

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ-2 В КЛЕТКАХ Т-КЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА JURKAT ПРИ ПОМОЩИ ПЕРЕКЛЮЧАЮЩЕГО СПЛАЙСИНГ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА К ЕЁ пре-мРНК**Д.Д. Жданов,^{1,2*} А.А. Плясова¹, Ю.А. Гладиллина¹, М.В. Покровская¹, С.С. Александрова¹, Н.Н. Соколов¹¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: zhdanovdd@mail.ru²Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Каспаза-2 является ферментом, участвующим в индукции апоптоза. Количество активного фермента каспазы-2 регулируется альтернативным сплайсингом (АС) её мРНК. Целью данной работы было определение способности олигонуклеотида, комплементарного пре-мРНК Casp-2, индуцировать АС. Данный олигонуклеотид блокировал связывание регулирующих сплайсинг белков со своими сайтами на конце экзона 9 пре-мРНК Casp-2, что приводило к индукции АС мРНК Casp-2: понижению экспрессии полноразмерного активного сплайс-варианта Casp-2L и повышению экспрессии укороченного варианта Casp-2S в клетках Т-клеточной лимфомы человека линии Jurkat. При этом уровень экспрессии общей Casp-2 не изменялся. Нарушение пропорции сплайс-вариантов Casp-2 приводил к ингибированию ферментативной активности каспазы-2.

Ключевые слова: каспаза-2; альтернативный сплайсинг; переключающий сплайсинг олигонуклеотид; ферментативная активность

DOI: 10.18097/BMCRM00108

ВВЕДЕНИЕ

Каспазы представляют собой семейство цистеиновых протеаз, осуществляющие протеолиз белков-субстратов после аспарагиновой кислоты в аминокислотной последовательности. Помимо расщепления различных белков-предшественников (например, ряда воспалительных цитокинов), каспазам принадлежит важная роль в процессах почечной смерти. Каспазы являются инициаторными, медиаторными и эффекторными молекулами в процессе развития апоптоза и играют определяющую роль в регуляции гибели клеток [1]. Каспаза-2 (Caspase-2, ген *Casp-2*) является одной из наиболее эволюционно консервативных каспаз и обладает свойствами как инициаторных, так и эффекторных каспаз [2].

Регуляция функции Casp-2 включает альтернативный сплайсинг (АС) её мРНК. Известно два сплайс-варианта Casp-2: Casp-2L (Long Form, длинная форма) и Casp-2S (Short Form, короткая форма). Полноразмерная белковая форма Casp-2L (435 аминокислотных остатков, а.о.), или ICH-1 (Interleukin-1 β -converting enzyme), состоит из т.н. p19 и p12 последовательностей, необходимых для активации и каталитической активности фермента [3]. 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 а.о. в области CARD домена (Caspase Recruitment Domain) на N-конце белковой молекулы [4]. Появление дополнительного кодирующего экзона 9 вызывает сдвиг рамки считывания, появление стоп-кодона на стыке экзонов 9 и 10 и укорочение белковой молекулы на 92 а.о. с С-конца белковой молекулы (рис. 1 А)

[5]. В результате АС Casp-2S теряет p12 последовательность и ферментативную активность. Сплайс-варианты Casp-2 обладают противоположным эффектом на судьбу клеток: Casp-2L индуцирует клеточную гибель, в то время как Casp-2S подавляет апоптотические процессы [6]. Casp-2L экспрессируется в большинстве тканей, в то время как Casp-2S – преимущественно в мозге, скелетных и сердечной мышцах [6, 7]. Casp-2 активируется в клеточных линиях Т- и В- лимфоцитов человека при стимуляции CD95 рецептора [8].

Известно участие некоторых факторов сплайсинга в регуляции АС Casp-2: hnRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) способствует включению экзона 9, а богатые серином и аргинином белки ASF (alternative splicing factor) и SF2 (splicing factor 2) способствуют его удалению [9]. Описано участие интронной последовательности, названной In100 [10, 11], которая взаимодействует с пре-мРНК Casp-2 белка RBM5 (RNA binding motif protein 5) [12].

