

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ**ПЕПТИД ЭПИТАЛОН ИНДУЦИРУЕТ ТЕЛОМЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЭЛОНГАЦИЮ ТЕЛОМЕР В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

В.Х.Хавинсон, И.Э.Бондарев, А.А.Бутюгов

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Добавление пептида эпیتالона в культуру фетальных фибробластов человека, негати́вных по теломеразе, индуцирует экспрессию каталитической субъединицы, ферментативную активность теломеразы и удлинение теломер, что, вероятно, связано с реактивацией гена теломеразы в соматических клетках и свидетельствует о возможности увеличения длительности жизни клеточной популяции и организма в целом.

Ключевые слова: пептид, эпیتالон, теломераза, теломеры, фибробласты

Пептид эпیتالон (Ala-Glu-Asp-Gly) сконструирован и синтезирован на основе анализа аминокислотного состава комплексного пептидного препарата эпیتالона, выделенного из эпифиза мозга животных [10]. Установлено, что эпیتالон восстанавливает нарушенную нейроэндокринную регуляцию у старых обезьян [11], индуцирует активацию рибосомальных генов [1]. Также обнаружено, что добавление тетрапептида в культуру лимфоцитов, выделенных от людей пожилого и старческого возраста, способствует деконденсации перичентрометрического гетерохроматина и активации генов, репрессированных вследствие зависимой от возраста конденсации эухроматиновых регионов хромосом [3]. Эпیتالон способствует увеличению средней продолжительности жизни у мышей и крыс и снижает частоту хромосомных aberrаций у ускоренно стареющих мышей SAM [2,4]. Следует отметить, что эпیتالон увеличивает среднюю и максимальную продолжительность жизни без развития злокачественных новообразований у этих животных [4-6]. Теломеразная теория старения связывает возрастное снижение пролиферативного потенциала тканей с критическим укорочением теломер в процессе клеточного деления [15]. Теломераза представляет собой рибонуклеиновый фермент, достраивающий потерянные из-за асимметрии в синтезе лидирующей и отстающей цепей ДНК теломерные повторы TTAGGG [13], и кодируется двумя генами — для РНК-

компонента и белкового компонента фермента [9]. У человека экспрессия белкового компонента теломеразы и соответствующая ферментативная активность наблюдается в большинстве злокачественных, половых, ранних эмбриональных и, возможно, стволовых клетках. Соматические клетки человека теломеразной активности лишены [12]. В настоящей работе было исследовано влияние эпیتالона на экспрессию каталитической субъединицы теломеразы, активность теломеразы и удлинение теломер в соматических клетках человека.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Культура положительной по теломеразе клеточной линии HeLa [9] и первичная культура человеческих фетальных легочных фибробластов 602/17 (24 нед) была получена из лаборатории клеточных культур НИИ гриппа РАМН. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина сульфата. Фетальные фибробласты, начиная с 27-го пассажа, обрабатывали эпیتالоном в концентрации 0.05 мкг/мл в течение 4 сут и анализировали [3].

Для детекции экспрессии белковой каталитической субъединицы теломеразы фетальные фибробласты помещали на стерильные предметные стекла ("Menzel-Glaser"). Иммуногис-

тохимическое окрашивание осуществляли мышиными моноклональными антителами к каталитической субъединице человеческой теломеразы NCL-hTERT (“Novocastra Laboratories Ltd.”). В качестве вторичных антител использовали универсальный пероксидазный набор ABC (“Dako”). Окрашивание препаратов проводили в соответствии с инструкциями к наборам указанных реактивов. Микроскопию осуществляли на аппарате “Nikon Eclipse E400” с цифровой камерой “AST1”.

