

На правах рукописи

Жданов Дмитрий Дмитриевич

**РОЛЬ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ENDOG В РЕГУЛЯЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНОГО
СПЛАЙСИНГА ПРЕ-МРНК АПОПТОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ**

03.01.04 – БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» (ИБМХ)

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
СОКОЛОВ Николай Николаевич

Официальные оппоненты: **ЛАЗАРЕВ Василий Николаевич,**
доктор биологических наук, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», заведующий лабораторией.

ШИШКИН Сергей Сергеевич,
доктор биологических наук, профессор, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук», заведующий лабораторией.

ЕГОРОВ Егор Евгеньевич,
доктор биологических наук, профессор ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Научно-исследовательский институт канцерогенеза)

Защита диссертации состоится «26» марта 2020 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» по адресу: 119121, гор. Москва, ул. Погодинская, д.10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан _____

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук



Карпова Е. А.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности. Гены высших организмов имеют «прерывистую структуру», в которой кодирующие участки – экзоны (включаемые в конечный мРНК транскрипт) чередуются с некодирующими участками – интронами (не включаются в конечный мРНК транскрипт). Данное открытие было сделано в 70-х годах прошлого столетия независимо друг от друга американским генетиком Филлипом Шарпом и британским биохимиком Ричардом Робертсом (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977). Процесс удаления интронов и лигирования экзонов в том порядке, в котором они располагаются в гене и пре-мРНК гена в ходе созревания (процессинга) мРНК был назван сплайсингом (от англ. *to splice* – сращивать концы чего-либо).

Одновременно с этим, американский молекулярный биолог Уолтер Гилберт обнаружил феномен удаления кодирующих последовательностей из пре-мРНК аденовирусов (Gilbert, 1978). Это привело к открытию альтернативного сплайсинга (АС) – варианту сплайсинга мРНК, при котором происходит выборочное включение или удаление экзонов, а также сохранение частей интронов в процессе созревании первичного транскрипта (пре-мРНК). Изучение АС пре-мРНК эукариотических организмов, позволило объяснить, почему в ходе экспрессии гена на основе одной и той же пре-мРНК происходит образование нескольких зрелых мРНК и нескольких изоформ одного белка (Tian et al., 2017).

Полагают, что АС подвергаются пре-мРНК практически всех генов с несколькими экзонами, что является одним из основных механизмов, определяющих разнообразие, активность и функцию белков в клетках, тканях и организмах. Многочисленные исследования подтвердили важнейшую и основополагающую роль АС пре-мРНК в регуляции биологических систем клеток (Irimia et al., 2007). Было обнаружено, что высшие эукариоты имеют более высокую долю пре-мРНК, подвергающихся АС, что указывает на роль данного механизма в эволюции. Можно утверждать, что АС опосредует различные биологические процессы на протяжении всей жизни организмов, от рождения до смерти (Fu et al., 2007; Hurt et al., 2006).

Регуляция процесса АС представляет собой сложный процесс, в котором задействованы многочисленные взаимодействующие компоненты: нуклеотидные последовательности на молекулах пре-мРНК (*цис*-элементы), являющиеся участками

взаимодействия с различными регуляторными белками (*транс*-факторами). *Цис*- и *транс*-компоненты влияют на активность главного мультибелкового комплекса сплайсосомы, осуществляющего вырезание и лигирование участков мРНК и могут индуцировать или ингибировать АС (Shi, 2017). На эффективность АС также может влиять вторичная структура мРНК (Jin et al.) и присутствие малых интерферирующих РНК (Alló et al., 2009).

Процесс АС является тканеспецифичным. Уровень мРНК различных сплайс-вариантов одного и того же гена может значительно различаться в различных клетках и тканях (Baralle and Giudice, 2017). Кроме того, АС может значительно изменяться при различных воздействиях на клетки, т.е. является индуцибельным процессом (Stamm, 2002). Поэтому изучение факторов, индуцирующих АС, механизмов регуляции данного процесса и его биологического эффекта является весьма актуальным.

Было обнаружено, что эндонуклеаза G (EndoG) способна влиять на процесс АС пре-мРНК некоторых генов. EndoG является апоптотическим белком и участвует в его развитии по каспаз-независимому пути (Vařecha et al., 2012). В норме EndoG локализуется в межмембранном пространстве митохондрий и транслоцируется в ядро в ответ на повреждение ДНК и развитие процессов клеточной гибели. При попадании в ядро EndoG способна расщеплять ДНК по поли-Г•поли-С последовательностям. Отличительной особенностью EndoG от других ДНКаз является её способность деградировать также и РНК в ядрах и цитоплазме (Ruiz-Carrillo and Renaud, 1987).

К настоящему времени механизм, по которому EndoG влияет на эффективность АС, мало изучен. В данной работе мы предприняли попытку исследовать механизм индукции АС эндонуклеазой G и его биологический эффект.

Цель работы: исследование механизма действия эндонуклеазы EndoG в регуляции АС пре-мРНК некоторых апоптотических белков и его биологического эффекта.

Основные задачи исследования:

1. Провести поиск мРНК белков, в регуляции АС которых участвует EndoG;
2. Изучить EndoG-зависимый механизм регуляции АС пре-мРНК;
3. Оценить возможность модуляции АС при помощи образуемых под действием EndoG переключающих сплайсинг олигонуклеотидов;

4. Изучить биологический эффект индукции АС пре-мРНК апоптотических белков TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x;
5. Оценить роль индукции EndoG в эффекторных лимфоцитах человека в результате действия регуляторных Т клеток.

Научная новизна. Впервые показана способность эндонуклеазы EndoG модулировать АС пре-мРНК. Описан механизм, согласно которому, увеличение экспрессии и транслокация EndoG в ядро клеток приводят к образованию активного олигонуклеотида EGPO (EndoG-produced oligonucleotide), который комплементарен экзон-интронному участку пре-мРНК и индуцирует АС. Впервые экспериментально показано природное существование переключающих сплайсинг олигонуклеотидов.

Исследован биологический эффект EndoG-индуцированного АС. Сплайсинг пре-мРНК TERT в пролиферирующих клетках вызывает ингибирование теломеразы, укорочение теломер, переход клеток в состояние репликативного старения и апоптоз. Индуцированный EndoG АС пре-мРНК DNase I ингибирует нуклеазную активность ДНКазы 1 и замедляет развитие апоптоза.

Впервые обнаружена способность регуляторных Т клеток индуцировать экспрессию EndoG и АС пре-мРНК hTERT в эффекторных лимфоцитах, что является одним из механизмов поддержания иммунной толерантности.

Проведённая работа позволяет по-новому взглянуть на процессы развития апоптоза, как на совокупность факторов, тормозящих и ускоряющих клеточную гибель, а также на процессы модуляции иммунного ответа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Индукция АС пре-мРНК апоптотических белков TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x под действием эндонуклеазы EndoG модулирует развитие программируемой гибели клеток человека, мыши и крысы.

2. Благодаря РНКазной активности, EndoG «вырезает» активные олигонуклеотиды (EGPO – EndoG-produced oligonucleotides) из нкРНК, синтезируемых с некодирующих цепей генов TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x. EGPO действуют аналогично переключающим сплайсинг олигонуклеотидам, которые, следовательно, существуют в природе. Применение EGPO возможно с целью модуляции АС пре-мРНК и активности теломеразы, Casp-2, DNase I и BCL-X.

3. Транслокация EndoG в ядра клеток (в т. ч. при развитии апоптотических процессов) является определяющим фактором инициации АС, поскольку обуславливает доступность EndoG для нкРНК и возможность образования переключающего сплайсинг олигонуклеотида EGPO.

4. Процессы индуцированного EndoG АС пре-мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы лежат в основе механизма супрессивного действия регуляторных Т клеток на эффекторные лимфоциты.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результатом работы является описание нового механизма индуцированного EndoG АС пре-мРНК как регулятора каталитической активности белков. Показана способность EndoG регулировать процессы программируемой клеточной гибели путем индукции АС пре-мРНК апоптотических белков каталитической субъединицы теломеразы TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x. В работе описан новый механизм супрессии эффекторных лимфоцитов регуляторными Т клетками, в основе которого лежит индукция EndoG сплайсинга мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы. В результате данного исследования впервые идентифицированы образуемые под действием EndoG олигонуклеотиды, индуцирующие АС hTERT, Casp-2, DNase I и BCL-x. Доказано существование в природе, переключающих сплайсинг олигонуклеотидов.

Практическая значимость исследования заключается в возможности применения *in vitro* продуцируемых EndoG переключающих сплайсинг олигонуклеотидов с целью модуляции АС пре-мРНК hTERT, Casp-2, DNase I и BCL-x в нормальных и опухолевых клетках для возможной коррекции патологических процессов.

Методология и методы диссертационного исследования. Работа построена на базе биохимических знаний о функционировании процесса АС, строении и функциях эндонуклеазы EndoG, теломеразы, дезоксирибонуклеазы 1, каспазы-2 и BCL-x, а также биологических эффектах, вызываемых данными белками. В работе применялись методы молекулярной и клеточной биологии, проводились эксперименты *in vivo* на мышах и крысах, а также с биоматериалом (периферической кровью) здоровых добровольцев.

Личный вклад автора. Автором обнаружена способность EndoG индуцировать АС и предложен план исследований по изучению механизма данного процесса. Автор изучил литературу по проблеме исследования и на основе предложенного плана

получил основную часть результатов. Соискателем были разработаны методики идентификации переключающих сплайсинг олигонуклеотидов, продуцируемых EndoG, адаптированы методики трансфекции клеток олигонуклеотидами, инкубации ядер клеток с олигонуклеотидами, а также методика совместного культивирования эффекторных лимфоцитов с регуляторными Т клетками. Проведена статистическая обработка полученных данных. Основные результаты автор опубликовал в рецензируемых научных журналах и представил в докладах конференций.

Степень достоверности и апробация результатов. Работа выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровне с использованием современного оборудования. Экспериментальные схемы включают достаточное количество технических повторений и адекватное количество контрольных измерений. Система оценки полученных результатов и критерии анализа подобраны специально для решения задач, поставленных в работе. Результаты работы согласуются с данными других исследователей.

Основные результаты исследования были представлены и доложены на всероссийских и международных конференциях: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Россия, Москва 2010 и 2016); 5th International Conference Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnology for Medicine (GPBNM-2010, St.Petersburg-Kizhi-Mandrogry-Valaam-Kovenets-St.Petersburg, Russia, 2010); Experimental Biology (USA, Anahaim, CA, 2010; San-Diego, CA, 2012; Boston, MT, 2013); Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Россия, Москва, 2010); Всероссийская конференция «Современные проблемы биохимии и биотехнологии» (Россия, Казань, 2010); 22nd International Congress of Anti-Cancer treatment (France, Paris, 2011); American Society of Gene & Cell Therapy 15th annual meeting and training course (USA, Philadelphia, PA, 2012); The Annual American Society of Nephrology Meeting (USA, San Diego, CA, 2012; Atlanta, 2013); International conference «A Focus of Nanomedicine» (USA, Little Rock, AR, 2013); Second Annual Central Arkansas Summer Undergraduate Research Symposium (USA, Little Rock, AR, 2013); Annual Biomedical Research Conference for Minority Students (USA, Nashville, TN, 2013); World Immune Regulation Meeting – IX (Switzerland, Davos, 2015); Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике (Россия, Воронеж, 2015 и 2016); Научная конференция

молодых учёных по медицинской биологии (Россия, Москва, 2016); XXI всероссийская конференция «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» (Россия, Санкт-Петербург, 2016); III Всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Россия, Санкт-Петербург, 2016); II Российский конгресс с международным участием «Пролиферативный синдром в биологии и медицине» (Россия, Москва, 2016); V съезд биохимиков России (Россия, Дагомыс, 2016); Cell technologies at the edge: research and practice (Russia, St. Petersburg, 2016); EMBO Conference «Protein translocation and cellular homeostasis», (Croatia, Dubrovnik, 2017); Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Беларусь, Минск, 2017); VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Россия, Москва, 2017); International conference Clinical proteomics. Postgenome medicine (Russia, Moscow, 2017); BioTechWorld (Russia, Moscow, 2018); 2nd International Caparica Conference in Splicing (Portugal, Lisbon, 2018); The 26th Conference of the European Cell Death Organization (Russia, St. Petersburg, 2018); 4th EACR Conference Cancer Genomics (Cambridge, UK, 2019); 44th FEBS Congress (Krakow, Poland 2019); EMBO Workshop Cell death in immunity and inflammation (Heraklion, Greece, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 65 научных работы в российских и иностранных научных изданиях, в том числе 27 статей в научных журналах рекомендованных ВАК, 36 публикаций в докладах российских и международных научных конференций, одна монография и одна глава научного пособия.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа построена по традиционной схеме и содержит разделы «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», включающий 439 источников и «Приложение». Работа изложена на 329 страницах машинописного текста, содержит 27 таблиц и 78 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассматриваются механизмы функционирования АС, дается обзор основных белков, регулирующих данный процесс. Рассмотрена роль процесса АС в развитии нормальных и патологических клеточных процессов. Отдельная глава посвящена роли АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы в нормальных и патологических процессах. Механизмы регуляции супрессорной функции регуляторных Т клеток раскрыты в заключительной части обзора литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные линии и культивирование клеток. Клетки линий опухолей кишечника человека LoVo, CaCo-2, DLD-1, HT 29, RKO, SW 620, LS 174T, COLO 320HSR, HCT-15, HCT-116, NCI-H50B, WiDr, а также клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, HCC1954, HCC1943, HCC1395, T42D, BT-474, ZR-75-1, CAMA-1, AU565 (все ATCC, США), культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific Inc., США) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажности.

Лабораторные животные. В экспериментах использовали аутбредных мышей линии ICR (CD-1) и инбредных мышей линий BALB/c, C57BL/10, C57BL/6, DBA/2, SJL, C3H и CBA в возрасте 6–9 недель, а также аутбредных крыс линий SD (Sprague Dawley), Wistar и инбредных крыс линий WKY (Wistar-Kyoto), SHR и DA (Dark Agouti) в возрасте 8–11 недель. Данные животные поступили из питомника лабораторных животных «Пушино». Трансгенные мыши линии B10.GFP, несущие ген зелёного флуоресцентного белка GFP, из питомника лабораторных животных «Андреевка». Мышей и крыс содержали в виварии в условиях отсутствия патогенной микрофлоры при естественном освещении, на брикетированном корме и постоянном доступе к воде.

Выделение и культивирование лимфоцитов. Образцы венозной крови здоровых доноров, давших письменное согласие на участие в исследовании, забирали в пробирки с антикоагулянтом К3EDTA (Greiner Bio-One, Австрия). Мононуклеарные клетки крови выделяли методом градиентного центрифугирования на Фиколе Lympholite-H (Cedarlane, Канада) и ресуспендировали в растворе ACD-A (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution – A, Cytosol Laboratories Inc., США) с 5%-ным бычьим

сывороточным альбумином. Фракции CD4⁺, CD8⁺, В- и NK- лимфоцитов получали методом магнитной селекции с использованием CD4⁺ Isolation Kit, CD8⁺ T Cell Isolation Kit, B Cell Isolation Kit II или CD56⁺CD16⁺ NK Cell Isolation Kit, соответственно, (все от Miltenyi Biotec) согласно протоколу производителя. Регуляторные Т-клетки (Трег) выделяли при помощи CD4⁺CD25⁺CD127dim/- Regulatory T Cell Isolation Kit II («Miltenyi Biotec», Германия). Клетки высевали в 25 см² культуральные флаконы (Corning, США) в концентрации 5x10⁵ клеток на 1 мл среды. У животных после эвтаназии, в асептических условиях, удаляли селезенку и ткань измельчали до отдельных клеток, дважды пропуская их гомогенат через нейлоновый гомогенизатор с диаметром пор 70 мкм Falcon Cell Strainer (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Мононуклеарные клетки получали методом градиентного центрифугирования гомогената на Фиколе Lympholite-H). Селекцию CD4⁺, 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 производителя (все от Miltenyi Biotec). 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 антител анти-CD28 (2 мкг/мл eBiosciences, США). Стимуляцию роста В- и НК-клеток осуществляли при помощи B Cell Expansion Kit и NK Cell Activation/Expansion Kit, соответственно (все от Miltenyi Biotec). Через каждые 3-4 суток культивирования клетки рассеивали до концентрации 5x10⁵ на 1 мл среды. Трег как человека, так и мыши в количестве 5x10⁴ клеток на лунку культивировали с аутологичными CD4⁺CD25⁻ Т-клетками, CD8⁺ Т-клетками, CD19⁺ В-клетками или CD56⁺CD16⁺ НК-клетками через полупроницаемую мембрану Millicell Culture Inserts, с диаметром пор 8 мкм (Millipore, США) в соотношении 1:1. Культивирование производили в 24-х луночном планшете в конечном объеме полной среды 1 мл на лунку. Среды заменяли через каждые четыре дня.

Обработка клеток повреждающими ДНК агентами и измерение цитотоксичности. Для индукции повреждения ДНК лимфоциты культивировали в течение 72 ч в присутствии следующих повреждающих ДНК химических веществ: бензопирен (1,2-бензопирен, Sigma, США), блеомицин (блеомицина сульфат, Sigma, США), цисплатин (цис-диамминдихлороплатина(II), Sigma, США), бромистый этидий

(Thermo Fisher Scientific, США). Суспензию клеток в концентрации 10^6 клеток на мл облучали гамма-излучением ^{60}Co на установке Gamma Cell 220 (Atomic Energy of Canada Ltd., Канада) при мощности дозы 0,23 Гр/мин и культивировали 72 ч. Для индукции экспрессии Casp-2S CD4^+ и CD8^+ Т лимфоциты культивировали в присутствии не летальной концентрации этопозида 5 мкМ (Sigma, США) в течение 24 ч. Оценку цитотоксической активности повреждающих ДНК агентов проводили по измерению активности лактатдегидрогеназы (Lactate dehydrogenase, LDH) в культуральной среде при помощи LDH Cytotoxicity Detection Kit (Takara, США) по методике производителя. Максимально нетоксичной дозой (МНД) считали максимальную дозу повреждающего ДНК агента, которая не вызывала статистически достоверного увеличения смертности клеток. Оценку количества клеток с поврежденной ДНК проводили методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling) при помощи FlowTACSTM Apoptosis Detection Kit (R&D Systems, США) по протоколу производителя с использованием проточного цитометра FACSCalibur (Beckton Dickinson, США) или MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Германия).

Трансфекция клеток. Лимфоциты человека и клетки карциномы кишечника человека CaCO-2 трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Трансфекцию CD4^+ Т клеток человека, мыши и крысы осуществляли плазмидами Mouse pEndoG-GFP, Rat pEndoG-GFP, или контрольной плазмидой pGFP. Все плазмиды были получены на основе вектора pGFP-N1 на заказ в компании Clontech (США). Трансфекцию осуществляли с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) по протоколу производителя. Оценку эффективности трансфекции (обычно она составляла 90–100%) проводили методом проточной цитометрии MACS Quant Analyzer 10 («Miltenyi Biotec», Германия) при подсчете GFP-положительных клеток меченых антителами CD4-VioBlue, CD8- VioBlue, CD19-APC или CD16/56-APC (все от «Miltenyi Biotec»), или посредством флуоресцентной микроскопии также путём подсчёта GFP-положительных клеток. Интенсивность флуоресценции GFP оценивали по уровню MFI (Mean Fluorescence Intensity). Для трансфекции клеток переключающими сплайсинг олигонуклеотидами EGPO (EndoG-produced oligonucleotide) использовали Oligofectamine Reagent (Invitrogen, США) по протоколу компании производителя. Все EGPO содержали химические модификации для защиты от действия внутриклеточных РНКаз: 2'-О-(2-метокси)этил рибозу (2'МОЕ), фосфоротиоатный остов и 5'-

метилцитозин. Все EGPO были конъюгированы с флуоресцентным красителем Cy5.5. Эффективность трансфекции EGPO оценивали методом проточной цитометрии при подсчёте Cy5.5-положительных клеток при помощи проточного цитометра MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Germany). Количество EGPO внутри клеток определяли по уровню MFI Cy5.5-положительных клеток.

Подсчёт количества и оценка жизнеспособности культивируемых клеток. Подсчёт количества и жизнеспособности клеток проводили окрашиванием трипановым синим на клеточном анализаторе Vi-cell XR Viability Cell Analyzer (Beckman Coulter, США). Фотографирование пролиферирующих клеток осуществляли при помощи инвертированного микроскопа Leica DMI300 (Leica Biosystems, США). Для анализа пролиферативной активности CD4⁺ Т-лимфоциты метили витальным флуоресцентным красителем CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) из набора CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и культивировали в течение четырёх суток. Ежедневно измеряли количество пролиферирующих клеток, подсчитывая процент CFSE-положительных клеток с пониженной интенсивностью флуоресценции методом проточной цитометрии (Quah and Parish, 2010). Количество циклов деления клеток в сутки (f) определяли по зависимости $N_t = N_0 2^{ft}$, где N_t – количество клеток в момент измерения (t), а N_0 – исходное количество клеток (Sherley et al., 1995).

