

УДК 577.57.017.6

Функции теломеразы: удлинение теломер и не только

М. П. Рубцова^{1,2*}, Д. П. Василькова¹, А. Н. Малякко¹, Ю. В. Нарайкина³, М. Э. Зверева^{1,2},
О. А. Донцова^{1,2}

¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

³Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

*E-mail: mprubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 08.02.2012 г.

РЕФЕРАТ На концах хромосом находятся специальные структуры – теломеры, от длины которых зависит пролиферативный потенциал клетки, или число делений, которые клетка может совершить до своей гибели. Длину теломер поддерживает фермент теломераза. К примеру, в эмбриональных клеточных линиях теломераза активна, и длина теломер в них остается постоянной, т.е. эти клетки обладают неограниченным потенциалом деления. В стволовых клетках активность теломеразы ниже, что позволяет лишь частично компенсировать укорачивание теломер. В соматических клетках активность теломеразы обычно отсутствует. Укорачивание теломер продолжается до тех пор, пока теломера не теряет способность защищать концы хромосомы, тогда клетка достигает предела Хейфлика и переходит в состояние старения, а после этого наступает кризис, сопровождающийся массовой гибелью клеток. Уцелевшие клетки превращаются в иммортальные или в злокачественные (раковые), способные к неограниченному делению и поддержанию длины теломер (как правило, с помощью теломеразы). Теломераза является обратной транскриптазой. Она состоит из двух основных компонентов – теломеразной РНК (TER) и обратной транскриптазы (TERT). TERT относится к некодирующим РНК, она содержит участок, служащий матрицей для синтеза теломер. В последнее время появляется все больше работ об альтернативных функциях компонентов теломеразы. В настоящем обзоре суммированы данные о структуре, биогенезе и функциях теломеразы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА теломераза, обратная транскриптаза, теломеры, митохондрия, повреждения ДНК, экспрессия генов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TER – теломеразная РНК; TERT – теломеразная обратная транскриптаза.

ВВЕДЕНИЕ

В клетках эукариот генетическая информация хранится в линейных молекулах ДНК – хромосомах [1]. Еще в 1930-х гг. обнаружили, что целые хромосомы и их обломки по-разному ведут себя в клетках. Разорванные хромосомы сливаются друг с другом, перестраиваются и характеризуются нестабильностью [2, 3]. Тогда же предположили, что подобные различия обусловлены присутствием на концах хромосом специальных нуклеотидных последовательностей, которые называли теломерами [3–5]. Теломеры состоят из повторяющихся последовательностей и набора специальных белков, которые взаимодействуют с такими повторами и организуют их в пространстве особым образом, образуя нуклеопротеидный комплекс – теломерный гетерохроматин [6, 7]. В ходе

репликации генома, происходящей при делении клеток, в результате удаления концевой РНК-затравки и, как следствие, неполной репликации линейных молекул ДНК наблюдается укорачивание 5'-конца дочерней цепи. Эту «проблему концевой недорепликации» в 1970-х гг. независимо сформулировали А.М. Оловников и Дж. Уотсон [8, 9]. Оловников предположил, что существует специальный фермент – теломераза, который может компенсировать «проблему концевой недорепликации». Этот фермент был открыт в 1987 г. Э. Грейдер и К. Блэкберн [10].

В состав теломеразы входят два основных компонента – обратная транскриптаза (TERT) и теломеразная РНК (TER), содержащая матричный участок для синтеза теломерных повторов [9]. Кроме того, в теломеразный комплекс входят многочисленные

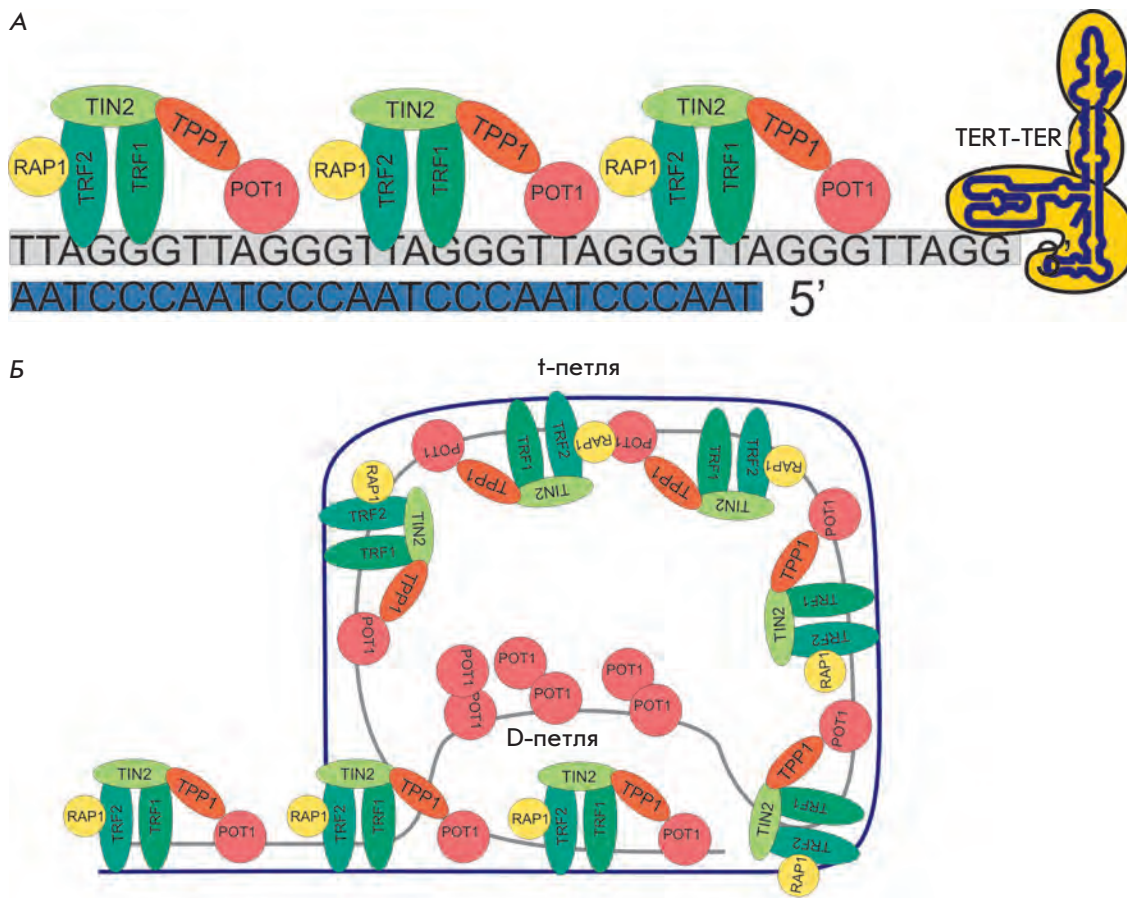


Рис. 1. Структура теломер. А – Схематическое изображение комплекса теломерной ДНК, белков шелтеринового комплекса и теломеразы. Б – Схематическое изображение шелтеринового комплекса, связанного с теломерной ДНК, в конфигурации t-петли.

дополнительные компоненты, обеспечивающие активность фермента *in vivo*. Дополнительные белки участвуют в разных процессах. Часть из них необходима для посадки теломеразы на теломеру в определенный момент клеточного цикла [10], другие белки регулируют активность фермента [11]. Известно, что теломераза работает не во всех клетках высших эукариот, однако, ее компоненты присутствуют в клетке практически всегда. В последнее время стали появляться данные о функциях компонентов теломеразы, не связанных с теломерами.

СТРУКТУРА ТЕЛОМЕР

Теломеры представляют собой повторяющиеся нуклеотидные последовательности, с которыми связаны специальные белки, защищающие концы хромосом от деградации и систем репарации двухцепочечных разрывов [12, 13]. По мере накопления данных была высказана гипотеза о том, что теломеры состоят из трех частей. Они содержат, во-первых, так называемый кеп – концевую структуру, которая защищает концы хромосом от деградации и системы репарации двухцепочечных разрывов (DDR – DNA damage response), а также контролирует удлинение теломер. Основная часть теломеры представлена двухцепочечной ДНК (дцДНК), состоящей из повторяющихся

и транскрибируемых последовательностей. Третью часть теломеры также занимают повторяющиеся последовательности, так называемые субтеломерные области [14, 15]. Нуклеотидная последовательность теломер обогащена остатками тимидина и гуанозина и достаточно консервативна. Теломеры млекопитающих представляют собой двухцепочечный участок, который состоит из повторов ТТАGGG и 3'-выступающего участка G-цепи длиной 150–200 нуклеотидов. Согласно одной из гипотез, выступающий участок G-цепи переплетается с двухцепочечным участком теломеры, образуя t-петлю. В месте взаимодействия выступающего 3'-конца с двухцепочечным участком образуется так называемая D-петля (рис. 1). t-Петли были обнаружены методом электронной микроскопии после выделения и специальной обработки ДНК. Однако существование таких структур в клетках однозначно не доказано, поэтому D-петли рассматриваются как предполагаемые структуры.

Функции теломер зависят от минимальной длины теломерных повторов и активности ассоциированного с ними белкового комплекса. Этот комплекс называется шелтерином и состоит из шести белков: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 и RAP1. Белки TRF1, TRF2

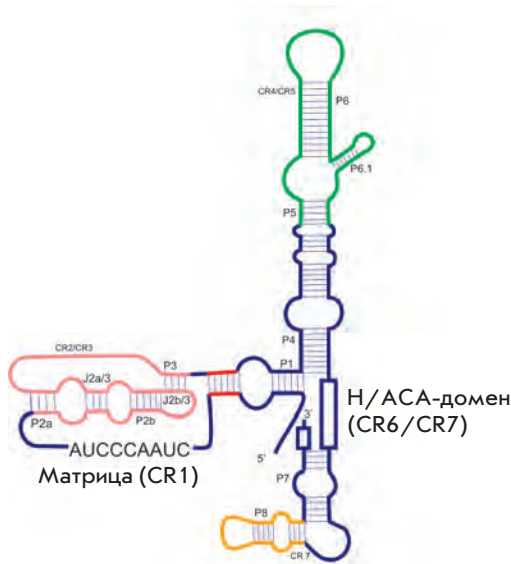
(telomeric repeat binding factor 1 и 2) и POT1 (protection of telomere protein 1) связаны с теломерной ДНК. TRF1 и TRF2 связываются с двухцепочечными участками теломер, а POT1 – с 3'-выступающим одноцепочечным участком G-цепи [16]. TRF1 и TRF2 связывают теломеры независимо, между собой они не взаимодействуют. Оба белка в виде гомодимера и олигомера специфично связывают ДНК-дуплекс с теломерной последовательностью 5'-YTAGGGTTR-3' [16–20]. POT1 высокоспецифично связывается с теломерной одноцепочечной ДНК (оцДНК) 3'-TAGGGTTRAG-3', указывая на возможность взаимодействия как с выступающей G-цепью, так и с вытесняемой ею последовательностью D-петли [13, 21–23]. POT1 взаимодействует с TRF1. Считается, что таким образом TRF1 способствует связыванию POT1 с одноцепочечным участком теломеры. Своими независимыми доменами TIN2 (TRF1-interacting protein 2) взаимодействует одновременно с TRF1 и TRF2, а также с комплексом TPP1–POT1, образуя мостик между компонентами шелтеринового комплекса [24, 25]. С-Концевой домен TPP1 связывается с TIN2, а центральный с POT1 [26–29], привлекая таким образом POT1 на теломеры [30, 31]. Кроме того, на N-конце TPP1 находится домен, взаимодействующий с теломеразой. Этот факт подтверждает предположение о том, что TPP1 привлекает теломеразу на конец хромосомы [32]. Белок RAP1 образует комплекс с TRF2 и с теломерой [33, 34]. В работах нескольких групп показано, что RAP1 не важен для кепирования теломер, но он препятствует рекомбинации на теломерных участках и повышает их стабильность [35, 36]. Таким образом, RAP1, в отличие от TRF1, TRF2, POT1 и TPP1, не защищает теломеры [32, 35, 36].

Существует гипотеза о формировании в теломерных областях хромосом G-квадруплексных структур. Четыре теломерных повтора способны образовывать G-квадруплекс, который ингибирует теломеразную активность [37–41]. С помощью антител, специфичных к G-квадруплексным структурам, прямо показано образование таких структур в клетках ресничных [42, 43]. Косвенно способность теломерных областей высших эукариот к формированию G-квадруплексных структур подтверждается экспериментальными данными. Согласно [44], длинные 3'-выступающие теломерные концы образуют G-квадруплекс *in vitro*. Известно, что лиганды, связывающие G-квадруплексные структуры, вызывают укорачивание теломер в клетках. При этом активность теломеразы не изменяется, но нарушается взаимодействие шелтеринового комплекса с теломерной ДНК. Теломеры становятся при этом нестабильными, связывание POT1 с ними нарушается, и в клетках активируется система ответа на повреждения ДНК.

