

ИНДУКЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ EndoG В ЛИМФОЦИТАХ МЫШИ И КРЫСЫ

© Д. Д. Жданов,^{1,*} Ю. А. Гладилина,¹ В. С. Орлова,² Д. В. Гришин,¹
М. В. Покровская,¹ С. С. Александрова,¹ О. В. Подобед,¹ Н. Н. Соколов¹

¹ Институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, 119121, и

² Российский университет дружбы народов, экологический факультет, Москва, 117198;

* электронный адрес: zhdanovdd@mail.ru

Известно, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG индуцирует альтернативный сплайсинг (АС) мРНК каталитической субъединицы теломеразы *TERT* (telomerase reverse transcriptase) и ингибирует активность теломеразы в опухолевых клетках и активированных Т-лимфоцитах человека. Цель работы — исследование возможности индукции АС мРНК *TERT* и ингибирования активности теломеразы эндонуклеазой EndoG в активированных лимфоцитах мыши и крысы. Для индукции экспрессии *EndoG*, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты, В-лимфоциты и НК-клетки мышей и крыс трансфицировали плазмидой рEndoG-GFP или инкубировали их с ДНК-повреждающим агентом цисплатином *in vitro*. Увеличение экспрессии *EndoG* приводило к уменьшению экспрессии полноразмерного активного варианта *TERT*, повышению синтеза укороченного сплайс-варианта и понижению активности теломеразы. Увеличение экспрессии EndoG, изменение пула мРНК сплайс-вариантов *TERT* и ингибирование активности теломеразы наблюдали в лимфоцитах мышей и крыс после введения цисплатина *in vivo*. Таким образом, EndoG способна индуцировать АС мРНК *TERT* и регулировать активность теломеразы в лимфоцитах мышей и крыс.

Ключевые слова: альтернативный сплайсинг, теломераза, лимфоциты, апоптотическая эндонуклеаза.

Принятые сокращения: АС — альтернативный сплайсинг, FSB — эмбриональная телячья сыворотка, TRAP — протокол амплификации теломерных повторов (telomeric repeat amplification protocol).

Теломераза активна в нормальных половых клетках, стволовых клетках и активированных лимфоцитах, а также в раковых клетках большинства типов (Kim et al., 1994). Данный фермент синтезирует теломерные повторы на концах хромосом, что позволяет клеткам поддерживать длину теломер на достаточном для неограниченной пролиферации уровне. Активность главного компонента теломеразы — каталитической субъединицы *TERT* (telomerase reverse transcriptase) — регулируется альтернативным сплайсингом (АС) ее мРНК. В клетках человека известно более двух десятков экспрессирующихся в минорных количествах сплайс-вариантов *TERT*, а их функция до конца не изучена. Только полноразмерный вариант *TERT* обладает каталитической активностью (Saebøe-Larsen et al., 2006). Большую часть общей мРНК *TERT* составляют два сплайс-варианта: α-вариант, который образуется при делеции части экзона 6, и β-вариант, образующийся в результате делеции экзонов 7 и 8, сдвига рамки считывания и появления стоп-кодона в экзоне 10 (Ulaner et al., 1998, 2000).

Ранее мы показали, что апоптотическая эндонуклеаза G (EndoG) индуцирует АС мРНК *TERT* в опухолевых клетках (Zhdanov et al., 2016, 2017) и активированных

CD4⁺ Т-лимфоцитах (Васина и др., 2017) человека. Повышенная экспрессия EndoG, например в ответ на повреждение ДНК, приводит к образованию малой РНК EGPO (EndoG-produced oligonucleotide), которая вызывает АС по механизму, сходному с действием переключающих сплайсинг олигонуклеотидов (Bauman et al., 2009; Khanna et al., 2010). Индуцированный EndoG АС мРНК *TERT* приводил к ингибированию активности теломеразы, укорочению теломер до критических значений и апоптозу клеток человека (Zhdanov et al., 2016). Представляет интерес изучение способности EndoG вызывать АС мРНК *TERT* других организмов.

В настоящей работе мы исследовали влияние EndoG на АС *TERT* и активность теломеразы в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах, а также В-лимфоцитах и НК-клетках мышей и крыс.

Материал и методика

Лабораторные животные. Работа с животными проводилась с соблюдением Декларации прав животных (World Medical Association Declaration of Helsinki):

<http://www.who.int/bulletin/archives/79%284%29373.pdf>) и одобрена этическим комитетом Института биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича. В экспериментах использовали инбредных мышей линий C57BL/6 в возрасте 6—9 нед, а также аутбредных крыс линий Wistar в возрасте 8—11 нед. Все животные поступили из питомника лабораторных животных «Пушино». Мышей и крыс содержали в виварии в условиях отсутствия патогенной микрофлоры при естественном освещении, на брикетированном корме и постоянном доступе к воде.

Забор крови, селекция и культивирование лимфоцитов. Животных подвергали эвтаназии в CO₂-камере и отбирали кровь путем пункции сердца. Кровь забирали в пробирки с антикоагулянтом K3EDTA (Greiner Bio-One, Австрия). Из крови выделяли мононуклеарные клетки методом градиентного центрифугирования на Фиколле Lympholite-H (Cedarlane, Канада). Селекцию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, CD19⁺ В-клеток или CD56⁺CD16⁺ НК-клеток выполняли методом магнитной селекции с использованием mouse/rat CD4⁺ Cell Isolation Kit, mouse/rat CD8⁺ T Cell Isolation Kit, mouse/rat B Cell Isolation Kit II или mouse/rat CD56⁺CD16⁺ NK Cell Isolation Kit соответственно по протоколу фирмы-производителя (все от Miltenyi Biotec, Германия). Клетки высевали в концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл среды. В работе использовали культуральную среду RPMI-1640 (Life technologies, США), содержащую 10 % FBS (Thermo Fisher Scientific Inc., США), антибиотики пенициллин (50 Ед/мл) и стрептомицин (50 мг/мл) (Sigma, США) (Васина и др., 2017). CD4⁺ и CD8⁺ клетки мышей и крыс культивировали в описанной среде, содержащей также 1 мМ пирувата натрия (Applichem, Германия), 10 мМ HEPES (Sigma) и 0.02 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma). Пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов стимулировали IL-2 (100 Ед/мл; R&D Systems, США), а также антителами анти-CD3 (5 мкг/мл; МедБиоСпектр, Россия) и антителами анти-CD28 (2 мкг/мл; eBiosciences, США). Стимуляцию роста В- и НК-клеток осуществляли при помощи В Cell Expansion Kit и NK Cell Activation/Expansion Kit соответственно (все от Miltenyi Biotec, Германия). Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5 % CO₂ и влажности 90 %. Через каждые 3 сут культивирования клетки рассеивали до концентрации $5 \cdot 10^5$ на 1 мл среды.

Для экспериментов *in vivo* мышам или крысам вводили внутривенно цисплатин в концентрации 20 мг/кг (Baspakian et al., 2005). Через 72 ч животных подвергали эвтаназии и отбирали кровь путем пункции сердца и производили селекцию лимфоцитов по описанной выше методике.

Обработка клеток цисплатином и трансфекция. Трансфекцию клеток мышей или крыс осуществляли плазмидой Mouse pEndoG-GFP или Rat pEndoG-GFP соответственно или контрольной плазмидой pGFP. Плазмиды на основе вектора pGFP-N1 синтезированы в компании Clontech (США). Трансфекцию проводили с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя. Оценку эффективности трансфекции осуществляли проточной цитометрией FACSCalibur (Beckton Dickinson, США) при подсчете GFP-положительных клеток.

