ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ
ИМЕНИ В. Н. ОРЕХОВИЧА» (ИБМХ)

На правах рукописи

ЖДАНОВ ДМИТРИЙ ДМИТРИЕВИЧ

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

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Соколов Николай Николаевич

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 10

1. ВВЕДЕНИЕ 12

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 20

2.1. Понятие о сплайсинге и альтернативном сплайсинге пре-мРНК 20

2.2. Виды альтернативного сплайсинга 21

2.3. Механизм альтернативного сплайсинга и его регуляция 24

2.3.1. Функционирование сплайсосомы 24

2.3.2. Роль SR-белков в регуляции альтернативного сплайсинга 27

2.3.3. Канонические и неканонические сайты сплайсинга 31

2.3.4. Роль вторичной структуры пре-мРНК в эффективности АС32

2.4. Роль альтернативного сплайсинга в регуляции нормальных клеточных процессов 36

2.5. Болезни, патогенез которых обусловлен нарушением процессов альтернативного сплайсинга 41

2.5.1. Роль альтернативного сплайсинга в развитии злокачественных процессов 48

2.6. Методы модуляции альтернативного сплайсинга 51

2.6.1. Малые молекулы как модуляторы АС 51

2.6.2. Переключающие сплайсинг олигонуклеотиды 55

2.7. Роль альтернативного сплайсинга в регуляции иммунного ответа 59

2.7.1. Роль альтернативного сплайсинга при аутоиммунных процессах 61

2.8. Теломераза и роль сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT в физиологических и патологических клеточных процессах 63

2.8.1. Эндогенная регуляция активности теломеразы 65

2.8.2. Варианты альтернативного сплайсинга hTERT 71

2.8.3. Связь АС пре-мРНК hTERT с теломеразной активностью и длиной теломер 74
2.8.4. Функции сплайс вариантов hTERT и теломеразы, не связанные с удлинением теломер 77
2.8.5. Клиническое значение сплайс-вариантов hTERT при опухолевых заболеваниях 82
2.9. Роль апоптотических эндонуклеаз в процессе клеточной гибели 95
2.10. Регуляция АС пре-мРНК каспазы-2 84
2.11. Функциональное значение альтернативного сплайсинга пре-мРНК генов семейства BCL-2 88
2.12. Механизмы супрессии эффекторных лимфоцитов регуляторными Т клетками 92
2.12.1. Ингибирование секреции IL-2 92
2.12.2. Секреция ингибиторных цитокинов 93
2.12.3. Цитолиз и апоптоз 96
2.12.4. Генерация аденозина 97
2.12.5. Влияние на созревание дендритных клеток и стимуляторную функцию 98
2.12.6. Разнообразие TCR на Трег клетках 100
2.12.7. $CD8^+$ Т регуляторные клетки 101
2.12.8. Модуляция активности цитокиновым сигналлингом 101
2.13. Заключение по обзору литературы 103
3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 105
3.1. Лабораторные животные 105
3.2. Клеточные линии и культивирование клеток 105
3.2.1. Выделение и культивирование лимфоцитов человека 107
3.2.2. Выделение и культивирование лимфоцитов мыши и крысы 108
3.2.3. Выделение и культивирование регуляторных Т-клеток человека и мыши 109

3.2.4. Изучение супрессорной активности регуляторных Т-клеток человека и мыши при бесконтактном совместном культивировании с аутологичными клетками 111
3.2.5. Изучение супрессорной активности регуляторных Т-клеток мыши *in vivo* 111
3.3. Обработка клеток повреждающими ДНК агентами и измерение цитотоксичности 112
3.4. Трансфекция клеток 113
3.5. Подсчёт количества и оценка жизнеспособности культивируемых клеток 114
3.6. Выделение клеточных органелл 118
3.7. Расщепление ДНК и РНК recEndoG или РНКазами 119
3.8. Экстракция РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени 121
3.9. Вестерн-блоттинг 122
3.10. Определение активности теломеразы 123
3.11. Определение ферментативной активности каспазы 2 124
3.12. Определение активности β-Gal 124
3.13. Определение ферментативной активности ДНКазы 1 125
3.14. Определение абсолютной длины теломер 125
3.15. Секвенирование РНК 126
3.16. Идентификация длинных некодирующих РНК (нкРНК) методом секвенирования следующего поколения 126
3.17. Фенотипирование лимфоцитов, определение апоптоза и клеточного цикла 126
3.18. Иммуноцитохимия 128
3.19. Статистический анализ 129

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 130
4.1. Феномен индукции АС эндонуклеазой EndoG 130

4.1.1. Индукция АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT эндонуклеазой EndoG в клетках MCF-7 130
4.2. Способность EndoG индуцировать АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT и ингибировать активность теломеразы 131
4.2.1. Индукция АС пре-мРНК hTERT эндонуклеазой EndoG в опухолевых клетках 131
4.2.1.1. Взаимосвязь уровня экспрессия EndoG с уровнем мРНК сплайс-вариантов hTERT в клетках линий рака кишечника человека 131
4.2.1.2. Уменьшение пула активной формы hTERT и снижение активности теломеразы при сверхэкспрессии EndoG 133
4.3. Индукция АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы TERT эндонуклеазой EndoG в лимфоцитах человека, мыши и крысы 135
4.3.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG и экспрессии сплайс-вариантов TERT в лимфоцитах человека, мыши и крысы 136
4.3.2. Индукция АС пре-мРНК hTERT в лимфоцитах человека в результате сверхэкспрессии EndoG 140
4.4 Способность повреждающих ДНК агентов активировать индуцированный EndoG и альтернативный сплайсинг пре-мРНК hTERT в лимфоцитах человека 142
4.4.1. Гибель $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток человека в результате действия повреждающих ДНК агентов 142
4.4.2. Индукция EndoG повреждающими ДНК агентами 143
4.4.3. Изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT и ингибирование теломеразы при индукции EndoG цисплатином в лимфоцитах человека 145
4.5. Способность цисплатина активировать индуцированный EndoG альтернативный сплайсинг мРНК TERT в лимфоцитах мыши и крысы 148

4.5.1. Индукция АС пре-мРНК TERT в лимфоцитах мыши и крысы в результате сверхэкспрессии EndoG и действия цисплатина *in vitro* 148

4.5.2. Индукция АС пре-мРНК TERT в лимфоцитах мыши и крысы *in vivo* в результате действия цисплатина 152

4.6. Поиск мРНК белков, в регуляции АС которых участвует EndoG 155

4.6.1. Результаты секвенирования РНК 155

4.7. Изучение способности EndoG индуцировать АС пре-мРНК DNase I и ингибировать нуклеазную активность 158

4.7.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG с уровнем мРНК сплайс-вариантов DNase I 158

4.7.2. Индукция АС пре-мРНК DNase I и ингибирование нуклеазной активности при сверхэкспрессии EndoG 160

4.8. Индукция EndoG АС пре-мРНК Casp-2 и ингибирование активности каспазы-2 162

4.8.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG с уровнем мРНК сплайс-вариантов Casp-2 163

4.8.2. Индукция АС пре-мРНК Casp-2 при сверхэкспрессии EndoG 165

4.9. Индукция EndoG АС пре-мРНК BCL-x 167

4.9.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG с уровнем мРНК сплайс-вариантов BCL-x 167

4.9.2. Индукция АС пре-мРНК BCL-x при сверхэкспрессии EndoG 168

4.10. Влияние EndoG на индукцию АС пре-мРНК Casp-2, DNase I и BCL-x в $CD4^+$ Т лимфоцитах мышей и крыс 170

4.10.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG с экспрессией сплайс-вариантов Casp-2, DNase I и BCL-x в лимфоцитах мышей и крыс 170

4.10.2. Индукция АС пре-мРНК и ингибирование ферментативной активности Casp-2, DNase I и BCL-x в результате сверхэкспрессии EndoG в лимфоцитах мыши и крысы *in vitro* 173

4.10.3. Индукция АС пре-мРНК Casp-2, DNase I и BCL-x и снижение ферментативной активности соответствующих белков в лимфоцитах мышей и крыс *in vivo* 175

4.11. Исследование EndoG-зависимого механизма регуляции АС пре-мРНК на примере апоптотических белков hTERT, ДНКазы 1, каспазы-2 и BCL-x 177

4.11.1. Изучение внутриклеточной локализации апоптотической эндонуклеазы EndoG и сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы hTERT и ДНКазы 1 177

4.11.1.1. Изменение экспрессии сплайс-вариантов hTERT в клетках в состоянии апоптоза и при подавлении экспрессии EndoG 177

4.11.2. Снижение активности теломеразы в клеточных органеллах при изменении пропорции сплайс-вариантов hTERT при апоптозе и в условиях подавления экспрессии EndoG 181

4.11.3. Ко-локализация эндонуклеазы EndoG с hTERT в норме и при апоптозе 185

4.11.4. Изменение экспрессии сплайс-вариантов DNase I в лимфоцитах в состоянии апоптоза и при подавлении экспрессии EndoG 187

4.11.5. Снижение нуклеазной активности в органеллах лимфоцитов при изменении пропорции сплайс-вариантов DNase I в условиях апоптоза или подавления экспрессии EndoG 190

4.11.6. Индукция АС пре-мРНК в цитоплазме и ядрах под действием recEndoG 194

4.11.6.1. Индукция АС пре-мРНК как результат РНКазной активности EndoG 197

4.11.6.2. Идентификация и экспрессия РНК-олигонуклеотидов, образующихся под действием EndoG 199

4.11.6.3. Идентификация и определение уровня синтеза нкРНК 201

4.12. Модуляция АС при помощи олигонуклеотидов, продуцируемых EndoG (EGPO) 203

4.12.1. Индукция АС пре-мРНК в ядрах клеток апоптотических генов, синтезированным EGPO 203

4.12.2. Влияние индукции АС пре-мРНК hTERT переключающими сплайсинг олигонуклеотидами на пролиферацию $CD4^+$ Т-лимфоцитов человека 205

4.12.2.1. Ингибирование теломеразы в результате трансфекции лимфоцитов EGPO к пре-мРНК hTERT 205

4.12.2.2. Время-зависимая индукция АС пре-мРНК hTERT и ингибирование теломеразы EGPO, блокирующим SRp20 и SRp40 207

4.12.2.3. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК hTERT влияет на пролиферацию $CD4^+$ Т-лимфоцитов 209

4.12.3. Влияние индукции АС пре-мРНК DNase I переключающим сплайсинг олигонуклеотидом на развитие апоптоза в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека 211

4.12.3.1. Индукция АС пре-мРНК DNase I под действием EGPO в лимфоцитах человека 211

4.12.3.2. Индуцированный АС пре-мРНК DNase I тормозит развитие апоптоза 213

4.13. Исследование биологического эффекта индукции АС пре-мРНК hTERT в клетках 218

4.13.1. Гибель $CD4^+$ Т-лимфоцитов со сниженным уровнем α+β+ hTERT 218

4.13.2. Переход клеток в состояние репликативного старения и ингибирование клеточного цикла в результате укорочения теломер 221

4.13.3. Отсутствие способности у ДНКазы 1 и ДНКазы X индуцировать АС пре-мРНК hTERT 223

4.13.4. Сверхэкспрессия EndoG вызывает гибель опухолевых клеток линии CaCo-2 225

4.13.5. Переход опухолевых клеток в состояние репликативного старения и ингибирование клеточного цикла при инактивации теломеразы 226
4.14. Биологический эффект индукции АС пре-мРНК DNase I 230
4.14.1. Замедление развития апоптоза в результате инактивации ДНКазы 1 230
4.15. Роль индуцированного EndoG АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT в супрессорном действии регуляторных Т клеток 232
4.15.1. Ингибирование теломеразы в таргетных лимфоцитах человека в результате бесконтактного культивирования с Трег клетками 233
4.15.2. Индукция экспрессии EndoG, АС пре-мРНК hTERT и ингибирование теломеразы в таргетных $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека аутологичными нТрег и иТрег клетками 234
4.15.3. Гибель таргетных лимфоцитов в результате контакт-независимого совместного культивирования с иТрег *in vitro* 236
4.15.4. Репликативное старение и ингибирование клеточного цикла в результате укорочения теломер в таргетных клетках 238
4.15.5. Гибель таргетных лимфоцитов мыши при длительном совместном культивировании с иТрег 241
4.15.6. Индукция АС пре-мРНК TERT и ингибирование теломеразы иТрег мыши в таргентых лимфоцитах *in vivo* 243
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 246
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 276
7. ВЫВОДЫ 279
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 280
9. БЛАГОДАРНОСТИ 317
10. ПРИЛОЖЕНИЕ 318

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АС – альтернативный сплайсинг.

БСА – бычий сывороточный альбумин.

ДК – дендритная клетка.

иТрег – индуцированные *ex vivo* Трег.

мтДНК – митохондриальная ДНК.

нкРНК – некодирующая РНК.

НТО – нетранслируемая область.

нТрег – нативные регуляторные Т клетки.

ОТ – обратная транскрипция.

п.н. – пары нуклеотидов.

ПНО – полиморфизм нуклеотидных оснований.

ПСО – переключающий сплайсинг олигонуклеотид.

т.п.о. – тысяча пар оснований.

Трег – регуляторные Т клетки.

ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

ADAR – действующая на РНК аденозиндезаминаза (*от англ.* adenosine deaminase acting on RNA).

APC – аллофикоцианин (*от англ.* Allophycocyanin).

β-Gal – бета-галактозидаза (*от англ.* beta-Galactosidase).

COX IV – Цитохром *C*-оксидаза IV (*от англ.* cytochrome C oxidase IV).

CFSE – карбоксифлуоресцеин сукцинимидильный эфир (*от англ.* carboxyfluorescein succinimidyl ester).

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол (*от англ.* 4,6-diamidino-2-phenylindole).

EGPO – олигонуклеотид, продуцируемый EndoG (*от англ.* EndoG-produced oligonucleotide).

EndoG – эндонуклеаза G (*от англ.* Endonuclease G).

ESE – экзонный энхансер сплайсинга (*от англ.* exonic splicing enhancer).

ESS – экзонный сайленсер сплайсинга (*от англ.* exonic splicing silencer).

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).

ISE – интронный энхансер сплайсинга (*от англ.* intronic splicing enhancer).

ISS – интронный сайленсер сплайсинга (*от англ.* intronic splicing silencer).

LDH – лактат дегидрогеназа (*от англ.* Lactate dehydrogenase).

MFI – средняя интенсивность флуоресценции (*от англ.* Mean Fluorescence Intensity).

RISC – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (*от англ.* RNA-induced silencing complex).

siRNA – малая интерферирующая РНК (*от англ.* small interfering RNA).

SR-белки – регулирующие сплайсинг (*от англ.* splicing regulatory) белки.

TERT – теломеразная обратная транскриптаза (*от англ.* Telomerase Reverse Transcriptase).

TRAP – протокол амплификации теломерных повторов (*от англ.* Telomeric Repeats Amplification Protocol).

1. 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 [1,2]. 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 [3]. Это привело к открытию альтернативного сплайсинга (АС) – варианту сплайсинга пре-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 [4].

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 [5]. 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 [6,7].

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 пре-мРНК и могут индуцировать или ингибировать АС [8]. На эффективность АС также может влиять вторичная структура пре-мРНК [9] и присутствие малых интерферирующих РНК [10].

Процесс АС является тканеспецифичным. Уровень мРНК различных сплайс-вариантов одного и того же гена может значительно различаться в различных клетках и тканях [11]. Кроме того, АС может значительно изменяться при различных воздействиях на клетки, т.е. является индуцибельным процессом [12]. 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 развитие по каспаз-независимому пути [13]. 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-G•поли-C последовательностям. Отличительной особенностью EndoG от других ДНКаз является её способность осуществлять деградацию также и РНК в ядрах и цитоплазме [14].

К настоящему времени механизм, по которому EndoG влияет на эффективность АС, мало изучен. В данной работе мы предприняли попытку исследовать механизм индукции АС эндонуклеазой EndoG 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 пре-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 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.

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.

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.

Научно-практическая значимость работы.

Результатом работы является описание нового механизма индуцированного EndoG АС пре-мРНК как регулятора каталитической активности и функции белков. Показана способность EndoG регулировать процессы программируемой клеточной гибели путём 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 пре-мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы. В результате данного исследования впервые идентифицированы образуемые под действием EndoG олигонуклеотиды, индуцирующие АС пре-мРНК 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.

Личный вклад соискателя.

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 учёных «Ломоносов» (Россия, Москва 2010 и 2016); 5th International Conference Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnology for Medicine (GPBNM-2010, St.Petersburg-Kizhi-

Mandrogy-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 (Cambrige, UK, 2019); 44th FEBS Congress (Krakow, Poland 2019), EMBO Workshop Cell Death 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 332 страницах машинописного текста, содержит 27 таблиц и 78 рисунков.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Понятие о сплайсинге и альтернативном сплайсинге пре-мРНК

Нормальное функционирование клеток зависит от правильной экспрессии множества РНК: как кодирующих, так и не кодирующих, белок матричных РНК (мРНК). Роль большинства не кодирующих белок РНК изучена достаточно подробно. Такие РНК принимают участие в процессе транскрипции (например, 7SK РНК), созревании мРНК (малые ядерные РНК, мяРНК, малые нуклеолярные РНК) и её трансляции (рибосомальные РНК, транспортные РНК, микроРНК). Обнаружено множество РНК, регулирующих функциональную активность белков (РНК-компонент теломеразы, РНК MRP (Nuclear ribonuclease (RNase) P)), а также РНК, чьи функции практически не изучены (vault РНК, Y РНК, взаимодействующая с PIWI РНК (piRNA)) [15].

Все кодирующие белок мРНК человека и большинство не кодирующих РНК синтезируются с ДНК в процессе транскрипции в виде пре-РНК, которые содержат последовательности нуклеотидов, присутствующие в ДНК, но не входящие в состав зрелой мРНК – интроны, и последовательности, присутствующие в зрелой мРНК – экзоны. Первичные транскрипты пре-мРНК до трансляции подвергаются ряду модификаций в процессе созревания: кэпирование на 5’-конце (присоединение нуклеотиддифосфатного остатка 5’-фосфатной группой ГТФ к 5’-концу пре-мРНК с образованием 5’-5’-фосфодиэфирной связи, а также метилирование остатка гуанина в составе ГТФ с образованием N7-метилгуанозина) и синтез полиА-последовательности на 3’-конце транскрипта. Вторым событием при созревании мРНК является сплайсинг, в результате которого нуклеотидные последовательности «вырезаются», а концы экзонов соединяются друг с другом. Как правило, зрелые мРНК содержат функциональную (транслируемую) открытую кодирующую

белок рамку считывания и не транслируемые области на 3’- и 5’-концах молекул [16]. Постранскрипционное созревание пре-мРНК играет существенную роль в обеспечении разнообразия белковых продуктов, кодируемых единичным геном. Основной способ его достижения – это альтернативный сплайсинг пре-мРНК и, как следствие, изменение стабильности зрелой мРНК (рис. 1).

Под понятием «альтернативный сплайсинг (АС)» принято понимать – вариант сплайсинга пре-РНК, при котором в ходе экспрессии гена на основе одного и того же первичного транскрипта (пре-мРНК) происходит образование нескольких зрелых мРНК в результате «вырезания» и соединения экзонов (или частей экзонов) в различных комбинациях. Этот процесс порождает появление различных форм зрелой мРНК. Белки, которые синтезируются в процессе трансляции таких мРНК, имеют разные аминокислотные последовательности, что и обеспечивает различия в их функционировании [17].

Следует отметить, что далеко не все мРНК, образовавшиеся в результате АС, подвергаются трансляции. Многие сплайсированные мРНК функционально не активны и подвергаются деградации комплексом RISC (RNA-induced silencing complex) [18].

2.2. Виды альтернативного сплайсинга

Важность процесса АС в формировании протеомного разнообразия подтверждается результатами работ, в которых показано, что практически все мульти-экзонные гены человека образуют несколько сплайс-вариантов мРНК [19,20]. Описаны пять основных типов АС, не приводящих к сдвигу рамки считывания (рис. 2). Наиболее частым типом (~ 30% случаев) является включение или делеция экзона или нескольких экзонов в цепи пре-мРНК (рис. 2А).

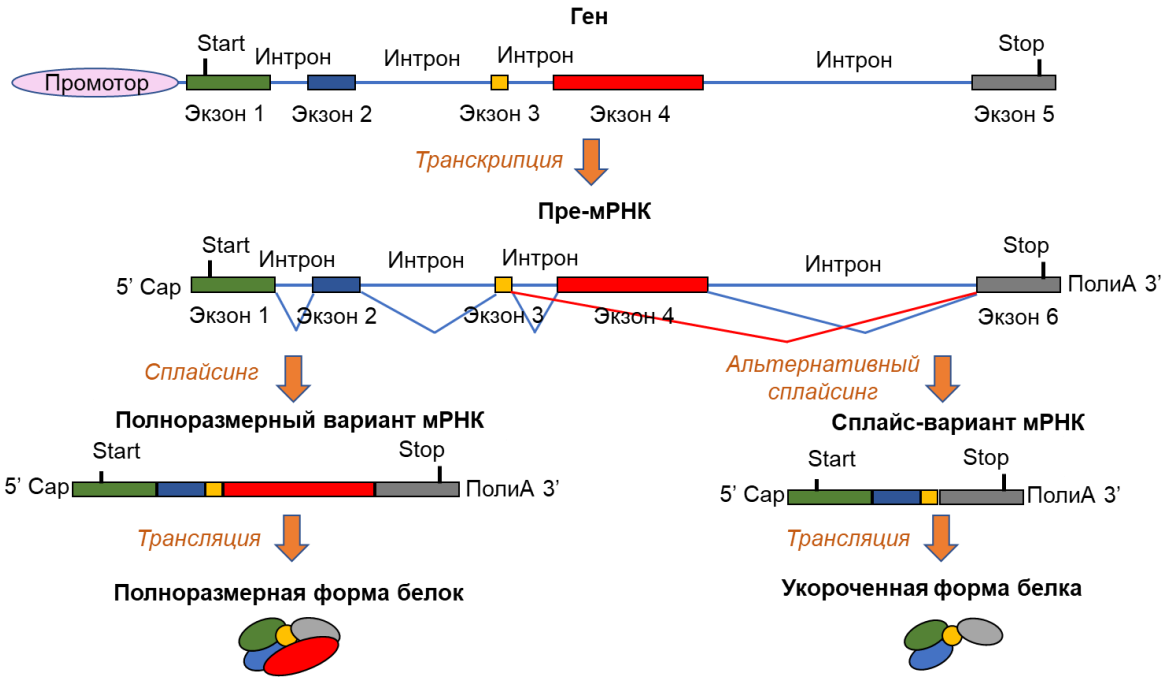


Рисунок 1. Схематическое изображение процессов сплайсинга и АС. В результате транскрипции на матрице гена синтезируется первичный транскрипт – пре-мРНК, содержащая нуклеотидные последовательности, кодирующие белок (экзоны) и не кодирующие белок (интроны). В процессе сплайсинга интроны удаляются, а концы экзонов соединяются. На матрице зрелой молекулы полноразмерной мРНК при трансляции синтезируется полноразмерная форма белка. В процессе АС происходит делеция экзона 4 и на матрице сплайс-варианта мРНК синтезируется укороченная форма белка. Экзоны обозначены цветными прямоугольниками. Цвет участков молекулы белка соответствуют цвету экзонов. Синие линии – делеция интронов в результате сплайсинга. Красная линия – делеция экзона в результате АС. Start, Stop – старт- и стоп-кодоны.

Реже наблюдается тип АС, при котором в конечный мРНК транскипт включается только один из двух возможных экзонов (взаимоисключающие экзоны) (рис. 2Б). Альтернативному сплайсингу могут подвергаться также части экзонов, что приводит в включению или делеции дополнительных

нуклеотидных последовательностей на 3’- или 5’- концах экзонов или же внутри экзона (рис. 2 В-Д). АС нуклеотидов внутри экзона наиболее часто встречается у человека в нетранслируемых участках мРНК. Это приводит к образованию длинных или укороченных экзонов. Включение или делеция альтернативных полиА сайтов (рис. 2Е) оказывает влияние не только на аминокислотную последовательность кодируемого белка, но также и на структуру некодируемой 3’-области. Результатом этого являются различия в способности зрелых мРНК взаимодействовать с различными регуляторными микроРНК и взаимодействующими с РНК белками, что влияет на стабильность самой мРНК и эффективность её трансляции [21].

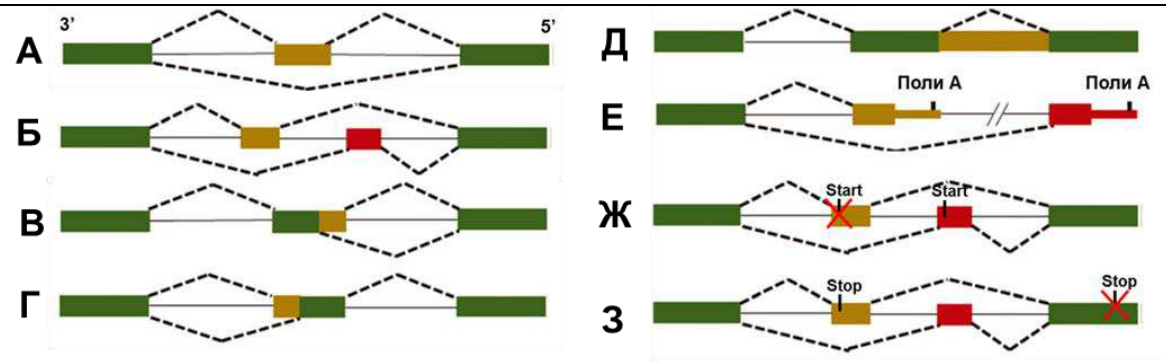


Рисунок 2 (по B. Cieply и соавт. [22] с модификациями). Схематическое изображение различных вариантов АС. Делеция экзона (А); взаимоисключение двух экзонов (Б); альтернативный 5’-участок (В); альтернативный 3’-участок (Г); делеция срединной части экзона (Д); альтернативный полиА участок (Е); альтернативный старт-кодон (Ж); альтернативный стоп-кодон (З). Зелёные прямоугольники – конститутивные (не удаляемые) участки, которые присутствуют во всех зрелых мРНК гена. Жёлтые и красные прямоугольники обозначают участки АС. Пунктирные линии – варианты соединения участков АС.

Появление сплайс-вариантов мРНК может являться результатом включения или делеции альтернативных экзонов, содержащих старт- и стоп-кодоны (рис. 2Ж, З). Альтернативные стоп-кодоны также могут появляться в результате сдвига рамки считывания при включении или делеции нуклеотидных последовательностей [23].

При трансляции различных сплайс-вариантов мРНК образуются изоформы белка с различной биологической активностью. Так в результате АС может изменяться способность белков к пост-трансляционным модификациям, белок-белковым взаимодействиям и внутриклеточная локализация. Такие изменения способны снижать, увеличивать или не влиять на каталитическую активность ферментов или функциональную активность белков, а также переключать её на противоположную (например, переключение про-апоптотической функции белка Bcl-xL на противоапоптотическую у Bcl-xS в результате АС пре-мРНК) [24].

2.3. Механизм альтернативного сплайсинга и его регуляция

2.3.1. Функционирование сплайсосомы

Процесс АС зависит от наличия специфичных последовательностей в участке или недалеко от границы экзона и интрона: 5’-сплас сайт, 3’-сплас сайт, и т.н. участок ветвления (branchpoint sequence), который располагается перед 3’-сплас сайтом (рис. 3). 5’-сплайс сайт представляет собой последовательность из девяти нуклеотидов, в которой обязательным является наличие динуклеотида GU в начале интрона. 3’-сплайс сайт содержит обязательную последовательность AG на конце интрона и полипиримидиновый участок перед этой последовательностью. Остальные нуклеотиды в 5’- и 3’-сплас сайтах менее консервативны. Нуклеотидные последовательности с наибольшим числом совпадений по отношению к описанным сплайс-сайтам являются «сильными» сайтами, т.е. АС в таких участках произойдёт с наибольшей вероятностью. В участках с наименьшим числом совпадений нуклеотидов, АС произойдёт с наименьшей вероятностью и такие участки являются «слабыми» сайтами.

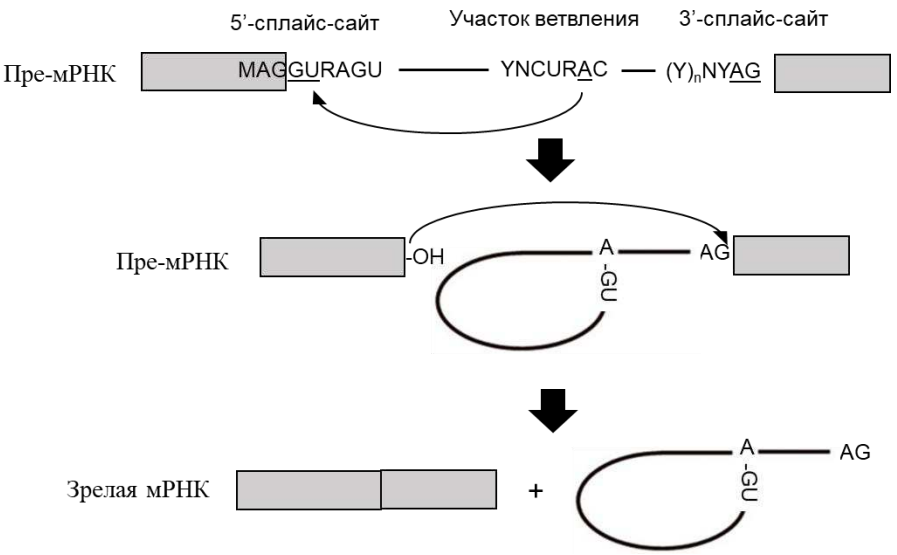


Рисунок 3. Схематическое изображение механизма сплайсинга интронов (по B. Cieply и соавт. [22] с модификациями). Удаление интронов протекает в две стадии при участии сплайс-сайтов. На первой стадии аденозин участка ветвления взаимодействует с уроцилом 5’-сплайс-сайта с образованием 2’-5’ фосфодиэфирной связи, формирующей петлеобразную структуру (лариат). На второй стадии гидроксильная группа 5’-сплайс-сайта взаимодействует с соседним экзоном с образованием 3’-5’ фосфодиэфирной связи. Нуклеотидная последовательность интрона высвобождается в виде лариата. N – любой нуклеотид, R – пурин, Y – пиримидин, M – аденин или цитозин. Консервативные нуклеотидные последовательности сплайс-сайтов подчёркнуты.

Основной структурой, которая осуществляет АС является сплайсосома – мультибелковый комплекс, состоящий из пяти основных малых ядерных рибонуклеопротеинов (субъединицы U1, U2 (и её изоформа U2AF), U4, U5 и U6) (рис. 4) и более 150 ассоциированных белков, регулирующих их функционирование. Первым этапом функционирования сплайсосомы является взаимодействие её субъединиц со сплайс-сайтами: U1 связывается с 5’-сайтом, U2 – с участком ветвления, а U2AF – с полипиримидиновым участком 3’-сплайс-сайта. Вторым этапом является присоединение субъединиц U4, U5 и U6 с U1 и U2AF, что приводит к сближению 5’- и 3’-сплайс-сайтов. На третьем этапе осуществляется удаление интрона в две стадии. На первой происходит

реакция трансэтерификации, при которой аденозин участка ветвления связывается с гуанидином GU-последовательности 5’-сайта.

На второй стадии происходит лигирование экзонов и удаление нуклеотидов разветвлённого интрона в виде петлеобразной структуры (лариата) [25].

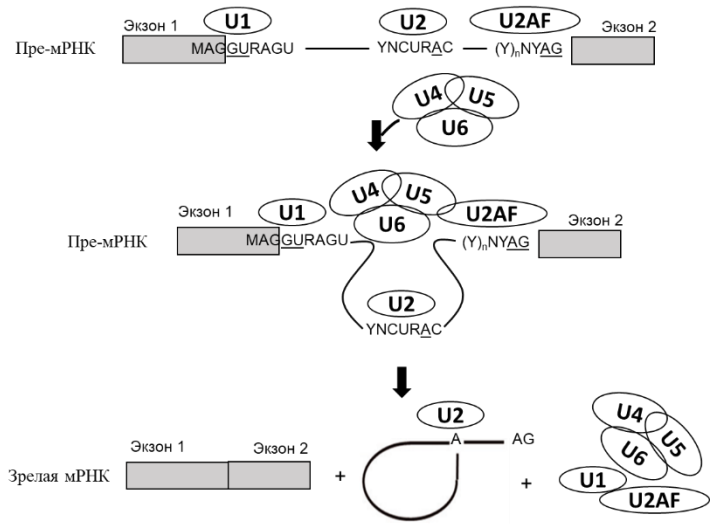


Рисунок 4. Схематическое изображение трех этапов функционирования сплайсосомы. На первом этапе субъединицы U1, U2 и U2AF связываются со сплайс-сайтами. На втором этапе субъединицы U4, U5 и U6 взаимодействуют с субъединицами U1 и U2AF, что приводит к сближению двух экзонов. На третьем этапе происходит лигирование двух экзонов, формируется лариат и высвобождаются субъединицы сплайсосомы.

Следует отметить, что кроме вышеописанного механизма функционирования основной сплайсосомы (катализирующей делецию интронов типа U2), обнаружено также действие минорной сплайсосомы, ответственной за делецию интронов типа U12 (около 800 экзонов в геноме человека). Главными компонентами минорной сплайсосомы являются субъединицы U12, U11, U4atac, U5 и U6atac, которые взаимодействуют с со сплайс-сайтами, отличными от таковых U2 интронов. Функционирование минорной сплайсосомы изучено недостаточно полно [26].

2.3.2. Роль SR-белков в регуляции альтернативного сплайсинга

Кроме ключевых сплайс-сайтов на молекуле пре-мРНК располагается множество нуклеотидных последовательностей (*цис*-элементов), являющихся участками взаимодействия с регулирующих сплайсинг белками (Splicing-regulatory proteins, SR-белками, *транс*-элементами). SR-белки могут активировать или ингибировать АС. Активатором сплайсинга является белок, индуцирующий включение экзона (или части экзона) в конечный мРНК транскрипт. Ингибитором АС является белок, вызывающий делецию нуклеотидной последовательности. Если *цис*-элемент располагается внутри экзона и связывается с SR-белком, который индуцирует АС, то такой элемент называют экзонный энхансер сплайсинга (exonic splicing enhancer, ESE). Если *цис*-элемент локализуется внутри экзона и связывается с SR-белком, который ингибирует АС, то такой элемент называют экзонный сайленсер сплайсинга (exonic splicing silencer, ESS) (рис. 5).

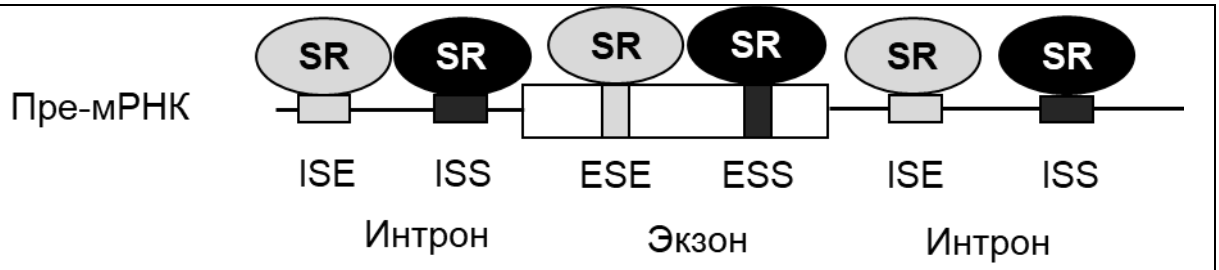


Рисунок 5. Схематическое изображение взаимодействия *транс*-элементов (SR-белков) с *цис*-элементами (регуляторные нуклеотидные последовательности – участки взаимодействия с SR-белками на молекуле пре-мРНК). ESE – exonic splicing enhancer, (экзонный энхансер сплайсинга); ESS – exonic splicing silencer (экзонный сайленсер сплайсинга) ISE – intronic splicing enhancer (интронный энхансер сплайсинга) ISS – intronic splicing silencer (интронный сайленсер сплайсинга).

Если *цис*-элемент располагается внутри интрона и взаимодействует с SR-белком индуцирующим или ингибирующим АС, то такие элементы называют интронные энхансеры сплайсинга (intronic splicing enhancer, ISE) или сайленсеры сплайсинга (intronic splicing silencer, ISS) [27,28]. Если сплайсосома осуществляет делецию интронов и лигирование экзонов при сплайсинге, то функционирование SR-белков является определяющим при модуляции АС, от которого зависит включение или делеция нуклеотидных последовательностей в конечную зрелую мРНК.

Семейство SR-белков было впервые обнаружено в 1990-х годах [29–31]. Доменные структуры, богатые аргинином и серином (RS домены) были впервые обнаружены у трёх регуляторных белков дрозофилы: SWAP (suppressor-of-white-apricot), Tra (transformer), и Tra-2 (transformer-2). Такие же домены были идентифицированы у SF2/ASF (splicing factor 2/alternative splicing factor), SC35 (spliceosomal component 35) и других регулирующих сплайсинг белков человека (таблица 1). RS домен ответствен за взаимодействие данных белков с РНК полимеразой II в процессе транскрипции, а также опосредует белок-белковые взаимодействия при функционировании сплайсосомы [32]. RS домены способны также связываться с участком ветвления и 5’ сплайс-сайтом на молекуле пре-мРНК, что указывает на вовлеченность данных белков в регуляцию сборки и специфичности функционирования сплайсосомы. Кроме того, RS домены определяют ядерную локализацию SR-белков, взаимодействуя с рецепторами ядерного транспорт.[33]. Кроме RS домена SR-белки имеют один или два домена узнавания РНК (RNA recognition motif, RRM домен), на N-конце молекулы, которые обеспечивают специфичность связывания с пре-мРНК. Некоторые SR-белки имеют также домены типа цинковых пальцев с тетрапептидами CCHC (цистеин-цистеин-гистидин-цистеин) и трипептидами PWI (пролин-триптофа-изолейцин), которые также обладают способностью связываться с пре-мРНК [34].

Таблица 1. Характеристики SR-белков.

SR-белок (название гена)	Домены	Сайт связывания	Метод определения сайта связывания	Роль в АС	Ссылка
SF2/ASF (*SFRS1*)	RRM×2, RS	RGAAGAAC AGGACRRAGC SRSASGA UGRWG	SELEX SELEX Функциональный SELEX CLIP	Активатор сплайсинга и АС	[35] [35] [36] [37]
SC35 (*SFRS2*)	RRM, RS	AGSAGAGUA GUUCGAGUA GRYYCSYR UGUUCSAGWU GWUWCCUGCUA GGGUAUGCUG GAGCAGUAGKS AGGAGAU UGCNGYY	SELEX SELEX Функциональный SELEX SELEX SELEX SELEX SELEX SELEX Функциональный SELEX	Активатор сплайсинга и АС	[35] [35] [38] [39] [39] [39] [39] [39] [40]
SRp20 (*SFRS3*)	RRM, RS	GGUCCUCUUC WCWWC CUCKUCY	Сдвиг при электрофорезе Анализ сплайсинга Аффинность РНК	Активатор сплайсинга и АС	[41] [39] [40]
SRp75 (*SFRS4*)	RRM×2, RS	GAAGGA	Сшивки при действии УФ	Активатор сплайсинга и АС	[42]
SRp40 (*SFRS5*)	RRM×2, RS	GAGCAGUCGGCUC ACDGS	SELEX Функциональный SELEX	Активатор сплайсинга и АС	[43] [36]
SRp55/B52 (*SFRS6*)	RRM×2, RS	USCGKM UCAACCAGGCGAC	Функциональный SELEX SELEX	Активатор сплайсинга и АС	[36] [44]
9G8 (*SFRS7*)	RRM, RS, цинковый палец типа CCHC	UCAACA ACGAGAGAY GGACGACGAG	Сшивки при действии УФ SELEX Функциональный SELEX	Активатор сплайсинга и АС	[45] [39] [40]
p54 (*SFRS11*)	RRM, RS	Обогащённый C	Сшивки при действии УФ	Ингибитор сплайсинга	[46]
SRp30c (*SFRS9*)	RRM×2, RS	GACGAC AAAGAGCUCGG CUGGAUU	Функциональный SELEX Функциональный SELEX Сдвиг при электрофорезе	Активатор сплайсинга и АС	[47] [47] [48]
hTra2*β* (*SFRS10*)	RRM, RS×2	(GAA)n	SELEX	Активатор сплайсинга	[49]
SRm160 *(SRRM1)*	RS, PWI	Обогащённый (GAA)n	Анализ сплайсинга	Ко-активатор сплайсинга и АС	[50]

Примечание к таблице 1. SELEX – Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением.
CLIP – Cross-linking and immunoprecipitation, сшивка и иммунопреципитация.

Полагают, что взаимодействие SR-белков с ESE последовательностями блокирует делецию экзонов, что обеспечивает заданный порядок экзонов в зрелой мРНК [51]. Были предложены две теории, объясняющие механизм блокирования делеции экзонов данными белками. Первая («модель сопряжённости») основана на способности ESE последовательностей связываться с SR-белками, которые стабилизируют взаимодействие между U1 субъединицей на 5’-конце экзона и U2AF субъединицей на 3’-конце. Таким образом достигается большая специфичность селекции сплайс-сайтов и эффективность сплайсинга [52]. Вторая модель («модель ингибирования») описывает SR-белки в качестве факторов, супрессирующих белки-ингибиторы АС, которые взаимодействуют с участками ESS [53]. SR-белки также способны образовывать регуляторные комплексы, формируя сложные белок-белковые взаимодействия со сплайсосомой, что вызывает сближение 5’- и 3’-концов соседних экзонов. Именно такая форма взаимодействия показана для SR-белков SF2/ASF и SC35 и субъединиц сплайсосомы U1 и U2AF, соответственно. Кроме того, было установлено, что SR-белки могут взаимодействовать непосредственно с участком ветвления, активируя сборку сплайсосомы. Они также опосредуют присоединение U4, U5 и U6 субъединиц при сборке сплайсосом. Показано, что второй RRM домен SR-белка SF2/ASFответствен за связывание со сплайс сайтами [54].

Полагают, что модулирующим действием на АС и выбором участка делеции является комбинаторное соотношение между *цис*-последовательностями и *транс*-регуляторными белками [55]. Количественное соотношение активаторных и ингибиторных SR-белков влияет на специфичность селекции сплайс-сайтов сплайсосомой, что и определяет эффективность АС пре-мРНК. Этим определяется тканеспецифичность АС в процессе клеточной трансформации, эмбрионального развития и иммортализации, а также способность клеток к индукции различных сплайс-вариантов мРНК в ответ на различные воздействия [11].

2.3.3. Канонические и неканонические сайты сплайсинга

С момента открытия АС было замечено, что большинство интронов имеют высоко консервативные динуклеотиды GT в 5'-сплайс-сайтах и AG в 3'-сплайс-сайтах. Такие GT-AG последовательности обнаружены более чем у 99% интронов генов человека и называются каноническими последовательностями. Как описано выше, такие последовательности являются сайтами связывания с субъединицей U2 сплайсосомы и делеция таких интронов (U2-интроны) при сплайсинге пре-мРНК осуществляется основной сплайсосомой [56].

Кроме канонических, обнаружены неканонические сплайс-сайты: GC-AG встречаются в 0,69 % случаев, AT-AC в 0,05%, GC-AG, GG-AT, GT-TG, GT-CG и CT-AG, AT-AG и AT-AA в менее чем 0,02% случаев [57]. Неканонические сплайс-сайты (показано только для AT-AC) узнаются субъединицей U12 минорной сплайсосомы [58]. Позднее Parada G.E. и соавторы [59] показали, что способность основной и минорной сплайсосомы связываться с определенными сплайс-сайты не столь специфична, и субъединицы U2 и U12 могут взаимодействовать с различными сплайс-сайтами (табл. 2).

Таблица 2. Разнообразие сплайс-сайтов генов человека [59].

№	Нуклеотид (% интронов)	Сплайсосома (% интронов)
1	GT-AG (98,9297)	U2 (99,0583); U12 (82,6911)
2	GC-AG (0,8890)	U2 (0,8855); U12 (0,2613)
3	AT-AC (0,0985)	U12 (13,1287)
4	GT-TG (0,0180)	U2 (0,0163); U12 (0,2613)
5	GG-AG (0,0144)	U2 (0,0145)
6	AT-AG (0,0117)	U2 (0,0027); U12 (1,3063)
7	AT-AA (0,0076)	U12 (1,1104)
8	GT-GG (0,0067)	U2 (0,0054); U12 (0,1960)
9	GA-AG (0,0063)	U2 (0,0063)
10	AT-AT (0,0045)	U12 (0,6532)
11	TT-AG (0,0045)	U2 (0,0045)
12	GT-AA (0,0040)	U2 (0,0041)
13	GT-AT (0,0031)	U2 (0,0009); U12 (0,3266)
14	GT-GA (0,0004)	U2 (0,0005)
15	GT-CG (0,0004)	U12 (0,0653)
16	GT-CC (0,0004)	U2 (0,0005)
17	GT-GT (0,0004)	U2 (0,0005)

Следует иметь в виду, что способность сплайсосомы удалять интроны при сплайсинге или экзоны при АС зависит не только от взаимодействия её субъединиц со сплайс-сайтами, но также опосредуется множеством регулирующих сплайсинг белков (SR-белков) и вторичной структурой пре-мРНК. Поскольку разнообразие SR-белков зависит от типа ткани, то эффективность АС также является тканезависимым процессом.

2.3.4. Роль вторичной структуры пре-мРНК в эффективности АС

Вторичная конформация пре-мРНК может влиять на исход АС из-за стерических изменения пространственной ориентации сплайс-сайтов и регуляторных элементов на её цепи. Полагают, что сближение сплайс-сайтов активирует АС, в то время как их удалённое расположение относительно друг друга ингибирует АС. Сближение или удаление

регуляторных последовательностей при вторичной конформации пре-мРНК влияет также на вероятность и силу взаимодействия с ними SR-белков и функционирование сплайсосомы [60]. Усиление АС наблюдается в случае, если в результате вторичной конформации происходит экспонирование (увеличение доступности для регуляторных белков) энхансера АС, 5’- и 3’- сплайс-сайтов или же сокрытие (уменьшение доступности) супрессорных участков. И наоборот, ингибирование АС наблюдается при экспонировании супрессорных участков и/или сокрытии энхансерных участков и 5’- и 3’- сплайс-сайтов. Функциональные механизмы регуляторной роль вторичной структуры пре-мРНК показаны на рис. 6.

Комплементарные структуры, сформированные со сплайс-сайтами цепи пре-мРНК, способны ингибировать присоединение субъединиц сплайсосомы к сплайс-сайтам (рис. 6А). Например, формирование комплементарной структуры экзона 6 с 5’-сплайс-сайтом экзона 7 пре-мРНК *SMN2* (survival of motor neuron 2) вызывает ингибирование присоединения субъединицы U1 и делецию экзона 7 [61].

Комплементарные структуры, сформированные с регуляторными участками на цепи пре-мРНК, способны ингибировать присоединение регулирующих сплайсинг белков (рис. 6Б). Например, формирование комплементарной структуры нуклеотидов интрона 4 с *цис*-участком на экзоне 5 пре-мРНК *cTNT* (cardiac troponin T) вызывает присоединение субъединицы сплайсосомы к альтернативному участку на экзоне 5, что приводит к делеции данного экзона [62].

Интересным является механизм, при котором вторичная структура пре-мРНК формирует участок взаимодействия с ферментом ADAR (adenosine deaminase acting on RNA). Данный фермент способен присоединяться к двуцепочечной РНК и превращать аденозин в инозин путём дезаминирования. Формирование динуклеотида аденозин-инозин в

3’-сплайс-сайте имитирует канонический сплайс-сайт AG и индуцирует AC (рис. 6В). Такое явление описано при AC пре-мРНК глутаматного рецептора крысы Gria2 (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2) [63].

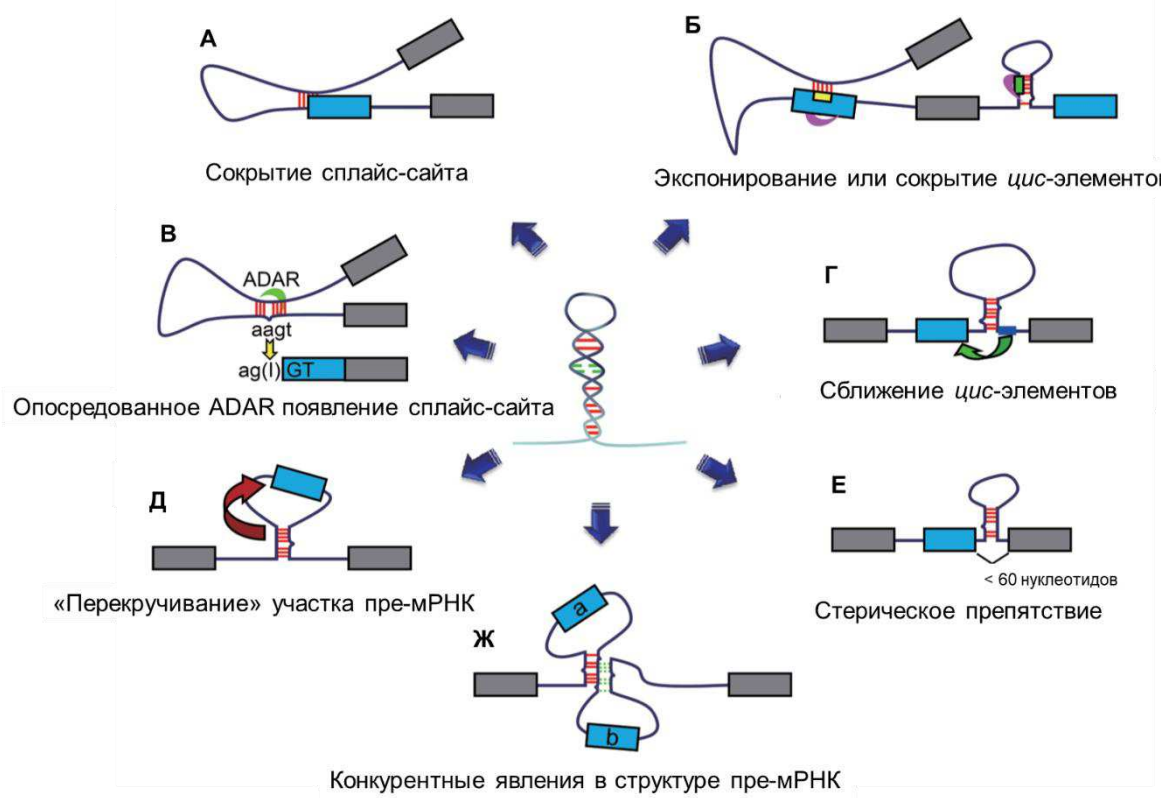


Рисунок 6. Регуляторная роль вторичной структуры пре-РНК при AC (по Jin Y. и соавт. с изменениями [9]). Показаны следующие функциональные механизмы: сокрытие сплайс-сайта (А); экспонирование или сокрытие цис-элементов (Б); опосредованное ADAR появление сплайс-сайта (В); сближение *цис*-элементов (Г); «перекручивание» участка пре-мРНК (Д); стерическое препятствие (Е); конкурентные явления в структуре пре-мРНК (Ж). Серые прямоугольники – конститутивные экзоны. Синие прямоугольники – альтернативные экзоны.

При функциональном механизме сближения *цис*-элементов, вторичная структура пре-мРНК не оказывает влияние на присоединение регуляторных белков и сплайсосомы, а только сближает соседние регуляторные участки (рис. 6Г). Вторичные структуры РНК способны сближать регуляторные элементы на расстоянии от нескольких сотен до

десятков тысяч оснований. Такое событие происходит, например, при АС пре-мРНК FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) [64].

Функциональный механизм перекручивания участка пре-мРНК наблюдается преимущественно в случаях делеции экзонов (рис. 6Г). При этом два интрона, окружающие экзон, формируют комплементарную структуру с образование петли, содержащей нуклеотидную последовательность экзона. Например, по такому механизму происходит делеция экзонов 5b и 5c в пре-мРНК гена *14-3-3ξ D. melanogaster* [65].

Показано, что для правильной сборки сплайсосомы млекопитающих необходимо наличие интрона длиной около 50 нуклеотидов (рис. 6Е). При меньшей длине интрона U1 и U2 субъединицы не способны прикрепиться к 5’- и 3’-сайтам. Такое явление наблюдается при индукции АС экзонов 2 и 3 α-тропомиозина, длина интрона между которыми 41 нуклеотид. Стерическое сближение этих двух экзонов при конформации пре-мРНК способствует их сближению и предотвращает их одновременную делецию [66].

По аналогии с механизмом перекручивания участка пре-мРНК, который содержит экзон, описано функционирование механизма, по которому несколько интронов способны формировать комплементарные структуры с образование нескольких петель, содержащей нуклеотидные последовательности экзонов (рис. 6Ж). Выбор варианта вставки или делеции экзонов в конечный мРНК транскрипт осуществляется по неизвестному механизму предположительно на «конкурентной основе». Например, по такому механизму осуществляется альтернативный выбор из двух экзонов при АС пре-мРНК гена *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor 1) [67].

Следует учесть, что вторичная структура пре-мРНК сама по себе не способна индуцировать или ингибировать АС, а функционирует в качестве одного из множества регуляторов этого процесса. Кроме того, несколько

регуляторных факторов различной силы действия и направленности способны действовать одновременно. Точный механизм или причину, почему эффект АС наступает и развивается в определенную сторону остаётся малоизученным.

2.4. Роль альтернативного сплайсинга в регуляции нормальных клеточных процессов

Поскольку АС является регулятором функциональной активности белков, данный процесс вовлечён в физиологическую регуляцию нормальных клеточных процессов. Под термином «нормальный клеточный процесс» следует понимать непатологические процессы дифференцировки и органогенеза, функционирования и контролируемой гибели клеток.

Фибронектин 1 (FN1 – Fibronectin 1) стал одним из первых белков, для индукции сплайс-вариантов которого были изучены биологические последствия. В результате АС пре-мРНК FN1 в зрелой мРНК удаляется или остаётся экзон, кодирующий т.н. экстрадомен А (Extradomen A - EDA), который определяет тканевую локализацию данного белка. Содержащий EDA фибронектин связан с клетками и является важным компонентом внеклеточного матрикса, что позволяет клеткам (преимущественно фибробластам) регулировать клеточную адгезию и миграцию. Фибронектин с делецией EDA образуется в клетках печени в виде растворимой формы и секретируется в плазму. Плазматический фибронектин функционирует в качестве компонента системы свёртывания крови [68].

Эмбриональные нервные клетки-предшественники дифференцируются в нейроны, которые после миграции постепенно формируются в нейронные цепи. Сравнительный анализ транскриптома коры головного мозга зародыша мыши и взрослой особи выявил изменение уровня сплайс-вариантов мРНК 400 генов. Наиболее интересным является регуляция миграции нейронов в результате действия

регулирующего сплайсинг белка NOVA2 (Neuro-oncological ventral antigen 2) на АС пре-мРНК гена *DAB* (disabled homologue 1). В процессе развития мозга принимают участие две изоформы белка, кодируемые сплайс-вариантами с экзонами 7b и 7c (*DAB1*-7bc) и без них. Синтез полноразмерной формы белка наблюдается на ранних этапах развития мозга, а укороченной формы на более поздних. Взаимодействие белка NOVA2 с интронным участком пре-мРНК DAB1 вызывает вставку экзонов 7b и 7c в конечный мРНК транскрипт. Синтез полноразмерного варианта белка DAB1 способствует нормальной миграции нейронов и нормальному развитию мозга, в то время как образование укороченной формы приводит к нарушению миграции нейронов и появлению дефектов мозгового развития [69]. АС пре-мРНК гена *RBFOX1* (RNA-binding protein FOX1 homologue). Белок, кодируемый данным геном, участвует в регуляции дифференциации нейронов и функционировании синапсов. В результате АС пре-мРНК RBFOX1 образуются два сплайс-варианта: содержащий экзон 19 и с делецией данного экзона. Белок, кодируемый полноразмерным вариантом, локализуется в ядрах нейронов и способствует их правильному сплайсингу. Белок, кодируемый коротким вариантом RBFOX1, находится в цитоплазме и стабилизирует структуру других мРНК, защищая их от действия интерферирующих РНК [70].

Сердце – это первый орган, который формируется в ходе эмбриогенеза, в связи с чем, эмбриональное развитие сердца очень хорошо изучено на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Однако, изменения, которые происходят в сердце постнатально до недавнего времени не были достаточно хорошо исследованы. Эти изменения носят обширный характер, поскольку после рождения сердце должно адаптироваться к различным кислородным и метаболическим условиям. Было установлено, что белок RBM20 (RNA-binding protein 20) регулирует АС пре-мРНК титина (titin, TTN) и способен таким образом изменять

эластичность кардиомиоцитов. Пре-мРНК титина состоит из 316 экзонов, из которых экзоны в положениях 50–219 подвергаются АС в процессе развития. Белок RBM20 способен избирательно включать в конечный мРНК транскрипт экзоны. условно обозначенные как N2B и N2BA. В норме обнаружены обе изоформы белка. При этом высокий уровень изоформы N2BA способствует формированию кардиомиоцитов с высокой, а N2B приводит к развитию кардиомиоцитов с низкой степенью эластичности. В процессе неонатального развития и у новорождённых преобладает N2BA изоформа, а у взрослых людей наблюдается равное соотношение N2BA и N2B изоформ, преобладание N2B изоформы вызывает развитие сердечной недостаточности в результате снижения эластичности кардиомиоцитов и утончения сердечной мышцы [71].

Апоптоз функционирует как общий механизм для устранения ненужных или повреждённых клеток во время их обновления и развития тканей в многоклеточных организмах. Более 200 белков участвуют в регуляции апоптотических процессов. Дисбаланс экспрессии тех или иных апоптотических белков часто является причиной злокачественных процессов. У эукариот апоптоз участвует в различных процессах, в том числе обуславливает иммунные реакции, эмбриональное развитие и поддержание гомеостаза тканей. В зависимости от типа стрессорного фактора или типов клеток, апоптоз индуцируется через внешние и внутренние пути. Внутренний путь активируется в результате действия многочисленных внутриклеточных стимулов, включая повреждение ДНК, стресс эндоплазматического ретикулума, окислительный стресс и разрушение митохондриальных мембран. Активация множественных рецепторов смерти или недостаток цитокинов индуцирует апоптоз, опосредованный внешними путями. Как внутренние, так и внешние пути приводят к высвобождению цитохрома С и других апоптоз-индуцирующих факторов, которые впоследствии активируют сигнальные и эффекторные

каспазы. Биологические функции некоторых апоптотических белков регулируются механизмом АС их пре-мРНК.

Временная экспрессия белка сурвивина, кодируемого геном *BIRC5* (baculoviral IAP repeat containing) достаточно хорошо коррелирует с переходом фаз клеточного цикла от G2 / M к фазе G1 [72]. В нескольких работах показано, что BIRC5 экспрессируется на постоянном уровне независимо от стадии клеточного цикла в опухолевых клетках, функционирует в качестве противоапоптотического белка и принадлежит к семейству белков ингибиторов апоптоза. Обнаружены три сплайс-варианта мРНК BIRC5: полноразмерный, с делецией экзона 3 и с делецией части экзона 2 (т.н. 2B вариант), которые оказывают противоположный эффект на развитие апоптотических процессов. Так вариант с делецией экзона 3 обладает выраженным антиапоптотическим действием, в то время как вариант 2B усиливает апопотоз [73].

Fas (Fas cell surface death receptor, также называемый Apo-1 и CD95) является членом суперсемейства рецепторов TNF, который опосредует внешний путь индукции апоптоза при взаимодействии с лигандом Fas. АС экзона 6 мРНК FAS генерирует две изоформы данного белка: связанную с мембраной (форма с экзоном 6) и растворимую (без экзона 6) [74]. Связанная с мембраной форма функционирует в качестве мощного активатора внутриклеточных апоптотических каскадов (преимущественно Каспаза-8-зависимых каскадов), в то время как растворимая форма является противоапоптоическим агентом, конкурируя с мембраносвязанной формой за активирующий FAS лиганд [75].

Другие белки, ответственные за регуляцию апоптотических процессов, и активность которых регулируется альтернативным сплайсингом, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Влияние процесса АС на активность апоптотических белков.

Пре-мРНК	Область АС	Тип АС	Регулятор сплайсинга	Биологический эффект на апоптоз	Ссылки
Survivin, baculoviral IAP repeat-containing protein 5.1-A-like	Экзон 3 Экзон 2B	Делеция экзона Делеция экзона	Не найден	Ингибитор (Сурвивин ΔEx3 и 3β) Активатор (Сурвивин 2β и 2α)	[76]
ERa, ERb, Estrogen receptor alpha and beta	Экзон 7 Экзон 10/11	Делеция экзона Делеция экзона	hnRNP G, Tra2b	Ингибитор (ERα+7) Активатор (ERRb2) Ингибитор (ERRβsf)	[77]
TRPM8, Transient receptor potential melastatin 8	Экзон 5a	Делеция экзона	Не найден	Ингибитор (sTRPM8α)	[78]
IL15, Interleukin-15	Экзон 6	Делеция экзона	Не найден	Активатор (IL-15ΔE6)	[79]
P53, protein 53	Экзон β/γ	Делеция экзона	Не найден	Активатор (p53β варианты)	[80]
Fas, Fas cell surface death receptor	Экзон 6	Делеция экзона	TIA-1/TIAR, PTBP1, HuR, hnRNP C	Ингибитор (Fas−exon 6) Про-апоптоз (Fas)	[81]
c-FLIP, CASP8 and FADD like apoptosis regulator	Экзон 5	Альтернативный 5’-сплайс-сайт	RBM5/10	Активатор (c-FLIP-L) Ингибитор (c-FLIP-S)	[82]
Bcl-x, (BCL2 like 1)	Экзон 2	Альтернативный 5’-сплайс-сайт	SRSF1, PTBP1, RBM4, RBM5, RBM10, and RBM11	Ингибитор (Bcl-xL) Активатор (Bcl-xS)	[83]
Bax (BCL2 associated X)	Экзон 3	Делеция экзона	Не найден	Активатор (Bax и BaxΔ2)	[84]
BIM (Bcl-2-like protein)	Экзон 3/4	Конкурентное включение экзонов	SRSF1	Активатор (BIM+exon 3) Ингибитор (BIM+exon 4)	[85]

2.5. Болезни, патогенез которых обусловлен нарушением процессов альтернативного сплайсинга

Нормальное функционирование клетки зависит от правильной регуляции АС пре-мРНК множества белков, со специфическими функциями. Нарушение механизма АС способно вызывать или являться следствием патологических процессов. Патологические процессы развиваются в следствие синтеза белка с «дефектной» функцией или же в результате нарушения пропорции изоформ белка по причине некорректного функционирования АС. К событиям, приводящим к нарушению процесса АС, относятся генетические мутации в регуляторных участках SR-белков и сплайс-сайтах мРНК, а также нарушение функционирования сплайсосомы и других ассоциированных с ней белков (рис. 7). Мутации в регуляторных областях пре-мРНК кодируемых белков будут вызывать изменения АС только данных конкретных мРНК, в то время как, нарушение функционирования сплайсосомы приводит к нарушению АС пре-мРНК множества других белков [22].

В настоящее время с нарушением АС в результате мутаций в регуляторных областях пре-мРНК связывают развитие ряда патологических событий. Наследственный изолированный дефицит гормона роста типа II развивается в следствие аутосомно-доминантной мутации в гене гормона роста (Growth Hormone 1, *GH1*), приводящей к недостаточности гормона роста (соматотропина). В норме в экзоне 3 пре-мРНК данного гена располагается нуклеотидная последовательность GAAGAA, являющаяся *цис*-участком взаимодействия с активатором АС, который индуцирует включение данного экзона в зрелую мРНК (рис. 8А). При мутации GAAGGA данная нуклеотидная последовательность на является регуляторной, что приводит к делеции экзона 3 при созревании мРНК и синтезу дефектного соматотропина [86].

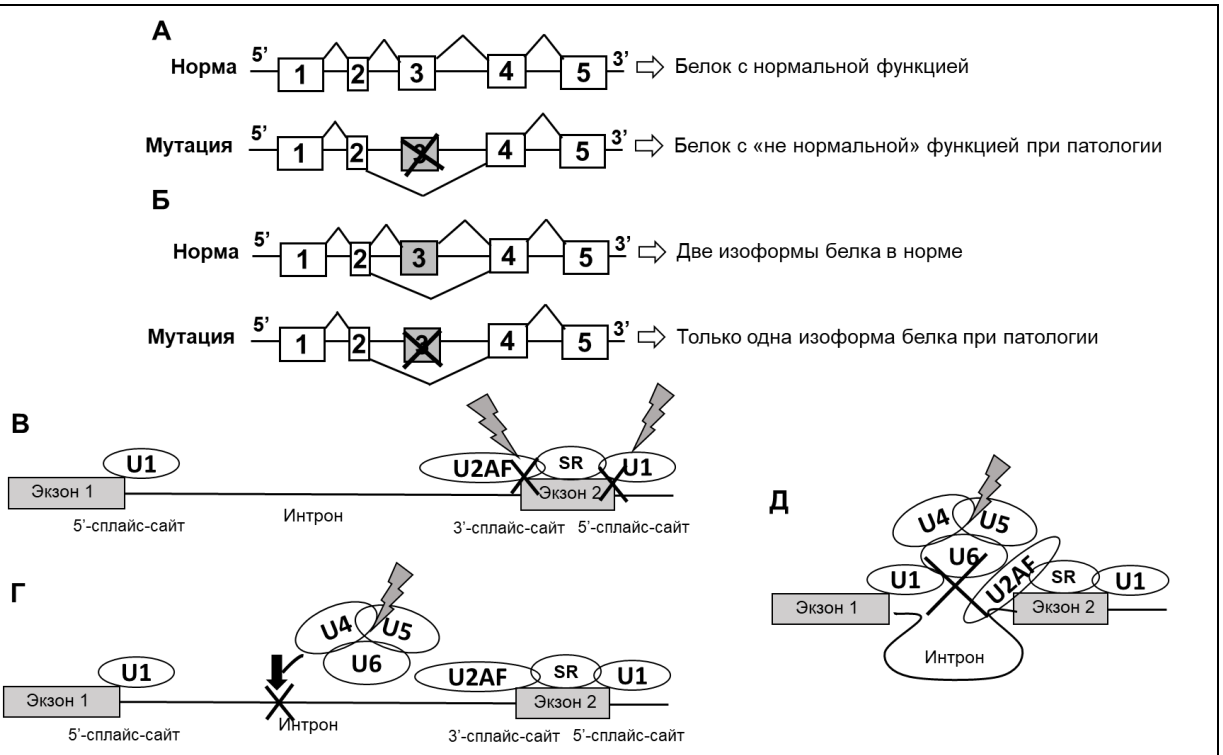


Рисунок 7. Схематическое изображение дефектов АС при патологии. Дефекты включения конститутивного экзона (или части экзона) (А) и дефекты включения альтернативных экзонов (Б). Дефекты белков сплайсосомы нарушающие взаимодействие субъединиц со сплайс-сайтами (В), нарушающие взаимодействие субъединиц друг с другом (Г) и ингибирующие «вырезание» интронов и лигирование экзонов (Д).

Миодистрофия Дюшенна, генетическое заболевание, связанное с нарушением строения мышечных волокон, развивается в результате мутации в гене дистрофина (Duchenne Muscle Dystrophia, *DMD*) и синтезу дефектного белка. Ген *DMD* состоит из 76-ти экзонов. В результате мутации (А→Т) в экзоне 31 образуется *цис*-участок, взаимодействующий с ингибитором АС (рис. 8Б). Это приводит к делеции данного экзона, сдвигу рамки считывания, появлению предварительного стоп-кодона и синтезу дефектного дистрофина [87].

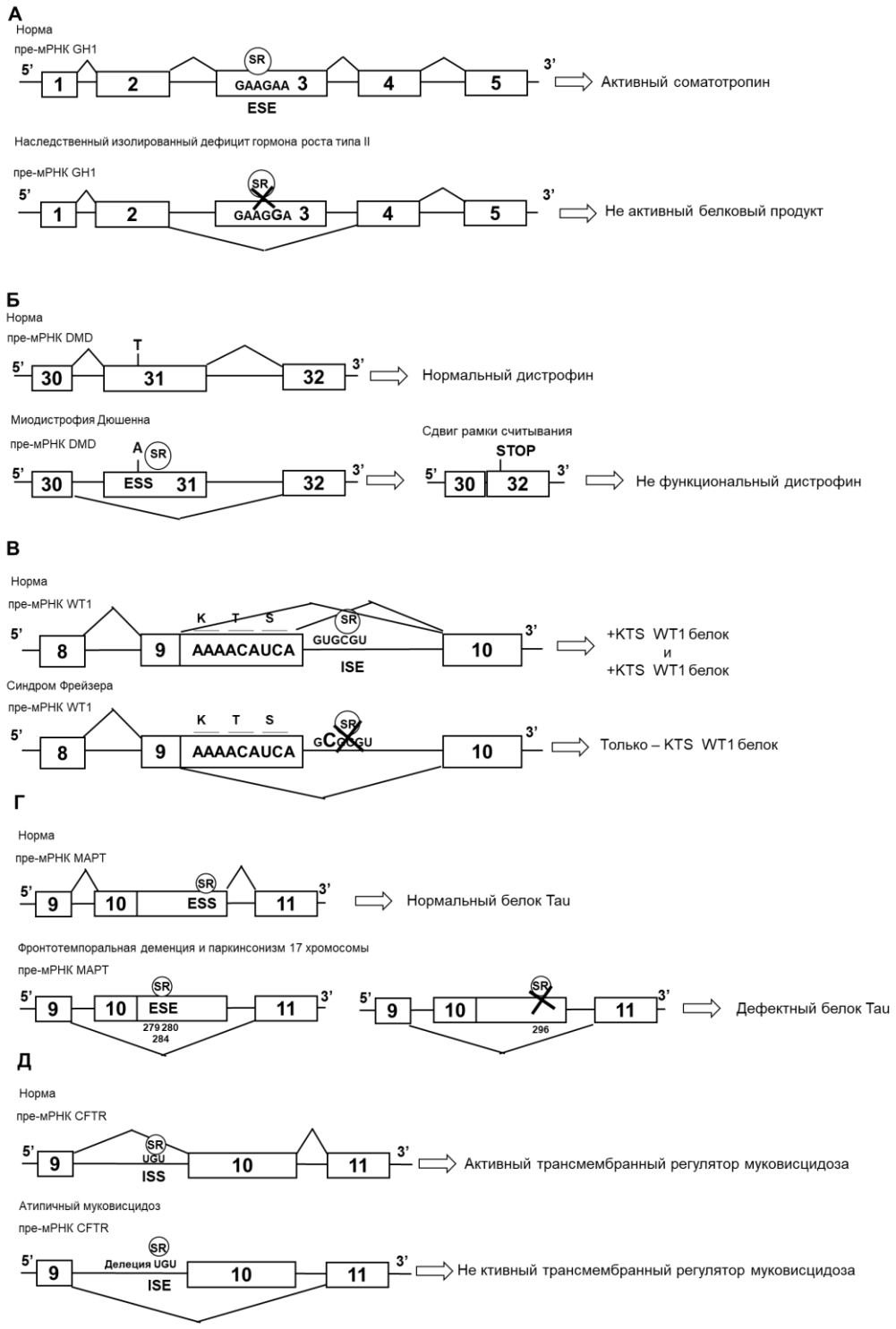


Рисунок 8. Схематическое изображение механизмов нарушения АС при патологии (см. пояснения в тексте). Наследственный изолированный дефицит гормона роста типа II (А), миодистрофия Дюшенна (Б), синдром Фрейзера (В), фронтотемпоральная деменция и паркинсонизм 17 хромосомы (Г), атипичный муковисцидоз (Д).

Синдром Фрейзера, аутосомно-рецессивное врождённое заболевание, характеризующееся множественными аномалиями, развивается в результате синтеза лишь одной изоформы транскрипционного фактора WT1 (Wilms Tumor 1). На конце экзона 9 располагаются нуклеотиды, кодирующие три аминокислоты лизин-треонин-серин (KTS). В норме на интроне 9 локализуется регуляторный *цис*-участок GUGCGU, взаимодействующий с ингибитором АС. Это приводит к синтезу мРНК, кодирующих обе изоформы WT1 в разных тканях: +KTS и –KTS. Мутация GCGCGU в данном участке приводит к потере его ингибиторных свойств и делеции области KTS. Таким образом синтезируется только одна –KTS изоформа белка (рис. 8В). В результате патологического функционирования единственной изоформы транскрипционного фактора WT1 нарушается транскрипция множества генов. Именно с этим связывают системность данной патологии и множественные аномалии развития [88].

Фронтотемпоральная деменция и паркинсонизм, ассоциированные с хромосомой 17 (FTDP-17), аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, влияющее на поведение, речь и движение, развивается в результате мутация в гене *MAPT* (Microtubule-associated Protein Tau) и вызывает агрегацию белков микротрубочек Tau и распад микротрубочек нейронов. В норме в экзоне 10 пре-мРНК данного гена располагается *цис*-участок, активирующий АС и включение экзона в зрелую мРНК (рис. 8Г). Обнаружены две причины нарушения АС и делеции экзона 10 при данной патологии. В первом случае, в результате мутаций в положениях 279, 280 и 284 формируется, *цис*-участок ингибирующий АС и индуцирующий делецию экзона 10. Во втором случае, в результате мутации в положении 296 теряется активаторная функция данного *цис*-участка, что также индуцирует делецию экзона 10 и синтез дефектного белка Tau [89].

Атипичный муковисцидоз, аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся поражением желёз внешней секреции и тяжёлыми нарушениями функций органов дыхания, развивается в результате мутации в гене трансмембранного регулятора муковисцидоза CFTR (cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator), ответственного за транспорт ионов хлора через мембрану клеток. В норме на интроне 9 пре-мРНК CFTR располагается регуляторный участок, содержащий нуклеотиды UGU, которые формируют активатор АС и индуцируют включение экзона 10 в конечный мРНК транскрипт (рис. 8Д). Делеция UGU в результате мутаций вызывает потерю индуцирующих и появлению ингибиторных свойств у данного *цис*-участка. Такое изменение сопровождается делецией экзона 10 в зрелой мРНК. Синтез неактивной формы CFTR приводит к накоплению ионов хлора внутри клеток и накоплению мукуса на внешней стороне мембраны [90]. Обнаружен ряд патологических состояний, развивающихся в результате нарушения функционирования сплайсосомы.

Спинальная мышечная атрофия, наследственное заболевание, протекающее с поражением или потерей двигательных нейронов передних рогов спинного мозга, развивается в результате нарушения функциорирования белка SMN (Survival of Motor Neuron). В норме данный белок кодируется двумя генами *SMN1* и *SMN2*. В экзоне 7 пре-мРНК SMN располагается регуляторная последовательность, индуцирующая включение данного экзона в конечный мРНК транскрипт. Функциональный белок SMN опосредует взаимодействие U1, U2, U4 и U5 субъединиц сплайсосомы. Мутация в экзоне 7 гена *SMN2* вызывает потерю регуляторной активности данного участка и делецию экзона. Дефектный белок не способен опосредовать взаимодействие субъединиц сплайсосомы, что приводит к нарушению её работы [91].

Идентифицированы три мутантных белка, принимающих участие в функционировании сплайсосомы и ответственных за развитие

пигментного ретинита. Пигментный ретинит, наследственное, дегенеративное заболевание глаз, в результате мутации белков, принимающих участие в метаболизме пигментного эпителия, липофусцина и гибели палочек. Мутации в гене *PRPF31* (pre-mRNA processing factor 31) приводят к синтезу дефектного белка, PRPF31 который нарушает взаимодействие U4/U6 и U5 субъединиц сплайсосомы. Мутации в гене *HPRP3* (pre-mRNA processing factor 3) влияют на взаимодействие U4 и U6 субъединиц сплайсосомы. Мутации в гене *PRPF8* (pre-mRNA processing factor 8) нарушают взаимодействие U5 субъединиц сплайсосомы с целевой пре-мРНК [92].

Миотоническая дистрофия, наследственное мультисистемное заболевание из группы нервно-мышечных заболеваний, с нарушением нормальное функционирование различных органов и систем. Развивается в результате мутаций в последовательности интронов генов *DMPK* (DM1 protein kinase) и *CNBP* (CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein), что приводит к увеличению количества Muscleblind белков (рис. 9).

В норме после крайних экзонов в пре-мРНК данных генов располагаются около сорока повторяющихся последовательностей: (CUG)n в пре-мРНК DMPK и (CCUG)n в пре-мРНК CNBP. У больных миотонической дистрофией количество таких последовательностей составляет от 80 до нескольких тысяч и соотносится с тяжестью заболевания: чем больше повторов, тем тяжелее симптомы. Белки Muscleblind связываются с CUG- и CCUG-последовательностями: чем больше количество этих последовательностей, тем больше количество Muscleblind белков. У больных белки Muscleblind взаимодействуют с CUG- и CCUG-последовательностями пре-мРНК других генов и вызывают изменение их АС. Так, взаимодействие Muscleblind белков с интроном 4 пре-мРНК CTNT (cardic Troponin T) вызывает делецию экзона 4 и синтез

дефектного кардиотропонина Т, ответственного за развитие кардиологических симптомов заболевания.

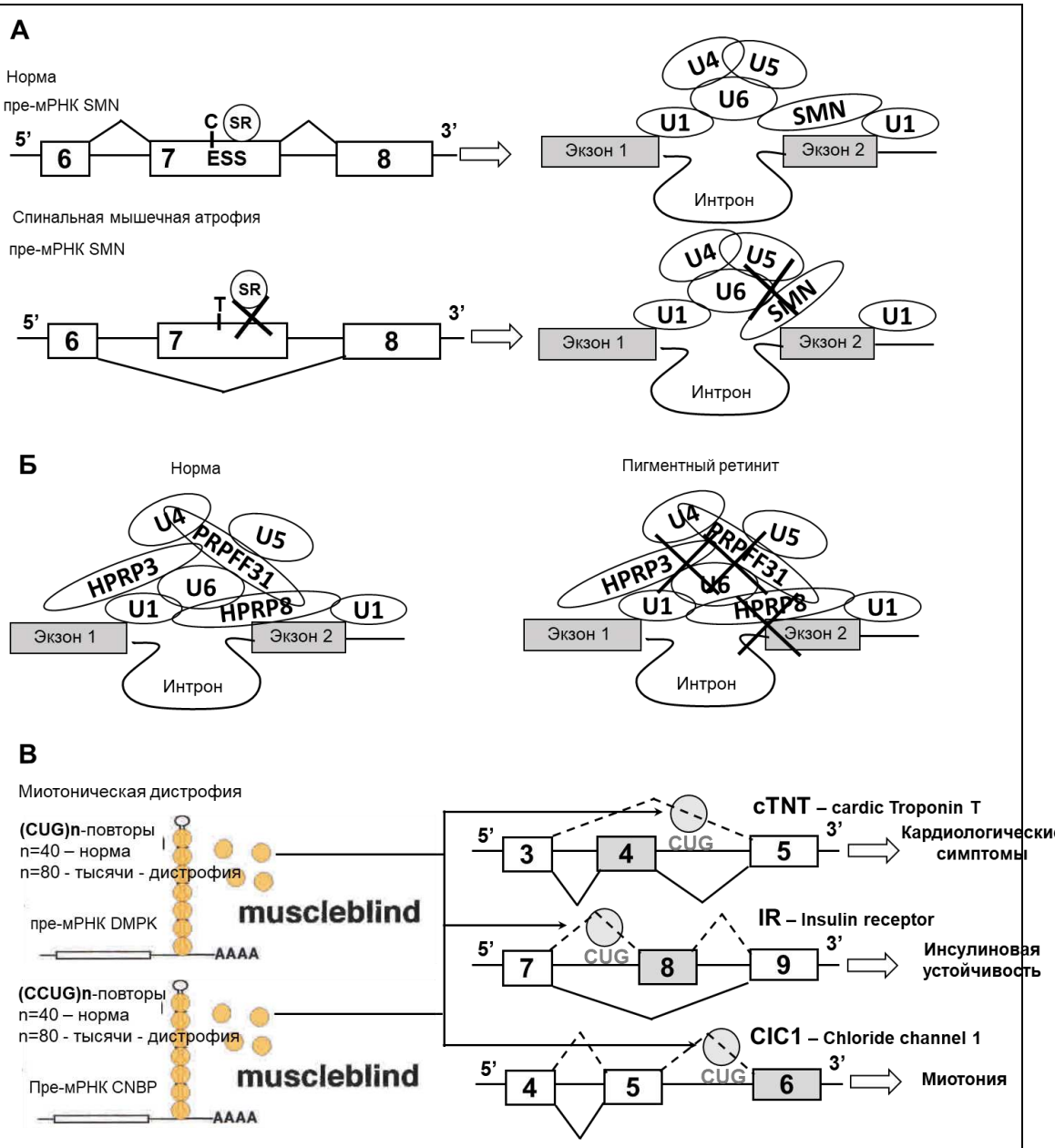


Рисунок 9. Схематическое изображение механизмов нарушения АС при патологиях, связанных с дисфункцией сплайсосомы (см. пояснения в тексте). Спинальная мышечная атрофия (А), пигментный ретинит (Б), миотоническая дистрофия (В).

Взаимодействие Muscleblind белков с интроном 7 пре-мРНК IR (Insulin receptor) вызывает делецию экзона 8 и синтез дефектного инсулинового рецептора, ответственного за развитие инсулиновой

устойчивости у больных. Взаимодействие Muscleblind белков с интроном 5 пре-мРНК CIC (Chloride channel 1) вызывает делецию экзона 6 и синтез дефектного белка хлоридных каналов, что является причиной развития миотонических нарушений [93].

2.5.1. Роль альтернативного сплайсинга в развитии злокачественных процессов

Активно исследуется активность АС и роль различных сплайс-вариантов при злокачественной трансформации клеток и опухолевом процессе. А именно, роль АС рассматривается применительно к процессам пролиферации, метастазирования и апоптоза. Клиническая функция аберрантных сплайсинговых изоформ также обсуждается, в частности, в отношении лекарственной устойчивости и радиочувствительности опухолевых клеток.

Были выявлены сплайс-варианты некоторых белков, которые стимулируют или способствуют прогрессии опухолевого развития. Циклин D1 и (cyclin D1b), сплайс-вариант циклина D1, образующийся при делеции экзона 4. Экспрессия циклина D1 и повышена в клетках лимфомы, рака пищевода, молочной железы, лёгких и простаты. Экспрессия данного сплайс-варианта является маркёром опухолевой прогрессии и терапевтической неэффективности при раке молочной железы и раке простаты, а также является прогностическим маркёром плохого прогноза и низкой продолжительности жизни при мелкоклеточном раке лёгких [94]. Тирозинкиназа SYK (Spleen tyrosine kinase), мощный супрессор опухолевой прогрессии экспрессируется в эпителиальных клетках молочной железы, в то время как её сплайс-вариант SYK(S) синтезтруется только в первичных опухолях молочной железы, но никогда в нормальных клетках [95]. Сплайс-вариант белка WT1 (Wilm’s tumor 1), образующийся при делеции экзона способствует пролиферации опухолевых клеток и вовлечён в прогрессию опухолей молочной железы [96].

Идентифицированы сплайс-варианты некоторых белков, ответственных за метастазирование опухолей. Одним из наиболее интересных примеров является функционирование сплайс-вариантов CD44. Пре-мРНК CD44 состоит из десяти экзонов, которые соединяясь в различной комбинации способны образовывать множество сплайс-вариантов. При этом полноразмерный вариант способствует ингибированию распространения метастазов [97]. Вариант CD44v6 экспрессируется в опухолевых тканях и является маркёром опухолевых стволовых клеток рака кишечника и метастазирования [98]. Ген CRK (CRK proto-oncogene, adaptor protein) кодирует два сплайс-варианта мРНК CRKI и CRKII. CRKII обнаружена в нормальных клетках мозга и клетках глиобластомы. В то же время уровень CRKI достаточно низок в нормальной ткани и очень высок в глиобластомах [99]. Показано, что сплайс-варианты гена супрессора опухолевого роста KLF6 (Kruppel like factor 6) также обладают различной активностью. Сплайс-вариант KLF6-sv1 кодирует белок, активирующий метастазирование инвазивного рака молочной железы [100]. Эндотелиальный фактор роста сосудов А (VEGFA, Vascular endothelial growth) является мощным регулятором опухолевого роста и метастазирования, а уровень его сплайс-вариантов может служить прогностическим маркёром успешности терапии сарком [101]. Известно, что высокий уровень экспрессии субъединицы α6 интегрина является маркёром рака молочной железы и других типов рака. Сплайс вариант α6Bβ1 активирует дифференцировку опухолевых стволовых клеток и инициирует опухолеобразование трижды негативного рака молочной железы [102].

АС является регулятором апоптотических процессов в опухолевых клетках. Кластерин (CLU, clusterin) участвует во множестве клеточных процессов и вовлечён в развитие опухолевых процессов раков множества типов [103]. Однако, его сплайс-вариант способен индуцировать апоптоз в

опухолевых клетках. Сплайс-варианты ELF2 (E74 like ETS transcription factor 2) ELF2A и ELF2B, которые образуются в результате АС 5’ нетранслируемой области, оказывают противоположный эффект на апоптоз. ELF2A служит активатором пролиферации опухолевых клеток, в то время как ELF2B активирует в них апоптоз [104]. Yang Y. и соавт. показали, что белок RIP3 (receptor-interacting protein 3) является индуктором апоптоза, в то время как его сплайс-вариант RIP3γ ингибирует развитие RIP3-индуцированного апоптоза в клетках рака кишечника и лёгких [105].

Спалйсинг мРНК может быть также важным индикатором клинического ответа на терапию и чувствительность клеток к химиопрепаратам. Anufrieva K.S. и соавт. показали изменение профиля сплайс-вариантов многих мРНК при различных видах химиотерапии опухолевых клеток [106].

Наиболее интересным примером является АС пре-мРНК андрогенового рецептора AR (androgen receptor) при терапии рака простаты. Полноразмерная белковая молекула AR состоит из N-концевого домена, центрального ДНК-связывающего домена, шарнирной области и С-концевой лиганд-связывающего домена. В результате АС в молекуле мРНК *AR* происходит делеция экзонов 5–8, белок теряет свой лиганд-связывающий домен и оказывается не способным взаимодействовать с тестостероном (сплайс-вариант AR-v7). Пациенты с экспрессией AR-v7 являются нечувствительными к AR-терапии [107]. Сурвивин 3b (Survivin 3b) является сплайс-вариантов сурвивина, который повышает устойчивость неопластических клеток к различным видам химиотерапии [108]. Белок BRCA1 (BRCA1 DNA repair associated) ответствен за репарацию повреждения ДНК. Сплайс-вариант BRCA1-Δ11, образующийся в результате мутации в экзоне 11, вызывает повышение устойчивости клеток к цисплатину [109]. Hughes M.A. и соавт. показали,

что полноразмерный и укороченный сплайс-варианты CFLAR (CASP8 and FADD like apoptosis regulator) являются антиапоптотическими белками и их экспрессия подавляется при химиотерапии, что приводит к повышению чувствительности клеток к действию препаратов [110].

Из достаточно большого массива экспериментальных данных становится понятно, что процесс АС играет критическую роль в опухолевом процессе. Однако, вопрос о том насколько специфична роль сплайс-вариантов различных генов в опухолевых процессах остаётся пока открытым.

2.6. Методы модуляции альтернативного сплайсинга

Учитывая центральную роль сплайсинга в регуляции реализации генетической информации и значимости данного процесса при нормальном функционировании клеток и при патогенезе некоторых заболеваний, интересным представляется поиск агентов и методов модуляции АС. Специфичность действия таких агентов является главной проблемой, ограничивающей их применения в терапевтических целях.

2.6.1. Малые молекулы как модуляторы АС

На исход АС могут влиять малые молекулы, которые связываются непосредственно с РНК: либо на сплайс-сайтах, либо на регуляторных последовательностях (ESE, ESS, ISE, ISS). Они могут непосредственно взаимодействовать с третичной структурой РНК или препятствовать взаимодействию регуляторного белка с РНК, а также ингибировать или активировать взаимодействие белка со сплайс сайтом.

Одним из подходов к поиску ингибиторов сплайсинга является проведение скрининга библиотек соединений в бесклеточных системах *in vitro*. В таких системах детектируются только прямые ингибиторы сплайсосомы и не учитывается влияние других факторов сплайсинга. Они также не ограничиваются определением молекул, которые могут

проникать через клеточные мембраны. В качестве таких систем применяются ядерный экстракт клеток, а уровень сплайс-вариантов оценивается методом количественной ПЦР [111]. В других работах используются антитела к РНК-связывающим белкам для детекции и скрининга ингибиторов сплайсинга [112]. Обнаруженные соединения обладали низкой способностью ингибировать АС (значение IC50 для них находился в диапозоне микромолярных концентраций).

