

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.218.214.5.24

©Коллектив авторов

ЭНДОНУКЛЕАЗА EndoG ИНДУЦИРУЕТ АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ hTERT И ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Д.Д. Жданов^{1,2}, Д.А. Васина², В.С. Орлова², В.Ю. Готовцева³, М.В. Бибикова³, В.С. Покровский¹,
М.В. Покровская¹, С.С. Александрова¹, Н.Н. Соколов¹*

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,

119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: +74992466980; факс: +74992450857; эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

²Экологический факультет, Российский университет дружбы народов, Москва

³ООО "Виорин", Москва

Активность теломеразы регулируется альтернативным сплайсингом мРНК её каталитической субъединицы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase). Увеличение количества неактивной сплайс-формы hTERT ингибирует теломеразную активность. В настоящее время механизм сплайсинга hTERT изучен недостаточно полно. Целью работы было изучение влияния апоптотической эндонуклеазы EndoG на альтернативный сплайсинг hTERT и активность теломеразы. В клетках 12 линий рака кишечника человека выявлена взаимосвязь между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT. Сверхэкспрессия EndoG в клетках CaCo-2 вызывала снижение экспрессии полноразмерного активного варианта hTERT и увеличение экспрессии сплайс-варианта. Уменьшение количества полноразмерного варианта hTERT приводило к снижению теломеразной активности, укорочению длины теломер до критических значений, переходу клеток в состояние репликативного старения, активации апоптотических процессов и гибели клеток. Эти данные указывают на участие EndoG в процессе альтернативного сплайсинга мРНК каталитической субъединицы теломеразы и регуляции теломеразной активности.

Ключевые слова: EndoG, теломераза, hTERT, альтернативный сплайсинг, CaCo-2

DOI 10.18097/PBMC20166203239

ВВЕДЕНИЕ

Теломераза представляет собой ферментативный комплекс, синтезирующий нуклеотидные повторы теломер TTAGGG на 3'-концах хромосом. Основными компонентами теломеразы человека является hTR (human Telomerase RNA), включающая в себя матрицу для синтеза теломерной ДНК и hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), обладающая активностью обратной транскриптазы и синтезирующая теломерные повторы на матрице hTR [1]. В нормальных соматических клетках человека активность теломеразы не обнаруживается [2]. Теломеры в соматических клетках укорачиваются при каждом цикле репликации ДНК. Укорочение теломер до критических значений приводит к переходу клеток в состояние репликативного старения, при котором клетки остаются живыми и поддерживают активный клеточный метаболизм, но не способны делиться. Этот этап сопровождается активацией экспрессии β-галактозидазы (b-Gal) [3,4]. В дальнейшем в таких клетках активируются апоптотические процессы, приводящие к их гибели [2]. Теломераза активна в нормальных половых клетках, стволовых клетках и активированных лимфоцитах, а также большинстве типов раковых клеток [5]. Активность теломеразы в данных клетках позволяет им поддерживать длину теломер на уровне достаточном для неограниченной пролиферации [6].

Известно, что активность теломеразы регулируется уровнем синтеза hTERT [7] и процессом альтернативного сплайсинга (AC) её мРНК [8, 9].

Регуляция экспрессии гена hTERT исследована достаточно хорошо [10], в то время как регуляция теломеразы при AC её мРНК мало изучена. В настоящее время известно 22 сплайс-варианта hTERT, однако только полноразмерный вариант hTERT обладает каталитической активностью [11, 12]. Два сплайс-варианта составляют большую часть общей мРНК hTERT. Делеция 36 нуклеотидов в экзоне 6 (α-вариант) вызывает удаление части обратного-транскриптазного домена А белковой молекулы и приводит к потере каталитической активности. Делеция 182 нуклеотидов экзона 7 и 8 (β-вариант) вызывает сдвиг рамки считывания и появление стоп-кодона в экзоне 10, что приводит к синтезу укороченной формы hTERT [13, 14]. Данный сплайс-вариант hTERT функционирует как доминантно-негативный [15].

Ранее было показано, что активность теломеразы зависит от активности апоптотических эндонуклеаз [16, 17], разрушающих ДНК клеток на последних стадиях апоптоза [18]. Эндонуклеаза G (EndoG) является сайт-специфичной эндонуклеазой избирательно расщепляющей двойные цепи ДНК по поли-(dG) последовательностям. Отличительная особенность EndoG состоит в том, что данный фермент обладает РНКазной активностью [19]. Известно, что EndoG вызывает старение клеток и значительно снижает их репликативный потенциал [20]. Кроме того, было обнаружено, что повышенный синтез EndoG приводит к значительному снижению активности теломеразы [16]. Цель настоящей работы состояла в изучении взаимосвязи между EndoG и AC hTERT.

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА

Клеточные линии и трансфекция клеток

Клетки 12 линий опухолей кишечника человека LoVo, CaCo-2, DLD-1, HT 29, RKO, SW 620, LS 174T, COLO 320HSR, HCT-15, HCT-116, NCI-H50B, WiDr (все ATCC, США) культивировали в среде RPMI-1640 (“Gibco”, США), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (“Gibco”, США) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажности. Трансфекцию клеток CaCo-2 плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP (обе “InvivoGen”, США) производили с использованием Lipofectamine 2000 (“Invitrogen”, США) по протоколу компании производителя. Оценку эффективности трансфекции (обычно 90-100%) осуществляли методом флуоресцентной микроскопии при подсчёте GFP-положительных клеток.

Экстракция РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США) по протоколу компании-производителя. Обратную транскрипцию (ОТ) и ПЦР в реальном времени проводили по методике, описанной Basnakian с соавт. [21]. Для этого 5 мкг тотальной РНК подвергали реакции ОТ в 25 мкл реакционной смеси (“Invitrogen”) по протоколу компании-производителя. В качестве реакционной смеси для ПЦР в реальном времени использовали Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (“Invitrogen”). Используемые праймеры (“Синтол”, Россия) представлены в таблице 1. Для амплификации применяли CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad”, США) и двухтемпературный режим реакции (отжиг праймеров/элонгация). Количество амплификатов определяли по флуоресценции в конце цикла элонгации. Оценку качества амплификации проводили по анализу кривой плавления от 60°C до 95°C в конце реакции (после 35-го цикла). Стандартные кривые эффективности ПЦР строили по серийным разведениям суммарных кДНК (1:40, 1:80, 1:160 и 1:320). Вычисление относительной концентрации РНК проводили по программе Qbase PLUS (“Bio-Rad”). Уровни мРНК изучаемых генов нормировали по мРНК конститутивно экспрессируемого референсного гена, кодирующего 18S рибосомную РНК. Продукты амплификации визуализировали в 2%-ном агарозном геле при окрашивании этидий-бромидом и фотографировали, используя ChemiDoc™ XRS imaging system (“Bio-Rad”).

