

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ тРНК И МОЛОДЫХ СУБСЕМЕЙСТВ Alu-ПОВТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА U937 ПРИ АПОПТОЗЕ

© И. Н. Кабанов,¹ Л. И. Тищенко

*Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета;
¹ электронный адрес: Ink5@yandex.ru*

На культуре клеток человека U937 изучали экспрессию генов, транскрибуемых РНК-полимеразой III, — инициаторной тРНК^{Met1}, тРНК^{His} и представителей молодых субсемейств AluY (AluYa5 и AluYb8) — при апоптозе, индуцированном камптотецином (САМ). Содержание тРНК^{Met1} возрастало в 1,5 раза, содержание тРНК^{His} не изменялось, а уровень AluY-РНК увеличивался в 4—10 раз через 6 ч действия САМ в сравнении с контрольными (неапоптотическими) клетками. Кроме того, изучали уровень метилирования ДНК AluYb8 клеток U937 при апоптозе. Показали, что степень метилирования ДНК AluYb8 не изменялась на разных стадиях апоптоза, а также не различалась между апоптотическими и контрольными клетками. Предполагается, что увеличение экспрессии генов молодых повторов AluY и тРНК^{Met1} играет роль в реализации апоптотического пути в клетке.

Ключевые слова: гены класса III, РНК-полимераза III, стабильные нетранслируемые РНК, SINE-последовательности, Alu-повторы, ОТ-ПЦР в реальном времени, метилирование ДНК, апоптоз.

Долгое время считали, что гены малых нетранслируемых РНК, транскрибируемые РНК-полимеразой III (генетический класс III), к которым принадлежат гены 5S рРНК, тРНК и некоторые другие, транскрибируются подобно генам домашнего хозяйства, т. е. конститутивно и с постоянной скоростью, и нет необходимости в сложной регуляции этого процесса. Позже были получены данные, свидетельствующие о том, что в клетке существуют сложные ген-специфичные и тканеспецифичные механизмы регуляции экспрессии различных генов класса III (Dieci et al., 2007; Nikitina, Tishchenko, 2007). Однако при исследовании экспрессии этих генов в качестве объекта в основном использовали гены, продукты которых участвуют в процессе трансляции, такие как гены 5S рРНК и тРНК, не рассматривая другие гены, также транскрибируемые РНК-полимеразой III, например гены коротких диспергированных повторов SINE.

Среди генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III, особый интерес представляют Alu-последовательности (представители класса SINE-повторов у человека), функция которых изучена недостаточно. Alu-повторы являются наиболее распространенными мобильными элементами в геноме человека. Они составляют около 13 % всего генома, и их количество достигает 1.1 млн копий (Goodfellow, White, 2007; Никитина, Тищенко, 2008). Полагают, что Alu-повторы произошли от гена 7SL РНК, их длина составляет примерно 300 пар оснований (п. о.), а свое название они получили в результате того, что их ДНК содержит сайт узнавания рестриктазой AluI (Quentin, 1992). Alu-повтор имеет димерную структуру и состоит из двух похожих, но не идентичных прямых повторов протяженностью около 130 п. о. — левого и правого

плеч. Плечи разделяет А-богатый регион, правое плечо закачивается коротким поли-А-трактом. В левом плече содержатся А- и В-боксы слабого внутреннего промотора РНК-полимеразы III (Hasler, Strub, 2006). Alu-повторы распространяются по геному с помощью механизма ретротранспозиции, для осуществления которого им необходима ревертаза, кодируемая повторами LINE (Dewannieux et al., 2003; Nikitina et al., 2011). Ретротранспозиция Alu может приводить к опухолевой трансформации клеток и некоторым генетическим заболеваниям, например гемофилии, нейрофиброматозу, синдрому Аптера и др. (Kazazian, 1998). С другой стороны, известно, что Alu-повторы способны выполнять функции энхансеров, инсуляторов, участков альтернативного сплайсинга и другие функции, дающие клетке преимущества, что, возможно, и объясняет их распространение по геному человека (Никитина, Тищенко, 2008).

В настоящее время есть основания полагать, что Alu-последовательности и их РНК-продукты могут играть роль не только в активации пролиферации, опухолевой трансформации, стрессе и ряде других процессов, но и в программируемой клеточной гибели — апоптозе (Berele, 2005; Nikitina, Tishchenko, 2007). Однако роль Alu-последовательностей и их РНК-транскриптов при апоптозе клеток детально не исследовали.

С другой стороны, известно, что одним из факторов, влияющих на экспрессию генов, является состояние хроматина, которое может определяться метилированием его ДНК. Паттерн метилирования ДНК наследуется, что делает эпигенетическую маркировку стабильной в ряду клеточных делений, однако уровень метилирования ДНК на протяжении жизни особи может изменяться как вслед-

ствие физиологической реакции клетки на изменения внешней среды, так и в связи с патологическим процессом, например онкогенной трансформацией, клеточным стрессом или клеточным старением (Jintaridith, Mutirangura, 2010; Кабанов, Тищенко, 2014). Метилирование ДНК, как правило, подавляет экспрессию генов (Yoder et al., 1997; Кабанов, Тищенко, 2014). Однако внутренние и внешние факторы, инициирующие изменения в метилировании ДНК, остаются мало изученными.

Alu-ДНК в норме, как правило, метилирована в значительной степени по сравнению с окружающей ДНК (Sandovici et al., 2005; Roman-Gomez et al., 2008), но гипометилирована при многих опухолевых заболеваниях (Rodriguez et al., 2008; Choi et al., 2009; Xie et al., 2010). Однако факторы, способствующие изменению метилирования ДНК, изучены недостаточно. Неясно, как изменяется паттерн метилирования ДНК при апоптозе клеток. Поэтому интересно узнать, меняется ли уровень метилирования ДНК наиболее транспозиционно-активного семейства AluY при вступлении опухолевых клеток в апоптоз.

