

На правах рукописи

Шепелев Никита Михайлович

**Некоторые аспекты функционирования теломеразного комплекса
у дрожжей и человека**

1.4.9. Биоорганическая химия

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва — 2023

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и в центре молекулярной и клеточной биологии Сколковского института науки и технологий.

Научные руководители

Рубцова Мария Петровна

доктор химических наук

Донцова Ольга Анатольевна

доктор химических наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты

Кузнецов Никита Александрович

доктор химических наук, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, лаборатория генетических технологий, заведующий лабораторией

Тишков Владимир Иванович

доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, профессор

Морозов Алексей Владимирович

доктор биологических наук, ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория регуляции внутриклеточного протеолиза, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «19» декабря 2023 г. в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <http://dissovet.msu.ru/dissertation/014.2/2757/>

Автореферат разослан «__» ноября 2023 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1. Актуальность темы исследования

Теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, активация которого обеспечивает неограниченный пролиферативный потенциал большинства эукариотических клеток за счет поддержания длины их теломер. Теломеры укорачиваются с каждым делением соматических клеток из-за проблемы репликации концов хромосом и действия эндонуклеаз. Когда теломеры становятся критически короткими, они не могут защищать концы линейных хромосом и подавлять передачу сигналов о повреждении ДНК, а пораженные клетки подвергаются остановке клеточного цикла и/или клеточному старению в ответ на повреждение ДНК.

Теломераза является одной из перспективных мишеней для разработки методов лечения онкологических заболеваний, поскольку необходима для неограниченной пролиферации большинства типов раковых клеток путем поддержания длины их теломер. Недостаток и мутации основных компонентов теломеразы и вспомогательных белков влияют на активность теломеразы на теломерах. Биогенез этих компонентов регулируется на каждом этапе: от транскрипции и процессинга РНК до созревания и посттрансляционных модификаций белка. Важной задачей является исследование механизмов регуляции биогенеза и активности теломеразы для разработки подходов, с помощью которых можно манипулировать теломеразой для управления регенерацией, предотвращения старения и лечения онкологических заболеваний.

В настоящий момент нет полной картины всех участников и регуляторов теломеразного комплекса и исчерпывающего описания того, как они взаимодействуют друг с другом. Кроме того, точная роль ряда уже известных участников теломеразного комплекса остается невыясненной. Определение механизмов биогенеза теломеразы у разных видов может помочь выявить ключевые принципы функционирования теломеразы.

2. Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы является определение некоторых аспектов функционирования вспомогательных белков в составе теломеразного комплекса дрожжей или человека. Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

- 1) Установление роли белка Est3 в теломеразной активности дрожжей *Hansenula polymorpha*
- 2) Идентификация компонентов теломеразы, ответственных за ассоциацию Est3 с теломеразной РНК в *Hansenula polymorpha*

3) Оценка влияния поли(АДФ-рибозил)ирования белков DKC1 и GAR1 человека на активность теломеразы

4) Анализ влияния поли(АДФ-рибозил)ирования на РНК-связывающие свойства белков DKC1 и GAR1 человека

3. Объект исследования

Объектами исследования в данной работе являются вспомогательный белок Est3 теломеразного комплекса дрожжей *H. polymorpha* и посттрансляционная модификация вспомогательных белков DKC1 и GAR1 теломеразного комплекса человека.

4. Предмет исследования

Предметом исследования данной работы являются функциональная роль белка Est3 в составе теломеразного комплекса дрожжей *H. polymorpha* и влияние поли(АДФ-рибозил)ирования на свойства белков DKC1 и GAR1 и биогенез теломеразного комплекса человека.

5. Научная новизна исследования

Впервые показано, что белок Est3 принципиально необходим для активности теломеразы дрожжей *H. polymorpha*.

Установлено, что белок Est3 привлекается в теломеразный комплекс *H. polymorpha* белком Est1, а связывание белка Est1 с теломеразной РНК также может зависеть от белка Est3.

Впервые показано влияние поли(АДФ-рибозил)ирования на сборку и активность теломеразного комплекса человека.

6. Научная и практическая значимость исследования

Научная ценность полученных результатов определяется тем, что в диссертации рассмотрены актуальные проблемы механизмов биогенеза теломеразного комплекса в разных организмах.

Результаты данного исследования показали, что ингибирование поли(АДФ-рибозил)ирования может приводить к активации теломеразы. Эти данные поднимают вопрос о возможной двойственной роли ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимераз, которые активно используются при терапии онкологических заболеваний. Кроме того, дальнейшее исследование биогенеза теломеразы может ускорить разработку малых молекул для регуляции активности теломеразного комплекса в целях усиления регенерации, предотвращения старения и терапии онкологических заболеваний.

7. Методология диссертационного исследования

Для достижения поставленной цели были использованы современные биохимические и молекулярно-биологические методы и подходы, соответствующие выбранной области исследований.

Для изучения ассоциации теломеразных белков с теломеразной РНК получены и охарактеризованы штаммы дрожжей *H. polymorpha* с нокаутами генов белковых компонентов теломеразы. При помощи иммунопреципитации за аффинный эпитоп выделен и очищен дрожжевой теломеразный комплекс из штаммов с нокаутами и штамма дикого типа. При этом оценено относительное количество совыделяющейся теломеразной РНК методом ПЦР в режиме реального времени. Оценена теломеразная активность *in vitro* при помощи электрофореза и автордиографии. Для анализа влияния поли(АДФ-рибозил)ирования на РНК-связывающие свойства белков DKC1 и GAR1 проведена иммунопреципитация белков дикого типа и их не поли(АДФ-рибозил)ированных мутантов с последующей оценкой относительного количества совыделяющихся молекул РНК в условиях нокаута, сверхэкспрессии и ингибирования активности PARP1.

8. Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Белок Est3 необходим для активности теломеразы *Hansenula polymorpha in vitro*.
- 2) Белок Est1 необходим, а теломеразная обратная транскриптаза не нужна для ассоциации белка Est3 с теломеразной РНК *H. polymorpha*.
- 3) Белок Est3 и в меньшей степени теломеразная обратная транскриптаза необходимы для взаимодействия Est1 с теломеразной РНК *H. polymorpha*.
- 4) Поли(АДФ-рибозил)ирование модулирует связывание белков DKC1 и GAR1 человека с РНК-партнерами.
- 5) PARP1 регулирует биогенез и стабильность теломеразного комплекса человека.

9. Степень достоверности результатов

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается воспроизводимостью экспериментов, использованием различных физико-химических и молекулярно-биологических методов анализа и статистической обработкой данных. Воспроизводимость результатов в ходе исследования подтверждали трехкратным повторением экспериментов. Результаты опытов получены на современном научном оборудовании с использованием реактивов, произведенных ведущими российскими и мировыми компаниями. Положения и выводы, сформулированные в диссертации,

подтверждаются публикациями результатов исследования в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

10. Апробация работы

Диссертация была представлена на заседании программного комитета программы аспирантуры «Науки о жизни» Сколковского института науки и технологий и на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также в виде устных и стендовых докладов на следующих всероссийских и международных конференциях: Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего»; II Объединенный научный форум, включающий VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды»; The 44th FEBS Congress; XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019».

11. Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 3 публикациях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

12. Личный вклад автора

Все результаты диссертации получены лично соискателем или при его непосредственном участии. В частности, диссертантом была проведена работа по поиску, анализу и систематизации литературы по теме исследования (публикация 1). Автор совместно с д.х.н. Рубцовой М.П. и д.х.н., проф., академиком РАН Донцовой О.А., участвовал в формулировке цели и задач исследования, а также разработал методики проведения экспериментов.

Соискателем проведена иммунопреципитация вспомогательных теломеразных белков дикого типа и их не поли(АДФ-рибозил)ированных мутантов с последующим определением эффективности их взаимодействия с РНК-партнерами в условиях нокдауна, сверхэкспрессии и ингибирования активности PARP1 с использованием методов вестерн-блоттинга и ПЦР в режиме реального времени (публикация 2). Соискателем получены и охарактеризованы штаммы дрожжей *H. polymorpha* с нокаутами генов компонентов теломеразы; выделен и очищен дрожжевой теломеразный комплекс при помощи иммунопреципитации; изучена ассоциация теломеразных белков с теломеразной РНК в составе теломеразного комплекса; измерена теломеразная активность *in vitro*. Для выполнения работы автором также использованы методы вестерн-блоттинга, Саузерн-блоттинга для оценки длины теломер, ПЦР

в режиме реального времени (публикация 3). Анализ данных и интерпретация результатов были проведены автором.

13. Структура и объем диссертации

Структура диссертации включает в себя «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», включающий 236 литературных источников. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 3 таблицами и изложена на 139 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Далее по тексту под теломеразной активностью *in vitro* подразумевается активность теломеразы после ее очистки или в экстракте клеток, оцененная с использованием модельного олигонуклеотидного субстрата, имитирующего 3'-конец теломер. Под теломеразной активностью *in vivo* подразумевается активность теломеразы в живых клетках, которая оценивается по длине теломер.

