

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ИНДУЦИРОВАННАЯ ЦИСПЛАТИНОМ ЭКСПРЕССИЯ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ EndoG ВЫЗЫВАЕТ ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ CD4⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Д.Д. Жданов^{1,2}, Д.А. Васина², Е.В. Орлова³, В.С. Орлова¹, В.С. Покровский^{1,2},
М.В. Покровская¹, С.С. Александрова¹, Н.Н. Соколов¹*

¹Научно-исследовательский биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

²Российский университет дружбы народов, экологический факультет,
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики,
142290, Пушкино, Московская область, ул. Институтская, 3

Альтернативный сплайсинг пре-мРНК каталитической субъединицы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) играет важную роль в регуляции активности теломеразы. Увеличение количества неактивной сплайс-формы hTERT ингибирует теломеразную активность. Известно, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG принимает участие в процессе альтернативного сплайсинга hTERT. Экспрессия EndoG возрастает в ответ на повреждения ДНК. Целью работы было изучение влияния повреждающего ДНК агента цисплатина на индукцию EndoG, альтернативный сплайсинг hTERT и активность теломеразы в CD4⁺ Т-лимфоцитах человека. Инкубация CD4⁺ Т-клеток с цисплатином вызывает повреждения ДНК и индукцию EndoG. Экспрессия EndoG сопровождается снижением синтеза полноразмерного активного варианта hTERT и увеличением экспрессии неактивного сплайс-варианта. Уменьшение количества полноразмерного варианта hTERT приводит к снижению теломеразной активности, укорочению длины теломер до критических значений, переходу клеток в состояние репликативного старения, активации апоптотических процессов и гибели клеток. Некоторые клетки остаются живыми и претерпевают злокачественную трансформацию. Злокачественно трансформированные клетки обладают повышенной теломеразной активностью и репликативным потенциалом, по сравнению с исходными CD4⁺ Т-клетками. Они имеют фенотип Т-клеточной лимфомы, а также обладают способностью формировать опухоли и вызывать гибель экспериментальных животных.

Ключевые слова: цисплатин, EndoG, теломераза, hTERT, альтернативный сплайсинг, злокачественная трансформация

DOI 10.18097/PBMC20176301013

ВВЕДЕНИЕ

Теломераза – мультибелковый комплекс, синтезирующий теломерные повторы TTAGGG на концах хромосом человека. В нормальных соматических клетках теломераза не активна и их теломеры укорачиваются на 40–200 пар нуклеотидов (п.н.) при каждом цикле деления; поэтому такие клетки способны делиться лишь ограниченное число раз. Укорочение длины теломер до критического уровня вызывает переход клеток в состояние так называемого “репликативного старения” (стадия M1 – mortality stage 1), при котором наблюдается замедление или полная остановка пролиферации, однако клетки остаются живыми и поддерживают активный метаболизм [1]. Изменение структуры теломер при достижении минимальной критической длины приводит к потере основных функций теломер и запуску механизмов системы ответа на повреждение ДНК, в результате в клетках происходит активация апоптоза [2]. Некоторым клеткам всё же удается преодолеть этот период; например, в присутствии вирусных онкогенов, вызывающих потерю функций белков p53 (Protein 53) и Rb (Retinoblastoma) [3]. Теломеры таких клеток

продолжают укорачиваться и полностью утрачивают свою защитную функцию. Это ведёт к хромосомной дестабилизации, сопровождающейся ингибированием пролиферации, накоплением генетических мутаций и клеточной смерти. Такая стадия называется “кризисом” (стадия M2). Немногие выжившие после стадии M2 клетки претерпевают злокачественную трансформацию (вероятно, в результате множества мутаций), задействуют механизмы удлинения теломер и становятся бессмертными [4]. Большинство (около 90%) раковых клеток обладают теломеразной активностью [5]. Активная теломераза в раковых клетках не восстанавливает полную длину теломер, характерную для нормальных клеток (длина теломер в раковых клетках значительно меньше, чем в нормальных), а постоянно поддерживает их размер [6, 7].

Главными компонентами теломеразы являются hTR (Human Telomerase RNA), включающая в себя РНК-матрицу для синтеза теломер, а также hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase), обладающая отбратно-транскриптазной активностью и синтезирующая теломерные повторы на матрице hTR [8]. Теломераза активна в нормальных половых

* - адресат для переписки

клетках, стволовых клетках и активированных лимфоцитах, а также в большинстве типов раковых клеток [5]. Известно, что активность фермента регулируется уровнем синтеза hTERT [9], а также процессом альтернативного сплайсинга (АС) её пре-мРНК. Процесс АС пре-мРНК hTERT изучен недостаточно полно. В настоящее время известно более двух десятков сплайс-вариантов hTERT, однако только полноразмерный вариант hTERT обладает каталитической активностью [10]. Большинство сплайс-вариантов экспрессируются в минорных количествах и их функция до конца не изучена. Два АС варианта составляют большую часть общей мРНК hTERT. Делеция 36 нуклеотидов в экзоне 6 (α -вариант) вызывает удаление части обратно-транскриптазного домена белковой молекулы и приводит к утрате каталитической активности. Делеция 182 нуклеотидов экзона 7 и 8 (β -вариант) приводит к сдвигу рамки считывания и появлению стоп-кодона в экзоне 10, что сопровождается синтезом укороченного сплайс-варианта hTERT [11,12], который функционирует как доминантно-негативный [13].

Ранее мы показали, что сверхэкспрессия апоптотической экзонуклеазы EndoG в опухолевых клетках вызывает АС пре-мРНК hTERT [14], понижение экспрессии полноразмерного $\alpha+\beta+$ и увеличение экспрессии $\alpha+\beta-$ сплайс-варианта. Изменение пропорции сплайс-вариантов приводит к ингибированию активности теломеразы, укорочению теломера, переходу опухолевых клеток в состояние репликативного старения и гибели клеток по пути апоптоза. Апоптотические экзонуклеазы – группа ферментов, разрушающих ДНК клеток на последних стадиях апоптоза [15]. Экзонуклеаза G (EndoG) является сайт-специфичной экзонуклеазой, избирательно расщепляющей двойные цепи ДНК по поли-Г последовательностям. Отличительной особенностью EndoG является её РНКазная активность [16]. Известно, что экспрессия EndoG возрастает в ответ на повреждения ДНК [17].

Данная работа проведена с целью изучения связи экспрессии EndoG, индуцированной повреждающим ДНК агентом цисплатином и АС hTERT в нормальных активированных CD4⁺ Т-лимфоцитах человека, а также влияния индуцированной экспрессии EndoG на пролиферацию клеток.

МЕТОДИКА

Забор крови, селекция и культивирование CD4⁺ Т-клеток

Образцы венозной крови четырёх здоровых доноров, давших письменное согласие на участие в данном исследовании, забирали в пробирки с антикоагулянтом K3EDTA (“Greiner Bio-One”, Австрия). Из крови выделяли мононуклеарные клетки методом градиентного центрифугирования на Фиколе Lympholite-H (“Cedarlane”, Канада). Получение фракции CD4⁺ клеток выполняли методом магнитной селекции с использованием CD4⁺ Isolation Kit, human (“Miltenyi Biotec”, Германия) по протоколу

производителя. Полученные CD4⁺ клетки высевали в концентрации 5×10^5 клеток на 1 мл среды. В работе использовали культуральную среду RPMI-1640 (“Life technologies”, США), содержащую 10% FBS (Fetal Serum Bovine, “Gibco”, США), стимуляторы роста IL-2 100 Ед/мл, (“R&D Systems”, США), 5 мкг/мл антитела анти-CD3 (“МедБиоСпектр”, Россия), 2 мкг/мл антитела анти-CD28 (“eBiosciences”, США), а также антибиотики пенициллин (50 Ед/мл) и стрептомицин (50 мг/мл) (“Sigma”, США). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90%. Через каждые три дня культивирования клетки рассеивали до концентрации 5×10^5 клеток на 1 мл среды и повторно полной средой. Подсчёт количества клеток производили окрашиванием трипановым синим на клеточном анализаторе Vi-cell XR Viability Cell Analyzer (“Beckman Coulter”, США). Фотографирование пролиферирующих клеток осуществляли при помощи инвертированного микроскопа Leica DMI300 (“Leica Biosystems”, США).

Обработка клеток цисплатином и измерение цитотоксичности

Для индукции повреждения ДНК CD4⁺ Т-клетки культивировали с цисплатином (цис-диаммин-дихлороплатина(II), “Sigma”). Цитотоксическую активность цисплатина оценивали по измерению активности лактатдегидрогеназы (Lactate dehydrogenase, LDH) в культуральной среде [18] при помощи LDH Cytotoxicity Detection Kit (“Takara”, США) по методике производителя. Максимально нетоксичной концентрацией (МНК) считали максимальную концентрацию цисплатина, которая не вызывала статистически достоверного увеличения смертности 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. [19]. 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”, США) по протоколу компании-производителя. Структура праймеров (“Синтол”, Россия) представлена 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. Стандартные кривые эффективности ПЦР строили по серийным разведениям (1:40, 1:80, 1:160 и 1:320) суммарных кДНК. Данные представляли в виде нормализации уровней мРНК изучаемых генов по 18S рРНК, использовавшегося в качестве референсного гена с конститутивной экспрессией.