Основная цель данной работы состояла в изучении уровня экспрессии различных представителей генов класса III — инициаторной tРНК^{Met1}, tРНК^{His} и представителей молодых субсемейств Alu (AluYa5 и AluYb8) при апоптозе. Объектом исследования явились AluY-повторы в клетках гистиоцитарной лимфомы человека U937. Субсемейство AluY было выбрано потому, что это наиболее распространенное и наиболее транспозиционно-активное субсемейство Alu в геноме человека (Nikitina, Tishchenko, 2007; Никитина, Тищенко, 2008).

Материал и методика

Клетки гистиоцитарной лимфомы человека U937, впервые полученные в 1976 г. (Sundström, Nilsson, 1976), были приобретены в Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (FBS) и гентамицин (40 мкг/мл), в течение 13 сут, а затем подвергали 2-суточному голоданию в среде RPMI-1640 без сыворотки. Далее плотность клеток доводили примерно до 1 млн/мл, добавив среду RPMI-1640 и сыворотку FBS до конечной концентрации 10 %. Клетки культивировали с сывороткой при 37 % в течение 2 ч (Dasgupta et al., 2004), после чего суспензию клеток U937 разделяли на две части: в одну (эксперимент) для индукции апоптоза добавляли ингибитор ДНК-топоизомеразы I камптотецин (САМ) до конечной концентрации 4 мкг/мл (Bicknell et al., 1994), а другую (контрольную) культивировали в прежних условиях (без САМ). Для анализа отбирали аликовты суспензии клеток из каждого флакона (с САМ и без САМ) через 2, 4 и 6 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью световой микроскопии по включению трипанового синего: погибшие клетки окрашивались в синий цвет, а живые — нет. Апоптоз клеток U937, индуцированный САМ, детектировали электрофоретически по увеличению количества фрагментированной геномной ДНК в цитоплазматической фракции клеток (Herrmann et al., 1994).

Анализ содержания РНК AluY в тотальной РНК клеток U937 проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли из клеток U937,

используя набор AquaPure RNA (Bio-Rad, США). Полученную тотальную РНК анализировали с помощью электрофореза в 1.2%-ном агарозном геле в присутствии формальдегида. Синтез кДНК на матрице тотальной РНК осуществляли с помощью набора RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) и статистического набора гексамерных праймеров. Полученную кДНК применяли в качестве матрицы при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, используя специфичные праймеры к РНК-продуктам повторов, принадлежащих к AluYa5 и другим различным субсемействам молодого семейства AluY (AluYa4, AluYa8, AluYb8, AluYb9, AluY, AluYc1 и Alu-Yg6): 5'-GGT CAG GAG ATC GAG ACC AT-3' (прямой праймер) и 5'-ACG GAG TCT CGC TCT GTC G-3' (обратный праймер). Кроме того, использовали специфичные праймеры к AluYb8 : 5'-GTC AGG AGA TCG AGA CCA TCC TGG CTA ACA A-3' (прямой праймер) и 5'-TCT GTC GCC CAG GCC GGA-3' (обратный праймер). Последовательности повторов AluY для подбора праймеров брали из базы данных Repbase (URL:<http://www.girinst.org/repbase/index.html>). Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer3 (URL: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Проба для ПЦР объемом 25 мкл содержала 10 мкл реакционной смеси EVA Green (2.5-кратный ПЦР-буфер Б (KCl, Трис-HCl, pH 8.8, 6.25 mM MgCl₂), Таq ДНК-полимеразу, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, глицерин, Tween-20 и интеркалирующий краситель), по 150 нМ прямого и обратного праймеров для Alu-последовательностей и 200 нг кДНК-матрицы. ПЦР в реальном времени проводили на установке CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, США). Программа амплификации: 95 °C — 5 мин; 45 циклов: 63 °C — 1 мин, 95 °C — 15 с. Измерение флуоресценции проводили при 84 °C. Кривые плавления продуктов ПЦР снимали в интервале температур 65—98 °C. Полученные данные анализировали с помощью программ CFX Manager (Bio-Rad, США) и Microsoft Excel 2003. Соотношение (*r*) уровней содержания исследуемой РНК в контроле (клетки без обработки САМ) и в эксперименте (клетки, обработанные САМ) вычисляли по формуле $r = E^{\Delta Ct}$, где *E* — эффективность амплификации, ΔCt — разница значений порогового цикла Ct в контроле и в эксперименте. В пробах с РНК без обработки обратной транскриптазой в результате ПЦР продукты не обнаруживались. ПЦР «в конечной точке» проводили на приборе Терцик (ДНК-технология). Программа амплификации: 95 °C — 5 мин; 32 цикла: 60 °C — 1 мин, 95 °C — 15 с; 60 °C — 5 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле на буфере SB (10 mM NaOH, pH 8.5 достигали кристаллической борной кислотой).

Анализ содержания транспортных РНК (tРНК^{Met1} и tРНК^{His}) в клетках U937 проводили с помощью ОТ-ПЦР. Процедуры выделения тотальной РНК и синтеза кДНК были такими же, как и при подготовке к ОТ-ПЦР с праймерами к Alu-последовательностям. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы при проведении ПЦР в реальном времени с использованием специфичных праймеров к инициаторной tРНК^{Met1} (прямой 5'-AGC AGA GTG GCG CAG C-3' и обратный 5'-TAG CAG AGG ATG GTT TAG ATC CA-3') и к tРНК^{His} (прямой 5'-GCC GTG ATC GTA TAG TGG TT-3' и обратный 5'-ATT CGA ACC GAG GTT GCT-3'). Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer3

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Проба для ПЦР объемом 25 мкл содержала 10 мкл реакционной смеси EVA Green (см. выше), по 300 нМ прямого и обратного праймеров, 80 нг кДНК-матрицы. ПЦР «в реальном времени» проводили на установке CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, США). Программа амплификации: 95 °C — 5 мин; 45 циклов: 62 °C — 1 мин, 95 °C — 15 с. Измерение флуоресценции проводили при 75 °C. Кривые плавления продуктов ПЦР снимали в интервале температур 55—90 °C. Анализ полученных данных проводили так же, как в случае ОТ-ПЦР с праймерами к Alu-последовательностям.

