

На правах рукописи

Рубцова Мария Петровна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОГЕНЕЗА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК ЧЕЛОВЕКА

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология,
02.00.10 – биоорганическая химия.

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора химических наук

Научный консультант:
д.х.н, профессор, академик РАН Донцова Ольга Анатольевна

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

Научный консультант

Донцова Ольга Анатольевна –

доктор химических наук, профессор,
академик РАН.

Официальные оппоненты

Кочетков Сергей Николаевич –

доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН заведующий лабораторией, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Кузнецов Никита Александрович –

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Кульбачинский Андрей Владимирович –

доктор биологических наук, заведующий лабораторией, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики РАН.

Защита диссертации состоится «03» декабря 2019 г. в 16 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»: <https://istina.msu.ru/dissertations/237178798/>

Автореферат разослан «__» сентября 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент



Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания, согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), занимают в мире второе место по количеству смертей в год. В основе развития онкологических заболеваний лежат мутации в генах, регулирующих механизмы деления клеток, что приводит к приобретению ими неограниченного потенциала деления. Нормальные соматические клетки организма не способны делиться бесконечно. Обычно после прохождения клеткой предела Хайфлика (примерно 50 делений) концевые участки хромосом – теломеры – становятся критически короткими, что приводит к нестабильности генома и активации клеточных программ гибели. Активация теломеразы, происходящая в 85-90% случаев онкологической трансформации клеток, способствует поддержанию длины теломер, необходимой для неограниченного деления. В то же время теломераза привлекает внимание научной общественности, как потенциальный инструмент увеличения продолжительности жизни организма. Активация теломеразы способствует регенерации тканей, а мутации в генах компонентов этого фермента, ассоциированы с заболеваниями, характеризующимися фенотипом преждевременного старения. Считается, что увеличение длины теломер позволит клеткам проходить большее количество делений, что обеспечит более длительное и здоровое функционирование организма.

Исследования, направленные на понимание механизмов функционирования и биогенеза теломеразы, проводятся с момента открытия этого фермента и рассматриваются в контексте разработки подходов к терапии онкологических заболеваний, а также процессов регенерации тканей и увеличения продолжительности жизни. Тем не менее, начиная с самых ранних работ по исследованию роли теломеразы в онкологической трансформации клеток, ученые наблюдали эффекты, оказываемые отдельными компонентами комплекса на пролиферативный статус клетки, на устойчивость к стрессу и другие процессы вне зависимости от активации теломеразы и длины теломер. Исследования последних лет продемонстрировали, что компоненты теломеразы в различных условиях могут иметь локализацию отличную от ядерной, где этот комплекс осуществляет свою основную роль, а также обладают дополнительными функциями, которые необходимо учитывать при разработке различных подходов, направленных как на терапию онкологических заболеваний, так и стимуляцию регенерации тканей или увеличение продолжительности жизни.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось исследование механизмов регуляции разных этапов функционирования теломеразы, затрагивающих формирование активного комплекса и взаимодействие с теломерами, а также биогенез и альтернативные функции теломеразной РНК человека.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

- 1). Изучить влияние репликативного белка А на активность теломеразы *in vitro*. Предложить модель регуляции взаимодействия теломеразы с теломерой.
- 2). Изучить возможность ингибирования сборки теломеразы человека с помощью блокирования структурных элементов теломеразной РНК.
- 3). Выяснить роль Интегратора в регуляции транскрипции и процессинга теломеразной РНК человека.
- 4). Проверить гипотезу о кодирующем потенциале теломеразной РНК человека.

Объект исследования – регуляция активности теломеразы человека.

Предмет исследования – биогенез и функционирование компонентов теломеразы человека.

Научная новизна и практическая значимость работы

Получены новые данные о биогенезе и функционировании компонентов теломеразы человека.

Взаимодействие теломеразы со своим субстратом – теломерой – является важным лимитирующим активность фермента событием, в регуляции которого участвуют многие клеточные компоненты. Мы продемонстрировали, что репликативный белок А (RPA – replicative protein A), влияя на доступность теломеры, регулирует активность теломеразы человека *in vitro*.

Установлено, что конформационная подвижность теломеразной РНК человека необходима для функционирования фермента, а фиксация структуры в одной из конформаций препятствует сборке активного фермента.

Использование репортерной системы для изучения терминации транскрипции теломеразной РНК человека позволило доказать ключевую роль мультисубъединичного комплекса Интегратор в промотор-зависимом процессинге первичного транскрипта.

Нарушения в процессе терминации транскрипции приводят к накоплению длинного первичного транскрипта, содержащего открытую рамку считывания для синтеза белка, существование которого продемонстрировано в настоящей работе при помощи нескольких взаимодополняющих методов. Белок hTERP, закодированный в теломеразной РНК человека, защищает клетку в стрессовых условиях и участвует в регуляции формирования аутофагосомы.

Полученные в настоящей работе данные о функционировании и биогенезе компонентов теломеразы человека будут востребованы в области разработки подходов к терапии онкологических заболеваний, а также в области регенерации тканей и увеличения продолжительности жизни.

Методология диссертационного исследования

При проведении исследования использовали современные методы биохимии, молекулярной и клеточной биологии. Плазмиды нарабатывали в штаммах-продуцентах *E.coli*. Препараты плазмид и РНК получали с использованием специализированных наборов реагентов от ведущих фирм-производителей. Чистоту препаратов нуклеиновых кислот проверяли методами электрофореза и спектрофотометрии. Экстракты клеток получали согласно современным методикам с использованием реактивов ведущих фирм производителей. Создание клеточных линий осуществляли, используя новейшие подходы и методики, в том числе направленное редактирование генома. Отбор клеточных популяций проводили при помощи современного высокоскоростного клеточного сортера BD FACSAria III. Подбор праймеров для полимеразной цепной реакции осуществляли при помощи онлайн-системы Primer-Blast (NCBI). ПЦР в реальном времени проводили при помощи прибора Bio-Rad CFX96 Real-Time System, а для обработки данных использовали программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager. Статистическую обработку данных осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 8.2.0. В работе использовали документирующую систему ChemiDoc XRS System BioRad и микроскопы Nikon C2 и Nikon Ti-Eclipse. Идентификацию спектров проводили, используя программное обеспечение PeakView 2.1 Software (ABSciex, Canada).

Основные положения, выносимые на защиту

Репликативный белок А модулирует активность теломеразы *in vitro*. RPA способствует взаимодействию теломеразы с теломерой, стимулируя удлинение теломер. Кооперативный характер связывания RPA с одноцепочечной ДНК блокирует взаимодействие теломеразы с теломерой, ингибируя синтез теломерных повторов.

Конформационные перестройки критичны для активности и сборки теломеразы. Фиксация расположения доменов теломеразной РНК человека блокирует сборку активного фермента.

Терминация транскрипции гена теломеразной РНК человека зависит от промотора. Промотор определяет корректность процессинга первичного транскрипта теломеразной РНК человека.

Мультисубъединичный комплекс Интегратор является ключевым регулятором транскрипции и биогенеза теломеразной РНК человека. Нокдаун генов субъединиц Интегратора приводит к накоплению в клетках предшественника теломеразной РНК человека.

Теломеразная РНК человека обладает кодирующим потенциалом. Белок hTERP, матрицей для синтеза которого служит теломеразная РНК человека, защищает клетки от гибели в условиях индукции апоптоза.

Степень достоверности результатов

В работе использовали современные широко применяемые методики измерений и оборудование, соответствующее международным стандартам, реактивы ведущих российских и международных производителей. Последовательности генов и фрагментов ДНК проверяли при помощи секвенирования. Культуры клеток происходили из международных коллекций и были дополнительно проверены на контаминацию микоплазмой. Эксперименты проводили как минимум трижды в трех технических повторностях. Статистическую обработку данных Вестерн-блоттинга и ОТ-ПЦР в реальном времени осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 8.2.0. Статистическую обработку данных масс-спектрометрии осуществляли, применяя алгоритм ProteomicS Performance Evaluation Pipeline Software (PSPEP) программного обеспечения ProteinPilot.

Все результаты, представленные в диссертационной работе, опубликованы в международных рецензируемых журналах.

Апробация работы

Диссертация была апробирована на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 12 сентября 2019 года. Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на всероссийских и международных конференциях (11 тезисов), в том числе на международных конференциях “Telomeres & Telomerase” Колд Спринг Харбор, США, 2011, 2013, 2017; The FEBS Congress, Санкт-Петербург 2013, Иерусалим 2017, Прага 2018; Keystone Symposium “Long Noncoding RNAs: Marching toward Mechanism” Санта-Фе, США, 2014, “Long Noncoding RNAs: From Evolution to Function”. Keystone Resort, 2015; ПОСТГЕНОМ, Казань, 2014, 2018; V съезд биохимиков России, Дагомыс, 2014; EMBO Workshop “Telomere biology in health and human disease”, Португалия, 2018.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 16 публикациях, в том числе: 15 -- в международных системах цитирования Web of Science и Scopus, а также в библиографической базе PubMed и 1 статья в журнале, входящем в РИНЦ.

Личный вклад автора

Диссертационная работа выполнена автором лично. Исследования затрагивали многие аспекты молекулярной биологии и выполнены в соавторстве с большим коллективом. Однако, автору принадлежит основная роль в выборе направления исследований, формулировке целей и задач исследований, проведении экспериментов, разработке методик, анализу полученных результатов, обобщении и представлении результатов в виде статей и докладов на конференциях. Некоторые исследования были проведены сотрудниками кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: Зверевой М.Э., Скворцовым Д.А., Остерманом И.А., а также аспирантами и дипломниками кафедры под руководством автора: Васильковой Д.П., Нарайкиной Ю.В., Юртаевой С.В. Автор принимала непосредственное участие в работах сотрудников Института Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Терехова С.С., Смирнова И.В. и Степанова А.В. Работы выполнены при поддержке грантов Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) и Российского Научного Фонда (РНФ), а также Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова (ПНР 5.13).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы» (раздел содержит 181 ссылку). Работу иллюстрируют 48 рисунков и 5 таблиц. Общий объем диссертации 147 страниц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа посвящена исследованию молекулярных механизмов функционирования теломеразы человека. Для выполнения основной функции теломеразы – удлинения теломера, необходимы два ее коровых компонента: теломеразная обратная транскриптаза и теломеразная РНК. Регуляция функционирования теломеразы многоступенчатый процесс, каждый этап которого вносит определенный вклад в работу фермента. Основными этапами регуляции работы теломеразы являются биогенез и сборка функционального фермента, а также его взаимодействие с субстратом – теломерой. Нарушения этих процессов, наблюдаемые при мутациях в компонентах теломеразы или теломер-ассоциированных белках, а также белках, участвующих в процессинге теломеразной РНК, приводят к развитию различного рода патологий, что позволяет предполагать потенциальную возможность управления работой теломеразы в терапевтических целях. Необходимо отметить, что дополнительные, не связанные с работой фермента, функции компонентов теломеразы, в частности теломеразной РНК, могут конкурировать в клетке, и смещение равновесия в сторону одной из функций также позволяют регулировать работу фермента.

В настоящей работе мы исследовали несколько аспектов функционирования теломеразы: взаимодействие фермента с теломерами, сборку активного фермента, биогенез теломеразной РНК, а также ее альтернативную функцию.

1. Взаимодействие теломеразы с теломерами

1.1. Репликативный белок А модулирует взаимодействие теломеразы с теломерами

Одним из важных аспектов функционирования теломеразы является взаимодействие с теломерами. Удлинение теломер происходит в S-фазе клеточного цикла, когда теломераза встречается с ними в нуклеоплазме. Теломерная ДНК, содержащая двуцепочечный и одноцепочечные участки, в ассоциации с мультисубъединичным белковым комплексом шелтерином образует сложные третичные структуры, такие как t- и D-петли и G-квадруплексы. Формирование третичных структур на конце теломер препятствует взаимодействию с ними теломеразы и является ингибирующим фермент фактором.

Репликативный белок А состоит из трех субъединиц: RPA70, RPA32 и RPA14. RPA участвует в клеточных процессах, связанных с метаболизмом ДНК: репликации, репарации и рекомбинации. Домены типа “OB-fold”, входящие в состав RPA, определяют его взаимодействие с оцДНК. RPA может образовывать комплексы с ДНК нескольких типов в зависимости от конформации белка. При образовании комплексов первого типа белок принимает вытянутую конформацию и с высоким сродством (до 0,1 нМ) связывает участок ДНК длиной 30 н.о.. Связывание оцДНК длиной 8-10 н.о. глобулярной формой RPA характеризуется кооперативностью. Промежуточная конформация гетеротримера взаимодействует с ДНК длиной 13-22 н.о.. RPA предпочитает последовательности ДНК, обогащенные пиримидиновыми основаниями, и эффективно взаимодействует с неканоническими структурами ДНК, например, G-квадруплексами, которые склонны образовывать теломеры. На момент исследования нами роли RPA в регуляции функционирования теломеразы в литературе появлялись первые публикации, демонстрирующие участие RPA в удлинении теломер. Было известно, что в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* RPA взаимодействует с белками, связанными с теломеразой, и могут способствовать ассоциации фермента с субстратом, а в дрожжах *Shizosaccharomyces pombe* RPA принимает участие в поддержании стабильности теломер. Была показана колокализация RPA с теломерами в клетках трипаносомы *Leishmania*. Активность теломеразы *Thermus thermophila* в системе *in vitro* снижается в присутствии RPA. На момент исследования нами влияния RPA на активность теломеразы человека было показано взаимодействие RPA человека с теломерной ДНК, которое способствовало разрушению, образованных ею G-квадруплексов *in vitro*.

Мы предположили, что RPA, связываясь с оцДНК теломерных участков, должен модулировать активность теломеразы. Имея сродство к оцДНК, RPA может вытеснять белки шелтеринового комплекса, освобождая 3'-конец теломер и способствуя связыванию теломеразы. Кооперативность взаимодействия RPA с оцДНК при повышении концентрации белка должна приводить к защите теломерного одноцепочечного участка и блокировке связывания теломеразы (рис. 1).

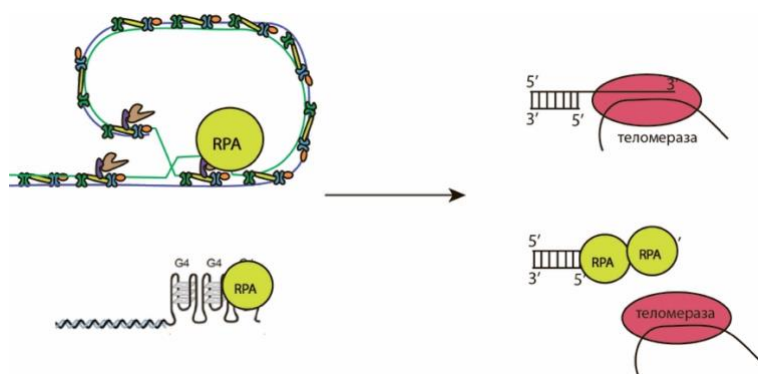


Рисунок 1. Предполагаемая модель модуляции активности теломеразы репликативным белком А.

Для проверки гипотезы о влиянии RPA на функционирование теломеразы мы воспользовались методом TRAP (Telomerase Repeated Amplification Protocol), который позволяет определять теломеразную активность в экстракте клеток. Для этого используют теломер-подобный праймер, который удлиняется теломеразой клеточного экстракта. Низкое содержание теломеразы в клетках затрудняет проводить прямую детекцию синтезированного теломеразой продукта, что заставляет исследователя вводить дополнительный этап ПЦР-амплификации. В ходе работы была проведена оптимизация метода TRAP, который является чувствительным ко многим параметрам реакции. Отработка и оптимизация метода TRAP была осуществлена в рамках работ, посвященных разработке диагностикума опухолей шейки матки. Эта работа была проведена в сотрудничестве с РОНЦ имени Н.Н. Блохина и позволила продемонстрировать предсказательный потенциал определения теломеразной активности в образцах биопсий предопухолевых поражений шейки матки.

Клетки линии HeLa использовали для получения S100 экстракта. Полученный экстракт инкубировали с поликлональными антителами кролика против RPA. Комплексы антител с целевым белком иммунопреципитировали, используя белок G сефарозу. Степень удаления RPA из экстракта клеток оценивали при помощи Вестерн-блоттинга. Согласно данным, приведенным на рисунке 2, RPA был удален из экстрактов практически полностью.

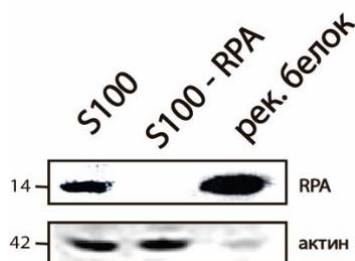


Рисунок 2. Анализ S100 экстракта клеток HeLa до и после иммунопреципитации RPA методом Вестерн-блоттинга.

На верхней панели представлен анализ содержания RPA в экстрактах до иммунопреципитации RPA (S100) и после (S100-RPA). В качестве контроля использовали рекомбинантный белок (рек. белок).

На нижней панели приведены данные о содержании актина в экстрактах клеток до иммунопреципитации RPA (S100) и после (S100-RPA). В качестве контроля использовали коммерческий препарат актина (рек. белок).