В настоящее время применение переключающих сплайсинг олигонуклеотидов (ПСО) считается одним из наиболее специфичных методов модуляции АС и ферментативной активности [13]. Ранее мы показали, что АС мРНК Casp-2 индуцируется в ответ на действие эндонуклеазы EndoG [14]. Мы предположили, что по аналогии со способностью EndoG производить активный ПСО к пре-мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) [15] и дезоксирибонуклеазы 1 (DNase I) [16], произведённый ею ПСО способен модулировать АС Casp-2. Целью данной работы явилось изучение способности ПСО, специфичного к пре-мРНК Casp-2, модулировать её АС.



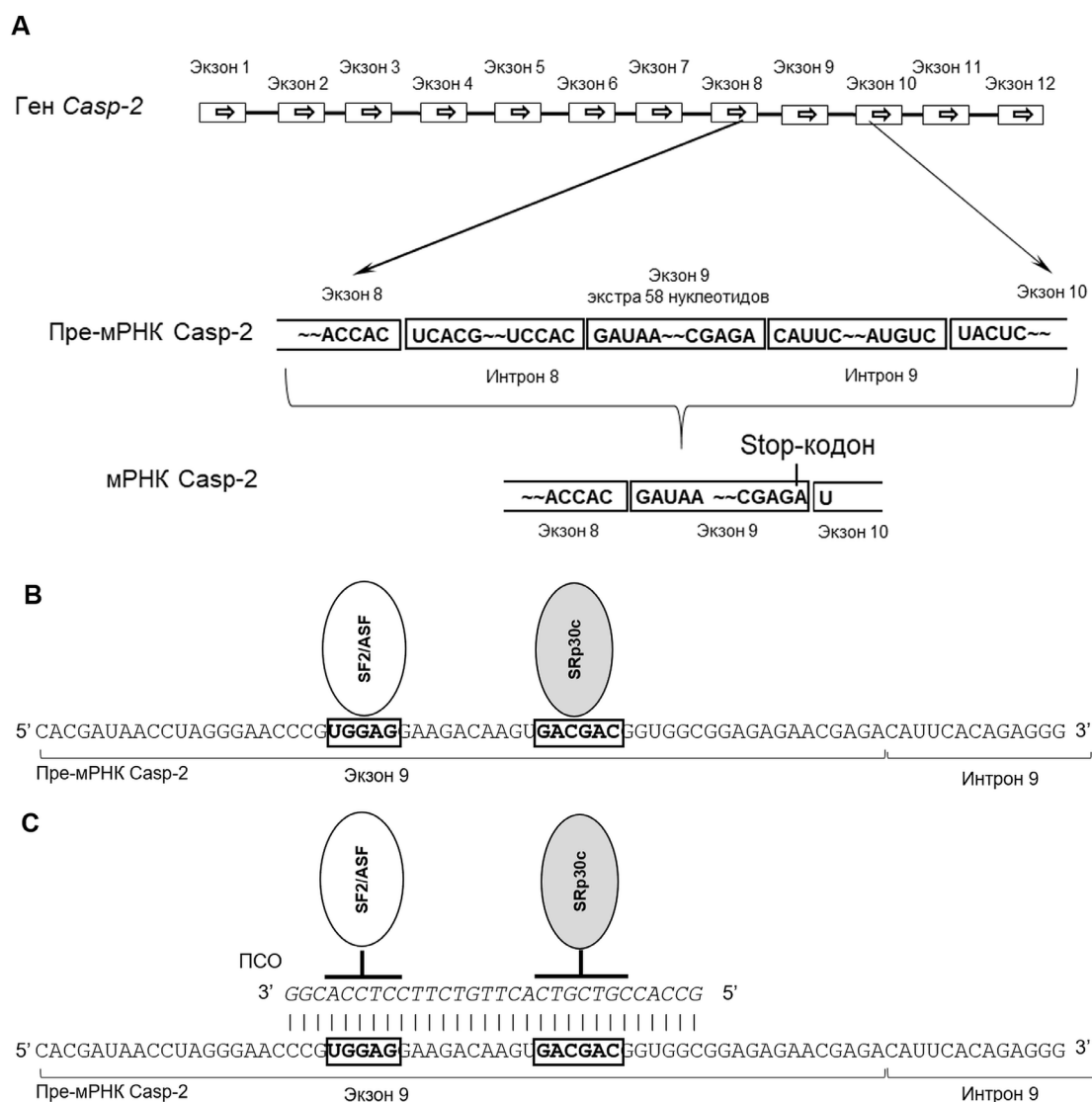


Рисунок 1. Гипотетическая схема механизма сплайсинга мРНК Casp-2 в результате действия ПСО. Гипотетическая схема АС мРНК Casp-2 (А). Включение экзона 9 в конечный мРНК транскрипт приводит к появлению стоп-кодона и синтезу укороченного Casp-2S сплайс-варианта. Схематическое изображение регулирующих сплайсинг 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 ПСО с пре-мРНК Casp-2 блокирует связывание обоих белков SF2/ASF и SRp30c с сайтами связывания (С). Результатом этого взаимодействия является индукция АС и включение экзона 9 в зрелой молекуле мРНК Casp-2S.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток и трансфекция

В работе использовали клетки Т-клеточной лимфомы человека линии Jurkat из коллекции клеточных культур Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 («Gibco», США), содержащей 10% FBS (Fetal Serum Bovine, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажности.

Для трансфекции клеток ПСО или контрольным нуклеотидом (табл. 1 «Синтол», Россия) использовали Oligofectamine Reagent («Invitrogen», США), следуя протоколу компании производителя.

Все олигонуклеотиды содержали химические модификации для защиты от действия внутриклеточных РНКаз: 2'-О-(2-метокси)этил рибозу (2'МОЕ),

