

УДК 576.32/.36:577.113

Аналоги Alu- и 7SL РНК подавляют жизнеспособность клеток MCF-7, модулируя транскрипцию генов ответа на стресс эндоплазматического ретикулума

Д. Н. Барякин^{1*}, Д. В. Семенов¹, А. В. Савельева^{1,2}, О. А. Коваль¹, И. В. Рабинов¹,
Е. В. Кулигина¹, В. А. Рихтер¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090,
Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090,
Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: baryakindn@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.08.2013

РЕФЕРАТ Геном человека на 11% состоит из Alu-ретротранспозонов, транскрипция которых РНК-полимеразой III (Pol III) приводит к накоплению от нескольких сотен до тысяч копий Alu-РНК в цитоплазме. Экспрессия Pol III Alu-РНК существенно возрастает при различных стрессах, а повышение уровня Alu-РНК сопровождается подавлением пролиферации, снижением жизнеспособности и индукцией апоптотических процессов в клетках человека. Однако вопрос о биологических функциях Pol III Alu-транскриптов, а также механизм их действия в настоящее время остается открытым. В представленной работе синтезированы аналоги Alu-РНК и ее эволюционного предшественника 7SL РНК. Трансфекция клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 аналогами Alu-РНК и 7SL РНК сопровождается снижением жизнеспособности и индукцией проапоптотических изменений в этих клетках. Анализ совместного действия этих аналогов и агониста D или тамоксифена показал, что снижение жизнеспособности клеток MCF-7, трансфицированных Alu-РНК и 7SL РНК, обусловлено модуляцией транскрипции. В результате полнотранскриптомного анализа экспрессии генов установлено, что под действием аналогов и Alu-, и 7SL РНК в клетках MCF-7 усиливается экспрессия генов регулятора транскрипции *NUPR1* (p8), а также фактора транскрипции *DDIT3* (CHOP). Сделан вывод, что индукция проапоптотических изменений клеток человека под действием аналогов Alu-РНК и 7SL РНК связана с активацией транскрипции генов факторов клеточного стресса, в том числе факторов ответа на стресс эндоплазматического ретикулума.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Alu-повторы, Alu-РНК, 7SL РНК, клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат; ЭР – эндоплазматический ретикулум; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид; JC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид; SRP (signal recognition particle) – сигналраспознающая частица.

ВВЕДЕНИЕ

Геном человека на 45% состоит из мобильных элементов, наиболее многочисленные среди которых Alu-повторы $\sim 1.1 \times 10^6$ копий, что составляет 10.6% ядерной ДНК [1, 2]. Во множестве Alu-повторов приматов выделяют несколько подсемейств, объединенных в три основные группы – AluJ, AluS и AluY [3]. Копийность представителей эволюционно древних AluJ-повторов, появление которых в геноме оце-

нивается примерно в 80 млн лет, и промежуточных подсемейств – AluS (~40 млн лет), в геноме человека не увеличивается. Повторы подсемейства AluY (> 20 млн лет) транспозиционно активны и в настоящее время [4].

Известно, что образование новых копий Alu- и родственных им SINE-повторов в геноме млекопитающих происходит по механизму ретротранспозиции, который включает стадию образования РНК-копий

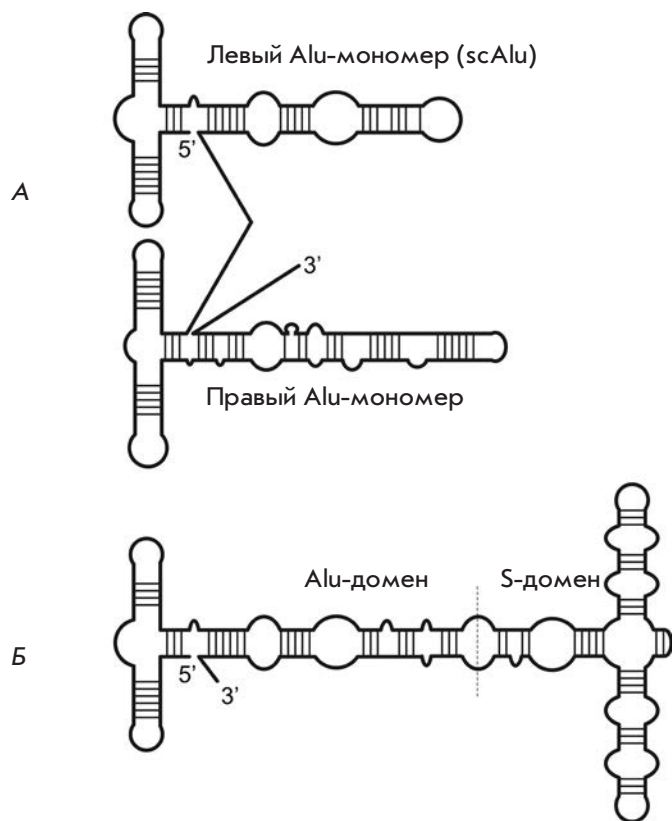


Рис. 1. Схематическое представление вторичной структуры Alu-РНК (А) и 7SL РНК (Б) в соответствии с данными [12]

SINE-ДНК. Эволюционно значимые изменения генома происходят благодаря «успешным» актам ретро-транспозиции повторов в половых клетках [5, 6].

Вместе с тем известно, что как в половых, так и в соматических клетках человека присутствуют РНК-копии геномных Alu-повторов (Alu-РНК) [7]. Alu-РНК синтезируются РНК-полимеразой III (Pol III) [8] и представляют собой набор РНК-копий «древних», транспозиционно неактивных Alu-повторов подсемейств J и S и транспозиционно активных AluY [7, 9, 10]. Alu-РНК, как и их эволюционный предшественник 7SL РНК, синтезируются в ядре, а затем транспортируются в цитоплазму. Часть Alu-транскриптов при этом подвергается 3'-эндонуклеазному процессингу с образованием укороченных форм – scAlu-РНК, представленных «левыми» мономерами Alu (рис. 1А). Наряду с укороченными Alu-транскриптами в клетках обнаруживают и непротранспозированные формы, представленные Alu-РНК, включающей и «левый», и «правый» мономеры, и 3'-концевую поли-А-последовательность (рис. 1А) [10, 11]. Количество полноразмерных

Pol III Alu-транскриптов составляет $\sim 10^2-10^3$ молекул на клетку. Регуляция экспрессии Alu-РНК в клетках человека отличается от регуляции других Pol III-транскриптов. Так, ингибитор трансляции циклогексимид и тепловой шок увеличивают экспрессию Alu-РНК в большей степени, чем других Pol III-транскриптов, таких, как 7SL, 7SK, 5S и U6 РНК [8]. Постоянное присутствие полноразмерных Alu-транскриптов в цитоплазме, а также увеличение экспрессии этих РНК при стрессе, с одной стороны, указывает на Alu-РНК как на строго контролируемый эндогенный фактор мутагенеза, а с другой, позволяет предположить, что Alu-РНК являются регуляторами жизненно важных клеточных процессов [12].