Полученные экстракты клеток HeLa дикого типа и обедненный по RPA, мы использовали для измерения теломеразной активности методом TRAP с последующим разделением продуктов реакции в полиакриламидном геле. Использовали разное количество экстракта, к которому в каждом случае добавляли одинаковое количество теломер-подобного праймера. Количество используемого экстракта в конкретной реакции определяли числом клеток, из которого он был получен.

Проведенный таким образом анализ изменения активности теломеразы выявил значимое ингибирование фермента в случае отсутствия в экстракте RPA. Активность теломеразы значительно снижена в экстрактах после иммунопреципитации RPA. Согласно нашим данным теломеразная активность сравнима в цельных экстрактах из 50 клеток и в экстрактах без RPA из 200 клеток (рис. 3А).

Необходимо отметить, что в цельных экстрактах активность теломеразы наблюдается, начиная с 10 клеток, постепенно нарастает до 50 клеток, после чего происходит ингибирование работы фермента. В случае использования экстрактов после иммунопреципитации RPA мы наблюдали появление активности в 200 клетках, а дальнейшее увеличение количества экстракта приводило к ингибированию работы фермента (рис. 3А).

В ходе иммунопреципитации может происходить совыделение компонентов клетки, образующих комплексы с целевым белком, антитела против которого были использованы в опыте. Чтобы исключить инактивацию теломеразы или удаления других белков-регуляторов активности фермента, мы оценили способность рекомбинантного RPA человека восстанавливать активность теломеразы при добавлении в экстракт.

Добавляли разные количества рекомбинантного RPA в обедненный RPA экстракт из 20 клеток, в котором отсутствует активность теломеразы. Появление теломеразной активности детектировали при добавлении RPA в концентрации от 0,2 мМ. Восстановление теломеразной активности происходит в процессивной манере, что характеризуется появлением длинных продуктов реакции (рис. 3Б), а повышение концентрации RPA приводит к снижению процессивности фермента, о чем свидетельствует перераспределение продуктов реакции в более короткую фракцию.

Интересно, что добавление рекомбинантного RPA к исходному цельному S100 экстракту приводит к стимуляции процессивности теломеразы, а при дальнейшем увеличении количества RPA в экстракте происходит ингибирование активности фермента (рис. 3Б).

RPA взаимодействует с оцДНК, проявляя слабое предпочтение последовательностям богатым пиримидиновыми основаниями, поэтому его влияние на теломеразную активность может быть неспецифичным, и любой белок, обладающий сродством к оцДНК, способен в экстракте проявить схожую активность. Мы добавляли белок SSB (single strand binding) *E.coli* в S100 экстракт в тех же количествах, что и RPA и оценивали влияние на теломеразную активность. Белок SSB взаимодействует с оцДНК и участвует в процессах репликации, репарации и других, подобно RPA. Мы обнаружили полное подавление активности теломеразы при добавлении SSB в S100 экстракт из 20 клеток. Добавление небольших количеств SSB к экстракту из 50 клеток существенно изменял спектр длин образуемых продуктов, а избыток SSB полностью ингибировал теломеразную активность (рис. 3В).

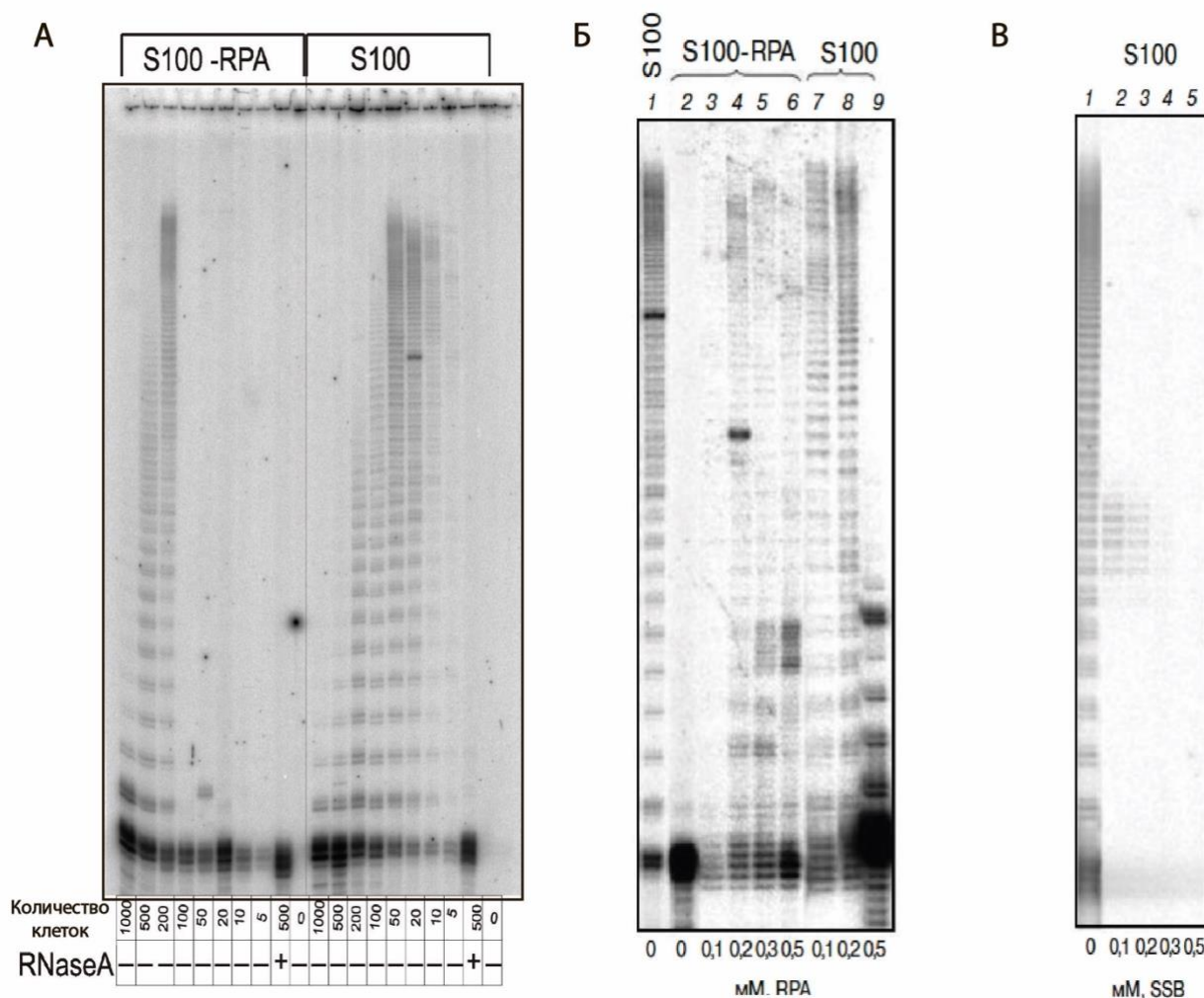


Рисунок 3. Влияние RPA на активность теломеразы.

А. Анализ теломеразной активности при помощи метода TRAP в S100 экстрактах клеток HeLa до и после иммунопреципитации RPA. В реакцию брали экстракт из определенного количества клеток. Обработка клеток RNaseA позволяет контролировать специфичность реакции.

Б. Анализ теломеразной активности при помощи метода TRAP в S100 экстрактах клеток HeLa до и после иммунопреципитации RPA при добавлении рекомбинантного препарата RPA.

В. Анализ теломеразной активности при помощи метода TRAP в S100 экстрактах клеток HeLa при добавлении SSB.

Полученные нами данные позволяют заключить, что RPA специфически взаимодействует с теломерными последовательностями ДНК и модулирует способность теломеразы удлинять субстрат. Субстратом теломеразы является 3'-выступающий конец теломеры.

Наше исследование роли RPA в регуляции активности теломеразы опубликовано в 2009 году и оказалось первой публикацией, определившей модулирующую активность RPA в отношении теломеразы человека. В последнее десятилетие исследования влияния RPA на функционирование теломеразы и теломер продолжались. Опубликованные за это время данные позволяют предложить модель, иллюстрирующую регуляторную роль RPA в поддержании длины теломер (рис. 4).

Основной мишенью связывания RPA в клетке является одноцепочечные участки ДНК, появляющиеся в ходе образования репликативных вилок. Удлинение теломер происходит в конце S-фазы клеточного цикла, когда репликация ДНК практически завершена. Освободившийся RPA взаимодействует с теломерными последовательностями,

что может способствовать расплетанию G-квартетных структур, вытеснению теломерных белков и облегчению взаимодействия теломеразы с субстратом. Кооперативное связывание RPA с ДНК приводит к блокировке теломерных участков, что препятствует эффективному синтезу теломер, снижая процессивность и ингибируя теломеразу.

Белок POT1 является регулятором доступности теломер для удлинения теломеразой. POT1 взаимодействует с G-богатым выступающим одноцепочечным участком теломер, защищая ДНК от деградации и процессов рекомбинации. Взаимодействие POT1 с теломерой стимулирует активность теломеразы по одним данным или блокирует взаимодействие фермента с субстратом, согласно другим данным. Сродство POT1 и RPA к оцДНК позволяет предполагать, что эти белки конкурируют за 3'-выступающий конец теломер. Обнаружено, что hnRNPA1 взаимодействует как с теломерой, так и с TERRA. В ходе репликации, формирующиеся репликативные вилки меняют структуру ДНК, в том числе и в теломерных областях. В ранней и средней S-фазе RPA вытесняет POT1 из теломерных областей. При переходе клетки в позднюю S-фазу белки RPA, POT1 и hnRNPA1 конкурируют за связывание с теломерами и POT1 способен привлечь активную теломеразу. В дальнейшем теломеры формируют структуру t-петли (рис. 4).

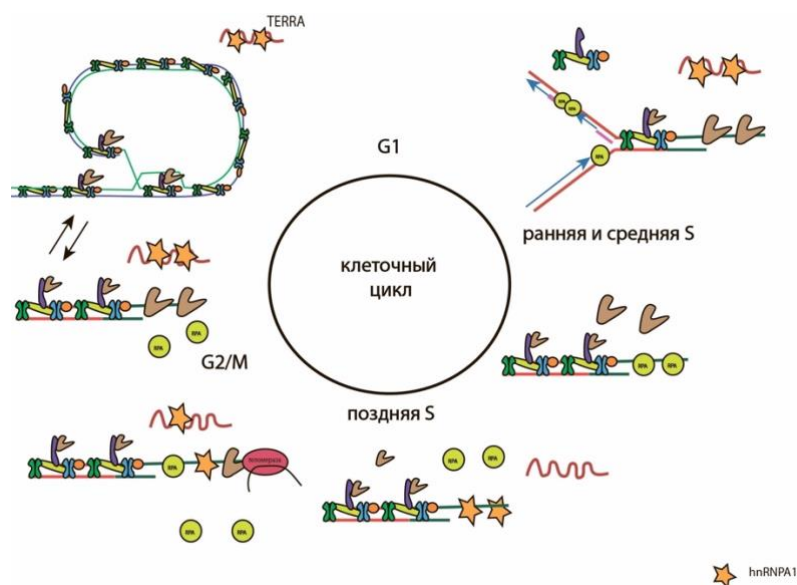


Рисунок 4. Схематичное изображение изменений теломерного хроматина в ходе клеточного цикла.

1.2. Биогенез теломеразы — потенциальный объект для разработки терапевтических подходов

Взаимодействие теломеразы с теломерой — один из этапов функционирования фермента, воздействие на который позволяет регулировать активность фермента. Биогенез теломеразного комплекса является многостадийным процессом, в котором каждый этап можно рассматривать в качестве потенциальной мишени для направленного воздействия в целях регуляции активности фермента. Ингибирование полимеразной активности теломеразы ввиду сходства ее каталитического центра с другими клеточными полимеразами приводит к многочисленным побочным эффектам. Блокирование матричного участка теломеразной РНК с помощью антисмысловых олигонуклеотидов оказывается неэффективным, потому что теломерная ДНК, а также TERRA предоставляют множество участков взаимодействия. Множество неспецифических участков связывания приводит к увеличению количества олигонуклеотида, необходимого для эффективного

ингибирования целевой мишени, что увеличивает риск побочных эффектов, а также повышает стоимость такого подхода. Воздействие на биогенез теломеразного комплекса представляется наиболее перспективным в аспекте разработки новых терапевтических подходов в области онкологии, а также регенерации тканей и продления жизни. В настоящей работе мы сосредоточились на исследовании возможности использования теломеразной РНК человека в качестве мишени для разработки подходов к регуляции функционирования теломеразного комплекса. В качестве потенциальных мишеней были выбраны различные аспекты функционирования теломеразной РНК: блокирование антисмысловыми олигонуклеотидами структурных элементов, потенциально-важных для сборки активного фермента, транскрипция и процессинг теломеразной РНК, а также альтернативные функции этой молекулы в клетке.

1.2.1. Ингибирование сборки теломеразы человека с помощью блокирования структурных элементов теломеразной РНК

Известно, что компоненты теломеразы осуществляют дополнительные, не связанные с удлинением теломер, функции, нарушение которых может непредсказуемо сказываться на состоянии клеток. Ингибирование активности теломеразы за счет блокирования сборки теломеразного комплекса не должно влиять на уровень компонентов фермента в клетке, что делает разработку подходов, основанных на ингибировании этой стадии биогенеза фермента, перспективными для дальнейшего внедрения в практику.

В структуре теломеразной РНК человека выделяют несколько доменов, участвующих в образовании комплекса с теломеразной обратной транскриптазой. В процессе формирования комплекса происходит взаимодействие TERT с псевдоузлом и доменом CR4/5 теломеразной РНК человека. Отдельно взятые молекулы РНК, соответствующие псевдоузлу и домену CR4/5 теломеразной РНК, в комплексе с TERT способны частично реконструировать активный фермент. Мутации, нарушающие образование шпильки Р6.1 домена CR4/5 приводят к нарушению взаимодействия hTERT с hTR, а также снижению теломеразной активности. Мы предположили, что взаимодействие антисмысловых олигонуклеотидов с элементами третичной структуры теломеразной РНК, вовлеченными в образование теломеразного комплекса, приведет к ингибированию сборки теломеразного комплекса. Для проверки гипотезы необходимо было определить структурные элементы теломеразной РНК, доступные для взаимодействия с антисмысловыми олигонуклеотидами. На основании данных о способности псевдоузла формировать альтернативную вторичную структуру, состоящую из двух шпилек, а также данных об открытых доменах теломеразной РНК, полученных при помощи химического пробинга *in vivo* и *in vitro*, мы выбрали несколько положений в молекуле теломеразной РНК в качестве мишеней для ингибирования сборки теломеразы (рис. 5). Для выбора наиболее оптимальных положений для блокировки олигонуклеотидами оценивали ингибирование экспрессии теломеразной РНК, а также теломеразной активности и длину теломер. Мы сравнили несколько подходов ингибирования при помощи коротких нуклеиновых кислот: РНК-интерференция при помощи siRNA или shRNA, а также антисмысловые ДНК-олигонуклеотиды. Участки взаимодействия используемых олигонуклеотидов отмечены на рисунке 5 красными линиями.

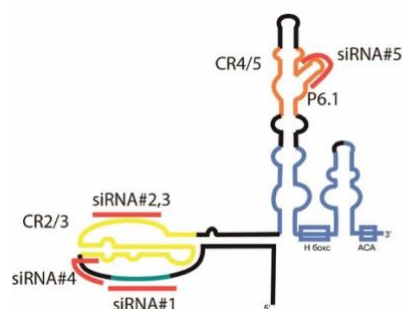


Рисунок 5. Схематичное изображение вторичной структуры теломеразной РНК человека. Красными линиями обозначены участки взаимодействия siRNA, shRNA и антисмысловых олигонуклеотидов, использованных в работе.

Мы использовали siRNA#1 комплементарную матричному участку теломеразной РНК человека в качестве положительного контроля и siRNA комплементарную последовательности люциферазы светлячка в качестве контроля неспецифического влияния. Клетки линии HEK293T трансфецировали синтезированными siRNA и через 48 часов оценивали изменение уровня экспрессии hTERC при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество теломеразной РНК в клетках нормировали на количество РНК генов *GAPDH* и U2 мРНК и количество теломеразной РНК в клетках трансфецированных siRNA комплементарной мРНК люциферазы светлячка. Оказалось, что siRNA#1, комплементарная матричному участку теломеразной РНК, человека снижает уровень экспрессии *hTERC* на 30%, а siRNA#2 комплементарная участку J2a/3 домена CR2/3 псевдоузла – на 40% (рис. 6A). Все остальные использованные siRNA не влияли на количество теломеразной РНК в клетках. Снижение количества теломеразной РНК, наблюдаемое нами при использовании РНК-интерференции, может быть недостаточным для эффективного ингибирования теломеразы, поэтому мы решили оценить изменение длины теломер в клетках в условиях длительного нокдауна гена *hTERC*. Для этого последовательности siRNA#1, 2 и 3, а также контрольной комплементарной мРНК люциферазы светлячка были клонированы в вектор LeGo-C или LeGo-Ceg для экспрессии короткой шпилечной РНК (shRNA), процессируемой в клетке с образованием микроРНК. Клетки с экспрессией пустого вектора использовали в качестве контроля. Были получены стабильные клеточные линии при помощи трансдукции вирусными частицами, несущими полученные конструкции. Выбранные нами вектора серии LeGo кодируют флуоресцентные белки, позволяющие обогатить культуру позитивной фракцией клеток после трансдукции. Мы использовали высокоскоростной клеточный сортер для отбора клеток, синтезирующих флуоресцентный белок, в геном которых интегрировала кассета для экспрессии shRNA и маркерный белок. Разработанные подходы к сортировке клеток позволили провести исследования в различных областях молекулярной биологии. Удалось изучить зависимость эффективности трансляции от структуры 5'-нетранслируемой области, разработать платформу для анализа биологического разнообразия и микробиологических сообществ, а также подходы к поиску лигандов для персонализированной терапии с использованием CAR-T клеток.