Таблица 1. Праймеры, использованные для ОТ-ПЦР в реальном времени

Мишень	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')	Размер амплификата, п.о.	Температура отжига, °C
EndoG	AATTGAGCTCCGCACCTACGTGAT	AGGATGTTTGGCACAAAGAGCAGC	167	55
α+β+ hTERT	TGTACTTTGTCAAGGTGGATGTG	GTACGGCTGGAGGTCTGTCAA	202	53
α+β- hTERT	TGTACTTTGTCAAGGTGGATGTG	GGCACTGGACGTAGGACGTGG	189	53
α-β+ hTERT	CTGAGCTGTACTTTGTCAAGGAC	GTACGGCTGGAGGTCTGTCAA	172	53
α-β- hTERT	CTGAGCTGTACTTTGTCAAGGAC	GGCACTGGACGTAGGACGTGG	159	58
b-Gal	GCAGCAGTGATGATCCAGAACT	CGTAGGTCACAGATGAGCCAATAA	75	60
18S	GGATCCATTGGAGGGCAAGT	ACGAGCTTTTAACTGCAGCAA	91	64

Вестерн-блоттинг

Клетки лизировали в 1 мл ТБЭ буфера (89 мМ Tris, 89 мМ H₃BO₃, 2 мМ EDTA pH 8,0) ультразвуком в течение двух минут при мощности 50 Вт с помощью ультразвукового дезинтегратора Model 50 Sonic Dismembrator (“Fisher Scientific”, США) и центрифугировали 10 мин при 12000 g для удаления клеточного дебриса. Концентрацию общего белка в образцах измеряли по методу Bradford [22] при помощи Bradford Protein Assay (“Pierce”, США), используя бычий сывороточный альбумин (БСА) для построения калибровочной кривой. Клеточный лизат (в пересчёте на 50 мкг тотального белка) растворяли в 50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, содержащем 1% SDS, 2 мМ EDTA, 1% β-меркаптоэтанол и 7,5% глицерин, денатурировали прогреванием при 100°C в течение 10 мин и разделяли электрофорезом в градиентном ПААГ [23] (100 В; 2 ч), используя NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gels (“Life Technologies”, США). Далее белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в Novex transferring buffer (“Invitrogen”) при 40 В в течение 3 ч, после чего мембраны окрашивали Ponceau S (“Sigma”, США) [24]. Затем мембраны блокировали Blotting-Grade Blocker (“Bio-Rad”) и инкубировали в течение 2 ч с первичными моноклональными антителами против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (anti-GAPDH), anti-hTERT (“Abcam”, США), разведёнными 1:1000, или поликлональными anti-EndoG (“Millipore”, США) антителами, разведёнными 1:500. После этого первичные антитела отмывали в фосфатно-солевом буфере pH 7,6 с 0,1% Твин-20, и мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (“Cell Signalling”, США). Для визуализации использовали набор реактивов SuperSignal chemiluminescent kit (“Pierce Biotechnology”, США) с последующим документированием в ChemiDoc™ XRS imaging system (“Bio-Rad”). Количественную оценку содержания белка проводили методом денситометрии, используя программу GelAnalyzer 2010a.

Определение активности теломеразы

Определение активности теломеразы проводили при помощи метода TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol, протокол амплификации теломерных повторов) [6, 25]. Клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА, 0,1 мМ фенилметил-сульфонилфторид, 5 мМ β-меркаптоэтанол,

0,5% ХАПС и 10% глицерин, из расчёта 1 мкл буфера на 10^3 клеток. Лизаты центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при 4°C; супернатант отбирали и хранили при -80°C. Элонгацию олигонуклеотидного субстрата-праймера и последующую амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 67 mM Tris-HCl, pH 8,8, 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Твин-20, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0,25 mM каждого из dNTPS, 0,1 мкг TS-праймера (Telomerase Substrate primer) (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') и 2 мкл клеточного экстракта, разведённого лизирующим буфером и эквивалентного 2000 клеток и инкубировали при 37°C в течение 25 мин. По окончании инкубации смесь выдерживали 10 мин при 96°C для инактивации теломеразы. Затем в смесь добавляли 0,1 мкг CX-праймера (Copy Extended primer) (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') и 2,5 Ед. Taq-полимеразы. Реакционную смесь подвергали ПЦР в следующем режиме: 94°C – 2 мин; 30 циклов: 94°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 40 с; 72°C – 5 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 12%-ом неденатурирующем ПААГ и ТБЭ буфере. Образцы вносили в лунки геля в объёме 10 мкл. Для визуализации разделённых продуктов использовали ChemiDoc™ XRS imaging system после выдерживания геля в течение 30 мин в растворе красителя SYBR Green I ("Invitrogen"). О теломеразной активности судили по денситометрии результатов TRAP в программе GelAnalyzer 2010a.

Определение абсолютной длины теломер

Для определения абсолютной длины теломер использовали методику, описанную в [24, 25]. Геномную ДНК выделяли при помощи PureLink Genomic DNA Mini Kit ("Thermo Scientific", США) и проводили ПЦР в реальном времени [27]. Длину теломер в каждом образце измеряли трижды. Для дальнейших расчётов брали усреднённое значение, если коэффициент вариации трёх технических реплик не превышал 2%. ДНК из нетрансфицированных клеток CaCo-2 использовали в качестве препарата сравнения.

Определение апоптоза и клеточного цикла

Для определения апоптоза трансфицированные клетки CaCo-2 обрабатывали раствором Трипсина с ЭДТА ("Gibco"), ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, "Gibco") и инкубировали с Аннексином V-FITC и пропидий йодидом из набора "FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis kit" ("Invitrogen") по протоколу производителя. Анализ 5×10^4 клеток осуществляли методом проточной цитометрии, используя FACSCalibur ("Beckton Dickinson", США). Для определения клеточного цикла клетки фиксировали в 70%-ном этаноле, обрабатывали FxCycle PI/RNase Staining Solution ("Thermo Scientific") по протоколу производителя и измеряли методом проточной цитометрии. Фазы клеточного цикла определяли по интенсивности сигнала пропидий йодида.

Определение активности b-Gal

Активность b-Gal в клетках определяли при помощи набора "Beta Galactosidase Detection Kit" ("Abcam") по протоколу производителя в 96-ти луночном планшете из тёмного пластика ("Corning", США). Измерение флуоресценции осуществляли в планшетном спектрометре MultiscanGo ("Thermo Scientific") при длинах волн возбуждения и эмиссии 490 нм и 525 нм, соответственно. Подсчет активности осуществляли для 1×10^3 клеток по калибровочной кривой с использованием коммерческой b-Gal ("Abcam") в диапазоне 0,01–100 ед./мл.

Статистический анализ

Статистически анализ результатов осуществляли по критерию Стьюдента при помощи программы Statistica 9.0 ("StatSoft Inc.", США). Результаты представляли в виде средних значений \pm стандартное отклонение. Значения считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Для изучения зависимости между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантами hTERT клетки, ранжированные по уровню экспрессии EndoG, были разделены на две группы. Клетки с уровнем экспрессии EndoG ниже медианы считали клетками с низкой экспрессией EndoG, а клетки с уровнем экспрессии EndoG выше медианы считали клетками с высокой экспрессией EndoG. В данных группах провели корреляционный анализ по Пирсону уровней экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT при помощи программы Statistica 9.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия EndoG коррелирует с экспрессией полноразмерной и AC форм hTERT

С целью изучения связи EndoG и AC формой hTERT произведена оценка экспрессии мРНК EndoG и сплайс-вариантов hTERT в клетках тканевых культур рака кишечника человека методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Полученные результаты подтвердили данные о том, что полноразмерный вариант hTERT $\alpha+\beta+$ и сплайс-вариант $\alpha+\beta-$ составляют большую часть общей мРНК hTERT (рис. 1 А-Д). Сплайс-варианты $\alpha-\beta+$ и $\alpha-\beta-$ находятся в минорных количествах. При ранжировании клеток по уровню относительной экспрессии EndoG медиана составила 0,24. Корреляционный анализ выявил зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT (рис. 1Е). В клетках с относительно низкой экспрессией EndoG (менее 0,24) наблюдалось преобладание полноразмерного $\alpha+\beta+$ hTERT над другими сплайс-формами. В группе клеток с относительно высокой экспрессией EndoG (более 0,24) выявлено увеличение экспрессии $\alpha+\beta-$ варианта hTERT и снижение экспрессии полноразмерного $\alpha+\beta+$ варианта. Зависимости между уровнями экспрессии EndoG и двумя другими сплайс-вариантами hTERT $\alpha-\beta+$ и $\alpha-\beta-$ не обнаружено. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG

ЭНДОНУКЛЕАЗА ENDOG ВЫЗЫВАЕТ АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ ТЕЛОМЕРАЗЫ

со сплайс-вариантами hTERT представлены в таблице 2. Для дальнейшей работы были выбраны клетки линии эпителиальной колоректальной

аденокарциномы CaCo-2, поскольку именно у них корреляция между экспрессией EndoG и сплайс-вариантами hTERT была наиболее выраженной.

