

©Коллектив авторов

## АКТИВНОСТЬ ТЕЛОМЕРАЗЫ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *mTert* И ДЛИНА ТЕЛОМЕР В ОТДАЛЁННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ $\gamma$ - И $\gamma,n$ -ОБЛУЧЕНИЯ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И В ОПУХОЛЯХ, ОБРАЗОВАВШИХСЯ ИЗ ЭТИХ КЛЕТОК

О.В. Высоцкая<sup>1</sup>, А.И. Глухов<sup>2,3</sup>, Ю.П. Семочкина<sup>1</sup>, С.А. Гордеев<sup>2</sup>, Е.Ю. Москалева<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>НИЦ Курчатовский институт,

123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1; \*эл. почта: Moskaeva\_EY@nrcki.ru

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>3</sup>Сеченовский университет, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

В пролиферирующих нормальных и опухолевых клетках сохранение длины теломер (ДТ) обеспечивает высокая активность теломеразы (АТ). В отсутствие АТ сохранение ДТ возможно при использовании механизма альтернативного удлинения теломер (АУТ). Для выяснения роли АТ или АУТ в поддержании ДТ в данной работе исследовали АТ, экспрессию гена каталитической субъединицы теломеразы мыши *mTert* и ДТ в культивируемых нормальных и трансформированных под действием  $\gamma$ - и  $\gamma,n$ -излучения мезенхимальных стволовых клетках (МСК) из костного мозга мыши, в саркомах, развившихся при введении облучённых МСК сингенным мышам, а также в полученных из этих опухолей линиях фибросарком. При длительном культивировании нормальных и трансформированных под действием  $\gamma$ - (1 Гр и 6 Гр) и  $\gamma,n$ -излучения (0,05 Гр; 0,5 Гр и 2 Гр) МСК из костного мозга мыши обнаружено снижение АТ в облучённых клетках. Ещё более глубокое снижение АТ обнаружено в саркомах, развившихся при введении трансформированных МСК сингенным мышам, и в линиях клеток фибросарком, выделенных из этих опухолей, в которых АТ либо отсутствовала, либо обнаруживалась на очень низком уровне. В трёх из четырёх полученных линий ДТ была снижена в два раза по сравнению с исходными МСК. При отсутствующей или низкой АТ и сниженной ДТ клетки всех полученных линий фибросарком успешно пролиферировали без признаков изменения выживаемости. Механизм поддержания ДТ в линиях клеток фибросарком с отсутствием АТ, возможно, связан с использованием пути АУТ. Обнаруженное снижение или отсутствие АТ в трансформированных при действии облучения МСК при сохранении или даже повышении уровня экспрессии гена теломеразы может быть связано с образованием неактивных сплайс-вариантов. Полученные линии трансформированных МСК и фибросарком с АТ и без активности этого фермента представляют удобную модель для исследования эффективности ингибиторов АТ и АУТ *in vitro* и *in vivo*.

**Ключевые слова:** теломераза; экспрессия генов; теломеры; альтернативное удлинение теломер; мезенхимальные стволовые клетки; саркома

**DOI:** 10.18097/PBMC20206603265

### ВВЕДЕНИЕ

В активно пролиферирующих нормальных клетках — эмбриональных и стволовых клетках, активированных лимфоцитах, семенниках, фолликулах яичников, коже и волосных фолликулах — длина теломер (ДТ) сохраняется на постоянном уровне благодаря активности теломеразы (АТ). В покоящихся клетках экспрессия гена теломеразы и АТ подавлены, но они реактивируются в опухолях различных типов [1]. Поэтому АТ рассматривается в качестве одного из чувствительных маркеров при диагностике злокачественных новообразований.

В 5–15% опухолей и в стволовых клетках обнаружен другой механизм поддержания ДТ, который связан не с АТ, а с гомологичной рекомбинацией теломерной ДНК. Он получил название альтернативного удлинения теломер (АУТ) [2–4]. Информация о способе поддержания ДТ в опухоли важна при диагностике, прогнозе и выборе тактики лечения. В связи с этим в настоящее время ведётся активный поиск и исследование ингибиторов АТ и АУТ для создания эффективных противоопухолевых препаратов с высокой избирательностью действия в отношении опухолевых клеток [3–5].

АУТ с высокой частотой обнаруживается в опухолях мезенхимного происхождения, образующихся, как полагают, из мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Так, в саркомах мягких тканей АУТ встречается почти в 60% новообразований. В опухолях других типов АУТ обнаруживают редко — с частотой от 1 до 15% [6]. Поэтому представляет особый интерес изучение способа поддержания ДТ в МСК и образующихся из них опухолей и механизмов переключения одного способа удлинения теломер на другой при злокачественной трансформации, индуцированной различными повреждающими воздействиями.

Ранее мы получили длительно культивируемую линию МСК из костного мозга мыши, клетки которой по морфологии, высокому уровню поверхностных антигенов Sca-1 и CD9, отсутствию маркеров CD45 и CD11b и способности к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении соответствовали требуемым параметрам МСК [7, 8]. Из этих клеток были получены линии трансформированных МСК в результате длительного культивирования клеток после  $\gamma$ -облучения в дозах 1 и 6 Гр [9] и после гамма-нейтронного ( $\gamma,n$ ) облучения в дозах

0,05 Гр, 0,5 Гр и 2 Гр [10]. Выбор указанных доз  $\gamma$ -облучения был обусловлен изучением возможности злокачественной трансформации МСК при высоком и низком уровне выживаемости этих клеток после воздействия, которая составила  $85 \pm 5\%$  при дозе 1 Гр и  $18 \pm 2\%$  при дозе 6 Гр при её оценке по клоногенной активности клеток [9]. При действии  $\gamma$ , $\beta$ -излучения аналогичный уровень выживаемости МСК наблюдали при дозах 0,5 Гр и 2,0 Гр соответственно [10]. Дозы от 0,1 Гр и менее при  $\gamma$ -облучении и от 0,05 Гр и менее при  $\gamma$ , $\beta$ -облучении относятся к диапазону малых доз. Выживаемость МСК при этих дозах не отличалась от контроля, но после  $\gamma$ -облучения МСК в дозе 0,1 Гр опухоли из облучённых клеток не развивались, в то время как после  $\gamma$ , $\beta$ -облучения МСК в дозе 0,05 Гр у 20% сингенных мышей после трансплантации облучённых клеток была обнаружена опухоль [10].

Опухоли, которые развивались у сингенных мышей при подкожном введении трансформированных под действием облучения МСК, по совокупности морфологических признаков классифицировали как многокомпонентные мезенхимомы, то есть опухоли сложного строения из производных мезенхимы, состоящие из различных тканей, так называемая “смесь сарком” [11], или низкодифференцированные фибросаркомы [10]. Из сарком, развившихся из облучённых МСК, были получены линии опухолевых клеток, трансплантация которых мышам приводила к развитию низкодифференцированных фибросарком [10]. Это позволило идентифицировать полученные линии как линии клеток фибросарком. Схема получения этих линий показана на рисунке 1.

