

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет
Кафедра химии природных соединений

На правах рукописи

МАЛЯВКО АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ

РЕГУЛЯЦИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ДРОЖЖЕЙ
Hansenula polymorpha

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:

д. х. н., профессор,
член-корр. РАН Донцова О.А.

к. х. н., доцент Зверева М.Э.

Москва – 2014

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	4
1. Введение.....	5
2. Обзор литературы. Регуляция длины теломер	6
2.1. Регуляция длины теломер почкующихся дрожжей (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Kluveromyces lactis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>).....	8
2.1.1. Структура теломер	9
2.1.2. Теломераза почкующихся дрожжей	12
2.1.3. Регуляция длины теломер <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.1.4. Регуляция длины теломер других почкующихся дрожжей	21
2.2. Регуляция длины теломер делящихся дрожжей (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	25
2.2.1. Структура теломер	25
2.2.2. Теломераза <i>S. pombe</i>	26
2.2.3. Регуляция длины теломер <i>S. pombe</i>	26
2.3. Регуляция длины теломер человека (<i>Homo sapiens</i>).....	32
2.3.1. Структура теломер человека	32
2.3.2. Теломераза человека	33
2.3.3. Регуляция теломеразы на теломерах	33
2.4. Заключение	37
3. Результаты и обсуждение	39
3.1. Постановка задачи.....	39
3.2. Обратная транскрипция A170	42
3.2.1. Детекция дополнительного dT на теломерах <i>in vivo</i>	42
3.2.2. Влияние мутаций нуклеотида A170 HpTER на длину теломер	46
3.2.3. Обратная транскрипция A170, как способ контроля длины теломер.....	52
3.3. Регуляция длины теломер <i>H. polymorpha</i> . Теломерные белки	55
3.4. Заключение	65

4. Материалы и методы.....	66
4.1. Реактивы, биопрепараты, буферные растворы, олигодезоксирибонуклеотиды, штаммы.....	66
4.2. Методики, использованные в работе	71
4.2.1. Базовые методики работы с ДНК и клетками, клонирование	71
4.2.2. Определение последовательностей теломер <i>H. polytorna</i>	76
4.2.3. Получение штаммов, экспрессирующих мутантные формы <i>HrTER</i>	77
4.2.4. Саузерн блот анализ концевых рестрикционных фрагментов	78
4.2.5. Получение штаммов <i>Rap1A-ΔC-НА</i> и <i>Rap1B-НА</i>	80
4.2.6. Получение «нокаутных» штаммов	82
4.2.7. Иммунопреципитация хроматина	83
5. Выводы	86
6. Список литературы	87

Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

TR – теломеразная РНК

TERT – теломеразная обратная транскриптаза

RPA – Replication Protein A

ChIP – иммунопреципитация хроматина

оцДНК – одноцепочечная ДНК

дцДНК – двуцепочечная ДНК

TRD – быстрое удаление теломеры

мяоРНК – малая ядрышковая РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

нт – нуклеотид

пн – пара нуклеотидов

тпн – тысяча пар нуклеотидов

НА – гемагглютинин

НА-таг – гемагглютининовый таг

НА-агароза – агароза, ковалентно модифицированная антителами к гемагглютинину

WT – дикий тип

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – 1,4-дитио-DL-треитол

ПМСФ – фенилметилсульфонилфторид

БСА – бычий сывороточный альбумин

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфаты

ДМСО – диметилсульфоксид

PEG4000 – полиэтиленгликоль 4000

ScRap1 – Rap1 из *Saccharomyces cerevisiae*. Аналогично для других белков и других видов дрожжей, например, KlRif1 – Rif1 из *Kluyveromyces lactis*. mRap1 – Rap1 мыши, hRap1 – Rap1 человека. Аналогично для других белков мыши и человека.

1. Введение

Концы эукариотических хромосом (теломеры) имеют структуру отличную от внутренних участков хромосом. Особое строение теломер позволяет им выполнять важнейшие функции. Например, теломеры осуществляют защиту хромосом от слияния и деградации, что необходимо для поддержания стабильности генома и жизнеспособности клеток. Однако, в результате недорепликации при каждом клеточном делении хромосомы соматических клеток эукариот теряют теломерную ДНК, и по достижении теломерами критической длины клетки входят в особое состояние (сенесценс) и, в конечном счёте, гибнут.

Теломераза – ферментативный комплекс, способный синтезировать теломерную ДНК, поддерживая длину теломер на нормальном уровне. Неограниченный пролиферативный потенциал одноклеточных эукариот, половых и стволовых клеток поддерживается за счёт теломеразы. Примечательно, что большинство типов раковых клеток также активирует теломеразу, и это придаёт им возможность делиться бесконечно. Поэтому теломераза является привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии [1, 2].

Стабильность генома обеспечивается контролем длины теломер, что включает в себя регуляцию различных и иногда противоположных по действию ферментов: нуклеаз, репликативных полимераз и теломеразы. Тем не менее, многие аспекты регуляции длины теломер до сих пор остаются невыясненными.

За последние десятилетия было изучено множество факторов, отвечающих за контроль длины теломер одноклеточных организмов, в частности – дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Однако, детали функционирования теломерных белков и теломеразы человека сильно отличаются от таковых в *S. cerevisiae* [4]. Сравнительный анализ может выявить консервативные и видоспецифические аспекты регуляции длины теломер, поэтому изучение других видов почкующихся дрожжей является актуальной задачей.

Данная работа посвящена изучению регуляции длины теломер дрожжей *Hansenula polymorpha*. Этот модельный организм, сохраняя преимущества работы с простейшими эукариотами, обладает рядом особых интересных свойств. *H. polymorpha* является термотолерантным организмом, что должно облегчать *in vitro* работу с его молекулярными компонентами. Также *H. polymorpha* отличается от *S. cerevisiae* особенно короткими теломерами и гомогенностью теломерных повторов, что делает изучение регуляции длины теломер дрожжей *H. polymorpha* интересной и актуальной задачей.

2. Обзор литературы. Регуляция длины теломер

Концы хромосом, по сути, представляют собой двуцепочечные разрывы в геноме. Репарация разрывов ДНК является необходимой для сохранения генетической информации. Для этого клетки используют сложные механизмы с участием огромного количества белков. Однако, узнавание теломер как разрывов такими белками привела бы к слипанию хромосом, что в свою очередь привело бы к катастрофическим последствиям. Поэтому защита концов хромосом от систем репарации двуцепочечных разрывов является, пожалуй, основной функцией теломер. Защитные функции теломер реализуются благодаря особому их строению. Теломерная ДНК состоит из повторяющихся коротких G/C-богатых последовательностей. Различают двуцепочечную часть теломер и одноцепочечную (3'-выступающий конец). С каждой из этих частей связывается специфический набор белков. Последовательности теломерных повторов и теломерных белков различных организмов могут сильно отличаться [5]. В норме соматические клетки теряют теломерную ДНК при каждом раунде репликации. Это связано с удалением короткой РНК затравки, необходимой для синтеза отстающей цепи ДНК-полимеразой, что приводит к неполной репликации теломерной ДНК (проблема недорепликации). В результате, после определённого числа делений длина теломер становится слишком короткой для выполнения защитной функции. Это, в конечном счете, ведёт к гибели клеток [6].

Теломераза – фермент, предназначенный для решения проблемы недорепликации. Основными компонентами теломеразного комплекса являются теломеразная РНК (TR) и теломеразная обратная транскриптаза (TERT). Помимо основных компонентов (TR и TERT) в состав теломеразного комплекса входит ряд вспомогательных белков, регулирующих этапы работы теломеразы. Точный состав комплекса варьирует у различных организмов [7]. Теломеразная РНК содержит короткий участок комплементарный полутора или двум теломерным повторам (матричный участок), который использует TERT для синтеза теломерной ДНК [8]. Выделяют четыре этапа работы теломеразы (Рисунок 2.1). На первом этапе происходит связывание ДНК-субстрата (3'-конец теломеры). Вторым этапом (элонгация) – синтез теломерного повтора. Характеристикой работы теломеразы на этом этапе является процессивность I-го типа – количество нуклеотидов теломерного повтора, добавленных без диссоциации фермента. После синтеза одного повтора теломераза может переместить теломерную ДНК в начало матричного участка (транслокация – третий этап) и снова синтезировать повтор. Количество теломерных повторов, добавленных за один раунд работы теломеразы – процессивность типа II. На четвёртом этапе происходит диссоциация теломеразы и теломеры.

1. Связывание

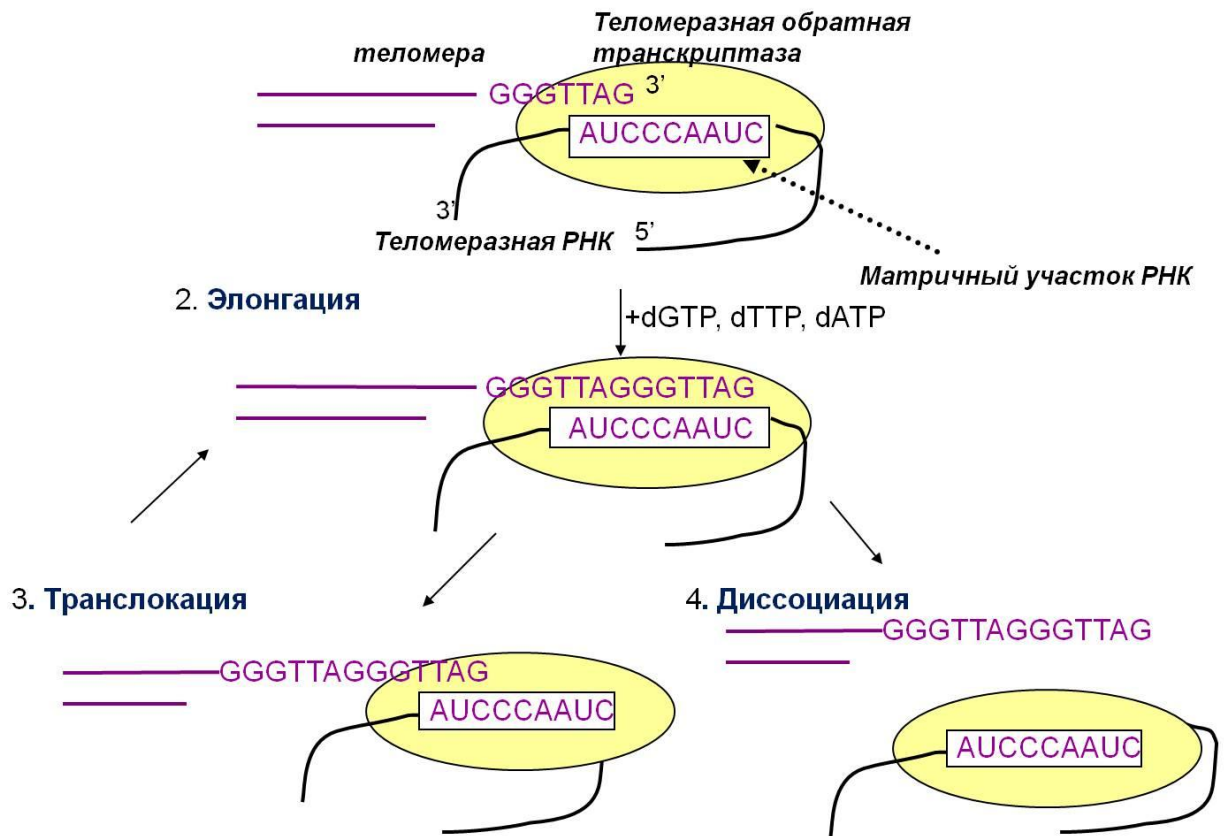


Рисунок 2.1. Схема работы теломеразы. Используется последовательность теломерного повтора человека.

Теломеры с одной стороны должны обеспечивать защитную функцию: закрывать доступ к ДНК нуклеазам и белкам систем репарации, а с другой стороны – обеспечивать доступ теломеразе для синтеза теломерной ДНК при каждом клеточном делении. Более того, теломераза должна удлинять все теломеры равномерно: ведь даже одной короткой теломеры достаточно для остановки клеточного цикла и потере хромосомы [9]. Для этого восстановление теломерной ДНК на коротких теломерах должно происходить более интенсивно, чем на теломерах нормальной длины. Механизмы, обеспечивающие поддержание этого баланса, и станут предметом данного обзора литературы. Ввиду больших отличий систем поддержания стабильности теломер различных групп организмов, они будут рассмотрены отдельно, что и определит структуру данного обзора. В каждой главе будут кратко описаны строение теломер и теломеразного комплекса, а затем – регуляция длины теломер.

2.1. Регуляция длины теломер почкующихся дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*)

По ходу эволюции дрожжей произошло, по меньшей мере, два необычных события: возникновение видов, использующих CTG кодон для кодирования серина (а не лейцина, как остальные), а также дупликация генома (WGD, whole-genome duplication). В качестве модельных организмов для изучения теломер и теломеразы используется, по крайней мере, по одному виду дрожжей, представляющих каждое из этих событий, а также некоторые промежуточные виды [10]. Относительное эволюционное родство модельных почкующихся дрожжей, описанных в данном обзоре, схематически изображено на рисунке 2.2. Наиболее изученными являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, поэтому им будет уделено основное внимание.

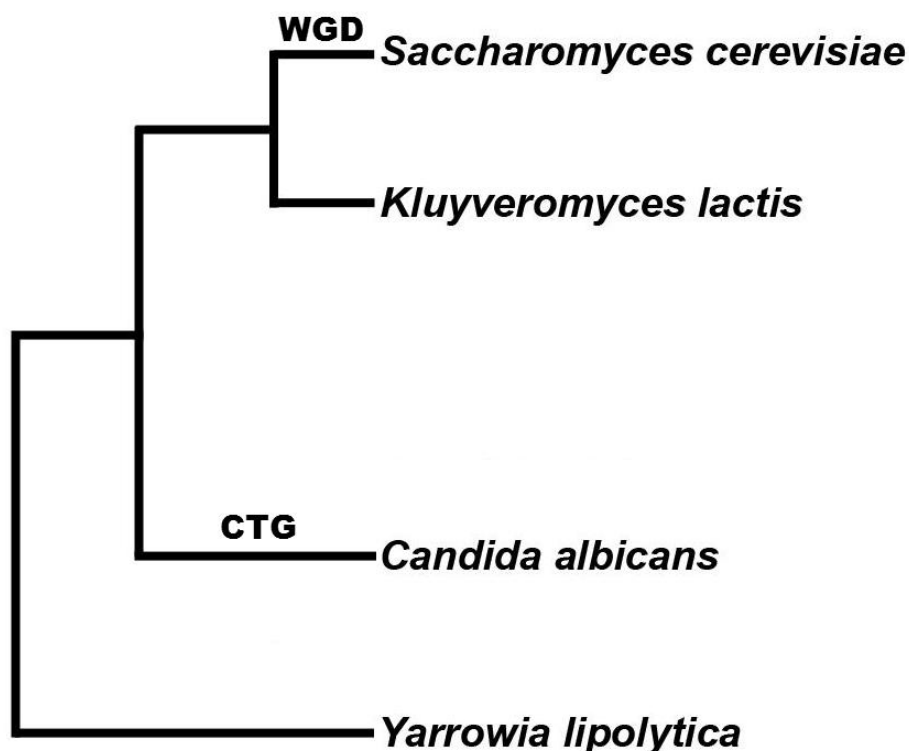


Рисунок 2.2. Схема эволюционного родства почкующихся дрожжей, описанных в данном обзоре (упрощённая адаптация из [11]). **CTG** – вид, у которого CTG кодон соответствует серину, а не лейцину; **WGD** – вид, у которого произошла дупликация генома.

2.1.1. Строение теломер

Теломеры почкующихся дрожжей претерпели очень сильные изменения за время эволюции: последовательности теломерных повторов значительно отличаются у разных видов (и отличаются от канонической TTAGGG последовательности), длина повтора находится в пределах 8-25 пн, при этом теломерные повторы часто являются гетерогенными [12]. Например, теломерный повтор *S. cerevisiae* гетерогенный T(G)₂₋₃(TG)₁₋₆, в то время как теломеры *C. albicans* состоят из гомогенных повторов ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGT.

С двуцепочечным участком теломер *S. cerevisiae* связан белок Rap1, посредством MYB домена [13]. С С-концевым доменом Rap1 взаимодействует два набора белков. Один из этих наборов (Sir3 и Sir4) ответственен за формирование гетерохроматина в субтеломерных областях [14]; тогда как основной функцией другого (Rif1 и Rif2) является участие в регуляции длины теломер [15, 16]. Rap1 участвует в защите теломерной ДНК от избыточного действия нуклеаз, а также от слияния теломер поскольку он ингибирует репарацию по пути негомологического соединения концов (NHEJ, non-homologous end joining) [17, 18].

Одноцепочечную часть теломер связывает белок Cdc13. Cdc13 и два других белка Stn1 и Ten1 образуют комплекс называемый CST [19]. CST структурно и функционально похож на гетеротримерный комплекс RPA (Replication Protein A), который связывает одноцепочечную ДНК, что играет важную роль при репликации и репарации. Подобно RPA комплексу CST эффективно связывает одноцепочечную ДНК, однако CST обладает большей специфичностью и сродством к теломерной оцДНК. Поэтому он предотвращает накопление на оцДНК теломер RPA (и привлекаемой этим комплексом киназы Mec1), а, следовательно, и остановку клеточного цикла и привлечение систем репарации. Однако, следует отметить, что CST не предотвращает связывание других участников ответа на повреждения ДНК: комплекса MRX (состоит из белков Mre11, Rad50, Xrs2) и ассоциированной с ним киназы Tel1 [20]. CST защищает С-цепь теломер от деградации нуклеазами [21]. Помимо выполнения защитных функций CST комплекс также важен для регулирования синтеза теломерной ДНК (причём, как G-цепи, так и С-цепи), поскольку белок Cdc13 взаимодействует как с теломеразой, так и с репликативной полимеразой [22, 23].

Другим важным теломерным компонентом является гетеродимер Ku70/Ku80. Его точное положение на теломерной ДНК неизвестно, но предполагают, что он связывается на границе двуцепочечной и одноцепочечной частей теломеры [24]. Ku70/Ku80 играет защитную роль: он также защищает С-цепь теломер от избыточной деградации нуклеазами [25, 26]. *S. cerevisiae* обладает ещё одним интересным белком, содержащим MYB домен, Tbf1. Этот белок очень схож с основными компонентами теломерного комплекса млекопитающих (TRF1 и TRF2) по

нескольким параметрам: MYB домены этих трёх белков обладают высокой степенью гомологии, Tbf1 содержит TRFH домен (как TRF1 и TRF2), и все три белка связывают последовательности TTAGGG [27]. Однако, в то время как TTAGGG являются теломерными повторами в случае млекопитающих, у *S. cerevisiae* TTAGGG содержатся только в субтеломерных областях хромосом [28]. Тем не менее, Tbf1 играет роль в регуляции длины теломер [29, 30].

Недавно структурные и биохимические исследования связывания белков Rap1, Rif1 и Rif2 с теломерной ДНК позволили предложить модель организации высшего порядка теломер [31]. Тетрамеризация Rif1, полимеризация Rif2 и взаимодействие обоих с Rap1 – являются элементами для построения особой структуры теломер, напоминающей застёжку типа "липучка". Такая структура обеспечивает необходимую защиту теломерной ДНК, оставляя в то же время возможность регуляции; поскольку все взаимодействия являются слабыми, и структура может быть легко разобрана (Рисунок 2.3).

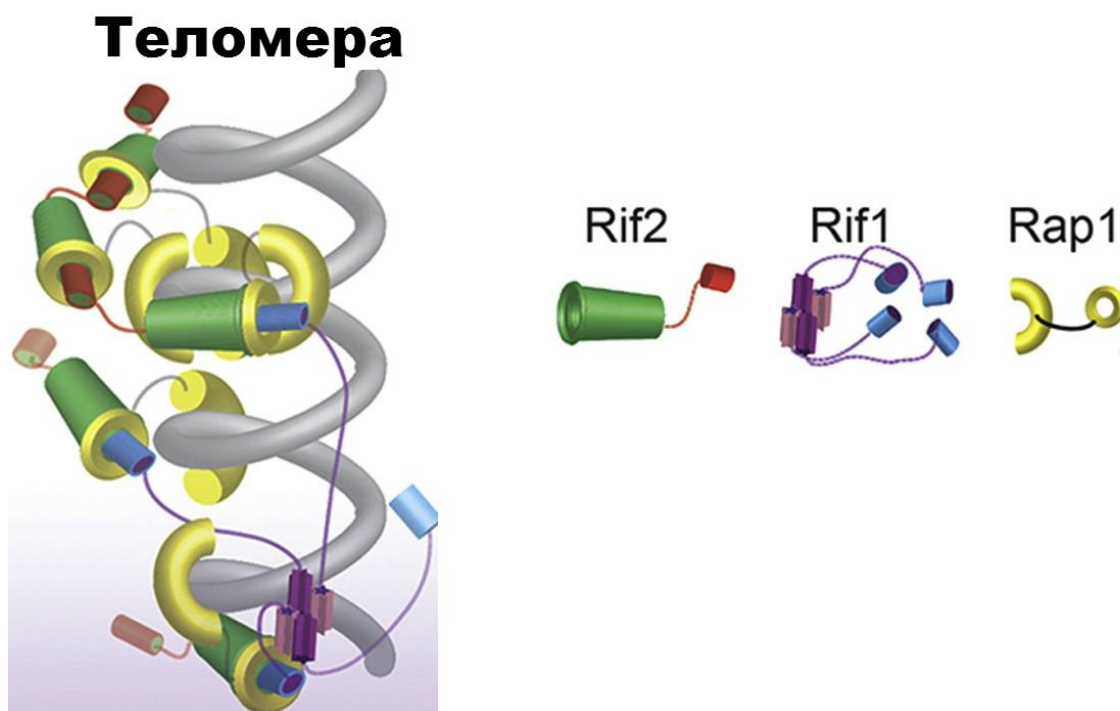


Рисунок 2.3. Модель организации высшего порядка теломер, образуемая за счёт взаимодействий между белками Rap1, Rif1 и Rif2 [31].

В других видах почкующихся дрожжей Rap1 тоже считается основным белком, связывающим двуцепочечную часть теломер [10]. Гомологи белка Rap1 есть у многих эукариотических организмов, в том числе у различных видов грибов, растений и млекопитающих. Однако, по крайней мере, у делящихся дрожжей и млекопитающих Rap1

напрямую не связывает теломерную ДНК; а ДНК-связывающая способность ScRap1 возможно является следствием дубликации центрального MYB домена [32]. Два других домена белка Rap1 (N-концевой BRCT домен и C-концевой домен (RCT)) присутствуют практически у всех эукариот, за исключением некоторых видов. Например, почкующиеся дрожжи *Yarrowia lipolytica* не имеют явного гомолога белка Rap1 [10]. У некоторых видов почкующихся дрожжей рода *Candida* (включая *Candida albicans*) гомологи Rap1 не имеют C-концевого домена [33]. Поскольку этот домен играет ключевую роль в регуляции длины теломер у *S. cerevisiae*, то его отсутствие в других дрожжах свидетельствует о значительных различиях в механизмах поддержания длины теломер среди почкующихся дрожжей.

Yarrowia lipolytica наиболее эволюционно удалены от остальных видов почкующихся дрожжей (Рисунок 2.2), и это отражено в структуре их теломер. Двухцепочечный участок теломер *Y. lipolytica* связан особым MYB-содержащим белком YITay1. MYB домен белка YITay1 более похож на таковые белков TRF1 и TRF2, чем на MYB домены других белков почкующихся дрожжей, в том числе и ScTbf1. Вдобавок, в геноме *Y. lipolytica* присутствует гомолог белка ScTbf1 (YITbf1), хотя его функция в качестве теломерного белка ещё не исследована. Эксперименты по связыванию YITay1 с теломерной ДНК *in vitro* подтверждают его сходство с TRF белками: обнаружено формирование структуры напоминающей теломерную петлю млекопитающих [34, 35].

Гомологи белка Rif1 обнаружены во всех исследованных почкующихся дрожжах (а также в других видах грибов, насекомых и позвоночных). Выделяют три консервативных домена в составе Rif1: HEAT повторы, SILK-мотив и особый ДНК-связывающий домен, хотя взаимное расположение этих доменов различно для разных типов организмов [36]. Связывание ДНК напрямую было показано только для белка Rif1 человека [37], однако предполагают, что дрожжевые гомологи Rif1 способны связывать ДНК, несмотря на низкую консервативность ДНК-связывающего домена [36]. Белки Rif2 и Sir3 присутствуют только в *S. cerevisiae* (и очень близких им видах) [10].

Гомологи компонентов комплекса CST (Cdc13, Stn1 и Ten1) были идентифицированы во всех видах почкующихся дрожжей (с известной последовательностью генома), за исключением *Y. lipolytica*. Cdc13 из *S. cerevisiae* имеет 5 доменов [3, 22]: N-концевой OB1 необходим для димеризации ScCdc13 и привлечения Pol1 (репликативной полимеразы), домен RD (recruitment domain) обеспечивает взаимодействие Est1-Cdc13, предположительный OB2 домен с неизвестной функцией, OB3 – ДНК-связывающий домен, OB4 каким-то образом участвует в регуляции длины теломер. Любопытно, что *C. albicans* (и некоторые другие виды рода *Candida*) имеют два гомолога белка Cdc13 (CaCdc13A и CaCdc13B). Оба эти гомолога короче, чем ScCdc13; они отличаются от последнего отсутствием двух N-концевых OB доменов (и

находящегося между ними домена RD). Как CaCdc13A, так и CaCdc13B являются компонентами теломерного хроматина, поскольку они связывают теломерную G-цепь *in vitro* и *in vivo*, а удаление каждого из генов CaCDC13A и CaCDC13B приводит к нарушению регуляции длины теломер [38, 39].

2.1.2. Теломераза почкующихся дрожжей

Основными компонентами теломеразного комплекса во всех организмах являются теломеразная РНК (TR) и теломеразная обратная транскриптаза (TERT) (в *S. cerevisiae* – TLC1 и Est2, соответственно). Этих компонентов достаточно для активности теломеразы *in vitro* [40]. *In vivo* же для работы теломеразы необходима помощь некоторых вспомогательных белков. Для различных типов организмов набор таких вспомогательных белков сильно отличается. В *S. cerevisiae* дополнительными компонентами теломеразного комплекса являются Est1, Est3, Ku70/Ku80 и семь Sm-белков [3]. Est1 необходим для привлечения теломеразы на теломеры за счёт взаимодействия с белком Cdc13 [41]. Вдобавок, Est1 важен для стимуляции активности теломеразы [42]. Функция белка Est3 гораздо менее понятна. Считается, что он участвует в активации теломеразы, а также регулирует взаимодействие теломеразы с ДНК (возможно, в области якорного сайта) за счёт взаимодействия с N-концевым доменом белка Est2 [43, 44]. Ku70/Ku80 отвечает за транспорт TLC1 в ядро, так как он может связываться с теломерной ДНК и с TLC1, но только не одновременно [45]. Sm-белки образуют гептамерный комплекс в виде кольца, который связывается около 3'-конца TLC1 и необходим для стабильности теломеразной РНК [46].

Последовательности теломеразных РНК из разных организмов обладают крайне низкой степенью гомологии. Несмотря на это, гены соответствующих TR были идентифицированы во многих видах почкующихся дрожжей. Описанные в литературе дрожжевые теломеразные РНК имеют схожее строение, у всех можно выделить несколько консервативных структурных элементов: матричный участок, граничный элемент (ТБЕ, template boundary element), псевдоузел и тройная спираль, трёхсторонняя шпилька (ТВЖ, three way junction) и Est1-связывающая шпилька [47, 48]. Исключение составляет только шпилька, отвечающая за взаимодействие с белками Ku70/Ku80 – эта структура присутствует только в TLC1 и теломеразных РНК ближайших родственников *S. cerevisiae* [49]. Белковые компоненты теломеразных комплексов (Est2, Est1 и Est3) относительно консервативны и присутствуют практически во всех видах почкующихся дрожжей. Исключением являются два вида *Candida parapsilosis* и *Lodderomyces elongisporus*: в их геномах отсутствуют гомологи белка Est1. К тому же, белки Est3 из этих организмов имеют добавочные N- и C-концевые домены, значимость которых пока неясна [43].

2.1.3. Регуляция длины теломер *Saccharomyces cerevisiae*

Регуляция работы теломеразы по клеточному циклу

Эксперименты по иммунопреципитации хроматина (ChIP) показывают, что в *S. cerevisiae* Est2 и TLC1 присутствуют на теломерах в течение практически всего клеточного цикла, хотя есть два пика повышенной ассоциации: в G1 и поздней S фазах [50]. Связывание в G1 фазе зависит от взаимодействия TLC1-Ku80 [51], тогда как ассоциация с теломерами в S фазе – от взаимодействия Cdc13-Est1 [52]. Ассоциация TLC1 с теломерами в G1 фазе нужна для накопления и удерживания теломеразы в ядре [45]. Действие же теломеразы происходит только в поздней S фазе клеточного цикла после завершения репликации теломерной ДНК [53]. Это согласуется с тем, что необходимые для работы теломеразы *in vivo* Est1 и Est3 обнаруживаются на теломерах только в поздней S фазе [50, 54]. Белки Rif1 и Rif2 каким-то образом регулируют этот процесс: при их удалении теломераза может работать и в G1 фазе [55]. Вероятно, это связано с формированием структуры высшего порядка теломер этими белками [31].

Модель "счёта белков"

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что не каждая теломера удлиняется при клеточном делении, причём предпочтение отдаётся более коротким теломерам. Во-первых, скорость удлинения теломеразой (количество добавленных нуклеотидов/число клеточных делений) зависит от длины теломер: по мере увеличения длины теломер скорость их удлинения падает [56]. Во-вторых, вероятность быть удлинённой выше для короткой теломеры, чем для более длинной [57]. Хотя количество добавляемых нуклеотидов не зависит от исходной длины. Результаты ChIP также показывают предпочтительную ассоциацию Est1 и Est2 с короткими теломерами в поздней S фазе [58, 59]. Наконец, наблюдения за единичными молекулами TLC1 в живой клетке методом микроскопии позволили сделать предположение, что синтез теломерной ДНК теломеразой в клетке – событие локализованное и организовано в специфические кластеры (называемые T-рес). Каждый из таких кластеров содержит всего несколько теломер и несколько молекул теломеразы. Причём, клетки, в которых искусственно повышено содержание коротких теломер, число T-рес возрастает [55].

Описанные выше результаты хорошо укладываются в так называемую модель "счёта белков", более десяти лет назад предложенную для объяснения ингибирующего эффекта белка Rap1 (и его партнёров Rif1 и Rif2) на длину теломер [60]. Согласно этой модели количество связанного теломерой Rap1 определяет способность этой теломеры быть удлинённой теломеразой: длинные теломеры связывают больше молекул Rap1, что в свою очередь приводит к формированию структуры, блокирующей теломеразу ("закрытое" состояние). Короткие

теломеры, следовательно, находятся в "открытом" состоянии доступном для действия теломеразы (Рисунок 2.4). Было предложено, что в передаче сигнала от Rap1 теломеразе участвует белок Cdc13.

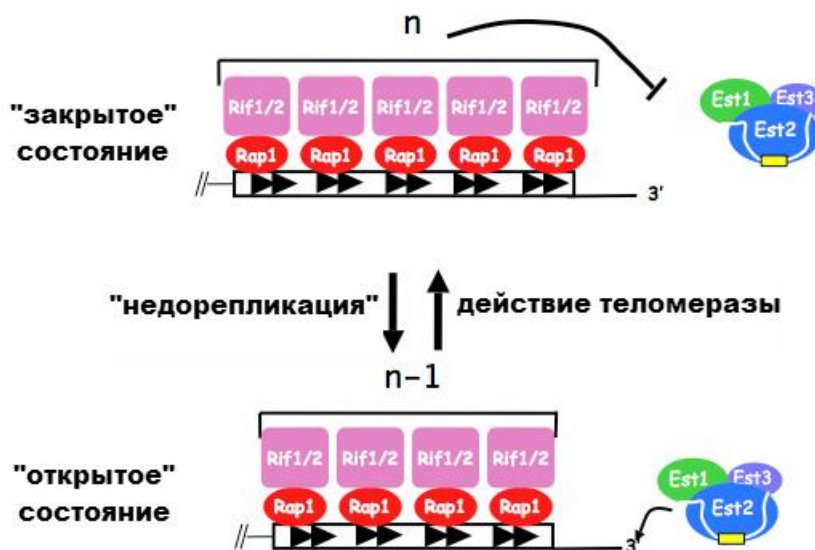


Рисунок 2.4. Модель «счёта белков».

