

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной генетики Российской академии наук

На правах рукописи

КОРДЮКОВА Мария Юрьевна

**Биогенез и локализация теломерных нуклеопротеиновых комплексов в
процессе оогенеза и раннего развития *Drosophila melanogaster***

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: д.б.н. Калмыкова Алла Ивановна

Москва – 2019

Оглавление

Список использованных сокращений	6
ВВЕДЕНИЕ	8
Актуальность темы исследования и степень ее разработанности	8
Цели и задачи исследования	10
Научная новизна и практическая значимость исследования	11
Методология и методы исследования.....	12
Положения, выносимые на защиту	12
Степень достоверности и апробация результатов	13
Личное участие автора в проведении исследований.....	15
Структура и объем работы	15
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Теломеры.....	16
1.1.1 Строение теломер млекопитающих	17
1.1.2 Теломерная РНК млекопитающих	19
1.1.3 Теломерные ретротранспозоны у разных видов.....	24
1.1.4 Теломеры дрозофилы	28
1.1.5 Контроль экспрессии теломерных повторов и длины теломер у <i>D. melanogaster</i>	30
1.1.6 Теломерные ретротранспозиции у дрозофилы	32
1.1.7 Структура Gag-белков, кодируемых теломерными повторами дрозофилы.....	39
1.2 Теломерная дисфункция и клеточный ответ на повреждение теломер	42
1.2.1 Дисфункция теломер у млекопитающих	42

1.2.2 Поддержание теломер и теломерная дисфункция в герминальных клетках млекопитающих	45
1.2.3 Теломерная дисфункция у дрозофилы	47
1.3 Молекулярные механизмы контроля оогенеза и раннего развития дрозофилы	49
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1. Линии <i>D. melanogaster</i> , использованные в работе.....	55
2.2 РНК-иммунопреципитация	56
2.3 Выделение РНК	56
2.4 Реакция обратной транскрипции	57
2.5 Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени	58
2.6 Ко-иммунопреципитация	59
2.7 Вестерн-блоттинг	59
2.8 Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> с РНК-зондом.....	60
2.9 Иммуноокрашивание яичников <i>Drosophila</i>	61
2.10 Получение зонда для РНК FISH	64
2.11 Сбор эмбрионов дрозофилы и подготовка для экспериментов	64
2.12 Культивирование и иммуноокрашивание клеток S2.....	65
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	67
3.1 Проверка трансгенной системы для экспрессии маркированного белка <i>HeT-A Gag</i>	67
3.2 <i>HeT-A</i> РНК и <i>HeT-A Gag</i> формируют РНП в процессе оогенеза и раннего развития <i>Drosophila</i>	70
3.2.1 Белок <i>HeT-A Gag</i> и <i>HeT-A</i> РНК взаимодействуют с образованием РНП в клетках <i>Drosophila</i> линии S2, в яичниках и ранних эмбрионах.....	71

3.2.2 <i>HeT-A</i> РНП является гетерогенной и включает также РНК теломерного ретроэлемента <i>TART</i>	72
<u>3.3 Структура и локализация теломерных РНП в различных тканях <i>Drosophila</i>.....</u>	<u>75</u>
3.3.1 Локализация <i>HeT-A</i> РНП в яичниках <i>Drosophila</i> на ранних этапах оогенеза	75
3.3.2 Локализация <i>HeT-A</i> РНП в яичниках <i>Drosophila</i> на средних и поздних этапах развития яйцевых камер.....	77
3.3.3 Локализация <i>HeT-A</i> РНП в эмбрионах <i>Drosophila</i>	79
3.3.4 <i>TART</i> РНК колокализуется с <i>HeT-A</i> РНП в яичниках и эмбрионах <i>Drosophila</i>	80
<u>3.4 Транспорт <i>HeT-A</i> РНП, направленный к минус концам микротрубочек, осуществляется транспортным белком <i>Egl</i></u>	<u>81</u>
3.4.1 Нокаун <i>egl</i> приводит к нарушению локализации <i>HeT-A</i> РНК в яичниках <i>Drosophila</i>	82
3.4.2 <i>HeT-A</i> РНП взаимодействуют с белком-транспортером <i>Egl</i> в яичниках и эмбрионах <i>Drosophila</i>	82
3.4.3 <i>Egl</i> колокализуется с <i>HeT-A</i> РНП в яичниках <i>Drosophila</i>	85
3.4.4 В яичниках дикого типа <i>HeT-A</i> Gag также колокализуется с <i>Egl</i>	85
3.4.5 Взаимодействие <i>HeT-A</i> РНП с <i>Egl</i> приводит к эктопическому накоплению <i>Egl</i> возле центросом в ранних эмбрионах при нарушении рiРНК сайленсинга и гиперэкспрессии <i>HeT-A</i>	
<u>3.5 Гиперэкспрессия теломерных РНП приводит к гибели клеток в различных типах тканей, при этом <i>HeT-A</i> Gag локализуется вблизи центросом митотических клеток.</u>	<u>88</u>
4. ОБСУЖДЕНИЕ	93

4.1 <i>HeT-A</i> Gag и <i>HeT-A</i> РНК образуют РНП в яичниках и эмбрионах дрозофилы	93
4.2 Биогенез <i>HeT-A</i> РНП в процессе оогенеза дрозофилы.....	94
4.3 РНК теломерного ретроэлемента <i>TART</i> ассоциирована с <i>HeT-A</i> РНП.....	97
4.4 Транспорт теломерных <i>HeT-A</i> РНП, направленный к минус-концам микротрубочек, осуществляется белком <i>Egalitarian</i> в яичниках и эмбрионах дрозофилы	98
4.5 <i>HeT-A</i> РНП накапливаются вокруг центросом в эмбрионах с нарушением рiРНК пути и нарушают локализацию <i>Egl</i>	100
4.6 <i>HeT-A</i> Gag скапливается у центросом при гиперэкспрессии в клетках и эмбрионах <i>Drosophila</i>	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
Выводы	107
Список литературы	108
Благодарности.....	134

Список использованных сокращений

- dNTP - deoxynucleotide triphosphate (дезоксирибонуклеотид трифосфат)
- DTT – dithiothreitol (дителиоэритол)
- H3K9me3 –histone lysine 9 methyl 3 (модифицированная форма гистона H3, триметилированная по девятому лизину)
- HeT-A* - Heterochromatic repeats A
- LTR - long-terminal repeats (длинные концевые повторы)
- non-LTR –non-long terminal repeats (группа ретротранспозонов, не имеющих длинных концевых повторов)
- piРНК - Piwi-interacting РНК (короткие РНК, взаимодействующие с белком Piwi)
- shРНК – short hairpin РНК (малые РНК, образующие шпильки)
- siРНК – small interfering РНК (малые интерферирующие РНК)
- TARE* - telomere associated and *HeT-A* related
- TART* - telomere associated retrotransposon
- TAS – telomeric associated sequence (ассоциированная с теломерами последовательность, субтеломерная область)
- TERRA - telomeric repeat-containing RNA (РНК, содержащая теломерные повторы)
- UAS – upstream activating sequence (вышележащая активирующая последовательность)
- UTP - uridintriphosphat (уридинтрифосфат)
- UTR – untranslated region (нетранслируемая область)
- БСА - бычий сывороточный альбумин
- кДНК – комплементарная ДНК
- млн - миллион
- мм - миллиметр
- мРНК – матричная РНК
- нг - нанограмм

нт – нуклеотид

ОРС – открытая рамка считывания

ОТ - обратная транскрипция

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией

п.н. - пара нуклеотидов

п.о. – пара оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК-FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ* с РНК-зондом

РНП - рибонуклеопротеин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Теломеры - это ДНК-белковые комплексы, которые защищают концы линейных эукариотических хромосом от деградации и слияния. Теломерная ДНК у большинства видов представляет собой короткие повторы, синтезируемые теломеразой. Белки, ассоциированные с теломерой, формируют теломерный защитный комплекс – шелтерин. Недавно было открыто, что теломерные повторы транскрибируются с образованием длинных некодирующих РНК – TERRA (TElomeric Repeat-containing RNA, Azzalin et al. 2007). Сложная система гомеостаза теломерного комплекса направлена на то, чтобы не допустить межхромосомные сшивки, а если это произошло, то остановить деление таких клеток, чтобы предотвратить развитие анеуплоидии и канцерогенеза. В отличие от хорошо изученного механизма защиты теломер, механизмы теломерного сигналинга далеки от понимания.

Уникальным свойством теломер *Drosophila* является то, что они состоят исключительно из ретротранспозонов типа LINE, *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*; *HeT-A* является основным элементом теломер (Casacuberta, 2017). Несмотря на различную природу теломерных повторов у *D. melanogaster* и видов, использующих теломеразу для удлинения теломерной ДНК, основные механизмы поддержания теломер похожи. Теломерный белковый комплекс *D. melanogaster* структурно отличается от шелтерина теломер млекопитающих, однако функционально аналогичен и защищает концы хромосом от деградации и слияния (Raffa et al. 2013). Транскрипция теломерных повторов – консервативная особенность, описанная у всех изученных видов. Теломерные транскрипты у *D. melanogaster* были описаны десятилетием раньше, чем TERRA человека (Danilevskaya et al. 1997, Danilevskaya et al. 1998). Теломерный транскриптом *D. melanogaster* в герминальных тканях составляют длинные транскрипты ретротранспозонов и

короткие РНК (Savitsky et al. 2006, Shpiz et al. 2009). *HeT-A* и *TART* продуцируют многочисленные смысловые и антисмысловые транскрипты (Shpiz et al. 2009, Maxwell et al. 2006). Смысловые транскрипты *HeT-A* можно рассматривать в качестве функциональных аналогов как теломеразной РНК, так и TERRA РНК. Очевидно, что экспрессия теломерных элементов должна строго контролироваться, обеспечивая регуляцию длины теломер. В яичниках *D. melanogaster* такой контроль обеспечивает особый механизм РНК интерференции – piРНК (Piwi interacting RNA) путь, который активен в герминальных клетках (Savitsky et al. 2006, Shpiz et al. 2009). В присутствии piРНК экспрессия теломерных повторов репрессирована, в то время как нарушения piРНК пути приводят к сильному накоплению теломерных транскриптов и увеличению частоты теломерных ретротранспозиций (Savitsky et al. 2006).

Теломеры имеют свойства гетерохроматина, поэтому их транскрипционная активность в нормальных клетках репрессирована. Увеличение уровня теломерной транскрипции в ответ на повреждение теломер может являться частью теломерного сигналинга, влияющего на клеточные процессы (Poggo et al. 2014). Ранее было показано, что при теломерной дисфункции, вызванной нарушением piРНК пути, либо других факторов, регулирующих экспрессию теломерных ретроэлементов дрозофилы, наблюдается гиперэкспрессия теломерных транспозонов, прежде всего *HeT-A*. Многочисленные длинные теломерные РНК накапливаются в герминальных тканях, транспортируются в ооцит и формируют агрегаты у митотических полюсов деления на синцитиальной стадии эмбриогенеза (Morgunova et al. 2015). Тем не менее, функциональная связь между накоплением теломерных транскриптов при теломерной дисфункции и нарушением развития остается не выясненной. Чтобы выяснить влияние теломерных продуктов на различные клеточные процессы, мы исследовали локализацию и функциональные взаимодействия *HeT-A* РНК и кодируемого ей Gag белка в герминальных тканях и раннем развитии при нарушениях piРНК пути.

РНК-связывающие белки участвуют в метаболизме РНК на различных стадиях ее жизненного цикла, от транскрипции до деградации, а теломерные рибонуклеопротеиновые комплексы (РНП) необходимы для функционирования теломер. Транскрипты и белки, кодируемые теломерными ретротранспозонами *HeT-A* и *TART*, были детектированы на различных этапах оогенеза как в природных линиях *D. melanogaster*, так и при нарушениях сайленсинга теломер (Morgunova et al. 2015, Lopez-Panadez et al. 2015, Vagin et al. 2004). Сферические частицы *HeT-A*, состоящие из *HeT-A* Gag и *HeT-A* РНК, были обнаружены в соматических тканях (Zhang et al. 2014). Однако биогенез теломерных РНП *D. melanogaster* в герминальных тканях и раннем развитии до сих пор плохо изучен. Более того, нет данных о динамике этого комплекса при нарушении функции теломер.

Биология теломер остается одной из наиболее актуальных областей современной науки о жизни. Основная масса исследований проводится на теломерах опухолевых клеток, где функционирование теломер нарушено. Особо актуально изучение механизмов регуляции гомеостаза теломер на уровне целого организма, что поможет понять сложный механизм теломерного сигналинга в норме и при патологии. Недавно обнаруженные теломерные РНК привлекают внимание исследователей, как возможные компоненты теломерного сигналинга. В данной работе исследуются биогенез и функции теломерных РНК и связанных с ними белков у модельного объекта *Drosophila melanogaster*. Работа проводилась на организменном уровне, а основное внимание уделялось исследованию теломер в герминальных тканях и в раннем развитии, так как целостность теломер на этих стадиях определяет нормальное развитие всего организма.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение биогенеза и локализации теломерных РНП комплексов в процессе оогенеза и раннего эмбриогенеза *D. melanogaster*.

Для этого были поставлены следующие задачи:

- 1). Проверить адекватность трансгенной модели для изучения теломерных РНП
- 2). Исследовать принципы формирования теломерных РНП в процессе оогенеза и раннего развития *Drosophila*
- 3) Исследовать особенности структуры и локализации теломерных РНП в яйцниках и ранних эмбрионах *Drosophila*
- 4) Изучить механизмы транспорта теломерных РНП в яйцниках и эмбрионах *Drosophila*
- 5) Исследовать влияние гиперэкспрессии теломерных РНП на выживаемость клеток линии S2 и эмбрионов *Drosophila*

Научная новизна и практическая значимость исследования

В данной работе впервые показано, что *HeT-A* Gag взаимодействует с *HeT-A* РНК, формируя *HeT-A* РНП в процессе оогенеза и раннего развития. Продемонстрировано, что *HeT-A* РНП являются многокомпонентными комплексами, взаимодействуя с другими теломерными транскриптами и клеточными белками. Показано формирование *HeT-A* РНП различной структуры в цитоплазме и хроматине яйцников и в эмбрионах *Drosophila*. Показано, что в транспорте теломерных РНП в процессе оогенеза и раннего развития участвует клеточный механизм, что, по-видимому, является причиной нарушений развития при дисфункции теломер и накоплении избыточных теломерных РНП. Наконец впервые показано, что индуцированная гиперэкспрессия теломерного повтора *HeT-A* в культивируемых клетках и эмбрионах *Drosophila* цитотоксична и приводит к их усиленной гибели.

В целом, эти данные указывают на возможный механизм клеточного ответа на повреждение теломер с участием теломерных транскриптов. Полученные в настоящей работе результаты расширяют современные научные представления о теломерной функции в герминальных тканях

Drosophila. Данные, полученные в настоящей работе могут быть использованы для изучения механизмов поддержания теломер и природы теломерной дисфункции в герминальных тканях и в раннем развитии у разных организмов.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с применением широкого спектра методов молекулярной биологии и генетики, а также современного оборудования. В работе были использованы такие методы как: ко-иммунопреципитация (ко-ИП), РНК-иммунопреципитация (РИП), Вестерн-блоттинг, полимеразная цепная реакция в реальном времени, совмещенная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР в реальном времени), флуоресцентная гибридизация *in situ* (РНК-FISH), совмещенная с иммуноокрашиванием, трансфекция культивируемых клеток дрозофилы, а также современные методы генетических исследований с применением индуцированной тканеспецифичной экспрессии и подавления работы гена с помощью РНК интерференции.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Подтверждена адекватность использования трансгенной модели для исследования экспрессии теломерного ретротранспозона *HeT-A Drosophila*. Характер экспрессии маркированной эпитопами трансгенной копии *HeT-A* сходен с таковым для эндогенных теломерных повторов *HeT-A*.
- 2) Показано, что белок *HeT-A Gag* взаимодействует с *HeT-A* РНК в процессе оогенеза и раннего развития, формируя рибонуклеопротеиновый комплекс, РНП. *HeT-A* РНП являются многокомпонентными и включают также РНК теломерного ретротранспозона *TART*.
- 3) *HeT-A* РНП в норме присутствуют в низких количествах в яичниках и ранних эмбрионах *Drosophila*, но в условиях дисфункции теломер *HeT-A*

РНП накапливаются и демонстрируют динамичную локализацию. В ядрах герминальных клеток и их предшественников обнаружены сферические *HeT-A* РНП. В цитоплазме питающих клеток яичников *Drosophila* *HeT-A* РНП формируют крупные гранулы, а в ранних эмбрионах материнские *HeT-A* РНП накапливаются вокруг центросом.

4) *HeT-A* РНП взаимодействуют и колокализуются в яичниках и ранних эмбрионах *Drosophila* с белком-переносчиком Egalitarian, который обеспечивает транспорт мРНК, необходимых для раннего развития. При накоплении *HeT-A* РНП вследствие дисфункции теломер белок Egalitarian выявляется в составе гранул *HeT-A* РНП, что сопровождается нарушением его нормальной локализации и может быть причиной остановки развития.

5) Индуцированная гиперэкспрессия *HeT-A* в культивируемых клетках и эмбрионах *Drosophila* цитотоксична и приводит к их усиленной гибели. При этом *HeT-A* РНП демонстрируют центросомную локализацию.

Степень достоверности и апробация результатов

По результатам данной работы было опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах. Основные результаты были представлены также на 4 научных конференциях.

Публикации в журналах

1. Оловников И.А., Моргунова В.В., Миронова А.А., Кордюкова М.Ю., Радион Е.И., Оленкина О.М., Акуленко Н.В., Калмыкова А.И. Взаимодействие транскриптов теломерного ретроэлемента *HeT-A* и кодируемого им белка Gag в раннем развитии *Drosophila*. // Биохимия. - 2016. - Т. 81. - С. 1283-1290.

2. Kordyukova M, Olovnikov I, Kalmykova A. Transposon control mechanisms in telomere biology. // *Current Opinion in Genetics & Development*. - 2018. - Vol. 49. - P. 56-62.
3. Kordyukova M, Morgunova V, Olovnikov I, Komarov P, Mironova A, Olenkina O, Kalmykova A. Subcellular localization and Egl-mediated transport of telomeric retrotransposon *HeT-A* ribonucleoprotein particles in the *Drosophila* germline and early embryogenesis. // *PlosOne*. - 2018. - Vol. 13. e0201787.
4. Кордюкова М.Ю., Калмыкова А.И. Природа и функции теломерных транскриптов. // *Биохимия*. - 2019. - Т. 84. - № 2. - С. 212-222.

Тезисы конференций

1. Кордюкова М.Ю., Оловников И.А., Моргунова В.В., Оленкина О.М., Михалева Е.А., Калмыкова А.И. Создание генетической модели для исследования тканеспецифичных особенностей теломерного белкового комплекса *Drosophila*. // 20-ая Международная Пущинская школа-конференция «Биология - наука XXI века», Пущино, 18 - 22 апреля 2016 г., - С. 132.
2. Kalmykova A, Radion E, Morgunova V, Kordyukova M, Olovnikov I, Ryazansky S, Lavrov S. Key role of piRNAs in telomere functioning in *Drosophila* germline. // *EMBO/EMBL Symposium: The Mobile Genome*. Heidelberg 11-14 October 2017.
3. Кордюкова М.Ю., Моргунова В.В., Оловников И.А., Комаров П.А., Миронова А.А., Оленкина О.М., Калмыкова А.И. Внутриклеточная локализация и механизм транспорта рибонуклеопротеиновых комплексов теломерного ретротранспозона *HeT-A* в герминальных тканях и раннем эмбриогенезе *Drosophila*. // Международная конференция *Chromosome*, Новосибирск, 20-24 августа 2018. РИНЦ <https://elibrary.ru/item.asp?id=35465385>.
4. Кордюкова М.Ю., Побегуц О.В., Бутенко И.О., Абрамов Ю.А., Оленкина О.М., Калмыкова А.И. Теломерные рибонуклеиновые комплексы

нарушают биогенез компонентов митотического аппарата при дисфункции теломер в процессе раннего развития *Drosophila*. // VIII Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике, Звенигород, 19-23 ноября 2018. («Молекулярная генетика, микробиология и вирусология» 2019, спецвыпуск, - С. 33).

Личное участие автора в проведении исследований

Представленные в данной работе результаты получены либо автором работы лично, либо при непосредственном участии автора. Лично автором проведены эксперименты по РНК-иммунопреципитации, ко-иммунопреципитации, Вестерн-блоттингу, часть экспериментов по иммуноокрашиванию яичников и эмбрионов *Drosophila*, РНК-FISH гибридизации. При участии автора проведены часть экспериментов по РНК-FISH и иммуноокрашиванию, ОТ-ПЦР в реальном времени. Имена соавторов, участвовавших в проведении экспериментов, указаны в соответствующих опубликованных работах

Структура и объем работы

Работа состоит из введения, пяти глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение») и выводов. Диссертационная работа изложена на 134 страницах, содержит 19 рисунков, а также 3 таблицы. Список литературы включает 226 источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Теломеры

Определение теломер, как структурных единиц хромосом, появилось при анализе хромосом дрозофилы. В 1938 году Герман Мюллер показал, что хромосомы могут переносить разрывы, обмены и воссоединения, однако длинные концевые делеции никогда не наблюдаются. Он заключил, что концы хромосом закрыты специальными структурами, и что разорванные хромосомы не могут существовать, если они не получают такую структуру от другой хромосомы. Он назвал эти структуры теломерами и отметил их гетерохроматиновую морфологию (Muller, 1934). В 1961 году ученый Леонард Хейфлик показал, что диплоидные неопухолевые культивируемые *in vitro* клетки человека не могут делиться неограниченное время, они умирают примерно после 50 делений (Hayflick and Moorhead 1961). Однако механизм этого явления был не понятен.

Впервые гипотезу, объясняющую экспериментальные данные Леонарда Хейfliка, в 1971 г. выдвинул советский учёный Алексей Матвеевич Оловников, предложив теорию маргинотомии, которая предполагает, что вследствие недорепликации последовательностей ДНК на концах хромосом происходит их укорочение. Для работы ДНК-полимеразы необходим РНК-праймер, который должен быть удален из конечного продукта, и поэтому ДНК укорачивается на длину РНК-затравки. Теория предполагала, что «нестарение» бактерий обусловлено кольцевой формой ДНК, а теломерные последовательности в стволовых и раковых клетках защищены благодаря постоянному - при каждом делении клетки - удлинению особым ферментом, современное название которого - теломераза (Olovnikov 1973). Согласно этой теории, эффект Хейfliка объяснялся чрезмерным укорочением теломер в терминально-дифференцированных клетках, что вызвало остановку их делений.

Существование специализированной теломерной ДНК и теломеразы было подтверждено экспериментально в работах Элизабет Блэкберн на *Tetrahymena*. В 1978 г. было показано, что теломеры *Tetrahymena thermophila* состоят из шестинуклеотидных повторов, которые защищают хромосомы от деградации. (Blackburn and Gall 1978; Szostak and Blackburn 1982). Позже было показано, что у многих других видов теломерная ДНК состоит из простых повторов (Gilson and Segal-Bendirdjian 2010). В 1985 году был открыт фермент, который поддерживает длину теломер, теломераза (Greider and Blackburn 1985). В начале 1990 Дж. Шостак связал укорочение теломер дрожжей с клеточным старением (Lundblad and Szostak 1989). Гипотеза о том, что длина теломер связана с клеточным старением была подтверждена в 1998 году, когда было показано, что эктопическая экспрессия теломеразы в соматических клетках человека приводит к увеличению числа их делений (Vodnar et al. 1998). Функция теломер нарушается при возникновении раковых клеток, поэтому теломерные белки являются важными мишенями противоопухолевой терапии.

1.1.1 Строение теломер млекопитающих

Теломеры представляют собой нуклеопротеиновые структуры, расположенные на концах линейных эукариотических хромосом. Они состоят из теломерных повторов ДНК, специфических белков и РНК. Теломеры защищают концы хромосом от деградации, слияния и активности системы репарации ДНК. Теломерная ДНК большинства эукариот представляет собой G-обогащенные повторы ДНК (у млекопитающих это повтор TTAGGG) с выступающим концом 3'-цепи, длина которого поддерживается ферментом теломеразой. Эта одноцепочечная ДНК у многих организмов внедряется в гомологичный двухцепочечный участок теломеры, формируя теломерную t-петлю. Формирование t-петли защищает 3'конец

хромосомы, по-видимому, предотвращая его распознавание системой репарации ДНК (Palm and de Lange 2008; Doksanı and de Lange 2014).

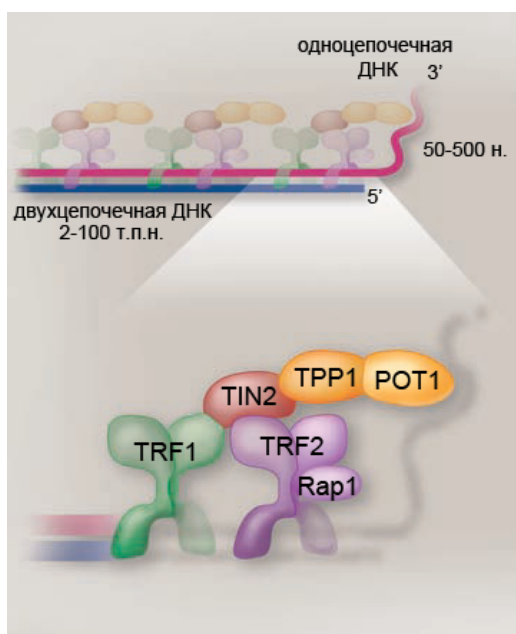


Рисунок 1. Структура шелтерина млекопитающих (Palm, 2008, с изменениями).

С теломерной ДНК связан белковый комплекс шелтерин. Непосредственно с теломерными повторами связаны белки TRF1 и TRF2 (telomere repeat factor 1 и 2), которые связываются с двухцепочечной ДНК и белок POT1 (protection of telomeres 1), который стабилизирует одноцепочечный выступающий конец ДНК (Рис. 1). С этими белками связаны остальные три белка шелтерина: TPP1 (telomere protection protein 1), Rap1 (repressor activator protein 1), TIN2 (TRF2- and TRF1-interacting nuclear protein 2). Шелтерин способствует формированию и стабилизации t-петли, таким образом регулируя активность теломеразы и защищая хромосомные концы от деградации и слияния. Белки шелтерина TRF2 и POT1 играют ключевую роль в инактивации системы репарации ДНК в теломерах млекопитающих (Palm and de Lange 2008; Doksanı and de Lange 2014).

Кроме шелтерина с теломерами связано большое количество белков, которые играют важную роль в поддержании и защите концов хромосом. Эти не относящиеся к шелтерину факторы обычно взаимодействуют с ними короткое время, в то время как шелтерин присутствует в теломерах в течение

всего жизненного цикла клетки. К тому же большая часть нешелтериновых белков имеет также нетеломерные функции. Эти белки относятся к системе репарации ДНК, системе ответа на повреждение ДНК, репликации ДНК, поддержания хроматина. Однако привлечение на теломеру большей части данных белков происходит с участием белков шелтерина (Palm and de Lange 2008; Doksanı and de Lange 2014).

У большинства эукариот удлинение теломерной ДНК происходит с помощью теломеразы. Теломераза представляет собой РНК-белковый комплекс (РНП), который состоит из одной длинной некодирующей РНК – теломеразной РНК, и ассоциированной с ней теломеразной обратной транскриптазы (TERT). Теломераза удлиняет 3' конец хромосомы, используя РНК компонент как комплементарную матрицу. Она синтезирует одноцепочечную ДНК, состоящую из повторов (G-цепь). Также она участвует в синтезе комплементарной цепи (C-цепи). Теломераза практически не активна в соматических клетках, средний уровень ее активности наблюдается в стволовых и половых клетках, наибольшая активность теломеразы выявлена в большинстве раковых клеток (Wang and Feigon 2017).

1.1.2 Теломерная РНК млекопитающих

Важнейшим компонентом теломер млекопитающих является теломерная РНК или TERRA (TElomeric Repeat-containing RNA). Теломерные транскрипты были описаны у многих организмов (Solovei et al. 1994; Danilevskaya et al. 1999), однако особый интерес к теломерной РНК появился после открытия TERRA у млекопитающих (Azzalin et al. 2007). Транскрипция TERRA у человека начинается в субтеломерных участках и продолжается в область теломерных повторов; матрицей служит С-богатая цепь ДНК, а сами транскрипты состоят из повторов UUAGGG. 5' концы TERRA у человека и *S.*

cerevisiae содержат “кэп”, 7-метил-гуанозин. Часть TERRA полиаденилируется (Azzalin and Lingner 2015). Полиаденилирование TERRA влияет на ее стабильность и ассоциацию с хроматином: polyA- TERRA ассоциирована с хроматином, а фракция polyA+ TERRA находится в нуклеоплазме и более стабильна. Скорее всего, пост-транскрипционные изменения TERRA влияют на ее функциональный статус и локализацию (Azzalin et al. 2007; Schoeftner and Blasco 2008; Luke et al. 2008; Porro et al. 2010).

Несколько исследований показали, что теломеры всех хромосом транскрибируют TERRA (Azzalin et al. 2007; Feretzaki et al. 2019). Однако существует альтернативная точка зрения, что TERRA в клетках человека в основном образуется в локусах 20q и Xp и взаимодействует *in trans* с теломерами других хромосом (Montero et al. 2016), а у мыши транскрибируются преимущественно субтеломерные области хромосом 9 и 18 (Lopez de Silanes et al. 2014).

Содержание TERRA в клетке регулируется как на транскрипционном, так и на пост-транскрипционном уровнях. Промоторы TERRA у человека находятся в субтеломерной области, содержат островки CpG и состоят из tandemных повторов, а их активность регулируется ДНК метилтрансферазами DNMT1 и DNMT3b (Nergadze et al. 2009). Экспрессия TERRA негативно регулируется гистоновой метилтрансферазой SUV39H1 и белком HP1, узнающим гистоновую метку H3K9me3 (Arnoult et al. 2012). Предполагается, что существует механизм обратной связи между накоплением TERRA при удлинении теломер и уровнем транскрипции TERRA. Механизмом такой саморегуляции, возможно, служит способность TERRA привлекать метилтрансферазу SUV39H1 к теломере, таким образом подавляя транскрипцию (Arnoult et al. 2012).

Значительная часть TERRA остается связанной с теломерами после транскрипции, причем теломерная локализация присуща неполиаденилированной фракции TERRA (Azzalin et al. 2007; Schoeftner and

Blasco 2008). Активность механизма nonsense-mediated RNA decay (NMD) удаляет избыток TERRA на теломерах (Azzalin et al. 2007). Хроматиновая фракция TERRA выполняет структурную роль в формировании теломерного гетерохроматина, взаимодействуя с теломерными белками, такими как TRF1 и TRF2, HP1, субъединицами пре-репликативного комплекса origin recognition complex (ORC), компонентами системы ДНК репарации (Deng et al. 2012). TERRA также привлекает на теломеры Polycomb repressive complex 2 (PRC2), который осуществляет метилирование гистона H3K27 (Wang et al. 2017; Montero et al. 2018), и метилтрансферазу SUV39H1, которая ответственна за метилирование H3K9 (Arnoult et al. 2012; Porro et al. 2014). Установление этих гистоновых меток в свою очередь необходимо для гетерохроматинизации теломер (Montero et al. 2018). Эти данные показывают, что TERRA является важным компонентом и регулятором теломерного хроматина.

Уменьшение содержания TERRA приводит к формированию γ H2AX-фокусов повреждения ДНК. Наблюдаются также дефекты кэпирования теломер, укорочение теломер и теломерные слияния (Lopez de Silanes et al. 2014; Montero et al. 2016; Chu et al. 2017). Таким образом, TERRA необходима для поддержания целостности теломер.

TERRA способна образовывать РНК-ДНК гибридные структуры в теломерах или R-петли. Теломерные R-петли являются медиаторами рекомбинации и, таким образом, участвуют в механизме альтернативного удлинения теломер (alternative lengthening of telomeres, ALT) (Balk et al. 2013; Yu et al. 2014). Считается, что образование R-петель в теломерах с участием TERRA позволяет запустить процесс ALT. ALT характерен для многих опухолевых клеток, в которых инактивирована теломераза. Повышенный уровень TERRA в таких опухолях подтверждает участие теломерных РНК в механизме ALT (Arora and Azzalin 2015).

Итак, TERRA играет важнейшую структурную роль в теломере, участвуя в сборке и поддержании теломерного хроматина. Однако недавние

исследования показали, что TERRA связывается не только с теломерами, но и с нетеломерным хроматином.

В эмбриональных стволовых клетках мыши были обнаружены множественные сайты локализации TERRA в нетеломерном хроматине, преимущественно в некодирующих последовательностях ДНК, в межгенных последовательностях, в интронах и псевдоаутосомных участках половых хромосом (Chu et al. 2017). Было показано, что TERRA может оказывать как активирующее, так и ингибирующее влияние на экспрессию ряда нетеломерных генов. Показано, что TERRA РНК связывается с промоторами и сайтами терминации транскрипции этих генов (Chu et al. 2017). Исследования на плюрипотентных клетках мыши показали, что TERRA способна привлекать репрессирующий комплекс Polycomb к генам, регулирующим плюрипотентность и дифференцировку клеток. При этом белок шелтерина TRF1 регулирует содержание TERRA в клетках (Marion et al. 2019).

Изучение белков-партнеров TERRA позволило приблизиться к пониманию хроматиновой нетеломерной роли TERRA. Среди белков, взаимодействующих с TERRA, были обнаружены факторы транскрипции и ремоделирования хроматина (Scheibe et al. 2013; Chu et al. 2017).

Таким образом, TERRA может выполнять не только функции, связанные с поддержанием теломер, но и участвовать в регуляции экспрессии различных генов.

Предполагается, что TERRA, регулируя активность белков, связывающихся с одноцепочечной теломерной ДНК, инициирует кэпирование теломер после репликации ДНК (Flynn et al. 2011). Также было показано, что индукция транскрипции TERRA, обусловленная субтеломерным связыванием CTCF, необходима для корректной репликации теломер и хромосомной стабильности (Beishline et al. 2017). Таким образом, транскрипция теломерных повторов и сами теломерные РНК обеспечивают стабильную репликацию теломерной ДНК.

TERRA может также выступать в качестве регулятора активности теломеразы, вместе с белками, взаимодействующими с ней (Schoeftner and Blasco 2008; Redon et al. 2013). TERRA сама по себе является мощным ингибитором теломеразы, связываясь с ней и с ее РНК компонентом. Однако *in vivo* TERRA связана с множеством белков, которые, по-видимому, регулируют ее активность (Redon et al. 2013; Chu et al. 2017).

Длина теломер и уровень экспрессии TERRA, по-видимому, являются взаимозависимыми (Arnoult et al. 2012). Высокий уровень экспрессии TERRA наблюдается при укорочении теломер при старении клеток *S.cerevisiae* с нокаутом теломеразы (Graf et al. 2017). Укорочение теломер также коррелирует с увеличением содержания TERRA у пациентов с синдромом ICF (immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies) (Yehezkel et al. 2008). Такая корреляция может свидетельствовать о сигнальной роли TERRA при теломерной дисфункции.