фосфоротиоатный остов, и 5'-метилцитозин как описано в [17]. Все олигонуклеотиды были конъюгированы с флуоресцентным красителем Cy5.5. Поиск в программе BLAST не выявил других участков в геноме человека, комплементарных ПСО. Эффективность трансфекции ПСО оценивали методом проточной цитометрии при подсчёте Cy5.5-положительных клеток, меченых антителами к CD4+ («Miltenyi Biotec», Германия) при помощи проточного цитометра MACS Quant Analyzer 10 («Miltenyi Biotec»). Количество олигонуклеотидов внутри клеток определяли по уровню средней интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) Cy5.5-положительных клеток.

Экстракция РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью PureLink RNA mini kit («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), следуя протоколу компании-производителя. Реакцию обратной

Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые для трансфекции клеток Jurkat

Название	Последовательность 5'-3'
ПСО	GCCACCGUCGUCACUUGUCUCCUCCACGG
Контрольный олигонуклеотид	AUGUGCCGUAGGUGAGGCCUCACGUUCGUU

Таблица 2. Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР в реальном времени

Мишень	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')	Размер амплификата п.о.	Температура отжига °С
Casp-2 общая	GCATGTACTCCCACCGTTGA	TGCTCAACACCAGTGCTAGG	242	60
Casp-2L	AGCTCTTTGACAACGCCAA	CAGGAACCTCGTTTGGTGT	262	58
Casp-2S	CCGTGGAGGTGCTATTGG	TCGGCAACTTTTCTTTACCG	165	57
18S	GGATCCATTGGAGGGCAAGT	ACGAGCTTTTAACTGCAGCAA	91	64

транскрипции (ОТ) проводили в 25 мкл реакционной смеси MMLV RT kit («Evrogen», Россия), используя 5 мкг тотальной РНК и протокол компании-производителя. В качестве реакционной смеси для ПЦР в реальном времени использовали qPCRMix-HS SYBR («Evrogen»). Праймеры («Evrogen») представлены в таблице 2.

