

УДК 577.21

ДЕЛЕЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ 184–188 ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК ЧЕЛОВЕКА НЕ ВЛИЯЕТ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ТЕЛОМЕРАЗЫ

© 2023 г. В. Л. Шляпина^{1,2,*}, академик РАН О. А. Донцова^{1,2,3,4}, М. П. Рубцова^{1,2}

Поступило 20.01.2023 г.

После доработки 09.03.2023 г.

Принято к публикации 09.03.2023 г.

Теломераза — рибонуклеопротеиновый комплекс, основными компонентами которого являются теломеразная РНК и обратная транскриптаза. Ранее в нашей лаборатории показано, что теломеразная РНК человека содержит открытую рамку считывания, первым нуклеотидом которой является аденин в положении 176. Открытая рамка считывания кодирует белок hTERP, и делеция нуклеотидов 184–188 теломеразной РНК человека нарушает открытую рамку считывания и приводит к отсутствию hTERP. Теломеразная РНК человека имеет консервативную структуру, изменения в которой влияют на активность теломеразы. В настоящей работе мы показали, что делеция нуклеотидов 184–188 теломеразной РНК не влияет на функционирование теломеразы.

Ключевые слова: теломеразная РНК, hTR, спираль P1, hTERP

DOI: 10.31857/S2686738923700233, **EDN:** QIFTNO

ВВЕДЕНИЕ

Теломераза — это рибонуклеопротеиновый комплекс, участвующий в достраивании концевых участков линейных хромосом эукариот — теломер, укорочение которых происходит во время каждого цикла клеточного деления в результате недорепликации, а также действия нуклеаз [1]. В состав теломеразного комплекса входят РНК и ряд белков, однако для каталитической активности теломеразы необходимы два основных компонента: теломеразная РНК (TR) и теломеразная обратная транскриптаза (TERT) [2]. TERT удлиняет 3'-выступающий конец ДНК, используя TR в качестве матрицы для синтеза теломерных повторов. Кроме функции матрицы, TR также играет важную роль в процессах локализации и сборки всего теломеразного комплекса [3].

Удлинение теломер необходимо клеткам с высоким пролиферативным потенциалом и ассоциировано с экспрессией *TERT*. В процессе дифференцировки происходит инактивация транскрипции *TERT* [4] в большинстве соматических клеток. Активно делящиеся клетки, такие как половые и стволовые, поддерживают экспрессию *TERT*. Увеличение пролиферативного потенциала клеток в случае раковой трансформации, активации иммунного ответа и в процессах регенерации ассоциировано с активацией экспрессии гена *hTERT* [1]. Экспрессия гена *TERC*, кодирующего РНК-компонент теломеразы, обнаружена практически во всех клетках вне зависимости от их пролиферативного статуса, так как помимо участия в теломеразном комплексе, TR выполняет ряд неканонических функций [5]. Во вторичной структуре TR выделяют четыре консервативных домена: псевдоузел (включающий матрицу), консервативные области 4 и 5 (CR4/CR5), H/ACA-бокс и CR7 (рис. 1) [3]. Для активности теломеразы решающее значение имеют псевдоузел, содержащий матрицу для синтеза теломер, и область CR4/CR5, состоящая из спиралей P5, P6 и критически важной петли-спирали P6.1. Этих структур вместе с TERT достаточно для активности теломеразного комплекса [6].