Действительно, накопление TERRA активирует процесс удлинения критически коротких теломер у дрожжей. Одним из механизмов этого процесса является формирование R-петель, что, по-видимому, провоцирует удлинение теломер путем гомологичной рекомбинации. При старении клеток *S. cerevisiae* с нокаутом теломеразы увеличивалось содержание TERRA и РНК-ДНК гибридов в теломерах (Graf et al. 2017).

Недавние исследования показывают, что увеличение транскрипции TERRA у *S. pombe* и *S. cerevisiae* приводит к удлинению теломер *in cis* за счет привлечения теломеразы (Cusanelli et al. 2013; Moravec et al. 2016). Причем у *S. pombe* связываться с теломеразой способна только та фракция TERRA, которая лишена теломерных повторов и полиаденилирована (Moravec et al. 2016). Таким образом, TERRA может способствовать удлинению теломер, привлекая теломеразу к коротким теломерам. По-видимому, различные популяции TERRA выполняют разные функции.

Таким образом, TERRA играет важную роль в поддержании теломер. В присутствии теломеразы TERRA способна привлекать ее к коротким

теломерам (Cusanelli et al. 2013; Moravec et al. 2016). В отсутствие теломеразы TERRA способствует удлинению укороченных теломер путем гомологичной рекомбинации (Graf et al. 2017). Кроме того, экспрессия TERRA увеличивается в ответ на подавление функции белка TRF2 при нормальной длине теломер (Caslini et al. 2009; Porro et al. 2014), что указывает на способность TERRA отвечать на функциональное состояние теломеры.

В герминальных клетках млекопитающих TERRA обнаружена в теломерах на стадии профазы I, как в мужских, так и в женских клетках, (Reig-Viader et al. 2013; Reig-Viader et al. 2014). Транскрипция TERRA начинается в эмбриональных предшественниках герминальных клеток – примордиальных герминальных клетках (Reig-Viader et al. 2014). В этих клетках TERRA колокализуется с теломеразой, по-видимому участвуя в регуляции ее активности. Были идентифицированы ряд белков, взаимодействующих с TERRA в примордиальных герминальных клетках (Brieno-Enriquez et al. 2019), однако этого оказалось недостаточно чтобы сделать однозначные выводы о функциональной роли TERRA в герминальных клетках млекопитающих.

1.1.3 Теломерные ретротранспозоны у разных видов

У плодовой мушки, *Drosophila*, в отличие от других эукариот, нет теломеразы, и поддержание теломер происходит исключительно за счет транспозиций ретроэлементов. Теломеры дрозофилы состоят из повторяющихся последовательностей, как и у организмов, имеющих теломеразу. Однако в данном случае повторы представляют собой группу трех специализированных ретротранспозонов типа LINE (Таблица 1). Два способа поддержания теломер – теломеразный и путем присоединения ретротранспозонов, долгое время считались альтернативными путями

поддержания теломер. В геноме *D. melanogaster* не обнаружено гена, кодирующего теломеразу, возможно из-за его утери после замещения неактивной теломеразы специализированными теломерными ретротранспозонами (Villasante et al. 2007; Garavis et al. 2013). Тем не менее, разделение видов на те, которые используют теломеразу либо ретротранспозоны для поддержания теломер, не является строгим. Инсерции ретротранспозонов в последовательности, генерированные теломеразой, были показаны для многих современных видов, включая шелкопряда (таблица 1). Так как теломеразная активность очень низка у шелкопряда и некоторых других насекомых, было сделано предположение, что ретротранспозоны могут замещать ее для поддержания теломер (Fujiwara et al. 2005; Garavis et al. 2013).

Теломерные ретротранспозиции *L1* в клетках млекопитающих, независимые от активности эндонуклеаз, были показаны на фоне инактивированной системы репарации двухцепочечных разрывов в клетках с нарушениями кэпирования теломер при мутациях DNA-ПК (киназы, активность которой необходима для функционирования кэпа) либо компонента шелтерина TRF2 (Morrish et al. 2007). Этот результат не является неожиданным, принимая во внимание способность ретротранспозонов к репарации разрывов ДНК с использованием 3'ОН гидроксила для инициации обратной транскрипции без участия эндонуклеазы (Morrish et al. 2002). Также было показано, что *L1* необходим для поддержания теломер в опухолевых клетках человека. Нокдаун *L1* приводил к появлению теломерных слияний, снижению активности теломеразы и к резкому увеличению клеточной гибели (Aschacher et al. 2016). Таким образом, даже не являясь структурным компонентом теломер, *L1* связан с теломерным гомеостазом, хотя механизм этой связи пока не выяснен (Mueller et al. 2018).

Существует гипотеза, что присоединение ретротранспозонов типа *LINE* к концам ДНК дало начало прото-теломерам первичных линейных хромосом (Garavis et al. 2013). Эти данные предполагают, что ретроэлементы являются

предшественниками теломеразы, которая прошла длительный эволюционный путь.

Таким образом, удлинение теломер путем транспозиций ретроэлементов может быть дополнительным путем при потере или уменьшении активности теломеразы (Servant and Deininger 2015). По сути, оба способа удлинения теломер используют активность обратной транскриптазы и могут рассматриваться как функционально аналогичные механизмы. Компоненты теломерного комплекса дрозофилы функционально гомологичны компонентам теломерного комплекса организмов, использующих теломеразу. Кэпирующий белковый комплекс дрозофилы – терминин, является функциональным аналогом шелтерина. Теломерные повторы дрозофилы также транскрибируются. В отличие от TERRA, теломерные РНК дрозофилы являются кодирующими. Однако есть сходные черты в биогенезе TERRA и теломерных РНК у дрозофилы, возможно, связанные с их консервативной теломерной функцией. Транскрипция теломерных повторов *Drosophila*, как и TERRA, направлена с промоторов, расположенных в теломерном гетерохроматине, а компоненты системы контроля качества РНК регулируют содержание теломерных РНК и обеспечивают их ядерную локализацию и деаденилирование (Azzalin and Lingner 2015; Morgunova et al. 2015).

Таблица 1. Теломерные ретротранспозоны у эукариот.

Организм царство, отдел, вид	Теломерный ретротранспозон		Наличие теломерных разных	Ссылка
	тип	название		
Protozoa Metamonada <i>Giardia lamblia</i>	Non-LTR	<i>GilT, GilM</i>	+	(Arkhipova and Morrison 2001)
Chromista Heterokonta <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	PLE	<i>Coprina</i>	+	(Gladyshev and Arkhipova 2007)
Plantae Chlorophyta <i>Clorella vulgaris</i>	Non-LTR	<i>Zepp</i>	+	(Higashiyama et al. 1997)
Tracheophyta <i>Selaginella moellendorffii</i>	PLE	<i>Coprina</i>	+	(Gladyshev and Arkhipova 2007)
Fungi Ascomycota <i>Magnaporthe oryzae</i>	Non-LTR	<i>MoTeR</i>	+	(Starnes et al. 2012)
<i>Nectria haematococca</i>	Non-LTR	<i>NhTeR1</i>	+	(Starnes et al. 2012)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Non-LTR	<i>FoNLR9</i>	+	(Starnes et al. 2012)
Basidiomycota <i>Cryptococcus neoformans</i>	Non-LTR	<i>Cnl1</i>	+	(Starnes et al. 2012)
<i>Coprinus cinereus</i>	PLE	<i>Coprina</i>	+	(Gladyshev and Arkhipova 2007)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PLE	<i>Coprina</i>	+	(Gladyshev and Arkhipova 2007)
Animalia Arthropoda Diptera <i>Drosophila melanogaster</i>	Non-LTR	<i>HeT-A, TART,</i>	-	(Villasante et al. 2007)
<i>Rhynchosciara americana</i>	Non-LTR	<i>TAHRE</i> <i>RaTART</i>	-	(Rezende-Teixeira et al. 2008)
Lepidoptera <i>Bombix mori</i>	Non-LTR	<i>TRAS, SART</i>	+	(Kubo et al. 2001)
<i>Dictyoploca japonica</i>	Non-LTR	<i>TRAS</i>	+	(Kubo et al. 2001)
<i>Samia cynthia ricini</i>	Non-LTR	<i>TRAS</i>	+	(Kubo et al. 2001)
<i>Mamestra brassicae</i>	Non-LTR	<i>TRAS</i>	+	(Mandrioli 2002)
Hemiptera <i>Acyrtosiphon pisum</i>	Non-LTR	<i>TRAS</i>	+	(Monti et al. 2013)
<i>Myzus persicae</i>	Non-LTR	<i>TRAS</i>	+	(Monti et al. 2013)
Rotifera <i>Philodina roseola</i>	PLE	<i>Athena</i>	+	(Arkhipova et al. 2017)
<i>Adineta vaga</i>	PLE	<i>Athena</i>	+	
Chordata <i>Cricetulus griseus</i>	Non-LTR	<i>L1</i>	+	(Morrish et al. 2007)

Non-LTR - ретротранспозоны типа LINE

PLE - Penelope like element, элемент типа Пенелопа

1.1.4 Теломеры дрозофилы

Теломеры дрозофилы состоят из повторяющихся последовательностей, как и у организмов, имеющих теломеразу. Однако в данном случае повторы представляют собой группу трех специализированных ретротранспозонов типа LINE: *HeT-A* (*Heterochromatic repeats A*), *TART* (*Telomere Associated Retrotransposon*) и *TAHRE* (*Telomere Associated and HeT-A Related*), *HeT-A* является основным теломерным повтором. Эти элементы расположены в случайном порядке, но всегда в одном направлении, голова к хвосту, их 3' концы направлены к центромере.

Теломеры *D. melanogaster* также защищены белковым комплексом - терминином. В его состав входят белки: HOAP (HP1/ORC-associated protein), Ver (Verrocchio), HipHop, Moi (Modigliani), и Tea (Raffa et al. 2011; Zhang et al. 2016). Терминин защищает концы хромосом от слияния друг с другом. Терминин функционально гомологичен шелтерину млекопитающих, однако структурная гомология белков терминиона и шелтерина не выявлена (Raffa et al. 2011; Zhang et al. 2016), за исключением белка Ver, который обладает структурной гомологией с белком дрожжей Stn1. Stn1 - компонент защитного теломерного Cdc13-Stn1-Ten1 комплекса, участвующего в стабилизации одноцепочечной теломерной ДНК (Raffa et al. 2010; Raffa et al. 2013). Белок Ver также связывает одноцепочечную теломерную ДНК.

Теломерный элемент *HeT-A* является главным структурным компонентом теломер дрозофилы. В среднем в геноме присутствуют 30-40 копий *HeT-A*, часть из которых полноразмерные (George et al. 2006). Два остальных теломерных ретротранспозона *TART* и *TAHRE* представлены небольшим количеством копий. Размер элементов – от шести до четырнадцати тысяч пар нуклеотидов. Элементы имеют необычно длинные 5' и 3' нетранслируемые области (UTR), которые содержат промоторные и регуляторные последовательности, сигнал полиаденилирования и открытые

рамки считывания. *TART* и *TAHRE* кодируют структурный белок Orf1p или Gag и белок Orf2p или Pol – обратную транскриптазу. *HeT-A* не имеет гена *pol* и, по-видимому, использует полимеразу других теломерных ретротранспозонов (Casacuberta, 2017).

Как и у других эукариот, теломерные повторы дрозофилы транскрибируются. *HeT-A* и *TAHRE* транскрибируются преимущественно в смысловом направлении, однако антисмысловые транскрипты также были детектированы. *TART* примерно одинаково экспрессируется как в смысловом, так и в антисмысловом направлении (Danilevskaya et al. 1999; Shpiz et al. 2009). Транскрипты *HeT-A* объединяют в себе как функции матрицы для удлинения теломер, так и теломерной РНК, TERRA, в то время как у млекопитающих эти РНК имеют разное происхождение.

Теломерные ретроэлементы дрозофилы несколько отличаются от других ретротранспозонов типа LINE. *L1* элемент человека имеет 5'-нетранслируемую область с двунаправленным промотором (Swergold et al. 1990; Speek et al. 2001), две открытые рамки считывания (ORF), ORF1 и ORF2, и 3'UTR, имеющую слабый сигнал полиаденилирования. Транскрибируемая бицистронная *L1* мРНК полиаденилируется и экспортируется в цитоплазму (Wei et al. 2001).

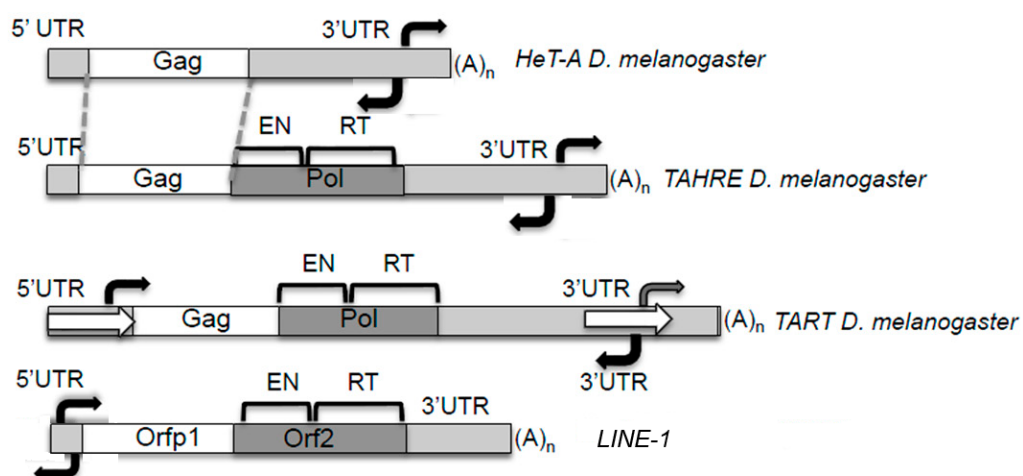


Рисунок 2. Структура теломерных ретроэлементов дрозофилы и ретротранспозона *L1* человека (Casacuberta 2017 с изменениями).

Теломерные элементы дрозофилы имеют 3'UTR большего размера, чем *L1*. Промотор *HeT-A* находится в 3'UTR элемента. Он является двунаправленным, инициируя транскрипцию смысловой цепи нижележащего элемента и также транскрипцию антисмысловой цепи данного элемента (Radion et al. 2017). Промотор *TAHRE* также находится в 3'UTR и является двунаправленным (Shpiz et al. 2007). *TART* имеет промоторы в области так называемых неконцевых прямых повторов в 5' и 3' UTR, с которых происходит смысловая и антисмысловая транскрипция (Maxwell et al. 2006).

1.1.5 Контроль экспрессии теломерных повторов и длины теломер у *D. melanogaster*

Удлинение теломер дрозофилы осуществляется с помощью транспозиции на концы хромосом специализированных теломерных ретротранспозонов с участием механизма обратной транскрипции. Интермедиатом транспозиций служат транскрипты теломерных ретроэлементов, поэтому контроль уровня экспрессии теломерных повторов напрямую связан с контролем длины теломер. Наследуемое удлинение теломер происходит в герминальных тканях. В гонадах различных животных, в том числе у *Drosophila*, экспрессия ретротранспозонов в норме подавлена системой piРНК сайленсинга. Основой системы являются piРНК, PIWI-interacting RNAs, ассоциированные с белками типа Argonaute подсемейства PIWI. piРНК генерируются из длинных одноцепочечных предшественников. У дрозофилы piРНК предшественники кодируются различными участками генома - piРНК кластерами, которые обогащены поврежденными копиями мобильных элементов. piРНК кластеры, обнаруженные в герминальных тканях дрозофилы, являются двухцепочечными и продуцируют piРНК из предшественников, транскрибирующихся с обеих геномных цепей (Aravin et al. 2007; Brennecke et al. 2007). piРНК вместе с PIWI-белками разрушают

транскрипты транспозонов на пост-транскрипционном уровне регуляции. Также piРНК участвуют в транскрипционном сайленсинге транспозонов, осуществляемом путем формирования гетерохроматина с участием белка HP1 и гистоновой метки H3K9me3 (Brennecke et al. 2008). Мутации компонентов системы piРНК приводят к гиперэкспрессии и мобилизации ретротранспозонов в герминальных тканях (Brennecke et al. 2007).

Экспрессия теломерных ретроэлементов в герминальных тканях дрозофилы также находится под контролем piРНК пути (Savitsky et al. 2006; Shpiz et al. 2009). В яичниках дрозофилы были выявлено большое количество piРНК, относящихся к обеим цепям ДНК теломер и субтеломерных областей (Brennecke et al. 2007). Таким образом, теломерные piРНК кластеры являются двухцепочечными. Главным отличием теломерных piРНК кластеров является то, что их транскрипты служат как источником, так и мишенью piРНК одновременно. Теломерные транскрипты процессируются, образуя piРНК, которые регулируют экспрессию теломерных мобильных элементов. При нарушении этого пути наблюдается их гиперэкспрессия, в первую очередь в сотни раз увеличивается количество *HeT-A* РНК (Shpiz et al. 2011). При этом также увеличивается частота транспозиций теломерных элементов на конец хромосомы (Savitsky et al. 2006; Shpiz et al. 2009). Частота транспозиций теломерных ретроэлементов на конец хромосомы в норме очень низка - 0,04 % на поколение (Kahn et al. 2000). При нарушении piРНК пути частота транспозиций резко увеличивается до 2-6 % (Savitsky et al. 2006). Таким образом, piРНК система негативно регулирует длину теломер *Drosophila*, скорее всего, подавляя транскрипцию теломерных повторов. Действительно, было показано, что piРНК необходимы для формирования и поддержания в процессе оогенеза теломерного гетерохроматина, в состав которого входят белки семейства HP1 – HP1a и Rhino, а также гистоновая модификация H3K9me3 (Radion et al. 2018). При нарушении системы piРНК происходит разрушение теломерного гетерохроматина и накопление РНК теломерных ретротранспозонов – интермедиатов удлинения теломер.

Теломерные piРНК были описаны не только у *Drosophila*, но также в эмбриональных стволовых клетках мыши и у *Arabidopsis* (Cao et al. 2009; Vrbsky et al. 2010). Возможно, редкие химерные транскрипты, содержащие последовательности транспозонов вместе с теломеразными повторами, становятся мишенями транспозон-специфичных piРНК и процессируются, образуя короткие piРНК.

Последовательность теломеры *Drosophila* не влияет на вероятность транспозиции на нее любого из трех теломерных ретротранспозонов не (Sheen and Levis 1994; Kahn et al. 2000). Поэтому последовательности теломер разных хромосомных концов разнородны по представленности и числу копий теломерных ретроэлементов (George et al. 2006).

Фрагменты элементов *TART* и *HeT-A* также выявляются в районах перицентромерного и субтеломерного гетерохроматина. Считается, активные ретротранспозиции не являются причиной перемещения этих фрагментов в данные районы гетерохроматина, они переместились туда в результате рекомбинации (Losada et al. 1997; Losada et al. 1999; Pardue and Debaryshe 2011).

1.1.6 Теломерные ретротранспозиции у дрозофилы

Удлинение теломер является сложным процессом с участием всех компонентов теломерного комплекса и клеточных сигнальных путей. Основным участником этого процесса у видов, кодирующих теломеразу, является сама теломераза - РНП с обратнo-транскриптазной активностью. У дрозофилы теломерные удлинения представляют собой ретротранспозиции. Детали этого процесса, в особенности, механизм сайт-специфичности теломерных присоединений, пока далеки от понимания. Однако очевидно, что в основе этого лежат механизмы, схожие с ретротранспозицией других ретроэлементов типа LINE.

Наиболее исследованным является жизненный цикл ретротранспозона *L1* человека. Краткое рассмотрение биогенеза РНК и белков, кодируемых *L1*, представленное в данной главе, поможет пониманию тех процессов, которые происходят с транскриптами теломерных ретротранспозонов дрозофилы в процессе теломерных ретротранспозиций.

Вновь образованные мРНК *L1* полиаденилируются и транспортируются из ядра в цитоплазму, где они используются как матрица для продукции белков, которые они кодируют. Ключевым моментом в биогенезе *L1* является формирование РНП, в состав которых входят РНК и белки ретротранспозона. *L1* мРНК взаимодействует с белками *L1* ORF1 и *L1* ORF2 (обратной транскриптазой, необходимой для ретротранспозиций), которые она кодирует, по правилу *цис*-предпочтения. Это правило состоит во взаимодействии белка с кодирующей его РНК (Wei et al. 2001). Важным свойством *L1* ORF1p является способность к полимеризации, как в присутствии, так и в отсутствии нуклеиновых кислот (Dai et al. 2014; Voeke et al. 2014). ORF1p полимеры, по-видимому, аккумулируются возле трансляционного аппарата, и когда *L1* транскрипт высвобождается от рибосом, он сразу встраивается в *L1* РНП (Callahan et al. 2012).

Затем *L1* РНП транспортируется в ядро из цитоплазмы, чтобы осуществить транспозицию новой копии *L1* в геном. Частицы проникают в ядро, как только клетка начинает делиться, и ядерная мембрана разрушается. ORF1p экспортируется из ядра в поздней G1 фазе клеточного цикла. Во время S и G2/M фаз ядерные *L1* RNP теряют ORF1p и состоят в основном из ORF2p и *L1* мРНК. Таким образом, ORF1p выполняет функцию шаперона, доставляя РНК-ORF2p комплекс к хроматину, но непосредственно в ретротранспозициях *L1* не участвует и покидает ядро до начала процесса (Mita et al. 2018).

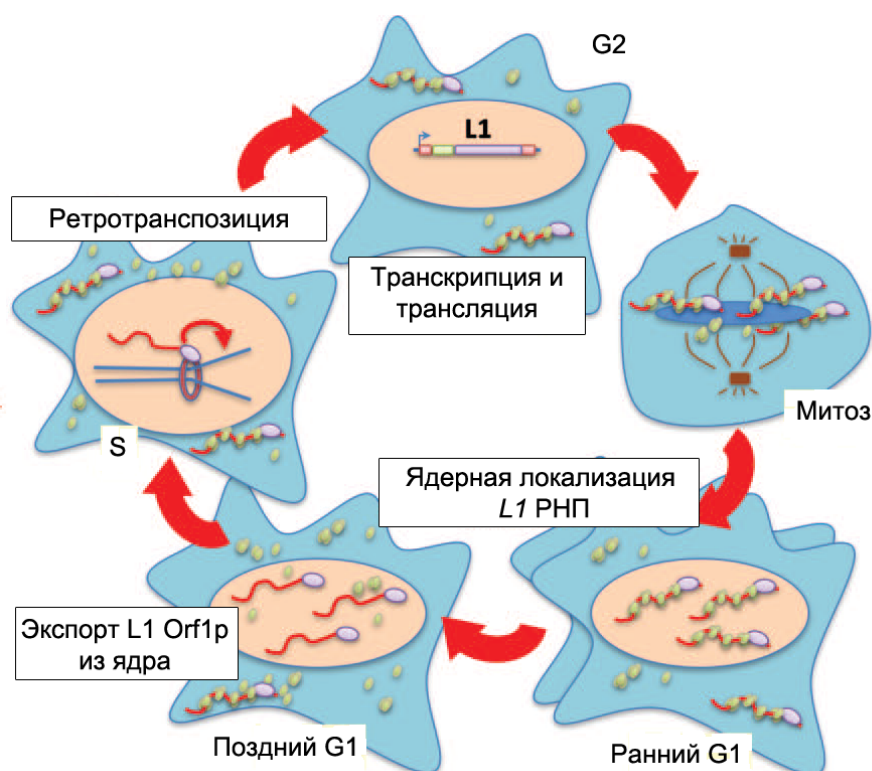


Рисунок 3. Жизненный цикл *L1* РНП (Mita et al. 2018 с модификациями).

Интересным фактом является то, что эффективная ретротранспозиция *L1* может происходить в дифференцированных первичных соматических клетках человека и в клетках с остановкой клеточного цикла в G1/S, а также в терминально дифференцированных нейрональных клетках (Kubo et al. 2006; Macia et al. 2017). То есть разрушение ядерной оболочки при митозе не является необходимым фактором для транспорта *L1* РНП в ядро.

Положительно заряженный ORF1p взаимодействует с хроматином, что повышает возможность аккумуляции *L1* РНП на хромосомах во время митоза и ядерной локализации *L1* после завершения клеточного деления. В S-фазе, когда происходит репликация геномной ДНК хозяина, происходят встраивания *L1* в геном (Mita et al. 2018).

Ретротранспозиция *L1* происходит по механизму обратной транскрипции, праймированной целевой ДНК (target primed reverse transcription, TPRT). Ее механизм представлен на рисунке 4.

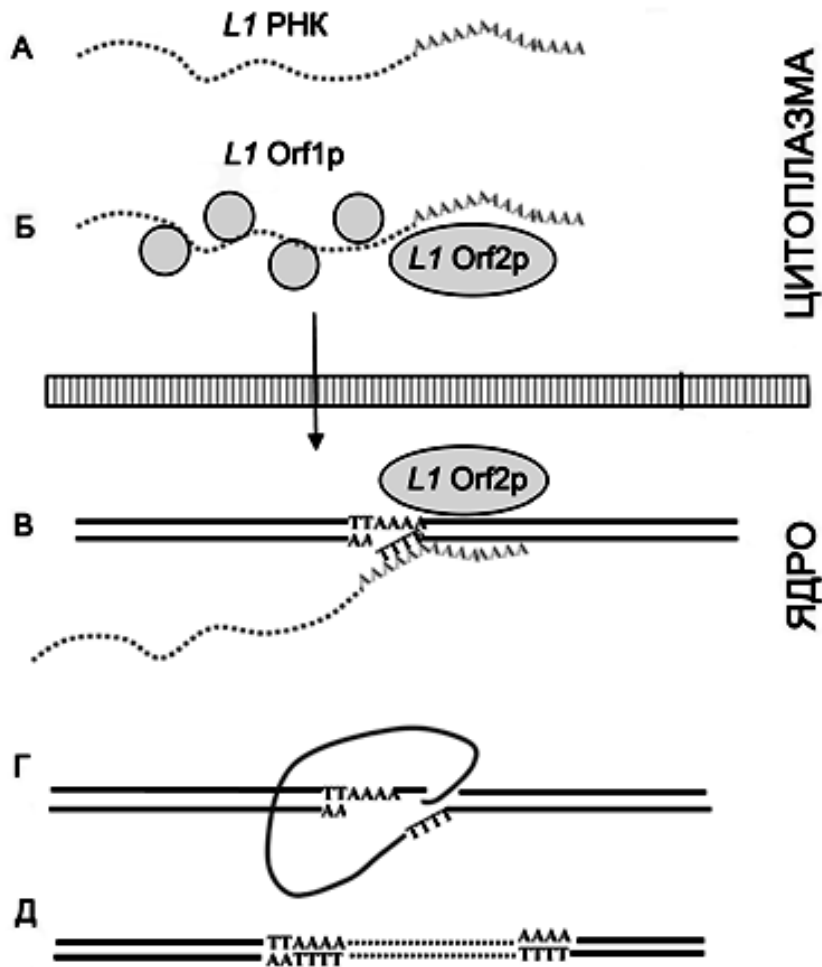


Рисунок 4. Модель ретротранспозиции ретроэлементов по механизму обратной транскрипции, праймированной целевой ДНК на примере ретротранспозона *L1*. (А) Сначала происходит транскрипция РНК, процессинг и экспорт в цитоплазму. (Б) Трансляция *L1* Orf1p и Orf2p, формируется *L1* РНП. (В) *L1* РНП проникают в ядро. Эндонуклеаза *L1* ORF2p гидролизует нижнюю цепь целевой ДНК, как правило, это АТ-обогащенные последовательности с консенсусной последовательностью ТТАААА. При этом происходит экспозиция 3'-ОН группы, которая праймирует обратную транскрипцию *L1* РНК от ее polyA хвоста. Поли-А участок *L1* транскрипта взаимодействует с гидролизованной ДНК. (Г) Обратная транскриптаза *L1* Orf2p синтезирует первую цепь ДНК. (Д) Для завершения ретротранспозиции производится гидролиз второй цепи по неизвестному механизму и синтез второй цепи ДНК. По завершению транспозиции разрывы лигируются. Предполагается, что по крайней мере некоторые из данных процессов осуществляются белками клетки-хозяина, возможно система репарации участвует в данном процессе. В итоге в сайте вставки генерируются прямые повторы (Krouter et al. 2009 с модификациями).

Теломерные ретротранспозоны дрозофилы также кодируют белки: все три элемента кодируют Gag белки, *TART* и *TAHRE* кодируют также обратную транскриптазу Pol, в то время как *HeT-A* является неавтономным ретротранспозоном.

В ядрах соматических клеток дрозофилы - нейробластов личинок 3 стадии, а также в клетках линии S2, были обнаружены сферические частицы в хроматине, напоминающие вирусные частицы, состоящие из белка *HeT-A* Gag (Рис. 5; Rashkova et al. 2002; Zhang et al. 2014). Внутри сфер, обнаруженных в нейробластах, была выявлена *HeT-A* РНК. *HeT-A* сферы находятся в хроматине вблизи теломер и колокализуются с теломерным белком HOAP (Zhang et al. 2014). Данные сферы появляются в определенные фазы клеточного цикла: при переходе из G1 в S фазу и при переходе из S в G2 фазу. Возможно, формирование *HeT-A* сфер является интермедиатом транспозиций.

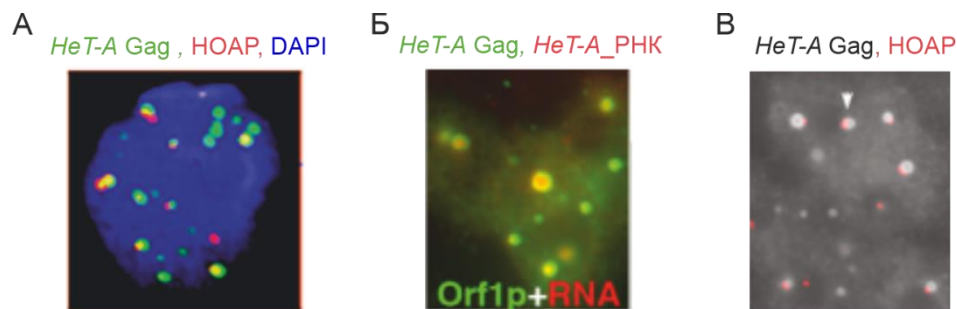


Рисунок 5. *HeT-A* Gag формирует сферы у теломер в клетках дрозофилы линии S2 и нейробластах личинок 3 стадии развития. (А) Клетки S2, трансфицированные плазмидой, кодирующей *HeT-A* Gag-GFP, с иммуноокрашиванием теломерного белка HOAP (Rashkova et al. 2002). (Б, В) *HeT-A* Gag (Orf1p) формирует сферы у теломер в нейробластах личинок дрозофилы 3 стадии. (Б) Иммуноокрашивание Orf1p, совмещенное с *HeT-A* РНК FISH. *HeT-A* РНК ассоциирована с каждой *HeT-A* сферой и находится внутри нее. На совмещенных рисунках сигналы Orf1p – зеленого цвета, сигналы РНК – красного цвета. (В) Двойное иммуноокрашивание Orf1p и HOAP. На совмещенном изображении сигналы HOAP – красного цвета (Zhang et al. 2014).

Интересен факт, что у *S. cerevisiae* теломеры реплицируются также в поздней S-фазе, при этом происходит их удлинение теломеразой (Marcand et al. 2000; Gilson et al. 2000). Так же временная связь процессов удлинения теломер и репликации была показана для опухолевых клеток человека (Zhao et al. 2009). По-видимому, связь репликации с элонгацией теломер является консервативным процессом, который важен для достройки одноцепочечной ДНК, синтезируемой теломеразой или обратной транскриптазой, до двухцепочечной теломерной ДНК.

Особенно важен контроль длины теломер в зародышевой линии, т.к. хромосомы герминальных клеток передаются потомству и определяют нормальное развитие всего организма. Модельные многоклеточные виды позволяют исследовать динамику теломер на организменном уровне. В яичниках дрозофилы *HeT-A* Gag детектируется на стадии 4-клеточного цистобласта при дерепрессии *HeT-A*. В стволовых клетках яичника в линиях дикого типа не выявляются транскрипты *HeT-A* (Zhang et al. 2014). На более поздних стадиях оогенеза РНК *HeT-A* и белок Gag *HeT-A* выявляются в небольшом количестве в питающих клетках яичника и в ооците (Lopez-Panades et al. 2015). При гиперэкспрессии *HeT-A* РНК накапливается возле centrosом в ранних эмбрионах (Morgunova et al. 2015). В перечисленных работах исследовали по отдельности либо РНК, либо белок *HeT-A*. Однако механизмы сборки *HeT-A* РНП и их транспорта, а также принципы их клеточной локализации в процессе оогенеза и раннего развития остаются неизученными.

Теломерные транспозиции у дрозофилы, по-видимому, в целом происходят схожим образом с ретротранспозициями *L1* человека. Однако выявлен ряд особенностей. Основное отличие состоит в том, что перемещения на концы хромосом являются сайт-специфичными, что предполагает существование механизма таргетирования теломерных ретроэлементов на теломеры. *HeT-A* является основным теломерным повтором, однако он не кодирует обратную транскриптазу (reverse

transcriptase, RT), поэтому взаимодействие *HeT-A* РНК с RT не может происходить по правилу *цис*-предпочтения. Так как ретротранспозиции теломерных элементов осуществляются на конец хромосомы, нет необходимости во внесении одноцепочечного разрыва. Однако *TART* pol имеет эндонуклеазный домен, который имеет высоко консервативную последовательность. Это предполагает, что эндонуклеазная активность все-таки необходима для теломерных транспозиций (Casacuberta and Pardue 2005). Возможно, для транспозиции необходим одноцепочечный разрыв всего в нескольких нуклеотидах от конца хромосомы, либо транспозиции могут происходить во внутренние части теломеры (Beaucher et al. 2012).

Теломерный элемент *TAHRE*, имеющий высокое сходство с *HeT-A*, также кодирует белок Gag и функциональный белок Pol (Abad et al. 2004), что делает его наиболее подходящим кандидатом из трех теломерных элементов для участия в удлинении теломер. Тем не менее, всего несколько копий элемента *TAHRE* присутствуют в теломерах дрозофилы, по-видимому, транспозиции *TAHRE* являются случайными и не могут быть надежным механизмом для удлинения теломер. (Villasante et al. 2007). Возможно, *TAHRE* Gag не может самостоятельно таргетироваться в теломеру, что является причиной его низкой копийности. Более того, даже в удаленных видах дрозофилы обнаружены неавтономные *HeT-A*-подобные элементы в теломерах, что указывает на важность именно такой организации теломер с участием ретротранспозонов (Villasante et al. 2007).

Важным вопросом остается то, как теломерные ретротранспозоны таргетируются к теломерам. Эксперименты по локализации меченных Gag белков ретроэлементов в клетках линии S2 показали, что Gag белки всех трех теломерных элементов эффективно транспортируются в ядро в отличие от Gag белков других ретроэлементов (*Doc* Gag, *I-factor* Gag, *jockey* Gag), а в цитоплазме эти белки формируют характерные кластеры (Rashkova et al. 2002). Однако только *HeT-A* Gag способен таргетироваться в теломеры, *TART* Gag и *TAHRE* Gag локализуются в теломерах только в присутствии *HeT-A*

Gag (Rashkova et al. 2003; Fuller et al. 2010). С использованием делеционных производных *HeT-A* и *TART* Gag было показано, что сигнальные последовательности для ассоциации с теломерами присутствуют только у *HeT-A* Gag. Эти последовательности несколько в различных участках белка, но они не дублируют друг друга (Rashkova et al. 2003). *HeT-A* не имеет собственной обратной транскриптазы в отличие от *TART* и *TAHRE*. *TART* или *TAHRE* может предоставлять обратную транскриптазу для обоих элементов, в то время как *HeT-A* может отвечать за таргетирование обоих ретротранспозонов к теломере. Роль в таргетировании может быть причиной того, что *HeT-A* является таким распространенным, несмотря на отсутствие обратной транскриптазы (Rashkova et al. 2002). Такое распределение ролей между энзиматической и матричной функциями различных теломерных ретротранспозонов напоминает строение теломеразы, состоящей из РНК-матрицы (TERC) и фермента (TERT). Эти данные указывают на то, что теломерные ретротранспозоны дрозофилы являются функциональными аналогами теломеразы.