Использование клеточных систем позволяет определять только молекулы, способные проникать через клеточную мембрану, а также учитывать возможность ингибирования различных регуляторных белков и сайтов их связывания. Moore M.J. и соавт. [113] разработали люциферазную систему на основе клеток HEK293. Люцифераза экспрессировалась, экзон в репортерном гене не удалялся. В другой работе Dreyfuss G. и соавт., [114] наоборот, использовали люциферазную систему в клетках Jurkat, в которой люцифераза экспрессировалась при делеции экзона репортерного гена.

В настоящее время обнаружено более двух десятков различных малых молекул ингибиторов АС [115]. Большинство из них обладает низкой специфичностью и способны изменять АС пре-мРНК множества генов. Однако некоторые соединения обладают специфическим действием и рассматриваются как потенциальным терапевтические препараты.

Одним из подходов к поиску переключающих сплайсинг соединений был скрининг их способности модулировать АС и индуцировать синтез полноразмерного варианта мРНК SMN2 [116]. Как сказано выше, АС пре-мРНК данного белка ответствен за развитие спинальной мышечной атрофии [91]. Было идентифицировано три класса соединений (SMN-C1, SMN-C2 и SMN-C3, рис. 10), которые способны индуцировать включение экзона 7 в конечный мРНК транскрипт, вызывать синтез полноразмерной формы белка, способны защищать нервно-мышечный контур и улучшать

двигательную функцию у мышей с моделью тяжёлой формы спинальной мышечной атрофии D7.

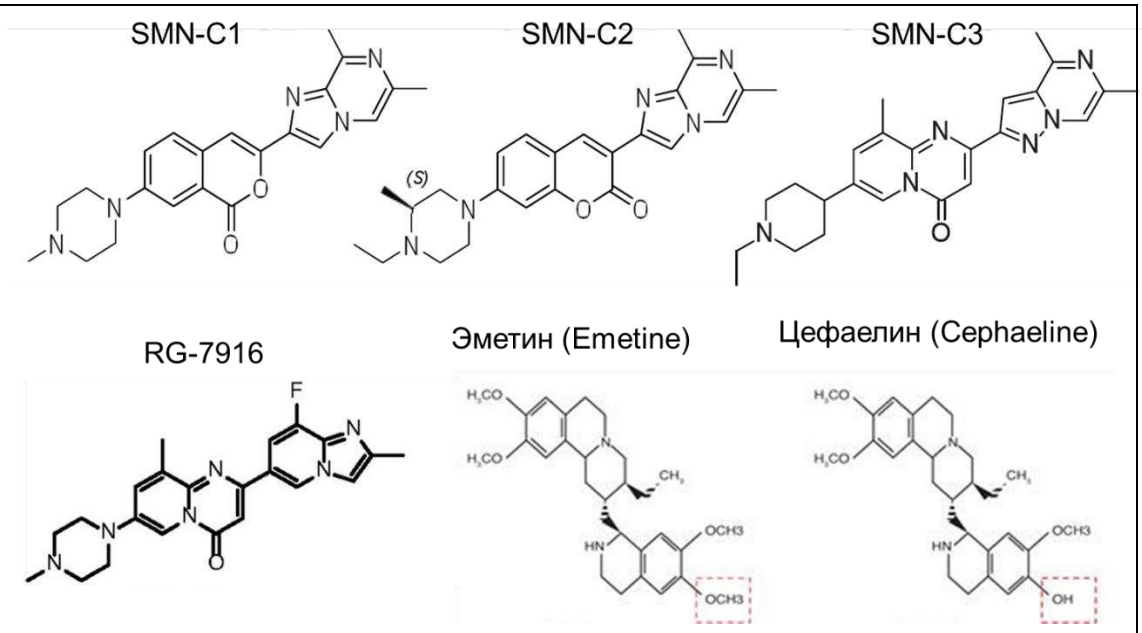


Рисунок 10. Малые молекулы – модуляторы АС пре-мРНК [116–118].

Точный механизм действия данных соединений остаётся неизученным, однако, полагают, что они взаимодействуют с пре-мРНК или с РНК-связывающими доменами регулирующих сплайсинг белков. Позже на основе данных соединений был синтезировано новое вещество RG-7916, которое оказалось способным взаимодействовать с пре-мРНК *SMN2* и увеличивать сродство активаторов АС FUBP1 (far upstream element binding protein 1) и KHSRP (KH-type splicing regulatory protein), что приводило в синтезу полноразмерного варианта SMN2 [117]. Ряд молекул рассматриваются в качестве модуляторов АС с целью терапии опухолевых процессов (таблица 4).

Таблица 4. Малые молекулы – потенциальные лекарственные средства для ингибирования АС пре-мРНК при опухолевых процессах.

Ген или мишень	Соединение	Описание действия	Ссылка
APAF1, apoptotic peptidase activating factor 1	Амиорид (Amioride)	Повышает радиочувствительность клеток мультиформной глиобластомы	[119]
AR, androgen receptor	6BIO	Повышает лекарственную чувствительность клеток рака предстательной железы	[120]
BTK, Bruton tyrosine kinase	Ибрутиниб (Ibrutinib)	Взаимодействует с киназами в клетках хронического лимфолейкоза	[121]
RBM39, RNA binding motif protein 39	Indisulam (Индисулам)	Вызывает деградацию RBM39 в кроветворной и лимфоидной тканях	[122]
SF3b, splicing factor 3b	Сплайсеостатин А (Spliceostatin A)	Проявляет антипролиферативный эффект на клетках HeLa	[123]
SF3b, splicing factor 3b	FR901464	Противоопухолевая активность при раке легких и раке молочной железы	[124]
SF3b, splicing factor 3b	E7107	Блокирует сборку сплайсосомы у пациентов с солидными опухолями	[124]
SF3b, splicing factor 3b	Меямицин В (Meayamycin B)	Индукция апоптоза в клетках рака головы и шеи	[125]
SF3b, splicing factor 3b	Ерантинин (Jerantinine A)	Противоопухолевая активность в результате взаимодействия с фактором сплайсинга при раке молочной железы	[126]
SF3b, splicing factor 3b	Судемицин (Sudemycin)	Индуцирует противоопухолевый ответ при хроническом лимфолейкозе	[127]
SF3b, splicing factor 3b	(Пладиенолиды Pladienolides)	Проявляет антипролиферативный эффект на клетках HeLa	[128]
SF3b, splicing factor 3b	GEX1A	Противоопухолевая активность в результате взаимодействия с белком SF3B1 (splicing factor 3b subunit 1 в клетках HeLa)	[129]
SRSF3, serine and arginine rich splicing factor 3	Дигоксин (Digoxin)	Индукция апоптоза в клетках HeLa	[130]
SR	NB-506	Индукция фосфорилирования SF2/ASF, активация апоптоза в лейкозных клетках	[131]
Сборка сплайсосомы	Изогинкгетин (Isoginkgetin)	Противоопухолевая активность в результате ингибирования АС в клетках HEK293	[113]
Сборка сплайсосомы	Мадразин (Madrasin)	Модуляция АС в клетках HeLa и HEK293	[112]
Сборка сплайсосомы	Кофеин (Caffeine)	Снижение выживаемости опухолевых клеток различных типов	[132]

Появляются данные, указывающие на то, что G-квадруплексные структуры, образуемые вторичной и третичной структурой пре-мРНК, являются сайтами взаимодействия с РНК-связывающим белком hnRNPF и, следовтельно, служат регуляторными участками АС. J. Zhang и соавт. [118] показали, что соединения эметин (Emetine) и цефаелин (Cephaeline) способны эффективно связываться с такими структурами и ингибировать индуцированный G-квадруплексами АС.

Известно, что активность SR-белков регулируется фосфорилированием их RS домена. Фосфорилирование способствует сборке сплайсомы вследствие усиления белок-белковых взаимодействий субъединиц, а также предотвращения случайных взаимодействий SR-белков с РНК. Основными белками, регулирующими процессы фосфорилирования-дефосфорилирования SR-белков, являются ферменты трёх семейств киназ: CDC2-like kinases (CLKs), dual-specificity tyrosine-regulated kinases (DYRKs), и SR-rich splicing factor protein kinases (SRPKs). Предпринимались попытки воздействовать на АС путём создания специфических ингибиторов их активности, которые, однако, закончились безуспешно [133].

2.6.2. Переключающие сплайсинг олигонуклеотиды

Наиболее специфичным способом модуляции АС и управления соответствующих клеточных процессов является использование переключающих сплайсинг олигонуклеотидов (ПСО). ПСО представляют собой молекулы из нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, которые способны специфически взаимодействовать с комплементарной последовательностью. Следует отметить, что все ПСО являются синтетическими молекулами и фактов их природного существования найти до сих пор не удавалось. Типичный размер ПСО составляет 15 – 30 нуклеотидов, что обеспечивает высокую степень специфичности к таргетному участку мишени и их относительно невысокую молекулярную

массу, облегчающую проникновение внутрь клеток. Взаимодействие ПСО с таргетным участком мишени перекрывает доступ субъединицам сплайсосомы к сплайс-сайтам или регуляторным SR-белкам к *цис*-последовательностям на цепи пре-мРНК (рис. 11). Таким образом ПСО способны индуцировать делецию или включение экзонов в конечный мРНК транскрипт [134].

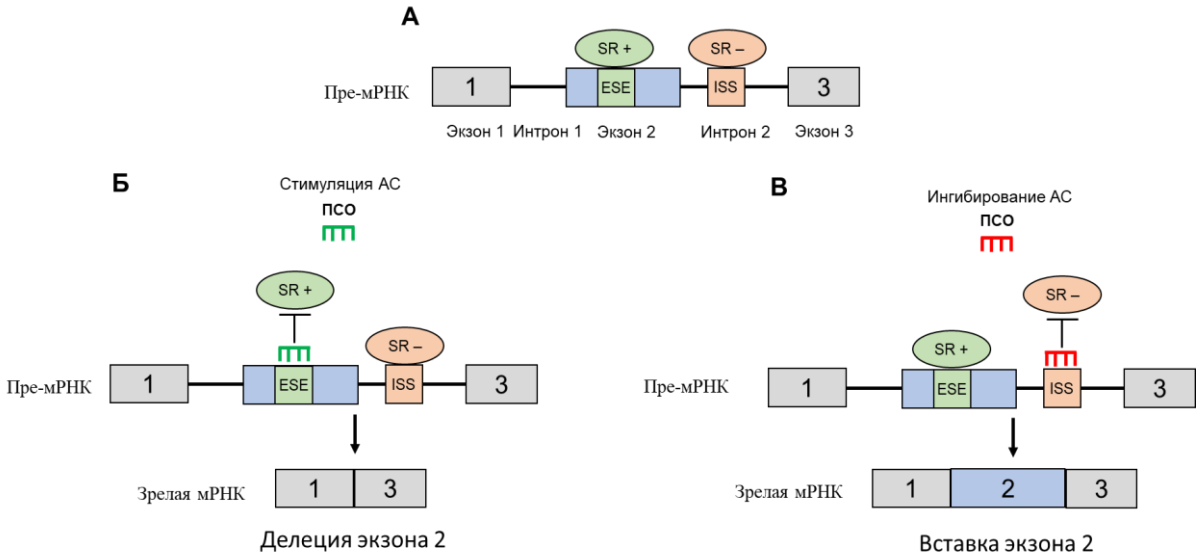


Рисунок 11. Схематическое изображение модуляции АС пре-мРНК переключающими сплайсинг олигонуклеотидами (ПСО). Схема взаимодействия активирующего АС SR-белка (зелёный SR+ овал) и ингибирующего АС SR-белка (розовый SR– овал) с регуляторными *цис*-элементами на интроне или экзоне (ESE – exonic splicing enhancer, ISS – intronic splicing silencer) (А). Серые прямоугольники – конститутивные экзоны. Голубой прямоугольник – альтернативный экзон. ПСО, который комплементарно связывается с участком ESE, ингибирует присоединение к нему активаторного SR+ белка, что стимулирует делецию экзона в конечный мРНК транскрипт (Б). ПСО, который комплементарно связывается с участком ISE, ингибирует присоединение к нему ингибиторного SR– белка, что стимулирует включение экзона (В).

С целью улучшения терапевтического применения ПСО, нуклеотиды их молекул подвергаются химическим модификациям (рис. 12). Прежде

всего это касается увеличения их устойчивости к действию РНКазы H, которая является самой активной внутриклеточной нуклеазой и нуклеазой плазмы крови [135]. С этой целью в химические модификации вводят в фосфатный остов и/или сахарный компонент олигонуклеотиов. Наиболее распространенной модификацией фосфатного остова является присоединение серы с образованием фосфоротиоатного остова. Модификация сахарного остатка в 2’-положении является наиболее эффективной стратегией увеличения стабильности ПСО. Применяются замены 2’-О-метильной группой (2’-ОМе) и 2’-О-метоксиэтильной группой (2’-МОЕ) [136].

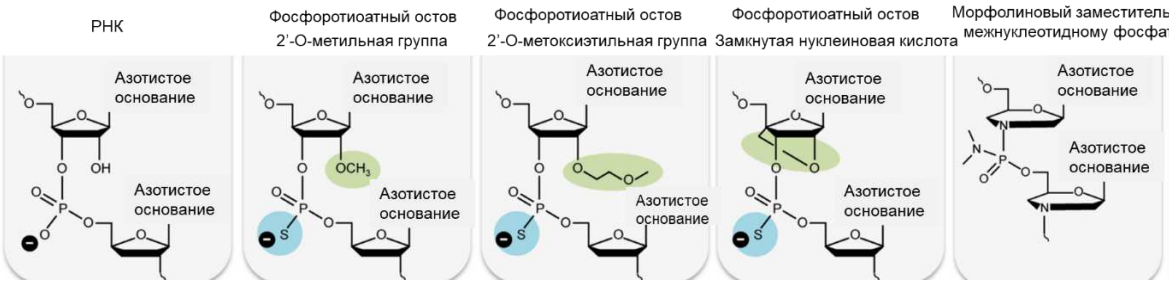


Рисунок 12. Структуры нуклеотидных аналогов, применяемых для создания ПСО (по Havens M.A. [137] с модификациями).

Использование замкнутых (закрытых) нуклеиновых кислот является стратегией, позволяющей увеличить специфичность взаимодействия ПСО с таргетным участком. Это даёт возможность уменьшить размер олигонуклеотида без потери специфичности. Стратегией, которая направлена на снижение способности олигонуклеотидов связываться с белками плазмы является введение морфолинового заместителя по межнуклеотидному фосфату. Такая замена обнаружена в природных нуклеотидах и даёт нейтральный заряд всей молекуле ПСО. Однако такие ПСО быстро выводятся из организма почками и не способны аккумулироваться в тканях, по сравнению с фосфоротиоатными аналогами. Для облегчения проникновения ПСО в клетки их конъюгируют

с транспортерными пептидами или дендримерами из шести гуанидинов [138].

В настоящее время исследуется возможность применения ПСО с целью терапии множества патологий, в т.ч. и опухолевых заболеваний (таблица 5). Однако, лишь только ПСО, в виде препаратов Eteplirsen и Kyndrisa, способные ингибировать делецию экзона 51 пре-мРНК дистрофина (DMD, Duchenne Muscular Dystrophy) и направленные на терапию мышечной дистрофии Дюшена проходили клинические испытания, закончившиеся безуспешно [139].

Таблица 5. ПСО, применяемые в качестве противоопухолевых терапевтических препаратов.

Ген	Событие АС	Описание действия	Ссылка
ATM, ATM serine/threonine kinase	Включение интрона 28	Увеличение чувствительности к радиации клеток HEK293	[140]
BCL2L1, BCL2 like 1	Делеция экзона 2	Индукция апоптоза в клетках глиомы человека	[141]
BRCA1, BRCA1 DNA repair associated	Делеция экзона 11	Усиление эффекта ингибирования PARP в клетках рака молочной железы	[142]]
ERBB2, erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	Делеция экзона 15	Индукция апоптоза в клетках рака молочной железы	[141]
HER4, erb-b2 receptor tyrosine kinase 4	Делеция экзона 26	Ингибирование пролиферации клеток рака молочной железы	[143]
MDM2, MDM2 proto-oncogene	Делеция экзона 11	Усиление чувствительности к повреждению ДНК клеток рака молочной железы	[144]
MDM4, MDM4 regulator of p53	Делеция экзона 6	Ингибирование роста клеток меланомы	[145]
PKM, pyruvate kinase M1/2	Включение экзона 10	Усиление чувствительности к химиотерапии клеток рака поджелудочной железы	[146]
STAT3, signal transducer and activator of transcription 3	Альтернативный 3' сплайс-сайт	Индукция апоптоза в клетках рака молочной железы	[147]
WT1, WT1 transcription factor	Включение экзона 5	Индукция гибели клеток лейкемии линии HL60	[148]

2.7. Роль альтернативного сплайсинга в регуляции иммунного ответа

Необычайно высокое разнообразие белковых форм, генерируемых АС, подразумевает что данный процесс регулирует практически каждый аспект клеточного метаболизма, и, как следствие, каждую систему организма. Иммунная система не является исключением. Эволюционировав, чтобы защитить организм от разнообразных патогенов, иммунная система требует разнообразия белков, и вклад АС в это разнообразие начало изучаться сравнительно недавно. Т- и В-лимфоциты являются основными эффекторными клетками адаптивного иммунного ответа, и иммунная система имеет разнообразный репертуар обоих типов клеток для борьбы с множеством патогенов. Их правильная дифференцировка, созревание, активация функционирование и гибель регулируется, в том числе, и процессом АС.

Контролируемая активация Т-клеток важна для правильного созревания Т-клеток. Главная роль в процессе активации принадлежат Т-клеточному рецептору (TCR, T-cell receptor) и CD28. Butte M. J. и соавт. [149] показали, что активация TCR и CD28 приводит к изменению уровней сплайс-вариантов мРНК множества генов. АС большинства из этих генов индуцируется рибонуклеопротеином hnRNPLL (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like). Однако, биологические последствия изменения уровня АС пре-мРНК различных белков в данных клетках остаются малоизученными. Достаточно большое внимание уделяется изучению влияния АС на функционирование молекулы-активатора CTLA-4 (Cytoyoxic T-lymphocyte antigen 4). АС её мРНК в 3’ некодирующей области коррелирует с пониженным уровнем синтеза растворимой формы. Другой сплайс-вариант мРНК liCTLA-4 с делецией экзона 2, который кодирует домен взаимодействия с CD80/CD86, функционирует в качестве

ингибитора активации и пролиферации Т-клеток, что, как полагают, имеет важное значение для поддержания иммунного гомеостаза [150].

Рецептор интерлейкина 7 (IL-7R, Interleukin 7 receptor, CD127), необходим для поддержания постоянного количества $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови. Делеция экзона 6 мРНК IL-7R, кодирующего трансмембранный домен белка, приводит к синтезу растворимой формы рецептора и ингибированию активации лимфоцитов. Обнаружено несколько сплайс-вариантов мРНК самого IL-7. Делеция экзона 5 приводит к усилению сигналлинга по пути STAT-5 через IL-7R и сопровождается ингибированием гибели лимфоцитов [151].

Также показано, что АС пре-мРНК PTPRC (protein tyrosine phosphatase receptor type C) регулирует уровень лимфоцитарного антигена CD45RA, что соотносится с количеством Т-клеток памяти [152].

АС пре-мРНК трансмембранной тирозинкиназы CD45 наиболее полноценно. Обнаружено пять сплайс-вариантов мРНК данного белка: CD45RABC, полноразмерный вариант (включение экзонов 4 – 6), CD45RAB (включение экзонов 4 и 5), CD45RB (включение экзонов 5 и 6), CD45RB (включение экзона 5) и CD45RO (делеция экзонов 4 – 6). В периферических Т-клетках делеция трёх экзонов (экзоны 4, 5 и 6) приводит к потере высоко гликозилированного участка молекулы, ответственного за димеризацию и формирование активного комплекса. Такой сплайс-вариант кодирует укороченную молекулу CD45 с низкой способностью к клеточной активации и, как полагают, служит механизмом поддержания Т-клеточного гомеостаза [153].

Т-клеточный рецептор CD3 является комплексом, ответственным за распознавание антигенов, презентированных главным комплексом гистосовместимости. Уровень синтеза цепи CD3ζ определяет способность Т-клеток к активации. Показано, что АС экзона 8 мРНК CD3ζ определяет функциональную активность данной молекулы [154]. 3’-нетранслируемая

область мРНК данного гена содержит AU-богатые участки и один интрон. АС в данной области, приводящий к делеции данного интрона, приводит к удалению двух AU-богатых участков, ингибированию CD3ζ-индуцированного сигналлинга и понижению жизнеспособности клеток [155].

Тирозинкиназа FYN (FYN proto-oncogene) участвует в передаче внутриклеточного сигналлинга, а также созревании и активации Т-клеток. АС экзона 7 мРНК FYN и образование сплайс-вариатов 7a и 7b приводит к потере домена взаимодействия с субстратом и домена фосфорилирования. В Т-лимфоцитах, экспрессирующих сплайс-вариант FYN7b, наблюдается более активная мобилизация внутриклеточного кальция и повышенная секреция IL-2 по сравнению с клетками, экспрессирующими FYN7a. Однако укороченные сплайс-варианты не способствуют клеточной активации в ответ на действие патогена [156].

Транскрипционный фактор LEF1 (Lymphocyte enhancer factor 1) активирует экспрессию Т-клеточного рецептора α (TCRα) взаимодействуя с энхансером гена. Экзон 6 *LEF1* кодирует домен связывания с энхансером гена. Делеция экзона 6 приводит к понижению экспрессии TCRα. Изменение уровней сплайс-вариантов LEF1 обнаружено в тимусе в Т-лимфоцитах различной степени зрелости. Полагают, что АС LEF1 является регулятором активации Т-клеток через TCRα при созревании в тимусе [157].

2.7.1. Роль альтернативного сплайсинга при аутоиммунных процессах

Знание механизмов, по которым АС регулирует нормальный иммунный ответ важно для понимания механизмов патогенеза заболеваний иммунной системы и способов их терапии. Гибель активированных клеток необходима для поддержания гомеостаза и поддержания постоянства количества лимфоцитов в условиях отсутствия

патогена. Активность множества факторов, координирующих процессы апоптоза, регулируется процессом АС их пре-мРНК (см. таблицу 3.) [158]. Влияние сплайс-вариантов этих факторов изучено в т.ч. и на клетках иммунной системы. Нарушение процессов контролируемой гибели иммунных клеток ведёт к развитию аутоиммунных заболеваний. Как и в случае с другими заболеваниями, в патогенезе которых задействованы процессы АС, аутоиммунные заболевания сопровождаются как мутациями в регулирующих сплайсинг последовательностях (*цис*-элементах), так и нарушениями функционирования регуляторных белков (*транс*-элементов).

Рассеянный склероз является наиболее распространённым нейродегенеративным заболеванием центральной нервной системы. Заболевание развивается в результате повреждения миелиновой оболочки аксонов аутореактивными лимфоцитами (преимущественно $CD8^+$ и $CD4^+$), что приводит к потере их способности проводить нервные импульсы [159].

Вовлеченность АС пре-мРНК IL7R в развитие рассеянного склероза подтверждено в нескольких независимых исследованиях, однако точный механизм влияния данного процесса на развитие патологии остаётся не изученным. Показано, что у больных рассеянным склерозом в лимфоцитах преобладает растворимая форма IL7R, кодируемая мРНК с делецией экзона 6. Нуклеотидная замена 2441T→C и сопряжённый с ней нуклеотидный полиморфизм rs6897932 вызывают синтез укороченного сплайс-варианта с делецией экзона 6 в различных клеточных линиях [160]. Данные результаты подтверждены и в исследованиях *in vivo*.

Изменение уровня сплайс-вариантов CTLA-4 обнаружено при ряде аутоиммунных заболеваний (аутоиммунный гипотиреоз, болезнь Грейвса, диабет 1-го типа и миастения Гравис. Было показано, что в лимфоцитах больных преобладает синтез растворимой формы, кодируемой мРНК с делецией экзона 3, в то время как синтез полноразмерной мембраносвязанной формы понижен [161].

У больных рассеянным склерозом обнаружено изменение уровня сплайс-вариантов CD45. Нуклеотидная замена 77C→G в экзоне 4 приводит к его делеции и синтезу удлинённого сплайс-варианта, обладающего способностью к димеризации, что увеличивает активность такого белка и сигналинг Т-клеточного рецептора. Полагают, что именно такая активация лежит в основе развития аутоиммунной активности Т-клеток к миелиновой оболочке нейронов. Нуклеотидная замена 138G→A в экзоне 6, напротив, приводит к увеличенному синтезу укороченного сплайс-варианта, что наблюдается в лимфоцитах пациентов с болезнью Грейвса и при некоторых других аутоиммунных заболеваниях [162].

2.8. Теломераза и роль сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT в физиологических и патологических клеточных процессах

На концах хромосом всех эукариотических и некоторых прокариотических организмов с линейной ДНК расположены теломеры – ДНК-белковые комплексы. Длина теломер уменьшается на 50 – 200 нуклеотидов при каждом цикле репликации, поэтому клетки способны делиться лишь ограниченное число раз («лимит Хэйфлика»). В 1973 г. А.М. Оловников объяснил данный феномен, предложив принцип работы счётчика делений. Его гипотеза основывалась на том, что при матричном синтезе хромосомы каждая возникшая копия должна быть короче предыдущей, и что с этим связано ограничение количества клеточных делений, возможность которых исчерпывается тогда, когда достигается критическое укорочение молекулы ДНК [163].

Теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, синтезирующий теломерные повторы ДНК концах хромосом человека. Основными компонентами теломеразы человека является hTR (Human Telomerase RNA), служащая матрицей для синтеза теломер и каталитическая субъединица hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase),

обладающая обратно транскриптазной (ОТ) активностью и осуществляющая синтез теломерных повторов на матрице hTR [164]. Реакционный цикл теломеразы схематически представлен на рис. 13.

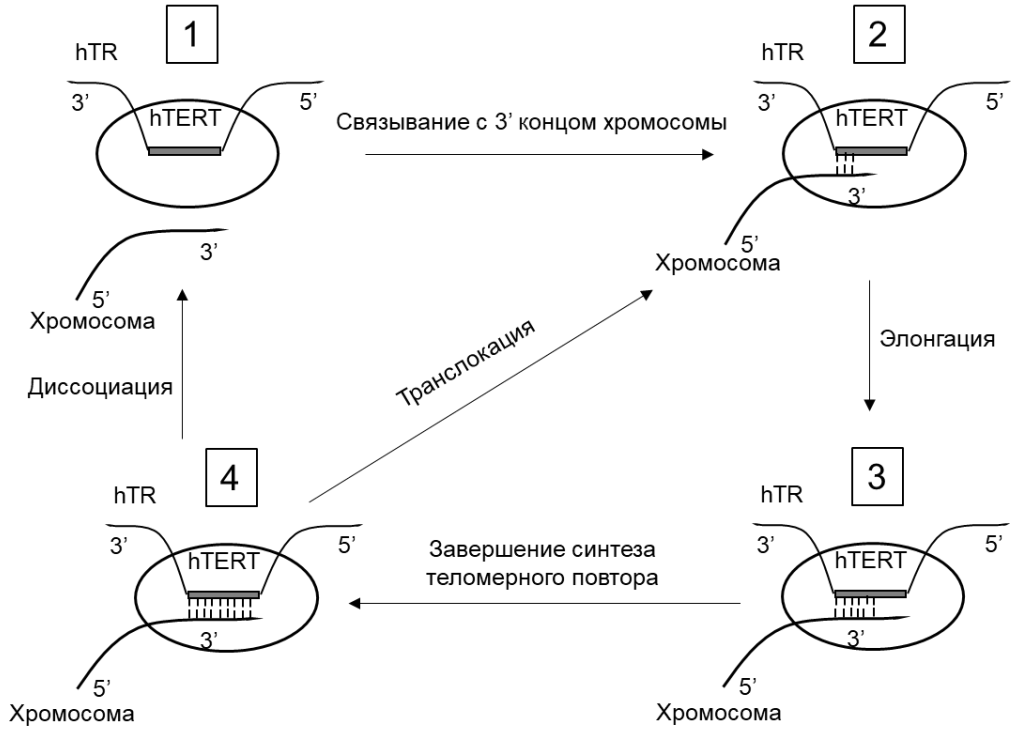


Рисунок 13. Схематическое изображение реакционного цикла теломеразы человека (по М.Э. Зверевой и соавт. [167] с изменениями). Цифрами обозначены положения теломеразы по отношению к 3' концу хромосомы на различных стадиях: 1 – теломеразный комплекс не связан с хромосомой; 2 – присоединение матрицы hTR к хромосоме; 3 – стадия элонгации, синтез теломерного повтора; 4 – завершение присоединения одного теломерного повтора, после которого теломераза способна вступать в цикл синтеза следующего теломера или диссоциировать (отделяться от хромосомы).

В соматических клетках активность теломеразы обнаружена в оплодотворённых яйцеклетках, активированных лимфацитах и некоторых стволовых клетках, а также в тканях при эмбриональном развитии [165]. В других клетках активность теломеразы детектируется на низком уровне или же не определяется совсем [166]. Полагают, что постоянное укорочение теломер в таких клетках и их последующее репликативное

старение являются барьером для злокачественной трансформации, а активация теломеразы вызывает неконтролируемый клеточный рост, что является главным признаком канцерогенеза.

90% опухолей и опухолевых клеточных линий обладают активной теломеразой, что позволяет им поддерживать длину теломер на уровне достаточной для неограниченной пролифирации, однако, существуют клетки, в которых теломеры синтезируются без участия теломеразы по альтернативному пути, основанном на рекомбинационных процессах.

В большинстве случаев теломеразная активность ограничивается уровнем экспрессии hTERT в клетке. Yi и соавт. [166] показали, что в отдельной клетке нормальных фибробластов содержится до 10 тыс. молекул hTR и, по крайней мере, в 10 раз больше в опухолевых клетках с активной теломеразой. Количество же мРНК hTERT в различных линиях опухолевых клеток варьирует от 20 до 40, на матрице которых синтезируется около 50 молекул hTERT Период полураспада молекулы hTR составляет более трёх недель, в то время как мРНК 2–3 часа [426]. Кроме того, пре-мРНК hTERT подвергается АС и, как показано, только 1–2 мРНК кодируют полноразмерную молекулу [166]. Таким образом, АС служит своего рода «регулятором точной настройки» ТА, которая не может быть достигнута только на уровне транскрипции [170]. Появляется все больше данных о функциональном значении изоформ hTERT, их влиянии на ТА, а также их роли при физиологических и патологических процессах.

2.8.1. Эндогенная регуляция активности теломеразы

Теломеразная активность зависит от количества этого фермента в клетке, что во многом определяется уровнем экспрессии генов, прежде всего генов главных субъединиц теломеразы (hTERT и hTR), представленных в геноме человека только одной копией. Время полужизни hTERT (24 ч) гораздо короче, чем у hTR (5 дней), которая присутствует в

клетке и в отсутствие теломеразной активности. Это, возможно, даёт ядерной hTR конкурентные преимущества перед другими РНК и реализацию в ядре именно теломеразной активности TERT. Другими словами, разнообразные проявления активности TERT зависят, в первую очередь, от экспрессии гена *hTERT*. Показано также, что введение гена *hTERT* в клетки приводит к появлению в них теломеразной активности и иммортализации клеток [171], а также обеспечивает выполнение других функций TERT [172].

В регуляции экспрессии гена *hTERT* участвуют многие факторы транскрипции (таблица 6). Некоторые факторы, стимулирующие экспрессию *hTERT*, могут активировать онкогены. Например, фактор STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription), который фосфорилируется киназами Src и Jak, при взаимодействии мембранных рецепторов с факторами роста и цитокинами и активирует непосредственно hTERT в нормальных и опухолевых клетках, причём STAT3 может активировать и онкогены. Амплификация хромосомного локуса, который кодирует *hTERT* или *hTR*, коррелирует с повышением уровня активного фермента в клетках и их онкотрансформацией [173].

Активировать экспрессию гена *hTERT* могут природные регуляторные пептиды, например комплекс пептидов эпифиза [174]. Известно, что метилирование ДНК приводит к снижению экспрессии генов. Однако влияние этой эпигенетической модификации на транскрипцию гена *hTERT* неоднозначно и зависит от расположения сайтов метилирования. Так, не выявлено взаимосвязи между степенью метилирования участка размером 550 п.н. гена *hTERT* (–500…+50) и уровнем экспрессии этого гена. Гиперметилирование участка –441…–218 в промоторе гена *hTERT* обнаружено во всех клеточных линиях, обладающих теломеразной активностью, а во всех негативных по

теломеразе образцах отмечено гипометилирование этого участка [175]. Причины этого явления не установлены.

Таблица 6. Регуляция экспрессии гена *hTERT* и активности теломеразы (использованы данные из источников [172,175–180])

Позитивная регуляция	**Негативная регуляция**
Транскрипционный и посттранскрипционный уровень	
Фактор транскрипции Sp1 взаимодействует с пятью GC-боксами в промоторе *hTERT* Продукт онкогена c-Myc (гомолог онкогена v) myc вируса миелоцитоматоза) взаимодействует с E-боксами промотора *hTERT* – CACGTC ER (рецептор эстрогенов) α и β NF-κB (ядерный фактор kB) активирует ген *hTERT* USF (вышележащий стимулирующий фактор) 1 и 2 взаимодействует с E-боксами в промоторе *hTERT* E6 (белок E6 папилломавируса человека типа 16) активирует *hTERT* через E-боксы и GC-боксы промотора *LANA* (ассоциированный с латентностью ядерный антиген герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши) активирует *hTERT* при взаимодействии с SP1 в промоторе *STAT3* (переносчик сигнала и активатор транскрипции) активирует экспрессию гена *hTERT* при взаимодействии с консенсусной последовательностью в его промоторе TTCNNNGAAA (три сайта), опосредует влияние факторов роста, цитокинов (интерлейкинов 6 и 2), онкогенов Метилирование промотора hTERT на участке –441…–218. Метилирование экзона 1	Опухолевый супрессор WT1 (взаимодействует с промотором гена *hTERT*) Фактор CTCF (взаимодействует с экзонами 1 и 2 гена *hTERT*) Метилирование ДНК в области промотора *hTERT* Антисмысловая РНК TERRA (содержит теломерные и суб-теломерные последовательности, ингибирует РНК-компонент теломеразы) Альтернативные транскрипты мРНК *hTERT* приводит к образованию белков со сниженной активностью или полным отсутствием активности
Посттрансляционный уровень	
Киназа Akt (фосфорилирование повышает активность теломеразы) Белок TCAB1 (осуществляет перенос РНК-компонента теломеразы в ядро) Белок TPP1 (предположительно участвует в доставке теломеразы к теломерам и увеличивает процессивность теломеразы)	Киназа c-Ab1 (фосфорилирование приводит к трехкратному снижению активности) Убиквитинирование с помощью MKRN1 приводит к деградации теломеразы Взаимодействие CHIP (C-концевой домен белка, взаимодействующего с Hsc70) с теломеразой вызывает её поли-убиквитинирование

Позднее было показано, что ген *hTERT* успешно экспрессируется, если область его промотора остаётся неметилированной. Эта область представляет собой участок гена *hTERT* (–160… –80), содержащий три из четырёх сайтов связывания фактора Sp1 – активатора транскрипции гена *hTERT* [176].

Экспрессия гена *hTERT* зависит от метилирования не только его промоторной области, но и кодирующих последовательностей. Экзоны 1 и 2 этого гена содержат сайты связывания ингибитора CTCF [179]. Если эти последовательности метилированы, то связывание ингибитора происходит с очень низкой эффективностью. Если же ДНК в районе сайтов связывания гипометилирована, то фактор CTCF взаимодействует с геном *hTERT*, что приводит к подавлению транскрипции [176].

Экспорт теломеразы из клеточного ядра приводит к снижению в нем теломеразной активности. Этому противодействует тирозинфосфатаза Shp2, способствующая тем самым продлению жизни клетки. В цитоплазме Shp2 участвует в модуляции клеточного роста, развития, тканевого воспаления, хемотаксиса. В ядре тирозинфосфатаза ассоциирована с активатором транскрипции белком STAT5. Таким же способом Shp2 затрудняет выход hTERT из митохондрий и замедляет старение, индуцируемое активными формами кислорода [181]. В условиях окислительного стресса содержание hTERT в митохондриях возрастает. В отсутствие теломеразы структура митохондрий нарушается, а содержание свободных радикалов в них увеличивается. Предполагается, что теломераза участвует в регуляции количества митохондрий в клетке. В обычных условиях фермент защищает мтДНК от повреждений и тем самым поддерживает стабильное количество органелл в клетке. В условиях окислительного стресса митохондрии с повреждённой ДНК подвергаются деградации [182].

На локализацию теломеразы оказывает влияние полифункциональный белок нуклеолин, основная функция которого состоит в регуляции транскрипции рибосомной ДНК. Нуклеолин участвует также в созревании рибосом и транспорте компонентов рибосомы из ядра в цитоплазму. Этот фосфопротеин связывает весь теломеразный комплекс посредством белок-белковых и РНК-белковых взаимодействий. В нормальных фибробластах теломераза вместе с нуклеолином локализуется в ядрышке [183]. В ядре нуклеолин участвует в регуляции клеточного цикла и транскрипции многих генов, в стабилизации теломер (путём связывания с одноцепочечными G-богатыми участками), а также в репликативном старении клеток. Вне ядра этот белок способен взаимодействовать со многими белками. Он регулирует активность факторов транскрипции и протеинкиназ, влияя таким образом на пролиферацию клеток. В гликозилированном состоянии нуклеолин образует кластеры на поверхности клеток и выполняет рецепторные функции. С его участием происходит передача сигналов факторов роста и цитокинов, а также эндоцитоз вирусных белков [183].

Среди белков шелтеринового комплекса (комплекса белков, поддерживающего трехмерную структуру теломер) с активностью теломеразы наиболее тесно связана танкираза – поли-(ADP-рибозо)-полимераза. Удлинение теломер, катализируемое теломеразой, ингибируется белком связывающим теломерные повторы TRF1, (telomere repeat binding factor 1). Танкираза 1 (TNKS1) поли-(ADP)-рибозилирует TRF1, что приводит к отделению этого белка от теломер, которые становятся доступными для взаимодействия с теломеразой. В свою очередь, функция TNKS1 регулируется путём фосфорилирования polo-подобной киназой 1 (Polo-like kinase 1 – Plk1). Отмечается прямая корреляционная связь между экспрессией генов TNKS1 и hTERT, при этом уровень экспрессии обоих генов увеличен при многих типах рака

[184]. Ингибирование TNKS1 ускоряет укорачивание теломер, вызванное подавлением теломеразной активности. Все это позволяет предполагать, что при онкологических заболеваниях наиболее успешной будет комбинированная терапия, направленная на ингибирование активности обоих ферментов. Танкиразы 1 и 2 – ферменты, участвующие в посттрансляционной модификации. Танкиразы могут взаимодействовать с различными белками, влиять на протекающие в клетке процессы, в том числе на перемещение рецептора GLUT-4, что отражается на стимулируемом инсулином поглощении глюкозы клетками, т.е. на энергетическом метаболизме. Танкиразы 1 и 2, вероятно, взаимозаменяемы в случае взаимодействия с TRF1 и IRAP (insulin-responsive aminopeptidase) [185]. Однако наличие у TNKS1 некоторых структурных особенностей позволяет специфически влиять (например, ингибировать) именно этот фермент. Таким образом, танкираза как сама по себе, так и вместе с теломеразой может служить мишенью для противоопухолевой терапии.

Некоторые особенности метаболизма, потенциальные факторы риска развития опухолевых заболеваний способствуют активации теломеразы или стимулируют её биосинтез. Белок лептин и его мембранные рецепторы играют центральную роль в регуляции массы тела, а экспрессия гена лептина коррелирует с экспрессией *hTERT* [186]. Сигналы лептина передаются преимущественно через JAK/STAT (Janus-activated Kinase/signal transducers and activators of transcription), что приводит к повышению экспрессии гена *hTERT* и продукции таких важных регуляторов клеточного цикла и выживаемости клеток, как циклин D1, c-Myc и сурвивин. В опосредуемой лептином регуляции экспрессии *hTERT* участвуют также Myc/Max/Mad, что в ряде случаев связано с ацетилированием гистонов в проксимальном участке промотора гена *hTERT* [187].

Холестерин (в составе липопротеинов) и его специфический поверхностный рецептор – Ск –вовлечён в регуляцию транскрипции *hTERT* в мононуклеарных клетках периферической крови человека. Активация этого рецептора приводит к подавлению экспрессии гена *hTERT* в результате репрессии генов c-Myc и PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ), кодирующего фактор транскрипции, вовлечённый в регуляцию адипогенеза, гомеостаза глюкозы, а также клеточной дифференцировки и пролиферации, экспрессии многих генов, связанных с канцерогенезом [188]. Следовательно, существует обратная связь между активированным рецептором холестерина и экспрессией гена *hTERT*.

Таким образом, на экспрессию *hTERT* влияют определенные метаболиты, причём преимущественно энергетического и липидного обмена. Возможно, существуют не только общие, но и тканеспецифичные механизмы активации экспрессии гена *hTERT*. Например, в $CD8^+$ Т-лимфоцитах аденозиндезаминаза повышает экспрессию генов *CD28* и *hTERT*, а аденозин, напротив, стимулирует снижение содержания CD28, уровня теломеразы, а также и ускорение клеточного старения [189]. Предполагается, что активировать теломеразу и её каталитическую субъединицу, обладающую значимыми самостоятельными биологическими активностями, можно воздействуя на экспрессию гена *hTERT* и формирование ферментативных комплексов, а также на локализацию TERT и её взаимодействие с другими компонентами клетки.

2.8.2. Варианты альтернативного сплайсинга hTERT

Ген *hTERT* человека имеет длину около 42 т.п.о. и состоит из 16 экзонов и 15 интронов. При трансляции полноразмерной мРНК синтезируется активная изоформа белка hTERT, который имеет массу 127 кДа и содержит 7 участков, характерных для обратных транскриптаз (1; 2; A; B`; C; D и E) и специфичный для теломеразы Т-участок (рис. 14). N-

концевой участок необходим для нуклеолярной локализации hTERT, взаимодействия с hTR, он ответствен за удлинение теломер. С-концевой участок отвечает за каталитическую активность фермента и его внутриядерную локализацию. В теломеразном комплексе hTERT проявляет активность в виде димеров. Олигомеризация осуществляется при взаимодействии участка 301 – 538 а.к. на N-конце одной молекулы и 914 – 1132 а.к. на С-конце другой молекулы [190].

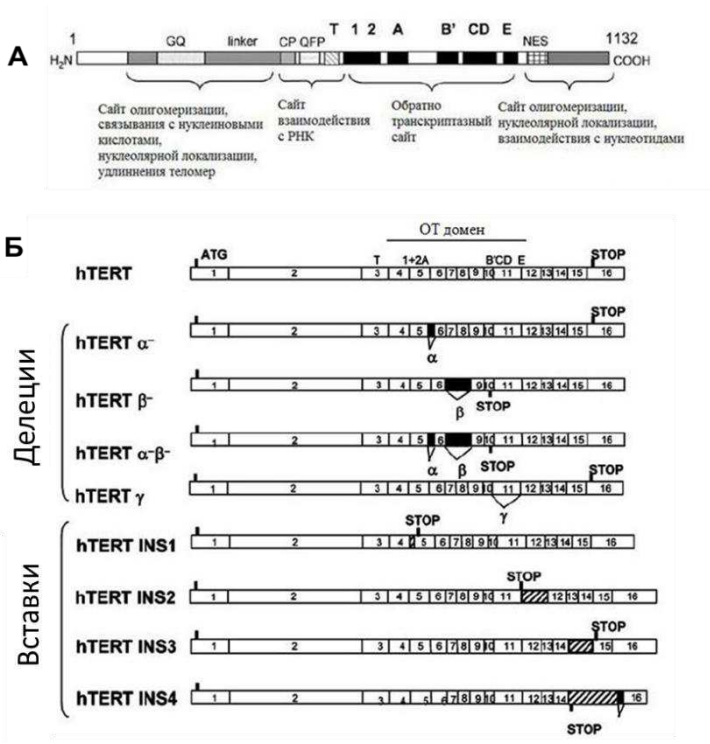


Рисунок 14. Строение молекулы hTERT. Доменное строение полноразмерного белка hTERT (А). Сплайс-варианты мРНК hTERT (Б).

На сегодняшний день известно несколько вариантов АС мРНК hTERT, представляющие собой делеции и вставки [191–193]. Такие сплайс-варианты составляют большую часть тотальной мРНК hTERT [166]. Некоторые из них встречаются в широком спектре тканей, в то время как другие являются органоспецифичными [192].

Наиболее изучаемыми вариантами АС пре-мРНК hTERT являются делеции в двух экзонах. Делеция 36 нуклеотидов в экзоне 6 (α-вариант), вызывает удаление части участка А в hTERT. В данном варианте не происходит сдвига рамки считывания, однако белок не обладает

ферментативной активностью. В варианте с β-делецией удалены 182 нуклеотида из 7 и 8 экзонов, что затрагивает участок B`. При этом происходит сдвиг рамки считывания, появление стоп-кодона в экзоне 10 и молекула белка теряет B`, C, D, и E участки на C-конце молекулы, что приводит к синтезу не активной изоформы hTERT. Вариант с γ-делецией характеризуется полным удалением 189 нуклеотидов 11 экзона без сдвига рамки. Это вызывает потерю D и E участков [194].

Помимо сплайс-вариантов с делециями обнаружено несколько мутантных форм с нуклеотидными вставками. Для формы INS1 (insertion 1) характерно наличие дополнительных нуклеотидов в интроне 14. В INS2 частично замещен интрон 11. INS3 имеет 15 дополнительных нуклеотидов в интроне 14, а INS4 имеет полную замену экзона 15 и 5` участка экзона 16 на 600 нуклеотидов интрона 14 [195].

Ни одна из сплайс-форм не обладает активностью сравнимой с таковой полноразмерной формы hTERT. Тем не менее, некоторые данные свидетельствуют об участии изоформ в физиологические и патологические клеточные процессы.

Каталитические свойства сплайс-форм hTERT с α– и β– делециями были детально изучены в различных клеточных линиях. Было показано, что α–β+ вариант обладают доминантно-негативным эффектом. Повышенный синтез такой изоформы вызывает значительное снижение активности теломеразы, укорочение теломер, переход клеток в состояние репликативного старения и апоптоз [196]. Хотя сплайс-формы hTERT обнаруживаются во множестве клеточных линий различных типов, их относительные пропорции различаются весьма сильно. В общем, α+β– изоформа синтезируется на большем уровне, в то время как изоформа с α– делециями синтезируется менее всех. В различных опухолевых клетках количество полноразмерного α+β+ варианта различается весьма сильно [197]. Также следует отметить, что данные категории АС

вариантов могут содержать прочие варианты сплайсинга в других местах транскрипта hTERT [166].

Механизм регуляции АС пре-мРНК hTERT изучен весьма слабо. На большинстве мест соединения интронов и экзонов располагаются консервативные 3’ – 5’ сплайсинговые последовательности AG-GT. Однако, экзон 8, делеция которого соответствует β– изоформе, окружён не консервативными сплайсинговыми последовательностями AG-AG и AA-GT [195]. Показано, что белки семейства SR и hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) участвуют в процессе сплайсинга, конкурируя за сайт связывания. Повышенный синтез белков SRSF11 (serine/arginine-rich splicing factor 11) увеличивает, а синтез hnRNPL (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L) и hnRNPH2 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2) снижает уровень α+β– варианта [194]. TGFβ1 (transforming growth factor, beta 1) также участвует в регуляции АС увеличивая экспрессию α+β– и уменьшая α+β+, что вызывает снижение активности теломеразы [198].

2.8.3. Связь АС пре-мРНК hTERT с теломеразной активностью и длиной теломер

В опухолях и клеточных линиях прослеживается хорошая корреляция между экспрессией тотальной мРНК hTERT и активностью теломеразы [199]. Однако, к подобным данным, нужно относиться осторожно по ряду причин. Во-первых, активность теломеразы, тесно связанная с клеточным циклом: увеличивается, когда клетки вступают в S-фазу и уменьшается, когда клетки находятся в стационарной фазе [200]. Во-вторых, для количественного определения мРНК hTERT используются разные методы, что делает проблематичным прямое сравнение различных экспериментальных данных [197]. В-третьих, механизм регуляции экспрессии, вероятнее всего, имеет тканевую специфичность, потому такие процессы как деградация белков

теломеразного комплекса и системы сплайсинга будут различаться в различных органах и по-разному влиять на сплайсинг [166,180].

В ряде работ показано, что активность теломерзы абсолютно зависит от экспрессии полноразмерной формы hTERT, но не других сплайс-форм [166,194,197,201]. В клетках меланомы, рака лёгких [202]и рака молочной железы [194,202] обнаружена обратная зависимость между экспрессией β– варианта и активностью теломеразы. α–β+ вариант является минорным, но может играть роль в негативной регуляции активности теломеразы при раке лёгких и нормальных клетках печени [201,202]. Однако, обнаружена положительная зависимость уровня активности теломеразы от других сплайс-вариантов, правда, не всегда статистически достоверная и не подтверждаемая во всех исследованиях [191,203,204].

Большой интерес вызывает анализ корреляции между АС вариантов и активностью теломеразы внутри одной клеточной линии или ткани при клеточной дифференциации, различных стадиях развития или канцерогенезе. Было обнаружено, что некоторые линии опухолевых и нормальных клеток яичников и матки с альтернативным удлинением теломер синтезирует α+β– вариант без экспрессии полноразмерной формы. Ulaner и соавт [205] наблюдали динамику изменения сплайс-вариантов в сердце, печени и почках эмбрионов. Активность теломеразы зависела от ткани и периода развития, отсутствовала в тканях при незначительной экспрессии полноразмерной hTERT при постоянной экспрессии α+β– варианта. Это может указывать на возможность присутствия альтернативного способа удлинения теломер в эмбриональных тканях [205]. Искусственная дифференцировка стволовых клеток вызывает незамедлительное снижение активности теломеразы и сопровождается значительным уменьшением общей hTERT [206] при

этом существенно увеличивается экспрессия α+β– варианта и снижается количество полноразмерной формы [166,207].

Механизм регуляции активности теломеразы при помощи АС может служить для поддержания длины теломер в нормальных клетках с неограниченной пролиферацией и низкой активности теломеразы, как, например, в гематопоэтических стволовых клетках [180]. Эти данные позволяют говорить о том, что доминирующая форма hTERT играет регуляторную роль, однако, не понятно является ли это следствием снижения экспрессии полноразмерного варианта или же ингибирующего действия сплайс-вариантов.

Роль сплайс-вариантов hTERT в регуляции активности теломеразы до конца не известна, а разнообразие качественных и количественных методов измерения мРНК hTERT затрудняет интерпретацию результатов. Barclay и соавт. [208] анализировали уровни активности теломеразы и сплайс-вариантов hTERT при аденокарциноме желудка и пищевода и не нашли зависимости между активностью теломеразы и экспрессией сплайс-вариантов, поскольку наблюдался очень большой разброс этих показателей у различных индивидумов. Такой результат может свидетельствовать об отсутствии регуляции активности теломеразы в результате АС в этих опухолях [208]. В опухолевых тканях лёгких при сравнении с нормальной ткагью, наблюдалось увеличение активности теломеразы и уровня всех вариантов АС, но не происходило значительного изменения пропорций вариантов [201]. В злокачественных тиреоидных опухолях, по сравнению с доброкачественными, обнаружено значительное увеличение полноразмерной формы, что коррелировало с повышенной активностью теломеразы и длиной теломер [207]. В образцах интерэпителиальной неоплазии матки и шейки матки не было обнаружено зависимости между активностью теломеразы и уровнем сплайс-вариантов hTERT. В работе Zaffaroni и соавт. [209] проведено

сравнение экспрессии сплайс-вариантов hTERT в доброкачественных и злокачественных опухолях молочной железы и обнаружили присутствие α+β– варианта только в карциномах, включая те образцы, которые не обладали теломеразной активностью, что может говорить о функциональном значении данной формы для этих опухолей. Наблюдалась повышенная экспрессия α+β– варианта при циррозе и ранних этапах канцерогенеза печени. Экспрессия α+β– варианта обнаружена в нормальной ткани почек в карциноме почек, в то время как полноразмерный вариант определялся только в образцах опухоли [210].

Данные о роли АС hTERT в эмбриональном развитии также весьма противоречивы. В почках эмбрионов с экспрессией α+β– формы и отсутствием теломеразной активности длина теломер значительно ниже, чем в соответствующей клеточной линии [205]. В клетках меланомы и рака молочной железы не обнаружено корреляции между длиной теломер экспрессией сплайс-вариантов hTERT [194,203]. В мононуклеарных клетках крови человека с острой миелоидной лейкемией длина теломер не коррелировала с уровнями сплайс-вариантов hTERT, однако, в мононуклеарных клетках пациентов с хронической лимфобластной лейкемией экспрессия сплайс-вариантов была обратно пропорциональна длине теломер [211].

2.8.4. Функции АС вариантов hTERT и теломеразы, не связанные с удлинением теломер

Изучение механизма действия теломеразы показало, что функции hTERT имеют ряд эффектов, свойственных не только опухолевым клеткам, и не относящиеся к удлинению теломер. Экстрателомерные функции hTERT условно можно разделить на зависящие и не зависящие от каталитической активности (см. табл. 7).

Появляется всё больше данных о роли hTERT в репарации ДНК. Внутри хромосом человека и грызунов располагаются участки подобные

микросателлитам, содержащие теломерные повторы [212]. Теломераза способна восстанавливать повреждения ДНК в таких участках. И хотя вероятность повреждения ДНК во внутрихромосомных теломерных последовательностях достаточно низка, эффект репарационного действия теломерзы доказан. Клетки с неактивным hTERT или мутантными формами TERT, обладающими каталитической активностью, но не способными связываться с теломерами и удлинять их, обладали пониженной активностью репарации ДНК [212].

Таблица 7. Классификация функций hTERT

Функция	**Зависимость от каталитической активности**	**Ссылки**
Удлинение теломер	Зависимая	[164,213,214]
Активация репарации ДНК	Зависимая	[212]
Стимуляция клеточного роста	Зависимая	[215]
Участие в функционировании митохондрий при окислительном стрессе	Зависимая	[182,216]
Ингибирование апоптоза	Независимая	[217]
Стимуляция пролиферации стволовых клеток	Независимая	[218]

hTERT также способна активировать клеточную пролиферацию, вызывая активацию рецептора EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) в эпителиальных клетках молочной железы и задействован в TGF-β сигнальном каскаде в первичных мышиных клеточных линиях [215]. Кроме того, стимулирование клеточного роста наблюдалось при отсутствии удлинения теломер [219].

Молекула hTERT способна функционировать в качестве регулятора клеточного гомеостаза, минимизируя воздействие патогенных факторов окружающей среды на организм. Увеличенный синтез при экзогенном внедрении белка hTERT вызывает повышение устойчивости клеток к действию различных стрессорных факторов, таких как активные формы

кислорода [216], гипоксия и гипероксия, токсичные молекулы различной химической природы, ненормальные условия роста [220]. Эти наблюдения подтверждаются экспериментами, в которых ингибирование hTERT вызывало снижение устойчивости опухолевых клеток и мышей к действию стрессорных факторов [221]. Повышенный синтез hTERT приводит к ингибированию апоптоза, вызванного различными токсичными агентами [222]. Сообщается, что активированная теломераза вызывает ингибирование апоптоза по TRAIL-индуцированному пути [223]. Также имеются данные о том, что молекула hTERT способна ингибировать p53-активированный апоптоз, даже при отсутствии теломеразной активности [217]. Внедрение гена *hTERT* в фибробласты легких IMR-90 приводит к повышению их устойчивости к действию гепатотоксических агентов: CCl_4, *трет*-бутилгидропироксида и D-галактозамина. Такие клетки более устойчивы к хромосомным нарушениям, вызванным ионизирующей радиацией [224]. Также сообщается об воздействии hTERT в клетках без активной теломеразы на двуцепочечные повреждения ДНК [212]. Однако доказательств связи ДНК-репарирующей системы с теломеразой пока нет.

Основной механизм развития клеточного гомеостаза при синтезе hTERT заключается в способности данного белка контролировать транскрипцию множества генов [225]. Показано, что hTERT входит в состав комплекса WNT/APC/β-catenin (wingless-type MMTV integration site family/adenomatous polyposis coli/β -cadherin-associated protein) регулирующего транскрипцию многих генов [226]. Вероятно, повышенный синтез hTERT повышает экспрессию генов, кодирующих белки, непосредственно отвечающих за удаление или разрушение токсичных молекул, а также апоптотические белки. К таким белкам следует отнести молекулярные шапероны (белки теплового шока),

глутатион-S-трансферазу, P-гликопротеин, систему белков BAX/BCL2 (B-cell CLL lymphoma 2 / BCL2-associated X protein) и др.

Одним из наиболее интересных открытий явилось то, что функции hTERT определяются не только ядерной локализацией. Ранее считалось, что большая часть hTERT локализована внутри ядра и в цитоплазме и взаимодействует с теломерами только при репликации [227]. Оказалось, что молекула hTERT имеет аминокислотную последовательность для проникновения в митохондрии, однако, её роль в митохондриях до сих пор не известна. Santos и соавт. [228] наблюдали зависимое от каталитической активности hTERT увеличение оксидативного повреждения митохондриальной ДНК (мтДНК). Возможной причиной такой активности hTERT является её способность и вызывать апоптоз в стволовых клетках с повреждённой ДНК, что поддерживает неизменность популяции стволовых клеток [182].

Показано, что hTERT выходит из ядра в присутствии свободных радикалов. Ahmed и соавт. [216] показали снижение повреждения ядерной ДНК при окислительном стрессе фибробластов, экспрессирующих hTERT, что говорит о её защитной роли. Авторы также установили, что окислительный стресс вызывает переход 80–90% всех молекул hTERT из ядра в митохондрии и оставшаяся в ядре теломераза не способна увеличивать теломеры. Возвращение hTERT в ядро восстанавливает длину теломер. Предположительно, hTERT напрямую взаимодействует с мтДНК, перераспределяясь из ядра в митохондрии в момент этого взаимодействия [216].

К некаталитическим функциям hTERT относят антиапоптотический эффект. Первым свидетельством этого явилась устойчивость клеток с hTERT неблагоприятным условиям культивирования таким как гипоксия, гипероксия и недостаток питательных веществ, по сравнению с клетками альтернативным механизмом удлинения теломер. Пребывание клеток в

условиях гипоксии вызывает увеличение экспрессии α+β– и уменьшение α+β+ изоформ, что приводит к уменьшению активности теломеразы [229]. Условия с пониженным содержанием кислорода являются нормальным состоянием в развитии опухолей. В раковых клетках происходит сдвиг в направлении анаэробного метаболизма, в частности, увеличение роли анаэробного гликолиза (эффект Варбурга). Эффект Варбурга включает в себя активацию множества белков, в т.ч. и теломеразы, которая, как полагают, направлена на увеличение выживаемости опухолевых клеток при неблагоприятных условиях. Ингибирование апоптоза hTERT происходит по неизвестному механизму, но при этом блокируется его митохондриальный и рецепторный пути активации [230,231]. Показано, что hTERT ингибирует апоптоз при различных видах нейрональных повреждений и коррелирует с экспрессией каталитически неактивных АС форм [217]. Listerman и соавт. [194] обнаружили, что повышенная экспрессия полноразмерной формы hTERT и α+β– варианта в линиях рака молочной железы вызывает снижение активации каспаз 3 и 7 после инкубации с цисплатином, что говорит о сохранении антиапоптотической активности α+β– формы. Такая активность также приводит к блокированию митохондриального и рецептор-опосредованного апоптоза, что согласуется с локализацией варианта с β–делециями в митохондриях [194]. Однако, не совсем ясно, какая именно часть hTERT и какие именно АС варианты ответственны за этот эффект.

Нокаутные по гену *TERT* мыши без активной теломеразы и с короткими теломерами имели дегенеративные повреждения кожи и слабый рост шерсти из-за пониженной пролиферации эпидермальных стволовых клеток. Восстановление активности теломеразы вызывало активацию стволовых клеток и восстановление кожного покрова и волосяных фолликул [218]. Полагают, что низкая теломеразная активность в стволовых клетках предотвращает укорочение теломер,

однако, показано, что сверхэкспрессия hTERT в гематопоэтических стволовых клетках не увеличивает скорость удлинения теломер. Такой эффект предполагает наличие весьма чувствительного механизма регуляции активности теломеразы [232]. Наиболее вероятным является АС пре-мРНК hTERT. Наличие экстрателомерных функций hTERT и теломеразы может объяснить экспрессию этого белка в нормальных тканях. Однако, функции каждой из изоформ следует изучить более детально. Hrdlickova и соавт. [193] показали, что сплайс-вариант hTERT с делецией экзонов 3–14 и отсутствием теломеразной активности экспрессируется в различных тканях и клеточных линиях. Повышенная экспрессия такой формы в клетках с активной теломеразой и без неё вызывала увеличение клеточной пролиферации, а нокаут при помощи РНК интерференции значительно снижал пролиферацию и влиял на клеточный цикл в клетках с альтернативным удлинением теломер [232]. Активные и неактивные формы hTERT способны активировать Wnt (wingless-type MMTV integration site family) сигнальный путь, действуя в качестве транскрипционного фактора в β-катениновых комплексах. Вариант с делецией экзонов 4–13 также увеличивал сигналлинг Wnt в клетках с активной теломеразой и без неё и активация была слабее у полноразмерной hTERT [193].

2.8.5. Клиническое значение сплайс-вариантов hTERT при опухолевых заболеваниях

Высокая активность теломеразы при некоторых типах рака является неблагоприятным прогностическим фактором [233]. Всего несколько работ посвящено изучению связи сплайс-вариантов hTERT с гистологическими и клиническим параметрами. Такие исследования осложняются различной чувствительностью диагностических методов, большим различием уровней экспрессии сплайс-вариантов у индивидумов и затруднением интерпретации результатов. В общем, более

агрессивные злокачественные опухоли экспрессируют больше полноразмерной hTERT, чем менее агрессивные или доброкачественные [194,201,207,233]. В линиях клеток рака молочной железы экспрессия полноразмерной формы hTERT была значительно выше в базальном (связан с плохим клиническим прогнозом), чем люминальном (связан с хорошим клиническим прогнозом) подтипе. Экспрессия β– изоформ показала обратную зависимость [194]. В опухолях лёгких отсутствовала корреляция экспрессии АС вариантов со степенью дифференциации, стадией заболевания и метастазами в лимфатические сосуды. При острой миелоидной лейкемии экспрессия полноразмерной hTERT коррелировала со стадией заболевания и была выше у пациентов с прогрессирующей формой [233].

Таким образом, каталитическая субъединица теломеразы hTERT регулируется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. АС пре-мРНК hTERT обнаружен во всех клетках человека независимо от наличия в них теломеразной активности. Каталитической активностью обладает только полноразмерная форма hTERT, которая участвует в элонгации теломер. Биологическая роль и клиническое проявление других АС вариантов hTERT до конца не изучена, поскольку не удаётся обнаружить связь экспрессии того или иного сплайс-варианта с каким-либо биологическим процессом. Однако, установлено, что сплайс-варианты hTERT не обладающие теломеразной активностью, функционируют как доминантно-негативные варианты, приводящие к снижению теломеразной активности в клетке в целом. Появляется все больше данных, описывающих эффекты hTERT, не связанные с удлинением теломер, и роли сплайс-вариантов в таких процессах отводится все больше внимания. Выяснение биологической роли изоформ hTERT и механизма и регуляции АС является важным для понимания развития физологических и патологических клеточных процессов.

2.9. Роль апоптотических эндонуклеаз в процессе клеточной гибели

Нормальное развитие многоклеточных организмов сопряжено с процессами программируемой клеточной гибели. Одним из последних и необратимых этапов данного процесса является функционирование апоптотических эндонуклеаз, которые гидролизуют ДНК – (дезоксирибонуклеазы, ДНКазы). У человека обнаружено два семейства ДНКаз в зависимости от биохимических свойств и степени гомологии: Семейство ДНКазы 1 (или ДНКазы 1-го типа), в которое входят собственно ДНКаза 1 (DNase I, deoxyribonuclease 1), DNase 1L1 (deoxyribonuclease 1 like 1), DNase 1L2 (deoxyribonuclease 1 like 2), DNase 1L3 (deoxyribonuclease 1 like 3); и семейство ДНКазы 2 (или ДНКазы 2-го типа): DNase2a (deoxyribonuclease 2 alpha), DNase2b (deoxyribonuclease 2 beta) и L-DNaseII (L-deoxyribonuclease II). Отдельно выделяют эндонуклеазу EndoG (Endonuclease G), которая обладает способностью гидролизовать как ДНК (ДНКазная активность), так и РНК (РНКазная активность) и является только Mg^{2+}-зависимой, а также Mg^{2+}-зависимую DFFB (DNA fragmentation factor subunit beta), являющуюся гомологом ДНКазы CAD (Caspase-activated DNase). ДНКазам 1-го типа для проявления нуклеазной активности необходимо присутствие катионом Ca^{2+} или Mg^{2+}. Их максимум активности наблюдается при нейтральном pH. Гидролиз ДНК осуществляют по 5’-фосфатным группам. ДНКазы семейства 2 не нуждаются в двухвалентных катионах, проявляют максимум активности при кислом значении pH и осуществляет гидролиз ДНК по 3’-фосфатным группам. Следует отметить, что ДНКаза L-DNaseII образуется в результате трансформации ингибитора сериновых протеаз серпина B1, также называемого LEI (Leukocyte elastase inhibitor) [234]. Большое разнообразие апоптотических эндонуклеаз и различие уровней их экспрессии в клетках различных типов позволяет регулировать

уровень нуклеазной активности в различных органах и тканях (таблица 13).

DNase I является ДНКазой с наибольшим уровнем экспрессии среди различных клеток и тканей [235]. Наибольший уровень экспрессии обнаружен в экзокринных клетках пищеварительного тракта. DNase I также присутствует в крови, где, как полагают, деградирует свободно циркулирующую ДНК. В крови также обнаружена присутствие DNase 1L3, которая секретируется миелоидными клетками печени и селезёнки, а также дендридными клетками и макрофагами. DNase 1L2 экспрессируется преимущественно скелетными мышцами и кардиомиоцитами. Высокий уровень экспрессии DNase 1L2 обнаружен в кератиноцитах [236].

В отличие от тканеспецифичной экспрессии ДНКаз первого семейства, экспрессия DNase2a и L-DNaseII обнаружена практически во всех типах тканей, что вероятнее всего объясняется её синтезом макрофагами, а не клетками различных типов. Высокие уровни DNase2b определяются в слюнных железах и лёгких, а также хрусталике глаза [237].

Интересна функция EndoG. В отличии от других апоптотических эндонуклеаз, в момент повреждения ДНК EndoG локализуется в митохондриях [238]. Белок EndoG синтезируется в цитоплазме в виде про-пептида размером 32 кДа, который транслоцируется в митохондрии благодаря наличию сигнального пептида [14,239] и хранится в межмембранном пространстве [238]. Про-белок EndoG неактивен [240]. Сигнальный пептид отщепляется при проникновении в митохондрии и зрелый белок, размером 27 кДа, может беспрепятственно покидать митохондрии при развитии апоптотических процессов. Полагают, что в митохондриях EndoG принимает необходима для расщепления митохондриальной ДНК (мтДНК) [241,242], синтезирует праймеры-

затравки при репликации мтДНК [239] и модулирует синтез мтДНК, влияя на её стабильность и/или транскрипцию [243]. При апоптозе EndoG транслоцируется в ядро, где осуществляет гидролиз полиG-полиC последовательностей ДНК [244], действуя по каспаз-независимому механизму [245]. На рис. 15 схематически изображены основные функции EndoG в норме и при апоптозе.

Изменение активности различных ДНКаз наблюдается при ряде патологий (таблица 8).

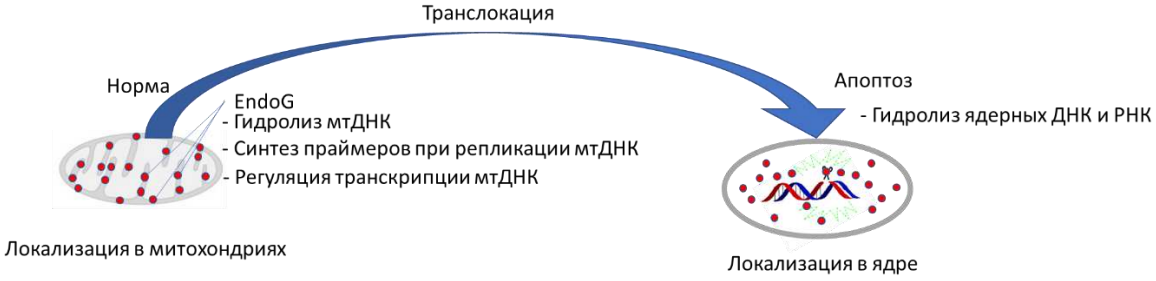


Рисунок 15. Схематическое изображение функций EndoG в норме и при апоптозе. В норме EndoG локализуется в межмембранном пространстве митохондрий, где ряд функций: гидролиз мтДНК при её необратимом повреждении, синтез праймров-затравок при репликации мтДНК или же принимает участие в транскрипции мтДНК. При развитии апоптоза EndoG транслоцируется в ядра и цитоплазму клеток, где осуществляет гидролиз ДНК и РНК.

Enari M. и соавт. впервые показали, что с гена *DNaseI* синтезируется несколько транскриптов (сплайс-вариантов) [254]. Однако их физиологическое значение изучено не было. В своей работе Basnakian A.G. и соавт. продемонстрировали изменение уровней сплайс-вариантов экзона 1 мРНК DNaseI в почках крыс после ишемии/реперфузии [255]. Появление данных сплайс-вариантов сопровождалось увеличением нуклеазной активности в ткани почек. Полагают, что такие изменения имеют отношение к регуляции гибели клеток почек. Механизм появления данных сплайс-вариантов остаётся пока неизученным.

Таблица 7. Биохимические свойства ДНКаз и патологии, связанные с их дисфункцией.

Нуклеаза	**Оптимальная pH**	**Продукты расщепления**	**Ca^{2+}/Mg^{2+} зависимость**	**Патология**	**Основные экспрессирующие ткани**	**Основной тип клеток**	**Локализация**	**Ссылки**
DNase1	Нейтральная	3’OH-5’P	Есть	Системная красная волчанка	Слюнные железы, почки, кишки	Экзокринные клетки, клетки Панета	Секретируемая форма	[246]
DNase1L1	Нейтральная	3’OH-5’P	Есть	Болезнь Помпе мышечная слабость	Сердечная и скелетные мышцы	Миоциты	Наружная поверхность, лизосомы	[247,248]
DNase1L2	Кислая	3’OH-5’P	Есть	Паракератоз; Псориаз	Эпидермис	Кератиноциты	Эндоплазматический ретиккулум	[247,249]
DNase1L3	Нейтральная	3’OH-5’P	Есть	Системная красная волчанка у детей	Селезёнка, печень	Макрофаги, дендритные клетки	Секретируемая форма, ядра	[247,250]
DNase2a	Кислая	3’P-5’OH	Нет	Смерть плода; ревматоидный артрит; волчаночный нефрит	Большинство тканей, костный мозг	Макрофаги	Лизосомы	[251]
Dnase2b	Кислая	3’P-5’OH	Нет	Катаракта	Хрусталик глаза, слюнная железа, лёгкие	Клетчатка	Лизосомы	[252]
L-DNaseII	Кислая	3’P-5’OH	Нет	Чувствительность к *Pseudomonas*	Костный мозг	Нейтрофилы	Ядро	[252,253]
CAD	Нейтральная	3’OH-5’P	Mg^{2+}	Рак	Повсеместно	Повсеместно	Ядро	[252]
EndoG	Нейтральная; основная	3’OH-5’P	Mg^{2+}	Гипертрофия сердца	Повсеместно	Повсеместно	Митохондрии и ядро	[252]

2.10. Регуляция АС пре-мРНК каспазы-2

Каспаза-2 (Casp-2, caspase 2) является наиболее эволюционно консервативной каспазой, которая участвует не только в инициации апоптоза, но и в реакции клеток на повреждение ДНК. Кроме того, она функционирует в качестве опухолевого супрессора. Активация Casp-2 индуцируется путём её олигомеризации и частичного протеолиза. Обнаружено два сплайс-варианта Casp-2: полноразмерный Casp-2L (Long), обладающий про-апоптотической активностью и укорочесснный Casp-2S (Short), проявляющий противо-апоптотическую активность. Короткий сплайс-вариант образуется в результате включения альтернативного экзона 9, что приводит к появлению преждевременного стоп-кодона [256]. АС пре-мРНК Casp-2 регулируется несколькими регуляторными белками. Белки SRSF1 и SRSF2 катализируют делецию экзона 9 и образование Casp-2L транскрипта, а белок hnRNP A1 способствует делеции экзона 9. Было показано, что другой белок этого семейства PTBP (Polypyrimidine tract binding) связывается с цис-элементом ниже экзона 9 и ингибирует вставку экзона в конечный мРНК транскрипт. Делеция экзона 9 также стимулируется белком SRSF3, который связывается с экзоном 8 [257].

2.11. Функциональное значение альтернативного сплайсинга пре-мРНК генов семейства BCL-2

Многие физиологические, фармакологические и экологические факторы способны индуцировать апоптоз. Несмотря на огромные структурное и функциональное разнообразие инициирующих факторов, в нисходящих сигнальных каскадах задействованы общие пути активации апоптоза. Одними из критических факторов, способных ускорять или замедлять течение данного процесса являются белки семейства белки семейства Bcl-2. Данное семейство включает в себя структурно и функционально родственные белки, обладающие как анти-апоптотическими свойствами (Bcl-

2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1 и Bcl-w), так и Bax, Bcl-XS, Bad, Bak, Bik, Bid, Bim, Bcl-G, Bok, Puma и Noxa [258]. Все эти белки содержат от 1 – 4 гомологичных домена BH (Bcl-2 homolog domains, BH1, BH2, BH3, BH4). В большинстве белков также присутствует гидрофобный мембранный домен на С-конце молекулы. Данный домен необходим для прикрепления белка к мембранам митохондрий, ядра и эндоплазматической сети. Точный механизм действия данных белков на апоптотические процессы до конца не изучен. Полагают, что процесс димеризации этих белков является ключевым регулятором их активности. Было показано, что домен BH3 ответствен за димеризацию и развитие про-апоптотической активности. Открытие способности BCL-2 образовывать комплексы с BAX явилось важным шагом к пониманию функционирования данных белков [259]. Относительные количества анти-апоптотических и про-апототических белков данного семейства являются индикаторами устойчивости клеток к апоптотическим стимулам.

Открытие множества сплайс-вариантов почти каждого белка семейства Bcl-2 добавляет ещё один уровень регуляции их апоптотической активности. В таблице 8 обобщена информация о влиянии сплайс-вариантов белков семейства Bcl-2 на апоптотические процессы. Два сплайс-варианта BCL-2 α и β отличаются лишь аминокислотной последовательностью на С-конце молекулы. Полноразмерный вариант BCL-2α содержит гидрофобный трансмембранный домен, что позволяет ему взаимодействовать преимущественно с мембранами митохондрий. Данный вариант является ингибитором апоптоза. Сплайс-вариант BCL-2β не содержит трансмембранного домена, локализуется преимущественно в цитозоле и не способен ингибировать развитие апоптотических процессов при различных стимулах [260].

Таблица 8. Общая характеристика сплайс-вариантов мРНК генов семейства *Bcl-2*.

Ген	Сплайс-вариант	Количество аминокислот	Размер белка (кДа)	Домены белка	Влияние на апоптоз	Внутриклеточная локализация	Ссылки
***Bcl-2* (B-cell Leukemia/Lymphoma 2)**	Bcl-2α Bcl-2β	239 205	26 22	BH1, 2, 3, 4, TM BH1, 2, 3, 4	Ингибитор Нет данных	Митохондрии Цитоплазма	[263]
***Bcl-X* (BCL2 like 1)**	Bcl-xL Bcl-xS Bcl-xβ	233 170 227	31 19 26	BH1, 2, 3, 4, TM BH3, 4, TM BH1, 2, 3, 4, TM	Ингибитор Активатор Нет данных	Митохондрии Митохондрии НИ	[264]
***Mcl-1* (Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 apoptosis regulator, BCL2 family member)**	Mcl-1_L Mcl-1_S	350 271	38 30-35	BH1, 2, 3, TM BH3	Ингибитор Активатор	Митохондрии Нет данных	[265]
***Bfl-1* (BCL2 related protein A1)**	Bfl-1_L Bfl-1_S	175 163	20 19	BH1, 2, 3, 4, TM BH1, 2, 3, 4	Ингибитор Ингибитор	Митохондрии Ядро	[266]
***Bax* (BCL2 associated X, apoptosis regulator)**	Baxα Baxβ Baxγ Baxδ Baxε Baxω Baxσ Baxψ	192 218 41 143 164 221 179 172	21 24 5 16 18 24 20 19	BH1, 2, 3, TM BH1, 2, 3 - BH1, 2, TM BH1, 3 BH1, 2, 3 BH1, 2, 3, TM BH1, 2, 3, TM	Активатор Активатор Нет данных Нет данных Активатор Активатор Активатор Активатор	Митохондрии Цитозоль Нет данных Нет данных Нет данных Нет данных Митохондрии Митохондрии	[267]

Обозначения доменов: BH – Bcl-2 homolog domains (домен гомологичный Bcl-2); TM – C-terminal hydrophobic transmembrane domains (С-концевой гидрофобный трансмембранный домен).

Таблица 8. (продолжение).

Ген	Сплайс-вариант	Количество аминокислот	Размер белка (кДа)	Домены белка	Влияние на апоптоз	Внутриклеточная локализация	Ссылки
***Bim* (BCL2 like 11)**	Bim_L Bim_S Bim_{EL} Bimα_1 Bimα_2 Bimβ_1 Bimβ_2 Bimβ_3 Bimβ_4 Bimγ	140 110 196 169 109 135 135 75 45 112	19 15 23 19 12 14 14 8 5 15	BH3, TM BH3, TM BH3, TM BH3 BH3 - - - - BH3	Активатор Активатор Активатор Активатор Активатор Нет данных Нет данных Нет данных Нет данных Активатор	Митохондрии Митохондрии Митохондрии Митохондрии Митохондрии Цитозоль Цитозоль Цитозоль Цитозоль Внутриклеточная	[268]
***PUMA* (BCL2 binding component 3)**	PUMA-α PUMA-β	193 131	25 16	BH3 BH3	Активатор Активатор	Митохондрии Митохондрии	[269]
***Bcl-G* (BCL2 like 14)**	$Bcl\text{-}G_L$ $Bcl\text{-}G_S$	327 252	37 28	BH2, 3 BH3	Активатор Активатор	Цитозоль Митохондрии	[270]
***Bcl-rambo* (BCL2 like 13)**	Bcl-rambo Bcl-ramboβ	485 104	85 12	BH1, 2, 3, 4, TM BH4	Активатор Активатор	Митохондрии Цитозоль	[271]
***Bid* (BH3 interacting domain death agonist)**	Bid_L Bid_S Bid_{ES} Bid_{EL}	195 137 99 242	22 15 11 27	BH3B, BH3 BH3B, - BH3B, BH3,	Активатор Ингибитор Ингибитор / Активатор Активатор	Цитозоль Цитозоль Митохондрии Комплекс Гольджи/ Митохондрии	[272]

Известны три сплайс-варианта BCL-x, которые также отличаются по своим функциям [261]. Полноразмерный вариант BCL-xL содержит все четыре BH-домена и С-концевой домен, локализуется в митохондриях и проявляет противо-апоптотическую активность. В укороченном сплайс-варианте BCL-xS отсутствуют 63 аминокислоты, кодирующие BH1- и BH2-домены, в результате АС 5'-сплайс-сайта первого экзона пре-мРНК. Данный сплайс-вариант функционирует в качестве про-апоптотического [261]. Третий сплайс-вариант BCL-xβ образуется в результате включения интрона перед экзоном 3 в конечный мРНК транскрипт и появления нового стоп-кодона. Функциональное значение данного сплайс-варианта не изучено [262].

2.12. Механизмы супрессии эффекторных лимфоцитов регуляторными Т клетками

Регуляторные Т-клетки (Трег) $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ играют важную роль в поддержании адаптивного иммунного ответа и иммунологической толерантности, подавляя активность эффекторных Т- и В-лимфоцитов и NK-клеток человека. Трег регулируют продолжительность и силу иммунного ответа. Нарушение регуляторной функции Трег является одной из причин развития и прогрессирования аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз, системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит и др.), аллергических реакций и хронических воспалительных процессов [273]. По современным представлениям, Трег способны влиять на эффекторные клетки двумя основными путями: контактным и бесконтактным.

2.12.1. Ингибирование секреции IL-2

Одним из наиболее изученных, среди множества механизмов действия Трег является ингибирование транскрипции интерлейкина 2 (IL-2) в $CD4^+$ Т-клетках [274]. При активации через рецептор TCR (T cell receptor) эффекторные $CD4^+$ Т-клетки клетки быстро синтезируют IL-2, а также другие про-воспалительные цитокины, такие как INFy (Interferone gamma), TNFa

(Tumor necrosis factor alpha) и IL-6 (интерлейкина 6). IL-2 является критическим фактором развития и активации как FoxP3 (Forkhead box P3) эффекторных клеток, так и Трег клеток. При блокировании IL-2 в эффекторных клетках Трег угнетает их активацию и пролиферацию. Изначально полагали, что главная функция IL-2 заключается в стимуляции размножения и активации периферических $CD4^+$ Т-клеток, однако, последние эксперименты показали, что у нокаутированных по IL-2 и IL-2R мышей развиваются системные и летальные аутоиммунные заболевания. Это указывает на важность IL-2 в поддержании аутотолерантности. Был сделан вывод, что механизмом супрессивной активности Трег является конкурентная борьба за IL-2 с эффекторными клетками и снижение доступности IL-2 для них [275].

2.12.2. Секреция ингибиторных цитокинов

Физический контакт между Трег и эфекторными клетками является важным для проявления супрессивного действия Трег, однако данный эффект может быть достигнут при секреции растворимых цитокинов. Таких как TGFb (transforming growth factor bet), IL-10 (интерлейкин 10) и IL-35 (интерлейкин 35) [276]. Ингибиторные цитокины могут действовать по двум направлениям. Первое, это напрямую подавлять активацию и/или размножение эффекторных Т-клеток, уменьшая тем самым их количества в очагах аутоиммунной активности. Второе, генерировать индуцированные Трег (iTрег, induced Treg), что поддерживает их размножение, т.е. гомеостаз в периферической крови.

Важность TGFb и IL-10 для развития оптимальной супрессивной функции Трег была показана на мышиных моделях. У мышей с дефицитом TGFb развивались аутоиммунные заболевания на 4 – 5 недели жизни, у таких мышей также наблюдалось сниженной количества $CD4^+CD25^+$ Трег клеток [277]. Ингибирование TGFb блокирующими антителами значительно снижает ингибиторную функцию, как человеческих, так и мышмных Трег *in vivo* [278]. Однако, из этих экспериментов не понятно действует ли TGFb

непосредственно на эффекторные клетки или же влияет на гомеостаз Треg в периферической крови, индуцируя iТрег из наивных предшественников.

IL-10 является активным иммуномодулирующим противовоспалительным цитокином. IL-10 понижает синтез Th1-цитокинов (TNFa, IL-1, IL-2 и INFy) антигенпрезентирующими клетками [279]. Также IL-10 приводит к уменьшению экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости 2-го типа и ко-стимуляторных молекул на поверхности дендритных клеток, что поддерживает их в неактивном состоянии[280,281]. IL-10 также регулирует активацию и функционирование тучных клеток [282] и синтез цитокинов эозинофилами [283] и напрямую супрессирует пролиферацию Т-клеток.

Ингибиторная роль IL-10 подтверждается множеством экспериментов. И хотя IL-10 не задействован в ингибиторной функции in vitro, у мышей без IL-10 развивались аутоиммунные заболевания, в т.ч. колиты. Аналогичная реакция наблюдается при дефектах рецептора IL-10 у человека. Эти данные соответствуют роли IL-10 в поддержании кишечного гомеостаза. Нейтрализация IL-10 вызывает отторжение аллогенного кожного трансплантата [284], что указывает на важность IL-10 в трансплантационном иммунитете. Кроме того, локальная секреция IL-10 необходима для защитного действия при в экспериментальных колитах и аутоиммунных энцефаломиелитах. По аналогии с индуктивным эффектом TGFb, стимуляция наивных предшественников IL-10 может приводить также к дифференциации iТрег. Хотя экспрессирующие IL-10 клетки не синтезируют FoxP3, их супрессорная активность сравнима нормальными FoxP3+ клетками, и, как полагают, они ответственны за баланс иммунитета в полости рта [285].

Механистически IL-10 обладает ингибиторным эффектом за счет модуляции функции дендритных клеток. Треg способны индуцировать экспрессию иммуносупрессивного B7-H4 на поверхности дендритных клеток опосредованно через IL-10 сигналлинг [286].

Показано, что продукции TGFb Treг клетками не достаточно для их иммуносупрессивного действия на мышиной модели IBD [287]. Вероятно, другие клетки, отличные от iTreг, могут производить достаточное количество TGFb для защиты от аутоиммунных колитов. Также возможно, что TGFb из других источников может обладать противовоспалительным эффектом *in vivo* и способствовать дифференциации и гомеостазу iTreг без прямого иммуносупрессивного действия.

TGFb обладает способностью индуцировать iTreг (также называют Th3) из наивных клеток-предшественников на периферии, а также в поддержании гомеостаза пTreг (периферических Treг) [288]. Цитокин TGFb также экспрессируется как трансмембранный белок на Treг мышей и человека и задействован в супрессорной активности. Мембранная экспрессия TGFb регулируется статусом активаци Treг: при активации в Treг возрастает экспрессия рецептора главного GARP (glycoprotein A predominant) или LRRC32 (Leucin-rich repeat containing), члена семейства белков с богатыми лейцином последовательностями [289]. GARP связывает латентный TGFb в комплекс с LAP (Latency-associated peptide) на поверхности мембраны Treг. Расщепленный сигнальный пептид LRRC32 необходим для поверхностной локализации нативного LRRC32 и последующей активации Treг. Сниженная экспрессия GARP вызывает уменьшение супрессивной активности Treг [289].

Трансмембранный TGFb также играет важную роль в развитии механизма инфекционной толерантности. Например, TGFb необходим для супрессии активации NK-клеток *in vivo*. Механистически мембранный TGFb может опосредовать супрессивную функцию Treг при взаимодействии с экспрессирующими NOTCH эффекторными клетками. Было показано, что мембранный TGFb необходим для экспрессии NOTCH 1 лиганда на Treг. Такие Treг могут взаимодействовать с экспрессирующими NOTCH эффекторными клетками, что вызывает в них синтез репрессированного транскрипционного фактора HES1 (hairy and enhancer of split 1) [290].

Другим цитокином, модулирующим ингибиторную активность Treg является IL-35, состоящий из IL-12a цепи (p35) и EIB3 части IL-27. Treg клетки дефицитные по IL-35 не способны контролировать IBD и гомеостатическое деление Т-клеток [276].

Гелектин 1 (Gelectin 1) также селективно экспрессируется Treg и, вероятно, необходим для супрессивной функции *in vivo*. Гелектин 1 является высоко консервативным членом семейства белков, связывающихся с b-галактозидазой. Он секретируется Treg клетками как гомодимер и способен связываться с поверхностными рецепторами, включая CD45, CD43 и CD7. Связь гелектина 1 с этими рецепторами на АПК вызывает арест их клеточного цикла, апоптоз и ингибирование секреции провоспалительных цитокинов. Блокирование экспрессии гелектина 1 вызывает значительное снижение супрессорной активности Treg [291].

2.12.3. Цитолиз и апоптоз

Цитолиз таргетных клеток при действии перфорина и гранзимов является главным путём, по которому NK- и $CD8^+$-клетки убивают опухолевые и поражённые вирусом клетки. Экспрессия гранзимов значительно варьируется в различных популяциях лимфоцитов. Было показано, что iTreg экспрессируют гранзим B (Granzyme B) и вызывают цитолиз таргетных эффекторных клеток по перфорин-зависимому пути. Также показано, что цитолиз зависим от TCR или распознавания главного комплекса гистосовместимости на поверхности АПК. Позже было установлено, что нативные Treg (нTreg) человека экспрессируют гранзим A, а не гранзим B при активации TCR. Как nTreg, так iTreg способны убивать аутологичные таргетные клетки, такие как $CD4^+$- и $CD8^+$-клетки по перфорин-зависимому пути. В случае цитолиза клеткам nTreg необходимо адгезивное взаимодействие с таргетными клетками, которое зависит от экспресии CD18, но не Fas/FasL [292]. Подобный механизм был показан на мышиных Treg. Эти клетки экспрессируют высокий уровень гранзима B при активации и способны убивать таргетные клетки по гранзим B-зависимому пути, но не по перфорин-

зависимому пути. Значимость гранзим-зависимого цитолиза была показана на нокаутированных мышах. Трег мышей, нокаутированных по гену гранзима B, обладали пониженной супрессорной активностью, в то время как Трег мышей, нокаутированных по гену перфорина имели нормальную активность. Несмотря на это было показано, что супрессорная функция Трег мышей не зависит от апоптоза [293].