Подавление экспрессии гена EndoG. Подавление экспрессии гена *EndoG* малыми интерферирующими РНК (small interfering RNA, siRNA) осуществляли по методике, описанной Apostolov E.O. и соавт. (Apostolov et al., 2011). Клетки CaCo-2 культивировали до 70-80% конфлюэнтного монослоя. Лимфоциты ресуспендировали до концентрации 1×10^3 клеток на 1 мл среды. Клетки трансфицировали парой siRNA (прямой 5'-AUGCCUGGAACAACCUGGAdTdT-3', и обратный 3'-UCCAGGUUGUCCAGGCAUdTdT-5', IDT, США) или парой контрольных неспецифичных siRNA Non-Targeting siRNA No. 1 (Dharmacon, США) в бессывороточной среде, содержащей 50 нМ siRNA и реагент для трансфекции TransIT-TKO transfection reagent (Mirus, США) в течение 48 ч.

Выделение клеточных органелл. Для выделения митохондрий клетки гомогенизировали на льду при помощи роторного гомогенизатора Ultra-Turrax T25 (IKA, США) в 1 мл буфера (220 мМ D-маннитол), 70 мМ сахароза, 20 мМ Трис, 1 мМ

ЭДТА, pH 7,4 и центрифугировали (10 мин при 700g, и +4°C). Супернатант центрифугировали 10 мин при 1000g для осаждения митохондрий. Качество митохондрий оценивали при помощи Cytochrome c Oxidase Assay Kit (Sigma, США) по протоколу производителя. Для получения цитоплазмы, клетки гомогенизировали на льду в роторном гомогенизаторе в 300 мкл буфера (10 mM ХЕПЕС, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; 0,1 mM ЭГТА, 0,3% NP-40, ингибитор протеаз (Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete, Mini, Roche, Швейцария), pH 7,4) и центрифугировали 3 мин (2000g; +4°C). Супернатант - фракция цитоплазмы. Для выделения ядер клетки гомогенизировали на льду в роторном гомогенизаторе в 300 мкл в 50 mM Трис-HCl, pH 7,9, 0,25 M сахарозе, 10 mM CaCl₂ и центрифугировали (ультрацентрифуга Optima XE (Beckman Coulter, США) в градиентном растворе 2 M сахарозы, 50 mM Трис-HCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM β-меркаптоэтанола при 70000g в течение 90 мин. Ядра дважды промывали в ТВЭ буфере (89 mM Трис, 89 mM H₃BO₃, 2 mM ЭДТА). Цитоплазму и ядра клеток инкубировали с recEndoG человека (ENDOG (Human) Recombinant Protein; Abnova, США) при 37°C или блеомицином (Блеомицин-РОНЦ, Россия).

Расщепление ДНК и РНК recEndoG или РНКазы. 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 mM Трис-HCl pH 7,9, содержащем 1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-меркаптоэтанол, в течение 20, 40 и 60 мин при 37°C. РНК инкубировали в течение 60 мин с 500 ед. РНКазы 1 (Invitrogen, США) и РНКазы А (Invitrogen, США) согласно протоколу компании. Затем образцы обрабатывали протеазой К (Qiaagen, США) для инактивации recEndoG или РНКаз. К расщепленной РНК добавляли каждый из 24-членных ДНК-олигонуклеотидов и инкубировали в течение 30 мин при 37°C для образования нековалентных комплексов ДНК-РНК, блокирующих активность EGPO.

Экстракция РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью PureLink RNA mini kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США по протоколу производителя. Для проведения реакции обратной транскрипции этого 5 мкг тотальной РНК подвергли реакции ОТ в 25 мкл реакционной смеси (Evrogene, Россия) по протоколу компании-производителя. В качестве реакционной смеси для ПЦР в реальном времени использовали Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen, Россия). Для амплификации применяли систему детекции ПЦР в реальном времени

DTPPrime 5 (ДНК-технология, Россия). Применяли двух температурный режим реакции (отжиг праймеров/элонгация). Количество амплификатов определяли по флуоресценции в конце цикла элонгации. Оценку качества амплификации проводили по анализу кривой плавления от 60°C до 95°C в конце реакции (после 35-го цикла). Стандартные кривые эффективности ПЦР строили по серийным разведениям суммарных кДНК (1:40, 1:80, 1:160 и 1:320). Вычисление относительной концентрации РНК проводили по программе DTPPrime 5 (ДНК-технология). Уровни мРНК изучаемых генов или их сплайс-вариантов нормировали по мРНК конститутивно экспрессируемых референсных генов: 18S рибосомной РНК (ген «домашнего хозяйства» для цитоплазмы), Ламин В1 (ген «домашнего хозяйства» для ядер) и NADH дегидрогеназа, субъединица 4 (ген «домашнего хозяйства» для митохондрий).

Вестерн-блоттинг. Клетки или клеточные органеллы лизировали в 1 мл буфера ТБЭ (89 мМ Tris, 89 мМ H₃BO₃, 2 мМ EDTA pH 8,0) ультразвуком в течение двух минут при мощности 50 Ватт с помощью ультразвукового дезинтегратора Model 50 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, США) и центрифугировали 10 мин при 12000g для удаления клеточного дебриса. Концентрацию общего белка в образцах измеряли по методу Bradford при помощи Bradford Protein Assay (Pierce, США), используя БСА для построения калибровочной кривой. Клеточный лизат (в пересчете на 50 мкг тотального белка) растворяли в 50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, содержащем 1% SDS, 2 мМ EDTA, 1% β-меркаптоэтанол и 7,5% глицерин, денатурировали прогреванием при 100°C в течение 10 мин и разделяли электрофорезом в градиентном полиакриламидном геле (ПААГ) (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, США) при 40 В в течение 3 ч. Мембраны блокировали Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, США) и инкубировали в течение 2 ч с первичными моноклональными антителами: anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, референсный белок для цитоплазмы), разведенными 1:1000; anti-Ламин В1 (референсный белок для ядер), разведенными 1:1000; anti-COX IV (cytochrome C oxidase IV, референсный белок для митохондрий), разведенными 1:1000; anti-hTERT, разведенными 1:1000; anti-Casp-2, разведенными 1 : 1000; anti-human BCL-xL, разведенными 1 : 1000 (все от Abcam, США); поликлональными anti-BCL-xS (BioLegend Inc., США), поликлональными anti-EndoG (Millipore, США) антителами, разведенными 1:500, или anti-mouse, anti-rat DNase

I, разведенными 1 : 500 (Rockland, США). 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 набор реактивов SuperSignal chemiluminescent kit (Pierce Biotechnology, США) с последующим документированием в ChemiDoc™ XRS imaging system (Bio-Rad, США). Количественную оценку содержания белка проводили методом денситометрии, используя программу GelAnalyzer 2010a.

Определение активности теломеразы. Определение активности теломеразы проводили при помощи метода TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol, протокол амплификации теломерных повторов). Клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5% ХАПС (CHAPS, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, Sigma, США) и 10% глицерин, из расчета 1 мкл буфера на 10³ клеток. Лизаты центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при 4°C. Элонгацию олигонуклеотидного субстрата-праймера и последующую амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Твин-20, 1,5 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0,25 мМ каждого из dNTPS, 0,1 мкг TS-праймера (Telomerase Substrate primer) (5'- ААТССГТССГАГСАГАГТТ -3') и 2 мкл клеточного экстракта и инкубировали при 37°C в течение 25 мин. По окончании инкубации смесь выдерживали 10 мин при 96°C для инактивации теломеразы. Затем в смесь добавляли 0,1 мкг СХ-праймера (Copy Extended primer) (5'- СССТТАСССТТАСССТТАСССТАА -3') и 2,5 ед. Таq-полимеразы. Реакционную смесь подвергали ПЦР в следующем режиме: 94° С – 2 мин; 30 циклов: 94° С – 30 с, 50°С – 30 с, 72° С – 40 с; 72° С – 5 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 12%-ном неденатурирующем ПААГ и ТБЭ буфере. Образцы вносили в лунки геля в объеме 10 мкл. Для визуализации разделенных продуктов использовали ChemiDoc™ XRS imaging system после выдерживания геля в течение 30 мин в растворе красителя SYBR Green I (Invitrogen, США). О теломеразной активности судили по денситометрии результатов TRAP в программе GelAnalyzer 2010a.

Определение ферментативной активности каспазы 2 и β-галактозидазы. Определение ферментативной активности Casp-2 в клеточных лизатах проводили в 96-ти луночном планшете из темного пластика (Corning, США) при помощи Caspase 2

Assay Kit Fluorometric, Abcam, США) по протоколу производителя. Измерение флуоресценции осуществляли в планшетном спектрометре MultiscanGo (Thermo Scientific, США) при длинах волн возбуждения и эмиссии 400 нм и 505 нм, соответственно.

Определение активности β -Gal. Активность β -галактозидазы (β -Gal) в клетках определяли при помощи набора Beta Galactosidase Detection Kit (Abcam, США) по протоколу производителя в 96-луночном планшете. Измерение флуоресценции проводили в планшетном спектрометре MultiscanGo при длинах волн возбуждения и эмиссии 490 нм и 525 нм, соответственно. Подсчёт активности осуществляли для 1×10^3 клеток по калибровочной кривой с использованием коммерческой β -Gal (Abcam, США) в диапазоне 0,01–100 ед/мл.

Определение ферментативной активности ДНКазы 1. Определение ферментативной активности DNase I проводили методом зимографии по протоколу DNA-SDS-PAGE, описанному Basnakian A.G. и соавт. (Basnakian et al., 2002). Клетки или клеточные органеллы гомогенизировали в буфере, содержащем 0,25 М сахарозу, 50 мМ Трис-НСl pH 7,4 и 5 мМ β -меркаптоэтанол. 60 мкг белка растворяли в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, pH 6,8, 2 мМ EDTA, 1% 2-меркаптоэтанол, 7,5% глицерин, 0,01% бромфеноловый и наносили на 10%-ный ПААГ, содержащий 0,1% SDS и денатурированную ДНК тимуса теленка (calf thymus denaturated DNA, Sigma, США). Электрофорез проводили при постоянной силе тока 35 мА в течение 1 ч в концентрирующем геле и при 75 мА в течение 3 ч в разделяющем геле. После электрофореза гель промывали в 150 мл молока (7,5 грамм, «Bio-Rad») в течение 1 ч при комнатной температуре) и инкубировали в течение ночи в 150 мл молока, содержащем 40 мМ мМ Трис-НСl pH 7.4, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ CaCl₂, 0.02% азид натрия для активации DNase 1. Визуализацию геля проводили окрашиванием в 1%-ном растворе бромистого этидия в течение 30 мин. Зонами активности ДНКазы 1 являлись неокрашенные участки геля в УФ свете.

Определение абсолютной длины теломер. Для определения абсолютной длины теломер использовали методику, описанную в (O'Callaghan and Fenech, 2011). Геномную ДНК выделяли при помощи PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Scientific, США) и проводили ПЦР в реальном (Cawthon, 2002). Длину теломер в каждом образце измеряли трижды. Для дальнейших расчётов брали усреднённое

значение трёх технических повторов. ДНК из интактных клеток CaCo-2 или лимфоцитов использовали в качестве препарат сравнения.

Секвенирование РНК. Из трансфицированных, инкубированных с цисплатином или контрольных клеток выделяли суммарную РНК и получали библиотеки кДНК при помощи Illumina TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit with Ribo-Zero Human/Mouse/Rat (Illumina Inc., США). Каждый образец кДНК разводили до концентрации 6 пМ и секвенировали при помощи HiScanSQ (Illumina Inc., США) в приложении Total RNA-Seq как описано Heruth и соавт. (Heruth et al., 2012). Результаты секвенирования анализировали относительно UCSC *Homo sapiens* reference genome hg19, *Mus musculus* reference genome mm10 и *Rattus norvegicus* reference genome rn10 при помощи программы TopHat v1.3.0 (Trapnell et al., 2012). Результат изменения уровня мРНК сплайс-вариантов считали достоверным, при условии отсутствия изменения уровня общей мРНК целевого гена.

Идентификация длинных некодирующих РНК (нкРНК) методом секвенирования следующего поколения. Суммарную РНК из клеток, ядер и цитоплазмы выделяли с помощью RNeasy Mini Kit. Подготовку библиотек осуществляли при помощи TruSeq Small RNA Library Preparation Kit (Illumina, США) по протоколу производителя. Секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq System (Illumina, США), данные анализировали согласно (Lopez et al., 2015).

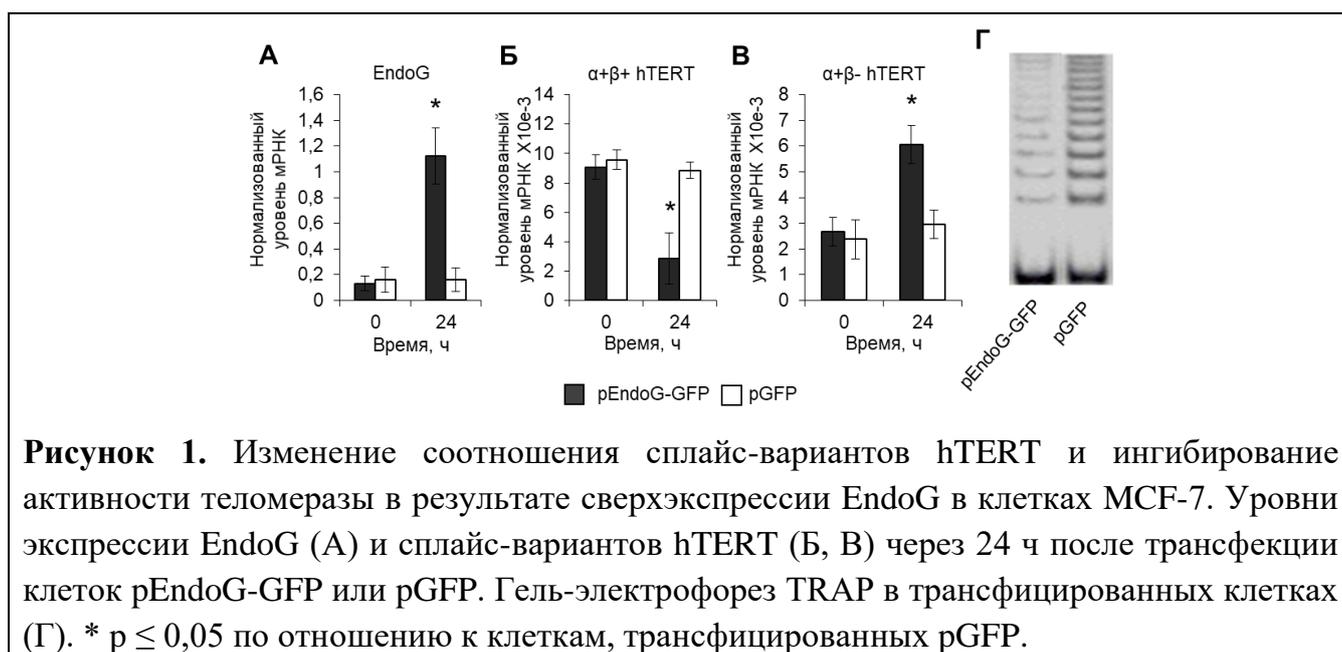
Фенотипирование лимфоцитов, определение апоптоза и клеточного цикла. Периферическую кровь доноров лизировали при помощи лизирующего буфера Red Blood Cell Lysis Buffer (Life Technologies, США) по протоколу производителя. Клетки в количестве 5×10^7 из осадка или после злокачественной трансформации ресуспендировали в 200 мкл PBS (Gibco, США). Клетки метили антителами к CD45-Vio770, а также каждым из CD3-FITC, CD4-FITC, CD8-FITC, CD14-FITC, CD16/56-FITC, CD2-FITC, CD5-FITC и CD7-FITC (все от Miltenyi Biotec, Германия) по протоколу производителя. Интенсивность экспрессии маркеров оценивали по уровню MFI (Mean Fluorescence Intensity) при проведении проточной цитометрии, используя MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Германия). Оценку степени зрелости и чистоту популяции Трег определяли методом проточной цитометрии по уровню экспрессии мембранного маркера CD127 при помощи human Treg detection cocktail для клеток человека или mouse Treg detection cocktail (оба от Miltenyi Biotec) для клеток

мышь. Анализ количества внутриклеточного фактора транскрипции FoxP3, который является главным маркером зрелых Трег проводили также методом проточной цитометрии в фиксированных клетках. Внутриклеточное мечение FoxP3 осуществляли при помощи антител к FoxP3 конъюгированных с аллофикоцианином (Allophycocyanin, APC) из набора human FoxP3 Treg Detection Kit для клеток человека или mouse FoxP3 Treg Detection Kit (оба от Miltenyi Biotec) для клеток мыши. Интенсивность внутриклеточной экспрессии маркера оценивали по уровню MFI. Для определения апоптоза клетки CaCo-2 обрабатывали раствором Трипсина с ЭДТА (Gibco, США) и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Лимфоциты и клетки CaCo-2 инкубировали с Аннексином V-FITC и пропидий йодидом из набора «FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis kit» (Invitrogen, США) по протоколу производителя. Анализ 5×10^4 клеток осуществляли методом проточной цитометрии. Для определения клеточного цикла клетки фиксировали в 70%-ном этаноле, обрабатывали FxCycle PI/RNase Staining Solution (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя и измеряли методом проточной цитометрии. Фазы клеточного цикла определяли по интенсивности сигнала пропидий йодида. Для индукции апоптоза в CD4⁺ Т-лимфоцитах клетки инкубировали в течение трёх часов с моноклональными антителами к CD95/FAS, клон CH11 (Merck, Darmstadt, Germany) в концентрации 500 нг/мл.

Статистический анализ. Каждый эксперимент проводили в четырёх повторах, за исключением оговорённых случаев. Статистически анализ результатов осуществляли по критерию Стьюдента при помощи программы Statistica 9.0 (StatSoft Inc., США). Результаты представляли в виде средних значений \pm стандартное отклонение. Значения считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Для изучения зависимости между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантами hTERT и DNase I клетки, ранжированные по уровню экспрессии EndoG, были разделены на две группы. Клетки с уровнем экспрессии EndoG ниже медианы считали клетками с низкой экспрессией EndoG, а клетки с уровнем экспрессии EndoG выше медианы считали клетками с высокой экспрессией EndoG. В данных группах провели корреляционный анализ по Пирсону уровней экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT и DNase I при помощи программы Statistica 9.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция AC пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT эндонуклеазой EndoG в клетках MCF-7. Способность апоптотической эндонуклеазы EndoG индуцировать AC впервые была нами показана для пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT на клетках линии MCF-7 аденокарциномы молочной железы человека. Клетки MCF-7 трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Эффективность трансфекции приближалась к 100% в течение 24 ч после трансфекции. Трансфекция клеток плазмидой pEndoG-GFP приводила к значительному увеличению экспрессии EndoG (рис. 1 А), достоверному снижению синтеза полноразмерной $\alpha+\beta+$ варианта hTERT (рис. 1 Б) и увеличению экспрессии $\alpha+\beta-$ варианта (рис. 1 В). Сверхэкспрессия EndoG не вызывала изменения синтеза минорных сплайс-вариантов $\alpha-\beta+$ и $\alpha-\beta-$ hTERT. Не выявлено изменения образования данных сплайс-вариантов при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP. Для анализа активности теломеразы в клеточных экстрактах использовали амплификацию теломерных повторов с помощью ПЦР (TRAP). Через 24 ч после трансфекции в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, активность теломеразы была достоверно ниже (рис. 1 Г). Уменьшения активности фермента не наблюдалось при трансфекции клеток контрольной плазмидой. Эти данные полностью согласуются с результатом измерения экспрессии сплайс-вариантов hTERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени.



Взаимосвязь экспрессии EndoG и экспрессии сплайс-вариантов TERT в лимфоцитах человека, мыши и крысы. Известно, что активная теломераза присутствует кроме опухолевых клеток и в активированных лимфоцитах (Fessler et al., 2013; Vicente et al., 2016). Мы изучили корреляцию экспрессии EndoG и сплайс-вариантов мРНК hTERT в лимфоцитах 50-ти здоровых доноров и лимфоцитах мышей и крыс различных линий, а также оценили возможность индукции AC при сверхэкспрессии EndoG. Для изучения взаимосвязи уровня экспрессии EndoG и количества сплайс-вариантов TERT, проведена оценка экспрессии их мРНК в CD4⁺ Т-лимфоцитах, CD8⁺ Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и NK-клетках 50-ти здоровых доноров, а также в CD4⁺ Т-лимфоцитах мышей и крыс различных линий методом ОТ-

ПЦР в реальном времени. Полученные результаты показали большой разброс уровней экспрессии как EndoG, так и сплайс-вариантов TERT как у здоровых доноров, а также у различных линий мышей и крыс. Корреляционный анализ показал зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT (Табл. 1).

Таблица 1. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в лимфоцитах человека.