Долгое время теломеразную РНК считали неcodирующей РНК. Однако некоторые ее свойства позволяют предположить codирующий потенциал. В процессе биогенеза hTR синтезируется длинный предшественник, который содержит

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия

⁴ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

*e-mail: vikyl4es@gmail.com

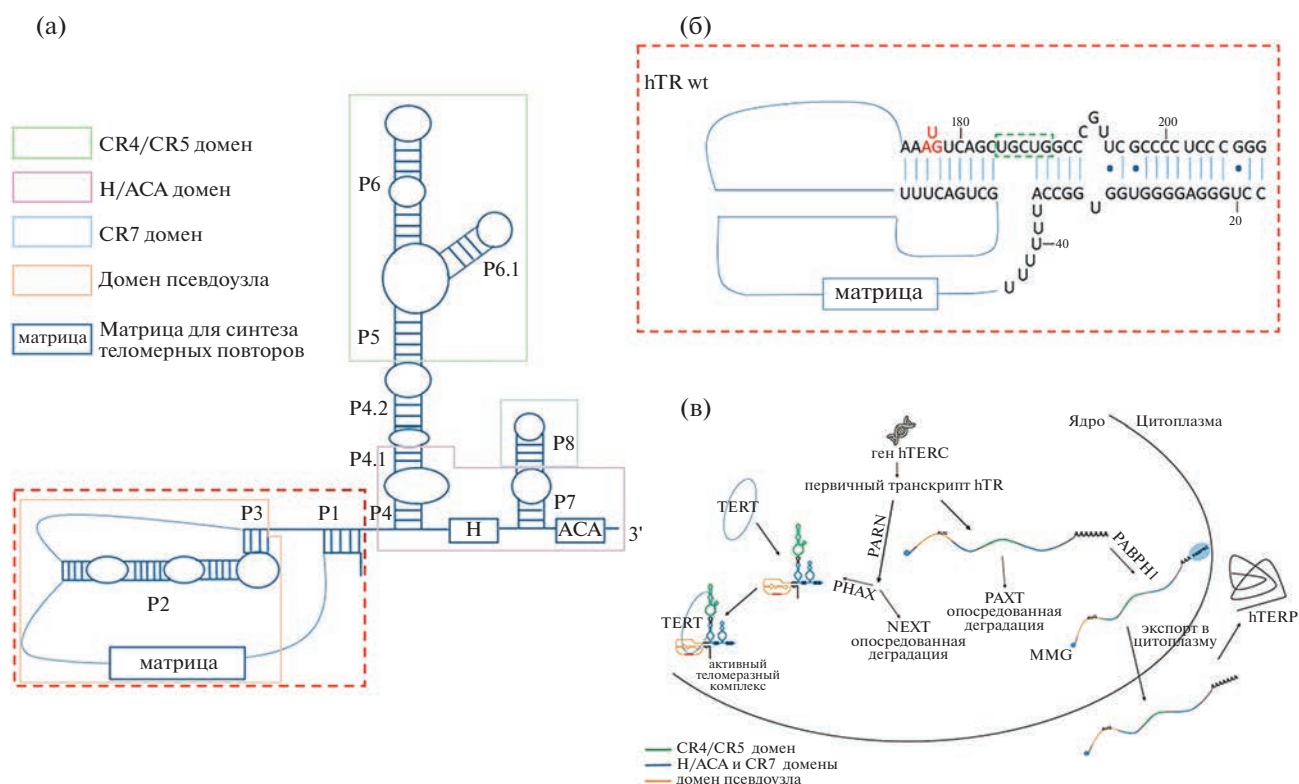


Рис. 1. Схема вторичной структуры hTR (по [6, 7, 19]). (а) Общий вид вторичной структуры hTR. (б) Увеличенный фрагмент спирали P1, красным выделен старт-кодон открытой рамки считывания, кодирующей белок hTERP; зеленой рамкой выделены нуклеотиды, которые удалены в результате действия CRISPR-Cas9. (в) Схема, иллюстрирующая процессинг и транспорт hTR; PAXT, PARN, NEXT, PHAX, PABPN1 — комплексы и белки, участвующие в процессинге hTR.

m⁷G-кеп на 5'-конце и открытую рамку считывания (ОРС). Процессинг первичного транскрипта РНК-экзосомой приводит либо к деградации, либо к формированию hTR, входящей в состав теломеразного комплекса. Небольшая доля теломеразной РНК в процессе биогенеза транспортируется в цитоплазму, используя механизмы экспорта мРНК (рис. 1) [7, 8].