Ранее К. Sakamoto и соавт. [13] показали, что трансфекция клеток HeLa ДНК-конструкциями, содержащими транскрипционно активные Alu-повторы, а также конструкциями, кодирующими 7SL РНК, вызывает подавление репликации ДНК, ингибирует трансляцию и оказывает антипролиферативное действие. Установлено, что трансфекция клеток НЕК 293 почки эмбриона человека ДНК, кодирующей Alu-повторы, приводит к специфической активации экспрессии репортерных генов, предположительно, за счет прямого ингибирования Alu-РНК дцРНК-активируемой протеинкиназы PKR [14]. Позже показали [15], что активация экспрессии репортерного гена в присутствии Alu-РНК обусловлена уменьшением лаг-периода трансляции новосинтезированных мРНК и не связана с ингибированием PKR. Однако новый молекулярный механизм влияния Alu-РНК на инициацию трансляции новосинтезированных мРНК при этом не был предложен.

J. Häslер и К. Strub предположили, что участие Pol III Alu-транскриптов в клеточных процессах связано с их структурным сходством с 7SL РНК (рис. 1) [12, 16]. Как и 7SL РНК, Alu-РНК взаимодействует с белками сигналраспознающей частицы (SRP) [17, 18]. Способность Alu-РНК модулировать трансляцию объясняют взаимодействием с белками SRP9/14: показано, что Alu-РНК активирует трансляцию, а Alu-РНК в комплексе с SRP9/14 ингибирует трансляцию суммарной мРНК клеток HeLa *in vitro* в экстрактах зародышей пшеницы [16].

В экспериментах *in vitro* показано, что Alu-РНК непосредственно взаимодействует с каталитической субъединицей РНК-полимеразы II (Pol II) человека и подавляет активность комплекса Pol II–TBP–TFIIВ–TFIIF на стадии инициации транскрипции [19, 20]. Эти данные позволили предположить, что Alu-РНК является неспецифическим регулятором транскрипции мРНК в клетках человека [19].

Недавно при изучении молекулярных и клеточных механизмов географической атрофии сетчатки –

одной из основных причин снижения остроты зрения и слепоты у людей старше 50 лет – установлено, что гибель клеток пигментного эпителия сетчатки сопровождается снижением экспрессии гена *DICER1* и накоплением в них Pol III AluSc-транскрипта [21]. При этом показано, что ключевой фермент посттранскрипционного процессинга микроРНК – РНКазы *Dicer1* гидролизует Alu-РНК *in vitro*. Снижение экспрессии *DICER1* приводит к накоплению AluSc-РНК, которая, в свою очередь, подавляет жизнеспособность и вызывает апоптотическую гибель клеток эпителия сетчатки [21]. Предложен молекулярный механизм цитотоксического действия Alu-РНК в клетках пигментированного эпителия, который включает в себя генерацию активных форм кислорода митохондриями, активацию NLRP3-инфламмасом, а также активацию MyD88-сигнального каскада [22]. Таким образом, именно увеличение уровня экспрессии Alu-РНК рассматривается в качестве основной причины гибели клеток при географической атрофии сетчатки. Однако нерешенным остается вопрос о причинах, по которым Alu-РНК вызывает образование активных форм кислорода [21, 22].

В настоящей работе синтезированы аналоги AluYa5-РНК и 7SL РНК и проведен сравнительный анализ их влияния на жизнеспособность и активацию проапоптотических процессов в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Проанализировано также действие на клетки MCF-7 аналогов Alu-РНК и 7SL РНК в сочетании с цитостатиками – ингибиторами репликации, транскрипции, трансляции и клеточного транспорта. Установлено, что проапоптотические процессы, индуцируемые в клетках MCF-7 аналогами Alu-РНК и 7SL РНК, модулируются тамоксифеном и актиномицином D. Результаты полнотранскриптомного анализа изменения экспрессии генов в клетках, трансфицированных аналогами Alu-РНК и 7SL РНК, позволяют предложить новый механизм цитотоксического действия этих РНК, основанный на активации генов ответа на стресс ЭР – *NUPR1*, *DDIT3*, *FOXRED2* и *ASNS*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

В работе использовали: МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид (Sigma, США); Trizol, липофектамин 2000 (Invitrogen, США); Taq-полимеразу, T7-РНК-полимеразу (Fermentas, США); йодид пропидия, индикатор JC-1, стаурополин (Sigma, США); конъюгат аннексина V с ФИТЦ (BD Pharmingen, США); цисплатин («ЛЕНС-Фарм», Россия); циклогексимид, актиномицин D (Appli-

Chem, ФРГ); интерферон α («Микроген», Россия); метотрексат, монензин (Sigma, США); тамоксифен («Верофарм», Россия); рекомбинантный фактор некроза опухолей α человека (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск), обратную транскриптазу MoMLV, рибонуклеозидтрифосфаты, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, T4-полинуклеотидкиназу («Биосан», Новосибирск). Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН.

Синтез аналогов Alu- и 7SL РНК

Для получения ДНК-матриц – продуктов ПЦР, кодирующих аналоги Alu- и 7SL РНК под промотором РНК-полимеразы фага T7, геномную ДНК клеток MCF-7 амплифицировали со следующими парами праймеров (строчным шрифтом выделен промотор T7-РНК-полимеразы): AluYa5, chr6:104,183,151–104,183,559: 5'-ATTTGATTCGGTTATTTCCAAGA-3', 5'-atgcagctaatacagactcactataggGAGAGTCTCAGCTACAGAATTGAA-3'; 7SL, chr14:50,329,268–50,329,585: 5'-AAGAGACGGGGTCTCGCTAT-3', 5'-atgcagctaatacagactcactataggTTCGCAGCGTCTCCGACC-3'.

ДНК-матрицы очищали с помощью электрофореза в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях. ДНК элюировали из геля в присутствии 100 мМ NaAc и переосаждали 70% этанолом.

Аналоги AluYa5-РНК и 7SL РНК человека синтезировали в буфере, содержащем 40 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 6 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 10 мМ NaCl, 2 мМ спермидина, 2 мМ NTP и 30 ед. акт. РНК-полимеразы фага T7 при 37°C в течение 2 ч. ДНК-матрицы гидролизировали в присутствии 1 ед. акт. ДНКазы I в течение 40 мин при 37°C, а затем ДНКазу инактивировали, выдерживая 15 мин при 65°C.

Очистку аналогов AluYa5-РНК и 7SL РНК проводили на хроматографической системе Миллихром А2 («Эконова», Россия) с переосаждением 70% этанолом в присутствии 100 мМ NaAc. Первичную структуру аналогов подтверждали с помощью обратной транскрипции РНК, амплификации и секвенирования кДНК по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 3730XL Genetic Analyser ЦКП СО РАН «Геномика».

