

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Зверева Мария Эмильевна

Теломераза: механизмы функционирования
и регуляции

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология,
02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Официальные оппоненты – **Кубарева Елена Александровна** – доктор химических наук, профессор, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского / Отдел химии нуклеиновых кислот, главный научный сотрудник

Георгиева София Георгиевна – доктор биологических наук, член-корреспондент Российской академии наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук / Лаборатория факторов транскрипции, главный научный сотрудник

Смирнов Иван Витальевич – доктор химических наук, Институт биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук / Группа комбинаторных методов конструирования биокатализаторов, главный научный сотрудник

Защита диссертации состоится «22» мая 2018 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, МГУ, Лабораторный корпус «А», аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/103267554/>

Автореферат разослан « ___ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Среди современных задач как молекулярной биологии, так и биоорганической химии в отдельное направление можно выделить получение новых знаний о функционировании сложных комплексов белков и нуклеиновых кислот (НК) на молекулярном уровне. Основная особенность функционирования таких комплексов состоит в абсолютной необходимости присутствия в комплексе как НК, так и белков для осуществления их биологических, в частности, каталитических функций. Примером такого функционального РНК-белкового комплекса является теломераза, активность которой лежит в основе компенсаторного механизма укорочения защитных структур на концах линейных эукариотических хромосом (теломер). Такое укорочение при отсутствии компенсации происходит с каждым клеточным делением и приводит к остановке продвижения по клеточному циклу при достижении теломерами критически короткого состояния (лимит Хейфлика).

Теломераза – это многокомпонентный ферментативный комплекс, который состоит из специализированной молекулы теломеразной РНК, служащей структурной основой для всего РНК-белкового комплекса и содержащей матричный участок для синтеза теломерной ДНК, а также обязательного специального белка, обладающего способностью к синтезу ДНК РНК-зависимым способом. В состав фермента также входит ряд дополнительных белков. Нарушение регуляции работы теломеразы взаимосвязано с процессом онкогенеза. Опухолевый процесс можно определить как отсутствие контроля роста клеток, что приводит к их быстрому делению и, как следствие, к очень коротким теломерам и нарушению их защитной функции. В некоторых клетках при нарушении защитной функции теломер из-за приобретённой геномной нестабильности накапливаются изменения, которые активируют теломеразу; такие клетки становятся способными преодолеть лимит Хейфлика. В результате, в большинстве типов опухолевых клеток наблюдается активация теломеразы.

Теломераза на сегодняшний момент служит привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии. Предполагается, что можно найти такие условия, когда опухолевые клетки уже гибнут, соматические клетки остаются неизменными из-за отсутствия в них активной теломеразы, а другие клетки организма, обладающие

неограниченным пролиферативным потенциалом для выполнения своей функции, например, стволовые, в силу особенностей своего существования в специальном микроокружении защищены от гибели. Существует надежда на то, что именно ингибирование теломеразы позволит создать малотоксичный препарат, воздействующий на наиболее агрессивные опухолевые клетки в широком спектре поражений. Рост чувствительности методов тестирования теломеразной активности расширил возможности достоверного определения эффективности функционирования теломеразы в клетках разных тканей, не относящихся к новообразованиям. Вместе с данными о генетически обусловленных заболеваниях, связанных с нарушением экспрессии и функционирования генов теломеразных компонентов, это позволило предположить необходимость существования активного теломеразного комплекса с точно настроенной регуляцией в клетках различных тканей для их восстановления после повреждений и регенерации. Таким образом, воздействие на теломеразу может изменить пролиферативный потенциал клетки не только в сторону его сокращения, но и увеличить возможное разрешенное число делений клетки. Существует гипотеза, что временная активация теломеразы может быть использована для того, чтобы корректировать дегенеративные изменения и старение.

Несмотря на ежегодное увеличение количества исследований, посвященных изучению свойств теломеразы (более 15 тыс. статей на момент написания этой работы), до сих пор существует много нерешенных проблем. Нет полной картины регуляции и функционирования теломеразы на молекулярном уровне. Недостаточное количество данных для сопоставления свойств теломераз из различных организмов лимитирует установление общих закономерностей. Отсутствует ясность в понимании альтернативных функций компонентов теломеразного комплекса. Ограниченность структурных данных затрудняет направленный поиск ингибиторов этого фермента.

Цели и задачи исследования

Глобальными целями исследования являлись:

1. Выявление особенностей функционирования теломеразного комплекса и его компонентов для понимания механизмов регуляции активности теломеразы.
2. Создание новых ингибиторов теломеразы.

Для этого было необходимо:

- А) Получить экспериментальные данные о механизме действия компонентов теломеразы с неизвестной функцией и определить олигомерный статус теломеразного комплекса в активном состоянии;
- Б) Разработать новую модельную систему для изучения теломеразы, которая позволит преодолеть существующую ограниченность структурных данных о компонентах теломеразы и расширить экспериментальные возможности в области регуляции функционирования теломеразы;
- В) Предложить новые ингибиторы теломеразы.

Научная новизна работы

Получены новые данные о фундаментальных свойствах теломеразного комплекса и его компонентов для различных организмов.

- С помощью ингибиторов теломеразы олигонуклеотидной природы подтверждено существование димера теломеразы человека и показано, что теломераза человека активна в димерном состоянии.

- Показана возможность использования димеризации теломеразной РНК для разработки эффективных ингибиторов теломеразы.

- Способность теломеразы *S. cerevisiae* синтезировать один теломерный повтор не связана с димеризацией теломеразы.

- Открыт новый процесс *in vivo*, который ограничивает длину теломер. Он связан с нарушением способности вновь удлиненного теломеразой 3'-конца теломеры перемещаться в начало матричного участка теломеразной РНК.

- Разработана стратегия для изучения теломер и теломеразы на основе использования термотолерантных дрожжей *H. polymorpha*, упрощающая работу с компонентами теломеразы *in vitro* в функциональных и структурных исследованиях. С помощью расшифровки структуры генома и транскриптома этих дрожжей определены основные компоненты теломеразного комплекса в этом организме. Разработаны методы нарушения теломеразных генов, определения длины теломер, обогащения клеточного экстракта теломеразой, определения теломеразной активности в термотолерантных дрожжах.

- Исследованы ранее неизвестные свойства дополнительного компонента теломеразы – белка Est3 *S. cerevisiae*; впервые обнаружена способность Est3

дестабилизировать ДНК/РНК-дуплексы, охарактеризована способность Est3 образовывать димеры и гидролизовать GTP.

– Впервые показано существование биотинилированного белка в составе теломеразного комплекса *S. cerevisiae*.

– Предложены новые ингибиторы теломеразы олигонуклеотидной природы и низкомолекулярные ингибиторы на основе металлоорганических комплексов тиогидантоинов.

Практическая значимость работы

– Продемонстрирована стабильность теломеразного комплекса термотолерантных дрожжей в выделенном состоянии и возможность использования его компонентов в качестве объекта для структурного анализа. В настоящее время эта система уже успешно используется для определения структуры компонентов теломеразы, например, методом ЯМР (проф. Польшаков В.И., МГУ) и с помощью рентгеновского лазера на свободных электронах XFEL (проф. Ламзин В.С., EMBL).

– Доказано существование нового механизма ограничения длины теломер, что позволит проводить направленный поиск специфических регуляторов активности теломеразы в клетках человека.

– Оптимизирована методика тестирования олигонуклеотидов и низкомолекулярных соединений на их способность ингибировать активность теломеразы.

– Предложен новый подход для изучения особенностей функционирования РНК-белковых комплексов с помощью оригинальных НК-конструкций, представляющих собой два олигонуклеотида, соединенных линкером ненуклеотидной природы.

– Высказано предположение, что такие НК-конструкции могут стать основой для разработки эффективных направленных противоопухолевых препаратов, благодаря их способности ингибировать как работу теломеразы в системе *in vitro*, так и ее сборку в клетке.

Положения, выносимые на защиту

1. Дополнительный компонент теломеразного комплекса дрожжей *S. cerevisiae* белок Est3 разрушает модельный РНК/ДНК-дуплекс *in vitro* и может гидролизовать GTP.

2. Дрожжевой теломеразе не требуется димеризация для добавления одного повтора.
3. Теломераза человека в функционально активном состоянии содержит димеры; это свойство может быть использовано для создания ингибиторов ее активности.
4. Модельная система на основе термотолерантных дрожжей позволяет расширить область исследования деталей функционирования теломеразного комплекса.
5. В термотолерантных дрожжах существует механизм ограничения длины теломер, закодированный в теломеразной РНК.
6. Регуляторами активности РНК-белкового комплекса, в частности теломеразы, могут быть НК-конструкции, представляющие собой два олигонуклеотида, соединенные линкером ненуклеотидной природы.
7. Направленное моделирование структурных особенностей теломерной НК в структуре соединения дает основу для разработки ингибиторов теломеразы.

Личный вклад автора

Докторская диссертационная работа выполнена автором лично. Исследования были междисциплинарными и проводились в соавторстве с большим коллективом, что отражено в опубликованных работах, однако автору принадлежит основная роль в выборе направления исследований, решении рабочих вопросов, преодолении различных экспериментальных проблем, в обобщении и представлении полученных результатов. Личный вклад автора состоял в непосредственном участии во всех этапах исследования – от формулировки проблем, постановки задач, проведения экспериментов до обсуждения и оформления результатов. Некоторые экспериментальные исследования при непосредственном участии автора были проведены сотрудниками кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: Рубцовой М.П., Скворцовым Д.А, а также аспирантами кафедры под руководством автора: Шарановым Ю.С., Щербаковой Д.М., Логвиной Н.М., Смекаловой Е.М., Малявко А.Н., Ажибеком Д.М., а также дипломниками Шубернецкой О.С., Парфеновой Ю.Ю.

Апробация работы

Диссертация была апробирована на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 23 сентября 2017 года, а также разделы работы в период с 2006 по 2015 годы были представлены в виде докладов и тезисов докладов на 22-х Всероссийских и Международных научных конференциях, в частности, на специализированной Международной конференции «Теломеры и теломераза» / “Telomeres&Telomerase” в 2007 и 2013 годах, на 38-ом конгрессе федерации биохимических обществ Европы (FEBS), проходившем 6-11 июля 2013 в г. Санкт-Петербург, Россия.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы отражены в 27 статьях в журналах, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science или Scopus, а также в библиографической базе PubMed. В рамках выполнения диссертационной работы получен 1 патент Российской Федерации и 1 международный патент.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы» (раздел состоит из 391 ссылки) и «Благодарности». Работу иллюстрируют 65 рисунков и 10 таблиц. Общий объем диссертации 260 страниц (без списка использованной литературы).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Один из подходов к исследованию принципов функционирования любого ферментативного комплекса основан на использовании обогащенной фракции клеточного экстракта или выделенного, чаще всего рекомбинантного, фермента. Теломераза – это многокомпонентный РНК-белковый комплекс со сложной регуляцией, отличающейся в различных типах клеток многоклеточного организма (рис. 1).

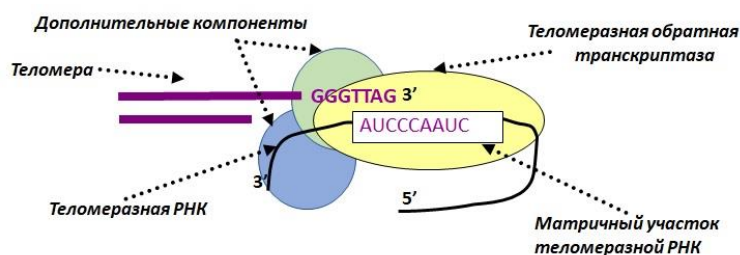


Рис. 1. Общая схема строения теломеразы в комплексе с 3'-концом теломеры.

Структура, функция и регуляция активности теломеразы рассмотрены в обзоре автора [1] (здесь и далее по тексту ссылки на работы из списка опубликованных по теме диссертации) в виде сравнительного анализа данных для теломеразного комплекса человека и дрожжей. Дрожжи чаще всего выбирают в качестве модельного организма для исследований теломеразы [2], так как в гаплоидном состоянии это унифицированный тип клеток с активной теломеразой. Использование дрожжей позволяет избежать некоторых методологических и экономических ограничений, которые возникают при работе с клетками высших эукариот. Это возможно благодаря существованию подходов для модификации генома дрожжей для доказательства связи гена с системой поддержания длины теломер по изменению длины теломер у таких модифицированных клеток и возможности получения большого количества клеток для выделения достаточного количества теломеразного комплекса для исследований *in vitro*. Можно предположить существование и выявить некоторые общие принципы и уникальные свойства в функционировании теломеразы и организации теломер для различных видов дрожжей [3]. Безусловно, в составе теломеразы и механизмах регуляции ее активности у человека и у одноклеточных эукариот существуют заметные отличия, но общность функции позволяет искать сходство направленно и лучше понимать фундаментальные особенности работы теломеразного комплекса.

1. Особенности функционирования теломеразного комплекса дрожжей и его компонентов

1.1. Свойства белка Est3 - компонента теломеразного комплекса дрожжей

Белок Est3 взаимодействует с НК и способствует диссоциации РНК/ДНК-дуплекса. В состав теломеразы кроме теломеразной РНК (TER) и теломеразной каталитической субъединицы (TERT) входят дополнительные компоненты (рис. 1). Наименее изученным дополнительным компонентом теломеразного комплекса дрожжей на начало исследований был белок Est3. Белок Est3 характерен именно для

дрожжевой теломеразы, его гомолог у высших эукариот не найден, но предполагают существование функционального аналога.

Первым объектом исследований были выбраны дрожжи *S. cerevisiae*. Описано множество факторов, отвечающих за регуляцию функционирования теломеразы у дрожжей *S. cerevisiae* [2]. Было сделано предположение, что белок Est3 отвечает за процессивную работу теломеразы в клетках *S. cerevisiae*. Для процессивной работы теломеразы необходима диссоциация гибридного дуплекса РНК/ДНК после синтеза теломерного повтора на РНК-матрице и перемещение 3'-конца теломерного повтора в начало матричного участка теломеразной РНК. Мы решили проверить влияние белка Est3 на стабильность гибридного дуплекса с помощью, разработанной нами, системы *in vitro*. Система состояла из трех компонентов. Прежде всего, это набор олигодезоксирибонуклеотидов и олигорибонуклеотидов с последовательностями, идентичными: 1) матричному участку теломеразной РНК; 2) последовательности теломерного повтора. Для контроля использовали комплементарные им олигонуклеотиды и олигонуклеотиды с нетеломерной последовательностью. Вторым компонентом системы был рекомбинантный белок Est3, содержащий дополнительную последовательность из 6-ти остатков гистидина (Est3-6His) или последовательность, соответствующую белку глутатион-S-трансферазе (GST-Est3), что обеспечивало эффективное выделение целевого белка методами аффинной хроматографии *in vitro*. Степень гомогенности препаратов Est3 составила 85-99 % в зависимости от выбранной стратегии [4–7]. Третий дополнительный компонент системы *in vitro* – нуклеозидтрифосфат или нуклеозиддифосфат служил источником энергии или потенциальным кофактором для успешного протекания процесса. Первоначально в этой роли мы использовали АТФ и ГТФ. Мы проверили образование возможных НК-белковых комплексов и диссоциацию НК-дуплексов в присутствии белка. За комплексообразованием и диссоциацией дуплексов следили методом «торможения» в ПААГ в неденатурирующих условиях с использованием [³²P]-меченных олигонуклеотидов. Детектировали появление комплекса с белком или свободного олигонуклеотида при диссоциации дуплекса. Результаты суммированы в табл. 1, где знак «—» соответствует отсутствию влияния белка в системе, знак «+/-» – эффект выражен слабо и не всегда, знак «+» – эффект слабый, количество «+» соответствует силе эффекта. В случае диссоциации НК-дуплекса

знак «--» означает стабилизацию дуплекса при добавлении белка. Олигонуклеотиды, имеющие последовательность G-цепи теломер (R2 и D2), лучше всего взаимодействовали с белком Est3 в присутствии АТР и GTP, причем для GTP эффект сильнее. Олигонуклеотиды, имеющие последовательность G-цепи теломер (R2 и D2), эффективнее всего взаимодействовали с белком Est3 в присутствии АТР и GTP, причем в случае GTP связывание было сильнее.

Таблица 1. Анализ комплексообразования и диссоциации НК-дуплексов с Est3.