Лимфоциты	Низкий уровень мРНК EndoG (N=25)		Высокий уровень мРНК EndoG (N=25)	
	$\alpha+\beta+$ hTERT	$\alpha+\beta-$ hTERT	$\alpha+\beta+$ hTERT	$\alpha+\beta-$ hTERT
CD4 ⁺ Т-клетки	-0,751*	+0,808*	-0,841*	+0,764*
CD8 ⁺ Т-клетки	-0,703*	+0,625*	-0,748*	+0,558*
В-клетки	-0,673*	+0,604*	-0,527	+0,569*
НК-клетки	-0,625	+0,749*	-0,677*	+0,612*

Примечание: * - коэффициенты корреляции статистически значимы, $p \leq 0,01$ по критерию корреляции Пирсона. “+” прямая корреляция: повышенный уровень мРНК EndoG соответствует повышенному уровню мРНК сплайс-варианта TERT. “-” обратная корреляция: повышенный уровень мРНК EndoG соответствует пониженному уровню мРНК сплайс-варианта hTERT.

В клетках с относительно низкой экспрессией EndoG (ниже медианы) обнаружено преобладание полноразмерного $\alpha+\beta+$ варианта. В группах клеток с относительно высокой экспрессией EndoG (выше медианы) выявлено увеличение количества мРНК сплайс-вариантов $\alpha+\beta-$ hTERT, а также снижение уровня мРНК полноразмерного варианта. Как и в случае с лимфоцитами человека, в лимфоцитах мышей и крыс наблюдалось преобладание полноразмерного сплайс-варианта $\alpha+\beta+$ TERT в клетках с относительно низкой экспрессией EndoG, и преобладание сплайс-варианта $\alpha+\beta-$ TERT в клетках с относительно высокой экспрессией EndoG (рис. 2).

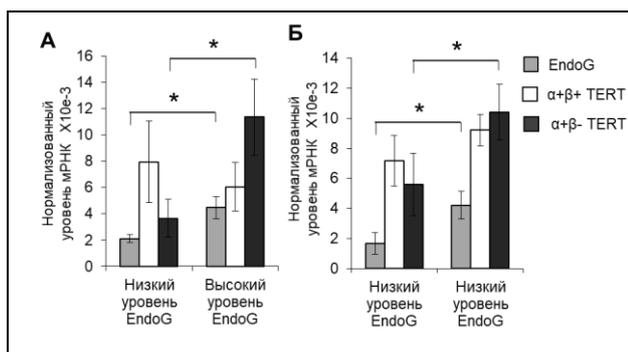
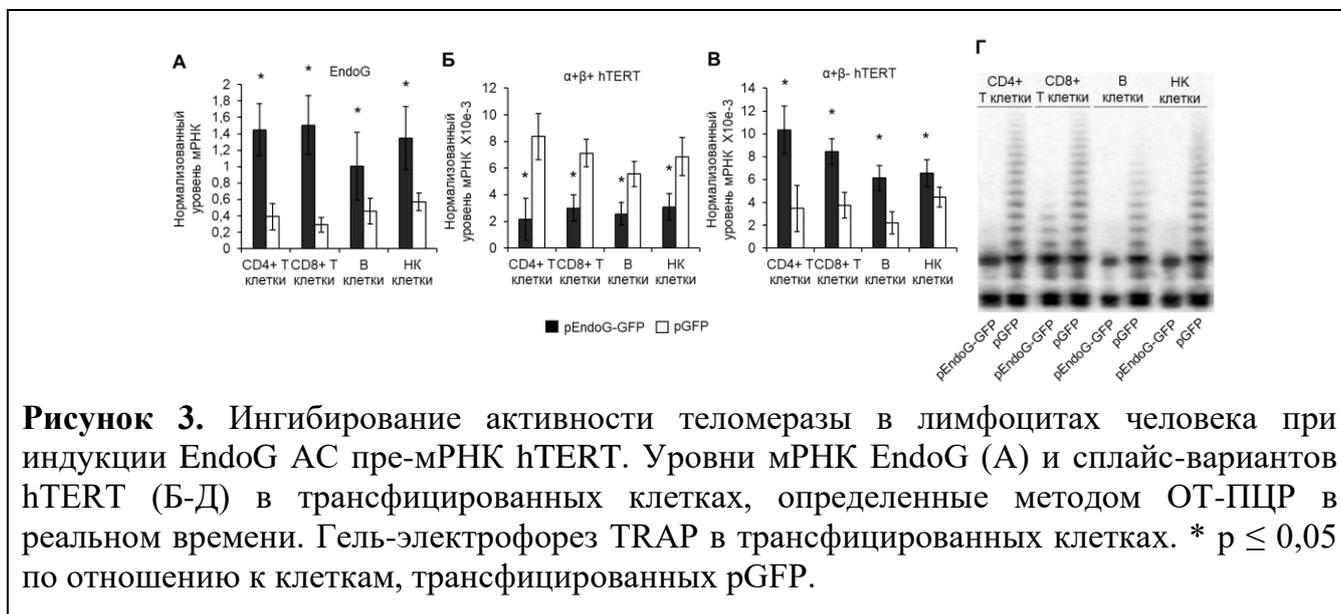


Рисунок 2. Зависимость экспрессии EndoG и сплайс-вариантов TERT в CD4⁺ Т-лимфоцитах мышей и крыс. Уровень экспрессии сплайс-вариантов TERT при ранжировании клеток мышей (B) и крыс (E) в группы с низким и высоким уровнем экспрессии EndoG. * - $p \leq 0,05$ для уровней экспрессии генов между группами клеток.

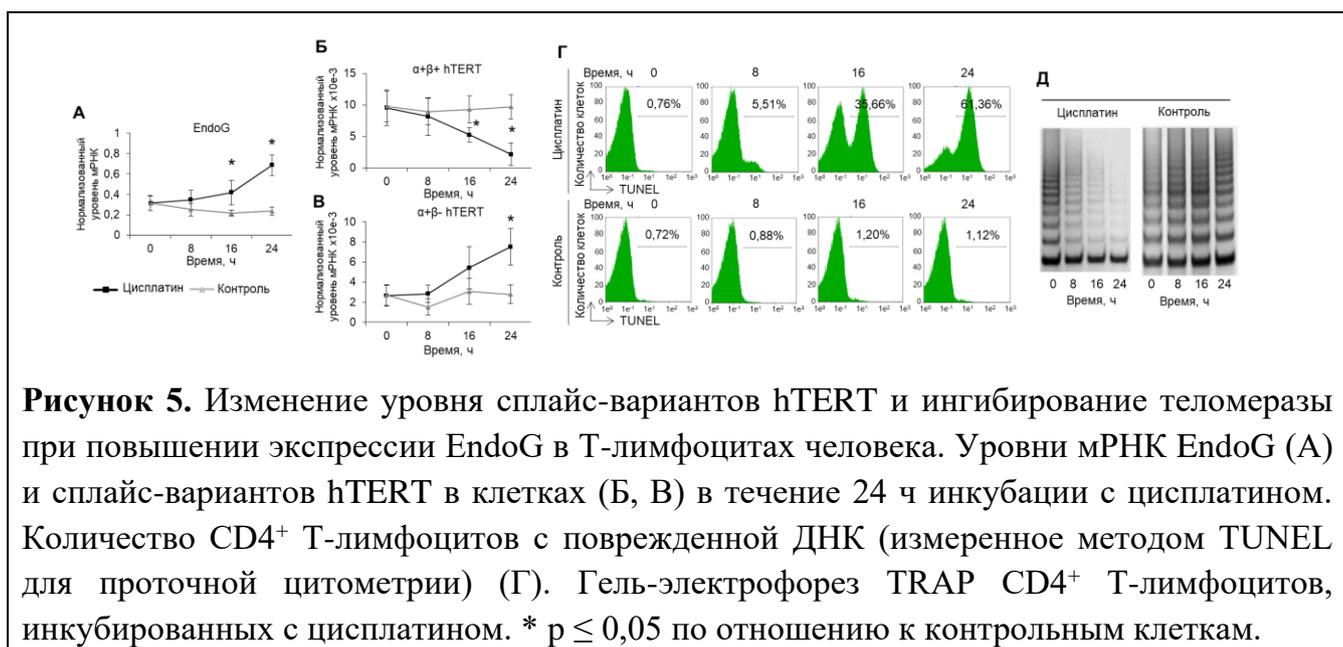
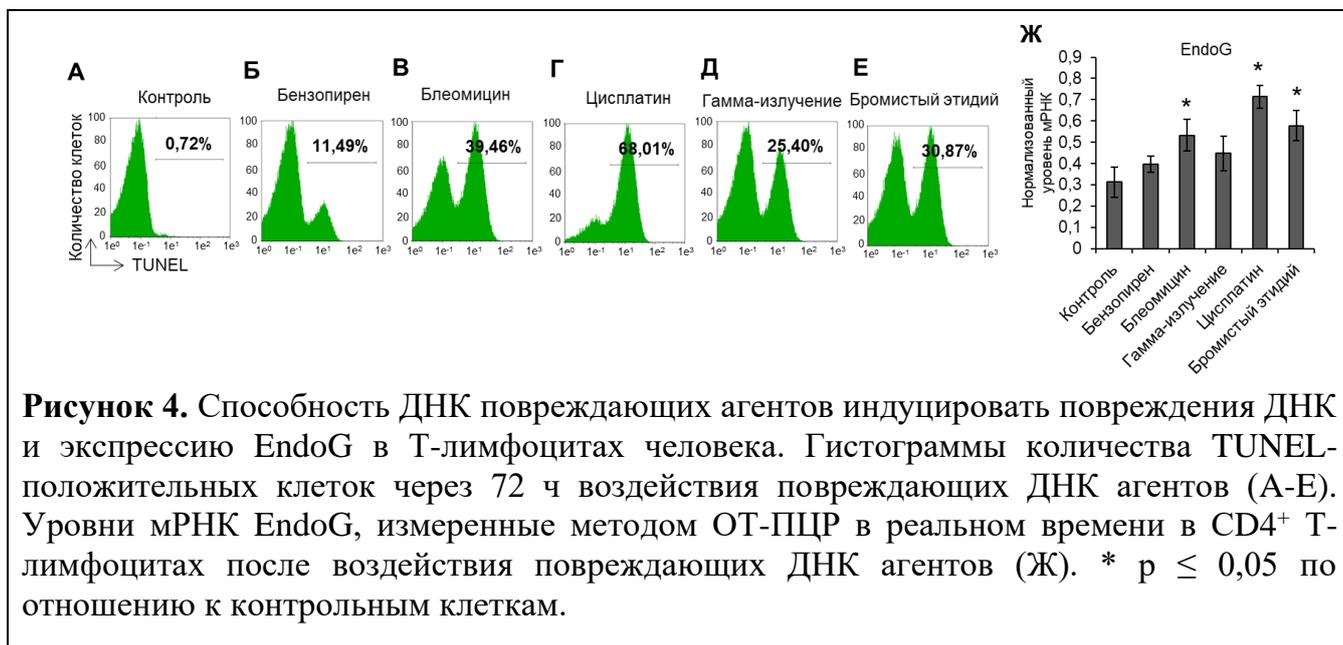
Индукция АС пре-мРНК TERT в лимфоцитах человека в результате сверхэкспрессии EndoG. Для установления возможной роли EndoG в индукции АС пре-мРНК hTERT в CD4⁺, CD8⁺, В- и НК-лимфоцитах человека сверхэкспрессию EndoG индуцировали методом трансфекции плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что трансфекция клеток плазмидой pEndoG-GFP приводила к значительному увеличению экспрессии EndoG (рис. 3 А). Повышение экспрессии EndoG сопровождалось достоверным снижением таковой полноразмерного $\alpha+\beta+$ варианта hTERT (рис. 3 Б) и увеличением экспрессии $\alpha+\beta-$ варианта (рис. 3 В). Установлено, что в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP,

активность теломеразы достоверно снижается (рис. 3 Г). Экспрессия EndoG и сплайс-вариантов hTERT, а также уровень активности теломеразы не изменялись при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP. Снижение активности теломеразы, вероятнее всего, происходит за счёт уменьшения количества полноразмерного $\alpha+\beta+$ варианта hTERT, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью.



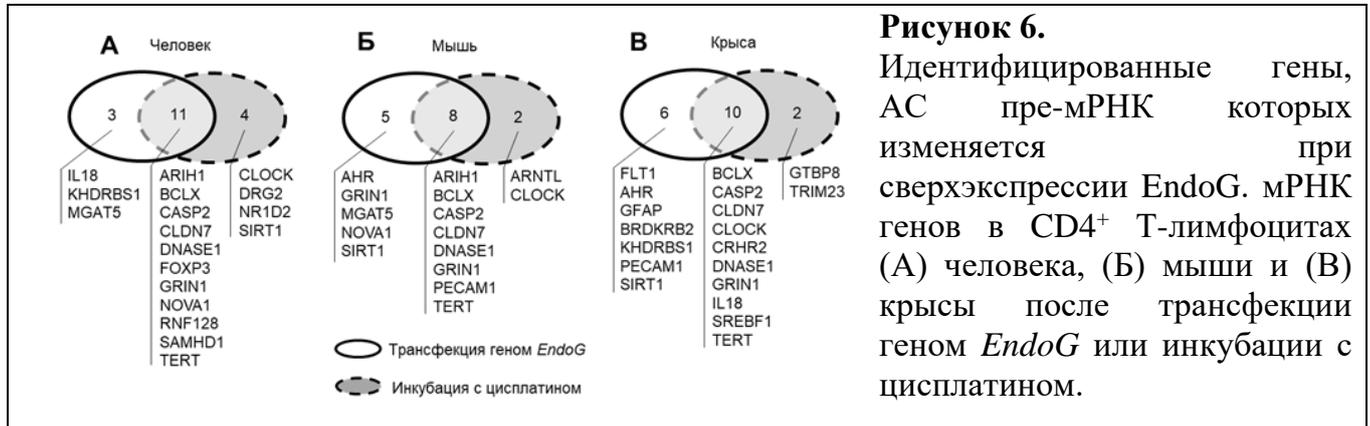
Способность повреждающих ДНК агентов активировать индуцированный EndoG и альтернативный сплайсинг пре-мРНК hTERT в лимфоцитах человека. Известно, что экспрессия EndoG возрастает в ответ на повреждения ДНК (Yin et al., 2007; Zhdanov et al., 2017). Мы проверили способность повреждающих ДНК агентов с различным механизмом действия индуцировать экспрессию EndoG, вызывать АС пре-мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы в нормальных активированных CD4⁺ Т лимфоцитах человека. Клетки инкубировали с веществами в максимальной нетоксичной концентрации (концентрации, которая вызывает повреждения ДНК, но не оказывает острого токсического действия на клетки) веществ или подвергали воздействию максимальной нетоксичной дозы радиации (доза с аналогичным эффектом). Используя метод TUNEL для проточной цитометрии, мы проследили изменение количества клеток с повреждённой ДНК после воздействия повреждающих ДНК. Все эти соединения вызывали достоверное увеличение клеток с повреждённой ДНК (рис. 4 А-Е), однако лишь блеомицин, цисплатин и бромистый этидий оказались способны индуцировать экспрессию EndoG (рис. 4 Ж). Методом ОТ-ПЦР в реальном времени было исследовано изменение экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в CD4⁺ Т-клетках, инкубированных с цисплатином в течение суток. Инкубация с цисплатином вызывала двукратное увеличение экспрессии EndoG через 24 ч (рис. 5 А). Увеличение экспрессии EndoG сопровождалось достоверным снижением экспрессии полноразмерного $\alpha+\beta+$ варианта hTERT (рис. 5 Б, Ж) и увеличением экспрессии $\alpha+\beta-$ варианта (рис. 5 В). С целью исследования связи индукции EndoG и повреждения ДНК проведено определение количества CD4⁺, содержащих повреждения ДНК, методом TUNEL. Обнаружено возрастание количества TUNEL-положительных клеток при увеличении времени инкубации с цисплатином (рис. 5 Г). Повышение количества клеток с поврежденной ДНК соотносится с увеличением экспрессии EndoG. Методом TRAP установлено, что инкубация с цисплатином CD4⁺ Т-клеток, приводит к постепенному снижению в них

активности теломеразы в течение 24-х часов до уровня $22,3 \pm 6,2\%$ от активности фермента контрольных клеток (рис. 5 Д). В контрольных $CD4^+$ Т-клетках активность фермента не изменялась. Эти данные полностью согласуются с результатом измерения экспрессии сплайс-вариантов hTERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени.



Поиск мРНК белков, в регуляции АС которых участвует EndoG. Апоптотическая эндонуклеаза EndoG индуцирует АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT в опухолевых клетках и лимфоцитах человека. Представляло интерес изучение способности EndoG вызывать АС пре-мРНК других генов. Мы попытались идентифицировать гены, АС которых индуцирует EndoG в активированных $CD4^+$ Т-клетках человека, мыши и крысы. Для определения мРНК генов, в сплайсинге которых участвует EndoG, индуцировали экспрессию EndoG путём трансфекции $CD4^+$ Т-лимфоцитов человека, мыши и крысы плазмидой pEndoG-GFP. Для контроля трансфекцию проводили плазмидой pGFP, кодирующей зеленый флуоресцентный белок GFP. Индукцию экспрессии EndoG осуществляли также

инкубацией клеток с повреждающим ДНК агентом цисплатином. Суммарную РНК клеток секвенировали. Анализ уровней мРНК сплайс-вариантов различных генов показал, что в клетках человека, мыши и крысы, трансфицированных рEndoG-GFP, и в клетках, инкубированных с цисплатином, изменяется количество мРНК сплайс-вариантов 28-ми генов (рис. 6). Выявленный сдвиг в соотношении сплайс-вариантов мРНК изучаемых генов не сопровождался изменением общих количеств их мРНК. Трансфекция клеток контрольной плазмидой рGFP не приводила к изменению пропорции мРНК изучаемых генов.



Изменение пропорции мРНК сплайс-вариантов выявленных генов подтверждено методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Дальнейшее исследование проводили на мРНК данных апоптотических генов. Обнаружено изменение пропорции мРНК сплайс-вариантов четырёх апоптотических генов, как в клетках человека, так и в клетках мыши и крысы: каталитической субъединицы теломеразы (TERT), каспазы-2 (caspase-2, Casp-2), дезоксирибонуклеазы 1 (deoxyribonuclease I, DNase I) и В-cell lymphoma-extra (BCL-x). Сверхэкспрессия EndoG вызывала уменьшение количества мРНК полноразмерного варианта $\alpha+\beta+$ TERT и увеличение уровня сплайс-варианта $\alpha+\beta-$ TERT, который образуется при делеции экзонов 7 и 8 пре-мРНК TERT. Повышение экспрессии EndoG сопровождалось снижением количества полноразмерной мРНК DNase I и увеличением уровня мРНК Δ DNase I, образующейся в результате делеции экзона 4. Обнаружено снижение уровня мРНК полноразмерного варианта Casp-2L и увеличение количества мРНК укороченного сплайс-варианта Casp-2S. Последний образуется в результате появления стоп-кодона из-за сдвига рамки считывания при включении дополнительного кодирующего экзона 9 (Aravind et al., 1999). Выявлено уменьшение количества полноразмерной мРНК BCL-xL и увеличение уровня мРНК BCL-xS, образующейся в результате делеции 189 нуклеотидов экзона 2.

Изучение способности EndoG индуцировать АС пре-мРНК DNase I и ингибировать нуклеазную активность. Была изучена корреляция экспрессии EndoG и сплайс-вариантов мРНК DNase I в лимфоцитах человека, а также оценена возможность индукции АС при сверхэкспрессии EndoG. Для оценки связи EndoG со сплайс-вариантами DNase I, определяли уровень их мРНК в CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и NK-клетках 50 здоровых доноров с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Установлено снижение уровней мРНК полноразмерной nDNase I и повышение количества мРНК Δ DNase I при повышении уровня EndoG в каждой субпопуляции лимфоцитов. Клетки были сгруппированы на основе количества их мРНК EndoG. Корреляционный анализ показал связь между уровнями мРНК EndoG и сплайс-вариантов DNase I во всех типах лимфоцитов. Клетки с низким количеством мРНК EndoG (ниже медианы) имели более высокий уровень мРНК nDNase I по сравнению с мРНК Δ DNase I. В группах клеток с

высоким уровнем EndoG (выше медианы) наблюдали повышение количества мРНК $\Delta 4DNase I$ и снижение уровня мРНК $nDNase I$. Коэффициенты корреляции EndoG и сплайс-вариантов DNase I представлены в таблице 2.