Анализ жизнеспособности клеток MCF-7, трансфицированных аналогами Alu- и 7SL РНК

Клетки аденокарциномы молочной железы человека культивировали в среде IMDM с добавлением 10 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина, 0.25 мкг/мл амфотерицина и 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Клетки MCF-7 культивировали в 96-луночном планшете до достижения плотности 60–70% моно-слоя. Клетки трансфицировали 1 мкг/мл РНК в комплексе с липофектаминоном по методике производителя (Invitrogen, США) и инкубировали в течение 24 или 72 ч, как указано в подписях к таблицам. В среду добавляли МТТ до конечной концентрации 0.7 мг/мл и инкубировали в течение 45 мин при 37°C. Среду удаляли, МТТ-формазан растворяли в изопропиловом спирте и определяли оптическую плотность раствора при $\lambda = 570$ нм с контролем при $\lambda = 620$ нм на многоканальном спектрофотометре Apollo 8 LB 912 (Berthold technologies).

Анализ проапоптотических изменений клеток MCF-7 с помощью проточной цитофлуориметрии

Клетки MCF-7, трансфицированные аналогами Alu- и 7SL РНК, и контрольные клетки, инкубированные в среде с липофектаминоном без РНК, трижды промывали PBS, инкубировали в течение 5 мин при 37°C в присутствии 0.1 мг/мл трипсина. Для анализа изменений клеточной мембраны суспензию клеток инкубировали в присутствии 4.5 мкг/мл йодида пропи-дия и конъюгата аннексина V – ФИТЦ по методике производителя (BD Pharmingen, США). Для анализа изменений трансмембранного потенциала митохондрий ($\delta\Psi$) суспензию клеток инкубировали в присутствии 2.5 мкг/мл JC-1. Препараты анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе Beckman Coulter FC 500 по методу, описанному в работе [23]. В качестве положительного контроля проапоптотических изменений использовали препараты клеток MCF-7, инкубированных 24 ч в присутствии 5 мкг/мл фактора некроза опухолей α или в присутствии 1 мкМ стауроспорина.

Анализ изменений транскриптома клеток MCF-7 на чипах Illumina

Клетки MCF-7 трансфицировали 1 мкг/мл Alu-РНК либо 1 мкг/мл 7SL РНК и инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в тех же условиях с липофектаминоном без РНК. Гибридизацию суммарной РНК клеток MCF-7 на чипах HT-12 Illumina проводили на базе ЗАО «Геноаналитика» (Москва). Дифференциальный анализ изменений экспрессии генов проводили с использованием алгоритма Illumina custom с нормированием данных по методу rank invariant. Для интерпретации результатов дифференциального анализа изменений экспрессии генов использовали транскрипты с параметром $\text{Detection_Pval} < 0.05$. При интерпретации данных об увеличении экспрессии генов под действием Alu-РНК из рассмотрения исключали транскрип-

ты, структура гибридизационных зондов (Illumina PROBE_SEQUENCE) для которых содержит прямые последовательности Alu-повторов.

Выборочную верификацию результатов полно-транскриптомного анализа проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием следующих пар праймеров:

PSPH – 5'-ATGATTGGAGATGGTGCCAC-3',
5'-CAGTGATATACCATTTGGCG-3';
DDIT3 – 5'-GACCTGCAAGAGGTCTGTGTC-3',
5'-AAGCAGGGTCAAGAGTGGTG-3';
MTHFD – 5'-TGTAGGACGAATGTGTTTGG-3',
5'-AACATTTGCAATGGGCATTCC-3';
TDP1 – 5'-CTCATCAGTTACTTTGATGGC-3',
5'-TGACTTCTTTGAAAGCGTCC-3';
ZNF682 – 5'-AAGCCAGAACTGATTAGCCG-3',
5'-AAGGTCTTCAGTGTAATGAG-3';
CEBPG – 5'-CGCTCGGAGTGGAGGCCGCC-3',
5'-CAGGGTGATCAATGGTTTCC-3'.

В качестве нормировочного контроля использовали мРНК *GAPDH*, *HPRT* [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние аналогов Alu- и 7SL РНК на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7

Действие Alu-РНК и ее эволюционного предшественника 7SL РНК на клетки человека анализировали с использованием аналога Alu-РНК – транскрипта геномного повтора человека AluYa5, а также аналога 7SL РНК человека.

Установлено, что трансфекция клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 аналогами Alu- и 7SL РНК вызывала существенные морфологические изменения: конденсацию цитоплазмы и ядер, разрушение мембранных контактов и открепление клеток от пластиковой подложки. К 72 ч инкубации аналоги Alu- и 7SL РНК вызывали морфологические изменения примерно у 20–30% клеток. При этом инкубация в среде с суммарной РНК MCF-7 или с аналогом фрагмента L1-РНК, или с липофектаминоном без РНК вызывала конденсацию и открепление от подложки не более 5% клеток MCF-7.

Чтобы выяснить, обусловлены ли морфологические изменения, наблюдаемые при воздействии аналогов Alu- и 7SL РНК, антипролиферативными и проапоптотическими процессами, клетки инкубировали с этими аналогами и анализировали их жизнеспособность с помощью МТТ-теста.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что аналоги Alu-РНК и 7SL РНК вызывают статистически значимое снижение жизнеспособности клеток MCF-7 в условиях трансфекции с липофектаминоном

Таблица 1. Влияние аналогов Alu-РНК и 7SL РНК на жизнеспособность, асимметрию, проницаемость цитоплазматической мембраны и трансмембранный потенциал митохондрий клеток MCF-7

РНК*	Снижение жизнеспособности (МТТ-индекс \pm SD, %)**	Проапоптотические изменения мембраны***			Трансмембранный потенциал митохондрий $\delta\Psi$ ****, % клеток	
		AnnV-/PI-	AnnV+/PI-	AnnV+/PI+	без диссипации	с диссипацией
		Жизнеспособные клетки, %	Апоптотические тельца, %	Вторичные некротические клетки, %		
7SL РНК	19.0 \pm 4.8	69.2	19.3	11.5	83.4	16.6
Alu-РНК	15.3 \pm 6.5	68.7	13.8	17.5	85.6	14.4
РНК MCF-7	-2.8 \pm 8.2	85.2	7.4	7.3	97.9	2.1
Липофектамин	0 \pm 2.5	89.9	6.8	3.3	99.7	0.3

*Клетки трансфицировали 1 мкг/мл РНК в комплексе с липофектамином.

**За 100% принимали жизнеспособность клеток, инкубированных в среде с липофектамином без РНК.

***Изменения мембраны клеток анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина V (AnnV), меченного ФИТЦ, и йодида пропидия (PI).

****Диссипацию трансмембранного потенциала митохондрий оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии клеток, окрашенных митохондриальным красителем JC-1 [23].