1. Постановка задачи

Теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, функционирующий в большинстве эукариот. Теломераза обеспечивает поддержание длины теломер, специальных ДНК-белковых защитных структур на концах линейных хромосом эукариот. Критически короткие теломеры стимулируют остановку клеточного цикла, старение и гибель клеток. Теломераза активируется примерно в 90% случаев рака, что позволяет опухолевым клеткам неограниченно делиться. Кроме того, теломераза необходима для сохранения пролиферативного потенциала стволовых клеток при развитии организма.

В данной работе мы сосредоточили внимание на изучении функционирования некоторых вспомогательных белков теломеразы у дрожжей и позвоночных. Для исследования мы выбрали вспомогательный белок Est3 теломеразы дрожжей, поскольку Est3 принципиально необходим для активности теломеразы *in vivo*. При этом его функциональная роль в работе теломеразы дрожжей остается малоизвестной. Еще одной малоизученной областью исследований теломеразы являются посттрансляционные модификации (ПТМ) компонентов этого комплекса. Для изучения роли ПТМ в функционировании теломеразы в качестве модели мы выбрали теломеразу человека, поскольку ПТМ более разнообразны и выражены у высших эукариот, чем у дрожжей. Мы сфокусировались на изучении поли(АДФ-рибозил)ирования в функционировании теломеразы человека, так как ингибиторы процесса поли(АДФ-рибозил)ирования активно используются при терапии различных видов рака. Таким образом,

изучение влияния данной модификации на функционирование теломеразного комплекса представляет высокую практическую значимость.

2. Вспомогательный белок Est3 в теломеразном комплексе дрожжей

Теломеразная обратная транскриптаза (TERT) и теломеразная РНК являются ключевыми компонентами теломеразного комплекса во всех эукариотах, которые используют теломеразу для поддержания длины теломер (Schumpfová and Fajkus, 2020). Для многих видов почкующихся дрожжей экспериментально установлено, что вспомогательные белки Est1 и Est3 входят в состав теломеразного комплекса и являются необходимыми для теломеразной активности *in vivo* (Lingner et al., 1997; Hughes et al., 2000; Egan and Collins, 2012).

Моделирование укладки белка Est3 выявило структурное сходство между белком Est3 *C. albicans* и OB-доменом TPP1, белковым компонентом теломер млекопитающих (Yu et al., 2008). TPP1 образует гетеродимерный комплекс с POT1, который напрямую связывается с одноцепочечной областью теломер млекопитающих. TPP1 может взаимодействовать с теломеразой и стимулировать ее активность и процессивность *in vitro* путем взаимодействия с TEN-доменом белка TERT человека (Nandakumar et al., 2012; Zhong et al., 2012).

Укладка белка Est3 *S. cerevisiae*, полученная с использованием минимальных данных ЯМР и алгоритма для предсказания структуры, также напоминает укладку OB-домена белка TPP1 (Rao et al., 2014). Структура белка Est3 *H. polymorpha* аналогична структуре *S. cerevisiae* Est3 и также соответствует классической OB-укладке, как было показано в нашей лаборатории с использованием только экспериментальных данных метода ЯМР (Shepelev et al., 2020).

Анализ мутаций Est3 в *C. albicans* выявил функциональные различия между поверхностными остатками, которые консервативны в Est3 и теломерном белке TPP1 млекопитающих и присутствуют только в Est3. Только последние важны для активности теломеразы *in vitro* и способствуют ассоциации Est3 с ней. Остатки, общие для Est3 и TPP1, расположены на одной стороне OB-укладки, вдали от канонической поверхности связывания нуклеиновой кислоты, характерной для OB-укладки. Это говорит о том, что Est3 и OB-домен TPP1 могут иметь консервативную функцию в регуляции теломеразы, отличную от связывания нуклеиновых кислот (Yu et al., 2008).

Таким образом, дрожжевой вспомогательный белок Est3 из разных видов дрожжей структурно схож с OB-доменом теломерного белка TPP1 человека. Можно предположить, что Est3 участвует в привлечении дрожжевой теломеразы к теломерам и ее активации, а в процессе эволюции эта функция была перенесена на теломерный белок TPP1 человека. Для

подтверждения этого предположения мы решили исследовать, может ли Est3 регулировать активность теломеразы *H. polymorpha in vitro*, а также определить теломеразный белок, отвечающий за привлечение Est3 в функциональный комплекс.

2.1 Влияние НА-эпитопа на функционирование теломеразных белков дрожжей *H. polymorpha*

Для изучения функционирования белка Est3 в теломеразном комплексе использовали штаммы дрожжей, содержащие три повтора гемагглютининового эпитопа (НА-эпитоп) на С-конце белков теломеразы: *Est1-НА*, *TERT-НА*, *Est3-НА*. Добавление эпитопа может нарушить функционирование белков и активность теломеразы *in vivo* соответственно. Для оценки влияния НА-эпитопа на функционирование белков Est1, TERT, Est3 мы культивировали независимо по 2 клон штаммов *Est1-НА*, *TERT-НА*, *Est3-НА* в течение примерно 200 поколений путем субкультивирования на чашках с агаром. Затем мы вырастили клетки в жидкой среде и выделили из них геномную ДНК, которую использовали для проверки наличия вставки с последовательностью НА-эпитопа в меченых генах (Рис. 1) методом ПЦР. ПЦР-продукты во всех образцах соответствовали ожидаемой длине.

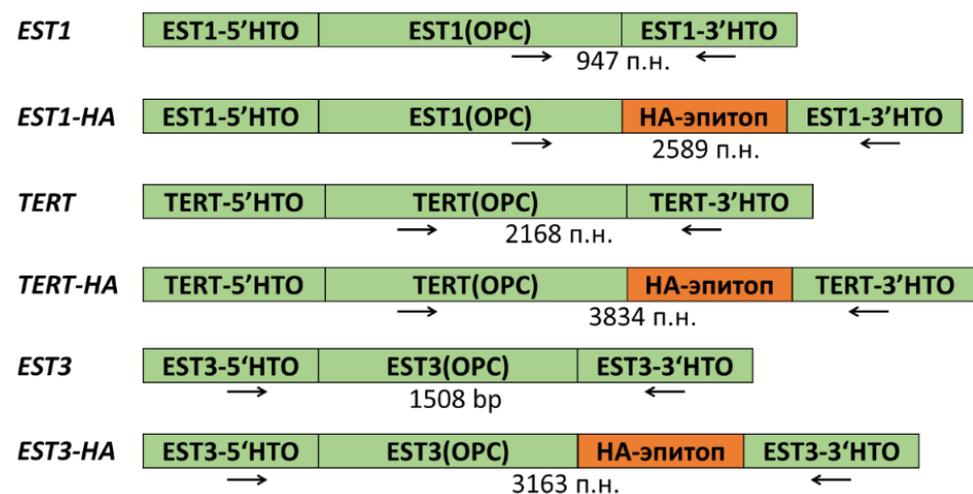


Рис. 1. Схема структуры генов белков теломеразы в диком типе и штаммах *Est1-НА*, *TERT-НА*, *Est3-НА*. Стрелками схематично отмечены участки отжига олигонуклеотидов для

ПЦР. Вставка содержала маркер селективности по урацилу (нет на схеме).

Чтобы оценить функционирование теломеразы в этих штаммах, мы определили длину теломер в двух независимо выращенных клонах для каждого штамма с помощью Саузерн-блоттинга. Детекцию фрагментов геномной ДНК, содержащих теломеры, проводили с помощью олигодезоксирибонуклеотида 5'-(CGCCACCC)₄-3', меченного ³²P на 5'-конце, комплементарного четырем теломерным повторам *H. polymorpha*.

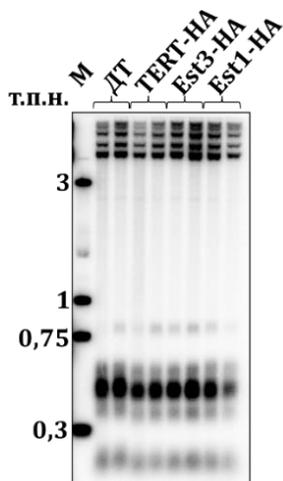


Рис. 2. Анализ длины теломер с использованием Саузерн-блоттинга. Длина фрагментов ДНК после рестрикции, содержащих теломерные повторы. «ДТ» – дикий тип. «т.п.н.» – тысяча п.н.

Введение НА-эпитопа во всех случаях оказывает минимальное влияние на длину теломер *H. polymorpha* (Рис. 2). Таким образом, мы заключили, что НА-эпитоп не влияет на взаимодействия компонентов теломеразного комплекса *in vivo*.