Далее изучали метилирование ДНК в клетках U937 только повтора AluYb8, поскольку именно этот мобильный элемент является наиболее распространенным и активным представителем семейства Alu-повторов. Анализ метилирования ДНК AluYb8 осуществляли методом метил-специфической ПЦР (Смирнихина, Лавров, 2009). Геномную ДНК из клеток U937 выделяли с использованием набора ZR Genomic DNA II Kit(tm) (Zymo Research, США), а затем 1 мкг ДНК из каждой пробы обрабатывали бисульфитом натрия и очищали с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold(tm) Kit (Zymo Research, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Условия проведения бисульфитной обработки: 98 °C — 10 мин; 53 °C — 30 мин; 8 циклов: 53 °C — 6 мин, 37 °C — 30 мин. Количественное определение содержания метилированных и неметилированных последовательностей AluYb8 проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров к AluYb8-повтору после бисульфитной обработки к метилированной последовательности (прямой праймер 5'-GTG GAT TAT GAG GTT AGG AGA TCG-3' и обратный 5'-CCG AAC TAC GAA CTA CAA TAA CGC-3') и к неметилированной последовательности (прямой праймер 5'-GTG GAT TAT GAG GTT AGG AGA TTG-3' и обратный 5'-CAA ACC AAA CTA CAA ACT ACA ATA ACA C-3'). Программа амплификации: 95 °C — 5 мин; 40 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 20 с, 72 °C — 10 с. Измерение флуоресценции проводили при 72 °C. Кривые плавления продуктов ПЦР снимали в интервале температур 65—99 °C. Соотношение (*r*) метилированных и неметилированных последовательностей AluYb8 вычисляли по формуле: $r = 2^{(CtU-CtM)}$, где 2 — это эффективность амплификации, Ct — пороговый цикл для пробы с праймерами к неметилированной последовательности (CtU) или для пробы с праймерами к метилированной последовательности (CtM).

Результаты

Характеристика клеток. Оценка жизнеспособности клеток показала, что в течение 6 ч после начала эксперимента выживаемость контрольных клеток составила 95, а экспериментальных — 90 %. Контрольные клетки, не содержащие САМ, и экспериментальные культуры выращивали при одинаковой плотности суспензии (около 1 млн клеток в 1 мл среды).

Характеристика ДНК и РНК клеток U937 при апоптозе. Апоптоз клеток, индуцируемый действием САМ, детектировали по появлению в цитоплазматической фракции клеток лестничной фрагментации ДНК после 6-часовой обработки. В контрольных клетках фрагментации ДНК не было (рис. 1).

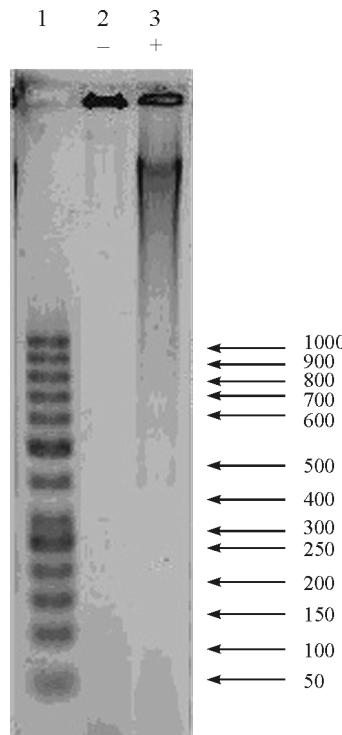


Рис. 1. Электрофореграмма разделения фрагментов ДНК цитоплазматической фракции клеток U937 через 6 ч культивирования в контроле (дорожка 2, —) и в присутствии 4 мкг/мл камптоцина (дорожка 3, +).

Дорожка 1 — маркер длин фрагментов.

Анализ РНК, выделенной из клеток U937, проводили с помощью электрофореза в 1.2%-ном агарозном геле на MOPS-буфере с формальдегидом. Как видно на рис. 2, после разделения в геле тотальной РНК, окрашенной бромистым этидием, наблюдаются две четкие полосы, соответствующие 28S (~4800 нуклеотидов) и 18S (~1900 нуклеотидов) РНК. Это означает, что тотальная РНК не деградировала при выделении и ее можно использовать в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции (получения кДНК для дальнейшего использования в ПЦР) (Chomczynski, 1992). При проведении ПЦР, когда в случае матрицы использовали РНК без добавления обратной транскриптазы, продукт ПЦР не обнаруживался.

Содержание тРНК в клетках U937. Анализ содержания инициаторной tРНК^{Met1} и tРНК^{His} в тотальной РНК клеток U937, находящихся в состоянии апоптоза, индуцированного САМ, методом ОТ-ПЦР в конечной точке показал, что содержание инициаторной tРНК^{Met1} повышалось примерно в 1.5 раза в апоптотических клетках по сравнению с контрольными клетками, тогда как содержание tРНК^{His} было примерно одинаково в апоптотических и контрольных клетках (рис. 3). Сходные данные были получены методом ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 4).