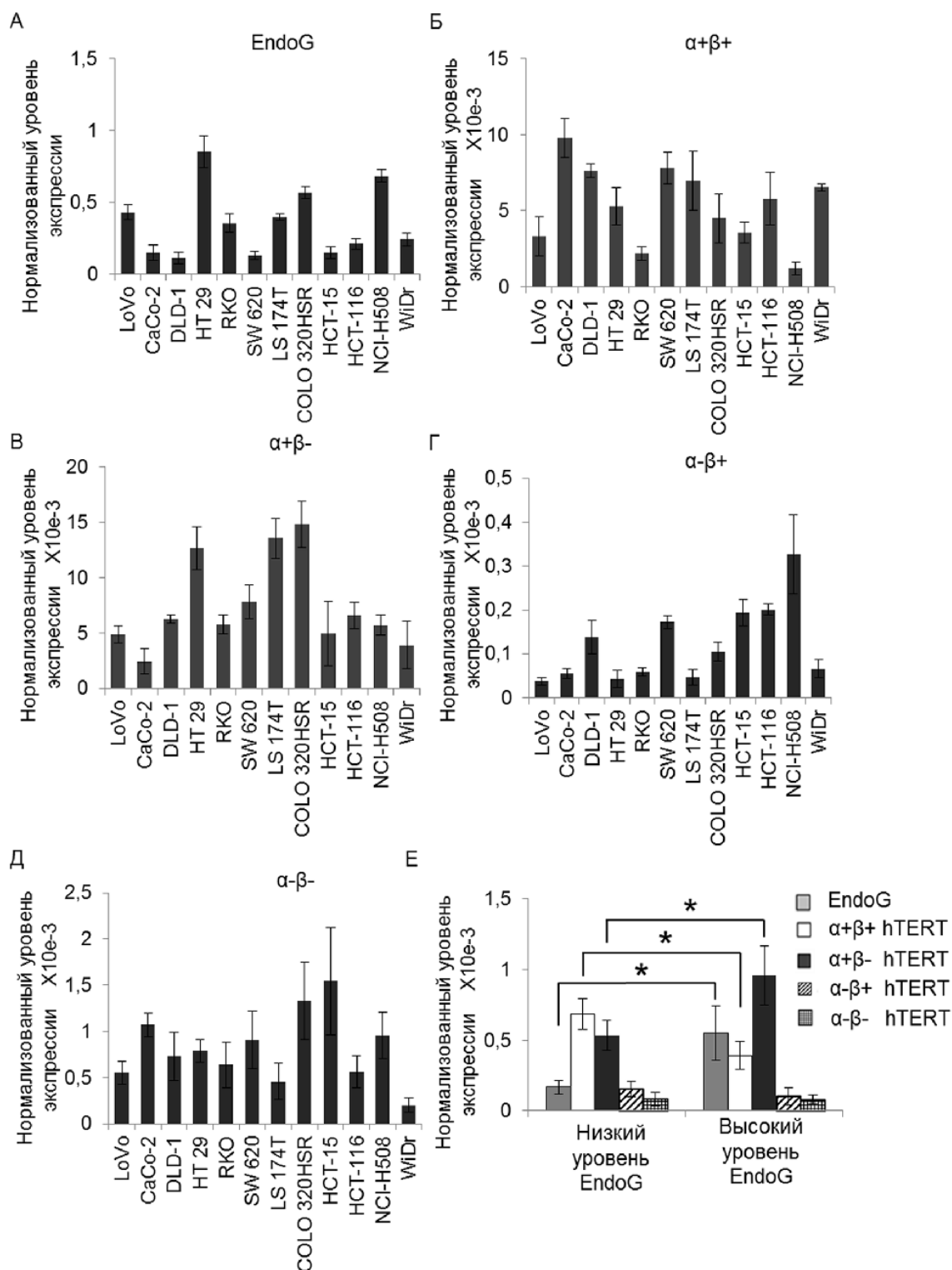


Рисунок 1. Корреляция экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в 12-ти клеточных линиях рака кишечника человека. Экспрессия (А) EndoG и (Б-Д) сплайс-вариантов hTERT. (Е) Зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT. Клетки были разделены на группы с низким и высоким уровнями экспрессии EndoG. Для повышения репрезентативности уровни экспрессии EndoG были уменьшены в 1000 раз, поскольку экспрессия EndoG гораздо выше экспрессии сплайс-вариантов hTERT. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. * - $p \leq 0,05$ для уровней экспрессии соответствующих генов между группами клеток.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT

Сплайс-вариант hTERT	Низкий уровень экспрессии EndoG (N=6)	Высокий уровень экспрессии EndoG (N=6)
$\alpha+\beta+$ (полноразмерный вариант)	0,748*	0,832*
$\alpha+\beta-$	0,819*	0,771*
$\alpha-\beta+$	0,272	0,46
$\alpha-\beta-$	0,399	0,485

Примечание: * - коэффициенты корреляции статистически значимы, $p \leq 0,01$ по критерию корреляции Пирсона.

Сверхэкспрессия EndoG индуцирует АС формы hTERT

Для установления возможной роли EndoG в индукции сплайс-варианта hTERT клетки CaCo-2 трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Эффективность трансфекции приближалась к 100% в течение 8 ч после трансфекции. Трансфекция клеток плазмидой pEndoG-GFP приводила к значительному увеличению экспрессии EndoG (рис. 2А), достоверному снижению экспрессии полноразмерной $\alpha+\beta+$ варианта (рис. 2Б) и увеличению экспрессии $\alpha+\beta-$ варианта (рис. 2В).

Сверхэкспрессия EndoG не вызвала изменения экспрессии $\alpha-\beta+$ (рис. 2Г) и $\alpha-\beta-$ вариантов (рис. 2Д). Не выявлено изменения экспрессии данных сплайс-вариантов при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP.

EndoG вызывает уменьшение пула активной формы hTERT и снижение активности теломеразы

Мы попытались выяснить влияние индукции сплайс-варианта hTERT на активность теломеразы при сверхэкспрессии EndoG. Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым

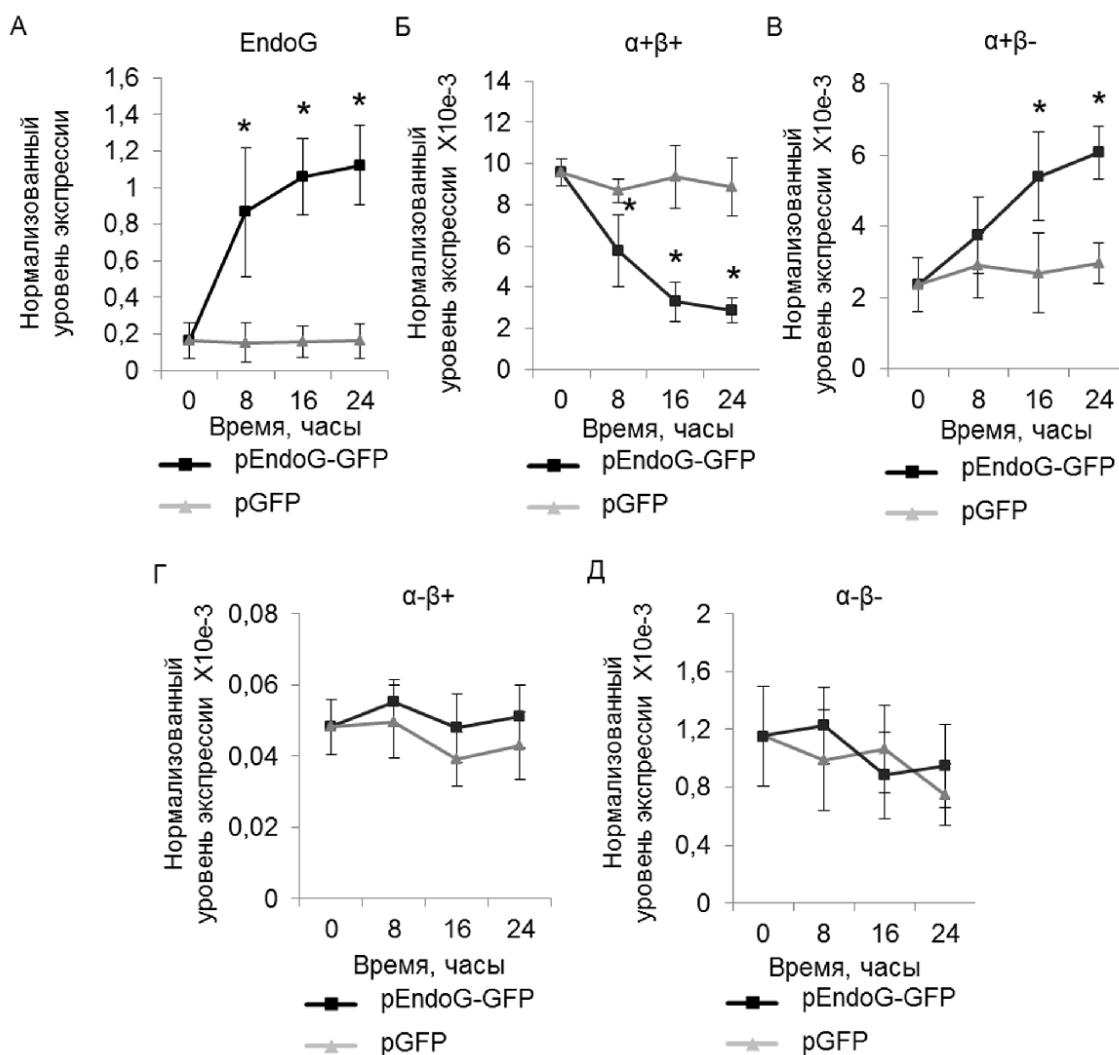


Рисунок 2. Сверхэкспрессия EndoG вызывает изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT. Уровни экспрессии (А) EndoG и (Б-Д) сплайс-вариантов hTERT в течение 24 ч после трансфекции клеток pEndoG-GFP или pGFP. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. * - $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

ЭНДОНУКЛЕАЗА ENDOG ВЫЗЫВАЕТ АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ ТЕЛОМЕРАЗЫ

белкам показали, что к 24 ч после трансфекции в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, происходит достоверное снижение полноразмерного $\alpha+\beta+$ варианта (рис. 3А-Д) и увеличение $\alpha+\beta-$ варианта hTERT. При трансфекции клеток контрольной плазмидой изменения пропорции белков сплайс-вариантов hTERT не выявлено. Не обнаружено и изменения пула белков $\alpha+\beta-$ и $\alpha-\beta-$ вариантов hTERT, поскольку их количество в клетке очень мало и не детектируется методом вестерн-блоттинга.

Для анализа активности теломеразы в клеточных экстрактах после трансфекции использовали метод амплификации теломерных повторов с помощью ПЦР (TRAP, telomeric repeat amplification protocol). В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, активность теломеразы достоверно снижается уже через 16 ч после трансфекции (рис. 3 Е,Ж). Уменьшения активности фермента не наблюдалось при трансфекции клеток контрольной плазмидой. Эти данные полностью согласуются с результатом

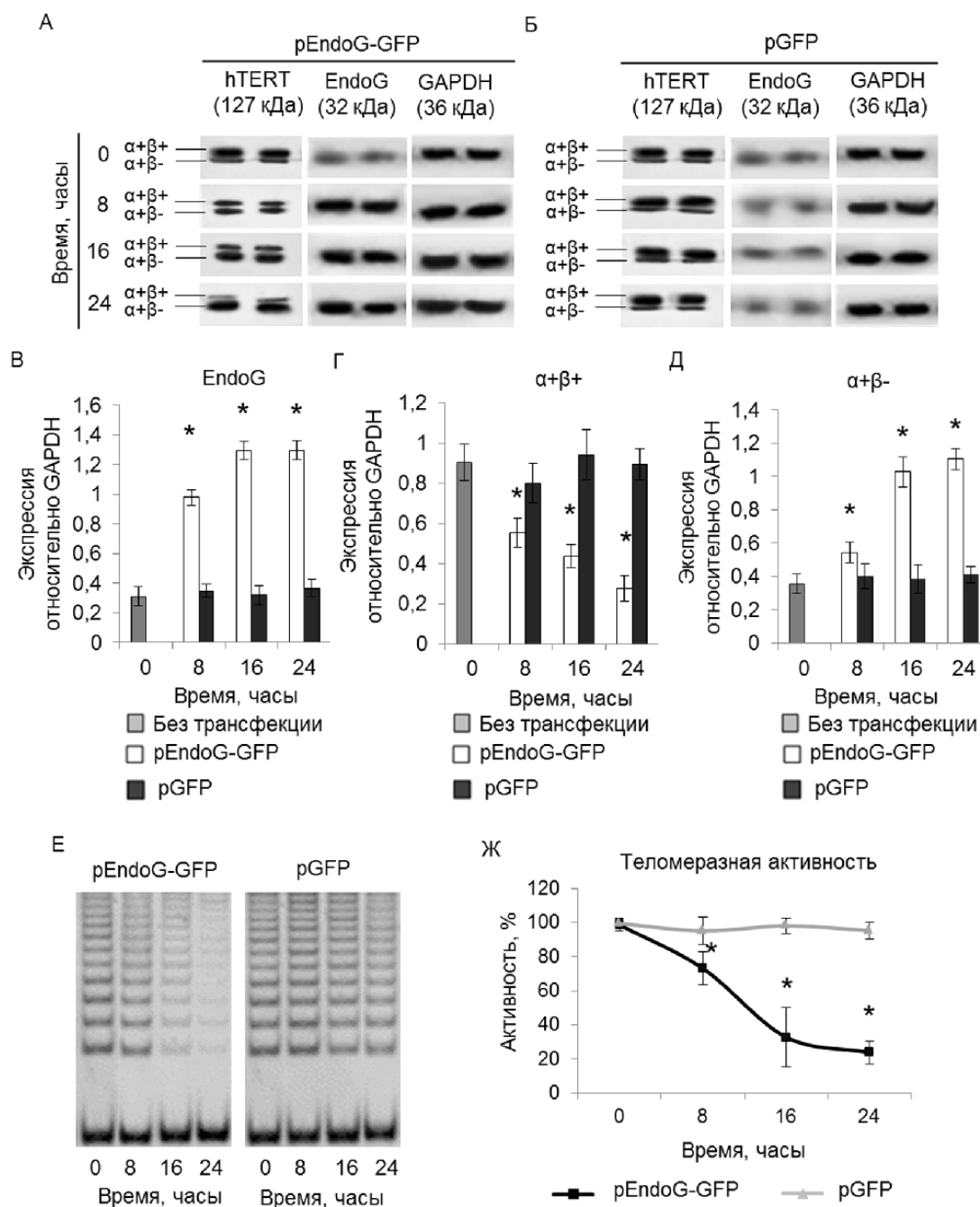


Рисунок 3. Сверхэкспрессия EndoG вызывает уменьшение количества активной формы hTERT и снижение активности теломеразы (А, Б) вестерн-блоттинг сплайс-вариантов hTERT, EndoG и референсного белка GAPDH в клетках CaCo-2 трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP. (В-Д) результаты определения количеств сплайс-форм hTERT и EndoG по отношению к GAPDH. (Е) Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках. (Ж) Результаты определения активности теломеразы, измеренной методом TRAP. N = 4. * - $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

измерения экспрессии сплайс-вариантов hTERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени и количеством сплайс-вариантов hTERT, измеренным при помощи вестерн-блоттинга. Снижение активности теломеразы, вероятнее всего, происходит за счёт уменьшения количества полноразмерного $\alpha+\beta+$ варианта hTERT, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью.

