

©Коллектив авторов

## ИНДУКЦИЯ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ EndoG ПОВРЕЖДАЮЩИМИ ДНК АГЕНТАМИ ВЫЗЫВАЕТ АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ hTERT И ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ В CD4<sup>+</sup> И CD8<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Д.Д. Жданов<sup>1,2\*</sup>, Д.А. Васина<sup>2</sup>, В.С. Орлова<sup>2</sup>, Е.В. Орлова<sup>3</sup>, Д.В. Гришин<sup>1</sup>, Ю.А. Гладилина<sup>1</sup>,  
М.В. Покровская<sup>1</sup>, С.С. Александрова<sup>1</sup>, Н.Н. Соколов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,  
119121, г. Москва, ул. Погодинская, 10; эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, Москва

<sup>3</sup>Институт Теоретической и экспериментальной биофизики, Москва

Активность каталитической субъединицы теломеразы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) регулируется процессом альтернативного сплайсинга ее мРНК. В настоящее время механизм сплайсинга hTERT изучен недостаточно полно. Известно, что в данном процессе принимает участие апоптотическая эндонуклеаза EndoG, экспрессия которой индуцируется в ответ на повреждение ДНК. Целью работы является изучение способности повреждающих ДНК агентов с различным механизмом действия вызывать индукцию EndoG и ингибировать активность теломеразы в результате активации процесса альтернативного сплайсинга hTERT в нормальных активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах человека. Все исследуемые повреждающие ДНК агенты индуцировали EndoG. Цисплатин, химиотерапевтический препарат, образующий сшивки ДНК, вызывал наибольшее количество повреждений ДНК и наибольшую индукцию EndoG. Инкубация CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток с цисплатином приводила к изменению пропорции сплайс-вариантов hTERT и ингибированию активности теломеразы.

**Ключевые слова:** EndoG, теломераза, hTERT, альтернативный сплайсинг, Т лимфоциты, повреждение ДНК

**DOI:** 10.18097/PBMC20176304296

### ВВЕДЕНИЕ

Теломераза активна в нормальных половых клетках, стволовых клетках и активированных лимфоцитах, а также большинстве типов раковых клеток [1]. Данный фермент синтезирует теломерные повторы на концах хромосом, что позволяет клеткам поддерживать длину теломер на уровне, достаточном для неограниченной пролиферации [5]. Активность главного компонента теломеразы – каталитической субъединицы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) регулируется процессом альтернативного сплайсинга (АС) ее мРНК. Известно более двух десятков сплайс-вариантов hTERT, которые экспрессируются в минорных количествах и их функция до конца не изучена. Только полноразмерный вариант hTERT обладает каталитической активностью [2]. Большую часть общей мРНК hTERT составляют два сплайс-варианта:  $\alpha$ -вариант, который образуется при делеции части экзона 6 и  $\beta$ -вариант, образующийся в результате делеции экзонов 7 и 8, сдвигу рамки считывания и появлению считывания стоп-кодона в экзоне 10 [3, 4].

Ранее мы показали, что апоптотическая экзонуклеаза EndoG участвует в регуляции АС мРНК hTERT [5], а сверхэкспрессия EndoG в опухолевых клетках вызывает понижение экспрессии полноразмерного  $\alpha+\beta+$  и увеличение экспрессии  $\alpha+\beta-$  сплайс-варианта [6]. Известно, что экспрессия EndoG увеличивается в ответ на повреждение ДНК [7, 8]. Повышенная экспрессия

EndoG, индуцированная повреждающим ДНК агентом цисплатином, в нормальных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах человека вызывает изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT, ингибирование активности теломеразы, укорочение теломер, переходу клеток в состояние репликативного старения и их гибель по пути апоптоза [8]. В данной работе мы проверили способность повреждающих ДНК агентов с различным механизмом действия индуцировать экспрессию EndoG и вызывать АС hTERT и ингибирование активности теломеразы в нормальных активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах человека.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### *Забор крови, селекция и культивирование Т-клеток*

Исследование выполнено на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках четырех здоровых доноров. Письменное согласие получено от всех доноров. Образцы венозной крови для получения Т-клеток забирали в пробирки с антикоагулянтом К3EDTA. Мононуклеарные клетки крови выделяли градиентным центрифугированием на Фиколе Lympholite-H ("Cedarlane", Канада) и ресуспендировали в растворе ACD-A (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution – A, "Cytosol Laboratories Inc.", США) с 5%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA) MACS BSA Stock Solution ("Miltenyi Biotec", Германия). Выделение фракции CD4<sup>+</sup> клеток проводили методом магнитной селекции с использованием CD4<sup>+</sup> Isolation Kit, human

(“Miltenyi Biotec”) по протоколу производителя. Выделение фракции CD8<sup>+</sup> выполняли при помощи CD8<sup>+</sup> Isolation Kit, human (“Miltenyi Biotec”). Полученные клетки высевали в 25 см<sup>2</sup> культуральные флаконы (“Corning”, США) в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток на 1 мл среды. Использовали культуральную среду RPMI-1640 (“Life technologies”, США) с 10% FBS (Fetal Serum Bovine, “Gibco”, США), стимуляторы роста 100 U/мл IL-2, (“R&D Systems”, США), 5 мкг/мл антитела анти-CD3 (“МедБиоСпектр”, Россия), 2 мкг/мл антитела анти-CD28 (“eBiosciences”, США), а также антибиотики 50 U/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (оба “Sigma”, США). Культивирование проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> при 90% влажности.