Это может свидетельствовать о вредных для клетки последствиях стабилизации G-квадруплексов в теломерных областях. Образование таких структур, по-видимому, возможно в переходных состояниях, но теломеры не способны постоянно поддерживать структуру G-квадруплексов [45].

Известно, что хромосомы в клетках эукариот упакованы специальными белками в хроматин. Считается, что в конденсированном состоянии хроматин не транскрибируется, а с эухроматином ассоциирован аппарат транскрипции клетки [46]. Теломерные участки хромосом образуют также так называемый теломерный хроматин [47]. Предполагается, что удлинение теломер может зависеть от эпигенетического статуса теломерного хроматина [48]. Известно, что как теломерные, так и субтеломерные участки обогащены гистонами, обычно связанными с репрессированными участками гетерохроматина, такими, как гистоны H3 (H3K9m3) и H4 (H4K20), триметилированные по остаткам лизина 9 и лизина 20 соответственно. С этими участками связаны и гетерохроматинсвязывающие белки 1 α , 1 β и 1 γ (известные как CBX5, CBX1 и CBX3 соответственно) [49–51]. Кроме того, установлено, что теломерная ДНК сильно метилирована. Хромосомы в клетках, в которых отсутствуют N-метилтрансферазы (SUV420H1 и SUV39H1), модифицирующие остатки лизина в гистонах, содержат слишком длинные теломеры [49, 50]. Такой же эффект наблюдается и в клетках со сниженным за счет дефицита DICER1 или ДНК-(цитозин-5) метилтрансфераз 1, 3A и 3B (DNMT1, 3A и 3B) статусом метилирования субтеломерных областей [52]. Не так давно обнаружили РНК, содержащую теломерные повторы – TERRA (Telomeric Repeat containing RNA), или теломерную РНК – TelRNA, которая образуется в результате транскрипции теломер. Эта РНК может взаимодействовать с теломерным хроматином и подавлять удлинение теломер *in vitro*, действуя как потенциальный ингибитор теломеразы [48, 53, 54]. Можно предположить, что в случае онкотрансформации клеток синтез TERRA должен репрессироваться, чтобы она не могла подавлять активность теломеразы.

Теломерный хроматин динамичен и его состояние может изменяться. В результате ядерного перепрограммирования дифференцированные соматические клетки могут стать индуцированными плюрипотентными клетками (iPS – induced pluripotent cell) [55]. Переход клеток в плюрипотентное состояние сопровождается изменениями в эпигенетическом статусе теломер. Теломерный хроматин становится менее конденсированным, в нем снижается содержание гистонов, что приводит к образованию большего количества TERRA, учащению рекомбинации теломер, длина теломер при этом увеличивается и становится



Теломеразная РНК человека

- Псевдоузел
- Элемент, связывающий матрицу
- Трансактивирующий домен
- Стабилизирующая шпилька

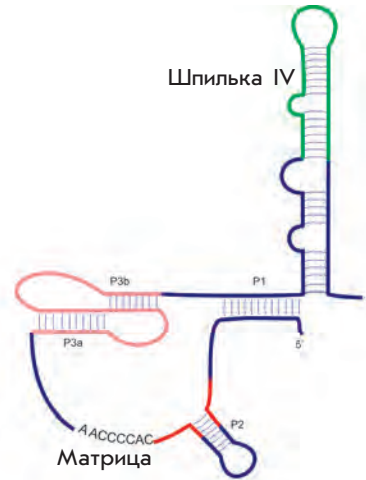
такой же, как и в эмбриональных стволовых клетках [56]. Хотя прямых доказательств регуляции длины теломер за счет изменения состояния хроматина еще не получено, приведенные наблюдения позволяют предположить такую возможность.

СТРУКТУРА ТЕЛОМЕРАЗЫ

Сборка теломеразы, ее существование в клетке и посадка на теломеры – процессы, в чем-то сходные, а в чем-то отличные у эволюционно далеких организмов [57–59]. Общие свойства обнаружены у всех компонентов теломеразы: обратной транскриптазы (TERT – telomerase reverse transcriptase), теломеразной РНК (TER – telomerase RNA) и TER-связывающих белков, которые стабилизируют РНК и способствуют сборке активного фермента. Необходимо отметить, что только TERT является высококонсервативным компонентом теломеразы. Результаты изучения компонентов, входящих в состав теломеразы, весьма противоречивы [60–64]. По-видимому, в процессе жизнедеятельности теломеразы, взаимодействуя с различными компонентами, может находиться в разных комплексах.

Структура TER

Теломеразная РНК – один из основных компонентов теломеразы, она содержит участок, который



Теломеразная РНК *T. thermophila*

Рис. 2. Структура теломеразной РНК. Схематическое изображение вторичных структур теломеразной РНК человека и *T. thermophila*. Консервативные элементы выделены цветом.

служит матрицей для синтеза теломер [65, 66]. Несмотря на различия в длине и нуклеотидной последовательности теломеразных РНК из разных организмов, вторичные структуры TER демонстрируют высокое сходство и содержат одинаковые структурные элементы [65, 67]. Консервативными в структуре TER являются матричный участок, псевдоузел, *транс*-активируемый домен и домены, необходимые для стабильности *in vivo* (рис. 2). Таким образом, в состав TER входят элементы, необходимые для теломеразной активности, а также для сборки, локализации и стабильности РНК, но не требуемые для ферментативной активности. Матричный участок TER взаимодействует с 3'-выступающей частью G-цепи теломер и направляет синтез ДНК. Этот участок должен быть одноцепочечным, хотя анализ вторичной структуры полученного *in vitro* транскрипта и TER в экспериментах *in vivo* выявляет различия в структуре, что свидетельствует о его взаимодействии с другими компонентами клетки [68–70]. Не так давно методом ЯМР получены данные об образовании триплексной структуры между элементами псевдоузла и матричным участком. Возможно, именно образованием этой структуры и объясняются различия в структуре матричного участка TER [71]. Предполагается также, что в отсутствие TERT и других необходимых компонентов TER не образует правильную струк-

туру. Матричный участок фланкируют два элемента: 5'-матричный ограничивающий и 3'-матричный узнающий [72–75]. 5'-Элемент представляет собой двухцепочечный участок, расположенный непосредственно перед матричным участком, он регулирует добавление нуклеотидов в ходе обратной транскрипции и, по-видимому, является участком связывания с TERT. С помощью мутагенеза показали, что для эффективного функционирования теломеразы важна не нуклеотидная последовательность, а именно вторичная структура этого участка. 3'-Узнающий элемент – это одноцепочечная структура, расположенная после матричного участка, которая позволяет 3'-концу матрицы занять активный центр, стимулирует теломеразную активность и процессивность при добавлении повторов, а также содержит участок связывания N-конца TERT [76, 77].

Из элементов вторичной структуры теломеразной РНК наиболее интенсивно изучается псевдоузел. Изменения стабильности псевдоузла приводят к снижению активности теломеразы, что указывает на важную биологическую роль этого структурного элемента [78, 79]. Полученные за последнее время результаты изучения олигонуклеотидов, имитирующих элементы структуры псевдоузла TERC, методом ЯМР и молекулярного моделирования подтвердили, что именно динамика третичной структуры псевдоузла играет важную роль в функционировании теломеразы [80–85]. Псевдоузел формируется благодаря образованию эволюционно консервативного Хугстеновского триплета U^{*}A^{*}U между U-богатой петлей 1 (J2b/3) и основной шпилькой в стебле (P3), которая помогает поддерживать структурную целостность и требуется для активности теломеразы. В то же время A-богатая петля 2 (часть J2a/3) вступает еще в два неканонических триплетных взаимодействия, которые способствуют стабилизации псевдоузла [86, 87]. Между этими двумя структурными элементами, состоящими из триплетов, находится еще одна Хугстеновская пара A^{*}U, которая создает стэкинг-подобное взаимодействие двух основных стеблей, что приводит к формированию окончательной структуры тройной спирали [85]. Мутации нуклеотидов внутри псевдоузла приводят к разрушению третичной структуры и значительно снижают активность теломеразы, а компенсаторные мутации восстанавливают теломеразную активность. Эти данные свидетельствуют о том, что третичная структура более существенно влияет на каталитическую активность фермента, чем последовательность нуклеотидов [71, 87, 88]. Предполагается, что псевдоузел позволяет правильно ориентировать дуплекс, состоящий из матрицы и праймера, в активном центре теломеразы [71]. Возможно, что способность этой структуры существовать в двух

конформациях – псевдоузла и шпильки – важна для функционирования теломеразы [83].

В отличие от псевдоузла, структура *транс*-активирующего домена TERC изучена менее подробно. Первичные структуры этого домена из разных организмов характеризуются высоким уровнем гомологии [7, 9, 87]. *Транс*-активирующий домен представляет собой длинную шпильку из нескольких очень стабильных спиралей, разделенных асимметричными петлями и одонуклеотидными выпетливаниями. Этот домен необходим для правильного формирования псевдоузла, добавления нуклеотидов и процессивности теломеразы при добавлении повторов [88–90]. Наиболее хорошо изучена спираль P6.1 *транс*-активирующего домена TERC человека. Этот элемент крайне важен для работы фермента [90–93]. Роль P6.1 у позвоночных понятна не до конца, но известно, что правильная структура этой спирали необходима для сборки теломеразы, а специфические последовательности в петлях играют важную роль в катализе [93]. Считается, что в результате взаимодействия петли P6.1 с матричным участком формируется третичная структура TERC, чем и объясняется роль этих элементов в активности и процессивности теломеразы [94].

На самом 3'-конце TERC позвоночных находится домен H/ACA, который встречается в малых ядрышковых РНК (мякРНК, small nucleolar RNA) и в малых РНК, специфичных для телец Кахала (мккаРНК, small Cajal body specific RNA). H/ACA-домен представляет собой одноцепочечный участок, содержащий H-бокс (ANANNA, где N – любой нуклеотид), следующую за ним шпильку, в которой находится САВ-бокс, и одноцепочечный 3'-конец, содержащий АСА-бокс [94, 95]. H/ACA-домен необходим для стабильности теломеразной РНК *in vivo* [96]. Внутри этого домена находится САВ-бокс, служащий сигналом локализации в тельцах Кахала. САВ-бокс не участвует в 3'-концевом процессинге теломеразной РНК [97].

В последнее время стали появляться данные о том, что первые 17 нуклеотидов TERC человека очень важны для активности теломеразы, отсутствие этого участка или мутации в нем существенно снижают активность фермента. Показано, что рибоолигонуклеотид с такой последовательностью образует G-квадруплекс. Можно предположить, что структура этого элемента должна влиять на структуру спирали P1 и позиционирование матричного участка теломеразной РНК [98–100].