2.12.4. Генерация аденозина

Несколько новых механизмов супрессорного действия Трег установлено за последнее десятилетие. Один из них состоит в синтезе иммуносупресиивного аденозина. Аденозин является сигнальной молекулой, участвующей в регуляции многих процессов и включение рецепторов аденозина на эффекторных клетках и антиген презентирующих клетках (АПК) приводит к ингибированию экспрессии цитокинов, что вызывает противовоспалительный эффект. Хотя аденозин может генерироваться во множестве биохимических путей [294], образование внеклеточного аденозина из АТФ и АДФ опосредуется эктонуклеазами CD39 (ecto-NTPDase 1) и CD73 (ecto-5'nucleotidase), экспрессирующихся на поверхности Трег клеток [295]. CD73 также экспрессируется на поверхности $CD4^+$ эффекторных клеток, но, как полагают, только экспрессия обоих CD39 и CD73 на Трег клетках приводит к оптимальному синтезу аденозина. Экспрессия CD39 и CD73 положительно коррелирует с экспрессией FoxP3 в Трег мышей [295] и эти клетки активно образуют аденозин из АТФ [296]. Экспрессия CD39 и CD73 также обнаружена и на Трег человека. Аденозин реализует свой эффект, действуя на 4 типа рецепторов, обозначаемых A1, A2A, A2B и A3 [294]. $CD4^+$ клетки и АПК в большинстве экспрессируют A2A рецептор, количество которого, значительно увеличивается при стимуляции TCR и TLR4. Показана функциональная значимость сигнала рецептора в Трег $A2A^{-/-}$ нокаутированных мышей. Эти клетки были не способны супрессировать воспалительный процесс на моделях колита, а $A2A^{-/-}$ эффекторные клетки оказались устойчивыми к действию нормальных Трег [297]. Ингибирование

эктонуклеазной активности и блокада антагонистами рецептора A2A способны подавлять супрессивную активность Трег в моделях *in vitro*. Трег клетки пациентов с рассеянным склерозом экспрессируют пониженное количество CD39, что согласуется с их ослабленной супрессорной функцией [298].

Эти данные говорят о том, что оптимальная супрессорная функция Трег клеток зависит от их способности образовывать аденозин из АТФ и АДФ и способности A2A рецептора таргетных клеток опосредовать противовоспалительный эффект.

Описан механизм, по которому аденозин вызывает ингибирующий эффект. Взаимодействие аденозина с A2A рецептором на поверхности эффекторных клеток и АПК взывает утрату стабильности РНК провоспалительных цитокинов INFy, TNFa, IL-2, IL-4 и IL-12, что приводит к снижению их секреции [299]. При этом аденозин стимулирует синтез провоспалительного цитокина IL-10. Аденозиновые рецепторы связаны с мембранными G-белками, активация которых в аденилат-циклазной системе приводит к увеличению количества циклического аденозин монофосфата (цАМФ). цАМФ вызывает активацию протеин киназы А, которая снижает силу «окислительного взрыва» в нейтрофилах [300].

Однако Трег сами экспрессируют A2A рецептор и отвечают на аденозиновый сигнал [297], что оптимизирует их функционирование. Активация протеинкиназы А в Трег приводит к активации фактора CREB, ответственного за регуляцию экспрессии FoxP3 [301]. Эти данные указывает на двойную функциональность аденозина: он снижает активность таргетных клеток и оптимизирует функцию Трег клеток.

2.12.5. Влияние на созревание дендритных клеток (ДК) и стимуляторную функцию

Трег способны проявлять свою ингибиторную функцию не только при непосредственном контакте с эффекторными клетками, но опосредованно через влияние на дендритные клетки (ДК). CTLA-4 (CD152) является ко-

стимуляторной молекулой конститутивно экспрессирующейся на Treг клетках, которая контактирует с CD80 и CD86 на поверхности АПК и вызывает их супрессию. Treг клетки как человека, так и мыши способны понижать экспрессию CD80 и CD86 на ДК *in vitro* [302]. Действие CTLA-4 на дендритные клетки заключается в ингибировании их созревания, подавлении экспрессии CD80 и CD86 на поверхности дендритных клеток и индукции иммунорегуляторного фермента индолеами-2,3-дезоксигеназы в дендритных клетках [303].

Показано, что культивированные с Treг ДК человека не способны эффективно презентировать антиген [302]. У мышей без CTLA-4 развивались летальные аутоиммунные заболевания уже на первых неделях жизни. Блокирование активности CTLA-4 моноклональными антителами в крови мышей также приводило к развитию аутоиммунных заболеваний. Treг клетки с малым количеством CTLA-4 обладали пониженной способностью увеличивать экспрессию CD80 и CD86 на ДК при их совместном культивировании [304]. Таким образом, CTLA-4 взаимодействуя с лигандами CD80 и CD86 на ДК способен нарушать антигенную презентацию и ко-стимуляторный потенциал данных клеток. Вероятнее всего, CTLA-4 действует по двум направлениям: передает сигнал ингибирования на активированные эффекторные клетки при взамодействии с рецепторами CD80 и CD86; и проявляет опосредованное действие угнетая функцию антиген презентирующих клеток.

Пониженная экспрессия CD80 и CD86, равно как и количество CTLA-4 снижает эффективность взаимодействия с CD28, что ограничивает способность АПК стимулировать и активировать наивные Т клетки. Интересно, что активированные $FoxP3^+$ эффекторные Т клетки также экспрессируют CD80 и CD86, поэтому вероятно, что Treг клетки, экспрессирующие CTLA-4, способны ингибировать активацию эффекторных клеток, по механизму сходному с АПК [305].

Другой клеточный белок, экспрессирующийся на Treг клетках, LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) является гомологом CD4 и способен связываться с главным комплексом гистосовместимости II (MHC II, main histocompatibility complex II) с высокой аффинностью, что приводит к ингибированию активации эффекторных клеток. Взаимодействие между Treг клетками и MHC II на ДК, опосредованное LAG-3 вызывает ингибирование активации ДК, вероятнее всего через ITAM-сигнальный путь, что приводит к активации SHP-1 и супрессиии созревания ДК и их способности презентировать антиген [303]. Нокаутирование LAG-3 у мышей вызывало нарушение супрессорной активности nTreг, в то время как трансфекция $CD4^+$ Т-клеток значительно увеличивала их супрессивный потенциал. Экспрессия LAG-3 регулируется белком EGR-2 (early growth response 2), сверхэкспрессия которого в $CD4^+$ Т-клетках мышей вызывала значительное увеличение $CD4^+CD25^-LAG\text{-}3^+$ Treг, которые секретировали большое количество IL-10 [306]. Camisaschi и соавт. [307] обнаружили, что LAG-3-положительные Treг образуют отдельную популяцию Treг в инфильтрате меланомы и секретируют большое количество IL-10 и TGF-b. Однако супрессорная активность таких Treг не зависела от данных цитокинов.

2.12.6. Разнообразие TCR на Treг клетках

Необычный путь, по которому Treг клетки способны поддерживать суппрессорную функцию является диферсификация их TCR. Treг клетки поддерживают такой же уровень разнообразия TCR, как и другие Т клетки [308]. Довольно небольшое количество TCR идентично у Treг и эффекторных клеток. Такое минимальное различие указывает на то, что большинство таргетных пептидов не узнается эффекторными клетками. Разнообразие TCR критично для дифференциации Treг в тимусе. Все больше данных указывает на то, что специфичность TCR необходима для поддержания иммунного баланса Treг в периферической крови. Необходимость разнообразия TCR в этом процессе показана в работах по адаптивному переносу Treг клеток без TCR в моделях реакции трансплантат против хозяина [309].

2.12.7. $CD8^+$ Т регуляторные клетки

В большинстве работ сделан акцент на функционирование $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Трег клеток. Однако, была описана популяция $CD8^+$ клеток, способных супрессировать аутореактивные Th2 клетки. Показано, что не классическая молекула MHC-1 Qa-1 экспрессируется субпопуляцией фолликулярных Th хелперных клеток (Tfh) и эта молекула распознается CD8. Взаимодействие Qa-1 и CD8 вызывает ингибирование таких Tfh при «помощи» В клеток и ингибирование аутореактивного ответа Tfh [310]. Установлено, что нарушение этого взаимодействия при мутации Qa-1 Tfh клеток приводит к развитию болезней, вызванных аутоантителами. Это способ суппрессии зависит от секреции IL-35 [311].

2.12.8. Модуляция активности цитокиновым сигналлингом

Показано, что цитокины, включая TNFa и IL-6, способны модулировать функцию Трег клеток *in vivo* [312,313]. Сигнал от TNFa поступает на Трег через TNFRII, который экспрессируется конститутивно и увеличивается при стимуляции. Повышенная экспрессия TNFRII дает усиленный сигнал TNFa внутрь клетки, что приводит к снижению уровней мРНК и белка FoxP3 и потере суппрессорной функции. Применение блокирующих антител к TNFa оказалось эффективным для терапии ревматоидного артрита и псориаза и, возможно, что этот эффект достигался за счёт восстановления функции Трег при блокаде TNFa [312].

Сигналлинг IL-6 на эффекторные клетки также влияет на Трег клетки мыши и человека [314]. Точный механизм, по которому сигнал от IL-6 позволяет эффекторным клеткам преодолеть суппресию Трег до конца не ясен. Показано, что он зависит от IL-6, секретируемого активированными через TLR4 ДК у мышей и от IL-6 ДК и эпителиальных клеток у человека [314]. Сигнал IL-6 через комплекс рецептора вызывает фосфорилирование и активацию множества транскрипционных факторов, включая STAT1 и STAT3. Относительный уровень фосфорилирования STAT3 (pSTAT3) и pSTAT1 является определяющим для активации суппрессорной функции Трег.

Сильное фосфорилирование STAT3 относительно STAT1 вызывает потерю устойчивой суппрессорной функции Treг, в то время как, усиленное фосфорилирование STAT1 приводит к усилению суппрессорной функции. В ситуации, когда суппрессия Treг не активна, ингибирование фосфорилирования STAT3 восстанавливает функциональную суппрессорную активность, даже в присутствии высоких доз IL-6. Поэтому микроокружение воспалённой ткани способно изменять фосфорилирование STAT1 и STAT3 и модулировать эффективность суппрессорной функции Treг. В пользу этого говорит тот факт, что экспрессия IL-6 повышена при некоторых аутоиммунных заболеваниях, включая псориаз, причём функциональный рецептор IL-6 присутствует на 30 – 40% периферических $CD4^+$ клеток [315]. Таким образом сигналлинг IL-6 на лимфоциты является важным механизмом суппрессивного действия Treг при аутоиммунных заболеваниях. Важность IL-6 показана и клинической эффективностью токализумаба, препарата моноклональных антител к рецептору IL-6 при лечении ревматоидного артрита [316].

Другой молекулой, участвующей в регуляторной функции Treг является трансмембранный белок CD83. Показано, что растворенная форма CD83, продуцируемая B-клетками и дендритными клетками, функционирует в качестве супрессорной молекулы [317]. Позднее было установлено, что CD83 также экспрессируется на мембране Treг и необходима для контактного ингибирования [318]. Трансфекция $CD4^+$ T-клеток геном *CD83* вызывает в них увеличение экспрессии CTLA-4 и FoxP3 и развитие супрессорной активности [318]. Вероятно, CD83 функционирует в качестве аутокринного фактора, регулирующего функцию Treг. Однако для CD83 не обнаружено рецептора и точный механизм регуляторного взаимодействия Treг и эффекторных лимфоцитов до конца не понятен.

2.13. Заключение по обзору литературы

Как показано в данном литературном обзоре, АС пре-мРНК является одним из главных регуляторов активности и функции белков и вовлечён в регуляцию нормальных клеточных процессов: развитие и дифференцировку, физиологическое функционирование и программированную клеточную гибель. С нарушением процесса АС связан рад патологий, которые на сегодняшний момент поддаются лишь симптоматическому лечению. Изучение точных механизмов функционирования и регуляции АС является важным для понимания функционирования клеток и развития патологических процессов.

На сегодняшний день остаётся множество не решённых вопросов. Главным из них является тканевая специфичность данного процесса. Известно, что в различных клетках тканях и органах эффективность АС пре-мРНК одного и того же гена может отличаться весьма существенно, даже при условии одинакового уровня его транскрипции. Кроме того, процесс АС в одних и тех же клеткам может отличаться в зависимости от внешних воздействий и развития внутриклеточных процессов. Поэтому АС принято считать индуцибельным процессом, т.е. процессом эффективность которого зависит от изменения каких-либо условий. Без сомнения, молекулярные процессы регуляции АС являются ключевым фактором, влияющим на его индуцибельность. Известно, что регулирующие сплайсинг белки (SR-белки) играют первостепенную роль в данном процессе. Вторичная структура пре-мРНК и доступность регуляторных областей в её цепи для взаимодействия с SR-белками также важна. Тканеспецифичная экспрессия SR-белков объясняет различие АС среди множества тканей. Однако тканевая специфичность SR-белков не объясняет различия эффективности АС при различных воздействиях на клетку, поскольку их экспрессия достаточно конститутивна. Также представляется маловероятным, что именно вторичная структура мРНК вносит вклад в исход АС, поскольку лабильность вторичных структур мРНК весьма низка. Эти факты позволяют

предположить наличие прочих, более стабильных и индуцируемых факторов, модулирующих АС.

Другим важным вопросом является вопрос о необходимости существования множества сплайс-вариантов мРНК одного гена. Нет понимания почему клетка тратит большие ресурсы на создание множества не функциональных мРНК, подлежащих немедленной деградации или же синтезу не функциональных белков. Иными словами, биологическая роль большинства сплайс-вариантов остаётся неизученной.

Поскольку АС вовлечён и сопряжён с развитием ряда патологий, предпринимаются попытки создания инструментов, позволяющих управлять данным процессов. Все они так или иначе направлены на модуляцию активности SR-белков. В первую очередь предпринимаются попытки разработки малых молекул, ингибирующих присоединение отдельных SR-белков к их регуляторным последовательностям или же изменяющих сигнальные каскады активации SR-белков. Данный подход представляется малоэффективным ввиду низкой специфичности таковых молекул по отношению к отдельным SR-белкам и способности одних и тех же белков модулировать сплайсинг различных пре-мРНК. Более перспективным представляется подход по созданию переключающих сплайсинг олигонуклеотидов, способных специфически взаимодействовать с пре-мРНК определенного гена. Однако эффективность доставки таких олигонуклеотидов до таргетной ткани пока остаётся не высокой.

В данной работе предпринята попытка изучения нового механизма индукции АС эндонуклеазой EndoG, исследование способности производимых ею олигонуклеотидов модулировать АС и биологической роли индуцируемых сплайс-вариантов.

3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Лабораторные животные

Работу с лабораторными животными, одобренную этическим комитетом Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича проводили с соблюдением Декларации прав животных (World Medical Association Declaration of Helsinki) в редакции 2013 г. 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 получены из питомника лабораторных животных «Пущино» (Пущино, Московская область, Россия). Трансгенные мыши линии B10.GFP, несущие ген зелёного флуоресцентного белка GFP, из питомника лабораторных животных «Андреевка» (Андреевка, Московская область, Россия). Мышей и крыс содержали в виварии в условиях отсутствия патогенной микрофлоры при естественном освещении, на брикетированном корме и постоянном доступе к воде. В таблице 9 указаны линии мышей и крыс, и эксперименты, в которых они использовались.

3.2. 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% FSB (Fetal Serum Bovine, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США) при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 и 95% влажности.

Таблица 9. Линии мышей и крыс, использованные в различных экспериментах.

№	Линии животных	Эксперименты
Мыши		
1	B10.GFP	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase ICasp-2 и BCL-X. Эксперименты по индукция АС мРНК TERT и ингибирование теломеразы иТрег мыши в таргентых лимфоцитах *in vivo*.
2	BALB/c	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
3	C3H	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
4	C57BL/6	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X. Изучение пособности цисплатина активировать индуцированный EndoG альтернативный сплайсинг мРНК Tert в лимфоцитах. Изучение индукцияи АС мРНК и ингибирования ферментативной активности Casp-2, DNase I и BCL-x в результате сверхэкспрессии EndoG в лимфоцитах *in vitro*. Секвенирование мРНК $CD4^+$ Т-лимфоцитов после трансфекции геном EndoG или обработки цисплатином. Изучение гибели таргетных лимфоцитов мыши при длительном совместном культивировании с иТрег. Эксперименты по индукция АС мРНК TERT и ингибирование теломеразы индуцированными регуляторными Т клетками мыши в таргентых лимфоцитах *in vivo*.
5	C57BL/10	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
6	CBA	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
7	DBA/2	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.

Таблица 9. (Продолжение)

№	Линии животных	Эксперименты
8	ICR (CD-1)	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
9	SJL	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
Крысы		
10	DA	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
11	SD	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
12	SHR	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.
13	Wistar	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X. Изучение пособности цисплатина активировать индуцированный EndoG альтернативный сплайсинг мРНК Tert в лимфоцитах. Секвенирование мРНК $CD4^+$ Т-лимфоцитов после трансфекции геном EndoG или обработки цисплатином. Изучение индукцияи АС мРНК и ингибирования ферментативной активности Casp-2, DNase I и BCL-x в результате сверхэкспрессии EndoG в лимфоцитах *in vitro.*
14	WKY	Выделение лимфоцитов из периферической крови с целью анализа уровней экспрессии сплайс-вариантов EndoG, Tert, DNase I, Casp-2 и BCL-X.

3.2.1. Выделение и культивирование лимфоцитов человека

Образцы венозной крови здоровых доноров, давших письменное согласие на участие в исследовании, забирали в пробирки с антикоагулянтом K3EDTA («Greiner Bio-One», Австрия). Мононуклеарные клетки крови выделяли методом градиентного центрифугирования на Фиколе Lympholite-H («Cedarlane», Канада, 20 мин при 1000*g*) в и ресуспендировали в растворе ACD-A (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution

– А, «Cytosol Laboratories Inc.», США) с 5%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА) MACS BSA Stock Solution («Miltenyi Biotec», Германия). Фракции $CD4^+$, $CD8^+$, В и НК 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. Клетки высевали в 25 $см^2$ культуральные флаконы («Corning», США) в концентрации $5x10^5$ клеток на 1 мл среды. В работе использовали культуральную среду RPMI-1640 («Life technologies», США), содержащую 10% FBS, антибиотики пенициллин (50 Ед/мл) и стрептомицин (50 мг/мл) («Sigma», США) [319]. 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 NK-клеток осуществляли при помощи B Cell Expansion Kit и NK Cell Activation/Expansion Kit, соответственно (все от «Miltenyi Biotec», Германия). Культивирование проводили в CO_2-инкубаторе при 37ºС, 5% CO_2 при влажности 95%. Через каждые 3-4 суток культивирования клетки рассеивали до концентрации $5x10^5$ на 1 мл среды.

3.2.2. Выделение и культивирование лимфоцитов мыши и крысы

Лимфоциты выделяли из периферической крови или из селезёнки мышей. В первом случае, животных подвергали эвтаназии в CO_2-камере и отбирали кровь путём пункции сердца. Кровь забирали в пробирки с антикоагулянтом K3EDTA («Greiner Bio-One», Австрия). Из крови выделяли мононуклеарные клетки методом градиентного центрифугирования на Фиколе Lympholite-H («Cedarlane», Канада, 20 мин при 1000*g*). Выделение лимфоцитов из селезёнки проводили по методике описанной Miltenyi S. и соавт. [320]. У животных после эвтаназии, в асептических условиях, удаляли селезёнки и ткань измельчали до отдельных клеток, дважды пропуская 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», Германия). Клетки высевали в 5 мл среды, в концентрации $5x10^5$ клеток на 1 мл среды. В работе использовали культуральную среду RPMI-1640 («Life technologies», США), содержащую 10% FSB («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), антибиотики пенициллин (50 Ед/мл) и стрептомицин (50 мг/мл) («Sigma», США) [319]). $CD4^+$ и $CD8^+$ клетки мышей и крыс культивировали в описанной среде, содержавшей также 1 мМ пирувата натрия («Applichem», Германия), 10 мМ HEPES («Sigma», США) и 0,02 мМ 2-меркаптоэтанол («Sigma», США). Пролиферацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов стимулировали IL-2, (100 Ед/мл, «R&D Systems», США), а также антителами анти-CD3 (5 мкг/мл «МедБиоСпектр», Россия) и антителами анти-CD28 (2 мкг/мл «eBiosciences», США). Стимуляцию роста В- и НК-клеток осуществляли при помощи B Cell Expansion Kit и NK Cell Activation/Expansion Kit соответственно, (все от «Miltenyi Biotec», Германия). Культивирование клеток проводили в CO_2-инкубаторе при 37ºС, 5% CO_2 и влажности 95%. Через каждые трое суток культивирования клетки рассеивали до концентрации $5x10^5$ на 1 мл среды.

3.2.3 Выделение и культивирование регуляторных Т-клеток человека и мыши

Образцы венозной крови здоровых доноров, отбирали в пробирки с антикоагулянтом K3EDTA («Greiner Bio-One», Австрия). Из крови выделяли мононуклеарные клетки 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 БСА. Нативные регуляторные Т-клетки (нТрег) выделяли при помощи $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$ Regulatory T Cell Isolation Kit II («Miltenyi Biotec», Германия).

Индуцированные *ex vivo* Трег (иТрег) культивировали согласно методике, описанной Lifshitz и соавт. [321]. Из фракции мононуклеарных клеток выделяли $CD4^+$ Т лимфоциты при помощи CD4 MicroBeads human Isolation Kit («Miltenyi Biotec», Германия) по протоколу производителя. $CD4^+$ Т-клетки высевали в 25 $см^2$ культуральные флаконы («Corning», США) в концентрации $5x10^5$ клеток на 1 мл среды. Использовали культуральную среду RPMI-1640 («Life technologies», США), содержащую 10% FBS, рекомбинантный IL-2 человека, (100 Ед/мл, «R&D Systems», США), рекомбинантный TGF-β человека (5 нг/мл «R&D Systems», США), а также антитела анти-CD3 (5 мкг/мл «МедБиоСпектр», Россия) и антитела анти-CD28 (2 мкг/мл «eBiosciences», США). Через трое суток клетки рассевали до концентрации $5x10^5$ клеток на 1 мл полной среды и культивировали дополнительно 4 дня.

Для получения Трег мыши, селезенки мышей линии C57BL/6 измельчали на нейлоновом гомогенизаторе с диаметром пор 70 мкм Falcon Cell Strainer («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) и выделяли мононуклеарные клетки методом градиентного центрифугирования гомогената на Фиколе Lympholite-H. Трег выделяли из фракции мононуклеарных клеток при помощи CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, mouse («Miltenyi Biotec», Германия). Трег культивировали по методике, описанной Feng и соавт. [322], в течение 7 дней в среде RPMI-1640 («Life technologies», США), содержащей 10% FBS, рекомбинантный IL-2 мыши, (100 Ед/мл, «R&D Systems», США), рекомбинантный TGF-β мыши (5ng/ml «R&D Systems», США), а также антитела анти-CD3 (5 мкг/мл «МедБиоСпектр», Россия) и антитела анти-CD28 (2 мкг/мл «eBiosciences», США).

Степень зрелости индуцированных *ex vivo* (иТрег) человека и мыши оценивали методом проточной цитометрии по уровню экспрессии мембранного маркера CD127 и внутриклеточного фактора транскрипции FoxP3.

3.2.4. Изучение супрессорной активности регуляторных Т-клеток человека и мыши при бесконтактном совместном культивировании с аутологичными клетками

Зрелые индуцированные *ex vivo* иТрег или нТрег как человека, так и мыши в количестве $5x10^4$ клеток на лунку культивировали с аутологичными $CD4^+CD25^-$ Т-клетками, $CD8^+$ Т-клетками, $CD19^+$ В-клетками или $CD56^+CD16^+$ NK-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 объёме полной среды 1 мл на лунку. Замену среды проводили через каждые четыре дня. Часть клеток отбирали для дополнительных исследований.

3.2.5. Изучение супрессорной активности регуляторных Т-клеток мыши *in vivo*

Из селезёнки трансгенных мышей линии B10.GFP, несущих ген GFP, выделяли $CD4^+CD25^-$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, $CD19^+$ В-клетки или $CD56^+CD16^+$ NK-клетки и культивировали их *ex vivo* по описанной выше методике. Клетки вводили внутривенно мышам линии C57BL/6 в количестве $3x10^9$ клеток / кг. Мышей разделяли на две группы по 12 особей в каждой. Мышам контрольной группы внутривенно вводили ФСБ, а животным опытной группы вводили аутологичные иТрег в количестве $3x10^9$ клеток на килограмм веса. Через 4 и 21 день животных подвергали эвтаназии в CO_2-камере, отбирали кровь путём пункции сердца, собирая её в пробирки с антикоагулянтом K3EDTA («Greiner Bio-One», Австрия). Далее из крови выделяли мононуклеарные клетки методом градиентного центрифугирования на Фиколе Lympholite-H («Cedarlane», Канада). GFP-положительные клетки получали из фракции мононуклеарных клеток

методом их сортировки активированной флуоресценцией при помощи клеточного сортера BD FACS Aria cell sorter («Beckton Dickinson», США). Субпопуляции лимфоцитов мыши выделяли из отсортированных клеток, используя 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 (все от «Miltenyi Biotec», Германия).

3.3. 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»), 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 [323] 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) [324] 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).

Для экспериментов *in vivo* мышам C57BL/6 или крысам Wistar вводили внутривенно цисплатин в концентрации 20 мг/кг [325]. Через 72 ч животных подвергали эвтаназии в CO_2-камере, отбирали кровь путём пункции сердца и производили селекцию лимфоцитов по описанной выше методике.

3.4. Трансфекция клеток

Лимфоциты человека и клетки карциномы кишечника человека CaCO-2 трансфицировали одной из плазмид pEndoG-GFP, pEndoG-GFP, pDNase1-GFP, pDNaseX-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%) осуществляли 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», Германия), или путём флуоресцентной микроскопии также путем подсчета GFP-положительных клеток. Интенсивность флуоресценции GFP оценивали по уровню MFI (Mean Fluorescence Intensity). Для трансфекции клеток переключающими сплайсинг олигонуклеотидами EGPO (EndoG-produced oligonucleotide) или контрольными нуклеотидами (табл. 10 – 13 «Синтол», Россия или «IDT», США) использовали Oligofectamine Reagent («Invitrogen», США) по протоколу компании производителя. Все EGPO содержали химические модификации для защиты от действия внутриклеточных РНКаз: 2’-O-(2-метокси)этил рибозу (2’MOE), фосфоротиоатный остов, и 5’-метилцитозин

как описано в [326]. Все EGPO были конъюгированы с флуоресцентным красителем Cy5.5. Нуклеотидные последовательности EGPO представлены в табл. 14, 15. Поиск в программе BLAST не выявил других участков в геноме человека, комплементарных EGPO. Эффективность трансфекции EGPO оценивали методом проточной цитометрии при подсчёте Cy5.5-положительных клеток при помощи проточного цитометра MACS Quant Analyzer 10 («Miltenyi Biotec», Германия). Количество EGPO внутри клеток определяли по уровню MFI Cy5.5-положительных клеток.

3.5. 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 [327]. Количество циклов деления клеток в сутки (f) определяли по зависимости $N_t = N_0 2^{tf}$, где N_t – количество клеток в момент измерения (t), а N_0 – исходное количество клеток [328].

Таблица 10. EGPO, комплементарные пре-мРНК hTERT, используемые для трансфекции клеток CaCo-2 и инкубации с их ядрами.

Название	**Последовательность 5’-3’**
EGPO	GGGUCGGUGGGCGUCCCGUUACCGUGGACCGGUGGAUGAGUGAACGG
Контрольная РНК	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCGUCAGG
Защищенный EGPO	G*G*G*U*C*GGUGGGCGUCCCGUUACCGUGGACCGGUGGAUGAGUGA*A*C*G*G*
Защищенная Контрольная РНК	A*U*G*U*G*CCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCG*U*C*A*G*G
***** - Фосфоротиоатная связь	

Таблица 11. EGPO, комплементарные пре-мРНК DNase I, используемые для трансфекции $CD4^+$ Т-лимфоцитов и инкубации с их ядрами.

Название	**Последовательность 5’-3’**
EGPO	CCUUGUCGAUAUUCCUCGCGAUGGACAAGCACAUGUCCACCCACCAGAUCUUUCGGUCCUUCGGGGAGGGAG
Контрольная РНК	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCGUCAGGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCG
Защищенный EGPO	C*C*U*U*G*UCGAUAUUCCUCGCGAUGGACAAGCACAUGUCCACCCACCAGAUCUUUCGGUCCUUCGGGG*A*G*G*G*A*G
Защищенная Контрольная РНК	A*U*G*U*G*CCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCGUCAGGUGCCGUAGGUGAGGCCUCAC*G*U*U*C*G
***** - Фосфоротиоатная связь	

Таблица 12. EGPO, комплементарные пре-мРНК Casp-2, используемые для трансфекции $CD4^+$ Т-лимфоцитов и инкубации с ядрами.

Название	**Последовательность 5'-3'**
EGPO	GGCACCUCCUUCUGUUCACUGCUGCCACCGCCUCUCUUGCUCUGUAAGUGUCUCCCAAUG
Контрольная РНК	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCGUCAGGAUAGGAGAUACUC
Защищенный EGPO	G*G*C*A*C*CUCCUUCUGUUCACUGCUGCCACCGCCUCUCUUGCUCUGUAAGUGUCUCC*C*A*A*U*G
Защищенная Контрольная РНК	A*U*G*U*G*CCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCGUCAGGAUAGGAGA*U*A*C*U*C
* **-** Фосфоротиоатная связь	

Таблица 13. EGPO, комплементарные пре-мРНК BCL-x, используемые для трансфекции клеток HCC1954 и инкубации с их ядрами.

Название	**Последовательность 5'-3'**
EGPO	GACUGGUCUCCGGUUUCUUUUCCCUGUGUGUUCCCC
Контрольная РНК	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGG
Защищенный EGPO	G*A*C*U*G*GUCUCCGGUUUCUUUUCCCUGUGUGU*U*C*C*C*C
Защищенная Контрольная РНК	A*U*G*U*G*CCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUA*A*A*C*G*G
* - Фосфоротиоатная связь	

Таблица 14. EGPO, комплиментарные пре-мРНК hTERT, используемые для трансфекции $CD4^+$ Т-лимфоцитов.

EGPO	**Последовательность нуклеотидов 5’ - 3’**	**Блокируемый регуляторный белок**
SRp20 24-осн EGPO	GUGGACCGGUGGAUGAGUGAACGG	SRp20
SRp40 24-осн EGPO	CGGGUCGGUGGGCGUCCCGUUACC	SRp40
Контрольный 24-осн EGPO	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACG	Нет специфичности
SRp20 и SRp40 48-осн EGPO	CGGGUCGGUGGGCGUCCCGUUACCGUGGACCGGUGGAUGAGUGAACGG	SRp20 и SRp40
Контрольный 48-осн EGPO	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGGAUUCCGUCAGGA	Нет специфичности

Таблица 15. Олигонуклеотиды, используемые для трансфекции лимфоцитов человека с целью индукции AC DNase I.

Олигонуклеотид	**Последовательность 5’-3’**
Переключающий сплайсинг олигонуклеотид	UUCUAGACCACCCACCUGAUCACGAACAGGUAGCGC
Контрольный 36-осн олигонуклеотид	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUUAAACGG

3.6. Выделение клеточных органелл

Выделение митохондрий проводили по методике, описанной Justo R. и соавт. [329]. Клетки гомогенизировали на льду при помощи роторного гомогенизатора Ultra-Turrax T25 («IKA», США) в 1 мл буфера (220 мМ D-маннитол («Sigma»), 70 мМ сахароза («Sigma», США), 20 мМ Трис («Sigma», США), 1 мМ ЭДТА («Sigma», США), pH 7,4) и центрифугировали (10 мин при 700xg, и +4°C). Супернатант центрифугировали 10 мин при 1000xg для осаждения митохондрий. Качество митохондрий оценивали при помощи Cytochrome c Oxidase Assay Kit («Sigma», США) по протоколу производителя.

Цитоплазму получали по методике, описанной Laukova M. и соавт. [330]. Клетки гомогенизировали на льду в роторном гомогенизаторе в 300 мкл буфера (10 мМ ХЕПЕС («Sigma», США), 10 мМ KCl («Sigma», США); 1,5 мМ $MgCl_2$; 0,1 мМ ЭГТА («Sigma», США), 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.

Выделение ядер проводили по методике, описанной Pravdenkova S.V. и соавт. [331]. Клетки гомогенизировали на льду в роторном гомогенизаторе в 300 мкл в 50 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 0,25 М сахарозе, 10 мМ $CaCl_2$ и центрифугировали ультрацентрифуге Optima XE («Beckman Coulter», США) в градиентном растворе 2 М сахарозы, 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ $CaCI_2$, 5 мМ β-меркаптоэтанола при 70000g в течение 90 мин. Ядра дважды промывали в ТВЭ буфере (89 мМ Трис, 89 мМ H_3BO_3, 2 мМ ЭДТА).

Цитоплазму и ядра клеток инкубировали с recEndoG человека (ENDOG (Human) Recombinant Protein; «Abnova», США) при 37°C или блеомицином («Блеомицин-РОНЦ», Россия).

3.7. Расщепление ДНК и РНК recEndoG или РНКазами

ДНК выделяли при помощи PureLink® Genomic DNA («Thermo Scientific», США), а РНК – с использованием RNeasy Mini Kit по протоколу производителя. ДНК и РНК инкубировали с 0,3 мкг recEndoG в 50 мМ Трис-HCl pH 7,9, содержащем 1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ $MgCl_2$, 5 мМ β-меркаптоэтанол, в течение 20, 40 и 60 мин при 37°C. РНК инкубировали в течение 60 мин с 500 ед. РНКазы 1 («Invitrogen», США) и РНКазы А («Invitrogen», США) согласно протоколу компании. Затем образцы обрабатывали протеазой К («Qiagen», США) для инактивации recEndoG или РНКаз.

К расщепленной РНК добавляли каждый из 24-членных ДНК-олигонуклеотидов (табл. 16 – 19) и инкубировали в течение 30 мин при 37ºC для образования нековалентных комплексов ДНК-РНК, блокирующих активность EGPO [332].

Таблица 16. ДНК-олигонуклеотиды, использованные для блокирования активности EGPO к пре-мРНК hTERT.

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

Таблица 17. ДНК-олигонуклеотиды, использованные для блокирования активности EGPO к пре-мРНК DNase I.

№	Последовательность 5’ – 3’	№	Последовательность 5’ – 3’
1	TTCTTCAATCCAGGGATGCACCAG	7	AGGAGCGCTACCTGTTCGTGTACA
2	GGGATGCACCAGACACCTATCACT	8	TGTTCGTGTACAGGTGGGTGGTCT
3	ACACCTATCACTACGTGGTCAGTG	9	GGTGGGTGGTCTAGAAAGCCAGGA
4	ACGTGGTCAGTGAGCCACTGGGAC	10	AGAAAGCCAGGAAGCCCCTCCCTC
5	AGCCACTGGGACGGAACAGCTATA	11	AGCCCCTCCCTCACCTGGGAGGGC
6	GGAACAGCTATAAGGAGCGCTACC	12	ACCTGGGAGGGCCCCAACAGAGCA

Таблица 18. ДНК-олигонуклеотиды, использованные для блокирования активности EGPO к пре-мРНК Casp-2.

№	Последовательность 5’ – 3’	№	Последовательность 5’ – 3’
1	TCGAGAGTGAAAGGACAAACGAG	7	GGTGGCGGAGAGAACGAGACATTC
2	GGACAAACGAGGAGAGTCCACGA	8	AACGAGACATTCACAGAGGGTTAC
3	AGAGTCCACGATAACCTAGGGAAC	9	ACAGAGGGTTACGTACCCCACACG
4	AACCTAGGGAACCCGTGGAGGAA	10	GTACCCCACACGACCCTGAACCCG
5	CCGTGGAGGAAGACAAGTGACGA	11	ACCCTGAACCCGTCGGGTACCGAG
6	ACAAGTGACGACGGTGGCGGAGA	12	TCGGGTACCGAGAGTCCGACCAGT

Таблица 19. ДНК-олигонуклеотиды, использованные для блокирования активности EGPO к пре-мРНК BCL-x.

№	Последовательность 5’ – 3’	№	Последовательность 5’ – 3’
1	TTCCTCTACGTCCATAACCACTCA	7	ACCTAGGTCCTCTTGCCGCCGACC
2	CATAACCACTCAGCCTAGCGTCGA	8	TTGCCGCCGACCCATTCTTGGTTC
3	GCCTAGCGTCGAACCTACCGGTGA	9	CATTCTTGGTTCGGGGAACACACA
4	ACCTACCGGTGAATGGACTTACTC	10	GGGGAACACACAGGGAAAAGAAA
5	ATGGACTTACTGGTGGATCTCGGA	11	GGGAAAAGAAACCGGAGACCAGT
6	GTGGATCTCGGAACCTAGGTCCTC	12	CGGAGACCAGTCTCTAGGGGTTGT

3.8. Экстракция РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью RNeasy Mini Kit («Qiagen», США) или PureLink RNA mini kit («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) по протоколу компании-производителя. Обратную транскрипцию (ОТ) и ПЦР в реальном времени проводили по методике, описанной Basnakian с совт. [333]. Для этого 5 мкг тотальной РНК подвергали реакции ОТ в 25 мкл реакционной смеси («Invitrogen», США) по протоколу компании-производителя. В качестве реакционной смеси для ПЦР в реальном времени использовали Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG («Invitrogen», США). Используемые праймеры представлены в Приложении в таблицах 7 –9. Праймеры были синтезированы следующими компаниями: «Синтол», Россия, «Евроген», Россия или «IDT», США. Для амплификации применяли CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», США) или систему детекции ПЦР в реальном времени DTPrime 5 («ДНК-технология», Россия). Использовали 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°С до 95°С 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 Qbase PLUS («Bio-Rad», США) или DTPrime 5 («ДНК-технология», Россия). Уровни мРНК изучаемых генов или их сплайс-вариантов нормировали по мРНК конститутивно экспрессируемых референсных генов: 18S рибосомной РНК (ген «домашнего хозяйства» для цитоплазмы), Ламин B1 (ген «домашнего хозяйства» для ядер) и NADH дегидрогеназа, субъединица 4 (ген «домашнего хозяйства» для митохондрий). Продукты амплификации визуализировали в

2%-ном агарозном геле при окрашивании этидий-бромидом и фотографировали, используя ChemiDoc™ XRS imaging system («Bio-Rad»).

3.9. Вестерн-блоттинг

Клетки или клеточные органеллы лизировали в 1 мл буфера ТБЭ (89 мМ Tris, 89 мМ H_3BO_3, 2 мМ EDTA pH 8,0) ультразвуком в течение двух минут при мощности 50 Ватт с помощью УЗ-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 [334] 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 ПААГ [335] (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, после чего мембраны окрашивали Ponseau S («Sigma», США) [336]. Затем 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 B1 (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 (ФСБ) 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.

3.10. Определение активности теломеразы

Определение активности теломеразы проводили при помощи метода TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol, протокол аплификации теломерных повторов) [337,338]. Клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ $MgCl_2$, 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 10^3 клеток. Лизаты центрифугировали при 12000 *g* в течение 30 мин при 4°C; супернатант отбирали и хранили при -80°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 $(NH_4)_2SO_4$, 0,01% Твин-20, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 0,25 мМ каждого из dNTPS, 0,1 мкг TS-праймера (Telomerase Substrate primer) (5'- AATCCGTCGAGCAGAGTT -3') и 2 мкл клеточного экстракта, разведенного лизирующим буфером и эквивалентного 2000 клеток 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 CX-праймера (Copy Extended primer) (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA -3') и 2,5 ед. Taq-полимеразы. Реакционную смесь подвергали ПЦР в следующем режиме: 94° C – 2 мин; 30

циклов: 94° 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 объёме 10 мкл. Для визуализации разделённых 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.

3.11. Определение ферментативной активности каспазы 2

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.

3.12. 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 («Corning», США). Измерение флуоресценции проводили в планшетном спектрометре MultiscanGo («Thermo Scientific», США) при длинах волн возбуждения и эмиссии 490 нм и 525 нм соответственно. Подсчет активности осуществляли для 1×10^3 клеток по калибровочной кривой с использованием коммерческой β-Gal («Abcam», США) в диапазоне 0,01–100 ед/мл.

3.13. Определение ферментативной активности ДНКазы 1

Определение ферментативной активности DNase I проводили методом зимографии по протоколу DNA-SDS-PAGE, описанному Баснакьяном и соавт. [38]. Клетки или клеточные органеллы гомогенизировали в буфере, содержащем 0,25 М сахарозу, 50 мМ Трис-HCl pH 7,4 и 5 мМ β-меркаптоэтанол. 60 мкг белка растворяли в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl, 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», США) в течение 1 ч при комнатной температуре) и инкубировали в течение ночи в 150 мл молока, содержащем 40 мМ мМ Трис-HCl pH 7,4; 5 мМ $MgCl_2$; 2 мМ $CaCl_2$; 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.

3.14. Определение абсолютной длины теломер

Для определения абсолютной длины теломер использовали методику, описанную в [339,340]. Геномную ДНК выделяли при помощи PureLink Genomic DNA Mini Kit («Thermo Scientific», США) и проводили ПЦР в реальном времени [340]. 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.

3.15. 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) [341,342]. 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. [343]. 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 [344]. Результат изменения уровня мРНК сплайс-вариантов считали достоверным, при условии отсутствия изменения уровня общей мРНК целевого гена.

3.16. Идентификация длинных некодирующих РНК (нкРНК) методом секвенирования следующего поколения

Суммарную РНК из клеток, ядер и цитоплазмы выделяли с помощью RNeasy Mini Kit. Подготовку библиотек проводили при помощи TruSeq Small RNA Library Preparation Kit («Illumina», США) по протоколу производителя. Секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq System («Illumina», США), данные анализировали согласно [345].

3.17. 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 нТрег и иТрег 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 мыши. 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 (ФСБ, «Gibco», США). 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 $5x10^4$ 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», Германия) в концентрации 500 нг/мл [20].

3.18. Иммуноцитохимия

Клетки линии CaCo-2 культивировали в 8-ми луночных камерах Nunc Lab-Tek Chamber Slide System («Thermo Scientific», США), фиксировали в 10%-ном формалине («Sigma», США) и проводили иммуноцитохимическое исследование, как указано в работе Apostolov и соавт. [346]. Клетки инкубировали с антителами кролика к EndoG («Millipore», США) и антителами козы к hTERT («Abcam», США) в разведении 1:200 в буфере BSA-T-PBS (0,5% бычий сывороточный альбумин, 0,05% Твин-20, ФСБ). Первичные антитела детектировали с помощью вторичных к антителам кролика IgG-AlexaFlour 647 («Invitrogen», США) или антителам козы IgG-AlexaFluor 594. В качестве контрольных использовали клетки, инкубированные только со вторичными антителами. После отмывки вторичных антител проводили окрашивание ядер клеток при помощи 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Клетки покрывали покровными стеклами Prolong Antifade kit (Invitrogen) и анализировали методом флуоресцентной микроскопии при помощи микроскопа Olympus IX-51 inverted microscope («Olympus America», США) с монохромной фотокамерой Hamamatsu ORCA-ER («Hamamatsu Photonics K.K.», Япония). Анализ снимков проводили в программе SlideBook 4.2. Измерение средней интенсивности флуоресценции осуществляли по каждому каналу. Красный цвет применяли для сигнала от EndoG, зеленый использовали для hTERT и синий для DAPI. Анализировали 20 снимков для каждой ячейки с клетками. Внутриклеточную ко-локализацию и пиксельную корреляцию EndoG и hTERT оценивали по алгоритму Пирсона и Мандерса в программе SlideBook 4.2. [347].

3.19. 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 ± стандартное отклонение. Значения считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Для изучения зависимости между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантами hTERT 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 проводили корреляционный анализ по Пирсону уровней экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT при помощи программы Statistica 9.0.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Феномен индукции АС эндонуклеазой EndoG

Способность апоптотической эндонуклеазы EndoG индуцировать АС впервые была показана для мРНК каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT на клетках линии MCF-7 аденокарциномы молочной железы человека.

4.1.1. Индукция АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT эндонуклеазой EndoG в клетках MCF-7

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. 16 А), достоверному снижению синтеза полноразмерной α+β+ варианта hTERT (рис. 16 Б) и увеличению экспрессии α+β– варианта (рис. 16 В). Сверхэкспрессия EndoG не вызывала изменения синтеза α–β+ (рис. 16 Г) и α–β– вариантов hTERT (рис. 16 Д). Не выявлено изменения образования данных сплайс-вариантов и 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. 16 Е). При трансфекции клеток контрольной плазмидой не наблюдалось уменьшения активности фермента. Эти данные полностью согласуются с результатом измерения экспрессии сплайс-вариантов hTERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Снижение активности теломеразы, вероятнее всего, происходило за счёт уменьшения количества полноразмерного α+β+ варианта hTERT, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью.

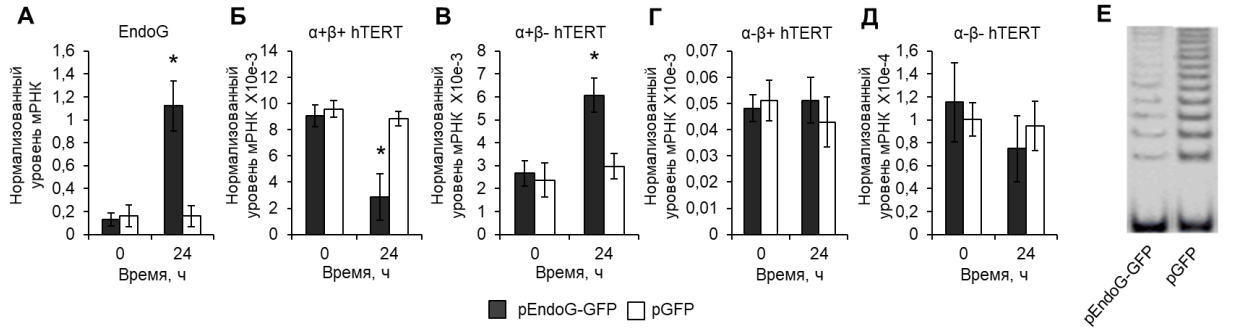


Рисунок 16. Изменение соотношения сплайс-вариантов hTERT и ингибирование активности теломеразы в результате сверхэкспрессии EndoG в клетках MCF-7. Уровни экспрессии EndoG (А) и сплайс-вариантов hTERT (Б-Д) через 24 ч после трансфекции клеток pEndoG-GFP или pGFP. Уровни мРНК нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках (Е). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

4.2. Способность EndoG индуцировать АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT и ингибировать активность теломеразы.

4.2.1. Индукция АС пре-мРНК hTERT эндонуклеазой EndoG в опухолевых клетках

Мы изучили корреляцию экспрессии EndoG и сплайс-вариантов мРНК hTERT в клетках различных линий опухолей кишечника человека, а также оценили возможность индукции АС при сверхэкспрессии EndoG.

4.2.1.1. Взаимосвязь уровня экспрессия EndoG с уровнем мРНК сплайс-вариантов hTERT в клетках линий рака кишечника человека

С целью изучения связи между EndoG и АС пре-мРНК hTERT, методом ОТ-ПЦР в реальном времени проведена оценка уровней мРНК EndoG и сплайс-вариантов hTERT в клетках тканевых культур рака кишечника человека. Полученные результаты подтвердили данные о том, что полноразмерный вариант hTERT α+β+ и сплайс-вариант α+β– составляют

большую часть общей мРНК hTERT (рис. 17 А-Д). Сплайс-варианты α–β+ и α–β– присутствуют в минорных количествах. При ранжировании клеток по уровню относительной экспрессии EndoG медиана составила 0,24. Корреляционный анализ выявил зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT (рис. 17 Е). В клетках с относительно низкой экспрессией EndoG (медиана менее 0,24) наблюдалось преобладание полноразмерного α+β+ hTERT над другими сплайс-вариантами. В группе клеток с относительно высокой экспрессией EndoG (медиана более 0,24) выявлено увеличение экспрессии α+β– варианта hTERT и снижение синтеза полноразмерного α+β+ варианта.

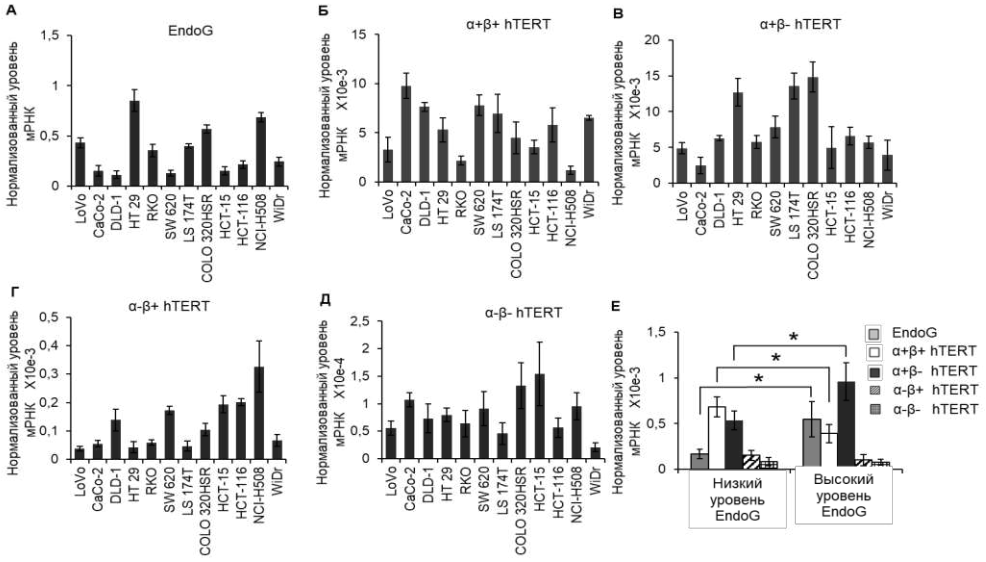


Рисунок 17. Взаимосвязь экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в 12-ти клеточных линиях рака кишечника человека. Уровни мРНК EndoG (А) и сплайс-вариантов hTERT (Б-Д). Зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT (Е). Клетки были разделены на группы с низким и высоким уровнями экспрессии EndoG. Для повышения репрезентативности уровни экспрессии EndoG были уменьшены в 1000 раз, поскольку экспрессия EndoG гораздо выше таковой сплайс-вариантов hTERT. Уровни мРНК нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. * $p \leq 0,05$ для уровней мРНК соответствующих генов между группами клеток.

Зависимости между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантами hTERT α–β+ и α–β– не обнаружено. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG со сплайс-вариантами hTERT представлены в таблице 20. Для дальнейшей работы выбраны клетки линии эпителиальной колоректальной аденокарциномы CaCo-2, поскольку именно в этих корреляция между экспрессией *EndoG* и сплайс-вариантами hTERT была наиболее выраженной.

Таблица 20. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и уровня мРНК сплайс-вариантов hTERT линий рака кишечника человека.

Сплайс-вариант hTERT	Низкий уровень экспрессии EndoG (N=6)	Высокий уровень экспрессии EndoG (N=6)
α+β+ (полноразмерный вариант)	– 0,748*	– 0,832*
α+β–	+ 0,819*	+ 0,771*
α–β+	– 0,272	– 0,460
α–β–	+ 0,399	– 0,485

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

4.2.1.2. Уменьшение пула активной формы hTERT и снижение активности теломеразы при сверхэкспрессии EndoG

Для установления возможной роли EndoG в индукции сплайс-варианта hTERT клетки CaCo-2 трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Эффективность трансфекции приближалась к 100% в течение 8 ч после трансфекции. Трансфекция клеток плазмидой pEndoG-GFP приводила к значительному увеличению синтеза EndoG (рис. 18 А), достоверному снижению экспрессии полноразмерной α+β+ варианта (рис. 18 Б) и увеличению синтеза α+β– варианта (рис. 18 В). Сверхэкспрессия EndoG не вызывала изменения экспрессии α–β+ (рис. 18 Г) и α–β– вариантов (рис. 18 Д). Не выявлено изменения синтеза данных сплайс-вариантов при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP.

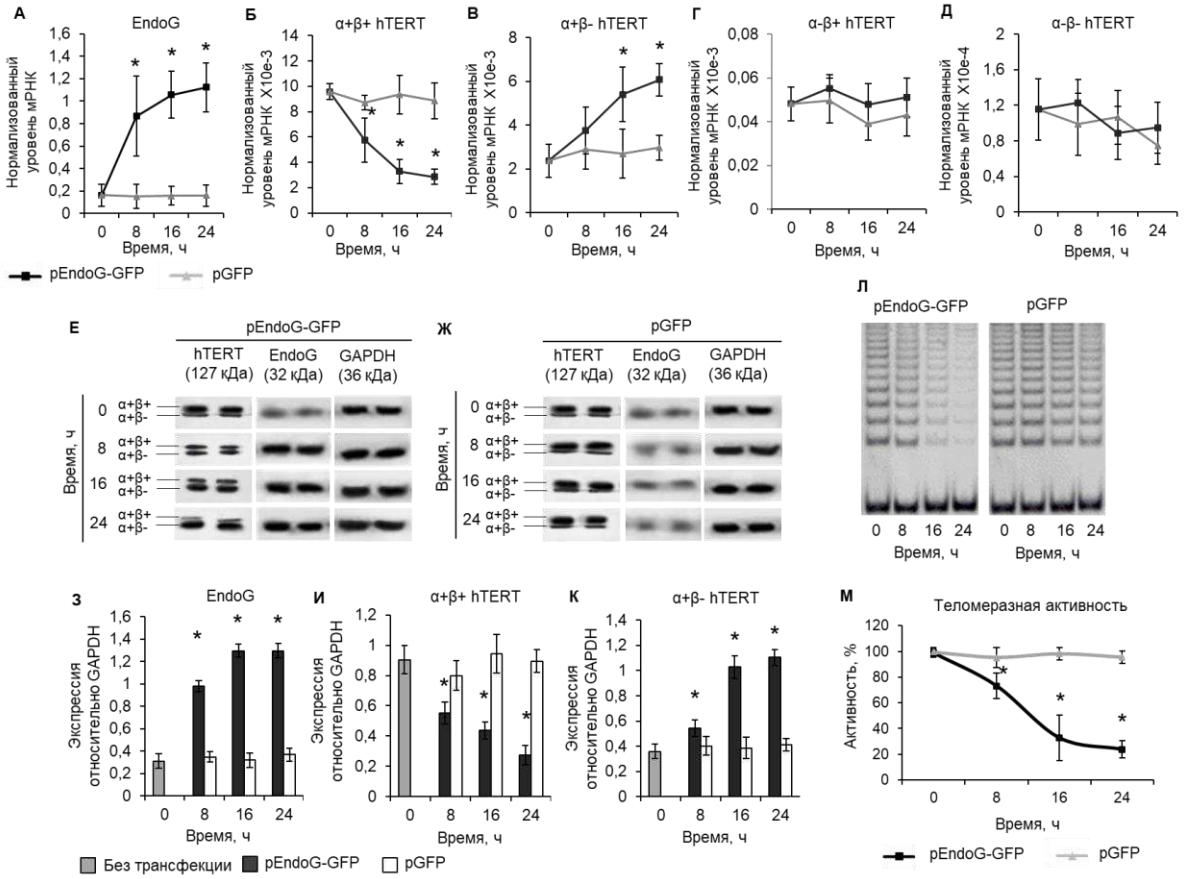


Рисунок 18. Изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT и ингибирование активности теломеразы в результате сверхэкспрессии EndoG в клетках CaCo-2. Уровни мРНК EndoG (А) и сплайс-вариантов hTERT (Б–Д) в течение 24 ч после трансфекции клеток pEndoG-GFP или pGFP. Уровни мРНК нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. Вестерн-блоттинг сплайс-вариантов hTERT, EndoG и референсного белка GAPDH в клетках CaCo-2 трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP (Е, Ж). Результаты определения количеств сплайс-форм hTERT и EndoG по отношению к GAPDH (З–К). Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках (Л). Результаты определения активности теломеразы, измеренной методом TRAP (М). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

Мы попытались выяснить влияние индукции сплайс-варианта hTERT на активность теломеразы при сверхэкспрессии EndoG. Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показали, что к 24 ч после трансфекции pEndoG-GFP в клетках CaCo-2, происходит достоверное снижение уровня полноразмерного α+β+ варианта (рис. 18 Е-К) и увеличение

содержания α+β– варианта hTERT. При трансфекции клеток контрольной плазмидой изменения пропорции белков сплайс-вариантов hTERT не выявлено. Не обнаружено и изменения пула белков α+β– и α–β– вариантов hTERT, поскольку их количество в клетке очень мало и не детектируется методом вестерн-блоттинга.

Для анализа активности теломеразы в клеточных экстрактах после трансфекции использовали метод амплификации теломерных повторов с помощью ПЦР. В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, активность теломеразы достоверно снижалась уже через 16 ч после трансфекции (рис. 18 Л, М). Однако 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 и количеством сплайс-вариантов hTERT, определенным при помощи вестерн-блоттинга. Снижение активности теломеразы, вероятнее всего, происходит за счёт уменьшения количества полноразмерного α+β+ варианта hTERT, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью.

4.3. Индукция АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы TERT эндонуклеазой EndoG в лимфоцитах человека, мыши и крысы

Известно, что активная теломераза присутствует кроме опухолевых клеток и в активированных лимфоцитах [348–350]. 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 АС при сверхэкспрессии EndoG.

4.3.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG и экспрессии сплайс-вариантов TERT в лимфоцитах человека, мыши и крысы

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 hTERT у здоровых доноров, а также TERT у различных линий мышей и крыс (рис. 19 А, В, Д, Ж; рис. 20 А, Б, Г, Ж).

При ранжировании лимфоцитов человека по уровню относительной экспрессии EndoG, медиана составила: 0,245 для $CD4^+$ Т-клеток; 0,346 для $CD8^+$ Т-клеток; 0,081 для В-клеток и 0,281 для NK-клеток. Корреляционный анализ показал зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT (рис. 20 Б, Г, Е, З). В клетках с относительно низкой экспрессией EndoG (ниже медианы) обнаружено преобладание полноразмерного α+β+ варианта. В группах клеток с относительно высокой экспрессией EndoG (выше медианы) выявлено увеличение количества мРНК сплайс-вариантов α+β– hTERT, а также снижение уровня мРНК полноразмерного варианта. Медиана уровней экспрессии EndoG в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мыши составила 0,311 для клеток мышей и 0,329 для клеток крыс различных линий. Как и в случае с лимфоцитами человека, наблюдалось преобладание полноразмерного сплайс-варианта α+β+ TERT в клетках с относительно низкой экспрессией EndoG, и сплайс-варианта α+β– TERT в клетках с относительно высокой экспрессией EndoG (рис. 20 В, Е). Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG со сплайс-вариантами мРНК TERT представлены в табл. 21 и табл. 22. Для дальнейшей работы были выбраны $CD4^+$ Т-клетки доноров 2, 3, 6 и 9, мышей линии C57BL/6 и крыс

линии Wistar, поскольку именно у них корреляция между экспрессией EndoG и количеством мРНК сплайс-вариантов TERT была наиболее выраженной.

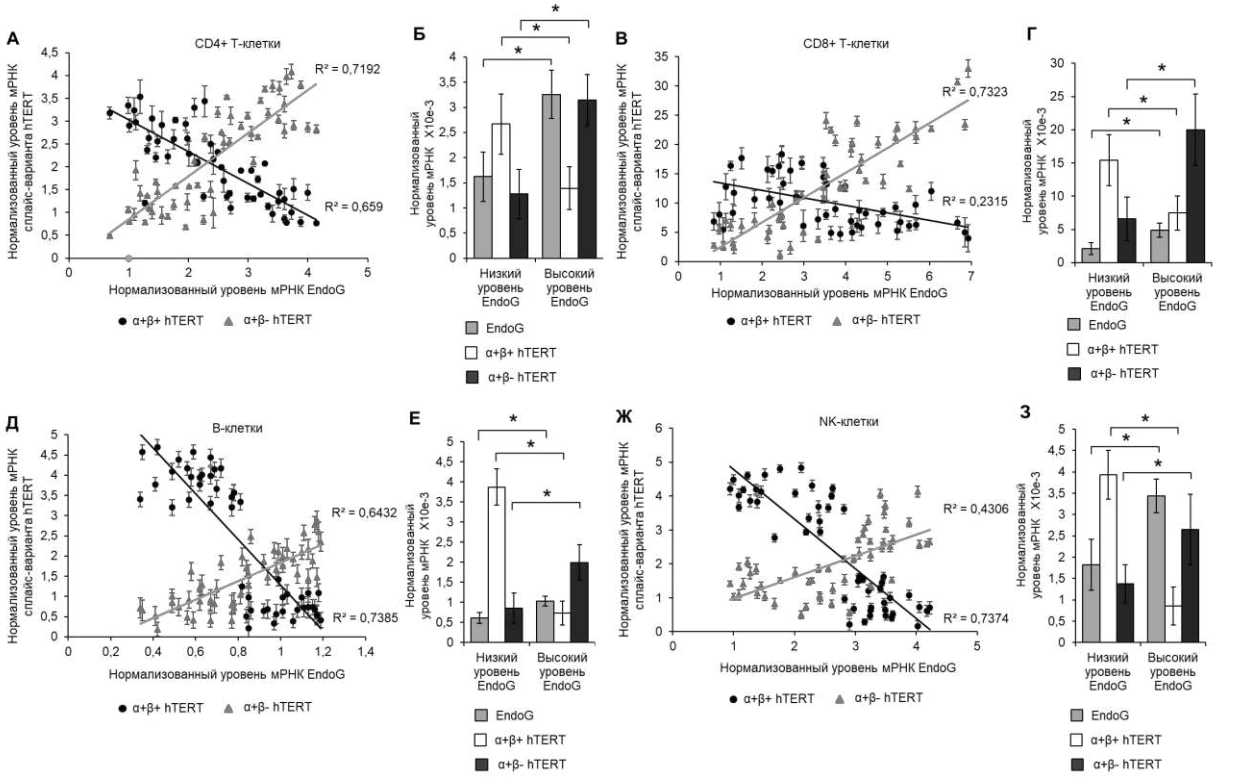


Рисунок 19. Взаимосвязь экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в лимфоцитах человека. Зависимость уровней мРНК сплайс-вариантов hTERT относительно уровня мРНК EndoG в $CD4^+$ Т-клетках (А), $CD8^+$ Т-клетках (В), В-клетках (Д) и NK-клетках (Ж). Уровни мРНК сплайс-вариантов hTERT при ранжировании $CD4^+$ Т-клеток, (Б) CD8+ Т-клеток (Г), В-клеток (Е) и NK-клеток (З) в группы с низким и высоким уровнем экспрессии EndoG. Уровни мРНК нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S рРНК. * - $p \leq 0,05$ для уровней мРНК между группами клеток. Черные и серые линии обозначают линии тренда для α+β+ TERT и α+β– TERT, соответственно.

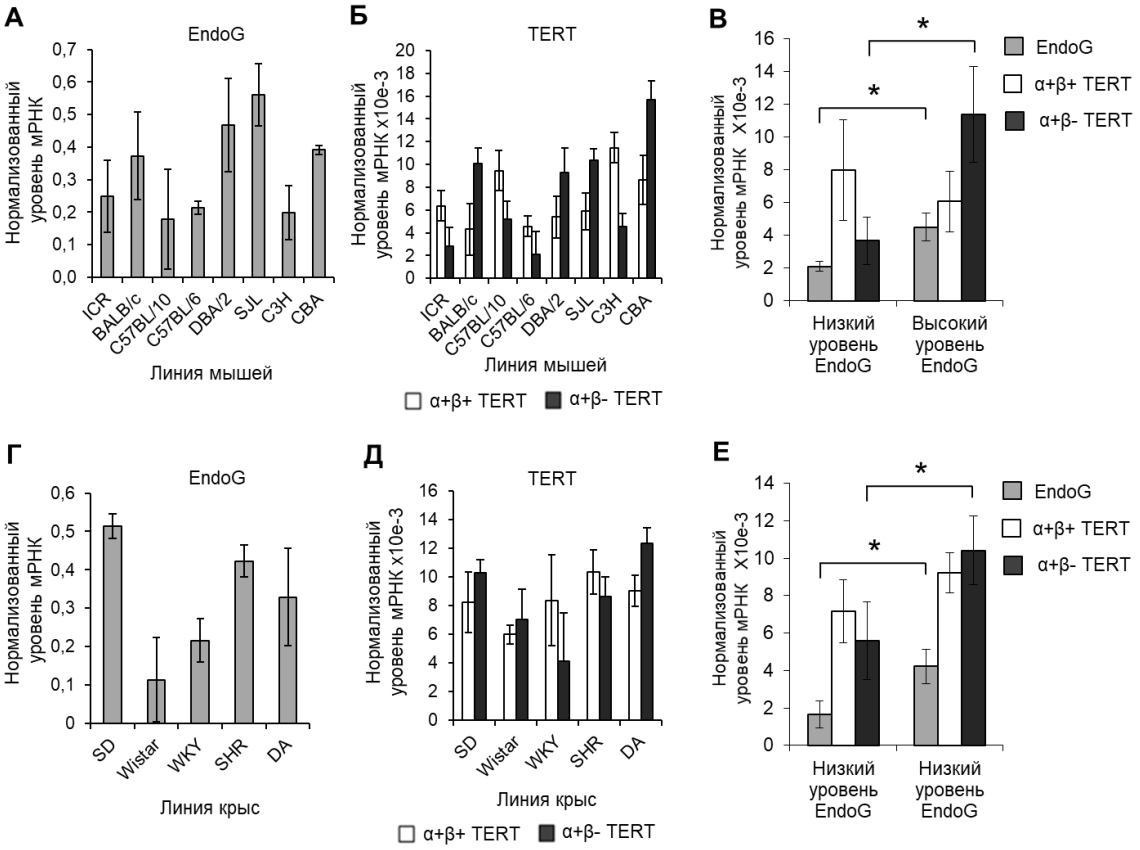


Рисунок 20. Взаимосвязь экспрессии EndoG и сплайс-вариантов TERT в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мышей и крыс. Уровень экспрессии EndoG (А, Г) и сплайс-вариантов TERT $CD4^+$ (Б, Д) в Т-клетках мышей и крыс различных линий. Уровень экспрессии сплайс-вариантов TERT при ранжировании клеток мышей (В) и крыс (Е) в группы с низким и высоким уровнем экспрессии EndoG. Уровни мРНК нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S рРНК. * - $p \leq 0,05$ для уровней экспрессии генов между группами клеток.

Таблица 21. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в лимфоцитах человека.

Лимфоциты	**Низкий уровень мРНК EndoG (N=25)**		**Высокий уровень мРНК EndoG (N=25)**	
	α+β+ hTERT	α+β– hTERT	α+β+ hTERT	α+β– 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*
NK-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 TERT.

Таблица 22. Коэффициенты корреляции экспрессии *EndoG* и сплайс-вариантов *TERT* в CD4$^+$ Т-лимфоцитах мыши и крысы.

Сплайс-вариант мРНК	**CD4$^+$ Т-лимфоциты мыши**		**CD4$^+$ Т-лимфоциты крысы**	
	Низкий уровень мРНК EndoG (N=4)	Высокий уровень мРНК EndoG (N=4)	Низкий уровень мРНК EndoG (N=2$^{\#}$)	Высокий уровень мРНК EndoG (N=3$^{\#}$)
α+β+ TERT	– 0,625*	– 0,731*	– 0,523	– 0,680
α+β– TERT	+ 0,751	+ 0,691*	+ 0,344	+ 0,482

Примечание: # - коэффициенты корреляции не являются статистически достоверными из-за малого объёма выборки. * - 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 TERT.

4.3.2. Индукция АС пре-мРНК hTERT в лимфоцитах человека в результате сверхэкспрессии EndoG

Для установления возможной роли EndoG в индукции АС пре-мРНК hTERT в $CD4^+$, $CD8^+$, В- и NK-лимфоцитах человека сверхэкспрессию EndoG индуцировали методом трансфекции плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Оценку количества мРНК сплайс-вариантов hTERT и анализ активности теломеразы проводили спустя 72 ч после трансфекции, когда её эффективность у всех исследуемых клеток приближалась к 100%.

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что трансфекция клеток плазмидой pEndoG-GFP приводила к значительному увеличению экспрессии EndoG (рис. 21 А). Повышение экспрессии EndoG сопровождалось достоверным снижением таковой полноразмерного α+β+ варианта hTERT (рис. 21 Б) и увеличением экспрессии α+β– варианта (рис. 21 В). Сверхэкспрессия EndoG не вызывала изменения синтеза α–β+ (рис. 21 Г) и α–β– вариантов (рис. 21 Д). Экспрессия EndoG и сплайс-вариантов *hTERT* не изменялась при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP.

Мы попытались выяснить влияние индукции α+β– сплайс-варианта hTERT на активность теломеразы. Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показали, что через 72 ч после трансфекции клеток pEndoG-GFP, наряду с возрастанием количества EndoG, происходит достоверное снижение уровня полноразмерного α+β+ варианта и увеличение количества α+β– варианта hTERT (рис. 21 Е–К). При трансфекции клеток контрольной плазмидой изменения EndoG и пропорции белков сплайс-вариантов hTERT не выявлено. Не обнаружено и изменения пула белков α–β+ и α–β–вариантов hTERT, поскольку их количество в клетке очень мало и не детектируется вестерн-блоттингом. Установлено, что в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, активность теломеразы достоверно снижается (рис. 21 Л, М). Уменьшение активности фермента не наблюдалось

при трансфекции клеток контрольной плазмидой. Эти данные полностью согласуются с результатом определения экспрессии сплайс-вариантов hTERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени и количеством сплайс-вариантов hTERT, измеренного вестерн-блоттингом.

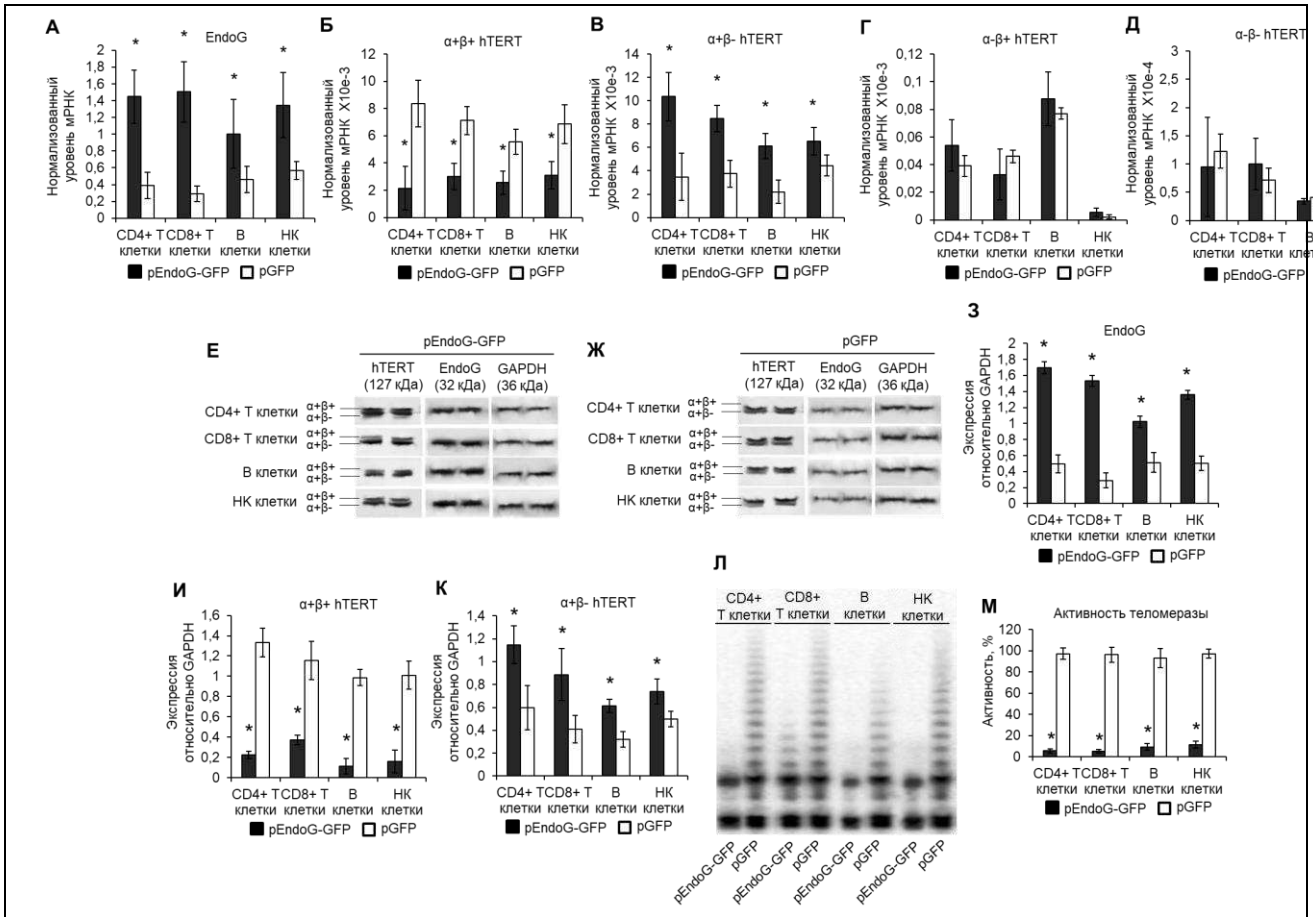


Рисунок 21. Ингибирование активности теломеразы в лимфоцитах человека при индукции EndoG АС пре-мРНК hTERT. Уровни мРНК EndoG (А) и сплайс-вариантов hTERT (Б-Д) в трансфицированных клетках, определенные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК нормализованы по отношению к уровню рРНК референсного гена 18S. Вестерн блоттинг сплайс-вариантов hTERT, EndoG и референсного белка GAPDH в лимфоцитах трансфицированных pEndoG-GFP (Е) или pGFP (Ж). Результаты определения количеств EndoG (З) и сплайс-форм hTERT (И, К) по отношению к GAPDH. Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках (Л) Результаты определения активности теломеразы, измеренной методом TRAP (М). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

4.4 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 [351,352]. 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 $CD4^+$ и $CD8^+$ Т лимфоцитах человека.

4.4.1. Гибель $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток человека в результате действия повреждающих ДНК агентов.

Исследование цитотоксической активности ДНК повреждающих агентов с различным механизмом действия на ДНК проводили с целью определения их максимальной нетоксичной дозы (МНД). При такой дозе повреждения ДНК не являлись летальными и клетки оставались жизнеспособными. Исследуемые дозы повреждающих ДНК агентов подобраны нами ранее в ходе предварительных экспериментов (данные не приводятся). Достоверного различия между цитотоксическим действием повреждающих ДНК химических веществ и гамма-излучения на $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки не обнаружено (рис. 22). Для бензопирена, образующего ковалентные связи с основаниями ДНК [353,354], и блеомицина, химиотерапевтического вещества, вызывающего однонитевые разрывы ДНК [355,356], МНД составила 0,005 нМ (рис. 19 А). и 0,06 мкг/мл (рис. 19 Б). Максимальная нетоксичная поглощённая доза гамма-излучения, вызывающего двунитевые разрывы ДНК [357], найдена равной 2 Гр (рис. 22 В). Для цисплатина, химиотерапевтического вещества, образующего сшивки ДНК [358], МНД составила 2 нМ (рис. 22 Г), а для интеркалятора бромистого этидия, вызывающего модификацию азотистых оснований [359,360], 100 нг/мл (рис. 22 Д).

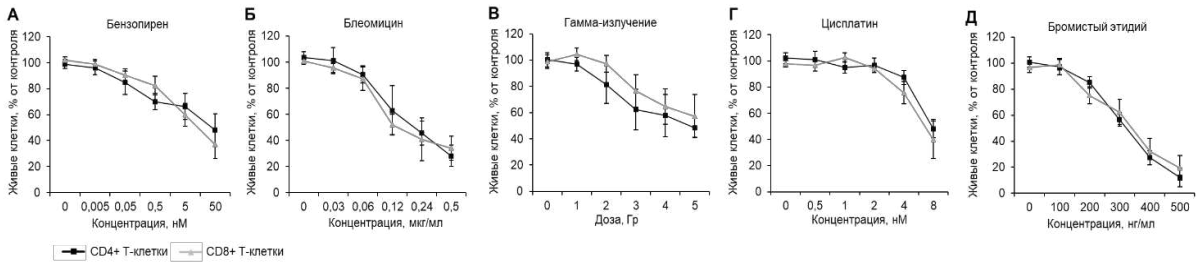


Рисунок 22. Цитотоксическая активность повреждающих ДНК агентов для Т-лимфоцитов человека. $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты культивировали в течение 72 ч с различными концентрациями ДНК-повреждающих химических веществ или после воздействия различных доз гамма-излучения. Количество мертвых клеток определяли по активности LDH в культуральной среде.

4.4.2. Индукция EndoG повреждающими ДНК агентами

Для оценки способности повреждающих ДНК агентов индуцировать EndoG проведено исследование уровней экспрессии EndoG в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках, инкубированных в течение 72 ч с указанными выше химическими агентами или подвергнутых воздействию гамма-излучения. Все исследуемые соединения, за исключением бензопирена и гамма-излучения, вызывали достоверное повышение экспрессии EndoG в $CD4^+$ Т-клетках (рис. 23 А). В $CD8^+$ Т-клетках только гамма-излучение не приводило к достоверному увеличению экспрессии EndoG. Достоверное различие в экспрессии EndoG между контрольными $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетками и между данными клетками после инкубации с бензопиреном и бромистым этидием отсутствовало. В $CD4^+$ Т-клетках, инкубированных с блеомицином и цисплатином, а также после воздействия гамма-излучения обнаружено достоверное увеличение экспрессии EndoG по сравнению с $CD8^+$ клетками. Причину повышенной экспрессии EndoG в $CD4^+$ Т-клетках трудно объяснить. Увеличение количества EndoG в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках, подвергнутых воздействию повреждающих ДНК агентов в МНД, подтверждено методом вестерн-блоттинга (рис. 23 Б-Г).

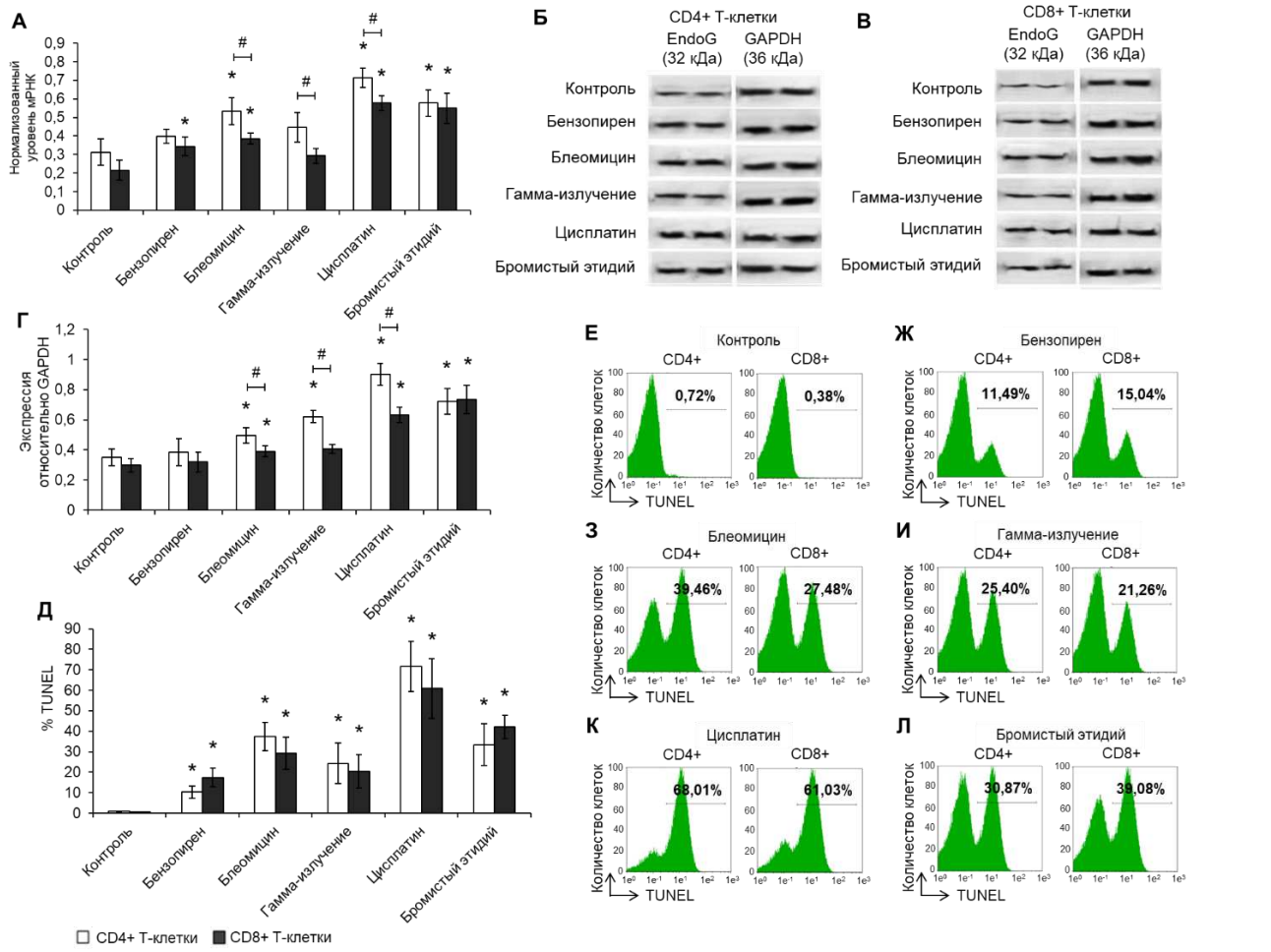


Рисунок 23. Способность ДНК повреждающих агентов индуцировать повреждения ДНК и экспрессию EndoG в Т лимфоцитах человека. Уровни мРНК EndoG, измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитах, культивированных в течение 72 ч с МНД повреждающих ДНК химических веществ или после воздействия гамма-излучения. Уровни мРНК EndoG нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S (А). Вестерн-блоттинг EndoG и референсного белка GAPDH в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках, подвергшихся воздействию повреждающих ДНК агентов (Б, В). Результаты определения количеств EndoG по отношению к GAPDH (Г). Гистограммы количества TUNEL-положительных клеток (Д). Количество $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов с поврежденной ДНК (измеренное методом TUNEL для проточной цитометрии) через 72 ч инкубации с повреждающими агентами (Е-Л). * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам; # $p \leq 0,05$ между $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетками.

Известно, что экспрессия EndoG в клетках может индуцироваться в ответ на повреждения ДНК [351]. Используя метод TUNEL для проточной цитометрии, мы проследили изменение количества клеток с поврежденной ДНК после воздействия повреждающих ДНК агентов в МНД. Все эти соединения вызывали достоверное увеличение клеток с повреждённой ДНК (рис. 23 Д-Л). Достоверного й различия между количеством TUNEL-положительных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, подвергшихся воздействию различных агентов не обнаружено. Поскольку цисплатин вызывал как наибольшее повреждение ДНК (рис. 23 Д, К), так и значительное увеличение экспрессии EndoG в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках (рис. 23 А-Г), то это соединение и было выбрано для дальнейших исследований.

4.4.3. Изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT и ингибирование теломеразы при индукции EndoG цисплатином в лимфоцитах человека

Ранее мы показали, что EndoG осуществляет альтернативный сплайсинг пре-мРНК hTERT [361]. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени было исследовано изменение экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках, инкубированных с МНД цисплатина в течение суток. Инкубация с цисплатином вызывала двукратное увеличение экспрессии EndoG через 24 ч ($p < 0,05$) как в $CD4^+$ (рис. 24 А), так и $CD8^+$ (рис. 24 Е) Т-клетках. Повышение экспрессии EndoG сопровождалось достоверным снижением экспрессии полноразмерного α+β+ варианта hTERT (рис. 24 Б, Ж) и увеличением экспрессии α+β– варианта (рис. 24 В, З). Изменения экспрессии α–β+ (рис. 24 Г, И) и α–β– (рис. 24 Д, К) сплайс-вариантов hTERT не обнаружено. Достоверное различие между уровнями экспрессии EndoG, а также сплайс-вариантов hTERT в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках отсутствовало.

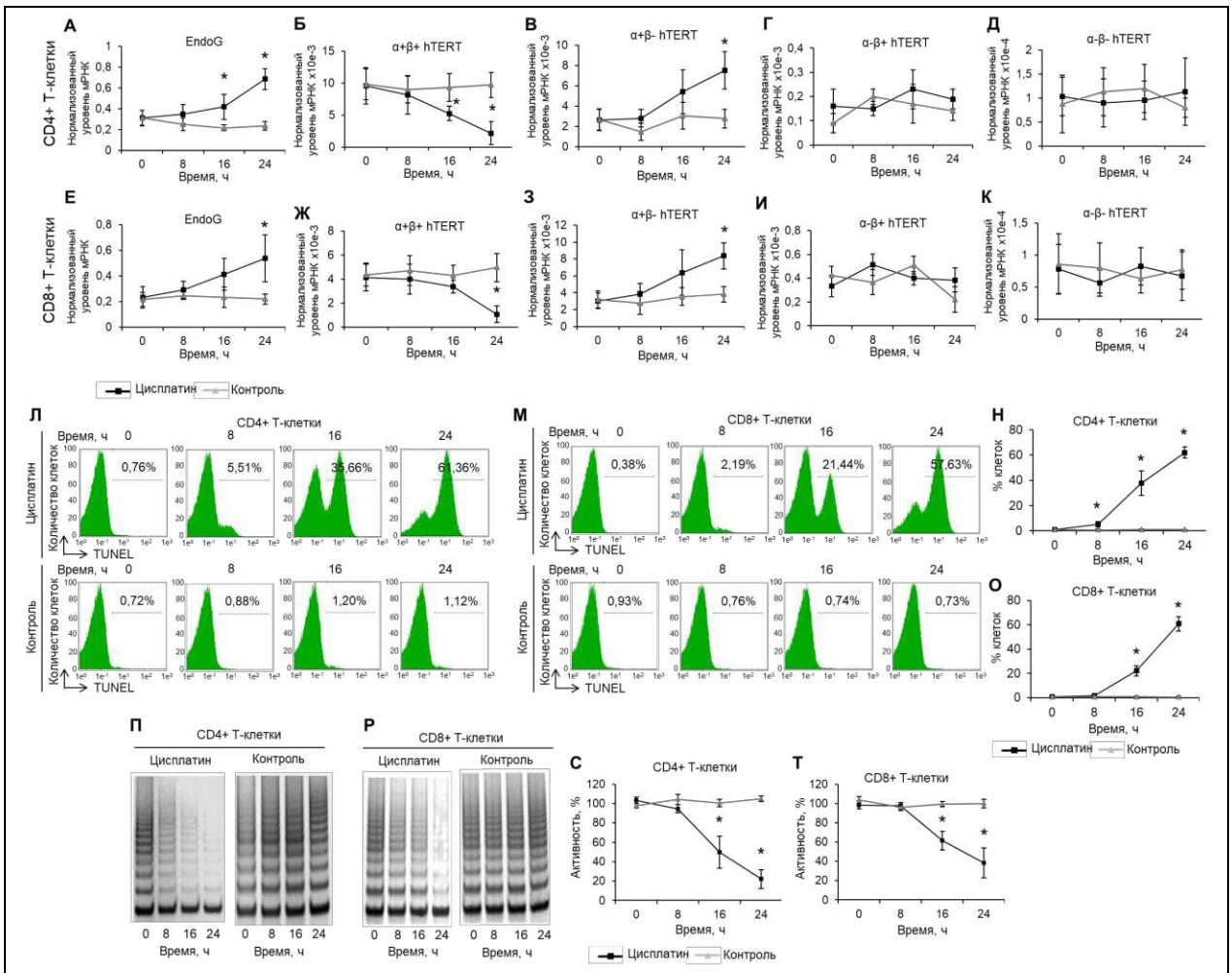


Рисунок 24. Изменение уровня сплайс-вариантов hTERT и ингибирование теломеразы при повышении экспрессии EndoG в Т-лимфоцитах человека. Уровни мРНК EndoG и сплайс-вариантов hTERT в $CD4^+$ (А-Д) и $CD8^+$ (Е-К) Т-клетках в течение 24 ч инкубации с цисплатином в концентрации 2 нМ. Количество $CD4^+$ (Л) и $CD8^+$ (М) Т-лимфоцитов с повреждённой ДНК (измеренное методом TUNEL для проточной цитометрии). Изменение количества TUNEL-положительных $CD4^+$(Н) и $CD8^+$ (О) Т-клеток при их инкубации с цисплатином. Гель-электрофорез TRAP $CD4^+$(П) и $CD8^+$(Р) Т-лимфоцитов, инкубированных с цисплатином. Результаты определения активности теломеразы методом TRAP в $CD4^+$(С) и $CD8^+$ (Т) Т-клетках. Уровни мРНК нормализованы по отношению к уровню рРНК референсного гена 18S. * $p \leq 0{,}05$ по отношению к контрольным клеткам.

Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показали, что к 24-м ч инкубации с цисплатином происходит достоверное увеличение количества EndoG, сопровождающееся снижением количества полноразмерного α+β+ варианта hTERT и возрастанием содержания α+β– варианта как в $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клетках. Не обнаружено и изменения пула белков α+β– и α–β– вариантов hTERT, поскольку их количество в клетке очень мало и не детектируется методом вестерн-блоттинга.

С целью исследования связи индукции EndoG и повреждения ДНК проведено определение количества $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, содержащих повреждения ДНК, методом TUNEL при инкубации в течение суток сцисплатином. Обнаружено возрастание количества TUNEL-положительных клеток при увеличении времени инкубации с цисплатином (рис. 24 Л-О). Статистически достоверного различия между количеством клеток с повреждённой ДНК в популяции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов не выявлено. Повышение количества клеток с повреждённой 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 ± 6,2% от активности фермента контрольных клеток (рис. 24 П, С). В $CD8^+$ Т-клетках активность теломеразы снижалась до уровня 39,8 ± 17,6% (рис. 24 Р, Т). В контрольных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках активность фермента не изменялась. Эти данные полностью согласуются с результатом измерения экспрессии сплайс-вариантов hTERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени и количеством сплайс-вариантов hTERT, измеренного вестерн-блоттингом.

4.5. Способность цисплатина активировать индуцированный EndoG альтернативный сплайсинг пре-мРНК TERT в лимфоцитах мыши и крысы

4.5.1. Индукция АС пре-мРНК TERT в лимфоцитах мыши и крысы в результате сверхэкспрессии EndoG и действия цисплатина *in vitro*

Для установления возможной роли EndoG в индукции АС пре-мРНК TERT в $CD4^+$, $CD8^+$, В - и NK-лимфоцитах мышей и крыс, в клетках индуцировали сверхэкспрессию EndoG методом трансфекции плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. У всех исследуемых клеток эффективность трансфекции приближалась к 94 – 99% через 72 ч. Известно, что экспрессия EndoG возрастает в ответ на повреждения ДНК [351,352]. Для подтверждения роли EndoG в процессе АС пре-мРНК TERT, экспрессию её гена индуцировали также повреждающим ДНК агентом цисплатином в концентрации 60 мкМ [351]. Исследуемая концентрация цисплатина подобрана нами ранее в ходе предварительных экспериментов. Методом TUNEL для проточной цитометрии изучено изменение количества клеток с поврежденной ДНК после инкубации с цисплатином. Инкубация с цисплатином вызывала увеличение повреждения ДНК в $CD4^+$, $CD8^+$ Т-клетках, В-клетках, а также NK-клетках мыши и крысы (рис. 25 А–Е).

Через 72 ч после трансфекции или инкубации клеток с цисплатином проводили оценку количества мРНК EndoG и сплайс-вариантов TERT. Трансфекция клеток плазмидой pEndoG-GFP, а также инкубация с цисплатином вызывали значительное повышение экспрессии EndoG (рис. 25 Ж, М) в лимфоцитах мыши и крысы. Сверхэкспрессия EndoG сопровождалась изменением пула мРНК сплайс-вариантов TERT: уменьшением количества мРНК полноразмерного вариант α+β+ TERT (рис. 25 З, Н) и увеличением пула мРНК укороченного плайс-варианта α+β– TERT (рис. 25 И, О). Сверхэкспрессия EndoG не вызывала изменения экспрессии двух других

сплайс-вариантов α–β+ TERT (рис. 25 К, П) и α–β– вариантов (рис. 25 Л, Р) в лимфоцитах мыши и крысы. Не выявлено изменения экспрессии сплайс-вариантов TERT при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP.

Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показали, что к 72 ч после трансфекции pEndoG-GFP или инкубации с цисплатином в клетках происходит достоверное увеличение EndoG, которое сопровождается снижением полноразмерного α+β+ варианта TERT и увеличением α+β– сплайс-варианта TERT в лимфоцитах мышей (рис. 26 А–З) и крыс (рис. 26 Л–Т). Не выявлено изменения пропорции белков сплайс-вариантов TERT при трансфекции клеток контрольной плазмидой. Не обнаружено и изменения пула белков α+β– и α–β– вариантов TERT, поскольку их количество в клетке очень мало и не детектируется методом вестерн-блоттинга. Активность теломеразы достоверно снижается через 72 ч после трансфекции лимфоцитов мыши (рис. 26 И, К) и крысы (рис. 26 У, Ф) плазмидой pEndoG-GFP или инкубации с цисплатином. Уменьшения активности фермента не наблюдается при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP. Эти данные полностью согласуются с результатом измерения экспрессии сплайс-вариантов TERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени и количеством сплайс-вариантов TERT, измеренным при помощи вестерн-блоттинга.

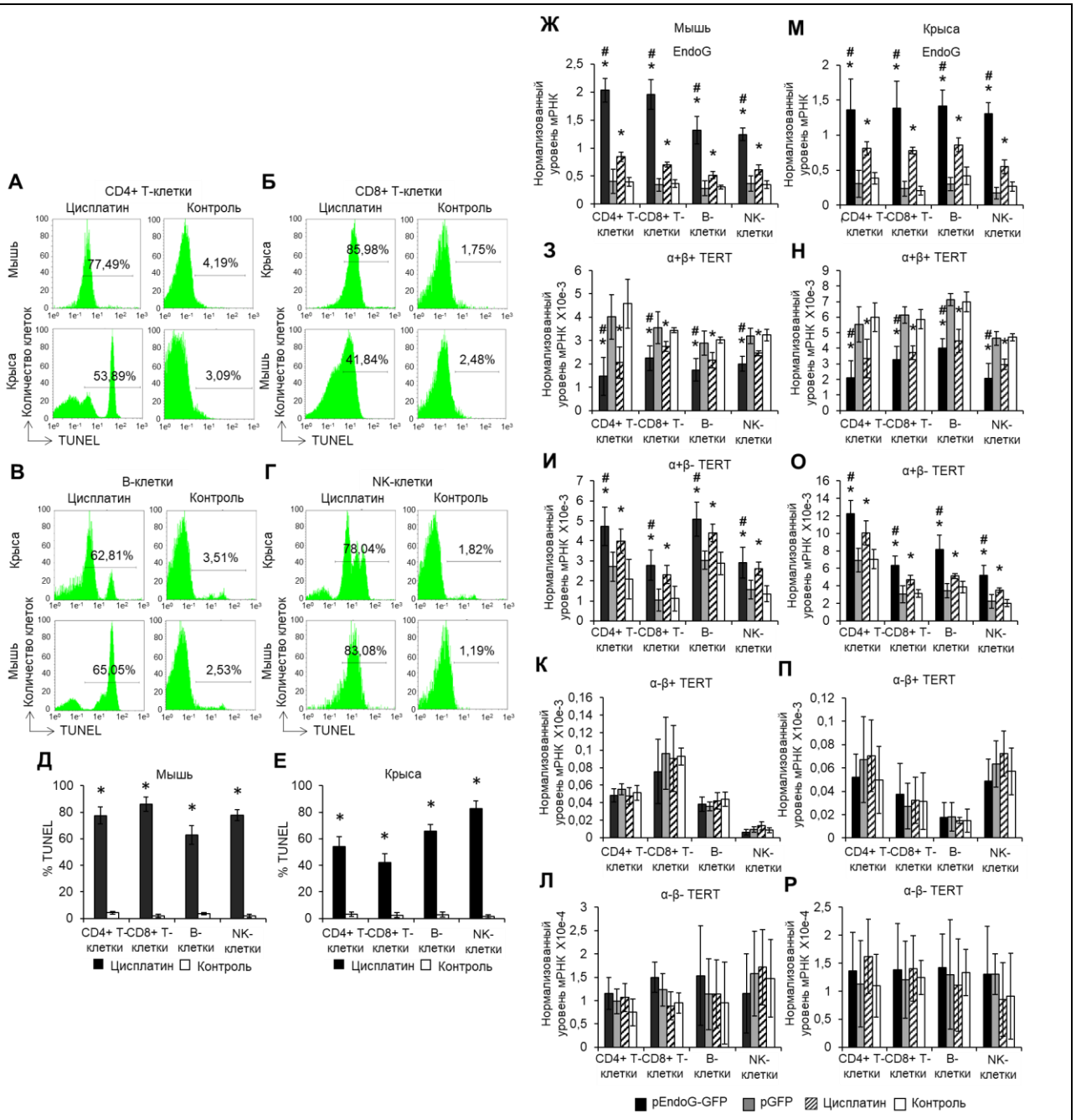


Рисунок 25. Индукция АС пре-мРНК TERT при сверхэкспрессии EndoG в NK-лимфоцитах мыши и крысы. Доля $CD4^+$ Т-клеток (А), $CD8^+$ Т-клеток (Б), В-клеток (В) и НК-клеток (Г) мышей и крыс с повреждённой ДНК (метод TUNEL для проточной цитометрии) через 72 ч действия цисплатина (60 мМ). Гистограммы количества TUNEL-положительных лимфоцитов мыши (Д) и крысы (Е). Уровни мРНК EndoG и сплайс-вариантов TERT в трансфицированных или культивированных с цисплатином лимфоцитах мыши (Ж–Л) и крысы (М–Р). * $p \leq 0{,}05$ по отношению к контрольным клеткам. # $P \leq 0.05$ по отношению к контрольным клеткам, трансфицированных pGFP.

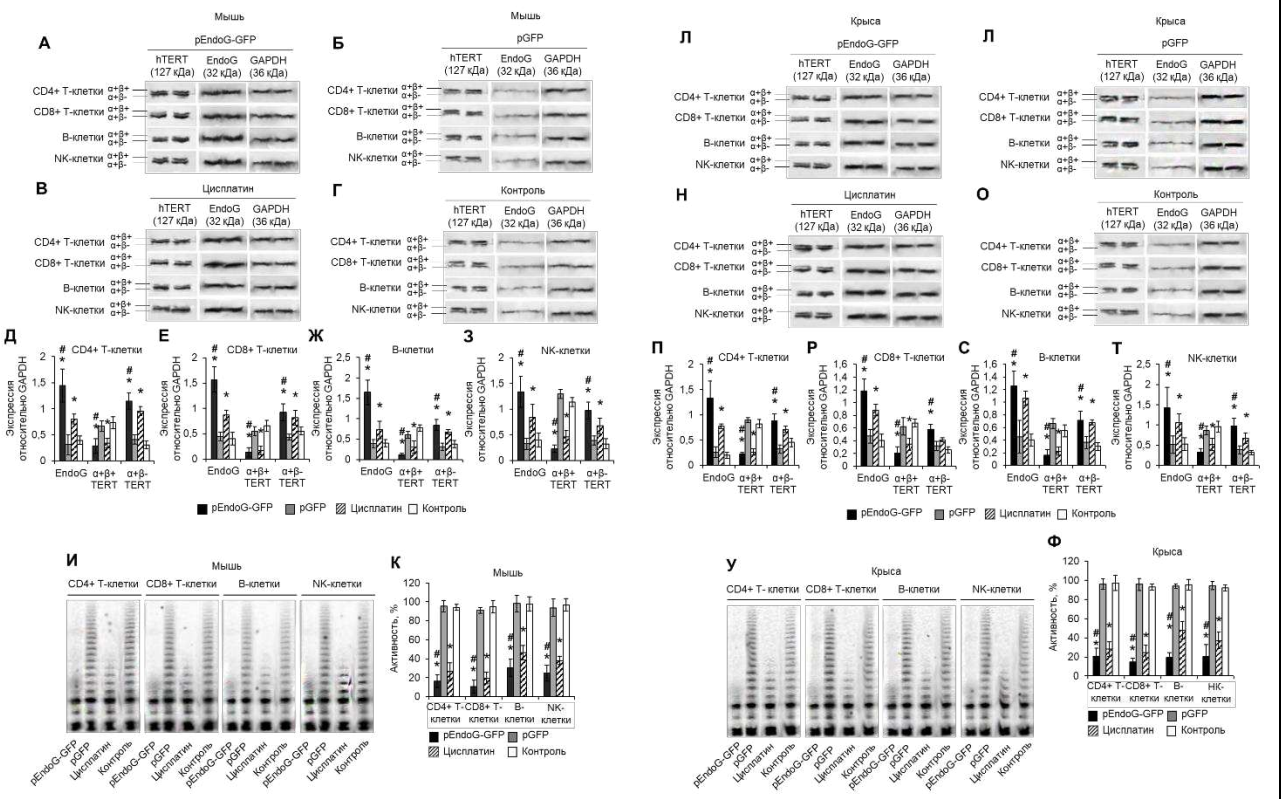


Рисунок 26. Индуцированное EndoG уменьшение пула активной формы TERT и снижение активности теломеразы *in vitro*. Вестерн блоттинг сплайс-вариантов TERT, EndoG и референсного белка GAPDH в лимфоцитах мыши, трансфицированных pEndoG-GFP (А), pGFP (Б), инкубированных с цисплатином (В) или интактных клетках (Г). Результаты определения количеств EndoG и сплайс-форм TERT по отношению к GAPDH (Д-З). Вестерн блоттинг (Л-О) и результаты определения количеств EndoG и сплайс-форм TERT (П-Т) в лимфоцитах крысы. Гель-электрофорез TRAP в лимфоцитах мышей (И) и крыс (У). Результаты определения активности теломеразы, измеренной методом TRAP в клетках мышей (К) и крыс (Ф). * $p \leq 0{,}05$ по отношению к контрольным клеткам. # $P \leq 0.05$ по отношению к контрольным клеткам, трансфицированных pGFP.

4.5.2. Индукция АС пре-мРНК TERT в лимфоцитах мыши и крысы *in vivo* в результате действия цисплатина

Для исследования способности EndoG вызывать АС пре-мРНК TERT *in vivo* мышам линии C57BL/6 и крысам линии Wistar внутривенно вводили цисплатин. Через 72 ч из крови животных выделяли Т-, В-, и NK-клетки и исследовали уровень экспрессии генов.

Методом TUNEL для проточной цитометрии выявлено увеличение количества лимфоцитов с поврежденной ДНК в крови мышей и крыс после введения цисплатина (рис. 27 А–Е). Возрастание количества клеток с поврежденной ДНК сопровождалось усилением экспрессии в них EndoG, а также достоверным снижением полноразмерного варианта α+β+ TERT и увеличением количества укороченного сплайс-варианта α+β– TERT в лимфоцитах мышей (рис. 27 Ж-И) и крыс (рис. 27 К–М). Результаты вестерн блоттинга показали, что индукция EndoG цисплатином сопровождается достоверным снижением количества полноразмерной формы белка α+β+ TERT и увеличением количества укороченной формы α+β– в лимфоцитах мышей (рис. 28 А–Е) и крыс (рис. 28 Ж–М). Изменение пула форм TERT сопровождалось снижением активности теломеразы в Т-, В- и NK-клетках мышей (рис. 27 О, П) и крыс (рис. 28 Р, С).

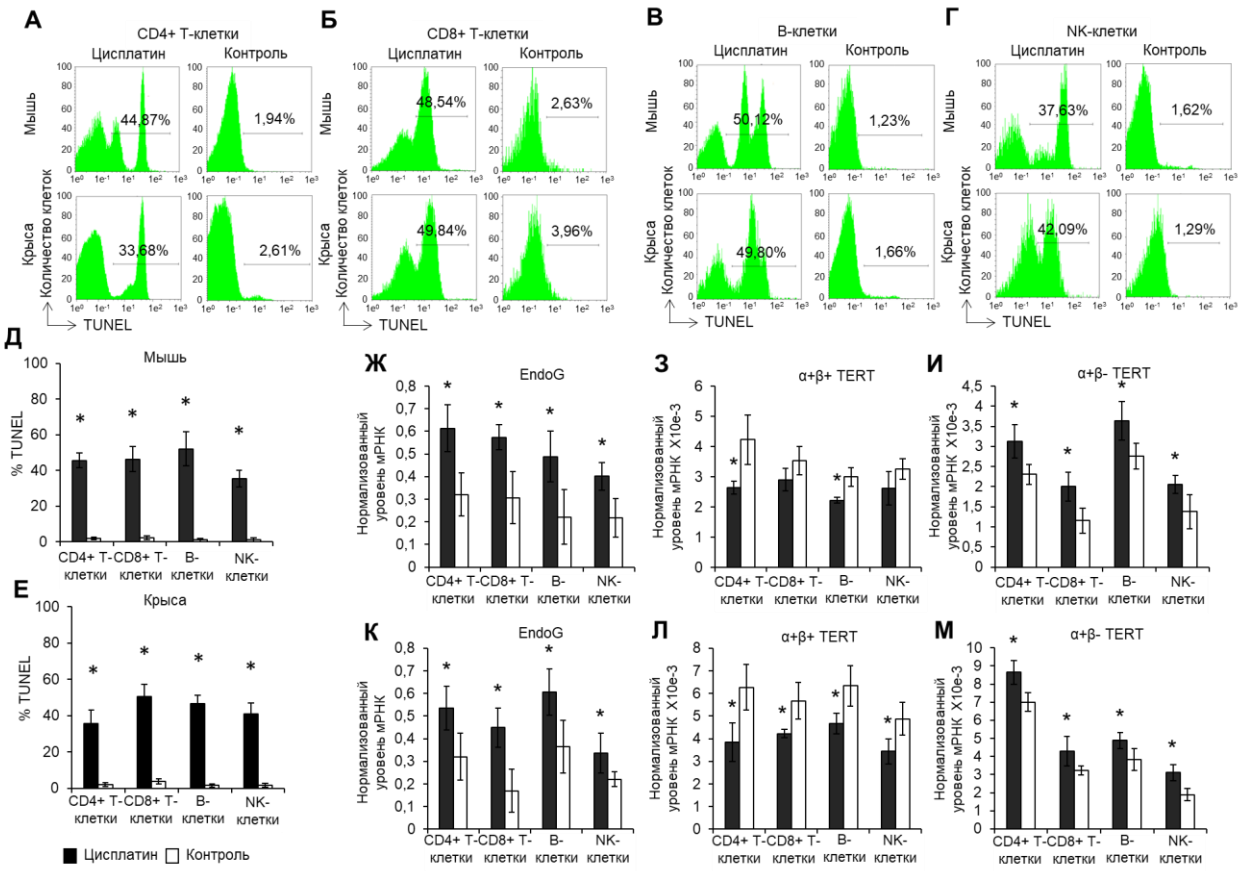


Рисунок 27. Экспрессия EndoG и сплайс-вариантов TERT в лимфоцитах мышей и крыс при повреждении ДНК, вызванного действием циплатином *in vivo*. Количество $CD4^+$ Т-клеток (А), $CD8^+$ Т-клеток (Б), В-клеток (В) и NK-клеток (Г) мышей и крыс с повреждённой ДНК (измеренное методом TUNEL для проточной цитометрии) через 72 ч после введения цисплатина. Гистограммы количества TUNEL-положительных лимфоцитов мыши (Д) и крысы (Е). Уровни мРНК EndoG (Ж) и сплайс-вариантов TERT (З, И) в лимфоцитах мыши и крысы (К-М) определенные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК нормализованы по отношению к уровню рРНК референсного гена *18S*. * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам контрольных животных.

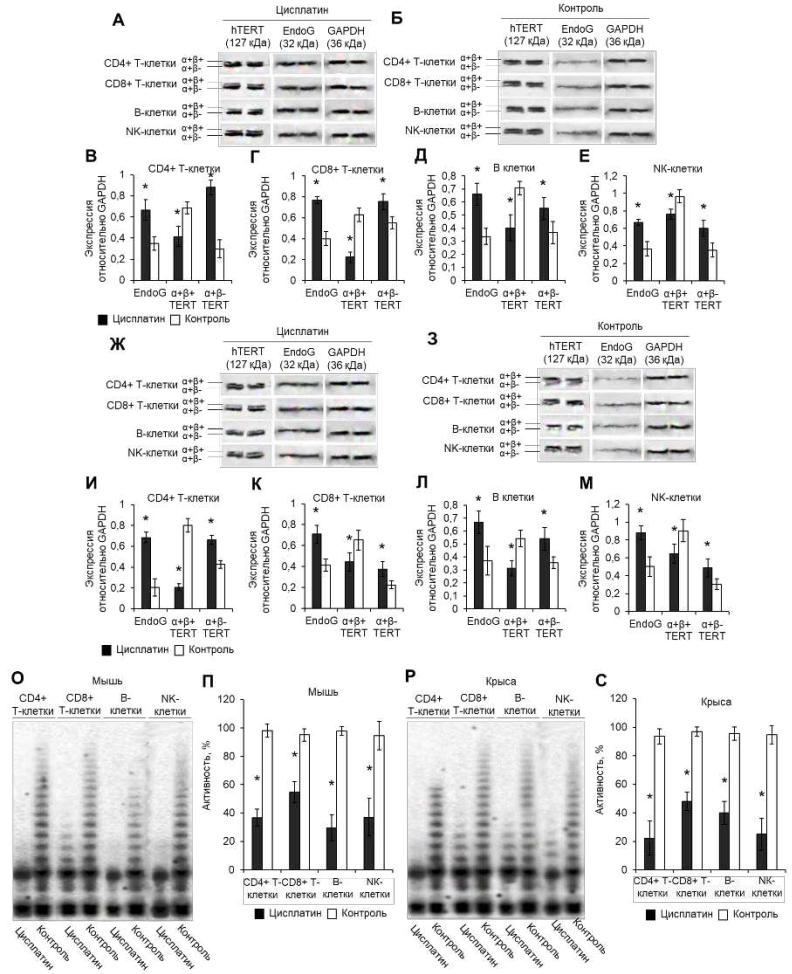


Рисунок 28. Ингибирование активности теломеразы в лимфоцитах мышей *in vivo* и крыс при индукции EndoG цисплатином. Вестерн блоттинг сплайс-вариантов TERT, EndoG и референсного белка GAPDH в лимфоцитах мышей через 72 ч после введения цисплатина (А) или в лимфоцитах мышей контрольной группы (Б). Результаты определения количеств EndoG и сплайс-форм TERT по отношению к GAPDH (В-Е). Вестерн блоттинг (Ж, З) и результаты определения количеств EndoG и сплайс-форм TERT (И-М) в лимфоцитах крысы. Гель-электрофорез TRAP в $CD4^+$ Т-клетках, $CD8^+$ Т-клетках, В-клетках и NK-клетках мышей (О) и крыс (Р). Результаты определения активности теломеразы, измеренной методом TRAP в клетках мышей (П) и крыс (С). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам контрольных животных.

4.6. 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.

4.6.1. Результаты секвенирования РНК

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 pEndoG-GFP, и в клетках, инкубированных с цисплатином, изменяется количество мРНК сплайс-вариантов 28-ми генов (рис. 29, 30). Выявленные уровни мРНК сплайс вариантов в лимфоцитах человека, мыши и крысы после трансфекции геном EndoG или инкубации с цисплатином представлены в приложении, в таблицах 1-6. Выявленный сдвиг в соотношении сплайс-вариантов мРНК изучаемых генов не сопровождался изменением общих количеств их мРНК. Трансфекция клеток контрольной плазмидой pGFP 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.

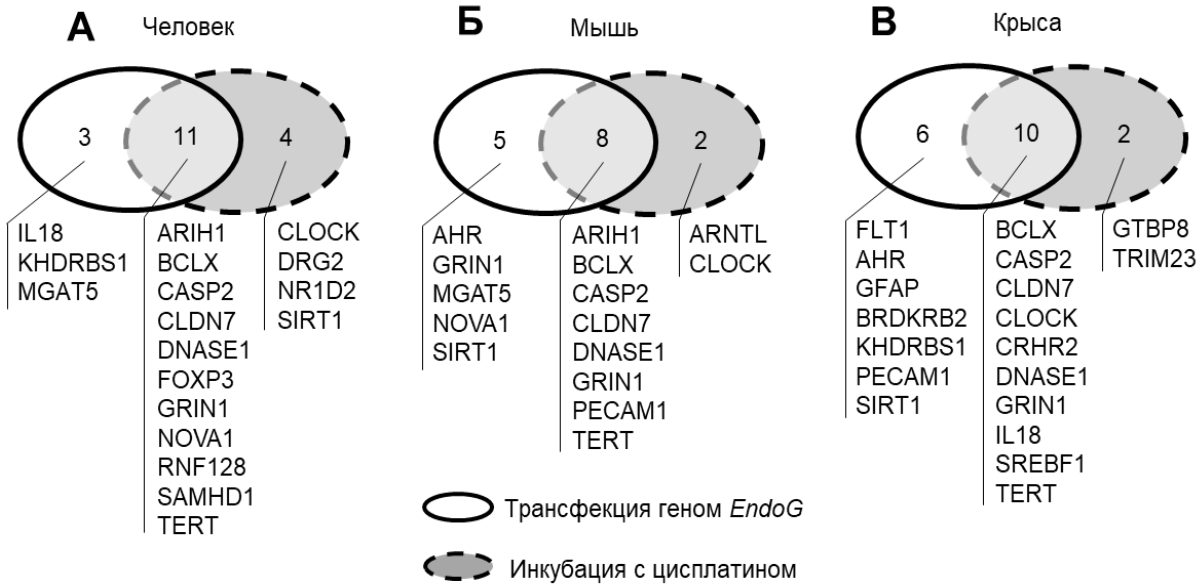


Рисунок 29. Идентифицированные гены, АС пре-мРНК которых изменяется при сверхэкспрессии EndoG. мРНК генов в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека (А), мыши (Б) и крысы (В) после трансфекции геном *EndoG* или инкубации с цисплатином.

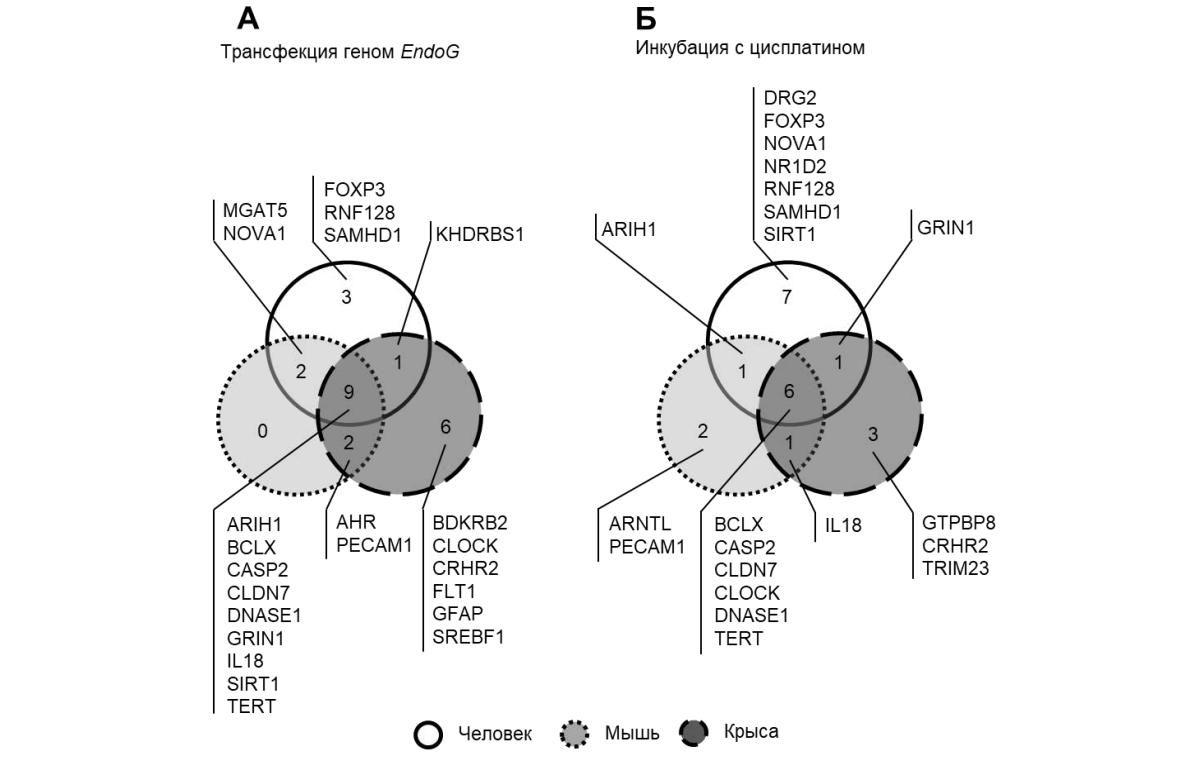


Рисунок 30. Сопоставление мРНК в $CD4^+$ Т-лимфоцитах после трансфекции геном *EndoG* (А) или инкубации с цисплатином (Б).

Обнаружено изменение пропорции мРНК сплайс-вариантов четырёх апоптотических генов, как в клетках человека, так и в клетках мыши и крысы. Это касалось каталитической субъединицы теломеразы (TERT), каспазы-2 (caspase-2, Casp-2), дезоксирибонуклеазы 1 (deoxyribonuclease I, DNase I) и B-cell lymphoma-extra (BCL-x). Сверхэкспрессия EndoG вызывала уменьшение количества мРНК полноразмерного варианта α+β+ hTERT и увеличение уровня сплайс-варианта α+β– TERT, который образуется при делеции экзонов 7 и 8 пре-мРНК TERT (рис. 31 А) [362]. Повышение экспрессии EndoG сопровождалось снижением количества полноразмерной мРНК DNase I и увеличением уровня мРНК Δ4DNase I, образующейся в результате делеции экзона 4 (рис. 31 Б). Обнаружено снижение уровня мРНК полноразмерного варианта Casp-2L и увеличение количества мРНК укороченного сплайс-варианта Casp-2S (рис. 31 В). Последний образуется в результате появления стоп-кодона из-за сдвига рамки считывания при включении дополнительного кодирующего экзона 9 [363]. Выявлено уменьшение количества полноразмерной мРНК BCL-xL и увеличение уровня мРНК BCL-xS, образующейся в результате делеции 189 нуклеотидов экзона 2 (рис. 31 Г).

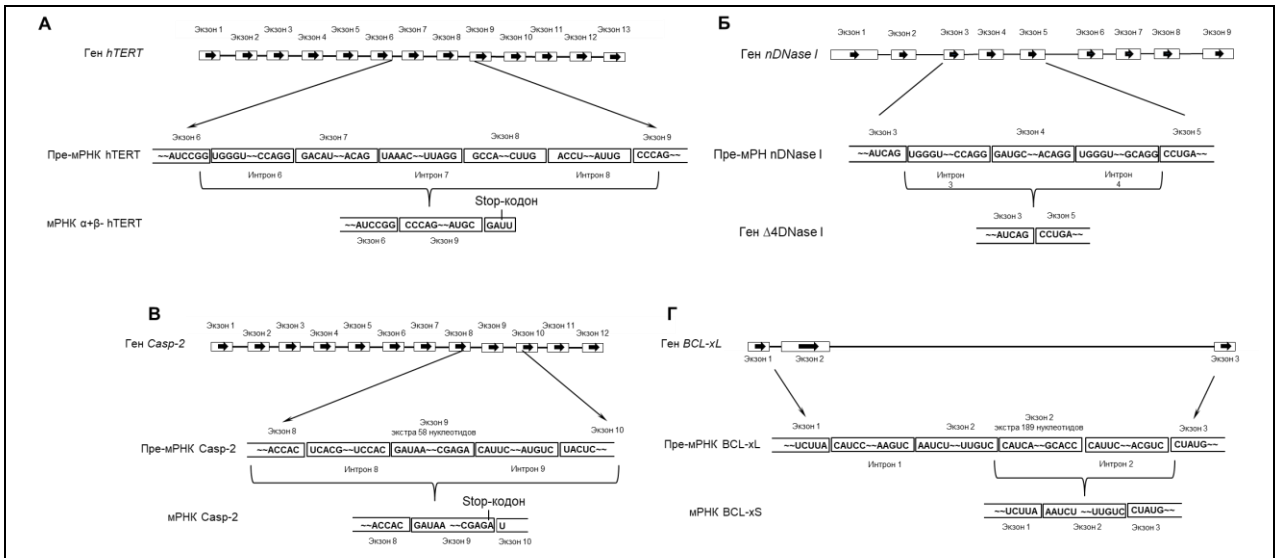


Рисунок 31. Схема АС пре-мРНК (А) TERT, (Б) DNase I, (В) Casp-2 и (Г) BCL-x человека (см. пояснения в тексте).

4.7. Изучение способности EndoG индуцировать АС пре-мРНК DNase I и ингибировать нуклеазную активность

Секвенирование тотальной РНК в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека, мыши и крысы со сверхэкспрессией EndoG позволило выявить индукцию АС пре-мРНК DNase I: понижение мРНК полноразмерного сплайс-варианта nDNase I и увеличение мРНК с делецией экзона 4 (Δ4DNase I) [364]. Была изучена корреляция экспрессии EndoG и сплайс-вариантов мРНК DNase I в лимфоцитах человека, а также оценена возможность индукции АС при сверхэкспрессии EndoG.

4.7.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG с уровнем мРНК сплайс-вариантов DNase I

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 (рис. 32). Установлено снижение уровней мРНК полноразмерной nDNase I и повышение количества мРНК Δ4DNase I при повышении уровня EndoG в каждой субпопуляции лимфоцитов. Клетки были сгруппированы на основе количества их мРНК EndoG. Полученные медианы для количеств мРНК EndoG и коэффициенты детерминации Пирсона (значение R^2) для уровней мРНК nDNase I и Δ4DNase I представлены в таблице 23. 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 Δ4DNase I. В группах клеток с высоким уровнем EndoG (выше медианы) наблюдали повышение количества мРНК Δ4DNase I и снижение уровня мРНК nDNase I. коэффициенты корреляции EndoG и сплайс-вариантов DNase I представлены в таблице 24. 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.

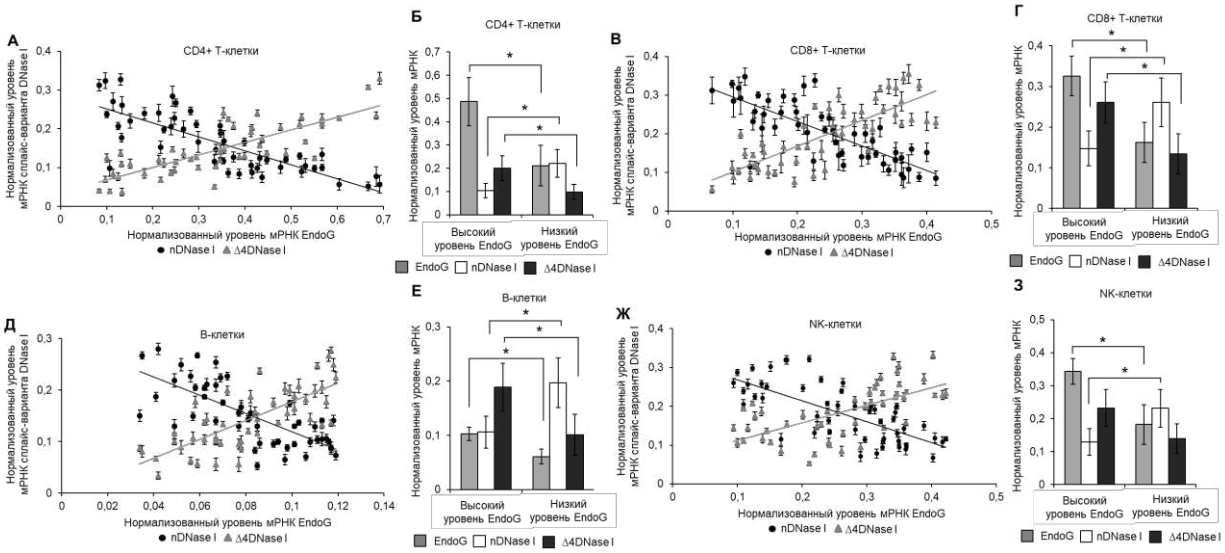


Рисунок 32. Взаимосвязь между уровнями мРНК EndoG и сплайс-вариантами DNase I в лимфоцитах человека. Уровни мРНК EndoG и DNase I в $CD4^+$ Т-клетках(А), $CD8^+$ Т-клетках (В), В-лимфоцитах (Д) и NK-клетках (Ж). Зависимость между уровнем мРНК EndoG и сплайс-вариантов DNase I в $CD4^+$ Т-клетках (Б), $CD8^+$ Т-клетках (Г), В-клетках (Е) и NK-клетках (З). Клетки разделены на две группы: с низким или высоким уровнем EndoG. Уровни мРНК нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S рРНК. N = 50. * - $p \leq 0,05$ для уровней мРНК между группами клеток. Черные и серые линии обозначают линии тренда для nDNase I и Δ4DNase I, соответственно.

Таблица 23. Медиана уровней мРНК EndoG и коэффициент детерминации Пирсона (значение R^2) для уровней мРНК EndoG и сплайс-вариантов DNase I.

Лимфоциты	**Медиана уровней мРНК EndoG**	**Значение R^2**	
		nDNase I	**Δ4DNase I**
$CD4^+$ Т-клетки (N=50)	0,347	0,644	0,652
$CD8^+$ Т-клетки (N=50)	0,246	0,623	0,627
В-клетки (N=50)	0,082	0,534	0,564
NK-клетки (N=50)	0,282	0,530	0,406

Таблица 24. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов DNase I в лимфоцитах человека.

Сплайс-вариант DNase I	Низкий уровень EndoG				Высокий уровень EndoG			
	$CD4^+$ T-клетки (N=25)	**$CD8^+$ T-клетки** (N=25)	**B-клетки** (N=25)	**NK-клетки** (N=25)	**$CD4^+$ T-клетки** (N=25)	**$CD8^+$ T-клетки** (N=25)	**B-клетки** (N=25)	**NK-клетки** (N=25)
nDNase I	– 0,778*	– 0,651*	– 0,629	– 0,548	– 0,716*	– 0,607*	– 0,644*	– 0,521
Δ4DNase 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.

4.7.2. Индукция АС пре-мРНК DNase I и ингибирование нуклеазной активности при сверхэкспрессии EndoG

Для определения возможной роли EndoG в индукции АС пре-мРНК DNase I проводили трансфекцию $CD4^+$ Т-клеток плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Эффективность трансфекции, измеренная методом проточной цитометрии, приближалась к 100% в течение 8 ч после трансфекции как в pEndoG-GFP, так и в pGFP-трансфицированных клетках (данные не представлены). В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, наблюдали индукцию мРНК полноразмерной nDNase I в течение первых 8 ч после трансфекции (рис. 33 А). Уровень мРНК nDNase I резко снижался в течение 8 – 21 ч после трансфекции. Изменения содержания мРНК nDNase I вероятно, были связаны с индукцией мРНК Δ4DNase I (рис. 33 Б). Уровень мРНК Δ4DNase 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. Вестерн блоттинг с использованием антител к ДНКазе 1, показал, что синтез белка nDNase I индуцировался в течение 12 ч после трансфекции, а затем

снижался ниже контрольного уровня в CD4$^+$ Т-клетках, трансфицированных плазмидой pEndoG-GFP (рис. 30 В–Е).

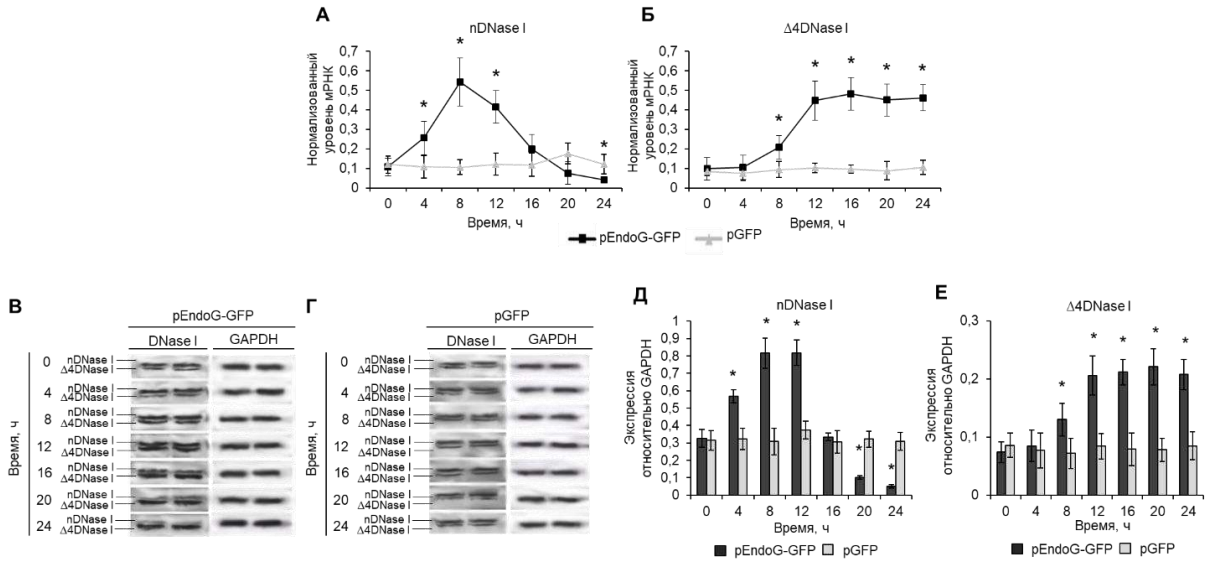


Рисунок 33. Индукция АС пре-мРНК DNase I в результате сверхэкспрессии EndoG. Уровни мРНК nDNase I (А) и Δ4DNase I (Б) в CD4$^+$ Т-лимфоцитах человека в течение 24 ч после трансфекции плазмидами pEndoG-GFP или pGFP. вестерн-блоттинг с антителами к ДНКазе 1 (В, Г). Результаты количественной оценки уровней сплайс-вариантов DNase I относительно GAPDH (Д, Е). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

Уровень белка сплайс-варианта Δ4DNase I повышался через 8 ч после трансфекции и полностью замещал нормальный сегмент через 20 ч после трансфекции.

Для проверки нуклеазной активности сплайс-варианта Δ4DNase I, мы трансфицировали CD4$^+$ Т-клетки плазмидами pΔ4DNase 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 Δ4DNase I была значительно ниже, чем у варианта nDNase I (рис. 34). Активность ДНКазы в клетках, трансфицированных pΔ4DNase I-GFP, значительно ниже, чем в контрольных pGFP-трансфицированных клетках. Такой результат указывает на доминантно-

негативный эффект действия сплайс-варианта Δ4DNase 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 Δ4DNase I и их белковых форм (рис. 33 B–E).

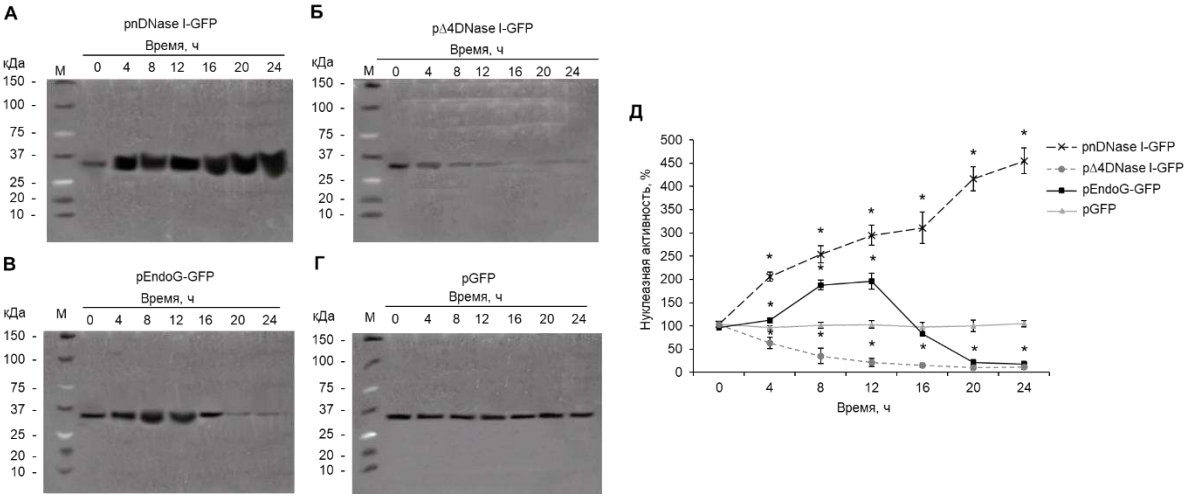


Рисунок 34. Доминантно-негативный эффект варианта Δ4DNase I. Результаты зимографии клеточных лизатов методом DNA-SDS-PAGE для $CD4^+$ Т-клеток в течение 24-х ч после трансфекции плазмидами pnDNase I-GFP (А), pΔ4DNase I-GFP (Б) pEndoG-GFP (В) или pGFP (Г). Оценка изображений зимографии с помощью денситометрии (Д). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

4.8. Индукция EndoG АС пре-мРНК Casp-*2* и ингибирование активности каспазы-2

Каспазы представляют собой семейство цистеиновых протеаз, осуществляющие протеолиз белков после аспарагиновой кислоты в аминокислотной последовательности. Каспазы являются инициаторными, медиаторными и эффекторными молекулами в процессе развития апоптоза и играют определяющую роль в регуляции гибели клеток [365]. Каспаза-2 (Caspase-2, Casp-2) – одна из наиболее эволюционно консервативных каспаз и обладает свойствами как инициаторных, так и эффекторных каспаз [366].

Ранее было показана связь Casp-2 и некоторых апоптотических эндонуклеаз [367,368], разрушающих ДНК клеток на последних стадиях апоптоза [369]. Мы изучили корреляцию экспрессии EndoG и сплайс-вариантов мРНК Casp-*2* в лимфоцитах 12-ти здоровых доноров, а также оценили возможность индукции АС при сверхэкспрессии EndoG.

4.8.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG с уровнем мРНК сплайс-вариантов Casp-2

С целью изучения связи между EndoG и сплайс-вариантами 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 (концентрация подобрана нами ранее, данные не представлены) приводила к достоверному увеличение экспрессии EndoG практически во всех образцах $CD4^+$ и $CD8^+$ Т клеток (рис. 35 А, Д). Этопозид вызывал также увеличение экспрессии общей Casp-2 (рис. 35 Б, Е), и каждого из сплайс-вариантов Casp-2 (рис. 35 В, Г, Ж, З). Полученные результаты согласуются с данными о том, что этопозид вызывает возрастание экспрессии Casp-2S [370–372]. При ранжировании клеток по уровню экспрессии EndoG медиана составила 0,299 для $CD4^+$ Т лимфоцитов и 0,216 для $CD8^+$ Т лимфоцитов. В группе клеток, инкубированных с этопозидом, медиана равнялась 0,488 для $CD4^+$ Т лимфоцитов и 0,500 для $CD8^+$ Т лимфоцитов.

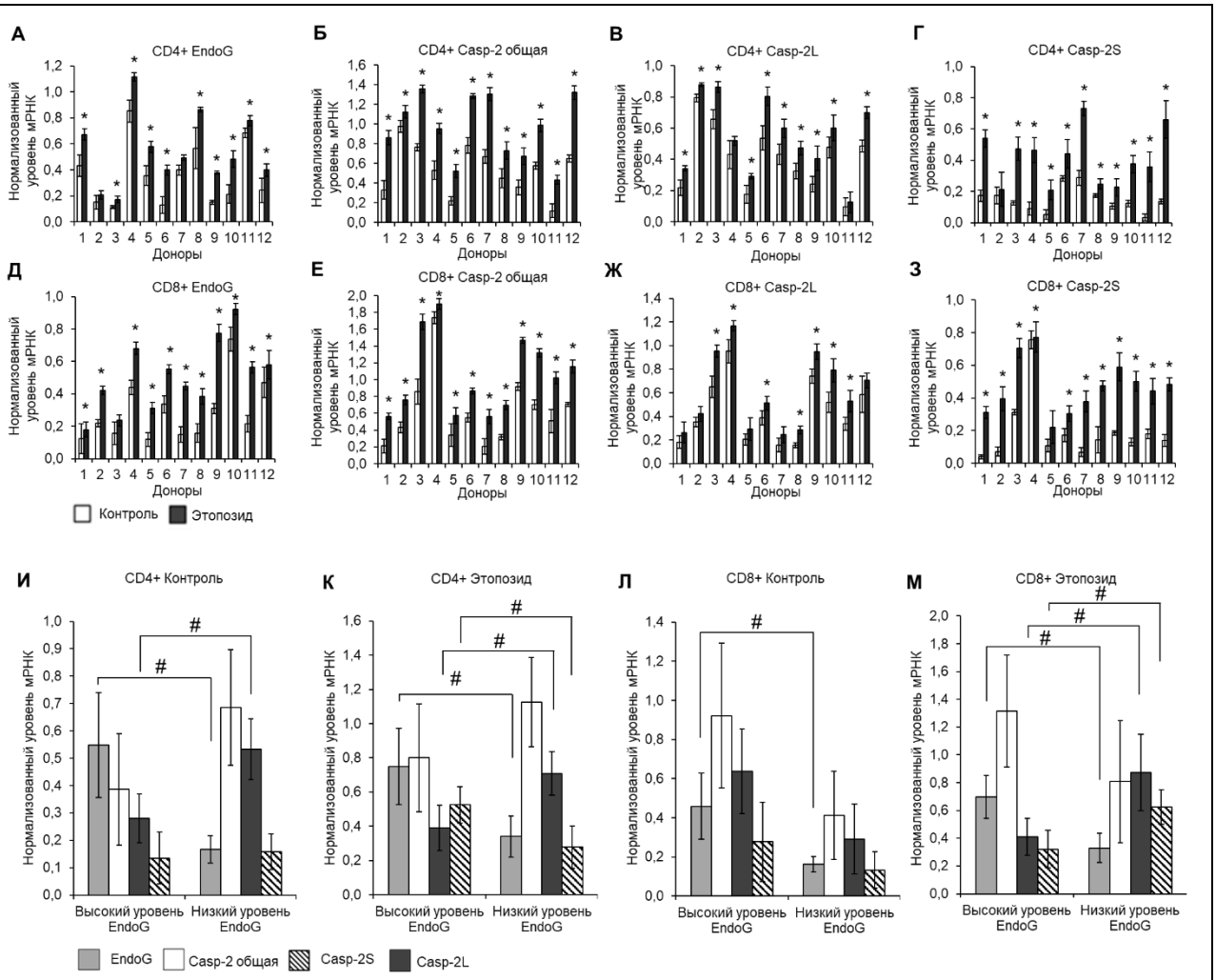


Рисунок 35. Зависимость между уровнями экспрессии EndoG и мРНК сплайс-вариантов Casp-2 в Т-клетках человека. Уровни экспрессии EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 (А) в $CD4^+$ (Б-Г) и $CD8^+$ (Д-З) Т-лимфоцитах 12-ти здоровых доноров до и после инкубации с этопозидом. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам. Зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 в (И) $CD4^+$ клетках и (К) $CD4^+$ клетках, инкубированных с этопозидом, а также (Л) $CD8^+$ клетках и (К) $CD8^+$ клетках, инкубированных с этопозидом. # $p \leq 0,05$ для уровней мРНК соответствующих генов между группами клеток.

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 табл. 25. Для дальнейшей работы были выбраны клетки $CD4^+$, поскольку именно у них корреляция между экспрессией EndoG и сплайс-вариантами Casp-2 была наиболее выраженной.

Таблица 25. 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, $p \leq 0,01$ 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.

4.8.2. Индукция АС пре-мРНК Casp-2 при сверхэкспрессии EndoG

Для установления возможной роли EndoG в индукции сплайс-варианта Casp-2 $CD4^+$ Т-клетки трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Эффективность трансфекции приближалась к 100% в течение 8 ч после трансфекции. Трансфекция клеток плазмидой pEndoG-GFP приводила к значительному увеличению экспрессии EndoG (рис. 36 А), уже через 8 ч. Синтез EndoG находился на стабильно высоком уровне в течение всего периода наблюдения. Возрастание экспрессии EndoG сопровождалось достоверным увеличением экспрессии общей Casp-2 (рис. 36 Б). Анализ синтеза сплайс-вариантов Casp-2 показал, что, несмотря на увеличение общей Casp-2, происходит снижение экспрессии Casp-2L (рис. 36 В). Увеличение общей Casp-2 происходило за счёт повышения экспрессии

Casp-2S (рис. 36 Г). Не выявлено изменения синтеза EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 при трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP.

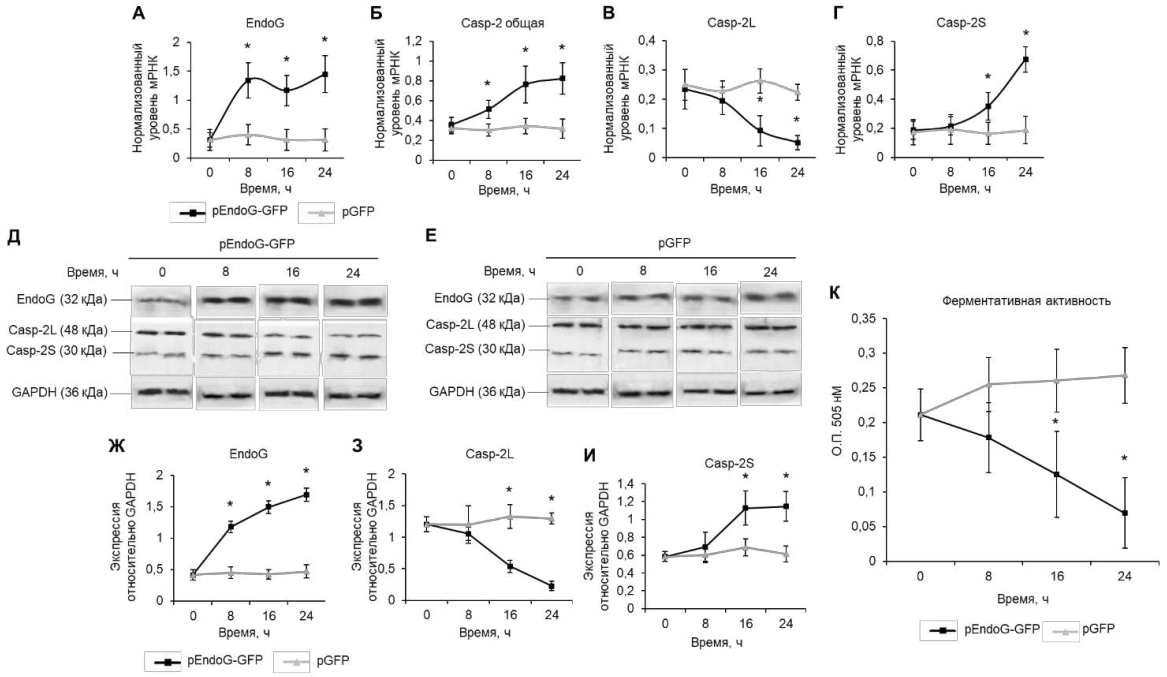


Рисунок 36. Экспрессия EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 в $CD4^+$ Т лимфоцитах человека, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP. Уровень экспрессии EndoG (А) и общей Casp-2 (Б), Casp-2L (В) и Casp-2S (Г) в $CD4^+$ Т-клетках в течение 24 ч после трансфекции, измеренный методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Вестерн блоттинг EndoG, сплайс-вариантов Casp-2 и референсного белка GAPDH в клетках трансфицированных (Д) pEndoG-GFP и (Е) pGFP. Результаты определения количеств EndoG (Ж) и сплайс-вариантов Casp-2 (З, И) по отношению к GAPDH. Ферментативная активность Casp-2 в трансфицированных клетках (К). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированым pGFP.

Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показали, что к 24-м ч после трансфекции в $CD4^+$ Т клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, наряду с увеличением количества EndoG, происходит достоверное снижение уровня полноразмерного варианта Casp-2L (рис. 36 Д-И) и увеличение количества Casp-2S. При трансфекции клеток

контрольной плазмидой изменения EndoG и пропорции белков сплайс-вариантов Casp-2 не выявлено.

В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, ферментативная активность Casp-2 достоверно снижалась уже через 16 ч после трансфекции (рис. 36 К). Уменьшения активности фермента не наблюдалось при трансфекции клеток контрольной плазмидой. Эти данные полностью согласуются с результатом измерения экспрессии сплайс-вариантов Casp-2 вестерн-блоттингом. Снижение активности теломеразы, вероятнее всего, происходит за счёт уменьшения количества полноразмерного Casp-2L варианта, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью.

4.9. Индукция EndoG АС пре-мРНК BCL-x

Белок B-cell lymphoma-extra (BCL-x), принадлежит к семейству белков BCL-2 и является мощным регулятором апоптотических процессов [373,374]. В процессе АС пре-мРНК BCL-x образуются два варианта: полноразмерный BCL-xL, кодирующий белок с антиапоптотическими свойствами, и укороченный в результате делеции части экзона 2 BCL-xS, кодирующий противоапоптотический белок [375].

Мы изучили корреляцию экспрессии EndoG и сплайс-вариантов мРНК BCL-x в клетках линий рака молочной железы человека, а также оценили возможность индукции АС при сверхэкспрессии EndoG.

4.9.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG с уровнем мРНК сплайс-вариантов BCL-x

С целью исследования связи между 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 разные уровни мРНК сплайс-вариантов BCL-x. (рис. 37 А). При ранжировании клеток по уровню относительной экспрессии EndoG медиана

составила 0,18. Корреляционный анализ выявил зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов BCL-x (рис. 37 Б). В клетках с относительно низкой экспрессией EndoG (медиана менее 0,18) наблюдалось преобладание полноразмерного BCL-xL. В группе клеток с относительно высокой экспрессией EndoG (медиана более 0,18) выявлено увеличение уровней мРНК укороченного сплайс-варианта BCL-xS и снижение содержания мРНК полноразмерного BCL-xL.

Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG со сплайс-вариантами BCL-x представлены в таблице 25. Для дальнейшей работы были выбраны клетки линии HCC1954, поскольку именно у них корреляция между экспрессией EndoG и уровнем мРНК сплайс-вариантов BCL-x была наиболее выраженной.

Таблица 25. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов BCL-x.

Сплайс-вариант BCL-x	Низкий уровень экспрессии EndoG (N=5)	Высокий уровень экспрессии EndoG (N=4)
BCL-xL	– 0,651*	– 0,619*
BCL-xS	+ 0,592*	+ 0,704*

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

4.9.2. Индукция АС пре-мРНК BCL-x при сверхэкспрессии EndoG

Для установления возможной роли EndoG в индукции сплайс-варианта BCL-x клетки линии HCC1954 (эпителиальный рак молочной железы человека) трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Через 24 ч после трансфекции клеток плазмидой pEndoG-GFP выявлено значительное увеличение экспрессии EndoG (рис. 37 В). Повышение экспрессии EndoG сопровождалось достоверным снижением

уровня мРНК полноразмерного варианта BCL-xL и увеличением количества укороченного сплайс-варианта BCL-xS. При трансфекции клеток контрольной плазмидой pGFP не выявлено изменения экспрессии EndoG и сплайс-вариантов BCL-x.

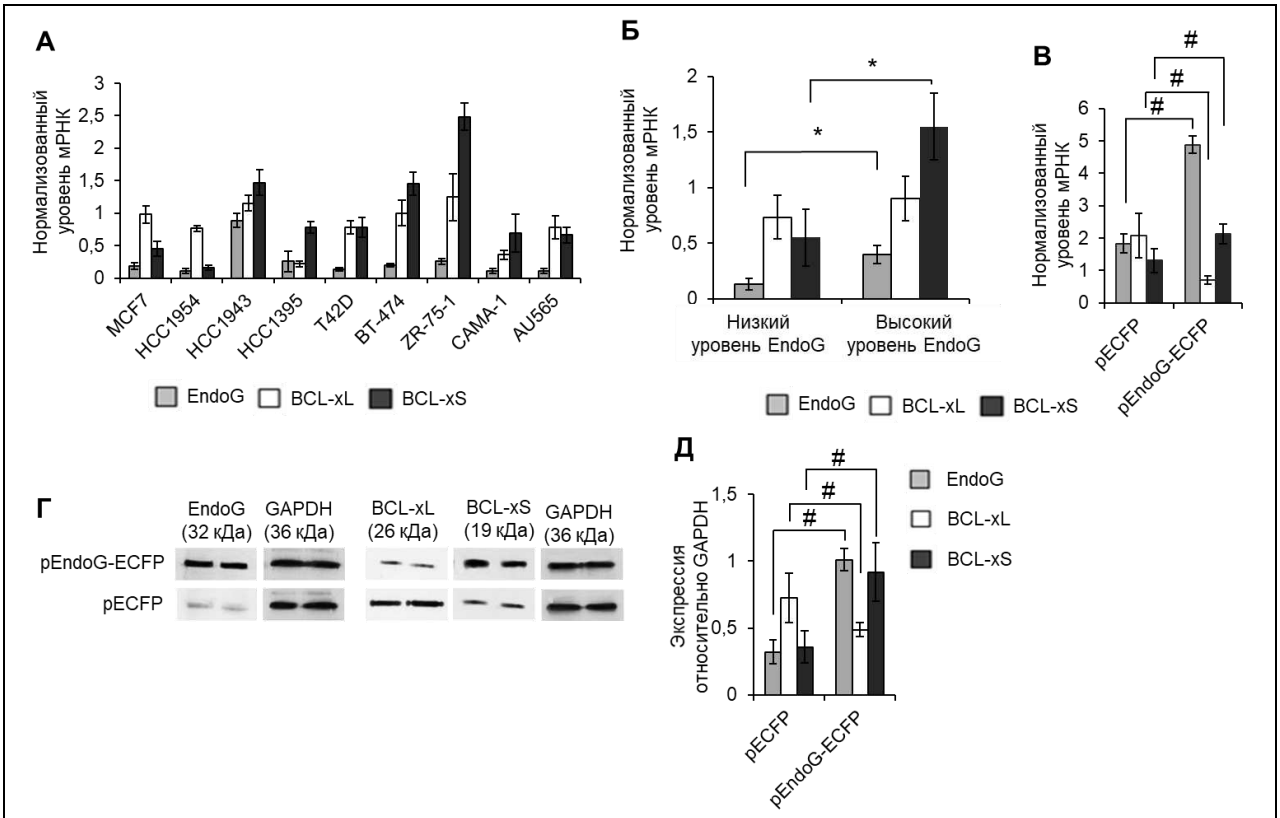


Рисунок 37. Способность EndoG индуцировать АС пре-мРНК BCL-x. Уровни мРНК EndoG и сплайс-вариантов BCL-x в клетках линий рака молочной железы человека (А). Зависимость между уровнем мРНК EndoG и сплайс-вариантов BCL-x (Б). Клетки были разделены на две группы: с низким или высоким уровнем EndoG. Уровни мРНК генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. Уровни мРНК EndoG и сплайс-вариантов BCL-x в клетках HCC1954 через 24 ч после трансфекции плазмидой pEndoG- GFP или контрольной плазмидой pGFP (В). вестерн-блоттинг с антителами к BCL-x (Г). Результаты количественной оценки уровней сплайс-вариантов BCL-x относительно GAPDH (Д). * $p \leq 0,05$ для уровней мРНК между группами клеток. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам.

Результаты вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показали, что к 24-м ч после трансфекции в HCC1954 клетках,

трансфицированных pEndoG-GFP, наряду с увеличением количества EndoG, происходит достоверное снижение уровня полноразмерного варианта BCL-xL (рис. 37 Г, Д) и увеличение количества BCL-xS. При трансфекции клеток контрольной плазмидой изменения EndoG и пропорции белков сплайс-вариантов BCL-x не выявлено

4.10. Влияние EndoG на индукцию АС пре-мРНК Casp-2, DNase I и BCL-x в $CD4^+$ Т лимфоцитах мышей и крыс

Выше было показано, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG индуцирует АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT, дезоксирибонуклеазы 1, каспазы-2 и BCL-x в клетках человека. Представляло интерес изучение способности EndoG вызывать АС пре-мРНК Casp-2, DNase I и BCL-x и у других организмов. Поэтому нами было исследовано влияние EndoG на АС пре-мРНК данных генов и каталитическую активность кодируемых ими белков в активированных $CD4^+$ Т-клетках мыши и крысы.

4.10.1. Взаимосвязь экспрессии EndoG с экспрессией сплайс-вариантов Casp-2, DNase I и BCL-x в лимфоцитах мышей и крыс

Для изучения взаимосвязи уровня экспрессии EndoG и количества сплайс-вариантов Casp-2, DNase I и BCL-x проведена оценка экспрессии мРНК этих генов в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мышей и крыс методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Полученные результаты показали большие различия в уровнях экспрессии как EndoG, так и сплайс-вариантов изучаемых генов как у мышей, так и у крыс различных линий (рис. 38 А–З).

При ранжировании клеток по уровню относительной экспрессии EndoG медиана составила 0,311 для $CD4^+$ Т-клеток мышей и 0,329 для клеток крыс различных линий. Корреляционный анализ показал зависимость между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов Casp-2, DNase I и BCL-x (рис. 38 И–Р). В клетках с относительно низкой экспрессией EndoG (ниже медианы) обнаружено преобладание полноразмерных сплайс-вариантов: Casp-2L,

nDNase I и BCL-xL над другими. В группах клеток с относительно высокой экспрессией EndoG (выше медианы) выявлено увеличение количества мРНК коротких сплайс-вариантов: Casp-2S, Δ4DNase I и BCL-xS, а также снижение уровня мРНК полноразмерных вариантов. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG со сплайс-вариантами изучаемых генов представлены в табл. 26. Для дальнейшей работы нами были выбраны $CD4^+$ Т-клетки мышей линии C57BL/6 и крыс линии Wistar, поскольку именно у них корреляция между экспрессией EndoG и количеством мРНК сплайс-вариантов изучаемых генов была наиболее выраженной.

Таблица 26. Коэффициенты корреляции экспрессии EndoG и сплайс-вариантов Casp-2, DNase I и BCL-x в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мыши и крысы.

Сплайс-вариант	**Мышь**		**Крыса**	
	Низкий уровень EndoG (N=4)	Высокий уровень EndoG (N=4)	Низкий уровень EndoG (N=2#)	Высокий уровень EndoG (N=3#)
Casp-2L	– 0,734 (*)	– 0,738 (*)	– 0,537	– 0,396
Casp-2S	+ 0,729 (*)	+ 0,725 (*)	+ 0,612	+ 0,604
nDNase I	– 0,688 (*)	– 0,721 (*)	– 0,468	– 0,390
Δ4DNase I	+ 0,724	+ 0,680 (*)	+ 0,312	+ 0,591
BCLXL	– 0,641 (*)	– 0,782	– 0,516	– 0,358
BCLXS	+ 0,680 (*)	+ 0,696 (*)	+ 0,445	+ 0,427

Примечание: # - коэффициенты корреляции не являются статистически достоверными из-за малого объема выборки. * - коэффициенты корреляции статистически значимы, $p \leq 0,01$ по критерию корреляции Пирсона. “+” прямая корреляция: повышенный уровень мРНК *EndoG* соответствует повышенному уровню мРНК сплайс-варианта. “–” обратная корреляция: повышенный уровень мРНК *EndoG* соответствует пониженному уровню мРНК сплайс-варианта.

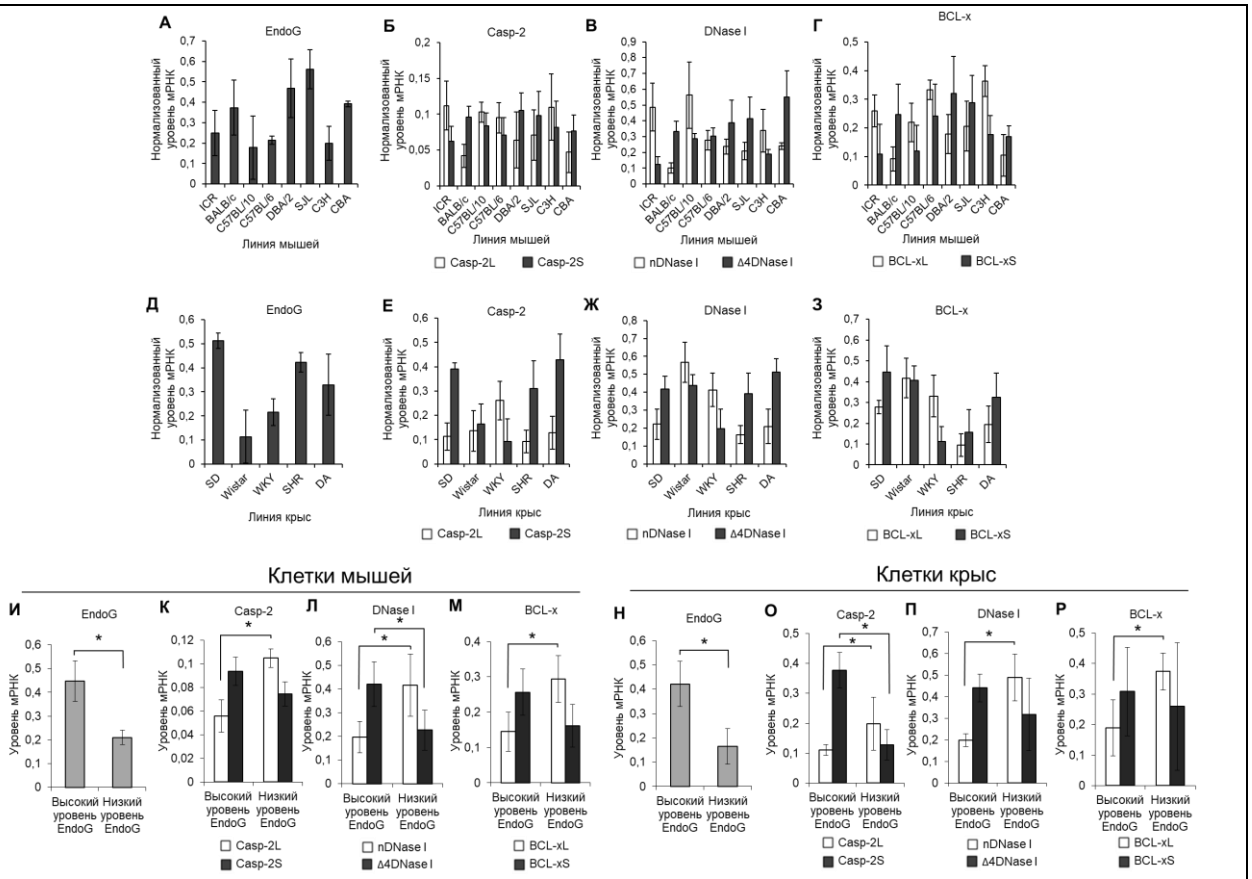


Рисунок 38. Взаимосвязь экспрессии EndoG, и сплайс-вариантов Casp-2, DNase I и BCL-x в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мыши и крысы. Уровень мРНК EndoG (А, Д) и сплайс-вариантов Casp-2 (Б, Е), DNase I (В, Ж) и BCL-x (Г, З) в $CD4^+$ Т-клетках, мышей различных линий и крыс различных линий. Уровень мРНК сплайс-вариантов Casp-2 (К, О), DNase I (Л, П) и BCL-x (М, Р) при высоком и низком уровнях экспрессии EndoG (И, Н) в $CD4^+$ Т-клетках мышей и крыс различных линий. Уровни мРНК измерены методом ОТ-ПЦР в реальном времени и нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S рРНК. * $p \leq 0{,}05$ для уровней экспрессии генов между группами клеток**.**

4.10.2. Индукция АС пре-мРНК и ингибирование ферментативной активности Casp-2, DNase I и BCL-x в результате сверхэкспрессии EndoG в лимфоцитах мыши и крысы *in vitro*

Для подтверждения роли EndoG в процессе АС пре-мРНК Casp-2, DNase I и BCL-x экспрессию её гена индуцировали цисплатином, повреждающим ДНК, в концентрации 60 мкМ [351], а также трансфицировали клетки плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. Исследуемая концентрация цисплатина подобрана нами ранее в ходе предварительных экспериментов.

Сверхэкспрессия EndoG сопровождалась изменением пула мРНК сплайс-вариантов Casp-2, DNase I и BCL-x; при этом наблюдали увеличение количества мРНК укороченных сплайс-вариантов (Casp-2S, Δ4DNase I и BCL-xS) и уменьшение уровня мРНК полноразмерных вариантов (Casp-2L, nDNase I и BCL-xL) и в клетках мыши (рис. 39 А–В) и крысы (рис. 39 Г–Е).

В трансфицированных pEndoG-GFP или инкубированных с цисплатином клетках мыши и крысы обнаружено существенное снижение в 2,5 – 3 раза активности Casp-2 (рис. 39 Ж).

Исследование нуклеазной активности методом зимографии выявило уменьшение активности данного фермента в 2,5 - 4 раза в клетках со сверхэкспрессией EndoG (рис. 39 З, И). Нам не удалось оценить влияние изменения соотношения форм BCL-x на его ферментативную активность в клетках, поскольку тест-система для измерения активности данного белка отсутствует.

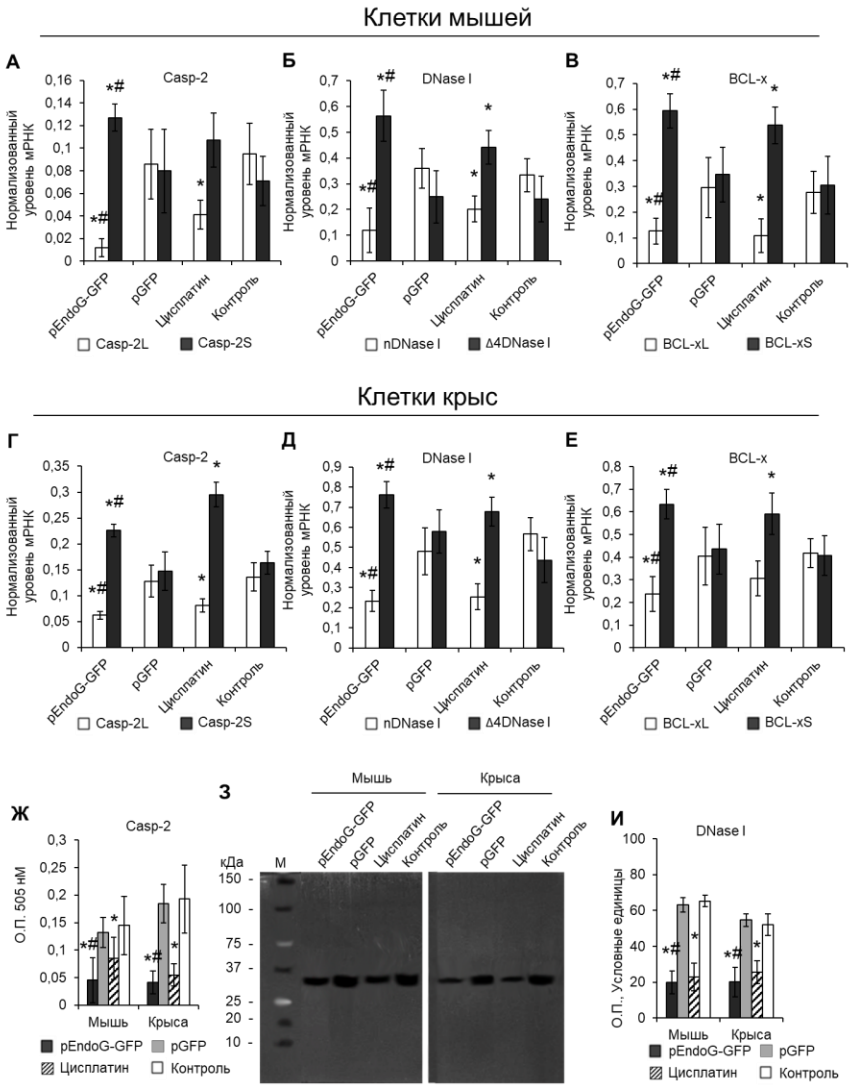


Рисунок 39. Ингибиранте ферментативной активности в результате индукции АС пре-мРНК Casp-2, DNase I и BCL-x. Уровни мРНК сплайс-вариантов Casp-2, DNase I и BCL-x в $CD4^+$ Т-лимфоцитах, мыши (А–В) и крысы (Г–Е), трансфицированных геном EndoG или инкубированных с цисплатином. Количества мРНК измерены методом ОТ-ПЦР в реальном времени и нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S рРНК. Диаграмма результатов определения ферментативной активности Casp-2 (Ж). Зимограмма клеток мыши и крысы, трансфицированных геном EndoG или инкубированных с цисплатином (З) и результаты определения нуклеазной активности, измеренной методом зимографии (И). * $p \leq 0{,}05$ по отношению к контрольным клеткам; # $p \leq 0{,}05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

4.10.3. Индукция АС пре-мРНК Casp-2, DNase I и BCL-x и снижение ферментативной активности соответствующих белков в лимфоцитах мышей и крыс *in vivo*

Для исследования способности EndoG вызывать АС Casp-2, DNase I и BCL-x *in vivo* мышам линии C57BL/6 и крысам линии Wistar внутривенно вводили цисплатин. Через 72 ч из крови животных выделяли $CD4^+$ Т-лимфоциты и исследовали экспрессию генов. Методом TUNEL для проточной цитометрии выявлено увеличение количества $CD4^+$ Т-клеток с поврежденной ДНК в крови мышей и крыс после введения цисплатина (рис. 40 А–В). Возрастание количества клеток с поврежденной ДНК сопровождалось усилением экспрессии в них EndoG и увеличением количества соответствующего белка, что показано методом ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 40 Г) и подтверждено Вестерн-блоттингом (рис. 40 Д–Ж).

Анализ уровней мРНК сплайс-вариантов изучаемых белков показал, что индукция EndoG цисплатином сопровождается достоверным снижением количества полноразмерных форм вариантов Casp-2L (рис. 40 З), nDNase I (рис. 40 И) и BCL-xL (рис. 40 К) и увеличением количества мРНК укороченных форм (Casp-2S, Δ4DNase I и BCL-xS) в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мышей и крыс. Изменение пула изучаемых форм белков сопровождалось снижением их ферментативной активности. При этом происходило достоверное снижение активности Casp-2 (рис. 40 Л) и нуклеазной активности DNase I (рис. 40 М, Н) в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мышей и крыс после введения цисплатина.

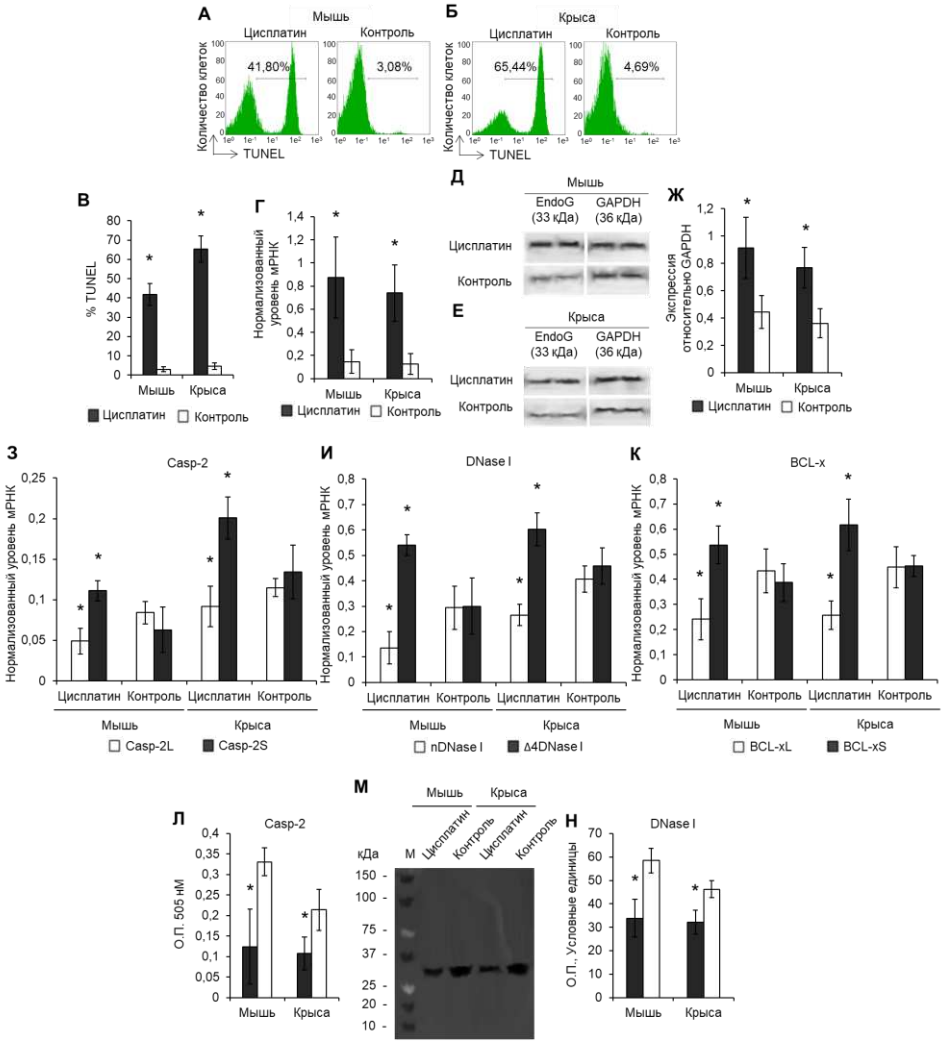


Рисунок 40. Индукция сплайс-вариантов и ингибирование ферментативной активности исследуемых белков через 72 ч после внутривенной инъекции цисплатина в дозе 60 мг/кг. Количество лимфоцитов мыши (А) и крысы (Б) с повреждённой ДНК, измеренное методом TUNEL для проточной цитометрии, и увеличение количества TUNEL-положительных клеток после инъекции цисплатина (В). Уровни мРНК EndoG, измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени, в $CD4^+$ Т-клетках мышей и крыс до и после инъекции цисплатина (Г); Вестерн блоттинг EndoG и референсного белка GAPDH в клетках мышей (Д) и крыс (Е), а также диаграмма количеств EndoG по отношению к количеству GAPDH. Уровни мРНК сплайс-вариантов мРНК Casp-2 (З), DNase I (И) и BCL-x (К) в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мышей и крыс. Диаграмма результатов определения ферментативной активности Casp-2 (Л). ДНК-SDS-ПААГ-зимограмма клеток мыши и крысы (М) и диаграмма результатов определения нуклеазной активности DNase I в клетках мыши и крысы, измеренной методом зимографии (Н). * $p \leq 0{,}05$ по отношению к клеткам контрольных животных.

4.11. Исследование EndoG-зависимого механизма регуляции АС пре-мРНК на примере апоптотических белков hTERT, ДНКазы 1, каспазы-2 и BCL-x

4.11.1 Изучение внутриклеточной локализации апоптотической эндонуклеазы EndoG и сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы hTERT и ДНКазы 1

Известно, что в норме EndoG локализуется в митохондриях и интернализуется в ядро только при развитии апоптотических процессов [376], в то время как процесс АС в большинстве случаев протекает в ядрах клеток [377]. 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. Учитывая это, 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.

4.11.1.1. Изменение экспрессии сплайс-вариантов hTERT в клетках в состоянии апоптоза и при подавлении экспрессии EndoG

С целью изучения связи экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT была проведена оценка количеств их мРНК в нормальных и апоптотических клетках рака кишечника человека CaCo-2, а также в нормальных и апоптотических клетках с подавленной экспрессией EndoG. Для достижения апоптоза клетки инкубировали с цисплатином. Подавление экспрессии EndoG осуществляли методом РНК-интерференции. Анализ жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии при окрашивании пропидий-йодидом и аннексином V-FITC показал, что через 24 ч инкубации с цисплатином, или после трансфекции клеток и последующей инкубации с цисплатином, более 81% клеток находились в состоянии апоптоза (рис. 41 А, Б). Достоверной разницы в количестве мёртвых клеток не обнаружено. Поэтому данную

популяцию клеток считали гомогенной, состоящей полностью из апоптотических клеток. В группе клеток, трансфицированных siRNA или контрольными siRNA, уровень апоптотических клеток не превышал уровень у контрольной группы. Из клеток была выделена тотальная РНК и проведено исследование экспрессии EndoG методом ОТ-ПЦР в реальном времени. В клетках, инкубированных с цисплатином, обнаружено достоверное увеличение экспрессии EndoG (рис. 41 В), достоверное снижение количества мРНК полноразмерного α+β+ сплайс-варианта hTERT (рис. 41 Г), а также достоверное увеличение количества мРНК α+β– сплайс-варианта hTERT (рис. 41 Д). Трансфекция клеток siRNA вызывала подавление экспрессии EndoG как в нормальных, так и апоптотических клетках. Угнетение экспрессии EndoG сопровождалось увеличением количества мРНК α+β+ сплайс-варианта hTERT при, практически, полном отсутствии мРНК α+β– сплайс-варианта hTERT. Апоптоз, индуцированный цисплатином, а также подавление экспрессии EndoG не приводили к изменению количества мРНК α–β+ (рис. 41 Е) и α–β– (рис. 41 Ж) сплайс-вариантов hTERT.

Результат вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показал, что в апоптотических клетках происходит достоверное увеличение уровня EndoG, снижение полноразмерной α+β+ формы и увеличение α+β– формы hTERT (рис. 41 З, И). Подавление экспрессии EndoG сопровождалось увеличением количества α+β+ формы и отсутствием синтеза α+β- формы hTERT, как в нормальных клетках, так и в условиях апоптоза. Не обнаружено изменения пула белков α–β+ и α–β– форм hTERT, поскольку их количество в клетке очень мало и не детектируется методом вестерн-блоттинга.

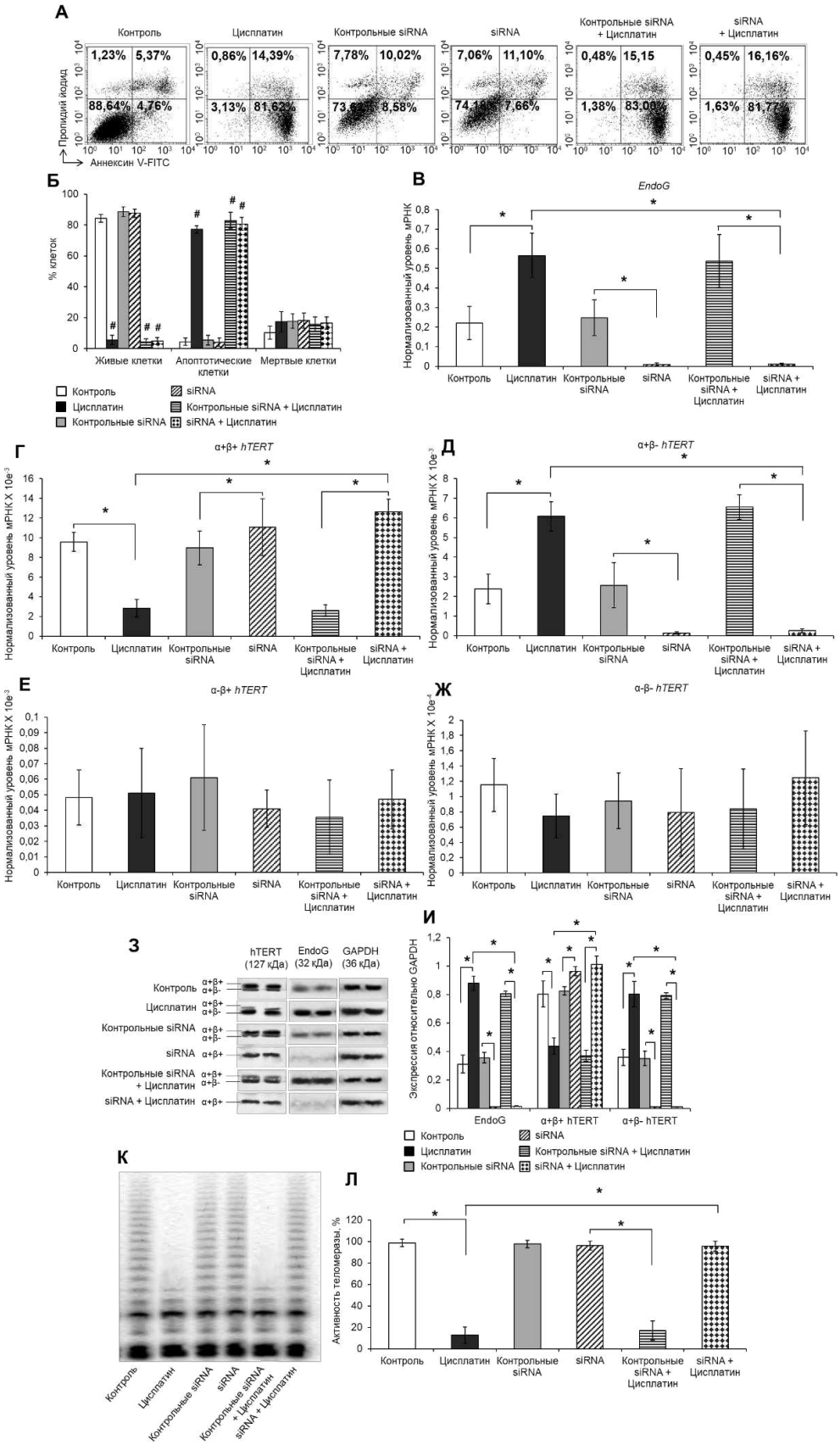

А
Контроль
Цисплатин
Контрольные siRNA
siRNA
Контрольные siRNA + Цисплатин
siRNA + Цисплатин
1,23% 5,37% 88,64% 4,76%
0,86% 14,39% 3,13% 81,62%
7,78% 10,02% 73,62% 8,58%
7,06% 11,10% 74,18% 7,66%
0,48% 15,15 1,38% 83,00%
0,45% 16,16% 1,63% 81,77%
Пропидий иодид
Аннексин V-FITC
Б
% клеток
Живые клетки
Апоптотические клетки
Мертвые клетки
Контроль
Цисплатин
Контрольные siRNA
siRNA
Контрольные siRNA + Цисплатин
siRNA + Цисплатин
В
EndoG
Нормализованный уровень мРНК
Г
α+β+ hTERT
Нормализованный уровень мРНК X 10e-3
Д
α+β- hTERT
Нормализованный уровень мРНК X 10e-3
Е
α-β+ hTERT
Нормализованный уровень мРНК X 10e-3
Ж
α-β- hTERT
Нормализованный уровень мРНК X 10e-4
З
hTERT (127 кДа)
EndoG (32 кДа)
GAPDH (36 кДа)
Контроль α+β+ α+β-
Цисплатин α+β+ α+β-
Контрольные siRNA α+β+ α+β-
siRNA α+β+
Контрольные siRNA + Цисплатин α+β+ α+β-
siRNA + Цисплатин α+β+
И
Экспрессия относительно GAPDH
EndoG
α+β+ hTERT
α+β- hTERT
К
Контроль
Цисплатин
Контрольные siRNA
siRNA
Контрольные siRNA + Цисплатин
siRNA + Цисплатин
Л
Активность теломеразы, %

Рисунок 41. Изменение сплайс-вариантов hTERT и активности теломеразы при индуцированном цисплатином апоптозе клеток и подавлении экспрессии EndoG siRNA. Результаты проточной цитометрии клеток CaCo-2**,** трансфицированных siRNA и инкубированных с цисплатином и меченых аннексином V-FITC и пропидий йодидом. Показан процент живых клеток (нижние левые квадранты), клеток в состоянии апоптоза (нижние правые квадранты) и мёртвых клеток (верхние квадранты) (А). гистограммы живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мертвых клеток CaCo-2 инкубированных с цисплатином или трансфицированных siRNA. # $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам (Б). Уровни мРНК EndoG (В), сплайс-вариантов hTERT (Г-Ж), измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК генов нормализованы по отношению к рРНК гена 18S. Вестерн блоттинг сплайс-форм hTERT, EndoG и референсного белка GAPDH в клетках CaCo-2, инкубированных с цисплатином или трансфицированных siRNA (З). Результаты определения количеств сплайс-форм hTERT и EndoG по отношению к GAPDH (И). Гель-электрофорез TRAP клеток, инкубированных с цисплатином. Результаты определения активности теломеразы, измеренной методом TRAP (К). * $p \leq 0,05$.