	Комплексообразование						Диссоциация НК-дуплекса				
	D1	R1	D2	R2	Dn	Rn	D1-D2	R1-R2	D1-R2	D2-R1	Dn-Rn
Est3	+/-	-	+	++	+/-	-	-	-	++	++	++
Est3+ATP	+/-	+/-	+	+++	+/-	+/-	-	--	+++	+++	+++
Est3+GTP	+/-	+/-	++	+++	+/-	+/-	-	--	+++	+++	+++
Est3+ADP	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	-	-	+	+	+
Est3+GDP	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+	+	+
Est3+GMPPNP	Эффект не тестировали						-	-	+	+	+

Присутствие Est3 не влияло на стабильность ДНК/ДНК - или РНК/РНК - дуплексов, но приводило к диссоциации гибридных ДНК-РНК -дуплексов независимо от их последовательности. В присутствии АТР или GTP эффект усиливался. GDP или негидролизуемый аналог GTP ингибировали это свойство белка Est3. Если связывание белка происходит с одним из компонентов гибридного дуплекса, что приводит к его диссоциации, то тот же эффект должен наблюдаться и для классических дуплексов. Вероятно белок Est3 взаимодействует именно с двумя цепями ДНК/РНК-дуплекса, что и приводит к его последующей диссоциации [6].

Белок Est3 гидролизует GTP

На основании свойства Est3 способствовать диссоциации гибридного ДНК/РНК - дуплекса в присутствии GTP и АТР и отсутствии этого эффекта в случае присутствия GDP или негидролизуемого аналога GTP – гуанозин-5'-(β, γ-имида)трифосфата (GMPPNP), была высказана гипотеза о возможности гидролиза GTP белком Est3. На первом этапе был проведен биоинформатический поиск мотивов в первичной структуре белка Est3, необходимых для катализа. Сходство этого белка с АТРазами не обнаружено. Известные консервативные мотивы для GTPаз в белке Est3 присутствовали частично (рис. 2А). Мы экспериментально проверили способность Est3 к олигомеризации и гидролизу GTP [7]. Известно, что замена в белке Est3

остатка D86 на А приводит к гибели клеток дрожжей в результате сенесценса из-за укороченных теломер (Yang et al., 2006). Это определило выбор использования мутантной формы Est3(D86A) в качестве контроля отсутствия в рекомбинантном Est3 примеси АТРаза и ГТРаза (рис. 3А).

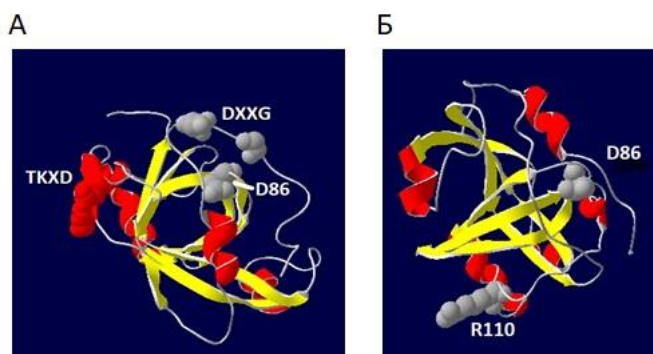


Рис. 2. Модель структуры белка Est3 *S. cerevisiae* (PDB Code ID 2M9V). А – консервативные аминокислотные последовательности ГТРаза: TKXD (отмечена) красным и DXXG (отмечена серым). Б – Отмечены аминокислотные остатки Est3, измененные в нашей работе.

Мы экспериментально проверили способность Est3 к олигомеризации и гидролизу ГТР [7]. Дополнительно выбрали мутантную форму Est3(R110E) со сходным эффектом *in vivo*, но в которой заменяемый аминокислотный остаток удален от потенциального ГТР-связывающего мотива Est3 (рис. 2Б). Гидролиз ГТР препаратами Est3, Est3(D86A) и Est3(R110E) детектировали по образованию свободного фосфата двумя независимыми методами: тонкослойной хроматографией при использовании γ -[P³²]-ГТР и качественной реакцией между PO₄³⁻ и молибдатом аммония и малахитовым зеленым, приводящей к появлению окрашенного комплекса (рис. 3). Накопление свободного фосфата в смеси белка и ГТР свидетельствовало в пользу того, что белок обладает ГТРазной активностью. Замена ГТР на АТР практически не приводила к гидролизу последнего (рис. 3А). Рассчитанная константа Михаэлиса (K_м), характеризующая взаимодействие Est3 как ГТРаза с субстратом, после оптимизации условий реакции составила 28 мМ. K_м Est3(R110E) была выше в 4 раза. В случае белка Est3(D86A) эффективной стимуляции гидролиза ГТР не наблюдали, в случае Est3(R110E) изменялся характер кривой зависимости начальной скорости гидролиза (v₀) ГТР от его концентрации (рис. 3Б). Сопоставление зависимостей v₀ гидролиза ГТР и АТР белками Est3, Est3(D86A) и Est3(R110E) от концентрации нуклеозидтрифосфатов позволяет сделать вывод, что Est3 представляет собой ГТРаза [7].

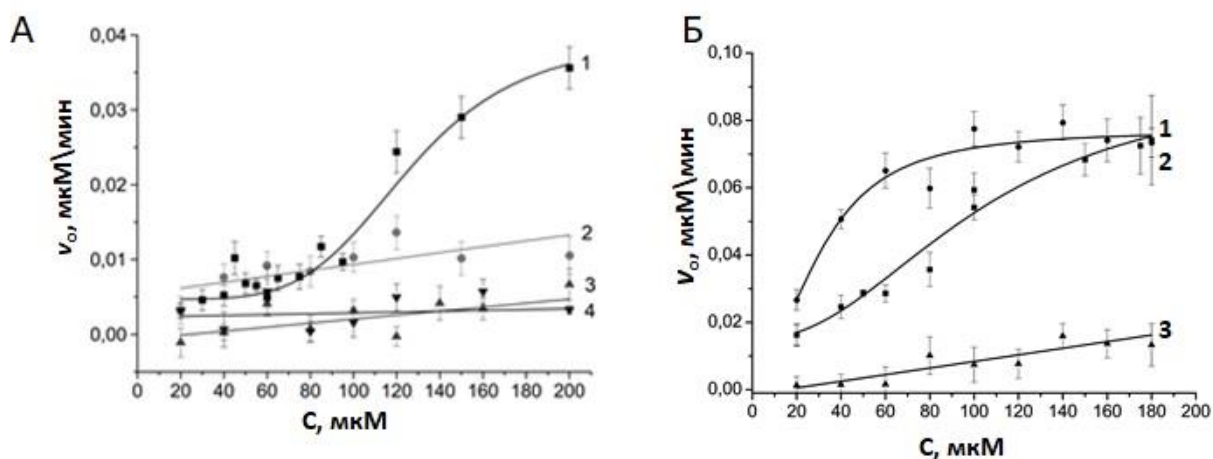


Рис. 3. Зависимость начальной скорости гидролиза GTP (АТР) белками Est3, Est3(D86A) и Est3(R110E) от концентрации субстрата методом колориметрии. А – 1 и 2 - гидролиз GTP и АТР белком Est3 дикого типа; 3 и 4 - гидролиз GTP и АТР в присутствии Est3(D86A). Б – гидролиз GTP в оптимизированных буферных условиях (присутствие Mg^{2+}) белками Est3 дикого типа (1), Est3(R110E) (2), Est3(D86A) (3).

Отсутствие всех мотивов, характерных для GTPаз, позволяет предположить, что Est3 представляет собой GTPазу нового класса. Альтернативное объяснение полученным данным заключается в том, что GTP гидролизуется в ходе побочного процесса. Тогда в белке должен быть участок, способный взаимодействовать с G-богатой последовательностью теломерной ДНК\РНК, который и образует «карман» для позиционирования GTP. Такое взаимодействие приводит к фиксации GTP в конформации, способствующей гидролизу этого нуклеозидтрифосфата. Нельзя исключить и регуляторную активацию GTPазной способности Est3 в составе сложного теломеразного комплекса как, например, в случае факторов трансляции, но обнаружить такой процесс не удалось из-за невозможности реконструкции активной теломеразы из индивидуальных компонентов. Однако если предположение о существовании специфического «кармана» для G-богатой последовательности верно, то ее присутствие должно ингибировать гидролиз GTP белком Est3 за счет конкурентного связывания. Действительно, в присутствии G-богатой теломерной последовательности скорость гидролиза GTP белком Est3 уменьшалась примерно в два раза. В то же время, добавление контрольного дезоксирибоолигонуклеотида с произвольной последовательностью не влияло на скорость гидролиза GTP. Оптимизация условий проведения реакции гидролиза GTP, катализируемой белком Est3, показала, что в присутствии Mg^{2+} начальная скорость гидролиза GTP увеличивается в 2 раза. Возможное объяснение состоит в участии

положительно заряженных ионов Mg^{2+} в координации фосфата GTP, несущего отрицательный заряд в активном центре фермента. Также возможно, что Mg^{2+} стимулирует олигомеризацию белка, что приводит к образованию «кармана» для активной GTPазы. Для проверки гипотезы о возможности формирования «кармана» для взаимодействия с GTP за счет димеризации белка в дополнение к гель-фильтрации [7] был разработан подход, наглядно показывающий процесс олигомеризации Est3. Использовали две рекомбинантные формы Est3 – Est3-6His и GST-Est3. Анализ препарата очищенного белка Est3-6His методом электрофореза в 12%-ном ПААГ с низкой концентрацией детергента в условиях, не вызывающих диссоциацию надмолекулярных комплексов белка, показал наличие в геле нескольких сигналов. Зоны, соответствующие меньшей подвижности белка в геле, исчезали при прогревании образца перед нанесением на гель в буфере с 8 М мочевиной, что свидетельствует об олигомеризации белка (рис. 4). На основе сравнения интенсивности сигналов можно заключить, что олигомер образуют примерно ~50% молекул белка Est3-6His. В следующем эксперименте белки GST-Est3 и Est3-6His смешивали в различных соотношениях, выделили белок Est3-6His методом аффинной хроматографии и анализировали состав выделенных фракций (рис. 4).

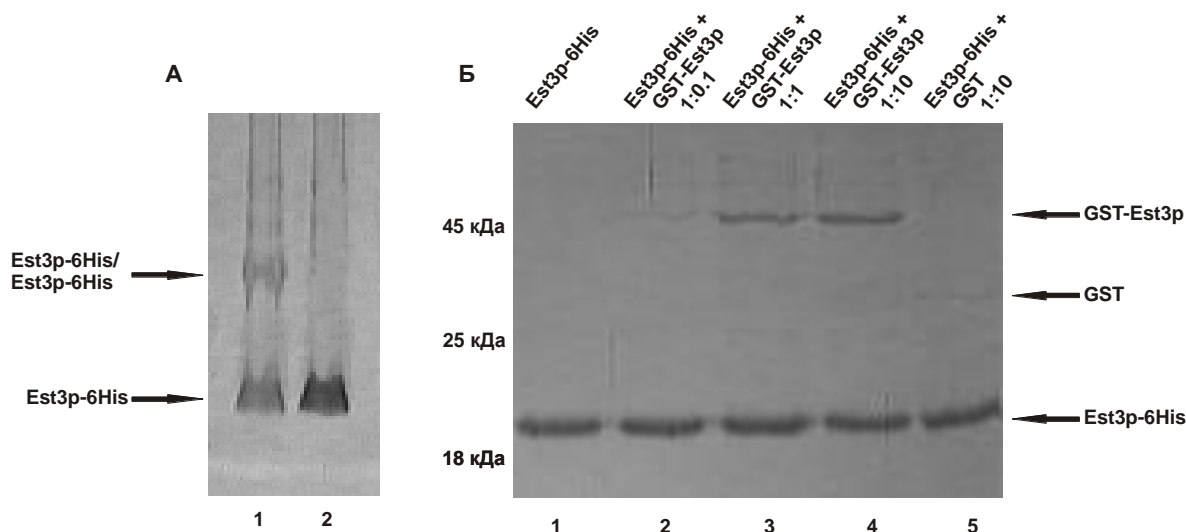


Рис. 4. Исследование олигомеризации рекомбинантного Est3 *S. cerevisiae* *in vitro*.

А – Анализ Est3 в 12%-ном ПААГ, содержащем 0,01% SDS. 1 – препарат Est3-6His, 2 – препарат Est3-6His предварительно прогретый при 95°C в буфере с 8 М мочевиной. Б – Анализ в 15%-ном ПААГ по Лэммли разделения белков, полученных при выделении на Ni-NTA-агарозе из смеси: из смеси Est3-6His и GST-Est3 в соотношениях 1: 0,1, 1: 1, 1: 10 (дорожки 2-4) соответственно, 5 – из смеси Est3-6His и GST в соотношении 1: 10 (контроль). Дорожка 1 – исходный препарат Est3-6His.

При увеличении молярного соотношения белков Est3-6His и GST-Est3 количество со-выделяющегося GST-Est3 не превышало количество Est3p-6His. Это подтверждает существование белка Est3 в форме димера [4]. Для исследования влияния Mg^{2+} , GTP или GDP на олигомеризацию белка, использовали описанный выше метод аффинного со-выделения рекомбинантных форм белка Est3. Количество димера оценивали методом денситометрического анализа зон белков в геле. Значения констант димеризации белка Est3 в отсутствие и в присутствии GTP или GDP были равными в пределах ошибки эксперимента. В присутствии Mg^{2+} значение константы димеризации (K_d) возросло более чем на порядок, показатель десятичного логарифма K_d в этом случае составил $8,3 \pm 0,2$. Это говорит о том, что образование димера белка не зависит от наличия в реакционной смеси GTP или GDP и не соответствует классической ситуации, когда при гидролизе GTP меняется пространственная организация комплекса [5]. Таким образом, гидролиз GTP, скорее всего, является побочным результатом существования GTP-связывающего «кармана», а не переключателем олигомерного статуса белка. Однозначно ответить на этот вопрос можно будет только после определения структуры Est3 на молекулярном уровне. Белок Est3 из другого вида дрожжей – *H. polymorpha*, не гидролизует GTP и не димеризовался *in vitro*. Это говорит о том, что найденная способность гидролизовать GTP и димеризоваться *in vitro* – это уникальное свойство белка Est3 из пекарских дрожжей, которое на данном этапе не может быть использовано для построения общей схемы функционирования теломеразного комплекса. Но и исключить значимость димеризации белка Est3 для функционирования теломеразы *in vivo* нельзя, что ставит вопрос роли димеризации других компонентов теломеразного комплекса.

1.2. Исследование взаимосвязи димеризации теломеразной РНК и синтеза теломерного повтора

Нами изучена взаимосвязь между димеризацией и активностью теломеразы *S. cerevisiae*. Ранее установлено, что димеризация дрожжевой теломеразы важна для поддержания длины теломер *in vivo* (Prescott and Blackburn, 1997). Для объяснения этого факта была предложена модель, согласно которой димеризация теломеразной РНК в теломеразе необходима для образования активного состояния теломеразы и синтеза теломерного повтора (рис. 5).

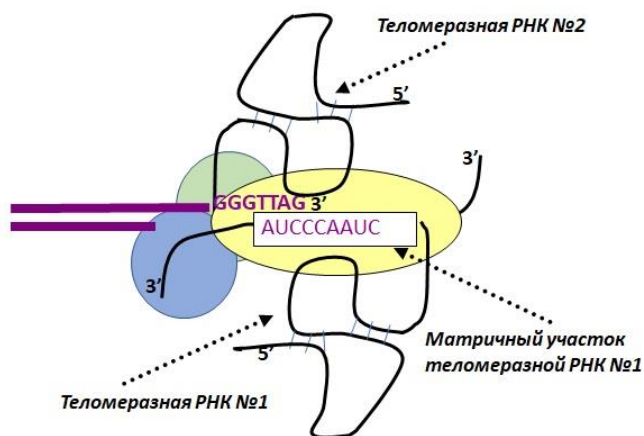


Рис. 5 Модель димеризации теломеразной РНК в теломеразном комплексе при образовании активного состояния теломеразы.

Для проверки возможной взаимосвязи димеризации теломеразной РНК у дрожжей *S. cerevisiae* (TER имеет тривиальное название TLC1) и активности теломеразы необходимо было создать систему с одновременной экспрессией двух различающихся, но полностью функциональных TER (содержащих одинаковый матричный участок дикого типа и все элементы, необходимые для взаимодействия с компонентами комплекса). После выделения теломеразного комплекса за одну TER, нужно было проверить наличие второй и оценить теломеразную активность (ТА) в выделенном препарате.