Таблица 1. Праймеры, используемые 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 разрушали в 1 мл ТБЭ буфера (89 мМ Трис, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ EDTA, pH 8,0) ультразвуком в течение двух минут при мощности 50 Ватт с помощью Model 50 Sonic Dismembrator ("Fisher Scientific", США) и центрифугировали (10 мин; 12000 g) для удаления дебриса. Концентрацию общего белка в образцах измеряли 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 Трис-HCl, pH 6,8, содержащем 1% SDS, 2 мМ EDTA, 1% β -меркаптоэтанол и 7,5% глицерин, денатурировали прогреванием (100°C; 10 мин) и разделяли электрофорезом в градиентном ПААГ [20] (100 В; 2 ч), используя NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Трис Protein Gels ("Life Technologies", США). Далее белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в Novex transferring buffer ("Invitrogen" США) при 40 В в течение 3 ч, после чего мембраны окрашивали Ponceau S ("Sigma"), как описано Hofnagel и соавт. [21]. Затем мембраны блокировали Blotting-Grade Blocker ("Bio-Rad") и инкубировали в течение 2 ч с первичными моноклональными антителами к GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 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 (ФСБ, "Gibco") с 0,1% Твин-20, и мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Cell Signalling", США). Для визуализации использовали SuperSignal chemiluminescent kit ("Pierce Biotechnology", США) с последующим документированием в ChemiDoc™ XRS imaging system ("Bio-Rad"). Количественную оценку содержания белка проводили методом денситометрии в программе GelAnalyzer 2010a.

Определение активности теломеразы

Активность теломеразы определяли методом TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol,

протокол амплификации теломерных повторов) [5, 22]. Клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭГТА, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид, 0,5% ХАПС, 5 мМ β -меркаптоэтанол, и 10% глицерин, из расчёта 1 мкл буфера на 10^3 клеток. Лизаты центрифугировали (30 мин, +4°C, 12000 g), супернатант отбирали и хранили при -80°C. Элонгацию олигонуклеотидного субстрата-праймера и последующую амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-HCl, pH 8,8, 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Твин-20, 1,5 мМ MgCl_2 , 1 мМ EGTA, 0,25 мМ каждого из dNTPS, 0,1 мкг TS-праймера (Telomerase Substrate primer) (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') и 2 мкл клеточного экстракта, разбавленного 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%-ном 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 описанную ранее методику [23, 24]. Геномную ДНК выделяли при помощи PureLink Genomic DNA Mini Kit ("Thermo Scientific") и проводили ПЦР в реальном времени по методике Cawthon R.M. [24]. Длину теломер в каждом образце измеряли трижды. Для дальнейших расчётов брали усреднённое значение. ДНК из интактных клеток CD4^+ Т-клеток использовали как референсную.

Иммунофенотипирование, определение апоптоза, клеточного цикла и уровня повреждения ДНК

Периферическую кровь доноров лизировали в буфере Red Blood Cell Lysis buffer ("Life Technologies") по протоколу производителя. Клетки в количестве 5×10^7 из осадка или после злокачественной трансформации ресуспендировали в 200 мкл ФСБ. Клетки метили антителами к CD45-Vio770, а также каждым из CD3-FITC, CD4-FITC, CD8-FITC, CD14-FITC, CD16/56-FITC, CD2-FITC, CD5-FITC, CD7-FITC (все от "Miltenyi Biotec") по протоколу производителя. Количество клеток определяли методом проточной цитометрии на цитометре FACSCalibur ("Beckton Dickinson", США). Интенсивность экспрессии маркеров оценивали по уровню MFI (Mean Fluorescence Intensity) при проведении проточной цитометрии. Для определения апоптоза CD4⁺ Т-клетки ресуспендировали в ФСБ и инкубировали с Аннексином V-FITC и пропидий йодидом из набора "FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis kit" ("Invitrogen") по протоколу производителя. Методом проточной цитометрии осуществляли анализ 5×10^4 клеток. 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. Оценку количества клеток с повреждённой ДНК проводили методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling) [25] при помощи FlowTACSTM Apoptosis Detection Kit ("R&D Systems") по протоколу производителя с использованием проточной цитометрии.

Определение активности бета галактозидазы

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

Оценка способности клеток образовывать опухоли in vivo

Для оценки способности трансформированных клеток образовывать опухоли использовали самцов мышей линии Balb/c nude в возрасте 6–9 недель (из питомника лабораторных животных "Пушино"). Мышей содержали в виварии в условиях отсутствия патогенной микрофлоры при естественном освещении, на брикетированном корме и постоянном доступе к воде. Мыши были разделены на две группы по 10 особей в каждой. Животным контрольной группы вводили свежевыделенные CD4⁺ Т-лимфоциты человека. Мышам экспериментальной группы

вводили злокачественно трансформированные клетки. Клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 в концентрации 1×10^6 в 200 мкл и вводили подкожно по стандартной методике [26]. Оценивали продолжительность жизни животных и размер опухолевого узла, измеренного в трёх плоскостях. По завершению эксперимента мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза. Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике.

Статистический анализ

Статистически анализ результатов осуществляли по критерию Стьюдента при помощи программы Statistica 9.0 ("StatSoft Inc.", США). Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение. Значения считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$. Статистический анализ выживаемости мышей проводили с использованием лог-рангового критерия и построения кривых Каплана-Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инкубация с цисплатином вызывает повреждение ДНК и гибель CD4⁺ Т-клеток

Для установления роли повреждения ДНК для CD4⁺ Т-лимфоцитов, клетки четырёх доноров инкубировали в течение 72 ч с цисплатином в ростовой среде и измеряли количество живых клеток, а также количество клеток с повреждённой ДНК. Используемые концентрации цисплатина были подобраны ранее в ходе предварительных экспериментов (данные не приводятся). Инкубация с цисплатином вызывала дозозависимую гибель CD4⁺ Т-клеток (рис. 1А) и дозозависимое увеличение количества клеток с повреждением ДНК (рис. 1Б,В). МНК цисплатина составила 2 мкМ, поскольку данная концентрация не вызывала статистически достоверного увеличения смертности клеток. При данной концентрации цисплатина повреждения ДНК являлись не летальными. Инкубация CD4⁺ Т-лимфоцитов с цисплатином в концентрации выше 2 мкМ не приводила к достоверному увеличению количества клеток с повреждённой ДНК.

Культивирование с цисплатином вызывает апоптоз CD4⁺ Т-клеток

Для установления влияния длительного воздействия повреждения ДНК на пролиферацию клеток, CD4⁺ Т-лимфоциты четырех доноров инкубировали с МНК цисплатина и ежедневно измеряли количество живых и мертвых клеток, а также клеток в состоянии апоптоза. В группе клеток, инкубированных с цисплатином, обнаружена массивная гибель на 24-28-е сутки (рис. 2). Так, на 24-е сутки наблюдалось резкое увеличение числа клеток в состоянии апоптоза до $8,56 \pm 2,19\%$. На 28-е сутки практически все клетки были мертвы. Контрольные клетки оставались живыми в течение 28-ми суток культивирования.

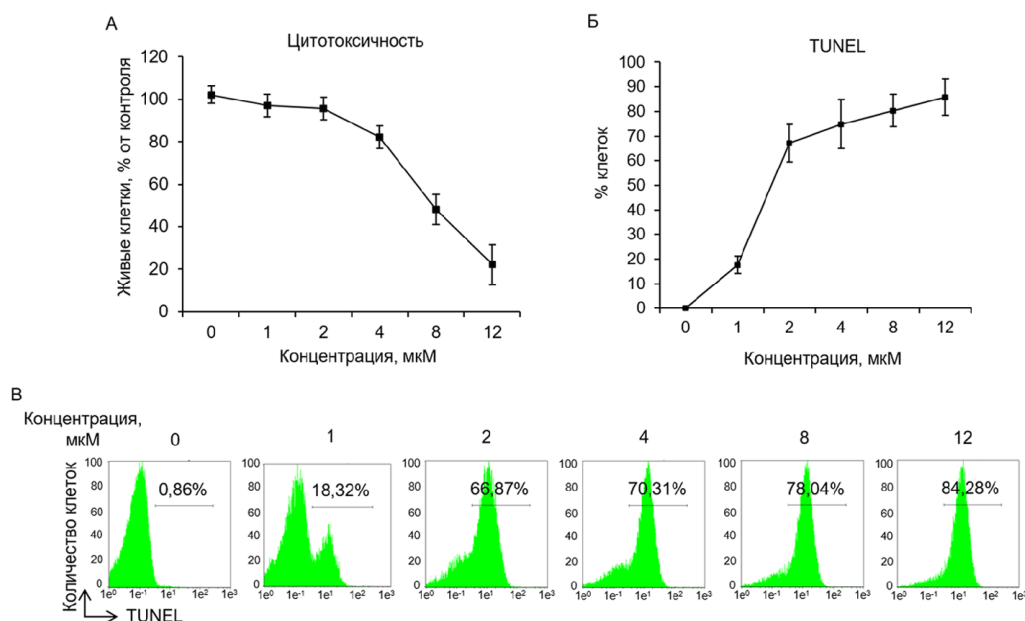


Рисунок 1. Цитотоксичность цисплатина и его способность вызывать повреждение ДНК в CD4⁺ Т-клетках. (А) Дозозависимая цитотоксическая активность цисплатина. CD4⁺ Т-лимфоциты культивировали в течение 72 ч с различными концентрациями цисплатина. Количество мертвых клеток определяли по активности LDH в культуральной среде. (Б) Увеличение количества TUNEL-положительных клеток при инкубации с цисплатином. N=4. * - $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам. (В) Количество CD4⁺ Т-лимфоцитов с повреждённой ДНК, измеренное методом TUNEL для проточной цитометрии (показан один репрезентативный опыт, всего 4).