($p < 0.05$). Наблюдаемые морфологические изменения в совокупности со снижением жизнеспособности под действием аналогов Alu- и 7SL РНК указывают на то, что трансфекция этими РНК приводит к проапоптотическим изменениям клеток.

Для того чтобы независимым методом оценить индукцию проапоптотических процессов в клетках MCF-7 под действием Alu- и 7SL РНК, мы провели анализ изменений трансмембранного потенциала митохондрий $\delta\Psi$ с использованием индикатора JC-1. В митохондриях жизнеспособных клеток индикатор JC-1 образует агрегаты со спектром флуоресценции, смещенным в длинноволновую область ($\lambda_{max} = 590$ нм). Диссипация трансмембранного потенциала митохондрий $\delta\Psi$ сопровождается сдвигом максимума спектра флуоресценции индикатора в зеленую область ($\lambda_{max} = 527$ нм). Анализ клеточных препаратов методом проточной цитофлуориметрии в присутствии индикатора JC-1 позволяет оценить относительный вклад популяции клеток с проапоптотическими изменениями мембраны митохондрий [23, 25].

Установлено, что снижение жизнеспособности клеток MCF-7 под действием аналога 7SL РНК сопровождается снижением трансмембранного потенциала $\delta\Psi$ примерно у 17% клеток (табл. 1). При этом действие 7SL РНК не отличалось от действия аналога Alu-РНК ($p > 0.05$). Таким образом, данные об изменении потенциала митохондрий $\delta\Psi$ согласуются с результатами анализа жизнеспособности с использованием МТТ-теста и с оценкой глубины морфологических изменений клеток.

Трансфекция клеток аналогами Alu- и 7SL РНК приводит к появлению постклеточных структур, экспонирующих на внешней поверхности фосфатидилсерин, а также структур, мембрана которых проницаема для йодида пропидия – апоптотических и вторичных некротических телец. Суммарный вклад апоптотических и вторичных некротических телец в общую популяцию клеток, трансфицированных аналогом Alu-РНК или аналогом 7SL РНК, составлял около 31% (табл. 1).

Известно, что появление фосфатидилсерина на внешней поверхности цитоплазматической мембраны, детектируемое по окраске аннексином V, является одним из самых ранних биохимических признаков апоптоза [26]. В то же время снижение активности митохондриальных и цитоплазматических оксидоредуктаз и изменение уровня NADH/NADPH, детектируемое с помощью МТТ-теста [27], характерно для поздних стадий апоптоза. Поэтому различия в цитотоксическом действии Alu- и 7SL РНК, оцененные по снижению индекса МТТ (~ 15–19%) и индукции апоптотических процессов по экспозиции фосфатидилсерина и проницаемости цитоплазматической мембраны (~ 31%), можно объяснить большей чувствительностью подхода с использованием системы аннексин V/PI.

В целом эти результаты позволяют заключить, что аналоги и Alu-РНК, и 7SL РНК снижают жизнеспособность и индуцируют проапоптотические изменения в субпопуляции клеток MCF-7, а действие аналогов Alu-РНК несущественно отличалось

Таблица 2. Влияние аналогов Alu-РНК и 7SL РНК на жизнеспособность клеток MCF-7 в присутствии цитостатиков

Эффектор (IC ₄₀ *)	Alu(+)-РНК		7SL(+)-РНК	
	МТТ-индекс ± SD, %**	p***	МТТ-индекс ± SD, %**	p***
Цисплатин (9.5 мкМ)	25.7 ± 7.7	0.004	20.0 ± 3.5	0.001
Циклогексимид (0.56 мкМ)	17.9 ± 6.7	0.010	14.9 ± 7.5	0.026
Интерферон α (400 МЕ/мл)	17.8 ± 7.6	0.022	26.5 ± 7.9	0.009
Метотрексат (33.3 мкМ)	11.5 ± 10.2	0.171	26.5 ± 8.4	0.011
Монензин (2.5 пМ)	3.8 ± 6.3	0.352	10.8 ± 5.1	0.021
Тамоксифен (450 мкМ)	-1.2 ± 12.7	0.897	-12.1 ± 12.6	0.244
Актиномицин D (5.6 нМ)	21.5 ± 21.2	0.232	-57.7 ± 22.6	0.031

*Указаны экспериментально подобранные концентрации эффекторов, при которых жизнеспособность клеток снижалась на 40% после инкубации в течение 72 ч (в присутствии липофектамина).

**Дополнительное снижение МТТ-индекса к 72 ч после трансфекции клеток РНК. За 0% принимали жизнеспособность клеток, инкубированных в среде с липофектаминоном, с эффектором в указанной концентрации и без РНК.

***Значение *p* для *t*-критерия Стьюдента.

от действия 7SL РНК на уровне изменения активности цитоплазматических и митохондриальных дегидрогеназ (МТТ-тест), диссипации трансмембранного потенциала митохондрий $\delta\Psi$ и по оценке глубины морфологических изменений.

Влияние Alu-РНК и 7SL РНК на жизнеспособность клеток MCF-7 в сочетании с цитостатиками

Ключевые процессы, подавление или активация которых происходит при трансфекции клеток аналогами Alu-РНК и 7SL РНК, мы охарактеризовали по изменению жизнеспособности MCF-7 в условиях совместного действия аналогов и серии цитостатиков (табл. 2). Совместное действие РНК и ингибиторов клеточных процессов анализировали с использованием такой концентрации цитостатиков в культуральной среде, при которой к 72 ч инкубации жизнеспособность клеток MCF-7 снижалась на 40% (IC₄₀).

Из данных табл. 2 видно, что трансфекция клеток аналогами Alu-РНК и 7SL РНК усиливает цитотоксическое действие: цисплатина на ~25 и 20%; циклогексимид на ~18 и 15%; интерферона α на ~18 и 27% соответственно (*p* < 0.05). Таким образом, для этого набора эффекторов трансфекция аналогами Alu- и 7SL РНК оказывала однонаправленное и сравнимое по величине действие на клетки MCF-7.

В основе цитотоксического действия цисплатина лежит образование нерепарируемых сшивок ДНК, подавление репликации и митоза [28]. Аддитивность цисплатина и Alu-РНК или 7SL РНК (табл. 2) прямо указывает на то, что цитотоксическое действие этого

цитостатика и Alu-РНК или 7SL РНК – независимые процессы, а эффекты этих РНК не связаны непосредственно с репликацией ДНК и активацией процессов репарации в клетках MCF-7.

