Биомедицинская химия, 2016 том 62, вып. 5, с. 544-554.

УДК 577.218.214.5
©Коллектив авторов

РЕГУЛЯЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ hTERT АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ EndoG

Д.Д. Жданов[1,2]*, Д.А. Васина[2], Е.В. Орлова[3], В.С. Орлова[2], М.В. Покровская[1], С.С. Александрова[1], Н.Н. Соколов[1]

[1]Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: +7(910)4781275; факс: +7(499)2450857; эл. почта: zhdanovdd@mail.ru
[2]Российский университет дружбы народов, экологический факультет, Москва
[3]Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино

Каталитическая субъединица теломеразы человека hTERT подвергается альтернативному сплайсингу, что приводит к потере её функций и снижению теломеразной активности. Известно, что в альтернативном сплайсинге мРНК hTERT принимает участие апоптотическая эндонуклеаза EndoG. Нами изучена роль EndoG в регуляции альтернативного сплайсинга мРНК hTERT. Показано, что сверхэкспрессия EndoG в клетках карциномы кишечника CaCo-2, а также обработка клеточных ядер и цитоплазмы рекомбинантной EndoG и инкубация ядер с РНК, расщепленной рекомбинантной EndoG, приводит к повышению уровня варианта с β-делецией. В изолированных клеточных ядрах и трансфицированных клетках альтернативный сплайсинг мРНК hTERT индуцировался 47-членным РНК-олигонуклеотидом. Идентифицирована длинная некодирующая РНК (1157 нуклеотидов), из которой образуется активный 47-членный РНК-олигонуклеотид. Предложен следующий механизм сплайсинга мРНК hTERT: с кодирующей цепи гена hTERT синтезируется пре-мРНК, а с матричной – длинная некодирующая РНК; EndoG вырезает из длинной некодирующей РНК 47-членный олигонуклеотид, комплементарный пре-мРНК hTERT, в месте соединения экзона 8 и интрона 8. Взаимодействие этого олигонуклеотида с пре-мРНК hTERT индуцирует альтернативный сплайсинг.

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

DOI 10.18097/PBMC20166205544

ВВЕДЕНИЕ

Теломераза представляет собой мультибелковый комплекс, синтезирующий теломерные повторы TTAGGG на концах хромосом. Главными компонентами теломеразы человека являются теломеразная РНК (hTR, Human Telomerase RNA), включающая РНК-матрицу для синтеза теломер, а также теломеразная обратная транскриптаза (hTERT, Human Telomerase Reverse Transcriptase), синтезирующая теломерные повторы на матрице hTR [1]. В нормальных соматических клетках теломераза не активна, и теломеры укорачиваются при каждом цикле репликации ДНК, что приводит к переходу клеток в состояние репликативного старения и активации апоптотических процессов [2]. Теломераза активна в половых и стволовых клетках, в активированных лимфоцитах, а также в большинстве типов раковых клеток [3], где поддерживает высокий пролиферативный потенциал. Активность теломеразы регулируется уровнем синтеза hTERT [4], а также альтернативным сплайсингом (АС) её мРНК. Процесс АС мРНК hTERT изучен недостаточно. В настоящее время известно более 20 вариантов сплайсинга hTERT, однако каталитической активностью обладает только полноразмерная hTERT [5]. Большинство вариантов экспрессируются в минорных количествах, а их функция до конца не изучена. Два варианта составляют большую часть общей мРНК hTERT. Делеция 36 нуклеотидов в экзоне 6 (α-вариант) вызывает удаление части обратнотранскриптазного домена А hTERT и приводит к потери каталитической активности. Делеция 182 нуклеотидов экзонов 7 и 8 (β-вариант) вызывает сдвиг рамки считывания и появление стоп-кодона в экзоне 10, что приводит к синтезу укороченного варианта hTERT [6, 7], который функционирует как доминантно-негативный [8]. Ранее мы показали, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG способна индуцировать АС мРНК hTERT и ингибировать активность теломеразы [9].

Апоптотические эндонуклеазы – группа ферментов, разрушающих ДНК клеток на последних стадиях апоптоза [10]. Эндонуклеаза G (EndoG) является сайт-специфичной эндонуклеазой, способной избирательно расщеплять двойные цепи ДНК по поли-G-последовательностям. К отличительной особенности EndoG относится её РНКазная активность [11]. EndoG вызывает репликативное старение клеток и значительно снижает их репликативный потенциал [12]. Цель нашей работы состояла в изучении механизма, связывающего EndoG и АС мРНК hTERT.

МЕТОДИКА

Культивирование и трансфекция клеток

Клетки карциномы кишечника человека CaCo-2, (“ATCC”, США) культивировали в среде RPMI-1640 (“Gibco”, США), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (“Gibco”), при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 и 95% влажности. Трансфекцию

* - адресат для переписки

клеток плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP (обе "InvivoGen", США) проводили с использованием Lipofectamine 2000 ("Invitrogen", США) по протоколу компании производителя. Эффективность трансфекции (обычно 90-100%) оценивали, подсчитывая число GFP-положительных клеток с использованием флуоресцентной микроскопии. Для трансфекции клеток 47-членным РНК-олигонуклеотидом EGPO (EndoG-produced oligonucleotide) или контрольной РНК (табл. 1, "Синтол", Россия) использовали Oligofectamine Reagent ("Invitrogen") по протоколу компании производителя. Для защиты от нуклеаз EGPO и контрольную РНК модифицировали основаниями с фосфоротиоатными связями.

Выделение клеточных органелл и обработка рекомбинантной EndoG (recEndoG)

Цитоплазму клеток получали согласно [13]. Клетки гомогенизировали на льду при помощи роторного гомогенизатора Ultra-Turrax T25 ("IKA", США) в 300 мкл буфера: 10 мМ HEPES ("Sigma", США), 10 мМ KCl ("Sigma"), 1,5 мМ $MgCl_2$ ("Sigma"), 0,1 мМ EGTA ("Sigma"), 0,3% NP-40, ингибитор протеаз (Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete, Mini, "Roche", Швейцария), pH 7,4, и центрифугировали в течение 3 мин при 2000 *g* и 4°C. Супернатант содержал фракцию цитоплазмы. Клеточные ядра выделяли согласно [14]. Клетки гомогенизировали на льду при помощи роторного гомогенизатора в 300 мкл раствора, содержащего 50 мМ Трис-HCl pH 7,9, 0,25 М сахарозу, 10 мМ $CaCl_2$, и центрифугировали (ультрацентрифуга Optima XE, "Beckman Coulter", США) при 70000 *g* в течение 90 мин в среде, содержащей 2 М сахарозу, 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ $CaCl_2$, 5 мМ β-меркаптоэтанол. Ядра промывали дважды в TBE-буфере (89 мМ Трис, 89 мМ H_3BO_3, 2 мМ EDTA) и ресуспендировали в 50 мМ Трис-HCl pH 7,9, содержащем 0,25 М сахарозу, 10 мМ $CaCl_2$, 5 мМ β-меркаптоэтанол. Цитоплазму и ядра клеток инкубировали с recEndoG человека (ENDOG (Human) Recombinant Protein;"Abnova", США) при 37°C.

Экстракция РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

Суммарную РНК из клеток, ядер и цитоплазмы выделяли с помощью RNeasy Mini Kit ("Qiagen", США) по протоколу компании-производителя. Обратную транскрипцию (ОТ) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили согласно [15]. Для этого 5 мкг суммарной РНК подвергли ОТ в 25 мкл реакционной смеси ("Invitrogen") по протоколу компании. В качестве реакционной смеси для ПЦР в реальном времени использовали Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG ("Invitrogen") по протоколу компании-производителя. Нуклеотидные последовательности праймеров ("Синтол") приведены в таблице 2. Для амплификации применяли CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System ("Bio-Rad", США) и двухтемпературный режим (отжиг праймеров/элонгация). Количество амплификатов определяли по флуоресценции в конце цикла элонгации. Качество амплификации оценивали с использованием кривой плавления от 60°C до 95°C (после 35-го цикла). Стандартные кривые эффективности ПЦР строили по серийным разведениям (1 : 40, 1 : 80, 1 : 160 и 1 : 320) суммарных кДНК. Относительную концентрацию РНК вычисляли по программе Qbase PLUS ("Bio-Rad").