Структура теломеразной обратной транскриптазы
Каталитическая субъединица теломеразы, TERC, намного более консервативна, чем TERT. Она имеет много мотивов, общих с другими обратными транскриптазами. В структуре всех известных TERC можно вы-

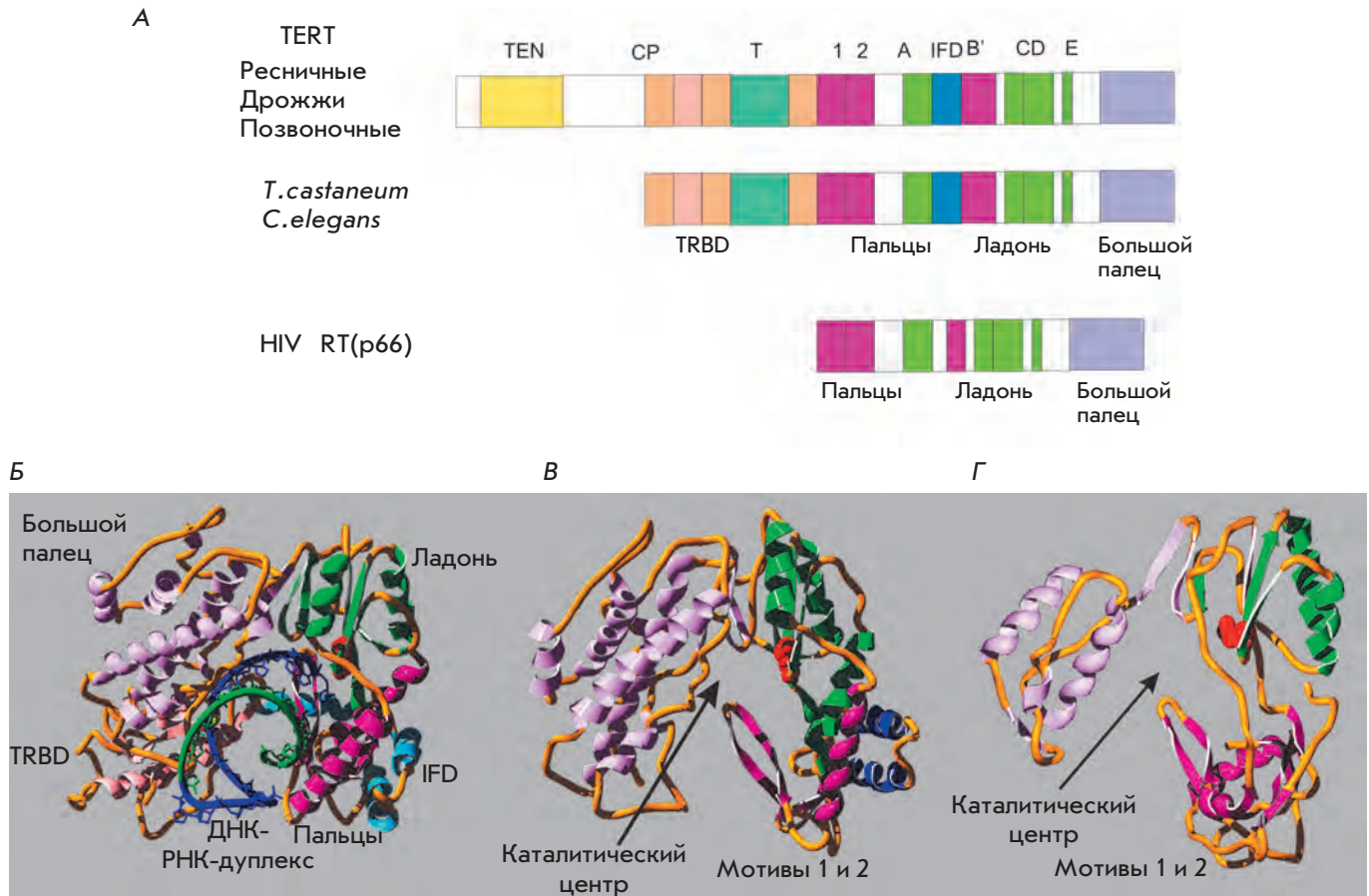


Рис. 3. Структура теломеразной обратной транскриптазы. **А** – Схематическое изображение доменной организации TERT разных организмов и обратной транскриптазы HIV. Гомологичные домены выделены цветом. **Б** – Пространственная структура комплекса TERT *T. castaneum* и РНК-ДНК-дуплекса. Рисунок получен с использованием PDB-файла 3KY. **В** – Пространственная структура TERT *T. castaneum*. Рисунок получен с использованием PDB-файла 3DU5. **Г** – Пространственная структура HIV RT. Рисунок получен с использованием PDB-файла 1N6Q. Красным выделены остатки Asn каталитических центров ферментов.

делить три домена: РНК-связывающий (этот домен, названный TRBD, подразделяют на RID1 и RID2), обратнотранскриптазный и малоконсервативный С-концевой [57, 95, 101]. Некоторые TERT содержат дополнительный N-концевой домен TEN, который вовлечен в связывание праймера, а также способствует процессивному добавлению теломерных повторов [57, 102]. Первичная структура обратнотранскриптазного домена сходна со структурами других полимераз и содержит семь консервативных мотивов (1, 2, А, В, С, D и E). Предполагается, что TERT произошла от ретротранспозонов [103]. Наибольшее сходство TERT имеет с интронсодержащими, так называемыми Penelope-подобными элементами.

Недавно были получены структуры высокого разрешения доменов TEN и TRBD TERT простейшего *Tetrahymena thermophila* [102, 103] и полноразмерной TERT *Tribolium castaneum* [104], открывающие

новые особенности структуры и функций теломеразы. Как следует из анализа структуры TERT *T. castaneum*, между TERT и другими полимеразми, включая субъединицу р66 обратной транскриптазы HIV, существует высокая структурная гомология [105]. Пространственное расположение основных доменов, а также ключевых аминокислотных остатков в них остается постоянным и соответствует структуре «правой руки», впервые описанной для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*. В таких структурах принято выделять так называемые субдомены «ладонь», «пальцы» и «большой палец» [106]. Обнаружено, что петля, отвечающая за связывание и позиционирование матрицы и нуклеотида, расположена между β-листами мотивов 1 и 2 и направлена в сторону активного центра [107, 108]. В то же время в структуре TERT и других полимераз (рис. 3) существуют и различия. Например,

TERT содержит дополнительный домен, который называется IFD (insertion in fingers domain). Этот домен находится вне центрального кольца между «пальцами» и «ладонью». Из структуры TERT *T. castaneum* видно, что три полностью консервативных домена образуют кольцеобразную структуру. Консервативный обратнотранскриптазный домен формирует «пальцы» и «ладонь», как и другие полимеразы, и занимает одну сторону кольца, а С-домен образует «большой палец» и находится в непосредственной близости от N-концевого РНК-связывающего домена, замыкая кольцо. Внутренний диаметр этой структуры равен 26 Å, а ее глубина составляет 21 Å, что примерно соответствует размерам А-спирали, состоящей из 8 п.н. Именно такую структуру имеет ДНК-РНК-дуплекс, находящийся в активном сайте полимеразы [109]. Поверхность отверстия представляет собой спиральную структуру из положительно заряженных аминокислотных остатков. Такая структура позволяет белку образовать плотный контакт с РНК-ДНК-гетеродуплексом [110]. Спираль 10 и 19 взаимодействуют с большой и малой бороздкой ДНК-РНК-дуплекса, находящегося в активном центре [111–115]. Нуклеотидсвязывающий участок располагается на границе «пальцев» и «ладони», что подтверждает высокое сходство с другими полимеразы. Определены несколько консервативных аминокислотных остатков, формирующих нуклеотидсвязывающий карман [115]. В активный центр фермента входят несколько неизменяемых остатков аспарагиновой кислоты и остаток лизина, который активирует уходящую пирофосфатную группу.

TRBD-домен TERT из *T. thermophila* и *T. castaneum*, как следует из анализа его структуры, обогащен спиральными структурами и разделен на две части. Эти два структурных элемента соединяются при помощи СР- и Т-мотивов. СР-мотив содержит положительно заряженный карман, а Т-мотив представляет собой узкую гидрофобную щель, которая содержит положительно заряженные остатки вблизи СР-мотива. Вместе они формируют протяженную борозду на поверхности TRBD, с которой и связывается TER [100, 103, 116–119]. Т-мотив содержит β-шпильку, вытянутую в направлении С-концевого домена, который образует «большой палец», и соединяет его с пальцами обратнотранскриптазного домена. Такое расположение TRBD-домена позволяет остаткам, находящимся на внутренней стороне кольца, располагаться непосредственно вблизи от активного центра. Кроме того, расщелина между TRBD и обратнотранскриптазными доменами дает возможность TER попадать в активный центр. Можно предположить, что теломеразная РНК проходит через эту щель и таким образом приносит матрицу в активный центр фермента [120].

БИОГЕНЕЗ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Как уже отмечалось, теломераза состоит из двух основных компонентов, но синтез, процессинг каждого из них, а также формирование активного фермента требуют участия большого числа дополнительных факторов. Регуляция экспрессии TERT на стадии транскрипции подробно рассмотрена в обзоре Скворцова и соавт. [121]. В результате альтернативного сплайсинга первичного транскрипта гена *hTERT* образуются 13 разных вариантов мРНК [122–125]. Наиболее распространены и хорошо изучены два из них, так называемые α- и β-формы. При образовании α-формы из шестого экзона удаляются 36 нуклеотидов, что приводит к изменению последовательности обратнотранскриптазного мотива А. Открытая рамка считывания при этом не нарушается [126, 127]. Делеция 182 нуклеотидов из экзона 7 и 8 и вставка из 38 нуклеотидов вызывают преждевременную остановку трансляции, что приводит к образованию β-формы *hTERT*, в которой нет трех важных обратнотранскриптазных мотивов [128, 129]. Сплайсинг может проходить в разных сайтах независимо друг от друга, поэтому в клетках часто сосуществуют разные формы мРНК *hTERT*. Комбинация разных форм мРНК, а также их количество зависят от типа клеток. Так один из вариантов мРНК (α-/β+-форма) выполняет регуляторные функции, действуя как доминантно-негативный ингибитор теломеразы и в нормальных, и в опухолевых клетках.

До сих пор не понятно, влияет ли соотношение полноразмерной мРНК *hTERT* и ее сплайсированных форм на активность теломеразы. В одних работах показано, что общий уровень экспрессии *hTERT* соответствует уровню теломеразной активности [126–129], тогда как в других не выявлено закономерностей в изменении теломеразной активности при изменении содержания какой-либо формы мРНК *hTERT* [130]. Предполагается, что регуляторные функции, выполняемые продуктами альтернативного сплайсинга *hTERT*, зависят от типа клеток. В ходе развития плода человека изменяется набор транскриптов *hTERT*. На ранних стадиях все ткани содержат полноразмерную мРНК *hTERT* и активную теломеразу, а в дальнейшем набор форм мРНК меняется в зависимости от типа ткани [131]. Можно предположить, что изменение экспрессии TERT необходимо для дифференцировки клеток в процессе развития организма.

Важную роль в регуляции работы теломеразы играет обратимое фосфорилирование TERT [132]. Известны многочисленные киназы и фосфатазы, которые влияют на фосфорилирование остатков серина, треонина и тирозина, меняя таким образом структуру, локализацию и активность ферментов. В первич-

ной структуре hTERT обнаружены неспецифические участки фосфорилирования, однако только несколько из них действительно подвергаются модификации и их фосфорилирование влияет на активность теломеразы.

Теломеразная РНК относится к классу некодирующих РНК, т.е. она не служит матрицей для синтеза белка. Как уже было сказано, теломеразная РНК содержит структурные элементы, характерные и для малых ядрышковых РНК, и для РНК, специфичных для телец Кахаля. У человека все Н/АСА-РНК кодируются интронами, они синтезируются в виде пре-мРНК, а затем процессируются с образованием зрелых РНК, лишенных кеп-структуры на 5'-конце [133]. В отличие от них, TERC человека транскрибируется РНК-полимеразой II со своего собственного промотора. В результате процессинга первичного транскрипта образуется зрелая форма из 451 нуклеотида, содержащая триметилгуаниновый кеп на 5'-конце. Частично процессинг теломеразной РНК изучен в клетках дрожжей. Известно, что в клетках *Schizosaccharomyces pombe* 3'-концевой процессинг TERC осуществляется сплайсосоной. Для образования активной теломеразной РНК необходима только первая стадия сплайсинга, которая приводит к высвобождению 5'-концевого экзона [134]. Если произойдет лигирование экзонов, то образуется продукт, который подвергается быстрой деградации. Совершенно непонятно, каким образом сплайсинг останавливается на промежуточной стадии.

Триметилирование 5'-концевого гуанина TERC в клетках дрожжей осуществляется метилтрансферазой Tgs1. Предполагается, что и у позвоночных этот фермент (hTgs1p) участвует в гиперметилировании 5'-кепа TERC в тельцах Кахаля, в которых он и содержится [135].

Изучение процессинга теломеразной РНК человека затрудняется ее низким содержанием в клетках. Теломеразная РНК человека экспрессируется и подвергается процессингу в клетках дрожжей [136]. При экспрессии в клетках дрожжей образуются как полиаденилированные, так и неполиаденилированные, процессированные и непроцессированные формы hTERT. Процессинг hTERT в этой системе осуществляют дрожжевые белки Cbf5p (гомолог дискерина), Nhp2p и Nop10p, которые участвуют в процессинге малых ядрышковых РНК, содержащих Н/АСА-домен [137–139]. Н/АСА-белки связываются с Н/АСА-доменом теломеразной РНК, который определяет 3'-границу зрелой hTERT. Предполагается, что в ходе процессинга hTERT ее 3'-конец отщепляется экзонуклеазами, а связавшиеся Н/АСА-белки определяют границу зрелой формы hTERT [136]. Предложена также гипотеза об активации нуклеаз

в результате связывания Н/АСА-белков с теломеразной РНК [140].

В 2011 году установили, что в состав теломеразного комплекса входит белок DDX36, или RHAU, известный как РНК-хеликаза. Он участвует также в деградации мРНК, содержащих AU-богатые элементы, и является резолвазой как ДНК, так и РНК G-квадруплексов [141–145]. Оказалось, что этот белок взаимодействует с 5'-концевым участком hTERT, который образует G-квадруплекс, и стабилизирует hTERT. Это происходит до триметилирования 5'-концевого гуанозина теломеразной РНК и, по-видимому, необходимо для защиты hTERT от деградации. После кепирования hTERT формирование G-квадруплекса становится невозможным, и RHAU перестает связываться с hTERT [146]. Кроме того, RHAU стимулирует образование спирали P1, и за счет этого достигается правильное позиционирование матричного участка hTERT [147].