Ряд длинных некодирующих РНК (lncRNA), у которых ранее не обнаруживалось способности к кодированию белка, имеют открытые рамки считывания и способны кодировать небольшие пептиды [9]. Для некоторых пептидов установлены функции, например миорегулин — образует единую трансмембранную альфа-спираль, которая взаимодействует с SERCA (Ca²⁺–АТФаза саркоплазматического ретикула) в мембране саркоплазматического ретикула и регулирует перенос Ca²⁺ [10]; NoBody (неаннотированный полипептид, диссоциирующий Р-тело) — регулирует количество Р-тел в клетках, взаимодействуя с декепирующими белками [11].

Есть примеры, когда можно разграничить функции lncRNA и микропептида, который с нее синтезируется: SPAR (малый регуляторный полипептид аминокислотного ответа) — взаимодей-

ствует с лизосомальной v-АТФазой, негативно регулируя активацию mTORC1 [12], а также принимает участие в регуляции эндотелиальных клеток, причем микропептид и lncRNA в комплексе с другими белками оказывают противоположное действие на ангиогенез [13]; HOXB-AS3 — микропептид подавляет рост рака толстой кишки [14], а lncRNA — способствует пролиферации, миграции и инвазии рака легких посредством активации PI3K/АКТ пути [15].

Ранее в нашей лаборатории показано, что теломеразная РНК человека кодирует белок hTERP [7], который защищает клетки в условиях индукции апоптоза доксорубицином [7], а также принимает участие в регуляции аутофагии [16]. Методом CRISPR-Cas9 редактирования генома была получена клеточная линия HEK293TdhTERP, в которой удалены 5 нуклеотидов (184–188) после стартового кодона AUG (расположены в P1-спирали вторичной структуры TR, рис. 1) [7, 8]. Такая мутация приводит к нарушению открытой рамки считывания, а также может приводить к изменению третичной структуры TR и влиять на функционирование теломеразной РНК [17]. Из литературных данных известно, что мутации в теломеразной РНК могут приводить к изменению

активности теломеразы [18], что в свою очередь может оказывать влияние на функционирование клетки.

Для того чтобы удостовериться, что делеция нуклеотидов 184–188 в hTR не оказывает влияния на функционирование теломеразы, мы сравнили уровень активности теломеразы, а также количество и локализацию каталитической субъединицы теломеразы в hTERP-дефицитных клетках и клетках дикого типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры

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

Клеточную линию HEK293TdhTERP получили при помощи технологии CRISPR/Cas9 ранее [7, 16].

Метод TRAP (протокол амплификации теломерных повторов)

Используемая методика основана на работе [20]. Осадок клеток, промытых холодным PBS, лизировали буфером (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM β-меркаптоэтанол, 5% глицерин, 0.5% CHAPS, 0.1 mM PMSF) на льду в течение 30 мин. Полученные лизаты центрифугировали при 14 000 g в течение 12 мин при 4°C. Супернатант отбирали и использовали сразу или замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда по A590 на Victor (PerkinElmer). Для каждого образца в реакцию ПЦР в реальном времени брали 0.5 и 1 мкг суммарного белка. Опыт проводили трижды, каждый раз осуществляя по три повтора реакции TRAP для каждого образца. Готовили реакционную смесь, содержащую TRAP-буфер (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 мг/мл БСА, 0.005% Tween-20), dNTPs и праймер TS (5'-AATCCGTCGAGCA-GAGTT-3'), добавляли к ней полученный лизат и инкубировали в течение 30 мин на комнатной температуре. Далее добавляли смесь АСХ праймера (5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3'), Taq-полимеразы и SYBR Green.