#### *Обработка клеток повреждающими ДНК агентами и измерение цитотоксичности*

Для индукции повреждения ДНК CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки культивировали в течение 72 ч в присутствии следующих повреждающих ДНК химических веществ: бензопирен (1,2-бензопирен, “Sigma”), блеомицин (блеомицина сульфат, “Sigma”), цисплатин (цис-диамминдихлороплатина(II), “Sigma”), бромистый этидий (“Thermo Fisher Scientific”, США). Суспензию клеток в концентрации  $10^6$  клеток на мл облучали гамма-излучением <sup>60</sup>Co на установке Gamma Cell 220 (“Atomic Energy of Canada Ltd.”, Канада) при мощности дозы 0,23 Гр/мин и культивировали 72 ч. Оценку цитотоксической активности повреждающих ДНК агентов проводили по измерению активности лактатдегидрогеназы (Lactate dehydrogenase, LDH) в культуральной среде [9] при помощи LDH Cytotoxicity Detection Kit (“Takara”, США) по методике производителя. Максимально нетоксичной дозой (МНД) считали максимальную дозу повреждающего ДНК агента, которая не вызывала статистически достоверного увеличения смертности клеток. Оценку количества клеток с повреждённой ДНК проводили методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling) [10] при помощи FlowTACSTM Apoptosis Detection Kit (“R&D Systems”, США) по протоколу производителя с использованием проточного цитометра FACSCalibur (“Beckton Dickinson”, США).

#### *Определение уровней экспрессии генов, вестерн-блоттинг и определение активности теломеразы*

Выделение РНК и оценку уровней экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT, вестерн-блоттинг и анализ активности теломеразы методом TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) осуществляли по описанным ранее протоколам [8].

#### *Статистический анализ*

Статистический 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  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Повреждающие ДНК агенты вызывают гибель CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток*

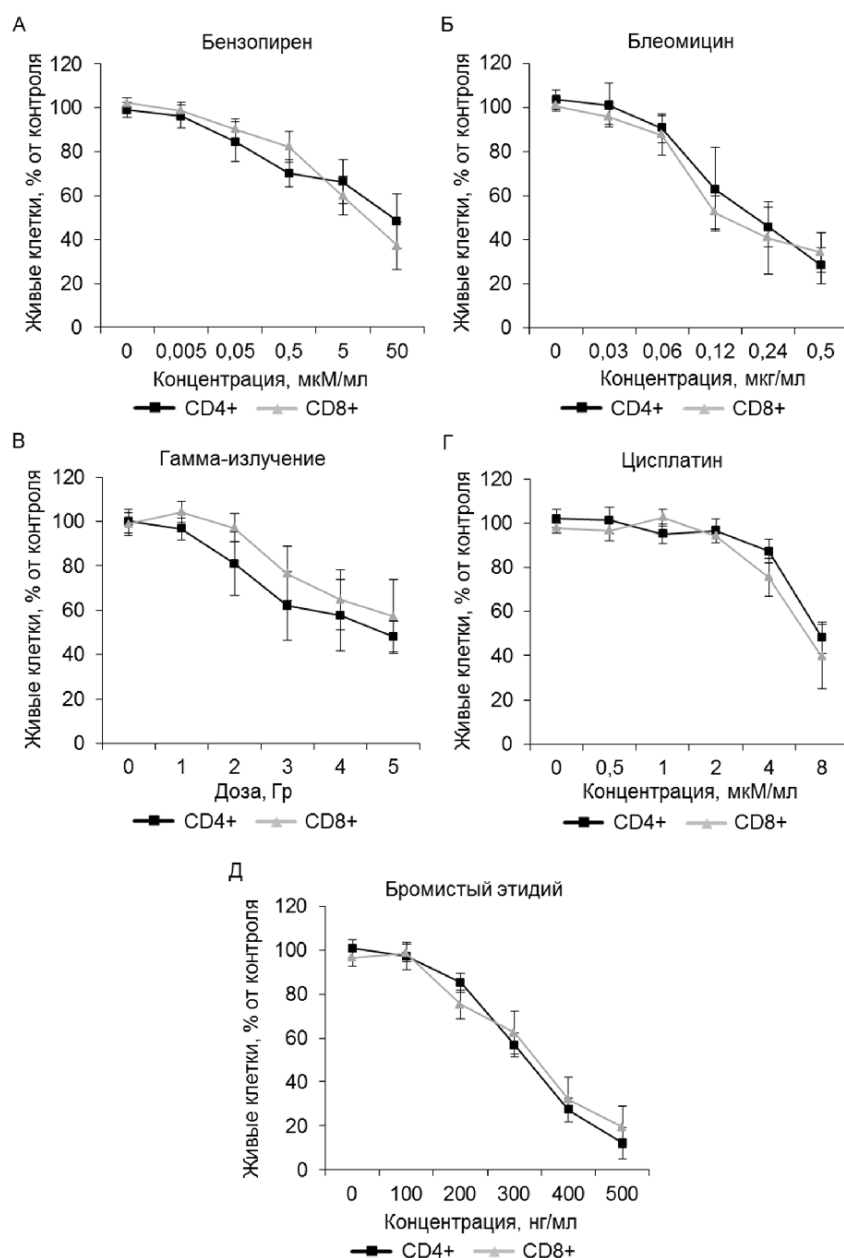
Исследование цитотоксической активности ДНК повреждающих агентов с различным механизмом действия на ДНК проводили с целью определения максимальной нетоксичной дозы. При данной дозе повреждения ДНК не являлись летальными и клетки оставались живыми. Исследуемые дозы повреждающих ДНК агентов подобраны нами ранее в ходе предварительных экспериментов (данные не приводятся). Достоверного различия между цитотоксическим действием повреждающих ДНК химических веществ и гамма-излучения на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки не обнаружено (рис. 1). МНД бензопирена, вещества образующего ковалентные связи с основаниями ДНК [11, 12], составила 0,005 мкг/мл (рис. 1А). МНД блеомицина, химиотерапевтического вещества, вызывающего одонитовые разрывы ДНК [13, 14], составила 0,06 мкг/мл (рис. 1Б). Максимальная нетоксичная поглощенная доза гамма-излучения, вызывающего двунитовые разрывы ДНК [15], составила 2 Гр (рис. 1В). МНД цисплатина, химиотерапевтического вещества, образующего сшивки ДНК [16], составила 2 мкг/мл (рис. 1Г). МНД бромистого этидия, вещества интеркалирующего в ДНК и вызывающего модификацию азотистых оснований [17, 18], составила 100 нг/мл (рис. 1Д).

