

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. Гладилина¹, 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.



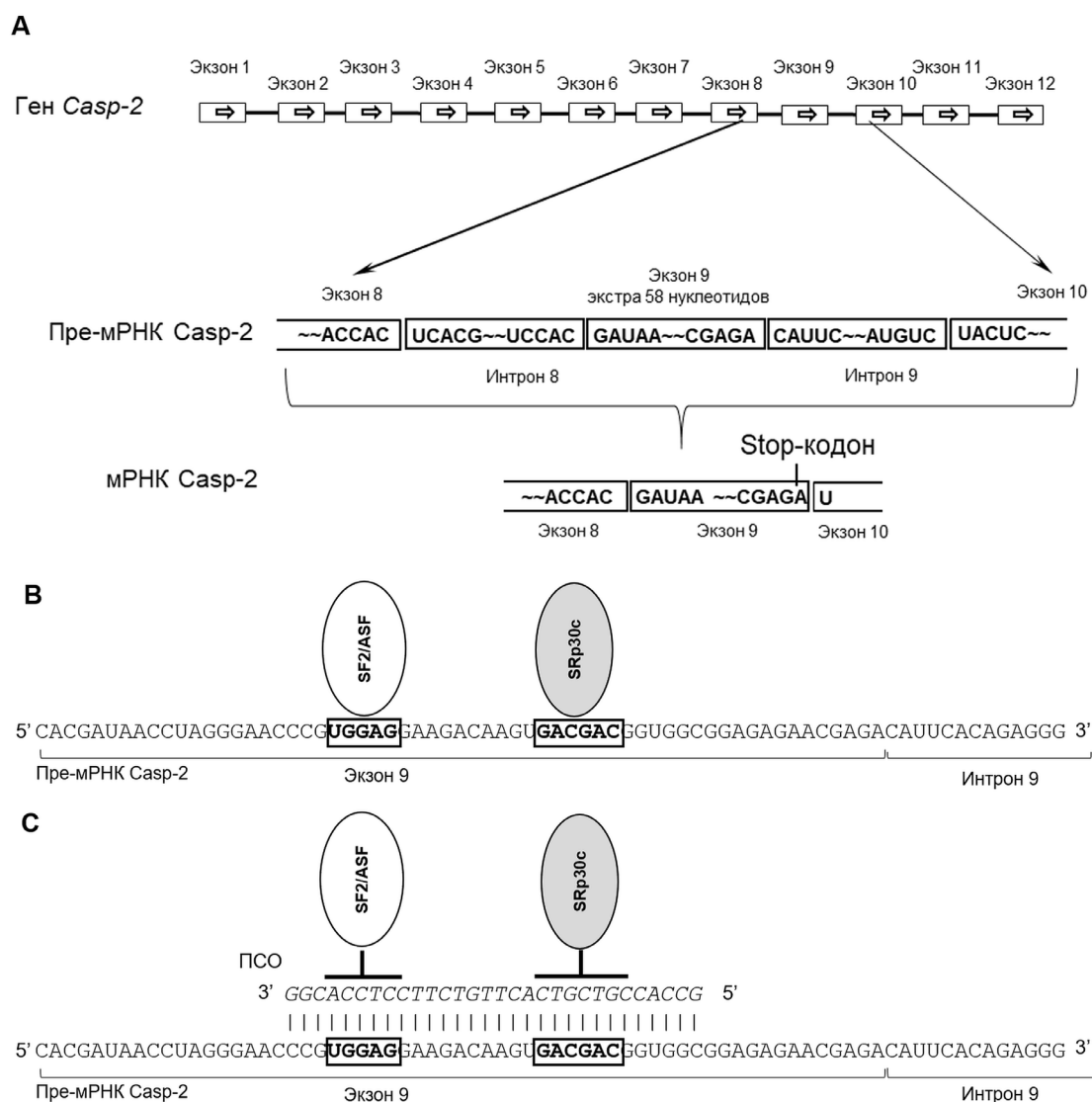


Рисунок 1. Гипотетическая схема механизма сплайсинга мРНК Casp-2 в результате действия ПСО. Гипотетическая схема АС мРНК Casp-2 (А). Включение экзона 9 в конечный мРНК транскрипт приводит к появлению стоп-кодона и синтезу укороченного Casp-2S сплайс-варианта. Схематическое изображение регулирующих сплайсинг 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 подсчете 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 °C
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 DTPRime 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 DTPRime 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).

