

УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА H3 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ С НОКАУТОМ

ADAMTS1, THBS1 И RBFOX2

Р.Р. Савченко¹, С.А. Васильев¹, В.С. Фишман²

Научный руководитель: д.б.н., профессор РАН И.Н. Лебедев

¹НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН,

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки 10, 634050

²Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: savchenko_renata@mail.ru

H3 GISTONE METHYLATION LEVEL IN THE *ADAMTS1, THBS1* AND *RBFOX2* KNOCKOUT CELL LINES

R.R. Savchenko¹, S.A. Vasilyev¹, V.S. Fishman²

Scientific Supervisor: I.N. Lebedev, D.Sc., Professor of RAS

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
of Russian Academy of Science, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki str. 10, 634050,

²Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Science,
Russia, Novosibirsk, 10 Lavrentyeva Prospect, 630090

E-mail: savchenko_renata@mail.ru

Abstract. *At present, there is an increasing interest in indirect participants of the DNA double-strand breaks repair processes. In this study we aimed to appreciate the effects of ADAMTS1, THBS1, and RBFOX2 genes on the transcriptional regulation through a change in H3K9, H3K27, H3K4 and H3K36 methylation levels in the knockout cell lines. It was shown that the THBS1 and RBFOX2 knockout cell lines were characterized by an elevated the histone H3K9me3 level (1.8- and 1.6-fold, respectively ($p < 0.01$)), while no significant differences were found in other knockout cell lines. Moreover, THBS1 knockout cell line was characterized by an 1.2-fold increase in histone H3K27me3 level ($p = 0.05$). The H3K4 and H3K36 methylation levels were significantly decreased only in RBFOX2 knockout cell line (1.6 and 1.7-fold, respectively ($p < 0.05$)) in comparison with the intact HeLa. Given the effects of knockout of analyzed genes on the DNA repair effectiveness, changes in the pattern of H3 histone methylation can lead to a change in the gene expression level and, as a consequence, affect the regulation of the radiation-induced cell response to DNA damage.*

Введение. Воздействие ионизирующего излучения вызывает значительные повреждения в клетках человека, наиболее губительными из которых являются двунитевые разрывы ДНК [1]. В то время как в литературе обсуждаются, главным образом, два основных механизма репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках млекопитающих (гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов) [2], роль других косвенных участников в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа остаётся недостаточно изученной. Эксперименты, проведенные нами ранее на лимфоцитах периферической крови человека, позволили выявить связь дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и 53BP1, являющихся маркерами

процессов репарации, и частотой радиационно-индуцированных центромеро-негативных микроядер, отражающих уровень повреждения ДНК. С целью оценить возможность участия выявленных генов в транскрипционной регуляции процессов репарации ДНК на основе опухолевой линии HeLa были созданы клеточные линии с мутациями в данных генах. Затем, в полученных линиях был проведён анализ уровня метилирования гистона H3 по лизину в позициях 4, 9, 27 и 36. Метилирование H3K9 и H3K27 сопутствует формированию гетерохроматина и рассматривается в первую очередь как модификация гистонов, направленная на подавление транскрипционной активности генов [3], в то время как метилирование H3K4 и H3K36 ассоциировано с эухроматином и активацией экспрессии [4,5].

Материалы и методы исследования. Линии с нокаутом генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* были созданы на основе опухолевой линии HeLa с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. Полученные мутации были охарактеризованы с помощью секвенирования нового поколения (NGS). Метилирование гистонов оценивалось методом иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием антител к H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3 и H3K36me3.

Результаты. Применение иммуноокрашивания позволило установить, что линии с мутациями в генах *THBS1* и *RBFOX2* характеризовались повышением уровня H3K9me3 по сравнению с исходной линией HeLa (в 1,8 и 1,6 раза, соответственно; $p < 0,01$). Кроме того, линия с мутацией в гене *THBS1* отличалась повышенным уровнем H3K27me3 (в 1,2 раза; $p = 0,05$). Тенденция к повышению уровня H3K9me3 наблюдалась в линии с мутацией гена *ADAMTS1* (в 1,5 раза), однако значимых отличий выявлено не было (рис. 1).