ПЦР проводили в приборе CFX96 (Bio-Rad) со следующими параметрами: 95°C в течение 3 мин, далее 35 циклов: 95°C 25 с, 50°C 25 с, 72°C 90 с. В каждом опыте в качестве контроля на контаминацию ставили реакции без лизатов.

Иммуноблоттинг

Клетки промывали холодным PBS и лизировали на льду в течение 30 мин буфером NETN (150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 50 mM Трис-HCl, pH 7.5, 0.5% NP-40) с добавлением ингибитора протеаз и фосфатаз (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Promega)). Полученные лизаты подвергали обработке ультразвуком в течение 15 с и центрифугировали при 14 000 g в течение 10 мин при 4°C. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда по A590 на Victor (PerkinElmer). Равные количества белка (25 мкг на дорожку) прогревали в Леммли буфере (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM ДТТ, 2% SDS, 0.1% бромфеноловый синий, 10% глицерин) в течение 5 мин и разделяли в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в денатурирующих условиях. Иммуноблоттинг проводили по стандартной методике с использованием первичных антител анти-hTERT (Ab32020; Abcam) и анти-GAPDH (Ab9485; Abcam), а также вторичные антитела против кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (7074; Cell Signaling Technology). Визуализацию проводили при помощи набора SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34096, ThermoFisher) в ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

Цитохимия

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

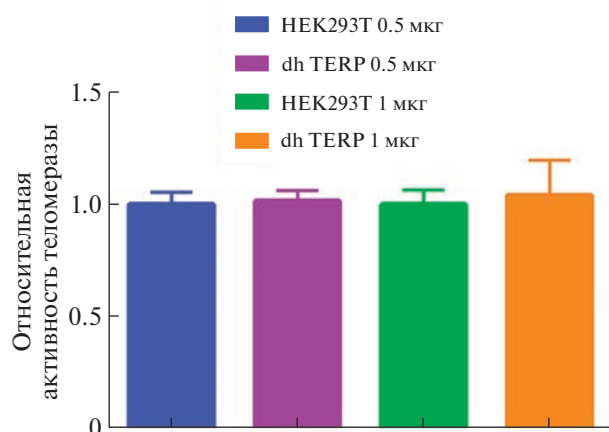


Рис. 2. Делеция нуклеотидов 184–188 теломеразной РНК человека не влияет на активность теломеразы. Гистограмма, демонстрирующая уровень активности теломеразы в клетках дикого типа (HEK293Т) и HEK293ТdhTERP (dhTERP), согласно результатам RQ-TRAP анализа. Каждый столбик отражает результаты трех независимых экспериментов с тремя техническими повторностями.

были сделаны на объективе 40/0.95 и обработаны с использованием стандартного программного обеспечения NIS-Elements.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, США). Статистическую значимость определяли с помощью t-теста. Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Открытая рамка считывания белка hTERT содержит 363 нуклеотида, первым из которых является аденин в положении 176 гена *hTERT*. Белок, содержащий 121 аминокислоту, может быть синтезирован в результате трансляции первичного транскрипта теломеразной РНК, который не подвергался процессингу для получения формы hTR, ассоциированной с теломеразным комплексом [7, 8]. В результате редактирования гена *hTERT* в клетках линии HEK293Т методом CRISPR-Cas9 были удалены 5 нуклеотидов в положении 184–188 гена *hTERT*. Данные нуклеотиды входят в состав спирали P1 (рис. 1), которая формируется в результате образования комплементарных взаимодействий между участками hTR и способствует формированию структуры псевдоузла [19]. Спираль P1 является ограничивающим обратную транскрипцию теломеразы фактором, что позволяет избежать добавления нуклеотидов, не кодируемых матрицей [21]. Учитывая ключевую роль

спирали P1 в обеспечении точности обратной транскрипции, были высказаны предположения о том, что модификации этого участка РНК могут оказывать значительное влияние на функционирование теломеразы [22]. Так как вносимая нами мутация затрагивает спираль P1, необходимо было проверить, влияют ли данные изменения на активность теломеразного комплекса, а также экспрессию и локализацию TERT.

