

ТЕЛОМЕРАЗА: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ

©2010 г. М. Э. ЗВЕРЕВА, Д. М. ЩЕРБАКОВА,
О. А. ДОНЦОВА

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
Москва*

I. Введение. II. Структура и функция теломеразы. III. Теломер-
связывающие белки. IV. Тестирование теломеразной активности.
V. Активирование теломеразы. VI. Ингибирование теломеразы.
VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

На концах хромосом эукариот расположены ДНК-белковые структуры – теломеры. Они, защищая линейные концы хромосом эукариот от деградации и слияния, поддерживают стабильность генома. Аппарат репликации клетки не в состоянии обеспечить полную репликацию концов хромосом, кроме того теломеры подвергаются воздействию нуклеаз и других деструктивных факторов. В результате при каждом делении клетки теломеры укорачиваются (рис. 1). У большинства организмов основным механизмом поддержания длины теломер служит достраивание теломерных повторов ДНК ферментом теломеразой [1]. Этот фермент удлиняет 3'-конец хромосомы, тогда как комплементарная цепь достраивается ДНК-полимеразами.

Теломераза представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс [2]. Коровый фермент включает в себя теломеразную обратную

Принятые сокращения: TERT – теломеразная обратная транскриптаза; TER – теломеразная РНК; ATM – протеинкиназа ATM (ataxia-telangiectasia-mutated); CTE – С-концевой домен TERT (C-terminal extension); IFD – домен TERT (insertion in fingers domain); TLC1 РНК – теломеразная РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; TWJ – Y-подобный структурный элемент РНК (three way junction); Pif1p – хеликаза дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; PIF1 – хеликаза млекопитающих; TERRA – РНК, транскрибируемая с теломерной ДНК (telomeric repeat-containing RNA).

Адрес для корреспонденции: zvereva@genebee.msu.ru.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки РФ П800, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК 02.740.11.0706) и РФФИ 09-04-12071-офи_м.

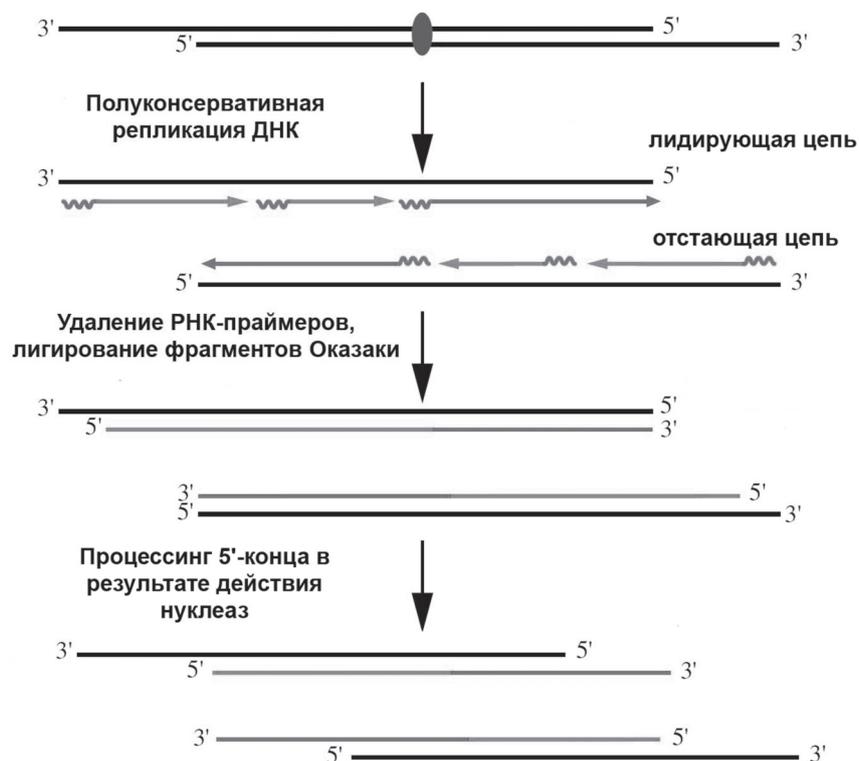


Рис. 1. Укорочение теломер в результате недорепликации и процессинга при делении клетки.

транскриптазу и теломеразную РНК, содержащую матричный участок для удлинения ДНК. Кроме того, в теломеразный комплекс входит еще целый ряд вспомогательных компонентов, которые обеспечивают функционирование теломеразы *in vivo*. Часть из них необходима для посадки теломеразы на теломеру в определенный момент клеточного цикла [3], другая – для регуляции ее активности [4]. Некоторые белки необходимы для созревания теломеразного комплекса и для деградации его компонентов [5]. Тонко регулируется количество теломеразы в клетках различного типа [6, 7]. Это существенно, поскольку в человеческих клетках укорочение теломер и, в конечном итоге, сенесценс, приведут к ограничению потенциала деления клетки [8]. Имеются данные, что активация теломеразы связана с развитием рака [9] и что она активна в клетках, обладающих потенциалом к неограниченному делению. Известно, что теломераза активна в 85% типов раковых

опухолей, а в остальных 15% случаев действуют другие механизмы поддержания длины теломер, основанные на рекомбинации [10]. Следует отметить, что теломеразная активность не обнаруживается в обычных соматических тканях. Как следствие, уже с первых лет исследования теломеразы, фермент стали считать универсальной мишенью, которую можно использовать при разработке антираковой терапии. Причем, решение проблемы лечения злокачественных пролиферативных болезней свелось к поиску соответствующего эффективного ингибитора теломеразной активности.

В течение прошлых десятилетий наблюдалось появление новых анти-теломеразных стратегий, работающих с большим или меньшим успехом. Камнем преткновения на этом пути оказался факт наличия активной теломеразы в половых и стволовых клетках. Однако следует отметить, что теломеры в опухолевых клетках существенно короче, чем в половых и стволовых. Укорочение теломер вызывает гибель опухолевых клеток при подавлении активности теломеразы намного раньше, чем нормальных стволовых клеток организма. Это позволяет думать, что существует «терапевтическое окно» для безопасного использования теломеразных ингибиторов, так как открывается возможность создания селективных универсальных противоопухолевых лекарственных средств. Раковые образования человека могут быть значительно более чувствительными, чем нормальные клетки, к поражающему действию ингибиторов теломеразы и их теломеры сокращаются до критической длины быстрее. Короткие теломеры вызывают клеточное старение. Такое направленное индуцирование клеточного старения в опухолевых клетках стало привлекательной терапевтической стратегией в лечении онкологических больных, при котором не только блокируется активное распространение опухолевых клеток, но наступает их гибель [11]. Апоптоз устраняет клетки новообразования немедленно и необратимо. Поэтому все больше видов химиотерапии направленно на запуск старения клеток в злокачественных новообразованиях. Повышение чувствительности методов тестирования теломеразной активности и совершенствование методов подготовки проб позволили расширить возможность определения активности теломеразы. Теломеразная активность была исследована во всех типах тканей. [12]. Помимо повышения теломеразной активности, наблюдаемого в раковых клетках, предполагается, что фермент может функционировать и в «нормальных клетках» с высокоточно настроенным регулированием [13]. Хотя сокращение длины теломер и вызванное этим начало старения является обычной судьбой соматических клеток, возможно, что

недостаток отдельных теломеразных компонентов, приводит к фенотипическому раннему старению с потерей функции на клеточном и системном уровне [14].

Основным критерием эффективности работы теломеразы является количество теломерных повторов на концах теломер. Сокращение длины теломер является признаком многих заболеваний и может быть, как следствием первичной дисфункции теломеразы, (например, обусловленным мутациями в основных компонентах теломеразы – hTERT, hTR или нарушением теломер-организующих систем), так и результатом преждевременной потери теломер, индуцированной другими факторами. К первому типу относится врожденный дискератоз. Врожденный дискератоз был первым идентифицированным у человека генетическим заболеванием, причиной которого было нарушение системы поддержания длины теломер [15]. Это заболевание характеризуется гиперпигментацией кожи, ороговением эпителия, дистрофией ногтей и прогрессивной апластической анемией. В большинстве случаев аутосомные болезни обусловлены мутациями в области N/ACA теломеразной РНК человека [16], в то время как связанные с X-хромосомой случаи возникают вследствие мутаций в белке дискерине, приводящих к нарушению сборки теломеразного комплекса. Недавно обнаруженная мутация в домене теломеразной обратной транскриптазы связана с аутосомальной доминирующей формой заболевания, что подчеркивает значение функционирования теломеразы в развитии этой болезни [17].

Мутации в теломер-связывающих белках приводят к хромосомной неустойчивости и синдрому преждевременного старения. Наличие коротких теломер – важный признак проявления болезни и в случаях других генетических заболеваний.

Известны случаи, когда укорочение теломер – это вторичный эффект болезни. К ним относятся синдром приобретенного иммунного дефицита [18]. Заболевания сердечнососудистой системы недавно также стали связывать с зависимым от длины теломер старением [19], а сокращение длины теломер в коронарных эндотелиальных клетках обнаружено у пациентов с ишемической болезнью сердца [20], так же укорочение теломер отмечено у больных келоидными заболеваниями [21]. Все это делает понятным возрастающий интерес исследователей и фармакологов к этому ферменту [22]. Идеальным было бы научиться регулировать теломеразу в определенных тканях и во времени, таким образом, компенсируя укорочение теломер.

Не столько само по себе укорочение, сколько невозможность за счет укорочения поддерживать определенную структуру нуклеиново-

белкового комплекса теломеры приводит к тому, что на определенном этапе клетка перестает делиться (сенесценс-фенотип). Это характерно для клеток соматических тканей млекопитающих и других многоклеточных организмов, у которых имеется определенное количество делений – лимит Хейфлика [23]. Длина теломер коррелирует с пролиферативным потенциалом клетки. Существование фермента, который препятствует укорочению теломер, предсказал задолго до его открытия российский ученый А.М. Оловников [24]. Он предложил назвать такой фермент теломеразой.

В рамках обзора невозможно охватить все, что известно на сегодняшний день о различных аспектах функционирования теломеразы и теломер. К настоящему времени опубликовано более 10 тысяч статей с ключевыми словами «теломера» и «теломераза». Не имея возможности рассмотреть их все, более подробно остановимся на вопросе о составе и структуре теломеразного комплекса, сосредоточившись на сравнении многочисленных данных для эволюционно далеко отстоящих друг от друга организмов: дрожжей и человека. Кратко обсудим особенности структуры теломер, так как они являются основным субстратом теломеразы, а также и методы измерения теломеразной активности. Имеющиеся данные о структуре и функции теломеразы анализируются в свете действия известных фармакологических агентов, ингибирующих или активирующих фермент, что необходимо для понимания принципов создания искусственных регуляторов теломеразы: ингибиторов и активаторов.

II. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Как уже указывалось, теломераза – это особая обратная транскриптаза, работающая в комплексе со специальной теломеразной РНК. Субстратами теломеразы в реакции являются дезоксирибонуклеотид-5'-трифосфаты и 3'-конец теломеры (в тестах *in vitro* это ДНК-олигонуклеотид, с последовательностью, соответствующей теломерным повторам хромосом). Особое свойство, отличающее теломеразу от других РНК-зависимых ДНК-полимераз, состоит в использовании фиксированного участка специальной РНК (называемой теломеразной) в качестве матрицы для удлинения теломеры. Теломеразная РНК взаимодействует с теломерой не только на этом матричном участке, но и дополнительно в так называемом «якорном сайте». Теломераза может добавлять несколько теломерных повторов за один акт присоединения к олигонуклеотидному субстрату [25].

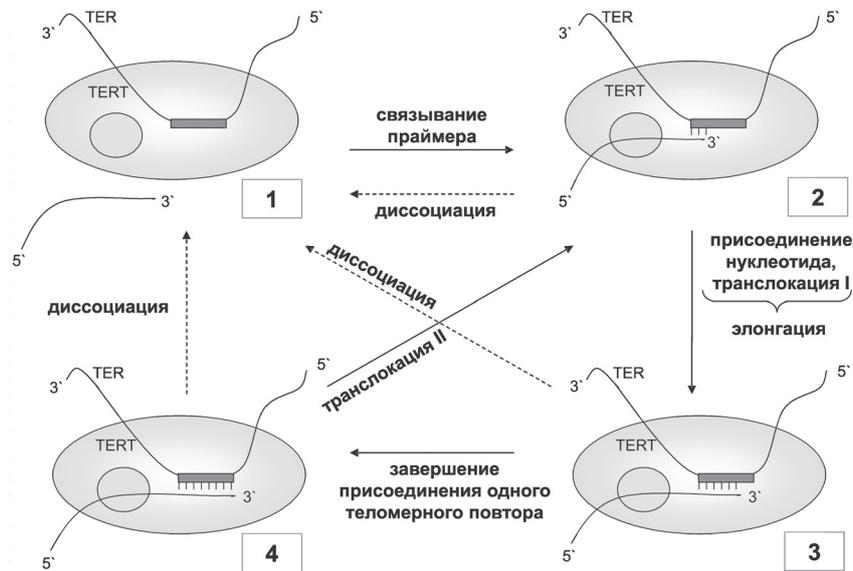


Рис. 2. Реакционный цикл теломеразы.

TERT – каталитическая субъединица (серым кружком показан якорный сайт), TER – теломеразная РНК с матричным участком (серый прямоугольник).

Цифры в рамке обозначают положение теломеразы по отношению к праймеру на различных стадиях: 1 – фермент не связан с праймером; 2 – отжиг праймера; 3 – стадия элонгации; 4 – завершение присоединения одного теломерного повтора. Пунктирными стрелками показаны возможные процессы диссоциации праймера при работе фермента.

Цикл реакций теломеразы *in vitro* (рис. 2) включает следующие стадии: связывание праймера, элонгацию, транслокацию, и диссоциацию. При последовательном переходе фермента из состояния (1) через состояния (2) и (3) в состояние (4) теломераза добавляет к праймеру один теломерный повтор. Переход (4) – (2) соответствует транслокации II, т.е. добавлению нескольких теломерных повторов без отделения от праймера (переход (4) – (1) на рис. 2).

На этом рисунке отражены процессы транслокации I и II. Способность к транслокации связана с процессивностью фермента. Выделяют два типа процессивности теломеразы [26]. Процессивность I – способность теломеразы к транслокации дуплекса РНК–ДНК в активном центре после присоединения каждого нуклеотида на стадии элонгации. Процессивность II – ее способность к транслокации относительно связанного ДНК-праймера после присоединения одного

теломерного повтора, в результате чего праймер вновь приобретает способность удлиняться (переход (4) – (2) на рис. 2). Два типа процессивности принципиально различаются между собой. Если в первом случае происходит одновременная транслокация дуплекса РНК–ДНК относительно активного центра фермента, то во втором – 3'-конец ДНК должен изменить свое положение относительно РНК-матрицы.

Эффективность прохождения стадий транслокации I и II в реакции *in vitro* у теломераз из разных организмов различается и может варьировать в зависимости от условий получения фракции с теломеразной активностью [27–29].