### *Повреждающие ДНК агенты индуцируют EndoG*

Для оценки способности повреждающих ДНК агентов индуцировать EndoG проведено исследование уровней экспрессии EndoG в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках, инкубированных в течение 72 ч с указанными выше химическими агентами или подвергнутых воздействию гамма-излучения. Все исследуемые соединения, за исключением бензопирена и гамма-излучения, вызвали достоверное повышение экспрессии EndoG в CD4<sup>+</sup> Т-клетках (рис. 2А). В CD8<sup>+</sup> Т-клетках только гамма-излучение не приводило к достоверному увеличению экспрессии EndoG. Достоверное различие в экспрессии EndoG между контрольными CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками, между данными клетками после инкубации с бензопиреном и бромистым этидием отсутствовало. В CD4<sup>+</sup> Т-клетках, инкубированных с блеомицином и цисплатином, а также после воздействия гамма-излучения обнаружено достоверно увеличенная экспрессия EndoG по сравнению с CD8<sup>+</sup> клетками. Причину повышенной экспрессии EndoG в CD4<sup>+</sup> Т-клетках мы объяснить не можем. Увеличение количества EndoG в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках, подвергнутых воздействию МНД повреждающих ДНК агентов, подтверждено методом вестерн-блоттинга (рис. 2 Б-Г).

### *Способность цитотоксических агентов вызывать повреждение ДНК*

Известно, что экспрессия EndoG в клетках может индуцироваться в ответ на повреждения ДНК [7]. Методом TUNEL для проточной цитометрии



**Рисунок 1.** Цитотоксическая активность повреждающих ДНК агентов для Т лимфоцитов человека. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты культивировали в течение 72 ч с различными концентрациями ДНК-повреждающих химических веществ или после воздействия различных доз гамма-излучения. Количество мёртвых клеток определяли по активности LDH в культуральной среде.

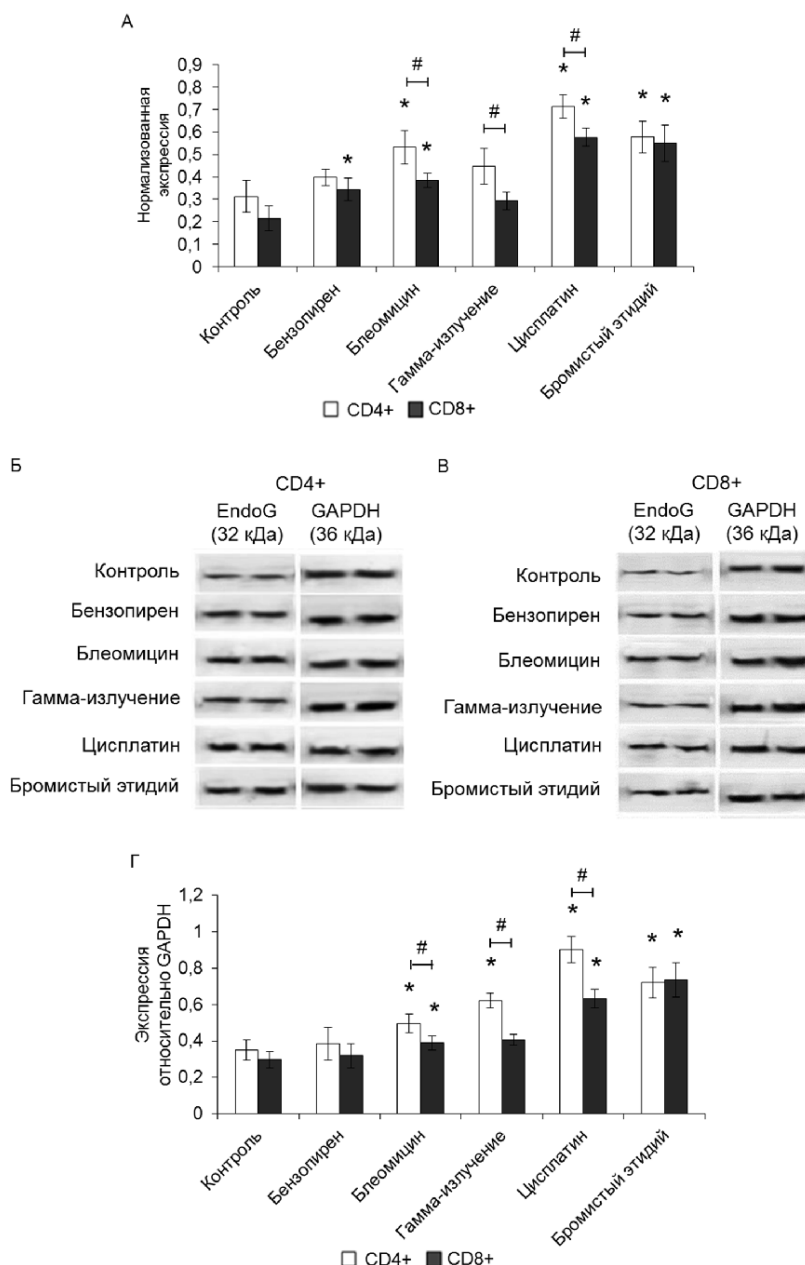
мы проследили, как изменяется количество клеток с повреждённой ДНК после воздействия МНД повреждающих ДНК агентов. Все эти агенты вызвали достоверное увеличение клеток с повреждённой ДНК (рис. 3). Достоверной разницы между количеством TUNEL-положительных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, подвергшихся воздействию различных агентов не обнаружено. Поскольку цисплатин вызывал как наибольшее повреждение ДНК (рис. 3Д), так и значительное увеличение экспрессии EndoG в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках (рис. 2), то данное соединение было выбрано для дальнейших исследований.