2.2 Влияние Est3 на активность теломеразы *H. polymorpha*

Рекомбинантные Est3 и TEN-домен Est2 (гомолог TERT) из *S. cerevisiae* взаимодействуют *in vitro*, а использование рекомбинантного Est3 повышает активность теломеразы *S. cerevisiae in vitro* (Talley et al., 2011; Lee et al., 2010). При этом белок Est3 не нужен для активности теломеразы *S. cerevisiae in vitro* (Hughes et al., 2000). Однако делеция Est3 в дрожжах *C. albicans* приводит к нарушению активности теломеразы *in vitro* в зависимости от последовательности олигонуклеотидного субстрата (Hsu et al., 2007). Потеря Est3 приводит к двух-трехкратному снижению процессивности теломеразы у родственных *S. cerevisiae* дрожжей *Saccharomyces castellii*, не зависящему от последовательности субстрата (Lee et al., 2010). На основании этих данных мы предположили, что Est3 может регулировать активность теломеразы *H. polymorpha in vitro*.

Для изучения роли Est3 в регуляции теломеразной активности штамм *TERT-НА* трансформировали с помощью ДНК-кассеты, содержащей маркер селективности, окруженный гомологичными областями вокруг открытой рамки считывания *EST3*. В результате гомологичной рекомбинации в геном был вставлен ген селективности по лейцину, и открытая рамка считывания *EST3* была нарушена (Рис. 3).

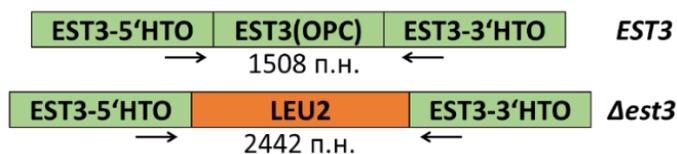


Рис. 3. Структура гена *EST3* в диком типе и нокауте. Стрелками отмечены участки отжига олигонуклеотидов для ПЦР.

После этого клетки, со встроенной ДНК-кассетой, отбирали на твердой селективной среде, не содержащей лейцин, так как клетки исходного штамма не способны синтезировать эту аминокислоту. Затем единичные колонии выращивали на жидкой среде без лейцина. Геномную ДНК выделяли из части полученной культуры и с помощью ПЦР отбирали клоны, содержащие вставку в ген *EST3*.

Отобранные клоны выращивали в 400 мл богатой среды. Белок TERT-НА выделяли из полученных культур клеток методом иммунопреципитации с использованием анти-НА-агарозы. Мы сравнили количество выделенного белка TERT-НА между диким типом и нокаутом *EST3* с помощью вестерн-блоттинга. Детекцию и визуализацию белков осуществляли с помощью первичных антител к НА-эпитопу, конъюгированных с пероксидазой хрена. Неожиданно мы обнаружили, что при нокауте гена *EST3* количество выделенного белка TERT-НА уменьшается до 20 раз (Рис. 4).

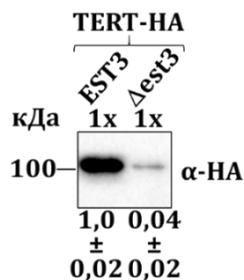
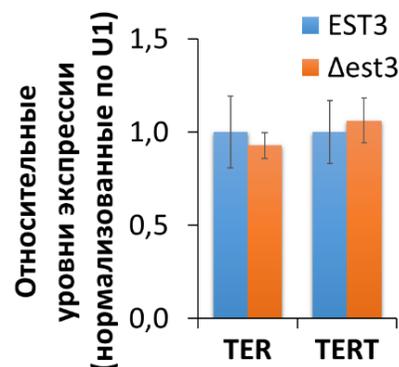


Рис. 4. Анализ количества белка TERT-НА после иммунопреципитации методом вестерн-блоттинга с антителами против НА. «1x» – при выделении взято одинаковое количество клеток этих штаммов. Указаны относительные средние значения \pm стандартные отклонения для трех независимо выращенных культур.

Мы решили выяснить с чем связано снижение содержания TERT-НА в клетках без *Est3*, а также происходит ли снижение количества теломеразной РНК (TER) в этих клетках. Для этого выделили РНК из равных аликвот клеточных экстрактов методом фенол-хлороформной экстракции и провели количественную ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) (Рис. 5).

Рис. 5. Уровни экспрессии теломеразной РНК (TER) и мРНК TERT в штаммах TERT-НА и TERT-НА $\Delta est3$ по результатам RT-qPCR. Значения нормированы на малую ядерную РНК (мяРНК) U1. Рассчитаны средние значения \pm стандартные отклонения для четырех независимо выращенных культур.



По результатам ПЦР количество мРНК TERT и теломеразной РНК не меняется в нокауте *EST3* по сравнению с диким типом. Снижение уровня TERT в штамме TERT-НА $\Delta est3$ можно объяснить усилением его деградации в клетках или снижением биосинтеза.

Тогда мы решили уравнивать количество выделяемого белка, взяв в 2 раза больше клеточного экстракта TERT-НА $\Delta est3$ для связывания с аффинной смолой и взяв в 10 раз меньше аффинной смолы после связывания клеточного экстракта TERT-НА. Однако необходимо было проверить, можно ли обнаружить в столь малом количестве белок TERT-НА и активность выделенной теломеразы *in vitro*.

Для проверки теломеразной активности после связывания экстракта TERT-НА, аналогично предыдущему эксперименту, производили двукратные серийные разведения

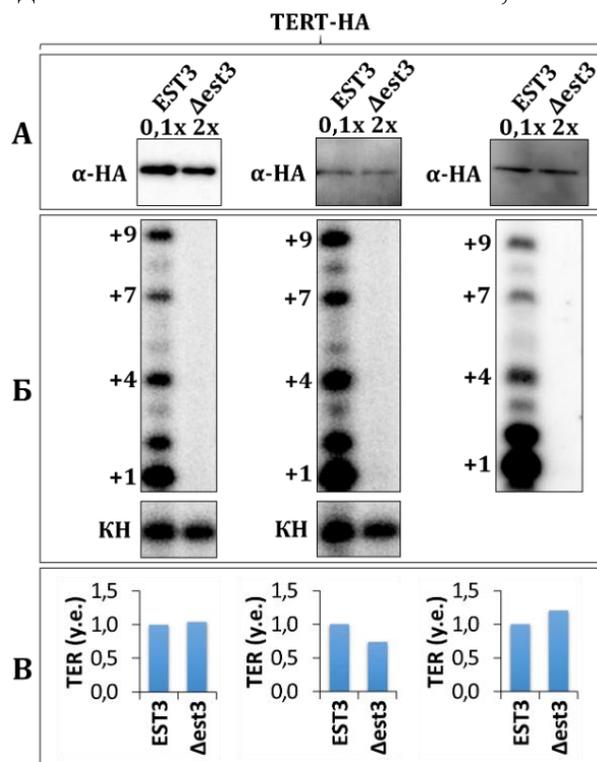
аффинной смолы. Затем мы проанализировали количество связанного белка TERT-НА в образцах с помощью вестерн-блоттинга, как описано ранее. Кроме того, мы также оценили теломеразную активность в этих образцах. Для оценки теломеразной активности использовали смесь dATP, dTTP, dCTP, α - 32 P-dGTP, и олигонуклеотидный субстрат HD5, которые добавляли к аффинной смоле (Рис. 6). Продукты элонгации олигонуклеотида HD5 теломеразой разделяли в денатурирующем ПААГ и визуализировали методом автордиографии.



Рис. 6. Схема удлинения олигонуклеотида HD5 теломеразой. Показана матричная область теломеразной РНК *N. polymorpha* (TER) и отмечены характерные продукты элонгации.

Даже при 16-кратном разведении аффинной смолы удалось детектировать связанный белок TERT-НА и теломеразную активность *in vitro*. Таким образом, мы можем использовать предлагаемый метод для анализа функционирования теломеразы в лизатах клеток со сниженным содержанием фермента. Также мы наблюдали отсутствие продуктов элонгации HD5 в контроле с добавлением РНКазы А, поэтому наблюдаемые продукты должны быть обусловлены активностью рибонуклеопротеина – теломеразы.

Для сравнения активности теломеразы между штаммами *TERT-НА Δest3* и *TERT-НА* мы использовали такие количества экстрактов, чтобы с аффинным носителем связывалось одинаковое количество TERT-НА, что подтверждали с помощью вестерн-блоттинга (Рис. 7А).



При этом количество коиммунопреципитированной теломеразной РНК было также примерно одинаковым, согласно результатам анализа ее содержания методом RT-qPCR после фенол-хлороформной экстракции из аффинной смолы (Рис. 7В).

Рис. 7. Влияние белка Est3 на активность теломеразы *in vitro*. (А) Анализ количества белка TERT-НА после иммунопреципитации из указанных штаммов методом вестерн-блоттинга с антителами против НА. «0,1x» и «2x» обозначают соотношение, в котором указанные образцы были взяты для экспериментов. (Б) Продукты удлинения

теломеразой субстрата HD5, меченные ^{32}P , разделяли с помощью ПААГ и визуализировали автордиографией. «КН» – контроль нанесения. (В) Относительное количество (у.е.) совместно очищенной теломеразной РНК (TER) по образцу дикого типа, определенное с помощью RT-qPCR.