Таблица 1. Олигонуклеотиды для трансфекции клеток и инкубации с ядрами

Название	**Последовательность 5′-3′**
EGPO	GGGUCGGUGGGCGUCCCGUUACCGUGGACCGGUGGAUGAGUGAACGG
Контрольная РНК	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCGUCAGG
Защищенный EGPO	G*G*G*U*C*GGUGGGCGUCCCGUUACCGUGGACCGGUGGAUGAGUGA*A*C*G*G*
Защищённая контрольная РНК	A*U*G*U*G*CCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCG*U*C*A*G*G

Примечание: * - фосфоротиоатная связь.

Таблица 2. Праймеры для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

Мишень	Прямой праймер (5′-3′)	Обратный праймер (5′-3′)	Размер амплификата п.о.	Температура отжига °C
EndoG	AATTGAGCTCCGCACCTACGTGAT	AGGATGTTTGGCACAAAGAGCAGC	167	55
α+β+ и α+β- hTERT	TCACGGAGGTCATCGCCAGCATC	CCTGGCACTGGACGTAGGACG	317 или 134	58
α+β+ hTERT	TGTACTTTGTCAAGGTGGATGTG	GTACGGCTGGAGGTCTGTCAA	202	53
α+β- hTERT	TGTACTTTGTCAAGGTGGATGTG	GGCACTGGACGTAGGACGTGG	189	53
нкРНК	CACCAGAGTCTCCTTTTCTGGC	CCCCGCTTGCCATTTCC	137	59
EGPO	CAGGGGCAAGTGAGTCAGG	CCCAGCCACCCGCAG	52	60
18S	GGATCCATTGGAGGGCAAGT	ACGAGCTTTTTAACTGCAGCAA	91	64
Ламин B1	GATTGCCCAGTTGGAAGCCT	TGGTCTCGTTAATCTCCTCTTCATACA	152	60

Для определения экспрессии EGPO использовали суммарную клеточную РНК, дополнительно очищенную при помощи miRNeasy kit (“Qiagen”), и TaqMan RT-PCR microRNA assays (“Applied Biosystems”, США) [16] по протоколу производителя. В качестве референсных генов использовали гены “домашнего хозяйства” 18S (для цитоплазмы) и ламина B1 (для ядер). Определяли уровни экспрессии мРНК изучаемых генов, нормированной по усреднённому значению экспрессии двух референсных генов. Продукты амплификации визуализировали в 2% агарозном геле, используя окрашивание бромидом этидия, и фотографировали в ChemiDoc™ XRS imaging system (“Bio-Rad”).

Расщепление ДНК и РНК recEndoG или РНКазами

ДНК выделяли при помощи PureLink® Genomic DNA (“Thermo Scientific”, США), а РНК – с использованием RNeasy Mini Kit по протоколу производителя. ДНК и РНК инкубировали с 0,3 мкг recEndoG в 50 мМ Трис-HCl pH 7,9, содержащем 1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ $MgCl_2$, 5 мМ β-меркаптоэтанол, в течение 20, 40 и 60 мин при 37°C. РНК инкубировали в течение 60 мин с 500 ед. РНКазы 1 (“Invitrogen”) и РНКазы A (“Invitrogen”) согласно протоколу компании. Затем образцы обрабатывали протеазой K (“Qiaqen”) для инактивации recEndoG или РНКаз. К расщеплённой РНК добавляли каждый из 24-членных ДНК-олигонуклеотидов (табл. 3) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C для образования нековалентных комплексов ДНК-РНК, блокирующих активность EGPO [17].

Таблица 3. ДНК-олигонуклеотиды для блокирования активности EGPO

№	Последовательность 5′– 3′
1	GGCATGTACGCTGTCAAGCACCGA
2	GTCAAGCACCGAGTGGACGTCCTC
3	GTGGACGTCCTCTGGTCGGGCGAC
4	TGGTCGGGCGACTCCCTACGGCAG
5	TCCCTACGGCAGCAGTAGCTCGTC
6	CAGTAGCTCGTCCAGACCCGTGAC
7	CAGACCCGTGACGGGACGTCCCAA
8	GGGACGTCCCAACCCGTGCCTGAG
9	CCCGTGCCTGAGGGTCGTCACCCA
10	GGTCGTCACCCAGGAGGGGACCCG
11	GGAGGGGACCCGTTAGTGACCCGA
12	TTAGTGACCCGAGTACTGGCCTGT

Вестерн-блотинг

Клетки разрушали в 1 мл TBE-буфера ультразвуком (2 мин, 50 Вт, Model 50 Sonic Dismembrator (“Fisher Scientific”, США)) и центрифугировали в течение 10 мин при 12000 *g* для удаления клеточного дебриса. Концентрацию общего белка в образцах измеряли по методу Бредфорд [18] при помощи Bradford Protein Assay (“Pierce”, США), используя бычий сывороточный альбумин (БСА) для построения калибровочной кривой. Клеточный лизат (в пересчёте на 50 мкг суммарного белка) растворяли в растворе, содержащем 50 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 2 мМ EDTA, 1% β-меркаптоэтанол и 7,5% глицерин, денатурировали прогреванием при 100°C в течение 10 мин и разделяли электрофоретически в градиентном полиакриламидном геле (ПААГ) [19] (100 В, 2 ч), используя NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gels (“Life Technologies”, США). Далее белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в Novex transferring buffer (“Invitrogen”) при 40 В в течение 3 ч, после чего мембраны окрашивали Ponseau S (“Sigma”) согласно [20]. Мембраны блокировали Blotting-Grade Blocker (“Bio-Rad”) и инкубировали в течение 2 ч с первичными моноклональными антителами anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), anti-hTERT (“Abcam”, США), разведёнными в соотношении 1 : 1000, или поликлональными anti-EndoG-антителами (“Millipore”, США) в соотношении 1 : 500. После этого первичные антитела отмывали в фосфатно-солевом буфере pH 7,6 с 0,1% Твин-20, и мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (“Cell Signalling”, США). Для визуализации использовали SuperSignal chemiluminescent kit (“Pierce Biotechnology”, США) с последующим документированием в ChemiDoc™ XRS imaging system (“Bio-Rad”). Содержание белка оценивали денситометрически в программе GelAnalyzer 2010a.

Определение активности теломеразы

Активность теломеразы определяли с использованием метода TRAP (амплификация теломерных повторов, Telomeric Repeat Amplification Protocol) [3, 21]. Клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl pH 7,5, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5% ХАПС (CHAPS, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate, “Sigma”) и 10% глицерин, из расчёта 1 мкл буфера на 10^3 клеток. Лизаты центрифугировали (30 мин, 4°C и 12000 *g*), супернатант отбирали и хранили при -80°C. Элонгацию олигонуклеотидного субстрата-праймера и последующую амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-HCl pH 8,8, 16,6 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,01% твин-20, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 0,25 мМ каждого из dNTP, 0,1 мкг TS-праймера (Telomerase Substrate primer) (5′-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3′) и 2 мкл клеточного экстракта, разбавленного лизирующим буфером и эквивалентного 2000 клеток, и инкубировали при 37°C в течение 25 мин. По окончании инкубации смесь выдерживали в течение 10 мин при 96°C для инактивации теломеразы. Затем в смесь добавляли 0,1 мкг CX-праймера (Copy Extended primer, 5′-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3′) и 2,5 ед. Taq-полимеразы. Реакционную смесь подвергали ПЦР в следующем режиме: 94°C – 2 мин; 30 циклов: 94°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 40 с; 72°C – 5 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 12% неденатурирующем ПААГ и

ТВЕ-буфере (89 мМ Трис, 89 мМ H_3BO_3, 2 мМ EDTA pH 8,0). Образцы (10 мкл) вносили в лунки геля. Для визуализации разделённых продуктов использовали ChemiDoc™ XRS imaging system после выдерживания геля в течение 30 мин в растворе красителя SYBR Green I (“Invitrogen”). О теломеразной активности судили по результатам TRAP, определенным денситометрически в программе GelAnalyzer 2010a.