Для индукции повреждения ДНК и экспрессии EndoG клетки культивировали с цисплатином (цис-дихлоридхлороплатина(II), Sigma) в концентрации 60 мкМ в течение 72 ч (Yin et al., 2007). Оценку количества кле-

ток с поврежденной ДНК проводили методом TUNEL для проточной цитометрии (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling) (Darzynkiewicz et al., 2008) при помощи FlowTACSTM Apoptosis Detection Kit (R&D Systems, США) по протоколу фирмы-производителя.

Определение уровней экспрессии генов, Вестерн-блоттинг и определение активности теломеразы. Выделение РНК и оценку экспрессии EndoG и сплайс-вариантов TERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени, Вестерн-блоттинг и анализ активности теломеразы методом TRAP (telomeric repeat amplification protocol) осуществляли по описанным ранее протоколам (Zhdanov et al., 2016).

Статистический анализ результатов осуществляли по критерию Стьюдента при помощи программы Statistica 9.0 (StatSoft Inc., США). Результаты представляли в виде средних значений и их стандартных отклонений. Значения считали статистически достоверными при $P \leq 0.05$.

Результаты

Индукция АС TERT при сверхэкспрессии EndoG. Для установления возможной роли EndoG в индукции АС мРНК TERT в CD4⁺, CD8⁺, В- и НК-лимфоцитах мышей и крыс в клетках индуцировали сверхэкспрессию EndoG методом трансфекции плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Эффективность трансфекции приближалась к 95—99 % через 72 ч у всех исследуемых клеток (рис. 1).

Для подтверждения роли EndoG в процессе АС мРНК TERT экспрессию ее гена индуцировали также повреждающим ДНК агентом цисплатином в концентрации 60 мкМ (Yin et al., 2007). Исследуемая концентрация цисплатина подобрана нами ранее в ходе предварительных экспериментов (данные не приводятся). Методом TUNEL для проточной цитометрии изучено изменение доли клеток с поврежденной ДНК после действия цисплатина. Культивирование с цисплатином вызывало увеличение повреждения ДНК в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, В-клетках, а также НК-клетках мыши и крысы (рис. 2).

Через 72 ч после трансфекции клеток или культивирования с цисплатином проводили оценку количества мРНК EndoG и сплайс-вариантов TERT. Трансфекция клеток плазмидой pEndoG-GFP, а также цисплатин вызывали значительное повышение экспрессии EndoG (рис. 3, а, е) в лимфоцитах мыши и крысы. Сверхэкспрессия EndoG сопровождалась изменением пула мРНК сплайс-вариантов TERT — уменьшением количества мРНК полноразмерного варианта ($\alpha+\beta+$) TERT (рис. 3, б, ж) и увеличением количества мРНК укороченного сплайс-варианта ($\alpha+\beta-$) TERT (рис. 3, в, з). Сверхэкспрессия EndoG не вызывала изменения экспрессии двух других сплайс-вариантов — ($\alpha-\beta+$) TERT (рис. 3, г, и) и ($\alpha-\beta-$) (рис. 3, д, к) — в лимфоцитах мыши и крысы. Не выявлено изменения экспрессии сплайс-вариантов TERT при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP.

Уменьшение пула активной формы TERT, индуцированное EndoG, и снижение активности теломеразы. Мы попытались выяснить влияние индукции сплайс-варианта hTERT на активность теломеразы при сверхэкспрессии EndoG. Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым

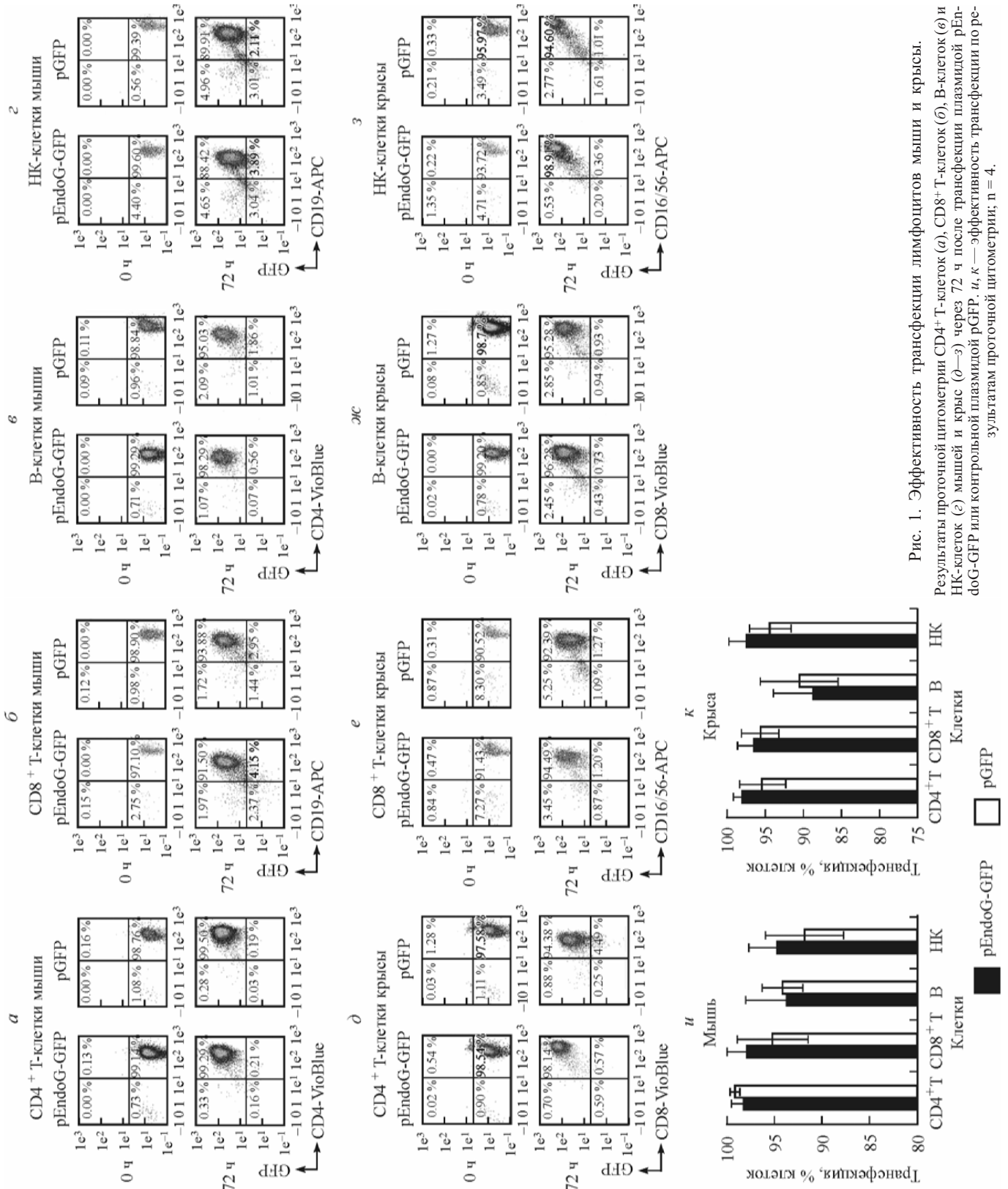


Рис. 1. Эффективность трансфекции лимфоцитов мыши и крысы. Результаты проточной цитометрии CD4⁺ Т-клеток (а), CD8⁺ Т-клеток (б), В-клеток (в) и НК-клеток (г) мышей и крыс (д—ж) через 72 ч после трансфекции плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. и, к — эффективность трансфекции по результатам проточной цитометрии; n = 4.