В состав теломеразного комплекса входят дополнительные белки, которые участвуют в процессах биогенеза фермента [148]. Теломеразный комплекс всегда содержит РНК-связывающий белок дискерин, который узнает Н/АСА-мотив как в теломеразной, так и в других некодирующих РНК (малых ядрышковых и ассоциированных с тельцами Кахаля) [149, 150]. Считается, что дискерин принимает участие в биогенезе теломеразного РНП (рибонуклеопротеида) и поддерживает стабильность теломеразной РНК [151, 152]. В состав теломеразного комплекса могут входить дискеринсвязывающие белки NOP10, NHP2 и GAR1 [153, 154]. ДНК-хеликазы понтин и рептин, обладающие АТФ-азной активностью, взаимодействуют с hTERT, hTERT и дискерином [155]. Содержание комплекса hTERT с этими белками максимально в S-фазе клеточного цикла. Именно в этот момент происходит удлинение теломера у дрожжей [156], а в клетках человека теломераза ассоциирована с теломерами [157, 158]. Можно предположить, что понтин и рептин влияют на регуляцию содержания hTERT на разных стадиях клеточного цикла или на сборку активной теломеразы в S-фазе. Дискерин постоянно связан с hTERT, а понтин и рептин взаимодействуют с hTERT. В S-фазе понтин и рептин взаимодействуют с дискерином, участвуя в образовании теломеразного РНП *de novo*.

Выявлению еще одного белка, участвующего в сборке и влияющего на активность теломеразы, посвящена одна из последних работ [159]. Оказалось, что этим белком является АТФ-аза NVL2. При помощи двухгибридной системы показано, что hTERT взаимодействует с белком NVL2. Ген NVL кодирует две изоформы АТФ-азы NVL – NVL1 и NVL2, ко-

торые относятся к AAA (ATPase associated with a variety of cellular activities) семейству АТФ-аз [160, 161]. hTERT взаимодействует с обеими изоформами, но комплекс с NVL2 оказался более прочным. В клетках hTERT колокализована с NVL2, который содержит два АТФ-азных домена. Мутация Lys311 в первом домене нарушает связывание этого белка с hTERT, а нокдаун NVL2 снижает активность теломеразы в клетках [159].

В состав теломеразного холофермента входит белок WDR79/TCAB1 (telomerase Cajal body protein 1) [58]. Тельца Кахаля обогащены этим белком, ассоциированным с TERT, TER и дискерином. При этом TCAB1 не взаимодействует с факторами сборки теломеразы NAF1, понтином и рептином. Предполагается, что на первом этапе созревания теломеразы NAF1 понтин и рептин способствуют сборке минимально активного фермента, состоящего из TERT, TERC и дискерина. После этого TCAB1 взаимодействует с активной теломеразой и определяет ее локализацию в тельцах Кахаля, способствуя связыванию с теломерами.

Данные об архитектуре теломеразного холофермента весьма противоречивы. Так показано, что теломераза обладает каталитической активностью только в виде димера, однако утверждается также, что в физиологических условиях димеризация не обязательна [162–164]. При помощи метода иммунопреципитации изучен состав белков, которые выделяются вместе с теломеразой [165]. Оказалось, что теломераза образует несколько комплексов, отличающихся по набору входящих в них белков. Предполагается, что состав теломеразного комплекса изменяется в процессе созревания. На первом этапе H/ACA-белки связываются с 3'-концевой шпилькой hTER, после чего второй комплекс H/ACA-белков с белком GAR1 взаимодействуют со стеблем шпильки CR4/CR5. На второй стадии GAR1 вытесняется белком TCAB1 из теломеразного РНП и связывается с hTERT. При этом в комплексе TERT и TCAB1 представлены в субстехиометрическом соотношении. Это может свидетельствовать о существовании как одного комплекса, содержащего сразу оба компонента, так и двух разных комплексов, каждый из которых содержит один из компонентов. Предполагается, что в клетках оба комплекса присутствуют одновременно, но при этом между ними происходит постоянный обмен компонентами.

Взаимодействие теломеразы с другими белками (La, Staufen, L22, гЯРНП C1/C2, TERP1, p23 и Hsp90) необходимо для формирования правильной структуры и ее стабилизации [132, 166, 167]. Однако влияют ли эти белки на теломеразную активность, неизвестно.

УДЛИНЕНИЕ ТЕЛОМЕР

Основная активность теломеразы обеспечивает РНК-зависимое удлинение теломер [168]. Каталитический цикл теломеразы состоит из нескольких последовательных стадий. После связывания субстрата происходит добавление одного теломерного повтора. Образовавшийся продукт может диссоциировать из активного центра фермента, а может транслоцироваться с дальнейшим удлинением. Способность теломеразы перемещать синтезируемую ДНК в начало матрицы позволяет описывать ее работу двумя типами процессивности. Добавление нуклеотида – процессивность типа I – присуща всем полимеразам, тогда как добавление повтора – процессивность типа II – уникальна для теломеразы и определяет способность фермента копировать матричный участок РНК много раз, удлиняя при этом одну молекулу субстрата [169, 170].

Связывание праймера на первой стадии реакционного цикла теломеразы обусловлено его комплементарным взаимодействием с матричным участком TER. При использовании праймеров с различной последовательностью эффективность образования комплекса с ферментом не коррелирует с длиной образуемого ДНК-РНК-дуплекса [171], так как теломераза связывается с субстратом при непосредственном участии не только матричного участка теломеразной РНК. Структурные элементы активного центра TERT контролируют эффективность формирования дуплекса, а также процесс транслокации новосинтезированного продукта в ходе процессивного синтеза теломерных повторов. Якорные участки в TERT и TER также принимают участие в первичном связывании праймера.

На второй стадии реакционного цикла теломеразы нуклеотиды присоединяются к праймеру [168, 172].

Основная особенность теломеразы – способность к процессивному добавлению повторов [170]. Механизм транслокации теломеразы после синтеза повтора остается неизвестным, не ясно также, нужна ли процессивность фермента этого типа для эффективного удлинения теломер или нет. Недавно обнаружили, что критически короткие теломеры удлинняются процессивно [173]. В ходе работы теломеразы образуется набор продуктов, отличающихся друг от друга числом теломерных повторов. После добавления одного теломерного повтора реакция останавливается или замедляется, т.е. транслокация и отжиг матрицы являются скоростными лимитирующими стадиями. Показано, что белки POT1 и TRP1 эффективно стимулируют процессивность теломеразы [174]. Предполагается, что процессивность теломеразы регулируется комплексом POT1–TRP1. Когда этот комплекс связан с 3'-концом праймера, теломеразная актив-

ность ингибируется, если же он связан с 5'-концом, то теломераза работает процессивно.

Известно, что теломераза активна не во всех клетках, тем не менее, теломеразная РНК представлена во всех клетках, а обратная транскриптаза – в большинстве клеток. Локализация компонентов теломеразы не всегда совпадает с местом ее «работы». Теломеразную РНК часто обнаруживают в цитоплазме, а обратную транскриптазу в митохондриях и других органеллах. Эти данные позволили предположить, что теломераза может не только поддерживать длину теломер, но и выполнять дополнительные функции в клетке.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ФУНКЦИИ КОМПОНЕНТОВ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Первые данные об альтернативных функциях теломеразы появились уже на ранних этапах изучения этого фермента. При изучении активности, субстратной специфичности и других свойств теломеразы были обнаружены продукты других ферментативных активностей. Оказалось, что теломераза способна катализировать и другие реакции (рис. 4).

Нуклеазная активность теломеразы

Изучение каталитической активности и субстратной специфичности теломеразы из *Thermus thermophila* показало, что длина получаемого продукта зависит от степени комплементарности праймера и матричного участка теломеразной РНК [175]. Если 3'-конец праймера некомплементарен матричному участку, то происходит разрыв на границе спаренной и неспаренной областей субстрата. Кроме того, разрыв возможен и в полностью комплементарном праймере. Место и вероятность разрыва в этом случае будут зависеть от длины и места предпочтительного отжига праймера на матричном участке. Таким образом, теломераза *Th. thermophila* обладает нуклеазной активностью. Позже обнаружили, что теломеразы дрожжей и человека также обладают такой активностью [176–181]. Детальное изучение механизма эндонуклеазной активности показало, что субстрат может расщепляться и в случае его полной комплементарности матрице с целью более предпочтительного позиционирования в каталитическом центре теломеразы. Эндонуклеазная активность теломеразы не является сиквенс-специфичной. Праймеры, имеющие в предпочтительных местах разрезания негидролизующие межнуклеотидные связи, подвергаются расщеплению в других местах [179, 182].

Трансферазная активность

Теломераза дрожжей и человека может обладать и трансферазной активностью. В присутствии ионов

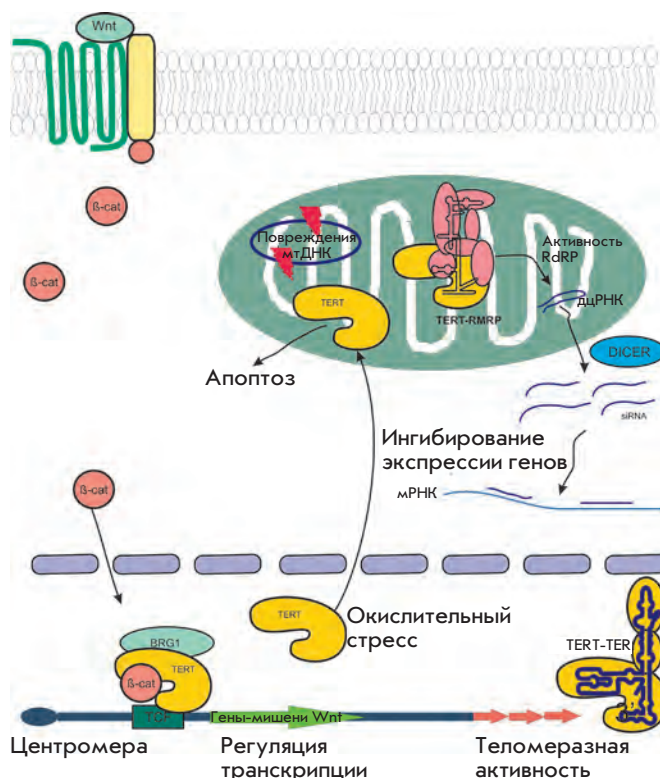


Рис. 4. Теломераза – фермент с множеством функций. Схематическое изображение механизмов функционирования теломеразы в клетке.

Mn^{2+} теломераза способна присоединять нуклеотиды независимо от матрицы. При этом предпочтение отдается GT-богатым на 5'-конце теломероподобным праймерам. Не известно, бывают ли ситуации *in vivo*, когда внутриклеточная концентрация Mn^{2+} достигает таких значений, при которых трансферазная активность выявлена *in vitro*. Тем не менее предполагается, что какие-то небольшие молекулы могут стимулировать эту способность теломеразы [183, 184].

Теломераза и митохондрии

На ранних этапах изучения теломеразы обнаружили, что hTERT экспрессируется и в клетках, в которых не выявляется теломеразная активность [185, 186]. Недавно показали, что белок hTERT присутствует в каждой соматической клетке, преимущественно в S-фазе [187], причем не только в ядре, но и в цитоплазме, и в митохондриях [188–194]. В иммортализованных фибробластах человека при обработке H_2O_2 и в условиях окислительного стресса hTERT экспортируется из ядра и перемещается в митохондрии [194]. Известно, что фибробласты эмбрионов мыши стареют быстрее, если их культивировать при повышенном содержании кислорода [195]. Недостаток

кислорода, как показано в сходных опытах на клетках человека, приводит к увеличению продолжительности жизни [196, 197]. Окислительный стресс может активировать опухолевые белки-супрессоры p53 и Rb [198, 199]. Существует несколько причин, приводящих к старению клеток при окислительном стрессе. Во-первых, повреждения ДНК, которые возникают при окислительном стрессе и индуцируют активность регуляторов клеточного цикла p21 и p16, способствующих старению клеток и задержке клеточного цикла [200, 201]. В результате снижения пролиферации теломеры становятся критически короткими, а клетки находятся в состоянии кризиса. На этой стадии клетки либо гибнут, либо в них активируется теломераза и они становятся бессмертными. Во-вторых, окислительный стресс может приводить к повреждению теломер. ДНК, входящая в состав теломер, обогащена остатками гуанина, чувствительными к окислению. Окисление этих остатков приводит к тому, что теломеры становятся более чувствительными к повреждению, а степень их укорачивания возрастает [202, 203]. Показано, что обработка клеток MitoQ-антиоксидантом, специфичным для митохондрий, снижает уровень повреждения теломер и увеличивает продолжительность жизни фибробластов, подвергнутых окислительному стрессу [204]. В-третьих, преждевременное старение, вызванное окислительным стрессом, может быть следствием прямой инактивации теломеразной активности.