Создание штаммов *S. cerevisiae*, экспрессирующих TER с аптамерной вставкой, и проверка их жизнеспособности

Для создания такой системы использовали методологию, разработанную автором ранее при исследовании функционирования другого РНК-белкового комплекса (тмРНК в процессе трансляции) [8]. В ген теломеразной РНК вводили последовательность, кодирующую РНК-аптамер, который обладает средством к стрептавидину. Исходя из результатов, полученных нами при изучении комплекса тмРНК с рибосомой [9], мы полагали, что РНК-аптамер, локализованный только на поверхности теломеразного комплекса, позволит выделить теломеразу методом аффинной хроматографии, проверить ее активность и установить присутствие в выделенном препарате разных молекул РНК. Поэтому для введения аптамера к стрептавидину были выбраны два района теломеразной РНК: 1005–1019 нуклеотидных остатков (н.о.) и 1056 – 1068 н.о. (рис. 6А, вставка 1 и вставка 2).

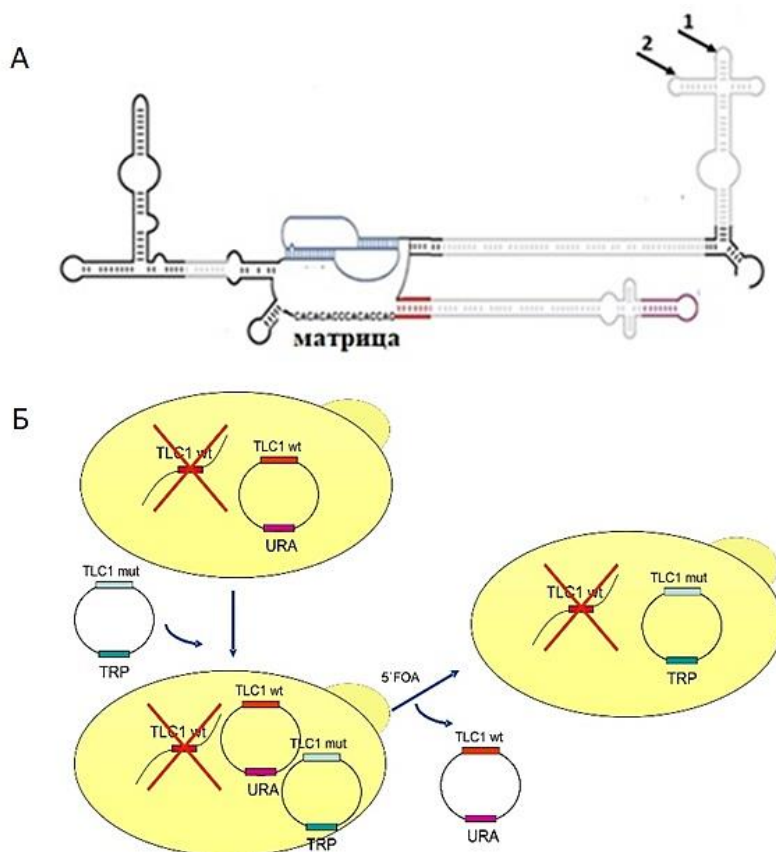


Рис. 6. Создание системы исследования димеризации теломеразы *S. cerevisiae*. А – Схема вторичной структуры теломеразной РНК (Zappulla et al., 2004). Стрелками 1 и 2 обозначены места введения РНК-аптамера. Б – Схема системы замены плазмид в клетках *S. cerevisiae* (желтые овалы), позволившая проверить жизнеспособность штаммов с модифицированной теломеразной РНК.

Они не перекрываются с известными районами взаимодействия белков теломеразного комплекса и локализованы в терминальной ветви вторичной структуры теломеразной РНК, ответственной за взаимодействие с Sm7-белками (рис. 6А).

Для определения влияния введения аптамерной вставки на сохранение функциональных свойств теломеразной РНК были получены модифицированные штаммы *S. cerevisiae*. В них с плазмиды (pTLCins1 или pTLCins2) экспрессировался ген теломеразной РНК со вставкой 1 или 2 (на рис. 6Б изображены как круг с TLC1 mut и TRP), а ген теломеразной РНК в геноме (рис. 6Б, изображен как TLC1 wt) был удален $\Delta tlc1$. Штаммы получали заменой плазмиды pTLC_URA (рис. 6Б, изображена как круг с TLC1 wt и URA) в штамме $\Delta tlc1$ на pTLCins1 или pTLCins2 выращиванием на среде с 5-фтороротовой кислотой (рис. 6Б, изображена как 5-FOA). Экспрессию измененной теломеразной РНК в клетках полученных штаммов подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Был проанализирован фенотип полученных штаммов на ограничение пролиферативного потенциала, появляющегося при нарушении функционирования теломеразы. Колонии клеток, наблюдаемые в последовательных

разведениях полученных штаммов, выглядели одинаково при сравнении с клетками дикого типа (рис. 7).

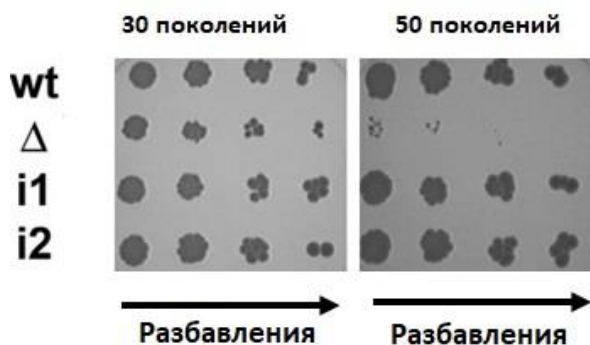


Рис. 7. Фенотип полученных штаммов, экспрессирующих TER со вставкой. Серия разбавлений равного количества клеток разных штаммов на твердой среде SC-Trp. Колонии после 30 и 70 поколений роста после потери плазмиды pTLC_URA. Штамм $\Delta tlc1$, экспрессирующий TER дикого типа с плазмиды отмечен как wt; штамм $\Delta tlc1$ без TER – Δ ; штамм $\Delta tlc1$, экспрессирующий TER со вставкой 1 или 2 – i1 и i2, соответственно.

Следовательно, наличие вставки в TER в каждом из двух положений не влияет на удлинение теломер *in vivo*, и эти участки TER действительно не являются функционально важными.

Экспонированность аптамера в положении 1005 -1019 н.о. теломеразной РНК на поверхность теломеразного комплекса

Низкая эффективность выделения TER со вставкой 2 из клеточного экстракта полученного штамма методом аффинной хроматографии свидетельствует о сложной организации участка 1056 – 1068 н.о. Только аптамерная вставка 1 TER (1005 -1019 н.о.) позволила нам получить теломеразную РНК на стрептавидин-сефарозе (SS) с высоким выходом (рис. 8А). scR1 РНК, не содержащая аптамерной последовательности, не связывалась с SS (рис. 8Б, дорожка 6). Возможность эффективно выделять TER с помощью вставки 1 позволило нам предположить экспонированность аптамера в положении 1005 - 1019 н.о. на поверхность теломеразного комплекса.

Влияние введения аптамерной вставки в теломеразной РНК на активность теломеразы *in vitro*

Для проверки влияния присутствия аптамерной вставки в TER на ТА использовали дрожжевые штаммы, содержащие только гены теломеразной РНК со вставкой. Мы протестировали активность теломеразы, зафиксированной на SS из экстракта клеток, «прямым» методом на основе реакции удлинения теломер-подобного олигодезоксирибонуклеотида (ТПО) TEL11 в присутствии дезоксинуклеозид-трифосфатов (dNTP) и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$ (рис. 8Г).

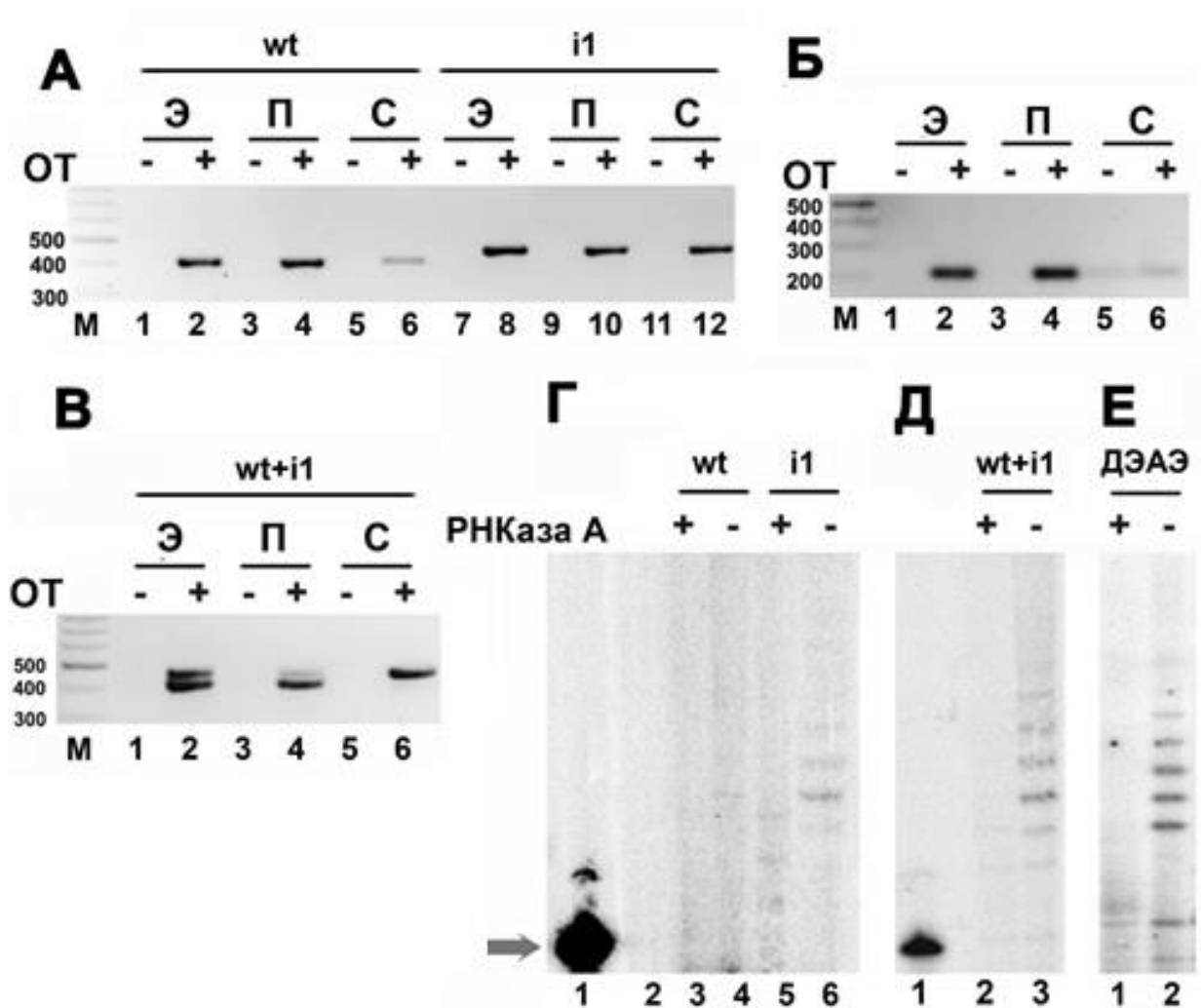


Рис. 8. Анализ выделения теломеразного комплекса из различных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* на стрептавидин-сефарозе. Обозначение штаммов по типу теломеразной РНК, экспрессирующийся в клетках: wt – ТЕР дикого типа, i1 – ТЕР со вставкой 1, wt+i1 – одновременно в одной клетке экспрессируется ТЕР дикого типа и ТЕР со вставкой 1. Анализ РНК методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР: А– Для теломеразной РНК для штаммов wt и i1. Б– scR1 РНК для штамма i1. В– Для теломеразной РНК для штамма wt+i1. ОТ– и ОТ+– реакции в отсутствие и в присутствии обратной транскриптазы. М– маркер длины фрагментов ДНК, в п.н. (цифры слева). РНК исходного дрожжевого экстракта отмечена сверху буквой Э; фракции РНК, содержащей несорбируемые на стрептавидин-сефарозе компоненты–П; компоненты на сорбенте–С. Г, Д, Е– Определение ТА «прямым» методом. Строка сверху со знаками (+) и (–) означает, что анализ проведен с предварительной обработкой РНКазой А и без нее, соответственно. Г– Выделение на стрептавидин-сефарозе из wt и i1 независимо. Дорожки: 1– 5′- [³²P]-содержащий олигодезоксирибонуклеотид TEL11; 2– разделительная; 3, 4– для wt; 5, 6– для i1. Д– Выделение теломеразы на стрептавидин-сефарозе из штамма wt+i1. 1 – 5′- [³²P]-содержащий олигодезоксирибонуклеотид TEL11; 2, 3 – для wt+i1. Е– Анализ ТА во фракции, обогащенной теломеразой с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе из исходного штамма. Положение олигодезоксирибонуклеотида TEL11 отмечено стрелкой.

Для сравнения анализировали теломеразу, выделенную из экстракта клеток методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, традиционно используемой для этих целей (рис. 8Е).

Для контроля определения активности именно РНК-белкового комплекса использовали предварительную обработку фракций РНКазой. Этим исключили присутствие в образце примеси ДНК-зависимой полимеразы, которая может влиять на результат анализа. Характерные продукты удлинения теломеразой ТПО TEL11 присутствуют только для штамма с теломеразной РНК со вставкой 1 (рис. 8Г). Аналогично теломеразе, выделенной традиционно с помощью ионообменной хроматографии (рис. 8Е), наблюдается добавление только одного теломерного повтора (рис. 8Г). На основании представленных данных можно сделать заключение, что TER, содержащая вставку 1 функциональна *in vitro*.

Влияние димеризации теломеразной РНК на активность теломеразы

Для проверки необходимости димеризации теломеразной РНК для синтеза теломеразой повтора мы использовали штамм, который содержал оба гена теломеразной РНК (со вставкой 1 и без нее). Оба варианта теломеразной РНК имели одинаковый уровень экспрессии, который оценивали методом ОТ-ПЦР в клеточном экстракте из этого штамма (рис. 8В, дорожка 2).

Экстракт из этого штамма использовали для иммобилизации теломеразы на SS и анализировали наличие обеих теломеразных РНК ОТ-ПЦР во всех фракциях в этом процессе. Во фракции, содержащей несорбируемые компоненты, количество TER со вставкой и дикого типа различно (рис. 8В, дорожка 4). Преобладает РНК дикого типа. С SS взаимодействует только TER со вставкой (рис. 8В). Отсутствие теломеразной РНК дикого типа в иммобилизованной фракции означает, что на сорбенте произошла иммобилизация мономера теломеразной РНК. В случае димера теломеразной РНК в теломеразе (рис. 5) детектировали бы оба типа теломеразной РНК. В результате полученных данных мы можем сделать вывод, что выделенная теломераза содержит только один тип теломеразной РНК и теломеразный комплекс, иммобилизованный на сорбенте - это мономер [10]. Иммобилизованный на SS теломеразный комплекс активен в «прямом» тесте ТА (рис. 8Д). Это означает, что *in vitro* теломераза, существующая как мономер, может синтезировать повтор. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что димеризация теломеразы не

нужна для синтеза повтора, но не исключают принципиальной возможности образования димера теломеразной РНК при определенной стадии ее процессинга или при процессивной работе фермента, когда один за другим добавляется несколько повторов. Мы не можем делать выводы об отсутствии взаимосвязи димеризации и процессивной работы теломеразы в тесте активности *in vitro*, так как мы не детектировали процессивность 2-ого типа исходно, возможно, вследствие природы этого типа дрожжей.

Модифицированный метод выделения теломеразы дрожжей на SS позволил определить присутствие в теломеразном комплексе белка, ковалентно модифицированного биотином [11]. Использование экстракта из штамма *S. cerevisiae Δarc1* позволило сделать предположение, что это белок Arc1 [12].

1.3. Теломераза термотолерантных дрожжей

При постановке исследований всегда остается возможность существования артефактов за счет нарушения свойств исследуемых биополимеров в условиях *in vitro*. Разобраться в этом помогает сравнительный анализ функционирования комплекса у различных видов, что позволяет выявить консервативные и видоспецифические аспекты работы различных биополимеров и, в частности, теломеразы. Кроме того, разработка системы для исследования теломеразы с потенциально более стабильными компонентами *in vitro* упростит работу и откроет дорогу к их структурным исследованиям.

