

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Шляпина Виктория Львовна

Роль белка hTERP в регуляции аутофагии

Специальность:

1.5.3. – Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук

Рубцова Мария Петровна

Москва – 2024

Оглавление

Список сокращений	5
Введение	11
1. Обзор литературы.....	15
1.1. Теломеры	15
1.2. Теломеразный комплекс	21
1.2.1. Основные сведения.....	21
1.2.2. Обратная транскриптаза теломеразы	22
1.2.3. Каталитический цикл теломеразы	24
1.2.4. Теломеразная РНК, ее структура и биогенез	27
1.3. Альтернативные функции теломеразы.....	35
1.3.1. Альтернативные функции обратной транскриптазы hTERT.....	36
1.3.1.1. TERT и Wnt-сигналинг.....	37
1.3.1.2. TERT и NF-κB сигналинг	38
1.3.1.3. TERT и MYC.....	39
1.3.1.4. Другие альтернативные функции TERT	39
1.3.2. Альтернативные функции теломеразной РНК	40
1.3.2.1. Кодированная функция теломеразной РНК.....	41
1.4. Аутофагия.....	42
1.4.1. Общие сведения.....	42
1.4.2. Процесс аутофагии	44
1.4.3. Регуляция аутофагии	46
1.4.3.1. Роль mTOR в регуляции аутофагии	47
1.4.3.2. Роль AMPK в регуляции аутофагии.....	51
1.4.4. Теломераза и аутофагия	54

2. Результаты и обсуждение	56
2.1. Создание клеточной линии с белком hTERP тегированным HiViT	56
2.2. Влияние делеции нуклеотидов 184-188 в hTR на функционирование теломеразы	61
2.2.1. Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на активность теломеразы	62
2.2.2. Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на экспрессию hTERT	63
2.2.3. Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на локализацию hTERT	63
2.3. Участие белка hTERP в процессе аутофагии	66
2.4. Выявление сигнального каскада, в регуляции которого участвует белок hTERP	71
2.5. Предполагаемый механизм действия hTERP в передаче сигналов AMPK-mTORC1	79
3. Материалы и методы	81
3.1. Клеточные культуры	81
3.2. Среды для культивирования E.coli	81
3.3. Приготовление компетентных клеток E.coli	81
3.4. Трансформация плазмидной ДНК в компетентные клетки E.coli	82
3.5. Получение плазмиды GFP-HiViT	83
3.5.1. Линеаризация вектора	83
3.5.2. Получение HiViT-вставки	84
3.5.3. Лигирование	85
3.6. Получение лентивирусных частиц для создания линии HEK293T-GFP-HiViT	86

3.7. Трансдукция	88
3.8. Метод CRIPR/Cas9 для создания клеточной линии, с белком hTERP тегированным HiViT	88
3.9. Выделение геномной ДНК	89
3.10. ПЦР	90
3.11. Протокол детекции HiViT-тегированных белков в клеточных лизатах	91
3.12. Протокол детекции HiViT-тегированных белков методом блоттинга	92
3.13. Метод TRAP (протокол амплификации теломерных повторов)	94
3.14. Создание клеточных линий, с оверэкспрессией белка hTERP	94
3.15. Трансфекция	95
3.16. Иммуноблотинг	96
3.16.1. Перечень использованных первичных антител	97
3.16.2. Перечень использованных вторичных антител	97
3.17. Обработка клеток	97
3.18. Цитохимия	98
3.19. Статистический анализ	98
4. Заключение	99
Выводы	100
Благодарности	101
Список литературы	102

Список сокращений

2DG	(2-Deoxy-D-glucose), 2-дезоксид-D-глюкоза
4E BP	(4E binding protein), фактор инициации трансляции 4E связывающий белок
ADP	(Adenosine diphosphate), аденозиндифосфат
AICAR	(5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide), 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид
AMBRA1	(Activating molecule in BECN1 regulated autophagy protein 1), активирующая молекула в белке 1 аутофагии, регулируемом BECN1
AMP	(Adenosine monophosphate), аденозинмонофосфат
АМРК	(AMP activated protein kinase), АМФ активируемая протеинкиназа
ATG	(autophagy related proteins), белки связанные с аутофагией
АТМ путь	(ataxia telangiectasia mutated), мутантный при атаксии телеангиэктазии белок
АТR путь	(Ataxia telangiectasia and Rad3 related), атаксия телеангиэктазия и Rad3 родственный белок
САМКК2	(Calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase), Кальций/кальмодулинзависимая протеинкиназа киназа 2
Cas9	(CRISPR associated protein 9), CRISPR ассоциированный белок
СВ	(Cajal body), тельца Кахаля
СВС	(Cap binding complex), кеп связывающий комплекс
Cdc27	(Cell division cycle protein 27), белок цикла клеточного деления 27

CRISPR	(Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами
CTE	(C terminal domain), C концевой домен
DAPI	(4',6 diamidino 2 phenylindole), 4',6 диамидино 2 фенилиндол
DHX36	(DEAH Box Helicase 36), DEATH бокс хеликаза 36
dNTP	(deoxynucleoside triphosphate), дезоксинуклеозидтрифосфаты
Doxy	(doxycycline), доксициклин
DSIF	(5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole Sensitivity Inducing Factor), 5,6-дихлор-1- β -D- рибофуранозилбензимидазол чувствительный фактор индукции
FIP200	(focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa), белок массой 200 кДа, взаимодействующий с семейством киназ фокальной адгезии
FISH	(fluorescence in situ hybridization), флуоресцентная гибридизация in situ
FOXO1	(forkhead box protein O1), фактор транскрипции FOXO1
GAPDH	(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
GFP	(green fluorescent protein), зелёный флуоресцентный белок
HCT116	клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека
HEK293T	(Human Embryonic Kidney 293), клеточная линия из клеток почки эмбриона человека

HeLa	(Henrietta Lacks), клеточная линия полученная из клеток эндотелия матки
HK II	(Hexokinase II), гексокиназа II
hTERP	(human telomerase RNA encoded protein), белок, кодируемый теломеразной РНК человека
hTR	(human telomerase RNA), теломеразная РНК человека
LC3	(Microtubule associated protein light chain 3), белок ассоциированный с микротрубочками легкая цепь 3
LKB1	(liver kinase B1), киназа печени B1
lncRNA	(long non coding RNA), длинная некодирующая РНК
m7G кеп	(7-methylguanosine), 7-метилгуанозин
MCF7	(Michigan Cancer Foundation 7), клеточная линия, полученная из аденокарциномы протоков молочной железы человека
MEF	(mouse embryonic fibroblasts), эмбриональные фибробласты мыши
MMG	(7-monomethylguanosine), 7-монометилгуанозин
mTOR	(mammalian target of rapamycin), мишень рапамицина млекопитающих
mTORC1	(mTOR complex 1), mTOR комплекс 1
mTORC2	(mTOR complex 2), mTOR комплекс 2
NAF1	(Nuclear Assembly Factor 1), ядерный фактор сборки 1
NAP	(nucleotide addition processivity), процессивность добавления нуклеотидов
ND1	(NADH ubiquinone oxidoreductase chain 1), НАДН убихинон оксидоредуктазы цепь 1
ND2	(NADH ubiquinone oxidoreductase chain 2), НАДН убихинон оксидоредуктазы цепь 2

NELF	(negative elongation factor), отрицательный фактор элонгации
NES	(Nuclear Export Signal), сигнальная последовательность экспорта из ядра
NEXT	(nuclear exosome targeting), комплекс, привлекающий ядерные экзосомы
NF κB	(nuclear factor κB), ядерный фактор κB
NOP10	(Nucleolar protein 10), белок ядрышка 10
ORF	(open reading frame), открытая рамка считывания
p70S6K	(70 kDa ribosomal protein S6 kinase), киназа рибосомного белка S6
PABPN1	(Poly(A) Binding Protein Nuclear 1), ядерный поли(А) связывающий белок 1
PAPD5	(Poly(A) RNA Polymerase Associated Domain Containing Protein 5), поли(А) РНК-полимераза, ассоциированная с домен содержащим белком 5
PARN	(Poly(A) specific ribonuclease), поли(А)-специфичная рибонуклеаза
PAHT	(Poly(A) exosome targeting complex), комплекс, способствующий привлечению экзосом к поли(А) хвосту
PE	(Phosphatidylethanolamine), фосфатидилэтаноламин
PNAH	(Phosphorylated adaptor for RNA export), фосфорилированный адаптор для экспорта РНК
PI3K	(phosphoinositide 3 kinase), фосфатидилинозитол-3-киназа I класса III
PI3P	(phosphatidylinositol 3 phosphate), фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI3P)
Pol II	(Polymerase II), РНК-полимераза II

POT1	(Protection of telomeres protein 1), белок защиты теломер 1
RAP	(repeat addition processivity), процессивность добавления повторов
Rheb	(Ras homolog enriched in brain), гомолог RAS, обогащенный в мозге
RNP	(ribonucleoprotein), рибонуклеопротеин
RT	(Reverse transcriptase domain), домен обратной транскриптазы
Ser	(Serine), серин
Sp1	(specificity protein 1), фактор транскрипции Sp1
SRS	(single stranded DNA retention surface), поверхность удержания одноцепочечной ДНК
TBE	(template boundary element), элемент, ограничивающий матрицу
TCAB1	(Telomerase Cajal Body Protein 1), теломеразный белок телец Кахаля 1
TEN	(N-terminal domain), N-концевой домен
TERRA	(Telomeric repeat containing RNA), РНК, содержащая теломерные повторы
TERT	(Telomerase Reverse Transcriptase), теломеразная обратная транскриптаза
TFEB	(Transcription factor EB), фактор транскрипции EB
TGS1	(Trimethylguanosine synthase 1), триметилгуанозинсинтаза 1
Thr	(Threonine), треонин
TNF α	(tumor necrosis factor α), фактор некроза опухоли α
TR	(telomerase RNA), теломеразная РНК

TRAMP	(Trf4/Air2/Mtr4p Polyadenylation complex), комплекс полиаденилирования, состоящий из белков Trf4/Air2/Mtr4p
TRBD	(TERT RNA binding domain), домен, связывающий теломеразную РНК
TRF1	(Telomeric Repeat Factor 1), фактор теломерных повторов 1
TRF2	(Telomeric Repeat Factor 2), фактор теломерных повторов 2
TSC	(Tuberous Sclerosis Complex), комплекс туберозного склероза
U2OS	(Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells), клеточная линия остеосаркомы человека
ULK1	(Unc 51 like autophagy activating kinase), Unc 51 подобная киназа, активирующая аутофагию 1
VEGF	(Vascular endothelial growth factor), фактор роста эндотелия сосудов
VPS	(vacuolar protein sorting), белки вакуолярной сортировки
АТФ	Аденозин-трифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	матричная РНК
мяРНК	малые ядерные РНК
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота

Введение

Актуальность проблемы

Аутофагия является одним из фундаментальных клеточных процессов важных для дифференцировки, развития, выживания и поддержания гомеостаза клеток [Aman и др., 2021]. В процессе аутофагии формируются аутофагосомы, образующие после слияния с лизосомами аутолизосомы, в которых происходит деградация поврежденных органелл, белков, липидов и нуклеиновых кислот [Jiang и др., 2019]. Нарушения этого процесса и его регуляции могут приводить к возникновению различных заболеваний, таких как рост и развитие опухолей (при повышенной активации аутофагии), нейродегенерация, а также могут происходить нарушения метаболизма и функционирования иммунной системы [Khandia и др., 2019]. Изучение аутофагии имеет большое значение, так как этот процесс регулирует клеточный метаболизм, а также оказывает влияние на функционирование всего организма, а снижение эффективности аутофагии ассоциировано с процессом старения [Song и др., 2018].

В настоящее время известны примеры неправильно аннотированных длинных некодирующих РНК (lncRNA), которые содержат в своей структуре открытые рамки считывания и способны кодировать короткие белки [Xing и др., 2021]. Долгое время теломеразную РНК считали некодирующей. Однако ряд ее свойств – длинный первичный транскрипт, который имеет открытую рамку считывания и m⁷G-кеп на 5'-конце, а также то, что небольшая часть теломеразной РНК в процессе биогенеза транспортируется в цитоплазму – позволили предположить, что данная РНК может кодировать белок, что было подтверждено в нашей лаборатории [Pakhomova и др., 2022; Rubtsova и др., 2018]. Оказалось, что теломеразная РНК человека кодирует белок – hTERP [Rubtsova и др., 2018], который выполняет защитные функции в клетках в условиях доксорубицин-индуцированного апоптоза, а мутации, нарушающие N-конец hTERP, влияют на

процессинг белка LC3, одного из основных участников формирования аутофагосомы [Rubtsova и др., 2018].

Однако, точная роль белка hTERP установлена не была. В связи с актуальностью изучения аутофагии и связью найденного белка с этим процессом поиск доказательств участия и выяснение роли белка hTERP в нем является актуальной задачей.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось определение роли белка hTERP в регуляции аутофагии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Подтвердить трансляцию теломеразной РНК человека.
2. Установить отсутствие влияния делеции нуклеотидов 184-188 в hTR на функционирование теломеразы.
3. Установить функциональную роль белка hTERP в регуляции аутофагии.

Научная новизна и практическая значимость

В исследовании впервые начато изучение роли hTERP в регуляции каскада киназ аутофагии. Впервые показано, что делеция нуклеотидов 184-188 в теломеразной РНК не оказывает влияния на функционирование теломеразы.

В настоящей работе показана роль белка hTERP в регуляции аутофагии и приведен предполагаемый механизм регуляции. В будущем полученные данные могут быть использованы при поиске новых противоопухолевых препаратов, исследовании проблем старения и долголетия.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях:

- **Шляпина В.Л.**, Корягина М.А. , Рубцова М.П. , Донцова О.А. «Роль белка hTERP в процессах аутофагии» (стендовый, XXXII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», ИБХ РАН, 2020)
- **Шляпина В.Л.**, Корягина М.А., Донцова О.А., Рубцова М.П. «Роль hTERP в модуляции сигнальных путей, регулирующих аутофагию» (стендовый, VII Съезд биохимиков и молекулярных биологов России, Сочи, 2022)

Список работ, опубликованных по теме исследования

1. **Shliapina V**, Koriagina M, Vasilkova D, Govorun V, Dontsova O, Rubtsova M. Human Telomerase RNA Protein Encoded by Telomerase RNA is Involved in Metabolic Responses. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9, 754611.
2. **Shliapina VL**, Yurtaeva SV, Rubtsova MP, Dontsova OA. At the Crossroads: Mechanisms of Apoptosis and Autophagy in Cell Life and Death. *Acta Naturae*, 2021, 13(2), P.106-115.
3. **Shliapina VL**, Dontsova OA, Rubtsova MP. Deletion of 184-188 Nucleotides of Human Telomerase RNA Does Not Affect the Telomerase Functioning. *Dokl Biochem Biophys*, 2023, 510(1), P.104-109.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в проведенное исследование заключался в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении экспериментов с применением современных методов молекулярной биологии, биохимии и генной инженерии, а также в обработке, анализе и оформлении

полученных результатов. Автор представлял результаты на научных конференциях и принимал участие в подготовке и написании публикаций.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Проведенные эксперименты соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании и с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, материалов и методов, заключения, выводов и списка литературы. Объем диссертации 119 страниц, материал иллюстрирован 33 рисунками. Список литературы включает 200 источников.

Положения, выносимые на защиту

- Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на функционирование теломеразы
- Белок hTERP принимает участие в регуляции аутофагии
- Белок hTERP участвует в регуляции активности АМПК

1. Обзор литературы

1.1. Теломеры

Генетический материал в клетках как про-, так и эукариот хранится в виде длинных молекул ДНК. Однако в отличие от прокариот, где ДНК имеет кольцевую структуру, в клетках эукариот ДНК представлена линейными хромосомами. Линейная структура ДНК приводит к проблеме репликации концов – 5'-конец новосинтезированной цепи не может быть полностью синтезирован полимеразой. Оловников [Olovnikov, 1973] и Уотсон [Watson, 1972] первыми указали на последствия «проблемы репликации концов хромосом», укорочение при каждом раунде удвоения клетки, что должно приводить к потере генетического материала и гибели клеток.

Другой американский ученый, Леонард Хейфлик, отмечал, что культивируемые клетки могут пережить только ограниченное количество делений [Hayflick, Moorhead, 1961]. На концах эукариотических хромосом расположены особые нуклеопротеиновые комплексы – теломеры. Теломерная ДНК состоит из большого числа коротких (5-8 п.н.) теломерных повторов, последовательность которых специфична для разных видов эукариот [Blackburn, Epel, Lin, 2015]. Предел Хейфлика логично объяснялся укорочением теломер при каждом делении клетки, однако возникает новый вопрос – как организмы способны выживать из поколения в поколение? И Оловников, и Уотсон предполагали наличие механизмов, позволяющих поддерживать длину теломер.

Понимание того, какой механизм позволяет поддерживать длину теломер и как он может работать стало появляться после работ Элизабет Блэкберн на *Tetrahymena thermophila*. Было отмечено, что концы хромосом этих инфузорий содержат большое количество повторов одной и той же последовательности из шести оснований – TTGGGG [Blackburn, Gall, 1978]. В 1985 году Элизабет Блэкберн и Кэрл Грейдер обнаружили ферментативную активность, осуществляющую удлинение теломерных последовательностей [Greider,

Blackburn, 1985]. Вскоре после этого был идентифицирован рибонуклеопротеиновый комплекс – теломераза [Greider, Blackburn, 1987], а также установлено, что теломеразная РНК является матрицей для синтеза повторов [Greider, Blackburn, 1989].

Теломерные области хромосом являются двуцепочечными, но на 3'-конце располагается короткий (от 50 до 500 нуклеотидов у человека) G-богатый одноцепочечный выступ [Palm, Lange De, 2008]. В связи с линейностью хромосом возникает две основные проблемы: проблема репликации концов хромосом и проблема защиты концов хромосом. Проблема репликации концов хромосом возникает из-за принципа работы ДНК-полимеразы и приводит к потере ДНК на самых концах хромосом после каждого цикла деления [Maestroni, Matmati, Coulon, 2017].

В процессе репликации ДНК-полимераза синтезирует комплементарную матричной цепь. Фермент ДНК-полимераза способен двигаться только в направлении от 3'- к 5'-концу матричной цепи ДНК, так как если бы были ферменты, которые способны двигаться в противоположном направлении, то было бы невозможно осуществлять коррекцию неверно спаренных нуклеотидов (при присоединении дезоксирибонуклеотид трифосфата на 5'-конец не происходит расщепление связи и, как следствие, нет энергии для дальнейшей полимеризации).

Молекула ДНК представляет собой спираль, состоящую из двух соединенных комплементарно цепей – таким образом, одна цепь молекулы ДНК будет иметь ориентацию 5'-3', в то время как комплементарная ей цепь будет иметь ориентацию 3'-5'. Во время репликации под действием хеликазы происходит расплетение двойной спирали ДНК с образованием «репликативной вилки». Синтез новых цепей ДНК в этой «вилке» происходит одновременно, но с разной скоростью – по матрице, которая имеет ориентацию 3'-5' будет происходить непрерывный синтез – вновь синтезируемая цепь является лидирующей; по матрице, которая имеет ориентацию 5'-3' будет происходить синтез отдельных фрагментов – вновь синтезируемая цепь является отстающей (Рис.1).

Для начала синтеза любой из цепей ДНК-полимеразе необходима небольшая (порядка 10 нуклеотидов) РНК-затравка. Для синтеза лидирующей цепи ДНК требуется одна РНК-затравка, которая располагается на 5'-конце. Однако, для синтеза отстающей цепи ДНК, который не может идти непрерывно, требуется несколько РНК-затравок. Они синтезируются ДНК-праймазой, а промежутки между соседними затравками составляют 100-200 нуклеотидов. Наличие 3'-свободной гидроксильной группы у каждой из затравок на отстающей цепи дает возможность ДНК-полимеразе синтезировать фрагменты Оказаки. Длина этих фрагментов ограничена расстоянием между соседними РНК-затравками.

После окончания синтеза ДНК происходит удаление РНК-затравок и целостность отстающей цепи восстанавливается за счет действия ДНК-полимеразы I и ДНК-лигазы.

Однако на 5'-конце новосинтезированной цепи есть небольшой фрагмент, который не может быть реплицирован так как для начала работы ДНК-полимеразе нужна РНК-затравка, а места для ее размещения – нет.

Дополнительному укорочению концов хромосом способствует и действие эндонуклеаз.

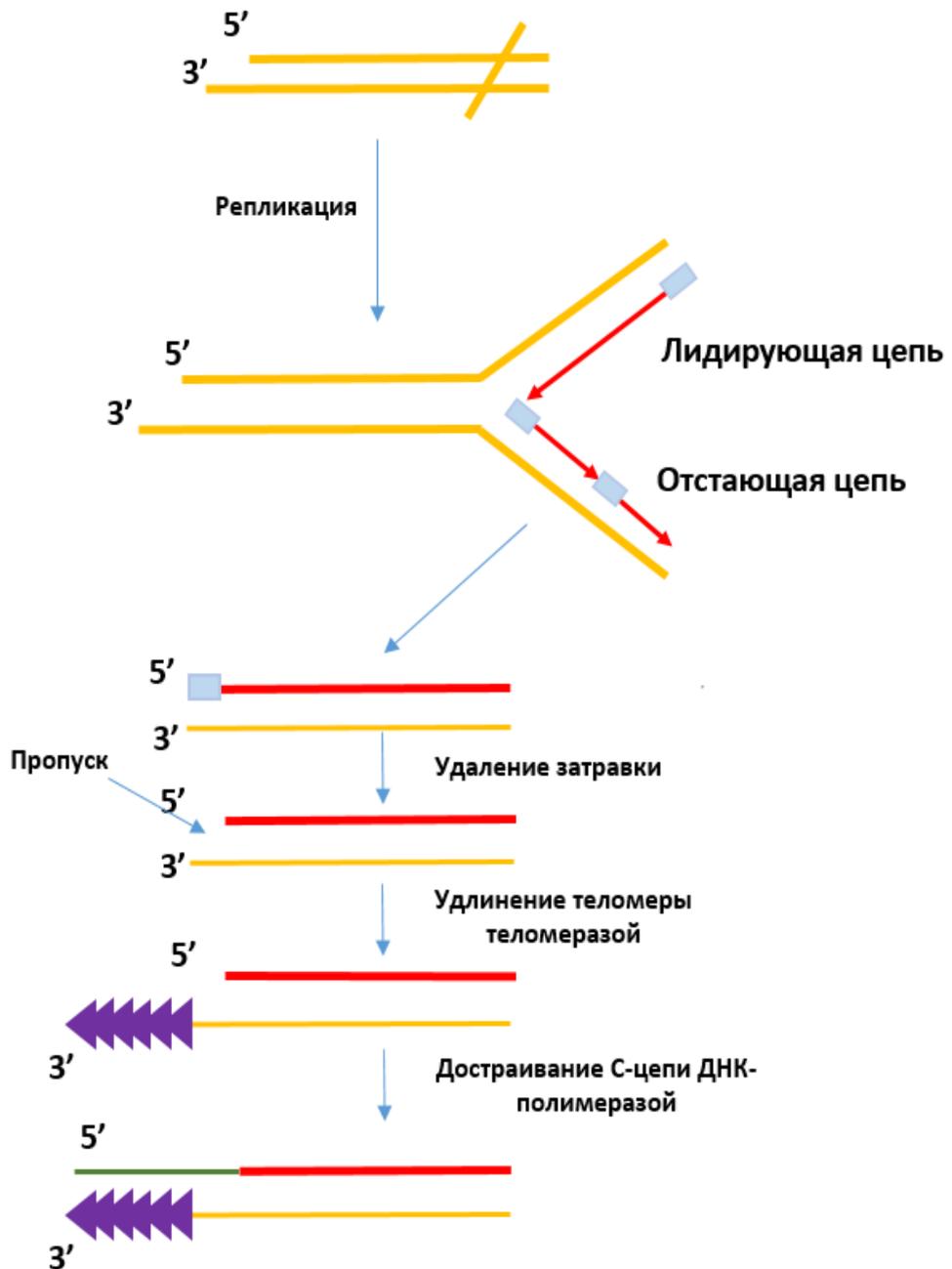


Рисунок 1. Схема, отражающая проблему недорепликации линейных концов хромосом, и ее решение при помощи теломеразы.

Решением проблемы недорепликации хромосом является теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из обратной транскриптазы, содержащей каталитический домен, и теломеразной РНК, содержащей матрицу для синтеза теломерных повторов. В активном состоянии теломеразный комплекс синтезирует новые теломерные повторы на 3'-концах молекул ДНК [Greider, Blackburn, 1985; Morin, 1989; Smith, Pendlebury, Nandakumar, 2020].

Проблема защиты концов хромосом возникает в том случае, если они ошибочно распознаются клеткой как двуцепочечные разрывы, требующие репарации [Palm, Lange De, 2008]. Эта проблема решается наличием в клетках белкового комплекса шелтерина, состоящего из 6 белков: POT1, TPP1, TIN2, TRF1, TRF2 и Rap1 [Palm, Lange De, 2008] (Рис. 2). Белки TRF2 и TRF1 распознают двуцепочечную теломерную ДНК [Galati и др., 2015; Sfeir, Lange De, 2012]. Белок TIN2 взаимодействует с белками TRF2 и TRF1, стабилизируя этот комплекс, а также с белками, связанными с одноцепочечной теломерной ДНК [Palm, Lange De, 2008; Ye и др., 2004]. Есть данные об участии TIN2 в регуляции активности теломеразы [Frank и др., 2015; Pike и др., 2019]. Белок POT1 с высокой специфичностью связывает одноцепочечный 3'-выступающий конец теломерной ДНК [Lei, Podell, Cech, 2004]. Взаимодействуя с теломерной ДНК, эти белки защищают ее от узнавания киназами ATM и ATR, активирующим репарацию двуцепочечных разрывов ДНК. Белок TPP1 служит для привлечения теломеразы [Sexton и др., 2014]. Белок Rap1, входящий в состав шелтеринового комплекса, рекрутируется на теломеры через белок TRF2 и незаменим для корректного функционирования теломер человека и мыши [Li, Oestreich, Lange De, 2000; Martinez и др., 2010].

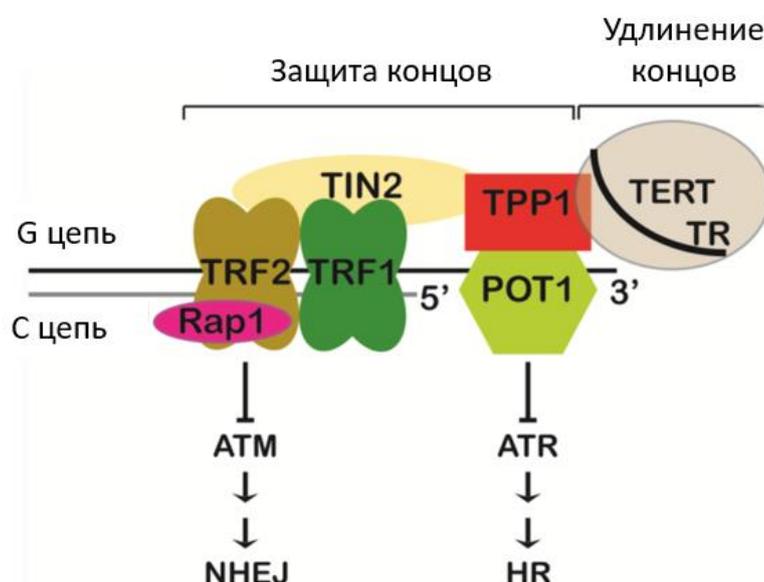


Рисунок 2. Состав комплексов, участвующих в защите и репликации концов хромосом (адаптировано из [Smith, Pendlebury, Nandakumar, 2020]).

Установлено, что одноцепочечный 3'-конец теломерной ДНК при участии TRF2 сворачивается в структуру типа «лассо», получившую название Т-петля (Рис. 3) [Doksani и др., 2013; Greider, 1999; Griffith и др., 1999; Timashev, Lange De, 2020]. Формирование Т-петель защищает концы хромосом от узнавания как двуцепочечных разрывов ДНК [Greider, 1999]. Также в теломерных областях формируются структуры, получившие название D-петель, за счет того, что одноцепочечный 3'-конец вплетается внутрь двуцепочечного участка ДНК [Greider, 1999; Nečasová и др., 2017].



Рисунок 3. Конфигурации Т-петли и D-петли вместе со схематическим изображением шелтеринового комплекса (адаптировано из [Smith, Pendlebury, Nandakumar, 2020]).

Показано, что богатые гуанином 3'-одноцепочечные выступы теломер человека могут формировать G-квадруплексы - неканонические вторичные структуры, образующиеся в последовательностях ДНК, содержащих последовательные ряды гуанинов [Lin, Yang, 2017]. Четыре гуанина способны образовывать G-квартеты за счет Хугстиновских связей, а три или более G-квартетов могут сформировать структуру G-квадруплекса [Maestroni, Matmati, Coulon, 2017]. Повторы теломерной ДНК позвоночных отличаются высокой консервативностью, что, как предполагается, связано с их способностью образовывать G-квадруплексные структуры ДНК [Neidle, Parkinson, 2002]. Образование G-квадруплексов в 3'-одноцепочечном выступе теломер выполняет защитную функцию, а также участвует в регуляции элонгации G-цепи теломеразой и последующего синтеза C-цепи ДНК-полимеразой [Gilson, Géli, 2007; Maestroni, Matmati, Coulon, 2017].

Установлено, что теломерная ДНК способна транскрибироваться, в результате чего образуется РНК, содержащая теломерные повторы (TERRA) [Chebly и др., 2022]. Последовательности TERRA считаются эволюционно консервативными среди позвоночных [Azzalin, Lingner, 2008].

Показано, что TERRA связывает основные компоненты теломеразы, TERT и TR (или теломерные повторы), но роль TERRA в функционировании теломеразы до сих пор неясна [Chebly и др., 2022; Montero и др., 2016].

1.2. Теломеразный комплекс

1.2.1. Основные сведения

Для удлинения теломер клетки используют специализированный рибонуклеопротеиновый комплекс – теломеразу. Длина теломер определяет репликативный потенциал клетки. Теломеразный комплекс осуществляет добавление теломерных повторов на 3'-конец хромосом, что помогает поддерживать стабильность генома и избегать узнавания концов хромосом как двуцепочечных разрывов [Udroiu, Marinaccio, Sgura, 2022]. В клетках человека теломерные повторы имеют последовательность TTAGGG [Blackburn, Collins, 2011].