Энзиматическую активность теломеразы определяли по протоколу амплификации теломерных повторов (TRAP) [9]. 10^6 Клеток отмывали холодным забуференным фосфатами физиологическим раствором (ЗФР) и лизировали 100 мкл холодного CHAPS-буфера, в котором в 10% глицерине содержалось 10 мМ трис-НСl, рН 7.5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА, 0.5% CHAPS, 0.1 мМ ФМСФ, 5 мМ 2-меркаптоэтанола, на льду в течение 30 мин. Экстракты центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 30 мин при 4°C. Супернатанты переносили в пробирки и хранили при -70°C. Для анализа теломеразной активности *in vitro* 2 мкл супернатанта добавляли к 46 мкл однократного Taq-буфера, содержащего 2 мкМ TS-праймера (5'-AAT CCG TCGAGC AGA GTT-3'), 50 мкМ dNTPs и инкубировали при 30°C в течение 30 мин. Затем добавляли 2 мкМ СХ-праймера (5'-CCC TTA CCC TTA CCC TTA CCC TTA -3'), 5 Ед Taq-ДНК полимеразы (“Promega”) и проводили 35 циклов ПЦР с параметрами: 94°C — 1 мин, 50°C — 1 мин, 72°C — 1.5 мин на термоциклере с нагревающейся крышкой “DNA Engine PTC-200” (“MJ Research”). Продукты ПЦР электрофоретически разделяли в 10% неденатурирующем полиакриламидном геле, ок-

рашивали с помощью “SYBR Green” (“Molecular Probes”) и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Среднюю длину теломер в индивидуальных клетках измеряли методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с проточной цитофлюориметрией (flow-FISH) [14]. Для этого клетки дважды отмывали в ЗФР, содержащем 0.2% БСА, и ресуспендировали в растворе для гибридизации, содержащем 70% формамида, 1.0% БСА, 20 мМ трис-НСl рН 7.0 (“Sigma”) и 0.3 мкг/мл специфичной для теломер С₃ТА₂ пептидно-нуклеиновой кислотной (ПНК) пробы, меченной ФИТЦ (“PerSeptive Biosystems”). Образцы подвергали тепловой денатурации при 80°C в течение 10 мин с последующей гибридизацией при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч. Затем суспензию клеток центрифугировали, супернатанты удаляли, а клетки дважды отмывали в буферном растворе, содержащем 70% формамида, 10 мМ трис-НСl рН 7.0, 0.1% БСА, 0.1% твин-20 (“Sigma”), и один раз в ЗФР, содержащем 0.1% БСА, 0.1% твин-20. После отмывания клетки ресуспендировали в ЗФР, содержащем 0.1% БСА, 10 мкг/мл РНКазы А (“Sigma”), 0.06 мкг/мл йодида пропидия (“Sigma”) и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч. Контрольную гибридизацию без ПНК осуществляли для выявления фоновой autofлуоресценции и для расчета специфичной для теломер флуоресценции в условных единицах. 10^4 Клеток анализировали методом проточной цитофлюориметрии на приборе “FACSCAN” (“Beckton-Dickenson”).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения “CellQuest” и “XnView1.17”. Достоверность раз-

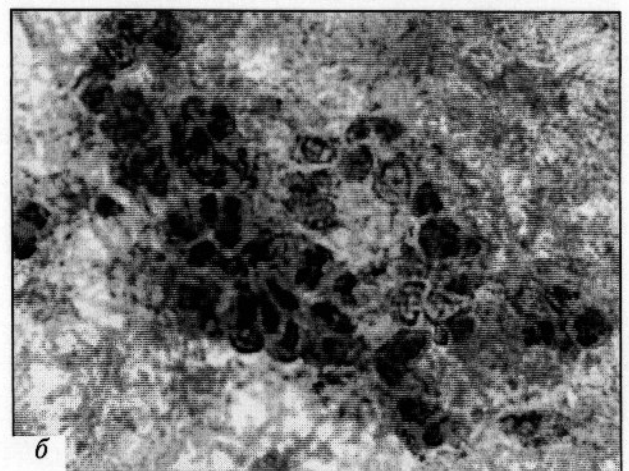
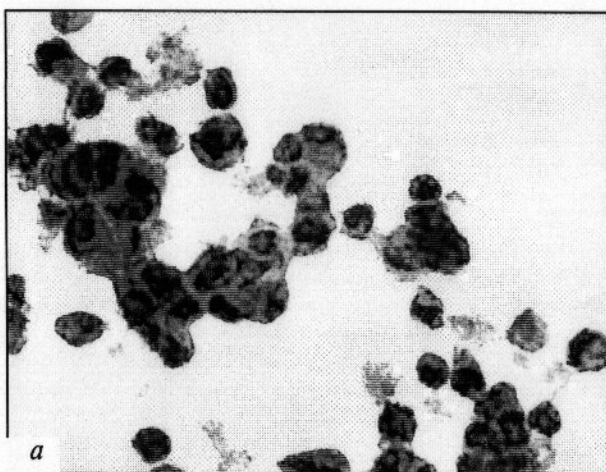


Рис. 1. Клетки HeLa (а) и фетальные фибробласты, обработанные эпиталоном (б). Окраска иммунопероксидазным методом, $\times 400$.

