

И. Э. Бондарев^{1,2}, В. Х. Хавинсон²

ПОДАВЛЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО МЕХАНИЗМА УДЛИНЕНИЯ ТЕЛОМЕР В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

¹ Гавайский центр исследования рака, Гавайский университет в Маноа, 96813 США, Гавайи, Гонолулу, Лаухала Стрит, 1236;² Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; e-mail: khavinson@gerontology.ru

Теломераза представляет собой рибонуклеопротеидный фермент, который удлиняет теломеры и, тем самым, поддерживает стабильность хромосом в зародышевых клеточных линиях, а также в большинстве раковых клеток, во время их удвоения. Однако до 30% опухолей различных типов у человека не экспрессируют теломеразу, а вместо этого используют альтернативный механизм удлинения теломер (АУТ, или АЛТ). В данной статье показано, что полученные из опухолевой ткани человека клеточные АЛТ-линии экспрессируют *LINE-1* (*L1*) ретротранспозон. Это указывает на его участие в поддержании теломер, возможно, с помощью механизма «проскальзывания» при синтезе теломерной ДНК. Помимо этого, подавление активности *L1*-кодированной обратной транскриптазы с помощью антисмысловой (антисенс) стратегии или обработки АЛТ-клеток ингибитором обратной транскриптазы 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидином (АЗТ) вызывает прогрессирующее укорачивание теломер, остановку деления в *G2*-фазе клеточного цикла и, в конечном счете, гибель раковой клетки. Данный результат указывает на наличие уникальной возможности излечения, в ряде случаев, онкологических заболеваний.

Ключевые слова: теломеры, теломераза, альтернативное удлинение теломер, ингибиторы обратной транскриптазы

Асимметрия в синтезе лидирующей и отстающей цепей ДНК приводит к «проблеме концевой репликации» линейных геномов [1]. Чтобы преодолеть эту проблему, в эукариотических хромосомах есть специализированные концевые структуры, теломеры, состоящие из повторов *TTAGGG* [2]. Постепенная потеря ДНК с концов теломер во время удвоения клетки была ассоциирована с контролем пролиферативного потенциала соматических клеток [14]. Напротив, генеративные линии [29] и большинство раковых клеток [17] экспрессируют специальный фермент (теломеразу), который удлиняет теломеры, тем самым поддерживая стабильность хромосом [10]. Подавление теломер-

разы ограничивает рост раковых клеток у человека [13]. Однако не все раковые клетки экспрессируют теломеразу. Было показано, что клетки, не экспрессирующие теломеразу, обладают очень длинными и гетерогенными теломерами в сочетании с иммортализацией, по-видимому, благодаря наличию одного или нескольких механизмов альтернативной элонгации теломер (АЛТ) [24]. Сообщается о наличии АЛТ у 30% опухолей различных типов у человека, клеточных линий, полученных из опухолевой ткани, и клеточных линий человека, иммортализованных *in vitro* [4–6, 24], а также до 50% в некоторых подгруппах опухолей [12]. Природа механизма АЛТ по-прежнему неясна, но сообщается о вероятном участии гомологичной рекомбинации между теломерами [9]. В то же самое время, различные ДНК-полимеразы, включая обратную транскриптазу ВИЧ, могут элонгировать последовательности теломерной ДНК *in vitro* за счёт «проскальзывания» при синтезе ДНК [21], что ведёт к синтезу продуктов, превышающих по размеру матричную ДНК. Поскольку белок, закодированный открытой рамкой считывания 2 (*ORF2*) *L1* ретротранспозона человека, представляет собой истинную обратную транскриптазу (*L1-PT*) [7, 18], и были получены сообщения об экспрессии *L1* ретротранспозона и соответствующей активности обратной транскриптазы в некоторых опухолях человека [3, 19, 28], можно предположить, что после завершения ретротранспозиции собственной РНК, *L1-PT* [16] может осуществлять синтез теломерной ДНК «проскальзыванием» и обеспечивать поддержание чрезвычайно длинных теломер в АЛТ клетках.

Материалы и методы

Клеточные линии. Все клеточные линии, используемые в исследовании, были получены из Американской коллекции клеточных культур (АТСС, Роквилл, Мэриленд). Среди источников клеток можно назвать остеогенные саркомы (*Saos-2* и *U-2 OS*), клеточные линии опухолей печени (*HEC-1*) и шейки матки (*HeLa*). Клетки культивировали в соответствии с рекомендациями АТСС. Для обработки клеток в питательные среды добавляли 0,2 мкмоль 3'-азидо-2',3'-дизезокситимидина — АЗТ («Sigma») [27].