Для амплификации применяли систему детекции ПЦР в реальном времени DTPprime 5 («ДНК-технология», Россия). Использовали двухтемпературный режим реакции (отжиг праймеров/элонгация). Количество амплификатов определяли по флуоресценции в конце цикла элонгации. Оценку качества амплификации проводили по анализу кривой плавления от 60°C до 95°C в конце реакции (после 35-го цикла). Стандартные кривые эффективности ПЦР строили по серийным разведениям суммарных кДНК (1:40, 1:80, 1:160 и 1:320). Вычисление относительной концентрации РНК проводили по DTPprime 5 («ДНК-технология»). Уровни мРНК изучаемых генов или их сплайс-вариантов нормировали по мРНК конститутивно экспрессируемого референсного гена: 18S рибосомной РНК.

Определение ферментативной активности Casp-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) следуя протоколу производителя. Измерение флуоресценции осуществляли в планшетном спектрометре MultiscanGo («Thermo Scientific») при длинах волн возбуждения и эмиссии 400 нм и 505 нм соответственно.

Статистический анализ

Статистический анализ результатов осуществляли, используя критерий Стьюдента при помощи программы Statistica 9.0 («StatSoft Inc.», США). Результаты представляли в виде средних значений \pm стандартное отклонение. Значения считали статистически достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Блокирование доступа регулирующих сплайсинг белков к своим сайтам взаимодействия.

Для того чтобы индуцировать АС мРНК Casp-2, клетки линии Jurkat трансфицировали 30-членным олигонуклеотидом, комплементарным 3'-концевой области экзона 9. Два регуляторных участка, являющихся сайтами взаимодействия с регулируемыми сплайсинг белками, расположены в данной области: UGGAC (сайт связывания белка SF2/ASF) и GACGAC (сайт связывания белка SRp30c) (рис. 1 В). Трансфекция клеток ПСО к пре-мРНК Casp-2 приводила к блокированию взаимодействия данных белков со своими сайтами связывания (рис. 1 С).

Индукция АС Casp-2 и ингибирование ферментативной активности при помощи ПСО

Уровень трансфекции клеток, определённый методом проточной цитометрии, приближался к 100% через 24 ч после трансфекции (рис. 2 А–С). При культивировании клеток наблюдали постепенное снижение эффективности трансфекции. Через 96 ч эффективность трансфекции составила 45.23–49.02%. Также обнаружено постепенное снижение внутриклеточного содержания олигонуклеотидов, детектированное по уровню MFI (рис. 2 D). Не выявлено значительных отличий в эффективности трансфекции и уровнях MFI в клетках, трансфицированных ПСО или контрольным 30-членным олигонуклеотидом.

Определение уровня экспрессии сплайс вариантов мРНК Casp-2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени не обнаружило изменения количества мРНК общей Casp-2 при трансфекции клеток ПСО или контрольным олигонуклеотидом (рис. 3 А). Трансфекция клеток ПСО вызывала индукцию АС мРНК Casp-2. Выявлено снижение уровня мРНК полноразмерного сплайс-варианта Casp-2L (рис. 3 В) и повышение количества мРНК укороченного варианта Casp-2S (рис. 3 С). Изменение пропорции сплайс-вариантов сопровождалось уменьшением ферментативной активности Casp-2 в трансфицированных ПСО клетках (рис. 3 D).

