

©Коллектив авторов

## ИНДУКЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА КАСПАЗЫ-2 АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ EndoG

Д.Д. Жданов\*, Ю.А. Гладилина, А.Н. Шишпарёнок

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

Каспаза-2 (Casp-2) — фермент, регулирующий развитие апоптотических процессов в клетке. Пре-мРНК Casp-2 подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого образуются белковый продукт Casp-2L, проявляющий каталитическую активность, и неактивный Casp-2S вариант. Механизм альтернативного сплайсинга пре-мРНК Casp-2 изучен недостаточно полно, однако известно, что апоптотические эндонуклеазы участвуют в регуляции активности Casp-2. Целью данной работы было изучение связи апоптотической эндонуклеазы EndoG и Casp-2 и роли EndoG в регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК Casp-2. Обнаружена взаимосвязь между экспрессией EndoG и сплайс-форм Casp-2 в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах человека, которая коррелиция усиливалась при инкубации клеток с ингибитором топоизомеразы II этопозидом. Повышение экспрессии Casp-2S сплайс-варианта обнаружено при сверхэкспрессии EndoG в CD4<sup>+</sup> Т-клетках, при обработке клеточной цитоплазмы и ядер рекомбинантной EndoG, а также при инкубации ядер с подвергнутой протеолитическому расщеплению рекомбинантной EndoG РНК. Альтернативный сплайсинг Casp-2 индуцировали 60-членным РНК-олигонуклеотидом в изолированных клеточных ядрах и при трансфекции клеток. Идентифицирована длинная не кодирующая РНК размером 1016 оснований, из которой образуется активный РНК-олигонуклеотид. На основании полученных результатов предложен следующий механизм сплайсинга мРНК: с кодирующей цепи гена Casp-2 синтезируется пре-мРНК, а с матричной цепи синтезируется длинная не кодирующая РНК. EndoG вырезает из длинной не кодирующей РНК 60-членный РНК-олигонуклеотид, комплементарный пре-мРНК Casp-2, в месте соединения экзона 9 и интрона 9, взаимодействие которых вызывает индукцию альтернативного сплайсинга.

**Ключевые слова:** EndoG; альтернативный сплайсинг; каспаза-2; Т-лимфоциты

**DOI:** 10.18097/PBMC20247004218

### ВВЕДЕНИЕ

Семейство цистеиновых протеаз, к которым принадлежит каспаза-2 (caspase-2, Casp-2), осуществляет расщепление пептидной связи, образованной аспарагиновой кислотой в аминокислотной последовательности белков-субстратов. Каспазы являются инициаторными, медиаторными и эффекторными молекулами в процессе развития апоптоза и играют определяющую роль в регуляции гибели клеток [1]. Casp-2 — одна из наиболее эволюционно консервативных среди прочих инициаторных и эффекторных каспаз [2].

Процесс альтернативного сплайсинга (АС) пре-мРНК Casp-2 оказывает существенное влияние на активность образующихся форм фермента. Полноразмерная Casp-2L (Long Form, длинная форма 435 а.к.), состоит из субъединиц p19 и p12, которые вовлечены в реализацию каталитической активности фермента [3]. Сплайс-вариант Casp-2S (Short Form, короткая форма) содержит не кодирующий экзон на 5'-конце мРНК. Его включение в зрелую мРНК приводит к инициации трансляции с кодирующего кодона 2 и потере N-концевого 31-членного пептида [4]. В результате АС Casp-2S теряет кодирующий p12 последовательность экзон 9 и ферментативную активность. Casp-2L индуцирует

клеточную гибель клеток, в то время как Casp-2S повышает выживаемость [5].

Известно об участии двух факторов в регуляции АС пре-мРНК Casp-2. Белок hnRNP A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) способствует образованию Casp-2S, в то время как сплайсинг-факторы ASF (alternative splicing factor) и SF2 (splicing factor 2) индуцируют Casp-2L [6]. Повреждения ДНК различными агентами, оксидативный стресс и тепловой шок клеток вызывают изменения пропорции сплайс-вариантов в клетках [7–11].

Ранее было показана связь Casp-2 и некоторых апоптотических эндонуклеаз [12, 13], разрушающих ДНК клеток на последних стадиях апоптоза [14]. Эндонуклеаза G (EndoG) является сайт-специфичной эндонуклеазой, избирательно расщепляющей двойные цепи ДНК по поли-(dG) последовательностям. Отличительная особенность EndoG состоит в том, что данный фермент обладает РНКазной активностью [15]. Ранее мы показали, что EndoG участвует в синтезе переключающих сплайсинг олигонуклеотидов так называемых EndoG-produced oligonucleotides (EGPO), способных модулировать теломеразную и нуклеазную активность [16–18]. Цель настоящей работы состояла в изучении взаимосвязи между EndoG и Casp-2 в Т-лимфоцитах человека.

*Принятые сокращения:* Casp-2 – caspase-2, каспаза-2; Casp-2L – caspase-2 long, каспаза-2 длинный вариант; EndoG – эндонуклеаза G; Casp-2S – caspase-2 short, каспаза-2 короткий вариант; EGPO – EndoG produced oligonucleotide, произведённый EndoG олигонуклеотид; АС – альтернативный сплайсинг; нкРНК – не кодирующая РНК.

## МЕТОДИКА

## Забор крови, селекция и культивирование Т-лимфоцитов

Образцы венозной крови здоровых доноров забирали в пробирки с антикоагулянтом K<sub>3</sub>EDTA (“Greiner Bio-One”, Австрия). Из крови выделяли мононуклеарные клетки методом градиентного центрифугирования на фиколе Lympholite-H (“Cedarlane”, Канада). Выделение фракции CD4<sup>+</sup> клеток выполняли методом магнитной селекции с использованием CD4<sup>+</sup> Isolation Kit, human (“Miltenyi Biotec”, Германия) по протоколу производителя. Выделение фракции CD8<sup>+</sup> Т-клеток выполняли при помощи CD8<sup>+</sup> Isolation Kit, human (“Miltenyi Biotec”). Культивирование клеток осуществляли по описанному ранее протоколу [19]. Полученные клетки высевали в концентрации 5×10<sup>5</sup> клеток на 1 мл среды. Использовали культуральную среду RPMI-1640 (“Life technologies”, США) с 10% FBS (Fetal Serum Bovine, “Gibco”, США), стимуляторами роста 100 Ед/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 антибиотиками 50 Ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (“Sigma”, США). Культивирование проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 90%.

## Инкубация с этопозидом и трансфекция клеток

Для индукции экспрессии Casp-2S CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты культивировали в присутствии ингибитора топоизомеразы II не летальной концентрации этопозида (5 мкМ) (“Sigma”) в течение 24 ч.

Трансфекцию CD4<sup>+</sup> Т-клеток осуществляли одной из плазмид рEndoG-GFP или контрольной плазмидой рGFP (синтезированы на заказ “Clontech”, США) на основе рGFP-N1 вектора [19]. Процедуру трансфекции проводили с использованием Lipofectamine 2000 (“Invitrogen”, США) по протоколу компании производителя. Оценку эффективности

трансфекции (обычно 90–99%) осуществляли методом проточной цитометрии при подсчёте количества GFP-положительных клеток. Для трансфекции клеток 60-членным нуклеотидом EGPO (EndoG-produced oligonucleotide, нуклеотид, произведённый EndoG) или контрольной РНК (таблица 1, “Синтол”, Россия) использовали Oligofectamine Reagent (“Invitrogen”) по протоколу компании-производителя. В состав EGPO и контрольной РНК входили основания с фосфоротиоатными связями для защиты от действия нуклеаз.

## Выделение клеточных органелл и их обработка recEndoG

Цитоплазму получали по методике, описанной Laukova и соавт. [20]. Выделение ядер проводили по методике, описанной Pravdenkova и соавт. [21]. Детально процедура описана нами ранее [22]. Цитоплазму и ядра клеток инкубировали с рекомбинантной EndoG человека ENDOG (Human Recombinant Protein (“Abnova”, США) при 37°C.

## Количественная ПЦР и определение ферментативной активности

Тотальную РНК из клеток, ядер и цитоплазмы выделяли с помощью набора для выделения суммарной РНК (“Biolabmix”, Россия) по протоколу компании-производителя. Обратную транскрипцию проводили при помощи реагентов из набора MMLV RT kit, а для ПЦР в реальном времени использовали qPCRmix-HS SYBR (оба реактива от “Evrogen”, Россия) по протоколам компании-производителя. Используемые праймеры (“Синтол”) представлены в таблице 2. Подробный протокол описан нами ранее [23]. В качестве референсных генов использовали 18S (ген “домашнего хозяйства” для цитоплазмы) и LMNB1, кодирующий ламин B1 (ген “домашнего хозяйства” для ядер). Данные экспрессии представляли в виде нормализованных уровней мРНК изучаемых генов по усреднённому значению экспрессии двух референсных генов [19].

Таблица 1. Олигонуклеотиды используемые для трансфекции клеток и инкубации с ядрами

Название	Последовательность 5'–3'
EGPO	GGCACCUCUUCUGUUCACUGCUGCCACCGCCUCUCUUGCUCUGUAAGUGUCUCCCAAUG
Контрольная РНК	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCGUCAGGAUAGGAGAUACUC
EGPO	G*G*C*A*C*CUCCUUCUGUUCACUGCUGCCACCGCCUCUCUUGCUCUGUAAGUGUCUCC*C*A*A*U*G
Контрольная РНК	A*U*G*U*G*CCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCGUCAGGAUAGGAGA*U*A*C*U*C

Примечание: \* – фосфоротиоатная связь.