Полученные нами клеточные линии исходных и трансформированных МСК мыши, а также полученные из МСК линии фибросарком могут служить моделью для анализа используемого клетками механизма поддержания ДТ в процессе злокачественной трансформации МСК, вызванной воздействием разных типов ионизирующего излучения, и в развивающихся из них саркомах.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в характеристике изменений уровня АТ, экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы мыши *mTert* и ДТ в культивируемых нормальных и трансформированных под действием  $\gamma$ - и  $\gamma$ , $\beta$ -излучения МСК из костного мозга мыши, в саркомах, развившихся при введении этих клеток сингенным мышам, и в полученных из этих опухолей линиях клеток фибросарком для выяснения роли АТ в поддержании ДТ в этих клетках.

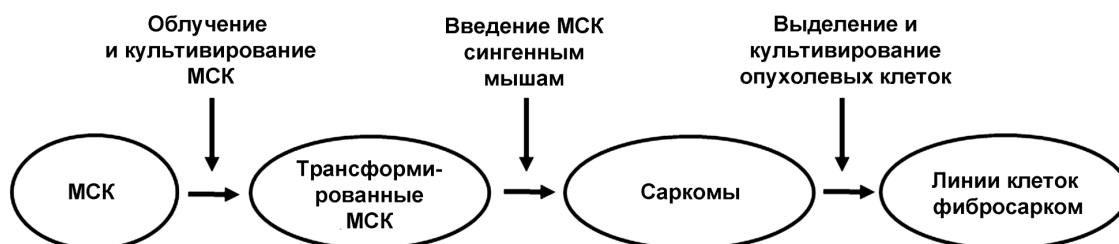
## МЕТОДИКА

### Выделение и культивирование МСК

Выделение и культивирование МСК из костного мозга и опухолей мышей проводили, как описано ранее [7]. Мышей линии C57BL/6 умерщвляли путём цервикальной дислокации. Костный мозг получали из костномозгового канала большеберцовых костей путём промывания полости фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 50 ед/мл гепарина и 0,25 мг/л гентамицина с помощью иглы 18G. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 200 g. Супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде  $\alpha$ -МЕМ (“Gibco”, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (“HyClone”, США) и 50 мкг/мл гентамицина и переносили в культуральные флаконы 25 см<sup>2</sup> (“Corning”, США) в плотности 40 тыс. клеток/см<sup>2</sup> на 24 ч для прикрепления к пластиковой поверхности. Через 24 ч не прикрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся клетки, которые содержали МСК, промывали 2 раза ФСБ и культивировали до достижения субконфлюентного состояния в СО<sub>2</sub>-инкубаторе (“NuAire”, США), после чего пересевали, используя раствор трипсин-EGTA (“Gibco”), и облучали после 20-го пассажа. Для выделения опухолевых МСК опухоли измельчали в культуральной среде  $\alpha$ -МЕМ, фрагменты ткани суспендировали в растворе аккумуля (“Stemcell Technologies”, Канада), инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, протирали через сито с диаметром пор 70 мкм, суспензию клеток собирали и промывали при центрифугировании 300 g 5 мин, переносили в культуральные флаконы и культивировали как описано выше для МСК из костного мозга.

### Облучение клеток

Клетки в культуральной среде подвергали действию  $\gamma$ -излучения от источника кобальт-60 на установке “ГУТ-200М” (НИЦ “Курчатовский Институт”, Россия) при комнатной температуре в дозах 1 Гр и 6 Гр при мощности дозы 0,75 Гр/мин. Условия облучения образцов в коллимированном пучке нейтронов и  $\gamma$ -квантов ядерного реактора и расчёт поглощенных доз подробно изложены в работе [10]. Плотность нейтронного потока, приведённая к 1 МВт мощности реактора, составляла  $0,71 \pm 0,07$  см<sup>2</sup>с<sup>-1</sup>. Энергетический диапазон нейтронов — от 0,5 эВ до 10 МэВ. Расчётная (с использованием программного пакета Geant4)



**Рисунок 1.** Схема получения линий клеток фибросарком из сарком, развившихся при подкожном введении трансформированных под действием  $\gamma$ - и  $\gamma$ , $\beta$ -излучения МСК из костного мозга мыши.

мощность поглощённой в образце дозы, приведённая к 1 МВт мощности реактора, равнялась  $0,6 \pm 0,1$  Гр/час. Из них 0,2 Гр/час обусловлено облучением нейтронами, а 0,4 Гр/час —  $\gamma$ -квантами.

#### *Индукция опухолей из облучённых МСК у сингенных мышей*

МСК облучали в указанных дозах и затем культивировали *in vitro* ещё в течение 10 пассажей для того, чтобы в клеточной популяции могли накопиться мутации с онкогенным потенциалом. Контрольные и облучённые клетки вводили сингенным мышам линии C57BL/6 массой 18-20 г подкожно в область правой лопатки в количестве 1 млн в 0,2 мл раствора ФСБ. Опухоли у животных развивались спустя 4-5 месяцев после  $\gamma$ -облучения [11] и через 5 месяцев после  $\gamma$ , $\beta$ -облучения [10]. После достижения 1–1,5 см в диаметре опухоли извлекали, разрезали на несколько кусочков и замораживали при  $-80^\circ\text{C}$  для последующего исследования, а часть кусочков использовали для выделения опухолевых МСК. Мыши находились в виварии Курчатова комплекса НБИКС-технологий по 5 животных в клетке в обычных условиях на стандартном рационе (Ресурсный центр нейробиологических исследований).

#### *Определение активности теломеразы*

Замороженные фрагменты опухолей и образцы МСК гомогенизировали при  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин в стеклянных гомогенизаторах в холодном лизирующем буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ EGTA, 0,1 мМ PMSF, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,5% CHAPS и 10% глицерин из расчёта 8 мкл буфера на 1 мг ткани или 1 мкл на 5000 культивируемых клеток. Полученные лизаты центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при  $4^\circ\text{C}$ . Супернатант тарировали, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^\circ\text{C}$ . Концентрацию белка в полученных экстрактах измеряли по методу Брэдфорда. Определение АТ в экстрактах проводили с помощью метода TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) с некоторыми модификациями для неизотопной детекции АТ, как описано ранее [11]. Элонгацию теломеразой олигонуклеотидного субстрата (TS-праймер) и последующую ПЦР-амплификацию синтезированных теломерных повторов проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01% Tween-20, 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ EGTA, 50 мМ каждого дНТФ, 0,1 мкг TS-праймера (5'-ATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), 4 мкг белка исследуемых экстрактов из опухолевой ткани или клеточных линий. В положительный контроль добавляли 0,4 мкг белка АТ-позитивной линии клеток миелолейкоза человека K562 ("АТСС", США) клеточной линии K562 (миелолейкоз человека). На первой стадии смесь инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 25 мин. После окончания инкубации смесь выдерживали 10 мин при  $96^\circ\text{C}$  для инактивации теломеразы.