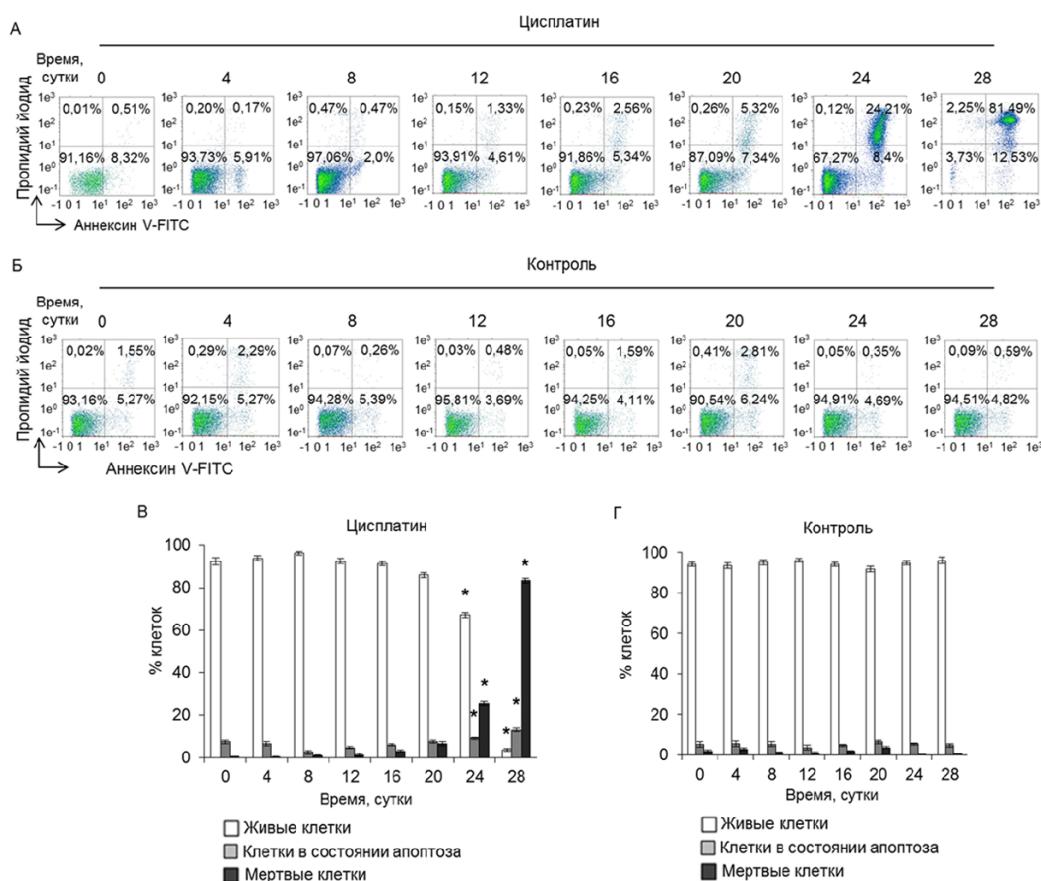


Рисунок 2. Индукция апоптоза и гибели CD4⁺ Т-клеток при культивировании с цисплатином. Результаты проточной цитометрии CD4⁺ Т-клеток (А) культивированных с цисплатином и (Б) контрольных клеток и меченых аннексином V-FITC и пропидий йодидом. Показан процент живых клеток (нижние левые квадранты), процент клеток в состоянии апоптоза (нижние правые квадранты) и процент мёртвых клеток (верхние квадранты). Показан один репрезентативный эксперимент, всего 4. Гистограммы живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мёртвых CD4⁺ Т-клеток (В) при культивировании с цисплатином (Г) в контрольной группе. N=4. * - $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам.

ЦИСПЛАТИН ВЫЗЫВАЕТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Культивирование с цисплатином вызывает увеличение экспрессии EndoG, снижение экспрессии $\alpha+\beta+$ варианта hTERT, уменьшение активности теломеразы и длины теломер

Известно, что экспрессия EndoG увеличивается в ответ на повреждения ДНК [17]. Нами изучено изменение экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в CD4⁺ Т-клетках при их культивировании

с МНК цисплатина. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что культивирование клеток с цисплатином приводило к повышению в них уровня экспрессии EndoG более чем в три раза. Экспрессия EndoG оставалась стабильно высокой в течение всего периода культивирования (рис. 3А). Повышенная экспрессия EndoG сопровождалась снижением экспрессии полноразмерного $\alpha+\beta+$ сплайс-варианта hTERT (рис. 3Б) и увеличением экспрессии