Анализ количества теломеразной РНК и длины теломер проводили через 75 удвоений популяции после получения на 90-95% обогащенной целевыми клетками фракции. Количество теломеразной РНК определяли при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Данные нормировали на количество РНК генов

GAPDH и U2 мяРНК. Длину теломер определяли при помощи ПЦР в реальном времени. Оказалось, что количество теломеразной РНК снижалось на 60-70% в случае использования shRNA#1 и 2 (рис. 6Б). Экспрессия shRNA#3, несмотря на частичную комплементарность последовательности, приводила к снижению количества теломеразной РНК в клетках на 50%.

Частичная комплементарность микроРНК не позволяет комплексу RISC деградировать целевую РНК. Однако, в случае теломеразной РНК взаимодействие с мишенью должно приводить к ингибированию сборки активной теломеразы. Известно, что свободная hTERT подвергается деградации в клетке. Мы предполагаем, что в данном случае фракция теломеразной РНК человека, не взаимодействующая с hTERT, подвергается деградации.

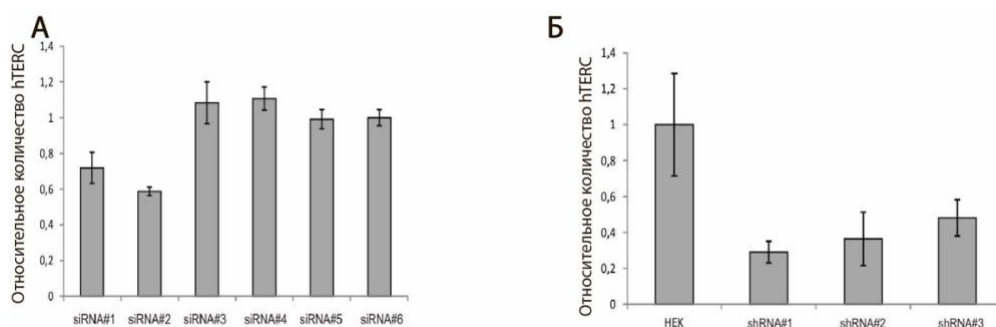


Рисунок 6. Эффективность снижения уровня экспрессии теломеразной РНК человека при помощи РНК-интерференции.

А. Влияние siRNA, взаимодействующих с разными областями теломеразной РНК, на ее количество в клетке.

Б. Влияние стабильной экспрессии shRNA, взаимодействующих с разными областями теломеразной РНК, на ее количество в клетке.

Анализ длины теломер выявил значительное укорочение концевых участков хромосом только в случае использования shRNA#2. Экспрессия shRNA#1 и 3 не оказала значительного влияния на длину теломер (рис. 7).

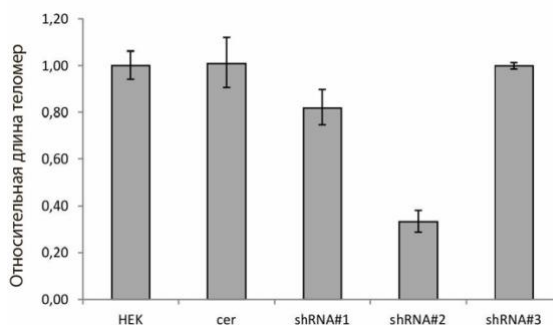


Рисунок 7. Снижение экспрессии гена теломеразной РНК человека приводит к укорочению теломер. Анализ длины теломер в клетках, экспрессирующих шпилечные РНК, взаимодействующие с теломеразной РНК человека.

Для проверки нашей гипотезы о нарушении сборки активного фермента благодаря блокированию участков теломеразной РНК, определяющих взаимодействия с обратной транскриптазой, мы оценили степень ингибирования теломеразной активности антисмысловыми олигонуклеотидами *in vivo* и *in vitro*. Обнаружено, что IC₅₀ олигонуклеотидов #1 и 2 *in vivo* составила 31,4 и 22,2 нМ (рис. 8 А,Б), соответственно, и 1,2

и 3,5 нМ при добавлении их в экстракт клеток с повышенной экспрессией генов компонентов теломеразы (рис. 8 В,Г).

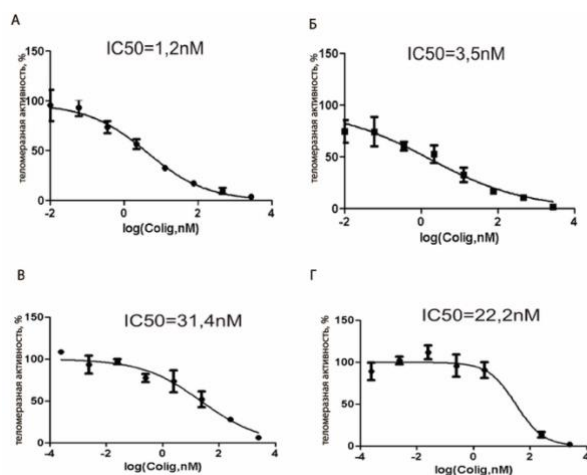


Рисунок 8. Антисмысловые олигонуклеотиды ингибируют активность теломеразы *in vivo* и *in vitro*.

А, Б. Кривая ингибирования активности теломеразы *in vivo* олигонуклеотидами #1 и 2, соответственно.

В, Г. Кривая ингибирования активности теломеразы *in vitro* олигонуклеотидами #1 и 2, соответственно.

Дополнительные исследования влияния блокировки структурных элементов теломеразной РНК на сборку активной теломеразы и активность фермента были проведены с использованием «химерных» олигорибонуклеотидов. Предложенный подход позволил фиксировать конформацию теломеразной РНК. Мы использовали конструкции, содержащие два олигонуклеотида комплементарные разным участкам теломеразной РНК, которые были соединены 1,3-пропандиоловым линкером (Рис. 9А.). Оценивали ингибирование теломеразы *in vivo* «химерными» олигонуклеотидами, в которых одно плечо соответствовало #1 или 2, а второе было комплементарно домену CR4/5 (рис. 9Б). Оказалось, что «химерные» олигонуклеотиды снижают активность теломеразы эффективнее одиночных. Сравнивали олигонуклеотиды, содержащие одинаковые модифицированные н.о. «Химерный» олигонуклеотид #1-CR4/5 ингибирует теломеразу в 2 раза эффективнее чем олигонуклеотид С3-#1 и в 20 раз, чем олигонуклеотид С3-CR4/5, а #2-CR4/5 – в 30 раз эффективнее, чем олигонуклеотид С3-#2 и в 10 раз, чем олигонуклеотид С3-CR4/5 (Таблица 1).

Значительная разница ингибирующих концентраций олигонуклеотидов при добавлении в экстракт и в условиях трансфекции позволило нам предположить, что «химерные» олигонуклеотиды влияют на сборку теломеразного комплекса. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели анализ взаимодействия hTERT с hTERC при помощи ультрацентрифугирования экстракта клеток в градиенте концентрации сахарозы (рис. 27А). Такой подход позволяет разделить свободную теломеразную РНК и ее комплекс с обратной транскриптазой. Анализ количества теломеразной РНК во фракциях, полученных после разделения градиента, продемонстрировал, что блокирование конформации при помощи «химерных» олигонуклеотидов приводит к снижению количества теломеразной РНК во фракции, соответствующей комплексу. Использование «химерного» олигонуклеотида с плечом комплементарным матричному участку приводило к снижению количества собранного комплекса до 40% от количества собранного комплекса в необработанных

клетках. В случае использования олигонуклеотида #2-CR4/5 теломеразный комплекс не собирался вовсе (рис. 10Б).

Таблица 1. Способность олигонуклеотидов ингибировать активность теломеразы

Название	IC50, нМ	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
C3-#1	100±20	5,2±0,9
C3-#2	19±16	43±21
C3-CR4/5	>500	41,1±7,4
#1-CR4/5	35±18	2,2±0,8
#2-CR4/5	229±72	3,9±1,7

Полученные нами данные позволяют предположить, что CR2/3 домен теломеразной РНК может находиться в двух конформациях. Формирование псевдоузла позволяет молекуле ассоциировать с обратной транскриптазой с образованием активного фермента. Стабилизация второй конформации приводит к блокированию связывания с hTERT и формирования активного теломеразного комплекса.

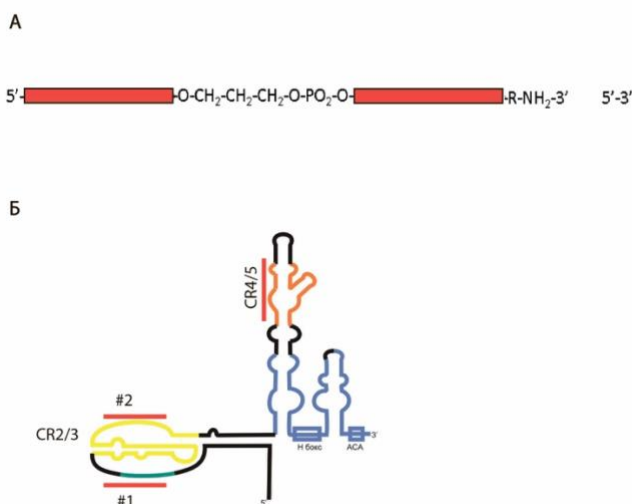


Рисунок 9. «Химерные» олигонуклеотиды, использованные для блокирования сборки теломеразного комплекса.

А. Схема строения «химерных» олигонуклеотидов.

Б. Участки взаимодействия «плечей» «химерных» олигонуклеотидов.

Применение «химерных» олигонуклеотидов, фиксирующих определенную конформацию теломеразной РНК, значительно усиливает эффективность ингибирования сборки теломеразы и теломеразной активности в сравнении с индивидуальными олигонуклеотидами. Таким образом, процесс сборки теломеразного комплекса является перспективной мишенью для разработки подходов к ингибированию теломеразы, а «химерные» олигонуклеотиды могут рассматриваться как потенциальные противоопухолевые препараты.

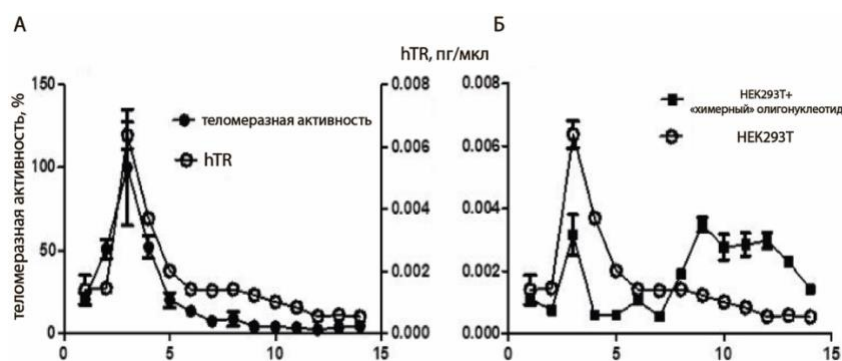


Рисунок 10. «Химерные» олигонуклеотиды блокируют сборку теломеразы.

А. Распределение теломеразной РНК человека и активности теломеразы по фракциям градиента концентрации сахарозы после ультрацентрифугирования экстрактов клеток линии HEK293Т.

Б. Распределение теломеразной РНК человека и активности теломеразы по фракциям градиента концентрации сахарозы после ультрацентрифугирования экстрактов клеток линии HEK293Т в нормальных условиях и в условиях культивирования с «химерным» олигонуклеотидом.

1.2.2. Транскрипция и процессинг теломеразной РНК человека

Биогенез теломеразного комплекса является многостадийным процессом, каждый этап которого может быть использован для разработки различных подходов к регуляции фермента. Понимание молекулярных механизмов протекания каждой стадии биогенеза позволит выявить новые перспективные мишени для направленной регуляции функционирования теломеразы. Теломеразная РНК человека является одним из двух коровых компонентов фермента, необходимых для каталитической активности фермента. Биогенез теломеразной РНК человека до сих пор недостаточно изучен. Созревание первичного транскрипта осуществляется в условиях конкуренции экзосомы, деградирующей РНК, и различных экзонуклеаз, осуществляющих точную коррекцию длины промежуточных интермедиатов. Молекулярный механизм регуляции транскрипции теломеразной РНК человека был недостаточно изучен.

Согласно данным предыдущих исследований, корректно процессированная теломеразная РНК человека образуется при использовании конструкций, экспрессия которых находится под контролем промоторов РНК-полимеразы II. Экзогенная экспрессия гена *hTERC* под контролем нативного промотора, а также промотора гена U3 мРНК обеспечивает образование «зрелой» формы теломеразной РНК, а CMV-промотор стимулирует накопление непроецированного транскрипта.

Регуляцию работы РНК-полимеразы II осуществляет большое количество разнообразных белков, которые привлекают фермент к промоторным областям, способствуют инициации транскрипции, обеспечивают переход в элонгационную манеру синтеза РНК, способствуют реактивации транскрипции после пауз и т.д. Главными регуляторами активности РНК-полимеразы II являются комплексы Медиатор, участвующий в синтезе матричных РНК, и Интегратор, который вовлечен в транскрипцию генов некодирующих РНК и некоторых специфических мРНК (например, мРНК гистонов). Известно, что в регуляции транскрипции и процессинга теломеразной РНК дрожжей *S.cerevisiae* участвует комплекс факторов терминации транскрипции Nrd1-Nab3-Sen1, который также привлекает экзосому и комплекс TRAMP. TRAMP осуществляет олигоаденилирование интермедиата теломеразной РНК. Короткая неструктурированная олиго(А)-последовательность является субстратом для экзосомы, гидролизующей РНК до тех пор, пока не встретит препятствие в виде комплекса Sm-белков, взаимодействующего

со структурными элементами 3'-концевого участка TLC1. Исследования последних лет продемонстрировали, что процессинг теломеразной РНК человека осуществляет экзосома при участии TRAMP-комплекса. TRAMP добавляет олиго(А)-последовательность на 3'-конец интермедиата TERC, а гидролиз экзосомой ограничен комплексом H/ACA-белков, взаимодействующих с 3'-концевой шпилькой. Сходство механизмов процессинга теломеразных РНК *S.cerevisiae* и человека позволяет предположить, что в регуляции терминации транскрипции hTERC может участвовать гомолог комплекса Nrd1-Nab3-Sen1. В клетках человека не обнаружено гомологов белков Nrd1, Nab3 и Sen1. Предполагается, что Интегратор является функциональным аналогом белка Sen1 *S.cerevisiae*, который участвует в терминации транскрипции мРНК и мтРНК.

Мы решили изучить терминацию транскрипции теломеразной РНК человека и роль Интегратора в этом процессе. В настоящей работе использовали репортерные бицистронные конструкции на основе лентивирусного вектора LeGo-iG2. Первый цистрон в использованных конструкциях представлен последовательностью, соответствующей теломеразной РНК человека с дополнительными 3'-концевыми 425 н.о., представленными в геноме (рис. 11А). Второй цистрон кодирует зеленый флуоресцентный белок (GFP – green fluorescent protein). Цистроны разделены внутренним участком посадки рибосомы IRES-элементом. Мы получили набор бицистронных конструкций, в которых экспрессия репортера осуществляется под контролем разных промоторов. В работе использовали промоторы SFFV (PSFFV) и гена β-актина курицы CbH1 (PCbH1), активность которого регулирует Медиатор, а также промотор гена U1 мРНК (PU1), регулируемый Интегратором, и нативный промотор теломеразной РНК человека (PhTR) (рис. 11А). Дополнительно были созданы конструкции с химерными промоторами SFFV-hTR и hTR-SFFV. Мы получили стабильные клеточные линии, в геном которых интегрировали бицистронные экспрессионные кассеты, используя трансдукцию лентивирусными частицами с последующим отбором флуоресцентных клеток при помощи сортировки. Синтез GFP в клетке может происходить только в случае синтеза полноразмерной бицистронной РНК. В случае терминации транскрипции после первого цистрона уровень флуоресценции должен быть заметно снижен.

Мы обнаружили, что эффективная трансляция мРНК GFP осуществлялась в случае использования репортерных кассет под контролем промоторов, регулируемых Медиатором. Клетки, получившие репортерные конструкции, экспрессию которых контролировал Интегратор, демонстрировали слабое фоновое свечение GFP (рис. 11Б, В). Интересно, что клетки, трансдуцированные репортерными кассетами под контролем химерного промотора PhTR-SFFV, обладали низким уровнем флуоресценции, а промотор PSFFV-hTR позволил получить две популяции клеток (рис. 11Б, В). Мы разделили клетки двух популяций и анализировали каждую из них как самостоятельную клеточную линию. В дальнейшем клетки с высоким уровнем флуоресценции будут названы “яркие”, а с низким – “неяркие” (рис. 11Б, В).