Действие интерферона α основано на рецепторопосредованной активации транскрипции генов, индуцируемых интерфероном, в том числе и гена протеинкиназы PKR. PKR, в свою очередь, активируется при взаимодействии с двухцепочечной РНК или с РНК, содержащей протяженные шпильки, и ингибирует синтез белка в клетке путем фосфорилирования фактора инициации трансляции eIF2 [29]. Поэтому аддитивное действие аналогов Alu- или 7SL РНК и интерферона α, может быть объяснено тем, что эти РНК, обладая развитой вторичной структурой (рис. 1), индуцируют PKR-зависимое подавление трансляции в клетках, обработанных интерфероном α. С другой стороны, активация PKR двухцепочечными РНК служит сигналом к индукции каскадов врожденного иммунного ответа клеток и, как следствие, интерферогенным стимулом [29]. Поэтому PKR-зависимый механизм действия Alu- и 7SL РНК предусматривает многократное усиление действия интерферона α. В то же время и Alu-, и 7SL РНК вызывают аддитивное снижение МТТ-индекса стимулированных интерфероном клеток, сравнимое со снижением жизнеспособности при сочетании Alu- или 7SL РНК с циклогексимидом или с действием самих РНК без интерферона α (табл. 1, 2). Кроме того, ранее в ряде работ было показано, что действие Alu-РНК на различные про-

цессы в клетках млекопитающих не связано непосредственно ни с развитой вторичной структурой этих РНК, ни с активацией PKR [15, 21, 22]. Таким образом, PKR-зависимый механизм действия структурированных РНК, а также интерферогенная активность таких РНК только частично объясняет индукцию проапоптотических процессов Alu- и 7SL РНК в клетках MCF-7.

7SL РНК вызывала значимое снижение МТТ-индекса в сочетании с метотрексатом и монензином ($p < 0.05$), а изменение жизнеспособности клеток при трансфекции Alu-РНК в сочетании с этими цитостатиками не было статистически значимым (табл. 2). При этом снижение МТТ-индекса 7SL РНК в присутствии метотрексата или монензина отличалось от снижения, индуцируемого Alu-РНК в сочетании с этими цитостатиками ($p < 0.05$). Эти данные показывают, что ингибитор дегидрофолатредуктазы – метотрексат, и ионофор – монензин, частично подавляют цитотоксическое действие Alu-РНК, но не 7SL РНК.

В препаратах клеток, инкубированных в среде с тамоксифеном, не наблюдалось дополнительного статистически значимого снижения жизнеспособности ($p > 0.05$) при трансфекции Alu-РНК или 7SL РНК (табл. 2). Поэтому можно заключить, что тамоксифен частично подавляет цитотоксическое действие и Alu-РНК, и 7SL РНК на клетки MCF-7.

Известно, что тамоксифен ингибирует рецепторы эстрогена, а его действие на клетки MCF-7 обусловлено изменением транскрипции эстрогензависимых генов. Тамоксифен также является эффективным модулятором действия интерферонов. Совместное действие интерферона и тамоксифена синергически снижает жизнеспособность клеток MCF-7 и индуцирует их массовую гибель как в культуре, так и в модели ксенографтов [30, 31]. Поэтому частичное подавление тамоксифеном цитотоксического действия аналогов Alu- и 7SL РНК на клетки MCF-7 подтверждает предположение о том, что влияние этих РНК на жизнеспособность клеток не связано с потенциальными интерферогенными свойствами этих структурированных РНК.

Актиномицин D, ДНК-интеркалятор и ингибитор транскрипции и репликации, полностью подавлял цитотоксическое действие аналога 7SL РНК, а Alu-РНК в сочетании с этим цитостатиком не вызывала дополнительного значимого снижения жизнеспособности (табл. 2). Принимая во внимание, что ингибирование репликации цисплатином не снижало действия Alu- и 7SL РНК, можно заключить, что частичная, в случае с Alu-РНК, и полная, в случае с 7SL РНК, отмена их цитотоксического действия актиномицином D обусловлена влиянием этих РНК

на транскрипцию в клетках человека. Данные о компенсации цитотоксического эффекта Alu- и 7SL РНК модулятором транскрипции тамоксифеном (табл. 2) подтверждают вывод о том, что ключевым элементом механизма действия и Alu-РНК, и ее ближайшего гомолога 7SL РНК на жизнеспособность клеток MCF-7 является модуляция транскрипции ядерной ДНК.

Анализ изменения экспрессии генов в клетках MCF-7 под действием аналогов Alu- и 7SL РНК

Гены, экспрессия которых изменяется под действием аналогов Alu- и 7SL РНК, мы выявляли с помощью полнотранскриптомного анализа РНК клеток MCF-7 на микрочипах Illumina HT-12. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в среде с липофектамином без РНК.

Установлено, что трансфекция Alu-РНК в клетки MCF-7 приводит к повышению экспрессии 68 транскриптов в 3 раза и более и к понижению экспрессии 87 транскриптов. Трансфекция клеток 7SL РНК повышала в 3 раза и более уровень 45 генов и понижала уровень 74 генов. В группах транскриптов с повышенной экспрессией выявлено 13 транскриптов, общих для Alu- и 7SL РНК, и 25 общих транскриптов обнаружено в группах с пониженной экспрессией. Эти данные показывают, что Alu-РНК и 7SL РНК вызывают изменения различающихся наборов транскриптов и позволяют предположить, что различаются также специфичность влияния, а возможно, и механизмы индукции проапоптотических процессов в клетках человека. Однако детальный анализ изменения экспрессии про- и антиапоптотических факторов позволил выявить ряд ключевых процессов, общих для клеток, трансфицированных как Alu-РНК, так и 7SL РНК.

Из данных, представленных в табл. 3 и 4, видно, что в списке транскриптов, экспрессия которых повышается в наибольшей степени, практически отсутствуют продукты интерферон-индуцируемых генов, таких, как *OAS*, *ISG*, *IFIT* или *STAT1* [32]. Кроме того, анализ GO-аннотаций в группе из 68 транскриптов, индуцируемых Alu-РНК, и в группе 45 транскриптов, индуцируемых 7SL РНК, не выявил статистически значимого ($p < 10^{-4}$) повышения вклада групп генов интерферонового ответа и генов врожденного иммунного ответа (данные не приведены). Эти результаты еще раз подтверждают вывод о том, что индукцию проапоптотических процессов в клетках человека аналогами Alu-РНК и 7SL РНК нельзя объяснить активацией PKR, взаимодействием с TLR-рецепторами или другим механизмом, связанным с интерферогенным действием этих РНК.

