

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

СКОЛКОВСКИЙ ИНСТИТУТ НАУКИ И ТЕХНОЛОГИИ

ЦЕНТР МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТочНОЙ БИОЛОГИИ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н., проф. Рубцова Мария Петровна

д.х.н., проф., академик РАН Донцова Ольга Анатольевна

Москва — 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
1. Актуальность темы исследования.....	8
2. Цели и задачи исследования.....	9
3. Объект исследования.....	9
4. Предмет исследования.....	9
5. Научная новизна исследования.....	10
6. Научная и практическая значимость исследования	10
7. Методология диссертационного исследования	11
8. Основные положения, выносимые на защиту	11
9. Степень достоверности результатов	12
10. Апробация работы	12
11. Публикации.....	13
12. Личный вклад автора.....	13
13. Структура и объем диссертации	15
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1. Теломеры – ДНК-белковые комплексы, защищающие концы хромосом в большинстве эукариот.....	16
2. Поддержание длины теломер – основная функция теломеразы.....	17
3. Функционирование дрожжевой теломеразы	18
3.1 Холофермент дрожжевой теломеразы	18
3.2 Сборка дрожжевой теломеразы.....	21

3.3 Посттрансляционные модификации (ПТМ) компонентов теломеразы дрожжей	26
4. Функционирование теломеразы позвоночных	27
4.1 Холофермент теломеразы человека	27
4.2 Предварительная сборка теломеразного РНП, опосредованная мотивом Н/АСА.....	30
4.3 Сборка активного теломеразного комплекса.....	33
4.4 Транспорт теломеразного РНП человека	38
4.5 Роль посттрансляционных модификаций в биогенезе теломеразы	43
5. Общие и особые черты биогенеза теломеразы у дрожжей и позвоночных	44
6. Поли(АДФ-рибозил)ирование и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы	46
6.1 Поли(АДФ-рибозил)ирование в регуляции активности белков и белковых комплексов	48
6.2 Функции PARP1	50
7. Заключение к обзору литературы	52
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	53
1. Реагенты и материалы	53
2. Буферные растворы и культуральные среды	55
3. Олигонуклеотиды	59
4. Штаммы, плазмиды и клеточные линии, использованные в работе.....	61
5. ПЦР.....	61
6. Разделение ДНК в агарозном геле	62

7.	Выделение фрагментов ДНК из реакционной смеси	62
8.	Выделение геномной ДНК <i>H. polymorpha</i>	63
9.	Трансформация штаммов <i>H. polymorpha</i>	63
10.	Иммунопреципитация белков за НА-эпитоп из <i>H. polymorpha</i>	64
11.	Культивирование клеток человека.....	65
12.	Иммунопреципитация за 3xFLAG-метку.....	65
13.	Электрофорез белков.....	66
14.	Вестерн-блоттинг.....	66
15.	Выделение РНК.....	68
16.	Количественный анализ РНК с помощью RT-qPCR	68
17.	Саузерн-блоттинг для оценки длины теломер у штаммов дрожжей	70
17.1	Получение и разделение рестрикционных фрагментов	70
17.2	Перенос ДНК на нейлоновую мембрану.....	71
17.3	Подготовка зонда для гибридизации.....	71
17.4	Гибридизация мембраны с зондами	71
18.	Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>	72
19.	Оценка теломеразной активности теломеразы дрожжей	72
20.	Оценка теломеразной активности теломеразы человека (RQ-TRAP) ..	73
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ		75
1.	Постановка задачи	75
2.	Вспомогательный белок Est3 в теломеразном комплексе дрожжей.....	76
2.1	Влияние НА-эпитопа на функционирование теломеразных белков дрожжей <i>H. polymorpha</i>	79
2.2	Влияние Est3 на активность теломеразы <i>H. polymorpha</i>	81

2.1	Влияние белков Est1 и TERT на ассоциацию белка Est3 с теломеразной РНК <i>H. polymorpha</i>	90
2.2	Анализ влияния белков Est3 и TERT на ассоциацию белка Est1 с теломеразной РНК <i>H. polymorpha</i>	94
2.3	Анализ влияния нокаутов <i>EST1</i> или <i>EST3</i> на уровень белка TERT в клетках <i>H. polymorpha</i>	97
2.4	Функционирование белка Est3 в теломеразе <i>H. polymorpha</i>	99
3.	Вспомогательные белки DKC1 и GAR1 в теломеразном комплексе человека	101
3.1	Анализ влияния ПАРилирования на способность белков DKC1 и GAR1 взаимодействовать с РНК-партнерами	102
3.2	Получение линии клеток со стабильным нокадауном <i>PARP1</i>	106
3.3	Анализ влияния нокадауна <i>PARP1</i> на способность белков DKC1 и GAR1 взаимодействовать с РНК-партнерами	107
3.4	Анализ влияния сверхэкспрессии <i>PARP1</i> на способность белка GAR1 взаимодействовать с РНК-партнерами	109
3.5	Биогенез и активность теломеразы при нокадауне <i>PARP1</i>	110
3.6	Влияние <i>PARP1</i> на длину и структуру теломер	115
3.7	Функциональная роль поли(АДФ-рибозил)ирования белков DKC1 и GAR1	116
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
	ВЫВОДЫ	121
	БЛАГОДАРНОСТИ	122
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	123

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 5'ММГ – 5'-монометилгуанозиновый кеп
- 5'ТМГ – 5'-2,2,7-триметилгуанозиновый кеп
- CR4/5 – консервативные регионы 4 и 5
- dNTP – 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат
- ДТТ – 1,4-дитио-DL-треитол
- FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*
- НА – гемагглютинин
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- ОВ-укладка – олигонуклеотид/олигосахарид-связывающая укладка
- RQ-TRAP – протокол количественной амплификации теломерных повторов в реальном времени
- RT-qPCR – количественная ПЦР с обратной транскрипцией
- SDS – додецилсульфат натрия
- SUMOилирование – посттрансляционная модификация белками SUMO
- TEN-домен – N-концевой домен белка TERT
- TER – теломеразная РНК дрожжей *Hansenula polymorpha*
- TERT – обратная транскриптаза теломеразы
- Tris – трис(гидроксиметил)аминометан
- Анти-НА-агароза – агароза, ковалентно связанная с антителами к гемагглютинину
- BCA – бычий сывороточный альбумин
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- Домен СТЕ – С-концевой домен TERT
- Домен RT – домен обратной транскриптазы белка TERT

Домен TRBD – РНК-связывающий домен белка TERT

ДТ – дикий тип

кДа – 1000 Дальтон

кшРНК – короткая шпилечная РНК

мкаРНК – малая РНК телец Кахаля

мякРНК – малые ядрышковая РНК

мяРНК – малая ядерная РНК

НП – не ПАРилированный

ОРС – открытая рамка считывания

п.н. – пара нуклеотидов

ПААГ – полиакриламидный гель

ПАРилирование – поли(АДФ-рибозил)ирование

ПТМ – посттрансляционные модификации

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНП – рибонуклеопротеин

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭГТА – триэтиленгликольдиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

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 *Hansenula 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 нокадауна, 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:

1) Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего». 2019

2) II Объединенный научный форум, включающий VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». 2019

3) The 44th FEBS Congress. 2019

4) XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019». 2019

11. Публикации

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

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>

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 *Hansenula 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.

Клонирование мутантных белков DKC1 и GAR1, очистка теломеразного комплекса человека путем иммунопреципитации за TERT и в градиенте сахарозы и оценка его активности *in vitro*, анализ длины теломер методом флуоресцентной гибридизации *in situ* проведены Савельевым Н.В. (публикация 2). Исходные

штаммы *H. polymorpha*, кодирующие химеры теломеразных белков с НА-эпитопом, и конструкции для получения нокаутов компонентов теломеразы получены Малявко А.Н. Структура и взаимодействие белка Est3 с модельными олигонуклеотидами и TEN-доменом белка TERT определены методом ЯМР Марьясиной С.С. (публикация 3).

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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ¹

Далее по тексту будут использованы устоявшиеся традиционные обозначения и их форматирование, принятые для дрожжей и человека. Названия штаммов дрожжей выделены курсивом, названия генов дрожжей и человека записаны прописными буквами курсивом. Нокауты дрожжевых генов указаны строчными буквами курсивом. 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.

В обзоре литературы будут рассмотрены состав и биогенез теломеразы дрожжей и человека, а также характеристика и функциональное значение поли(АДФ-рибозил)ирования у эукариот.

1. Теломеры – ДНК-белковые комплексы, защищающие концы хромосом в большинстве эукариот

Теломеры – это особые комплексы на концах хромосом эукариот, состоящие из короткой повторяющейся G-богатой последовательности ДНК и связанных с ней белков. Данный комплекс предотвращает распознавание концов линейных хромосом как повреждения ДНК и активацию механизмов репарации ДНК. Основная функция теломер – защита хромосом от слияния и деградации [1].

¹ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация 1, выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

Линейная молекула ДНК чрезвычайно нестабильна внутри эукариотической клетки: если ее концы гомологичны геномной ДНК, то может произойти рекомбинация и интеграция линейного фрагмента ДНК в хромосому. В противном случае линейная ДНК будет деградирована, лигирована или иным образом перестроена [2]. Эксперимент, проведенный в начале 1980-х годов, продемонстрировал, что линеаризованная плазида, содержащая G-богатые теломерные последовательности филогенетически удаленного простейшего *Tetrahymena*, стабильна в дрожжах [3]. Это исследование показало, что теломеры могут функционировать в разных филогенетических ветвях, что предполагает их значительную функциональную консервативность. Позже стало ясно, что G-богатые повторы на концах хромосом функционируют у большинства эукариот [4].

2. Поддержание длины теломер – основная функция теломеразы

Теломераза обеспечивает эукариотическим клеткам неограниченный пролиферативный потенциал, поддерживая длину теломер [5,6]. Максимум активности теломеразы приходится на конец S-фазы, когда она привлекается к теломерам и добавляет один или несколько теломерных повторов к 3'-концу хромосомы за счет обратнотранскриптазной активности, используя небольшой участок теломеразной РНК в качестве матрицы [7]. Теломеразная активность необходима, так как теломеры укорачиваются с каждым делением соматических клеток из-за проблемы «репликации концов» хромосом [8,9] и действия эндонуклеаз [10]. Когда теломеры становятся критически короткими, они не могут защитить концы линейных хромосом от передачи сигналов о повреждении ДНК. В этом случае в клетках происходит остановка клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК и/или старение [11,12]. Некоторые клетки переживают этот кризис и приобретают

неограниченный потенциал деления, активируя теломеразу для удлинения теломер. Это явление наблюдается в большинстве раковых клеток [13]. Лишь небольшая часть раковых клеток может задействовать механизм альтернативного удлинения теломер без участия теломеразы [14]. Теломераза активна в клетках, которые должны непрерывно делиться в течение жизни организма, и активируется в особых случаях, когда требуется усиленная пролиферация [15,16]. Дефицит активности теломеразы в процессе развития в стволовых клетках связан с заболеваниями, сопровождающимися преждевременным старением из-за снижения способности к регенерации пораженных стволовых клеток [17].

3. Функционирование дрожжевой теломеразы

Далее в подразделе описана теломераза почкующихся дрожжей (в первую очередь работы по *Saccharomyces cerevisiae*). Это связано с тем, что использованный в работе модельный организм *Hansenula polymorpha* относится к почкующимся дрожжам. Кроме того, при описании использованы устоявшиеся названия теломеразных компонентов дрожжей *S. cerevisiae*, у которых теломеразный комплекс наиболее хорошо изучен. Эти названия используются, если не указано иное.

3.1 Холофермент дрожжевой теломеразы

Основными компонентами теломеразного комплекса почкующихся дрожжей являются теломеразная РНК (TLC1) и теломеразная обратная транскриптаза (Est2), белки Est1, Est3, Pop1, Pop6, Pop7, гетеродимер уKu70/80 и гептамер Sm7. TLC1 работает как гибкий каркас для ассоциированных белков. Вторичная структура TLC1 включает в себя центральный каталитический участок (матричный участок и

псевдоузел), а также три удаленные от центра структуры, образуемые тремя большими стеблями, с которыми связываются вспомогательные белки (Рис. 1) [18].

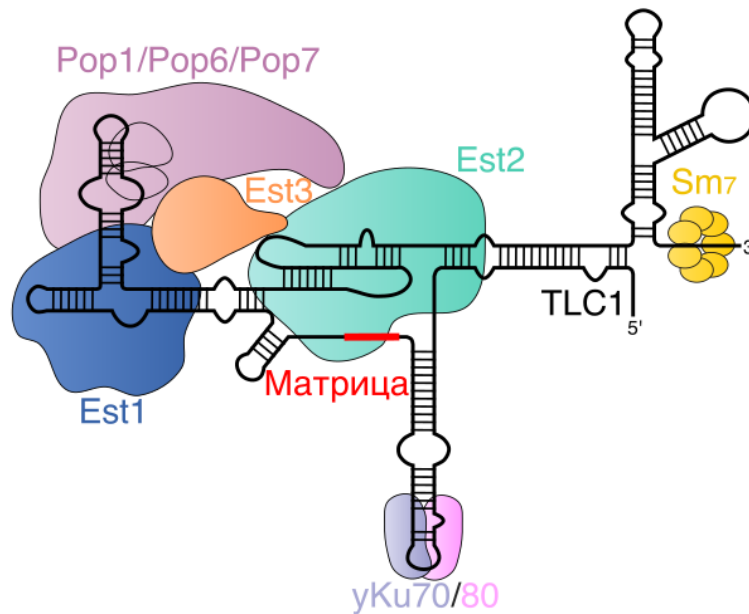


Рис. 1. Состав холофермента теломеразы почкующихся дрожжей [19]. Вторичная структура TLC1 и белковых компонентов, а также взаимодействие между ними показаны в упрощенном виде. Белки Est играют важную роль в гомеостазе теломер у дрожжей. Est2 связывает псевдоузел (не подписан) и матричную область TLC1. Белки Est1 и Pop связывают один и тот же большой стебель TLC1. Белки Pop способствуют связыванию Est1 и Est2 (и, возможно, Est3). Est3 не взаимодействует с TLC1 и связывается через Est1 и/или Est2 в зависимости от вида дрожжей. Гетеродимер yKu70/80 связывает другой большой стебель TLC1. Гептамерное белковое кольцо Sm7 защищает 3'-конец TLC1.

Несмотря на то, что TLC1 и Est2 достаточны для активности теломеразы *in vitro* [20], перечисленные вспомогательные белки необходимы для функционирования теломеразы *in vivo*. Sm7 играет ключевую роль в стабилизации TLC1 в цитоплазме путем связывания вблизи 3'-конца TLC1 в структуре, известной

как «терминальный стебель» или «стебель Sm» [21,22]. Est2 распознает псевдоузел и матричную область, расположенную в проксимальном центре TLC1, где сходятся три больших стебля TLC1 [23]. Est1 опосредует основной путь привлечения теломеразы к теломерам во время поздней S-фазы путем взаимодействия с теломерным белком Cdc13 и теломеразной РНК [24–29]. Кроме того, Est1 изменяет конформацию Cdc13, что приводит к высвобождению 3'-конца теломеры и связыванию и активации теломеразы [30]. Связывание Est1 с TLC1 происходит в результате взаимодействия со структурными элементами типов «петля-шпилька» и «выступ» в части, известной как «стебель Est1» [31].

Гетеродимер уKu70/80, хорошо известный своей ролью в восстановлении разрывов ДНК, распознает короткую структуру типа «стебель-петля» внутри другого большого стебля TLC1, называемого «стебель уKu» [32–34]. Кроме того, белок уKu80 может связываться с теломерным белком Sir4, предоставляя теломеразе альтернативный способ связывания с концом теломеры [34,35]. Est3, небольшой белок, принимающий олигонуклеотид/олигосахарид-связывающую укладку (ОВ-укладку), остается наименее изученным компонентом холофермента теломеразы дрожжей. Считается, что его связывание имеет решающее значение для правильной конформации комплекса, потенциально регулируя путь сборки теломеразы [36]. Est3 взаимодействует с Est1 и Est2 в теломеразном комплексе [36]. Белки с ОВ-укладкой высококонсервативны и известны своим участием в поддержании целостности генома, особенно на теломерах [37]. Наконец, теломеразный комплекс включает набор белков Pop (Pop1, Pop6 и Pop7), которые также являются компонентами комплексов РНКазы Р и РНКазы MRP [38]. Белки Pop связываются с доменом CS2a/TeSS «стебля Est1» рядом с сайтом связывания белка Est1. Их присутствие

имеет решающее значение для биогенеза теломеразы и ее ядерной локализации [39,40].

3.2 Сборка дрожжевой теломеразы

Вероятно, что вновь синтезированная молекула TLC1 связывается с кеп-связывающим комплексом (CBC) и транскрипционно-экспортным комплексом 1 (TREX-1), подобно другим кепированным m⁷G РНК [41,42]. Считается, что эти комплексы способствуют ранним этапам созревания TLC1, таким как привлечение экспортина Xpo1. Существующие данные позволяют предположить, что цитоплазматический экспорт TLC1 полностью зависит от Xpo1 [22,43]. Однако в мутантном штамме *tex67-5* TLC1 быстро разрушается ядерной экзосомой, что позволяет предполагать участие гетеродимера экспортного рецептора Mex67–Mtr2 как адаптера во время процесса экспорта, который также стабилизирует РНК [22,44].

После экспорта в цитоплазму гептамерное кольцо Sm₇ собирается вокруг последовательности 3'-конца TLC1 [41]. Вопреки начальному представлению [43], комплекс Sm₇ не требуется сразу для стабильности РНК после транскрипции, что позволяет молекулам TLC1 с мутациями в участке связывания Sm₇ достигать цитоплазмы неповрежденными [22]. Однако у дрожжей существуют небольшие различия в механизмах защиты 3'-конца теломеразной РНК. Например, у *Schizosaccharomyces pombe* только предшественник теломеразной РНК (TER1) связывается с комплексом Sm₇, и его замена на гептамерное кольцо Lsm2-8 необходима для стабильности зрелой РНК [45]. Кроме того, эволюционно консервативный белок Lar7, также известный как Pof8, играет решающую роль в стабилизации связывания белков Lsm с TER1 [46]. The1 и Vmc1 работают совместно с Lar7, распознавая правильно свернутую TER1 и способствуя привлечению

гептамера Lsm2-8 [47,48]. Следует отметить, что делящиеся дрожжи сильно отличаются от почкующихся дрожжей, и в особенности в функционировании ДНК-белковых комплексов на теломерах [49].

В отсутствие любого из белков Est теломеразная РНК *S. cerevisiae* накапливается в цитоплазме, что указывает на то, что сборка теломеразного рибонуклеопротеина (РНП) происходит в цитоплазме и необходима для его последующего импорта в ядро [43]. Однако эти данные не противоречат связыванию по крайней мере, одного из белков Est в ядре. Таким образом, точное время добавления каждого белка Est неясно [41]. Предполагается, что сборка активного теломеразного РНП является сложным регулируемым процессом, в котором субъединица Est3 действует как переключатель, контролирующий пути сборки/разборки РНП [36]. Est2 и Est1 могут напрямую связывать определенные участки теломеразной РНК [23–25,50], и накопление промежуточного комплекса Est1–TLC1–Est2 можно обнаружить на ранних стадиях клеточного цикла [36]. Существование теломеразного комплекса, содержащего все три субъединицы Est, оказывается преходящим, поскольку ближе к концу клеточного цикла накапливается комплекс Est1–TLC1–Est3 без Est2 [36]. Диссоциацию Est2 в фазах G2/M можно объяснить его взаимодействием с другим белком. Белок PinX1, который считается фактором ареста Est2 в ядрышке, подходит под эту роль [51].

Эксперименты на альтернативных моделях почкующихся дрожжей указывают на дополнительный уровень сложности для создания общей модели сборки теломеразы. Возможно, наиболее ярким примером является отсутствие генов *EST1* в геномах *Candida parapsilosis* и *Lodderomyces elongisporus*, а также увеличенный размер открытых рамок считывания гена *EST3*. Довесок к белку Est3

играет важную роль во взаимодействии между Est3 и Est2 в вышеназванных штаммах [52]. С другой стороны, в *Candida albicans*, по всей видимости, взаимодействие между Est1 и TLC1 зависит от предварительного связывания Est3, что позволяет предположить неспособность образовывать субкомплекс Est1–TER–Est2 без Est3 [53]. Описанные несоответствия отражают эволюционную пластичность механизмов сборки теломеразы.

Дополнительная стабилизация комплекса теломеразной РНК с белками Est происходит за счет связывания белков Pop с доменом CS2a/TeSS на TLC1. В их отсутствие (в мутантах *pop1* и *pop6*) взаимодействие между Est1 и TLC1 ослаблено и теломеразная РНК накапливается в цитоплазме [39,40,54]. Как часть основных механизмов процессинга РНК, белки Pop присутствуют в большинстве организмов, а элементы, подобные CS2a/TeSS TLC1, можно обнаружить в теломеразных РНК многих дрожжей, включая *S. pombe* и *H. polymorpha* [38]. Еще предстоит определить, взаимодействуют ли белки Pop с Est3 и влияют ли на его ассоциацию с теломеразным комплексом. Напротив, связывание гетеродимера уKu70/80 может быть специфичным для *S. cerevisiae* и близкородственных видов [55–57]. Это предположение подтверждается отсутствием стабильной ассоциации между уKu70/80 и TER (ортологом TLC1), наблюдаемой в эксперименте по коиммунопреципитации теломеразной РНК *H. polymorpha* [58]. В пользу этого свидетельствует тот факт, что даже у *S. cerevisiae* взаимодействие между уKu70/80 и TLC1, по-видимому, играет второстепенную роль в привлечении теломеразы на теломеры по сравнению с основным путем через взаимодействие Cdc13–Est1 [34]. Однако связывание белков Ku с TLC1 может иметь решающее значение для

эффективного импорта теломеразного РНП в ядро, поскольку молекулы TLC1 накапливаются в цитоплазме в мутанте *Δyku70* в *S. cerevisiae* [43].

Независимо от точного состава и конформации теломеразного РНП, импортин Mtr10 и кариоферины Kap122 и Cse1 могут участвовать в транспорте теломеразы в ядро [43,54,59]. Однако их значение для импорта является дискуссионным, поскольку штамм *Δmtr10*, имеет плейотропный фенотип и низкий уровень TLC1 [59], а в другом исследовании эффект мутации *Δkap122* оказался незначительным [22]. Заключительным этапом созревания теломеразы является образование 5'-2,2,7-триметилгуанозинового кепа (5'ТМГ) на 5'-конце TLC1 и окончательный процессинг 3'-конца экзосомой, что, скорее всего, происходит в ядрышке после импорта в ядро полностью собранного теломеразного комплекса [22,54]. Стоит также отметить, что имеющиеся данные не противоречат представлению о перемещении теломеразы между ядром и цитоплазмой [41].

На основе описанных данных составлена общая схема биогенеза теломеразного комплекса у почкующихся дрожжей (на основе данных по *S. cerevisiae*), которая представлена на Рис. 2.

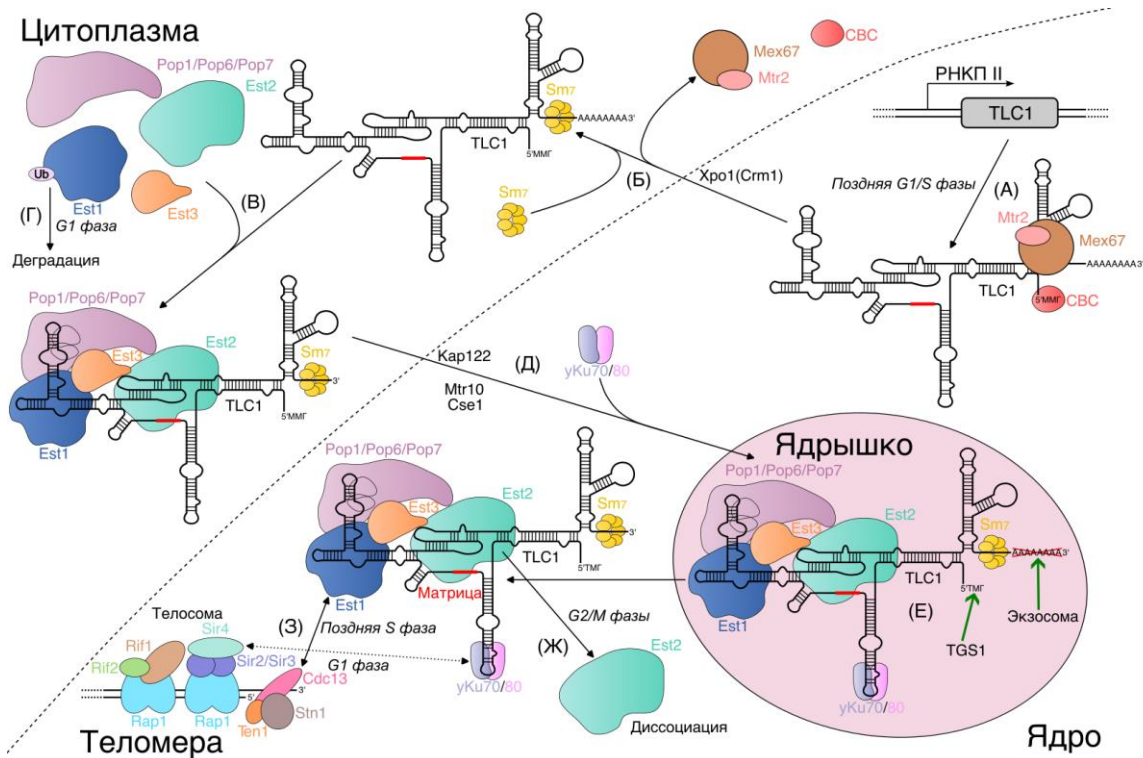


Рис. 2. Модель биогенеза теломеразы у почкующихся дрожжей [19]. (А) В поздней G1- и S-фазах теломеразная РНК (TLC1) синтезируется РНК-полимеразой II (РНКП II). Незрелая TLC1 имеет монометилированный 5'-конец (5'ММГ), связанный кеп-связывающим комплексом (CBC), и 3'-поли(А) хвост (если он не процессируется экзонуклеолитическим расщеплением). При транскрипции гетеродимер рецептора экспорта Mex67–Mtr2 связывается с TLC1, стабилизируя и способствуя ее ядерному экспорту. (Б) Экспортин Xpo1 обеспечивает экспорт TLC1 в цитоплазму, где происходит диссоциация комплекса с Mex67–Mtr2 и CBC, а комплекс Sm7 связывает 3'-конец TLC1. (В) Белки Pop, Est1, Est2 и Est3 собираются в комплекс в цитоплазме в неизвестном порядке и по неизвестному механизму. (Г) В G1-фазе клеточного цикла уровень белка Est1 подавляется за счет убиквитинирования и последующей деградации. (Д) Собранный теломеразный комплекс импортируется в ядро под действием импортина Mtr10 и кариофертинов

Kap122 и *Cse1*. После импорта у *Ku70/80* связывает теломеразный РНП, возможно, способствуя его удержанию в ядре. (Е) Теломеразный комплекс перемещается в ядрышко, где поли(А) хвост окончательно удаляется и образуется 5'-2,2,7-триметилгуанозиновый кеп (5'ТМГ). (Ж) В G2- и M-фазах *Est2* диссоциирует из теломеразного РНП, тем самым ограничивая активность теломеразы определенными стадиями клеточного цикла. (З) Теломеры почкующихся дрожжей защищены белковым комплексом (телосомой). Двухцепочечная область теломер связана *Rap1* и связанными с ним белками *Rif1/Rif2* или белками *Sir2/Sir3/Sir4*. Одноцепочечный участок защищен *Cdc13* в комплексе с белками *Stn1* и *Ten1*. Во время поздней S-фазы теломераза дрожжей привлекается к теломерам за счет взаимодействия между *Cdc13* и *Est1*, что поддерживается активацией *Est1* в S-фазе. Гетеродимер у *Ku70/80* также может связывать теломеры через белок *Sir4* в фазе G1, но это взаимодействие не способствует удлинению теломер.

3.3 Посттрансляционные модификации (ПТМ) компонентов теломеразы дрожжей

За несколько десятилетий изучена только одна посттрансляционная модификация субъединицы теломеразы дрожжей в контексте функционирования теломеразы: убиквитинирование белка *Est1* в *S. cerevisiae*. Количество *Est1* регулируется в течение клеточного цикла. При этом максимум наблюдается в S-фазе. Убиквитинлигаза *Ufd4* E3 модифицирует *Est1*, активируя протеасомную деградацию этого белка [60–62]. Мутация *cdc48-3* (компонент комплекса, нацеливающего белки на протеасому) и делеция *ufd4* увеличивают количество *Est1*, влияя на сборку теломеразы и поддержание длины теломер [63].

Предположение о фосфорилировании Est3 было обозначено в статье [64]. Однако какой остаток может быть модифицирован, какой киназой, а также потенциальные функциональные последствия такой модификации не были идентифицированы.

В нескольких статьях сообщалось о модификации гетеродимера уKu70/80 небольшими убиквитин-подобными модификаторами (SUMO) или SUMOилирование уKu70/80. Три лигазы SUMO E3 (Mms21, Siz1 и Siz2) участвуют в модификации С-конца уKu70 [65–67], в то время как Siz2 может также модифицировать уKu80 [66]. Хотя нарушение SUMOилирования уKu70/80 действительно приводит к значительным изменениям длины теломер, они не обязательно связаны с процессом сборки теломеразы. Эффекты мутаций в ферментах SUMO E3 трудно интерпретировать, учитывая, что SUMOилирование затрагивает несколько белков, включая теломерные [68]. Кроме того, обнаружено фосфорилирование остатка Ser623 уKu80 киназой Pho85, но мутация *uku80^{S623A}*, по-видимому, не нарушает поддержание теломер [69].

Примечательно, что в ходе нескольких широкомасштабных скринингов выявлен ряд посттрансляционных модификаций в белках теломеразы [70–72]. Их потенциальное участие в поддержании теломер остается нераскрытым. Учитывая решающую роль ПТМ в контроле разнообразных клеточных процессов, а также тот факт, что до сих пор только одну из них связывают с биогенезом теломеразы, вполне вероятно, что некоторые из упомянутых или пока не обнаруженных модификаций могут регулировать сборку холофермента теломеразы дрожжей.

4. Функционирование теломеразы позвоночных

4.1 Холофермент теломеразы человека

Биогенез теломеразного комплекса позвоночных наиболее подробно изучен у человека, что во многом обусловлено медицинской значимостью правильного функционирования теломеразы. Поэтому далее будут рассматриваться результаты, полученные преимущественно на клетках человека. Одним из хорошо известных редких наследственных заболеваний, связанных со снижением активности теломеразы, является врожденный дискератоз [73]. Нарушение функционирования белка дискерина (DKC1) приводит к снижению содержания теломеразы в клетках и укорочению теломер. Точечные мутации дискерина приводят к X-сцепленной форме врожденного дискератоза [74], при котором падение количества теломеразы сопровождается дефектами активно пролиферирующих тканей, костного мозга, легких и кожи. Аутосомно-доминантные формы врожденного дискератоза [75] наблюдаются при мутациях теломеразной обратной транскриптазы, теломеразной РНК [76] и теломерного белка TIN2 [77]. Эти заболевания указывают на прямую и важную связь между патофизиологией врожденного дискератоза и укорочением теломер.