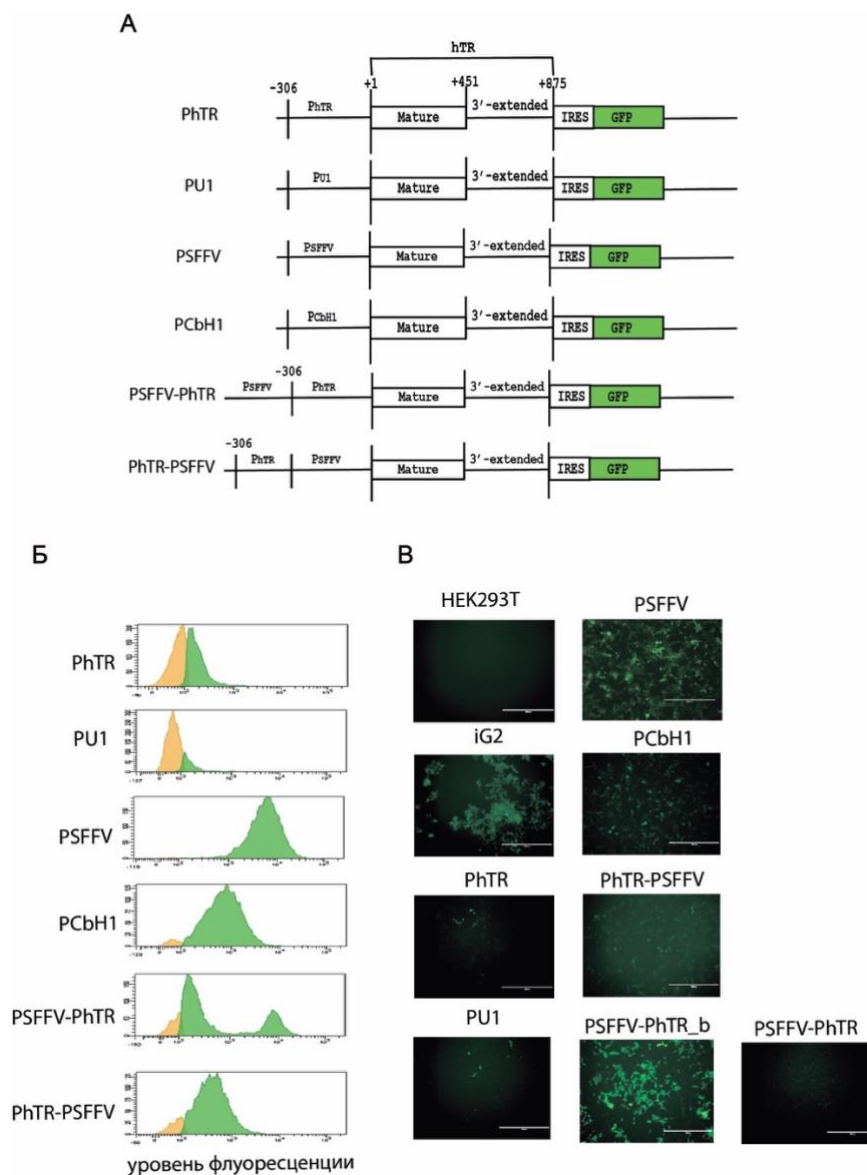


Рисунок 11. Репортерная система на основе бицистронной конструкции позволяет контролировать эффективность терминирования транскрипции.

А. Схематичное изображение бицистронных конструкций под контролем разных промоторов.

Б. Анализ флуоресценции клеток, экспрессирующих бицистронные репортерные кассеты, методом цитофлуориметрии.

В. Флуоресценция клеток, экспрессирующих бицистронные репортерные кассеты, при помощи флуоресцентной микроскопии.

Разный уровень флуоресценции в клетках после вирусной трансдукции можно объяснить не только влиянием промотора и преждевременной терминацией транскрипции, но и эффективностью интеграции вирусных кассет в геном клетки. Возможно, что клетки получили разное количество копий репортерной кассеты, что может определять различия в уровне флуоресценции. Мы определили количество копий репортерных кассет, интегрировавшихся в геном клеток, применив ПЦР в реальном времени (рис. 12). ПЦР в реальном времени проводили, используя в качестве матрицы геномную ДНК, выделенную из клеток полученных линий, и праймеры специфичные последовательности, кодирующей GFP. Нормализацию данных и расчет количества копий проводили, построив калибровочную прямую, на основе данных ПЦР в реальном времени, в которой в качестве матрицы использовали разные количества плазмиды, кодирующей GFP. Мы обнаружили,

как и предполагали, что клетки действительно получили разное число копий экспрессирующих кассет. Однако, наблюдаемая тенденция обратна ожидаемой. Мы обнаружили большее количество копий кассет в клетках с низким уровнем флуоресценции и меньшее количество копий – в клетках с ярким свечением, что позволяет утверждать, что количество GFP не зависит от числа копий репортерной кассеты, встроенной в геном клеток (рис. Рез. 12).

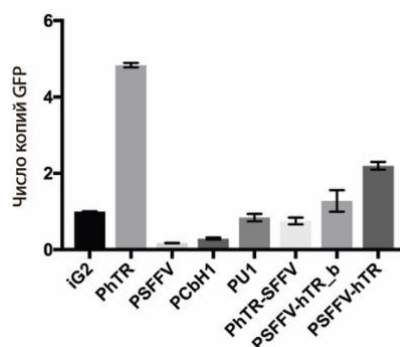


Рисунок 12. Количество копий GFP, трансдуцированных в геном клеток репортерных линий.

Разделение линии клеток, трансдуцированных вирусными частицами, несущими конструкции под контролем химерного промотора PSFFV-PhTR, на две популяции: яркую и неяркую – может произойти из-за появления мутаций в терминаторной области, возникших в процессе культивирования клеток или в результате использования аппаратом транскрипции разных частей регуляторной области.

Появление мутаций в бицистронной конструкции исключили, осуществив амплификацию участка, соответствующего теломеразной РНК человека, и секвенирование полученного продукта.

В целях проверки второй возможной причины разного уровня флуоресценции мы определили 5'-концы транскриптов, синтезированных в клеточных линиях PhTR, PSFFV и PSFFV-PhTR_b и PSFFV-PhTR при помощи 5'-RACE подхода (рис. 13А). Продукт обратной транскрипции с праймером специфичным теломеразной РНК человека был обработан терминальной трансферазой и амплифицирован. Терминальная трансфераза достраивает олиго-dC-последовательность на 5'-конце кДНК. В ПЦР используется пара праймеров, один из которых (обратный) комплементарен последовательности теломеразной РНК человека, а другой (прямой) содержит несколько дезоксиинозинов, что позволяет ему эффективно взаимодействовать только с олиго-dC-последовательностью. Полученный ПЦР продукт секвенировали. Оказалось, что клетки, экспрессирующие конструкции под контролем промоторов PhTR и PSFFV, содержали только один тип продукта, начало которых соответствует +1 положению теломеразной РНК, а клетки, в которых экспрессию кассеты контролировал химерный промотор PSFFV-PhTR, накапливали два типа транскриптов: дикого типа (+1 положение) и удлиненный с 5'-конца, в состав которого входил промотор PhTR (рис. 13Б).

Необходимо отметить, что клетки популяции со слабым уровнем флуоресценции содержали преимущественно транскрипт дикого типа, а в клетках, демонстрирующих яркое свечение GFP, SFFV-промотор выигрывал конкуренцию и происходила транскрипция более длинного продукта. Полученные данные позволяют утверждать, что именно промотор гена уже на стадии инициации транскрипции определяет события, которые

произойдут при терминеции синтеза РНК. Можно предположить, что промотор определяет состав комплекса, который обеспечивает корректное протекание всех основных этапов транскрипции гена, включая как инициацию, так и элонгацию и даже терминецию этого процесса.

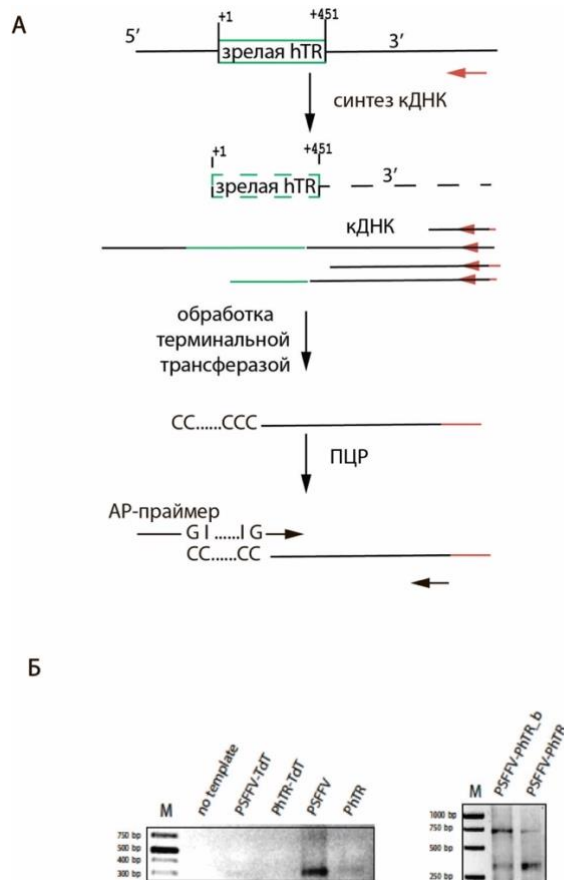


Рисунок 13. Эффективность терминеции транскрипции бицистронной мРНК зависит от промотора.

А. Схема, иллюстрирующая принцип метода определения 5'-границы транскрипта 5'-RACE.

Б. Анализ положения старта транскрипции бицистронных конструкций в репортерных линиях при помощи 5'-RACE подхода. Образцы -TdT не были обработаны терминальной трансферазой.

Для доказательства зависимости положения терминеции транскрипции от природы промотора мы определили количество «зрелой» формы и удлиненного с 3'-конца предшественника теломеразной РНК человека в полученных клеточных линиях, экспрессирующих бицистронные кассеты под контролем разных промоторов. Использовали пары праймеров, специфичные разным областям теломеразной РНК человека: «зрелой» форме и предшественнику, удлиненному с 3'-конца (рис. 14А). Необходимо отметить, что данные о количестве теломеразной РНК, полученные при использовании праймеров, специфичных «зрелой» форме транскрипта, показывают нам общее количество всех форм hTERC в клетках. Данные о количестве теломеразной РНК человека, полученные при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени, нормировали на количество копий GFP, интегрировавших в геном клеток. Мы наблюдали повышение общего количества теломеразной РНК в 2, 5, 394, 49, 32, 10, 12,5 и 3,6 раз для клеток PhTR, PSFFV, PCbH1, PU1, PhTR-PSFFV, PSFFV-PhTR_b и PSFFV-PhTR, соответственно, по сравнению с клетками, экспрессировавшими контрольную векторную конструкцию LeGo-iG2 (рис. 14А). Количество удлиненного предшественника возросло в

23, 30000, 2500, 82, 628, 1685 и 79 раз для клеток PhTR, PSFFV, PCbH1, PU1, PhTR-PSFFV, PSFFV-PhTR_b и PSFFV-PhTR, соответственно, по сравнению с клетками, экспрессировавшими контрольную векторную конструкцию LeGo-iG2 (рис. 14А). Во всех случаях мы наблюдали изменение общего количества теломеразной РНК, что затрудняет оценивать эффективность терминации транскрипции. Чтобы оценивать эффективность терминации транскрипции или процессинга теломеразной РНК человека независимо от изменения общего количества РНК мы решили нормировать количество удлинённого предшественника к общему количеству теломеразной РНК в клетке, для чего нормировали количество 3'-удлинённого транскрипта на общее количество теломеразной РНК в клетке.

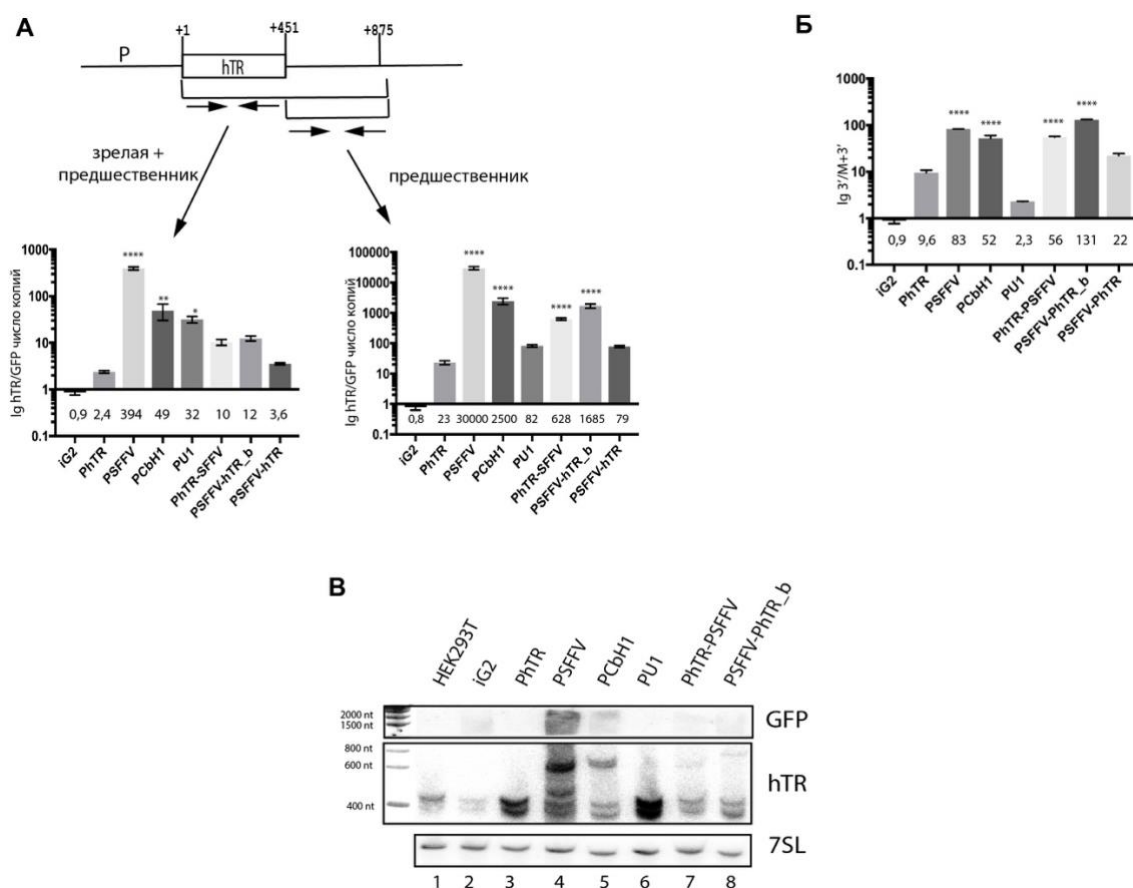


Рисунок 14. Терминация транскрипции гена теломеразной РНК человека зависит от промотора.

А. Схематичное изображение транскрипта теломеразной РНК человека и праймеров, использованных для анализа количества «зрелой» формы теломеразной РНК и ее предшественника. Гистограммы, демонстрирующие количество «зрелой» теломеразной РНК человека (слева) и ее предшественника (справа) в клетках репортерных линий, согласно результатам обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество hTR нормировали на количество мРНК GAPDH и на число копий GFP в геноме клеток. **** обозначает $P < 0,0001$, ** -- $P < 0,01$ и * -- $P < 0,1$, статистическая значимость рассчитана с использованием метода Шидака для множественных сравнений.

Б. Гистограмма, демонстрирующая эффективность процессинга теломеразной РНК человека, согласно результатам обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени. Данные получены в результате нормировки количества непроцессированной формы на суммарное количество теломеразной РНК человека.

В. Зависимость терминации транскрипции гена теломеразной РНК человека от промотора, согласно данным Нозерн-блоттинга. Верхняя панель представляет результат гибридизации мембраны с зондом специфичным мРНК GFP, средняя – hTR, нижняя – 7SL РНК (контроль нанесения).

Оказалось, что промоторы, регулируемые Интегратором, обеспечивают незначительное накопление непротранскрибированного продукта (в 9,6 и 2,3 раза в случае использования PhTR и PU1, соответственно), а промоторы, зависящие от Медиатора, вносят существенный вклад в накопление непротранскрибированного продукта (в 83, 52, 131 раз в случае использования PSFFV, PCbH1 и PSFFV-PhTR_b, соответственно) (рис. 14B). Дополнительные доказательства зависимости терминации транскрипции *hTERC* от промотора были получены при анализе суммарной клеточной РНК методом гибридизации по Нозерну. Для этого суммарную клеточную РНК разделили при помощи электрофореза в ПААГ, перенесли на мембрану и гибридизовали с радиоактивно-мечеными зондами, специфичными теломеразной РНК человека, мРНК GFP и 7SL РНК, используемой в качестве контроля нанесения. Мы обнаружили, что корректно процессированная «зрелая» форма теломеразной РНК человека накапливается в случае использования нативного промотора и промотора U1 мРНК (PhTR и PU1). Использование других промоторов приводило к появлению дополнительного промежуточного продукта длиной около 600 н.о., а также бицистронной мРНК, выявленной при помощи гибридизации с зондом специфичным мРНК GFP (рис. 14B).