Для образования минимального активного теломеразного комплекса необходимы два компонента – каталитическая субъединица, являющаяся теломеразной обратной транскриптазой (TERT), и теломеразная РНК (TR). Функциональный теломеразный комплекс находится в активно-делящихся клетках, таких как половые, стволовые и раковые [Grill, Nandakumar, 2021]. В большинстве соматических клеток теломеразный комплекс неактивен, что обусловлено ингибированием транскрипции каталитической субъединицы TERT в процессе дифференцировки [Cifuentes-Rojas, Shippen, 2012].

Уникальность теломеразы обусловлена тем, что это единственная из известных в настоящее время обратная транскриптаза, которая имеет собственную РНК матрицу, используемую для синтеза теломерных повторов [Sanford и др., 2021].

На биогенез, локализацию и регуляцию функционирования теломеразы большое влияние оказывают вспомогательные белки – дискерин, NHP2, NOP10 и GAR1 [Hockemeyer, Collins, 2015]. Во время биогенеза происходит перемещение рибонуклеопротеинового комплекса между тельцами Кахаля, ядрышком и нуклеоплазмой. Первоначально происходит котранскрипционное взаимодействие дискерина, NHP2, NOP10 и NAF1 с hTR. Получившийся комплекс перемещается в тельца Кахаля, где происходит триметилирование 5'-кепа hTR и устранение хеликазой DDX36, образовавшихся на 5'-конце hTR, G-квадруплексов. Замена белка NAF1 на GAR1 и взаимодействие этого обновленного рибонуклеопротеинового комплекса с hTERT и TCAB1 формирует активный теломеразный комплекс [Egan, Collins, 2012; Sexton, Collins, 2011] в тельцах Кахаля или нуклеоплазме [Rubtsova, Dontsova, 2020; Vogan и др., 2016].

1.2.2. Обратная транскриптаза теломеразы

Обратная транскриптаза TERT является каталитическим компонентом теломеразного комплекса.

Ген *hTERT* человека располагается на 5 хромосоме, состоит из 42 т.п.н. и содержит 15 интронов и 16 экзонов [Akincilar, Unal, Tergaonkar, 2016]. Установлено, что в результате альтернативного сплайсинга может образовываться 13 различных вариантов мРНК TERT [Hrdličková, Nehyba, Henry R. Bose, 2012; Sæbøe-Larssen, Fossberg, Gaudernack, 2006]. Промоторная область гена *hTERT* содержит GC-боксы и E-боксы [Dratwa и др., 2020].

Структура hTERT представлена четырьмя консервативными структурными доменами: N-концевым доменом (TEN), доменом, связывающим теломеразную РНК (TRBD), RT-доменом, содержащим активный центр фермента, и C-концевым доменом (СТЕ) (Рис. 4) [Podlevsky, Chen, 2012].



Рисунок 4. Структура hTERT человека (адаптировано из [Udroiu, Marinaccio, Sgura, 2022])

TEN-домен выполняет важную роль в функционировании теломеразы как *in vitro*, так и *in vivo*. Он содержит несколько специфичных консервативных мотивов, важных для TERT-TR взаимодействия и процессивности фермента [Wu, Collins, 2014]. Кроме того, в состав этого домена входят участки, связывающие одноцепочечную теломерную ДНК [Sealey и др., 2010]. Это взаимодействие стабилизирует комплекс ДНК-субстрата и фермента (и, как следствие, становится возможным добавление нескольких теломерных повторов одной молекулой фермента без диссоциации комплекса). Таким образом, TEN-домен необходим для регуляции связывания теломеразы с теломерой и процессивного добавления повторов [Robart, Collins, 2011; Schmidt, Dalby, Cech, 2014].

TRBD-домен обеспечивает высокоаффинное связывание TERT с TR [Bley и др., 2011].

Пространственную структуру TERT описывают как «правую руку», выделяя в ее составе «пальцы», «ладонь» и «большой палец». Домен RT соответствует «пальцам» (помогают связывать входящие нуклеотиды) и «ладони» (является каталитическим сайтом) этой структуры [Chan, Wang, Feigon, 2017]. RT-домен является каталитическим участком полимеразы. Мутации консервативных остатков RT-домена фермента приводят к нарушению ферментативной активности

теломеразы *in vitro* и *in vivo* – такие мутанты не способны поддерживать длину теломер. Мутации в этом домене ассоциированы с развитием заболеваний, таких как врожденный дискератоз и апластическая анемия [Armanios и др., 2007; Chu, MacNeil, Autexier, 2016; Lingner и др., 1997].

СТЕ-домен соответствует «большому пальцу» в составе обратной транскриптазы. Он способствует формированию и стабилизации ДНК-РНК дуплекса в активном центре фермента [Chan, Wang, Feigon, 2017]. Также в этом домене содержится Nuclear Export Signal (NES) – мотив, который позволяет TERT выходить из ядра [Haendeler и др., 2003].

Привлечению теломеразы на теломеры у позвоночных способствует один из белков шелтеринового комплекса – TPP1. Взаимодействие происходит между ОБ-доменом TPP1 и TEN доменом TERT, что приводит к расположению всего теломеразного комплекса в одноцепочечной области теломер. За счет расположения в одноцепочечной области облегчается взаимодействие матричного участка теломеразной РНК с теломерами [Hockemeyer, Collins, 2015; Rubtsova, Dontsova, 2020].

1.2.3. Каталитический цикл теломеразы

Теломераза уникальна среди ДНК-полимераз тем, что она использует внутреннюю матрицу РНК для процессивного добавления теломерных повторов [Sanford и др., 2021].

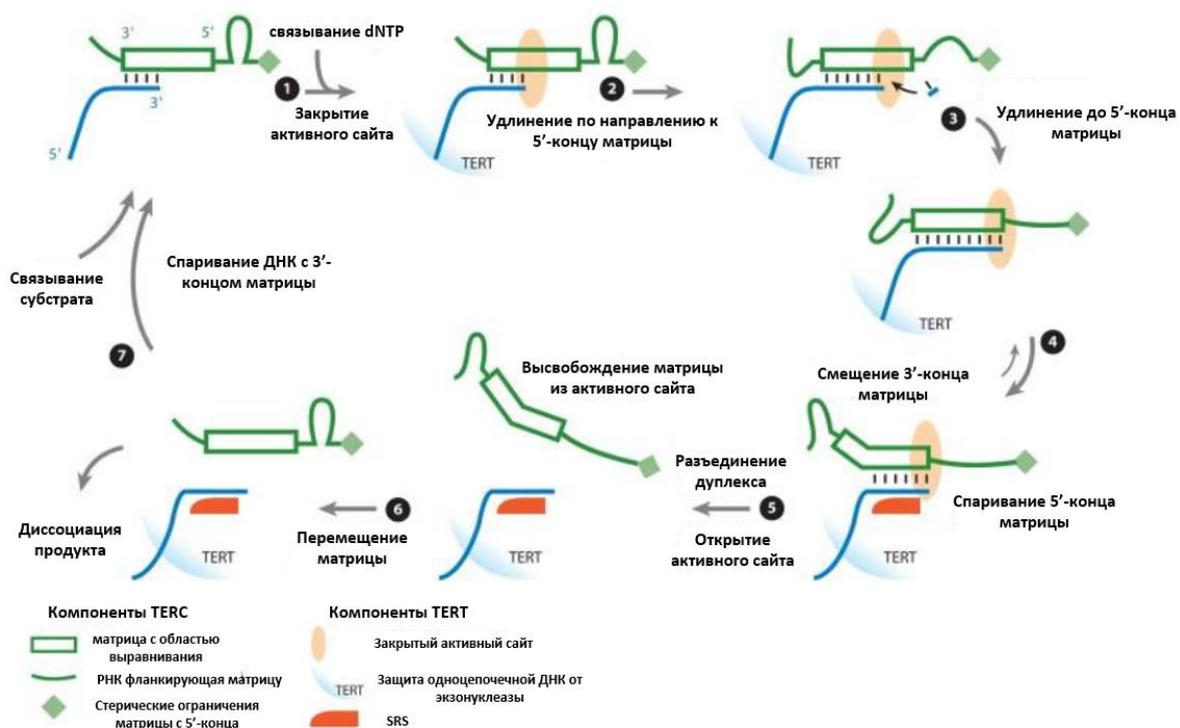


Рисунок 5. Каталитический цикл теломеразы (адаптировано из [Wu и др., 2017])

Каталитический цикл теломеразы (Рис. 5) начинается со спаривания выступающих оснований одноцепочечной теломерной ДНК с 3'-концом матрицы TR. После формирования ДНК-РНК дуплекса и связывания dNTP происходит закрытие активного центра и формирование конформации, способной к удлинению. Далее происходит удлинение, пока не будет достигнут стерический барьер на 5'-конце матрицы - ограничивающий элемент матрицы (ТВЕ) [Sanford и др., 2021; Wu, Collins, 2014]. По мере продвижения 5'-конца матрицы через активный центр происходит смещение ее 3'-конца и фланкирующего участка РНК. При добавлении нуклеотидов постоянно поддерживается дуплекс РНК-ДНК длиной 5 п.н., что представляет собой оптимальную длину для размещения в активном центре фермента [Qi и др., 2012; Sanford и др., 2021]. Смещение дуплекса в результате синтеза нового повтора изменяет конформации и положения 3'-конца матрицы и фланкирующего участка РНК, что приводит к открытию активного центра, разделению дуплекса и высвобождению матрицы. ДНК, которая была связана с матрицей, сохраняет связь с SRS (single-stranded DNA retention surface)

TERT, а сама матрица – перемещается, формируя новый короткий ДНК-РНК дуплекс. Если этот дуплекс в результате конформационных изменений необходимых для восстановления функционально активного центра захватывается в центральную полость кольца TERT (формируется из «пальцев», «ладони» и «большого пальца»), то начинается еще один виток цикла синтеза [Wu и др., 2017]. В противном случае происходит диссоциация комплекса теломеразы и теломеры и синтез теломерных повторов прекращается.

Белок TPP1 стимулирует транслокацию и увеличивает количество добавляемых за один акт теломерных повторов, стабилизируя взаимодействие теломеразы с теломерой [Rubtsova, Dontsova, 2020; Schmidt, Cech, 2015].

Теломераза имеет два характерных свойства, одно из которых является уникальным. Первое свойство, общее для всех ДНК-полимераз, представляет собой процессивность добавления нуклеотидов (NAP) - количество нуклеотидов, добавленных до того, как произойдет диссоциация комплекса фермента и матрицы из 6 нуклеотидов CCAAUC: матрица отделяется от вновь синтезированной ДНК и перемещается в активный сайт, а ДНК повторно связывается с матрицей РНК, чтобы инициировать еще один раунд добавления нуклеотидов (Рис.5) [Bagshaw, Hentschel, Stone, 2021; Sanford и др., 2021]. Уровень NAP определяется по разнице в длине продуктов теломеразы – разница в длине продуктов в 6 нуклеотидов свидетельствует о высоком уровне NAP, в то время как продукты промежуточной длины свидетельствуют о более низком уровне NAP [Sanford и др., 2021; Xi, Cech, 2014].

Второе уникальное свойство теломеразы представляет собой процессивность добавления повторов (RAP) - количество повторов GGTTAG, которые теломераза добавляет до полной диссоциации комплекса со своим ДНК-субстратом (Рис. 6) [Sanford и др., 2021]. Способность одной молекулы теломеразы процессивно добавлять множественные повторы была продемонстрирована в реакциях, содержащих значительный избыток субстрата теломерной одноцепочечной ДНК по сравнению с ферментом [Greider, 1991]. Мутации TERT, нарушающие RAP,

связаны с развитием заболеваний, что подчеркивает важность этого параметра для поддержания длины теломер и здоровья человека [Robart, Collins, 2010].

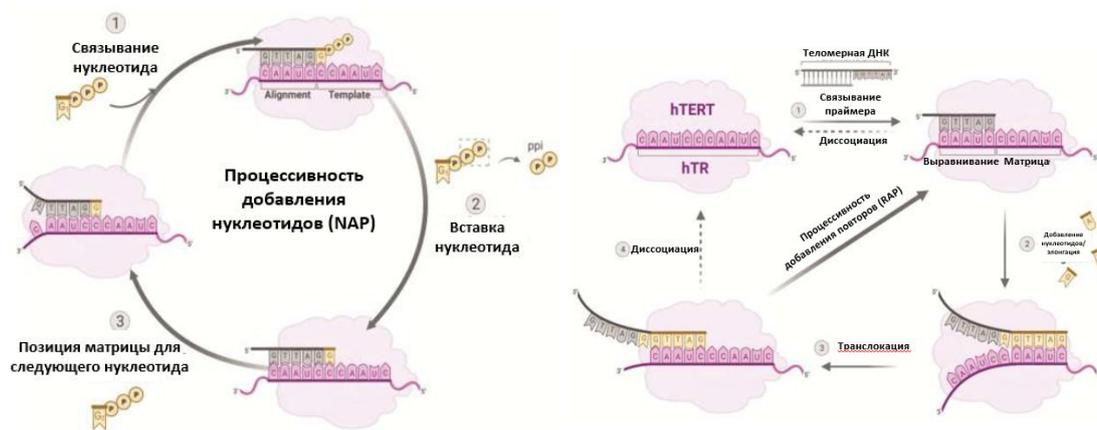


Рисунок 6. Процессивность добавления нуклеотидов (слева) и повторов (справа) теломеразой (адаптировано из [Sanford и др., 2021]).

1.2.4. Теломеразная РНК, ее структура и биогенез

Важным компонентом теломеразного комплекса является теломеразная РНК (TR). Длина теломеразной РНК может варьировать в зависимости от класса и вида организмов, у позвоночных – от 312 н. до 559 н. [Chen, Blasco, Greider, 2000; Zhang, Kim, Feigon, 2011]. Зрелая теломеразная РНК человека hTR имеет длину 451 н. [Zhang, Kim, Feigon, 2011].

В структуре теломеразной РНК выделено несколько консервативных доменов: псевдоузел (включающий матрицу), консервативные области 4 и 5 (CR4/CR5), H/ACA-бокс и CR7 (Рис. 7)[Zhang, Kim, Feigon, 2011]. Сохранение именно консервативных структур, а не последовательности нуклеотидов, позволяет предположить необходимость этих структурных мотивов для формирования теломеразного комплекса и синтеза теломерных повторов [Chen, Blasco, Greider, 2000; Mitchell, Collins, 2000; Zhang, Kim, Feigon, 2011].

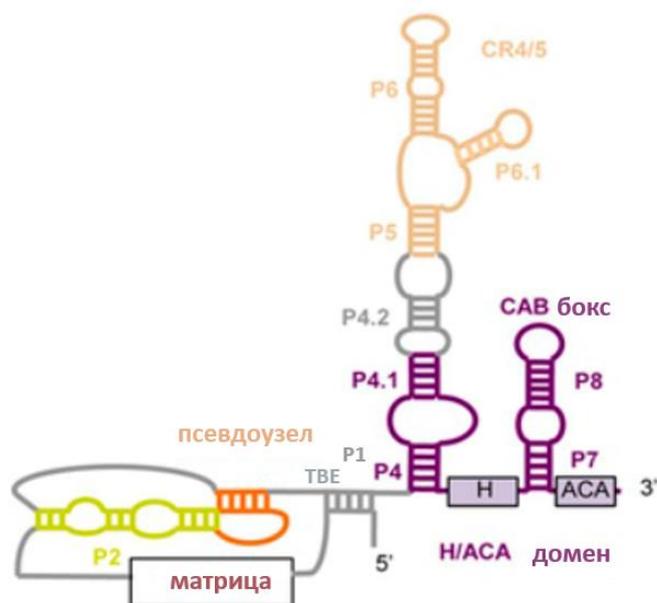


Рисунок 7. Вторичная структура теломеразной РНК человека
(адаптировано из [Nguyen и др., 2018])

Коровый домен, который состоит из псевдоузла, матричного участка и консервативной области 4/5, представляет большой интерес для биохимических и биофизических исследований, так как именно в нем располагается большинство консервативных нуклеотидов, мутации которых ассоциированы с различными заболеваниями [Zhang, Kim, Feigon, 2011].

5'-конец TR организован в домен, который включает в себя матрицу, 5'-прилегающий к матрице граничный элемент матрицы (ТВЕ) [Chen, Greider, 2003] и псевдоузел, соединенный с 3'-концом матрицы одноцепочечной областью [Chan, Wang, Feigon, 2017]. Стабилизация псевдоузла происходит за счет третичных взаимодействий между элементами РНК [Chan, Wang, Feigon, 2017; Theimer, Blois, Feigon, 2005]. Формированию структуры псевдоузла способствует спираль P1 [Chen, Blasco, Greider, 2000]. Она также является фактором, ограничивающим движение теломеразы по матрице, в результате чего не происходит добавление лишних нуклеотидов, не кодируемых матричным участком [Chen, Greider, 2003].

TBE – короткая спираль, которая располагается перед одноцепочечным участком и является частью спирали P1. У hTR эта спираль замыкает весь псевдоузловой домен в кольцо [Chan, Wang, Feigon, 2017; Chen, Greider, 2003]. TBE с высокой аффинностью связывается с TRBD доменом TERT, что позволяет предотвратить добавление нуклеотидов, расположенных за пределами матрицы [Podlevsky, Chen, 2016].

Домен CR4/CR5 hTR представляет собой STE (stem terminus element) и напрямую взаимодействует с hTERT независимо от корового домена [Zhang, Kim, Feigon, 2011]. Он формируется спиралью P5 и P6, образующими структуру «стебель-петля» [Chen, Blasco, Greider, 2000]. Большинство консервативных остатков локализовано в короткой шпильке P6.1, спираль из четырех пар оснований Уотсона-Крика которой увенчана петлей из 5 нуклеотидов. Все 8 нуклеотидов, образующих пары оснований Уотсона-Крика, консервативны у позвоночных и необходимы для связывания TERT и активности теломеразы [Robart, Collins, 2010; Zhang, Kim, Feigon, 2011].

3'-конец hTR был идентифицирован как элемент РНК, специфичный для малых РНК телец Кахаля (СВ) H/ACA (scaRNA), и играет важную роль в биогенезе и регуляции теломеразы *in vivo*, включая накопление, процессинг 3'-конца и локализацию hTR [Kiss, Fayet-Lebaron, Jády, 2010; Theimer и др., 2007; Zhang, Kim, Feigon, 2011]. H/ACA домен hTR связывает два набора из четырех эволюционно консервативных белков H/ACA RNP (дискерин, Gar1, Nop10 и Nhp2) с образованием H/ACA RNP [Schlotter и др., 2023; Zhang, Kim, Feigon, 2011].

H/ACA домен hTR также содержит консервативный элемент локализации в тельца Кахаля (СAB-бокс), который представляет собой шпильку в домене CR7 [Jády, Bertrand, Kiss, 2004; Zhang, Kim, Feigon, 2011].

Биогенез теломеразной РНК в клетках эукариот подразделяют на пять этапов – транскрипция, кепирование, сплайсинг, процессинг 3'-конца и транспорт. При возникновении нарушений в процессе биогенеза образуются нефункциональные

транскрипты, которые подвергаются деградации. Синтез теломеразной РНК осуществляет РНК-полимераза II, а специфический ко-транскрипционный процессинг кодирующих и некодирующих изоформ определяется дополнительными факторами [Pakhomova и др., 2022].

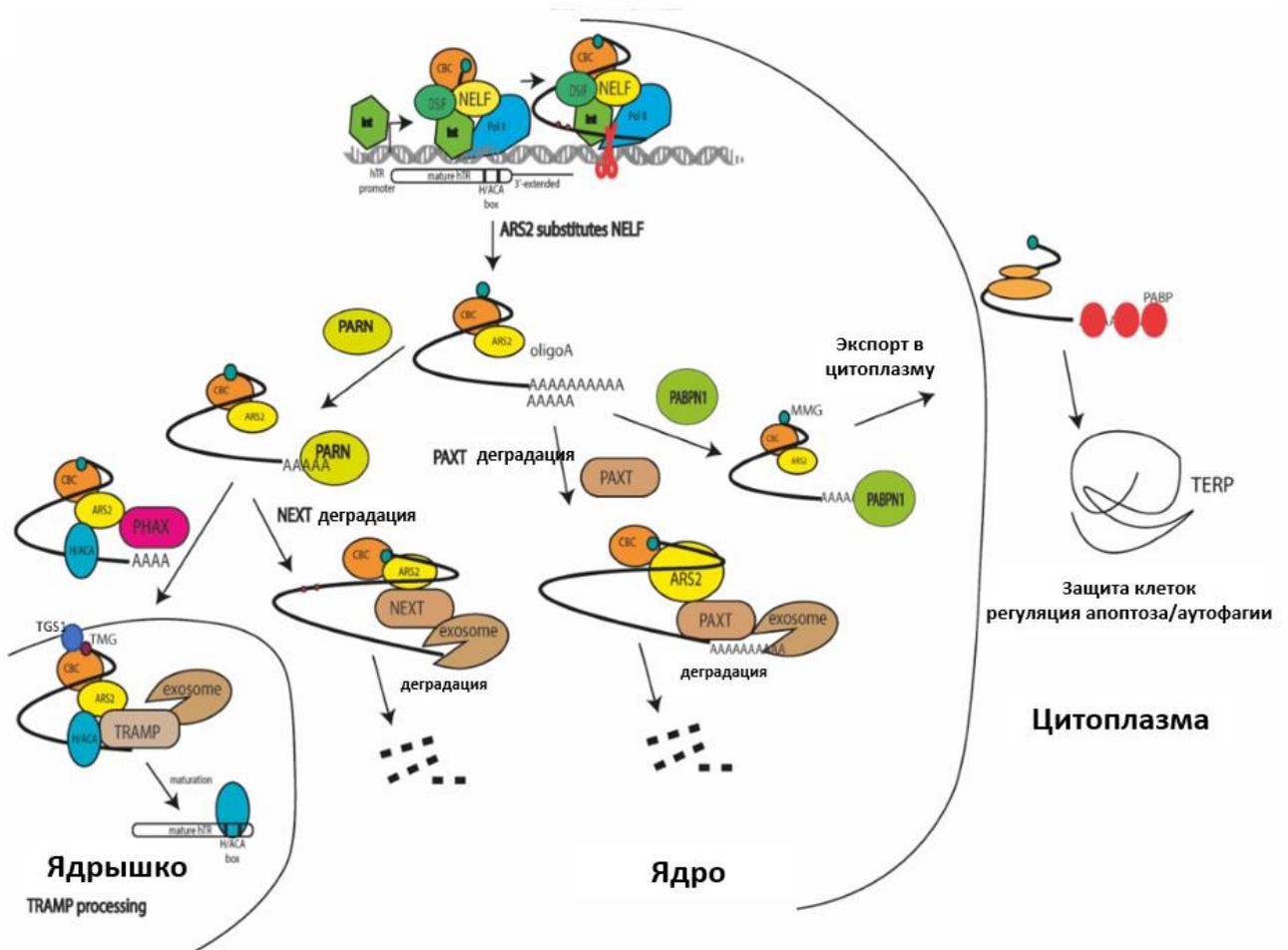


Рисунок 8. Схема, иллюстрирующая механизмы биогенеза продуктов транскрипции гена теломеразной РНК человека (адаптировано из [Rubtsova, Dontsova, 2022]).

Теломеразная РНК синтезируется в виде набора предшественников различной длины (выявлены продукты длиной от 461 до 1500 н.), которые

подвергается процессингу в результате чего укорачиваются и образуют «зрелую» РНК, которая является компонентом теломеразного комплекса «Зрелая» теломеразная РНК имеет длину 451 нуклеотид [Roake и др., 2019]. В клетках до 70-80% всей hTR существует в зрелой форме. РНК-полимераза II (Pol II) совместно с белковыми комплексами DSIF (DRB Sensitivity Inducing Factor) и NELF (negative elongation factor) продуцирует первичные транскрипты hTR разной длины [Feng и др., 1995, Pakhomova и др., 2022]. Образовавшиеся длинные транскрипты либо деградируют, либо процессируются в зрелую форму посредством механизма 3'-процессинга, отличного от механизмов свойственных мРНК и мРНК [Fu, Collins, 2003]. Для выбора судьбы транскрипта-предшественника белок NELF должен быть заменен на ARS2 [Nguyen и др., 2015], который осуществляет координацию путей процессинга и деградации транскрипта hTR [Melko и др., 2020].

В процессе транскрипции Pol II взаимодействует с комплексами Медиатор или Интегратор, которые координируют различные ко-транскрипционные процессы, обеспечивая правильный биогенез транскриптов. Медиатор представляет собой многосубъединичный комплекс, который соединяет специфические факторы транскрипции с Pol II и общими факторами транскрипции и необходим для формирования комплекса преинициации транскрипции мРНК [Soutourina, 2018]. Интегратор также представляет собой многосубъединичный комплекс, который, в свою очередь, регулирует транскрипцию некодирующих РНК [Kirstein и др., 2021] и специализированных мРНК, таких как мРНК гистонов [Skaar и др., 2015]. Недавнее исследование показало, что промотор hTR участвует в терминации транскрипции путем рекрутирования Интеграторного комплекса. Когда hTR находится под контролем промоторов Pol II, рекрутирующих Медиатор, образуется больше 3'-удлиненных транскриптов [Rubtsova и др., 2019] и нарушается их 3'-концевой процессинг.

Процессинг 3'-конца hTR включает в себя стабилизацию в результате взаимодействия H/ACA домена hTR с белками и гидролитическое расщепление нуклеазами экспонированной 3'-последовательности. Первичный транскрипт

может подвергаться двум процессам, между которыми возникает конкуренция. Стабилизацию, способствующую накоплению зрелой формы, осуществляют Н/АСА белки, а деградация происходит при участии экзосомы и адаптерных комплексов NEXТ (nuclear exosome targeting), TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4p Polyadenylation complex) или PAXТ (PolyA exosome targeting complex [Meola и др., 2016]).

Пре-Н/АСА-комплекс, состоящий из NAF1, NOP10, NHP2 и дискерина ко-транскрипционно взаимодействует с Н/АСА-боксом Н/АСА домена теломеразной РНК [Darzacq и др., 2006]. Это взаимодействие стимулируется последовательностью ВЮ-бокса, являющейся уникальной для hTR и отсутствующей в других Н/АСА РНК [Egan, Collins, 2012]. Во время перехода из пре-Н/АСА комплекса к зрелому Н/АСА комплексу происходит замена NAF1 на GAR1 [Leulliot и др., 2007]. Комплекс пре-Н/АСА играет важную роль в стабилизации hTR на ранней стадии биогенеза. Предполагается, что сборка этого комплекса необходима для правильного созревания и накопления hTR [Qin, Autexier, 2021].

Деградация транскриптов осуществляется мультибелковым комплексом – экзосомой. Существует несколько различных комплексов, способствующих привлечению экзосомы. Субстратная специфичность адаптерных белковых комплексов, привлекающих экзосомы, определяется их субклеточной локализацией и состоянием полиаденилирования мишени [Qin, Autexier, 2021]. Олигоаденилированные предшественники hTR могут быть деградированы за счет экзосомы, которую привлекает к hTR комплекс PAXТ (poly(A) tail exosome targeting) [Pakhomova и др., 2022],[Rubtsova, Dontsova, 2022]. Также олигоаденилированные транскрипты могут быть гидролизованы с 3'-конца экзонуклеазой PARN и далее подвергаться деградации экзосомой, привлеченной комплексом NEXТ [Moon и др., 2015].

NEXТ представляет собой адапторный комплекс, находящийся в нуклеоплазме, который преимущественно рекрутирует экзосому для деградации

неаденилированной РНК [Wu и др., 2020]. В состав комплекса NEXT входят белок ZCCHC8, РНК-хеликаза MTR4 и РНК-связывающий белок RBM7 [Lubas и др., 2011]. NEXT может в первую очередь приводить к деградации более длинных предшественников hTR, которые не процессируются в зрелую форму. Столь длинные предшественники редки, поскольку подавляющее большинство возникающих транскриптов hTR не превышают в длину 461 нуклеотида, которые, вероятно, будут процессироваться в зрелую форму [Roake и др., 2019].

Еще одним из возможных путей, по которым может развиваться судьба транскрипта hTR, является его олигоденилирование неканонической поли(А)-полимеразой PAPD5 [Shukla и др., 2020] с последующим укорочением за счет взаимодействия с PARN и дальнейшее взаимодействие образовавшегося укороченного транскрипта с PNAH приводит к транспорту в ядрышко [Boulon и др., 2004]. В ядрышке происходит гиперметилование, осуществляемое триметилгуанозинсинтазой TGS1 [Chen и др., 2020], а также дальнейшие этапы созревания, которые заключаются в укорочении транскрипта за счет воздействия экзосомы, привлеченной комплексом TRAMP (комплекс полиаденилирования Trf4/Air2/Mtr4p). Модифицированные транскрипты далее транспортируются в тельца Кахаля [Tseng и др., 2015].

Помимо ранее описанных путей можно отметить, что олигоденилированные предшественники hTR могут сразу транспортироваться в тельца Кахаля, где они процессируются экзонуклеазами PARN и TOE1 [Deng и др., 2019]. TOE1 проявляет активность деаденилирования и процессинга 3'-конца в отношении hTR (преимущественно коротких предшественников длиной не более 455 нт) *in vitro* и в клетках [Son, Park, Kim, 2018]. Далее созревшая hTR локализуется в тельцах Кахаля.

Данные флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) показывают, что на протяжении большей части клеточного цикла hTR находится в тельцах Кахаля (CB) [Zhu и др., 2004]. CB также облегчают рекрутирование теломеразы к теломерам [Cristofari и др., 2007], хотя они и не являются строго необходимыми для этого

процесса, поскольку гомеостаз теломер может поддерживаться в клетках человека, лишенных коилина - структурного белка телец Кахаля [Chen и др., 2015]. Локализация hTR в тельцах Кахаля требует связывания TCAB1 с эволюционно консервативной последовательностью САВ-бокса в 3'-шпильке hTR [Venteicher и др., 2009]. Недостаток TCAB1 приводит к тому, что hTR перестает локализоваться в тельцах Кахаля в то время, как количество hTR или эффективность сборки теломеразы не меняются [Chen и др., 2018].