На стадии ПЦР в реакционную смесь добавляли 0,1 мкг СХ-праймера (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') и 2,5 ед. акт. SmarTaq ДНК-полимеразы ("Диалат", Россия). Амплификацию проводили в течение 28 циклов ПЦР. Разделение амплифицированных TRAP-продуктов осуществляли методом электрофореза в 10% неденатурирующем ПААГ, используя трис-боратный-ЭДТА буфер (1xTBE). Смесь после стадии ПЦР вносили в лунки геля в объёме 10 мкл. В качестве лидирующего красителя использовали Orange G ("Sigma", США). Электрофорез проводили в течение 45 мин при напряжённости электрического поля 20 В/см. Визуализацию разделённых TRAP-продуктов проводили на УФ-трансиллюминаторе ( $\lambda = 300$  нм) после окрашивания геля в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре в растворе красителя SYBR Gold ("Molecular Probes", США). Для визуализации результатов использовали систему гель-документирования Syngene G:BOX Chemi XT4 (Великобритания) с встроенной программой обработки полученного изображения GeneTools. Проводили расчёт интенсивности свечения пиков (в условных единицах), соответствующих дискретным фрагментам TRAP-продуктов. Суммарная площадь пиков принималась за величину АТ в конкретном образце. Далее рассчитывали относительную АТ, сравнивая с выбранным положительным контрольным образцом. Положительным контролем служил экстракт МСК костного мозга мыши, характеризующихся высокой АТ, сопоставимой с АТ в экстракте теломеразы-позитивных опухолевых клеток миелолейкоза человека линии K562. В качестве отрицательного контроля использовали образец, в который вместо клеточного экстракта вносили лизирующий буфер.

#### *Определение экспрессии гена mTert методом ОТ-ПЦР*

Суммарную клеточную РНК выделяли по методу Chomczynski и соавт. с некоторыми модификациями [12]. Анализ относительной экспрессии исследуемого гена проводили с помощью ОТ-ПЦР. Обратную транскрипцию (синтез кДНК) проводили в реакционной смеси с конечным объёмом 20 мкл, приготовленной на обработанной ДЭПК деионизованной стерильной воде и содержащей 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01% (v/o) Tween-20, 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ каждого дНТФ, 3,2 мкг смеси гексамерных праймеров со случайной последовательностью, 10 мМ дитиотреитола, 10 ед. акт. ингибитора рибонуклеаз, 30 ед. рекомбинантной обратной транскриптазы M-MLV, 1 мкг суммарной РНК. Смесь инкубировали при  $42^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Реакцию останавливали путём тепловой инактивации обратной транскриптазы, выдерживая смесь при  $94^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Полученную кДНК амплифицировали методом ПЦР с использованием специфичных пар праймеров к кДНК исследуемого гена. Проверку геноспецифичности праймеров осуществляли при помощи программ Oligo Ver. 7 и Primer-BLAST

([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi)). Нуклеотидные последовательности генов были взяты из базы данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). ПЦР проводили в реакционной смеси с конечным объемом 50 мкл, содержащей 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% (в/о) Tween 20, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ каждого дНТФ, 15 пкмоль каждого из пары праймеров: *mTert* f 5' GAA CTC CGT TGT CAT CGA GCA 3', r 5' CCC ATA CTC AGG AAC GCC AT 3' продукт 325 п.н.; *mβ-Actin* f 5' CAG GTC ATC ACT ATT GGC AAC 3', r 5' GGA CTC ATC GTA CTC CTG CT 3' продукт 360 п.н., 2,5 ед. акт. рекомбинантной SmarTaq ДНК-полимеразы ("Диалат"), 5 мкл реакционной ОТ-смеси, содержащей кДНК. Временной и температурный режим ПЦР был одинаковым для кДНК *mTert* и *mβ-Actin*: 94°C — 30 с (первый цикл — 2 мин), 59°C — 30 с (первый цикл — 1 мин), 72°C — 1 мин (последний цикл — 7 мин). Количество циклов ПЦР для *mTert* — 38, для *mβ-Actin* — 28.

Продукты ОТ-ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, при использовании буфера TBE (0,1 М Трис, 0,09 М борная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8,3). Образцы вносили в лунки геля в объеме 10 мкл. Для визуализации результатов использовали систему гель-документирования G:BOX Chemi XT4 ("Syngene", Великобритания) с встроенной программой обработки полученного изображения GeneTools. Уровни экспрессии исследуемого гена нормализовали по отношению к уровню экспрессии конститутивного гена *mβ-Actin*, который принимали за единицу.

#### Определение абсолютной ДТ

Для определения абсолютной ДТ использовали метод [13, 14]. Геномную ДНК выделяли при помощи набора ExtractDNA Blood ("Евроген", Россия) и проводили ПЦР в реальном времени по методу [13]. Праймеры для определения ДТ: *teloF* 5' CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT 3', *teloR* 5' GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT 3'. В качестве стандарта для определения длины теломер использовали матрицу TelSta (TTA GGG TTT GGG)<sub>7</sub> [13]. Праймеры для однокопийного гена *mβ-Актина*: *ActF*: 5' CTTAGCTGTGTTCTTGCACCTCC 3', *ActR*: 5' CAGAAAGCCACAAGAAACACTC 3'. В качестве стандарта однокопийного гена использовали матрицу гена *mβ-Актина*: 5'CTTAGCTGTGTTCTTG CACTCCTTGCACTGTCTCAGATCTATCCATACAGTT TCACCTGCCCTGAGTGTCTTGTGGCTTTCTG3'. ДТ в каждом образце измеряли трижды и использовали среднее значение. По стандартным кривым определяли длину теломерных повторов в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.) в реакции и количество копий *mβ-Актина* в реакции. Для расчёта средней длины теломер на диплоидный геном мыши нормировали длину теломерных повторов к количеству копий *mβ-Actin*: т.п.н. теломер/количество копий *mβ-Actin*, что соответствует длине теломер т.п.н./геном.

#### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы "Origin". Результаты представлены в виде средних значений ± ошибка среднего. Значения считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

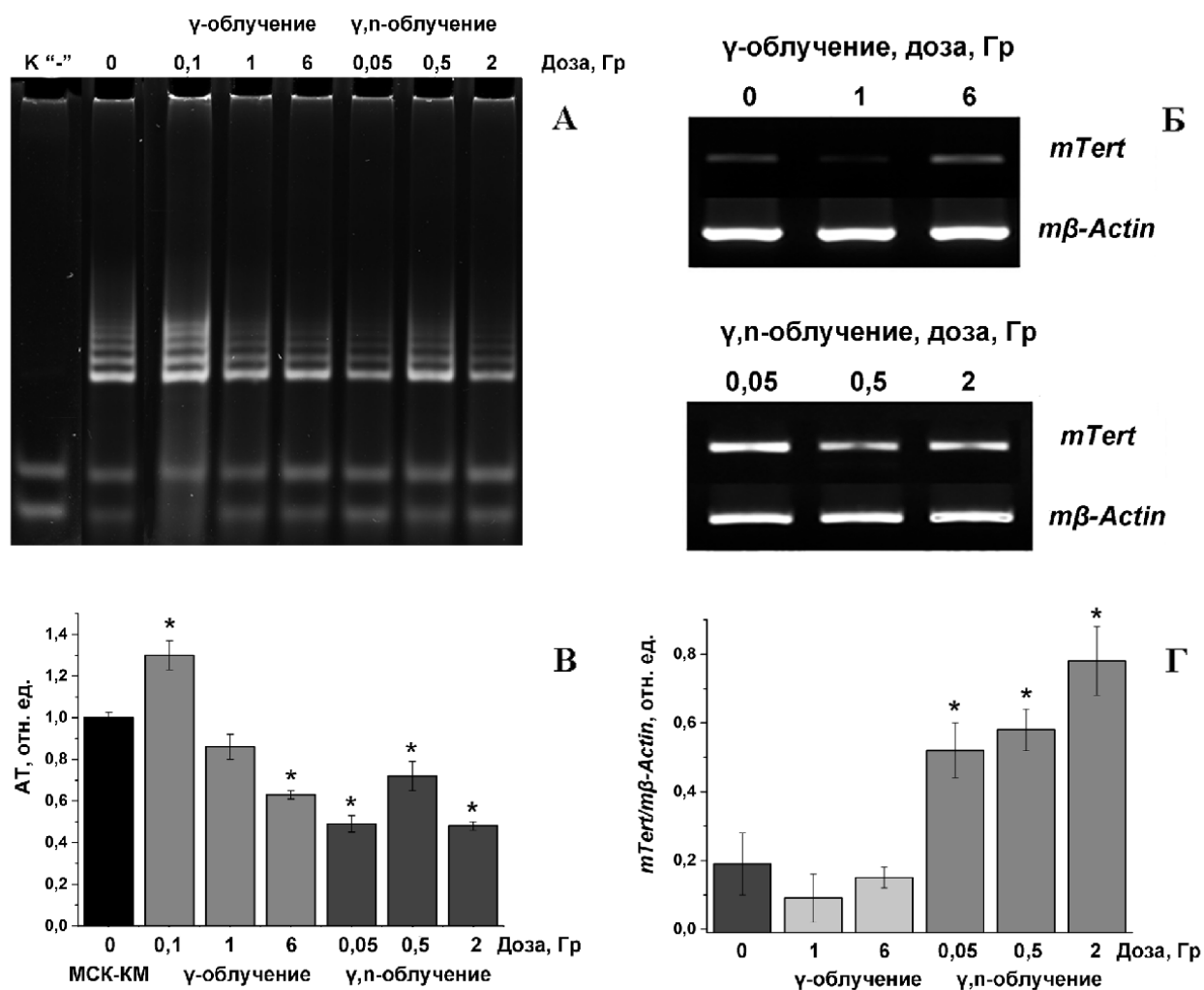
#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа АТ и экспрессии гена теломеразы в контрольных и облучённых МСК в отдалённый период (через 2 месяца после облучения) представлены на рисунке 2. АТ, обнаруженная в контрольных МСК, была принята за 1 ед. При воздействии на МСК γ-излучения в дозе 0,1 Гр наблюдается повышение АТ до  $1,30 \pm 0,07$  отн. ед. ( $p < 0,05$ ). При дозе 1 Гр АТ снижалась до  $0,86 \pm 0,06$  отн. ед., а при дозе 6 Гр — до  $0,63 \pm 0,06$  отн. ед. (рис. 2А,В). В МСК, облучённых смешанным γ,п-излучением в дозах 0,05 Гр; 0,5 Гр и 2 Гр, наблюдалось снижение АТ до  $0,49 \pm 0,04$  отн. ед.,  $0,72 \pm 0,07$  отн. ед.,  $0,48 \pm 0,02$  отн. ед. соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 2А,В).

Таким образом, при анализе АТ в контрольных и облучённых МСК после длительного культивирования обнаружено снижение АТ на 14% после облучения в дозе 1 Гр ( $p > 0,05$ ) на 40% после γ-облучения в дозе 6 Гр и на 30–50% после γ,п-облучения клеток во всех исследованных дозах ( $p < 0,05$ ). После облучения в дозе 0,1 Гр АТ была повышена, что коррелировало с более высокой скоростью пролиферации этих клеток.

Экспрессия гена *mTert* в контрольных МСК была невысокой, составляла  $0,19 \pm 0,09$  отн. ед. по отношению к экспрессии гена *mβ-Actin* и практически не изменялась после γ-облучения МСК в дозах 1 Гр и 6 Гр (рис. 2Б,Г). В тоже время после γ,п-облучения МСК в дозах 0,05 Гр, 0,5 Гр и 2 Гр обнаружено значительное, достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение относительного уровня экспрессии *mTert* до  $0,52 \pm 0,08$  отн. ед.,  $0,58 \pm 0,06$  отн. ед. и  $0,78 \pm 0,09$  отн. ед. (рис. 2Б,Г).

Полученные результаты позволяют констатировать, что уровень экспрессии гена *mTert* в МСК мыши, γ-облучённых в дозах 1 Гр и 6 Гр, в отдалённый период после воздействия не отличался от контроля, а после γ,п-облучения был повышен в 3–4 раза по сравнению с контрольными клетками (рис. 2Б,Г). При этом следует подчеркнуть, что несмотря на повышенный уровень экспрессии гена теломеразы, её активность после γ,п-облучения была значительно снижена (рис. 2А,В). Следует отметить, что во многих типах опухолей человека обнаружены мутации в промоторе гена теломеразы, с наиболее высокой частотой среди которых встречались мутации C228T и C250T [15, 16]. Присутствие этих мутаций коррелировало с повышением экспрессии hTERT и повышением АТ в глиомах (в опухолях и в ксенографтах) [15], в отличие от обнаруженного нами повышения экспрессии гена *mTert*, которое сопровождалось не увеличением, а снижением АТ (рис. 2Б,Г).