Теломеразная РНК человека (hTR) и TERT человека (hTERT) достаточны для активности теломеразы *in vitro* в лизате ретикулоцитов кролика, в котором содержатся дополнительные белки необходимые для сборки теломеразного комплекса [78,79]. Однако для эффективного функционирования теломеразного комплекса *in vivo* требуется множество дополнительных белков [80]. Итак, кратко рассмотрим вторичную структуру теломеразной РНК и холофермента теломеразы человека (Рис. 3).

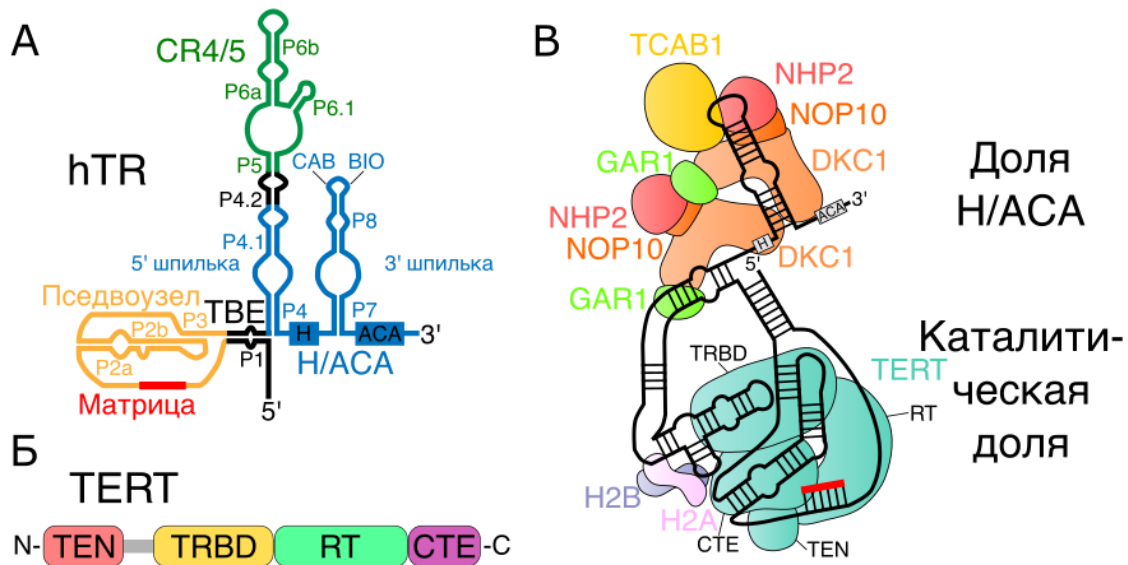


Рис. 3. Схема структур hTR и hTERT и холофермента теломеразы человека [19]. (А) Вторичная структура теломеразной РНК человека (hTR). CR4/5 – консервативные регионы 4 и 5; TBE – матричный граничный элемент; H/ACA – боксы H и ACA; CAB – бокс телец Кахаля; BIO – бокс, способствующий биогенезу. Отмечены псевдоузел, матричный участок, 5'- и 3'-шпильки домена H/ACA, а также элементы P1, P2a, P2b, P3, P4, P4.1, P4.2, P5, P6a, P6b, P6.1, P7 и P8. (Б) Доменная структура обратной транскриптазы теломеразы (TERT) от N- к C-концу. TEN – N-концевой домен теломеразы; TRBD – теломеразный РНК-связывающий домен; RT – домен обратной транскриптазы; CTE – C-концевой домен. (В) Схема холофермента теломеразы человека, показывающая взаимоотношения доменов hTERT, связанных белков и hTR, адаптированная на основе структуры теломеразы человека, полученной криоэлектронной микроскопией. Теломераза принимает двудольную структуру, связанную теломеразной РНК. Первая доля состоит из домена H/ACA hTR, который связывает два тетрамера (белки DKC1, NOP10, NHP2 и GARI) и белка TCAB1.

Вторая доля состоит из белка hTERT, а также доменов псевдоузла и области CR4/5 hTR. TEN, TRBD, RT и CTE те же, что и в (Б).

Сравнительный анализ последовательностей теломеразных РНК среди позвоночных выявил несколько консервативных областей, включая псевдоузел, домен CR4/5 и домен Н/АСА [81]. Другие важные элементы включают матричную область и матричный граничный элемент (ТВЕ) (Рис. 3А).

У большинства организмов, включая позвоночных, TERT содержит четыре домена: N-концевой домен теломеразы (TEN), теломеразный РНК-связывающий домен (TRBD), домен обратной транскриптазы (RT) и C-концевой домен (CTE) [82] (Рис. 3Б). Аминокислотная последовательность между доменами TRBD и TEN представляет собой область низкой сложности, богатую пролином, аргинином и глицином, которая может способствовать димеризации TERT или может быть местом расщепления протеазой в клетках человека [83] (Рис. 3Б, показано серым цветом).

4.2 Предварительная сборка теломеразного РНП, опосредованная мотивом Н/АСА

Биогенез и накопление hTR не требуют участия hTERT [84]. Правильный процессинг теломеразной РНК требует наличия мотива Н/АСА. Мотив Н/АСА имеет консервативную вторичную структуру, состоящую из двух шпилек, разделенных одноцепочечным Н-боксом с консенсусной последовательностью 5'-ANANNA-3', где N представляет собой любой нуклеотид. Структура заканчивается одноцепочечным 3'-концом, который включает нуклеотиды АСА [85]. Малые ядрышковые РНК (мякРНК) и малые РНК, специфичные для теллец Кахаля (мкаРНК), содержат мотив Н/АСА. Эти семейства малых РНК в основном участвуют

в модификации рибосомных РНК (участвуют мякРНК) и малых ядерных РНК (участвуют мкаРНК), определяя специфические сайты превращения уридина в псевдоуридин [86]. На сегодняшний день не выявлена мишень РНК для псевдоуридилирования, за которую отвечала бы теломеразная РНК. Отличительной особенностью hTR от других РНК с мотивом Н/АСА является наличие спиралей Р6.1 и Р6b [87], расположенных на 5'-шпильке в консервативной области CR4/5. Кроме того, hTR в структуре 3'-шпильки присутствует ВЮ-бокс, который отличает ее от других РНК человека с Н/АСА мотивом. ВЮ-бокс помогает в сборке теломеразного РНП [88]. 3'-шпилька hTR также включает в себя бокс телец Кахаля, называемый САВ-бокс [89] (Рис. 3А).

У дрожжей мякРНК Н/АСА и теломеразная РНК транскрибируются как отдельные молекулы РНК-полимеразой II и процессируются из синтезированных предшественников [90]. У инфузорий теломеразная РНК также экспрессируется со своего промотора, но с помощью РНК-полимеразы III [91]. Интересно, что у человека мякРНК и мкаРНК Н/АСА обычно образуются как продукты процессинга интронов после сплайсинга мРНК [92]. Однако теломеразная РНК человека, подобно дрожжевой, синтезируется РНК-полимеразой II в виде отдельного транскрипта и процессируется промотор-зависимым образом [93]. Следовательно, биогенез теломеразной РНК отличается от биогенеза большинства человеческих РНК, несущих мотив Н/АСА. Если hTR транскрибируется РНК-полимеразой III или если домен Н/АСА hTR транскрибируется внутри интрона мРНК РНК-полимеразой II, в клетке накапливается только 3'-конец молекул теломеразной РНК, несущих мотив Н/АСА [85,94]. В отличие от других РНК Н/АСА человека, процессинг в

направлении 5'–3' должен быть подавлен, чтобы сохранить псевдоузел и матричный участок.

Мотив H/ACA участвует в формировании рибонуклеопротеинового комплекса (комплекса H/ACA) с белками H/ACA – дискерином (DKC1), NHP2, NOP10 и GAR1 – во всех мякРНК и мкаРНК позвоночных [95,96]. Дискерин, NHP2 и NOP10 были идентифицированы методом иммунопреципитации теломеразы с последующей масс-спектрометрическим анализом выделенных компонентов [97]. Каждая шпилька теломеразной РНК H/ACA связывает белковый тетрамер, состоящий из дискерина, NHP2, NOP10 и GAR1 [80]. Дискерин, NHP2 и NOP10 обладают РНК-связывающей активностью. При этом GAR1 привлекается только за счет межбелковых взаимодействий [98]. Однако эти белки не способны к самостоятельному образованию комплекса с доменом H/ACA *in vivo* без вспомогательных белков [99,100].

Сборка теломеразного комплекса, опосредованная мотивом H/ACA, происходит следующим образом. Во-первых, фактор сборки SHQ1 связывается с дискерином в цитоплазме и стабилизирует его, предположительно предотвращая неспецифическое связывание с РНК и неспецифическое псевдоуридилирование [101,102]. Сигнал ядерной локализации дискерина направляет комплекс дискерин–SHQ1 в ядро. После импорта в ядро SHQ1 отделяется от дискерина шаперонным комплексом R2TP, состоящим из узнающих мишень белков PIN1D1, RPA3 и AAA+ АТФаз RUVBL1 и RUVBL2 (также известных как понтин и рептин) [100]. Сборке комплекса H/ACA может способствовать белок NUFIP, который связывает NHP2 и взаимодействует с PIN1D1 [103]. Нарушение активности любого из этих факторов сборки приводит к нарушению накопления зрелой теломеразной РНК *in vivo*

[100,104]. Связывание дискерина с теломеразной РНК происходит во время транскрипции, чтобы обеспечить правильный процессинг теломеразной РНК [105,106]. Шапероны размещают два тетрамера [80], каждый из которых состоит из дискерина, NHP2, NOP10 и фактора сборки NAF1, который позже заменяется структурно сходным GAR1 [105,107] посредством неизвестного механизма, предположительно с участием белка SMN [105]. Замена происходит до транспорта рибонуклеопротеина Н/АСА в тельца Кахаля или ядрышки, поскольку NAF1 обнаруживается только в нуклеоплазме, но не в тельцах Кахаля или ядрышках [99,105]. NAF1 может привлекаться к С-концевому домену РНК-полимеразы II, способствуя сборке мякРНК [108]. Механизм сборки тетрамеров и участия комплекса R2TP остается неясным.

Мутагенез 3'- и 5'-шпилек мякРНК Н/АСА, а также результаты криоэлектронной микроскопии структуры теломеразы человека показывают, что первый тетрамер из дискерина, NHP2, NOP10, NAF1 связывается с 3'-шпилькой во время сборки рибонуклеопротеинового комплекса Н/АСА. Это первоначальное связывание позволяет второму тетрамеру собраться на 5'-шпильке [80,98]. Белки дискерин, NHP2, NOP10 и NAF1 необходимы для стабильности теломеразной РНК и других РНК Н/АСА *in vivo* [109–112]. Несмотря на то, что GAR1 является стехиометрическим партнером для связывания мякРНК с мотивом Н/АСА, он не является необходимым для их стабильности *in vivo* [110]. По результатам иммунопреципитации GAR1 может быть менее стабильно связан с теломеразным комплексом по сравнению с дискерином, NHP2 и NOP10 [97]. Это согласуется с моделью замены NAF1 на GAR1 на более поздних стадиях сборки теломеразы.

4.3 Сборка активного теломеразного комплекса

Разница между мкаРНК и мякРНК заключается в наличии консервативной последовательности из четырех нуклеотидов в мкаРНК, САВ-бокса, необходимого для локализации в тельцах Кахаля [89]. Тельца Кахаля – это динамические безмембранные органеллы, находящиеся в ядре эукариотических клеток. Тельца Кахаля участвуют в созревании и процессинге рибонуклеопротеинов, включая малые ядерные РНП (мяРНП) и малые РНП, специфичные для этих образований (мкаРНП) [113]. Теломеразная РНК содержит последовательности Н/АСА и САВ-боксов и локализуется в тельцах Кахаля, как и мкаРНК, только после процессинга и присоединения белков Н/АСА, как было показано при помощи гибридизации *in situ* [94,114,115].

Совыделение комплексов, связанных с дискерином, из линий опухолевых клеток позволило обнаружить белок TCAB1 (также известный как WDR79 или WRAP53), который ассоциируется с теломеразой [116]. TCAB1 стабильно связывает мкаРНК, но не мякРНК. Этот белок локализован в тельцах Кахаля, но не в ядрышках. Нокаун TCAB1 приводит к локализации теломеразной РНК вне телец Кахаля, предположительно в ядрышках, и неэффективному удлинению теломер, не связанному с ферментативной активностью теломеразы *in vitro* [116–118]. Однако более поздние исследования показали, что нокаут TCAB1 также приводит к падению активности теломеразы *in vitro* в раковых и эмбриональных стволовых клетках без изменения содержания hTR [119,120]. Предполагается, что TCAB1 опосредует правильное сворачивание удаленных петель Р6b и Р6.1 теломеразной РНК, обеспечивая эффективное взаимодействие домена CR4/5 и hTERT и умеренно стимулируя теломеразную активность *in vitro* [120]. Криоэлектронная микроскопия позволила установить, что TCAB1 является стабильной субъединицей

холофермента теломеразы [121]. Шаперон TRiC необходим для сворачивания TCAB1 и правильной сборки теломеразы [122]. TCAB1 высвобождается из комплекса с hTR во время митоза, что совпадает с уходом TCAB1 из телец Кахаля. В то же время общее содержание hTR, белка TCAB1 и активность теломеразы *in vitro* оставались постоянными на протяжении всего клеточного цикла, что позволяет предположить, что TCAB1 может играть роль регулятора холофермента теломеразы, позволяя удлинять теломеры [123].

hTERT связывает домен CR4/5 и домен псевдоузла/матрицы hTR за счет своего домена TRBD. Кроме того, TEN-домен также участвует в формировании домена псевдоузла/матрицы для стабилизации дуплекса РНК–ДНК на 3'-конце матрицы [124]. Предполагается, что сборка комплекса hTERT–hTR происходит при участии шаперона Hsp90 [125,126], который вовлечен в регуляцию клеточного цикла, поддержание целостности хромосом и другие сигнальные пути [127]. Белок p23 образует комплекс с Hsp90. Подавление функционирования p23 приводит к снижению активности теломеразы *in vitro* [128,129]. Ингибирование Hsp90 гелдамицином снижает содержание активного теломеразного комплекса и вызывает деградацию hTERT протеасомой. Иммунопреципитация Hsp90 и p23 приводит к обогащению активной теломеразы, что указывает на их взаимодействие со зрелым теломеразным комплексом [130]. Обработка клеток гелдамицином также приводит к потере белка NHP2, что указывает на участие Hsp90 в его стабилизации [103]. Однако интерпретация эффекта Hsp90 затруднена, поскольку нарушение работы одного из ключевых шаперонов в клетке может вызывать косвенный эффект.

Другой белок, AAA-АТФаза NVL2, также может действовать как шаперон hTERT. NVL2 взаимодействует и локализуется вместе с hTERT в ядрышке.

Снижение содержания NVL2 понижает уровень hTERT и активность теломеразы *in vitro* [131]. Кроме того, было показано, что экспрессия доминантно-негативной формы фактора сборки мяРНП белка SMN нарушает локализацию hTERT *in vivo* и теломеразную активность *in vitro* [132]. SMN может играть роль в сборке каталитически активного теломеразного комплекса [132], поскольку SMN ассоциирует с GAR1 *in vivo* [133,134]. Комплекс SMN сконцентрирован в ядерных тельцах, где он может способствовать замене NAF1 на GAR1.

Интересно, что hTR и hTERT колокализуются только на теломерах на протяжении большей части клеточного цикла [123]. В отличие от hTR, hTERT имеет тенденцию локализоваться в частях ядра, отличных от телец Кахаля, особенно в ядрышках раковых клеток согласно ряду работ [114,135]. Белок PinX1 может способствовать ядерной локализации hTERT, но это наблюдалось только в контексте сверхэкспрессии hTERT [136]. Однако в недавней статье путем эндогенного мечения показано, что hTERT принципиально не локализуется в ядрышках [118].

В настоящее время существует несколько моделей сборки hTR и hTERT. Первая модель предполагает, что сборка происходит посредством взаимодействия телец Кахаля, несущих hTR, и ядрышек, несущих hTERT, так как в S-фазе клеточного цикла hTERT концентрируется из нуклеоплазмы в ядрышки [137,138] и, предполагается, что тельца Кахаля перемещаются на периферию ядрышек, неся с собой теломеразную РНК [138]. Вторая модель предполагает, что сборка происходит в ядрышках. Показано, что hTERT может локализоваться в ядрышках и связываться с теломеразным РНП в плотном фибриллярном компоненте ядрышка [139,140], сохраняя при этом взаимодействие с нуклеолином [140,141], до тех пор, пока зрелый комплекс не будет привлечен к тельцам Кахаля с помощью TCAB1 [140]. Однако

активная роль ядрышек в сборке теломеразы дискуссионна [142,118]. Третья модель предполагает, что сборка происходит в телах Кахаля. По данным микроскопии структурированной освещенности, hTR расположена на периферии телец Кахаля. Это говорит о том, что hTERT может захватывать теломеразную РНК на выходе из телец Кахаля [143]. В принципе полученные результаты не противоречат возможности того, что сборка может происходить просто в нуклеоплазме, без участия специальных ядерных компартментов.

Несмотря на многочисленные эксперименты, проведенные для определения локализации, точное расположение сборки комплекса hTERT–hTR в ядре остается неясным. Частично это можно объяснить ограничениями используемых методов. Например, замечено, что белковая метка на N-конце hTERT влияет на его функционирование в клетках [144]. Также нельзя исключить, что функционирование белка hTERT может быть изменено в условиях сверхэкспрессии, часто используемых в исследованиях.

Недавние достижения в криоэлектронной микроскопии показали, что димеры гистонов H2A и H2B также являются субъединицей теломеразы [121]. Интересно, что H2A–H2B связывается со стеблем Р6.1 в каталитической доле теломеразы, а не в доле H/ACA [121]. Стебель Р6.1 в домене CR4/5 высококонсервативен среди млекопитающих [87]. Гистоны также являются высококонсервативными белками [145]. На основании этого можно предположить, что димер H2A–H2B является частью теломеразного комплекса у других млекопитающих, возможно, способствуя правильному сворачиванию домена CR4/5. В настоящее время нет данных, на какой стадии сборки димер H2A–H2B присоединяется к теломеразному комплексу. Однако можно предположить, что это происходит после сборки комплекса hTERT–

hTR за счет сворачивания hTR. Дальнейшие исследования должны выявить роль этого димера в функционировании теломеразы.

Гиперметилирование 5'-кепа теломеразной РНК с помощью триметилгуанозинсинтазы 1, TGS1, также играет важную роль в транспортировке и рекрутировании теломеразы. Обнаружены две изоформы TGS1 с различной локализацией [146]. Полноразмерная изоформа может локализоваться в тельцах Кахаля и в цитоплазме, тогда как более короткая изоформа локализуется только в тельцах Кахаля и связывается с компонентами мРНК C/D и H/ACA [146]. Интересно, что обработка ингибитором TGS1, синефунгином, значительно снижала количество тельц Кахаля в раковых клетках и опухолевых органоидах [147]. После нокаута TGS1 количество тельц Кахаля также снижается, а мРНК имеют тенденцию неправильно локализоваться в ядрышках [148]. Между тем, флуоресцентная гибридизация hTR *in situ* (FISH) в сочетании с иммунофлуоресцентной визуализацией TRF2 выявили значительное снижение содержания теломеразной РНК на концах хромосом при нокауте TGS1 [147]. В условиях отсутствия TGS1 происходит накопление теломеразной РНК в цитоплазме, а также увеличивается общее количество hTR в клетке без изменения содержания непротранскрибированных форм теломеразной РНК [148]. Следовательно, опосредованное TGS1 гиперметилирование 5'-кепа hTR может, в принципе, ограничивать удлинение теломер. Недавняя работа указывает на то, что метилирование теломеразной РНК человека с помощью TGS1 2,2,7-триметилгуанозином необходимо для прямого зависящего от теломеразы поддержания теломер, хотя само метилирование 5'ТМГ необязательно для активности теломеразы *in vitro* [147].

4.4 Транспорт теломеразного РНК человека

Транспорт теломеразного комплекса является наиболее противоречивой частью его биогенеза. Основной вопрос заключается в том, как субъядерная компартиментализация влияет на созревание hTR и теломеразы. В настоящее время все работы сосредоточены на выяснении роли телец Кахаля и ядрышек в этом процессе.

Анализ локализации 3'-удлиненной формы теломеразной РНК методом FISH позволяет предположить, что по крайней мере часть процессинга 3'-конца hTR происходит в ядрышке [149]. В то же время взаимодействие hTR с TCAB1 приводит к концентрации теломеразного РНП в тельцах Кахаля [116,117,143]. Потеря TCAB1 приводит к накоплению hTR в ядрышках [118]. Примечательным результатом исследований взаимодействия между коилином, основным компонентом телец Кахаля, и РНК является то, что все мкРНК могут проходить через тельца Кахаля на пути в ядрышко, в то время как мкРНК остаются там [150].

Транспорт мкРНК в тельца Кахаля осуществляется фактором РНАХ. Предположительно, кепированная 5'ММГ теломеразная РНК, транспортируется с помощью РНАХ, взаимодействие с которым было показано [151]. Nopp140, внутренне неупорядоченный фосфопротеин телец Кахаля, совыделяется совместно с дискерином, как и TCAB1 [116]. Nopp140 необходим для привлечения и удержания всех мкРНП в тельцах Кахаля. Nopp140 играет важную роль в формировании телец Кахаля и локализации в них мкРНК и теломеразной РНК [152]. Nopp140 предположительно может функционировать как фактор транспорта между ядрышком и тельцами Кахаля [153].

Транспортировка hTR к теломерам и тельцам Кахаля также зависит от hTERT в раковых клетках. Снижение содержания hTERT приводит к делокализации hTR

как из телец Кахаля, так и от теломер, не влияя на ее количество в клетке [154]. В то же время сверхэкспрессия hTERT также приводит к уменьшению локализации hTR, меченой MS2, в тельцах Кахаля [143]. Анализ коэффициентов диффузии меченого hTERT на живых клетках выявил три отдельные популяции частиц теломеразы. Существовали две быстро диффундирующие популяции, которые могут представлять собой несвязанный hTERT и диффундирующие теломеразные РНП, и менее мобильную популяцию, которая может представлять собой теломеразные РНП, связанные с тельцами Кахаля или теломерами [155]. Интересно, что даже в клетках без hTR 25-30% частиц hTERT медленно диффундировали или были статичными [118]. Все эти результаты позволяют предположить, что могут существовать ядерные структуры, отличные от телец Кахаля, ядрышек или теломер, которые сохраняют hTERT для обеспечения оптимальной сборки теломеразы.

Следует отметить, что тельца Кахаля и ядрышки не являются полностью отдельными структурами, а имеют сложные взаимоотношения. Иногда они могут перекрываться, о чем свидетельствуют данные электронной микроскопии и совместная локализация телец Кахаля и ядрышковых факторов [156]. Тельцам Кахаля нужны ядрышки для поддержания целостности, но не наоборот. Это указывает на то, что тельца Кахаля могут выполнять вспомогательную функцию. В принципе, ядрышки могут выполнять по крайней мере часть функций телец Кахаля, в зависимости от условий.

В завершение подраздела на Рис. 4 представлена общая схема биогенеза теломеразного комплекса человека.

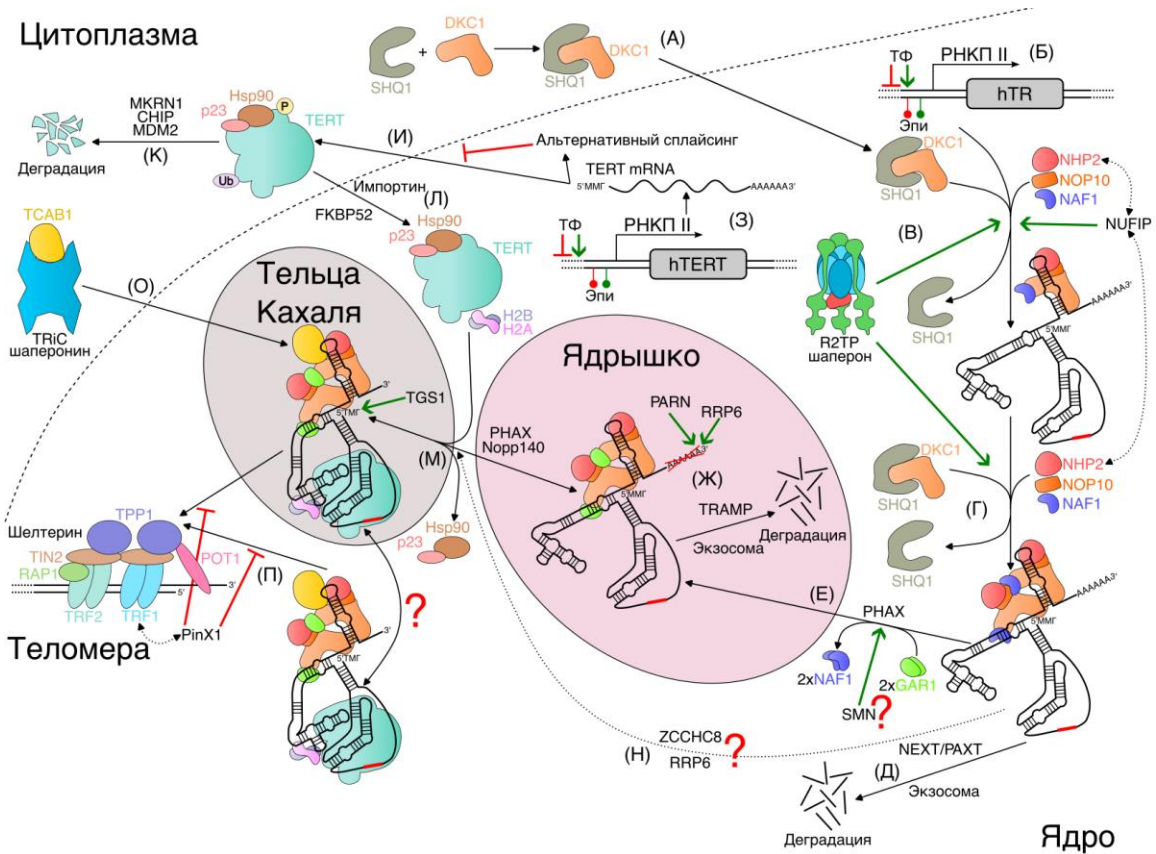


Рис. 4. Модель биогенеза теломеразного комплекса человека [19]. (А) После синтеза дискерин (*DKC1*) стабилизируется белком *SHQ1* в цитоплазме и транспортируется в ядро. (Б) Теломеразная РНК (*hTR*) экспрессируется РНК-полимеразой II (*РНКП II*) под контролем различных транскрипционных факторов и под влиянием эпигенетических модификаций промотора *hTR*, как 3'-полиаденилированный и содержащий монометилированный 5'-кеп (5'ММГ) предшественник. (В) При синтезе *hTR* первый тетрамер *Н/АСА* (*DKC1*, *NOP10*, *NHP2* и *NAF1*) прикрепляется к 3'-шпильке *Н/АСА* с помощью шаперона *R2TP* и фактора *NUFIP*, которые взаимодействуют с *NHP2*. В результате высвобождается *SHQ1*. (Г) Вторым тетрамер собирается схожим образом. (Д) Если предшественник *hTR* слишком длинный, то он разрушается за счет *NEXT*- или *РАХТ*-зависимого привлечения экзосомы [157,158]. (Е) Во время транспорта

предварительно собранного комплекса в ядрышко, осуществляемого с помощью PNAH, может происходить замена NAF1 на GAR1, возможно, с участием белка SMN. (Ж) PARN и RRP6 деаденилируют предшественников hTR в ядрышке. Комплекс TRAMP полиаденилирует предшественники hTR и способствует их деградации экзосомой [149,157,159]. (З) мРНК hTERT синтезируется РНКП II. Промотор hTERT связан со многими транскрипционными факторами, эпигенетически модифицирован и часто мутирует при раке. (И) Сплайсинг мРНК hTERT формирует различные изоформы, которые конкурируют с полноразмерной изоформой. Полноразмерная изоформа транслируется в белок hTERT, который стабилизируется в цитоплазме шапероном Hsp90-p23. (К) Уровни активного hTERT контролируются убиквитинированием через E3-убиквитинлигазы MKRN1, CHIP и MDM2, а также фосфорилированием. (Л) Импортинный комплекс транспортирует hTERT в ядро через ядерные поры. Ко-шаперон FKBP52 взаимодействует с комплексом hTERT-Hsp90 и способствует ядерному транспорту hTERT посредством динеин/динактин-зависимого механизма. (М) После процессинга hTR, предварительно собранный, комплекс H/ACA транспортируется в тельца Кахаля, вероятно, с помощью PNAH и Nopp140. hTERT, а затем димер H2A-H2B присоединяются к теломеразному РНП, вероятно, на периферии тельца Кахаля. 2,2,7-триметилгуанозиновый кеп (5'ТМГ) образуется TGS1 в тельцах Кахаля. (Н) hTR может процессироваться вне ядрышка с помощью другого механизма и доставляться в тельца Кахаля, как предположено в [160]. (О) После трансляции TCAB1 стабилизируется шаперонином TRiC и импортируется в ядро, где TCAB1 завершает сборку холофермента теломеразы. (П) Теломеры защищены белковым комплексом, известным как шелтерин. Двухцепочечная

теломерная область связана гомодимерами TRF1 и TRF2. TIN2 выполняет функцию моста, связывая TRF1 и TRF2. TIN2 также связан с TPP1. Белок POT1 связывается с одноцепочечной областью теломер и взаимодействует с TPP1. RAP1 связывается с TRF2. Теломеразный комплекс может доставляться к теломерам с помощью телец Кахаля или самостоятельно. Взаимодействие между TEL-патчем TPP1 и TEN-доменом hTERT позволяет привлекать теломеразу к теломерам. Белок PinX1 взаимодействует с TRF1 и hTERT и ингибирует взаимодействие теломеразы с теломерами. Теломеразный комплекс может перемещаться между ядром, тельцами Кахаля и нуклеоплазмой, но в нормальных условиях TCAB1 смещает баланс в сторону телец Кахаля.