Дальнейшие эксперименты привели к прояснению деталей предложенной модели. Так например, было показано, что действие белка Rap1 на длину теломер полностью зависит от белков Rif; а следовательно на самом деле ведётся счёт связанных Rif1 и Rif2, а не Rap1, и роль Rap1 заключается в привлечении Rif белков на теломеры за счёт взаимодействия с его С-концом [61]. В свою очередь ингибирующее действие, оказываемое Rif белками, опосредовано киназой Tel1 (гомолог АТМ киназы человека) [62]. Tel1 – положительный регулятор длины теломер, поскольку теломеры сильно укорачиваются при удалении соответствующего гена [63]. Как и в случае двуцепочечных разрывов ДНК Tel1 привлекается на теломеры посредством взаимодействия с С-концом белка Xrs2 – субъединицы комплекса MRX. Как MRX, так и Tel1 связываются с короткими теломерами [58, 64, 65]. Белок Rif2 конкурирует с Tel1 за связывание С-конца Xrs2, нивелируя таким образом ассоциацию Tel1 с длинными теломерами. Rif1 тоже участвует в ингибировании накопления Tel1 на теломерах, однако механизм такого ингибирования до сих пор не понятен. Более того, этот эффект слабее, чем Rif2, и частично зависит от последнего [66]. Стоит отметить, что в клетках штамма *Δrif1* теломеры длиннее, чем в штамме *Δrif2* [15]. Таким образом, негативный эффект белка Rif1 на длину теломер не может быть полностью объяснён ингибированием ассоциации Tel1 с теломерами. В штамме *Δtell* связывание MRX с ДНК нарушается Rap1 белком независимо от наличия белков Rif.

Предполагается, что Rap1 смещает MRX комплекс с теломер, если ассоциация Tel1 с теломерами блокирована белками Rif1 и Rif2 [66].

Tel1 киназа важна для нормальной ассоциации теломеразы с теломерами [67]. Это объясняют положительным влиянием киназы Tel1 на взаимодействие Cdc13-Est1, причём считается, что мишенью фосфорилирования является белок Cdc13 [68]. Однако, существуют только противоречивые данные о возможной модификации Cdc13 киназой Tel1 [3, 69]. Альтернативная модель действия Tel1 была предложена Н. Гао и соавторами [70]: отсутствие Tel1 приводит к нарушению процессинга С-цепи теломер, в результате чего субстрат для теломеразы оказывается неоптимальным. Модель может быть дополнена тем фактом, что Tel1 улучшает связывание MRX с теломерами, делая его устойчивым Rap1-зависимому ингибирующему действию [66]. Согласно этой модели, действие теломерных белков направлено скорее в сторону ингибирования ассоциации MRX с теломерами, чем взаимодействию Tel1 с теломерами. Эту гипотезу поддерживает тот факт, что клетки *Δtel1* (с короткими теломерами) содержат меньше теломерной оцДНК, тогда как клетки с тройной мутацией A2287V/I2336T/K2751R в Tel1 (с удлинёнными теломерами) содержат больше теломерной оцДНК [71]. Однако, несмотря на то, что MRX и Tel1 действуют по одному и тому же пути в регуляции длины теломер, и теломеры в штаммах *Δmre11* и *Δtel1* cells одинаково коротки, клетки *Δmre11* содержат больше оцДНК, чем *Δtel1* [72]. Значит стимуляция MRX-зависимого образования теломерной оцДНК не может полностью объяснить функции Tel1 киназы в контроле длины теломер [72].

Стоит отметить, что некоторые экспериментальные факты не очень хорошо укладываются в модель "счёта белков" в том виде, как она представлена выше. Во-первых, суперэкспрессия Rif1 и Rif2 в штамме с удлинёнными теломерами за счёт удаления С-концевого домена Rap1 приводит к укорочению теломер, что говорит о возможности Rif белков выполнять свою функцию независимо от Rap1 [61]. Во-вторых, короткие теломеры содержат такое же количество Rif1, как и длинные [58]. Если учесть слабое и Rif2-зависимое ингибирование теломерной ассоциации Tel1, то механизм действия Rif1 совершенно непонятен. Rif1 может ингибировать накопление RPA и последующее развитие ответа на повреждения ДНК на дисфункциональных теломерах (например, при мутации в каком-либо теломерном белке), скорее всего за счёт конкуренции с RPA за связывание оцДНК [73]. RPA также участвует в привлечении теломеразы на теломеры [74]; тогда можно предположить, что на нормальных теломерах функцией Rif1 является нарушение связывания RPA. Более того, было предложено, что Rif1 подобным образом может маскировать теломерный 3'-выступающий конец от теломеразы [73] – это предположение также частично объясняет функцию Rif1.

Другие механизмы контроля длины теломер S. cerevisiae

Несмотря на то, что Rap1-Rif1-Rif2-зависимое ингибирование MRX/Tel1 связывания с теломерами является основным путём регуляции работы теломеразы в *S. cerevisiae*, в литературе описан ряд других механизмов.

Фактор транскрипции Tbf1 (а также Reb1) укорачивает теломеры, если сайт связывания этого белка расположить вблизи повторов TG₁₋₃ [30]. Однако, этот эффект не исчезает (а наоборот, проявляется сильнее) в штамме с делецией гена *TEL1*. В штамме *Atell* частота удлинения теломеразой больше не зависит от длины искусственной теломеры, что согласуется с выключением основного механизма Rap1-Rif1-Rif2-MRX/Tel1 [75]. Однако при введении в такую теломеру сайтов связывания Tbf1 этот эффект пропадает. Равно как и в случае теломеры природной хромосомы (содержащей Tbf1 сайт) – частота удлинения теломеразой зависит от длины в штамме *Atell*. Практически все хромосомы *S. cerevisiae* в своих субтеломерных областях содержат сайты связывания Tbf1. Таким образом, существует ещё один механизм контроля длины теломер *S. cerevisiae* – механизм зависимый от Tbf1 белка. Объяснением наблюдаемого эффекта может служить результат, полученный в другой работе: Tbf1 и Rap1 скооперировано нарушают ассоциацию MRX комплекса с концами ДНК [76]. N-концевой участок белка Tbf1 необходим для такого ингибирования, однако ни C-концевой домен Rap1, ни Rif1 или Rif2 не нужны. Важность N-конца Tbf1 для контроля длины теломер продемонстрирована и в некоторых других работах [30, 75].

Способность Tbf1 участвовать в регуляции теломер продемонстрирована экспериментами в мутантных дрожжах с так называемыми "гуманизированными" теломерами. Теломерные повторы TG₁₋₃ *S. cerevisiae* могут быть заменены на канонические TTAGGG повторы человека при введении соответствующих мутаций в матричный участок TLC1. Получаемые теломеры связаны белком Tbf1 (а не Rap1 в отличие от обычных повторов TG₁₋₃ в то время как белки Rap1, Rif1 и Rif2 не участвуют в регуляции таких теломер [77]. Детали механизма регуляции длины таких теломер были прояснены экспериментами по связыванию с ДНК, заканчивающимися повторами TTAGGG разной длины [78]. Так, связывание MRX с ДНК, содержащей на конце 230 пн TTAGGG, ингибируется белком Tbf1, тогда как с более коротким участком TTAGGG (длиной в 60 пн) связывается больше MRX. Также с 60 пн TTAGGG теломерами ассоциируется больше Est1 и Est2, чем с длинными. Связывание теломеразы с короткими концами не нарушалось при удалении гена *TEL1*, однако эффективность добавления нуклеотидов при этом сильно уменьшалась в штамме *Atell*. В результате можно сделать вывод о том, что Tbf1 регулирует ассоциацию теломеразы с TTAGGG теломерами посредством ингибирования MRX комплекса, но не Tel1 киназы;

несмотря на необходимость Tel1 киназы для работы теломеразы (в "гуманизированном" штамме с мутацией *Δtel1* теломеры короткие).

Ещё одним негативным регулятором длины теломер *S. cerevisiae* является 5'-3' ДНК хеликаза Pif1. Совместное удаление Rif белков и Pif1 приводит к суммарному увеличению длины теломер, следовательно, регуляторные пути этих белков различны [62, 79]. Pif1 уменьшает теломеразную активность *in vitro*, разрушая взаимодействие теломераза-олигонуклеотид [80]. Вероятно, что *in vivo* Pif1 хеликаза действует аналогично, поскольку при её суперэкспрессии снижается уровень Est1 и Est2, связанных с теломерами [81]. Взаимодействие с доменом "палец" Est2 необходимо для выполнения функции Pif1 [82]. Pif1 предпочтительно ассоциирует с длинными теломерами, что объясняет её роль в регуляции длины теломер [3].

Существует особый способ укоротить аномально удлинённые теломеры с помощью "быстрого удаления теломеры" (TRD, telomere rapid deletion) (Рисунок 2.5). Этот процесс происходит с довольно высокой частотой в клетках дикого типа: существует ~4% вероятность того, что одна из теломер в гаплоидной клетке подвергнется "быстрому удалению" при каждом клеточном делении [32]. Механизмом TRD является интерхроматидная рекомбинация: 3'-выступающий конец теломеры внедряется в двуцепочечную часть хромосомы и теломерные повторы образующейся петли вырезаются с образованием кольцевого фрагмента ДНК в качестве побочного продукта [83]. Этот процесс поражает своей точностью: теломеры укорачиваются до длины равной средней длине большинства теломер в клетке. Каким образом достигается такая точность пока не понятно. Две субъединицы MRX комплекса Mre11 и Rad50 являются необходимыми для эффективного TRD. Отдельно отмечают сложную роль Mre11 в процессе TRD, поскольку различные мутации могут приводить как к повышению, так и понижению эффективности "быстрого удаления теломеры" [84].



Рисунок 2.5. Схема "быстрого удаления теломеры" (TRD) [85].

Гены, примыкающие к теломерам, подвержены особому типу замалчивания известному под названием "теломерного позиционного эффекта" (TPE, telomere position effect) [86]. Тем не менее, в субтеломерных областях располагаются промоторы, направленные в сторону концов хромосом. Продуктом транскрипции с таких промоторов является особый класс некодирующих РНК – TERRA [87]. TERRA синтезируется РНК полимеразой II и представляет из себя полиаденилированные транскрипты длиной от 100 до 1200 нт, состоящих частично из РНК вариантов субтеломерных последовательностей и частично из теломерных повторов. Она является важным компонентом теломерного хроматина [88].

TERRA регулирует длину теломер. В клетках *S. cerevisiae* дикого типа уровень транскрипции TERRA очень низкий и для её детекции необходимо нарушение функции Rat1 экзонуклеазы [89]. В штамме с мутацией *rat1-1* (содержащим повышенное количество TERRA) теломеры укорачиваются за счёт ингибирования теломеразы [89]. В другой работе индукция транскрипции TERRA с одной из теломер приводила к укорочению этой теломеры, однако, в этом случае укорочение происходило независимо от активности теломеразы. В этом случае обнаружилось, что TERRA нарушает способность белков Ku70/Ku80 защищать теломеры от деградации экзонуклеазой Exo1 [90]. В этих экспериментах TERRA играет роль негативного регулятора длины теломер.

Rap1 контролирует уровень TERRA в клетке несколькими регуляторными путями (Рисунок 2.6) [91]. С-концевой домен Rap1 стимулирует Rat1-зависимую деградацию TERRA. Вдобавок, белки-партнёры Rap1 ингибируют транскрипцию TERRA. Такое ингибирование зависит от типа теломер. Теломеры *S. cerevisiae* различаются по содержанию в субтеломерных областях особых повторяющихся последовательностей – X- и Y'-элементов. X-элементы находятся практически во всех субтеломерных областях, тогда как Y'-элементы присутствуют не всегда. Транскрипция TERRA с теломер, содержащих только X-элементы в субтеломерной области, зависит в большей степени от Sir белков, тогда как ингибирование TERRA на Y'-содержащих теломерах осуществляется в основном белками Rif1 и Rif2. Стоит отметить, что белок Rif1 оказывает более сильное ингибирующее действие на транскрипцию TERRA, чем Rif2.

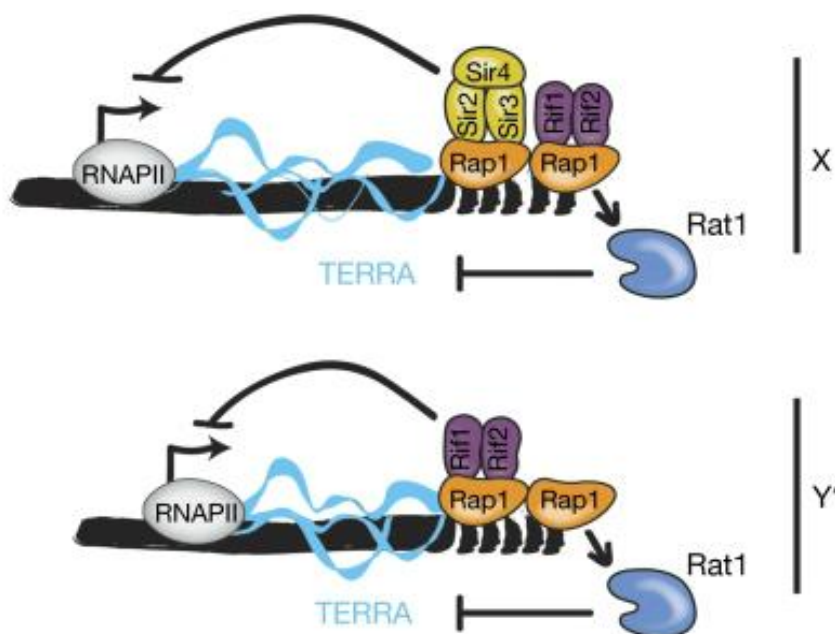


Рисунок 2.6. Механизмы ингибирования TERRA теломерными белками на X- и Y'-теломерах. RNAPII – РНК полимераза II [91].

Неожиданный результат был получен в экспериментах по наблюдению за единичными молекулами TERRA [92]. Примерно 10% клеток, экспрессирующих меченную TERRA с одной из теломер, содержали локусы TERRA возле периферии ядра; а в S фазе происходила совместная локализация этих локусов с теломерами, с которых осуществлялась транскрипция TERRA. Мечение молекул TLC1, теломеры 6R и TERRA получаемую с теломеры 6R позволило наблюдать за всеми тремя молекулами *in vivo* одновременно. Оказалось, что локусы, образуемые TERRA и TLC1 совместно локализовались во время S фазы, а затем происходила совместная локализация обоих локусов с теломерой 6R. Более того, индукция транскрипции TERRA осуществлялась преимущественно с коротких теломер, которые в свою очередь являются предпочтительными субстратами теломеразы. Сделанные эксперименты позволили авторам работы построить модель регуляции длины теломер с участием TERRA. Согласно этой модели, укорочение теломер запускает транскрипцию TERRA, TERRA формирует локус, который в свою очередь формирует кластер молекул теломеразы способных к удлинению теломер, а эти кластеры направляются на теломеры, с которых происходила транскрипция TERRA. В построенной модели (Рисунок 2.7) TERRA выступает в качестве (ключевого) положительного регулятора длины теломер, что несколько противоречит выводам о негативном влиянии TERRA, сделанным в описанных выше работах [93].

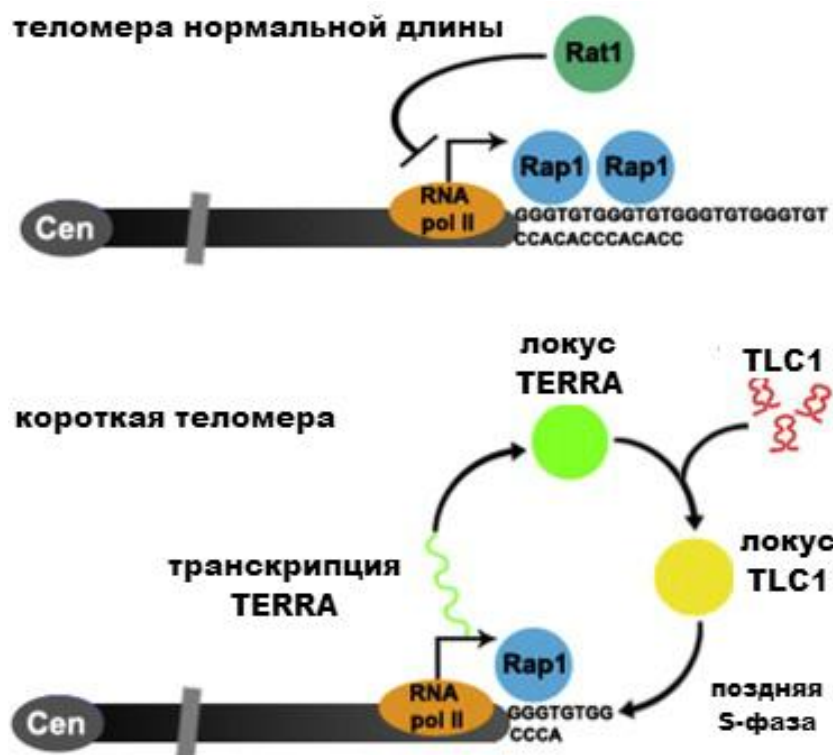


Рисунок 2.7. TERRA, как положительный регулятор длины теломер [92].

К удлинению теломер приводят мутации в некоторых белках репликативного аппарата: например, Rfc1 (репликативный фактор C) и Pol1 (ДНК-праймаза) [94]. На основании этого, предполагают, что синтез G-цепи теломеразой и C-цепи полимеразой отстающей цепи связаны каким-то образом. Обнаружено, что эта связь осуществляется через комплекс CST: Cdc13 и Stn1 взаимодействуют с праймазой Pol1, в то же время Cdc13 взаимодействует с теломеразой [23, 95]. Детали механизма ингибирования теломеразы посредством синтеза C-цепи пока неясны.

2.1.4. Регуляция длины теломер других почкующихся дрожжей

Помимо *S. cerevisiae* контроль длины теломер был изучен в двух других видах почкующихся дрожжей: *Kluyveromyces lactis* и *Candida albicans*. Однако, степень их изученности несравненно меньше, чем *S. cerevisiae*. Тем не менее, в этой главе мы попытались вывести механизмы, действующие в этих двух видах дрожжей, на основании результатов немногочисленных экспериментов и сравнении их с аналогичными для *S. cerevisiae*.

Некоторые мутации в матричном участке теломеразной РНК *K. lactis* приводят к неконтролируемому удлинению теломер теломеразой [96, 97]; при введении таких мутаций в ДНК теломер *K. lactis* происходит нарушение связывания KIRap1 с теломерами, а

суперэкспрессия KIRap1 приводит, по меньшей мере, к частичному подавлению фенотипа длинных теломер, наблюдаемому в данных мутантах. Следовательно, KIRap1 контролирует длину теломер в *K. lactis*. Удаление 31 С-концевой аминокислоты KIRap1 (KIRap1-ΔC) также приводит к удлинению теломер [98], что свидетельствует в пользу того, что для осуществления негативного эффекта белка KIRap1 на длину теломер необходим С-концевой домен, как и в случае его гомолога в *S. cerevisiae*. Удаление двух компонентов MRX комплекса (KIMre11 и KIRad50) приводит к коротким и стабильным теломерам [99], что также указывает на сходство механизмов контроля длины теломер в *K. lactis* and *S. cerevisiae*. Однако, степень удлинения теломер в KIRap1-ΔC мутантах невелика в сравнении с радикальным нарушением регуляции теломер в мутантах ScRap1-ΔC [98]. Это может указывать на различие в степени участия С-концевого домена Rap1 в регулировании длины теломер в этих двух видах дрожжей. Поскольку основной функцией С-концевого домена Rap1 *S. cerevisiae* считается ингибирование ассоциации киназы Tel1 с теломерами (посредством Rif белков), можно предположить, что KITel1 играет меньшую роль, либо вовсе не участвует в поддержании теломер *K. lactis*. Основной же функцией KIRap1 тогда логично было бы считать ингибирование связывания KIMRX комплекса с теломерами, подобно эффекту, оказываемому ScRap1 на ScMRX в штамме *Δtel1*.

Матричный участок KITER относительно большой – 30 нт, и его можно условно разбить на несколько функциональных областей (Рисунок 2.8) [96]. Два идентичных участка (5 нт) в начале и в конце матрицы нужны для правильной транслокации [100]. Мутации в области, кодируемой нуклеотидами 4-9, ведут к высокому уровню рекомбинации в субтеломерных областях, однако не очень сильно влияют на длину теломер. Мутации в правой половине сайта связывания KIRap1 (нуклеотиды 21-25) приводят к несколько укороченным теломерам (в отличие от мутаций в левой части KIRap1 сайта (нуклеотиды 16-20)), значит, этот участок может выполнять особую функцию с положительным влиянием на длину теломер [96]. Особый интерес представляет собой участок, примыкающий к левой половине KIRap1 сайта (нуклеотиды 10-15): по крайней мере, некоторые мутации в этой области сначала вызывают укорочение теломер, однако, после дальнейшего культивирования мутантных штаммов теломеры становятся очень длинными [96]. Связывание KIRap1 с теломерной ДНК из таких мутантных штаммов не нарушено, а суперэкспрессия KIRap1 не подавляет фенотип удлинённых теломер. Более того, одна из таких мутаций и KIRap1-ΔC синергетически влияют на длину теломер [98]. Теломеры в мутантных штаммах остаются длинными даже после удаления KIRad52, а значит теломеры удлиняются не за счёт рекомбинации, а за счёт работы теломеразы [96]. Описанный фенотип может быть объяснён небольшим нарушением взаимодействия ДНК-KIRap1, однако, возможно этот эксперимент свидетельствует о

существовании дополнительного (Rap1-независимого) механизма контроля длины теломер *K. lactis* (Рисунок 2.9Б).



Область матричного участка	A+A'	Б	В	KIRap1 (16-20)	KIRap1 (21-25)
Фенотип мутаций в данной области	Короткие теломеры	Слабое изменение длины	Сначала короткие, затем очень длинные теломеры	Очень длинные теломеры	Небольшое укорочение теломер

Рисунок 2.8. Матричный участок теломеразной РНК *K. lactis*. Функциональные области и теломерный фенотип мутаций в них.

Делеция белка Rap1 в *C. albicans* приводит к тому, что теломеры становятся длинными и гетерогенными [33], что свидетельствует о схожести функций, выполняемых белками CaRap1 и ScRap1. Однако, есть ряд экспериментальных данных, позволяющих предполагать наличие существенных различий в механизмах контроля длины теломер этими белками. Негативный эффект ScRap1 на длину теломер осуществляется посредством ингибирования теломеразы, поскольку ScRap1 ограничивает доступ теломеразы на теломеры; причём С-концевой домен является ключевым элементом в этом процессе. У CaRap1 отсутствует аналогичный домен, что говорит об отличном механизме действия CaRap1. Более того, теломераза не является мишенью ингибирующего действия CaRap1, поскольку удаление CaTERT не только не приводит к подавлению фенотипа в штамме $\Delta rap1$, но и усугубляет его [33]. Следовательно, основной функцией CaRap1 является подавление рекомбинации на теломерах. Похожие фенотипы наблюдаются также в штаммах с делециями генов других теломерных белков *C. albicans*: *KU70*, *STN1* и *TEN1* [33]. Однако, в случае штамма $\Delta ten1$ (возможно и $\Delta stn1$) длинные теломеры поддерживаются и за счёт теломеразы, и за счёт рекомбинации [101]. В штамме же $\Delta ku70$ избыточное удлинение теломер зависит только от теломеразы [102]. Логично сделать предположение, что доступность теломер для теломеразы в *C. albicans* регулируется

гетеродимером CaKu70/Ku80 и комплексом CaCST; а механизм "счёта белков" ("счёта Rap1"), описанный для *S. cerevisiae*, не реализуется в *C. albicans* (Рисунок 2.9В).

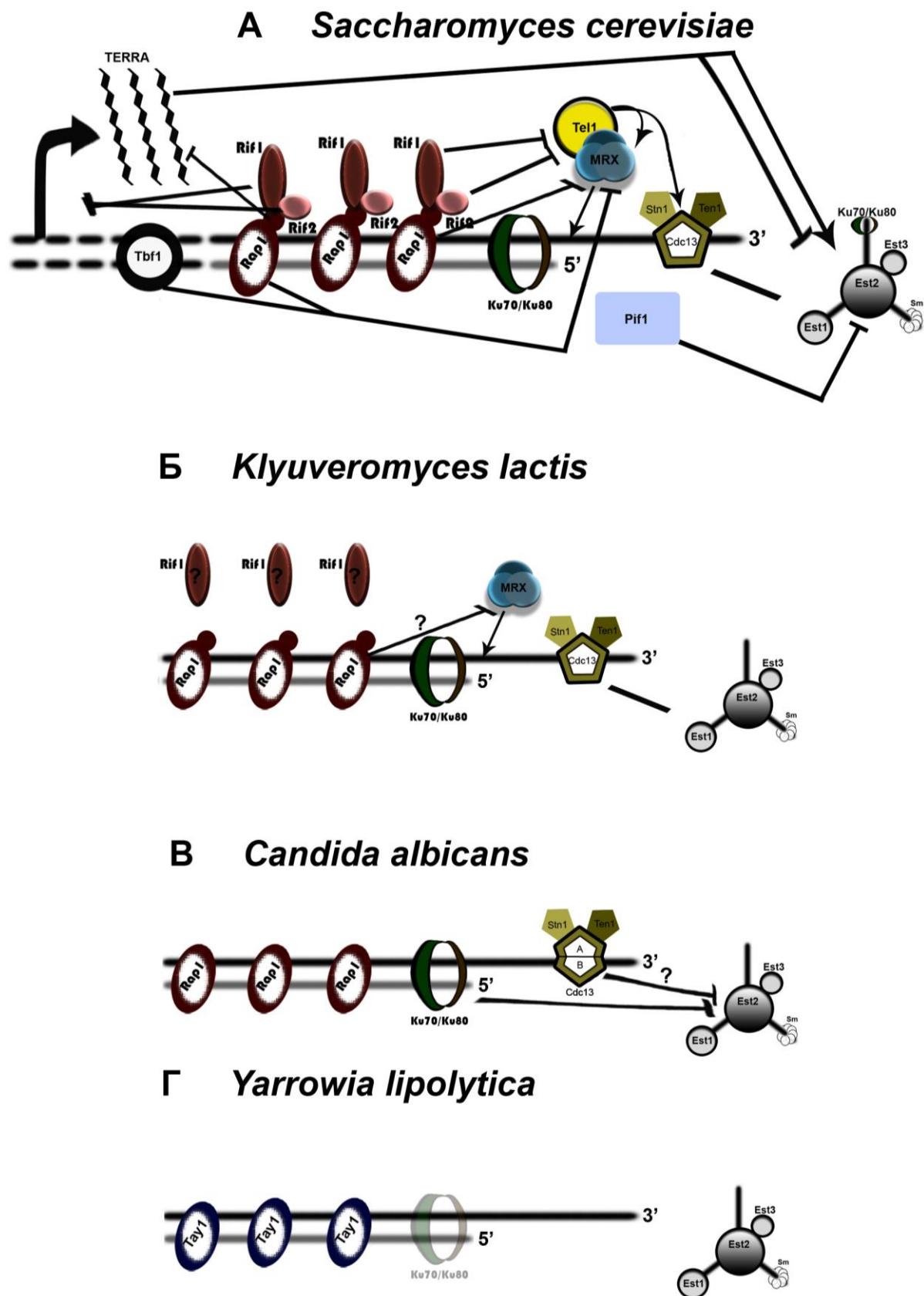


Рисунок. 2.9. Регуляция длины теломер в почкующихся дрожжах. Положительное действие отображено стрелкой, ингибирующее – тупой стрелкой.

2.2. Регуляция длины теломер делящихся дрожжей (*Schizosaccharomyces pombe*)

2.2.1. Строение теломер

Подобно теломерам *S. cerevisiae* теломеры *S. pombe* гетерогенны, консенсусной последовательностью является G₂₋₈TTAC(A), а наиболее часто встречающимся мотивом является TTACAGG [103].

По структуре и белковому составу теломеры *S. pombe* (Рисунок 2.10) больше похожи на теломеры млекопитающих. С двуцепочечной частью теломер связывается MYB-белок Taz1 – ортолог белков TRF1 и TRF2 млекопитающих. Taz1 связывает белок Rap1 – гомолог белка Rap1 *S. cerevisiae*. В отличие от ScRap1, SpRap1 не связывает двуцепочечную ДНК теломер напрямую. Rap1 в свою очередь связывает белок Poz1, Poz1 – Trp1, а Trp1 связывается с двумя белками: Ccq1 и Pot1 [104]. Pot1 является фактором, связывающим теломерную одноцепочечную ДНК [105]. Ccq1 играет ключевую роль в привлечении теломеразы на теломеры за счёт взаимодействия с Est1 [106, 107]. Таким образом, 3'-выступающий конец теломеры и её внутренняя двуцепочечная часть оказываются соединёнными посредством белок-белковых взаимодействий в *S. pombe*; такая структура теломер очень похожа на ситуацию в млекопитающих. На теломеры *S. pombe* также привлекается белок Rif1 за счёт взаимодействия с Taz1 [108]. Несмотря на то, что гомолога белка ScCdc13 в *S. pombe* обнаружить пока не удалось, другие комплекса CST – Stn1 и Ten1 играют роль в защите теломер *S. pombe* от слияния [109]. Комплекс Ku70/Ku80 также присутствует на теломерах *S. pombe* и выполняет защитную функцию [110, 111].

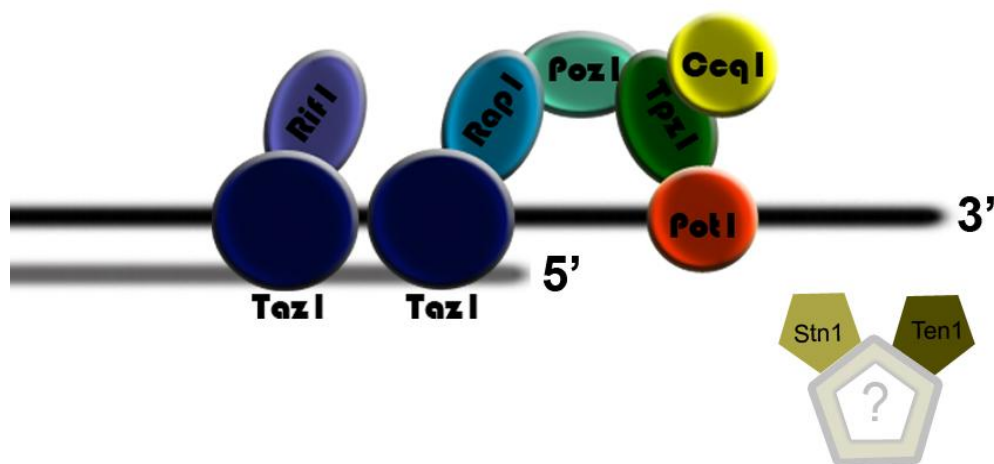


Рисунок 2.10. Строение теломер *S. pombe*.

2.2.2. Теломераза *S. pombe*

У *S. pombe* помимо теломеразной РНК (TER1) и теломеразной обратной транскриптазы (Trt1) компонентами теломеразного комплекса являются белок Est1 и семь белков комплекса Lsm2-8 [112]. Sm-белки (необходимые для стабильности TLC1 *S. cerevisiae*) также важны для функционирования TER1, поскольку они участвуют в биогенезе теломеразы *S. pombe*; однако, они заменяются на Lsm-белки в ходе процессинга TER1 и именно Lsm-белки являются компонентами теломеразного комплекса *S. pombe* [113]. SpEst1 необходим для привлечения теломеразы на теломеры (подобно своему гомологу в *S. cerevisiae*), поскольку он связывает TER1 и один из компонентов теломерного хроматина – Ccq1.

2.2.3. Регуляция длины теломер *S. pombe*

Удаление гена *taz1* приводит к значительному удлинению и повышению гетерогенности теломер [114]. Удлинения теломер при удалении гена *taz1* в штамме $\Delta trt1$ не наблюдается, значит теломераза ответственна за синтез теломер в этом случае [115]. Таким образом, фактор связывания двуцепочечной части теломер в *S. pombe* (Taz1) негативно влияет на работу теломеразы. Это напоминает ситуацию в *S. cerevisiae* (только фактор другой – Rap1), и поэтому было сделано предположение о существовании в *S. pombe* системы "счёта белков", аналогичной *S. cerevisiae*.

Также подобно ситуации в *S. cerevisiae* белки, взаимодействующие с фактором связывания двуцепочечной части теломер (Rap1 и Rif1 в *S. pombe*), отвечают за регуляцию длины теломер [108, 116]. В штамме $\Delta rap1$ теломеры удлиняются, причём их длина несколько больше, чем в штамме $\Delta taz1$. Однако, в двойном мутанте $\Delta rap1\Delta taz1$ длина теломер такая же, как в $\Delta taz1$. Теломеры штамма $\Delta rif1$ тоже длиннее, чем в штамме дикого типа, но степень удлинения не такая значительная, как в штамме $\Delta rap1$. При этом теломеры штаммов $\Delta rif1\Delta taz1$ и $\Delta taz1$ имеют одинаковую длину. Наиболее длинные теломеры наблюдали в штамме $\Delta rap1\Delta rif1$, но при последующем удалении *taz1* они укорачивались до длины штамма $\Delta taz1$. Эти эксперименты показывают, что ингибирование теломеразы белком Taz1 осуществляется двумя независимыми путями: Rap1-зависимым и Rif1-зависимым. При этом Taz1 также оказывает некое положительное влияние на длину теломер.