Недавно предсказали, что на N-конце TERT находится сигнал локализации в митохондриях (MTS – mitochondria transport signal), состоящий из 20 аминокислотных остатков [205]. MTS высококонсервативен в TERT высших эукариот, таких, как растения, рыбы и млекопитающие, но этой сигнальной последовательности нет у дрожжей и ресничных [192]. Если MTS добавить к зеленому флуоресцентному белку (GFP), то можно наблюдать появление флуоресценции в митохондриях. А синтезированный *in vitro* белок A, содержащий на N-конце MTS из hTERT, поступает в очищенные митохондрии за счет мембранного потенциала [205]. Локализация hTERT в митохондриях установлена разными методами, в том числе при помощи иммуноблотинга и коиммунопреципитации [191, 192, 194, 206–208]. Экстракты митохондрий из различных клеток человека обладают теломеразной активностью. hTERT находится в матриксе митохондрий и соосаждается вместе с белками TOM20, TOM40 и TIM23 [191]. Показано также, что hTERT выделяется вместе с мтДНК-связывающим белком TFAM, с HSP60 и TIM23, но не с TOM20 [205]. Повышение содержания hTERT в митохондриях, подвергнутых окислительному стрессу, приводит к стабилизации мтДНК и стимулирует функцио-

нирование митохондрий. При этом снижается образование активных форм кислорода и повышается мембранный потенциал митохондрий [194]. hTERT взаимодействует с участками мтДНК, кодирующими субъединицы 1 и 2 NADH-убихинооксидоредуктазы (ND1 и ND2). В клетках сердца, но не печени мышей, экспрессирующих hTERT, наблюдаются изменения в дыхательной цепи [191]. Тем не менее позднее обнаружили, что hTERT неспецифически взаимодействует с мтДНК [205]. С помощью метода иммунопреципитации хроматина, модифицированного для митохондрий, показано, что обратная транскриптаза теломеразы взаимодействует как с участками, кодирующими ND1, ND2, так и 12S и 16S рРНК, ND4 и ND5, COXI и COXIII, тРНК и субъединицы 6 и 8 АТФ-синтазы [205]. Известно, что повышенная экспрессия hTERT в фибробластах человека не предотвращает их индуцированное стрессом старение, но защищает от апоптоза и некроза [209]. Продемонстрирован и противоположный эффект повышенной экспрессии hTERT в условиях окислительного стресса, т.е. увеличение степени повреждения ДНК [192, 206]. В таких клетках возрастает содержание биодоступного железа, которое может стимулировать образование гидроксил-радикалов, повреждающих ДНК [192].

Факторы, отвечающие за внутриклеточную локализацию hTERT, до сих пор не известны. hTERT содержит сигнал локализации в митохондриях и сигнал экспорта из ядра (NES). Предсказано, что hTERT содержит несколько сигналов ядерной локализации (NLS) [210, 211]. Однако остается непонятным, как регулируется локализация этого белка внутри клетки. Известно, что при окислительном стрессе внутриклеточное распределение hTERT изменяется в результате посттрансляционных модификаций [189, 194, 208, 210, 212–216]. Показано, что Src-киназа контролирует экспорт hTERT из ядра в цитоплазму при окислительном стрессе [189, 194], а дефосфорилирование hTERT фосфатазой Shp-2 приводит к импорту hTERT из цитоплазмы в ядро [212]. Во время окислительного стресса киназа Src фосфорилирует Tyr707 TERT. Модифицированная hTERT взаимодействует с белком Ran, компонентом ядерной поры, после чего экспортируется из ядра при участии кариеферина CRM1. При обработке клеток перекисью водорода уровень hTERT дикого типа в митохондриях снижается, а уровень hTERT, в которой Tyr707 заменен на Phe и не может быть фосфорилирован Src-киназой, не изменяется. Экспрессируемая в клетках мутантная hTERTY707P накапливается в ядре во время окислительного стресса, а уровень апоптоза этих клеток ниже, чем клеток, содержащих hTERT дикого типа [189]. Показано также, что при обработ-

ке клеток H_2O_2 уровень hTERT дикого типа в митохондриях увеличивается за несколько часов, тогда как в условиях гипероксии для развития подобного эффекта требуется несколько дней. В клетках, которые вернули «к нормальной жизни» после культивирования в условиях гипероксии, hTERT возвращается в ядро [194].

Несколько лет назад обнаружили, что hTERT может образовывать комплекс не только с hTER, но и с РНК-компонентом эндорибонуклеазы, участвующей в процессинге митохондриальной РНК (mitochondrial RNA processing endoribonuclease) RMRP. Оказалось, что комплекс hTERT с RMRP обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы и синтезирует двухцепочечные РНК, используя в качестве матрицы РНК-компонент RMRP. Эти РНК процессируются ферментативным комплексом DICER с образованием малых интерферирующих РНК (siRNA), которые в дальнейшем снижают уровень RMRP в клетке, т.е. работа RMRP регулируется по принципу отрицательной обратной связи [217].

Достоверно установлено, что функционирование hTERT в митохондриях не зависит от hTER, и hTER не импортируется в митохондрии [205]. Оказалось, что вместе с hTERT из митохондрий выделяются митохондриальные тРНК, которые служат праймерами в реакции обратной транскрипции, катализируемой hTERT. При этом добавление hTER и мутация в одном из обратнотранскриптазных доменов hTERT ингибируют эту реакцию. Отсутствие hTERT в митохондриях приводит к митохондриальной дисфункции. Предполагается, что hTERT может участвовать в репликации и репарации мтДНК [205].

Из всего сказанного следует, что данные о функциях hTERT и о компонентах, взаимодействующих с ней в митохондриях, весьма противоречивы. По-видимому, это можно объяснить ограниченным количеством фермента в клетке. Все работы, посвященные функциям теломеразы в митохондриях, выполнены в условиях сверхэкспрессии белка. Дополнительные домены, которые используют для выделения и детекции белка, могут быть причиной недостоверных результатов. Следует отметить, что к настоящему времени в научном сообществе не сформировано определенного мнения о функциях теломеразы в митохондриях.

Теломераза и повреждения ДНК

Известно, что нефункциональные теломеры взаимодействуют с набором белков, вовлеченных в ответ клеток на повреждения ДНК [218–220]. Эти белки участвуют в передаче сигнала в ответ на различные воздействия. ATR и ATM входят в семейство про-

теинкиназ, родственных фосфоинозитид-3-киназам (PIKK) [221]. ATM – основной белок, который активируется на двухцепочечных разрывах ДНК (DSB) [222], а ATR – при появлении одноцепочечных концов ДНК, возникающих при образовании аддуктов ДНК, во время процессинга DSB или при остановке репликативной вилки [223, 224]. Отсутствие ATM приводит к декепированию и укорочению теломер, кроме того, TRF2 связывается с ATM-киназой и ингибирует ее активацию [225]. В условиях повышенной экспрессии hTER наблюдается подавление активности ATR-киназы, а снижение количества теломеразной РНК в клетках, напротив, способствует повышению активности ATR. Эти процессы не зависят от уровня активности теломеразы и длины теломер. При снижении уровня экспрессии hTER в клетках увеличивается количество белка p53, супрессора опухолевого роста и основного игрока в пути передачи сигнала при онкогенных стрессах. При этом в клетках возрастает содержание белка CHK1 – регулятора клеточного цикла. p53 и CHK1 являются основными субстратами ATR-киназы. hTER ингибирует ATR-киназу *in vivo* и нарушает регуляцию прохождения контрольных точек при повреждении ДНК [226].

Мутации в матричном участке теломеразной РНК вызывают снижение уровня белка TRF2, что стимулирует вступление клеток в апоптоз. Этот эффект зависит от ATM. В результате активации ATM наблюдается фосфорилирование p53, который, в свою очередь, активирует транскрипцию гена *GADD45γ*, а повышение уровня *GADD45γ* приводит к вступлению клеток в апоптоз. Таким образом, мутации в матричном участке теломеразной РНК вызывают появление в ДНК повреждений, которые клеточные системы распознают как двухцепочечные разрывы [227].

В клетках эукариот в ответ на повреждения ДНК гистон H_2AX фосфорилируется ATM-киназой. Фосфорилированный γH_2AX связывается с ДНК в местах двухцепочечных разрывов. В клетках без hTERT, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения, система DDR не функционирует. Фибробласты, в которых экспрессия hTERT стабильно подавлена при помощи РНК-интерференции, количество ATM и γH_2AX снижено, тогда как длина теломер в них изменяется незначительно, но изменяются структура хроматина и посттрансляционные модификации гистонов [187]. Известно, что при сверхэкспрессии hTERT в фибробластах крайней плоти человека в 20 раз снижается частота спонтанных разрывов хромосом в фазе G1, а также повышается уровень АТР [228], возможно, вследствие защитного действия hTERT на митохондрии. АТР необходим для работы факторов ремоделирования хроматина [229] и акти-

вазии АТМ-киназы [230]. По-видимому, защищая митохондрии, hTERT опосредованно влияет на синтез АТФ в клетке и на все процессы, для которых необходим его гидролиз.

Теломераза и регуляция экспрессии генов

Развитие методов изучения функционирования клетки и экспрессии генов позволило исследовать, как активность одних генов влияет на экспрессию других. При помощи анализа на кДНК-микрочипах установлено, что в клетках надпочечников быка, сверхэкспрессирующих TERT, изменяется уровень экспрессии 284 генов [231].

В настоящий момент известно, что теломераза, регулируя экспрессию различных генов, может влиять на клеточный цикл. Повышение уровня TERT приводит к увеличению пролиферативного потенциала стромальных клеток костного мозга человека [232], гиперплазии и гипертрофии кардиомиоцитов мыши [233]. Повышение уровня экспрессии *hTERT* в эпителиальных клетках молочной железы человека, в которых делетирован ген *p16*, придает им устойчивость к антипролиферативному действию трансформирующего фактора β (TGF- β) [234]. При этом не обнаружено зависимости между длиной теломер и чувствительностью клеток к TGF- β . Известно также, что активация теломеразы в клетках эпителия молочной железы человека стимулирует их переход к митозу [235].

Получены доказательства того, что теломераза влияет на сигнальный путь pRB/E2F. При стимуляции митоза циклины D образуют комплекс с CDK4 и CDK6 и фосфорилируют белок ретинобластомы pRB, при этом инактивируя его. В результате взаимодействие pRB с фактором транскрипции E2F нарушается. E2F при этом активируется, и начинают экспрессироваться гены, необходимые для перехода клетки из G1- в S-фазу. Сверхэкспрессия hTERT в клетках хрусталика глаза человека приводит к усилению их роста. При этом наблюдается гиперфосфорилирование pRB и ингибирование экспрессии p53, p21 и GCIP [236]. p21 и GCIP являются ингибиторами комплексов циклинов с циклин-зависимыми киназами [237, 238], а p53 активирует транскрипцию p21 [239]. Таким образом hTERT активирует pRB/E2F-зависимый путь прохождения по клеточному циклу. С другой стороны, укорачивая фазу G1 клеточного цикла, hTERT стимулирует пролиферацию эмбриональных стволовых клеток человека [240]. Этот процесс ассоциирован с повышением экспрессии циклина D1 и гиперфосфорилированием pRB. Можно предположить, что транскрипционная активность E2F возрастает, поскольку увеличен уровень одного из его активаторов – CDC6. Кроме того, pRB ги-

перфосфорилирован в hTERT-иммортиализованных фибробластах крайней плоти человека и в эпителиальных клетках аденоидов человека, которые преодолели кризис после сверхэкспрессии hTERT [241]. Интересно, что в этом случае экспрессия p21 и p53 не изменяется, а белок p16, который является ингибитором циклин-зависимой киназы CDK4/6 в комплексе с циклином D, в этих клетках отсутствует [242].

Таким образом, hTERT-зависимая стимуляция пролиферации клеток обусловлена ингибированием белка pRB и активацией фактора транскрипции E2F. В то же время, согласно [243, 244], этот же механизм обеспечивает индукцию апоптоза

Известно, что при сверхэкспрессии hTERT в клетках повышается содержание рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), трансмембранной рецепторной тирозинкиназы, которая принимает участие в процессах роста, выживания, пролиферации и дифференцировки клеток млекопитающих [235, 245]. После связывания лиганда EGFR приобретает способность активировать разные сигнальные пути. Два из них (Ras/Raf/MEK/ERK и PI3K/Akt-киназы) участвуют в развитии опухолей. Эти киназные каскады совместно стимулируют входение клеток в S-фазу клеточного цикла, влияя на экспрессию, стабильность и внутриклеточную локализацию циклинов D-типа [246–250]. Об этом свидетельствуют результаты опытов, в которых клетки, сверхэкспрессирующие ген *hTERT*, имеют такой же фенотип, как и клетки, в которых сверхэкспрессируется ген *EGFR* или активированы киназные каскады.