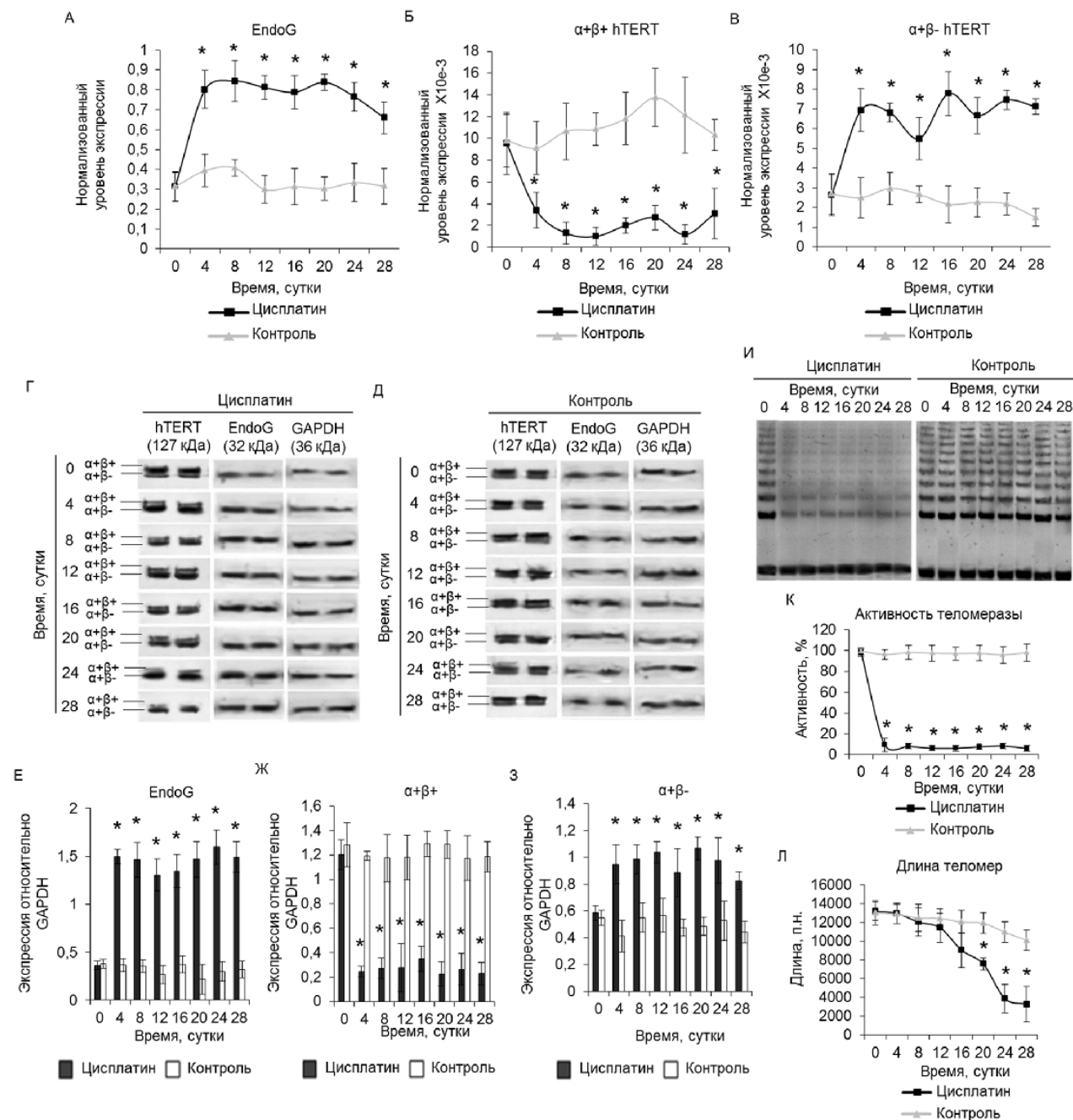


Рисунок 3. Индуцированная цисплатином экспрессия EndoG при культивировании клеток поддерживает низкую экспрессию полноразмерного сплайс-варианта hTERT, ингибирование активности теломеразы и укорочение длины теломер. Уровни экспрессии (А) EndoG и (Б, В) сплайс-вариантов hTERT в CD4⁺ Т-клетках при культивировании с цисплатином. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S рРНК. Вестерн блоттинг сплайс-вариантов hTERT и EndoG в CD4⁺ Т-клетках (Г), культивированных с цисплатином и (Д) группе контрольных клеток. Результаты определения количеств EndoG (Е) и сплайс-вариантов hTERT (Ж-З) по отношению к GAPDH. (К) Гель-электрофорез TRAP в культивируемых клетках. (Л) 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 контрольным клеткам.

$\alpha\beta^-$ -варианта (рис. 3В). В контрольных клетках достоверного изменения экспрессии EndoG, $\alpha\beta^+$ и $\alpha\beta^-$ -сплайс-вариантов hTERT не обнаружено. Достоверное изменение количества исследуемых белков в CD4⁺ Т-клетках, культивированных с цисплатином, по сравнению с контрольными клетками подтверждено методом вестерн блоттинга (рис. 3Г-З).

Мы проследили, как изменяется активность теломеразы и длина теломер в CD4⁺ Т-клетках при культивировании в присутствии цисплатина. Методом TRAP установлено, что инкубация с цисплатином вызывает значительное снижение активности теломеразы (рис. 3И,К); теломеразная активность оставалась стабильно низкой в течение всего периода культивирования. 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 клетках, культивированных в присутствии цисплатина, происходило уменьшение длины теломер более чем в 4 раза за 24 дня (рис. 3Л). При дальнейшем культивировании размер теломер уменьшался незначительно и оставался на низком уровне. В контрольных клетках также обнаружено укорочение длины теломер, однако оно было не столь быстрым, как у клеток, культивированных с цисплатином.

Укорочение теломер вызывает переход клеток в состояние репликативного старения и ингибирует клеточный цикл

Известно, что ингибирование теломеразы в активно пролиферирующих клетках приводит к их переходу в состояние репликативного старения, что сопровождается остановкой клеточного цикла в фазе G0/G1 [22, 27]. Используя метод проточной цитометрии при мечении ДНК клеток пропидием йодидом, мы оценили распределение по фазам клеточного цикла пролиферирующих в присутствии цисплатина CD4⁺ Т-лимфоцитов. В культивированных с цисплатином клетках обнаружено значительное уменьшение количества клеток в S и G2/M фазах и достоверное увеличение в G0/G1 фазе на 16-е сутки (рис. 4А,В). Однако, клетки оставались живыми (рис. 2А,В). На 24-е сутки наблюдалось дальнейшее снижение количества клеток в G2/M фазе, а также увеличение количества апоптотических клеток. На 28-е сутки практически все клетки находились в состоянии апоптоза. В контрольных клетках изменений клеточного цикла не выявлено (рис. 4Б, Г).

Маркером перехода клеток в состояние репликативного старения является повышение экспрессии и активности b-Gal. В связи с этим была исследована экспрессия и активность данного фермента при культивировании CD4⁺ Т-клеток в присутствии цисплатина. На 26-е сутки инкубации с цисплатином обнаружено достоверное увеличение экспрессии b-Gal в клетках (рис. 4Д). На 24-28-е сутки уровень экспрессии оставался стабильно высоким. Ферментативная активность b-Gal повышалась на 20-е сутки инкубации и оставалась высокой

на 24-е сутки (рис. 4Е). На 28-е сутки выявлено снижение ферментативной активности b-Gal, что объясняется массивной гибелью клеток. В контрольных клетках, экспрессия и активность b-Gal оставались неизменными. Активация b-Gal в клетках на 20-е сутки инкубации с цисплатином согласуется с ингибированием S и G2/M фаз клеточного цикла, что указывает на переход клеток в состояние репликативного старения. Гибель таких клеток на 24-28-е сутки культивирования являлась дальнейшим следствием этого состояния.

Динамика пролиферации CD4⁺ Т-клеток в присутствии цисплатина

Исследовано влияние цисплатина на абсолютное количество CD4⁺ Т-клеток (рис. 5А). В популяции клеток, культивированных с цисплатином, наблюдался экспоненциальный рост с момента начала культивирования до 16-х суток. Дальнейшее культивирование приводило к остановке пролиферации на 16-24 сутки, что согласуется с укорочением длины теломер до критических значений, переходом клеток в состояние репликативного старения и остановкой клеточного цикла в G0/G1 фазе (рис. 3, 4). На 28-е сутки культивирования наблюдалось резкое уменьшение количества живых клеток, что соответствует массивной гибели в результате развития апоптотических процессов в стареющих клетках (рис. 2). Массивная гибель клеток происходила до 36-х суток культивирования, количество клеток уменьшилось до единичных живых в поле зрения. Клетки оставались живыми, но не были способны к размножению. Однако на 49-е сутки культивирования выявлен массивный неограниченный рост клеток, продолжавшийся до 55-х суток. Мы предположили, что данные клетки подверглись злокачественной трансформации и приобрели неограниченный пролиферативный потенциал. В популяции контрольных клеток наблюдали аналогичную динамику лишь на первых этапах культивирования. Экспоненциальный рост клеток происходил до 20-х суток культивирования. В целом, количество клеток в контрольной популяции было на 3 порядка выше, чем в популяции клеток, культивированных с цисплатином. Это указывает на влияние индуцированной экспрессии EndoG и цисплатина не только на систему теломеразного комплекса, но и на другие системы, ингибирующие пролиферативную активность клеток. На 28–32-е сутки рост клеток останавливался, клетки массово гибли на 36-е сутки культивирования. Гибель всех клеток наблюдалась к 48-ми суткам. Оставшихся в живых клеток не обнаружено, злокачественной трансформации клеток не происходило.

Популяция CD4⁺ Т-клеток, полученная методом магнитной селекции, культивируемая в условиях *ex vivo* представляет собой одиночные клетки округлой формы размером 5-8 мкм (рис. 5Б,В, 0-е сутки культивирования). Пролiferация таких клеток происходила в виде кластеров пролиферации (12-е сутки культивирования), представляющих собой агрегаты клеток размером около 50-70 мкм.