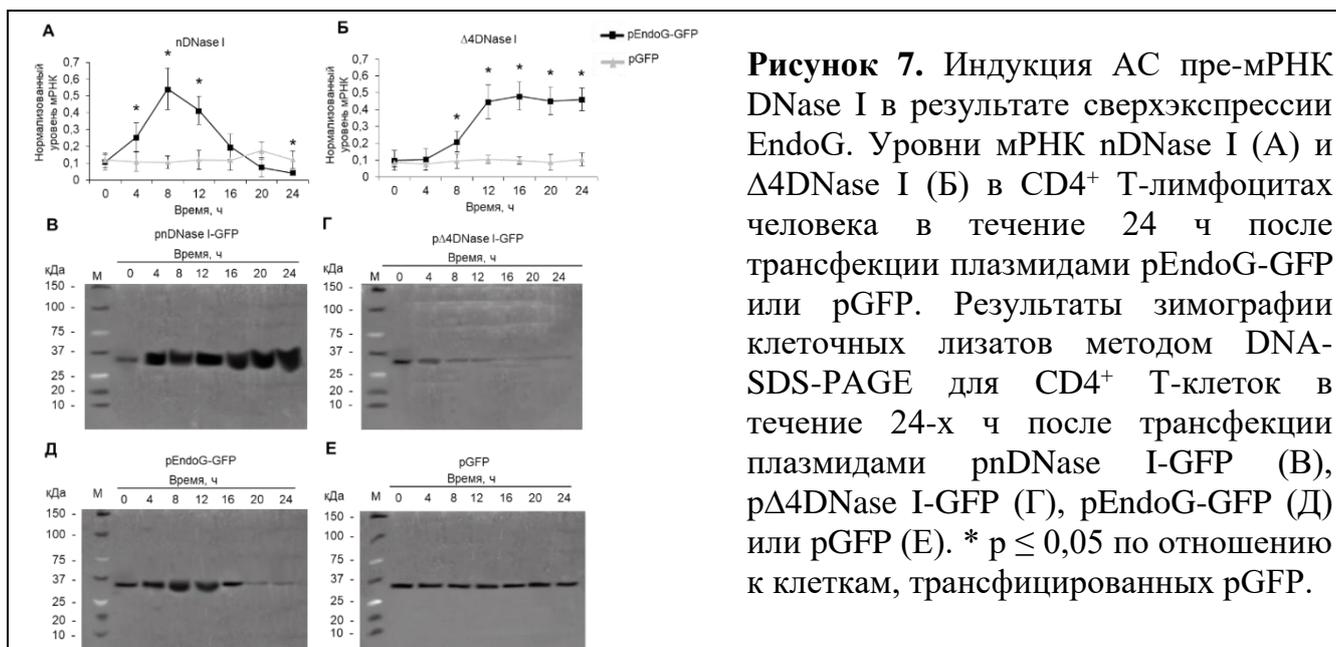
Таблица 2. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов DNase I в лимфоцитах человека.

Сплайс-вариант DNase I	Низкий уровень EndoG				Высокий уровень EndoG			
	CD4 ⁺ Т-клетки (N=25)	CD8 ⁺ Т-клетки (N=25)	В-клетки (N=25)	НК-клетки (N=25)	CD4 ⁺ Т-клетки (N=25)	CD8 ⁺ Т-клетки (N=25)	В-клетки (N=25)	НК-клетки (N=25)
nDNase I	-0,778*	-0,651*	-0,629	-0,548	-0,716*	-0,607*	-0,644*	-0,521
$\Delta 4DNase I$	+0,803*	+0,664*	+0,657*	+0,573*	+0,750*	+0,645*	+0,656*	+0,538

* - коэффициенты корреляции статистически значимы, $p \leq 0,01$ по критерию корреляции Пирсона. “+” прямая корреляция: повышенный уровень мРНК EndoG соответствует повышенному содержанию мРНК сплайс-варианта DNase I. “-” обратная корреляция: повышенный уровень мРНК EndoG соответствует пониженному уровню мРНК сплайс-варианта DNase I.

Для дальнейших экспериментов мы использовали CD4⁺ Т-клетки, так как в них обнаружена более сильная корреляция между экспрессией EndoG и сплайс-вариантов DNase I, чем в других лимфоцитах. Для определения возможной роли EndoG в индукции АС пре-мРНК DNase I проводили трансфекцию CD4⁺ Т-клеток плазмидой pEndoG-GFP, или контрольной плазмидой pGFP. В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, наблюдали индукцию мРНК полноразмерной nDNase I в течение первых 8 ч после трансфекции (рис. 7 А, Б). Уровень мРНК nDNase I резко снижался в течение 8 - 21 ч после трансфекции. Изменения содержания мРНК nDNase I вероятно, были связаны с индукцией мРНК $\Delta 4DNase I$. Уровень мРНК $\Delta 4DNase I$ повышался в течение первых 8 ч после трансфекции и оставался высоким до 24 ч после трансфекции. Трансфекция клеток плазмидой pGFP не вызывала каких-либо изменений в уровнях сплайс-вариантов мРНК DNase I. Для проверки нуклеазной активности сплайс-варианта $\Delta 4DNase I$, мы трансфицировали CD4⁺ Т-клетки плазмидами p $\Delta 4DNase I$ -GFP или pnDNase I-GFP, после чего тестировали в клеточных экстрактах активность ДНКазы методом зимографии по протоколу DNA-SDS-PAGE. Установлено, что нуклеазная активность варианта $\Delta 4DNase I$ была значительно ниже, чем у варианта nDNase I (рис. 7 Д-Е). Активность ДНКазы в клетках, трансфицированных p $\Delta 4DNase I$ -GFP, значительно ниже, чем в контрольных pGFP-трансфицированных клетках. Такой результат указывает на доминантно-негативный эффект действия сплайс-варианта $\Delta 4DNase I$. В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP наблюдали увеличение активности ДНКазы через 12 ч после трансфекции, и её резкое снижение через 20-24 ч. Изменения активности ДНКазы в EndoG-трансформированных клетках согласуются с наблюдаемыми изменениями уровней мРНК nDNase I и $\Delta 4DNase I$ и их белковых форм.

Индукция EndoG АС пре-мРНК Casp-2 и ингибирование активности каспазы-2. С целью изучения связи EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени проведена оценка экспрессии мРНК EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах 12 здоровых доноров, а также Т-лимфоцитах, инкубированных с этопозидом.



Инкубация клеток с этопозидом в не летальной концентрации 5 мкМ приводила к достоверному увеличению экспрессии EndoG практически во всех образцах CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток. В клетках с относительно низкой экспрессией EndoG (ниже значения медианы) наблюдалось преобладание полноразмерного варианта Casp-2L над Casp-2S. В группе клеток с относительно высокой экспрессией EndoG (выше значения медианы) выявлено увеличение экспрессии варианта Casp-2S и снижение экспрессии полноразмерного Casp-2L. Инкубация клеток с этопозидом вызывала усиление зависимости экспрессии сплайс-вариантов Casp-2 и EndoG, а также увеличение коэффициентов корреляции. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG со сплайс-вариантами Casp-2 представлены в таблице 3.

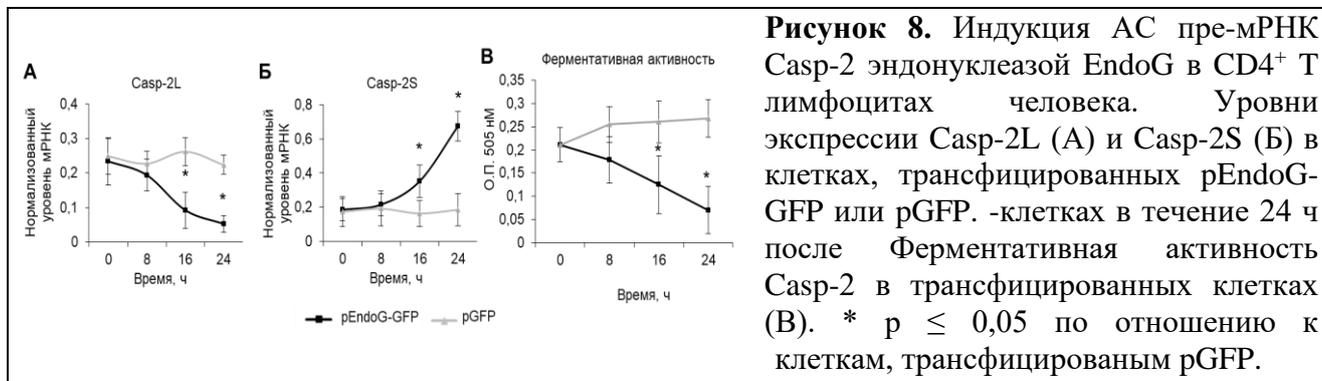
Таблица 3. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов Casp-2.

Сплайс-вариант Casp-2	Низкий уровень экспрессии EndoG		Высокий уровень экспрессии EndoG	
	CD4 ⁺ (N=6)	CD8 ⁺ (N=6)	CD4 ⁺ (N=6)	CD8 ⁺ (N=6)
Casp-2L (Контроль)	- 0,701*	- 0,554	- 0,722*	- 0,540
Casp-2L (Этопозид)	- 0,747*	- 0,697	- 0,836*	- 0,709*
Casp-2S (Контроль)	+ 0,612	+ 0,646	+ 0,608	+ 0,677
Casp-2S (Этопозид)	+ 0,815*	+ 0,735*	+ 0,702*	+ 0,706*

* - коэффициенты корреляции статистически значимы, p ≤ 0,01 по критерию корреляции Пирсона. “+” прямая корреляция: повышенный уровень мРНК EndoG соответствует повышенному уровню мРНК сплайс-варианта Casp-2. “-” обратная корреляция: повышенный уровень мРНК EndoG соответствует пониженному уровню мРНК сплайс-варианта Casp-2.

Для дальнейшей работы были выбраны клетки CD4⁺, поскольку именно у них корреляция между экспрессией EndoG и сплайс-вариантами Casp-2 была наиболее выраженной. Для установления возможной роли EndoG в индукции сплайс-варианта Casp-2 CD4⁺ Т-клетки трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Возрастание экспрессии EndoG сопровождалось достоверным понижением экспрессии Casp-2L (рис. 8 А). Увеличение общей Casp-2 происходило за счёт увеличения экспрессии Casp-2S (рис. 8 Б). В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP,

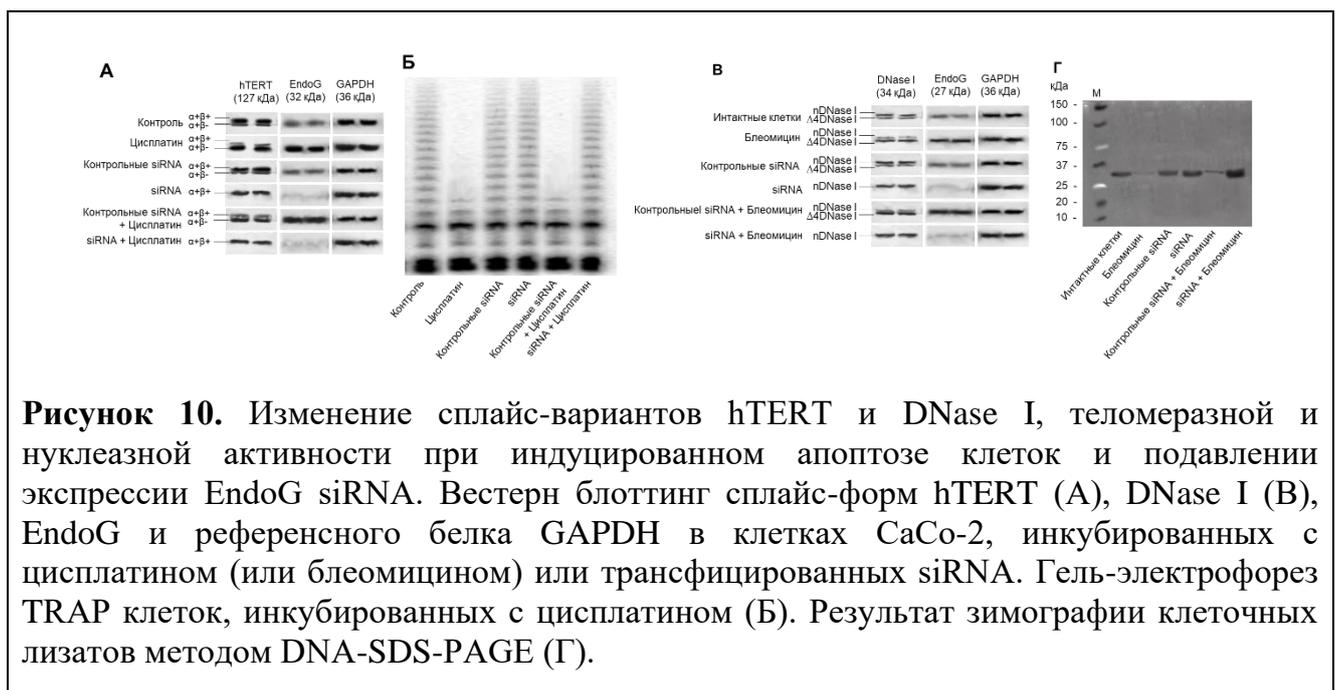
ферментативная активность Casp-2 достоверно снижалась уже через 16 ч после трансфекции (рис. 8 В). Снижение активности теломеразы, вероятнее всего, происходит за счёт уменьшения количества полноразмерного Casp-2L варианта, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью. Не выявлено изменения пропорции сплайс-вариантов Casp-2 и её ферментативной активности при трансфекции клеток контрольной плазмидой рGFP.



Индукция EndoG АС пре-мРНК BCL-x эндонуклеазой EndoG. С целью изучения связи EndoG и АС пре-мРНК BCL-x проведена оценка уровней мРНК EndoG и сплайс-вариантов BCL-x в клетках методом ОТ-ПЦР в реальном времени. В клетках различных линий были обнаружены различные уровни мРНК EndoG и сплайс-вариантов BCL-x. Корреляционный анализ выявил зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов BCL-x (рис. 9 А). В клетках с относительно низкой экспрессией EndoG наблюдалось преобладание полноразмерного BCL-xL. В группе клеток с относительно высокой экспрессией EndoG выявлено увеличение уровней мРНК укороченного сплайс-варианта BCL-xS и понижение уровней мРНК полноразмерного BCL-xL. Для установления возможной роли EndoG в индукции сплайс-варианта BCL-x клетки линии HCC1954 (эпителиальный рак молочной железы человека) трансфицировали плазмидой рEndoG-GFP или контрольной плазмидой рGFP. Через 24 ч после трансфекции клеток плазмидой рEndoG-GFP выявлено значительное увеличение экспрессии EndoG. Повышение экспрессии EndoG сопровождалось достоверным снижением уровня мРНК полноразмерного варианта BCL-xL и увеличением количества укороченного сплайс-варианта BCL-xS (рис. 9 Б). Не выявлено изменения экспрессии EndoG и сплайс-вариантов BCL-x при трансфекции клеток контрольной плазмидой рGFP.

Изменение уровня сплайс-вариантов hTERT и DNase I в клетках в состоянии апоптоза и при подавлении экспрессии EndoG. Известно, что в норме EndoG локализуется в митохондриях и интернализуется в ядро только при развитии апоптотических процессов (Ohsato et al., 2002), в то время как процесс АС в большинстве случаев протекает в ядрах клеток (Montes et al., 2012). Поэтому вопрос о ко-локализации EndoG, hTERT и DNase I в клетке, а также локализации процесса АС пре-мРНК hTERT и DNase I является весьма интересным. Мы изучили внутриклеточную локализацию, экспрессии и количества мРНК EndoG и сплайс-вариантов hTERT и DNase I в клеточных компартментах в норме и при апоптозе опухолевых клеток или CD4⁺ Т-лимфоцитов человека. Была проведена оценка сплайс-вариантов hTERT и DNase I в нормальных и апоптотических клетках, а также в нормальных и апоптотических клетках с подавленной экспрессией EndoG методом РНК-интерференции. Результат вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показал, что в апоптотических клетках

происходит достоверное увеличение EndoG, снижение полноразмерных $\alpha+\beta+$ формы hTERT и nDNase I (рис. 10 А, В), а также увеличение сплайсированных форм $\alpha+\beta-$ hTERT и Δ 4DNase I. Подавление экспрессии EndoG сопровождалось увеличением количества $\alpha+\beta+$ формы hTERT и nDNase I и полным отсутствием синтеза $\alpha+\beta-$ формы hTERT и Δ 4DNase I как в нормальных клетках, так и в условиях апоптоза. Изменение пропорции сплайс-вариантов сопровождалось ингибированием теломеразной активности (рис. 10 Б) и нуклеазной активности (рис. 10 В).

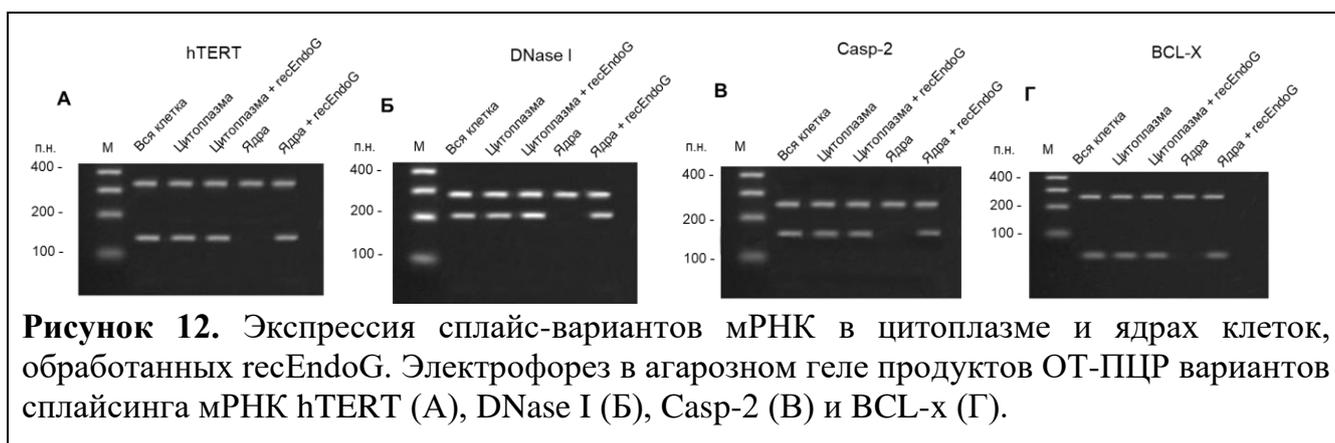


Мы попытались выяснить влияние индукции апоптоза на изменения пропорции EndoG и сплайс-вариантов hTERT и DNase I в цитоплазме, ядрах и митохондриях. Результаты вестерн-блоттинга показали, что в результате развития апоптоза происходит транслокация EndoG из митохондрий в ядра и цитоплазму и сопровождается изменением пропорции сплайс-вариантов hTERT и DNase I (рис. 11). При инкубации с цисплатином или блеомицином в цитоплазме апоптотических клеток наблюдали значительное увеличение количества EndoG. При этом количество полноразмерного варианта $\alpha+\beta+$ hTERT и nDNase I достоверно снижалось, а количество варианта $\alpha+\beta-$ hTERT и Δ 4DNase I возрастало. Индукция апоптоза также приводила к достоверному увеличению в ядрах количества EndoG и снижению уровня полноразмерного $\alpha+\beta+$ сплайс-варианта hTERT и

nDNase I и увеличению $\alpha+\beta$ - hTERT и $\Delta 4$ DNase I. Обратный эффект действия цисплатина на количество EndoG и сплайс-вариантов hTERT наблюдался в митохондриях. Развитие процессов апоптоза приводило к достоверному снижению количества EndoG, увеличению количества полноразмерного $\alpha+\beta$ + и уменьшению содержания $\alpha+\beta$ - сплайс-варианта hTERT.