Идентификация длинных некодирующих РНК (нкРНК) методом секвенирования следующего поколения

Суммарную РНК из клеток, ядер и цитоплазмы выделяли с помощью RNeasy Mini Kit. Подготовку библиотек проводили при помощи TruSeq Small RNA Library Preparation Kit (“Illumina”, США) по протоколу производителя. Секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq System (“Illumina”), данные анализировали согласно [16].

Статистический анализ

Результаты анализировали с использованием критерия Стьюдента и программы Statistica 9.0 (“StatSoft Inc.”, США) и представляли в виде средних значений ± стандартное отклонение. Статистически значимыми результаты считали при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Увеличение АС мРНК hTERT при сверхэкспрессии EndoG

Для исследования влияния EndoG на АС мРНК hTERT клетки CaCo-2 эпителиальной карциномы кишечника человека трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Эффективность трансфекции, мониторинг которой проводили при помощи флуоресцентной микроскопии, приближалась к 100% в течение 8 ч после трансфекции. Через 24 ч после трансфекции из клеток выделяли РНК и проводили ОТ-ПЦР в реальном времени. Сверхэкспрессия EndoG (рис. 1А) вызывала значимое увеличение экспрессии варианта α+β- hTERT и уменьшение полноразмерного α+β+ варианта (рис. 1Б). Нуклеотидную последовательность продуктов амплификации подтверждена секвенированием.

Мы попытались оценить влияние индукции вариантов сплайсинга мРНК hTERT на активность теломеразы при сверхэкспрессии EndoG. Методом вестерн-блотинга с использованием антител к изучаемым белкам показано, что через 24 ч после трансфекции в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, наблюдалось статистически значимое снижение содержания полноразмерного α+β+ варианта и увеличение уровня α+β- hTERT (рис. 1В,Г). В экстрактах клеток, трансфицированных pEndoG-GFP, методом TRAP определили активность теломеразы и установили её статистически значимое снижение (рис. 1Д,Е).

Не обнаружено изменений экспрессии EndoG, альтернативных вариантов hTERT и активности теломеразы при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP.

Индукция АС мРНК hTERT в цитоплазме и ядрах под действием recEndoG

Известно, что теломераза проявляет свою ферментативную активность в ядре, где синтезирует теломерные повторы [22]. Апоптотическая эндонуклеаза EndoG в норме находится в межмембранном пространстве митохондрий, при развитии апоптотических процессов она интернализуется в ядро, где деградирует ДНК [23]. Мы предположили, что в нормальных условиях процесс АС пре-мРНК hTERT происходит не в ядре. Для проверки этого из клеток CaCo-2 были выделены ядра и цитоплазма. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени показано, что в ядрах полностью отсутствует экспрессия варианта α+β- hTERT (рис. 2А,Б). В цитоплазме и ядрах экспрессия варианта α+β+ была приблизительно одинаковой. Инкубация ядер и цитоплазмы с recEndoG в течение 1 ч приводила к появлению варианта α+β- в ядрах и увеличению его уровня в цитоплазме. При этом экспрессия варианта α+β+ hTERT снижалась. В ядрах клеток CaCo-2 вариант α+β- отсутствовал, и появлялся только в присутствии recEndoG, поэтому ядра этих клеток стали моделью для дальнейшего изучения влияния EndoG на АС hTERT.

Индукция АС мРНК hTERT в результате РНКазной активности EndoG

Теоретически возможно, что под действием РНКазной активности EndoG могут образоваться малые некодирующие РНК, регулирующие АС [24], или олигонуклеотиды, переключающие сплайсинг [25]. Мы предположили, что один из таких олигонуклеотидов способен вызвать делецию экзонов 7 и 8 в пре-мРНК hTERT. Чтобы проверить это предположение, из ядер клеток CaCo-2 выделили суммарную ДНК, которую обработали recEndoG. Суммарную ядерную РНК расщепляли recEndoG или РНКазами (РНКаза А или РНКаза 1). Деградацию РНК и ДНК подтверждали электрофорезом в ПААГ (данные не приведены). Продукты расщепления ДНК и РНК очищали от белков и инкубировали с ядрами клеток CaCo-2. Количество альтернативных вариантов мРНК hTERT анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Этот эксперимент показал, что именно РНК, а не ДНК, расщеплённая recEndoG, способна индуцировать экспрессию варианта α+β- hTERT в ядрах данных клеток (рис. 3А,Б). Ни РНКаза А, ни РНКаза 1 подобного эффекта не вызывали. Изменение экспрессии альтернативных вариантов мРНК hTERT при инкубации клеточных ядер с РНК, обработанной recEndoG, было время-зависимым (рис. 3Б). Увеличение продолжительности обработки вызывало статистически значимое увеличение экспрессии варианта α+β- и снижение экспрессии варианта α+β+. Этот эксперимент позволяет предположить, что эффект индукции варианта α+β- специфичен для EndoG и зависит от способности фермента деградировать РНК с образованием активного продукта, индуцирующего АС.