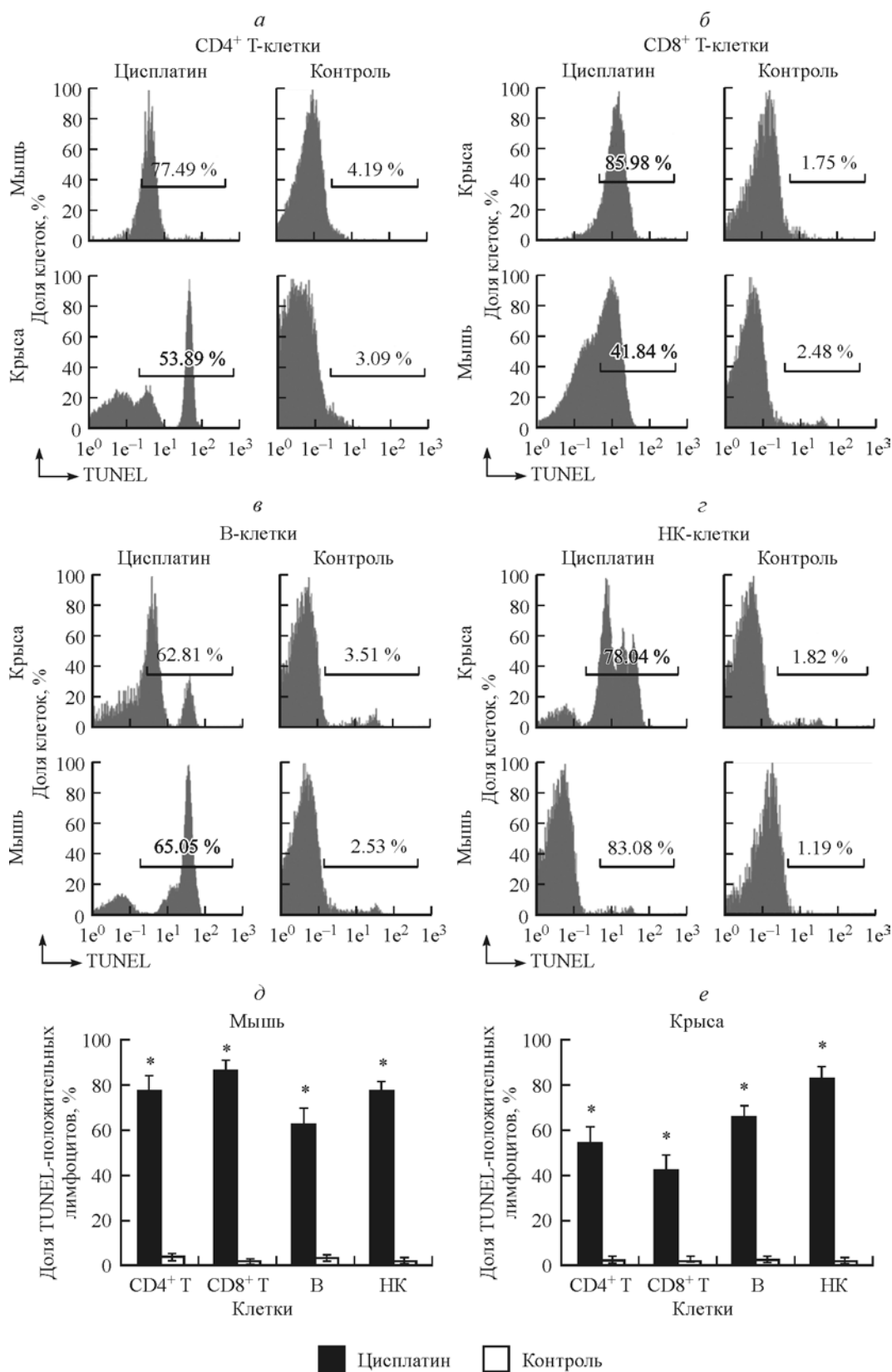
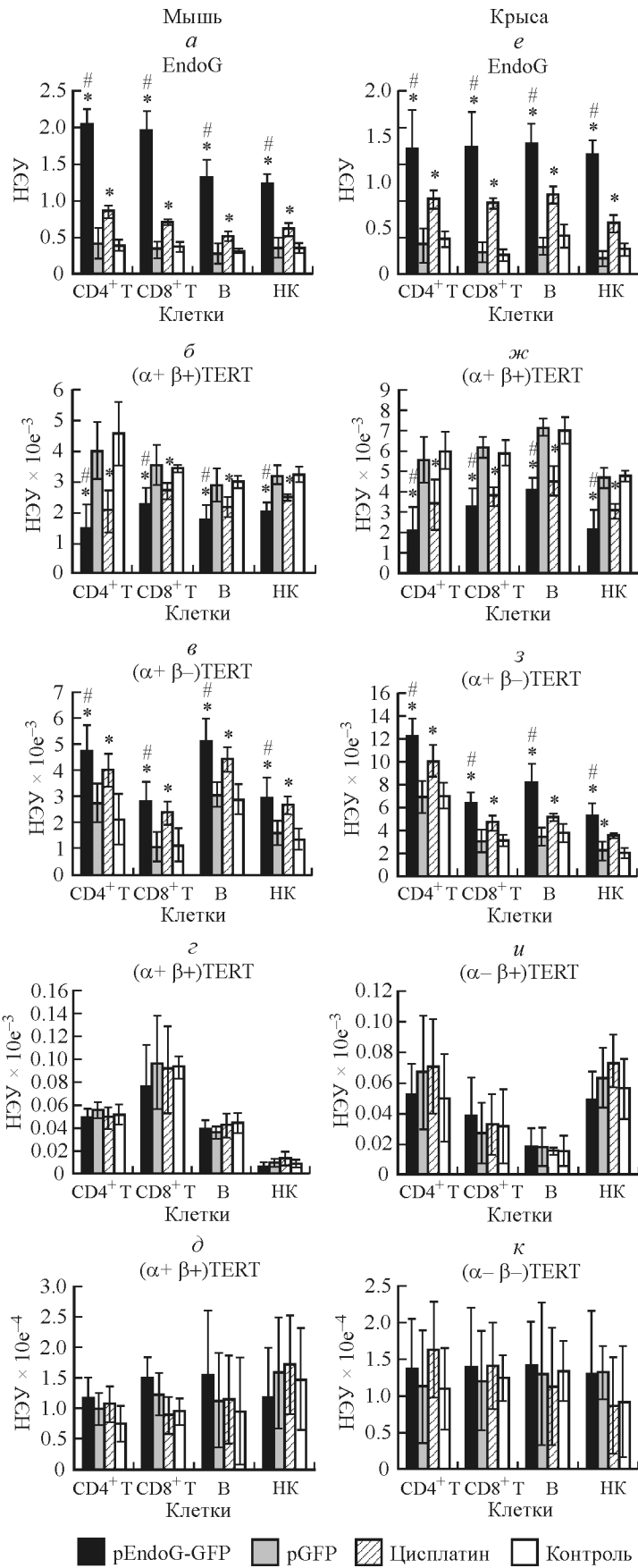


Рис. 2. Способность цисплатина индуцировать повреждения ДНК в лимфоцитах мыши и крысы.

Доля CD4⁺ Т-клеток (а), CD8⁺ Т-клеток (б), В-клеток (в) и НК-клеток (г) мышей и крыс с поврежденной ДНК (метод TUNEL для проточной цитометрии) через 72 ч действия цисплатина (60 мМ). Гистограммы количества TUNEL-положительных лимфоцитов мыши (д) и крысы (е); n = 4; звездочка показывает достоверность отличия ($P \leq 0.05$) по отношению к контрольным клеткам.