Теломераза дрожжей *in vitro* делает паузы и останавливает наращивание праймера после присоединения каждого нуклеотида. Таким образом, можно говорить о неэффективной транслокации I и отсутствии транслокации II. С особенностью процессивности первого типа связывают наблюдаемую гетерогенность добавляемых теломеразой повторов в теломерах дрожжей *S. cerevisiae* [30].

Теломеразы человека и простейших процессивны по второму типу *in vitro*. Они способны добавлять сотни нуклеотидов к теломерному субстрату, многократно достраивая теломерные повторы по своей РНК-матрице [31, 32]. Теломеразы ряда других организмов, таких как мышь [33], различные дрожжи [34, 35], не процессивны по второму типу *in vitro*. Для теломеразы дрожжей *S. cerevisiae* показано, что, удлинив теломерный праймер, теломераза остается связанной со своим субстратом [36]. В то же время *in vivo* эта теломераза способна добавлять к теломере более 100 нуклеотидов за один клеточный цикл [37]. Это противоречие можно объяснить тем, что *in vivo* фермент процессивен по второму типу, или тем, что происходит непродессивное удлинение, в результате которого фермент много раз диссоциирует и затем ассоциирует с теломерой вновь для нового удлинения.

Показано, что теломераза дрожжей способна удлинять праймеры с нетеломерной последовательностью в районе 4–6 н. от 3'-конца более чем на один теломерный повтор. При этом фермент не добавляет несколько теломерных повторов, как обладающие процессивностью второго типа теломеразы человека и простейших, а проскальзывает дальше по матрице [38].

Однако существует и другое мнение о различии в процессивности теломераз дрожжей и других организмов. Предполагается, что различие в процессивности между теломеразными носителями носит не качественный, а количественный характер [39].

Для изучения процессивности теломеразы дрожжей *in vivo* и механизма того, каким способом теломераза эффективно удлиняет самые короткие теломеры, Чанг с соав. [40] создали специальную систему. При экспрессировании одновременно теломеразной РНК дикого типа и РНК с мутированным матричным участком, следили за удлинением теломер в одном раунде клеточного цикла. Теломерные повторы, встраиваемые при участии двух типов теломеразной РНК были различимы, и по частоте их встраивания можно делать выводы о характере работы теломеразы. Было обнаружено, что теломераза в среднем не процессивна. Однако, на самых коротких теломерах было обнаружено процессивное удлинение, которое оказалось зависимым от ортолога АТМ млекопитающих, Tel1p киназы.

В дополнение к процессам, показанным на рис. 2, нужно добавить, что у теломераз дрожжей [41, 42], простейших [27] и человека [43, 44] обнаружена ассоциированная с этим ферментом нуклеазная активность.

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ТЕЛОМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Теломеразная РНК (TER – telomerase RNA) содержит матричный участок и другие функционально важные элементы вторичной структуры, участвующие в ограничении матричного участка, связывании белковой субъединицы, а также частично выполняющие каталитические и другие функции [2, 45]. Теломеразная обратная транскриптаза (TERT – telomerase reverse transcriptase) содержит каталитически важный домен, напоминающий домен обратных транскриптаз, а также домены, характерные только для теломераз, необходимые для связывания TER, ДНК-субстрата, функциональной активности теломеразы [2, 46]. TER и TERT образуют коровый фермент. Этих компонентов достаточно для обеспечения функциональной активности теломеразы *in vitro*. Для функционирования *in vivo* необходимы вспомогательные белки, часть которых входит в состав холофермента. Несмотря на большой интерес к теломеразе и важность ее изучения в прикладном аспекте, структурные данные о TERT, TER и других теломеразных белках стали появляться относительно недавно из-за сложности изучения теломеразы (чрезвычайно низкое содержание фермента в клетке, трудность получения ее компонентов в растворимой форме и в достаточном количестве и др.). В этом разделе, посвященном TER и TERT, основное внимание уделено новым результатам, полученным в последние годы.

Теломеразная обратная транскриптаза (TERT)

Доменная структура. Каталитические субъединицы теломераз имеют аминокислотную последовательность, сходную с последовательностью обратных транскриптаз. В вирусных обратных транскриптазах и теломеразах установлена консервативность аминокислотных остатков (а. о.), отвечающих за катализ, связывание нуклеотидов, распознавание рибо- и дезоксирибонуклеотидов [25].

Обратно-транскриптазный домен TERT отличается от соответствующего домена обратных транскриптаз тем, что между консервативными для обратных транскриптаз мотивами A и B' находится участок IFD (рис. 3). Этот участок важен для функционирования теломеразы дрожжей *in vivo*. Мутации в нем приводят к снижению активности фермента *in vitro* [47].

Поиск функционально значимых участков в первичной структуре белка и выделение в них а. о., при замене которых нарушается то или иное свойство теломеразы, в большинстве работ [48–50] проведены на основе гомологии между TERT различных организмов. Подходы, не использующие гомологию (например, «метод эволюции одного гена» [51]), привели к сходным результатам.

Функциональные домены белка и участки в них получили разные названия. В целом, в структуре TERT можно выделить четыре функциональных домена: 1) N-концевой домен, содержащий умеренно консервативный GQ-блок (гипомутабельный домен I согласно классификации [51]), который в последнее время называют TEN-доменом [52]; 2) РНК-связывающий домен (TRBD-домен) с консервативными мотивами CP, QFP и T (гипомутабельные домены II, III и IV); 3) обратно-транскриптазный домен (RT-домен), содержащий семь консервативных мотивов и IFD-участок; 4) низкоконсервативный C-концевой домен (CTE – домен).

Получить TERT в растворимой форме в количестве, достаточном для кристаллизации – довольно сложная задача, что затрудняет структурные исследования этого белка. Поэтому структурных данных о белке TERT пока немного. Данные о структурной организации всего

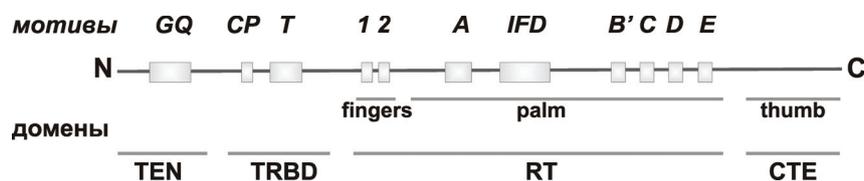


Рис. 3. Доменная структура TERT.

комплекса вообще отсутствуют. В последнее время был достигнут большой прогресс в изучении TERT, так как появились структуры, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа, отдельных доменов TERT [52, 53], а также всей молекулы TERT, не включающий в себя TEN-домен [54]. Тщательные биохимические исследования в сочетании с направленным мутагенезом, которые проводились с учетом новых полученных данных о структуре, значительно расширили представления о механизме функционирования TERT [39, 55]. Удалось закристаллизовать каталитическую субъединицу красного мучного жука *Tribolium castaneum*, геном которого был недавно секвенирован [56]. TERT *T. castaneum* не содержит TEN-домена. Остальные домены (TRBD, RT, STE) образуют кольцо. Мотивы, вовлеченные в связывание субстрата и катализ, расположены внутри кольца. В кольце могут располагаться 7–8 пар оснований РНК–ДНК дуплекса. Вся структура имеет много общего со структурами ретровирусных обратных транскриптаз, вирусных РНК-полимераз и ДНК-полимераз В-семейства [54].

Различия в структуре различных TERT касаются, в основном, N- и C-концевых участков. Эти сведения представляются особенно интересными, так как в концевых районах не наблюдается значительной консервативности последовательностей TERT у различных организмов.

Рассмотрим известные структурные аспекты и функции доменов TERT.

Обратно-транскриптный доме (RT). В соответствии с принадлежностью к обратным транскриптазам TERT имеют в своей структуре 7 консервативных мотивов в этом домене, характерных для обратных транскриптаз. Отличительной особенностью теломераз является большой участок вставки между мотивами А и В – IFD. Если следовать аналогии рассмотрения полимераз в виде «правой руки», то эти два мотива окажутся расположенными в доменах «ладонь» и «пальцы». IFD-участок получил свое название, так как оказался вставкой в домене «пальцы» – Insertion in Fingers Domain [56]. Принадлежность TERT к обратным транскриптазам была подтверждена в многочисленных работах [32, 57, 58]. При этом были найдены консервативные аминокислотные остатки, ответственные за катализ – три остатка аспарагиновой кислоты, расположенные в мотивах А и С [58].

RT-домен в структуре TERT *T. castaneum* представляет собой два субдомена («ладонь» и «пальцы»), построенных из β -листов и α -спиралей, что характерно для ретровирусных обратных транскриптаз, вирусных РНК-полимераз и ДНК-полимераз В-семейства. Домен полимераз «большой палец» соответствует в структуре STE-домену.

Сравнение структуры TERT *T. castaneum* со структурой обратной транскриптазы ВИЧ (HIV) свидетельствовало об их большом сходстве, за исключением наличия мотива IFD в TERT. Этот мотив состоит из двух антипараллельных α -спиралей, играющих важную роль в структурном расположении двух других спиралей, возможно, вовлеченных в непосредственный контакт с РНК–ДНК дуплексом.

На основе сравнения структур TERT и обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и идентификации консервативных остатков в их структуре установлено вероятное расположение нуклеотид-связывающего кармана. Он находится на стыке субдоменов «ладонь» и «пальцы».

Функционально TERT различных организмов были проанализированы с использованием мутагенеза. В RT-домене Est2p (TERT дрожжей), помимо мутаций, нарушающих функцию фермента и сборку комплекса [47–51], обнаружены интересные мутации, вызывающие удлинение теломер [59]. Мутации в мотиве E вызывают увеличение процессивности в добавлении нуклеотидов [59]. Известны мутации в субдомене «пальцы» (мотивы 1 и 2), которые приводят к тому, что теломераза *in vivo* не ингибируется хеликазой Pif1p [60]. Вообще, известно, что активность хеликазы Pif1p приводит к удалению теломеры с теломеры. Это показано *in vitro* при добавлении Pif1p *in trans* в реакцию удлинения праймера теломеразой [61]. При этом процессивность теломеразы уменьшается. Аналогичное действие PIF1 в реакции *in vitro* на теломеразную активность показано и для теломеразы человека [62]. В дрожжах *in vivo* в штамме *pif1Δ* теломеры оказываются длиннее, чем в штамме дикого типа. Это удлинение зависит от теломеразы [61]. Суперэкспрессия Pif1p, наоборот, способствует укорочению теломер [63]. Обнаружена также такая интересная функция Pif1p, как ингибирование добавления теломер теломеразой к двухцепочечным разрывам [64]. Мутации в Est2p, нарушающие действие Pif1p *in vivo*, свидетельствуют о взаимодействии этих белков, возможно, косвенном [60].

TEN-домен. Взаимодействие TERT с ДНК-субстратом. Еще до кристаллизации TEN-домена TERT теломеразы *Tetrahymena thermophila* существовали доказательства того, что TEN-домен в TERT дрожжей и человека представляет собой обособленный структурный домен [49, 65]. Необходимые для функционирования теломеразы *in vitro* и *in vivo* N-концевые домены не обнаруживают сходства с какими-либо участками в других белках, поэтому трудно представить возможную структуру этого участка на основе гомологии, исходя лишь из последовательности аминокислот.

Недавно был закристаллизован TEN-домен TERT *T. thermophila* [52]. Оказалось, что он представляет собой новый структурный домен. В найденной структуре идентифицированы консервативные а. о. и доказана их функциональная значимость. Большинство этих остатков группируется в бороздке на поверхности домена. Эти остатки необходимы для каталитической активности теломеразы, некоторые из них участвуют в специфическом взаимодействии с одноцепочечным участком ДНК – субстратом для удлинения теломеразой. Положительно заряженные остатки на С-конце домена вовлечены в неспецифическое взаимодействие с РНК. Особенности всего TEN-домена являются взаимодействие с одноцепочечной ДНК, а также способность связывать РНК, что необходимо для функционирования теломеразы.

Рассмотрим подробнее, что известно о взаимодействии TERT с ДНК-субстратом. Теломераза взаимодействует с субстратом не только в месте отжига его 3'-конца на матричном участке TER, но и с его 5'-концом, в так называемом «якорном сайте». Предполагается также, что 3'-конец праймера непосредственно взаимодействует с TERT. В теломеразах человека [66], дрожжей [67] и простейших [27] выделяют дальний якорный сайт (~16–21 н.о. от 3'-конца праймера, находящегося в каталитическом сайте) и ближний якорный сайт, расположенный ближе к 3'-концу праймера (~4–14 н.о. от 3'-конца). Целый ряд фактов указывает на то, что якорный сайт расположен в TEN-домене. Прежде всего, это подтверждено с помощью метода химических шшивок [52, 68], а также с помощью мутагенеза [52, 66].

Теломераза дрожжей обладает повышенной эффективностью удлинения коротких праймеров (~ 9 н.) и праймеров с «мутациями» (нетеломерной последовательностью) в области ближнего якорного сайта [67]. Это обусловлено тем, что при диссоциации от праймера теломераза освобождается из устойчивого комплекса с ним и снова становится активной и способной к удлинению нового праймера. При пониженной концентрации праймера подобный эффект практически исчезает.

Теломераза *T. thermophila* обладает повышенной способностью удлинять короткие праймеры [69]. По-видимому, как и теломераза дрожжей *S. cerevisiae*, она легко отделяется от коротких субстратов после удлинения, и поэтому за единицу времени способна удлинить больше молекул праймера в условиях его многократного избытка [68]. Подобные эффекты влияния длины праймера на эффективность его удлинения обнаружены и для теломеразы человека [66].

Вклад ближнего и дальнего якорных сайтов во взаимодействие процессивных теломераз простейших и человека и неprocessивной теломеразы дрожжей с праймером различен. Установлено, что дальний якорный сайт теломеразы дрожжей лишь незначительно влияет на связывание праймера. Так, теломераза дрожжей [67], в отличие от теломеразы человека [70], практически не удлиняет праймеры с достаточно протяженной (8–15 н.о.) нетеломерной последовательностью на 3'-конце и теломерной на 5'-конце (15 н.о.). О функциональной роли и локализации дальнего якорного сайта сведений недостаточно. Возможно, что он формируется не за счет TERT, а за счет других компонентов комплекса. Эндогенная и реконструированная *in vitro* теломераза *T. thermophila* по-разному ведут себя в реакции *in vitro*. Оказалось, что у эндогенного фермента процессивность второго типа возрастает при увеличении длины праймера, но это нехарактерно для реконструированного фермента. Возможно, в функционировании эндогенной теломеразы *T. thermophila* принимает участие дальний якорный сайт, который удерживает праймер от диссоциации и стимулирует его процессивное удлинение [71]. Взаимодействие в дальнем якорном сайте (20–22 н. от 3'-конца праймера) теломеразы простейших вида *Euplotes aediculatus* было подтверждено непосредственно с помощью химических сшивок [72].