В этом эксперименте, несмотря на одинаковое содержание TERT и TER, отсутствие Est3 привело к исчезновению теломеразной активности *in vitro* (Рис. 7Б). Следовательно, белок Est3 необходим для теломеразной активности *H. polymorpha in vitro*. Возможно, роль белка Est3 у *H. polymorpha* аналогична роли его гомолога у *S. cerevisiae* и может включать активацию теломеразы.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы определяли активность теломеразы *in vitro* после иммунопреципитации TERT-НА из штаммов *TERT-НА* и *TERT-НА Δest3* в присутствии рекомбинантного белка Est3 (Рис. 8).

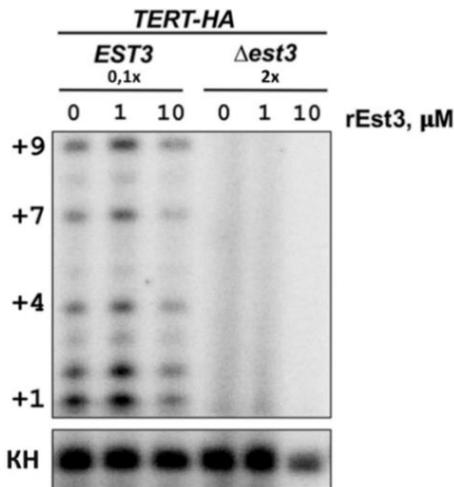


Рис. 8. Влияние рекомбинантного белка Est3 на активность теломеразы *in vitro*. Показаны продукты удлинения HD5, соответствующие одному теломерному повтору. К образцам были предварительно добавлены указанные финальные концентрации белка Est3. «КН» – контроль нанесения.

Даже при высокой концентрации белка Est3 нам не удалось обнаружить теломеразную активность для образца из штамма *TERT-НА Δest3*. Рекомбинантный белок Est3 не приводил к существенному изменению активности теломеразы *in vitro* или ее процессивности (не показано на рисунке) в случае штамма *TERT-НА*. Тем не менее добавление высокой концентрации Est3 приводило к небольшому ингибированию теломеразной активности *in vitro*, что можно объяснить неспецифическим ингибированием реакции вследствие избытка белка. Таким образом наши результаты указывают на существенные отличия теломеразы *H. polymorpha* от теломеразы *S. cerevisiae*. Отсутствие Est3 не влияет на активность теломеразы *S. cerevisiae in vitro*, при этом добавление рекомбинантного Est3 повышает активность теломеразы *S. cerevisiae in vitro*, очищенной из клеток дикого типа.

2.3 Влияние белков Est1 и TERT на ассоциацию белка Est3 с теломеразной РНК *H. polymorpha*

По результатам иммунопреципитации установлено, что Est3 сохраняет ассоциацию с теломеразной РНК в отсутствие Est1, но теряет ее при удалении Est2 (гомолога TERT) в *S. cerevisiae* (Hughes et al., 2000). Однако в другой работе при иммунопреципитации хроматина выявлено, что ассоциация белка Est3 с теломерами у *S. cerevisiae* происходит на поздних этапах фазы S и в G2-фазе, одновременно с белком Est1. При этом в данной работе также показано, что очищенные рекомбинантные Est1 и Est3 взаимодействуют *in vitro* (Tuzon et al., 2011). Это указывает на то, что не только Est2, но и Est1 может быть нужен для привлечения Est3 в теломеразный комплекс *S. cerevisiae*.

Данные по гомологам Est3 из других видов дрожжей указывают на различия в их функционировании. Например, отсутствие Est3 снижает связывание теломеразной РНК с Est1 более чем в 10 раз по сравнению с диким типом при неизменном ее уровне в *C. albicans* (Hsu et al., 2007). В другой работе показано, что белки Est3 из *Candida parapsilosis* и *Lodderomyces elongisporus* несут дополнительные N- и C-концевые области в дополнение к ОБ-укладке, которые необходимы для образования стабильного комплекса с доменом TEN белка TERT (Yen et al., 2011).

Взаимодействие между рекомбинантными Est3 и TEN-доменом TERT не удалось обнаружить методом ЯМР для белков *H. polymorpha* (Shepelev et al., 2020). Это указывает на то, что свойства и роль белка Est3 у *H. polymorpha* могут отличаться от таковых у *S. cerevisiae*, где данное взаимодействие обнаружено. В связи с этим нашей задачей было идентифицировать белок, ответственный за привлечение Est3 в теломеразный комплекс *H. polymorpha*, так как Est3 не способен самостоятельно связываться с теломеразной РНК.

Мы использовали конструкции для создания нокауты генов *TERT* и *EST1* аналогичные конструкции для получения нокаута *EST3*. Штамм *Est3-НА* трансформировали конструкциями для гомологичной рекомбинации, в результате чего маркер селективности был вставлен в геном, и открытая рамка считывания *EST1* или *TERT* была нарушена (Рис. 9). После этого дрожжи высевали на твердую селективную среду, не содержащую лейцин. Затем отдельные колонии нокаута *EST1* (штамм *Est3-НА Δest1*) и нокаута *TERT* (штамм *Est3-НА Δtert*) выращивали в жидкой среде без лейцина. Геномную ДНК выделяли из полученной культуры. Клоны, содержащие вставку в гены *EST1* или *TERT*, отбирали с помощью ПЦР.

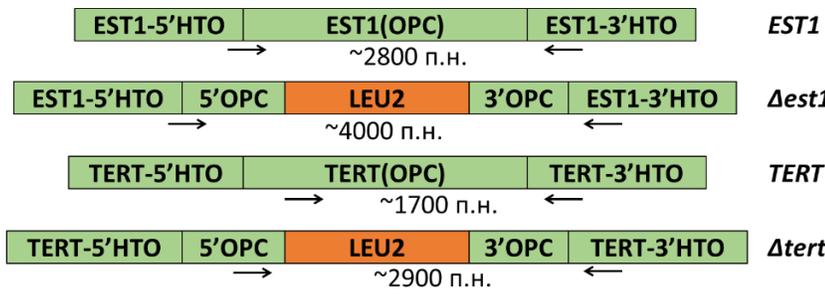


Рис. 9. Структура генов *EST1* и *TERT* в диком типе и в нокаутах. Стрелками отмечены участки отжига олигонуклеотидов для отбора клонов методом ПЦР после трансформации.

Отобранные клоны выращивали и выделяли белок Est3-НА из клеточной массы как описано ранее для штаммов *TERT-НА* и *TERT-НА Δest3*. Используя вестерн-блоттинг, количество связанного с аффинной смолой белка Est3-НА из дикого типа и нокаутов *EST1* или *TERT* сравнивали способом, аналогичным предыдущему эксперименту. Фенол-хлороформным методом экстрагировали совыделенную с Est3-НА РНК из образцов аффинной смолы и РНК из равных аликвот клеточных экстрактов и проводили RT-qPCR. В трёх повторностях наблюдали примерно одинаковое количество выделенного белка Est3-НА. Отсутствие сигнала для отрицательного контроля, не содержащего в белке эпитопа НА, указывает на селективное выделение Est3-НА (Рис. 10А). Для каждого образца рассчитывали выход совыделенной с Est3-НА теломеразной РНК как ее количество после иммунопреципитации поделенное на количество в исходных клеточных экстрактах с учетом всех разбавлений (Рис. 10Б).

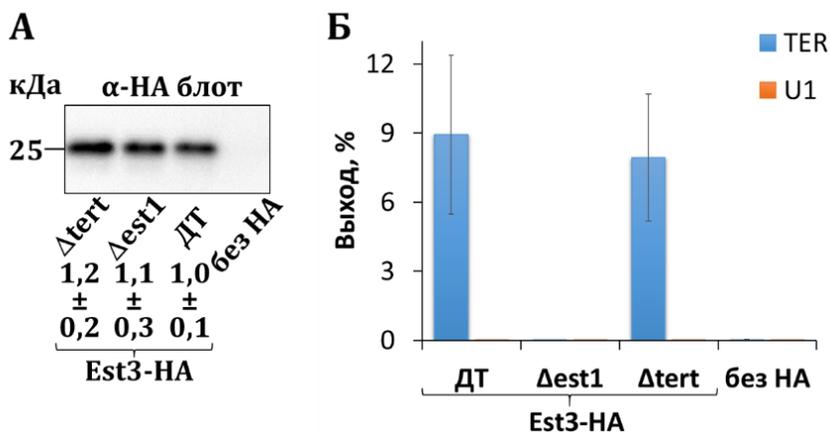


Рис. 10. Анализ влияния белков *Est1* и *TERT* на ассоциацию белка Est3-НА с теломеразной РНК. (А) Анализ количества выделенного белка Est3-НА из указанных штаммов методом вестерн-блоттинга с антителами против НА.

Рассчитаны относительные интенсивности полос. (Б) Количество совыделившейся теломеразной РНК (TER) и контрольной мРНК U1 в образцах определяли с помощью RT-qPCR. На (А) и (Б) указаны среднее значение \pm стандартное отклонение для трех независимо выращенных культур. «ДТ» – дикий тип. «Без НА» – штамм *H. polymorpha*, не содержащий вставку с НА-эпитопом.