Дот-блоттинг. Полная клеточная РНК была выделена с помощью раствора «RNA-STA 60» (Tel-Test, Inc.). Реакция была выполнена с использованием 30 мкг полной РНК и «HRP North2South» («Pierce»), меченой $\rho BS-L1_{RP}$ -EGFP плазмиды [22] в качестве специфического зонда в соответствии с протоколами производителей.

Инкорпорация бромдезоксисуридина (БДУ). Окрашивание для внедрения БДУ выполняли с использованием клеток, которые инкубировали с 10 мкмоль БДУ («Sigma») в течение 2,5 ч, окрашенными BU-33 анти-БДУ моноклональными антителами («Sigma») и FITC-мечеными Alexa 488 козьими антимышиными IgG (H+L) (Fab') фрагментами («Molecular Probes»), контрокрашенными с использованием 50 мкг/мл пропидиума йодида — ПИ («Sigma») и проанализированными с помощью проточной цитофлюориметрии в соответствии с описанием [26].

Измерение длины теломер с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивали с помощью теломерспецифического FITC конъюгированного $(C_3TA_2)_3$ пептидной нуклеиновой кислотой («Applied Biosystems») зонда и контрокрашивали с помощью 0,06 мкг/мл ПИ в соответствии с описанием [20].

Ингибирование обратной транскриптазы L1 с использованием антисмысловой стратегии. Для получения L1-специфичной обратной транскриптазы была создана целевая антисмысловая ПЦР-конструкция; это было сделано с помощью OT-F (5'-ATG ACA GGA TCA ACT TCA CAC-3'), OT-R (5'-TCC TGC TTT CTC TTG TAG GCA-3') праймеров и $\rho BS-L1_{RP}$ -EGFP плазмиды в качестве матрицы. 929 п.о. ПЦР-продукт был клонирован в вектор $\rho TargetT$ («Promega»). Рекомбинантные конструкции, содержащие вставку в смысловой и антисмысловой ориентации, были

очищены с помощью *Plasmid Midi Kit* («Qiagen»), линеаризированы с помощью *Xmn I* («Promega») и трансфицированы в *U-2* клетки OS с помощью «Липофектамина» («Gibco») в соответствии с инструкциями производителей. После 40 дней селекции на питательных средах, содержащих 0,5 мг/мл G418 («Gibco»), клетки были собраны, окрашены пептидной нуклеиновой кислотой и ПИ и проанализированы с помощью проточной цитометрии [25].

Результаты и обсуждение

Для того чтобы обнаружить L1-специфичную РНК в двух линиях клеток (остеогенные саркомы *U-2 OS* и *Saos-2*), которые по полученным сообщениям [24] поддерживают теломеры с помощью механизма АЛТ, полная мРНК была проанализирована с помощью дот-блоттинга и с помощью зонда, специфичного для L1-ретротранспозона. Теломеразоположительные клеточные линии (*HEC-1* и *HeLa*) использовали для сравнения [17]. Обе АЛТ клеточные линии в этом тесте дали положительные реакции. Как и ожидалось, клетки *HEC-1* дали полностью отрицательную реакцию. Анализ клеток *HeLa* продемонстрировал лишь следы L1 транскриптов, о чем сообщалось ранее [19].

Далее — для проверки гипотезы — линии АЛТ клеток были обработаны АЗТ в терапевтической концентрации [27], чтобы определить возможность ингибирования синтеза теломерной ДНК «проскальзыванием» с помощью АЗТ-ТФ, с последующим индуцированием укорочения теломер. Длину теломер в клеточных линиях, обработанных и необработанных АЗТ, измеряли с помощью проточной цитометрии с теломерспецифичным зондом в виде пептидной нуклеиновой кислоты [15, 25]. Чтобы определить распределение цикла клетки, последние окрашивали ПИ [25]. После 14 дней обработки АЗТ, в обеих клеточных линиях альтернативного удлинения теломер (АУТ) были отмечены укорочение теломер (в среднем на 50%), массивный апоптоз и остановка клеточного цикла в G2 фазе. Чтобы подтвердить специфичность АЗТ-индуцированного укорочения теломеры для клеток АУТ, клеточную линию *HeLa*, которая известна наличием теломеразы, обработали АЗТ при тех же самых условиях. АЗТ при выбранной концентрации не оказывал никакого влияния на длину теломер или распределение клеточного цикла в клетках *HeLa*.