Содержание РНК AluY в клетках U937. При изучении содержания продуктов экспрессии Alu-повторов (Alu-РНК) в клетках в качестве объекта исследования были выбраны представители молодого субсемейства AluY (AluYa5 и AluYb8), поскольку они являются наиболее распространенными и транспозиционно-активными Alu-последовательностями в геноме человека (Schmid, 2003; Nikitina, Tishchenko, 2007). Методом коли-

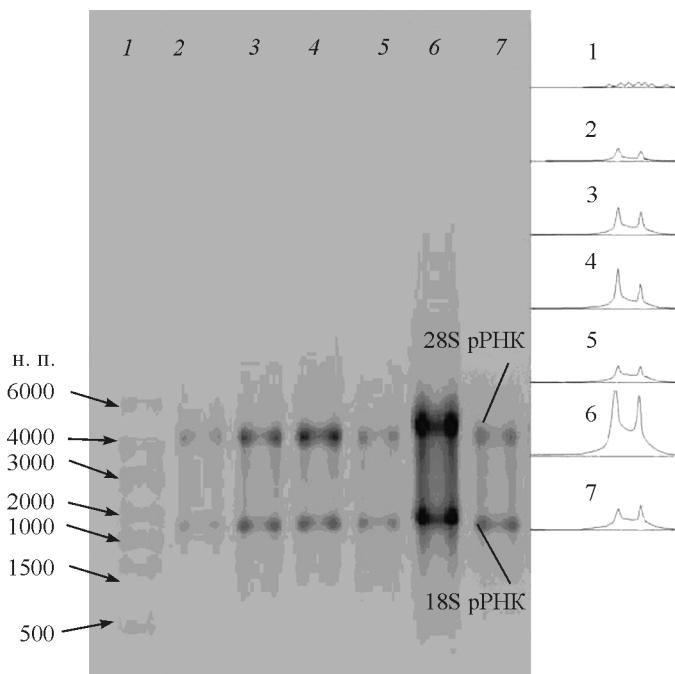


Рис. 2. Электрофореграммаtotальной РНК контрольных и апоптотических клеток U937.

Дорожки: 1 — маркер длины фрагментов РНК; 2, 4, 6 — контроль (клетки соответственно через 2, 4 и 6 ч после культивирования в среде с 10 % сыворотки); 3, 5, 7 — клетки соответственно через 2, 4 и 6 ч культивирования в той же среде и в присутствии 4 мкг/мл амптиотецина (САМ); н. п. — нуклеотидные пары. Справа — денситограммы геля, полученные с помощью программы ImageJ 1.39u (NIH, США). Разделение в 1.2%-ном агарозном геле.

чественной ОТ-ПЦР в реальном времени мы получили данные об экспрессии AluYb8 и других молодых субсе-

мейств AluY в контрольных и апоптотических клетках. Уровень экспрессии генов молодых субсемейств Alu оценивали по содержанию соответствующих РНК в тотальной РНК клеток. Оказалось, что при апоптозе, индуцированном САМ, уровни экспрессии AluYa5 и AluYb8 в клетках через 6 ч значительно возрастали (в 4—10 раз) по сравнению с контрольными клетками (рис. 5).

Анализ кривых плавления продуктов ПЦР, полученных амплификацией с праймерами к последовательности AluYa5, показал присутствие целого ряда слившихся друг с другом пиков. Это объясняется тем, что для амплификации мы использовали праймеры, подобранные к консервативным участкам последовательности AluYa5, которые присутствуют и в других последовательностях, принадлежащих к различным субсемействам молодого семейства AluY (AluYa4, AluYa5, AluYa8, AluYb8, AluYb9, AluY, AluYc1 и AluYg6). Поэтому продукты ПЦР в реальном времени в данном случае являются гетерогенными и представлены ДНК-копиями, которые соответствуют фрагментам различных Alu-повторов и имеют разные температуры плавления, но одинаковые размеры.

Очевидно, что данные, представленные на рис. 6 *a*, относятся не только к AluYa5-РНК, но и к РНК других перечисленных субсемейств Alu. Для амплификации AluYb8-кДНК использовали праймеры, комплементарные уникальным участкам этой последовательности, которые присутствуют также у AluYb9 (отличается от AluYb8 лишь одной нуклеотидной заменой и распространена в геноме человека в значительно меньшей степени), но отсутствуют у последовательностей, принадлежащих к другим субсемействам AluY. В этом случае продукт ПЦР был представлен последовательностями AluYb8 и AluYb9 с близкой температурой плавления, при денатурации которых на кривой плавления присутствовали два пика (рис. 6, *b*). Таким образом, данные свидетельствуют о том, что в апоптотических клетках U937 существенно по-

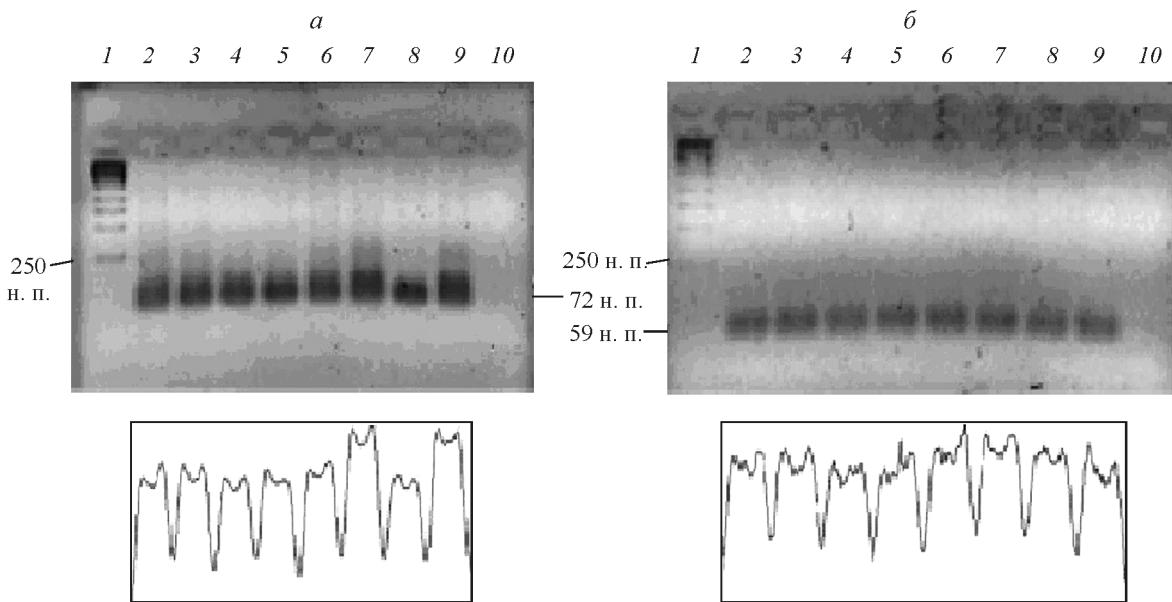


Рис. 3. Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР «в конечной точке» в 2%-ном агарозном геле. Амплификация с использованием праймеров к tРНК^{Met1} (*a*) и к tРНК^{His} (*b*).