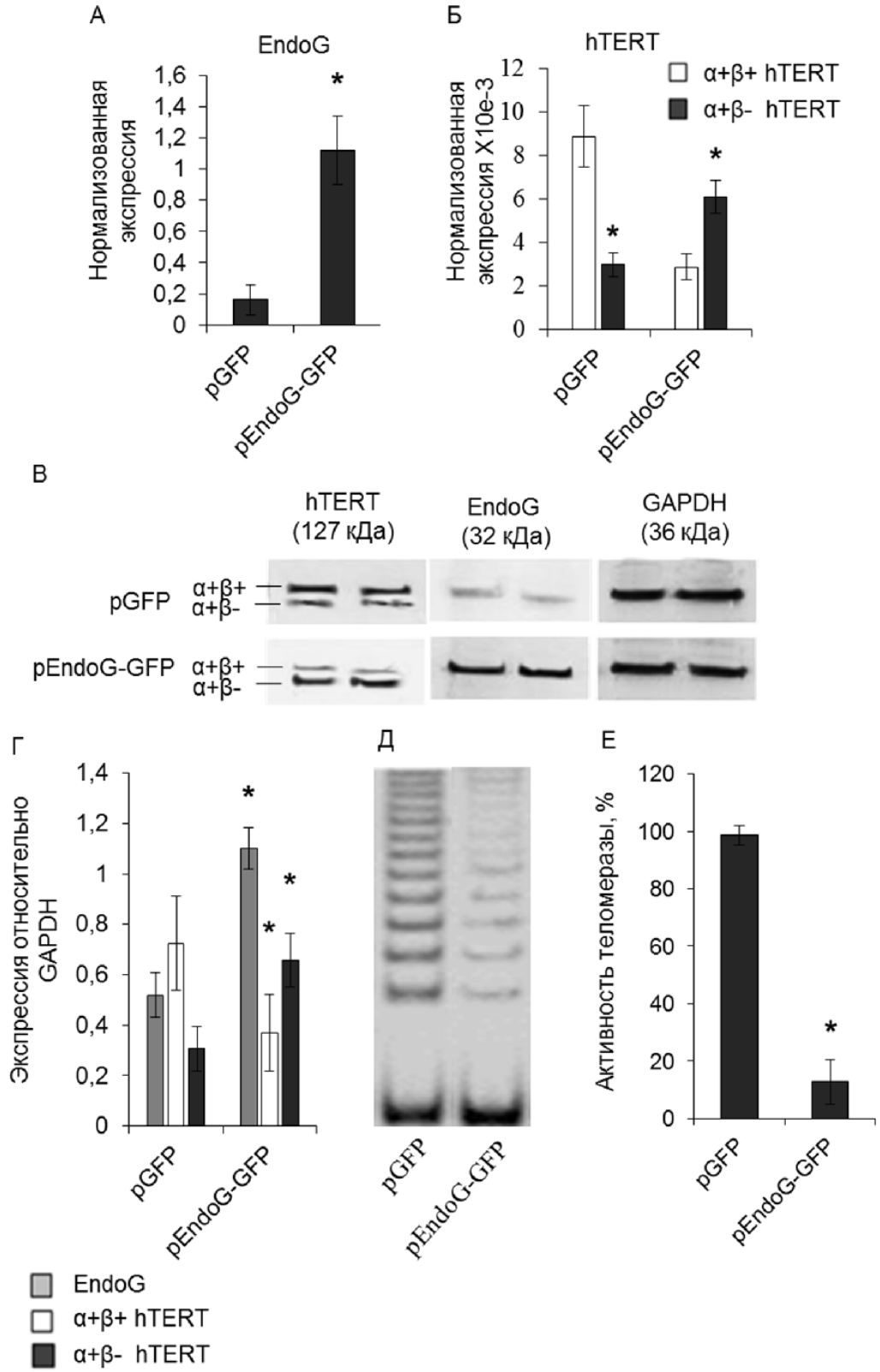

Рисунок 1. Экспрессия EndoG и альтернативных вариантов мРНК hTERT в клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP. Уровень экспрессии EndoG (А) и вариантов α+β+ и α+β- альтернативного сплайсинга мРНК hTERT (Б) в клетках CaCo-2 через 24 ч после трансфекции, измеренный методом ОТ-ПЦР в реальном времени. N=4, * - p≤0,05 по сравнению с клетками, трансфицированными pGFP. Вестерн-блот-анализ EndoG, вариантов сплайсинга мРНК hTERT и референсного белка GAPDH в трансфицированных клетках (В). Относительное содержание альтернативных вариантов hTERT и EndoG по отношению к GAPDH (Г). N=4, * - p≤0,05 по сравнению с клетками, трансфицированными pGFP. Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках (Д). Активность теломеразы, измеренная методом TRAP (Е). N=4. * - p≤0,05 по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

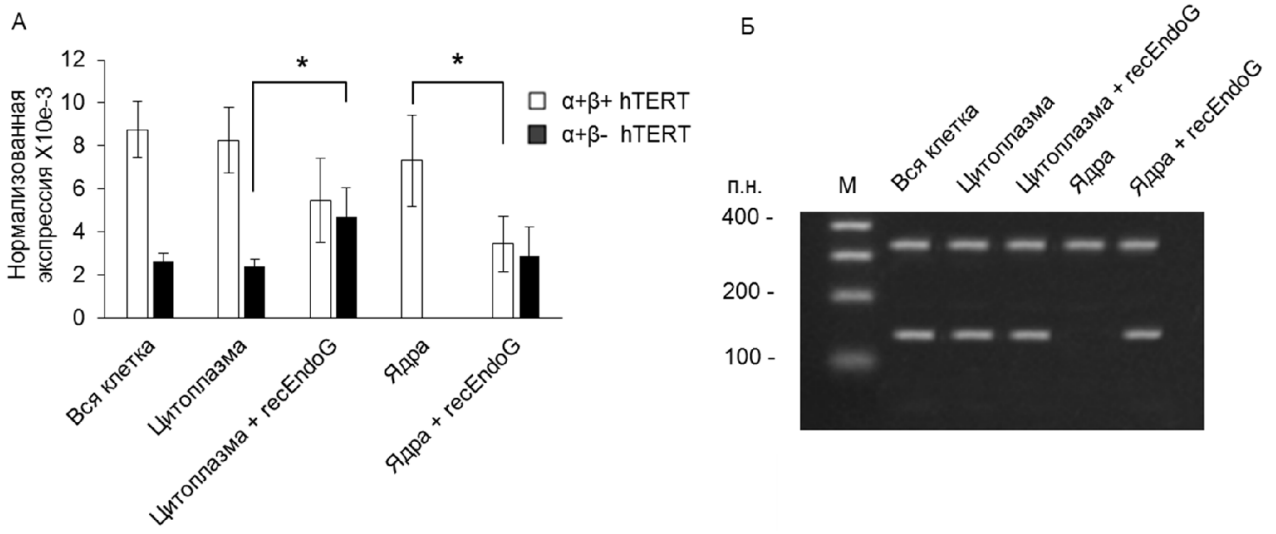

Рисунок 2. Экспрессия вариантов hTERT в цитоплазме и ядрах клеток CaCo-2, обработанных recEndoG. Уровни экспрессии вариантов α+β+ и α+β- мРНК hTERT (А). N= 4, * - p≤0,05 по сравнению с необработанными клетками. Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР вариантов сплайсинга пре-мРНК hTERT (Б). М - маркер молекулярных масс.

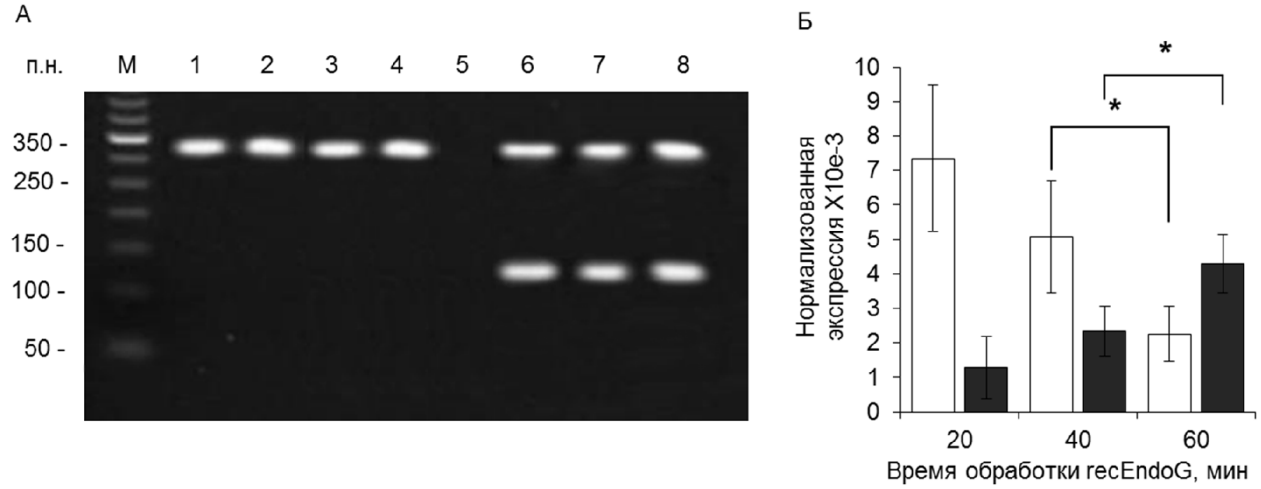

Рисунок 3. Индукция АС пре-мРНК hTERT в ядрах клеток CaCo-2. Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР альтернативных вариантов мРНК hTERT (А): М - маркер молекулярных масс; 1 - ядра; 2 - ядра, инкубированные с ДНК, расщеплённой recEndoG; 3 - ядра, инкубированные с РНК, обработанной РНКазой А; 4 - ядра, инкубированные с РНК, обработанной РНКазой 1; 5 - РНК, расщеплённая recEndoG; 6 - ядра, инкубированные с РНК, обработанной recEndoG в течение 20 мин; 7 - ядра, инкубированные с РНК, обработанной recEndoG в течение 40 мин; 8 - ядра, инкубированные с РНК, обработанной recEndoG в течение 60 мин. Уровни экспрессии вариантов α+β+ и α+β- мРНК hTERT в ядрах, инкубированных с РНК, расщеплённой recEndoG (Б). N = 4. * - p≤0,05.