Таблица 2. Праймеры, используемые для количественной ПЦР

Мишень	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')	Размер амплификата п.о.	Температура отжига °C
EndoG	AATTGAGCTCCGCACCTACGTGAT	AGGATGTTTGGCACAAGAGCAGC	167	55
Casp-2 общая	GCATGTACTCCACCGTTGA	TGCTCAACACCACTGCTAGG	242	60
Casp-2L	AGCTCTTTGACAACGCCAA	CAGGAACCTCGTTTGGTGT	262	58
Casp-2S	CCGTGGAGGTGCTATTGG	TCGGCAACTTTCTTTACCG	165	57
нкРНК	CGTGCACCACCATATCCTGT	GGGCACCAGAGTTAATGAAGC	101	60
EGPO	ACCTCCTTCTGTTCACCTGCTG	CCCATGCATTGGGAGACACTT	63	59
18S	GGATCCATTGGAGGGCAAGT	ACGAGCTTTTAACTGCAGCAA	91	64
LMNB1	GATTGCCAGTTGGAAGCCT	TGGTCTCGTTAATCTCCTCTTCATACA	152	60

## ИНДУКЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА Casp-2 ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ EndoG

Определение ферментативной активности Casp-2 проводили при помощи набора Caspase 2 Assay Kit Fluorometric ("Abcam", США) по протоколу производителя. Процедура детально описана нами ранее [23].

### Расщепление ДНК и РНК ферментами recEndoG или РНКазы

ДНК выделяли при помощи реагента "ЛИРА" и набора D-cells для выделения ДНК из клеток животных и бактерий ("Biolabmix"). РНК выделяли как описано выше. Полученные ДНК и РНК инкубировали с 0,3 мкг recEndoG в 50 мМ Трис-НСl, рН 7,9, 1 мМ СаCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ β-меркаптоэтанолом в течение 20 мин, 40 мин и 60 мин при 37°C. Инкубацию РНК с 500 ед. РНКазы 1 ("Invitrogen") и РНКазы А ("Invitrogen") осуществляли по протоколу компании производителя в течение 60 мин. Затем образцы инкубировали с протеиназой К ("Biolabmix") для инактивации recEndoG или РНКаз. К обработанной ферментами РНК добавляли каждый их 24-членных ДНК-олигонуклеотидов (табл. 3) и инкубировали 30 мин при 37°C для образования нековалентных комплексов ДНК•РНК, блокирующих активность EGPO [19, 24].

### Идентификация нкРНК

Тотальную РНК из клеток, ядер и цитоплазмы выделяли с помощью RNeasy Mini Kit ("Invitrogen"). Подготовку библиотек для секвенирования проводили при помощи TruSeq Small RNA Library Preparation Kit ("Illumina", США) по протоколу производителя. Секвенирование осуществляли при помощи секвенатора MiSeq System ("Illumina"), анализ данных проводили по методике, описанной Lopez и соавт. [25].

### Статистический анализ

Статистический анализ результатов осуществляли по критерию Стьюдента при помощи программы Statistica 9.0. Результаты представляли в виде средних значений ± стандартное отклонение. Различия считали статистически достоверными при  $p=0,05$ . Для изучения зависимости между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантами Casp-2 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки ранжировали по уровню экспрессии EndoG и

Таблица 3. ДНК-олигонуклеотиды, используемые для блокирования активности EGPO

№	Последовательность 5' – 3'
1	TCGAGAGTGAAAGGACAAACGAGG
2	GGACAAACGAGGAGAGTCCACGAT
3	AGAGTCCACGATAACCTAGGGAAC
4	AACCTAGGGAACCCGTGGAGGAAG
5	CCGTGGAGGAAGACAAGTGACGAC
6	ACAAGTGACGACGGTGGCGGAGAG
7	GGTGGCGGAGAGAACGAGACATTC
8	AACGAGACATTCACAGAGGGTTAC
9	ACAGAGGGTTACGTACCCACACG
10	GTACCCACACGACCCTGAACCCG
11	ACCCTGAACCCGTGGGTACCGAG
12	TCGGGTACCGAGAGTCCGACCAGT

разделяли на две группы. Клетки с уровнем экспрессии EndoG ниже медианы считали клетками с низкой экспрессией EndoG, клетки с уровнем экспрессии EndoG выше медианы считали клетками с высокой экспрессией EndoG. В данных группах провели корреляционный анализ по Пирсону уровней экспрессии EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 при помощи программы Statistica 9.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

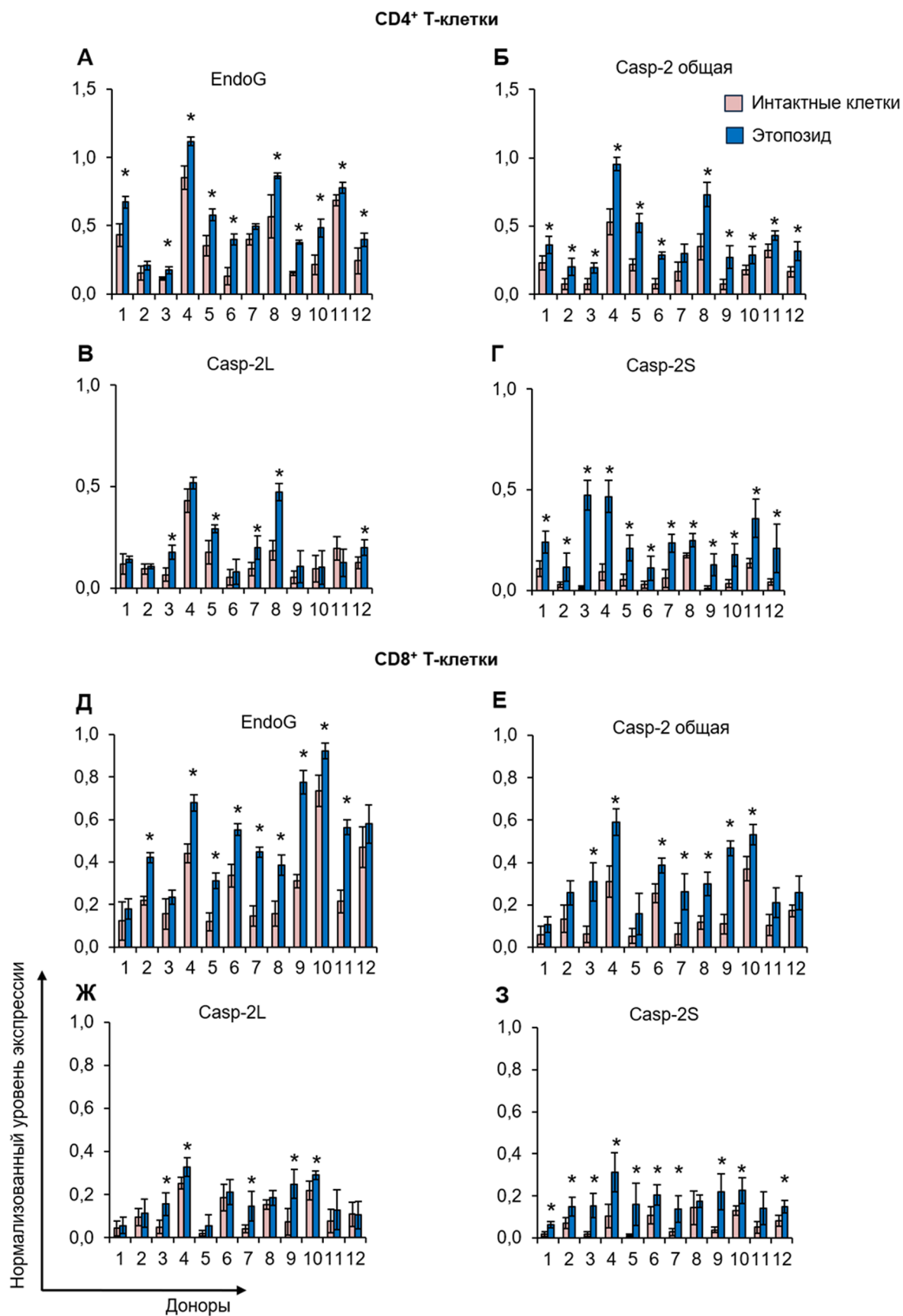
### Экспрессия EndoG коррелирует с экспрессией сплайс-вариантов Casp-2

Для определения взаимосвязи EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 произведена оценка уровней мРНК EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах двенадцати доноров методом количественной ПЦР. Инкубация клеток с 5 мкМ этопозидом (не летальная концентрация, подобрана нами в предварительных экспериментах) приводила к достоверному увеличению экспрессии EndoG в большинстве образцов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (рис. 1). Этопозид вызывал увеличение экспрессии как общей Casp-2, так и каждого из сплайс-вариантов. Проведено ранжирование клеток по уровню экспрессии EndoG. Медиана составила 0,296 для CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и 0,218 для CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. После инкубации с этопозидом медиана составила 0,480 и 0,503 для CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов соответственно.

Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG со сплайс-вариантами Casp-2 представлены в таблице 4. Полученные результаты согласуются с данными о том, что этопозид вызывает увеличение экспрессии Casp-2S [3, 26, 27]. Поскольку корреляция между экспрессией EndoG и сплайс-вариантами Casp-2 была наиболее выраженной у CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, данные клетки были выбраны для дальнейшей работы.

### Увеличение AC Casp-2 при сверхэкспрессии EndoG

Для установления возможной роли EndoG в индукции AC Casp-2 CD4<sup>+</sup> Т-клетки трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP. Эффективность трансфекции была высокой и приближалась к 98–99% в течение 8 ч после трансфекции. Трансфекция клеток геном EndoG сопровождалась достоверным увеличением количества общей мРНК Casp-2 (рис. 2А). Анализ уровня мРНК сплайс-вариантов Casp-2 показал, что, несмотря на увеличение общей Casp-2, происходит понижение количества мРНК Casp-2L (рис. 2Б) при одновременном увеличении мРНК Casp-2S (рис. 2В). В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, ферментативная активность Casp-2 достоверно снижалась уже через 16 ч после трансфекции (рис. 2Г). Не выявлено изменения пропорции сплайс-вариантов Casp-2 и ферментативной активности при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP. Результат данного эксперимента указывает на то, что понижение ферментативной активности, вероятнее всего, происходит за счёт уменьшения количества полноразмерного Casp-2L сплайс-варианта, поскольку именно этот вариант обладает каталитической активностью.

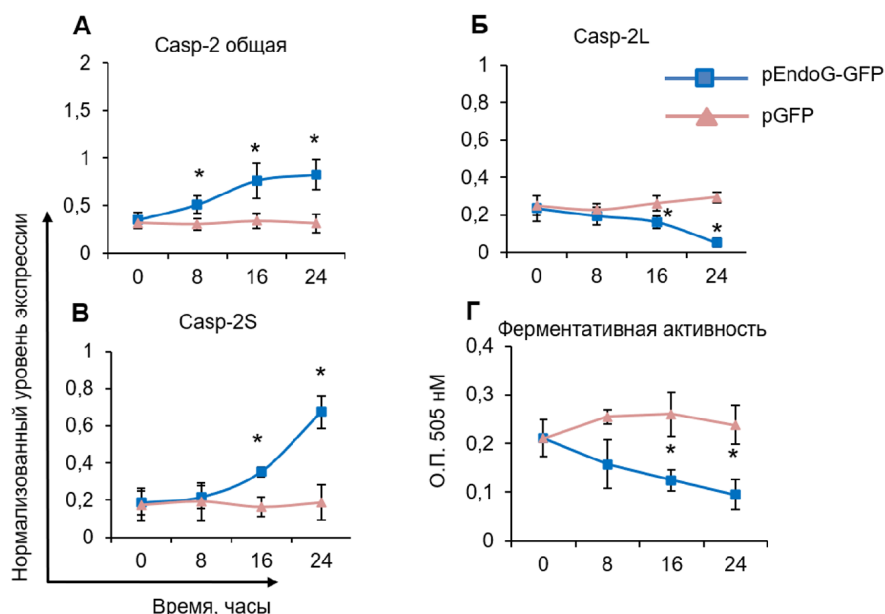


**Рисунок 1.** Зависимость между уровнями мРНК EndoG, Casp-2S и Casp-2L в Т-лимфоцитах до и после обработки этопозидом. Уровни мРНК (А, Д) EndoG и (Б, Е) общей мРНК Casp-2, (В, Ж) Casp-2L и (Г, З) Casp-2S в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсной рРНК 18S. \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к интактным клеткам.

# ИНДУКЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА Casp-2 ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ EndoG

Таблица 4. Коэффициенты корреляции мРНК EndoG и сплайс-вариантов Casp-2

Сплайс-вариант Casp-2	Низкий уровень мРНК EndoG		Высокий уровень мРНК EndoG	
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Casp-2L (Контроль)	0,701 (n=6)	0,554 (n=7)	0,722 (n=6)	0,540 (n=5)
Casp-2L (Этопозид)	0,747 (n=6)	0,697 (n=6)	0,836 (n=6)	0,709 (n=6)
Casp-2S (Контроль)	0,612 (n=6)	0,646 (n=6)	0,608 (n=6)	0,677 (n=6)
Casp-2S (Этопозид)	0,815 (n=6)	0,735 (n=6)	0,702 (n=6)	0,706 (n=6)



**Рисунок 2.** Уровни мРНК сплайс-вариантов Casp-2 в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах человека, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP. Уровень мРНК (А) общей Casp-2, (Б) Casp-2L и (В) Casp-2S в CD4<sup>+</sup> клетках в течение 24 ч после трансфекции, измеренная методом количественной ПЦР. (Г) Ферментативная активность Casp-2 в трансфицированных клетках. n=4, \* – p≤0,05 по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

## Индукция AC Casp-2 в цитоплазме и ядрах в результате действия recEndoG

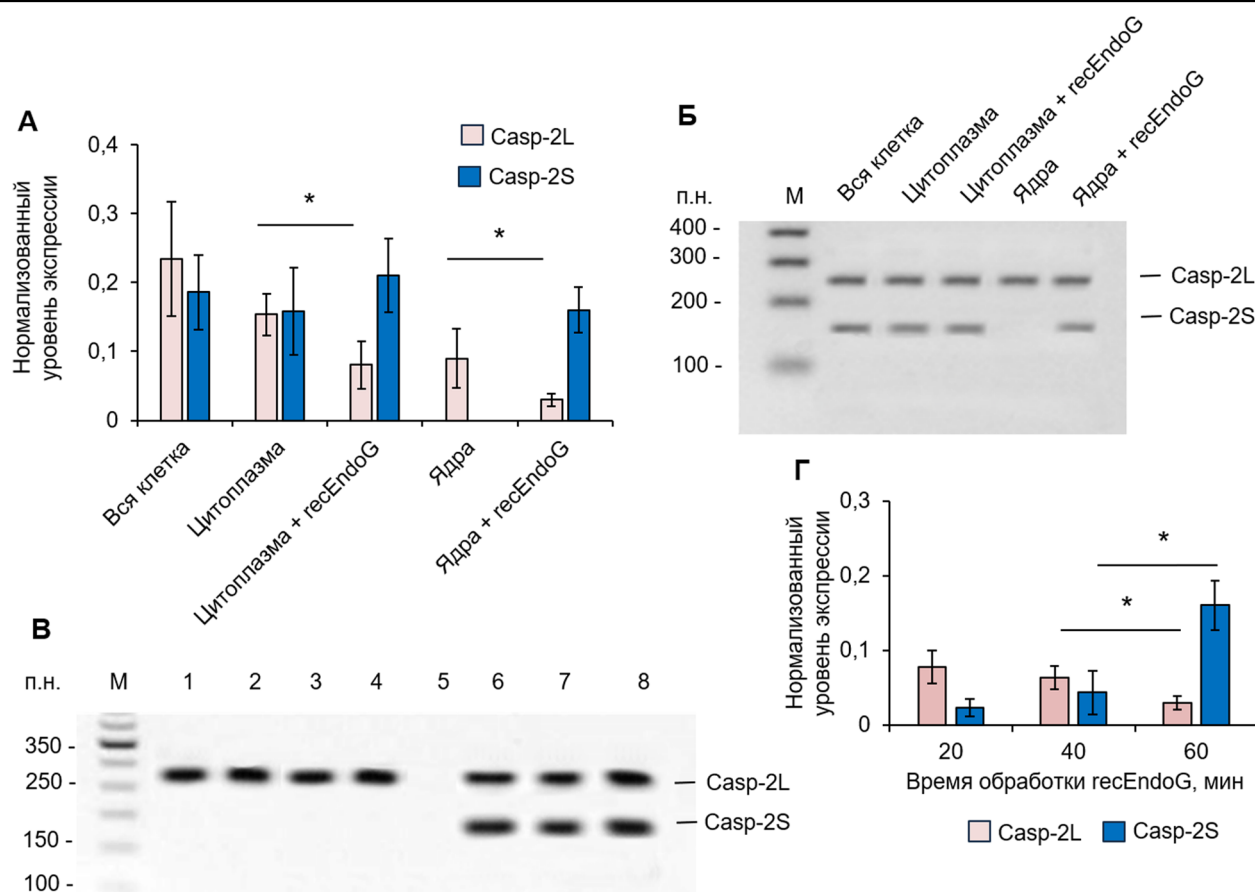
Апоптотическая эндонуклеаза EndoG в норме локализуется в межмембранном пространстве митохондрий и интернализуется в ядро при развитии апоптотических процессов гидролиза ДНК [28]. Из CD4<sup>+</sup> Т-клеток были выделены ядра и цитоплазма. Последующий анализ количественной ПЦР показал, что в ядрах полностью отсутствует мРНК Casp-2S (рис. 3). Приблизительно одинаковое количество Casp-2L обнаружено в цитоплазме и ядрах. Инкубация ядер и цитоплазмы с recEndoG в течение часа вызывало появление Casp-2S в ядрах и достоверное увеличение в цитоплазме. При этом происходило уменьшение экспрессии Casp-2L. Поскольку в ядрах CD4<sup>+</sup> Т-клеток отсутствовал вариант Casp-2S и появлялся только в присутствии recEndoG, ядра этих клеток стали моделью для дальнейшего изучения влияния EndoG на AC Casp-2.