Установлено, что активность теломеразы в апоптотических клетках достоверно ниже (рис. 41 К, Л). Эти данные полностью согласуются с результатом измерения количества мРНК сплайс-вариантов hTERT методом ОТ-ПЦР в реальном времени и количеством сплайс-форм hTERT, определенного вестерн-блоттингом.

Подавление экспрессии EndoG, и как следствие, отсутствие α+β– формы hTERT, не вызывало ингибирования активности теломеразы в апоптотических клетках. Трансфекция клеток контрольными siRNA не приводила к подавлению я экспрессии EndoG, и не оказывала влияния на изменение пула сплайс-вариантов hTERT и активность теломеразы как в норме, так и при апоптозе.

4.11.2. Снижение активности теломеразы в клеточных органеллах при изменении пропорции сплайс-вариантов hTERT при апоптозе и в условиях подавления экспрессии EndoG

Известно, что теломераза проявляет ферментативную активность в ядре, синтезируя теломерные повторы [378], в то время как апоптотическая эндонуклеаза EndoG в норме локализуется в межмембранном пространстве митохондрий и интернализуется в ядро при развитии апоптотических процессов [376]. Процесс АС пре-мРНК белков также локализуется в ядрах [377]. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени определили уровни мРНК EndoG и сплайс-вариантов hTERT в цитоплазме и ядрах нормальных клеток, клеток в состоянии апоптоза, а также в клеточных органеллах в условиях подавления экспрессии EndoG. Не обнаружено достоверного различия между количествами мРНК EndoG в цитоплазме и ядрах нормальных клеток (рис. 42 А). Достоверное увеличение мРНК наблюдалось как в цитоплазме, так и ядрах клеток, инкубированных с цисплатином. Подавление экспрессии EndoG методом РНК-интерференции вызывало ожидаемое снижение количества мРНК EndoG в цитоплазме и ядрах нормальных и апоптотических клеток до уровня предела детектирования.

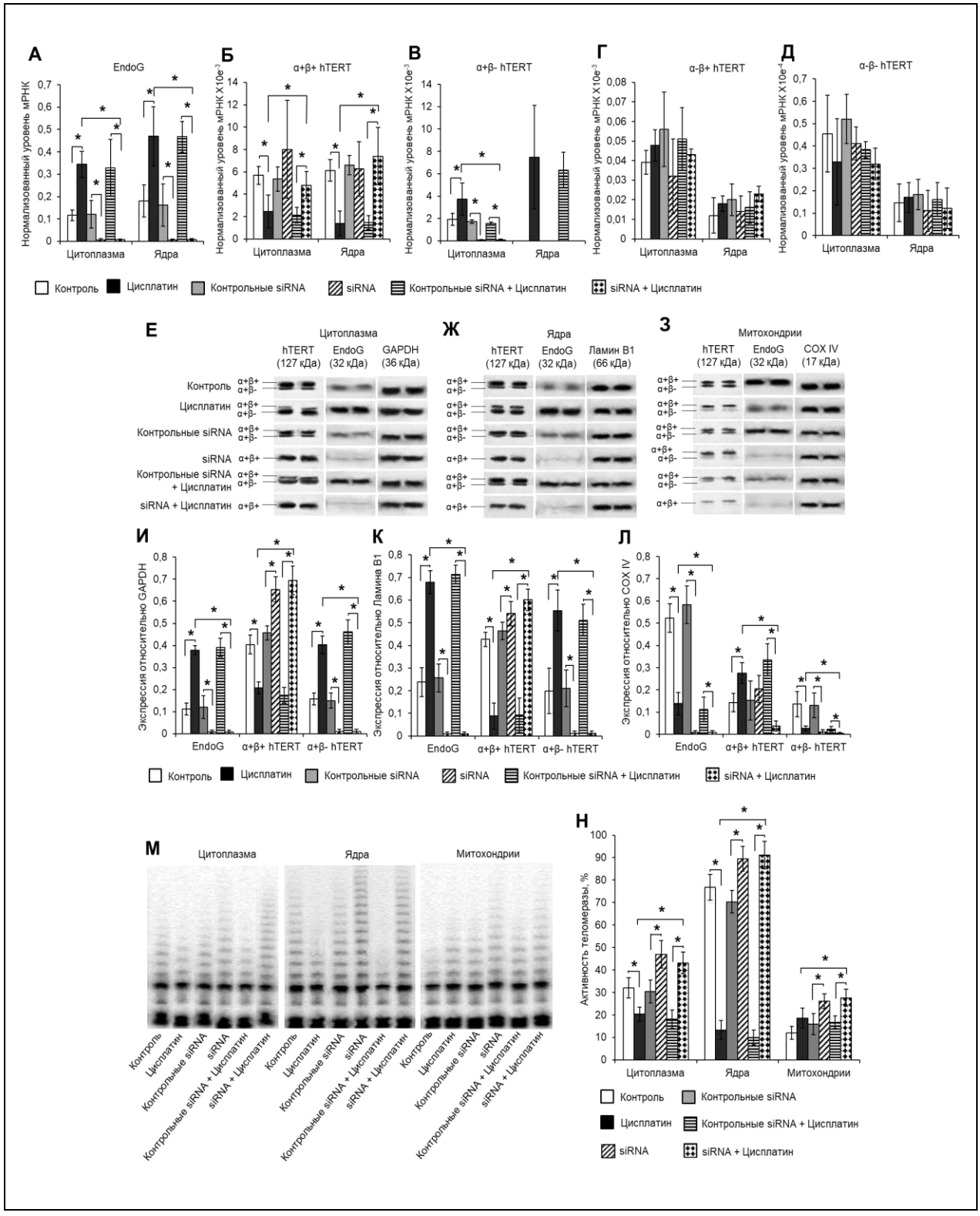
Не обнаружено достоверной разницы между уровнями мРНК полноразмерного α+β+ сплайс-варианта hTERT в цитоплазме и ядрах нормальных клеток (рис. 42 Б). Достоверное снижение количества мРНК данного сплайс-варианта как в цитоплазме, так и в ядрах установлено при инкубации клеток с цисплатином. Подавление экспрессии EndoG вызывало достоверное увеличение количества мРНК α+β+ сплайс-варианта hTERT в цитоплазме и ядрах апоптотических клеток, в то время как её возрастание в данных компартментах нормальных клеток было не достоверно (рис. 42 Б).

Неожиданно, не удалось обнаружить мРНК α+β– сплайс-варианта hTERT в ядрах нормальных клеток, в то время как в цитоплазме уровень мРНК

данного варианта был достаточно высок (рис. 42 В). Инкубация клеток с цисплатином приводила к достоверному увеличению количества мРНК α+β– сплайс-варианта hTERT в цитоплазме и появлению его мРНК в ядрах. Подавление экспрессии EndoG вызывало достоверное снижение количества мРНК α+β– сплайс-варианта hTERT в цитоплазме нормальных и апоптотических клеток. Количество мРНК α+β– сплайс-варианта в ядрах апоптотических клеток с подавленной экспрессией EndoG было ниже пределов детектирования (рис. 42 В).

Обратный эффект действия цисплатина на количество EndoG и сплайс-вариантов hTERT наблюдался в митохондриях. Индукция апоптоза не приводила к изменению количества мРНК α–β+ (рис. 42 Г) и α–β– (рис. 42 Д) сплайс-вариантов hTERT во всех изучаемых органеллах, как в нормальных клетках, так и в клетках в условиях подавления экспрессии EndoG. Трансфекция клеток контрольными siRNA не вызывала понижения уровня мРНК EndoG, и не оказывала влияния на изменение пула мРНК сплайс-вариантов hTERT в цитоплазме и ядрах нормальных и апоптотических клеток.

Мы попытались выяснить влияние изменения пропорции сплайс-вариантов hTERT на активность теломеразы в цитоплазме, ядрах и митохондриях. Результаты вестерн-блоттинга показали, что в цитоплазме апоптотических клеток количество полноразмерного варианта α+β+ hTERT достоверно снижается, а количество варианта α+β–hTERT возрастает (рис. 42 Е, И). Эти данные согласуются с увеличением количества EndoG в данных клетках и соотносятся с результатами определения количества мРНК, измеренного метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Исследование методом TRAP показало, что теломеразная активность в цитоплазме нормальных клетках составляет около 30% от общей теломеразной активности клетки (рис. 42 М, Н). При инкубации клеток с цисплатином происходило достоверное снижение активности теломеразы в цитоплазме до уровня 20% от исходного.


А
EndoG
Нормализованный уровень мРНК
Цитоплазма
Ядра
Б
α+β+ hTERT
Нормализованный уровень мРНК X10e-3
В
α+β- hTERT
Г
α-β+ hTERT
Д
α-β- hTERT
Нормализованный уровень мРНК X10e-4
Контроль
Цисплатин
Контрольные siRNA
siRNA
Контрольные siRNA + Цисплатин
siRNA + Цисплатин
Е
Цитоплазма
hTERT (127 кДа)
EndoG (32 кДа)
GAPDH (36 кДа)
Ж
Ядра
Ламин B1 (66 кДа)
З
Митохондрии
COX IV (17 кДа)
И
Экспрессия относительно GAPDH
К
Экспрессия относительно Ламина B1
Л
Экспрессия относительно COX IV
М
Н
Активность теломеразы, %

←

Рисунок 42. Внутриклеточная локализация EndoG и сплайс-вариантов hTERT при апоптозе и подавлении экспрессии EndoG siRNA. Уровни мРНК EndoG (А) и сплайс-вариантов hTERT (Б-Д), измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК нормализованы по отношению к уровням мРНК референсных генов. Вестерн блоттинг сплайс-форм hTERT, EndoG и референсного белка GAPDH в цитоплазме клеток CaCo-2, инкубированных с цисплатином и подавлением экспрессии EndoG siRNA (Е). Вестерн блоттинг сплайс-форм hTERT, EndoG и референсного белка Ламин B1 в ядрах клеток (Ж). Вестерн блоттинг сплайс-форм hTERT, EndoG и референсного белка COX IV в митохондриях клеток (З). Результаты определения количеств сплайс-форм hTERT и EndoG по отношению к референсным белкам в цитоплазме (И), ядрах (К) и митохондриях клеток (Л). Гель-электрофорез TRAP в органеллах клеток, инкубированных с цисплатином или трансфицированных siRNA (М). Результаты определения активности теломеразы в органеллах клеток, измеренной методом TRAP (Н). * $p \leq 0,05$.

Инкубация клеток с цисплатином приводила к достоверному увеличению в ядрах количества EndoG и снижению уровня полноразмерного α+β+ сплайс-варианта hTERT (рис. 42 Ж, К). Несмотря на отсутствие локализации мРНК α+β– сплайс-варианта hTERT в ядрах нормальных клеток, мы обнаружили присутствие его белка в ядрах методом вестерн блоттинга. Инкубация клеток с цисплатином приводила к достоверному снижению количества α+β+ и увеличению α+β– белков сплайс-варианта hTERT. Активность теломеразы в ядрах нормальных клеток составила около 75% от общей теломеразной активности клетки. При инкубации клеток с цисплатином происходило достоверное снижение активности теломеразы в цитоплазме до уровня 15%.

Развитие процессов апоптоза приводило к достоверному снижению количества EndoG, увеличению количества полноразмерного α+β+ и уменьшению содержания α+β– сплайс-варианта hTERT (рис. 42 З, Л). Активность теломеразы в митохондриях нормальных клеток была на уровне

около 10% от общей теломеразной активности клетки. При инкубации клеток с цисплатином достоверного изменения активности теломеразы в митохондриях не обнаружено.

Подавление экспрессии EndoG методом РНК-интерференции, как и ожидалось, приводило к исчезновению данного белка в цитоплазме, ядрах и митохондриях нормальных и апоптотических клеток (рис. 42 Е-Л). Отсутствие EndoG сопровождалось увеличением количества полноразмерной α+β+ hTERT и, практически, полным отсутствием α+β– сплайс-варианта hTERT во всех изучаемых клеточных компартментах. В апоптотических и нормальных клетках с подавленной экспрессией EndoG наблюдалось достоверное увеличение активность теломеразы, что соотносится с повышением количества мРНК α+β+ hTERT (рис. 42 М, Н). Трансфекция клеток контрольными siRNA не вызывала снижения уровня мРНК EndoG, и не оказывала влияния на изменение пула мРНК сплайс-вариантов hTERT в цитоплазме, ядрах и митохондриях нормальных и апоптотических клеток.

4.11.3. Ко-локализация эндонуклеазы EndoG с hTERT в норме и при апоптозе

Внутриклеточную локализацию я EndoG и hTERT в нормальных и апоптотических клетках исследовали методом флуоресцентной микроскопии. Инкубация клеток с цисплатином приводила к достоверному увеличению количества уровня EndoG, в то время как количество hTERT оставалось неизменным (рис. 43 А, Б).

Для выявления степени внутриклеточной ко-локализации EndoG и hTERT был проведен ее анализ при помощи алгоритмов: Пирсона и Мандерса. Полученные данные указывают на высокую степень ко-локализации EndoG и hTERT в нормальных клетках по критерию Мандерса (рис. 43 В). Степень ко-локализации достоверно увеличивалась в апоптотических клетках при инкубации с цисплатином. Пиксельный анализ по критерию Пирсона также

позволяет говорить о высокой степени ко-локализации EndoG и hTERT в нормальных и апоптотических клетках (табл. 27).

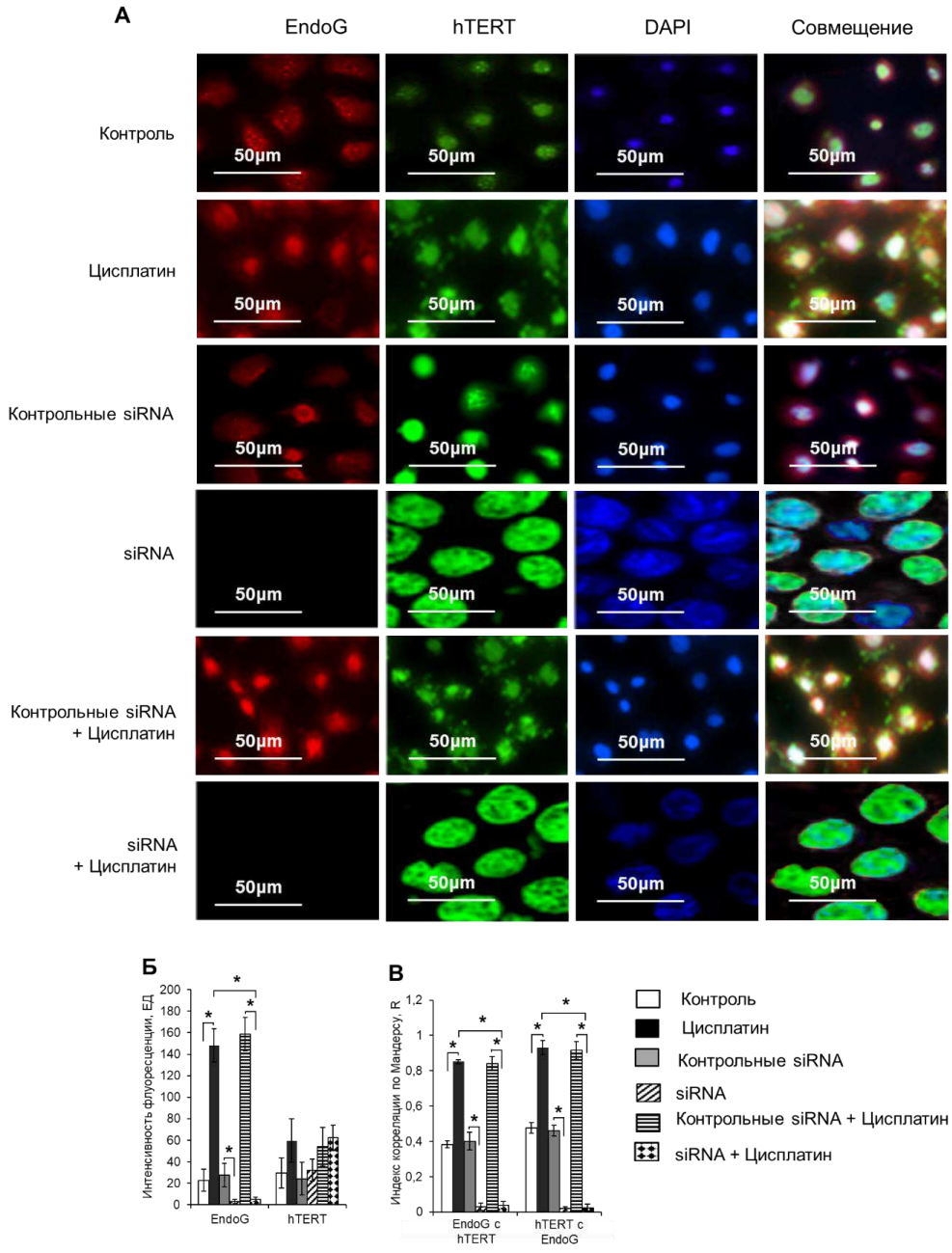


Рисунок 43. Увеличение внутриклеточной ко-локализации EndoG и hTERT при апоптозе. Флуоресцентная микроскопия клеток, меченных антителами к EndoG, hTERT и DAPI (А). Результаты количественного определения EndoG и hTERT по интенсивности флуоресценции (Б). * $p \leq 0,05$. (В) Индекс Мандерса ко-локализации EndoG с hTERT и hTERT с EndoG. * $p \leq 0,05$.

Таблица 27. Коэффициенты корреляции Пирсона ко-локализации EndoG и hTERT.

Группа клеток	Контроль	Цисплатин	Контрольные siRNA	siRNA	Контрольные siRNA + Цисплатин	siRNA + Цисплатин
Коэффициент Пирсона	0,77	0,86	0,72	0,06	0,83	0,08

4.11.4. Изменение экспрессии сплайс-вариантов DNase I в лимфоцитах в состоянии апоптоза и при подавлении экспрессии EndoG

С целью изучения связи экспрессии EndoG и сплайс-вариантов DNase I проведена оценка количеств их мРНК в нормальных и апоптотических $CD4^+$ Т-лимфоцитах, а также в нормальных и апоптотических клетках со сниженной экспрессией EndoG. Для достижения апоптоза клетки инкубировали с блеомицином. Подавление экспрессии EndoG осуществляли методом РНК-интерференции. Анализ жизнеспособности клеток, методом проточной цитометрии при окрашивании пропидий-йодидом и аннексином V-FITC показал, что через 24 ч инкубации с цисплатином, или после трансфекции клеток и последующей инкубации с цисплатином, более 85% клеток находились в состоянии апоптоза (рис. 44 А, Б). Достоверного различия в количестве мертвых клеток не обнаружено. Учитывая это, данную популяцию клеток считали гомогенной, полностью состоящей из апоптотических клеток. В группе клеток, трансфицированных siRNA или контрольными siRNA, уровень апоптотических клеток не превышал таковой у контрольной группы. Из клеток была выделена тотальная РНК и проведено исследование экспрессии EndoG методом ОТ-ПЦР в реальном времени. В клетках, инкубированных с блеомицином, обнаружено достоверное увеличение экспрессии EndoG (рис. 44 В), достоверное снижение количества мРНК полноразмерного сплайс-варианта nDNase I (рис. 44 Г), а также достоверное увеличение количества мРНК сплайс-варианта Δ4DNase I (рис. 44 Д).

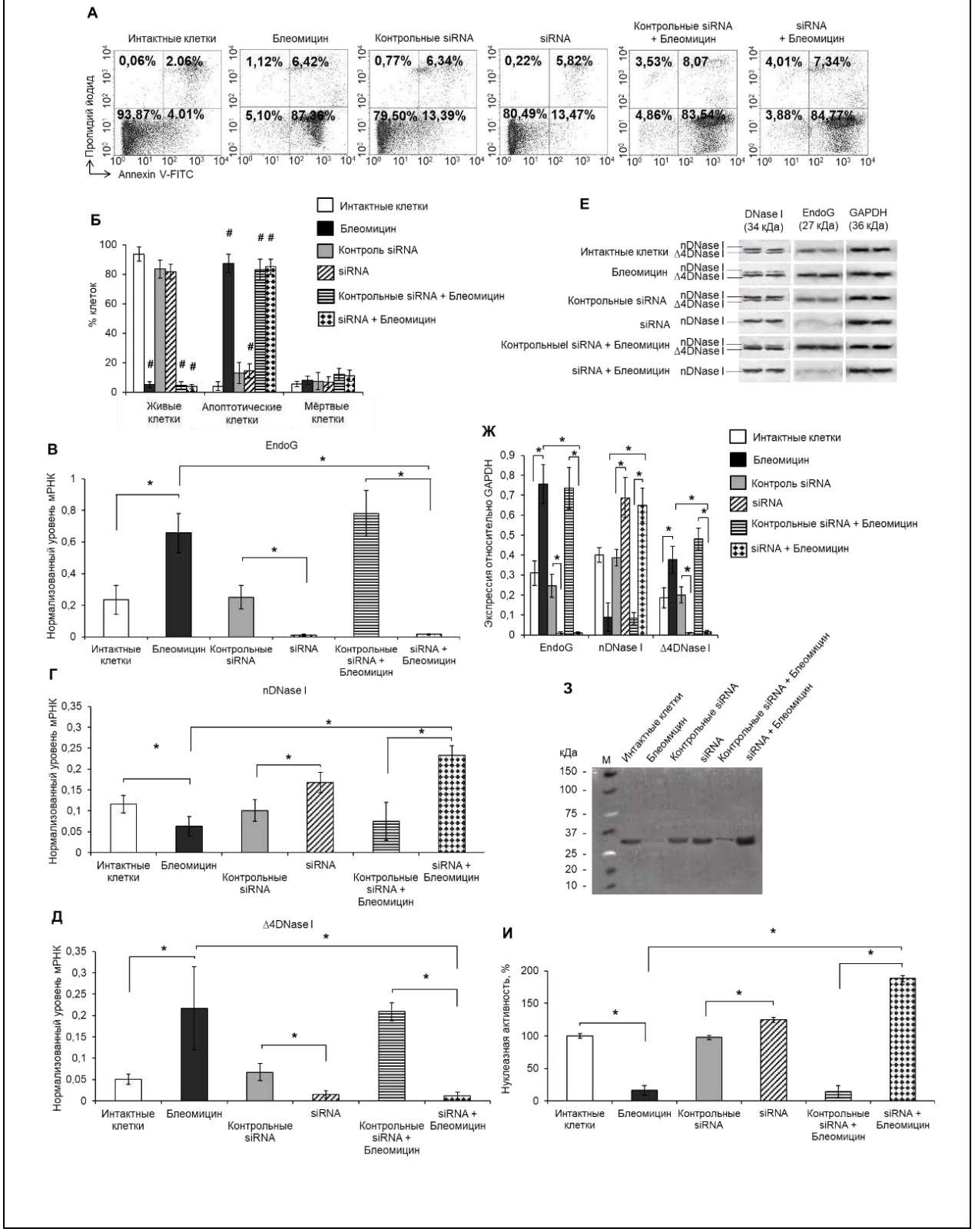


Рисунок 44. Изменение сплайс-вариантов DNase I и нуклеазной активности

при индуцированном блеомицином апоптозе клеток и подавлении экспрессии EndoG siRNA. Результаты проточной цитометрии клеток $CD4^+$ Т-лимфоцитов**,** трансфицированных siRNA и инкубированных с блеомицином и меченых аннексином V-FITC и пропидий йодидом (А). Показан процент живых клеток (нижние левые квадранты), клеток в состоянии апоптоза (нижние правые квадранты) и мёртвых клеток (верхние квадранты). Гистограммы живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мёртвых лимфоцитов, инкубированных с блеомицином или трансфицированных siRNA (Б). # $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам. Уровни мРНК EndoG (В), сплайс-вариантов DNase I, измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени (Г-Д). Уровни мРНК генов нормализованы по отношению к рРНК гена 18S. Вестерн блоттинг сплайс-форм DNase I, EndoG и референсного белка GAPDH в лимфоцитах, инкубированных с блеомицином или трансфицированных siRNA (Е). Результаты определения количеств сплайс-форм DNase I и EndoG по отношению к GAPDH (Ж). Результат зимографии клеточных лизатов методом DNA-SDS-PAGE (З). Оценка изображений зимографии с помощью денситометрии (Д). * $p \leq 0,05$.

Трансфекция клеток siRNA вызывала угнетение экспрессии EndoG как в нормальных, так и апоптотических клетках. Подавление экспрессии EndoG сопровождалось увеличением количества мРНК nDNase I при, практически, полном отсутствии мРНК сплайс-варианта Δ4DNase I. Результат вестерн-блоттинга с использованием антител к изучаемым белкам показал, что в апоптотических лимфоцитах происходит достоверное увеличение EndoG, снижение полноразмерной формы nDNase I и увеличение формы Δ4DNase I (рис. 44 Е, Ж). Подавление экспрессии EndoG сопровождалось увеличением количества формы nDNase I и отсутствием синтеза формы Δ4DNase I, как в нормальных клетках, так и в условиях апоптоза. Установлено, что нуклеазная активность в апоптотических клетках достоверно ниже (рис. 44 З, И). Эти данные полностью согласуются с результатом измерения количества мРНК сплайс-вариантов DNase I методом ОТ-ПЦР в реальном времени и количеством сплайс-форм DNase I, определенного вестерн-блоттингом.

Подавление экспрессии EndoG, и как следствие, отсутствие формы Δ4DNase I не вызывало ингибирования нуклеазной активности в апоптотических клетках. Трансфекция клеток контрольными siRNA не приводила к подавлению экспрессии EndoG, и не оказывала влияния на изменение пула сплайс-вариантов DNase I и нуклеазной активности теломеразы как в норме, так и при апоптозе.

4.11.5. Снижение нуклеазной активности в органеллах лимфоцитов при изменении пропорции сплайс-вариантов DNase I в условиях апоптоза или подавления экспрессии EndoG

Далее было проведено исследование количеств мРНК EndoG и сплайс-вариантов DNase I в цитоплазме и ядрах нормальных лимфоцитов, лимфоцитов в состоянии апоптоза, а также в органеллах лимфоцитов в условиях подавления экспрессии EndoG. Не обнаружено достоверного различия между количествами мРНК EndoG в цитоплазме и ядрах нормальных лимфоцитов (рис. 45 А). Достоверное увеличение мРНК наблюдалось как в цитоплазме, так и ядрах клеток, инкубированных с блеомицином. Подавление экспрессии EndoG методом РНК-интерференции вызывало ожидаемое снижение количества мРНК EndoG в цитоплазме и ядрах нормальных и апоптотических клеток до уровня предела детектирования.

Не выявлено достоверного различия между уровнями мРНК полноразмерного сплайс-варианта nDNase I в цитоплазме и ядрах нормальных клеток (рис. 45 Б). Достоверное снижение количества мРНК данного сплайс-варианта как в цитоплазме, так и в ядрах установлено при инкубации клеток с блеомицином. Подавление экспрессии EndoG вызывало достоверное увеличение количества мРНК сплайс-варианта nDNase I в цитоплазме и ядрах апоптотических клеток, в то время как её повышение в данных компартментах нормальных клеток было недостоверно (рис. 45 Б).

Как и в случае с мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT, не удалось обнаружить мРНК укороченного сплайс-варианта Δ4DNase I в ядрах нормальных лимфоцитов, в то время как в цитоплазме уровень мРНК данного варианта был достаточно высок (рис. 45 В).

Инкубация клеток с блеомицином приводила к достоверному увеличению количества мРНК сплайс-варианта Δ4DNase I в цитоплазме и появлению его мРНК в ядрах. Подавление экспрессии EndoG вызывало достоверное снижение количества мРНК сплайс-варианта Δ4DNase I в цитоплазме нормальных и апоптотических клеток. Количество мРНК сплайс-варианта Δ4DNase I в ядрах апоптотических клеток со сниженной экспрессией EndoG было ниже пределов детектирования (рис. 45 В).

Трансфекция клеток контрольными siRNA не вызывала уменьшения уровня мРНК EndoG, и не оказывала влияния на изменение пула мРНК сплайс-вариантов DNase I в цитоплазме и ядрах нормальных и апоптотических клеток. Мы попытались выяснить влияние изменения пропорции сплайс-вариантов DNase I на нуклеазную активность в цитоплазме и ядрах. Результаты вестерн-блоттинга показали, что в цитоплазме апоптотических клеток количество полноразмерного варианта nDNase I достоверно снижается, а количество укороченного Δ4DNase I варианта возрастает (рис. 45 Г, Ж). Эти данные согласуются с увеличением количества EndoG в данных клетках и соотносятся с результатами определения количества мРНК, измеренного метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Исследование методом зимографии показало, что нуклеазная активность в цитоплазме нормальных клеток составляет около 36% от общей нуклеазной активности клетки (рис. 45 К, М). При инкубации клеток с блеомицином происходило достоверное снижение нуклеазной активности в цитоплазме до уровня 22%.

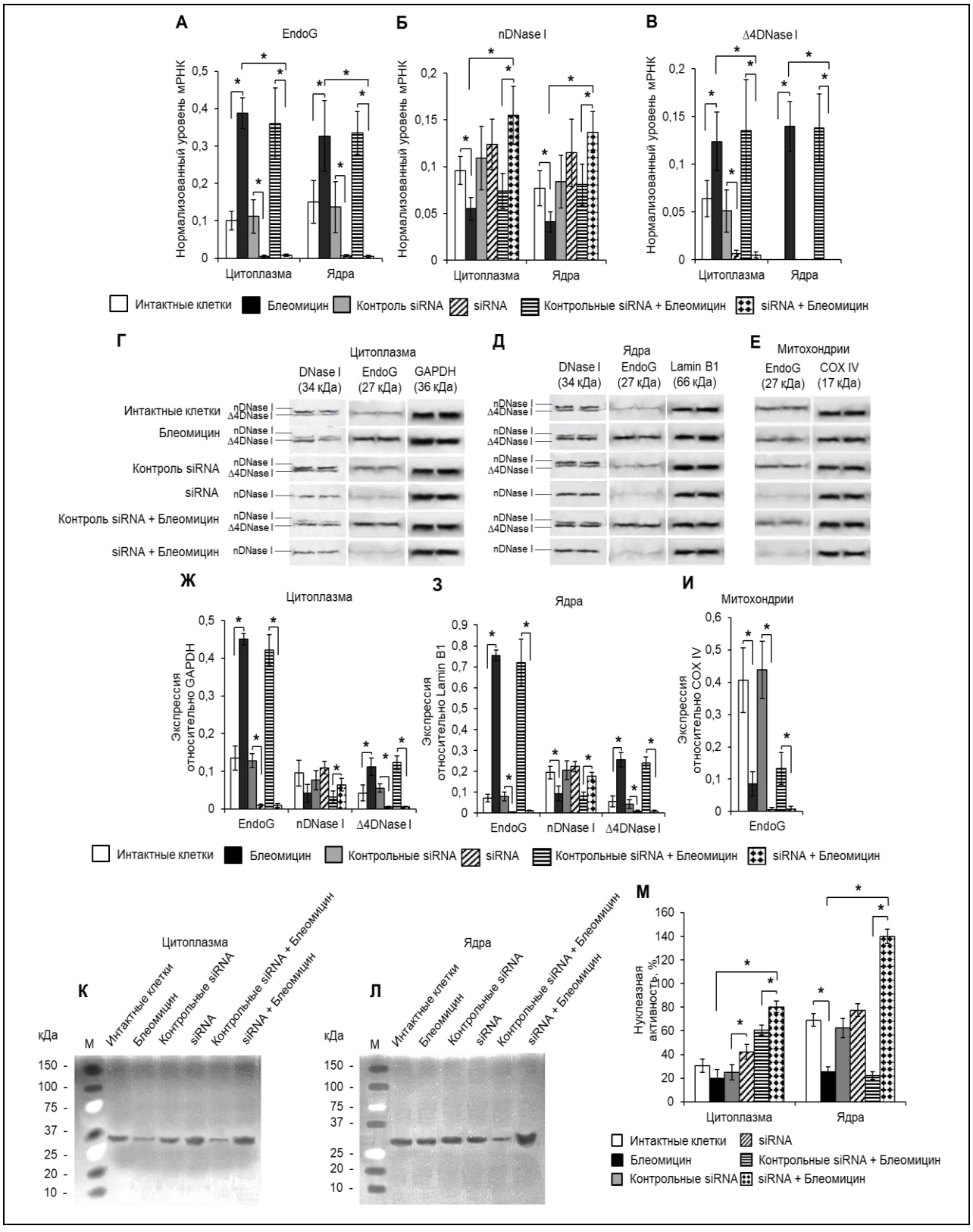

А
EndoG
Б
nDNase I
В
Δ4DNase I
Нормализованный уровень мРНК
Цитоплазма
Ядра
Интактные клетки
Блеомицин
Контроль siRNA
siRNA
Контрольные siRNA + Блеомицин
siRNA + Блеомицин
Г
Цитоплазма
DNase I (34 кДа)
EndoG (27 кДа)
GAPDH (36 кДа)
Д
Ядра
DNase I (34 кДа)
EndoG (27 кДа)
Lamin B1 (66 кДа)
Е
Митохондрии
EndoG (27 кДа)
COX IV (17 кДа)
nDNase I
Δ4DNase I
Ж
Цитоплазма
Экспрессия относительно GAPDH
З
Ядра
Экспрессия относительно Lamin B1
И
Митохондрии
Экспрессия относительно COX IV
EndoG
nDNase I
Δ4DNase I
К
Цитоплазма
Л
Ядра
кДа
M
150
100
75
37
25
20
10
М
Нуклеазная активность, %

Рисунок 45. Внутриклеточная локализация EndoG и сплайс-вариантов DNase I при апоптозе и подавлении экспрессии EndoG siRNA. Уровни мРНК EndoG (А) и сплайс-вариантов DNase I (Б–В), измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК нормализованы по отношению к таковым мРНК референсных генов. Вестерн блоттинг сплайс-форм DNase I, EndoG и референсного белка GAPDH в цитоплазме $CD4^+$ Т-лимфоцитов, инкубированных с блеомицином и подавлением экспрессии EndoG siRNA (Г). Вестерн блоттинг сплайс-форм DNase I, EndoG и референсного белка Ламин B1 в ядрах клеток (Д). Вестерн блоттинг EndoG и референсного белка COX IV в митохондриях клеток (Е). Результаты определения количеств сплайс-форм DNase I и EndoG по отношению к референсным белкам в цитоплазме (Ж), ядрах (З) и митохондриях (Н) клеток. Результат зимографии в клеточных органеллах методом DNA-SDS-PAGE (К, Л). Оценка изображений зимографии с помощью денситометрии (М). * $p \leq 0,05$.

Инкубация клеток с блеомицином приводила к достоверному увеличению в ядрах количества EndoG и снижению количества полноразмерного варианта nDNase I (рис. 45 Д, З). Несмотря на отсутствие локализации мРНК сплайс-варианта Δ4DNase I в ядрах нормальных лимфоцитов, мы обнаружили присутствие его белка в ядрах методом вестерн блоттинга. Инкубация клеток с блеомицином приводила к достоверному снижению количества белка nDNase I и увеличению Δ4DNase I. Нуклеазная активность в ядрах нормальных клеток составила около 71% от общей нуклеазной активности клетки. При инкубации клеток с блеомицином происходило достоверное снижение активности теломеразы в цитоплазме до уровня 22%.

Как и в случае с каталитической субъединицей теломеразы hTERT, в митохондриях наблюдали обратный эффект действия блеомицина на количество EndoG. Развитие процессов апоптоза приводило к достоверному снижению количества EndoG (рис. 45 Е, И). При подавление экспрессии EndoG методом РНК-интерференции, как и предполагалось, данный белок в

цитоплазме, ядрах и митохондриях нормальных и апоптотических клеток не был обнаружен (рис. 45 Г–И). Отсутствие EndoG сопровождалось увеличением количества полноразмерной nDNase I и, практически, полным отсутствием сплайс-варианта Δ4DNase I в цитоплазме и ядрах лимфоцитов. В апоптотических и нормальных клетках с подавленной экспрессией EndoG наблюдалось достоверное возрастание нуклеазной активности, что соотносится с увеличением количества мРНК nDNase I (рис. 45 К – М).

Трансфекция клеток контрольными siRNA не вызывала уменьшения уровня мРНК EndoG, и не оказывала влияния на изменение пула мРНК сплайс-вариантов DNase I в цитоплазме, ядрах и митохондриях нормальных и апоптотических лимфоцитов.

4.11.6. 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 где деградирует ДНК [379]. EndoG также обладает способностью гидролизовать РНК [376].

Ранее мы показали, что мРНК укороченного сплайс-варианта α+β– hTERT отсутствует в ядрах клеток CaCo-2, мРНК укороченных сплайс-вариантов Δ4DNase I и Casp-2S в ядрах $CD4^+$ Т-лимфоцитов человека, а мРНК BCL-xS в ядрах клеток HCC1954. Тем не менее, эти сплайс-варианты определялись в цитоплазме указанных клеток. Была изучена способность EndoG индуцировать АС в ядрах и цитоплазме клеток CaCo-2.

Ядерную и цитоплазматическую фракции клеток CaCo-2 инкубировали с рекомбинантной EndoG (recEndoG). Методом ОТ-ПЦР в реальном времени было показано, что в ядрах клеток CaCo-2 вариант α+β– hTERT не экспрессируется (рис. 46 А, Б). В то же время, в цитоплазме и ядрах уровень мРНК варианта α+β+ был приблизительно одинаковым. Инкубация ядер и

цитоплазмы с recEndoG в течение 1 ч приводила к появлению мРНК варианта α+β– в ядрах и увеличению её уровня в цитоплазме. При этом содержание мРНК варианта α+β+ hTERT снижалось.

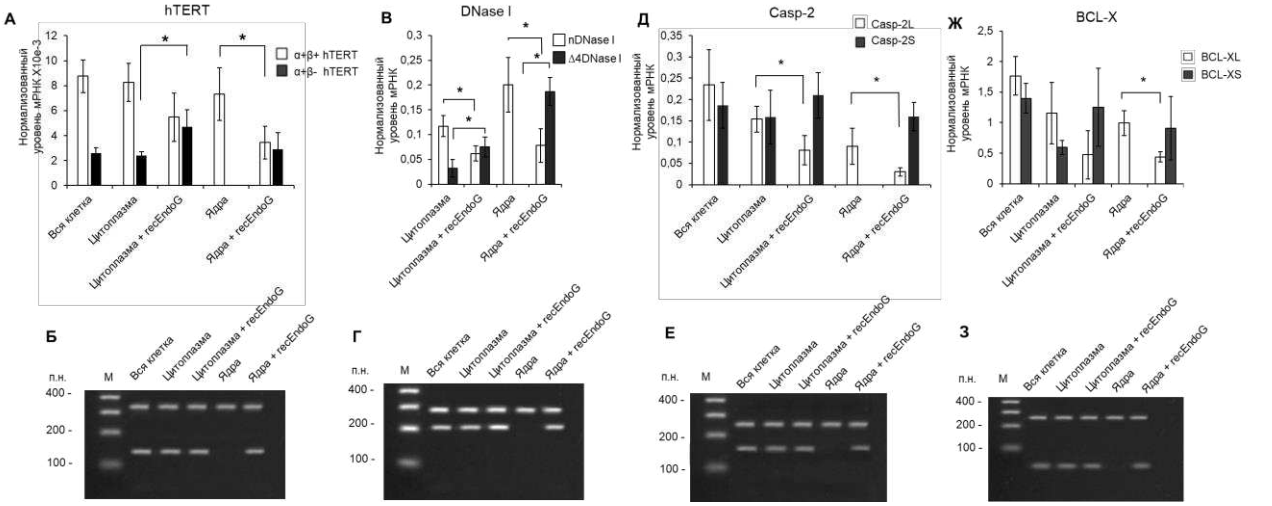


Рисунок 46. Экспрессия сплайс-вариантов мРНК в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG. Уровни экспрессии сплайс-вариантов α+β+ и α+β– мРНК hTERT в клетках CaCo-2 (А), nDNase I и Δ4DNase I (В) и Casp-2S и Casp-2L (Д) в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека, а также BCL-xL и BCL-xS (Ж) в клетках HCC1954. Уровни мРНК нормализованы по отношению к рРНК гена 18S. Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР вариантов сплайсинга мРНК hTERT (Б), DNase I (Г), Casp-2 (Е), BCL-x (З). * $p \leq 0{,}05$ по сравнению с необработанными клетками. М – маркёр молекулярных масс.

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 Δ4DNase 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. 46 В–Е).

Инкубация ядер и цитоплазмы клеток HCC1954 приводила к появлению мРНК сплайс-варианта BCL-xS в ядрах и увеличению её уровня в цитоплазме (рис. 46 Ж–З).

В ядрах клеток укороченные сплайс-варианты отсутствовали и появлялись только в присутствии recEndoG, поэтому ядра этих клеток были выбраны в качестве моделей для дальнейшего изучения влияния EndoG на АС.

Для доказательства того, что именно EndoG, а не отдалённые последствия её сверхэкспрессии или повреждения ДНК индуцируют АС, мы инкубировали ядра $CD4^+$ Т-клеток с recEndoG или повреждающим ДНК агентом блеомицином в течение 1 часа в различных концентрациях. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени показали, что повышение концентрации recEndoG стимулировало АС пре-мРНК DNase I (рис. 47 А, Б).

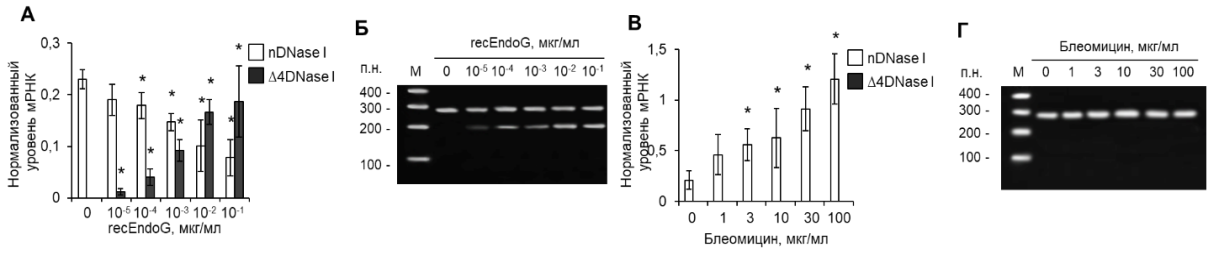


Рисунок 47. Экспрессия сплайс-вариантов мРНК DNase I в ядрах клеток, обработанных recEndoG или блеомицином. Уровни мРНК сплайс-вариантов DNase I в ядрах, обработанных recEndoG (А) или блеомицином (В) в различных концентрациях. Уровни мРНК нормализованы по отношению к рРНК гена 18S. Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР вариантов сплайсинга мРНК DNase I в ядрах, обработанных recEndoG (Б) или блеомицином (Г). * $p \leq 0,05$ по сравнению с необработанными ядрами клетками. М – маркёр молекулярных масс.

При этом наблюдалось дозозависимое увеличение уровня полноразмерной мРНК Δ4DNase I и уменьшение уровня сплайс-варианта nDNase I. Обработка ядер клеток блеомицином вызывало лишь увеличение уровня мРНК nDNase I (что является характерным ответом на повреждение ДНК и релаксацию хроматина) и не сопровождалось индукцией АС (рис. 47 В, Г). Результаты данного эксперимента позволяют утверждать, что именно EndoG, а не просто повреждение ДНК является причиной индукции АС.

4.11.6.1. Индукция АС пре-мРНК как результат РНКазной активности EndoG

Теоретически возможно, что под действием РНКазной активности EndoG могут образоваться малые некодирующие РНК, регулирующие АС [380], или олигонуклеотиды, переключающие сплайсинг [381]. 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 HCC1954 были выделилены суммарная ДНК и РНК, которые расщепляли recEndoG или РНКазами (РНКаза А или РНКаза 1). Деградацию РНК и ДНК подтверждали электрофорезом в ПААГ (данные не приводятся). 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 recEndoG, способна индуцировать образование мРНК сплайс-варианта α+β– hTERT в ядрах клеток CaCo-2 (рис. 48 А), сплайс-вариантов Δ4DNase I и Casp-2S в ядрах $CD4^+$ Т-клеток человека (рис. 48 Г, Ж) и BCL-xS в ядрах клеток HCC1954 (рис. 48 К). Ни РНКаза А, ни РНКаза 1 подобного эффекта не оказывали (рис. 48 В, Е, И, М). Изменение экспрессии альтернативных вариантов мРНК при инкубации клеточных ядер с РНК, обработанной recEndoG, было время-зависимым (рис. 48 Б, Д, З, Л). 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.

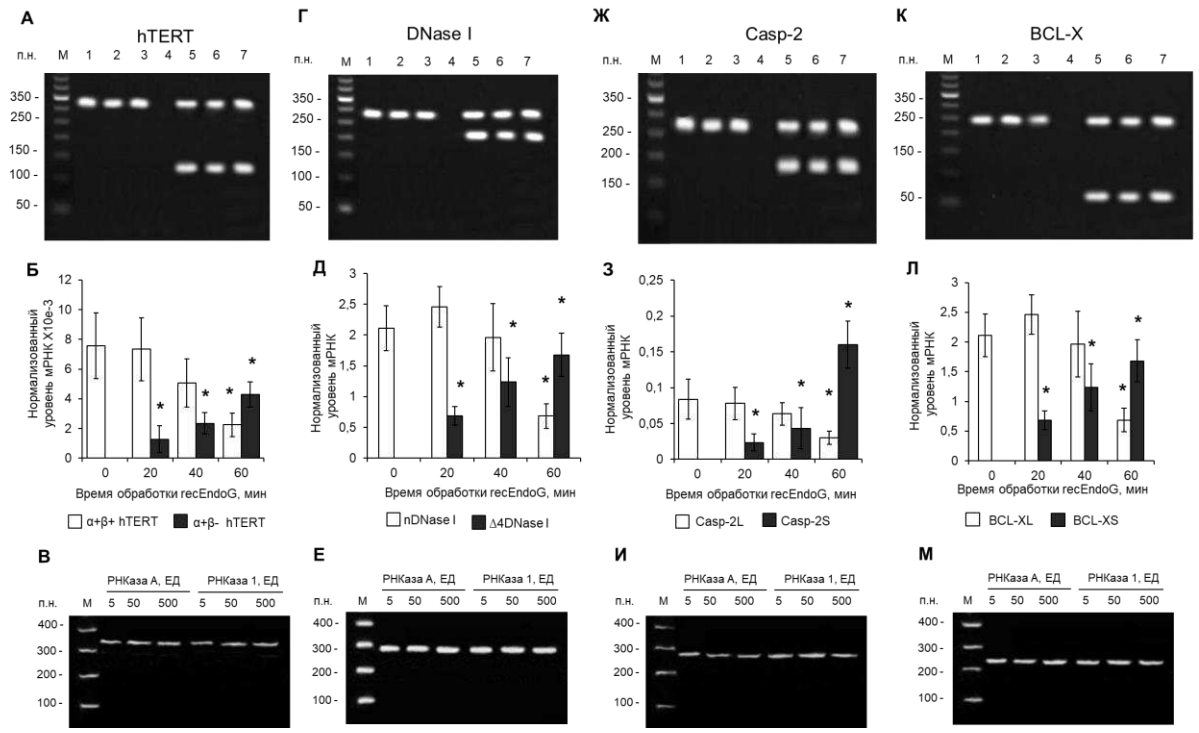


Рисунок 48. Индукция АС пре-мРНК в ядрах клеток в результате РНКазной активности EndoG. Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР альтернативных вариантов мРНК hTERT в клетках CaCo-2 (А); DNase I) (Г) и Casp-2 (Ж) в $CD4^+$ Т-клетках; BCL-x в летках HCC1954 (К). М – маркёр молекулярных масс; 1 – ядра; 2 – РНК; 3 – ядра, инкубированные с ДНК, расщепленной recEndoG; 4 – РНК, расщепленная recEndoG; 5 – ядра, инкубированные с РНК, обработанной recEndoG в течение 20 мин; 6 – ядра, инкубированные с РНК, обработанной recEndoG в течение 40 мин; 7 – ядра, инкубированные с РНК, обработанной recEndoG в течение 60 мин. Уровни мРНК вариантов α+β+ и α+β– мРНК hTERT (Б), nDNase I и Δ4DNase I (Д), Casp-2S и Casp-2L (З), BCL-xL и BCL-xS (Л) в ядрах, инкубированных с РНК, расщепленной recEndoG. Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР альтернативных вариантов мРНК hTERT (В), DNase I (Е), Casp-2 (И), BCL-x (М) в ядрах, инкубированных с РНК, расщепленной РНКазой А или РНКазой 1. * $p \leq 0,05$.

4.11.6.2. 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 этого предположения и определения длины EGPO, ядерную РНК клеток CaCo-2, HCC1954 или $CD4^+$ Т-лимфоцитов, расщепленную recEndoG, 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. 49 А, В, Д, Ж). Предполагалось, что эти олигонуклеотиды должны формировать нековалентные комплексы с EGPO и блокировать его действие [332]. С помощью ОТ-ПЦР было показано, что некоторые олигонуклеотиды блокировали АС, что подтвердило и позволило определить размер EGPO на уровне 48 нуклеотидов для мРНК hTERT (рис. 49 Б), 72 нуклеотидов для мРНК DNase I (рис. 49 Г), 60 нуклеотидов для мРНК Casp-2 (рис. 49 Е) и 36 нуклеотидов для мРНК BCL-x (рис. 49 З).

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что сверхэкспрессия EndoG в клетках вызывает значимое увеличение количества EGPO для всех изучаемых мРНК (рис. 50). В цитоплазме, обработанной recEndoG, экспрессия EGPO была также повышена. 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.

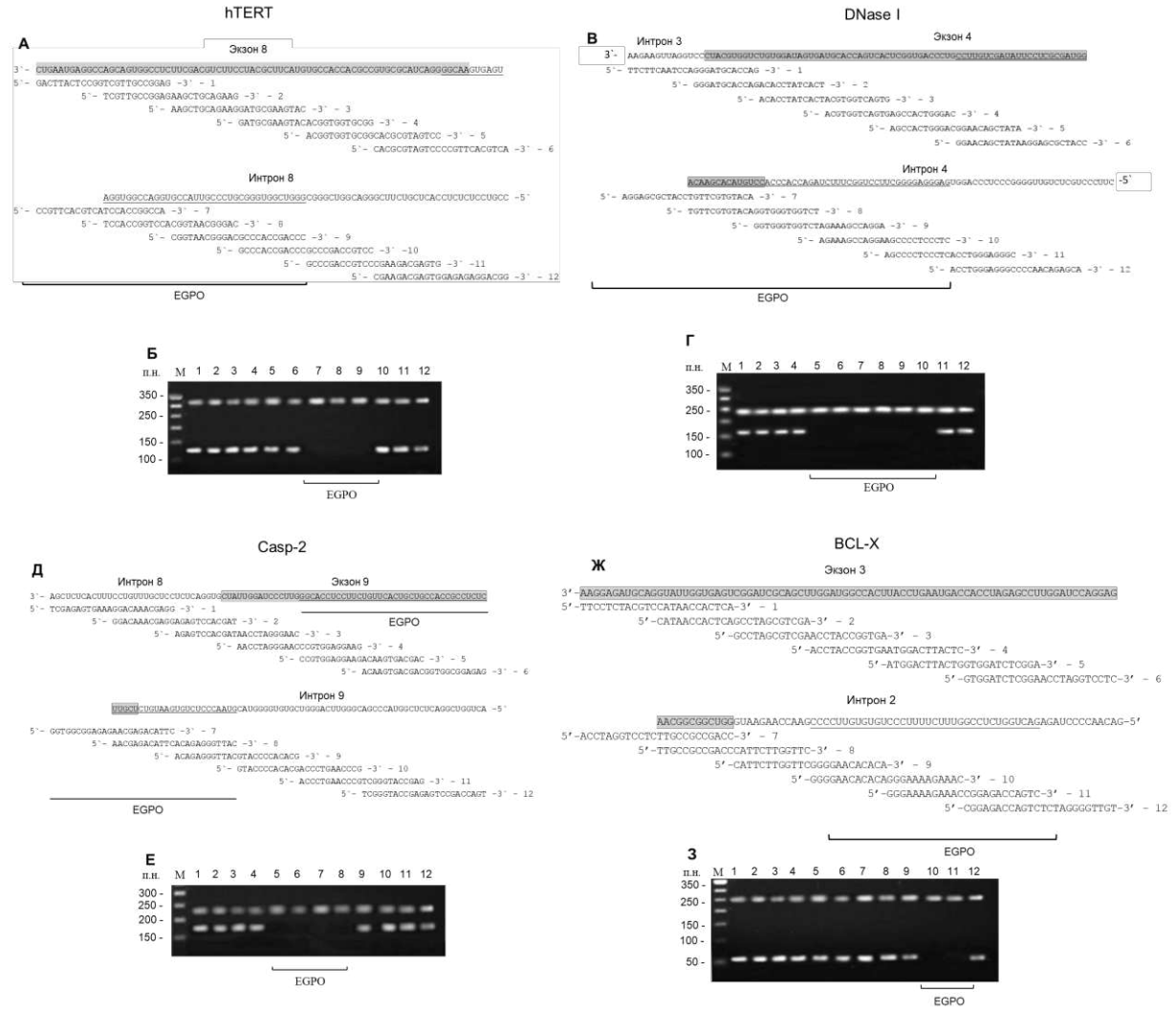


Рисунок 46. Регуляция АС олигонуклеотидами EGPO. Положение антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов по отношению к гипотетической нкРНК hTERT (А), DNase I (В), Casp-2 (Д), BCL-x (Ж). Показаны участки расположения EGPO. Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР hTERT в ядрах, инкубированных с РНК, расщепленной recEndoG и инкубированной с ДНК-олигонуклеотидами hTERT (Б), DNase I (Г), Casp-2 (Е), BCL-x (З). М – маркёр молекулярных масс.

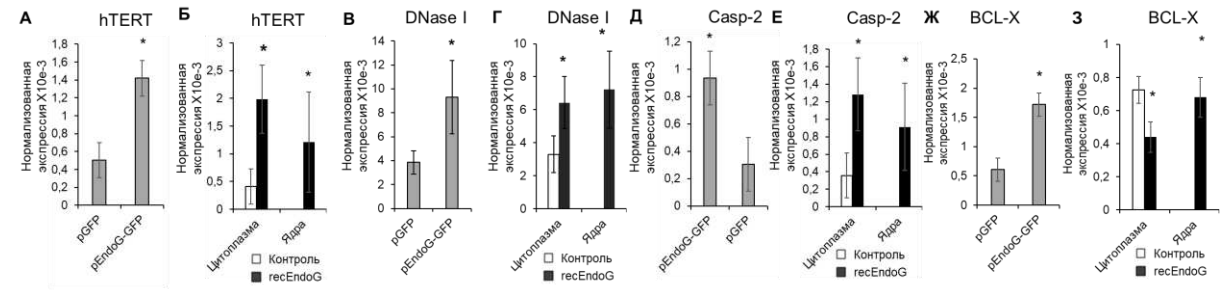


Рисунок 50. Экспрессия EGPO в клетках и клеточных органеллах. Показаны уровни EGPO hTERT в клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP (А) и в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG (Б); уровни EGPO DNase I (В) и Casp-2 (Д) в клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP, а также в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG (Г, Е); уровни EGPO BCL-x (Ж) в клетках HCC1954, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP, в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG (З). * $p \leq 0,05$ по сравнению с необработанными ядрами клеток.

4.11.6.3. 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. 51А). При помощи ОТ-ПЦР в реальном времени определен уровень экспрессии нкРНК для hTERT в клетках, трансфицированных плазмидами EndoG-GFP или GFP, а также в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG. Сверхэкспрессия EndoG в клетках не вызывала изменения экспрессии нкРНК (рис. 51 Б). В цитоплазме и ядрах, обработанных recEndoG, изменения экспрессии нкРНК также не обнаружено (рис. 51 В).

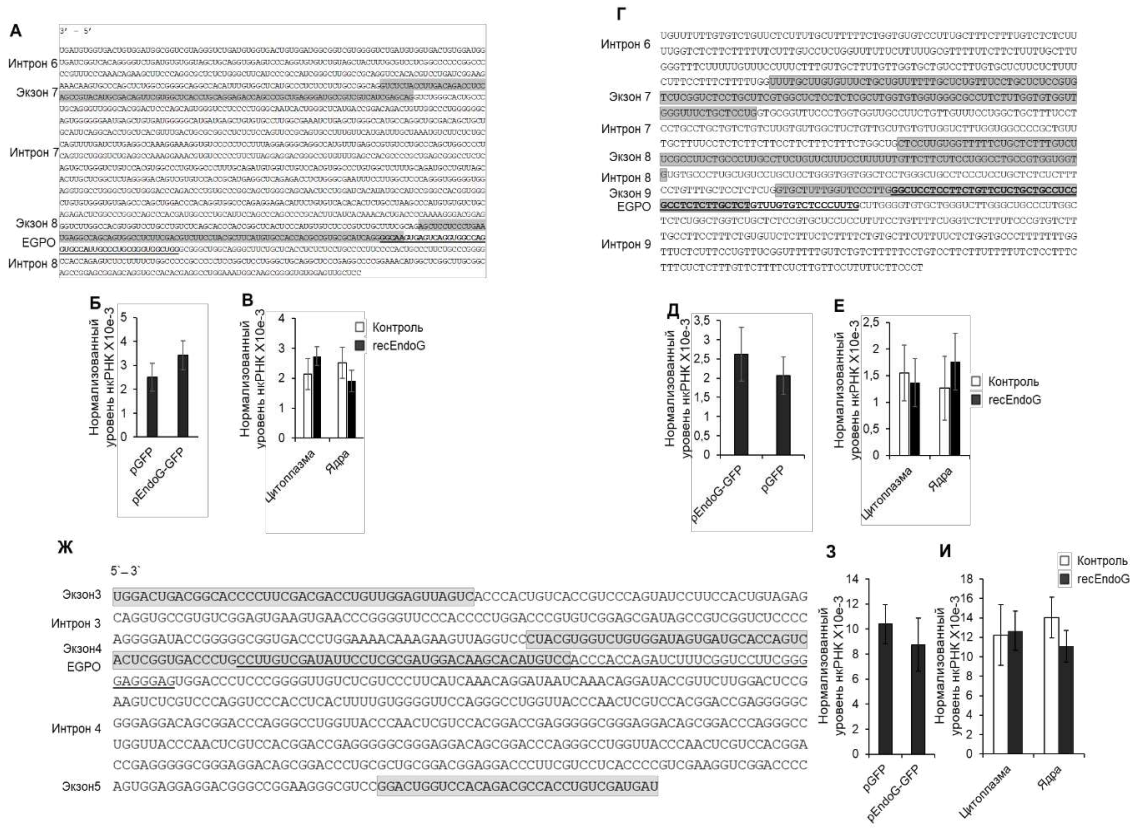


Рисунок 51. Нуклеотидные последовательности нкРНК и уровни их синтеза. Нуклеотидные последовательности нкРНК hTERT (А), Casp-2 (Г) и DNase I (Ж). Указаны участки соответствующие интронам и экзонам мРНК, а также место расположения EGPO. Уровни нкРНК в клетках трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP (Б, Д, Е), а также в цитоплазме и ядрах клеток, обработанных recEndoG (В, Е, К).

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 (рис. 51 Г). Как и в случае с нкРНК для hTERT, сверхэкспрессия EndoG в лимфоцитах не вызывала изменения экспрессии нкРНК для Casp-2 (рис. 51 Д). В цитоплазме и ядрах, обработанных recEndoG, изменения экспрессии нкРНК также не обнаружено (рис. 51 Е). Для пре-мРНК DNase I длина нкРНК составила 773 нуклеотида (рис. 51 Ж). 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 recEndoG (рис. 51 З, И). Наиболее вероятно, что в цитоплазме и ядрах клеток нкРНК синтезируется на постоянном уровне, а количество EGPO регулируется активностью и/или количеством EndoG.

4.12. Модуляция АС при помощи олигонуклеотидов, продуцируемых EndoG (EGPO)

4.12.1. Индукция АС пре-мРНК в ядрах клеток апоптотических генов, синтезированным EGPO

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 специфицные пре-мРНК целевых генов способны дозо-зависимо активировать АС (рис. 52). В клетках CaCo-2 повышение уровня мРНК α+β– сплайс-варианта hTERT и снижение полноразмерного варианта α+β+ наблюдалось при увеличении концентрации EGPO к пре-мРНК hTERT (рис. 52 А–Г). 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 (рис. 52 Д–М). В ядрах клеток линии HCC1954 увеличение концентрации EGPO к пре-мРНК BCL-x сопровождалось повышением уровня мРНК варианта BCL-xS и снижением содержания варианта BCL-xL (рис. 52 О–С). Контрольные неспецифичные олигонуклеотиды оказались не способными индуцировать АС пре-мРНК целевых генов.

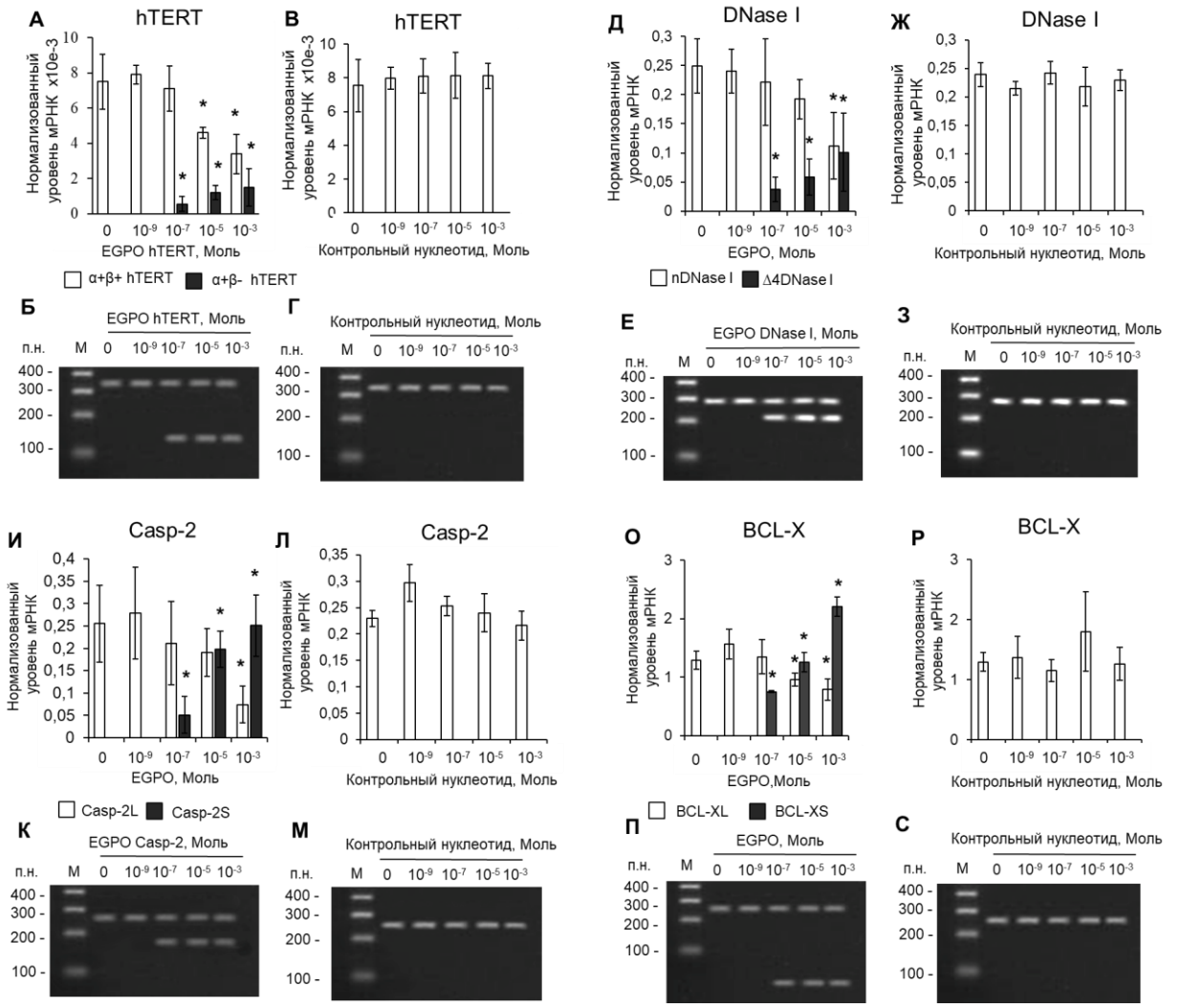


Рисунок 52. Индукция АС пре-мРНК целевых генов в ядрах изолированных клеток при их инкубации с EGPO. Ядра клеток CaCo-2 инкубировали с EGPO к пре-мРНК hTERT. Ядра $CD4^+$ Т-лимфоцитов инкубировали с EGPO к пре-мРНК DNase I или Casp-2. Ядра клеток HCC1954 инкубировали с EGPO к пре-мРНК BCL-x. Уровни мРНК сплайс-вариантов мРНК hTERT в ядрах, обработанных искусственным EGPO (А) или контрольной неспецифической РНК (В). Электрофорез в агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР вариантов сплайсинга мРНК hTERT в ядрах, обработанных EGPO (Б) или контрольной неспецифической РНК (Г). То же для сплайс-вариантов мРНК DNase I (Д-З), Casp-2 (И-М) и BCL-x (О-С). М - маркер молекулярных масс. * $p \leq 0,05$ по сравнению с необработанными ядрами клеток.

Таким образом, EGPO, действует как эндогенный переключатель сплайсинга и вызывает АС пре-мРНК целевых генов в изолированных ядрах клеток.

4.12.2. 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 и в клетках. Для проверки этого предположения $CD4^+$ Т-лимфоциты трансфицировали синтезированным EGPO или контрольными олигонуклеотидами, которые содержали химические модификации для защиты от действия внутриклеточных РНКаз: 2'-О-(2-метокси)этил рибозу (2'MOE), фосфоротиоатный остов, и 5'-метилцитозин [382].

4.12.2.1. Ингибирование теломеразы в результате трансфекции лимфоцитов EGPO к пре-мРНК hTERT

Для индукции АС пре-мРНК hTERT $CD4^+$ Т-лимфоциты трансфицировали одним из EGPO, которые блокируют сайты связывания сплайс-регуляторных белков SRp20 и SRp40 (рис. 53 А–Г) на молекуле пре-мРНК. Через 24 часа после трансфекции были выявлены незначительные изменения уровня общей мРНК hTERT в клетках, трансфицированных каждым из EGPO (рис. 53 Д). SRp20 24-осн EGPO, блокирующий только сайты связывания для белка SRp20, и SRp40 24-осн EGPO, блокирующий только сайты связывания белка SRp40, были способны индуцировать АС пре- пре-мРНК hTERT на умеренном уровне (рис. 53 Е, Ж). Трансфекция клеток этими EGPO приводила к подавлению мРНК α+β+ hTERT и повышению мРНК α+β– hTERT. TRAP анализ в клеточных экстрактах показал, что индукция АС пре-мРНК hTERT сопровождалась ингибированием активности теломеразы (рис. 53 З, И). Наиболее значительные изменения уровней сплайс-вариантов мРНК hTERT и ингибирования активности теломеразы наблюдали в клетках, трансфицированных SRp20 и SRp40 48-осн EGPO, которые блокировал сайты

связывания для обоих белков SRp20 и SRp40. Данный EGPO был выбран для дальнейшего исследования.

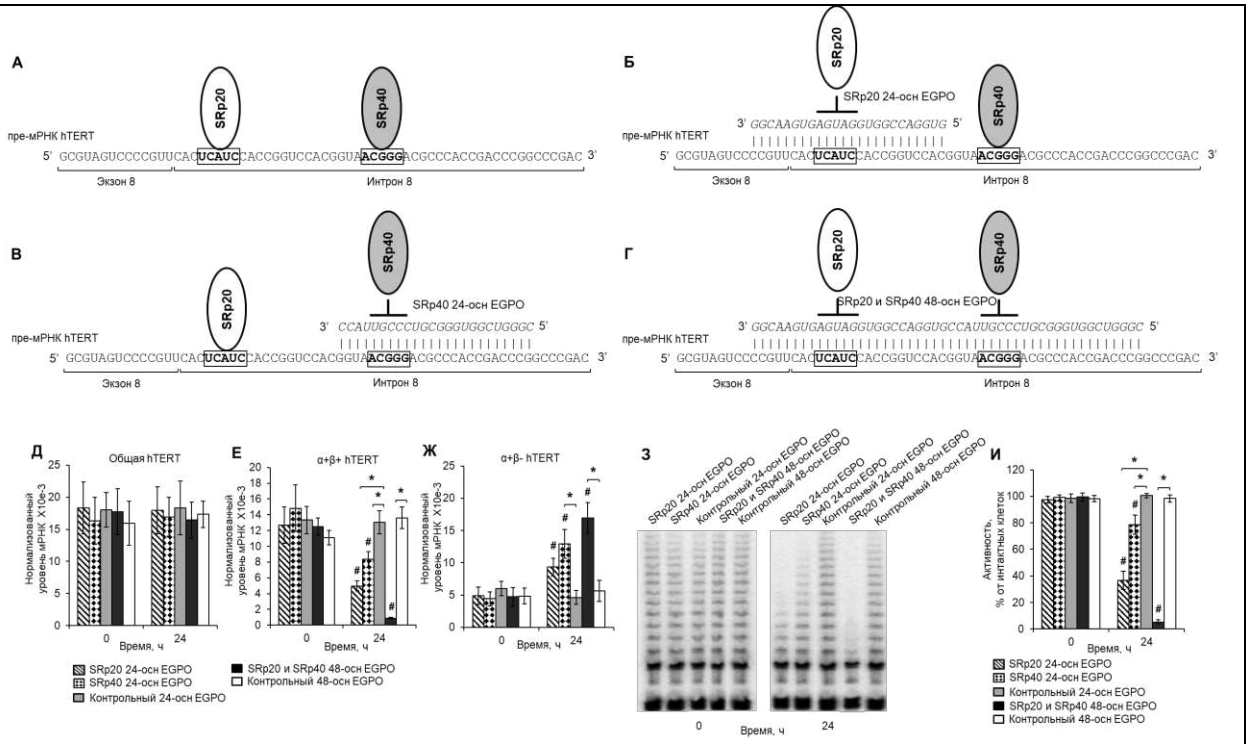


Рисунок 53. Индукция АС пре-мРНК hTERT и ингибирование теломеразы после трансфекции лимфоцитов EGPO. Схематическое изображение регулирующих сплайсинг белков SRp20 (показан в виде белого эллипса) и SRp40 (показан в виде серого эллипса), взаимодействующих с сайтами связывания на молекуле пре-мРНК hTERT (А). Трансфекция клеток 24-осн специфическими антисмысловыми EGPO блокирует связывание каждого белка SRp20 (Б) или SRp40 (В) с сайтами связывания. Трансфекция клеток 48-осн специфическими антисмысловыми EGPO блокирует связывание обоих белков SRp20 и SRp40 (Г) с сайтами связывания. Сайты связывания SRp20 и SRp40 показаны в рамке. Специфические EGPO выделены курсивом. Уровни мРНК общей hTERT (Д) и её сплайс-вариантов (Е, Ж) через 24 ч после трансфекции клеток EGPO. Уровни мРНК были нормализованы по отношению к уровню рРНК референсного гена 18S. TRAP гель-электрофорез для трансфицированных клеток (З). Результаты активности теломеразы, измеренные с помощью TRAP (И). # $p \leq 0,05$ по отношению к трансфицированным клеткам во временной точке 0. * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным контрольными EGPO.

Неспецифический контрольный 24-осн EGPO и контрольный 48-осн EGPO не индуцировали ни АС пре-мРНК hTERT, и не ингибировали теломеразу.

4.12.2.2. Время-зависимая индукция АС пре-мРНК hTERT и ингибирование теломеразы EGPO, блокирующим SRp20 и SRp40

Методом проточной цитометрии показано, что эффективность трансфекции была близка к 100% через 24 ч после трансфекции и постепенно снижалась до 49,03 – 67,65% к 96 ч как в клетках, трансфицированных SRp20 и SRp40 48-осн EGPO, так и контрольным 48-осн EGPO (рис. 54 А–В). Количество Cy5.5-конъюгированных EGPO, детектированное по уровню MFI, было наивысшим (91,29 - 81,95 усл. ед.) через 24 часа после трансфекции и постепенно снижалось до 41.20 - 50,75 усл. ед. через 96 ч после трансфекции (рис. 54 Г). Различия в эффективности трансфекции и MFI между группами клеток, трансфицированных SRp20 и SRp40 48-осн EGPO или контрольным 48-осн EGPO, были незначительными, что указывает на гомогенность данных клеточных популяций. Были изучены изменения уровней сплайс-вариантов hTERT в трансфицированных клетках в течение 96 часов после трансфекции. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени, показано значительное снижение уровня мРНК полноразмерной α+β+ hTERT в клетках, трансфицированных SRp20 и SRp40 48-осн EGPO (рис. 54 Д). Уменьшение количества полноразмерного варианта hTERT сопровождалось значительным повышением содержания сплайс-варианта α+β– hTERT (рис. 54 Е). Результаты вестерн-блоттинга показали значительное уменьшение количества белка варианта α+β+ hTERT и увеличение α+β– hTERT в клетках, трансфицированных SRp20 и SRp40 48-осн EGPO (рис. 54 Ж–И). Снижение уровня полноразмерного варианта сопровождалось ингибированием активности теломеразы (рис. 54 К–Л). Изменения уровня мРНК сплайс-вариантов hTERT и ингибирования теломеразы были связаны с

эффективностью трансфекции и количеством SRp20 и SRp40 48-осн EGPO внутри клеток.

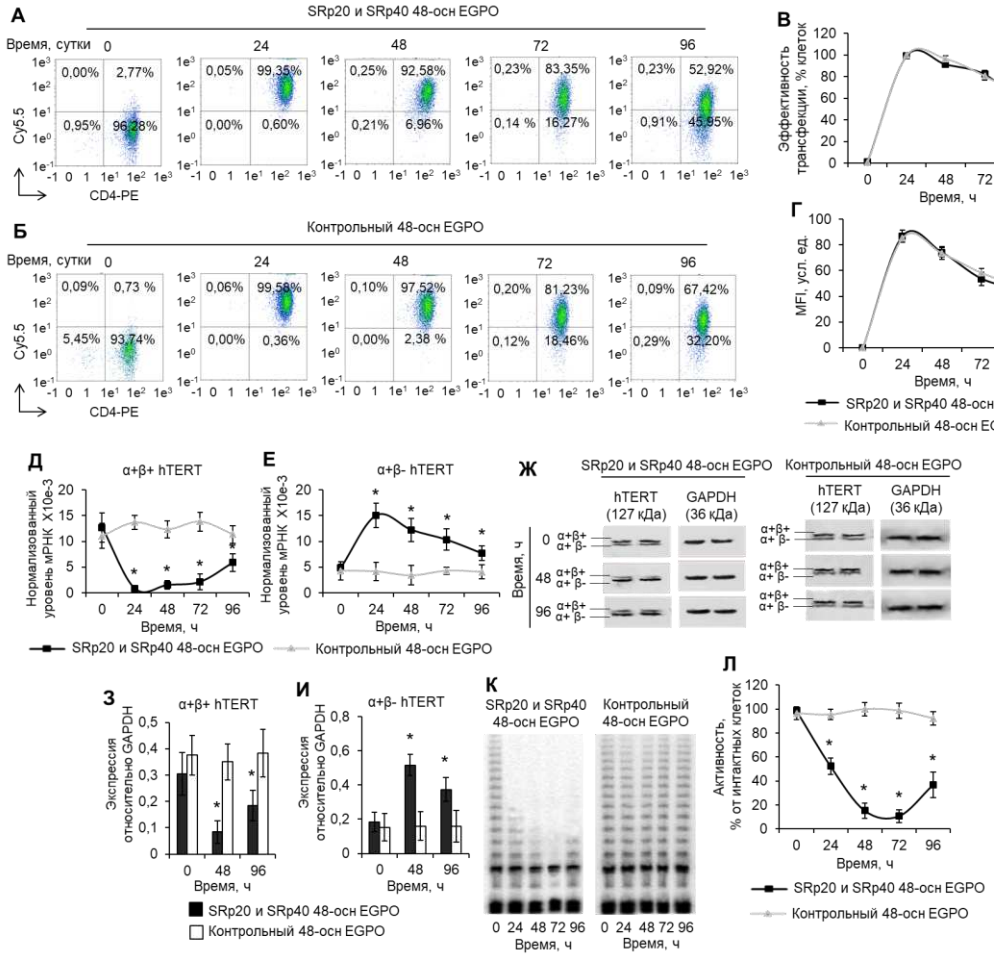


Рисунок 54. Индукция АС пре-мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы с помощью SRp20 и SRp40-блокирующего EGPO. Результаты проточной цитометрии $CD4^+$ Т-клеток, трансфицированных меченным Cy5.5 48-осн EGPO SRp20 и SRp40 (А) или контрольным 48-осн EGPO (Б) через 96 ч после трансфекции. Эффективность трансфекции (В) MFI Cy5.5-положительных клеток (Г). Уровни мРНК сплайс-вариантов hTERT, измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени (Д–Е). Вестерн-блоттинг сплайс-вариантов hTERT и контрольного белка GAPDH в трансфицированных $CD4^+$ Т-клетках (Ж). Результаты количественного определения варианта сплайсинга hTERT относительно GAPDH (З, И). TRAP гель-электрофорез для трансфицированных клеток (К). Результаты активности теломеразы, измеренные с помощью TRAP (Л). Усл. ед., условные единицы измерения; * $p \leq 0{,}05$ по отношению к клеткам, трансфицированных контрольным 48-осн SSO.

Снижение эффективности трансфекции и количества EGPO через 96 после трансфекции клеток сопровождалось снижением интенсивности АС пре-мРНК hTERT и ослаблением ингибирования теломеразы. В клетках, трансфицированных неспецифическим контрольным 48-осн EGPO, изменений в уровнях сплайс-вариантов hTERT и активности теломеразы не обнаружено.

4.12.2.3. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК hTERT влияет на пролиферацию $CD4^+$ Т-лимфоцитов

Известно, что каталитическая субъединица теломеразы способна оказывать влияние на пролиферативную активность лимфоцитов человека в результате функционирования по теломер-независимым механизмам [383,384]. Для исследования пролиферативной активности, трансфицированные лимфоциты метили витальным флуоресцентным красителем CFSE. С помощью проточной цитометрии был определён процент пролиферирующих клеток. Трансфекция клеток SRp20 и SRp40 48-осн EGPO приводила к значительному ингибированию пролиферации клеток уже через 24 ч после трансфекции (8,08 ± 2,12% против 32,19 ± 2,51% в контрольной группе (рис. 55 А–В). Через 72 ч после трансфекции почти 100% контрольных клеток начинали делиться, в то время как деление обнаружено лишь 52,33 ± 7,36% клеток, трансфицированных SRp20 и SRp40 48-осн EGPO. В гистограммах проточной цитометрии контрольной группы наблюдали образование дискретных пиков, которые представляют собой популяции поколений пролиферирующих клеток [327]. Клетки, трансфицированные SRp20 и SRp40 48-осн EGPO не формировали подобные пики, что указывало на участие активной hTERT в регуляции клеточного цикла.

Ингибирование пролиферативной активности приводило к снижению общего числа клеток. Через 96 ч после трансфекции число клеток в контрольной группе составило $7,56 \pm 0,94 \times 10^5$, а количество клеток, трансфицированных SRp20 и SRp40 48-осн EGPO - $1,44 \pm 0,65 \times 10^5$ (рис. 55

Г). Частота клеточных циклов в сутки было равно 2,34 для клеток, трансфицированных контрольным 48-осн EGPO, и 1,25 для клеток, трансфицированных SRp20 и SRp40 48-осн EGPO. Различия в скорости роста не были связаны с гибелью клеток. Существенной разницы в уровне гибели клеток в различных группах не обнаружено (рис. 55 Д).

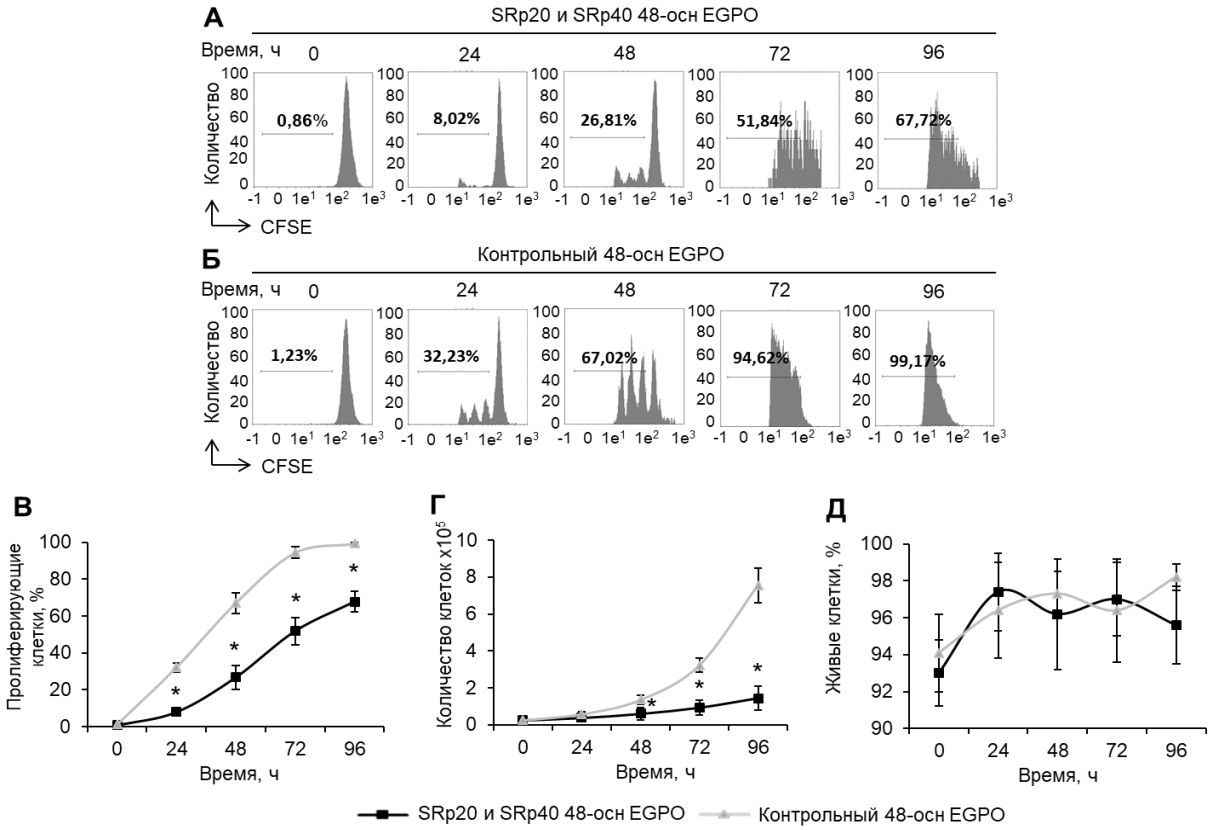


Рисунок 55. Ингибирование пролиферации $CD4^+$ Т-лимфоцитов, трансфицированных EGPO, блокирующим SRp20 и SRp40. Результат проточной цитометрии пролиферирующих меченных CFSE лимфоцитов, трансфицированных 48-осн SSO (А) SRp20 и SRp40 или (Б) контрольного 48-мерным SSO в течение 96 часов. (В) Процент популяции пролиферирующих клеток с пониженным сигналом CFSE. Число (Г) и жизнеспособность (Д) пролиферирующих трансфицированных клеток. * $p \leq 0,05$ по отношению к клетками, трансфицированным контрольным 48-осн SSO.

4.12.3. Влияние индукции АС пре-мРНК DNase I переключающим сплайсинг олигонуклеотидом на развитие апоптоза в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека

4.12.3.1. Индукция АС пре-мРНК DNase I под действием EGPO в лимфоцитах человека

С целью изучения способности EGPO к пре-мРНК DNase I индуцировать АС и влиять на прогрессию апоптоза, мы трансфицировали $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты, а также В- и NK-клетки человека 36-осн олигонуклеотидом, специфичным к пре-мРНК DNase I и перекрывающим сайты взаимодействия с регуляторными белками SC35 и SRp40 (рис. 56 А, Б) или контрольным неспецифичным 36-осн олигонуклеотидом. Через 24 ч после трансфекции в клетках измеряли уровень мРНК сплайс-вариантов DNase I и нуклеазную активность. Наблюдали незначительное изменение уровней мРНК общей DNase I во всех типах трансфицированных клеток (рис. 56 В) EGPO к DNase I оказался способным индуцировать АС. Обнаружено снижение уровня мРНК полноразмерной nDNase I и увеличение такового сплайс-варианта Δ4DNase I (рис. 56 Г, Д) во всех типах лимфоцитов человека. Индукция АС сопровождалась снижением нуклеазной активности в лизатах клеток (рис. 56 Е – З). Наиболее значительная индукция АС и ингибирование нуклеазной активности были выявлены в $CD4^+$ Т-лимфоцитах, поэтому они были выбраны нами для дальнейшего исследования. Не специфический контрольный 36-осн олигонуклеотид не вызывал изменения ни АС пре-мРНК DNase I ни нуклеазной активности в клетках.