Сверхэкспрессия EndoG вызывает гибель опухолевых клеток CaCo-2

Поскольку EndoG вызывает уменьшение количества полноразмерной формы hTERT, что приводит к снижению в клетках активности теломеразы, представляла интерес дальнейшая судьба клеток с неактивным ферментом. Для этого клетки CaCo-2, трансфицированные pEndoG-GFP или pGFP, культивировали в ростовой среде

и ежедневно измеряли количество живых и мертвых клеток, а также клеток в состоянии апоптоза. В группе клеток, трансфицированных pEndoG-GFP, обнаружена массивная гибель на четвёртые и пятые сутки после трансфекции (рис. 4 А,В). Так, на четвёртые сутки наблюдалось резкое увеличение числа клеток в состоянии апоптоза до $12,4\pm 2,0\%$. На пятые сутки практически все клетки были мертвы. Клетки, трансфицированные контрольной плазмидой, оставались живыми в течение всего периода наблюдения (рис. 4 Б,Г). Количество мертвых клеток и клеток в состоянии апоптоза не превышало такового в контрольной группе. Наши результаты не согласуются с данными Listerman и соавт. [8], которые показали, что сверхэкспрессия $\alpha+\beta$ - сплайс-варианта hTERT способна защищать клетки от апоптоза. Вероятнее всего, в нашем случае, сверхэкспрессия EndoG сама по себе (а не только в результате индуцированного ей

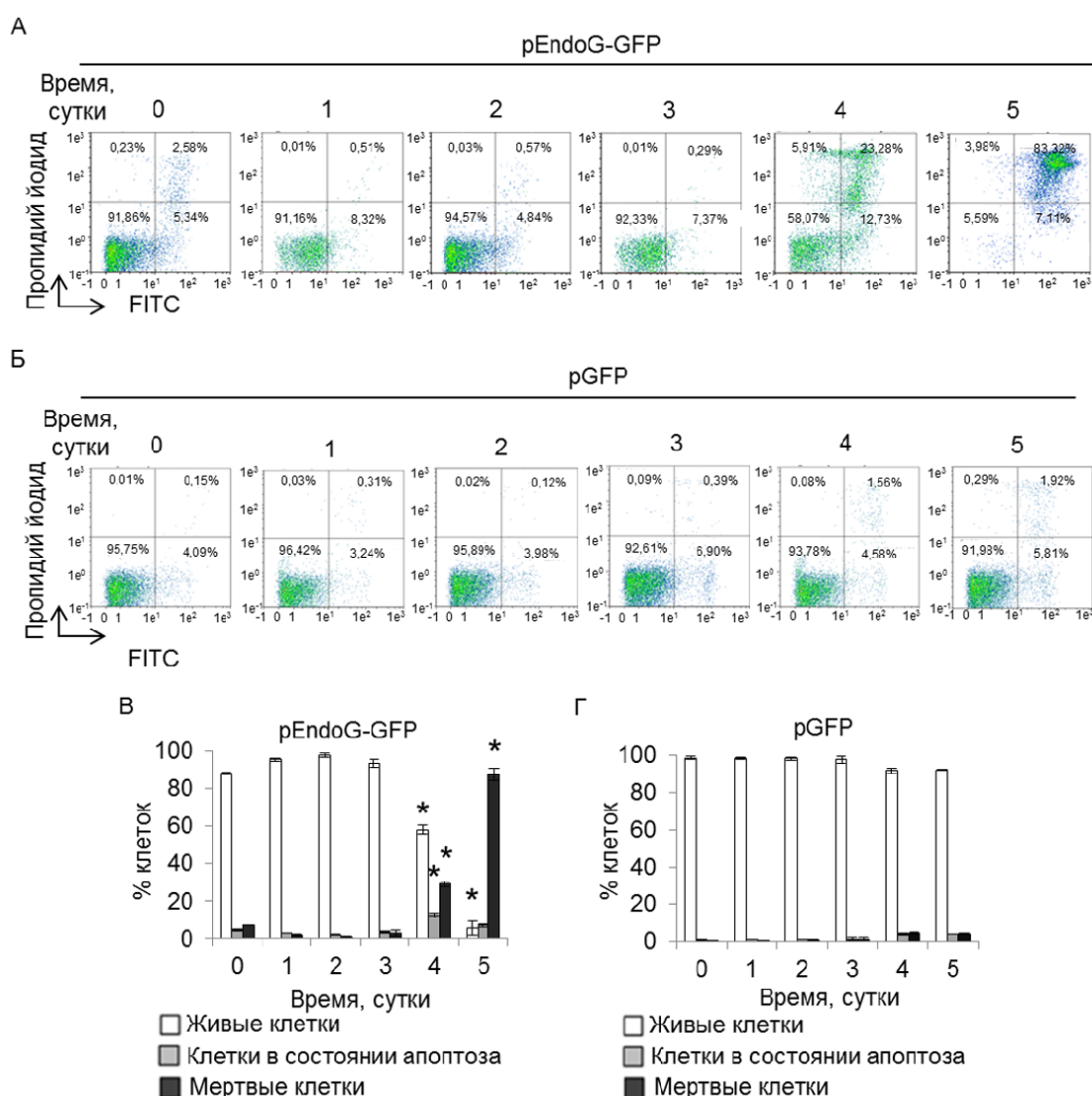


Рисунок 4. Сверхэкспрессия EndoG вызывает гибель опухолевых клеток CaCo-2 при культивировании. Результаты проточной цитометрии клеток CaCo-2 трансфицированных (А) pEndoG-GFP или (Б) pGFP и меченых аннексином V-FITC и пропидий йодидом. Показан процент живых клеток (нижние левые квадранты), клеток в состоянии апоптоза (нижние правые квадранты) и мертвых клеток (верхние квадранты). Гистограммы живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мертвых клеток CaCo-2 трансфицированных (В) pEndoG-GFP или (Г) pGFP. N = 4. * - $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

сплайсинга hTERT и ингибирования активности теломеразы) влияла на судьбу клеток. Кроме того, авторы указанной работы не проследили динамику укорочения теломер в клетках после трансфекции. Ниже будет показано, что EndoG способна оказывать влияние на теломеры напрямую и сокращать пролиферативный потенциал клеток.

Сверхэкспрессия EndoG вызывает переход клеток в состояние репликативного старения и ингибирует клеточный цикл

Известно, что ингибирование теломеразы в активно пролиферирующих клетках вызывает их переход в состояние репликативного старения. Это сопровождается остановкой клеточного цикла в фазе G₀/G₁ [24, 28]. Мы измерили клеточный цикл в пролиферирующих клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP и pGFP, методом проточной цитометрии при мечении ДНК клеток пропидий йодидом. При трансфекции pEndoG-GFP, обнаружено значительное уменьшение количества клеток в фазах S и G₂/M и достоверное увеличение в фазе G₀/G₁ на третий день после трансфекции (рис. 5 А,В). Однако при этом клетки оставались живыми (рис. 4 А,В). На четвертый день наблюдалось дальнейшее снижение количества клеток в фазе G₂/M, а также увеличение количества апоптотических клеток. На пятые сутки практически все клетки находились в состоянии апоптоза. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, изменения клеточного цикла не выявлено (рис. 5 Б,Г).

Увеличение экспрессии и активности b-Gal является маркером перехода клеток в состояние репликативного старения. Мы исследовали экспрессию и активность данного фермента в процессе культивирования трансфицированных клеток. В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, наблюдали достоверное увеличение экспрессии b-Gal на третьи сутки после трансфекции (рис. 5Д). На четвертые и пятые сутки уровень экспрессии оставался стабильно высоким. Ферментативная активность b-Gal также повышалась на третьи сутки после трансфекции и оставалась высокой на четвертые (рис. 5Е). На пятые сутки наблюдали снижение ферментативной активности b-Gal, что объясняется массивной гибелью клеток. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, экспрессия и активность b-Gal оставались неизменными.