По результатам ПЦР количество совыделившейся с Est3 теломеразной РНК в штамме *Est3-НА Δtert* не меняется по сравнению с диким типом (7,9% и 8,9% соответственно). В то же

время среднее количество совместно очищенной теломеразной РНК снижается примерно на три порядка для штамма *Est3-НА Δest1* по сравнению с диким типом *Est3-НА* (0,0025% и 8,9% соответственно). Таким образом, белок Est3 *H. polymorpha* связан с теломеразной РНК через белок Est1, а не через TERT, что согласуется с данными ЯМР об отсутствии взаимодействия между TEN-доменом TERT и Est3.

Обнаруженное свойство отличает *H. polymorpha* от *S. cerevisiae*, поскольку гомологи TERT и Est3 взаимодействуют у *S. cerevisiae*. Однако это свойство сближает *H. polymorpha* с *C. albicans*, регуляторные субъединицы Est1 и Est3 которого взаимозависимы при сборке теломеразного комплекса. Мы предположили, что ассоциация Est1 с теломеразным комплексом *H. polymorpha* также зависит от Est3.

2.4 Анализ влияния белков Est3 и TERT на ассоциацию белка Est1 с теломеразной РНК *H. polymorpha*

В аналогичном эксперименте нокауты *TERT* и *EST3* были получены со штаммом *Est1-НА*. Отбор клонов со вставкой (как показано на Рис. 3 и Рис. 9), их проверка с помощью ПЦР и получение клеточной массы проводили как описано ранее для штаммов *TERT-НА* и *TERT-НА Δest3*.

Белок Est1-НА выделяли на аффинной к НА-эпиту то смоле. Для трех повторов одинаковое количество выделенного белка наблюдали во всех штаммах, согласно результатам вестерн-блоттинга (Рис. 11А). РНК выделяли из равных аликвот клеточных экстрактов и образцов аффинной смолы после связывания фенол-хлороформным методом и проводили RT-qPCR (Рис. 11Б). Выход теломеразной РНК рассчитывали аналогично предыдущему эксперименту со штаммом *Est3-НА*.

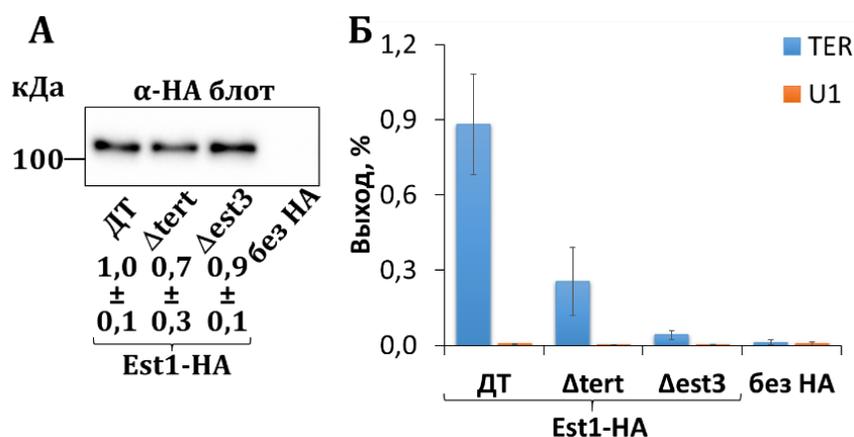


Рис. 11. Анализ влияния белков Est3 и TERT на ассоциацию белка Est1-НА с теломеразной РНК. (А) Анализ количества выделенного белка Est1-НА из указанных штаммов методом вестерн-блоттинга с антителами против НА.

Рассчитаны относительные интенсивности полос. (Б) Количество совыделившейся теломеразной РНК (TER) и контрольной мяРНК U1 в образцах определяли с помощью RT-

qPCR. На (А) и (Б) указаны среднее значение \pm стандартное отклонение для трех независимо выращенных культур. «ДТ», «Без НА» – аналогично (Рис. 10)

По результатам ПЦР количество совыделившейся теломеразной РНК снизилось у обоих нокаутов по сравнению с диким типом. В то же время количество совыделившейся теломеразной РНК из штамма *Est1-NA Δ est3* снижается примерно на порядок по сравнению с диким типом *Est1-NA* (0,041% и 0,88% соответственно). Это указывает на то, что белку Est1 необходим белок Est3 для эффективного взаимодействия с теломеразной РНК в *H. polymorpha*. Однако TERT также опосредует ассоциацию Est3 с теломеразной РНК (выход 0,25% для *Est1-NA Δ tert* и 0,88% для *Est1-NA* соответственно). На основании полученных результатов высказано предположение, что белки Est1 и Est3 *H. polymorpha* взаимозависимы при ассоциации с теломеразной РНК.

3. Вспомогательные белки DKC1 и GAR1 в теломеразном комплексе человека

Методом криоэлектронной микроскопии установлено, что теломераза человека состоит из двух пространственно удаленных частей, связанных посредством теломеразной РНК (hTR). Первая часть включает домен Н/АСА hTR, который состоит из двух шпилек, разделенных консенсусной последовательностью 5'-ANANNA-3' (N – любой нуклеотид), и завершается одноцепочечным 3'-концом, который включает нуклеотиды АСА. Каждая шпилька связывает тетрамер, состоящий из белков DKC1, NOP10, NHP2 и GAR1 (которые далее по тексту обозначены как комплекс Н/АСА). Вторая часть включает белок TERT человека (hTERT) и остальную часть hTR (Nguyen, 2021). Домен Н/АСА необходим для биогенеза семейств малых ядрышковых РНК и малых РНК, специфичных для телец Кахаля, а также hTR в позвоночных (Cioce and Lamond, 2005; Fu and Collins, 2007).

Глобальный поиск поли(АДФ-рибозил)ирования (ПАРилирования) при помощи масс-спектрометрии выявил наличие данной посттрансляционной модификации у белков DKC1 и GAR1 (Zhang et al., 2013). Мы решили исследовать способность комплекса Н/АСА связывать целевые РНК в случае ПАРилированных белков дикого типа и не ПАРилированных мутантов DKC1 и GAR1, а также оценить влияние данной модификации на функционирование теломеразного комплекса.

3.1 Анализ влияния ПАРилирования на способность белков DKC1 и GAR1 взаимодействовать с РНК-партнерами

Для изучения влияния ПАРилирования на взаимодействие белков DKC1 и GAR с РНК-партнерами мы получили конструкции, кодирующие DKC1 и GAR1 с мутациями в

положениях, подвергающихся модификации (Zhang et al., 2013). Были сделаны замены E414Q, E420Q, E429Q, E439Q, E483Q и E487Q в DKC1, и E67Q, E74Q, E80Q, D81N и E104Q в GAR1.

Мы использовали плазмиды, кодирующие как дикий тип, так и мутантные формы DKC1 и GAR1, меченные 3xFLAG. Мы трансфицировали этими конструкциями клетки НЕК293Т и проводили аффинную очистку GAR1 или DKC1 за 3xFLAG. Уровень ПАРилирования мутированных белков и белков дикого типа анализировали методом вестерн-блоттинга в денатурирующих условиях. Используя антитела против ПАР, мы подтвердили снижение уровня сигнала ПАРилирования (Рис. 12А и Б) в полосках, соответствующих мутантным GAR1-FLAG и DKC1-FLAG1, а также наблюдали изменение подвижности белков GAR1 и DKC1 в геле (Рис. 12В и Г).

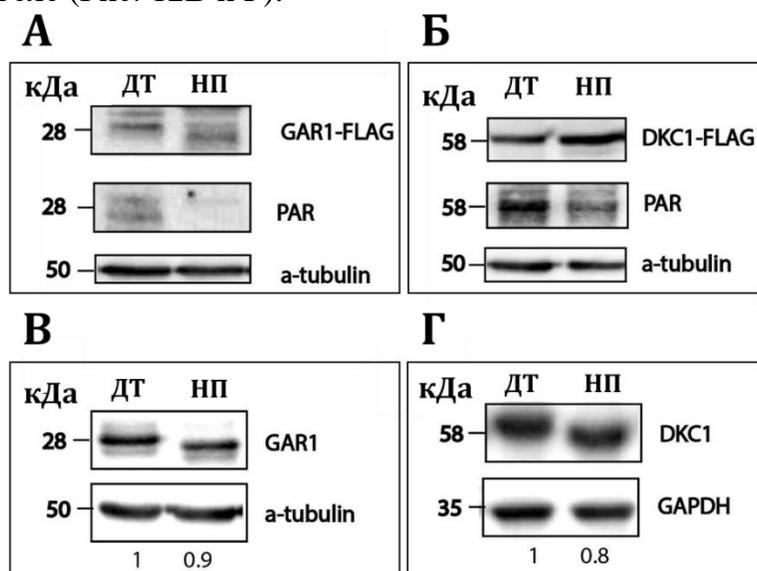


Рис. 12. Анализ 3xFLAG-меченных белков дикого типа (ДТ) и не ПАРилированных (НП) белков GAR1 и DKC1 методом вестерн-блоттинга с антителами против FLAG и поли(АДФ-рибозы) (PAR) (А) и (Б), против GAR1 (В) и против DKC1 (Г) клеточных лизатов после трансфекции. α -тубулин или GAPDH служили контролем нанесения (нижние панели на (А), (Б), (В) – α -тубулин и (Г) – GAPDH). Относительные средние значения интенсивности полос в (В) и (Г) были рассчитаны из трех повторов при нормировке на контроль нанесения.