Дорожки: 1 — маркер длины фрагментов ДНК (DNA Ladder 1 kb); 2 — клетки через 48 ч сывороточного голодания; 3, 4 — клетки соответственно через 2 и 4 ч после добавления 10 % сыворотки; 5 — 2 ч в присутствии 4 мкг/мл САМ; 6 — 6 ч в среде с 10 % сыворотки; 7 — 4 ч в присутствии САМ; 8 — 6 ч в среде с 10 % сыворотки; 9 — 6 ч в присутствии САМ; 10 — контроль: проба без кДНК. Во все пробы брали одинаковое количество кДНК. Под электрофореграммами приведены денситограммы гелей (получены с помощью программы ScionImage for Windows). Представлены результаты одного из трех повторяющихся экспериментов.

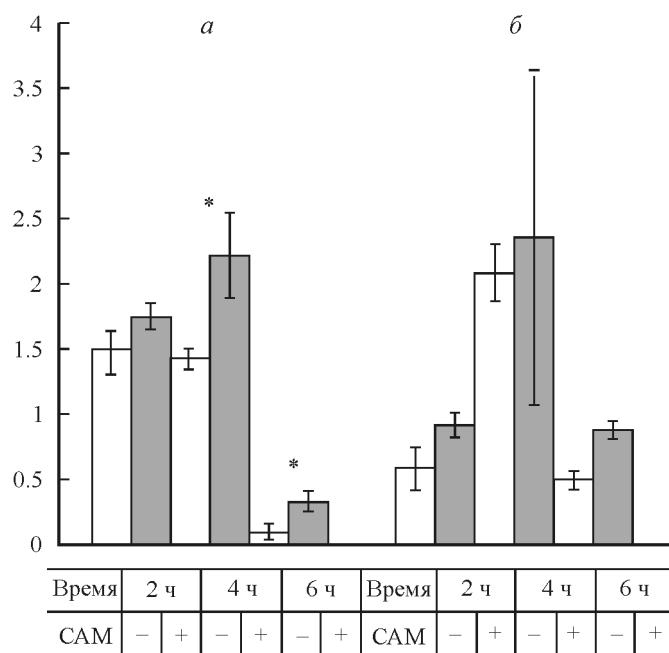


Рис. 4. Содержание тРНК^{iMet1} (а) и тРНК^{His} (б) в тотальной РНК клеток U937 в контроле и после действия 4 мкг/мл САМ в течение разного времени. ОТ-ПЦР в реальном времени.

По вертикали — экспрессия РНК в экспериментальных и контрольных пробах, отн. ед. Чёрные столбцы — в присутствии САМ, белые — в отсутствие САМ. Звездочкой отмечена пара столбцов с уровнем значимости $0.01 < P < 0.05$.

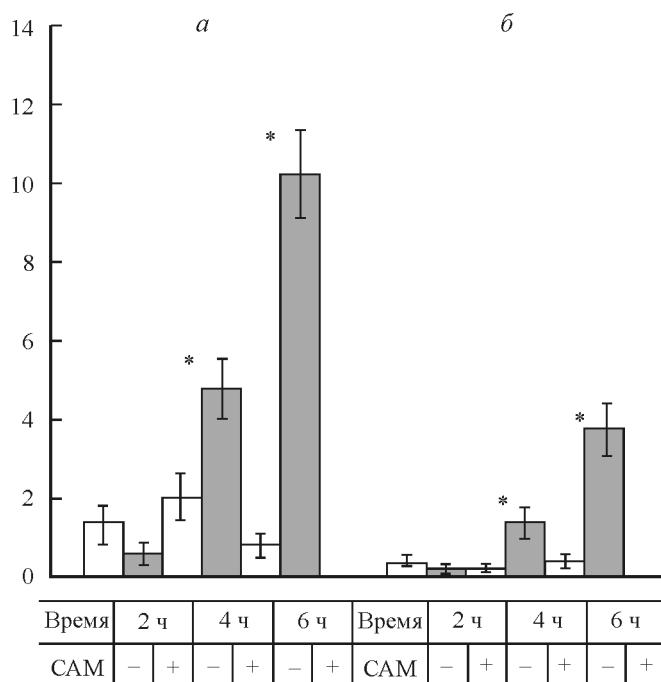


Рис. 5. Содержание AluYa5-РНК (а) и AluYb8-РНК (б) в тотальной РНК клеток U937 в контроле и после действия 4 мкг/мл САМ в течение разного времени. ОТ-ПЦР в реальном времени.

По вертикали — экспрессия РНК в экспериментальных и контрольных пробах, отн. ед. Остальные обозначения те же, что и на рис. 4.

вышается содержание Alu-РНК, синтезируемых с Alu-повторами, принадлежащими к целому ряду молодых субсемейств.

Метилирование ДНК AluYb8-повторов в клетках U937 исследовали методом метил-чувствительной ПЦР. Результаты исследований показали, что доля последовательностей AluYb8, метилированных в областях, комплементарных праймерам, составляла 92 ± 6 , а неметилированных — $7 \pm 5\%$. Эти показатели не зависели от времени культивирования и присутствия САМ, т. е. контрольные и апоптотические клетки не различались. Таким образом, повышение экспрессии Alu-повторов не сопровождается снижением уровня метилирования их последовательности.