4.5 Роль посттрансляционных модификаций в биогенезе теломеразы

Посттрансляционные модификации влияют на биогенез рибонуклеопротеинов H/ACA, включая теломеразный комплекс. Многочисленные исследования показали, что белки дискерин, GAR1, NHP2, NAF1 и белки шаперонного комплекса R2TP (RPA3, понтин и рептин) подвергаются модификациям с помощью небольших убиквитиноподобных модификаторов (SUMO) [161–165]. Ковалентная посттрансляционная модификация SUMO, SUMOилирование, участвует во множестве процессов в клетке [166]. Недавняя работа выявила несколько сайтов SUMOилирования в богатой лизином области сигнала ядерной/ядрышковой локализации на С-конце дискерина, наиболее важным из которых является K467. Замена K467R приводит к потере локализации дискерина в ядрышке и падению теломеразной активности *in vitro* [167]. Кроме того, GAR1 содержит гидрофобный мотив, который взаимодействует с SUMO и способствует эффективному связыванию дискерина с GAR1 [167]. Предполагается, что дискерин

растворяется в плотном фибриллярном компоненте ядрышка из-за мотива в GAR1, взаимодействующего с SUMO, который распознает эту модификацию дискерина [167]. В недавней работе показано, что одна треть молекул дискерина статически связана с ядрышком [118]. Можно предположить, что это может зависеть от SUMOилирования дискерина. Интересно, что функционирование рептина и понтина также регулируется SUMOилированием [168,169]. Роль SUMOилирования в функционировании факторов сборки и компонентов теломеразного комплекса еще предстоит оценить должным образом.

Помимо SUMOилирования, одноцепочечная селективная монофункциональная урацил-ДНК-гликозилаза 1 (SMUG1) участвует в ядрышковой локализации дискерина [170]. Нокаут *SMUG1* фибробластах эмбрионов мыши приводит к нарушению локализации дискерина [171].

Результаты количественной фосфопротеомики указывают на то, что белки H/ACA (дискерин, GAR1, NHP2, NOP10 и NAF1) меняют статус фосфорилирования в течение клеточного цикла [172], что также может влиять на биогенез теломеразы и ее функционирование.

5. Общие и особые черты биогенеза теломеразы у дрожжей и позвоночных

Биогенез теломеразы как у дрожжей, так и у позвоночных включает схожие стадии и молекулярных участников, но есть заметные различия. У позвоночных регуляция биогенеза теломеразы более сложна и точно настраивается с помощью различных сигнальных путей и модификаций хроматина [173]. Как у дрожжей, так и у позвоночных биогенез теломеразного комплекса включает транскрипцию с помощью РНК-полимеразы II и процессинг теломеразной РНК [157,174,175]. До

связывания теломеразной обратной транскриптазы теломеразные РНК дрожжей и позвоночных задействуют белки, которые остаются частью активного холофермента и необходимы для стабильности теломеразной РНК *in vivo*. Дрожжи используют для этой цели белки Sm или Lsm [41,45], позвоночные задействуют белки H/ACA [105,106]. Теломеразные РНК дрожжей и позвоночных сначала кепируются 5'ММГ на 5'-конце, который затем превращается в 5'ТМГ на более поздних стадиях биогенеза [21].

У человека изоформы hTERT существуют благодаря альтернативному сплайсингу, который увеличивает сложность регуляции [176]. Шапероны Hsp90 и p23 связываются с TERT человека и способствуют сборке теломеразы [126,129]. Показано, что дрожжевые ортологи Hsp90 и p23 способствуют активности теломеразы *in vitro* и *in vivo* за счет усиления связывания теломеразы с ДНК [126,177,178]. Их функциональную роль в сборке теломеразы еще предстоит оценить. Таким образом, дрожжевые ортологи Hsp90 и p23, вероятно, оказывают прямое влияние на удлинение теломер теломеразой, тогда как у позвоночных эти шапероны в основном специализируются на сборке теломеразы.

Интересно, что и дрожжи, и позвоночные контролируют сборку теломеразного комплекса посредством компарментализации, но по-разному. Дрожжи, скорее всего, полагаются на экспорт теломеразной РНК в цитоплазму и последующую сборку там [43]. В свою очередь, у позвоночных ядерные тельца, скорее всего, играют решающую роль в этом [138,139,143].

Активность теломеразного комплекса, по-видимому, у дрожжей регулируется более непосредственно, чем у позвоночных, посредством процесса сборки–разборки. У дрожжей Est1 разрушается в фазе G1 [60–62] и Est2

диссоциирует в фазах G2/M [36], ограничивая сборку теломеразы. В свою очередь, теломеразная активность *in vitro* у человека существенно не меняется на протяжении клеточного цикла. При этом TCAB1 покидает комплекс в М-фазе [123], что должно привести к падению активности теломеразы *in vitro* в некоторой степени [119,120]. В целом процесс разборки теломеразного комплекса у позвоночных не изучен.

Более того, механизмы привлечения теломеразы на теломеры также различаются, особенно у почкующихся дрожжей и позвоночных. У почкующихся дрожжей теломераза рекрутируется в теломеры посредством двух различных механизмов: пути Sir4–yKu80 и основного пути Cdc13–Est1 [179,180]. У позвоночных рекрутирование теломеразы в теломеры опосредовано множеством факторов, включая TPP1, POT1 и TIN2 [181,182]. Механизмы привлечения холоферментов к теломерам также демонстрируют некоторое функциональное сходство в филогенетических группах. Регуляторная активность Cdc13, Est1 и Est3 у дрожжей может соответствовать роли TIN2-связанного TPP1 у позвоночных.

Критические этапы биогенеза и привлечения теломеразы у дрожжей и позвоночных имеют некоторые функциональные сходства. В то же время состав теломеразного комплекса, особенности регуляции биогенеза и механизмы его привлечения к теломерам существенно различаются между двумя системами.

Следующий раздел обзора литературы посвящен функционированию посттрансляционной модификации, которая является одним из объектов исследования данной работы.

6. Поли(АДФ-рибозил)ирование и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы

Поли(АДФ-рибозил)ирование (или ПАРилирование) является посттрансляционной модификацией белков, заключающейся в ковалентном присоединении длинных разветвленных цепей поли(АДФ-рибозы) (Рис. 5).

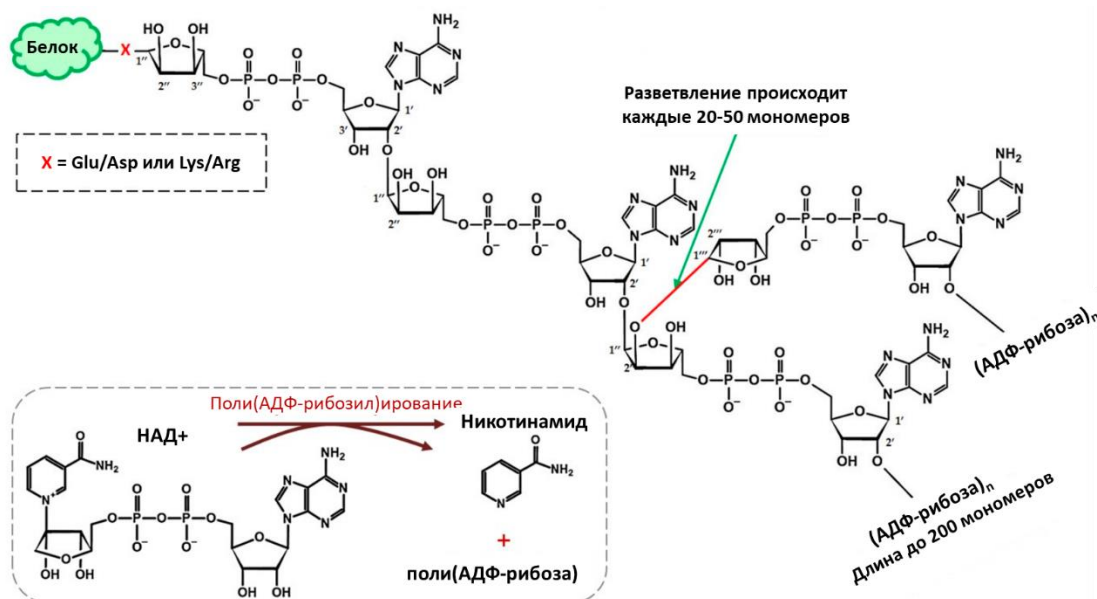


Рис. 5. Схема реакции поли(АДФ-рибозил)ирования [183]. Первый мономер АДФ-рибозы присоединяется к целевому белку чаще всего через остатки глутаминовой, аспарагиновой кислот, лизина или аргинина. Примерно каждые 20-50 мономеров АДФ-рибозы может происходить ветвление цепи путем присоединения следующей АДФ-рибозы через 2'-гидроксильную группу рибозы в полимерной цепи. Длина полимерной цепи может достигать 200 мономеров и более. Реакция поли(АДФ-рибозил)ирования заключается в расщеплении НАД⁺ на никотинамид и АДФ-рибозу, которая присоединяется к растущей полимерной цепи, как показано в отдельной панели снизу.

Белки семейства PARP (поли(АДФ-рибоза)полимеразы) катализируют реакцию присоединения, а за гидролиз цепей поли(АДФ-рибозы) отвечают белки семейства PARG (поли(АДФ-рибоза)гликогидролазы). Белки PARP представляют

собой суперсемейство белков, каждый из которых обладает высококонсервативным доменом (АДФ-рибозил)трансферазы, катализирующим расщепление никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) на никотинамид и АДФ-рибозу [184,185] (Рис. 5). Затем АДФ-рибоза переносится на определенные аминокислотные остатки акцепторного белка, включая глутамат, лизин, аргинин, серин и аспартат, а также, цистеин, треонин, гистидин, тирозин и фосфосерин через фосфатную группу, что было выяснено при помощи протеомного анализа [186,187]. На сегодняшний день механизм распознавания мишени белками PARP или сайт-специфичность ПАРилирования во многом неясны [188]. Реакция (АДФ-рибозил)ирования может приводить к присоединению мономера или полимера (линейного или разветвленного) в зависимости от конкретного фермента семейства PARP [188].

Известно, что полимеры АДФ-рибозы, присоединенные к белку PARP1, – центральной клеточной поли(АДФ-рибоза)полимеразе – в ходе реакций автомодификации могут достигать размера более 200 остатков и длины до 100 нм, а также разветвляться через каждые 20-50 остатков [188]. При этом цепи ПАР принимают сильно разветвленную «звездчатую» форму, как было показано с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии [189].

Конститутивные уровни поли-АДФ-рибозы обычно очень низки при нормальном состоянии клетки [190]. Однако в ответ на генотоксический стресс или стимуляцию митогенами активность PARP и уровень поли(АДФ-рибозы) могут повышаться на порядок и более [190].

6.1 Поли(АДФ-рибозил)ирование в регуляции активности белков и белковых комплексов

Широкомасштабные протеомные исследования показали, что множество белков подвергается ПАрилированию и/или способны связываться с поли(АДФ-рибозой) [187]. Данные белки участвуют во многих процессах в клетке: регуляция структуры хроматина, репарация ДНК, биосинтез белков, регуляция клеточного цикла и многие другие. Считается, что главной функцией ПАрилирования является регуляция активности белков, связывающих нуклеиновые кислоты [190].

Очевидно, что присоединение крупных полимеров из поли(АДФ-рибозы) к белкам может менять физические и биохимические свойства целевых белков из-за высокого отрицательного заряда и большой молекулярной массы поли(АДФ-рибозы). Первоначально предполагали, что высокий отрицательный заряд поли-АДФ-рибозы предотвращает любое взаимодействие белков, связанных с поли(АДФ-рибозой), с белками или с нуклеиновыми кислотами [191,192] в результате электростатического отталкивания между отрицательно заряженной поли(АДФ-рибозой) и отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом нуклеиновых кислот. Например, аутомодификация PARP1 приводит к диссоциации комплекса белка с ДНК [193]. Однако позже было замечено, что ПАрилирование по-разному влияет на акцепторный белок в зависимости от контекста. Во-первых, модифицированные белки могут действовать как платформа для привлечения других белков. Например, для эффективной репарации одноцепочечных разрывов ДНК необходим белок XRCC1, который привлекается аутомодифицированными PARP1 или PARP2, связанными в месте повреждения ДНК [194,195]. Во-вторых, ПАрилирование может изменять структуру белка-акцептора, влияя на его белок-белковые взаимодействия [196,197] или модулировать его каталитическую

активность. Кроме того, ПАРилирование может скрывать ДНК- или РНК-связывающие домены модифицированного белка [198].

Влияние ПАРилирования на функциональные и физико-химические свойства конкретных белков-акцепторов поли(АДФ-рибозы) в большинстве случаев неизвестно. Множество белков, модифицированных поли(АДФ-рибозой), представляют собой белки, связывающиеся с ядерной ДНК, включая белки PARP, гистоны, топоизомеразы, факторы транскрипции. Несколько исследований предоставили доказательства того, что ассоциация/присоединение крупных полимеров поли(АДФ-рибозы) к факторам транскрипции, включая ТАТА-связывающий белок, YY-1, p53, Sp1 и CREB, влияет на их ДНК-связывающую активность и тем самым ингибирует транскрипцию *in vitro* [199].

Целевые белки, которые нековалентно взаимодействуют с поли(АДФ-рибозой), обычно содержат ПАР-связывающие модули, такие как ПАР-связывающие консенсусные мотивы (PBM), PAR-связывающие мотивы цинковых пальцев (PBZ), макродоменные укладки, домены WWE и многие другие модули [198].

6.2 Функции PARP1

PARP1 – наиболее изученный представитель семейства 17 белков PARP у млекопитающих [190]. PARP1 является высококонсервативным многофункциональным белком, присутствующим в большинстве эукариот. Его структура включает в себя три ключевых домена: N-концевой ДНК-связывающий домен, который состоит из мотивов цинковых пальцев; домена BRCT, содержащего центральный домен аутомодификации; и высококонсервативный С-концевой каталитический домен [188].

Полагают, что PARP1 ответственен за 90% всего ПАРилирования в клетке. Однако часть его функций могут выполнять другие белки семейства PARP [190]. Ключевой и наиболее изученной ролью PARP1 является его участие в репарации ДНК и регуляция структуры хроматина. Однако исследования последних лет показали участие PARP1 в транскрипции, процессинге РНК и биогенезе рибосом.

PARP1 отвечает за основную часть ПАРилирования при ответе на повреждение ДНК. PARP1 активируется различными одонитевыми повреждениями ДНК, двухцепочечными разрывами ДНК, а также при остановке репликативной вилки [200]. PARP1 играет важную роль в механизмах эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов, гомологической рекомбинации и негомологического соединения концов [200]. В целом, во всех названных механизмах PARP1 связывается в месте повреждения ДНК и быстро активируется, катализирует автоПАРилирование и модификацию близлежащих целевых белков. К данным белкам относятся белки репарации, гистоны и другие связанные с хроматином белки. В конечном счете именно уровень активации PARP1 определяет будет ли он способствовать репарации ДНК или активации механизма клеточной гибели [200].

При отсутствии стресса большая часть PARP1 и ядерной поли(АДФ-рибозы) расположена в ядрышке [201]. Нокдаун или ингибирование PARP1 приводит к разборке ядрышка, накоплению промежуточных продуктов процессинга рРНК и снижению сборки полисом в цитоплазме [201]. Это указывает на важную роль PARP1 в биогенезе рРНК.

Другой известной функцией PARP1 при тепловом шоке является ПАРилирование поли(А)-полимеразы [202]. Эта модификация приводит к снижению полиаденилирования и, соответственно, биосинтеза зрелой мРНК за счет

диссоциации комплекса поли(А)полимеразы с мРНК [202]. Неизвестно, ПАРилируется ли поли(А)полимераза при отсутствии стресса.

Интересно, что повышение активности PARP1 при тепловом шоке также влияет на сплайсинг путем регуляции взаимодействия гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов с РНК [203], так как они способны связывать поли(АДФ-рибозу) [204]. Кроме того, поли(АДФ-рибоза) связывается с фактором сплайсинга ASF/SF2 и регулирует его фосфорилирование и, соответственно, сплайсинг. Есть свидетельства, что PARP1 может регулировать транспорт белков через тельца Кахаля, а также способствовать их образованию [205].

7. Заключение к обзору литературы

Биогенез теломеразного комплекса представляет собой сложный многостадийный процесс, задействующий большое количество молекулярных участников. При этом как эффективность биогенеза, так и активность теломеразы определяется текущими потребностями клетки, ее внутренним состоянием и внешней средой.

Изучение механизмов биогенеза теломеразы среди различных организмов позволяет выявить ключевые аспекты, регулирующие теломеразную активность. Данные аспекты могут контролироваться эволюционно отдаленными молекулярными участниками, но при этом сами аспекты обладают функциональной консервативностью.

Понимание консервативных молекулярных механизмов регуляции теломеразной активности позволит создать эффективные подходы к управлению процессами регенерации тканей, предотвращения старения и для борьбы со многими онкологическими заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Реагенты и материалы

PVDF мембрана Amersham Hybond P, набор для проявления вестерн-блоттинга Amersham ECL (GE, США);

D-глюкоза, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), легкоплавкая агароза для электрофореза, бакто-триптон, дрожжевой экстракт, бактоагар, Nonidet NP-40, Тритон X-100, ацетат аммония, TEMED, Tween 20, CHAPS (Хеликон, Россия);

Маркер длины ДНК 1 kb Plus DNA Ladder, PureLink РНКза А, dNTP, гликоген, RiboLock, набор для синтеза первой цепи кДНК Maxima для RT-qPCR, буфер обратной транскриптазы 5x Maxima RT; полинуклеотидкиназа Т4, Taq-полимераза, ДНКза I, эндонуклеазы рестрикции и фирменные буферные растворы для них, маркеры длины ДНК, среда DMEM/F-12, трипсин (Thermo Fisher Scientific, США);

NaCl, NaOH, ЭДТА, MgCl₂, H₃BO₃, персульфат аммония, бромфеноловый синий, ксилолцианол, бромид этидия, глицерин, (NH₄)₂SO₄, цитрат натрия (Merk, Германия и Хеликон, Россия);

Набор для лизиса Precellys VK05 (Bertin Instruments, Франция)

Полимераза Q5® и ее запатентованный буферный раствор (New England Biolabs, Великобритания);

Sybr Green I 10000x (Invitrogen, США)

YNB (дрожжевая азотистая основа без аминокислот), мочевины (Difco, США);

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ синтезированы в Институте биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова (Россия);

Набор реагентов для выделения ДНК из реакционной смеси и из агарозного геля (Евроген, Россия и Qiagen, Германия);

Уксусная кислота, соляная кислота, изоамиловый спирт, хлороформ, фенол производства (Химмед, Россия);

Анти-НА-агароза (пришитое моноклональное мышинное антитело против НА-эпитопа, клон НА-7), моноклональные мышинные антитела на FLAG-метку клон М2, аденин, моноклональные мышинные антитела против НА-эпитопа конъюгированные с пероксидазой хрена (клон 3F10), урацил, лейцин, триптофан, гистидин, треонин, аргинин, изолейцин, лизин, метионин, фенилаланин, тирозин, валин, стеклянные шарики 425-600 микрон, бычий сывороточный альбумин, HEPES, ДТТ, ДНК тимуса теленка, спермидин, формамид, протеиназа К, PMSF, поливинилпирролидон, ацетат лития, нокодазол (Sigma-Aldrich, США);

Антитела на TRF1 (ab10579), TRF2 (ab13579), PARP1 (ab137653), TERT (ab32020), DKC1 (ab64667), β -актин (ab8229), GAPDH (ab181602), α -тубулин (ab18251) (Abcam, США), GAR1 (11711-1-AP) (Proteintech, США), PAR (4336-BPC, Trevigen, США)

Глицин, Tris, PBS в виде таблеток (Amresco, США)

Этанол (Ферейн, Россия);

Фиколл 400 (Pharmacia, Швеция);

Полиэтиленгликоль 4000, Твин 20 (Fluka, Германия);

Додецилсульфат натрия (SDS), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, Кумасси R-250 (Serva, Германия);

Культуральный пластик для адгезивных культур (Eppendorf, Германия)

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы Евроген и Люмипроб (Россия);

2. Буферные растворы и культуральные среды

Таблица 1. Растворы, использованные в работе.

Применение	Название	Состав
Культуральные среды	Среда YPD (твердая среда YPD)	2% бакто-триптон, 1% дрожжевой экстракт, 2% глюкоза (+2% бакто-агар для твердой среды)
	Среда SD	2% глюкоза, 0,17% YNB, 0,5% (NH ₄) ₂ SO ₄
	Среда SC-Leu (твердая среда SC-Leu)	0,67% YNB, 2% глюкоза, 0,01% аденин, 0,02% урацил, 0,01% триптофан, 0,005% гистидин, 0,02% треонин, 0,002% аргинин, 0,003% изолейцин, 0,003% лизин, 0,002% метионин, 0,005% фенилаланин, 0,003% тирозин, 0,015% валин (+2% бакто-агар для твердых сред)
	Среда DMEM/F-12	Смесь 1:1 сред DMEM и Ham's F-12

Буферы для иммунопреципитации теломеразы дрожжей	HLBISO+	20 мМ HEPES (pH 7,5), 2 мМ MgCl ₂ , 10% глицерин, 0,1% Nonidet P-40, 150 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ
	HLBISO-	20 мМ HEPES (pH 7,5), 2 мМ MgCl ₂ , 10% глицерин, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ
Буферы для электрофореза	TBE	0,1 М Tris (pH 8.3), 0,1 М H ₃ BO ₃ , 2 мМ ЭДТА
	TGS	25 мМ Tris (pH 8,3), 192 мМ глицин, 0,1% SDS
	Разделяющий гель для электрофореза белков	375 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,05% TEMED, 6-15% акриламид, 0,5% N,N'-метиленбисакриламид
	Концентрирующий гель для электрофореза белков	125 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,05% TEMED, 5% акриламид, 0,17% N,N'-метиленбисакриламид
	10% денатурирующий ПААГ	9.5% акриламид, 0.5% N,N'-метиленбисакриламид, 7М мочевины, 0.1% персульфат

		аммония, 0,05% TEMED в буфере ТВЕ
	Агарозный гель	1–2% агароза в буфере ТВЕ, 0,056 мкг/мл этидия бромида
	буфер NU (для нанесения белков в ПААГ)	8 М мочевины, 5% SDS, 0,2 М Tris- HCl (pH 6,8), 1 мМ ЭДТА, 1,5% ДТТ, 0,2% бромфеноловый синий
	6xLD	0,03% ксилолцианол, 0,03 % бромфеноловый синий, 10 мМ Tris-HCl, 60 мМ ЭДТА (pH 7,6), 60% глицерин
Буферы для вестерн- блоттинга	TGSE	25 мМ Tris (pH 8,3), 192 мМ глицин, 0,1% SDS, 20% этанол
	TBST	20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20
Буферы для анализа теломеразной активности <i>in vitro</i>	STOP-буфер	20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 20 мМ ЭДТА, 0,2% SDS
	10xTAV	50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ спермидин, 10 мМ ДТТ
	FA	80% деионизированный формаид, 0.1% (w/v) бромфеноловый синий, 0.1% (w/v) ксилолцианол в буфере ТВЕ

	буфер для лизиса TRAP	10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ MgCl ₂ , 0,1 мМ PMSF, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ ЭГТА, 5% глицерина и 0,5% CHAPS
	Буфер 1x TRAP	20 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 мМ MgCl ₂ , 63 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 0,1 мг/мл БСА и 0,005% Tween 20
Буферы для Саузерн-блоттинга	2xSSC	0,3 М NaCl, 0,03 М цитрат натрия (pH 7,0)
	100x раствор Денхардта	2% БСА, 2% фиколл 400, 2% поливинилпирролидон
	гибридизационный буфер	6xSSC, 0,5% SDS, 5x раствор Денхарда, 100 мкг/мл ДНК из спермы лосося
Буфер для иммунопреципитации теломеразы человека	IP-буфер	50 мМ HEPES–KOH pH 7.5-8.0, 150 мМ KCl, 2 мМ MgCl ₂ , 0.1% Nonidet NP-40, 10% глицерин, 1мМ EGTA, 0.4 мМ PMSF, 0.3 мМ ДТТ, 1/500 от общего объема Ribolock RI
	YLB	10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 2% Triton-X, 1% SDS

	TE	10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА
	LTD	100 мМ ацетат лития, 0,5 мг/мл геномная ДНК из тимуса теленка в буфере TE (pH 8,0)

3. Олигонуклеотиды

Таблица 2. ДНК-олигонуклеотиды, использованные в исследовании.

Название	Нуклеотидная последовательность
C4	5'-CGCCACCCCGCCACCCCGCCACCCCGCCACCC-3'
HD5	5'-AAAAAGGGTGGCG-3'
HD6	5'-AAAAAAGGGTGGC-3'
e3f	5'-GTGAAGGCAACGAACGATGG-3'
e3r	5'-CGGCTAAAGGAGATGCAGAC-3'
qT2f	5'-ACTCGATTTGTCCCGAACCAAC-3'
HU1f	5'-GGAGATCACAGGAGATCATG-3'
HU1r	5'-ACTCCTCCGAAGGGAAGAG-3'
qRf	5'-ATGCTGTCGGTCCCACTAAC-3'
qRr	5'-CCACCACAGCCGTA CTTCTC-3'
qT1f	5'-CAAAGGTCTCGGGTGTCTCC-3'
qT1r	5'-CATCCGACAGGCCTATGACA-3'
5E1HAf	5'-AAAAGTCGACTCAATTGTAAGCGATCCC-3'
5E1HAr	5'-AAACCCGGGTTTTCCATATTGGTGATACGC-3'
3E2HAr	5'-AAATCGATATGTCCATCGAACGCAAGAACTG-3'

NE1f	5'-ATGACGAATTCCGAATTCAATAACCC-3'
NE1r	5'-TTAGGGTTTTCCATATTGGTGATACG-3'
5E2HAr	5'-AAACCCGGGAAAGTTTTGAGAAGCGAACGGATAAAG-3'
3E1HAr	5'-AAATCGATGACTACGCTATCCGACATAGATCC-3'
hE3Haf	5'-TCCTTAACGGTGGTTCCGAG-3'
hE3HAr	5'-GACGTCAAGATCGAGGCAAC-3'
18S fw	5'-CTACCACATCCAAGGAAGGCA-3'
18S rev	5'-TTTTTCGTCACTACCTCCCCG-3'
28S fw	5'-GGGTGGTAAACTCCATCTAAGG-3'
28S rev	5'-GCCCTCTTGA ACTCTCTCTTC-3'
5.8S fw	5'-GGTGGATCACTCGGCTCGT-3'
5.8S rev	5'-GCAAGTGCGTTCGAAGTGTC-3'
GAPDH fw	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'
GAPDH rev	5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'
hTR F1	5'-GTGGTGGCCATTTTTTGTCTAAC-3'
hTR R1	5'-TGCTCTAGAATGAACGGTGGAA-3'
U2 fw	5'-CGCTTCTCGGCCTTTTGGC -3'
U2 rev	5'-GTGCACCGTTCCTGGAGGT -3'
U87 fw	5'-TGAATGTCACGGTCCCTTTGT-3'
U87 rev	5'-GCTGCTCCATGATCCCATAC-3'
ACX	5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3'
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'

4. Штаммы, плазмиды и клеточные линии, использованные в работе.

*Таблица 3. Штаммы *H. polymorpha*, использованные в работе*

Штамм	Описание штамма
<i>DL1</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2</i>
<i>Est1-HA</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 EST1-3HA::HpURA3</i>
<i>TERT-HA</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 TERT-3HA::HpURA3</i>
<i>Est3-HA</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 EST3-3HA::HpURA3</i>
<i>Est1-HA Δtert</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 EST1-3HA::HpURA3 tert::HpLEU2</i>
<i>Est1-HA Δest3</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 EST1-3HA::HpURA3 est3::HpLEU2</i>
<i>TERT-HA Δest1</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 TERT-3HA::HpURA3 est1::HpLEU2</i>
<i>TERT-HA Δest3</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 TERT-3HA::HpURA3 est3::HpLEU2</i>
<i>Est3-HA Δest1</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 EST3-3HA::HpURA3 est1::HpLEU2</i>
<i>Est3-HA Δtert</i>	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 EST3-3HA::HpURA3 tert::HpLEU2</i>

5. ПЦР

Для ПЦР готовили следующую смесь:

5x буфер для полимеразы Q5	10 мкл
Смесь dNTP (по 25 мМ каждый)	0,4 мкл
Олигонуклеотид 1	30 пмоль
Олигонуклеотид 2	30 пмоль
Полимераза Q5	0,5 мкл (1 ед.)

Геномная ДНК / плаزمида 300 нг / 1 нг

H₂O до 50 мкл

ПЦР проводили на приборе Bio-Rad T100™ Thermal Cycler. Параметры ПЦР: предварительный прогрев 98°C, 30 с; 30 циклов: 98°C 10 с, 68°C 20 с, 72°C 2,5 мин; в конце программы 72°C 5 мин.

6. Разделение ДНК в агарозном геле

Продукты ПЦР разделяли в 1-2% агарозном геле в зависимости от длины ДНК. Для приготовления 1% агарозного геля к 80 мл буфера TBE добавляли 0,8 г агарозы. Раствор нагревали в микроволновой печи до полного растворения агарозы. После охлаждения полученного раствора до ~50°C добавляли 5,6 мкл водного раствора бромистого этидия 10 мг/мл, перемешивали и выливали в камеру для заливки. Образцы смешивали с буфером 6xLD в соотношении 5:1, после затвердевания геля наносили в лунки и проводили электрофорез при напряжении 150 В. Для оценки длины ДНК использовали маркер 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Гель фотографировали с использованием прибора ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) при облучении УФ-лампой.

7. Выделение фрагментов ДНК из реакционной смеси

Выделение фрагментов ДНК из реакционной смеси проводили с использованием набора реагентов Cleanup Mini («Евроген») согласно протоколу производителя. К реакционной смеси добавляли 5 объемов связывающего буфера (Евроген) и перемешивали. Затем смесь пропускали через колонку для выделения ДНК (Евроген). Колонку промывали 750 мкл Wash Solution (Евроген) и элюировали ДНК 15 мкл Elution Buffer (Евроген). Концентрацию ДНК определяли по поглощению на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific).

8. Выделение геномной ДНК *H. polymorpha*

Одиночные колонии после трансформации выращивали в 2 мл жидкой среды СД при интенсивном перемешивании ~200 об/мин. Клетки из 1 мл жидкой культуры осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 4 мин, а среду сливали. Далее добавляли 200 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, 0,3 г стеклянных шариков и 200 мкл буфера YLB. Энергично перемешивали в течение 1 мин на вортексе, а затем добавляли 200 мкл раствора TE. Смесь центрифугировали при 16000 g в течение 5 мин, отбирали 300 мкл водной фазы, добавляли к ней 1 мл 96%-ного этанола и перемешивали на вортексе. Центрифугировали при 16000 g 5 мин, отбирали супернатант, растворяли осадок в 400 мкл раствора TE, добавляли 1 мкл РНКазы А и инкубировали при 37°C 10 мин. Затем к смеси добавляли 10 мкл 4 М ацетата аммония и 1 мл 96%-ного этанола и смесь перемешивали. Центрифугировали при 16000 g 5 мин, отбирали супернатант, осадок сушили на воздухе при 45°C, растворяли в 25 мкл буфера TE при перемешивании.

