



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Martyna Wojtala

**Zmiany statusu metylacji grup
lizynowych białek determinowane
aktywnością metylotransferazy G9a
i lizyno-specyficznej demetylazy 1
jako modulator funkcji komórek
śródbłónka naczyniowego**

Changes in the methylation of lysine groups
of proteins determined by the activity
of G9a methyltransferase and lysine-specific
demethylase 1 as a modulator of the function
of vascular endothelial cells

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biofizyki Molekularnej
Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego

pod kierunkiem
dr. hab. Anety Balcerczyk, prof. UŁ

STRESZCZENIE

Jednym z epigenetycznych mechanizmów kontroli ekspresji genów są potranslacyjne modyfikacje białek histonowych, katalizowane przez specyficzne grupy enzymów. Mają one zasadnicze znaczenie w kształtowaniu struktury chromatyny i wpływają na jej architekturę (1) bezpośrednio, oddziałując na interakcje: histon-histon, histony-DNA, nukleosom-nukleosom lub (2) pośrednio (informacyjnie) – modyfikacja potranslacyjna warunkowana jest poprzednią, a także inicjuje rekrutację innych białek zdolnych do modyfikowania chromatyny. Lokalne zmiany stopnia kondensacji chromatyny rzutują na dostępność czynników transkrypcyjnych do promotorów genów, a w konsekwencji na ich ekspresję i procesy metaboliczne. Synergizm modyfikacji potranslacyjnych wpływa na regulację wielu procesów komórkowych, w tym cykl komórkowy, transkrypcję genów, replikację oraz naprawę DNA.

Spośród wielu modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych największy wpływ na organizację przestrzenną chromatyny wywiera acetylacja i metylacja, której regulatory są przedmiotem niniejszej dysertacji. O ile acetylacja jest kojarzona ze wzrostem ekspresji genów, o tyle metylacja histonów ma niejednoznaczny wpływ na regulację procesu transkrypcji, zależny od pozycji metylowanych reszt aminokwasowych oraz liczby przyłączonych doń grup metylowych. Rozregulowanie tego mechanizmu epigenetycznego będące m. in. konsekwencją mutacji w genach, kodujących enzymy odpowiedzialne za wprowadzanie i usuwanie grup metylowych lub wynikające z niedostatecznego poziomu substratu, może prowadzić do różnego typu stanów patologicznych, w tym również progresji chorób nowotworowych. Za metylację histonów a także niektórych białek niehistonowych odpowiedzialne są metylotransferazy histonów, które katalizują reakcję przyłączenia grup(y) metylowej, natomiast antagonistyczne do nich działanie wykazują demetylazy histonów. Odkąd stwierdzono, że metylacja jest odwracalna, zaczęto poszukiwać związków chemicznych, których działanie hamowałoby aktywność metylotransferaz i demetylaz białek histonowych w celu przywrócenia prawidłowego metabolizmu komórkowego.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie roli procesów metylacji i demetylacji reszt lizynowych białek, warunkowanych aktywnością metylotransferazy G9a (ang. *G9a histone methyltransferase*, G9a HMT) i lizyno-specyficznej demetylazy 1 (ang. *lysine-specific demethylase 1*, LSD1), na wybrane elementy topografii chromatyny i metabolizmu śródbłonki naczyniowego.

Śródbłonek to największy gruczoł endokryny człowieka. Ze względu na swoją lokalizację i ciągły kontakt z przepływającą krwią, odgrywa niezwykle istotną rolę w procesach fizjologicznych (regulacji przepływu i ciśnienia krwi, syntezie i wydzielaniu czynników aktywnych biologicznie,