1.1.7 Структура Gag-белков, кодируемых теломерными повторами дрозофилы

Исследование сигнальных функций компонентов теломер, в первую очередь, теломерных белков, важно для понимания механизмов поддержания теломерного гомеостаза. Несмотря на то, что партнеры теломерных белков активно исследуются на клетках млекопитающих, остается много нерешенных вопросов в том, как теломераза привлекается на теломеру и каков механизм передачи сигналов между теломерой и клеткой. Особенно важен вопрос о том, каковы механизмы остановки делений при дисфункции теломер различной природы.

Основное отличие теломер, образуемых теломеразой и ретротранспозонами, состоит в том, что в последнем случае теломерные

повторы являются кодирующими. Кроме ревертазы, они кодируют РНК-связывающий белок Gag, который выполняет, скорее всего, теломерное таргетирование и может участвовать в сигнальных функциях теломер. Действительно, показано, что нокадаун *HeT-A* Gag приводит к слиянию хромосом в клеточной культуре, а, следовательно, этот белок выполняет важную структурную функцию в теломерах дрозофилы (Silva-Sousa et al. 2012).

HeT-A и *TART* относятся к *jockey* группе ретротранспозонов типа LINE, которая является лишь одной из 14 изученных филогенетических групп ретротранспозонов данного типа. По структуре Orf1p белки, кодируемые ретротранспозонами, делятся на 5 типов. К I типу отнесены белки, схожие с ретровирусными белками (группы *I*, *jockey*, *R1*, *Tad1*, *L1*(Tx, plant)), ко II типу – белки, схожие с *L1* Orf1p млекопитающих (*L1* млекопитающих, *L1* Tx, *CR1*). Gag белки ретроэлементов *HeT-A*, *TART* и *TAHRE* относятся к I типу.

В структуре Orf1p белков I и II типа определяются неканонические РНК-связывающие RRM домены. (Рис. 6, Khazina and Weichenrieder 2009). Белки I типа имеют один или два RRM домена, и мотив CCHC – «цинковые пальцы». RRM домен и мотив «цинковые пальцы» расположены рядом и по-видимому функционально связаны. «Цинковый палец» или CCHC домен у белков теломерных ретроэлементов представляет собой три повтора последовательности CX₂CX₄HX₇C (Sheen and Levis 1994; Pardue et al. 1996; Pardue and DeBaryshe 2003). У ретровирусов этот домен отвечает за связывание с ретровирусной РНК и участвует во взаимодействиях Gag мономеров друг с другом.

Белки II типа также имеют несколько белковых функциональных доменов. Хорошо изучена структура *L1* Orf1p млекопитающих. В N-концевой части белка расположен мотив coiled coil, ORF1p формирует тример, опосредованный этим мотивом. Этот же мотив необходим для связывания нуклеиновых кислот (Khazina et al. 2011). С-концевая часть белка содержит неканонический РНК узнающий мотив (RRM) и отдельный С-

концевой домен (CTD). С-концевая часть белка имеет высоко аффинную РНК связывающую активность и активность шаперона для нуклеиновых кислот. N-концевая часть белка в целом высоко вариабельна, хотя мотив coiled coil консервативен среди позвоночных; С-концевая часть высоко консервативна. (Naufer et al. 2018). Визуализация *L1* ORF1p мыши методом атомной силовой микроскопии показали, что он имеет форму удлиненной гантели (Martin et al. 2003).

RRM домены белков I и II типа схожи, хорошо изучена структура RRM домена *L1* Orf1p. Показано, что она представляет собой несколько удлиненных петель, стабилизированных единичными солевыми мостиками (Khazina et al. 2011).

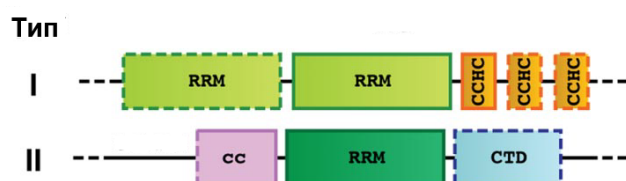


Рисунок 6. Структура белков Gag I и II типа (Khazina and Weichenrieder 2009).

Исследование структуры белков *HeT-A* и *TART* Gag показало наличие мотива, который назван основным участком гомологии (major homology region, MHR), - QGX₂EX₇R. MHR находится ближе к N-концу относительно цинковых пальцев. Этот сегмент обладает значительной степенью гомологии среди различных групп ретровирусов и участвует в сборке вирусных частиц (Pardue et al. 1996). Последовательность MHR *HeT-A* и *TART* Gag более всего гомологична MHR Gag белка вируса иммунодефицита человека (Rashkova et al. 2003). Также *HeT-A* Gag имеет участок полиморфизма по длине, который у различных элементов имеет вставки и/или делеции размером от 1 до 31 кодона (Pardue et al. 1996). *TART* Gag имеет участок, который содержит различное число 75-аминокислотных повторов (Sheen and Levis 1994). Эти участки в *HeT-A* Gag и *TART* Gag находятся в относительно схожих позициях

возле N-конца белков. Также *HeT-A* Gag и *TART* Gag имеют участок с укладкой coiled coil близко к C-концу, который напоминает мотив «лейциновая застежка». Значимость этих мотивов пока требует изучения (Rashkova et al. 2003).

Таким образом, структура теломерных Gag белков дрозофилы свидетельствует об их РНК-связывающей активности (домены RRM) и возможной полимеризации (домены «цинковые пальцы»).

Практически не исследовался вопрос о функциональных партнерах белков *HeT-A* Gag и *TART* Gag. Для *HeT-A* Gag было показано взаимодействие с транскрипционным фактором Putzig (Silva-Sousa et al. 2012) и фактором ремоделирования хроматина Nap-1 (Lopez-Panades and Casacuberta 2016). В привлечении *HeT-A* сфер к теломере важную роль играет компонент теломерного защитного комплекса дрозофилы, белок Ver. Мутации в гене *ver* приводят к практически полному исчезновению теломерной локализации *HeT-A* сфер, чего не наблюдается при мутации генов, кодирующих белки HP1 и HOAP, которые также локализованы на теломере (Zhang et al. 2014).

1.2 Теломерная дисфункция и клеточный ответ на повреждение теломер

Основным типом теломерной дисфункции является критическое укорочение теломер или нарушение сборки теломерного защитного комплекса. При этом происходит остановка клеточных делений и гибель клетки.

1.2.1 Дисфункция теломер у млекопитающих

Теломераза активна только в половых, стволовых и эмбриональных клетках, а в дифференцированных соматических тканях теломераза

неактивна, что приводит к укорочению ДНК с каждым циклом деления клеток. Критическое укорочение теломер обычно ведет к репликативному старению - остановке делений клеток, либо к апоптозу. Предотвращение укорочения теломер индуцированной экспрессией теломеразы отодвигает наступление старения и увеличивает продолжительность жизни клеток (Bodnar et al. 1998; Vaziri and Benchimol 1998). В стволовых клетках человека, например в гемопоэтических, также с возрастом происходят процессы укорочения теломер, которым, по-видимому, не может противостоять активность теломеразы в этих клетках (Blasco et al. 2007). Важно чтобы клетки с критически укороченными теломерами не продолжали делиться, это может приводить к теломерным слияниям, анеуплоидии и канцерогенезу.

Остановка делений при теломерной дисфункции может происходить несколькими путями. Исследования у млекопитающих, дрожжей и дрозофилы показали, что при повреждении теломер активируется ответ на повреждение ДНК (Musaro et al. 2008; Doksanı and de Lange 2014). При прогрессирующей потере теломерных повторов в результате недорепликации концов хромосом при делении клеток компоненты шелтерина могут быть утеряны с теломерных участков. Это приводит к экспозиции конца теломер, который распознается аппаратом репарации ДНК как двухцепочечный разрыв ДНК (Griffith et al. 1999).

Эта гипотеза позднее нашла экспериментальное подтверждение. Индуцированное декэпирование теломер при нокдауне компонентов шелтерина TRF2 и POT1 приводит к привлечению белков ответа на повреждение ДНК и к p53-зависимому апоптозу либо клеточному старению, заключающемуся прежде всего в необратимой остановке деления клетки в стадии G1 клеточного цикла. (Karlseder et al. 1999; Takai et al. 2003; Wu et al. 2006). В первичных культурах клеток человека прогрессивное укорочение теломер при делении клеток и нарушении экэпирования также приводит к привлечению белков ответа на повреждение ДНК к теломерам, активации

ATM и ATR киназ, индукции клеточного старения (d'Adda di Fagagna et al. 2003; Herbig et al. 2004). Теломерные белки шелтерина при нормальной длине теломер ингибируют активность белков ответа на повреждение ДНК. TRF2 связывает двухцепочечную ДНК и репрессирует ATM сигнальный путь, а POT1, связывающийся с одноцепочечной ДНК, ингибирует ATR путь (Denchi and de Lange 2007). Также в индукции клеточного старения участвует p16-Rb путь (Zhang et al. 2012). Возможно, существуют другие пути теломерного сигналинга при укорочении теломер, которые пока не изучены.

Большая часть исследований показывают, что старение является следствием укорочения теломер в клетках. Однако в настоящее время некоторые исследования показали, что теломерная дисфункция может инициироваться независимо от длины теломер. Уровень повреждения теломер, независимо от их длины, увеличивается с возрастом в клетках кишечника и печени мышей (Hewitt et al. 2012; Jurk et al. 2014), нейронах гиппокампа и печени приматов (Fumagalli et al. 2012). Предполагается, что это приводит к индукции клеточного старения, что является одной из причин возрастной дисфункции тканей. При этом копирование теломер не нарушается. Это предполагает, что укорочение теломер и потеря кэпа не является единственной причиной активации ответа на повреждение ДНК при дисфункции теломер. Возможным объяснением этого феномена является накопление персистирующих двухцепочечных разрывов в теломерах, а также нарушение конформации t-петли (Vitorelli and Passos 2017).

Существуют многочисленные исследования о связи дисфункции теломер с различными заболеваниями человека, такими как опухоли, синдромы недостаточности функции костного мозга, идиопатический фиброз легких, сердца, печени. Возникновение основных заболеваний, ассоциированных со старением, таких как воспалительные процессы, гипертония, заболевания сердечно-сосудистой системы, а также хронический стресс, коррелирует с укорочением теломер (Gilson and Segal-Bendirdjian

2010). В связи с этим изучение механизмов поддержания теломер очень важно.

Теломерные РНК, по-видимому, также участвуют в ответе на повреждение теломер. Уровень содержания TERRA в клетке очень динамичен, он увеличивается при повреждении теломер и при декэпировании теломер в клетках человека (Caslini et al. 2009; Porro et al. 2014a; Porro et al. 2014b). При этом TERRA способна привлекать теломеразу к укороченным теломерам, а также индуцировать удлинение теломер по механизму ALT путем образования R-петель (Moravec et al. 2016; Graf et al. 2017). Белки ответа на повреждение ДНК не влияют на транскрипцию TERRA (Porro et al. 2014). Таким образом, TERRA может опосредовать особый путь ответа на повреждение теломер, однако роль TERRA в теломерном сигналинге не исследована.

1.2.2 Поддержание теломер и теломерная дисфункция в герминальных клетках млекопитающих

Поддержание длины теломер в герминальных клетках очень важно для раннего развития эмбриона млекопитающих. Активность теломеразы относительно низкая в зрелых ооцитах и в эмбрионах на стадии дробления, а на стадии морулы и бластоцисты происходит реактивация теломеразы и активное удлинение теломер (Schaetzlein et al. 2004; Liu et al. 2007). Активность теломеразы и удлинение теломер показаны также для дифференцирующихся мужских половых клеток (Thilagavathi et al. 2013).

Функциональные теломеры важны для прохождения мейоза как в мужских, так и в женских половых клетках млекопитающих. Во время первой профазы мейоза на стадии лептотены и зиготены происходит спаривание и рекомбинация гомологичных хромосом. Для этих процессов как в мужских, так и в женских половых клетках необходима кластеризация

теломер, прикрепление их к ядерной оболочке и формирование особой структуры хромосом - «букета» (Zalensky et al. 1995; Scherthan et al. 1996; Zalensky et al. 1997; Tease and Fisher 1998; Bass et al. 2000). Формирование структуры «букета» играет важную роль в опознавании и выравнивании гомологов, способствуя инициации синапсиса и рекомбинации хромосом. Это происходит за счет ограничения пространства для поиска и увеличения вероятности первичной ассоциации гомологов в околотеломерных участках. У поздних поколений мышей с нокаутом теломеразы происходит нарушение сборки функционального мейотического веретена и выравнивания хромосом во время мейоза, нарушается синапсис и рекомбинация между гомологами (Liu et al. 2002; Liu et al. 2004). Эти данные указывают на важную функциональную роль теломер в процессе деления клетки.

Дисфункция теломер в поздних поколениях мышей с нокаутом теломеразы приводит к нарушению фертильности самок, уменьшению размера потомства и нарушению эмбрионального развития, что в конечном итоге приводит к полной стерильности (Lee et al. 1998; Herrera et al. 1999). Укорочение теломер, как в сперматозоидах, так и в ооцитах, может приводить к аномалиям дробления и развития эмбриона. У таких эмбрионов наблюдается цитофрагментация и апоптоз, как показали эксперименты на мышцах с нокаутом теломеразы (Liu et al. 2002). Критически укороченные теломеры в эмбрионах человека также приводят к генерации бластоцист с нарушенной морфологией и апоптозу (Keefe et al. 2005). Было показано, что анеуплоидия у эмбрионов человека часто ассоциирована с недостаточной длиной теломер (Treff et al. 2011). Таким образом, функциональные теломеры необходимы для нормального прохождения мейоза и раннего развития эмбриона. Дисфункция теломер приводит к апоптозу и гибели эмбрионов.

Было показано, что теломеры важны также для поддержания гранулезных клеток, которые являются функциональным аналогом питающих клеток яичника *Drosophila*. Клетки гранулезы окружают ооцит на всех этапах развития фолликула. Функция этих клеток – синтез факторов

роста для ооцита, а также гормонов. Они обмениваются с ооцитом сигнальными молекулами и питательными веществами через каналы между ними. При критическом укорочении теломер клетки гранулезы подвергаются апоптозу, и развитие ооцита нарушается (Ozturk et al. 2014).

1.2.3 Теломерная дисфункция у дрозофилы

При потере функции терминиона у дрозофилы, как и у млекопитающих, активируется ответ на повреждение ДНК (Musaro et al. 2008). При декэпировании теломер, вызванной мутацией гена *sav*, кодирующего компонент терминиона, белок НОАР, индуцируется остановка клеточного цикла, которая супрессируется мутациями компонентов пути ответа на повреждение ДНК - *Atr*, *Atrip*, *Chk1*, *Rad50* (Musaro et al. 2008). Потеря теломер приводит к активации caspase-3-опосредованного p53-зависимого апоптоза (Titen and Golic 2008). Этот апоптотический ответ регулируется двумя p53-зависимыми путями, первый опосредован Chk2 киназой, второй – опосредован ATR и Chk1 киназами (Titen and Golic 2008).

Апоптоз, индуцированный дисфункцией теломер, только частично супрессируется при мутации p53 (Oikemus et al. 2006). В отсутствие p53 апоптоз при потере теломер все равно происходит, хотя он является отложенным во времени (Wichmann et al. 2006, Titen and Golic 2008). В мутантах компонентов системы ответа на повреждение ДНК также наблюдается спонтанный апоптоз (Oikemus et al. 2006). Это предполагает, что активация апоптоза при повреждении хромосом не всегда зависит от пути ответа на повреждение ДНК. По-видимому, в клетках дрозофилы существуют дополнительные пути активации апоптоза при теломерной дисфункции.

В клетках с нарушением кэпирования, вызванным мутацией НОАР, помимо активации ответа на повреждение ДНК также происходит активация

чекпойнта сборки митотического веретена (spindle assembly checkpoint, SAC) (Musaro et al. 2008). SAC активируется при нарушении взаимодействия кинетохор и микротрубочек и задерживает наступление анафазы до тех пор, пока все хромосомы не будут корректно выровнены на метафазной пластинке (Musacchio 2015). Показано, что SAC не является следствием ответа на повреждение ДНК. (Musaro et al. 2008). Активация SAC при повреждении теломер была также описана для дрожжей (Miller and Cooper 2003; Nakano et al. 2014). Возможно, SAC ответ является дополнительным механизмом защиты от геномной нестабильности, если в клетке с декэпированными теломерами не срабатывает ответ на повреждение ДНК.

Существует особый тип теломерной дисфункции у дрозофилы, при котором теломеры сохраняют свою нормальную длину, защитный теломерный комплекс не нарушен, однако наблюдается гиперэкспрессия теломерных повторов и накопление теломерных РНК. Такие нарушения также сопровождаются слияниями теломер и остановкой развития. Например, мутации компонентов piРНК пути, таких как Piwi, SpnE, Zucchini, Armi, Cutoff, Aub (Vagin et al. 2004; Savitsky et al. 2006; Chen et al. 2007; Pane et al. 2007), компонентов Ccr4-Not деаденилазного комплекса, транскрипционных факторов Woc и Trf2 (Morgunova et al. 2015), приводят к резкому увеличению транскрипции теломерных ретротранспозонов у дрозофилы. При этом преимущественно происходит гиперэкспрессия одного из теломерных компонентов – ретроэлемента *HeT-A*, в то время как экспрессия других теломерных ретроэлементов изменяется не так выражено. Стоит отметить, что при дисфункции кэпирующего комплекса при мутациях *cav* и *ver* дерепрессии *HeT-A* не наблюдается (Frydrychova et al. 2008; Morgunova et al. 2015). Гиперэкспрессия *HeT-A* при этом сопровождается множественными митотическими дефектами в ранних эмбрионах и их повышенной смертностью. При этом наблюдаются теломерные слияния, что указывает на то, что в теломерах появляются разрывы и идут рекомбинации. Появляются многополюсные митозы, хромосомные мостики и свободные

центросомы, которые при этом не теряют γ -тубулин. Множественные транскрипты *HeT-A* транспортируются в эмбрион и накапливаются около центросом (Morgunova et al. 2015). Однако мутации белков ответа на повреждение ДНК не супрессируют гиперэкспрессию *HeT-A* и не приводят к уменьшению эмбриональной смертности (Klattenhoff et al. 2007). Эти данные указывают на то, что, по-видимому, избыточные теломерные РНК участвуют в особом сигнальном пути, активирующемся при гиперэкспрессии теломерных повторов. Возможно, именно накопление *HeT-A* РНК при теломерной дисфункции участвует в индукции нарушений митотических делений, приводящих к ранней остановке развития аномальных эмбрионов.

1.3 Молекулярные механизмы контроля оогенеза и раннего развития дрозофилы

Важнейшие этапы контроля теломер происходят в клетках зародышевой линии и в процессе раннего развития. Целостность теломер на этих стадиях определяет нормальное развитие. Исследования теломер на организменном уровне особенно важны для понимания особенностей регуляции теломер в герминальных тканях в норме и при дисфункции теломер. Данная глава посвящена краткому описанию процессов оогенеза и раннего развития дрозофилы, тех стадий, на которых проводились исследования теломерных РНК в данной работе.

Яичник дрозофилы содержит около 15 овариол - цепочек из яйцевых камер на разных стадиях развития (Рис. 7). Стволовые герминальные и соматические клетки находятся в самом раннем участке овариолы, который называется гермарий. Герминальные стволовые клетки делятся и продуцируют дочерние клетки - цистобласты. Цистобласт проходит через четыре клеточных деления, производя яйцевую камеру -

шестнадцатиклеточную герминальную цисту, окруженную соматическими фолликулярными клетками.

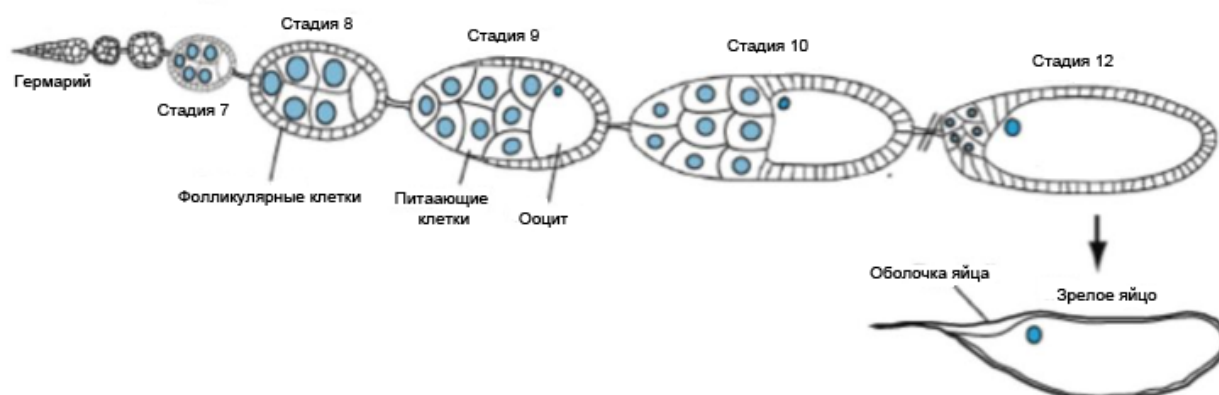


Рисунок 7. Схема яичника дрозофилы (Becalska and Gavis 2009 с модификациями).

Яйцевые камеры затем проходят через четырнадцать стадий оогенеза, до образования зрелого ооцита. При образовании яйцевой камеры в гермариуме одна из герминальных клеток дифференцируется в ооцит, а остальные пятнадцать клеток развиваются как полиплоидные питающие клетки (Huynh and St Johnston 2004). Эти клетки снабжают ооцит питательными веществами, органеллами, мРНК и белками, необходимыми для оогенеза и раннего эмбрионального развития. Соматические фолликулярные клетки необходимы для корректной спецификации оси ооцита и синтеза желтка, вителлиновой мембраны и хориона. В клетках цисты гермария начинается мейотическое деление. На протяжении всего оогенеза ооцит находится в профазе I мейоза (Megraw and Kaufman 2000).

Ядро ооцита по большей части транскрипционно неактивно в течение оогенеза, хроматин находится в сильно конденсированной форме. В питающих клетках ДНК проходит через циклы эндорепликации, происходит полиплоидизация (Steinhauer and Kalderon 2006). Большая часть РНК и белков, необходимых для развития, синтезируется в питающих клетках и транспортируется в ооцит, в частности основные мРНК – детерминанты осей ооцита, *gurken*, *bicoid*, *oskar*. Этот транспорт зависит от микротрубочек на

всех стадиях оогенеза (Pokrywka and Stephenson 1995). Локализация мРНК, определяющих полярность ооцита, важна для формирования передне-задней и дорзо-вентральной осей эмбриона (Рис. 8).

После оплодотворения происходит быстрое завершение мейоза и образуется зиготическое ядро, которое начинает делиться путем митозов. Первые 9 зиготических делений синхронны, не сопровождаются цитокинезом. Вследствие этого ядра находятся в общей цитоплазме, образуя синцитий. После 7 деления наблюдается миграция ядер к периферии зиготы, в перикортикальную зону. После 9 деления группа ядер достигает заднего полюса яйца, где находится полярная плазма. Ядра, достигшие полярной плазмы, немедленно приобретают клеточную структуру и дают начало клеткам-предшественникам зародышевого пути. Между 9 и 10 делениями мигрирующие ядра достигают периферии яйца и начинают образовывать единый слой, выстраиваясь в перикортикальном пространстве. Таким образом, в перикортикальной зоне образуется около 8000 ядер. Эта стадия развития называется стадией синцитиальной бластодермы (Johnstone and Lasko 2001).

При созревании ооцита РНК, синтезируемые в питающих клетках, транспортируются в ооцит по микротрубочкам в направлении от плюс конца (растущий конец трубочки) к минус концу (центр организации трубочки, находится в ооците) (Рис.8 А). Egalitarian и его кофактор BicD, работая в комплексе с моторным белком динеином, являются важнейшими факторами транспорта РНК, направленного к минус концам микротрубочек в яичниках и эмбрионах *Drosophila*. Они связывают мРНК с динеином и микротрубочками (Navarro et al. 2004, Dienstbier et al. 2009).

Хотя Egl не имеет канонических РНК связывающих мотивов, он способен связываться с сигналами РНК локализации многих транскриптов, например *gurken*, *hairy*, *K10*, ретротранспозона *I-element* (Dienstbier et al. 2009). Эти сигналы представляют собой вторичные структуры РНК «стебель-петля» или шпилька, для которых характерна не сколько консенсусная

последовательность, сколько образуемая спираль определенной конформации, которая, как считается, и распознается транспортными белками (Bullock et al. 2003).

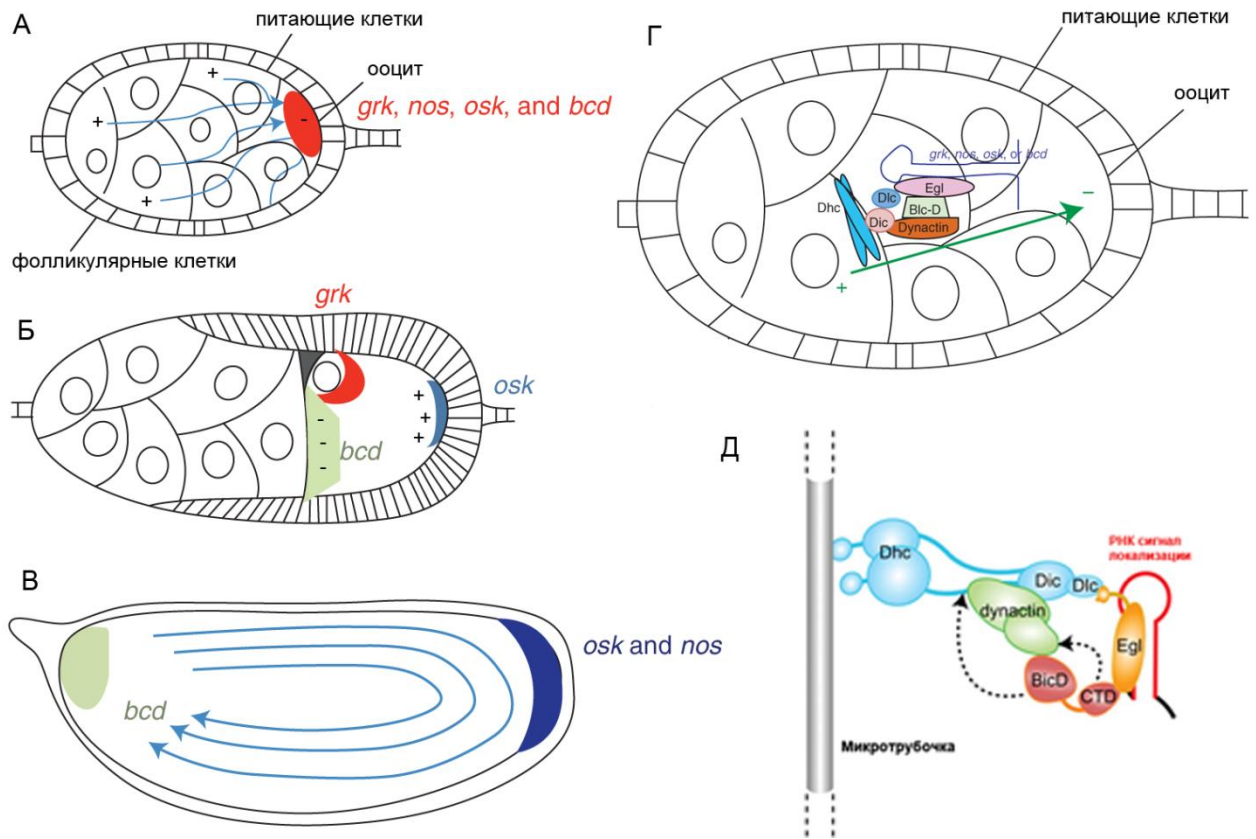


Рисунок 8. Транспорт мРНК в оогенезе дрозофилы.

(А) В раннем оогенезе (2-6 стадия развития ооциты) центр организации микротрубочек локализуется в задней части ооцита, плюс концы трубочек проникают в питающие клетки. Происходит активный транспорт синтезированных в питающих клетках РНК и белков в ооцит по микротрубочкам в направлении их минус концов. (Б) На средних стадиях оогенеза происходит реорганизация микротрубочек в ооците, их минус концы закрепляются в передней части кортекса, плюс концы находятся в задней части. Происходит транспорт мРНК *bicoid*, *bcd*, в переднюю часть ооцита, а мРНК *oskar* в заднюю часть, за счет этого происходит организация передне-задней полярности ооцита. (В) На поздних стадиях оогенеза происходит центростремительный поток цитоплазмы, с одновременным закреплением мРНК на кортексе, происходит накопление мРНК *osk* и *nos* на постериорном полюсе ооцита. микротрубочки окрашены в зеленый цвет, обозначены их + и - концы (Lasko 2012 с модификациями). (Г) Модель связывания мРНК с микротрубочками цитоскелета для транспорта, направленного к минус концам трубочек. Egl взаимодействует с мРНК за счет «шпильчатых» структур, белком BicD и легкой цепью моторного белка динеина. BicD взаимодействует с динактином (dynactin), который в свою очередь связывается с динеином. Тяжелая цепь динеина (Dhc) взаимодействует с микротрубочками и катализирует движение к минус-концу трубочки (Lasko 2012 с модификациями). (Д) Транспортный комплекс Egl-BicD-динеин (Dienstbier et al. 2009 с модификациями).

В оогенезе Egl-BicD комплекс необходим для организации микротрубочек ооцита, корректной локализации моторных белков Dhc, Khc, BicD. При нокадауне *egl* локализация этих белков нарушается, также нарушается строение цитоскелета в ооцитах и миграция ядра в антерио-дорсальную область (Sanghavi et al. 2016). Egl может напрямую влиять на сборку микротрубочек (Sanghavi et al. 2016). Egl также специфично связывается с мРНК *bicoid*, *gurken*, *oskar* в яичниках и необходим для их корректной локализации. При нокадауне Egl на средних и поздних стадиях оогенеза, наблюдается делокализация этих мРНК в ооците и питающих клетках (St Johnston and Ahringer 2010; Sanghavi et al. 2016).

Egl и BicD необходимы на самых ранних стадиях оогенеза для спецификации ооцита при развитии яйцевой камеры. Egl осуществляет транспорт факторов, ответственных за дифференцировку ооцита, по микротрубочкам в единственную клетку яйцевой камеры - будущий ооцит (Mach and Lehmann 1997; Huynh and St Johnston 2000).

Таким образом, Egl участвует в транспорте мРНК, локализации моторных белков, а также напрямую влияет на строение цитоскелета ооцита (Sanghavi et al. 2016). В эмбрионах дрозофилы Egl также участвует в динеин-зависимом транспорте мРНК, направленном к минус-концу микротрубочек в апикальную часть эмбриона на стадии бластодермы. (Bullock and Ish-Horowicz 2001; Bullock et al. 2006).

Механизмы транспорта и локализованного распределения транскриптов, по-видимому, консервативны для разных типов клеток. (Bullock and Ish-Horowicz 2001). *gurken*, *bicoid*, *K10*, and *nanos* мРНК накапливаются в апикальной цитоплазме с участием Egl после инъекции в бластодерму эмбриона. При эктопической экспрессии эмбриональных РНК *ftz* и *h* в оогенезе они аккумулируются в передней части ооцита. Таким образом, система транспорта мРНК из питающих клеток в ооцит яичника и в апикальную бластодерму эмбриона распознает одни и те же сигналы локализации и использует один и тот же аппарат (Bullock et al. 2003;

Nashchekin and St Johnston 2009). По-видимому, тот же аппарат участвует в локализации мРНК *inscuteable* в эмбриональных нейробластах и мРНК *stardust* в эпителиальных клетках (Hughes et al. 2004; Horne-Badovinac and Bilder 2008).

Таким образом, Egl является важнейшим фактором транспорта мРНК, необходимых для оогенеза и раннего развития *Drosophila*.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Линии *D. melanogaster*, использованные в работе

В работе использовали трансгенные линии, полученные ранее в лаборатории следующим образом. Для получения плазмиды pUAST-HeT-A-NA-FLAG полноразмерный элемент *HeT-A*, кодирующий белок Gag, слитый с NA (гемагглютинин) и FLAG эпитопами, клонировали в вектор pUAST-attB. Для получения плазмиды pUAST-HeT-A-NA-FLAG_ms2, восемь MS2 элементов были встроены в конец 3'UTR *HeT-A* элемента. Конструкции были интегрированы в сайт встраивания att на 3 хромосоме (линия 24862, Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC). Мух с герминальным нокдауном получали путем скрещивания самцов, несущих shPHK *spnE* (103913, Vienna Drosophila Resource Centre, VDRC), *piwi* (101658, VDRC), *egl* (21779, VDRC), *HeT-A* Gag-NA и *HeT-A* Gag-NA-MS2 трансгены, совмещенные с shPHK *spnE*, shPHK *piwi* совмещенную с shPHK *egl* (линии получены в лаборатории) и драйверной линией 25751 (P{UAS-Dcr-2.D}. v1, w1118, P{GAL4-nos.NGT}40, BDSC). Линия 25751 несет в геноме трансген GAL4 под контролем промотора *nanos*, специфичного для герминальных тканей. Природная линия Gaiano III несет локус Tel, который влияет на длину теломер, эта линия характеризуется удлинненными теломерами (Siriaco et al. 2002).

Эмбрионы с гиперэкспрессией *HeT-A* Gag получали путем скрещивания девственных самок, несущих трансген HeT-A-NA-FLAG, с самцами линии 5460 (P[Gal4-da.G32]UH1, BDSC), несущей в геноме трансген GAL4 под контролем промотора *daughterless*, экспрессия которого высока в раннем эмбриогенезе *Drosophila*. Для контроля скрещивали самок линии, несущей в геноме трансген UAS-RFP (8547, P{w[+mC]=UAS-RedStinger}6, BDSC), с самцами линии 5460.

2.2 РНК-иммунопреципитация (РИП)

Для РИП 100-200 яичников от 1-4-дневных самок либо 50 мкл 0-2 часовых эмбрионов гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса (Sigma) на льду в 5 объемах буфера для лизиса (10 мМ HEPES, pH 7.0, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 0.5% NP-40, ингибитор протеаз Complete mini protease inhibitor cocktail (Roche), 20 мМ NaF, 0.2 мМ NaVO₄, 1 U/μl RiboLock RNase Inhibitor (ThermoScientific)). Для РИП с анти-НА магнитными частицами в буфер для лизиса добавляли 1% Triton X-100, 0.1% SDS и 10% глицерин. Экстракты осветляли центрифугированием при 16000 g при 4° C в течение 10 мин и разбавляли 9 объемами буфера NT2 (50 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 0.05% NP-40, 0.2 мМ NaVO₄, 20 мМ NaF, RiboLock 1 U/μl). Лизаты инкубировали с анти-НА магнитными частицами (20 мкл, Pierce) или с покрытыми антителами (5 мкг первичных антител на образец) магнитными частицами Dynabeads Protein A (ThermoFisherScientific) 2 часа при 4° C на ротаторе. После трех промывок буфером NT2 1/10 часть частиц сохраняли для анализа методом Вестерн блоттинга.