Выбор новой модельной системы для исследования теломеразы у дрожжей

Одной из задач исследования стала разработка системы для изучения теломеразы у других видов почкующихся дрожжей. При малом количестве РНК-белкового комплекса в клетке, его невысокой стабильности *in vitro* основной сложностью становится получение воспроизводимых результатов из-за разрушения и потерь комплекса при выделении. Необходимо, чтобы свойства самого организма обеспечивали повышенную прочность РНК-белковых комплексов. Так как более стабильные *in vitro* ферменты выделяют из организмов, живущих в экстремальных условиях, мы решили использовать термофильный или термотолерантный организм как модельный для изучения теломеразы и теломер. При постановке экспериментов *in vitro* с белками или многокомпонентными системами из такого организма вероятность успеха больше, так как стабильность выделенных белков связана со

способностью организма функционировать при повышенных температурах, отобранной эволюцией. Необходимо также, чтобы теломеры этого организма были регулярными, как и у человека. Это позволяет уже на стадии выбора модели исследования иметь некоторые общие свойства системы и найти особенности, скрытые ранее при использовании других дрожжей из-за гетерогенности теломерных повторов. Кроме того, использование в качестве модельного организма дрожжей из семейства, не исследованного с точки зрения функционирования теломеразного комплекса, позволит расширить фундаментальные знания о механизме поддержания длины теломер. Исходя из изложенного выше, для изучения теломеразы мы выбрали термотолерантные дрожжи *H. polymorpha* (альтернативные названия: *Ogataea polymorpha* и *Pichia angusta*). Они живут при повышенных температурах и имеют те же преимущества работы с одноклеточными эукариотами, которыми обладают пекарские дрожжи из-за биотехнологических приложений.

Идентификация и характеристика теломеразных генов дрожжей *H. polymorpha*

Для идентификации и дальнейшей характеристики теломеразных генов термотолерантных дрожжей, в рамках совместной работы с проф. Равиным Н.В. и сотр. (центр Биоинженерии РАН) было проведено секвенирование полного генома *H. polymorpha* [13] и выполнен анализ транскриптома [14] в искусственных условиях укорочения теломер при повышении температуры. Полученные результаты показали, что укорочение теломер при повышенных температурах связано с уменьшением количества мРНК TERT. Полученные данные позволили провести поиск теломеразных генов по гомологии. Идентификация гена теломеразной РНК была проведена на основе поиска в геноме последовательности, состоящей из одного с половиной теломерного повтора (матричный участок теломеразной РНК и место посадки теломеры на матрицу). Поиск такой последовательности привел к выявлению 50 районов в геноме. Из них в первую очередь исключили последовательности, кодирующие белки. В результате остался один участок в геноме, окружённый генами, гомологи которых соседствуют с геном теломеразной РНК у пекарских дрожжей. Потенциальный ген каталитической субъединицы теломеразы был определен по гомологии с генами белков TERT других организмов. Экспериментальное подтверждение взаимосвязи идентифицированных генов с теломеразой было основано на определении фенотипа укороченных теломер для

искусственно полученных штаммов с делециями потенциальных генов *TERT* и *TER*. Для этого проверяли жизнеспособность штаммов также, как и для пекарских дрожжей с теломеразными РНК, содержащими аптамерную вставку и определяли степень укорочения теломер методом анализа концевых фрагментов хромосом. Однозначным доказательством идентификации генов основных компонентов теломеразного комплекса стало восстановление поддержания длины теломер при экзогенной экспрессии гена в штамме с делецией этого гена. Также белок *TERT* *H. polymorpha* получили путем рекомбинантной экспрессии в *E. coli*, выделили его в растворимом состоянии и проверили его РНК-зависимую ДНК-полимеразную активность *in vitro*. Детекция такой активности позволила утверждать, что это именно теломеразная обратная транскриптаза [15].

На основании последовательности теломерного повтора и анализа последовательности *TER* *H. polymorpha* мы определили длину матричного участка, которая составила 8 нуклеотидов, закодированных 171-178 н.о. в последовательности *TER*.

Разработка метода тестирования теломеразной активности в дрожжах *H. polymorpha*

Для того, чтобы изучать какой-либо ферментативный комплекс, не охарактеризованный ранее, в первую очередь необходимо иметь тест на предполагаемую активность и увеличить выход обогащения фермента из экстракта клеток. Для этого был использован подход, аналогичный традиционному подходу концентрирования теломеразы из экстракта пекарских дрожжей (на основе ионообменной хроматографии). Для визуализации активности теломеразы использовали «прямой» метод детекции, где в качестве ТПО был выбран олигодезоксирибонуклеотид с теломерной последовательностью *H. polymorpha*. Границы теломерного повтора мы могли только предполагать. Для функционирования теломеразы необходимо, чтобы конец теломерного повтора был комплементарен началу матричного участка теломеразной РНК. Это требуется для транслокации синтезированной последовательности нуклеотидов в начало матричного участка при добавлении нового повтора. Чтобы определить добавляемый повтор и границы матричного участка, был проведен эксперимент с серией олигодезоксирибонуклеотидов в качестве ТПО, последовательности которых отличались одним нуклеотидом. Длина всех олигодезоксирибонуклеотидов была

одинаковой, так как число нуклеотидов равное удаленному с 3'-конца было добавлено в последовательность с 5'-конца (рис. 9). Это позволило сделать анализ результатов определения ТА более наглядным.

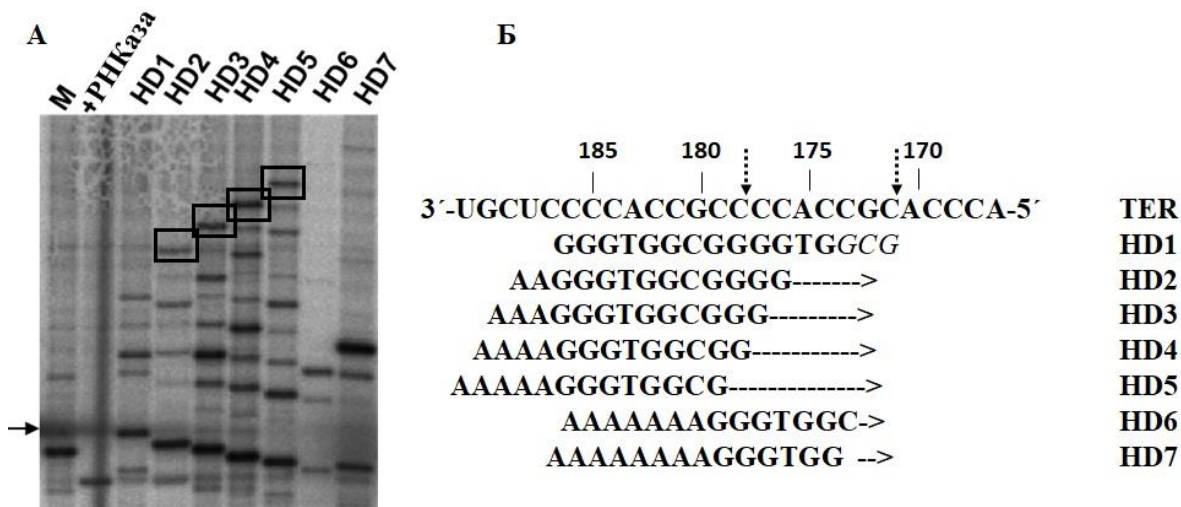


Рис. 9. Определение границ теломерного повтора и матричного участка у теломеразной РНК *H. polymorpha*. А – Использование различных субстратов (HD1- HD5) отмечено над дорожкой соответствующим названием. Стрелка указывает на положение в геле зоны, соответствующей по подвижности длине исходных олигодезоксирибонуклеотидов. + РНКазы – обработка РНКазой. М – маркер длины. Б – Схема определения границ теломерного повтора. Показана возможная гибридизация набора олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих полностью или частично последовательность теломерного повтора, и матричного участка теломеразной РНК *H. polymorpha*. Вертикальными стрелками отмечены положения, используемые как первый и последний матричные нуклеотиды. Для HD1 присоединяемые теломеразой нуклеотиды выделены курсивом. Горизонтальными стрелками указано направление синтеза. TER – теломеразная РНК, HD№ – ТПО.

Как и ожидалось, подвижность зон, соответствующих продуктам реакции, уменьшалась в ряду олигодезоксирибонуклеотидов HD1-HD5 (рис. 9А). Этот эффект виден для наиболее длинного продукта (выделен в рамку на рис. 9А). Это отражает изменение позиции гибридизации субстрата в начальный участок матрицы теломеразной РНК. HD5 может гибридизоваться как в самом начале, так и на конце матричного участка. Для HD6 и HD7 наблюдается практически единичный сигнал, соответствующий добавлению двух и трех нуклеотидов до конца матричного участка теломерного повтора. В совокупности, эти данные позволили предположить, что концевые участки повтора соответствуют последовательности 5'-GGTGGCGG-3'.

Свойства теломеразы термотолерантных дрожжей в зависимости от температуры
 Дрожжи *H. polymorpha* живут при более высоких температурах, чем другие виды дрожжей, поэтому необходимо было провести анализ активности теломеразы при различных температурах. Теломеразная активность в экстракте не детектировалась при температурах выше 35°C – почти оптимальной для роста клеток (рис. 10А).

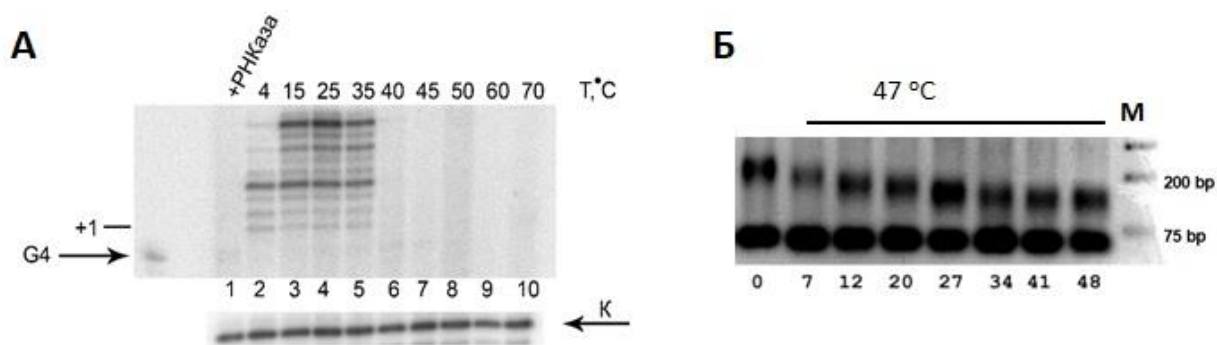


Рис. 10. Взаимосвязь активности теломеразы *H. polymorpha* и повышения температуры. А – Анализ активности теломеразы при различных температурах [16]. «К» – внутренний стандарт, представляющий собой [P³²]-содержащий олигодезоксирибонуклеотид, который добавляют после проведения реакции к продуктам теломеразной реакции до очистки и используют для сравнения результатов. При наличии одинаковой интенсивности сигнала можно сравнивать дорожки между собой. Цифры над дорожками – температура реакции. Обработка реакционной смеси РНКазой указано над соответствующей дорожкой как «+РНКазы». Б – Укорочение длины теломер в клетках *H. polymorpha* в условиях культивации при 47°C, установленное методом определения теломерной длины одной хромосомы. Снизу цифрами указано число удвоений количества клеток при 47°C. 0 – культура выращена при 37 °C и разбавлена.

При снижении температуры до 4°C детектируется синтез теломерной ДНК, но меняется набор продуктов. Только для первой части повтора, состоящей из пяти нуклеотидов, при низкой температуре синтез идет также эффективно, как и при 37°C. Такое наблюдение позволяет предположить существование термодинамического барьера в реакции синтеза полного теломерного повтора, связанного со структурными изменениями в архитектуре теломеразного комплекса, которые облегчаются с повышением температуры. Этот факт реорганизации теломеразного комплекса независимо подтвержден в экспериментах по переносу энергии флуоресценции между одной молекулой теломеразной РНК и ТПО при исследовании процессивной работы теломеразы человека (Park et al., 2014). Прекращение функционирования теломеразы, способной поддерживать длину

теломер в термотолерантных дрожжах, приводило к укорочению теломер при культивировании дрожжей при повышении температуры (рис. 10Б) [14].

Теломераза термотолерантных дрожжей синтезирует *in vitro* дополнительный Т

При анализе ТА *in vitro* оказалось, что к ТПО добавляется большее, чем в теломерном повторе число нуклеотидов в обогащенном теломеразой экстракте. Природу дополнительного, 9-ого от положения +1 нуклеотида устанавливали путем пошагового определения последовательности с использованием дидезоксирибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов при удлинении ТПО HD1. Его последовательность выбрана таким образом, что удлиняемый конец оказывается в центре матричного участка теломеразной РНК при гибридизации. При наличии в смеси только радиоактивно меченного dGTP к субстрату HD1 присоединялся лишь один нуклеотид в соответствии с последовательностью матрицы (рис. 11А).

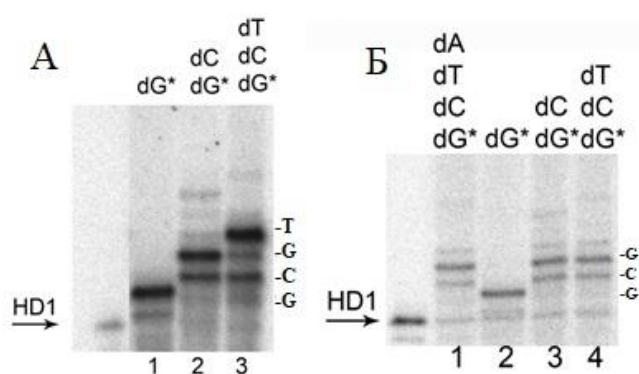


Рис. 11. Активность теломеразы *H. polymorpha in vitro* в присутствии различного набора dNTP. А — TER дикого типа. Б — TER с заменой А170С. Стрелкой отмечена зона, соответствующая исходному ТПО HD1. Добавленные dNTP отмечены над дорожками как dN, dG* соответствует $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{-dGTP}$. Справа отмечены присоединенные к HD1 нуклеотиды.

Совместное добавление $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$ и dCTP приводило к присоединению еще трех нуклеотидов. Синтез дополнительного нуклеотида, соответствующего девятому нуклеотиду в реакции описанной выше, и являющийся четвертым при использовании в качестве субстрата для удлинения олигонуклеотида HD1, происходил только в том случае, когда добавляли 2'-дезокситимидин-5'-трифосфат. Таким образом, к ТПО добавлялась последовательность, несоответствующая теломерному повтору 5'-GGGTGGCG-3', а именно 5'-GGGTGGCGT-3'. Эта последовательность может быть синтезирована при использовании граничащего с матричным участком нуклеотида А170 в теломеразной РНК. Чтобы доказать, что за добавление дополнительного нуклеотида ответственно именно положение 170 теломеразной РНК, а не трансферазная активность белка из экстракта, была введена мутация в ген теломеразной РНК, приводящая к замене А170С. Мы

проанализировали последовательность нуклеотидов, присоединенную теломеразой, выделенной из штамма, экспрессирующего TER с заменой A170C (рис. 11 Б). Действительно, добавление 2'-дезокситимидин-5'-трифосфата к смеси субстрата HD1, [α - 32 P]-dGTP, dCTP и теломеразы из штамма, экспрессирующего TER с заменой A170C не привело к удлинению продукта реакции (рис. 11 Б, дорожки 3 и 4) в отличие от анализа TER дикого типа (рис. 11 А, зона, отмечена Т справа от геля, дорожки 3 и 4). Это подтверждает не только наличие замены A170C в теломеразной РНК, но и то, что нуклеотид A170 необходим для детектируемого нами присоединения последнего нуклеотида. Эффективность этого процесса невысока, поскольку последний добавляемый теломеразой дикого типа нуклеотид в реакции синтеза теломерного повтора *in vitro* не присутствует в последовательности теломерного повтора *H. polymorpha*. Мы не смогли обнаружить дополнительный Т после последовательности теломерного повтора (5'-GGGTGGCG-3') внутри теломерной ДНК при анализе данных секвенирования генома этих дрожжей. При синтезе 5'-GGGTGGCGT-3' нарушается идентичность последовательности конца теломеры. Это должно предотвращать эффективное добавление нового повтора в следующем раунде синтеза вследствие невозможности формирования 3'-концом теломеры идеального дуплекса с матрицей, без которого не будет идти инициация синтеза ДНК. Мы проверили, может ли теломераза использовать в реакции *in vitro* в качестве теломерного субстрата олигодезоксирибонуклеотид, соответствующий по последовательности такому вновь синтезированному повтору, определенному нами, и не детектировали удлинения. Это означает удаление дополнительного Т в процессе функционирования теломеразы и то, что единственным положением этого Т в теломере *in vivo* может быть только 3'-конец теломеры.