kontroli dystrybucji substancji odżywczych, angiogenezie, neoangiogenezie, reakcjach zapalnych i odpornościowych). Zaburzenia prawidłowego funkcjonowania śródbłonna odgrywa znaczącą rolę w rozwoju i przebiegu jednostek chorobowych: miażdżycy, nadciśnieniu, cukrzycy, chorobie niedokrwiennej serca i tętnic obwodowych jak również nowotworów. Mimo znaczącego postępu badań z zakresu fizjologii śródbłonna, ciągle uczymy się na temat roli markerów epigenetycznych w jego metabolizmie.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej jako model badawczy wykorzystano ludzkie komórki śródbłonna pochodzenia mikronaczyniowego (HMEC-1) oraz żylnego (HUVECs). Limitując aktywność analizowanych enzymów (G9a HMT, LSD1), poprzez (1) zastosowanie specyficznych inhibitorów, takich jak: BIX-01294, chaetocyna czy 2-PCPA, jak również (2) blokując ekspresję obu białek przez shRNA, stwierdzono znaczący wpływ metylotransferazy G9a na progresję cyklu komórkowego zależną od aktywacji punktu kontrolnego warunkowanego aktywnością Chk1. Zahamowanie aktywności G9a HMT powodowało przyrost subpopulacji komórek w fazie G_0/G_1 z jednoczesną utratą liczebności komórkowej w fazie S i G_2/M , czemu towarzyszył wzrost ekspresji genów punktów kontrolnych, tj. Rb1, p21 oraz p-S317 Chk1. Dodatkowo wykazano zaangażowanie G9a HMT w kształtowanie struktur pseudokapilarnych (niedobór enzymu skutkowało zahamowaniem procesu). Silnie obniżony potencjał proliferacyjny komórek śródbłonna na skutek zablokowania aktywności G9a HMT może mieć istotne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej na skutek ograniczenia patologicznej angiogenezy, a także w leczeniu zaburzeń proliferacji naczyń (miażdżycy, cukrzycowych powikłań naczyniowych, restenozy). Przeprowadzone badania wykazały, że usuwanie grup metylowych z reszt lizynowych białek histonowych i niehistonowych jest ważnym czynnikiem regulującym proliferację komórek.

Stwierdzono, że LSD1 również odgrywa znaczącą rolę w progresji cyklu komórkowego HMEC-1, warunkując przejście fazowe G_2/M poprzez indukowanie zmian w ekspresji cykliny A i B oraz p21. Rolę LSD1 w prawidłowych procesach podziałowych powiązano z aktywacją (fosforylacją S317) kinazy Chk1, krytycznej dla przejścia fazowego G_2/M . Przyrost subpopulacji komórek w fazie M, po wyciszeniu aktywności LSD1, wskazuje na ograniczoną możliwość wejścia komórek na drogę apoptozy. Co więcej, komórki te wykazywały liczne aberracje chromosomowe, m. in.: utratę części chromosomów, obecność fragmentów acentrycznych czy mostki chromosomowe. Istotny udział LSD1 w utrzymaniu stabilności genetycznej i naprawie DNA potwierdziły badania na modelu transkrypcyjnym, gdzie zaobserwowano istotny wzrost dwuniciowych pęknięć DNA oraz uszkodzeń oksydacyjnych DNA (utlenianie puryn i pirymidyn). Poszukiwania powiązań regulacji cyklu komórkowego z organizacją strukturalną chromatyny, doprowadziły do wniosku, że LSD1 wykazuje potencjał do oddziaływania na wyższe struktury chromatyny w kierunku relaksacji, czego dowiodły badania nad lokalizacją i ekspresją białek HP1 i CAF1.