Идентификация и экспрессия РНК-олигонуклеотида, образующегося под действием EndoG

Поиск в базе GenBank последовательности, подобной экзонам 7 и 8 *hTERT*, не дал результатов. Поэтому мы предположили, что олигонуклеотид EGPO, который образуется под действием EndoG и способен индуцировать АС мРНК hTERT, происходит из нкРНК, синтезируемой с антисмысловой цепи гена *hTERT* цепи ДНК. С целью проверки этой гипотезы и определения длины EGPO, ядерную РНК клеток CaCo-2, расщеплённую recEndoG, инкубировали с каждым из 24-членных ДНК-олигонуклеотидов, комплементарных участкам экзона 8 и интрона 8 потенциальной нкРНК hTERT, и добавили к ядрам клеток CaCo-2 (рис. 4А). Эти олигонуклеотиды должны формировать нековалентные комплексы с EGPO и блокировать его действие [17]. С помощью ОТ-ПЦР показали, что три олигонуклеотида блокировали АС, что подтвердило правильность гипотезы и позволило определить размер EGPO на уровне 47 нуклеотидов (рис. 4Б).

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени показано, что сверхэкспрессия EndoG в клетках вызывает значимое увеличение экспрессии EGPO (рис. 4В). В цитоплазме, обработанной recEndoG, также была повышена экспрессия EGPO (рис. 4Г). В клеточных ядрах экспрессия EGPO не обнаружена, она появлялась после инкубации с recEndoG. Эти данные согласуются с отсутствием варианта α+β- в ядрах интактных клеток CaCo-2 и его появлением при сверхэкспрессии EndoG и обработки ядер recEndoG.

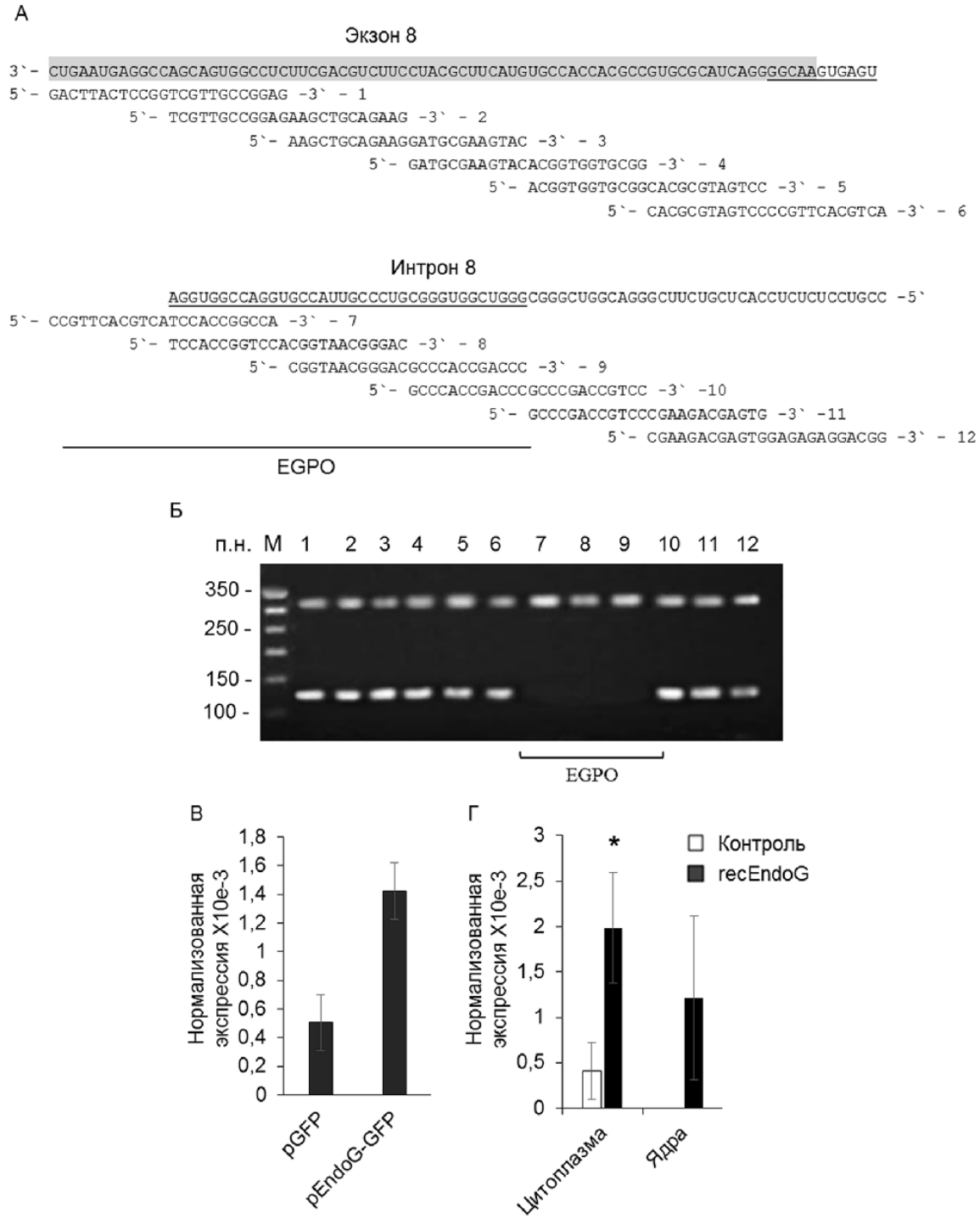

Рисунок 4. Регуляция АС олигонуклеотидом EGPO, и экспрессия EGPO. Положение антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов по отношению к гипотетической нкРНК (А). Показано место расположения EGPO. Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР hTERT в ядрах, инкубированных с РНК, расщеплённой recEndoG и инкубированной с ДНК-олигонуклеотидами (Б). М - маркер молекулярных масс. Уровень EGPO (В) в клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP, а также в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG (Г).

Индукция АС мРНК hTERT искусственно синтезированным EGPO

Для подтверждения того, что активация АС мРНК hTERT обусловлена действием самого EGPO, а не связана с повышенным синтезом EndoG, ядра клеток CaCo-2 инкубировали с искусственно синтезированным EGPO или контрольной неспецифической РНК того же размера. Показано, что в концентрации 10^{-7} М и выше EGPO способен дозозависимо активировать АС (рис. 5А-Г). Повышение экспрессии варианта α+β- и снижение полноразмерного варианта α+β+ наблюдали при увеличении концентрации EGPO. Таким образом, EGPO, вероятно, действует как эндогенный переключатель сплайсинга и вызывает АС hTERT.