Ядерный поли(А)-связывающий белок 1 (PABPN1) связывает hTR с более длинными поли(А)-хвостами по сравнению с теми, которые связаны с hTERT или дискерином [Nguyen и др., 2015]. Ранее показано, что PABPN1 способствует деградации полиаденилированной РНК [Bresson и др., 2015], привлекая экзосому к поли(А)-последовательности РНК. Учитывая, что PABPN1 взаимодействует с PARN РНК-независимым образом [Nguyen и др., 2015], высказано предположение, что защитная функция PABPN1 при созревании hTR достигается за счет рекрутирования PARN к полиаденилированному предшественнику hTR. Предполагают, что постепенно удлиняющийся поли(А)-хвост действует как сенсор, а PABPN1 рекрутируется преимущественно в предшественники hTR с более длинным поли(А)-хвостом, что определяет приоритет их созревания в дальнейшем [Qin, Autexier, 2021].

PABPN1 может быть заменен на PABP (поли(А)-связывающий белок) для экспорта длинных полиаденилированных транскриптов hTR в цитоплазму для дальнейшей трансляции [Meola, Jensen, 2017]. Изначально цитоплазматическую локализацию hTR наблюдали только при наличии патологий – недостаток дискерина и PARN, что приводило к накоплению hTR или дефектам процессинга [Shukla и др., 2016]. Однако в недавних исследованиях продемонстрировано, что в норме hTR также может наблюдаться в цитоплазме [Chen и др., 2020; Rubtsova и др., 2018]. Фермент, ответственный за полиаденилирование локализованного в цитоплазме hTR, на настоящий момент не идентифицирован. Отмечено, что дефицит канонических PAP снижает уровень hTR, что является аргументом в

пользу того, что hTR обладает свойствами мРНК [Rubtsova, Dontsova, 2022]. Полиаденилирование необходимо для превращения hTR в зрелый компонент теломеразного комплекса. Нарушение этой стадии приводит к накоплению непротранскрибированных транскриптов в цитоплазме, где происходит трансляция, приводящая к синтезу hTERP [Rubtsova, Dontsova, 2022].

Помимо модификаций 3'-конца, также происходят модификации и 5'-конца. 5'-концы транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II имеют котранскрипционно образующийся монометилгуанозин (MMG) кеп. Кеп MMG на мРНК-предшественниках обеспечивает взаимодействие с кеп-связывающим комплексом (CBC), адаптерными белками PNAH и CRM1 для транспорта в цитоплазму [Boulon и др., 2004]. Для реимпорта из цитоплазмы в ядро необходимо чтобы прошло гиперметилование MMG-кепа посредством TGS1. Процессы ядерного импорта и экспорта hTR, а также модификация кепа пока изучены мало, однако известно, что недостаток TGS1 приводит к цитоплазматическому накоплению hTR [Chen и др., 2020].

Суммируя детали процессинга и локализации hTR, можно отметить, что ген *hTERC* продуцирует молекулы двух типов. Первый тип – это РНК компонент теломеразы hTR, который имеет длину 451 нуклеотид и у которого присутствует TMG-кеп. Эти молекулы локализованы в ядре и в комплексе с hTERT обеспечивают синтез теломер в активно пролиферирующих клетках. Второй тип молекул – это hTR как мРНК, имеющие MMG-кеп и удлинённый 3'-конец. Они локализуются в цитоплазме и являются матрицей для синтеза hTERP в неидентифицированных на настоящий момент условиях [Rubtsova, Dontsova, 2022].

1.3. Альтернативные функции теломеразы

Основной канонической функцией теломеразного комплекса является синтез теломер. Если в клетке присутствует активный теломеразный комплекс, то

укорочения теломер во время очередного цикла клеточного деления не происходит. Таким образом, основные компоненты теломеразного комплекса (как hTERT, так и hTR) играют важную роль в процессе биологического старения, дегенеративных заболеваниях и метаболизме при онкологических заболеваниях [Romaniuk и др., 2019].

Показано, что hTERT кроме удлинения теломер принимает участие в регуляции ключевых метаболических процессов клеток, влияющих на выживаемость, экспрессию генов, пути передачи сигналов и функционирование митохондрий [Romaniuk и др., 2019; Teichroeb, Kim, Betts, 2016].

Помимо ядерной локализации hTERT может иметь цитоплазматическую и митохондриальную локализации. Можно отметить, что митохондриальная локализация hTERT коррелирует со снижением уровня активных форм кислорода и усилением дыхания [Romaniuk и др., 2019]. Также есть данные о корреляции митохондриальной локализации hTERT с повышенным потенциалом мембраны митохондрий [Haendeler и др., 2009; Singhapol и др., 2013].

hTR также имеет неканонические функции - она способна принимать участие в таких процессах, как ранние стадии онкогенеза, регуляция экспрессии генов и защитные механизмы клеток [Rubtsova, Dontsova, 2020].

1.3.1. Альтернативные функции обратной транскриптазы hTERT

Вначале к функциям теломеразы приписывали только активность в процессе удлинения теломер, но на сегодняшний день установлено, что TERT принимает участие в регуляции различных внутриклеточных механизмов независимо от участия в процессе удлинения теломер, которые влияют на многие физиологические процессы и принимают участие в регуляции событий связанных с онкогенезом, прогрессией опухолей и резистентностью к терапии. В настоящее время хорошо известно, что TERT действует как транскрипционный (ко-) фактор,

регулирующий экспрессию генов, а наиболее изученными сигнальными путями, регулируемые hTERT, являются Wnt/ β -катенин и NF- κ B пути [Ségal-Bendirdjian, Geli, 2019].

1.3.1.1. TERT и Wnt-сигналинг

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин играет центральную роль в процессе развития организма, в стволовых и раковых клетках. В отсутствие передачи Wnt-сигнала цитоплазматический β -катенин образует комплекс с белками AXIN, белком аденоматоза полипоза толстой кишки (adenomatous polyposis coli, APC) и киназой гликогенсинтазы 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3B). Образование этого комплекса приводит к фосфорилированию β -катенина с дальнейшей деградацией по убиквитин-протеасомному пути.

Во время связывания белка Wnt с Frizzled-рецепторами и LRP происходит дестабилизация комплекса β -катенина с белками AXIN, APC и GSK3B. Свободный β -катенин перемещается в ядро, где образует комплекс с транскрипционными факторами TCF/LEF, способствуя транскрипции целевого гена. Это будет приводить к изменениям в пролиферации и/или дифференцировке клеток [Holland и др., 2013].

Прямая связь между TERT и Wnt-сигнальным путем была выявлена в раковых и стволовых клетках. Обнаружено, что TERT служит кофактором в транскрипционном комплексе β -катенина в эмбриональных стволовых клетках мыши и в эмбрионах *Xenopus laevis* [Park и др., 2009]. Стимуляция рецепторов Wnt на плазматической мембране приводит к образованию комплекса TERT с фактором транскрипции BRG1 (также известным как SMARCA4), вовлеченным в регуляцию экспрессии генов-мишеней Wnt [Wu и др., 2013]. С другой стороны, исследования, проведенные на клеточных линиях MCF7 и HeLa, не выявили физической ассоциации hTERT и BRG1 или β -катенина в клетках [Listerman, Gazzaniga, Blackburn, 2014; Liu и др., 2013; Romaniuk и др., 2019].

Также есть данные о том, что временная активация пути Wnt/ β -катенин индуцирует экспрессию мРНК hTERT и повышает активность теломеразы в различных клеточных линиях [Lafferty-Whyte и др., 2009]. На культурах раковых клеток человека (эмбриональной карциномы NTera2 и колоректальной карциномы SW480) обнаружено, что β -катенин может напрямую регулировать экспрессию TERT [Hoffmeyer и др., 2012].

Полученные данные наталкивают на вывод о том, что потенциальное влияние hTERT может осуществляться по двум разным путям: hTERT может индуцировать транскрипцию β -катенин-зависимых генов или Wnt/ β -катенин может непосредственно влиять на транскрипцию hTERT [Hoffmeyer и др., 2012].

1.3.1.2. TERT и NF- κ B сигналинг

Доказательства того, что TERT способна регулировать экспрессию генов, зависимых от NF- κ B получены на клетках множественной миеломы, в которых субъединица NF- κ B p65 модулирует ядерную транслокацию TERT. Оказывается происходит образование комплекса TERT с p65, который может перемещаться из цитоплазмы в ядро при индукции TNF α [Dratwa и др., 2020]. Позднее установлено, что TERT стимулирует экспрессию ряда генов, транскрипция которых контролируется NF- κ B, таких как *IL-6*, *IL-8* и фактор некроза опухоли- α (TNF α) [Ghosh и др., 2012]. Также показано, что hTERT регулирует экспрессию матриксных металлопротеиназ (MMP) посредством NF- κ B-зависимой транскрипции [Ding и др., 2013]. Поскольку NF- κ B является ключевым регулятором воспалительных процессов и процессов развития, hTERT, вероятно, регулирует воспаление и развитие посредством взаимодействия с NF- κ B [Ségal-Bendirdjian, Geli, 2019].

1.3.1.3. TERT и MYC

MYC известен как прямой активатор транскрипции *TERT* [Piropoulos и др., 2009], по данным недавних исследований – TERT может регулировать MYC [Koh и др., 2015]. Показано, что TERT, независимо от теломерной роли, регулирует уровень содержания в клетке белка MYC, влияя на связывание с промоторами-мишенями, что способствует либо активации, либо репрессии генов-мишеней MYC [Koh и др., 2015]. TERT регулирует убиквитинирование и протеасомную деградацию MYC, и этот эффект не зависит от удлинения теломер [Koh и др., 2015].

1.3.1.4. Другие альтернативные функции TERT

Есть данные о том, что hTERT может стимулировать ангиогенез за счет стимуляции экспрессии гена *VEGF* посредством взаимодействия с промотором гена и фактором транскрипции Sp1 [Liu и др., 2016; Romaniuk и др., 2019].

О возможной защитной роли каталитической субъединицы теломеразы свидетельствует то, что небольшая часть hTERT локализуется в митохондриях [Gordon, Santos, 2010]. *In vitro* (на изолированной из клеток общей ДНК, включающей митохондриальную ДНК) и *in vivo* (на клеточных линиях) показано, что в нормальных условиях hTERT, локализованная в митохондриях, снижает повреждения митохондриальной ДНК, вызванные облучением ультрафиолетом или обработкой бромистым этидием [Romaniuk и др., 2019; Singhapol и др., 2013]. Каталитическая активность фермента необходима для проявления защитной активности, а также показано, что hTERT связывает митохондриальную ДНК в областях, кодирующих ND1 и ND2, которые опосредуют образование активных форм кислорода [Haendeler и др., 2009; Romaniuk и др., 2019].

1.3.2. Альтернативные функции теломеразной РНК

В отличие от TERT, ген которой преимущественно экспрессируется в активно делящихся клетках, таких как раковые, половые и стволовые, TR обнаруживается во всех клетках независимо от их пролиферативного статуса [Cong, Wright, Shay, 2002].

Недавние исследования продемонстрировали, что TR стимулирует пролиферацию клеток независимо от активности теломеразы, регулируя транскрипцию генов-мишеней сигнального пути PI3K-AKT. Кроме того, обнаружено, что ключевой фактор транскрипции FOXO1, который негативно регулируется путем PI3K-AKT, транскрипционно подавляет экспрессию *TERC*. Эти результаты демонстрируют новую петлю положительной обратной связи между TR и путем PI3K-AKT [Wu и др., 2022].

Ранее TR рассматривали как некодирующую lncRNA, которая совместно с каталитической субъединицей TERT образует теломеразный комплекс. Однако было показано, что TR осуществляет альтернативные функции, например, ингибирует апоптоз в иммунных клетках и участвует в реакции на повреждение ДНК, независимо от активности теломеразы [Gazzaniga, Blackburn, 2014; Kedde и др., 2006].

Есть данные о том, что TR усиливает экспрессию и секрецию воспалительных цитокинов, стимулируя путь NF-κB независимым от теломеразы образом [Liu и др., 2019].

Продемонстрировано, что нокдаун hTR в клеточной линии рака толстой кишки человека HCT116, приводит к подавлению экспрессии генов, связанных с ангиогенезом и метастазированием. Часть из этих подавляемых генов, включая Cyclin G2 и Cdc27, участвуют в регуляции клеточного цикла [Li и др., 2005; Romaniuk и др., 2019].

1.3.2.1. Кодированная функция теломеразной РНК

Долгое время теломеразную РНК классифицировали как некодирующую РНК. Однако, в ней присутствует открытая рамка считывания, трансляция которой приводит к синтезу белка, названного hTERP (human Telomerase RNA Protein) [Rubtsova и др., 2018]. Открытая рамка считывания, кодирующая белок hTERP, содержит 363 нуклеотида, первым из которых является аденин в положении 176 теломеразной РНК. Белок, содержащий 121 аминокислоту, может быть синтезирован в результате трансляции первичного транскрипта теломеразной РНК, который не подвергался процессингу для получения формы hTR, ассоциированной с теломеразным комплексом [Pakhomova и др., 2022; Rubtsova и др., 2018]. Существование этого белка подтверждено тремя независимыми методами – иммуноблоттинга, флуоресцентной микроскопии и масс-спектрометрии [Rubtsova и др., 2018]. Также установлено, что этот белок выполняет защитные функции в клетках в условиях доксорубицин-индуцированного апоптоза, а мутации, нарушающие N-конец hTERP, влияют на процессинг белка LC3, одного из основных участников формирования аутофагосомы [Rubtsova и др., 2018].

В стрессовых условиях в клетке происходит конкуренция апоптоза и аутофагии. Активация апоптоза приводит к гибели клеток, а аутофагия способствует выживанию. Ранее было показано, что экзогенная экспрессия *hTERC* дикого типа, а также ее мутантных форм, не образующих комплекс с hTERT, способствует выживанию клеток в условиях индукции апоптоза [Gazzaniga, Blackburn, 2014]. Согласно нашим данным мутации белка hTERP влияют на протекание аутофагии по неизвестному механизму, для выяснения которого необходимы дальнейшие исследования.

1.4. Аутофагия

1.4.1. Общие сведения

Впервые явление аутофагии обнаружено в 1960 годах, но из-за сложностей изучения о нем было мало известно до 1990х, когда японский молекулярный биолог Ёсинори Осуми провел эксперименты [Baba и др., 1994; Mizushima и др., 1998; Ohsumi, 1999; Takeshige и др., 1992; Tsukada, Ohsumi, 1993], в которых идентифицировал ключевые гены аутофагии пекарских дрожжей [Klionsky, 2008]. Позднее был объяснен весь процесс аутофагии в дрожжах и установлено, что в клетках человека существует аналогичный механизм – строго регулируемый клеточный процесс, в результате которого поврежденные белки или органеллы попадают в аутофагические везикулы, которые далее сливаются с лизосомами, где происходит разрушение и переработка захваченных компонентов [Chen, Gao, Su, 2021; Nakatogawa и др., 2009]. Аутофагия протекает в клетках как в нормальных условиях, так и в ответ на неблагоприятные условия среды, такие как стрессы вызванные гипоксией и дефицитом питательных веществ. Активация аутофагии в неблагоприятных условиях обусловлена необходимостью снабжения клеток питательными веществами и энергией, а также необходимостью поддержания клеточного гомеостаза [Chen, Gao, Su, 2021]. Снижение активности аутофагосом происходит при старении организма, а также является одним из распространенных факторов, ассоциированным с нейродегенерацией [Park, Kang, Lee, 2020].

Основываясь на том, как и какие именно части и компоненты клетки подвергаются деградации, выделяют три основных вида аутофагии в клетках млекопитающих: макроаутофагия, микроаутофагия и аутофагия, опосредованная шаперонами (Рис. 9) [Xiang и др., 2020]. В процессе макроаутофагии происходит захват компонентов цитоплазмы клеток двумембранными везикулами, называемых аутофагосомами, которые впоследствии сливаются с лизосомами, где их содержимое расщепляется [Hansen, Rubinsztein, Walker, 2018]. Макроаутофагия

может быть селективной и в зависимости от того, на деградацию чего она направлена выделяют большое количество ее селективных видов: митофагия, ксенофагия, агрефагия, ретикулофагия, ферритинофагия, гликофагия, рибофагия, липофагия, лизофагия, нуклеофагия и др. [Abdrakhmanov, Gogvadze, Zhivotovsky, 2020]. Микроаутофагия предполагает заключение компонентов цитоплазмы непосредственно в лизосому, где происходит их деградация, опосредованная кислыми гидролазами [Wang, Klionsky, Shen, 2023]. Аутофагия, опосредованная шаперонами, заключается в селективной деградации отдельных цитозольных белков, несущих KFERQ-подобный мотив, которые доставляются в лизосомы для деградации в комплексе с белками-шаперонами [Kaushik, Cuervo, 2018; Wang, Klionsky, Shen, 2023].

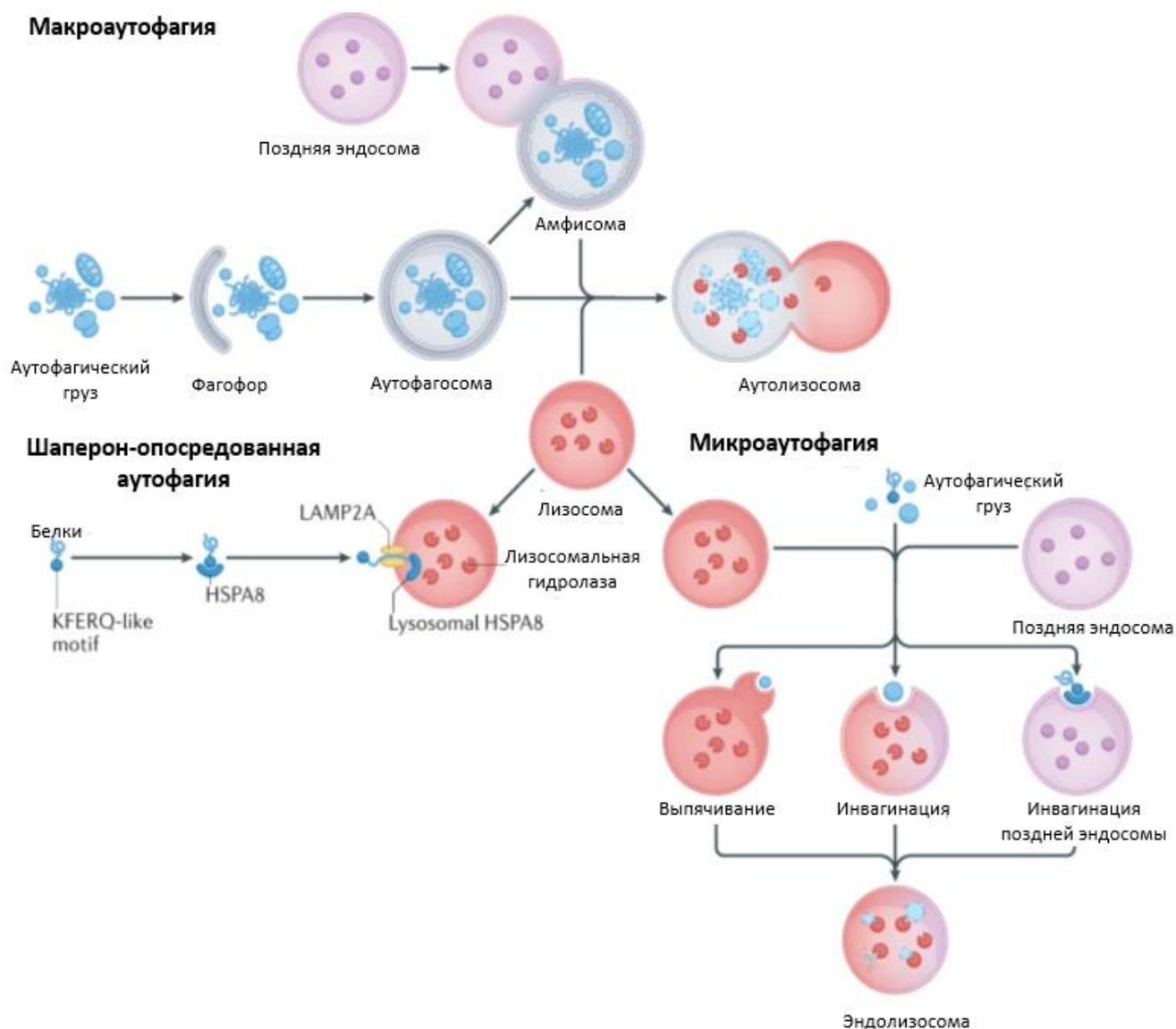


Рисунок 9. Схема макроаутофагии, микроаутофагии и шаперон-опосредованной аутофагии у млекопитающих (адаптировано из [Wang, Klionsky, Shen, 2023]).

В этой работе основное внимание уделяется макроаутофагии (далее называемой аутофагией).

1.4.2. Процесс аутофагии

Процесс аутофагии осуществляется рядом белков (ATG – autophagy-related proteins), и может быть разделен на пять основных последовательных этапов: (1)

инициация, (2) образование двумембранной пре-аутофагосомы или фагофора, (3) удлинение (рост) фагофора и захват цитоплазматического груза, (4) слияние аутофагосомы (полностью закрытого фагофора) с лизосомой, и (5) деградация захваченного груза в аутолизосомах (Рис. 10) [Hansen, Rubinsztein, Walker, 2018].

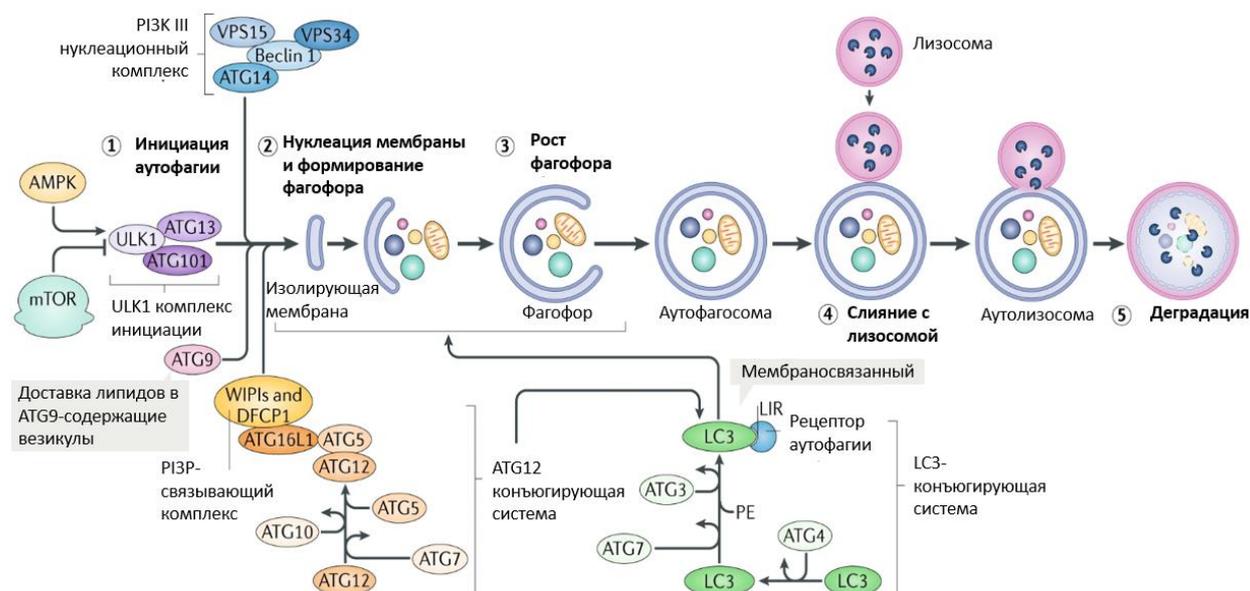


Рисунок 10. Схема, отображающая процесс, и основные механизмы, регулирующие макроаутофагию (адаптировано из [Wang, Klionsky, Shen, 2023]).

Коровые белки аутофагии, необходимые для образования аутофагосом и доставки их содержимого к лизосомам, объединены в функциональные комплексы [Dikic, Elazar, 2018]. На первом этапе комплекс ULK1, состоящий из киназы ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1), ATG13 (autophagy related protein 13), FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa) и ATG101, транслоцируется к сайтам инициации аутофагии и регулирует привлечение комплекса VPS34 (vacuolar sorting protein 34), в состав которого входят фосфатидилинозитол-3-киназа I класса III (PI3K), VPS34, ATG14L, VPS15 и Beclin 1. Комплекс VPS34 обеспечивает образование фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI3P) при формировании структуры фагофора. Появление PI3P служит сигналом начала формирования аутофагосомы. Увеличение размера фагофора происходит в

результате действия двух убиквитин-подобных конъюгирующих каскадов: ATG5-ATG12 и MAP-LC3/ATG8/LC3. По мере роста мембрана фагофора замыкается, образуя двумембранную аутофагосому, внутри которой случайным образом захватываются части цитоплазмы. Далее происходит слияние сформированной аутофагосомы с лизосомой с образованием аутолизосомы, внутри которой происходит деградация ее содержимого (Рис. 10) [Dikic, Elazar, 2018; Feng и др., 2014].

1.4.3. Регуляция аутофагии

Аутофагия подвергается регуляции на разных уровнях с участием молекул сигнальных каскадов клетки. Существует большое количество регуляторов аутофагии, которые находятся в сложных взаимодействиях друг с другом и в зависимости от условий, в которых находится клетка, могут оказывать разное воздействие на этот процесс. Среди них - сигнальные пути Ras/Raf/ERK и JNK [Cagnol, Chambard, 2010; Zhou и др., 2015], белок Beclin 1 [Vega-Rubín-de-celis, 2019], SIRT1 и p38 MAPK [Keil и др., 2013; Lee, 2019]. Однако наиболее изучены такие регуляторы аутофагии, как mTOR, PI3K/АКТ и AMPK (Рис.11).

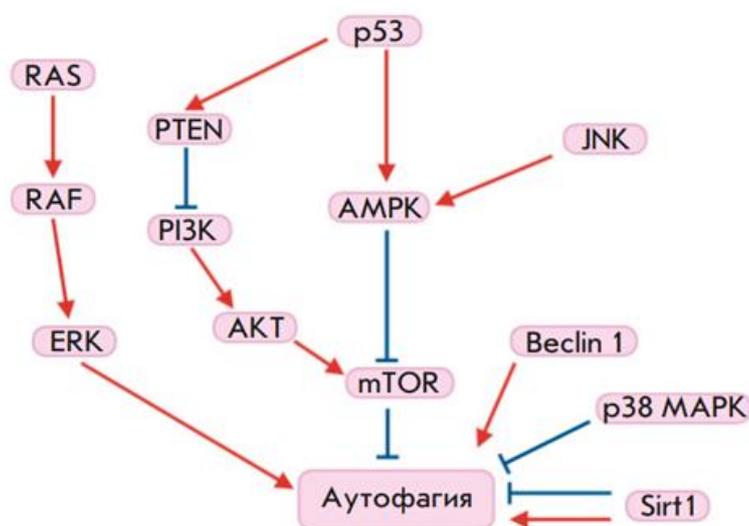


Рисунок 11. Схема, отражающая регуляторные механизмы аутофагии (по [Jiang и др., 2019]).

1.4.3.1. Роль mTOR в регуляции аутофагии

mTOR (mammalian target of rapamycin) – это серин-треониновая протеинкиназа, которая принимает участие в регуляции роста и метаболизма эукариотических клеток. Функционирование этой киназы осуществляется посредством двух комплексов – mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) и mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) [Sun и др., 2023].

В клетках млекопитающих mTORC1 фосфорилирует нижестоящие мишени и регулирует процессы трансляции мРНК, метаболизма и белкового обмена [Martina и др., 2012]. Ключевой активатор mTORC1 – малая ГТФаза Rheb [Тее и др., 2003]. Активность Rheb регулирует белок TSC2, входящий в состав комплекса TSC (Tuberous Sclerosis Complex), формируемого тремя белками – TSC1, TSC2 и TBC1D7 (Рис. 13) [Dibble и др., 2012; Menon и др., 2014]. Фосфорилирование АМПК (AMP-activated protein kinase) Thr в положении 1271 и Ser в положении 1387 активирует TSC2, что приводит к подавлению активности Rheb и, как следствие, ингибированию mTORC1 (Рис. 12) [Inoki, Zhu, Guan, 2003]. Кроме АМПК фосфорилировать TSC2 может киназа АКТ, которая участвует в ответе клеток на повреждение ДНК, воздействие факторов роста и в регуляции метаболизма глюкозы и гликолиза в раковых клетках [Skeen и др., 2006]. АКТ фосфорилирует Ser в положении 939 TSC2, что приводит к стимуляции активности mTORC1 и дальнейшему ингибированию аутофагии (Рис. 13) [Dibble, Cantley, 2015].