Активация b-Gal на третьи сутки после трансфекции геном EndoG согласуется с ингибированием S и G₂/M фаз клеточного цикла, что указывает на переход клеток в состояние репликативного старения. Гибель таких клеток на четвертые и пятые сутки культивирования являлась дальнейшим следствием этого состояния.

Состояние репликативного старения клеток сопровождается снижением экспрессии $\alpha+\beta+$ варианта hTERT

Нами было изучено изменение экспрессии изоформ hTERT при культивировании трансфицированных

клеток CaCo-2. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что уровень экспрессии EndoG оставался стабильно высоким в течение всего периода культивирования (рис. 6А). Сверхэкспрессия EndoG сопровождалась снижением экспрессии полноразмерного $\alpha+\beta+$ сплайс-варианта hTERT (рис. 6Б) и увеличением экспрессии $\alpha+\beta-$ варианта (рис. 6В). В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, изменения экспрессии EndoG $\alpha+\beta+$ и $\alpha+\beta-$ сплайс-вариантов hTERT не обнаружено. Достоверное изменение количества исследуемых белков в клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP, по сравнению с клетками, трансфицированными pGFP, подтверждено методом вестерн-блоттинга (рис. 6 Г-З).

Состояние репликативного старения клеток вызывается уменьшением активности теломеразы и длины теломер

Состояние репликативного старения клеток наступает в случае укорочения теломер до критических значений. Мы проследили, как изменяется активность теломеразы и длина теломер в трансфицированных клетках CaCo-2 при их культивировании. Методом TRAP установлено, что в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, теломеразная активность оставалась стабильно низкой в течение всего периода культивирования (рис. 7 А,Б). В контрольных клетках активность фермента не изменялась. Снижение активности теломеразы в активно делящихся клетках должно вызывать укорочение длины теломер. Методом ПЦР в реальном времени установлено, что в трансфицированных pEndoG-GFP клетках происходило уменьшение длины теломер более чем в 6 раз в первые два дня после трансфекции (рис. 7В). При дальнейшем культивировании длина теломер уменьшалась незначительно и оставалась на низком уровне. В клетках, трансфицированных pGFP, укорочения длины теломер не наблюдали. Аномально резкое укорочение длины теломер за трое первых суток культивирования мы связываем с индивидуальной особенностью клеток линии CaCo-2, поскольку данные клетки пролиферируют быстро и за сутки способны удваивать популяцию около трёх раз. Также теломеры клеток могут подвергаться деградации самой EndoG или другими эндонуклеазами при их активации. Такая интерпретация даёт наиболее рациональное объяснение быстрому укорочению теломер при нескольких циклах деления, поскольку известно, что эндонуклеазы способны осуществлять деградацию G-квадруплексных структур, формируемых теломерами [29-31]. Кроме того, ранее мы показали, что сверхэкспрессия EndoG приводит к активации других эндонуклеаз [32]. Несомненно, непосредственное влияние EndoG на динамику теломер требует дальнейшего изучения.

Укорочение теломер в первые два дня культивирования сопровождалось понижением экспрессии $\alpha+\beta+$ варианта hTERT (рис. 6Б) и уменьшением активности теломеразы (рис. 7А). Вероятнее всего, на третий день культивирования длина теломер в трансфицированных pEndoG-GFP

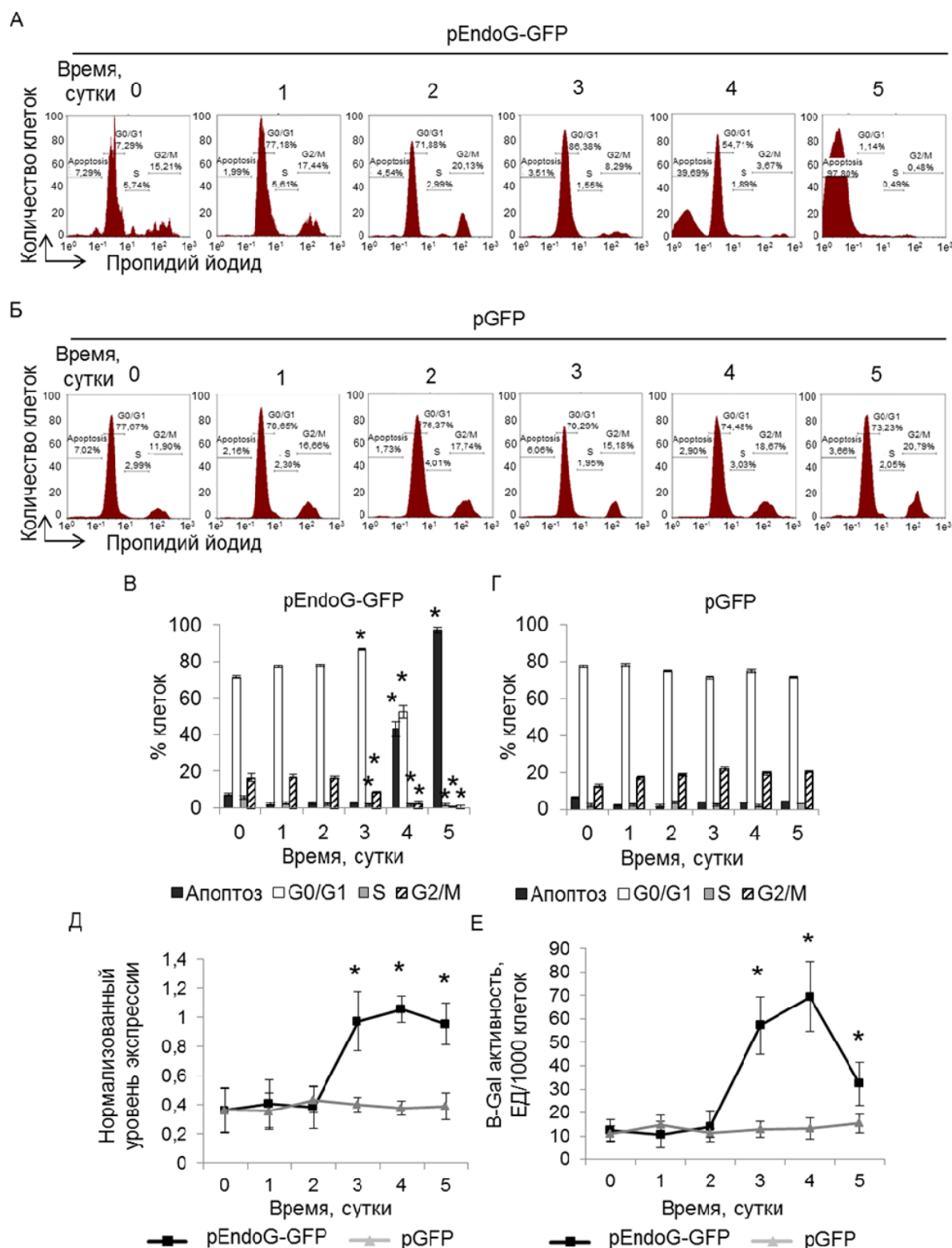


Рисунок 5. Ингибирование клеточного цикла клеток при их переходе в состояние репликативного старения. Результаты измерения клеточного цикла методом проточной цитометрии при окрашивании ДНК клеток пропадий йодидом. Показан процент клеток CaCo-2, трансфицированных (А) pEndoG-GFP или (Б) pGFP в состоянии апоптоза, а также G₀/G₁, S и G₂/M фазах клеточного цикла. (В, Г) Гистограммы количества трансфицированных клеток в различных фазах клеточного цикла. (Д) Уровень экспрессии b-Gal в клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP. Уровень экспрессии гена нормализован по отношению к экспрессии референсного гена 18S. (Е) Ферментативная активность b-Gal в трансфицированных клетках. Активность b-Gal представлена в ЕД на 1000 клеток, определенная по калибровочной кривой. * - $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