Обсуждение

При исследовании содержания инициаторной тРНК^{iMet1} и тРНК^{His} в тотальной РНК клеток U937, находящихся в состоянии апоптоза, индуцированного САМ, методом ОТ-ПЦР «в конечной точке» и в реальном времени были получены следующие результаты: 1) содержание инициаторной тРНК^{iMet1} повышалось в апоптотических клетках примерно в 1.5 раза по сравнению с контрольными; 2) по содержанию тРНК^{His} контрольные и апоптотические клетки практически не различались.

Ранее было показано, что при апоптозе, индуцированном ЭФР в высокой концентрации (100 нг/мл), в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 также повышается содержание инициаторной тРНК^{iMet} в тотальной РНК клеток (Никитина и др., 2004). Повышенное

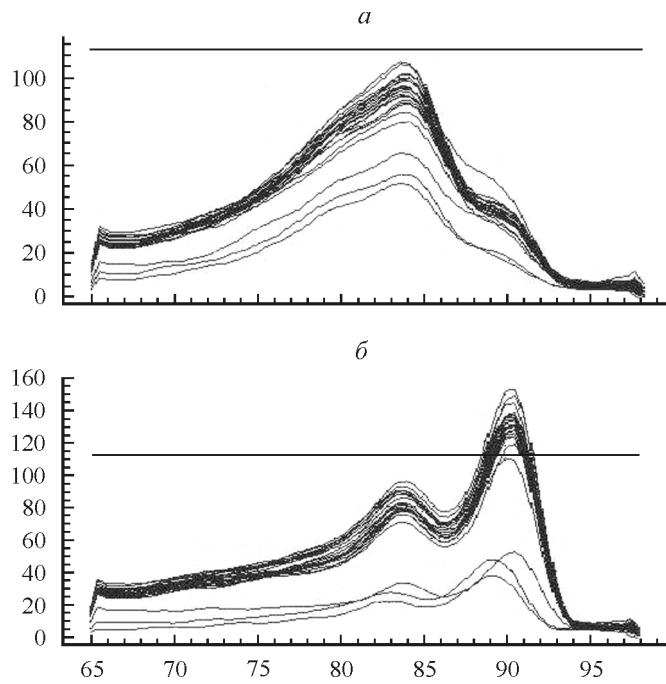


Рис. 6. Кривые плавления продуктов амплификации кДНК, полученные при проведении ПЦР в реальном времени в присутствии специфичных праймеров для последовательности AluYa5 и других представителей AluY (а) и AluYb8 (б).

По оси абсцисс — температура, °С; по оси ординат — отрицательная величина скорости изменения флуоресценции EVA Green в пробе.

содержание тРНК^{Met} (ответственной за инициацию трансляции) по сравнению с примерно постоянным содержанием тРНК, участвующих в элонгации, например тРНК^{His}, по-видимому, необходимо клеткам, переходящим в состояние апоптоза, для того чтобы они могли быстро начать синтез проапоптотических белков (например, каспаз), участвующих в реализации программы клеточной гибели. Это предположение согласуется с тем фактом, что на скорость биосинтеза белка (трансляции) в наибольшей степени влияет доступность специфичных тРНК (инициаторных — тРНК^{Met1}), а не количество мРНК, как считали ранее (Brockmann et al., 2007).

Следующий этап работы состоял в исследовании содержания продуктов экспрессии Alu-повторов, принадлежащих к молодому семейству AluY, в клетках U937 при переходе к апоптозу. Это было необходимо для проверки гипотезы о том, что короткие диспергированные повторы SINE, к которым относятся Alu-последовательности человека, и их РНК-продукты могут играть определенную роль в реакции клетки на сильные цитотоксические повреждения и, возможно, участвовать в реализации апоптозного пути. Было обнаружено, что при апоптозе содержание Alu-РНК в клетках U937 значительно возрастает (в 4—10 раз) по сравнению с контрольными клетками.

В настоящее время имеются данные, свидетельствующие о том, что при различных повреждающих воздействиях на клетку в ней повышается содержание SINE-транскриптов, что сопровождается либо восстановлением клетки, либо ее гибелю (апоптозом) (Nikitina, Tishchenko, 2007; Никитина, Тищенко, 2008; Nikitina et al., 2011). Существует ряд предположений о возможной роли Alu-РНК, а также транскриптов других представителей семейства SINE (B1- и B2-РНК у грызунов) в обеспечении восстановления клетки после стресса (Nikitina, Tishchenko, 2007). Однако роль SINE-транскриптов и инициаторной тРНК^{Met1} при апоптозе клеток до сих пор не выяснена. Имеющиеся в настоящее время сведения позволяют предположить следующие механизмы, посредством которых последовательности SINE, SINE-транскрипты, а также тРНК^{Met1} могут влиять на программируемую клеточную гибель (Никитина, Тищенко, 2008; Nikitina et al., 2011). Так, тРНК^{Met1} может участвовать в активации синтеза de novo проапоптотических белков (например, каспаз) (Mei et al., 2010). Увеличение содержания Alu-РНК, вероятно, способствует усилинию ретротранспозиции этих элементов, поскольку при апоптозе также возрастает экспрессия мобильных элементов LINE, содержащих ген обратной транскриптазы, необходимый для ретротранспозиции как LINE, так и SINE. Ретротранспозиция Alu-последовательностей может приводить к внутригеномным перестройкам, способствующим апоптозу (Bennett et al., 2004; Dewannieux, Heidmann, 2005). Другой механизм — это влияние Alu-РНК на трансляцию посредством либо взаимодействия с SRP и рибосомами, либо связывания с протеинкиназой PKR, активация которой может способствовать апоптозу (Chu et al., 1998; Williams, 1999). Наконец, апоптозу клеток может способствовать активация Alu-повторами внутриклеточных систем неспецифического иммунитета, таких как система интерферона β (Malathi et al., 2007).