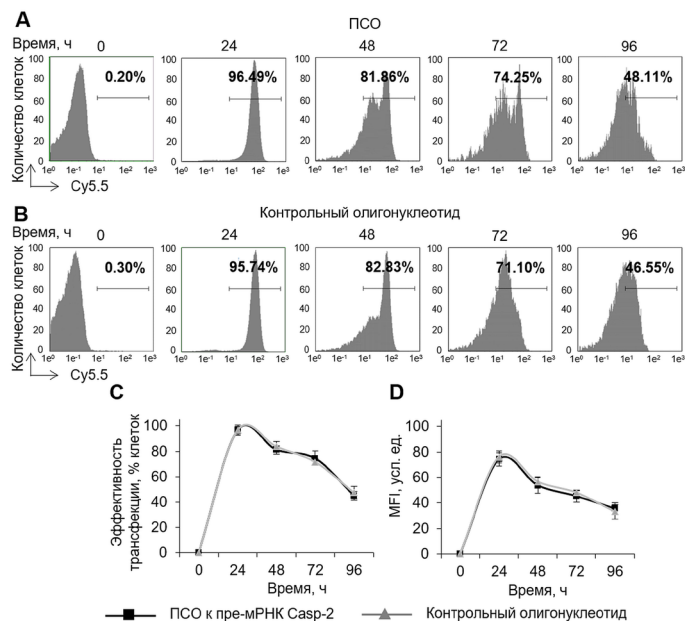


Рисунок 2. Эффективность трансфекции клеток Jurkat. Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии клеток в течение 96 ч после трансфекции PCSO (A) или контрольным 30-членным олигонуклеотидом (B). Эффективность трансфекции (C). MFI Cy5.5-положительных трансфицированных клеток. Усл. ед. – условные единицы

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 PCSO. PCSO представляют собой молекулы из нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, которые способны специфически взаимодействовать с комплементарной последовательностью. Следует отметить, что все PCSO являются синтетическими молекулами, и фактов их природного существования найти до сих пор не удалось. Типичный размер PCSO составляет 15–30 нуклеотидов, что обеспечивает высокую степень специфичности к таргетному участку и их относительно невысокую молекулярную массу, облегчающую проникновение внутрь клеток. Взаимодействие PCSO с таргетным участком перекрывает доступ субъединицам сплайсосома к сплайс-сайтам или регуляторным SR-белкам к *цис*-последовательностям на цепи пре-мРНК (рис. 1). Таким образом, PCSO способны

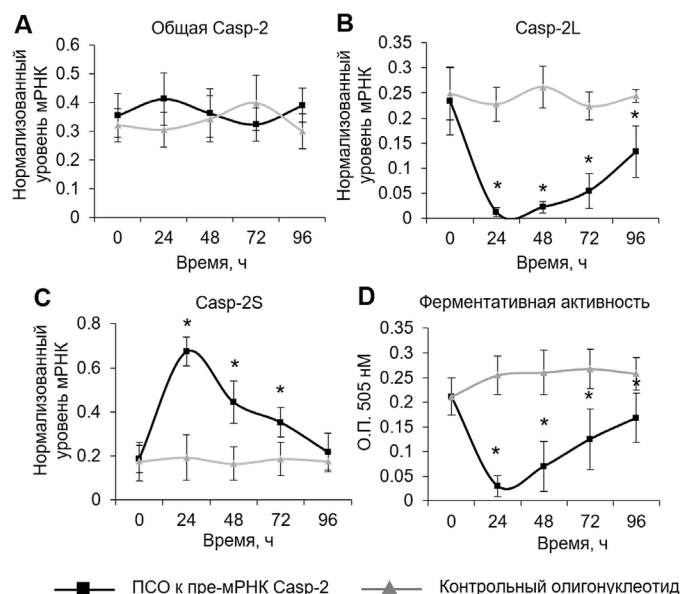


Рисунок 3. Индукция АС мРНК Casp-2 и торможение активности этого фермента в результате трансфекции клеток PCSO. Уровни мРНК общей Casp-2 (A) и её сплайс-вариантов: Casp-2L (B) и Casp-2S (C), определенные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Ферментативная активность Casp-2 в трансфицированных клетках (D). * $p \leq 0.05$ 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 PCSO 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

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M. (1997) Characterization of a mammalian cell death gene Nedd2. *Leukemia*, **11**(3), 385–386.
8. 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
9. 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
10. 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
11. Havlioglu, N., Wang, J., Fushimi, K., Vranoski, 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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