Удаление гена *poz1* приводит к Trt1-зависимому удлинению теломер [104]. Введение $\Delta poz1$ мутации в штаммы $\Delta taz1$ и $\Delta rap1$ не приводит к увеличению длины теломер в последних, что говорит о том, что Taz1-Rap1-зависимый путь ингибирования теломеразы на самом деле Taz1-Rap1-Poz1-зависимый. Poz1 взаимодействует как с Rap1, так и с Trp1, то есть он является

центральным звеном белкового мостика, соединяющего двуцепочечную часть теломеры с одноцепочечной (Рисунок 2.10). Поскольку белки двуцепочечной части теломеры оказывают негативное влияние на удлинение теломер теломеразой, а белки одноцепочечной части – положительное (о чём будет подробнее написано ниже), была предложена модель регуляции длины теломер в *S. pombe* (Рисунок 2.11) [104]. Согласно этой модели длинные теломеры должны находиться "закрытом" (недоступном для теломеразы) состоянии, поскольку они связывают большее количество Taz1-Rap1-Poz1 комплексов, а следовательно существует большая вероятность взаимодействия с Ccq1-Trpz1-Pot1 комплексом и нивелирования оказываемого им положительного эффекта.

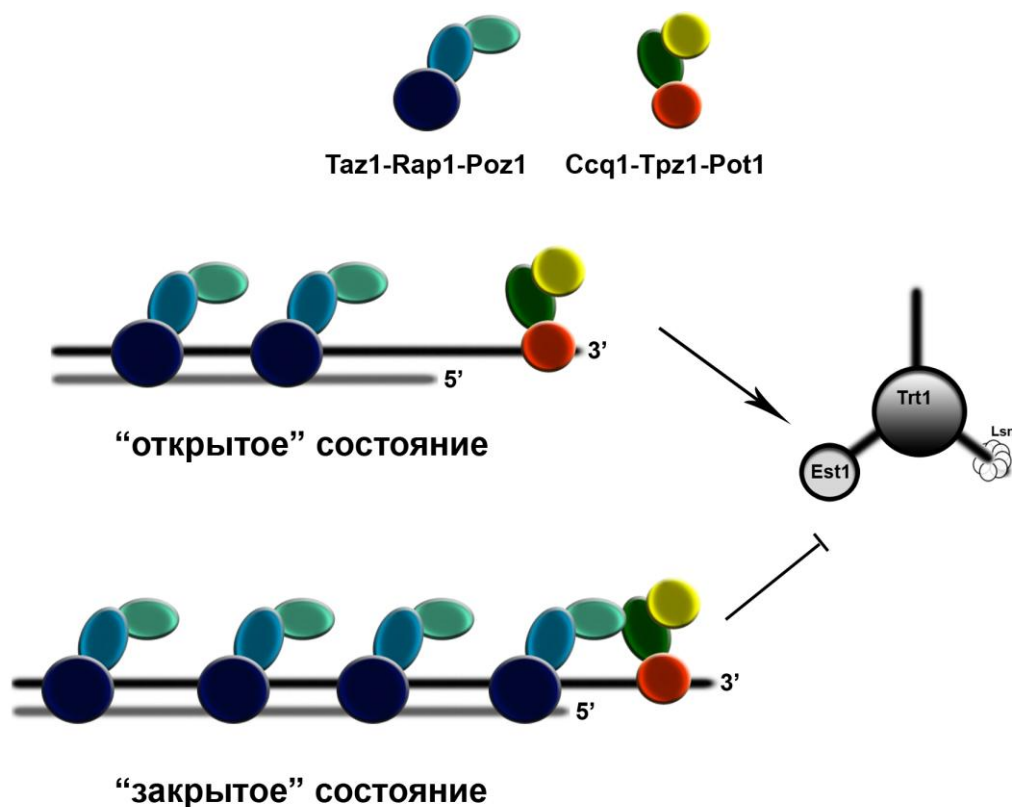


Рисунок 2.11. Модель регуляции теломер *S. pombe* .

Каким же образом белки одноцепочечной части теломер (Ccq1, Trpz1 и Pot1) стимулируют ассоциацию теломеразы? Удаление генов *tpz1* и *pot1* быстро приводит к полной потере теломер и жизнеспособности клеток [104, 105], что свидетельствует о важности функций соответствующих белков для защиты теломер, но с другой стороны этот факт не позволяет выяснить роль этих генов в привлечении теломеразы. Напротив, удаление гена *ccq1* только приводит к значительному укорочению теломер [117]. Дальнейшие эксперименты выявили критическую роль Ccq1 в привлечении теломеразы на теломеры [104, 118]: Ccq1 взаимодействует с теломеразой за счёт прямого взаимодействия с компонентом теломеразного

комплекса Est1 [107] , а на теломеры Ccq1 привлекается за счёт взаимодействия Ccq1-Trp1-Pot1.

Важно отметить, что киназы Tel1 (гомолог АТМ киназы) и Rad3 (гомолог АТR киназы) играют важную роль в поддержании теломер: следствием удаления соответствующих генов в *S. pombe* является нарушение ассоциации теломеразы с теломерами и полная потеря теломерной ДНК [119, 120]. Мутация $\Delta tel1 \Delta rad3$ также является причиной пониженной ассоциации Ccq1 с теломерами, что должно приводить к нарушению ассоциации теломеразы. Более того, выяснилось, что Tel1 и Rad3 фосфорилируют Ccq1 по остатку Thr93 и это фосфорилирование стимулирует взаимодействие Ccq1-Est1 [106]. Последней деталью механизма является тот факт, что Taz1, Rap1 и Poz1 ингибируют фосфорилирование Ccq1.

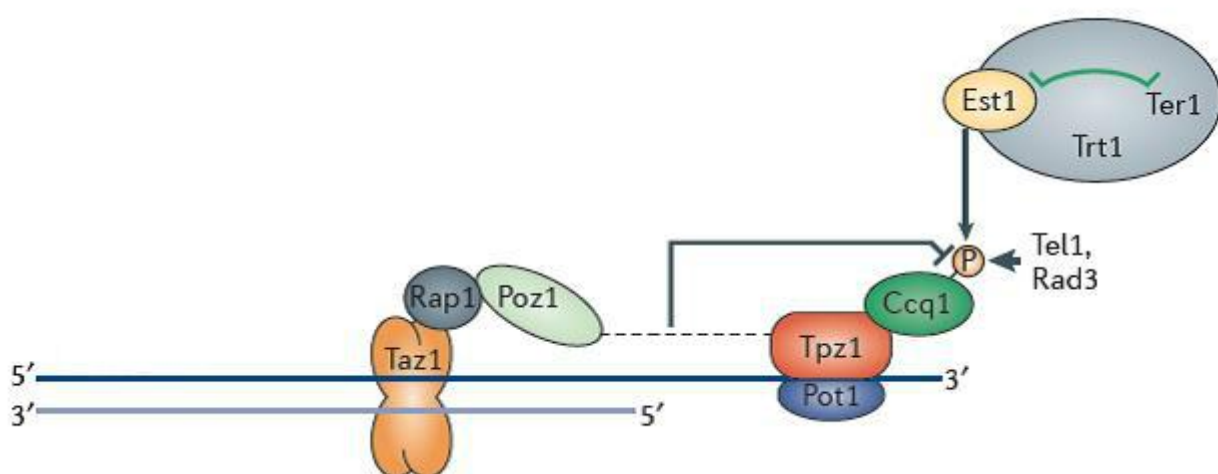


Рисунок 2.12. Фосфорилирование Ccq1, как ключевой элемент в привлечении теломеразы на теломеры *S. pombe* [4].

Дополнительным подтверждением описанного механизма являются недавние эксперименты с мутантами Trp1, не приводящими к полной потере функции белка [121]. Так, нарушение взаимодействий Trp1-Pot1 и Trp1-Poz1 приводило к удлинению теломер, и соответствующие мутации находились в одном и том же регуляторном пути, что и Rap1 и Poz1. Однако, неожиданные результаты были получены при изучении мутации L449A в Trp1, нарушающей взаимодействие Trp1-Ccq1. Оказалось, что несмотря на схожие фенотипы штамма $\Delta ccq1$ и штамма с мутацией L449A в Trp1 (короткие теломеры и активация сигнальных путей репарации ДНК), ассоциация Ccq1 или теломеразы с теломерами в штамме с мутацией L449A в Trp1 не нарушается. Это говорит, во-первых, о существовании альтернативного пути привлечения Ccq1 (а, следовательно, и теломеразы) на теломеры (не за счёт взаимодействий Ccq1-Trp1-Pot1). Во-вторых, о новой критичной функции Ccq1 – активация каким-то образом комплекса теломера-теломераза за счёт взаимодействия Ccq1-Trp1. Предположительно, такая

активация происходит за счёт посттрансляционной модификации Trp1, разрушающей ингибирующий теломеразу белковый мостик, соединяющий дцДНК и оцДНК теломер. С учётом этих выводов модель регуляции длины теломер *S. pombe* должна быть несколько изменена (Рисунок 2.13).

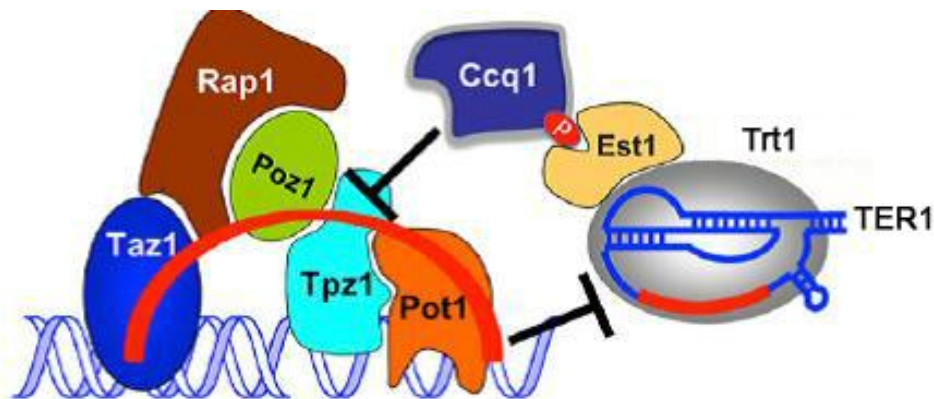


Рисунок 2.13. Альтернативная роль Ccq1 в привлечении теломеразы на теломеры *S. pombe* [121].

Однако, многие аспекты остаются невыясненными в предложенной модели регуляции длины теломер. Например, каким именно образом Taz1-Rap1-Poz1 ингибируют фосфорилирование Ccq1 по остатку Thr93? Какое место занимает в данной модели белок Rif1, ассоциированный с Taz1 и негативно влияющий на длину теломер? Мутации некоторых других белков также влияют на длину теломер, но не задействованы в данной модели. Например, мутации в полимеразе лидирующей цепи Polε приводят к укорочению теломер, тогда как мутации в полимеразах отстающей цепи Polα и Polδ приводят к удлинению теломер [122]. Более того, степень ассоциации с теломерами в разных фазах клеточного цикла не одинакова у всех компонентов теломерного комплекса, а значит, мостик из теломерных белков может на самом деле не образовываться *in vivo* или образовываться только на маленьком отрезке клеточного цикла [120, 123].

Попытка ответить на эти вопросы и построить более «динамическую» модель регуляции теломер (Рисунок 2.14) была предпринята в недавней работе [123]. Одним из важных событий для привлечения теломеразы является накопление Ccq1-Trp1-Pot1 комплексов на теломерах в S-фазе клеточного цикла. Однако, центральным событием в данной модели является прибытие репликативных полимераз на теломеры. До этого было обнаружено, что полимеразы лидирующей цепи Polε появляются на теломерах несколько раньше, чем полимеразы отстающей цепи Polα и Polδ [124]. Более раннее появление Polε приводит к накоплению оцДНК, и как

следствие к накоплению RPA и Rad3 киназы, фосфорилированию Ccq1 по остатку Thr93 и привлечению теломеразы. Белки Rap1 и Poz1 стимулируют привлечение полимераз отстающей цепи, что объясняет их негативное действие на теломеразу. Taz1 влияет, как на время прибытия Pol α и Pol δ (положительно, через Rap1 и Poz1), так и на Pol ϵ (отрицательно). Отрицательное влияние Taz1 на прибытие Pol ϵ предположительно опосредуется белком Rif1, поскольку последний был задействован в регуляции времени "разгорания" ориджинов [125, 126]. Обнаружено, что количество Taz1 на теломерах уменьшается при наступлении S-фазы, что "запускает" репликацию теломер. При этом короткие теломеры должны реплицироваться раньше, поскольку содержат меньше Taz1, и накапливать больше RPA и Rad3 киназы и теломеразы. Ещё одним аспектом регуляции в данной модели является взаимодействие Trp1 с двумя компонентами CST комплекса – Stn1-Ten1. Предполагается, что это взаимодействие способствует привлечению Pol α и ингибированию теломеразы. Важность этого взаимодействия была продемонстрирована в двух других работах [127, 128]. Показано, что Trp1 модифицируется SUMO белком по остатку Lys242, такое сумоилирование Trp1 повышает его сродство к Stn1, а нарушение этой модификации приводит к увеличению длины теломер.

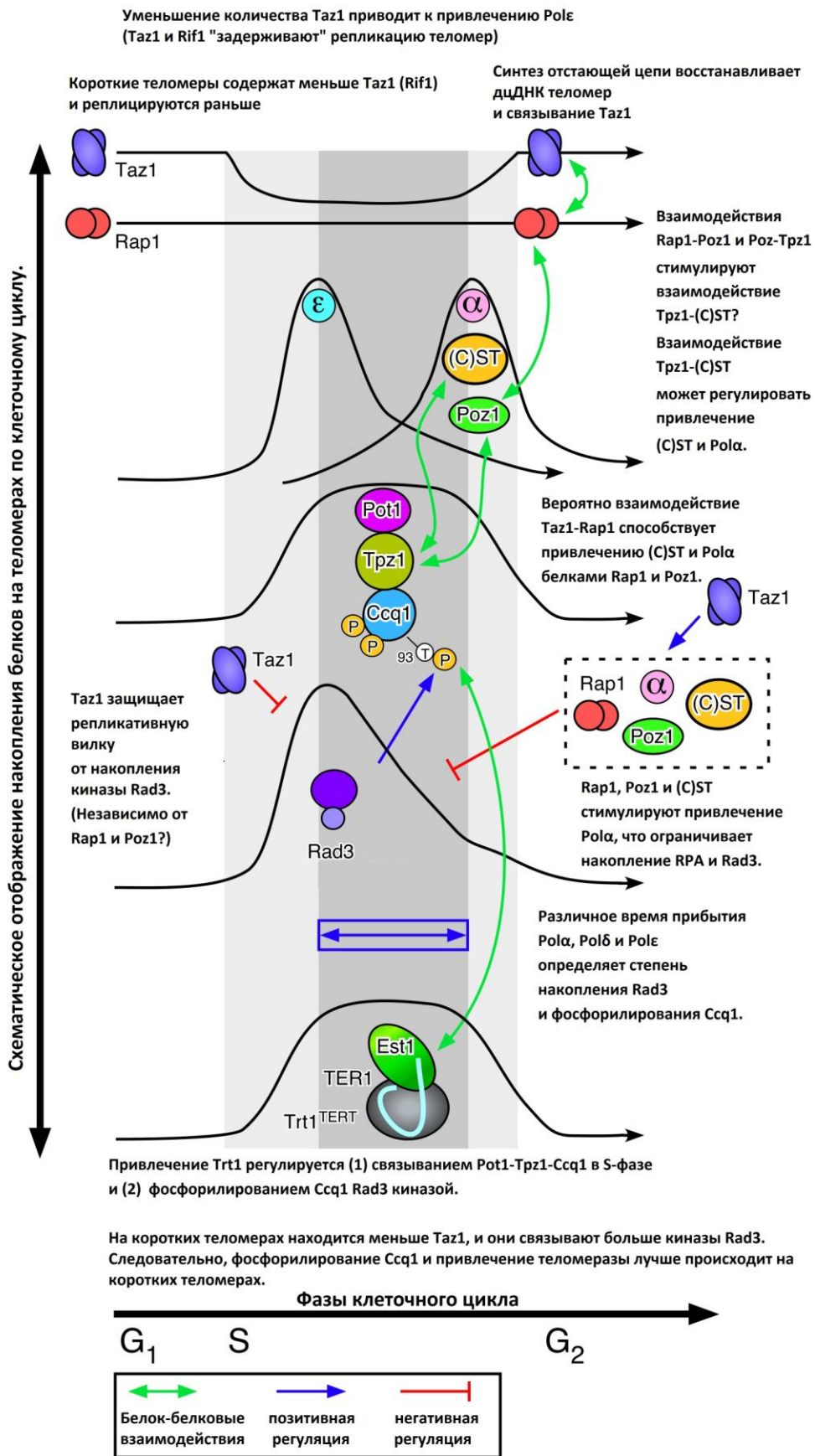


Рисунок 2.14. «Динамическая» модель регуляции длины теломер *S. pombe* [123].

2.3. Регуляция длины теломер человека (*Homo sapiens*)

2.3.1. Структура теломер человека

Теломерная ДНК млекопитающих и других позвоночных состоит из повторов ТTAGGG [129, 130]. Эта последовательность составляет теломеры многих организмов на всех ступенях эволюции: в том числе некоторых простейших, растений и грибов; предполагают, что ТTAGGG является предшественником всех остальных теломерных повторов [131].

Как уже упоминалось, белковый состав теломер человека и *S. pombe* имеет много общего (сравните Рисунок 2.10 и Рисунок 2.15). Так, теломеры человека связываются комплексом из шести белков под названием "шелтерин" (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1, POT1) [132]. Двухцепочечная часть теломер покрыта гомодимерами белков TRF1 и TRF2 – оба белка связывают ДНК при помощи MYB домена. Димеры TRF1 и TRF2 взаимодействуют между собой и вместе связывают белок TIN2. POT1 – фактор, связывающий одноцепочечную часть теломер. TPP1 – белок, взаимодействующий с POT1 и усиливающий его сродство к ДНК. TPP1 взаимодействует с TIN2. Таким образом, двухцепочечная и одноцепочечная часть теломеры оказываются связаны цепочкой белок-белковых взаимодействий, как и в случае делящихся дрожжей. Белок Rap1 также является компонентом теломерного хроматина, однако в отличие от теломер *S. pombe*, Rap1 человека не участвует в образовании белкового мостика – он ассоциирован с теломерами за счёт взаимодействия с TRF2.

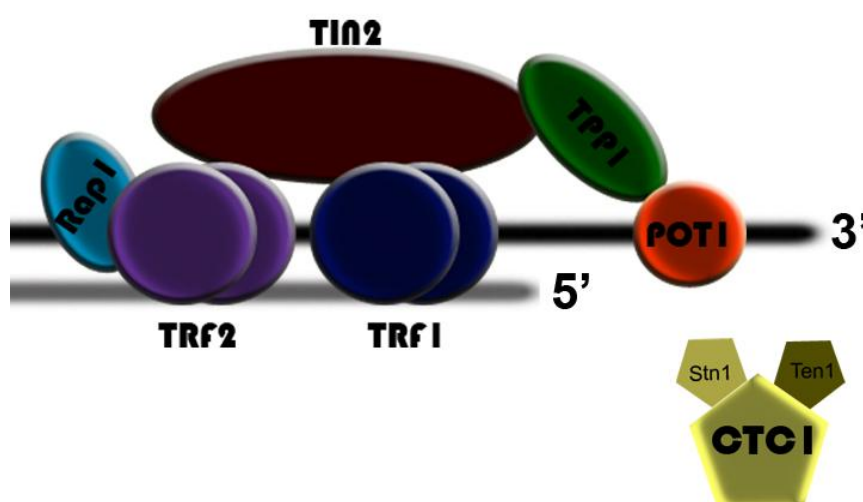


Рисунок 2.15. Структура теломер человека.

Одноцепочечная часть теломер связана и защищена белком Pot1, что напоминает ситуацию в *S. pombe* и отличается от ситуации в почкующихся дрожжах, где фактором

связывания теломерной оцДНК является компонент комплекса CST – Cdc13. Однако, равно как и в *S. pombe* два других компонента CST – Stn1 и Ten1 имеют гомологов и участвуют в процессинге теломер человека. Более того, в отличие от *S. pombe*, третий компонент комплекса CST в человеке был идентифицирован – белок CTC1, хотя он не является настоящим гомологом Cdc13 [133].

Большое количество других белков также ассоциируют с теломерами человека и вносят важный вклад в защитную функцию шелтерина (например, Ku70/80). Однако, как правило эти факторы присутствуют в гораздо меньшем количестве, чем белки шелтеринового комплекса, а их ассоциация с теломерами часто временная (шелтерин находится на теломерах в течении всего клеточного цикла). Поэтому обычно эти белки рассматривают, как медиаторы функций шелтерина [134].

2.3.2. Теломераза человека

Теломеразный комплекс человека сильно отличается от дрожжевых по составу и свойствам. Теломеразная РНК человека (hTR) короче дрожжевых более чем в два раза и у неё отсутствуют такие характерные для дрожжевых TR элементы, как сайт взаимодействия с Sm-белками и участок взаимодействия с белком Est1 [112]. Более того, у человека есть три гомолога Est1: Est1A/Smg6, Est1B/Smg5 и Est1C/Smg7, но ни один из них не выполняет функции привлечения теломеразы на теломеры. Est1A и Est1B ассоциированы с активной теломеразой, однако его функция до сих пор неизвестна [135, 136]. Важно отметить, что один из доменов белка шелтеринового комплекса TPP1 гомологичен субъединице теломеразы *S. cerevisiae* белку Est3 [137]. Как Est3, так и TPP1 взаимодействуют с N-концевым доменом теломеразной обратной транскриптазы TERT и стимулируют теломеразную активность [138].

На 3' конце hTR содержит мотивы H/ACA, присутствующие в некоторых мяоРНК. Аналогично другим мяоРНК hTR связывает дискерин, GAR1, NOP10 и NHP2 и эти белки обеспечивают стабильность 3'-конца hTR [112]. hTR также содержит особый CAB мотив, служащий местом связывания ещё одного компонента теломеразного комплекса человека – белка TCAB1 [139]. TCAB1 важен для локализации теломеразы в тельца Кахаля, а также для привлечения на теломеры.

2.3.3. Регуляция теломеразы на теломерах

Эксперименты на клеточных линиях позволили установить, что аналогично другим модельным организмам теломерные белки человека задействованы в ингибировании удлинения

теломер теломеразой. Нокдаун TRF1 приводит к удлинению теломер, тогда как суперэкспрессия TRF1 укорачивает теломеры [140, 141]. Длинные теломеры содержат больше TRF1, чем короткие [142], а специфическое привлечение TRF1 на одну из теломер приводит к её укорочению [143]. TRF2 и Rap1 также являются негативными регуляторами длины теломер, однако, их влияние на теломеры несколько отличается от TRF1 [141, 144, 145]. Так, например, если механизм действия TRF1 заключается в ингибировании действия теломеразы, то TRF2 укорачивает теломеру по другому механизму (не зависящему от теломеразы) [143]. Остальные компоненты шелтерина TIN2, TPP1 и POT1 ведут себя подобно TRF1 [142, 146, 147, 148].

Шелтерин может быть выделен из клеточных экстрактов в свободной от ДНК форме [149, 150]. Локализация белка POT1 на теломерах зависит от его взаимодействия с TPP1 (а в конечном счёте от TRF1 и TRF2), но не зависит от его способности связывать ДНК [142, 147]. Количество всех компонентов шелтеринового комплекса на теломерах увеличивается с длиной теломер [142]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что шелтерин выполняет свою функцию как единое целое, несмотря на существование специфических функций для каждого из белков. Наглядно это было продемонстрировано, по крайней мере, на мышинных клетках: результатом совместного нокаута mTRF1 и mTRF2 явилось полное освобождение теломер от компонентов шелтерина [151]. Этот факт несколько отличает шелтерин человека от подобного комплекса в делящихся дрожжах, который представляет собой более динамичную структуру.

Удаление ДНК-связывающего домена POT1 приводит к удлинению теломер (но не к диссоциации POT1 или других компонентов шелтерина), следовательно, связывание ДНК белком POT1 может являться ключевым событием в регуляции теломеразы. При этом POT1 выступает в качестве последнего посредника в передаче сигнала о длине теломеры [142]. Один из возможных вариантов нарушения работы теломеразы посредством связывания ДНК белком POT1 – конкуренция POT1 и теломеразы за связывание 3'-конца теломеры. Возможность ингибирования по такому механизму была продемонстрирована, по крайней мере, *in vitro*.

Таким образом, комплекс теломерных белков человека выполняет роль сенсора длины теломер и контроль длины теломер человека может осуществляться по принципу "счёта белков", как и в описанных выше дрожжевых системах (Рисунок 2.16).

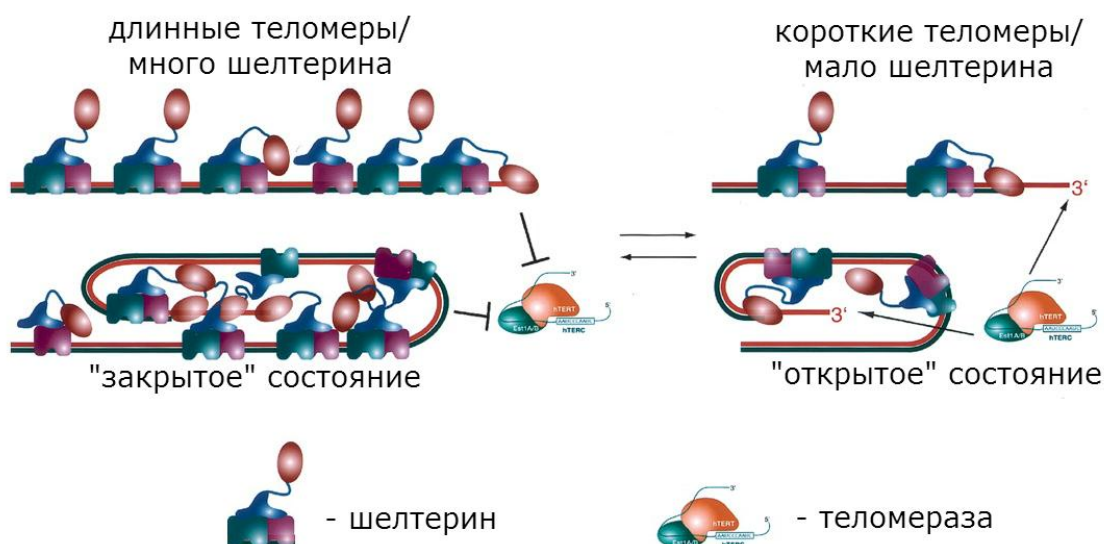


Рисунок 2.16. Модель регуляции длины теломер человека шелтериновым комплексом [132].

Однако, POT1 также оказывает положительное влияние на теломеры. Суперэкспрессия POT1 приводит к удлинению теломер [152]. Вдобавок, *in vitro* POT1 блокирует теломеразную активность только на некоторых субстратах. При связывании POT1 с олигонуклеотидом так, что хотя бы восемь нуклеотидов с 3'-конца остаются свободными, активность и процессивность теломеразы даже увеличиваются [153]. Более того, дальнейшее увеличение активности в этом случае происходит при дополнительном добавлении белка TPP1 [154]. Эти результаты говорят о возможности более сложного влияния шелтеринового комплекса на работу теломеразы *in vivo*. Предполагают наличие дополнительного фактора и/или посттрансляционной модификации, которые могли бы переключать POT1/TPP1 из ингибирующего состояния в активирующее [154].

Ключевым моментом в предложенной модели регуляции теломеразы человека белками шелтеринового комплекса является контроль активности (процессивности) теломеразы. Однако, в рассмотренных ранее аналогичных моделях дрожжей ингибирующее действие теломерных белков было скорее направлено на привлечение теломеразы на теломеры. Каким же образом происходит доставка теломеразного комплекса на теломеры человека? Оказывается, взаимодействие между N-концевым OB-fold доменом TPP1 и N-концевым доменом hTERT, необходимое для активации теломеразы, также важно для взаимодействия теломеразы с теломерами [155, 156]. Удаление N-концевого домена TPP1 приводит к укорочению теломер, в отличие от фенотипа нокдауна полноразмерного TPP1. Этот факт добавляет сложности в механизм контроля теломеразы шелтерином. Более того,

фосфорилирование TPP1 по остатку Ser111, происходящее в поздней S, G2 и M фазах клеточного цикла, отвечает за регуляцию привлечения теломеразы по клеточному циклу [157].

Другим важным аспектом ассоциации теломеразы с теломерами является локализация в тельца Кахала (ТК) – особые клеточные структуры, обогащённые некоторыми белками (например, coilin и TCAB1) и выполняющие ряд важных функций. В течение S фазы клеточного цикла часть ТК ассоциированы с теломерами и теломеразной РНК, что позволило предположить роль этих структур в синтезе теломер [158]. Компонент теломеразного комплекса TCAB1 важен для локализации hTR в ТК и на теломеры [139]. В другой работе была продемонстрирована важность другого компонента ТК – coilin для доставки hTR на теломеры, а также была показана независимость функции TCAB1 от coilin в этом процессе при суперэкспрессии теломеразы [159].

Тем не менее, привлечение теломеразы на теломеры скорее всего не является основным регулируемым событием в контроле длины теломер человека, по крайней мере, в том виде, как это происходит в дрожжах. Так, в отличие от *S. cerevisiae* (практически) каждая теломера удлиняется теломеразой, по крайней мере, в двух раковых линиях человека в условиях поддержания длины теломер [160]. При этом добавляется примерно 60 нт, синтезируемых процессивно одной молекулой теломеразы. В условиях восстановления длины теломер (после обработки клеток ингибитором), происходит повышение количества добавляемых нуклеотидов. Однако, это повышение происходит не за счёт увеличения процессивности теломеразы: скорее происходит повышение числа молекул теломераз, удлиняющих эту теломеру [161].

Нокдаун каждого из компонентов комплекса CST человека приводит к удлинению теломер за счёт теломеразы [162]. Следовательно, несмотря на то, что CTC1 не является гомологом Cdc13 из *S. cerevisiae*, участие CST комплекса в контроле длины теломер сохранилось в процессе эволюции. CST человека связывает теломерную оцДНК, а также белки TPP1 и POT1, и эти взаимодействия нарушают активность теломеразы *in vitro*. Наконец, обогащение CST на теломерах происходит в поздней S-фазе, и это обогащение зависит от работы теломеразы, следовательно, CST предпочтительно связывается с новосинтезированными теломерными повторами. На основании этих данных, комплексу CST была присвоена функция терминатора работы теломеразы. Существуют также данные об участии CST в стимуляции работы полимеразы отстающей цепи ($\rho\alpha$) [163], однако нет данных, свидетельствующих о каком-либо влиянии синтеза С-цепи на работу теломеразы человека.

2.4. Заключение

В данном обзоре мы рассмотрели основные регуляторные пути, обеспечивающие поддержание гомеостаза теломер, на трёх модельных организмах: почкующиеся дрожжи *S. cerevisiae*, делящиеся дрожжи *S. pombe* и человек. Следует отметить, что за 30 лет, прошедших со времени открытия теломеразы, многие аспекты регуляции длины теломер были выяснены, несмотря на технические трудности, связанные с работой в теломеразной области. Тем не менее, детали механизмов контроля длины теломер неизвестны до сих пор даже для такого хорошо изученного организма, как *S. cerevisiae*.

В *S. cerevisiae* основной регуляторный путь, обеспечивающий стабильную длину теломер, осуществляется за счёт контроля ассоциации теломеразы с теломерами посредством белков Rap1-Rif1-Rif2-MRX/Tel1. Rap1-Rif1-Rif2 являются своеобразным сенсором длины теломер, а передача информации теломеразе опосредована комплексом MRX/Tel1 за счёт модуляции взаимодействия Cdc13-Est1. Этот регуляторный путь стал основой для понимания гомеостаза теломер (во всех организмах): белки двуцепочечной части теломер ингибируют связывание теломеразы с белками одноцепочечной части теломер за счёт влияния на регуляторный элемент. Однако даже в этом тщательно изученном механизме существует много пробелов. Каким образом происходит стимуляция взаимодействия теломеразы-теломера белками комплекса MRX/Tel1? Роль белка Rif1 всё ещё остаётся загадочной.

Следующий уровень сложности формируют дополнительные пути контроля работы теломеразы: Pif1 хеликаза, Tbf1, TERRA – важные участники биогенеза теломер, но их роль в поддержании стабильности теломер только начинает проясняться. Более того, масштабные скрининги штаммов мутантных *S. cerevisiae* выявили более 300 генов, функция которых важна для поддержания длины теломер [164]. Безусловно, полное понимание гомеостаза теломер требует построение сети взаимодействий продуктов всех этих генов.

При рассмотрении контроля длины теломер в различных организмах поражает значительное различие в механизмах, осуществляющих этот контроль. Особенно ярко это различие проявляется при сравнении строения теломер почкующихся дрожжей и человека. Так, единственным общим компонентом теломерного хроматина *S. cerevisiae* и человека является белок Rap1. Однако и его функция не является консервативной в процессе эволюции: в *S. cerevisiae* Rap1 – один из главных участников регуляции теломеразы, тогда как hRap1 вносит лишь небольшой (пока невыясненный) вклад в поддержание стабильности теломер человека. Да и сам процесс удлинения теломер теломеразой значительно отличается между этими двумя организмами. Теломераза синтезирует ДНК лишь на некоторых теломерах, в то время как каждая теломера человека удлиняется теломеразой при каждом делении.