Для РИП использовали следующие антитела: анти-Egl (От R. Lehmann), анти-GFP (Abcam), анти-НА (Cell signaling technology, 6E2), для контроля - нормальные иммуноглобулины IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology).

2.3 Выделение РНК

Для выделения РНК, к магнитным частицам после РИП, либо к лизату тканей добавляли 500 мкл реагента Trisol (Life Technologies) и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 100 мкл хлороформа, встряхивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Смесь центрифугировали 10 мин при 16000 g при 4° C. Отбирали верхнюю фазу в чистую пробирку, добавляли равный объем хлороформа и встряхивали.

Смесь центрифугировали еще раз и отбирали супернатант. К супернатанту добавляли равный объем изопропанола, 0.1 объема ацетата натрия и 1 мкл GlycoBlue и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. На следующий день смесь центрифугировали при 16000 g 1 час при 4° C. Осадок промывали 2 раза 80 % этанолом, один раз 96 % этанолом и высушивали на воздухе. Затем осажденную РНК растворяли в 50 мкл Resuspension solution (Life Technologies) в течение 10 мин при 60° C. Для измерения концентрации РНК использовали спектрофотометр NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific).

2.4 Реакция обратной транскрипции

Сначала РНК обрабатывали ДНКазой I. Для этого к раствору РНК добавляли 0.1 объём TURBO DNase Buffer I (Invitrogen) и 1 мкл ДНКазы I (Invitrogen), к раствору РНК (конечный объём 10 мкл) и инкубировали в течение 20 минут при 37 °C. Затем добавляли 1 мкл реагента DNase Inactivation Reagent (Life Technologies) для инактивации ДНКазы и инкубировали 5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая. Центрифугировали смесь в течение 1 минуты при 16000 g, отбирали супернатант и переносили его в новую пробирку.

Для синтеза первой цепи кДНК к 10 мкл раствора РНК добавляли по 1 мкл 10 mM dNTP смеси и рандомных гексапраймеров, и инкубировали 5 минут при 65° C. Затем на льду добавляли в смесь 4 мкл буфера для обратной транскриптазы 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 1 мкл ингибитора РНКаз RiboLock (Invitrogen), 2 мкл 0.1 M DTT, 1 мкл обратной транскриптазы SuperScript™ III RT (Invitrogen) и инкубировали при 42° C в течение 50 минут, затем инактивировали ревертазу 15 мин при 70° C.

Для ПЦР полученные пробы кДНК разводили в 3 раза. Протокол ПЦР в реальном времени описан ниже, праймерами представлены в таблице 2.

Уровень транскрипции исследуемых мишеней был нормирован на уровень транскрипции гена «домашнего хозяйства» *rp49*.

2.5 Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР)

В каждую реакцию ПЦР (30 мкл) добавляли по 3 мкл кДНК, по 1 мкл 5 мкМ раствора праймеров, 0.6 мкл смеси dNTP с концентрацией 10 мМ каждого, 3 мкл 10-кратного буфера для HS ДНК-полимеразы (Evrogen), 0.015 мкл Syto13 (Thermo Fischer Scientific) и 0.25 мкл HS ДНК-полимеразы. Для амплификации использовали прибор Light Cycler 96 (Roche), для обработки результатов использовали программное обеспечение производителя (Roche). Использованные праймеры указаны в таблице 2.

Таблица 2. Праймеры, использованные для ПЦР

мишень	ориентация	последовательность
<i>rp49</i>	прямой	ATGACCATCCGCCAGCATAC
	обратный	GCTTAGCATATCGATCCGACTGG
<i>TART-A</i>	прямой	AATGAACTTTGTCTGCCCTCCCA
	обратный	ATCTGTCTACTGTCCGCCTTCGCTA
<i>HeT-A</i>	прямой	GGAGTGATGAGCGGCGGAAA
	обратный	CCAGGCAAGCGGACAAACGA
<i>I-element</i>	прямой	ACAAAATCACTTCAAAAACATACCAATCCC
	обратный	GCATCCCTCAACTTCTCCTCCACAG
<i>jockey</i>	прямой	AAATGAGGAAAGTAGCAGGTGTTGAGCC
	обратный	CGCAGATTGAGTTGGCATACTTCC
<i>gurken</i>	прямой	TTTCTAGTGGTGGACAATCGG
	обратный	ACAATCTGTGACGGCGACAA
<i>nanos</i>	прямой	GGGTGAGGATTTGTGGAAAGTAGAGTGC
	обратный	GAAAAGTTATCTGCTGCTGCGCCAC
<i>oskar</i>	прямой	ACGGGCAATCCATTTCCACT
	обратный	TGGCGATATCCTTGGTCTTT
<i>MS2</i>	прямой	ATCGGTGCTTCCGTCTTCT
	обратный	GAAATTAATACGACTCACTATAGGT TGTTTAATTTGTTTCTTTTCAGG
<i>HeT-A-NA</i>	прямой	AATCCCAACTCACAAAAGGCC
	обратный	GTCTTGTAGTCAGCGTAATCG

2.6 Ко-иммунопреципитация (ко-ИП)

Яичники (400 пар) или эмбрионы (около 70 мкл) гомогенизировали на льду в гомогенизаторе Даунса в 9 объемах IP буфера (20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, комплексный ингибитор протеаз Complete Mini protease inhibitor cocktail (Roche), 0.2 mM NaVO₄, 20 mM NaF, RiboLock 1ед/мкл (ThermoScientific)). Экстракты осветляли центрифугированием при 16000 g при 4° C в течение 10 мин. Супернатанты инкубировали с анти-НА магнитными частицами (20 мкл, Pierce) 30 мин при комнатной температуре на ротаторе. После трех промывок в IP буфере связавшиеся белки элюировали с частиц кипячением в буфере Laemmli (31.25 mM Трис-HCl, pH 6.8, 12.5% глицерин, 1% ДСН, 0.005% бромфеноловый синий, 2.5% β-меркаптоэтанол) в течение 5 мин. Частицы осаждали и сохраняли супернатант для анализа методом Вестерн блоттинга.

2.7 Вестерн-блоттинг

Для Вестерн-блоттинга сначала проводили разделение белков методом электрофореза в 8 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по Лэммли. Образцы для электрофореза смешивали с буфером Laemmli, инкубировали при 100° C в течение 5 мин и наносили на гель. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (ТГБ, Трис 25 mM, глицин 250 mM, 0.1 % ДСН) при постоянном напряжении 60 В при движении образцов в концентрирующем геле и 120 В – в разделяющем. После завершения электрофореза гель инкубировали в буфере для переноса (1x ТГБ, 20% этанол, 0.04% SDS) в течение 5 мин. Проводили перенос белков из геля на мембрану PVDF (Immobilon, Millipore) в камере для влажного переноса Mini Trans-Blot (Bio-Rad) согласно инструкции производителя. После переноса мембрану промывали водой, затем инкубировали в буфере

PBT в течение 5 мин на качалке. Мембрану блокировали в растворе 0.2 % растворе I-Block в буфере PBT в течение часа на качалке при комнатной температуре. Затем блокирующий раствор сливали, добавляли первичные антитела, разведенные в блокирующем растворе, и инкубировали в течение 1 часа на качалке при комнатной температуре. Мембрану промывали 3 раза буфером PBT в течение 5 мин. Добавляли вторичные антитела, разведенные в блокирующем растворе, и инкубировали 40 мин на качалке. Мембрану промывали 3 раза по 5 мин на качалке и инкубировали в буфере CDP-assay buffer (20 mM Трис-НСl, 2 mM MgCl₂, рН 9.8) в течение 5 мин на качалке. Затем на мембрану наносили субстрат для щелочной фосфатазы Immun-Star™ AP Chemiluminescence (Bio-Rad) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Используемые первичные антитела указаны в таблице 3.

2.8 Флуоресцентная гибридизация *in situ* с РНК-зондом (РНК-FISH)

Для получения одного препарата на льду проводили диссекцию около 20 пар яичников, овариолы яичников отделяли друг от друга иглой. По окончании диссекции яичники фиксировали в 4 % растворе параформальдегида (рН 7.4) в течение 20 минут при комнатной температуре на ротаторе при 15 оборотах в минуту. После фиксации яичники промывали 4 раза PBT. Затем проводили пермеабиллизацию раствором протеиназы К в PBS (50 мкг/мл) в течение 5 мин при комнатной температуре. Протеиназу инактивировали раствором глицина в PBT (2 мг/мл) в течение 2 мин при комнатной температуре на ротаторе. После пермеабиллизации проводили повторную фиксацию в 4 % растворе параформальдегида (рН 7.4) в течение 20 минут при комнатной температуре на ротаторе. После фиксации яичники промывали 4 раза PBT (PBS; 0.1% Tween 20) и один раз HS/PBT 1/1 в течение 5 мин на ротаторе. Затем проводили прегибридизацию в буфере HS (50% формамид, 5x SSC, 0.1% Tween 20, 100 мкг/мл денатурированной ДНК

(Promega), 50 мкг/мл гепарина) при 60° С в течение 1 часа. Состав 1x SSC буфера - 15 mM NaCl, 15 mM цитрат натрия, pH 7.0.

Гибридизацию проводили в 200 мкл буфера HS с 4 мкл зонда, специфичного к *HeT-A* РНК, либо *TART* РНК, при 60° С в течение ночи. После гибридизации яичники последовательно промывали следующими растворами:

- HS без зонда при 60° С в течение 30 мин трижды
- HS/PBT 1/1 при 60° С в течение 15 мин
- 2x SSC, 0.1% Tween 20 при 60° С в течение 15 мин дважды
- 0.2x SSC, 0.1% Tween 20 при 60° С в течение 15 мин дважды
- PBT при комнатной температуре в течение 15 мин дважды

Затем проводили иммуноокрашивание, начиная с этапа инкубации с Image-IT.

2.9 Иммуноокрашивание яичников *Drosophila*

Для получения одного препарата на льду проводили диссекцию около 20 пар яичников, овариолы яичников отделяли друг от друга иглой. По окончании диссекции материал фиксировали в 4 % растворе параформальдегида (pH 7.4) в течение 20 минут при комнатной температуре на ротаторе при 15 оборотах в минуту. После фиксации яичники промывали 4 раза PBT. Для окрашивания цитоплазматических белков проводили пермеабиллизацию 0.6% раствором Тритона X-100 в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре на ротаторе. Для окрашивания ядерных белков проводили пермеабиллизацию раствором протеиназы К в PBS (50 мкг/мл) в течение 5 мин при комнатной температуре. Протеиназу инактивировали раствором глицина в PBT (2 мг/мл) в течение 2 мин при комнатной температуре на ротаторе. После пермеабиллизации проводили повторную фиксацию в 4 % растворе параформальдегида (pH 7.4) в течение 20 минут

при комнатной температуре на ротаторе. Затем материал промывали 3 раза PBT. К яичникам добавляли 1-2 капли реагента Image-IT FX signal enhancer (Life Technologies) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После инкубации органы промывали PBT 2 раза при комнатной температуре на ротаторе. Затем блокировали 5% раствором БСА в PBT с 0.3% Тритоном X-100 (PBT-TR) в течение 30 мин. После этого проводили инкубацию с первичными антителами, разведенными в 3% растворе БСА в PBT-TR в течение ночи при 4° C на ротаторе.

На следующий день яичники промывали буфером PBT-TR в течение 5 мин при комнатной температуре на ротаторе 7 раз. Затем материал блокировали 5% БСА в PBT-TR в течение 30 мин при комнатной температуре на ротаторе. После инкубации с БСА к яичникам добавляли вторичные антитела, разведенные в растворе 3% БСА в PBT-TR, инкубировали в течение ночи при комнатной температуре на ротаторе и отмывали 4 раза в PBT-TR по 5 минут каждый раз. Отмытые яичники окрашивали DAPI в PBT в течение 30 минут при комнатной температуре. На конечном этапе органы выкладывали на предметное стекло в капле монтирующей среды Vectashield (Vector laboratories), накрывали покровным стеклом и заплавляли лаком. Визуализацию препаратов осуществляли на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 Meta. Использованные в иммуноокрашивании первичные и вторичные антитела представлены в таблице 3.

Таблица 3. Антитела, использованные для иммуноокрашивания и Вестерн-блоттинга.

Антитело	Животное - производитель	Разведение для иммуноокрашивания	Разведение для Вестерн-блоттинга	Источник
Первичные антитела				
Анти-HeT-A Gag	Морская свинка	1/500	1/1000	От Y.S. Rong,
Анти-HeT-A Gag	Кролик		1/1000	От E. Casacuberta
Анти-НОАР	Крыса	1/100	1/1000	Получены в лаборатории
Анти-NipNor	Морская свинка	1/300		От Y.S. Rong
Анти-Egl	Кролик	1/100	1/1000	От R. Lehmann
Анти-НА	Мышь	1/100	1/1000	Cell Signalling, 6E2
Анти- α -тубулин	Мышь		1/1000	Sigma, T9026
Анти- γ -тубулин	Кролик	1/300		Sigma, GC-17
Анти-Dhc	Мышь	1/200		Hybridoma bank, 2C11
Анти-BicD	Мышь		1/1000	Hybridoma bank, 4C2
Вторичные антитела				
Анти-IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488	Коза	1/500		Jackson ImmunoResearch, 715-545-151
Анти-IgG кролика, конъюгированные с Cy3	Осел	1/500		Jackson ImmunoResearch, 711-166-152
Анти-IgG морской свинки, конъюгированные с Alexa Fluor 647	Осел	1/500		Jackson ImmunoResearch, 706-606-148
Анти-дигоксигенин, конъюгированные с флуоресцеином	Овца	1/200		Roche, 11207741910
Анти – флуоресцеин/Oregon Green, конъюгированные с Alexa Fluor 488	Коза	1/500		Invitrogen, A11090
Анти-IgG мыши, конъюгированные с щелочной фосфатазой	Осел		1/20000	Jackson ImmunoResearch, 715-055-151
Анти-IgG кролика, конъюгированные с щелочной фосфатазой	Коза		1/20000	Sigma, A-3937
Анти-IgG морской свинки, конъюгированные с щелочной фосфатазой	Коза		1/20000	Sigma, A5062

2.10 Получение зонда для РНК FISH

Для получения РНК зонда проводили *in vitro* транскрипцию Т7 РНК полимеразой на матрице линейризованной плазмидной ДНК. Около 1 мкг ДНК использовали в 10-20 мкл реакции транскрипции, содержащей DIG(дигоксигенин)-UTP (6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-UTP) (Roche). После синтеза РНК осаждали этанолом. Затем промывали 70% этанолом и растворяли в 20 мкл воды. После чего к РНК добавляли 80 мкл гибридизационного буфера (HS), что при ожидаемом синтезе около 10 мкг РНК давало раствор 0.1 мкг/мкл, который может храниться при -20°C в течение нескольких месяцев.

HeT-A проба содержала фрагмент рамки считывания последовательности GenBank DMU06920 4330-4690 нт, *TART* антисмысловая проба содержала фрагмент, соответствующий 2377-2888 нт последовательности GeneBank DMU02279. Фрагменты были клонированы в вектор pBS SK⁻. MS2 проба была получена следующим образом. Сначала нарабатывали ПЦР-продукт с помощью праймеров MS2 (Таблица 2) на матрице плазмиды pUAST-HeTA-NA-FLAG_ms2. В обратный праймер встроен промотор Т7 РНК полимеразы. Затем данный ПЦР-продукт использовали в качестве матрицы в реакции транскрипции.

2.11 Сбор эмбрионов дрозофилы и подготовка для экспериментов

Для сбора эмбрионов дрозофилы использовали клетки для сбора эмбрионов Embryo Collection Cage-Large (Genesee Scientific). В клетку помещали 100-200 дрозофил. Для сбора 0-2 часовых эмбрионов в клетку помещали чашку Петри с виноградным агаром FlyStuff Grape Agar (Genesee Scientific) на 2 часа. На чашку дополнительно наносили немного пекарских дрожжей, яблочного уксуса и воды. По прошествии двух часов эмбрионы

собирали кисточкой с поверхности чашки в пробирку и промывали РВТ. Для дехорионизации эмбрионы обрабатывали в смеси раствора гипохлорита натрия (отбеливатель «Белизна») с РВТ (1/1) на ротаторе в течение 10 мин и промывали РВТ. После этого их хранили при -80°C и использовали для КОП и РИП. Для иммуноокрашивания эмбрионы далее фиксировали в метаноле 5 минут на ротаторе. Затем для удаления вителлиновой оболочки эмбрионы помещали в смесь метанол/гептан (1/1) и инкубировали 5 мин, встряхивая несколько раз. После этого эмбрионы промывали метанолом, и хранили в метаноле при -20°C . Для окрашивания *HeT-A* Gag и γ -тубулина в 2-5 часовых эмбрионах *Drosophila* эмбрионы дехорионизировали и фиксировали смесью 4% параформальдегида и гептана (1:3) в течение 1 часа на ротаторе при комнатной температуре. Затем параформальдегид отбирали и добавляли объем метанола, равный объему гептана. Эмбрионы встряхивали для удаления вителлиновых оболочек. Отбирали супернатант, промывали эмбрионы метанолом и хранили в метаноле при -20°C .

Для подсчета выживаемости эмбрионов с гиперэкспрессией *HeT-A* Gag либо контрольных эмбрионов с гиперэкспрессией RFP в клетку для сбора эмбрионов с чашкой Петри, содержащей 1 % агарозу, помещали около 100 дрозофил, около 70 девственных самок трансгенной линии *HeT-A-Gag-NA* либо UAS-RFP (контроль) и около 30 самцов линии 5460, несущей драйвер *da-GAL4*. Через 6 часов чашку с агарозой вынимали, подсчитывали количество отложенных яиц. Через двое суток подсчитывали количество мертвых эмбрионов, оставшихся после вылупления личинок.

2.12 Культивирование и иммуноокрашивание клеток S2

Клетки S2 (Schneider 2) выращивали в среде Schneider *Drosophila* Medium (Invitrogen), с добавлением 10 % термически инактивированной фетальной телячьей сыворотки (Gibco), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл

стрептомицина. Клетки трансфицировали плазмидами pUAST-HeT-A-NA и pUAST-GFP с драйверной плазмидой pAC-GAL4 с помощью реактива FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) согласно инструкции производителя.

Для иммуноокрашивания клетки в экспоненциальной фазе роста иммобилизовали на покровных стеклах. Промывали PBS и фиксировали 4 % параформальдегидом (pH 7.4) в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре. Промывали PBT-TR три раза по 5 мин, пермеабелизовали PBT-TR в течение 20 мин, блокировали PBT-TR с 3% нормальной сывороткой козы (Invitrogen) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем инкубировали с первичными антителами в PBT-TR с 3% нормальной сывороткой козы в течение 3 часов при комнатной температуре либо в течение ночи при 4° С и промывали PBT-TR 3 раза по 10 мин. После этого производили инкубацию со вторичными антителами в PBT-TR с 3% нормальной сывороткой козы в течение 3 часов при комнатной температуре либо в течение ночи при 4° С и промывали PBT-TR три раза по 10 мин. Стекла с клетками монтировали на предметное стекло в капле SlowFade Gold Antifade reagent (Invitrogen), содержащем DAPI (1 мкг/мл), и заглавливали лаком. Визуализацию препаратов проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 Meta. Используемые в иммуноокрашивании первичные и вторичные антитела представлены в таблице 3.

Для определения доли мертвых клеток аликвоту суспензии клеток (~40 мкл) смешивали с равным количеством 0.4% (w/v) раствора красителя трипанового синего в PBS для визуализации мертвых клеток. Несколько микролитров смеси вносили под покровное стекло камеры Горяева и производили подсчет общего количества и доли мертвых клеток. Для этого использовали формулу C (клеток/мл) = $2.5 \cdot 10^5$ (количество клеток в одном большом квадрате), C (клеток/мл) = $4 \cdot 10^6$ (количество клеток в одном малом квадрате)

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Проверка трансгенной системы для экспрессии маркированного белка *HeT-A Gag*

В данной работе мы исследовали жизненный цикл РНК и белков, образуемых теломерными повторами *Drosophila*. Для изучения локализации теломерных РНК в оогенезе и раннем развитии, мы сфокусировались на основном теломерном элементе *HeT-A*, который активно транскрибируется при нарушении рiРНК пути. В виду активности рiРНК пути *HeT-A Gag* практически не детектируется в яичниках природных линий. Поэтому большая часть экспериментов была проведена при гиперэкспрессии *HeT-A* на фоне герминального нокдауна компонента рiРНК пути *spnE*. Такой подход позволил нам визуализировать основные этапы биогенеза теломерных РНК, а также связать теломерную дисфункцию и гиперэкспрессию теломерных повторов с нарушениями развития.

Многокопийность и полиморфизм эндогенных копий *HeT-A* затрудняют исследование биогенеза РНК и белка, кодируемых этими повторами. Для исследования локализации и поиска партнеров теломерной РНК и белков в лаборатории была создана конструкция рUAST-*HeT-A*-HA-FLAG, содержащая теломерный ретротранспозон *HeT-A*. В этой конструкции белок Gag содержит искусственные эпитопы HA (гемаглютинин) и FLAG. (Рис. 9 А). Данная конструкция была использована для создания трансгенных мух. Таким образом, была получена трансгенная система для исследования биогенеза теломерных РНК и белков, требующая проверки.

В данной работе была исследована экспрессия трансгенного *HeT-A Gag* как в культуре клеток дрозофилы, так и в трансгенных мухах. Для экспрессии трансгенного *HeT-A Gag*-HA в клетках дрозофилы линии S2 была проведена трансфекция клеток плазмидой рUAST-*HeT-A*-HA-FLAG и драйверной плазмидой рAC-GAL4, экспрессирующей GAL4 активатор под актиновым промотором. *HeT-A* РНК была выявлена в клетках с помощью

ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием праймеров к *HeT-A* и тотальной РНК, выделенной из трансфицированных клеток (Рис. 9 Б). Белок *HeT-A* Gag-НА-FLAG ожидаемого молекулярного веса (110 кДа) был выявлен в лизате клеток методом Вестерн блоттинга (Рис. 9 В). Таким образом, данная конструкция продуцирует *HeT-A* РНК и белок *HeT-A* Gag.

Затем была изучена экспрессия трансгенной копии *HeT-A* в тканях трансгенной линии. Уровень трансгенной *HeT-A* РНК в яичниках *Drosophila* был проверен с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием трансген-специфичных праймеров, в норме и на фоне герминального нокдауна компонента рiРНК пути *spnE* (Savitsky et al. 2006). Ген *spnE* кодирует РНК-хеликазу SpnE, которая необходима для рiРНК сайленсинга (Malone et al. 2009; Ott et al. 2014). Видно, что нокдаун *spnE* приводит к значительному увеличению содержания как эндогенной, так и трансгенной РНК *HeT-A* (Рис. 9 Г). Рекомбинантный белок *HeT-A* Gag-НА-FLAG детектируется Вестерн-блоттингом с использованием антител к НА эпитопу в яичниках трансгенных мух только при нокдауне *spnE* (Рис. 9 Д). В норме экспрессия *HeT-A* находится под контролем рiРНК пути. Даже в яичниках природной линии с удлинёнными теломерами Gaiano III *HeT-A* Gag практически не детектируется, но при этом *HeT-A* Gag выявляется в соматических тканях взрослых мух (Рис. 9 Е). Таким образом, рiРНК система осуществляет строгий контроль экспрессии теломерных повторов и трансгенной копии *HeT-A* именно в герминальных тканях.

Иммуноокрашивание трансгенных яичников выявило накопление трансгенного белка *HeT-A* Gag-НА в питающих клетках и в ооците (Рис. 9 Ж). Такая же локализация была ранее показана для эндогенного белка *HeT-A* Gag, который кодируется эндогенными повторами *HeT-A* (Рис. 10 З).

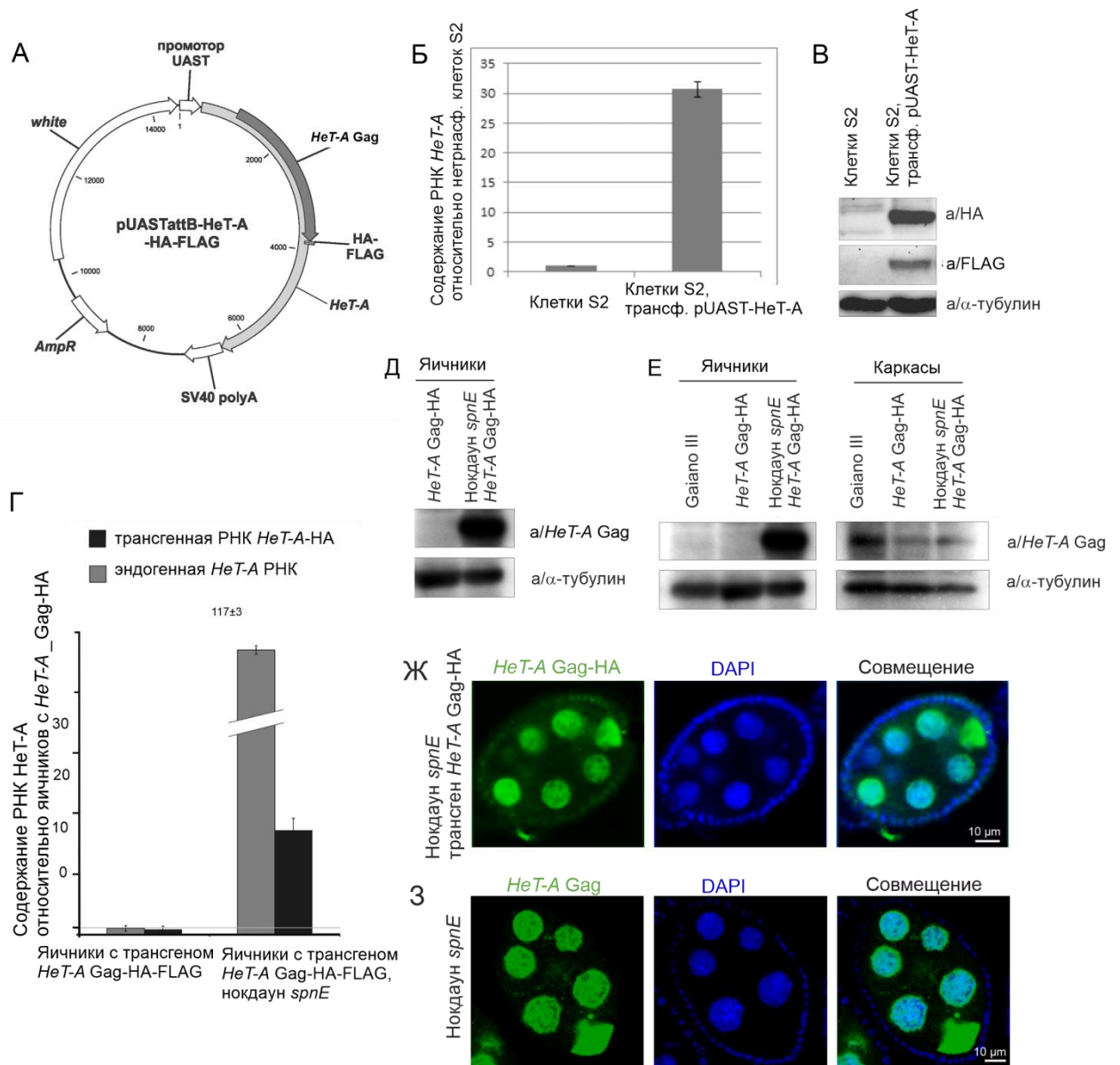


Рисунок 9. Экспрессия трансгенной копии теломерного повтора *HeT-A* в клетках и яичниках *Drosophila*. (А) Схема вектора pUAST-HeT-A-HA-FLAG. (Б) Анализ содержания *HeT-A* РНК в нетрансфицированных клетках S2 и клетках после трансфекции плазмидами pUAST-HeT-A-HA-FLAG и pAC-GAL4 («драйвер»). *rp49* использовали в качестве референтного гена для нормализации данных. (В) Анализ содержания *HeT-A* Gag в лизате нетрансфицированных клеток S2 и лизате клеток после трансфекции плазмидами pUAST-HeT-A-HA-FLAG и pAC-GAL4. (Г) Анализ содержания трансгенной и эндогенной РНК *HeT-A* в яичниках *Drosophila*, содержащих трансген *HeT-A*-Gag-HA, в норме и на фоне нокадауна *spnE*. (Д) Анализ содержания трансгенного белка *HeT-A* Gag-HA в яичниках и каркасах линии *Drosophila*, содержащей трансген *HeT-A*-Gag-HA, в норме и на фоне нокадауна *spnE* методом Вестерн-блоттинга с антителами к HA-эпистоу. (Е) Анализ содержания белка *HeT-A* Gag в яичниках и каркасах *Drosophila* линии *Gaiano III*, а также трансгенной линии *HeT-A*-Gag-HA, в норме и при нокадауне *spnE*, методом Вестерн-блоттинга с антителами к *HeT-A* Gag. (Ж) Иммуноокрашивание яичников трансгенной линии *HeT-A* Gag-HA, на фоне нокадауна *spnE* антителами к HA-эпистоу и яичников с нокадауном *spnE* без трансгена антителами к *HeT-A* Gag (3).

Таким образом, характер экспрессии трансгенной копии *HeT-A* сходен с характером экспрессии эндогенных теломерных повторов, что делает данную трансгенную систему применимой для решения дальнейших задач. Использование данной системы позволяет изучать локализацию *HeT-A* Gag-НА с помощью коммерческих высокоаффинных анти-НА антител, а также использовать данные антитела для изучения взаимодействия *HeT-A* Gag-НА с другими белками и РНК методами ко-ИП и РИП.

3.2 *HeT-A* РНК и *HeT-A* Gag формируют РНП в процессе оогенеза и раннего развития *Drosophila*

Биогенез РНК управляется РНК-связывающими белками, которые определяют локализацию, время жизни и специфичность взаимодействий транскриптов. Поэтому для понимания роли теломерных РНК важно идентифицировать белки, которые связываются с ними. Особенно важно выявление клеточных партнеров теломерной РНК при дисфункции теломер и гиперэкспрессии теломерных повторов, т.к. подобные взаимодействия могут играть ключевую роль в теломерном сигналинге и остановке деления клетки.

В случае теломер *Drosophila*, очевидным кандидатом на роль РНК-связывающего белка транскриптов *HeT-A* является кодируемый ими белок *HeT-A* Gag. Прямое распознавание транскрипта ретротранспозона кодируемым им белком было открыто для ретротранспозона человека *L1* и известно, как правило *cis*-предпочтения (Wei et al. 2001; Kulpa and Moran 2006). Мы предположили, что теломерный белок Gag, кодируемый *HeT-A*, взаимодействует с *HeT-A* РНК, формируя РНП в герминальных тканях дрозофилы.

В виду активности системы рiРНК экспрессия *HeT-A* сильно репрессирована в герминальных тканях по сравнению с соматическими (Savitsky et al. 2006; Morgunova et al. 2015). *HeT-A* Gag не детектируется

Вестерн-блоттингом в яичниках дикого типа даже в линии с удлинёнными теломерами Gaiano III (Рисунок 9 Г, Д). При нарушениях рiРНК пути при нокадауне гена *spnE*, происходит накопление *HeT-A* Gag в яичниках, что делает возможным детектировать теломерные РНК и белки. Чтобы изучить биогенез *HeT-A* РНП при дисфункции теломер, мы охарактеризовали их локализацию во время оогенеза и первых часов эмбрионального развития при герминальном нокадауне *spnE*.

3.2.1 Белок *HeT-A* Gag и *HeT-A* РНК взаимодействуют с образованием РНП в клетках *Drosophila* линии S2, в яичниках и ранних эмбрионах

В данной работе было изучено взаимодействие *HeT-A* Gag с *HeT-A* РНК методом РНК-иммунопреципитации с детекцией преципитированных РНК с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Сначала мы исследовали взаимодействие *HeT-A* Gag и *HeT-A* РНК в клетках линии S2. *HeT-A* Gag-НА преципитировали из лизатов клеток, трансфицированных плазмидами pUAST-*HeT-A*-НА-FLAG и pAC-GAL4; для контроля использовали не трансфицированные клетки S2. Было показано, что в комплексе с *HeT-A* Gag-НА присутствует *HeT-A* РНК (Рис. 10 А, Б).

Чтобы подтвердить наличие данного взаимодействия *in vivo*, *HeT-A* Gag-НА преципитировали из лизатов яичников с нокадауном *spnE* с использованием антител анти-НА. Яичники с нокадауном *spnE*, не несущие *HeT-A*-НА трансген, использовали в качестве контроля. В преципитате было показано существенное накопление транскриптов *HeT-A*, что указывает на формирование *HeT-A* РНП *in vivo* (Рис. 10 В, Д).

Для исследования взаимодействия *HeT-A* Gag и *HeT-A* РНК в раннем эмбриогенезе *Drosophila*, белок Gag-НА преципитировали из лизатов эмбрионов 0-2 часового возраста от мух трансгенной линии, экспрессирующей *HeT-A*-НА в герминальных тканях при нокадауне *spnE*. В качестве контроля для преципитации использовали лизат эмбрионов с

нокдауном *spnE*, не несущих трансген. Транскрипты *HeT-A* были существенно обогащены в преципитате *HeT-A* Gag-НА (Рис. 10 Д, Е).

Таким образом, *HeT-A* РНК и *HeT-A* Gag образуют РНП в процессе оогенеза и раннего развития.

Чтобы изучить взаимодействие между белком *HeT-A* Gag и кодирующей его РНК матрицей (правило *цис*-предпочтения) мы воспользовались другой трансгенной линией, кодирующей *HeT-A* Gag-НА и содержащей последовательность бактериофага MS2 в 3'UTR *HeT-A*. Такая конструкция кодирует одновременно маркированный эпитопом НА белок Gag и РНК, маркированную последовательностями MS2. Уникальный зонд, гибридизующийся с этой последовательностью, позволяет выявлять только трансгенную РНК. РНК FISH с зондом MS2 в сочетании с анти-НА иммуноокрашиванием показали колокализацию трансгенной РНК и меченого белка как в ядрах, так и цитоплазме питающих клеток яичника, а также в цитоплазме ооцита (Рис. 10 Ж, З). Высокая частота колокализации *HeT-A*-MS2 РНК и белка *HeT-A* Gag-НА свидетельствует в пользу взаимодействия *HeT-A* Gag и *HeT-A* РНК согласно правилу *цис*-предпочтения, т.е. белок Gag скорее всего связывается с кодирующей его матрицей ко-трансляционно.

3.2.2 *HeT-A* РНП является гетерогенной и включает также РНК теломерного ретроэлемента *TART*

Известно, что *HeT-A* Gag участвует в таргетировании Gag белка другого теломерного ретроэлемента *TART* (Rashkova et al. 2002). Мы предположили, что *HeT-A* РНП могут содержать другие компоненты, в частности, могут быть ассоциированы также с *TART* РНК. Мы проанализировали РНК, преципитированную с анти-НА антителом, в экспериментах РИП, описанных выше, на содержание *TART* РНК (Рис. 10 А,

В, Д). В результате было показано существенное обогащение *TART* РНК в преципитатах *HeT-A* Gag-НА из лизатов яичников и эмбрионов.