Повреждения ДНК, детектируемые методом TUNEL, могут возникать не только в результате

действия повреждающих ДНК агентов, но также при действии на ДНК индуцированной EndoG [19]. Кроме того, индукция EndoG способна вызывать экспрессию других апоптотических эндонуклеаз, ответственных за деградацию ДНК [20]. В увеличении количества TUNEL-положительных клеток наиболее вероятен обоюдный вклад повреждающих ДНК агентов и EndoG.

#### *Изменение экспрессии сплайс-вариантов hTERT при индукции EndoG цисплатином*

Ранее мы показали, что EndoG вызывает альтернативный сплайсинг hTERT [6]. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени мы проследили

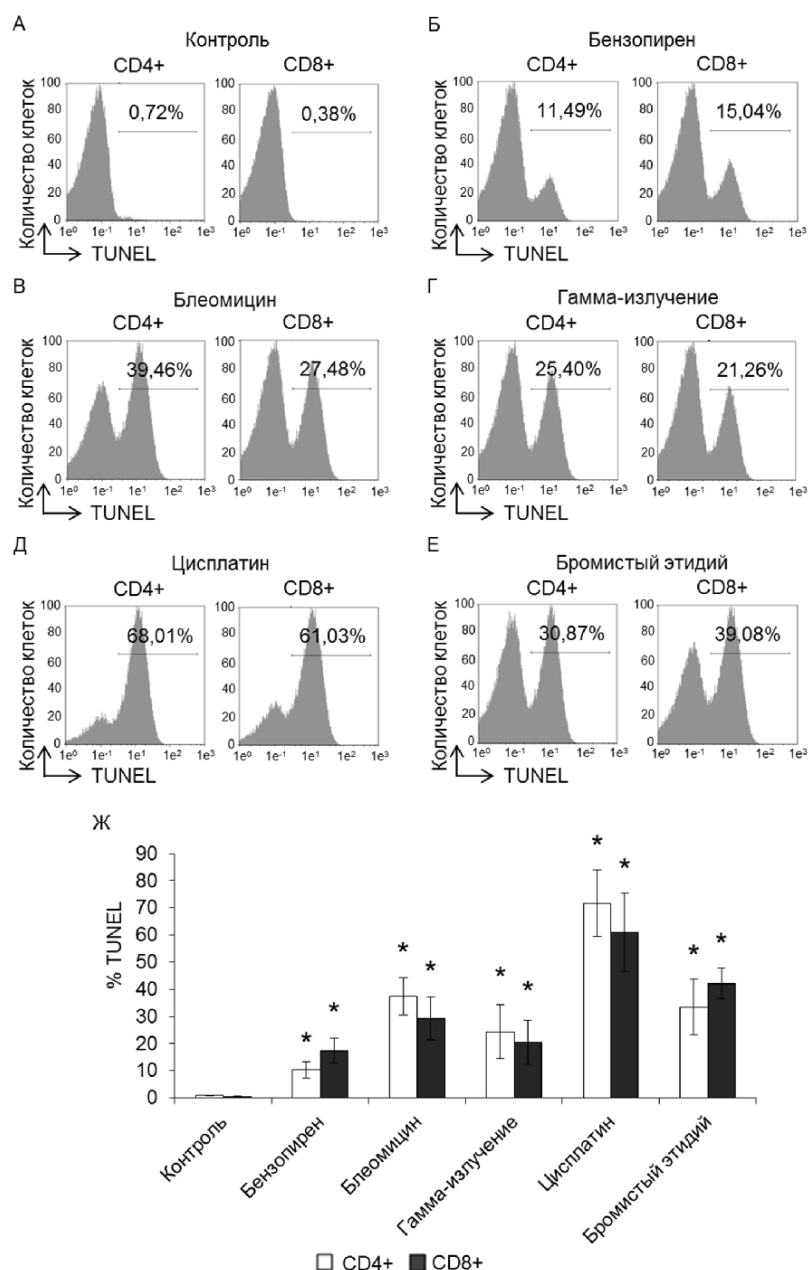


**Рисунок 2.** Способность ДНК повреждающих агентов индуцировать экспрессию EndoG в Т-лимфоцитах человека. (А) Уровни экспрессии EndoG, измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени, в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитах, культивированных в течение 72 ч с МНД повреждающих ДНК химических веществ или после воздействия гамма-излучения. Уровни экспрессии EndoG нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. (Б) Вестерн-блоттинг EndoG и референсного белка GAPDH в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках, подвергшихся воздействию повреждающих ДНК агентов. (В) Результаты определения количеств EndoG по отношению к GAPDH. N = 4. \* - p≤0,05 по отношению к контрольным клеткам; # - p≤0,05 между CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетками.

как изменяется экспрессия EndoG и сплайс-вариантов hTERT в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках, инкубированных с МНД цисплатина в течение 24-х ч. Инкубация с цисплатином вызывала двукратное увеличение экспрессии EndoG через 24 ч (данные статистически достоверны) как в CD4<sup>+</sup> (рис. 1А), так и CD8<sup>+</sup> (рис. 1Е) Т-клетках. Увеличение экспрессии EndoG сопровождалось достоверным снижением экспрессии полноразмерного α+β+ варианта hTERT (рис. 4 Б,Ж) и увеличением экспрессии α+β- варианта (рис. 4 В,З). Изменения экспрессии α-β+ (рис. 4 Г,И) и α-β-

(рис. 4 Д,К) сплайс-вариантов hTERT не обнаружено. Достоверное различие между уровнями экспрессии EndoG, а также сплайс-вариантов hTERT в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках также отсутствовало.

Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показали, что к 24-м ч инкубации с цисплатином происходит достоверное увеличение количества EndoG, которое сопровождается снижением количества полноразмерного α+β+ варианта hTERT и увеличением α+β- варианта как в CD4<sup>+</sup> (рис. 5 А-Д), так и CD8<sup>+</sup> Т-клетках



**Рисунок 3.** Способность цитотоксических агентов индуцировать повреждения ДНК в Т-лимфоцитах человека. (А-Е) Количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитов с повреждённой ДНК (измеренное методом TUNEL для проточной цитометрии) через 72 ч инкубации с МНД повреждающих ДНК веществ или после воздействия гамма-излучения. (Ж) Гистограммы количества TUNEL-положительных клеток. N = 4. \* -  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам.

(рис. 5 Е-К). 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.

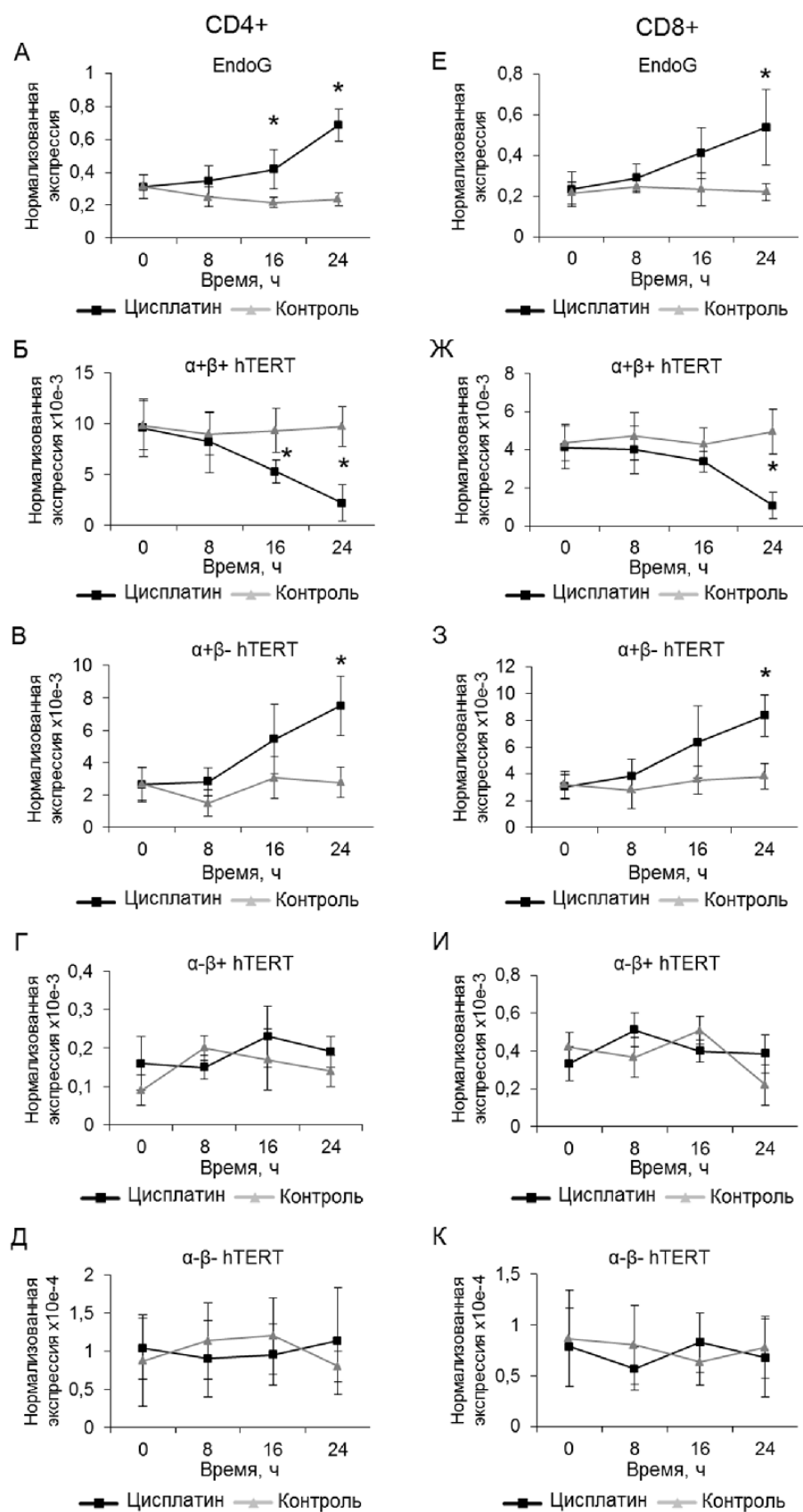
*Инкубация с цисплатином приводит к увеличению количества клеток с повреждённой ДНК*

С целью исследования связи индукции EndoG и повреждения ДНК мы провели исследование количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, содержащих повреждения ДНК методом TUNEL в течение 24-х ч инкубации с цисплатином. Обнаружено возрастание количества TUNEL-положительных клеток при увеличении времени инкубации