Ранее было показано, что в результате своей РНКазной активности EndoG синтезирует малые РНК, модулирующие AC (EGPO) [16–18]. Для доказательства того, что EndoG аналогично действует на Casp-2, тотальную ДНК и РНК выделяли из ядер CD4<sup>+</sup> Т-клеток и инкубировали с recEndoG или контрольными неспецифическими РНКазой (РНКазой А или РНКазой 1). Обработанные нуклеазами ДНК и РНК очищали от белков и инкубировали с ядрами

CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Анализ количества Casp-2 осуществляли методом количественной ПЦР. Этот эксперимент показал, что именно РНК, а не ДНК, подвергнутая расщеплению recEndoG, способна индуцировать Casp-2S в ядрах данных клеток (рис. 3В). Ни РНКазы А, ни РНКазы 1 не вызывали подобного эффекта. Изменение экспрессии сплайс-вариантов Casp-2 при инкубации ядер клеток с обработанной recEndoG РНК зависело от времени (рис. 3Г). Увеличение времени обработки РНК вызывало достоверное увеличение количества мРНК Casp-2S и снижение количества мРНК Casp-2L.

## Идентификация РНК-олигонуклеотида EGPO, производённого EndoG, и его экспрессия

Поиск в базе GenBank последовательности, подобной экзону 9 Casp-2, не дал результатов. Поэтому мы предположили, что образующийся под действием EndoG олигонуклеотид (EGPO), способный индуцировать AC Casp-2, появляется из длинной некодирующей РНК (нкРНК), которая синтезируется с цепи ДНК, комплементарной транскрибирующей цепи Casp-2. Для проверки этой гипотезы и установления длины EGPO обработанную recEndoG РНК ядер CD4<sup>+</sup> Т-клеток инкубировали с каждым из 24-членных ДНК-олигонуклеотидов, комплементарных участкам интрона 8, экзона 9 и интрона 9 потенциальной нкРНК Casp-2,



**Рисунок 3.** Уровни мРНК сплайс-вариантов Casp-2 в цитоплазме и ядрах CD4<sup>+</sup> Т-клеток после обработки recEndoG. (А) Уровни мРНК сплайс-вариантов Casp-2. (Б) Электрофорез в агарозном геле ПЦР-амплификатов сплайс-вариантов Casp-2. (В) Индукция AC Casp-2 в ядрах CD4<sup>+</sup> Т-клеток ПЦР-амплификатов сплайс-вариантов Casp-2: 1 – ядра; 2 – ядра после инкубации с ДНК, обработанной recEndoG; 3 – ядра после инкубации с РНК, обработанной РНКазой А; 4 – ядра после инкубации с РНК, обработанной РНКазой 1; 5 – РНК, обработанная recEndoG; 6 – ядра после инкубации с РНК, обработанной recEndoG в течение 20 мин; 7 – ядра после инкубации с РНК, обработанной recEndoG в течение 40 мин; 8 – ядра после инкубации с РНК, обработанной recEndoG в течение 60 мин. (Г) Уровни мРНК сплайс-вариантов Casp-2 в ядрах, инкубированных с РНК, обработанной recEndoG. n=4, \* – p≤0,05. М – маркер молекулярных масс.

и добавляли к ядрам CD4<sup>+</sup> Т-клеток (рис. 4А). Данные олигонуклеотиды способны образовывать нековалентные комплексы с EGPO и блокировать его действие [24]. Анализ ПЦР показал, что сплайсинг блокировали четыре олигонуклеотида, что позволило определить размер EGPO на уровне 60 нуклеотидов (рис. 4Б). Нуклеотидная последовательность EGPO представлена на рисунке 4А.

Исследование экспрессии EGPO методом количественной ПЦР показало, что трансфекция EndoG вызывает достоверное увеличение количества EGPO (рис. 4В). В цитоплазме, обработанной recEndoG, также обнаружено увеличение экспрессии EGPO (рис. 4Г). В intactных ядрах клеток EGPO не был обнаружен и появился после инкубации с recEndoG. Эти данные согласуются с отсутствием сплайс-варианта *Casp-2S* в ядрах intactных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и его появлением при трансфекции геном EndoG или обработке ядер recEndoG.

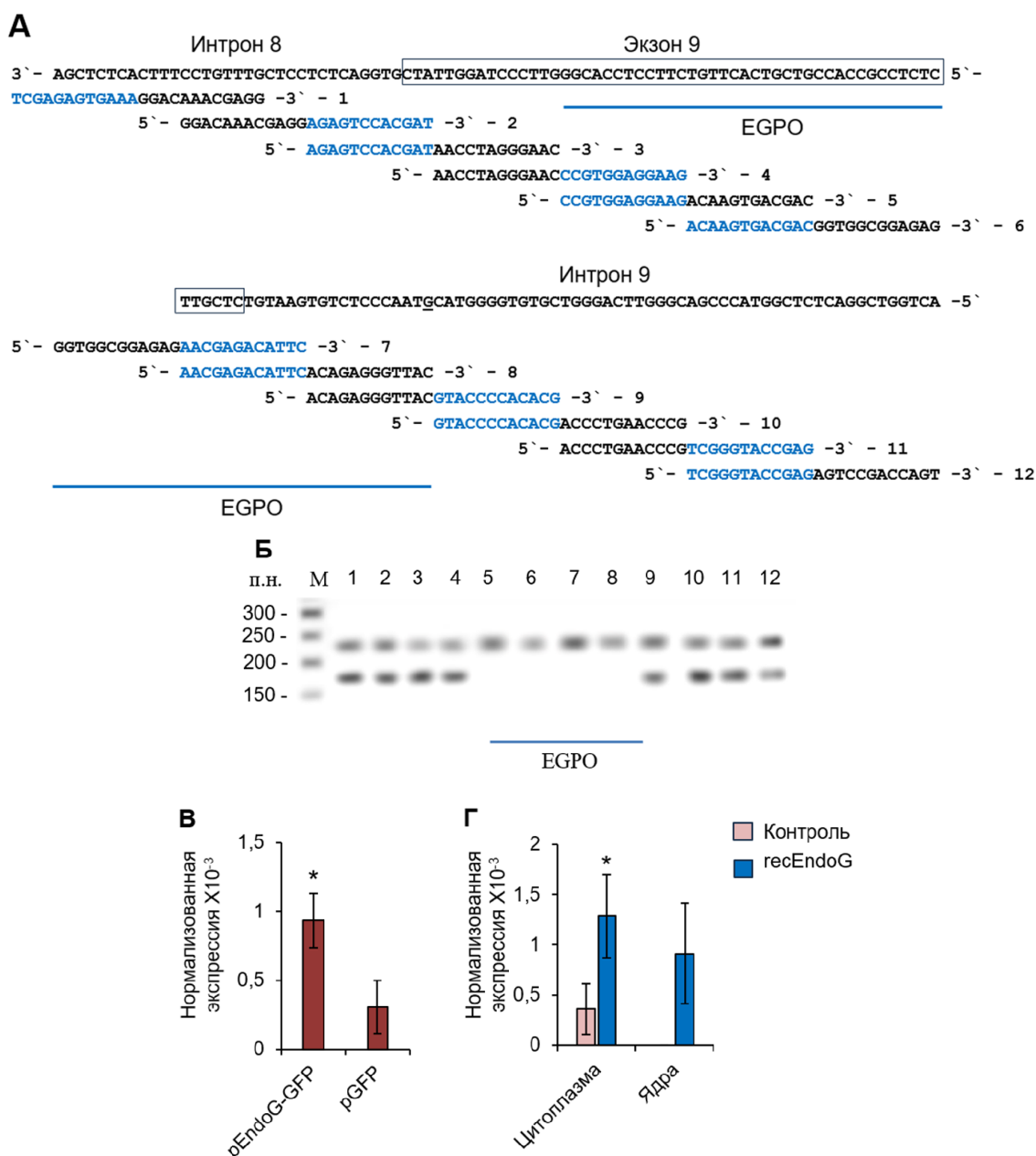
#### Индукция AC Casp-2 синтезированным EGPO

Для подтверждения того, что EGPO способен активировать AC пре-мРНК Casp-2, ядра CD4<sup>+</sup> Т-клеток

инкубировали с искусственно синтезированным EGPO или контрольной неспецифичной РНК равного размера. Данный эксперимент показал, что синтезированный EGPO способен дозозависимо активировать AC при концентрации 10<sup>-7</sup> М и выше (рис. 5А–Г). При увеличении концентрации EGPO наблюдали повышение уровня мРНК варианта *Casp-2S* и понижение уровня мРНК Casp-2L. Таким образом, EGPO, вероятно, действует в качестве эндогенного переключателя сплайсинга олигонуклеотида и вызывает AC Casp-2.

Поскольку EGPO индуцирует AC *Casp-2* в экспериментах с бесклеточной системой (то есть в ядрах и цитоплазме), для проверки того, что EGPO активен в клетках, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты трансфицировали синтезированным EGPO или контрольной РНК. Методом количественной ПЦР было показано, что уровень мРНК варианта *Casp-2S* достоверно повышался в клетках, трансфицированных EGPO (рис. 5Д). При этом наблюдалось достоверное снижение количества мРНК *Casp-2L*. Изменение пропорции сплайс-вариантов Casp-2 сопровождалось снижением ферментативной активности в образцах (рис. 5Е).