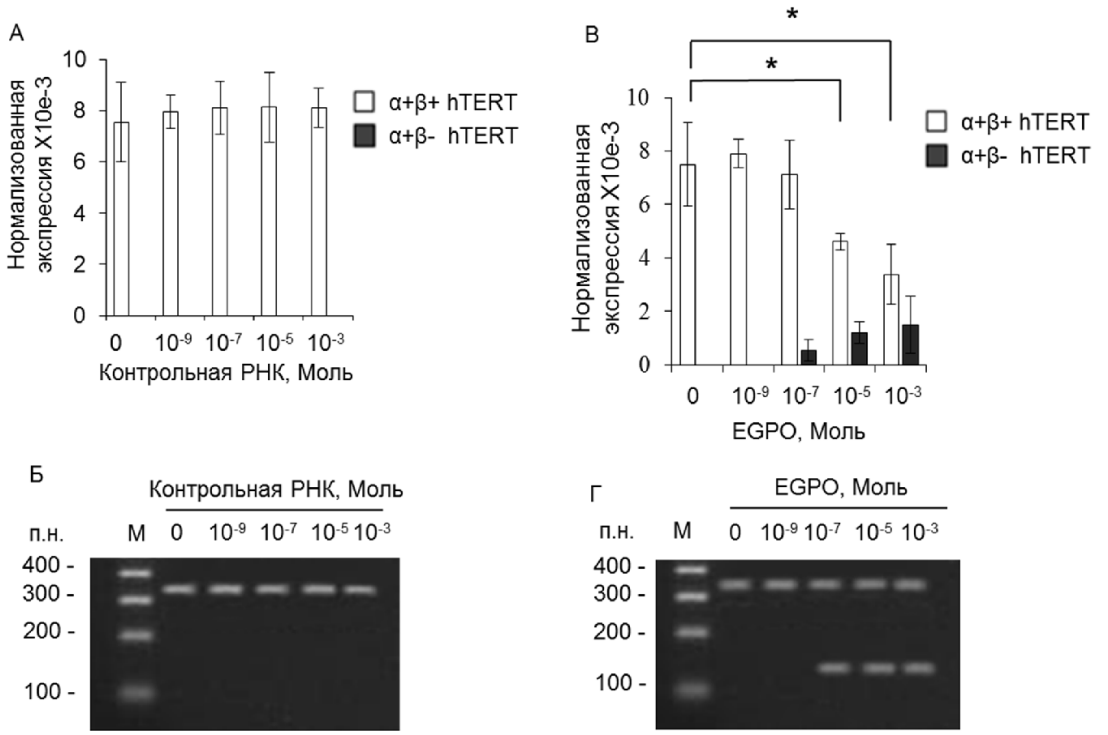

Рисунок 5. Экспрессия вариантов сплайсинга мРНК hTERT в ядрах клеток CaCo-2, обработанных искусственным EGPO или контрольной РНК. Уровни вариантов α+β+ и α+β- мРНК hTERT в ядрах, обработанных контрольной неспецифической РНК (А) и искусственным EGPO (Б). Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР вариантов сплайсинга мРНК hTERT в ядрах, обработанных контрольной неспецифической РНК (В) и EGPO (Г). М - маркер молекулярных масс.

Поскольку EGPO индуцирует АС мРНК hTERT в бесклеточной системе, то он должен активировать АС в клетках. Для проверки этого клетки CaCo-2 трансфицировали синтезированным EGPO и контрольной РНК, которые содержали нуклеотиды с фосфоротиоатными связями для защиты от внутриклеточных РНКаз [26]. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени показано, что экспрессия варианта α+β- статистически значимо повышалась в клетках, трансфицированных EGPO (рис. 6А), а экспрессия варианта α+β+ при этом снижалась. Изменение соотношения альтернативных вариантов hTERT в клетках, трансфицированных геном *EndoG*, подтверждено вестерн-блотингом (рис. 6Б,В). В трансфицированных EGPO клетках значительно снижалась активность теломеразы (рис. 6Г,Д), что согласуется с данными о доминантно-негативном действии варианта α+β- [27, 28].

Идентификация и экспрессия нкРНК

С целью идентификации нкРНК, из которой EndoG вырезает EGPO, суммарную РНК анализировали при помощи секвенирования следующего поколения. Нуклеотидную последовательность нкРНК (1754 нуклеотида) подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Эта нкРНК перекрывает окончание интрона 6, экзоны 7 и 8, интрон 7, а также начало интрона 8 в пре-мРНК hTERT (рис. 7А).

При помощи ОТ-ПЦР в реальном времени определен уровень экспрессии нкРНК в клетках, трансфицированных генами *EndoG-GFP* или *GFP*, а также в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG. Сверхэкспрессия EndoG в клетках не вызывала изменения экспрессии нкРНК (рис. 7Б). В цитоплазме и ядрах, обработанных recEndoG, изменения экспрессии нкРНК также не обнаружено (рис. 4Г). Наиболее вероятно, что в цитоплазме и ядрах клеток нкРНК синтезируется на постоянном уровне, а количество EGPO регулируется активностью EndoG.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами описан новый механизм АС, связанный с действием РНКазной активности EndoG. Ни один из известных механизмов делеции экзонов, включая супрессию сайта сплайсинга, сокрытие или экспонирование *cis*-элемента, ADAR-опосредованную селекцию сайта сплайсинга, сближение *cis*-элементов, перекручивание интронов, а также конкурентные явления во вторичной структуре РНК, в данном случае не подходит [29, 30].

В общих чертах исследуемый механизм можно описать по следующей гипотетической схеме. С кодирующей цепи гена *hTERT* синтезируется пре-мРНК, а с матричной (некодирующей) – нкРНК размером 1754 нуклеотида (рис. 8А). EndoG вырезает из нкРНК 47-членный РНК-олигонуклеотид EGPO, комплементарный пре-мРНК hTERT в месте соединения экзона 8 и интрона 8 (рис. 8Б). Взаимодействие EGPO и пре-мРНК hTERT вызывает АС и появление β-варианта. В пользу этого механизма говорят следующие факты. Повышенный синтез EndoG вызывает увеличение экспрессии варианта α+β- и снижение экспрессии α+β+ hTERT,