9. Трансформация штаммов *H. polymorpha*

В 4 мл среды YPD инокулировали колонию целевого штамма *H. polymorpha* и инкубировали при интенсивном перемешивании ~200 об/мин в течение 14–16 ч при 37°C. Затем культуру клеток разводили свежей средой до OD600 = 0,1 и инкубировали при перемешивании еще 2–3 ч (~200 об/мин) при 37°C до OD600 ≈ 0,3. Затем 300 мкл клеточной суспензии в среде осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 3 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 25 мкл раствора LTD, добавляли около 0,5 мкг ДНК-кассеты (продукт ПЦР для трансформации) и 3 капли стерильного 70% полиэтиленгликоля 4000 (~25-30 мкл). Клеточную суспензию

хорошо перемешивали на вортексе. Полученную суспензию инкубировали при перемешивании (~200 об/мин) при 30°C в течение 30 мин, затем инкубировали при 45°C 18 мин. После этого клетки охлаждали не менее 5 мин при –80°C, добавляли 1 мл YPD и инкубировали при перемешивании со скоростью 200 об/мин в течение 2 ч при 30°C. Клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 5000 g и температуре 4°C, ресуспендировали в 50–100 мкл оставшейся среды и высевали на чашки Петри с селективной средой SC-Leu. Затем их выращивали в течение 3 дней при 30°C.

10. Иммунопреципитация белков за HA-эпитоп из *H. polymorpha*

К отобранным клонам целевых штаммов добавляли 2 мл YPD и выращивали в течение ~16 ч при 37°C. Культуры клеток разводили в 400 мл богатой среды YPD до OD600 = 0,1 и выращивали штаммы до OD600 = 1 при 37°C при интенсивном перемешивании ~200 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием при 3200 g в течение 10 мин, среду сливали. Клетки ресуспендировали в 1 мл буфера HLBISO+. Полученные суспензии делили пополам (~950 мкл) и переносили в пробирки со стеклянными шариками (набор VK05, Bertin Instruments). Клетки разрушали на гомогенизаторе Precellys Evolution (Bertin Instruments) в течение 20 с при 7400 об/мин, затем охлаждали на льду в течение 1 мин. Эту операцию проводили десять раз.

Полученные экстракты очищали центрифугированием при 16000 g в течение 20 мин и собирали надосадочную жидкость. Белки со аффинным эпитопом выделяли из очищенного экстракта методом иммунопреципитации на анти-HA-агарозе. 40 мкл суспензии анти-HA-агарозы промывали 1 мл буфера HLBISO+ и добавляли к ней 1 мл очищенного экстракта. Связывание осуществляли в течение 1 ч при 4°C и

перемешивании на ротаторе. После связывания экстракт удаляли и аффинную смолу трижды промывали 1 мл буфера HLBISO+ и буфером HLBISO– при оценке теломеразной активности *in vitro*.

11. Культивирование клеток человека

Линии клеток человека выращивали в инкубаторе при 37°C и атмосфере 5% CO₂. Клетки субкультивировали каждые 2-3 дня. Все манипуляции проводили в ламинарном боксе в стерильных условиях. Все растворы предварительно нагревали до 37°C.

Среду из флакона T25 с клетками отбирали, промывали 5 мл буфера PBS, отбирали PBS и добавляли 1 мл раствора трипсина с ЭДТА для открепления клеток со дна емкости. Флакон инкубировали при 37°C в течение 10 мин, затем встряхивали и добавляли 4 мл среды DMEM/F12, после чего клетки ресуспендировали пипеткой. В зависимости от целевого разведения необходимый объем клеточной суспензии переносили во флакон со свежей средой. При работе с другими флаконами объемы среды и буфера увеличивали или уменьшали пропорционально изменению рабочей поверхности используемого флакона. При необходимости подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева.

12. Иммунопреципитация за 3xFLAG-метку

35 миллионов клеток HEK293T подвергали электропорации с плазмидой, экспрессирующей белок, меченный 3xFLAG, и инкубировали в течение 2 дней. Электропорацию проводили по рекомендуемым условиям для HEK293T из набора для электропорации в носиках на 100 мкл (набор Neon 100 µL на приборе Neon Transfection System, Thermo Fisher Scientific, США). Затем клетки открепляли трипсином, инактивировали трипсин добавлением среды и собирали при 800 об/мин,

5 мин, 4°C. После сбора клетки промывали ледяным PBS, снова центрифугировали и PBS удаляли. Затем клетки лизировали 1 мл ледяного IP-буфера в течение 30 мин при 4°C на ротаторе и центрифугировали при 16000g, 15 мин, 4°C. В это время агарозу M2 Anti-FLAG из расчета 45 мкл смолы на образец промывали 2 раза IP-буфером путем центрифугирования при 2500g, 3 мин, 4°C и ресуспендирования в нем же. Супернатант отбирали от клеточного дебриса, в качестве исходного экстракта брали 50 мкл, а к остальное переносили к смоле, промытую IP-буфером. Затем образцы инкубировали в течение 16 ч при 4°C при перемешивании на ротаторе. На следующий день смолу осаждали при 2500g, 3 мин, 4°C, проскок отбирали и 4 раза промывали по 250 мкл ледяного IP-буфера, каждый раз центрифугируя при 2500g, 3 мин, 4°C.

13. Электрофорез белков

Собирали камеру для заливки Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell и заливали разделяющий ПААГ гель от 6 до 15% (в зависимости от массы целевых белков), покрытый ~1,5 мл 96% этилового спирта. После полимеризации разделяющего геля сливали верхний слой спирта и заливали концентрирующий гель, в который вставляли гребенку для нанесения образцов. После полимеризации концентрирующего геля наносили образцы, предварительно прогретые в NU-буфере с добавлением ДТТ при 95°C в течение 5 мин. Электрофорез проводили в буфере TGS при 80 В до достижения бромфенолового синего границы концентрирующего и разделяющего гелей, затем при 180 В до достижения красителем конца геля. Гель вынимали из камеры и отрезали участки геля, не содержащие образцов.

14. Вестерн-блоттинг

Следующая конструкция была собрана в ячейке Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Фильтровальную бумагу и мембрану разрезали по размеру геля. Фильтровальную бумагу для блоттинга Extra Thick (Bio-Rad), пропитывали буфером для переноса TGSE в течение 10 минут и клали в ячейку. На бумагу помещали мембрану из PVDF (Amersham), предварительно промытую в этаноле и дистиллированной воде (по ~2 мин) и в буфере TGSE в течение 10 мин. Гель после электрофореза пропитывали буфером TGSE в течение 30 минут и клали поверх мембрану из PVDF. Мембрану накрывали той же фильтровальной бумагой, также смоченной буферным раствором TGSE. При сборке слои разглаживали валиком для удаления пузырьков воздуха между гелем, мембраной и бумагой. Перенос белков из геля на мембрану осуществляли в течение 45 мин при напряжении 15 В. После этого конструкцию разбирали, мембрану помещали в 5%-ный раствор БСА в буфере TBST и инкубировали в течение 16–20 ч при 4°C при небольшом перемешивании ~50 об/мин.

Для визуализации белков, мембрану инкубировали в течение 1 ч с первичными антителами в разведении 1:2000 в 1% растворе БСА в буфере TBST. Затем мембрану промывали TBST 3 раза по ~20 мл по 10 мин. После мембрану инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами в разведении 1:10000 в 1% растворе БСА в буфере TBST. Затем мембрану промывали TBST 5 раз по ~20 мл по 10 мин. В случае конъюгированных антител после связывания и пяти промывок буфером TBST сразу приступали к проявлению. Окрашивание проводили с использованием набора ECL Western blotting Detection Kit (Amersham) согласно протоколу. Готовили смесь растворов «А» и «Б» в соотношении 1:1, наносили на мембрану так, чтобы раствор полностью покрывал мембрану, и инкубировали при

комнатной температуре в течение 2 минут. Затем раствор декантировали и хемилюминесцентное излучение детектировали с помощью прибора ChemiDoc XRS+ (Bio Rad). Интенсивность сигналов определяли с помощью программы Image Lab (Bio Rad).

15. Выделение РНК

К аффинной смоле после связывания белка или к 10 мкл клеточного экстракта добавляли 2 мкл протеиназы К (20 мг/мл), 1 мкл 10% SDS и HLBISO+ до 100 мкл и инкубировали 30 мин при 37°C с перемешиванием при 1000 об/мин. Далее добавляли 100 мкл HLBISO+ и 200 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, интенсивно перемешивали на вортексе в течение 20 с и центрифугировали 4 мин при 20000 g. Брали 100 мкл водной фазы и 100 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, интенсивно перемешивали на вортексе в течение 20 с и центрифугировали 4 мин при 20000 g. Отбирали 50 мкл водной фазы, добавляли 150 мкл 96%-ного этанола, 5 мкл 3 М NaCl и 1,5 мкл гликогена (20 мг/мкл), перемешивали на вортексе и инкубировали при –20°C в течение 16–20 ч. Нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием при 16000 g и 4°C в течение 10 мин. Осадок промывали 200 мкл 75% этанола. Затем сушили в течение 15–25 мин под вакуумом до удаления остатков спирта. Осадок растворяли в 20 мкл воды при перемешивании в течение 2 мин.

16. Количественный анализ РНК с помощью RT-qPCR

Удаляли ДНК в следующей смеси:

РНК	1–6 мкл
10x буфер для ДНКазы I	2 мкл
ДНКазы I (1 ед/мкл)	2 мкл

RiboLock (40 ед/мкл) 0.1 мкл

H₂O до 20 мкл

Смесь инкубировали 30 мин при 37°C, добавляли 2 мкл 50 мМ ЭДТА и инкубировали 10 мин при 65°C.

После этого кДНК получали из образцов РНК в следующей смеси:

РНК после ДНКазы I 5 мкл

Maxima 5x Reverse Transcriptase Buffer 2 мкл

dNTP, 25 мМ каждый 0.4 мкл

Олигонуклеотид для обратной транскрипции 0.1 мкл

Maxima Enzyme Mix 1 мкл

H₂O до 10 мкл

Кроме того, в той же смеси был изготовлен отрицательный контроль, но без обратной транскриптазы. Смеси инкубировали 30 мин при 50°C и 5 мин при 85°C.

Аmplификацию полученной кДНК проводили в составе следующей смеси:

10x буфер Taq-полимеразы 2,5 мкл

MgCl₂, 50 мМ 2,5 мкл

dNTP, 25 мМ each 0,2 мкл

Олигонуклеотид 1 15 пмоль

Олигонуклеотид 2 15 пмоль

кДНК 3 мкл

SYBR Green I 10000x 1x

Taq-полимераза (5 ед/мкл) 0,3 мкл

H₂O up to 25 мкл

ПЦР в реальном времени проводили на системе CFX96 Touch (Bio-Rad). Параметры ПЦР: предварительный нагрев 95°C, 5 мин; 40 циклов: 95°C 30 с, 61°C 30 с, 72°C 30 с. Уровень экспрессии генов рассчитывали по $\Delta\Delta C_t$ методу при нормировке на контрольную мРНК. Относительное количество РНК в образцах и выход РНК после иммунопреципитации рассчитывали по ΔC_t методу с учетом всех разбавлений в процессе приготовления образцов для ПЦР.

Олигонуклеотиды для ПЦР в реальном времени проверяли на специфичность путем разделения ПЦР-продуктов в агарозном геле и на эффективность амплификации при использовании серии разведений кДНК. Эффективность для пар олигонуклеотидов, использованных в работе, была в диапазоне 95-105%.

17. Саузерн-блоттинг для оценки длины теломер у штаммов дрожжей

Штаммы *H. polymorpha* выращивали в течение 2 суток при 37°C. После этого отбирали по колонии каждого штамма, штаммы дрожжей рассеивали на отдельные колонии и выращивали в тех же условиях (первый пересев). Далее эти операции повторяли до десятого пассажа (~200 поколений дрожжей).

17.1 Получение и разделение рестрикционных фрагментов

Геномную ДНК штаммов *H. polymorpha* обрабатывали эндонуклеазой рестрикции PstI в составе следующей смеси:

10x буфер O	1,25 мкл
Геномная ДНК	10,5 мкл
PstI	0,75 мкл

Смесь инкубировали ~16 ч при 37°C, затем 20 мин при 65°C. Добавляли 2,5 мкл буфера для нанесения 6xLD. Образцы наносили в 1% агарозный гель и проводили электрофорез при токе 50 мА в течение ~8 часов.

17.2 Перенос ДНК на нейлоновую мембрану

Гель инкубировали в течение 15 мин в 0,25 М HCl, а затем инкубировали в 0,4 М NaOH в течение 30 мин при умеренном перемешивании. Затем ДНК перенесли на нейлоновую мембрану Whatman Nytran SuPerCharge (Sigma-Aldrich). Для этого была собрана следующая конструкция: в ванну заливали 0,4 М NaOH и помещали подложку. На подложку помещали 2 кусочка фильтровальной бумаги, смоченной раствором 0,4 М NaOH, так, чтобы концы бумаги были погружены в щелочь в ванне. Гель клали сверху вверх дном, а на него помещали мембрану, смоченную раствором 0,4 М NaOH, не допуская образования пузырьков воздуха между гелем и мембраной. На мембрану помещали три листа фильтровальной бумаги, смоченной 0,4 М раствором NaOH. Сверху помещали стопку фильтровальной бумаги (высотой около 5 см) и груз (около 500 г). Собранную конструкцию оставили примерно на 16 часов.

17.3 Подготовка зонда для гибридизации

Для мечения олигонуклеотида С4 приготовили следующую смесь:

С4	20 пмоль
10x буфер А	4 мкл
[γ - ³² P]АТР	800 МВq
Полинуклеотидкиназа Т4	2 мкл
H ₂ O	up to 40 мкл

Смесь инкубировали 1 ч при 37°C, затем 10 мин при 75°C.

17.4 Гибридизация мембраны с зондами

После переноса мембрану промывали в 2xSSC-буфере в течение 2 мин, сушили в течение 1 ч при 80°C в вакуумной сушилке для гелей и промывали 6xSSC-буфером в течение 2 мин. Далее прегибридизацию проводили в буфере для гибридизации в течение 1 часа при 68°C. Объем буфера подбирали таким образом, чтобы на один квадратный сантиметр мембраны приходилось 0,2-0,3 мл. Далее проводили гибридизацию с зондом (концентрация 0,25 пмоль/мл) в гибридизационном буфере с 0,01 М ЭДТА в течение 4 ч при 68°C. Затем мембрану промывали 2xSSC-буфером с 0,25% SDS дважды при 60°C и один раз при 68°C в течение 15 мин. Мембрану сушили и анализировали методом электронной автордиографии на приборе Turphoon™ FLA 9500 (GE).

18. Флуоресцентная гибридизация *in situ*

Клетки синхронизировали в фазе G2/M с использованием обработки нокодазолом в концентрации 100 нг/мкл в течение 8 часов. Затем клетки обрабатывали гипотоническим раствором (0,075 М KCl, 8 г/л цитрата натрия) и осуществляли распространение метафазных хромосом и проводили гибридизацию *in situ*, как описано ранее [206]. Изображения получали с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Ti2000.

19. Оценка теломеразной активности теломеразы дрожжей

Для оценки теломеразной активности дрожжей *in vitro* приготовили следующую смесь:

HD5	50 пмоль
10x буфер TAB	5 мкл
10x смесь dATP, dTTP, dCTP	5 мкл
[α - ³² P]dGTP	800 MBq

Аффинная смола в буфере HLBISO–	15 мкл
H ₂ O	до 50 мкл

Смесь инкубировали 30 мин при 30°C, затем добавляли 200 мкл буфера STOP и 3 мкл протеиназы К (20 мг/мл). После инкубации при 37°C в течение 1 ч добавляли 10 пмоль 5'-³²P-меченного олигонуклеотида HD6 (контроль нанесения), а также 25 мкл 3 М NaCl и 250 мкл фенола интенсивно перемешивали на вортексе в течение 20 с и центрифугировали 5 мин при 16000 g. Отбирали 250 мкл водной фазы, добавляли 250 мкл смеси хлороформ:изоамиловый спирт в соотношении 24:1, интенсивно перемешивали на вортексе в течение 20 с и центрифугировали 5 мин при 16000 g. Затем отбирали 200 мкл водной фазы, добавляли в качестве соосадителя 1 мкл гликогена (20 мг/мл) и 600 мкл 96% этанола. Смесь инкубировали при –70°C около 16 часов. Нуклеиновые кислоты осаждали при 16000 g в течение 20 мин при 4°C и затем отбирали спиртовой раствор. Осадок дважды промывали 500 мкл 80% этанола, сушили при 70°C и растворяли в 10 мкл буфера для нанесения FA. Образцы с продуктами реакции нагревали в формамидном буфере в течение 10 мин при 95°C. Продукты реакции с добавлением 5'-³²P-фосфорилированного HD6 в качестве контроля нанесения разделяли в 10% денатурирующем ПААГ в буфере TBE. Гель сушили в течение 1 часа при 80°C в вакууме и анализировали методом электронной автордиографии на приборе Turphoon FLA 9500 (GE).

20. Оценка теломеразной активности теломеразы человека (RQ-TRAP)

Для анализа теломеразной активности методом RQ-TRAP клетки подсчитывали, осаждали, промывали PBS и лизировали в холодном буфере для лизиса TRAP. Клеточные экстракты разбавляли буфером 1x TRAP до равного

количества клеточных эквивалентов. Разбавленный экстракт инкубировали со смесью TRAP 1 (буфер 1x TRAP, dNTP до 200 мкМ и 15 пмоль праймера TS на реакцию) эквивалентно 2000 клеток при 25°C в течение 30 минут. Добавляли смесь TRAP 2 (H₂O, 1,25 ед. Taq-полимеразы и 15 пмоль праймера ACX и 1x SYBR Green I на реакцию) и проводили количественную ПЦР с использованием Bio-Rad CFX96/C1000 с начальной денатурацией при 95°C в течение 2 минут, а затем 37 циклов 95°C – 35 с, 50°C – 35 с и 72°C – 90 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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, и таким образом, компенсирует укорачивание теломер при делении клеток. 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. Теломераза является малопредставленным комплексом в клетке: несколько десятков единиц на дрожжевую клетку и несколько сотен на человеческую клетку. Кроме того, теломераза не обладает жесткой и компактной структурой и, как рибонуклеопротеин, подвержена действию РНКаз. Таким образом, описанные свойства осложняют работу с теломеразой и изучение ее структурных особенностей.

В нашей лаборатории мы используем штамм дрожжей *Hansenula polymorpha* (также известен как *Ogataea parapolymorpha*) в качестве модельного организма для изучения дрожжевой теломеразы. *H. polymorpha* обладает высокой устойчивостью к различным стрессам и переносит культивацию при температуре до 50°C [207]. Термотолерантные организмы обычно имеют более стабильные белки и белковые комплексы. Это свойство облегчает изучение и очистку белков *H. polymorpha* и белковых комплексов. Ранее в лаборатории были успешно выделены N-концевой

домен теломеразной обратной транскриптазы и белок Est3 из *H. polymorpha* и получены их структуры методом ЯМР [208].

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 малопонятной. 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. В данной работе мы сфокусировались на изучении поли(АДФ-рибозил)ирования в функционировании теломеразы человека. Теломераза активируется в большинстве опухолевых клеток, а 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 дрожжей²

² При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации 1 и 3, выполненные в соавторстве и указанные во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

Первоначальные эксперименты с белком Est3 из *S. cerevisiae* показали, что он входит в состав теломеразного комплекса дрожжей [209] и необходим для поддержания длины теломер [210]. Например, когда белок Est3 соединен с ДНК-связывающим доменом теломерного белка Cdc13, доступ теломеразы к теломерам значительно увеличивается, что приводит к удлинению теломер. Этот эффект сопоставим с эффектом в аналогичном эксперименте с использованием Est1, что указывает на ассоциацию Est3 с теломеразным комплексом [209].

Моделирование укладки белка Est3 выявило структурное сходство между белком Est3 *C. albicans* и ОВ-доменом TPP1, компонентом шелтеринового комплекса млекопитающих [211]. 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 [182,212].

Укладка белка Est3 *S. cerevisiae*, полученная с использованием минимальных данных ЯМР и алгоритма для предсказания структуры, также напоминает укладку ОВ-домена белка TPP1 (Рис. 6) [213]. В нашей лаборатории получена экспериментальная структура белка Est3 *H. polymorpha* методом ЯМР без использования алгоритмов для предсказания структуры (Рис. 6) [214].

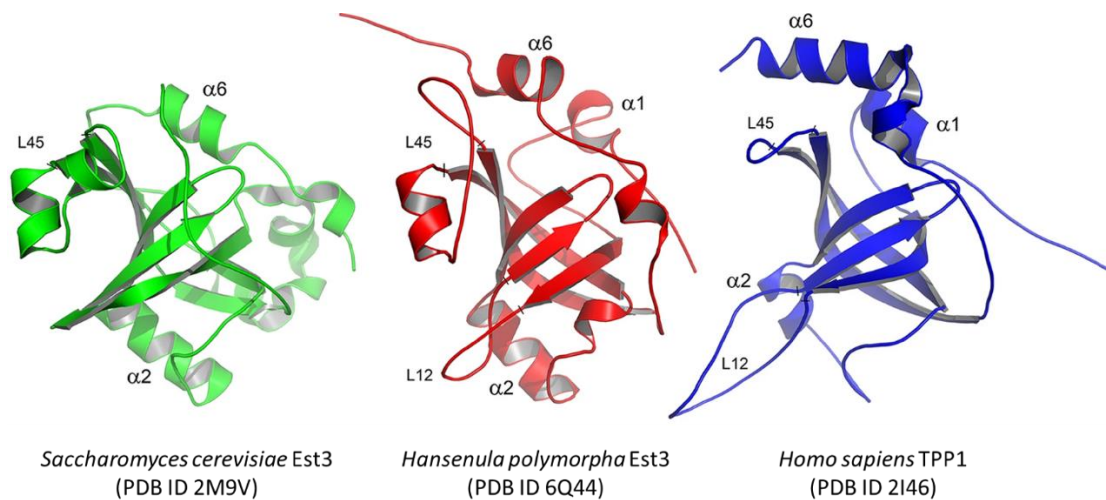


Рис. 6. Структуры белка *Est3 S. cerevisiae*, белка *Est3 H. polymorpha* и ОБ-домена белка *TPP1* человека в ленточном представлении, с некоторыми отмеченными элементами вторичной структуры [214].

В *H. polymorpha Est3* состоит из 4 α -спиралей и 5 β -цепей, а также 2 коротких фрагментов β -цепей и одной короткой α -спирали. Общая структура аналогична структуре *S. cerevisiae Est3* и соответствует классической ОБ-укладке (Рис. 6) [208,215].

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*. Хотя оба типа остатков важны для поддержания теломер *in vivo*, только последние важны для теломеразной активности *in vitro* и способствуют ассоциации *Est3* с теломеразой [211]. Остатки, общие для *Est3* и *TPP1*, расположены на одной стороне ОБ-складчатой структуры, вдали от канонической поверхности связывания нуклеиновой кислоты, характерной для ОБ-укладки. Это говорит о том, что *Est3* и ОБ-домен *TPP1* могут иметь консервативную функцию в регуляции теломеразы, отличную от связывания нуклеиновых кислот [211].

Мутагенез поверхностных остатков показал, что на поверхности Est3 в *S. cerevisiae* имеются два участка с разными функциями по поддержанию теломер [213]. Первый набор остатков совпадает с TEL-областью белка TPP1, участвующей во взаимодействии с TEN-доменом TERT человека [212]. Второй набор остатков необходим для репликации теломер *in vivo*. Мутации этих остатков приводили к нарушению поддержания длины теломер без ослабления взаимодействия Est3 с теломеразой. Функция этой поверхности пока неизвестна [213].

Таким образом, дрожжевой вспомогательный белок Est3 из разных видов дрожжей структурно схож с ОВ-доменом теломерного белка TPP1 человека. Основная функция TPP1 заключается в привлечении теломеразы к теломерам через N-концевой домен теломеразной обратной транскриптазы и активации теломеразы. Таким образом, 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, ранее полученные в лаборатории: *Est1-НА*, *TERT-НА*, *Est3-НА*. Добавление эпитопа может нарушить функционирование белков и активность теломеразы *in vivo* соответственно. Для

оценки влияния HA-эпитопа на функционирование белков Est1, TERT, Est3 мы культивировали независимо по 2 клон штаммов *Est1-HA*, *TERT-HA*, *Est3-HA* в течение примерно 200 поколений путем субкультивирования на чашках с агаром. Затем мы вырастили клетки в жидкой среде и выделили из них геномную ДНК. Сначала для проверки наличия вставки с последовательностью HA-эпитопа в меченых генах (Рис. 7А) мы провели ПЦР и визуализировали полученные продукты в агарозном геле (Рис. 7Б).

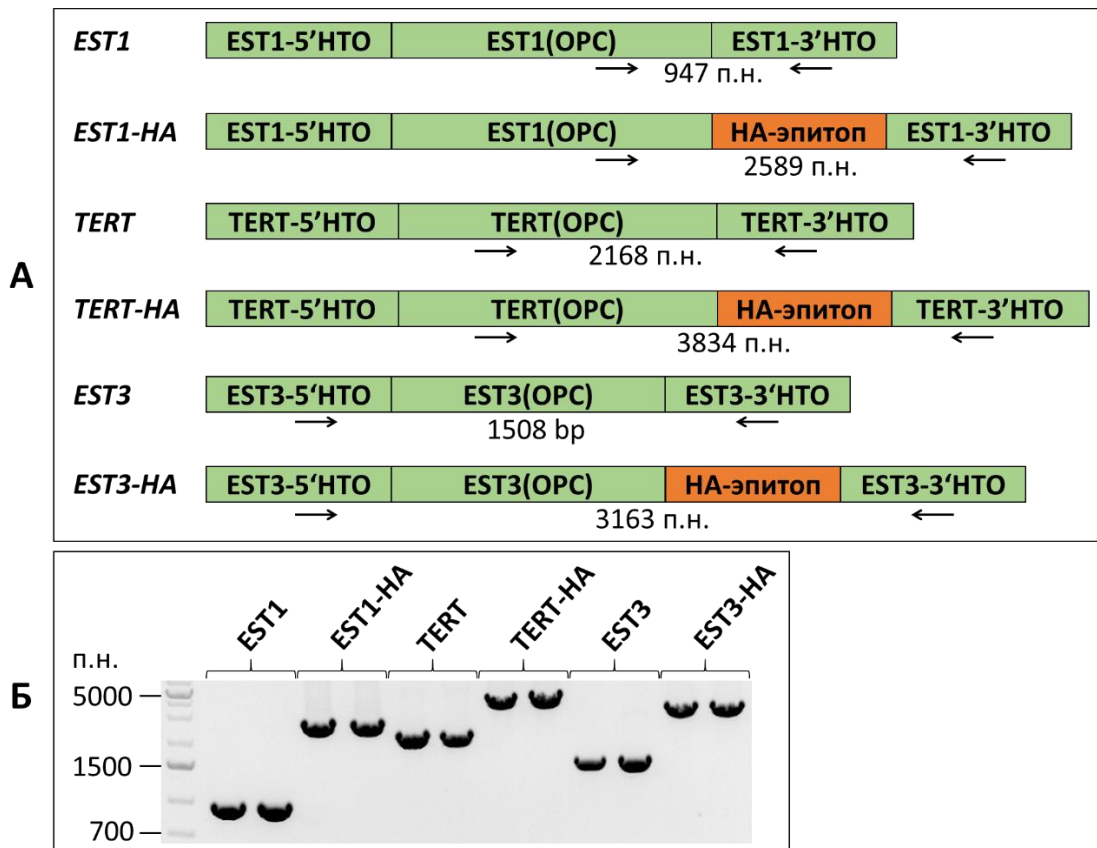
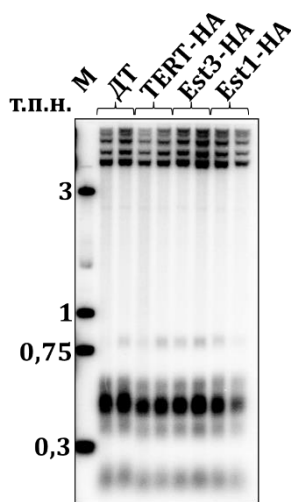


Рис. 7. Проверка штаммов на наличие вставки, кодирующей HA-эпитоп в генах белков теломеразы. (А) Схема структуры генов белков теломеразы в диком типе и штаммах *Est1-HA*, *TERT-HA*, *Est3-HA*. Стрелками схематично отмечены участки отжига олигонуклеотидов для ПЦР. Вставка также содержала маркер

селективности по урацилу (не обозначен на схеме). (Б) Анализ продуктов ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле.

Продукты ПЦР в случае дикого типа оказались короче по сравнению со штаммами *Est1-НА*, *TERT-НА*, *Est3-НА*. Все образцы содержали вставку ожидаемой длины.

Чтобы оценить функционирование теломеразы в этих штаммах, мы определили длину теломер в двух независимо выращенных клонах для каждого штамма с помощью Саузерн-блоттинга. Выделенную геномную ДНК обрабатывали эндонуклеазой рестрикции PstI. Фрагменты ДНК разделяли в агарозном геле и переносили на нейлоновую мембрану. Детекцию фрагментов геномной ДНК,



содержащих теломеры, проводили с помощью олигодезоксирибонуклеотида 5'-(CGCCACCC)₄-3', меченного ³²P на 5'-конце, который комплементарен четырем теломерным повторам в *H. polymorpha*.

Рис. 8. Анализ длины теломер с использованием Саузерн-блоттинга. Длина фрагментов ДНК после рестрикции, содержащих теломерные повторы, практически не изменяется у *Est1-НА*, *TERT-НА* и *Est3-НА* по сравнению с диким типом (ДТ). «т.п.н.» – тысяча пар нуклеотидов.

Введение НА-эпитопа во всех случаях оказывает минимальное влияние на длину теломер *H. polymorpha* (Рис. 8). 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*

Est3 считается регуляторным белком теломеразы у дрожжей *S. cerevisiae*. 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* [216,217]. При этом белок Est3 не нужен для активности теломеразы *S. cerevisiae in vitro* [209]. Однако делеция Est3 в дрожжах *C. albicans* приводит к нарушению активности теломеразы *in vitro* в зависимости от последовательности олигонуклеотидного субстрата, который выступает в качестве аналога 3'-конца теломер [218]. При изучении возможного вклада Est3 в активность фермента у родственных *S. cerevisiae* дрожжей *Saccharomyces castellii* выяснилось, что потеря Est3 приводит к двух-трехкратному снижению процессивности теломеразы. Этот эффект не зависел от последовательности субстрата, как показал анализ панели олигонуклеотидных субстратов, покрывающих матричную область теломеразной РНК *S. castellii* [217]. Методом ЯМР не выявлено конформационных изменений структуры белка Est3 *S. cerevisiae* в присутствии одноцепочечной ДНК. Добавление рекомбинантного белка Est3 из *Escherichia coli* полностью восстанавливало теломеразную активность *S. castellii in vitro*, тогда как увеличение количества Est3 не повышало ее [217]. Это указывает на то, что белок Est3 может регулировать работу теломеразы, но не за счет связывания с одноцепочечным участком теломеры. На основании этих данных мы предположили, что Est3 может регулировать активность теломеразы *H. polymorpha in vitro*.

