezina et al., 2014; Lezina et al., 2015). На сегодняшний день всего известно около 30 негистоновых мишней Set7/9, участвующих в таких клеточных процессах, как регуляция экспрессии генов, дифференцировка, ответ на повреждение ДНК и др. Таким образом, Set7/9 потенциально может участвовать в данных процессах и влиять на такие важные туморогенные характеристики, как чувствительность клеток к генотоксическим агентам, скорость пролиферации и уровень апоптоза. Действительно, в литературе имеются данные о том, что эктопическая экспрессия Set7/9 способствует повышению уровня апоптоза в клетках острого миелоидного лейкоза и снижению уровня апоптоза в клетках рака легкого (Gu et al., 2017). При этом в цитированной работе отсутствуют данные о роли Set7/9 в запуске апоптоза в условиях генотоксического стресса, вызванного химиопрепаратами. Другое исследование демонстрирует роль Set7/9 в ответе клеток на генотоксический стресс, вызванный ингибитором топоизоме-

разы II доксорубицином (Lezina et al., 2015). Показано, что нокдаун Set7/9 повышает чувствительность клеток остеосаркомы человека U2OS к доксорубицину и снижает уровень reparации двухцепочечных разрывов в данных клетках (Lezina et al., 2015).

На сегодняшний день рак легкого является одной из наиболее распространенных причин онкологической смертности, а пятилетняя выживаемость после постановки диагноза в среднем не превышает 20 % (Torre et al., 2016). Около 80 % случаев рака легкого относят к немелкоклеточной карциноме легкого (НМККЛ). Особенной агрессивностью отличается НМККЛ с мутациями в гене *kras*, для которой применение ингибиторов EGFR является неэффективным (Riely et al., 2008). Таким образом, поиск биомаркеров для оценки эффективности химиотерапии при данной форме НМККЛ является особенно актуальным. По этой причине мы выбрали линию НМККЛ человека с мутацией G12S в гене *kras* для исследования роли метилтрансферазы Set7/9 в клеточном ответе на обработку генотоксическими химиопрепаратами.

Материал и методика

В работе использовали следующие клеточные линии — линию НМККЛ человека A540 и линию фибробластов эмбриональной почки человека НЕК293-Т. Клеточные линии культивировали при 37 °C в среде RPMI

(в случае линии A549) и DMEM (в случае HEK293-T) (Invitrogen, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) в присутствии смеси пенициллина и стрептомицина (Биолот, Россия). Для проведения иммуноблотинга белки разделяли с помощью 13%-ного ПААГ в денатурирующих условиях, переносили на PVDF-мембрану, которую затем инкубировали с соответствующими первичными антителами. Использовали первичные антитела против Set7/9 (Santa Cruz Biotechnology, США, разведение 1 : 1000) и β -актина (Sigma-Aldrich, США, разведение 1 : 5000).

Для оценки уровня экспрессии *Setd7* использовали метод количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Для этого тотальную РНК экстрагировали из клеток A549 с нокаутом *Set7/9* и из контрольных клеток с использованием реагента TriZol (ThermoFisher, Латвия) согласно инструкции фирмы-производителя. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFisher, Латвия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Для анализа экспрессии генов *setd7* и *GAPDH* использовали следующие праймеры: к *setd7* прямой 5'-TCATTGATGTGCCTGAGCCSTA-3' и обратный 5'-TCAGGGTGCGGATGCATTGAT-3', к *GAPDH* прямой 5'-GAGGTCAATGAAGGGTCAT-3' и обратный 5'-AGTCAACGGATTGGTCGTA-3'.

Для нокаута *Set7/9* в клеточной линии A549 применяли методику CRISPR/Cas9. Использовали вектор lentiCRISPRv2.0, включающий в себя как последовательность фермента Cas9, так и скаффолд для направляющей РНК (guide RNA, gRNA) (Sanjana et al., 2014). В данный вектор клонировали последовательность gRNA, специфическую для *Set7/9*: 5'-ATGGATAGCGACGACGAGATGGTGGAGGAGGCCGTGGAAGGGCACCTGGACGATGACGGATTACCGCACGGTTCTGCACA-3', подобранную с помощью ресурса CCTop (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>). Для получения стабильных клеточных линий использовали метод лентивирусной трансдукции. Для сборки лентивирусных частиц в клетки HEK293T котрансфицировали вектор lentiCRISPRv2.0 с последовательностью gRNA (в качестве контроля использовали исходный вектор lentiCRISPRv2.0, не несущий gRNA), а также упаковочный вектор psPAX2 и вектор,

кодирующий лентивирусную оболочку, pMD2.G. После множественного заражения клетки вели на селективной среде с пуромицином.