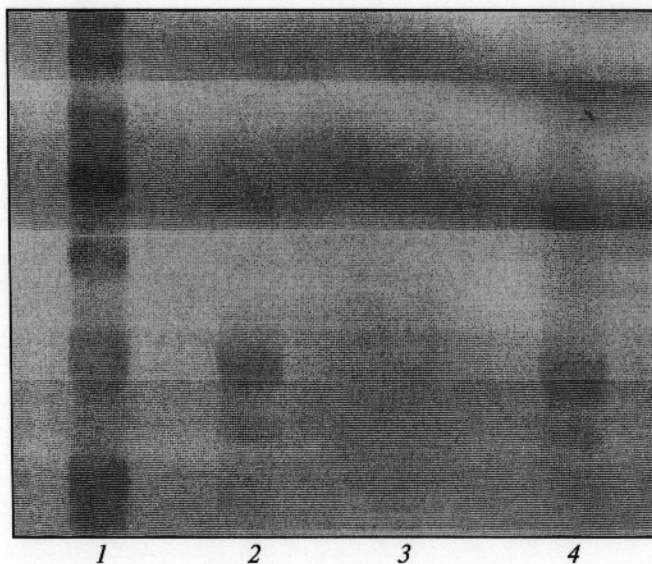


Рис. 2. Электрофоретическое разделение и детекция в ПААГ ПЦР-амплифицированных удлиненных TS-праймеров. 1 — 10 п.о., ДНК-маркер; 2 — клетки HeLa; 3 — фибробласты; 4 — фибробласты, обработанные эпиталоном.

личий между вариантами оценивали с помощью t критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуногистохимическое исследование показало интенсивное ядерное окрашивание клеток положительной по теломеразе линии HeLa (рис. 1, а), использованных в качестве положительного контроля, а также обработанных эпиталоном фетальных фибробластов (рис. 1, б). В интактных (контрольных) фетальных фибробластах подобного окрашивания не обнаружено.

В интактных фетальных фибробластах также не обнаружено теломеразной активности, в

то время как такая активность выявлена в клетках HeLa и фибробластах, обработанных эпиталоном (рис. 2).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* с проточной цитофлуориметрией продемонстрировала увеличение средней и максимальной длины теломер в фазе G1 клеточного цикла в фетальных фибробластах, обработанных эпиталоном, по сравнению с контрольными клетками (рис. 3). Средняя длина теломер в фазе G1 клеточного цикла в контроле составила 180 усл. ед. Добавление эпиталона привело к увеличению средней длины теломер до 240 усл. ед. ($p < 0.05$).

Результаты проведенного эксперимента показали, что эпиталон в соматических клетках