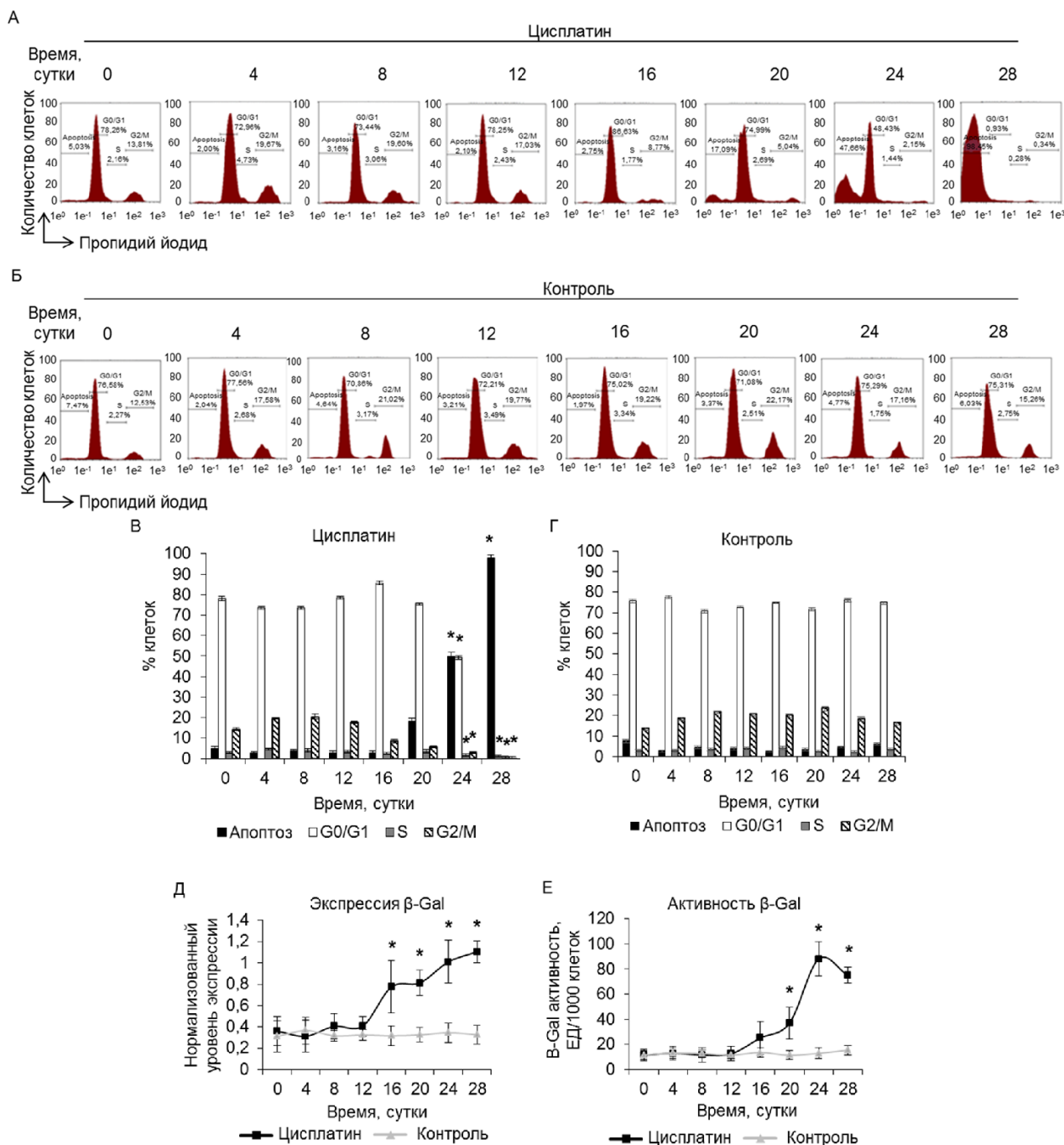


Рисунок 4. Ингибирование клеточного цикла клеток при их переходе в состояние репликативного старения. Результаты измерения клеточного цикла методом проточной цитометрии при окрашивании ДНК клеток пропидий йодидом. Показан процент $CD4^+$ Т-клеток (А) культивируемых с цисплатином и (Б) группе контрольных клеток в состоянии апоптоза, а также G0/G1, S и G2/M фазах клеточного цикла. Показан один репрезентативный эксперимент, всего 4. (В, Г) Гистограммы количества клеток в различных фазах клеточного цикла (Д) Уровень экспрессии β -Gal в контрольных $CD4^+$ Т-клетках и при их культивировании с цисплатином. Уровень экспрессии гена нормализован по отношению к экспрессии референсного гена 18S рРНК. (Е) Ферментативная активность β -Gal в культивируемых клетках. Активность β -Gal представлена в ЕД на 1000 клеток, определенная по калибровочной кривой. N=4. * - $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам.

Пребывание клеток в состоянии репликативного старения (24-е сутки культивирования) сопровождалось распадом кластеров пролиферации на отдельные клетки. При этом наблюдалось увеличение размера отдельных клеток до 10-17 мкм. Форма клеток в состоянии репликативного старения отличалась от округлой. Развитие процессов апоптоза

и массовой клеточной гибели на 32-е сутки культивирования сопровождалось появлением большого количества клеток с измененной формой и клеточного дебриса. После массовой клеточной гибели в популяции клеток культивируемых с цисплатином живыми оставались единичные клетки (48-е сутки культивирования). В популяции

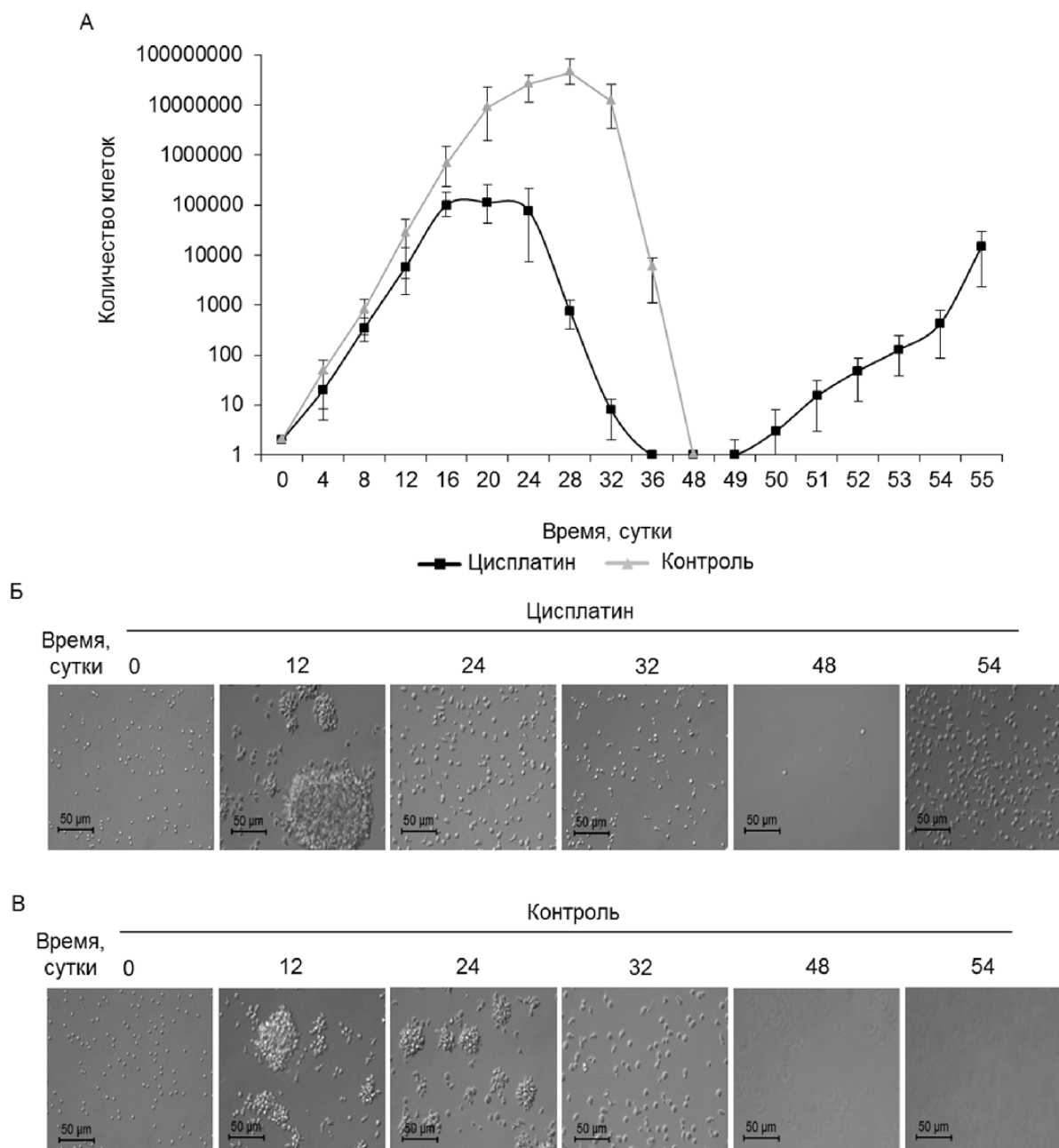


Рисунок 5. Динамика развития $CD4^+$ Т-клеток при культивировании с цисплатином (см. описание в тексте). (А) Абсолютное количество клеток при культивировании. $N=4$. (В) Микрофотографии пролиферирующих клеток (увеличение $\times 200$).

контрольных клеток, после массовой гибели на 48-е сутки и далее, живых клеток не обнаружено. Злокачественно трансформированные клетки в результате действия цисплатина (54-е сутки) пролиферировали не в виде кластеров пролиферации, а одиночными клетками, форма данных клеток сильно отличалась от округлой.

Культивирование клеток с цисплатином сопровождается увеличением количества клеток с повреждением ДНК

Мы проследили динамику изменения количества $CD4^+$ Т-клеток с поврежденной ДНК при их культивировании с цисплатином и после

злокачественной трансформации методом TUNEL. Культивирование с цисплатином поддерживало уровень клеток с поврежденной ДНК в пределах 61,00–68,53% в течение 48-ми суток культивирования (рис. 6А,В). Уровень клеток с поврежденной ДНК в популяции после злокачественной трансформации не превышал 5,74%. В группе контрольных клеток уровень клеток с поврежденной ДНК не превышал таковой уровень у исходных клеток (0-е сутки культивирования) (рис. 6Б,Г). Увеличение количества клеток с поврежденной ДНК в контрольной группе на 32-е сутки связан с остановкой пролиферации, развитием апоптотических процессов и началом гибели клеток (рис. 5), которое характеризуется деградацией ДНК апоптотическими эндонуклеазами [28].