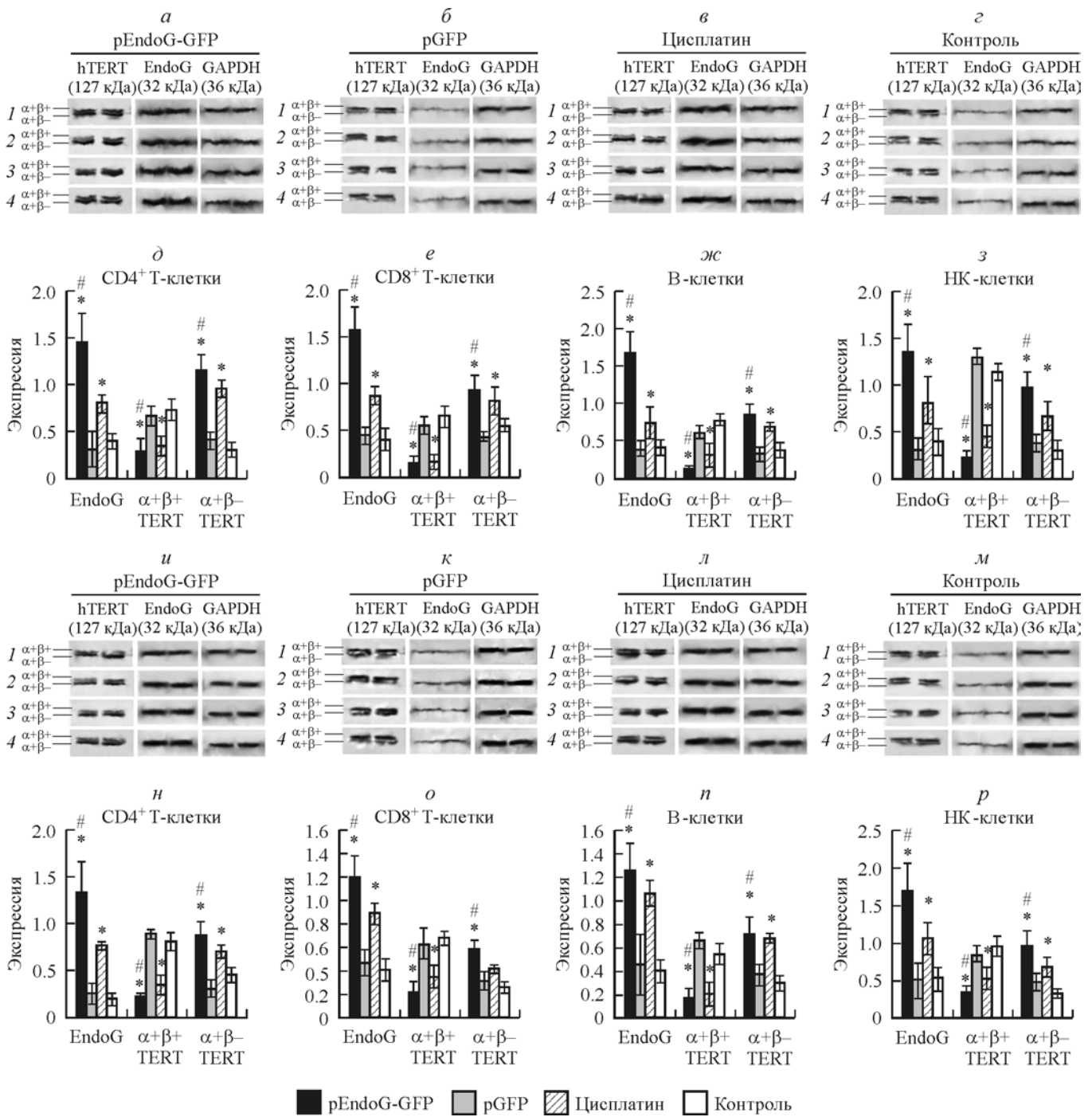


Рис. 4. Уменьшение количества активной формы TERT при сверхэкспрессии EndoG.

Вестерн-блоттинг сплайс-вариантов TERT, EndoG и референсного белка GAPDH в лимфоцитах мыши (а–г) и крысы (и–м), трансфицированных рEndoG-GFP, рGFP, культивированных с цисплатином или в интактных клетках. д–з — результаты определения количеств EndoG и сплайс-форм TERT (экспрессия) по отношению к GAPDH для мыши; н–р — то же для крысы. Панели Вестерн-блота: 1 — CD4⁺ Т-клетки, 2 — CD8⁺ Т-клетки, 3 — В-клетки, 4 — НК-клетки; n = 4; решетка показывает достоверность отличия по отношению к клеткам, трансфицированным рGFP, звездочка — по отношению к контрольным интактным клеткам (P ≤ 0.05).



Рис. 3. Уровни мРНК EndoG и сплайс-вариантов TERT в трансфицированных или культивированных с цисплатином лимфоцитах мыши (а–д) и крысы (е–к).

Метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Показаны нормализованные уровни экспрессии (НУЭ) мРНК по отношению к уровню рНК референсного гена 18S; n = 4; решетка показывает достоверность отличия по отношению к клеткам, трансфицированным рGFP, звездочка — по отношению к контрольным интактным клеткам (P ≤ 0.05).