Мы использовали следующие конструкции для создания нокаутов теломеразных генов. В этих конструкциях маркер селективности по лейцину окружен областями гомологии длиной около 500 п.н., которые соответствуют

последовательности вокруг открытых рамок считывания генов. Штамм *TERT-HA* трансформировали с помощью ДНК-кассеты, содержащей маркер селективности, окруженный гомологичными областями вокруг ОРС *EST3*. В результате гомологичной рекомбинации в геном был вставлен ген селективности по лейцину, и открытая рамка считывания *EST3* была нарушена (Рис. 9А). После этого клетки, в геном которых встроилась ДНК-кассета, отбирали на твердой селективной среде, не содержащей лейцин, так как клетки исходного штамма не способны синтезировать эту аминокислоту. Затем единичные колонии выращивали в жидкой селективной среде без лейцина. Геномную ДНК выделяли из части полученной культуры и с помощью ПЦР отбирали клоны, содержащие вставку в ген *EST3* (Рис. 9Б).

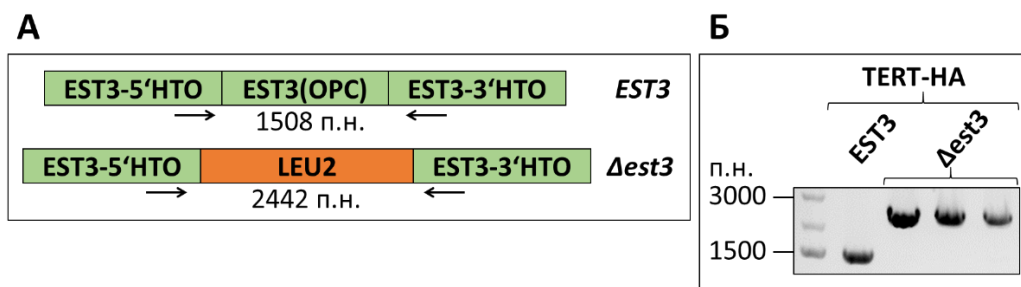


Рис. 9. Проверка штамма *TERT-HA Δest3* на наличие вставки в гене *EST3*. (А) Структура гена *EST3* в диком типе и нокауте. Стрелками отмечены участки отжига олигонуклеотидов для ПЦР. (Б) Анализ продуктов ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле. Продукты ПЦР в случае дикого типа короче по сравнению с нокаутом.

Следует отметить, что нокаут гена какого-либо компонента теломеразы приводит к нестабильности генома дрожжей и их гибели. Поэтому все штаммы с нокаутами генов теломеразных белков получали и отбирали методом ПЦР-анализа заново для каждого эксперимента в данной работе. 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-эпиту, конъюгированных с пероксидазой хрена. Неожиданно мы обнаружили, что при нокауте гена *EST3* количество выделенного белка TERT-НА уменьшается до 20 раз (Рис. 10).

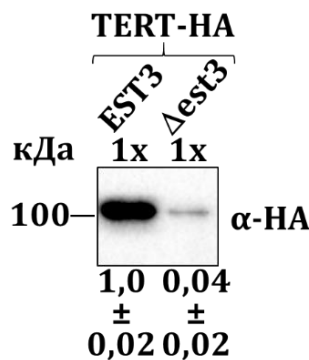


Рис. 10. Анализ количества белка TERT-НА после иммунопреципитации методом вестерн-блоттинга с антителами против НА. «1x» означает, что при выделении было взято одинаковое количество клеток этих штаммов. Цифры ниже представляют собой количественный расчет интенсивности полос

(относительное среднее значение \pm стандартное отклонение, рассчитанное для трех независимо выращенных культур каждого штамма).

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 (Рис. 11).

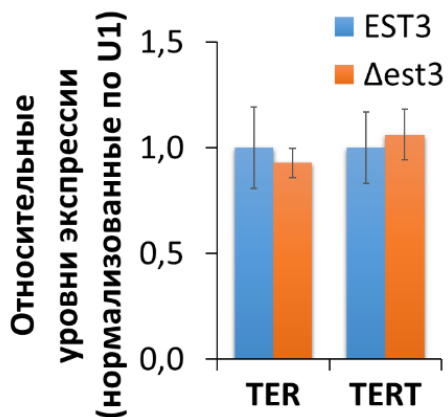


Рис. 11. Уровни экспрессии теломеразной РНК (TER) и мРНК TERT в штаммах TERT-NA и TERT-NA $\Delta est3$, определенные методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Значения нормированы на мРНК U1. Данные, представленные на

диаграмме (среднее значение \pm стандартное отклонение), были получены при выделении РНК из четырех независимо выращенных культур каждого штамма.

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-NA $\Delta est3$ 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-NA $\Delta est3$ для связывания с аффинной смолой и взяв в 10 раз меньше аффинной смолы после связывания клеточного экстракта TERT-NA. Однако необходимо было проверить, можно ли обнаружить в столь малом количестве белок TERT-NA и активность выделенной теломеразы *in vitro*, поскольку даже в нормальных условиях теломераза представляет собой малопредставленный комплекс, оцениваемый в несколько десятков единиц на дрожжевую клетку [219].

Для проверки теломеразной активности после связывания экстракта TERT-NA, аналогично предыдущему эксперименту, производили двукратные серийные разведения аффинной смолы. Затем мы проанализировали количество связанного белка TERT-NA в образцах с помощью вестерн-блоттинга, как описано ранее (Рис. 12Б, верхняя панель). Кроме того, мы также оценили теломеразную активность в

этих образцах (Рис. 12Б, средняя панель). Для оценки теломеразной активности использовали смесь dATP, dTTP, dCTP, α - ^{32}P -dGTP, и олигонуклеотидный субстрат HD5, которые в соответствующем буфере добавляли к аффинной смоле (Рис. 12А). Продукты элонгации олигонуклеотида HD5 теломеразой разделяли в денатурирующем ПААГ и визуализировали методом автордиографии (Рис. 12Б, средняя панель). Олигонуклеотид HD6, меченный ^{32}P на 5'-конце, служил контролем нанесения (Рис. 12Б, нижняя панель).

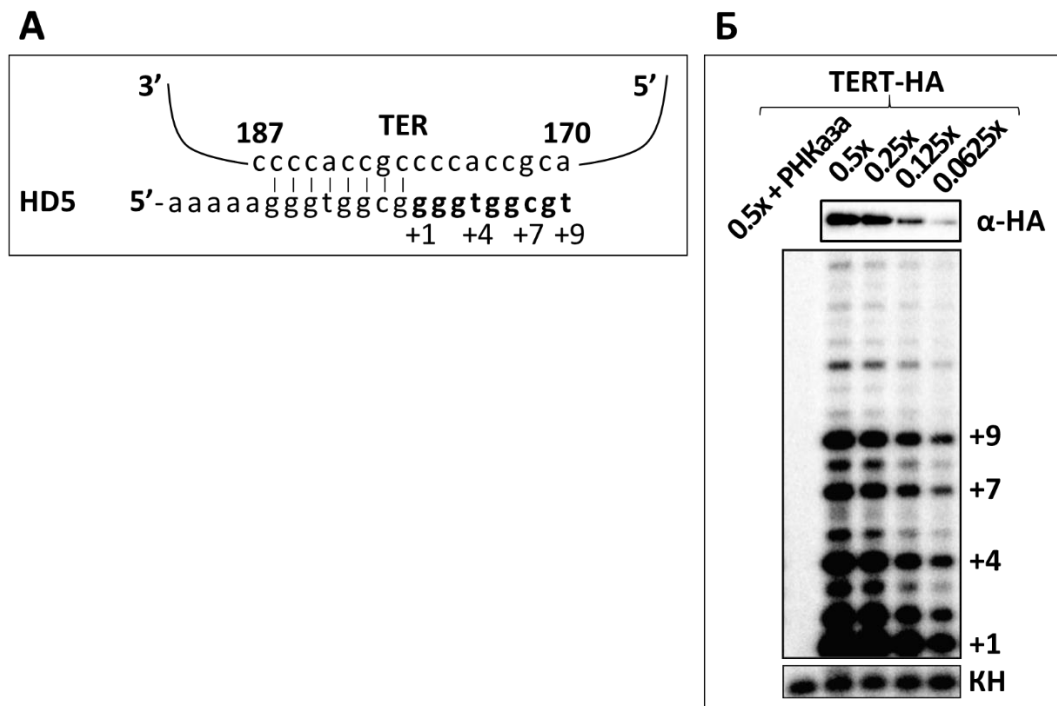


Рис. 12. Анализ теломеразной активности после связывания экстракта TERT-HA с аффинным носителем. (А) Схема удлинения субстрата (олигонуклеотида HD5) теломеразой. (Б) Верхняя панель демонстрирует анализ содержания белка TERT-HA, выделенного из различных количеств аффинной смолы, сшитой с антителами против HA. На средней панели показана картина разделения меченных ^{32}P продуктов удлинения субстрата HD5 теломеразой, связанной с

аффинным носителем, после электрофореза в ПААГ и визуализации авторадиографией. Отсутствие активности в контроле после инкубации с РНКазой указывает на то, что продукты элонгации обусловлены активностью теломеразы, а не активностью другого фермента. «КН» – контроль нанесения на нижней панели.

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, так как в этом случае сигнал должен быть выше предела обнаружения каждого метода.

Для сравнения активности теломеразы в штамме *TERT-НА Δest3* с *TERT-НА* мы использовали такие количества экстрактов, чтобы с аффинным носителем связывалось одинаковое количество TERT-НА, что подтверждали с помощью вестерн-блоттинга (Рис. 13А). При этом количество коиммунопреципитированной теломеразной РНК было также примерно одинаковым, согласно результатам анализа ее содержания методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией после фенол-хлороформной экстракции из аффинной смолы (Рис. 13В).

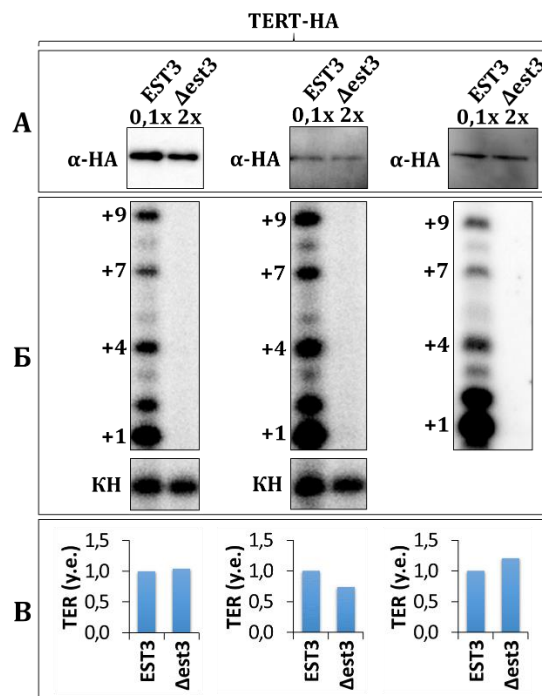


Рис. 13. Влияние белка *Est3* на активность теломеразы *in vitro*. (А) Анализ количества белка *TERT-HA* после иммунопреципитации из указанных штаммов методом вестерн-блоттинга с антителами против *HA*. «0,1x» и «2x» обозначают соотношение, в котором указанные образцы были взяты для экспериментов. (Б) Продукты удлинения теломеразой субстрата *HD5*, меченные ^{32}P , разделяли с помощью ПААГ и визуализировали автордиографией. «KH» – контроль нанесения. (В) Относительное количество (у.е.) совместно очищенной теломеразной РНК (*TER*) по образцу дикого типа, определенное с помощью *RT-qPCR*. Эксперимент был повторен три раза.

В этом эксперименте, несмотря на одинаковое содержание *TERT* и *TER*, отсутствие *Est3* привело к исчезновению теломеразной активности *in vitro* (Рис. 13Б). Следовательно, белок *Est3* необходим для теломеразной активности *H. polymorpha in vitro*. Возможно, роль белка *Est3* у *H. polymorpha* аналогична роли его гомолога у *C. albicans* и может включать активацию теломеразы.

Чтобы проверить эту гипотезу, следовало попробовать восстановить теломеразную активность *in vitro*, используя рекомбинантный белок Est3. Для этого мы использовали рекомбинантный белок Est3, полученный в *E. coli*. Аналогично предыдущему эксперименту мы уравнивали количество выделенного белка TERT-НА из штаммов *TERT-НА* и *TERT-НА Δest3*. После иммунопреципитации за НА-эпитоп образцы инкубировали с рекомбинантным белком Est3 и определяли теломеразную активность *in vitro* (Рис. 14).

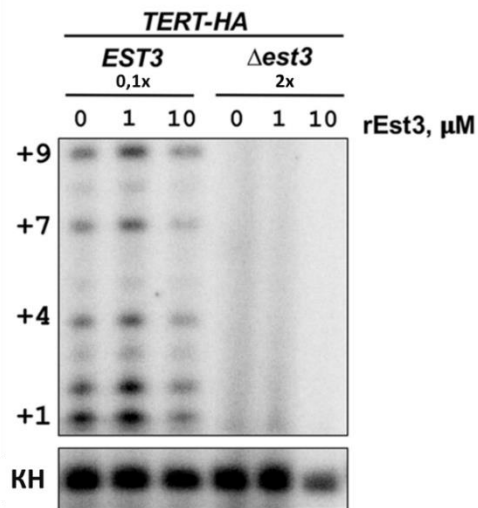


Рис. 14. Влияние рекомбинантного белка Est3 на активность теломеразы *in vitro*. Показаны продукты удлинения, соответствующие одному теломерному повтору. К образцам были предварительно добавлены указанные финальные концентрации белка Est3. «KH» – контроль нанесения.

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 высокая концентрация Est3 приводила 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* [209], при этом добавление рекомбинантного Est3 повышает активность теломеразы *S. cerevisiae in vitro*, очищенной из клеток дикого типа [216].

2.1 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* [209]. В другом эксперименте использовали штаммы *S. cerevisiae*, экспрессирующие мутантные версии теломеразной РНК, в которых нарушено взаимодействие с Est1 или Est2. По результатам иммунопреципитации также показано, что ассоциация белка Est3 зависит от Est2 при сборке теломеразного комплекса, что позволяет предположить, что белки Est2 и Est3 взаимодействуют напрямую [217].

Однако в другой работе методом иммунопреципитации хроматина было выявлено, что ассоциация белка Est3 с теломерами у *S. cerevisiae* происходит на поздних этапах фазы S и в G2-фазе, одновременно с белком Est1 [220]. Это указывает на то, что ассоциация Est3 с теломерами может также зависеть от Est1 и обуславливаться прямым взаимодействием этих белков, поскольку в данной работе также показано, что очищенные рекомбинантные Est1 и Est3 взаимодействуют *in vitro*. Более того, ассоциация Est1 и Est2 с теломерами не менялась в отсутствие Est3 [220]. Это указывает на то, что не только Est2, но и Est1 может быть нужен для

привлечения Est3 в теломеразный комплекс *S. cerevisiae*, а Est3 может действовать в конце процесса привлечения и активации теломеразы [221].

Данные по гомологам Est3 из других видов дрожжей указывают на различия в их функционировании. Например, исследование на *C. albicans* показало, что отсутствие Est3 снижает связывание теломеразной РНК с Est1 более чем в 10 раз по сравнению с диким типом при неизменном уровне теломеразной РНК [218]. 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. Эти гомологи образуют стабильные комплексы с доменом TEN белка TERT. Для эффективного образования комплекса необходимы N- и C-концевые области, а также консервативные остатки внутри ОБ-укладки [222]. Однако взаимодействие между очищенным рекомбинантным Est3 и доменом TEN *in vitro* не было обнаружено для *S. cerevisiae*, *C. albicans* или *C. tropicalis* в описанной работе [222]

Взаимодействие между рекомбинантными Est3 и TEN-доменом TERT не удалось обнаружить методом ЯМР для белков *H. polymorpha* [214]. Это указывает на то, что свойства и роль белка Est3 у *H. polymorpha* могут отличаться от таковых у *S. cerevisiae*, где данное взаимодействие обнаружено [216]. 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 нокаутов генов *TERT* и *EST1* аналогичные конструкции для получения нокаута *EST3*. Штамм *Est3-NA* трансформировали с использованием данных кассет. В результате гомологичной

рекомбинации маркер селективности был вставлен в геном, и открытая рамка считывания *EST1* или *TERT* была нарушена (Рис. 15А). После этого дрожжи высеивали на твердую селективную среду, не содержащую лейцин. Затем отдельные колонии нокаута *EST1* (штамм *Est3-HA Δest1*) и нокаута *TERT* (штамм *Est3-HA Δtert*) выращивали в жидкой селективной среде, не содержащей лейцин. Геномную ДНК выделяли из полученной культуры. Клоны, содержащие вставку в гены *EST1* или *TERT*, отбирали с помощью ПЦР (Рис. 15Б).

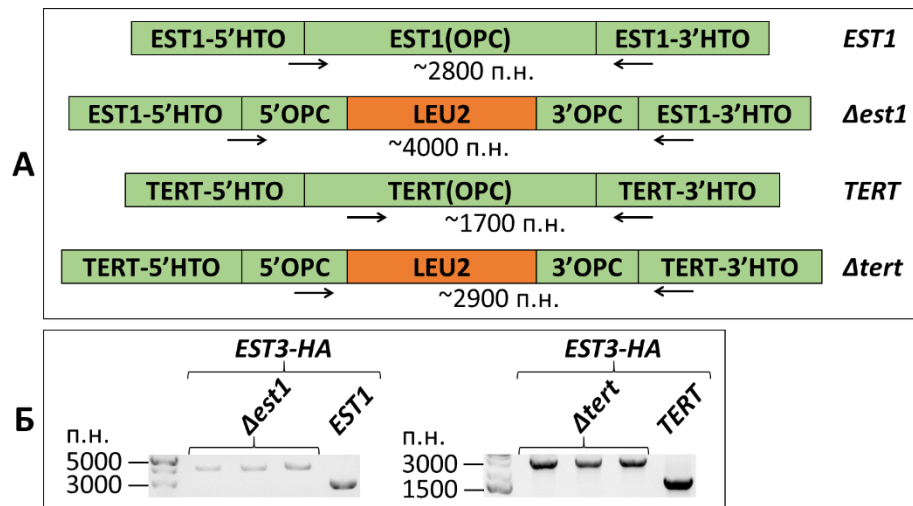


Рис. 15. Отбор штаммов *Est3-HA Δest1* и *Est3-HA Δtert* на наличие вставки в генах *EST1* и *TERT* соответственно. (А) Структура этих генов в диком типе и в нокаутах. Стрелками отмечены участки отжига олигонуклеотидов для отбора клонов методом ПЦР после трансформации. (Б) Анализ продуктов ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле. Продукты ПЦР в случае дикого типа короче, чем в случае нокаута.

Отобранные клоны выращивали в 400 мл богатой среды YPD. Выделение белка *Est3-HA* осуществляли методом иммунопреципитации на анти-*HA*-агарозе. 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. 16А). 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. 16Б).

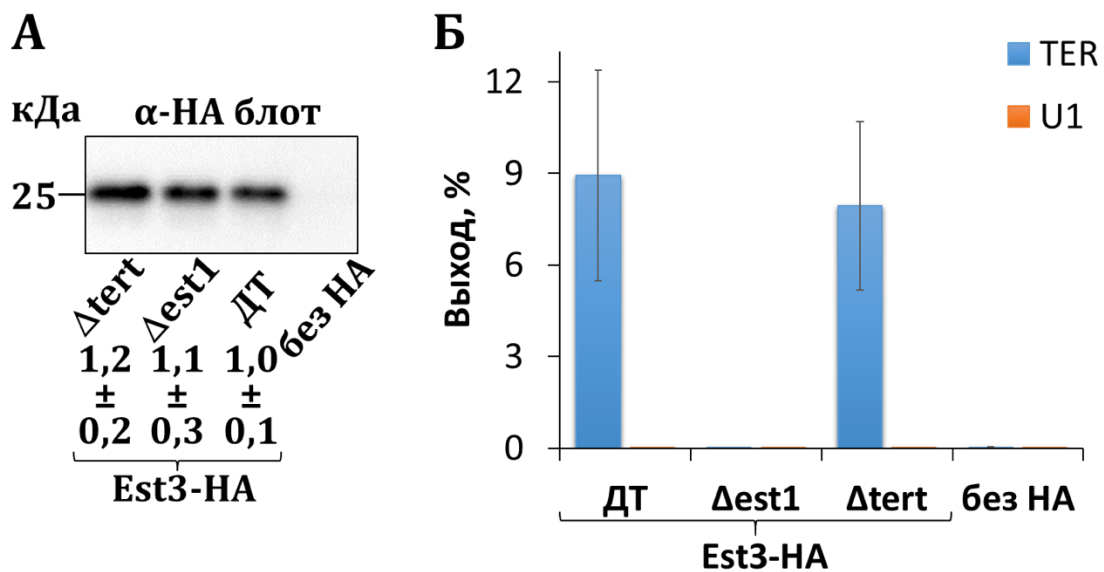


Рис. 16. Анализ влияния белков *Est1* и *TERT* на ассоциацию белка *Est3-НА* с теломеразной РНК. (А) Количество белка *Est3-НА* из указанных штаммов, связанного с аффинным носителем, определяли методом вестерн-блоттинга с антителами против НА. Цифры ниже представляют собой количественный расчет интенсивности полос (относительное среднее значение \pm стандартное

отклонение, рассчитанное для трех независимо выращенных культур каждого штамма). (Б) Количество совыделившейся теломеразной РНК (TER) и контрольной мРНК U1 в образцах определяли с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Данные, представленные на диаграмме (среднее значение \pm стандартное отклонение), были получены при анализе трех независимо выращенных культур каждого штамма. «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-NA Δ tert* 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-NA Δ est1* по сравнению с диким типом *Est3-NA* (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*, что, по-видимому, необходимо как для включения Est3 в теломеразный комплекс, так и для процессивности теломеразы. Однако это свойство сближает *H. polymorpha* с *C. albicans*, регуляторные субъединицы Est1 и Est3 которого взаимозависимы при сборке теломеразного комплекса [218]. Мы предположили, что ассоциация Est1 с теломеразным комплексом *H. polymorpha* также зависит от Est3.

2.2 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-HA*. Отбор клонов со вставкой (как показано на Рис. 9А и Рис. 15А), их проверка с помощью ПЦР (Рис. 17) и получение клеточной массы проводили как описано ранее для штаммов *TERT-HA* и *TERT-HA Δest3*.

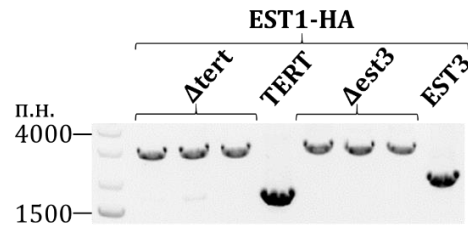


Рис. 17. Тестирование штаммов *Est1-HA Δtert* и *Est1-HA Δest3* на наличие вставки в генах *TERT* и *EST3* соответственно при помощи ПЦР. Схема генов в случае дикого типа и нокаутов аналогична представленной ранее на Рис. 9А и Рис. 15А.

Белок *Est1-HA* выделяли на аффинной к HA-эпиту суле. Для трех повторов одинаковое количество выделенного белка наблюдали во всех штаммах, согласно результатам вестерн-блоттинга. Отсутствие сигнала для отрицательного контроля, не содержащего в белке эпитопа HA, указывает на селективное выделение *Est1-HA* на аффинной смоле (Рис. 18А). РНК выделяли из равных аликвот клеточных экстрактов и образцов аффинной смолы после связывания фенол-хлороформным методом и проводили RT-qPCR (Рис. 18Б). Выход теломеразной РНК рассчитывали аналогично предыдущему эксперименту со штаммом *Est3-HA*.

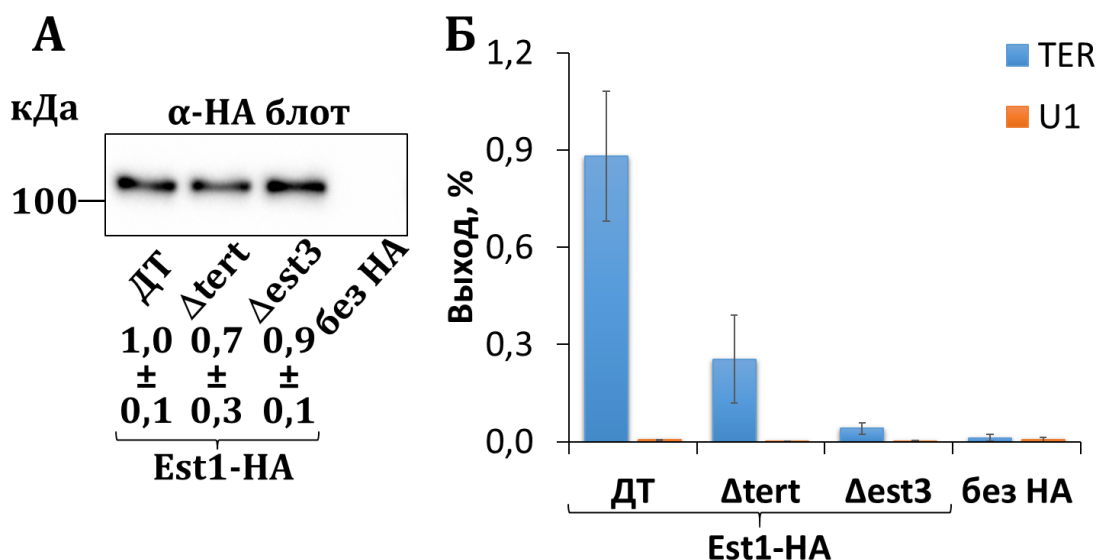


Рис. 18. Анализ влияния белков *Est3* и *TERT* на ассоциацию белка *Est1-НА* с теломеразной РНК. (А) Анализ количества выделенного белка *Est1-НА* после иммунопреципитации из указанных штаммов методом вестерн-блоттинга с антителами против НА-эпитопа. Цифры ниже представляют собой количественный расчет интенсивности полос (относительное среднее значение \pm стандартное отклонение, рассчитанное для трех независимо выращенных культур каждого штамма). (Б) Количество совместно очищенной теломеразной РНК (*TER*) и контроля очистки мРНК *U1* в образцах определяли с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Данные, представленные на диаграмме (среднее значение \pm стандартное отклонение), были получены из трех независимо выращенных культур каждого штамма. «ДТ» – дикий тип. «Без НА» – штамм *H. rolytorpha*, не содержащий вставку с НА-эпитопом.

По результатам ПЦР количество совыделившейся теломеразной РНК снизилось у обоих нокаутов по сравнению с диким типом. В то же время количество совыделившейся теломеразной РНК у штамма *Est1-НА Δest3* снижается примерно на порядок по сравнению с диким типом *Est1-НА* (0,041% и 0,88% соответственно). Это

указывает на то, что белку Est1 необходим белок Est3 для эффективной ассоциации с теломеразной РНК в *H. polymorpha*. Однако TERT также опосредует ассоциацию Est3 с теломеразной РНК (выход 0,25% для *Est1-НА Δtert* и 0,88% для *Est1-НА* соответственно). На основании полученных результатов высказано предположение, что белки Est1 и Est3 *H. polymorpha* взаимозависимы при ассоциации с теломеразной РНК.

2.3 Анализ влияния нокаутов *EST1* или *EST3* на уровень белка TERT в клетках *H. polymorpha*

Как отмечалось выше, при нарушении гена *EST3* количество выделенного белка TERT-НА снижается примерно в 20 раз (Рис. 10). Мы проанализировали клеточные экстракты и образцы после иммунопреципитации из штаммов *TERT-НА*, *TERT-НА Δest1*, *TERT-НА Δest3* с использованием вестерн-блоттинга (Рис. 19).

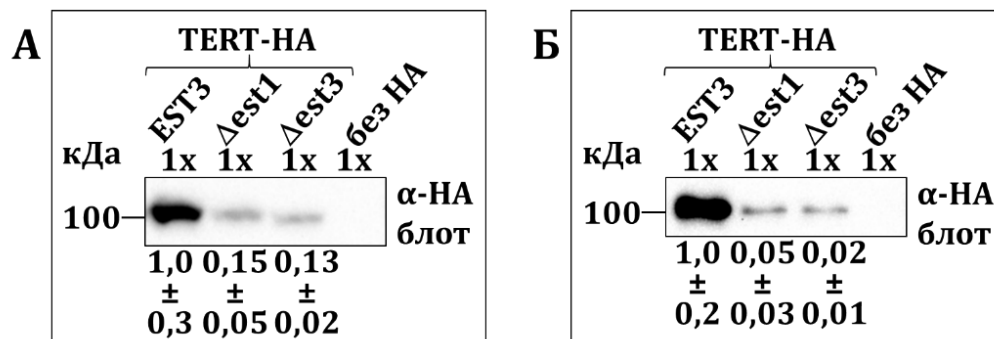


Рис. 19. Анализ количества белка TERT-НА методом вестерн-блоттинга с антителами против НА. (А) в клеточных экстрактах исходного штамма TERT-НА и нокаутов *EST1* или *EST3*, а также штамма *H. polymorpha* дикого типа, (Б) после иммунопреципитации из указанных штаммов. «1x» означает, что для вестерн-блоттинга было взято одинаковое количество лизатов этих штаммов в (А) или такое же количество культур клеток этих штаммов для иммунопреципитации в (Б). Для обоих блотов приведенные ниже цифры представляют собой

количественную оценку интенсивности полос (относительное среднее значение \pm стандартное отклонение, рассчитанное для трех независимо выращенных культур каждого штамма).

Оказалось, что уровень белка TERT-НА действительно снижается в дрожжевых клетках при нокаутах *EST1* и *EST3* (Рис. 19А). Соответственно, при нарушении работы гена *EST1* количество выделенного белка TERT-НА также, как и при нарушении работы гена *EST3* снижается примерно в 20 раз (Рис. 19Б).

Раз белки Est1 и Est3 необходимы для поддержания определенного количества белка TERT-НА в клетках *H. polymorpha*, то следует проверить оказывает ли похожий эффект теломеразная РНК *H. polymorpha* (TER). Для создания нокаута *TER* мы использовали конструкцию, аналогичную описанным ранее, в которой маркер селективности по лейцину окружен областями гомологии длиной около 500 п.н., соответствующих гену *TER* и соседней нуклеотидной последовательности. Клоны с нокаутом *TER* были отобраны путем проверки фенотипа при посеве разбавлений насыщенной культуры клеток до единичных колоний при сравнении с исходным штаммом TERT-НА.