W toku badań nad rolą LSD1 w metabolizmie śródbłonka analizowano jej funkcję w regulacji odpowiedzi zapalnej indukowanej przez lipopolisacharyd. W opozycji do niektórych danych literaturowych, wskazujących na przeciwzapalną aktywność lizyno-specyficznej demetylazy 1 w komórkach nowotworowych, śródbłonkowy model badawczy jednoznacznie wykazał prozapalną naturę LSD1, związaną ze (1) wzrostem uwalnianych zewnątrzkomórkowo mediatorów zapalenia, (2) wzrostem ekspresji licznych molekuł prozapalnych oraz (3) silną rekrutacją limfocytów do aktywowanego śródbłonka. Wzmożona transkrypcja zdecydowanej większości ujawnionych genów prozapalnych zależna jest od czynnika transkrypcyjnego NFκB, którego aktywacja odbywa się m. in. w odpowiedzi na obecność endotoksyn bakteryjnych. Stwierdzono, że LSD1 stymuluje translokację NFκB do jądra, a inhibitor 2-PCPA znacząco hamuje ten proces. Nie udało się dostarczyć żadnych dowodów na bezpośrednie oddziaływanie LSD1 na podjednostkę p65 NFκB. Zatem nie jest wiadome, czy wsparcie LSD1 w propagacji odpowiedzi zapalnej polega na ułatwieniu dostępu czynnika transkrypcyjnego do promotorów mediatorów zapalenia poprzez lokalną relaksację chromatyny czy usuwanie znaczników molekularnych z p65.

Podsumowując, zarówno przyłączanie jak i usuwanie grup metylowych z reszt lizynowych białek, katalizowanych przez G9a HMT i LSD1 odpowiednio, stanowi ważny czynnik regulacyjny fundamentalnych procesów metabolicznych śródbłonka – proliferacji i angiogenezy, stabilności genetycznej, naprawy DNA oraz odpowiedzi zapalnej. O ile koneksja między aktywnością obu enzymów wobec białek histonowych i organizacją strukturalną chromatyny w aspekcie badanych procesów komórkowych została wykazana, potencjalne interakcje G9a HMT i LSD1 z białkami niehistonowymi wymagają dalszych badań.

Małgorzata Stojala

ABSTRACT

Gene expression is controlled by epigenetic mechanisms, including post-translational modifications of histone proteins (PTMs), catalyzed by appropriate classes of enzymes. They are essential in shaping the chromatin structure and affect its architecture (1) directly, influencing the interactions: histone-histone, histones-DNA, nucleosome-nucleosome or (2) indirectly (informatively) – PTM is conditioned by the previous one and initiates recruiting other proteins capable of modifying chromatin. Local changes in chromatin condensation affect the availability of transcription factors to promoters and, consequently, gene expression and metabolism. The synergistic actions of PTMs regulate many cellular processes, including the cell cycle, gene transcription, replication and DNA repair.

Among the many post-translational modifications of histone proteins, acetylation and methylation exert the greatest influence on the conformation of chromatin, the regulators of which are the subject of this dissertation. While acetylation is associated with an increase in gene expression, the methylation of histones has an ambiguous effect on the regulation of the transcription process, depending on the position of methylated amino acid residues and the number of methyl groups attached to it. Deregulation of this epigenetic mechanism that is, *inter alia*, the consequence of mutations in genes encoding enzymes responsible for the attachment and removal of methyl groups or result from insufficient substrate level, may lead to various types of pathological conditions, including the cancer and metastasis. Histone methyltransferases (HMTs) are responsible for the methylation of histones as well as some nonhistone proteins, which catalyze the reaction of adding a methyl group(s), while histone demethylases (HDMs) have an antagonistic effect. Since methylation was found to be reversible, chemicals that would inhibit the activity of HMTs and HDMs have been sought to restore normal cellular metabolism.

The main objective of this dissertation was to determine the role of methylation and demethylation of lysine residues of proteins conditioned by the activity of G9a methyltransferase (G9a HMT) and lysine-specific demethylase 1 (LSD1) on selected elements of chromatin topography and the regulation of selected metabolic processes of microvascular endothelium (HMEC-1).

Endothelium is the largest human endocrine gland. Due to its location and constant contact with blood flowing, it plays an extremely important role in physiological processes (regulation of blood flow and pressure, synthesis and secretion of biologically active factors, control of nutrient distribution, angiogenesis, inflammatory and immune reactions). Disturbances

in the proper functioning of the endothelium play a significant role in the development and course of the following diseases: atherosclerosis, hypertension, diabetes, ischemic heart disease and peripheral arterial disease or cancers. Despite advances in endothelial physiology research, little is known about the role of epigenetic markers in endothelial metabolism.