Имеются факты, свидетельствующие о том, что 3'-конец праймера непосредственно взаимодействует с TERT. Известно, что связывание праймера теломеразой человека зависит от положения его 3'-конца на РНК-матрице [73]. Теломераза *E. aediculatus* может удлинять химерные праймеры с нетеломерным 3'-концом. Химерные праймеры не могут образовать дуплекс с РНК-матрицей. Удлинение этих праймеров начинается с начала матричного участка [74]. Возможно, это происходит за счет взаимодействия 3'-конца праймера с TERT и его позиционирования относительно РНК-матрицы. Теломераза дрожжей неэффективно связывает и удлиняет праймеры, у которых два последних нуклеотида на 3'-конце нетеломерные (некомплементарные матрице) [36]. Возможно, в этом случае нарушается взаимодействие 3'-конца праймера с TERT.

Недавно, методом анализа единичных молекул с помощью флуоресценции, было непосредственно показано, что ДНК-субстрат в отсутствие TER образует стабильный комплекс с TERT человека [75].

Удаление TEN домена из TERT практически приводит к неактивной теломеразе [52, 76]. Ряд консервативных остатков в TEN-домене выполняют структурную роль. Большинство из них группируются с противоположных сторон поверхности домена. С одной стороны они

образуют глубокую канавку, другая же сторона состоит из α -спиралей, консервативные остатки которых имеют в основном кислый или гидрофобный характер.

Для теломеразы *T. thermophila* с помощью метода химических сшивок обнаружено взаимодействие ДНК-праймера с TEN-доменом [52, 55]. Это непрочное взаимодействие не фиксируется такими методами, как связывание на фильтрах и изменение подвижности под действием тока [55]. Показано, что TERT, не содержащая TEN-домена, взаимодействует с ДНК-праймером, причем эффективность этого взаимодействия соответствует одной третьей от эффективности взаимодействия полноразмерной TERT [55]. Это говорит о том, что TEN-домен не является единственным местом связывания ДНК-праймера. Аминокислотные остатки, ответственные за связывание, расположены в структуре домена близко друг к другу. Они группируются в окрестности бороздки на одной из сторон поверхности домена. Получены интересные данные, свидетельствующие о том, что функция TEN-домена не сводится только к связыванию ДНК-праймера. Обнаружена мутация, которая не влияет на связывание праймера, но влияет на активность фермента [55]. Был обнаружен контакт ДНК-праймера с расположенным на периферии TEN-домена Trp187. Оказалось, что этот контакт детектировался при любом из трех положений 3'-конца праймера на матрице (в начале матричного участка, в середине и ближе к его 5'-концу). Учитывая, что праймер не может растягиваться при удлинении, а активный сайт фермента остается в одном и том же месте, этот результат можно объяснить, лишь приняв, что за счет подвижности TEN-домена изменяется положение этого домена по отношению к активному сайту [55]. Особенно интересны эти данные в связи с отсутствием структуры полноразмерной TERT, включающей в себя TEN-домен. Учитывая предполагаемую длину и геометрию РНК–ДНК дуплекса в активном сайте, можно заключить, что расстояние между Trp187 и остатками Asp в активном центре изменяется от 17 до 27 Å в зависимости от положения 3'-конца праймера на матричном участке [55]. Основываясь на данных о структуре этого домена, предполагают, что подвижность TEN-домена достигается за счет гибкости его С-конца [52]. Благодаря такой подвижности РНК–ДНК дуплекс может перемещаться в активном центре при удлинении праймера. Все предполагаемые варианты взаимодействия праймера с теломеразой показаны на рис. 4.

Несмотря на то, что остаток Trp187 TERT *T. thermophila* непосредственно взаимодействует с ДНК праймером, он не является необходимым для проявления каталитической активности фермента [55].

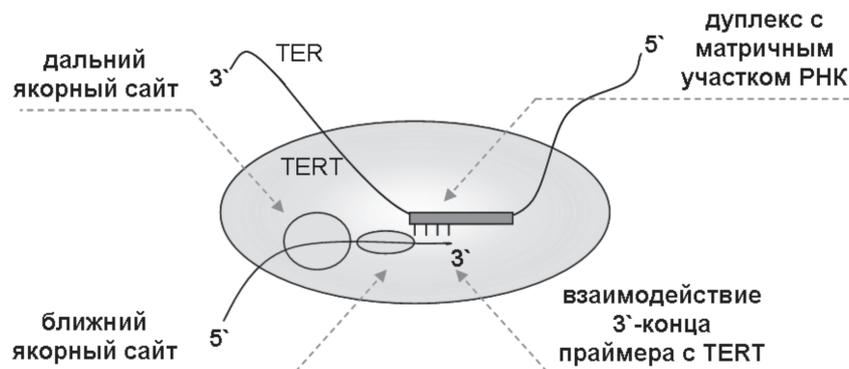


Рис. 4. Взаимодействия праймера с теломеразой

Ухудшение взаимодействия с праймером обнаруживается при мутации других аминокислотных остатков, расположенных на расстоянии от Trp187 [55], что влияет на активность теломеразы. Предполагают, что в связывании ДНК-праймера принимают участие целый ряд аминокислотных остатков. Все они расположены в структуре на поверхности TEN-домена в районе бороздки, что подтверждается с помощью мутагенеза и анализа структуры этого домена [52].

TEN-домен способен к неспецифическому взаимодействию с РНК [77, 78]. Высказано предположение [52], что неспецифическое взаимодействие с РНК, которое демонстрирует TEN-домен, превращается в общей структуре фермента в специфическое.

На основе предложенных структур, гомологии, расчетов, учитывающих электростатические взаимодействия, была построена структура TEN-домена дрожжей, в которой определено положение консервативных остатков, для которых подтверждено участие в формировании якорного сайта теломеразы дрожжей [39].

На основе структуры TEN-домена *T. thermophila* [52] был направленно создан, а затем проанализирован ряд мутаций в TERT, предположительно влияющих на способность теломеразы взаимодействовать с ДНК в якорном сайте [79]. При этом удалось обнаружить, что одна из замен (L14A), приводя к потере ферментом процессивности по второму типу, не оказывала влияния на его взаимодействие с праймером и добавление нуклеотидов до конца матричного участка. Замена соседнего с L14A остатка приводила к снижению процессивности на 50%. Недавно была предложена модель, объясняющая роль якорного сайта и конкретно найденных остатков в процессивности [79]. Суть ее состоит в том, что процессивность обеспечивается за счет взаимодействия TEN-домена с 5'-концом праймера и каталитическим доменом

во время удлинения. Это взаимодействие нарушается в тот момент, когда происходит транслокация, а затем оно снова возникает. Предполагается, что L14A принимает участие в этом процессе.

В TEN-домене Est2p дрожжей также обнаружены мутации, приводящие к удлинению теломер по сравнению со штаммом дикого типа [80]. Эти мутации не влияют на ферментативные свойства теломеразы *in vitro*. Единственный участник процесса удлинения теломеразой теломер, необходимый для того, чтобы теломеры были длиннее – это Tel1p. Предполагают, что N-концевой домен Est2p каким-то образом взаимодействует с Tel1p при удлинении теломер теломеразой [80]. Среди мутаций в TEN-домене Est2p обнаружены также такие, которые приводят к изменению ассоциации теломерного белка Rap1p с двухцепочечной теломерной ДНК [81]. Механизм этого влияния пока не ясен.

TRBD-домен. TERT отличается от других обратных транскриптаз прежде всего способностью использовать внутреннюю РНК-матрицу при добавлении теломерных повторов. В теломеразе человека TEN-домен (RID1 по другой классификации) взаимодействует с псевдоузлом TER, а TRBD-домен (RID2 по другой классификации) – со шпилькой Р6.1 домена CR4-CR5. Именно последнее взаимодействие критично для сборки фермента [82].

Установлена структура изолированного домена TRBD *T. thermophila* [53]. РНК-связывающий домен TRBD содержит в своей структуре, в основном, спиральные мотивы. Эта структура уникальна. Мотив QFP не участвует в связывании РНК, а выполняет структурную функцию, в то время как тогда как в связывании РНК непосредственно участвуют консервативные мотивы CP и T. Консервативные а. о. расположены таким образом, что на поверхности образуется как бы 2 кармана. Один из них узкий, ограниченный гидрофобными остатками и специфичный для связывания одноцепочечной РНК (Т-карман); второй более широкий и может связывать РНК-дуплекс (Т-CP карман) [53]. Предполагают, что в качестве двухцепочечной РНК TRBD-домен взаимодействует со спиралью I в структуре TER *T. thermophila*, а в качестве одноцепочечной – с 5'-граничным элементом TER *T. thermophila*.

Детальная картина положения аминокислотных остатков объясняет эффекты описанных мутаций в TRBD домене TERT [53]. Оба РНК-связывающих кармана охватывают по периментру всю поверхность домена.

Известно, что кроме TRBD-домена, в связывании TER, а именно 5'-граничного элемента, участвует мотив CP2, на границе доменов

TEN и TRBD [83, 84]. Каким образом регулируется связывание TRBD-домена и мотива CP2, а также функциональная значимость взаимодействия 5'-граничного элемента с мотивом CP2 не ясно.

На основе структуры TRBD-домена *T. thermophila* трудно делать выводы о том, как в теломеразах дрожжей и человека реализуются взаимодействия, необходимые для сборки и активности фермента. Дело в том, что элементы РНК, взаимодействующие с TERT, отличаются у разных организмов, хотя различные TERT проявляют между собой гомологию. Мы вернемся к этой проблеме в разделе, посвященном TER.

Среди белков, взаимодействующих с компонентами теломеразного комплекса, обнаружен интересный ядрышковый белок PinX1p, который конкурирует с TLC1 РНК (TER дрожжей *S. cerevisiae*) за взаимодействие с Est2p (TERT дрожжей *S. cerevisiae*) [85]. Гомолог PinX1p дрожжей обнаружен и у человека – это белок PinX1 [86, 87]. Этот белок является отрицательным регулятором теломеразы и взаимодействует с hTERT. Возможно, TERT взаимодействует с PinX1 с помощью того же домена, что и с TER, то есть домена TRBD. Роль взаимодействия TERT с PinX1 до сих пор не ясна. Предполагают, что таким образом TERT, несвязанная с TER, «хранится» в неактивном состоянии [85].

СТЕ-домен. В структуре TERT *T. castaneum* СТЕ-домен по отношению к остальным доменам расположен определенным образом и представляет собой так называемый «большой палец», если следовать общепринятой классификации доменов полимераз. Структура этого домена не похожа на структуры соответствующих доменов обратных транскриптаз. Показано, что СТЕ-домен TERT представляет собой новый структурный домен [54]. В структуре СТЕ-домен пространственно сближен с TRBD-доменом. Такая организация доменов TERT приводит к образованию центрального «отверстия», достаточного по ширине для аккомодации двухцепочечных нуклеиновых кислот длиной 7–8 оснований, что хорошо согласуется с экспериментальными данными о длине дуплекса в активном центре теломеразы [88]. Джиллис и соавт. смоделировали положение РНК–ДНК дуплекса в полученной структуре TERT. Согласно этой модели одна из спиралей СТЕ-домена взаимодействует с малой бороздкой РНК–ДНК дуплекса. Справедливость полученной модели подтверждают экспериментальные факты, полученные ранее на основе мутагенеза [89, 90].

Ранее предполагалось, что СТЕ-домен не важен для функционирования теломеразы дрожжей *in vivo* [51]. Однако более поздние сведения говорят о важности этого домена для стабильности белка Est2p

и эффективности удлинения ДНК-субстрата [59, 89]. В теломеразе человека мутации в STE-доме приводят к нарушению функционирования теломеразы, сходному с некоторыми мутациями в TEN-доме [91, 92].

Нуклеазная активность теломеразы. Теломеразы проявляют нуклеазную активность по отношению к олигонуклеотидным субстратам. Эндонуклеазная активность выявлена в теломеразной фракции дрожжей, подвергнутой многостадийной очистке с использованием различных видов аффинной хроматографии [41]. Нуклеазной активностью обладают также реконструированные *in vitro* теломеразы человека [43, 44] и простейших [93]. Нуклеазная активность теломеразы дрожжей зависит от концентрации нуклеотидов [41]. Однако отвечающий за нуклеазную активность домен теломеразы не идентифицирован.

Теломераза с наибольшей вероятностью вносит разрыв на границе спаренных и неспаренных оснований праймера и матричного участка TER [41, 43]. Теломераза человека даже полностью может расщеплять теломерный олигонуклеотид в зависимости от его положения на матрице при отжиге [43]. Следует отметить, что если в предпочтительные места разрезания ввести негидролизующие межнуклеотидные связи, то фермент способен расщеплять ДНК-субстрат в других местах [41, 44]. Химерные праймеры могут быть разрушены и относительно далеко от 3'-конца – на границе теломерной и нетеломерной областей [41, 44]. Оставшиеся теломерные концы затем удлиняются ферментом. Как уже упоминалось выше, теломераза дрожжей в отличие от теломеразы человека не способна удлинять праймеры с достаточно протяженной 3'-концевой нетеломерной последовательностью. Такие праймеры служат плохими субстратами и для нуклеазной активности. Возможно, в теломеразе человека во взаимодействии с подобными праймерами вовлечен дальний якорный сайт [44].

Трансферазная активность. Было показано, что в присутствии Mn^{2+} теломераза дрожжей и человека может работать как терминальная трансфераза, то есть, способна присоединять нуклеотиды независимо от матрицы [94]. Даже в таком необычном качестве теломераза отдает предпочтение GT-богатым, теломер-подобным с 5'-конца субстратам. Явление терминально-трансферазной активности объясняет ряд физиологических процессов. Известно, например, что суперэкспрессия теломеразной обратной транскриптазы млекопитающих провоцирует преждевременное старение клеток и появление рака, что не может быть объяснено влиянием белка на длину теломера. Одним из возможных объяснений этого явления может служить

предположение о том, что суперэкспрессия TERT выявляет обычно скрытую терминально-трансферазную активность белка и, как следствие, оказывает губительное воздействие на физиологию клетки. Неизвестно, является ли внутриклеточная концентрация Mn^{2+} достаточной для такого преобразования теломеразы в нормальных или патологических условиях. С другой стороны, возможно, что еще не идентифицированы небольшие молекулы, которые могли бы приводить к такому же результату [94].

Защитные функции теломеразы. В ряде работ было обнаружено интересное явление. Мутанты компонентов корового фермента теломеразы дрожжей и человека влияли на рост клеток, их фенотип, независимо от эффекта на длину теломер [38, 95]. Нобелевский лауреат 2009 года Элизабет Блэкберн предложила следующее объяснение наблюдаемым явлениям: теломераза, помимо удлинения концов теломер, проявляет защитные функции на теломере [96]. К настоящему времени появилось уже довольно много работ, свидетельствующих о том, что не столько укорочение теломер приводит к сенесценсу, сколько нарушение их структуры, а, следовательно, защитной функции. Нарушение структуры теломер сопровождается появлением G-богатых выступающих концов, появление которых говорит о нарушении защитной функции теломеры и о дегградации C-богатой цепи [97, 98]. Фенотип G-богатых выступающих концов наблюдается при нарушении функционирования защитных теломерных белков (Cdc13p, Ku70/Ku80) [98–100].