И всё-таки общие закономерности могут быть выявлены. Принцип «счёта белков» – ингибирование теломеразы белками двуцепочечной части теломер – сохраняется в процессе эволюции. Комплекс CST играет важную роль в регуляции теломеразы во всех трёх рассмотренных организмах. Некоторые общие детали наблюдаются между двумя организмами, но отсутствуют в третьем. Так, важность взаимодействий Est1 с теломеразной РНК и Est1 с одним из белков одноцепочечной части теломер для привлечения теломеразы показано для *S. cerevisiae* и *S. pombe*, но в человеке такого не обнаружено. С другой стороны сама структура теломер более схожа у человека и *S. pombe*, чем у почкующихся и делящихся дрожжей.

Также в данном обзоре мы рассмотрели регуляцию длины теломер в некоторых других видах почкующихся дрожжей. Удивительно что, несмотря на относительную эволюционную близость этой группы организмов, наблюдаются некоторые принципиальные различия в контроле теломер. В *C. albicans*, белок Rap1 не имеет С-концевого домена для привлечения Rif белков, а Cdc13 представляет собой гетеродимер и по всей видимости лишён способности взаимодействия с Est1. Более того, ингибирование теломеразы *C. albicans* происходит по радикально другому механизму, чем в *S. cerevisiae*, не включающему Rap1, но включающему Ku70/Ku80 и CST. Отдельно стоит отметить *Y. lipolytica*: теломеры этого вида почкующихся дрожжей связаны белком Tau1 (гомологом TRF белков), и в геноме *Y. lipolytica* нет гомологов Rap1 и Cdc13. Возможно, дальнейшие эксперименты покажут, что теломеры *Y. lipolytica* по строению и свойствам более похожи на теломеры делящихся дрожжей и млекопитающих.

Определение общих функций теломерных белков различных организмов позволит выявить более консервативные (следовательно, более значимые) аспекты механизмов поддержания длины теломер. Поэтому использование различных модельных организмов в изучении теломеразы и теломер является важной и актуальной задачей. Простейшие организмы, такие как почкующиеся дрожжи, по-прежнему остаются подходящими кандидатами для этой цели, ввиду простоты культивирования и проведения генно-инженерных манипуляций.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Постановка задачи

В предыдущем разделе мы подчеркнули важность использования разнообразных модельных организмов для изучения теломер и теломеразы. Одним из таких организмов являются дрожжи *Hansenula polymorpha*. *H. polymorpha* – термотолерантные метилотрофные почкующиеся дрожжи. Помимо основных преимуществ работы с простейшими эукариотами (простота культивирования и проведения генно-инженерных манипуляций), полезным свойством *H. polymorpha* является термофильность: некоторые штаммы дрожжей этого вида способны выживать при температурах выше 50 °С. Белки и нуклеопротеиновые комплексы термотолерантных организмов являются более стабильными, что облегчает работу с ними *in vitro*. Особенно актуальным этот факт является для теломеразы, поскольку в клетке этот фермент присутствует в крайне малых количествах, и его выделение для структурных и биохимических исследований затруднено.

H. polymorpha включают в себя несколько штаммов дрожжей, которые на самом деле представляют собой различные виды [11]. Проводилось несколько попыток переклассифицировать некоторые из них. В данной работе используется штамм *H. polymorpha* DL-1 (ATCC 26012). Согласно последней классификации его отнесли к виду *Candida parapolymorpha* [165], однако большинство исследователей по-прежнему придерживается исторического названия *Hansenula polymorpha* DL-1 (встречается ещё название *Ogataea parapolymorpha* DL-1 [11]). В данной работе мы будем использовать название *H. polymorpha*.

На сегодняшний день опубликован как митохондриальный, так и ядерный геном *H. polymorpha* [11, 166]. Согласно полученным данным филогенетически ближайшими к *H. polymorpha* видами являются *Brettanomyces custersianus* и *Dekkera bruxellensis*. Эволюционно *H. polymorpha* значительно удалены от остальных дрожжей, используемых для изучения теломер (Рисунок 3.1). На концах хромосом *H. polymorpha* содержится последовательность 5'-GGGTGGCG-3', повторяющаяся 18-23 раз, что делает *H. polymorpha* обладателем самых коротких теломер среди всех организмов. Теломеры этого вида дрожжей также характеризуются высокой гомогенностью [167]. Таким образом, *H. polymorpha* является полезным и интересным модельным организмом для изучения теломеразы.

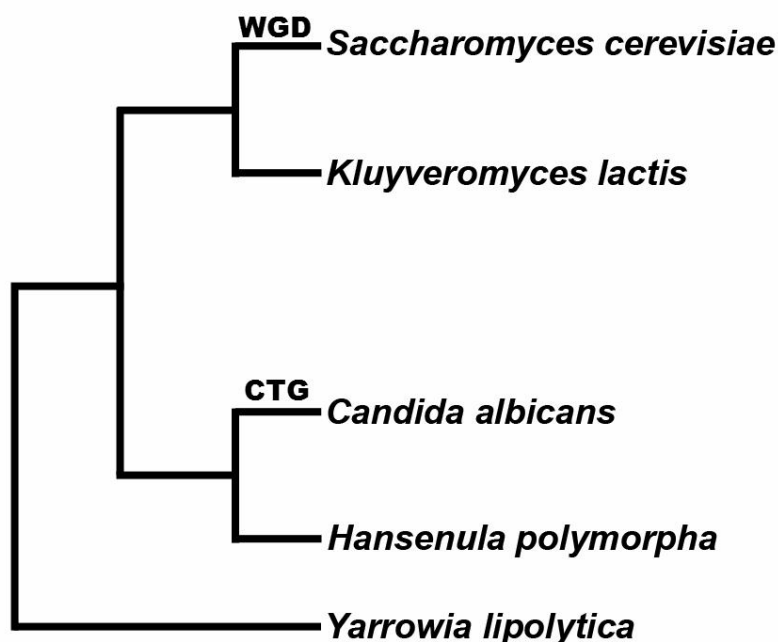


Рисунок 3.1. Схема эволюционного положения *H. polymorpha* относительно модельных почкующихся дрожжей, описанных в данной работе (упрощённая адаптация из [11]). **CTG** – вид, у которого CTG кодон соответствует серину, а не лейцину; **WGD** – вид, у которого произошла дупликация генома.

В нашей лаборатории были определены и охарактеризованы основные компоненты теломеразного комплекса *H. polymorpha*: теломеразная РНК (HrTER), HrTERT, HrEst1 и HrEst3 [168, 169, 170, 171]. HrTER содержит основные элементы, характерные для TLC1 и других теломеразных РНК почкующихся дрожжей, тем не менее, были обнаружены некоторые особенности. Одной из них является особое свойство матричного участка HrTER. На основании комплементарности теломерному повтору матричный участок HrTER должен представлять собой последовательность из 17 нуклеотидов (комплементарную двум повторам GGGTGGCG + ещё один нуклеотид – С187, Рисунок 3.2). Однако, характеристика теломеразной активности *in vitro* выявила использование для обратной транскрипции дополнительного нуклеотида – А170 [169]. Так, к олигонуклеотиду 5'-(GGGTGGCG)₄-3' вместо одного повтора 5'-GGGTGGCG-3' теломераза добавляет последовательность 5'-GGGTGGCGT-3' (Рисунок 3.2). Следовательно, вместо предсказанных 17 нуклеотидов, матричный участок HrTER содержит 18.

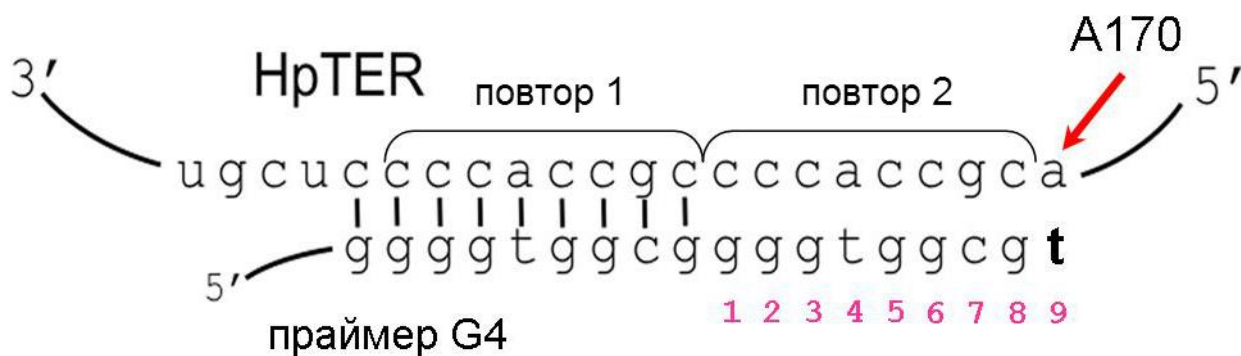


Рисунок 3.2. Схема удлинения олигонуклеотида G4 теломеразой *H. polymorpha in vitro*.

Однако, среди последовательностей теломер, полученных в результате секвенирования генома *H. polymorpha* [11], не было обнаружено ни единого случая присутствия дополнительного нуклеотида dT после последовательности 5'-GGGTGGCG-3'. Следовательно, обратная транскрипция A170 может быть *in vitro* артефактом. С другой стороны последовательность 5'-GGGTGGCGT-3' не является субстратом теломеразы, поскольку не может отжигаться в матричном участке [169]. Значит, дополнительный dT может удаляться для работы теломеразы, что должно затруднять его детекцию *in vivo*. Тогда включение дополнительного «нетеломерного» dT может служить механизмом для регулирования работы теломеразы. Изучение этой возможности станет первой задачей данной работы.

Другой задачей станет дальнейшая характеристика регуляции длины теломер *H. polymorpha*. У почкующихся дрожжей регуляция теломеразы осуществляется преимущественно теломерными белками. Поэтому было решено проанализировать функции белков *H. polymorpha*, гомологичных известным регуляторам длины теломер других почкующихся дрожжей.

Таким образом, целью настоящей работы является изучение регуляции длины теломер *H. polymorpha*.

3.2. Обратная транскрипция A170

3.2.1. Детекция дополнительного dT на теломерах *in vivo*

Невозможность использования теломеразой последовательности 5'-GGGTGGCGT-3' *in vitro* и необходимость удаления дополнительного dT для работы теломеразы означает, что единственным местом в теломере где dT может находиться (если транскрипция A170 происходит) – самый 3'-конец теломеры. Анализируемые ранее последовательности теломер, полученные в результате секвенирования генома *H. polymorpha*, могли не содержать концевых теломерных повторов, и поэтому включение dT не наблюдали ранее.

Для того, чтобы получить последовательности теломер *H. polymorpha* вместе с концевыми повторами было решено применить следующий подход. Первый этап – получение фрагментов, содержащих теломерные последовательности *H. polymorpha*, при помощи «теломерного» ПЦР, второй – высокопроизводительное секвенирование полученных фрагментов. «Теломерный» ПЦР проводили по методике, успешно применяемой ранее для получения последовательностей теломер в других организмах [172], с небольшой модификацией (Рисунок 3.3).

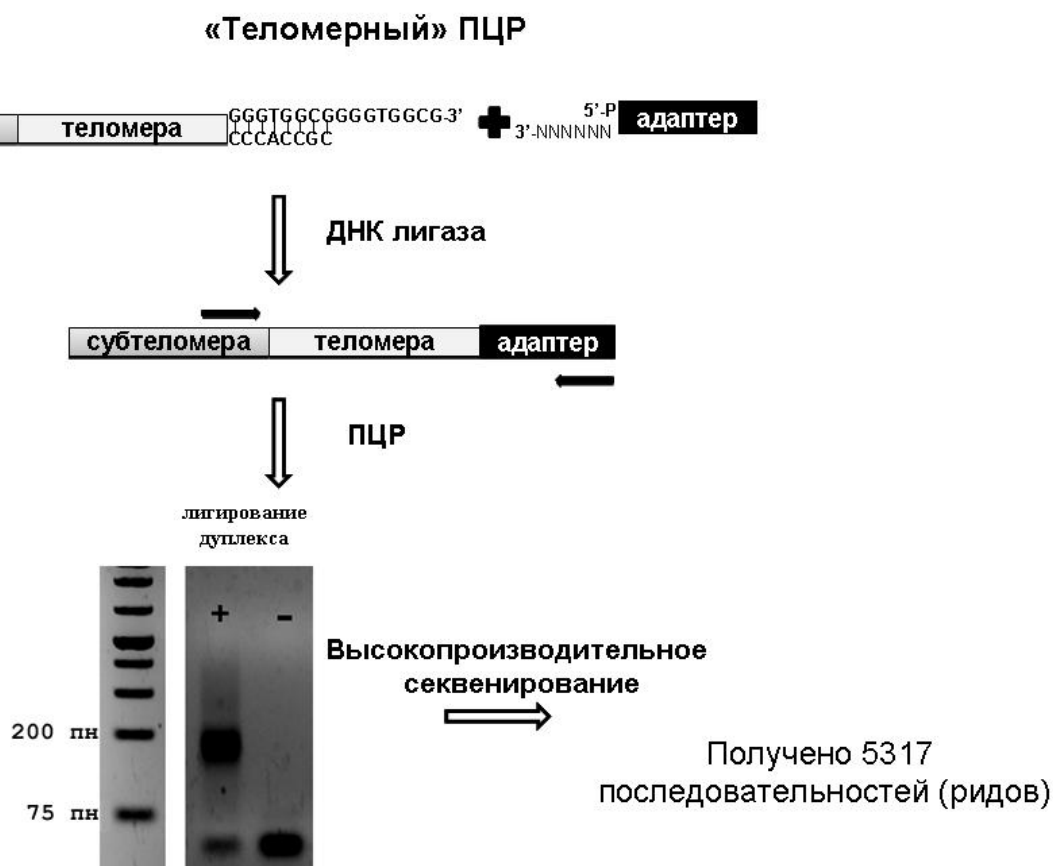


Рисунок 3.3. Схема эксперимента для определения последовательностей теломерных повторов *H. polymorpha*.

К геномной ДНК *H. polymorpha* лигировали заранее сформированный короткий двуцепочечный фрагмент ДНК с 3'-выступающей одноцепочечной случайной последовательностью («адаптер»). Выступающий конец «адаптера» нужен, поскольку теломеры также имеют 3'-выступающий конец; а случайная последовательность позволяет «адаптеру» присоединяться ко всем теломерам независимо от точной последовательности последнего теломерного повтора. Далее проводили ПЦР с использованием олигонуклеотида, комплементарного субтеломерной области, и другого олигонуклеотида, комплементарного последовательности адаптера, в качестве прямого и обратного праймеров, соответственно. В результате получали ДНК фрагмент длиной около 200 пн, содержащий теломерные повторы *H. polymorpha* (рис 3.3).

Последовательности теломерных повторов в полученных ДНК фрагментах определяли при помощи высокопроизводительного секвенирования (по методу Roche/454 Life Sciences). Секвенирование проводили в лаборатории Николая Викторовича Равина (Центр «Биоинженерия» РАН). В результате было получено 5317 последовательностей (ридов). Риды получались в результате прочтения ДНК как с прямого праймера (тогда рид представляет собой G-цепь теломеры), так и с обратного (C-цепь теломеры). Большинство ридов представляли собой продукты неполного прочтения ДНК фрагментов, однако, встречались и «полноразмерные» риды. Пример такого «полноразмерного» рида представлен на рисунке 3.4. На данном примере хорошо видно, что внутренние теломерные повторы представлены последовательностью 5'-GGGTGGCG-3' (либо допустимыми вариантами, с пропусками G в указанных позициях: 5'-GGGTGGCG-3'), и только самый последний повтор (непосредственно перед адаптером) имеет dT нуклеотид в нужном положении 5'-GGGTGGCGT-3'.

```
>H9J94MM01DGYI7 length=181 xy=1306_0833 region=1 run=R_2013_05_16_16_15_48_
AAGCGCAGAGTTGGTTTTTCAGGATGCGGTCTGAGGCTCTGGTGGCGGG
TGCGGGTGGCGGGTGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGTGC
GGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCGGGTGGCGGGGTG
GCGGGGTGGCGTATCTACAGTGAGTCGTACGC
```

Рисунок 3.4. Пример «полноразмерного» рида ПЦР фрагмента, содержащего теломерную ДНК *H. polymorpha*. Серым цветом выделена субтеломерная часть, чёрным – адаптерная последовательность. Последний теломерный повтор подчёркнут. Дополнительный dT нуклеотид выделен красным цветом.

Таким образом, дополнительный dT нуклеотид действительно встречается в теломерах *H. polymorpha* в составе последнего теломерного повтора. Мы решили проанализировать частоту встречаемости dT среди полученных в данном эксперименте ридов. Поскольку большинство ридов были продуктами неполного прочтения ДНК фрагментов, и среди внутренних теломерных повторов дополнительный dT не находится, то мы проанализировали только риды, содержащие крайние повторы (таких ридов оказалось 1248). Для этого мы посчитали число ридов с каждым из возможных вариантов последовательности последнего повтора (таблица 3.1). Для наглядности результаты данного анализа также представлены на рисунке 3.5.

Таблица 3.1. Анализ концевых теломерных повторов. Число последовательностей каждого из вариантов повтора отражается числом ридов, содержащих NNNNNNNN**AT** (для ридов, прочитанных с прямого праймера) + **AT**NNNNNNNN (для ридов, прочитанных с обратного праймера), где NNNNNNNN – последовательность теломерного повтора, **AT** – последовательность от адаптера (маркирующая в данном случае концевой теломерный повтор).

Последовательность последнего теломерного повтора	Число последовательностей	% от суммарного количества
GGGTGGCGT AT + AT ACGCCACCC	1121	89,82
GGGTGGCG AT + AT CGCCACCC	44	3,53
GGGGTGGC AT + AT GCCACCCC	31	2,48
CGGGGTGG AT + AT CCACCCCG	1	0,08
GCGGGGTG AT + AT CACCCCGC	1	0,08
GGCGGGGT AT + AT ACCCCGCC	15	1,20
TGGCGGGG AT + AT CCCCGCCA	5	0,40
GTGGCGGG AT + AT CCCGCCAC	11	0,88
GGTGGCGG AT + AT CCGCCACC	19	1,52
Суммарное количество	1248	100

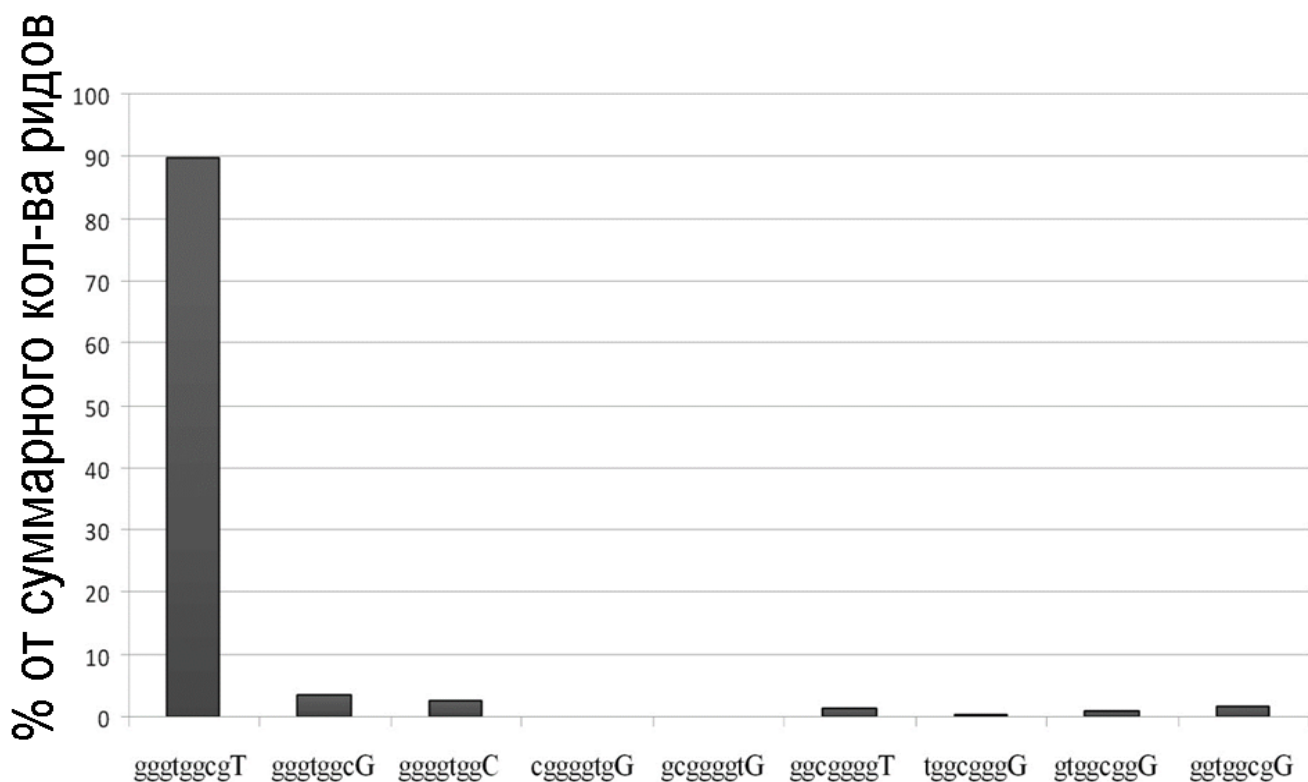


Рисунок 3.5. Частота встречаемости каждого из вариантов конечного теломерного повтора.

В результате оказалось, что подавляющее большинство (90%) всех проанализированных конечных повторов представлено последовательностью 5'-GGGTGGCGT-3'. Этот результат свидетельствует в пользу того, что практически каждая теломера в клетке *H. polymorpha* содержит дополнительный dT на самом 3'-конце. Геномная ДНК для данного эксперимента выделялась из несинхронизированных по клеточному циклу клеток. Значит, остальные варианты конечных повторов могут представлять собой теломеры, потерявшие концевой dT в результате недорепликации, но ещё не успевшие удлиниться теломеразой. Вклад в частоту повторов без dT может также вносить деградация ДНК в процессе выделения. С учётом этого можно предположить, что обратная транскрипция A170 происходит при каждом раунде синтеза теломерной ДНК теломеразой.

Полученные в этом эксперименте данные позволяют сделать ещё один интересный вывод. Дело в том, что при каждом раунде репликации 50% теломер неизбежно должны терять часть нуклеотидов с 3'-конца (проблема недорепликации, см. введение в «Обзор литературы»), включая дополнительный dT нуклеотид. Наблюдаемое присутствие dT практически на каждой теломере означает, что теломераза синтезирует ДНК, по меньшей мере, на 50% теломер в каждой S фазе клеточного цикла. Однако, нельзя исключить возможности того, что оставшиеся

50% теломер (сохранившие дополнительный dT) также удлиняются теломеразой: можно предположить существование специального механизма удаления dT экзонуклеазой. В любом случае, эти выводы свидетельствуют о различиях в регуляции работы теломеразы на теломерах между *H. polymorpha* и *S. cerevisiae*, поскольку менее 10% теломер *S. cerevisiae* удлиняются теломеразой при каждом делении [57].

3.2.2. Влияние мутаций нуклеотида A170 HpTER на длину теломер

Для того, чтобы изучить функциональное значение обратной транскрипции A170 и включения дополнительного dT на конец теломеры, мы провели мутагенез матричного участка HpTER. В первую очередь мы заменили нуклеотид A170 в матричном участке на каждый из трёх других возможных нуклеотидов (A170U, A170C, A170G).

Для получения штаммов *H. polymorpha*, экспрессирующих мутантные формы HpTER, штамм, в котором удалён ген теломеразной РНК (Δ HpTER), был трансформирован плазмидами, несущими ген HpTER с мутацией. Длина теломер в полученных штаммах измерялась методом Саузерн блот анализа концевых рестрикционных фрагментов. Этот метод заключается в обработке геномной ДНК эндонуклеазой рестрикции, разделении полученных фрагментов в агарозном геле, переносе ДНК на мембрану и визуализации фрагментов, содержащих теломерные повторы, гибридизацией с радиоактивно-меченым олигонуклеотидом 5'-(GGGTGGCG)₄-3'. По разнице в подвижности в агарозном геле фрагментов, содержащих теломерные повторы, можно судить о длине теломер.

Результаты измерения длины теломер в штаммах с мутациями A170U, A170C и A170G представлен на рисунке 3.6. Из полученных данных видно, что введение мутации теломеры A170C в матричный участок теломеразной РНК *H. polymorpha* приводит к значительному увеличению длины теломер. Возрастает как средняя длина, так и гетерогенность длины. В то же время мутации A170U и A170G практически не влияют на длину теломер.

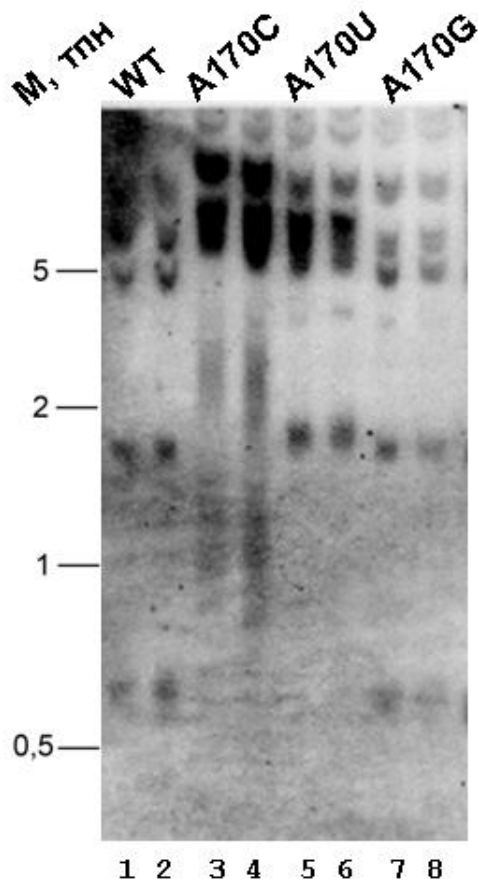


Рисунок 3.6. Саузерн блот анализ концевых рестрикционных фрагментов в штаммах с мутациями A170C (дорожки 3, 4), A170U (дорожки 5, 6) и A170G (дорожки 7, 8). В качестве контроля использовали штамм $\Delta HpTER$, трансформированный плазмидой с геном HpTER дикого типа (WT, дорожки 1 и 2). М – маркер.



Рисунок 3.7. Схема влияния мутаций A170 на синтез теломерной ДНК теломеразой.

Каким же образом мутация A170C может приводить к увеличению длины теломер? Для ответа на этот вопрос нужно сравнить между собой продукты удлинения теломеразой с различными нуклеотидами в положении 170 матричного участка HpTER (Рисунок 3.7). Если в положении 170 находится аденозин (ситуация дикого типа), то в результате синтеза теломерной ДНК последним нуклеотидом оказывается «нетеломерный» dT. Как уже упоминалось, такой продукт действия теломеразы не может быть использован для синтеза следующего теломерного повтора до тех пор, пока дополнительный dT не будет удалён с 3'-конца ДНК. Необходимость проведения этого дополнительного шага должна ограничивать работу теломеразы. В случае мутаций A170G и A170U в HpTER, продукт удлинения теломеразой также не может являться субстратом теломеразы, ведь на 3'-конец теломер присоединяются нуклеотиды (dC и dA), не присутствующие в данном положении теломерных повторов в норме (Рисунок 3.7). Напротив, замена аденозина в 170-м положении на цитозин радикально изменяет ситуацию. В качестве последнего нуклеотида теломераза с мутацией A170C добавляет dG – нуклеотид, который и должен находиться в этом месте повтора. Продукт работы теломеразы оказывается полностью комплементарным началу матричного участка, следовательно, мутация A170C в HpTER снимает необходимость удаления 3'-концевого нуклеотида перед следующим раундом синтеза теломерного повтора (Рисунок 3.7). Это должно приводить к увеличению числа теломерных повторов, добавленных теломеразой. Действительно, наблюдаемая в данном эксперименте длина теломер в штаммах с мутациями A170G и A170U практически не отличается от штамма дикого типа (Рисунок 3.6), тогда как результатом введения мутации A170C являются удлиненные и гетерогенные теломеры в соответствующем штамме (Рисунок 3.6).

С другой стороны, полученному результату могут быть даны альтернативные объяснения. Например, мутация A170C (но не A170G и A170U) в матричном участке HpTER может приводить к снижению эффективности добавления дополнительного нуклеотида. Это также привело бы к возможности использования продукта синтеза теломеразой, без необходимости дополнительного шага удаления 3'-концевого нуклеотида. Ещё одной альтернативой является нарушение взаимодействия с теломерным 3'-выступающим концом фактора связывания одноцепочечной части теломеры. На примере делящихся дрожжей и человека было показано, как связывание таких факторов важно для регуляции работы теломеразы и длины теломер.

Для того чтобы опровергнуть эти альтернативные объяснения и подтвердить наше предположение о влиянии встраивания дополнительного нуклеотида на способность теломеразы использовать продукт своей работы повторно без лишнего шага, мы создали ещё два штамма с мутациями в матричном участке HpTER (Рисунок 3.8). Одна из мутаций – замена

цитозина в положении 178 на аденозин (С178А). Такая мутация придаёт способность теломеразе репозиционировать теломерный повтор с дополнительным нуклеотидом на конце не за счёт изменения природы дополнительного нуклеотида, а за счёт изменения природы участка матрицы НpTER, используемого для отжига. Другая мутация – дополнительная к А170С замена цитидина в положении 171 на аденозин (А170С/С171А, далее – СА170АС). При действии теломеразы с такой двойной мутацией снова возникает необходимость в удалении (уже двух) 3'-концевых нуклеотидов для эффективного повторного использования продукта своей работы. В то время как мутация С178А должна приводить к удлинению теломер (примерно аналогичному ситуации в А170С), теломеры в штамме с мутацией СА170АС в теломеразной РНК должны снова стать короткими и гомогенными (Рисунок 3.8).

Длина теломер в штаммах, экспрессирующих НpTER с мутациями С178А и СА170АС, была проанализирована методом Саузерн блоттинга концевых рестриционных фрагментов. Результаты представлены на рисунке 3.8. Из данных, изображённых на этом рисунке, видно, что введение мутации С178А в НpTER приводит к удлинению теломер и увеличению гетерогенности их длины; причём теломеры в штамме с такой мутацией подобны теломерам в штамме с мутацией А170С (ср. дорожки 7, 8 и 1, 2). Это согласуется с нашим предположением о том, что мутация С178А должна приводить к повышению способности теломеразы использовать продукт своей работы повторно. С другой стороны, согласно нашему предположению, замена С171А подавляет фенотип штамма А170С – теломеры в штамме с двойной мутацией СА170АС короткие и гомогенные (Рисунок 3.8, дорожки 3, 4 и 1, 2), как в штамме дикого типа (даже несколько короче; Рисунок 3.8, дорожки 3, 4 и 5, 6).