**Рисунок 4.** Регуляция АС EGPO и экспрессия EGPO. (А) Схематическое положение антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов по отношению к нкРНК Casp-2 и EGPO. (Б) Электрофорез в агарозном геле продуктов ПЦР-амплификатов Casp-2 в ядрах, инкубации с ДНК-олигонуклеотидами. М – маркер молекулярных масс. Уровень экспрессии EGPO (В) в CD4<sup>+</sup> Т-клетках, трансфицированных плазмидами pEndoG-GFP или pGFP, и в (Г) в цитоплазме и ядрах клеток, после обработки resEndoG. Экзон 9 выделен рамкой.

#### Идентификация и экспрессия нкРНК

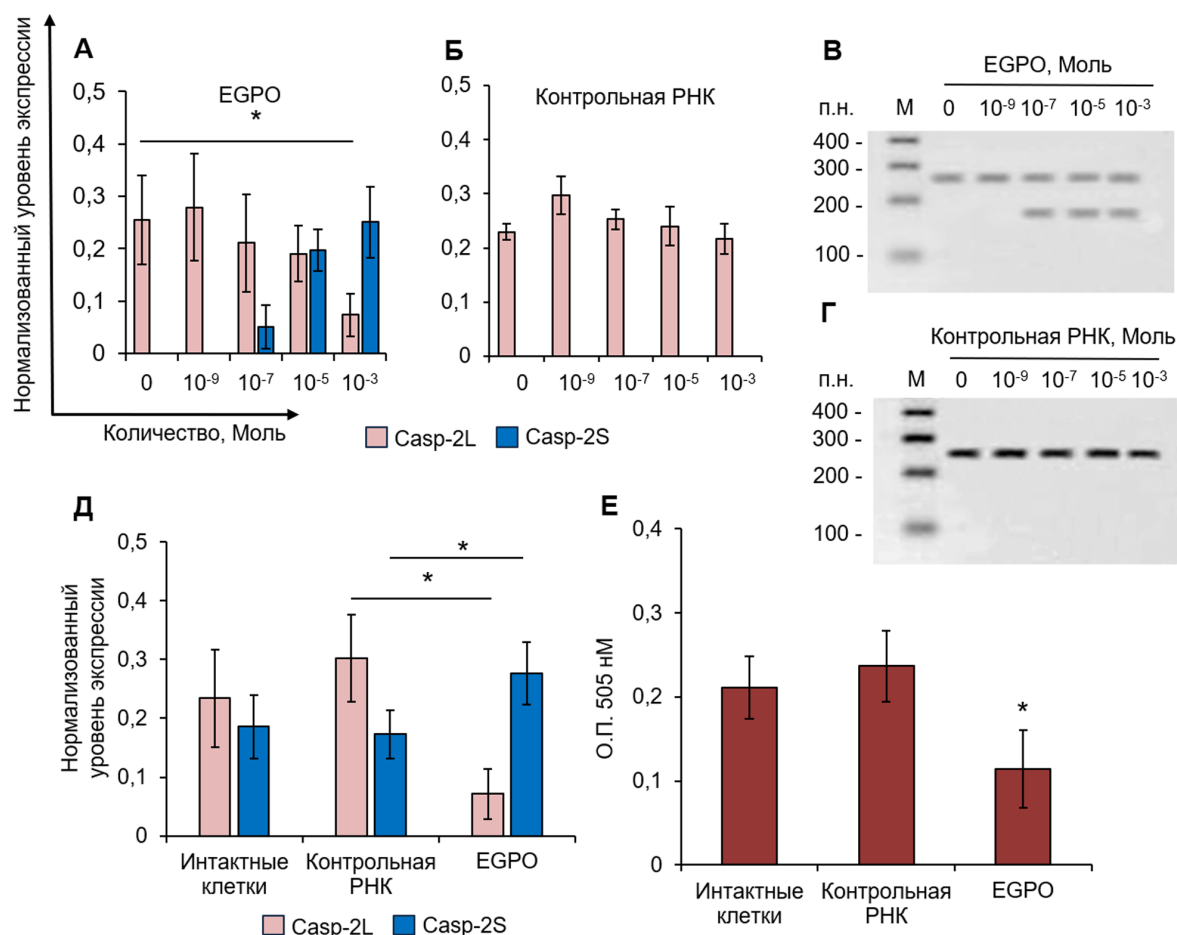
Для идентификации нкРНК, из которой EndoG вырезает EGPO, проводили анализ секвенирования тотальной РНК. Была идентифицирована нкРНК, которая перекрывает окончание интрона 6, полностью экзоны 7, 8 и 9, интроны 7 и 8, а также начало интрона 9 цепи пре-мРНК Casp-2 (рис. 6А).

При помощи количественной ПЦР определён уровень нкРНК в клетках, трансфицированных плазмидами EndoG-GFP или GFP, и в ядрах и цитоплазме клеток, обработанных resEndoG. Трансфекция геном EndoG не вызвала изменения уровня нкРНК (рис. 6Б). В ядрах и цитоплазме,

обработанной resEndoG, изменения уровня нкРНК не выявлено (рис. 6В). Из данного эксперимента можно сделать вывод, что постоянное количество нкРНК синтезируется и локализуется в ядрах и цитоплазме, а количество активной EGPO, индуцирующей АС Casp-2, регулируется активностью EndoG.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Первое наблюдение способности эндонуклеазы EndoG индуцировать АС была показана в нашей работе по индукции апоптотических эндонуклеаз при сверхэкспрессии EndoG [29]. Обнаружено понижение экспрессии мРНК дезоксирибонуклеазы I



**Рисунок 5.** Уровень мРНК сплайс-вариантов Casp-2 после воздействия EGPO. Уровни экспрессии сплайс-вариантов Casp-2 в ядрах, после обработки (А) EGPO или (Б) контрольной неспецифической РНК. Электрофорез в агарозном геле ПЦР-амплификатов сплайс-вариантов Casp-2 в ядрах, после обработки (В) EGPO или (Г) контрольной неспецифической РНК. (Д) Уровни мРНК сплайс-вариантов Casp-2 в клетках через 24 ч после трансфекции. (Е) Ферментативная активность Casp-2 в трансфицированных клетках.  $n=4$ , \* —  $p \leq 0,05$ . М — маркер молекулярных масс.

(ДНКазы I) при сохранении количества белка. Позднее именно индукция АС пре-мРНК ДНКазы I объяснила этот эффект. Аналогичным образом, индукция АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT вызывала гибель опухолевых клеток [16] и лимфоцитов [18]. Был описан эффект гибели и злокачественной трансформации лимфоцитов человека или мыши под действием EndoG-индуцированного АС *hTERT* [30–36]. Молекулярный механизм действия EndoG на систему АС был описан для первичных транскриптов гена hTERT [22, 37] и ДНКазы I [17]. При секвенировании тотальной РНК лимфоцитов человека и мыши после индукции EndoG был идентифицирован ряд других генов, АС которых изменён [38].

В данной работе изучен АС, являющийся результатом РНКазной активности EndoG. Механизм АС можно описать по следующей гипотетической схеме: с кодирующей цепи гена *Casp-2* синтезируется пре-мРНК, а с матричной (некодирующей) цепи синтезируется нкРНК размером 1016 нуклеотидов (рис. 7А). EndoG вырезает из нкРНК 60-членный РНК-олигонуклеотид EGPO,

комплементарный пре-мРНК Casp-2 в месте соединения экзона 9 и интрона 9 (рис. 7Б). Взаимодействие EGPO и пре-мРНК Casp-2 вызывает АС и появление варианта Casp 2S. В подтверждение этого механизма говорят следующие факты, приведённые в данной работе. Повышенный синтез EndoG вызывал увеличение экспрессии Casp 2S и понижение экспрессии Casp 2L варианта Casp-2, что приводило к снижению протеазной активности этого фермента [5]. Обработка цитоплазмы и ядер клеток gesEndoG вызывало увеличение экспрессии мРНК Casp-2S и снижение мРНК полноразмерного Casp-2L варианта. Расщепление gesEndoG тотальной РНК из клеточных ядер и последующая инкубация этой РНК с ядрами приводило к появлению в них Casp-2S сплайс-варианта. Поскольку инкубация ядер с ДНК, обработанной gesEndoG, не приводило к АС Casp-2, эти данные указывают на принадлежность фактора, вызывающего АС именно к нкРНК, а также на его происхождение в результате РНКазной активности EndoG (поскольку действие РНКаз 1 и А не вызывало АС). Это свидетельствует в пользу того, что активный РНК-олигонуклеотид (EGPO) “вырезается” EndoG из нкРНК.