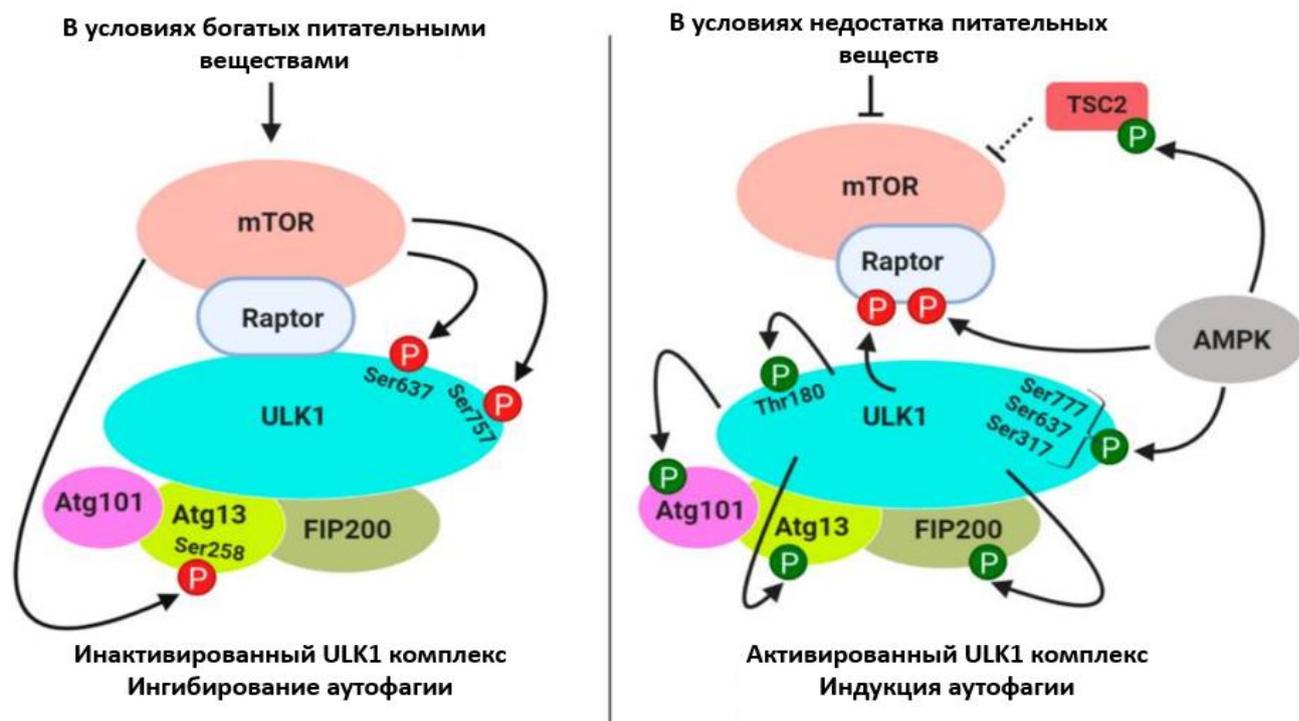


Рисунок 12. Регуляция комплекса ULK1 через mTOR (адаптировано из [Dossou, Basu, 2019])

Активированная mTORC1 фосфорилирует свои мишени – протеинкиназу рибосомного белка S6 (p70S6K) и белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E (4E-BP), что приводит к активации трансляции, росту и пролиферации клеток. Фосфорилирование Ser757 и Ser637 ULK1 ингибирует его активность (Рис. 12), препятствуя инициации аутофагии. Также происходит фосфорилирование ATG13 по Ser258 (показано на клетках HEK293T и MEF (mouse embryonic fibroblasts)) [Puente, Hendrickson, Jiang, 2016]. Однако в стрессовых условиях (например, при недостатке питательных веществ) происходит инактивация mTORC1, активация комплекса ULK1 за счет аутофосфорилирования по Thr180 или за счет фосфорилирования AMPK одного из остатков – Ser777, Ser637, Ser317. Также AMPK оказывает активирующее действие на ULK1 за счет негативной регуляции mTORC1 через фосфорилирование Raptor и TSC2 (Рис. 12). Активированный комплекс ULK1 фосфорилирует ATG13, FIP200 и ATG101. Происходит инициация аутофагии и образование аутофагосом [Klionsky, Schulman, 2014; Rabanal-Ruiz, Otten, Korolchuk, 2017].

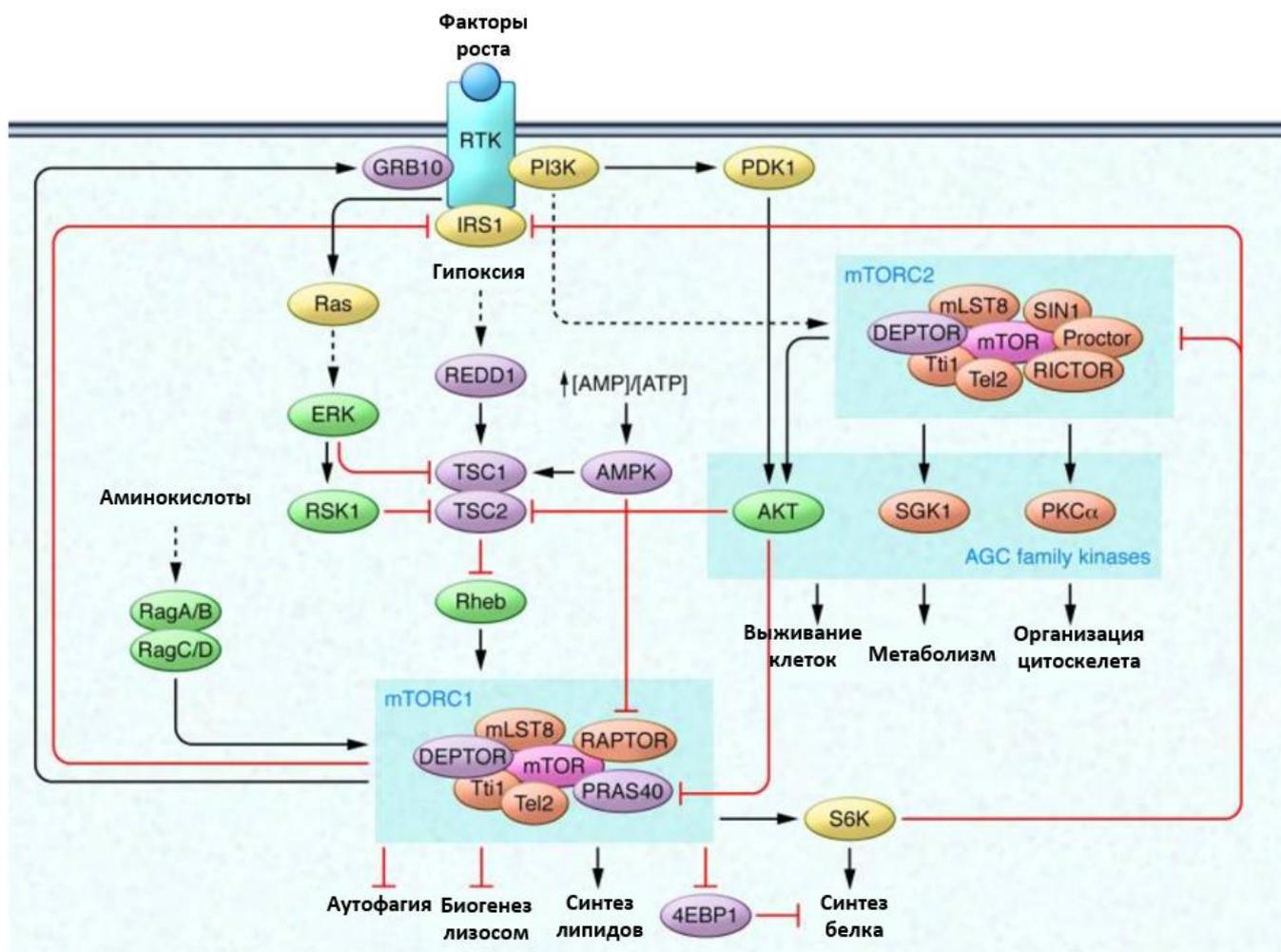


Рисунок 13. Сигнальная сеть mTOR (адаптировано из [Kim, Guan, 2015])

mTORC1 объединяет в себе контроль передачи сигналов от рецепторов факторов роста и информации о питательных веществах, стимулируя анаболические процессы, такие как синтез белка и липидов, в то же время ингибируя катаболические процессы, такие как биогенез лизосом и аутофагия [Kim, Guan, 2015].

Также mTORC1 играет важную роль в аутофагии, являясь одним из ее основных регуляторов [Rabanal-Ruiz, Otten, Korolchuk, 2017].

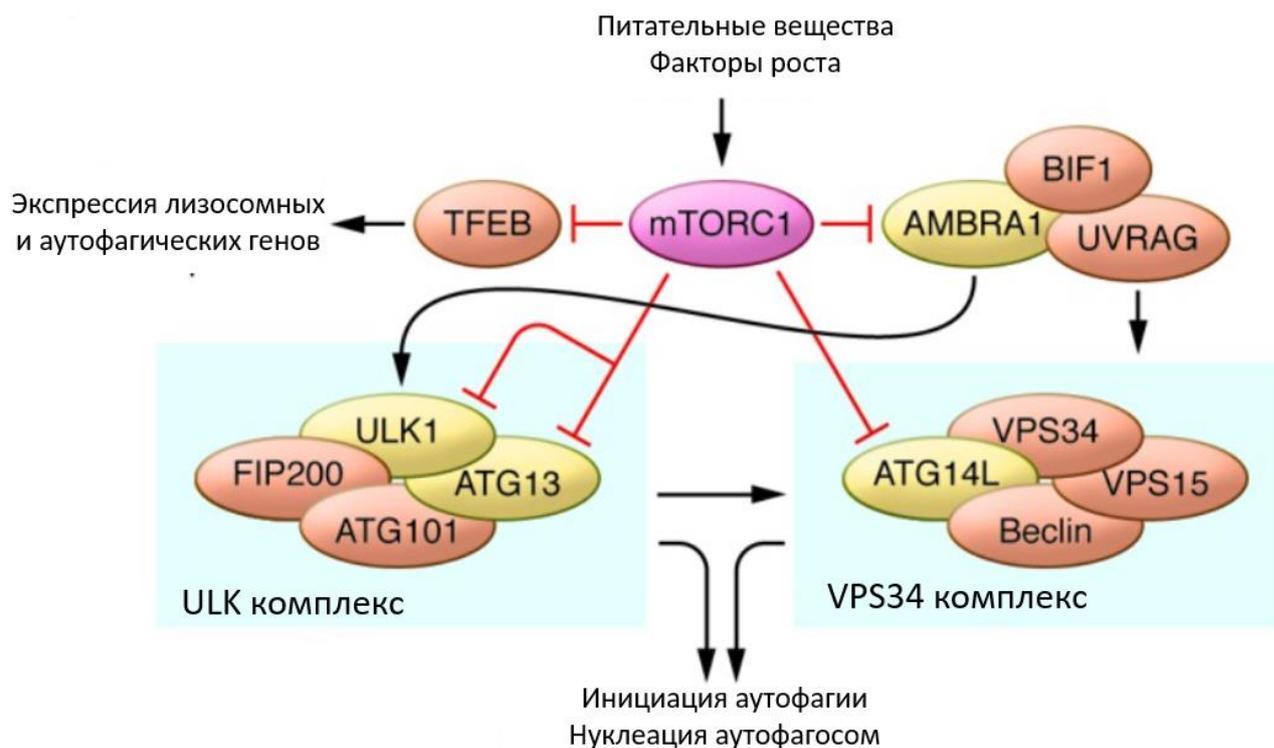


Рисунок 14. mTORC1 опосредованная регуляция аутофагии (адаптировано из [Kim, Guan, 2015])

Во время активации mTORC1 происходит ингибирование аутофагии за счет фосфорилирования таких мишеней, как ULK1, ATG13, AMBRA1 и ATG14L (Рис. 14). mTORC1 также модулирует локализацию и фосфорилирует транскрипционный фактор TFEB, который является ключевым регулятором экспрессии генов аутофагии и лизосомы [Kim, Guan, 2015].

1.4.3.2. Роль АМРК в регуляции аутофагии

АМРК – это один из ключевых регуляторов метаболизма у эукариот, который позволяет организмам приспособиться к неблагоприятным условиям среды [Tamargo-Gómez, Mariño, 2018]. АМРК регулирует рост клеток, метаболизм липидов и глюкозы, а также аутофагию [Herzig, Shaw, 2018]. АМРК отвечает за активацию альтернативных метаболических путей, если это необходимо [Tamargo-Gómez, Mariño, 2018]. Увеличение соотношений АМР/АТФ или АМР/АДП активирует АМРК. АМРК принимает участие в стимуляции аутофагии в условиях дефицита глюкозы, аминокислот и АТФ [González и др., 2020].

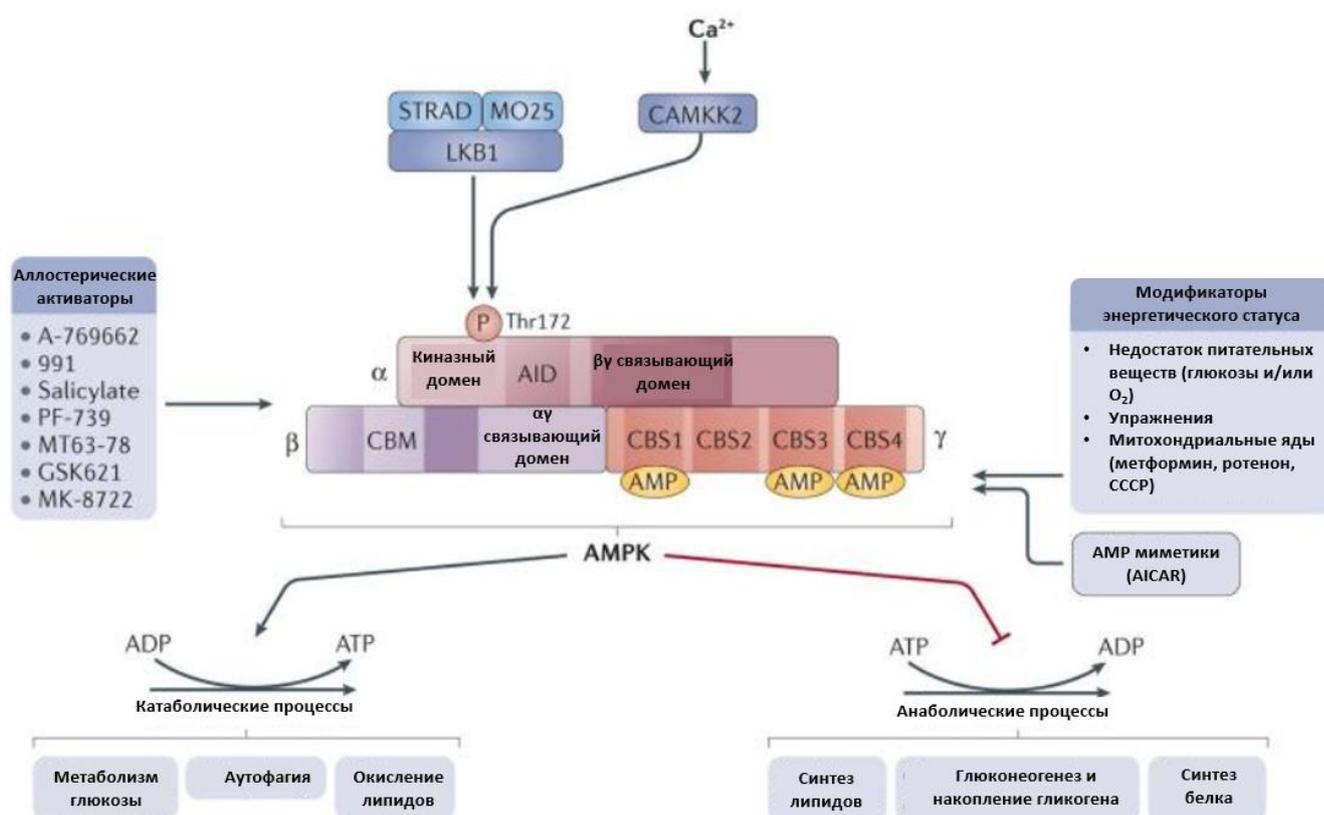


Рисунок 15. Структура и активация АМРК (адаптировано из [Herzig, Shaw, 2018])

АМПК ингибирует анаболические и активирует катаболические процессы, что необходимо для стабилизации энергетического баланса в клетке [Hardie, 2004].

Ввиду того что АМПК имеет большое влияние на энергетические процессы в клетке, ее активность регулируют несколько вышестоящих регуляторов (Рис. 15) [Herzig, Shaw, 2018]. Активация АМПК вышестоящими киназами происходит посредством фосфорилирования Thr в положении 172 каталитической субъединицы (Рис. 16) [Herzig, Shaw, 2018]. Одной из вышестоящих киназ, регулирующих активность АМПК, является киназа LKB1 [Woods и др., 2003]. Установлено, что LKB1 отвечает за активацию АМПК в условиях недостатка энергии и повреждения митохондрий [Shackelford, Shaw, 2009].

Также фосфорилирование Thr в положении 172 АМПК осуществляет киназа CAMKK2 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase), чувствительная к изменению уровня кальция, что связывает кальциевую передачу сигналов и регуляцию энергетического метаболизма клетки [Marcelo, Means, York, 2016].

Сама АМПК влияет на процесс аутофагии, фосфорилируя нижестоящие мишени. Во время активации АМПК способна фосфорилировать TSC2 и RAPTOR, что в свою очередь приводит к снижению активности комплекса mTORC1 (Рис. 13). Еще одной прямой мишенью АМПК является ULK1, фосфорилирование которого по Ser467, Ser555, Thr574 и Ser637 [Kim и др., 2011; Papinski, Kraft, 2016], приводит к его активации. Белок ATG13, компонент ULK1 комплекса, является прямой мишенью не только самого ULK1, но и мишенью АМПК и mTORC1 [Puentes, Hendrickson, Jiang, 2016].

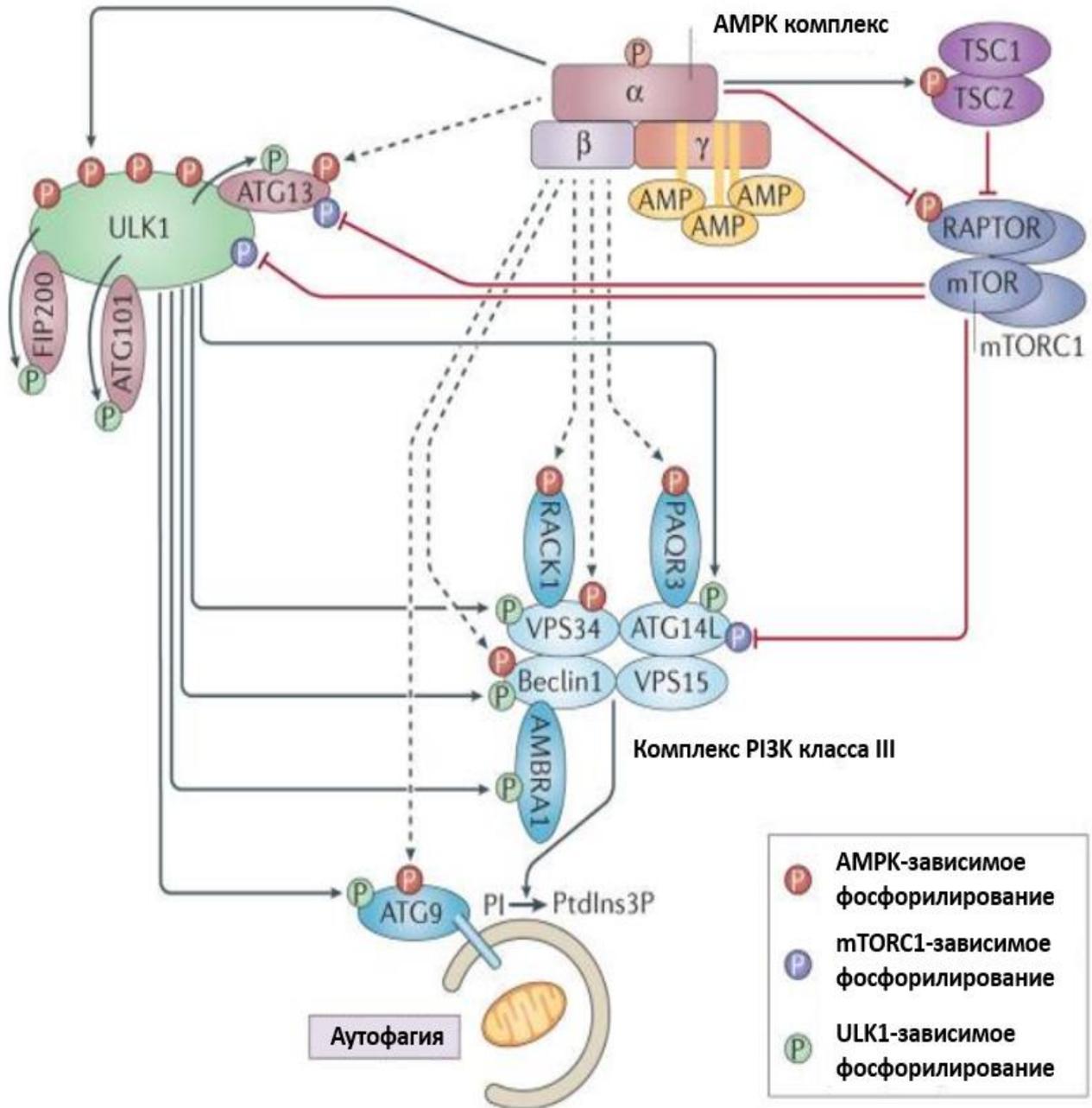


Рисунок 16. Регуляция аутофагии mTOR, AMPK и ULK1 (адаптировано из [Herzig, Shaw, 2018]). Стрелки отображают, ингибирующим или активирующим событием для белка является фосфорилирование по указанному сайту.

1.4.4. Теломераза и аутофагия

TERT ингибирует киназную активность комплекса mTORC1 во многих клеточных линиях, что приводит к активации аутофагии как в базовых условиях, так и в условиях отсутствия аминокислот. Кроме того, клетки с дефицитом TERT демонстрируют неспособность должным образом поддерживать уровень аутофагии. Функционально TERT-индуцированная аутофагия обеспечивает преимущество выживания клеток в условиях недостатка питательных веществ [Ali и др., 2016].

Показано, что TERT участвует в регуляции активности гексокиназы II (HK II) – важного фермента гликолиза, который катализирует его самую первую стадию – превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат [Roh и др., 2018]. В условиях недостатка глюкозы HK II ингибирует mTORC1, приводя к переходу от гликолиза к аутофагии [Roberts, Miyamoto, 2015]. Установлено, что активация HK II, обусловленная TERT, приводит к снижению активности mTORC1 и, как следствие, к аутофагии [Roh и др., 2018].

Недостаток теломеразы снижает эффективность аутофагии, вызванной дефицитом аминокислот. Теломераза активирует аутофагию в условиях голода по глюкозе [Ali и др., 2016; Harris, Cheng, 2016]. Альтернативно, аутофагия, опосредованная Beclin 1, снижает активность теломеразы, что позволяет предположить, и обратную связь между теломеразой и аутофагией [Tajiri и др., 2017]. Данные свидетельствуют в пользу того, что теломераза защищает клетки от стрессов, активируя аутофагию, а активность теломеразы может быть подавлена в условиях активации аутофагии посредством отрицательной обратной связи [Roh и др., 2018].

Таким образом, пролиферация клеток зависит от активности теломеразы и наличия питательных веществ, которые могут быть получены в результате активации аутофагии и исследование взаимосвязи процессов функционирования компонентов теломеразы и аутофагии является актуальной перспективной задачей, а

выявленные закономерности позволят приблизиться к пониманию механизмов опухолеобразования, старения и регенерации.

2. Результаты и обсуждение

Ключевой целью данной работы являлось определение роли белка hTERP в регуляции аутофагии. Ранее в нашей лаборатории показано, что теломеразная РНК человека кодирует белок hTERP, а мутации, нарушающие N-конец hTERP, влияют на процессинг белка LC3, одного из основных участников формирования аутофагосомы [Rubtsova и др., 2018].

В ходе настоящей работы требовалось подтвердить трансляцию теломеразной РНК человека, а также установить участие белка hTERP в регуляции аутофагии и выявить сигнальный каскад, в регуляции которого участвует белок hTERP.

2.1. Создание клеточной линии с белком hTERP тегированным HiViT

Ранее мы столкнулись с проблемой получения антител против белка hTERP. Получаемые антитела обладали низкой специфичностью. Для решения проблемы детекции белка hTERP мы решили создать клеточную линию, в которой белок hTERP содержит дополнительный аффинный довесок на С-конце. В качестве аффинного довеска выбрали короткий пептид HiViT, состоящий из 11 аминокислот. Малая длина пептида позволяет с высокой долей вероятности исключить его влияние на свойства изучаемого белка, а его способность, связываясь с большой субъединицей LgViT, образовывать активную люциферазу позволяет с высокой чувствительностью детектировать химерный белок. Интенсивность люминесценции прямо пропорциональна количеству HiViT-меченого белка в клеточном лизате [Schwinn и др., 2018].

Линия HEK293T, в которой на С-конец белка hTERP присоединена последовательность HiViT, была создана с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. После трансфекции плазмидой, кодирующей гидовую последовательность для Cas9, и одноцепочечного олигонуклеотида-

матрицы для гомологичной рекомбинации, клетки рассаживали на моноклоны, далее из них выделяли геномную ДНК, проводили ПЦР с праймерами, специфичными редактируемой области генома и анализировали длину продукта методом электрофореза в агарозном геле. Ожидали увидеть более длинный продукт ПЦР в случае встраивания в нужную область последовательности, кодирующей HiViT. Среди проанализированных четырех 96-луночных планшетов был отобран один моноклон, для которого наблюдали один ПЦР-продукт ожидаемой длины (больше, чем в диком типе), что свидетельствует о встраивании HiViT-тега в оба аллеля геномной последовательности (Рис. 17). Встраивание HiViT в нужную область геномной последовательности подтвердили при помощи секвенирования по Сэнгеру (Рис. 18).

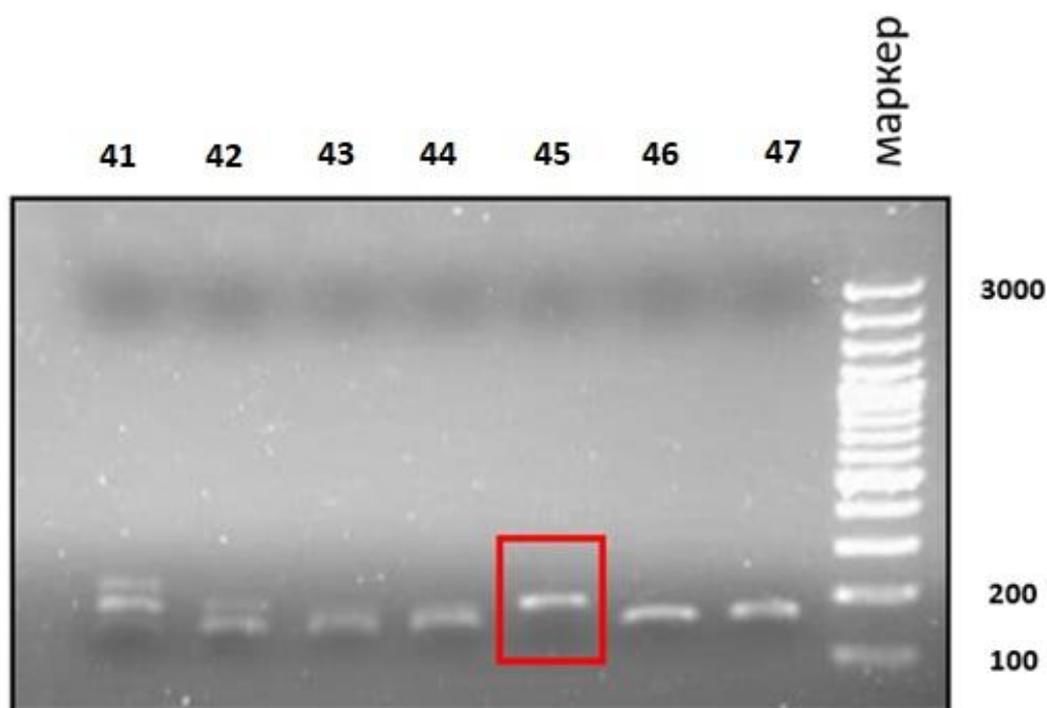


Рисунок 17. Анализ результатов геномного редактирования при помощи ПЦР. Фотография агарозного геля после разделения продуктов ПЦР. 41-47 – номера анализируемых моноклонов. Моноклон, выбранный для дальнейшего анализа отмечен красной рамкой.

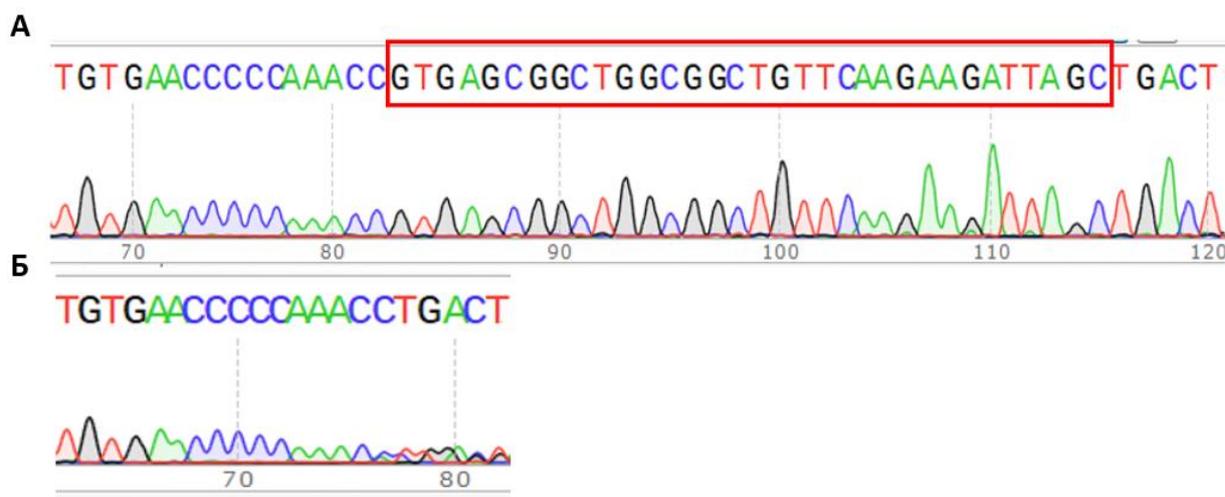


Рисунок 18. Анализ результатов геномного редактирования при помощи секвенирования по Сэнгеру. А) Хроматограмма, демонстрирующая встраивание последовательности, кодирующей HiBiT, в конец кодирующей hTERP области. Красным выделена нуклеотидная последовательность HiBiT. Б) Хроматограмма клеток HEK293T дикого типа, демонстрирующая конец кодирующей hTERP области.

Создание клеточной линии hTERP-HiBiT было необходимо для подтверждения трансляции теломеразной РНК человека, в процессе которой образуется белок hTERP. После подтверждения встраивания нуклеотидной последовательности в нужную область генома необходимо было убедиться, что химерный белок синтезируется в клетках.

Для этого нами были проведены эксперименты по определению hTERP-HiBiT меченного белка в клетках. Определение общего тегированного белка проводили в клеточных лизатах с использованием коммерческого набора Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega). Интенсивность люминесценции, образующейся в результате активности люциферазы, прямо пропорциональна количеству тегированного белка в клетках. Отрицательным контролем выступали образцы, содержащие лизаты клеток HEK293T дикого типа. В качестве положительного контроля использовали созданную нами клеточную линию

HEK293T, в которую случайным образом интегрировали в геном последовательность, кодирующую химерный белок GFP-HiBiT. Фоновые значения люминесценции определяли по лункам, содержащим только культуральную среду и лизирующий буфер.