Теломераза термотолерантных дрожжей синтезирует *in vivo* дополнительный Т

Для того, чтобы проверить предположение о присутствии искомого Т на конце теломер *in vivo*, после выделения геномной ДНК *H. polymorpha* к ее концам присоединяли ДНК-дуплекс методом ферментативного лигирования. ПЦР проводили, используя как матрицу модифицированную таким образом геномную ДНК и пару праймеров: олигонуклеотид, комплементарный субтеломерной области *H. polymorpha*, и другой олигодезоксирибонуклеотид, комплементарный последовательности лигированного дуплекса. Анализ нуклеотидных

последовательностей полученных ПЦР-фрагментов проводили совместно с проф. Равиным Н.В. и сотр. методом высокопроизводительного секвенирования. Для определения концевой нуклеотида были выбраны только полные «прочтения». Они содержали теломерные повторы и известную последовательность из лигированного дуплекса. Только последний теломерный повтор имел Т на конце. 90% всех проанализированных прочтений содержало в качестве концевой последовательности 5'-GGGTGGCGT-3', то есть, вероятно, что каждая теломера содержит Т на 3'-конце. Это означает, что взаимодействие теломеразы с нуклеотидом А170 теломеразной РНК происходит при каждом синтезе концевой теломерного повтора ДНК.

Функциональная значимость для теломеразы термотолерантных дрожжей Т на 3'-конце вновь синтезированного теломерного повтора

Чтобы сделать предположение о функциональной значимости этого процесса, мы заменили нуклеотид А170 теломеразной РНК на U, G или C и проверили изменение длины теломер в таких штаммах в ряду поколений после введения мутации двумя независимыми способами: методом анализа длины концевых фрагментов хромосом на основе Саузерн-блотинга и методом определения теломерной длины одной хромосомы (STELA-анализ). Только замена А на С приводила к увеличению средней длины теломер и гетерогенности фрагментов при полной комплементарности 3'-конца вновь синтезированного теломерного повтора к началу матрицы теломеразной РНК (рис. 12).

В случае замены А170G и А170U продукт удлинения теломеразой также не может являться ее субстратом без дополнительной коррекции, как и в случае теломеразной РНК дикого типа (рис. 13). Напротив, появление в 170-м положении С приводит к образованию на конце теломерного повтора dG. Продукт удлинения субстрата теломеразой оказывается способным образовать идеальный дуплекс с началом матричного участка теломеразной РНК (рис. 13). Это означает, что замена А170С в матричном участке теломеразной РНК «снимает паузу», необходимую для удаления 3'-концевого нуклеотида. Это может приводить к увеличению количества повторов, синтезированных теломеразой за одно присоединение к концу хромосомы. Данное предположение согласуется с фактами, согласно которым длина теломер в штаммах, содержащих TER с заменами А170G и А170U, сопоставима с длиной теломер в

штамме с РНК дикого типа, а введение в TER замены A170C приводит к появлению более длинных и гетерогенных фрагментов теломер. Это говорит о важности полной комплементарности 3'-конца вновь синтезированного теломерного повтора к началу матрицы теломеразной РНК для контроля длины теломер.

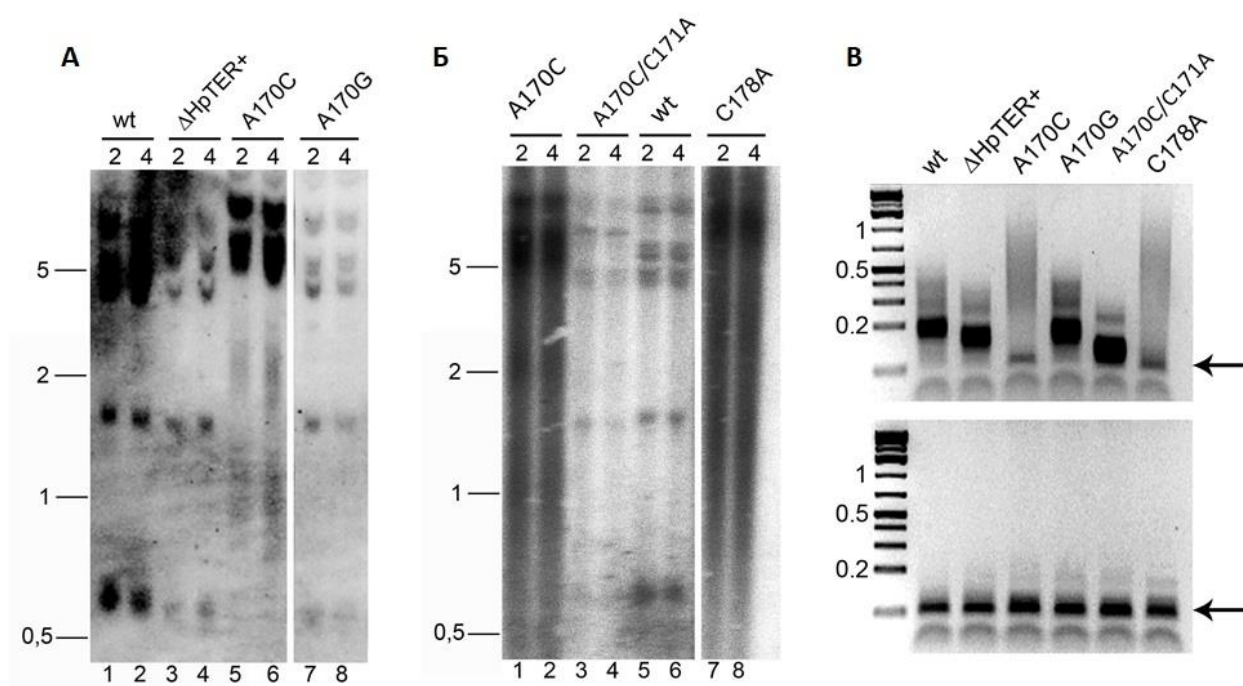


Рис. 12. Анализ длины теломер штаммов с теломеразной РНК, несущей замены в положении A170. А, Б – Саузерн-блот анализ с пробой последовательности теломерного повтора для концевых рестрикционных фрагментов геномной ДНК в различных штаммах. wt – штамм дикого типа (А – дорожки 1, 2, Б – дорожки 5, 6), $\Delta HprTER+$ – штамм с удаленным геном теломеразной РНК в геноме и геном РНК дикого типа в плазмиде (А – дорожки 3, 4). Штаммы с геном теломеразной РНК, которая содержит замены A170C (А – дорожки 5, 6, Б – дорожки 1, 2), A170G (А – дорожки 7, 8), A170C/C171A (Б – дорожки 2, 4), C178A (Б – дорожки 7, 8) обозначены соответственно сверху. Слева отмечены положения маркера длины ДНК, в тысячах п. н. В – STELA-анализ длины теломер. Верхнее изображение – анализ продуктов «теломерного» ПЦР. Нижнее изображение – контроль специфичности сигнала. Стрелкой отмечен неспецифичный продукт амплификации. Остальные подписи соответствуют А.

Для дополнительного подтверждения корректности модели мы создали еще два штамма с заменами в матричном участке TER. Начальный фрагмент матрицы был изменен так, чтобы теломерный повтор с дополнительным Т на 3'-конце образовывал идеальный дуплекс с началом матричного участка (это замена C178A в TER). Во втором случае в TER кроме замены A170C вводили замену в соседнее положение 171. Функционирование теломеразы с такой двойной заменой в

теломеразной РНК вновь требует удаления 3'-концевых нуклеотидов для эффективного образования дуплекса с началом матричного участка. Замена С178А в теломеразной РНК приводила к удлинению теломер аналогично А170С (рис. 12Б, дорожки 7, 8), а двойная замена А170С и С171А (А170С/С171А) - к образованию коротких и гомогенных теломер (рис. 12Б, дорожки 3, 4). Полученные результаты подтверждают важность комплементарности вновь синтезированного 3'-конца с началом матричного участка теломеразной РНК в контроле длины теломер у термотолерантных дрожжей.

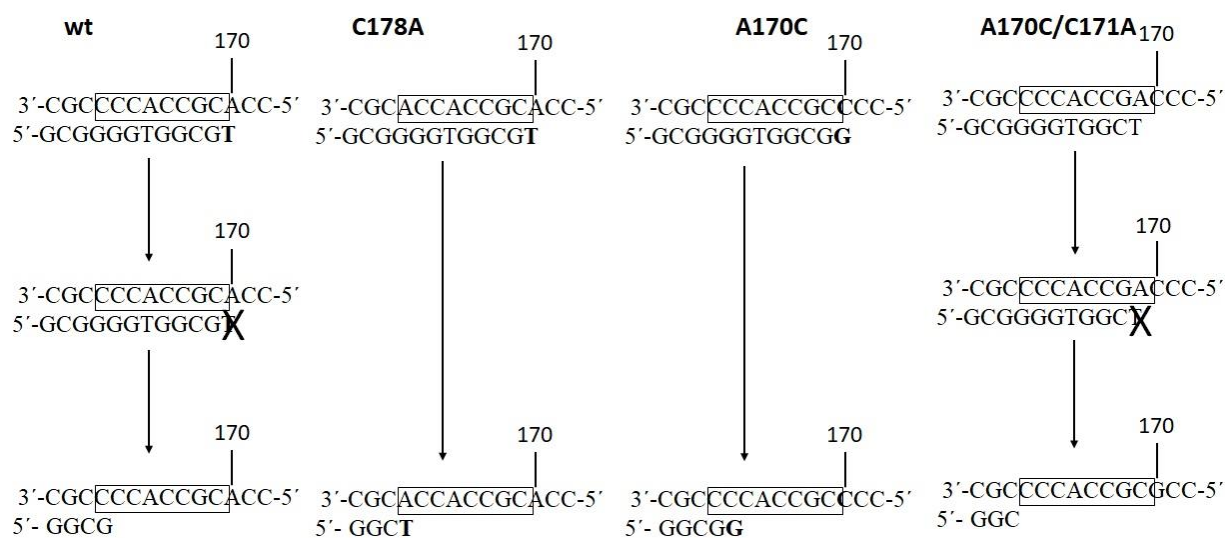


Рис. 13. Схема, иллюстрирующая комплементарность продукта удлинения ДНК теломеразой с различными нуклеотидами в положении А170 теломеразной РНК. wt – TER дикого типа, остальные схемы озаглавлены согласно замене в TER. Матричный участок TER выделен рамкой. Стрелка вниз означает процесс транслокации. В случае wt, А170G, А170U без удаления последнего нуклеотида (этот процесс отмечен крестом) начало синтеза следующего повтора невозможно.

Таким образом, впервые показано, что обратная транскрипция теломеразой *H. polymorpha* нуклеотида А170 теломеразной РНК приводит к появлению «дополнительного» Т на 3'-конце вновь синтезированного повтора как *in vitro*, так и *in vivo*. Он препятствует удлинению теломер за счёт неспособности продукта реакции, катализируемой теломеразой, перемещаться в начало матричного участка теломеразной РНК и образовывать корректный гибридный дуплекс РНК/ДНК. Возможно, что такое встраивание Т на конец хромосомы уменьшает эффективность транслокации и, как следствие, способность добавлять несколько повторов за одно присоединение теломеразы, то есть снижает процессивность второго типа, характерную для теломеразы. Обнаруженный нами дополнительный Т на конце

теломер представляет собой идеальный «переключатель» фермента из процессивного в непроцессивное состояние (рис. 14).

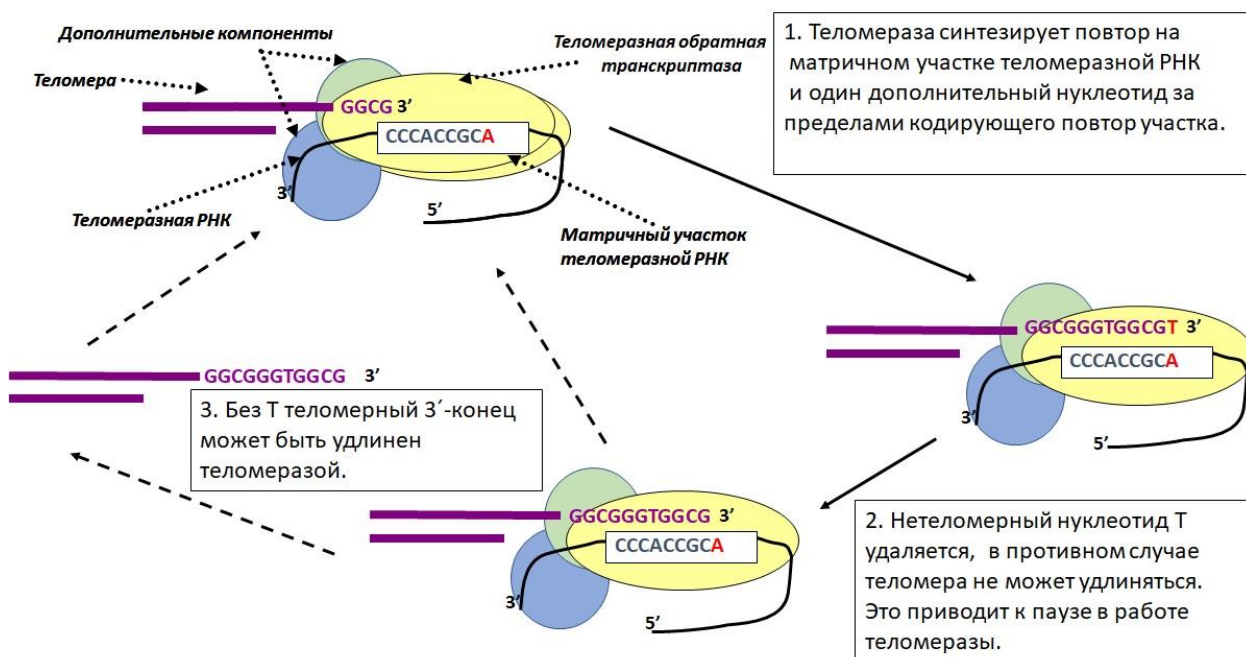


Рис. 14. Схема регуляции функционирования теломеразы *H. polymorpha*.

Доказанное нами существование такого механизма в природе открывает возможность его направленного поиска в клетках человека. В настоящее время уже существуют данные о том, что нарушение контроля длины теломер ассоциировано с повышенным риском развития рака легких (Sun et al., 2015), что косвенно подтверждает существование тканеспецифичных систем ограничения длины теломер у человека.

2. Новые подходы к ингибированию теломеразы человека

2.1. Адаптация метода определения теломерной активности человека для поиска ингибиторов теломеразы

Создание ингибиторов теломеразы человека, потенциально противоопухолевых препаратов [17], возможно только при наличии адекватной системы тестирования активности теломеразы. Для создания такой системы первоначально оптимизировали методики определения активности теломеразы в клеточном экстракте из линий клеток человека. Выбор метода анализа ТА был основан на сопоставлении известных подходов к измерению [18]. Мы остановились на наиболее широко используемом тесте амплификации теломерных повторов (ТРАП), в котором сигнал от функционирования теломеразы усиливается амплификацией с

помощью ПЦР. Основная проблема возникает на этапе ПЦР в силу того, что анализируемые соединения могут влиять как на ДНК-полимеразу, так и на матрицу, мешая ее амплификации, что будет приводить к ложному отнесению соединений к теломеразным ингибиторам.