Для проведения МТТ-теста клетки рассаживали в 96-луночные культуральные планшеты и обрабатывали генотоксическими агентами доксорубицином и цисплатином в различных концентрациях. Через 24 ч в каждую лунку добавляли 10 мкл 5 мг/мл раствора МТТ в PBS и помещали в CO₂-инкубатор на 4 ч. После этого среду отбирали, в каждую лунку добавляли 100 мкл растворителя (0.3%-ный раствор HCl в изопропаноле) и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 30 мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм с помощью флуориметра (Fluorofot, Россия). Жизнеспособность клеток рассчитывали как относительную величину, принимая за 100 % значения оптической плотности раствора в лунках с контрольными клетками, не подвергшимися обработке.

Уровень апоптоза в клетках после обработки генотоксическими агентами этопозидом и цисплатином в течение 24 ч измеряли методом проточной цитофлуориметрии с помощью прибора Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Германия) и набора реагентов Muse Annexin V & Dead Cell Assay Kit (Merck Millipore, Германия) по протоколу, рекомендованному фирмой-производителем.

Результаты и обсуждение

Получение клеточной линии A549 с нокаутом *Set7/9* с помощью системы CRISPR/Cas9. Для получения линии с нокаутом *setd7*, кодирующего метилтрансферазу *Set7/9*, выбрали линию НМККЛ человека, экспрессирующую белок p53 дикого типа и характеризующуюся наличием распространенной мутации G12S в гене *kras*, а также относительно высоким уровнем белка *Set7/9* (https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-185?geo_country=ru#history).

По результатам количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени уровень мРНК *setd7* в линии с нокаутом, оцененный, остается неизменным по сравнению с контрольной линией, так как фермент Cas9 вырезает лишь небольшой фрагмент ДНК, что не влияет на уровень мРНК (рис. 1, *a*). Трансляции *Set7/9* с данной РНК

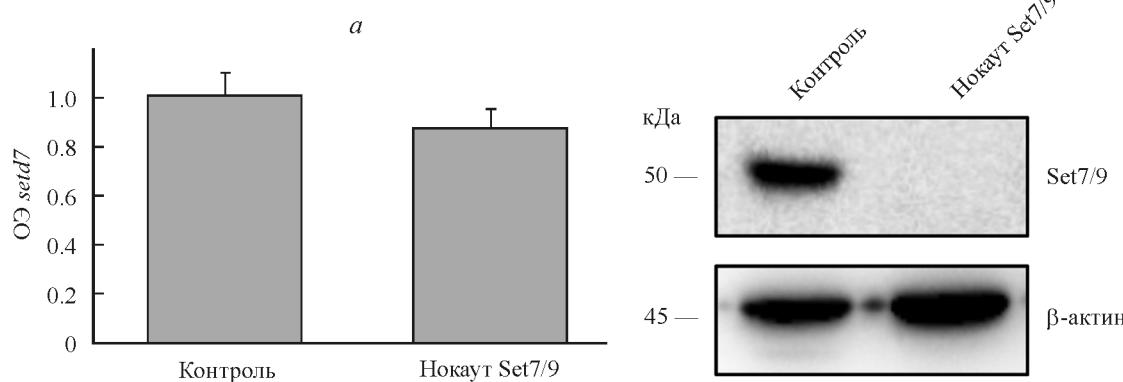


Рис. 1. Нокаут *Set7/9* с использованием системы CRISPR/Cas9.

a — уровень относительной экспрессии (ОЭ) гена *setd7*, кодирующего белок *Set7/9*, на уровне мРНК (количественная ОТ-ПЦР в реальном времени) в контрольных клетках и в клетках с нокаутом *Set7/9*; вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. *б* — репрезентативные результаты Вестерн-блот-анализа уровня белка *Set7/9* в контрольных клетках и в клетках с нокаутом *Set7/9*, β -актин — контроль нагрузки.