На Рис. 19 приведен график с результатами измерения люминесценции. Статистически значимых различий в люминесценции между клетками дикого типа и клетками, содержащими тегированный HiBiT белок, выявлено не было. Эти результаты можно объяснить малым количеством белка hTERP в клетках.

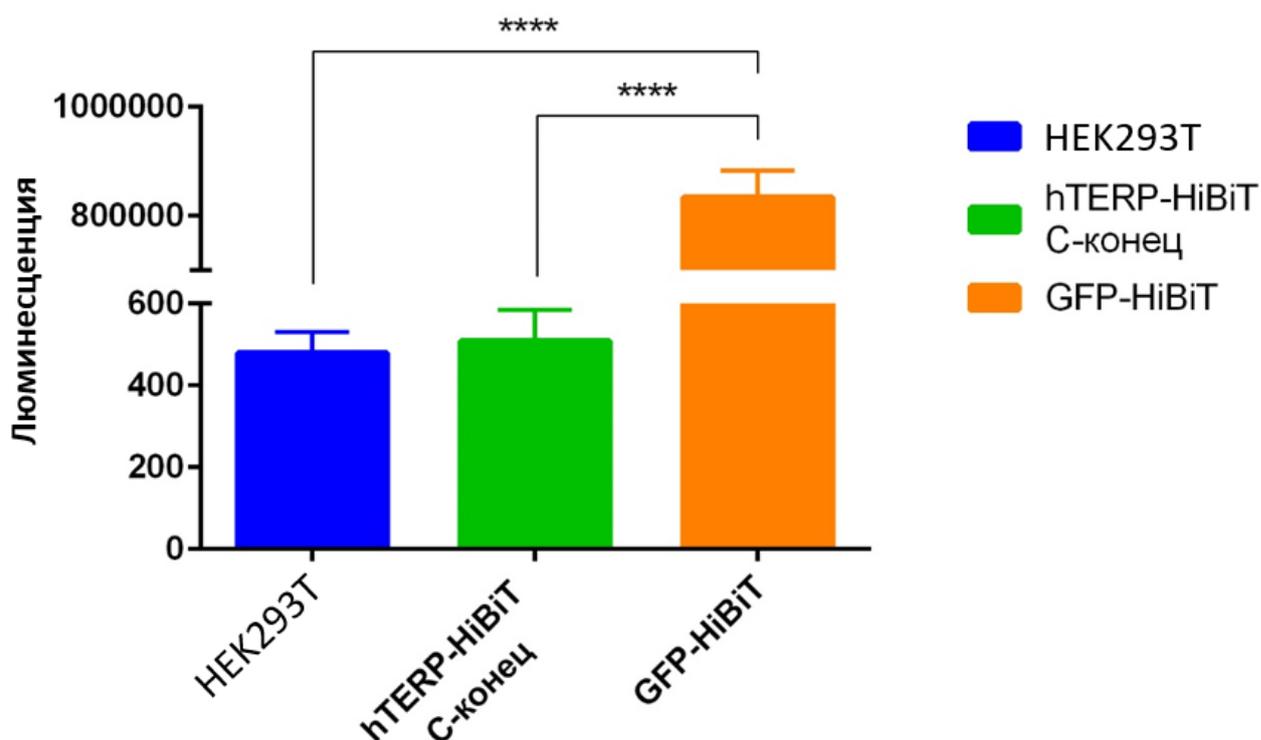


Рисунок 19. Сравнение интенсивности люминесценции в клетках HEK293T дикого типа, содержащих hTERP-HiBiT тегированный белок (С-конец), и клетках, содержащих GFP-HiBiT белок. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Сравнения проведены с использованием однофакторного дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения GraphPad. $***p < 0,0001$. Каждый столбик отражает результаты трех независимых экспериментов с двумя техническими повторностями.

Далее для подтверждения синтеза химерного белка в клетках мы решили использовать метод блоттинга. Детекцию сигнала осуществляли при помощи коммерческого набора Nano-Glo HiBiT Blotting System (Promega) без использования антител, а присутствие HiBiT определяется по активности люциферазы при добавлении LgBiT и субстрата. Этим способом можно увеличить время накопления сигнала фермента, а также определить молекулярную массу белка, тегированного HiBiT. Сигнал накапливался в течение 30 часов. В результате установлено, что химерный белок hTERP-HiBiT синтезируется в полученной клеточной линии (Рис. 20).

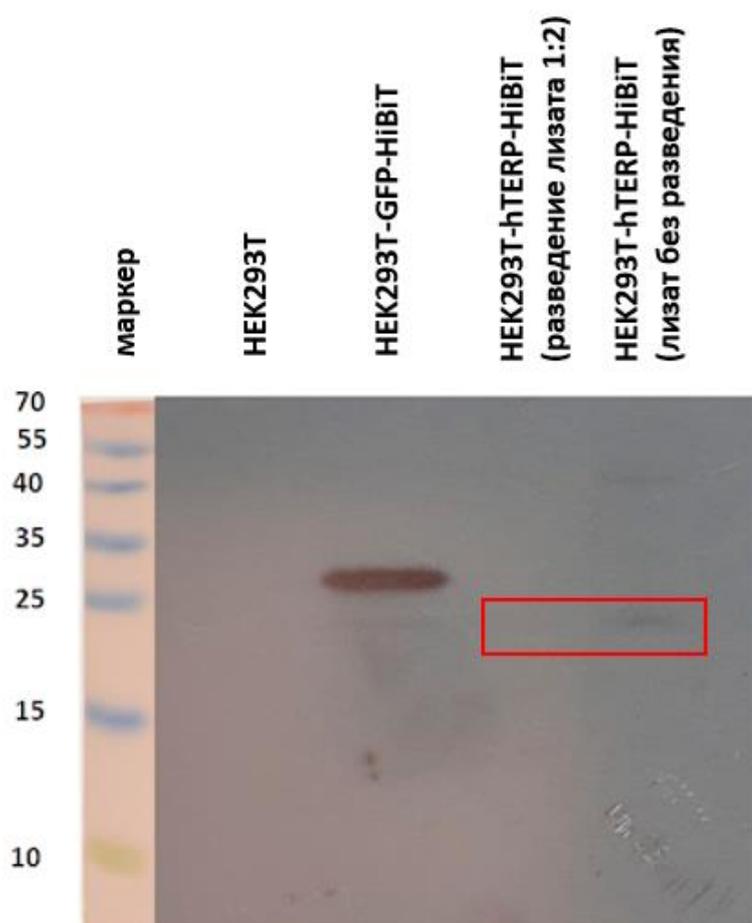


Рисунок 20. Результаты блоттинга лизатов полученной клеточной линии, в которой присутствует hTERP-HiBiT. Красным выделен фрагмент мембраны, где наблюдается исследуемый белок. Лизат готовили из клеток выращенных в лунке 6-ти луночной плашки (конфлюентность 90%) в 70 мкл лизирующего буфера; нанесение на дорожку – 20 мкл.

Таким образом, мы доказали, что белок hTERP является продуктом трансляции теломеразной РНК человека. В дальнейшей работе мы сосредоточились на выяснении роли белка hTERP в функционировании клеток, для чего использовали, полученную ранее в лаборатории при помощи редактирования генома клеточную линию НЕК293Т, в которой белок hTERP отсутствует.

По данным литературных источников мутации в hTR могут влиять на активность теломеразы [Liu и др., 2022], что будет оказывать влияние на различные процессы внутри клетки. Необходимо было убедиться в том, что мутация, инактивирующая трансляцию теломеразной РНК не влияет на функционирование теломеразы.

2.2. Влияние делеции нуклеотидов 184-188 в hTR на функционирование теломеразы

Ранее в результате редактирования в клетках линии НЕК293Т методом CRISPR-Cas9 были удалены 5 нуклеотидов в положении 184-188 гена *hTERC* и получена клеточная линия dTERP НЕК293Т, в которой биосинтез белка hTERP невозможен из-за делеции стартового кодона открытой рамки считывания. Данные нуклеотиды входят в состав спирали P1, которая образуется за счет комплементарных взаимодействий между участками hTR и способствует формированию структуры псевдоузла [Chen, Blasco, Greider, 2000]. Так как спираль P1 имеет ключевую роль в обеспечении точности обратной транскрипции, нельзя было исключить, что такая мутация будет влиять на функционирование теломеразы [Voou и др., 2012].

Для нашей дальнейшей работы важно удостовериться, что вносимая в hTR мутация не будет оказывать влияние на функционирование теломеразы, т.к. нарушения в теломерах приводят к изменениям метаболической активности клеток. Для выполнения этой задачи мы сравнили уровень активности теломеразы,

а также количество и локализацию каталитической субъединицы теломеразы в hTERP-дефицитных клетках и клетках дикого типа.

2.2.1. Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на активность теломеразы

Определение активности теломеразы проводили методом TRAP (протокол амплификации теломерных повторов) с использованием ПЦР в реальном времени (Рис. 21). Для определения влияния мутаций в hTR на активность теломеразы мы использовали клетки линии HEK293T дикого типа и клетки dhTERP HEK293T. Статистически значимых различий в активности теломеразы между клетками дикого типа и мутантными клетками выявлено не было.

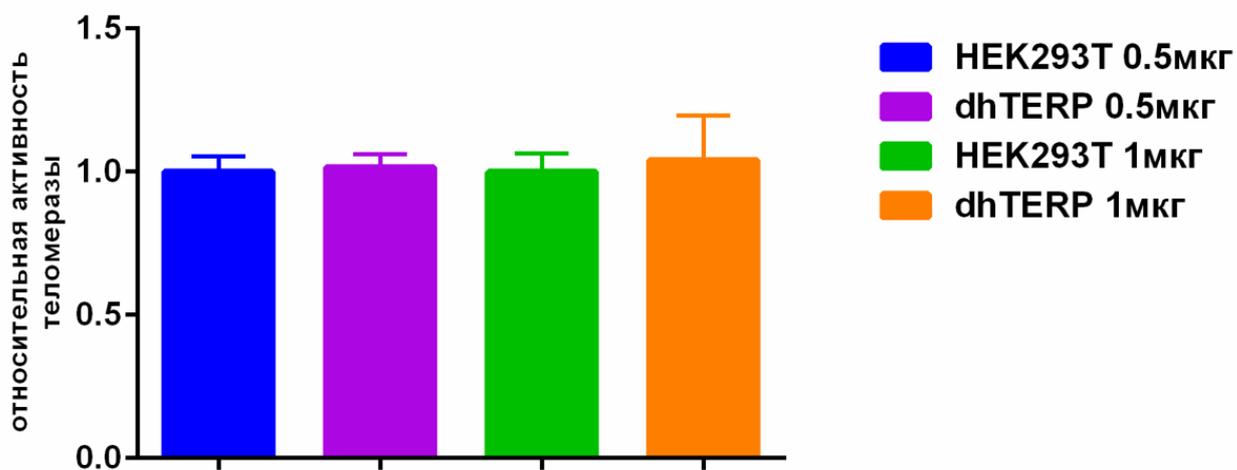


Рисунок 21. Делеция нуклеотидов 184-188 теломеразной РНК человека не влияет на активность теломеразы. Гистограмма, демонстрирующая уровень активности теломеразы в клетках дикого типа (HEK293T) и dhTERP HEK293T (dhTERP), согласно результатам RQ-TRAP анализа. Каждый столбик отражает результаты трех независимых экспериментов с тремя техническими повторностями.

2.2.2. Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на экспрессию hTERT

Для определения количества hTERT в клетках дикого типа HEK293T и клетках dhTERT HEK293T использовали метод иммуноблотинга (Рис. 22). В качестве контроля нормировки проводили анализ количества GAPDH. Статистически значимых различий в уровне экспрессии hTERT между клетками дикого типа и мутантными клетками выявлено не было.

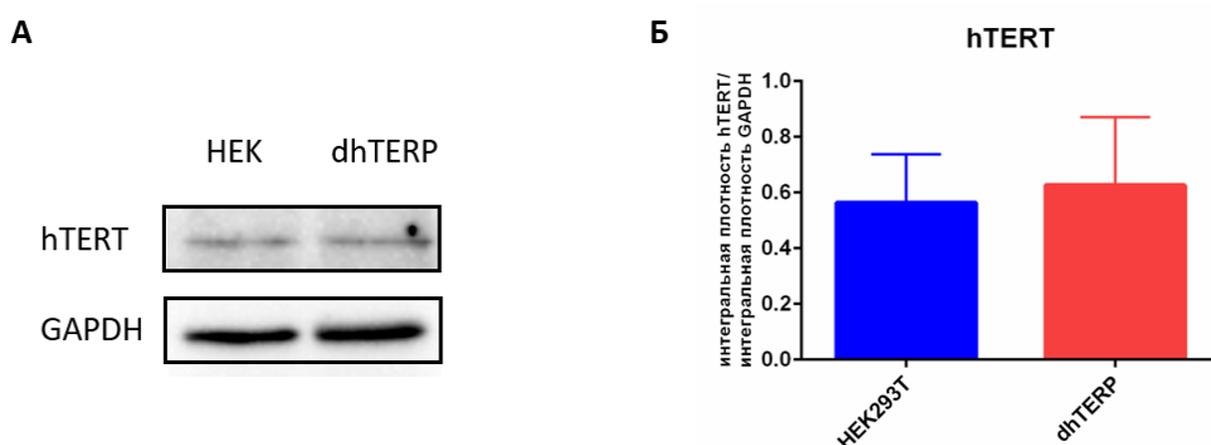


Рисунок 22. Экспрессия hTERT в клетках дикого типа HEK293T (HEK) и dhTERT HEK293T (dhTERT). А) Иммуноблотинг лизатов из клеток дикого типа HEK293T и dhTERT HEK293T Б) Количественная оценка уровня экспрессии. Столбцы отражают отношение интегральной плотности hTERT к интегральной плотности GAPDH; данные получены в трех независимых экспериментах

2.2.3. Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на локализацию hTERT

По данным из литературных источников, hTERT имеет и ядерную, и цитоплазматическую локализацию [Куо и др., 2003]. Сравнение локализации hTERT в клетках HEK293T дикого типа, и клетках dhTERT HEK293T осуществляли методом цитохимии (Рис. 23). В качестве отрицательного контроля в данных

экспериментах использовали образцы, окрашенные только вторичными антителами. Различий в локализации hTERT между клетками HEK293T дикого типа и клетками dhTERT HEK293T не выявлено.

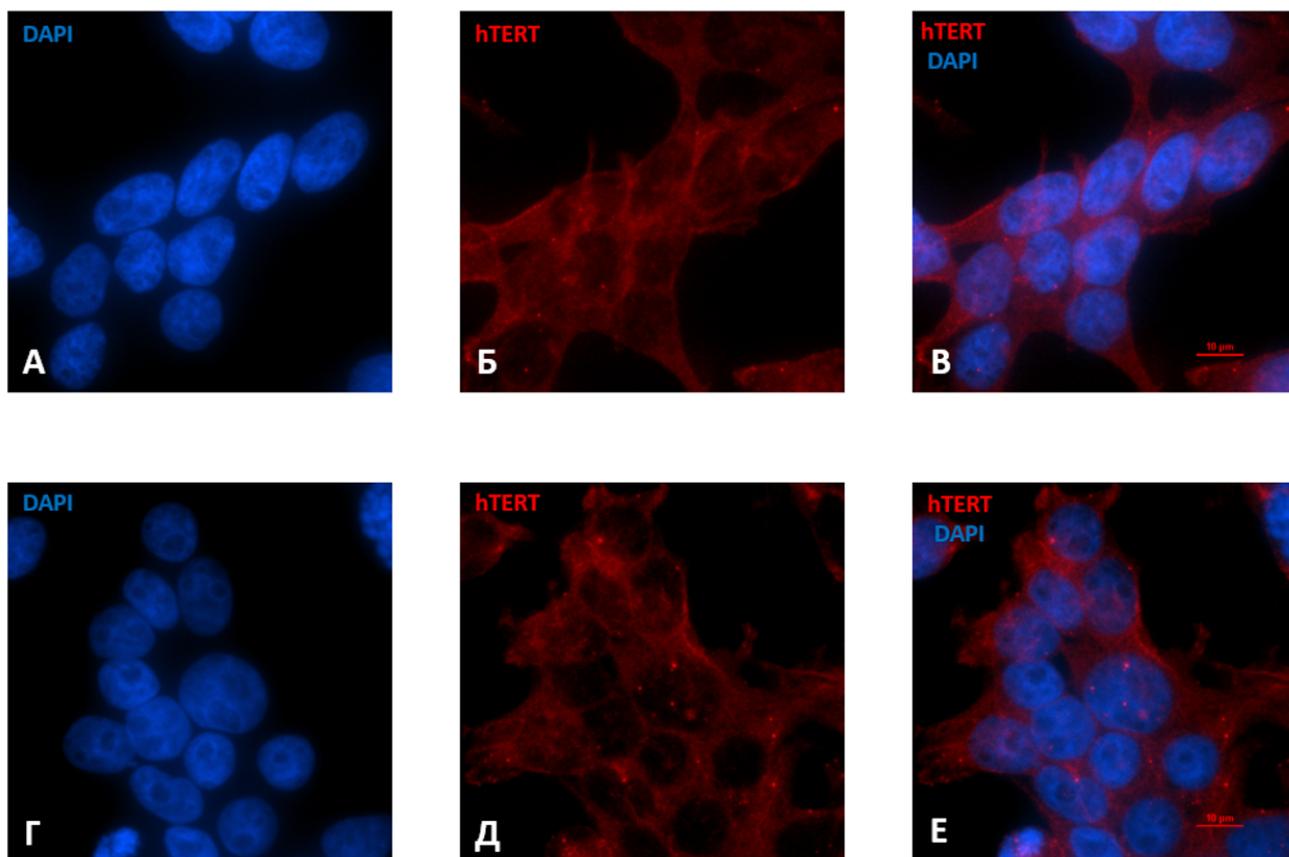


Рисунок 23. Иммунолокализация hTERT в клетках HEK293T дикого типа и клетках dhTERT HEK293T. Окраска клеток HEK293T (А), (Б), (В) и клеток dhTERT HEK293T (Г), (Д), (Е) первичными антителами на hTERT и вторичными антителами с Cy5 меткой; синий – ядра, окрашенные DAPI; красный – hTERT; бар – 10 мкм

Спираль P1 можно разделить на две области – P1a и P1b [Chen, Greider, 2003]. Нуклеотиды 184-186 hTR располагаются в линкерной области сразу после псевдоузла до спирали P1b (три нуклеотида), а 187-188 входят в состав самой спирали (Рис. 24). Мутация приводит к удлинению линкерного участка, но спираль P1b по-прежнему продолжает формироваться (хотя и в более коротком варианте –

остается 3 комплементарные пары из 5) и тем самым, ограничение матрицы по-прежнему присутствует. Удаление одноцепочечного участка из трех нуклеотидов между псевдоузлом и спиралью P1b может быть скомпенсировано за счет линкерного участка между матрицей и спиралью P1b и hTERT по-прежнему может связываться с hTR и оставаться активной.

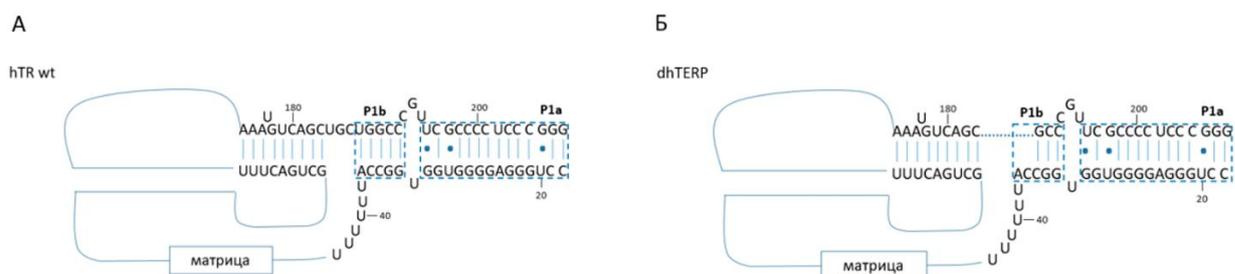


Рисунок 24. Схема фрагмента вторичной структуры hTR (по [Anderson и др., 2015; Nguyen и др., 2018; Rubtsova и др., 2018]). А) Фрагмент вторичной структуры hTR клеток HEK293T дикого типа; Б) Фрагмент вторичной структуры hTR клеток dhTERP HEK293T.

Из полученных нами данных видно, что уровень экспрессии, локализация hTERT и активность теломеразы не отличается в клетках HEK293T дикого типа и в клетках dhTERP HEK293T. Данные результаты позволяют утверждать, что делеция нуклеотидов 184-188 спирали P1 не приводит к глобальным пространственным перестройкам структуры hTR – матрица для синтеза теломерных повторов остается доступной для фермента и нет затруднений для сборки теломеразного комплекса.

Все это позволяет заключить, что все эффекты, наблюдаемые в клетках dhTERP HEK293T, вызваны именно отсутствием белка hTERP, а не изменениями в функционировании теломеразы, которые могли возникнуть из-за модификаций hTR.

После того, как мы убедились, что выбранная нами клеточная линия пригодна для исследования эффектов, вызываемых отсутствием белка hTERP, мы

перешли к непосредственному определению участия и роли данного белка в процессе аутофагии.

2.3. Участие белка hTERP в процессе аутофагии

В предыдущих работах показано, что мутации нарушающие N-конец hTERP оказывают влияние на базальный уровень аутофагии [Rubtsova и др., 2018]. Чтобы исследовать, участвует ли и как именно участвует hTERP в регуляции сигнальных путей, мы использовали клеточные линии dhTERP HEK293T, HEK293T дикого типа, а также HEK293T и теломеразо-негативные U2OS с эктопической сверхэкспрессией белка.

Клеточные линии с эктопической экспрессией конструкции, кодирующей белок hTERP, тегированный HA-тагом, были получены с использованием системы с транспозазой Sleeping Beauty [Kowarz, Löscher, Marschalek, 2015]. Мы получили клеточные линии с индуцированной доксициклином экспрессией hTERP-3HA и только 3HA в качестве контроля путем интеграции экспрессирующей кассеты в геном клеток. После трансфекции клетки культивировали в среде с антибиотиком для отбора модифицированных клеток. Отобранные клетки обрабатывали доксициклином для индукции экспрессии hTERP-3HA и 3HA. Экспрессия hTERP-3HA была подтверждена вестерн-блоттингом с использованием антител, специфичных к HA-эпиту.

Развитие аутофагии оценивали по отношению форм LC3I и LC3II. В процессе аутофагии происходит образование аутофагосом, которые можно определить по наличию белка LC3 (белок, ассоциированный с микротрубочками, легкая цепь 3), который необходим для их созревания. Под действием протеазы ATG4 происходит расщепление LC3, образуется LC3I форма, оканчивающаяся остатком глицина (Рис. 25). Конъюгация фосфатидилэтаноламина (PE) к концевому остатку глицина LC3I при участии ATG7, ATG3 и комплекса ATG12-ATG5-ATG16L превращает его в LC3II. Уровень белка LC3II является показателем количества аутофагосом [Zhang и др., 2019].

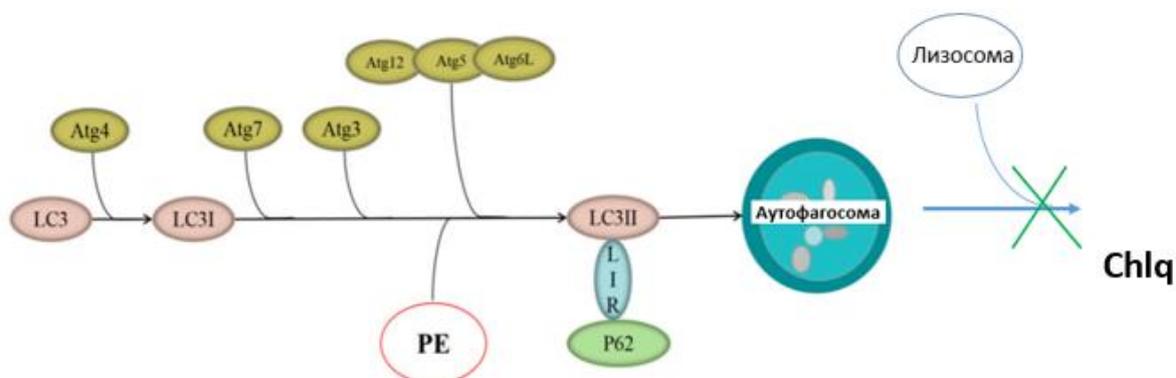


Рисунок 25. Схема превращения LC3I в LC3II (*Chl* (*chloroquine*) – хлорохин, *LIR* (*LC3 interaction region*) - область взаимодействия с LC3, *p62* (*ubiquitin-binding protein p62*) – убиквитинсвязывающий белок *p62*, адаптировано из [Zhang и др., 2019])

Превращение LC3I в LC3II в результате конъюгации фосфатидилэтаноламина к LC3I во время аутофагии анализировали вестерн-блоттингом в условиях ингибирования слияния аутофагосомы с лизосомой при добавлении хлорохина [Kabeва и др., 2000].

Чтобы исследовать роль hTERP в прогрессии аутофагии, мы помещали клетки в условия недостатка аминокислот или обрабатывали 5-аминоимдазол-4-карбоксамид рибонуклеотидом (AICAR). Каждое из этих условий оказывает влияние на сигнальные пути, связанные с инициацией аутофагии и пролиферацией клеток (Рис. 26). В условиях недостатка аминокислот происходит ингибирование mTORC1 и стимуляция аутофагии. Добавление AICAR активирует AMPK и вызывает аутофагию [Kim и др., 2016]. Более того, AMPK-индуцированная активация АКТ приводит к стимуляции компенсаторных механизмов обеспечения выживания и ингибированию аутофагии [Leclerc и др., 2010; Zhao и др., 2017].

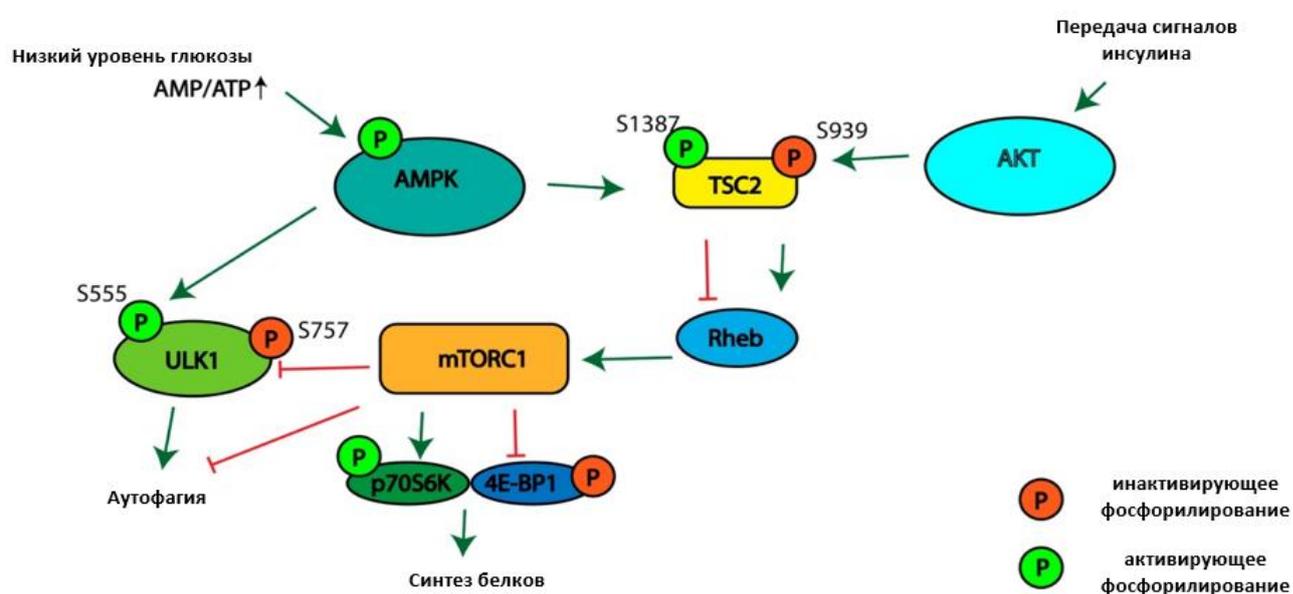


Рисунок 26. Схема, иллюстрирующая сигнальные пути, участвующие в регуляции активности mTORC1, аутофагии и синтезе белка.

Мы обнаружили, что недостаток аминокислот приводит к ингибированию аутофагии, в то время как обработка AICAR активирует аутофагию в клетках с дефицитом hTERP (Рис. 27 А, Б, Д). Оверэкспрессия hTERP в клетках НЕК293Т активировала аутофагию при дефиците аминокислот (Рис. 27 В, Д), и ингибировала ее в клетках, обработанных AICAR (Рис. 27 Г, Д).