РНК, связанную с выделенными белками, очищали и использовали для анализа методом RT-qPCR. Для анализа мы выбрали РНК, которые являются хорошо известными партнерами комплекса Н/АСА, включая рибосомные РНК (5.8S и 28S), теломеразную РНК (hTR) и мяРНК (U2 и U87). Сначала мы рассчитывали выход целевых РНК после коиммунопреципитации, нормируя количество конкретной РНК в элюции к ее количеству в исходном лизате. Затем выход РНК для не ПАРилированных мутантов делили на выход РНК для белков дикого типа, чтобы оценить изменение РНК-связывающих свойств GAR1 и DKC1 (Рис. 13).

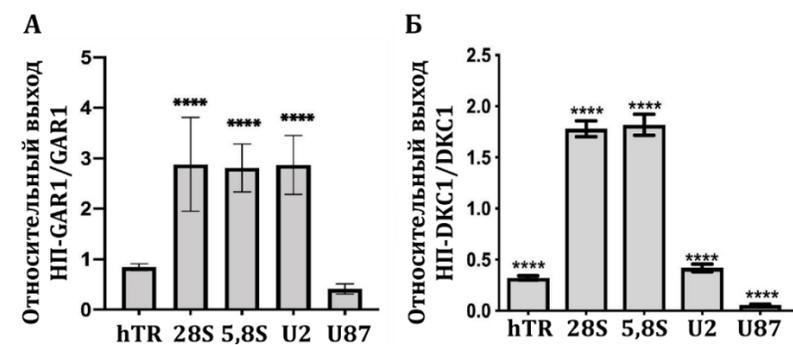


Рис. 13. Анализ РНК-

связывающих свойств белков GAR1 и DKC1 дикого типа и не ПАРилированных мутантов (НП-GAR1 и НП-DKC1). Относительный выход целевых РНК, очищенных

совместно с GAR1(А) и DKC1(Б), определяли с помощью RT-qPCR. Среднее значение \pm стандартная ошибка рассчитаны для трех независимых повторов. ****р-значение < 0,0001 по критерию множественных сравнений Шидака.

Мутации по-разному повлияли на связывание РНК-партнеров (Рис. 13). Мы наблюдали лучшее связывание 28S, 5,8S и U2 РНК в случае НП-GAR1. В то же время связывание hTR и U87 было несколько слабее с НП-GAR1 по сравнению с GAR1 дикого типа (Рис. 13А). Более сильно связывались рибосомные РНК и уменьшалось количество совыделяющихся мРНК и hTR, образующих комплекс с не ПАРилированным DKC1, по сравнению с DKC1 дикого типа (Рис. 13Б). Таким образом, ПАРилирование может по-разному регулировать биогенез и сборку различных рибонуклеопротеиновых комплексов.

Изменение аминокислотного остатка может изменить третичную структуру белка, что приведет к нарушению функции белка. Мы провели мутагенез шести аминокислотных остатков в DKC1 и пяти в GAR1, чтобы получить не ПАРилированные GAR1 и DKC1. Чтобы подтвердить, что отсутствие ПАРилирования, а не изменение структуры мутантных белков влияет на их сродство к РНК, мы проанализировали РНК-связывающие свойства GAR1 в условиях ингибирования активности белков семейства PARP олапарибом. Мы трансфицировали клетки НЕК293Т конструкцией с меченным 3xFLAG белком GAR1 дикого типа и инкубировали их в течение 3 часов с 50 мкМ олапариба. РНК из клеточных экстрактов и связанную с выделенным GAR1 после иммунопреципитации за FLAG, очищали и использовали для анализа методом RT-qPCR. Сначала мы рассчитывали выход целевых РНК аналогично предыдущему эксперименту на (Рис. 13). Для сравнения результатов относительное количество РНК (описанные выше), осажденных с помощью GAR1 из обработанных олапарибом клеток, было нормировано на относительное количество РНК, осажденных с помощью GAR1 из необработанных клеток (Рис. 14).

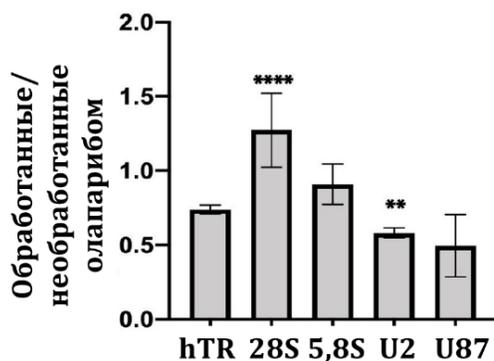


Рис. 14. Анализ эффективности связывания РНК с GAR1 после обработки олапарибом методом RT-qPCR. Уровень РНК, связанной с GAR1, в клетках, обработанных олапарибом, нормировали на уровень РНК, связанной с GAR1, в клетках без обработки. Средние значения \pm стандартная ошибка рассчитаны на основе трехкратных экспериментов RT-qPCR. **** $P < 0,0001$ и ** $P < 0,01$ по критерию множественных сравнений Шидака.

Мы наблюдали, что эффективность связывания hTR с GAR1 уменьшалась, в то время как уровень 28S рибосомной РНК, связанной с GAR1, увеличивался в клетках, обработанных олапарибом (Рис. 14). Следует отметить, что кратковременная обработка ингибитором не позволяет полностью устранить ПАРилирование, а длительная – невозможна из-за гибели клеток. Тем не менее полученные данные частично подтверждают результаты, полученные с использованием не ПАРилированного мутанта GAR1 (Рис. 13А) и подтверждают вывод о том, что ПАРилирование регулирует РНК-связывающую способность Н/АСА-белков.

Для изучения эффектов от длительного ингибирования PARP1 мы создали стабильную клеточную линию со сниженным уровнем экспрессии *PARP1*, трансдуцировав клетки НЕК293Т лентивирусными частицами, содержащими конструкцию LeGo-Cer, кодирующую короткую шпилечную РНК для подавления экспрессии *PARP1* (кшPARP1). Используемая плаزمида также кодирует флуоресцентный белок Cer, который позволил отобрать трансдуцированные клетки при помощи клеточного сортера. В качестве контроля использовали клеточную линию, стабильно экспрессирующую пустой вектор LeGo-Cer. Содержание мРНК PARP1 снизилось в 2 раза, а белка PARP1 – в 1,8 раза в клетках с нокдауном по сравнению с контрольными, согласно результатам анализа методами RT-qPCR и вестерн-блоттинга. Полученные линии мы использовали для последующих экспериментов.

Клеточную линию с нокдауном *PARP1* трансфицировали конструкциями 3xFLAG-DKC1 и 3xFLAG-GAR1, получали лизаты и проводили иммунопреципитацию за FLAG. После иммунопреципитации экстрагировали совыделяющуюся РНК из элюции и РНК из лизата и анализировали содержание различных РНК с помощью RT-qPCR. Сначала мы рассчитывали выход целевых РНК, как описано ранее. Затем рассчитанный выход РНК из клеток со сниженным уровнем PARP1 был нормирован на выход РНК из контрольных клеток, экспрессирующих пустой вектор (Рис. 15В и Г).