Таким образом, можно заключить, что терминация транскрипции теломеразной РНК человека зависит от промотора и Интегратор может быть ключевым регулятором этого процесса. Для подтверждения ключевой роли Интегратора в регуляции транскрипции гена *hTERC* мы оценили изменения количества непротранскрибированной формы теломеразной РНК человека в клетках дикого типа в условиях ингибирования экспрессии генов компонентов Интегратора при помощи РНК-интерференции.

В настоящий момент известно, что в состав Интегратора входит 14 субъединиц. Мы выбрали 3 компонента Интегратора для проверки гипотезы об участии Интегратора в регуляции транскрипции гена теломеразной РНК человека. INTS1 является самым большим белком, входящим в состав Интегратора, и представляет собой каркас для сборки всего мультикомпонентного комплекса. INTS9 и INTS11 участвуют в процессинге 3'-концов синтезируемых транскриптов. INTS11 является гомологом главного фактора, вносящего разрыв на 3'-конце синтезируемых мРНК, CPSF73, а INTS9 – гомолог CPSF100, который координирует разрезание синтезируемого транскрипта и терминацию транскрипции, а также вовлечен в регуляцию перехода РНК-полимеразы II к процессивной элонгации после остановки. Функции остальных субъединиц Интегратора мало изучены.

Ингибирование экспрессии генов субъединиц Интегратора проводили в клетках HEK293T дикого типа при помощи siRNA описанных ранее в литературе. В качестве контроля специфичности использовали по две siRNA для ингибирования экспрессии каждого гена и siRNA, комплементарную последовательности, кодирующей люциферазу светлячка. Эффективность нокдауна генов определяли при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. В дальнейших экспериментах по ингибированию экспрессии генов компонентов Интегратора использовали только одну siRNA, которая наиболее эффективно снижала уровень экспрессии целевого гена. В ходе этого эксперимента мы оценили взаимовлияние экспрессии генов различных субъединиц Интегратора. В случае нокдауна гена INTS1 были определены уровни мРНК как INTS1, так и INTS9, и INTS11 (рис. 15A, Б, В). Оказалось, что экспрессия генов компонентов Интегратора регулируется по механизму обратной связи. Мы наблюдали повышение экспрессии хотя бы одной из двух нецелевых для siRNA субъединиц Интегратора при снижении экспрессии целевого гена. В случае нокдауна гена *INTS1* происходит усиление

экспрессии генов *INTS9* и *INTS11*, в случае нокдауна гена *INTS11* увеличивается количество мРНК *INTS1* и *INTS9* (рис. 15А, В). Нокдаун *INTS9* практически не влияет на экспрессию других исследуемых компонентов Интегратора (рис. 15Б). Можно предположить, что отдельные компоненты комплекса Интегратор вовлечены в регуляцию экспрессии других компонентов. Механизм регуляции экспрессии компонентов Интегратора требует дальнейшего исследования.

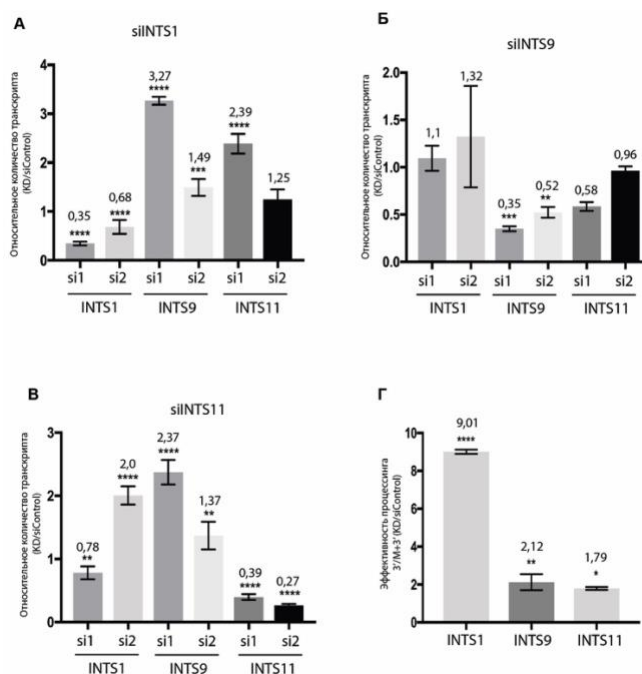


Рисунок 15. Экспрессия генов компонентов Интегратора *INTS1*, *INTS9* и *INTS11* регулируется по механизму обратной связи. Ингибирование экспрессии генов компонентов Интегратора *INTS1*, *INTS9* и *INTS11* снижает эффективность процессинга U2 мРНК.

А. Изменение экспрессии генов компонентов Интегратора *INTS1*, *INTS9* и *INTS11* в условиях ингибирования экспрессии *INTS1*.

Б. Изменение экспрессии генов компонентов Интегратора *INTS1*, *INTS9* и *INTS11* в условиях ингибирования экспрессии *INTS9*.

В. Изменение экспрессии генов компонентов Интегратора *INTS1*, *INTS9* и *INTS11* в условиях ингибирования экспрессии *INTS11*.

Г. Эффективность процессинга U2 мРНК в условиях ингибирования экспрессии генов компонентов Интегратора *INTS1*, *INTS9* и *INTS11*.

Уровень экспрессии анализировали методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество целевых РНК нормировано на контрольную мРНК GAPDH и на количество копий GFP в геноме клеток. **** обозначает $P < 0,0001$, *** -- $P < 0,001$, ** -- $P < 0,01$ и * -- $P < 0,1$, статистическая значимость получена с использованием метода Шидака для множественных сравнений.

Известно, что Интегратор является ключевым регулятором формирования 3'-конца мРНК. Мы решили использовать данные об изменении количества «зрелой» формы и непротессированной с 3'-конца U2 мРНК в условиях нокдауна генов компонентов Интегратора в целях подтверждения специфичности используемых siRNA (рис. 15Г). Количество разных форм U2 мРНК определяли при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени, используя праймеры специфичные «зрелому» или 3'-удлиненному транскрипту.

Используя праймеры, специфичные «зрелой» форме U2 мяРНК, мы определяем общий уровень экспрессии гена, а праймеры, специфичные непротрансценсированной форме, позволяют нам определить количество только 3'-удлиненного транскрипта. В дальнейшем вычисляли отношение количества непротрансценсированного транскрипта к количеству «зрелой» формы РНК, чтобы исключить вклад глобального изменения уровня экспрессии U2 мяРНК в результате нокдауна компонентов Интегратора. Нокдаун гена *INTS1* приводит к снижению эффективности процессинга U2 мяРНК в 9 раз, а снижение уровня экспрессии *INTS9* и *INTS11* повышает количество непротрансценсированной формы в 2,1 и 1,8-раз, соответственно, по сравнению с клетками, обработанными siRNA специфичной гену люциферазы светлячка. Таким образом мы дополнительно подтвердили специфичность работы использованных нами siRNA (рис. 15Г).

Мы предполагали, что Интегратор вовлечен в регуляцию транскрипции и формирования 3'-конца теломеразной РНК человека. Предыдущие эксперименты продемонстрировали, что «зрелая» форма теломеразной РНК формируется при экспрессии репортерных конструкций только под контролем промоторов, регулируемых Интегратором. Для подтверждения участия Интегратора в биогенезе теломеразной РНК человека мы определили изменение эффективности процессинга транскрипта в условиях нокдауна компонентов Интегратора. Определяли общий уровень экспрессии теломеразной РНК человека, используя праймеры, специфичные «зрелой» форме транскрипта, а также количество 3'-удлиненной формы, проводя обратную транскрипцию сопряженную с ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными непротрансценсированному транскрипту. Оказалось, что нокдаун *INTS1* снижает эффективность процессинга в 6 раз, а снижение уровня экспрессии генов *INTS9* и *INTS11* приводит к накоплению непротрансценсированной формы теломеразной РНК человека в 2,3 и 1,2 раза, соответственно, в сравнении с клетками, обработанными siRNA, специфичной гену люциферазы светлячка (рис. 16). Таким образом, мы подтвердили, что Интегратор участвует в регуляции транскрипции теломеразной РНК человека.

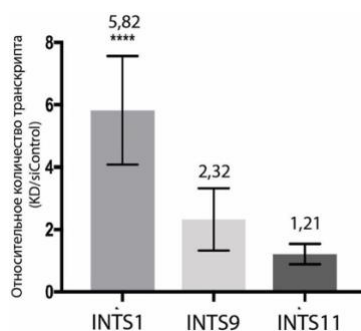


Рисунок 16. Эффективность процессинга теломеразной РНК человека в условиях ингибирования экспрессии генов компонентов Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11.

Уровень экспрессии анализировали методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество теломеразной РНК человека нормировано на контрольную мРНК GAPDH и на количество копий GFP в геноме клеток. **** обозначает $P < 0,0001$, статистическая значимость получена с использованием метода Шидака для множественных сравнений.

Несмотря на интенсивные исследования последних лет, точная длина первичного транскрипта теломеразной РНК человека, также, как и положение терминации транскрипции до сих пор остаются неизвестным. Известно, что Интегратор, привлекая различные факторы, участвует в регуляции всех стадий транскрипции и последующего

процессинга РНК. Процессинг 3'-конца теломеразной РНК человека осуществляется котранскрипционно при участии CBCA и NEXT-комплексов. Ассоциация CBCA-комплекса с Интегратором через взаимодействие с белком NELF способствует корректному процессингу 3'-концов мРНК. Можно предположить, что в случае биогенеза теломеразной РНК человека CBCA и NEXT-комплексы, а также экзосома могут привлекаться при участии Интегратора (рис. 17).

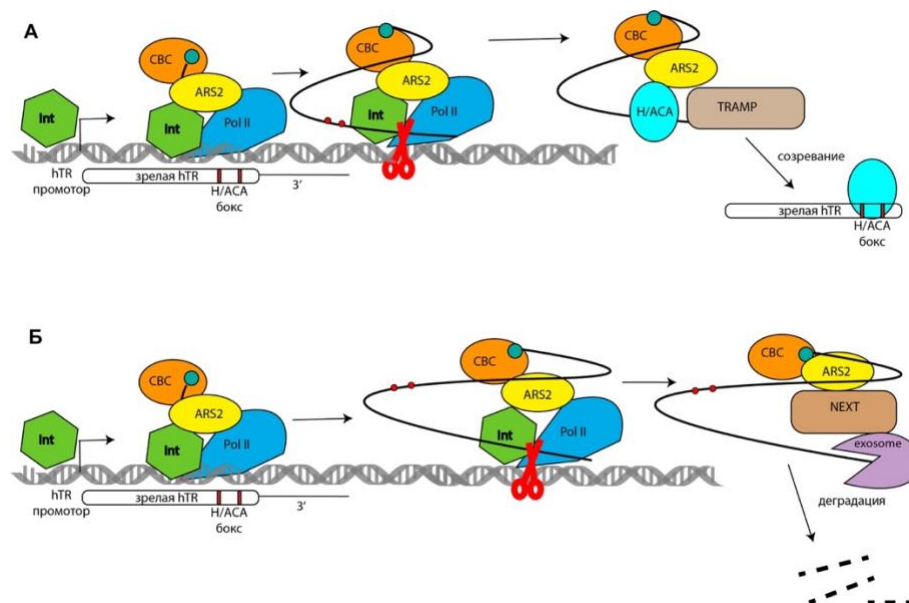


Рисунок 17. Схема, иллюстрирующая молекулярный механизм транскрипции и котранскрипционного процессинга теломеразной РНК человека.

В условиях снижения количества Интегратора в клетках эффективность привлечения процессирующего комплекса на синтезируемый транскрипт будет ингибирована, что приведет к накоплению первичного транскрипта, не подвергшегося укорочению с 3'-конца. Увеличение количества непротранскрибированного транскрипта может позволить определить положение 3'-конца первичного транскрипта теломеразной РНК человека. Мы использовали клетки, обработанные siRNA специфичной к мРНК INTS1, а также клетки, экспрессирующие репортерные конструкции под контролем промоторов PhTR и PSFFV, для определения положения терминации транскрипции гена *hTERC*. 3'-конец определяли при помощи методики 3'-RACE (рис. 18А), с последующим пиросеквенированием полученных ампликонов.

На первом этапе проводили лигирование адаптерного праймера к фракции тотальной РНК, выделенной из исследуемых клеток. Обратную транскрипцию и последующий ПЦР проводили при помощи обратного праймера, комплементарного адаптерному, и прямого праймера, комплементарного участку, выходящему за пределы зрелой формы теломеразной РНК человека. Таким образом мы получали ПЦР-продукты, соответствовавшие только непротранскрибированному транскрипту. В результате секвенирования мы выявили набор продуктов, диапазон длин которых соответствовал удлинённой теломеразной РНК на 30-400 н.о., в случае клеток, экспрессирующих репортерную конструкцию под контролем промотора PSFFV (рис. 18Б), ни одного продукта для клеток PhTR и клеток, обработанных siRNA, специфичной гену люциферазы светлячка,

и накопление продукта, удлинненного на 120 н.о., для клеток со сниженной экспрессией гена *INTS1* (рис. 18B).

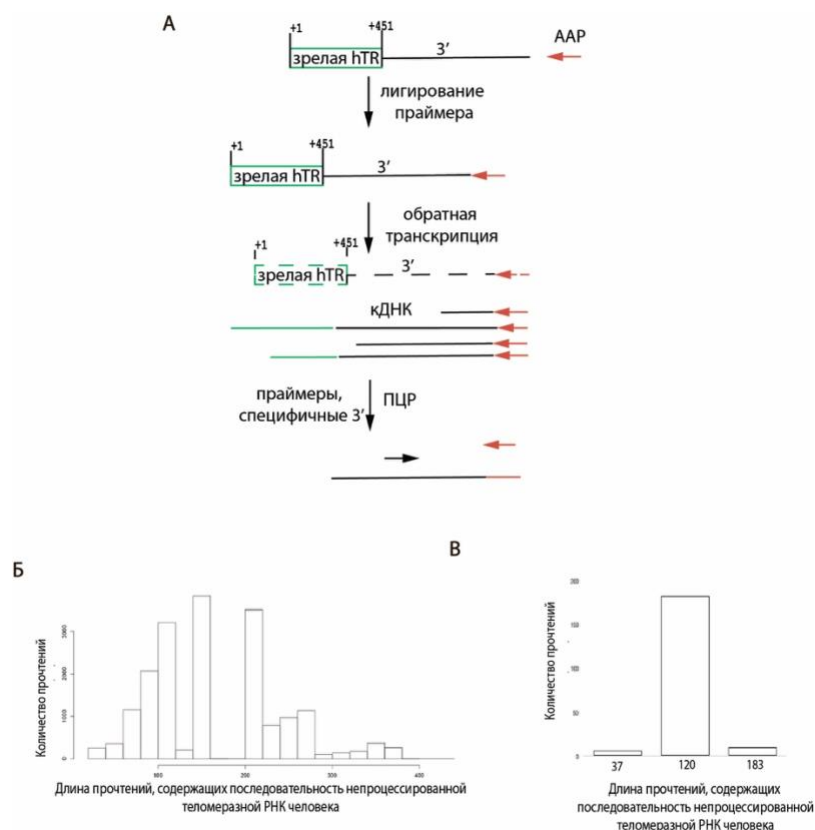


Рисунок 18. Определение длины транскрипта теломеразной РНК человека.

А. Схема, иллюстрирующая принцип метода определения 3'-границы транскрипта 3'-RACE.

Б. Распределение количества прочтений непротрансцензированной формы теломеразной РНК человека по длине транскрипта в клетках линии, экспрессирующей бицистронную кассету под контролем SFFV-промотора.

В. Распределение количества прочтений непротрансцензированной формы теломеразной РНК человека по длине транскрипта в клетках HEK293T со сниженным количеством мРНК *INTS1*.

Биогенез теломеразной РНК является одним из ключевых механизмов, регулирующих работу теломеразы. Мутации в компонентах клетки, вовлеченных в процессинг теломеразной РНК человека, ассоциированы с патологиями, характеризующимися нарушениями функционирования теломеразы и поддержания длины теломер. Исследования последних лет выявили конкуренцию процессинга первичного транскрипта теломеразной РНК человека с образованием ее зрелой формы и деградации hTERC при участии экзосомы. В настоящем исследовании мы продемонстрировали участие мультисубъединичного комплекса Интегратор, одного из регуляторов транскрипции и котранскрипционного процессинга синтезируемых РНК, в биогенезе теломеразной РНК человека. Полученные нами данные в совокупности с исследованиями последних лет позволяют предполагать, что именно Интегратор отвечает за привлечение компонентов, участвующих в процессинге или деградации, к новосинтезируемому транскрипту теломеразной РНК человека, что позволяет поддерживать физиологический уровень теломеразной РНК человека в клетке.

1.2.3. Теломеразная РНК человека -- матрица для синтеза белка, обладающего защитными свойствами

Изучая роль Интегратора в биогенезе теломеразной РНК человека, мы продемонстрировали накопление транскрипта длиной 571 н.о. в условиях ингибирования экспрессии *INTS1*. Существование транскриптов теломеразной РНК человека длиной до 1500 н.о. было показано ранее при помощи методов глобального секвенирования. Мутации в теломеразной РНК человека, нарушающие ее процессинг также, как и мутации в компонентах, вовлеченных в ее биогенез, приводят к накоплению hTERC в цитоплазматических тельцах суТЕР. Работы, связанные с глобальным анализом рибосом-ассоциированных РНК, показывают, что hTERC локализуется в полисомной фракции, т.е. взаимодействует с транслирующими рибосомами. Интересно, что количество теломеразной РНК человека в полисомной фракции превышает количество мРНК hTERT. Совокупность данных о свойствах, структуре и биогенезе теломеразной РНК человека позволяет предположить, что она обладает кодирующим потенциалом.