Для дрожжей *Candida albicans* было показано, что удаление генов EST2 (дрожжи *C. albicans* – диплоидные) приводит не только к укорочению теломер, но и к увеличению количества G-богатых выступающих концов теломер [101]. В противоположность, делеции генов EST1 и EST3 *C. albicans*, гомологичных генам *S. cerevisiae*, приводят к укорочению теломер, но не к нарушению их структуры и появлению G-богатых выступающих концов [101].

Защитные функции теломеразы *C. albicans* были подтверждены также в опытах, показавших, что каталитически не активная TERT может ингибировать накопление G-богатых выступающих концов, причем оказалось, что в защитной функции теломеразы *C. albicans* принимает участие не только TERT, но и TER [102]. Механизм этого процесса пока не выяснен.

Возможное объяснение того, что, в отличие от *C. albicans*, удаление у *S. cerevisiae* генов, кодирующих TER и TERT, не приводит к нарушению структуры теломер, заключается в том, что эти дрожжи очень быстро переходят к стадии сенесценса либо у них существуют какие-то альтернативные механизмы защиты структуры теломер [102].

Активность теломеразы, независимая от каталитической, также наблюдалась в клетках мышей, из которых была удалена TERT. При этом была отмечена стимуляция TERT пролиферации клеток [103]. Недавно этот факт получил объяснение. Оказалось, что TERT участвует в транскрипции генов «Wnt- β -catenin» сигнального пути, который стимулирует пролиферацию эмбриональных и стволовых клеток [104]. Такая функция TERT представляет собой, по сути, координацию аппарата поддержания теломер в делящихся клетках с помощью теломеразы с экспрессией генов, необходимых для пролиферации.

Теломеразная РНК (TER)

Вторичная структура и ее отдельные элементы. У различных организмов (простейшие, дрожжи, позвоночные) TER значительно отличаются по размеру и последовательности. Процессированная зрелая TER дрожжей *S. cerevisiae* (TLC1 РНК) состоит из 1167 н.о., а непроцессированная – примерно из 1300 н.о. [105, 106]. TER простейших и млекопитающих заметно короче – около 150 н.о. [107] и 450 н.о. [108], соответственно. Несмотря на различия в размере РНК и последовательности н.о., общая функция TER заставляет исследователей искать у них общие структурные элементы. С помощью филогенетического анализа были установлены вторичные структуры TER для всех перечисленных выше типов организмов: простейшие [107] и позвоночные [108], а также дрожжи *S. cerevisiae* [105, 106, 109, 110].

В дополнение к матричному участку TER содержит элементы вторичной структуры, необходимые для каталитических функций, процессивности по типу I и II, а также элементы, необходимые для созревания, стабильности теломеразы и локализации TER.

Все структуры содержат так называемый центральный домен, включающий в себя псевдоузел, матричный участок (template), 5'-граничный элемент (у простейших TBE – template boundary element). TER простейших содержит также элемент TRE (template recognition element) – элемент узнавания начала матричного участка каталитической субъединицы TERT. Все TER также содержат участок, связывающий белки, ответственные за созревание и стабильность TER. Эти элементы отличаются, так как отличаются и эти белки, и пути созревания TER.

TER дрожжей отличается от TER простейших и человека своим большим размером, установлено также, что около 50% структуры не связано с ее активностью *in vivo*, и, самое главное, в TER дрожжей не найден элемент, который присутствует в TER простейших и человека, – так называемый транс-активирующий домен. Большой

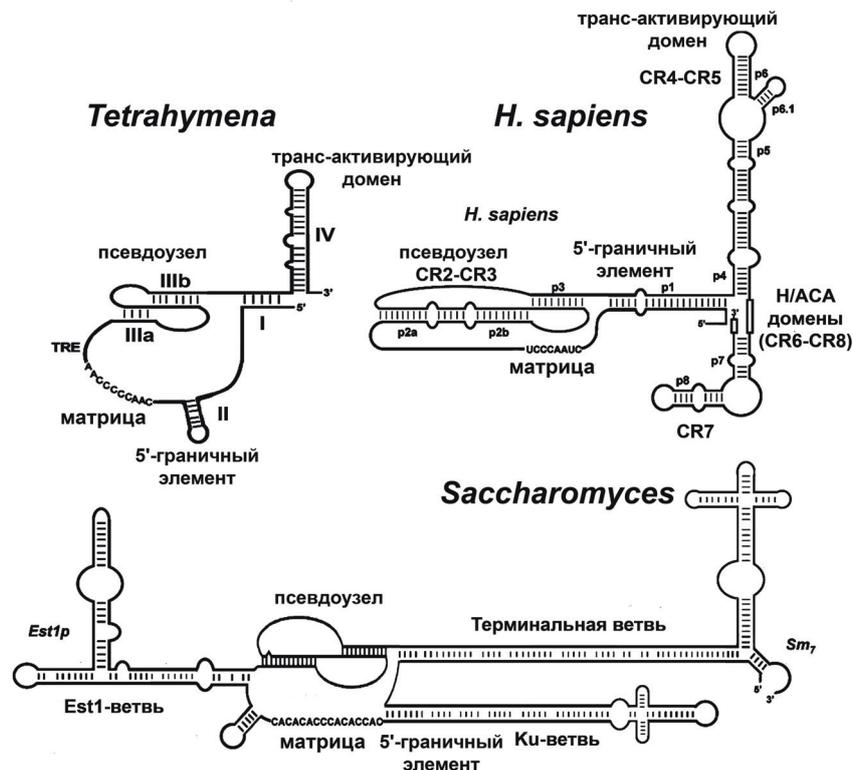


Рис. 5. Вторичные структуры TER различных организмов: простейших *Tetrahymena* [122], млекопитающих, а также и человека [123], и дрожжей *Saccharomyces* [120, 121].

размер и высокая степень эволюционного разнообразия TLC1 РНК долгое время затрудняли определение ее пространственной структуры. Расшифровки нуклеотидных последовательностей геномов дрожжей, наиболее близких *S. cerevisiae*, открыло дорогу работам по определению вторичной структуры TLC1 РНК на основе филогенетического анализа [105, 106, 109]. Оказалось, что при столь большом эволюционном разнообразии всей последовательности, для функционирования теломеразы *in vivo* важно меньше половины нуклеотидов TLC1 РНК (около 500 н.о. из 1200–1300 н.о.) [111].

Вторичные структуры теломеразных РНК из различных организмов представлены на рисунке 5: простейших *Tetrahymena* [107], дрожжей *Saccharomyces* [105, 106], млекопитающих, а также и человека [108].

Структурные элементы TER, ответственные за катализ и связывание TERT. Все TER содержат элементы, взаимодействующие с TERT. Вначале рассмотрим элементы, расположенные в центральном домене. Большинство их являются общими для TER различных организмов.

TER не только служит матрицей для катализа, но и участвует в нем. В теломеразах млекопитающих и простейших TER вносит вклад в процессивность теломеразы [29, 112]. Показано, что нуклеотидные остатки в структуре псевдоузла TLC1 РНК также вносят свой вклад, принимая непосредственное участие в процессе катализа.

Матричный участок. Взаимодействие TER с ДНК-праймером. Обычно длина матричного участка TER примерно равна длине полутора копий теломерного повтора, но может быть длиннее или короче [26]. Сам матричный участок в TER и его границы определяет вторичная структура TER. На 3'-конце этого участка находится участок отжига праймера, а на 5'-конце – граничный элемент, отделяющий матричный участок от остальной части молекулы. У TER *T. thermophila* описан также элемент TRE [113], который служит для узнавания матричного участка TER каталитической субъединицей TERT.

Матричный участок играет важную роль в катализе. Некоторые мутации в нем могут приводить к значительному изменению активности фермента *in vivo* и *in vitro*. Тринуклеотидные замены в различных местах матричного участка TLC1 РНК снижают активность фермента, иногда вплоть до полной ее потери. Обнаружена также мутация, вызывающая «проскальзывание» по матрице при удлинении праймера [38]. Точечные замены в матричном участке TER *T. thermophila* приводят к неточному встраиванию нуклеотидов и к ранней диссоциации праймера.

Следует отметить, что в некоторых случаях мутации в матричном участке TER не влияют на активность фермента. Так, при замене всего матричного участка TER *T. thermophila* активность теломеразы сохраняется, но теряется ее процессивность *in vitro* [114]. Предполагают, что нуклеотид-специфические взаимодействия TER-TERT в области матрицы не обязательны для способности теломеразы *T. thermophila* удлинять праймер в пределах одного теломерного повтора. Если же вместо РНК-матрицы использовать ДНК-матрицу, то можно получить не процессивную теломеразу с очень низкой эффективностью удлинения праймера [115].

При замене матричного участка в TLC1 РНК на матричный участок TER человека в теломерах обнаруживаются гомогенные повторы, соответствующие новой матрице. Следовательно, можно предполагать,

что за гетерогенность теломерных повторов в хромосомах дрожжей отвечает последовательность нуклеотидов матрицы в TLC1 РНК, на которой возможны различные варианты отжига праймера при связывании его для удлинения [30].

Интересна роль последовательности нуклеотидов в участке отжига теломерного праймера в проявлении ферментом процессивности [32, 111]. Теломераза человека, у которой этот участок длиннее (5 н.), чем у теломеразы мыши (2 н.), процессивна по второму типу *in vitro*, в отличие от неprocessивной теломеразы мыши. Это различие объясняют эффективностью отжига праймера при транслокации: последовательность в участке отжига праймера должна совпадать с 5'-концевой последовательностью матричного участка [29]. Однако процессивность определяется не только участком отжига праймера. Так, например, в теломеразе дрожжей этот участок достаточно протяженный (5 н.), но фермент не проявляет процессивности по второму типу *in vitro* [29].

Кажется вполне вероятным, что длина дуплексного участка между матрицей и праймером возрастает по мере присоединения нуклеотидов к праймеру, однако это предположение опровергается рядом работ. У теломераз *E. aedicularis* и человека [73] отсутствует корреляция между числом пар оснований дуплекса, который праймер потенциально способен образовать с матричным участком, и эффективностью его связывания ферментом. С помощью метода химического тестирования матричного участка TLC1 РНК показано, что в теломеразе дрожжей при удлинении праймера число спаренных оснований между субстратом и матричным участком РНК остается постоянным и равным семи [88]. При этом, по ходу процесса удлинения новые пары образуются с 3'-конца праймера, а с 5'-конца происходит расплетание цепей.

Для теломеразы человека установлена зависимость взаимодействия праймера с теломеразой от его положения на матрице при отжиге [73]. Предполагают, что это связано с взаимодействием 3'-конца праймера с TERT.

5'-граничный элемент. Этот элемент в структуре TERT тормозит удлинение праймера дальше определенного района матричного участка. Он представляет собой спираль, ограничивающую одноцепочечный участок (теломеразы дрожжей [109, 116] и человека [132]) или специфическую последовательность (теломеразы простейших [84]).

Сходны ли механизмы действия 5'-граничных элементов TERT в различных организмах? У простейших этот элемент представляет собой специфическую нуклеотидную последовательность, эффективно

связывающую TERT, у дрожжей и млекопитающих – это стебель и шпилька во вторичной структуре РНК [116, 117]. 5'-граничный элемент дрожжей связывает TERT и непосредственно примыкает к матричному участку. Возможно, у простейших, дрожжей и млекопитающих механизм действия 5'-граничного элемента различен. Эта структура ограничивает движение матричного участка TER в активном центре теломеразы простейших в результате РНК-белковых взаимодействий. Такое движение матричного участка необходимо при удлинении праймера, так как при добавлении каждого нуклеотида положение матрицы относительно активного центра должно изменяться. В теломеразе человека движение матричного участка TER ограничено за счет РНК-РНК взаимодействий во вторичной структуре. Предполагается, что в теломеразе дрожжей 5'-граничный элемент ограничивает не только движение РНК, но и доступность одноцепочечного участка, так как стебель шпильки 5'-граничного элемента в TER примыкает непосредственно к матрице.

Недавно была обнаружена и охарактеризована TER дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* – TER1 [118, 119]. Эта РНК длиной 1213 н.о., независимо взаимодействует с SpEst1 и SpEst2 (ортологи Est1p и Est2p *S. cerevisiae*). Был проанализирован 5'-граничный элемент этой РНК. Как и для теломеразы *S. cerevisiae* важной оказалась не нуклеотидная последовательность этого участка, а образование им двухцепочечной спирали РНК, механически препятствующей дальнейшему удлинению праймера. Однако, оказалось, что часть спаренного района в спирали включает в себя участок матрицы, то есть 5'-граничный элемент, представляющий собой двухспиральную РНК, который при удлинении должен частично расплетаться. С этой особенностью связывают гетерогенность теломерных повторов некоторых дрожжей.

Псевдоузел в структуре TER. Взаимодействие TER с TERT. Псевдоузел во вторичной структуре TER различных организмов расположен одинаково по отношению к матричному участку [45]. Выяснено, что для функционирования теломераз важна не только вторичная структура TER, но и нуклеотидная последовательность высококонсервативных участков в псевдоузле, в том числе, и одноцепочечных [45, 109, 120].

В последнее время появилось несколько работ, в которых сообщалось об установлении третичной структуры некоторых элементов TER простейших и человека.

В центральном домене TER человека спирали P2b и P3, а также петли J2b/3 и J2a/3 образуют псевдоузел. Третичная структура псевдо-

узла в центральном домене TERC и ее соответствие экспериментальным данным, полученным на основе мутагенеза, впервые были непосредственно установлены в 2005 году для теломеразы человека [121]. Структурный и мутационный анализы свидетельствовали о наличии тройной спирали в этой области. Теломеразная активность находится в строгой корреляции со стабильностью тройной спирали. При этом, если одни данные свидетельствуют в пользу динамичной структуры псевдоузла [122], то другие – говорят о ее статичности [120].

Недавно и для TLC1 РНК дрожжей *S. cerevisiae* было показано образование тройной спирали в центральном домене [110]. Нарушение этой структуры приводило к уменьшению теломеразной активности *in vitro* и укорочению теломер *in vivo*. При этом связывание с Est2p не изменялось. Было высказано предположение, получившее экспериментальное подтверждение, что тройная спираль важна не для связывания Est2p, а участвует в катализе за счет ориентации спирали матрица-праймер с помощью 2'-ОН групп. Было показано подобное участие в катализе псевдоузла в теломеразной РНК человека. Роль структуры тройной спирали не ограничивается только катализом, гораздо более важную функцию она выполняет в качестве структуры, сближающей дуплекс матричного участка и праймера с активным центром TERC.