**Рисунок 2.** Активность теломеразы (А, В) и экспрессия гена *mTert* (Б, Г) в контрольных и облучённых МСК мыши через 2 месяца после γ- и γ,п-облучения в разных дозах. А — типичная электрофореграмма TRAP-продуктов ПЦР в 10% ПААГ, окрашивание SYBR Gold. К'-' — отрицательный контроль — вместо белкового экстракта внесён 1 мкл лизирующего буфера. Б — типичная электрофореграмма ПЦР-продуктов генов *mTert* и *mβ-Actin* в 1,5% агарозном геле, окрашивание бромистым этидием. В — зависимость АТ от дозы и типа облучения. Г — зависимость уровня экспрессии гена *mTert* от дозы и типа облучения. Представлены средние значения и ошибка среднего. \* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с исходными контрольными МСК.

В сложнейшей регуляции АТ важную роль играют продукты альтернативного сплайсинга мРНК гена теломеразы. У человека описано образование более 20 изоформ теломеразы, образующихся в результате этого процесса [2, 17]. N-концевой фрагмент теломеразы содержит последовательность, направляющую белок в митохондрии, сигнал ядерной локализации и домены взаимодействия с РНК, а С-концевая часть содержит области, определяющие активность обратной транскриптазы [17]. В большинстве изоформ теломеразы эти критические элементы структуры белка оказываются в различной степени нарушенными. Поэтому неудивительно, что высокая АТ обнаружена только у полноразмерного фермента, мРНК которого содержит все 16 экзонов, в то время как в клетках человека все известные сплайс-варианты были неактивны, и, более того, обладали способностью ингибировать АТ. Тем не менее, высокий уровень экспрессии каталитически неактивных изоформ обнаруживается

в разных тканях во время эмбрионального развития и в плюрипотентных стволовых клетках, а некоторые изоформы hTERT образуются конститутивно независимо от образования полноразмерной hTERT. Эти сведения позволили заключить, что образующиеся в результате альтернативного сплайсинга изоформы hTERT играют важную роль в регуляции АТ, и, кроме того, в реализации неканонических функций теломеразы, не связанных с её каталитической активностью [17].

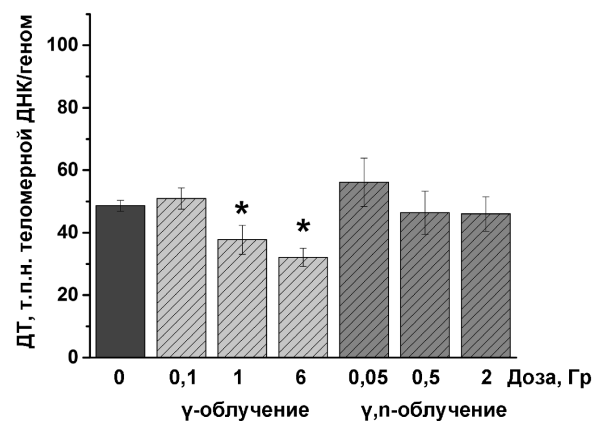
Ряд экспериментальных данных подтверждает эти представления. Так, в клетках 16-ти линий остеосаркомы человека обнаружена корреляция между высоким уровнем экспрессии сплайс-вариантов мРНК теломеразы и её низкой активностью [18]. Недавно Ждановым и соавт. обнаружено [19], что повреждение ДНК клеток при действии γ-излучения и цитотоксических препаратов с различным механизмом действия приводит к повышению уровня альтернативного сплайсинга и

экспрессии изоформы  $\alpha+\beta$ -hTERT в активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах человека и снижению экспрессии полноразмерного варианта  $\alpha+\beta$ -hTERT. Авторами показано, что этот процесс был опосредован эндонуклеазой G, а изменение соотношения вариантов hTERT приводило к снижению АТ [19]. Полученные этой группой результаты позволяют предположить, что обнаруженное в нашей работе снижение АТ в отдалённый период после действия  $\gamma$ - и  $\gamma,n$ -излучения также может быть связано с образованием неактивных изоформ теломеразы в результате альтернативного сплайсинга. Такая регуляция АТ у мышей уже обнаружена, и на сегодняшний день известно 5 изоформ теломеразы. Высоко активна также, как в клетках человека, только полноразмерная теломераза, синтезируемая на матрице мРНК, содержащей 16 экзонов. Известные сплайс-варианты *mTert* неактивны или обладают низкой АТ [20, 21]. Используемые в нашей работе праймеры для анализа уровня экспрессии *mTert* покрывают область мРНК, которая подвергается процессу активного альтернативного сплайсинга; поэтому возможно, что наблюдаемое повышение уровня экспрессии гена *mTert* связано с активацией экспрессии сплайс-вариантов *mTert*. Этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Повышение экспрессии гена *mTert* обнаружено только после  $\gamma,n$ -облучения МСК. Отметим, что в отдалённый период после этого воздействия на МСК мыши в использованных дозах нами было показано 2-3-кратное повышение уровня секреции  $\gamma,n$ -облучёнными клетками цитокина TGF- $\beta$ 1, в отличие от уровня его секреции после  $\gamma$ -облучения МСК, который практически не отличался от контроля [10]. В опытах на культуре эпителиальных клеток было обнаружено, что действие TGF- $\beta$ 1 приводило к снижению АТ, несмотря на сохранение экспрессии гена теломеразы; это сопровождалось потерей полноразмерного транскрипта TERT и высоким уровнем экспрессии неактивного  $\beta$ -варианта данного гена [22]. Возможно, что повышенный уровень экспрессии *mTert* после  $\gamma,n$ -облучения МСК опосредован высоким уровнем секреции TGF- $\beta$ 1 этими клетками.

Результаты анализа ДТ представлены на рисунке 3. Снижение ДТ обнаружено через 2 месяца после  $\gamma$ -облучения МСК в дозах 1 Гр и 6 Гр. Облучение МСК в низкой дозе 0,1 Гр не приводило к изменению ДТ, что коррелирует с высокой АТ (рис. 2В) при воздействии этой дозы. После  $\gamma,n$ -облучения МСК в дозах 0,05–2 Гр снижения ДТ не наблюдали, но возрастала вариабельность этого показателя по сравнению с необлучёнными МСК.

Таким образом, в отдалённый период после  $\gamma$ - и  $\gamma,n$ -облучения МСК в сублетальных дозах обнаружено снижение АТ в культивируемых клетках при неизменяющемся или возрастающем уровне экспрессии гена теломеразы. Снижение ДТ через 2 мес. после облучения при этом наблюдали только после  $\gamma$ -облучения МСК в тех дозах, при которых АТ снижалась, а уровень экспрессии гена теломеразы не изменялся. В этих условиях снижение АТ после



**Рисунок 3.** Длина теломер (ДТ) в МСК через 2 месяца после воздействия на клетки  $\gamma$ - и  $\gamma,n$ -излучения в разных дозах. Представлены средние значения и ошибка среднего, \* —  $p \leq 0,05$ .