В последнее время популярна гипотеза «палки о двух концах» в отношении роли мобильных элементов в регуляции апоптоза и канцерогенеза (Belancio et al., 2010). Повреждение ДНК вследствие активации экспрессии и ретротранспозиции мобильных элементов LINE и SINE в

нормальных клетках или на ранних стадиях трансформации приводит к апоптозу клеток, препятствуя канцерогенезу. Но если клетка потеряла способность к апоптозу, то активность мобильных элементов может приводить к усилению генетической нестабильности, опухолевой трансформации клетки и эволюции опухоли в сторону более агрессивных форм (Oren, 2003; Belancio et al., 2010).

Суммируя полученные результаты, можно констатировать, что при апоптозе содержание тРНК (кроме инициаторной тРНК) не изменяется, а количество Alu-РНК значительно повышается. Невыясненным остается механизм, позволяющий клетке одновременно не изменять синтез элонгирующих тРНК и повышать синтез Alu-РНК и тРНКⁱ, при том что гены обеих этих групп РНК имеют одинаковые промоторы. Одним из возможных механизмов различной экспрессии генов SINE и других генов класса III при апоптозе может быть изменение метилирования последовательностей соответствующих генов (Kochanek et al., 1993; Vorce et al., 1994). Для проверки этой гипотезы в клетках U937 исследовали метилирование AluYb8-повторов методом метил-чувствительной ПЦР. Показатели метилирования AluYb8-ДНК не изменились на разных стадиях апоптоза, а также не различались между апоптотическими и контрольными клетками. Повышение экспрессии Alu-повторов при апоптозе не сопровождалось снижением уровня метилирования их последовательности. Однако следует отметить, что праймеры, используемые нами, не включали в себя промотор гена AluYb8, поэтому данных о метилировании CpG в промоторе гена AluYb8 не получено. Можно предположить, что влияние на транскрипцию будет оказывать метилирование именно CpG-сайтов, входящих в состав промотора AluYb8, так как именно с промотором связываются базальные транскрипционные факторы TFIIIB и TFIIIC, которые затем привлекают в транскрипционный комплекс РНК-полимеразу III (Никитина, Тищенко, 2008). Кроме того, было показано, что на транскрипцию генов класса III с внутригенным промотором, а именно гена EBER-1 вируса Эпштейна—Барра) существенное влияние оказывает метилирование CpG-сайтов, расположенных не внутри гена, а в 5'-фланкирующей области (Banati et al., 2008). Было показано также, что метилирования критических CpG-динуклеотидов в промоторе LINE достаточно, чтобы гарантировать репрессию их транскрипции (Dewannieux et al., 2003; Steinhoff, Schulz, 2003). Можно предположить, что и в случае Alu-повторов достаточно высокий уровень их метилирования не препятствует экспрессии тех копий AluYb8, которые имеют гипометилированные участки промотора или 5'-фланкирующей области, однако это является предметом дальнейших исследований.

Список литературы

- Кабанов И. Н., Тищенко Л. И. 2014. Изменение метилирования ДНК повторяющихся последовательностей и однокопийных генов при онкологических и некоторых других заболеваниях человека. Вестник СПбГУ. Сер. 3 (3) : 62—83. (Kabanov I. N., Tishchenko L. I. 2014. Changing the DNA methylation of repetitive sequences and repetitive sequences and single-copy genes in cancer and other human diseases. Vestnik of St. Petersburg State University. Ser. 3 (3) : 62—83.)
- Никитина Т. В., Назарова Н. Ю., Аксенов Н. Д., Тищенко Л. И., Туохимаа И., Седова В. М. 2004. Уровень малых ста-