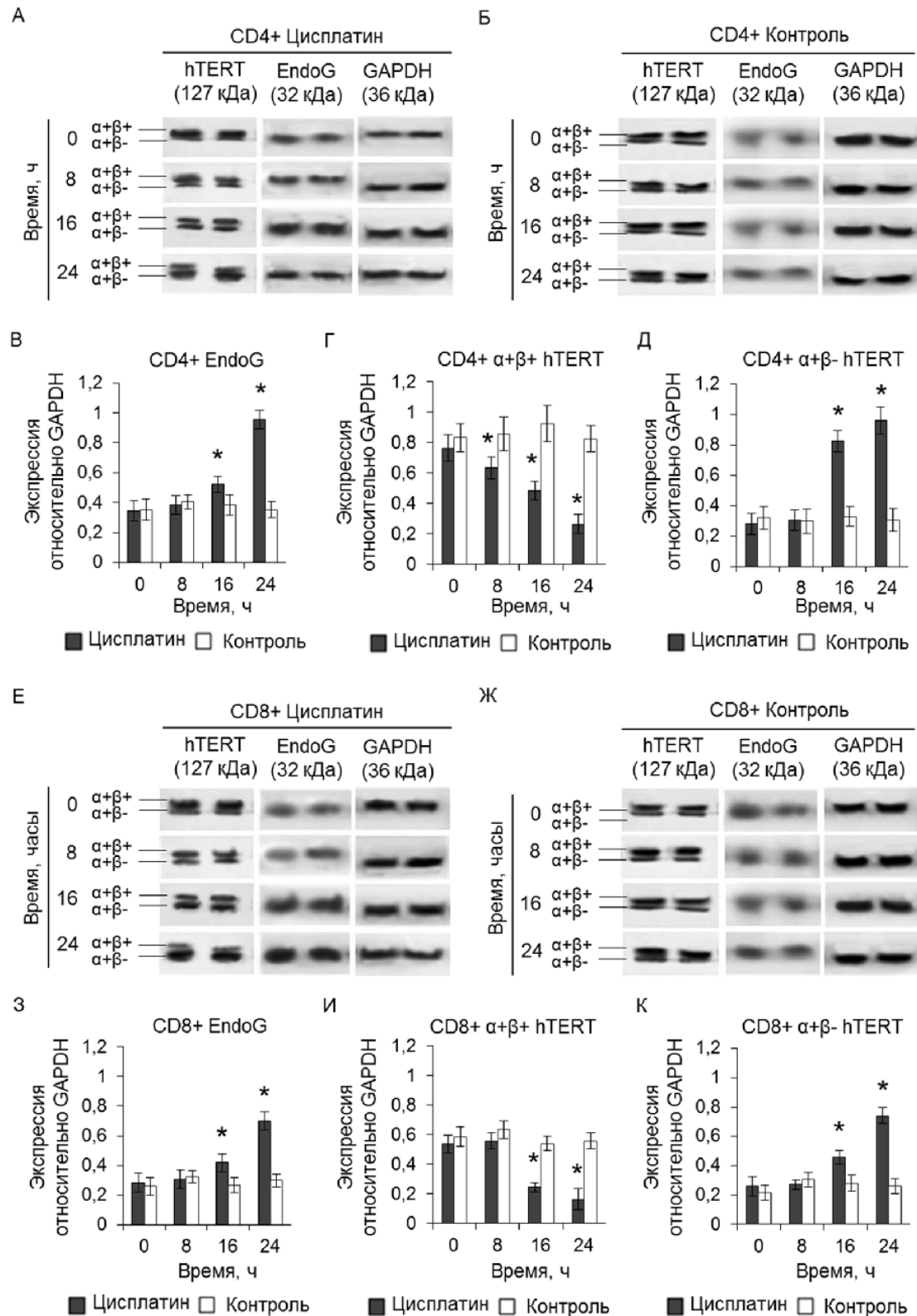
с цисплатином (рис. 6). Статистически достоверного различия между количеством клеток с повреждённой ДНК в популяции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов не выявлено. Повышение количества клеток с повреждённой ДНК соотносится с увеличением экспрессии EndoG (рис. 4, 5).

*Инкубация с цисплатином вызывает ингибирование активности теломеразы*

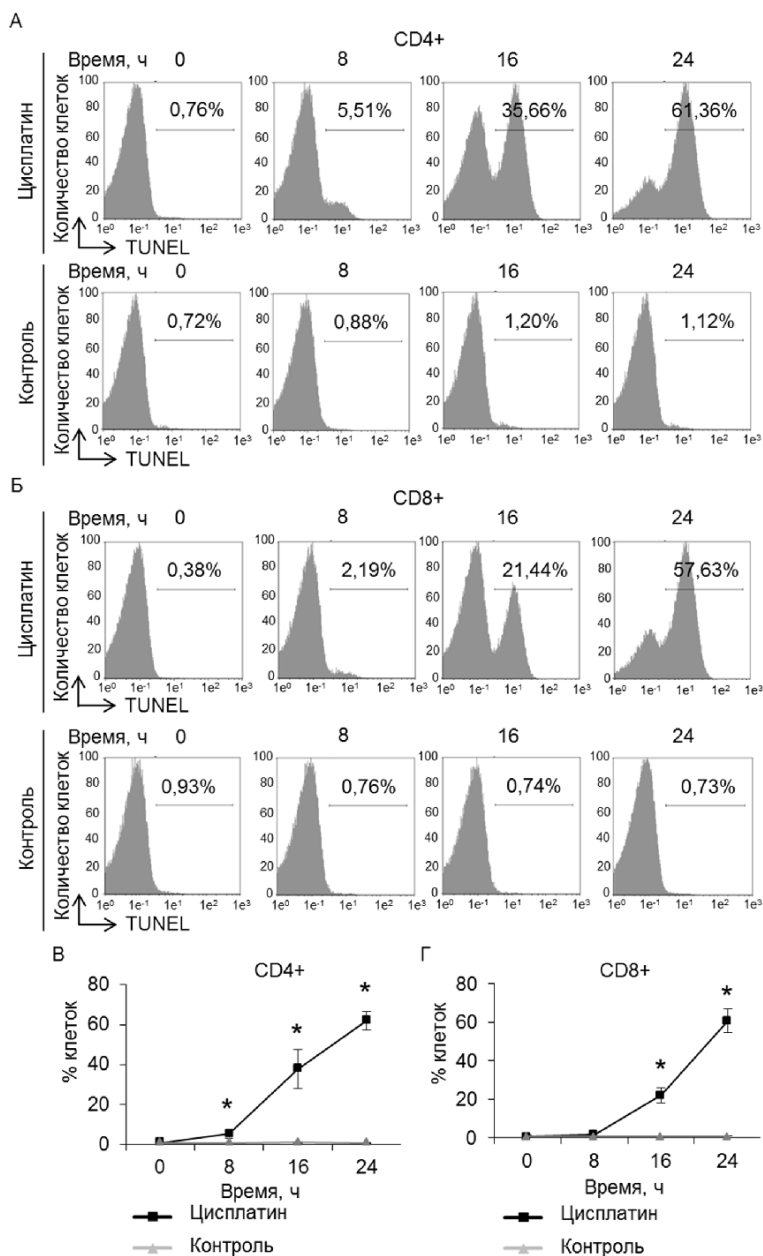
Методом TRAP установлено, что инкубация с цисплатином CD4<sup>+</sup>, приводит к постепенному снижению в них активности теломеразы в течение 24-х ч до уровня  $22,3 \pm 6,2\%$  от активности фермента контрольных клеток (рис. 7 А,В). В CD8<sup>+</sup> Т-клетках