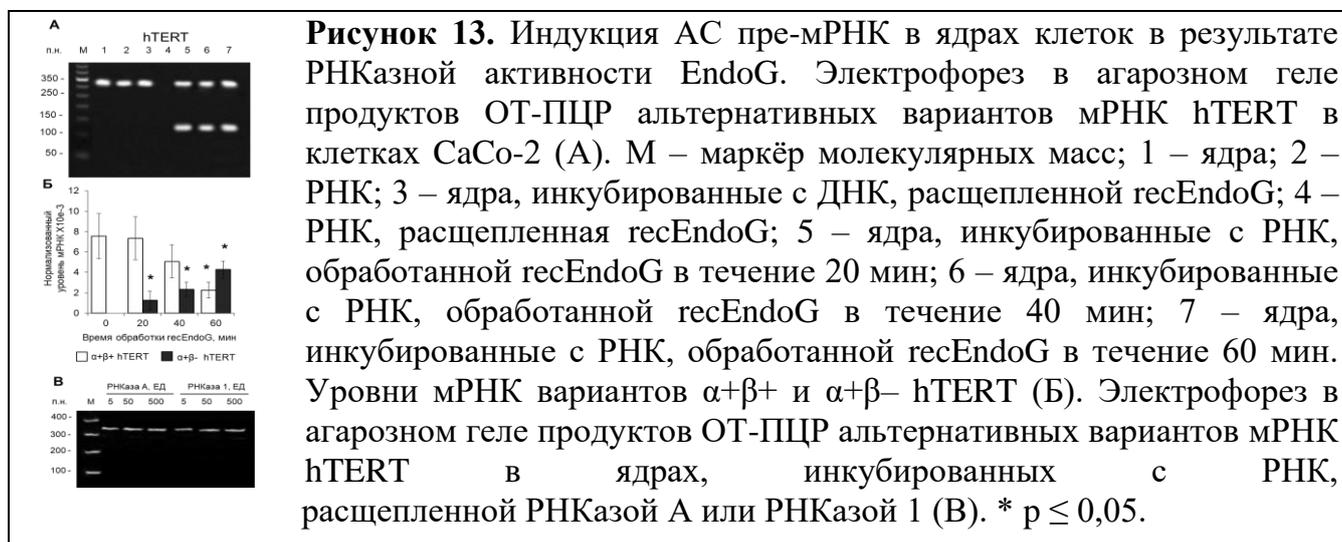


Индукция АС пре-мРНК в цитоплазме и ядрах под действием recEndoG. Апоптотическая эндонуклеаза EndoG в норме находится в межмембранном пространстве митохондрий, при развитии апоптотических процессов она интернализуется в ядро. Нами была изучена способность EndoG индуцировать АС в ядрах и цитоплазме клеток. Ядерную и цитоплазматическую фракции клеток инкубировали с рекомбинантной EndoG (recEndoG). Методом ОТ-ПЦР в реальном времени было показано, что в ядрах клеток CaCo-2 вариант $\alpha+\beta$ - hTERT не экспрессируется. (рис. 12 А). В то же время, в цитоплазме и ядрах уровень мРНК варианта $\alpha+\beta$ + был приблизительно одинаковым. Инкубация ядер и цитоплазмы с recEndoG в течение 1 ч приводила к появлению мРНК варианта $\alpha+\beta$ - в ядрах и увеличению её уровня в цитоплазме. При этом содержание мРНК варианта $\alpha+\beta$ + hTERT снижалось. Ядерная и цитоплазматическая фракции также были выделены и из CD4⁺ Т-лимфоцитов человека. Инкубация ядер и цитоплазмы с recEndoG в течение 1 ч приводила к появлению мРНК вариантов $\Delta 4$ DNase I и Casp-2S в ядрах и увеличению их уровня в цитоплазме. При этом содержание мРНК nDNase I и Casp-2L в цитоплазме и ядрах снижалось (рис. 12 Б, В). Инкубация ядер и цитоплазмы клеток НСС1954 приводила к появлению мРНК сплайс-варианта BCL-xS в ядрах и увеличению её уровня в цитоплазме (рис. 12 Г). В ядрах клеток укороченные сплайс-варианты отсутствовали и появлялись только в присутствии recEndoG, поэтому ядра этих клеток стали моделями для дальнейшего изучения влияния EndoG на АС.



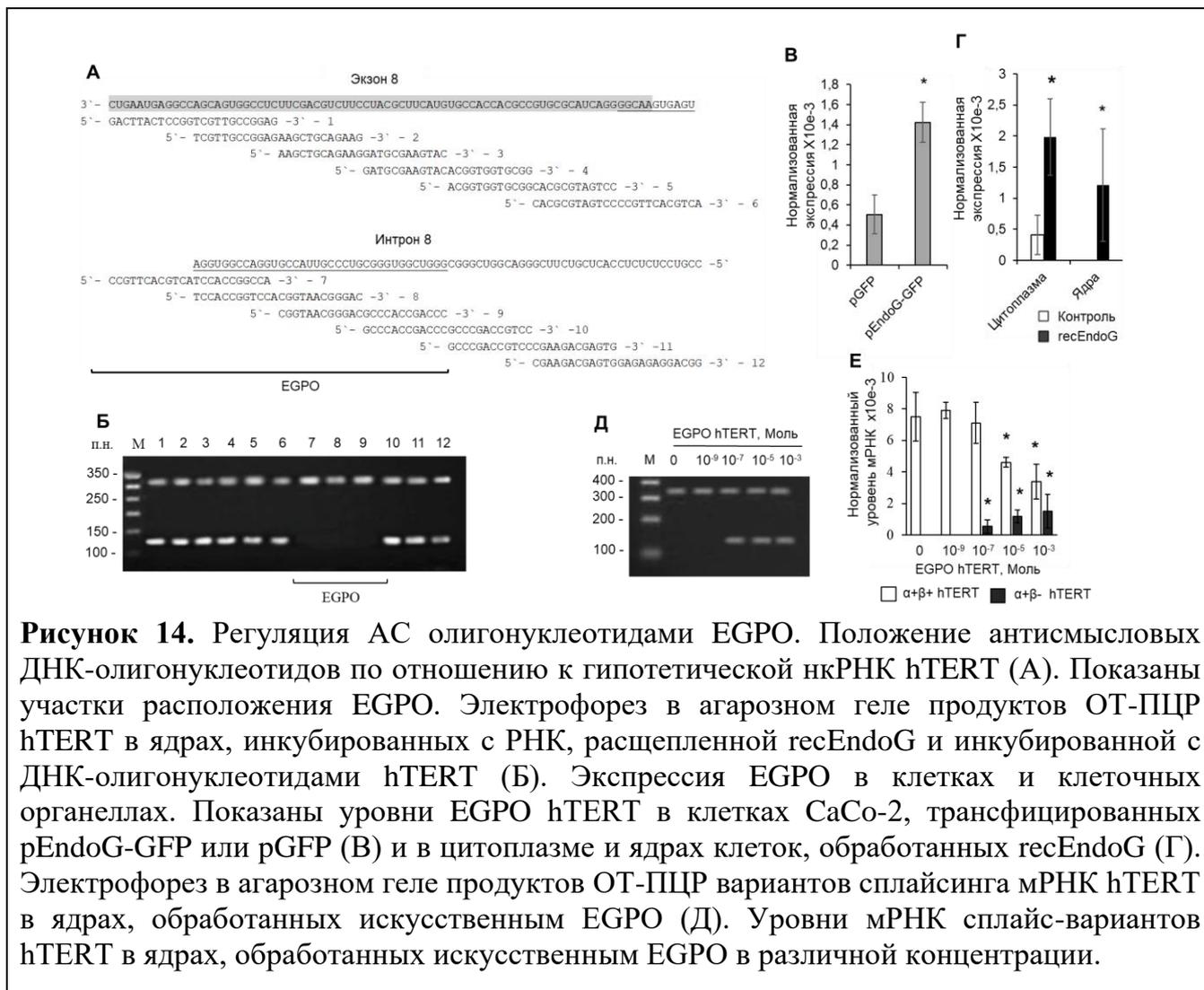
Индукция АС пре-мРНК в результате РНКазной активности EndoG.

Теоретически возможно, что под действием РНКазной активности EndoG могут образоваться малые некодирующие РНК, регулирующие АС, или олигонуклеотиды, переключающие сплайсинг (Bauman et al., 2009). Мы предположили, что один из таких олигонуклеотидов способен вызвать делецию экзонов мРНК hTERT, DNase I, Casp-2 и BCL-x. Для проверки этого предположения, из ядер клеток CaCo-2, CD4⁺ Т-лимфоцитов или клеток линии НСС1954 были выделены суммарная ДНК и РНК, которые расщепляли gscEndoG или РНКазами (РНКаза А или РНКаза 1). Продукты расщепления ДНК и РНК очищали от белков и инкубировали с ядрами соответствующих клеток. Количество альтернативных сплайс-вариантов мРНК анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Этот эксперимент показал, что именно РНК, а не ДНК, расщепленная gscEndoG, способна индуцировать образование мРНК сплайс-варианта $\alpha+\beta$ - hTERT в ядрах клеток CaCo-2 (рис. 13 А), сплайс-вариантов Δ 4DNase I и Casp-2S в ядрах CD4⁺ Т-клеток человека и BCL-xS в ядрах клеток НСС1954. Изменение экспрессии альтернативных вариантов мРНК при инкубации клеточных ядер с РНК, обработанной gscEndoG, было время-зависимым (рис. 13 Б). Ни РНКаза А, ни РНКаза 1 подобного эффекта не оказывали (рис. 13 В). Увеличение продолжительности обработки вызывало статистически значимое повышение экспрессии укороченных сплайс-вариантов и снижение таковой полноразмерных вариантов. Этот эксперимент позволил сделать предположение о том, что эффект индукции укороченных сплайс-вариантов специфичен для EndoG и зависит от способности фермента деградировать РНК с образованием активного продукта, индуцирующего АС. На рис. 13 показан репрезентативный пример индукции АС пре-мРНК hTERT. Результаты опытов по индукции АС пре-мРНК DNase I, Casp-2 и BCL-x аналогичны.



Идентификация и экспрессия РНК-олигонуклеотидов, образующихся под действием EndoG. Поиск в базе GenBank последовательности, подобной экзонам 7 и 8 hTERT, экзону 4 DNase I, экзону 9 Casp-2 и экзону 3 BCL-x не дал положительных результатов. Поэтому мы предположили, что олигонуклеотиды, которые образуются под действием EndoG и способны индуцировать АС пре-мРНК, происходят из нкРНК, синтезируемых с антисмысловых цепей ДНК указанных генов. Активный РНК-олигонуклеотид, продуцируемый EndoG был назван EGPO – EndoG-produced oligonucleotide. С целью проверки этой гипотезы и определения длины EGPO, ядерную РНК клеток CaCo-2, НСС1954 или CD4⁺ Т-лимфоцитов, расщепленную gscEndoG, инкубировали с каждым из 24-членных ДНК-олигонуклеотидов, комплементарных

участкам экзона 8 и интрона 8 потенциальной нкРНК hTERT, экзона 4 и интрона 4 нкРНК DNase I, экзона 9 и интрона 9 нкРНК Casp-2, или экзону 3 и интрону 2 нкРНК BCL-x и добавляли к ядрам соответствующих клеток (рис. 14 А).

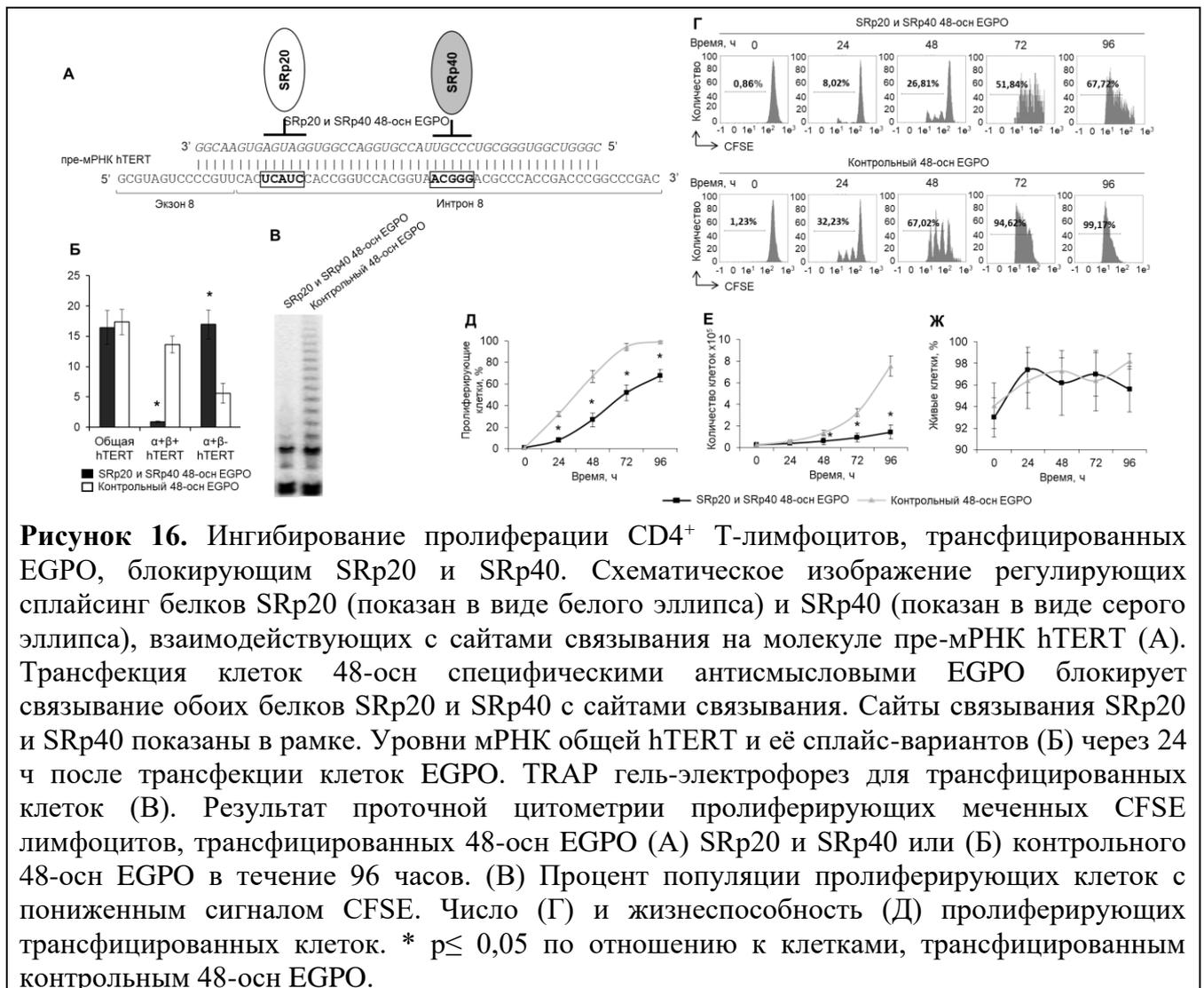


Предполагалось, что эти олигонуклеотиды должны формировать нековалентные комплексы с EGPO и блокировать его действие. С помощью ОТ-ПЦР было показано, что некоторые олигонуклеотиды блокировали АС, что подтвердило правильность нашей гипотезы и позволило определить размер EGPO на уровне 48 нуклеотидов для мРНК hTERT (рис. 14 Б), 72 нуклеотидов для мРНК DNase I, 60 нуклеотидов для мРНК Casp-2 и 36 нуклеотидов для мРНК BCL-x. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что сверхэкспрессия EndoG в клетках вызывает значимое увеличение количества EGPO для всех изучаемых пре-мРНК (рис. 14 В). В цитоплазме, обработанной recEndoG, экспрессия EGPO была также повышена (рис. 14 Г). В клеточных ядрах экспрессия EGPO не обнаружена, но появлялась после инкубации с recEndoG. Эти данные согласуются с отсутствием укороченных сплайс-вариантов в ядрах интактных клеток и их появлением при сверхэкспрессии EndoG и обработки ядер recEndoG. Для подтверждения того, что активация АС пре-мРНК hTERT обусловлена действием самого EGPO, а не связана с повышенным синтезом EndoG, ядра клеток CaCo-2, CD4⁺ Т-лимфоциты человека или клеток линии HCC1954 инкубировали с синтезированными EGPO к целевым генам или с контрольными неспецифическими олигонуклеотидами того же размера. Показано, что в концентрации 10⁻⁷ М и выше EGPO специфичные пре-

мРНК целевых генов способны дозозависимо активировать АС (рис. 14 Д, Е). В клетках CaCo-2 повышение уровня мРНК $\alpha+\beta$ - сплайс-варианта hTERT и снижение полноразмерного варианта $\alpha+\beta+$ наблюдалось при увеличении концентрации EGPO к пре-мРНК hTERT. В ядрах CD4⁺ Т-лимфоцитов при повышении концентрации EGPO к пре-мРНК DNase I и Casp-2 обнаружено увеличение уровней мРНК укороченных сплайс-вариантов и снижение таковых мРНК полноразмерных сплайс-вариантов. В ядрах клеток линии HCC1954 увеличение концентрации EGPO к пре-мРНК BCL-x сопровождалось повышением уровня мРНК варианта BCL-xS и снижением уровня варианта BCL-xL. Контрольные неспецифичные олигонуклеотиды оказались не способными индуцировать АС пре-мРНК целевых генов. Таким образом, EGPO, действует как эндогенный переключатель сплайсинга и вызывает АС пре-мРНК целевых генов в изолированных ядрах клеток. На рис. 14 показан репрезентативный пример определения нуклеотидной последовательности EGPO для hTERT и индукции АС пре-мРНК hTERT при помощи искусственного EGPO. Результаты опытов по идентификации EGPO для пре-мРНК DNase I, Casp-2 и BCL-x аналогичны.

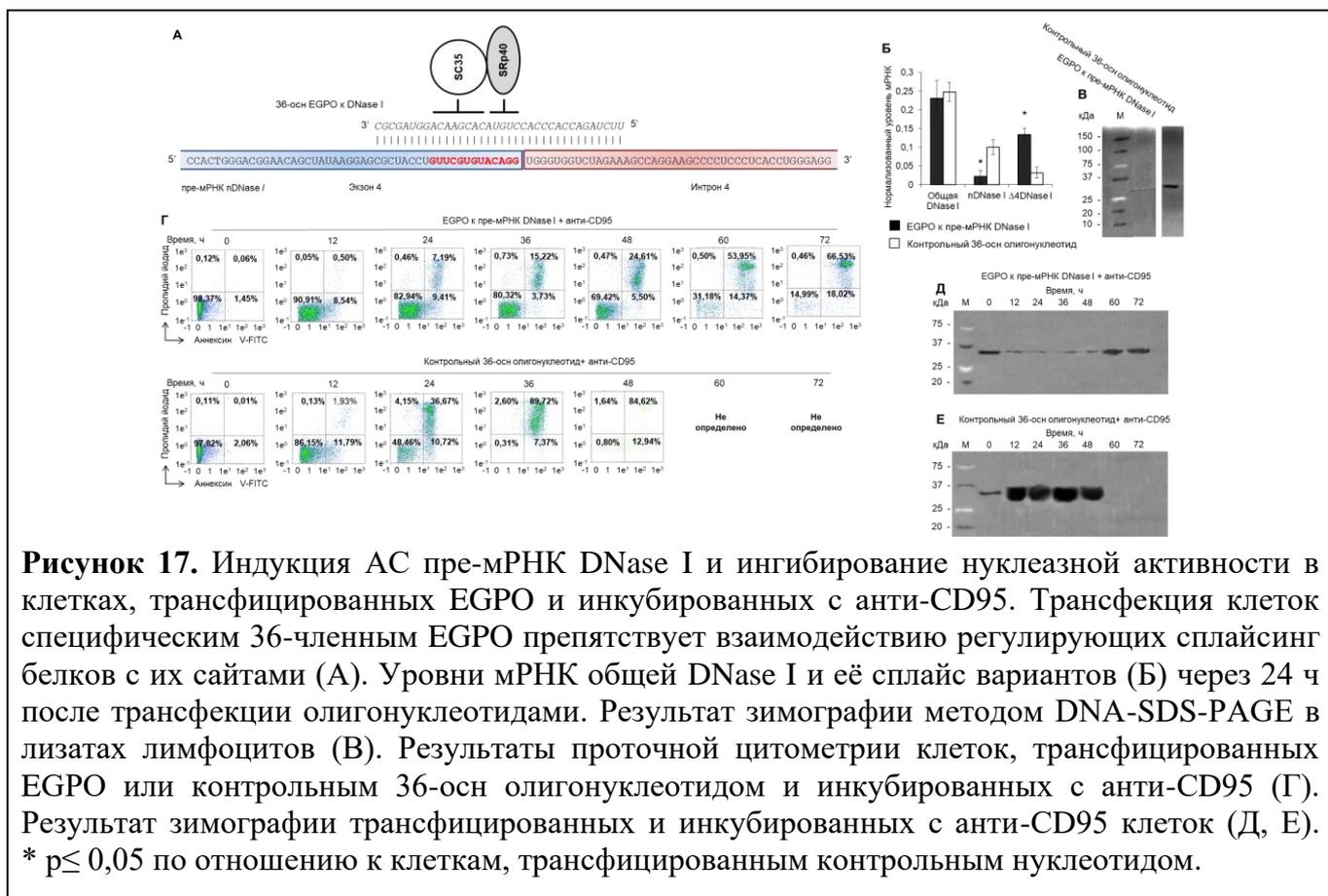
Идентификация и определение уровня синтеза нкРНК. С целью идентификации нкРНК, из которой EndoG вырезает EGPO к пре-мРНК целевых генов hTERT, DNase 1, Casp-2 и BCL-x, суммарную РНК клеток анализировали при помощи секвенирования следующего поколения. В результате была идентифицирована нкРНК (1754 нуклеотида) для гена hTERT в клетках CaCo-2. Нуклеотидную последовательность нкРНК 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. 15 А). При помощи ОТ-ПЦР в реальном времени определен уровень экспрессии нкРНК для hTERT в клетках, трансфицированных генами EndoG-GFP или GFP, а также в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных гесEndoG. Сверхэкспрессия EndoG в клетках не вызывала изменения экспрессии нкРНК (рис. 15 Б). В цитоплазме и ядрах, обработанных гесEndoG, изменения экспрессии нкРНК также не обнаружено (рис. 15 В). Длина нкРНК для пре-мРНК Casp-2 составила 1016 оснований. Данная молекула перекрывает окончание интрона 6, полностью экзоны 7, 8 и 9, интроны 7 и 8, а также начало интрона 9 цепи пре-мРНК Casp-2. Как и в случае с нкРНК для hTERT, сверхэкспрессия EndoG в лимфоцитах не вызывала изменения экспрессии нкРНК для Casp-2. В цитоплазме и ядрах, обработанной гесEndoG изменения экспрессии нкРНК также не обнаружено. Для пре-мРНК DNase I длина нкРНК составила 773 нуклеотида. Молекула перекрывала конец экзона 3, полностью интроны 3, 4 и экзон 4, а также начало интрона 5 цепи пре-мРНК DNase I. Не обнаружено изменений в уровнях данной нкРНК в клетках со сверхэкспрессией EndoG, а также в цитоплазме и ядрах, обработанных гесEndoG. Наиболее вероятно, что в цитоплазме и ядрах клеток нкРНК синтезируется на постоянном уровне, а количество EGPO регулируется активностью и/или количеством EndoG. На рис. 15 приведен репрезентативный пример определения нуклеотидной последовательности нкРНК для hTERT и уровня её экспрессии. Результаты опытов по идентификации нкРНК для DNase I, Casp-2 и BCL-x аналогичны.