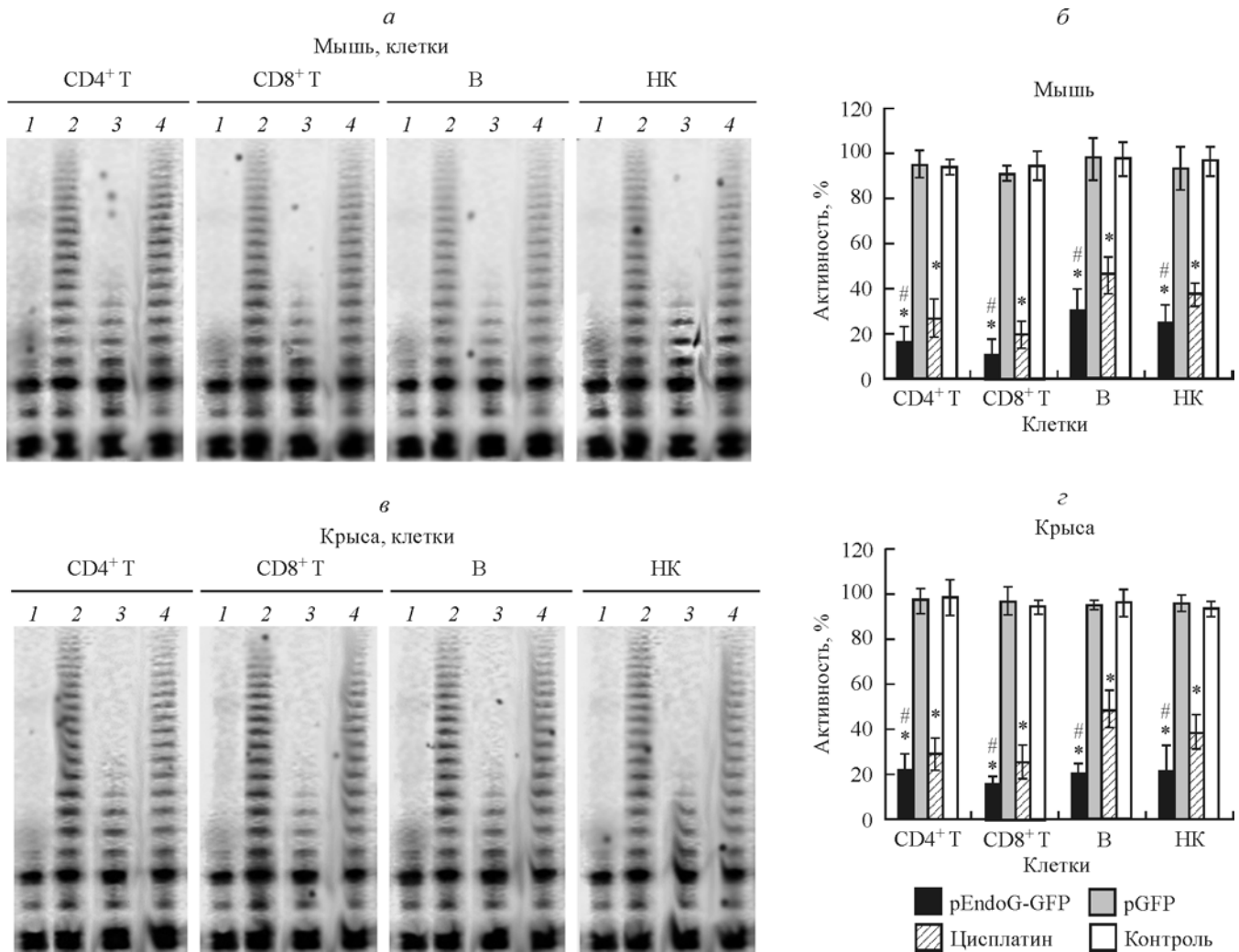


Рис. 5. Ингибирование активности теломеразы в лимфоцитах мышей (а, б) и крыс (в, з) при сверхэкспрессии EndoG. а, в — гель-электрофорез TRAP; дорожки: 1 — клетки, трансфицированные pEndoG-GFP; 2 — клетки, трансфицированные pGFP; 3 — клетки, культивированные с цисплатином; 4 — интактные клетки. б, з — результаты определения активности теломеразы, измеренной методом TRAP. $n = 4$; звездочка — по отношению к контрольным интактным клеткам, решетка — по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP ($P \leq 0.05$).

белкам показали, что через 72 ч после трансфекции pEndoG-GFP или культивирования цисплатином в клетках происходит увеличение EndoG, которое сопровождается снижением полноразмерного варианта TERT ($\alpha+\beta+$) и увеличением сплайс-варианта ($\alpha+\beta-$) TERT в лимфоцитах мышей (рис. 3, а—з) и крыс (рис. 3, и—р). При трансфекции клеток контрольной плазмидой изменения пропорции белков сплайс-вариантов TERT не выявлено. Не обнаружено и изменения пула белков ($\alpha+\beta-$)- и ($\alpha-\beta-$)-вариантов TERT, поскольку их количество в клетке очень мало и не детектируется методом Вестерн-блоттинга.

Для анализа активности теломеразы в клеточных экстрактах после трансфекции использовали метод амплификации теломерных повторов с помощью ПЦР (TRAP). Активность теломеразы снижалась через 72 ч после трансфекции лимфоцитов мыши (рис. 5, а, б) и крысы (рис. 5, в, з) плазмидой pEndoG-GFP или действия цисплатина. Уменьшения активности фермента не наблюдали при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP.

Эти данные полностью согласуются с результатом измерения экспрессии сплайс-вариантов TERT методом

ОТ-ПЦР в реальном времени и количеством сплайс-вариантов TERT, измеренным при помощи Вестерн-блоттинга. Снижение активности теломеразы, вероятнее всего, происходит за счет уменьшения количества полноразмерного ($\alpha+\beta+$)-варианта hTERT, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью.

Понижение активности теломеразы *in vivo* в результате АС TERT, вызванного индуцированной экспрессией EndoG. Для исследования способности EndoG вызывать АС TERT мышам линии C57BL/6 и крысам линии Wistar внутривенно вводили цисплатин. Через 72 ч из крови животных выделяли Т-, В- и НК-клетки и исследовали экспрессию генов. Методом TUNEL для проточной цитометрии выявлено увеличение количества лимфоцитов с поврежденной ДНК в крови мышей и крыс после введения цисплатина (рис. 6, а—е). Возрастание количества клеток с поврежденной ДНК сопровождалось усилением экспрессии в них EndoG, а также снижением полноразмерного ($\alpha+\beta+$)-варианта TERT и увеличением количества укороченного сплайс-варианта ($\alpha+\beta-$) TERT в лимфоцитах мышей (рис. 7, а—в) и крыс (рис. 7, з—е).

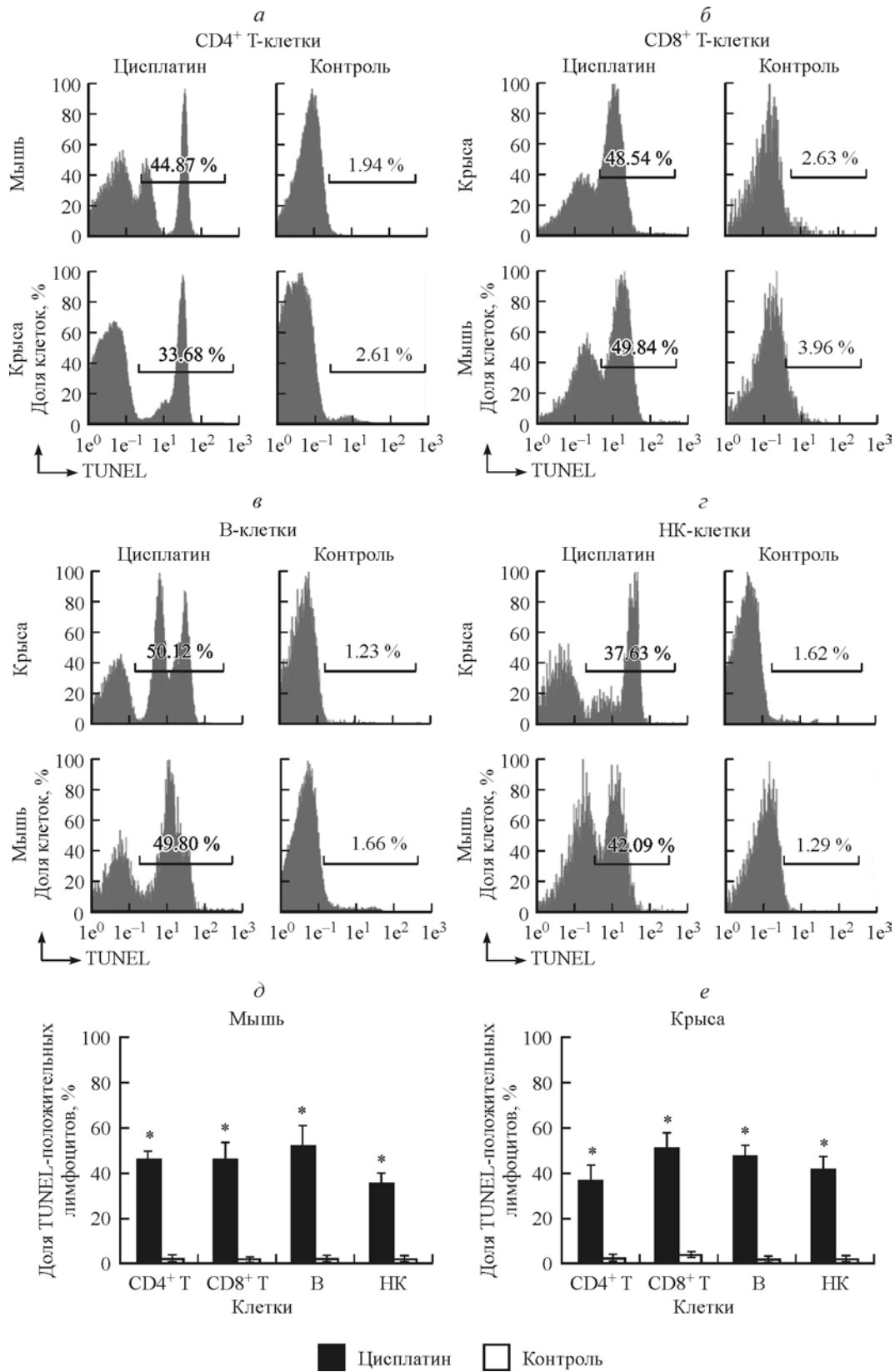


Рис. 6. Способность цисплатина индуцировать повреждения ДНК в лимфоцитах мыши и крысы in vivo: CD4⁺ T (а), CD8⁺ T (б), В (в) и НК (г).