На первом этапе ТРАП проводили с использованием изотопа фосфора [^{32}P]. Именно этот вариант был использован нами для определения присутствия теломеразы в клетках опухолей шейки матки при разработке диагностикума онкозаболеваний [19]. Эта работа проводилась под руководством член.-кор. РАН Киселева Ф.Л. (РОНЦ имени Н.Н. Блохина). Мы подобрали условия тестирования активности теломеразы для образцов биопсии предопухолевых поражений шейки матки [20]. Комплексный анализ зависимости ТА от стадии трансформации показал, что теломераза всегда активна при опухолевых поражениях, а ее активация происходит на предопухолевых стадиях. Увеличение количества образцов привело к необходимости оптимизации теста и отказу от использования изотопов. Мы показали сохранение чувствительности метода при переходе от радиоавтографии к детекции на основе измерения флуоресценции SybrGreen I, которая возникает при взаимодействии красителя с ДНК, провели оптимизацию разделения продуктов реакции при тестировании ТА [21] и показали возможность использования этого метода для клеточных образцов других млекопитающих с теломерным повтором 5'-TTAGGG-3' [22]. Эффективная детекция сигнала по флуоресценции позволила перейти к количественному методу измерения ТА. Для этого применили метод амплификации теломерных повторов, в котором детекция продуктов ПЦР происходит в реальном времени по накоплению флуоресцентного сигнала. Мы использовали такую детекцию с дополнительной модификацией самого метода - добавлением шага разбавления инкубационной смеси после теломеразной реакции перед ПЦР-амплификацией. Эта модификация стала возможна за счет увеличения количества теломеразы в образце [23]. На первом этапе добавляется вещество - потенциальный ингибитор - к экстракту, заведомо имеющему теломеразную активность. После этого проводится разбавление реакционной смеси исходя из уровня ингибирования этим веществом ПЦР, определенного независимо. Это возможно, так как ПЦР в реальном времени очень чувствительный метод при достаточно высокой концентрации в реакционной смеси продуктов удлинения ТПО

теломеразой. Увеличения выхода продуктов удлинения ТПО теломеразой достигли за счет дополнительной экспрессии основных компонентов комплекса теломеразы и дополнительных этапов очистки клеточного экстракта. Такой подход позволил решить проблему количественного измерения ингибирования теломеразы соединениями различной природы, которые могут значительно ингибировать реакцию ПЦР на шаге амплификации сигнала от удлинения ТПО теломеразой. С его помощью проведена оценка ингибирующего эффекта на активность теломеразы олигонуклеотидов [23] и веществ, блокирующих амплификацию непосредственно за счет взаимодействия с последовательностями теломерных повторов [24].

2.2. Анализ возможных путей блокирования функционирования теломеразы

Возможные пути блокирования функционирования теломеразы показаны на рис. 15.

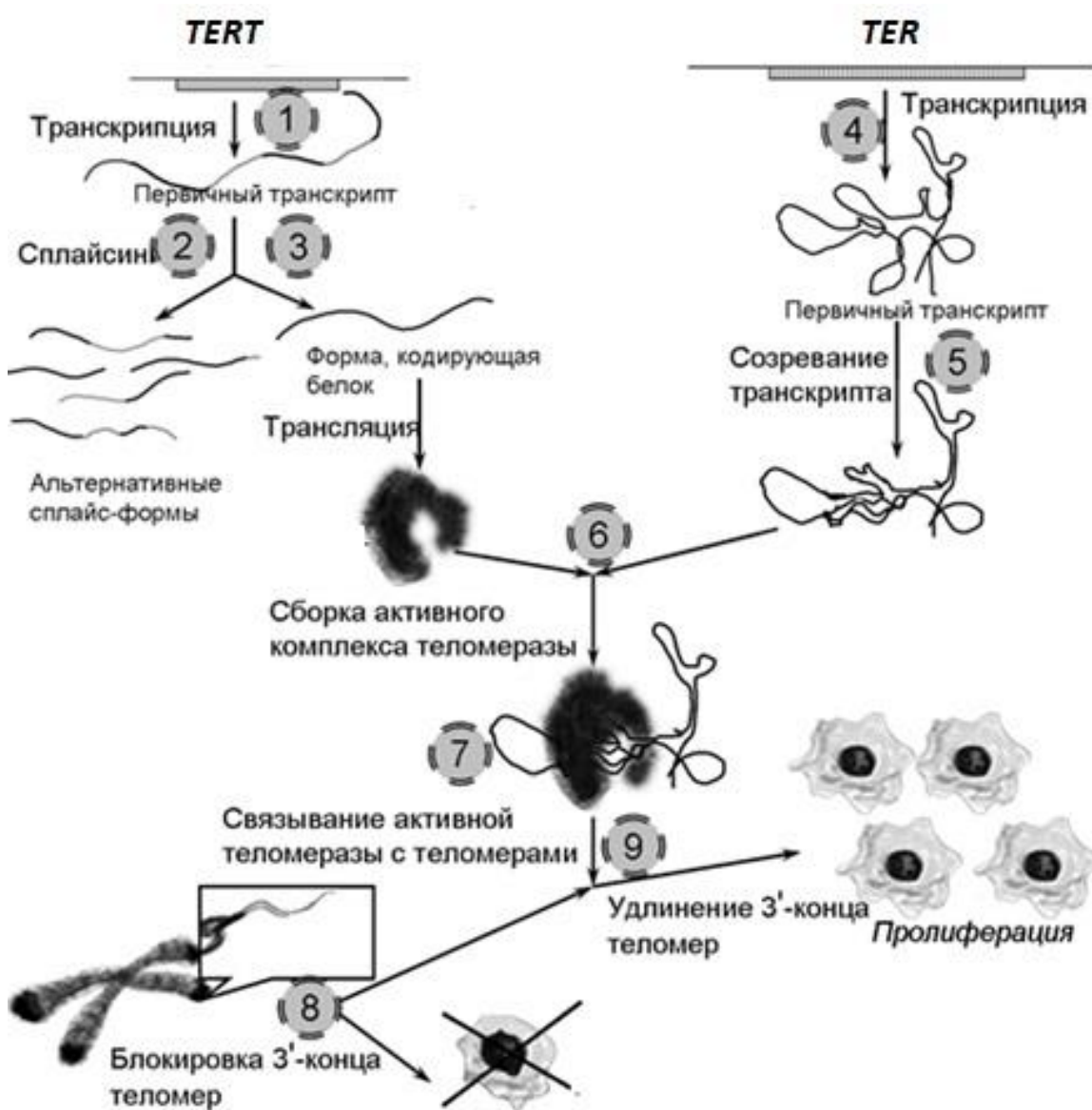


Рис. 15. Возможные пути блокирования функционирования теломеразы.

Чтобы снизить теломеразную активность в клетке, можно уменьшить количество компонентов теломеразного комплекса (рис. 15, пути 1, 4), заблокировать функционирование теломеразы как фермента (рис. 15, пути 7-9), нарушить биогенез теломеразы (рис. 15, пути 2, 3, 4 и 5), снизить стабильность теломеразного комплекса [25]. Наименее исследованы пути влияния на биогенез теломеразы.

2.3. Подходы к ингибированию активности теломеразы

Преимуществом подхода ингибирования активности теломеразного комплекса за счет нарушения биогенеза теломеразы является сохранение без изменений уровня экспрессии индивидуальных теломеразных компонентов в клетке, роль которых пока до конца неясна. Такой подход был предложен в литературе (Jäger et al., 2016), но экспериментально реализован не был. В качестве ингибиторов теломеразы мы сконструировали соединения двух типов: 1) воздействующие на димер и/или блокирующие конформационное состояние теломеразной РНК (разветвленные олигонуклеотиды); 2) моделирующие структуру НК, важной для функционирования теломеразы (олигонуклеотиды и низкомолекулярные соединения).

Использование олигонуклеотидов, направленных на нарушение димеризации теломеразной РНК человека, для ингибирования активности теломеразы

Естественным выбором для создания таких соединений было использование олигонуклеотидов, комплементарных матричной части ТЕР человека, соединенных в одну молекулу через линкер, который дает конформационную подвижность, а также различную ориентацию олигонуклеотидов при объединении их в одну «химерную» НК-конструкцию. Олигонуклеотид М, комплементарный матричной части теломеразной РНК, был объединен в пару во всех возможных вариантах (5'-3', 3'-3', 5'-5') через 1,3-пропандиоловый линкер (СЗ). Все олигонуклеотиды содержали в 2'-положении углеводных фрагментов О-метильную группу (2-ОМе) для увеличения их стабильности и остаток 6-аминогексанола (-NH₂) на 3'-конце для защиты от нуклеаз и от узнавания теломеразой в качестве субстрата (табл. 2). В качестве контроля влияния СЗ в НК-конструкциях, содержащих последовательность М, использовали 2'-ОМе-олигонуклеотид М с линкером СЗ на 5'-конце или 3'-конце (МсЗ или сЗМ). Для каждой НК-конструкции оценивалась способность ингибировать теломеразную активность в выделенном теломеразном комплексе

Таблица 2. Характеристика способности олигонуклеотидов различной структуры ингибировать активность теломеразы человека.

Название	Последовательность олигонуклеотидов, позиции комплементарного участка TER	IC ₅₀ , нМ	
		<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>
c3N	2'-OMe(5'-C3-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ -3'), 272-256	> 500	41,1±7,4
c3M	2'-OMe(5'-C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ -3'), 65-46	100±20	5,2±0,9
c3J	2'-OMe(5'-C3-UUGCUCUAGAAUGAACG-NH ₂ -3'), 168-152	19±16 6,8±0,8 #	43±21
c3G	2'-OMe(5'-C3-UAGGGUUAGACAA-NH ₂ -3'), 54-42	11,6±5,6 5,5±0,6 #	67±33
Mc3	2'-OMe(5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-C3-3'), 65-46	75±57 77,4±10#	175±137
Mc3N	2'-OMe(5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-3'-C3-5'-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ -3'), 65-46&272-256	35±18 118±20 #	2,2±0,8
MNc3	2'-OMe(5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -C3-3'), 65-46-272-256	> 500	18,4±5,6
c3MN	2'-OMe(5'-C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAGGU-UGCCCCGGGCCGACCGCG -NH ₂ -3'), 65-46-272-256	> 500	1,2±0,4
M*c3N	2'-OMe(3'-NH ₂ -GAUUGGGAUUGACUCUCC-5'-C3-5'-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ -3'), 46-65&272-256	15,7±8,2 72±8 #	0,51±0,11
Mc3N*	2'-OMe(5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-3'-C3-3'-GCGCCAGCCGGGCCCGUUG-5'), 65-46&256-272	13,5±3,4	7±1
c3Mc3N	2'-OMe(5'-C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-3'-C3-5'-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ -3'), 65-46&272-256	184±58	0,7±0,5
Nc3M	2'-OMe(5'-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -3'-C3-5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ -3'), 256-272&46-65	76±21 27±3 #	1,3±0,9
Nc3J	2'-OMe(5'-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -3'-C3-5'-UUGCUCUAGAAUGAACG-NH ₂ -3'), 272-256&168-152	> 500	1,5±0,7
N*c3J	2'-OMe(3'-NH ₂ -GCGCCAGCCGGGCCCGUUG-5'-C3-5'-UUGCUCUAGAAUGAACG-NH ₂ -3'), 256-272&168-152	> 500	1,3±0,6
Jc3N	2'-OMe(5'-UUGCUCUAGAAUGAACG -3'-C3-5'-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ -3'), 168-152&272-256	229±72	3,9±1,7
Nmisc3J	2'-OMe(5'-GUUCGCCCCGCGCCGACGCCG-3'-C3-5'-UUGCUCUAGAAUGAACG-NH ₂ -3'), 272-256&168-152	> 500	8,5±3,5
Nc3Jmis	2'-OMe(5'-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -3'-C3-5'-UUGUCCUAAGAUGACAG-NH ₂ -3'), 272-256&168-152	> 500	11,2±0,8
Nmisc3-Jmis	2'-OMe(5'-GUUCGCCCCGCGCCGACGCCG-3'-C3-5'-UUGUCCUAAGAUGACAG-NH ₂ -3'), 272-256&168-152	> 500	18,4±3,2
compNc3J	2'-OMe(5'-CGCGGUCGGCCGCGGCAAC-3'-C3-5'-CGUUCAUUCUAGAGCAA-NH ₂ -3'), 256-272 (компл. цепь) и 152-168 (компл. цепь)	> 500	> 500
Mc3M	2'-OMe(5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-3'-C3-5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ -3'), 65-46&65-46	221±10	1,4±0,3
M*c3M	2'-OMe(3'-NH ₂ -GAUUGGGAUUGACUCUCC-5'-C3-5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ -3'), 46-65&65-46	11,9±0,3 19,3±2,5 #	0,3±0,1
MMc3	2'-OMe(5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-C3-3'), 65-46-65-46	42±1 26,7±3 #	4,5±0,9
c3Mc3M	2'-OMe(5'-C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-3'-C3-5'-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ -3'), 65-46&65-46	44±12	0,31±0,04

- IC₅₀ рассчитана исходя из результатов, полученных прямым теломеразным методом, в остальных случаях IC₅₀ определены с помощью метода количественного ТРАП [23].

(IC₅₀ *in vitro*, табл. 2) или в клеточном экстракте после культивирования клеток в присутствии соединений (IC₅₀ *ex vivo*, табл. 2) [23]. Обнаружено, что IC₅₀ *in vitro* отличаются для «химерных» олигонуклеотидов с разной ориентацией (Mc3M и M*c3M, табл. 2) на порядок. Это можно объяснить именно специфическим взаимодействием двух объединенных последовательностей М с димером теломеразной РНК. Если в теломеразном комплексе присутствует две ТЕР и такой комплекс функционален (то есть димеризация ТЕР – это не результат агрегации при выделении *in vitro*), то их матричные участки ориентированы в пространстве строго определенным образом. Такая определенная ориентация двух матриц будет диктовать предпочтения во взаимодействии с «химерными» олигонуклеотидами с различной ориентацией двух последовательностей, комплементарных матрицам. Наблюдаемая нами разница в эффективности ингибирования теломеразы НК-конструкциями Mc3M и M*c3M говорит об определенной ориентации матричных участков теломеразной РНК в одном теломеразном комплексе. Этот эффект нельзя объяснить стерическими затруднениями. В контрольном эксперименте расположение модификации СЗ на 5'- или на 3'- конце индивидуального олигонуклеотида М не влияло на его ингибирующую способность. c3M или Mc3M могут независимо взаимодействовать как с одной, так и с другой субъединицей димера теломеразы. В случае Mc3M увеличение конструкции на последовательность М на 3'-конце по сравнению с Mc3 однозначно будет вносить стерические затруднения во взаимодействие 3'-конца с одной из субъединиц теломеразы. Это может быть причиной снижения в три раза эффективности ингибирования теломеразы *in vitro* «химерным» олигонуклеотидом Mc3M по сравнению с Mc3 или c3M. В то же время, НК-конструкция с теми же последовательностями, ориентированными по-другому, когда соединение происходит 5'-концами, ингибирует теломеразу на порядок лучше (см. в табл. 2 M*c3M). Это можно объяснить совпадением ориентации олигонуклеотидных фрагментов с ориентацией матричных участков ТЕР в димере. В результате реализуются комплементарные взаимодействия с матричными участками теломеразной РНК в димере для обоих олигонуклеотидов конструкции M*c3M. Сходная тенденция наблюдается при сравнении IC₅₀ *ex vivo*. Это наблюдение подтверждает, что во фракции активной теломеразы человека присутствует димер теломеразной РНК. Открытие

способности теломеразы функционировать в форме димера – это новая основа создания эффективных ингибиторов теломеразы.

Ингибирование теломеразы «химерными» НК-конструкциями

Для ингибирования активности теломеразы путем фиксирования конформации TER «химерными» НК-конструкциями (рис. 16) необходимо было выбрать районы TER для дизайна комплементарных им 2'-ОМе-содержащих олигорибонуклеотидов. В случае матричного участка был предложен участок с небольшим сдвигом М, так как открытая нами новая система регуляции длины теломер у термотолерантных дрожжей, закодированная в TER, позволяет нам предположить важность участка TER, расположенного непосредственно за матричным.