Среди генов, экспрессия которых повышается под действием и Alu-РНК, и 7SL РНК (табл. 3, 4),

Таблица 3. Транскрипты клеток MCF-7, уровень которых изменяется под действием аналога Alu-ПНК

Транскрипт*	Идентификатор	Относительное изменение экспрессии**	Краткое описание
Повышение экспрессии			
<i>NUPR1</i>	NM_001042483	5.3	Nuclear protein, transcriptional regulator
<i>PER3</i>	NM_016831	5.1	Period homolog 3 (Drosophila)
<i>TXNIP</i>	NM_006472	4.7	Thioredoxin interacting protein
<i>ASNS</i>	NM_133436	4.5	Asparagine synthetase, transcript variant 1
<i>ZNF773</i>	NM_198542	4.3	Zinc finger protein 773
<i>FAM119A</i>	NM_001127395	4.1	Family with sequence similarity 119, member
<i>ZNF750</i>	NM_024702	4.1	Zinc finger protein 750
<i>PRRT2</i>	NM_145239	4.0	Proline-rich transmembrane protein 2
<i>KCNE4</i>	NM_080671	3.9	Potassium voltage-gated channel
<i>C6ORF48</i>	NM_001040437	3.9	Chromosome 6 open reading frame 48
<i>AUH</i>	NM_001698	3.8	AU RNA binding protein
<i>DDIT3</i>	NM_004083	3.8	DNA-damage-inducible transcript 3
<i>KRT81</i>	NM_002281	3.7	Keratin 81
<i>RNASE4</i>	NM_194430	3.6	Ribonuclease, RNase A family 4
<i>FBXO15</i>	NM_152676	3.6	F-box protein 15
<i>FLJ45244***</i>	NM_207443	3.6	<i>DICER1</i> antisense RNA 1 non-coding RNA
<i>MTHFD2</i>	NM_001040409	3.5	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
Понижение экспрессии			
<i>FOXRED2</i>	NM_024955	0.15	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2
<i>PPRC1</i>	NM_015062	0.19	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1
<i>CHP</i>	NM_007236	0.21	Calcium binding protein P22
<i>PHLDA2</i>	NM_003311	0.21	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2
<i>TMEM158</i>	NM_015444	0.21	Transmembrane protein 158
<i>ATN1</i>	NM_001007026	0.22	Atrophin 1 (ATN1)
<i>DLK2</i>	NM_206539	0.23	Delta-like 2 homolog (Drosophila)
<i>HPS1</i>	NM_182639	0.23	Hermansky-Pudlak syndrome 1
<i>TMEM214</i>	NM_017727	0.23	Transmembrane protein 214
<i>MED24</i>	NM_014815	0.24	Mediator complex subunit 24
<i>PLEC1</i>	NM_000445	0.24	Plectin 1, intermediate filament binding protein 500 kDa
<i>ZYX</i>	NM_003461	0.24	Zyxin
<i>ACD</i>	NM_022914	0.25	Adrenocortical dysplasia homolog (mouse)
<i>PCDH7</i>	NM_002589	0.25	Protocadherin 7 (PCDH7)
<i>RDH10</i>	NM_172037	0.25	Retinol dehydrogenase 10 (all-trans)
<i>GPX2</i>	NM_002083	0.26	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)

*Приведены транскрипты, аннотированные в базе данных RefSeq (accessions NM, NR). Серым выделены транскрипты, экспрессия которых изменилась под действием и Alu-ПНК, и 7SL ПНК.

**Изменение количества транскрипта в клетках, обработанных Alu-ПНК, относительно контрольных клеток, обработанных липофектаминол.

***Последовательность зонда HT-12 Illumina для гена *FLJ45244* совпадает с последовательностью *DICER-AS1* (NR_015415).

Таблица 4. Транскрипты клеток MCF-7, уровень которых изменяется под действием аналога 7SL РНК

Транскрипт*	Идентификатор	Относительное изменение экспрессии**	Краткое описание
Повышение экспрессии			
<i>NUPR1</i>	NM_001042483	4.5	Nuclear protein, transcriptional regulator
<i>TXNIP</i>	NM_006472	4.3	Thioredoxin interacting protein
<i>PRRT2</i>	NM_145239	4.3	Proline-rich transmembrane protein 2
<i>PSPH</i>	NM_004577	4.2	Phosphoserine phosphatase
<i>ASNS</i>	NM_133436	3.8	Asparagine synthetase, transcript variant 1
<i>KY</i>	NM_178554	3.8	Kyphoscoliosis peptidase
<i>FABP6</i>	NM_001445	3.7	Fatty acid binding protein 6, ileal
<i>DDIT3</i>	NM_004083	3.6	DNA-damage-inducible transcript 3
<i>CTSK</i>	NM_000396	3.6	Cathepsin K
<i>KRT81</i>	NM_002281	3.6	Keratin 81
<i>PFAAP5</i>	NM_014887	3.4	Phosphonoformate immuno-associated protein 5
<i>NT5E</i>	NM_002526	3.4	5'-Nucleotidase, ecto (CD73)
<i>ARL3</i>	NM_004311	3.4	ADP-ribosylation factor-like 3
<i>ULBP1</i>	NM_025218	3.4	UL16 binding protein 1
<i>BACE2</i>	NM_138992	3.4	Beta-site APP-cleaving enzyme 2
<i>RNASE4</i>	NM_194431	3.3	Ribonuclease, RNase A family 4
Понижение экспрессии			
<i>FOXRED2</i>	NM_024955	0.16	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2
<i>GPX2</i>	NM_002083	0.16	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
<i>TUBB2A</i>	NM_001069	0.17	Tubulin, beta 2A
<i>PLEC1</i>	NM_000445	0.19	Plectin 1, intermediate filament binding protein
<i>ZC3HAV1</i>	NM_024625	0.20	Zinc finger CCCH-type, antiviral 1
<i>SLC35C1</i>	NM_018389	0.21	Solute carrier family 35, member C1
<i>NCOR2</i>	NM_001077261	0.21	Nuclear receptor co-repressor 2
<i>PIGW</i>	NM_178517	0.22	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class W
<i>MUC1</i>	NM_001044391	0.22	Mucin 1, cell surface associated
<i>OPA3</i>	NM_025136	0.23	Optic atrophy 3 (autosomal recessive, with chorea and spastic paraplegia)
<i>PDPK1</i>	NM_002613	0.23	3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1
<i>SLC29A3</i>	NM_018344	0.23	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3
<i>HCFC1</i>	NM_005334	0.24	Host cell factor C1 (VP16-accessory protein)
<i>FAHD1</i>	NM_001018104	0.24	Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1 (FAHD1)
<i>PARP12</i>	NM_022750	0.24	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12
<i>LRRC14</i>	NM_014665	0.25	Leucine rich repeat containing 14

*Приведены транскрипты, аннотированные в базе данных RefSeq (accessions NM, NR). Серым выделены транскрипты, экспрессия которых изменилась под действием и Alu-РНК, и 7SL РНК.

**Изменение количества транскрипта в клетках, обработанных Alu-РНК, относительно контрольных клеток, обработанных липофектаминол.

выделяется *NUPR1*. Известно, что экспрессия гена транскрипционного регулятора *NUPR1* (кодирует белок p8) усиливается в ответ на различные стрессовые воздействия и вызывает устойчивость клеток к химиотерапевтическим средствам, а снижение экспрессии *NUPR1* сопровождается подавлением роста раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [33, 34]. Однако повышение уровня мРНК *NUPR1* сопровождается и апоптотические изменения раковых клеток [35].