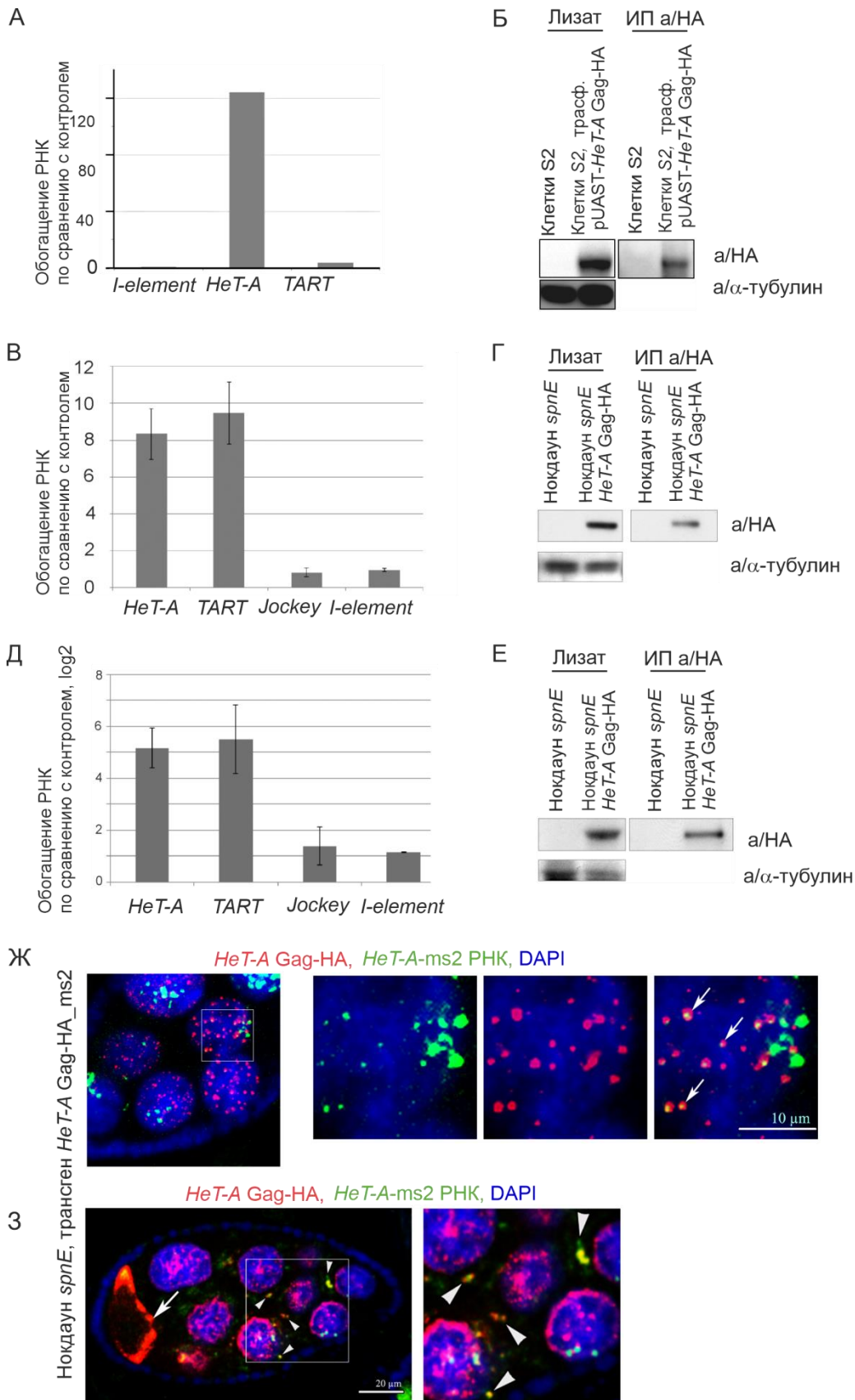


Рисунок 10. *HeT-A* РНК и *HeT-A Gag* формируют РНП. (А) Взаимодействие *HeT-A Gag* и *HeT-A* РНК в клетках линии S2. *HeT-A Gag*-НА преципитировали антителами анти-НА из лизатов клеток, трансфицированных плазмидами pUAST-*HeT-A*-НА-FLAG и pAC-GAL4, для контроля использовали клетки S2. Содержание РНК анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. (В) Анализ содержания РНК, преципитированной антителами анти-НА из лизатов яичников трансгенных мух *HeT-A-Gag*-НА с нокдауном *spnE* и контрольных яичников мух с нокдауном *spnE* без трансгена методом ОТ-ПЦР в реальном времени. (Д) Анализ содержания РНК, преципитированной антителами анти-НА из лизатов эмбрионов 0-2 часового возраста от мух трансгенной линии, экспрессирующей *HeT-A*-НА в герминальных тканях при нокдауне *spnE*. В качестве контроля использовали эмбрионы с нокдауном *spnE*, не несущие трансген. Для (А, В, Д) показано содержание опытной РНК по отношению к контролю. Показаны планки погрешностей стандартных отклонений для двух повторностей. (Б, Г, Е) Анализ *HeT-A Gag*, иммунопреципитированного из лизатов клеток S2 (Б), яичников (Г), эмбрионов (Д) методом Вестерн-блоттинга. Антитела, использованные для Вестерн-блоттинга, указаны справа. (Ж, З) Выявление меченой *HeT-A*-НА-MS2 РНК методом РНК FISH, с использованием зонда, специфичного к MS2 РНК, совмещенное с иммуноокрашиванием *HeT-A Gag*-НА антителами к НА-эпиту. *HeT-A*-НА-MS2 РНК колокализуется с белком *HeT-A Gag*-НА (указано стрелками). Показаны фрагмент яйцевой камеры питающей клетки яичника *Drosophila* на 6 стадии оогенеза. (Ж) Фрагмент ядра питающей клетки, (З) фрагмент цитоплазмы питающей клетки. Длинной стрелкой указана колокализация в ооците.

Содержание *TART* РНК в преципитатах *HeT-A Gag*-НА из лизатов клеток S2 было существенно меньшим, что может объясняться низким уровнем экспрессии *TART* в клетках по сравнению с яичниками с нокдауном *spnE*, где экспрессия *TART* повышена (Рис. 10 А, В, Д). Для сравнения мы также проанализировали содержание РНК ретроэлементов *jockey* и *I-element*. Для *HeT-A Gag* не было показано взаимодействие с Gag белками этих элементов в культуре клеток (Rashkova et al. 2003). Нами также не было показано взаимодействие *HeT-A Gag* с РНК *jockey* и *I-element* (Рис. 10 А, В, Д).

Таким образом, в комплексе, ассоциированном с *HeT-A* Gag, была обнаружена *TART* РНК, это предполагает, что *HeT-A* РНП – многокомпонентные комплексы.

3.3 Структура и локализация теломерных РНП в различных тканях *Drosophila*

Основным подходом в решении данной задачи был метод РНК FISH, комбинированной с иммуноокрашиванием, на целых тканях (whole-mount). Экспериментально были подобраны различные условия обработки, повышающей проницаемость образцов тканей (пермеабиллизация), которые позволяли детектировать либо ядерные, либо цитоплазматические структуры (см. Методы), так как применение стандартных подходов не позволяло исследовать структуры ядерных РНП. Данный подход позволил выявить динамичную картину распределения *HeT-A* РНП в процессе оогенеза и раннего развития.

3.3.1 Локализация *HeT-A* РНП в яичниках *Drosophila* на ранних этапах оогенеза

Мы проанализировали колокализацию *HeT-A* РНК и *HeT-A* Gag на разных стадиях оогенеза при нокдауне *spnE*, используя РНК FISH гибридизацию, совмещенную с иммуноокрашиванием. Было показано, что в яичниках в зоне 2А гермария *HeT-A* транскрипты колокализуются с *HeT-A* Gag, формируя сферические РНП (Рис. 11 А). Их размер примерно 1-2 микрона. Подобные частицы были обнаружены ранее в соматических клетках - нейробластах личинок дрозофилы (Zhang et al. 2014). Многочисленные *HeT-A* сферы, наблюдающиеся в ядрах делящихся цистобластов, предположительно являются интермедиатами теломерного

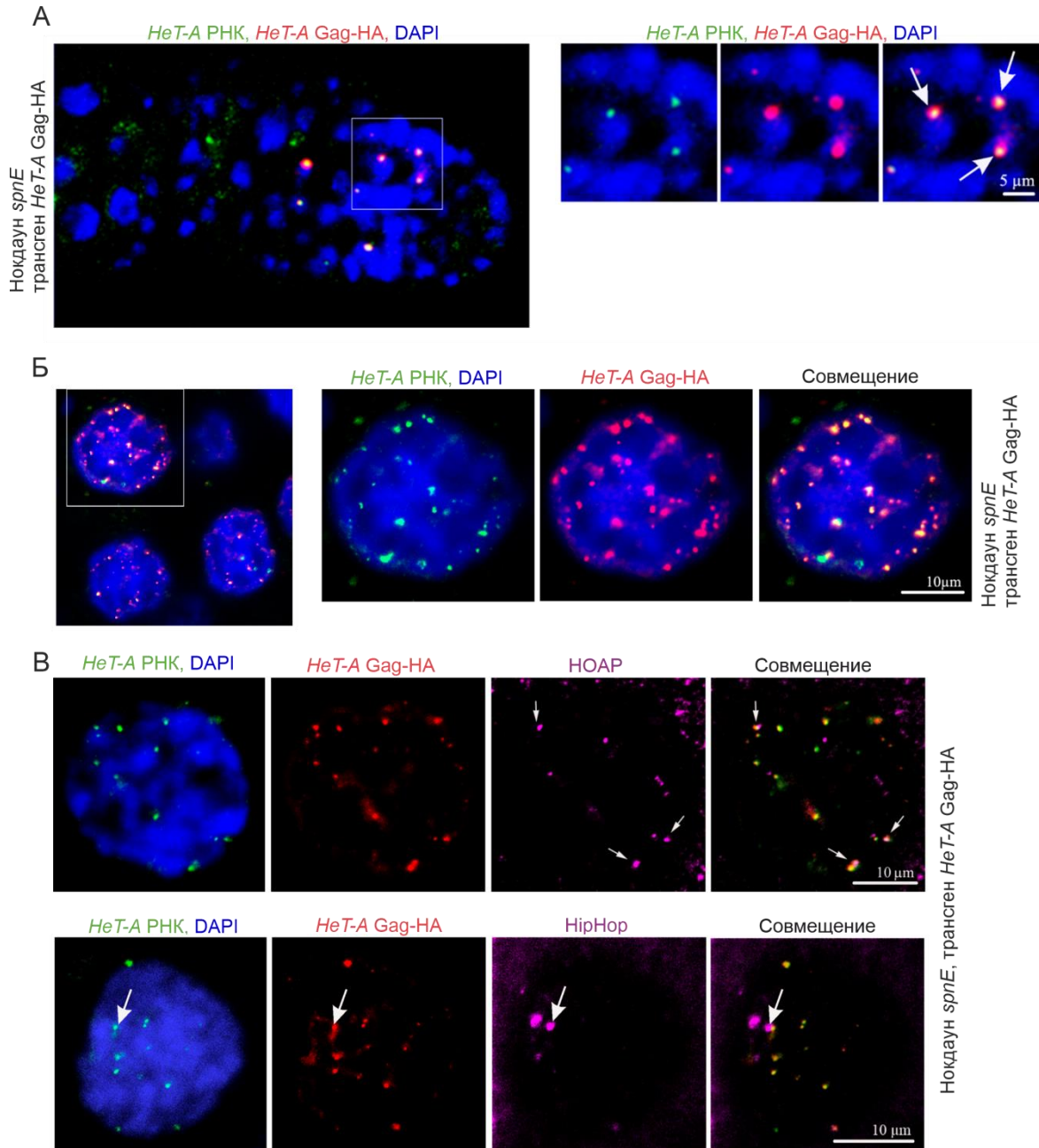


Рисунок 11. *HeT-A* РНК и *HeT-A* Gag-HA формируют РНП в хроматине клеток гермария и питающих клеток яичника дрозофилы. (А) *HeT-A* РНК (зеленый) колокализуется с *HeT-A* Gag-HA (красный) в гермарии яичников *Drosophila*. Часть снимка увеличена (белый прямоугольник). *HeT-A* сферы в цистобластах указаны стрелками. (Б) *HeT-A* РНК (зеленый) колокализуется с *HeT-A* Gag-HA в ядрах питающих клеток. Слева показан фрагмент яйцевой камеры. Показано увеличенное ядро питающей клетки яичника. (В) Окрашивание *HeT-A* РНК (зеленый) совмещенное с окрашиванием *HeT-A* Gag-HA (красный) и теломерных белков HOAP или HipHop (фиолетовый) в ядрах питающих клеток яйцевой камеры седьмой стадии развития. *HeT-A* РНП, колокализованные с теломерами, указаны стрелками.

элонгационного комплекса, что согласуется с высоким уровнем теломерных присоединений в мутантах *spnE* (Savitsky et al. 2006). Мы не выявили *HeT-A* РНП в герминальных тканях яичников дрозофилы линии Gaiano III с удлинёнными теломерами. Принимая во внимание очень низкую частоту спонтанных терминальных транспозиций в норме (Kahn et al. 2000), сборка *HeT-A* сфер может быть очень редким событием на фоне дикого типа, либо *HeT-A* РНП могут быть меньше по размеру и не детектироваться с помощью применяемых методов микроскопии.

3.3.2 Локализация *HeT-A* РНП в яичниках *Drosophila* на средних и поздних этапах развития яйцевых камер

На более поздних стадиях оогенеза в яичниках с нокдауном *spnE* многочисленные сферические *HeT-A* РНП детектируются в ядрах терминально дифференцированных питающих клеток, лишь небольшая часть из них ассоциирована с теломерами (Рис. 11 Б, В). Таким образом, после сборки в цитоплазме, *HeT-A* РНП мигрируют в ядро и связываются как с теломерами, так и с нетеломерным хроматином. Возможно, эти нетеломерные ядерные *HeT-A* РНП имеют сигнальную роль, передавая информацию о теломерной дисфункции. Теломерные факторы млекопитающих также могут локализоваться в хроматине вне теломер, регулируя транскрипцию различных генов (Ye et al. 2014).

Цитоплазматические гранулы *HeT-A* РНП выявляются как в питающих клетках, так и в ооците при нокдауне *spnE* (Рис. 12 А). В ооците *HeT-A* Gag и *HeT-A* РНК накапливаются по всему объёму ооцита, их диффузная локализация полностью перекрывается (Рис. 12 А). *HeT-A* РНК FISH в комбинации с иммуноокрашиванием анти-НА в яичниках дикого типа линии uw не выявило сигналов, что служило в качестве контроля на специфичность иммуноокрашивания (Рис. 12 Г).

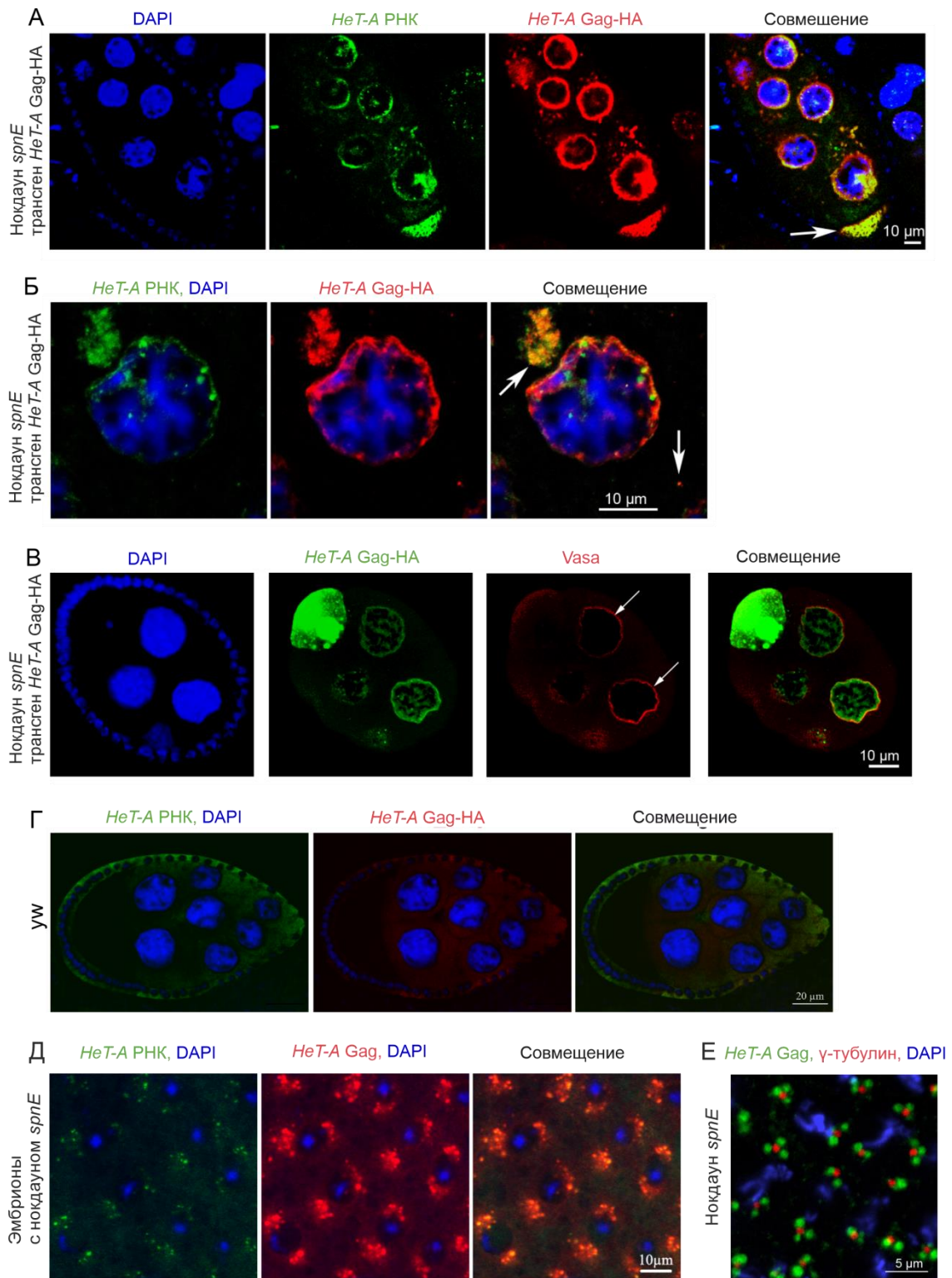


Рисунок 12. *HeT-A* РНК и *HeT-A* Gag-НА формируют РНП в цитоплазме питающих клеток яичника *Drosophila*. (А) *HeT-A* РНК (зеленый) и *HeT-A* Gag-НА (красный) образуют крупные агрегаты в цитоплазме яичника дрозофилы и накапливаются в ооците (показано стрелкой). Иммуноокрашивание яичников *Drosophila* трансгенной линии *HeT-A*-Gag-НА с нокдауном *spnE*, совмещенное с *HeT-A* РНК FISH. (Б) Агрегаты *HeT-A* в цитоплазме крупным планом, указаны стрелками. (В) *HeT-A* Gag-НА (зеленый) частично колокализуется с белком Vasa (красный). (Г) Контрольное иммуноокрашивание яичников

Drosophila линии *uw* антителами анти-НА, совмещенное с *HeT-A* РНК FISH . (Д) *HeT-A* РНК (зеленый) колокализуется с *HeT-A* Gag (красный) вокруг полюсов деления в эмбрионах *Drosophila* возрастом 0-2 часа с нокдауном *spnE*. (Е) *HeT-A* Gag (зеленый) формирует скопления вокруг центросом, окрашенных с помощью антител к γ -тубулину (красный).

В цитоплазме питающих клеток некоторые *HeT-A* РНП формируют крупные агрегаты неправильной формы, отличные от ядерных сферических частиц (Рис. 12 А, Б). Окрашивание *HeT-A* Gag-НА было выявлено также в окооядерной рибонуклеопротеиновой структуре – нюаж (nuage) (Рис. 12 В). По-видимому, импорт в ядро большого количества *HeT-A* Gag сопровождается его задержкой в нюаж. Функциональная значимость этого пока не ясна.

3.3.3 Локализация *HeT-A* РНП в эмбрионах *Drosophila*

Ранее было показано, что материнские транскрипты *HeT-A* формируют скопления вокруг центросом в синцитии эмбриона на этапе формирования бластодермы при нокдауне *spnE* (Morgunova et al. 2015). Мы показали, что *HeT-A* Gag колокализуется с *HeT-A* РНК, образуя скопления РНП вокруг полюсов деления в эмбриональном синцитии (Рис. 12 Д). Окрашивание *HeT-A* Gag и компонента центросом γ -тубулина показало скопление *HeT-A* РНП вокруг центросом, однако колокализации с центросомами не наблюдается (Рис. 12 Е). Предполагается, что центросомная локализация теломерных РНП при дисфункции теломер может играть сигнальную роль, влияя на клеточный цикл.

3.3.4 *TART* РНК колокализуется с *HeT-A* РНП в яичниках и эмбрионах *Drosophila*

С помощью *TART* РНК FISH гибридизации, совмещенной с иммуноокрашиванием *HeT-A* Gag-НА. мы показали, что *TART* РНК колокализуется с агрегированными *HeT-A* РНП в цитоплазме питающих клеток (Рис. 13 А). Эти данные подтвердили присутствие *TART* РНК в комплексе с *HeT-A* РНП, выявленное методом РИП (Рис. 10 А, В, Д). В ядрах питающих клеток транскрипты *TART* выявляются рядом с теломерами, но не в составе сферических *HeT-A* РНП (Рис. 13 Б). Транскрипты *TART* также выявляются в эмбриональном синцитии у centrosом и полностью колокализуются с *HeT-A* Gag-НА (Рис. 13 В). Таким образом, *HeT-A* Gag может не только связываться с *HeT-A* РНК *in cis*, но и взаимодействовать *in trans* с *TART* РНК, напрямую или с участием белков-посредников.

Все эти данные, взятые вместе, предполагают, что *HeT-A* РНК и *HeT-A* Gag образуют РНП разной структуры на разных стадиях оогенеза при нарушении сайленсинга рiРНК. Склонность к агрегации белка *HeT-A* Gag, замеченная при проведении экспериментов, по-видимому, является свойством данного белка, важным при формировании крупных гранул различной формы. Можно предположить, что при агрегации *HeT-A* Gag в клетке в состав частиц захватываются клеточные компоненты, и это функционально важно. Это предположение было подтверждено на следующем этапе работы.

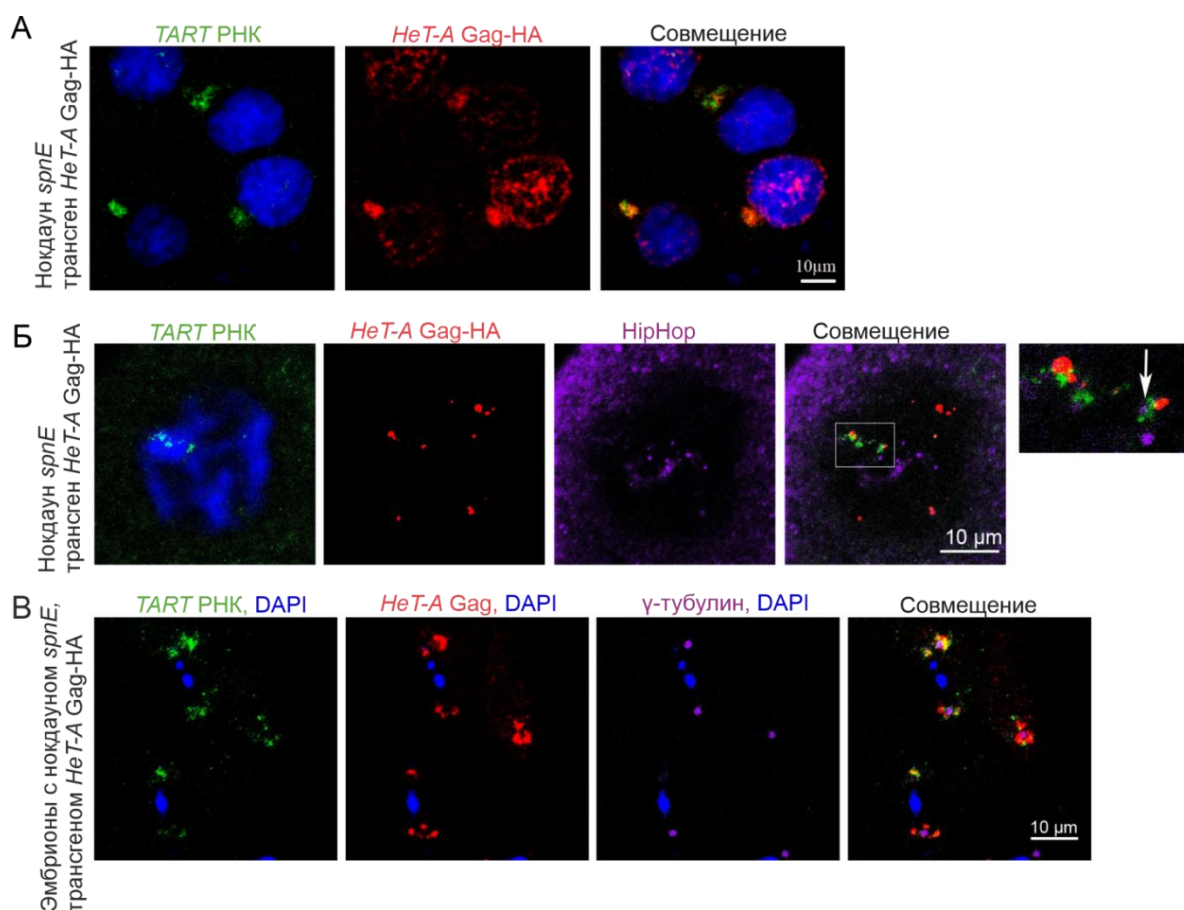


Рисунок 13. *HeT-A* РНП ассоциированы с *TART* РНК в цитоплазме яичников дрозофилы. (А) Транскрипты *TART* колокализуются с *HeT-A* Gag-HA (красный) в цитоплазме питающих клеток в яичниках *Drosophila* с нокдауном *spnE* и трансгеном *HeT-A-Gag-HA* (Б) *TART* РНК частично колокализуется с *HeT-A* Gag-HA (красный) в ядрах питающих клеток. (указано стрелкой) Показан снимок отдельного ядра питающей клетки яйцевой камеры на 6 стадии развития. (В) Транскрипты *TART* колокализуются с *HeT-A* Gag-HA (красный) в эмбрионах *Drosophila* с нокдауном *spnE* и трансгеном *HeT-A-Gag-HA*

3.4 Транспорт *HeT-A* РНП, направленный к минус концам микротрубочек, осуществляется транспортным белком Egl

При нарушении пути рiРНК продукты *HeT-A* накапливаются в ооците с ранних стадий оогенеза, предполагая, что какой-то механизм обеспечивает их перемещение из питающих клеток в ооцит (Vagin et al. 2004; Savitsky et al. 2006). Egl, белок, который взаимодействует с динеиновым моторным

комплексом, является основным транспортным белком, осуществляющим транспорт РНК, направленный к минус концам микротрубочек, на разных стадиях оогенеза (Mach and Lehmann 1997; Dienstbier et al. 2009; Sanghavi et al. 2016). Egl имеет важное значение для спецификации ооцита, у мутантов *egl* все 16 клеток яйцевой камеры становятся питающими клетками (Navarro et al. 2004). Мы предположили, что Egl может быть вовлечен в локализацию *HeT-A* РНК.

3.4.1 Нокдаун *egl* приводит к нарушению локализации *HeT-A* РНК в яичниках *Drosophila*

При нокдауне основного компонента piРНК пути, *piwi*, множественные транскрипты *HeT-A* накапливаются в ооците и колокализуются с динеином, который считается маркером дифференцировки ооцита (Navarro et al 2004) (Рис. 14 А). При двойном герминальном нокдауне *piwi* и *egl* специфическая локализация *HeT-A* в ооците не наблюдается (Рис. 14 А), *HeT-A* РНК и динеин накапливаются в цитоплазме питающих клеток. Делокализация *HeT-A*, по-видимому, вызвана дезорганизацией системы микротрубочек, вызванной нокдауном *egl* (Sanghavi et al. 2016). Основываясь на этом наблюдении, мы сосредоточили внимание на изучении роли Egl в транспорте *HeT-A* РНП.

3.4.2 *HeT-A* РНП взаимодействуют с белком-транспортером Egl в яичниках и эмбрионах *Drosophila*

Чтобы определить, связывается ли Egl с *HeT-A* РНК, мы выполнили РИП с последующим ОТ-ПЦР в реальном времени. Egl преципитировали из лизата яичников с нокдауном *spnE*. Как и ожидалось, типичные мРНК, транспортируемые Egl, *nanos*, *oskar* и *gurken*, связаны с комплексом Egl-BicD (Sanghavi et al. 2016) (Рис. 14 Б, В).

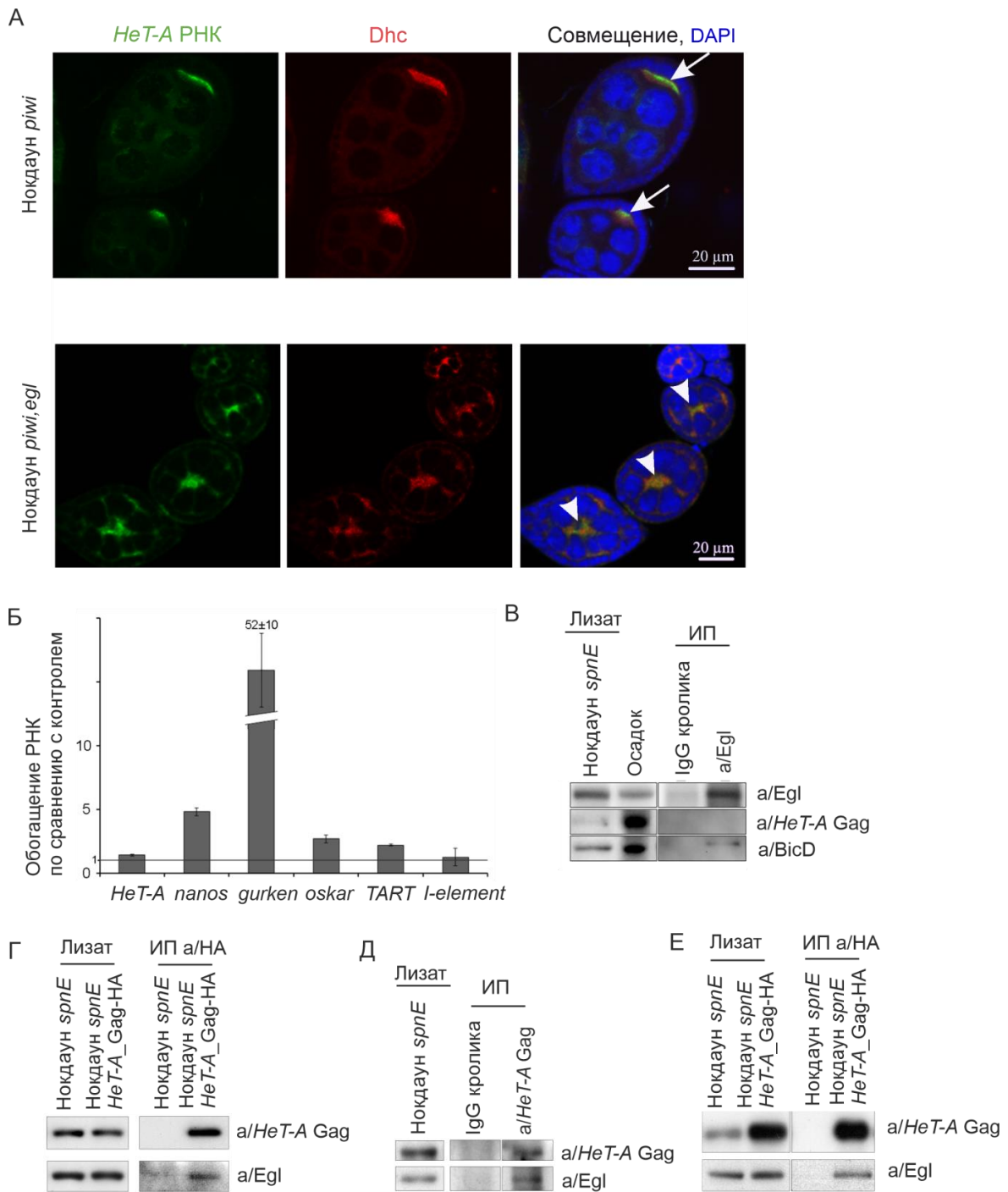


Рисунок 14. Egl участвует в транспорте *HeT-A* РНП в яичниках. (А) Нокдаун *egl* приводит к делокализации транскриптов *HeT-A*. Яйцевые камеры на 4-5 стадии оогенеза с нокдауном *piwi* (верхняя панель) и двойным нокдауном *piwi-egl* (нижняя панель) окрашены на динеин (*Dhc*) (красный). *HeT-A* РНК (зеленый) локализована в ооците при нокдауне *piwi*, но делокализуется при двойном нокдауне *piwi, egl* (указано стрелками). (Б) РИП, с использованием анти-*Egl* антител относительно контрольной РИП с нормальными *IgG* кролика из лизата яичников с нокдауном *sprE* в присутствии трансгена *HeT-A-Gag-HA*. *rp49* использовали для нормализации. (В) Анализ иммунопреципитированных белков

методом Вестерн-блоттинга. Антитела, использованные для ИП указаны сверху. Антитела, использованные для Вестерн-блоттинга указаны справа. (Г) Ко-ИП трансгенного *HeT-A Gag-NA* из экстракта яичников. Анализ белков, иммунопреципитированных антителом анти-NA из лизата яичников с нокдауном *spnE* и трансгеном *HeT-A-Gag-NA* либо без него (контроль) методом Вестерн-блоттинга. Анти-NA антитела иммунопреципитируют белки *HeT-A Gag-NA* и *Egl*. (Д) Ко-ИП эндогенного *HeT-A Gag* из экстракта яичников. Анализ белков иммунопреципитированных антителом анти-*HeT-A Gag* либо нормальными IgG кролика (контроль) из лизата яичников с нокдауном *spnE* методом Вестерн-блоттинга. Антитела к *HeT-A Gag* иммунопреципитируют белки *HeT-A Gag-NA* и *Egl*. (Е) Ко-ИП трансгенного *HeT-A Gag-NA* из эмбрионального экстракта. Анализ белков иммунопреципитированных антителом анти-NA из лизата эмбрионов возрастом 0-2 часа с нокдауном *spnE* и трансгеном *HeT-A Gag-NA* либо без него (контроль) методом Вестерн-блоттинга. Анти-NA антитела иммунопреципитируют белки *HeT-A Gag-NA* и *Egl*.

Однако обогащение *HeT-A* РНК было незначительным (Рис. 14 Б). Было предположено, что *HeT-A* РНК взаимодействует с *Egl* не напрямую, а находясь в комплексе с белком *HeT-A Gag*. (Рис. 14 Б). В условиях проведения РИП взаимодействие *Egl* и *HeT-A Gag* может разрушаться.