Биоинформатический анализ первичной структуры гена теломеразной РНК человека выявил наличие открытой рамки считывания, кодирующей белок, состоящий из 121 аминокислотного остатка. Открытая рамка считывания начинается со 176 н.о. гена теломеразной РНК человека и выходит за границу зрелой формы hTERC (рис. 19А). Белок, названный hTERP – human Telomerase RNA Protein, имеет молекулярную массу 13 кДа. hTERP обогащен положительно-заряженными аминокислотными остатками и обладает рассчитанной изоэлектрической точкой pI 11,7.

Консервативность аминокислотной последовательности свидетельствует о функциональности кодируемого белка. Мы провели анализ последовательности TERP из разных организмов и 30% гомологию последовательностей гипотетических белков из 10 позвоночных (рис. 19Б): человека, шимпанзе, гориллы, лошади, свиньи, коровы, мыши, лягушки, рыб *Danio rerio* и *Gasterosteus aculeatus*. Анализ гомологии гипотетических белков сравнимой длины (121 а.о. для человека, 113 а.о. для кота, 106 а.о. для лошади и 139 а.о. для мыши) выявил, что они идентичны как минимум на 40% и обогащены аминокислотными остатками Arg, Gly и Pro.

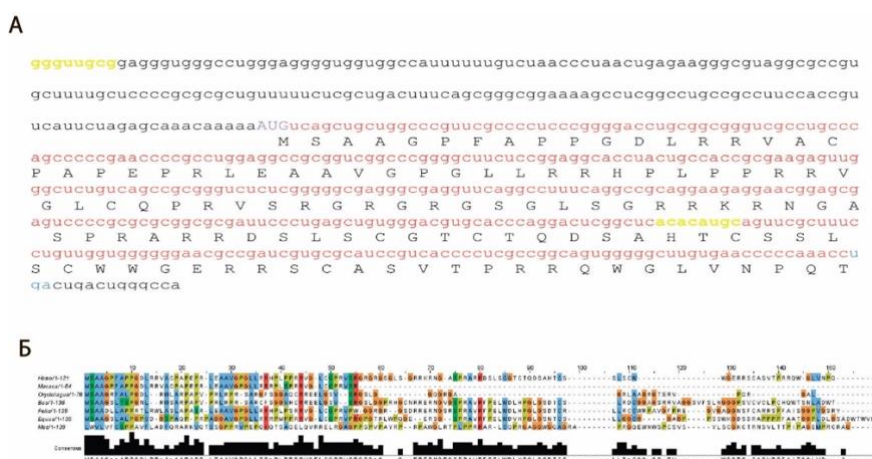


Рисунок 19. Теломеразная РНК человека кодирует открытую рамку считывания.

А. Последовательность открытой рамки считывания, обнаруженной в гене теломеразной РНК человека.

Б. Биоинформатическое выравнивание последовательностей открытых рамок считывания, обнаруженных в теломеразных РНК человека, гориллы, мыши, быка и лошади. Визуализация выравнивания проведена в программе JalView.

Программы предсказания физико-химических свойств белков по первичной структуре относят hTERP к классу так называемых нативно-неструктурированных белков ((Intrinsically Unstructured Proteins (IUPs), Intrinsically Disordered Proteins (IDPs)). Известно, что нативно-неструктурированные белки функционируют в составе различных мультикомпонентных комплексов. Скорость эволюции нативно-неструктурированных белков повышена по сравнению с белками, поддерживающими точную структуру. Сходство аминокислотных последовательностей гомологов нативно-неструктурированных белков из разных организмов низко, т.к. корректное функционирование требует поддержания заряда и гидрофобности белка.

В целях выявления уникальных пептидов hTERP, когда-либо выявляемых при исследованиях протеомов клеток, мы провели анализ архива протеомной базы данных PRIDE Archive. Проводили виртуальное расщепление hTERP разными протеазами при помощи программы Peptide Cutter. Поиск полученных последовательностей пептидов в базе данных PRIDE позволил обнаружить 11 уникальных пептидов из hTERP, выявленных в ходе исследований интерактом транскрипционных факторов, тирозиновых фосфатаз и циклин-зависимых киназ в клетках HEK293T.

Синтез белка осуществляется рибосомами в цитоплазме клеток. Косвенные данные свидетельствуют о накоплении теломеразной РНК человека в цитоплазме при нарушении ее процессинга. Доказательство локализации теломеразной РНК человека проводили, разделяя экстракт клеток HEK293T на цитоплазматическую и ядерную фракции. РНК, выделенную из полученных фракций использовали для определения количества теломеразной РНК человека методом обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Качество разделения фракций подтверждали при помощи Вестерн-блоттинга. Мы продемонстрировали, что после разделения цитоплазматической и ядерной фракции, α -тубулин находится в цитоплазме и перинуклеарной фракции, а гистон H3 – только в ядре (рис. 20А). Контроль разделения РНК между ядром и цитоплазмой осуществляли, определяя количество несплайсированной и сплайсированной форм мРНК *GAPDH* при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Содержание РНК в каждой фракции оценивали как долю от общего содержания этой РНК во фракции суммарной клеточной РНК, которую находили как отношение *St* в анализируемой фракции к *St* в тотальной РНК. Данные представляли в виде гистограммы (рис. 20Б). Соответствие продукта ожидаемому анализируемому при помощи электрофореза в агарозном геле ПЦР смеси после амплификации продукта обратной транскрипции (рис. 20 В). Мы обнаружили, что полностью сплайсированная форма мРНК *GAPDH* находится в цитоплазматической фракции, а несплайсированная пре-мРНК – в ядерной. Таким образом, предложенный метод может быть использован для установления локализации теломеразной РНК человека.

Анализ содержания hTERC в ядерной и цитоплазматической фракциях выявил, что 20-30% теломеразной РНК находится в цитоплазматической фракции (рис. 20Б, Г) и она может быть использована в качестве матрицы для синтеза белка.

Идентификацию белка hTERP в клетках человека осуществляли при помощи трех различных независимых подходов. Последовательность теломеразной РНК человека, кодирующую hTERP, клонировали в вектор pET32b+ и экспрессировали в *E.coli*. Белок выделяли при помощи аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе, благодаря наличию 6His-эпитопа в экспрессионной кассете. Очищенный белок использовали для иммунизации

кролика. Иммунизацию проводили на базе вивария Института биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина.

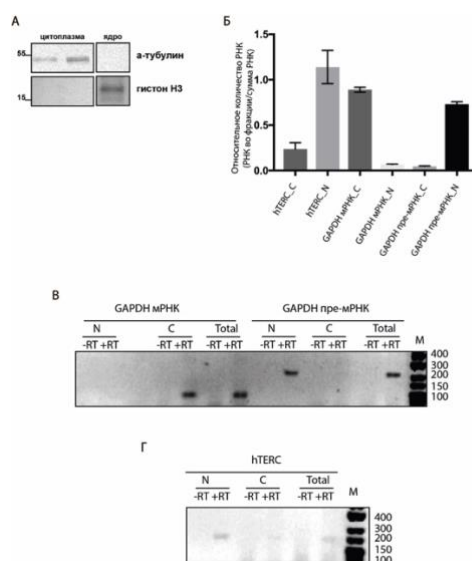


Рисунок 20. Теломеразная РНК человека локализуется в ядре и цитоплазме.

А. Анализ разделения ядерной и цитоплазматической фракций экстракта при помощи метода Вестерн-блоттинга. Проверляли содержание α-тубулина и гистона H3 в экстрактах.

Б. Анализ содержания РНК в ядерной и цитоплазматической фракциях клеточного экстракта. Количество РНК определяли при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество РНК во фракции нормировали на ее количество во фракции суммарной клеточной РНК. В качестве контроля разделения фракций использовали мРНК GAPDH. Сплайсированная мРНК содержится в цитоплазме, а несплайсированная пре-мРНК – в ядре.

В. Анализ продуктов обратной транскрипции сопряженной с ПЦР для мРНК и пре-мРНК GAPDH методом электрофореза в агарозном геле.

Г. Анализ продуктов обратной транскрипции сопряженной с ПЦР для hTERC методом электрофореза в агарозном геле.

Сыворотку крови иммунизированного кролика использовали для выделения IgG-фракции антител при помощи белок G-сефарозы. Полученную IgG фракцию инкубировали ночь с экстрактом клеток линии VA13, которые не содержат hTERC, и проводили аффинную очистку антител специфичных к hTERP, используя NHS-сефарозу, предварительно конъюгированную с рекомбинантным hTERP.

Полученные антитела использовали для идентификации белка hTERP при помощи иммунофлуоресцентного анализа и методом Вестерн-блоттинга. Для идентификации белка при помощи иммунофлуоресцентного анализа и Вестерн-блоттинга использовали клетки почки эмбриона человека HEK293T, фибросаркомы HT1080, Т-лимфоцитов человека Jurkat и фибробластов легкого эмбриона VA13. Клетки линии VA13 не содержат теломеразной РНК согласно литературным данным.

Для визуализации hTERP в клетках использовали первичные антитела специфичные hTERP. Методом флуоресцентной микроскопии мы обнаружили распределение специфичного сигнала в объеме теломеразо-позитивных (содержащих теломеразную РНК) клеток, а в клетках теломеразо-негативной линии VA13 флуоресценция не была выявлена (рис. 21А). Ядро клеток окрашивали DAPI. Уровень экспрессии hTERC в используемых клетках подтверждали при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени (рис. 21Б). Метод Вестерн-блоттинга выявил наличие белка hTERP в клетках

теломеразо-позитивных линий (рис. 21В) и его отсутствие в клетках линии VA13 (рис. 21Г).

Снижение экспрессии hTERC в клетках HEK293T при помощи РНК-интерференции с применением двух разных shRNA (рис. 22А) уменьшает количество белка hTERP (рис. 22Б), согласно данным Вестерн-блоттинга. Экзогенная экспрессия hTERC дикого типа, но не ее мутантных форм (рис. 22В, Г), в которых нарушена открытая рамка считывания белка hTERP, приводит к появлению специфического сигнала в клетках линии VA13, что было выявлено при помощи иммунофлуоресцентной микроскопии (рис. 22Д) и Вестерн-блоттинга (рис. 22Е).

Анализ клеток методом иммунофлуоресцентной микроскопии выявил специфический сигнал в клетках линии VA13 в условиях экзогенной экспрессии hTERC дикого типа и мутантной формы, кодирующей 17 а.о. N-концевой пептид (рис. 22Д), длина которого не позволяла выявить его при использовании метода Вестерн-блоттинга (рис. 22Е). Мы не наблюдали возникновения позитивного сигнала в клетках VA13 в условиях экзогенной экспрессии теломеразной РНК человека с инактивированным стартовым кодоном в открытой рамке считывания ни методом иммунофлуоресцентной микроскопии, ни Вестерн-блоттингом (рис. 22Д,Е).

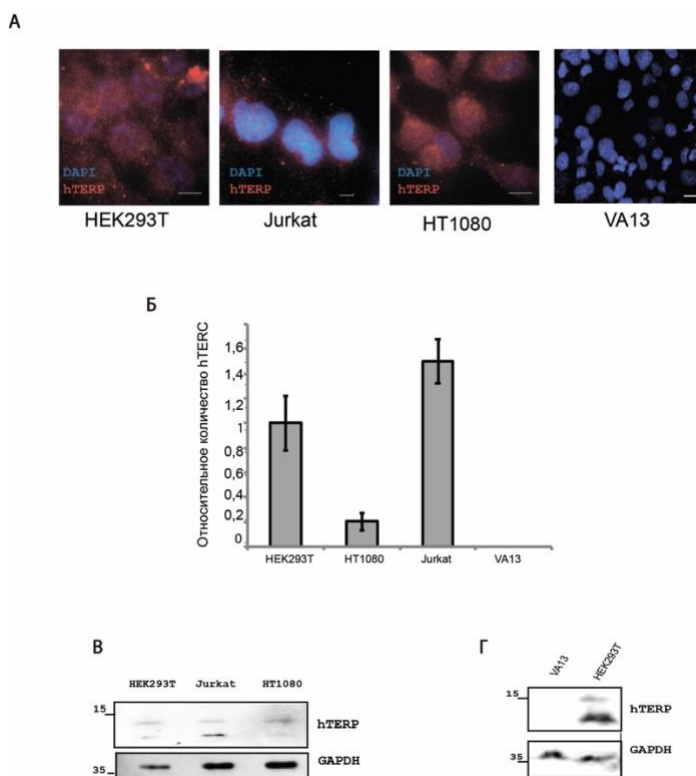


Рисунок 21. hTERP присутствует в теломеразо-положительных клетках (HEK293T, Jurkat, HT1080) и отсутствует в теломеразо-негативных клетках VA13.

А. Анализ содержания hTERP в клетках линий HEK293T, Jurkat, HT1080 и VA13 методом иммунофлуоресцентного анализа. DAPI -- синий, hTERP – красный.

Б. Содержание теломеразной РНК человека в клетках линий HEK293T, Jurkat, HT1080 и VA13, согласно результатам обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени.

В. Анализ содержания hTERP в клетках линий HEK293T, Jurkat и HT1080 методом Вестерн-блоттинга. Верхняя панель – hTERP, нижняя панель – GAPDH – контроль нанесения.

Г. Анализ содержания hTERP в клетках линий HEK293T и VA13 методом Вестерн-блоттинга. Верхняя панель – hTERP, нижняя панель – GAPDH – контроль нанесения.

Методом Вестерн-блоттинга нам удалось выявить несколько форм белка hTERP (рис. 21В, Г, 22Б,Е). Мы предполагаем, что в клетке присутствует полноразмерный белок, молекулярная масса которого составляет 13,3 кДа, и короткая форма, которая соответствует продукту трансляции зрелой формы теломеразной РНК и имеет молекулярную массу 9,9 кДа. Белок hTERP склонен к олигомеризации, которую может обеспечивать N-концевой домен белка, имеющий гомологию с доменом олигомеризации белка p62. Олигомерные комплексы были выявлены при помощи Вестерн-блоттинга препаратов рекомбинантного белка и экстрактов клеток линии HEK293Т.

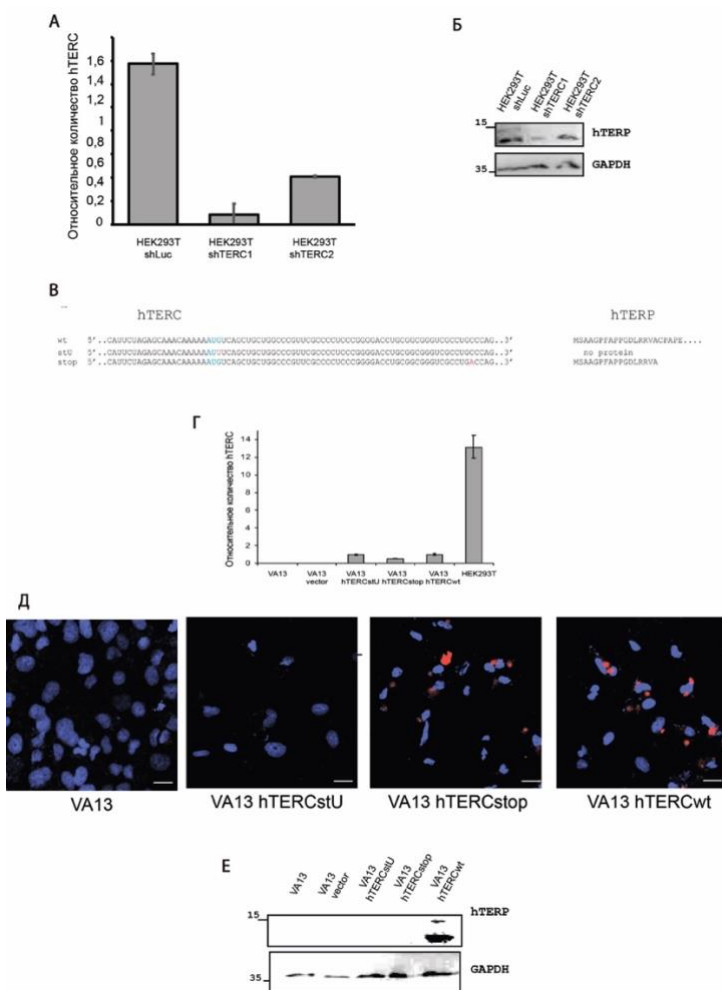


Рисунок 22. Содержание белка hTERP в клетке зависит от уровня экспрессии *hTERC*.

А. Ингибирование экспрессии *hTERC* в клетках линии HEK293Т методом РНК-интерференции, согласно данным обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени.

Б. Уменьшение количества hTERP в клетках линии HEK293Т в условиях ингибирования экспрессии *hTERC*. Верхняя панель hTERP, нижняя – GAPDH.

В. Последовательность начала открытой рамки считывания hTERP дикого типа и ее мутантных форм, используемых для экспрессии в клетках VA13.

Г. Количество теломеразной РНК человека в клетках линии VA13 в условиях экзогенной экспрессии теломеразной РНК дикого типа и ее мутантных форм, согласно данным обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени.