- бильных РНК зависит от физиологического состояния клетки. Цитология. 46 (5) : 437—441. (Nikitina T. V., Nazarova N. Yu., Aksenov N. D., Tishchenko L. I., Tuohimaa P., Sedova V. M. 2004. The small stable RNA depends on the physiological state of the cells. Tsitologiya. 46 (5) : 437—441.)
- Nikitina T. V., Tishchenko L. I. 2008. Роль экспрессии мобильных элементов класса SINE и генов, транскрибуемых РНК-полимеразой III, в регуляции внутриклеточных процессов (обзор). Молекуляр. биол. 42 (2) : 547—558. (Nikitina T. V., Tishchenko L. I. 2008. Role of the expression of mobile elements sine and the genes directed by RNA polymerase III in the regulation of intracellular processes. Mol. Biol. (Moscow). 42 (4) : 547—558.)
- Smirnihina C. A., Lavrov A. V. 2009. Методы оценки метилирования остатков цитозина в ДНК. Молекуляр. биол. 43 (3) : 387—391. (Smirnihina C. A., Lavrov A. V. 2009. Methods for assessing methylation of cytosine residues in DNA. Mol. Biol. (Moscow). 43 (3) : 387—391.)
- Banati F., Koroknai A., Salamon D., Takacs M. 2008. CpG-methylation silences the activity of the RNA polymerase III transcribed EBER-1 promoter of Epstein—Barr virus. FEBS Lett. 582 : 705—709.
- Beere H. M. 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. J. Clin. Invest. 115 : 2633—2639.
- Belancio V. P., Roy-Engel A. M., Deininger P. L. 2010. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. Seminars in Cancer Biology. 20 : 200—210.
- Bennett E. A., Coleman L. E., Tsui C., Pittard W. S., Devine S. E. 2004. Natural genetic variation caused by transposable elements in humans. Genetics. 168 : 933—951.
- Bicknell G. R., Snowden R. T., Cohen G. M. 1994. Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line, U937. J. Cell Sci. 107 : 2483—2489.
- Brockmann R., Beyer A., Heinisch J. J., Wilhelm T. 2007. Post-transcriptional expression regulation: what determines translation rates? PLoS Comput. Biol. 3. e57.
- Choi S. H., Worswick S., Byun H. M., Shear T., Soussa J. C., Wolff E. M., Douer D., Garcia-Manero G., Liang G., Yang A. S. 2009. Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. Int. J. Cancer. 125 : 723—729.
- Chomeczynski P. 1992. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. Nucl. Acids Res. 20 : 3791—3792.
- Chu W.-M., Ballard R., Carpick B. W., Williams B. R. G., Schmid C. W. 1998. Potential Alu function: regulation of the activity of double-stranded RNA-activated kinase PKR. Mol. Cell. Biol. 18 : 58—68.
- Dasgupta P., Sun J., Wang S., Fusaro G. 2004. Disruption of the Rb-Raf-1 interaction inhibits tumor growth and angiogenesis. Mol. Cell. Biol. 24 : 9527—9541.
- Dewannieux M., Esnault C., Heidmann T. 2003. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. Nat. Genet. 35 : 41—48.
- Dewannieux M., Heidmann T. 2005. L1-mediated retrotransposition of murine B1 and B2 SINEs recapitulated in cultured cells. J. Mol. Biol. 349 : 241—247.
- Dieci G., Fiorino G., Castelnovo M., Teichmann M., Pagan A. 2007. The expanding RNA polymerase III transcriptome. Trends Genet. 23 : 614—622.
- Goodfellow S. J., White R. J. 2007. Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. Cell. Cycle. 3 : 2323—2326.
- Hasler J., Strub K. 2006. Alu elements as regulators of gene expression. Nucl. Acids Res. 34 : 5491—5497.
- Herrmann M., Lorenz H.-M., Voll R., Grunke M. 1994. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. Nucl. Acids Res. 22 : 5506—5507.
- Jintaridit P., Mutirangura A. 2010. Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. Physiol. Genomics. 41 : 194—200.
- Kazazian H. H., jr. 1998. Mobile elements and disease. Curr. Opin. Genet. Develop. 8 : 343—350.
- Kochanek S., Renz D., Doerfler W. 1993. DNA methylation in the Alu sequences of diploid and haploid primary human cells. EMBO J. 12. 1141—1151.
- Malathi K., Dong B., Gale M., jr., Silverman R. H. 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. Nature. 448 : 816—819.
- Mei Y., Stonestrom A., Hou Y. M., Yang X. 2010. Apoptotic regulation and tRNA. Protein Cell. 1 : 795—801.
- Nikitina T. V., Tishchenko L. I. 2007. Role of genetic element SINE expression in apoptosis of the cell. In: New developments in cell apoptosis research. New York: Nova Sci. Publ. Inc. 159—178.
- Nikitina T. V., Tishchenko L. I., Schulz W. A. 2011. Recent insights into regulation of transcription by RNA polymerase III and the cellular functions of its transcripts. Biol. Chem. 392 : 395—404.
- Oren M. 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. Cell Death Differ. 10 : 431—442.
- Quentin Y. 1992. Origin of the Alu family: a family of Alu-like monomers gave birth to the left and the right arms of the Alu elements. Nucl. Acids Res. 20 : 3397—3401.
- Rodriguez J., Vives L., Jordá M., Morales C., Muñoz M., Vendrell E., Peinado M. A. 2008. Genome-wide tracking of unmethylated DNA Alu repeats in normal and cancer cells. Nucl. Acids Res. 36 : 770—784.
- Roman-Gómez J., Jiménez-Velasco A., Agirre X., Castillo-Já A., Navarro G., San Jose-Eneriz E., Garate L., Cordeu L., Cervantes F., Prosper F., Heiniger A., Torres A. 2008. Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of chronic myeloid leukemia. Leuk. Res. 32 : 487—490.
- Sandovici I., Kassovska-Bratinova S., Loredo-Osti J. C., Leppert M., Suárez A., Stewart R., Bautista F. D., Schiraldi M., Sapienza C. 2005. Interindividual variability and parent of origin DNA methylation differences at specific human Alu elements. Hum. Mol. Genet. 14 : 2135—2143.
- Schmid C. W. 2003. Alu: a parasite's parasite? Nat. Genet. 35 : 15—16.
- Steinhoff C., Schulz W. A. 2003. Transcriptional regulation of the human LINE-1 retrotransposon L1.2B. Mol. Genet. Genomics. 270 : 394—402.
- Sundström C., Nilsson K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int. J. Cancer. 17 : 565—577.
- Vorce R. L., Lee B., Howard B. H. 1994. Methylation- and mutation-dependent stimulation of Alu transcription *in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203 : 845—851.
- Williams B. R. G. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. Oncogene. 18 : 6112—6120.
- Xie H., Wang M., Bonaldo M. F., Rajaram V., Stellplug W., Smith C., Arndt K., Goldman S., Tomita T., Soares M. B. 2010. Epigenomic analysis of Alu repeats in human ependymomas. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107 : 6952—6957.
- Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. Trends Genet. 13 : 335—340.

FEATURES OF tRNA GENES AND YOUNG SUBFAMILIES Alu-REPEATS EXPRESSION
IN PROLIFERATION AND APOPTOSIS

I. N. Kabanov,¹ L. I. Tishchenko

Department of Biochemistry of St. Petersburg State University;
¹ e-mail: Ink5@yandex.ru

Using human U937 cell culture, we studied the expression of the RNA polymerase III-directed genes — tRNA^{iMet1}, tRNA^{His} and Alu-repeats belonging to the youngest subfamilies AluY (AluYa5 and AluYb8) — during camptothecin-induced apoptosis. The level of tRNA^{iMet1} increased 1.5-fold, tRNA^{His} level did not change, and the level of AluY-RNA increased 4—10-fold after 6 hours of CAM treatment compared to control (non-apoptotic) cells. We also studied the level of AluYb8 DNA methylation at apoptosis U937. We have shown that the level of AluYb8 DNA methylation does not change at different stages of apoptosis, and does not differ in apoptotic and control cells. We assume that the increase in gene expression of young AluY repeats and tRNA^{iMet1} plays a role in the apoptosis pathway realization in the cell.

Key words: class III genes, RNA polymerase III, stable non-translated RNAs, SINE, Alu-repeats, real-time RT-PCR, DNA methylation, apoptosis.