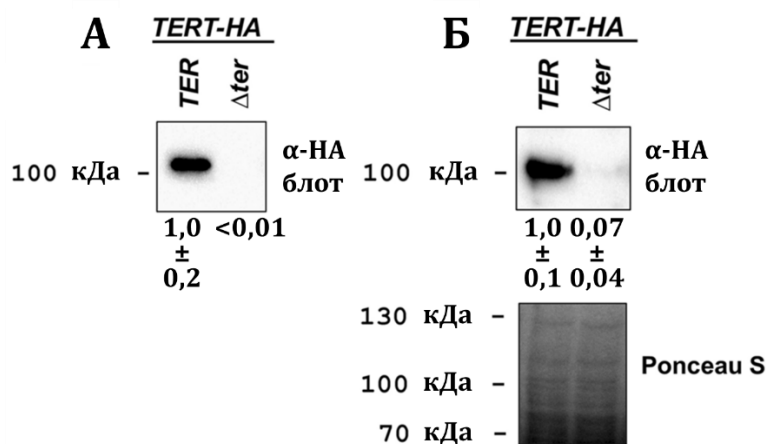


Рис. 20. Анализ количества белка TERT-НА методом вестерн-блоттинга с антителами против НА (А) в клеточных экстрактах указанных штаммов, (Б) после иммунопреципитации из указанных штаммов. Нижняя панель показывает мембрану после окрашивания красителем *Ronseal S*, использованного для демонстрации одинакового количества белков в образцах, использованных в эксперименте. Для обоих блотов приведенные ниже цифры представляют собой количественную оценку интенсивности полос (относительное среднее значение \pm стандартное отклонение, рассчитанное для трех независимо выращенных культур каждого штамма).

Мы не смогли обнаружить какое-либо содержание белка TERT-НА в случае нокаута *TER* при сравнении с исходным штаммом (Рис. 20А). А при иммунопреципитации мы наблюдали, что TERT-НА практически не выделяется из клеток без *TER*, также как и в случае отсутствия *Est1* и *Est3* (Рис. 20Б). Полученные данные указывают на то, что несвязанный в теломеразный комплекс белок TERT-НА может быть подвержен деградации.

2.4 Функционирование белка Est3 в теломеразе *H. polymorpha*

Est3 не взаимодействует напрямую с теломеразной РНК *in vitro* у почкующихся дрожжей. Для *S. cerevisiae* существуют противоречивые данные о том, какой белок, *Est1* или *Est2* (обратная транскриптаза теломеразы *S. cerevisiae*), отвечает за рекрутирование *Est3* в теломеразный комплекс. В ряде исследований утверждается, что ассоциация белка *Est3* с теломеразным комплексом зависит только от *Est2*, предполагая их непосредственное взаимодействие [217]. В другой работе показано, что *Est3* связывается с доменом TEN *Est2* *S. cerevisiae in vitro*, а добавление рекомбинантного *Est3* усиливает теломеразную активность *S. cerevisiae*

in vitro [216]. Эти результаты позволяют предположить, что Est3 может способствовать процессивности теломеразы *S. cerevisiae* посредством взаимодействия с TEN-доменом Est2 [216]. Однако другие исследования показали, что связывание Est3 с теломерами зависит от Est1, а очищенные рекомбинантные Est1 и Est3 взаимодействуют *in vitro* [220]. Таким образом, Est3 может действовать на завершающей стадии процесса привлечения теломеразы на теломеры и ее активации в *S. cerevisiae* [221].

Напротив, исследование штаммов *C. albicans* показало, что отсутствие Est3, не влияя на содержание теломеразной РНК в клеточных экстрактах, снижает связывание Est1 с ней более чем в 10 раз по сравнению с диким типом [218]. На основании этого было высказано предположение, что регуляторные субъединицы Est1 и Est3 взаимозависимы в ассоциации с теломеразным комплексом *C. albicans* [218].

В данной работе мы показали, что белок Est3 необходим для активности теломеразы *H. polymorpha in vitro*. Оказалось, что белок Est3 привлекается к комплексу белком Est1, а не TERT. Этот результат согласуется с тем фактом, что Est3 и домен TERT TEN *H. polymorpha* не взаимодействуют *in vitro*, как показано методом ЯМР. Напротив, для *S. cerevisiae* показано взаимодействие гомологов этих белков *in vitro*, что, предположительно, способствует процессивности теломеразы. Кроме того, считается, что их структурные гомологи в организме человека TRP1 (Est3) и TEN-домен hTERT взаимодействуют, способствуя удлинению теломер [211]. Однако в свете полученных результатов консервативность и значимость этого взаимодействия могут быть преувеличены.

В работе выявлена взаимозависимость Est1 и Est3 при ассоциации с теломеразной РНК, а также одинаковое снижение содержания белка TERT в отсутствие Est1 и Est3, что может быть связано со снижением его биосинтеза в клетках или увеличением деградации. Это также отличает теломеразу *H. polymorpha* от *S. cerevisiae*, где этого не наблюдали. В то же время функционирование белков Est1 и Est3 у *H. polymorpha* похоже на *C. albicans*, учитывая описанную взаимозависимость Est1 и Est3 при сборке теломеразного комплекса у *C. albicans*. Возможно, для продуктивной ассоциации TERT с теломеразной РНК необходимо предварительное связывание с ней субкомплекса Est1–Est3. Если удалить Est1 (или Est3), то связывание Est3 (или Est1) нарушается, что может привести к нарушению связывания TERT и/или каталитически неактивной конформации комплекса TERT–теломеразная РНК у *H. polymorpha*. Тогда снижение ассоциации TERT с теломеразной РНК приводит к увеличению концентрации свободного TERT, что, в свою очередь, может привести к его дестабилизации и усилению деградации. Такая гипотеза могла бы объяснить наблюдаемое одинаковое снижение TERT в клетках с нокаутом *EST1*, *EST3* или *TER* и отсутствие обнаруживаемой теломеразной активности *in vitro* в случае нокаута *EST3*.

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

3. Вспомогательные белки DKC1 и GAR1 в теломеразном комплексе человека³

³ При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации 1 и 2, выполненные в соавторстве и указанные во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в

Глобальный поиск поли(АДФ-рибозил)ирования (ПАРилирования) при помощи масс-спектрометрии выявил наличие данной посттрансляционной модификации у белков DKC1 и GAR1, которые являются компонентами комплекса H/ACA [223]. Мы решили исследовать способность комплекса H/ACA 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 [224].

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 [223]. С этой целью мы провели сайт-направленный мутагенез и сделали замены E414Q, E420Q, E429Q, E439Q, E483Q и E487Q в DKC1. А в GAR1 мы заменили E67Q, E74Q, E80Q, D81N и E104Q. Заменяя глутаминовую кислоту на глутамин и аспарагиновую кислоту на аспарагин, мы убираем карбоксильную группу необходимую для ПАРилирования, но сохраняем примерно одинаковый размер и молекулярную массу аминокислотных остатков.

Мы использовали плазмиды, кодирующие как дикий тип, так и мутантные формы DKC1 и GAR1, меченные 3xFLAG. Мы трансфицировали этими конструкциями клетки HEK293T и проводили аффинную очистку GAR1 или DKC1 за 3xFLAG. Уровень ПАРилирования мутированных белков и белков дикого типа

которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

анализировали методом вестерн-блоттинга в денатурирующих условиях. Используя антитела против ПАР, мы наблюдали снижение сигнала ПАРилирования (Рис. 21А и Б) в полосах, соответствующих GAR1-FLAG и DKC1-FLAG1, а также наблюдали изменение подвижности белков GAR1 и DKC1 в геле (Рис. 21В и Г).

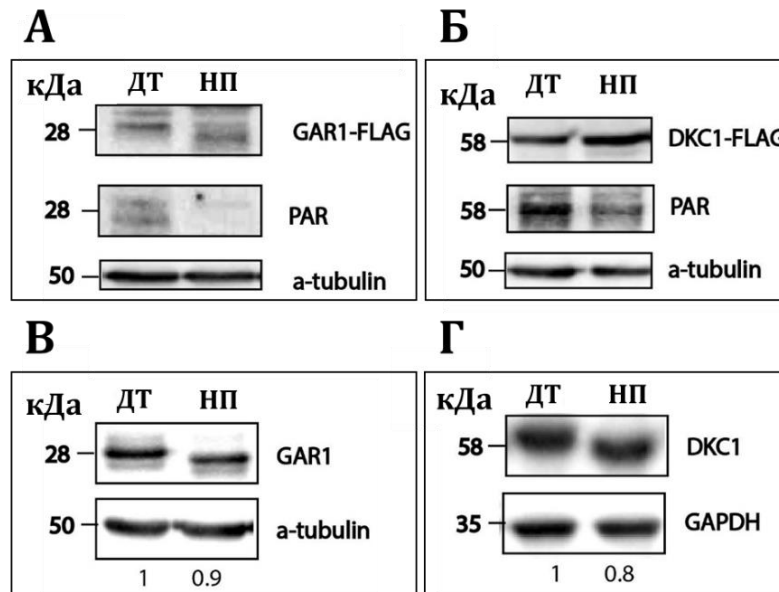


Рис. 21. Анализ 3xFLAG-меченных белков дикого типа (ДТ) и не ПАРилированных (НП) белков GAR1 и DKC1 методом вестерн-блоттинга с антителами против FLAG и поли(АДФ-рибозы) (PAR) (А) и (Б), против GAR1 (В) и против DKC1 (Г) клеточных лизатов после трансфекции. α -тубулин или GAPDH служили контролем нанесения (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.

Мы иммунопреципитировали экспрессированные белки с использованием метки 3xFLAG посредством аффинной очистки. 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. 22).

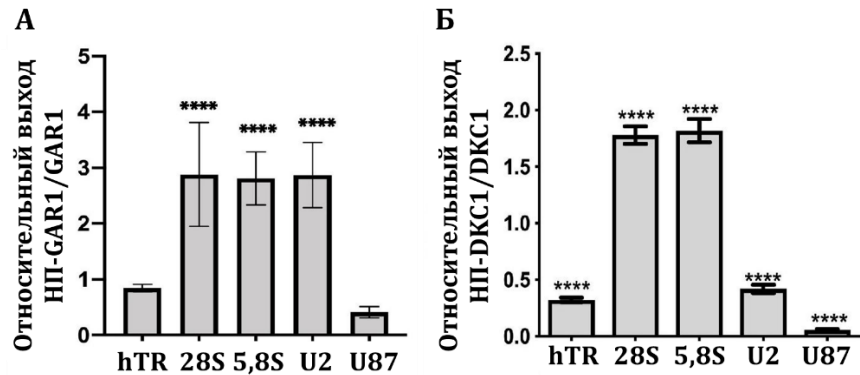


Рис. 22. Анализ РНК-связывающих свойств белков GAR1 и DKC1 дикого типа и не ПАРилированных мутантов (НП-GAR1 и НП-DKC1). Относительный выход целевых РНК, очищенных совместно с GAR1(А) и DKC1(Б), определяли с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Данные, представленные на диаграмме (среднее 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. 22). 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. 22А). Более сильно связывались рибосомные РНК и уменьшалось количество совыделяющихся мяРНК и hTR, образующих комплекс с не

ПАРилированным DKC1, по сравнению с DKC1 дикого типа (Рис. 22Б). Эти результаты показали, что 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 средство к РНК, мы проанализировали РНК-связывающие свойства GAR1 в условиях ингибирования активности белков семейства PARP олапарибом. Мы трансфицировали клетки HEK293T 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. 22). Для сравнения результатов относительное количество РНК (описанные выше), осажденных с помощью GAR1 из обработанных олапарибом клеток, были нормированы на относительное количество РНК, осажденных с помощью GAR1 из необработанных клеток (Рис. 23)

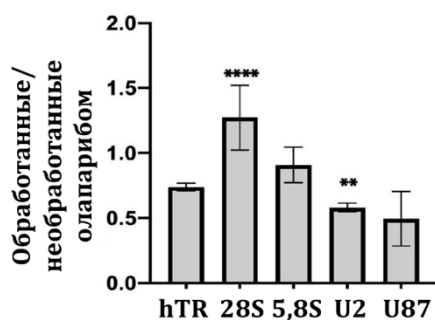


Рис. 23. Анализ изменения эффективности связывания РНК с GAR1 после обработки олапарибом методом RT-qPCR. Уровень РНК, связанной с GAR1, в клетках, обработанных олапарибом, нормировали на

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. 23). Следует отметить, что кратковременная обработка 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. 22А) и подтверждают вывод о том, что ПАРилирование регулирует РНК-связывающую способность Н/АСА-белков.

3.2 Получение линии клеток со стабильным нокадаунм *PARP1*

Мы также протестировали влияние ПАРилирования на РНК-связывающую способность Н/АСА-белков в условиях нокадауна *PARP1* посредством РНК-интерференции. Мы создали стабильную клеточную линию со сниженным уровнем экспрессии *PARP1*, трансдуцировав клетки НЕК293Т лентивирусными частицами, содержащими конструкцию LeGo-Cer [225], кодирующую короткую шпилечную РНК (кшРНК) для подавления экспрессии *PARP1* (кшPARP1), использованную ранее в другой работе [226]. 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. Мы проанализировали

эффективность нокдауна *PARP1* при помощи RT-qPCR и вестерн-блоттинга (Рис. 24).

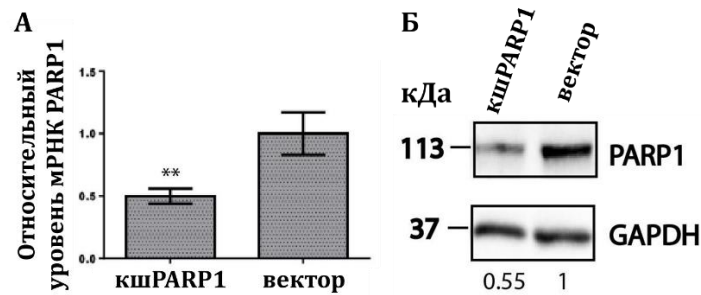


Рис. 24. Анализ эффективности нокдауна *PARP1*. (А) Относительный уровень экспрессии *PARP1* по сравнению с *GAPDH* в клетках, экспрессирующих кшРНК, и контрольных клетках определен с помощью RT-qPCR. ** указывает на двустороннее значение p для непарного t -критерия $< 0,01$. (Б) Уровень белка *PARP1* в лизатах клеток, экспрессирующих кшРНК, и контрольных клетках по вестерн-блоттингу. *GAPDH* – контроль нанесения. Средние значения интенсивности полос были рассчитаны из трех повторов при нормировке на контроль нанесения.

Уровень мРНК *PARP1* снизился в 2 раза (Рис. 24А), а уровень белка *PARP1* снизился в 1,8 раза (Рис. 24Б) в клетках с нокдауном по сравнению с контрольными, как показано с помощью методов RT-qPCR и вестерн-блоттинга соответственно. Полученные линии мы использовали для последующих экспериментов.

3.3 Анализ влияния нокдауна *PARP1* на способность белков *DKC1* и *GAR1* взаимодействовать с РНК-партнерами

Клеточную линию с нокдауном по *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. 25В и Г).

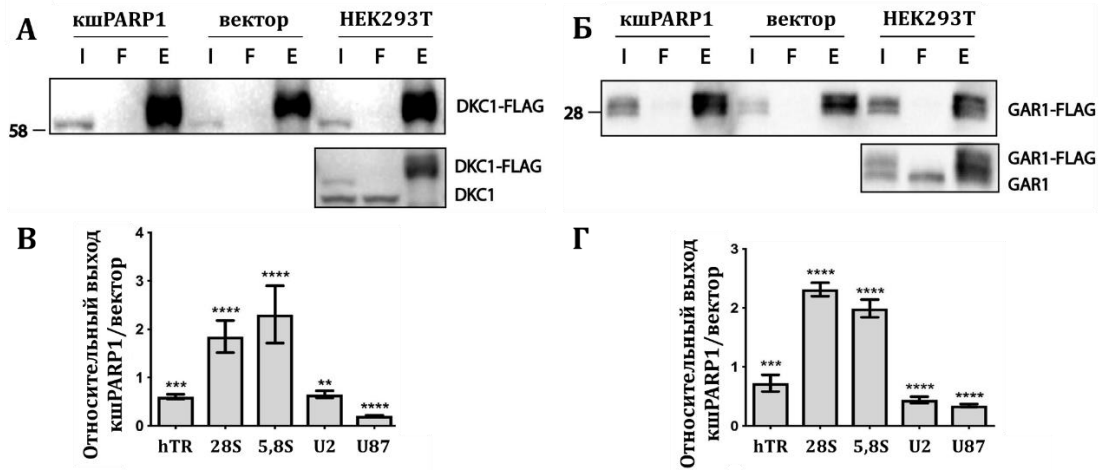


Рис. 25. Анализ РНК-связывающих свойств белков *GAR1* и *DKC1* дикого типа в условиях нокдауна *PARP1*. (А) Иммунопреципитацию *3xFLAG-DKC1* из клеток *HEK293T* контролировали при помощи вестерн-блоттинга с антителами против *FLAG* (верхняя панель) и с антителами против *DKC1* (нижняя панель). *I* – лизат, *F* – просок, *E* – элюат. (Б) То же, 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) То же, что в (В), но для *GAR1*. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$ и ** $P < 0,01$ по критерию множественных сравнений Шидака.

Мы заметили, что количество рибосомной РНК, связанной с *DKC1* (Рис. 25В) и *GAR1* (Рис. 25Г) 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.

3.4 Анализ влияния сверхэкспрессии *PARP1* на способность белка GAR1 взаимодействовать с РНК-партнерами

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 нокдауном *PARP1*. Мы выбрали GAR1 потому, что предыдущий эксперимент продемонстрировал, что мутации приводили к более выраженному снижению ПАРилирования GAR1, чем DKC1 (Рис. 21А). 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. 26А). 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. 26Б).

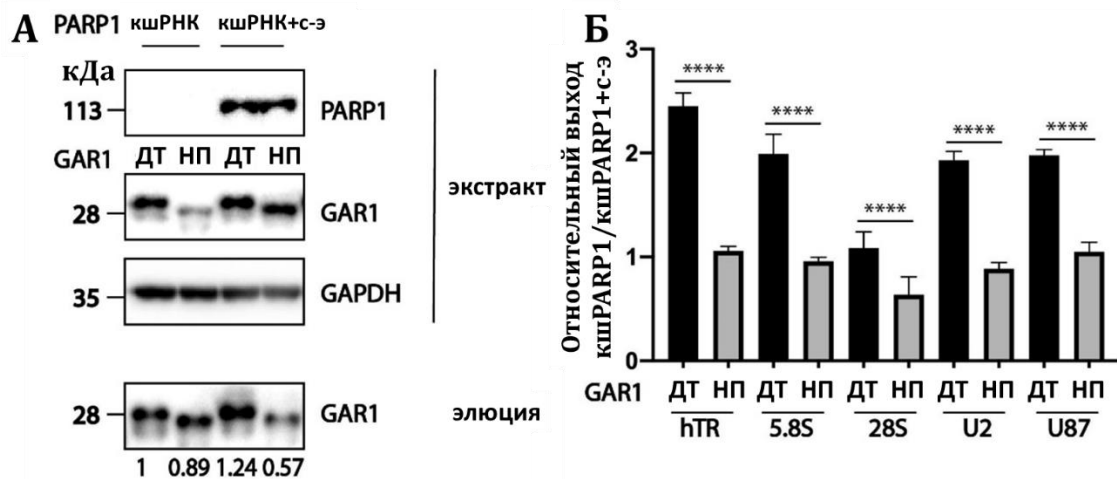


Рис. 26. Анализ влияния сверхэкспрессии PARP1 на ассоциацию GAR1 дикого типа и не ПАРилированного GAR1 с различными молекулами РНК. (А) Анализ содержания PARP1, GAR1 и НП-GAR1 в клеточных лизатах (панель экстракт) и эффективности иммунопреципитации (панель элюция) методом вестерн-блоттинга. (Б) Анализ относительных уровней РНК, коиммунопреципитированной с GAR1 дикого типа (ДТ) и не ПАРилированного мутанта (НП), 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. 26В). Таким образом, мы показали, что сверхэкспрессия PARP1 принципиально влияет на способность белка GAR1 связываться с РНК в отличие от мутантного GAR1.

3.5 Биогенез и активность теломеразы при нокдауне PARP1

ПАРилирование участвует в регуляции поддержания теломер в клетках млекопитающих [227,228]. Кратковременное подавление экспрессии PARP1 путем РНК-интерференции приводит к быстрому укорочению теломер, но не влияет на активность теломеразы [228]. PARP1 ингибирует связывание TRF2 с теломерами, что приводит к их укорочению [229]. Мы проверили влияние стабильного нокдауна *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. 27).

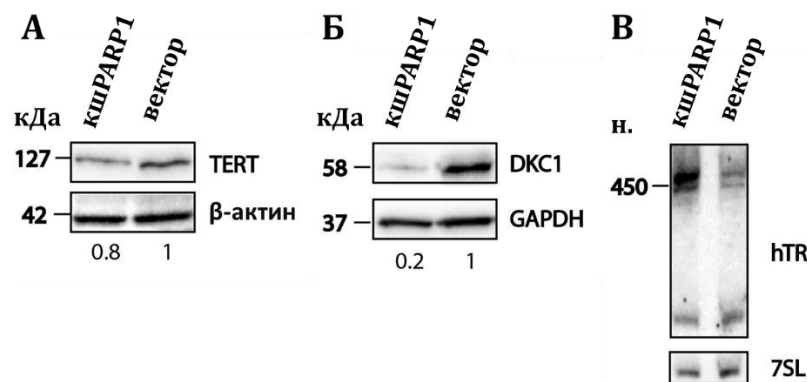


Рис. 27. Уровни *TERT*, *DKC1* и *hTR* при нокдауне *PARP1*. *киPARP1* – клетки, экспрессирующие *киРНК* против *PAPR1*, вектор – контрольные клетки, экспрессирующие пустой вектор. Анализ содержания белка *TERT*(А) и *DKC1*(Б) в лизатах клеток методом вестерн-блоттинга. Относительные средние значения 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 *75L* использовали для контроля количества внесенной в ПЛАГ РНК.

Интересно, что уровни hTERT (Рис. 27А) и DKC1 (Рис. 27Б) существенно снижены в клетках с нокадауном *PARP1*. Однако при нокадауне *PARP1* содержание hTR в клетке увеличивается, тогда как содержание коротких фрагментов деградированной hTR [230] оказывается схожим (Рис. 27В).

Поскольку уровни TERT, DKC1 и hTR изменились, мы проанализировали активность и процессивность теломеразы в условиях недостатка *PARP1*, используя метод RQ-TRAP (Рис. 28).

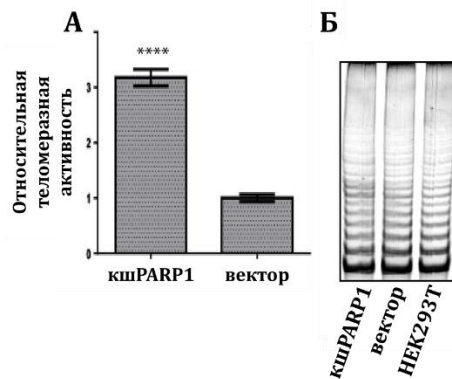


Рис. 28. Анализ теломеразной активности при нокадауне *PARP1*. (А) Анализ теломеразной активности RQ-TRAP в указанных клеточных линиях. **** указывает на двусторонний непарный *t*-критерий *p* со значением $<0,0001$. (Б) Анализ процессивности теломеразы с использованием анализа RQ-TRAP с последующим разделением продуктов ПЦР в ПААГ.

Клетки со сниженным уровнем *PARP1* продемонстрировали повышенный уровень теломеразной активности *in vitro*, как показал анализ методом RQ-TRAP (Рис. 28А), однако на процессивность теломеразы это не повлияло (Рис. 28Б), как мы наблюдали, разделяя продукты RQ-TRAP в ПААГ.

Мы предположили, что снижение содержания *PARP1* влияет на сборку не только Н/АСА-рибонуклеопротеинов, но и теломеразы. Мы

коиммунопреципитировали теломеразный комплекс из клеток HEK293T, экспрессирующих вектор LeGo-Ceg или кшPARP1, используя антитела против hTERT. В результате были выделены сопоставимые уровни hTERT из разных клеточных линий, как было показано методом вестерн-блоттинга (Рис. 29А, нижняя панель), а количество совыделенной hTR, согласно результатам RT-qPCR (Рис. 29Б), оказалось в 3 раза выше в клетках со сниженным содержанием PARP1.

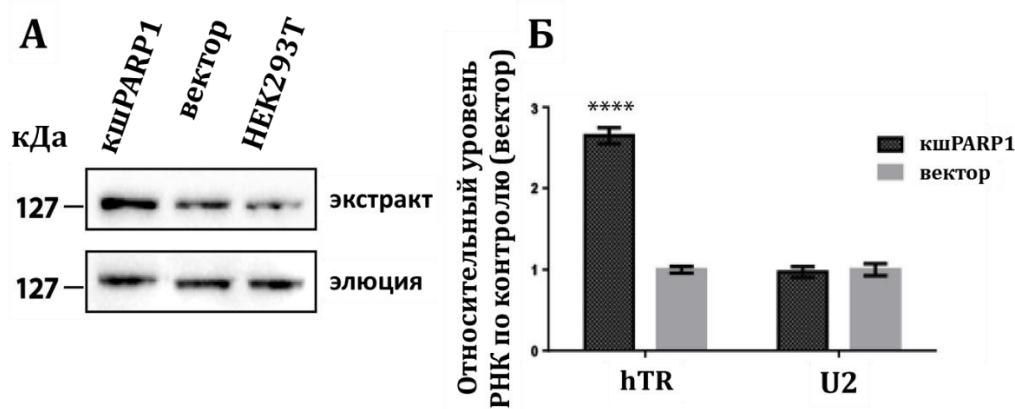


Рис. 29. Анализ влияния PARP1 на сборку теломеразы. (А) Иммунопреципитацию hTERT из лизатов указанных клеточных линий контролировали при помощи вестерн-блоттинга с антителами против hTERT. (Б) Анализ количеств hTR, совыделившихся с hTERT, осуществляли методом RT-qPCR. Относительный уровень hTR, выделенной из лизатов клеток со сниженным содержанием PARP1, нормировали на относительный уровень hTR, выделенной из лизатов контрольных клеток. U2 мРНК использовали в качестве контроля специфичности выделения hTR. **** указывает на двусторонний непарный t-критерий со р-значением <0,0001.

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 (Рис. 30) [231]. После центрифугирования образцы были разобраны на фракции, в которых определили теломеразную активность и содержание hTR.

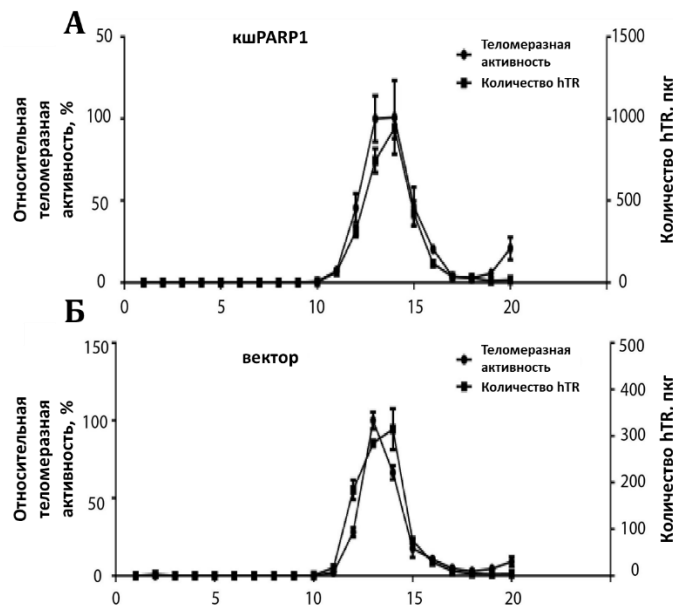


Рис. 30. Анализ теломеразной активности и содержания hTR во фракциях градиента концентраций сахарозы после центрифугирования лизатов клеток. Распределение hTR и теломеразной активности во фракциях градиента концентраций сахарозы после центрифугирования лизатов клеток HEK293T, экспрессирующих кшРНК, нацеленную на мРНК PARP1(A), и пустой вектор LeGo-Cer(B).

В контрольных клетках, а также в клетках с нокдауном *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

(Рис. 30). Результаты подтверждают наши предыдущие данные о том, что содержание hTR в клетках со сниженным содержанием PARP1 в 3 раза выше, чем в клетках, экспрессирующих вектор LeGo-Cer. Таким образом мы показали, что сниженное содержание PARP1 в клетках приводит к стабилизации теломеразного комплекса.

3.6 Влияние PARP1 на длину и структуру теломер

Мы проанализировали влияние повышенной стабильности теломеразного комплекса на длину и структуру теломер при длительном нокадауне *PARP1* (более 50 пассажей клеток) (Рис. 31).

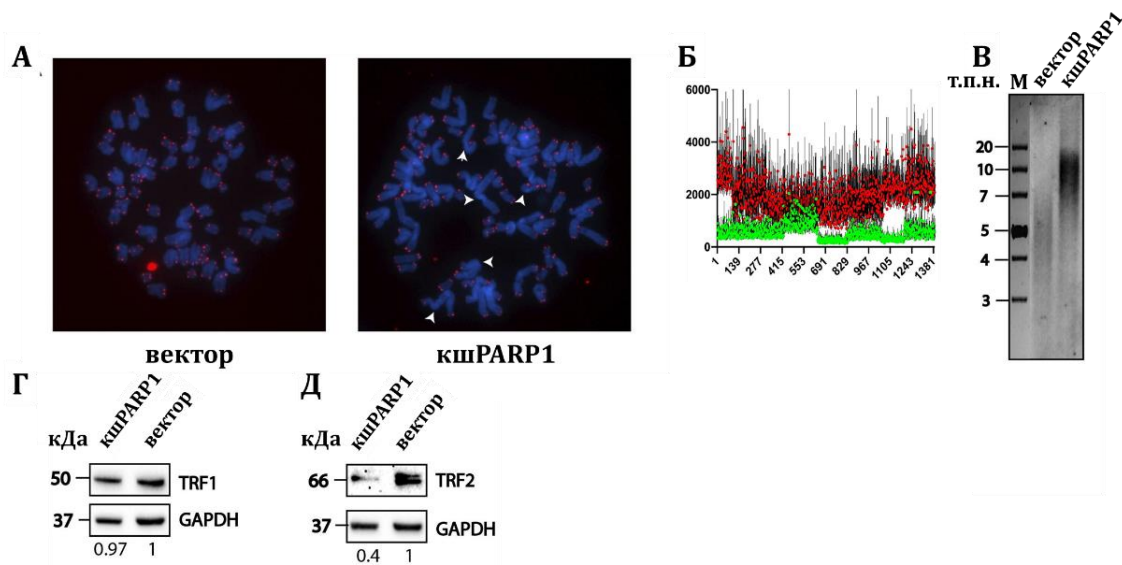


Рис. 31. *PARP1* участвует в регуляции длины и структуры теломер. (А) Анализ теломер методом FISH на метафазных спредах хромосом из клеток, экспрессирующих вектор LeGo-Cer и кшРНК, специфичную для мРНК *PARP1*. Белые стрелки указывают на дефекты в структуре теломер. (Б) Визуализация данных обчета данных FISH теломер, выполненный с помощью программного обеспечения *Telometer* Университета Джонса Хопкинса. Зеленые точки соответствуют теломерам хромосом контрольных клеток (вектор), а красные точки

соответствуют теломерам хромосом клеток с пониженным уровнем PARP1 (киPARP1). (В) Анализ длины рестрикционных фрагментов теломер из клеток с нокдауном PARP1 методом Саузерн-блоттинга. (Г) Анализ содержания белка TRF1 в указанных клеточных линиях методом вестерн-блоттинга. (Д) Анализ содержания белка TRF2 в указанных клеточных линиях методом вестерн-блоттинга. GAPDH – контроль нанесения.