В теломеразной РНК дрожжей *S. cerevisiae* и *K. lactis* псевдоузел участвует во взаимодействии с каталитической белковой субъединицей. В TERC млекопитающих для связывания TERC и функционирования теломеразы *in vivo* и *in vitro* нужны не только псевдоузел, но и другая консервативная структура в удаленном от псевдоузла участке – шпилька Р6.1 высококонсервативного домена CR4-CR5. Аналогичной структуры в TLC1 РНК не найдено. Домен CR4-CR5 вместе со шпилькой Р6.1 относят к так называемым «транс-активирующим доменам».

В третичной структуре домена CR4-CR5 было установлено расположение спиралей Р6а и Р6b, а также петли J6 между ними [123]. Важнейшая для функционирования теломеразы шпилька Р6.1 содержит на конце петли три нуклеотида, остатки оснований которых экспонированы в раствор. Химическое тестирование их структуры *in vivo* показал, что они недоступны для модификации. Это позволяет предположить, что они вовлечены во взаимодействия с белком или с РНК.

В TERC млекопитающих [120, 124] и простейших псевдоузел во вторичной структуре необходим для процессивности при удлинении праймера, причем в случае теломеразы простейших, важен не только

псевдоузел, но и шпилька IV. Интересно, что замена псевдоузла в TERC человека на аналогичную структуру из теломеразы *T. thermophila* приводит к образованию непроективного *in vitro* фермента с низкой активностью. Предполагается, что такая замена нарушает взаимодействие удаленной шпильки Р6.1 со структурой псевдоузла, а, возможно, и с TERC.

С помощью ЯМР-спектроскопии коротких аналогов TERC простейших удалось определить структуру шпилек II и IV [125, 126]. В шпильке II для функционирования теломеразы и ограничения синтеза по матрице для связывания TERC необходимо самое основание шпильки, конец же шпильки не важен для активности. Шпилька IV необходима для взаимодействия с TERC, вспомогательным белком р65 и для проявления ферментом процессивности [112, 127, 128]. Шпильку IV относят к транс-активирующим доменам TERC; за счет неспаренного выпетливания GA она формирует сильно изогнутую структуру [125, 126].

Особенности функционирования TERC у различных организмов.

Для теломеразы простейших *T. thermophila* установлено, что со шпилькой IV и элементом TRE взаимодействует TEN-домен TERC, а с 5'-граничным элементом TBE – TRBD-домен TERC [126]. Сборке комплекса, а также изгибу шпильки IV в области выпетливания GA способствует белок р65. Эти данные приближают исследователей к разгадке механизма действия теломеразы, однако пока может быть предложена только модель собранной теломеразы. Псевдоузел TERC *T. thermophila*, консервативный среди различных TERC, не играет важной роли в связывании TERC с TERC.

Хотя для теломераз простейших и млекопитающих можно проследить аналогию в наличии удаленных элементов TERC, необходимых для взаимодействия с TERC, общность их функции не так очевидна. В отличие от простейших, у млекопитающих и человека псевдоузел TERC участвует во взаимодействии с TERC, причем он взаимодействует с TEN-доменом TERC, а с TRBD-доменом взаимодействует удаленный элемент CR4-CR5 [78]. В теломеразе простейших наблюдается обратная ситуация: TEN-домен взаимодействует с удаленной шпилькой IV, а TRBD-домен – с 5'-граничным элементом TBE центрального домена TERC.

Проблема принципиального различия между TERC млекопитающих и TERC дрожжей не решена до сих пор. Во многих работах пытаются найти аналогии и обнаружить общий механизм функционирования теломераз различных организмов [109, 129].

При изучении структуры ТЕР *K. lactis* было предложено рассматривать новый элемент в структурах теломеразных РНК – это место смыкания трех спиралей – TWJ (Three Way Junction) в терминальной ветви РНК [129]. Показано, что этот элемент важен для активности теломеразы – мутации в нем вызывают укорочение теломер. Некоторые мутации в этом участке, удаленном от матричного, приводят к потере теломеразой активности *in vitro*. Суперэкспрессия частично подавляет эффект мутаций в TWJ *in vivo*. Браун и сотр. [129] соотносят этот элемент в структуре с CR4-CR5 ТЕР млекопитающих. Как уже говорилось, теломеразные РНК дрожжей и высших эукариот отличаются между собой не только длиной, но и наличием в ТЕР млекопитающих участка прочного связывания TERT (CR4-CR5 с Р6.1 шпилькой), расположенного отдельно от центрального домена, который также связывает TERT. Возможно, такую аналогию можно провести, однако непосредственного взаимодействия элемента TWJ терминальной ветви с TERT не обнаружено.

Предложенные аналогии элементов в структуре теломеразной РНК дрожжей и млекопитающих опровергаются следующим фактом. Как уже упоминалось выше, в лаборатории Т. Чеха была получена РНК, называемая miniT – укороченная молекула TLC1 РНК (500 н.о.), которая функционировала *in vivo*, но теломеры оказывались укороченными [130]. Эта РНК вместе с Est2p была впервые использована для реконструкции теломеразы дрожжей *in vitro* [130]. Еще более короткая miniGoT также может быть использована для реконструкции функциональной теломеразы *in vitro*, при этом она фактически представлена исключительно центральным доменом TLC1 РНК. Для фермента млекопитающих было показано, что «минимальная» ТЕР, необходимая для реконструкции активной теломеразы *in vivo*, должна обязательно включать в себя помимо центрального домена еще и удаленный CR4-CR5 домен [120]. Эти данные свидетельствуют о том, что в теломеразной РНК дрожжей может вообще не быть аналога CR4-CR5 домена. Как же тогда объяснить тот факт, что каждая из этих теломераз активна, если их ТЕР заметно отличаются, а TERT, наоборот, достаточно гомологичны? Так как в реконструированной *in vitro* теломеразе теоретически никакие другие компоненты, кроме ТЕР и TERT не должны быть необходимыми для активности, то, возможно, стоит вместо поиска общих мотивов в РНК искать различия в белках. Также, возможно, что в активности теломераз, реконструированных *in vitro*, принимают участие компоненты лизата ретикулоцита кролика (RRL), в котором эта реконструкция проводится. Кроме того, стоит учитывать при рассмотрении механизма работы теломераз

неидентифицированные пока компоненты. К примеру, недавно были обнаружены новые компоненты, которые принимают участие в сборке фермента и ассоциируют с ним из лизата [131]. Ими оказались АТФазы pontin и reptin.

Элементы вторичной структуры TER, необходимые для ее созревания и стабилизации, а также сборки с TERT *in vivo*. Биогенез TER. Как уже говорилось выше, элементы вторичной структуры TER, взаимодействующие с белками, необходимыми для созревания, стабилизации и сборки с TERT, отличаются у разных организмов. Пути созревания и стабилизации TER также различны.

Первоначальный транскрипт TER простейших синтезируется РНК-полимеразой III и при этом не процессируется. У простейших *T. thermophila* TER взаимодействует с белком р65, входящим в состав теломеразы [128, 132, 133]. Белок р65 содержит N-концевой, La-мотив (мотив связывания РНК), RRM и C-концевой домены. Все они взаимодействуют с элементами стебель I/ стебель IV в TER. Белок р65 способствует взаимодействию TER и TERT, то есть сборке теломеразного комплекса, а также стабилизации TER. У других простейших *Euplotes aediculatus* TER также связывает белок, содержащий La-мотив, – р43. Показано, что при реконструкции комплекса *in vitro* белок р65 значительно стимулирует образование активной теломеразы [5, 128]. Белок р65 взаимодействует с консервативным выпетливанием GA в шпильке IV, способствуя ее изгибу.

У млекопитающих первоначальный транскрипт синтезируется РНК-полимеразой II, затем TER кэпируется на 5'-конце, модифицируется и процессируется на 3'-конце [134, 135]. Процессинг и стабильность TER зависят от H/ACA мотива, находящегося на 3'-конце молекулы. H/ACA мотив также входит в состав малых ядрышковых РНК, участвующих в посттранскрипционной модификации некодирующих РНК. С этим мотивом взаимодействуют четыре белка, необходимые для аккумуляции и стабильности РНК – dyskerin, NHP2, NOP10 и GAR1. Все эти белки входят в состав теломеразного комплекса [15, 136–138]. Нарушение созревания TER человека ассоциировано с таким генетическим заболеванием, как врожденный дискератоз. Также TER содержит мотив САВ, который ответствен за локализацию TER в тельцах Каяла [135].

TER дрожжей *S. cerevisiae* (TLC1 РНК) по многим параметрам похожа на малые ядерные РНК (мяРНК), участвующие в сплайсинге. Первичный транскрипт синтезируется РНК-полимеразой II, полиаденилируется, на 5'-конец добавляется TMG-кэп и далее процессируется в зрелую молекулу с удалением поли(А)-конца [139, 140].

Полиаденилированный предшественник TLC1 РНК составляет около 5–10% от общего количества TLC1 РНК [140, 141]. TLC1 РНК содержит уридин-богатый консенсусный мотив RAU4-6GR (R-пуриновое основание) мяРНК дрожжей, который взаимодействует с Sm-белками. Такой же мотив найден у некодирующих малых ядерных РНК дрожжей (snРНК). Мутация в участке связывания Sm-белков в TER или уменьшение количества одного из них (например Sm D1) приводит к резкому уменьшению количества TLC1 РНК и теломеразы. Показано, что Sm-белки входят в состав холофермента [139].

TLC1 РНК подвергается 3'-концевому процессингу [105, 106]. Обнаружено несколько различных форм этой РНК, которые различаются длиной 5'-концевой части. Показана возможность модификации основания C651 *in vivo*. Детали процесса биогенеза TLC1 РНК до конца не ясны, однако получены данные, свидетельствующие о том, что при биогенезе эта РНК может перемещаться между ядром и цитоплазмой [142, 143].

TER1 дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* имеет много общего с TLC1 РНК *S. cerevisiae* [118, 119]. Недавно был расшифрован процесс биогенеза у дрожжей *S. pombe*, оказалось, что для созревания TER1 необходим не полный сплайсинг, а только его первая стадия последующего лигирования экзонов [144]. Такой неполный сплайсинг был описан впервые. Возможно, что подобный процесс ответствен и за созревание других теломеразных РНК.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ ТЕЛОМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА

В теломеразном комплексе различных организмов идентифицированы дополнительные белки, необходимые для его функционирования. К примеру, теломеразный комплекс *S. cerevisiae* состоит не только из каталитической субъединицы (Est2p) и молекулы РНК (TLC1), являющейся матрицей для обратной транскрипции, но и содержит дополнительные субъединицы – Est1p и Est3p [145]. Они не требуются для работы теломеразы *in vitro*, однако необходимы для ее функционирования *in vivo* [146].

В первичной структуре Est1p имеется потенциальный РНК-узнающий мотив RRM [147]. Этот белок, наряду с Est2p, образует контакт с теломеразной РНК вблизи матричного участка, что указывает на его участие в формировании активного центра фермента. Est1p может формировать стабильный TLC1-содержащий комплекс даже в отсутствие Est2p или Est3p. Установлено также, что Est1p взаимодействует с 3'-концевой областью теломерной ДНК [148]. Однако *in vivo* Est1p может связываться с теломерной ДНК только в комплексе с Cdc13p. Таким образом, Est1p является посредником, связывающим

теломерный комплекс с Cdc13p [149]. Est3p – постоянный компонент теломеразного комплекса и, более того, ассоциация Est3p с ферментом требует интактности каталитического центра. Взаимодействие Est3p с Cdc13p значительно увеличивает доступ теломеразы к теломере [150].

В человеческой теломеразе также были обнаружены дополнительные теломеразные компоненты помимо TERT и TER. Человеческий геном содержит три ортолога Est1, два из которых (Est1A, Est1B) кодируют белки, участвующие в регуляции теломеразы [150]. На данный момент ортологи Est3 не идентифицированы.

III. ТЕЛОМЕР-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

Белки, специфически связывающиеся с теломерной последовательностью и взаимодействующие с этими белками факторы, образуют динамичную рибонуклеопротеидную структуру. Эта структура функционирует как защитная, участвует в регуляции длины теломер, а также отвечает за молчание генов на теломерных и прителомерных участках. Кроме того, структуры теломер служат мишенями для ингибиторов, которые препятствуют связыванию теломеразы с теломерой [151, 152].

Теломерная ДНК дрожжей состоит из двуцепочечного участка длиной 250–350 п.о. с последовательностью $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ и короткого одноцепочечного выступающего конца с последовательностью TG_{1-3} . Теломерные повторы дрожжей $((TG)_{0-6}TGGGTGTG(G))_n$ [30]) гетерогенны в отличие от гомогенных повторов теломер млекопитающих $(TTAGGG)_n$ [153].

В дрожжах двухцепочечный участок теломер непосредственно связывает белок Rap1p [154], а одноцепочечный – Cdc13p [155]. Rap1p взаимодействует с комплексом Sir-белков (silent information regulators), которые ответственны за формирование гетерохроматина в субтеломерной области. Белок Rap1p также взаимодействует с теломерными белками Rif1p и Rif2p. Эти белки ассоциированы с теломерой на протяжении всего клеточного цикла и являются негативными регуляторами теломеразы [156].

С одноцепочечным 3'-выступающим концом взаимодействует белок Cdc13p. Белок Cdc13p – регулятор доступа теломеразы к теломере. Известно, что он может взаимодействовать с двумя различными белковыми комплексами, противоположным образом влияющие на способность теломеразы удлинять теломеры. Выше уже было сказано, что Cdc13p необходим для посадки теломеразы на теломеру. Эта его функция реализуется посредством взаимодействия с компонентом

теломеразы Est1p [61]. С другой стороны, Cdc13p взаимодействует с белковым комплексом Stn1p–Ten1p, который подавляет удлинение теломер теломеразой. Обнаружено сходство структур Rpa2p и Stn1p, а также сходство биохимических характеристик всего комплекса Cdc13p–Stn1p–Ten1p с комплексом белков RPA (Rpa1p–Rpa2p–Rpa3p, соответственно) [157]. Установлено, что гетеротример Cdc13p–Stn1p–Ten1p взаимодействует с комплексом ДНК-полимеразы- α , необходимой для синтеза комплементарной С-цепи в теломерной ДНК [158].

Гетеродимер Ku-белков связывается на границе одноцепочечного и двухцепочечного участков теломер. В поддержании длины теломер Ku-белки участвуют различными способами. Они защищают конец теломеры. За счет взаимодействия с Ku-белками TLC1 РНК холофермент теломеразы (Est2p и TLC1 РНК) оказывается связанным с теломерами в G1 фазе клеточного цикла [159].

У млекопитающих теломерная ДНК более плотно упакована в нуклеосомы, чем у других эукариот; некоторые из нуклеосом несут на себе маркеры гетерохроматина [160]. С двухцепочечной теломерной ДНК взаимодействуют белки TRF1 и TRF2, с одноцепочечным участком – белок POT1 и его партнер TPP1. Белок TRF2 связывает RAP1. Белки, связывающие одноцепочечную и двухцепочечную ДНК, взаимодействуют друг с другом через белок TIN2, который взаимодействует с TRF1 и TRF2, а также с белком TPP1. Вся эта структура на теломерах млекопитающих была названа «шелтерином» (от англ. shelter – убежище), так как она выполняет защитные функции [161].