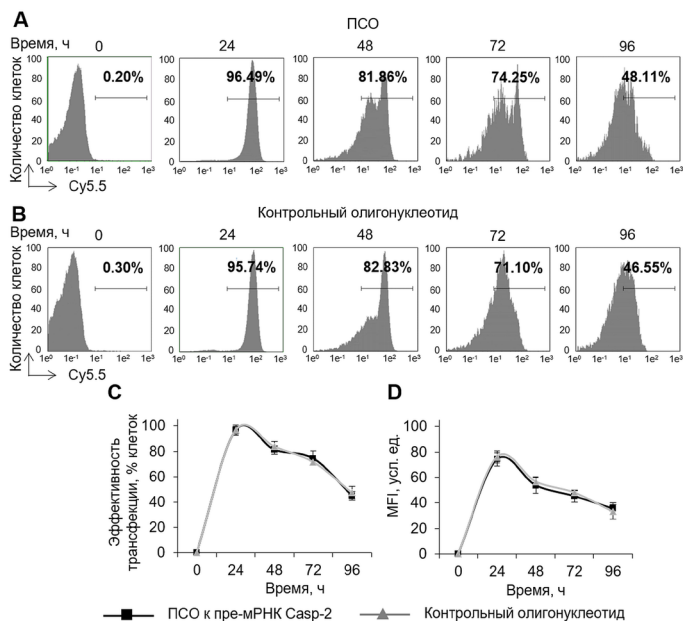


Рисунок 2. Эффективность трансфекции клеток Jurkat. Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии клеток в течение 96 ч после трансфекции ПСО (А) или контрольным 30-членным олигонуклеотидом (В). Эффективность трансфекции (С). MFI Cy5.5-положительных трансфицированных клеток. Усл. ед. – условные единицы

Снижение ферментативной активности Casp-2, вероятно, является следствием пониженной экспрессии полноразмерной формы Casp-2L, поскольку именно полноразмерный вариант обладает каталитической активностью. Следует отметить, что индукция АС и ингибирование активности Casp-2 достигало максимальных значений через 24 ч после трансфекции. Постепенная нормализация данных параметров происходила при дальнейшем культивировании клеток: уровень мРНК Casp-2L и её ферментативная активность постепенно повышались, в то время как уровень мРНК Casp-2S постепенно снижался и к концу периода наблюдения достигал значения контрольных клеток. Данная нормализация АС и ферментативной активности согласуется с постепенным понижением эффективности трансфекции и уровня MFI в культивируемых клетках.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день наиболее специфичным способом модуляции АС и управления соответствующими клеточными процессами является использование 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 удалось. Типичный размер ПСО составляет 15–30 нуклеотидов, что обеспечивает высокую степень специфичности к таргетному участку и их относительно невысокую молекулярную массу, облегчающую проникновение внутрь клеток. Взаимодействие ПСО с таргетным участком перекрывает доступ субъединицам сплайсосомы к сплайс-сайтам или регуляторным SR-белкам к *цис*-последовательностям на цепи пре-мРНК (рис. 1). Таким образом, ПСО способны