Показана доля клеток с поврежденной ДНК (метод TUNEL для проточной цитометрии) через 72 ч после введения в культуральную среду цисплатина. д, е — гистограммы количества TUNEL-положительных лимфоцитов мыши и крысы соответственно; n = 4, звездочка показывает достоверность отличия (P ≤ 0.05) по отношению к контрольным клеткам.

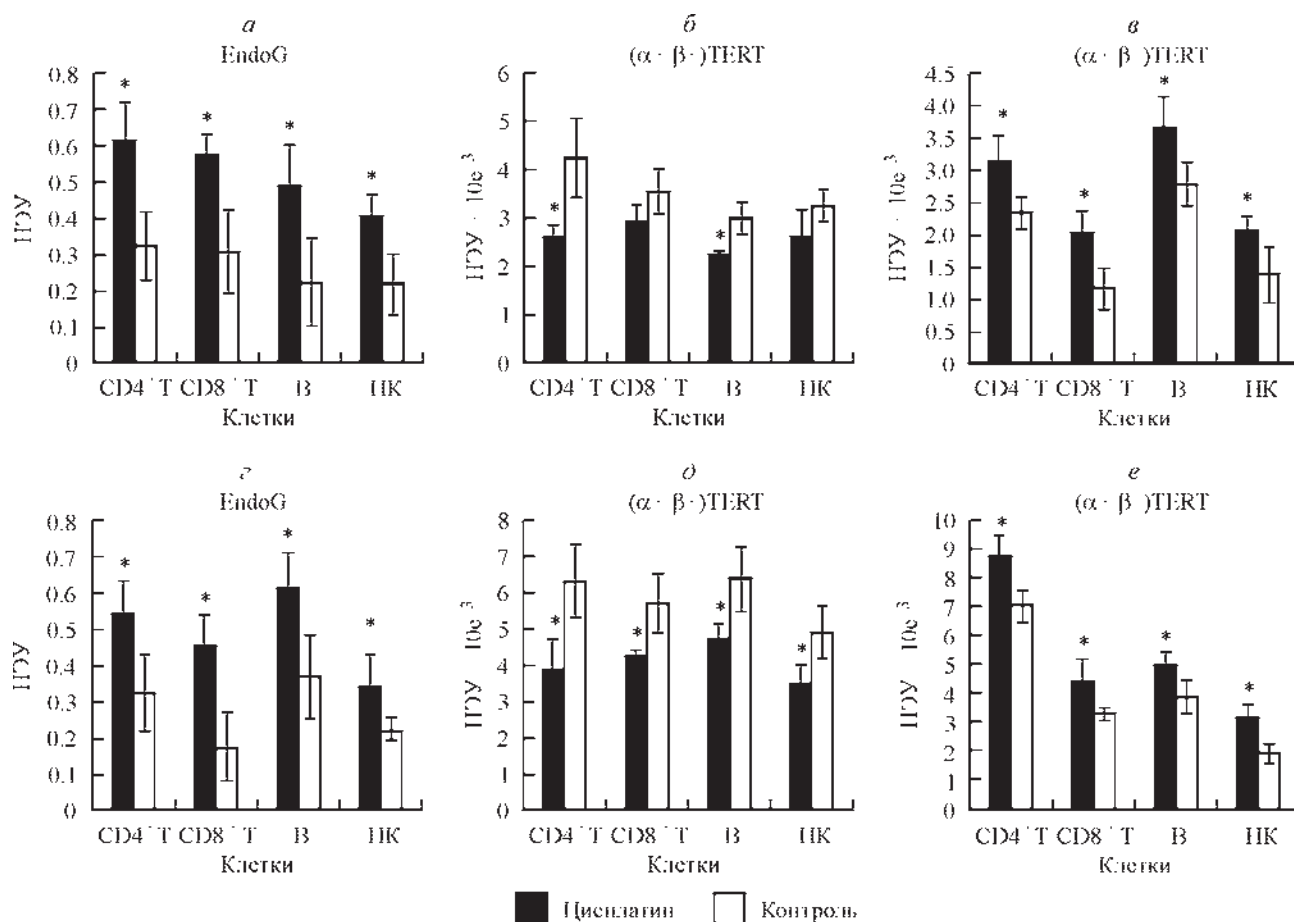


Рис. 7. Экспрессия EndoG и сплайс-вариантов TERT в лимфоцитах мышей и крыс после введения цисплатина.

Уровни мРНК EndoG (а) и сплайс-вариантов TERT (б, в) в лимфоцитах мыши и крысы (г—е), определенные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК нормализованы по отношению к уровню рНК референсного гена *18S*; n = 4, звездочка показывает достоверность отличия ($P \leq 0.05$) по отношению к контрольным клеткам. НЭУ — нормализованный уровень экспрессии.

Результаты Вестерн-блоттинга показали, что индукция EndoG цисплатином сопровождается снижением количества полноразмерной формы белка ($\alpha+\beta+$) TERT и увеличением количества укороченной формы ($\alpha+\beta-$) в лимфоцитах мышей (рис. 8, а—е) и крыс (рис. 8, ж—м). Изменение пула форм TERT сопровождалось снижением активности теломеразы в T-, В- и НК-клетках мышей (рис. 9, а, б) и крыс (рис. 9, в, г).

Обсуждение

Апоптотические эндонуклеазы — группа ферментов, разрушающих ДНК клеток на последних стадиях апоптоза (Nagata et al., 2003). EndoG является сайт-специфической эндонуклеазой, способной избирательно расщеплять двойные цепи ДНК по последовательностям поли-G (Ruiz-Carrillo et al., 1987). Участие апоптотической эндонуклеазы EndoG в процессе АС мРНК TERT было показано нами ранее в клетках карциномы кишечника человека CaCo-2 (Zhdanov et al., 2016) и активированных CD4⁺ T-лимфоцитах человека (Васина и др., 2017). Вопрос о способности EndoG индуцировать АС мРНК TERT в лимфоцитах других организмах является актуальным. Для ответа на этот вопрос мы индуцировали экспрессию *EndoG* в CD4⁺ и CD8⁺ T-лимфоцитах, В-лимфоцитах или

НК-клетках мышей и крыс двумя методами: трансфицировали клетки плазмидой pEndoG-GFP или культивировали их с повреждающим ДНК агентом цисплатином (Yin et al., 2007).

Сверхэкспрессия EndoG при трансфекции лимфоцитов плазмидой pEndoG-GFP вызывала увеличение количества неактивного ($\alpha+\beta-$)-сплайс-варианта TERT и уменьшение содержания активного ($\alpha+\beta+$)-варианта. Снижение количества активной формы TERT при сверхэкспрессии EndoG сопровождалось уменьшением активности теломеразы.