Определение активности теломеразы проводили методом TRAP с использованием ПЦР в реальном времени (рис. 2). Для определения влияния мутаций в hTR на активность теломеразы мы использовали клетки линии HEK293Т дикого типа и клетки HEK293ТdhTERP [16]. Статистически значимых различий в активности теломеразы между клетками дикого типа и мутантными клетками выявлено не было.

Для определения количества hTERT в клетках дикого типа HEK293Т и клетках HEK293ТdhTERP был использован метод иммуноблотинга (рис. 3). В качестве контроля нормировки проводили анализ количества GAPDH. Статистически значимых различий в уровне экспрессии hTERT между клетками дикого типа и мутантными клетками выявлено не было.

Согласно литературным данным, hTERT может иметь как ядерную, так и цитоплазматическую локализацию [23]. Сравнение локализации hTERT в клетках HEK293Т дикого типа, и клетках HEK293ТdhTERP осуществляли методом цитохимии (рис. 4). В качестве отрицательного контроля в данных экспериментах были использованы образцы, окрашенные только вторичными антителами. Различий в локализации hTERT между клетками HEK293Т дикого типа и клетками HEK293ТdhTERP не выявлено.

Спираль P1 во вторичной структуре теломеразной РНК человека формируется за счет комплементарных взаимодействий между нуклеотидами в положении 18–37 и 197–208. Образование спирали P1 необходимо для формирования структуры псевдоузла, содержащего матрицу для синтеза теломер, и определяющего каталитическую активность теломеразного комплекса [19, 21]. Гуанин-богатая последовательность 5'-концевого участка hTR склонна к образованию G-квадруплекса, разрушение которого осуществляет хеликаза RHAU (RNA helicase associated with AU-rich elements или DHX36 (DEAN box protein 36)), взаимодействуя с первыми 43 нуклеотидами теломеразной РНК [22, 24]. Образование квадруплекса препятствует формированию спирали P1 и способствует ингибированию теломеразной активности, что было продемонстрировано в условиях снижения экспрессии гена *DHX36*.

Саму спираль P1 можно разделить на две области – P1a и P1b, которые разделены между собой

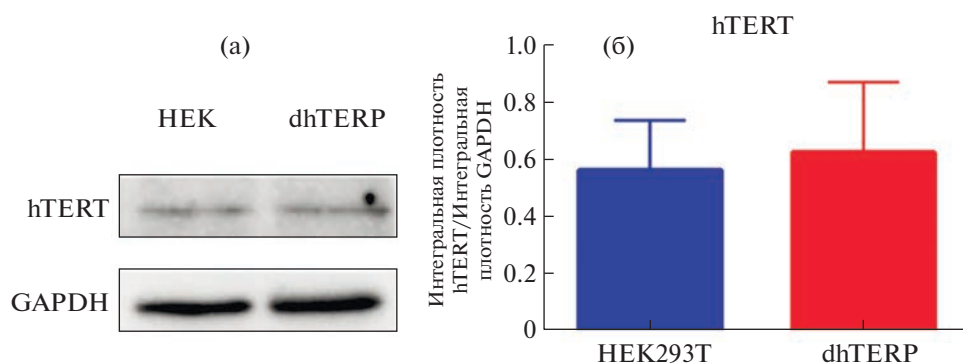


Рис. 3. Экспрессия hTERT в клетках дикого типа HEK293T (HEK) и HEK293TdhTERT (dhTERT). (а) Иммуноблоттинг лизатов из клеток дикого типа HEK293T и HEK293TdhTERT. (б) Количественная оценка уровня экспрессии. Столбцы отражают отношение интегральной плотности hTERT к интегральной плотности GAPDH; данные получены в трех независимых экспериментах.