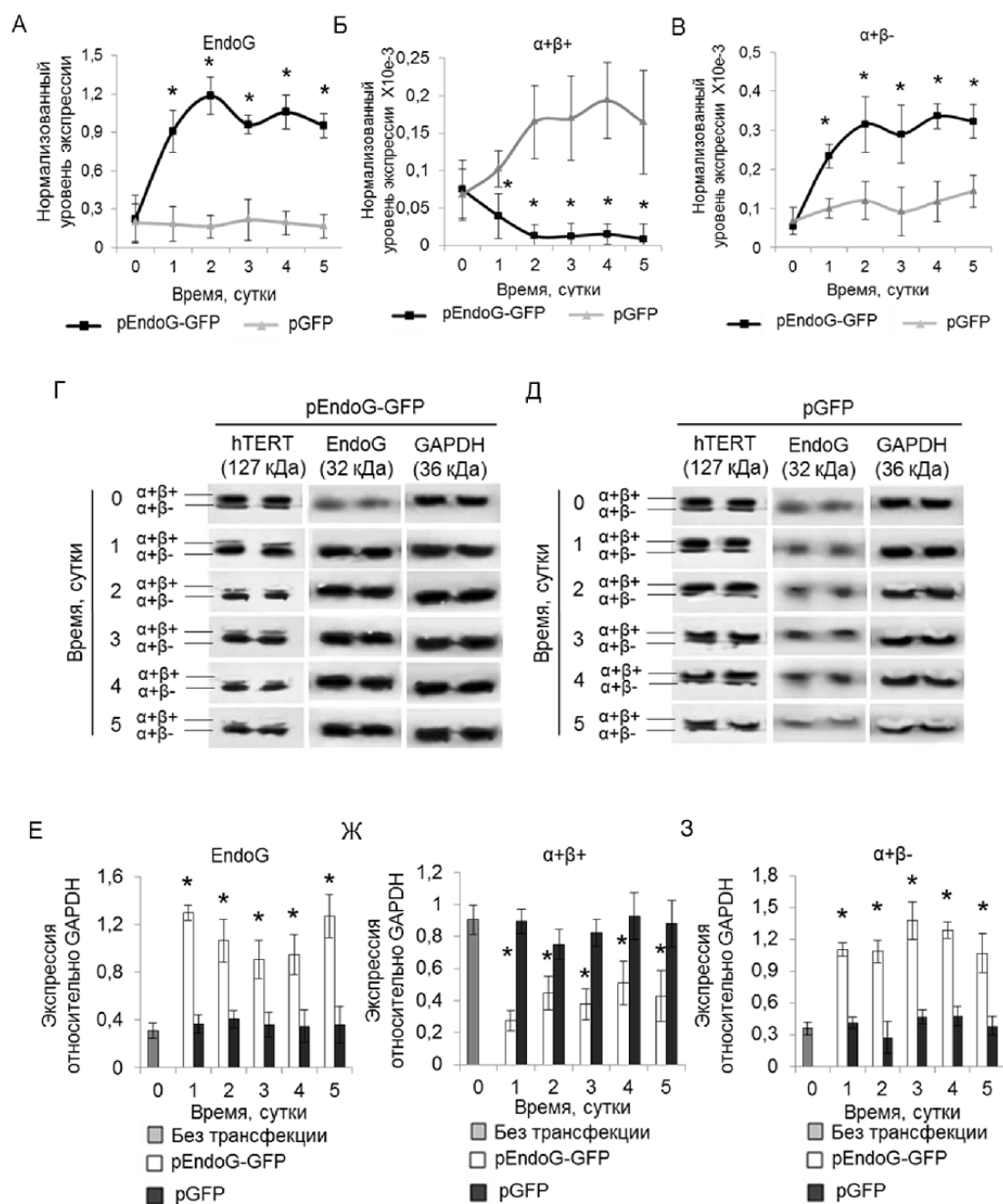


Рисунок 6. Сверхэкспрессия EndoG при культивировании клеток поддерживает низкую экспрессию полноразмерного сплайс-варианта hTERT. Уровни экспрессии (А) EndoG и (Б, В) сплайс-вариантов hTERT в клетках CaCo-2 при их трансфекции pEndoG-GFP или pGFP. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. Вестерн-блоттинг сплайс-вариантов hTERT и EndoG в CaCo-2, трансфицированных (Г) pEndoG-GFP или (Д) pGFP. (Е-З) результаты определения количеств сплайс-вариантов hTERT и EndoG по отношению к GAPDH. N = 4. * - $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

клетках снижалась до критических для данной линии клеток значений и клетки переходили в состояние репликативного старения. Эти клетки оставались живыми, но теряли способность к дальнейшему делению. Остановка клеточного цикла в фазе G_0/G_1 и снижение количества клеток в фазах S и G_2/M на третий день культивирования (рис. 5 А,В) согласуется с неспособностью клеток к делению. Массовая клеточная гибель, наблюдаемая на четвёртый

и пятый день культивирования (рис. 4 А,В), вероятно, связана с развитием апоптотических процессов в стареющих клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Хотя процесс АС мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT участвует в регуляции активности теломеразы в клетках,

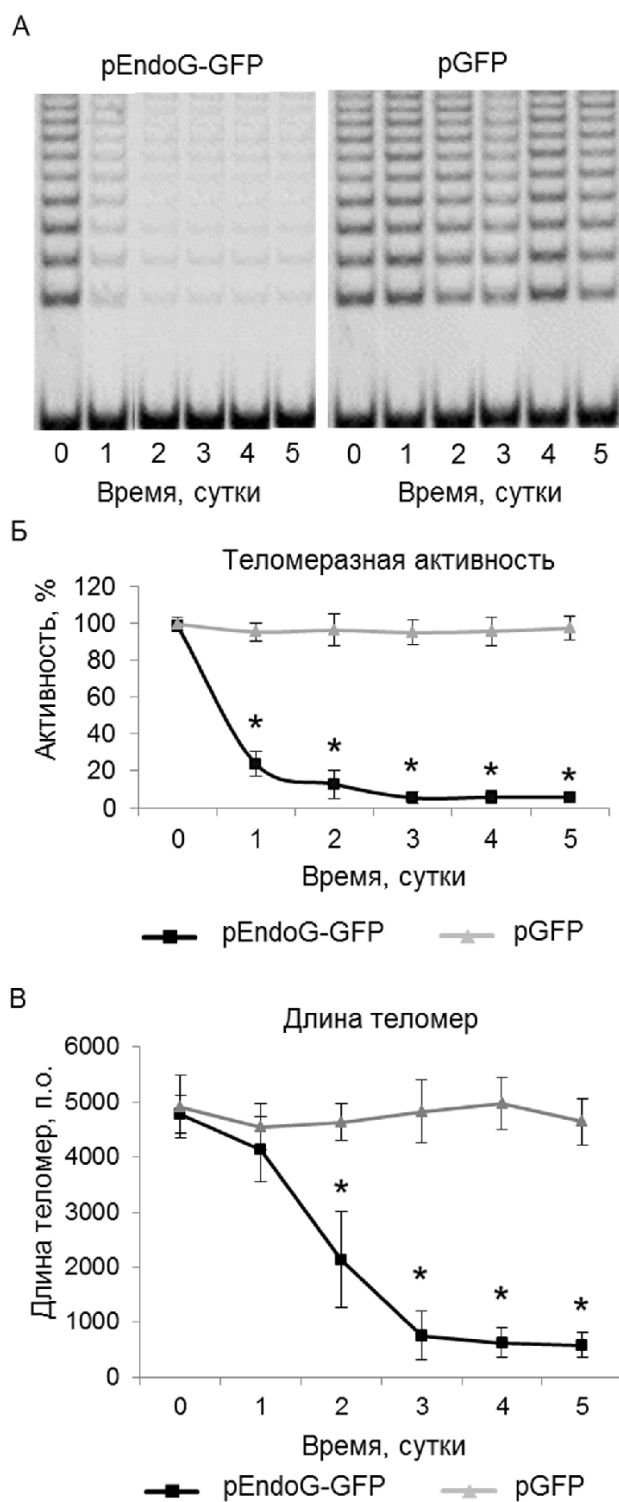


Рисунок 7. Трансфекция клеток CaCo-2 pEndoG-GFP вызывает снижение активности теломеразы и длины теломер в процессе культивирования. (А) Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках. (Б) Результаты определения активности теломеразы методом TRAP. (В) Абсолютная длина теломер, измеренная методом ПЦР в реальном времени. N = 4. * - $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