Чтобы продемонстрировать укорочение теломер и изменения интенсивности синтеза ДНК, в динамике U-2 OS клетки были обработаны АЗТ в течение разных промежутков времени и одновременно проанализированы с помощью проточной цитометрии. Скорость синтеза ДНК была определена путём встраивания 5-БДУ. Результаты показали прогрессивное укорочение теломер (в среднем до 50 %) и снижение синтеза ДНК (в среднем на 40 %). Важно отметить, что изменения в распределении клеточного цикла, синтезе ДНК и длине теломер были быстрыми и могли быть обнаружены уже через 10 дней обработки АЗТ.

В то же самое время, окрашивание ПИ показало более высокое содержание ДНК в обработанных АЗТ клетках (в среднем на 25 %) на поздних стадиях обработки (21 и 40 дней) по сравнению с необработанными клетками. Рациональное объяснение этого факта заключается в том, что короткие теломеры вызывают слияние хромосом «конец-в-конец».

Чтобы подтвердить тот факт, что АУТ проводится только обратной транскриптазой L1, клетки U-2 OS были трансфицированы вектором экспрессии, содержащим часть человеческого L1-ORF2 в смысловой и антисмысловой ориентации. После 40 дней селекции с помощью G418, клетки были собраны и проанализированы с использованием проточной цитометрии. Клетки, несущие антисмысловую конструкцию, как и ожидалось, продемонстрировали массивный апоптоз, остановку клеточного цикла в G2-фазе и укорочение теломер. Напротив, клетки, экспрессирующие смысловую конструкцию, не показали никаких различий в длине теломер или клеточном цикле.

Заключение

Эти данные хорошо соотносятся с другими описанными случаями подавления механизма АУТ [23] или подавления теломеразы [11]. Индукция апоптоза в обработанных АЗТ клетках АУТ, по видимому, не зависит от p53, так как U-2 OS и Saos-2 представляют p53+/+ и p53-/- линии опухолевых клеток [8]. Поскольку опухоли с подавленным удлинением теломер теряют пролиферативный потенциал [14], а АЗТ уже находится в клиническом использовании, данные результаты дают уникальную возможность лечения до 30 % случаев онкологических заболеваний. Также могут применяться некоторые другие нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (например,

2',3'-дидезоксиинозин (ddI) или 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин (d4T), которые уже используются в клинической практике.

Авторы выражают благодарность Хейгу Казизиану за подарок плазмиды pBS-L1_{RP}-EGFP.

Литература

1. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР. 1971. Т. 201. С. 1496–1499.
2. Allshire R.C., Dempster M., Hastie N.D. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly // Nucleic Acids Res. 1989. Vol. 17. P. 4611–4627.
3. Bratthauer G.L., Fanning T.G. Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer // Oncogene. 1992. Vol. 7. P. 507–510.
4. Bryan T.M., Englezou A., Gupta J., Bacchetti S. et al. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity // EMBO J. 1995. Vol. 14. P. 4240–4248.
5. Bryan T.M., Englezou A., Dalla-Pozza L., Dunham M.A. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines // Nat. Med. 1997. Vol. 3. P. 1271–1274.
6. Bryan T.M., Reddel R.R. Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells // Europ. J. Cancer. 1997. Vol. 33. P. 767–773.
7. Clements A.P., Singer M.F. The human LINE-1 reverse transcriptase: effect of deletions outside the common reverse transcriptase domain // Nucleic Acids Res. 1998. Vol. 26. P. 3528–3535.
8. Craig C., Kim M., Ohri E. et al. Effects of adenovirus-mediated p16INK4A expression on cell cycle arrest are determined by endogenous p16 and Rb status in human cancer cells // Oncogene. 1998. Vol. 16. P. 265–272.
9. Dunham M.A., Neumann A.A., Fasching C.L., Reddel R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells // Nat. Genet. 2000. Vol. 26. P. 447–450.
10. Greider C.W., Blackburn E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts // Cell. 1985. Vol. 43. P. 405–413.
11. Guiducci C., Cerone M.A., Bacchetti S. Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability // Oncogene. 2001. Vol. 20. P. 714–725.
12. Gupta J., Han L.P., Wang P. et al. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity // J. nat. Cancer Inst. 1996. Vol. 88. P. 1152–1157.
13. Hahn W.C., Steward S.A., Brooks M.W. et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells // Nat. Med. 1999. Vol. 5. P. 1164–1170.
14. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // Nature. 1990. Vol. 34. P. 458–460.
15. Hultdin M., Gronlund E., Norrback K. et al. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry // Nucleic Acids Res. 1998. Vol. 26. P. 3651–3656.
16. Kazazian H.H. Jr., Moran J.V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome // Nat. Genet. 1998. Vol. 19. P. 19–24.
17. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer // Science. 1994. Vol. 266. P. 2011–2015.
18. Mathias S.L., Scott A.F., Kazazian H.H. Jr. et al. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element // Science. 1991. Vol. 254. P. 1808–1810.