Влияние индукции АС пре-мРНК hTERT переключающими сплайсинг олигонуклеотидами на пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов человека. Поскольку EGPO индуцирует АС пре-мРНК hTERT в бесклеточной системе (в изолированных ядрах), то он должен активировать АС в клетках. Для проверки этого предположения CD4⁺ Т-лимфоциты трансфицировали синтезированным EGPO или контрольными олигонуклеотидами, которые содержали химические модификации для защиты от



Влияние индукции АС пре-мРНК DNase I переключающим сплайсинг олигонуклеотидом на развитие апоптоза в CD4⁺ Т-лимфоцитах человека. С целью изучения способности EGPO к пре-мРНК DNase I индуцировать АС и влиять на прогрессию апоптоза, мы трансфицировали CD4⁺ Т-лимфоциты 36-осн олигонуклеотидом, специфичным к пре-мРНК DNase I и перекрывающим сайты взаимодействия с регуляторными белками SC35 и SRp40 (рис. 17 А) или контрольным неспецифичным 36-осн олигонуклеотидом. Через 24 ч наблюдали незначительное изменение уровней мРНК общей DNase I (рис. 17 Б). EGPO к DNase I оказался способным индуцировать АС. Наблюдали понижение уровня мРНК полноразмерной pDNase I и увеличение уровня сплайс-варианта Δ4DNase I. Индукция АС сопровождалась понижением нуклеазной активности в лизатах клеток (рис. 17 В). Не специфический контрольный 36-осн олигонуклеотид не вызывал изменения ни АС Δ4DNase I ни нуклеазной активности в клетках. Для того чтобы исследовать влияние EGPO к пре-мРНК DNase I на развитие апоптоза, трансфицированные клетки инкубировали с индуцирующим апоптоз антителами к CD95/FAS. Количество живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мёртвых клеток измеряли каждые 12 ч. Массовая гибель клеток наблюдалась через 24-36 ч после индукции апоптоза в группе клеток, трансфицированных контрольным 36-осн олигонуклеотидом (рис. 17 Г). Значительное увеличение количества клеток в состоянии апоптоза 10,63 – 13,29 % наблюдали в

период 12 – 24 ч. Через 36 ч в живых осталось менее 1% клеток. Через 48 ч практически все клетки были мёртвыми. Наблюдали значительное увеличение выживаемости клеток, трансфицированных EGPO к DNase. Большинство клеток оставались живыми в течение 12 – 48 ч после индукции апоптоза. Количество клеток в состоянии апоптоза было значительно ниже (3,70 – 9,43%) по сравнению с таковыми клетками, трансфицированными контрольным олигонуклеотидом. Апоптоз в большинстве клеток развился не ранее через 60 - 72 ч. Методом зимографии исследовали уровень нуклеазной активности в лизатах клеток. Нуклеазная активность была заметно понижена в клетках, трансфицированных EGPO как инкубированных с анти-CD95 (рис. 17 Д).



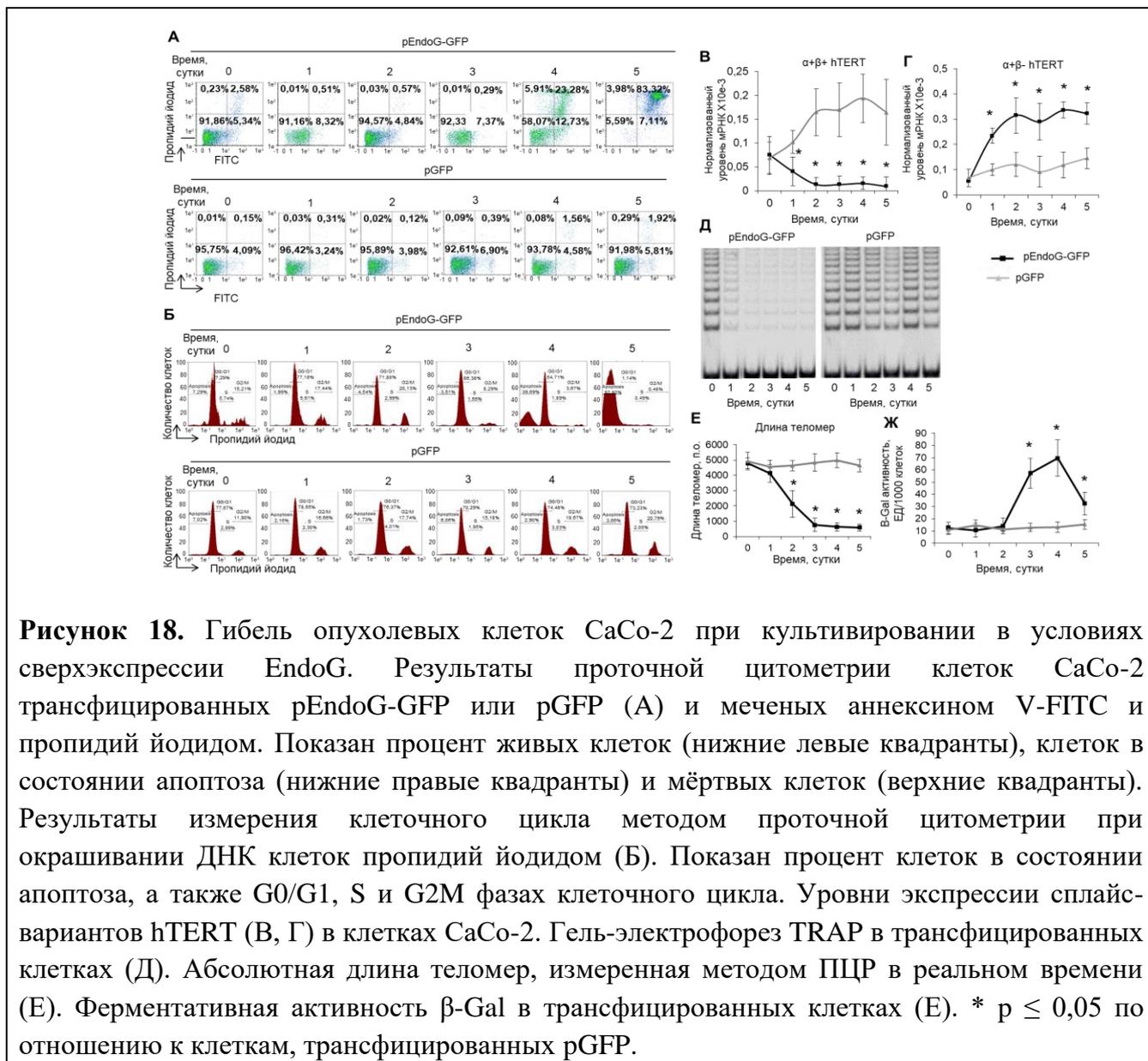
Однако в трансфицированных EGPO и инкубированных с анти-CD95 наблюдали увеличение нуклеазной активности в период 60-72 ч, что связано с массовой гибелью клеток в этот интервал времени. Как и ожидалось, наблюдали значительное увеличение нуклеазной активности в клетках, инкубированных с анти-CD95 и трансфицированных контрольным 36-осн олигонуклеотидом, что связано с развитием апоптотических процессов (рис. 17 Е). Таким образом, показано, что искусственно синтезированный EGPO, специфичный пре-мРНК DNase I способен индуцировать АС, что приводит к синтезу неактивной формы ферменты и тормозит развитие апоптоза в лимфоцитах человека.

Сверхэкспрессия EndoG вызывает АС пре-мРНК hTERT, ингибирование теломеразы, укорочение теломер, арест клеточного цикла и гибель опухолевых клеток линии CaCo-2. Поскольку EndoG вызывает уменьшение количества полноразмерной формы hTERT, что приводит к снижению активности теломеразы в опухолевых клетках, представляла интерес дальнейшая судьба таких клеток с

неактивным ферментом. Для этого клетки CaCo-2, трансфицированные рEndoG-GFP или рGFP, культивировали в ростовой среде и ежедневно измеряли количество живых и мёртвых клеток, а также клеток в состоянии апоптоза. В группе клеток, трансфицированных рEndoG-GFP, обнаружена массивная гибель на четвертые и пятые сутки после трансфекции (рис. 18 А). Так, на четвертые сутки наблюдалось резкое увеличение числа клеток в состоянии апоптоза до $12,4 \pm 2,0\%$. На пятые сутки практически все клетки были мертвы. Мы измерили клеточный цикл в пролиферирующих клетках, методом проточной цитометрии при мечении ДНК клеток пропидий йодидом. При трансфекции рEndoG-GFP, обнаружено значительное уменьшение количества клеток в фазах S и G₂/M и достоверное увеличение в фазе G₀/G₁ на третий день после трансфекции (рис. 18 Б). Однако при этом клетки оставались живыми. На четвёртый день наблюдалось дальнейшее снижение количества клеток в фазе G₂/M, а также увеличение количества апоптотических клеток. На пятые сутки практически все клетки находились в состоянии апоптоза. Увеличение активности β-Gal является маркёром перехода клеток в состояние репликативного старения. Мы исследовали активность данного фермента в процессе культивирования. Ферментативная активность β-Gal также повышалась на третьи сутки после трансфекции и оставалась высокой на четвертые (рис. 18 Ж). На пятые сутки наблюдали снижение ферментативной активности β-Gal, что объясняется массивной гибелью клеток. Активация β-Gal на третьи сутки после трансфекции геном EndoG согласуется с ингибированием S и G₂/M фаз клеточного цикла, что указывает на переход клеток в состояние репликативного старения. Гибель таких клеток на четвертые и пятые сутки культивирования являлась дальнейшим следствием этого состояния. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что сверхэкспрессия EndoG сопровождалась снижением уровня мРНК полноразмерного α+β+ сплайс-варианта hTERT (рис. 18 В) и увеличением мРНК α+β- варианта (рис. 18 Г). Далее было изучено изменение активности теломеразы и длины теломер в трансфицированных клетках CaCo-2 при их культивировании. Методом TRAP установлено, что в клетках, трансфицированных рEndoG-GFP, теломеразная активность оставалась стабильно низкой в течение всего периода культивирования (рис. 18 Д). В контрольных клетках активность фермента не изменялась. Снижение активности теломеразы в активно делящихся клетках должно вызывать укорочение длины теломер. Методом ПЦР в реальном времени установлено, что действительно в первые два дня после трансфекции рEndoG-GFP клетках происходило уменьшение длины теломер более чем в 6 раз (рис. 18 Е). При дальнейшем культивировании длина теломер снижалась незначительно и оставалась на низком уровне. Клетки, трансфицированные контрольной плазмидой, оставались живыми в течение всего периода культивирования, в них не наблюдали ни ингибирования клеточного цикла, ни сокращения длины теломер, ни активации АС пре-мРНК hTERT, ни ингибирования теломеразы, ни активации β-Gal.

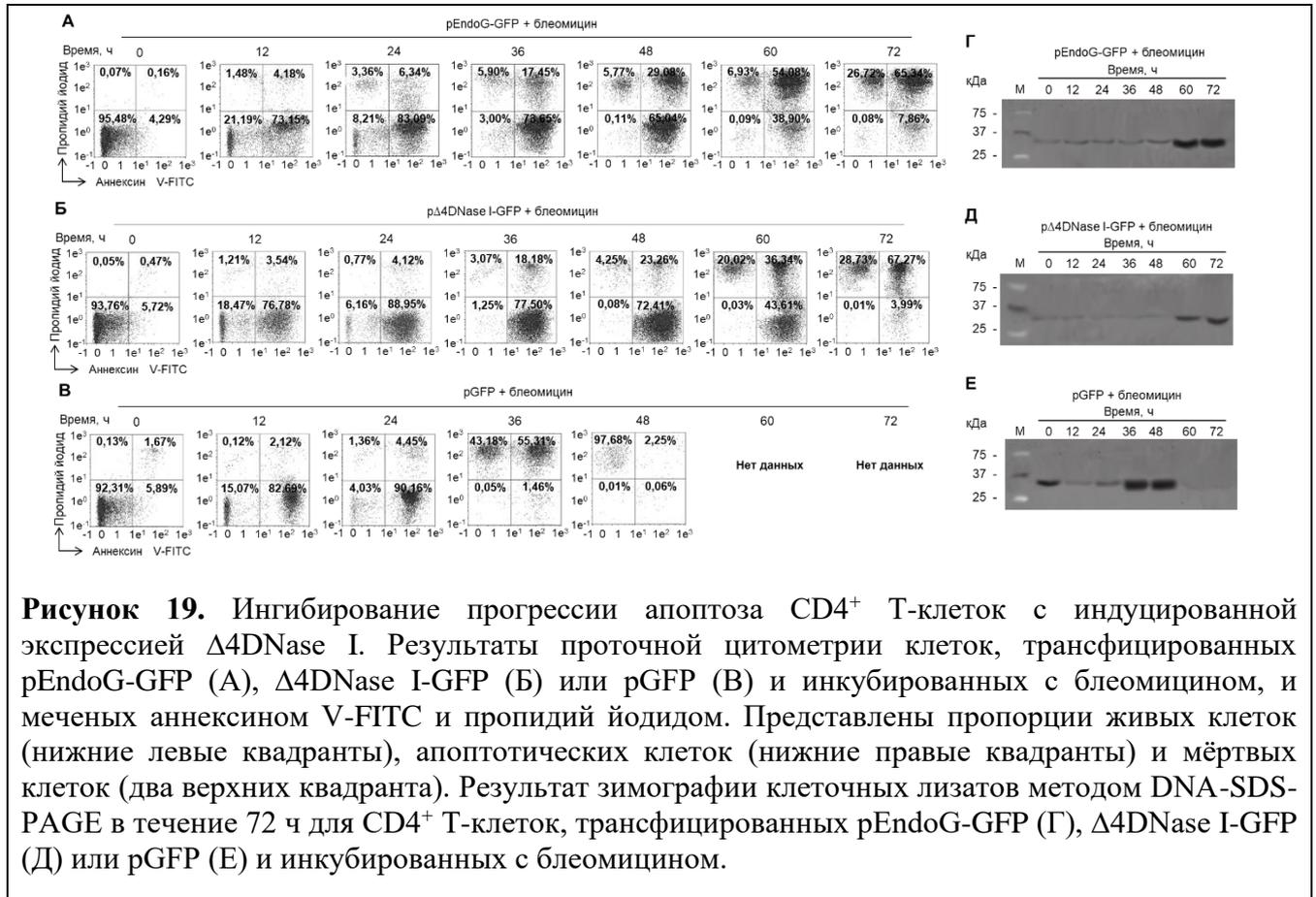
Замедление развития апоптоза в результате инактивации ДНКазы 1. Индукция АС пре-мРНК DNase I в результате действия EndoG вызывает ингибирование нуклеазной активности ДНКазы 1. Представляло интерес изучить влияние инактивации ДНКазы 1 на динамику развития апоптоза в нормальных CD4⁺ Т-лимфоцитах человека. Для исследования динамики развития апоптоза CD4⁺ Т-лимфоцитах человека клетки трансфицировали одной из плазмид рEndoG-GFP, рΔ4DNase I-GFP или рGFP и культивировали их с блеомицином в концентрации 0,05 ед/мл⁻¹. Количество живых клеток, апоптотических и мёртвых клеток определяли при помощи проточной

цитометрии при их мечении аннексином V-FITC и пропидий йодидом через каждые 12 ч. Массивную гибель клеток наблюдали через 60–72 ч после инкубации с блеомицином в группах клеток, трансфицированных pEndoG-GFP и pΔ4DNase I-GFP (рис. 19 А, Б).



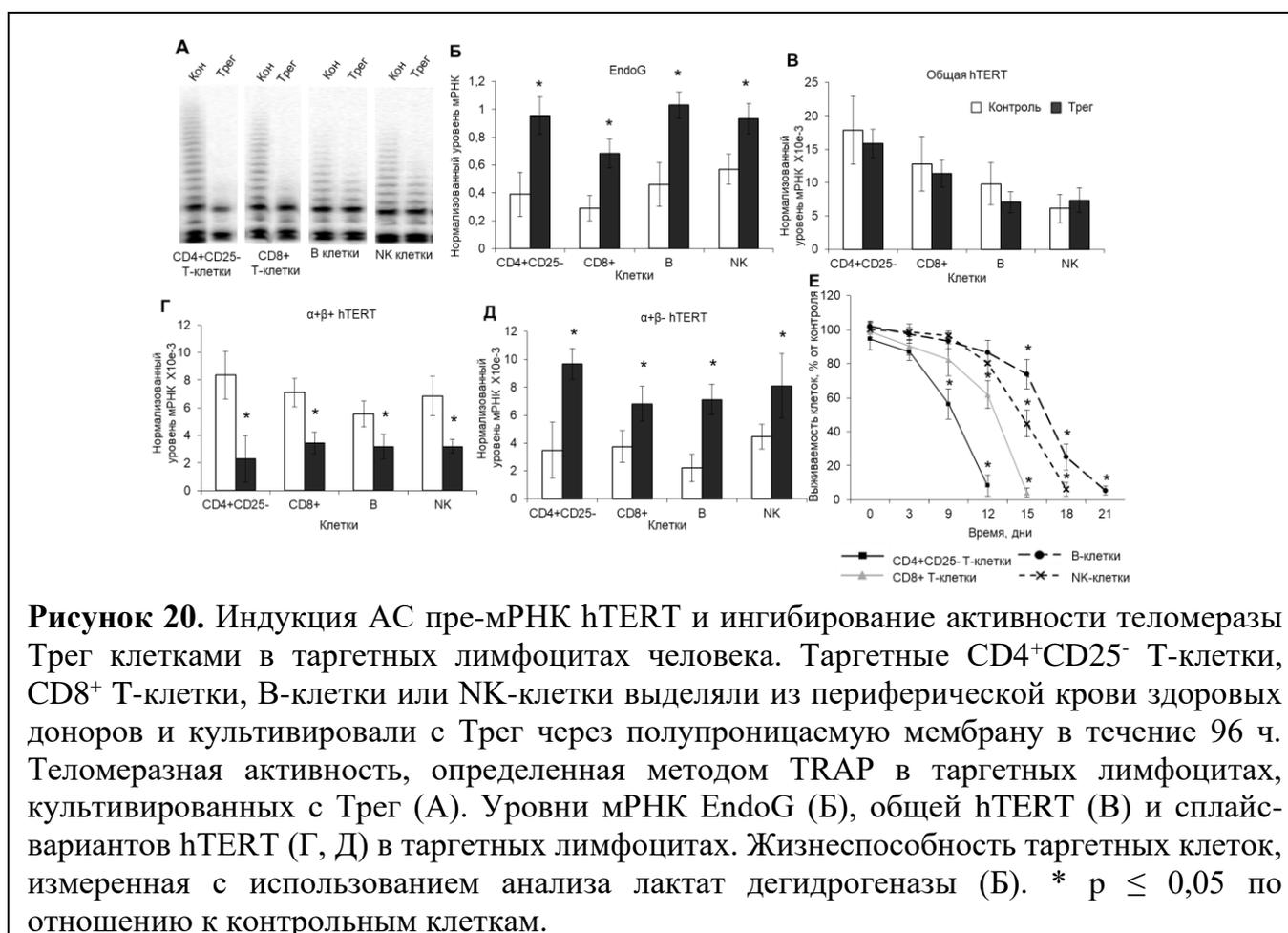
В то же время практически все клетки, трансфицированные контрольной плазмидой pGFP, погибали в течение 48 ч инкубации с блеомицином (рис. 19 В). Через 60-72 ч инкубации количество клеток не определяли, в виду полной их гибели. Замедление развития апоптоза в группах клеток, трансфицированных pEndoG-GFP или pΔ4DNase I-GFP сопровождалось увеличением продолжительности фазы раннего апоптоза, которую детектировали по количеству только аннексин-V-положительных клеток. Было исследовано влияние AC пре-мРНК DNase I на нуклеазную активность клеток при развитии апоптоза. В клетках, трансфицированных плазмидой pEndoG-GFP или pΔ4DNase I-GFP нуклеазная активность была существенно ниже, чем в контрольных pGFP-трансфицированных клетках (рис. 19 Г-Е). Обработка блеомицином вызывала увеличение нуклеазной активности в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP или pΔ4DNase I-GFP через 60-72 ч инкубации, что соотносится с массивной гибелью клеток в этот период. Обнаружено ингибирование нуклеазной активности в течение 12–24 ч

инкубации с блеомицином в клетках, трансфицированных рGFP. Это ингибирование объясняется способностью блеомицина индуцировать EndoG и АС пре-мРНК DNase I через 12 ч инкубации. Увеличение нуклеазной активности в период 36–60 ч инкубации с блеомицином соотносится с массовой гибелью клеток в этот период. В течение 60–72 ч инкубации нуклеазная активность в контрольных клетках не детектировалась в виду полной гибели клеток.