$\gamma$ -облучения коррелировало со снижением ДТ. Известно, что АТ повышается через 24–48 ч после облучения клеток в дозе 10 Гр, что расценивается как участие теломеразы в процессе репарации повреждений, возникающих в области теломер [23]. При этом, несмотря на повышение АТ через 5 суток после облучения, было обнаружено увеличение доли коротких теломер в клетках, которая только к 10 суткам после воздействия приближалась к параметрам контрольных клеток, что могло быть связано как с удлинением теломер теломеразой, так и с гибелью клеток с короткими теломерами к этому времени [23]. Сведения о состоянии системы “АТ — экспрессия гена *mTert* — ДТ” в трансформированных МСК или в других клетках мыши в отдалённый период после облучения нам не известны.

Отсутствие снижения ДТ в МСК с пониженной АТ позволяет полагать, что либо имеющегося уровня АТ достаточно для сохранения ДТ, либо что в этих клетках наряду с АТ используется и АУТ. В дальнейших экспериментах для индукции опухолей использовали МСК через 2 мес. культивирования после  $\gamma$ -облучения в дозах 1 Гр и 6 Гр и после  $\gamma,n$ -облучения в дозах 0,05 Гр и 0,5 Гр.

Через 16–20 недель после подкожного введения сингенным мышам линии C57BL/6 МСК,  $\gamma$ -облучённых в дозах 1 Гр и 6 Гр и  $\gamma,n$ -облучённых в дозах 0,05 Гр и 0,5 Гр, у животных развивались саркомы, из которых были получены линии клеток фибросарком (рис. 1). После подкожного введения этих клеток сингенным мышам уже через 2 недели у животных развивались фибросаркомы [10].

Результаты, полученные при исследовании АТ, экспрессии гена теломеразы и ДТ в развившихся саркомах и культивируемых клетках фибросарком, выделенных из опухолей, представлены в таблице.

Ранее нами было обнаружено присутствие АТ в экстрактах одной из опухолей, образовавшихся у мышей после введения им МСК, облучённых в дозе 1 Гр, и одной опухоли после введения МСК, облучённых в дозе 6 Гр [11]. В настоящей работе показано, что АТ присутствует во всех саркомах,

Таблица. Анализ активности и экспрессии гена теломеразы и длины теломер в саркомах, развившихся у сингенных мышей линии C57BL/6 при подкожном введении облученных МСК, и в линиях клеток фибросарком, выделенных из сарком — в сравнении с этими показателями в исходных клетках

Показатель	Доза и тип облучения клеток			
	γ-излучение		γ,n-излучение	
	1 Гр	6 Гр	0,05 Гр	0,5 Гр
<b>Активность теломеразы, отн. ед.</b>				
Саркомы	0,21±0,03 <sup>&amp;,*</sup> ↓	0,31±0,05 <sup>&amp;,*</sup> ↓	0,05±0,03 <sup>&amp;,*</sup> ↓	0,0±0,0 <sup>&amp;,*</sup> ↓
Линии клеток фибросарком	0,00±0,00 <sup>&amp;,*</sup> ↓	0,23±0,04 <sup>&amp;,*</sup> ↓	0,22±0,02 <sup>&amp;,*</sup> ↓ <sup>†</sup>	0,0±0,0 <sup>&amp;,*</sup> ↓
<b>mTert/β-актин, отн. ед.</b>				
Саркомы	0,14±0,05	0,44±0,06 <sup>&amp;,*</sup> ↑	0,51±0,11	0,23±0,03 <sup>*</sup> ↓
Линии клеток фибросарком	0,08±0,02	0,52±0,03 <sup>&amp;,*</sup> ↑	0,65±0,05	0,09±0,02 <sup>*#</sup> ↓
<b>Длина теломер, т.п.н. теломерной ДНК/геном</b>				
Саркомы	9,85±0,21 <sup>&amp;,*</sup> ↓	11,86±4,38 <sup>&amp;,*</sup> ↓	40,49±5,63	34,25±0,90 <sup>&amp;,*</sup> ↓
Линии клеток фибросарком	24,87±5,33 <sup>&amp;,*</sup> ↓ <sup>†</sup>	28,66±3,99 <sup>&amp;,*</sup> ↓ <sup>†</sup>	41,56±9,04	25,29±4,19 <sup>&amp;,*</sup> ↓

Примечание: & — отличия от исходной контрольной линии МСК достоверны, \* — отличия от исходных облученных линий МСК достоверны, # — отличия от исходных опухолей достоверны, p≤0,05. Стрелка при знаках &, \* или # указывает повышение (↑) или снижение (↓) исследуемого показателя по отношению к исходной линии или исходной опухоли.

развившихся из γ-облученных МСК после их длительного культивирования, но она была значительно ниже, чем в исходных облученных МСК, трансплантированных для индукции опухолей, значения АТ для которых приведены на рисунке 2В. В саркомах, развившихся из МСК после γ,n-облучения, АТ практически отсутствовала. При введении сингенным мышам трансформированных МСК опухоль образуют наиболее злокачественные клетки, способные не только к неограниченной пролиферации, но и ускользающие от противоопухолевого иммунного ответа. Поэтому получение сарком, а затем из них линий опухолевых клеток, в нашем случае фибросарком, обеспечивает своего рода селекцию наиболее злокачественных из трансформированных при облучении МСК.

В клетках полученных линий фибросарком АТ либо отсутствовала (после γ-облучения в дозе 1 Гр и γ,n-облучения в дозе 0,5 Гр), либо оставалась на очень низком уровне (таблица). Таким образом, злокачественная трансформация МСК сопровождалась снижением вплоть до полного исчезновения АТ, что отличает саркомы от опухолей, образующихся из клеток других типов, в которых, напротив, наблюдается реактивация теломеразы.

Уровень экспрессии гена *mTert* в опухолях, развившихся из γ-облученных в дозе 1 Гр МСК и из γ,n-облученных в дозе 0,05 Гр МСК, не отличался от уровня в исходных линиях МСК и составлял 0,14±0,05 отн. ед. и 0,51±0,11 отн. ед. соответственно. В опухолях, развившихся из γ-облученных в дозе 6 Гр МСК, он возрастал в 3 раза, а в саркомах, развившихся из МСК, γ,n-облученных в дозе 0,5 Гр, был снижен до 0,23±0,03 отн. ед. — в 2 раза по сравнению с исходной линией облученных МСК, где он был равен 0,58±0,06 отн. ед. (таблица, рис. 2Г), но не отличался для такового в необлученных контрольных МСК (0,19±0,09 отн. ед., рис. 2Г). В клетках фибросарком, полученных из опухолей, развившихся из γ-облученных в дозе 6 Гр МСК и из γ,n-облученных в дозе 0,05 Гр МСК, уровень

экспрессии гена *mTert* оставался на высоком уровне. В клетках линий фибросарком, полученных из опухолей, развившихся из γ-облученных в дозе 1 Гр МСК он не отличался от уровня в исходной опухоли, а в клетках, полученных из опухолей, развившихся из γ,n-облученных в дозе 0,5 Гр был достоверно снижен до 0,09±0,02 отн. ед. (таблица, рис. 2Г). На основании полученных данных можно констатировать отсутствие каких бы то ни было закономерностей в изменении уровня экспрессии гена *mTert* в опухолях, развившихся из трансформированных при действии γ- и γ,n-облучения МСК, и отсутствие корреляции с уровнем АТ в этих опухолях. Это свидетельствует о необходимости проведения не только исследования уровня экспрессии гена теломеразы, но и анализа образования продуктов альтернативного сплайсинга мРНК гена *mTert*, способных регулировать АТ.