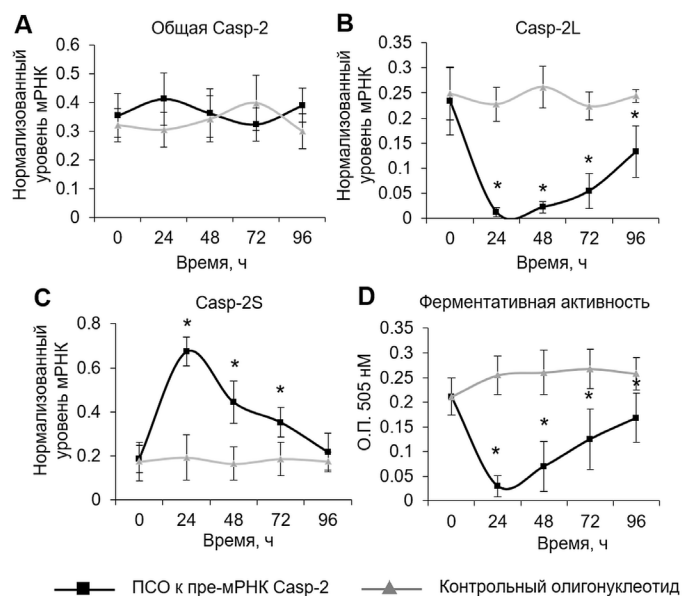


Рисунок 3. Индукция АС мРНК Casp-2 и торможение активности этого фермента в результате трансфекции клеток ПСО. Уровни мРНК общей Casp-2 (А) и её сплайс-вариантов: Casp-2L (В) и Casp-2S (С), определенные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Ферментативная активность Casp-2 в трансфицированных клетках (D). * $p \leq 0.05$ по отношению к клеткам, трансфицированным контрольным 30-членным олигонуклеотидом.

индуцировать делецию или включение экзонов в конечный мРНК транскрипт [18]. В настоящее время исследуется возможность применения ПСО с целью терапии множества патологических состояний [19], в т.ч. и опухолевых заболеваний.

Мы изучили способность олигонуклеотида, комплементарного области на экзоне 9 пре-мРНК Casp-2, индуцировать АС. Обнаружено снижение уровня мРНК полноразмерного варианта Casp-2L и увеличение количества мРНК укороченного сплайс-варианта Casp-2S (рис. 2). Последний образуется в результате появления стоп-кодона из-за сдвига рамки считывания при включении дополнительного кодирующего экзона 9 [4]. Изменение пропорции сплайс-вариантов Casp-2 приводило к ингибированию активности этого фермента.

ВЫВОДЫ

В данной работе показано, что активность Casp-2 можно ингибировать при помощи 30-членного олигонуклеотида, способного индуцировать АС её мРНК. Возможно, что в дальнейшем данный олигонуклеотид может стать противоапоптотическим агентом и найти применение в биомедицине в качестве цитопротектора. Кроме того, полученные результаты подтверждают определяющую роль участка на конце экзона 9 в регуляции АС мРНК Casp-2.