In the presented doctoral dissertation, human endothelial cells of microvascular (HMEC-1) and venous (HUVEC) origin were used as a research model. By limiting the activity of the tested enzymes, (1) by using specific inhibitors, such as: BIX-0126, chaetocin or 2-PCPA, as well as (2) by blocking expression both proteins by shRNA, a significant effect of G9a methyltransferase on cell cycle progression dependent on the activation of the checkpoint Chk1. Inhibition of G9a HMT activity caused an increase in the cell subpopulation in the G_0/G_1 phase with a simultaneous loss of cellular abundance in the S and G_2/M phase, which was accompanied by an increase in the expression of checkpoint genes, i.e. Rb1, p21 and p-S317 Chk1. Additionally, the involvement of G9a HMT in capillary tube-like formation has been observed (the enzyme deficiency resulted in the inhibition of the process). The strongly reduced proliferation potential of endothelial cells due to blocking the activity of G9a HMT may be important in antitumor therapy due to the limitation of pathological angiogenesis, as well as in the treatment of vascular proliferation disorders (atherosclerosis, diabetic vascular complications, restenosis). The conducted studies have shown that the removal of methyl groups from lysine residues of histone and nonhistone proteins is an important factor regulating cell proliferation.

LSD1 has also been found to play a significant role in the progression of the HMEC-1 cell cycle, conditioning the G_2/M phase transition by inducing changes in the expression of cyclin A and B and p21. The role of LSD1 in normal division processes has been associated with the activation (S317 phosphorylation) of the Chk1 kinase, critical for the G_2/M phase transition. The increase in the M-phase subpopulation of cells indicates a limited possibility for cells to enter the apoptotic pathway after LSD1 activity has been silenced. Moreover, these cells showed chromosomal aberrations, i. e.: loss and logging chromosomes, acentric fragments or chromosome bridges. The significant role of LSD1 in maintaining genetic stability and DNA repair was confirmed by studies with HMEC-1 LSD1 KDs, where a significant increase in DNA double-strand breaks and DNA oxidative damage (oxidation of purines and pyrimidines) was observed. The search for the relationship between the regulation of the cell cycle and the structure of chromatin, led to the conclusion that LSD1 has the potential to affect higher chromatin structures towards relaxation, as demonstrated by studies on the localization and expression of HP1 and CAF1 proteins.

During studies on the role of LSD1 in endothelial metabolism, its function in the regulation of the inflammatory response induced by the lipopolysaccharide was investigated. Contrary

to some literature data showing its anti-inflammatory activity of lysine-specific demethylase 1 in cancer cells, the endothelial research model unambiguously demonstrated the pro-inflammatory nature of LSD1, associated with (1) an increase in extracellularly released inflammatory mediators, (2) an increase in the expression of numerous pro-inflammatory molecules as well as (3) a strong recruitment of lymphocytes to the activated endothelium. Increased transcription of most of the revealed pro-inflammatory genes depends on the transcription factor NFκB, the activation of which takes place, among others in response to the presence of bacterial endotoxins. LSD1 stimulate NFκB translocation to the nucleus proved, and the 2-PCPA inhibitor significantly inhibited this process. No evidence could be provided of any direct effect of LSD1 on the p65 subunit of NFκB. Thus, it is not known whether the support of LSD1 in the propagation of the inflammatory response is based on facilitating the access of the transcription factor to the promoters of inflammation mediators through local chromatin relaxation or removal of molecular markers from p65.

In summary, the addition and removal of methyl groups from the lysine residues of proteins catalyzed by G9a HMT and LSD1, respectively, is an important regulatory factor for the fundamental metabolic processes of the endothelium – proliferation and angiogenesis, genetic stability, DNA repair and inflammatory response. While the connection between the activity of both enzymes towards histone proteins and the structural organization of chromatin in the context of the studied cellular processes has been demonstrated, the potential interactions of G9a HMT and LSD1 with non-histone proteins require further research.

Ekaterina Mojzala