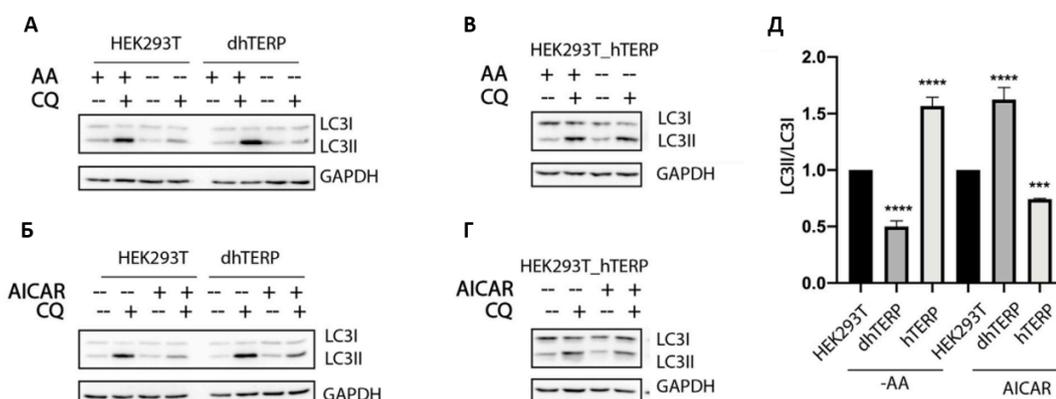


Рисунок 27. *hTERP* влияет на протекание аутофагии. (А, Б) Анализ содержания белка LC3 в лизатах клеток дикого типа и клеток *dhTERP* HEK293T в нормальных условиях (AA+) и в условиях недостатка аминокислот (AA-) методом иммуноблоттинга (А) в нормальных условиях и при обработке AICAR (Б). Слияние аутофагосом с лизосомами блокировали, обрабатывая клетки 10 мкМ хлорохина (CQ). GAPDH использовали в качестве контроля нанесения. (В, Г) Анализ содержания белка LC3 в лизатах клеток дикого типа и клеток сверхэкспрессирующих *hTERP*-ЗНА методом иммуноблоттинга в нормальных условиях (AA+) и в условиях недостатка аминокислот (AA-) (В) в нормальных условиях и при обработке AICAR (Г). (Д) Количественная оценка степени превращения LC3I в LC3II в клетках HEK293T дикого типа, *dhTERP* и сверхэкспрессирующих *hTERP*, в условиях недостатка аминокислот или обработанных AICAR. Соотношение LC3II к LC3I в обработанных хлорохином клетках, в условиях недостатка аминокислот (А, В), или в клетках, обработанных AICAR (Б, Г), нормализовали к отношению LC3II к LC3I в обработанных хлорохином клетках, культивируемых в нормальных условиях. Скорость конверсии LC3 для мутантных клеток нормировали по такому же отношению для клеток дикого типа. Скорость превращения LC3I в LC3II определяли по трем независимым экспериментам (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего) и количественно определяли с использованием программного обеспечения GraphPad. *** $p < 0,001$ по критерию множественных сравнений Данетта.

Оверэкспрессия hTERP в теломеразо-негативных клетках U2OS приводила к ингибированию аутофагии в условиях недостатка аминокислот (Рис. 28 А, В) и после обработки AICAR (Рис. 28 Б, В).

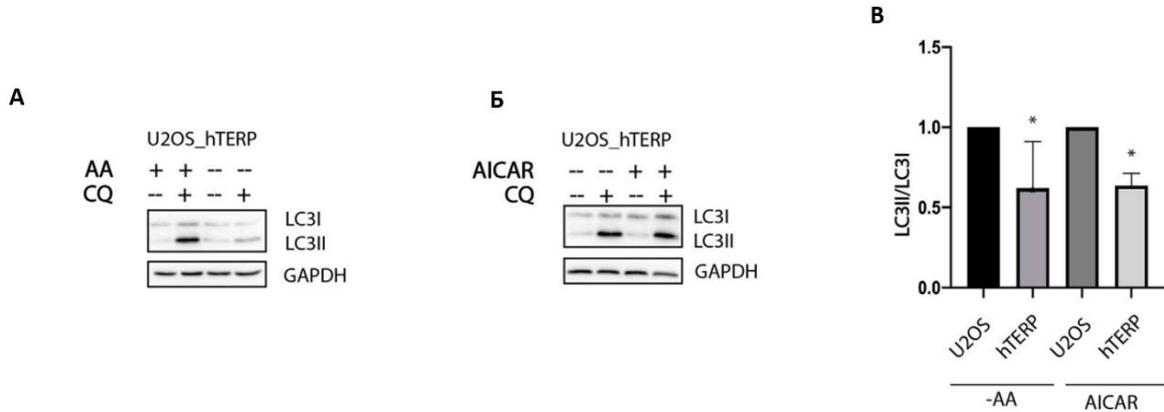


Рисунок 28. Анализ эффективности протекания аутофагии в клетках U2OS дикого типа и оверэкспрессирующих hTERP-ЗНА. Анализ конверсии LC3. Анализ содержания белка LC3 в лизатах клеток дикого типа и клеток оверэкспрессирующих hTERP-ЗНА методом иммуноблоттинга в нормальных условиях (AA+) и в условиях недостатка аминокислот (AA-) (А) в нормальных условиях или при обработке AICAR (Б). (В) Количественная оценка степени превращения LC3I в LC3II в клетках U2OS дикого типа и оверэкспрессирующих hTERP, в условиях недостатка аминокислот или обработанных AICAR. Соотношение LC3II к LC3I в обработанных хлорохином клетках, в условиях недостатка аминокислот (А), или клетках, обработанных AICAR (Б), нормировали к отношению LC3II к LC3I в обработанных хлорохином клетках, культивируемых в нормальных условиях. Скорость конверсии LC3 для мутантных клеток нормировали к такому же отношению для клеток дикого типа. Скорость превращения LC3I в LC3II определяли по трем независимым экспериментам (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего) и количественно определяли с использованием программного обеспечения GraphPad. $**p < 0,01$ и $*p < 0,05$ по критерию множественного сравнения Данетта.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов мы установили, что белок hTERP принимает участие в регуляции процесса аутофагии. Далее мы сосредоточились на определении того, на каком именно этапе hTERP участвует в регуляции аутофагии. Для этого нами был проанализирован профиль фосфорилирования белков сигнальных путей АМПК и АКТ.

2.4. Выявление сигнального каскада, в регуляции которого участвует белок hTERP

Сигнальные пути АМПК и АКТ регулируют процесс аутофагии в зависимости от различных внешних условий. Каждый из этих путей состоит из каскадов белков, изменение профиля фосфорилирования которых влияет на активность нижестоящих мишеней.

Процесс аутофагии регулируется большим количеством киназ, которые находятся в сложных взаимосвязях друг с другом. Для того, чтобы понять на каком именно этапе белок hTERP может оказывать влияние на процесс аутофагии, сначала было необходимо проанализировать и оценить изменение активности киназ сигнальных путей АМПК и АКТ в клетках НЕК293Т дикого типа, клетках dhTERP НЕК293Т и клетках НЕК293Т с индуцируемой доксициклином сверхэкспрессией hTERP.

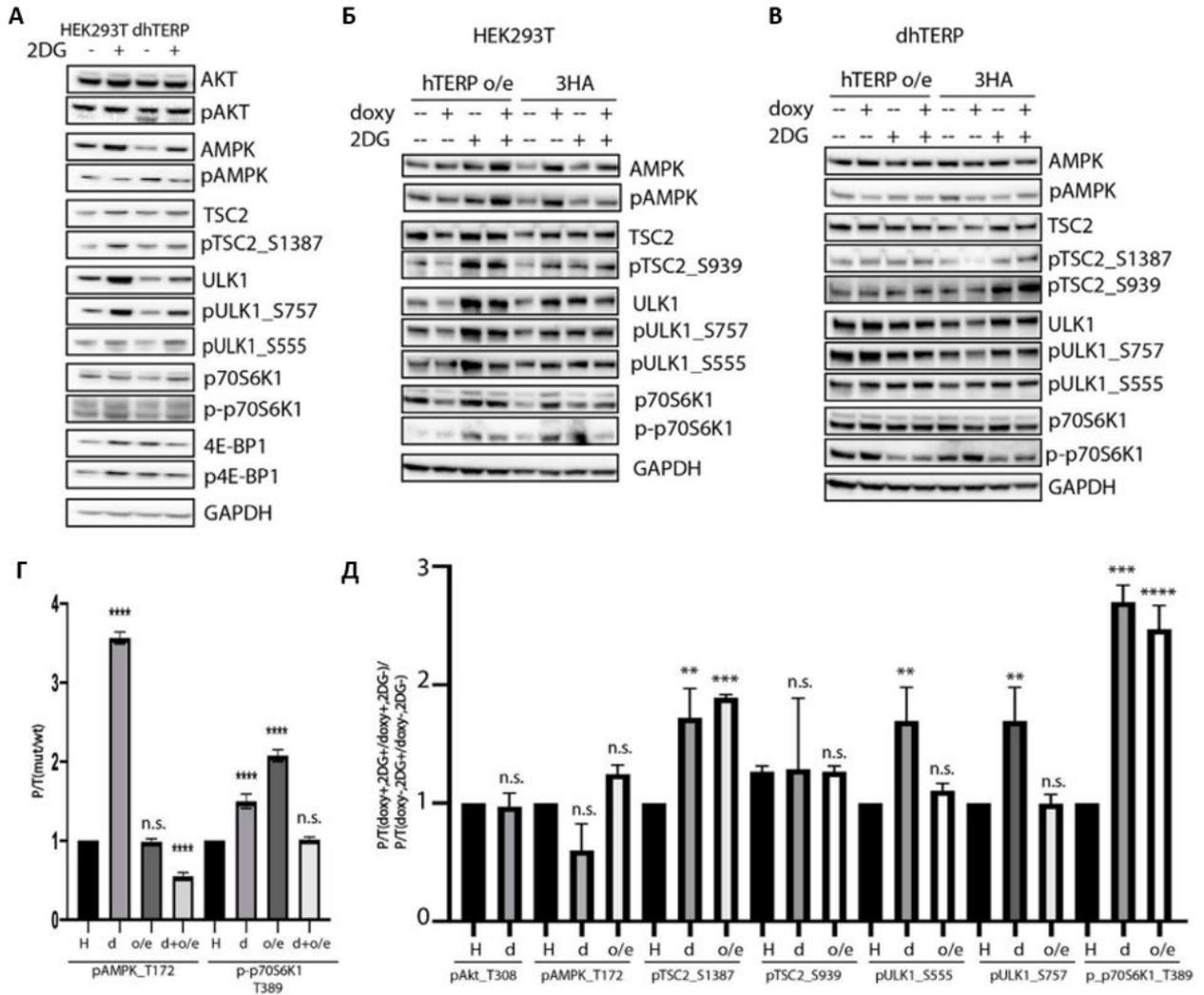


Рисунок 29. *hTERP* модулирует активность киназ соответствующих сигнальных путей в клетках HEK293T. (А) Анализ профиля фосфорилирования киназ в лизатах клеток дикого типа и клеток *dhTERP* HEK293T, обработанных 2 мМ 2-дезоксид-D-глюкозой (2DG) или без обработки 2DG исследовали с помощью иммуноблоттинга. (Б, В). Анализ профиля фосфорилирования киназ в лизатах клеток HEK293T дикого типа (Б) и клеток *dhTERP* HEK293T (В), экзогенно экспрессирующих 3HA (HA) или *hTERP*-3HA (*hTERP* o/e) после обработки 2 мМ 2-DG или без обработки 2DG исследовали при помощи иммуноблоттинга указанными антителами. (Г) Количественная оценка уровней фосфорилирования указанных белков. Черные столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках HEK293T дикого типа. Серые столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках *dhTERP*

HEK293. Темно-серые столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в оверэкспрессирующих клетках hTERP HEK293T, обработанных доксициклином. Светло-серые столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в оверэкспрессирующих клетках hTERP dhTERP HEK293T, обработанных доксициклином. Соотношение для модифицированных клеток нормировали по соотношению для клеток HEK293T дикого типа по трем независимым экспериментам вестерн-блоттинга (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего) и количественно оценивали с использованием программного обеспечения GraphPad. **** $p < 0,0001$ по критерию множественных сравнений Данетта. (Д)

Количественная оценка уровней фосфорилирования указанных белков. Черные столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках HEK293T дикого типа, обработанных 2DG, по сравнению с отношением в необработанных клетках. Серые столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках dhTERP, обработанных 2DG, по сравнению с отношением в необработанных клетках. Белые столбцы соответствуют соотношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках с оверэкспрессией hTERP dhTERP HEK293T, обработанных доксициклином (doxu+), и 2DG, нормированным по соотношению для клеток с оверэкспрессией-3HA dhTERP HEK293T, обработанных доксициклином (doxu+/2DG+), или клеток, не обработанных 2DG (2DG-). Такая же количественная оценка была проведена для образцов, не обработанных доксициклином (doxu-) или обработанных 2DG, относительно соотношения для клеток, не обработанных доксициклином (doxu-/2DG+), или клеток, не обработанных 2DG (2DG-). Нормализованные данные использовали для количественной оценки изменений степени фосфорилирования целевого белка при экзогенной экспрессии hTERP [(doxu+, 2DG+/doxu+, 2DG-)/(doxu-, 2DG+/doxu-, 2DG-)]. Соотношение для клеток, обработанных 2DG, нормировали по

соотношению для необработанных клеток по трем независимым экспериментам вестерн-блоттинга (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего) и количественно оценивали с использованием программного обеспечения GraphPad.

$**p < 0,01$, $***p < 0,001$ и $****p < 0,0001$ по критерию множественного сравнения Данетта.

Для сравнения активности киназ путей АМПК и АКТ, принимающих участие в сигнальных путях регулирующих mTORC1, использовали метод вестерн-блоттинга. Мы определяли отношение количества фосфорилированной формы киназы к общему количеству этой же киназы в клетках дефицитных по белку hTERP и клетках с оверэкспрессией hTERP в нормальных условиях культивирования. Оказалось, что уровень hTERP оказывает значительное влияние на фосфорилирование АМПК и p70S6K (Рис. 29 Г). Фосфорилирование p70S6K усиливалось и в отсутствии hTERP и при его оверэкспрессии (Рис. 29 Г). Уровень фосфорилированной формы p70S6K в клетках нокаутных по исследуемому белку восстанавливался до такого же уровня, как и в клетках НЕК293Т дикого типа при экзогенной оверэкспрессии hTERP (Рис. 29 В, Г). Уровень фосфорилированной формы АМПК повышался в клетках, нокаутных по hTERP, оверэкспрессия hTERP в нокаутных клетках приводила к восстановлению уровня фосфорилированной АМПК до такого же уровня, как в клетках дикого типа. Оверэкспрессия hTERP в клетках НЕК293Т не выявила влияния на уровень фосфорилирования АМПК.

Таким образом, наблюдаемые нами различия в уровне фосфорилирования отдельных киназ входящих в сигнальные пути, регулирующие аутофагию, между клетками НЕК293Т дикого типа, клетками dhTERP НЕК293Т и клетками НЕК293Т с оверэкспрессией белка подтверждают участие hTERP в регуляции аутофагии.

Для дальнейшего определения возможного механизма действия hTERP нам было необходимо проанализировать профиль фосфорилирования киназ сигнальных путей АМПК и АКТ в условиях, отличных от стандартных и оказывающих влияние на процесс аутофагии. При определении участия hTERP и его влияния на базальную аутофагию мы рассматривали условия аминокислотного

голодания и обработки AICAR, каждое из которых модулирует активность АМПК [González и др., 2020; Hardie, Ross, Hawley, 2012]. Чтобы изучить возможные механизмы действия hTERP на процессы, регулирующие клеточные ответы на стрессовые условия, мы решили модулировать ингибирование гликолиза, обрабатывая клетки 2-дезоксид-D-глюкозой (2DG), что также влияет на активность АМПК.

2DG является производным глюкозы и при фосфорилировании гексокиназой 2 образует 2DG-фосфат, который не может быть использован в дальнейших этапах гликолиза. Происходит накопление 2DG-фосфата, что приводит к ингибированию гексокиназы 2 и, как следствие, происходит ингибирование гликолиза и снижение содержания АТФ. Низкий уровень АТФ приводит к активации АМПК, стимуляции аутофагии и ингибированию синтеза белка. 2DG также индуцирует и фосфорилирование АКТ и ее мишеней независимым от АМПК способом [Zhong и др., 2008].

Для сравнения активности анализируемых киназ использовали метод вестерн-блоттинга и определяли отношение количества фосфорилированных форм к общему количеству киназы. Полученное соотношение для клеток, обработанных 2DG, было нормировано к соотношению для необработанных клеток (Рис. 29 Д, черные столбцы соответствуют клеткам НЕК293Т дикого типа, а серые столбцы соответствуют клеткам dhTERP).

Чтобы подтвердить участие hTERP в регуляции активности анализируемых киназ, мы оверэкспрессировали hTERP в клетках НЕК293Т дикого типа и мутантных клетках. Клетки обрабатывали доксициклином для индукции экспрессии hTERP-ЗНА и ЗНА и 2 мМ 2DG в течение 48 часов. Экспрессию hTERP-ЗНА подтверждали вестерн-блоттингом с антителами, специфичными к ЗНА. Необработанные клетки, клетки, обработанные только доксициклином или только 2DG, использовали в качестве контроля. Количество фосфорилированной и тотальной форм киназ, участвующих в клеточном ответе на дефицит глюкозы, анализировали с помощью вестерн-блоттинга.

Из графиков на Рис. 29 видно, что клетки, дефицитные по hTERP, демонстрируют пониженную активацию АМПК по сравнению с клетками НЕК293Т дикого типа в ответ на обработку 2DG. Однако степень фосфорилирования прямых мишеней АМПК - ULK1_Ser 555 и TSC2_Ser 1387 - немного увеличивалась (Рис. 29 А, Д) в клетках dhTERP по сравнению с клетками НЕК293Т дикого типа, что должно приводить к активации аутофагии в клетках, дефицитных по hTERP. Уровень фосфорилирования ULK1 по Ser555 и TSC2 по Ser1387 восстанавливался при оверэкспрессии hTERP-3НА. С другой стороны, фосфорилирование p70S6K и 4E-BP1 было повышено в клетках dhTERP, что обеспечивает активацию синтеза белка и стимуляцию клеточной пролиферации. Мы не наблюдали каких-либо значительных изменений в фосфорилировании киназы АКТ или ее мишени Ser939 TSC2.

Помимо анализа данных, полученных на теломеразо-положительных клеточных линиях НЕК293Т, НЕК293Т dhTERP и НЕК293Т с оверэкспрессией hTERP, мы проанализировали профиль фосфорилирования тех же киназ в клетках теломеразо-негативной клеточной линии остеосаркомы U2OS дикого типа и клетках U2OS с доксициклин-индуцируемой оверэкспрессией hTERP-3НА.

По графикам на Рис. 30 можно видеть, что оверэкспрессия hTERP-3НА в клетках U2OS приводила к небольшому ингибированию фосфорилирования TSC2 по Ser1387 и ULK1 по Ser757 и увеличению фосфорилирования pULK1 по Ser555 и p70S6K1 в условиях обработки клеток 2DG. Оверэкспрессия hTERP оказывает влияние на сигнальную ось TSC2-mTORC1 в теломеразо-негативных клетках U2OS в условиях обработки клеток 2DG.

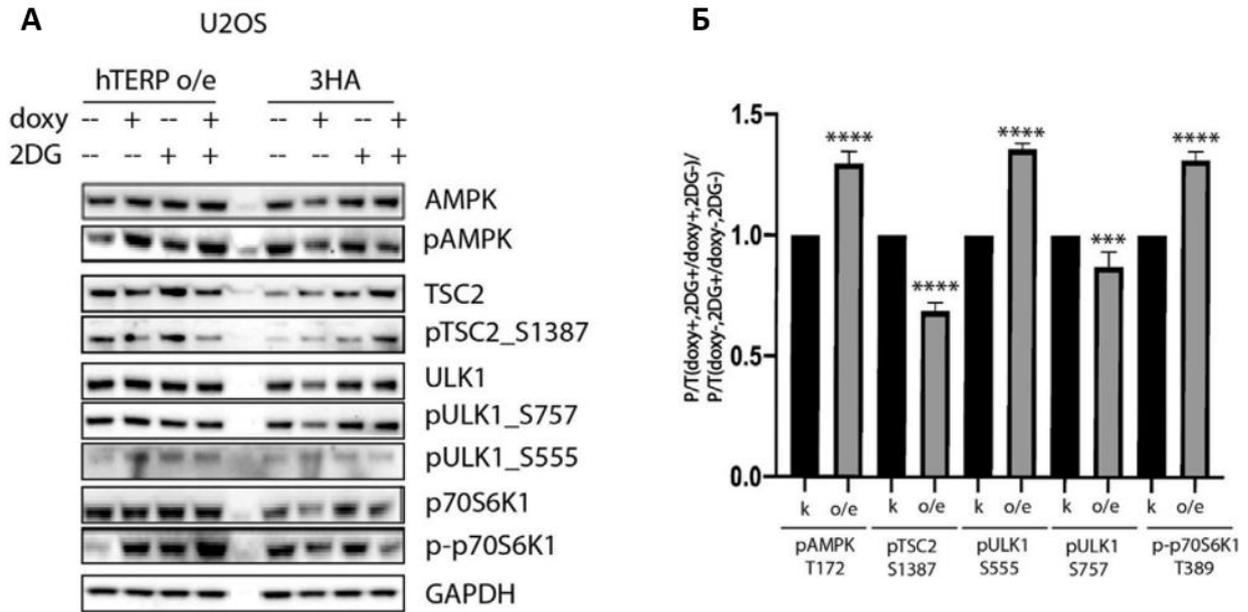


Рисунок 30. *hTERP* модулирует активность киназ соответствующих сигнальных путей в клетках U2OS. (А) Анализ профиля фосфорилирования киназ в лизатах клеток U2OS, экзогенно экспрессирующих 3HA или *hTERP*-3HA, обработанных 2 мМ 2DG или без него, исследовали при помощи иммуноблоттинга указанными антителами. (Б) Количественная оценка степени фосфорилирования указанных белков. Черные столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках U2OS с оверэкспрессией 3HA, обработанных доксициклином (*doxy*+), или в клетках, обработанных 2DG, нормализованным к отношению для клеток, обработанных доксициклином (2DG+/doxy+) к клеткам, не обработанным 2DG (2DG-). Серые столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках с оверэкспрессией *hTERP*, обработанных доксициклином (*doxy*+), или в клетках, обработанных 2DG, нормализованным к отношению для клеток, обработанных доксициклином (2DG+/doxy+), или в клетках, не обработанных 2DG (2DG-). Такая же количественная оценка была проведена для образцов, не обработанных доксициклином (*doxy*-) или обработанных 2DG, относительно соотношения клеток, не обработанных доксициклином (2DG+/doxy-), или клеток, не обработанных 2DG (2DG-). Эти нормированные данные использовали для

*количественной оценки изменений степени фосфорилирования целевого белка при экзогенной экспрессии hTERP [(doxy+, 2DG+)/(doxy+, 2DG-)/(doxy-, 2DG+)/(doxy-, 2DG-)]. Соотношение для клеток, обработанных 2DG, нормировали к соотношению для необработанных клеток по трем независимым экспериментам вестерн-блоттинга (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего) и количественно оценивали с использованием программного обеспечения GraphPad. *** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$ по критерию множественного сравнения Данетта.*

Таким образом, можно заключить, что hTERP участвует в регуляции сигнального пути, ответственного за определение энергетического статуса клетки. Дефицит hTERP приводит к активации биосинтеза белка (повышенное фосфорилирование p70S6K1 и 4E-BP1) с одной стороны и к активации аутофагии (повышенное фосфорилирование ULK1 по Ser 555) с другой стороны. Мы наблюдали влияние hTERP на фосфорилирование нижестоящих мишеней mTORC1 - ULK1_S757, p70S6K1 и 4E-BP1, что позволяет предполагать участие hTERP в регуляции сигнального пути mTORC1.

Проведенные эксперименты были спланированы так, чтобы была возможность разделить функции hTERP и hTR. В клетках с мутацией в теломеразной РНК, инактивирующей трансляцию hTERP, не нарушается функция теломеразного комплекса, а восстановление экспрессии hTERP в нокаутных клетках мы проводили при помощи конструкции, кодирующей последовательность ORF hTERP, а не из полноразмерного hTERC. Аналогичные эффекты наблюдали как в теломеразо-положительных клетках HEK293T, так и в теломеразо-негативных клетках U2OS. Эти данные доказывают, что белок hTERP действительно принимает участие в регуляции передачи сигналов AMPK и mTORC1.

2.5. Предполагаемый механизм действия hTERP в передаче сигналов AMPK-mTORC1

На основании полученных данных мы предполагаем механизм действия hTERP в передаче сигналов AMPK-mTORC1.

Мы обнаружили разнонаправленное действие hTERP на аутофагию и биосинтез белка и предполагаем, что происходит нарушение оси сигнального пути. Активация AMPK должна приводить к фосфорилированию TSC2 по Ser1387 и ингибированию mTORC1 с последующим снижением уровня фосфорилирования p70S6K1. Мы продемонстрировали активацию mTORC1 и повышенное фосфорилирование p70S6K1 в клетках без hTERP или с его повышенным содержанием. Однако уровень фосфорилирования AMPK был снижен в отсутствие hTERP и повышен, когда hTERP был оверэкспрессирован, но профиль фосфорилирования TSC2 по Ser1387 противоположен ожидаемому. Он был снижен в клетках с оверэкспрессией hTERP и повышен в клетках, где hTERP отсутствовал. Суммируя эти данные, мы предполагаем, что hTERP регулирует фосфорилирование TSC2 по Ser1387 с помощью AMPK и последующее взаимодействие и активацию Rheb (Рис. 31). Мы предполагаем, что hTERP может участвовать в регуляции взаимодействия между AMPK и TSC2, что приводит к снижению степени фосфорилирования последнего. В то же время отсутствие hTERP стимулирует взаимодействие белков (AMPK и TSC2) и фосфорилирование TSC2, что приводит к стабилизации комплекса. Стабильное взаимодействие TSC2 с AMPK приведет к неспособности TSC2 стимулировать ГТФазную активность Rheb и, как следствие, к активации mTORC1.

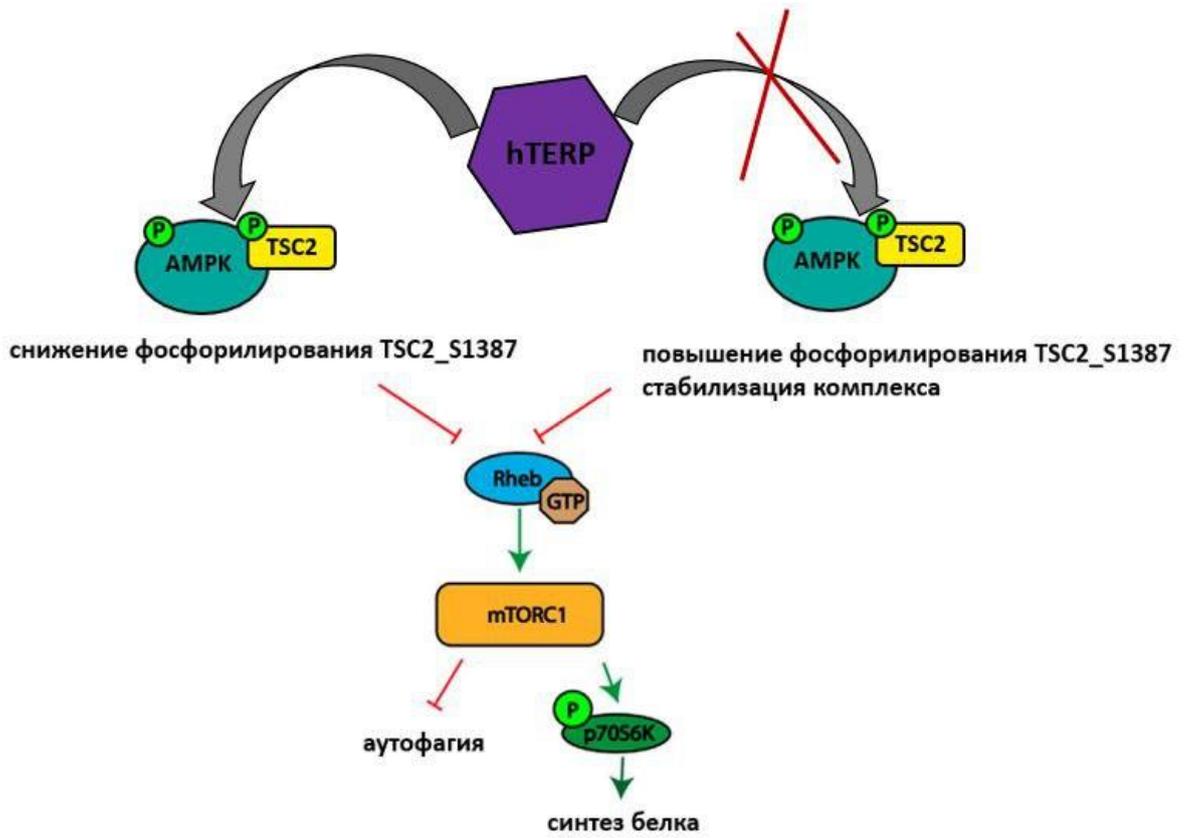


Рисунок 31. Схема, иллюстрирующая роль hTERP в регуляции AMPK-зависимого пути активации аутофагии.

3. Материалы и методы

3.1. Клеточные культуры

Клетки HEK293T (клетки почки эмбриона человека) и U2OS (клетки остеосаркомы человека) выращивали в среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением глутамакса (Thermo Fisher Scientific), 10% сыворотки крови эмбрионов телят (FBS, Gibco), 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific) при 37°C и 5% CO₂. Конфлюентность и жизнеспособность культур исследовали под инвертированным микроскопом. Клетки были исследованы на заражение микоплазмой и дали отрицательный результат (MycroReport, кат. номер MR001, Евроген).

Клеточную линию dhTERP HEK293T получили при помощи технологии CRISPR/Cas9 ранее [Rubtsova и др., 2018].

3.2. Среды для культивирования *E.coli*

Для выращивания *E.coli* использовали жидкие и твердые среды. Жидкую среду LB готовили, добавляя к 100 мл воды 2,5 г сухой LB по Miller (Amresco) (для приготовления твердой среды к этому раствору добавляли 1,5% бакто-агара). Полученную смесь автоклавировали и остужали до комнатной температуры (в случае твердой среды – после остывания до температуры 40-45°C заливали чашки Петри).

3.3. Приготовление компетентных клеток *E.coli*

Приготовление компетентных клеток осуществляли по следующему протоколу:

- Высеивали колонии *E.coli* из стока на чашку Петри с твердой средой LB
- Две колонии вносили в колбы с жидкой средой LB (по 25 мл среды в каждой колбе).

- Инкубировали колбы при температуре 18⁰С и перемешивании (120 об/мин) до OD~ 0,6

- Колбы с выросшими клетками инкубировали во льду в течении 10 минут

- Далее переносили среду с клетками в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 4⁰С и 2500 об/мин (ротор JA-10, Beckman Coulter).

- Сливали жидкость после центрифугирования и в каждую из пробирок добавляли по 80 мл холодного (0⁰С) буфера ТВ (10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl pH 6,7, 55 mM MnCl₂).

- Тщательно ресуспендировали осадок клеток

- Центрифугировали в течение 10 минут при 4⁰С и 2500 об/мин (ротор JA-10, Beckman Coulter)

- Сливали жидкость после центрифугирования и добавляли 20 мл холодного (0⁰С) буфера ТВ

- Тщательно ресуспендировали осадок клеток и добавляли по каплям 1264 мкл ДМСО. После добавления аккуратно перемешивали полученную смесь

- Инкубировали смесь во льду в течение 10 минут

- Аликвотили полученные компетентные клетки по 150 мкл в стерильные эппендорфы, замораживали в жидком азоте и хранили при -80⁰С.