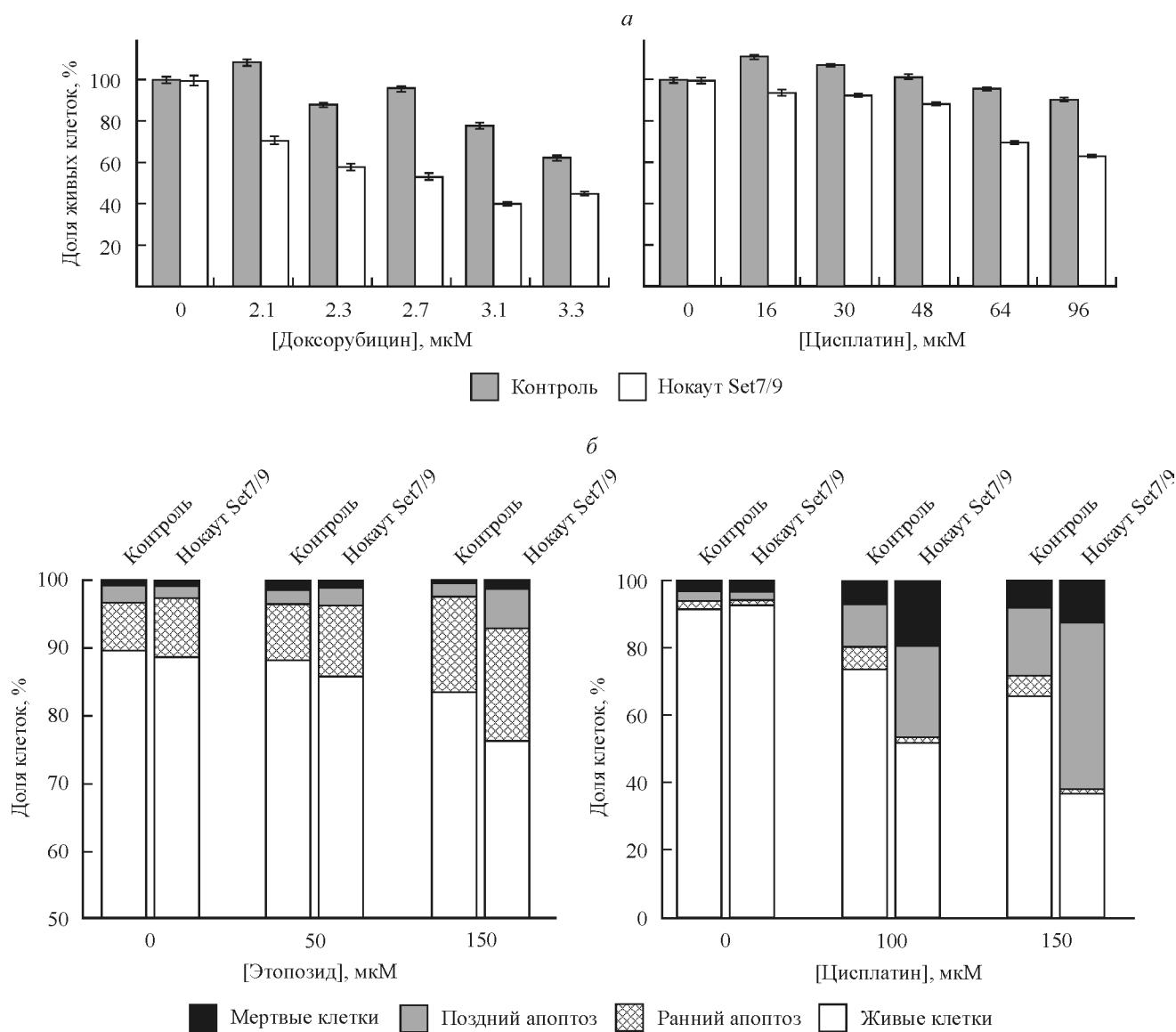


Рис. 2. Влияние уровня Set7/9 на чувствительность клеток А549 к генотоксическим препаратам.

a — доля живых клеток по результатам МТТ-теста в клеточных линиях с нокаутом Set7/9 и контрольной после обработки доксорубицином и цисплатином; вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. *б* — распределение клеток по стадиям апоптотической гибели в клеточных линиях с нокаутом Set7/9 и контрольной после обработки этопозидом и цисплатином.

при этом не происходит, что подтверждено с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием антител, специфичных к Set7/9 (рис. 1, б).

Клетки А549 с нокаутом Set7/9 обладают повышенной чувствительностью к доксорубицину и цисплатину. Чтобы определить влияние Set7/9 на чувствительность раковых клеток к генотоксическим агентам, мы выбрали два химиотерапевтических препарата, входящих в современные схемы лечения НМККЛ с различным механизмом действия — доксорубицин и цисплатин. Доксорубицин является ингибитором ДНК топоизомеразы II и вызывает образование двухцепочечных разрывов ДНК, что приводит к активации таких механизмов reparации, как гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов. Цисплатин в свою очередь образует сшивки пуриновых оснований и индуцирует эксцизионную reparацию нуклеотидов и оснований.

На рис. 2, *a* представлены результаты МТТ-теста, проведенного с использованием контрольной клеточной линии и линии А549 с нокаутом Set7/9. Нокаут Set7/9 повышает чувствительность исследуемой клеточной линии как к доксорубицину, так и к цисплатину. Полученные нами данные частично согласуются с результатами, полученными ранее. Так, показано, что подавление экспрессии Set7/9 в клетках остеосаркомы человека приводит к повышению чувствительности данных клеток к доксорубицину (Lezina et al., 2015).