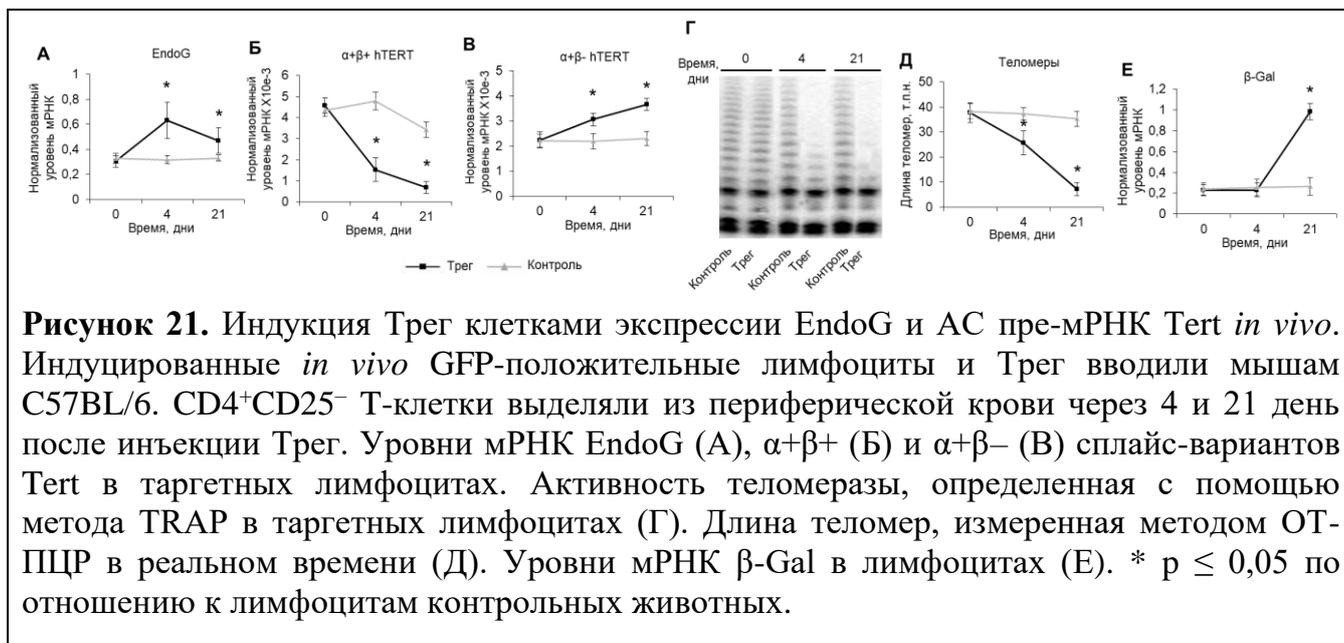
Изучение роли индуцированного EndoG АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT в супрессорном действии регуляторных Т клеток. Трег клетки способны индуцировать старение эффекторных лимфоцитов *in vitro* и *in vivo* (Ye et al., 2012), что является косвенным доказательством вовлеченности теломеразы в данный процесс. Учитывая сказанное, мы изучили способность Трег индуцировать EndoG и АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT в эффекторных лимфоцитах человека и мыши. Таргетные эффекторные CD4⁺CD25⁻ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, В-клетки или НК-клетки культивировали с Трег в течение 96 часов через полупроницаемую мембрану. Методом TRAP было показано, что Трег способны ингибировать активность теломеразы во всех таргетных лимфоцитах (рис. 20 А). Наиболее значительное ингибирование фермента обнаружено в CD4⁺CD25⁻ Т-клетках (9,1-10,7% от контроля), тогда как в В-клетках выявлен наименьший уровень ингибирования (59,3-63,1%). Для изучения возможного механизма ингибирования теломеразы была исследована экспрессия сплайс-вариантов мРНК hTERT и EndoG в таргетных клетках методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Ингибирование теломеразы сопровождалось повышением уровня мРНК EndoG (рис. 20 Б). Увеличение экспрессии EndoG не вызывало изменения количества мРНК общей hTERT во всех изучаемых

клетках (рис. 20 В), однако, сопровождалось изменением уровней мРНК сплайс-вариантов hTERT. Культивирование с Трег приводило к снижению количества мРНК полноразмерного варианта $\alpha+\beta+$ hTERT (рис. 20 Г) и увеличению уровня мРНК укороченного сплайс-варианта $\alpha+\beta-$ hTERT (рис. 20 Д) во всех типах клеток-мишеней. Наиболее значительные изменения в уровнях мРНК сплайс-вариантов hTERT наблюдали в $CD4^+CD25^-$ Т-лимфоцитах, поэтому дальнейшие исследования проводили именно на этих клетках. Нами было изучено влияние длительного совместного культивирования целевых лимфоцитов с Трег клетками. Установлено, что в этом случае происходит значительное снижение жизнеспособности целевых лимфоцитов (рис. 20 Е). $CD4^+CD25^-$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты полностью погибали на 12-ый и 15-ый день культивирования, тогда как В- и NK-клетки были более устойчивыми и погибали на 21-ый и 18-й день эксперимента, соответственно. Длительное совместное культивирование с Трег привело к значительному снижению жизнеспособности целевых клеток (рис. Рез 5А). $CD4^+CD25^-$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты полностью погибали на 12-ый и 15-ый день культивирования, тогда как В- и NK-клетки были более устойчивыми и погибли на 21-ый и 18-й день соответственно.



Чтобы оценить способность Трег клеток индуцировать EndoG-ассоциированный АС пре-мРНК TERT и ингибирование теломеразы в целевых лимфоцитах *in vivo*, из селезенок GFP-трансгенных мышей выделяли $CD4^+CD25^-$ Т-клетки, индуцировали их *in vivo* и вводили внутривенно мышам линии C57BL/6. Через 24 ч мыши получали Трег. Спустя 4 и 21 день после инъекции Трег, измеряли содержание Трег в периферической крови. Методом проточной цитометрии показано увеличение доли Трег до $17,53 \pm 3,25\%$

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-положительных клеток в группе мышей, получавших Трег по сравнению с $7,47 \pm 2,46\%$ в контрольной группе, однако через 21 день после введения Трег, их доля снизилась почти до исходного уровня: $10,14 \pm 2,29\%$. Наблюдалось постепенное уменьшение количества GFP-положительных лимфоцитов в обеих группах мышей. Однако у мышей, получавших Трег, количество GFP-положительных лимфоцитов были значительно ниже, чем в контрольной группе, что указывало на увеличение Трег-индуцированной гибели таргетных лимфоцитов. GFP-положительные CD4⁺CD25⁻ Т-клетки выделяли из периферической крови мышей методом сортировки при активированной флуоресценции (Fluorescence Activated Cell Sorting). Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени показали увеличение уровня мРНК EndoG во всех типах лимфоцитов у мышей, получавших Трег (рис. 21 А). Индукция EndoG сопровождалась индуцированным АС пре-мРНК TERT: наблюдалось снижение уровня мРНК полноразмерного варианта $\alpha+\beta+$ (рис. 21 Б) и повышение количества укороченного сплайс-варианта $\alpha+\beta-$ (Рис. 21 В). Методом TRAP-анализа показано ингибирование теломеразы в таргетных лимфоцитах мышей, которым вводили Трег (рис. 21 Г). В таргетных лимфоцитах мышей, получавших Трег, обнаружено уменьшение длины теломер (рис. 21 Д) и индукция экспрессии маркера репликативного старения β -Gal через 21 день после инъекции иТрег (рис. 21 Е).



На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что аутологичные Трег человека и мыши способны подавлять пролиферацию респондерных Т-, В- и НК-клеток по контакт-независимому механизму в результате индукции эндонуклеазой EndoG АС пре-мРНК hTERT (в лимфоцитах человека) и Tert (в лимфоцитах мыши), ингибирования теломеразы и укорочения теломер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Альтернативный сплайсинг пре-мРНК является «регулятором точной настройки» ферментативной активности и функции белков, однако механизм этой регуляции изучен недостаточно полно. В настоящей работе мы показали, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG способна индуцировать АС пре-мРНК ряда белков в различных клетках человека, мыши и крысы.

Изучен механизм индукции АС эндонуклеазой EndoG для пре-мРНК апоптотических белков: каталитической субъединицы теломеразы TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x. Ключевым фактором, инициирующим АС является транслокация EndoG из митохондрий в цитоплазму и ядра и взаимодействие EndoG с нкРНК целевых генов. EndoG вырезает из нкРНК активный олигонуклеотид EGPO (EndoG-produced oligonucleotide), комплементарный пре-мРНК целевых генов. По результатам наших экспериментов, размер таких EGPO составляет 36-72 нуклеотида. Взаимодействие EGPO с пре-мРНК блокирует доступ и связывание регулирующих сплайсинг белков с пре-мРНК, что и индуцирует АС и делецию экзонов в процессе дальнейшего созревания (процессинга) мРНК. В подтверждение этому, мы показали, что искусственно синтезированные EGPO способны самостоятельно индуцировать АС пре-мРНК целевых генов, ингибировать активность белков и модулировать различные клеточные процессы.

Очевидно, что действие EGPO аналогично действию искусственных переключающих сплайсинг олигонуклеотидов (Havens and Hastings, 2016). Анализ литературы не выявил какого-либо экспериментального подтверждения природного существования переключающих сплайсинг олигонуклеотидов. Поэтому настоящую работу можно считать первым доказательством данного факта.

Очевидно, что описанный механизм требует более глубокого изучения. В частности, не понятно, каким образом синтезируются нкРНК, почему EndoG вырезает EGPO определенного размера, хотя в нкРНК присутствуют и другие поли-G-поли-C-последовательности, почему EGPO комплементарен местам соединения экзонов и интронов, какие ещё 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.

Индукция АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы TERT приводила к делеции экзонов 7 и 8 и синтезу укороченного варианта данного белка. Он

не был активен и проявлял доминантно-негативные свойства. В пролиферирующих клетках с повышенным синтезом данного варианта наблюдалось ингибирование активности теломеразы, укорочение теломер до критических значений, арест клеточного цикла в G0/G1 фазах, переход клеток в состояние репликативного старения и развитие апоптоза.

Индукция AC пре-мРНК DNase I приводила к делеции экзона 4 и синтезу варианта белка, не обладающего нуклеазной активностью. В клетках с повышенным синтезом данного варианта наблюдали замедление темпов развития апоптоза. Такие клетки были более устойчивы к действию повреждающего ДНК агента блеомицина.

Индукция AC пре-мРНК Casp-2, напротив, приводила к вставке экзона 9 в зрелую мРНК. Вставка этого экзона вызывала сдвиг рамки считывания, образование стоп-кодона и синтез укороченного неактивного варианта белка.

Индукция AC пре-мРНК BCL-x также приводила к вставке экзона 3 в зрелую мРНК и синтезу белка с антиапоптотической активностью.

Следует отметить, что большая часть работы по изучению влияния EndoG на AC пре-мРНК выполнена в условиях *in vitro* в бесклеточных системах или на клеточных культурах. Однако, вовлеченность описанного механизма в регуляцию клеточных процессов *in vivo*, доказана высоким уровнем корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов мРНК исследуемых белков в свежeweделенных лимфоцитах человека, мыши и крысы, а также способностью цисплатина индуцировать EndoG и AC при его внутривенном введении мышам и крысам. Кроме того, было показано, что аутологичные регуляторные Т клетки (Treg) мыши способны индуцировать EndoG и AC пре-мРНК Tert в эффекторных таргетных CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитах, а также В- и NK-клетках в условиях *in vivo*. В эффекторных лимфоцитах, подвергшихся действию Трег клеток, наблюдалось ингибирование активности теломеразы, появление укороченных теломер и фенотипа, характерного для стареющих клеток. Данные нашего исследования указывают на вовлеченность процессов регуляции AC пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы и активности теломеразы в модуляцию иммунного ответа

Таким образом, результаты настоящей работы указывают на способность EndoG регулировать ферментативную и функциональную активность различных белков и, как следствие, определять «судьбы» клеток различных организмов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что эндонуклеаза EndoG участвует в регуляции АС пре-мРНК.
2. Транслокация EndoG из митохондрий в ядро при развитии апоптоза, является основным фактором, индуцирующим EndoG-зависимый АС пре-мРНК.
3. EndoG вырезает из нкРНК активный олигонуклеотид (EGPO), комплементарный пре-мРНК TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x и индуцирует АС. Следовательно, переключающие сплайсинг олигонуклеотиды существуют в природе. Искусственные EGPO способны модулировать АС и изменять функциональную активность белков.
4. Повреждающие ДНК агенты способны индуцировать экспрессию EndoG и, следовательно, АС пре-мРНК TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x.
5. Индуцированный EndoG АС пре-мРНК TERT в пролиферирующих клетках вызывает ингибирование теломеразы, укорочение теломер, переход клеток в состояние репликативного старения и апоптоз.
6. Индуцированный EndoG АС пре-мРНК DNase I ингибирует нуклеазную активность DNКазы 1 и замедляет развитие апоптоза.
7. Индуцированный EndoG АС пре-мРНК hTERT является одним из механизмов подавления пролиферации эффекторных лимфоцитов регуляторными Т клетками.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Жданов Д.Д.**, Орлова Е.В. Ингибиторы функций теломер и теломеразы // Молекулярная медицина – 2011. – № 2. – С. 3 – 17.
2. **Жданов Д.Д.**, Соколов Н.Н. Механизм альтернативного удлинения теломер в опухолевых клетках // Молекулярная медицина – 2011. – № 5. – С. 3 – 16.
- 3а. Коваленко Н.А., **Жданов Д.Д.**, Бибикина М.В., Готовцева В.Ю. Влияние соединений ITEL1296 и aITEL1296 на теломеразную активность и рост опухолевых клеток // Биомедицинская химия – 2011. – № 57. – С. 501 – 510.
- 3б. Kovalenko N.A., **Zhdanov D.D.**, Bibikova M.V., Gotovtseva V.Y. The Influence of Compound aITEL1296 on Telomerase Activity and Growth of Cancer Cells // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry. – 2012. – № 6 (1) – P. 48 – 54.
4. **Жданов Д.Д.**, Коваленко Н.А., Бибикина М.В., Готовцева В.Ю., Орлова Е.В. Механизм ингибирования теломеразной активности новым природным соединением aITEL1296 // Молекулярная медицина – 2012. – № 1. – С. 31 – 36.
- 5а. Коваленко Н.А., **Жданов Д.Д.**, Коваленко Т.Ф. Возможности и эффекты активации теломеразы // Молекулярная биология. – 2013. – V. 47 (4). – С. 544 – 557.

56. Kovalenko N.A., **Zhdanov D.D.**, Kovalenko T.F. Possibilities and Effects of Telomerase Activation // *Molecular Biology*. – 2013. – V. 47 (4). – P. 476 – 487. (IF=0,799).

6. **Zhdanov D.D.**, Fahmi T., Wang X., Apostolov E.O., Sokolov N.N., Javadov S., Basnakian A.G. Regulation of Apoptotic Endonucleases by EndoG // *DNA Cell Biol.* – 2015 V. 34 (5). – P. 316 – 326. (IF=2,236)

7а. Елисеева Д.Д., Лифшиц Г.В., Лохонина А.В., **Жданов Д.Д.**, Завалишин И.А., Быковская С.Н. Лечение выращенными *ex vivo* аутологичными регуляторными Т-клетками CD4+CD25+Foxp3+CD127low восстанавливает баланс иммунной системы пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом // *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова*. – 2016. – № 2 (2). – P. 54 – 62.

7б. Eliseeva D.D., Lifshits G.V., Lokhonina A.V., **Zhdanov D.D.**, Zavalishin I.A., Bykovskaya S.N. Treatment with *Ex Vivo* Expanded Autologous Regulatory CD4+CD25+Foxp3+CD127low T Cells Restores the Balance of the Immune System in Patients with Remitting Multiple Sclerosis // *Neurosci. Behav. Physi.* – 2017. – № 47 (5). – P. 553 – 560.

8а. **Жданов Д.Д.**, Васина Д.А., Орлова В.С., Готовцева В.Ю., Бибикина М.В., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Эндонуклеаза EndoG индуцирует альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT и гибель опухолевых клеток // *Биомедицинская химия*. – 2016. – №62 (3). – С. 239 – 250.

8б. **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. Apoptotic Endonuclease EndoG Induces Alternative Splicing of Telomerase Catalytic Subunit hTERT and Death of Tumor Cells // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2016. – № 10 (4). – P. 310 – 321.

9. Lifshitz G.V., **Zhdanov D.D.**, Lokhonina A.V., Eliseeva D.D., Lyssuck L.Y., Zavalishin I.A., Bykovskaya S.N. *Ex vivo* Expanded Regulatory T cells CD4+CD25+FoxP3+CD127Low Develop Strong Immunosuppressive Activity in Patients with Remitting-Relapsing Multiple Sclerosis // *Autoimmunity*. – 2016 – V. 49 (6). – P. 388 – 396. (IF=2,629).

10а. **Жданов Д.Д.**, Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Регуляция альтернативного сплайсинга каталитической субъединицы теломеразы hTERT апоптотической эндонуклеазой EndoG // *Биомедицинская химия*. – 2016. – № 62 (5). – С. 544 – 554.

10б. **Zhdanov D.D.**, Vasina D.A., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. Apoptotic Endonuclease EndoG Regulates Alternative Splicing of Human Telomerase Catalytic Subunit hTERT // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2017. – №11 (2). – P. 154 – 165.

11а. Васина Д.А., **Жданов Д.Д.**, Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Апоптотическая эндонуклеаза EndoG вызывает ингибирование активности теломеразы и злокачественную трансформацию CD4+ Т клеток человека // *Биохимия*. – 2017. – № 82 (1). – С. 76 – 91.

11б. Vasina D.A., **Zhdanov D.D.**, Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. Apoptotic Endonuclease EndoG Inhibits Telomerase Activity and Induces Malignant Transformation of Human CD4+ T Cells // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – № 82 (1). – P. 24 – 37. (IF=1,537).

12. **Жданов Д.Д.**, Лохонина А.В., Соколов Н.Н. Роль сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT в физиологических и

патологических клеточных процессах // Молекулярная медицина – 2017. – №15 (1). – С. 3 – 9.

13а. **Жданов Д.Д.**, Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Покровский В.С., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Индуцированная цисплатином экспрессия апоптотической эндонуклеазы EndoG вызывает ингибирование активности теломеразы и злокачественную трансформацию CD4+ Т лимфоцитов человека // Биомедицинская химия. – 2017. – № 63 (1). – Р. 13 – 26.

13б. **Zhdanov D.D.**, Vasina D.A., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. Cisplatin-Induced Apoptotic Endonuclease Endog Inhibits Telomerase Activity and Causes Malignant Transformation of Human CD4+ T Lymphocytes // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2017. – № 11 (3). – Р. 251 – 264.

14а. **Жданов Д.Д.**, Покровский В.С., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Внутриклеточная локализация апоптотической эндонуклеазы EndoG и сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы hTERT // Биохимия. – 2017. – № 82 (8). – С. 1163 – 1175.

14б. **Zhdanov D.D.**, Pokrovsky V.S., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. Intracellular Localization of Apoptotic Endonuclease EndoG and Splice-Variants of Telomerase Catalytic Subunit hTERT // Biochemistry (Moscow) – 2017. – №82 (8). – Р. 894 – 905. (IF=1,537).

15. **Zhdanov D.D.**, Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Eldarov M.A., Grishin D.V., Basharov M.M., Gladilina Y.A., Podobed O.V., Sokolov N.N. *Rhodospirillum rubrum* l-asparaginase targets tumor growth by a dual mechanism involving telomerase inhibition // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2017. – V. 492. – Р. 282 – 288. (IF=2,466).

16а. **Жданов Д.Д.**, Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Гришин Д.В., Гладиллина Ю.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Индукция апоптотической эндонуклеазы EndoG повреждающими ДНК агентами вызывает альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT и ингибирование активности теломеразы в CD4+ и CD8+ Т лимфоцитах человека // Биомедицинская химия. – 2017. – № 63 (4). – С. 296 – 305.

16б. **D.D. Zhdanov**, D.A. Vasina, V.S. Orlova, E.V. Orlova, D.V. Grishin, Y.A. Gladilina, M.V. Pokrovskaya, S.S. Aleksandrova, N.N. Sokolov. Induction of apoptotic endonuclease Endog with DNA-damaging agents initiates alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT and inhibition of telomerase activity hTERT in human CD4+ and CD8+ T lymphocytes // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2018. – № 12 (2). – Р. 119 – 129.

17. **Zhdanov D.D.**, Vasina D.A., Grachev V.A., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. Alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT generated by apoptotic endonuclease EndoG induces human CD4+ T cell death // Eur. J. Cell Biol. – 2017 – V. 96. – Р. 653 – 664. (IF=3,712).