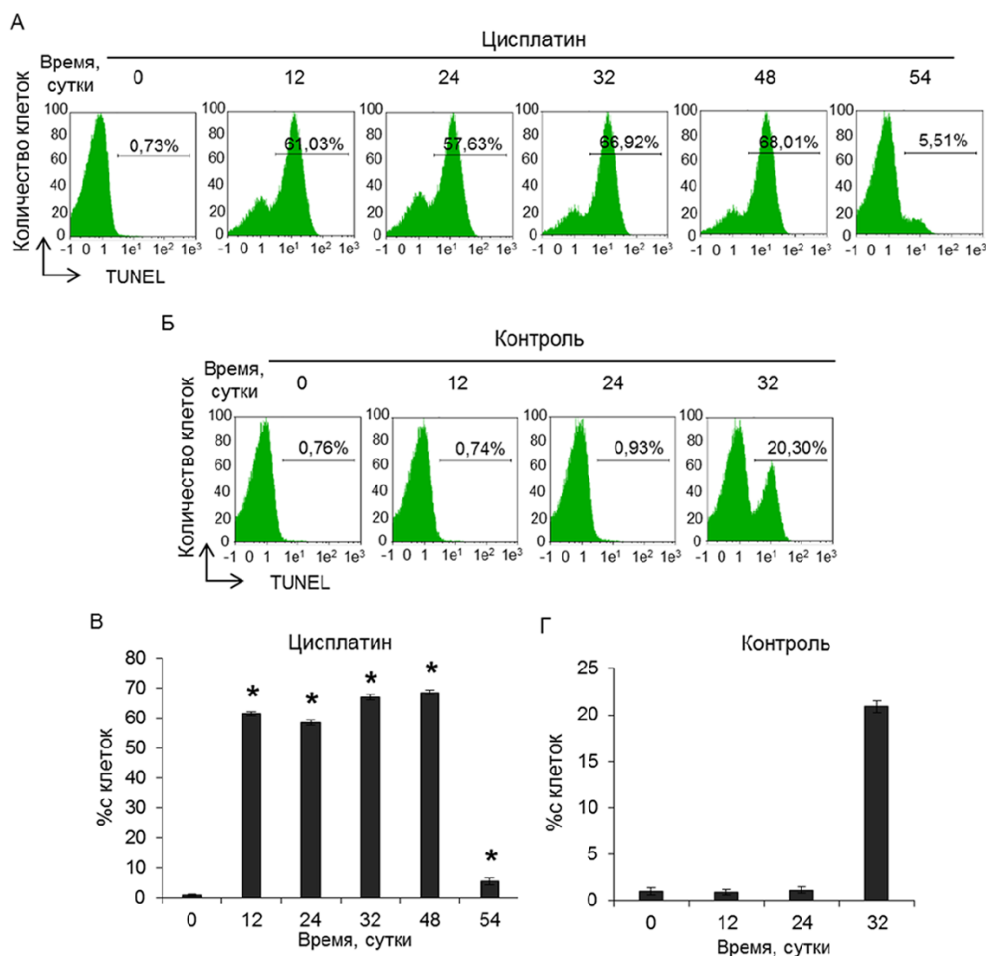


Рисунок 6. Увеличенный уровень $CD4^+$ Т-клеток с поврежденной ДНК при их культивировании с цисплатином. Количество лимфоцитов с поврежденной ДНК, измеренное методом TUNEL для проточной цитометрии (А) при культивировании с цисплатином и (Б) в группе контрольных клеток. Увеличение количества TUNEL-положительных клеток при (В) инкубации с цисплатином и (Г) в группе контрольных клеток. N=4. * - $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам.

Злокачественно трансформированные $CD4^+$ Т-клетки обладают повышенной активностью теломеразы и фенотипом Т-клеточной лимфомы

Мы сравнили экспрессию EndoG и сплайс-вариантов hTERT в исходных $CD4^+$ Т-клетках и в злокачественно трансформированных клетках. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что уровень экспрессии EndoG в трансформированных клетках был достоверно ниже, чем в исходных клетках (рис. 7А). Уровень экспрессии полноразмерного $\alpha+\beta+$ варианта hTERT в трансформированных клетках не отличался от уровня в исходных клетках (рис. 7Б), в то время как экспрессия $\alpha+\beta-$ варианта была значительно снижена (рис. 7В). Не обнаружено изменения экспрессии минорных $\alpha-\beta+$ и $\alpha-\beta-$ сплайс-вариантов (рис. 7Г,Д). Достоверное изменение количества исследуемых белков в злокачественно трансформированных клетках подтверждено методом вестерн блоттинга (рис. 7Е,Ж). Методом TRAP установлено, что в трансформированных клетках теломеразная активность более чем в три раза выше, чем в исходных $CD4^+$ Т-клетках (рис. 7З,И). Увеличенная активность теломеразы согласуется с повышенной

пролиферативной активностью злокачественно трансформированных клеток и уровнями экспрессии в них $\alpha+\beta+$ и $\alpha+\beta-$ сплайс-вариантов hTERT. Длина теломер в трансформированных клетках была более чем в 3 раза меньше, чем в исходных клетках (рис. 7К).

Исследование иммунофенотипа популяции трансформированных клеток методом проточной цитометрии показало значительное увеличение количества клеток, экспрессирующих CD2, CD5 и CD7, что характерно для Т-клеточной лимфомы (рис. 7Л,М; табл. 2). Иммунофенотип трансформированных клеток можно описать как $CD45^+CD3^+CD4^+CD2^+CD5^+CD7^+$. Увеличение количества клеток с данными маркерами сопровождалось повышением экспрессии молекул на каждой клетке, о чём свидетельствует увеличение уровня MFI (табл. 2). В популяции трансформированных клеток отсутствовали цитотоксические Т-лимфоциты (маркер $CD8^+$), НК-клетки (маркеры $CD16/56^+$) и макрофаги (маркер $CD14^+$). Небольшое количество (около 0,5%) клеток с маркером $CD8^+$ в популяции трансформированных клеток представляли клетки с экспрессией как $CD8^+$, так и $CD4^+$, что также является характерным для Т-клеточной лимфомы.