Теломеры делящихся дрожжей *S. pombe* по своему устройству ближе к теломерам высших эукариот, чем теломеры *S. cerevisiae* [162]. Rap1p дрожжей *S. pombe* не связывает двухцепочечную теломерную ДНК напрямую, а взаимодействует с теломер-связывающим белком Taz1p, тогда как с одноцепочечным участком связан белок Pot1p. 3'-выступающий конец на теломерах ресничных простейших связывают белки ТЕВР α и ТЕВР β . Эти белки являются ортологами белков POT1 и TPP1, соответственно [162].

3'-выступающая G-богатая цепь на теломерах может образовывать сложные структуры – G-квадруплексы [163, 164]. Это находящиеся в стеклинг-конформации (уложенные параллельно) G-квартеты, то есть плоские структуры из четырех гуанинов, образующие хугстиновские пары и находящиеся в одной цепи ДНК. Образование таких структур на теломерах может представлять проблему для репликации ДНК и удлинения теломер теломеразой. Теломерная ДНК позвоночных может образовывать, помимо G-квадруплексов, сложную структуру

в виде петли. Т-петля образуется, когда 3'-одноцепочечный конец внедряется в двухцепочечную область, где вытесненная вторая цепь образует внутреннюю D-петлю [165, 166].

В отличие от дрожжевого белка Cdc13p, белок POT1 млекопитающих в зависимости от его положения относительно 3'-конца при связывании с ДНК может не только препятствовать, но и способствовать удлинению теломер теломеразой. Если POT1 не находится на самом конце ДНК, то он разрушает G-квадруплексы, и таким образом дает теломеразе возможность удлинять теломеры. [167].

Несмотря на различия в характерах белковых комплексов, связывающих теломерные концы, между теломерными комплексами различных организмов обнаружено также интересное сходство. TPP1 млекопитающих содержит OB-fold домен, похожий на домен белка простейших ТЕВРβ, а POT1 содержит другой OB-fold домен, похожий на домен белка простейших ТЕВРα, который работает в паре с ТЕВРβ. Так что можно говорить о сходстве комплексов ТЕВРα–ТЕВРβ простейших и POT1–TPP1 млекопитающих. Еще более интересным представляется недавно обнаруженное сходство OB-fold домена белка Est3p дрожжей *S. cerevisiae* и аналогичного домена у белка TPP1 [168]. На роль POT1, продолжая аналогию, можно предложить Est1p. Других аналогий в процессе привлечения теломеразы на теломеру между Est3p и TPP1 пока не обнаружено, но, несомненно, этот факт требует внимания и дает повод для дальнейшего поиска подобных аналогий.

Недавно был обнаружен интересный факт. Оказывается, в клетках дрожжей *S. cerevisiae* [169], человека [170] и мыши [171] полимеразы II транскрибируют теломерные повторы и образуются РНК-продукты, названные TERRA (Telomere Repeat-Containing RNA или теломерная РНК). TERRA транскрибируется с С-богатой цепи и ассоциирована с теломерным хроматином. Повышенное количество TERRA в клетках человека коррелирует с потерей теломер, в то время как в дрожжах это вызывает ингибирование теломеразы. Механизм функционирования TERRA, его ассоциации с теломерами и роль в онкогенезе пока не ясны (более подробно о TERRA см. в [172]).

В дрожжах теломеры собраны в кластеры и ассоциированы с ядерной оболочкой. Значение такой локализации до конца не выяснено, возможно, оно связано с репликацией теломер и существенно для правильной сборки этого сложного ДНК-белкового комплекса после репликации [172].

IV. ТЕСТИРОВАНИЕ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Знание структурных и функциональных особенностей теломеразы открывает дорогу для поиска ингибиторов и активаторов теломеразы. И, в первую очередь, встает вопрос: каким образом могут быть измерены снижение или повышение активности теломеразы? Это не простая задача. Характерной особенностью теломеразы является низкое число ее копий на клетку [173], а следовательно, и низкая активность, даже в опухолевых клетках, где теломераза активирована [174]. На первый взгляд, проще всего было бы прямо измерять влияние ингибиторов на активность выделенного фермента. Однако, такой прямой тест, подходящий для кинетических исследований, доступен немногим. Прямое измерение теломеразной активности основано на детекции продуктов работы теломеразы при удлинении олигонуклеотида с использованием $\alpha^{32}\text{P}$ -меченного дезоксирибонуклеозид-трифосфата как мономера [175–177]. В этом методе олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность теломеры, что позволяет ему служить хорошим субстратом для удлинения теломеразой. Суммарная радиоактивность присоединенной к этому олигонуклеотиду метки пропорциональна теломеразной активности. Реакционная смесь может быть проанализирована электрофоретически, что дает дополнительную информацию о процессивности фермента. Из-за неудобства, вызванного необходимостью использовать $\alpha^{32}\text{P}$ -меченные нуклеотиды с высокой удельной активностью, и из-за низкой чувствительности метода, он не получил широкого распространения. Существуют несколько других методов определения теломеразной активности, и кроме того, имеются коммерчески доступные наборы для измерения активности фермента. Эти методы основаны на усилении сигнала с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР была впервые применена Кимом и др. для усиления сигнала от продуктов деятельности теломеразы [178]. Такой метод получил название «ТРАП-тест». Используя сведения о низкой специфичности теломеразы к субстрату, авторы заменили олигонуклеотид с естественной теломерной последовательности субстратным праймером (TS) с нетеломерной последовательностью. Это позволило усилить сигнал в шаге ПЦР от теломераза-зависимого удлинения олигонуклеотидного субстрата, подавляя при этом ложно-положительное увеличение сигнала, например, за счет образования продуктов ПЦР из-за самоотжига праймеров. Этот метод не являясь количественным, тем не менее благодаря своей чувствительности и воспроизводимости получил самое широкое распространение [179]. В дальнейшем, на стадии амплификации сигнала, использовали ПЦР в реальном времени, что

позволило перейти к количественной оценке, создать протоколы, идентифицировать и характеризовать теломеразные ингибиторы [176, 177].

Используя методы измерения теломеразной активности на основе ПЦР для изучения теломеразных ингибиторов, нужно иметь в виду, что теломераза – специализированная ДНК-полимераза. Таким образом, существует шанс, что исследуемое вещество предполагаемого теломеразного ингибитора может также ингибировать процесс удлинения праймера, катализируемый ДНК-зависимой ДНК-полимеразой в ПЦР; поэтому необходимы дополнительные контроли.

Последующая характеристика теломеразных ингибиторов или активаторов, может включать измерение эффектов этих веществ на клеточных линиях опухоли. Для оценки действия препаратов на клеточную культуру, широко используются два метода, которые различаются только по продолжительности обработки клеточной культуры исследуемыми веществами. Так, краткосрочная (до двух суток) обработка позволяет проводить измерение теломеразной активности в экстракте, выделенном из обработанных таким образом клеток и оценить токсичность веществ. Долгосрочная обработка, приводящая к измеримому сокращению теломер, скорее указывает на прекращение каталитической деятельности теломеразы.

V. АКТИВАЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Основным ограничением использования низкомолекулярных соединений, напрямую взаимодействующих с ферментом теломеразой и усиливающих ее активность, является необходимость сохранения остаточной теломеразной активности в ткани, где потенциально может проявиться терапевтический эффект таких соединений. Возможной мишенью таких соединений являются стволовые клетки регенерируемых тканей, для которых характерна постоянная невысокая теломеразная активность. Другой мишенью могут быть лимфоциты, так же имеющие собственный низкий уровень теломеразной активности. Во время активации их роста, ферментативная активность теломеразы возрастает в основном за счет фосфорилирования TERT, вызывающего изменение локализации белка в клетке [180]. Со временем, эти клетки крови прогрессивно теряют свою способность усиливать теломеразную активность, что приводит к репликативному старению и к высоко дифференцированной популяции клеток [181]. Недавно этот процесс был рассмотрен детально [182]. Молекулы, увеличивающие теломеразную активность, могли бы восстановить

пролиферативную способность клеток крови, так же как и некоторые другие функции.

Одним из наиболее многообещающих активаторов теломеразы на настоящий момент являются разрабатываемые компанией Geron низкомолекулярные соединения TAT0001 и TAT0002. Компания анонсировала начало I/II фазы клинических испытаний этих веществ (<http://www.geron.com>).

TA-65L, теломеразный активатор выделенный из китайского растения *Astragalus*, был протестирован в пилотных клинических испытаниях и проявил способность усиливать иммунитет и сексуальную функцию, а так же улучшать состояние кожи (<http://www.tasciences.com>).

Вещества, непосредственно действующие на теломеры или теломеразу пока редки, но существуют несколько агентов, которые противодействуют старению и усиливают теломеразную активность косвенно. Эндотелиальные клетки, так же как и сосудистые клетки гладких мышц, имеют низкую теломеразную активность. Несколько лет назад было продемонстрировано, что введение hTERT в человеческие эндотелиальные клетки увеличивает продолжительность их жизни [177, 178].

Митохондриальная дисфункция, вызывающая повышенное содержание активных кислородных соединений (ROS) названа главной детерминантой зависимого от теломер старения на уровне одиночной клетки [183]. Антиоксиданты задерживают начало сосудистого старения в теломер-зависимом пути. *In vitro* ROS снижают уровень ядерного белка hTERT и теломеразную активность в эндотелиальных клетках. Это сопровождается ранним появлением фенотипа старения, в то время, как инкубация с антиоксидантом N-ацетилцистеином блокирует ядерный экспорт hTERT в цитозоль [184]. Токоферол, известный антиоксидант, так же подавляет сокращение длины теломер и сохраняет уровень теломеразной активности в клетках капиллярных сосудов мозга [185].

Для активации теломеразы используются так же экстракты из природных объектов. Так, экстракт *Gingo Biloba* задержал начало старения за счет стимулирования формирования теломеразы через передачу сигналов PI3k/Akt-пути [186].

За последние десятилетия число неизлечимых хронических дегенеративных заболеваний существенно увеличилось. Разработка методов их лечения должна включать поиски способов регенерации тканей, которая может стимулироваться теломеразо-активирующими веществами. Таким образом, несомненно, имеется насущная необхо-

димось дальнейших поисков и изучения теломеразных активаторов (предпочтительно низкомолекулярных), которые могут быть использованы в терапии дегенеративных заболеваний в ближайшем будущем.

VI. ИНГИБИРОВАНИЕ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Все имеющиеся на сегодняшний день ингибиторы теломеразной активности можно разделить на три группы. Это аналоги нуклеотидов и нуклеозидов, отличные от них низкомолекулярные соединения и ингибиторы на основе олигонуклеотидов. Рассмотрим все три группы.

Так как каталитическая субъединица теломеразы – обратная транскриптаза, и уже существуют антивирусные препараты, к примеру, для лечения ВИЧ-инфекций, блокирующие действие обратной транскриптазы, то идея проверить ингибирующую способность таких препаратов по отношению к теломеразе лежала на поверхности. Наиболее широко используемый ингибитор обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека – это азидотимидин (AZT). При обработке AZT T-клеток лейкемии наблюдали положительный эффект, что свидетельствовало о целесообразности применения этого нуклеозида в качестве анти-теломеразного агента [187]. В результате такой обработки наблюдалась потеря теломеразной активности и сокращение длины теломер. Поскольку фармакологические свойства AZT были уже хорошо изучены, стало возможным завершить исследование в этом направлении при лечении пациентов с лейкемией/лимфомой T-клеток. У пациентов, имеющих дикий тип белка p53, в отличие от пациентов с видоизмененным белком p53, наступала ремиссия после обработки AZT. В другой работе [188] было установлено, что эффект ингибирования теломеразы AZT связан не столько с остановкой реакции из-за невозможности включения следующего нуклеотидного остатка, сколько из-за конкурентного связывания этих веществ в активном центре фермента. Исследования аналогов нуклеозидов в качестве теломеразных ингибиторов были продолжены в ряде многочисленных работ (таблица сравнения представлена в обзоре [22]). Наиболее активными ингибиторами этого класса являются, судя по анализу патентов, акрилизированные нуклеозиды и производные гуанина [189, 190].

Другой класс ингибиторов теломеразы – группа низкомолекулярных соединений с отличными от нуклеозидов структурами. Эта группа включает вещества, действующие главным образом на hTERT [191]. Некоторые из них, используются при лечении ВИЧ-инфекции.

Так как рубромицин и некоторые из его аналогов были известны как мощные ингибиторы рептровирусных обратных транскриптаз [192], логическим продолжением исследований было тестирование ингибирования теломеразы рубромицином и сходными соединениями [193]. Рубромицины и пурпурамицины оказались сильными ингибиторами (50%-ые ингибирующие концентрации – начиная от 3 мкМ). Сообщалось, что некоторые хинолины препятствуют пролиферации клеток [194], хотя механизм такого действия был не понятен. Тем не менее, этот факт лег в основу тестирования анти-теломеразной активности указанных соединений [195]. Флоксацин и левофлоксацин умеренно ингибировали теломеразную активность. Аналог красителя родоциана, МКТ077, который предпочтительно накапливается в клетках опухоли и митохондриях [196], был использован как базовая структура для создания более мощного ингибитора теломеразы, названного FJ5002 (IC₅₀ FJ5002 был 2 мкМ) [197]. Длительное культивирование клеточной линии лейкемии человека, при высокой концентрации FJ5002 сопровождалось прогрессивной потерей теломер, стимулированием старения и кризисом клеток.

В настоящее время предложена гипотеза о механизме действия соединений, основанная на предположении о стабилизации особых квадруплексных структур на концах теломер, которые блокируют связывание теломеразы со своим субстратом [198, 199]. Эти ингибиторы блокируют теломеразу или за счет нарушения белково-нуклеиновых взаимодействий, поддерживающих структуру теломер или за счет блокировки связывания субстрата (теломеры) с ферментом (теломеразой). К сожалению, квадруплексы могут образовываться не только на теломерах, но и в других G-богатых областях генома, поэтому часто невозможно предсказать эффект блокирования G-квадруплексной структуры ДНК селективными лигандами. По этой причине синтез ингибиторов такого рода не считается перспективным на данный момент направлением. Однако, на основе стабилизации квадруплексов идентифицировано много новых ингибиторов [200]. Многообещающим ненуклеозидным ингибитором теломеразы такого типа является VIBR1532 – простое синтетическое соединение, представляющее собой нафталиновое производное бензойной кислоты (IC₅₀ 93 нМ) [201]. Обработка раковых клеток этим препаратом, не обладающим высокой цитотоксичностью, ведет к прогрессивному сокращению теломер. После длительного периода обработки клеток этим веществом наблюдался арест пролиферации и появление признаков старения, включая морфологические, митотические и хромосомные нарушения. Препарат VIBR1532 оказался активным в естест-

венных условиях; при его введении голым мышам, наблюдалось уменьшение опухолевого потенциала предварительно привитых клеток опухоли.