Продукт гена *DDIT3* – фактор транскрипции *CHOP* – ключевой медиатор клеточной гибели в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума. Повышение экспрессии этого гена или микроинъекции белка *CHOP* вызывают диссипацию трансмембранного потенциала митохондрий ($\delta\Psi$), генерацию активных форм кислорода и апоптотическую гибель клетки (детально рассмотрено в обзоре [36]). Поэтому наблюдаемое повышение экспрессии гена *DDIT3* в клетках MCF-7 под действием аналогов Alu- и 7SL РНК (табл. 3, 4) является существенным проапоптотическим стимулом. Повышение экспрессии *DDIT3* (*CHOP*) и индукция апоптоза в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума могут вызываться непосредственно активацией гена *NUPR1* (p8), как показано в случае индуцируемого канбиноидами апоптоза клеток астроцитомы U87MG [35].

Необходимо отметить, что повышение уровня мРНК *DDIT3*, а также мРНК *PSPH* и *MTHFD2* в клетках MCF-7 под действием Alu-РНК или 7SL РНК (табл. 3, 4) подтверждено при выборочной проверке результатов полнотранскриптомного анализа независимым методом ОТ-ПЦР (данные не иллюстрированы).

Экспрессия гена *FOXRED2* понижается под действием и Alu-, и 7SL РНК (табл. 3, 4). Продукт гена *FOXRED2*, флавопротеин ERFAD, участвует в перемещении белков из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму. Снижение экспрессии этого гена связывают с активацией протеотоксического стресса эндоплазматического ретикулума [37]. Еще один признак активации ответа на стресс эндоплазматического ретикулума – повышение экспрессии гена аспарагинсинтетазы *ASNS*, транскрипция которого активируется ССААТ/энхансерсвязывающим белком *CHOP* [38].

Таким образом, снижение экспрессии *FOXRED2*, наблюдаемое одновременно с повышением уровня *NUPR1* (p8), *DDIT3* (*CHOP*) и *ASNS*, позволяет заключить, что индукция проапоптотических процессов в клетках MCF-7 под действием Alu- и 7SL РНК связана с модуляцией транскрипции ключевых клеточных факторов ответа на стресс эндоплазматического ретикулума.

Недавно был предложен новый механизм развития географической атрофии сетчатки, основанный

на снижении экспрессии *DICER1* в клетках эпителия, который приводит к усилению экспрессии Alu-РНК [21]. Субретинальная трансфекция клеток конструкцией, кодирующей 7SL РНК, а также аналогом 7SL РНК не приводила к дегенерации пигментного эпителия сетчатки мыши, в отличие от трансфекции Alu-РНК [21, 22]. Высказано предположение, что цитотоксическое действие Alu-РНК на клетки пигментного эпителия сетчатки связано с неустановленными свойствами Alu-РНК, а механизм действия – с генерацией активных форм кислорода митохондриями [22].

Полученные нами данные показывают, что и Alu-, и 7SL РНК вызывают сравнимые изменения трансмембранного потенциала митохондрий клеток MCF-7 (табл. 1). Следовательно, по крайней мере в клетках MCF-7, и Alu-, и 7SL РНК индуцируют близкие по глубине изменения мембраны митохондрий. При анализе влияния Alu- и 7SL РНК в сочетании

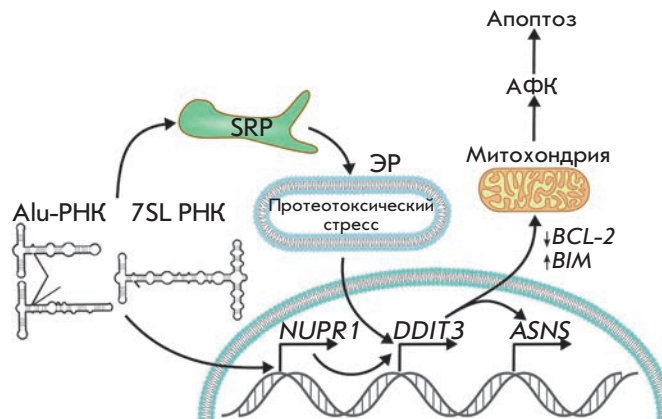


Рис. 2. Схема предполагаемого механизма индукции проапоптотических процессов в клетках MCF-7, трансфицированных аналогами Alu- и 7SL РНК. Трансфекция клеток аналогами Alu- и 7SL РНК сопровождается увеличением экспрессии гена регулятора транскрипции *NUPR1* (p8), который активирует транскрипцию *DDIT3* (*CHOP*) [35]. Увеличение экспрессии фактора транскрипции *DDIT3* вызывает апоптотические изменения внешней мембраны митохондрий по механизму, включающему понижение транскрипции *BCL-2* и активацию транскрипции *BIM*. Апоптоз, индуцируемый *CHOP* (*DDIT3*), сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК) [36]. Увеличение экспрессии *DDIT3* может происходить в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума, вызванного взаимодействием аналогов Alu- и 7SL РНК с белками SRP, – нарушением транспорта белков через мембрану ЭР. Стресс эндоплазматического ретикулума сопровождается повышением экспрессии гена аспарагинсинтетазы (*ASNS*), транскрипция которого активируется *CHOP* [38]

с актиномицином D и тамоксифеном на жизнеспособность клеток MCF-7 установлено, что цитотоксическое действие этих РНК обусловлено модуляцией транскрипции. Данные об изменении экспрессии генов (табл. 3, 4) показывают, что трансфекция клеток аналогами Alu-РНК или 7SL РНК сопровождается не только неспецифическим ответом на экзогенную РНК – увеличением уровня мРНК рибонуклеазы *RNASE4* и 5'-эктонклеотидазы *NT5E*, но и появлением проапоптотических стимулов: *NUPR1*, *DDIT3*, *FOXRED2*. При этом экспрессия гена *NUPR1* индуцируется в ответ на широкий спектр стрессовых воздействий, а *DDIT3* и *FOXRED2* специфически связаны с ответом на стресс эндоплазматического ретикулума. Продукт гена *DDIT3* – белок СНОР, является ключевым индуктором апоптоза в ответ на протеотоксический стресс ЭР. Полученные нами данные позволяют предложить механизм проапоптотического действия Alu- и 7SL РНК, который включает в себя активацию транскрипции *NUPR1* (p8) и проапоптотического гена *DDIT3*, продукт которого СНОР индуцирует апоптоз по митохондриальному пути в субпопуляции клеток MCF-7 (рис. 2).