ФИНИНСИРОВАНИЕ

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

ЛИТЕРАТУРА

- Bao, Q., Shi, Y. (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death and Differentiation*, **14**(1), 56–65. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402028
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Zhivotovsky, B. (2010) The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends in Cell Biology*, **20**(3), 150–159. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.12.006
- Wotawa, A., Solier, S., Logette, E., Solary, E., Corcos, L. (2002) Differential influence of etoposide on two caspase-2 mRNA isoforms in leukemic cells. *Cancer Letters*, **185**(2), 181–189. DOI: 10.1016/S0304-3835(02)00287-2
- Aravind, L., Dixit, V.M., Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**(2), 47–53. DOI: 10.1016/S0968-0004(98)01341-3
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S. (2005) Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331**(3), 859–867. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.03.191
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., Yuan, J. (1994) Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell*, **78**(5), 739–750. DOI: 10.1016/S0092-8674(94)90422-7
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M. (1997) Characterization of a mammalian cell death gene Nedd2. *Leukemia*, **11**(3), 385–386.
- Lavrik, I.N., Golks, A., Baumann, S., Krammer, P.H. (2006) Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood*, **108**(2), 559–565. DOI: 10.1182/blood-2005-07-007096
- Jiang, Z.H., Zhang, W.J., Rao, Y., Wu, J.Y. (1998) Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(16), 9155–9160. DOI: 10.1073/pnas.95.16.9155
- Côté, J., Dupuis, S., Wu, J.Y. (2001) Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(11), 8535–8543. DOI: 10.1074/jbc.M008924200
- Havlioglu, N., Wang, J., Fushimi, K., Vbranovski, M.D., Kan, Z., Gish, W., Wu, J.Y. (2007) An intronic signal for alternative splicing in the human genome. *PLoS one*, **2**(11), e1246. DOI: 10.1371/journal.pone.0001246
- Fushimi, K., Ray, P., Kar, A., Wang, L., Sutherland, L.C., Wu, J.Y. (2008) Up-regulation of the proapoptotic caspase 2 splicing isoform by a candidate tumor suppressor, RBM5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(41), 15708–15713. DOI: 10.1073/pnas.0805569105
- Rocha, C.S.J. (2019) Antisense Oligonucleotides for Splice Modulation: Assessing Splice Switching Efficacy. *Methods Mol. Biol.* **2036**, 73–90. DOI: 10.1007/978-1-4939-9670-4_4
- Zhdanov, D.D., Gladilina, Y.A., Grishin, D.V., Pokrovsky, V.S., Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova, S. S., Sokolov, N. N. (2018) Apoptotic Endonuclease EndoG Induces Alternative Splicing of Telomerase TERT Catalytic Subunit, Caspase-2, DNase I, and BCL-x in Human, Murine, and Rat CD4+ T Lymphocytes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **44**(1), 90–103. DOI: 10.1134/S1068162018010181
- Zhdanov, D.D., Vasina, D.A., Orlova, V.S., Gotovtseva, V.Y., Bibikova, M. V., Pokrovsky, V.S., Sokolov, N.N. (2016) Apoptotic endonuclease EndoG induces alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT and death of tumor cells. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **10**(4), 310–321. DOI: 10.1134/S1990750816040090
- Zhdanov, D.D., Gladilina, Y.A., Pokrovsky, V.S., Grishin, D.V., Grachev, V.A., Orlova, V.S., Sokolov, N.N. (2019) Endonuclease G modulates the alternative splicing of deoxyribonuclease 1 mRNA in human CD4+ T lymphocytes and prevents the progression of apoptosis. *Biochimie*, **157**, 158–176. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.11.020
- Baker, B.F., Lot, S.S., Condon, T.P., Cheng-Flournoy, S., Lesnik, E.A., Sasmor, H.M., Bennett, C. F. (1997) 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. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(18), 11994–12000. DOI: 10.1074/jbc.272.18.11994
- Rigo, F., Seth, P.P., Bennett, C.F. (2014) Antisense oligonucleotide-based therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **825**, 303–352. DOI: 10.1007/978-1-4939-1221-6_9
- Havens, M.A., Hastings, M.L. (2016) Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Research*, **44**(14), 6549–6563. DOI: 10.1093/nar/gkw533

Поступила:	15.07.2019
После доработки:	04.09.2019
Принята к публикации:	16.09.2019

INHIBITION OF CASPASE-2 ACTIVITY IN HUMAN JURKAT T-CELL LYMPHOMA CELLS BY SPLICE SWITCHING OLIGONUCLEOTIDE TO ITS pre-mRNA

D.D. Zhdanov^{1,2*}, A.A. Plyasova¹, Yu. A. Gladilina¹, M.V. Pokrovskaya¹, S.S. Alexandrova¹, N.N. Sokolov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: zhdanovdd@mail.ru

²Peoples Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198 Russia

Caspase-2 is a key enzyme involved in induction of apoptosis. The caspase-2 level is regulated by alternative splicing (AS) of its mRNA. The aim of this work was to determine the ability of an oligonucleotide complementary to Casp-2 pre-mRNA to induce AS. This oligonucleotide blocked the binding of splicing-regulating proteins to their sites at the end of exon 9 of Casp-2 pre-mRNA, leading to induction of AS of Casp-2 mRNA. The decrease in expression of full-size active splice-variant (Casp-2L) and the increase the expression of a shortened variant (Casp-2S) was demonstrated in human T-cell lymphoma Jurkat cell line. The expression level of total Casp-2 remained unchanged. Disproportion of splice variants of Casp-2 led to inhibition of enzymatic activity of caspase-2.

Key words: caspase-2; alternative splicing; splice switching oligonucleotide; enzymatic activity

FUNDING

The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of the State Academies of Sciences for 2013–2020.

Received: 15.07.2019, revised: 04.09.2019, accepted: 16.09.2019