Используя метод FISH для визуализации теломер метафазных спредов хромосом, мы обнаружили увеличение числа слитых хромосом при снижении содержания PARP1 в клетках (Рис. 31А). Детальный качественный и количественный анализ данных микроскопии при помощи программного обеспечения Telometer Университета Джонса Хопкинса (Рис. 31Б), а также определение длины теломер при помощи Саузерн-блоттинга рестрикционных теломерных фрагментов (Рис. 31В) показал ее увеличение в клетках со сниженным содержанием PARP1. Содержание белка TRF1 в клетке не зависит от количества PARP1 в клетках (Рис. 31Г), а содержание TRF2 значительно снизилось при нокдауне PARP1 по сравнению с таковым в контрольной клеточной линии (Рис. 31Д).

3.7 Функциональная роль поли(АДФ-рибозил)ирования белков DKC1 и GAR1

Поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1) играет решающую роль в клеточном ответе на повреждение ДНК [232]. Теломеры, являющиеся специализированными ДНК-белковыми структурами, защищают концы линейных хромосом эукариот от системы распознавания повреждений ДНК [233]. Предыдущие исследования показали, что PARP1 участвует в поддержании длины

теломер. Он взаимодействует с теломерами через белок TRF2, накапливаясь на критически коротких теломерах, защищая их от агентов, повреждающих ДНК. Кроме того, PARP1 участвует в расщеплении Т-петли, привлекая НД-резольвазы [234]. Было обнаружено, что кратковременное ингибирование PARP1 в клетках HeLa с помощью РНК-интерференции или неспецифических химических веществ приводит к укорочению теломер [228]. Однако некоторые исследования показали, что такая обработка лишь незначительно ингибирует танкиразу (паралог PARP1) и не влияет на длину теломер [235]. Примечательно, что мышинные клетки без PARP1 не демонстрируют дисфункцию теломер [227]. В целом данные о влиянии ПАРилирования на длину теломер противоречивы.

Мы провели эксперименты по изучению эффекта длительного ингибирования PARP1 в клетках HEK293T. Стабильно экспрессируя кшРНК, специфичную для мРНК PARP1, мы наблюдали значительное удлинение теломер и накопление различных аномалий теломер, включая концы хромосом без детектируемых теломер и слияние концов хромосом и хроматид. Наблюдаемые эффекты согласуются с предыдущими результатами для клеток, в которых активность PARP1 ингибировали в результате применения соединений, повреждающих ДНК.

Анализ фрагментов рестрикции теломер клеток со сниженной экспрессией *PARP1* после длительного периода культивирования (более 50 пассажей) выявил удлиненные теломеры. При этом мы наблюдали увеличение активности теломеразы в этих клетках. Напротив, кратковременное ингибирование экспрессии *PARP1* приводило к снижению активности теломеразы, в отличие от эффектов длительного ингибирования PARP1. Однако, в соответствии с кратковременным

ингибированием, мы также наблюдали снижение уровней TRF2 в клетках с недостатком PARP1. Это снижение может сделать теломеры более доступными для теломеразы. Кроме того, снизилось содержание hTERT, каталитической субъединицы теломеразы, что соотносится с данными о том, что ингибирование активности PARP1 приводит к снижению уровня транскрипции *hTERT* [236]. Содержание DKC1 и hTERT также снизилось в клетках с нокадауном *PARP1*, что потенциально способствует снижению активности теломеразы. Однако мы наблюдали повышенный уровень теломеразной РНК, что указывает на стабилизацию теломеразного комплекса в отсутствие ПАРилирования.

Для проверки данной гипотезы мы исследовали сборку теломеразного комплекса путем коиммунопреципитации с hTERT и центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы. Во всех случаях hTR присутствовала в активном теломеразном комплексе, и ее содержание было в 3 раза выше для клеток с недостатком PARP1 по сравнению с контрольными клетками.

Мы также показали, что ПАРилирование влияет на связывание РНК белками H/ACA комплекса, такими как DKC1 и GAR1. Эти данные были подтверждены четырьмя различными подходами с использованием точечных мутаций для нейтрализации ПАРилирования этих белков, нокадауна *PAPR1*, ингибирования его активности и сверхэкспрессии *PAPR1* для восстановления его экспрессии в условиях нокадауна.

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. А также при помощи вестерн-блоттинга обнаружено значительное снижение содержания белка TERT при инактивации генов *EST1*, *EST3* и *TER*, кодирующих другие компоненты теломеразного комплекса *H. polymorpha*.

В данной работе мы впервые показали, что поли(АДФ-рибозил)ирование влияет на связывание РНК белками H/ACA-комплекса DKC1 и GAR1 при помощи коиммунопреципитации РНК за белки DKC1 и GAR1, меченные меткой FLAG. 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 провели длительный нокдаун PARP1 в клетках HEK293T, стабильно экспрессируя короткую шпилечную РНК, специфичную для мРНК PARP1. При этом мы наблюдали значительное удлинение теломер при анализе длины рестрикционных фрагментов теломер, а также при помощи метода FISH. Используя

метод FISH мы также выявили накопление различных аномалий теломер, включая концы хромосом без детектируемых теломер и слияние концов хромосом и хроматид.

Мы обнаружили, что содержание белков DKC1 и hTERT снизилось в клетках с нокаутом *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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает особую благодарность своим научным руководителям д.х.н. Рубцовой М.П. и д.х.н. академику РАН Донцовой О.А. за ценные советы, помощь и поддержку по ходу выполнения работы.

Автор признателен к.х.н. Марьясиной С.С. за выполнение экспериментов по ЯМР, которые стали важной и неотъемлемой частью совместной публикации про белок Est3. Кроме того автор также благодарен Савельеву Н.В., который начинал изучать поли(АДФ-рибозил)ирование в контексте функционирования теломеразы в нашей лаборатории и заложил большую основу для завершения проекта. Автор признателен к.х.н. Малявко А.Н. за обучение и наставления при становлении автора как исследователя.

Автор благодарен коллегам к.х.н. Петровой О.А., к.х.н Родиной Е.В., к.ф.-м.н. Ефимову С.В., к.х.н. Манцызову А.Б., д.х.н. Польшакову В.И., д.х.н. Зверевой М.Э., д.х.н. академику РАН Лаврик О.И. за различную помощь, оказанную при выполнении работы, а также сотрудникам, аспирантам и студентам лаборатории химии нуклеопротеидов химического факультета МГУ за разностороннюю помощь и дружескую атмосферу.

В конце я хотел бы поблагодарить всю свою семью за поддержку, в особенности свою супругу Шепелеву Александру, которая всегда вдохновляет меня активно работать, несмотря на возникающие иногда трудности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blackburn E.H. Telomere states and cell fates // *Nature*. 2000. V. 408, № 6808. P. 53–56.
2. Orr-Weaver T.L., Szostak J.W., Rothstein R.J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981. V. 78, № 10. P. 6354–6358.
3. Szostak J.W., Blackburn E.H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors // *Cell*. 1982. V. 29, № 1. P. 245–255.
4. Blackburn E.H., Greider C.W., Szostak J.W. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging // *Nat. Med.* 2006. V. 12, № 10. P. 1133–1138.
5. Greider C.W., Blackburn E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts // *Cell*. 1985. V. 43, № 2 Pt 1. P. 405–413.
6. Morin G.B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats // *Cell*. 1989. V. 59, № 3. P. 521–529.
7. Pfeiffer V., Lingner J. Replication of Telomeres and the Regulation of Telomerase // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013. V. 5, № 5. P. a010405–a010405.
8. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy // *Journal of Theoretical Biology*. 1973. V. 41, № 1. P. 181–190.
9. Chow T.T., Zhao Y., Mak S.S., Shay J.W., Wright W.E. Early and late steps in telomere overhang processing in normal human cells: the position of the final RNA primer drives telomere shortening // *Genes & Development*. 2012. V. 26, № 11. P. 1167–1178.
10. Pfeiffer V., Lingner J. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends // *PLoS Genet*. 2012. V. 8, № 6. P. e1002747.
11. Fumagalli M., Rossiello F., Clerici M., Barozzi S., Cittaro D., Kaplunov J.M., Bucci G., Dobrev M., Matti V., Beausejour C.M., Herbig U., Longhese M.P., d’Adda di Fagagna F. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation // *Nat Cell Biol*. 2012. V. 14, № 4. P. 355–365.
12. Hewitt G., Jurk D., Marques F.D.M., Correia-Melo C., Hardy T., Gackowska A., Anderson R., Taschuk M., Mann J., Passos J.F. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence // *Nat Commun*. 2012. V. 3, № 1. P. 708.
13. Blasco M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond // *Nat. Rev. Genet*. 2005. V. 6, № 8. P. 611–622.
14. MacKenzie D., Watters A.K., To J.T., Young M.W., Muratori J., Wilkoff M.H., Abraham R.G., Plummer M.M., Zhang D. ALT Positivity in Human Cancers: Prevalence and Clinical Insights // *Cancers*. 2021. V. 13, № 10. P. 2384.
15. Holt S.E., Shay J.W. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer // *J. Cell. Physiol*. 1999. V. 180, № 1. P. 10–18.
16. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. Extension of life-span by introduction

- of telomerase into normal human cells // *Science*. 1998. V. 279, № 5349. P. 349–352.
17. Lupatov A.Yu., Yarygin K.N. Telomeres and Telomerase in the Control of Stem Cells // *Biomedicines*. 2022. V. 10, № 10. P. 2335.
 18. Zappulla D.C., Cech T.R. Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101, № 27. P. 10024–10029.
 19. Shepelev N., Dontsova O., Rubtsova M. Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications in Telomerase Biogenesis and Recruitment to Telomeres // *IJMS*. 2023. V. 24, № 5. P. 5027.
 20. Lingner J., Cech T.R., Hughes T.R., Lundblad V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. V. 94, № 21. P. 11190–11195.
 21. Seto A.G., Zaug A.J., Sobel S.G., Wolin S.L., Cech T.R. *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle // *Nature*. 1999. V. 401, № 6749. P. 177–180.
 22. Vasanovich Y., Bajon E., Wellinger R.J. Telomerase biogenesis requires a novel Mex67 function and a cytoplasmic association with the Sm7 complex // *eLife*. 2020. V. 9. P. e60000.
 23. Chappell A.S., Lundblad V. Structural elements required for association of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA with the Est2 reverse transcriptase // *Mol Cell Biol*. 2004. V. 24, № 17. P. 7720–7736.
 24. Lubin J.W., Tucey T.M., Lundblad V. Using Separation-of-Function Mutagenesis To Define the Full Spectrum of Activities Performed by the Est1 Telomerase Subunit *in Vivo* // *Genetics*. 2018. V. 208, № 1. P. 97–110.
 25. Seto A.G. A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast // *Genes & Development*. 2002. V. 16, № 21. P. 2800–2812.
 26. Evans S.K., Lundblad V. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access // *Science*. 1999. V. 286, № 5437. P. 117–120.
 27. Pennock E., Buckley K., Lundblad V. Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication // *Cell*. 2001. V. 104, № 3. P. 387–396.
 28. Tucey T.M., Lundblad V. A Yeast Telomerase Complex Containing the Est1 Recruitment Protein Is Assembled Early in the Cell Cycle // *Biochemistry*. 2013. V. 52, № 7. P. 1131–1133.
 29. Wu Y., Zakian V.A. The telomeric Cdc13 protein interacts directly with the telomerase subunit Est1 to bring it to telomeric DNA ends in vitro // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. V. 108, № 51. P. 20362–20369.
 30. Chen Y.-F., Lu C.-Y., Lin Y.-C., Yu T.-Y., Chang C.-P., Li J.-R., Li H.-W., Lin J.-J. Modulation of yeast telomerase activity by Cdc13 and Est1 in vitro // *Sci Rep*. 2016. V. 6, № 1. P. 34104.
 31. Lebo K.J., Niederer R.O., Zappulla D.C. A second essential function of the Est1-binding arm of yeast telomerase RNA // *RNA*. 2015. V. 21, № 5. P. 862–876.
 32. Peterson S.E., Stellwagen A.E., Diede S.J., Singer M.S., Haimberger Z.W., Johnson C.O., Tzoneva M., Gottschling D.E. The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku // *Nature Genetics*. 2001. V. 27, № 1. P. 64–67.

33. Pflingsten J.S., Goodrich K.J., Taabazuing C., Ouenzar F., Chartrand P., Cech T.R. Mutually Exclusive Binding of Telomerase RNA and DNA by Ku Alters Telomerase Recruitment Model // *Cell*. 2012. V. 148, № 5. P. 922–932.
34. Chen H., Xue J., Churikov D., Hass E.P., Shi S., Lemon L.D., Luciano P., Bertuch A.A., Zappulla D.C., Géli V., Wu J., Lei M. Structural Insights into Yeast Telomerase Recruitment to Telomeres // *Cell*. 2018. V. 172, № 1–2. P. 331–343.e13.
35. Hass E.P., Zappulla D.C. The Ku subunit of telomerase binds Sir4 to recruit telomerase to lengthen telomeres in *S. cerevisiae* // *eLife*. 2015. V. 4.
36. Tucey T.M., Lundblad V. Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex // *Genes & Development*. 2014. V. 28, № 19. P. 2077–2089.
37. Bianco P.R. OB-fold Families of Genome Guardians: A Universal Theme Constructed From the Small β -barrel Building Block // *Front. Mol. Biosci*. 2022. V. 9. P. 784451.
38. Lemieux B., Laterreur N., Perederina A., Noël J.-F., Dubois M.-L., Krasilnikov A.S., Wellinger R.J. Active Yeast Telomerase Shares Subunits with Ribonucleoproteins RNase P and RNase MRP // *Cell*. 2016. V. 165, № 5. P. 1171–1181.
39. Laterreur N., Lemieux B., Neumann H., Berger-Dancause J.-C., Lafontaine D., Wellinger R.J. The yeast telomerase module for telomere recruitment requires a specific RNA architecture // *RNA*. 2018. V. 24, № 8. P. 1067–1079.
40. Garcia P.D., Leach R.W., Wadsworth G.M., Choudhary K., Li H., Aviran S., Kim H.D., Zakian V.A. Stability and nuclear localization of yeast telomerase depend on protein components of RNase P/MRP // *Nat Commun*. 2020. V. 11, № 1. P. 2173.
41. Bartle L., Vasianovich Y., Wellinger R.J. Maturation and shuttling of the yeast telomerase RNP: assembling something new using recycled parts // *Curr Genet*. 2022. V. 68, № 1. P. 3–14.
42. Okamura M., Inose H., Masuda S. RNA Export through the NPC in Eukaryotes // *Genes*. 2015. V. 6, № 1. P. 124–149.
43. Gallardo F., Olivier C., Dandjinou A.T., Wellinger R.J., Chartrand P. TLC1 RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres // *EMBO J*. 2008. V. 27, № 5. P. 748–757.
44. Wu H., Becker D., Krebber H. Telomerase RNA TLC1 Shuttling to the Cytoplasm Requires mRNA Export Factors and Is Important for Telomere Maintenance // *Cell Reports*. 2014. V. 8, № 6. P. 1630–1638.
45. Tang W., Kannan R., Blanchette M., Baumann P. Telomerase RNA biogenesis involves sequential binding by Sm and Lsm complexes // *Nature*. 2012. V. 484, № 7393. P. 260–264.
46. Collopy L.C., Ware T.L., Goncalves T., Kongsstovu S., Yang Q., Amelina H., Pinder C., Alenazi A., Moiseeva V., Pearson S.R., Armstrong C.A., Tomita K. LARP7 family proteins have conserved function in telomerase assembly // *Nat Commun*. 2018. V. 9, № 1. P. 557.
47. Páez-Moscoso D.J., Ho D.V., Pan L., Hildebrand K., Jensen K.L., Levy M.J., Florens L., Baumann P. A putative cap binding protein and the methyl phosphate capping enzyme Bin3/MePCE function in telomerase biogenesis // *Nat Commun*. 2022. V. 13, № 1. P. 1067.

48. Porat J., El Baidouri M., Grigull J., Deragon J.-M., Bayfield M.A. The methyl phosphate capping enzyme Bmc1/Bin3 is a stable component of the fission yeast telomerase holoenzyme // *Nat Commun.* 2022. V. 13, № 1. P. 1277.
49. Rhind N., Chen Z., Yassour M., Thompson D.A., Haas B.J., Habib N., Wapinski I., Roy S., Lin M.F., Heiman D.I., Young S.K., Furuya K., Guo Y., Pidoux A., Chen H.M., Robbertse B., Goldberg J.M., Aoki K., Bayne E.H., Berlin A.M., Desjardins C.A., Dobbs E., Dukaj L., Fan L., FitzGerald M.G., French C., Gujja S., Hansen K., Keifenheim D., Levin J.Z., Mosher R.A., Müller C.A., Pfiffner J., Priest M., Russ C., Smialowska A., Swoboda P., Sykes S.M., Vaughn M., Vengrova S., Yoder R., Zeng Q., Allshire R., Baulcombe D., Birren B.W., Brown W., Ekwall K., Kellis M., Leatherwood J., Levin H., Margalit H., Martienssen R., Nieduszynski C.A., Spatafora J.W., Friedman N., Dalgaard J.Z., Baumann P., Niki H., Regev A., Nusbaum C. Comparative Functional Genomics of the Fission Yeasts // *Science.* 2011. V. 332, № 6032. P. 930–936.
50. Livengood A.J., Zaug A.J., Cech T.R. Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction // *Mol Cell Biol.* 2002. V. 22, № 7. P. 2366–2374.
51. Lin J., Blackburn E.H. Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA // *Genes Dev.* 2004. V. 18, № 4. P. 387–396.
52. Yen W.-F., Chico L., Lei M., Lue N.F. Telomerase regulatory subunit Est3 in two *Candida* species physically interacts with the TEN domain of TERT and telomeric DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2011. V. 108, № 51. P. 20370–20375.
53. Hsu M., Yu E.Y., Singh S.M., Lue N.F. Mutual Dependence of *Candida albicans* Est1p and Est3p in Telomerase Assembly and Activation // *Eukaryotic Cell.* 2007. V. 6, № 8. P. 1330–1338.
54. Hirsch A.G., Becker D., Lamping J.-P., Krebber H. Unraveling the stepwise maturation of the yeast telomerase including a Cse1 and Mtr10 mediated quality control checkpoint // *Sci Rep.* 2021. V. 11, № 1. P. 22174.
55. Smekalova E.M., Malyavko A.N., Zvereva M.I., Mardanov A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G., Westhof E., Dontsova O.A. Specific features of telomerase RNA from *Hansenula polymorpha* // *RNA.* 2013. V. 19, № 11. P. 1563–1574.
56. Červenák F., Juríková K., Devillers H., Kaffe B., Khatib A., Bonnell E., Sopkovičová M., Wellinger R.J., Nosek J., Tzfati Y., Neuvéglise C., Tomáška L. Identification of telomerase RNAs in species of the *Yarrowia* clade provides insights into the co-evolution of telomerase, telomeric repeats and telomere-binding proteins // *Sci Rep.* 2019. V. 9, № 1. P. 13365.
57. Dalby A.B., Goodrich K.J., Pflingsten J.S., Cech T.R. RNA recognition by the DNA end-binding Ku heterodimer // *RNA.* 2013. V. 19, № 6. P. 841–851.
58. Malyavko A.N., Petrova O.A., Zvereva M.I., Polshakov V.I., Dontsova O.A. Telomere length regulation by Rif1 protein from *Hansenula polymorpha* // *Elife.* 2022. V. 11. P. e75010.
59. Ferrezuelo F., Steiner B., Aldea M., Futcher B. Biogenesis of Yeast Telomerase Depends on the Importin Mtr10 // *Mol Cell Biol.* 2002. V. 22, № 17. P. 6046–6055.
60. Taggart A.K.P., Teng S.-C., Zakian V.A. Est1p As a Cell Cycle-Regulated Activator of Telomere-Bound Telomerase // *Science.* 2002. V. 297, № 5583. P. 1023–1026.

61. Osterhage J.L., Talley J.M., Friedman K.L. Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle–restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2006. V. 13, № 8. P. 720–728.
62. Ferguson J.L., Chao W.C.H., Lee E., Friedman K.L. The Anaphase Promoting Complex Contributes to the Degradation of the *S. cerevisiae* Telomerase Recruitment Subunit Est1p // *PLoS ONE* / ed. by Lustig A.J. 2013. V. 8, № 1. P. e55055.
63. Lin K.-W., McDonald K.R., Guise A.J., Chan A., Cristea I.M., Zakian V.A. Proteomics of yeast telomerase identified Cdc48-Npl4-Ufd1 and Ufd4 as regulators of Est1 and telomere length // *Nat Commun*. 2015. V. 6, № 1. P. 8290.
64. Tuzon C.T., Wu Y., Chan A., Zakian V.A. The *Saccharomyces cerevisiae* Telomerase Subunit Est3 Binds Telomeres in a Cell Cycle– and Est1–Dependent Manner and Interacts Directly with Est1 In Vitro // *PLoS Genetics* / ed. by Biggins S. 2011. V. 7, № 5. P. e1002060.
65. Zhao X., Blobel G. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. V. 102, № 13. P. 4777–4782.
66. Ferreira H.C., Luke B., Schober H., Kalck V., Lingner J., Gasser S.M. The PIAS homologue Siz2 regulates perinuclear telomere position and telomerase activity in budding yeast // *Nat Cell Biol*. 2011. V. 13, № 7. P. 867–874.
67. Hang L.E., Lopez C.R., Liu X., Williams J.M., Chung I., Wei L., Bertuch A.A., Zhao X. Regulation of Ku-DNA Association by Yku70 C-terminal Tail and SUMO Modification // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. V. 289, № 15. P. 10308–10317.
68. Hang L.E., Liu X., Cheung I., Yang Y., Zhao X. SUMOylation regulates telomere length homeostasis by targeting Cdc13 // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2011. V. 18, № 8. P. 920–926.
69. Carballar R., Martínez-Láinez J.M., Samper B., Bru S., Bállega E., Mirallas O., Ricco N., Clotet J., Jiménez J. CDK-mediated Yku80 Phosphorylation Regulates the Balance Between Non-homologous End Joining (NHEJ) and Homologous Directed Recombination (HDR) // *Journal of Molecular Biology*. 2020. V. 432, № 24. P. 166715.
70. Henriksen P., Wagner S.A., Weinert B.T., Sharma S., Bacinskaja G., Rehman M., Juffer A.H., Walther T.C., Lisby M., Choudhary C. Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol Cell Proteomics*. 2012. V. 11, № 11. P. 1510–1522.
71. Swaney D.L., Beltrao P., Starita L., Guo A., Rush J., Fields S., Krogan N.J., Villén J. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation // *Nat Methods*. 2013. V. 10, № 7. P. 676–682.
72. Lanz M.C., Yugandhar K., Gupta S., Sanford E.J., Faça V.M., Vega S., Joiner A.M.N., Fromme J.C., Yu H., Smolka M.B. In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome // *EMBO Rep*. 2021. V. 22, № 2. P. e51121.
73. Bertuch A.A. The molecular genetics of the telomere biology disorders // *RNA Biology*. 2016. V. 13, № 8. P. 696–706.
74. Heiss N.S., Knight S.W., Vulliamy T.J., Klauck S.M., Wiemann S., Mason P.J., Poustka A., Dokal I. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a

- highly conserved gene with putative nucleolar functions // *Nat Genet.* 1998. V. 19, № 1. P. 32–38.
75. Armanios M., Chen J.-L., Chang Y.-P.C., Brodsky R.A., Hawkins A., Griffin C.A., Eshleman J.R., Cohen A.R., Chakravarti A., Hamosh A., Greider C.W. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. V. 102, № 44. P. 15960–15964.
 76. Vulliamy T., Marrone A., Goldman F., Dearlove A., Bessler M., Mason P.J., Dokal I. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita // *Nature.* 2001. V. 413, № 6854. P. 432–435.
 77. Savage S.A., Giri N., Baerlocher G.M., Orr N., Lansdorp P.M., Alter B.P. TIN2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita // *Am J Hum Genet.* 2008. V. 82, № 2. P. 501–509.
 78. Weinrich S.L., Pruzan R., Ma L., Ouellette M., Tesmer V.M., Holt S.E., Bodnar A.G., Lichtsteiner S., Kim N.W., Trager J.B., Taylor R.D., Carlos R., Andrews W.H., Wright W.E., Shay J.W., Harley C.B., Morin G.B. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT // *Nat. Genet.* 1997. V. 17, № 4. P. 498–502.
 79. Beattie T.L., Zhou W., Robinson M.O., Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro // *Current Biology.* 1998. V. 8, № 3. P. 177–180.
 80. Egan E.D., Collins K. Specificity and Stoichiometry of Subunit Interactions in the Human Telomerase Holoenzyme Assembled *In Vivo* // *Mol Cell Biol.* 2010. V. 30, № 11. P. 2775–2786.
 81. Chen J.-L., Blasco M.A., Greider C.W. Secondary Structure of Vertebrate Telomerase RNA // *Cell.* 2000. V. 100, № 5. P. 503–514.
 82. Autexier C., Lue N.F. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase // *Annu. Rev. Biochem.* 2006. V. 75, № 1. P. 493–517.
 83. Wu R.A., Dagdas Y.S., Yilmaz S.T., Yildiz A., Collins K. Single-molecule imaging of telomerase reverse transcriptase in human telomerase holoenzyme and minimal RNP complexes // *eLife.* 2015. V. 4. P. e08363.
 84. Yi X., Tesmer V.M., Savre-Train I., Shay J.W., Wright W.E. Both Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms Regulate Human Telomerase Template RNA Levels // *Mol Cell Biol.* 1999. V. 19, № 6. P. 3989–3997.
 85. Mitchell J.R., Cheng J., Collins K. A Box H/ACA Small Nucleolar RNA-Like Domain at the Human Telomerase RNA 3' End // *Mol Cell Biol.* 1999. V. 19, № 1. P. 567–576.
 86. Cioce M., Lamond A.I. Cajal bodies: a long history of discovery // *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005. V. 21. P. 105–131.
 87. Chen J.-L. A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA // *Nucleic Acids Research.* 2002. V. 30, № 2. P. 592–597.
 88. Egan E.D., Collins K. An enhanced H/ACA RNP assembly mechanism for human telomerase RNA // *Mol Cell Biol.* 2012. V. 32, № 13. P. 2428–2439.
 89. Richard P., Darzacq X., Bertrand E., Jány B.E., Verheggen C., Kiss T. A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs // *EMBO J.* 2003. V. 22, № 16. P. 4283–4293.
 90. Tollervey D., Kiss T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs // *Current Opinion in Cell Biology.* 1997. V. 9, № 3. P. 337–342.

91. Hargrove B.W., Bhattacharyya A., Domitrovich A.M., Kapler G.M., Kirk K., Shippen D.E., Kunkel G.R. Identification of an essential proximal sequence element in the promoter of the telomerase RNA gene of *Tetrahymena thermophila* // *Nucleic Acids Research*. 1999. V. 27, № 21. P. 4269–4275.
92. Kiss T. Biogenesis of small nuclear RNPs // *Journal of Cell Science*. 2004. V. 117, № 25. P. 5949–5951.
93. Rubtsova M.P., Vasilkova D.P., Moshareva M.A., Malyavko A.N., Meerson M.B., Zatsepin T.S., Naraykina Y.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Dontsova O.A. Integrator is a key component of human telomerase RNA biogenesis // *Sci Rep*. 2019. V. 9, № 1. P. 1701.
94. Theimer C.A., Jády B.E., Chim N., Richard P., Breece K.E., Kiss T., Feigon J. Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals // *Mol Cell*. 2007. V. 27, № 6. P. 869–881.
95. Kiss T., Fayet E., Jady B.E., Richard P., Weber M. Biogenesis and Intranuclear Trafficking of Human Box C/D and H/ACA RNPs // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2006. V. 71, № 0. P. 407–417.
96. Pogacic V., Dragon F., Filipowicz W. Human H/ACA Small Nucleolar RNPs and Telomerase Share Evolutionarily Conserved Proteins NHP2 and NOP10 // *Mol Cell Biol*. 2000. V. 20, № 23. P. 9028–9040.
97. Fu D., Collins K. Purification of Human Telomerase Complexes Identifies Factors Involved in Telomerase Biogenesis and Telomere Length Regulation // *Molecular Cell*. 2007. V. 28, № 5. P. 773–785.
98. Nguyen T.H.D. Structural biology of human telomerase: progress and prospects // *Biochemical Society Transactions*. 2021. V. 49, № 5. P. 1927–1939.
99. Hoareau-Aveilla C., Bonoli M., Caizergues-Ferrer M., Henry Y. hNaf1 is required for accumulation of human box H/ACA snoRNPs, scaRNPs, and telomerase // *RNA*. 2006. V. 12, № 5. P. 832–840.
100. Machado-Pinilla R., Liger D., Leulliot N., Meier U.T. Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs // *RNA*. 2012. V. 18, № 10. P. 1833–1845.
101. Grozdanov P.N., Roy S., Kittur N., Meier U.T. SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs // *RNA*. 2009. V. 15, № 6. P. 1188–1197.
102. Walbott H., Machado-Pinilla R., Liger D., Blaud M., Réty S., Grozdanov P.N., Godin K., van Tilbeurgh H., Varani G., Meier U.T., Leulliot N. The H/ACA RNP assembly factor SHQ1 functions as an RNA mimic // *Genes Dev*. 2011. V. 25, № 22. P. 2398–2408.
103. Boulon S., Marmier-Gourrier N., Pradet-Balade B., Wurth L., Verheggen C., Jády B.E., Rothé B., Pescia C., Robert M.-C., Kiss T., Bardoni B., Krol A., Branlant C., Allmang C., Bertrand E., Charpentier B. The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery // *Journal of Cell Biology*. 2008. V. 180, № 3. P. 579–595.
104. Venteicher A.S., Meng Z., Mason P.J., Veenstra T.D., Artandi S.E. Identification of ATPases Pontin and Reptin as Telomerase Components Essential for Holoenzyme Assembly // *Cell*. 2008. V. 132, № 6. P. 945–957.