3.4. Трансформация плазмидной ДНК в компетентные клетки *E.coli*

- Ранее приготовленные компетентные клетки (аликвоты по 150 мкл) размораживали на льду в течение ~ 10-15 минут.

- Добавляли к ним 1 мкл плазмидной ДНК (5 нг/мкл).

- Инкубировали смесь компетентных клеток и ДНК на льду в течение 30 минут.

- Нагревали смесь в термостате («Гном») в течение 30 сек при 42⁰С
- Добавляли к смеси 750 мкл среды LB и инкубировали при 37⁰С в течение 1 часа при постоянном перемешивании
- После инкубации осаждали клетки, отбирали 600 мкл среды. Осадок ресуспендировали в оставшейся среде и высевали на чашку Петри с селективным антибиотиком и твердой средой LB).
- Инкубировали чашку в термостате при 37⁰С в течение ~ 16 часов.

3.5. Получение плазмиды GFP-NiBiT

Для получения плазмиды использовали вектор LeGO-iG2 (Addgene, # 27341).

Для линейаризации вектора производили подбор рестриктазы таким образом, чтобы сайт рестрикции находился на С-конце белка GFP. Проводили рестрикцию с использованием рестриктазы Bsp1407I (ThermoFisher) согласно протоколу производителя.

3.5.1. Линейаризация вектора

Вектор LeGo-iG2 обрабатывали рестриктазой Bsp1407I (10 ед/мкл, ThermoFisher).

Составляли следующую рестрикционную смесь:

10x буфер «Tango» (ThermoFisher) 2 мкл

Вектор LeGo-iG2 (Addgene) 0,5 мкг

Bsp1407I (10 ед/мкл, ThermoFisher) 0,5 мкл

Вода до 20 мкл

Рестриктию проводили при 37⁰С в течение 16 часов. Инактивировали рестриктию при 65⁰С в течение 20 минут. Далее очищали продукт с использованием набора «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen)

Подбор праймеров осуществляли с использованием программного обеспечения SnapGene (США) таким образом, чтобы HiBiT-тег был добавлен на С-конец белка GFP и находился с ним в одной рамке считывания (Рис.32).

Последовательности праймеров:

HiBiT_Fw (5'-3'): gtacgtgagcggctggcggctgttcaagaagattagctga

HiBiT_Rv (5'-3'): gtactcagctaattcttctgaacagccgccagccgctcac

После подбора праймеров проводили их отжиг и фосфорилирование с последующим лигированием с линейаризованным вектором.

3.5.2. Получение HiBiT-вставки

После подбора праймеров проводили их фосфорилирование и отжиг.

HiBiT_Fw (100 пммоль/мкл) 1мкл

HiBiT_Rw (100 пммоль/мкл) 1мкл

АТФ 10мМ (ThermoFisher) 1 мкл

PNK (10 ед/мкл, ThermoFisher) 1 мкл

Вода 5,5 мкл

Инкубировали полученную смесь при 37⁰С в течение 30 минут, далее проводили инактивацию при 95⁰С в течение 5 минут.

3.5.3. Лигирование

Лигирование линейризованного вектора и HiBiT-вставки проводили с использованием «Rapid Ligation Kit» (ThermoFisher). Состав реакционной смеси:

Линейризованный вектор 10-100 нг

Вставка (10х мольный избыток по отношению к вектору)

5х буфер для T4 ДНК-лигазы (ThermoFisher) 4 мкл

Вода до 20 мкл

T4 ДНК-лигаза (5 ед/мкл, ThermoFisher) 1 мкл

Полученную смесь инкубировали при 22⁰С в течение 15 минут. Далее лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (штамм JM109). Выросшие колонии переносили в пробирки с жидкой средой LB и выращивали ночь при 37⁰С.

Выделяли плазмиду при помощи набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) согласно протоколу производителя.

Полученную плазмиду (Рис. 32) для проверки корректности сборки секвенировали в Центре Коллективного Пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН).

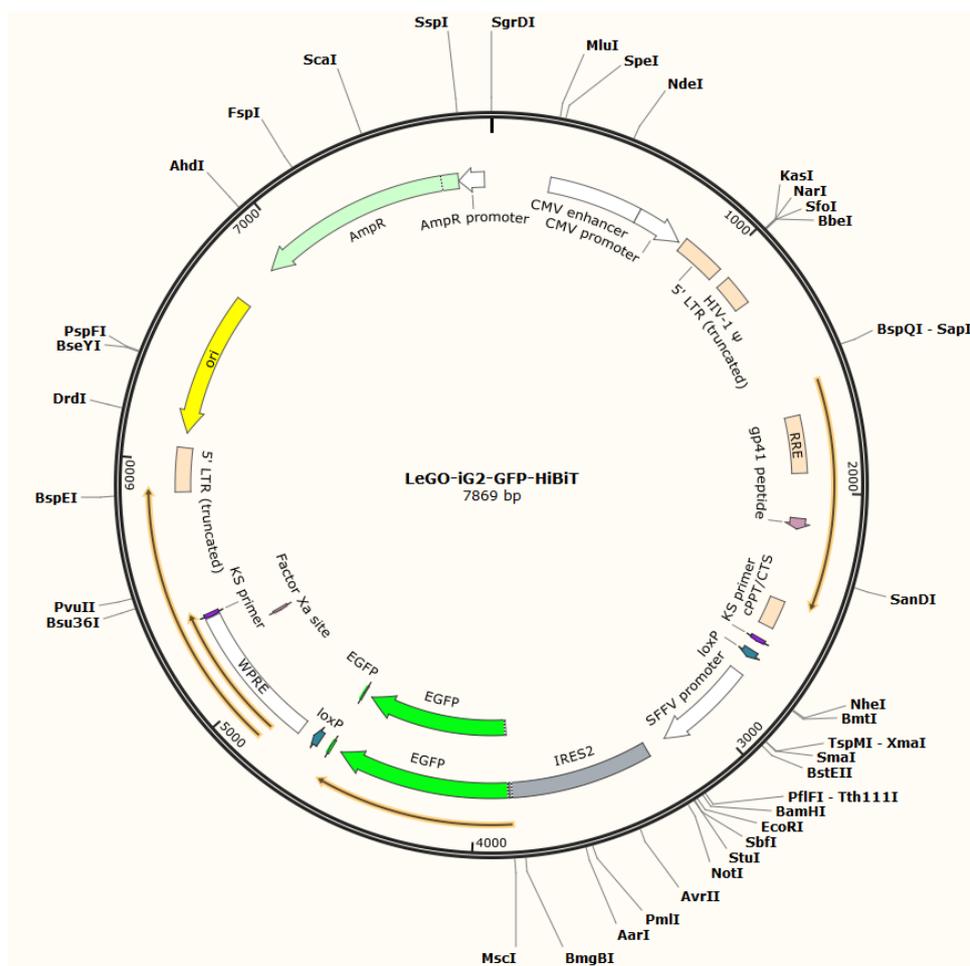


Рисунок 32. Схема полученной плазмиды *LeGO-iG2-GFP-HiBiT*

3.6. Получение лентивирусных частиц для создания линии НЕК293Т-GFP-HiBiT

Трансдукцию клеточной линии НЕК293Т проводили с использованием Lipofectamine3000 (Thermo Fisher).

Для сборки вирусов использовали плазмиды psPAX2 (Addgene, #12260), pCMV-VSV-G (Addgene, #8454) и клонированную плазмиду, LeCO-iG2-GFP-HiBiT

Первый день:

высевали клетки в лунку 6-ти луночной плашки (конфлюентность 70-80%, 1×10^6 клеток в 2 мл среды Opti-MEM(Gibco)). Инкубировали плашку в течение ночи (37°C , 5% CO_2)

Второй день:

- готовили ДНК-липидные комплексы с Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher) согласно протоколу производителя
- инкубировали полученные комплексы при комнатной температуре в течение 20 минут
- перед добавлением комплексов в лунку отбирали из нее 1 мл среды
- добавляли 500 мкл ДНК-липидных комплексов в каждую лунку. Аккуратно перемешивали, избегая открепления клеток
- инкубировали плашку в течение 6 часов (37⁰C, 5% CO₂)
- после 6-ти часов инкубации отбирали среду с ДНК-липидными комплексами и заменяли ее на свежую среду Opti-MEM (Gibco)

Третий день:

- через 24 часа после трансфекции отбирали по 2 мл супернатанта из каждой лунки в фалькон на 15 мл. Помещали фалькон на +4⁰C
- заменяли отобранную среду на 2 мл свежей среды Opti-MEM(Gibco)
- инкубировали плашку в течение ночи (37⁰C, 5% CO₂)

Четвертый день:

- через 52 часа после трансфекции отбирали по 2 мл супернатанта из каждой лунки в фалькон (который использовали в третий день)
- отобранный в третий и четвертый дни супернатант центрифугировали 10 минут при 2000rpm и комнатной температуре
- отбирали супернатант, фильтровали его через фильтр с диаметром пор 45мкм
- аликвотили получившиеся вирусы и хранили их на -80⁰C

3.7. Трансдукция

Первый день:

- засекали клетки в лунки 6-ти луночной плашки (400 тыс. клеток, 2 мл среды DMEM-F12 (Gibco) с 10% FBS(Gibco)). Инкубировали в течение ночи (37⁰C, 5% CO₂)

Второй день:

- перед трансдукцией готовили среду с полибренном (Sigma, конечная концентрация 8 мг/мл). Далее отбирали у клеток культуральную среду, добавляли 2 мл ранее приготовленной среды с полибренном и по 20 мкл ранее полученных вирусов. Оставляли плашку инкубироваться в течение ночи (37⁰C, 5% CO₂).

Третий день:

- отбирали среду и заменяли ее на 2 мл свежей среды (DMEM-F12 (Gibco)) с 10% FBS (Gibco) и оставляли клетки расти в течение двух-трех дней. Далее анализировали полученную клеточную линию с использованием флуоресцентного микроскопа Evos Imaging System (Thermo Fisher Scientific) – если наблюдалось зеленое свечение, то трансдукция прошла успешно.

3.8. Метод CRIPR/Cas9 для создания клеточной линии, с белком hTERP тегированным HiBiT

Для создания клеточной линии с белком hTERP тегированным HiBiT использовали технологию CRISPR/Cas9. Олигонуклеотиды, соответствующие последовательности одиночной гидовой РНК (sgRNA), после гибридизации лигировали вектор pX458 [Ran и др., 2013], расщепленным эндонуклеазой BbsI (Thermo Fisher). Полученную плазмиду проверяли секвенированием и трансфицировали при помощи Lipofectamine 3000 в клетки HEK293T вместе с олигонуклеотидом, содержащим последовательность, кодирующую HiBiT

окруженную плечами гомологии. Отбор трансфицированных клеток осуществляли по экспрессии зеленого флуоресцентного белка GFP с использованием проточного цитометра FACS Aria III (BD). Далее полученные клетки рассаживали на моноклоны в 96-луночных планшетах и культивировали в течение 10-14 дней (37°C, 5% CO₂). После культивирования выделяли из клеток геномную ДНК, проводили ПЦР для амплификации интересующего участка ДНК и анализировали продукты с помощью ПЦР в агарозном геле. Образцы, отобранные после анализа, отдавали на секвенирование для проверки корректности.

3.9. Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора LumiPure (Люмипроб) согласно протоколу производителя.

- Для выделения выращивали клетки в лунке 6-ти луночного планшета до конфлюэнтности 80-90%

- Отбирали культуральную жидкость и снимали клетки с помощью трипсина (Gibco)

- После снятия центрифугировали клетки при 300 × g в течение 5 мин. Удаляли супернатант, полученный осадок клеток аккуратно ресуспендировали в 100 мкл PBS (Sigma-Aldrich). Получившуюся суспензию клеток переносили в новую пробирку.

- В пробирку с образцом добавляли 300 мкл лизирующего раствора ВВ (Люмипроб) и 10 мкл раствора протеиназы К (Люмипроб), после чего тщательно перемешивали содержимое пробирки на вортексе

- Инкубировали полученную смесь при 55 °С в течение 15 мин, периодически перемешивая на вортексе (1–2 раза)

- Помещали колонку для выделения геномной ДНК (Люмипроб) в пробирку для сбора проскока, переносили на колонку лизат и центрифугируйте при 12 000

об/мин 45 сек. После центрифугирования помещали колонку в новую пробирку для сбора проскока

- Наносили на колонку 500 мкл промывочного раствора А (Люмипроб), центрифугировали при 12 000 об/мин 30 сек. После центрифугирования помещали колонку в новую пробирку для сбора проскока

- Наносили на колонку 500 мкл промывочного раствора В (Люмипроб), центрифугировали при 12 000 об/мин 3 мин

- Перемещали колонку в новую пробирку, наносили в центр колонки 50 мкл предварительно прогретого до 55 °С элюирующего буфера (Люмипроб). Инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 12 000 об/мин 60 сек. Выделенная ДНК находилась в элюате.

3.10. ПЦР

Для проведения ПЦР использовали стандартные протокол. Состав реакционной смеси включал в себя:

10x буферный раствор для Taq-полимеразы (Thermo Fisher) 5 мкл

ДНК-матрица 50 нг

праймер_Fw 25 пмоль

праймер_Rw 25 пмоль

смесь dNTP (Thermo Fisher) по 0,2 мМ каждого

MgCl₂ (Thermo Fisher) 2,5 мМ

Taq-полимераза (Thermo Fisher) 1 мкл

H₂O до 50 мкл

После приготовления смеси тщательно ее перемешивали и помещали в прибор T100 Thermal Cycler (BioRad). Амплификацию проводили по следующему протоколу:

- 95⁰C 10 мин (предварительный прогрев);

- 95⁰C 30 секунд;

- 58⁰C С 30 секунд;

- 72⁰C 40 секунд;

x30

После окончания ПЦР анализировали полученную смесь фрагментов ДНК в 1% агарозном геле.

3.11. Протокол детекции HiViT-тегированных белков в клеточных лизатах

- Клетки с тегированным белком и клетки дикого типа культивировали до конфлюэнтности 70-80% (37⁰C, 5% CO₂) в лунках 96-ти луночного планшета

- Перед началом измерения планшеты с клетками доставали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре до установления равновесия. Для измерения использовали непрозрачные белые планшеты, что позволяло минимизировать влияние соседних лунок и поглощение излучаемого света при измерении

- К каждой из лунок добавляли литический реагент Nano-Glo® HiViT. Объем добавляемого реагента был равен объему культуральной среды, присутствующей в лунке. После добавления литического реагента помещали плашку на орбитальный шейкер (скорость 500 об/мин) на 10 минут для получения оптимальных результатов и снижения вариабельности между повторами

- Инкубировали полученные образцы при комнатной температуре в течение 10 минут для установления равновесия между LgViT и HiViT в лизате. После этого

проводили измерение люминисценции на приборе Victor X5 (Perkin Elmer) в режиме детекции люминесценции

- Полученные значения далее обсчитывали, вычитая значения фона (фоном считали значения лунок, содержащих культуральную среду (без клеток) с добавлением литического реагента)

3.12. Протокол детекции HiViT-тегированных белков методом блоттинга

Используемый протокол подобран таким образом, чтобы чувствительность обнаружения HiViT-меченных белков была максимальной – подобрано время инкубации оптимальное для максимального взаимодействия с LgViT.

- Проводили разделение белков клеточных лизатов с использованием ДСН-ПААГ (12%). Для возможности определения молекулярной массы белков после разделения – наносили маркер молекулярной массы на одну из дорожек

- Переносили белки из геля на нитроцеллюлозную мембрану с использованием прибора для полусухого переноса Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad)

- Перемещали мембрану в контейнер с TBST, далее контейнер помещали на орбитальный шейкер (70 об/мин), чтобы отмыть мембрану от буфера для переноса. Количество буфера для отмывки подбирали таким образом, чтобы вся мембрана была им покрыта. Оставляли мембрану в растворе TBST на 10 минут

- Готовили в фальконе необходимое для покрытия всей мембраны количество Nano-Glo HiViT реагента для блоттинга. Для этого разбавляли 10X Nano-Glo Blotting Buffer (из расчета его разведения в 10 раз) водой. Перемешивали получившуюся смесь переворачивая фалькона (5-10 раз)

- В полученный в предыдущем пункте буфер добавляли белок LgViT (из расчета разведения в 200 раз). Из контейнера с мембраной удаляли раствор TBST и заменяли полученным раствором LgViT/буфер

- Инкубировали мембрану в контейнере с раствором LgViT/буфер в течение ночи при +4°C (для достижения максимального сигнала), на качающем шейкере (25 об/мин). После инкубации доставали контейнер и уравнивали температуру до комнатной (в течение 15-20 минут) перед добавлением субстрата

- В контейнер с мембраной и раствором LgViT/буфер добавляли субстрат для анализа люциферазы Nano-Glo (из расчета его разведения в 500 раз). Перед добавлением наклоняли контейнер в одну сторону и добавляли субстрат в собранный раствор. Далее немедленно перемешивали раствор за счет нескольких качаний контейнера вперед и назад. Инкубировали мембрану в полученном растворе в течение 5 минут при комнатной температуре

- После инкубации мембрану доставали из раствора и помещали в файл для дальнейшей визуализации сигнала

- Сигнал накапливали на рентгеновской пленке (Kodak) в кассете в течение 30 часов. Все этапы работы с пленкой проводили в темной комнате с красным светом

- После извлечения пленки из кассеты помещали ее в кювету с раствором проявителя (состав на 1л: 2г метола, 90г Na_2SO_3 , 8г гидрохинона, 52,5г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5г KBr, H_2O до 1 л) на 2-3 минуты

- Далее помещали пленку в кювету с фиксажем (состав на 1л: 250г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 50г NH_4Cl , 17г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, H_2O до 1 л) на 4-6 минут

- После фиксации промывали пленку в проточной воде и фотографировали в прозрачном режиме

3.13. Метод TRAP (протокол амплификации теломерных повторов)

Используемая методика основана на работе [Kim и др., 1994]. Осадок клеток, промытых холодным PBS, лизировали буфером (10мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1 мМ MgCl₂, 1мМ EGTA, 5мМ β-меркаптоэтанол, 5% глицерин, 0.5% CHAPS, 0.1 мМ PMSF) на льду в течение 30 минут. Полученные лизаты центрифугировали при 14000g в течение 12 минут при 4°C. Супернатант отбирали и использовали сразу или замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда по A590 на Victor (PerkinElmer). Для каждого образца в реакцию ПЦР в реальном времени брали 0,5 мкг и 1 мкг суммарного белка. Опыт проводили трижды, каждый раз осуществляя по три повтора реакции TRAP для каждого образца. Готовили реакционную смесь, содержащую TRAP-буфер (20мМ Tris-HCl pH 8.3, 1.5мМ MgCl₂, 50мМ KCl, 0.1 мг/мл БСА, 0.005% Tween-20), dNTPs и праймер TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), добавляли к ней полученный лизат и инкубировали в течение 30 минут на комнатной температуре. Далее добавляли смесь АСХ праймера (5'-GCGCGGСТТАСССТТАСССТТАСССТААСС-3'), Taq-полимеразы и SYBR Green. ПЦР проводили в приборе CFX96 (Bio-Rad) со следующими параметрами: 95°C в течение 3 минут, далее 35 циклов: 95°C 25 секунд, 50°C 25 секунд, 72°C 90 секунд. В каждом опыте в качестве контроля на контаминацию ставили реакции без лизатов.

3.14. Создание клеточных линий, с оверэкспрессией белка hTERP

Для создания клеточных линий оверэкспрессирующих белок hTERP-ЗНА или только ЗНА, которые использовали в качестве контроля, были клонированы соответствующие конструкции в вектор pSBtet-Neo (Рис. 33) [Kowarz, Löscher, Marschalek, 2015], предварительно обработанный эндонуклеазой SfiI. Полученные плазмиды были верифицированы секвенированием и далее трансфицированы

вместе с плазмидой, кодирующей Sleeping Beauty транспозазу, в клетки с использованием Lipofectamine 3000. Клетки после трансфекции культивировали в среде, содержащей антибиотик G418, для отбора тех клеток, в которых произошло встраивание в геном экспрессирующей кассеты. Отобранные клетки обрабатывали доксициклином, чтобы вызвать экспрессию hTERP-3HA и ЗНА.

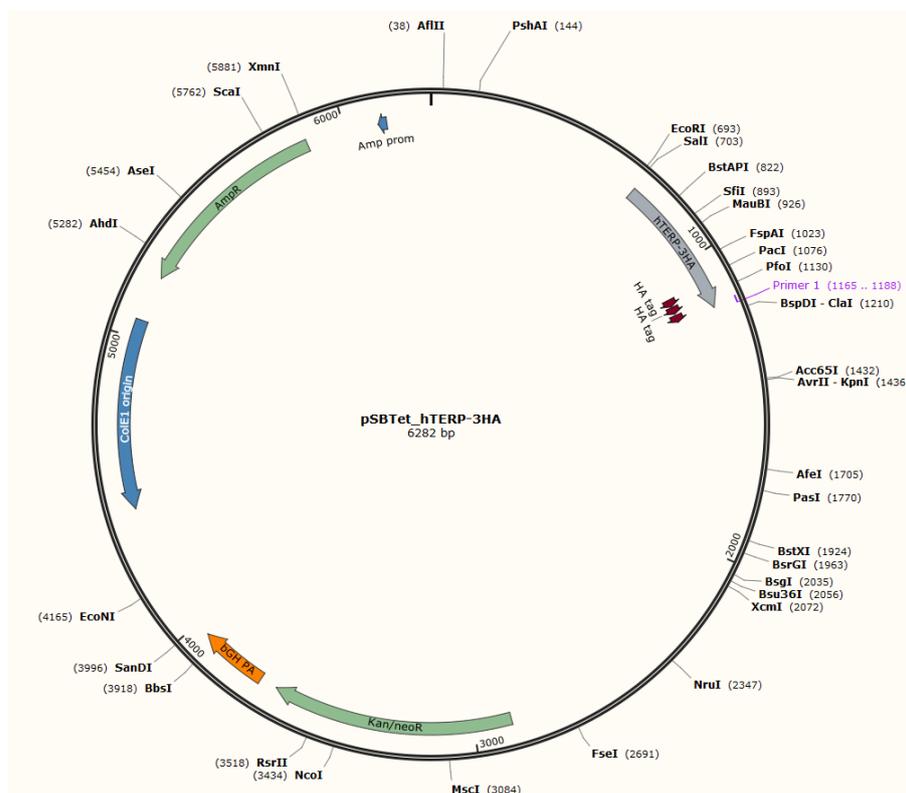


Рисунок 33. Схема полученной плазмиды pSBtet-hTERP-3HA

3.15. Трансфекция

Трансфекцию плазмидных ДНК в клетки осуществляли при помощи набора реагентов Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher):

- Выращивали клетки до конфлюэнтности 70-80% в лунках 6-ти луночных культуральных планшетов

- После того, как клетки достигли необходимой конфлюэнтности, готовили две пробирки, содержащие по 125 мкл среды Opti-MEM (Gibco). В одну из пробирок добавляли 3,75 мкл реагента Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher), в

другую – 2500 нг трансфицируемой ДНК и 5 мкл реагента P3000 (Thermo Fisher). Содержимое каждой из пробирок хорошо перемешивали.

- Смешивали содержимое пробирок. После этого инкубировали полученный раствор в течение 10-15 минут при комнатной температуре.

- Добавляли раствор с сформировавшимися ДНК-липидными комплексами в культуральную среду клеток. Аккуратно перемешивали, стараясь избежать открепления клеток

- Инкубировали планшет с клетками в течение 2-3 дней (CO₂ 5%, 37°C) и далее отбирали клетки либо посредством дальнейшего культивирования в среде селективным антибиотиком, либо посредством сортирования.

3.16. Иммуноблотинг

Клетки промывали холодным PBS и лизировали на льду в течение 30 минут буфером NETN (150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 0,5% NP-40) с добавлением ингибитора протеаз и фосфатаз (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Promega)). Полученные лизаты подвергали обработке ультразвуком в течение 15с и центрифугировали при 14000g в течение 10 мин при 4°C. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда по A590 на Victor (PerkinElmer). Равные количества белка (25 мкг на дорожку) прогревали в Леммли буфере (50mM Tris-HCl (pH 6.8), 100mM ДТТ, 2% SDS, 0.1% бромфеноловый синий, 10% глицерин) в течение 5 минут и разделяли в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в денатурирующих условиях.

Иммуноблотинг проводили по стандартной методике с использованием первичных и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена или только первичных анти-НА антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Визуализацию проводили при помощи набора SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34096, ThermoFisher) в ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

3.16.1. Перечень использованных первичных антител

анти-hTERT (Ab32020; Abcam); анти-GAPDH (Ab9485; Abcam); анти-MAP LC3 alpha/beta (sc-398822; Santa Cruz Biotech); анти-AKT (9272; Cell Signaling Technology); анти-фосфо-AKT (Thr308) (4056; Cell Signaling Technology); анти-AMPK alpha (5832; Cell Signaling Technology); анти-фосфо-AMPK alpha (Thr172) (2535; Cell Signaling Technology); анти-p70S6K (9202; Cell Signaling Technology); анти-фосфо-p70S6K (Thr389) (9206; Cell Signaling Technology); анти-TSC2 (4308; Cell Signaling Technology); анти-фосфо-TSC2 (Ser1387) (5584; Cell Signaling Technology); анти-фосфо-TSC2 (Ser939) (3615; Cell Signaling Technology); анти-ULK1 (8054; Cell Signaling Technology); анти-фосфо-ULK1(Ser555) (5869; Cell Signaling Technology); анти-фосфо-ULK1(Ser757) (6888; Cell Signaling Technology); анти-4E-BP1 (9452; Cell Signaling Technology); анти-фосфо-4E-BP1(Thr37/46) (2855; Cell Signaling Technology); анти-НА-HRP (3F10) (12 013 819 001; Roche); анти-GAPDH (Ab9485; Abcam).

3.16.2. Перечень использованных вторичных антител

антитела против кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (7074; Cell Signaling Technology); антитела против мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (G2-6520; Thermo Fisher); антитела против козы конъюгированные с пероксидазой хрена (G1-1620; Thermo Fisher).

3.17. Обработка клеток

Клетки высевали в количестве $3,0 \times 10^3$ /см² в 6-луночный планшет и обрабатывали 10 мкМ хлорохином (C66288, Sigma-Aldrich) в течение 6 ч для ингибирования аутофагии или аналогом аденозина 2 мМ 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид (AICAR; 9944, Cell Signaling Technology) в течение 1 ч для стимуляции активности AMPK. Для создания условий недостатка аминокислот клетки инкубировали в среде, лишенной аминокислот (20 мМ HEPES, pH 7,4; 140 мМ NaCl; 1 мМ CaCl₂; 1 мМ MgCl₂; 5 мМ глюкозы) в течение 1 ч при 37°C с

хлорохином или без него. Ингибирование гликолиза осуществляли путем обработки клеток 2 мМ 2DG в течение 48 часов.

3.18. Цитохимия

Клетки выращивали на покровных стеклах, покрытых полилизинном. Отбирали среду и фиксировали в 4% формальдегиде в PBS в течение 10 минут. Далее клетки промывали PBS 3 раза по 10 минут. Пермеабиллизацию проводили 0.5% тритон X-100 в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре, промывали PBS 3 раза по 10 минут. Далее инкубировали 1 час при комнатной температуре в блокирующем растворе (PBS, 1% сывороточный альбумин (БСА), 0.05% Tween20) и в течение ночи при 4°C с первичными антителами (анти-hTERT, ab5181, Abcam; разведение 1:200) в блокирующем растворе. Клетки промывали 0.05% Tween20/PBS 5 раз по 5 минут и затем инкубировали со вторичными, конъюгированными с Cy5, антителами против мыши (A10524, Invitrogen; 1:1000) в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки снова промывали 0,05% Tween20/PBS 5 раз по 5 минут. Покровные стекла с клетками помещали в Mowioil с DAPI на предметные стекла. Флуоресцентные изображения получены с использованием системы Nikon-Ti-eclipse. Изображения были сделаны на объективе 40/0.95 и обработаны с использованием стандартного программного обеспечения NIS-Elements.

3.19. Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, США). Статистическую значимость определяли с помощью t-теста, однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправками Сидака или Данетта. Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз.

4. Заключение

В настоящей работе мы показали, что мутация, вносимая нами в Р1 спираль теломеразной РНК, не оказывает влияния на функционирование и локализацию теломеразы. Также установлено, что ранее обнаруженный белок hTERP, кодируемый теломеразной РНК, принимает участие в регуляции процесса аутофагии, модулируя сигнальный путь АМПК. Полученные нами результаты позволяют приблизиться к пониманию связи между биогенезом и функцией теломеразной РНК, а также предположить механизм действия hTERP в передаче сигналов АМПК-mTORC1. Изучение молекулярного механизма действия hTERP является многообещающим направлением для дальнейших исследований.

Выводы

1. Введение HiViT пептида на С-конец белка hTERP при помощи метода геномного редактирования подтвердило трансляцию теломеразной РНК человека.
2. Делеция нуклеотидов 184-188 теломеразной РНК человека инактивирует открытую рамку считывания hTERP, но не влияет на функционирование теломеразы.
3. Процессинг белка LC3 – основного маркера аутофагии – зависит от содержания hTERP. Белок hTERP участвует в регуляции индуцированной аутофагии.
4. Профиль фосфорилирования белков, участвующих в регуляции аутофагии, меняется при изменении содержания hTERP в клетке. Белок hTERP участвует в передаче сигналов AMPK и mTORC1.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.х.н. Рубцовой М.П. и заведующей отделом функционирования живых систем ИБХ РАН, д.х.н. академику РАН О.А. Донцовой за терпение, ценные советы, помощь в планировании и проведении экспериментов и решении возникающих в ходе работы трудностей.

Автор выражает глубокую благодарность всему коллективу лаборатории химии нуклеопротеидов кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за готовность всегда помочь с решением возникающих по ходу выполнения работы задач, а также за возможность проведения необходимых экспериментов. Автор благодарен аспирантке Корягиной Марии за разностороннюю помощь в исследовании белка hTERP. Также автор выражает благодарность к.х.н. Нарайкиной Ю.В., результаты работы которой стали отправной точкой для исследования роли белка hTERP в регуляции аутофагии.