Чтобы проверить данное предположение, на следующем этапе работы мы провели ко-ИП белковых комплексов, связанных с *HeT-A Gag-NA* с использованием антител к NA из лизатов яичников с нокдауном *spnE*. Анализ комплексов с помощью Вестерн-блоттинга показал, что *Egl* действительно ассоциирован с *HeT-A Gag-NA*. Ко-ИП эндогенного *HeT-A Gag* с антителами к *HeT-A Gag* из лизата яичников с нокдауном *spnE*, но без трансгена *HeT-A Gag-NA*, также показала взаимодействие эндогенного *HeT-A Gag* и *Egl*, подтверждая специфичность данного комплекса.

В ранних эмбрионах возрастом 0-2 часа также было показано взаимодействие *HeT-A Gag* и *Egl*. Ко-ИП *HeT-A Gag-NA* с а-NA антителами из лизатов эмбрионов возрастом 0-2 часа с нокдауном *spnE* показала, что *Egl* ассоциирован с *HeT-A Gag-NA*. Таким образом мы показали, что *HeT-A Gag*

ассоциирован с Egl в яичниках и эмбрионах *Drosophila* при нарушении piRNA пути

3.4.3 Egl колокализуется с HeT-A РНП в яичниках *Drosophila*

Результат, полученный с помощью ко-ИП, был подтвержден с использованием HeT-A РНК FISH в сочетании с иммуноокрашиванием. В норме Egl диффузно распределен в цитоплазме питающих клеток яичника, также он локализован в околоядерной структуре «нюаж» и накапливается в ооците (Рис. 15 А). При нарушениях piRNA пути Egl образует крупные скопления в цитоплазме питающих клеток, которые колокализуются с HeT-A РНП (Рис. 15 Б, В, Г). В питающих клетках образуются большие агрегаты неправильной формы Egl и HeT-A РНП, которые также частично колокализуются в «нюаж» (Рис. 15 Г). Иммуноокрашивание Egl и эндогенного HeT-A Gag в яичниках с нокдауном *spnE* без трансгена HeT-A-Gag-НА выявило также многочисленные агрегаты Egl, колокализованные с HeT-A Gag, что указывает, что их образование не является побочным эффектом агрегации трансгенного HeT-A Gag-НА (Рис. 15 Б, Д). Этот результат соответствует данным ко-ИП о взаимодействии Egl с эндогенным HeT-A Gag (Рис. 14 Д).

3.4.4 В яичниках дикого типа HeT-A Gag также колокализуется с Egl

Так как мы проводим детекцию HeT-A РНП на фоне нарушения piRNA пути и гиперэкспрессии HeT-A повторов, возникает вопрос, насколько выявляемый паттерн отражает ситуацию в норме. Предположительно, HeT-A РНП в норме ведут себя так же как при гиперэкспрессии, но их количество ниже детектируемого, а образование агрегатов не происходит. Мы предположили, что в яичниках дикого типа HeT-A-РНП также взаимодействует с Egl, и провели иммуноокрашивание Egl и HeT-A Gag, совмещенное с выявлением HeT-A РНК методом FISH, в яичниках

дрозофилы линии Gaiano III, которая обладает увеличенным числом копий *HeT-A* (Siriaco et al. 2002).

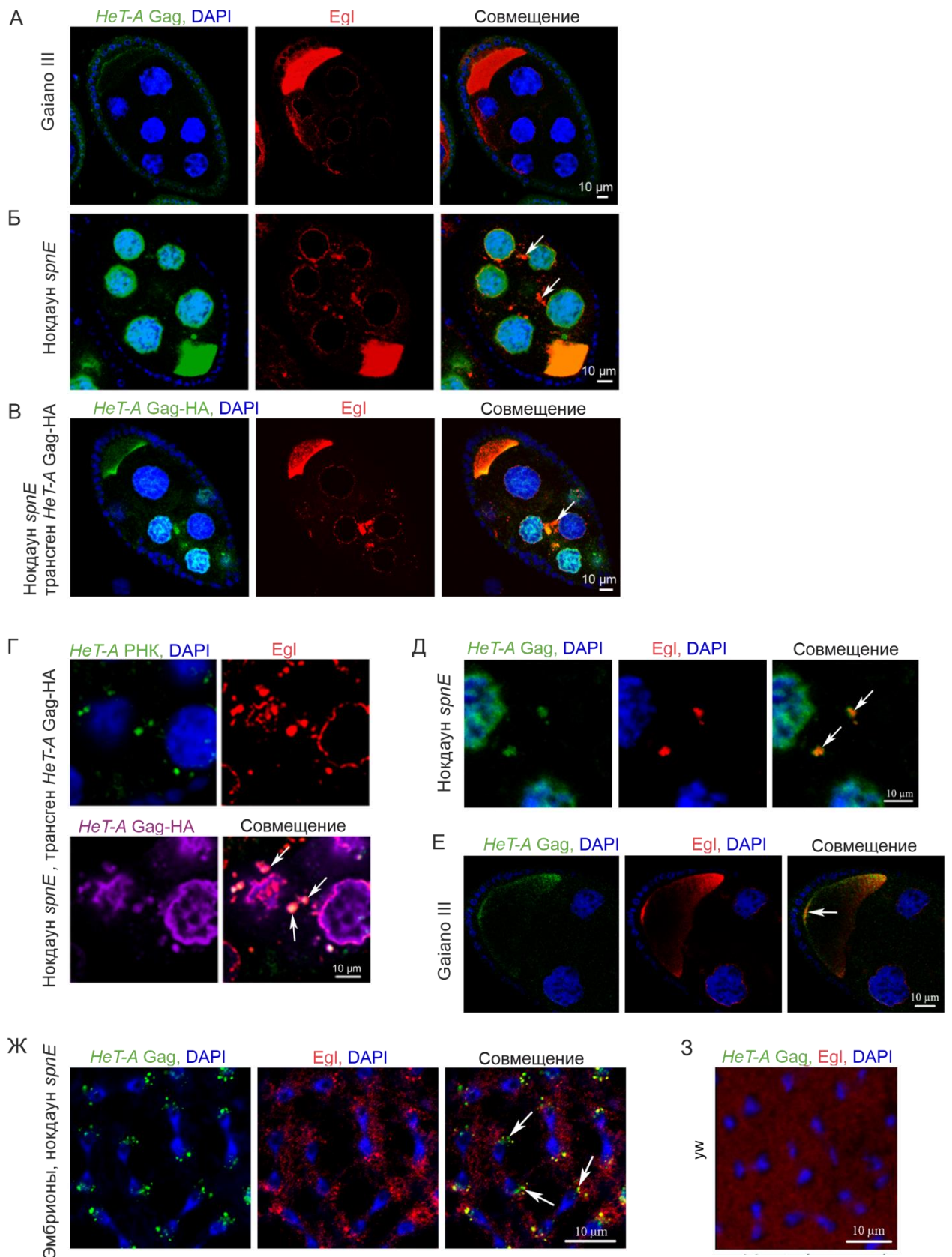


Рисунок 15. *HeT-A* РНП колокализуется с *Egl* в яичниках и эмбрионах *Drosophila*. (А) *HeT-A* Gag (зеленый) и *Egl* (красный) в яичниках дикого типа линии Gaiano III. (Б) *HeT-A* Gag и *Egl* формируют агрегаты в цитоплазме питающих клеток яичников с нокдауном *spnE* (указано стрелками). (В) *HeT-A* Gag-НА и *Egl* формируют агрегаты в цитоплазме питающих клеток яичников трансгенной линии *HeT-A-Gag-НА* с нокдауном *spnE* (указано стрелками). (Г) Агрегаты *HeT-A* Gag-НА (фиолетовый) и *Egl* (красный) крупным планом (указано стрелками), в состав гранул входит также *HeT-A* РНК (зеленый). (Д) *HeT-A* РНК (зеленый), *HeT-A* Gag-НА (фиолетовый) и *Egl* (красный) формируют агрегаты в цитоплазме питающих клеток яичников с нокдауном *spnE* и трансгеном *HeT-A-НА* (указано стрелками). Показан фрагмент яйцевой камеры на 9 стадии оогенеза. (Е) *HeT-A* Gag (зеленый) и *Egl* (красный) колокализованы в задней области ооцита (указано стрелкой) в яичниках мух линии Gaiano III на 10 стадии развития. Фрагмент яйцевой камеры. (Ж) *HeT-A* РНП ассоциирован с *Egl* в ранних эмбрионах. Эмбрионы возрастом 0-2 часа с нокдауном *spnE* были окрашены антителами анти-*HeT-A* Gag и анти-*Egl* (красный), ДНК была окрашена DAPI (синий). Показаны телофазы митозов, *HeT-A* Gag колокализуется с *Egl* возле полюсов деления (указано стрелками). (З) Для контроля эмбрионы линии uw возрастом 0-2 часа были окрашены антителами анти-*HeT-A* Gag и анти-*Egl* (красный), ДНК была окрашена DAPI (синий).

Ранее было показано, что *Egl* локализован на заднем полюсе ооцитов на 9-10 стадиях оогенеза (Mach et al. 1997, Sanghavi et al. 2016). Несмотря на низкий уровень *HeT-A* Gag в яичниках Gaiano III, мы обнаружили его скопление на заднем полюсе ооцита и колокализацию с *Egl* (Рис. 15 Е). Этот результат показывает, что в норме *Egl* также взаимодействует с эндогенным *HeT-A* Gag.

Таким образом, наши данные показывали, что *Egl* необходим для транспорта и локализации *HeT-A* РНП в ооците при дерепрессии *HeT-A*, вызванной нарушением рiРНК сайленсинга. Эксперименты с использованием линии Gaiano III показывает, что схожий механизм функционирует в норме.

3.4.5 Взаимодействие *HeT-A* РНП с *Egl* приводит к эктопическому накоплению *Egl* возле centrosом в ранних эмбрионах при нарушении *pi*РНК сайленсинга и гиперэкспрессии *HeT-A*

Затем мы исследовали взаимодействие *Egl* и *HeT-A* Gag в раннем эмбриогенезе. Было показано взаимодействие белков в ранних эмбрионах методом ко-ИП (Рис. 14 Е). Иммуноокрашивание выявило колокализацию эндогенного *HeT-A* Gag и *Egl* и их скопления около centrosом в эмбриональном синцитии при нокадауне *spnE*, в то время как в эмбрионах без нарушения *pi*РНК пути *Egl* распределен равномерно, а *HeT-A* Gag не детектируется (Рис. 15 Ж, З).

Эти данные предполагают, что в условиях образования избыточного количества *HeT-A* Gag при нарушении *pi*РНК пути, взаимодействие *Egl* с *HeT-A* Gag может приводить к удержанию *Egl* и его эктопической локализации в ранних эмбрионах с нокадауном *spnE*. Здесь стоит напомнить, что при нокадауне *spnE* основные детерминанты осей эмбриона – мРНК *oskar*, *nanos*, *gurken* – взаимодействуют с *Egl* в яичниках (Рис. 14 Б). В эмбрионе *Drosophila* также происходит опосредованное комплексом *Egl*-BicD с динеином перемещение мРНК, отвечающих за сегментацию эмбриона (Wilkie et al. 2001, Bullock et al. 2001). Удержание *Egl* в комплексе с *HeT-A* Gag может нарушать транспорт важных клеточных мРНК, приводя к остановке развития.

3.5 Гиперэкспрессия теломерных РНП приводит к гибели клеток в различных типах тканей, при этом *HeT-A* Gag локализуется вблизи centrosом митотических клеток.

Ранее было показано, что при мутациях генов, нарушающих различные клеточные пути, такие как сайленсинг транспозонов (*pi*РНК путь), транскрипцию многих генов (транскрипционные факторы *Trf2* и *Woc*) или

контроль качества РНК (деаденилазный комплекс Ccr4-Not), происходит остановка митотических делений в ранних эмбрионах дрозофилы и высокая эмбриональная смертность (Morgunova et al. 2015). Все эти мутации сопровождаются также нарушением теломерного сайленсинга и накоплением теломерных РНП в процессе оогенеза, а затем вокруг centrosом в процессе раннего развития. Таким образом, нарушение различных по природе факторов, регулирующих экспрессию теломерных РНК, приводит к фенотипам, наводя на мысль о ключевой роли гиперэкспрессии *HeT-A* в проявлении мутантного фенотипа. Однако нельзя исключить, что наблюдаемые нарушения развития связаны с тем, что исследуемые факторы затрагивают другие клеточные мишени. Для выяснения этого вопроса было решено провести эксперименты с индуцированной гиперэкспрессией трансгенного *HeT-A* в различных клетках негерминальной ткани, где транскрипты *HeT-A* стабильны и не разрушаются системой рiРНК. В таком эксперименте можно посмотреть прямой эффект накопления продуктов *HeT-A* на судьбу клетки. Кроме того, в таких экспериментах можно проследить, будет ли наблюдаться локализация *HeT-A* РНП рядом с centrosомами. Centrosомная локализация теломерных РНП в митотических клетках дикого типа не наблюдается, скорее всего потому, что в норме уровень транскриптов *HeT-A* очень низок. Нами было сделано предположение, что именно накопление избыточных теломерных РНП нарушает функцию centrosом и приводит к нарушениям митоза и гибели эмбрионов. Поэтому нашей следующей задачей было показать, что в отсутствии мутаций теломерные РНП будут локализованы вблизи centrosом, и что гиперэкспрессия *HeT-A* может обладать цитотоксическим эффектом на фоне нормального генетического фона.

Сначала была исследована цитотоксичность гиперэкспрессии *HeT-A* в клетках S2 и *in vivo*, в эмбрионах *Drosophila*. Был проведен подсчет доли мертвых клеток S2 при гиперэкспрессии *HeT-A* Gag либо белка GFP – в качестве контроля.

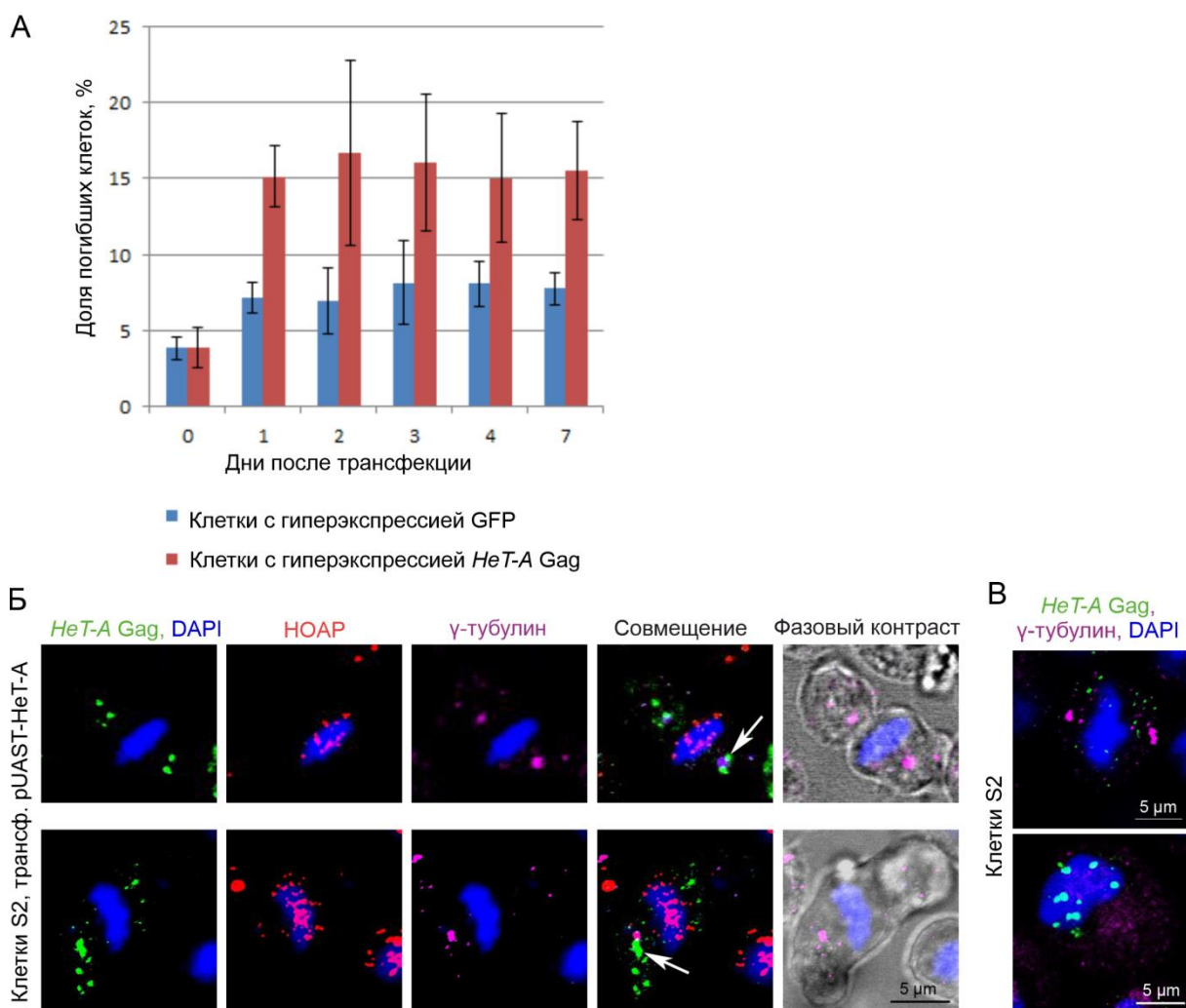


Рисунок 16. Индуцированная гиперэкспрессия *HeT-A* Gag токсична для клеток S2. Для гиперэкспрессии *HeT-A* Gag-НА в культивируемых клетках S2 клетки котрансфицировали плазмидами pUAST-HeT-A-НА и pAC-GAL4, для контроля использовали клетки с гиперэкспрессией GFP, которые котрансфицировали плазмидами pUAST-GFP и pAC-GAL4 (А) Гиперэкспрессия *HeT-A* Gag в клетках линии S2 приводит к увеличению доли погибших клеток по сравнению с контрольными клетками S2 с гиперэкспрессией GFP. Показаны планки погрешностей стандартных отклонений для трех повторностей, различия статистически достоверны ($p < 0.05$). (Б) *HeT-A* Gag локализуется около centrosом в клетках линии S2 гиперэкспрессирующих *HeT-A* Gag-НА. Клетки окрашены DAPI (синий), антителами к *HeT-A* Gag (зеленый), HOAP (красный) и γ-тубулину (фиолетовый). Показаны клетки в метафазе митоза, *HeT-A* Gag локализуется рядом с centrosомами (показано стрелками). (В) Контрольные клетки S2, окрашенные DAPI (синий), антителами к *HeT-A* Gag (зеленый) и γ-тубулину (фиолетовый). Вверху показана клетка в метафазе митоза, *HeT-A* Gag не детектируется внизу – клетка в интерфазе, детектируются крупные фокусы *HeT-A* Gag в хроматине.

Показано, что при экспрессии *HeT-A* наблюдалась усиленная гибель клеток, начиная со второго дня после трансфекции (Рис. 16 А). Процент погибших клеток при экспрессии *HeT-A* превышал в 2 раза данный показатель при экспрессии GFP. Следовательно, гиперэкспрессия *HeT-A* сама по себе цитотоксична.

Также была определена доля эмбрионов с индуцированной гиперэкспрессией *HeT-A Gag*, погибших в процессе развития. С помощью скрещивания трансгенной линии *HeT-A-Gag-NA* с драйверной линией, экспрессирующей активатор GAL4 под контролем промотора гена *daughterless (da)*, был получен высокий уровень экспрессии *HeT-A* в эмбрионах возраста 2-5 часов (Рис. 17 А). В качестве контроля служили эмбрионы с гиперэкспрессией белка RFP, полученные путем скрещивания трансгенной линии UAS-RFP и драйверной линии. Выживаемость эмбрионов с гиперэкспрессией *HeT-A Gag* по сравнению с контрольными эмбрионами была снижена в 3.5 раза (Рис. 17 Б). Следовательно, избыточные *HeT-A* РНП токсичны для эмбрионов.

Затем мы изучили локализацию *HeT-A* РНП, гиперэкспрессия которых была индуцирована искусственным образом в клетках линии S2 и эмбрионах *Drosophila*. Иммуноокрашивание клеток с гиперэкспрессией *HeT-A Gag-NA* выявило белок *HeT-A Gag* вблизи центросом в делящихся клетках (Рис. 16 В). При этом в контрольных нетрансфицированных клетках S2 *HeT-A Gag* не детектируется на стадии митоза, а в интерфазе выявляются крупные фокусы *HeT-A Gag* в хроматине.

Аналогичный эксперимент был проведен *in vivo* в эмбрионах с гиперэкспрессией *HeT-A Gag-NA*. Иммуноокрашивание эмбрионов выявило *HeT-A Gag-NA* вблизи центросом (Рис. 17 В) в клетках эмбрионов. В эмбрионах контрольной линии с гиперэкспрессией RFP *HeT-A Gag* не был детектирован (Рис. 17 Г).

Таким образом, усиление экспрессии *HeT-A* на фоне нормального генотипа цитотоксично, а продукты экспрессии – *HeT-A* РНП – имеют нетеломерную локализацию и накапливаются вокруг центросом.

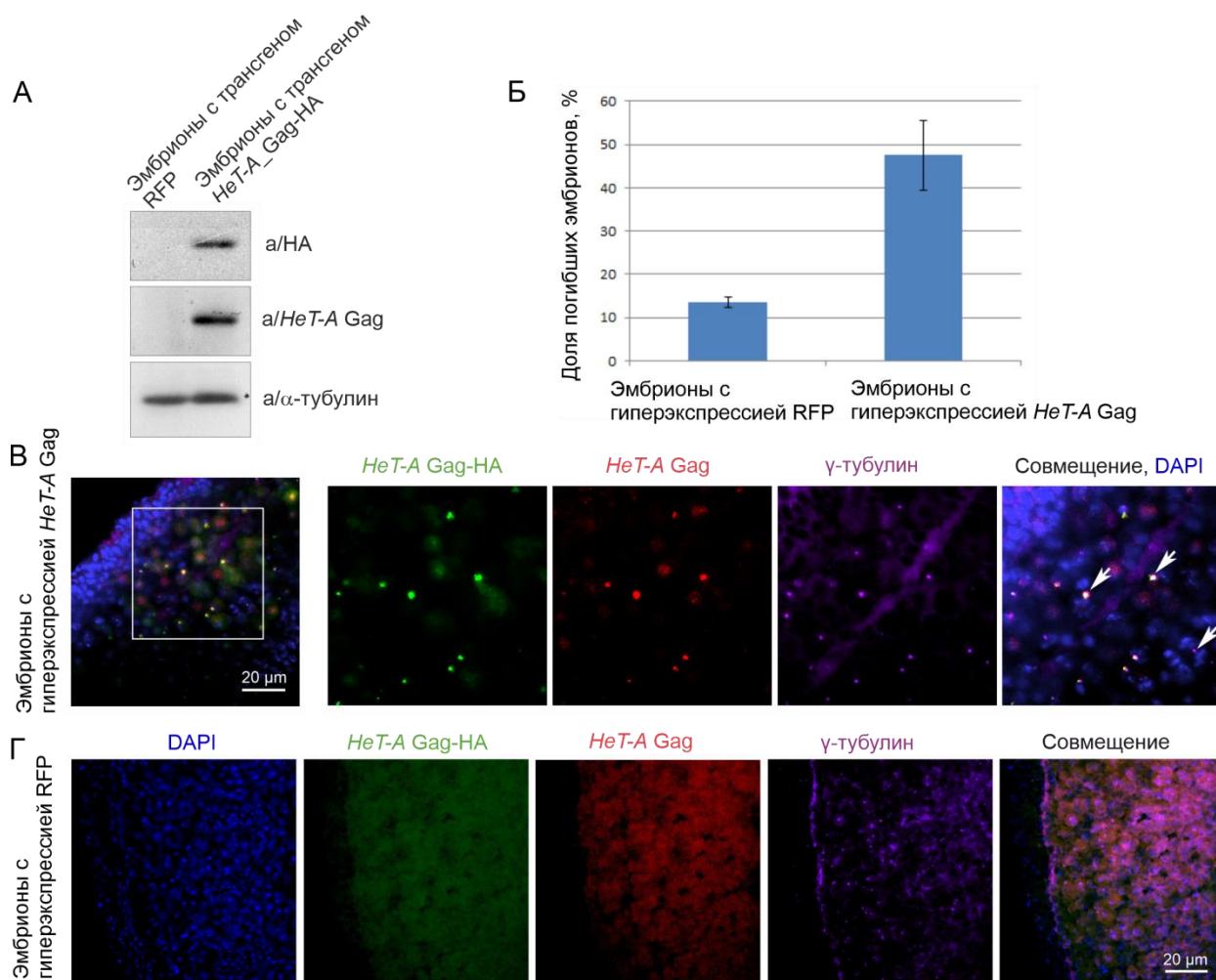


Рисунок 17. Индуцированная гиперэкспрессия *HeT-A Gag* токсична для эмбрионов *Drosophila*. Эмбрионы с индуцированной гиперэкспрессией *HeT-A Gag*-NA несут трансген *HeT-A Gag*-NA и *da-GAL4* драйвер, контрольные эмбрионы несут трансген *UAS-RFP* и *da-GAL4* драйвер. (А) Гиперэкспрессию *HeT-A Gag* в эмбрионах верифицировали Вестерн-блоттингом. Используемые антитела указаны справа. (Б) Гиперэкспрессия *HeT-A Gag* в эмбрионах дрозофилы приводит к увеличению доли погибших эмбрионов по сравнению с контрольными эмбрионами с гиперэкспрессией RFP. Показаны планки погрешностей стандартных отклонений для трех повторностей. (В) *HeT-A Gag* локализуется около centrosом в клетках эмбрионов дрозофилы с гиперэкспрессией *HeT-A Gag*. Эмбрионы окрашены DAPI (синий), антителами к HA (зеленый), *HeT-A Gag* (красный) и γ -тубулину (фиолетовый). Колокализация *HeT-A Gag* и centrosом показана стрелками. (Г) Окрашивание контрольных эмбрионов с гиперэкспрессией RFP, *HeT-A Gag* не выявляется.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы исследовали жизненный цикл РНК и белков, образуемых теломерными повторами *Drosophila*. Для изучения локализации теломерных РНК в оогенезе и раннем развитии, мы сфокусировались на основном теломерном элементе *HeT-A*, который активно транскрибируется при нарушении рiРНК пути. В виду активности рiРНК пути *HeT-A* Gag практически не детектируется в яичниках природных линий (Рис. 9 E). Поэтому большая часть экспериментов была проведена при гиперэкспрессии *HeT-A* на фоне герминального нокдауна компонента рiРНК пути *spnE*. Такой подход позволил нам визуализировать основные этапы биогенеза теломерных РНК, а также связать теломерную дисфункцию и гиперэкспрессию теломерных повторов с нарушениями развития.

4.1 *HeT-A* Gag и *HeT-A* РНК образуют РНП в яичниках и эмбрионах дрозофилы

Считается, что ретротранспозоны типа LINE имеют ретровирусное происхождение (Parrish and Tomonaga 2016). Взаимодействие Gag белков с вирусной РНК и формирование нуклеокапсида в целом характерно для ретровирусов (Pornillos and Ganser-Pornillos 2019). Gag белки теломерных ретротранспозонов *Drosophila* имеют мотив «цинковые пальцы», который схож с нуклеокапсидными доменами Gag полипептидов ретровирусов (Rashkova et al. 2003; Khazina and Weichenrieder 2009). Этот мотив у ретровирусов участвует в связывании РНК и обеспечивает связывание мономеров Gag белков друг с другом. На основе этого наблюдения было сделано предположение, что Orf1p полипептиды, кодируемые ретротранспозонами, могут быть функционально схожим с белками нуклеокапсидов ретровирусов, упаковывая интермедиаты ретротранспозиции. В настоящее время известно, что РНК ретротранспозона

L1 человека взаимодействует с белками *L1* Orf1 и Orf2, которые она кодирует. Взаимодействие происходит по принципу *цис*-предпочтения, состоящего в том, что белки взаимодействуют со своей матрицей (Wei et al. 2001). Однако для Gag белков (Orf1p белков), кодируемых ретроэлементами *Drosophila* взаимодействие с кодирующей их мРНК не было изучено.

Нами было показано, что транскрипты *HeT-A* ассоциированы с белком *HeT-A* Gag, который они кодируют, как в яичниках дрозофилы, так и в ранних эмбрионах. Наши данные свидетельствуют в пользу того, что взаимодействие происходит по правилу *цис*-предпочтения.

4.2 Биогенез *HeT-A* РНП в процессе оогенеза дрозофилы

В данной работе было показано, что на ранних стадиях оогенеза в цистобластах гермария ядерные *HeT-A* РНП представляют собой сферические частицы. По результатам конфокальной микроскопии видно, что *HeT-A* Gag расположен на поверхности сферы, а *HeT-A* РНК – внутри. Эти сферы предположительно являются интермедиатами комплекса элонгации теломер. *HeT-A* сферы были выявлены только в яичниках с нокдауном *spnE*, но не в яичниках мух дикого типа. Для поиска *HeT-A* сфер мы использовали также природные линии *D. melanogaster* с увеличенным числом копий *HeT-A*, однако не удалось выявить сферические *HeT-A* частицы в яичниках данных линий. Этот результат согласуется с данными об очень низком уровне экспрессии *HeT-A* и низком уровне транспозиций на конец хромосомы, наблюдающийся в мухах дикого типа (Kahn et al. 2000; Savitsky et al. 2006).

Участок гермария, где выявляются *HeT-A* сферы, соответствует так называемому Piwi-less pocket («карман, лишенный Piwi»; Dufourt et al. 2014; Theron et al. 2018). В раннем оогенезе в определенном участке гермария (стадия 2a), контроль над транспозонами ослабляется, и они начинают перемещаться. На этой стадии экспрессия *piwi* сильно понижается.

Предполагается, что это может быть выгодно для подавления активности мобильных элементов на последующих стадиях оогенеза, так как способствует образованию коротких РНК из транскриптов мобильных элементов (Dufourt et al. 2014; Theron et al. 2018). Похожий паттерн экспрессии был показан для ретроэлемента *HeT-A*. Эндогенные копии *HeT-A*, так же как и трансген *HeT-A-LacZ*, сайленсированы в яичниках дикого типа системой piРНК. В мутантах *piwi/piwi* их экспрессия увеличена по всей овариоле. В гетерозиготах *piwi/+* сайленсинг частично восстанавливается, но экспрессия *HeT-A* или *HeT-A-LacZ* наблюдается только в гермариин в районе Piwiless pocket (Shpiz et al. 2011). Интересно, что элонгация теломер – жизненно-важный процесс – и активация транспозонов происходят на одной и той же стадии, что предполагает наличие связи между контролем длины теломер и регуляцией транспозонов с участием piРНК. Для некоторых ретроэлементов дрозофилы показаны транспозиции на более поздних стадиях оогенеза, в ядрах созревающего ооцита (Wang et al. 2018), по-видимому, время и механизмы транспозиции различны для разных групп ретротранспозонов. При созревании ооцитов человека в профазе I мейоза так же происходит активация транспозона *L1*, при этом перемещения *L1* являются главной причиной деградации до 80 % развивающихся ооцитов на этой стадии мейоза (Hunter et al. 2017). Таким образом, активация ретроэлементов в герминальных тканях на этапе оогенеза эволюционно консервативна.

Для ретротранспозонов типа LINE характерно образование РНП в виде гранул различной формы и состава в цитоплазме и ядрах клеток человека (Taylor et al. 2013; Taylor et al. 2018). *HeT-A* сферы напоминают вирусоподобные частицы LTR ретроэлементов *Drosophila*, таких как *copia* и *gypsy* (Shiba and Saigo 1983; Song et al. 1994). Формирование *HeT-A* сфер может иметь значение для концентрирования и защиты от деградации факторов, необходимых для доставки их к теломере и транспозиции на конец хромосомы.

На более поздних стадиях оогенеза в яичниках с нокдауном *spnE* многочисленные сферические *HeT-A* РНП детектируются в ядрах терминально дифференцированных питающих клеток, лишь небольшая часть из них ассоциирована с теломерами. Возможно, эти *HeT-A* РНП не участвуют в ретротранспозициях, а имеют сигнальную роль, передавая информацию о теломерной дисфункции. Теломерные факторы млекопитающих также могут локализоваться в хроматине вне теломер, регулируя транскрипцию различных генов (Ye et al. 2014).

Возможно, в ядрах питающих клеток также происходят транспозиции *HeT-A* на концы хромосом при ослаблении контроля над экспрессией ретроэлементов, включая теломерные. Ретротранспозиции в неделящихся клетках были описаны для *L1* человека. Такие транспозиции происходят в дифференцированных первичных соматических клетках человека и в клетках с остановкой клеточного цикла в G1/S, а также в терминально дифференцированных нейрональных клетках (Kubo et al. 2006; Maciá et al. 2017). Нейрональные транспозиции мобильных элементов привлекают внимание исследователей, как возможный механизм клеточной памяти, хотя данная гипотеза нуждается в подтверждении.

HeT-A РНП формирует структуры с различными характеристиками во время оогенеза при нарушении системы рiРНК. В цитоплазме питающих клеток формируются *HeT-A* РНП, представляющие собой агрегаты неправильной формы, а в ядре – сферические частицы. Таким образом, часть *HeT-A* РНП, формирующихся в питающих клетках, перемещается в ядро, другая часть транспортируется в ооцит (Рис. 18). Необходимо отметить, что структурно и функционально различные ядерные и цитоплазматические *L1* РНП были выявлены также в клетках человека (Taylor et al. 2018). Биогенез теломерных РНП в яичниках *Drosophila* схематически представлен на рисунке 18.

4.3 РНК теломерного ретроэлемента *TART* ассоциирована с *HeT-A* РНП

РНК другого теломерного ретротранспозона, *TART*, также была обнаружена в комплексе с *HeT-A* РНП. Известно, что теломерные элементы *TART* и *TAHRE*, в отличие от *HeT-A* ретротранспозона, кодируют обратные транскриптазы, которые, по-видимому, необходимы для ретротранспозиций *HeT-A*. Транзиентно экспрессированные белки *HeT-A* и *TART* Gag способны формировать теломер-ассоциированные структуры в культивируемых клетках, причем *TART* Gag транспортируется в теломеры только при коэкспрессии с *HeT-A* Gag (Rashkova et al. 2003). Колокализация *HeT-A* Gag и *TART* Pol наблюдается в ядрах нейробластов (Lopes-Panades et al. 2015). По нашим данным транскрипты *TART*, как и *HeT-A*, связываются с *HeT-A* Gag, что свидетельствует в пользу совместного транспорта *HeT-A* РНП и *TART* РНП в яичниках дрозофилы. Таким образом, *HeT-A* Gag может не только связываться с РНК *HeT-A in cis*, но и взаимодействовать *in trans* с *TART* РНК. Белок Orf1p ретротранспозона *L1* человека взаимодействует преимущественно *in cis* со своей матрицей, однако в некоторой степени функционирует *in trans*. Это способствует ретротранспозициям РНК, не относящихся к *L1*, например РНК клетки-хозяина или РНК *SINE* элемента *Alu* (Esnault et al. 2000; Dewannieux et al. 2003). Этот механизм лежит в основе образования псевдогенов.