В 2005 году было показано, что ингибитором теломеразы является природный лактон хеленалин [202]. Способ действия этого цитостатического агента не ясен. Любопытно, что полиненасыщенные жирные кислоты, ингибируют фермент, взаимодействуя непосредственно с белком каталитической субъединицей теломеразы и, вместе с тем, выключают также экспрессию гена hTERT [203].

Недавно был предложен уникальный подход к проблеме ингибирования теломеразы: использование веществ, которые участвуют в процессе узнавания РНК/ДНК гетеродуплексов, сформированных при взаимодействии теломеразной РНК и концов хромосом [204].

В работе [205] было продемонстрировано, что главный катехин зеленого чая (*Epigallocatechin gallate*), непосредственно ингибирует теломеразу. Было также установлено, что EGCG, чайные полифенолы и другие компоненты чая претерпевают структурные перестройки при физиологически допустимых условиях, приводящие к увеличению ингибирующего действия этих веществ на теломеразу.

Наиболее интересный потенциальный ингибитор был найден при скрининге 16 тысяч органических соединений [206]. Им оказалось производное изотиозолина (50% ингибирование достигается при концентрации 1,0 мкМ) – неконкурентный ингибитор по отношению к субстрату и дезоксинуклеотидтрифосфатам. Он обладает замечательной селективностью, но в то же время не влияет на ДНК-полимеразу и обратную транскриптазу вируса иммунодефицита человека. Глутатион и дитиотриетол усиливают его ингибирующую активность, что предполагает ингибирование теломеразы путем воздействия на остатки цистеина в каталитической субъединице.

Третий класс ингибиторов представлен олигонуклеотидами. Успешное клонирование и изучение компонентов теломеразы открыли путь для ее направленной инактивации олигонуклеотидами. Именно матричная область hTR служит мишенью для антисмысловых олигонуклеотидов. При исследовании вторичной структуры этой РНК была продемонстрирована полная доступность ее матричной области [122, 207]. Большинство методов, используемых в «антисмысловых технологиях», хорошо известны и широко применяются. Поэтому было относительно просто приспособить их для ингибирования теломеразы. Таким образом, матричный район hTERT стал еще одной (помимо hTR) мишенью для блокирования теломеразы антисмысловым олигонуклеотидом. Новые технологии,

а именно, использование siРНК, рибозимов и аптамеров открывают безграничные возможности для создания ингибиторов на основе олигонуклеотидов. Существуют две основные проблемы возникающие при использовании олигонуклеотидов в качестве терапевтических веществ: (1) – проблема их доставки; и (2) – их низкая стабильность в биологической окружающей среде. Эти проблемы были частично решены путем создания химически модифицированных олигонуклеотидов, сохраняющих большую часть биологической активности. Детальное описание химических модификаций олигонуклеотидов лежит вне рамок этого обзора (см. обзоры в этой области [208, 209]).

Несмотря на большой объем информации о теломеразных ингибиторах, переход от полученных исследователями соединений, ингибирующих теломеразу, к успешному внедрению препаратов в клинику происходит медленно.

Так для препарата Imetelstat (олигонуклеотида GRN163L, комплементарного матричной части теломеразной РНК), клинические испытания, спонсируемые корпорацией Genon (Калифорния), были начаты в конце 2006 года. Доказана безопасность и подобраны оптимальные дозы препарата.

Таким образом, относительно немногие клинические испытания, выполненные на данный момент, дали обнадеживающие результаты. Развитие области противораковой терапии на основе ингибирования теломеразы становится перспективным направлением. Значительный прогресс был достигнут пока только в терапии с использованием олигонуклеотидов. Другие низкомолекулярные ингибиторы ждут своего часа.

Альтернативная возможность – использование в ближайшем будущем регуляторных функций hTERT [21]. Независимые от полимеризующей активности регуляторные свойства hTERT или теломеразной РНК на данный момент полностью не изучены, но уже получены захватывающие результаты, которые могут быть использованы для получения антираковых терапевтических агентов. Нельзя исключить, что уже используемые ингибиторы теломеразной активности могут воздействовать на другие функции теломеразы (помимо поддержания длины теломер). Понимание этих функций позволит разработать более эффективные ингибиторы.

Существуют, казалось бы, противоречивые заключения о воздействии теломеразных ингибиторов на опухолевые клетки, культивируемые *in vitro*. В ряде случаев некоторые вещества вызывали долгосрочный эффект, уменьшая длину теломер, тогда как в других случаях, инги-

бирование теломеразы приводило к быстрому и очень мощному антипролиферативному эффекту. Объяснение этим на первый взгляд противоречащим друг другу наблюдениям существует. Если ингибитор выступает как вещество, воздействующее на теломеразу как на ДНК-полимеразу и не затрагивает никакие другие экстра-теломерные функции фермента или структуру теломеры, то в этом случае долгосрочная обработка должна вызывать укорочение теломер, и, как следствие, потерю безграничного репликативного потенциала опухолевой клетки и стимулирование старения или апоптоза. Если же клетка уже имеет короткие теломеры или же ингибитор влияет на другие функции фермента или структуру теломеры, то наблюдается быстрый ответ. Ингибирование теломеразной активности hTERT с помощью антисмысловой последовательности нуклеиновой кислоты слитой с пептидом [211] или с использованием siРНК, направленной против hTERT мРНК, относится именно ко второму типу ингибирования, приводящего к быстрому подавлению роста раковых клеток [212].

Другое предположение состоит в том, что именно поддержание структуры теломеры ответственно за пролиферативный потенциал клетки. А на этот показатель влияет не только активный фермент теломеразы, но и структурные белки теломеры, а также все регуляторные белки [213]. В частности, белки, взаимодействующие непосредственно с компонентами теломеразного корового фермента, так же влияют на пролиферативный потенциал клетки. Установлено, что дискерин является существенным компонентом активной теломеразы. Данные о его связи с теломеразой и ее активностью суммированы в недавно опубликованном обзоре Масона [214]. Возможно, в ближайшем будущем начнутся поиски ингибиторов, непосредственно взаимодействующих с дискерином и препятствующих взаимодействию связыванию дискерина с теломеразой. Иными словами, сложные процессы регуляции теломеразы открывают много путей для создания модуляторов теломеразной активности.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы теломераза стала основой для разработки методов антираковой терапии. В обзоре рассмотрена структура и особенности функционирования теломеразы, а так же некоторые ее ингибиторы и активаторы, которые в будущем могут быть использованы в терапии.

В последние годы, на основе фундаментальных исследований механизма работы теломеразы, были найдены различные способы блокирования катализируемого теломеразой процесса – поддержания длины теломер. Во-первых – это прямое ингибирование: либо каталитической субъединицы (hTERT), либо РНК-компоненты теломеразного комплекса (hTERC). Во-вторых – блокирование связывания теломер с теломеразой.

Поиск активаторов теломеразы – относительно новая область. Развитие современных тенденций в медицине, связанных с использованием в терапии стволовых клеток, может скоро сделать такие активаторы центром повышенного внимания. Однако на данный момент веществ, проявляющих такие свойства, идентифицировано мало.

Дальнейший поиск и создание новых соединений, модулирующих активность теломеразы, могут быть успешными только при полном понимании механизма работы фермента и углублении представлений о структуре компонентов теломеразы, что не возможно без обобщения уже накопленных данных и новых фундаментальных исследований в этой области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greider, C.W., Blackburn E.H. (1987) *Cell*, **51**, 887–898.
2. Щербакова Д.М., Зверева М.Э., Шпанченко О.В., Донцова О.А. (2006) *Молекулярная Биология*, **40**, 1–15.
3. Osterhage, J.L., Talley, J.M., Friedman, K.L. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 720–728.
4. Hsu, M., Yu, E.Y., Singh, S.M., Lue, N.F. (2007) *Eukaryot. Cell*, **6**, 1330–1338.
5. Collins, K. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 484–494.
6. Mozdy, A.D., Podell, E.R., Cech, T.R. (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28**, 4152–4161.
7. Cristofari, G., Lingner, J. (2006) *EMBO J.*, **25**, 565–574.
8. Denchi, E.L. (2009) *DNA Repair (Amst)*, **8**, 1118–1126.
9. Janknecht, R. (2004) *FEBS Lett.*, **564**, 9–13.
10. Bollmann, F.M. (2007) *Cancer Treat. Rev.*, **33**, 704–709.
11. Schmitt, C.A. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1775**, 5–20.
12. Masutomi, K., et al. (2003) *Cell*, **114**, 241–253.
13. Kaszubowska, L. (2008) *J. Physiol. Pharmacol.*, **59 Suppl 9**, 169–186.
14. Flores, I., Benetti, R., Blasco, M.A. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 254–260.
15. Mitchell, J.R., Wood, E., Collins, K. (1999) *Nature*, **402**, 551–555.
16. Mitchell, J.R., Cheng, J., Collins, K. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 567–576.
17. Armanios, M., et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15960–15964.
18. Chen, G., Tai, A.K., Lin, M., Chang, F., Terhorst, C., Huber, B.T. (2007) *Eur. J. Immunol.*, **37**, 663–674.
19. Minamino, T., Komuro, I. (2007) *Circ. Res.*, **100**, 15–26.

20. *Ogami, M., et al.* (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 546–550.
21. *De Felice, B., Wilson, R.R., Nacca, M.* (2009) *BMC Med. Genet.*, **10**, 110.
22. *Tarkanyi, I., Aradi, J.* (2008) *Biochimie*, **90**, 156–172.
23. *Hayflick, L.* (1997) *Biochemistry (Mosc.)*, **62**, 1180–1190.
24. *Olovnikov, A.M.* (1973) *J. Theor. Biol.*, **41**, 181–190.
25. *Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K., Lingner, J.* (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 572–579.
26. *Lue, N.F.* (2004) *Bioessays*, **26**, 955–962.
27. *Collins, K.* (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 187–218.
28. *Bosoy, D., Lue, N.F.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 93–101.
29. *Chen, J.L., Greider, C.W.* (2003) *EMBO J.*, **22**, 304–314.
30. *Forstemann, K., Lingner, J.* (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7277–7286.
31. *Morin, G.B.* (1989) *Cell*, **59**, 521–529.
32. *Greider, C.W.* (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4572–4580.
33. *Prowse, K.R., Avilion, A.A., Greider, C.W.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1493–1497.
34. *Cohn, M., Blackburn, E.H.* (1995) *Science*, **269**, 396–400.
35. *Lue, N.F., Peng, Y.* (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4331–4337.
36. *Prescott, J., Blackburn, E.H.* (1997) *Genes Dev.*, **11**, 2790–2800.
37. *Teixeira, M.T., Arneric, M., Sperisen, P., Lingner, J.* (2004) *Cell*, **117**, 323–335.
38. *Prescott, J., Blackburn, E.H.* (1997) *Genes Dev.*, **11**, 528–540.
39. *Lue, N.F., Li, Z.* (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5213–5222.
40. *Chang, M., Arneric, M., Lingner, J.* (2007) *Genes Dev.*, **21**, 2485–2494.
41. *Niu, H., Xia, J., Lue, N.F.* (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 6806–6815.
42. *Petrov, A.V., Dokudovskaya, S.S., Sokolov, K.A., Lavrik, O.I., Favre, A., Dontsova, O.A., Bogdanov, A.A.* (1998) *FEBS Lett.*, **436**, 35–40.
43. *Huard, S., Autexier, C.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2171–2180.
44. *Oulton, R., Harrington, L.* (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3244–3256.
45. *Theimer, C.A., Feigon, J.* (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 307–318.
46. *Autexier, C., Lue, N.F.* (2006) *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 493–517.
47. *Lue, N.F., Lin, Y.C., Mian, I.S.* (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8440–8449.
48. *Friedman, K.L., Heit, J.J., Long, D.M., Cech, T.R.* (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1–13.
49. *Xia, J., Peng, Y., Mian, I.S., Lue, N.F.* (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5196–5207.
50. *Bosoy, D., Peng, Y., Mian, I.S., Lue, N.F.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 3882–3890.
51. *Friedman, K.L., Cech, T.R.* (1999) *Genes Dev.*, **13**, 2863–2874.
52. *Jacobs, S.A., Podell, E.R., Cech, T.R.* (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 218–225.
53. *Rouda, S., Skordalakes, E.* (2007) *Structure*, **15**, 1403–1412.
54. *Gillis, A.J., Schuller, A.P., Skordalakes, E.* (2008) *Nature*, **455**, 633–637.
55. *Romi, E., Baran, N., Gantman, M., Shmoish, M., Min, B., Collins, K., Manor, H.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8791–8796.
56. *Richards, S., et al.* (2008) *Nature*, **452**, 949–955.
57. *Nugent, C.I., Lundblad, V.* (1998) *Genes Dev.*, **12**, 1073–1085.
58. *Weinrich, S.L., et al.* (1997) *Nat. Genet.*, **17**, 498–502.
59. *Peng, Y., Mian, I.S., Lue, N.F.* (2001) *Mol. Cell.*, **7**, 1201–1211.
60. *Eugster, A., et al.* (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 734–739.

61. Boule, J.B., Vega, L.R., Zakian, V.A. (2005) *Nature*, **438**, 57–61.
62. Zhang, D.H., Zhou, B., Huang, Y., Xu, L.X., Zhou, J.Q. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1393–1404.
63. Zhou, J., Monson, E.K., Teng, S.C., Schulz, V.P., Zakian, V.A. (2000) *Science*, **289**, 771–774.
64. Mangahas, J.L., Alexander, M.K., Sandell, L.L., Zakian, V.A. (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 4078–4089.
65. Jacobs, S.A., Podell, E.R., Wuttke, D.S., Cech, T.R. (2005) *Protein Sci.*, **14**, 2051–2058.
66. Moriarty, T.J., Ward, R.J., Taboski, M.A., Autexier, C. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 3152–3161.
67. Lue, N.F., Peng, Y. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1487–1494.
68. Lue, N.F. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 26586–26591.
69. Hardy, C.D., Schultz, C.S., Collins, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 4863–4871.
70. Harrington, L.A., Greider, C.W. (1991) *Nature*, **353**, 451–454.
71. Baran, N., Haviv, Y., Paul, B., Manor, H. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 5570–5578.
72. Hammond, P.W., Lively, T.N., Cech, T.R. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 296–308.
73. Wallweber, G., Gryaznov, S., Pongracz, K., Pruzan, R. (2003) *Biochemistry*, **42**, 589–600.
74. Melek, M., Greene, E.C., Shippen, D.E. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3437–3445.
75. Alves, D., Li, H., Codrington, R., Orte, A., Ren, X., Klenerman, D., Balasubramanian, S. (2008) *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 287–289.
76. Lai, C.K., Mitchell, J.R., Collins, K. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 990–1000.
77. O'Connor, C.M., Lai, C.K., Collins, K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 17533–17539.
78. Moriarty, T.J., Marie-Egyptienne, D.T., Autexier, C. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 3720–3733.
79. Zaug, A.J., Podell, E.R., Cech, T.R. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 870–872.
80. Ji, H., Platts, M.H., Dharamsi, L.M., Friedman, K.L. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 9103–9114.
81. Ji, H., Adkins, C.J., Cartwright, B.R., Friedman, K.L. (2008) *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 2380–2390.
82. Chen, J.L., Opperman, K.K., Greider, C.W. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 592–597.
83. Miller, M.C., Liu, J.K., Collins, K. (2000) *EMBO J.*, **19**, 4412–4422.
84. Lai, C.K., Miller, M.C., Collins, K. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 415–420.
85. Lin, J., Blackburn, E.H. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 387–396.
86. Zhou, X.Z., Lu, K.P. (2001) *Cell*, **107**, 347–359.
87. Banik, S.S., Counter, C.M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 51745–51748.
88. Forstemann, K., Lingner, J. (2005) *EMBO Rep.*, **6**, 361–366.
89. Hossain, S., Singh, S., Lue, N.F. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 36174–36180.
90. Huard, S., Moriarty, T.J., Autexier, C. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4059–4070.
91. Banik, S.S., Guo, C., Smith, A.C., Margolis, S.S., Richardson, D.A., Tirado, C.A., Counter, C.M. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 6234–6246.
92. Armbruster, B.N., Banik, S.S., Guo, C., Smith, A.C., Counter, C.M. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7775–7786.
93. Gandhi, L., Collins, K. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 721–733.