**А**

Инtron 6 AGAATATGTGTCTGAACTCATATGCATTTTTCTGGTGAGTCCATAGCTTTCTTTAGTCTCTCAA  
AAGGTCTCTTCTTTATCATTTGACCACAGGAATATACATAAAGCGTTTTATCTTCTAATAGCTTA  
GGGTTTCAAAAAGAAACCAAACTTTGATGCTTATGTTGGTGCTGACCTTAGTGACACAACACTAAA  
CATTCCTTCTTTTAGAAATGCAAGAGAACTGCAGAAATTTGCACAGTTACCTGCACACCGAGT

Экзон 7 CACGGACTCCTGCATCGTGGCACTCCTCTCGCATGGTGTGGAGGGCGCCATCTATGGTGTGGATG  
GGAAACTGCTCCAGTGGGATACCCCTGGTGGAGCCAAGCTGTTGAAACCAGGCTGCTTTACCTCC  
Инtron 7 TGCCTGTGTCTGTCAAGTGATGGCTACTGTTGCATGTGTAGGACTTAGGAGGCCCGCTGAATG  
CTTAACCTCTCTTCTCTCTTTCTTTCTGGCACTCCAAGAGGTTTTTCAGCTCTTTGACAACG

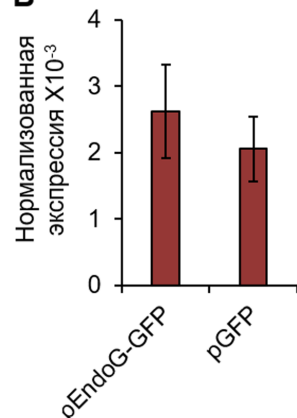
Экзон 8 CCAACTGCCCAAGCCTACAGAACAACCAAAAATGTTCTTCATCCAGGCCTGCCGTGGAGGTAGT  
GCCCTAGCAGACCAGCACCTGGGTGGTGGCTCCTGGGCAGCCTCCACCAGCTCTCACTTTCTCTG

Инtron 8 TTTGCTCCTCTCAGGTGCTATTGGATCCCTTGGGACCTCCTTCTGTTCACTGCTGCCACCGCCT

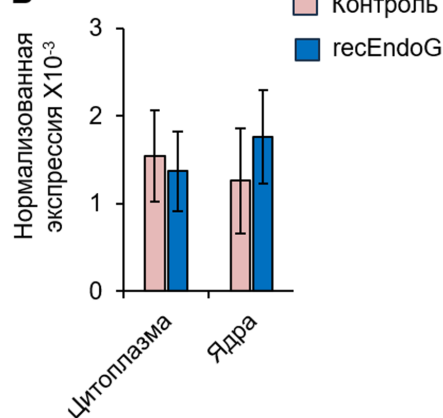
Экзон 9 CTCTTGTCTCTTAAGTGTCTCCCAATGCATGGGGTGTGCTGGGACTTGGGCAGCCCATGGCTCTC  
AGGCTGGTCAGCTCTCCGTGCACCACCATATCCTGTTTTCAAGTCTCTTATCCCGTGTCTTTGCC

Инtron 9 TTCCTTTCTGAGAACTCTTACTCTTTCTGTGCTTCATTAAGTCTGGTGCCTTTTTTTGGTTAC  
TCATTCCAGTTACGGATTTTGTATCTGTCTTTCTCTGTCCTTCTATTTTATCTCCTTTCTTTCTTC  
ACTCTTTGTCTTTTCACTTGTTCATATACCTCCCT

**Б**

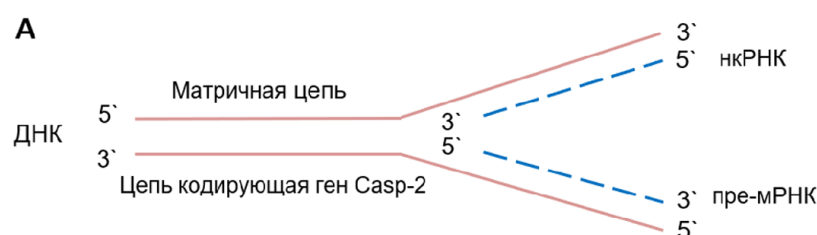


**В**

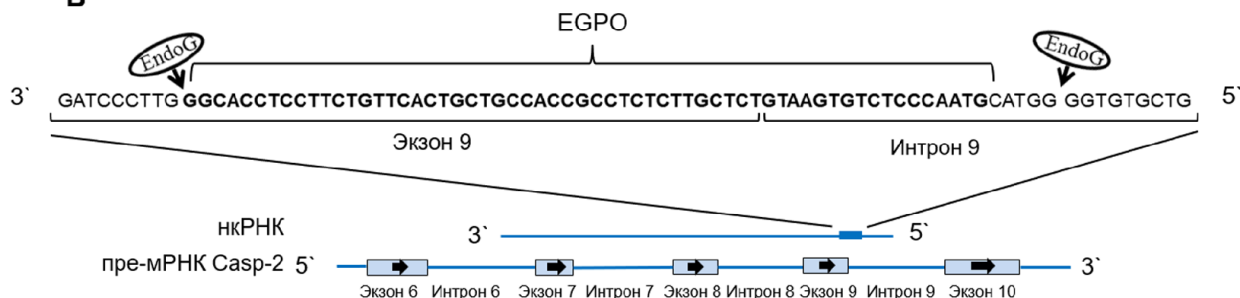


**Рисунок 6.** Нуклеотидная последовательность нкРНК и её уровень синтеза. (А) Определённая методом секвенирования по Сэнгеру нуклеотидная последовательность нкРНК. Показаны соответствующие интронам и экзонам участки мРНК, а также место расположения EGPO. Экзоны выделены рамкой. EGPO обозначен жирным шрифтом.

**А**



**Б**



**Рисунок 7.** Гипотетическая схема описанного механизма. (А) Схема расположения мест синтеза нкРНК и пре-мРНК Casp-2. (Б) Гипотетическая схема расположения нкРНК и Casp-2 при индукции АС эндонуклеазой EndoG пре-мРНК Casp-2 (см. пояснения в тексте).

Наиболее вероятным происхождением нкРНК мы считаем её синтез на матричной (некодирующей) цепи гена *Casp-2*. Приблизительные размер и нуклеотидную последовательность EGPO удалось установить, используя метод гибридизации ДНК-олигонуклеотидов с предполагаемой EGPO. Данный метод позволил установить размер EGPO с минимальной погрешностью в 12 нуклеотидов с 3' и 5' концов. Уменьшение размера ДНК-олигонуклеотидов вызывало снижение их специфичности к EGPO и не приводило к ингибированию АС. На границах EGPO располагаются G-богатые участки (GGG на 3' и GGGG на 5' конце молекулы), которые, вероятно, и являются участком действия EndoG. Искусственно синтезированный EGPO вызывал активацию АС *Casp-2* в ядрах CD4<sup>+</sup> Т-клеток и самих CD4<sup>+</sup> Т-клетках при трансфекции и приводил к понижению протеазной активности *Casp-2*.

Ранее идентификация активных олигонуклеотидов, производимых EndoG и способных модулировать АС, а также их специфичных сайтов на целевые пре-мРНК, позволила использовать их для модуляции клеточных процессов [19]. Переключающие сплайсинг-олигонуклеотиды были применены для подавления активности теломеразы и пролиферации опухолевых клеток [39], подавлению активности *Casp-2* [23] и апоптоза в Т-лимфоцитах человека [40], определения цитопротекторной активности полиаминов [41] и модуляции пролиферативной и супрессорной активности регуляторных Т-клеток человека [42].

В нашей работе экспрессия EGPO увеличивалась при трансфекции клеток геном EndoG и обработки цитоплазмы и ядер гесEndoG. С целью установления нуклеотидного субстрата для действия EndoG при производстве EGPO мы использовали секвенирование тотальной РНК, которое позволило определить нуклеотидную последовательность нкРНК. Экспрессия нкРНК в клетках не зависела от действия EndoG. Это косвенно указывает на то, что количество произведенного EGPO регулируется активностью EndoG, но не уровнем экспрессии нкРНК.

Результаты исследования EndoG-индуцированного АС легли в основу работ о влиянии АС на клеточные процессы. Была определена роль АС hTERT на пролиферацию регуляторных Т-клеток, человека [43–46] и мыши [47], а также его роль в пролиферации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [48].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АС *Casp-2* является регулятором активности данного фермента и определяет развитие и ингибирование апоптотических процессов в клетках, однако, механизм регуляции АС изучен недостаточно полно. Результатом данной работы стало описание нескольких явлений. Показана способность апоптотической эндонуклеазы EndoG вызывать АС мРНК *Casp-2* в ядрах и цитоплазме клеток. Показано, что малая РНК EGPO, образуемая из нкРНК, вызывает АС по механизму, сходному с действием переключающих сплайсинг

олигонуклеотидов. Таким образом, в данной работе мы показали, что механизм действия EndoG на систему АС пре-РНК *Casp-2* аналогичен таковому для hTERT [16] и ДНКазы I [17]. Понимание механизма влияния EndoG на систему АС дало направление работам по определению влияния АС и апоптотических ферментов на пролиферативные процессы в лимфоцитах.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Елисеевой Д.Д. (Научный центр неврологии) за предоставление образцов крови здоровых доноров.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Группа из 12 условно здоровых доноров была набрана амбулаторным отделением Научно-исследовательского центра неврологии. Все процедуры с пациентами проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 года и ее последующими обновлениями, а также с этическими стандартами Национального исследовательского комитета. Исследование было одобрено комитетом по этике Научного центра неврологии (протокол номер 12-3 от 28 декабря 2020 г.). Письменное согласие получено от всех доноров, участвовавших в исследовании.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bao Q., Shi Y. (2007) Apoptosome: A platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.*, **14**(1), 56–65. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402028
2. Vakifahmetoglu-Norberg H., Zhivotovsky B. (2010) The unpredictable caspase-2: What can it do? *Trends Cell Biol.*, **20**(3), 150–159. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.12.006
3. Wotawa A., Solier S., Logette E., Solary E., Corcos L. (2002) Differential influence of etoposide on two caspase-2 mRNA isoforms in leukemic cells. *Cancer Lett.*, **185**(2), 181–189.
4. Aravind L., Dixit V.M., Koonin E.V. (1999) The domains of death: Evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.*, **24**(2), 47–53.
5. Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H., Yuan J. (1994) Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell*, **78**(5), 739–750.
6. Jiang Z.H., Zhang W.J., Rao Y., Wu J.Y. (1998) Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(16), 9155–9160.