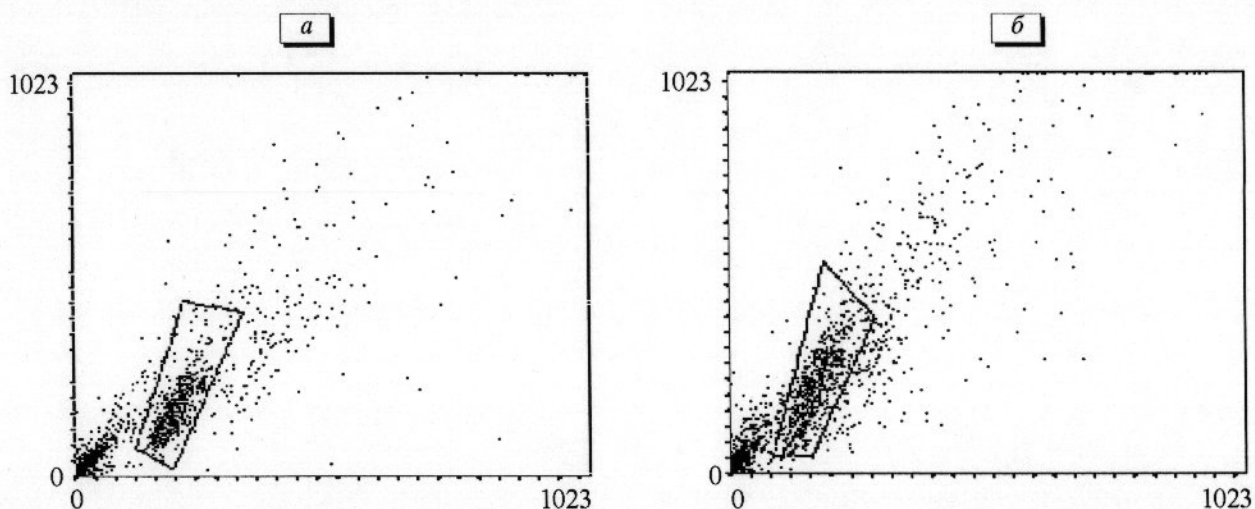


Рис. 3. Результаты определения длины теломер методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с проточной цитофлуориметрией (flow-FISH). Фетальные фибробласты в контроле (а), фетальные фибробласты, обработанные эпиталоном (б). По вертикали — прокрашивание теломер ПНК-ФИТЦ пробой (линейный масштаб). По горизонтали — прокрашивание клеточной ДНК йодидом пропидия (линейный масштаб). Клетки в фазе G1 клеточного цикла обведены рамками.

человека может индуцировать экспрессию энзиматического компонента теломеразы, теломеразную активность и удлинение теломер, которое в среднем составило 33.3%. Таким образом, в нашем эксперименте впервые установлена индукция теломеразной активности пептидом. Эти данные в значительной мере способствуют пониманию геропротекторных эффектов эпиталона в различных экспериментальных моделях [10]. Известно, что критически короткие теломеры не способны предотвращать слияние хромосом, что может привести к активации протоонкогенов и малигнизации клетки [7], активация теломеразы и удлинение теломер под действием пептида объясняет один из механизмов противоопухолевого действия эпиталона у старых животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов С.В., Бохелер К.П., Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. // Бюл. exper. биол. 2002. Т. 133, № 3. С. 340-347.
2. Розенфельд С.В., Того Е.Ф., Михеев В.С. и др. // Там же. С. 320-322.
3. Хавинсон В.Х., Лежсва Т.А., Монаселидзе Дж.Г. и др. // Там же. № 10. С. 451-455.
4. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., Mikhalski A.I., Yashin A.I. // Mech. Aging Dev. 2001. Vol. 122. P. 41-68.
5. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., Popovich I.G., Zabezhinski M.A. // Cancer Lett. 2002. Vol. 183. P. 1-8.
6. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., Provinciali M. et al. // Int. J. Cancer. 2002. Vol. 101. P. 7-10.
7. Elmore L.W., Holt S.E. // Mol. Carcinog. 2000. Vol. 28, N 1. P. 1-4.
8. Feng J., Funk W.D., Wang S.S. et al. // Science. 1995. Vol. 269, N 5228. P. 1236-1241.
9. Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T. et al. // Nat. Med. 1995. Vol. 1. P. 249-255.
10. Khavinson V.Kh. // Neuroendocrinol. Lett. 2002. Vol. 23, Suppl. 3. P. 11-144.
11. Khavinson V., Goncharova N., Lapin B. // Ibid. 2001. Vol. 22. P. 251-254.
12. Meyerson M., Counter C., Eaton E.N. // Cell. 1997. Vol. 90, N 4. P. 785-795.
13. Morin G.B. // Cell. 1989. Vol. 59, N 3. P. 521-529.
14. Rufer N., Dragowska W., Thornbury G. et al. // Nat. Biotechnol. 1998. Vol. 16, N 8. P. 743-747.
15. Wright W.E., Shay J.W. // Nat. Biotechnol. 2002. Vol. 20, N 7. P. 682-688.

Получено 24.04.03