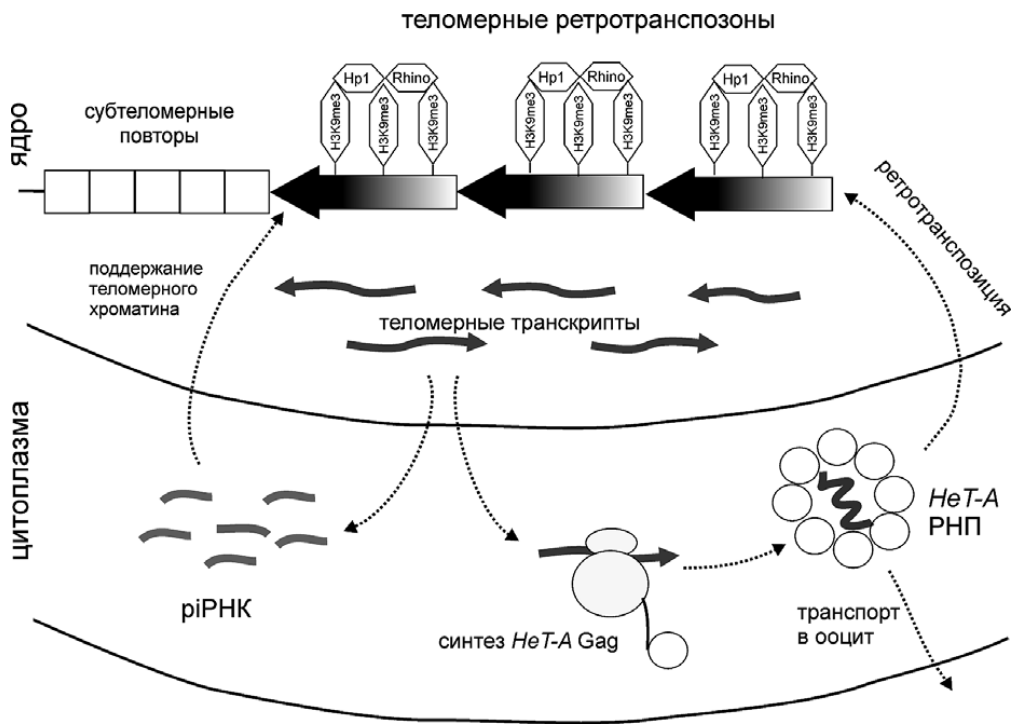


Рисунок 18. Биогенез теломерных РНК в герминальных тканях *Drosophila*. Часть транскриптов теломерных ретротранспозонов (затемненные толстые стрелки) процессирует на рiРНК, которые участвуют в поддержании теломерного хроматина. Другая часть транскриптов теломерного элемента *HeT-A* транслируется с образованием белка *HeT-A Gag*. Формирующиеся *HeT-A* РНП служат интермедиатами теломерных ретроинверсий. Баланс между этими двумя процессами обеспечивает поддержание оптимальной длины теломер у *Drosophila*.

4.4 Транспорт теломерных *HeT-A* РНП, направленный к минус-концам микротрубочек, осуществляется белком *Egalitarian* в яичниках и эмбрионах дрозофилы

При нарушении рiРНК пути *HeT-A Gag* и *HeT-A* РНК аккумулируются в ооците, начиная с ранних этапов оогенеза. Белок *Egl* является основным транспортным белком, который обеспечивает транспорт и локализацию материнских РНК на различных стадиях оогенеза дрозофилы (Sanghavi et al. 2016). В мутантах рiРНК пути в питающих клетках и ооците ранее были детектированы цитоплазматические агрегаты, в состав которых входят белки

динеин, Egl и BicD (Mach and Lehmann 1997; Navarro et al. 2009). Образование этих скоплений зависит от микротрубочек. Данные агрегаты динеина в цитоплазме питающих клеток и ооцита содержат также Orf1p *I*-элемента, а в ооците - также транскрипты *I*-элемента, *HeT-A* и *TART*. Было сделано предположение, что динеиновые агрегаты могут представлять собой увеличенные РНП частицы, которые в норме транспортируют РНК из питающих клеток в ооцит (Navarro et al. 2009).

Ко-ИП *HeT-A* Gag в комбинации с РНК FISH и иммуноокрашиванием показали, что транспортный комплекс Egl-динеин обеспечивает транспорт цитоплазматических *HeT-A* РНП в герминальных тканях. Мы показали, что эти цитоплазматические агрегаты содержат *HeT-A* Gag, *HeT-A* РНК и транспортный белок Egl, причем *HeT-A* РНП количественно являются основным компонентом гранул. Предположительно, *HeT-A* РНП могут катализировать агрегацию белков и РНК, взаимодействующих с ней. Взаимодействие комплекса Egl-BicD и *HeT-A* РНП может приводить к формированию Egl-содержащих агрегатов при гиперэкспрессии *HeT-A*, вызванной дисфункцией системы piРНК. Хотя Egl считается РНК-связывающим белком, обсуждается возможность того, что в Egl-зависимом транспорте РНК могут участвовать белки-посредники (Bullock et al. 2003). Была показана колокализация белков Egl и *HeT-A* Gag в цитоплазме питающих клеток и ооцита при нокадауне *spnE*, а также в ооците яичников мух природной линии Gaiano III. Эти результаты свидетельствуют о том, что Egl участвует в транспорте *HeT-A* РНП из питающих клеток в ооцит как в норме, так и при гиперэкспрессии *HeT-A*.

Ранее был также описан транспорт теломерных мРНК *TAHRE* и *HeT-A* в герминальную плазму ооцита на фоне их дерепрессии при мутации *p53*. Этот транспорт также происходит по микротрубочкам, но направлен к их плюс концу. В таргетировании теломерных РНК к плюс концам трубочек участвует моторный белок кинезин, а также белки Staufen и Tm1C, которые также транспортируют мРНК *oskar* в задний полюс ооцита (Tiwari et al.

2017). Таким образом, транспорт теломерных транскриптов может идти несколькими путями, к минус концам трубочек посредством Egl-BicD комплекса, а к плюс концам – путем связывания с кинезином.

4.5 *HeT-A* РНК накапливаются вокруг центросом в эмбрионах с нарушением piРНК пути и нарушают локализацию Egl

Мутации многих генов piРНК пути нарушают асимметричную локализацию РНК относительно осей ооцита и приводят к гибели эмбрионов дрозофилы (Cook et al. 2004; Chen et al. 2007; Klattenhoff et al. 2007; Pane et al. 2007). При нарушении системы piРНК сайленсинга активируются многие транспозоны, что, как предполагается, повышает количество двухцепочечных разрывов. Это приводит к индукции ответа на повреждение ДНК. Однако эмбриональная смертность не супрессируется мутациями компонентов пути ответа на повреждение ДНК, таких как киназы ATR и Chk2 (Klattenhoff et al. 2007). Это свидетельствует в пользу существования дополнительных путей остановки развития у эмбрионов с нарушениями piРНК пути. При мутациях piРНК пути происходит мощная индукция транскрипции теломерных элементов, в десятки раз превышающая ответ других ретротранспозонов на нарушение piРНК пути. Теломерные транскрипты накапливаются вокруг полюсов деления в ранних эмбрионах. При этом наблюдается явление митотической катастрофы, сопровождаемое появлением теломерных слияний и полиплоидных ядер (Morgunova et al. 2015). Подобные фенокопии наблюдаются при нарушении различных факторов, которые регулируют экспрессию *HeT-A*. Эти данные навели нас на предположение о том, что избыточные теломерные РНК участвуют в особом пути клеточного ответа на повреждение теломер, активирующемся при гиперэкспрессии теломерных повторов. Возможно, именно они участвуют в индукции нарушений оогенеза и эмбриогенеза, чтобы предотвратить анеуплоидию, появление опухолевых клеток и аномалии развития.

В эмбрионе *Drosophila* происходит перемещение мРНК по микротрубочкам. В раннем эмбрионе существует сеть микротрубочек в кортикальном слое эмбриона, по которым транспортируется мРНК *bcd*, образуя градиент (Spirov et al. 2009). На стадии синцитиальной бластодермы трубочки направляются таким образом, что их минус концы лежат апикально относительно ядер, а плюс концы направлены в базальную цитоплазму. По трубочкам происходит транспорт транскриптов, отвечающих за сегментную полярность *wingless*, *fushi tarazu*, *hairy*, *runt*, а также мРНК *bicoid* из базальной части в апикальную, опосредованный белками динеином, Egl и BicD (Bullock and Ish-Horowicz 2001; Wilkie and Davis 2001).

В данной работе было показано, что транскрипты *HeT-A* вместе с белком *HeT-A* Gag формируют скопления вокруг centrosом во время формирования бластодермы в синцитии эмбрионов дрозофилы. При этом было показано взаимодействие Egl и *HeT-A* Gag в ранних эмбрионах с нокдауном *spnE* и их колокализация около centrosом, не характерная для эмбрионов дикого типа. Таким образом, по-видимому, транспорт *HeT-A* РНП в эмбрионах, как и в яичниках, опосредован белком Egl. Накопление Egl у centrosом в эмбрионах с дерепрессией *HeT-A* может нарушать нормальную локализацию важнейших транспортируемых Egl мРНК (Рис. 19). В дальнейшем это может приводить к дефектам развития и гибели эмбриона. Возможно, избыточные теломерные РНП, которые образуются при дисфункции теломер, могут вызывать остановку развития таких эмбрионов, таким образом сохраняя целостность генома в ряду поколений.

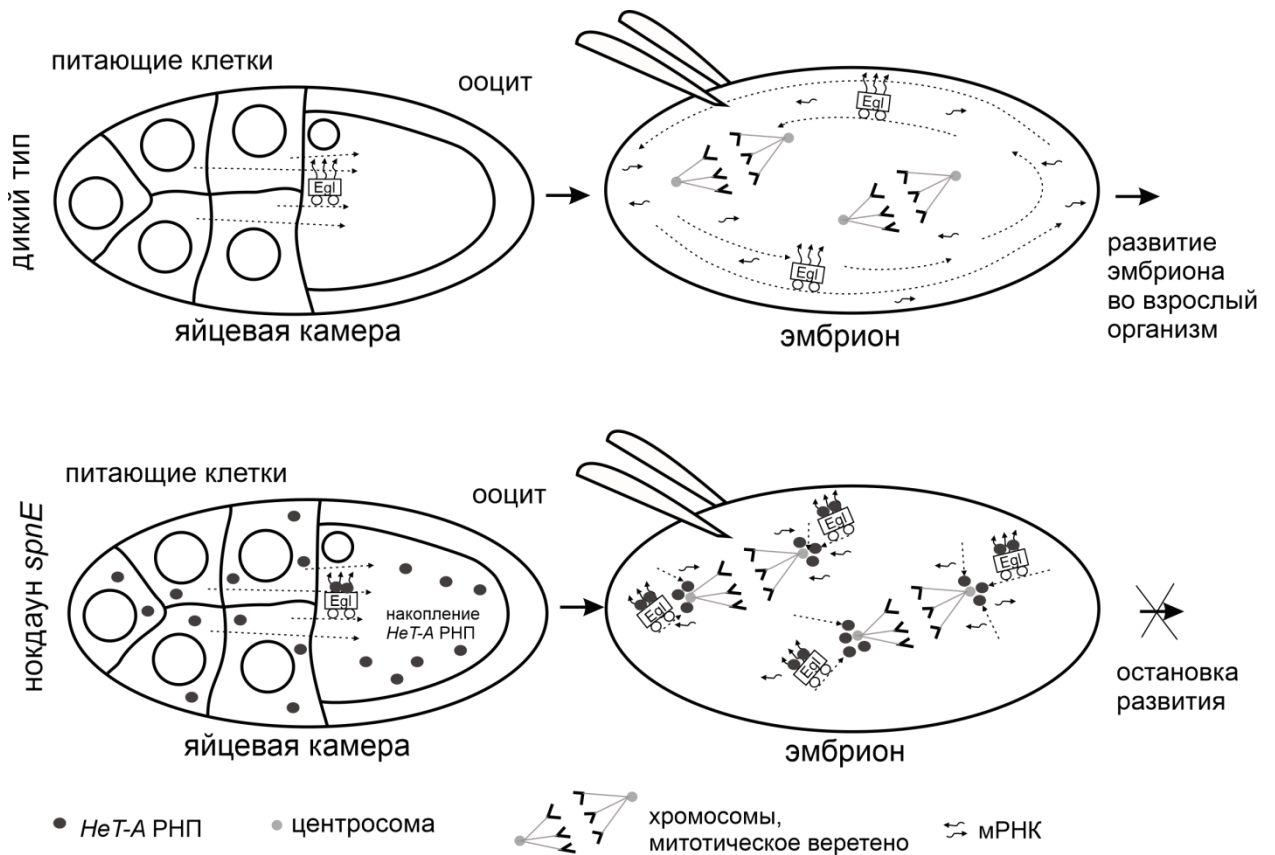


Рисунок 19. Механизм нарушения раннего развития при активации транскрипции теломерных повторов в процессе оогенеза *Drosophila*. В норме Egl участвует в транспорте и локализации мРНК, ответственных за паттернинг эмбриона (верхняя часть). Нокадаун *spnE*, нарушающий биогенез рiРНК, приводит к образованию множественных HeT-A РНП в яичниках *Drosophila*, которые взаимодействуют с белком-транспортером Egl. Удержание Egl в составе HeT-A РНП может привести к нарушению транспорта мРНК, определяющих паттернинг эмбриона, и к остановке раннего развития (нижняя часть)

4.6 HeT-A Gag скапливается у центросом при гиперэкспрессии в клетках и эмбрионах *Drosophila*

В данной работе была показана цитотоксичность гиперэкспрессии HeT-A в клеточной линии и на эмбриональной стадии в отсутствии каких-либо генетических нарушений. Этот результат был получен как на культуре клеток дрозофилы при трансфекции плазмиды, кодирующей HeT-A, так и *in vivo* в эмбрионах, несущих трансген, кодирующий HeT-A. По сравнению с контрольными клетками, экспрессия HeT-A приводила к статистически

значимому увеличению гибели клеток. Гиперэкспрессия *HeT-A* на эмбриональной стадии развития также приводила к снижению выживаемости эмбрионов по сравнению с контролем. Таким образом, гиперэкспрессия *HeT-A* Gag без нарушения рiРНК пути либо других мутаций сама по себе может приводить к гибели эмбрионов на ранних этапах развития.

Похожим образом гиперэкспрессия *L1* в опухолевых культурах клеток человека с активной теломеразой, а также в неопухолевых клетках является токсичной, замедляя рост клеток и приводя к повышенному уровню клеточной гибели (Belgnaoui et al. 2006; Wallace et al. 2008; Belancio et al. 2010; Aschacher et al. 2016). Более того, установлена корреляция между экспрессией *L1* и генов, кодирующих белки шелтерина и теломеразу (Aschacher et al. 2016), что указывает на связь между активностью ретротранспозонов и теломер, поддерживаемых теломеразой.

Также в данной работе мы показали, что центросомная локализация *HeT-A* РНП наблюдается не только на фоне мутаций, но и на фоне нормального генотипа при гиперэкспрессии трансгена *HeT-A* в культивируемых клетках дрозофилы линии S2 либо в клетках эмбрионов. Таким образом, центросомная локализация присуща избыточным частицам *HeT-A* РНП в клетках, не несущих мутаций, и обусловлена, по-видимому, их специфическими клеточными взаимодействиями. Можно предположить, что такая локализация имеет сигнальную роль, передавая сигнал о теломерной дисфункции митотическому аппарату клетки посредством теломерных РНП.

Известны белки, ассоциированные с теломерами млекопитающих, которые участвуют в регуляции митоза. Например, танкираза 1 млекопитающих обеспечивает поли-АДФ-рибозилирование центросомного белка NuMA, необходимое для сборки центросом в митозе (Chang et al. 2005; Chang et al. 2009; Palazzo et al. 2014). Компонент шелтерина TRF1 необходим для привлечения в центромеры киназы Aurora B, которая необходима для корректной сегрегации хромосом (Ohishi et al. 2014). Эти данные указывают

на существование связи между теломерами и митотическим аппаратом, однако функциональная роль этих взаимодействий пока неясна.

Центросомная локализация также показана для белков таких ретровирусов, как HIV-1 (Afonso et al. 2007; Zamborlini et al. 2007), HTLV-1 (Peloponese et al. 2005; Ching et al. 2006), foamy virus (Yu et al. 2006; Lehmann-Che et al. 2007), вируса гепатита HBV (Fujii et al. 2006). Локализация вирусных частиц HIV-1, foamy virus при этом зависит от микротрубочек и комплекса динеин-динактин-BicD2, который взаимодействует напрямую с капсидом HIV-1 (McDonald et al. 2002, Petit et al. 2003; Carnes et al. 2018). Возле центросом происходит сборка вирусных капсидов (Levesque et al. 2006; Lehmann-Che et al. 2007). Белки вирусов способны взаимодействовать с белками клетки хозяина, в частности с белками центросом (Ching et al. 2006; Fujii et al. 2006; Zhang et al. 2012; Sakai et al. 2011). Это может приводить к нарушению механизмов регуляции количества центросом, часто приводя к их амплификации (Chang et al. 2004; Hossain et al. 2018; Yun et al. 2004). В дальнейшем это приводит к нарушению митотического деления клеток, анеуплоидии и канцерогенезу. Механизмы действия вирусных белков на митотический аппарат клетки различаются у различных вирусов и до конца не изучены. Наши данные показывают, что белки теломерных ретроэлементов также способны взаимодействовать с белками клетки-хозяина и влиять на клеточные процессы. Исследование белков-партнеров теломерных РНК позволит выявить механизмы клеточного ответа на повреждение теломер, которые лежат в основе поддержания целостности генома многоклеточных организмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование роли теломерного комплекса в процессе оогенеза и в раннем развитии важно для понимания механизмов, обеспечивающих контроль целостности генетической информации. Важным компонентом теломерного комплекса являются теломерные транскрипты, однако мало известно о белках-партнерах теломерной РНК.

Транскрипция теломерных повторов является консервативным свойством теломер у всех изученных видов, однако функции и биогенез теломерных РНК до конца не выяснены. Количество теломерных РНК в норме строго регулируется, так же как и их внутриклеточная локализация. У большинства исследованных видов поддерживается низкий уровень теломерной РНК, а значительная ее фракция удерживается вблизи теломер, формируя внешний каркас. Увеличение уровня транскрипции теломерных повторов приводит к нарушению стабильности теломер.

Используя *Drosophila*, как модельный объект, мы исследовали роль теломерных РНК в проявлении фенотипов, связанных с гиперэкспрессией теломерных ретроэлементов, что отражает нарушение гомеостаза теломерного комплекса. Показано, что транскрипты основного теломерного ретротранспозона дрозофилы - *HeT-A* - взаимодействуют с кодируемым ими РНК-связывающим белком *HeT-A* Gag в яичниках и в эмбрионах, образуя РНП, при нарушении рiРНК пути. Более того, на ранних этапах оогенеза *HeT-A* РНП образуют вблизи теломер сферические структуры, которые предположительно являются интермедиатами транспозиций и участвуют в удлинении теломер. Однако не на всех этапах развития данные частицы находятся вблизи теломер, что указывает на существование нетеломерной функции этого комплекса. *HeT-A* РНП выявлены в цитоплазме питающих клеток и в ооците. Показано, что в норме и при нарушении рiРНК пути белок *HeT-A* Gag взаимодействует с основным белком-перевозчиком материнских РНК, Egl, который осуществляет также транспорт *HeT-A* РНП в ооцит с

помощью динеинового мотора. Материнские РНП, образованные из продуктов теломерного ретротранспозона *HeT-A* при его гиперэкспрессии, локализуются вблизи centrosом, центров организации микротрубочек, во время первых часов развития. Более того, теломерные РНП продолжают удерживать белок Egl, что может быть одной из причин нарушения развития эмбриона. Centrosомная локализация *HeT-A* РНП наблюдается не только у мутантов, но и в диком типе при активации транскрипции *HeT-A*, что сопровождается цитотоксическим действием. Мы предполагаем, что РНП теломерного ретротранспозона *HeT-A* участвуют в клеточном ответе на повреждение теломер, приводя к остановке развития и тем самым предотвращая развитие генетической патологии.

Выводы

- 1) Подтверждена адекватность использования трансгенной модели для исследования экспрессии теломерного ретротранспозона *HeT-A Drosophila*. Характер экспрессии маркированной эпитопами трансгенной копии *HeT-A* сходен с таковым для эндогенных теломерных повторов *HeT-A*.
- 2) Показано, что белок *HeT-A Gag* взаимодействует с *HeT-A* РНК в процессе оогенеза и раннего развития, формируя рибонуклеопротеиновый комплекс, РНП. *HeT-A* РНП являются многокомпонентными и включают также РНК теломерного ретротранспозона *TART*.
- 3) *HeT-A* РНП в норме присутствуют в низких количествах в яичниках и ранних эмбрионах *Drosophila*, но в условиях дисфункции теломер *HeT-A* РНП накапливаются и демонстрируют динамичную локализацию. В ядрах герминальных клеток и их предшественников обнаружены сферические *HeT-A* РНП. В цитоплазме питающих клеток яичников *Drosophila* *HeT-A* РНП формируют крупные гранулы, а в ранних эмбрионах материнские *HeT-A* РНП накапливаются вокруг центросом.
- 4) *HeT-A* РНП взаимодействуют и колокализуются в яичниках и ранних эмбрионах *Drosophila* с белком-переносчиком Egalitarian, который обеспечивает транспорт мРНК, необходимых для раннего развития. При накоплении *HeT-A* РНП вследствие дисфункции теломер белок Egalitarian выявляется в составе гранул *HeT-A* РНП, что сопровождается нарушением его нормальной локализации и может быть причиной остановки развития.
- 5) Индуцированная гиперэкспрессия *HeT-A* в культивируемых клетках и эмбрионах *Drosophila* цитотоксична и приводит к их усиленной гибели. При этом *HeT-A* РНП демонстрируют центросомную локализацию.

Список литературы

1. Abad JP, De Pablos B, Osoegawa K, De Jong PJ, Martin-Gallardo A, Villasante A. TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. // *Mol Biol Evol.* - 2004. - Vol. 21. - № 9. - P. 1620-1624.
2. Afonso PV, Zamborlini A, Saib A, Mahieux R. Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons. // *Retrovirology.* - 2007. - Vol. 4. - № 27.
3. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. // *Science.* - 2007. - Vol. 318. - № 5851. - P. 761-764.
4. Arkhipova IR, Morrison HG. Three retrotransposon families in the genome of *Giardia lamblia*: two telomeric, one dead. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2001. - Vol. 98. - № 25. - P. 14497-14502.
5. Arkhipova IR, Yushenova IA, Rodriguez F. Giant Reverse Transcriptase-Encoding Transposable Elements at Telomeres. // *Mol Biol Evol.* - 2017. - Vol. 34. - № 9. P. 2245-2257.
6. Arnoult N, Van Beneden A, Decottignies A. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1alpha. // *Nat Struct Mol Biol.* - 2012. - Vol. 19. - № 9. - P. 948-956.
7. Arora R, Azzalin CM. Telomere elongation chooses TERRA ALTERNatives. // *RNA Biol.* - 2015. - Vol. 12. - № 9. - P. 938-941.
8. Aschacher T, Wolf B, Enzmann F, Kienzl P, Messner B, Sampl S, Svoboda M, Mechtcheriakova D, Holzmann K, Bergmann M. LINE-1 induces hTERT and ensures telomere maintenance in tumour cell lines. // *Oncogene.* - 2016. - Vol. 35. - № 1. - P. 94-104.
9. Azzalin CM, Lingner J. Telomere functions grounding on TERRA firma. // *Trends Cell Biol.* - 2015. - Vol. №25. - № 1. - P. 29-36.

10. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantuli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. // *Science*. - 2007. - Vol. 318. - № 5851. P. 798-801.
11. Balk B, Maicher A, Dees M, Klermund J, Luke-Glaser S, Bender K, Luke B. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. // *Nat Struct Mol Biol*. - 2013. - Vol. 20. - № 10. - P. 1199-1205.
12. Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ. Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. // *J Cell Sci*. - 2000. - Vol. 113. - P. 1033-1042.
13. Beaucher M, Zheng XF, Amariei F, Rong YS. Multiple pathways suppress telomere addition to DNA breaks in the *Drosophila* germline. // *Genetics*. - 2012. - Vol. 191. - № 2. - P. 407-417.
14. Becalska AN, Gavis ER. Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. // *Development*. - 2009. - Vol. 136. - № 15. - P. 2493-2503.
15. Beishline K, Vladimirova O, Tutton S, Wang Z, Deng Z, Lieberman PM. CTCF driven TERRA transcription facilitates completion of telomere DNA replication. // *Nat Commun*. - 2017. - Vol. 8. - № 1. - P. 2114.
16. Belancio VP, Roy-Engel AM, Pochampally RR, Deininger P. Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues. // *Nucleic Acids Res*. - 2010. - Vol. 38. - № 12. - P. 3909-3922.
17. Belgnaoui SM, Gosden RG, Semmes OJ, Haoudi A. Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. // *Cancer Cell Int*. - 2006. - Vol. 6. - P. 13.
18. Biessmann H, Valgeirsdottir K, Lofsky A, Chin C, Ginther B, Levis RW, Pardue ML. HeT-A, a transposable element specifically involved in "healing" broken chromosome ends in *Drosophila melanogaster*. // *Mol Cell Biol*. - 1992. - Vol. 12. - № 9. - P. 3910-3918.

19. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. // *J Mol Biol.* - 1978. - Vol. 120. - № 1. - P. 33-53.
20. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. // *Nat Chem Biol.* - 2007. - Vol. 3. - № 10. - P. 640-649.
21. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. // *Science.* - 1998. - Vol. 279. - № 5349. - P. 349-352.
22. Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. // *Cell.* - 2007. - Vol. 128. - № 6. - P. 1089-1103.
23. Brennecke J, Malone CD, Aravin AA, Sachidanandam R, Stark A, Hannon GJ. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. // *Science.* - 2008. - Vol. 322. - № 5906. - P. 1387-1392.
24. Brieno-Enriquez MA, Moak SL, Abud-Flores A, Cohen PE. Characterization of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) localization and protein interactions in primordial germ cells of the mousedagger. // *Biol Reprod.* - 2019. - Vol. 100. - № 4. - P. 950-962.
25. Bullock SL, Ish-Horowicz D. Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. // *Nature.* - 2001. - Vol. 414. - № 6864. - P. 611-616.
26. Bullock SL, Nicol A, Gross SP, Zicha D. Guidance of bidirectional motor complexes by mRNA cargoes through control of dynein number and activity. // *Curr Biol.* - 2006. - Vol. 16. - № 14. - P. 1447-1452.
27. Bullock, SL, Zicha D, Ish-Horowicz D. The *Drosophila* hairy RNA localization signal modulates the kinetics of cytoplasmic mRNA transport. // *EMBO J.* - 2003. - Vol. 22. - № 10. - P. 2484-2494.

28. Callahan KE, Hickman AB, Jones CE, Ghirlando R, Furano AV. Polymerization and nucleic acid-binding properties of human L1 ORF1 protein. // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - Vol. 40. - № 2. - P. 813-827.
29. Cao F, Li X, Hiew S, Brady H, Liu Y, Dou Y. Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin. // *RNA.* - 2009. - Vol. 15. - № 7. - P. 1274-1281.
30. Carnes SK, Zhou J, Aiken C. HIV-1 Engages a Dynein-Dynactin-BICD2 Complex for Infection and Transport to the Nucleus. // *J Virol.* - 2018. - Vol. 92. - № 20. e00358-18.
31. Casacuberta E, Pardue ML. HeT-A and TART, two *Drosophila* retrotransposons with a bona fide role in chromosome structure for more than 60 million years. // *Cytogenet Genome Res.* - 2005. - Vol. 110. - № 1-4. - P. 152-159.
32. Casacuberta E. *Drosophila*: Retrotransposons Making up Telomeres. // *Viruses.* - 2017. - Vol. №9. - № 7. E192.
33. Caslini C, Connelly JA, Serna A, Broccoli D, Hess JL. MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. // *Mol Cell Biol.* - 2009. - Vol. 29. - № 16. - P. 4519-4526.
34. Chang F, Re F, Sebastian S, Sazer S, Luban J. HIV-1 Vpr induces defects in mitosis, cytokinesis, nuclear structure, and centrosomes. // *Mol Biol Cell.* - 2004. - Vol. 15. - № 4. - P 1793-1801.
35. Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ. Interaction between Poly(ADP-ribose) and NuMA contributes to mitotic spindle pole assembly. // *Mol Biol Cell.* - 2009. - Vol. 20. - № 21. - P. 4575-4585.
36. Chang W, Dynek JN, Smith S. NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribosylation) by tankyrase 1 in mitosis. // *Biochem J.* - 2005. - Vol. 391. - № 2. - P. 177-184.
37. Chen Y, Pane A, Schupbach T. Cutoff and aubergine mutations result in retrotransposon upregulation and checkpoint activation in *Drosophila*. // *Curr Biol.* - 2007. - Vol. 17. - № 7. -P. 637-642.

38. Ching YP, Chan SF, Jeang KT, Jin DY. The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. // *Nat Cell Biol.* - 2006. - Vol. 8. - № 7. - P. 717-724.
39. Chu HP, Cifuentes-Rojas C, Kesner B, Aeby E, Lee HG, Wei C, Oh HJ, Boukhali M, Haas W, Lee JT. TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres. // *Cell.* - 2017. - Vol. 170. - № 1. - P. 86-101.
40. Cook HA, Koppetsch BS, Wu J, Theurkauf WE. The *Drosophila* SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification. // *Cell.* - 2004. - Vol. 116. - № 6. - P. 817-829.
41. Cusanelli E, Romero CA, Chartrand P. Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. // *Mol Cell.* - 2013. - Vol. 51. - № 6. - P. 780-791.
42. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. // *Nature.* - 2003. - Vol. 426. - № 6963. - P. 194-198.
43. Dai L, LaCava J, Taylor MS, Boeke JD. Expression and detection of LINE-1 ORF-encoded proteins. // *Mob Genet Elements.* - 2014. - Vol. №4. e29319.
44. Danilevskaya ON, Arkhipova IR, Traverse KL, Pardue ML. Promoting in tandem: the promoter for telomere transposon HeT-A and implications for the evolution of retroviral LTRs. // *Cell.* - 1997. - Vol. 88. - № 5. - P. 647-655.
45. Danilevskaya ON, Traverse KL, Hogan NC, DeBaryshe PG, Pardue ML. The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription. // *Mol Cell Biol.* - 1999. - Vol. 19. - № 1. - P. 873-881.
46. Dawson A, Hartswood E, Paterson T, Finnegan DJ. A LINE-like transposable element in *Drosophila*, the I factor, encodes a protein with properties similar to those of retroviral nucleocapsids. // *EMBO J.* - 1997. - Vol. 16. - № 14. - P. 4448-4455.

47. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. // *Nature*. - 2007. - Vol. 448. - № 7157. - P. 1068-1071.
48. Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. // *Mol Cell*. - 2009. - Vol. 35. - № 4. - P. 403-413.
49. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. // *Nat Genet*. - 2003. - Vol. 35. - № 1. - P. 41-48.
50. Dienstbier M, Boehl F, Li X, Bullock SL. Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. // *Genes Dev*. - 2009. - Vol. 23. - № 13. - P. 1546-1558.
51. Doksani Y, de Lange T. The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. - 2014. - Vol. 6. - № 12. a016576.
52. Dufourt J, Dennis C, Boivin A, Gueguen N, Theron E, Goriaux C, Pouchin P, Ronsseray S, Brassat E, Vaury C. Spatio-temporal requirements for transposable element piRNA-mediated silencing during *Drosophila* oogenesis. // *Nucleic Acids Res*. - 2014. - Vol. 42. - № 4. - P. 2512-2524.
53. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. // *Nat Genet*. - 2000. - Vol. 24. - № 4. - P. 363-367.
54. Feretzaki M, Renck Nunes P, Lingner J. Expression and differential regulation of human TERRA at several chromosome ends. // *RNA*. - 2019. rna.072322.119.
55. Flynn RL, Centore RC, O'Sullivan RJ, Rai R, Tse A, Songyang Z, Chang S, Karlseder J, Zou L. TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. // *Nature*. - 2011. - Vol. 471. - № 7339. - P. 532-536.
56. Frydrychova RC, Mason JM, Archer TK. HP1 is distributed within distinct chromatin domains at *Drosophila* telomeres. // *Genetics*. - 2008. - Vol. 180. - № 1. - P. 121-131.

57. Fujii R, Zhu C, Wen Y, Marusawa H, Bailly-Maitre B, Matsuzawa S, Zhang H, Kim Y, Bennett CF, Jiang W, Reed JC. HBXIP, cellular target of hepatitis B virus oncoprotein, is a regulator of centrosome dynamics and cytokinesis. // *Cancer Res.* - 2006. - Vol. 66. - № 18. - P. 9099-9107.
58. Fujiwara H, Osanai M, Matsumoto T, Kojima KK. Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*. // *Chromosome Res.* - 2005. - Vol. 13. - № 5. - P. 455-467.
59. Fuller AM, Cook EG, Kelley KJ, Pardue ML. Gag proteins of *Drosophila* telomeric retrotransposons: collaborative targeting to chromosome ends. // *Genetics.* - 2010. - Vol. 184. - № 3. - P. 629-636.
60. Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, Bucci G, Dobрева M, Matti V, Beausejour CM, Herbig U, Longhese MP, d'Adda di Fagagna F. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. // *Nat Cell Biol.* - 2012. - Vol. 14. - № 4. - P. 355-365.
61. Garavis M, Gonzalez C, Villasante A. On the origin of the eukaryotic chromosome: the role of noncanonical DNA structures in telomere evolution. // *Genome Biol Evol.* - 2013. - Vol. 5. - № 6. P. 1142-1150.
62. George JA, DeBaryshe PG, Traverse KL, Celniker SE, Pardue ML. Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements. // *Genome Res.* - 2006. - Vol. 16. - № 10. - P. 1231-1240.
63. Gilson E, Segal-Bendirdjian E. The telomere story or the triumph of an open-minded research. // *Biochimie.* - 2010. - Vol. 92. - № 4. - P. 321-326.
64. Gladyshev EA, Arkhipova IR. Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2007. - Vol. 104. - № 22. - P. 9352-9357.
65. Graf M, Bonetti D, Lockhart A, Serhal K, Kellner V, Maicher A, Jolivet P, Teixeira MT, Luke B. Telomere length determines TERRA and R-loop regulation through the cell cycle. // *Cell.* - 2017. - Vol. 170. - № 1. - P. 72-85.

66. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. // *Cell*. - 1985. - Vol. 43. - № 2. - P. 405-413.
67. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. // *Cell*. - 1999. - Vol. 97. - № 4. - P. 503-514.
68. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. // *Exp Cell Res*. - 1961. - Vol. 25. - P. 585-621.
69. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. // *Exp Cell Res*. - 1961. - Vol. 25. - P. 585-621.
70. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). // *Mol Cell*. - 2004. - Vol. 14. - № 4. - P. 501-513.
71. Herrera E, Samper E, Martin-Caballero J, Flores JM, Lee HW, Blasco MA. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. // *EMBO J*. - 1999. - Vol. 18. - № 11. - P. 2950-2960.
72. Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, Anderson R, Taschuk M, Mann J, Passos JF. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. // *Nat Commun*. - 2012. - Vol. 3. - P. 708.
73. Higashiyama T, Noutoshi Y, Fujie M, Yamada T. Zepp, a LINE-like retrotransposon accumulated in the Chlorella telomeric region. // *EMBO J*. - 1997. - Vol. 16. - № 12. - P. 3715-3723.
74. Horne-Badovinac S, Bilder D. Dynein regulates epithelial polarity and the apical localization of stardust A mRNA. // *PLoS Genet*. - 2008. - Vol. 4. - № 1. e8.
75. Hossain D, Ferreira Barbosa JA, Cohen ÉA, Tsang WY. HIV-1 Vpr hijacks EDD-DYRK2-DDB1DCAF1 to disrupt centrosome homeostasis. // *J Biol Chem*. - 2018. - Vol. 293. - № 24. - P. 9448-9460.