Показано, что сверхэкспрессия hTERT в эпителиальных клетках приводит к повышению количества фактора роста фибробластов (FGF), а также рецептора этого фактора (FGFR) [228, 235]. Кроме того, в hTERT-иммортиализованных фибробластах значительно повышено содержание эпирегулина, одного из лигандов рецептора фактора роста эпидермиса, который играет ключевую роль в поддержании статуса пролиферации этих клеток [251]. Известно, что в нормальных клетках человека эпирегулин репрессирован, но он активируется в опухолях с высоким пролиферативным потенциалом [252]. Возможно, что теломераза стимулирует его антиапоптотические, пропролиферативные и пронеопластические свойства.

Экспрессия двух изоформ фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) активирована в клетках рака молочной железы человека, а также в клетках HeLa и в нормальных клетках легкого эмбриона, трансфицированных hTERT [253]. Известно также, что VEGF стимулирует экспрессию hTERT и активирует теломеразу при помощи сигнальных каскадов Ras- и Akt-

киназ. Таким образом, hTERT и факторы роста взаимодействуют по механизму положительной обратной связи в процессах регуляции клеточного цикла, образования опухолей и ангиогенеза.

В 2003 году обнаружили, что активация теломеразы может приводить к эпигенетическому сайленсингу генов-супрессоров в раковых клетках [254]. При экспрессии hTERT в нормальных фибробластах человека активируется промотор гена ДНК-метилтрансферазы I (*DNMT1*). Механизм этого воздействия до сих пор не установлен, но можно предположить, что одним из основных участников активации транскрипции может быть фактор транскрипции STAT3. Известно, что именно этот белок индуцирует экспрессию *DNMT1* в злокачественных T-клеточных опухолях [255]. Передавать сигнал от hTERT к STAT3 в этом случае может уже упомянутый EGFR, который фосфорилирует и таким образом активирует STAT3 [256]. *DNMT1*, метилируя промоторные участки генов, участвует в регуляции их экспрессии.

Недавно было обнаружено, что теломераза взаимодействует и с сигнальным путем Wnt/APC/ β -катенин. Показано, что TERT взаимодействует с фактором BRG1, ремодулирующим хроматин. BRG1 является кофактором β -катенина в процессах регуляции транскрипции генов, относящихся к Wnt-сигнальному пути. Оказалось, что TERT может взаимодействовать непосредственно с промоторами, которые регулируются Wnt и β -катенином. Известно, что сигнальный путь Wnt играет важную роль в процессах дифференцировки и пролиферации клеток, а влиянием компонентов теломеразы на этот

регуляторный каскад, по-видимому, можно объяснить эффекты, наблюдаемые при экспрессии TERT в стволовых клетках [257].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последнее время появляются данные, указывающие на разнообразие функций, выполняемых основными компонентами теломеразы в клетках. Некоторые из них, такие, как нуклеазная и трансферазная активность, ассоциированы с основной ролью теломеразы и ее полимеразной активностью. Другие, например, регуляция экспрессии генов, защита от апоптоза и участие в ответе на повреждение ДНК, не связаны непосредственно с полимеразной активностью. Необходимо отметить, что клетки высших эукариот содержат очень мало теломеразы, поэтому практически все данные получены в условиях искусственной экспрессии ее компонентов. В таких условиях можно сделать выводы о наличии взаимодействий, которые на самом деле не существуют. Часто ученые из разных лабораторий получают противоречащие друг другу данные, которые сложно интерпретировать. Скорее всего, такие противоречия обусловлены использованием разных систем и моделей. Тем не менее все новые появляющиеся данные позволяют предполагать, что теломераза выполняет более разнообразные функции, и ее влияние на клетку не ограничивается регуляцией длины теломер. ●

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 02.740.11.0706, Программы развития МГУ ПНР 5.13 и при поддержке РФФИ (№ 11-04-01233-а и 11-04-12051-офи-м-2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morgan T.H. // *Science*. 1911. V. 34. P. 636–638.
- McClintock B. // *Mo. Agric. Exp. Res. Stn. Res. Bull.* 1931. V. 163. P. 4–30.
- Muller H.J. // *Collecting Net*. 1938. V. 8. P. 182–195.
- Blackburn E.H., Gall J.G. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 120. P. 33–53.
- Blackburn E.H., Budarf M.L., Challoner P.B., Cherry J.M., Howard E.A., Katzen A.L., Pan W.C., Ryan T. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1983. V. 47. Pt. 2. P. 1195–1207.
- De Lange T., Lundblad V., Blackburn E.H. *Telomeres*. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- Hsu T.C., Arrighi F.E., Saunders G.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1972. V. 69. P. 1464–1466.
- Olovnikov A.M. // *J. Theor. Biol.* 1973. V. 41. P. 181–190.
- Watson J. // *Nat. New Biol.* 1972. V. 239. P. 197–201.
- Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell*. 1987. V. 51. P. 887–898.
- Gallardo F., Laterreur N., Cusanelli E., Ouenzar F., Querido E., Wellinger R.J., Chartrand P. // *Mol. Cell*. 2011. V. 44. P. 819–827.
- de Lange T. // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 532–540.
- Chan S.R., Blackburn E.H. // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2004. V. 359. P. 109–121.
- Palm W., de Lange T. // *Annu. Rev. Genet.* 2008. V. 42. P. 301–334.
- Riethman H., Ambrosini A., Paul S. // *Chromosome Res.* 2005. V. 13. P. 505–515.
- Mattern K.A., Swiggers S.J., Nigg A.L., Lowenberg B., Houtsmuller A.B., Zijlmans J.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. P. 5587–5594.
- Oganesian L., Graham M.E., Robinson P.J., Bryan T.M. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 11279–11290.
- de Lange T. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 2100–2110.
- Palm W., de Lange T. // *Annu. Rev. Genet.* 2008. V. 42. P. 301–334.
- Broccoli D., Smogorzewska A., Chong L., de Lange T. // *Nat. Genet.* 1997. V. 17. P. 231–235.
- Court R., Chapman L., Fairall L., Rhodes D. // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. P. 39–45.
- Bianchi A., Stansel R.M., Fairall L., Griffith J.D., Rhodes D., de Lange T. // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 5735–5744.
- Lei M., Podell E.R., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. V. 11. P. 1223–1229.
- Baumann P., Cech T.R. // *Science*. 2001. V. 11. P. 1171–1175.
- Loayza D., de Lange T. // *Nature*. 2003. V. 423. P. 1013–1018.

26. Kim S.H., Beausejour C., Davalos A.R., Kaminker P., Heo S.J., Campisi J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 15. P. 43799–43804.
27. Ye J.Z., Hockemeyer D., Krutchinsky A.N., Loayza D., Hooper S.M., Chait B.T., de Lange T. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1649–1654.
28. Ye J.Z., Donigian J.R., van Overbeek M., Loayza D., Luo Y., Krutchinsky A.N., Chait B.T., de Lange T. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 47264–47271.
29. Chen Y., Yang Y., van Overbeek M., Donigian J.R., Baciu P., de Lange T., Lei M. // *Science.* 2008. V. 319. P. 1092–1096.
30. Liu D., Safari A., O'Connor M.S., Chan D.W., Laegerle A., Qin J., Songyang Z. // *Nat. Cell Biol.* 2004. V. 6. P. 673–680.
31. Kibe T., Osawa G.A., Keegan C.E., de Lange T. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. P. 1059–1066.
32. Chen L.Y., Liu D., Songyang Z. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 5898–5909.
33. Xin H., Liu D., Wan M., Safari A., Kim H., Sun W., O'Connor M.S., Songyang Z. // *Nature.* 2007. V. 445. P. 559–562.
34. Celli G.B., de Lange T. // *Nat. Cell Biol.* 2005. V. 7. P. 712–718.
35. Li B., de Lange T. // *Mol. Biol. Cell.* 2003. V. 12. P. 5060–5068.
36. Li B., Oestreich S., de Lange T. // *Cell.* 2000. V. 101. P. 471–483.
37. Oganessian L., Bryan T.M. // *BioEssays.* 2007. V. 29. P. 155–165.
38. Zahler A.M., Williamson J.R., Cech T.R., Prescott D.M. // *Nature.* 1991. V. 350. P. 718–720.
39. Wong H.M., Payet L., Huppert J.L. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2009. V. 11. P. 146–155.
40. Neidle S., Parkinson G.N. // *Biochimie.* 2008. V. 90. P. 1184–1196.
41. Oganessian L., Moon I.K., Bryan T.M. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 1148–1159.
42. Schaffitzel C., Berger I., Postberg J., Hanes J., Lipps H.J., Plückthun A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 8572–8577.
43. Paeschke K., Simonsson T., Postberg J., Rhodes D., Lipps H.J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. V. 10. P. 847–854.
44. Tang J., Kan Z.Y., Yao Y., Wang Q., Hao Y.H., Tan Z. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. 1200–1208.
45. Shinozuka K., Sekiguchi T., Ebara Y., Moriguchi T. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 2007. V. 51. P. 7–8.
46. Martínez P., Thanasoula M., Carlos A.R., Gómez-López G., Tejera A.M., Schoeftner S., Dominguez O., Pisano D.G., Tarsounas M., Blasco M.A. // *Nat. Cell Biol.* 2010. V. 12. P. 768–780.
47. Blasco M.A. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 299–309.
48. Sfeir A., Kabir S., van Overbeek M., Celli G.B., de Lange T. // *Science.* 2010. V. 327. P. 1657–1661.
49. Martínez P., Thanasoula M., Muñoz P., Liao C., Tejera A., McNeese C., Flores J.M., Fernández-Capetillo O., Tarsounas M., Blasco M.A. // *Genes Dev.* 2009. V. 23. P. 2060–2075.
50. Sfeir A., Kosiyatrakul S.T., Hockemeyer D., MacRae S.L., Karlseder J., Schildkraut C.L., de Lange T. // *Cell.* 2009. V. 138. P. 90–103.
51. Hsu T.C., Arrighi F.E., Saunders G.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 69. P. 1464–1466.
52. Schoeftner S., Blasco M.A. // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 2323–2336.
53. Benetti R., Gonzalo S., Jaco I., Schotta G., Klatt P., Jenuwein T., Blasco M.A. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 178. P. 925–936.
54. García-Cao M., O'Sullivan R., Peters A.H., Jenuwein T., Blasco M.A. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. P. 94–99.
55. Gonzalo S., Jaco I., Fraga M.F., Chen T., Li E., Esteller M., Blasco M.A. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 416–424.
56. Benetti R., Gonzalo S., Jaco I., Muñoz P., Gonzalez S., Schoeftner S., Murchison E., Andl T., Chen T., Klatt P., Li E., Serrano M., Millar S., Hannon G., Blasco M.A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. V. 15. P. 268–279.
57. Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoriauli L., Giulotto E., Lingner J. // *Science.* 2007. V. 318. P. 798–801.
58. Venteicher A.S., Abrew E.B., Meng Z., McCann K.E., Terns R.M., Veenstra T.D., Terns M.P., Artandi S.E. // *Science.* 2009. V. 323. P. 644–648.
59. Venteicher A.S., Meng Z., Mason P.J., Veenstra T.D., Artandi S.E. // *Cell.* 2008. V. 132. P. 945–952.
60. Fu D., Collins K. // *Mol. Cell.* 2007. V. 28. P. 773–785.
61. Cohen S.B., Graham M.E., Lovrecz G.O., Bache N., Robinson P.J., Reddel R.R. // *Science.* 2007. V. 315. P. 1850–1853.
62. Legassie J.D., Jarstfer M.B. // *Structure.* 2006. V. 14. P. 1603–1609.
63. Chen J.L., Greider C.W. // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 183–192.
64. Theimer C.A., Feigon J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. V. 16. P. 307–318.
65. Sperger J.M., Cech T.R. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 7005–7016.
66. Antal M., Boros E., Solymosy F., Kiss T. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 912–920.
67. Bhattacharyya A., Blackburn E.H. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 5721–5731.
68. Qiao F., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. V. 15. P. 634–640.
69. Chen J.L., Greider C.W. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 2747–2752.
70. Box J.A., Bunch J.T., Zappulla D.C., Glynn E.F., Baumann P. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 24224–24233.
71. Tzfati Y., Fulton T.B., Roy J., Blackburn E.H. // *Science.* 2000. V. 288. P. 863–867.
72. Lai C.K., Miller M.C., Collins K. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 415–420.
73. O'Connor C.M., Lai C.K., Collins K. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 17533–17539.
74. Miller M.C., Collins K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 6585–6590.
75. Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell.* 1985. V. 43. P. 405–413.
76. Blasco M.A. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. P. 611–622.
77. Miller M.C., Collins K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 6585–6590.
78. Ulyanov N.B., Shefer K., James T.L., Tzfati Y. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 6150–6160.
79. Shefer K., Brown Y., Gorkovoi V., Nussbaum T., Ulyanov N.B., Tzfati Y. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 2130–2143.
80. Cao S., Chen S.J. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 367. P. 909–924.
81. Theimer C.A., Blois C.A., Feigon J. // *Mol. Cell.* 2005. V. 17. P. 671–682.
82. Kim N.K., Zhang Q., Zhou J., Theimer C.A., Peterson R.D., Feigon J. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 384. P. 1249–1261.
83. Theimer C.A., Finger L.D., Trantirek L., Feigon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 449–454.
84. Ly H., Blackburn E.H., Parslow T.G. // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. P. 6849–6856.
85. Chen J.L., Greider C.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 8080–8085.
86. Kim N.W., Piatyzek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. // *Science.* 1994. V. 266. P. 2011–2015.
87. Chen Y., Fender J., Legassie J.D., Jarstfer M.B., Bryan T.M., Varani G. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 3156–3166.
88. Richards R.J., Wu H., Trantirek L., O'Connor C.M., Collins K., Feigon J. // *RNA.* 2006. V. 12. P. 1475–1485.
89. Leeper T.C., Varani G. // *RNA.* 2005. V. 11. P. 394–405.
90. Chen J.L., Opperman K.K., Greider C.W. // *Nucl. Acids Res.*