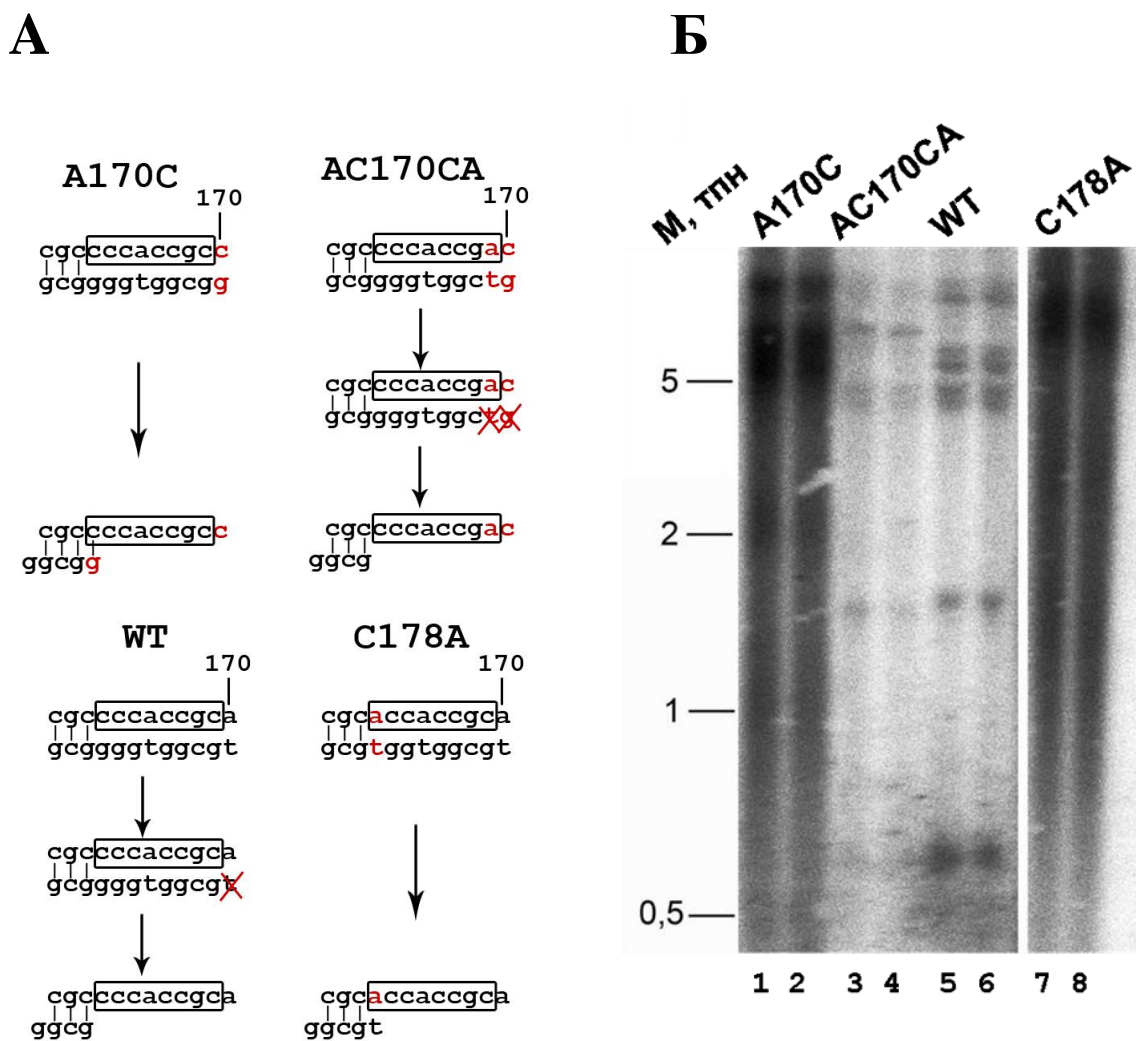


Рисунок 3.8. Влияние мутаций C178A и AC170CA в матричном участке НрТЕР на длину теломер. А. Схема влияния мутаций C178A и AC170CA на синтез теломерной ДНК теломеразой. Б. Саузерн блот анализ концевых рестрикционных фрагментов в штаммах с мутациями C178A (дорожки 7, 8) и AC170CA (дорожки 3, 4). В качестве контроля использовали штамм Δ НрТЕР, трансформированный плазмидой с геном НрТЕР дикого типа (WT, дорожки 5 и 6); а также штамм с мутацией A170C (дорожки 1, 2). М – маркер.

Для дополнительного подтверждения полученных данных, мы провели измерение теломер в штаммах с описанными мутациями в НpTER альтернативным методом – методом «теломерного» ПЦР, используемым ранее для определения последовательности последнего теломерного повтора. Данный метод позволяет получить фрагменты ДНК, содержащие теломерные повторы одной из теломер *H. polymorpha*. О длине теломер можно судить по подвижности получаемых фрагментов в агарозном геле. Для контроля специфичности, также проводили ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК без предварительного лигирования «адаптера».

Результаты измерения длины теломер этим методом в штаммах с мутациями матричного участка НpTER представлены на рисунке 3.9. Теломеры в штаммах A170G и AC170CA короткие и гомогенные (аналогично ситуации в штамме дикого типа), тогда как в штаммах A170C и C178A теломеры удлинённые и гетерогенные. Стоит отметить, что наблюдаемый в дорожках A170C и C178A продукт короткой длины является неспецифическим, поскольку точно такой же продукт получается в контрольном опыте (Рисунок 3.9). Данные, полученные этим методом и методом Саузерн блоттинга, полностью согласуются между собой.

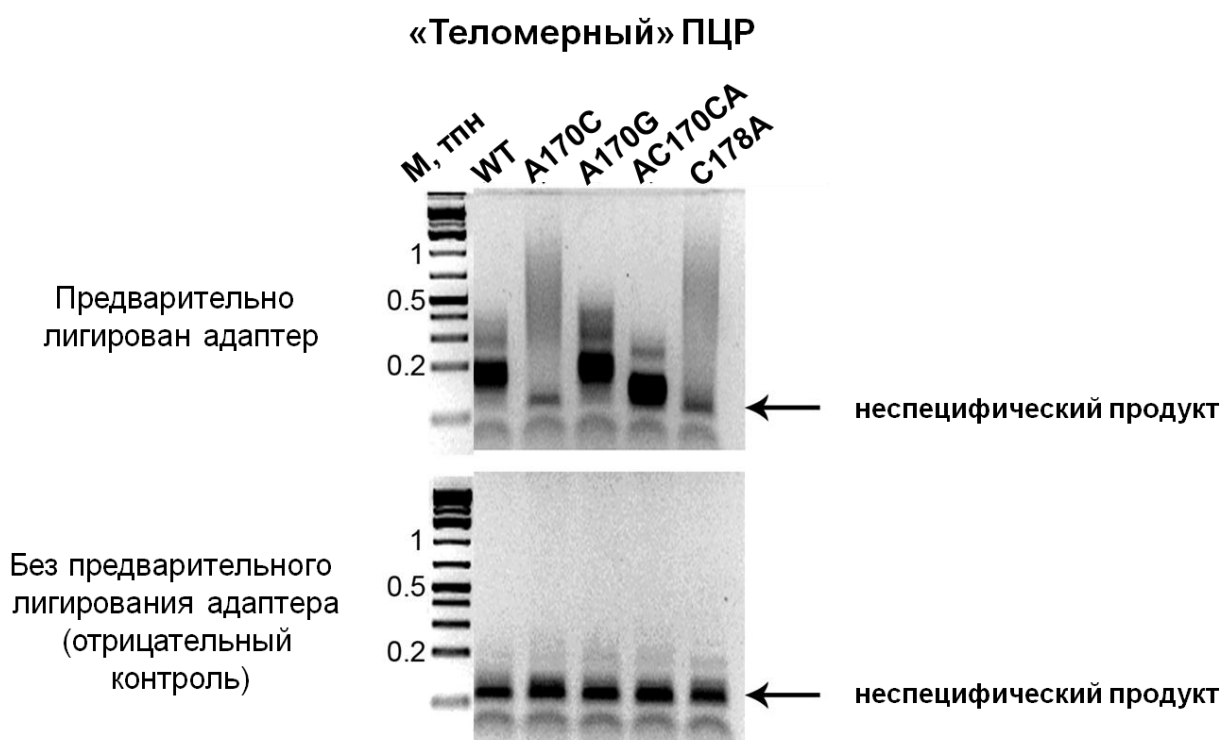


Рисунок 3.9. Длина теломер в мутантных штаммах, измеренная методом «теломерного» ПЦР. М – маркер.

3.2.3. Обратная транскрипция A170, как способ контроля длины теломер

Таким образом, в данном разделе мы показали, что обратная транскрипция нуклеотида A170 матричного участка H_hTER (и встраивание дополнительного dT нуклеотида) происходит *in vivo* и этот процесс ограничивает длину теломер *H. polymorpha*. Причём, ограничение длины теломер происходит за счёт нарушения способности продукта удлинения теломеразой репозиционироваться в начало матричного участка. Существует несколько аспектов работы теломеразы, которые могли бы регулироваться обратной транскрипцией A170.

В первую очередь логично предположить, что встраивание дополнительного dT должно снижать число теломерных повторов, добавленных за один раунд работы теломеразы (процессивность типа II). Процессивность II-го типа играет важнейшую роль в поддержании теломер человека: обнаружены ассоциированные с болезнями мутации в hTERT, влияющие специфически на процессивность [173, 174, 175]. Теломераза дрожжей *S. cerevisiae*, напротив, в большинстве случаев непроецессивна *in vitro* и *in vivo* [176, 177], тем не менее, детектировали процессивное удлинение теломеразой *S. cerevisiae* очень коротких теломер [177]. Теломераза *H. polymorpha* также непроецессивна *in vitro*. Однако, по аналогии с *S. cerevisiae* можно предположить существование определённых условий, когда необходима активация процессивности теломеразы. Дополнительный dT нуклеотид в таком случае представляет собой идеальный переключатель из непроецессивного в процессивное состояние (и наоборот). Тогда цикл работы теломеразы *H. polymorpha* будет выглядеть, как изображено на рисунке 3.10. После связывания теломеры и синтеза теломерного повтора может произойти либо добавление dT и диссоциация теломеразы, либо транслокация и синтез следующего повтора.

В то же время, если теломераза *H. polymorpha* непроецессивна при любых условиях, обратная транскрипция A170 всё равно может регулировать количество добавленных теломерных повторов. Ведь встраивание дополнительного нуклеотида должно нарушать возможность синтеза следующего теломерного повтора и другой молекулой теломеразы. Так, в каждой S-фазе клеточного цикла несколько молекул теломеразы *S. cerevisiae* синтезируют теломерную ДНК на одной теломере [55]. Если такая ситуация осуществляется и в *H. polymorpha*, то регуляция посредством обратной транскрипции A170 может выглядеть как на рисунке 3.11. В этом случае теломераза всегда диссоциирует после добавления одного повтора, независимо от добавления dT. Удлинение теломеры будет происходить до тех пор, пока одна из теломераз не добавит dT.

Другим сценарием регуляции посредством обратной транскрипции A170 при непроецессивной теломеразе может быть следующее. Цикл работы будет выглядеть так же, как

на рисунке 3.11. Однако, предположим, что только одна молекула теломеразы может сработать в S-фазе на одной теломере. Тогда вероятность обратной транскрипции A170 будет проявляться, как доля теломер, содержащих dT на конце хромосом; а этот параметр прямо влияет на число теломер, способных удлиниться теломеразой.

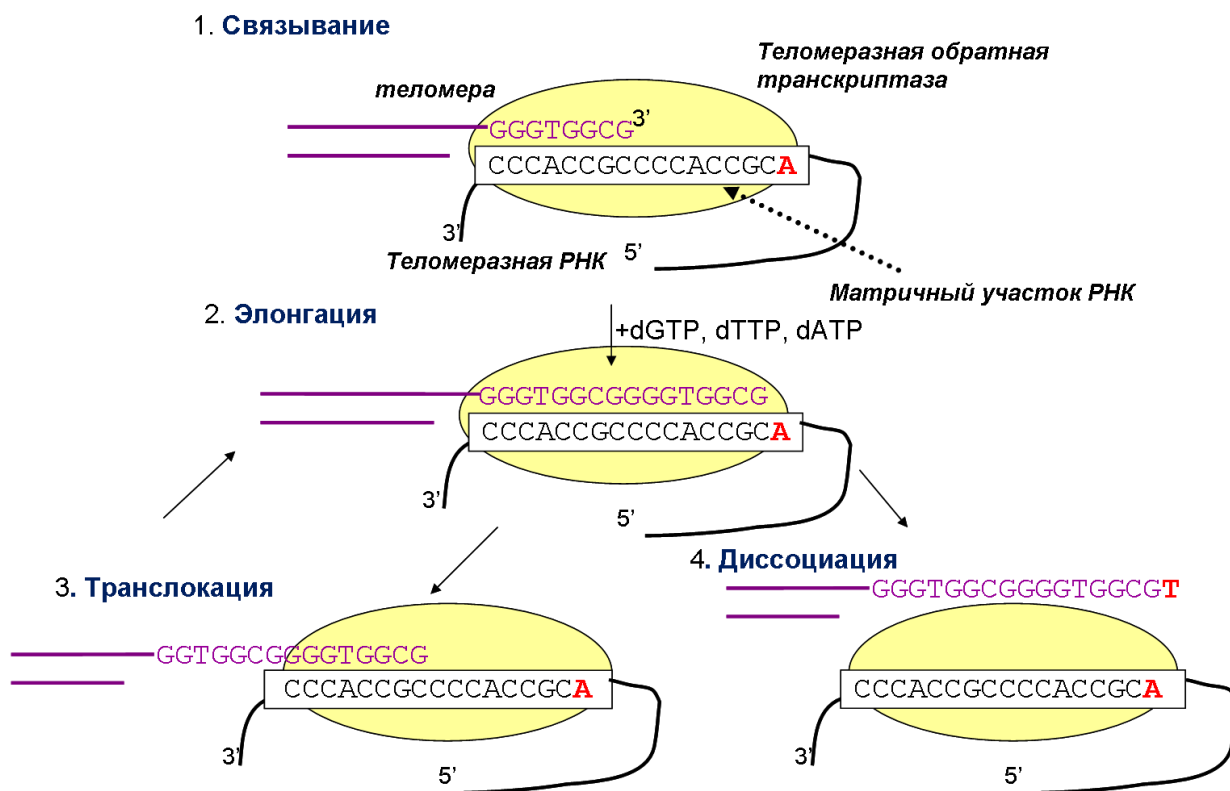


Рисунок 3.10. Цикл работы теломеразы *H. polymorpha*. Регуляция процессивности типа

II.

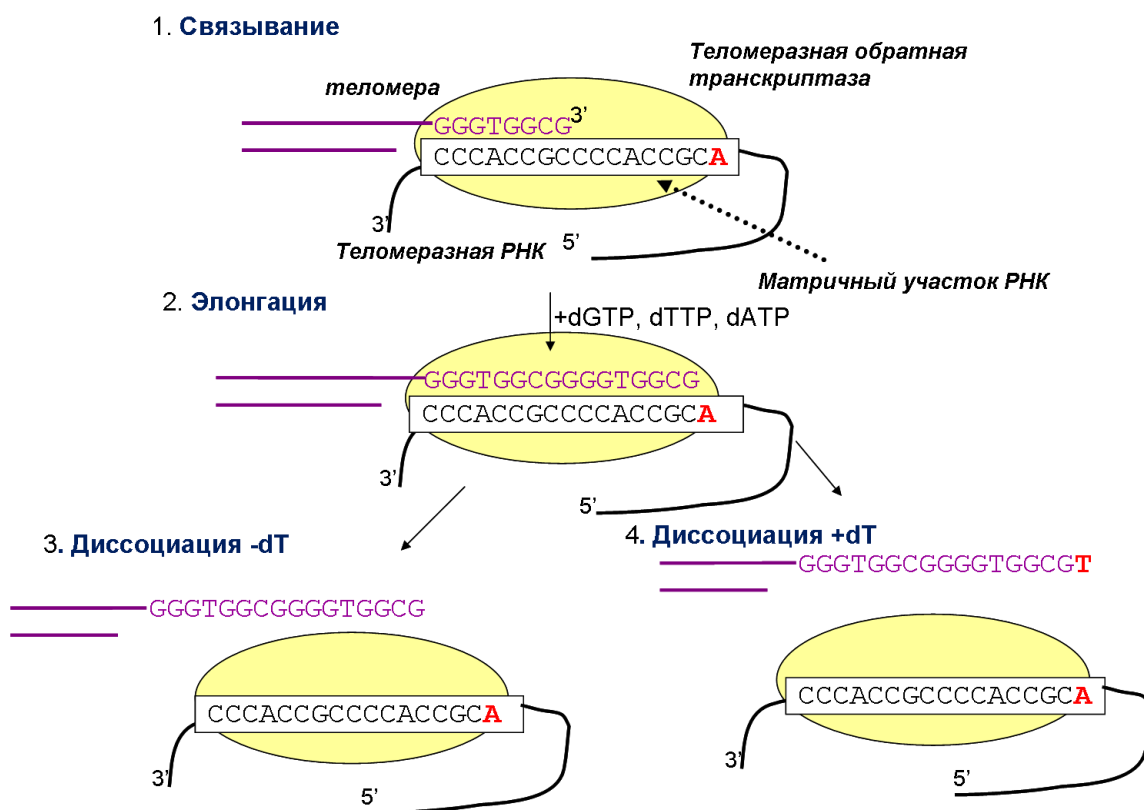


Рисунок 3.11. Цикл работы теломеразы *H. polymorpha*. Регуляция процессов после диссоциации.

К сожалению, введённые нами мутации матричного участка HpTER не позволяют различить эти возможные сценарии. Более того, нарушение регуляции теломеразы за счёт мутаций A170C и C178A могут приводить к удлинению теломер посредством нарушения ещё одного аспекта теломеразной активности *in vivo*. Во всех изученных организмах теломераза синтезирует нуклеотиды только в поздней S-фазе клеточного цикла. В *S. cerevisiae*, это регулируется, по меньшей мере, белками Rif: в отсутствие Rif1 и Rif2 теломераза может действовать и в других фазах [55]. В *H. polymorpha* ограничение активности теломеразы вне S-фазы клеточного цикла может происходить из-за присутствия дополнительного dT нуклеотида.

В любом случае, открытое нами свойство теломеразы *H. polymorpha* является важным фактором ограничения длины теломер в этом организме. В обзоре литературы были рассмотрены различные способы контроля длины теломер в других организмах, в частности в почкующихся дрожжах *S. cerevisiae*. Возникает вопрос: действуют ли в *H. polymorpha* механизмы регуляции длины теломер описанные для *S. cerevisiae*? В следующем разделе мы попытаемся дать ответ на этот вопрос.

3.3. Регуляция длины теломер *H. polymorpha*. Теломерные белки

Основной механизм регуляции длины теломер *S. cerevisiae* осуществляется белками Rap1, Rif1, Rif2, комплексом MRX и киназой Tel1. Мутация в гене *RAP1* (приводящая к потере С-концевого домена), равно как и удаление генов *RIF1* и *RIF2*, приводит к значительному удлинению теломер *S. cerevisiae*. С другой стороны, результатом удаления гена *TEL1*, либо гена одного из компонентов комплекса MRX, является укорочение теломер. Для ответа на вопрос о консервативности механизмов поддержания длины теломер *H. polymorpha* и *S. cerevisiae* мы решили проверить влияние удаления соответствующих генов *H. polymorpha* на длину теломер. В качестве компонента комплекса MRX был выбран белок Mre11.

Идентификация гомологов указанных белков в геноме *H. polymorpha* осуществлялась при помощи программы BLAST со стандартными параметрами. Поиск осуществлялся по базе данных NCBI, содержащей последовательности предсказанных белков *H. polymorpha*, с использованием последовательностей соответствующих белков *S. cerevisiae* в качестве поискового запроса. Основным критерием отбора служило значение оценки выравнивания (alignment score): предсказанный белок *H. polymorpha* считался гомологом соответствующего белка *S. cerevisiae* в том случае, когда значение оценки выравнивания двух белков превышало 40.

В результате для четырёх белков *S. cerevisiae* были найдены гомологи в *H. polymorpha* (таблица 3.2). Исключением оказался белок Rif2: его гомолог не был обнаружен в *H. polymorpha*. Это не удивительно, поскольку во многих других видах почкующихся дрожжей также не могли обнаружить гомолога Rif2 [10].

Таблица 3.2. Гомологи *H. polymorpha* белков-регуляторов длины теломер.

Белок <i>S. cerevisiae</i>	Rap1		Rif1	Rif2	Tel1	Mre11
Гомолог в <i>H. polymorpha</i> (номер в базе GenBank)	Rap1A (ESW96538.1)	Rap1B (ESW98690.1)	Rif1 (ESW98598.1)	-	Tel1 (ESW99476.1)	Mre11 (ESW95820.1)
Оценка выравнивания (alignment score)	147	72.4	44.7	-	531	433
% идентичности	26%	27%	19%	-	32%	47%
Пороговое значение (E-value)	$9e^{-38}$	$1e^{-13}$	$2e^{-04}$	-	$1e^{-153}$	$5e^{-143}$

Поиск BLAST выдал два кандидата в гомологи белка Rap1, удовлетворяющих критериям отбора: Rap1A (ESW96538.1) и Rap1B (ESW98690.1). Наличие двух гомологов говорит о возможном разделении функций Rap1 в *H. polymorpha*. Дупликация теломерных белков – довольно распространённое явление: в некоторых видах дрожжей рода *Candida* присутствует два гомолога Cdc13, в клетках мыши – два гомолога POT1 [39, 178]. Тем не менее, нельзя исключить вероятности того, что один из обнаруженных нами Rap1 белков *H. polymorpha* потерял теломерную функцию в ходе эволюции.

Чтобы получить предварительные данные о возможных функциональных отличиях ScRap1 и его гомологов в *H. polymorpha*, мы решили проанализировать доменную структуру HpRap1A и HpRap1B. ScRap1 состоит из трёх функциональных доменов: BRCT, дублированный MYB домен и С-концевой домен. В гомологе Rap1 человека, например, MYB домен не дублирован и с этим связывают его неспособность связывать теломерную ДНК напрямую. У гомолога Rap1 *C. albicans* отсутствует С-концевой домен, играющий ключевую роль в регуляции длины теломер. Наличие подобных отличий между ScRap1 и HpRap1A и HpRap1B позволило бы сделать предположения о функциях последних. Мы построили множественное выравнивание белковых последовательностей гомологов Rap1 из некоторых видов почкующихся дрожжей (Рисунок 3.12). Данное выравнивание показало присутствие в HpRap1A и HpRap1B консервативных мотивов, характерных для всех трёх доменов ScRap1, несмотря на низкую общую консервативность (характерную для теломерных белков). Проведённый анализ свидетельствует о схожей доменной организации Rap1 белков *H. polymorpha* и *S. cerevisiae*, следовательно, о возможности выполнения этими белками аналогичных функций.

A. BRCT домен

```

SACCE 106 EPTTDDTAADEKKEQVS-----GPPLSNMKFYLNRAADAHDSLNDIQLARLIRANGGEVLDKSPRESK--E---NVFI
SACCA 98 NETSTSTGENPQKDQNA-TPVAISTFQGMNFFMNRNNDAAHSAHDVQLARLIMAHSGNVLASLPEDTTDVS---NVYV
SACDA 147 APLRTN---SNTSDNGA-NPKKKLVFENIKFFINRSGAIDSSTEAQLERLITANGGEIVKALPQQAS--S---DFV
ASGOS 24 -----GIFHGLKFFADIN-----KLYYKSAVSKLGGVVLEEPPKEVQ--R---DQYI
KLULA 22 -----VGWFDGVSFFIDPLI-----NDMIALGNAMRNNGGAVLEAPEKSS--REWEAAAF
CANAL 84 -----PKNSPP-KPFFVDKDGKSMLEFYIPEEPN-----RNKYRDLIIRYGGVIVKEGFPV-----I
CANDU 81 -----PNRSPP-KPFFVDKDGKSMLEFYIPEEPN-----RNKYRDLIITHGGVIVKEYFPSI-----I
HANPOA 71 -----SPIDQVLLGQKELLGNGAA-----NDVSHVIEELGGSVVSGENNGQI--Y---LARS
HANPOB 14 -----GAGPAQSDVFDATGKPKFYLYPPLDR-----NQQLINLLENNGGHVAVGSKDVTIVLS---SEEF

```

```

SACCE 175 V-SPYN-HTNLEPTVTPYIKACQSNLSLLNENYLVYDNYDF-REVVLSR-LQEESSHNGVDNS-NS-----N--SDN
SACCA 174 I-SPYN-DTKLEPTVTPYIKACVSNLLNINHYLVYDNYDF-RSVIDTQ-LQSEINNDH-HV-DH-----DEASKK
SACDA 218 V-SPYN-DTKLEPTITTYIRTCLARDILLPLENYLVYDNYDF-RAVIDSE-LRSLNGDGE--KA-DQ-----N--DH
ASGOS 68 V-SHVN-TFDLEPTVDFISNSLDQNLNLLVGFLLPVVNE-RSEYVDV-VSDTSRIDS-----RI
KLULA 71 VSKRYD-EDYRIFVHPSYILDICDAGILLNVHDYLGKPESSGFVRFDSNSISDEYNIGS--QLSDLPGSDVTRAA--VKI
CANAL 136 I-LSNN-EDLYGFSKLKFIDDCIAKNQLLSVFDYGT-YGTY-NNPEAA-FDTSIINEL-N---D-----DI
CANDU 133 P-LSNN-EELVGFIKLKFIDDCIAQNLPLVFDYGT-YG---NPEAP-FDASSIIDEF-H---S-----DI
HANPOA 120 V-SDVNPINVEVYSNFVYTAQRDHLVPLDNDKFKIR-RPP-Q-----L
HANPOB 73 I-MSED-LKRFHVRYVEVQKSTHGTG-IONLSDEYEH-----

```

Б. MYB1+MYB2 домен

```

SACCE 372 LDVVRKNPTRR-TTHTLYDEISHY--V----PNHTGNSIRHRFRVYLSKRLDYVYVDFKFKLVRDLDGN-LIKT--KV
SACCA 354 LDVVRKNPTRR-TTHTLYDEISHY--V----PNHTGNSIRHRFRVYLSKRLDYVYVDFKFKLVRDLDGN-LIKT--KT
SACDA 393 LDVVRKNPTRR-TTHTLYDEISHY--V----PNHTGNSIRHRFRVYLSKRLDYVYVDFKFKLVRDLDGN-LIKT--KL
ASGOS 235 LDVVRKNPTRR-TTHTLYDEISHY--V----PNHTGNSIRHRFRVYLSKRLDYVYVDFKFKLVRDLDGN-LIKT--DV
KLULA 225 LDVVRKNPTRR-TTHTLYDEISHY--V----PNHTGNSIRHRFRVYLSKRLDYVYVDFKFKLVRDLDGN-LIKT--DI
CANAL 264 LEHIRKPRFR-QSQKFYQALAL--E--PLRGHTGNSIRSRFRKHESSLNLYKTDQ-DQLIRDEAGN-LIKIGLDE
CANDU 252 LEQVRKPRFR-QSQKFYKLAEL--E--PLRGHTGNSIRSRFRKHESSLNLYKTDNDM-DELIYDEAGN-LIKIGLDQ
HANPOA 209 LDLIRNPNLR-STHSFAKLAQLPV----SGHTGNSIRSRFRKHESSLNLYKTDNDM-DELIYDEAGN-LIKIGLDQ
HANPOB 138 FEIRKPRPMMGYKGHQYKDAEL--DFFKERNRSASLRETRT-LKYDIEVYKAGPN-KELLRDANGN-YLRD--YD

```

```

SACCE 441 LPPSIKKKFSADEDYTLAIAVKKQFYRDLYQIDDPDTCGRSLITDEDTPATAARRNMTMPNHVFGSEFNFAAVRTQSRKGP
SACCA 423 LPPSIKKKFTAEDYTLALAVKKQFYRDLYQIDDPDTCNLTNSNEDSPTAARRNMTMPNHVFGNEPSENFVNDRRGP
SACDA 462 LPPSIKKKFTAEDYALAVSVKKQFYRDLYQIDDPDSCQSLISAQDSPTAARRNMTMPNHVFGSEFGKFKVNDRRGP
ASGOS 304 LQQGLKPKFTAEDYQALNIAVKKQFYRDLYQIDDPDTCESLIRDDDEPSTVAKRKMVMDPTFIFGKEPSEFQDINVDRRGP
KLULA 294 LENGLKPKFSEEDYNLAVVKKQFYRDAEQRDPDTCASLIAEDDEPNIVAKROLVNTTEIDSEVPSSEKTVNDRGP
CANAL 337 MPGTLKPKFTPEDDYILCCVALEYMAS-----NNIDSIG
CANDU 325 MPGTLKPKFIPQDDYILCCYALKYMET-----TNTDSSA
HANPOA 282 LESLRSQYTAEDYELCKHLHFKEN-----MSQYAKK-RKLDGNS-----
HANPOB 211 LKK-KTTFSAWDEEMCRTVMKLR----PTTDEKCFEII-----N

```

```

SACCE 521 IAREFFKHFAEHAAHTENAWRDRFRKFLLA-YGIDDIYSYBAEKAQNRPEPEPMKNLTNR-----PKRPGVP----
SACCA 503 VAREFFKSFADANVSHSENAWRDRFRKFLLT-EGVDHYIEYEEQETNACRKEPEPMKNLTNR-----PRKAGI----
SACDA 542 IAREFFKSFADENPTHTENAWRDRFRKFLLT-EGVDAYIAYEIERASGREPEPEPMKNLTNR-----PKRVNAP----
ASGOS 384 LSREFFKTYEKYPSHTENAWRDRFRKFLLN-YGIDYIAYEYENEQAHNRPPEPMKNLTNR-----VKRPG-P----
KLULA 374 LSREFFKLEALEVPTHTENAWRDRFRKFLTP-YGIDSYISYBECMEEGIEPEPEPMKNLTNR-----PKREG-P----
CANAL 371 LRYSEFDGMYRKYRNHTLQSWRDRFRKYLIRKSDIVDYKEYYENCKEKGMAPRCLTRTAP-----
CANDU 359 LPYSFVDSMYRKPKHTLHWRDRFRKYLIRKSDIVDYKEYYENCKEKGMAPRCLTRTAP-----
HANPOA 323 LPESVTELVAKFRHSAMSWRDRFRKFAASK-YGLEBYMKYEDCLAKNITPEPMKNLSSR-----AKDSKDVKMKL
HANPOB 248 FPTGFRDNYASSHPRHHTSEWRORYKMFSL-EGIANYLKCYIMQIRQKPEPEPMKNLSSR-----AKDSKDVKMKL

```

В. С-концевой домен

SACCE	657	ISN-----S	LPF--EYPHEIAEAI	RSDFSN-----	ED-IV	DNIDPDTISFP	PKIATTD---	IFLPLFF																																																								
SACCA	648	LESNNNGN	NNNLPF--EYSPEIAEAI	RNDFDN-----	EGKEFD	DNIDPDTIKFP	PPEIATTD---	IFLPLFF																																																								
SACDA	685	LES-----	TLPF--EYPOEIAEAI	RNDFTN-----	EEEEVD	DNIDPNSIKFP	PPIASTIE---	IFLPTFF																																																								
ASGOS	504	MESHQN-Q	APDLPF--EYTOELAES	IRNNEFM-----	ETQFD	DNINPDEIPFP	PQIATTD---	IFMPFFF																																																								
KLULA	490	AE	TQQE--EQARS--	LYADDVAERIR	HQVAL--	HEEVD	NYDFDSIPFP	PKIADND--	DFEDHTFF																																																							
CANAL																																																																
CANDU																																																																
HANPOA	469	F	AL-----P-----	S	IETEGNEFSF-----	EE--L	KKEDPPIK	KNKSLINVEETCAQIEQIFG																																																								
HANPOB	374																																																															
SACCE	709	H	F	GSTRQFM-----	DKLHE	VISGDYEPSQAE	KLVDLCE	ETGIRK	NFSTSIL	TCLSGDLMVFP	RYFLNMFK----																																																					
SACCA	708	Q	F	GSTRNFM-----	E	KVENVIKRDYEPSQAE	KLVEDLCE	EAGVRR	GFSTSIL	TALSGDLMIFFP	RYFLNMFK----																																																					
SACDA	738	Q	M	GSTRRFM-----	L	KVNEVITRDYEPSQAE	KLVDLS	EAGVRR	TFSTSIL	TALSGDLMVFP	RYFLTMFK----																																																					
ASGOS	563	H	F	ATTRDFL-----	N	KVHEIVNRTYHTSQAE	KLVEDLR	ECGIRK	AFSTSIL	TALSGDLMVLP	RYFLCAFR----																																																					
KLULA	548	N	R	STKEFI-----	Q	KLBEIITREYDE	SQADVLVHDL	VECGIR	KKYATSVL	TALTGDSLFP	RYILTSFK----																																																					
CANAL																																																																
CANDU																																																																
HANPOA	515	S	F	GSSI-----																																																												
HANPOB	439	--SDP	R--F	ALSLKNEGPPID	ADVLP-----	R	KESF	EQDK	TLPQVTVTK	TLSQLASG	CIKEYYIIFL	EFHRCNSR																																																				
SACCE	775																																																															
SACCA	774																																																															
SACDA	804																																																															
ASGOS	629																																																															
KLULA	614																																																															
CANAL																																																																
CANDU																																																																
HANPOA	565																																																															
HANPOB	510	R	N	L	V	L	D	C	I	K	N	Y	L	D	T	N	G	K	E	L	V	Q	K	P	G	W	S	N	K	A	E	W	L	G	N	D	S	H	L	N	S	L	E	L	Y	H	G	E	H	D	Y	R	T	Q	L	E	N	M	R	K	I	K	---	Q

Рисунок 3.12. Множественное выравнивание гомологов Rap1. Последовательности гомологов Rap1 были выравнены при помощи программы T-COFFEE и размечены при помощи программы VoxShade. На рисунке представлены выравнивания отдельных доменов: А – BRCT домен, Б – дублированный MYB домен, В – С-концевой домен. Чёрным выделены аминокислоты, идентичные более чем в 50% последовательностей, серым – аминокислоты, схожие более чем в 50% последовательностей. Сокращённые названия организмов: SACCE – *Saccharomyces cerevisiae*, SACCA – *Saccharomyces castellii*, SACDA – *Saccharomyces dairenensis*, ASGOS – *Ashbya gossypii*, KLULA – *Kluyveromyces lactis*, CANAL – *Candida albicans*, CANDU – *Candida dubliniensis*, HANPOA (А и В) – *Hansenula polymorpha* (белки Rap1А и Rap1В, соответственно).