Д. Наличие hTERP в клетках VA13 в условиях экзогенной экспрессии теломеразной РНК дикого типа и ее мутантных форм, согласно методу иммунофлуоресцентной микроскопии. DAPI – синий, hTERP – красный.

Е. Наличие hTERP в клетках VA13 в условиях экзогенной экспрессии теломеразной РНК дикого типа и ее мутантных форм, согласно методу Вестерн-блоттинга. Верхняя панель hTERP, нижняя – GAPDH.

Окончательным и неопровержимым доказательством существования белка является идентификация при помощи метода масс-спектрометрии. Сотрудничество с Федеральным Научно-Клиническим Центром Физико-Химической Медицины ФМБА России позволило провести LC-MS/MS-идентификацию белка hTERP в клетках HEK293T. Предварительный анализ рекомбинантного белка hTERP показал, что в результате трипсинолиза образуются 5 пептидов, которые могут быть идентифицированы с достоверностью >99%. Метод направленного LC-MS/MS анализа позволил выявить один уникальный пептид LEAAVGPGLLR (m/z 548,3) в триптическом гидролизате белков цитоплазматического экстракта клеток HEK293T (рис. 23А,Б).

Уникальность идентифицированного пептида подтверждена при помощи поиска гомологов в полной базе данных BlastP. Концентрирование hTERP при помощи иммунопреципитации позволило увеличить количество идентифицированных пептидов до трех (рис. 23В).

Использование трех независимых подходов позволило доказать кодирующий потенциал теломеразной РНК человека и достоверно идентифицировать белок hTERP в клетках линии HEK293T, экспрессирующей *hTERC*.

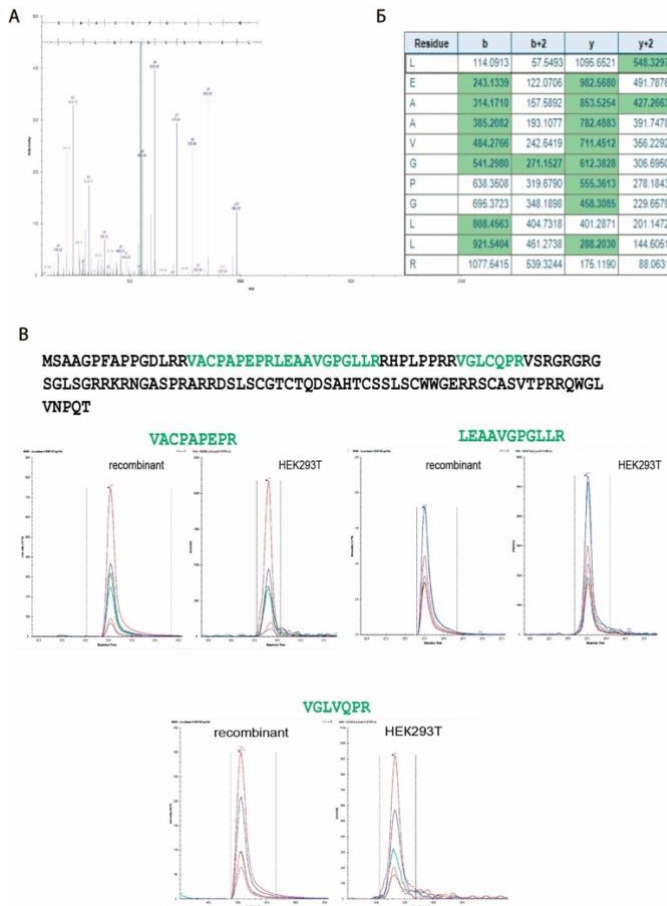


Рисунок 23. Белок hTERP идентифицирован методом масс-спектрометрии.
 А. Спектр пептида, использованного для идентификации белка hTERP.
 Б. Последовательность пептида и разница масс между продуктами фрагментации пептида.
 В. Последовательности и спектры трех пептидов, которые были идентифицированы в клетках линии HEK293T.

Известные альтернативные функции теломеразной РНК человека позволили нам выдвинуть гипотезу об участии белка hTERP в регуляции апоптоза. Экспрессия

последовательности, кодирующей теломеразную РНК человека неспособную ассоциировать с hTERT, приводит к защите CD4⁺ Т-клеток в условиях индукции апоптоза. Для изучения роли белка hTERP мы воспользовались подходом loss-of-function и gain-of-function. Инактивацию синтеза белка hTERP проводили при помощи метода направленного редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9. Многочисленные попытки инактивации открытой рамки считывания не позволили получить клетки, не содержащие белка hTERP. Мы получили 10 клонов с мутациями в открытой рамке считывания, кодирующей hTERP. Оба аллеля содержали мутации только в 4 случаях.

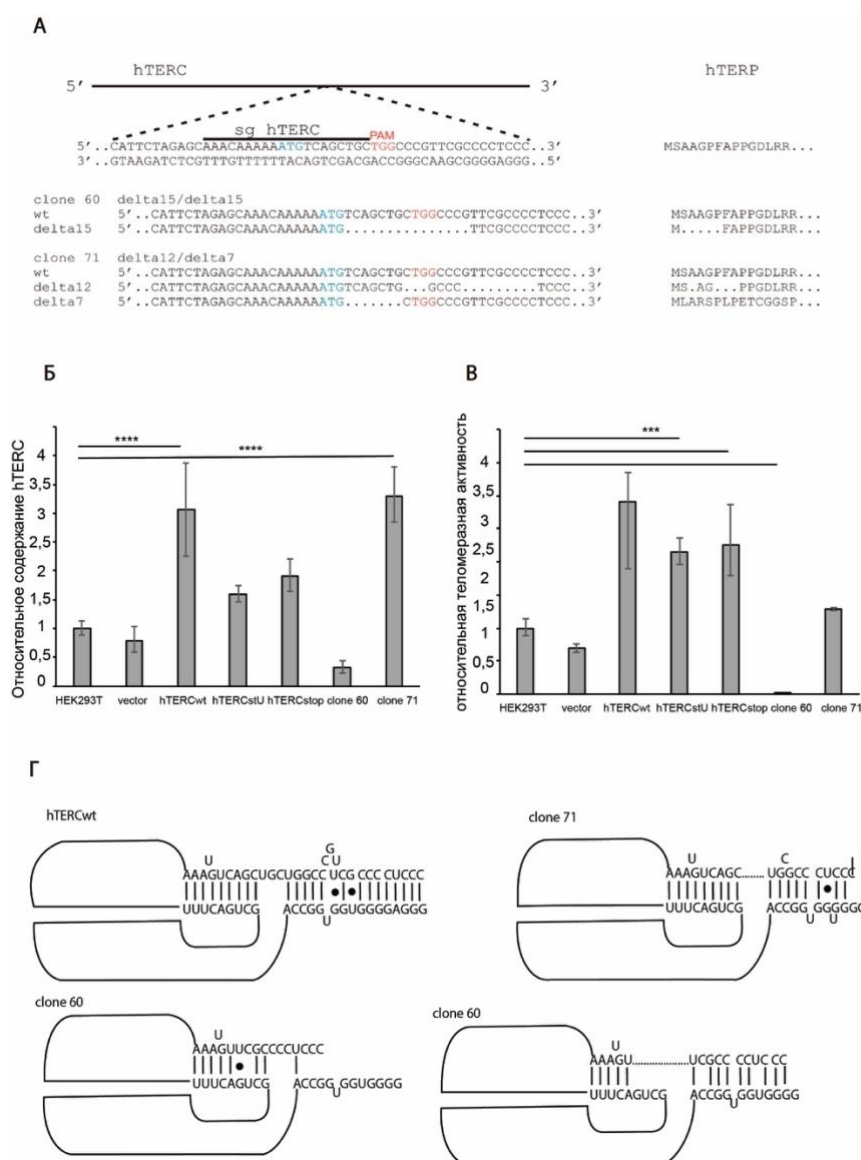


Рисунок 24. Мутантные формы теломеразной РНК человека, использованные для исследования роли hTERP. А. Последовательность начала открытой рамки считывания hTERP дикого типа и ее мутантных форм, полученных в результате редактирования генома клеток HEK293Т. Б. Относительное содержание теломеразной РНК человека в модифицированных клеточных линиях, использованных в исследовании роли белка hTERP. В. Изменение теломеразной активности в модифицированных клеточных линиях. Г. Предполагаемые изменения вторичной структуры теломеразной РНК человека в результате возникших мутаций.

Однако, во всех случаях хотя бы один аллель имел делецию, которая не приводила к сбою рамки считывания. Мы ожидали, что в 66% случаев появления мутаций должен

происходить сбой рамки считывания, т.к. делеции двух из трех нуклеотидов нарушают рамку. Анализ полученных клонов выявил, что только 16% мутаций вызывали сбой рамки считывания. Низкая эффективность сбоя рамки считывания, кодирующей hTERP, позволяет предположить, что исследуемый белок является необходимым для жизнедеятельности клеток линии HEK293T.

Мы выбрали два клона для дальнейшего исследования функциональной роли белка hTERP (рис. 24А). В клетках клона 60 произошла делеция 15 н.о. в обоих аллелях, и в этом случае N-конец hTERP укорочен на 5 аминокислот (отсутствуют аминокислоты 2-6). В клоне «71» в одном аллеле гена *hTERC* отсутствуют 7 нуклеотидов, что полностью нарушает открытую рамку считывания, а другой аллель содержит делецию 12 нуклеотидов, при которой возможен синтез hTERP с отсутствием 4 аминокислот на N-конце (аминокислоты 2, 5-7) (рис. 24А). Мы провели анализ количества теломеразной РНК в полученных клеточных линиях и обнаружили его повышение в 3 раза в клетках клона 71 и снижение в 2 раза для клеток клона 60 (рис. 24Б). Теломеразная активность не изменялась в клоне 71 и полностью пропадала в клоне 60 (рис. 24В). Такое влияние мутаций на теломеразную активность можно объяснить нарушением структуры псевдоузла hTERC, происходящего в случае делеции 15 н.о. в клоне 60 (рис. 24Г). Мутация, произошедшая в одном из аллелей клона 71, затрагивает элемент, ограничивающий матричный участок, но не нарушает структуру псевдоузла и не должен влиять на активность теломеразы (рис. 24Г). Снижение количества hTERP в обоих клонах показано при помощи Вестерн-блоттинга (рис. 25А).

При помощи трансдукции клеток HEK293T лентивирусными частицами мы получили набор клеточных линий с экзогенной экспрессией hTERC дикого типа и ее мутантных форм, в которых нарушена открытая рамка считывания белка hTERP. hTERC-stU мутант содержит замену в стартовом кодоне, которая инактивирует открытую рамку считывания, а в мутанте hTERC-stop произведена замена C229A, что приводит к синтезу укороченного варианта hTERP (17 а.о.) (рис. 22В). Уровень экспрессии hTERC увеличился в 1,5-3 раза, а теломеразная активность – в 2,5-3 раза во всех полученных стабильных клеточных линиях (рис. 24Б,В). Количество белка hTERP возросло только в клетках, экспрессирующих hTERC дикого типа (рис. 25А). Клетки всех полученных линий были обработаны доксорубицином или этопозидом для индукции апоптоза. Выживаемость клеток оценивали через 48 часов инкубации клеток с апоптоз-индуцирующими препаратами. Мы наблюдали значительное изменение морфологии (изменение формы клеток, потеря адгезивности, «блеbbing») всех анализируемых линий клеток, исключая HEK293T_hTERCwt с повышенной экспрессией hTERC дикого типа (рис. 25Б). Морфология клеток не изменилась только в линии с повышенной экспрессией гена *hTERC* и повышенным количеством hTERP (рис. 25Б). Количественный анализ выживаемости клеток проводили с помощью колориметрического теста оценки метаболической активности клеток -МТТ. Мы наблюдали защиту клеток от апоптоза только при увеличении экспрессии hTERC дикого типа (рис. 25В, Г). В этом случае инкубация клеток с высокими концентрациями доксорубина вызывала гибель всего лишь 20% клеток (рис. 25В). Снижение выживаемости наблюдали для клеток клона 71 (рис. 25Г).

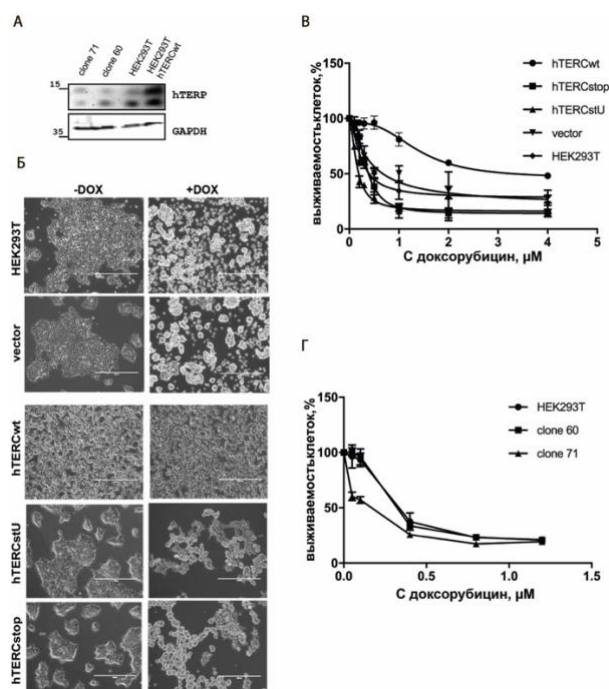


Рисунок 25. Белок hTERP защищает клетки от апоптоза.

А. Анализ содержания белка hTERP в используемых клеточных линиях методом Вестерн-блоттинга. Верхняя панель hTERP, нижняя – GAPDH.

Б. Изменение морфологии клеток разных линий в условиях обработки доксорубицином. Микрофотографии получали через 48 часов культивации клеток в присутствии (+ DOX) или без (-DOX) доксорубицина.

В. Кривые выживаемости клеток линии HEK293T с экзогенной экспрессией теломеразной РНК человека дикого типа и ее мутантных форм в условиях обработки доксорубицином.

Г. Кривые выживаемости клеток клонов 60 и 71 в условиях обработки доксорубицином.

Экспрессия теломеразной РНК дикого типа, но не ее мутантных форм защищает клетки от апоптоза независимо от активности теломеразы. Уменьшение количества hTERP в клетках и мутации N-концевого домена белка приводят к снижению выживаемости клеток в условиях индукции апоптоза. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что не количество теломеразной РНК и уровень теломеразной активности, а количество функционального hTERP определяет выживаемость клеток в условиях индуцированного апоптоза.

Аутофагия – процесс, поддерживающий метаболический и энергетический гомеостаз клетки. В некоторых условиях активация аутофагии противодействует гибели клеток в результате развития апоптоза. N-концевой домен (1-37 а.о.) hTERP содержит домен гомологичный первым 50 аминокислотным остаткам p62/SQSTM1 (степень идентичности 30%) (рис. 26А). Данный мотив p62 способствует олигомеризации белка и его ассоциации с LCK-киназой. p62 участвует в регуляции процессинга компонента аутофагосомы белка LC3. LC3 присутствует в клетках в двух формах. В нормальных условиях LC3I-форма ассоциирована с микротрубочками, а индукция аутофагии приводит к конъюгации фосфоэтаноламина и потере взаимодействия белка LC3 с микротрубочками. Образованная LC3II-форма стимулирует образование аутофагосомы, оставаясь заякоренной на мембране. Последующее слияние аутофагосомы с лизосомой приводит к деградации всех заключенных внутри компартмента компонентов, в том числе LC3II, который остается заякоренным на мембране. Существование разных форм LC3 в клетке, а также его деградация в ходе аутофагии позволяет использовать этот белок в качестве

маркера активации и прогрессии этого процесса. Обработка клеток хлорокином ингибирует слияние аутофагосомы с лизосомой, что приводит к накоплению LC3 в клетке. Общее количество и соотношение форм LC3 позволяет оценивать прогресс развития аутофагии.

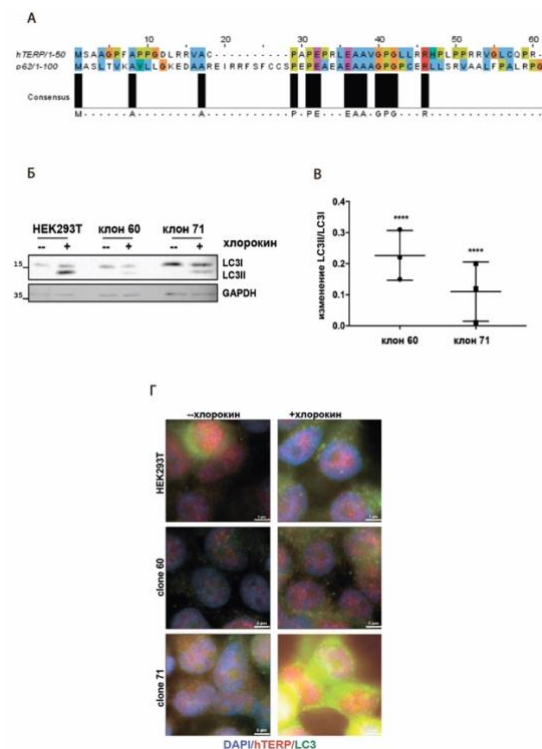


Рисунок 26. Белок hTERP участвует в регуляции аутофагии.