Автор выражает благодарность сотрудникам отдела функционирования живых систем ИБХ РАН за важные комментарии и замечания на семинарах отдела.

Автор выражает огромную благодарность всему преподавательскому составу биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автор выражает безмерную благодарность своим близким, друзьям и всей своей семье, особенно родителям и сестре, за неоценимую моральную поддержку и помощь во всех начинаниях.

Список литературы

1. Abdrakhmanov A., Gogvadze V., Zhivotovsky B. To Eat or to Die: Deciphering Selective Forms of Autophagy // *Trends Biochem. Sci.* 2020. Т. 45. № 4. С. 347–364.
2. Akincilar S. C., Unal B., Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. Т. 73. № 8. С. 1659–1670.
3. Ali M. и др. Telomerase reverse transcriptase induces basal and amino acid starvation-induced autophagy through mTORC1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. Т. 478. № 3. С. 1198–1204.
4. Aman Y. и др. Autophagy in healthy aging and disease // *Nat. Aging* 2021 18. 2021. Т. 1. № 8. С. 634–650.
5. Anderson D. M. и др. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance // *Cell.* 2015. Т. 160. № 4. С. 595–606.
6. Armanios M. Y. и др. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis // *N. Engl. J. Med.* 2007. Т. 356. № 13. С. 1317–1326.
7. Azzalin C. M., Lingner J. Telomeres: the silence is broken // *Cell Cycle.* 2008. Т. 7. № 9. С. 1161–1165.
8. Baba M. и др. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization // *J. Cell Biol.* 1994. Т. 124. № 6. С. 903.
9. Bagshaw C. R., Hentschel J., Stone M. D. The Processivity of Telomerase: Insights from Kinetic Simulations and Analyses // *Molecules.* 2021. Т. 26. № 24.
10. Blackburn E. H., Collins K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. Т. 3. № 5. С. 1–9.
11. Blackburn E. H., Epel E. S., Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection // *Science.* 2015. Т. 350. № 6265. С. 1193–1198.

12. Blackburn E. H., Gall J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena* // *J. Mol. Biol.* 1978. Т. 120. № 1. С. 33–53.
13. Bley C. J. и др. RNA-protein binding interface in the telomerase ribonucleoprotein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Т. 108. № 51. С. 20333–20338.
14. Booy E. P. и др. The RNA helicase RHAU (DHX36) unwinds a G4-quadruplex in human telomerase RNA and promotes the formation of the P1 helix template boundary // *Nucleic Acids Res.* 2012. Т. 40. № 9. С. 4110–4124.
15. Boulon S. и др. PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli // *Mol. Cell.* 2004. Т. 16. № 5. С. 777–787.
16. Bresson S. M. и др. Canonical Poly(A) Polymerase Activity Promotes the Decay of a Wide Variety of Mammalian Nuclear RNAs // *PLoS Genet.* 2015. Т. 11. № 10.
17. Cagnol S., Chambard J. C. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence // *FEBS J.* 2010. Т. 277. № 1. С. 2–21.
18. Chan H., Wang Y., Feigon J. Progress in Human and *Tetrahymena* Telomerase Structure Determination // *Annu. Rev. Biophys.* 2017. Т. 46. С. 199–225.
19. Chebly A. и др. Telomeric Repeat-Containing RNA (TERRA): A Review of the Literature and First Assessment in Cutaneous T-Cell Lymphomas // *Genes (Basel).* 2022. Т. 13. № 3.
20. Chen C., Gao H., Su X. Autophagy-related signaling pathways are involved in cancer (Review) // *Exp. Ther. Med.* 2021. Т. 22. № 1.
21. Chen J. L., Blasco M. A., Greider C. W. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA // *Cell.* 2000. Т. 100. № 5. С. 503–514.
22. Chen J. L., Greider C. W. Template boundary definition in mammalian telomerase // *Genes Dev.* 2003. Т. 17. № 22. С. 2747–2752.
23. Chen L. и др. An Activity Switch in Human Telomerase Based on RNA

- Conformation and Shaped by TCAB1 // *Cell*. 2018. Т. 174. № 1. С. 218- 230.e13.
24. Chen L. и др. Loss of Human TGS1 Hypermethylase Promotes Increased Telomerase RNA and Telomere Elongation // *Cell Rep*. 2020. Т. 30. № 5. С. 1358- 1372.e5.
25. Chen Y. и др. Human cells lacking coilin and Cajal bodies are proficient in telomerase assembly, trafficking and telomere maintenance // *Nucleic Acids Res*. 2015. Т. 43. № 1. С. 385–395.
26. Chu T. W., MacNeil D. E., Autexier C. Multiple Mechanisms Contribute to the Cell Growth Defects Imparted by Human Telomerase Insertion in Fingers Domain Mutations Associated with Premature Aging Diseases // *J. Biol. Chem*. 2016. Т. 291. № 16. С. 8374.
27. Cifuentes-Rojas C., Shippen D. E. Telomerase regulation // *Mutat. Res*. 2012. Т. 730. № 1–2. С. 20–27.
28. Cong Y.-S., Wright W. E., Shay J. W. Human telomerase and its regulation // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2002. Т. 66. № 3. С. 407–425.
29. Cristofari G. и др. Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation // *Mol. Cell*. 2007. Т. 27. № 6. С. 882–889.
30. Darzacq X. и др. Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells // *J. Cell Biol*. 2006. Т. 173. № 2. С. 207–218.
31. Deng T. и др. TOE1 acts as a 3' exonuclease for telomerase RNA and regulates telomere maintenance // *Nucleic Acids Res*. 2019. Т. 47. № 1. С. 391–405.
32. Dibble C. C. и др. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1 // *Mol. Cell*. 2012. Т. 47. № 4. С. 535–546.
33. Dibble C. C., Cantley L. C. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling // *Trends Cell Biol*. 2015. Т. 25. № 9. С. 545–555.
34. Dikic I., Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2018. Т. 19. № 6. С. 349–364.

35. Ding D. и др. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer // *FEBS J.* 2013. Т. 280. № 14. С. 3205–3211.
36. Doksanı Y. и др. Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation // *Cell.* 2013. Т. 155. № 2. С. 345.
37. Dossou A. S., Basu A. The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy // *Cancers (Basel).* 2019. Т. 11. № 10.
38. Dratwa M. и др. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation // *Front. Immunol.* 2020. Т. 11. С. 589929.
39. Egan E. D., Collins K. An enhanced H/ACA RNP assembly mechanism for human telomerase RNA // *Mol. Cell. Biol.* 2012. Т. 32. № 13. С. 2428–2439.
40. Feng J. и др. The RNA component of human telomerase // *Science.* 1995. Т. 269. № 5228. С. 1236–1241.
41. Feng Y. и др. The machinery of macroautophagy // *Cell Res.* 2014. Т. 24. № 1. С. 24–41.
42. Frank A. K. и др. The Shelterin TIN2 Subunit Mediates Recruitment of Telomerase to Telomeres // *PLoS Genet.* 2015. Т. 11. № 7.
43. Fu D., Collins K. Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs // *Mol. Cell.* 2003. Т. 11. № 5. С. 1361–1372.
44. Galati A. и др. TRF1 and TRF2 binding to telomeres is modulated by nucleosomal organization // *Nucleic Acids Res.* 2015. Т. 43. № 12. С. 5824–5837.
45. Gazzaniga F. S., Blackburn E. H. An antiapoptotic role for telomerase RNA in human immune cells independent of telomere integrity or telomerase enzymatic activity // *Blood.* 2014. Т. 124. № 25. С. 3675–3684.
46. Ghosh A. и др. Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription // *Nat. Cell Biol.* 2012. Т. 14. № 12. С. 1270–1281.
47. Gilson E., Géli V. How telomeres are replicated // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. Т.

8. № 10. С. 825–838.

48. González A. и др. AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control // *Cell Metab.* 2020. Т. 31. № 3. С. 472–492.

49. Gordon D. M., Santos J. H. The emerging role of telomerase reverse transcriptase in mitochondrial DNA metabolism // *J. Nucleic Acids.* 2010. Т. 2010.

50. Greider C. W. Telomerase is processive // *Mol. Cell. Biol.* 1991. Т. 11. № 9. С. 4572–4580.

51. Greider C. W. Telomeres do D-loop-T-loop // *Cell.* 1999. Т. 97. № 4. С. 419–422.

52. Greider C. W., Blackburn E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts // *Cell.* 1985. Т. 43. № 2 Pt 1. С. 405–413.

53. Greider C. W., Blackburn E. H. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity // *Cell.* 1987. Т. 51. № 6. С. 887–898.

54. Greider C. W., Blackburn E. H. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis // *Nature.* 1989. Т. 337. № 6205. С. 331–337.

55. Griffith J. D. и др. Mammalian telomeres end in a large duplex loop // *Cell.* 1999. Т. 97. № 4. С. 503–514.

56. Grill S., Nandakumar J. Molecular mechanisms of telomere biology disorders // *J. Biol. Chem.* 2021. Т. 296.

57. Haendeler J. и др. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707 // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Т. 23. № 13. С. 4598–4610.

58. Haendeler J. и др. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009. Т. 29. № 6. С. 929–935.

59. Hansen M., Rubinsztein D. C., Walker D. W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018 199. 2018. T. 19. № 9. C. 579–593.
60. Hardie D. G. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream // *J. Cell Sci.* 2004. T. 117. № Pt 23. C. 5479–5487.
61. Hardie D. G., Ross F. A., Hawley S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. T. 13. № 4. C. 251–262.
62. Harris R. C., Cheng H. Telomerase, Autophagy and Acute Kidney Injury // *Nephron.* 2016. T. 134. № 3. C. 145–148.
63. Hayflick L., Moorhead P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. T. 25. № 3. C. 585–621.
64. Herzig S., Shaw R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. T. 19. № 2. C. 121–135.
65. Hockemeyer D., Collins K. Control of telomerase action at human telomeres // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. T. 22. № 11. C. 848–852.
66. Hoffmeyer K. и др. Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells // *Science.* 2012. T. 336. № 6088. C. 1549–1554.
67. Holland J. D. и др. Wnt signaling in stem and cancer stem cells // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013. T. 25. № 2. C. 254–264.
68. Hrdličková R., Nehyba J., Henry R. Bose J. Alternatively Spliced Telomerase Reverse Transcriptase Variants Lacking Telomerase Activity Stimulate Cell Proliferation // *Mol. Cell. Biol.* 2012. T. 32. № 21. C. 4283.
69. Iliopoulos D. и др. Epigenetic regulation of hTERT promoter in hepatocellular carcinomas // *Int. J. Oncol.* 2009. T. 34. № 2. C. 391–399.
70. Inoki K., Zhu T., Guan K. L. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival // *Cell.* 2003. T. 115. № 5. C. 577–590.

71. Jády B. E., Bertrand E., Kiss T. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal // *J. Cell Biol.* 2004. Т. 164. № 5. С. 647–652.
72. Jiang G. M. и др. The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy // *Mol. Cancer.* 2019. Т. 18. № 1.
73. Kabeya Y. и др. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing // *EMBO J.* 2000. Т. 19. № 21. С. 5720–5728.
74. Kaushik S., Cuervo A. M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Т. 19. № 6. С. 365–381.
75. Kedde M. и др. Telomerase-independent regulation of ATR by human telomerase RNA // *J. Biol. Chem.* 2006. Т. 281. № 52. С. 40503–40514.
76. Keil E. и др. Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45 β -MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy // *Cell Death Differ.* 2013. Т. 20. № 2. С. 321–332.
77. Khandia R. и др. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy // *Cells.* 2019. Т. 8. № 7. С. 674.
78. Kim J. и др. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 // *Nat. Cell Biol.* 2011. Т. 13. № 2. С. 132–141.
79. Kim J. и др. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities // *Exp. Mol. Med.* 2016. Т. 48. № 4.
80. Kim N. W. и др. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer // *Science.* 1994. Т. 266. № 5193. С. 2011–2015.
81. Kim Y. C., Guan K. L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation // *J. Clin. Invest.* 2015. Т. 125. № 1. С. 25–32.
82. Kirstein N. и др. The Integrator complex at the crossroad of coding and noncoding

RNA // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2021. T. 70. C. 37–43.

83. Kiss T., Fayet-Lebaron E., Jády B. E. Box H/ACA small ribonucleoproteins // *Mol. Cell.* 2010. T. 37. № 5. C. 597–606.

84. Klionsky D. J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve // *Autophagy.* 2008. T. 4. № 6. C. 740–743.

85. Klionsky D. J., Schulman B. A. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. T. 21. № 4. C. 336–345.

86. Koh C. M. и др. Telomerase regulates MYC-driven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity // *J. Clin. Invest.* 2015. T. 125. № 5. C. 2109.

87. Kowarz E., Löscher D., Marschalek R. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines // *Biotechnol. J.* 2015. T. 10. № 4. C. 647–653.

88. Кyo S. и др. Significance of immunological detection of human telomerase reverse transcriptase: re-evaluation of expression and localization of human telomerase reverse transcriptase // *Am. J. Pathol.* 2003. T. 163. № 3. C. 859–867.

89. Lafferty-Whyte K. и др. A gene expression signature classifying telomerase and ALT immortalization reveals an hTERT regulatory network and suggests a mesenchymal stem cell origin for ALT // *Oncogene.* 2009. T. 28. № 43. C. 3765–3774.

90. Leclerc G. M. и др. AMPK-induced activation of Akt by AICAR is mediated by IGF-1R dependent and independent mechanisms in acute lymphoblastic leukemia // *J. Mol. Signal.* 2010. T. 5.

91. Lee I. H. Mechanisms and disease implications of sirtuin-mediated autophagic regulation // *Exp. Mol. Med.* 2019. T. 51. № 9.

92. Lei M., Podell E. R., Cech T. R. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. T. 11. № 12. C. 1223–1229.

93. Leulliot N. и др. The box H/ACA RNP assembly factor Naf1p contains a domain homologous to Gar1p mediating its interaction with Cbf5p // *J. Mol. Biol.* 2007. Т. 371. № 5. С. 1338–1353.
94. Li B., Oestreich S., Lange T. De. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution // *Cell.* 2000. Т. 101. № 5. С. 471–483.
95. Li S. и др. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA // *J. Biol. Chem.* 2005. Т. 280. № 25. С. 23709–23717.
96. Lin C., Yang D. Human Telomeric G-Quadruplex Structures and G-Quadruplex-Interactive Compounds // *Methods Mol. Biol.* 2017. Т. 1587. С. 171–196.
97. Lingner J. и др. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase // *Science.* 1997. Т. 276. № 5312. С. 561–567.
98. Listerman I., Gazzaniga F. S., Blackburn E. H. An investigation of the effects of the core protein telomerase reverse transcriptase on Wnt signaling in breast cancer cells // *Mol. Cell. Biol.* 2014. Т. 34. № 2. С. 280–289.
99. Liu B. и др. Structure of active human telomerase with telomere shelterin protein TPP1 // *Nature.* 2022. Т. 604. № 7906. С. 578–583.
100. Liu H. и др. TERC promotes cellular inflammatory response independent of telomerase // *Nucleic Acids Res.* 2019. Т. 47. № 15. С. 8084–8095.
101. Liu N. и др. hTERT promotes tumor angiogenesis by activating VEGF via interactions with the Sp1 transcription factor // *Nucleic Acids Res.* 2016. Т. 44. № 18. С. 8693–8703.
102. Liu Z. и др. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells // *Oncogene.* 2013. Т. 32. № 36. С. 4203–4213.
103. Lubas M. и др. Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting

complex // *Mol. Cell*. 2011. Т. 43. № 4. С. 624–637.

104. Maestroni L., Matmati S., Coulon S. Solving the Telomere Replication Problem // *Genes (Basel)*. 2017. Т. 8. № 2.

105. Marcelo K. L., Means A. R., York B. The Ca(2+)/Calmodulin/CaMKK2 Axis: Nature's Metabolic CaMshaft // *Trends Endocrinol. Metab.* 2016. Т. 27. № 10. С. 706–718.

106. Martina J. A. и др. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB // *Autophagy*. 2012. Т. 8. № 6. С. 903–914.

107. Martinez P. и др. Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites // *Nat. Cell Biol.* 2010. Т. 12. № 8. С. 768–780.

108. Melko M. и др. Mapping domains of ARS2 critical for its RNA decay capacity // *Nucleic Acids Res.* 2020. Т. 48. № 12. С. 6943–6953.

109. Menon S. и др. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome // *Cell*. 2014. Т. 156. № 4. С. 771–785.

110. Meola N. и др. Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts // *Mol. Cell*. 2016. Т. 64. № 3. С. 520–533.

111. Meola N., Jensen T. H. Targeting the nuclear RNA exosome: Poly(A) binding proteins enter the stage // *RNA Biol.* 2017. Т. 14. № 7. С. 820–826.

112. Mitchell J. R., Collins K. Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase // *Mol. Cell*. 2000. Т. 6. № 2. С. 361–371.

113. Mizushima N. и др. A protein conjugation system essential for autophagy // *Nature*. 1998. Т. 395. № 6700. С. 395–398.

114. Montero J. J. и др. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres // *Nat. Commun.* 2016. Т. 7.

115. Moon D. H. и др. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component // *Nat. Genet.* 2015. Т. 47. № 12. С. 1482–1488.
116. Morin G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats // *Cell.* 1989. Т. 59. № 3. С. 521–529.
117. Nakatogawa H. и др. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. Т. 10. № 7. С. 458–467.
118. Nečasová I. и др. Basic domain of telomere guardian TRF2 reduces D-loop unwinding whereas Rap1 restores it // *Nucleic Acids Res.* 2017. Т. 45. № 21. С. 12170–12180.
119. Neidle S., Parkinson G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002. Т. 1. № 5. С. 383–393.
120. Nguyen D. и др. A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA // *Cell Rep.* 2015. Т. 13. № 10. С. 2244–2257.
121. Nguyen T. H. D. и др. Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme // *Nature.* 2018. Т. 557. № 7704. С. 190.
122. Ohsumi Y. Molecular mechanism of autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae* // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1999. Т. 354. № 1389. С. 1577–1581.
123. Olovnikov A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* 1973. Т. 41. № 1. С. 181–190.
124. Pakhomova T. и др. Role of RNA Biogenesis Factors in the Processing and Transport of Human Telomerase RNA // *Biomedicines.* 2022. Т. 10. № 6.
125. Palm W., Lange T. De. How shelterin protects mammalian telomeres // *Annu. Rev. Genet.* 2008. Т. 42. С. 301–334.

126. Papinski D., Kraft C. Regulation of Autophagy By Signaling Through the Atg1/ULK1 Complex // *J. Mol. Biol.* 2016. T. 428. № 9 Pt A. C. 1725–1741.
127. Park H., Kang J. H., Lee S. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: A Hunter for Aggregates // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. T. 21. № 9.
128. Park J. И др. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin // *Nature.* 2009. T. 460. № 7251. C. 66–72.
129. Pike A. M. и др. TIN2 Functions with TPP1/POT1 To Stimulate Telomerase Processivity // *Mol. Cell. Biol.* 2019. T. 39. № 21.
130. Podlevsky J. D., Chen J. J. L. It all comes together at the ends: Telomerase structure, function, and biogenesis // *Mutat. Res.* 2012. T. 730. № 0. C. 3.
131. Podlevsky J. D., Chen J. J. L. Evolutionary perspectives of telomerase RNA structure and function // *RNA Biol.* 2016. T. 13. № 8. C. 720.
132. Puente C., Hendrickson R. C., Jiang X. Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy // *J. Biol. Chem.* 2016. T. 291. № 11. C. 6026–6035.
133. Qi X. и др. RNA/DNA hybrid binding affinity determines telomerase template-translocation efficiency // *EMBO J.* 2012. T. 31. № 1. C. 150–161.
134. Qin J., Autexier C. Regulation of human telomerase RNA biogenesis and localization // *RNA Biol.* 2021. T. 18. № 3. C. 305–315.
135. Rabanal-Ruiz Y., Otten E. G., Korolchuk V. I. mTORC1 as the main gateway to autophagy // *Essays Biochem.* 2017. T. 61. № 6. C. 565–584.
136. Ran F. A. и др. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat. Protoc.* 2013. T. 8. № 11. C. 2281–2308.
137. Roake C. M. и др. Disruption of Telomerase RNA Maturation Kinetics Precipitates Disease // *Mol. Cell.* 2019. T. 74. № 4. C. 688- 700.e3.
138. Robart A. R., Collins K. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly,

activity, and processivity using disease-linked subunit variants // *J. Biol. Chem.* 2010. T. 285. № 7. С. 4375–4386.

139. Robart A. R., Collins K. Human telomerase domain interactions capture DNA for TEN domain-dependent processive elongation // *Mol. Cell.* 2011. T. 42. № 3. С. 308–318.

140. Roberts D. J., Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy // *Cell Death Differ.* 2015. T. 22. № 2. С. 248–257.

141. Roh J. П и др. Hexokinase 2 is a molecular bridge linking telomerase and autophagy // *PLoS One.* 2018. T. 13. № 2. С. e0193182.

142. Romaniuk A. и др. The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off // *Mol. Biol. Rep.* 2019. T. 46. № 1. С. 1401–1411.

143. Rubtsova M. и др. Protein encoded in human telomerase RNA is involved in cell protective pathways // *Nucleic Acids Res.* 2018. T. 46. № 17. С. 8966–8977.

144. Rubtsova M., Dontsova O. Human Telomerase RNA: Telomerase Component or More? // *Biomolecules.* 2020. T. 10. № 6. С. 1–15.

145. Rubtsova M., Dontsova O. How Structural Features Define Biogenesis and Function of Human Telomerase RNA Primary Transcript // *Biomedicines.* 2022. T. 10. № 7.

146. Rubtsova M. P. и др. Integrator is a key component of human telomerase RNA biogenesis // *Sci. Rep.* 2019. T. 9. № 1.

147. Sæbøe-Larssen S., Fossberg E., Gaudernack G. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues // *BMC Mol. Biol.* 2006. T. 7.

148. Sanford S. L. и др. How DNA damage and non-canonical nucleotides alter the telomerase catalytic cycle // *DNA Repair (Amst).* 2021. T. 107. С. 103198.

149. Schlotter F. и др. Proteomic analyses reveal new features of the box H/ACA RNP biogenesis // *Nucleic Acids Res.* 2023. Т. 51. № 7.
150. Schmidt J. C., Cech T. R. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation // *Genes Dev.* 2015. Т. 29. № 11. С. 1095–1105.
151. Schmidt J. C., Dalby A. B., Cech T. R. Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres // *Elife.* 2014. Т. 3. № October2014. С. 1–20.
152. Schwinn M. K. и др. CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide // *ACS Chem. Biol.* 2018. Т. 13. № 2. С. 467–474.
153. Sealey D. C. F. и др. The N-terminus of hTERT contains a DNA-binding domain and is required for telomerase activity and cellular immortalization // *Nucleic Acids Res.* 2010. Т. 38. № 6. С. 2019–2035.
154. Ségal-Bendirdjian E., Geli V. Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglia // *Front. Cell Dev. Biol.* 2019. Т. 7. С. 482490.
155. Sexton A. N. и др. Genetic and molecular identification of three human TPP1 functions in telomerase action: recruitment, activation, and homeostasis set point regulation // *Genes Dev.* 2014. Т. 28. № 17. С. 1885–1899.
156. Sexton A. N., Collins K. The 5' guanosine tracts of human telomerase RNA are recognized by the G-quadruplex binding domain of the RNA helicase DHX36 and function to increase RNA accumulation // *Mol. Cell. Biol.* 2011. Т. 31. № 4. С. 736–743.
157. Sfeir A., Lange T. De. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem // *Science.* 2012. Т. 336. № 6081. С. 593–597.
158. Shackelford D. B., Shaw R. J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. Т. 9. № 8. С. 563–575.
159. Shukla S. и др. Inhibition of telomerase RNA decay rescues telomerase deficiency caused by dyskerin or PARN defects // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Т. 23. № 4. С. 286–

292.

160. Shukla S. и др. Chemical inhibition of PAPD5/7 rescues telomerase function and hematopoiesis in dyskeratosis congenita // *Blood Adv.* 2020. Т. 4. № 12. С. 2717–2722.

161. Singhapol C. и др. Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 1.

162. Skaar J. R. и др. The Integrator complex controls the termination of transcription at diverse classes of gene targets // *Cell Res.* 2015. Т. 25. № 3. С. 288–305.

163. Skeen J. E. и др. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner // *Cancer Cell.* 2006. Т. 10. № 4. С. 269–280.

164. Smith E. M., Pendlebury D. F., Nandakumar J. Structural biology of telomeres and telomerase // *Cell. Mol. Life Sci.* 2020. Т. 77. № 1. С. 61–79.

165. Son A., Park J. E., Kim V. N. PARN and TOE1 Constitute a 3' End Maturation Module for Nuclear Non-coding RNAs // *Cell Rep.* 2018. Т. 23. № 3. С. 888–898.

166. Song X. и др. Crosstalk Between Apoptosis and Autophagy Is Regulated by the Arginylated BiP/Beclin-1/p62 Complex // *Mol. Cancer Res.* 2018. Т. 16. № 7. С. 1077–1091.

167. Soutourina J. Transcription regulation by the Mediator complex // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Т. 19. № 4. С. 262–274.

168. Sun Y. и др. mTORC2: a multifaceted regulator of autophagy // *Cell Commun. Signal.* 2023. Т. 21. № 1.

169. Taji F. и др. Autophagy induction reduces telomerase activity in HeLa cells // *Mech. Ageing Dev.* 2017. Т. 163. С. 40–45.

170. Takeshige K. и др. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction // *J. Cell Biol.* 1992. Т. 119. № 2. С. 301.

171. Tamargo-Gómez I., Mariño G. AMPK: Regulation of Metabolic Dynamics in the

Context of Autophagy // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. T. 19. № 12.

172. Tee A. R. и др. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb // *Curr. Biol.* 2003. T. 13. № 15. С. 1259–1268.

173. Teichroeb J. H., Kim J., Betts D. H. The role of telomeres and telomerase reverse transcriptase isoforms in pluripotency induction and maintenance // *RNA Biol.* 2016. T. 13. № 8. С. 707–719.

174. Theimer C. A. и др. Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals // *Mol. Cell.* 2007. T. 27. № 6. С. 869–881.

175. Theimer C. A., Blois C. A., Feigon J. Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function // *Mol. Cell.* 2005. T. 17. № 5. С. 671–682.

176. Timashev L. A., Lange T. De. Characterization of t-loop formation by TRF2 // *Nucleus.* 2020. T. 11. № 1. С. 164–177.

177. Tseng C. K. и др. Human Telomerase RNA Processing and Quality Control // *Cell Rep.* 2015. T. 13. № 10. С. 2232–2243.

178. Tsukada M., Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *FEBS Lett.* 1993. T. 333. № 1–2. С. 169–174.

179. Udriou I., Marinaccio J., Sgura A. Many Functions of Telomerase Components: Certainties, Doubts, and Inconsistencies // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. T. 23. № 23. С. 15189.

180. Vega-Rubín-de-celis S. The Role of Beclin 1-Dependent Autophagy in Cancer // *Biol.* 2020, Vol. 9, Page 4. 2019. T. 9. № 1. С. 4.

181. Venteicher A. S. и др. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis // *Science.* 2009. T. 323. № 5914. С. 644–648.

182. Vogan J. M. и др. Minimized human telomerase maintains telomeres and resolves

endogenous roles of H/ACA proteins, TCAB1, and Cajal bodies // *Elife*. 2016. T. 5. № AUGUST.

183. Wang L., Klionsky D. J., Shen H. M. The emerging mechanisms and functions of microautophagy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2023. T. 24. № 3. C. 186–203.

184. Watson J. D. Origin of concatemeric T7 DNA // *Nat. New Biol.* 1972. T. 239. № 94. C. 197–201.

185. Woods A. и др. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade // *Curr. Biol.* 2003. T. 13. № 22. C. 2004–2008.

186. Wu G. и др. A Two-Layered Targeting Mechanism Underlies Nuclear RNA Sorting by the Human Exosome // *Cell Rep.* 2020. T. 30. № 7. C. 2387- 2401.e5.

187. Wu R. A. и др. Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. T. 86. C. 439.

188. Wu R. A., Collins K. Human telomerase specialization for repeat synthesis by unique handling of primer-template duplex // *EMBO J.* 2014. T. 33. № 8. C. 921–935.

189. Wu S. и др. Telomerase RNA TERC and the PI3K-AKT pathway form a positive feedback loop to regulate cell proliferation independent of telomerase activity // *Nucleic Acids Res.* 2022. T. 50. № 7. C. 3764–3776.

190. Wu X. qin и др. Feedback regulation of telomerase reverse transcriptase: new insight into the evolving field of telomerase in cancer // *Cell. Signal.* 2013. T. 25. № 12. C. 2462–2468.

191. Xi L., Cech T. R. Inventory of telomerase components in human cells reveals multiple subpopulations of hTR and hTERT // *Nucleic Acids Res.* 2014. T. 42. № 13. C. 8565–8577.

192. Xiang H. и др. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose // *Acta Pharm. Sin. B.* 2020. T. 10. № 4. C. 569.

193. Xing J. и др. LncRNA-Encoded Peptide: Functions and Predicting Methods // *Front.*

Oncol. 2021. Т. 10.

194. Ye J. Z. S. и др. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres // J. Biol. Chem. 2004. Т. 279. № 45. С. 47264–47271.

195. Zhang Q., Kim N. K., Feigon J. Architecture of human telomerase RNA // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Т. 108. № 51. С. 20325–20332.

196. Zhang Y. и др. The Role of Astragaloside IV against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury: Suppression of Apoptosis via Promotion of P62-LC3-Autophagy // Molecules. 2019. Т. 24. № 9.

197. Zhao Y. и др. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway // Mol. Cancer. 2017. Т. 16. № 1.

198. Zhong D. и др. 2-Deoxyglucose induces Akt phosphorylation via a mechanism independent of LKB1/AMP-activated protein kinase signaling activation or glycolysis inhibition // Mol. Cancer Ther. 2008. Т. 7. № 4. С. 809–817.

199. Zhou Y. Y. и др. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway // Biosci. Rep. 2015. Т. 35. № 3. С. 1–10.

200. Zhu Y. и др. Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells // Mol. Biol. Cell. 2004. Т. 15. № 1. С. 81–90.