Для того чтобы понять, какой из гомологов белков Rap1 связывает теломеры в *H. polymorpha*, мы получили штамм, экспрессирующий белок Rap1B слитый с гемагглютининовым тагом (НА таг). Для этого мы заменили на хромосоме ген *RAP1B* на модифицированный ген (*RAP1B-НА*). К сожалению, нам не удалось получить аналогичный штамм с тагированным Rap1A. Это может быть связано с тем, что наличие тага в данном положении нарушает функцию Rap1A, которая необходима для жизни клетки. Rap1 является критически важным для жизнедеятельности *S. cerevisiae* – делеция гена *RAP1* в *S. cerevisiae* является летальной. Однако удаление С-концевого домена хорошо переносится клетками *S. cerevisiae*. Поэтому мы получили штамм, экспрессирующий мутантный Rap1A, в котором С-концевой домен белка заменён на НА таг (путём соответствующей замены генов на хромосоме). Для связывания с ДНК С-концевой домен Rap1 не нужен, поэтому полученный тагированный вариант белка без С-домена также поможет нам ответить на вопрос о взаимодействии Rap1A с теломерами *H. polymorpha*. Замену генов на хромосоме в полученных штаммах подтверждали ПЦР анализом согласно схеме, изображённой на рисунке 3.13. Наличие продуктов нужной длины говорит об успешной замене генов.

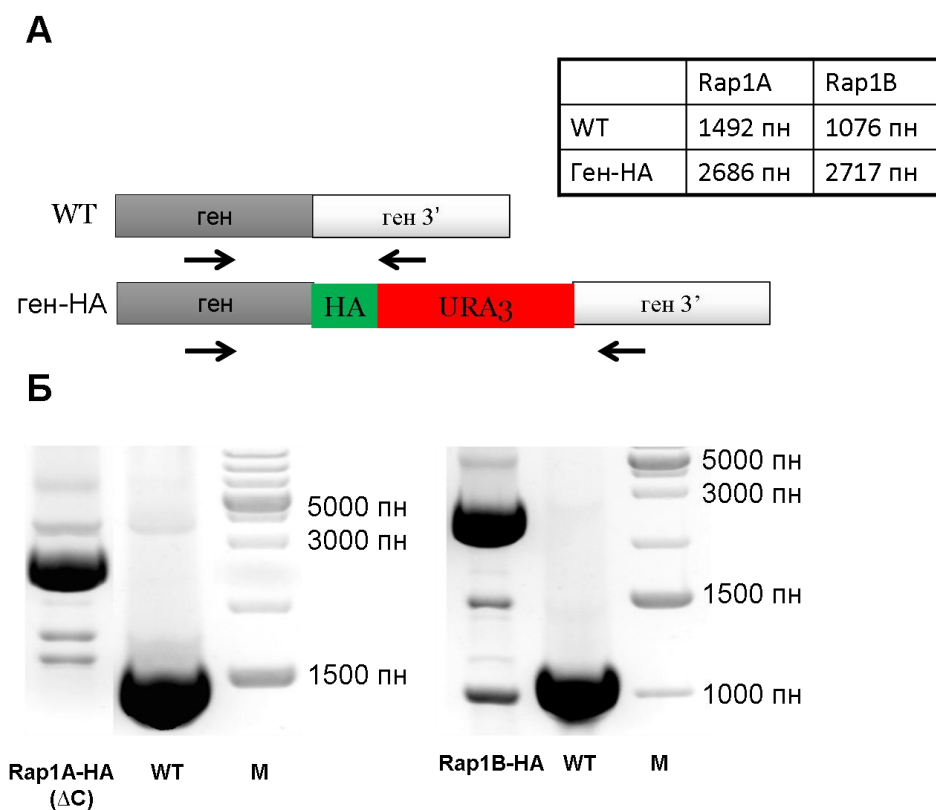


Рисунок 3.13. Создание штаммов Rap1A-ΔC-НА и Rap1B-НА. А – схема ПЦР анализа геномной ДНК. Стрелки обозначают праймеры, использованные в ПЦР реакции. В таблице приведены ожидаемые длины ПЦР продуктов. Б – продукты ПЦР с геномной ДНК штаммов WT и штаммов с тагированными Rap1 белками, разделенные в агарозном геле. Длины (мажорных) ПЦР продуктов в дорожках соответствуют ожидаемым. М – маркер.

Проверку ассоциации Rap1 белков с теломерами осуществляли методом иммунопреципитации хроматина по схеме, изображённой на рисунке 3.14А. Клетки штаммов Rap1A-ΔС-НА, Rap1B-НА и дикого типа обрабатывали формальдегидом для фиксации взаимодействий белок-ДНК. Затем из фиксированных клеток получали экстракты и воздействовали на них ультразвуком для фрагментации хроматина. При этом получались фрагменты ДНК длиной около 500 пн. Из полученных экстрактов выделяли тагированные белки при помощи аффинной хроматографии с использованием НА-агарозы (агароза, ковалентно модифицированная антителами к НА тагу). Экстракт, полученный из штамма дикого типа (daduA, не имеющий тагированных белков), использовали для оценки количества ДНК, выделяющейся за счет неспецифических взаимодействий. Наличие теломер в совыделяющейся с тагированными белками ДНК проверяли ПЦР анализом с использованием праймеров 1 (sub7f, sub7r), при этом амплифицируется фрагмент ДНК из субтеломерной области хромосомы VII длиной около 200 пн, отстоящий от конца хромосомы не более, чем на 200 пн. В качестве контроля специфичности проводили ПЦР с праймерами 2 (7100f, 7100r), которые амплифицируют фрагмент ДНК (длиной около 200 пн), отстоящий от конца хромосомы на 100 000 пн. Результаты ПЦР анализа приведены на рисунке 3.14Б. Обогащение ПЦР продукта праймеров 1 в случае штаммов Rap1A-ΔС-НА и Rap1B-НА (по сравнению со штаммом дикого типа) свидетельствует о взаимодействии белков Rap1A и Rap1B с теломерной ДНК. О специфичности этого взаимодействия свидетельствует отсутствие аналогичного обогащения ПЦР продукта праймеров 2.

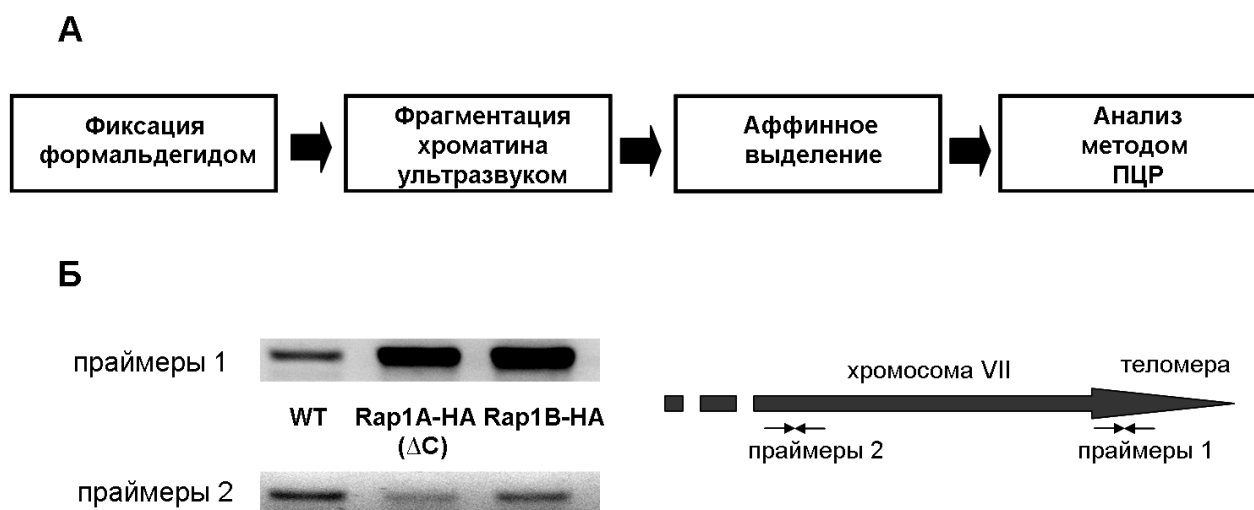


Рисунок 3.14. Оценка ассоциации Rap1 белков с теломерами методом иммунопреципитации хроматина. А – схема эксперимента. Б – схема и результат ПЦР анализа.

Таким образом, оба гомолога Rap1 взаимодействуют с теломерами *H. polymorpha in vivo*. Проведённый эксперимент не позволяет утверждать, что теломерная локализация обоих белков осуществляется за счёт прямого взаимодействия с ДНК. Тем не менее, присутствие в Rap1A и Rap1B дублированного MYB домена свидетельствует в пользу именно прямого взаимодействия.

Далее мы решили проверить участие белков Rap1A, Rap1B, Rif1, Mre11 и Tel1 в регуляции длины теломер *H. polymorpha*. Для этой цели мы создали штаммы с делециями генов этих белков ("нокаутные" штаммы) путём замены соответствующих генов на хромосоме на ген LEU2. Получить штамм с делецией гена *RAP1A* нам не удалось, что согласуется с необходимостью функции Rap1A для жизни клетки. Для оценки влияния Rap1A на длину теломер мы использовали полученный ранее штамм, в котором С-концевой домен заменён на НА таг. Ведь именно С-концевой домен должен играть ключевую роль в регуляции длины теломер. Поскольку Rap1A и Rap1B могут иметь сходную функцию, мы также создали штамм, в котором одновременно удалены ген *RAP1B* и С-концевой домен Rap1A (штамм RAΔCΔRB). Замену генов на хромосоме в полученных штаммах подтверждали ПЦР анализом согласно схеме, изображённой на рисунке 3.15. Наличие продуктов нужной длины говорит об успешной замене генов.

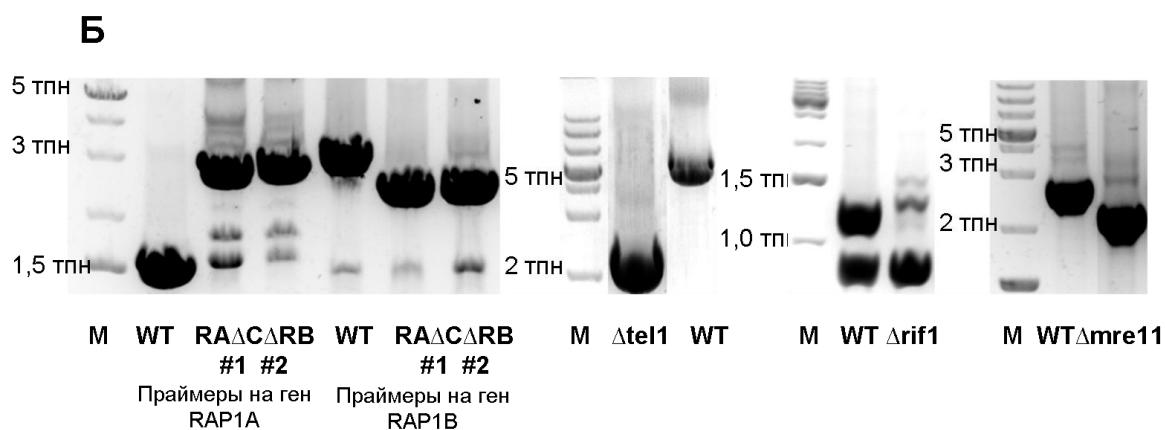
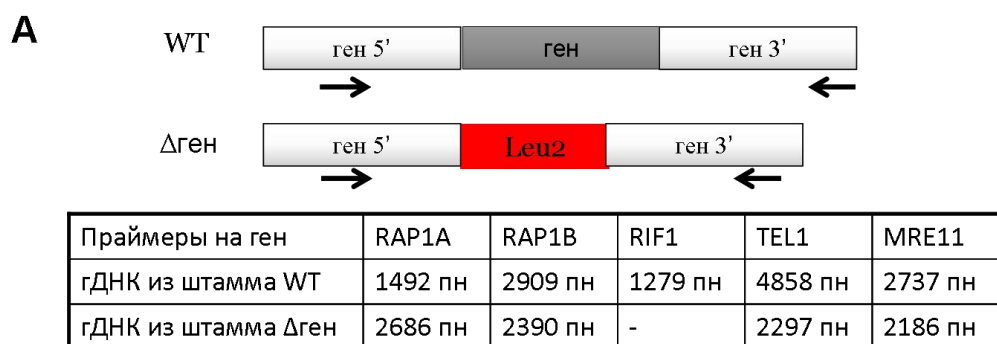
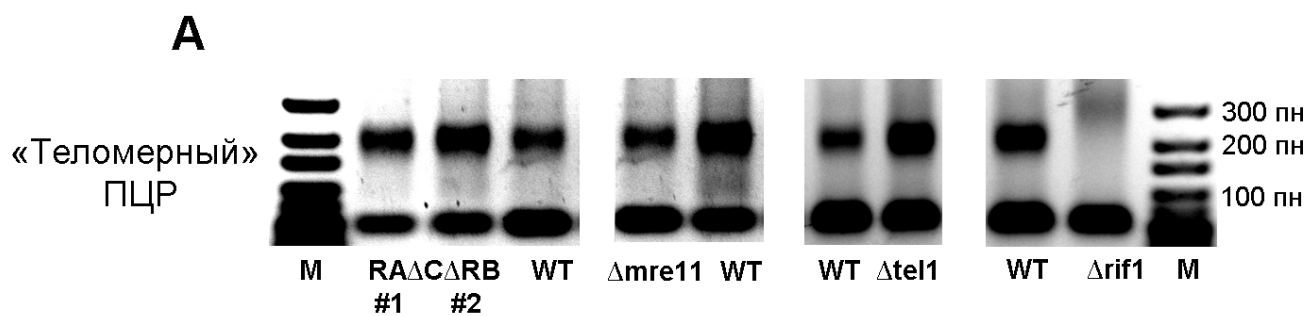


Рисунок 3.15. Создание "нокаутных" штаммов. А – схема ПЦР анализа геномной ДНК. Стрелки обозначают праймеры, использованные в ПЦР реакции. Исключением является ген *RIF1* – праймеры подобраны таким образом, что при правильной замене генов продукта ПЦР не должно получаться (см. таблицу). В таблице приведены ожидаемые длины ПЦР продуктов. гДНК – геномная ДНК. Б – разделенные в агарозном геле продукты ПЦР с геномной ДНК штаммов WT, штаммов с делециями генов *RIF1*, *TEL1*, *MRE11* и штамма RAΔCΔRB (#1 и #2 – два независимо полученных штамма). Длины (мажорных) ПЦР продуктов в дорожках соответствуют ожидаемым. Результаты ПЦР анализа с геномной ДНК штамма *ΔrapB* аналогичны таковым штамма RAΔCΔRB, поэтому не приведены на рисунке. М – маркер.

Полученные штаммы культивировали в течение 50 поколений. Из клеток после культивирования выделяли геномную ДНК и измеряли длину теломер при помощи «теломерного» ПЦР. Результаты представлены на рисунке 3.16А. Оказалось, что ни удаление *RAP1B*, ни удаление С-концевого домена Rap1A, ни их совместная мутация не приводит к изменению длины теломер. Более того, длина теломер в штаммах *Δtel1* и *Δmre11* также не отличается от длины в штамме дикого типа. Только удаление *RIF1* приводит к значительному удлинению теломер.



Б

Белок <i>S. cerevisiae</i>	Rap1		Rif1	Rif2	Tel1	Mre11
Длина теломер в Δ штамме	+ (ΔC домен)		+	+	-	-
Белок <i>H. polymorpha</i>	Rap1A	Rap1B	Rif1	-	Tel1	Mre11
Длина теломер в Δ штамме	wt (ΔC домен)	wt	+		wt	wt

Рисунок 3.16. Длина теломер в нокаутных штаммах и штамме дикого типа (WT). А – результаты «теломерного» ПЦР. На рисунке не приведены результаты «теломерного» ПЦР для штаммов Rap1A-ΔC-НА и $\Delta rap1B$, поскольку результат не отличается от такового для штамма RAΔCΔRB. #1 и #2 – два независимо полученных штамма RAΔCΔRB. М – маркер. Б – сравнение длины теломер в штаммах *S. cerevisiae* и *H. polymorpha* с делециями указанных генов. «+» – теломеры в штамме с соответствующей мутацией длиннее, чем в штамме дикого типа, «-» – теломеры короче, чем в штамме дикого типа, «wt» – теломеры такой же длины, как в штамме дикого типа.

Таким образом, единственным (из проанализированных гомологов *S. cerevisiae*) белком, регулирующим теломеры *H. polymorpha*, оказался белок Rif1 (Рисунок 3.16Б). Это несколько удивительно, ведь выбранные нами белки *S. cerevisiae* являются участниками одного регуляторного пути. Так, согласно модели "счёта белков", ингибирующее действие ScRif1 осуществляется после его привлечения на теломеры за счёт взаимодействия с С-концевым доменом ScRap1. В *H. polymorpha* два Rap1 белка, тем не менее, ни удаление одного из них, ни удаление С-концевого домена другого, ни совместная мутация не приводят к изменению длины теломер. С другой стороны, действие ScRif1 на теломеразу опосредовано ScTel1 киназой.

Однако, ни HprTel1, ни привлекающий её на теломеры HprMRX комплекс не участвуют в регуляции длины теломер, как показали наши эксперименты. Следовательно, HprRif1 ингибирует теломеразу, используя другие механизмы.

За время изучения механизмов контроля длины теломер *S. cerevisiae* накопились данные, свидетельствующие о том, что теломерная функция ScRif1 более сложна, чем это представлено в модели «счёта белков». Например, ScRif1 может привлекаться на ДНК независимо от ScRap1. При этом он ингибирует накопление комплекса ScRPA, который в свою очередь задействован в привлечении теломеразы. Это говорит о возможности существования альтернативного регуляторного пути с участием ScRif1. Существование такого пути в *H. polymorpha* могло бы объяснить функцию HprRif1. Другое возможное объяснение может быть связано с ролью Rif1 в репликации. Во многих организмах Rif1 является важным фактором контроля времени «разгорания» ориджинов репликации: в отсутствие Rif1 многие участки генома реплицируются раньше положенного [179, 180]. Выдвинута гипотеза о центральной роли времени репликации в регуляции длины теломер делящихся дрожжей *S. pombe*: короткие теломеры, содержащие меньше Taz1-Rif1 реплицируются раньше и, как следствие, привлекают большее количество теломеразы (см. раздел 2.2.3.) [123]. Проверка этих предположений в *H. polymorpha* представляется интересным направлением дальнейших исследований. С другой стороны, открытие альтернативного механизма действия HprRif1 может расширить репертуар функций, выполняемых гомологами Rif1 в других организмах.

Факторы связывания двуцепочечной части теломерной ДНК контролируют длину теломер во всех изученных организмах. В свете этого полученные нами данные в *H. polymorpha* несколько противоречивы. Однако мы не можем исключить того, что остальная часть белка Rap1A (N-концевой или ДНК-связывающий домены) важна для регуляции теломер. Тем не менее, с уверенностью можно утверждать, что в этом случае механизм действия Rap1A будет другим, нежели в *S. cerevisiae*.

3.4. Заключение

В представленной работе охарактеризована регуляция длины теломер дрожжей *Hansenula polymorpha*. Результаты проведённых экспериментов показали существование в этом виде почкующихся дрожжей двух факторов, ограничивающих длину теломер. Первый из них – обратная транскрипция нуклеотида A170 теломеразной РНК *H. polymorpha* и, как результат, встраивание дополнительного dT нуклеотида. Этот процесс ограничивает длину теломер *H. polymorpha* за счёт нарушения способности продукта удлинения теломеразой репозиционироваться в начало матричного участка. Аналогов данному способу регуляции активности теломеразы в других организмах не найдено. В литературе описаны примеры включения неверных нуклеотидов на 3'-конец теломерного повтора *in vitro* [181, 182, 183, 184], однако эти случаи являлись результатом мутаций компонентов теломеразы. Таким образом, данное свойство теломеразы является новым способом контроля длины теломер.

Второй важный фактор контроля теломер *H. polymorpha* – белок Rif1. Удаление гена этого белка приводит к удлинению теломер *H. polymorpha*, следовательно, его функция заключается в ингибировании работы теломеразы. Участие этого белка в регуляции теломеразы является общим, по крайней мере, для двух других эволюционно далёких видов дрожжей – *S. cerevisiae* и *S. pombe*. Однако, наши данные говорят о различии механизмов действия гомологов Rif1 в *H. polymorpha* и *S. cerevisiae*: удаление генов *TEL1*, *MRE11*, *RAP1B* и удаление С-концевого домена *RAP1A* не изменяет длину теломер *H. polymorpha*. Таким образом, проведённая нами работа позволяет сделать вывод о специфичности регуляторного пути Rap1-Rif1/Rif2-MRX/Tel1 для *S. cerevisiae* (и очень близких им видов).

Выводы, сделанные при изучении регуляции длины теломер *H. polymorpha*, наглядно иллюстрируют, как мажорный регуляторный путь в одном организме может стать минорным или вовсе отсутствовать в других, при очевидной консервативности отдельных участников этого пути. Это снова подчёркивает важность использования различных модельных организмов для исследований теломер и теломеразы.

4. Материалы и методы

4.1. Реактивы, биопрепараты, буферные растворы, олигодезоксирибонуклеотиды, штаммы

В работе были использованы следующие реактивы и препараты:

- NaCl, NH₄OAc, KCl, (NH₄)SO₄, MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, Tris, NaOH, ЭДТА, H₃BO₃, LiCl, цитрат натрия, бромфеноловый синий, ксиленцианол, бромистый этидий, глицерин фирм Merck, Германия и Helicon, Россия;
- ДСН, 1,4-дителиотреитол (ДТТ) фирмы Serva, Германия;
- Д-глюкоза, насыщенный буфером ТЕ фенол, NP-40 фирмы Helicon, Россия
- уксусная кислота, соляная кислота, хлороформ, изоамиловый спирт, фирмы Химмед, Россия;
- Triton X-100 фирмы Roth, Германия;
- этанол фирмы Ферейн, Россия;
- азотистые основания: аденин, урацил; аминокислоты: глицин, лейцин, триптофан, гистидин, треонин, аргинин, изолейцин, лизин, метионин, фенилаланин, тирозин, валин; глюкоза, стеклянные шарики диаметром 425–600 микрон, НА-агароза, LiOAc, ДТТ, ПМСФ, БСА, поливинилпирролидон, ДНК спермы лосося, формальдегид, ампициллин, канамицин, хлорамфеникол, ДМСО, PIPES, генетицин, протеиназа К, РНаза А фирмы Sigma, Германия;
- полиэтиленгликоль 4000 фирмы Fluka, Германия;
- бакто-триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар, Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids (YNB), фирмы Difco, США;
- легкоплавкая агароза для электрофореза фирмы Life Technologies, Шотландия;
- мембрана HybondN+, [α -³²P]dGTP, [γ -³²P]ATP фирмы GE Healthcare, США;
- олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы фирмами Евроген и Синтол, Россия;
- гликоген, набор для очистки ПЦР продуктов, набор реагентов для выделения плазмидной ДНК, набор для быстрого лигирования ДНК, набор реагентов для выделения ДНК из агарозного геля; маркеры длины ДНК (1 kb Plus DNA Ladder и Ultra Low Range DNA Ladder), T4 ДНК лигаза, Taq-полимераза, Pfu-полимераза, полинуклеотид киназа T4, терминальная трансфераза, эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *PmeI*, *BglII*, *Sall*, *XmaI*, *ClaI*, *SacII*, *XbaI*, *BamHI* и фирменные буферные растворы к ним фирмы Thermo Scientific, США;
- фильтровальная бумага Whatman 3MM фирмы Whatman Biomerta, Германия;
- набор для амплификации G/C-богатых фрагментов ДНК GC-RICH PCR System фирмы Roche, Франция;

- набор для проведения мутагенеза QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit фирмы Agilent Technologies, США.
- фиколл 400 фирмы Pharmacia, Швеция.
- штаммы *daduA* и *DL1-1* были любезно предоставлены Михаилом Агафоновым (Москва), штамм *ΔHrTER* был любезно предоставлен Еленой Смекаловой (Москва);
- плаزمида *pKAM_RNA* была любезно предоставлена Еленой Смекаловой (Москва), плазмиды *pCCUR1* и *pCHLX* были любезно предоставлены Михаилом Агафоновым (Москва);

Таблица 4.1. Растворы, использовавшиеся в работе.

Название раствора	Состав раствора
среда LB, твердая среда LB	1 % бакто-триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1% NaCl (1,5% бакто-агар для твердой среды)
SOB	2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 8,55 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5 mM MgCl ₂
SOC	2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 8,55 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5 mM MgCl ₂ , 20 mM глюкоза
ТВ	10 mM PIPES, 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, 55 mM MnCl ₂ (pH 6,7)
среда YPD, твердая среда YPD (на глюкозе)	2% бакто-триптон, 1% дрожжевой экстракт, 2% глюкоза (2% бакто-агар для твердой среды)
среда SC, твердая среда SC (на глюкозе)	0,17% YNB, 0,5% (NH ₄)SO ₄ , 2% глюкоза, 0,01% аденин, 0,02% урацил, 0,01% лейцин, 0,01% триптофан, 0,005% гистидин, 0,02% треонин, 0,002% аргинин, 0,003% изолейцин, 0,003% лизин, 0,002% метионин, 0,005% фенилаланин, 0,003% тирозин, 0,015% валин (2% бакто-агар для твердой среды, 250 мкл 2M NaOH на 200 мл твердой среды).
среда SC-LEU, твердая среда SC-Trp (на глюкозе)	среда SC без добавления лейцина
среда SC-URA, твердая среда SC-Ura (на глюкозе)	среда SC без добавления урацила
10x буфер ТА	20 mM Tris-ацетат (pH 7.5), 50 mM NaCl и 2 mM MgCl ₂
2xSSC	0,3 M NaCl, 0,03 M цитрат натрия, pH 7.0
буфер для гибридизации	6xSSC, 0,5% ДСН, 5x раствор Денхардта, 100 мкг/мл ДНК спермы лосося

100x Денхардта	раствор	2% БСА, 2% фиколл 400, 2% поливинилпирролидон
ChIPLysis		50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1% Triton X-100, 0,1% ДСН, 0,5 mM ПМСФ
ChIPLysis500		50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1% Triton X-100, 0,1% ДСН, 0,5 mM ПМСФ
ChIPWash		10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,25 LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% ДСН, 1 mM ЭДТА
TE		10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM ЭДТА
TES		10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM ЭДТА, 1% ДСН
TE0,67S		10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM ЭДТА, 0,67% ДСН
1xTBE		0,1 M Tris-HCl (pH 8,3), 0,1 M H ₃ BO ₃ , 2 mM ЭДТА
10xTBE		1 M Tris-HCl (pH 8,3), 1 M H ₃ BO ₃ , 20 mM ЭДТА
агарозные гели		1-2% агароза в буфере 1xTBE, 0,05 мкг/мл бромистый этидий
6x буфер нанесения агарозный гель	для на	10 mM Tris, 60 mM ЭДТА (pH 7,6), 0,03% ксиленцианол, 0,03 % бромфеноловый синий, 60% глицерин
буфер YLB		1xTE, 100 mM, 2% Triton X-100, 1% ДСН

Таблица 4.2. ДНК-олигонуклеотиды, использовавшиеся в работе.

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность
PBoli733	5'-GCGTACGACTCACTGTAGATNNNNN-3'-O(CH ₂) ₂ CH ₂ OH
PBoli749	5'p-ATCTACAGTGAGTCGTACGCAA-3'-биотин
S12	5'-AAGCGGCAGAGTTGGTTTCAGGATGC-3'
PBoli745	5'-GCGTACGACTCACTGTAGAT-3'
24f	5'-CTTCACTATGCGGTGTTCTCGCCACCCCGCCACCC-3'
24r	5'-GGGTGGCGGGGTGGCGAGAACACCGCATAGTGAAG-3'
23f	5'-CTTCACTATGCGGTGTTCCCGCCACCCCGCCACCC-3'
23r	5'-GGGTGGCGGGGTGGCGGGAACACCGCATAGTGAAG-3'
25f	5'-CTTCACTATGCGGTGTTCTCGCCACCCCGCCACCC-3'
25r	5'-GGGTGGCGGGGTGGCGCGAACACCGCATAGTGAAG-3'
34f	5'-CTTCACTATGCGGTGTTCCAGCCACCCCGCCACCC-3'
34r	5'-GGGGTGGCGGGGTGGCTGGAACACCGCATAGTGAAG-3'
38f	5'-GGTGTTCACGCCACCACGCCACCCCTCGTCAAC-3'

38r	5'-GTTGACGAGGGGTGGCGTGGTGGCGTGAACACC-3'
G4	5'-GGGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCG-3'
C4	5'-CGCCACCCCGCCACCCCGCCACCCCGCCACCC-3'
U3f	5'- AAAAGATCTAGAGCTAAGTTTGTGGAG-3'
U3r	5'- AAAGAATTCGAGCTCGTTTAAACTACAACGAAGCACATCAACT GG -3'
5Rap1BHaf	5'-ATTTGTCGACGAACCTACGACGTAC-3'
5Rap1BHAr	5'-AAACCCGGGCTGTTTTATCTTGCGCATATTCTCCAG-3'
5Rap1AΔCf	5'-AAAAGTCGACCGAAGAGGACTACGAGCTATG-3'
5Rap1AΔCr	5'-AAACCCGGGATCGTCGTTTCAGAGCCTTGATCTC-3'
3Rap1BHaf	5'-AAAAGTTTAAACTCGTTCGTCCTCGTCTAGGTC-3'
3Rap1BHAr	5'-AAATCGATGAATCCGCTTTCTCGCTGCTAC-3'
3Rap1AΔCf	5'-AAAAGTTTAAACAATCCGTGAGTTTGGAGCATCCAC-3'
3Rap1AΔCr	5'-AAATCGATCGAGGCTTTGGTGTGGTGTC-3'
5Rap1Bf	5'-AACCGCGGCCTCAATCTCCTGCTCGATGC-3'
5Rap1Br	5'-AAATCTAGAGTGCTGCGAGTGTGTTTATCGG-3'
5Rif1f	5'-AACCGCGGACCAGGTCATCTACAGAGACGAG-3'
5Rif1r	5'-AAATCTAGACGGGTGTGTGATTCTGCAAACC-3'
rif1r	5'-GATGCGCAGGTGGCGTTGTCC-3'
5Tellf	5'-AACCGCGGCTGGACCTGTTGGTAAGGAGTG-3'
5Tellr	5'-AAATCTAGATCTCGCTCAGCTGGCGATAC-3'
5Mre11f	5'-AACCGCGGTGAGCAATCTGCGAATAGAGCAGC-3'
5Mre11r	5'-AAATCTAGACTGGCCCTGATTCTATGTCCG-3'
3Rap1Bf	5'-AAGGATCCTCGTTCGTCCTCGTCTAGGTC-3'
3Rap1Br	5'-AAGAATTCGAATCCGCTTTCTCGCTGCTAC-3'
3Rif1f	5'-AAGGATCCGTTGGAATCTCGCCGACTCAGG-3'
3Rif1r	5'-AAGAATTCGTCACCAGTTCTTCCAGCTTGACC-3'
3Tellf	5'-AAGGATCCGTTGCTGCTTCTGCTGCGTG-3'
3Tellr	5'-AAGAATTCGCCACATTCTGTGCGTCTTTCAG-3'
3Mre11f	5'-AAGGATCCAAACCGACCAGTCTGTTCGG-3'
3Mre11r	5'-AAGAATTCCTCTCCATCCACTTGTC-3'
Sub7f	5'-TGCTGGGTGGTAAGAGCTAGG-3'
Sub7r	5'-CTGAAACCAACTCTGCCGCTTC-3'

7100f	5'-GTGCTGGTCTCCTTCAGCTTC-3'
7100r	5'-CCTCCGATATCAAGGAGCTTGTG-3'

Таблица 4.3. Штаммы, использовавшиеся в работе.

Штамм	Описание штамма
<i>H. polymorpha</i>	
DL1-1	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2</i>
daduA	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3</i>
Δ HpTER	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 HpTER::HpLEU2</i>
Rap1A- Δ C-HA	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 Rap1AΔ466-613-3HA::HpURA3</i>
Rap1B-HA	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 Rap1B-3HA::HpURA3</i>
RA Δ C Δ RB	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 Rap1AΔ466-613-3HA::HpURA3 rap1B::HpLEU2</i>
Δ rap1B	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 rap1B::HpLEU2</i>
Δ rif1	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 rif1::HpLEU2</i>
Δ tel1	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 tel1::HpLEU2</i>
Δ mre11	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2 ura3 mre11::HpLEU2</i>
<i>E. coli</i>	
JM-109	e14- (McrA-) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK- mK+) supE44 relA1 (lac-proAB) (F' traD36 proAB lacIqZ M15)</i>

4.2. Методики, использованные в работе

4.2.1. Базовые методики работы с ДНК и клетками, клонирование

4.2.1.1. Выделение плазмид

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора реагентов для выделения плазмидной ДНК фирмы Thermo Scientific согласно протоколу производителя.

Колонию клеток штамма JM109 *E. coli* помещали в 5 мл среды LB, содержащей соответствующий антибиотик, и инкубировали при перемешивании в течение 16 ч на 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 6000 об/мин 5 мин, ресуспендировали в 250 мкл раствора Resuspension solution (Thermo Scientific), добавляли 250 мкл раствора Lysis solution, перемешивали до образования вязкого раствора. К полученному раствору добавляли 350 мкл раствора Neutralization solution (Thermo Scientific), перемешивали до появления белых хлопьев. Суспензию осаждали центрифугированием при 14000 об/мин 5 мин, отбирали супернатант и пропускали его через колонку для выделения ДНК (Thermo Scientific), промывали эту колонку 2 раза по 500 мкл буферного раствора Wash solution (Thermo Scientific). Элюировали с колонки ДНК 30 мкл буферного раствора Elution buffer (Thermo Scientific).