В лимфоцитах периферической крови детектируется очень низкая активность теломеразы (Counter et al., 1995). В условиях *in vitro* при стимуляции пролиферации клеток IL-2 и антителами к CD3 и CD28 активность теломеразы значительно увеличивается (Moro-Garcia et al., 2012), однако ее активности недостаточно для неограниченной пролиферации T-клеток (Liu et al., 2001). Мы не обнаружили достоверной разницы между активностью теломеразы в различных лимфоцитах мыши и крысы.

Известно, что экспрессия EndoG возрастает в ответ на повреждения ДНК (Yin et al., 2007; Жданов и др., 2017). Индуцированное цисплатином повреждение ДНК лимфоцитов мышей и крыс *in vitro* и *in vivo* сопровождалось увеличением экспрессии *EndoG*, ($\alpha+\beta-$)-сплайс-варианта TERT, понижением экспрессии полноразмерного

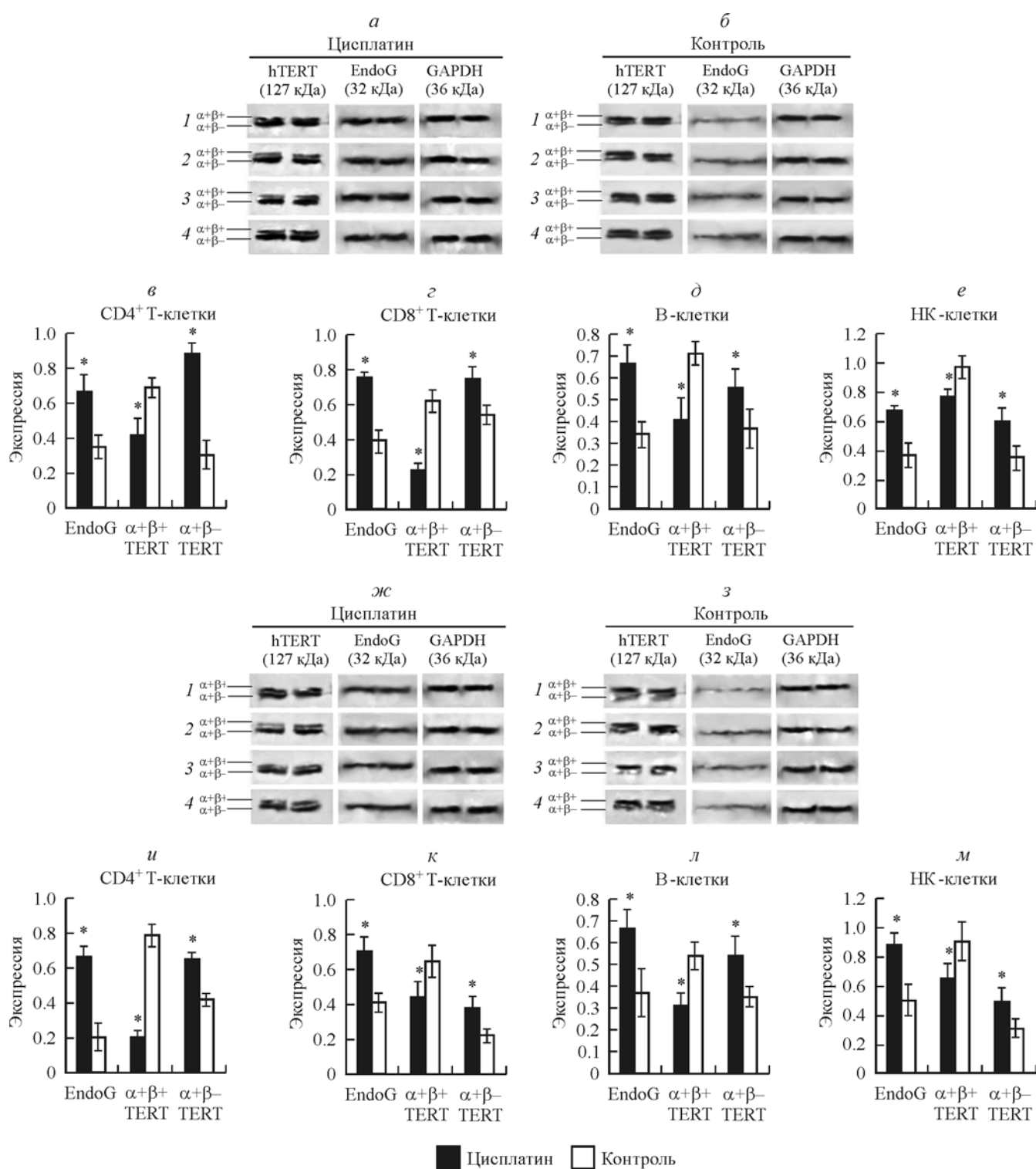


Рис. 8. Уменьшение количества активной формы TERT при индукции сверхэкспрессии EndoG *in vivo*.

Вестерн-блоттинг сплайс-вариантов TERT, EndoG и референсного белка GAPDH в клетках лимфоцитах мыши (а, б) и крысы (ж, з), культивированных с цисплатином или в контроле. Количества EndoG и сплайс-форм TERT определены по отношению к GAPDH для мыши (в-е) и крысы (и-м). Панели Вестерн-блота (клетки): 1 — CD4⁺ Т, 2 — CD8⁺ Т, 3 — В-клетки, 4 — НК-клетки; n = 4, звездочка показывает достоверность отличия ($P \leq 0.05$) по отношению к контрольным клеткам.