Таким образом, в ходе данной работы мы впервые показали влияние статуса Set7/9 на восприимчивость клеток рака легкого к генотоксическим агентам различного механизма действия.

Нокаут Set7/9 вызывает повышение уровня апоптоза в клетках А549 после обработки доксорубицином и цисплатином. С помощью проточной цитофлуориметрии мы исследовали

механизм гибели клеток с различным статусом Set7/9 при обработке генотоксическими агентами различного типа действия — этопозидом и цисплатином. В данном эксперименте мы использовали этопозид как альтернативный ингибитор топоизомеразы II, также применяющийся в составе схем противоопухолевой терапии по причине того, что данный препарат не характеризуется флуоресценцией в отличие от доксорубицина. Доксорубицин в свою очередь характеризуется сходными характеристиками поглощения и испускания света с 7-амино-актиномицином D (7ААМД), применяемым в данной методике в качестве маркера проницаемости клеточной мембранны.

В результате мы показали, что нокаут Set7/9 способствует повышению уровня апоптоза в клетках А549 при обработке этопозидом и цисплатином (рис. 2, б). При этом при обработке клеток 50 и 150 мкМ этопозида в течение 24 ч клетки в основном находились на стадии раннего апоптоза, а при обработке цисплатином в концентрациях 100 и 150 мкМ в течение того же времени наблюдалось преобладание клеток в состоянии позднего апоптоза (рис. 2, б).

Таким образом, мы показали, что чувствительность клеток А549 с нокаутом Set7/9 к ДНК-повреждающим агентам различного механизма действия обусловлена повышением уровня апоптоза. Возможно, данное действие обеспечивается влиянием Set7/9 на транскрипционную активность проапоптотического фактора p53, что, однако, требует дальнейшего более подробного изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 17-75-10198).

Список литературы

- Gu Y., Wang Y., Wang X., Gao L., Yu W., Dong W.-F. 2017. Opposite effects of SET7/9 on apoptosis of human acute myeloid leukemia cells and lung cancer cells. *J. Cancer.* 8 : 2069.
- Kassner I., Andersson A., Fey M., Tomas M., Ferrando-May E., Hottiger M. O. 2013. SET7/9-dependent methylation of ARTD1 at K508 stimulates poly-ADP-ribose formation after oxidative stress. *Open Biol.* 3 : 120173.
- Lezina L., Aksanova V., Fedorova O., Malikova D., Shuvalov 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 : 25843.
- 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 and Differentiation.* 21 : 1889.
- Pradhan S., Chin H. G., Estève P.-O., Jacobsen S. E. 2009. SET7/9 mediated methylation of non-histone proteins in mammalian cells. *Epigenetics.* 4 : 383—387.
- Riely G. J., Kris M. G., Rosenbaum D., Marks J., Li A., Chitale D. A., Nafa K., Riedel E. R., Hsu M., Pao W. 2008. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 14 : 5731—5734.
- Sanjana N. E., Shalem O., Zhang F. 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods.* 11 : 783.
- Ting A. H., McGarvey K. M., Baylin S. B. 2006. The cancer epigenome — components and functional correlates. *Genes Develop.* 20 : 3215—3231.
- Torre L. A., Siegel R. L., Jemal A. 2016. Lung cancer statistics. In: Lung cancer and personalized medicine. New York: Springer. 1—19.
- 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

Set7/9 METHYLTRANSFERASE KNOCK OUT INCREASES THE SENSITIVITY OF LUNG CANCER CELLS TO GENOTOXIC DRUGS

V. A. Mamontova,¹ A. V. Petukhov,^{1,2} O. A. Fedorova,¹ O. Yu. Shuvalov,¹ N. A. Barlev,¹ A. A. Daks^{1,*}

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: alexandra.daks@gmail.com

Lysine-specific methyltransferase Set7/9 was initially described as enzyme methylating the 4 lysine of the canonical histone H3. It was later shown that Set7/9 is able to methylate up to 30 non-histone targets involved in such cellular processes as gene expression regulation, cell differentiation, DNA damage response, and others. We assumed that the susceptibility of cells to genotoxic agents may depend on the status of Set7/9. Using the CRISPR/Cas9 genomic editing tool, we created the A549 human lung cancer cell line with knockout of Set7/9. Using the obtained cellular model, we showed that knockout of Set7/9 increases the sensitivity of lung cancer cells to genotoxic agents — doxorubicin and cisplatin, which is achieved by increasing the level of apoptosis.

Key words: Set7/9, CRISPR/Cas9, knockout, doxorubicin, cisplatin, etoposide