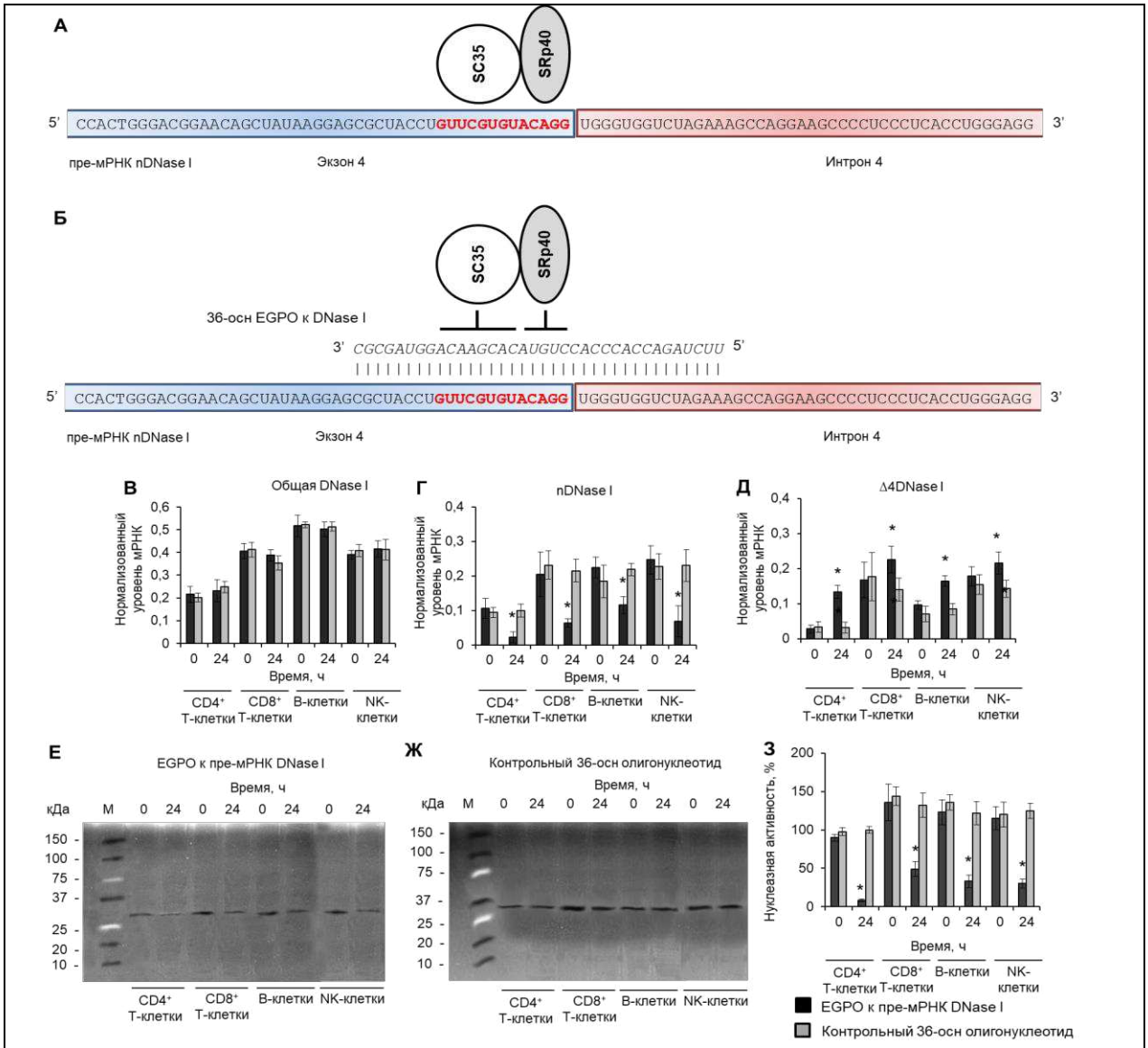


Рисунок 56. Индукция АС пре-мРНК DNase I и ингибирование нуклеазной активности в лимфоцитах человека после трансфекции EGPO. Схематическое взаимодействие регулирующих сплайсинг белков SC35 и SRp40 с их сайтами на молекуле пре-мРНК DNase I (А). Трансфекция клеток специфическим 36-членным EGPO препятствует взаимодействию регулирующих сплайсинг белков с их сайтами (Б). Уровни мРНК общей DNase I (В) и её сплайс вариантов (Г, Д) через 24 ч после трансфекции олигонуклеотидами. Результат зимографии методом DNA-SDS-PAGE в лизатах лимфоцитов, трансфицированных EGPO к пре-мРНК DNase I (Е) или контрольным 36-осн нуклеотидом (Ж). Оценка изображений зимографии с помощью денситометрии (З). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным контрольным 36-осн нуклеотидом. М – маркёр молекулярных масс.

4.12.3.2. Индуцированный АС пре-мРНК DNase I тормозит развитие апоптоза

Для того чтобы исследовать влияние EGPO к пре-мРНК DNase I на развитие апоптоза, трансфицированные клетки инкубировали с индуцирующим апоптоз антителами к CD95/FAS [385]. Эффективность трансфекции клеток, определенная по уровню MFI Cy5.5-положительных клеток приближалась к 100% через 12 ч и постепенно снижалась до уровня 81,64 – 69,36% к 72 ч в клетках, трансфицированных как EGPO к DNase I, так и контрольным 36-осн олигонуклеотидом. Внутриклеточное содержание Cy5.5-конъюгированных олигонуклеотидов (определенное по уровню MFI) было наивысшем 91,92 – 77,72 условных единиц через 12 ч после трансфекции и постепенно снижалось до 42,95 – 25,67 условных единиц к 72 часам. Уменьшение уровня MFI наблюдалось через 36 ч после трансфекции. Такое снижение объясняется сокращением внутриклеточной концентрации олигонуклеотидов в результате деления клеток [386]. Различия эффективности трансфекции и уровнями MFI между группами клеток, трансфицированными EGPO и контрольным олигонуклеотидом были недостоверными, что указывает на гомогенность данных клеток. 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. 57 Б, З) и группе не трансфицированных клеток (рис. 57 Д, Л). 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. Обнаружено значительное увеличение выживаемости клеток, трансфицированных EGPO к DNase I (рис. 57 А, Ж).

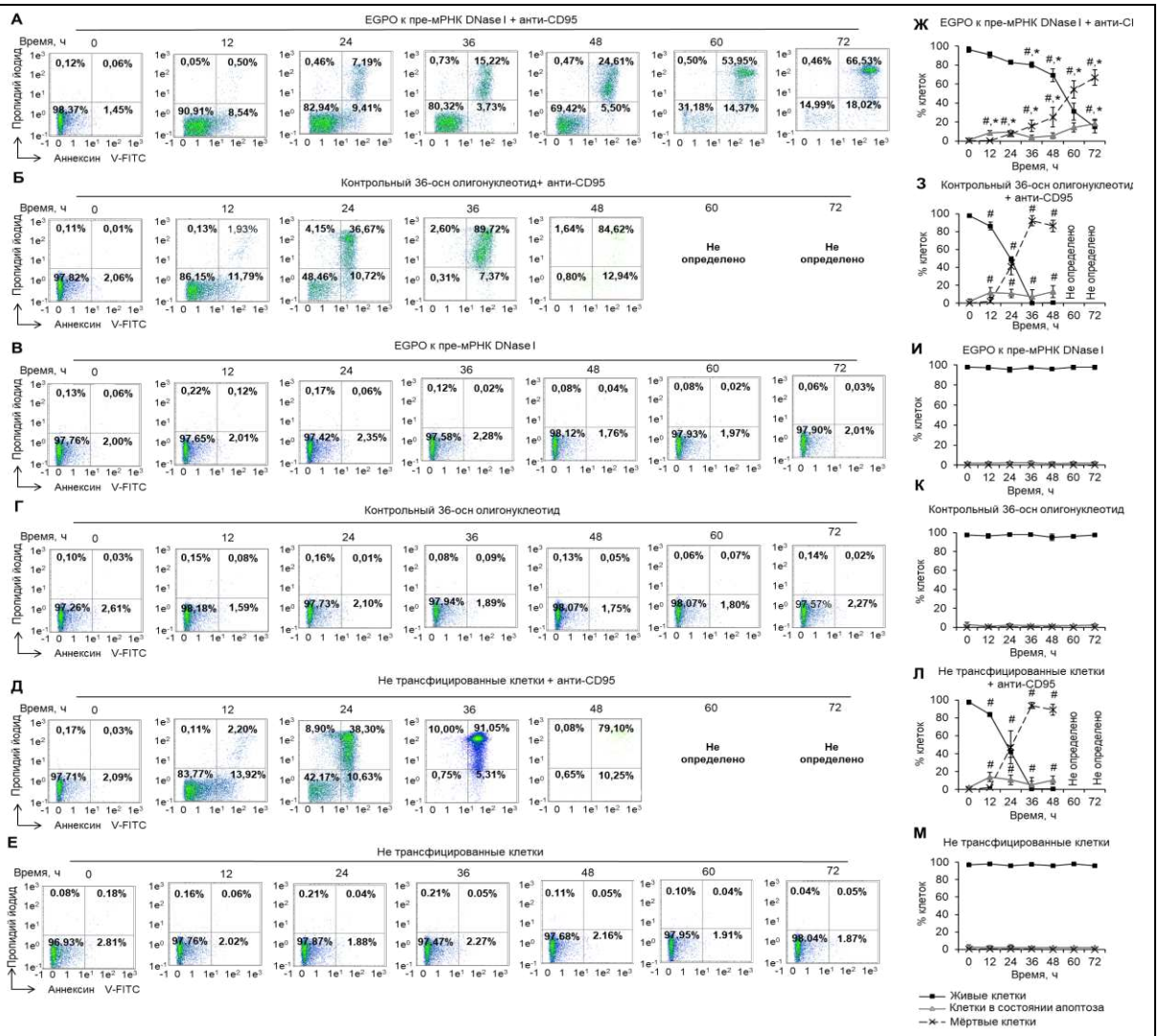


Рисунок 57. Ингибирование развития апоптоза в клетках, трансфицированных EGPO к пре-мРНК DNase I и инкубированных с анти-CD95. $CD4^+$ Т-клетки метили аннексином V-FITC и пропидий йодидом и измеряли количество живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мёртвых клеток через каждые 12 часов. Результаты проточной цитометрии клеток**,** трансфицированных EGPO (А, В) или контрольным 36-осн олигонуклеотидом (Б, Г), инкубированных с анти-CD95 (А, Б, Д) и контрольных интактных клеток (Е). Показан процент живых клеток (нижние левые квадранты), клеток в состоянии апоптоза (нижние правые квадранты) и мёртвых клеток (верхние квадранты). Гистограммы результатов измерения живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мёртвых клеток методом проточной цитометрии. * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным контрольным 36-осн нуклеотидом. # $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, не инкубированных с анти-CD95.

Большинство клеток оставались жизнеспособными в течение 12 – 48 ч после индукции апоптоза. Количество клеток в состоянии апоптоза было значительно ниже (3,70 – 9,43%) по сравнению с таковыми, трансфицированными контрольным олигонуклеотидом. Апоптоз в большинстве клеток развился не ранее через 60 - 72 ч. Клетки, которые были трансфицированы EGPO к пре-мРНК DNase I или контрольным олигонуклеотидом, но не были стимулированы анти-CD95, оставались живыми в течение всего периода наблюдения (рис. 54 В, И, Г, К). Количество клеток в состоянии апоптоза и мёртвых клеток не превышало уровень таковых в группе контрольных интактных клеток (рис. 54 Е, М).

Обнаружено повышение уровня мРНК общей DNase I во всех трансфицированных клетках с индукцией апоптоза (рис. 58 А). Однако, уровень полноразмерной nDNase I повышался только в клетках, трансфицированных контрольным 36-осн олигонуклеотидом (рис. 58 Б) или в не трансфицированных клетках. В клетках, трансфицированных EGPO выявлено понижение уровня nDNase I и повышение количества мРНК сплайс-варианта Δ4DNase I в течение всего периода культивирования (рис. 58 В). В клетках, трансфицированных контрольным олигонуклеотидом и в нетрансфицированных клетках, индукция апоптоза не сказывалась на эффективности АС. Уровень мРНК общей DNase I не изменялся в не трансфицированных клетках (рис. 58 Г). Как и в случае с клетками с индуцированным апоптозом, трансфекция EGPO вызывала АС пре-мРНК DNase I: уровень nDNase I снижался, в то время как уровень Δ4DNase I повышался (рис. 58 Д, Е). В клетках, трансфицированных EGPO. Наблюдалась незначительная нормализация АС в период 48 – 72 ч: уровень nDNase I повышался, в то время как Δ4DNase I уменьшался (рис. 58 Б, В, Д, Е).

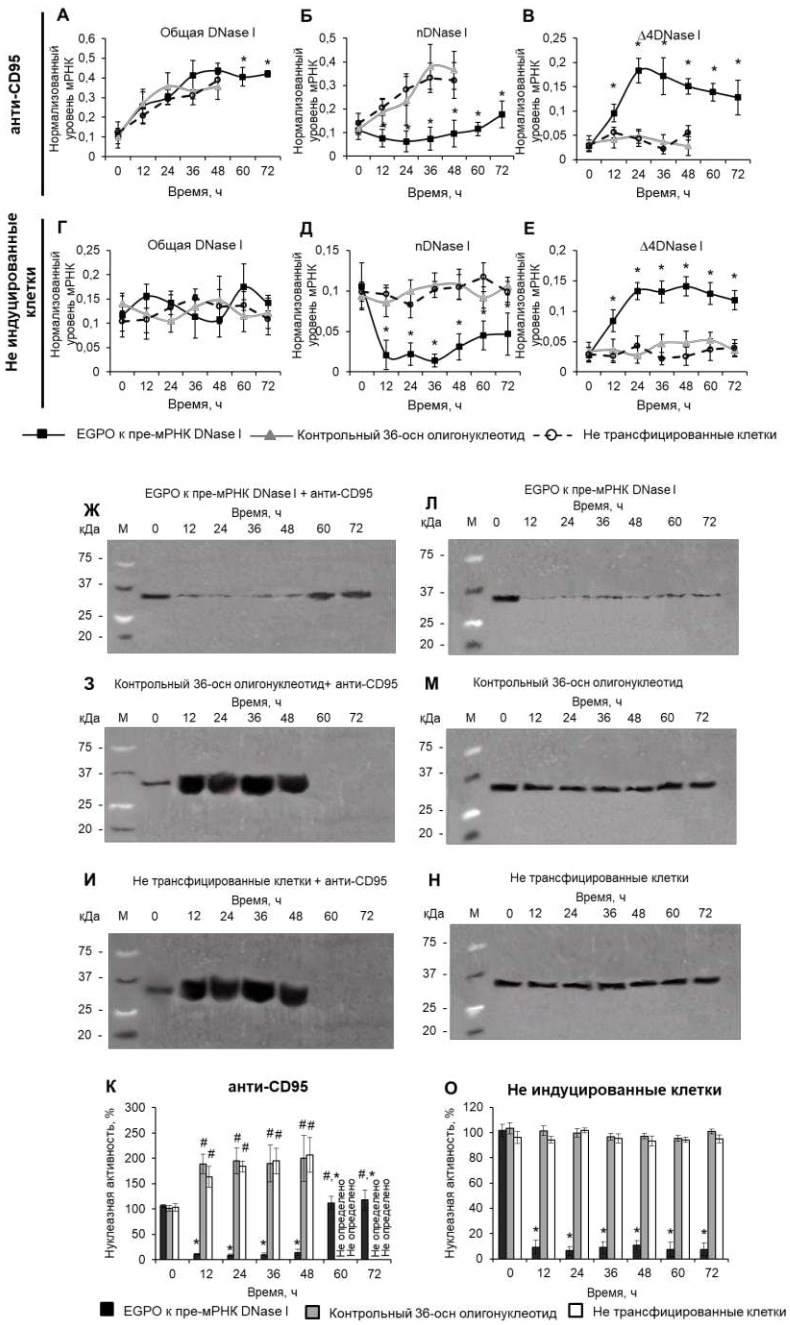


Рисунок 58. Индукция АС пре-мРНК DNase I и ингибирование нуклеазной активности в клетках, трансфицированных EGPO и инкубированных с анти-CD95. Уровни мРНК общей DNase I (А, Г) и её сплайс вариантов (Б, В, Д, Е) через 24 ч после трансфекции олигонуклеотидами. Результат зимографии методом DNA-SDS-PAGE в лизатах лимфоцитов, трансфицированных EGPO к пре-мРНК DNase I или контрольным 36-осн нуклеотидом (Ж-И, Л-Н). Оценка изображений зимографии с помощью денситометрии (К, О). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным контрольным 36-осн нуклеотидом. # $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, не инкубированных с анти-CD95. М – маркёр молекулярных масс.

Нормализация АС с течением времени объясняется понижением внутриклеточного количества EGPO, наблюдаемое в трансфицированных клетках в этот период. Не удалось определить уровни мРНК сплайс-вариантов DNase I в контрольных клетках с индукцией апоптоза в период 60 – 72 ч, поскольку все клетки к этому времени погибли. Методом зимографии исследовали уровень нуклеазной активности в лизатах клеток. Нуклеазная активность бала заметно снижена в клетках, трансфицированных EGPO как инкубированных, так и не инкубированных с анти-CD95, так и не инкубированных (рис. 58 Ж, Л, К, О). 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 как не трансфицированных, так и трансфицированных контрольным 36-осн олигонуклеотидом, что связано с развитием апоптотичских процессов (рис. 58 З, И). В интактных клетках, а также в трансфицированных клетках без индукции апоптоза нуклеазная активность оставалась неизменной. Снижение нуклеазной активности стало результатом индукции АС пре-мРНК DNase I и уменьшением экспрессии полноразмерного варианта nDNase I, поскольку именно полноразмерная форма фермента обладает каталитической активностью.

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.

4.13. Исследование биологического эффекта индукции АС пре-мРНК hTERT в клетках

Индукция АС пре-мРНК hTERT в результате действия EndoG вызывает ингибирование активности теломеразы. Было изучено влияние инактивации теломеразы на пролиферацию нормальных $CD4^+$ Т-лимфоцитов человека и опухолевых клеток линии CaCo-2.

4.13.1. Гибель $CD4^+$ Т-лимфоцитов со сниженным уровнем α+β+ hTERT

Для установления возможного влияния EndoG на пролиферацию клеток $CD4^+$ Т, лимфоциты четырёх доноров трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP, клетки выращивали и ежедневно измеряли количество живых и мёртвых клеток, а также клеток в состоянии апоптоза. В группе клеток, трансфицированных pEndoG-GFP, обнаружена массированная гибель на 24-28-е сутки после трансфекции (рис. 59). Так, на 24-е сутки наблюдалось резкое увеличение числа клеток в состоянии апоптоза до 13,31±2,12%. На 28-е сутки практически все клетки были мертвы. Клетки, трансфицированные контрольной плазмидой, оставались живыми в течение 28-ми суток культивирования. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени установлено, что уровень экспрессии EndoG оставался стабильно высоким в течение всего периода культивирования (рис. 60 А). Снижение уровня экспрессии EndoG при длительном выращивании трансфицированных клеток объясняется большим количеством удвоений популяции и сокращением количества плазмид внутри клеток. Сверхэкспрессия EndoG сопровождалась снижением уровня мРНК полноразмерного α+β+ варианта hTERT (рис. 60 Б) и увеличением экспрессии α+β– варианта (рис. 60 В). В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, изменений экспрессии EndoG, α+β+ и α+β– сплайс-вариантов hTERT не обнаружено. Достоверное изменение количества исследуемых белков в $CD4^+$ Т клетках, трансфицированных

pEndoG-GFP, по сравнению с трансфицированными pGFP клетками подтверждено методом вестерн блоттинга (рис. 57 Г–З).

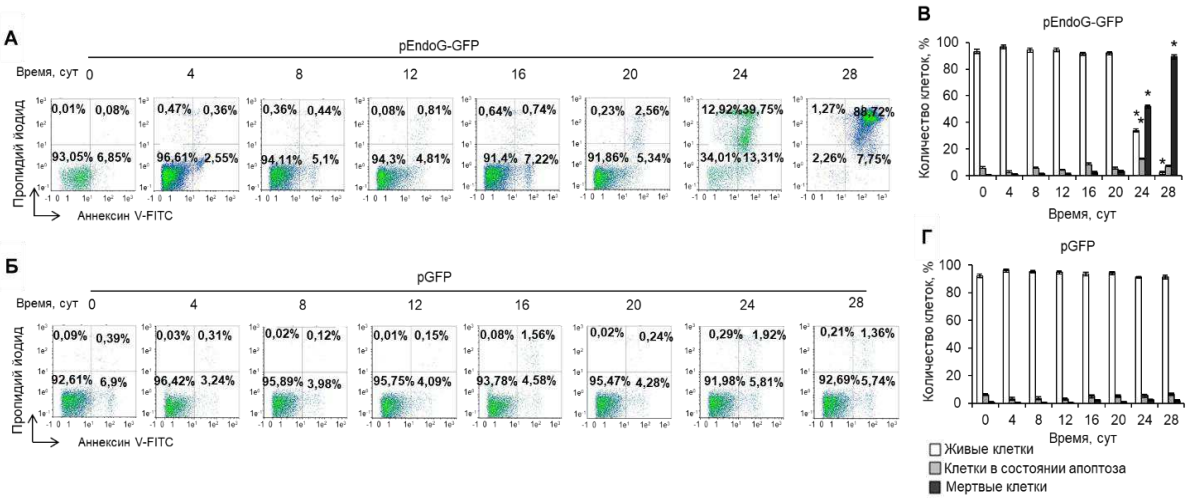


Рисунок 59. Гибель $CD4^+$ Т-клеток при их культивировании в условиях сверхэкспрессии EndoG. Результаты проточной цитометрии $CD4^+$ Т клеток трансфицированных pEndoG-GFP (А) или pGFP (Б) и меченых аннексином V-FITC и пропидий йодидом. Показан процент живых клеток (нижние левые квадранты), процент клеток в состоянии апоптоза (нижние правые квадранты) и процент мёртвых клеток (верхние квадранты). Приводится один репрезентативный эксперимент, всего их 4. Гистограммы живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мёртвых $CD4^+$ Т клеток трансфицированных pEndoG-GFP (В) или pGFP (Г). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

Состояние репликативного старения клеток наступает в случае укорочения теломер до критических значений. Мы проследили, как изменяется активность теломеразы и длина теломер в трансфицированных $CD4^+$ Т клетках при культивировании. Методом TRAP установлено, что в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, теломеразная активность оставалась стабильно низкой в течение всего периода культивирования (рис. 60 И, К). В контрольных клетках активность фермента не изменялась. Снижение активности теломеразы в активно делящихся клетках должно вызывать укорочение длины теломер.

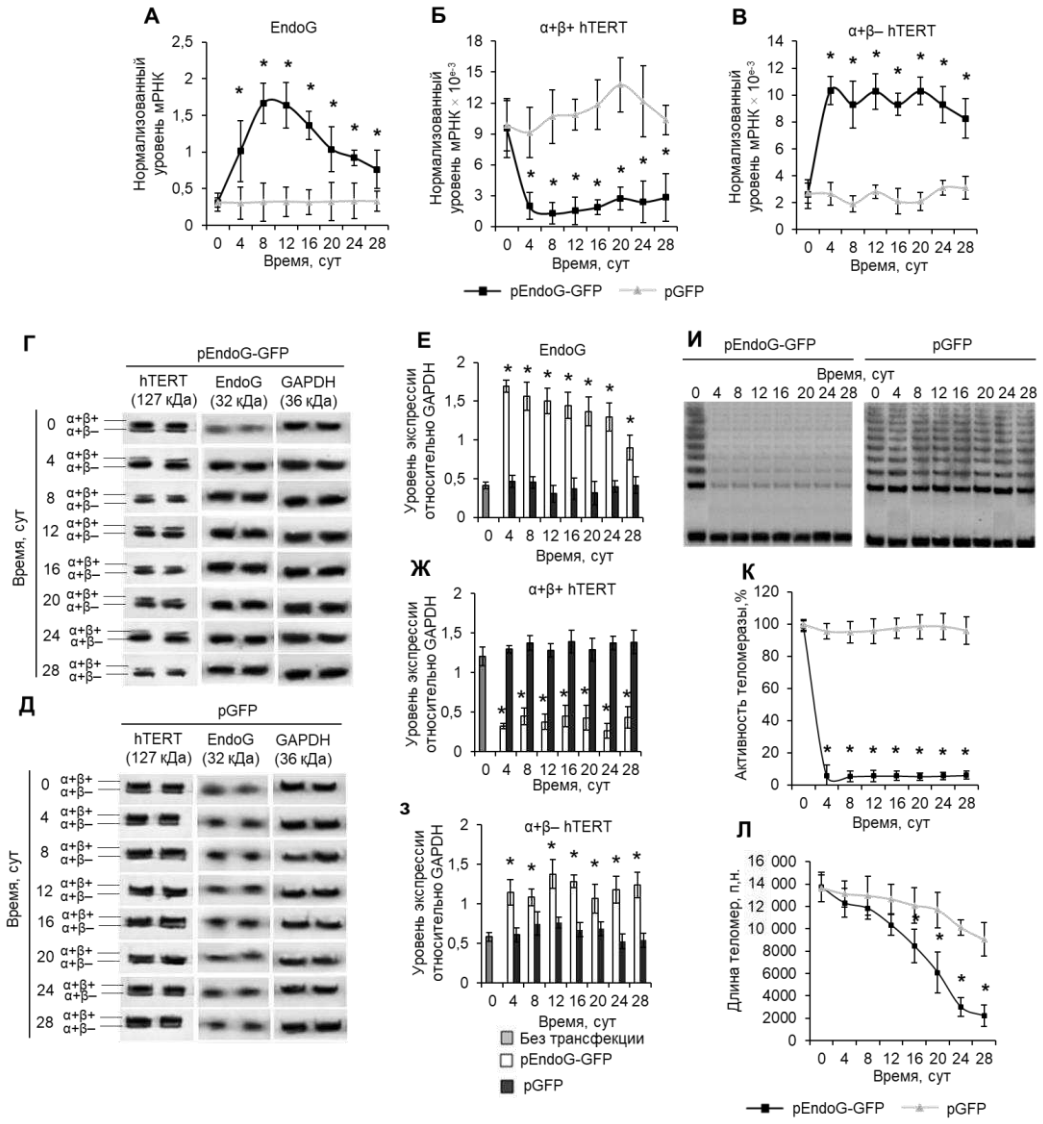


Рисунок 60. Сверхэкспрессия EndoG при культивировании клеток поддерживает низкий уровень мРНК полноразмерного сплайс-варианта hTERT, ингибирование активности теломеразы и укорочение длины теломер. Уровни экспрессии EndoG (А) и сплайс-вариантов hTERT (Б, В) в $CD4^+$ Т-клетках при их трансфекции pEndoG-GFP или pGFP. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. Вестерн блоттинг сплайс-вариантов hTERT и EndoG в $CD4^+$ Т-клетках, трансфицированных pEndoG-GFP (Г) или pGFP (Д). Результаты определения количеств EndoG (Е) и сплайс-вариантов hTERT (Ж-З) по отношению к GAPDH. Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках (И). Результаты определения активности теломеразы методом TRAP (К). Абсолютная длина теломер, измеренная методом ПЦР в реальном времени (Л). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

Методом ПЦР в реальном времени установлено, что в трансфицированных pEndoG-GFP клетках происходило уменьшение длины теломер более чем в 6 раз за 24 суток после трансфекции (рис. 60 Л). При дальнейшем культивировании размер теломер уменьшался незначительно и оставался на низком уровне. В клетках, трансфицированных pGFP, также обнаружено укорочение длины теломер, однако оно было не столь быстрым, как у клеток со сверхэкспрессией EndoG.

4.13.2. Переход клеток в состояние репликативного старения и ингибирование клеточного цикла в результате укорочения теломер

Известно, что ингибирование теломеразы в активно пролиферирующих клетках вызывает их переход в состояние репликативного старения, что сопровождается остановкой клеточного цикла в фазе G0/G1 [338,387]. Мы измерили клеточный цикл в пролиферирующих $CD4^+$ Т клетках, трансфицированных pEndoG-GFP и pGFP, методом проточной цитометрии при мечении ДНК клеток пропидий йодидом. При трансфекции pEndoG-GFP, обнаружено значительное уменьшение количества клеток в S и G2/M фазах и достоверное увеличение в G0/G1 фазе на 20-е сутки после трансфекции (рис. 61 А, В). Однако, клетки оставались живыми (рис. 59 А, В). На 24-е сутки наблюдалось дальнейшее снижение количества клеток в G2/M фазе, а также увеличение числа апоптотических клеток. На 28-е сутки практически все клетки находились в состоянии апоптоза. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, изменений клеточного цикла не выявлено (рис. 61 Б, Г).

Маркёром перехода клеток в состояние репликативного старения является увеличение экспрессии и активности β-Gal. Поэтому мы исследовали экспрессию и активность данного фермента в процессе культивирования трансфицированных клеток. В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, наблюдалось достоверное увеличение экспрессии β-Gal на 20-е сутки после

трансфекции (рис. 61 Д). На 24-28-е сутки уровень экспрессии оставался стабильно высоким. Ферментативная активность β-Gal также повышалась на 20-е сутки после трансфекции и оставалась высокой на 24-е сутки (рис. 61 Е).

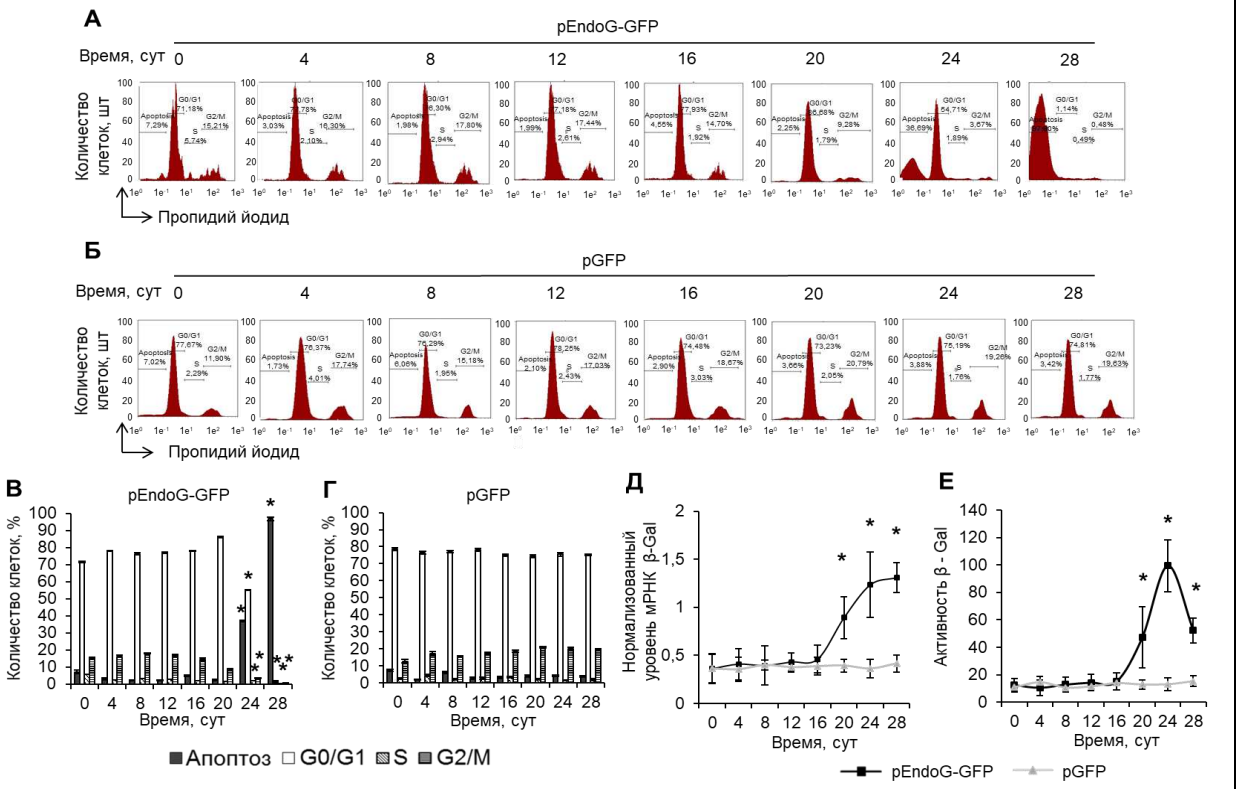


Рисунок 61. Ингибирование клеточного цикла при переходе клеток в состояние репликативного старения. Результаты измерения клеточного цикла методом проточной цитометрии при окрашивании ДНК клеток пропидий йодидом. Показан процент $CD4^+$ Т-клеток, трансфицированных pEndoG-GFP (А) или pGFP (Б) в состоянии апоптоза, а также G0/G1, S и G2M фазах клеточного цикла. Приведён один репрезентативный эксперимент, (всего 4). Гистограммы количества трансфицированных клеток в различных фазах клеточного цикла (В, Г) Уровень экспрессии β-Gal в $CD4^+$ Т-клеток, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP (Д). Уровень экспрессии гена нормализован по отношению к экспрессии референсного гена 18S. Ферментативная активность β-Gal в трансфицированных клетках Активность β-Gal представлена в ЕД на 1000 клеток, определённая по калибровочной кривой (Е). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

На 28-е сутки наблюдалось снижение ферментативной активности β-Gal, что объясняется массированной гибелью клеток. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, экспрессия и активность β-Gal оставались неизменными. Активация β-Gal на 20-е 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 24-28-е сутки культивирования являлась дальнейшим следствием этого состояния.

4.13.3. Отсутствие способности у ДНКазы 1 и ДНКазы X индуцировать АС пре-мРНК hTERT

Поскольку апоптотическая эндонуклеаза EndoG вызывала гибель клеток и индукцию АС пре-мРНК hTERT, представлялось интересным исследовать влияние и других апоптотических эндонуклеаз с широкой специфичностью действия на жизнеспособность клеток и индукцию АС пре-мРНК hTERT. Для этой цели $CD4^+$ Т-клетки четырёх доноров трансфицировали геном ДНКазы 1 (плазмидой pDNase 1-GFP) или ДНКазы X (pDNase X-GFP), культивировали в ростовой среде и измеряли количество живых и мёртвых клеток, а также клеток в состоянии апоптоза. В группе клеток, pDNase 1-GFP, обнаружена массированная их гибель уже через 24-48 ч после трансфекции (рис. 62 А, Г). В группе клеток, трансфицированных pDNase X-GFP, гибель клеток наблюдалась через 36-48 ч после трансфекции (рис. 62 Б, Д). Клетки, трансфицированные контрольной плазмидой pGFP, оставались живыми в течение 48 ч (рис. 62 В, Е). Сверхэкспрессия ДНКазы 1 и ДНКазы X не вызывала изменения уровня мРНК α+β+ и α+β– сплайс-вариантов hTERT (рис. 62 Ж, З).

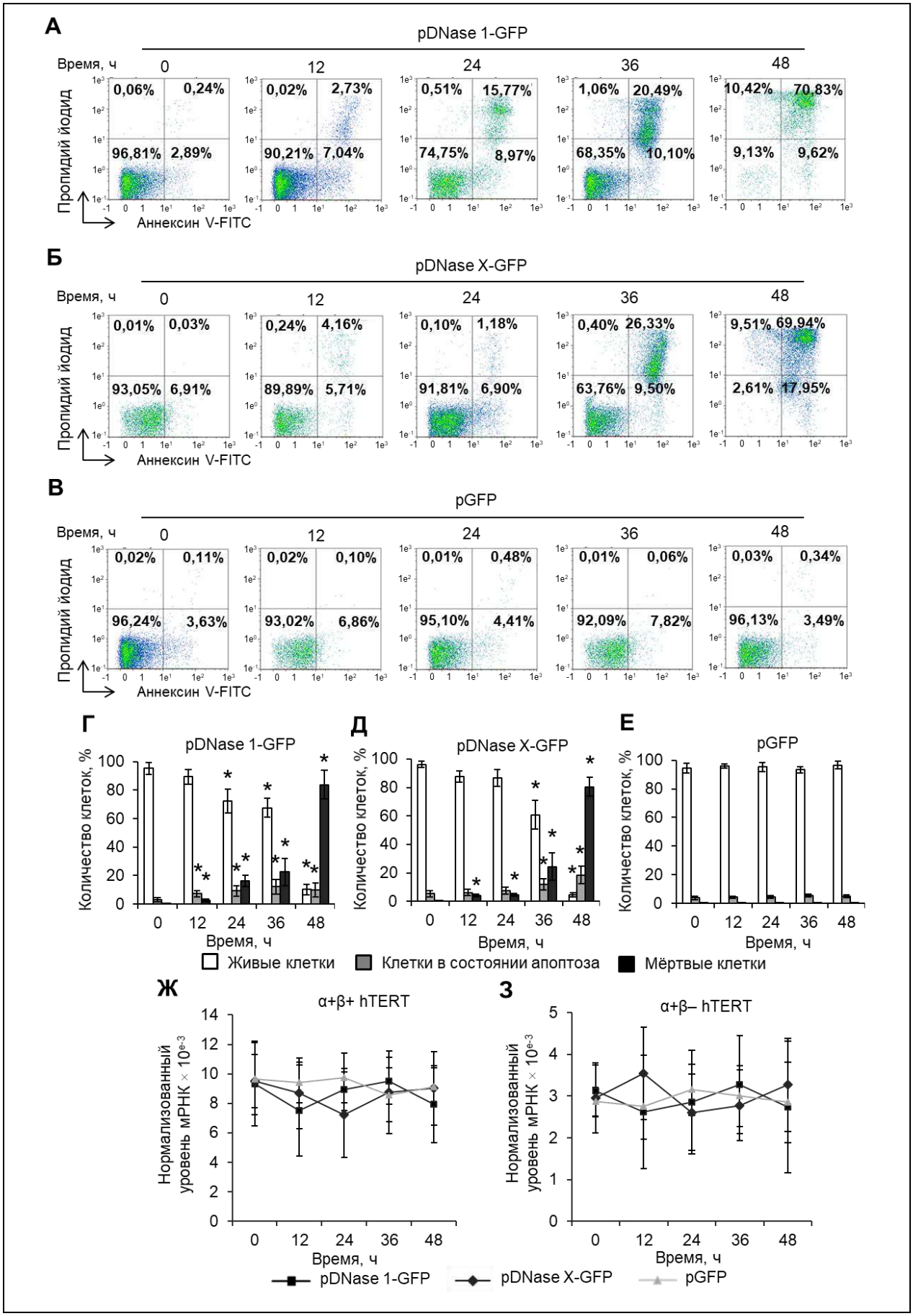

А
pDNase 1-GFP
Время, ч
0
12
24
36
48
Пропидий йодид
Аннексин V-FITC
0,06% 0,24% 96,81% 2,89%
0,02% 2,73% 90,21% 7,04%
0,51% 15,77% 74,75% 8,97%
1,06% 20,49% 68,35% 10,10%
10,42% 70,83% 9,13% 9,62%
Б
pDNase X-GFP
0,01% 0,03% 93,05% 6,91%
0,24% 4,16% 89,89% 5,71%
0,10% 1,18% 91,81% 6,90%
0,40% 26,33% 63,76% 9,50%
9,51% 69,94% 2,61% 17,95%
В
pGFP
0,02% 0,11% 96,24% 3,63%
0,02% 0,10% 93,02% 6,86%
0,01% 0,48% 95,10% 4,41%
0,01% 0,06% 92,09% 7,82%
0,03% 0,34% 96,13% 3,49%
Г
pDNase 1-GFP
Количество клеток, %
Время, ч
Д
pDNase X-GFP
Е
pGFP
Живые клетки
Клетки в состоянии апоптоза
Мёртвые клетки
Ж
α+β+ hTERT
Нормализованный уровень мРНК × 10e-3
З
α+β– hTERT
pDNase 1-GFP
pDNase X-GFP
pGFP

Рисунок 62. Сверхэкспрессия ДНКазы 1 и ДНКазы X вызывает быструю гибель $CD4^+$ Т клеток и не оказывает влияния на уровень мРНК сплайс-вариантов hTERT. Результаты проточной цитометрии $CD4^+$ Т клеток трансфицированных pDNase 1-GFP (А), pDNase X-GFP (Б) или pGFP и меченых аннексином V-FITC и пропидий йодидом (В). Показан процент живых клеток (нижние левые квадранты), процент клеток в состоянии апоптоза (нижние правые квадранты) и процент мёртвых клеток (верхние квадранты). Показан один из 4-х репрезентативный эксперимент, (всего 4). Гистограммы живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мёртвых $CD4^+$ Т клеток трансфицированных pDNase 1-GFP (Г), pDNase X-GFP (Д) или pGFP (Е). Уровни мРНК α+β+ hTERT (Ж) α+β– hTERT (З) в трансфицированных $CD4^+$ Т-клетках. Уровни мРНК нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. * $p \leq 0{,}05$ по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

4.13.4. Сверхэкспрессия EndoG вызывает 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 pEndoG-GFP или pGFP, культивировали в ростовой среде и ежедневно измеряли количество живых и мёртвых клеток, а также клеток в состоянии апоптоза. В группе клеток, трансфицированных pEndoG-GFP, обнаружена массивная гибель на четвертые и пятые сутки после трансфекции (рис. 63 А, В). Так, на четвертые сутки наблюдалось резкое увеличение числа клеток в состоянии апоптоза до 12,4±2,0%.

На пятые сутки практически все клетки были мертвы. Клетки, трансфицированные контрольной плазмидой, оставались живыми в течение всего периода наблюдения (рис. 63 Б, Г). Количество мёртвых клеток и клеток в состоянии апоптоза не превышало такового в контрольной группе.

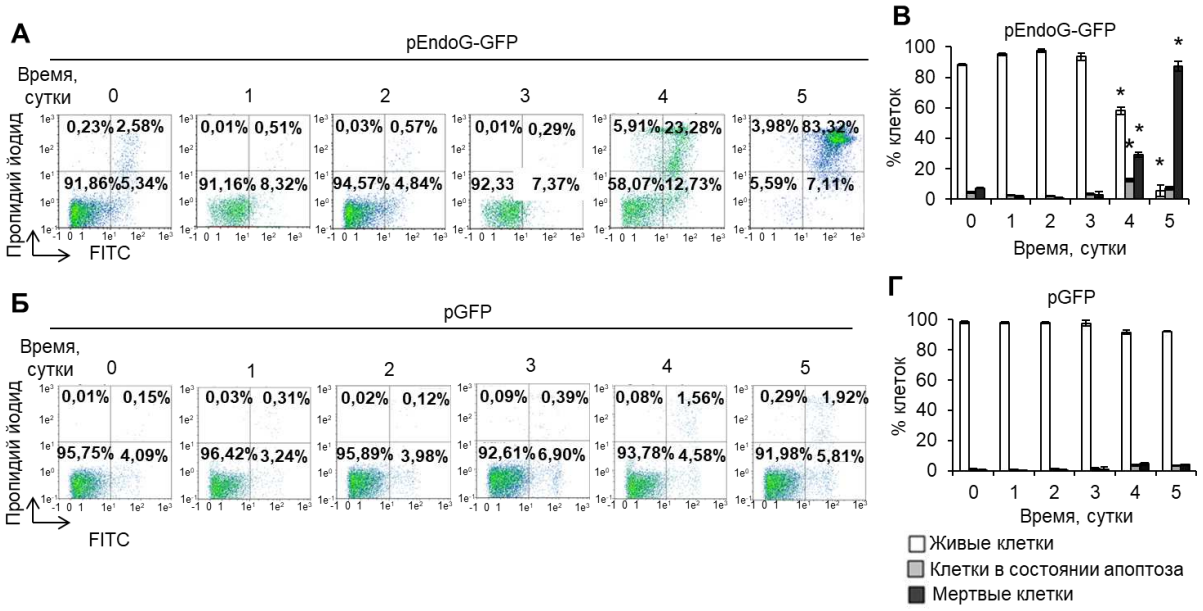


Рисунок 63. Гибель опухолевых клеток CaCo-2 при культивировании в условиях сверхэкспрессии EndoG. Результаты проточной цитометрии клеток CaCo-2 трансфицированных pEndoG-GFP (А) или pGFP (Б) и меченых аннексином V-FITC и пропидий йодидом. Показан процент живых клеток (нижние левые квадранты), клеток в состоянии апоптоза (нижние правые квадранты) и мёртвых клеток (верхние квадранты). Гистограммы живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и мёртвых клеток CaCo-2 трансфицированных pEndoG-GFP (В) или pGFP (Г). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

4.13.5. Переход опухолевых клеток в состояние репликативного старения и ингибирование клеточного цикла при инактивации теломеразы

Мы измерили клеточный цикл в пролиферирующих клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP и pGFP, методом проточной цитометрии при мечении ДНК клеток пропидий йодидом. При трансфекции pEndoG-GFP, обнаружено значительное уменьшение количества клеток в фазах S и G_2/M и достоверное увеличение в фазе G_0/G_1 на третий день после трансфекции (рис. 64 А, В). Однако при этом клетки оставались живыми (рис. 63 А, В). На четвёртый день наблюдалось дальнейшее снижение количества клеток в фазе G_2/M, а также увеличение количества апоптотических клеток. На пятые сутки

практически все клетки находились в состоянии апоптоза. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, изменения клеточного цикла не выявлено (рис. 64 Б, Г).

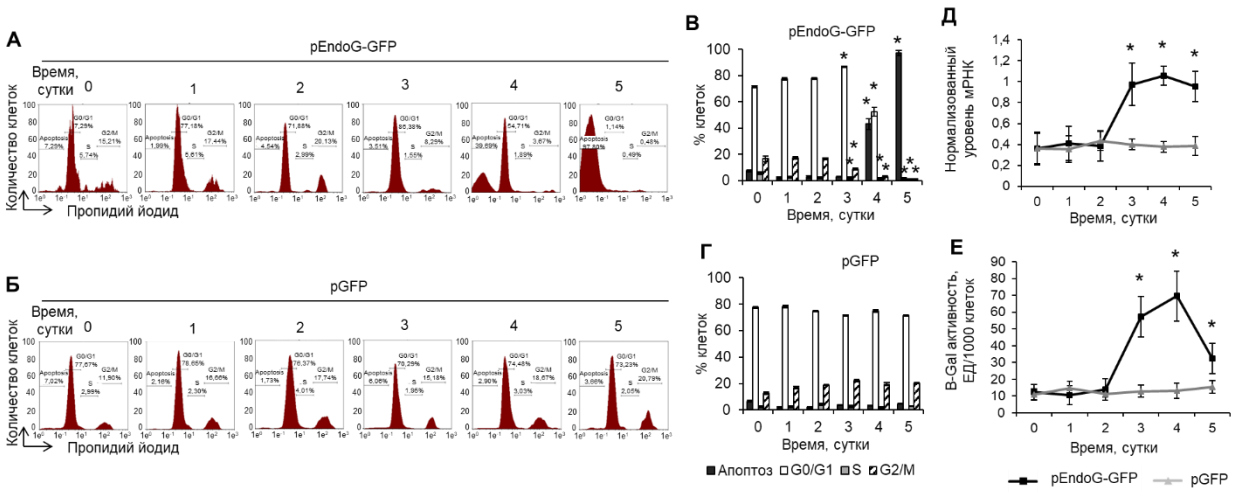


Рисунок 64. Ингибирование клеточного цикла клеток при их переходе в состояние репликативного старения. Результаты измерения клеточного цикла методом проточной цитометрии при окрашивании ДНК клеток пропидий йодидом. Показан процент клеток CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP (А) или pGFP (Б) в состоянии апоптоза, а также G0/G1, S и G2M фазах клеточного цикла. Гистограммы количества трансфицированных клеток в различных фазах клеточного цикла (В, Г). Уровень мРНК β-Gal в клетках CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP или pGFP. Уровень мРНК нормализован по отношению к экспрессии референсного гена 18S (Д). Ферментативная активность β-Gal в трансфицированных клетках (Е). Активность β-Gal представлена в ЕД на 1000 клеток, определенная по калибровочной кривой. * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

Увеличение экспрессии и активности β-Gal является маркером перехода клеток в состояние репликативного старения. Была исследована экспрессия и активность данного фермента в процессе культивирования трансфицированных клеток CaCo-2. В клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, наблюдали достоверное увеличение экспрессии β-Gal на третьи сутки после трансфекции (рис. 64 Д). На четвертые и пятые сутки уровень

экспрессии оставался стабильно высоким. Ферментативная активность β-Gal также повышалась на третьи сутки после трансфекции и оставалась высокой на четвертые (рис. 64 Е). На пятые сутки обнаружено снижение ферментативной активности β-Gal, что объясняется массированной гибелью клеток. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, экспрессия и активность β-Gal оставались неизменными. Активация β-Gal на третьи сутки после трансфекции геном EndoG согласуется с ингибированием S и G_2/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 уровень экспрессии EndoG оставался стабильно высоким в течение всего периода культивирования (рис. 65 А). Сверхэкспрессия EndoG сопровождалась снижением уровня мРНК полноразмерного α+β+ сплайс-варианта hTERT (рис. 65 Б) и увеличением мРНК α+β– варианта (рис. 65 В). В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, изменения уровней мРНК EndoG, α+β+ и α+β– сплайс-вариантов hTERT не обнаружено (рис. 65 Г-З).

Далее было изучено изменение активности теломеразы и длины теломер в трансфицированных клетках CaCo-2 при их культивировании. Методом TRAP установлено, что в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, теломеразная активность оставалась стабильно низкой в течение всего периода культивирования (рис. 65 И, К). В контрольных клетках активность фермента не изменялась. Снижение активности теломеразы в активно делящихся клетках должно вызывать укорочение длины теломер. Методом ПЦР в реальном времени было установлено, что действительно в первые два дня после трансфекции pEndoG-GFP клетках происходило уменьшение длины теломер более чем в 6 раз (рис. 62 В).

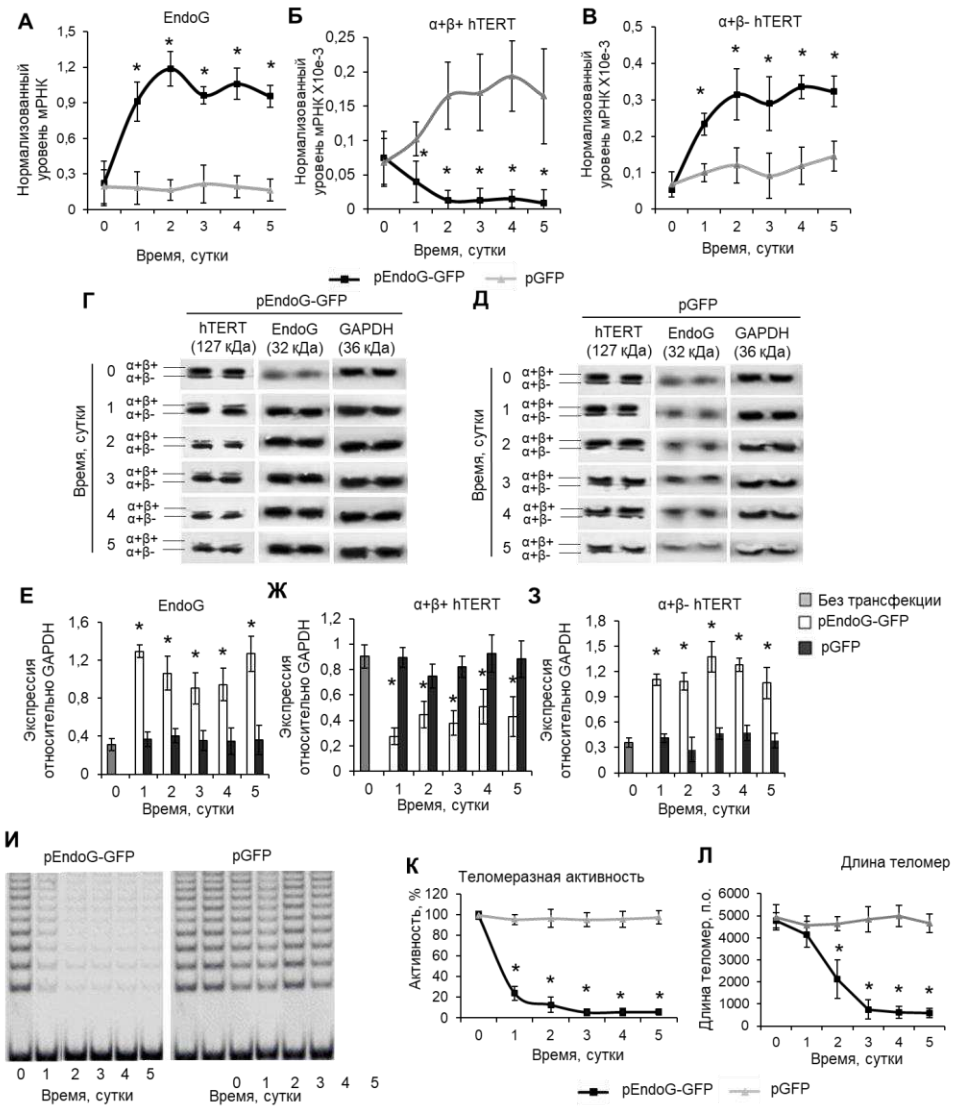


Рисунок 65. Укорочение теломер при культивировании клеток с неактивной теломеразой. Уровни экспрессии EndoG (А) и сплайс-вариантов hTERT (Б, В) в клетках CaCo-2 при их трансфекции pEndoG-GFP или pGFP. Уровни экспрессии генов нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. Вестерн-блоттинг сплайс-вариантов hTERT и EndoG в CaCo-2, трансфицированных pEndoG-GFP (Г) или pGFP (Д). результаты определения количеств сплайс-вариантов hTERT и EndoG по отношению к GAPDH (Е-З). Гель-электрофорез TRAP в трансфицированных клетках (И). Результаты определения активности теломеразы методом TRAP (К). Абсолютная длина теломер, измеренная методом ПЦР в реальном времени (Л). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным pGFP.

При дальнейшем культивировании длина теломер снижалась незначительно и оставалась на низком уровне. В клетках CaCo-2, трансфицированных pGFP, укорочения длины теломер не выявлено.

4.14. Биологический эффект индукции АС пре-мРНК DNase I

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.

4.14.1. Замедление развития апоптоза в результате инактивации ДНКазы 1

Для исследования динамики развития апоптоза $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека клетки трансфицировали одной из плазмид pEndoG-GFP, pΔ4DNase I-GFP или pGFP 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. Трансфекция плазмидами не оказывала значительного влияния на развитие апоптоза в течение 72 ч (рис. 66). Массивную гибель клеток наблюдали через 60–72 ч после инкубации с блеомицином в группах клеток, трансфицированных pEndoG-GFP и pΔ4DNase I-GFP. В то же время практически все клетки, трансфицированные контрольной плазмидой pGFP, погибали в течение 48 ч инкубации с блеомицином. 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 АС пре-мРНК DNase I на нуклеазную активность клеток при развитии апоптоза.

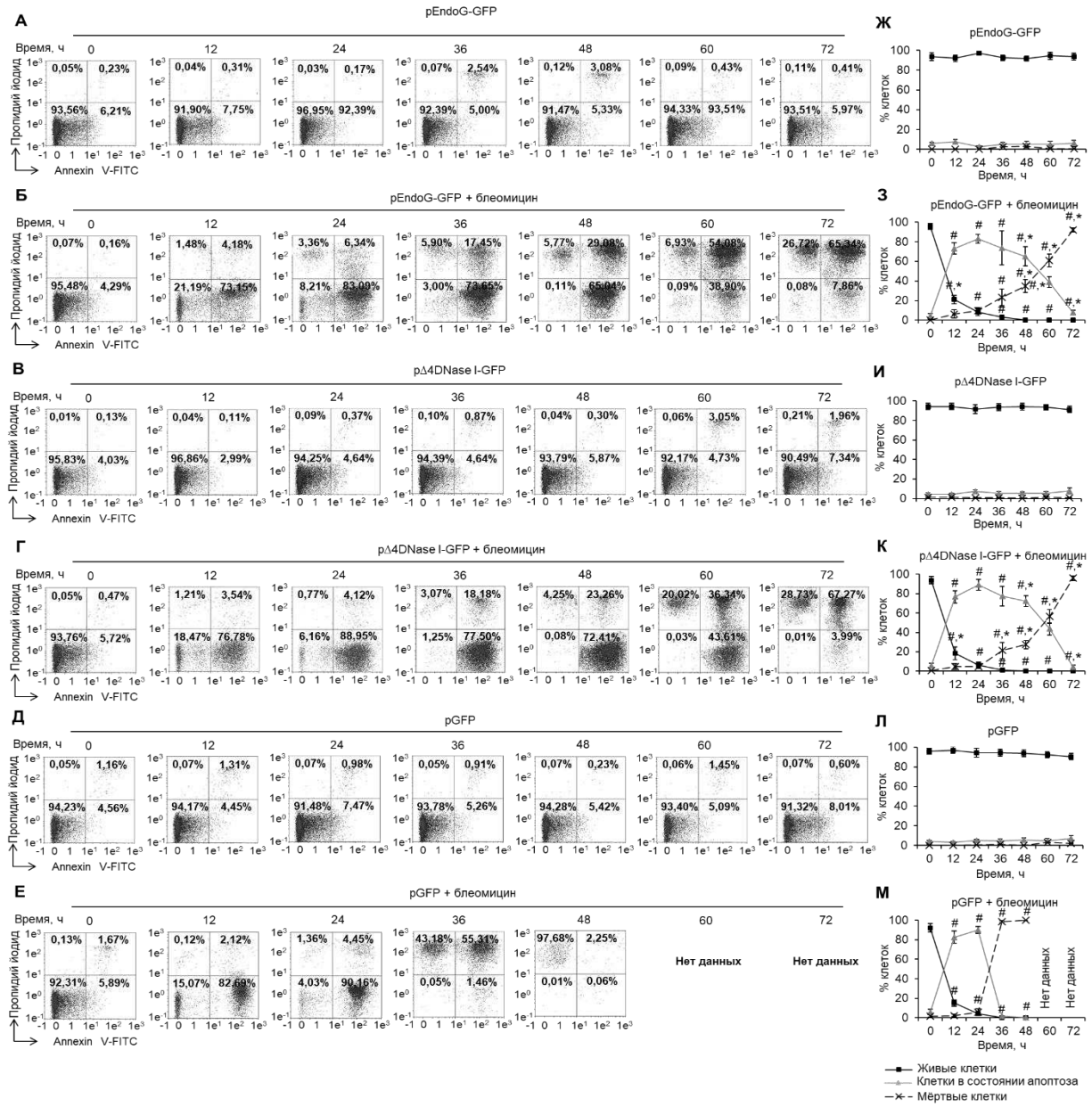


Рисунок 66. Ингибирование прогрессии апоптоза $CD4^+$ Т-клеток с индуцированной экспрессией Δ4DNase I. Результаты проточной цитометрии клеток, трансфицированных pEndoG-GFP (А), Δ4DNase I-GFP (В) или pGFP (Д) и инкубированных с блеомицином, и меченых аннексином V-FITC и пропидий йодидом (Б, Г, Е). Представлены пропорции живых клеток (нижние левые квадранты), апоптотических клеток (нижние правые квадранты) и мёртвых клеток (два верхних квадранта). Пропорции живых, апоптотических и мёртвых $CD4^+$ Т-клеток, измеренные методом проточной цитометрии (Ж-М). # $P \leq 0,05$ по отношению к клеткам не обработанным блеомицином. * $P \leq 0,05$ по отношению к клеткам трансфицированным pGFP и инкубированных с блеомицином.

В клетках, трансфицированных плазмидами pEndoG-GFP или pΔ4DNase I-GFP нуклеазная активность была существенно ниже, чем в контрольных pGFP-трансфицированных клетках (рис. 67). 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 (рис. 66). Обнаружено ингибирование нуклеазной активности в течение 12–24 ч инкубации с блеомицином в клетках, трансфицированных pGFP. 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.

4.15. Роль индуцированного EndoG АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT в супрессорном действии регуляторных Т клеток

Регуляторные Т-клетки (Трег) $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ играют важную роль в поддержании адаптивного иммунного ответа и иммунологической толерантности, подавляя активность эффекторных Т- и В-лимфоцитов и NK-клеток человека [388]. Трег регулируют продолжительность и силу иммунного ответа. Нарушение регуляторной функции Трег является одной из причин развития и прогрессирования аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз, системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит и др.) [389–391], аллергических реакций [392] и хронических воспалительных процессов [273]. Трег клетки способны индуцировать старение эффекторных лимфоцитов *in vitro* и *in vivo* [393], 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.

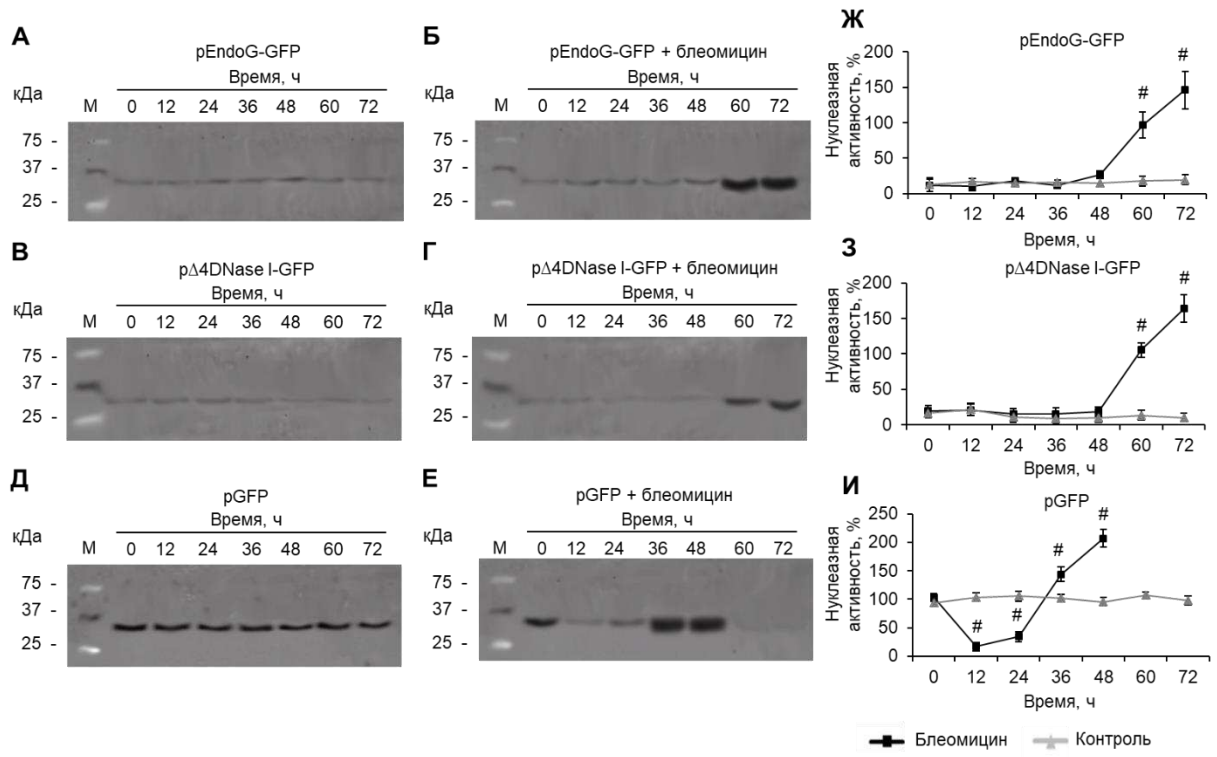


Рисунок 67. Ингибирования нуклеазной активности в $CD4^+$ Т-клетках с индуцированной экспрессии Δ4DNase I. Результат зимографии клеточных лизатов методом DNA-SDS-PAGE в течение 72 ч для $CD4^+$ Т-клеток, трансфицированных pEndoG-GFP (А), Δ4DNase I-GFP (В) или pGFP (Д) и инкубированных с блеомицином (Б, Г, Е). Оценка изображений зимографии с помощью денситометрии (Ж-И). * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам не обработанным блеомицином.

4.15.1. Ингибирование теломеразы в таргетных лимфоцитах человека в результате бесконтактного культивирования с Трег клетками

Таргетные эффекторные $CD4^+CD25^-$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, В-клетки или NK-клетки культивировали с нативными Трег (нТрег) или индуцированными Трег (иТрег) в течение 96 часов через полупроницаемую мембрану. Методом TRAP было показано, нТрег, как и иТрег способны ингибировать активность теломеразы во всех таргетных лимфоцитах (рис. 68 А, Б). 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. 68 В). Увеличение экспрессии EndoG не вызывало изменения количества мРНК общей hTERT во всех изучаемых клетках (рис. 68 Г), однако, сопровождалось изменением уровней мРНК сплайс-вариантов hTERT. Культивирование с нТрег или иТрег приводило к снижению количества мРНК полноразмерного варианта α+β+ hTERT (рис. 68 Д) и увеличению уровня мРНК укороченного сплайс-варианта α+β– hTERT (рис. 68 Е) 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.

4.15.2. Индукция экспрессии EndoG, АС пре-мРНК hTERT и ингибирование теломеразы в таргетных $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека аутологичными нТрег и иТрег клетками

Для определения времени индукции АС пре-мРНК hTERT и ингибирования активности теломеразы исследовали экспрессию сплайс-вариантов hTERT в течение 96 часов совместного культивирования с нТрег и иТрег клетками. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени показано, что нТрег, как и иТрег стимулируют с течением времени альтернативный сплайсинг пре-мРНК hTERT. Обнаружено снижение уровней мРНК полноразмерного α+β+ варианта (Рис. 69 А) и укороченного α+β– варианта (Рис. 69 Б) Изменения количеств сплайс-вариантов мРНК hTERT сопровождались увеличением экспрессии EndoG (Рис. 69 В), что подтверждает участие EndoG в АС пре-

мРНК hTERT. Не выявлено различий в способности нТрег и иТрег клеток индуцировать АС пре-мРНК hTERT и экспрессию EndoG.

Для дальнейшей работы использовали иТрег клетки, поскольку они могут быть получены в большом количестве и способны индуцировать наравне с нТрег клетками АС пре-мРНК hTERT и EndoG в таргетных эффекторных лимфоцитах.

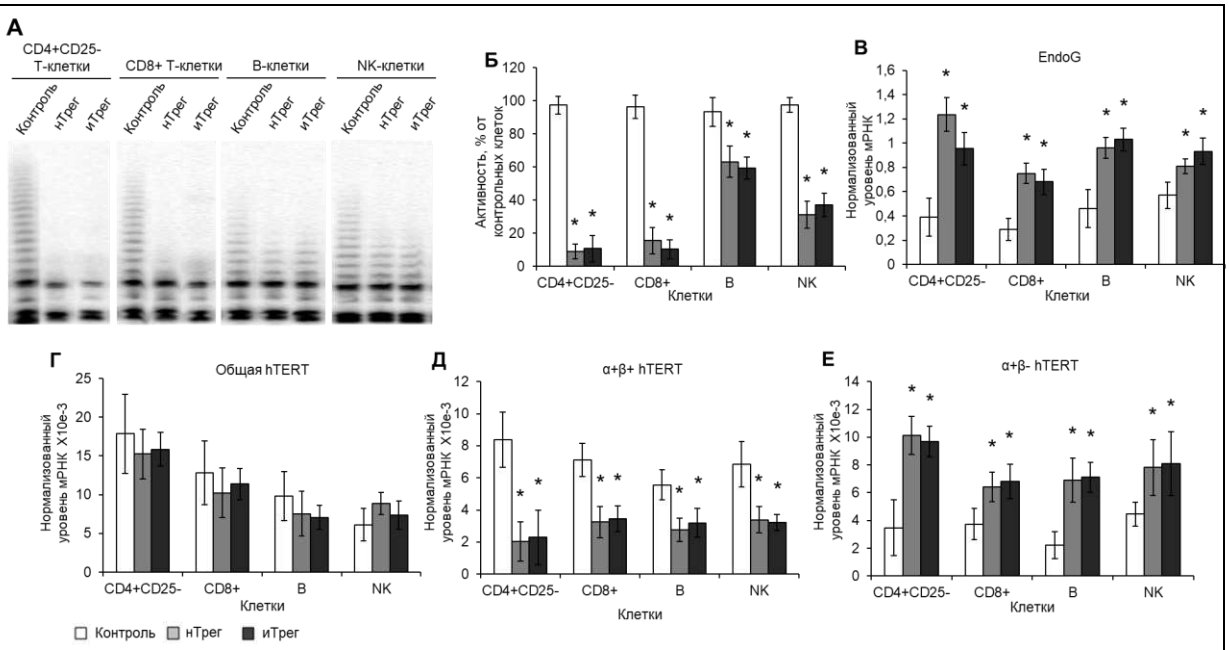


Рисунок 68. Индукция АС пре-мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы Трег клетками в таргетных лимфоцитах человека. Таргетные $CD4^{+}CD25^{-}$ Т-клетки, $CD8^{+}$ Т-клетки, В-клетки или NK-клетки выделяли из периферической крови здоровых доноров и культивировали с нТрег или иТрег через полупроницаемую мембрану в течение 96 ч. Теломеразная активность, определенная методом TRAP в таргетных лимфоцитах, культивированных с нТрег или иТрег (А). Результаты количественного определения TRAP (Б). Уровни мРНК EndoG (В), общей hTERT (Г) и сплайс-вариантов hTERT (Д-Е) в таргетных лимфоцитах. Уровни мРНК нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам.

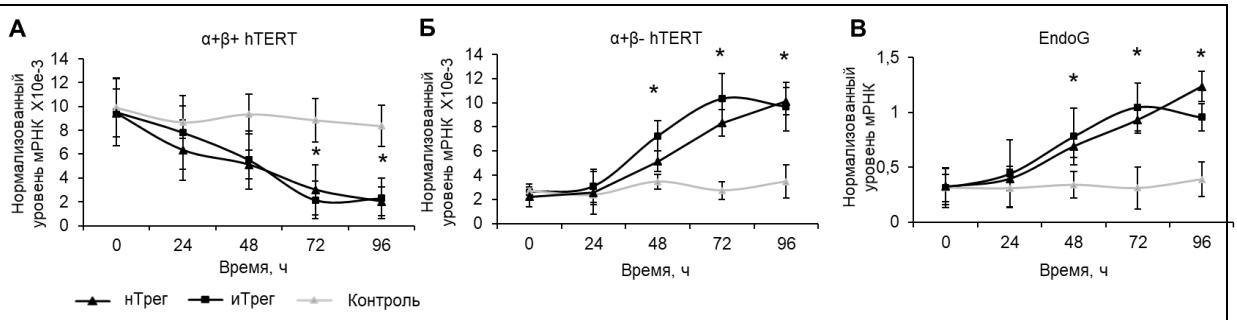


Рисунок 69. Индукция АС пре-мРНК hTERT в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека Трег клетками. Таргетные $CD4^+CD25^-$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, В-клетки или NK-клетки выделяли из периферической крови здоровых доноров и совместно культивировали с нТрег и иТрег через полупроницаемую мембрану в течение 96 часов. Уровни мРНК сплайс-вариантов hTERT (А) и EndoG (Б) в клетках-мишенях. Уровни мРНК нормализованы относительно экспрессии референсного гена 18S. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам.

4.15.3. Гибель таргетных лимфоцитов в результате контакт-независимого совместного культивирования с иТрег *in vitro*

Для определения влияния Трег на пролиферацию таргентных клеток со сниженной теломеразой, $CD4^+CD25^-$ Т-клетки, полученные от четырёх доноров, культивировали совместно со зрелыми иТрег через полупроницаемую мембрану. Ежедневно проводили подсчёт мёртвых, живых и апоптотических таргетных лимфоцитов. Массовую гибель таргетных лимфоцитов наблюдали в течение 45-60 дней совместного культивирования (ко-культивации) с иТрег (Рис. 70 А, В). На 45-й день количество апоптотических клеток резко возростало до 10,62 ± 2,37%. На 60-й день практически все клетки были мертвы. Контрольные клетки оставались живыми в течение 60 дней культивирования (Рис. 70 Б, Г).

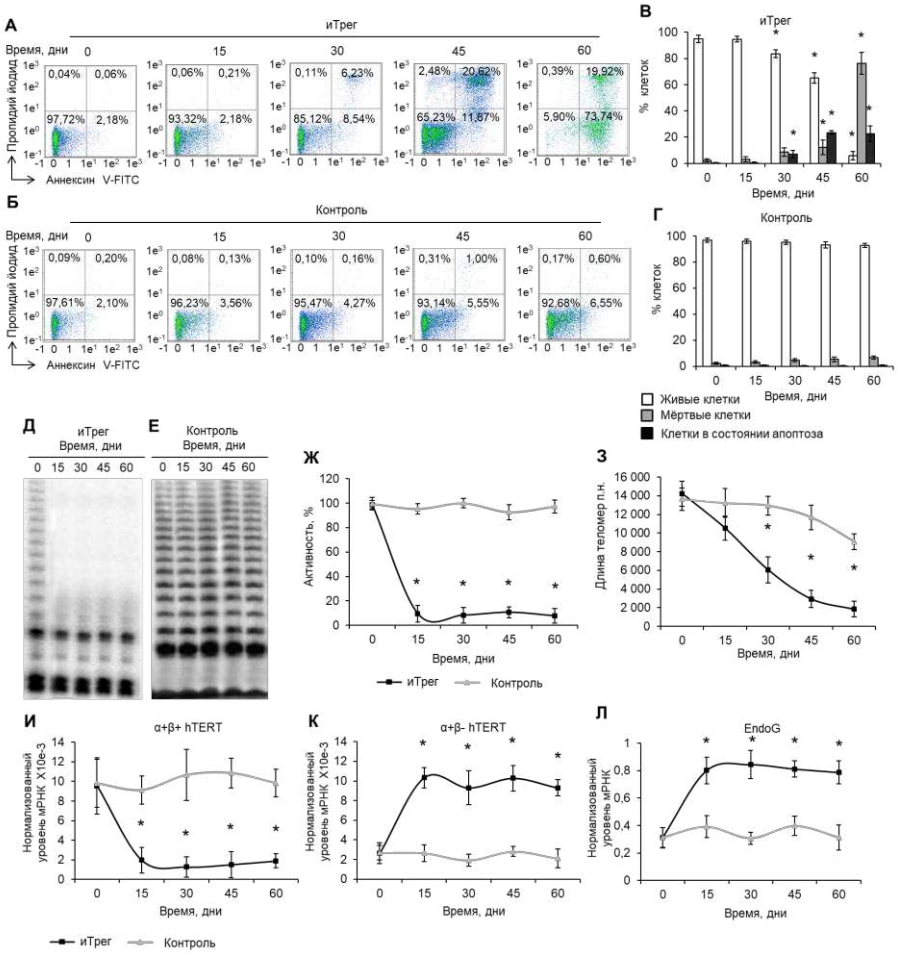


Рисунок 70. Гибель таргетных $CD4^{+}CD25^{-}$ Т-клеток при совместном культивировании с иТрег через полупроницамую мембрану. Результаты проточной цитометрии для таргетных лимфоцитов, совместно культивированных с иТрег (А), и контрольных лимфоцитов (Б). Клетки окрашивали аннексином V-FITC и пропидий йодидом. Показано соотношение живых клеток (нижний левый квадрант), апоптотических клеток (нижний правый квадрант) и мёртвых клеток (два верхних квадранта). Гистограммы живых, апоптотических и мертвых клеток-мишеней (В), совместно культивируемых с иТрег и контрольных клеток (Г). Гель-электрофорез TRAP для таргетных лимфоцитов, ко-культивированных с иТрег (Д) и контрольных таргетных клеток (Е). (Ж) Результаты определения активности теломеразы TRAP. Длина теломер в клетках-мишенях, определенная с помощью ПЦР в реальном времени (З). Уровни мРНК сплайс-вариантов hTERT (И, К) и EndoG (Л) при совместном культивировании с иТрег. Уровни экспрессии гена были нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам.

Для исследования возможного механизма гибели таргетных $CD4^+CD25^-$ Т-лимфоцитов, в них исследовали активность теломеразы и длину теломер. Методом TRAP анализа показано, что активность теломеразы в таргетных клетках оставалась низкой в течение всего времени культивирования (рис. 70 Д, Ж). Изменения активности фермента в контрольных клетках не обнаружено (рис. 70 Е, Ж). Вероятно снижение активности теломеразы в активно делящихся клетках должно приводить к укорочению теломер. Методом ПЦР в реальном времени установлено, что длина теломер в таргетных лимфоцитах уменьшилась в 5 раз в течение 60 дней совместного культивирования с Трег (рис. 70 З). При дальнейшем выращивании длина теломер незначительно снижалась и оставалась на низком уровне. В контрольных клетках также наблюдалось укорочение теломер, но оно не было таким быстрым, как в таргетных клетках, инкубированных с Трег.

Изучены изменения в уровнях сплайс-вариантах мРНК hTERT в таргетных Т-клетках мишенях, культивированных совместно с иТрег. Показано снижение уровня полноразмерного варианта α+β+ hTERT (рис. 70 И) и увеличение такового мРНК укороченного сплайс-варианта α+β– (рис. 7 К). Экспрессия EndoG в клетках-мишенях возрастала более чем в 2 раза при совместном культивировании с иТрег (рис. 70 Л). Сверхэкспрессия EndoG согласуется с индукцией АС пре-мРНК hTERT и подавлением активности теломеразы.

4.15.4. Репликативное старение и ингибирование клеточного цикла в результате укорочения теломер в таргетных клетках

Известно, что ингибирование теломеразы в активно пролиферирующих клетках вызывает репликативное старение, сопровождающееся остановкой клеточного цикла в фазах G0/G1 [338,394]. Методом проточной цитометрии с использованием мечения ДНК клеток пропидий йодидом был изучен

клеточный цикл в пролиферирующих таргетных $CD4^+CD25^-$ Т-клетках, культивируемых совместно с иТрег.

Обнаружено значительное уменьшение количества клеток-мишеней в фазах S и G2/M и увеличение числа клеток в фазах G0/G1 через 30 дней совместного культивирования с иТрег (рис. 71 А, В). Все клетки оставались жизнеспособными. На 45 день эксперимента наблюдалось дальнейшее уменьшение количества клеток в фазе G2/M и увеличение числа апоптотических клеток. Практически все клетки вступили в фазу раннего апоптозу к 60-му дню опыта. Изменений в клеточном цикле контрольных клеток обнаружено не было (рис. 71 Б, Г).

Известно, что повышение экспрессии и активности β-Gal являются маркером перехода клеток в состояние репликативного старения. Мы исследовали экспрессию и активность этого фермента во время совместного культивирования таргетных клетокс с иТрег. Через 45 дней после начала культивирования наблюдалось увеличение экспрессии β-Gal в лимфоцитах (рис. 71 Д). Уровень экспрессии β-Gal оставался стабильно высоким в течение 60 дней. Ферментативная активность β-Gal также увеличивалась через 45 дней после трансфекции и сохранялась на высоком уровне на 60-ый день (рис. 71 Е). К этому времени было обнаружено медленное снижение ферментативной активности β-Gal, что объясняется массовой гибелью клеток. Изменений экспрессии и активности β-Gal в группе контрольных клеток не выявлено.

Активация β-Gal на 30-й день совместного культивирования согласуется с ингибированием фаз клеточного цикла S и G2/M в клеточном цикле, что указывает на переход клеток в состояние репликативного старения. Гибель клеток на 45-60 сутки культивирования была дальнейшим следствием этого состояния.

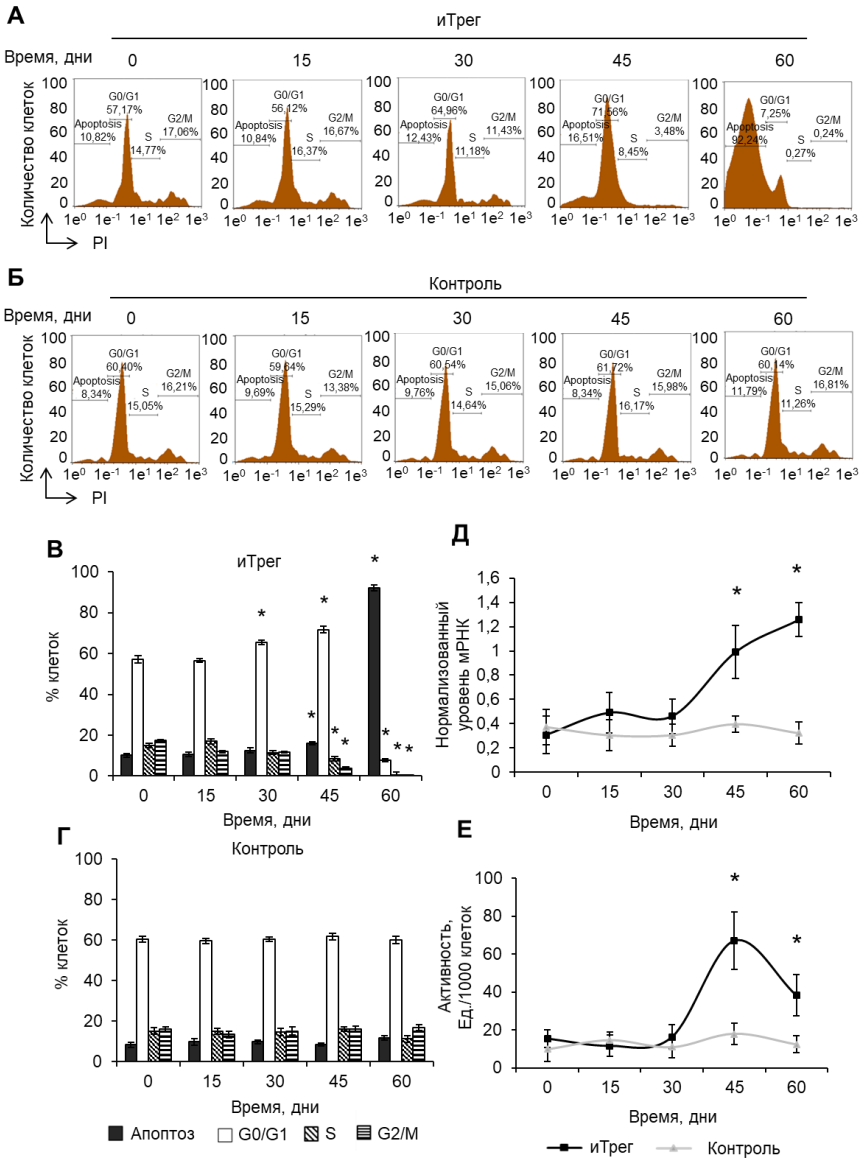


Рисунок 71. Ингибирование клеточного цикла и переход таргетных лимфоцитов в состояние репликативного старения. Результаты определения клеточного цикла с использованием проточной цитометрии и мечения ДНК клеток пропидий йодидом. Представлена доля таргетных $CD4^+CD25^-$ Т-клеток во время совместного культивирования с иТрег (А) и контрольных клеток (Б) в состоянии апоптоза, а также в фазах G0/G1, S и G2/M клеточного цикла. Гистограммы количества клеток в разных фазах клеточного цикла (В и Г). Уровни экспрессии *β-Gal* в таргетных клетках (Д). Уровни экспрессии гена *β-Gal* были нормализованы по отношению к экспрессии референсного гена 18S. Активность фермента β-Gal в таргетных (Е). Активность β-Gal представлена в виде Единиц (Ед.) на 1000 клеток (определено по калибровочной кривой). * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам.

4.15.5. Гибель таргетных лимфоцитов мыши при длительном совместном культивировании с иТрег

Известно, что эффект ингибирования теломеразы может развиваться в течение длительного периода времени [395,396], поэтому нами было изучено влияние длительного совместного культивирования таргетных лимфоцитов мыши с иТрег клетками. Установлено, что в этом случае происходит значительное снижение жизнеспособности таргетных лимфоцитов (рис. 72 А). $CD4^+CD25^-$ 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.

Естественно, что снижение активности теломеразы в пролиферирующих клетках должно вызывать укорочение теломер. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени показали наличие теломер различной длины у лимфоцитов разных типов и быстрое уменьшение длины теломер при культивировании. Было обнаружено, что у $CD4^+CD25^-$ Т-клеток, изначально имевших самые короткие теломеры (53,73 ± 6,36 т.п.н.), после 12-ти дней совместного культивирования длина теломер снижалась до 6,34 ± 2,26 т.п.н. (рис. 72 Б). Длина теломер в $CD8^+$ Т-клетках уменьшилась с 66,01 ± 4,86 т.п.н. до 5,23 ± 2,57 т.п.н. после 15-ти дней совместного культивирования (рис. 72 В). В-клетки, которые первоначально обладали самыми длинными теломерами (124,54 ± 6,44 т.п.н.), имели через 21 день совместного культивирования длину теломер в прелелах 21,25 ± 4,68 т.п.н. (рис. 72 Г). Длина теломер в NK-клетках постепенно уменьшалась с 92,93 ± 5,48 т.п.н. до 7,33 ± 3,30 т.п.н. в течение 18-ти дней совместного культивирования с иТрег (рис. 72 Д). В то же время, длина теломер контрольных лимфоцитов была относительно стабильной. Известно, что ингибирование теломеразы наряду с укорочением теломер в пролиферирующих клетках сопровождается переходом клеток в состояние репликативного старения, связанное с активацией β-Gal [397].

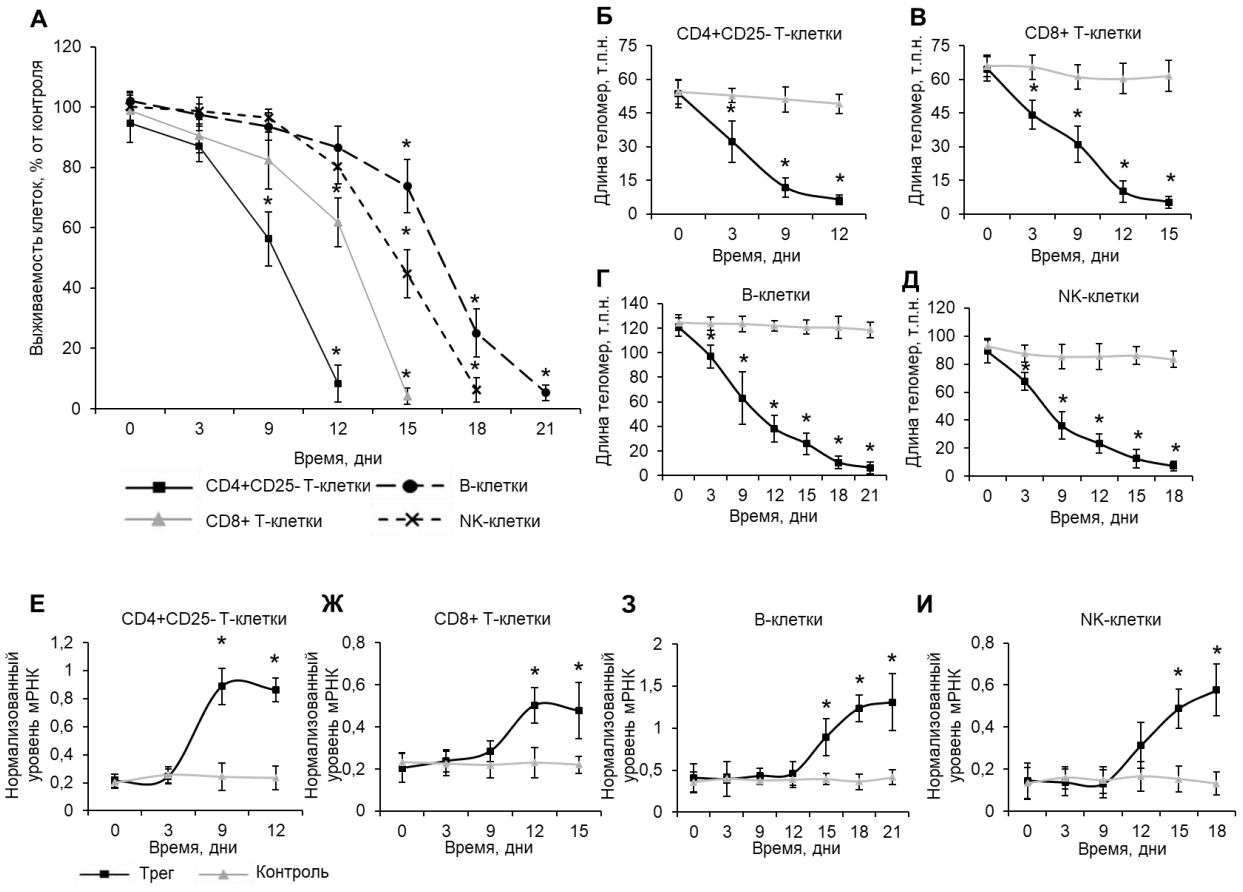


Рисунок 72. Укорочение теломер и гибель таргетных лимфоцитов мыши при длительном совместном культивировании с иТрег. Таргетные лимфоциты мыши культивировали с иТрег через полупроницаемую мембрану в течение 12–21 дня. Жизнеспособность таргетных клеток, измеренная с использованием анализа LDH (А). Длина теломер в лимфоцитах мыши измеренная методом ОТ-ПЦР в реальном времени (Б-Д). уровни мРНК β-Gal в таргетных лимфоцитах (Е-И). Уровни мРНК были нормализованы по отношению к уровню рРНК референсного гена 18S. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным лимфоцитам.

Учитывая это, мы исследовали экспрессию гена этого фермента в мышиных лимфоцитах при совместном культивировании с иТрег. Установлено, что иТрег индуцировали значительное увеличение экспрессии β-Gal в течение 9-12 дней в $CD4^+CD25^-$ Т-клетках (рис. 72 Е), 12-15 дней - в $CD8^+$ Т-клетках (рис. 72 Ж), 15-18 дней - в В-клетках (рис. 72 З) и в NK-

клетках (рис. 72 И). В контрольных клетках изменений в экспрессии β-Gal не обнаружено.