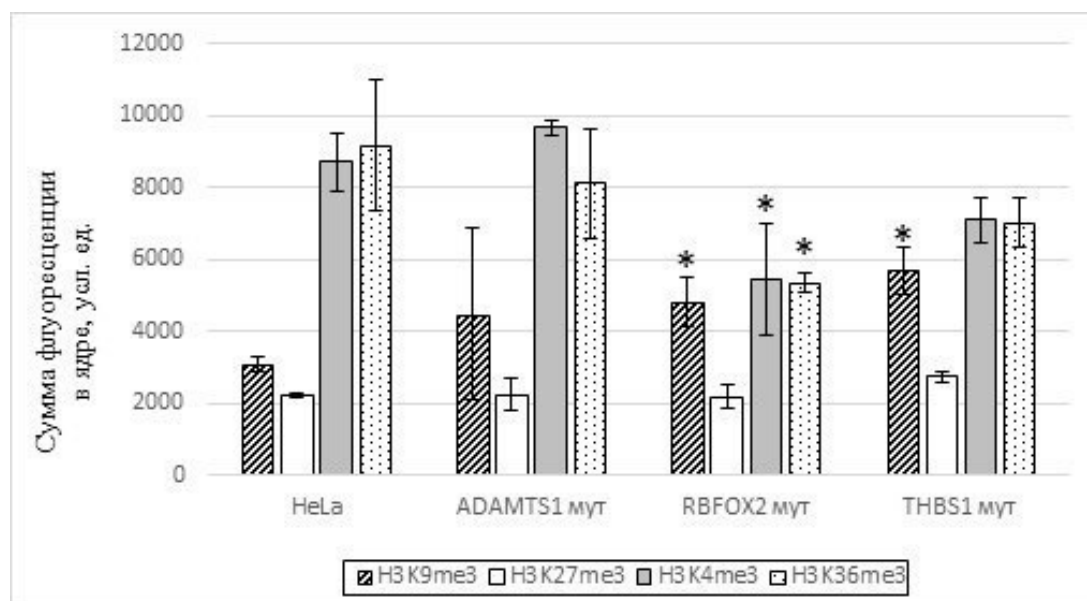


Рис.1 Влияние мутаций в генах *ADAMTS1*, *RBFOX2* и *THBS1* в клеточной линии HeLa на уровень метилирования гистонов в необлученных клетках

Снижение уровня метилирования гистона H3 по лизину в позициях 4 и 36 было отмечено только для линии с мутацией в гене *RBFOX2* (в 1,6 и 1,7 раз, соответственно; $p < 0,05$) (рис. 1).

Обращает на себя внимание паттерн метилирования гистона H3 в линии с мутацией *RBFOX2*. С одной стороны, данная линия характеризуется повышенным уровнем H3K9me3, традиционно связанным с подавлением активности генов, с другой стороны, данный эффект усиливается снижением уровней H3K4me3 и H3K36me3. Однако, как и в случае с *THBS1*, механизмы влияния *RBFOX2* на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов через уровень метилирования гистонов в настоящий момент остаются неясными.

Заключение. Поскольку ранее нами было показано, что экспрессия генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* коррелирует со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и 53BP1 и частотой радиационно-индуцированных микроядер, выявленные в данной работе гены, по-видимому, опосредованно влияют на уровень репарации двунитевых разрывов ДНК. Возможно, это влияние осуществляется на уровне эпигенетической регуляции через изменение уровня метилирования гистона H3, однако вопрос о причине изменения рисунка метилирования данного гистона в линиях с мутациями обсуждаемых генов на сегодняшний день остаётся открытым. Несмотря на это, изучение роли косвенных участников процессов репарации ДНК остаётся актуальным, поскольку может внести значительный вклад в развитие понимания механизмов, лежащих в основе индивидуального ответа соматических клеток человека на воздействие мутагенных факторов, включая ионизирующее излучение.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-50178 и гранта Президента Российской Федерации МК-5944.2018.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Santivasi, W. L., Xia, F. (2014). Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol. 21, no. 2, pp. 251-259.
2. Lomax, M. E., Folkes, L. K., O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clinical Oncology*, no. 25, pp. 578-585.
3. Allshire, R. C., Madhani, H. D. (2017). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, doi:10.1038/nrm.2017.119.
4. Martin, C., Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 6, no. 11, pp. 838-849.
5. Miller, J. L., Grant, P. A. (2013). The role of DNA methylation and histone modifications in transcriptional regulation in humans. *Subcellular Biochemistry*, no. 61, pp. 289-317.