А. Биоинформатическое выравнивание последовательностей N-концевых доменов hTERP и p62. Визуализация выравнивания проведена в программе JalView.

Б. Анализ количества и формы белка LC3 в клетках HEK293T и клонов 60 и 71 методом Вестерн-блоттинга. Верхняя панель – LC3, нижняя – GAPDH.

В. Количественный анализ процессинга LC3 в клетках HEK293T и клонов 60 и 71. Количество LC3II нормировали на количество LC3I и эффективность процессинга в клетках HEK293T дикого типа.

Г. Иммунофлуоресцентный анализ колокализации белков hTERP и LC3 в клетках HEK293T и клонов 60 и 70 в условиях обработки хлорокином.

Мы оценили количество и процессинг белка LC3 в клетках HEK293T и клонах 60 и 71, полученных в результате редактирования генома, методом Вестерн-блоттинга и обнаружили снижение общего количества LC3 в клоне 60 и повышение – в клоне 71 (рис. 26Б,В). Процессинг LC3 значительно снижен в обоих исследуемых клонах. Методом иммунофлуоресцентной микроскопии выявлена частичная колокализация LC3 и hTERP (рис. 26Г). Исследования функционирования компонентов теломеразы в основном сосредоточены в областях, связанных с процессами опухолеобразования и механизмами, регулирующими продолжительность жизни. Незначительные усилия, направленные на изучение функций отдельных компонентов теломеразы, не связанные с функционированием фермента, выявили участие теломеразной РНК в механизмах защиты клеток в стрессовых условиях. Анализ первичной структуры гена теломеразной РНК человека, а также полученные данные о длине первичного транскрипта, его процессинге и локализации позволили предположить кодирующий потенциал классической некодирующей РНК. Мы идентифицировали белок, кодируемый теломеразной РНК

человека, и продемонстрировали его участие в защите клеток от апоптоза и регуляции процесса формирования аутофагосомы.

3.3. Заключение

Настоящая работа была посвящена исследованию молекулярных механизмов биогенеза и функционирования компонентов теломеразы человека. Теломераза является привлекательной мишенью для разработки подходов к направленной регуляции механизмов онкотрансформации и продолжительности жизни. Активная теломераза предоставляет клеткам неограниченный потенциал деления, что реализуется большинством опухолей, а также способствует регенерации тканей. Поиск возможностей вмешиваться в регуляцию этих процессов с целью увеличения продолжительности жизни и ингибирования роста опухолей осуществляется с момента открытия фермента и его функции в организме. Теломераза состоит из нескольких компонентов и биогенез активного комплекса представляет собой мультистадийный процесс. Доскональное знание молекулярных механизмов всех этапов биогенеза и функционирования теломеразы является актуальным и перспективным в аспекте поиска новых мишеней для разработки терапевтических подходов.

Основной функцией теломеразного комплекса является удлинение теломер, в процессе которого необходимо взаимодействие фермента с концом хромосом, нуклеотидный и белковый состав которого обеспечивает формирование сложных структур, защищающих ДНК от деградации и рекомбинации. Регуляция доступности теломер является одним из ключевых этапов, оказывающих влияние на способность теломеразы их удлинять.

В состав активного фермента входят два основных компонента: теломеразная РНК и обратная транскриптаза. Формирование активного комплекса и поддержание его структурной конформации является важным регуляторным этапом активности теломеразы. В большинстве соматических клеток экспрессия гена обратной транскриптазы инактивируется в процессе эмбрионального развития. Экспрессия гена теломеразной РНК человека осуществляется в большинстве соматических клеток на протяжении всей жизни организма и поддерживается на определенном уровне. Излишки синтезируемого транскрипта деградируют клеточные экзосомы. Исследования процессов опухолеобразования и выживания клеток в различных стрессовых условиях продемонстрировали, что теломеразная РНК обеспечивает защиту клеток, а также увеличивает их пролиферативный потенциал вне зависимости от активности теломеразы и длины теломер, что позволяет выдвинуть гипотезу о выполнении теломеразной РНК альтернативных функций.

В настоящем исследовании нам удалось продемонстрировать роль белка RPA в регуляции взаимодействия теломеразы с теломерами. Взаимодействие RPA с теломерами способствует расплетанию G-квартетных структур и вытеснению теломерных белков, что облегчает взаимодействие теломеразы с субстратом. Склонность к кооперативному связыванию RPA с ДНК приводит к блокировке теломерных участков, что предотвращает связывание теломеразы и ингибирует удлинение теломер.

Сборка активного теломеразного комплекса является одним из ключевых этапов регуляции активности фермента. Воздействие на отдельные этапы этого процесса является потенциально перспективным подходом. В рамках настоящей работы выявлены

структурные элементы теломеразной РНК человека, блокирование которых при помощи антисмысловых олигонуклеотидов приводит к ингибированию теломеразной активности. Фиксация определенной конформации hTERC при помощи химерных олигонуклеотидов полностью блокирует сборку фермента и ингибирует активность теломеразы.

Количество теломеразной РНК человека поддерживается в клетке на протяжении жизни организма на определенном уровне и мутации в генах, продукты экспрессии которых участвуют в процессинге hTERC, приводят к развитию различных заболеваний, характеризующихся фенотипом преждевременного старения и ассоциированных с короткими теломерами. Исследование механизма транскрипции гена теломеразной РНК человека выявил участие мультикомпонентного комплекса Интегратор в регуляции синтеза и процессинга hTERC. Интегратор в промотор-зависимой манере определяет положение терминации транскрипции, а также способствует привлечению клеточных компонентов, участвующих в процессинге или деградации теломеразной РНК человека, регулируя таким образом количество hTERC в клетке.

Исследование кодирующего потенциала теломеразной РНК человека подтвердил ее функционирование в качестве матрицы для синтеза белка. Белок hTERP, кодируемый теломеразной РНК человека, идентифицирован в клетках HEK293T при помощи масс-спектрометрических методов исследования. Мы продемонстрировали, что белок hTERP защищает клетки в условиях индукции апоптоза, а также вовлечен в регуляцию формирования аутофагосомы. Основные молекулярные компоненты сигнальных путей аутофагии и апоптоза находятся в сложных перекрестных взаимосвязях и нередко индуцируются сходными стимулами. Опухолевые клетки демонстрируют устойчивость к апоптозу, а также повышенный уровень аутофагии, что позволяет им преодолевать терапевтические воздействия. Повышение количества теломеразной РНК, но не активацию теломеразы на начальных этапах процесса опухолеобразования связывают с усилением пролиферативной активности клеток и устойчивости клеток к стрессовым воздействиям. Можно предположить, что активация экспрессии гена теломеразной РНК человека приводит к повышению содержания hTERP в клетке, который защищает клетки в стрессовых условиях жизнедеятельности. Дальнейшие исследования функциональной роли белка hTERP позволят выяснить его участие в процессах опухолеобразования, а также жизнедеятельности клеток.

В настоящей работе исследованы различные аспекты функционирования компонентов теломеразного комплекса человека, каждый из которых является потенциальной мишенью для разработки новых подходов к воздействию на пролиферативный потенциал клетки в целях регуляции процессов опухолеобразования, а также продолжительности жизни и регенерации тканей.

ВЫВОДЫ

1. Репликативный белок А модулирует активность теломеразы *in vitro*. В условиях недостатка или избытка RPA происходит ингибирование активности теломеразы. С одной стороны, RPA облегчает взаимодействие теломеразы с теломерами. Кооперативное связывание RPA с ДНК блокирует теломерные участки, что предотвращает связывание теломеразы и ингибирует удлинение теломер при повышении количества белка.
2. Выявлены структурные элементы теломеразной РНК человека, блокирование которых при помощи антисмысловых олигонуклеотидов приводит к ингибированию теломеразной активности. Взаимодействие химерных олигонуклеотидов с двумя доменами теломеразной РНК одновременно блокирует сборку фермента и ингибирует активность теломеразы.
3. Мультисубъединичный комплекс Интегратор регулирует транскрипцию и процессинг теломеразной РНК человека. Интегратор в промотор-зависимой манере определяет положение терминации транскрипции, а также способствует привлечению клеточных компонентов, участвующих в процессинге или деградации теломеразной РНК человека, регулируя таким образом количество hTERC в клетке.
4. Субъединицы Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11 вовлечены в регуляцию транскрипции и процессинга теломеразной РНК человека. Ингибирование экспрессии генов *INTS1*, *INTS9* и *INTS11* снижает эффективность терминации транскрипции и процессинга теломеразной РНК человека. Длина первичного транскрипта hTERC в условиях ингибирования экспрессии гена *INTS1* составляет 571 н.о.
5. Теломеразная РНК человека кодирует белок hTERP. Идентифицированный белок hTERP защищает клетки в условиях индукции апоптоза, а также участвует в регуляции формирования аутофагосом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. **Rubtsova M.P.**, Vasilkova D.P., Moshareva M.A., Malyavko A.N., Meerson M.B., Zatsepin T.S., Naraykina Y.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Dontsova O.A. Integrator is a key component of human telomerase RNA biogenesis // *Sci Rep*. 2019 V.9. №1. P. 1701. doi:10.1038/s41598-018-38297-6. IF 4,122
2. **Rubtsova M.**, Naraykina Y., Vasilkova D., Meerson M., Zvereva M., Prassolov V., Lazarev V., Manuvera V., Kovalchuk S., Anikanov N., Butenko I., Pobeguts O., Govorun V., Dontsova O. Protein encoded in human telomerase RNA is involved in cell protective pathways // *Nucleic Acids Res*. 2018. V. 46. № 17. P. 8966-8977. doi: 10.1093/nar/gky705. IF 11,561
3. Stepanov A.V., Markov O.V., Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Zhang H., Jones T., Sen'kova A.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Kalinin R.S., **Rubtsova M.P.**, Meleshko A.N., Genkin D.D., Belogurov A.A. Jr, Xie J., Gabibov A.G., Lerner R.A. Autocrine-based selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma // *Sci Adv*. 2018 V. 4. № 11. eaau4580. doi: 10.1126/sciadv.aau4580. IF 11,511
4. **Рубцова М.П.**, Василькова Д.П., Нарайкина Ю.В., Донцова О.А. Особенности процессинга теломеразных РНК дрожжей и человека // *Acta Naturae. (англоязычная версия)* 2016. Т. 8. № 4. С. 81-90. IF 2,000
5. 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. IF 11,56
6. 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 // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014.V. 57, № 14, P. 6252-6258. IF 6,253
7. Vasilkova D.V., Azhibek D.M., Zatsepin T.S., Naraykina Y.V., Prassolov V.S., Prokofjeva M.M., Zvereva M.I., **Rubtsova M.P.** Dynamics of human telomerase RNA structure revealed by antisense oligonucleotide technique // *Biochimie*. 2013 V. 95. № 12. P. 2423-2428. doi:10.1016/j.biochi.2013.09.001. IF 3,188
8. **Рубцова М.П.**, Василькова Д.П., Малавко А.Н., Нарайкина Ю.В., Зверева М.Э., Донцова О.А. Функции теломеразы: удлинение теломер и не только. // *Acta Naturae. (англоязычная версия)*. 2012. Т. 4. № 2. С.6-23. IF 2,000
9. Petrenko A.A., Korolenkova L.I., Skvortsov D.A., Fedorova M.D., Skoblov M.U., Baranova A.V., Zvereva M.E., **Rubtsova M.P.**, Kissel'ov F.L. Cervical intraepithelial neoplasia: Telomerase activity and splice pattern of hTERT mRNA // *Biochimie*. 2010. V. 92. № 12. P. 1827-1831. doi: 10.1016/j.biochi.2010.07.015. IF 3,188
10. Смекалова Е.М., Зверева М.Э., Громенко Е.В., Шуберneckая О.С., **Рубцова М.П.**, Донцова О.А. Биосинтез и созревание теломеразной РНК // *Биохимия*. 2012. Т.77, №10, С.1350-1361. IF 2,102
11. Скворцов Д.А., **Рубцова М.П.**, Зверева М.Э., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. Регуляция теломеразы в онкогенезе // *Acta Naturae. (англоязычная версия)*. 2009. №1, с.51-67. IF 2,000
12. **Рубцова М.П.**, Скворцов Д.А., Петрусева И.О., Лаврик О.И., Спирин П.В., Прасолов В.С., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. Репликативный белок А модулирует активность теломеразы человека *in vitro*. // *Биохимия*. 2009. №1, с.92-96. IF 2,102
13. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., **Rubtsova M.P.**, Kostryukova E.S., Ziganshin R.H., Kornienko M.A., Vanyushkina A.A., Bukato O.N., Ilina E.N., Vlasov V.V., Severinov K.V., Gabibov A.G., Altman S. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota Communities // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 38. P. 9551-9556. doi:10.1073/pnas.1811250115. IF 9,504
14. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A. Jr, **Rubtsova M.P.**, Kartseva O.V., Gomzikova M.O., Moskovtsev A.A., Bukatin A.S., Dubina M.V., Kostryukova E.S., Babenko V.V., Vakhitova M.T., Manolov A.I., Malakhova M.V., Kornienko M.A., Tyakht A.V., Vanyushkina A.A., Ilina E.N., Masson P., Gabibov A.G., Altman S. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 10. P. 2550-2555. doi: 10.1073/pnas.1621226114. IF 9,504
15. Evfratov S.A., Osterman I.A., Komarova E.S., Pogorelskaya A.M., **Rubtsova M.P.**, Zatsepin T.S., Semashko T.A., Kostryukova E.S., Mironov A.A., Burnaev E., Krymova E., Gelfand M.S., Govorun V.M., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Application of sorting and next generation sequencing to study 5'-UTR influence on

translation efficiency in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 4. № 6. P. 3487-3502. doi: 10.1093/nar/gkw1141. IF 11,56

В рецензируемых изданиях, индексируемых в базе данных РИНЦ.

1. Скворцов Д.А., Зверева М.Э., **Рубцова М.П.**, Павлова Л.С., Петренко А.А., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. Оптимизированный метод детекции теломеразной активности в диагностике рака. // *Вестник МГУ. Серия Химия*. 2010, Т. 51, №. 3, С. 197-202.

Избранные тезисы докладов на научных конференциях:

1. **Рубцова М.П.**, Нарайкина Ю.В., Юртаева С.В., Василькова Д.П., Мошарева М.А., Донцова О.А. Новое в функционировании теломеразной РНК человека. V МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ "ПОСТГЕНОМ'2018", Казань, Россия, 29 октября - 2 ноября 2018.
2. **Rubtsova M.**, Vasilkova D., Dontsova O. Integrator is involved in the human telomerase RNA biogenesis. FEBS 2018, Прага, Чехия, 7-12 июля 2018
3. **Maria Rubtsova**, Yulia Naraykina, Olga Pobeguts, Ivan Butenko, Vadim Govorun, Olga Dontsova. Human telomerase RNA codes for cell protective protein. Telomere biology in health and human disease, Troia, Португалия, 1-6 мая 2018
4. Малявко А., Петрова О., Зверева М., Родина Е., Манцызов А., Польшаков В., Нарайкина Ю., Василькова Д., **Рубцова М.**, Белецкий А., Равин Н., Бутенко И., Побегуц О., Говорун В., Донцова О. Новые аспекты функционирования компонентов теломеразы. Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017
5. Yulia Naraykina, **Maria Rubtsova**, Daria Vasilkova, Mark Meerson, Maria Zvereva, Vasily Lazarev, Valentin Manuvera, Sergey Kovalchuk, Nickolay Anikanov, Ivan Butenko, Olga Pobeguts, Vadim Govorun, Olga Dontsova. Coding non-coding human telomerase RNA. 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back", Иерусалим, Израиль, 10-14 сентября 2017
6. Vasilkova D., **Rubtsova M.**, Naraykina Y., Meerson M., Lazarev V., Manuvera V., Pobeguts O., Kovalchuk S., Butenko I., Govorun V., Dontsova O. Human telomerase RNA protects cells from apoptosis through autophagy triggering. Telomeres and telomerase, Cold Spring Harbor, NY, США, 2-6 мая 2017
7. **Рубцова М.П.**, Нарайкина Ю.В., Василькова Д.В., Меерсон М.Б., Бутенко И.О., Побегуц О.В., Говорун В.М., Донцова О.А. Функциональная роль белка, кодируемого теломеразной РНК человека. V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016
8. Малявко А., Зверева М., Петрова О., Родина Е., Манцызов А., Польшаков В., Нарайкина Ю., **Рубцова М.**, Донцова О. Теломеры и теломераза – новые особенности. Химическая биология. Международная конференция посвященная 90-летию академика Д.Г.Кнорре., Новосибирск, Россия, 24-28 июля 2016
9. **Rubtsova M.**, Naraykina J., Vasilkova D., Kovalchuk S., Govorun V., Dontsova O. New function of noncoding human telomerase RNA. Long Noncoding RNAs: From Evolution to Function. Keystone Resort, США, 15-21 марта 2015
10. **Рубцова М.**, Нарайкина Ю., Василькова Д., Ковальчук С., Говорун В., Донцова О. Новые аспекты экспрессии гена теломеразной РНК человека. IV международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (POSTGENOME 2014), Казань, 2014
11. Naraykina Y., Vasilkova D., Dontsova O., **Rubtsova M.** Coding noncoding human telomerase RNA. Long Noncoding RNAs: Marching toward Mechanism, Santa Fe, New Mexico, USA, Мексика, 2014