ДТ в опухолях, развившихся из γ-облученных МСК со сниженной АТ, была снижена по сравнению с исходными линиями (рис. 2В, рис. 3, таблица). В то же время в линиях фибросарком, полученных из соответствующих опухолей, ДТ была выше, чем в исходных опухолях, несмотря на отсутствие или низкий уровень АТ (таблица). Но в саркомах, развившихся из γ,n-облученных МСК, и в линии фибросаркомы, полученной из опухоли, развившейся после введения мышам МСК, γ,n-облученных в дозе 0,05 Гр, ДТ не отличалась от той, которая наблюдалась в тех исходных облученных МСК, которые трансплантировали мышам для индукции опухолей (рис. 3, таблица). В клетках линии фибросаркомы, полученной из опухоли, развившейся при трансплантации мышам МСК после γ,n-облучения в дозе 0,5 Гр, ДТ составляла 25,29±4,19 т.п.н. теломерной ДНК/геном и была достоверно снижена (по сравнению с ДТ исходно трансплантированных облученных МСК, в которых она составляла 46,38±6,95 т.п.н. теломерной ДНК/геном (рис. 3, таблица). ДТ во всех линиях фибросарком, кроме линии, полученной после γ,n-облучения в дозе 0,05 Гр,

была также достоверно ниже, чем в исходной линии контрольных МСК, в которой она составляла  $48,61 \pm 1,75$  т.п.н. теломерной ДНК/геном (рис. 3).

Следует отметить что, несмотря на значительное статистически значимое снижение ДТ в трёх из четырёх полученных линий фибросарком по сравнению с исходной линией контрольных МСК, клетки фибросарком по своей жизнеспособности не отличались от исходной линии. Это позволяет полагать, что МСК обладают “избыточным” запасом ДТ, снижение которой практически в 2 раза в клетках полученных линий фибросарком не повлияло на выживаемость клеток. Действительно, ещё в конце 90-х годов было обнаружено, что теломеры инбредных мышей, в том числе и мышей линии C57BL/6, характеризуются очень большими размерами: от 30 т.п.н до 150 т.п.н., в отличие от мышей с меньшим стажем инбредного размножения, у которых ДТ была менее 20-25 т.п.н., то есть такого порядка, как в клетках полученных нами линий фибросарком [24, 25].

Особо следует отметить две линии фибросарком, в которых АТ отсутствовала, (линии, полученные из опухолей, развившихся при трансплантации мышам МСК, трансформированных при  $\gamma$ -облучении в дозе 1 Гр и  $\gamma$ -облучении в дозе 0,5 Гр), но ДТ не отличалась от ДТ в линиях с АТ (таблица). Можно предполагать, что в этих линиях произошло переключение механизма поддержания ДТ с использования АТ на путь АУТ. Этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

При длительном культивировании нормальных и трансформированных под действием  $\gamma$ - (1 Гр и 6 Гр) и  $\gamma$ -излучения (0,05 Гр, 0,5 Гр и 2 Гр) МСК из костного мозга мыши впервые обнаружено снижение АТ в облучённых клетках. Ещё более глубокое снижение АТ обнаружено в саркомах, развившихся при введении трансформированных МСК сингенным мышам и в линиях клеток фибросарком, выделенных из этих опухолей, в которых АТ либо отсутствовала, либо обнаруживалась на очень низком уровне. ДТ в трёх из четырёх полученных линий была снижена в два раза по сравнению с исходными МСК. При отсутствующей или низкой АТ и сниженной ДТ клетки всех полученных линий фибросарком успешно пролиферировали без признаков снижения выживаемости. Механизм поддержания ДТ в линиях клеток фибросарком с отсутствием АТ нуждается в изучении, и можно полагать, что он связан с использованием пути АУТ.

Обнаруженное снижение или отсутствие АТ в трансформированных МСК при сохранении или даже повышении уровня экспрессии гена теломеразы может быть связано с экспрессией неактивных сплайс-вариантов, что требует дальнейшего изучения. Полученные линии трансформированных МСК и фибросарком с АТ и без активности этого фермента могут быть удобной моделью для исследования эффективности ингибиторов АТ и АУТ *in vitro* и *in vivo*.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ №1363 от 25.06.2019 г).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1977) и требованиями этического комитета НИЦ “Курчатовский институт” по вопросам биомедицинских исследований.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Скворцов Д.А., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. (2009) *Acta Naturae*, **1**(1), 51-67. [Skvortsov D.A., Rubzova M.P., Zvereva M.E., Kiselev F.L., Donzova O.A. (2009) *Acta Naturae*, **1**(1), 51-67.]
2. Cesare A.J., Reddel R.R. (2010) *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 319-330.
3. Dilley R.L., Greenberg R.A. (2015) *Trends Cancer.*, **1**(2), 145-156.
4. Zhao S., Wang F., Lin Liu L. (2019) *Genes*, **10**, 1030. DOI: 10.3390/genes10121030
5. Mosoyan G., Kraus T., Ye F., Eng K., Crispino J.D., Hoffman R., Iancu-Rubin C. (2017) *Leukemia*, **31**(11), 2458-2467.
6. Duran S.T. (2012) *J. Cancer*, **3**, 67-82.
7. Посыпанова Г.А., Москалёва Е.Ю., Родина А.В., Семочкина Ю.П., Ратушняк М.Г., Перевозчикова В.Г. (2016) *Радиационная биология. Радиоэкология*, **56**(1), 35-43. [Posypanova G.A., Moskaleva E.Yu., Rodina A.V., Semochkina Yu.P., Ratushnyak M.G., Perevozchikova V.G. (2016) *Radiatsionnaya Biologiya. Radioecologia*, **56**(1), 35-43].
8. Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Чукалова А.А., Посыпанова Г.А. (2017) *Человек и электромагнитные поля. Сборник докладов V Международной конференции: - Саров: РФЯЦ-ВНИИЭФ*, 2017. - сс. 426-435. [Moskaleva E.Yu., Semochkina Yu.P., Rodina A.V., Chukalova A.A., Posypanova G.A. (2017) *Human and Electromagnetic Fields. The V International Conference: - Sarov: RFNC-VNIIEP*, 2017. - pp. 426-435].
9. Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Чукалова А.А., Посыпанова Г.А. (2017) *Радиационная биология. Радиоэкология*, **57**(3), 245-256. [Moskaleva E.Yu., Semochkina Yu.P., Rodina A.V., Chukalova A.A., Posypanova G.A. (2017) *Radiatsionnaya Biologiya. Radioecologia*, **57**(3), 245-256.]
10. Семочкина Ю.П., Родина А.В., Москалева Е.Ю., Жорова Е.С., Сапрыкин В.П., Арзуманов С.С., Сафронов В.В. (2019) *Медицинская радиология и радиационная безопасность*, **64**(1), 5-14. [Semochkina Yu.P., Rodina A.V., Moskaleva E.Yu., Zhorova E.S., Saprykin V.P., Arzumanov S.S., Safronov V.V. (2019) *Medical Radiology and Radiation Safety*, **64**(1), 5-14.]