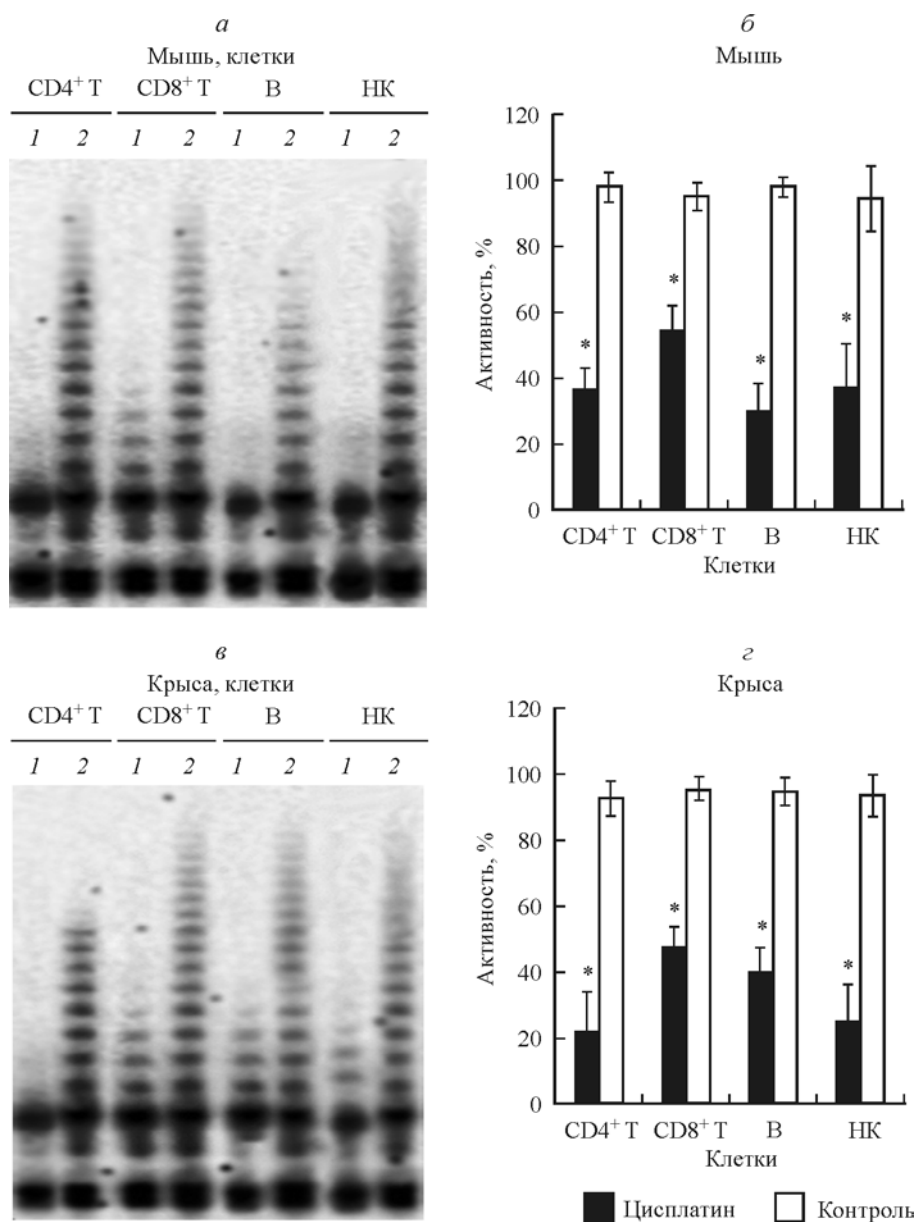


Рис. 9. Ингибирование активности теломеразы в лимфоцитах мышей (а, б) и крыс (в, г) после действия цисплатина. Гель-электрофорез TRAP в CD4⁺T-клетках, CD8⁺T-клетках, В-клетках и НК-клетках мышей (а) и крыс (в). Результаты определения активности теломеразы, измеренной методом TRAP в клетках мышей (б) и крыс (г). Дорожка 1 — клетки животных, которым ввели цисплатин; дорожка 2 — клетки контрольных животных; n = 4, звездочка показывает достоверность отличия ($P \leq 0.05$) по отношению к клеткам контрольных животных.

($\alpha+\beta+$)-варианта *TERT* и снижением ферментативной активности теломеразы.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG способна индуцировать АС мРНК каталитической субъединицы теломеразы *TERT* и регулировать активность теломеразы не только в клетках человека, но и в лимфоцитах мышей и крыс.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 гг.

Список литературы

Васина Д. А., Жданов Д. Д., Орлова В. С., Орлова Е. В., Покровская М. В., Александрова С. С., Соколов Н. Н. 2017. Апоптотическая эндонуклеаза EndoG вызывает ингибирование активности теломеразы и злокачественную трансформацию CD4⁺-клеток человека. Биохимия. 82 (1): 76—91. (Vasina D. A., Zhdanov D. D., Orlova V. S., Orlova E. V., 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: 24—37.)

Жданов Д. Д., Васина Д. А., Орлова Е. В., Орлова В. С., Покровская М. В., Покровский В. С., Александрова С. С., Соколов Н. Н. 2017. Индуцированная цисплатином экспрессия апоптотической эндонуклеазы EndoG вызывает ингибирование активности теломеразы и злокачественную трансформацию

- цию CD4+ Т лимфоцитов человека. Биомед. 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. Biomed. Khim. 63 (1) : 13—26.)
- Basnakian A. G., Apostolov E. O., Yin X., Napirei M., Mannerz H. G., Shah S. V. 2005. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by deoxyribonuclease I. J. Amer. Soc. Nephrol. 16 : 697—702.
- Bauman J., Jearawiriyapaisarn N., Kole R. 2009. Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides. Oligonucleotides. 19 : 1—13.
- Counter C. M., Gupta J., Harley C. B., Leber B., Bacchetti S. 1995. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. Blood. 85 : 2315—2320.
- Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Zhao H. 2008. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. Methods. 44 : 250—254.
- Khanna A., Stamm S. 2010. Regulation of alternative splicing by short non-coding nuclear RNAs. RNA Biol. 7 : 480—485.
- Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science. 266 : 2011—2015.
- Liu K., Hodes R. J., Weng N. 2001. Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. J. Immunol. 166 : 4826—4830.
- Moro-Garcia M. A., Alonso-Arias R., Lopez-Larrea C. 2012. Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response. Curr. Genomics. 13 : 589—602.
- Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N., Fukuyama H. 2003. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. Cell Death Differ. 10 : 108—116.
- Ruiz-Carrillo A., Renaud J. 1987. Endonuclease G: a (dG)n X (dC)n-specific DNase from higher eukaryotes. EMBO J. 6 : 401—407.
- Saebøe-Larssen S., Fossberg E., Gaudernack G. 2006. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) : analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. BMC Mol. Biol. 7 : 26.
- Ulaner G. A., Hu J. F., Vu T. H., Giudice L. C., Hoffman A. R. 1998. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. Cancer Res. 58 : 4168—4172.
- Ulaner G. A., Hu J. F., Vu T. H., Oruganti H., Giudice L. C., Hoffman A. R. 2000. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. Int. J. Cancer. 85 : 330—335.
- Yin X., Apostolov E. O., Shah S. V., Wang X., Bogdanov K. V., Buzder T., Stewart A. G., Basnakian A. G. 2007. Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice. J. Amer. Soc. Nephrol. 18 : 2544—2553.
- 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. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. 10 : 310—321.
- Zhdanov D. D., Vasina D. A., Orlova E. V., Orlova V. S., Pokrovskaya M. V., Aleksandrova S. S., Sokolov N. N. 2017. Apoptotic endonuclease EndoG regulates alternative splicing of human telomerase catalytic subunit hTERT. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. 11 : 154—165.

Поступила 11 IX 2017

INDUCTION OF ALTERNATIVE SPLICING OF TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT BY APOPTOTIC ENDONUCLEASE EndoG IN MURINE LYMPHOCYTES

D. D. Zhdanov,^{1,*} Yu. A. Gladilina,¹ V. S. Orlova,² D. V. Grishin,¹ M. V. Pokrovskaya,¹ S. S. Aleksandrova,¹ O. V. Podobed,¹ N. N. Sokolov¹

¹ Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121,
and ² Peoples Friendship University of Russia, Ecological Faculty, Moscow, 117198;
* e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Apoptotic endonuclease EndoG is known to induce alternative splicing (AS) of mRNA of telomerase catalytic subunit TERT (telomerase reverse transcriptase) in human cancer cells and activated T lymphocytes. The aim of this work was to study the possibility of induction AS of *TERT* mRNA and inhibition of telomerase activity by EndoG in activated lymphocytes of mice and rats. In order to overexpress *EndoG*, CD4⁺, CD8⁺ T-lymphocytes, B-lymphocytes and NK-cells from mice and rats were transfected with pEndoG-GFP plasmid or incubated with DNA-damaging agent cisplatin *in vitro*. *EndoG* overexpression was associated with down-regulation of the expression of full-length *TERT* and up-regulation of truncated spliced variant which resulted in inhibition of telomerase activity. Induction of EndoG and changes in the expression of *TERT* splice-variants accompanied by telomerase inhibition was observed in murine lymphocytes after *in vivo* cisplatin administration. Thus, EndoG was shown to induce AS of *TERT* mRNA and regulate telomerase activity in murine lymphocytes.

Key words: alternative splicing, telomerase, lymphocytes, apoptotic endonuclease.