4.15.6. Индукция АС пре-мРНК TERT и ингибирование теломеразы иТрег мыши в таргентых лимфоцитах *in vivo*

Чтобы оценить способность Трег клеток индуцировать EndoG-ассоциированный АС пре-мРНК TERT и ингибирование теломеразы в таргетных лимфоцитах *in vivo*, из селезенок GFP-трансгенных мышей выделяли $CD4^+CD25^-$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, В-клетки или NK-клетки, индуцировали их *in vivo* и вводили внутривенно мышам линии C57BL/6. Через 24 ч мыши получали иТрег. Спустя 4 и 21 день после инъекции иТрег, измеряли содержание иТрег в периферической крови. Методом проточной цитометрии показано увеличение доли иТрег до 17,53 ± 3,25% $CD4^+CD25^+FoxP3^+$-положительных клеток в группе мышей, получавших Трег по сравнению с 7,47 ± 2,46% в контрольной группе, однако через 21 день после введения Трег, их доля снизилась почти до исходного уровня: 10,14 ± 2,29%. Наблюдалось постепенное уменьшение количества GFP-положительных лимфоцитов в обеих группах мышей. Однако у мышей, получавших иТрег, 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, $CD8^+$ Т-клетки, В-клетки или NK-клетки выделяли из периферической крови мышей методом сортинга 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 иТрег (рис. 73 А–Г). Индукция EndoG сопровождалось индуцированным АС пре-мРНК TERT: наблюдалось снижение уровня мРНК полноразмерного варианта α+β+ (рис. 73

Д–З) и повышение количества укороченного сплайс-варианта α+β– (рис. 73 И–М).

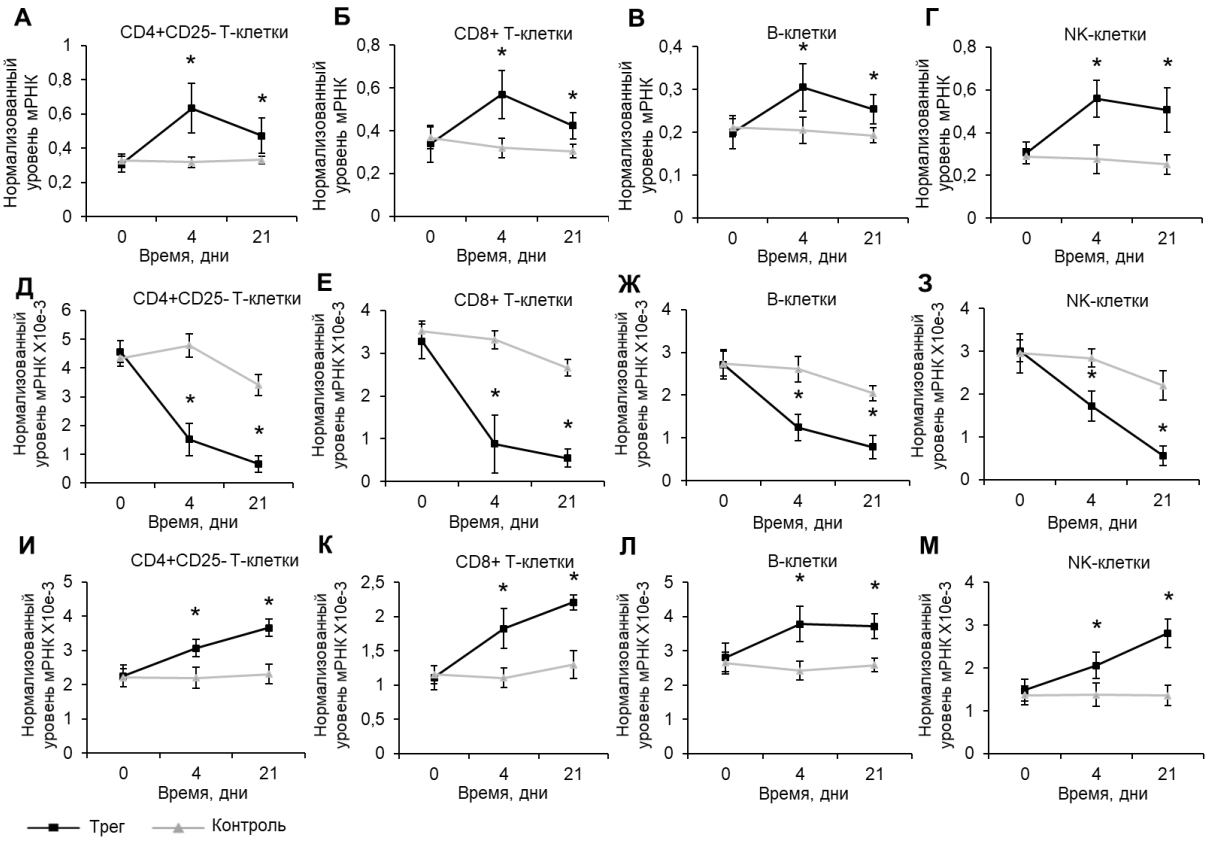


Рисунок 73 Индукция иТрег клетками экспрессии EndoG и АС пре-мРНК TERT *in vivo*. Индуцированные *in vivo* GFP-положительные лимфоциты и иТрег вводили мышам C57BL/6. GFP-положительные $CD4^{+}CD25^{-}$ Т-клетки, $CD8^{+}$ Т-клетки, В-клетки и NK-клетки выделяли из периферической крови через 4 и 21 день после инъекции иТрег. Уровни мРНК EndoG (А–Г), α+β+ (Д–З) и α+β– (И–М) сплайс-вариантов TERT в таргетных лимфоцитах. Уровни мРНК были нормализованы по отношению к уровню рРНК референсного гена 18S. * $p \leq 0,05$ по отношению к лимфоцитам контрольных животных.

Методом TRAP-анализа показано ингибирование теломеразы во всех типах GFP-положительных лимфоцитов мышей, которым вводили иТрег (рис. 74 А–З). Во всех типах лимфоцитов мышей, получавших иТрег, обнаружено уменьшение длины теломер (рис. 74 И–М) и индукция экспрессии маркера репликативного старения β-Gal через 21 день после инъекции иТрег (рис. 74 Н–Р).

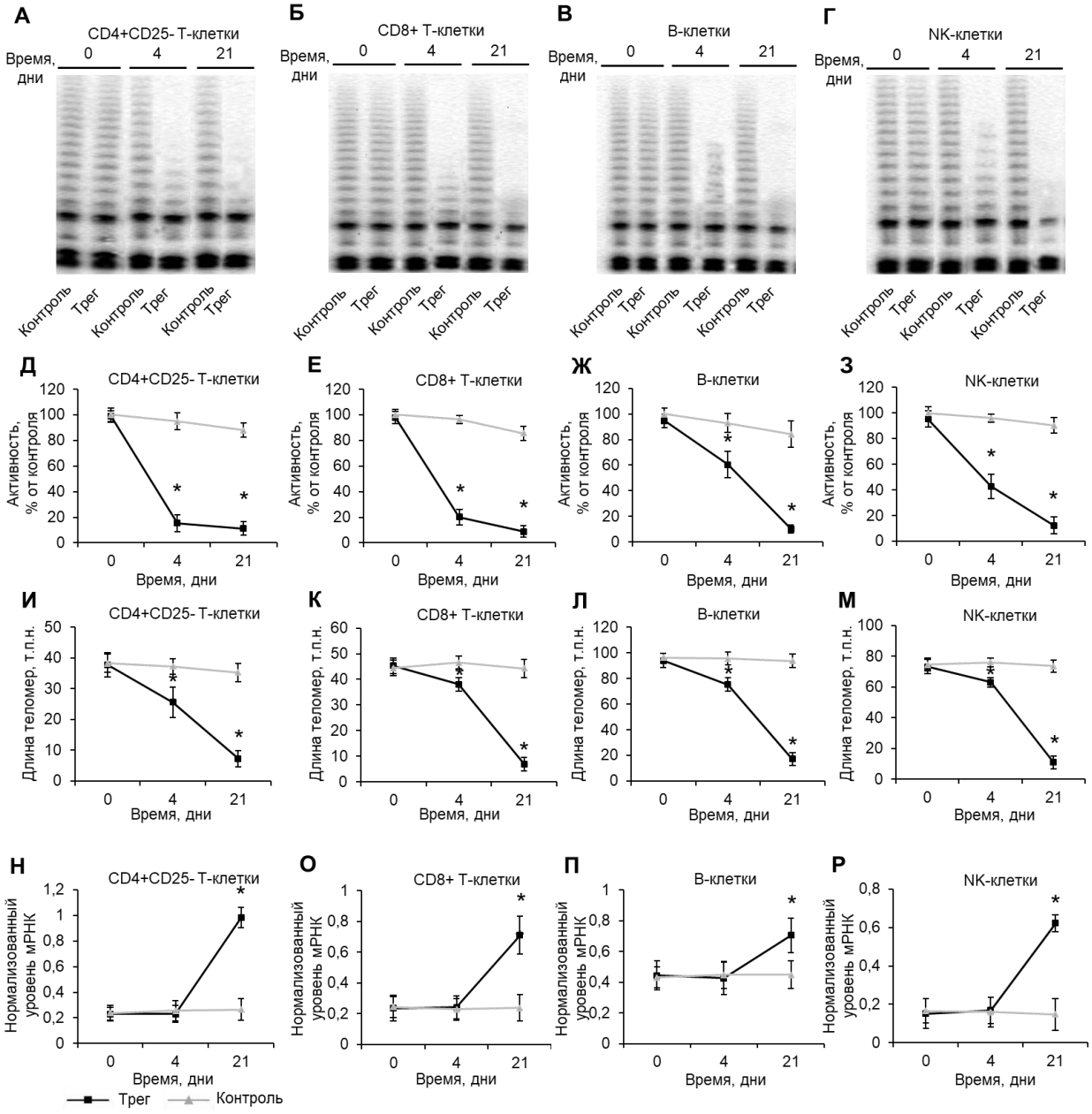


Рисунок 74. Укорочение теломер и репликативное старение таргетных лимфоцитов *in vivo*. Таргетные GFP-положительные лимфоциты выделяли из периферической крови мышей через 4 и 21 день после инъекции иТрег. Активность теломеразы, определенная с помощью метода TRAP в таргетных лимфоцитах (А–Г). Результаты количественного TRAP определения с помощью денситометрии (Д–З). Длина теломер, измеренная методом ОТ-ПЦР в реальном времени (И–М). Уровни мРНК β-Gal в лимфоцитах (Н–Р). Уровни мРНК были нормализованы по отношению к уровню рРНК референсного гена 18S. * $p \leq 0,05$ по отношению к лимфоцитам контрольных животных.

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процесс АС пре-мРНК является одним из основных механизмов, регулирующих уровень белков, их каталитическую активность и функционирование и таким образом модулировать клеточные процессы, в которые они вовлечены. АС позволяет увеличить разнообразие белковых продуктов генов, сохраняя при этом относительно небольшое их количество в геноме и не создавая избыточных копий генов. Идентифицировано множество белков, принимающих участие в данных процессах. Однако механизм АС изучен пока недостаточно полно.

Результаты наших экспериментов показали, что апоптотическая эндонуклеаза EndoG, которая в норме локализуется в митохондриях и транслоцируется в ядра клеток при развитии апоптоза, способна индуцировать АС пре-мРНК ряда генов.

Вся работа по изучению роли EndoG в регуляции АС пре-мРНК и каталитической активности апоптотических белков началась с нашего случайного наблюдения. Было обнаружено, что трансфекция клеток геном EndoG (плазмидой pEndoG-GFP) вызывала замедление пролиферации клеток MCF-7 рака молочной железы человека. Оказалось, что в клетках со сверхэкспрессией EndoG снижается активность теломеразы (фермента, синтезирующего теломерные повторы на 3’-концах хромосом эукариот) в результате индукции АС пре-мРНК её каталитической субъединицы hTERT (рис. 16).

В настоящее время известно более двух десятков сплайс-вариантов hTERT, однако только полноразмерный вариант hTERT обладает каталитической активностью [192]. Большинство сплайс-вариантов экспрессируются в минорных количествах и их функция до конца не изучена. Два сплайс-варианта составляют большую часть общей мРНК hTERT. Делеция 36-ти нуклеотидов в экзоне 6 (α– вариант) вызывает удаление части обратно-

транскриптазного домена белковой молекулы и приводит к утрате каталитической активности. При делеции 182 нуклеотидов экзонов 7 и 8 (β– вариант) происходит сдвиг рамки считывания и появление стоп-кодона в экзоне 10, что сопровождается синтезом укороченного сплайс-варианта hTERT, функционирующего как доминантно-негативный [194].

Следствием индуцированного EndoG АС пре-мРНК hTERT в клетках MCF-7 явилось уменьшение синтеза полноразмерного активного α+β+ варианта hTERT и увеличение образования укороченного неактивного α+β– сплайс-варианта (рис. 16).

Известно, что активная теломераза функционирует в стволовых, половых, опухолевых клетках и активированных лимфоцитах. Поэтому мы исследовали влияние EndoG на АС пре-мРНК hTERT в опухолевых клетках и различных субпопулляциях активированных лимфоцитов человека, а также на АС пре-мРНК TERT в различных субпопулляциях активированных лимфоцитов мышей и крыс (рис. 19 – 21). Во всех экспериментах наблюдался одинаковый результат: уменьшение синтеза полноразмерного активного варианта TERT и увеличение накопления укороченного сплайс-варианта. Индукция АС сопровождалось ингибированием активности теломеразы.

В лимфоцитах периферической крови определяется крайне низкая активность теломеразы. В условиях *in vitro* при стимуляции пролиферации клеток IL-2 и антителами к CD3 и CD28 активность теломеразы значительно возрастает [398]. В не стимулированных $CD4^+$, $CD8^+$ Т-лимофцитах, В-лимфоцитах и НК-клетках 50-ти здоровых доноров была обнаружена высокая корреляция уровней мРНК EndoG и сплайс-вариантов hTERT. В клетках с низким уровнем мРНК EndoG наблюдалось преобладание мРНК полноразмерного варианта α+β+ hTERT над мРНК укороченного сплайс-варианта α+β– hTERT, в то время как в клетках с высоким уровнем мРНК EndoG обнаружено преобладание мРНК укороченного варианта над мРНК

полноразмерного (рис. 19). Аналогичная взаимосвязь была выявлена в лимфоцитах мышей и крыс различных линий (рис. 20) и клетках опухолевых линий человека (рис. 17).

Известно, что экспрессия EndoG возрастает в ответ на повреждения ДНК [351,352]. Кроме того, EndoG интернализуется в ядра клеток из межмембранного пространства митохондрий при апоптозе [376]. Поэтому мы исследовали способность повреждающих ДНК агентов с различным механизмом действия индуцировать экспрессию EndoG и вызывать АС пре-мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы в нормальных активированных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитах человека. Было установлено, что при повышенной экспрессии EndoG, индуцированной повреждающим ДНК агентами, также наблюдается индукция АС пре-мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы в условиях *in vitro* (рис. 23, 24, 27, 28).

Следует отметить, то повреждения ДНК, детектируемые методом TUNEL, могут возникать в результате воздействия как повреждающих ДНК агентов, так и при действии на ДНК индуцированной EndoG [14]. Кроме того, индукция EndoG способна вызывать экспрессию других апоптотических эндонуклеаз, ответственных за деградацию ДНК [399]. В увеличении количества TUNEL-положительных клеток наиболее вероятен совместный вклад повреждающих ДНК агентов и EndoG.

Наиболее активным соединением, способным в нетоксичной концентрации в наибольшей степени повреждать ДНК и индуцировать EndoG и АС пре-мРНК hTERT, оказался цисплатин (рис. 24). В связи с этим, данное соединение было использовано для оценки возможности индуцировать АС в условиях *in vivo* при внутривенном введении экспериментальным животным (мышам и крысам). Было обнаружено, что цисплатин способен вызывать повреждение ДНК, индуцировать экспрессию EndoG, АС пре-мРНК hTERT и

ингибировать активность теломеразы в Т- и В-лимфоцитах, а также в NK-клетках животных.

Одна из главных задач работы состояла в исследовании механизма, индукции АС под действием EndoG. В первую очередь была изучена внутриклеточная локализация EndoG и сплайс-вариантов в нормальных и апоптотических клетках. Для индукции апоптоза клетки инкубировали с цисплатином и через 24 часа была получена практически гомогенная популяция апоптотических клеток. Вероятно, увеличение уровня EndoG в цитоплазме и ядрах клеток явилось следствием повреждающего действия цисплатина на ДНК. Изменение количества α+β+ и α+β– сплайс-вариантов в цитоплазме и ядрах апоптотических клеток было результатом повышенной экспрессии EndoG (рис. 41).

В отличие от других апоптотических эндонуклеаз, в момент повреждения ДНК EndoG локализуется в митохондриях [238]. Исходно EndoG синтезируется в цитоплазме в виде про-пептида (про-белка) размером 32 кДа, который транслоцируется в митохондрии благодаря наличию сигнального пептида [14,239] и хранится в межмембранном пространстве [238]. Про-белок EndoG неактивен [240]. Сигнальный пептид отщепляется при проникновении в митохондрии и зрелый белок, размером 27 кДа, может беспрепятственно покидать митохондрии при развитии апоптотических процессов. При апоптозе EndoG транслоцируется в ядро, где осуществляет расщепление полиG-полиС последовательностей ДНК [244], действуя по каспаз-независимому механизму [400].

Как правило, процесс АС пре-мРНК локализуется в ядре клеток. Эписомальная экспрессия EndoG в клетках после трансфекции плазмидой pEndoG-GFP позволила локализовать EndoG в цитоплазме и ядрах, сделать её «доступной» пре-мРНК hTERT и индуцировать АС.

Отсутствие мРНК α+β– сплайс-варианта в ядрах нормальных клеток указывает на то, что в нормальных условиях процесс АС пре-мРНК hTERT в ядре не протекает. Мы обнаружили мРНК α+β– сплайс-варианта в ядрах апоптотических клеток. Согласно нашему предположению именно интернализация EndoG в ядро при апоптозе вызывает появление в нём α+β– сплайс-варианта. Исследование содержания hTERT в органеллах нормальных и апоптотических клеток методом вестерн блоттинга показало, что в ядрах нормальных клеток присутствуют α+β– сплайс-вариант hTERT и его количество ожидаемо увеличивается при апоптозе. В митохондриях в норме обнаруживаются оба сплайс-варианта hTERT примерно в равных количествах. Присутствие hTERT в митохондриях согласуется с данными других авторов [194,401]. При апоптозе снижается количество как α+β– сплайс-варианта hTERT, так и EndoG. Можно предположить, что уменьшение количества EndoG при апоптозе вызвано его интернализацией в ядро. Увеличение уровня α+β– и уменьшение пула α+β+ сплайс-вариантов hTERT согласуется со снижением активности теломеразы и повышением количества EndoG в ядрах и цитоплазме. Нами также была обнаружена теломеразная активность в митохондриях, которая, однако, при апоптозе не изменялась (рис. 42). Исследование клеточной локализации EndoG и hTERT методом иммуноцитохимии подтвердило их высокую степень ко-локализации в ядре (рис. 43), что косвенным образом указывает на сопряжённость их активности.

Мы описали механизм регуляции АС пре-мРНК hTERT, связанный с РНКазной активностью EndoG. В данном случае для понимания этого механизма не подходят ни один из известных механизмов делеции экзонов, включая супрессию сайта сплайсинга, сокрытие или экспонирование *cis*-элемента, ADAR-опосредованную селекцию сайта сплайсинга, сближение *cis*-элементов, перекручивание интронов, а также конкурентные явления во вторичной структуре РНК [402].

В общих чертах исследуемый механизм можно представить по следующей гипотетической схеме. С кодирующей цепи гена *hTERT* синтезируется пре-мРНК, а с матричной (некодирующей) - нкРНК размером 1754 нуклеотида (рис. 51). EndoG вырезает из нкРНК 48-членный РНК-олигонуклеотид EGPO, комплементарный пре-мРНК hTERT в участке соединения экзона 8 и интрона 8 (рис. 75 А, Б). Взаимодействие EGPO и пре-мРНК hTERT вызывает АС и появление сплайсированного β–варианта. В пользу этого механизма говорят следующие факты. Повышенный синтез EndoG вызывает увеличение экспрессии варианта α+β– и уменьшению экспрессии α+β+ hTERT, что приводит к снижению активности теломеразы. Известно, что некоторые альтернативные варианты hTERT действуют как доминантно-негативные, а их повышенный синтез вызывает значительное снижение активности теломеразы [196,403]. Обработка цитоплазмы и ядер клеток recEndoG вызывает увеличение экспрессии мРНК α+β– и снижение уровня полноразмерного варианта α+β+. Обработка суммарной РНК из клеточных ядер recEndoG, и последующая инкубация продуктов расщепления с ядрами приводят к появлению в них альтернативного варианта α+β–. Поскольку инкубация ядер с ДНК, обработанной recEndoG, не вызывает АС пре-мРНК hTERT, можно полагать, что фактор, вызывающий АС, относится именно к РНК, а его происхождение связано с РНКазной активностью EndoG (действие РНКазы 1 и РНКазы А не вызывало АС). Было сделано предположение, что активный РНК-олигонуклеотид (EGPO) «вырезается» EndoG из нкРНК. По нашему мнению, наиболее вероятно, что нкРНК синтезируется на матричной (некодирующей) цепи гена hTERT, поскольку никакой другой участок, комплементарный нкРНК не был обнаружен. Приблизительный размер EGPO и его нуклеотидную последовательность удалось установить, использовав метод гибридизации ДНК-олигонуклеотидов с предполагаемой EGPO.

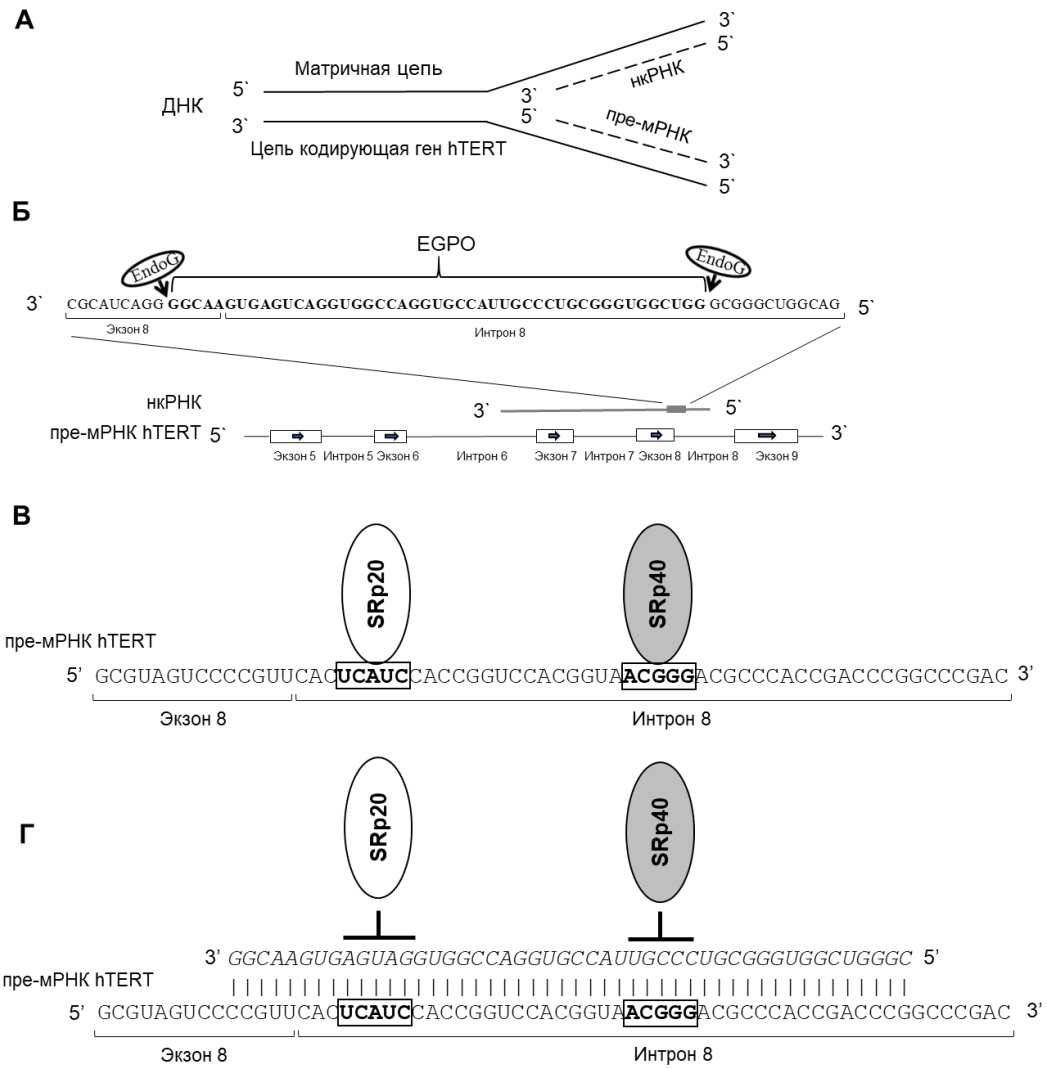


Рисунок 75. Гипотетическая схема механизма сплайсинга пре-мРНК hTERT в результате действия EndoG. Гипотетическая схема расположения мест синтеза пре-мРНК hTERT и нкРНК (А). С кодирующей цепи гена *hTERT* синтезируется пре-мРНК, а с матричной – нкРНК. Гипотетическая схема расположения нкРНК и EGPO при регуляции АС эндонуклеазой EndoG пре-мРНК hTERT (Б). EndoG вырезает из нкРНК EGPO, комплементарный пре-мРНК hTERT. Взаимодействие EGPO и пре-мРНК hTERT вызывает АС и появление β-варианта hTERT. Схематическое изображение регулирующих сплайсинг белков SRp20 (показан в виде белого эллипса) и SRp40 (показан в виде серого эллипса), взаимодействующих с сайтами связывания (показаны в черной рамке) на молекуле пре-мРНК hTERT (В). Взаимодействие EGPO с пре-мРНК hTERT блокирует связывание обоих белков SRp20 и SRp40 с сайтами связывания (Г). Результатом этого взаимодействия является индукция АС и делеция экзонов 7 и 8 в зрелой молекуле мРНК.

С помощью этого метода определен размер EGPO с минимальной погрешностью 12 нуклеотидов с 3’- и 5’- концов. Уменьшение размера ДНК-олигонуклеотидов снижало их специфичность к EGPO и не вызывало ингибирования АС. На границах EGPO располагаются G-богатые участки (GGGG на 3’- и GGGCGGG на 5’-конце), которые, вероятно, и являются сайтом, на который действует EndoG. Трансфекция искусственно синтезированного EGPO вызывала активацию АС пре-мРНК hTERT в клеточных ядрах CaCo-2 и в самих клетках и приводила к снижению активности теломеразы. EGPO весьма сильно отличается от микроРНК, активных при АС [402] – его длина гораздо больше 22 нуклеотидов, и он образуется из нкРНК известного гена. Действие EGPO сходно с действием описанных малых некодирующих ядерных РНК [380] или терапевтических олигонуклеотидов, переключающих сплайсинг [381]. Однако следует отметить, что размер EGPO больше, чем у малых ядерных РНК (15-25 нуклеотидов), и образуется он из комплементарной цепи регулируемого им гена. Экспрессия EGPO увеличивалась при трансфекции клеток геном EndoG и обработке цитоплазмы и ядер recEndoG. Чтобы установить субстрат EndoG, из которого образуется EGPO, мы использовали метод секвенирования следующего поколения и определили нуклеотидную последовательность нкРНК. Экспрессия нкРНК в клетках не зависела от действия EndoG. Наиболее вероятно, что количество EGPO регулируется активностью EndoG, а не уровнем нкРНК. Ключевым явлением индукции АС в ядрах является транслокация EndoG в ядра, и доступность EndoG для нкРНК.

На участке интрона 8 пре-мРНК hTERT, который перекрывается EGPO располагаются два участка: UCAUC и ACGGG, являющиеся сайтами связывания регулирующих сплайсинг белков SRp20 и SRp40, соответственно (рис. 75 В, Г). Эти белки функционируют как ингибиторы процесса АС [404]. Наиболее вероятно, что взаимодействие EGPO и пре-мРНК блокирует доступ

этих белков к своим сайтам и вызывает индукцию АС, приводящую к делеции экзонов 7 и 8 в зрелой молекуле мРНК.

Следует отметить, что другие широко специфичные ДНКазы (ДНКаза 1 и ДНКаза X) не были способны индуцировать АС пре-мРНК hTERT (рис. 61), что указывает на вовлеченность именно EndoG в регуляцию данного процесса.

Для решения задачи поиска мРНК белков, в регуляции АС которых участвует EndoG, мы трансфицировали $CD4^+$ Т-лимфоциты человека, мыши или крысы плазмидами, содержащими гены EndoG или инкубировали их с цисплатином, после чего проводили анализ уровней мРНК методом секвенирования тотальной РНК (RNA seq). Было обнаружено 28 генов, уровень сплайс-вариантов мРНК которых, варьирует при неизменном количестве общей мРНК данных генов. Изменение уровней сплайс-вариантов мРНК обнаруженных генов было подтверждено методом ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 29, 30).

Для дальнейшего исследования (кроме мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT) были выбраны мРНК белков ДНКазы 1 (DNase I), каспазы-2 (Casp-2) и BCL-x, поскольку изменение уровней сплай-вариантов было обнаружено как в лимфоцитах человека, так и мыши и крысы, как при трансфекции геном EndoG, так и при индукции EndoG цисплатином.

Белки, кодируемые выбранными для исследования генами, участвуют в развитии апоптоза. Ранее было обнаружено, что повреждения ДНК клеток, вызванные различными агентами, окислительный стресс, и тепловой шок приводят к изменению пропорции сплайс-вариантов Casp-2 в клетках [405]. Эти данные согласуются с результатами наших экспериментов, в которых цисплатин вызывал повреждение ДНК и индукцию экспрессиии EndoG. Описано два сплайс-варианта Casp-2: Casp-2L (Long Form, длинная форма) и Casp-2S (Short Form, короткая форма). Полноразмерная Casp-2L (435 a.o.), также известная как ICH-1 (Interleukin-1β-converting enzyme), состоит из p19 и

p12 последовательностей, необходимых для активации и каталитической активности фермента. Сплайс-вариант Casp-2S содержит альтернативный не кодирующий экзон на 5’-конце мРНК, что приводит к инициации трансляции с кодирующего кодона 2 и потере 31 аминонокислоты части CARD-домена (Caspase Recruitment Domain) на N-конце белка [363]. Появление дополнительного кодирующего экзона 9 вызывает сдвиг рамки считывания, появление стоп-кодона на стыке экзонов 9 и 10 и укорочение С-концевого участка белка на 92 а.о. В результате АС Casp-2S теряет p12 последовательность и ферментативную активность. Сплайс-варианты Casp-2 оказывают противоположный эффект: Casp-2L индуцирует клеточную гибель, в то время как Casp-2S подавляет развитие апоптотических процессов[406].

При развитии апоптотических процессов EndoG функционирует одновременно с другой апоптотической эндонуклеазой DNase I. Последняя обнаруживается в клетках в наибольших количествах, является самой активной из апоптотических ДНКаз и участвует в инициировании цисплатин-индуцированной активации гена EndoG [325]. Индукция АС DNase I эндонуклеазой EndoG сопровождается снижением экспрессии полноразмерного варианта DNase I в нормальных клетках почки крысы NRK-52E, трансфицированных плазмидой pEndoG-ECFP [399].

BCL-x – трансмембранный белок митохондрий, регулирующий секрецию содержимого митохондрий, например, цитохромов в цитозоль при развитии апоптотических процессов [407]. Полноразмерный вариант BCL-xL ингибирует функцию белка p53 и обладает антиапоптотическим действием. Делеция 189 нуклеотидов в молекуле мРНК вызывает синтез укороченного варианта BCL-xS, который является про-апоптотическим белком. Повреждения ДНК, вызванные действием противоопухолевых препаратов, приводят к увеличению уровня мРНК BCL-xS и активации апоптоза *in vitro*

[408], что согласуется с показанным нами действием цисплатина и активацией им EndoG.

Для подтверждения результатов секвенирования РНК мы исследовали уровни экспрессии EndoG и сплайс-вариантов TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x в интактных $CD4^+$ Т-клетках здоровых доноров, а также мышей и крыс различных линий (рис. 32, 35, 37). Корреляционный анализ показал, что увеличенная экспрессия EndoG сопровождается повышенным синтезом укороченных сплайс-вариантов мРНК данных генов. Методами ОТ-ПЦР в реальном времени и вестерн блоттинга подтверждено изменение количества сплайс-вариантов мРНК и белков исследуемых генов в $CD4^+$ Т-клетках, трансфицированных геном EndoG или инкубированных с цисплатином или этопозидом (рис. 33, 36, 37). При изменении соотношения сплайс-вариантов происходило уменьшение ферментативной активности исследуемых белков в клетках человека, мыши и крысы (рис. 34, 36, 37). Индуцированное цисплатином повреждение ДНК у мышей и крыс сопровождалось увеличением АС пре-мРНК TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x и снижением их ферментативной активности *in vivo*.

По аналогии с мРНК каталитической субъединицей теломеразы hTERT, мы исследовали механизм индукции АС пре-мРНК DNase I в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека

Процесс АС пре-мРНК является регуляторным механизмом апоптотичесских эндонуклеаз. Ранее было показано, что пре-мРНК DNase I способна подвергаться АС в 5’-конце не транслируемой области, так и в кодирующей части[255]. АС также подвергаются мРНК DNase X [409], DNase 1L2 [410], CAD [411] и ингибитора ICAD [412].

Нами была обнаружена, выраженная корреляция между уровнями мРНК EndoG и сплайс-вариантами мРНК DNase I в лимфоцитах человека (рис. 32). Сверхэкспрессия EndoG в $CD4^+$ Т-лимфоцитах вначале индуцировала, а на

поздних этапах инактивировала нуклеазную активность ДНКазы 1. Такая индукция на ранних этапах, вероятнее всего, была вызвана повреждением ДНК (ДНКазной активностью EndoG). Тот факт, что повреждающий ДНК агент блеомицин был способен активировать ДНКазу 1 подтверждает данное предположение. Кроме того, ранее мы показали, что EndoG сама по себе способна индуцировать экспрессию DNase I [399]. Угнетение нуклеазной активности возникало в результате АС пре-мРНК и делеции экзона 4, как в клетках со сверхэкспрессией EndoG, так и воздействии recEndoG на изолированные ядра клеток (рис. 46). Сплайс-вариант Δ4DNase I проявлял доминантно-негативные свойства и подавлял нуклеазную активность DNase I в клетках.

Как и в случае с укороченным сплайс-вариантом мРНК α+β– hTERT, мы не обнаружили укороченного варианта мРНК Δ4DNase I в ядрах нормальных (неапоптотических) клеток (рис. 46). Данное наблюдение может быть объяснено несколькими событиями: быстрым экспортом зрелой мРНК в цитоплазму из ядра, быстрой деградацией дефектной РНК или внеядерной локализацией процесса АС.

Индукция апоптоза блеомицином вызывала переход белка EndoG из митохондрий в цитоплазму и ядра и индуцировала АС пре-мРНК DNase I. Таким образом, как и в случае с АС пре-мРНК hTERT было показано, что выход EndoG из митохондрий и её «доступность» для пре-мРНК DNase I является обязательным условием индукции АС.

Ингибирование экспрессии EndoG малыми интерферирующими РНК сопровождалось изменением пула сплайс-вариантов DNase I: наблюдали увеличение уровня мРНК и белка полноразмерного варианта nDNase I и практически полное отсутствие укороченного варианта Δ4DNase I (рис. 44, 45). Данные изменения сопровождались увеличением нуклеазной активности в

цитоплазме и ядрах нормальных и апоптотических клетках. Эти результаты подтверждают участие EndoG в регуляции АС пре-мРНК DNase I.

По аналогии с пре-мРНК hTERT методом гибридизации РНК с 12-ти членными ДНК-олигонуклеотидами нам удалось установить размер и нуклеотидную последовательность EGPO с точностью до 12-ти нуклеотидов. Данные олигонуклеотиды образовывали комплексы РНК·ДНК и подавляли способность EGPO индуцировать АС. Уменьшение размера ДНК-олигонуклеотидов до менее 12 оснований приводило к снижению их специфичности и неспособности ингибировать действие EGPO.

Механизм действия EndoG при индукции АС пре-мРНК DNase I был аналогичен механизму индукции АС пре-мРНК hTERT.

С кодирующей цепи гена hTERT синтезируется пре-мРНК, а с матричной (некодирующей) - нкРНК размером 773 нуклеотида (рис. 51 Г). EndoG вырезает из нкРНК 72-членный РНК-олигонуклеотид EGPO, комплементарный пре-мРНК DNase I в месте соединения экзона 4 и интрона 4 (рис 76 А, Б). Взаимодействие EGPO и пре-мРНК DNase I вызывает АС и появление сплайсированного Δ4 варианта. На границах EGPO на нкРНК располагаются G-богатые и C-богатые участки (CCC на 3’- и CCCGGGG на 5’-конце), которые, вероятно, и являются сайтом, на который действует EndoG [14]. Трансфекция искусственно синтезированного 72-х членным EGPO вызывала активацию АС пре-мРНК DNase I в клеточных ядрах и в лимфоцитах и приводила к снижению нуклеазной активности.

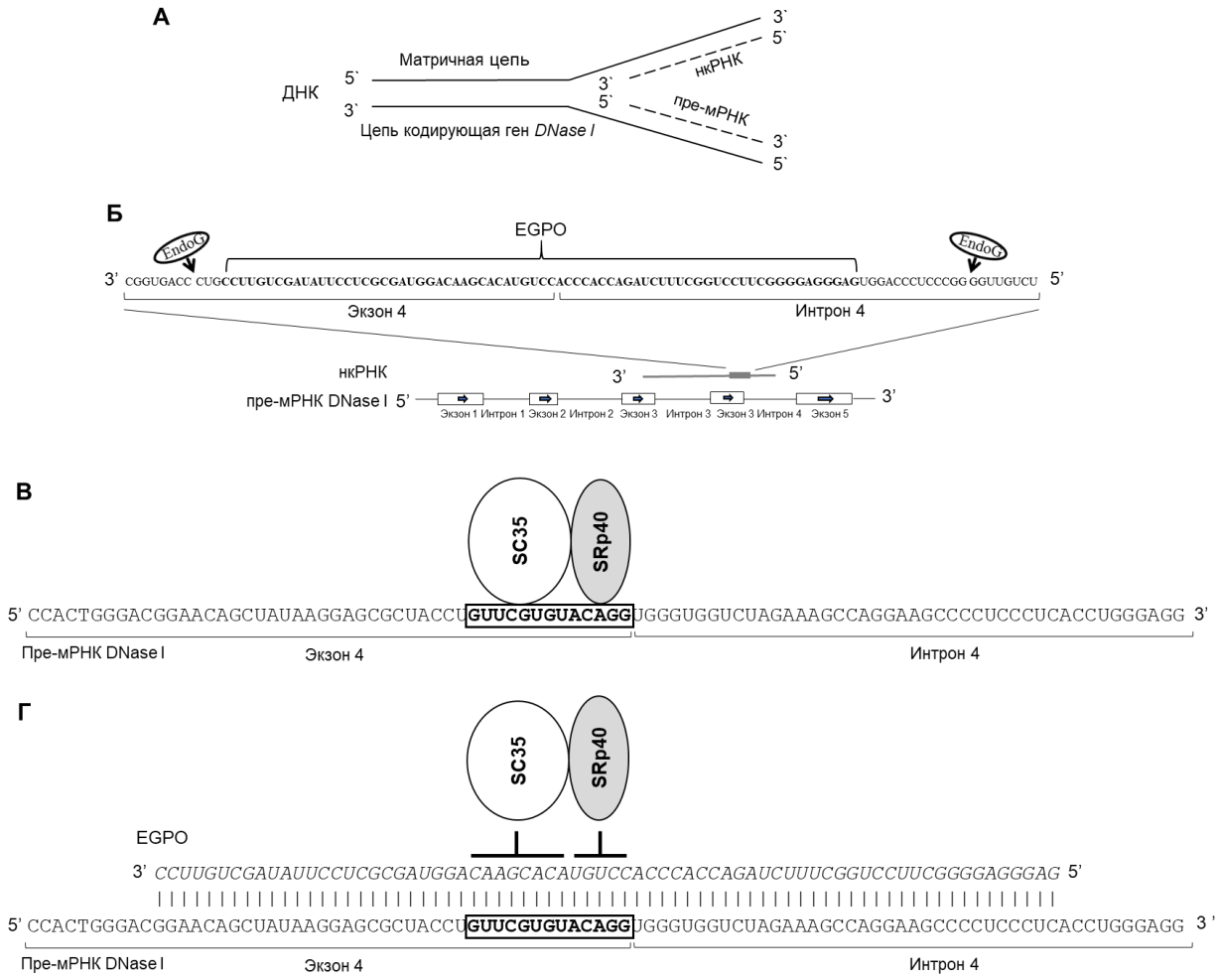


Рисунок 76. Гипотетическая схема механизма сплайсинга пре-мРНК DNase I в результате действия EndoG. Гипотетическая схема расположения мест синтеза пре-мРНК DNase I и нкРНК (А). С кодирующей цепи гена DNase I синтезируется пре-мРНК, а с матричной – нкРНК. Гипотетическая схема расположения нкРНК и EGPO при регуляции АС эндонуклеазой EndoG пре-мРНК DNase I (Б). EndoG вырезает из нкРНК EGPO, комплементарный пре-мРНК DNase I. Взаимодействие EGPO и пре-мРНК DNase I вызывает АС и появление спайс-варианта Δ4DNase I. Схематическое изображение регулирующих сплайсинг белков SC35 (показан в виде белого эллипса) и SRp40 (показан в виде серого эллипса), взаимодействующих с сайтами связывания (показаны в черной рамке) на молекуле пре-мРНК DNase I (В). Взаимодействие EGPO с пре-мРНК DNase I блокирует связывание обоих белков SC35 и SRp40 с сайтами связывания (Г). Результатом этого взаимодействия является индукция АС и делеция экзон 4 в зрелой молекуле мРНК Δ4DNase I.

На конце экзона 4 пре-мРНК DNase I расположена богатая пиримидинами последовательность GUUCGUGUA и перекрывающая её последовательность ACAGG, являющиеся сайтами связывания регулирующих сплайсинг белков SC35 и SRp40, соответственно [35] (рис 76 В, Г).

Как и в случае АС пре-мРНК hTERT, можно предположить, что взаимодействие EGPO и пре-мРНК DNase I блокирует доступ этих белков к своим сайтам и вызывает индукцию АС, приводящую к делеции экзона 4 в зрелой молекуле мРНК. В отличие от АС пре-мРНК hTERT и DNase I, когда EndoG вызывала делецию экзонов, в случае с пре-мРНК Casp-2 действие EndoG приводило к вставке экзона 9 в зрелую молекулу её мРНК. Как описано выше, вставка этого интрона приводила к сдвигу рамки считывания, появлению стоп-кодона и синтезу укороченного сплайс-варианта Casp-2S.

Как и в случае с hTERT и DNase I мы обнаружили сильную взаимосвязь уровней мРНК EndoG и сплайс-вариантов Casp-2 в нормальных $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека и в апоптотических клетках, после инкубации с этопозидом (рис. 35). В ядрах нормальных лимфоцитов укороченный сплайс-вариант обнаружен и появлялся только после воздействия этопозида или recEndoG. Методом гибридизации РНК с 12-ти членными ДНК-олигонуклеотидами нам удалось установить размер и нуклеотидную последовательность EGPO с точностью до 12-ти нуклеотидов.

Механизм действия EndoG при индукции АС пре-мРНК Casp-2 был аналогичен механизму индукции АС пре-мРНК hTERT и DNase I.

С кодирующей цепи гена Casp-2 синтезируется пре-мРНК, а с матричной (некодирующей) - нкРНК размером 1016 нуклеотидов (рис. 51 Ж). EndoG вырезает из нкРНК 60-членный РНК-олигонуклеотид EGPO, комплементарный пре-мРНК Casp-2 в месте соединения экзона 9 и интрона 9 (рис. 77 А, Б). Взаимодействие EGPO и пре-мРНК Casp-2 вызывает АС,

вставку экзона 9 и появление сплайсированного укороченного варианта Casp-2S.

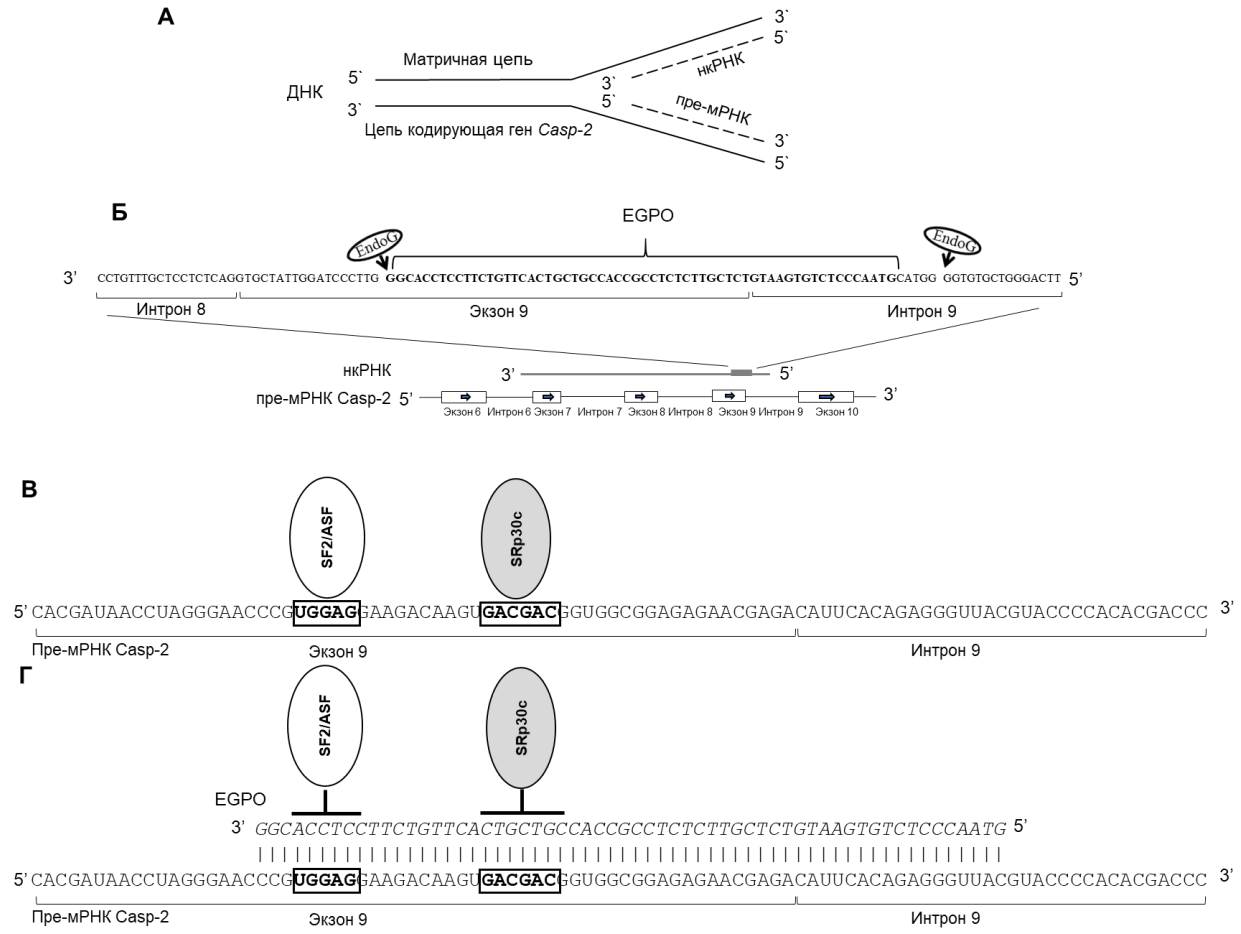


Рисунок 77. Гипотетическая схема механизма сплайсинга пре-мРНК Casp-*2* в результате действия EndoG. Гипотетическая схема расположения мест синтеза пре-мРНК Casp-2 и нкРНК (А). С кодирующей цепи гена Casp-2 синтезируется пре-мРНК, а с матричной – нкРНК. Гипотетическая схема расположения нкРНК и EGPO при регуляции АС эндонуклеазой EndoG пре-мРНК Casp-2 (Б). EndoG вырезает из нкРНК EGPO, комплементарный пре-мРНК Casp-2. Взаимодействие EGPO и пре-мРНК Casp-2 вызывает АС, включение экзона 9 и появление спайс-варианта Casp-2S. Схематическое изображение регулирующих сплайсинг белков SF2/ASF (показан в виде белого эллипса) и SRp30c (показан в виде серого эллипса), взаимодействующих с сайтами связывания (показаны в черной рамке) на молекуле пре-мРНК Casp-2 (В). Взаимодействие EGPO с пре-мРНК Casp-2 блокирует связывание обоих белков SF2/ASF и SRp30c с сайтами связывания (Г). Результатом этого взаимодействия является индукция АС и включение экзон 9 в зрелой молекуле мРНК Casp-2S.

На границах EGPO располагаются G-богатые участки (GGG на 3’- и GGGG на 5’-конце молекулы), которые, вероятно, и являются сайтом действия EndoG. Трансфекция искусственно синтезированного 60-х членным EGPO вызывала активацию АС пре-мРНК Casp-2 в клеточных ядрах и в лимфоцитах и приводила к снижению её ферментативной активности. На конце экзона 9 пре-мРНК Casp-2, который перекрывается EGPO располагаются два участка: UGGAG и GACGAC, являющиеся сайтами связывания регулирующих сплайсинг белков SF2/ASF и SRp30, соответственно (рис. 77 В, Г).

Как и в описанных выше случаях, мы можем предположить, что взаимодействие EGPO и пре-мРНК Casp-2 блокирует доступ этих белков к своим сайтам и вызывает индукцию АС, приводящую к вставке экзона 9 в зрелую молекулу мРНК. Как и в случае с пре-мРНК Casp-2, действие EndoG вызывало вставку экзона 3 при созревании мРНК BCL-x. Была обнаружена высокая степень корреляции между уровнем EndoG и сплайс-вариантами мРНК BCL-x в клетках различных опухолевых линий человека, а также в лимфоцитах человека, мыши и крысы (рис. 37). Аналогично сплайс-вариантам α+β– hTERT, Δ4DNase I и Casp-2S, наблюдались индукция АС и увеличение уровня варианта BCL-x после трансфекции клеток геном EndoG или обработки ядер клеток recEndoG. Размер EGPO, индуцировавшего АС пре-мРНК BCL-x, составил 36 нуклеотидов. EGPO комплементарен началу интрона 2 пре-мРНК BCL-x и перекрывает сайт UGGUG, являющийся участком взаимодействия с регуляторным белком SF2/ASF (рис 78 В, Г). Данный результат ещё раз подтверждает наше предположение о том, что взаимодействие EGPO и пре-мРНК BCL-x блокирует доступ этих белков к своим сайтам и вызывает индукцию АС, приводящую к вставке экзона 3 в зрелую молекулу мРНК и синтезу удлинённой формы белка BCL-xL.

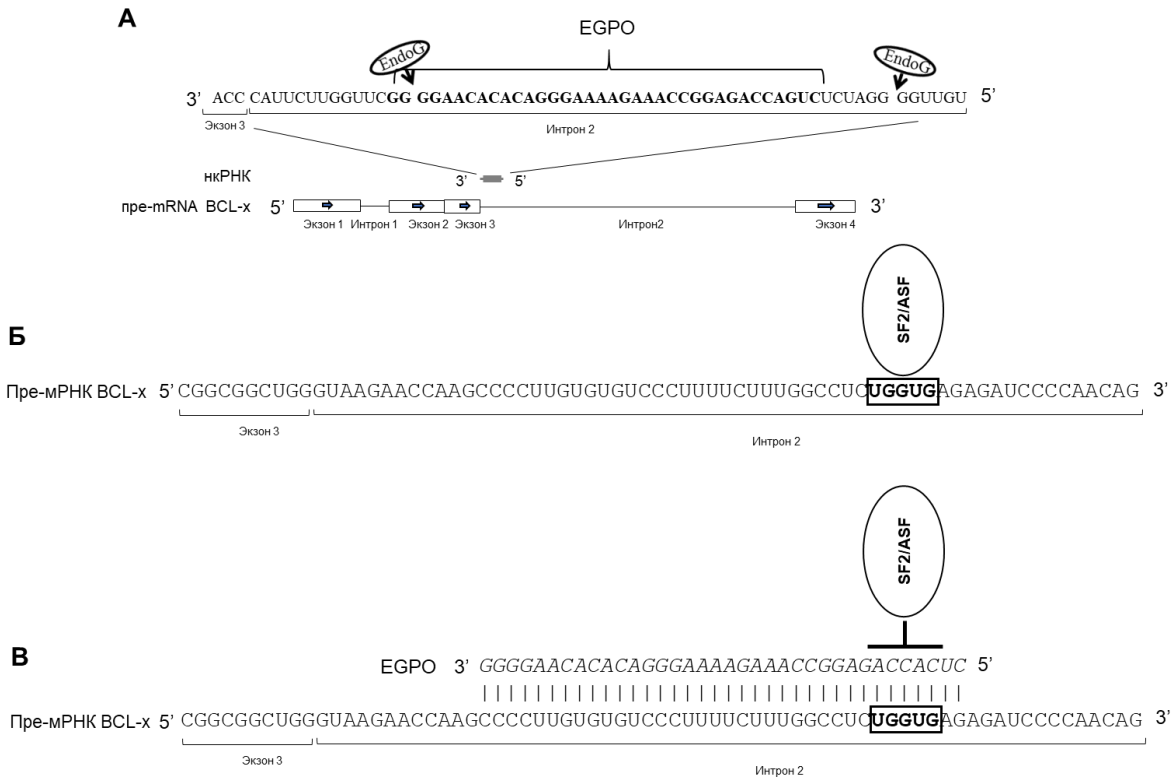


Рисунок 78. Гипотетическая схема механизма сплайсинга пре-мРНК BCL-x в результате действия EndoG. Гипотетическая схема расположения EGPO при регуляции АС эндонуклеазой EndoG пре-мРНК (А). EndoG вырезает из нкРНК EGPO, комплементарный пре-мРНК BCL-x. Взаимодействие EGPO и пре-мРНК BCL-x вызывает АС, включение экзона 3 и появление спайс-варианта BCL-xL. Схематическое изображение регулирующего сплайсинг белка SF2/ASF (показан в виде белого эллипса), взаимодействующего со своим сайтом связывания (показаны в черной рамке) на молекуле пре-мРНК BCL-x (Б). Взаимодействие EGPO с пре-мРНК BCL-x блокирует связывание белка SF2/ASF с сайтом связывания (В). Результатом этого взаимодействия является индукция АС и включение экзона 3 в зрелой молекуле мРНК BCL-xL.

Следует отметить, что блокирование с помощью EGPO участков взаимодействия с белком SRp40 на пре-мРНК hTERT и DNase I вызывало делецию экзонов в процессе дальнейшего созревания мРНК. Это указывает на функционирование данного белка в качестве «положительного» регулятора, индуцирующего включение экзонов при созревании мРНК. Блокирование с помощью EGPO участков взаимодействия с белком SF2/ASF на пре-мРНК Casp-2 и BCL-x, напротив, приводило к включению экзонов при созревании их мРНК. Это указывает на функционирование данного белка в качестве «отрицательного» регулятора, индуцирующего делецию экзонов. Однако данные утверждения требуют более глубокого дальнейшего изучения.

Для решения задачи по оценки возможности применения EGPO с целью модуляции АС целевых пре-мРНК, мы трансфицировали $CD4^+$ Т-лимфоциты человека ДНК олигонуклеотидами, которые содержали химические модификации для защиты от действия внутриклеточных РНКаз. Эти олигонуклеотиды были комплементарны участкам взаимодействия с регулирующими сплайсинг белками SRp20 и SRp40 на участке интрона 8 пре-мРНК hTERT (рис. 52, 53). Для данной работы были выбраны $CD4^+$ Т-клетки, поскольку эффект индукции АС пре-мРНК hTERT эндонуклеазой EndoG был описан нами ранее для этих клеток. Культивирование клеток, трансфицированных каждым из олигонуклеотидов, блокирующих один из регулирующих сплайсинг белков вызывало, индукцию АС. Наибольшей активностью обладал олигонуклеотид, взаимодействующий сразу с сайтами обоих белков. Данный олигонуклеотид вызывал ингибирование пролиферации лимфоцитов по теломер-независимому механизму без индукции клеточной гибели (рис. 54, 55).

Известно, что функционально активная каталитическая субъединица теломеразы hTERT обнаружена в множественных нормальных соматических человеческих клетках, включая лимфоциты, мозг, печень, простату, сердце, и

фибробласты, независимо от активности теломеразы [199], что указывает на вовлеченность данного белка в другие клеточные процессы, отличные от системы теломеры-теломераза. Предпринимаются попытки описать функционирование сплайс-вариантов hTERT при различных физиологических и патологических процессах [413]. Результаты наших исследований согласуются с результатами, полученными K. Masutomi и соавт. [414], в которых показано, что инактивация hTERT вызывает ингибирование пролиферации клеток.

На основании наших результатов и данных др. авторов [172,176,179,180] можно предположить, что активная форма hTERT может модулировать пролиферацию лимфоцитов теломер-независимым образом. Это предположение подтверждает тот факт, что клетки с ингибированной теломеразой не формировали дискретные пики популяции в диаграммах проточной цитометрии, которые наблюдались в контрольных клетках (рис. 55).

Способность hTERT регулировать экспрессию генов клеточного цикла Mac-2BP, VEGF и циклина D1 показана в нескольких работах [415,416]. Кроме того, масштабные эксперименты по транскриптомному профилированию показали, что экспрессия 284 генов, связанных с дифференцировкой, регуляцией клеточного цикла, метаболизмом и апоптозом, изменяются при индукции hTERT. Подробные механизмы участия hTERT в экспрессии генов ещё предстоит изучить. Было предложено несколько гипотез. Одна из них предполагает, что теломераза может быть вовлечена в эпигенетические модификации структуры хроматина, которые косвенно влияют на экспрессию генов. В поддержку этой гипотезы свидетельствует то, что избыточная экспрессия hTERT активируются и стабилизируют ДНК 5-метилцитозин трансферазой I, а подавление экспрессии hTERT сопровождается изменением структуры хроматина [212]. Другой возможный механизм заключается в том, что теломераза может взаимодействовать с факторами транскрипции

хроматина или модифицирующих факторов, которые непосредственно регулируют определенные факторы транскрипции генов. В подтверждение этой гипотезы показано, что hTERT взаимодействует с NF-κB, p65 и β-катенином и опосредует транскрипционную регуляцию экспрессии целевого гена [417].

Для решения задачи по оценки возможности применения EGPO к пре-мРНК DNase I для ингибирования скорости развития апоптоза, мы трансфицировали $CD4^+$, $CD8^+$ Т-лимфоциты, а также В-лимфоциты и NK-клетки человека синтетическим 36-членным олигонуклеотидом, который был комплементарен сайту взаимодействия с белками SC35 и SRp40. Действие данного EGPO вызывало индукцию укороченного неактивного сплайс-варианта Δ4DNase I и ингибирование нуклеазной активности в лимфоцитах всех типов (рис. 56). Наибольшая активность EGPO наблюдалась в $CD4^+$ Т-лимфоцитах. Олигонуклотиды размера менее 36 оснований не были способны эффективно индуцировать АС DNase I по причине низкой специфичности к её пре-мРНК. В трансфицированных EGPO лимфоцитах наблюдали замедление развития апотоза, который индуцировали антителами к CD95/FAS (рис. 57, 58). Развитие апоптоза в таких клетках сопровождалось увеличением экспрессии общей DNase I. Однако, в контрольных клетках такое увеличение явилось результатом повышения уровня мРНК полноразмерной nDNase I, в то время как в трансфицированных EGPO клетках повышался синтез укороченного сплайс-варианта Δ4DNase I (рис. 56).

Таким образом, искусственно синтезированные EGPO к пре-мРНК hTERT и DNase I возможно применять для индукции АС их мРНК и ингибирования аткивности теломеразы и нуклеазной активности. При дальнейшем изучении такие олигонуклеотиды возможно использовать в качестве терапевтических препаратов с целью модуляции пролиферативных процессов и процессов клеточной гибели.

С целью решения задачи по изучению биологического эффекта индукции АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT клетки $CD4^+$ Т-лимфоциты человека и клетки карциномы кишечника человека CaCo-2 культивировали в течение длительного времени (5 и 28 суток, соответственно) в условиях сверхэкспрессии EndoG после трансфекции плазмидой pEndoG-GFP.

Снижение количества активной формы hTERT при сверхэкспрессии EndoG сопровождалось достоверным уменьшением активности теломеразы. Длительное культивирование трансфицированных клеток приводило к их массированной гибели. Такой результат не согласуется с данными, полученными Listerman I. и соавт. [194]. Авторы показали, что сверхэкспрессия α+β– сплайс-варианта hTERT способна защищать клетки от апоптоза. Вероятнее всего в нашем случае на судьбу клеток оказывают влияние сама про себе сверхэкспрессия EndoG, а не только индуцированный ею сплайсинг мРНК hTERT и ингибирование активности теломеразы. Кроме того, в работе не прослежена динамика укорочения теломер в клетках после трансфекции. Как было отмечено выше, EndoG способна оказывать влияние на теломеры напрямую и снижать пролиферативный потенциал клеток.

Культивирование трансфицированных клеток с повышенной экспрессией EndoG приводило к укорочению их теломер до критических значений и переходу клеток в состояние репликативного старения, что подтверждается увеличением экспрессии и активности β-Gal, а также остановкой клеточного цикла в G0/G1 фазе.

При культивировании $CD4^+$ Т-лимфоцитов в течение 20-24-х суток укорочение теломер сопровождалось снижением экспрессии α+β+ варианта мРНК hTERT (рис. 60) и уменьшением активности теломеразы. Вероятнее всего, на 24-е сутки культивирования длина теломер в трансфицированных pEndoG-GFP клетках снижалась до критических значений и клетки переходили

в состояние репликативного старения. Эти клетки оставались живыми, но теряли способность к дальнейшему делению. Остановка клеточного цикла в G0/G1 фазе и снижение количества клеток в фазе S и G2/M на 16-24-е сутки культивирования (рис. 61) согласуется с неспособностью клеток к делению. Массовая гибель лимфоцитов, наблюдаемая на 24-28 сутки культивирования, вероятно, вызвана развитием апоптотических процессов в стареющих клетках. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой pGFP, также наблюдали укорочение длины теломер при делении клеток. Эти данные согласуются с ограниченным репликативным потенциалом Т-лимфоцитов. Как отмечено выше, в условиях *in vitro* при стимуляции пролиферации клеток IL-2 и антителами к CD3 и CD28 активность теломеразы значительно возрастала [398], однако, её активность была недостаточной для неограниченной пролиферации Т клеток [418]. В нашем случае экспоненциальный рост клеток, трансфицированных pEndoG-GFP продолжался до 20-х суток культивирования, за которое происходило около 20 удвоений популяции. Этого количества делений явно недостаточно для столь быстрого укорочения теломер.

Резкое укорочение длины теломер в клетках, трансфицированных pEndoG-GFP, можно также объяснить деградацией теломер самой EndoG или другими эндонуклеазами при их активации. Это наилучшим образом объясняет быстрое укорочение теломер, поскольку известно, что эндонуклеазы способны деградировать G-квадруплексные структуры, формируемые теломерами [419–421]. Кроме того, ранее мы показали, что сверхэкспрессия EndoG приводит к активации других эндонуклеаз [399]. Несомненно, непосредственное влияние EndoG на динамику теломер требует дальнейшего изучения. За 28 суток культивирования длина теломер в $CD4^+$ Т-лимфоцитах сократилась до около 2000 п.н. Наиболее вероятно, что гибель $CD4^+$ Т клеток была вызвана именно укорочением теломер до этих значений.

В клетках линии CaCo-2 также наблюдалось быстрое укорочение теломер при культивации в условия ингибирования теломеразы (более чем в 6 раз в первые два дня после трансфекции) (рис. 63 – 65). Кроме вышеописанных причин, мы связываем это с индивидуальной особенностью клеток линии CaCo-2, поскольку данные клетки пролиферируют быстро и за сутки способны удваивать популяцию около трех раз.

Следует подчеркнуть, что при сверхэкспрессии других апоптотических эндонуклеаз с широкой специфичностью ДНКазы 1 и ДНКазы X происходила полная гибель и $CD4^+$ Т клеток уже через 48 ч после трансфекции, при этом не изменялась экспрессия сплайс-вариантов мРНК hTERT (рис. 62). Эти данные подтверждают участие именно EndoG в индукции АС пре-мРНК hTERT.

С целью решения задачи по изучению биологического эффекта индукции АС пре-мРНК DNase I мы индуцировали экспрессию сплайс-варианта Δ4DNase I в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека и инкубировали их с блеомицином для активации процесса апоптоза и деградации ДНК). Результаты эксперимента указывают на то, что EndoG может модулировать АС пре-мРНК DNase I и снижать нуклеазную активность ДНКазы 1 на ранних стадиях апоптоза (детектирована по количеству аннексин V-положительных клеток), но не на поздних стадиях, характеризующихся фрагментацией ДНК (детектирована по количеству пропидий-йодид-положительных клеток) [63]. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что АС пре-мРНК DNase I увеличивает продолжительность ранней стадии апоптоза и тормозит его прогрессирование Такой вывод подтверждается результатами работы [351], в которой показано, что EndoG индуцируется DNase I и обнаруживается в ядрах мёртвых клеток [351]. Установлено, что DNase I и EndoG действуют совместно, деградируя ДНК на поздних стадиях апоптоза [423]. Полученные нами данные, напротив, свидетельствует о разнонаправленном действии данных эндонуклеаз: EndoG играет роль

защитного механизма, ингибируя нуклеазную активность ДНКазы 1. По-видимому, тот факт, что EndoG способна угнетать нуклеазную активность, объясняет её локализацию в ядре при апоптозе клеток. EndoG действует с самого начала стадии фрагментации ДНК (необратимой стадии гибели клеток), но её функция регуляции АС пре-мРНК DNase I проявляется в более ранние периоды времени. Это представляет интересную схему механизмов гибели клеток, в которой деградирующий ДНК и убивающий клетки фермент EndoG, способен замедлять деградацию ДНК и тормозить развитие апоптоза, когда данный процесс заходит “слишком далеко”, развивается “слишком быстро” или инициируется “слишком рано”.

Таким образом, в настоящей работе показана механистическая связь EndoG и ДНКазы 1, ответственной за регуляцию клеточной гибели на поздних стадиях апоптоза. Хотя многие детали регуляции АС пре-мРНК DNase I эндонуклеазой EndoG остаются неизвестными, в более широкой перспективе представляется важным, что активность апоптотических эндонуклеаз регулируется путём АС, что в дополнение к множеству других факторов, обеспечивает ещё большую гибкость клеточного ответа на повреждения ДНК. В свете наших данных активация апоптотической эндонуклеазы EndoG может быть защитным механизмом от гибели клеток.

С целью решения задачи по оценки роли индукции EndoG в эффекторных лимфоцитах человека в результате действия регуляторных Т клеток (Трег), $CD4^+CD25^-$, $CD8^+$ Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK-клетки человека или мыши культивировали с аутологичными $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Трег через полупроницаемую мембрану в течение длительного времени (до 60-ти суток). Использование такой мембраны позволяет клеткам обмениваться растворенными веществами, но препятствует контактному взаимодействию.

Регуляторные Т-клетки (Трег) $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ играют важную роль в поддержании адаптивного иммунного ответа и

иммунологической толерантности, подавляя активность эффекторных Т- и В-лимфоцитов и NK-клеток человека [388,424]. Трег регулируют продолжительность и силу иммунного ответа. Нарушение регуляторной функции Трег является одной из причин развития и прогрессирования аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз, системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит и др.), аллергических реакций и хронических воспалительных процессов.

По современным представлениям, Трег способны влиять на эффекторные клетки двумя основными путями: контактным и бесконтактным. Механизмы контакт-зависимой регуляторной активности Трег изучены достаточно подробно. Описано влияние мембранных молекул CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) [304], LAG-3 (lymphocyte activating 3) [303,307] и CD83 [318] на активность эффекторных лимфоцитов и их цитолиз под действием гранзимов А и В и перфорина [292] в результате контактного действия Трег. Было показано, что таким образом Трег мышей [425,426] и человека [292] индуцируют гибель эффекторных клеток по пути апоптоза.

В то же время, механизмы контакт-независимой регуляторной активности Трег изучены недостаточно полно. Последствия контакт-независимого влияния Трег на эффекторные лимфоциты человека не однозначны и, вероятно, являются результатом суммарного действия различных факторов. Предполагают, что секретируемые Трег цитокины TGF-b (transforming growth factor beta), интерлейкин-10 (IL-10) и интерлейкин-35 (IL-35) способны супрессировать эффекторные клетки [276,427–429]. Кроме того, Трег конкурируют за ростовой фактор интерлейкин-2 (IL-2), необходимый для пролиферации Т-клеток, поглощая его из окружающей среды и снижая его доступность для других клеток [275]. Лишённые IL-2 эффекторные лимфоциты погибают по пути апоптоза [275] или становятся

нечувствительными к активации или стимуляции [430]. Трег могут агрегировать с дендритными клетками по leukocyte functional antigen-1 (LFA-1) – зависимому пути и индуцировать противовоспалительные механизмы [431].

Интересно, что Трег способны индуцировать старение Т-клеток *in vitro* и *in vivo*, которое связано с селективной модуляцией сигналов p38 и ERK1/2 и регуляторных молекул клеточного цикла p53, p21 и p16 [393]. Важным открытием явился тот факт, что лимфоциты могут подвергаться ограниченному числу делений [432], после чего у них развивается фенотип стареющих клеток. Стареющие клетки остаются живыми и метаболически активны, но не способны к пролиферации. Старение является наиболее распространённым следствием потери теломер и активности теломеразы в пролиферирующих клетках. В этом случае принято употреблять термин «репликативное старение», который используется для описания ограниченного репликативного потенциала клеток [433].

Теломер-зависимое старение претерпевают лимфоциты, подвергшиеся непрерывной антигенной стимуляции, клональной экспансии и потерявшие теломеры из-за многочисленных циклов деления. Было показано, что антиген-стимулированные лимфоциты человека и мыши обладают активной теломеразой, функции которой не достаточно для неограниченной пролиферации [434].

Скорость старения иммунных клеток прогрессивно возрастает с возрастом [435] и развитием иммунологических нарушений [436]. Антиген-стимулированные лимфоциты человека обладают достаточно сильным пролиферативным потенциалом и подвергаются 11 – 57 удвоениям популяции, оставаясь живыми в течение 30 – 170 дней [437] *in vitro*. Индукция клеточного старения – механизм, используемый иммунной системой под действием $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Трег [393].

На основании результатов данной работы можно сделать вывод о том, что аутологичные Treг человека и мыши способны подавлять пролиферацию респондерных Т-, В- и NK-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. Данный вывод основан на следующих фактах. Во-первых, Treг были способны индуцировать экспрессию EndoG во всех типах таргетных лимфоцитах (рис. 68). Во-вторых, индукция экспрессии EndoG сопровождалась активацией АС пре-мРНК hTERT и Tert: при этом наблюдались уменьшение синтеза полноразмерного активного α+β+ варианта и увеличение уровня укороченного неактивного α+β− варианта, а также ингибирование активности теломеразы. Супрессия EndoG предотвращала индукцию АС и ингибирование активности теломеразы. В-третьих, длительное совместное культивирование Treг с таргетными лимфоцитами через полупроницаемую мембрану вызывало переход клеток в состояние репликативного старения (детектированы по увеличенному количеству β-Gal), укорочению теломер и развитию апоптотических процессов (рис. 70, 71). Как и в случае сверхэкспресии EndoG при инкубации клеток с цисплатином, мы наблюдали транслокацию EndoG из митохондрий в цитоплазму и ядра, что подтверждает описанный выше механизм действия EndoG при индукции АС пре-мРНК hTERT.

Нами обнаружены большие различия в длинах теломер в лимфоцитах различных типов (рис. 72). Длины теломер играет важную роль в поддержании стабильности генома и регулирует процессы репликации и клеточной гибели. Наши данные согласуются с наблюдением о том, что в клетках без активной теломеразы теломеры укорачиваются на 40–200 п.н. при каждом делении клеток и клетки способны делиться лишь ограниченное количество раз. Укорочение теломер до критических значений вызывает переход клеток в

состояние репликативного старения, при котором клетки остаются метаболически активными, но не способными к делению [438]. Изменение структуры теломер при достижении ими минимальной критической длины приводит к утрате ими защитных функций и запускает в клетке процессы ответа на повреждения ДНК, завершающиеся развитием апоптоза [439]. Наиболее вероятно, что во время длительного культивирования с Трег, теломеры таргетных лимфоцитов достигают критически малой длины и переходят в состояние репликативного старения. Массовая гибель таргетных клеток, наиболее вероятно, связана именно с развитием в них процессов апоптоза.

Как и ожидалось для клеток с ингибированной теломеразой, старение и гибель *in vitro* наблюдались только после сокращения длины теломер, обусловленного пролиферацией. Важно отметить, что начальная длина теломер была связана с длительностью культивирования лимфоцитов при ингибировании теломеразы. Для В-клеток, которые имевших самые длинные теломеры, требовался 21 день пролиферации перед гибелью. $CD8^+$ Т-лимфоциты и NK-клетки, имевшие умеренную длину теломер, погибали через 15-18 дней, а $CD4^+CD25^-$ Т клетки, с самыми короткими теломерами, через 12 дней пролиферации.

Для подтверждения результатов экспериментов *in vitro*, мы размножали таргетные GFP-положительные Т-, В- и НК-лимфоциты *ex vivo* и вводили их и Трег клетки мышам. Через 4 и 21 день (данные временные периоды были выбраны на основе результатов, полученных *in vitro*) из крови животных отбирали эффекторные лимфоциты. В данных клетках была обнаружена индукция экспрессии EndoG, АС пре-мРНК Tert, ингибирование теломеразы, укороченные теломеры и признаки перехода клеток в состояние репликативного старения (рис. 73, 74). Следует отметить, что количество GFP-положительных лимфоцитов в периферической крови мышей, получавших

Трег, было значительно ниже, чем у контрольной группы. Эти данные соответствуют результатам индуцируемой Трег гибели лимфоцитов, полученным *in vitro*.

Несмотря на то, что растворимый фактор, продуцируемый Трег клетками и вызывающий увеличение экспрессии EndoG в таргетных лимфоцитах не идентифицирован, наши результаты демонстрируют, что пролиферация Т-, В- и NK-лимфоцитов может быть остановлена в результате постоянного контакт-независимого воздействия Трег клеток. Результаты данной работы дают основания полагать, что регуляция иммунного ответа может осуществляться в результате Трег-зависимого репликативного старения Т-, В- и NK-клеток.

6. 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 [137]. Анализ литературы не выявил какого-либо экспериментального подтверждения природного существования переключающих сплайсинг олигонуклеотногидов. 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 АС пре-мРНК DNase I приводила к делеции экзона 4 и синтезу варианта белка, не обладающего нуклеазной активностью. В клетках с повышенным синтезом данного варианта наблюдалось замедление темпов развития апоптоза. Такие клетки были более устойчивы к действию повреждающего ДНК агента блеомицина.

Индукция АС 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 АС 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 АС 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 свежевыделенных лимфоцитах человека, мыши и

крысы, а также способностью цисплатина индуцировать EndoG и АС при его внутривенном введении мышам и крысам. Кроме того, было показано, что аутологичные регуляторные Т клетки (Трег) мыши способны индуцировать EndoG и АС 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 АС пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы и активности теломеразы в модуляцию иммунного ответа

Таким образом, результаты настоящей работы указывают на способность EndoG регулировать функционирование различных белков, модулировать клеточные процессы, в которые они вовлечены и, как следствие, определять «судьбы» клеток различных организмов.

7. 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 активность ферментов.

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 ДНКазы 1 и замедляет развитие апоптоза.

7. Индуцированный EndoG АС пре-мРНК hTERT является одним из механизмов подавления пролиферации эффекторных лимфоцитов регуляторными Т клетками.

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berget S.M., Moore C., Sharp P.A. Spliced segments at the 5’ terminus of adenovirus 2 late mRNA. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1977. V. 74. P. 3171–3175.
2. Chow L.T., Gelinas R.E., Broker T.R., Roberts R.J. An amazing sequence arrangement at the 5’ ends of adenovirus 2 messenger RNA. // Cell. 1977. V. 12. P. 1–8.
3. Gilbert W. Why genes in pieces? // Nature. 1978. V. 271. P. 501.
4. Tian N., Li J., Shi J., Sui G. From General Aberrant Alternative Splicing in Cancers and Its Therapeutic Application to the Discovery of an Oncogenic DMTF1 Isoform. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 191.
5. Irimia M., Penny D., Roy S.W. Coevolution of genomic intron number and splice sites. // Trends Genet. 2007. V. 23. P. 321–325.
6. Fu G., Condon K.C., Epton M.J., Gong P., Jin L, Condon G.C., Morrison N.I., Dafa’alla T.H., Alphey L. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. // Nat. Biotechnol. 2007. V.25. P. 353–357.
7. Hurt K.J., Sezen S.F., Champion H.C., Crone J.K. et al. Alternatively spliced neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. V. 103. P. 3440–3443.
8. Shi Y. The Spliceosome: A Protein-Directed Metalloribozyme. // J. Mol. Biol. 2017. V. 429. P. 2640–2653.
9. Jin Y., Yang Y., Zhang P. New insights into RNA secondary structure in the alternative splicing of pre-mRNAs. // RNA Biol. 2011. V. 8. P. 450–457.
10. Alló M., Buggiano V., Fededa J.P., Petrillo E. et al. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. P. 717–724.
11. Baralle F.E., Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. V. 18. P. 437–451.
12. Stamm S. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. // Hum. Mol. Genet. 2002. V. 11. P. 2409–2416.
13. Vařecha M., Potěšilová M., Matula P., Kozubek M. Endonuclease G interacts with histone H2B and DNA topoisomerase II alpha during apoptosis. // Mol. Cell. Biochem. 2012. V. 363. P. 301–307.
14. Ruiz-Carrillo A., Renaud J. Endonuclease G: a (dG)n X (dC)n-specific DNase from higher eukaryotes. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 401–407.
15. Ozata D.M., Gainetdinov I., Zoch A., O’Carroll D., Zamore P.D. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. // Nat. Rev. Genet. 2019. V. 20. P. 89–108.

16. Galloway A., Cowling V.H. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. // Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech. 2019. V. 1862. P. 270–279.
17. Lee Y., Rio D.C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. // Annu. Rev. Biochem. 2015.V. 84. P. 291–323.
18. Pratt A.J., MacRae I.J. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 17897–17901.
19. Wang E.T., Sandberg R., Luo S., Khrebtukova I., Zhang L., Mayr C., Kingsmore S.F., Schroth G.P., Burge C.B. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. // Nature. 2008.V. 456. P. 470–476.
20. Pan Q., Shai O., Lee L.J., Frey B.J., Blencowe B.J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. // Nat. Genet. 2008. V. 40. P.1413–1415.
21. Blencowe B.J. Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses. // Cell. 2006. V. 126. P. 37–47.
22. Cieply B., Carstens R.P. Functional roles of alternative splicing factors in human disease // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2015. V. 6. P. 311–326.
23. Miriami E., Sperling R., Sperling J., Motro U. Regulation of splicing: The importance of being translatable // RNA. 2004. V. 10. P. 1.
24. Kelemen O., Convertini P., Zhang Z., Wen Y., Shen M., Falaleeva M., Stamm S. Function of alternative splicing // Gene. 2013. V. 514. P. 1–30.
25. Kannan R., Helston R.M., Dannebaum R.O., Baumann P. Diverse mechanisms for spliceosome-mediated 3′ end processing of telomerase RNA // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 6104.
26. Verma B., Akinyi M. V., Norppa A.J., Frilander M.J. Minor spliceosome and disease // Semin. Cell Dev. Biol. 2018. V. 79. P. 103–112.
27. Savisaar R., Hurst L.D. Exonic splice regulation imposes strong selection at synonymous sites // Genome Res. 2018. V. 28. P. 1442–1454.
28. Sohail M., Xie J. Diverse regulation of 3′ splice site usage. // Cell. Mol. Life Sci. 2015. V. 72. P. 4771–4793.
29. Fu X.D. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. // RNA. 1995. V. 1. P. 663–680.
30. Graveley B.R. Sorting out the complexity of SR protein functions. // RNA. 2000. V. 6. P. 1197–1211.
31. Bourgeois C.F., Lejeune F., Stévenin J. Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 2004. V.78. P. 37–88.
32. Zahler A.M., Lane W.S., Stolk J.A., Roth M.B. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. // Genes Dev. 1992. V. 6. P. 837–847.

33. Kohtz J.D., Jamison S.F., Will C.L., Zuo P., Lührmann R., Garcia-Blanco M.A., Manley J.L. Protein–protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. // Nature. 1994. V. 368. P. 119–124.
34. Szymczyna B.R., Bowman J., McCracken S., Pineda-Lucena A., Lu Y., Cox B., Lambermon M., Graveley B.R., Arrowsmith C.H., Blencowe B.J. Structure and function of the PWI motif: a novel nucleic acid-binding domain that facilitates pre-mRNA processing. // Genes Dev. 2003. V. 17. P. 461–475.
35. Tacke R., Manley J.L. The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. // EMBO J. 1995. V. 14. P. 3540–3551.
36. Liu H.X., Zhang M., Krainer A.R. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 1998–2012.
37. Sanford J.R., Coutinho P., Hackett J.A., Wang X., Ranahan W., Caceres J.F. Identification of nuclear and cytoplasmic mRNA targets for the shuttling protein SF2/ASF. // PLoS One. 2008. V.3. e3369.
38. Liu H.X., Chew S.L., Cartegni L., Zhang M.Q., Krainer A.R. Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions. // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. P. 1063–1071.
39. Cavaloc Y., Bourgeois C.F., Kister L., Stévenin J. The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers. // RNA. 1999. V.5. P. 468–483.
40. Schaal T.D., Maniatis T. Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 1705–1719.
41. Lou H., Neugebauer K.M., Gagel R.F., Berget S.M. Regulation of alternative polyadenylation by U1 snRNPs and SRp20. // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 4977–4985.
42. Exline C.M., Feng Z., Stoltzfus C.M. Negative and positive mRNA splicing elements act competitively to regulate human immunodeficiency virus type 1 vif gene expression. // J. Virol. 2008. V. 82. P. 3921–3931.
43. Tacke R., Chen Y., Manley J.L. Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997. V. 94. P. 1148–1153.
44. Shi H., Hoffman B.E., Lis J.T. A specific RNA hairpin loop structure binds the RNA recognition motifs of the Drosophila SR protein B52. // Mol. Cell. Biol. 1997. V. 17. P. 2649–2657.

45. Lynch K.W., Maniatis T. Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the Drosophila doublesex splicing enhancer. // Genes Dev. 1996. V. 10. P. 2089–2101.
46. Kennedy C.F., Krämer A., Berget S.M. A role for SRp54 during intron bridging of small introns with pyrimidine tracts upstream of the branch point. // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 5425–5434.
47. Tian H., Kole R. Strong RNA splicing enhancers identified by a modified method of cycled selection interact with SR protein. // J. Biol. Chem. 2001. V.276. P. 33833–33839.
48. Simard M.J., Chabot B. SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization. // Mol. Cell. Biol. 2002. V. 22. P. 4001–4010.
49. Tacke R., Tohyama M., Ogawa S., Manley J.L. Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing. // Cell. 1998. V. 93. P. 139–148.
50. Eldridge A.G., Li Y., Sharp P.A., Blencowe B.J. The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999. V. 96. P. 6125–6130.
51. Ibrahim E.C., Schaal T.D., Hertel K.J., Reed R., ManiatisT. Serine/arginine-rich protein-dependent suppression of exon skipping by exonic splicing enhancers. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. V. 102. P. 5002–5007.
52. Graveley B.R., Hertel K.J., Maniatis T. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. // RNA. 2001. V. 7. P. 806–818.
53. Zhu J., Mayeda A., Krainer A.R. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. // Mol. Cell. 2001. V. 8. P. 1351–1361.
54. Birney E., Kumar S., Krainer A.R. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 5803–5816.
55. Smith C.W.J., Valcárcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. // Trends Biochem. Sci. 2000. V. 25. P. 381–388.
56. Nilsen T.W. RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. // Cell. 1994. V. 78. P. 1–4.
57. Burset M., Seledtsov I.A., Solovyev V.V. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 4364–4375.
58. Tarn W.Y., Steitz J.A. Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. P. 132–137.

59. Parada G.E., Munita R., Cerda C.A., Gysling K. A comprehensive survey of non-canonical splice sites in the human transcriptome. // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. 10564–10578.
60. Hiller M., Zhang Z., Backofen R., Stamm S. Pre-mRNA Secondary Structures Influence Exon Recognition. // PLoS Genet. 2007. V.3. P. e204.
61. Singh N.N., Singh R.N., Androphy E.J. Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. P. 371–389.
62. Warf M.B., Diegel J. V., von Hippel P.H., Berglund J.A. The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. V.106. P. 9203–9208.
63. Bratt E., Ohman M., Coordination of editing and splicing of glutamate receptor pre-mRNA. // RNA. 2003. V.9. P. 309–318.
64. Muh S.J., Hovhannisyan R.H., Carstens R.P. A Non-sequence-specific double-stranded RNA structural element regulates splicing of two mutually exclusive exons of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2). // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 50143–501454.
65. Yang Y., Zhan L., Zhang W., Sun F., Wang W., Tian N., Bi J., Wang H., Shi D., Jiang Y., Zhang Y., Jin Y. RNA secondary structure in mutually exclusive splicing. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. V. 18. P. 159–168.
66. Dube D.K., Mclean M.D., Dube S., Poiesz B.J. Translational Control of Tropomyosin Expression in Vertebrate Hearts. // Anat. Rec. 2014. V. 297. P. 1585–1595.
67. Miriami E., Margalit H. R. Sperling, Conserved sequence elements associated with exon skipping. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 1974–1983.
68. White E.S., Muro A.F. Fibronectin splice variants: Understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. // IUBMB Life. 2011. V. 63. P. 538–546.
69. Yano M., Hayakawa-Yano Y., Mele A., Darnell R.B. Nova2 regulates neuronal migration through an RNA switch in disabled-1 signaling. // Neuron. 2010. V. 66. P. 848–858.
70. Gao C., Ren S., Lee J.-H., Qiu J., et al. RBFox1-mediated RNA splicing regulates cardiac hypertrophy and heart failure. // J. Clin. Invest. 2016. V. 126. P. 195–206.
71. Li S., Guo W., Dewey C.N., Greaser M.L. Rbm20 regulates titin alternative splicing as a splicing repressor. // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. P. 2659–2672.
72. Faversani A., Vaira V., Moro G.P., Tosi D., Lopergolo A., Schultz D.C., Rivadeneira D., Altieri D.C., Bosari S., Survivin family proteins as novel

molecular determinants of doxorubicin resistance in organotypic human breast tumors // Breast Cancer Res. 2014. V. 16. P. R55.
73. Waligórska-Stachura J., Andrusiewicz M., Sawicka-Gutaj N., Kubiczak M., Jankowska A., Liebert W., Czarnywojtek A., Waśko R., Blanco-Gangoo A.R., Ruchała M. Evaluation of survivin splice variants in pituitary tumors. // Pituitary. 2015. V. 18. P. 410–416.
74. Paronetto M.P., Bernardis I., Volpe E., Bechara E., Sebestyén E., Eyras E., Valcárcel J. Regulation of FAS exon definition and apoptosis by the Ewing sarcoma protein. // Cell Rep. 2014. V.7. P. 1211–1226.
75. Izquierdo J.M., Majós N., Bonnal S., Martínez C., Castelo R., Guigó R., Bilbao D., Valcárcel J. Regulation of Fas Alternative Splicing by Antagonistic Effects of TIA-1 and PTB on Exon Definition. // Mol. Cell. 2005. V. 19. P. 475–484.
76. Waligórska-Stachura J., Andrusiewicz M., Sawicka-Gutaj N., Kubiczak M., Jankowska A., Liebert W., Czarnywojtek A., Waśko R., Blanco-Gangoo A.R., Ruchała M. Evaluation of survivin splice variants in pituitary tumors. // Pituitary. 2015. V. 18. P. 410–416.
77. Hirschfeld M., Ouyang Y.Q., Jaeger M., Erbes T., Orlowska-Volk M., zur Hausen A., Stickeler E. HNRNP G and HTRA2-BETA1 regulate estrogen receptor alpha expression with potential impact on endometrial cancer // BMC Cancer. 2015. V. 15. P. 86.
78. Frühwald J., Camacho Londoño J., Dembla S., Mannebach S., Lis A., Drews A., Wissenbach U., Oberwinkler J., Philipp S.E. Alternative Splicing of a Protein Domain Indispensable for Function of Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) Ion Channels. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 36663–36672.
79. Zhao L., Hu B., Zhang Y., Song Y. et al. An activation-induced IL-15 isoform is a natural antagonist for IL-15 function. // Sci. Rep. 2016.V. 6. P. 25822.
80. Kim S., An S.S.A. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. // Medicine (Baltimore). 2016. V. 95. e3993.
81. Julien P., Miñana B., Baeza-Centurion P., Valcárcel J., Lehner B. The complete local genotype–phenotype landscape for the alternative splicing of a human exon. // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11558.
82. Hughes M.A., Powley I.R., Jukes-Jones R., Horn S., Feoktistova M., Fairall L., Schwabe J.W.R., Leverkus M., Cain K., MacFarlane M. Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. // Mol. Cell. 2016. V. 61. P. 834–849.
83. Shkreta L., Toutant J., Durand M., Manley J.L., Chabot B. SRSF10 Connects DNA Damage to the Alternative Splicing of Transcripts Encoding Apoptosis,

Cell-Cycle Control, and DNA Repair Factors // Cell Rep. 2016.V. 17. P. 1990–2003.
84. Zhang H., Lin Y., Manas A., Zhao Y., Denning M.F., Ma L., Xiang J. Bax 2 Promotes Apoptosis through Caspase-8 Activation in Microsatellite-Unstable Colon Cancer. // Mol. Cancer Res. 2014. V. 12. P. 1225–1232.
85. Juan W.C., Roca X., Ong S.T. Identification of cis-Acting Elements and Splicing Factors Involved in the Regulation of BIM Pre-mRNA Splicing. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e95210.
86. Miletta M.C., Petkovic V., Eblé A., Flück C.E., Mullis P.-E. Rescue of Isolated GH Deficiency Type II (IGHD II) via Pharmacologic Modulation of GH-1 Splicing. // Endocrinology. 2016. V.157. P. 3972–3982.
87. Relizani K., Goyenvalle A. The Use of Antisense Oligonucleotides for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. // in: Methods Mol. Biol. 2018. P. 171–183.
88. Piekiełko-Witkowska A., Nauman A. Alternative splicing and its role in pathologies of the endocrine system. // Endokrynol. Pol. 2011. V. 62. P. 160–170.
89. Lisowiec J., Magner D., Kierzek E., Lenartowicz E., Kierzek R. Structural determinants for alternative splicing regulation of the MAPT pre-mRNA. // RNA Biol. 2015. V. 12. P. 330–342.
90. Arrisi-Mercado P., Romano M., Muro A.F., Baralle F.E. An Exonic Splicing Enhancer Offsets the Atypical GU-rich 3′ Splice Site of Human Apolipoprotein A-II Exon 3. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 39331–39339.
91. Van Alstyne M., Simon C.M., Sardi S.P., Shihabuddin L.S., Mentis G.Z., Pellizzoni L. Dysregulation of Mdm2 and Mdm4 alternative splicing underlies motor neuron death in spinal muscular atrophy. // Genes Dev. 2018. V. 32. P. 1045–1059.
92 Wickramasinghe V.O., Gonzàlez-Porta M., Perera D., Bartolozzi A.R., Sibley C.R., Hallegger M., Ule J., Marioni J.C., Venkitaraman A.R. Regulation of constitutive and alternative mRNA splicing across the human transcriptome by PRPF8 is determined by 5′ splice site strength. // Genome Biol. 2015. V. 16. P. 201.
93. Choi J., Dixon D.M., Dansithong W., Abdallah W.F., Roos K.P., Jordan M.C., Trac B., Lee H.S., Comai L., Reddy S. Muscleblind-like 3 deficit results in a spectrum of age-associated pathologies observed in myotonic dystrophy. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 30999.
94. Augello M.A., Berman-Booty L.D., Carr R., Yoshida A. et al. Consequence of the tumor-associated conversion to cyclin D1b. // EMBO Mol. Med. 2015. V. 7. P. 628–647.