2002. V. 10. P. 139–147.
91. Ueda C.T., Roberts R.W. // *RNA*. 2004. V. 10. P. 139–147.
92. Meier B., Clejan I., Liu Y., Lowden M., Gartner A., Hodgkin J., Ahmed S. // *PloS Genet*. 2006. V. 2. e. 18.
93. Gillis A.J., Schuller A.P., Skordalakes E. // *Nature*. 2008. V. 455. P. 633–636.
94. Balakin A.G., Smith L., Fournier M.J. // *Cell*. 1996. V. 86. P. 823–834.
95. Ganot P., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. // *Genes Dev*. 1997. V. 11. P. 941–956.
96. Fu D., Collins K. // *Genes Dev*. 2006. V. 20. P. 531–536.
97. Theimer C.A., Jády B.E., Chim N., Richard P., Breece K.E., Kiss T., Feigon J. // *Mol. Cell*. 2007. V. 27. P. 869–881.
98. Gros J., Guédin A., Mergny J.L., Lacroix L. // *Chembiochem*. 2008. V. 9. P. 2075–2079.
99. Li X., Nishizuka H., Tsutsumi K., Imai Y., Kurihara Y., Uesugi S. // *J. Biochem*. 2007. V. 141. P. 755–765.
100. Xu Y., Ishizuka T., Kimura T., Komiyama M. // *J. Am. Chem. Soc*. 2010. V. 132. P. 7231–7233.
101. Jacobs S.A., Podell E.R., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2006. V. 13. P. 218–225.
102. Arkhipova I.R., Pyatkov K.I., Meselson M., Evgen'ev M.B. // *Nat. Genet*. 2003. V. 33. P. 123–124.
103. Rouda S., Skordalakes E. // *Structure*. 2007. V. 15. P. 1403–1412.
104. Mitchell M., Gillis A., Futahashi M., Fujiwara H., Skordalakes E. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2010. V. 17. P. 513–518.
105. Sarafianos S.G., Clark Jr. A.D., Das K., Tuske S., Birktoft J.J., Ilankumaran P., Ramesha A.R., Sayer J.M., Jerina D.M., Boyer P.L., et al. // *EMBO J*. 2002. V. 21. P. 6614–6624.
106. Ollis D.L., Brick P., Hamlin R., Xuong N.G., Steitz T.A. // *Nature*. 1985. V. 313. P. 762–766.
107. Miller M.C., Liu J.K., Collins K. // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 4412–4422.
108. Harris D., Kaushik N., Pandey P.K., Yadav P.N., Pandey V.N. // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. P. 33624–33634.
109. Legassie J.D., Jarster M.B. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 14191–14201.
110. Bosoy D., Lue N.F. // *Nucl. Acids Res*. 2004. V. 32. P. 93–101.
111. Lue N.F., Lin Y.C., Mian I.S. // *Mol. Cell. Biol*. 2003. V. 23. P. 8440–8449.
112. Hossain S., Singh S., Lue N.F. // *J. Biol. Chem*. 2002. V. 277. P. 36174–36180.
113. Huard S., Moriarty T.J., Autexier C. // *Nucl. Acids Res*. 2003. V. 31. P. 4059–4070.
114. Banik S.S., Guo C., Smith A.C., Margolis S.S., Richardson D.A., Tirado C.A., Counter C.M. // *Mol. Cell. Biol*. 2001. V. 22. P. 6234–6246.
115. Bosoy D., Lue N.F. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 46305–46312.
116. Bryan T.M., Goodrich K.J., Cech T.R. // *Mol. Cell*. 2000. V. 6. P. 493–499.
117. Cunningham D.D., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2005. V. 25. P. 4442–4454.
118. Lai C.K., Mitchell J.R., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2001. V. 21. P. 990–1000.
119. Bosoy D., Peng Y., Mian I.S., Lue N.F. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 3882–3890.
120. Sekarah V.G., Soares J., Jarstfer M.B. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1804. P. 1190–1201.
121. Скворцов Д.А., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. // *Acta Naturae*. 2009. T. 1. № 1. С. 51–68.
122. Wick M., Zubov D., Hagen G. // *Gene*. 1999. V. 232. P. 97–106.
123. Kilian A., Bowtell D.D., Abud H.E., Hime G.R., Venter D.J., Keese P.K., Duncan E.L., Reddel R.R., Jefferson R.A. // *Hum. Mol. Genet*. 1997. V. 6. P. 2011–2019.
124. Saeboe-Larssen S., Fossberg E., Gaudernack G. // *BMC Mol. Biol*. 2006. V. 7. P. 26.
125. Hisatomi H., Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Nagao K., Kanamaru T., Hirata H., Hibi N., Tsukada Y. // *Neoplasia*. 2003. V. 5. P. 193–197.
126. Colgin L.M., Wilkinson C., Englezou A., Kilian A., Robinson M.O., Reddel R.R. // *Neoplasia*. 2000. V. 2. P. 426–432.
127. Yi X., White D.M., Aisner D.L., Baur J.A., Wright W.E., Shay J.W. // *Neoplasia*. 2000. V. 2. P. 433–440.
128. Cerezo A., Kalthoff H., Schuermann M., Schafer B., Boukamp P. // *J. Cell Sci*. 2002. V. 115. P. 1305–1312.
129. Barclay J.Y., Morris A.G., Nwokolo C.U. // *Dig. Dis. Sci*. 2005. V. 50. P. 1299–1303.
130. Song M.S., Lee S.W. // *FEBS Lett*. 2006. V. 580. P. 5033–5043.
131. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R. // *Cancer Res*. 1998. V. 58. P. 4168–4172.
132. Aisner D.L., Wright W.E., Shay J.W. // *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2002. V. 12. P. 80–85.
133. Jády B.E., Bertrand E., Kiss T. // *J. Cell. Biol*. 2004. V. 1. P. 647–652.
134. Box J.A., Bunch J.T., Tang W., Baumann P. // *Nature*. 2008. V. 456. P. 910–914.
135. Girard C., Verheggen C., Neel H., Cammas A., Vagner S., Soret J., Bertrand E., Bordonné R. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 25. P. 2060–2069.
136. Dez C., Henras A., Faucon B., Lafontaine D., Caizergues-Ferrer M., Henry Y. // *Nucl. Acids Res*. 2001. V. 29. P. 598–603.
137. Lafontaine D.L., Tollervey D. // *Trends Biochem. Sci*. 1998. V. 23. P. 383–388.
138. Watkins N.J., Gottschalk A., Neubauer G., Kastner B., Fabrizio P., Mann M., Lührmann R. // *RNA*. 1998. V. 4. P. 1549–1568.
139. Henras A., Henry Y., Bousquet-Antonelli C., Noaillac-Depeyre J., Gélugne J.P., Caizergues-Ferrer M. // *EMBO J*. 1998. V. 17. P. 7078–7090.
140. Kufel J., Allmang C., Chanfreau G., Petfalski E., Lafontaine D.L., Tollervey D. // *Mol. Cell. Biol*. 2000. V. 20. P. 5415–5424.
141. Tran H., Schilling M., Wirbelauer C., Hess D., Nagamine Y. // *Mol. Cell*. 2004. V. 13. P. 101–111.
142. Vaughn J.P., Creacy S.D., Routh E.D., Joyner-Butt C., Jenkins G.S., Pauli S., Nagamine Y., Akman S.A. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 38117–38120.
143. Creacy S.D., Routh E.D., Iwamoto F., Nagamine Y., Akman S.A., Vaughn J.P. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 34626–34634.
144. Iwamoto F., Stadler M., Chalupníková K., Oakeley E., Nagamine Y. // *Exp. Cell. Res*. 2008. V. 314. P. 1378–1391.
145. Lattmann S., Giri B., Vaughn J.P., Akman S.A., Nagamine Y. // *Nucl. Acids Res*. 2010. V. 38. P. 6219–6233.
146. Sexton A.N., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2011. V. 31. P. 736–743.
147. Booy E.P., Meier M., Okun N., Novakowski S.K., Xiong S., Stetefeld J., McKenna S.A. // *Nucl. Acids Res*. 2012. Jan 11.
148. McEachern M.J., Krauskopf A., Blackburn E.H. // *Annu. Rev. Genet*. 2000. V. 34. P. 331–358.
149. Meier U.T. // *Chromosoma*. 2005. V. 114. P. 1–14.
150. Matera A.G., Terns R.M., Terns M.P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2007. V. 8. P. 209–220.
151. Wang C., Meier U.T. // *EMBO J*. 2004. V. 23. P. 1857–1867.
152. Mitchell J.R., Cheng J., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 1999. V. 19. P. 567–576.
153. Pogacíc V., Dragon F., Filipowicz W. // *Mol. Cell. Biol*. 2000. V. 20. P. 9028–9040.
154. Dragon F., Pogacíc V., Filipowicz W. // *Mol. Cell. Biol*. 2000.