о нём до сих пор известно немного. В данной работе впервые показана способность апоптотической эндонуклеазы EndoG осуществлять АС мРНК hTERT и снижать активность теломеразы. Об этом свидетельствуют следующие факты: во-первых, экспрессия EndoG достаточно сильно коррелировала с экспрессией полноразмерного $\alpha+\beta+$ и $\alpha+\beta$ -сплайс-варианта hTERT в различных клеточных линиях рака кишечника человека; во-вторых, сверхэкспрессия EndoG при трансфекции клеток CaCo-2 плазмидой pEndoG-GFP вызывала увеличение количества неактивной ($\alpha+\beta$ -) формы hTERT и уменьшение содержания активной ($\alpha+\beta+$) формы. Снижение количества активной формы hTERT вызывало достоверное уменьшение активности теломеразы уже в первые 24 ч после трансфекции. Культивирование трансфицированных клеток с повышенной экспрессией EndoG приводило к укорочению их теломер до критических значений и переходу клеток в состояние репликативного старения, что подтверждается увеличением экспрессии и активности b-Gal, а также остановкой клеточного цикла в фазе G₀/G₁. Дальнейшее культивирование клеток, находящихся в состоянии репликативного старения, вызывало их массированную гибель. Очевидно, что участие EndoG в АС формы hTERT является фундаментальным процессом в поддержании клеточного гомеостаза и определяет судьбу клеток. Бесспорно, описанный процесс требует дальнейшего более глубокого изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blackburn E.H. (2000) Nature, **408**, 53-56.
2. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. (1990) Nature, **345**, 458-460.
3. Ewald J.A., Desotelle J.A., Church D.R., Yang B., Huang W., Laurila T.A., Jarrard D.F. (2013) Prostate, **73**, 337-345.
4. Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., Morrone A., Johung K., Goodwin E.C., Kleijer W.J., DiMaio D., Hwang E.S. (2006) Aging Cell, **5**, 187-195.
5. Kaszubowska L. (2008) J. Physiol. Pharmacol., **59** (Suppl 9), 169-186.
6. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. (1994) Science, **266**, 2011-2015.
7. Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D., Ziaugra L., Beijersbergen R.L., Davidoff M.J., Liu Q., Bacchetti S., Haber D.A., Weinberg R.A. (1997) Cell, **90**, 785-795.
8. Listerman I., Sun J., Gazzaniga F.S., Lukas J.L., Blackburn E.H. (2013) Cancer Res., **73**, 2817-2828.
9. Krams M., Claviez A., Heidorn K., Krupp G., Parwaresch R., Harms D., Rudolph P. (2001) Am. J. Pathol., **159**, 1925-1932.
10. Daniel M., Peek G.W., Tollefsbol T.O. (2012) Gene, **498**, 135-146.
11. Saebøe-Larssen S., Fosberg E., Gaudernack G. (2006) BMC Mol. Biol., **7**, 26-32.
12. Hrdlicková R., Nehyba J., Bose H.R. Jr. (2012) Mol. Cell Biol. **32**(21), 4283-4296.
13. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R. (1998) Cancer Res., **58**, 4168-4172.

14. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Oruganti H., Giudice L.C., Hoffman A.R. (2000) *Int. J. Cancer*, **85**, 330-335.
15. Listerman I., Sun J., Gazzaniga F.S., Lukas J.L., Blackburn E.H. (2013) *Cancer Res.*, **73**, 2817-2828.
16. Oulton R., Harrington L. (2004). *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3244-3256.
17. Lydeard J.R., Jain S., Yamaguchi M., Haber J.E. (2007) *Nature*, **448**, 820-823.
18. Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N., Fukuyama H. (2003) *Cell Death Differ.*, **10**, 108-116.
19. Ruiz-Carrillo A., Renaud J. (1987) *EMBO J.*, **6**, 401-407.
20. Diener T., Neuhaus M., Koziel R., Micutkova L., Jansen-Dürr P. (2010) *Exper. Gerontol.*, **45**, 638-644.
21. Basnakian A.G., Apostolov E.O., Yin X., Abiri S.O., Stewart A.G., Singh A.B., Shah, S. V. (2006) *Exper. Cell Res.*, **312**, 4139-4149.
22. Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
23. Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
24. Hofnagel O., Luechtenborg B., Stolle K., Lorkowski S., Eschert H., Plenz G., Robenek H. (2004) *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **24**, 1789-1795.
25. Kovalenko N.A., Zhdanov D.D., Bibikova M.V., Gotovtseva V.I. (2011) *Biomed. Chem.*, **57**, 501-510.
26. O'Callaghan N., Fenech M. (2011) *Biological Procedures Online*, **13**, 3.
27. Cawthon R.M. (2002) *Nucl. Acids Res.*, **30**, e47.
28. Ruden M., Puri N. (2013) *Cancer Treatment Reviews*, **39**, 444-456.
29. Read M.A., Wood A.A., Harrison J.R., Gowan S.M., Kelland L.R., Dosanjh H.S., Neidle S. (1999) *J. Med. Chem.*, **42**, 4538-4546.
30. Zhou Z., Du Y., Zhang L., Dong S. (2012) *Biosens. Bioelectron.*, **34**, 100-105.
31. Martadinata H., Heddi B., Lim K.W., Phan A.T. (2011) *Biochemistry*, **50**, 6455-6461.
32. Zhdanov D.D., Fahmi T., Wang X., Apostolov E.O., Sokolov N.N., Javadov S., Basnakian A.G. (2015) *DNA Cell Biol.*, **34**, 316-326.

Поступила: 30. 12. 2015.
Принята к печати: 11. 04. 2016.

APOPTOTIC ENDONUCLEASE EndoG INDUCES ALTERNATIVE SPLICING OF TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT hTERT AND DEATH OF TUMOR CELLS

**D.D. Zhdanov^{1,2}, D.A. Vasina², V.S. Orlova², V.Y. Gotovtseva³, M.V. Bibikova³, V.S. Pokrovsky¹,
M.V. Pokrovskaya¹, S.S. Aleksandrova¹, N.N. Sokolov¹**

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7910478 1275; fax: +74992450857; e-mail: zhdanovdd@mail.ru

²Ecological Faculty, Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russia

³"Viorin" LLC, Moscow, Russia

Telomerase activity is known to be regulated by alternative splicing of its catalytic subunit hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) mRNA. Induction of non-active spliced hTERT leads to inhibition of telomerase activity. However, very little is known about the mechanism of hTERT mRNA alternative splicing. The aim of this study was to determine the role of apoptotic endonuclease EndoG in alternative splicing of hTERT and telomerase activity. Strong correlation was found between expression of EndoG and hTERT splice-variants in 12 colon cancer cell lines. Overexpression of EndoG in CaCo-2 cells downregulated the expression of active full-length hTERT variant and upregulated non-active spliced variant. Reduction of full-length hTERT caused downregulation of telomerase activity, dramatically shortening of telomeres length during cell divisions, converting cells to the replicative senescence state, activation of apoptosis and finally cell death. These data indicated the participation of EndoG in alternative splicing of mRNA of telomerase catalytic subunit, regulation of telomerase activity and cell fate.

Key words: EndoG, telomerase, hTERT, alternative splicing, CaCo-2