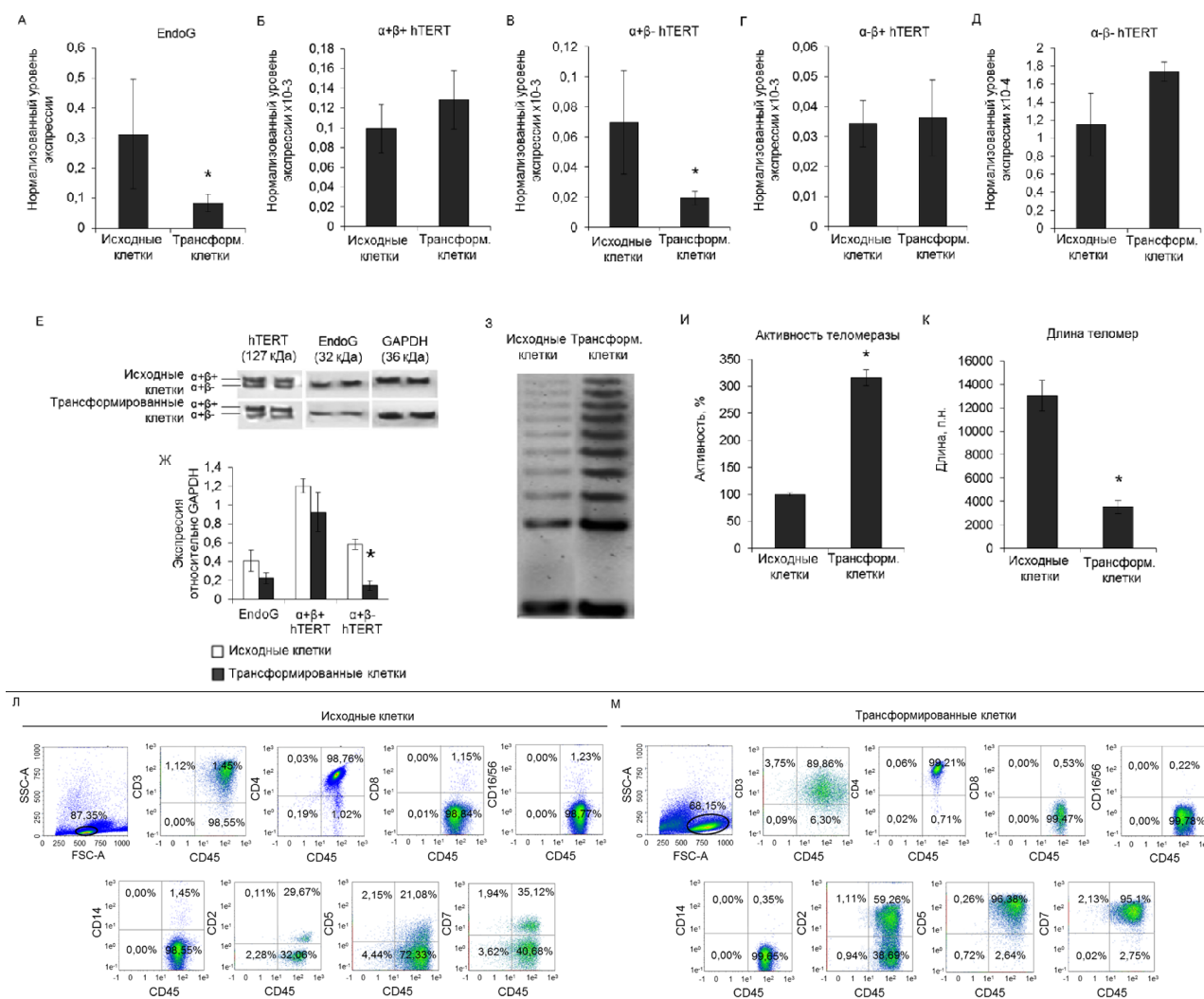


Рисунок 7. Повышенная активность теломеразы и фенотип Т-клеточной лимфомы у злокачественно трансформированных CD4⁺ Т-клеток. Уровни экспрессии (А) EndoG и (Б-Д) сплайс-вариантов hTERT в исходных и злокачественно трансформированных CD4⁺ Т клетках. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S рРНК. (Е) Вестерн блоттинг сплайс-вариантов hTERT и EndoG в исходных и злокачественно трансформированных CD4⁺ Т клетках. (Ж) Результаты определения количеств EndoG и сплайс-вариантов hTERT по отношению к GAPDH. (З) Гель-электрофорез TRAP в трансформированных клетках. (И) Результаты определения активности теломеразы методом TRAP. (К) Абсолютная длина теломер, измеренная методом ПЦР в реальном времени. N=4. * - p<0,05 по отношению к исходным клеткам. Результаты определения иммунофенотипа методом проточной цитометрии в популяции (Л) исходных клеток и (М) трансформированных клеток. Показан один репрезентативный эксперимент, всего 4. Трансформ. клетки - трансформированные клетки.

Таблица 2. Уровень экспрессии клеточных маркеров (N=4)

Клеточный маркер	Исходные клетки		Трансформированные клетки	
	% клеток	MFI	% клеток	MFI
CD45 ⁺ CD3 ⁺	97,12±2,20	24,17±3,83	88,51±2,11	24,82±2,34
CD45 ⁺ CD4 ⁺	98,51±1,13	28,28±2,12	99,15±0,42	30,34±6,34
CD45 ⁺ CD8 ⁺	1,88±1,02	1,10±0,45	0,53±0,12	0,79±0,15
CD45 ⁺ CD16/56 ⁺	1,27±0,51	0,94±0,18	0,19±0,13	0,31±0,11
CD45 ⁺ CD14 ⁺	1,00±0,67	0,67±0,26	0,38±0,21	0,54±0,09
CD45 ⁺ CD2 ⁺	25,32±8,18	7,25±1,43	63,17±12,35	19,67±5,55
CD45 ⁺ CD5 ⁺	24,21±5,63	6,66±3,11	94,61±4,84	26,88±6,75
CD45 ⁺ CD7 ⁺	37,26±4,12	9,05±1,98	96,48±2,35	25,90±38,56

Трансформированные CD4⁺ Т-клетки обладают способностью образовывать опухоли и вызывают гибель экспериментальных мышей

Для оценки способности трансформированных CD4⁺ Т-клеток к развитию опухоли *in vivo* эти клетки и нормальные CD4⁺ Т-лимфоциты вводили бестимусным мышам линии Balb/c nude. Злокачественно трансформированные CD4⁺ Т-лимфоциты формировали быстро развивающиеся опухолевые узлы (рис. 8А). Уже на десятые сутки после введения клеток животным размер опухоли достоверно отличался от такового опухоли в контрольной группе. К концу периода наблюдения опухоль достигла размера 1933±375 мм³. В контрольной группе животных (с введёнными нормальными CD4⁺ Т-лимфоцитами) выявлено подкожное образование в месте введения клеток размером не более 11 мм³. При этом происходило постепенное уменьшение размеров данного образования: к 15-му дню наблюдения его размер не превышал двух мм³, и к 20-му дню место введения клеток не отличалось от окружающей ткани. Одновременно с развитием опухолей наблюдалась гибель мышей с введёнными трансформированными клетками (рис. 8А). На 31-е сутки после введения клеток погибли все животные. В группе контрольных животных погибла всего одна мышь на 20-е сутки эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя процесс АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT участвует в регуляции активности теломеразы в клетках, о нём до сих пор известно немного. В настоящей работе показана способность индуцированной цисплатином апоптотической эндонуклеазы EndoG осуществлять АС пре-мРНК hTERT, снижать активность теломеразы и вызывать злокачественную трансформацию нормальных CD4⁺ Т-лимфоцитов человека. Об этом свидетельствуют следующие факты. Инкубация клеток с цисплатином вызывала увеличение количества EndoG, неактивного ($\alpha+\beta$ -) сплайс-варианта hTERT и уменьшение содержания

активного ($\alpha+\beta$ +) варианта. Снижение количества активной формы hTERT сопровождалось достоверным уменьшением активности теломеразы. Длительное культивирование клеток с цисплатином приводило к их массивной гибели. Эти результаты не согласуются с данными Listerman и соавт. [13], которые показали, что сверхэкспрессия $\alpha+\beta$ - сплайс-варианта hTERT способна защищать клетки от апоптоза. Вероятнее всего, в нашем случае на судьбу клеток оказывают влияние сама по себе сверхэкспрессия EndoG, а не только индуцированный ею сплайсинг hTERT и ингибирование активности теломеразы. Кроме того, авторы не проследили динамику укорочения теломер в клетках. Как мы отмечали выше, EndoG способна оказывать влияние на теломеры напрямую и сокращать пролиферативный потенциал клеток.

Культивирование 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 G0/G1 фазе.

Укорочение теломер в течение 20-24-х суток культивирования сопровождалось снижением экспрессии $\alpha+\beta$ варианта hTERT (рис. 3Б) и уменьшением активности теломеразы (рис. 3И,К). Вероятнее всего, на 24-е сутки длина теломер в клетках, инкубированных с цисплатином, снижалась до критических значений и клетки переходили в состояние репликативного старения. При этом клетки оставались живыми, но теряли способность к дальнейшему делению. Остановка клеточного цикла в G0/G1 фазе и снижение количества клеток в фазах S и G2/M на 16-24-е сутки культивирования (рис. 5) согласуется с неспособностью клеток к делению. Массовая клеточная гибель, наблюдаемая на 28-36 сутки (рис. 2), вероятно, вызвана развитием апоптотических процессов в стареющих клетках. В клетках, инкубированных с цисплатином, также обнаружено укорочение длины теломер при делении клеток. Эти данные согласуются с ограниченным репликативным потенциалом Т-лимфоцитов [29].

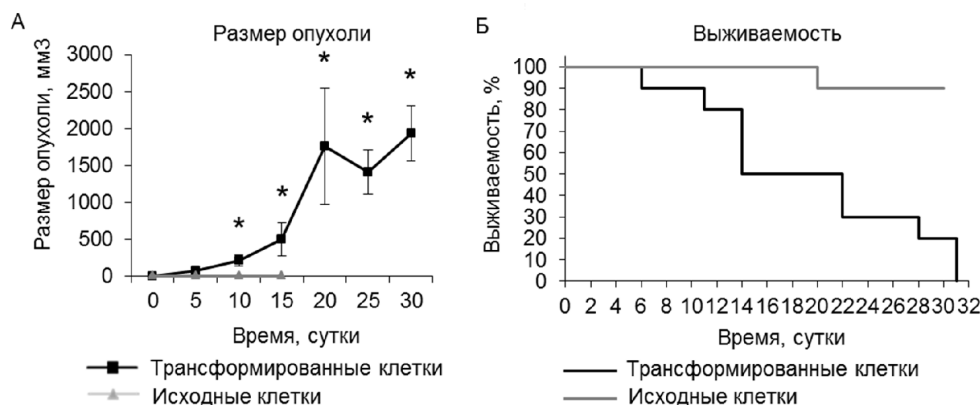


Рисунок 8. Способность злокачественно трансформированных CD4⁺ Т-клеток образовывать опухоль *in vivo* и вызывать гибель экспериментальных мышей. (А) Размер опухоли, образованной трансформированными и нормальными CD4⁺ Т-клетками. * - $p \leq 0,05$ по отношению к контрольной группе животных. (Б) Кривые Каплана-Мейера выживаемости мышей с введёнными трансформированными и нормальными CD4⁺ Т-клетками.