4.2.1.2. ПЦР

Составляли следующую смесь:

10x буферный раствор для Pfu-полимеразы (с MgSO ₄)	10 мкл
смесь dNTP (25 мМ каждого)	0,4 мкл
праймер 1	30 пмоль
праймер 2	30 пмоль
гДНК	300 нг
Pfu полимеразы	1 мкл
H ₂ O	до 50 мкл

Параметры ПЦР: предварительный прогрев 95°C 5 мин,
30 циклов: 95°C 30 с,
58°C 30 с,
72°C 1 мин,
в конце программы 72°C 10 мин.

После проведения ПЦР фрагменты ДНК выделяли при помощи набора для очистки ПЦР продуктов (Thermo Scientific) согласно протоколу производителя.

4.2.1.3. Приготовление векторов и вставок

Составляли следующую реакционную смесь:

ДНК	1–4 мкг
10x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции	2 мкл
эндонуклеаза рестрикции	10 ед
H ₂ O	до 20 мкл

Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Добавляли 4 мкл буфера для нанесения, наносили на агарозный гель и приводили к разделению фрагментов ДНК. ДНК-фрагмент нужной длины вырезали из геля и выделяли с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля (Thermo Scientific).

4.2.1.4. Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле

Для приготовления агарозного геля добавляли нужное количество агарозы к 100 мл раствора 1xTBE (1% гель - 1 г агарозы на 100 мл раствора 1xTBE). Раствор прогревали в микроволновой печи до полного растворения агарозы, но не допуская кипения. После полученный раствор охлаждали до ~ 40–50°C, добавляли 5 мкл водного раствора бромистого этидия 10 мг/мл, перемешивали, выливали в плашку. После застывания геля вносили образцы в ячейки и проводили электрофорез при силе тока ~ 100 мА. Фотографировали гель при помощи камеры с УФ лампой (прибор ChemiDoc (Bio-Rad)).

4.2.1.5. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора реагентов для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля фирмы Thermo Scientific согласно протоколу с использованием фирменных реагентов. Полоску агарозного геля массой ~ 100 мкг, содержащую нужный фрагмент ДНК, растворяли в 150 мкл буферного раствора Binding buffer (Thermo Scientific) при 55°C до полного растворения геля. Добавляли 100 мкл изопропилового спирта, перемешивали переворачиванием, пропускали через колонку для выделения ДНК (Thermo Scientific). Промывали колонку 750 мкл буферного раствора Wash solution (Thermo Scientific), элюировали ДНК 30 мкл буферного раствора Elution Buffer (Thermo Scientific).

Концентрацию ДНК определяли по поглощению при 260 нм.

4.2.1.6. Лигирование

Составляли следующую смесь:

Вектор	50 нг
Вставка избыток к вектору)	10–50 нг (3х–10х мольный)
5х буферный раствор для Т4 ДНК-лигазы	4 мкл
Т4 ДНК-лигаза	1 мкл
H ₂ O	до 20 мкл

Инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*.

4.2.1.7. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Свежую колонию клеток *E. coli* помещали в 50 мл среды SOB и инкубировали при температуре 18°C при перемешивании (125 об/мин) до оптической плотности $A_{600} \sim 0,6$. Культуру клеток выдерживали в течение 10 мин во льду, переносили в центрифужные пробирки и осаждали центрифугированием в роторе JA 14 при 5000 об/мин, 4°C в течение 10 мин. Супернатант сливали и ресуспендировали осадок в 20 мл охлажденного до 4°C буферного раствора ТВ. Суспензию клеток инкубировали при помешивании при 0°C 10 мин. Клетки осаждали центрифугированием в роторе JA 14 при 5000 об/мин, 4°C 10 мин, промывали 20 мл буферного раствора ТВ, инкубировали при 0°C 10 мин и осаждали центрифугированием. Клетки ресуспендировали в 4 мл буферного раствора ТВ, добавляли 280 мкл ДМСО (до 7%) и инкубировали 10 мин при 0°C. Суспензию клеток переносили по 200 мкл в 1,5 мл стерильные пробирки и быстро замораживали в жидком азоте. Клетки хранили при температуре –70°C.

4.2.1.8. Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Пробирку с компетентными клетками 200 мкл размораживали во льду, добавляли 1–5 мкл раствора плазмидной ДНК (~ 0,1 мкг) или лигазную смесь и инкубировали 30 мин при 0°C. Затем прогревали смесь на водяной бане в течение 40–50 сек при 42°C, охлаждали до 0°C во льду, добавляли 400 мкл среды LB и инкубировали 1 час при 37°C. Аликвоту 100–200 мкл (в

случае плазмидной ДНК) или полный объем (в случае лигазной смеси) трансформационной смеси высевали на чашку Петри с твердой средой LB, содержащей соответствующий антибиотик. Инкубировали чашку при 37°C в течение 16 ч.

4.2.1.9. Секвенирование плазмид

Нуклеотидную последовательность полученной плазмиды контролировали с помощью автоматического секвенатора ABI prism 3100-Avant genetic Analyzer (4-х капиллярный). Для проведения реакции секвенирования образцы отдавали в Центр Коллективного Пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

4.2.1.10 Трансформация клеток *H. polymorpha*

5 мл среды YPD инокулировали колонией необходимого штамма *H. polymorpha* и инкубировали при интенсивном перемешивании 200 об/мин в течение 16 ч при 30°C. Затем культуру клеток разбавляли свежей средой до A600 ~ 0,2 и инкубировали ее при перемешивании еще 4 ч (150–170 об/мин) при 30°C до A600 ~ 0,6–1,0. Затем 1 мл суспензии клеток в среде осаждали мягким центрифугированием 5000 об/мин в течение 5 мин при 4°C, промывали стерильной дистиллированной водой, затем снова осаждали центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в 25 мкл раствора 0,1 М LiOAc в буферном растворе TE, содержащем 0,5 мг/мл карьерной ДНК, добавляли к клеткам около 1 мкг ДНК (плазида или ПЦР-фрагмент) и 3 капли стерильного 70% PEG4000 (~30мкл). Суспензию клеток хорошо перемешивали. Полученную суспензию инкубировали при перемешивании (200 об/мин) при 30°C в течение 30 минут. Затем и выдерживали в термостате при 45°C в течение 18 мин. После этого клетки охлаждали 5 мин при -70°C, добавляли 1 мл YPD и инкубировали при перемешивании 200 об/мин в течение 2 ч при 30°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 1 мин при 5000 об/мин при 4°C, ресуспендировали в 50 мкл TE и высевали на заранее прогретые до 30°C чашки Петри с необходимой селективной средой.

Для получения кассеты для трансформации методом ПЦР составляли следующую смесь (такая же смесь использовалась для проверки замены генов на хромосоме методом ПЦР):

10x буфер для Taq полимеразы (+KCl)	2,5 мкл
25 mM MgCl ₂	2,5 мкл
смесь dNTP (25 mM каждого)	0,2 мкл
праймер 1	15 пмоль
праймер 2	15 пмоль

плазмида (гДНК)	5 нг (150 нг)
Тақ полимераза	0,3 мкл
H ₂ O	до 25 мкл

Параметры ПЦР: предварительный прогрев 95°C 5 мин,
 30 циклов: 95°C 30 с,
 55°C 30 с,
 72°C 3 мин,
 в конце программы 72°C 10 мин.

После проведения ПЦР добавляли 5 мкл бх буфера для нанесения на агарозный гель и проводили разделение фрагментов ДНК в 2% агарозном геле (раздел 4.2.6.4.). ДНК-фрагмент нужной длины вырезали из геля и выделяли с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля (Thermo Scientific).

4.2.1.11 Выделение геномной ДНК *H. polymorpha*

2 мл среды YPD инокулировали клетками необходимого штамма *H. polymorpha*, инкубировали при интенсивном перемешивании 200 об/мин при 37°C около 12 часов. Клетки осаждали центрифугированием при 14000 об/мин 5 мин, промывали 500 мкл стерильной воды, осаждали центрифугированием, отбирали воду и ресуспендировали в оставшемся количестве воды. Далее добавляли 200 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, 0,3 г стеклянных шариков и 200 мкл буфера YLB. Интенсивно перемешивали на вортексе в течение 2 мин, добавляли 200 мкл раствора TE. Центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин, отбирали водную фазу, добавляли к ней 1 мл этанола (96%), перемешивали переворачиванием. Центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин, отбирали водную фазу, осадок растворяли в 400 мкл раствора TE, добавляли 3 мкл рибонуклеазы А (10 мг/мл), инкубировали при 37°C в течение 5 мин. Затем к смеси добавляли 10 мкл 4 М NH₄OAc, 1 мл этанола. Центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин, отбирали супернатант, осадок сушили на воздухе при 44-45°C, растворяли в 30 мкл раствора TE. Концентрация выделенной ДНК составляла ~ 0,5 мкг/мкл.

4.2.2. Определение последовательностей теломер *H. polymorpha*

В данном эксперименте использовали геномную ДНК, выделенную из клеток штамма *H. polymorpha* дикого типа DL1-1.

«Теломерный» ПЦР.

Формирование адаптера. Адаптер формировали из ДНК-олигонуклеотидов PBoli733 и PBoli749 в буфере TA. Составляли следующую смесь:

10x буфер TA	5 мкл
PBoli733	5 пмоль
PBoli749	5 пмоль
H ₂ O	до 50 мкл

Полученный раствор нагревали при 95°C, в течение 1 мин, далее выдерживали при 75°C 5 минут и оставляли медленно охлаждаться до комнатной температуры.

Лигирование адаптера к геномной ДНК. Дуплекс лигировался к выделенной геномной ДНК с помощью набора для быстрого лигирования ДНК (Rapid DNA ligation kit, Thermo Scientific). Реакционная смесь:

5x буфер	2 мкл
гДНК	1 мкг
«адаптер»	2,5 мкл
T4 ДНК лигаза	0,5 мкл
H ₂ O	до 10 мкл

Полученный раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, далее выдерживали при 65°C 10 минут.

ПЦР. ПЦР проводился с помощью реагентов набора для амплификации G/C-богатых участков GC-RICH PCR System (Roche).

В пробирке 0,2 мл составляли следующую смесь:

5x буфер	2,5 мкл
5M раствор GC resolution solution	2,5 мкл
смесь dNTP (25 mM каждого)	0,2 мкл
праймер S12	15 пмоль

праймер PBoI745	15 пмоль
ДНК (гДНК+адаптер)	2 мкл
ДНК полимеразы	1 мкл
H ₂ O	до 25 мкл

Параметры ПЦР: предварительный прогрев 95°C 5 мин,
 30 циклов: 95°C 30 с,
 56°C 30 с,
 72°C 30 с,
 в конце программы 72°C 10 мин.

Для анализа длины теломер после проведения ПЦР в смесь добавляли 5 мкл бх буфера для нанесения на агарозный гель, проводили разделение фрагментов ДНК в 2% агарозном геле. В качестве маркера длины ДНК использовали Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific).

Секвенирование ПЦР продуктов.

Для глубокого секвенирования теломер после разделения в агарозном геле зону, соответствующую ПЦР продукту теломер (около 200 пн) вырезали из геля. Затем выделяли ДНК с использованием набора для выделения ДНК из геля (Thermo Scientific). Для анализа получали ДНК в количестве 500 нг (в виде водного раствора с концентрацией 10 нг/мкл). Концентрацию измеряли при помощи спектрофотометра Nanodrop 2000. Секвенирование проводилось на геномном секвенаторе Roche GS FLX по протоколу Titanium в лаборатории Николая Викторовича Равина (Центр «Биоинженерия» РАН). Из ридов, прошедших контроль качества, выбирались те, которые содержали последовательности праймеров S12 и/или PBoI745. В результате получилось 5317 ридов, эти последовательности были размещены в базе данных SRA (NCBI) под номером SRX316596.

4.2.3. Получение штаммов, экспрессирующих мутантные формы HpTER

4.2.3.1. Мутагенез матричного участка HpTER

Мутагенез проводили на плазмиде rKAM556_{RNA}, представляющей собой шаттл вектор rKAM556 (устойчивость к канамицину) [185], содержащий ген теломеразной РНК *H. polymorpha*. Мутагенез проводили при помощи набора QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). В пробирке 0,2 мл составляли следующую смесь:

10x буфер	2,5 мкл
Quickchange solution	1,5 мкл
смесь dNTP (10 мМ каждого)	0,5 мкл
праймер 1	10 пмоль
праймер 2	10 пмоль
плазмида	5 нг
ДНК полимераза	0,3 мкл
H ₂ O	до 25 мкл

Параметры ПЦР: предварительный прогрев 95°C 1 мин,
 30 циклов: 95°C 30 с,
 55°C 60 с,
 68°C 4 мин,
 в конце программы 68°C 10 мин.

Затем добавляли 0,5 мкл эндонуклеазы рестрикции DpnI, инкубировали 1 час при 37 °C и проводили трансформацию в *E. coli*. Выделяли из полученных колоний плазмиды и проверяли правильность мутации секвенированием.

В качестве праймеров использовали олигонуклеотиды:

мутация A170U – 24f/24r, A170C – 23f/23r, A170G – 25f/25r, CA170AC – 34f/34r, C178A – 38f/38r.

4.2.3.2. Создание штаммов

Полученными плазмидами трансформировали штамм *ΔHprTER*. Для селекции после трансформации клетки высевали на среду 0,7xYPD + 120 мкг/мл генетицина.

4.2.4. Саузерн блот анализ концевых рестриционных фрагментов

4.2.4.1. Получение и разделение рестриционных фрагментов

Из необходимого штамма *H. polymorpha* выделяли 10 мкг геномной ДНК и обрабатывали её эндонуклеазой рестрикции EcoRI. Для этого составляли следующую смесь:

10x буфер EcoRI	2,5 мкл
-----------------	---------

гДНК	10 мкг
EcoRI	3 мкл
H ₂ O	до 25 мкл

Инкубировали смесь 16 часов при 37 °С, затем 20 мин при 65 °С. Добавляли 5 мкл буфера для нанесения на агарозный гель. Образцы наносили в 1,5% агарозный гель и проводили электрофорез при 100мА в течение 4 часов. Гель фотографировали при помощи камеры с УФ-лампой (ChemiDoc, Bio-Rad) для визуализации маркера длины ДНК (здесь использовали 1 kb Plus DNA Ladder).

4.2.4.2. Перенос ДНК на нитроцеллюлозную мембрану

После электрофореза обрезали лишние участки геля (не содержащие ДНК) и измеряли оставшуюся часть. Инкубировали обрезанный гель 15 мин при умеренном перемешивании в 0,25 М HCl, ополаскивали дистиллированной водой, инкубировали в 0,4 М NaOH 30 мин при небольшом перемешивании. Далее осуществляли перенос ДНК на мембрану HybondN+ (Amersham). Для этого собирали следующую конструкцию. В ванночку наливали 0,4 М NaOH и клали подложку. На подложку клали 2 куса фильтровальной бумаги Whatman 3ММ, смоченной раствором 0,4 М NaOH, чтобы концы бумаги были погружены в щёлочь в ванночке. Сверху клали гель вверх дном, на него – мембрану, смоченную раствором 0,4 М NaOH, не допуская образования пузырьков воздуха между гелем и мембраной. На мембрану клали три листа фильтровальной бумаги Whatman 3ММ, смоченных раствором 0,4 М NaOH. На мембрану помещали три листа фильтровальной бумаги Whatman 3ММ, смоченной раствором 0,4 М NaOH, сверху – стопку фильтровальной бумаги (высотой 5 см), сверху – груз (около 300 г). Полученный «сэндвич» оставляли на 12-16 часов.

4.2.4.3. Приготовление зондов для гибридизации

Для гибридизации использовали два зонда. Первый зонд – в олигонуклеотид G4, меченный добавлением [α -³²P]dGTP на 3'-конец терминальной трансферазой (Thermo Scientific) и олигонуклеотид С4, меченный по 5'-концу радиоактивным фосфатом (³²P) при помощи T4 полинуклеотид киназы (Thermo Scientific).

Для мечения G4 составляли смесь из компонентов набора для терминальной трансферазы:

G4	1 нмоль
----	---------

5x буфер	10 мкл
[α - ³² P]dGTP	800 МБк
H ₂ O	до 50 мкл
терминальная трансфераза	1 мкл

Инкубировали смесь 15 мин при 37 °С, затем добавляли 2 мкл 0,5 М ЭДТА и инкубировали смесь 10 мин при 75 °С.

Для мечения С4 составляли смесь из компонентов набора для Т4 полинуклеотид киназы:

С4	1 нмоль
10x буфер А	5 мкл
[γ - ³² P]АТР	800 МБк
H ₂ O	до 50 мкл
Т4 полинуклеотид киназа	1 мкл

Инкубировали смесь 20 мин при 37 °С, затем 10 мин при 75 °С.

4.2.4.4. Гибридизация мембраны с зондами

Методика представляет собой модифицированный протокол, описанный в (137). Вкратце, мембрану после переноса промывали в буфере 2xSSC, запекали в течение 1 часа при 80 °С под вакуумом, промывали буфером 6xSSC. Далее проводили прегибридизацию в буфере для гибридизации в течение 1 часа при 68 °С. Объём буфера выбирали из расчёта 0,2 мл на каждый квадратный сантиметр мембраны. Далее проводили гибридизацию с зондами (концентрация – 10 пмоль/мл) в буфере для гибридизации (+0,01 М ЭДТА) в течение 12-16 часов при 68 °С. Затем мембрану промывали буфером 2xSSC+0,25% ДСН трижды по 15 мин при 68 °С. Мембрану подсушивали и анализировали с помощью электронной автордиографии на приборе Turphon FLA 9500.

4.2.5. Получение штаммов *Rap1A-ΔC-НА* и *Rap1B-НА*

4.2.5.1. Плазмида *pFA6a-3НА-HpURA3*

Для создания штаммов с тагированными белками использовалась плазмида *pFA6a-3НА-HpURA3*. Эта плазмида была получена из плазмиды *pFA6a-3НА-kanMX6* (устойчивость к ампициллину) [186] путём клонирования в одну стадию. В процессе клонирования ген

устойчивости к генетицину (kanMX6) в плазмиде pFA6a-3HA-kanMX6 заменяли на ген HpURA3, придающий клеткам *H. polymorpha* способность расти на среде без урацила, по сайтам эндонуклеаз рестрикции PmeI и BglII. Ген *HpURA3* получали методом ПЦР с праймерами U3f и U3r, в качестве матрицы использовали плазмиду pCCUR1 (устойчивость к хлорамфениколу).

4.2.5.2. Получение кассет для трансформации

Сначала из плазмиды pFA6a-3HA-HpURA3 получали плазмиды, содержащие необходимые кассеты для трансформации, путём клонирования в две стадии (Рисунок 4.1). «ген» – участок соответствующего гена длиной около 500 пн, кодирующий последние аминокислоты белка. «HA» – фрагмент ДНК, кодирующий последовательность YPYDVVPDYA, повторённую три раза. «ген 3'» – участок длиной около 500 пн, расположенный в геноме после стоп-кодона соответствующего гена. На первой стадии вставляли «ген» в плазмиду pFA6a-3HA-HpURA3 по сайтам SalI и XmaI. «ген» получали методом ПЦР с праймерами 5Rap1BHAF/5Rap1BHAR (для штамма Rap1B-NA) или 5Rap1AΔCf/5Rap1AΔCr (для штамма Rap1A-ΔC-NA), используя гДНК *H. polymorpha* в качестве матрицы. На второй стадии в получившуюся плазмиду вставляли «ген 3'» по сайтам PmeI и ClaI. «ген 3'» получали методом ПЦР с праймерами 3Rap1BHAF/3Rap1BHAR (для штамма Rap1B-NA) или 3Rap1AΔCf/3Rap1AΔCr (для штамма Rap1A-ΔC-NA), используя гДНК *H. polymorpha* (из штамма DL1-1) в качестве матрицы.

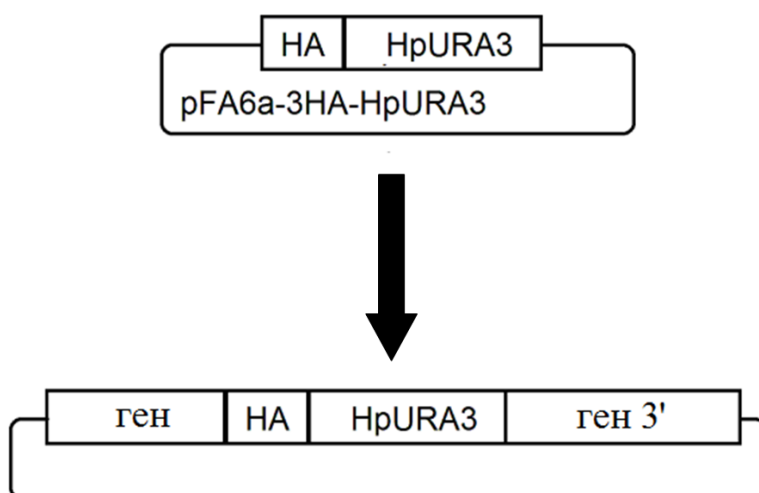


Рисунок 4.1. Схема получения плазмид с кассетами для трансформации из pFA6a-3HA-HpURA3.

Кассеты для трансформации получали методом ПЦР с праймерами 5Rap1BNAf/3Rap1BNAr (для штамма Rap1B-NA) или 5Rap1AΔCf/3Rap1AΔCr (для штамма Rap1A-ΔC-NA), используя соответствующие плазмиды в качестве матрицы. Состав ПЦР смеси и параметры ПЦР описаны в разделе 4.2.1.10.

4.2.5.3. Получение штаммов, отбор клонов

Полученными кассетами трансформировали штамм *daduA*. Для селекции после трансформации клетки высевали на среду, не содержащую урацил (SC-URA). Замену генов на хромосоме в колониях после трансформации подтверждали методом ПЦР с праймерами 5Rap1BNAf/3Rap1BNAr (для штамма Rap1B-NA) или 5Rap1AΔCf/3Rap1AΔCr (для штамма Rap1A-ΔC-NA), используя гДНК из колоний в качестве матрицы. Состав ПЦР смеси и параметры ПЦР описаны в разделе 4.2.1.10.

4.2.6. Получение «нокаутных» штаммов

4.2.6.1. Получение кассет для трансформации

Сначала из плазмиды рCHLX (устойчивость к хлорамфениколу) [187] получали плазмиды, содержащие необходимые кассеты для трансформации, путём клонирования в две стадии (Рисунок 4.2). «ген 5'» – участок соответствующего гена длиной около 500 пн, расположенный в геноме перед старт-кодоном соответствующего гена. «HrLEU2» – ген *HrLEU2*, позволяющий клеткам расти на среде без лейцина. «ген 3'» – участок длиной около 500 пн, расположенный в геноме после стоп-кодона соответствующего гена. На первой стадии вставляли «ген 5'» в плазмиду рCHLX по сайтам SacII и XbaI. «ген 5'» получали методом ПЦР с праймерами 5Rap1Bf/5Rap1Br (для штамма *Δrap1B*), 5Rif1f/5Rif1r (для штамма *Δrif1*), 5Tel1f/5Tel1r (для штамма *Δtel1*) и 5Mre11f/5Mre11r (для штамма *Δmre11*), используя гДНК *H. polymorpha* в качестве матрицы. На второй стадии в получившуюся плазмиду вставляли «ген 3'» по сайтам BamHI и EcoRI. «ген 3'» получали методом ПЦР с праймерами 3Rap1Bf/3Rap1Br (для штамма *Δrap1B*), 3Rif1f/3Rif1r (для штамма *Δrif1*), 3Tel1f/3Tel1r (для штамма *Δtel1*) и 3Mre11f/3Mre11r (для штамма *Δmre11*), используя гДНК *H. polymorpha* в качестве матрицы.

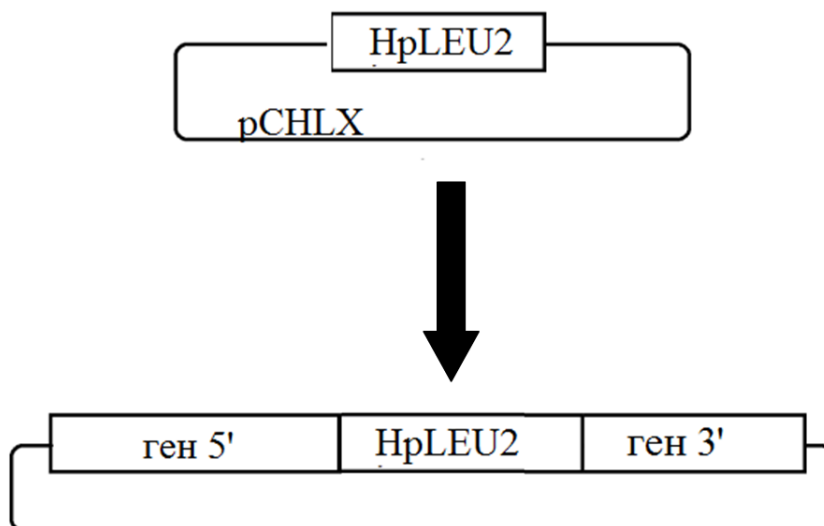


Рисунок 4.2. Схема получения плазмид с кассетами для трансформации из pCHLX.

Кассеты для трансформации получали методом ПЦР с праймерами 5Rap1Bf/3Rap1Br (для штамма *Δrap1B*), 5Rif1f/3Rif1r (для штамма *Δrif1*), 5Tel1f/3Tel1r (для штамма *Δtell*) и 5Mre11f/3Mre11r (для штамма *Δmre11*), используя соответствующие плазмиды в качестве матрицы. Состав ПЦР смеси и параметры ПЦР описаны в разделе 4.2.1.10.

4.2.6.2. Получение штаммов, отбор клонов.

Полученными кассетами трансформировали штамм *daduA*. Для селекции после трансформации клетки высевали на среду, не содержащую лейцин (SC-LEU). Замену генов на хромосоме в колониях после трансформации подтверждали методом ПЦР с праймерами 5Rap1Bf/3Rap1Br (для штамма *Δrap1B*), 5Rif1f/3Rif1r (для штамма *Δrif1*), 5Tel1f/3Tel1r (для штамма *Δtell*) и 5Mre11f/3Mre11r (для штамма *Δmre11*), используя гДНК из колоний в качестве матрицы. Состав ПЦР смеси и параметры ПЦР описаны в разделе 4.2.1.10.

4.2.7. Иммунопреципитация хроматина

5 мл среды YPD инокулировали колонией соответствующего штамма и инкубировали при интенсивном перемешивании 200 об/мин в течение 16 ч при 30°C. Затем культуру клеток разбавляли свежей средой до $A_{600} \sim 0,2$ и инкубировали ее при перемешивании еще 3 ч (150–170 об/мин) при 30°C до $A_{600} \sim 1,0$. К 50 мл полученной культуры клеток добавляли по каплям 1,35 мл 37% формальдегида, инкубировали 1 час при перемешивании на комнатной

температуре. Затем добавляли 2,5 мл 2,5 М глицина и инкубировали при перемешивании ещё 5 минут. После этого клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 5000 об/мин и дважды промывали водой. Полученный осадок клеток замораживали в жидком азоте и механически перетирали с помощью дисмембратора (Mikro-DismembratorU, фирмы Sartorius, Россия). Перетертый порошок клеток размораживали во льду 1 мл холодного буфера ChIP Lysis. Далее проводили разрушение хроматина во льду ультразвуком при максимальной мощности (3 подхода по 11 секунд, с перерывами в 2 минуты), в результате получались фрагменты ДНК около 500 пн. Центрифугировали лизат в течение 15 минут при 4°C при 14000 rpm. 0,9 мл полученного экстракта инкубировали с 30 мкл НА-агарозы (предварительно уравновешенной в ChIP Lysis буфере) 2 часа при +4°C. Промывали 2×1 мл ChIP Lysis буфера, 1×1 мл ChIP Lysis 500 буфера, 2×1 мл ChIP Wash буфера и 1×1 мл TE буфера. Далее элюировали инкубацией смолы при 65°C в течение 15 мин в 110 мкл TES буфера, затем промывали смолу 150 мкл TE0,67S буфером (объединяли эти две фракции). 250 мкл фракций инкубировали при 68°C в течение 16 часов для разрушения формальдегидных сшивок. Затем разбавляли в 2 раза буфером TE и обрабатывали протеиназой К (к 500 мкл полученного раствора добавляли 5 мкл протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл) в течение 2 часов при 37°C. Добавляли 5 мкг гликогена и 55 мкл 4 М LiCl, экстрагировали белки равным объемом фенола, затем смесью хлороформ:изоамиловый спирт (24:1), затем осаждали ДНК добавлением 1 мл этанола. Центрифугировали в течение 15 минут при 4°C при 14000 rpm. Полученный осадок сушили на воздухе, растворяли в 25 мкл TE буфера (содержащем 10 мкг РНазы А) и инкубировали 1 час при 37°C. Проводили ПЦР анализ полученных образцов. В качестве праймеров использовали Sub7f/Sub7r (для определения теломер в выделенной ДНК) и 7100f/7100r (для определения неспецифической ДНК).

В пробирке 0,2 мл составляли следующую смесь:

10x буфер для Taq полимеразы (+KCl)	2,5 мкл
25 mM MgCl ₂	2,5 мкл
смесь dNTP (25 mM каждого)	0,2 мкл
праймер 1	15 пмоль
праймер 2	15 пмоль
ДНК	1 мкл
Taq полимеразы	0,3 мкл
H ₂ O	до 25 мкл

Параметры ПЦР: предварительный прогрев 95°C 5 мин,

30 циклов: 95°C 30 с,
55°C 30 с,
72°C 30 с,
в конце программы 72°C 10 мин.

После проведения ПЦР в смесь добавляли 5 мкл бх буфера для нанесения на агарозный гель, проводили разделение фрагментов ДНК в 2% агарозном геле.

5. Выводы

1. Теломеры термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha* содержат на 3'-конце дополнительный dT нуклеотид, который не обнаруживается в составе внутренних теломерных повторов.
2. Обратная транскрипция теломеразной каталитической субъединицей нуклеотида A170 теломеразной РНК, в результате которой происходит добавление дополнительного dT, является фактором, ограничивающим длину теломер *H. polymorpha*.
3. Белки Rap1, Tel1 и Mre11 не участвуют в контроле длины теломер *H. polymorpha* в отличие от их гомологов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Делеция гена белка Rif1 приводит к увеличению длины теломер у *H. polymorpha* аналогично своему гомологу в *S. cerevisiae*.
5. Белок Rif1 регулирует длину теломер *H. polymorpha* независимо от Rap1.
6. Регуляция длины теломер *H. polymorpha* теломерными белками радикально отличается от таковой в *S. cerevisiae*.

6. Список литературы

- [1] Shay J.W., Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. // *Eur J Cancer*. 1997. V. 33. P. 787-791.
- [2] Damm K., Hemmann U., Garin-Chesa P., Huel N., Kauffmann I., Priepe H., Niestroj C., Daiber C., Enenkel B., Guilliard B., Lauritsch I., Muller E., Pascolo E., Sauter G., Pantic M., Martens U.M., Wenz C., Lingner J., Kraut N., Rettig W.J., Schnapp A. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. // *EMBO J*. 2001. V. 20. P. 6958-6968.
- [3] Wellinger R.J., Zakian V.A. Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. // *Genetics*. 2012. V. 191. P. 1073-1105.
- [4] Nandakumar J., Cech T.R. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013. V. 14. P. 69-82.
- [5] de Lange T., Lundblad V., Blackburn E.H. Telomeres. // *Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York*. 2006.
- [6] Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. // *Biochemistry (Mosc)*. 1997. V. 62. P. 1180-1190.
- [7] Shcherbakova D.M., Zvereva M.E., Shpanchenko O.V., Dontsova O.A. [Telomerase: structure and properties of the enzyme, characteristics of the yeast telomerase]. // *Mol Biol (Mosk)*. 2006. V. 40. P. 580-594.
- [8] Greider C.W., Blackburn E.H. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. // *Nature*. 1989. V. 337. P. 331-337.
- [9] Sandell L.L., Zakian V.A. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. // *Cell*. 1993. V. 75. P. 729-739.
- [10] Lue N.F. Plasticity of telomere maintenance mechanisms in yeast. // *Trends Biochem Sci*. 2010. V. 35. P. 8-17.
- [11] Ravin N.V., Eldarov M.A., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Schneider J., Mardanova E.S., Smekalova E.M., Zvereva M.I., Dontsova O.A., Mardanov A.V., Skryabin K.G. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. // *BMC Genomics*. V. 14. P. 837.
- [12] McEachern M.J., Blackburn E.H. A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. V. 91. P. 3453-3457.
- [13] Konig P., Giraldo R., Chapman L., Rhodes D. The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. // *Cell*. 1996. V. 85. P. 125-136.
- [14] Moretti P., Freeman K., Coodly L., Shore D. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. // *Genes Dev*. 1994. V. 8. P. 2257-2269.