105. Darzacq X., Kittur N., Roy S., Shav-Tal Y., Singer R.H., Meier U.T. Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells // *Journal of Cell Biology*. 2006. V. 173, № 2. P. 207–218.
106. Ashbridge B., Orte A., Yeoman J.A., Kirwan M., Vulliamy T., Dokal I., Klenerman D., Balasubramanian S. Single-Molecule Analysis of the Human Telomerase RNA·Dyskerin Interaction and the Effect of Dyskeratosis Congenita Mutations // *Biochemistry*. 2009. V. 48, № 46. P. 10858–10865.
107. Leulliot N., Godin K.S., Hoareau-Aveilla C., Quevillon-Cheruel S., Varani G., Henry Y., Van Tilbeurgh H. The Box H/ACA RNP Assembly Factor Naf1p Contains a Domain Homologous to Gar1p Mediating its Interaction with Cbf5p // *Journal of Molecular Biology*. 2007. V. 371, № 5. P. 1338–1353.
108. Fatica A., Dlakić M., Tollervey D. Naf1p is a box H/ACA snoRNP assembly factor // *RNA*. 2002. V. 8, № 12. P. 1502–1514.
109. Zeng X.-L., Thumati N.R., Fleisig H.B., Hukezalie K.R., Savage S.A., Giri N., Alter B.P., Wong J.M.Y. The accumulation and not the specific activity of telomerase ribonucleoprotein determines telomere maintenance deficiency in X-linked dyskeratosis congenita // *Hum Mol Genet*. 2012. V. 21, № 4. P. 721–729.
110. Vulliamy T., Beswick R., Kirwan M., Marrone A., Digweed M., Walne A., Dokal I. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105, № 23. P. 8073–8078.
111. Walne A.J., Vulliamy T., Marrone A., Beswick R., Kirwan M., Masunari Y., Al-Qurashi F.-H., Aljurf M., Dokal I. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10 // *Hum Mol Genet*. 2007. V. 16, № 13. P. 1619–1629.
112. Stanley S.E., Gable D.L., Wagner C.L., Carlile T.M., Hanumanthu V.S., Podlevsky J.D., Khalil S.E., DeZern A.E., Rojas-Duran M.F., Applegate C.D., Alder J.K., Parry E.M., Gilbert W.V., Armanios M. Loss-of-function mutations in the RNA biogenesis factor NAF1 predispose to pulmonary fibrosis-emphysema // *Sci Transl Med*. 2016. V. 8, № 351. P. 351ra107.
113. Hebert M.D., Poole A.R. Towards an understanding of regulating Cajal body activity by protein modification // *RNA Biology*. 2017. V. 14, № 6. P. 761–778.
114. Zhu Y., Tomlinson R.L., Lukowiak A.A., Terns R.M., Terns M.P. Telomerase RNA Accumulates in Cajal Bodies in Human Cancer Cells // *MBoC*. 2004. V. 15, № 1. P. 81–90.
115. Jády B.E., Bertrand E., Kiss T. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal // *J Cell Biol*. 2004. V. 164, № 5. P. 647–652.
116. Venteicher A.S., Abreu E.B., Meng Z., McCann K.E., Terns R.M., Veenstra T.D., Terns M.P., Artandi S.E. A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis // *Science*. 2009. V. 323, № 5914. P. 644–648.
117. Zhong F., Savage S.A., Shkreli M., Giri N., Jessop L., Myers T., Chen R., Alter B.P., Artandi S.E. Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita // *Genes Dev*. 2011. V. 25, № 1. P. 11–16.

118. Al-Masraf B.S., Perez G.I., Adams-Boone K., Cohen S.B., Han L., Yu K., Schmidt J.C. TCAB1 prevents nucleolar accumulation of the telomerase RNA to promote telomerase assembly: preprint. *Cell Biology*, 2021.
119. Vogan J.M., Zhang X., Youmans D.T., Regalado S.G., Johnson J.Z., Hockemeyer D., Collins K. Minimized human telomerase maintains telomeres and resolves endogenous roles of H/ACA proteins, TCAB1, and Cajal bodies // *eLife*. 2016. V. 5. P. e18221.
120. Chen L., Roake C.M., Freund A., Batista P.J., Tian S., Yin Y.A., Gajera C.R., Lin S., Lee B., Pech M.F., Venteicher A.S., Das R., Chang H.Y., Artandi S.E. An Activity Switch in Human Telomerase Based on RNA Conformation and Shaped by TCAB1 // *Cell*. 2018. V. 174, № 1. P. 218-230.e13.
121. Ghanim G.E., Fountain A.J., van Roon A.-M.M., Rangan R., Das R., Collins K., Nguyen T.H.D. Structure of human telomerase holoenzyme with bound telomeric DNA // *Nature*. 2021. V. 593, № 7859. P. 449–453.
122. Freund A., Zhong F.L., Venteicher A.S., Meng Z., Veenstra T.D., Frydman J., Artandi S.E. Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1 // *Cell*. 2014. V. 159, № 6. P. 1389–1403.
123. Vogan J.M., Collins K. Dynamics of Human Telomerase Holoenzyme Assembly and Subunit Exchange across the Cell Cycle // *J Biol Chem*. 2015. V. 290, № 35. P. 21320–21335.
124. Nguyen T.H.D., Tam J., Wu R.A., Greber B.J., Toso D., Nogales E., Collins K. Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme // *Nature*. 2018. V. 557, № 7704. P. 190–195.
125. Keppler B.R., Grady A.T., Jarstfer M.B. The Biochemical Role of the Heat Shock Protein 90 Chaperone Complex in Establishing Human Telomerase Activity // *Journal of Biological Chemistry*. 2006. V. 281, № 29. P. 19840–19848.
126. Toogun O.A., DeZwaan D.C., Freeman B.C. The Hsp90 Molecular Chaperone Modulates Multiple Telomerase Activities // *Mol Cell Biol*. 2008. V. 28, № 1. P. 457–467.
127. Jackson S.E. Hsp90: structure and function // *Top Curr Chem*. 2013. V. 328. P. 155–240.
128. Woo S.H., An S., Lee H.-C., Jin H.-O., Seo S.-K., Yoo D.-H., Lee K.-H., Rhee C.H., Choi E.-J., Hong S.-I., Park I.-C. A Truncated Form of p23 Down-regulates Telomerase Activity via Disruption of Hsp90 Function // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. V. 284, № 45. P. 30871–30880.
129. Lee J.H., Chung I.K. Curcumin inhibits nuclear localization of telomerase by dissociating the Hsp90 co-chaperone p23 from hTERT // *Cancer Letters*. 2010. V. 290, № 1. P. 76–86.
130. Holt S.E., Aisner D.L., Baur J., Tesmer V.M., Dy M., Ouellette M., Trager J.B., Morin G.B., Toft D.O., Shay J.W., Wright W.E., White M.A. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes // *Genes & Development*. 1999. V. 13, № 7. P. 817–826.
131. Her J., Chung I.K. The AAA-ATPase NVL2 is a telomerase component essential for holoenzyme assembly // *Biochem Biophys Res Commun*. 2012. V. 417, № 3. P. 1086–1092.

132. Bachand F., Boisvert F.-M., Côté J., Richard S., Autexier C. The Product of the *Survival of Motor Neuron* (*SMN*) Gene is a Human Telomerase-associated Protein // *MBoC* / ed. by Wickens M.P. 2002. V. 13, № 9. P. 3192–3202.
133. Pellizzoni L., Baccon J., Charroux B., Dreyfuss G. The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1 // *Current Biology*. 2001. V. 11, № 14. P. 1079–1088.
134. Whitehead S.E., Jones K.W., Zhang X., Cheng X., Terns R.M., Terns M.P. Determinants of the interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the dimethylarginine-modified box H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein GAR1 // *J Biol Chem*. 2002. V. 277, № 50. P. 48087–48093.
135. Yan P., Benhattar J., Seelentag W., Stehle J.-C., Bosman F.T. Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues // *Histochem Cell Biol*. 2004. V. 121, № 5. P. 391–397.
136. Lin J., Jin R., Zhang B., Yang P.X., Chen H., Bai Y.X., Xie Y., Huang C., Huang J. Characterization of a novel effect of hPinX1 on hTERT nucleolar localization // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007. V. 353, № 4. P. 946–952.
137. Wong J.M.Y., Kusdra L., Collins K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage // *Nat Cell Biol*. 2002. V. 4, № 9. P. 731–736.
138. Tomlinson R.L., Ziegler T.D., Supakorndej T., Terns R.M., Terns M.P. Cell Cycle-regulated Trafficking of Human Telomerase to Telomeres // *MBoC*. 2006. V. 17, № 2. P. 955–965.
139. Etheridge K.T., Banik S.S.R., Armbruster B.N., Zhu Y., Terns R.M., Terns M.P., Counter C.M. The Nucleolar Localization Domain of the Catalytic Subunit of Human Telomerase // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. V. 277, № 27. P. 24764–24770.
140. Lee J.H., Lee Y.S., Jeong S.A., Khadka P., Roth J., Chung I.K. Catalytically active telomerase holoenzyme is assembled in the dense fibrillar component of the nucleolus during S phase // *Histochem Cell Biol*. 2014. V. 141, № 2. P. 137–152.
141. Khurts S., Masutomi K., Delgermaa L., Arai K., Oishi N., Mizuno H., Hayashi N., Hahn W.C., Murakami S. Nucleolin Interacts with Telomerase // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. V. 279, № 49. P. 51508–51515.
142. Lin J., Jin R., Zhang B., Chen H., Bai Y.X., Yang P.X., Han S.W., Xie Y.H., Huang P.T., Huang C., Huang J.J. Nucleolar localization of TERT is unrelated to telomerase function in human cells // *Journal of Cell Science*. 2008. V. 121, № 13. P. 2169–2176.
143. Laprade H., Querido E., Smith M.J., Guérit D., Crimmins H., Conomos D., Pourret E., Chartrand P., Sfeir A. Single-Molecule Imaging of Telomerase RNA Reveals a Recruitment-Retention Model for Telomere Elongation // *Molecular Cell*. 2020. V. 79, № 1. P. 115-126.e6.
144. Chiba K., Vogan J.M., Wu R.A., Gill M.S., Zhang X., Collins K., Hockemeyer D. Endogenous Telomerase Reverse Transcriptase N-Terminal Tagging Affects Human Telomerase Function at Telomeres *In Vivo* // *Mol Cell Biol*. 2017. V. 37, № 3. P. e00541-16.
145. Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications // *Nature*. 2000. V. 403, № 6765. P. 41–45.

146. Girard C., Verheggen C., Neel H., Cammas A., Vagner S., Soret J., Bertrand E., Bordonné R. Characterization of a Short Isoform of Human Tgs1 Hypermethylase Associating with Small Nucleolar Ribonucleoprotein Core Proteins and Produced by Limited Proteolytic Processing // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. V. 283, № 4. P. 2060–2069.
147. Buemi V., Schillaci O., Santorsola M., Bonazza D., Broccia P.V., Zappone A., Bottin C., Dell’Omo G., Kengne S., Cacchione S., Raffa G.D., Piazza S., di Fagagna F. d’Adda, Benetti R., Cortale M., Zanconati F., Del Sal G., Schoeftner S. TGS1 mediates 2,2,7-trimethyl guanosine capping of the human telomerase RNA to direct telomerase dependent telomere maintenance // *Nat Commun*. 2022. V. 13, № 1. P. 2302.
148. Chen L., Roake C.M., Galati A., Bavasso F., Micheli E., Saggio I., Schoeftner S., Cacchione S., Gatti M., Artandi S.E., Raffa G.D. Loss of Human TGS1 Hypermethylase Promotes Increased Telomerase RNA and Telomere Elongation // *Cell Rep*. 2020. V. 30, № 5. P. 1358-1372.e5.
149. Nguyen D., Grenier St-Sauveur V., Bergeron D., Dupuis-Sandoval F., Scott M.S., Bachand F. A Polyadenylation-Dependent 3’ End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA // *Cell Reports*. 2015. V. 13, № 10. P. 2244–2257.
150. Machyna M., Kehr S., Straube K., Kappei D., Buchholz F., Butter F., Ule J., Hertel J., Stadler P.F., Neugebauer K.M. The Coilin Interactome Identifies Hundreds of Small Noncoding RNAs that Traffic through Cajal Bodies // *Molecular Cell*. 2014. V. 56, № 3. P. 389–399.
151. Boulon S., Verheggen C., Jady B.E., Girard C., Pescia C., Paul C., Ospina J.K., Kiss T., Matera A.G., Bordonné R., Bertrand E. PHAX and CRM1 Are Required Sequentially to Transport U3 snoRNA to Nucleoli // *Molecular Cell*. 2004. V. 16, № 5. P. 777–787.
152. Bizarro J., Bhardwaj A., Smith S., Meier U.T. Nopp140-mediated concentration of telomerase in Cajal bodies regulates telomere length // *Mol Biol Cell*. 2019. V. 30, № 26. P. 3136–3150.
153. Isaac C., Yang Y., Meier U.T. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies // *J Cell Biol*. 1998. V. 142, № 2. P. 319–329.
154. Tomlinson R.L., Abreu E.B., Ziegler T., Ly H., Counter C.M., Terns R.M., Terns M.P. Telomerase Reverse Transcriptase Is Required for the Localization of Telomerase RNA to Cajal Bodies and Telomeres in Human Cancer Cells // *MBoC* / ed. by Matera A.G. 2008. V. 19, № 9. P. 3793–3800.
155. Schmidt J.C., Zaug A.J., Cech T.R. Live Cell Imaging Reveals the Dynamics of Telomerase Recruitment to Telomeres // *Cell*. 2016. V. 166, № 5. P. 1188-1197.e9.
156. Trinkle-Mulcahy L., Sleeman J.E. The Cajal body and the nucleolus: “In a relationship” or “It’s complicated”? // *RNA Biology*. 2017. V. 14, № 6. P. 739–751.
157. Tseng C.-K., Wang H.-F., Burns A.M., Schroeder M.R., Gaspari M., Baumann P. Human Telomerase RNA Processing and Quality Control // *Cell Rep*. 2015. V. 13, № 10. P. 2232–2243.
158. Pakhomova T., Moshareva M., Vasilkova D., Zatsepin T., Dontsova O., Rubtsova M. Role of RNA Biogenesis Factors in the Processing and Transport of Human Telomerase RNA // *Biomedicines*. 2022. V. 10, № 6. P. 1275.

159. Roake C.M., Chen L., Chakravarthy A.L., Ferrell J.E., Raffa G.D., Artandi S.E. Disruption of Telomerase RNA Maturation Kinetics Precipitates Disease // *Mol Cell*. 2019. V. 74, № 4. P. 688-700.e3.
160. Qin J., Autexier C. Regulation of human telomerase RNA biogenesis and localization // *RNA Biology*. 2021. V. 18, № 3. P. 305–315.
161. Becker J., Barysch S.V., Karaca S., Dittner C., Hsiao H.-H., Diaz M.B., Herzig S., Urlaub H., Melchior F. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues // *Nat Struct Mol Biol*. 2013. V. 20, № 4. P. 525–531.
162. Hendriks I.A., D'Souza R.C.J., Yang B., Verlaan-de Vries M., Mann M., Vertegaal A.C.O. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner // *Nat Struct Mol Biol*. 2014. V. 21, № 10. P. 927–936.
163. Impens F., Radoshevich L., Cossart P., Ribet D. Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. V. 111, № 34. P. 12432–12437.
164. Xiao Z., Chang J.-G., Hendriks I.A., Sigurdsson J.O., Olsen J.V., Vertegaal A.C.O. System-wide Analysis of SUMOylation Dynamics in Response to Replication Stress Reveals Novel Small Ubiquitin-like Modified Target Proteins and Acceptor Lysines Relevant for Genome Stability // *Mol Cell Proteomics*. 2015. V. 14, № 5. P. 1419–1434.
165. Hendriks I.A., Lyon D., Young C., Jensen L.J., Vertegaal A.C.O., Nielsen M.L. Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation // *Nat Struct Mol Biol*. 2017. V. 24, № 3. P. 325–336.
166. Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins // *Nature*. 2009. V. 458, № 7237. P. 422–429.
167. MacNeil D.E., Lambert-Lanteigne P., Qin J., McManus F.P., Bonneil E., Thibault P., Autexier C. SUMOylation- and GAR1-Dependent Regulation of Dyskerin Nuclear and Subnuclear Localization // *Mol Cell Biol*. 2021. V. 41, № 4. P. e00464-20.
168. Kim J.H., Lee J.M., Nam H.J., Choi H.J., Yang J.W., Lee J.S., Kim M.H., Kim S.-I., Chung C.H., Kim K.I., Baek S.H. SUMOylation of pontin chromatin-remodeling complex reveals a signal integration code in prostate cancer cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. V. 104, № 52. P. 20793–20798.
169. Kim J.H., Choi H.J., Kim B., Kim M.H., Lee J.M., Kim I.S., Lee M.H., Choi S.J., Kim K.I., Kim S.-I., Chung C.H., Baek S.H. Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis // *Nat Cell Biol*. 2006. V. 8, № 6. P. 631–639.
170. Jobert L., Skjeldam H.K., Dalhus B., Galashevskaya A., Vågbø C.B., Bjørås M., Nilsen H. The human base excision repair enzyme SMUG1 directly interacts with DKC1 and contributes to RNA quality control // *Mol Cell*. 2013. V. 49, № 2. P. 339–345.
171. Kroustallaki P., Lirussi L., Carracedo S., You P., Esbensen Q.Y., Götz A., Jobert L., Alsøe L., Sætrom P., Gagos S., Nilsen H. SMUG1 Promotes Telomere Maintenance through Telomerase RNA Processing // *Cell Reports*. 2019. V. 28, № 7. P. 1690-1702.e10.
172. Olsen J.V., Vermeulen M., Santamaria A., Kumar C., Miller M.L., Jensen L.J., Gnad F., Cox J., Jensen T.S., Nigg E.A., Brunak S., Mann M. Quantitative

- phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis // *Sci Signal*. 2010. V. 3, № 104. P. ra3.
173. Cifuentes-Rojas C., Shippen D.E. Telomerase regulation // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012. V. 730, № 1–2. P. 20–27.
 174. Noël J.-F., Larose S., Abou Elela S., Wellinger R.J. Budding yeast telomerase RNA transcription termination is dictated by the Nrd1/Nab3 non-coding RNA termination pathway // *Nucleic Acids Res*. 2012. V. 40, № 12. P. 5625–5636.
 175. Dionne I., Larose S., Dandjinou A.T., Abou Elela S., Wellinger R.J. Cell cycle-dependent transcription factors control the expression of yeast telomerase RNA // *RNA*. 2013. V. 19, № 7. P. 992–1002.
 176. Hrdličková R., Nehyba J., Bose H.R. Alternatively Spliced Telomerase Reverse Transcriptase Variants Lacking Telomerase Activity Stimulate Cell Proliferation // *Mol Cell Biol*. 2012. V. 32, № 21. P. 4283–4296.
 177. Grandin N., Charbonneau M. Hsp90 levels affect telomere length in yeast // *Mol Genet Genomics*. 2001. V. 265, № 1. P. 126–134.
 178. Toogun O.A., Zeiger W., Freeman B.C. The p23 molecular chaperone promotes functional telomerase complexes through DNA dissociation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. V. 104, № 14. P. 5765–5770.
 179. Chan A., Boulé J.-B., Zakian V.A. Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres // *PLoS Genet*. 2008. V. 4, № 10. P. e1000236.
 180. Stellwagen A.E., Haimberger Z.W., Veatch J.R., Gottschling D.E. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends // *Genes Dev*. 2003. V. 17, № 19. P. 2384–2395.
 181. Abreu E., Arintonovska E., Reichenbach P., Cristofari G., Culp B., Terns R.M., Lingner J., Terns M.P. TIN2-Tethered TPP1 Recruits Human Telomerase to Telomeres *In Vivo* // *Mol Cell Biol*. 2010. V. 30, № 12. P. 2971–2982.
 182. Zhong F.L., Batista L.F.Z., Freund A., Pech M.F., Venteicher A.S., Artandi S.E. TPP1 OB-Fold Domain Controls Telomere Maintenance by Recruiting Telomerase to Chromosome Ends // *Cell*. 2012. V. 150, № 3. P. 481–494.
 183. Sukhanova M.V., Singatulina A.S., Pastré D., Lavrik O.I. Fused in Sarcoma (FUS) in DNA Repair: Tango with Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 and Compartmentalisation of Damaged DNA // *IJMS*. 2020. V. 21, № 19. P. 7020.
 184. Chambon P., Weill J.D., Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1963. V. 11, № 1. P. 39–43.
 185. Nishizuka Y., Ueda K., Nakazawa K., Hayaishi O. Studies on the Polymer of Adenosine Diphosphate Ribose // *Journal of Biological Chemistry*. 1967. V. 242, № 13. P. 3164–3171.
 186. Vyas S., Matic I., Uchima L., Rood J., Zaja R., Hay R.T., Ahel I., Chang P. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity // *Nat Commun*. 2014. V. 5, № 1. P. 4426.
 187. Hendriks I.A., Larsen S.C., Nielsen M.L. An Advanced Strategy for Comprehensive Profiling of ADP-ribosylation Sites Using Mass Spectrometry-based Proteomics* // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2019. V. 18, № 5. P. 1010–1026.

188. Alemasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins // *Nucleic Acids Research*. 2019. V. 47, № 8. P. 3811–3827.
189. Sukhanova M.V., Abrakhi S., Joshi V., Pastre D., Kutuzov M.M., Anarbaev R.O., Curmi P.A., Hamon L., Lavrik O.I. Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosylation) using high-resolution AFM imaging // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44, № 6. P. e60–e60.
190. Hassa P. O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases // *Front Biosci*. 2008. V. 13, № 13. P. 3046.
191. Ferro A.M., Olivera B.M. Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism // *J Biol Chem*. 1982. V. 257, № 13. P. 7808–7813.
192. Zahradka P., Ebisuzaki K. A shuttle mechanism for DNA-protein interactions. The regulation of poly(ADP-ribose) polymerase // *Eur J Biochem*. 1982. V. 127, № 3. P. 579–585.
193. Satoh M.S., Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair // *Nature*. 1992. V. 356, № 6367. P. 356–358.
194. Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. XRCC1 Is Specifically Associated with Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity following DNA Damage // *Molecular and Cellular Biology*. 1998. V. 18, № 6. P. 3563–3571.
195. Fisher A.E.O., Hochegger H., Takeda S., Caldecott K.W. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase // *Molecular and Cellular Biology*. 2007. V. 27, № 15. P. 5597–5605.
196. Fischbach A., Krüger A., Hampp S., Assmann G., Rank L., Hufnagel M., Stöckl M.T., Fischer J.M.F., Veith S., Rossatti P., Ganz M., Ferrando-May E., Hartwig A., Hauser K., Wiesmüller L., Bürkle A., Mangerich A. The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by PARP1 // *Nucleic Acids Research*. 2018. V. 46, № 2. P. 804–822.
197. Yang G., Chen Y., Wu J., Chen S.-H., Liu X., Singh A.K., Yu X. Poly(ADP-ribosylation) mediates early phase histone eviction at DNA lesions // *Nucleic Acids Research*. 2020. V. 48, № 6. P. 3001–3013.
198. Teloni F., Altmeyer M. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44, № 3. P. 993–1006.
199. Malanga M., Althaus F.R. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network // *Biochem Cell Biol*. 2005. V. 83, № 3. P. 354–364.
200. Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017. V. 18, № 10. P. 610–621.
201. Boamah E.K., Kotova E., Garabedian M., Jarnik M., Tulin A.V. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) Regulates Ribosomal Biogenesis in *Drosophila Nucleoli* // *PLoS Genet* / ed. by Lis J.T. 2012. V. 8, № 1. P. e1002442.
202. Di Giammartino D.C., Shi Y., Manley J.L. PARP1 Represses PAP and Inhibits Polyadenylation during Heat Shock // *Molecular Cell*. 2013. V. 49, № 1. P. 7–17.

203. Ji Y., Tulin A.V. Poly(ADP-ribosylation) of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulates splicing // *Nucleic Acids Research*. 2009. V. 37, № 11. P. 3501–3513.
204. Gagné J.-P., Hunter J.M., Labrecque B., Chabot B., Poirier G.G. A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins // *Biochemical Journal*. 2003. V. 371, № 2. P. 331–340.
205. Kotova E., Jarnik M., Tulin A.V. Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 Is Required for Protein Localization to Cajal Body // *PLoS Genet* / ed. by Cohen-Fix O. 2009. V. 5, № 2. P. e1000387.
206. Ourliac-Garnier I., Londoño-Vallejo A. Telomere Length Analysis by Quantitative Fluorescent In situ Hybridization (Q-FISH) // *Telomeres and Telomerase* / ed. by Songyang Z. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. V. 735. P. 21–31.
207. *Hansenula polymorpha: biology and applications* / ed. by Gellissen G. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 347 p.
208. Петрова Ольга Алексеевна. Структурные исследования компонентов теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*: Диссертация. МГУ им. М.В. Ломоносова, 2018.
209. Hughes T.R., Evans S.K., Weilbaecher R.G., Lundblad V. The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase // *Curr. Biol*. 2000. V. 10, № 13. P. 809–812.
210. Lendvay T.S., Morris D.K., Sah J., Balasubramanian B., Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes // *Genetics*. 1996. V. 144, № 4. P. 1399–1412.
211. Yu E.Y., Wang F., Lei M., Lue N.F. A proposed OB-fold with a protein-interaction surface in *Candida albicans* telomerase protein Est3 // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2008. V. 15, № 9. P. 985–989.
212. Nandakumar J., Bell C.F., Weidenfeld I., Zaugg A.J., Leinwand L.A., Cech T.R. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity // *Nature*. 2012. V. 492, № 7428. P. 285–289.
213. Rao T., Lubin J.W., Armstrong G.S., Tucey T.M., Lundblad V., Wuttke D.S. Structure of Est3 reveals a bimodal surface with differential roles in telomere replication // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2014. V. 111, № 1. P. 214–218.
214. 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 // *Sci Rep*. 2020. V. 10, № 1. P. 11109.
215. Mariasina S.S., Efimov S.V., Petrova O.A., Rodina E.V., Malyavko A.N., Zvereva M.I., Klochkov V.V., Dontsova O.A., Polshakov V.I. Chemical shift assignments and the secondary structure of the Est3 telomerase subunit in the yeast *Hansenula polymorpha* // *Biomol NMR Assign*. 2018. V. 12, № 1. P. 57–62.
216. Talley J.M., DeZwaan D.C., Maness L.D., Freeman B.C., Friedman K.L. Stimulation of yeast telomerase activity by the ever shorter telomere 3 (Est3) subunit is dependent on direct interaction with the catalytic protein Est2 // *J. Biol. Chem*. 2011. V. 286, № 30. P. 26431–26439.
217. Lee J., Mandell E.K., Rao T., Wuttke D.S., Lundblad V. Investigating the role of the Est3 protein in yeast telomere replication // *Nucleic Acids Res*. 2010. V. 38, № 7. P. 2279–2290.

218. Hsu M., Yu E.Y., Singh S.M., Lue N.F. Mutual dependence of *Candida albicans* Est1p and Est3p in telomerase assembly and activation // *Eukaryotic Cell*. 2007. V. 6, № 8. P. 1330–1338.
219. Mozdy A.D., Cech T.R. Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency // *RNA*. 2006. V. 12, № 9. P. 1721–1737.
220. Tuzon C.T., Wu Y., Chan A., Zakian V.A. The *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3 binds telomeres in a cell cycle- and Est1-dependent manner and interacts directly with Est1 in vitro // *PLoS Genet*. 2011. V. 7, № 5. P. e1002060.
221. Tucey T.M., Lundblad V. Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex // *Genes Dev*. 2014. V. 28, № 19. P. 2077–2089.
222. Yen W.-F., Chico L., Lei M., Lue N.F. Telomerase regulatory subunit Est3 in two *Candida* species physically interacts with the TEN domain of TERT and telomeric DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. V. 108, № 51. P. 20370–20375.
223. Zhang Y., Wang J., Ding M., Yu Y. Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome // *Nat Methods*. 2013. V. 10, № 10. P. 981–984.
224. 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 // *Front Cell Dev Biol*. 2021. V. 9. P. 621134.
225. Weber K., Bartsch U., Stocking C., Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis // *Mol Ther*. 2008. V. 16, № 4. P. 698–706.
226. Wu W., Kong Z., Duan X., Zhu H., Li S., Zeng S., Liang Y., Iliakis G., Gui Z., Yang D. Inhibition of PARP1 by small interfering RNA enhances docetaxel activity against human prostate cancer PC3 cells // *Biochem Biophys Res Commun*. 2013. V. 442, № 1–2. P. 127–132.
227. Espejel S., Klatt P., Méñissier-de Murcia J., Martín-Caballero J., Flores J.M., Taccioli G., de Murcia G., Blasco M.A. Impact of telomerase ablation on organismal viability, aging, and tumorigenesis in mice lacking the DNA repair proteins PARP-1, Ku86, or DNA-PKcs // *J Cell Biol*. 2004. V. 167, № 4. P. 627–638.
228. Beneke S., Cohausz O., Malanga M., Boukamp P., Althaus F., Bürkle A. Rapid regulation of telomere length is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 // *Nucleic Acids Res*. 2008. V. 36, № 19. P. 6309–6317.
229. Gomez M., Wu J., Schreiber V., Dunlap J., Dantzer F., Wang Y., Liu Y. PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres // *Mol Biol Cell*. 2006. V. 17, № 4. P. 1686–1696.
230. Li S., Blackburn E.H. Expression and suppression of human telomerase RNA // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006. V. 71. P. 211–215.
231. Azhibek D., Zvereva M., Zatsepin T., Rubtsova M., Dontsova O. Chimeric bifunctional oligonucleotides as a novel tool to invade telomerase assembly // *Nucleic Acids Res*. 2014. V. 42, № 15. P. 9531–9542.
232. Tong W.-M., Hande M.P., Lansdorp P.M., Wang Z.-Q. DNA Strand Break-Sensing Molecule Poly(ADP-Ribose) Polymerase Cooperates with p53 in Telomere Function, Chromosome Stability, and Tumor Suppression // *Molecular and Cellular Biology*. 2001. V. 21, № 12. P. 4046–4054.
233. de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem // *Science*. 2009. V. 326, № 5955. P. 948–952.

234. Schmutz I., Timashev L., Xie W., Patel D.J., de Lange T. TRF2 binds branched DNA to safeguard telomere integrity // *Nat Struct Mol Biol.* 2017. V. 24, № 9. P. 734–742.
235. Wahlberg E., Karlberg T., Kouznetsova E., Markova N., Macchiarulo A., Thorsell A.-G., Pol E., Frostell Å., Ekblad T., Öncü D., Kull B., Robertson G.M., Pellicciari R., Schüler H., Weigelt J. Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors // *Nat Biotechnol.* 2012. V. 30, № 3. P. 283–288.
236. Hsieh M.-H., Chen Y.-T., Chen Y.-T., Lee Y.-H., Lu J., Chien C.-L., Chen H.-F., Ho H.-N., Yu C.-J., Wang Z.-Q., Teng S.-C. PARP1 controls KLF4-mediated telomerase expression in stem cells and cancer cells // *Nucleic Acids Research.* 2017. V. 45, № 18. P. 10492–10503.