76. Hughes JR, Bullock SL, Ish-Horowicz D. Inscuteable mRNA localization is dynein-dependent and regulates apicobasal polarity and spindle length in *Drosophila* neuroblasts. // *Curr Biol.* - 2004. - Vol. 14. - № 21. - P. 1950-1956.
77. Hunter N. Oocyte Quality Control: Causes, Mechanisms, and Consequences. // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* - 2017. - Vol. 82. - P. 235-247.
78. Huynh JR, St Johnston D. The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. // *Curr Biol.* - 2004. - Vol. 14. - № 11. - P. 438-449.
79. Huynh JR, St Johnston D. The role of BicD, Egl, Orb and the microtubules in the restriction of meiosis to the *Drosophila* oocyte. // *Development.* - 2000. - Vol. 127. - № 13. - P. 2785-2794.
80. Johnstone O, Lasko P. Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. // *Annu Rev Genet.* - 2001. - Vol. 35. - P. 365-406.
81. Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R, Hewitt G, Pender SL, Fullard N, Nelson G, Mann J, van de Sluis B, Mann DA, von Zglinicki T. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. // *Nat Commun.* - 2014. - Vol. 2. - P. 4172.
82. Kahn T, Savitsky M, Georgiev P. Attachment of HeT-A sequences to chromosomal termini in *Drosophila melanogaster* may occur by different mechanisms. // *Mol Cell Biol.* - 2000. - Vol. 20. - № 20. - P. 7634-7642.
83. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. // *Science.* - 1999. - Vol. 283. - № 5406. - P. 1321-1325.
84. Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao B, Weitzen S, Agarwal S, Blasco MA. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women - toward a telomere theory of reproductive aging in women. // *Am J Obstet Gynecol.* - 2005. - Vol. 192. - № 4. - P. 1256-1260.

85. Khazina E, Truffault V, Buttner R, Schmidt S, Coles M, Weichenrieder O. Trimeric structure and flexibility of the L1ORF1 protein in human L1 retrotransposition. // *Nat Struct Mol Biol.* - 2011. - Vol. 18. - № 9. - P. 1006-1014.
86. Khazina E, Weichenrieder O. Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - Vol. 106. - № 3. - P. 731-736.
87. Klattenhoff C, Bratu DP, McGinnis-Schultz N, Koppetsch BS, Cook HA, Theurkauf WE. *Drosophila* rasiRNA pathway mutations disrupt embryonic axis specification through activation of an ATR/Chk2 DNA damage response. // *Dev Cell.* - 2007. - Vol. 12. - № 1. - P. 45-55.
88. Kroutter EN, Belancio VP, Wagstaff BJ, Roy-Engel AM. The RNA polymerase dictates ORF1 requirement and timing of LINE and SINE retrotransposition. // *PLoS Genet.* - 2009. - Vol. 5. - № 4. e1000458.
89. Kubo S, Seleme MC, Soifer HS, Perez JL, Moran JV, Kazazian HH, Kasahara N. L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2006. - Vol. 103. - № 21. - P. 8036-8041.
90. Kubo Y, Okazaki S, Anzai T, Fujiwara H. Structural and phylogenetic analysis of TRAS, telomeric repeat-specific non-LTR retrotransposon families in Lepidopteran insects. // *Mol Biol Evol.* - 2001. - Vol. 18. - № 5. - P. 848-857.
91. Kulpa DA, Moran JV. Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. // *Nat Struct Mol Biol.* -2006. - Vol. 13. - № 7. - P. 655-660.
92. Lasko P. mRNA localization and translational control in *Drosophila* oogenesis. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* - 2012. - Vol. 4, - № 10. a012294.

93. Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. // *Nature*. - 1998. - Vol. 392. - № 6676. - P. 569-574.
94. Lehmann-Che J, Renault N, Giron ML, Roingeard P, Clave E, Tobaly-Tapiero J, Bittoun P, Toubert A, de The H, Saib A. Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells. // *PLoS Pathog*. - 2007. - Vol. 3. - № 5. e74.
95. Lévesque K, Halvorsen M, Abrahamyan L, Chatel-Chaix L, Poupon V, Gordon H, DesGroseillers L, Gatignol A, Mouland AJ. Trafficking of HIV-1 RNA is mediated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 expression and impacts on viral assembly. // *Traffic*. - 2006. - Vol. 7. - № 9. - P. 1177-93.
96. Liu L, Bailey SM, Okuka M, Munoz P, Li C, Zhou L, Wu C, Czerwiec E, Sandler L, Seyfang A, Blasco MA, Keefe DL. Telomere lengthening early in development. // *Nat Cell Biol*. - 2007. - Vol. 9. - № 12. - P. 1436-1441.
97. Liu L, Blasco M, Trimarchi J, Keefe D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. // *Dev Biol*. - 2002. - Vol. 249. - № 1. - P. 74-84.
98. Liu L, Blasco MA, Keefe DL. Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. // *EMBO Rep*. - 2002. - Vol. 3. - № 3. - P. 230-234.
99. Liu L, Franco S, Spyropoulos B, Moens PB, Blasco MA, Keefe DL. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2004. - Vol. 101. - № 17. - P. 6496-6501.
100. Lopez de Silanes I, Grana O, De Bonis ML, Dominguez O, Pisano DG, Blasco MA. Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes. // *Nat Commun*. - 2014. - Vol. 5. - P. 4723.

101. Lopez-Panades E, Casacuberta E. NAP-1, Nucleosome assembly protein 1, a histone chaperone involved in *Drosophila* telomeres. // *Insect Biochem Mol Biol.* - Vol. 70. - P. 111-115.
102. Lopez-Panades E, Gavis ER, Casacuberta E. Specific Localization of the *Drosophila* Telomere Transposon Proteins and RNAs, Give Insight in Their Behavior, Control and Telomere Biology in This Organism. // *PLoS One.* - 2015. - Vol. 10. - № 6. e0128573.
103. Losada A, Abad JP, Villasante A. Organization of DNA sequences near the centromere of the *Drosophila melanogaster* Y chromosome. // *Chromosoma.* - 1997. - Vol. 106. - № 8. - P. 503-512.
104. Losada A, Agudo M, Abad JP, Villasante A. HeT-A telomere-specific retrotransposons in the centric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* chromosome 3. // *Mol Gen Genet.* - 1999. - Vol. 262. - № 4-5. - P. 618-622.
105. Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol Cell.* - 2008. - Vol. 32. - № 4. - P. 465-477.
106. Lundblad V, Szostak JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. // *Cell.* - 1989. - Vol. 57. - № 4. - P. 633-643.
107. Mach JM, Lehmann R. An Egalitarian-BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in *Drosophila*. // *Genes Dev.* - 1997. - Vol. 11. - № 4. - P. 423-435.
108. Macia A, Widmann TJ, Heras SR, Ayllon V, Sanchez L, Benkaddour-Boumzaouad M, Munoz-Lopez M, Rubio A, Amador-Cubero S, Blanco-Jimenez E, Garcia-Castro J, Menendez P, Ng P, Muotri AR, Goodier JL, Garcia-Perez JL. (2017). Engineered LINE-1 retrotransposition in nondividing human neurons. // *Genome Res.* - Vol. 27. - № 3. - P. 335-348.
109. Malone CD, Brennecke J, Dus M, Stark A, McCombie WR, Sachidanandam R, Hannon GJ. Specialized piRNA pathways act in germline

- and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. // *Cell*. - 2009. - Vol. 137. - № 3. - P. 522-535.
110. Mandrioli M. Cytogenetic characterization of telomeres in the holocentric chromosomes of the lepidopteran *Mamestra brassicae*. // *Chromosome Res.* - 2002. - Vol. 10. - № 4. - P. 279-286.
111. Marcand S, Brevet V, Mann C, Gilson E. Cell cycle restriction of telomere elongation. // *Curr Biol.* - 2000. - Vol. 10. - № 8. - P. 487-490.
112. Marión RM, Montero JJ, López de Silanes I, Graña-Castro O, Martínez P, Schoeftner S, Palacios-Fábrega JA, Blasco MA. TERRA regulate the transcriptional landscape of pluripotent cells through TRF1-dependent recruitment of PRC2. // *Elife.* - 2019. - Vol. 8. e44656.
113. Martin SL, Branciforte D, Keller D, Bain DL. Trimeric structure for an essential protein in L1 retrotransposition. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2003. - Vol. 100. - № 24. - P. 13815-13820.
114. Maxwell PH, Belote JM, Levis RW. Identification of multiple transcription initiation, polyadenylation, and splice sites in the *Drosophila melanogaster* TART family of telomeric retrotransposons. // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - Vol. 34. - № 19. - P. 5498-5507.
115. McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. // *J Cell Biol.* - 2002. - Vol. 159. - № 3. - P. 441-452.
116. Megraw TL, Kaufman TC. The centrosome in *Drosophila* oocyte development. // *Curr Top Dev Biol.* - 2000. - Vol. 49. - P. 385-407.
117. Miller KM, Cooper JP. The telomere protein Taz1 is required to prevent and repair genomic DNA breaks. // *Mol Cell.* - 2003. - Vol. 11. - № 2. - P. 303-313.
118. Mita P, Wudzinska A, Sun X, Andrade J, Nayak S, Kahler DJ, Badri S, LaCava J, Ueberheide B, Yun CY, Fenyo D, Boeke JD. LINE-1 protein localization and functional dynamics during the cell cycle. // *Elife.* - 2018. - Vol. 7. e30058

119. Montero JJ, Lopez de Silanes I, Grana O, Blasco MA. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. // *Nat Commun.* - 2016. - Vol. 7. - P. 12534.
120. Montero JJ, Lopez-Silanes I, Megias D, Castells-Garcia A, Blasco MA. TERRA recruitment of polycomb to telomeres is essential for histone trimethylation marks at telomeric heterochromatin. // *Nat Commun.* - 2018. - Vol. 9. - № 1. - P. 1548.
121. Monti V, Serafini C, Manicardi GC, Mandrioli M. Characterization of non-LTR retrotransposable TRAS elements in the aphids *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae* (Aphididae, Hemiptera). // *J Hered.* - 2013. - Vol. 104. - № 4. - P. 547-553.
122. Moravec M, Wischnewski H, Bah A, Hu Y, Liu N, Lafranchi L, King MC, Azzalin CM. (2016). TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. // *EMBO Rep.* - Vol. 17. - № 7. - P. 999-1012.
123. Morgunova V. Akulenko N, Radion E, Olovnikov I, Abramov Y, Olenina LV, Shpiz S, Kopytova DV, Georgieva SG, Kalmykova A. Telomeric repeat silencing in germ cells is essential for early development in *Drosophila*. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. - Vol. 43. - № 18. - P. 8762-8773.
124. Morrish TA, Garcia-Perez JL, Stamato TD, Taccioli GE, Sekiguchi J, Moran JV. Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. // *Nature.* - 2007. - Vol. 446. - № 7132. - P. 208-212.
125. Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE, Batzer MA, Moran JV. DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. // *Nat Genet.* - 2002. - Vol. 31. - № 2. - P. 159-165.
126. Mueller C, Aschacher T, Wolf B, Bergmann M. A role of LINE-1 in telomere regulation. // *Front Biosci.* - 2018. - Vol. 23. - P. 1310-1319.
127. Muller HJ. The remaking of chromosomes. // *Collecting Net.* - 1938. - Vol. 13. - P. 181-195.

128. Musacchio A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. // *Curr Biol.* - 2015. - Vol. 25. - № 20. - P. 1002-1018.
129. Musaro M, Ciapponi L, Fasulo B, Gatti M, Cenci G. Unprotected *Drosophila melanogaster* telomeres activate the spindle assembly checkpoint. // *Nat Genet.* - 2008. - Vol. 40. - № 3. - P. 362-366.
130. Nakano A, Masuda K, Hiromoto T, Takahashi K, Matsumoto Y, Habib AG, Darwish AG, Yukawa M, Tsuchiya E, Ueno M. Rad51-dependent aberrant chromosome structures at telomeres and ribosomal DNA activate the spindle assembly checkpoint. // *Mol Cell Biol.* - 2014. - Vol. 34. - № 8. - P. 1389-1397.
131. Nashchekin D, St Johnston D. Egalitarian recruitment of localized mRNAs. // *Genes Dev.* - 2009. - Vol. 23. - № 13. - P. 1475-1480.
132. Naufer MN, Furano AV, Williams MC. Protein-nucleic acid interactions of LINE-1 ORF1p. // *Semin Cell Dev Biol.* - 2018. - Vol. 86. - P. 140-149.
133. Navarro C, Bullock S, Lehmann R. Altered dynein-dependent transport in piRNA pathway mutants. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - Vol. 106. - № 24. - P. 9691-9696.
134. Navarro C, Puthalakath H, Adams JM, Strasser A, Lehmann R. Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate. // *Nat Cell Biol.* - 2004. - Vol. 6. - № 5. - P. 427-435.
135. Nergadze SG, Farnung BO, Wischniewski H, Khoriantseva L, Vitelli V, Chawla R, Giulotto E, Azzalin CM. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. // *RNA.* - 2009. - Vol. 15. - № 12. - P. 2186-2194.
136. Ohishi T, Muramatsu Y, Yoshida H, Seimiya H. TRF1 ensures the centromeric function of Aurora-B and proper chromosome segregation. // *Mol Cell Biol.* - 2014. - Vol. 34. - № 13. - P. 2464-2478.

137. Oikemus SR, Queiroz-Machado J, Lai K, McGinnis N, Sunkel C, Brodsky MH. Epigenetic telomere protection by *Drosophila* DNA damage response pathways. // *PLoS Genet.* - 2006. - Vol. 2. - № 5. e71.
138. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. // *J Theor Biol.* -1973. - Vol. 41. - № 1. - P. 181-190.
139. Ott KM, Nguyen T, Navarro C. The DExH box helicase domain of spindle-E is necessary for retrotransposon silencing and axial patterning during *Drosophila* oogenesis. // *G3 (Bethesda).* - 2014. - Vol. 4. - № 11. - P. 2247-2257.
140. Ozturk S, Sozen B, Demir N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. // *Mol Hum Reprod.* - 2014. - Vol. 20. - № 1. - P. 15-30.
141. Palazzo L, Della Monica R, Visconti R, Costanzo V, Grieco D. ATM controls proper mitotic spindle structure. // *Cell Cycle.* - 2014. – Vol. 13. - № 7. - P. 1091-1100.
142. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. // *Annu Rev Genet.* - 2008. - Vol. 42. - P. 301-334.
143. Pane A, Wehr K, Schupbach T. zucchini and squash encode two putative nucleases required for rasiRNA production in the *Drosophila* germline. // *Dev Cell.* - 2007. - Vol. 12. - № 6. - P. 851-862.
144. Pardue ML, Danilevskaya ON, Lowenhaupt K, Wong J, Erby K. The gag coding region of the *Drosophila* telomeric retrotransposon, HeT-A, has an internal frame shift and a length polymorphic region. // *J Mol Evol.* - 1996. - Vol. 43. - № 6. - P. 572-583.
145. Pardue ML, Debaryshe P. Adapting to life at the end of the line: How *Drosophila* telomeric retrotransposons cope with their job. // *Mob Genet Elements.* - 2011. - Vol. 1. - № 2. - P. 128-134.

146. Pardue ML, DeBaryshe PG. Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. // *Annu Rev Genet.* - 2003. - Vol. 37. - P. 485-511.
147. Parrish NF, Tomonaga K. Endogenized viral sequences in mammals. // *Curr Opin Microbiol.* - 2016. - Vol. 31. - P. 176-183.
148. Peloponese JM, Haller K, Miyazato A, Jeang KT. Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2005. - Vol. 102. - № 52. - P. 18974-18979.
149. Petit C, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Bittoun P, Real E, Jacob Y, Tordo N, De The H, Saib A. Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. // *J Cell Sci.* - 2003. - Vol. 116. - P. 3433-42.
150. Pokrywka NJ, Stephenson EC. Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. // *Dev Biol.* - 1995. - Vol. 167. - № 1. - P. 363-370.
151. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK. Maturation of retroviruses. // *Curr Opin Virol.* - 2019. - Vol. 36. - P. 47-55.
152. Porro A, Feuerhahn S, Delafontaine J, Riethman H, Rougemont J, Lingner J. Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. // *Nat Commun.* - 2014. - Vol. 5. - P. 5379.
153. Porro A, Feuerhahn S, Lingner J. TERRA-reinforced association of LSD1 with MRE11 promotes processing of uncapped telomeres. // *Cell Rep.* - 2014. - Vol. 6. - № 4. - P. 765-776.
154. Porro, A, Feuerhahn S, Reichenbach P, Lingner J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. // *Mol Cell Biol.* - 2010. - Vol. 30. - № 20. - P. 4808-4817.
155. Radion E, Morgunova V, Ryazansky S, Akulenko N, Lavrov S, Abramov Y, Komarov PA, Glukhov SI, Olovnikov I, Kalmykova A. Key

- role of piRNAs in telomeric chromatin maintenance and telomere nuclear positioning in *Drosophila* germline. // *Epigenetics Chromatin*. - 2018. - Vol. 11. - № 1. - P. 40.
156. Radion E, Ryazansky S, Akulenko N, Rozovsky Y, Kwon D, Morgunova V, Olovnikov I, Kalmykova A. Telomeric Retrotransposon HeT-A Contains a Bidirectional Promoter that Initiates Divergent Transcription of piRNA Precursors in *Drosophila* Germline. // *J Mol Biol*. - 2017. - Vol. 429. - № 21. - P. 3280-3289.
157. Raffa GD, Cenci G, Ciapponi L, Gatti M. Organization and Evolution of *Drosophila* Terminin: Similarities and Differences between *Drosophila* and Human Telomeres. // *Front Oncol*. - 2013. - Vol. 3. - P. 112.
158. Raffa GD, Ciapponi L, Cenci G, Gatti M. Terminin: a protein complex that mediates epigenetic maintenance of *Drosophila* telomeres. // *Nucleus*. - 2011. - Vol. 2. - № 5. - P. 383-391.
159. Raffa GD, Raimondo D, Sorino C, Cugusi S, Cenci G, Cacchione S, Gatti M, Ciapponi L. Verrocchio, a *Drosophila* OB fold-containing protein, is a component of the terminin telomere-capping complex. // *Genes Dev*. - 2010. - Vol. 24. - № 15. - P. 1596-1601.
160. Rashkova S, Athanasiadis A, Pardue ML. Intracellular targeting of Gag proteins of the *Drosophila* telomeric retrotransposons. // *J Virol*. - 2003. - Vol. 77. - № 11. - P. 6376-6384.
161. Rashkova S, Karam SE, Kellum R, Pardue ML. Gag proteins of the two *Drosophila* telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends. // *J Cell Biol*. - 2002. - Vol. 159. - № 3. - P. 397-402.
162. Rashkova S, Karam SE, Pardue ML. Element-specific localization of *Drosophila* retrotransposon Gag proteins occurs in both nucleus and cytoplasm. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2002. - Vol. 99. - № 6. - P. 3621-3626.

163. Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. // *Nucleic Acids Res.* - 2010. - Vol. 38. - № 17. - P. 5797-5806.
164. Redon S, Zemp I, Lingner J. A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1. // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - Vol. 41. - № 19. - P. 9117-9128.
165. Reig-Viader R, Brieno-Enriquez MA, Khoriantuli L, Toran N, Cabero L, Giulotto E, Garcia-Caldes M, Ruiz-Herrera A. Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes. // *Hum Reprod.* - 2013. - Vol. 28. - № 2. - P. 414-422.
166. Reig-Viader R, Vila-Cejudo M, Vitelli V, Busca R, Sabate M, Giulotto E, Caldes MG, Ruiz-Herrera A. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) and telomerase are components of telomeres during mammalian gametogenesis. // *Biol Reprod.* - 2014. - Vol. 90. - № 5. - P. 103.
167. Rezende-Teixeira P, Siviero F, Brandao AS, Santelli RV, Machado-Santelli GM. Molecular characterization of a retrotransposon in the *Rhynchosciara americana* genome and its association with telomere. // *Chromosome Res.* - 2008. - Vol. 16. - № 5. - P. 729-742.
168. Sakai K, Barnitz RA, Chaigne-Delalande B, Bidère N, Lenardo MJ. Human immunodeficiency virus type 1 Vif causes dysfunction of Cdk1 and CyclinB1: implications for cell cycle arrest. // *Virology J.* - 2011. - Vol. 11. - № 8. - P. 219.
169. Sanghavi P, Liu G, Veeranan-Karmegam R, Navarro C, Gonsalvez GB. Multiple Roles for Egalitarian in Polarization of the *Drosophila* Egg Chamber. // *Genetics.* - 2016. - Vol. 203. - № 1. - P. 415-432.
170. Savitsky M, Kwon D, Georgiev P, Kalmykova A, Gvozdev V. Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline. // *Genes Dev.* - 2006. - Vol. 20. - № 3. - P. 345-354.

171. Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, Niemann H, Rudolph KL. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2004. - Vol. 101. - № 21. - P. 8034-8038.
172. Scheibe M, Arnoult N, Kappei D, Buchholz F, Decottignies A, Butter F, Mann M. Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. // *Genome Res.* - 2013. - Vol. 23. - № 12. - P. 2149-2157.
173. Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M, Cremer T. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. // *J Cell Biol.* - 1996. - Vol. 134. - № 5. - P. 1109-1125.
174. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. // *Nat Cell Biol.* - 2008. - Vol. 10. - № 2. - P. 228-236.
175. Servant G, Deininger PL. Insertion of Retrotransposons at Chromosome Ends: Adaptive Response to Chromosome Maintenance. // *Front Genet.* - 2015. - Vol. 6. - P. 358.
176. Sheen FM, Levis RW. Transposition of the LINE-like retrotransposon TART to *Drosophila* chromosome termini. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1994. - Vol. 91. - № 26. - P. 12510-12514.
177. Shiba T, Saigo K. Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element copia in *Drosophila melanogaster*. // *Nature.* - 1983. - Vol. 302. - № 5904. - P. 119-124.
178. Shpiz S, Kwon D, Rozovsky Y, Kalmykova A. rasiRNA pathway controls antisense expression of *Drosophila* telomeric retrotransposons in the nucleus. // *Nucleic Acids Res.* - 2009. - Vol. 37. - № 1. - P. 268-278.
179. Shpiz S, Kwon D, Uneva A, Kim M, Klenov M, Rozovsky Y, Georgiev P, Savitsky M, Kalmykova A. Characterization of *Drosophila* telomeric retroelement TAHRE: transcription, transpositions, and RNAi-

- based regulation of expression. // *Mol Biol Evol.* - 2007. - Vol. 24. - № 11. - P. 2535-2545.
180. Shpiz S, Olovnikov I, Sergeeva A, Lavrov S, Abramov Y, Savitsky M, Kalmykova A. Mechanism of the piRNA-mediated silencing of *Drosophila* telomeric retrotransposons. // *Nucleic Acids Res.* - 2011. - Vol. 39. - № 20. - P. 8703-8711.
181. Silva-Sousa R, Lopez-Panades E, Pineyro D, Casacuberta E. The chromosomal proteins JIL-1 and Z4/Putzig regulate the telomeric chromatin in *Drosophila melanogaster*. // *PLoS Genet.* - 2012. - Vol. 8. - № 12. e1003153.
182. Siriaco GM, Cenci G, Haoudi A, Champion LE, Zhou C, Gatti M, Mason JM. Telomere elongation (Tel), a new mutation in *Drosophila melanogaster* that produces long telomeres. // *Genetics.* - 2002. - Vol. 160. - № 1. - P. 235-245.
183. Solovei I, Gaginskaya ER, Macgregor HC. The arrangement and transcription of telomere DNA sequences at the ends of lampbrush chromosomes of birds. // *Chromosome Res.* - 1994. - Vol. 2. - № 6. - P. 460-470.
184. Song SU, Gerasimova T, Kurkulos M, Boeke JD, Corces VG. An env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that gypsy is an infectious retrovirus. // *Genes Dev.* - 1994. - Vol. 8. - № 17. - P. 2046-2057.
185. Speek M. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. // *Mol Cell Biol.* - 2001. - Vol. 21. - № 6. - P. 1973-1985.
186. Spirov A, Fahmy K, Schneider M, Frei E, Noll M, Baumgartner S. Formation of the bicoid morphogen gradient: an mRNA gradient dictates the protein gradient. // *Development.* - 2009. - Vol. 136. - № 4. - P. 605-614.
187. St Johnston D, Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. // *Cell.* - 2010. - Vol. 141. - № 5. - P. 757-774.

188. Starnes JH, Thornbury DW, Novikova OS, Rehmeier CJ, Farman ML. Telomere-targeted retrotransposons in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*: agents of telomere instability. // *Genetics*. - 2012. - Vol. 191. - № 2. - P. 389-406.
189. Steinhauer J, Kalderon D. Microtubule polarity and axis formation in the *Drosophila* oocyte. // *Dev Dyn*. - 2006. - Vol. 235. - № 6. - P. 1455-1468.
190. Swergold GD. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. // *Mol Cell Biol*. - 1990. - Vol. 10. - № 12. - P. 6718-6729.
191. Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. // *Cell*. - 1982. - Vol. 29. - № 1. - P. 245-255.
192. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. // *Curr Biol*. - 2003. - Vol. 13. - № 17. - P. 1549-1556.
193. Taylor MS, Altukhov I, Molloy KR, Mita P, Jiang H, Adney EM, Wudzinska A, Badri S, Ischenko D, Eng G, Burns KH, Fenyo D, Chait BT, Alexeev D, Rout MP, Boeke JD, LaCava J. Dissection of affinity captured LINE-1 macromolecular complexes. // *Elife*. - 2018. - Vol. 7. e30094.
194. Taylor MS., LaCava J, Mita P, Molloy KR, Huang CR, Li D, Adney EM, Jiang H, Burns KH, Chait BT, Rout MP, Boeke JD, Dai L. Affinity proteomics reveals human host factors implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition. .. *Cell*. - 2013. - Vol. 155. - № 5. - P. 1034-1048.
195. Tease C, Fisher G. Analysis of meiotic chromosome pairing in the female mouse using a novel minichromosome. // *Chromosome Res*. - 1998. - Vol. 6. - № 4. - P. 269-276.
196. Theron E, Maupetit-Mehouas S, Pouchin P, Baudet L, Brassat E, Vaury C. The interplay between the Argonaute proteins Piwi and Aub within *Drosophila* germlinum is critical for oogenesis, piRNA biogenesis and TE silencing. // *Nucleic Acids Res*. - 2018. - Vol. 46. - № 19. - P. 10052-10065.

197. Theurkauf WE, Alberts BM, Jan YN, Jongens TA. A central role for microtubules in the differentiation of *Drosophila* oocytes. // *Development*. - 1993. - Vol. 118. - № 4. - P. 1169-80.
198. Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R. Telomere length in reproduction. // *Andrologia*. - 2013. - Vol. 45. - № 5. - P. 289-304.
199. Titen SW, Golic KG. Telomere loss provokes multiple pathways to apoptosis and produces genomic instability in *Drosophila melanogaster*. // *Genetics*. - 2008. - Vol. 180. - № 4. - P. 1821-1832.
200. Tiwari B, Kurtz P, Jones AE, Wylie A, Amatruda JF, Boggupalli DP, Gonsalvez GB, Abrams JM. Retrotransposons Mimic Germ Plasm Determinants to Promote Transgenerational Inheritance. // *Curr Biol*. - 2017. - Vol. 27. - № 19. - P. 3010-3016.
201. Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. // *PLoS Genet*. - 2011. - Vol. 7. - № 6. e1002161.
202. Vagin VV, Klenov MS, Kalmykova AI, Stolyarenko AD, Kotelnikov RN, Gvozdev VA. The RNA interference proteins and vasa locus are involved in the silencing of retrotransposons in the female germline of *Drosophila melanogaster*. // *RNA Biol*. - 2004. - Vol. 1. - № 1. - P. 54-58.
203. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. // *Curr Biol*. - 1998. - Vol. 8. - № 5. - P. 279-282.
204. Victorelli S, Passos JF. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. // *EBioMedicine*. - 2017. - Vol. 21. - P. 14-20.
205. Villasante A, Abad JP, Planello R, Mendez-Lago M, Celniker SE, de Pablos B. *Drosophila* telomeric retrotransposons derived from an ancestral element that was recruited to replace telomerase. // *Genome Res*. - 2007. - Vol. 17. - № 12. - P. 1909-1918.

206. Vrbsky J, Akimcheva S, Watson JM, Turner TL, Daxinger L, Vyskot B, Aufsatz W, Riha K. siRNA–Mediated Methylation of Arabidopsis Telomeres. // *PLoS Genet.* - 2010. - Vol. 6. - № 6. e1000986.
207. Wallace NA, Belancio VP, Deininger PL. L1 mobile element expression causes multiple types of toxicity. // *Gene.* - 2008. - Vol. 419. - № 1-2, - P. 75-81.
208. Wang L, Dou K, Moon S, Tan FJ, Zhang ZZ. Hijacking Oogenesis Enables Massive Propagation of LINE and Retroviral Transposons. // *Cell.* - 2018. - Vol. 174. - № 5. - P. 1082-1094.
209. Wang X, Goodrich KJ, Gooding AR, Naeem H, Archer S, Paucek RD, Youmans DT, Cech TR, Davidovich C. Targeting of Polycomb Repressive Complex 2 to RNA by Short Repeats of Consecutive Guanines. // *Mol Cell.* - 2017. - Vol. 65. - № 6. - P. 1056-1067.
210. Wang Y, Feigon J. Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. // *Curr Opin Struct Biol.* - 2017. - Vol. 47. - P. 77-87.
211. Wei W, Gilbert N, Ooi SL, Lawler JF, Ostertag EM, Kazazian HH, Boeke JD, Moran JV. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. // *Mol Cell Biol.* - 2001. - Vol. 21. - № 4. - P. 1429-1439.
212. Wichmann A, Jaklevic B, Su TT. Ionizing radiation induces caspase-dependent but Chk2- and p53-independent cell death in *Drosophila melanogaster*. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2006. - Vol. 103. - № 26. - P. 9952-9957.
213. Wilkie GS, Davis I. *Drosophila* wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. // *Cell.* - 2001. - Vol. 105. - № 2. - P. 209-219.
214. Wu L, Multani AS, He H, Cosme-Blanco W, Deng Y, Deng JM, Bachilo O, Pathak S, Tahara H, Bailey SM, Deng Y, Behringer RR, Chang S. Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant

- homologous recombination at telomeres. // *Cell*. - 2006. - Vol. 126. - № 1. - P. 49-62.
215. Ye J, Renault VM, Jamet K, Gilson E. Transcriptional outcome of telomere signalling. // *Nat Rev Genet*. - 2014. - Vol. 15. - № 7. - P. 491-503.
216. Yehezkel S, Segev Y, Viegas-Pequignot E, Skorecki K, Selig S. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. // *Hum Mol Genet*. - 2008. - Vol. 17. - № 18. - P. 2776-2789.
217. Yu SF, Eastman SW, Linial ML. Foamy virus capsid assembly occurs at a pericentriolar region through a cytoplasmic targeting/retention signal in Gag. // *Traffic*. - 2006. - Vol. 7. - № 8. - P. 966-977.
218. Yu TY, Kao YW, Lin JJ. Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2014. - Vol. 111. - № 9. - P. 3377-3382.
219. Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A, Zalenskaya IA, Balhorn R, Bradbury EM. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. // *Chromosoma*. - 1995. - Vol. 103. - № 9. - P. 577-590.
220. Zalensky AO, Tomilin NV, Zalenskaya IA, Teplitz RL, Bradbury EM. Telomere-telomere interactions and candidate telomere binding protein(s) in mammalian sperm cells. // *Exp Cell Res*. - 1997. - Vol. 232. - № 1. - P. 29-41.
221. Zamborlini A, Lehmann-Che J, Clave E, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Roingard P, Emiliani S, Toubert A, de The H, Saib A. Centrosomal pre-integration latency of HIV-1 in quiescent cells. // *Retrovirology*. - 2007. - Vol. 4. - P. 63.
222. Zhang L, Beaucher M, Cheng Y, Rong YS. Coordination of transposon expression with DNA replication in the targeting of telomeric retrotransposons in *Drosophila*. // *EMBO J*. - 2014. - Vol. 33. - № 10. - P. 1148-1158.

223. Zhang SM, Song M, Yang TY, Fan R, Liu XD, Zhou PK. HIV-1 Tat impairs cell cycle control by targeting the Tip60, Plk1 and cyclin B1 ternary complex. // *Cell Cycle*. - 2012. - Vol. 11. - № 6. - P. 1217-1234.
224. Zhang X, Wu X, Tang W, Luo Y. Loss of p16(Ink4a) function rescues cellular senescence induced by telomere dysfunction. // *Int J Mol Sci*. - 2012. - Vol. 13. - № 5. - P. 5866-5877.
225. Zhang Y, Zhang L, Tang X, Bhardwaj SR., Ji J, Rong YS. MTV, an ssDNA Protecting Complex Essential for Transposon-Based Telomere Maintenance in *Drosophila*. // *PLoS Genet*. - 2016. - Vol. 12. - № 11. e1006435.
226. Zhao Y, Sfeir AJ, Zou Y, Buseman CM, Chow TT, Shay JW, Wright WE. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. // *Cell*. - 2009. - Vol. 138. - № 3. -P. 463-475.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю Калмыковой Алле Ивановне за предоставленную возможность работать в лаборатории, чуткое и компетентное руководство, понимание и ценные советы. Автор выражает благодарность Оловникову Ивану Алексеевичу за разработку трансгенной модели и помощь на начальных этапах работы. Также автор выражает благодарность Моргуновой Валерии Витальевне за помощь в проведении иммуноокрашивания и FISH, Мироновой Анастасии Александровне за помощь в проведении РНК-иммунопреципитации, Михалевой Елене Анатольевне за помощь в проведении экспериментов с клетками S2, Оленкиной Оксане Михайловне и Абрамову Юрию Александровичу за помощь в проведении скрещиваний трансгенных линий мух; Радион Елизавете Ивановне и Комарову Павлу Андреевичу за помощь в проведении ОТ-ПЦР в реальном времени. Автор выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории исследования геномных повторов эукариот и сотрудникам отдела молекулярной генетики клетки Института молекулярной генетики РАН за теплую атмосферу в коллективе, ценные советы и обсуждение данных.

Также автор выражает благодарность Центру коллективного пользования Центру клеточных и генных технологий Института молекулярной генетики РАН за возможность работать на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 Meta. Кроме того автор благодарит E. Casacuberta (Институт эволюционной биологии, Барселона, Испания), Y. Rong (Университет Сун Ятсена, Гуанчжоу, Китай), R. Lehmann (Институт биомолекулярной медицины, Нью-Йорк, США) за предоставленные антитела.

Кроме того, автор благодарит свою семью и друзей за моральную поддержку в процессе выполнения работы.