94. Roy, J., Fulton, T.B., Blackburn, E.H. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 3286–3300.
95. Zhu, J., Wang, H., Bishop, J.M., Blackburn, E.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3723–3728.
96. Blackburn, E.H. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 859–862.
97. Maringele, L., Lydall, D. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 1919–1933.
98. Zubko, M.K., Guillard, S., Lydall, D. (2004) *Genetics*, **168**, 103–115.
99. Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P., Wellinger, R.J. (1998) *Science*, **280**, 741–744.
100. Garvik, B., Carson, M., Hartwell, L. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6128–6138.
101. Steinberg-Neifach, O., Lue, N.F. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2710–2722.
102. Hsu, M., McEachern, M.J., Dandjinou, A.T., Tzfati, Y., Orr, E., Blackburn, E.H., Lue, N.F. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11682–11687.
103. Sarin, K.Y., Cheung, P., Gilison, D., Lee, E., Tennen, R.I., Wang, E., Artandi, M.K., Oro, A.E., Artandi, S.E. (2005) *Nature*, **436**, 1048–1052.
104. Park, J.I., et al. (2009) *Nature*, **460**, 66–72.
105. Zappulla, D.C., Cech, T.R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10024–10029.
106. Dandjinou, A.T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J.F., Abou Elela, S., Wellinger, R.J. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 1148–1158.
107. Romero, D.P., Blackburn, E.H. (1991) *Cell*, **67**, 343–353.
108. Chen, J.L., Blasco, M.A., Greider, C.W. (2000) *Cell*, **100**, 503–514.
109. Lin, J., Ly, H., Hussain, A., Abraham, M., Pearl, S., Tzfati, Y., Parslow, T.G., Blackburn, E.H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14713–14718.
110. Qiao, F., Cech, T.R. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 634–640.
111. Livengood, A.J., Zaugg, A.J., Cech, T.R. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 2366–2374.
112. Lai, C.K., Miller, M.C., Collins, K. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 1673–1683.
113. Miller, M.C., Collins, K. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6585–6590.
114. Ware, T.L., Wang, H., Blackburn, E.H. (2000) *EMBO J.*, **19**, 3119–3131.
115. Legassie, J.D., Jarstfer, M.B. (2005) *Biochemistry*, **44**, 14191–14201.
116. Seto, A.G., Umansky, K., Tzfati, Y., Zaugg, A.J., Blackburn, E.H., Cech, T.R. (2003) *RNA*, **9**, 1323–1332.
117. Chen, J.L., Greider, C.W. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 2747–2752.
118. Leonardi, J., Box, J.A., Bunch, J.T., Baumann, P. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 26–33.
119. Webb, C.J., Zakian, V.A. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 34–42.
120. Chen, J.L., Greider, C.W. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8080–8085; discussion 8077–8089.
121. Theimer, C.A., Blois, C.A., Feigon, J. (2005) *Mol. Cell*, **17**, 671–682.
122. Antal, M., Boros, E., Solymosy, F., Kiss, T. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 912–920.
123. Leeper, T.C., Varani, G. (2005) *RNA*, **11**, 394–403.
124. Ly, H., Blackburn, E.H., Parslow, T.G. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 6849–6856.

125. Chen, Y., Fender, J., Legassie, J.D., Jarstfer, M.B., Bryan, T.M., Varani, G. (2006) *EMBO J.*, **25**, 3156–3166.
126. Richards, R.J., Wu, H., Trantirek, L., O'Connor, C.M., Collins, K., Feigon, J. (2006) *RNA*, **12**, 1475–1485.
127. Mason, D.X., Goneska, E., Greider, C.W. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5606–5613.
128. Prathapam, R., Witkin, K.L., O'Connor, C.M., Collins, K. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 252–257.
129. Brown, Y., Abraham, M., Pearl, S., Kabaha, M.M., Elboher, E., Tzfati, Y. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6280–6289.
130. Zappulla, D.C., Goodrich, K., Cech, T.R. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1072–1077.
131. Venteicher, A.S., Meng, Z., Mason, P.J., Veenstra, T.D., Artandi, S.E. (2008) *Cell*, **132**, 945–957.
132. Witkin, K.L., Collins, K. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 1107–1118.
133. O'Connor, C.M., Collins, K. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2029–2036.
134. Feng, J., et al. (1995) *Science*, **269**, 1236–1241.
135. Fu, D., Collins, K. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 531–536.
136. Mitchell, J.R., Collins, K. (2000) *Mol. Cell*, **6**, 361–371.
137. Pogacic, V., Dragon, F., Filipowicz, W. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 9028–9040.
138. Dragon, F., Pogacic, V., Filipowicz, W. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3037–3048.
139. Seto, A.G., Zaug, A.J., Sobel, S.G., Wolin, S.L., Cech, T.R. (1999) *Nature*, **401**, 177–180.
140. Chapon, C., Cech, T.R., Zaug, A.J. (1997) *RNA*, **3**, 1337–1351.
141. Mozdy, A.D., Cech, T.R. (2006) *RNA*, **12**, 1721–1737.
142. Teixeira, M.T., Forstemann, K., Gasser, S.M., Lingner, J. (2002) *EMBO Rep.*, **3**, 652–659.
143. Gallardo, F., Olivier, C., Dandjinou, A.T., Wellinger, R.J., Chartrand, P. (2008) *EMBO J.*, **27**, 748–757.
144. Box, J.A., Bunch, J.T., Tang, W., Baumann, P. (2008) *Nature*, **456**, 910–914.
145. Hughes, T.R., Evans, S.K., Weilbaecher, R.G., Lundblad, V. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 809–812.
146. Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R., Lundblad, V. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11190–11195.
147. Zhou, J., Hidaka, K., Fletcher, B. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1947–1955.
148. Virta-Pearlman, V., Morris, D.K., Lundblad, V. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 3094–3104.
149. Evans, S.K., Lundblad, V. (1999) *Science*, **286**, 117–120.
150. Snow, B.E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R.M., Robinson, M.O., Harrington, L. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 698–704.
151. Neidle, S. (2009) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 239–250.
152. Wong, H.M., Payet, L., Huppert, J.L. (2009) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **11**, 146–155.
153. Meyne, J., Ratliff, R.L., Moyzis, R.K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7049–7053.
154. Wright, J.H., Zakian, V.A. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1454–1460.
155. Bourns, B.D., Alexander, M.K., Smith, A.M., Zakian, V.A. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5600–5608.

156. Smith, C.D., Smith, D.L., DeRisi, J.L., Blackburn, E.H. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 556–570.
157. Gao, H., Cervantes, R.B., Mandell, E.K., Otero, J.H., Lundblad, V. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 208–214.
158. Pennock, E., Buckley, K., Lundblad, V. (2001) *Cell*, **104**, 387–396.
159. Fisher, T.S., Taggart, A.K., Zakian, V.A. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1198–1205.
160. Smogorzewska, A., de Lange, T. (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 177–208.
161. de Lange, T. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 2100–2110.
162. Gilson, E., Geli, V. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**, 825–838.
163. Guedin, A., De Cian, A., Gros, J., Lacroix, L., Mergny, J.L. (2008) *Biochimie*, **90**, 686–696.
164. Johnson, J.E., Smith, J.S., Kozak, M.L., Johnson, F.B. (2008) *Biochimie*, **90**, 1250–1263.
165. Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., de Lange, T. (1999) *Cell*, **97**, 503–514.
166. Wei, C., Price, M. (2003) *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 2283–2294.
167. Lei, M., Zaug, A.J., Podell, E.R., Cech, T.R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 20449–20456.
168. Lee, J., Mandell, E.K., Tucey, T.M., Morris, D.K., Lundblad, V. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 990–997.
169. Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li Z., Lingner, J. (2008) *Mol. Cell*, **32**, 465–477.
170. Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E., Lingner, J. (2007) *Science*, **318**, 798–801.
171. Schoeftner, S., Blasco, M.A. (2008) *Nat. Cell. Biol.*, **10**, 228–236.
172. Luke, B., Lingner, J. (2009) *EMBO J.*, **28**, 2503–2510.
173. Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., Reddel, R.R. (2007) *Science*, **315**, 1850–1853.
174. Skvortsov, D.A., Rubtsova, M.P., Zvereva, M.I., Kisseljov, F.L., Dontsova, O.A. (2009) *Acta Naturae*, 49–65.
175. Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1985) *Cell*, **43**, 405–413.
176. Wege, H., Chui, M.S., Le, H.T., Tran, J.M., Zern, M.A. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, E3–3.
177. Huang, Y.P., Liu, Z.S., Tang, H., Liu, M., Li, X. (2006) *Clin. Chim. Acta*, **372**, 112–119.
178. Kim, N.W., Wu, F. (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2595–2597.
179. Fajkus, J. (2006) *Clin. Chim. Acta.*, **371**, 25–31.
180. Liu, K., Hodes, R.J., Weng, N. (2001) *J. Immunol.*, **166**, 4826–4830.
181. Akbar, A.N., Vukmanovic-Stejić, M. (2007) *J. Immunol.*, **178**, 6689–6694.
182. Fujisaki, H., Kakuda, H., Imai, C., Mullighan, C.G., Campana, D. (2009) *Br. J. Haematol.*, **145**, 606–613.
183. Passos, J.F., et al. (2007) *PLoS Biol.*, **5**, e110.
184. Haendeler, J., Hoffmann, J., Diehl, J.F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2004) *Circ. Res.*, **94**, 768–775.
185. Tanaka, Y., Moritoh, Y., Miwa, N. (2007) *J. Cell. Biochem.*, **102**, 689–703.
186. Dong, X.X., Hui, Z.J., Xiang, W.X., Rong, Z.F., Jian, S., Zhu, C.J.

- (2007) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **49**, 111–115.
187. Datta, A., Bellon, M., Sinha-Datta, U., Bazarbachi, A., Lepelletier, Y., Canioni, D., Waldmann, T.A., Hermine, O., Nicot, C. (2006) *Blood*, **108**, 1021–1029.
188. Strahl, C., Blackburn, E.H. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 53–65.
189. Bondarev, I.E. (2006) Patent: WO2006US19488 20060518
190. Hajek, M., Matulova, N., Votruba, I., Holy, A., Tloust'ova, E. (2005) *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 894–900.
191. Sluis-Cremer, N., Temiz, N.A., Bahar, I. (2004) *Curr. HIV Res.*, **2**, 323–332.
192. Goldman, M.E., Salituro, G.S., Bowen, J.A., Williamson, J.M., Zink, D.L., Schleif, W.A., Emini, E.A. (1990) *Mol. Pharmacol.*, **38**, 20–25.
193. Ueno, T., Takahashi, H., Oda, M., Mizunuma, M., Yokoyama, A., Goto, Y., Mizushima, Y., Sakaguchi, K., Hayashi, H. (2000) *Biochemistry*, **39**, 5995–6002.
194. Seay, T.M., Peretsman, S.J., Dixon, P.S. (1996) *J. Urol.*, **155**, 757–762.
195. Yamakuchi, M., Nakata, M., Kawahara, K., Kitajima, I., Maruyama, I. (1997) *Cancer Lett.*, **119**, 213–219.
196. Propper, D.J., et al. (1999) *Ann. Oncol.*, **10**, 923–927.
197. Naasani, I., Seimiya, H., Yamori, T., Tsuruo, T. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 4004–4011.
198. Lipps, H.J., Rhodes, D. (2009) *Trends Cell. Biol.*, **19**, 414–422.
199. Balasubramanian, S., Neidle, S. (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, 345–353.
200. Ou, T.M., Lu, Y.J., Tan, J.H., Huang, Z.S., Wong, K.Y., Gu, L.Q. (2008) *ChemMedChem*, **3**, 690–713.
201. Damm, K., et al. (2001) *EMBO J.*, **20**, 6958–6968.
202. Huang, H.S., Chou, C.L., Guo, C.L., Yuan, C.L., Lu, Y.C., Shieh, F.Y., Lin, J.J. (2005) *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 1435–1444.
203. Eitsuka, T., Nakagawa, K., Suzuki, T., Miyazawa, T. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1737**, 1–10.
204. Rangarajan, S., Friedman, S.H. (2007) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 2267–2273.
205. Naasani, I., Seimiya, H., Tsuruo, T. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 391–396.
206. Hayakawa, N., Nozawa, K., Ogawa, A., Kato, N., Yoshida, K., Akamatsu, K., Tsuchiya, M., Nagasaka, A., Yoshida, S. (1999) *Biochemistry*, **38**, 11501–11507.
207. Chen, J.L., Greider, C.W. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14683–14684.
208. Dikmen, Z.G., Ozgurtas, T., Gryaznov, S.M., Herbert, B.S. (2009) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1792**, 240–247.
209. Gryaznov, S.M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1489**, 131–140.
210. Lai, S.R., Cunningham, A.P., Huynh, V.Q., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O. (2007) *Exp. Cell. Res.*, **313**, 322–330.
211. Folini, M., Berg, K., Millo, E., Villa, R., Prasmickaite, L., Daidone, M.G., Benatti, U., Zaffaroni, N. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 3490–3494.
212. Gandellini, P., Folini, M., Bandiera, R., De Cesare, M., Binda, M., Veronese, S., Daidone, M.G., Zunino,

- F., Zaffaroni, N.* (2007) *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 1703–1714.
213. *Beliveau, A., Bassett, E., Lo, A.T., Garbe, J., Rubio, M.A., Bissell, M.J., Campisi, J., Yaswen, P.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4431–4436.
214. *Gu, B., Bessler, M., Mason, P.J.* (2009) *Cell Cycle*, **8**, 6–10.