- [15] Wotton D., Shore D. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 748-760.
- [16] Hardy C.F., Sussel L., Shore D. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. // *Genes Dev.* 1992. V. 6. P. 801-814.
- [17] Vodenicharov M.D., Laterreur N., Wellinger R.J. Telomere capping in non-dividing yeast cells requires Yku and Rap1. // *EMBO J.* 2010. V. 29. P. 3007-3019.
- [18] Marcand S., Pardo B., Gratias A., Cahun S., Callebaut I. Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 1153-1158.
- [19] Gao H., Cervantes R.B., Mandell E.K., Otero J.H., Lundblad V. RPA-like proteins mediate yeast telomere function. // *Nat Struct Mol Biol.* 2007. V. 14. P. 208-214.
- [20] Hirano Y., Sugimoto K. Cdc13 telomere capping decreases Mec1 association but does not affect Tel1 association with DNA ends. // *Mol Biol Cell.* 2007. V. 18. P. 2026-2036.
- [21] Grandin N., Damon C., Charbonneau M. Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 1173-1183.
- [22] Sun J., Yang Y., Wan K., Mao N., Yu T.Y., Lin Y.C., DeZwaan D.C., Freeman B.C., Lin J.J., Lue N.F., Lei M. Structural bases of dimerization of yeast telomere protein Cdc13 and its interaction with the catalytic subunit of DNA polymerase alpha. // *Cell Res.* 2011. V. 21. P. 258-274.
- [23] Qi H., Zakian V.A. The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 1777-1788.
- [24] Martin S.G., Laroche T., Suka N., Grunstein M., Gasser S.M. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. // *Cell.* 1999. V. 97. P. 621-633.
- [25] Gravel S., Larrivee M., Labrecque P., Wellinger R.J. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. // *Science.* 1998. V. 280. P. 741-744.
- [26] Polotnianka R.M., Li J., Lustig A.J. The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. // *Curr Biol.* 1998. V. 8. P. 831-834.
- [27] Billaud T., Koering C.E., Binet-Brasselet E., Ancelin K., Pollice A., Gasser S.M., Gilson E. The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 1294-1303.
- [28] Koering C.E., Fourel G., Binet-Brasselet E., Laroche T., Klein F., Gilson E. Identification of high affinity Tbf1p-binding sites within the budding yeast genome. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 2519-2526.

- [29] Hediger F., Berthiau A.S., van Houwe G., Gilson E., Gasser S.M. Subtelomeric factors antagonize telomere anchoring and Tel1-independent telomere length regulation. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 857-867.
- [30] Berthiau A.S., Yankulov K., Bah A., Revardel E., Luciano P., Wellinger R.J., Geli V., Gilson E. Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 846-856.
- [31] Shi T., Bunker R.D., Mattarocci S., Ribeyre C., Faty M., Gut H., Scrima A., Rass U., Rubin S.M., Shore D., Thoma N.H. Rif1 and Rif2 shape telomere function and architecture through multivalent Rap1 interactions. // *Cell.* 2013. V. 153. P. 1340-1353.
- [32] Li B., Lustig A.J. A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 1310-1326.
- [33] Yu E.Y., Yen W.F., Steinberg-Neifach O., Lue N.F. Rap1 in *Candida albicans*: an unusual structural organization and a critical function in suppressing telomere recombination. // *Mol Cell Biol.* 2010. V. 30. P. 1254-1268.
- [34] Kramara J., Willcox S., Gunisova S., Kinsky S., Nosek J., Griffith J.D., Tomaska L. Tay1 protein, a novel telomere binding factor from *Yarrowia lipolytica*. // *J Biol Chem.* 2010. V. 285. P. 38078-38092.
- [35] Visacka K., Hofr C., Willcox S., Necasova I., Pavlouskova J., Sepsiova R., Wimmerova M., Simoncova L., Nosek J., Fajkus J., Griffith J.D., Tomaska L. Synergism of the two Myb domains of Tay1 protein results in high affinity binding to telomeres. // *J Biol Chem.* 2012. V. 287. P. 32206-32215.
- [36] Sreesankar E., Senthilkumar R., Bharathi V., Mishra R.K., Mishra K. Functional diversification of yeast telomere associated protein, Rif1, in higher eukaryotes. // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. P. 255.
- [37] Xu D.Y., Muniandy P., Leo E., Yin J.H., Thangavel S., Shen X., Li M., Agama K., Guo R., Fox D., Meetei A.R., Wilson L., Nguyen H., Weng N.P., Brill S.J., Li L., Vindigni A., Pommier Y., Seidman M., Wang W.D. Rif1 provides a new DNA-binding interface for the Bloom syndrome complex to maintain normal replication. // *Embo Journal.* 2010. V. 29. P. 3140-3155.
- [38] Yu E.Y., Sun J., Lei M., Lue N.F. Analyses of *Candida* Cdc13 orthologues revealed a novel OB fold dimer arrangement, dimerization-assisted DNA binding, and substantial structural differences between Cdc13 and RPA70. // *Mol Cell Biol.* 2012. V. 32. P. 186-198.
- [39] Lue N.F., Chan J. Duplication and functional specialization of the telomere-capping protein Cdc13 in *Candida* species. // *J Biol Chem.* 2013. V. 288. P. 29115-29123.

- [40] Lingner J., Cech T.R., Hughes T.R., Lundblad V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. V. 94. P. 11190-11195.
- [41] Taggart A.K., Zakian V.A. Telomerase: what are the Est proteins doing? // *Curr Opin Cell Biol*. 2003. V. 15. P. 275-280.
- [42] DeZwaan D.C., Freeman B.C. The conserved Est1 protein stimulates telomerase DNA extension activity. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. V. 106. P. 17337-17342.
- [43] Yen W.F., Chico L., Lei M., Lue N.F. Telomerase regulatory subunit Est3 in two *Candida* species physically interacts with the TEN domain of TERT and telomeric DNA. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. V. 108. P. 20370-20375.
- [44] Talley J.M., DeZwaan D.C., Maness L.D., Freeman B.C., Friedman K.L. Stimulation of yeast telomerase activity by the ever shorter telomere 3 (Est3) subunit is dependent on direct interaction with the catalytic protein Est2. // *J Biol Chem*. 2011. V. 286. P. 26431-26439.
- [45] Pflingsten J.S., Goodrich K.J., Taabazuing C., Ouenzar F., Chartrand P., Cech T.R. Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. // *Cell*. 2012. V. 148. P. 922-932.
- [46] Seto A.G., Zaug A.J., Sobel S.G., Wolin S.L., Cech T.R. *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. // *Nature*. 1999. V. 401. P. 177-180.
- [47] Gunisova S., Elboher E., Nosek J., Gorkovoy V., Brown Y., Lucier J.F., Laterreur N., Wellinger R.J., Tzfati Y., Tomaska L. Identification and comparative analysis of telomerase RNAs from *Candida* species reveal conservation of functional elements. // *RNA*. 2009. V. 15. P. 546-559.
- [48] Lin J., Ly H., Hussain A., Abraham M., Pearl S., Tzfati Y., Parslow T.G., Blackburn E.H. A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. V. 101. P. 14713-14718.
- [49] Dalby A.B., Goodrich K.J., Pflingsten J.S., Cech T.R. RNA recognition by the DNA end-binding Ku heterodimer. // *RNA*. 2013. V. 19. P. 841-851.
- [50] Taggart A.K., Teng S.C., Zakian V.A. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. // *Science*. 2002. V. 297. P. 1023-1026.
- [51] Fisher T.S., Taggart A.K., Zakian V.A. Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. // *Nat Struct Mol Biol*. 2004. V. 11. P. 1198-1205.
- [52] Chan A., Boule J.B., Zakian V.A. Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. // *PLoS Genet*. 2008. V. 4. P. e1000236.
- [53] Marcand S., Brevet V., Mann C., Gilson E. Cell cycle restriction of telomere elongation. // *Curr Biol*. 2000. V. 10. P. 487-490.

- [54] Tuzon C.T., Wu Y., Chan A., Zakian V.A. The *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3 binds telomeres in a cell cycle- and Est1-dependent manner and interacts directly with Est1 in vitro. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. P. e1002060.
- [55] Gallardo F., Laterreur N., Cusanelli E., Ouenzar F., Querido E., Wellinger R.J., Chartrand P. Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. // *Mol Cell.* 2011. V. 44. P. 819-827.
- [56] Marcand S., Brevet V., Gilson E. Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 3509-3519.
- [57] Teixeira M.T., Arneric M., Sperisen P., Lingner J. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. // *Cell.* 2004. V. 117. P. 323-335.
- [58] Sabourin M., Tuzon C.T., Zakian V.A. Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. // *Mol Cell.* 2007. V. 27. P. 550-561.
- [59] Bianchi A., Shore D. Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. // *Genes Dev.* 2007. V. 21. P. 1726-1730.
- [60] Marcand S., Gilson E., Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. // *Science.* 1997. V. 275. P. 986-990.
- [61] Levy D.L., Blackburn E.H. Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length. // *Mol Cell Biol.* 2004. V. 24. P. 10857-10867.
- [62] Craven R.J., Petes T.D. Dependence of the regulation of telomere length on the type of subtelomeric repeat in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics.* 1999. V. 152. P. 1531-1541.
- [63] Greenwell P.W., Kronmal S.L., Porter S.E., Gassenhuber J., Obermaier B., Petes T.D. TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. // *Cell.* 1995. V. 82. P. 823-829.
- [64] Hector R.E., Shtofman R.L., Ray A., Chen B.R., Nyun T., Berkner K.L., Runge K.W. Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. // *Mol Cell.* 2007. V. 27. P. 851-858.
- [65] McGee J.S., Phillips J.A., Chan A., Sabourin M., Paeschke K., Zakian V.A. Reduced Rif2 and lack of Mec1 target short telomeres for elongation rather than double-strand break repair. // *Nat Struct Mol Biol.* 2010. V. 17. P. 1438-1445.
- [66] Hirano Y., Fukunaga K., Sugimoto K. Rif1 and rif2 inhibit localization of tel1 to DNA ends. // *Mol Cell.* 2009. V. 33. P. 312-322.
- [67] Goudsouzian L.K., Tuzon C.T., Zakian V.A. *S. cerevisiae* Tel1p and Mre11p are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association. // *Mol Cell.* 2006. V. 24. P. 603-610.

- [68] Tseng S.F., Lin J.J., Teng S.C. The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 6327-6336.
- [69] Churikov D., Corda Y., Luciano P., Geli V. Cdc13 at a crossroads of telomerase action. // *Front Oncol.* 2013. V. 3. P. 39.
- [70] Gao H., Toro T.B., Paschini M., Braunstein-Ballev B., Cervantes R.B., Lundblad V. Telomerase recruitment in *Saccharomyces cerevisiae* is not dependent on Tel1-mediated phosphorylation of Cdc13. // *Genetics.* 2010. V. 186. P. 1147-1159.
- [71] Martina M., Clerici M., Baldo V., Bonetti D., Lucchini G., Longhese M.P. A balance between Tel1 and Rif2 activities regulates nucleolytic processing and elongation at telomeres. // *Mol Cell Biol.* 2012. V. 32. P. 1604-1617.
- [72] Ritchie K.B., Petes T.D. The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 475-479.
- [73] Xue Y., Rushton M.D., Maringele L. A novel checkpoint and RPA inhibitory pathway regulated by Rif1. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. P. e1002417.
- [74] Luciano P., Coulon S., Faure V., Corda Y., Bos J., Brill S.J., Gilson E., Simon M.N., Geli V. RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. // *EMBO J.* 2012. V. 31. P. 2034-2046.
- [75] Arneric M., Lingner J. Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast. // *EMBO Rep.* 2007. V. 8. P. 1080-1085.
- [76] Fukunaga K., Hirano Y., Sugimoto K. Subtelomere-binding protein Tbf1 and telomere-binding protein Rap1 collaborate to inhibit localization of the Mre11 complex to DNA ends in budding yeast. // *Mol Biol Cell.* 2012. V. 23. P. 347-359.
- [77] Brevet V., Berthiau A.S., Civitelli L., Donini P., Schramke V., Geli V., Ascenzioni F., Gilson E. The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 1697-1706.
- [78] Ribaud V., Ribeyre C., Damay P., Shore D. DNA-end capping by the budding yeast transcription factor and subtelomeric binding protein Tbf1. // *EMBO J.* 2012. V. 31. P. 138-149.
- [79] Schulz V.P., Zakian V.A. The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. // *Cell.* 1994. V. 76. P. 145-155.
- [80] Boule J.B., Vega L.R., Zakian V.A. The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. // *Nature.* 2005. V. 438. P. 57-61.
- [81] Zhou J., Monson E.K., Teng S.C., Schulz V.P., Zakian V.A. Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. // *Science.* 2000. V. 289. P. 771-774.

- [82] Eugster A., Lanzuolo C., Bonneton M., Luciano P., Pollice A., Pulitzer J.F., Stegberg E., Berthiau A.S., Forstemann K., Corda Y., Lingner J., Geli V., Gilson E. The finger subdomain of yeast telomerase cooperates with Pif1p to limit telomere elongation. // *Nat Struct Mol Biol.* 2006. V. 13. P. 734-739.
- [83] Bucholtz M., Park Y., Lustig A.J. Intrachromatid excision of telomeric DNA as a mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol Cell Biol.* 2001. V. 21. P. 6559-6573.
- [84] Williams B., Bhattacharyya M.K., Lustig A.J. Mre 11 p nuclease activity is dispensable for telomeric rapid deletion. // *DNA Repair (Amst).* 2005. V. 4. P. 994-1005.
- [85] Lustig A.J. Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. // *Nat Rev Genet.* 2003. V. 4. P. 916-923.
- [86] Gottschling D.E., Aparicio O.M., Billington B.L., Zakian V.A. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. // *Cell.* 1990. V. 63. P. 751-762.
- [87] Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoriantseva L., Giulotto E., Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. // *Science.* 2007. V. 318. P. 798-801.
- [88] Maicher A., Lockhart A., Luke B. Breaking new ground: Digging into TERRA function. // *Biochim Biophys Acta.* 2014. V. P.
- [89] Luke B., Panza A., Redon S., Iglesias N., Li Z., Lingner J. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol Cell.* 2008. V. 32. P. 465-477.
- [90] Pfeiffer V., Lingner J. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. P. e1002747.
- [91] Iglesias N., Redon S., Pfeiffer V., Dees M., Lingner J., Luke B. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. // *EMBO Rep.* 2011. V. 12. P. 587-593.
- [92] Cusanelli E., Romero C.A., Chartrand P. Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. // *Mol Cell.* 2013. V. 51. P. 780-791.
- [93] Smekalova E., Baumann P. TERRA -a calling card for telomerase. // *Mol Cell.* 2013. V. 51. P. 703-704.
- [94] Adams A.K., Holm C. Specific DNA replication mutations affect telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol Cell Biol.* 1996. V. 16. P. 4614-4620.
- [95] Grossi S., Puglisi A., Dmitriev P.V., Lopes M., Shore D. Pol12, the B subunit of DNA polymerase alpha, functions in both telomere capping and length regulation. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 992-1006.

- [96] Underwood D.H., Carroll C., McEachern M.J. Genetic dissection of the *Kluyveromyces lactis* telomere and evidence for telomere capping defects in TER1 mutants with long telomeres. // *Eukaryot Cell*. 2004. V. 3. P. 369-384.
- [97] Krauskopf A., Blackburn E.H. Control of telomere growth by interactions of RAP1 with the most distal telomeric repeats. // *Nature*. 1996. V. 383. P. 354-357.
- [98] Krauskopf A., Blackburn E.H. Rap1 protein regulates telomere turnover in yeast. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. V. 95. P. 12486-12491.
- [99] Carter S.D., Iyer S., Xu J., McEachern M.J., Astrom S.U. The role of nonhomologous end-joining components in telomere metabolism in *Kluyveromyces lactis*. // *Genetics*. 2007. V. 175. P. 1035-1045.
- [100] Underwood D.H., Zinzen R.P., McEachern M.J. Template requirements for telomerase translocation in *Kluyveromyces lactis*. // *Mol Cell Biol*. 2004. V. 24. P. 912-923.
- [101] Sun J., Yu E.Y., Yang Y., Confer L.A., Sun S.H., Wan K., Lue N.F., Lei M. Stn1-Ten1 is an Rpa2-Rpa3-like complex at telomeres. // *Genes Dev*. 2009. V. 23. P. 2900-2914.
- [102] Chico L., Ciudad T., Hsu M., Lue N.F., Larriba G. The *Candida albicans* Ku70 modulates telomere length and structure by regulating both telomerase and recombination. // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e23732.
- [103] Joseph I., Lustig A.J. Telomeres in meiotic recombination: the yeast side story. // *Cell Mol Life Sci*. 2007. V. 64. P. 125-130.
- [104] Miyoshi T., Kanoh J., Saito M., Ishikawa F. Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. // *Science*. 2008. V. 320. P. 1341-1344.
- [105] Baumann P., Cech T.R. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. // *Science*. 2001. V. 292. P. 1171-1175.
- [106] Moser B.A., Chang Y.T., Kosti J., Nakamura T.M. Tel1ATM and Rad3ATR kinases promote Ccq1-Est1 interaction to maintain telomeres in fission yeast. // *Nat Struct Mol Biol*. 2011. V. 18. P. 1408-1413.
- [107] Webb C.J., Zakian V.A. *Schizosaccharomyces pombe* Ccq1 and TER1 bind the 14-3-3-like domain of Est1, which promotes and stabilizes telomerase-telomere association. // *Genes Dev*. 2012. V. 26. P. 82-91.
- [108] Kanoh J., Ishikawa F. spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. // *Curr Biol*. 2001. V. 11. P. 1624-1630.
- [109] Martin V., Du L.L., Rozenzhak S., Russell P. Protection of telomeres by a conserved Stn1-Ten1 complex. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. V. 104. P. 14038-14043.
- [110] Baumann P., Cech T.R. Protection of telomeres by the Ku protein in fission yeast. // *Mol Biol Cell*. 2000. V. 11. P. 3265-3275.

- [111] Nakamura T.M., Moser B.A., Russell P. Telomere binding of checkpoint sensor and DNA repair proteins contributes to maintenance of functional fission yeast telomeres. // *Genetics*. 2002. V. 161. P. 1437-1452.
- [112] Egan E.D., Collins K. Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins. // *RNA*. 2012. V. 18. P. 1747-1759.
- [113] Tang W., Kannan R., Blanchette M., Baumann P. Telomerase RNA biogenesis involves sequential binding by Sm and Lsm complexes. // *Nature*. 2012. V. 484. P. 260-264.
- [114] Cooper J.P., Nimmo E.R., Allshire R.C., Cech T.R. Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. // *Nature*. 1997. V. 385. P. 744-747.
- [115] Nakamura T.M., Cooper J.P., Cech T.R. Two modes of survival of fission yeast without telomerase. // *Science*. 1998. V. 282. P. 493-496.
- [116] Miller K.M., Ferreira M.G., Cooper J.P. Taz1, Rap1 and Rif1 act both interdependently and independently to maintain telomeres. // *EMBO J*. 2005. V. 24. P. 3128-3135.
- [117] Flory M.R., Carson A.R., Muller E.G., Aebersold R. An SMC-domain protein in fission yeast links telomeres to the meiotic centrosome. // *Mol Cell*. 2004. V. 16. P. 619-630.
- [118] Tomita K., Cooper J.P. Fission yeast Ccq1 is telomerase recruiter and local checkpoint controller. // *Genes Dev*. 2008. V. 22. P. 3461-3474.
- [119] Naito T., Matsuura A., Ishikawa F. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. // *Nat Genet*. 1998. V. 20. P. 203-206.
- [120] Moser B.A., Subramanian L., Khair L., Chang Y.T., Nakamura T.M. Fission yeast Tel1(ATM) and Rad3(ATR) promote telomere protection and telomerase recruitment. // *PLoS Genet*. 2009. V. 5. P. e1000622.
- [121] Jun H.I., Liu J., Jeong H., Kim J.K., Qiao F. Tpz1 controls a telomerase-nonextendible telomeric state and coordinates switching to an extendible state via Ccq1. // *Genes Dev*. 2013. V. 27. P. 1917-1931.
- [122] Dahlen M., Sunnerhagen P., Wang T.S. Replication proteins influence the maintenance of telomere length and telomerase protein stability. // *Mol Cell Biol*. 2003. V. 23. P. 3031-3042.
- [123] Chang Y.T., Moser B.A., Nakamura T.M. Fission yeast shelterin regulates DNA polymerases and Rad3(ATR) kinase to limit telomere extension. // *PLoS Genet*. 2013. V. 9. P. e1003936.
- [124] Moser B.A., Subramanian L., Chang Y.T., Noguchi C., Noguchi E., Nakamura T.M. Differential arrival of leading and lagging strand DNA polymerases at fission yeast telomeres. // *EMBO J*. 2009. V. 28. P. 810-820.
- [125] Tazumi A., Fukuura M., Nakato R., Kishimoto A., Takenaka T., Ogawa S., Song J.H., Takahashi T.S., Nakagawa T., Shirahige K., Masukata H. Telomere-binding protein Taz1 controls global

- replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 2050-2062.
- [126] Hayano M., Kanoh Y., Matsumoto S., Renard-Guillet C., Shirahige K., Masai H. Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 137-150.
- [127] Garg M., Gurung R.L., Mansoubi S., Ahmed J.O., Dave A., Watts F.Z., Bianchi A. Tpz1/TPP1 SUMOylation reveals evolutionary conservation of SUMO-dependent Stn1 telomere association. // *EMBO Rep.* 2014. V. 15. P. 871-877.
- [128] Miyagawa K., Low R.S., Santosa V., Tsuji H., Moser B.A., Fujisawa S., Harland J.L., Raguimova O.N., Go A., Ueno M., Matsuyama A., Yoshida M., Nakamura T.M., Tanaka K. SUMOylation regulates telomere length by targeting the shelterin subunit Tpz1(Tpp1) to modulate shelterin-Stn1 interaction in fission yeast. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014. V. 111. P. 5950-5955.
- [129] Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L., Wu J.R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988. V. 85. P. 6622-6626.
- [130] Meyne J., Ratliff R.L., Moyzis R.K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989. V. 86. P. 7049-7053.
- [131] Fulneckova J., Sevcikova T., Fajkus J., Lukesova A., Lukes M., Vlcek C., Lang B.F., Kim E., Elias M., Sykorova E. A Broad Phylogenetic Survey Unveils the Diversity and Evolution of Telomeres in Eukaryotes. // *Genome Biology and Evolution.* 2013. V. 5. P. 468-483.
- [132] de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 2100-2110.
- [133] Miyake Y., Nakamura M., Nabetani A., Shimamura S., Tamura M., Yonehara S., Saito M., Ishikawa F. RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. // *Mol Cell.* 2009. V. 36. P. 193-206.
- [134] Palm W., de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. // *Annu Rev Genet.* 2008. V. 42. P. 301-334.
- [135] Snow B.E., Erdmann N., Cruickshank J., Goldman H., Gill R.M., Robinson M.O., Harrington L. Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. // *Curr Biol.* 2003. V. 13. P. 698-704.
- [136] Redon S., Reichenbach P., Lingner J. Protein RNA and protein protein interactions mediate association of human EST1A/SMG6 with telomerase. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 7011-7022.

- [137] Lee J., Mandell E.K., Tucey T.M., Morris D.K., Lundblad V. The Est3 protein associates with yeast telomerase through an OB-fold domain. // *Nat Struct Mol Biol.* 2008. V. 15. P. 990-997.
- [138] Zaug A.J., Podell E.R., Nandakumar J., Cech T.R. Functional interaction between telomere protein TPP1 and telomerase. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. P. 613-622.
- [139] Venteicher A.S., Abreu E.B., Meng Z., McCann K.E., Terns R.M., Veenstra T.D., Terns M.P., Artandi S.E. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. // *Science.* 2009. V. 323. P. 644-648.
- [140] van Steensel B., de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. // *Nature.* 1997. V. 385. P. 740-743.
- [141] Smogorzewska A., van Steensel B., Bianchi A., Oelmann S., Schaefer M.R., Schnapp G., de Lange T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. // *Mol Cell Biol.* 2000. V. 20. P. 1659-1668.
- [142] Loayza D., De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. // *Nature.* 2003. V. 423. P. 1013-1018.
- [143] Ancelin K., Brunori M., Bauwens S., Koering C.E., Brun C., Ricoul M., Pommier J.P., Sabatier L., Gilson E. Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. // *Mol Cell Biol.* 2002. V. 22. P. 3474-3487.
- [144] O'Connor M.S., Safari A., Liu D., Qin J., Songyang Z. The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. // *J Biol Chem.* 2004. V. 279. P. 28585-28591.
- [145] Li B., de Lange T. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. // *Mol Biol Cell.* 2003. V. 14. P. 5060-5068.
- [146] Kim S.H., Kaminker P., Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. // *Nat Genet.* 1999. V. 23. P. 405-412.
- [147] Liu D., Safari A., O'Connor M.S., Chan D.W., Laegerler A., Qin J., Songyang Z. PTop interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. // *Nat Cell Biol.* 2004. V. 6. P. 673-680.
- [148] Ye J.Z., Hockemeyer D., Krutchinsky A.N., Loayza D., Hooper S.M., Chait B.T., de Lange T. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1649-1654.
- [149] Liu D., O'Connor M.S., Qin J., Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. // *J Biol Chem.* 2004. V. 279. P. 51338-51342.
- [150] Ye J.Z., Donigian J.R., van Overbeek M., Loayza D., Luo Y., Krutchinsky A.N., Chait B.T., de Lange T. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. // *J Biol Chem.* 2004. V. 279. P. 47264-47271.

- [151] Sfeir A., de Lange T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. // *Science*. 2012. V. 336. P. 593-597.
- [152] Colgin L.M., Baran K., Baumann P., Cech T.R., Reddel R.R. Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. // *Curr Biol*. 2003. V. 13. P. 942-946.
- [153] Lei M., Zaug A.J., Podell E.R., Cech T.R. Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. // *J Biol Chem*. 2005. V. 280. P. 20449-20456.
- [154] Wang F., Podell E.R., Zaug A.J., Yang Y., Baciu P., Cech T.R., Lei M. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. // *Nature*. 2007. V. 445. P. 506-510.
- [155] Zhong F.L., Batista L.F., Freund A., Pech M.F., Venteicher A.S., Artandi S.E. TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. // *Cell*. 2012. V. 150. P. 481-494.
- [156] Abreu E., Arifonovska E., Reichenbach P., Cristofari G., Culp B., Terns R.M., Lingner J., Terns M.P. TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. // *Mol Cell Biol*. 2010. V. 30. P. 2971-2982.
- [157] Zhang Y., Chen L.Y., Han X., Xie W., Kim H., Yang D., Liu D., Songyang Z. Phosphorylation of TPP1 regulates cell cycle-dependent telomerase recruitment. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. V. 110. P. 5457-5462.
- [158] Jady B.E., Richard P., Bertrand E., Kiss T. Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. // *Mol Biol Cell*. 2006. V. 17. P. 944-954.
- [159] Stern J.L., Zyner K.G., Pickett H.A., Cohen S.B., Bryan T.M. Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. // *Mol Cell Biol*. 2012. V. 32. P. 2384-2395.
- [160] Zhao Y., Sfeir A.J., Zou Y., Buseman C.M., Chow T.T., Shay J.W., Wright W.E. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. // *Cell*. 2009. V. 138. P. 463-475.
- [161] Zhao Y., Abreu E., Kim J., Stadler G., Eskiocak U., Terns M.P., Terns R.M., Shay J.W., Wright W.E. Processive and distributive extension of human telomeres by telomerase under homeostatic and nonequilibrium conditions. // *Mol Cell*. 2011. V. 42. P. 297-307.
- [162] Chen L.Y., Redon S., Lingner J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. // *Nature*. 2012. V. 488. P. 540-544.
- [163] Casteel D.E., Zhuang S., Zeng Y., Perrino F.W., Boss G.R., Goulian M., Pilz R.B. A DNA polymerase- α primase cofactor with homology to replication protein A-32 regulates DNA replication in mammalian cells. // *J Biol Chem*. 2009. V. 284. P. 5807-5818.
- [164] Ungar L., Yosef N., Sela Y., Sharan R., Ruppin E., Kupiec M. A genome-wide screen for essential yeast genes that affect telomere length maintenance. // *Nucleic Acids Res*. 2009. V. 37. P. 3840-3849.

- [165] Suh S.O., Zhou J.J. Methylotrophic yeasts near *Ogataea* (*Hansenula*) polymorpha: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. // *FEMS Yeast Res.* 2010. V. 10. P. 631-638.
- [166] Eldarov M.A., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G. Complete sequence and analysis of the mitochondrial genome of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. // *FEMS Yeast Res.* 2011. V. 11. P. 464-472.
- [167] Sohn J.H., Choi E.S., Kang H.A., Rhee J.S., Rhee S.K. A family of telomere-associated autonomously replicating sequences and their functions in targeted recombination in *Hansenula polymorpha* DL-1. // *J Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 1005-1013.
- [168] Smekalova E.M., Petrova O.A., Zvereva M.I., Dontsova O.A. *Hansenula Polymorpha* TERT: A Telomerase Catalytic Subunit Isolated in Recombinant Form with Limited Reverse Transcriptase Activity. // *Acta Naturae.* 2012. V. 4. P. 70-73.
- [169] Смекалова Е. Идентификация и изучение функциональных особенностей новой теломеразы дрожжей. // Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук. М.: МГУ. 2012.
- [170] Парфёнова Ю. Поиск функции белка Est3 в работе теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*. // Дипломная работа. М.: МГУ. 2014.
- [171] Petrova O.A., Smekalova E.M., Zvereva M.E., Lamzin V., Dontsova O.A. Identification of additional telomerase component of the yeast H-polymorpha is a step towards understanding the complex at the atomic level. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2014. V. 455. P. 59-64.
- [172] Leonardi J., Box J.A., Bunch J.T., Baumann P. TER1, the RNA subunit of fission yeast telomerase. // *Nat Struct Mol Biol.* 2008. V. 15. P. 26-33.
- [173] Gramatges M.M., Qi X., Sasa G.S., Chen J.J., Bertuch A.A. A homozygous telomerase T-motif variant resulting in markedly reduced repeat addition processivity in siblings with Hoyeraal Hreidarsson syndrome. // *Blood.* 2013. V. 121. P. 3586-3593.
- [174] Alder J.K., Cogan J.D., Brown A.F., Anderson C.J., Lawson W.E., Lansdorp P.M., Phillips J.A., 3rd, Loyd J.E., Chen J.J., Armanios M. Ancestral mutation in telomerase causes defects in repeat addition processivity and manifests as familial pulmonary fibrosis. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. P. e1001352.
- [175] Robart A.R., Collins K. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using disease-linked subunit variants. // *J Biol Chem.* 2010. V. 285. P. 4375-4386.
- [176] Cohn M., Blackburn E.H. Telomerase in yeast. // *Science.* 1995. V. 269. P. 396-400.

- [177] Chang M., Arneric M., Lingner J. Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genes Dev.* 2007. V. 21. P. 2485-2494.
- [178] Baumann P., Price C. Pot1 and telomere maintenance. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. P. 3779-3784.
- [179] Mattarocci S., Shyian M., Lemmens L., Damay P., Altintas D.M., Shi T.L., Bartholomew C.R., Thoma N.H., Hardy C.F.J., Shore D. Rif1 Controls DNA Replication Timing in Yeast through the PP1 Phosphatase Glc7. // *Cell Reports.* 2014. V. 7. P. 62-69.
- [180] Yamazaki S., Ishii A., Kanoh Y., Oda M., Nishito Y., Masai H. Rif1 regulates the replication timing domains on the human genome. // *Embo Journal.* 2012. V. 31. P. 3667-3677.
- [181] Seto A.G., Umansky K., Tzfati Y., Zaug A.J., Blackburn E.H., Cech T.R. A template-proximal RNA paired element contributes to *Saccharomyces cerevisiae* telomerase activity. // *Rna-a Publication of the Rna Society.* 2003. V. 9. P. 1323-1332.
- [182] Box J.A., Bunch J.T., Zappulla D.C., Glynn E.F., Baumann P. A flexible template boundary element in the RNA subunit of fission yeast telomerase. // *Journal of Biological Chemistry.* 2008. V. 283. P. 24224-24233.
- [183] Booy E.P., Meier M., Okun N., Novakowski S.K., Xiong S., Stetefeld J., McKenna S.A. 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. V. 40. P. 4110-4124.
- [184] Moriarty T.J., Marie-Egyptienne D.T., Autexier C. Regulation of 5' template usage and incorporation of noncognate nucleotides by human telomerase. // *RNA.* 2005. V. 11. P. 1448-1460.
- [185] Agaphonov M., Romanova N., Choi E.S., Ter-Avanesyan M. A novel kanamycin/G418 resistance marker for direct selection of transformants in *Escherichia coli* and different yeast species. // *Yeast.* 2010. V. 27. P. 189-195.
- [186] Longtine M.S., McKenzie A., 3rd, Demarini D.J., Shah N.G., Wach A., Brachat A., Philippsen P., Pringle J.R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Yeast.* 1998. V. 14. P. 953-961.
- [187] Sohn J.H., Choi E.S., Kim C.H., Agaphonov M.O., Ter-Avanesyan M.D., Rhee J.S., Rhee S.K. A novel autonomously replicating sequence (ARS) for multiple integration in the yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. // *J Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 4420-4428.