**Рисунок 4.** Повышенная экспрессия EndoG сопровождается изменением экспрессии сплайс-вариантов hTERT в Т-лимфоцитах человека. Уровни экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в (А-Д) CD4<sup>+</sup> и (Е-К) CD8<sup>+</sup> Т-клетках в течение 24 ч инкубации с цисплатином в концентрации 2 мкМ/мл. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. N = 4. \* -  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам



**Рисунок 5.** Повышенная экспрессия EndoG сопровождается уменьшением количества активного α+β+ варианта hTERT и увеличением количества α+β- сплайс-варианта. Вестерн-блоттинг EndoG, сплайс-вариантов hTERT и референсного белка GAPDH в (А) CD4<sup>+</sup> клетках, инкубированных с цисплатином в концентрации 2 мкМ/мл и (Б) контрольных CD4<sup>+</sup> клетках. (В-Д). Результаты определения количеств EndoG и сплайс-вариантов hTERT по отношению к GAPDH в CD4<sup>+</sup> клетках. Вестерн-блоттинг EndoG, сплайс-вариантов hTERT и референсного белка GAPDH в (Е) CD8<sup>+</sup> клетках, инкубированных с цисплатином, и (Ж) контрольных CD8<sup>+</sup> клетках. (З-К) Результаты определения количеств EndoG и сплайс-вариантов hTERT по отношению к GAPDH в CD8<sup>+</sup> клетках. N = 4. \* - p<0,05 по отношению к контрольным клеткам.



**Рисунок 6.** Увеличение количества Т-лимфоцитов человека с поврежденной ДНК при их инкубации с цисплатином. Количество (А) CD4<sup>+</sup> и (Б) CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с поврежденной ДНК (измеренное методом TUNEL для проточной цитометрии) в течение 24 ч инкубации с цисплатином в концентрации 2 мкМ/мл. Изменение количества TUNEL-положительных (В) CD4<sup>+</sup> и (Г) CD8<sup>+</sup> клеток при их инкубации с цисплатином. N = 4. \* - p≤0,05 по отношению к контрольным клеткам.

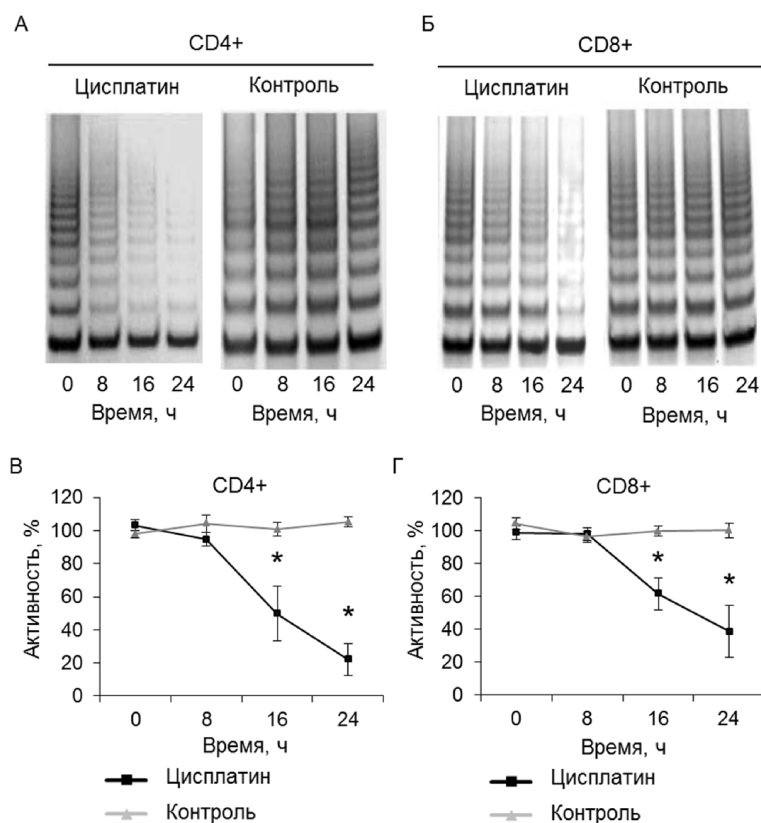
активность теломеразы снижалась до уровня  $39,8 \pm 17,6\%$  (рис. 7 Б,Г). В контрольных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках активность фермента не изменялась. Эти данные полностью согласуются с результатом измерения экспрессии сплайс-вариантов hTERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени и количеством сплайс-вариантов hTERT, измеренного вестерн-блоттингом. Снижение активности теломеразы, вероятнее всего происходит за счёт уменьшения количества полноразмерного  $\alpha+\beta$ - варианта hTERT, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью. Также вероятно ингибирование активности теломеразы в результате повышения