19. Moran J.V., Holmes S.E., Naas T.P. et al. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells // *Cell*. 1996. Vol. 87. P. 917–927.
20. Murakami J., Nagai N., Shigemasa K., Ohama K. Inhibition of telomerase activity and cell proliferation by a reverse transcriptase inhibitor in gynaecological cancer cell lines // *Europ. J. Cancer*. 1999. Vol. 35. P. 1027–1034.
21. Nozawa K., Suzuki M., Takemura M., Yoshida S. In vitro expansion of mammalian telomere repeats by DNA polymerase alpha-primase // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28. P. 3117–3124.
22. Ostertag E.M., Prak E.T., DeBerardinis R.J. et al. Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28. P. 1418–1423.
23. Perrem K., Bryan T.M., Englezou A. et al. Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids // *Oncogene*. 1999. Vol. 18. P. 3383–3390.
24. Reddel R.R., Bryan T.M., Colgin L.M. et al. Alternative lengthening of telomeres in human cells // *Radiat. Res.* 2001. Vol. 155 P. 194–200.
25. Rufer N., Dragowska W., Thornbury G. et al. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry // *Nat. Biotechnol.* 1998. Vol. 16. P. 743–747.
26. Sasaki K., Murakami T., Oginio T. et al. Flow cytometric estimation of cell cycle parameters using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine // *Cytometry*. 1986. Vol. 7. P. 391–395.
27. Schmidtmayerova H., Mayer V. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by azidothymidine (AZT) in cultured cells // *Bratisl. Lek. Listy*. 1993. Vol. 94. P. 76–80.
28. Skowronski J., Singer M.F. Expression of a cytoplasmic LINE-1 transcript is regulated in a human teratocarcinoma cell line // *Proc. nat. Acad. Sci. USA*. 1985. Vol. 82. P. 6050–6054.
29. Wright W.E., Piatyszek M.A., Raine W.E. et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells // *Dev. Genet.* 1996. Vol. 18. P. 173–179.

Adv. geront. 2016. Vol. 29. № 2. P. 218–221

I.E. Bondarev^{1,2}, V.Kh. Khavinson²

SUPPRESSION OF ALTERNATIVE TELOMERE LENGTHENING IN CANCER CELLS WITH REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

¹ University of Hawaii Cancer Research Center at Manoa, 1236 Lauhala Street, Honolulu, Hawaii, 96813 USA;

² St. Petersburg's Institute of Bioregulation and Gerontology, 3, pr. Dynamo, St. Petersburg 197110;

e-mail: khavinson@gerontology.ru

Telomerase is a ribonucleoprotein enzyme that elongates telomeres and therefore maintains chromosomal stability in germline, and in the majority of cancer cells, during cell doubling. However, up to 30% of human tumors of different types do not express telomerase, but instead use an alternative lengthening of telomeres (*ALT*). Here authors show that human tumor-derived *ALT* cell lines express a *LINE-1* (*L1*) retrotransposon, which suggests its participation in telomere maintenance, possibly by a «slippage» mechanism of telomeric *DNA* synthesis. Moreover, suppression of the *L1* encoded reverse transcriptase activity using an antisense strategy, or treatment of the *ALT* cells with the reverse transcriptase inhibitor 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (*AZT*), induces progressive telomere loss, arrest in *G2*-phase of the cell cycle, and, eventually, in cancer cell death. This finding suggests an exciting opportunity for the cure of up to 30% of cancer cases.

Key words: telomeres, telomerase, alternative lengthening of telomeres, reverse transcriptase inhibitors