18а. **Жданов Д.Д.**, Гладиллина Ю.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Гришин Д.В., Подобед О.В., Соколов Н.Н. Индукция альтернативного сплайсинга и ингибирование активности каталитической субъединицы теломеразы в Т, В и НК клетках человека апоптотической эндонуклеазой EndoG // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – № 164 (10). – С. 479 – 483.

18б. **D.D. Zhdanov**, Y.A. Gladilina, M.V. Pokrovskaya, S.S. Aleksandrova, D.V. Grishin, O V. Podobed, N.N. Sokolov Induction of alternative splicing and inhibition of activity of telomerase catalytic subunit by apoptotic endonuclease EndoG in human T, B and NK cells //

Bulletin of Experimental Biology and Medicine – 2018. – № 164 (4). – P. 478 – 482. (IF=0,456).

19. **Zhdanov D.D.**, Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Eldarov M.A., Grishin D.V., Basharov M.M., Gladilina Y.A., Podobed O.V., Sokolov N.N. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase in cancer Jurkat cell line and normal human CD4+ T lymphocytes // *Cancer Med.* – 2017. – V. 6 (11). – P. 2697 – 2712. (IF=3,362).

20. Васина Д.А., **Жданов Д.Д.**, Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Ингибирование активности теломеразы при сверхэкспрессии апоптотической эндонуклеазы EndoG в CD4+ Т клетках человека // *Молекулярная медицина.* – 2017. – №15 (6). – С. 51 – 57.

21а. **Жданов Д.Д.**, Гладилина Ю.А., Гришин Д.В., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Индукция альтернативного сплайсинга каталитической субъединицы теломеразы TERT, каспазы-2, ДНКазы I и BCL-x апоптотической эндонуклеазой EndoG в CD4+ Т-лимфоцитах человека, мыши и крысы // *Биоорганическая химия.* – 2018. – № 44 (1). – С. 87 – 101.

21б. **D.D. Zhdanov**, Y.A. Gladilina, D.V. Grishin, V.S. Pokrovsky, M.V. Pokrovskaya, S.S. Aleksandrova, N.N. Sokolov Apoptotic endonuclease EndoG induces alternative splicing of telomerase TERT catalytic subunit, caspase-2, DNase I, and BCL-x in human, murine, and rat CD4+ T lymphocytes // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2018. – № 44 (1). – P. 90–103.

22а. **Жданов Д.Д.**, Гладилина Ю.А., Орлова В.С., Гришин Д.В., Покровская М.В., Александрова С.С., Подобед О.В., Соколов Н.Н. Индукция альтернативного сплайсинга каталитической субъединицы теломеразы апоптотической эндонуклеазой EndoG в лимфоцитах мыши и крысы // *Цитология.* – 2018. – № 60 (2) – С. 104 – 115.

22б. **D.D. Zhdanov**, Y.A. Gladilina, V.S. Orlova, D.V. Grishin, O.V. Podobed, M.V. Pokrovskaya, S.S. Aleksandrova, N.N. Sokolov Induction of Telomerase Catalytic Subunit Alternative Splicing by Apoptotic Endonuclease G in Mouse and Rat Lymphocytes // *Cell and Tissue Biology.* – 2018. – № 12 (3). – P. 217 – 230.

23. **Zhdanov D.D.**, Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Sokolov N.N. Murine regulatory T cells induce death of effector T, B, and NK lymphocytes through a contact-independent mechanism involving telomerase suppression and telomere-associated senescence // *Cell. Immunol.* – 2018. – V. – 331, – P. 146 – 160. (IF=3,171).

24. **Zhdanov D.D.**, Gladilina Y.A., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Pokrovsky V.S., Sokolov N.N. Contact-independent suppressive activity of regulatory T cells is associated with telomerase inhibition, telomere shortening and target lymphocyte apoptosis // *Mol. Immunol.* – 2018. – V. 101. – P. 229 – 244. (IF=3,188).

25. **Zhdanov D.D.**, Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Plyasova A.A., Pokrovsky V.S., Sokolov N.N. Endonuclease G modulates the alternative splicing of deoxyribonuclease 1 mRNA in human CD4+ T lymphocytes and prevents the progression of apoptosis // *Biochimie.* – 2019 – V. 157. – P. 158 – 176. (IF=3,188).

26. **Zhdanov D.D.**, Plyasova A.A., Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Lobaeva T.A., Sokolov N.N. Inhibition of telomerase activity by splice-switching oligonucleotides targeting the

mRNA of the telomerase catalytic subunit affects proliferation of human CD4⁺ T lymphocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2019. – V. 509. – P. 790 – 796. (IF=2,559).

27а. **Жданов Д.Д.**, Габашвили А.Н., Гладилина Ю.А., Гришин Д.В., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Плясова А.А., Соколов Н.Н. Характеристика опухолей, развившихся у бестимусных мышей после введения им злокачественно трансформированных *ex vivo* CD4⁺ Т-лимфоцитов человека // *Цитология.* – 2019. – № 61 (2). – С. 150 – 162.

27б. **Zhdanov D.D.**, Gabasvili A.N., Gladilina Y.A., Grishin D.V., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Plyasova A.A., Sokolov N.N. Characteristics of tumors that develop in athymic mice after transplantation of human malignant CD4⁺ T-lymphocytes transformed *ex vivo* // *Cell and Tissue Biology.* – 2019. – № 13 (3). – P. 176 – 187.

Материалы трудов конференций

28. **Жданов Д.Д.** Теломеразная активность и её связь с экспрессией транскрипционных вариантов гена HSP90α и гена каталитической субъединицы теломеразы при опухолевых заболеваниях желудка и кишечника // Публикация в сборнике: Материалы докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» – 2009. – С. 9

29. **Zhdanov D.D.**, Kovalenko N.A., Abakumova O.Y., Bibikova M.V., Gotovtseva V.Y. Telomerase inhibitor suppresses growth of cancer cells *in vitro* // In: 5th International Conference Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnology for Medicine (GPBNM-2010), Russia, St.Petersburg-Kizhi-Mandrogry-Valaam-Kovenets- St.Petersburg May 31 – June 5. – 2010. – P. 70.

30. **Zhdanov D.**, Kovalenko N., Orlova E. Molecular chaperone HSP90α isoform 1 forms telomerase complex. Experimental Biology Meeting, April 2010, Anahaim, CA, USA // In: FASEB Journal. – 2010 – V. 24: 464.3.

31. **Жданов Д.Д.**, Коваленко Н.А., Абакумова О.Ю., Бибикова М.В., Готовцева В.Ю., Соколов Н. Н. Исследование взаимодействия ингибитора теломеразной активности с субъединицами теломеразы // Публикация в сборнике: I международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 17–19 ноября 2010 года, г. Москва, Россия. – с. 102.

32. **Жданов Д.Д.**, Коваленко Н.А., Бибикова М.В., Соколов Н.Н. Соединение aTEL1296 ингибирует активность теломеразы и подавляет рост опухолевых клеток // Публикация в сборнике: Современные проблемы биохимии и биотехнологии. Сборник трудов I Всероссийской Интернет-конференции. Казань, 17 – 22 ноября 2010 г.

33. **Zhdanov D.D.** Kovalenko N., Gotovtseva V., Bibikova M. Influence of compounds ITEL1296 and aTEL1296 on telomerase activity and the growth of cancer cells // In: 22nd International Congress of Anti-Cancer treatment, 1–4 February 2011, Paris, France. P. 352.

34. **Zhdanov D.D.**, Fahmi T., Wang X., Savenka A., Basnakian A.G. Downregulation of DNase I expression by EndoG in kidney tubular epithelial cells. Experimental Biology Meeting, April 2012, San-Diego, CA, USA // In: FASEB Journal. – 2012 – 26: lb 568.

35. Jang D., Wang X., Fite T., Fahmi T., **Zhdanov D.**, Basnakian A.G. Degradation of plasmid DNA by DNase I and EndoG in blood plasma and relations between the endonucleases. American Society of Gene & Cell Therapy 15th annual meeting & training course, May 15–19, 2012 Philadelphia, PA, USA // In: Molecular Therapy. – 2012. – V. 20 Supplement 1. – P. 796.

36. Basnakian A.G., **Zhdanov D.**, Fahmi T., Wang X., Savenka A. Positive and negative regulation of endonucleases by EndoG in kidney tubular epithelial cells. The Annual American Society of Nephrology Meeting, 30 October – 4 November, 2012 San Diego, CA, USA. In: JASN Abstract Supplement. – 2012. – 103A, TH-PO040.

37. **Zhdanov D.**, Wang X., Fahmi T., Shah S., Basnakian A.G. Alternatively-spliced DNase I acts as dominant-negative inhibiting cisplatin toxicity to kidney cells. Experimental Biology Meeting, April 2013, Boston, MA, USA. In: FASEB Journal. –2013.– 27: 889.4.

38. Apostolov E.A., Fahmi T., Fite T., Savenka A., Wang X., Karaduta O., Jang D., Stewart A., Topiwala K., **D. Zhdanov**, Basnakian A. Novel DNA fragmentation-based technology for the assessment of nanomaterial toxicity in vitro and in vivo. In: A Focus of Nanomedicine, February 27, 2013, Little Rock, AR, USA.

39. Slaybaugh K., **Zhdanov D.**, Savenka A., Basnakian A.G. Alternative Splicing of Bcl-X Pre-mRNA in Cytoplasm. In: Second Annual Central Arkansas Summer Undergraduate Research Symposium, July 24, 2013. Little Rock, AR, USA.

40. Basnakian A.G., **Zhdanov D.**, Fahmi T., Savenka A., Truncated DNase I acts as dominant-negative inhibiting kidney cell death induced by cisplatin. The Annual American Society of Nephrology Meeting, November 5 – 10, 2013 Atlanta, GA, USA. In: JASN Abstract Supplement. – 2013. – 385A. – FR-PO092.

41. Slaybaugh K., **Zhdanov D.**, Savenka A., Basnakian A.G. Alternative Splicing of Bcl-x Pre-mRNA in Cytoplasm. 2013 In: Annual Biomedical Research Conference for Minority Students, November 13 – 16, 2013 Nashville, TN, USA.

42. Lifshits G., **Zhdanov D.**, Eliseeva D., Lokhonina A., Karandashev E., Lyssuk E., Bykovskaia S. Expanded *ex vivo* regulatory T cells CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD125^{Low} prevent relapses in patients with remitting relapsing multiple sclerosis. In: World Immune Regulation Meeting – IX 18 – 21. – March 2015, Davos, Switzerland. – P. 41

43. **Жданов Д.Д.**, Соколов Н.Н., Фахи Т., Баснакян А.Г. Апоптотическая эндонуклеаза EndoG вызывает синтез неактивной формы теломеразы и апоптоз опухолевых клеток. Публикация в сборнике: Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике. 2 – 3 ноября 2015 г., Воронеж, Россия. – С. 65 – 68.

44. Lokhonina A.V., Nechaev D.N., **Zhdanov D.D.**, Eliseeva D.D, Bykovskaia S.N. Transformed *ex vivo* regulatory T cells in patients with multiple sclerosis have restored immunosuppressive activity. In: Cell technologies at the edge: research & practice. April 06-08 2016, St. Petersburg, Russia. P.S.2–31. P.95

45. Васина Д.А., **Жданов Д.Д.** Апоптотическая эндонуклеаза EndoG вызывает ингибирование теломеразы и злокачественную трансформацию CD4⁺ Т клеток человека. Публикация в сборнике: Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016». Секция «Биология» 11 -15 апреля 2016 г., Москва, Россия. – С. 79

46. Васина Д.А., **Жданов Д.Д.**, Соколов Н.Н., Орлова В.С. Индуцированное цисплатином ингибирование теломеразы приводит к злокачественной трансформации CD4⁺ Т лимфоцитов. Публикация в сборнике: Научная конференция молодых учёных по медицинской биологии. ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА. 19 -20 апреля 2016 г, Москва, Россия. – С. 37-38

47. Елисеева Д.Д., Быковская С.Н., Завалишин И.А., Захарова М.Н., Лохонина А.В., **Жданов Д.Д.** Оценка безопасности и клинико-иммунологической эффективности применения аутологичной клеточной вакцины регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{Low} (вакцина Трег) для иммунотерапии ремиттирующего рассеянного склероза. XXI всероссийская конференция «Нейроиммунология.

Рассеянный склероз». 19-22 мая 2016 г., Санкт-Петербург, Россия. Публикация в журнале: Нейроиммунология. – 2016. – Том XIII, №1-2 – С. 29-30.

48. **Жданов Д.Д.**, Васина Д.А., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Внутриклеточная локализация эндонуклеазы EndoG и каталитической субъединицы теломеразы в норме и при апоптозе. III Всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», 12 -14 сентября 2016 г., Санкт-Петербург, Россия. Публикация в журнале: Медицинский академический журнал. – 2016. – Том 16, № 3, – С. 123.

49. Васина Д.А., **Жданов Д.Д.**, Орлова В.С., Соколов Н.Н. Укорочение теломер и повреждение ДНК апоптотической эндонуклеазой EndoG приводят к злокачественной трансформации CD4+ Т клеток человека // III Всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», 12 -14 сентября 2016 г., Санкт-Петербург, Россия. Публикация в журнале: Медицинский академический журнал. – 2016. – Том 16, № 3. – С. 554.

50. Васина Д.А., **Жданов Д.Д.**, Орлова В.С., Соколов Н.Н. Злокачественная трансформация лимфоцитов человека при ингибировании теломеразы цисплатином V съезд биохимиков России, 4-9 октября 2016 г., Дагомыс, Россия // Публикация в журнале Acta Naturae. – 2016 спецвыпуск, том 2. – С. 13 – 14.

51. **Жданов Д.Д.**, Васина Д.А., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Покровский В.С., Н.Н. Соколов Индукция альтернативного сплайсинга каталитической субъединицы теломеразы hTERT апоптотической эндонуклеазой EndoG вызывает гибель клеток V съезд биохимиков России, 4-9 октября 2016 г., Дагомыс, Россия. // Публикация в журнале Acta Naturae. – 2016 спецвыпуск, том 2. – С. 61.

52. **Жданов Д.Д.**, Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. Гибель Т лимфоцитов человека в результате ингибирования теломеразы индуцированного эндонуклеазой EndoG // Публикация в сборнике: II Международная научная конференция «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» 1 – 2 ноября 2016 г., Воронеж, Россия. – С. 101 – 111.

53. Нечаев Д.Н., **Жданов Д.Д.**, Быковская С.Н. Пролиферация и дифференцировка *ex vivo* регуляторных Т клеток человека // Публикация в сборнике: II Российский конгресс с международным участием «Пролиферативный синдром в биологии и медицине», 30 ноября – 2 декабря 2016 г., Москва, Россия. – С. 18-23.

54. **Zhdanov D.D.**, Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. Intracellular colocalization of apoptotic endonuclease EndoG and telomerase catalytic subunit hTERT in normal and apoptotic cells // In: EMBO Conference “Protein translocation and cellular homeostasis”, 18-22 March, 2017, Dubrovnik, Croatia. – P. 117

55. Покровская М.В., **Жданов Д.Д.**, Эльдаров М.А., Александрова С.С., Веселовский А.В., Покровский В.С., Гришин Д.В., Гладилина Ю.А., Соколов Н.Н. Оптимизация антителомеразной активности L-Аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* методом сайт-направленного мутагенеза // Публикация в сборнике: Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», 5 - 9 июня 2017 г, Минск, Беларусь. – С. 76 – 77.

56. **Жданов Д.Д.**, Покровская М.В., Александрова С.С., Гладилина Ю.А., Соколов Н.Н. Белки и пептиды Регуляция альтернативного сплайсинга и активности каспазы-2 апоптотической эндонуклеазой EndoG VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» 18-22 сентября 2017 г, Москва, Россия // Публикация в журнале Acta Naturae. – 2017 спецвыпуск, том 2. – С. 81.

57. **D. Zhdanov**, Y. Gladilina, D. Grishin, M. Pokrovskaya, S. Aleksandrova, N. Sokolov Modulation of alternative splicing and activity of telomerase catalytic subunit TERT, caspase-2, DNase I and Bcl-x in human and murine lymphocytes // In: Clinical proteomics. Postgenome medicine, 30 October - 1 November 2017, Moscow, Russia. – P. 194.

58. Plyasova A.A., **Zhdanov D.D.**, Pokrovskaya M.V., Pokrovsky V.S., Alexandrova S.S., Sokolov N.N. Rhodospirillum Rubrum L-asparaginase affects tumor growth though telomerase inhibition // In: BioTechWorld, May 23-25, 2018, Moscow, Russia. – P. 80 – 81.

59. **Zhdanov D.D.**, Gladilina Y.A., Orlova V.S., Sokolov N.N. Modulation of mRNA alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT by endonuclease EndoG in human colorectal cancer cells 2nd International Caparica Conference in Splicing July 16 – 19, 2018, Lisbon, Portugal // In: Journal of Integrated OMICS. – 2018. – V. 8 (2): SPECIAL ISSUE № 1, – 1 – 21: 2.

60. **Zhdanov D.D.**, Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Plyasova A.A., Sokolov N.N. Prevention of apoptosis progression by Deoxyribonuclease I inactivation thought Endonuclease G-induced alternative splicing of its mRNA // In: The 26th Conference of the European Cell Death Organization October 10 – 12, 2018, St. Petersburg, Russia.

61. **Zhdanov D.**, Pokrovskaya M., Alexandrova S., Plyasova A., Grishin D., Basharov M., Sokolov N., Pokrovsky V. Inhibition of telomerase activity by *Rhodospirillum rubrum* type I L-asparaginase // In: 4th EACR Conference Cancer Genomics June 23 – 26, 2019, Cambridge, UK – P. 133

62. **Zhdanov D.**, Plyasova A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Sokolov N.N. Regulatory T cells induces telomerase-associated aging of effector lymphocytes 44th FEBS Congress July 6–11, 2019, Krakow, Poland // In: FEBS Open Bio 9 (Suppl. 1) (2019) P. 296, P–31–009.

63. **D.D. Zhdanov**, V.S. Pokrovsky, A.A. Plyasova, N.N. Sokolov Contact-independent induction of apoptosis in effector lymphocytes by regulatory T cells is associated with telomerase inhibition and telomere shortening // In: EMBO Workshop Cell death in immunity and inflammation October 6–10, 2019, Heraklion, Greece, P1-05.

Книги и главы книг

64. **Жданов Д.** Репликативное старение клеток человека: структурная организация и регуляция функций теломер и теломеразы. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co., - 101 с. ISBN: 978-3-8443-5316-7 2011

65. **Жданов Д.Д.** Репликативное старение клеток: молекулярные основы и методы терапевтического воздействия. (Глава 7. Стр. 165). Современные проблемы биохимии: учебное пособие / под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина. Витебск, Беларусь. Издательство УО «ВГУ им. П.М. Машерова». 2010 г. – 384 с. ISBN: 978-985-517-272-8

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АС – альтернативный сплайсинг
БСА – бычий сывороточный альбумин
ОТ – обратная транскрипция
нкРНК – некодирующая РНК
п.н. – пары нуклеотидов
Трег – регуляторные Т клетки
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
АРС – аллофикоцианином (*от англ. Allophycocyanin*)
β-Gal – бета-галактозидаза (*от англ. beta-Galactosidase*)
СОХ IV – Цитохром С-оксидаза IV (*от англ. cytochrome C oxidase IV*)
CFSE – карбоксифлуоресцеин сукцинимидильный эфир (*от англ. carboxyfluorescein succinimidyl ester*)
EGPO – олигонуклеотид, продуцируемый EndoG (*от англ. EndoG-produced oligonucleotide*)
EndoG – эндонуклеаза G (*от англ. Endonuclease G*)
FACS – Сортировка клеток с активированной флуоресценцией (*от англ. fluorescence-activated cell sorting*)
FSB – эмбриональная телячья сыворотка (*от англ. Fetal Serum Bovine*)
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*от англ. glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase*)
GFP – зеленый флуоресцентный белок (*от англ. Green Fluorescent Protein*)
LDH – лактат дегидрогеназа (*от англ. Lactate dehydrogenase*)
MFI – средняя интенсивность флуоресценции (*от англ. Mean Fluorescence Intensity*).
siRNA – малая интерферирующая РНК (*от англ. small interfering RNA*)
TERT – теломеразная обратная транскриптаза (*от англ. Telomerase Reverse Transcriptase*)
TRAP – протокол амплификации теломерных повторов (*от англ. Telomeric Repeats Amplification Protocol*)

БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь, выражаю благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук, профессору Соколову Николаю Николаевичу за неоценимый вклад в создание и написание данной работы. Также благодарю весь коллектив лаборатории медицинской биотехнологии, института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича за помощь в провидении экспериментов и новые идеи. Отдельно благодарю Алексея Георгиевича Баснакьяна (Alexei G. Basnakian, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA) за помощь в проведении экспериментов на первых этапах выполнения работы. Также выражаю благодарность д.б.н., проф. Орловой Валентине Сергеевне и д.б.н., проф. Грачеву Владимиру Александровичу (экологический факультет Российского университета дружбы народов) за финансовую помощь при подготовке статей к публикации. Благодарю д.м.н. Покровского Вадима Сергеевича (лаборатория комбинированной терапии опухолей, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ), за помощь в проведении экспериментов на лабораторных животных.