экспрессии  $\alpha+\beta$ - сплайс-варианта hTERT, поскольку данный вариант является доминантно-негативным [21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс альтернативного сплайсинга каталитической субъединицы теломеразы hTERT является регулятором активности теломеразы. В данном процессе принимает участие апоптотическая эндонуклеаза EndoG. В работе показано, что индукция EndoG возможна в результате действия на нормальные активированные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты человека повреждающих ДНК агентов с различным





**Рисунок 7.** Ингибирование активности теломеразы в Т-лимфоцитах человека при их инкубации с цисплатином. Гель-электрофорез TRAP (А) CD4<sup>+</sup> и (Б) CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, инкубированных 24 ч с цисплатином в концентрации 2 мкМ/мл. (Б) Результаты определения активности теломеразы методом TRAP в (В) CD4<sup>+</sup> и (Г) CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. N = 4. \* - p ≤ 0,05 по отношению к контрольным клеткам.

механизмом действия. Цисплатин вызывал наибольшее увеличение экспрессии EndoG. Инкубация CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток с цисплатином приводила к уменьшению экспрессии полноразмерного активного α+β- варианта hTERT и увеличению экспрессии α+β- сплайс-варианта. Изменение пропорции вариантов hTERT приводило к снижению активности теломеразы.

## ЛИТЕРАТУРА

- 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.
- Saebøe-Larssen S., Fosberg E., Gaudernack G. (2006) *BMC Mol. Biol.*, **7**, 26.
- Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Oruganti H., Giudice L.C., Hoffman A.R. (2000) *Int. J. Cancer*, **85**, 330-335.
- Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 4168-4172.
- Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2016) *Biomed. Khim.*, **62**, 544-554. DOI: 10.18097/PBMC20166205544.
- Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova V.S., Gotovtseva V.Y., Bibikova M.V., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2016) *Biomed. Khim.*, **62**, 239-250. DOI: 10.18097/PBMC20166203239.
- Yin X., Apostolov E.O., Shah S.V., Wang X., Bogdanov K.V., Buzder T., Stewart A.G. (2007) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 2544-2553.
- Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2017) *Biomed. Khim.*, **63**, 13-26. DOI: 10.18097/PBMC20176301013.
- Chan F.K.-M., Moriwaki K., De Rosa M.J. (2013) *Methods Mol. Biol.*, **979**, 65-70.
- Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Zhao H. (2008) *Methods*, **44**, 250-254.
- Yang W. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 868-872.
- Ling H., Sayer J.M., Plosky B.S., Yagi H., Boudsocq F., Woodgate R., Jerina D.M., Yang W. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2265-2269.
- Mira A., Gimenez E.M., Bolzán A.D., Bianchi M.S., López-Larraz D.M. (2013) *Arch. Environ. Occup. Health*, **68**, 107-116.
- Povirk L.F., Finley Austin M.J. (1991) *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, **257**, 127-143.
- Kuefner M.A., Brand M., Engert C., Schwab S.A., Uder M. (2015) *Rofo*, **187**, 872-878.
- Perez R.P. (1998) *Eur. J. Cancer*, **34**, 1535-1542.
- McGill M., Pathak S., Hsu T.C. (1974) *Chromosoma*, **47**, 157-166.
- Ikeuchi T. (1984) *Cytogenet. Cell Genet.*, **38**, 56-61.
- Ruiz-Carrillo A., Renaud J. (1987) *EMBO J.*, **6**, 401-407.
- 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.
- Listerian I., Sun J., Gazzaniga F.S., Lukas J.L., Blackburn E.H. (2013) *Cancer Res.*, **73**, 2817-2828.

Поступила: 07. 06. 2017.  
Принята к печати: 28. 06. 2017.

INDUCTION OF APOPTOTIC ENDONUCLEASE EndoG WITH DNA-DAMAGING AGENTS  
INITIATES ALTERNATIVE SPLICING OF TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT hTERT AND  
INHIBITION OF TELOMERASE ACTIVITY hTERT IN HUMAN CD4<sup>+</sup> AND CD8<sup>+</sup> T-LYMPHOCYTES

*D.D. Zhdanov<sup>1,2</sup>, D.A. Vasina<sup>2</sup>, V.S. Orlova<sup>2</sup>, E.V. Orlova<sup>3</sup>, D.V. Grishin<sup>1</sup>, Yu.A. Gladilina<sup>1</sup>,  
M.V. Pokrovskaya<sup>1</sup>, S.S. Aleksandrova<sup>1</sup>, N.N. Sokolov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: zhdanovdd@mail.ru

<sup>2</sup>Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Moscow, Russia

Activity of telomerase catalytic subunit hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) can be regulated by alternative splicing of its mRNA. At present time exact mechanism of hTERT splicing is not fully understood. Apoptotic endonuclease EndoG is known to participate this process. EndoG expression is induced by DNA damages. The aim of this work was to investigate the ability of DNA-damaging agents with different mechanism of action to induce EndoG expression and inhibit telomerase activity due to the activation of hTERT alternative splicing in normal activated human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes. All investigated DNA-damaging agents were able to induce EndoG expression. Cisplatin, a therapeutic compound, producing DNA cross-links induced the highest level of DNA damages and EndoG expression. Incubation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells with cisplatin caused the changes in proportion of hTERT splice variants and inhibition of telomerase activity.

**Key words:** EndoG, telomerase, hTERT, alternative splicing, T-lymphocytes, DNA damage