95. Wang L., Duke L., Zhang P.S., Arlinghaus R.B., Symmans W.F., Sahin A., Mendez R., Le Dai J. Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. // Cancer Res. 2003.V. 63. P. 4724–4730.
96. Nasomyon T., Samphao S., Sangkhathat S., Mahattanobon S., Graidist P. Correlation of Wilms' tumor 1 isoforms with HER2 and ER-α and its oncogenic role in breast cancer. // Anticancer Res. 2014. V.34. P. 1333–1342.
97. Yae T., Tsuchihashi K., Ishimoto T., Motohara T. et al. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. // Nat. Commun. 2012. V.3. P. 883.
98. Todaro M., Gaggianesi M., Catalano V., Benfante A. et al. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. P. 342–356.
99. Takino T., Nakada M., Miyamori H., Yamashita J., Yamada K.M., Sato H. CrkI adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma. // Cancer Res. 2003. V. 63. P. 2335–2337.
100. Hatami R., Sieuwerts A.M., Izadmehr S., Yao Z. et al. KLF6-SV1 drives breast cancer metastasis and is associated with poor survival. // Sci. Transl. Med. 2013. V. 5. 169ra12.
101. English W.R., Lunt S.J., Fisher M., Lefley D. V., Dhingra M., Lee Y.-C., Bingham K., Hurrell J.E., Lyons S.K., Kanthou C., Tozer G.M. Differential Expression of VEGFA Isoforms Regulates Metastasis and Response to Anti-VEGFA Therapy in Sarcoma. // Cancer Res. 2017. V. 77. P. 2633–2646.
102. Goel H.L., Gritsko T., Pursell B., Chang C., Shultz L.D., Greiner D.L., Norum J.H., Toftgard R., Shaw L.M., Mercurio A.M. Regulated Splicing of the α6 Integrin Cytoplasmic Domain Determines the Fate of Breast Cancer Stem Cells. // Cell Rep. 2014. V. 7. P. 747–761.
103. Fuzio P., Napoli A., Ciampolillo A., Lattarulo S., Pezzolla A., Nuzziello N., Liuni S., Giorgino F., Maiorano E., Perlino E. Clusterin transcript variants expression in thyroid tumor: a potential marker of malignancy? // BMC Cancer. 2015. V. 15. P. 349.
104. Guan F.H.X., Bailey C.G., Metierre C., O'Young P., Gao D., Khoo T.L., Holst J., Rasko J.E.J. The antiproliferative ELF2 isoform, ELF2B, induces apoptosis in vitro and perturbs early lymphocytic development in vivo. // J. Hematol. Oncol. 2017. V. 10. P. 75.
105. Yang Y., Hu W., Feng S., Ma J., Wu M. RIP3 beta and RIP3 gamma, two novel splice variants of receptor-interacting protein 3 (RIP3), downregulate RIP3-induced apoptosis. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 332. P.181–187.

106. Anufrieva K.S., Shender V.O., Arapidi G.P., Pavlyukov M.S., Shakhparonov M.I., Shnaider P.V., Butenko I.O., Lagarkova M.A., Govorun V.M. Therapy-induced stress response is associated with downregulation of pre-mRNA splicing in cancer cells. // Genome Med. 2018. V.10. P. 49.
107. Antonarakis E.S., Lu C., Luber B., Wang H. et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. // J. Clin. Oncol. 2017.V. 35. P. 2149–2156.
108. Vegran F., Mary R., Gibeaud A., Mirjolet C., Collin B., Oudot A., Charon-Barra C., Arnould L., Lizard-Nacol S., Boidot R. Survivin-3B Potentiates Immune Escape in Cancer but Also Inhibits the Toxicity of Cancer Chemotherapy. // Cancer Res. 2013. V. 73. P. 5391–5401.
109. Wang Y., Bernhardy A.J., Cruz C., Krais J.J. et al. The BRCA1- 11q Alternative Splice Isoform Bypasses Germline Mutations and Promotes Therapeutic Resistance to PARP Inhibition and Cisplatin. // Cancer Res. 2016. V. 76. P. 2778–2790.
110. Hughes M.A., Powley I.R., Jukes-Jones R., Horn S., Feoktistova M., Fairall L., Schwabe J.W.R., Leverkus M., Cain K., MacFarlane M. Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. // Mol. Cell. 2016. V. 61. P. 834–849.
111. Effenberger K.A., Perriman R.J., Bray W.M., Lokey R.S., Ares M., Jurica M.S. A High-Throughput Splicing Assay Identifies New Classes of Inhibitors of Human and Yeast Spliceosomes. // J. Biomol. Screen.2013. V. 18. P. 1110–1120.
112. Pawellek A., McElroy S., Samatov T., Mitchell L., Woodland A., Ryder U., Gray D., Lührmann R., Lamond A.I. Identification of Small Molecule Inhibitors of Pre-mRNA Splicing. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 34683–34698.
113. O'Brien K., Matlin A.J., Lowell A.M., Moore M.J., The Biflavonoid Isoginkgetin Is a General Inhibitor of Pre-mRNA Splicing. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 33147–33154.
114. Younis I., Berg M., Kaida D., Dittmar K., Wang C., Dreyfuss G. Rapid-response splicing reporter screens identify differential regulators of constitutive and alternative splicing. // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. P. 1718–1728.
115. Effenberger K.A., Urabe V.K., Jurica M.S. Modulating splicing with small molecular inhibitors of the spliceosome. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2017. V. 8. e1381.

116. Naryshkin N.A., Weetall M., Dakka A., Narasimhan J. et al. Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. // Science. 2014. V. 345. P. 688–693.
117. Wang J., Schultz P.G., Johnson K.A. Mechanistic studies of a small-molecule modulator of SMN2 splicing. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2018. V. 115. P. E4604–E4612.
118. Zhang J., Harvey S.E., Cheng C. A high-throughput screen identifies small molecule modulators of alternative splicing by targeting RNA G-quadruplexes. // Nucleic Acids Res. 2019. V.47. P. 3667–3679.
119. Tang J.-Y., Chang H.-W., Chang J.-G. Modulating roles of amiloride in irradiation-induced antiproliferative effects in glioblastoma multiforme cells involving Akt phosphorylation and the alternative splicing of apoptotic genes. // DNA Cell Biol. 2013. V. 32. P. 504–510.
120. Zhang X., Castanotto D., Nam S., Horne D., Stein C. 6BIO Enhances Oligonucleotide Activity in Cells: A Potential Combinatorial Anti-androgen Receptor Therapy in Prostate Cancer Cells. // Mol. Ther. 2017. V.25 P. 79–91.
121. Khan M., Gibbons J.L., Ferrajoli A. Spotlight on ibrutinib and its potential in frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia. // Onco. Targets. Ther. 2017. V. 10. P. 1909–1914.
122. Han T., Goralski M., Gaskill N., Capota E., Kim J., Ting T.C., Xie Y., Williams N.S., Nijhawan D. Anticancer sulfonamides target splicing by inducing RBM39 degradation via recruitment to DCAF15. // Science. 2017. V.356. P. eaal3755.
123. Corrionero A., Minana B., Valcarcel J. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. // Genes Dev. 2011. V. 25. P. 445–459.
124. Hong D.S., Kurzrock R., Naing A., Wheler J.J., Falchook G.S., Schiffman J.S., Faulkner N., Pilat M.J., O'Brien J., LoRusso P. A phase I, open-label, single-arm, dose-escalation study of E7107, a precursor messenger ribonucleic acid (pre-mRNA) splicesome inhibitor administered intravenously on days 1 and 8 every 21 days to patients with solid tumors. // Invest. New Drugs. 2014. V. 32. P. 436–444.
125. Gao Y., Trivedi S., Ferris R.L., Koide K. Regulation of HPV16 E6 and MCL1 by SF3B1 inhibitor in head and neck cancer cells. // Sci. Rep.2014. V. 4. P. 6098.
126. Chung F.F.-L, Tan P.F.T.M., Raja V.J., Tan B.-S. et al. Jerantinine A induces tumor-specific cell death through modulation of splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1). // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 42504.
127. Xargay-Torrent S., López-Guerra M., Rosich L., Montraveta A. et al. The splicing modulator sudemycin induces a specific antitumor response and

cooperates with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. // Oncotarget. 2015. V. 6. P. 22734–22749.
128. Effenberger K.A., Anderson D.D., Bray W.M., Prichard B.E., Ma N., Adams M.S., Ghosh A.K., Jurica M.S. Coherence between cellular responses and in vitro splicing inhibition for the anti-tumor drug pladienolide B and its analogs. // J. Biol. Chem. 2014. V.289. P. 1938–1947.
129. Hasegawa M., Miura T., Kuzuya K., Inoue A. et al. Identification of SAP155 as the Target of GEX1A (Herboxidiene), an Antitumor Natural Product. // ACS Chem. Biol. 2011. V. 6. P. 229–233.
130. Lu G.-Y., Liu S.-T., Huang S.-M., Chang Y.-L., Lin W.-S. Multiple effects of digoxin on subsets of cancer-associated genes through the alternative splicing pathway. // Biochimie. 2014. V. 106. P. 131–139.
131. Pilch B., Allemand E., Facompré M., Bailly C., Riou J.F., Soret J., Tazi J. Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506. // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 6876–6884.
132. Lu G.-Y., Huang S.-M., Liu S.-T., Liu P.-Y., Chou W.-Y., Lin W.-S. Caffeine induces tumor cytotoxicity via the regulation of alternative splicing in subsets of cancer-associated genes. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2014. V.47. P.83–92.
133. Bates D.O., Morris J.C., Oltean S., Donaldson L.F. Pharmacology of Modulators of Alternative Splicing. // Pharmacol. Rev. 2017 V.69. P. 63–79.
134. Rigo F., Seth P.P., Bennett C.F. Antisense oligonucleotide-based therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. // Adv. Exp. Med. Biol. 2014. V. 825. P. 303–352.
135. Takei Y., Kadomatsu K., Yuasa K., Sato W., Muramatsu T. Morpholino antisense oligomer targeting human midkine: Its application for cancer therapy. // Int. J. Cancer. 2005. V. 114. P. 490–497.
136. Eckstein F. Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides. // Nucleic Acid Ther. 2014. V. 24. P.374–387.
137. Havens M.A., Hastings M.L. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 6549–6563.
138. Geary R.S. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2009. V. 5. P. 381–391.
139. Pires V.B., Simões R., Mamchaoui K., Carvalho C., Carmo-Fonseca M., Short (16-mer) locked nucleic acid splice-switching oligonucleotides restore dystrophin production in Duchenne Muscular Dystrophy myotubes. // PLoS One. 2017. V. 12. e0181065.
140. Kralovicova J., Moreno P.M.D., Cross N.C.P., Pêgo A.P., Vorechovsky I. Antisense Oligonucleotides Modulating Activation of a Nonsense-Mediated

RNA Decay Switch Exon in the ATM Gene. // Nucleic Acid Ther. 2016. V. 26. P. 392–400.
141. Wan J., Sazani P., Kole R. Modification of HER2 pre-mRNA alternative splicing and its effects on breast cancer cells. // Int. J. Cancer. 2009. V. 124. P. 772–777.
142. Smith L.D., Leme de Calais F., Raponi M., Mellone M., Buratti E., Blaydes J.P., Baralle D. Novel splice-switching oligonucleotide promotes BRCA1 aberrant splicing and susceptibility to PARP inhibitor action. // Int. J. Cancer. 2017. V. 140. P. 1564–1570.
143. Nielsen T.O., Sorensen S., Dagnæs-Hansen F., Kjems J., Sorensen B.S. Directing HER4 mRNA expression towards the CYT2 isoform by antisense oligonucleotide decreases growth of breast cancer cells in vitro and in vivo //, Br. J. Cancer. 2013. V. 108. P. 2291–2298.
144. Comiskey D.F., Jacob A.G., Singh R.K., Tapia-Santos A.S., Chandler D.S. Splicing factor SRSF1 negatively regulates alternative splicing of MDM2 under damage. // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. P. 4202–4218.
145. Dewaele M., Tabaglio T., Willekens K., Bezzi M. et al. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. // J. Clin. Invest. 2016. V. 126. P. 68–84.
146. Calabretta S., Bielli P., Passacantilli I., Pilozzi E., Fendrich V., Capurso G., Fave G.D., Sette C. Modulation of PKM alternative splicing by PTBP1 promotes gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. // Oncogene. 2016. V. 35 P. 2031–2039.
147. Zammarchi F., de Stanchina E., Bournazou E., Supakorndej T., Martires K., Riedel E., Corben A.D., Bromberg J.F., Cartegni L. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. V. 108. P. 17779–17784.
148. Renshaw J., Orr R.M., Walton M.I., Te Poele R., Williams R.D., Wancewicz E.V., Monia B.P., Workman P., Pritchard-Jones K. Disruption of WT1 gene expression and exon 5 splicing following cytotoxic drug treatment: antisense down-regulation of exon 5 alters target gene expression and inhibits cell survival. // Mol. Cancer Ther. 2004. V. 3. P. 1467–1484.
149. Butte M.J., Lee S.J., Jesneck J., Keir M.E., Haining W.N., Sharpe A.H. CD28 Costimulation Regulates Genome-Wide Effects on Alternative Splicing. // PLoS One. 2012. V.7. e40032.
150. Ueda H., Howson J.M.M., Esposito L., Heward J. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. // Nature. 2003. V. 423. P. 506–511.

151. Vudattu N.K., Magalhaes I., Hoehn H., Pan D., Maeurer M.J. Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. // Genes Immun. 2009. V. 10. P. 132–140.
152. Wu Z., Jia X., de la Cruz L., Su X.-C. et al. Memory T Cell RNA Rearrangement Programmed by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein hnRNPLL. // Immunity. 2008. V. 29. P. 863–875.
153. Xu Z., Weiss A., Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. // Nat. Immunol. 2002. V. 3. P. 764–771.
154. Moulton V.R., Tsokos G.C. Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2 Regulates the Expression of the ζ Subunit of the Human T Cell Receptor-associated CD3 Complex. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 12490–12496.
155. Chowdhury B., Tsokos C.G., Krishnan S., Robertson J., Fisher C.U., Warke R.G., Warke V.G., Nambiar M.P., Tsokos G.C. Decreased stability and translation of T cell receptor zeta mRNA with an alternatively spliced 3'-untranslated region contribute to zeta chain down-regulation in patients with systemic lupus erythematosus. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 18959–18966.
156. Brignatz C., Paronetto M.P., Opi S., Cappellari M. et al. Alternative Splicing Modulates Autoinhibition and SH3 Accessibility in the Src Kinase Fyn. // Mol. Cell. Biol. 2009. V. 29. P. 6438–6448.
157. Mallory M.J., Jackson J., Weber B., Chi A., Heyd F., Lynch K.W. Signal- and Development-Dependent Alternative Splicing of LEF1 in T Cells Is Controlled by CELF2. // Mol. Cell. Biol. 2011. V. 31. P. 2184–2195.
158. Schwerk C., Schulze-Osthoff K. Regulation of Apoptosis by Alternative Pre-mRNA Splicing. // Mol. Cell. 2005. V. 19. P. 1–13.
159. Simeoni M., Auquier P., Fernandez O., Flachenecker P. et al. Validation of the Multiple Sclerosis International Quality of Life questionnaire. // Mult. Scler. J. 2008. V. 14. P. 219–230.
160. Gregory S.G., Schmidt S., Seth P., Oksenberg J.R. et al. Multiple Sclerosis Genetics Group, Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 1083–1091.
161. Gu M., Kakoulidou M., Giscombe R., Pirskanen R., Lefvert A.K., Klareskog L., Wang X. Identification of CTLA-4 isoforms produced by alternative splicing and their association with myasthenia gravis. // Clin. Immunol. 2008. V. 128. P. 374–381.
162. Boxall S., Stanton T., Hirai K., Ward V. et al. Disease associations and altered immune function in CD45 138G variant carriers. // Hum. Mol. Genet. 2004. V. 13. P. 2377–2384.

163. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. // J. Theor. Biol. 1973. V. 41. P. 181–190.
164. Blackburn E.H., Telomere states and cell fates. // Nature. 2000. V. 408. P. 53–56.
165. Broccoli D., Young J.W., de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995. V. 92. P. 9082–9086.
166. Yi X., Shay J.W., Wright W.E., Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. P. 4818–4825.
167. Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A. Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation. // Biochemistry (Moscow)/ 2010. V. 75. P. 1563–1564.
168. Yi X., Tesmer V.M., Savre-Train I., Shay J.W., Wright W.E. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 3989–3997.
169. Xu D., Gruber A., Björkholm M., Peterson C., Pisa P. Suppression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in differentiated HL-60 cells: regulatory mechanisms. // Br. J. Cancer.1999. V. 80. P. 1156–1161.
170. Wong M.S., Chen L., Foster C., Kainthla R., Shay J.W., Wright W.E. Regulation of telomerase alternative splicing: a target for chemotherapy. // Cell Rep. 2013. V. 3. P. 1028–1035.
171. Egorov E.E., Terekhov S.M., Vishniakova K.S., Karachentsev D.N., E. V. et al. Telomerization as a method of obtaining immortal human cells preserving normal properties. // Ontogenez. 2003. V.34. P. 183–192.
172. Cifuentes-Rojas C., Shippen D.E. Telomerase regulation. // Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 2012. V. 730. P. 20–27.
173. Saretzki G., Petersen S., Petersen I., Kölble K., von Zglinicki T. hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. // Cancer Lett. 2002. V. 176. P. 81–91.
174. Khavinson V.K., Zemchikhina V.N., Trofimova S. V., Malinin V. V. Effects of peptides on proliferative activity of retinal and pigmented epithelial cells. // Bull. Exp. Biol. Med. 2003. V. 135. P. 597–599.
175. Guilleret I., Yan P., Grange F., Braunschweig R., Bosman F.T., Benhattar J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. // Int. J. Cancer. 2002. V. 101. P. 335–341.
176. Renaud S., Loukinov D., Abdullaev Z., Guilleret I., Bosman F.T., Lobanenkov V., Benhattar J. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-

binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. P. 1245–1256.
177. Kyo S., Takakura M., Fujiwara T., Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. // Cancer Sci. 2008. V. 99. P. 1528–1538.
178. Konnikova L., Simeone M.C., Kruger M.M., Kotecki M., Cochran B.H. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 6516–6520.
179. Renaud S., Loukinov D., Bosman F.T., Lobanenkov V., Benhattar J. CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. P. 6850–6860.
180. Wojtyla A., Gladych M., Rubis B. Human telomerase activity regulation. // Mol. Biol. Rep. 2011. V. 38. P. 3339–3349.
181. Jakob S., Altschmied J., Haendeler J. «Shping» different cellular localizations - a potential new player in aging processes. // Aging (Albany. NY). 2009. V.1. P. 664–668.
182. Santos J.H., Meyer J.N., Van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. // Hum. Mol. Genet. 2006. V. 15. P. 1757–1768.
183. Khurts S., Masutomi K., Delgermaa L., Arai K., Oishi N., Mizuno H., Hayashi N., Hahn W.C., Murakami S. Nucleolin interacts with telomerase. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 51508–51515.
184. Gao J., Zhang J., Long Y., Tian Y., Lu X. Expression of Tankyrase 1 in Gastric Cancer and Its Correlation with Telomerase Activity. // Pathol. Oncol. Res. 2011. V. 17. P. 685–690.
185. Sbodio J.I., Lodish H.F., Chi N.-W. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). // Biochem. J.2002. V. 361. P. 451–459.
186. Chiang Y.J., Hsiao S.J., Yver D., Cushman S.W., Tessarollo L., Smith S., Hodes R.J. Tankyrase 1 and Tankyrase 2 Are Essential but Redundant for Mouse Embryonic Development. // PLoS One. 2008. V. 3. e2639.
187. Stefanou N., Papanikolaou V., Furukawa Y., Nakamura Y., Tsezou A. Leptin as a critical regulator of hepatocellular carcinoma development through modulation of human telomerase reverse transcriptase. // BMC Cancer. 2010. V. 10. P. 442.
188. Fajas L., Debril M.B., Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. // J. Mol. Endocrinol. 2001. V. 27. P. 1–9.

189. Parish S.T., Kim S., Sekhon R.K., Wu J.E., Kawakatsu Y., Effros R.B. Adenosine deaminase modulation of telomerase activity and replicative senescence in human CD8 T lymphocytes. // J. Immunol. 2010. V. 184. P. 2847–2854.
190. Arai K., Masutomi K., Khurts S., Kaneko S., Kobayashi K., Murakami S. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity. // J. Biol. Chem. 2002 V. 277. P. 8538–8544.
191. Ohyashiki J.H., Hisatomi H., Nagao K., Honda S., Takaku T., Zhang Y., Sashida G., Ohyashiki K. Quantitative relationship between functionally active telomerase and major telomerase components (hTERT and hTR) in acute leukaemia cells. // Br. J. Cancer. 2005. V. 92. P. 1942–1947.
192. Saebøe-Larssen S., Fossberg E., Gaudernack G. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. // BMC Mol. Biol. 2006. V.7. P. 26.
193. Hrdlicková R., Nehyba J., Bose H.R. Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation. // Mol. Cell. Biol. 2012. V. 32. P. 4283–4296.
194. Listerman I., Sun J., Gazzaniga F.S., Lukas J.L., Blackburn E.H. The major reverse transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits telomerase activity but protects from apoptosis. // Cancer Res. 2013. V. 73. P. 2817–2828.
195. Wick M., Zubov D., Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). // Gene. 1999. V. 232. P. 97–106.
196. Yi X., White D.M., Aisner D.L., Baur J.A., Wright W.E., Shay J.W. An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. // Neoplasia. 2000. V. 2. P. 433–440.
197. Lincz L.F., Mudge L.-M., Scorgie F.E., Sakoff J.A., Hamilton C.S., Seldon M. Quantification of hTERT splice variants in melanoma by SYBR green real-time polymerase chain reaction indicates a negative regulatory role for the beta deletion variant. // Neoplasia. 2008. V. 10. P. 1131–1137.
198. Cerezo A., Kalthoff H., Schuermann M., Schäfer B., Boukamp P. Dual regulation of telomerase activity through c-Myc-dependent inhibition and alternative splicing of hTERT. // J. Cell Sci. 2002. V. 115. P. 1305–1312.
199. Ramakrishnan S., Eppenberger U., Mueller H., Shinkai Y., Narayanan R. Expression profile of the putative catalytic subunit of the telomerase gene. // Cancer Res. 1998. V. 58. P. 622–625.

200. Drummond M.W., Balabanov S., Holyoake T.L., Brummendorf T.H. Concise review: Telomere biology in normal and leukemic hematopoietic stem cells. // Stem Cells. 2007. V.25. P. 1853–1861.
201. Mavrogiannou E., Strati A., Stathopoulou A., Tsaroucha E.G., Kaklamanis L., Lianidou E.S. Real-time RT-PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase splice variants in tumor cell lines and non-small cell lung cancer. // Clin. Chem. 2007. V. 53. P. 53–61.
202. Liu Y., Wu B., Zhong H., Tian X., Fang W. Quantification of alternative splicing variants of human telomerase reverse transcriptase and correlations with telomerase activity in lung cancer. // PLoS One. 2012. V. 7. P. e38868.
203. Lincz L.F., Mudge L.-M., Scorgie F.E., Sakoff J.A., C.S. Hamilton, M. Seldon. Quantification of hTERT splice variants in melanoma by SYBR green real-time polymerase chain reaction indicates a negative regulatory role for the beta deletion variant. // Neoplasia. 2008. V. 10. P. 1131–1137.
204. Rha S.Y., Jeung H.C., Park K.H., Kim J.J., Chung H.C. Changes of telomerase activity by alternative splicing of full-length and beta variants of hTERT in breast cancer patients. // Oncol. Res. 2009. V. 18. P. 213–220.
205. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R. Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development. // Int. J. Cancer. 2001. V. 91. P. 644–649.
206. Fajkus J., Borsky M., Kunická Z., Kovaríková M., Dvoráková D., Hofmanová J., Kozubík A. Changes in telomerase activity, expression and splicing in response to differentiation of normal and carcinoma colon cells. // Anticancer Res. V. 23. (n.d.) P. 1605–1612.
207. Wang Y., Meeker A.K., Kowalski J., Tsai H.-L. et al. Telomere Length Is Related to Alternative Splice Patterns of Telomerase in Thyroid Tumors. // Am. J. Pathol. 2011. V. 179. P. 1415–1424.
208. Barclay J.Y., Morris A.G., Nwokolo C.U. HTERT mRNA partially regulates telomerase activity in gastric adenocarcinoma and adjacent normal gastric mucosa. // Dig. Dis. Sci. 2005. V. 50. P. 1299–1303.
209. Zaffaroni N., Della Porta C., Villa R., Botti C., Buglioni S., Mottolese M., Grazia Daidone M. Transcription and alternative splicing of telomerase reverse transcriptase in benign and malignant breast tumours and in adjacent mammary glandular tissues: implications for telomerase activity. // J. Pathol. 2002. V.198. P. 37–46.
210. Fan Y., Liu Z., Fang X., Ge Z. et al. Differential expression of full-length telomerase reverse transcriptase mRNA and telomerase activity between

normal and malignant renal tissues. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. P. 4331–4337.
211. Palma M., Parker A., Hojjat-Farsangi M., Forster J., Kokhaei P., Hansson L., Österborg A., Mellstedt H. Telomere length and expression of human telomerase reverse transcriptase splice variants in chronic lymphocytic leukemia // Exp. Hematol. 2013. V. 41. P. 615–626.
212. Masutomi K., Possemato R., Wong J.M.Y., Currier J.L., Tothova Z., Manola J.B., Ganesan S., Lansdorp P.M., Collins K., Hahn W.C. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. V. 102. P. 8222–8227.
213. Wright W.E., Piatyszek M.A., Rainey W.E., Byrd W., Shay J.W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. // Dev. Genet. 1996. V. 18. P. 173–179.
214. Härle-Bachor C., Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis inhuman skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996. V. 93. P. 6476–6481.
215. Geserick C., Tejera A., González-Suárez E., Klatt P., Blasco M.A. Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase to transforming growth factor-beta signaling. // Oncogene. 2006. V. 25. P. 4310–4319.
216. Ahmed S., Passos J.F., Birket M.J., Beckmann T., Brings S., Peters H., Birch-Machin M.A., von Zglinicki T., Saretzki G. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. // J. Cell Sci. 2008. V. 121. P. 1046–1053.
217. Rahman R., Latonen L., Wiman K.G. hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. // Oncogene. 2005. V. 24. P. 1320–1327.
218. Wang J.C.Y., Warner J.K., Erdmann N., Lansdorp P.M., Harrington L., Dick J.E. Dissociation of telomerase activity and telomere length maintenance in primitive human hematopoietic cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. V. 102. P. 14398–14403.
219. Brachner A., Sasgary S., Pirker C., Rodgarkia C. et al. Telomerase- and alternative telomere lengthening-independent telomere stabilization in a metastasis-derived human non-small cell lung cancer cell line: effect of ectopic hTERT. // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 3584–3592.
220. Rubio M.A., Davalos A.R., Campisi J. Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress. // Exp. Cell Res. 2004. V. 298. P. 17–27.

221. Blasco M. Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. // Eur. J. Cell Biol. 2003. V. 82. P. 441–446.
222. Yang J., Chang E., Cherry A.M., Bangs C.D., Oei Y., Bodnar A., Bronstein A., Chiu C.P., Herron G.S. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 26141–26148.
223. Dudognon C., Pendino F., Hillion J., Saumet A., Lanotte M., Ségal-Bendirdjian E. Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. // Oncogene. 2004. V. 23. P. 7469–7474.
224. Pirzio L.M., Freulet-Marrière M.-A., Bai Y., Fouladi B., Murnane J.P., Sabatier L., Desmaze C. Human fibroblasts expressing hTERT show remarkable karyotype stability even after exposure to ionizing radiation. // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 104. P. 87–94.
225. Perrault S.D., Hornsby P.J., Betts D.H. Global gene expression response to telomerase in bovine adrenocortical cells. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 335. P. 925–936.
226. Park J.-I., Venteicher A.S., Hong J.Y., Choi J. et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. // Nature. 2009. V. 460. P. 66–72.
227. Maser R.S., DePinho R.A. Keeping telomerase in its place. // Nat. Med. 2002. V. 8. P. 934–936.
228. Santos J.H., Meyer J.N., Skorvaga M., Annab L.A., Van Houten B. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. // Aging Cell. 2004. V.3. P. 399–411.
229. Anderson C.J., Hoare S.F., Ashcroft M., Bilsland A.E., Keith W.N. Hypoxic regulation of telomerase gene expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. // Oncogene. 2006. V. 25. P. 61–69.
230. Xi L., Chen G., Zhou J., Xu G. et al. Inhibition of telomerase enhances apoptosis induced by sodium butyrate via mitochondrial pathway. // Apoptosis. 2006. V. 11. P. 789–798.
231. Del Bufalo D., Rizzo A., Trisciuoglio D., Cardinali G., Torrisi M.R., Zangemeister-Wittke U., Zupi G., Biroccio A. Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. // Cell Death Differ. 2005. V.12. P. 1429–1438.
232. Smith L.L., Coller H.A., Roberts J.M. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. // Nat. Cell Biol. 2003. V. 5. P. 474–479.
233. Hartmann U., Brümmendorf T.H., Balabanov S., Thiede C., Illme T., Schaich M. Telomere length and hTERT expression in patients with acute myeloid

leukemia correlates with chromosomal abnormalities. // Haematologica. 2005. V. 90. P. 307–316.
234. Keyel P.A. Dnases in health and disease. // Dev. Biol. 2017. V. 429. P. 1–11.
235. Napirei M., Ricken A., Eulitz D., Knoop H., Mannherz H.G. Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. // Biochem. J. 2004. V. 380. P. 929–937.
236. Sisirak V., Sally B., D'Agati V., Martinez-Ortiz W. et al. Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. // Cell. 2016. V. 166. P. 88–101.
237. Nishimoto S., Kawane K., Watanabe-Fukunaga R., Fukuyama H. et al. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. // Nature. 2003. V. 424 P. 1071–1074.
238. Lee B.I., Lee D.J., Cho K.J., Kim G.W. Early nuclear translocation of endonuclease G and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. // Neurosci. Lett. 2005. V. 386. P. 23–27.
239. Côté J., Ruiz-Carrillo A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. // Science. 1993. V. 261. P. 765–769.
240. Ikeda S., Kawasaki N. Isolation and characterization of the Schizosaccharomyces pombe cDNA encoding the mitochondrial endonuclease(1). // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1519. P. 111–116.
241. Tiranti V., Rossi E., Ruiz-Carrillo A., Rossi G., Rocchi M., Didonato S., Zuffardi O., Zeviani M. Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and Endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. // Genomics. 1995. V. 25. P. 559–564.
242. Zhou Q., Li H., Li H., Nakagawa A. et al. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. // Science. 2016. V. 353. P. 394–399.
243. McDermott-Roe C., Ye J., Ahmed R., Sun X.-M. et al. Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function // Nature. 2011. V. 478. P. 114–118.
244. Lin J.L.J., Wu C.-C., Yang W.-Z., Yuan H.S. Crystal structure of endonuclease G in complex with DNA reveals how it nonspecifically degrades DNA as a homodimer. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 10480-10490.
245. Uren R.T., Dewson G., Bonzon C., Lithgow T., Newmeyer D.D., Kluck R.M. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 2266–2274.

246. Napirei M., Ricken A., Eulitz D., Knoop H., Mannherz H.G. Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. // Biochem. J. 2004. V. 380. P. 929–937.
247. Shiokawa D., Tanuma S. Characterization of Human DNase I Family Endonucleases and Activation of DNase γ during Apoptosis. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 143–152.
248. Lichtenbelt K.D., Kroos M.A., Sinke R.J., Wokke J.J.H., Reuser A.J.J. M.G.E.M. Ausems, Frequency of the deletion polymorphism of DNASE1L1 in 137 patients with acid maltase deficiency (Pompe disease). // Exp. Mol. Pathol. 2006. V. 80. P. 308–309.
249. Fischer H., Szabo S., Scherz J., Jaeger K. et al. Essential Role of the Keratinocyte-Specific Endonuclease DNase1L2 in the Removal of Nuclear DNA from Hair and Nails. // J. Invest. Dermatol. 2011. V. 131. P. 1208–1215.
250. Errami Y., Naura A.S., Kim H., Ju J. et al. Apoptotic DNA fragmentation may be a cooperative activity between caspase-activated deoxyribonuclease and the poly(ADP-ribose) polymerase-regulated DNAS1L3, an endoplasmic reticulum-localized endonuclease that translocates to the nucleus during apoptosis. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 3460–3468.
251. Rossol M., Pierer M., Arnold S., Keysser G., Burkhardt H., Baerwald C., Wagner U. Homozygosity for DNASE2 single nucleotide polymorphisms in the 5'-regulatory region is associated with rheumatoid arthritis. // Ann. Rheum. Dis. 2009. V. 68. P. 1498–1503.
252. Counis M.-F., Torriglia A. Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. // Biochimie. 2006. V. 88. P. 1851–1858.
253. Torriglia A., Leprêtre C., Padrón-Barthe L., Chahory S., Martin E. Molecular mechanism of L-DNase II activation and function as a molecular switch in apoptosis. // Biochem. Pharmacol. 2008. V. 76. P. 1490–1502.
254. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. // Nature. 1998. V. 391. P. 43–50.
255. Basnakian A.G., Singh A.B., Shah S.V. Identification and expression of deoxyribonuclease (DNase) I alternative transcripts in the rat. // Gene. 2002. V. 289. P. 87–96
256. Cote J., Dupuis S., Jiang Z., Wu J.Y. Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: Identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. V. 98. P. 938–943.
257. Jang H.N., Lee M., Loh T.J., Choi S.-W. et al. Exon 9 skipping of apoptotic caspase-2 pre-mRNA is promoted by SRSF3 through interaction with exon 8. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1839. P. 25–32.

258. Cory S., Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. // Nat. Rev. Cancer. 2002. V. 2. P. 647–656.
259. Oltval Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death. // Cell. 1993. V. 74. P. 609–619.
260. Petros A.M., Olejniczak E.T., Fesik S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 2004. V. 1644. P. 83–94.
261. Wu L., Mao C., Ming X. Modulation of Bcl-x Alternative Splicing Induces Apoptosis of Human Hepatic Stellate Cells. // Biomed Res. Int. 2016. P. 1–7.
262. Droin N.M., Green D.R. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 2004. V. 1644. P. 179–188.
263. Tanaka S., Saito K., Reed J.C. Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 10920–10926.
264. Boise L.H., González-García M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nuñez G., Thompson C.B. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. // Cell. 1993. V. 74. P. 597–608.
265. Bae J., Leo C.P., Hsu S.Y., Hsueh A.J. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 25255–25261.
266. Ko J.-K., Lee M.-J., Cho S.-H., Cho J.-A., Lee B.-Y., Koh J.S., Lee S.-S., Shim Y.-H., Kim C.-W. Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. // Oncogene. 2003. V. 22. P. 2457–2465.
267. Wolter K.G., Hsu Y.-T., Smith C.L., Nechushtan A., Xi X.-G., Youle R.J. Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. // J. Cell Biol. 1997. V. 139. P. 1281–1292.
268. O'Connor L., Strasser A., O'Reilly L.A., Hausmann G., Adams J.M., Cory S., Huang D.C. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 384–395.
269. Nakano K., Vousden K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. // Mol. Cell. 2001. V. 7. P. 683–694.
270. Guo B., Godzik A., Reed J.C. Bcl-G, a Novel Pro-apoptotic Member of the Bcl-2 Family. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 2780–2785.

271. Kataoka T., Holler N., Micheau O., Martinon F., Tinel A., Hofmann K., Tschopp J. Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 19548–19554.
272. Renshaw S.A., Dempsey C.E., Barnes F.A., Bagstaff S.M., Dower S.K., Bingle C.D., Whyte M.K.B. Three novel Bid proteins generated by alternative splicing of the human Bid gene. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 2846–2855.
273. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. // Nat. Immunol. 2005. V. 6. P. 345–352.
274. Oberle N., Eberhardt N., Falk C.S., Krammer P.H., Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. // J. Immunol. 2007. V. 179. P. 3578–3587.
275. Pandiyan P., Zheng L., Ishihara S., Reed J., Lenardo M.J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. // Nat. Immunol. 2007. V. 8. P. 1353–1362.
276. Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S., Vignali D.A.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. // Nature. 2007. V. 450. P. 566–569.
277. Huber S., Schramm C., Lehr H.A., Mann A., Schmitt S., Becker C., Protschka M., Galle P.R., Neurath M.F., Blessing M. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. // J. Immunol. 2004. V. 173. P. 6526–6531.
278. Strauss L., Bergmann C., Szczepanski M., Gooding W., Johnson J.T., Whiteside T.L. A Unique Subset of CD4+CD25highFoxp3+ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- 1 Mediates Suppression in the Tumor Microenvironment. // Clin. Cancer Res. 2007. V. 13. P. 4345–4354.
279. Buelens C., Verhasselt V., De Groote D., Thielemans K., Goldman M., Willems F. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. // Eur. J. Immunol. 1997. V. 27. P. 1848–1852.
280. Buelens C., Willems F., Delvaux A., Piérard G., Delville J.P., Velu T., Goldman M. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. // Eur. J. Immunol. 1995. V. 25. P. 2668–2672.

281. Ding L., Linsley P.S., Huang L.Y., Germain R.N., Shevach E.M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. // J. Immunol. 1993. V. 151. P. 1224–1234.
282. Royer B., Varadaradjalou S., Saas P., Guillosson J.J., Kantelip J.P., Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. // Clin. Exp. Allergy. 2001. V. 31. P. 694–704.
283. Takanaski S., Nonaka R., Xing Z., O'Byrne P., Dolovich J., Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. // J. Exp. Med. 1994. V. 180. P. 711–715.
284. Kingsley C.I., Karim M., Bushell A.R., Wood K.J. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. // J. Immunol. 2002. V. 168. P. 1080–1086.
285. Vieira P.L., Christensen J.R., Minaee S., O'Neill E.J., Barrat F.J., Boonstra A., Barthlott T., Stockinger B., Wraith D.C., O'Garra A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. // J. Immunol. 2004. V. 172. P. 5986–5993.
286. Kryczek I., Wei S., Zou L., Zhu G., Mottram P., Xu H., Chen L., Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 40–44.
287. Fahlén L., Read S., Gorelik L., Hurst S.D., Coffman R.L., Flavell R.A., Powrie F. T cells that cannot respond to TGF-β escape control by CD4 + CD25 + regulatory T cells. // J. Exp. Med. 2005. V. 201. P. 737–746.
288. Marie J.C., Liggitt D., Rudensky A.Y. Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor-β Receptor. // Immunity. 2006. V. 25. P. 441–454.
289. Probst-Kepper M., Geffers R., Kröger A., Viegas N. et al. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. // J. Cell. Mol. Med. 2009. V. 13. P. 3343–3357.
290. Ostroukhova M., Qi Z., Oriss T.B., Dixon-McCarthy B., Ray P., Ray A. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-. // J. Clin. Invest. 2006. V. 116. P. 996–1004.
291. Garin M.I., Chu C.-C., Golshayan D., Cernuda-Morollon E., Wait R., Lechler R.I. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. // Blood. 2007. V. 109. P. 2058–2065.

292. Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P., Ley T.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. // Immunity. 2004. V. 21. P. 589–601.
293. Szymczak-Workman A.L., Delgoffe G.M., Green D.R., Vignali D.A.A. Cutting Edge: Regulatory T Cells Do Not Mediate Suppression via Programmed Cell Death Pathways. // J. Immunol. 2011. V. 187. P. 4416–4420.
294. Sitkovsky M. V., Lukashev D., Apasov S., Kojima H. et al. Physiological Control of Immune Response and Inflammatory Tissue Damage by Hypoxia - Inducible F actors and Adenosine A2A Receptors. // Annu. Rev. Immunol. 2004. V. 22. P. 657–682.
295. Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. // J. Exp. Med. 2007. V. 204. P. 1257–1265.
296. Gavin M.A., Rasmussen J.P., Fontenot J.D., Vasta V., Manganiello V.C., Beavo J.A., Rudensky A.Y. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. // Nature. 2007. V. 445. P. 771–775.
297. Naganuma M., Wiznerowicz E.B., Lappas C.M., Linden J., Worthington M.T., Ernst P.B. Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 2765–2769.
298. Fletcher J.M., Lonergan R., Costelloe L., Kinsella K., Moran B., O'Farrelly C., Tubridy N., Mills K.H.G. CD39+Foxp3+ Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. // J. Immunol. 2009. V. 183. P. 7602–7610.
299. Wilson J.M., Ross W.G., Agbai O.N., Frazier R., Figler R.A., Rieger J., Linden J., Ernst P.B. The A2B Adenosine Receptor Impairs the Maturation and Immunogenicity of Dendritic Cells. // J. Immunol. 2009. V. 182. P. 4616–4623.
300. Sullivan G.W., Rieger J.M., Michael Scheld W., Macdonald T.L., Linden J. Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A 2A receptor agonists. // Br. J. Pharmacol. 2001. V. 132. P. 1017–1026.
301. Kim H.-P., Leonard W.J. CREB/ATF-dependent T cell receptor–induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. // J. Exp. Med. 2007. V. 204. P. 1543–1551.
302. Misra N., Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V., Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. // J. Immunol. 2004. V. 172. P. 4676–4680.

303. Liang B., Workman C., Lee J., Chew C. et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. // J. Immunol. 2008. V. 180. P.5916–5926.
304. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. // Science. 2008. V. 322. P. 271–275.
305. Paust S., Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. // Immunol. Rev. 2005. V. 204. P. 195–207.
306. Okamura T., Fujio K., Shibuya M., Sumitomo S., Shoda H., Sakaguchi S., Yamamoto K. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. V. 106. P. 13974–13979.
307. Camisaschi C., Casati C., Rini F., Perego M., De Filippo A., Triebel F., Parmiani G., Belli F., Rivoltini L., Castelli C. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. // J. Immunol. 2010. V. 184. P. 6545–6551.
308. Pacholczyk R., Ignatowicz H., Kraj P., Ignatowicz L. Origin and T Cell Receptor Diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T Cells. // Immunity. 2006. V. 25 P. 249–259.
309. Föhse L., Suffner J., Suhre K., Wahl B. et al. High TCR diversity ensures optimal function andhomeostasis of Foxp3 + regulatory Tcells. // Eur. J. Immunol. 2011. V. 41. P. 3101–3113.
310. Hu D., Ikizawa K., Lu L., Sanchirico M.E., Shinohara M.L., Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. // Nat. Immunol. 2004. V. 5. P. 516–523.
311. Kim H.-J., Verbinnen B., Tang X., Lu L., Cantor H. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8+ regulatory T cells is essential for self tolerance. // Nature. 2010. V. 467. P. 328–332.
312. Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M., Lipsky P.E. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. // Blood. 2006. V. 108. P. 253–261.
313. Pasare C., Medzhitov R. Toll Pathway-Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells. // Science. 2003. V. 299. P. 1033–1036.
314. Goodman W.A., Levine A.D., Massari J. V., Sugiyama H., McCormick T.S., Cooper K.D. IL-6 Signaling in Psoriasis Prevents Immune Suppression by Regulatory T Cells. // J. Immunol. 2009. V. 183. P. 3170–3176.

315. Betz U.A., Müller W. Regulated expression of gp130 and IL-6 receptor alpha chain in T cell maturation and activation. // Int. Immunol. 1998. V. 10. P. 1175–1184.
316. Smolen J.S., Beaulieu A., Rubbert-Roth A., Ramos-Remus C., Rovensky J., Alecock E., Woodworth T., Alten R. OPTION Investigators, Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. // Lancet. 2008. V. 371. P. 987–997.
317. Scholler N., Hayden-Ledbetter M., Dahlin A., Hellström I., Hellström K.E., Ledbetter J.A. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. // J. Immunol. 2002. V. 168. P. 2599–2602.
318. Reinwald S., Wiethe C., Westendorf A.M., Breloer M., Probst-Kepper M., Fleischer B., Steinkasserer A., Buer J., Hansen W. CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity. // J. Immunol. 2008. V. 180 P. 5890–5897.
319. 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. // Biochem. 2017. V. 82. P. 24–37.
320. Miltenyi S., Müller W., Weichel W., Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. // Cytometry. 1990. V. 11. P. 231–238.
321. Lifshitz G.V., Zhdanov D.D., Lokhonina A. V., Eliseeva D.D., Lyssuck E.Y., Zavalishin I.A., Bykovskaia S.N. Ex vivo expanded regulatory T cells CD4(+)CD25(+)FoxP3(+)CD127(Low) develop strong immunosuppressive activity in patients with remitting-relapsing multiple sclerosis. // Autoimmunity. 2016. P. 1–9.
322. Feng Y., van der Veeken J., Shugay M., Putintseva. E. V. et al. A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. // Nature. 2015. V. 528. P. 132–136.
323. Chan F.K.-M., Moriwaki K., De Rosa M.J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. // Methods Mol. Biol. 2013. V. 979. P. 65–70.
324. Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. // Methods. 2008.V.44. P. 250–254.
325. Basnakian A.G., Apostolov E.O., Yin X., Napirei M., Mannherz H.G., Shah S.V., Cisplatin Nephrotoxicity Is Mediated by Deoxyribonuclease I. // J. Am. Soc. Nephrol. 2005. V. 16. P. 697–702.
326. Baker B.F., Lot S.S., Condon T.P., Cheng-Flournoy S., Lesnik E.A., Sasmor H.M., Bennett C.F. 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA

level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 11994–2000.
327. Quah B.J.C., Parish C.R. The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. // J. Vis. Exp. 2010. V. 44. P. 2259.
328. Sherley J.L., Stadler P.B., Stadler J.S. A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. // Cell Prolif. 1995.V. 28. P. 137–144.
329. Justo R., Alcolea M.P., Colom B., Riera A.N., Gianotti M., García-Palmer F.J. Morphofunctional changes in the mitochondrial subpopulations of conceptus tissues during the placentation process. // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. P. 2199–2209.
330. Laukova M., Alaluf L.G., Serova L.I., Arango V., Sabban E.L. Early intervention with intranasal NPY prevents single prolonged stress-triggered impairments in hypothalamus and ventral hippocampus in male rats. // Endocrinology. 2014. V. 155. P. 3920–3933.
331. Pravdenkova S. V., Basnakian A.G., James S.J., Andersen B.J. DNA fragmentation and nuclear endonuclease activity in rat brain after severe closed head injury. // Brain Res. 1996. V. 729. P. 151–155.
332. Nakama M., Kawakami K., Kajitani T., Urano T., Murakami Y. DNA-RNA hybrid formation mediates RNAi-directed heterochromatin formation. // Genes Cells. 2012. V. 17. P. 218–233.
333. Basnakian A.G., Apostolov E.O., Yin X., Abiri S.O., Stewart A.G., Singh A.B., Shah S.V. Endonuclease G promotes cell death of non-invasive human breast cancer cells. // Exp. Cell Res. 2006. V. 312. P. 4139–4149.
334. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
335. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
336. Hofnagel O., Luechtenborg B., Stolle K., Lorkowski S., Eschert H., Plenz G., Robenek H. Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004. V. 24. P. 1789–1795.
337. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M, Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. // Science. 1994. V. 266. P. 2011–2015.

338. 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. // Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2012. V. 6. P. 48–54.
339. O'Callaghan N.J., Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. // Biol. Proced. Online. 2011. V. 13. P. 3.
340. Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. e47.
341. Cheranova D., Gibson M., Chaudhary S., Zhang L.Q., Heruth D.P., Grigoryev D.N., Qing Ye S. RNA-seq Analysis of Transcriptomes in Thrombin-treated and Control Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells. // J. Vis. Exp. 2013. V. 72. P. 4393.
342. Zhang L.Q., Cheranova D., Gibson M., Ding S., Heruth D.P., Fang D., Ye S.Q. RNA-seq Reveals Novel Transcriptome of Genes and Their Isoforms in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells Treated with Thrombin. // PLoS One. 2012. V. 7. e31229.
343. Heruth D.P., Gibson M., Grigoryev D.N., Zhang L.Q., Ye S.Q., RNA-seq analysis of synovial fibroblasts brings new insights into rheumatoid arthritis. // Cell Biosci. 2012. V. 2. P. 43.
344. Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D.R., Pimentel H., Salzberg S.L., Rinn J.L., Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. // Nat. Protoc. 2012. V.7. P. 562–578.
345. Lopez J.P., Diallo A., Cruceanu C., Fiori L.M. et al. Biomarker discovery: quantification of microRNAs and other small non-coding RNAs using next generation sequencing. // BMC Med. Genomics. 2015. V. 8. P. 35.
346. Apostolov E.O., Ray D., Alobuia W.M., Mikhailova M.V., Wang X., Basnakian A.G., Shah S.V. Endonuclease G mediates endothelial cell death induced by carbamylated LDL. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011. V. 300. P. H1997-2004.
347. Manders E.M., Stap J., Brakenhoff G.J., van Driel R., Aten J.A. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. // J. Cell Sci. 1992. V. 103. Pt. 3. P. 857–62.
348. Vicente R., Mausset-Bonnefont A.-L., Jorgensen C., Louis-Plence P., Brondello J.-M. Cellular senescence impact on immune cell fate and function. // Aging Cell. 2016. V. 15. P. 400–406.
349. Akbar A.N., Vukmanovic-Stejic M. Telomerase in T lymphocytes: use it and lose it? // J. Immunol. 2007. V. 178. P. 6689–6694.

350. Fessler J., Ficjan A., Duftner C., Dejaco C. The Impact of Aging on Regulatory T-Cells. // Front. Immunol. 2013. V.4. P. 231.
351. Yin X., Apostolov E.O., Shah S.V., Wang X., Bogdanov K.V., Buzder T., Stewart A.G., Basnakian A.G. Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice. // J. Am. Soc. Nephrol. 2007. V. 18. P. 2544–2553.
352. Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova E. V., Orlova V.S., Pokrovsky 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. // Biomed. Khim. 2017. V. 63. P. 13–26.
353. Yang W. Portraits of a Y-family DNA polymerase. // FEBS Lett. 2005. V. 579. P. 868–872.
354. Ling H., Sayer J.M., Plosky B.S., Yagi H., Boudsocq F., Woodgate R., Jerina D.M., Yang W. Crystal structure of a benzo[a]pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. V. 101. P. 2265–2269.
355. Mira A., Gimenez E.M., Bolzán A.D., Bianchi M.S., López-Larraza D.M. Effect of Thiol Compounds on Bleomycin-Induced DNA and Chromosome Damage in Human Cells. // Arch. Environ. Occup. Health. 2013. V.68. P. 107–116.
356. Povirk L.F., Finley Austin M.J. Genotoxicity of bleomycin. // Mutat. Res. Genet. Toxicol. 1991. V. 257. P. 127–143.
357. Kuefner M.A., Brand M., Engert C., Schwab S.A., Uder M. Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology. // RöFo Fortschritte Auf Dem Gebiete Der Röntgenstrahlen Und Der Nukl. 2015. V. 187. P. 872–878.
358. Perez R.P., Ozols R.F., Williams S.D., Loehrer P.J. et al. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. // Eur. J. Cancer. 1998. V. 34. P. 1535–1542.
359. McGill M., Pathak S., Hsu T.C. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness. // Chromosoma. 1974. V. 47. P. 157–166.
360. Ikeuchi T. Inhibitory effect of ethidium bromide on mitotic chromosome condensation and its application to high-resolution chromosome banding. // Cytogenet. Cell Genet. 1984. V. 38. P. 56–61.
361. 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. // Biomeditsinskaya Khimiya. 2016. V. 62. P. 239–250.
362. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Oruganti H., Giudice L.C., Hoffman A.R. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. // Int. J. Cancer. 2000. V. 85. P. 330–335.
363. Aravind L., Dixit V.M., Koonin E.V. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. // Trends Biochem. Sci. 1999. V. 24. P. 47–53.
364. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Grishin D.V., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. 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. // Russ. J. Bioorganic Chem. 2018. V. 44. P. 90–103.
365. Bao Q., Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. // Cell Death Differ. 2007. V. 14. P. 56–65.
366. Vakifahmetoglu-Norberg H., Zhivotovsky B. The unpredictable caspase-2: what can it do? // Trends Cell Biol. 2010. V. 20. P. 150–159.
367. Dahal G.R., Karki P., Thapa A., Shahnawaz M., Shin S.Y., Lee J.S., Cho B., Park I.-S. Caspase-2 cleaves DNA fragmentation factor (DFF45)/inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD). // Arch. Biochem. Biophys. 2007. V. 468. P. 134–139.
368. Brad A.M., Hendricks K.E.M., Hansen P.J. The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of caspase-9 activation and caspase-mediated DNA damage. // Reproduction. 2007. V. 134. P. 789–797.
369. Nagata S., H. Nagase, K. Kawane, N. Mukae, H. Fukuyama. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. // Cell Death Differ. 2003. V. 10. P. 108–116.
370. Droin N., Beauchemin M., Solary E., Bertrand R. Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade. // Cancer Res. 2000. V. 60. P. 7039–7047.
371. Parent N., Sané A.-T., Droin N., Bertrand R. Procaspase-2S inhibits procaspase-3 processing and activation, preventing ROCK-1-mediated apoptotic blebbing and body formation in human B lymphoma Namalwa cells. // Apoptosis. 2005. V. 10. P. 313–322.
372. Wotawa A., Solier S., Logette E., Solary E., Corcos L. Differential influence of etoposide on two caspase-2 mRNA isoforms in leukemic cells. // Cancer Lett. 2002. V. 185. P. 181–189.
373. Hatok J., Racay P. Bcl-2 family proteins: master regulators of cell survival. // Biomol. Concepts. 2016. V. 7. P. 259–270.

374. Risberg K., Redalen K.R., Sønstevold L., Bjørnetrø T., Sølvernes J., Ree A.H. Pro-survival responses to the dual inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins and mTOR-mediated signaling in hypoxic colorectal carcinoma cells. // BMC Cancer. 2016. V. 16. P. 531.
375. Shkreta L., Toutant J., Durand M., Manley J.L., Chabot B. SRSF10 Connects DNA Damage to the Alternative Splicing of Transcripts Encoding Apoptosis, Cell-Cycle Control, and DNA Repair Factors. // Cell Rep. 2016. V. 17. P. 1990–2003.
376. Ohsato T., Ishihara N., Muta T., Umeda S., Ikeda S., Mihara K., Hamasaki N., Kang D. Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 5765–5770.
377. Montes M., Becerra S., Sánchez-Álvarez M., Suñé C. Functional coupling of transcription and splicing. // Gene. 2012. V. 501. P. 104–117.
378. Blackburn E.H. Switching and signaling at the telomere. // Cell. 2001. V. 106. P. 661–673.
379. Apostolov E.O., Wang X., Shah S. V., Basnakian A.G. Role of EndoG in development and cell injury. // Cell Death Differ. 2007. V. 14. P. 1971–1974.
380. Khanna A., Stamm S. Regulation of alternative splicing by short non-coding nuclear RNAs. // RNA Biol. 2010. V. 7. P. 480–485.
381. Bauman J., Jearawiriyapaisarn N., Kole R. Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides. // Oligonucleotides. 2009. V. 19. P. 1–13.
382. Pirollo K.F., Rait A., Sleer L.S., Chang E.H. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. // Pharmacol. Ther. 2003. V. 99. P. 55–77.
383. Roth A., Yssel H., Pene J., Chavez E.A., Schertzer, P.M. Lansdorp, H. Spits, R.M. Luiten. Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes. // Blood. 2003. V. 102. P. 849–857.
384. Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. // Exp. Gerontol. 2009. V. 44. P. 485–492.
385. Carroll H.P., Ali S., Kirby J.A. Accelerating the induction of Fas-mediated T cell apoptosis: a strategy for transplant tolerance? // Clin. Exp. Immunol. 2001. V.126. P. 589–597.
386. Homann S., Hofmann C., Gorin A.M., Nguyen H.C.X. et al. A novel rapid and reproducible flow cytometric method for optimization of transfection efficiency in cells. // PLoS One. 2017. V. 12. e0182941.
387. Ruden M., Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. // Cancer Treat. Rev. 2013. V. 39. P. 444–456.
388. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

(CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. // J. Immunol. 1995. V. 155. P. 1151–1164.
389. Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., D.A. Hafler. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. // J. Exp. Med. 2004. V. 199. P. 971–979.
390. Valencia X., Yarboro C., Illei G., Lipsky P.E. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. // J. Immunol. 2007. V. 178. P. 2579–2588.
391. Fessler J., Felber A., Duftner C., Dejaco C. Therapeutic potential of regulatory T cells in autoimmune disorders. // BioDrugs. 2013. V. 27. P. 281–291.
392. Larché M., Akdis C.A., Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. // Nat. Rev. Immunol. 2006. V. 6. P. 761–771.
393. Ye J., Huang X., Hsueh E.C., Zhang Q., Ma C., Zhang Y., Varvares M.A., Hoft D.F., Peng G. Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence. // Blood. 2012. V. 120. P. 2021–2031.
394. 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. // Biomeditsinskaya Khimiya. 2016. V. 62. P. 544-554.
395. Shi J.B., Chen L.Z., Wang Y., Xiou C., Tang W.J., Zhou H.P., Liu X.H., Yao. Benzophenone-nucleoside derivatives as telomerase inhibitors: Design, synthesis and anticancer evaluation in vitro and in vivo. // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 124. P. 729–739.
396. Burchett K.M., Yan Y., Ouellette M.M. Telomerase Inhibitor Imetelstat (GRN163L) Limits the Lifespan of Human Pancreatic Cancer Cells. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e85155.
397. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995. V. 92. P. 9363–9367.
398. Moro-García M.A., Alonso-Arias R., López-Larrea C. Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response. // Curr. Genomics. 2012. V. 13. P. 589–602.
399. 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. P. 316–326.
400. van Loo G., Schotte P., van Gurp M., Demo H. et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. // Cell Death Differ. 2001. V. 8. P. 1136–1142.

401. Eitan E., Braverman C., Tichon A., Gitler D., Hutchison E.R., Mattson M.P., Priel E. Excitotoxic and Radiation Stress Increase TERT Levels in the Mitochondria and Cytosol of Cerebellar Purkinje Neurons. // Cerebellum. 2016. V. 15. P. 509-517.
402. Makeyev E. V., Zhang J., Carrasco M.A., Maniatis T. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. // Mol. Cell. 2007. V. 27. P. 435–448.
403. Colgin L.M., Wilkinson C., Englezou A., Kilian A., Robinson M.O., Reddel R.R. The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. // Neoplasia. 2000. V.2. P. 426–432.
404. Long J.C., Caceres J.F. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression // Biochem. J.2009. V. 417. P. 15–27.
405. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Tamm C., Heidari N., Orrenius S., Zhivotovsky B. DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. // Cell Death Differ. 2008. V.15. P. 555–566.
406. Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H., Yuan J. Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. // Cell. 1994. V. 78. P. 739–750.
407. Chao D.T., Linette G.P., Boise L.H., White L.S., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. // J. Exp. Med. 1995. V. 182. P. 821–828.
408. Shkreta L., Michelle L., Toutant J., Tremblay M.L., Chabot B. The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 331–340.
409. Coy J.F., Velhagen I., Himmele R., Delius H., Poustka A., Zentgraf H. Isolation, differential splicing and protein expression of a DNase on the human X chromosome. // Cell Death Differ. 1996. V. 3. P. 199–206.
410. Shiokawa D., Matsushita T., Kobayashi T., Matsumoto Y., Tanuma S.-I. Characterization of the human DNAS1L2 gene and the molecular mechanism for its transcriptional activation induced by inflammatory cytokines. // Genomics. 2004. V. 84. P. 95–105.
411. Hsieh S.Y., Liaw S.F., Lee S.N., Hsieh P.S., Lin K.H., Chu C.M., Liaw Y.F. Aberrant caspase-activated DNase (CAD) transcripts in human hepatoma cells. // Br. J. Cancer. 2003. V. 88. P. 210–216.
412. Kawane K., Fukuyama H., Adachi M., Sakahira H., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkin N.A., Nagata S. Structure and promoter analysis of murine CAD and ICAD genes. // Cell Death Differ. 1999. V. 6. P. 745–752.

413. Bollmann F.M. Physiological and pathological significance of human telomerase reverse transcriptase splice variants. // Biochimie. 2013. V. 95. P. 1965–1970.
414. Masutomi K., Yu E.Y., Khurts S., Ben-Porath I. et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. // Cell. 2003. V. 114. P. 241–253.
415. Park Y.P., Choi S.-C., Kim J.H., Song E.Y. et al. Up-regulation of Mac-2 binding protein by hTERT in gastric cancer. // Int. J. Cancer. 2007. V. 120. P. 813–820.
416. Jagadeesh S., Banerjee P.P. Telomerase reverse transcriptase regulates the expression of a key cell cycle regulator, cyclin D1. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 347. P. 774–780.
417. Zhou J., Ding D., Wang M., Cong Y.-S. Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. // BMB Rep. 2014. V. 47. P. 8–14.
418. Hodes R.J., Hathcock K.S., Weng N. Telomeres in T and B cells. // Nat. Rev. Immunol. 2002. V. 2. P. 699–706.
419. Read M.A., Wood A.A., Harrison J.R., Gowan S.M., Kelland L.R., Dosanjh H.S., Neidle S. Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships. // J. Med. Chem. 1999. V. 42. P. 4538–4546.
420. Zhou Z., Du Y., Zhang L., Dong S. A label-free, G-quadruplex DNAzyme-based fluorescent probe for signal-amplified DNA detection and turn-on assay of endonuclease., Biosens. Bioelectron. 2012. V. 34. P. 100–105.
421. Martadinata H., Heddi B., Lim K.W., Phan A.T. Structure of long human telomeric RNA (TERRA): G-quadruplexes formed by four and eight UUAGGG repeats are stable building blocks. // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 6455–6461.
422. Wlodkowic D., Telford W., Skommer J., Darzynkiewicz Z. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. // Methods Cell Biol. 2011. V. 103. P. 55–98.
423. Widlak P., Li L.Y., Wang X., Garrard W.T. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 48404–48409.
424. Grant C.R., Liberal R., Mieli-Vergani G., Vergani D., Longhi M.S. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and yet unanswered questions. // Autoimmun. Rev. 2015. V. 14. P. 105–116.
425. Gondek D.C., Lu L.-F., Quezada S.A., Sakaguchi S., Noelle R.J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a

granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. // J. Immunol. 2005. V. 174. P. 1783–1786.
426. Qin H.-Y., Mukherjee R., Lee-Chan E., Ewen C., Bleackley R.C., Singh B. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. // Int. Immunol. 2006. V. 18. P. 1001–1015.
427. Marie J.C., Letterio J.J., Gavin M., Rudensky A.Y, TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. // J. Exp. Med. 2005. V. 201. P. 1061–1067.
428. Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T., Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. // J. Exp. Med. 2001. V. 193. P. 1303–1310.
429. Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. Biology of interleukin-10. // Cytokine Growth Factor Rev. 2010. V. 21. P.331–344.
430. Kueng H.J., Manta C., Haiderer D., Leb V.M. et al., Fluorosomes: a convenient new reagent to detect and block multivalent and complex receptor-ligand interactions. // FASEB J. 2010. V. 241. P.572–1582.
431. Onishi Y., Fehervari Z., Yamaguchi T., Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. V.105. P. 10113–10118.
432. Adibzadeh M., Mariani E., Bartoloni C., Beckman I. et al. Lifespans of T lymphocytes. // Mech. Ageing Dev. 1996. V. 91. P. 145–154.
433. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. // Exp. Cell Res. 1961. V. 25. P. 585–621.
434. Hodes R.J., Hathcock K.S., Weng N. Telomeres in T and B cells. // Nat. Rev. Immunol. 2002. V. 2. P. 699–706.
435. Effros R.B. Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: Effect of chronic infection and stress. // Exp. Gerontol. 2011. V. 46. P. 135–140.
436. Bignon A., Regent A., Klipfel L., Desnoyer A., de la Grange P., Martinez V., Lortholary O., Dalloul A., Mouthon L., Balabanian K. DUSP4-mediated accelerated T-cell senescence in idiopathic CD4 lymphopenia // Blood. 2015. V. 125. P. 2507–2518.
437. Perillo N.L., Walford R.L., Newman M.A., Effros R.B. Human T lymphocytes possess a limited in vitro life span. // Exp. Gerontol. 1989. V. 24. P. 177–187.
438. Shay J.W. Telomerase therapeutics: telomeres recognized as a DNA damage signal: commentary re: K. Kraemer et al., antisense-mediated hTERT inhibition

specifically reduces the growth of human bladder cancer cells. Clin. Cancer Res.// 2003. V. 9.: P.3794-3800, Clin. Cancer Res. 2003. V. 9. P. 3521–3525.
439. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W., Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. // Nature. 1990. V. 345. P. 458–460.

9. 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.

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Уровни мРНК сплайс-вариантов в CD4+ Т-лимфоцитах человека, трансфицированных pEndoG-GFP. Показаны нормализованные уровни мРНК по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

№	Спалйс-вариант	Уровень мРНК
1	Общая BCLX	1,300
	Полноразмерная BCLX (BCL-xL)	0,395 #
	Делеция 189 нуклеотидов с 3'конца экзона 2 (BCL-xS)	3,066 #
2	Общая DNase I	1,233
	Полноразмерная DNase I (nDNase I)	0,324 #
	Делеция экзона 4 DNase I (Δ4DNase I)	2,967 #
3	Общая TERT	1,112
	Полноразмерная TERT (α+β+ TERT)	0,534 #
	Δexons 7-8 TERT (α+β– TERT)	2,755 #
4	Общая Casp-2	0,088
	Полноразмерная Casp-2 (Casp-2L)	0,457 #
	Вставка экзона 9 Casp-2 (Casp-2S)	1,967 #
5	Общая GRIN 1	0,909
	Полноразмерная GRIN 1	0,215 #
	Δexons 4 GRIN 1	2,318 #
6	Общая CLDN7	1,055
	Полноразмерная CLDN7	0,416 #
	Делеция экзона 3 CLDN7	1,821 #
7	Общая KHDRBS1	1,108
	Полноразмерная KHDRBS1	0,106 #
	Делеция экзона 3 KHDRBS1	4,520 #
8	Общая RNF128	1,109
	Полноразмерная RNF128	0,148
	Делеция экзона 1 RNF128	4,315
9	Общая MGAT5	0,886
	Полноразмерная MGAT5	0,141 #
	Делеция экзонов 12-18 MGAT5	2,067 #
10	Общая IL18	0,958
	Полноразмерная IL18	0,361 #
	Делеция экзона 3 IL18	2,267 #
11	Общая NOVA 1	0,974
	Полноразмерная NOVA 1	0,067 #
	Делеция экзона 4 NOVA 1	3,437 #
12	Общая FOXP3	1,002
	Полноразмерная FOXP3	0,034 #
	Делеция экзона 2 FOXP3	2,167 #
13	Общая SAMHD1	0,963
	Полноразмерная SAMHD1	0,413 #
	Делеция экзона 14 SAMHD1	3,528 #
14	Общая ARIH1	1,211
	Полноразмерная ARIH1	0,519#
	Делеция экзонов 1-2 ARIH1	2,692#

# $p < 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным контрольной плазмидой pGFP.

Таблица 2. Уровни мРНК сплайс-вариантов в $CD4^+$ Т-лимфоцитах мыши, трансфицированных pEndoG-GFP. Показаны нормализованные уровни мРНК по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

№	Спалйс-вариант	Уровень мРНК
1	Общая TERT	0,917
	Полноразмерная TERT (α+β+ TERT)	0,636 #
	Делеция экзонов 7-8 TERT (α+β– TERT)	2,299 #
2	Общая Casp-2	1,135
	Полноразмерная Casp-2 (Casp-2L)	0,317 #
	Вставка экзона 9 Casp-2 Casp-2 (Casp-2S)	1,866 #
3	Общая DNase I	0,806
	Полноразмерная DNase I (nDNase I)	0,355 #
	Делеция экзона 4 DNase I (Δ4DNase I)	2,957 #
4	Общая BCLX	0,964
	Полноразмерная BCLX (BCLXL)	0,235 #
	Делеция 189 нуклеотидов с 3'конца экзона 2 (BCLXS)	3,677 #
5	Общая NOVA 1	1,333
	Полноразмерная NOVA 1	0,113 #
	Делеция экзона4 NOVA 1	2,045 #
6	Общая IL18	0,893
	Полноразмерная IL18	0,054 #
	Делеция экзона 3 IL18	3,401 #
7	Общая ARIH1	1,067
	Полноразмерная ARIH1	0,418 #
	Делеция экзонов 1-2 ARIH1	1,996 #
8	Общая MGAT5	1,101
	Полноразмерная MGAT5	0,141 #
	Делеция экзонов 12-18 MGAT5	4,318 #
9	Общая SIRT1	1,214
	Полноразмерная SIRT1	0,159 #
	Делеция экзона 2 SIRT1	4,108 #
10	Общая CLDN7	1,211
	Полноразмерная CLDN7	0,528 #
	Делеция экзона 3 CLDN7	1,574 #
11	Общая AHR	1,134
	Полноразмерная AHR	0,531 #
	Делеция экзона 3 AHR	1,553 #
12	Общая PECAM1	0,877
	Полноразмерная PECAM1	0,538 #
	Делеция экзона 4 PECAM1	1,998 #
13	Общая GRIN 1	1,347
	Полноразмерная GRIN 1	0,706#
	Делеция экзонов 4 GRIN 1	1,464 #

# $p < 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным контрольной плазмидой pGFP.

Таблица 3. Уровни мРНК сплайс-вариантов в $CD4^+$ Т-лимфоцитах крысы, трансфицированных pEndoG-GFP. Показаны нормализованные уровни мРНК по отношению к клеткам, трансфицированных pGFP.

№	Спалйс-вариант	Уровень мРНК
1	Общая BCLX	1,007
	Полноразмерная BCLX (BCLXL)	0,388 #
	Делеция 189 нуклеотидов с 3'конца экзона 2 (BCLXS)	1,905 #
2	Общая TERT	1,061
	Полноразмерная TERT (α+β+ TERT)	0,196 #
	Делеция экзонов 7-8 TERT (α+β– TERT)	4,677 #
3	Общая DNase I	0,819
	Полноразмерная DNase I (nDNase I)	0,404 #
	Делеция экзона 4 DNase I (Δ4DNase I)	2,031 #
4	Общая Casp-2	0,930
	Полноразмерная Casp-2 (Casp-2L)	0,561 #
	Вставка экзона 9 Casp-2 (Casp-2S)	2,347 #
5	Общая BDKRB2	0,943
	Полноразмерная BDKRB2	0,045 #
	Делеция экзона 2 BDKRB2	2,795 #
6	Общая CLDN7	1,007
	Полноразмерная CLDN7	0,106 #
	Делеция экзона 3 CLDN7	2,031 #
7	Общая PECAM1	0,924
	Полноразмерная PECAM1	0,119 #
	Делеция экзона 4 PECAM1	1,952 #
8	Общая GRIN 1	0,979
	Полноразмерная GRIN 1	0,221 #
	Делеция экзонов 4 GRIN 1	1,941 #
9	Общая SIRT1	1,104
	Полноразмерная SIRT1	0,981 #
	Делеция экзона 2 SIRT1	1,936 #
10	Общая GFAP	1,056
	Полноразмерная GFAP	0,069 #
	Делеция экзонов 8-9 GFAP	1,775 #
11	Общая CRHR2	0,963
	Полноразмерная CRHR2	0,122 #
	Делеция экзонов 1-2 CRHR2	1,188 #
12	Общая IL18	0,957
	Полноразмерная IL18	0,103 #
	Делеция экзона 3 IL18	1,889 #
13	Общая KHDRBS1	1,061
	Полноразмерная KHDRBS1	0,425 #
	Делеция экзона 3 KHDRBS1	1,884 #

14	Общая AHR	1,132
	Полноразмерная AHR	0,436 #
	Делеция экзона 3 AHR	1,776 #
15	Общая SREBF1	1,232
	Полноразмерная SREBF1	0,528 #
	Делеция экзона 5 SREBF1	1,772 #
16	Общая CLOCK	0,996
	Полноразмерная CLOCK	0,547 #
	Делеция экзона 14 CLOCK	1,731 #
17	Общая FLT1	0,863
	Полноразмерная FLT1	0,560 #
	Делеция экзона 15-30 FLT1	1,691 #

# $p < 0,05$ по отношению к клеткам, трансфицированным контрольной плазмидой pGFP.

Таблица 4. Уровни мРНК сплайс-вариантов в $CD4^+$ Т-лимфоцитах человека, инкубированных с цисплатином.

№	Спалйс-вариант	Уровень мРНК
1	Общая TERT	1,206
	Полноразмерная TERT (α+β+ TERT)	0,604 *
	Делеция экзонов 7-8 TERT (α+β– TERT)	1,959 *
2	Общая Casp-2	1,099
	Полноразмерная Casp-2 (Casp-2L)	0,360 *
	Вставка экзона 9 Casp-2 (Casp-2S)	1,773 *
3	Общая DNase I	0,968
	Полноразмерная DNase I (nDNase I)	0,504 *
	Делеция экзона 4 DNase I (Δ4DNase I)	2,032 *
4	Общая BCLX	1,166
	Полноразмерная BCLX (BCLXL)	2,241 *
	Делеция 189 нуклеотидов с 3'конца экзона 2 (BCLXS)	0,541 *
5	Общая NOVA 1	1,061
	Полноразмерная NOVA 1	0,105 *
	Делеция экзона 4 NOVA 1	2,182 *
6	Общая GRIN 1	0,856
	Полноразмерная GRIN 1	0,044 *
	Делеция экзонов 4 GRIN 1	3,811 *
7	Общая CLOCK	1,195
	Полноразмерная CLOCK	0,130 *
	Делеция экзонов 1-8 CLOCK	3,174 *
8	Общая NR1D2	0,887
	Полноразмерная NR1D2	0,159 *
	Делеция экзонов 2–6 NR1D2	2,870 *
9	Общая FOXP3	1,299
	Полноразмерная FOXP3	0,174 *
	Делеция экзона 2 FOXP3	2,038 *
10	Общая DRG2	0,867
	Полноразмерная DRG2	0,208 *
	Делеция экзонов 1-2 DRG2	2,037 *
11	Общая ARIH1	1,150
	Полноразмерная ARIH1	0,184 *
	Делеция экзонов 1-2 ARIH1	2,030 *
12	Общая SAMHD1	0,819
	Полноразмерная SAMHD1	0,209 *
	Делеция экзона 14 SAMHD1	2,002 *
13	Общая SIRT1	1,056
	Полноразмерная SIRT1	0,271 *
	Делеция экзона 2 SIRT1	2,001 *
14	Общая RNF128	9,105
	Полноразмерная RNF128	0,166 *
	Делеция экзона 1 RNF128	1,834 *

15	Общая CLDN7	0,892
	Полноразмерная CLDN7	0,118 *
	Делеция экзона 3 CLDN7	1,821 *

* $p < 0,05$ по отношению к интактным контрольным клеткам.

Таблица 5. Уровни мРНК сплайс-вариантов в $CD4^+$ Т-лимфоцитах крысы, инкубированных с цисплатином.

№	Спалйс-вариант	Уровень мРНК
1	Общая TERT	0,993
	Полноразмерная TERT (α+β+ TERT)	0,521 *
	Делеция экзонов 7-8 TERT (α+β+ TERT)	2,002 *
2	Общая Casp-2	0,067
	Полноразмерная Casp-2 (Casp-2L)	1,244 *
	Вставка экзона 9 Casp-2 (Casp-2S)	0,866 *
3	Общая DNase I	0,964
	Полноразмерная DNase I (nDNase I)	0,637 *
	Делеция экзона 4 DNase I (Δ4DNase I)	2,250 *
4	Общая BCLX	1,096
	Полноразмерная BCLX (BCLXL)	0,355 *
	Делеция 189 нуклеотидов с 3'конца экзона 2 (BCLXS)	3,051 *
5	Общая ARNTL	0,897
	Полноразмерная ARNTL	0,362 *
	Делеция экзона 6 ARNTL	2,895 *
6	Общая ARIH1	1,033
	Полноразмерная ARIH1	0,318 *
	Делеция экзонов 1-2 ARIH1	2,506 *
7	Общая CLDN7	1,091
	Полноразмерная CLDN7	0,305 *
	Делеция экзона 3 CLDN7	2,354 *
8	Общая IL18	0,958
	Полноразмерная IL18	0,336 *
	Делеция экзона 3 IL18	1,980 *
9	Общая CLOCK	1,054
	Полноразмерная CLOCK	0,441 *
	Делеция экзона 1-9 CLOCK	1,901 *
10	Общая PECAM1	1,083
	Полноразмерная PECAM1	0,541 *
	Делеция экзона 4 PECAM1	1,703 *

* $p < 0,05$ по отношению к интактным контрольным клеткам.

Таблица 6. Уровни мРНК сплайс-вариантов в $CD4^+$ Т-лимфоцитах крысы, инкубированных с цисплатином.

#	**Спалйс-вариант**	**Уровень мРНК**
1	Общая TERT	1,008
	Полноразмерная TERT (α+β+ TERT)	0,412 *
	Делеция экзонов 7-8 TERT (α+β+ TERT)	2,352 *
2	Общая CASP-2	0,794
	Полноразмерная CASP-2 (Casp-2L)	0,520 *
	Вставка экзона 9 Casp-2 (Casp-2S)	2,214 *
3	Общая DNASE I	0,907
	Полноразмерная DNase I (nDNase I)	0,631 *
	Делеция экзона 4 DNase I (Δ4DNase I)	2,000 *
4	Общая BCLX	1,095
	Полноразмерная BCLX (BCLXL)	0,304 *
	Делеция 189 нуклеотидов с 3'конца экзона 2 (BCLXS)	1,855 *
5	Общая GTPBP8	0,995
	Полноразмерная GTPBP8	0,314
	Делеция экзона 2 GTPBP8	1,772 *
6	Общая SREBF1	0,865 *
	Полноразмерная SREBF1	0,288 *
	Делеция экзона 5 SREBF1	1,807 *
7	Общая CLOCK	0,911
	Полноразмерная CLOCK	0,305 *
	Делеция экзона 14 CLOCK	1,807 *
8	Общая GRIN 1	1,215
	Полноразмерная GRIN 1	0,336 *
	Делеция экзона 4 GRIN 1	1,800 *
9	Общая CLDN7	1,165
	Полноразмерная CLDN7	0,201 *
	Делеция экзона 3 CLDN7	1,746 *
10	Общая CRHR2	1,114
	Полноразмерная CRHR2	0,553 *
	Делеция экзонов 1-2 CRHR2	1,568 *
11	Общая TRIM23	0,924
	Полноразмерная TRIM23	0,341
	Делеция экзона 2 TRIM23	1,608 *
12	Общая IL18	0,999 *
	Полноразмерная IL18	0,503 *
	Делеция экзона 3 IL18	1,739 *

* $p < 0,05$ по отношению к интактным контрольным клеткам.

Обозначения мРНК генов в таблицах 1 – 6.

AHR - Aryl-hydrocarbon receptor

ARIH1 - Ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1

ARNTL - Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like

BCLX – B cell Lymphoma extra. Другое название BCL2L1.

BDKRB2 - Bradykinin receptor B2

CASP-2 – Caspase 2

CLDN7 – Claudin 7

CLOCK - CLOCK circadian regulator

CRHR2 - Corticotropin releasing hormone receptor 2

DNase I – Deoxyribonuclease 1

DRG2 - Developmentally regulated GTP binding protein 2

FOXP3 - Forkhead box P3

FLT1 - FMS-related tyrosine kinase 1

GFAP - Glial fibrillary acidic protein

GRIN 1 - Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1

GTPBP8 - GTP-binding protein 8

IL18 - Interleukin 18

KHDRBS1 - KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 1

MGAT5 - Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase

NOVA1 - NOVA alternative splicing regulator 1

NR1D2 - Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2c

PECAM1 - Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1

RNF128 - Ring finger protein 128, E3 ubiquitin protein ligase

SAMHD1 - SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1

SIRT1 - Sirtuin 1

SREBF1 - Sterol regulatory element binding transcription factor 1

TERT – Telomerase reverse transcriptase

TRIM23 - Tripartite motif-containing 23

Таблица 7. Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР в реальном времени в экспериментах с клетками человека.

мРНК	Прямой праймер (5’-3’)	Обратный праймер (5’-3’)	Размер амплификата, п.о.	Температура отжига, °C
EndoG	AATTGAGCTCCGCACCTACGTGAT	AGGATGTTTGGCACAAAGAGCAGC	167	55
α+β+ hTERT	TGTACTTTGTCAAGGTGGATGTG	GTACGGCTGGAGGTCTGTCAA	202	53
α+β- hTERT	TGTACTTTGTCAAGGTGGATGTG	GGCACTGGACGTAGGACGTGG	189	53
α-β+ hTERT	CTGAGCTGTACTTTGTCAAGGAC	GTACGGCTGGAGGTCTGTCAA	172	53
α-β- hTERT	CTGAGCTGTACTTTGTCAAGGAC	GGCACTGGACGTAGGACGTGG	159	58
hTERT нкРНК	CACCAGAGTCTCCTTTTCTGGC	CCCCGCTTGCCATTTCC	137	59
hTERT EGPO	CAGGGGCAAGTGAGTCAGG	CCCAGCCACCCGCAG	52	60
β-Gal	GCAGCAGTGATGATCCAGAACT	CGTAGGTCACAGATGAGCCAATAA	75	60
Casp-2L и 2S	AGCTCTTTGACAACGCCAA	TCGGCAACTTTTCTTTACCG	171 и 232	58
Casp-2 общая	GCATGTACTCCCACCGTTGA	TGCTCAACACCAGTGCTAGG	242	60
Casp-2L	AGCTCTTTGACAACGCCAA	CAGGAACCTCGTTTGGTGTT	262	58
Casp-2S	CCGTGGAGGTGCTATTGG	TCGGCAACTTTTCTTTACCG	165	57
Casp-2 нкРНК	CGTGCACCACCATATCCTGT	GGGCACCAGAGTTAATGAAGC	101	60
Casp-2 EGPO	ACCTCCTTCTGTTCACTGCTG	CCCATGCATTGGGAGACACTT	63	59

Таблица 8. Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР в реальном времени в экспериментах с клетками человека (продолжение).

мРНК	Прямой праймер (5’-3’)	Обратный праймер (5’-3’)	Размер амплификата, п.о.	Температура отжига, °C
BCL-xL и BCL-xS	ACCCCAGGGACAGCATATCAG	TGCATTGTTCCCATAGAGTTCCAC	255	57
BCL-xL	ACCCCAGGGACAGCATATCAG	GCCGTTCTCCTGGATCCAAG	216	58
BCL-xS	ATGGCAGCAGTAAAGCAAG	GTTCCACAAAAGTATCGCTCTG	135	64
BCL-x EGPO	TGCAGGTATTGGTGAGTCGG	ACGTCTCCAACAATCACCCAA	198	65
DNase I и Δ4DNase I	ATCCTGAGCCGCTATGACAT	TGTGAACCGGGAGAAGAACCTG	239	58
DNase I	GCTACATTGTGCAGATCCTGAGC	TGTACACGAACAGGTAGCGCTCC	224	57
Δ4DNase	GCTACATTGTGCAGATCCTGAGC	ACCTGGTCAGGCTGATTGAGGTT	161	58
DNase 1 нкРНК	CCGTGTCGGAGTGAAGTGAA	ATCCACAGACCACGTAGGGA	137	59
DNase 1 EGPO	TTCCTCGCGATGGACAAGCA	CCTCCCCGAAGGACCGAAAG	58	62
NADH дегидрогеназа	TACACGATGAGGCAACCAAA	GGTAGGGGGTGTGTTGTGAG	162	55
18S	GGATCCATTGGAGGGCAAGT	ACGAGCTTTTTAACTGCAGCAA	91	64
Ламин B1	GATTGCCCAGTTGGAAGCCT	TGGTCTCGTTAATCTCCTCTTCATACA	152	60

Таблица 9. Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР в реальном времени в экспериментах с клетками мыши и крысы.

мРНК	Прямой 5'-3’	Обратный 5'-3’	Размер амплификата, п.о.	Температура отжига, °С
EndoG крысы	GCATGCCTGGAACAACCTTGAGAA	TGCCTCCAGGATCAACACCTTGAA	193	65
EndoG мыши	GAATGCCTGGAACAACCTTGAGAG	TGCCTCCAGGATCAACACCTTGAA	169	64
α+β+ TERT	TGCTACTGTTGAGCCGAGTG	TTTGGTACAGGGGAGACCCA	120	55
α+β- TERT	TGCTACTGTTGAGCCGAGTG	CTGGCCCCAGTCAAGTTAGG	167	58
Casp-2L	GCATACATAGCAATGCGTGGCCTT	TCAGTGTCAGTCTGTGGGCATTGA	109	64
Casp-2S	AGACCTAAGTGCAGTGTCCTTGCT	ATACTGGTCACGTCCAAGTGGCTT	100	65
DNase I и Δ4DNase I	TGCTGTTGGGAAGCTACTGGATGA	CAAACTCCCTGACCTCTGTGAACC	157	65
DNase I	ATCCTGAGTCGCTATGACATCGC	CCTGTACACAAAAAGGTACTGTT	174	59
Δ4DNase I	ATCCTGAGTCGCTATGACATCGC	ACCTGGTCAGGCCGATTGAGTTC	101	65
BCL-xL	TCGGCCAGCTTTATAAGTCAGCGA	TGGGTACAGGGACATCTTTGCACT	85	65
BCL-xS	AGTTTCCAGGGATTGGCAAGCAAC	ATTTGGCAAAGCTCTGGAAGGTGG	195	64
β-actin	TGAGAGGGAAATCGTGCGTGACAT	AACGCTCATTGCCGATAGTGATGA	152	65
18S	GGTCCATTGGAGGGCAAGT	ACGAGCTTTTTAACTGCAGCAA	91	64