7. Robertson J.D., Enoksson M., Suomela M., Zhivotovsky B., Orrenius S. (2002) Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome *c* release during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **277**(33), 29803–29809. DOI: 10.1074/jbc.M204185200
8. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Tamm C., Heidari N., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2008) DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death Differ.*, **15**(3), 555–566. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402286
9. Fushimi K., Ray P., Kar A., Wang L., Sutherland L.C., Wu J.Y. (2008) Up-regulation of the proapoptotic caspase 2 splicing isoform by a candidate tumor suppressor, RBM5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(41), 15708–15713. DOI: 10.1073/pnas.0805569105
10. Tu S., McStay G.P., Boucher L.-M., Mak T., Beere H.M., Green D.R. (2006) *In situ* trapping of activated initiator caspases reveals a role for caspase-2 in heat shock-induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, **8**(1), 72–77. DOI: 10.1038/ncb1340
11. Peart M.J., Tainton K.M., Ruefli A.A., Dear A.E., Sedelies K.A., O'Reilly L.A., Waterhouse N.J., Trapani J.A., Johnstone R.W. (2003) Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.*, **63**(15), 4460–4471.
12. Dahal G.R., Karki P., Thapa A., Shah Nawaz M., Shin S.Y., Lee J.S., Cho B., Park I.-S. (2007) Caspase-2 cleaves DNA fragmentation factor (DFF45)/inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD). *Arch. Biochem. Biophys.*, **468**(1), 134–139. DOI: 10.1016/j.abb.2007.09.007
13. Brad A.M., Hendricks K.E.M., Hansen P.J. (2007) The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of caspase-9 activation and caspase-mediated DNA damage. *Reproduction (Cambridge, England)*, **134**(6), 789–797. DOI: 10.1530/REP-07-0146
14. Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N., Fukuyama H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ.*, **10**(1), 108–116. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401161
15. Ruiz-Carrillo A., Renaud J. (1987) Endonuclease G: A (dG)n X (dC)n-specific DNase from higher eukaryotes. *EMBO J.*, **6**(2), 401–407. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb04769.x
16. 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) Эндонуклеаза EndoG индуцирует альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT и гибель опухолевых клеток. *Биомедицинская химия*, **62**(3), 239–250. [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) Apoptotic endonuclease EndoG induces alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT and death of tumor cells. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **62**(3), 239–250.] DOI: 10.18097/PBMC20166203239
17. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Plyasova A.A., Sokolov N.N. (2019) Endonuclease G modulates the alternative splicing of deoxyribonuclease 1 mRNA in human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and prevents the progression of apoptosis. *Biochimie*, **157**, 158–176. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.11.020
18. Zhdanov D.D., Vasina D.A., Grachev V.A., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Sokolov N.N. (2017) Alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT generated by apoptotic endonuclease EndoG induces human CD4<sup>+</sup> T cell death. *Eur. J. Cell Biol.*, **96**(7), 653–664. DOI: 10.1016/j.ejcb.2017.08.004
19. Жданов Д.Д. (2021) Роль эндонуклеазы EndoG в регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК апоптотических белков. Дисс. докт. наук, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва. [Zhdanov D.D. (2020) Rol' endonukleazy EndoG v regulyacii al'ternativnogo splajsinga pre-mRNK apoptoticheskikh belkov. Diss. dokt. nauk, Institute of Biomedical Chemistry, Moscow.]
20. Laukova M., Alaluf L.G., Serova L.I., Arango V., Sabban E.L. (2014) Early intervention with intranasal NPY prevents single prolonged stress-triggered impairments in hypothalamus and ventral hippocampus in male rats. *Endocrinology*, **155**(10), 3920–3933. DOI: 10.1210/en.2014-1192
21. Pravdenkova S.V., Basnakian A.G., James S.J., Andersen B.J. (1996) DNA fragmentation and nuclear endonuclease activity in rat brain after severe closed head injury. *Brain Res.*, **729**(2), 151–155.
22. Жданов Д.Д., Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2016) Регуляция альтернативного сплайсинга каталитической субъединицы теломеразы hTERT апоптотической эндонуклеазой EndoG. *Биомедицинская химия*, **62**(5), 544–554. [Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2016) Apoptotic endonuclease EndoG regulates alternative splicing of human telomerase catalytic subunit hTERT. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **62**(5), 544–554.] DOI: 10.18097/PBMC20166205544
23. Жданов Д.Д., Плясова А.А., Гладиллина Ю.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2019) Ингибирование активности каспазы-2 в клетках Т-клеточной лимфомы человека Jurkat при помощи переключающего сплайсинг олигонуклеотида к её пре-мРНК. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **2**(3), e00108. [Zhdanov D.D., Plyasova A.A., Gladilina Yu.A., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Sokolov N.N. (2019) Inhibition of caspase-2 activity in human Jurkat T-cell lymphoma cells by splice switching oligonucleotide to its pre-mRNA. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **2**(3), e00108.] DOI: 10.18097/BMCRM00108
24. Nakama M., Kawakami K., Kajitani T., Urano T., Murakami Y. (2012) DNA-RNA hybrid formation mediates RNAi-directed heterochromatin formation. *Genes Cells*, **17**(3), 218–233. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01583.x
25. Lopez J.P., Diallo A., Cruceanu C., Fiori L.M., Laboissiere S., Guillet I., Fontaine J., Ragoussis J., Benes V., Turecki G., Ernst C. (2015) Biomarker discovery: Quantification of microRNAs and other small non-coding RNAs using next generation sequencing. *BMC Med. Genomics*, **8**, 35. DOI: 10.1186/s12920-015-0109-x
26. Droin N., Beauchemin M., Solary E., Bertrand R. (2000) Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade. *Cancer Res.*, **60**(24), 7039–7047.
27. Parent N., Sané A.-T., Droin N., Bertrand R. (2005) Procaspase-2S inhibits procaspase-3 processing and activation, preventing ROCK-1-mediated apoptotic blebbing and body formation in human B lymphoma Namalwa cells. *Apoptosis*, **10**(2), 313–322. DOI: 10.1007/s10495-005-0805-7
28. Ohsato T., Ishihara N., Muta T., Umeda S., Ikeda S., Mihara K., Hamasaki N., Kang D. (2002) Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur. J. Biochem.*, **269**(23), 5765–5770.
29. Zhdanov D.D., Fahmi T., Wang X., Apostolov E.O., Sokolov N.N., Javadov S., Basnakian A.G. (2015) Regulation of apoptotic endonucleases by EndoG. *DNA Cell Biol.*, **34**(5), 316–326. DOI: 10.1089/dna.2014.2772