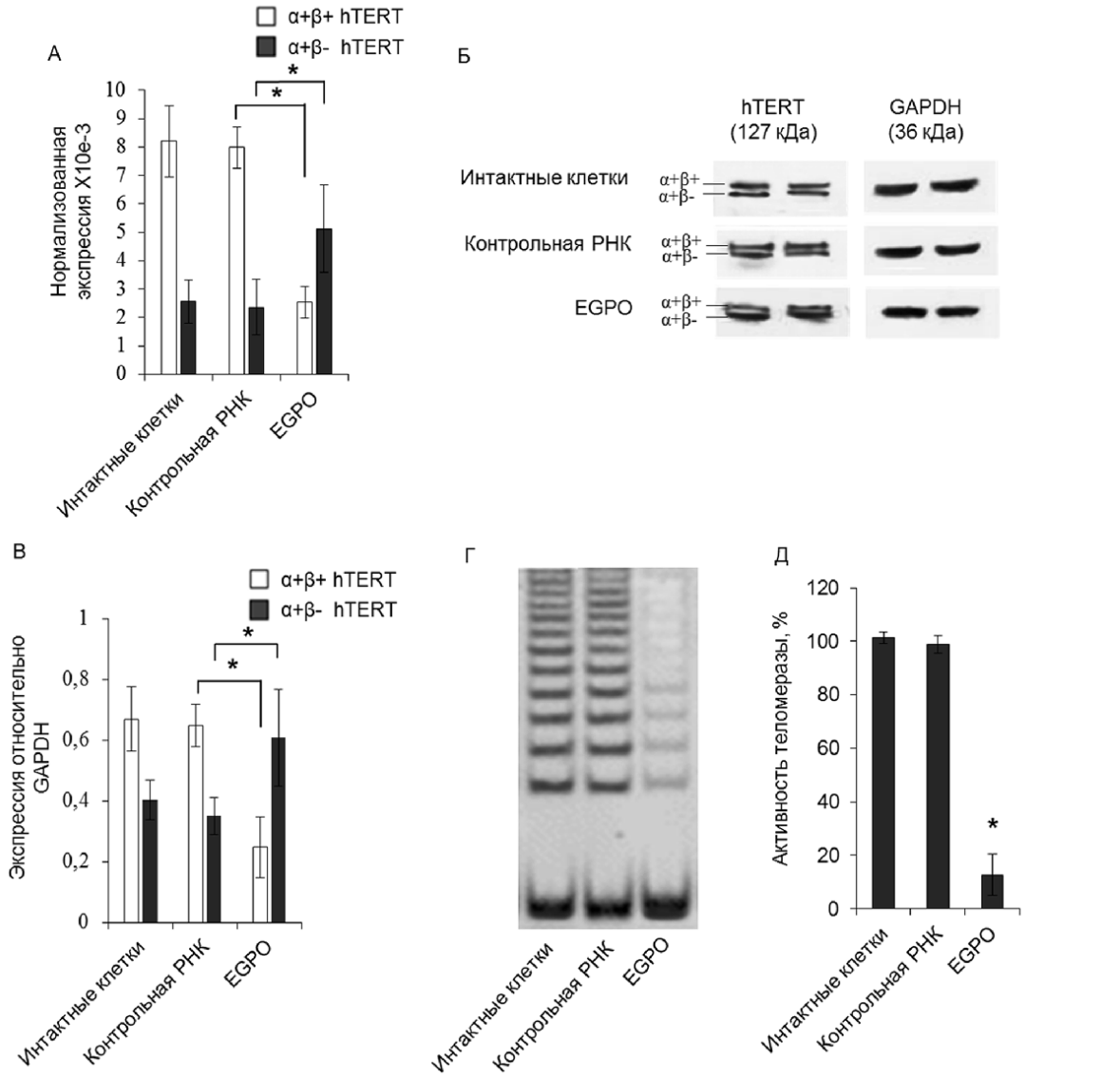

Рисунок 6. Экспрессия альтернативных вариантов мРНК hTERT в клетках CaCo-2, трансфицированных искусственным EGPO и контрольной неспецифической РНК. Уровни вариантов α+β+ и α+β- hTERT в клетках через 24 ч после трансфекции (А). Вестерн-блотинг вариантов сплайсинга hTERT и референсного белка GAPDH (Б). Определение относительных количеств вариантов hTERT (по отношению к GAPDH) (В). N=4, * - p≤0,05 по сравнению с клетками, трансфицированными контрольной РНК. Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках (Г). Активность теломеразы, измеренная методом TRAP (Д). N=4. * - p≤0,05 по отношению к клеткам, трансфицированным контрольной РНК.

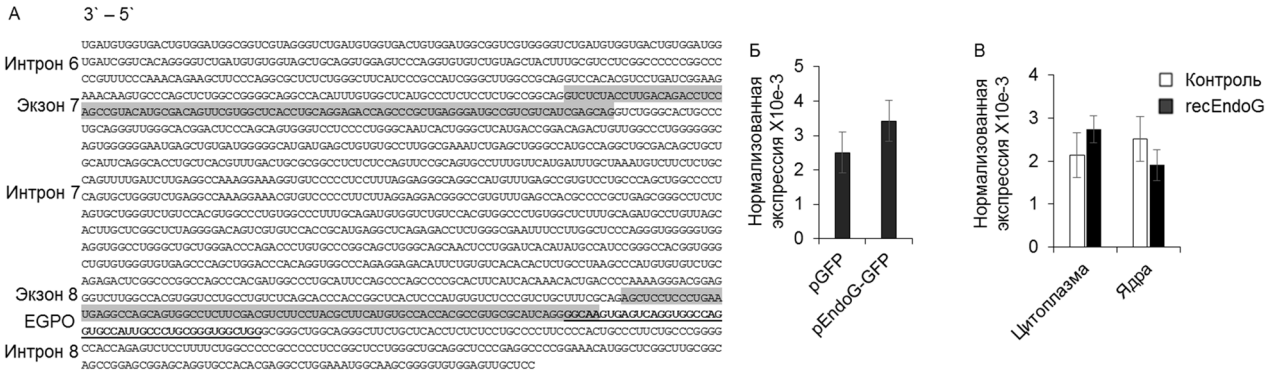

Рисунок 7. Нуклеотидная последовательность нкРНК и её экспрессия. Нуклеотидная последовательность нкРНК, определенная методом секвенирования следующего поколения (А). Указаны участки, соответствующие интронам и экзонам мРНК, а также место расположения EGPO. Уровень экспрессии нкРНК в клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP (Б), а также в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG (В).

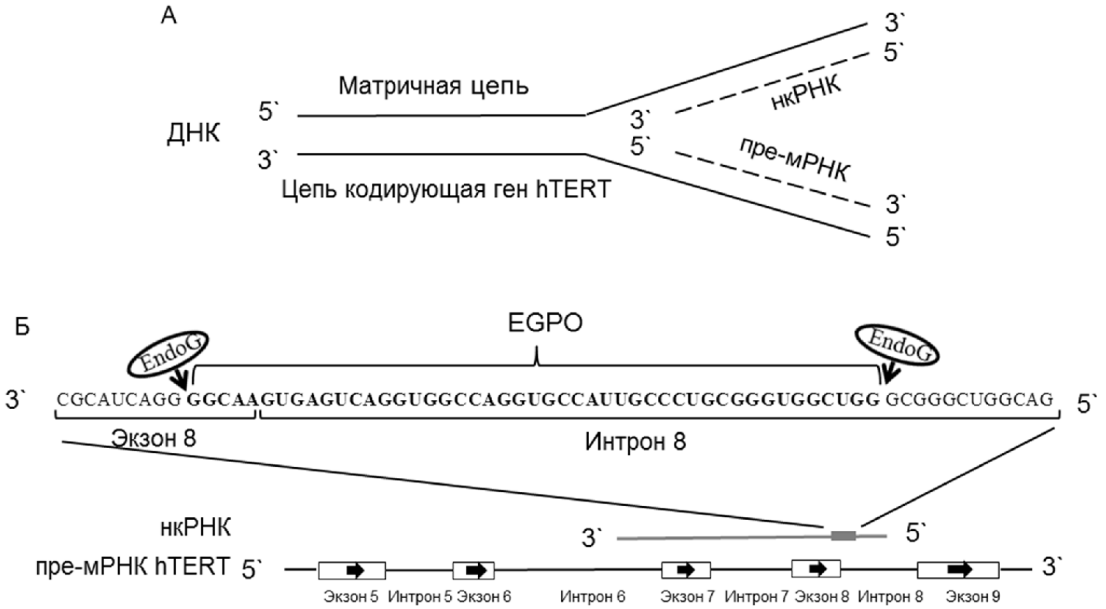

Рисунок 8. Гипотетическая схема механизма сплайсинга мРНК hTERT. (А) Гипотетическая схема расположения мест синтеза пре-мРНК hTERT и нкРНК. С кодирующей цепи гена *hTERT* синтезируется пре-мРНК, а с матричной – нкРНК. (Б) Гипотетическая схема расположения нкРНК и EGPO при регуляции АС эндонуклеазой EndoG пре-мРНК hTERT. EndoG вырезает из нкРНК EGPO, комплементарный пре-мРНК hTERT. Взаимодействие EGPO и пре-мРНК hTERT вызывает АС и появление β-варианта hTERT.