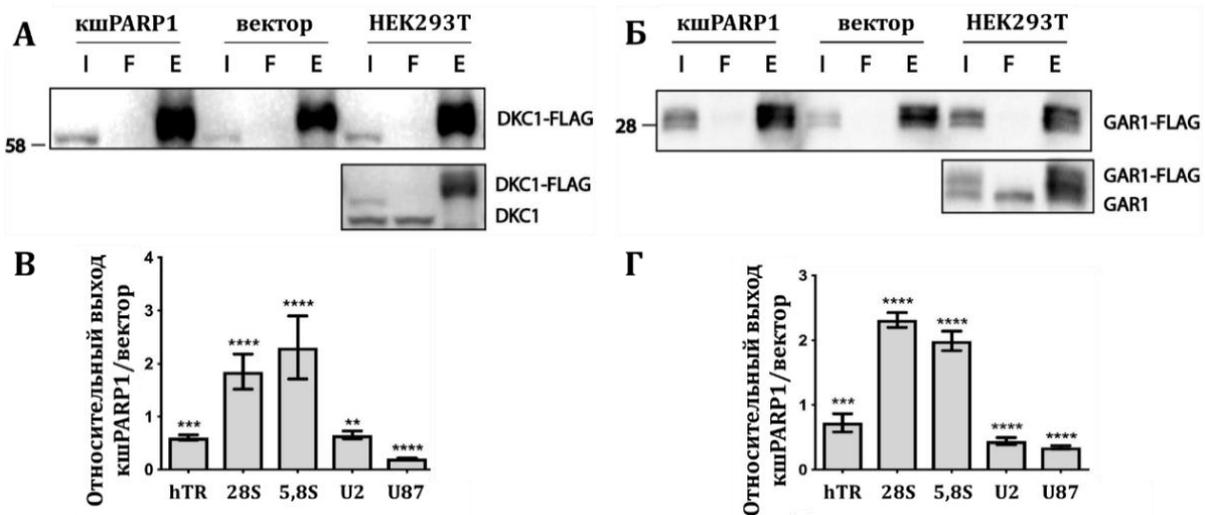


Рис. 15. Анализ РНК-связывающих свойств белков *GAR1* и *DKC1* дикого типа в условиях нокадауна *PARP1*. (А) Иммунопреципитацию 3xFLAG-*DKC1* из клеток *HEK293T* контролировали при помощи вестерн-блоттинга с антителами против FLAG (верхняя панель) и с антителами против *DKC1* (нижняя панель). I – лизат, F – просок, E – элюция. (Б) Тоже, что в (А), но для *GAR1*. (В) Относительный выход РНК, коиммунопреципитированных с *DKC1*, согласно данным метода RT-qPCR. Средние значения \pm стандартная ошибка рассчитаны на основе трехкратных экспериментов RT-qPCR с тремя повторами. **** $P < 0.0001$ и *** $P < 0.001$ с использованием поправки Шидака для множественного тестирования. (Г) Тоже, что в (В), но для *GAR1*. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$ и ** $P < 0,01$.

Мы заметили, что количество рибосомной РНК, связанной с *DKC1* (Рис. 15В) и *GAR1* (Рис. 15Г) увеличивалось, тогда как количество hTR и мяРНК снижалось в клетках с недостатком *PARP1* по сравнению с контрольными клетками. Таким образом мы наблюдали, что различные способы снижения эффективности ПАРилирования (химическое ингибирование активности белков семейства *PARP*, ингибирование экспрессии *PARP1* при помощи РНК-интерференции или сайт-направленный мутагенез подвергающихся модификации аминокислотных остатков в белках) оказывают схожий эффект на характер связывания РНК с *DKC1* и *GAR1*, независимо от используемого подхода.

Чтобы продемонстрировать прямое влияние активности *PARP1* на способность белков *GAR1* и *DKC1* связываться с РНК, мы сверхэкспрессировали *PARP1* дикого типа, а также не ПАРилированный *GAR1* и *GAR1* дикого типа в клетках со стабильным нокадауном *PARP1*. Мы выбрали *GAR1* потому, что предыдущий эксперимент продемонстрировал, что мутации приводили к более выраженному снижению ПАРилирования *GAR1*, чем *DKC1* (Рис. 12А).

Клетки со сниженным уровнем PARP1 (кшPARP1) котрансфицировали либо 3xFLAG-GAR1, либо 3xFLAG-НП-GAR1 и конструкцией PARP1. Лизаты клеток использовали для иммунопреципитации белка GAR1 и анализа совыделяющихся РНК с помощью RT-qPCR. Экспрессия PARP1, GAR1 и качество иммунопреципитации были подтверждены вестерн-блоттингом (Рис. 16А). Рассчитывали выход РНК после элюции, как описано ранее. Рассчитанный выход совыделяющейся РНК из клеток, сверхэкспрессирующих GAR1 дикого типа или НП-GAR1 со сверхэкспрессией PARP1, был нормирован на выход РНК, совыделяющейся из клеток со сниженным уровнем PARP1. Относительные уровни белков, элюированных при иммунопреципитации, использовали в качестве коэффициентов при расчете РНК, связанной с белком GAR1 (Рис. 16Б).

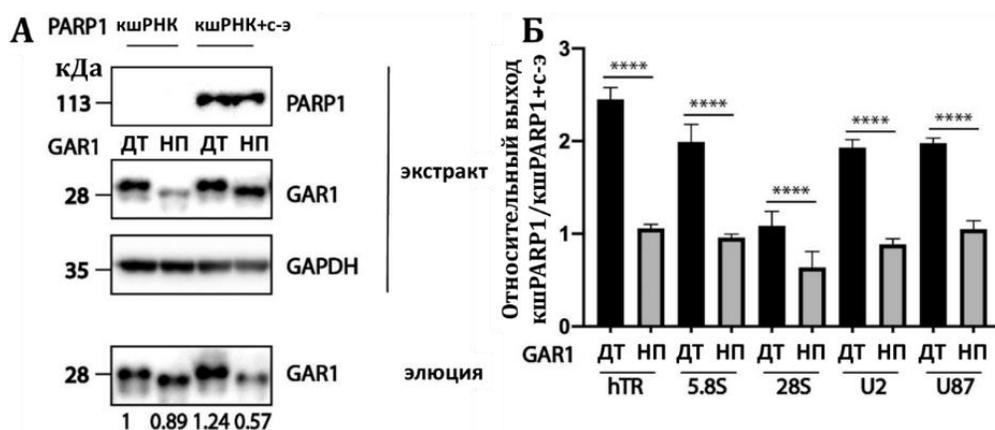


Рис. 16. Анализ влияния сверхэкспрессии PARP1 на ассоциацию GAR1 дикого типа (ДТ) и не ПАРилированного GAR1 (НП) с РНК-партнерами. (А) Анализ содержания PARP1,

GAR1 и НП-GAR1 в клеточных лизатах (панель экстракт) и эффективности иммунопреципитации (панель элюция) методом вестерн-блоттинга. (Б) Анализ относительных уровней совыделяющихся РНК с GAR1 дикого типа и не ПАРилированного мутанта методом RT-qPCR. Средние значения \pm стандартная ошибка рассчитаны для трех повторов. $****P < 0,0001$ по критерию множественных сравнений Шидака.

Мы обнаружили, что сверхэкспрессия PARP1 повышала количество совыделяющихся РНК с GAR1 дикого типа примерно вдвое, при этом наблюдались незначительные различия в ассоциации РНК с не ПАРилированным GAR1 (Рис. 16Б). Таким образом, мы показали, что сверхэкспрессия PARP1 принципиально влияет на способность белка GAR1 связываться с РНК в отличие от мутантного GAR1.

3.2 Биогенез и активность теломеразы при нокдауне PARP1

ПАРилирование участвует в регуляции поддержания теломер в клетках млекопитающих. Кратковременное подавление экспрессии PARP1 путем РНК-интерференции приводит к быстрому укорочению теломер, но не влияет на активность теломеразы (Beneke et

al., 2008). PARP1 ингибирует связывание теломерного белка TRF2 с теломерами, что приводит к их укорочению (Gomez et al., 2006). Мы проверили влияние стабильного нокадауна *PARP1* на биогенез и активность теломеразы. В первую очередь мы определили уровни компонентов теломеразы и эффективность ассоциации теломеразного комплекса в клетках с недостатком PARP1 (Рис. 17).

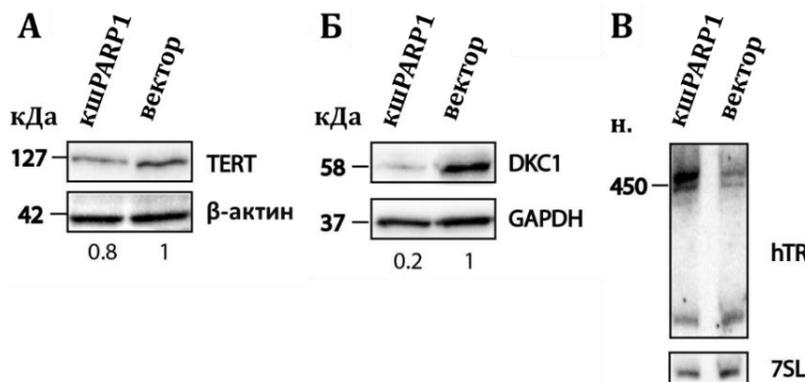


Рис. 17. Уровни *TERT*, *DKC1* и *hTR* при нокадауне *PARP1*. *kshPARP1* – клетки, экспрессирующие *kshPНК* против *PARP1*, вектор – контрольные клетки, экспрессирующие пустой вектор.

Анализ содержания белка *TERT* (А) и *DKC1* (Б) в лизатах клеток методом вестерн-блоттинга. Относительные средние значения интенсивности полос были рассчитаны из трех повторов при нормировке на контроль нанесения β -актин или *GAPDH*. (В) Анализ экспрессии *hTR* в указанных клеточных линиях методом нозерн-блоттинга. Гибридизацию с олигонуклеотидами комплементарными *РНК* *7SL* использовали для контроля количества внесенной в ПААГ *РНК*.

Интересно, что уровни *hTERT* (Рис. 17А) и *DKC1* (Рис. 17Б) существенно снижены в клетках с нокадауном *PARP1*. Однако при нокадауне *PARP1* содержание *hTR* в клетке увеличивается, тогда как содержание коротких фрагментов деградированной *hTR* оказывается схожим (Рис. 17В).

Поскольку уровни *TERT*, *DKC1* и *hTR* изменились, мы проанализировали активность и процессивность теломеразы в условиях нокадауна *PARP1*, используя метод *RQ-TRAP* (Рис. 18).