- V. 20. P. 3037–3048.
155. Venteicher A.S., Meng Z., Mason P.J., Veenstra T.D., Artandi S.E. // *Cell*. 2008. V. 132. P. 945–957.
156. Marcand S., Brevet V., Mann C., Gilson E. // *Curr. Biol*. 2000. V. 10. P. 487–490.
157. Jády B.E., Richard P., Bertrand E., Kiss T. // *Mol. Biol. Cell*. 2006. V. 17. P. 944–954.
158. Tomlinson R.L., Ziegler T.D., Supakorndej T., Terns R.M., Terns M.P. // *Mol. Biol. Cell*. 2006. V. 17. P. 955–965.
159. Her J., Chung I.K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012. V. 417. P. 1086–1092.
160. Germain-Lee E.L., Obie C., Valle D. // *Genomics*. 1997. V. 44. P. 22–34.
161. Nagahama M., Hara Y., Seki A., Yamazoe T., Kawate Y., Shinohara T., Hatsuzawa K., Tani K., Tagaya M. // *Mol. Biol. Cell*. 2004. V. 15. P. 5712–5723.
162. Errington T.M., Fu D., Wong J.M., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2008. V. 28. P. 6510–6520.
163. Sekaran V.G., Soares J., Jarstfer M.B. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1804. P. 1190–1201.
164. ЩербакOVA Д.М., Соколов К.А., Зверева М.Э., Донцова О.А. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 749–755.
165. Egan E.D., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2010. V. 30. P. 2775–2786.
166. Forsythe H.L., Jarvis J.L., Turner J.W., Elmore L.W., Holt S.E. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 15571–15574.
167. Hamma T., Ferré-D'Amaré A.R. // *J. Biol. Chem*. 2010. V. 285. P. 805–809.
168. Autexier C., Lue N.F. // *Annu. Rev. Biochem*. 2006. V. 75. P. 493–517.
169. Greider C.W. // *Mol. Cell. Biol*. 1991. V. 11. P. 4572–4580.
170. Lue N.F. // *BioEssays*. 2004. V. 26. P. 955–962.
171. Wallweber G., Gryaznov S., Pongracz K., Pruzan R. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 589–600.
172. Steitz T.A. // *J. Biol. Chem*. 1999. V. 274. P. 17395–17398.
173. Chang M., Arneric M., Lingner J. // *Genes Dev*. 2007. V. 21. P. 2485–2494.
174. Wang J., Yu L., Li J., Deng R., Wang X. // *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2007. V. 48. P. 93–99.
175. Collins K., Greider C.W. // *Genes Dev*. 1993. V. 7. P. 1364–1376.
176. Cohn M., Blackburn E.H. // *Science*. 1995. V. 269. P. 396–400.
177. Lue N.F., Peng Y. // *Nucl. Acids Res*. 1997. V. 25. P. 4331–4337.
178. Lue N.F., Peng Y. // *Nucl. Acids Res*. 1998. V. 26. P. 1487–1494.
179. Oulton R., Harrington L. // *Mol. Biol. Cell*. 2004. V. 15. P. 3244–3256.
180. Huard S., Autexier C. // *Nucl. Acids Res*. 2004. V. 32. P. 2171–2180.
181. Petrov A.V., Dokudovskaya S.S., Sokolov K.A., Lavrik O.I., Favre A., Dontsova O.A., Bogdanov A.A. // *FEBS Lett*. 1998. V. 436. P. 35–40.
182. Niu H., Xia J., Lue N.F. // *Mol. Cell. Biol*. 2000. V. 20. P. 6806–6815.
183. Lue N.F., Bosoy D., Moriarty T.J., Autexier C., Altman B., Leng S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 9778–9783.
184. Смекалова Е.М., Петрова О.А., Зверева М.Э., Донцова О.А. // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 1. С. 72–75.
185. Kilian A., Bowtell D.D., Abud H.E., Hime G.R., Venter D.J., Keese P.K., Duncan E.L., Reddel R.R., Jefferson R.A. // *Hum. Mol. Genet*. 1997. V. 6. P. 2011–2019.
186. Ramakrishnan S., Eppenberger U., Mueller H., Shinkai Y., Narayanan R. // *Cancer Res*. 1998. V. 58. P. 622–625.
187. Masutomi K., Possemato R., Wong J.M., Currier J.L., Tothova Z., Manola J.B., Ganesan S., Lansdorp P.M., Collins K., Hahn W.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 8222–8227.
188. Armbruster B.N., Banik S.S., Guo C., Smith A.C., Counter C.M. // *Mol. Cell. Biol*. 2001. V. 21. P. 7775–7786.
189. Haendeler J., Hoffmann J., Brandes R.P., Zeiher A.M., Dimmeler S. // *Mol. Cell. Biol*. 2003. V. 23. P. 4598–4610.
190. Haendeler J., Hoffmann J., Diehl J.F., Vasa M., Spyridopoulos I., Zeiher A.M., Dimmeler S. // *Circ. Res*. 2004. V. 94. P. 768–775.
191. Haendeler J., Dröse S., Büchner N., Jakob S., Altschmied J., Goy C., Spyridopoulos I., Zeiher A.M., Brandt U., Dimmeler S. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009. V. 29. P. 929–935.
192. Santos J.H., Meyer J.N., Skovvaga M., Annab L.A., van Houten B. // *Aging Cell*. 2004. V. 3. P. 399–411.
193. Santos J.H., Meyer J.N., van Houten B. // *Hum. Mol. Genet*. 2006. V. 15. P. 1757–1768.
194. Ahmed S., Passos J.F., Birkett M.J., Beckmann T., Brings S., Peters H., Birch-Machin M.A., von Zglinicki T., Saretzki G. // *J. Cell Sci*. 2008. V. 121. P. 1046–1053.
195. Parrinello S., Samper E., Krtošić A., Goldstein J., Melov S., Campisi J. // *Nat. Cell. Biol*. 2003. V. 5. P. 741–747.
196. Packer L., Fuehr K. // *Nature*. 1977. V. 267. P. 423–425.
197. von Zglinicki T., Saretzki G., Döcke W., Lotze C. // *Exp. Cell Res*. 1995. V. 220. P. 186–193.
198. Shay J.W., Pereira-Smith O.M., Wright W.E. // *Exp. Cell Res*. 1991. V. 196. P. 33–39.
199. Wright W.E., Pereira-Smith O.M., Shay J.W. // *Mol. Cell. Biol*. 1989. V. 9. P. 3088–3092.
200. Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., et al. // *Nature*. 2005. V. 436. P. 725–730.
201. Kim K.S., Kang K.W., Seu Y.B., Baek S.H., Kim J.R. // *Mech. Ageing Dev*. 2009. V. 130. P. 179–188.
202. Henle E.S., Han Z., Tang N., Rai P., Luo Y., Linn S. // *J. Biol. Chem*. 1999. V. 274. P. 962–971.
203. Oikawa S., Kawanishi S. // *FEBS Lett*. 1999. V. 453. P. 365–368.
204. Saretzki G., Murphy M.P., von Zglinicki T. // *Aging Cell*. 2003. V. 2. P. 141–143.
205. Sharma N.K., Reyes A., Green P., Caron M.J., Bonini M.G., Gordon D.M., Holt I.J., Santos J.H. // *Nucl. Acids Res*. 2012. V. 40. P. 712–725.
206. Santos J.H., Meyer J.N., van Houten B. // *Hum. Mol. Genet*. 2006. V. 15. P. 1757–1768.
207. Del Bufalo D., Rizzo A., Trisciuoglio D., Cardinali G., Torrisi M.R., Zangemeister-Wittke U., Zupi G., Biroccio A. // *Cell Death Differ*. 2005. V. 12. P. 1429–1438.
208. Büchner N., Zschauer T.C., Lukosz M., Altschmied J., Haendeler J. // *Exp. Gerontol*. 2010. V. 45. P. 558–562.
209. Gorbunova V., Seluanov A., Pereira-Smith O.M. // *J. Biol. Chem*. 2002. V. 277. P. 38540–38549.
210. Seimiya H., Sawada H., Muramatsu Y., Shimizu M., Ohko K., Yamane K., Tsuruo T. // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 2652–2661.
211. Kovalenko O.A., Caron M.J., Ulema P., Medrano C., Thomas A.P., Kimura M., Bonini M.G., Herbig U., Santos J.H. // *Aging Cell*. 2010. V. 9. P. 203–219.
212. Jakob S., Schroeder P., Lukosz M., Büchner N., Spyridopoulos I., Altschmied J., Haendeler J. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 33155–33161.
213. Akiyama M., Hideshima T., Hayashi T., Tai Y.T.,

- Mitsiades C.S., Mitsiades N., Chauhan D., Richardson P., Munshi N.C., Anderson K.C. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 18–21.
214. Liu K., Hodes R.J., Weng N. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 4826–4830.
215. Kimura A., Ohmichi M., Kawagoe J., Kyo S., Mabuchi S., Takahashi T., Ohshima C., Arimoto-Ishida E., Nishio Y., Inoue M., et al. // *Oncogene.* 2004. V. 23. P. 4505–4515.
216. Ram R., Uziel O., Eldan O., Fenig E., Beery E., Lichtenberg S., Nordenberg Y., Lahav M. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 914–923.
217. Maida Y., Yasukawa M., Furuuchi M., Lassmann T., Possemato R., Okamoto N., Kasim V., Hayashizaki Y., Hahn W.C., Masutomi K. // *Nature.* 2009. V. 461. P. 230–235.
218. d'Adda di Fagnana F., Teo S.H., Jackson S.P. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1781–1799.
219. Takata H., Kanoh Y., Gunge N., Shirahige K., Matsuura A. // *Mol. Cell.* 2004. V. 14. P. 515–522.
220. Verdun R.E., Crabbe L., Haggblom C., Karlseder J. // *Mol. Cell.* 2005. V. 20. P. 551–561.
221. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kaçmaz K., Linn S. // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 39–85.
222. Shiloh Y. // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. P. 155–168.
223. Flynn R.L., Zou L. // *Trends Biochem. Sci.* 2011. V. 36. P. 133–140.
224. López-Contreras A.J., Fernandez-Capetillo O. // *DNA Repair (Amst.)* 2010. V. 9. P. 1249–1255.
225. Karlseder J., Hoke K., Mirzoeva O.K., Bakkenist C., Kastan M.B., Petrini J.H., de Lange T. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. P. 1150–1156.
226. Kedde M., le Sage C., Duursma A., Zlotorynski E., van Leeuwen R., Nijkamp W., Beijersbergen R., Agami R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 40503–40514.
227. Mahalingam D., Tay L.L., Tan W.H., Chai J.H., Wang X. // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 3724–3738.
228. Sharma G.G., Gupta A., Wang H., Scherthan H., Dhar S., Gandhi V., Iliakis G., Shay J.W., Young C.S., Pandita T.K. // *Oncogene.* 2003. V. 22. P. 131–146.
229. Osley M.A., Tsukuda T., Nickoloff J.A. // *Mutat. Res.* 2007. V. 618. P. 65–80.
230. Kruhlak M.J., Celeste A., Dellaire G., Fernandez-Capetillo O., Müller W.G., McNally J.G., Bazett-Jones D.P., Nussenzweig A. // *J. Cell. Biol.* 2006. V. 172. P. 823–834.
231. Perrault S.D., Hornsby P.T., Betts D.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 335. P. 925–936.
232. Simonsen J.L., Rosada C., Serakinci N., Justesen J., Stenderup K., Rattan S.I., Jensen T.G., Kassem M. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 592–596.
233. Oh H., Taffet G.E., Youker K.A., Entman M.L., Overbeek P.A., Michael L.H., Schneider M.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 10308–10313.
234. Stampfer M.R., Garbe J., Levine G., Lichtsteiner S., Vasserot A.P., Yaswen P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 4498–4503.
235. Smith L.L., Coller H.A., Roberts J.M. // *Nat. Cell. Biol.* 2003. V. 5. P. 474–479.
236. Xiang H., Wang J., Mao Y., Liu M., Reddy V.N., Li D.W. // *Oncogene.* 2002. V. 21. P. 3784–3791.
237. Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D. // *Nature.* 1993. V. 366. P. 701–704.
238. Xia C., Bao Z., Tabassam F., Ma W., Qiu M., Hua S., Liu M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 20942–20948.
239. el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B. // *Cell.* 1993. V. 75. P. 817–825.
240. Yang C., Przyborski S., Cooke M.J., Zhang X., Stewart R., Anyfantis G., Atkinson S.P., Saretzki G., Armstrong L., Lako M. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 850–863.
241. Farwell D.G., Shera K.A., Koop J.I., Bonnet G.A., Matthews C.P., Reuther G.W., Coltrera M.D., McDougall J.K., Klingelutz A.J. // *Am. J. Pathol.* 2000. V. 156. P. 1537–1547.
242. Serrano M., Hannon G.J., Beach D. // *Nature.* 1993. V. 366. P. 704–707.
243. Ginsberg D. // *FEBS Lett.* 2002. V. 529. P. 122–125.
244. Lazzarini Denchi E., Helin K. // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. P. 661–668.
245. Oda K., Matsuoka Y., Funahashi A., Kitano H. // *Mol. Syst. Biol.* 2005. V. 1. P. 1–10.
246. Liu J.J., Chao J.R., Jiang M.C., Ng S.Y., Yen J.J., Yang-Yen H.F. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 3654–3663.
247. Lavoie J.N., L'Allemain G., Brunet A., Müller R., Pouyssegur J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 20608–20616.
248. Muise-Helmericks R.C., Grimes H.L., Bellacosa A., Malstrom S.E., Tsichlis P.N., Rosen N. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 29864–29872.
249. Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F., Sherr C.J. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 3499–3511.
250. Huang W., Chang H.Y., Fei T., Wu H., Chen Y.G. // *Oncogene.* 2007. V. 26. P. 2471–2482.
251. Lindvall C., Hou M., Komurasaki T., Zheng C., Henriksson M., Sedivy J.M., Björkholm M., Teh B.T., Nordenskjöld M., Xu D. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 1743–1747.
252. Toyoda H., Komurasaki T., Uchida D., Morimoto S. // *Biochem. J.* 1997. V. 326. P. 69–75.
253. Zhou L., Zheng D., Wang M., Cong Y.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 386. P. 739–743.
254. Young J.I., Sedivy J.M., Smith J.R. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 19904–19908.
255. Zhang Q., Wang H.Y., Woetmann A., Raghunath P.N., Odum N., Wasik M.A. // *Blood.* 2006. V. 108. P. 1058–1064.
256. Park O.K., Schaefer T.S., Nathans D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 13704–13708.
257. Park J.I., Venteicher A.S., Hong J.Y., Choi J., Jun S., Shkreli M., Chang W., Meng Z., Cheung P., Ji H., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 66–72.