что приводило к снижению активности теломеразы. Известно, что некоторые альтернативные варианты hTERT действуют как доминантно-негативные, а их повышенный синтез вызывает значительное снижение активности теломеразы [27, 28]. Обработка цитоплазмы и ядер клеток recEndoG приводит к увеличению экспрессии мРНК α+β- и снижению уровня полноразмерного варианта α+β+. Расщепление суммарной РНК из клеточных ядер recEndoG, и последующая инкубация продуктов расщепления с ядрами приводили к появлению в них альтернативного варианта α+β-. Поскольку инкубация ядер с ДНК, обработанной recEndoG, не приводила к АС мРНК hTERT, можно считать, что фактор, вызывающий АС, относится именно к РНК, а его происхождение связано с РНКазной активностью EndoG (действие РНКаз 1 и А не вызывало АС). Предположили, что активный РНК-олигонуклеотид (EGPO) “вырезается” EndoG из нкРНК. Наиболее вероятно, по нашему мнению, что нкРНК синтезируется на матричной (некодирующей) цепи гена *hTERT*. Приблизительный размер EGPO и его нуклеотидную последовательность удалось установить, используя метод гибридизации ДНК-олигонуклеотидов с предполагаемой EGPO. С помощью этого метода определен размер EGPO с минимальной погрешностью 12 нуклеотидов с 3′- и 5′-концов. Уменьшение размера ДНК-олигонуклеотидов снижало их специфичность к EGPO и не вызывало ингибирования АС. На границах EGPO располагаются G-богатые участки (GGGG на 3′- и GGGCGGG на 5′-конце), которые, вероятно, и являются участком, на который действует EndoG. Трансфекция искусственно синтезированного EGPO вызывала активацию АС мРНК hTERT в клеточных ядрах и в самих клетках CaCo-2 и приводила к снижению активности теломеразы. EGPO весьма сильно отличается от микроРНК, активных при АС [29] – его длина гораздо больше ~22 нуклеотидов, и он образуется из нкРНК известного гена. Действие EGPO сходно с действием описанных малых некодирующих ядерных РНК [24] или терапевтических олигонуклеотидов, переключающих сплайсинг [25]. Однако следует отметить, что размер EGPO больше, чем у малых ядерных РНК (15-25 нуклеотидов), и образуется он из комплементарной цепи регулируемого им гена. Экспрессия EGPO увеличивалась при трансфекции клеток геном *EndoG* и обработке цитоплазмы и ядер recEndoG. Чтобы установить субстрат EndoG, из которого образуется EGPO, мы использовали метод секвенирования следующего поколения и определили нуклеотидную последовательность нкРНК. Экспрессия нкРНК в клетках не зависела от действия EndoG. Наиболее вероятно, что количество EGPO регулируется активностью EndoG, а не уровнем нкРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АС пре-мРНК hTERT является “регулятором точной настройки” теломеразной активности, однако механизм этой регуляции изучен недостаточно полно. Нами показано, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG способна вызывать АС мРНК hTERT в ядрах и цитоплазме клеток. Установлено, что в нормальных условиях процесс β-делеции мРНК hTERT происходит вне ядра. Показано также, что малая РНК EGPO, которая образуется из нкРНК, вызывает АС по механизму, сходному с действием переключающих сплайсинг олигонуклеотидов. Очевидно, что этот механизм требует более глубокого изучения. В частности, не понятно, каким образом синтезируется нкРНК с матричной цепи гена *hTERT*, почему EndoG вырезает EGPO именно такого размера, хотя в нкРНК

присутствуют и другие поли-G-последовательности, почему EGPO комплементарен месту соединения экзона 8 и интрона 8, какие еще белки участвуют в этом процессе. Но очевидно, что этот механизм существенно отличается от всех известных, поскольку участие EndoG в процессе АС и образование малых некодирующих РНК под действием EndoG описано впервые.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. *Blackburn E.H.* (2000) Nature, **408**, 53-56.
2. *Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W.* (1990) Nature, **345**, 458-460.
3. *Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Shay J.W.* (1994) Science, **266**, 2011-2015.
4. *Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D., Weinberg R.A.* (1997) Cell, **90**, 785-795.
5. *Saebøe-Larssen S., Fossberg E., Gaudernack G.* (2006) BMC Mol. Biol., **7**, 26.
6. *Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Oruganti H., Giudice L.C., Hoffman A.R.* (2000) Int. J. Cancer., **85**, 330-335.
7. *Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R.* (1998) Cancer Res., **58**, 4168-4172.
8. *Listerman I., Sun J., Gazzaniga F.S., Lukas J.L., Blackburn E.H.* (2013) Cancer Res., **73**, 2817-2828.
9. *Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova V.S., Gotovtseva V.Y., Bibikova M.V., Pokrovsky V.S., Sokolov N.N.* (2016) Biomed. Chem., **62**, 239-250.
10. *Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae,N., Fukuyama H.* (2003) Cell Death Differ., **10**, 108-116.
11. *Ruiz-Carrillo A., Renaud J.* (1987) EMBO J., **6**, 401-647.
12. *Diener T., Neuhaus M., Koziel R., Micutkova L., Jansen-Dürr P.* (2010) Exp. Gerontol., **45**, 638-644.
13. *Laukova M., Alaluf L.G., Serova L.I., Arango V., Sabban E.L.* (2014) Endocrinology, **155**, 3920-3933.
14. *Pravdenkova S.V., Basnakian A.G., James S.J., Andersen B.J.* (1996) Brain Res., **729**, 151-155.
15. *Basnakian A.G., Apostolov E.O., Yin X., Abiri S.O., Stewart A.G., Singh A.B., Shah S.V.* (2006) Exp. Cell Res., **312**, 4139-4149.
16. *Lopez J.P., Diallo A., Cruceanu C., Fiori L.M., Laboissiere S., Guillet I., Ernst C.* (2015) BMC Med. Genomics, **8**, 35.
17. *Nakama M., Kawakami K., Kajitani T., Urano T., Murakami Y.* (2012) Genes Cells, **17**, 218-233.
18. *Bradford M.M.* (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
19. *Laemmli U.K.* (1970) Nature, **227**, 680-685.
20. *Hofnagel O., Luechtenborg B., Stolle K., Lorkowski S., Eschert H., Plenz G., Robenek H.* (2004) Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biol., **24**, 1789-1795.
21. *Kovalenko N.A., Zhdanov D.D., Bibikova M.V., Gotovtseva V.I.* (2011) Biomed Chem., **57**(5), 501-510.
22. *Blackburn E.H.* (2001) Cell, **106**, 661-673.
23. *Ohsato T., Ishihara N., Muta T., Umeda S., Ikeda S., Mihara K., Kang D.* (2002) Eur. J. Biochem., **269**, 5765-5770.
24. *Khanna A., Stamm S.* (2010) RNA Biol., **7**, 480-485.
25. *Bauman J., Jearawiriyapaisarn N., Kole R.* (2009) Oligonucleotides, **19**, 1-13.
26. *Pirollo K.F., Rait A., Sleer L.S., Chang E.H.* (2003) Pharmacol. Therapeut., **99**, 55-77.
27. *Yi X., White D.M., Aisner D.L., Baur J.A., Wright W.E., Shay J.W.* (2000) Neoplasia, **2**, 433-440.
28. *Colgin L.M., Wilkinson C., Englezou A., Kilian A., Robinson M.O., Reddel R.R.* (2000) Neoplasia, **2**, 426-432.
29. *Makeyev E.V., Zhang J., Carrasco M.A., Maniatis T.* (2007) Mol. Cell, **27**, 435-448.
30. *Jin Y., Yang Y., Zhang P.* (2011) RNA Biol., **8**, 450-457.

Поступила: 07. 07. 2016.
Принята к печати: 11. 10. 2016.

APOPTOTIC ENDONUCLEASE EndoG REGULATES ALTERNATIVE SPLICING OF HUMAN TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT hTERT

D.D. Zhdanov[1,2], D.A. Vasina[2], E.V. Orlova[3], V.S. Orlova[2], M.V. Pokrovskaya[1], S.S. Aleksandrova[1], N.N. Sokolov[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel. +7910478 1275; fax: +74992450857; e-mail: zhdanovdd@mail.ru
[2]Ecological faculty, Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russia
[3]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia

Human telomerase catalytic subunit hTERT is subjected to alternative splicing results in loss of its function and leads to decrease of telomerase activity. However, very little is known about the mechanism of hTERT pre-mRNA alternative splicing. Apoptotic endonuclease EndoG is known to participate this process. The aim of this study was to determine the role of EndoG in regulation of hTERT alternative splicing. Increased expression of β-deletion splice variant was determined during EndoG over-expression in CaCo-2 cell line, after EndoG treatment of cell cytoplasm and nuclei and after nuclei incubation with EndoG digested cell RNA. hTERT alternative splicing was induced by 47-mer RNA oligonucleotide in naked nuclei and in cells after transfection. Identified long non-coding RNA, that is the precursor of 47-mer RNA oligonucleotide. Its size is 1754 nucleotides. Based on the results the following mechanism was proposed. hTERT pre-mRNA is transcribed from coding DNA strand while long non-coding RNA is transcribed from template strand of hTERT gene. EndoG digests long non-coding RNA and produces 47-mer RNA oligonucleotide complementary to hTERT pre-mRNA exon 8 and intron 8 junction place. Interaction of 47-mer RNA oligonucleotide and hTERT pre-mRNA causes alternative splicing.

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