11. Moskaleva E.Yu., Rodina A.V., Semochkina Yu.P., Vysotskaya O.V., Glukhov A.I., Chukalova A.A., Posypanova G.A., Zhorova E.S., Saprykin V.P. (2017) Cell Tissue Biology, **11**(5), 381-388.
12. Глухов А.И., Высоцкая О.В., Свиная Л.В., Зимник О.В., Быков И.И., Хоробрых Т.В. (2011) Молекулярная медицина, №1, 35-40. [Glukhov A.I., Vysotskaya O.V., Svinareva L.V., Zimnik O.V., Bykov I.I., Khorobrykh T.V. (2011) Molecular Medicine, #1, 35-40.]
13. O'Callaghan N.J., Fenech M.A. (2011) Biol. Proced. Online, **13**, 3. DOI: 10.1186/1480-9222-13-3
14. Cawthon R.M. (2002) Nucl. Acids Res., **30**(10), e47. DOI: 10.1093/nar/30.10.e47
15. Huang D.S., Wang Z., He X.J., Diplas B.H., Yang R., Killela P.J., Meng Q., Ye Z.Y., Wang W., Jiang X.T. et al. (2015) Eur. J. Cancer, **51**, 969-976.
16. Ramlee M.K., Wang J., Toh W.X., Li S. (2016) Genes (Basel), **7**(8), pii: E50. DOI: 10.3390/genes7080050
17. Teichroeb J.H., Kim J., Betts D.H. (2016) RNA Biol, **213**(8), 707-719.
18. Fujiwara-Akita H., Maesawa C., Honda T., Kobayashi S., Masuda T. (2005) Int. J. Oncol., **26**(4), 1009-1016.
19. Жданов Д.Д., Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2018) Биомед. химия, **63**(1), 13-26 [Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova V.S., Orlova E.V., Grishin D.V., Gladilina Yu.A., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2018) Biomed. Khimiya, **63**(1), 13-26.]
20. Sykorova E., Fajkus J. (2009) Biol. Cell, **101**, 375-392.
21. Rousseau P., Khondaker S., Zhu S., Lauzon C., Mai S., Autexier C. (2016) Biol Cell., **108**(4), 96-112.
22. Cerezo A., Kalthoff H., Schuermann M., Schäfer B., Boukamp P. (2002) J. Cell Sci., **115**(6), 1305-1312.
23. Sishc B.J., Nelson C.B., McKenna M.J., Battaglia C.L., Herndon A., Idate R., Howard L., Liber H.L., Bailey S.M. (2015) Front. Oncol., **5**, 257. DOI: 10.3389/fonc.2015.00257
24. Kipling D., Cooke H.J. (1990) Nature, **347**(6291), 400-402.
25. Hemann M.T., Greider C.W. (2000) Nucl. Acids Res., **28**(22), 4474-4478.

Поступила в редакцию: 18. 03. 2020.  
После доработки: 22. 05. 2020.  
Принята к печати: 22. 05. 2020.

# TELOMERASE ACTIVITY, *mTert* GENE EXPRESSION AND THE TELOMERE LENGTH IN MOUSE MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE LATE PERIOD AFTER $\gamma$ - AND $\gamma$ ,n-IRRADIATION AND IN THE TUMORS DEVELOPED FROM THESE CELLS

O.V. Vysotskaya<sup>1</sup>, A.I. Glukhov<sup>2,3</sup>, Yu.P. Semochkina<sup>1</sup>, S.A. Gordeev<sup>2</sup>, E.Yu. Moskaleva<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>NRC Kurchatov Institute,

1 Akademika Kurchatova sq., Moscow, 123182 Russia; \*e-mail: Moskaleva\_EY@nrcki.ru

<sup>2</sup>Faculty of Biology, Moscow State University, 1-12 Leninskie Gory, Moscow, 119234 Russia

<sup>3</sup>Sechenov University, 8-2 Trubetskaya str., Moscow, 119991 Russia

In proliferating normal and tumor cells, the telomere length (TL) is maintained by high telomerase activity (TA). In the absence of TA the TL maintenance involves a mechanism of alternative lengthening of telomeres (ALT). The aim of this study was to investigate the level of TA, the *mTert* expression and TL in cultured normal and transformed by  $\gamma$ - and  $\gamma$ ,n-irradiation mesenchymal stem cells (MSCs) from mouse bone marrow, in sarcomas that developed after the transplantation of these cells into syngeneic mice, and in fibrosarcoma cell lines obtained from these tumors to find out the role of AT or ALT in maintaining TL in these cells. During prolonged cultivation of normal and transformed under the influence of  $\gamma$ - (1 Gy and 6 Gy) and  $\gamma$ ,n-irradiation (0.05 Gy, 0.5 Gy, and 2 Gy) MSCs from mouse bone marrow, a decrease in TA was detected in irradiated cells. Even deeper decrease in TA was found in sarcomas developed after administration of transformed MSCs to syngeneic mice and in fibrosarcoma cell lines isolated from these tumors in which TA was either absent or was found to be at a very low level. TL in three of the four lines obtained was halved compared to the initial MSCs. With absent or low TA and reduced TL, the cells of all the obtained fibrosarcoma lines successfully proliferated without signs of a change in survival. The mechanism of telomere maintenance in fibrosarcoma cell lines in the absence of TA needs further investigation and it can be assumed that it is associated with the use of the ALT. The detected decrease or absence of TA in transformed under the action of irradiation MSCs with the preservation or even an increase in the telomerase gene expression may be associated with the formation of inactive splicing variants, and requires further study. The obtained lines of transformed MSCs and fibrosarcomas with TA and without the activity of this enzyme can be a useful model for studying the efficacy of TA and ALT inhibitors *in vitro* and *in vivo*.

**Key words:** telomerase; gene expression; telomeres; alternative lengthening of the telomeres; mesenchymal stem cells; sarcoma

**Funding.** This work was supported by the NRC “Kurchatov Institute” (order No. 1363 of June 25, 2019).

Received: 18.03.2020, revised: 22.05.2020, accepted: 22.05.2020.