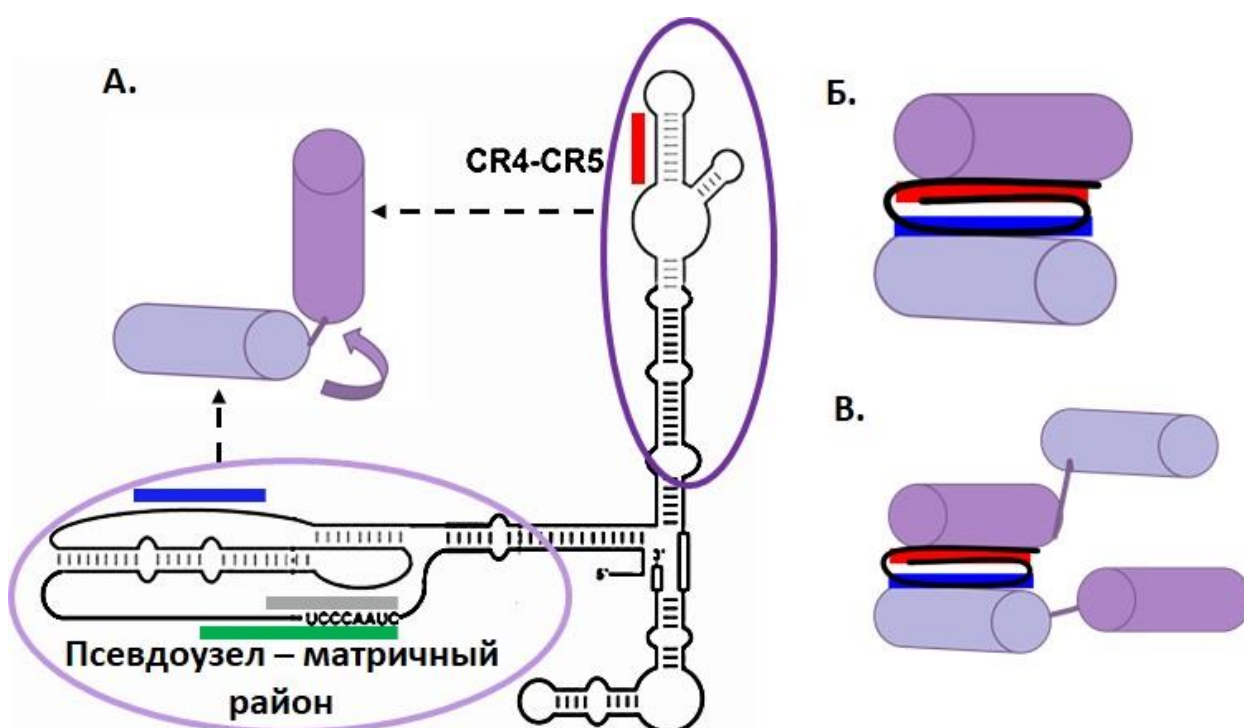


Рис. 16. Общая схема подхода к ингибированию активности теломеразы «химерными» НК-конструкциями. А – Схема вторичной структуры TER человека, на которой отмечены положения индивидуальных олиго-нуклеотидов: М показан зеленой, G – серой, J – синей, N – красной линиями. Овалами обведены функциональные домены TER, их схематическое изображение показано слева в виде цилиндров, соединенных линкером. Две возможности блокировки TER разветвленными НК-конструкциями: внутри- (Б) и межмолекулярная (B). «Химерный» олигонуклеотид представлен «скрепкой».

Выбор района TER в дополнение к матричному был основан на данных о двух функционально значимых доменах этой РНК: первый формирует матричный участок и район псевдоузла TER, второй – CR4/CR5 - ветвь (Chen et al., 2002).

Олигонуклеотиды, комплементарные к последовательностям именно в этих участках ТЕР, были выбраны для создания «химерных» молекул (рис. 16А). НК-конструкции сконструированы и проанализированы по описанной выше схеме. Характеристика влияния различных олигонуклеотидов на активность теломеразы представлена в табл. 2. Наше предположение о возможности использования таких соединений для ингибирования активности теломеразы подтвердилось. Сравнение IC_{50} НК-конструкций Mc3N, MNc3, c3MN, M*c3N, Mc3N*, c3Mc3N, Nc3M показало важность нуклеотидного линкера между олигонуклеотидными фрагментами для ингибирования активности теломеразы. Индивидуальные олигонуклеотиды (c3N, c3M, c3J, c3G, Mc3) ингибируют активность теломеразы менее эффективно, чем объединенные в одну молекулу. Например, НК-конструкция Mc3N в два раза эффективнее ингибирует теломеразу, чем 2'-ОМе-олигонуклеотид c3M. IC_{50} M*c3N и Mc3N* в 5 раз ниже, чем у c3M. Этот эффект возможен как из-за димеризации теломеразы, так и за счет взаимодействия соединения с одной молекулой ТЕР (рис. 16Б). Второй вариант более вероятен, так как для соединений, содержащих разные 2'-ОМе-олигонуклеотидные фрагменты (J, M, N), взаимосвязи между ориентацией в «химере» (M*c3N, Mc3N*, Mc3N) и способностью к ингибированию теломеразы не наблюдается (табл. 2). Вместе с тем, при наличии в НК-конструкции только последовательности M изменение в ней взаимной ориентации олигонуклеотидов (Mc3M и M*c3M) меняло эффективность ингибирования на порядок. Очевидна необходимость подбора последовательностей для таких ингибиторов. Например, при объединении 2'-ОМе-олигорибонуклеотидов J и N в одно соединение (Nc3J, N*c3J, Jc3N) по сравнению с индивидуальным c3J эффективность ингибирования снижается. Неспецифическое взаимодействие с другими НК или белками клетки исключили, проверив частично комплементарные к ТЕР человека НК-конструкции (Nmisc3J, Nc3Jmis, Nmisc3Jmis). Данные, полученные *ex vivo*, отличаются от результатов *in vitro*. Особенного внимания заслуживают соединения, использование которых приводит к увеличению эффективности ингибирования активности теломеразы *ex vivo*. Для сравнения эффекта был синтезирован 2'-ОМе-олигонуклеотид c3G с последовательностью препарата Imetelstat (компания Geron, США) – олигонуклеотидного ингибитора теломеразы, проходящего клинические испытания (Chiappori et al., 2015). В

частности, для НК-конструкции Jc3N эффективность ингибирования возрастает в ~30 раз по сравнению с эффективностью НК-конструкции c3G. Наиболее вероятный механизм ингибирования активности теломеразы в клетке такими НК-конструкциями – это блокирование взаимодействия TERT и TER за счет фиксирования конформации TER.

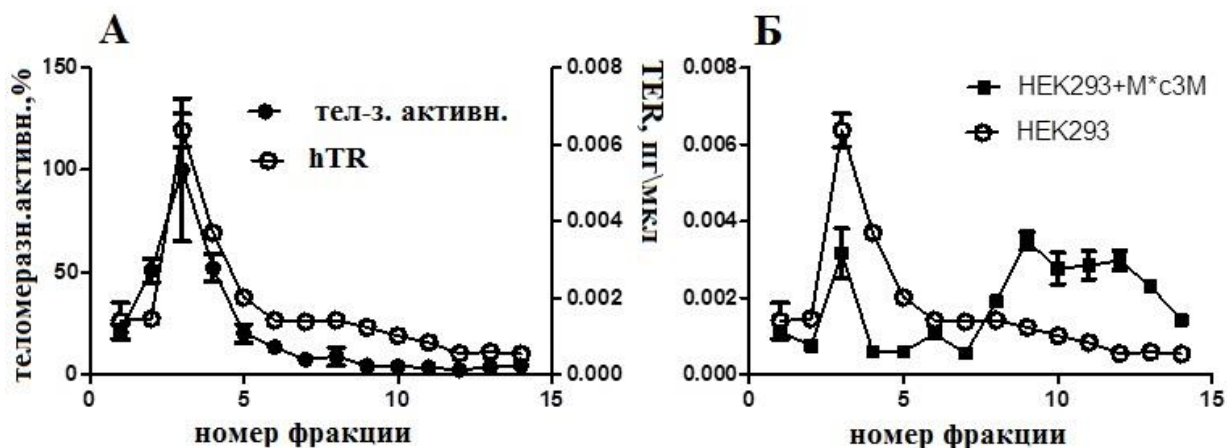


Рис. 17. Оценка влияния разветвленных НК-конструкций на сборку теломеразного комплекса *in vivo*. А – Распределение TER и ТА по фракциям градиента. Б – Распределение TER по фракциям градиента из экстракта клеток с и без M*c3M. Нумерация фракций начинается с более тяжелой.

Для проверки этого предположения было проведено центрифугирование клеточного экстракта в сахарозном градиенте для отделения свободной теломеразной РНК от ее комплексов с белками. Фракции после разделения были собраны, в них измерены количество TER и ТА (рис. 17). Максимум распределения количества TER по градиенту совпадает с максимумом по ТА (рис. 17А), то есть во фракции 3 находится собранная теломераза. Для экстракта клеток, инкубированных в присутствии НК-конструкции M*c3M, по сравнению с контрольными клетками при центрифугировании в градиенте сахарозы количество TER снижается в области собранной теломеразы (фракция 3, рис. 17Б) и увеличивается в области свободной теломеразной РНК (фракции 9-12). Количество собранного теломеразного комплекса оценивали по площади пика. Для эффективных ингибиторов Nc3J, M*c3N, c3MN оно не превышает 40% от количества собранного комплекса в не обработанных клетках. Наиболее значительный эффект наблюдали для НК-конструкции Nc3J. В этом случае образование теломеразного комплекса не детектировалось.

Блокирование именно сборки теломеразы является несомненным плюсом для дальнейшего использования «химерных» НК-конструкций как потенциальных противоопухолевых агентов, что возможно после решения проблемы их доставки в клетку [25].

Изучение ингибирования активности теломеразы олигонуклеотидами, моделирующими структуру НК

Использование синтетических олигонуклеотидов позволило проверить гипотезу о том, что продукт удлинения теломеразы высвобождается из РНК/ДНК-дуплекса и может формировать G-квадруплекс, который может конкурировать в активном центре теломеразы с теломерным субстратом. Мы исследовали способность различных модельных субстратов, неудлиняемых, но имитирующих теломерную НК ингибировать ТА. Были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды, 2'-ОМе-олигонуклеотиды и олигорибонуклеотиды, которые содержали последовательности 2-х или 4-х теломерных повторов (табл. 3). Охарактеризована их способность ингибировать активность теломеразы человека в условиях, при которых G-квадруплексная структура формируется (табл. 3, 63 мМ KCl) и не формируется (табл. 3, 63 мМ LiCl).

Таблица 3. Характеристика способности различных олигонуклеотидов с теломерной последовательностью ингибировать теломеразу.

Название	Последовательность	IC ₅₀ , нМ 63 мМ KCl	IC ₅₀ , нМ 63 мМ LiCl
HuG4D	d(TTAGGG) ₄ -NH ₂	>500	190±28
HuG2D	d(TTAGGG) ₂ -NH ₂	334±160	>500
HuG2-2'OMe	2'OMe(UUAGGG) ₂ -NH ₂	1,06±0,62	1,0±0,5
HuG4-2'OMe	2'OMe(UUAGGG) ₄ -NH ₂	0,96±0,68	0,92±0,41
HuG4R	r(UUAGGG) ₄	1,75±0,16	1,15±0,12
HuG2R	r(UUAGGG) ₂	23±5	11,0±0,9

Образование такими олигонуклеотидами G-квадруплексной структуры в присутствии 63 мМ KCl подтверждалось методом кругового дихроизма. Оказалось, что 2'-ОМе-олигонуклеотиды (HuG2-2'OMe, HuG4-2'OMe) и олигорибонуклеотиды (HuG4R, HuG2R) в большей степени, чем олигодезоксирибонуклеотиды (HuG4D, HuG2D) ингибируют теломеразную активность. Наиболее эффективным ингибитором являлся HuG4-2'OMe, содержащий 4-е теломерных повтора, не зависимо от условий. То есть эффект ингибирования теломеразной активности не был связан со способностью образовывать G-квадруплексные структуры. Это

свидетельствует о том, что у теломеразы существует участок связывания РНК с теломерными повторами (TERRA), а конкуренция G-квадруплексов с субстратом теломеразы отсутствует [26].

Ингибирование активности теломеразы низкомолекулярными соединениями

Данные об ингибировании активности теломеразы, полученные с помощью олигонуклеотидов, позволили нам предложить следующие требования к низкомолекулярному соединению: в нем должны быть плоские элементы, геометрически сходные с гуанинами, например, азотсодержащие гетероциклические соединения, которые находятся друг над другом на расстоянии фосфодиэфирной связи, т.е. аналоги двух соседних гуанинов в одной цепи.

Такая задача потребовала дизайна новых соединений и разработки подходов к их синтезу. Эта часть работы выполнялась совместно с группой проф. Мажуги А.Г. (Химический факультет МГУ). Были выбраны медные комплексы тиогидантоинов (рис. 18). Расстояние в соединениях между гидантоиновыми частями было зафиксировано образованием комплекса с медью и примерно соответствовало расстоянию между двумя соседними основаниями G в G-квадруплексе.

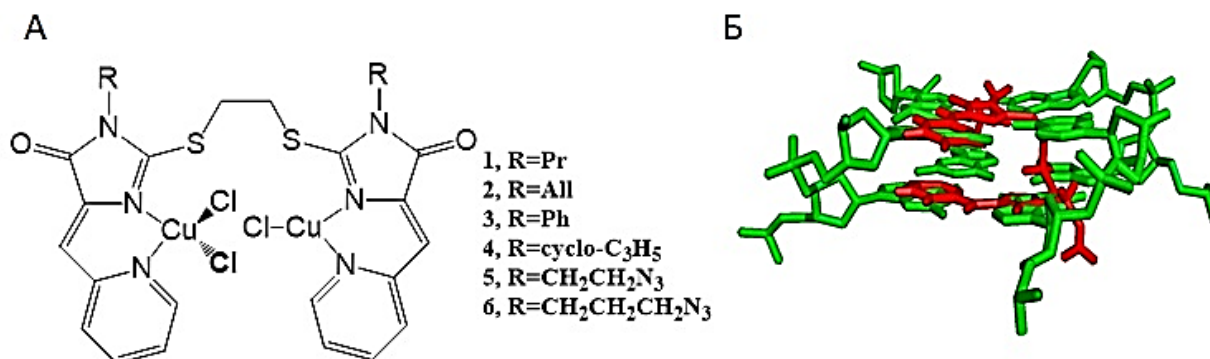


Рис. 18. Медные комплексы на основе 2-алкилтио-5-арилметилен-4H-имидазолин-4-она. А – Общая формула. Б – Совмещение пространственных структур комплекса с ДНК-квадруплексом (PDB-code Id 1KF1).

После проверки цитотоксичности синтезированных соединений **1-6** на нескольких клеточных линиях для дальнейших исследований был выбран комплекс **2**, так как он имел высокую цитотоксичность и лучшую растворимость в воде. Важно, что комплекс **2** продемонстрировал наилучшую способность ингибировать теломеразу. По данным световой микроскопии комплекс **2** изменял морфологию НЕК293 клеток (приводил к сокращению их размера, потере сцепления и округлению формы). Чтобы понять механизм действия соединения, необходимо было прежде всего

выяснить, может ли комплекс **2** непосредственно взаимодействовать с ДНК и расщеплять ее. Превращение суперспирализованной плазмиды в релаксированную форму было использовано как высокочувствительный индикатор появления разрывов ДНК, возможно вызванных соединением **2** (рис. 19).

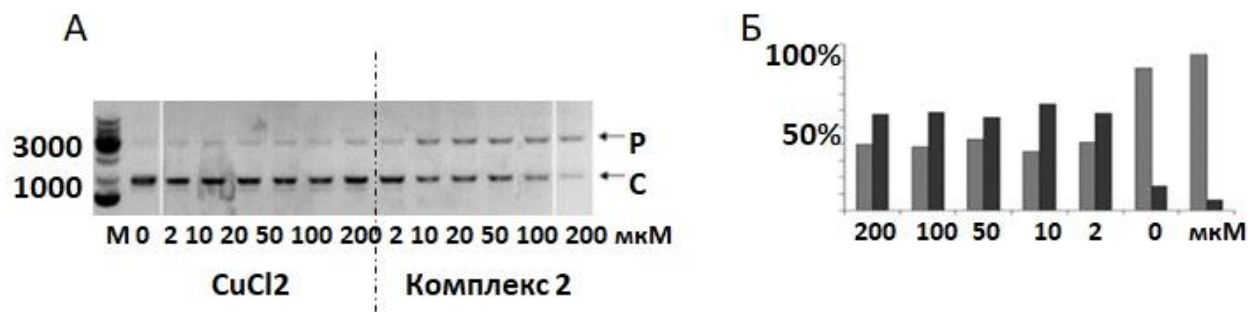


Рис. 19. Анализ расщепления ДНК комплексом **2** *in vitro*. А – Электрофорез в агарозном геле плазмиды pUC18, обработанной комплексом **2** или раствором CuCl₂ (0-200 мкМ). “0” – исходная ДНК после инкубации в таких же буферных условиях без обработки, М – маркер длины ДНК, п.н. Стрелками отмечено положения: Р - релаксированная форма, С – суперскрученная форма. Б – Количественная оценка форм плазмиды, образующихся в ходе эксперимента, методом денситометрии.