30. Васина Д.А., Жданов Д.Д., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2017) Апоптотическая эндонуклеаза EndoG вызывает ингибирование активности теломеразы и злокачественную трансформацию CD4+ Т-клеток человека. Биохимия, **82**(1), 76–91. [Vasina D.A., Zhdanov D.D., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2017) Apoptotic endonuclease EndoG inhibits telomerase activity and induces malignant transformation of human CD4+ T cells. Biochemistry (Moscow), **82**(1), 24–37.] DOI: 10.1134/S0006297917010035
31. Жданов Д.Д., Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2017) Индуцированная цисплатином экспрессия апоптотической эндонуклеазы EndoG вызывает ингибирование активности теломеразы и злокачественную трансформацию CD4+ Т лимфоцитов человека. Биомедицинская химия, **63**(1), 13–26. [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) Cisplatin-induced apoptotic endonuclease EndoG inhibits telomerase activity and causes malignant transformation of human CD4+ T lymphocytes. Biomeditsinskaya Khimiya, **63**(1), 13–26.] DOI: 10.18097/PBMC20176301013
32. Жданов Д.Д., Васина Д.А., Орлова В.С., Орлова Е.В., Гришин Д.В., Гладиллина Ю.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2017) Индукция апоптотической эндонуклеазы EndoG повреждающими ДНК агентами вызывает альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT и ингибирование активности теломеразы в CD4+ и CD8+ Т лимфоцитах человека. Биомедицинская химия, **63**(4), 296–305. [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. (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+ and CD8+ T-lymphocytes. Biomeditsinskaya Khimiya, **63**(4), 296–305.] DOI: 10.18097/PBMC20176304296
33. Жданов Д.Д., Гладиллина Ю.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Гришин Д.В., Подобед О.В., Соколов Н.Н. (2017) Индукция альтернативного сплайсинга и ингибирование активности каталитической субъединицы теломеразы в Т, В и NK клетках человека апоптотической эндонуклеазой EndoG. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **164**(10), 479–483. [Zhdanov D.D., Gladilina Yu.A., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Grishin D.V., Podobed O.V., Sokolov N.N. (2018) Induction of alternative splicing and inhibition of activity of telomerase catalytic subunit by apoptotic endonuclease EndoG in human T, B, and NK cells. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, **164**(4), 478–482.] DOI: 10.1007/s10517-018-4016-y
34. Васина Д.А., Жданов Д.Д., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2017) Ингибирование активности теломеразы при сверхэкспрессии апоптотической эндонуклеазы EndoG в CD4+ Т клетках человека. Молекулярная медицина, **15**(6), 51–57. [Vasina D.A., Zhdanov D.D., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2017) Ingibirovanie aktivnosti telomerazy pri sverhekspressii apoptoticheskoy endonukleazy EndoG v CD4+ T kletkah cheloveka. Molekulyarnaya Medicina, **15**(6), 51–57.]
35. Жданов Д.Д., Гладиллина Ю.А., Орлова В.С., Гришин Д.В., Покровская М.В., Александрова С.С., Подобед О.В., Соколов Н.Н. (2018) Индукция альтернативного сплайсинга каталитической субъединицы теломеразы апоптотической эндонуклеазой EndoG в лимфоцитах мыши и крысы. Цитология, **60**(2), 104–115. [Zhdanov D.D., Gladilina Yu.A., Orlova V.S., Grishin D.V., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Podobed O.V., Sokolov N.N. (2018) Indukciya al'ternativnogo splajsinga kataliticheskoy sub'edinicy telomerazy apoptoticheskoy endonukleazoy EndoG v limfocitah myshi i krysy. Citologiya, **60**(2), 104–115.] DOI: 10.31116/tsitol.2018.02.05
36. Жданов Д.Д., Габашвили А.Н., Гладиллина Ю.А., Гришин Д.В., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Плясова А.А., Соколов Н.Н. (2019) Характеристика опухолей, развившихся у бестимусных мышей после введения им злокачественно трансформированных ex vivo CD4+ Т-лимфоцитов человека. Цитология, **61**(2), 150–162. [Zhdanov D.D., Gabashvili A.N., Gladilina Yu.A., Grishin D.V., Pokrovskij V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Plyasova A.A., Sokolov N.N. (2019) Harakteristika opuholej, razvivshisya u bestimusnyh myshej posle vvedeniya im zlokachestvenno transformirovannyh ex vivo CD4+ T-limfocitov cheloveka. Citologiya, **61**(2), 150–162.] DOI: 10.1134/S004137711902010X
37. Жданов Д.Д., Покровский В.С., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2017) Внутриклеточная локализация апоптотической эндонуклеазы EndoG и сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы hTERT. Биохимия, **82**(8), 1163–1175. [Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2017) Intracellular localization of apoptotic endonuclease EndoG and splice-variants of telomerase catalytic subunit hTERT. Biochemistry (Moscow), **82**(8), 894–905.] DOI: 10.1134/S0006297917080041
38. Жданов Д.Д., Гладиллина Ю.А., Гришин Д.В., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2018) Индукция альтернативного сплайсинга каталитической субъединицы теломеразы TERT, каспазы-2, ДНКазы I и BCL-x апоптотической эндонуклеазой EndoG в CD4+ Т-лимфоцитах человека, мыши и крысы. Биоорганическая химия, **44**(1), 87–101. [Zhdanov D.D., Gladilina Yu.A., Grishin D.V., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2018) Apoptotic endonuclease EndoG induces alternative splicing of telomerase TERT catalytic subunit, caspase-2, DNase I, and BCL-x in human, murine, and rat CD4+ T lymphocytes. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, **44**(1), 90–103.] DOI: 10.7868/S0132342318010098
39. Zhdanov D.D., Plyasova A.A., Gladilina Yu.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Lobaeva T.A., Sokolov N.N. (2019) Inhibition of telomerase activity by splice-switching oligonucleotides targeting the mRNA of the telomerase catalytic subunit affects proliferation of human CD4+ Т lymphocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **509**(3), 790–796. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.186
40. Zhdanov D.D., Plyasova A.A., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Gladilina Yu.A., Sokolov N.N. (2020) Inhibition of nuclease activity by a splice-switching oligonucleotide targeting deoxyribonuclease 1 mRNA prevents apoptosis progression and prolong viability of normal human CD4(+) T-lymphocytes. Biochimie, **174**, 34–43. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.04.009

41. Gladilina Y.A., Bey L., Hilal A., Neborak E.V., Blinova V.G., Zhdanov D.D. (2022) Cytoprotective activity of polyamines is associated with the alternative splicing of RAD51A pre-mRNA in normal human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(3), 1863. DOI: 10.3390/ijms23031863
42. Blinova V.G., Gladilina Y.A., Abramova A.A., Eliseeva D.D., Vtorushina V.V., Shishparenok A.N., Zhdanov D.D. (2023) Modulation of suppressive activity and proliferation of human regulatory T cells by splice-switching oligonucleotides targeting FoxP3 pre-mRNA. *Cells*, **13**(1), 77. DOI: 10.3390/cells13010077
43. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Pokrovsky V.S., Sokolov N.N. (2018) Contact-independent suppressive activity of regulatory T cells is associated with telomerase inhibition, telomere shortening and target lymphocyte apoptosis. *Molecular Immunology*, **101**, 229–244. DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2018.07.017
44. Plyasova A.A., Zhdanov D.D. (2021) Alternative splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and its implications in physiological and pathological processes. *Biomedicines*, **9**(5), 526. DOI: 10.3390/biomedicines9050526
45. Blinova V.G., Novachly N.S., Gippius S.N., Hilal A., Gladilina Y.A., Eliseeva D.D., Zhdanov D.D. (2021) Phenotypical and functional characteristics of human regulatory T cells during *ex vivo* maturation from CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Appl. Sci.*, **11**(13), 5776. DOI: 10.3390/app11135776
46. Блинова В.Г., Гладиллина Ю.А., Елисеева Д.Д., Лобаева Т.А., Жданов Д.Д. (2022) Повышенная супрессорная активность трансформированных *ex vivo* регуляторных Т-клеток в сравнении с нестимулированными клетками того же донора. *Биомедицинская химия*, **68**(1), 55–67. [Blinova V.G., Gladilina Y.A., Eliseeva D.D., Lobaeva T.A., Zhdanov D.D. (2022) Increased suppressor activity of transformed *ex vivo* regulatory T-cells in comparison with unstimulated cells of the same donor. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(1), 55–67.] DOI: 10.18097/PBMC20226801055
47. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Sokolov N.N. (2018) Murine regulatory T cells induce death of effector T, B, and NK lymphocytes through a contact-independent mechanism involving telomerase suppression and telomere-associated senescence. *Cell. Immunol.*, **331**, 146–160. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.06.008
48. Жданов Д.Д., Лохонина А.В., Соколов Н.Н. (2017) Роль сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT в физиологических и патологических клеточных процессах. *Молекулярная медицина*, **15**(1), 3–9. [Zhdanov D.D., Lokhonina A.V., Sokolov N.N. (2017) Rol' splajs-variantov kataliticheskoy sub"ediny telomerazy cheloveka hTERT v fiziologicheskikh i patologicheskikh kletochnyh processah. *Molekulyarnaya Medicina*, **15**(1), 3–9.]

Поступила в редакцию: 22. 04. 2024.  
После доработки: 02. 06. 2024.  
Принята к печати: 26. 06. 2024.

## APOPTOTIC ENDONUCLEASE EndoG INDUCES ALTERNATIVE SPLICING OF CASPASE-2

D.D. Zhdanov\*, Yu.A. Gladilina, A.N. Shishparenok

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Caspase-2 (Casp-2) is an enzyme that regulates the development of apoptosis upon alternative splicing of its mRNA. The long form of Casp-2 (Casp-2L) promotes apoptosis while the short form (Casp-2S) has decreased enzymatic activity and inhibits the development of apoptotic processes. However, very little is known about the mechanism of Casp-2 alternative splicing. Several endonucleases are known to participate in this process. The aim of this study was to determine the role of EndoG in regulation of Casp-2 alternative splicing. Strong correlation between expression levels of EndoG and Casp-2 splice-variants was found in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> human T lymphocytes. Such correlation increased after incubation of these cells with etoposide. Increased expression of Casp-2S was determined during EndoG over-expression in CD4<sup>+</sup> T-cells, after EndoG treatment of cell cytoplasm and nuclei and after nuclei incubation with EndoG digested cell RNA. Casp-2 alternative splicing was induced by a 60-mer RNA oligonucleotide in naked nuclei and in cells after transfection. The identified long non-coding RNA of 1016 nucleotides is the precursor of the 60-mer RNA oligonucleotide. Based on the results the following mechanism has been proposed. Casp-2 pre-mRNA is transcribed from the coding DNA strand while long non-coding RNA is transcribed from the template strand of the Casp-2 gene. EndoG digests long non-coding RNA and produces the 60-mer RNA oligonucleotide complementary to the Casp-2 pre-mRNA exon 9 and intron 9 junction place. Interaction of the 60-mer RNA oligonucleotide and Casp-2 pre-mRNA causes alternative splicing.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Key words:** EndoG; alternative splicing; caspase-2; T lymphocytes

**Funding.** The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period (2021–2030) (No. 122022800499-5).

Received: 22.04.2024; revised: 02.06.2024; accepted: 26.06.2024.