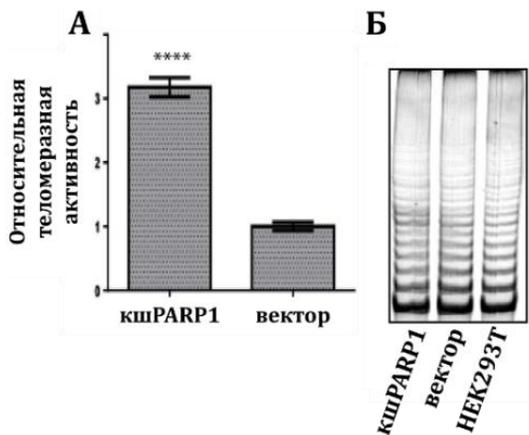


Рис. 18. Анализ теломеразной активности при нокадауне *PARP1*. (А) Анализ теломеразной активности *RQ-TRAP* в указанных клеточных линиях. **** – $p < 0,0001$ по двустороннему непарному *t*-критерию. (Б) Анализ процессивности теломеразы с использованием анализа *RQ-TRAP* с последующим разделением продуктов ПЦР в ПААГ.

Клетки со сниженным уровнем *PARP1* продемонстрировали повышенный уровень теломеразной активности *in vitro*, как показал

анализ методом RQ-TRAP (Рис. 18А), однако на процессивность теломеразы это не повлияло (Рис. 18Б).

Эти данные подтверждаются результатами анализа длины и структуры теломер методами Саузерн-блоттинга и гибридизации *in situ* на метафазных хромосомах, при помощи которых было показано удлинение теломер, а также увеличение числа слитых хромосом в клетках с длительным ингибированием экспрессии *PARP1*.

Мы предположили, что снижение содержания *PARP1* влияет на сборку не только Н/АСА-рибонуклеопротеидов, но и теломеразы. Мы коиммунопреципитировали теломеразный комплекс из клеток HEK293Т, экспрессирующих вектор LeGo-Cer или кш*PARP1*, используя антитела против hTERT. В результате были выделены сопоставимые уровни hTERT из разных клеточных линий, как было показано методом вестерн-блоттинга (Рис. 19А, нижняя панель), а количество совыделенной hTR, согласно результатам RT-qPCR (Рис. 19Б), оказалось в 3 раза выше в клетках со сниженным содержанием *PARP1*.

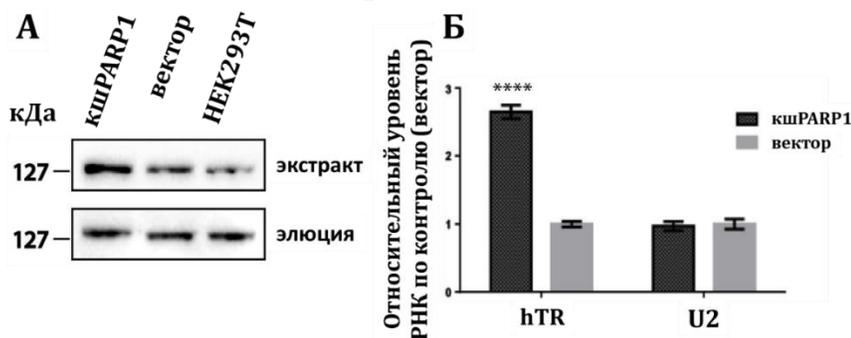


Рис. 19. Анализ влияния

PARP1 на сборку теломеразы. (А) Иммунопреципитацию hTERT из лизатов указанных клеточных линий контролировали при помощи вестерн-блоттинга с

антителами против hTERT. (Б) Анализ количеств hTR, совыделившихся с hTERT методом RT-qPCR. Относительный уровень hTR, выделенной из лизатов клеток с нокадауном *PARP1*, нормировали на относительный уровень hTR, выделенной из лизатов контрольных клеток. U2 мРНК использовали в качестве контроля специфичности выделения hTR. **** – *p*-значение < 0,0001 по двустороннему непарному *t*-критерию.

Для анализа влияния ПАРилирования на сборку теломеразного комплекса мы получили лизаты из клеток с нокадауном *PARP1* и из контрольных клеток, экспрессирующих пустой вектор, и разделили их с помощью центрифугирования в градиенте концентраций сахарозы. После центрифугирования образцы были разобраны на фракции, в которых определили теломеразную активность и содержание hTR.

В контрольных клетках, а также в клетках с нокадауном *PARP1* мы наблюдали, что максимальные уровни hTR коррелируют с максимальной теломеразной активностью. Оказалось, что в клетках со сниженным уровнем *PARP1* в 3 раза большее количество

теломеразной РНК находится во фракциях градиента, проявляющими теломеразную активность, при сравнении с контрольными клетками. Таким образом мы показали, что сниженное содержание PARP1 в клетках приводит к стабилизации теломеразного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе при помощи иммунопреципитации теломеразы за аффинный эпитоп на белке TERT, контроля количества выделяющегося белка TERT методом вестерн-блоттинга, ПЦР в режиме реального времени для оценки количества совыделяющейся теломеразной РНК и анализа теломеразной активности *in vitro* мы впервые показали, что вспомогательный белок Est3 принципиально необходим для активности теломеразы дрожжей *H. polymorpha in vitro*.

Используя аналогичный набор методов, мы показали, что белок Est3 привлекается в теломеразный комплекс *H. polymorpha* белком Est1. Кроме того, в работе выявлена взаимозависимость Est1 и Est3 при ассоциации с теломеразной РНК.

Описанные результаты подчеркивают важность использования альтернативных модельных организмов в целом и в области изучения теломеразного комплекса для получения более полной картины функционирования теломеразы.

В данной работе мы впервые показали, что поли(АДФ-рибозил)ирование влияет на связывание РНК белками H/ACA-комплекса DKC1 и GAR1. Для этого мы использовали четыре различных подхода для влияния на поли(АДФ-рибозил)ирование белков DKC1 и GAR1: экспрессия мутантных *DKC1* и *GAR1*, нокдаун *PARP1*, сверхэкспрессия *PARP1* и ингибирование активности *PARP1* малой молекулой.

Мы обнаружили, что содержание белков DKC1 и hTERT снизилось в клетках с нокдауном *PARP1*, а количество теломеразной РНК возросло. Мы исследовали сборку теломеразного комплекса путем иммунопреципитации за hTERT. При этом количество совыделяющейся теломеразной РНК оказалось примерно в 3 раза выше в клетках с недостатком *PARP1* по сравнению с контрольными клетками. Аналогичный результат получен после выделения активной фракции теломеразы при центрифугировании лизатов в градиенте концентрации сахарозы, что свидетельствует о стабилизации теломеразного комплекса в условиях недостатка *PARP1*.

Полученные результаты дают ценную информацию о сложном взаимодействии между *PARP1*, активностью теломеразы и механизмами поддержания теломер.

В целом, результаты данной работы подчеркивают важную роль вспомогательных белков и их посттрансляционных модификаций для биогенеза теломеразного комплекса.

ВЫВОДЫ

1. В работе впервые показано, что белок Est3 необходим для активности иммунопреципитированной теломеразы *Hansenula polymorpha in vitro*.
2. С использованием метода коиммунопреципитации установлено, что белок Est1 необходим, а белок TERT не нужен для ассоциации белка Est3 с теломеразной РНК *Hansenula polymorpha*.
3. При помощи коиммунопреципитации показано, что белок Est3 и в меньшей степени TERT необходимы для взаимодействия Est1 с теломеразной РНК *Hansenula polymorpha*.
4. При использовании четырех подходов продемонстрировано, что поли(АДФ-рибозил)ирование модулирует связывание белков DKC1 и GAR1 человека с РНК-партнерами: 5.8S, 28S, U2, U87 РНК и теломеразной РНК.
5. При помощи стабильного нокдауна PARP1 показано, что данный белок регулирует биогенез и стабильность теломеразного комплекса человека.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.014.2 по специальностям 1.4.9. Биоорганическая химия и 1.5.3. Молекулярная биология (химические науки):

1. **Shepelev N.**, Dontsova O., Rubtsova M. Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications in Telomerase Biogenesis and Recruitment to Telomeres // *International journal of molecular sciences*. 2023. V. 24, № 5. P. 5027. **IF 5.6** (Web of Science). <https://doi.org/10.3390/ijms24055027>

2. Savelyev N.V., **Shepelev N.M.**, Lavrik O.I., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. PARP1 Regulates the Biogenesis and Activity of Telomerase Complex Through Modification of H/ACA-Proteins // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. V. 9. P. 621134. **IF 5.5** (Web of Science). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.621134>

3. **Shepelev N.M.**, Mariasina S.S., Mantsyzov A.B., Malyavko A.N., Efimov S.V., Petrova O.A., Rodina E.V., Zvereva M.I., Dontsova O.A., Polshakov V.I. Insights into the structure and function of Est3 from the *Hansenula polymorpha* telomerase // *Scientific Reports*. 2020. V. 10, № 1. P. 11109. **IF 4.6** (Web of Science). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68107-x>