В Т-лимфоцитах периферической крови детектируется очень низкая активность теломеразы [30]. В условиях *ex vivo* при стимуляции пролиферации клеток IL-2 и антителами к CD3 и CD28 активность теломеразы значительно увеличивается [31], однако, ее активности недостаточно для неограниченной пролиферации Т-клеток [32]. В нашем случае экспоненциальный рост клеток, инкубированных с цисплатином, продолжался до 16-х суток культивирования, за это время происходило около 16 удвоений популяции. Такого количества делений недостаточно для столь быстрого укорочения теломер. Резкое укорочение длины теломер в клетках, инкубированных с цисплатином, также можно объяснить деградацией теломер самой EndoG или другими эндонуклеазами при их активации. Этим наилучшим образом можно объяснить быстрое укорочение теломер, поскольку известно, что эндонуклеазы способны деградировать G-квадруплексные структуры, формируемые теломерами [33-35]. Кроме того, ранее мы показали, что сверхэкспрессия EndoG приводит к активации других эндонуклеаз [36]. Несомненно, непосредственное влияние EndoG на динамику теломер требует дальнейшего изучения. За 28 суток культивирования длина теломер сократилась до примерно 4000 п.н. Наиболее вероятно, что злокачественная трансформация CD4⁺ Т-клеток произошла, когда их теломеры укоротились до этих значений. Данный размер теломер сохранился в трансформированных клетках, а высокая активность теломеразы поддерживает высокий репликативный потенциал данных клеток. Исследование иммунофенотипа трансформированных клеток показало, что эти клетки являются лейкоцитами (поскольку экспрессируют общелейкоцитарный антиген CD45), лимфоцитами (поскольку экспрессируют CD3), а также Т-лимфоцитами-хелперами (поскольку экспрессируют CD4). Злокачественно трансформированные клетки обладали иммунофенотипом Т-клеточной лимфомы, для которой характерна одновременная экспрессия маркеров CD2, CD5 и CD7 [37]. Эксперименты по злокачественной трансформации CD4⁺ Т-клеток при индукции EndoG цисплатином выполнены на клетках четырех доноров, что указывает на воспроизводимость результатов. Злокачественность трансформированных CD4⁺ Т-клеток подтверждена в эксперименте *in vivo* с бестимусными мышами. Данные клетки были способны образовывать опухоли и вызывать гибель животных. Полученные данные указывают на присущую EndoG способность вызывать АС пре-мРНК hTERT.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активность теломеразы регулируется процессом АС пре-мРНК её каталитической субъединицы hTERT, однако, механизм АС изучен недостаточно полно. Результатом данной работы явилось описание нескольких новых явлений. Во-первых, продемонстрировано, что индуцированная цисплатином экспрессия EndoG, способна вызывать АС мРНК

hTERT и ингибировать активность теломеразы. Во-вторых, показано, что длительное культивирование CD4⁺ Т-лимфоцитов с цисплатином приводит к их злокачественной трансформации. Очевидно, что участие EndoG в АС hTERT является фундаментальным процессом в поддержании клеточного гомеостаза и определяет судьбу клеток. Бесспорно, описанный процесс требует дальнейшего более глубокого изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shay J.W. (2003) Clin. Cancer Res., **9**, 3521-3525.
2. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. (1990) Nature, **345**, 458-460.
3. Wright W.E., Pereira-Smith O.M., Shay J.W. (1989) Mol. Cell Biol., **9**, 3088-3092.
4. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) Cell, **100**, 57-70.
5. 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.
6. Marian C.O., Wright W.E., Shay J.W. (2010) Int. J. Cancer, **127**, 321-331.
7. Marian C.O., Cho S.K., McEllin B.M., Maher E.A., Hatanpaa K.J., Madden C.J., Mickey B.E., Wright W.E., Shay J.W., Bachoo R.M. (2010) Clin. Cancer Res., **16**, 154-163.
8. Blackburn E.H. (2000) Nature, **408**, 53-56.
9. 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.
10. Saeboe-Larssen S., Fossberg E., Gaudernack G. (2006) BMC Mol. Biol., **7**, 26.
11. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Oruganti H., Giudice L.C., Hoffman A.R. (2000) Int. J. Cancer, **85**, 330-335.
12. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R. (1998) Cancer Res., **58**, 4168-4172.
13. Listerman I., Sun J., Gazzaniga F.S., Lukas J.L., Blackburn E.H. (2013) Cancer Res., **73**, 2817-2828.
14. Жданов Д.Д., Васина Д.А., Орлова В.С., Готовцева В.Ю., Бибикова М.В., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2016) Биомед. химия, **62**, 239-250. doi:10.18097/pbmc20166203239
15. Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N., Fukuyama H. (2003) Cell Death Diff., **10**, 108-116.
16. Ruiz-Carrillo A., Renaud J. (1987) The EMBO J., **6**, 401-407.
17. Yin X., Apostolov E.O., Shah S.V., Wang X., Bogdanov K.V., Buzder T., Stewart A.G., Basnakian A.G. (2007) JASN, **18**, 2544-2553.
18. Chan F.K.-M., Moriwaki K., De Rosa M.J. (2013) Methods Mol. Biol., **979**, 65-70.
19. Basnakian A.G., Apostolov E.O., Yin X., Abiri S.O., Stewart A.G., Singh A.B., Shah S.V. (2006) Exp. Cell Res., **312**, 4139-4149.
20. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680-685.
21. Hofnagel O., Luechtenborg B., Stolle K., Lorkowski S., Eschert H., Plenz G., Robenek H. (2004) Arter. Thromb. Vasc. Biol., **24**, 1789-1795.

22. Коваленко Н.А., Жданов Д.Д., Бибикина М.В., Готовцева В.Ю. (2011) Биомед. химия, **57**, 501-510. doi:10.18097/pbmc20115705501.
23. O'Callaghan N.J., Fenech M. (2011) Biological Procedures Online, **13**, 3.
24. Cawthon R.M. (2002) Nucleic Acids Research, **30**, e47.
25. Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Zhao H. (2008) Methods, **44**, 250-254.
26. Pokrovsky V.S., Treshalina H.M., Lukasheva E.V., Sedakova L.A., Medentzev A.G., Arinbasarova A.Y., Berezov T.T. (2013) Anti-Cancer Drugs., **24**, 846-851.
27. Ruden M., Puri N. (2013) Cancer Treat. Rev., **39**, 444-456.
28. Scovassi A.I., Torriglia A. (2003) Eur. J. Histochem., **47**, 185-194.
29. Effros R.B., Pawelec G. (1997) Immunology Today., **18**, 450-454.
30. Counter C.M., Gupta J., Harley C.B., Leber B., Bacchetti S. (1995) Blood., **85**, 2315-2320.
31. Moro-García M.A., Alonso-Arias R., López-Larrea C. (2012) Cur. Genomics., **13**, 589-602.
32. Hodes R.J., Hathcock K.S., Weng N. (2002) Nat. Rev. Imm., **2**, 699-706.
33. 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.
34. Zhou Z., Du Y., Zhang L., Dong S. (2012) Biosens. Bioelectron., **34**, 100-105.
35. Martadinata H., Heddi B., Lim K.W., Phan A.T. (2011) Biochemistry., **50**, 6455-6461.
36. Zhdanov D.D., Fahmi T., Wang X., Apostolov E.O., Sokolov N.N., Javadov S., Basnakian A.G. (2015) DNA and Cell Biology, **34** 316-326.
37. Sangle N.A., Agarwal A.M., Smock K.J., Leavitt M.O., Warnke R., Bahler D., Perkins S.L. (2011) App. Immunohistochem. Mol. Morphol., **19**, 579-583.

Поступила: 21. 09. 2016.
Принята к печати: 27. 12. 2016.

CISPLATIN-INDUCED APOPTOTIC ENDONUCLEASE ENDOG INHIBITS TELOMERASE ACTIVITY AND CAUSES MALIGNANT TRANSFORMATION OF HUMAN CD4⁺ T LYMPHOCYTES

**D.D. Zhdanov^{1,2}, D.A. Vasina², E.V. Orlova³, V.S. Orlova², V.S. Pokrovsky^{1,2},
M.V. Pokrovskaya¹, S.S. Aleksandrova¹, N.N. Sokolov¹**

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: zhdanovdd@mail.ru
²Peoples Friendship University of Russia, Ecological Faculty,
6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198 Russia
³Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,
3 Institutskaya str., Puschino, Moscow region, 142290 Russia

Alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT pre-mRNA (human Telomerase Reverse Transcriptase) regulates telomerase activity. Increased expression of non-active splice variant hTERT results in inhibition of telomerase. Apoptotic endonuclease EndoG is known to participate in hTERT alternative splicing. Expression of EndoG can be induced in response to DNA damages. The aim of this study was to determine the ability of a DNA-damaging compound, cisplatin, to induce EndoG and its influence on alternative splicing of hTERT and telomerase activity in human CD4⁺ T lymphocytes. Overexpression of EndoG in CD4⁺ T cells downregulated the expression of active full-length hTERT variant and upregulated its non-active spliced variant. Reduction of full-length hTERT caused downregulation of telomerase activity, shortening of telomeres length during cell divisions, converting cells to the replicative senescence state, activation of apoptosis and finally cell death. Few cells survived and underwent malignant transformation. Transformed cells have increased telomerase activity and proliferative potential compare to initial CD4⁺ T cells. These cells have phenotype of T lymphoblastic leukemic cells and are able to form tumors and cause death in experimental mice.

Key words: cisplatin, EndoG, telomerase, hTERT, alternative splicing, malignant transformation