Накопление релаксированной формы плазмидной ДНК было обнаружено, начиная с 10 мкМ концентрации комплекса **2**. Мы предположили, что в клетке у этого комплекса присутствует партнер белковой природы, который при взаимодействии с комплексом может стимулировать повреждение ДНК. С этой целью мы проверили может ли комплекс **2** ингибировать полимеразы, оперирующие на ДНК. Наиболее значительный эффект ингибирования комплексом **2** был обнаружен для теломеразы человека (IC₅₀ 2 мкМ) и обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека (IC₅₀ 4 мкМ). Комплекс **2** ингибировал также ряд других полимераз, но с меньшей эффективностью (значения IC₅₀ были выше на порядок). Хотя из этих данных следует, что комплекс **2** сам по себе не может рассматриваться как потенциальное теломераза-специфичное соединение [27], данные, полученные при его изучении, позволяют осуществить направленный поиск ингибиторов теломеразы без разрушения ДНК (например, с помощью комплексов с другими металлами).

3. Заключение

В результате работы удалось однозначно решить вопрос о необходимости димеризации теломеразы для реализации ее каталитической функции. Оказалось, что димеризация в случае *S. cerevisiae* возможна за счет различных компонентов теломеразного комплекса, но наличие двух теломеразных РНК не является необходимым условием для наращивания теломер еще на один повтор *in vitro*. Анализ же ингибирования активности теломеразы человека с помощью разветвленных НК-конструкций позволил установить, что во фракции активной теломеразы существуют комплексы, которые содержат пару теломеразных РНК. Ограничения дрожжей *S. cerevisiae* как модельной системы для исследований теломеразы были преодолены с помощью использования термотолерантных дрожжей. Были решены такие технические сложности как отсутствие систем детекции ТА и длины теломер, неполные геномные и транскриптомные данные для этого организма, неидентифицированные гены основных компонентов теломеразы. Исследование свойств *in vitro* TERT говорит о перспективности использования этой системы для структурных исследований теломеразы. Изучение белка Est3 из этого организма *in vitro* позволило ограничить выводы о биохимических свойствах этого белка только дрожжами *S. cerevisiae* и подчеркнуло необходимость структурных исследований для определения функции Est3. При использовании термотолерантных дрожжей для изучения теломеразы оказалось, что существует механизм контроля длины теломер, закодированный в теломеразной РНК, когда теломераза добавляет кроме повтора еще и дополнительный нуклеотид на только что синтезированный 3'-конец хромосомы, что препятствует дальнейшему его удлинению. Установление механизма регуляции длины теломер у дрожжей позволит в будущем направленно искать схожий механизм регуляции у человека. Система *H. polymorpha* позволила установить взаимосвязь между эффективностью транскрипции и повышением температуры и увидеть изменения в количестве мРНК каталитической субъединицы теломеразы.

Мы модифицировали метод измерения ТА в клеточном экстракте для тестирования клинических образцов и для оценки эффективности потенциальных ингибиторов различной природы, влияющих на амплификацию теломерных повторов в ТРАП.

Наш метод позволил изучать в качестве ингибиторов теломеразы олигонуклеотиды и квадруплекс-стабилизирующие соединения.

В работе были сформулированы два подхода к созданию новых ингибиторов теломеразы. Это, во-первых, направленное создание разветвленных олигонуклеотидных конструкций, нацеленных на изменение пространственной структуры димера теломеразной РНК и нарушение сборки теломеразного комплекса. Во-вторых, конструирование низкомолекулярных соединений, моделирующих структуру НК. Показано, что соединения первого типа эффективно ингибируют сборку теломеразы в клетке и ее активность *in vitro*. В силу того, что последовательности олигонуклеотидов могут быть выбраны направленно, этот подход, применимость, которого показана пока только для теломеразы, универсален для нарушения сборки любых РНК-белковых комплексов и может быть применен для изучения их функционирования и/или строения. Предложен новый класс низкомолекулярных соединений, ингибирующих теломеразу и обладающих способностью расщеплять ДНК.

Более перспективным для будущей разработки противоопухолевой терапии, после решения проблемы направленной доставки соединений в клетки, являются созданные нами олигонуклеотидные ингибиторы, представляющие разветвленные НК-конструкции, которые имеют лучшие характеристики, чем использованный для сравнения аналог первого теломеразного ингибитора олигонуклеотидной природы с теломерной последовательностью – препарата Imetelstat, находящегося в стадии клинических испытаний. Разработанные нами НК-конструкции не содержат теломерной последовательности, что снижает неспецифическое действие таких соединений. Это создает потенциал для их дальнейшего использования.

ВЫВОДЫ

1. На основе геномных и транскриптомных данных, полученных при изучении термотолерантных дрожжей *H. polymorpha*, продемонстрирована перспективность их использования как модельного организма для изучения функционирования теломеразы.
2. Установлено, что в природе существует механизм ограничения длины теломер, закодированный в теломеразной РНК. Обратная транскрипция теломеразой дрожжей *H. polymorpha* нуклеотида A170 теломеразной РНК приводит к появлению «дополнительного» Т на 3'-конце вновь синтезированного повтора как *in vitro*, так и *in vivo*. Т препятствует удлинению теломер за счёт неспособности продукта реакции, катализируемой теломеразой, перемещаться в начало матричного участка теломеразной РНК и образовывать корректный гибридный РНК/ДНК - дуплекс.
3. Выявлены уникальные свойства теломеразного компонента дрожжей *S. cerevisiae*, нехарактерные для *H. polymorpha*. Впервые установлено, что дополнительный компонент теломеразного комплекса дрожжей *S. cerevisiae* белок Est3 способствует диссоциации гибридного ДНК/РНК - дуплекса, а также может димеризоваться и гидролизовать GTP *in vitro*, что не характерно для Est3 *H. polymorpha*.
4. Предложен универсальный подход для изучения и нарушения сборки РНК-белковых комплексов с помощью оригинальных НК-конструкций, представляющих собой два олигонуклеотида, соединенные линкером ненуклеотидной природы. Применение таких конструкций позволило доказать существование димера теломеразной РНК в активном теломеразном комплексе человека *in vitro* и ингибировать его функционирование.
5. Моделирование свойств НК-компонента теломеразного комплекса позволило найти новые ингибиторы теломеразы. Предложен новый класс соединений на основе медных комплексов тиогидантоинов, которые имитируют пространственное расположение двух нуклеотидов теломерного повтора человека. Впервые показано, что такие соединения обладают способностью ингибировать теломеразу *in vitro* и расщеплять ДНК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus.

1. **Зверева М.Э.**, Щербакова Д.М., Донцова О.А. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности // *Успехи биоорганической химии*. 2010. Т. 50. С. 155–202.
2. Щербакова Д.М., **Зверева М.Э.**, Шпанченко О.В, Донцова О.А. Теломераза: строение и свойства фермента, особенности теломеразы дрожжей // *Молекулярная биология*. 2006. Т. 40. С. 514–527.
3. Malyavko A.N., Parfenova Y.Y., **Zvereva M.I.**, Dontsova O.A. Telomere length regulation in budding yeasts // *FEBS Lett*. 2014. V. 588, № 15. P. 2530–2536.
4. Шаранов Ю.С., Смекалова Е.М., **Зверева М.Э.**, Донцова О.А. Выделение активного теломеразного белка Est3p и изучение его димеризации *in vitro* (ускоренная публикация) // *Биохимия*. 2007. Т. 72, № 7. С. 866–871.
5. Малявко А.Н., Логвина Н. А., **Зверева М. Э.**, Донцова О. А. Димеризация *in vitro* теломеразного белка Est3p стимулируется ионами магния // *Доклады Академии Наук*. 2010. Т. 433, № 1. С. 126–128.
6. Sharanov Y.S., **Zvereva M.I.**, Dontsova O.A. *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3p binds DNA and RNA and stimulates unwinding of RNA/DNA heteroduplexes // *FEBS Lett*. 2006. V. 580, № 19. P. 4683–4690.
7. Shubernetskaya O., Logvina N., Sharanov Y., **Zvereva M.** Yeast telomerase protein Est3 is a novel type of GTPase // *Biochimie*. 2011. V. 93, № 2. P. 202–206.
8. Ivanov P.V., **Zvereva M.I.**, Shpanchenko O.V., Dontsova O.A., Bogdanov A.A., Aglyamova G.V., Lim V.I., Teraoka Y., Nierhaus K.H. How does tmRNA move through the ribosome? // *FEBS Lett*. 2002. V. 514, № 1. P. 55–59.
9. Shpanchenko O.V., **Zvereva M.I.**, Ivanov P.V., Bugaeva E.Yu., Rozov A.S., Bogdanov A.A., Kalkum M., Isaksson L., Nierhaus K.H. and Dontsova O.A. Stepping tmRNA through the ribosome // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280, № 18. P. 18368–18374.
10. Щербакова Д.М., Соколов К. А., **Зверева М.Э.** Донцова О. А. Теломераза дрожжей *Sacchromyces cerevisiae* активна *in vitro* в мономерной форме // *Биохимия*. 2009. Т. 74, № 7. С. 923-932.
11. Щербакова Д.М., **Зверева М.Э.**, Донцова О.А. Биотинилированный компонент входит в состав теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1, № 2. С.92-97
12. Малявко А.Н., **Зверева М.Э.**, Донцова О.А. Биотинилированный Arc1p как потенциальный кандидат на белок, входящий в состав теломеразы дрожжей // *Вестник Московского Университета*. Серия 2. Химия. 2012. Т. 53, № 5. С. 335–338.
13. Ravin N.V., Eldarov M.A., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Schneider J., Mardanova E.S., Smekalova E.M., **Zvereva M.I.**, Dontsova O.A., Mardanov A.V., Skryabin K.G. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1 // *BMC Genomics*. 2013. V. 14. P. 837.
14. Белецкий А.В., Малявко А. Н., Суханова М. В., Марданова Е. С., **Зверева М. Э.**, Марданов А. В., Донцова О. А., Лаврик О. И., Равин Н. В. Экспрессия генов дрожжей *Hansenula polymorpha* DL1, участвующих в поддержании целостности

- теломер и репарации днк, в условиях теплового стресса // *Доклады Академии Наук*. 2015. Т. 462, № 5. С. 605.
15. Смекалова Е.М., Петрова О.А., **Зверева М.Э.**, Донцова О.А.. Рекомбинантная форма TERT *Hansenula polymorpha* обладает ограниченной обратнотранскриптазной активностью // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4, № 1. С. 72–75.
 16. 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.
 17. Скворцов Д.А., Рубцова М.П., **Зверева М.Э.**, Киселев Ф.Л., Донцова О.А. Регуляция теломеразы в онкогенезе // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1, № 1. С. 51–67.
 18. Скворцов Д.А., **Зверева М. Э.**, Шпанченко О. В., Донцова О. А. Теломераза: методы определения активности // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3, № 1(8) С. 51-72.
 19. Скворцов Д.А., Гаспарьян Н.М., Рубцова М.П., **Зверева М.Э.**, Федорова М.Д., Павлова Л.С., Богданов А.А., Донцова О.А., Киселев Ф.Л. Теломераза как потенциальный маркер для ранней диагностики рака шейки матки // *Доклады Академии Наук*. 2006. Т. 408, № N4. С. 556-559.
 20. Petrenko A.A., Korolenkova L., Skvortsov D., Fedorova M., Skoblov M., Baranova A., **Zvereva M.**, Rubtsova M., Kissel'jov F. Cervical intraepithelial neoplasia: telomerase activity and splice pattern of hTERT mRNA // *Biochimie*. V. 92, № 12. P. 1827–1831.
 21. Скворцов Д.А., **Зверева М.Э.**, Павлова Л.С., Петренко А.А., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. Оптимизированный метод детекции теломеразной активности в диагностике рака // *Вестник Московского Университета*. Серия 2. Химия. 2010. Т. 65, № 3. С. 165–169.
 22. Zhdanova N.S., Draskovic I., Minina J.M., Karamysheva T.V., Novo C.L., Liu W.-Y., Porreca R.M., Gibaud A., **Zvereva M.E.**, Skvortsov D.A., Rubtsov N.B., Londoño-Vallejo A. Recombinogenic telomeres in diploid *Sorex granarius* (*Soricidae*, *Eulipotyphla*) fibroblast cells // *Mol. Cell. Biol*. 2014. V. 34, № 15. P. 2786–2799.
 23. 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.
 24. Ilyinsky N.S., Shchyolkina, A.K., Borisova, O.F., Mamaeva, O.K., **Zvereva, M.I.**, Azhibek, D.M. et al. Novel multi-targeting anthra[2,3-b]thiophene-5,10-diones with guanidine-containing side chains: interaction with telomeric G-quadruplex, inhibition of telomerase and topoisomerase I and cytotoxic properties // *Eur. J. Med. Chem*. 2014. V. 85. P. 605–614.
 25. **Зверева М.Э.**, Зацепин Т.С., Ажибек Д. М., Шубернецкая О.С., Шпанченко О.В., Донцова О.А. Олигонуклеотидные ингибиторы теломеразы: перспективы использования в диагностике и терапии онкологических заболеваний // *Биохимия*. 2015. Т. 80, № 3. С. 309–319.
 26. Azhibek D, Skvortsov D, Andreeva A, Zatsepin T, Arutyunyan A, **Zvereva M**, Dontsova O. TERRA mimicking ssRNAs prevail over the DNA substrate for telomerase in vitro due to interactions with the alternative binding site // *J. Mol. Recognit*. 2016. V. 29, № 6. P. 242–247.
 27. Majouga A.G.*, **Zvereva M.I.***, Rubtsova M.P., Skvortsov D.A., Mironov A.V., Azhibek D.M., Krasnovskaya O.O., Gerasimov V.M., Udina A.V., Vorozhtsov N.I., Beloglazkina E.K., Agron L., Mikhina L.V., Tretyakova A.V., Zyk N.V., Zefirov N.S., Kabanov A.V., Dontsova O.A. Mixed valence copper (I,II) binuclear complexes with

unexpected structure: synthesis, biological properties and anticancer activity // *J. Med. Chem.* 2014. V. 57, № 14. P. 6252–6258. *равный вклад

Патенты:

1. Мажуга А. Г., **Зверева М.Э.**, Агрон Л.А., Белоглазкина Е.К., Ворожцов Н.И., Донцова О.А., Зык Н.В., Киселев Ф.Л., Скворцов Д.А. / Ингибиторы теломеразы и способ их получения // Патент на изобретение N 2010113946 от 9 апреля 2010 г.
2. Mazhuga A.G., **Zvereva M.I.**, Agron L.A., Beloglazkina E.K., Vorozhtcov N.I., Dontsova O.A., Zyk N.V., Kiselev F.L., Skvortsov D.A. / Telomerase inhibitors and a method for the preparation thereof // WIPO Patent Application WO/2011/126409.

Избранные тезисы докладов на научных конференциях:

1. **Zvereva M.I.**, Rubtsova M.P., Sharanov Y.S., Skvortsov D.A., Kissel'ov F.L., Dontsova O.A. (2007) New properties of components of telomerase. Scientific conference «Telomeres&Telomerase», Cold Spring Harbor, New York, USA, Abstract book. P. 192.
2. **Zvereva M.**, Malyavko A., Smekalova E., Petrova O., Lamzin M., Rodina E., Dontsova O., Groves M. (2012) Identification of components and features of a *H. polymorpha* telomerase complex: towards an understanding of cell division control. International Scientific Conference «Pharmaceutical and Medical Biotechnology», Moscow, Russia. Abstract book. P. 495.
3. **Zvereva M.**, Smekalova E., Malyavko A., Petrova O., Mardanov A., Ravin N., Skryabin K., Westhof E., Dontsova O. (2013) Telomerase complex from *Hansenula polymorpha*. The 38th Federation of European Biochemical Societies Congress, St.-Peterburg, Russia. FEBS Journal, Issue Supplement s1, V. 280. P. 31.
4. **Zvereva M.**, Azhibek D., Skvortsov D., Rubtsova M., Maguga A., Zatsepin T., Dontsova O. (2014) Inhibition of telomerase is the basis for novel anti-cancer therapy. IV Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика», Казань, Россия. Сборник трудов конференции. С. 272.
5. **Zvereva M.**, Malyavko A., Petrova O., Kozlov A., Parfenova Ju, Smekalova E., Dontsova O. (2015) Unique features of telomerase from *Hansenula polymorpha*. Formate dehydrogenases from eukaryotes. Program and Abstract Book of International Conference «Biocatalysis-2015»: Fundamentals and Applications", Istra, Moscow region, Russia. Abstract book. P. 41.