Поскольку 7SL РНК является компонентом сигналраспознающей частицы, а Alu-РНК способна взаимодействовать с белками SRP9/14, можно предположить, что активация аналогами Alu- и 7SL РНК ответа на стресс эндоплазматического ретикулума обусловлена нарушением функционирования именно этого компонента трансляционного аппарата клеток человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее было установлено, что увеличение экспрессии Alu-РНК в клетках человека вызывает подавление репликации ДНК, ингибирует трансляцию и оказывает антипролиферативное действие. Полученные нами данные указывают на то, что ключевой процесс, опосредующий снижение жизнеспособности клеток аденокарциномы человека MCF-7 под действием аналогов как Alu-РНК, так и 7SL РНК, – транскрипция ядерной ДНК. При этом не происходит активации экспрессии интерферон-индуцибельных генов. В то же время трансфекция клеток MCF-7 Alu-РНК или 7SL РНК сопровождается изменением экспрессии ряда генов, в том числе *NUPR1*, *DDIT3*, *FOXRED2* и *ASNS*. Известно, что изменение транскрипции этих генов ассоциировано с комплексным ответом клетки на стресс ЭР, который способен индуцировать образование активных форм кислорода и гибель клетки по митохондриальному пути апоптоза. Предположительно активация ответа на стресс ЭР под действием аналогов Alu- и 7SL РНК связана с нарушением функционирования в клетках SRP.

В целом полученные нами результаты, а также опубликованные данные показывают, что Alu-РНК является не только маркером, но и медиатором сигналов клеточного стресса. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 13-04-01058), междисциплинарным интеграционным проектом Президиума СО РАН № 84 (2012–2014 гг.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. International Human Genome Sequencing Consortium // Nature. 2001. V. 409. № 6822. P. 860–921.
2. Deininger P.L., Batzer M.A. // Genome Res. 2002. V. 12. № 10. P. 1455–1465.
3. Batzer M.A., Deininger P.L., Hellmann-Blumberg U., Jurka J., Labuda D., Rubin C.M., Schmid C.W., Zietkiewicz E., Zuckerkandl E. // J. Mol. Evol. 1996. V. 42. № 1. P. 3–6.
4. Jurka J., Krnjajic M., Kapitonov V.V., Stenger J.E., Kokhanyu O. // Theor. Popul. Biol. 2002. V. 61. № 4. P. 519–530.
5. Dewannieux M., Esnault C., Heidmann T. // Nat. Genet. 2003. V. 35. № 1. P. 41–48.
6. Batzer M.A., Deininger P.L. // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. № 5. P. 370–379.
7. Liu W.M., Maraia R.J., Rubin C.M., Schmid C.W. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. № 6. P. 1087–1095.
8. Liu W.M., Chu W.M., Choudary P.V., Schmid C.W. // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. № 10. P. 1758–1765.
9. Shaikh T.H., Roy A.M., Kim J., Batzer M.A., Deininger P.L. // J. Mol. Biol. 1997. V. 271. № 2. P. 222–234.
10. Maraia R.J., Driscoll C.T., Bilyeu T., Hsu K., Darlington G.J. // Mol. Cell Biol. 1993. V. 13. № 7. P. 4233–4241.
11. Sarrowa J., Chang D.Y., Maraia R.J. // Mol. Cell Biol. 1997. V. 17. № 3. P. 1144–1151.
12. Häslér J., Strub K. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. № 19. P. 5491–5497.
13. Sakamoto K., Fordis C.M., Corsico C.D., Howard T.H., Howard B.H. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 5. P. 3031–3038.
14. Chu W.M., Ballard R., Carpick B.W., Williams B.R., Schmid C.W. // Mol. Cell Biol. 1998. V. 18. № 1. P. 58–68.
15. Rubin C.M., Kimura R.H., Schmid C.W. // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. № 14. P. 3253–3261.
16. Hasler J., Strub K. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. № 8. P. 2374–2385.
17. Bovia F., Wolff N., Ryser S., Strub K. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 2. P. 318–326.
18. Chang D.Y., Hsu K., Maraia R.J. // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. № 21. P. 4165–4170.
19. Mariner P.D., Walters R.D., Espinoza C.A., Drullinger L.F., Wagner S.D., Kugel J.F., Goodrich J.A. // Mol. Cell. 2008. V. 29. № 4. P. 499–509.
20. Yakovchuk P., Goodrich J.A., Kugel J.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 14. P. 5569–5574.
21. Kaneko H., Dridi S., Tarallo V., Gelfand B.D., Fowler B.J., Cho W.G., Kleinman M.E., Ponicsan S.L., Hauswirth W.W., Chiodo V.A., et al. // Nature. 2011. V. 471. № 7338. P. 325–330.
22. Tarallo V., Hirano Y., Gelfand B.D., Dridi S., Kerur N., Kim Y., Cho W.G., Kaneko H., Fowler B.J., Bogdanovich S., et al. // Cell. 2012. V. 149. № 4. P. 847–859.
23. Galluzzi L., Vitale I., Kepp O., Seror C., Hangen E., Perfettini J.L., Modjtahedi N., Kroemer G. // Methods Enzymol. 2008. V. 442. P. 355–374.

24. Stepanov G.A., Semenov D.V., Savelyeva A.V., Kuligina E.V., Koval O.A., Rabinov I.V., Richter V.A. // *Biomed. Res. Int.* 2013. V. 2013. ID 656158.
25. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. № 1. P. 99–163.
26. Demchenko A.P. // *Exp. Oncol.* 2012. V. 34. № 3. P. 263–268.
27. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. // *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005. V. 11. P. 127–152.
28. Siddik Z.H. // *Oncogene.* 2003. V. 22. № 47. P. 7265–7279.
29. Balachandran S., Barber G.N. // *Meth. Mol. Biol.* 2007. V. 383. P. 277–301.
30. Lindner D.J., Kolla V., Kalvakolanu D.V., Borden E.C. // *Mol. Cell Biochem.* 1997. V. 167. № 1–2. P. 169–177.
31. Iacopino F., Robustelli della Cuna G., Sica G. // *Int. J. Cancer.* 1997. V. 71. № 6. P. 1103–1108.
32. Der S.D., Zhou A., Williams B.R., Silverman R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 26. P. 15623–15628.
33. Goruppi S., Iovanna J.L. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 3. P. 1577–1581.
34. Guo X., Wang W., Hu J., Feng K., Pan Y., Zhang L., Feng Y. // *Anat. Rec. (Hoboken).* 2012. V. 295. № 12. P. 2114–2121.
35. Carracedo A., Lorente M., Egia A., Blázquez C., García S., Giroux V., Malicet C., Villuendas R., Gironella M., González-Feria L., et al. // *Cancer Cell.* 2006. V. 9. № 4. P. 301–312.
36. Tabas I., Ron D. // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. № 3. P. 184–190.
37. Riemer J., Appenzeller-Herzog C., Johansson L., Bodenmiller B., Hartmann-Petersen R., Ellgaard L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 35. P. 14831–14836.
38. Siu F., Chen C., Zhong C., Kilberg M.S. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 51. P. 48100–48107.