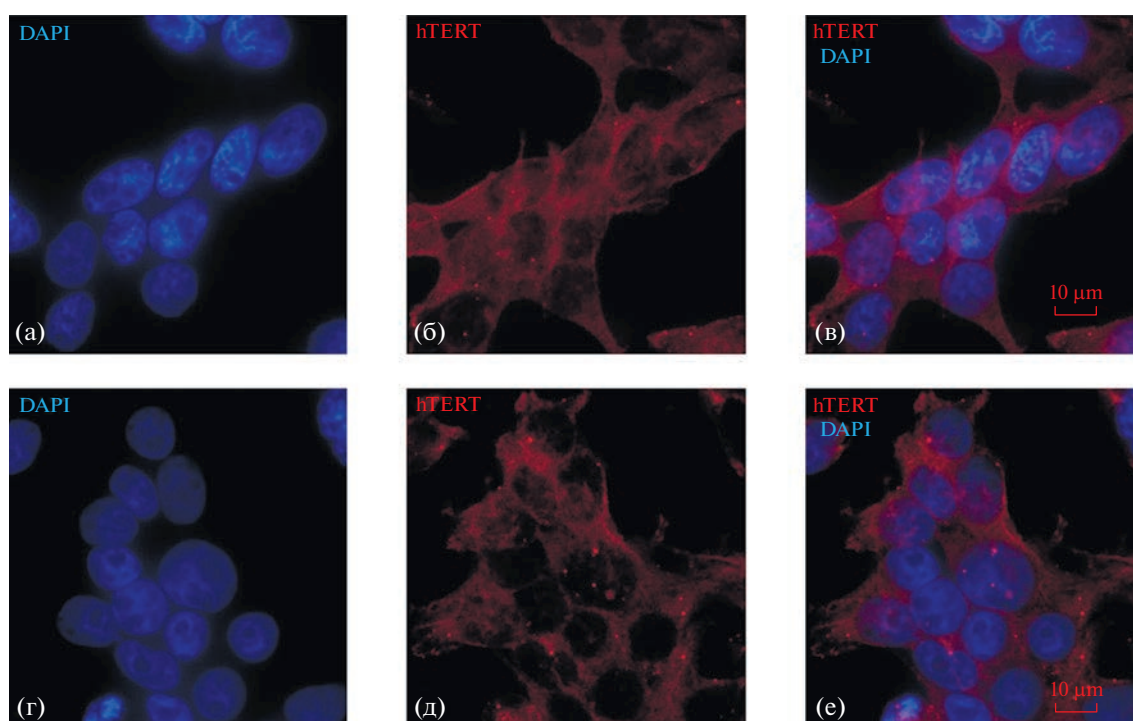


Рис. 4. Иммунолокализация hTERT в клетках HEK293T дикого типа и клетках HEK293TdhTERT. Окраска клеток HEK293T (а), (б), (в) и клеток HEK293TdhTERT (г), (д), (е) первичными антителами на hTERT и вторичными антителами с Cy5 меткой; синий — ядра, окрашенные DAPI; красный — hTERT; бар — 10 мкм.

внутренней петлей (рис. 5) [21]. Отсутствие спирали P1a не меняет структуру добавленных повторов, в то время как отсутствие обеих частей (P1a и P1b) приводит к удлинению матрицы и добавлению дополнительных нуклеотидов при синтезе теломерных повторов [21].

Мутации, приводящие к нарушению спаривания нуклеотидов во всей части P1b, приводят к снижению активности теломеразного комплекса и синтезу неправильных теломерных повторов, а

изменение последовательности в одноцепочечной области с 38 по 43 нуклеотиды не влияет на функционирование теломеразы. Таким образом, для корректного функционирования теломеразного комплекса необходимо образование спирали P1b, которая определяет границу матрицы, а одноцепочечная последовательность между матрицей и этой спиралью обеспечивает гибкость для перемещения матрицы внутри активного сайта TERT во время удлинения теломер [21].

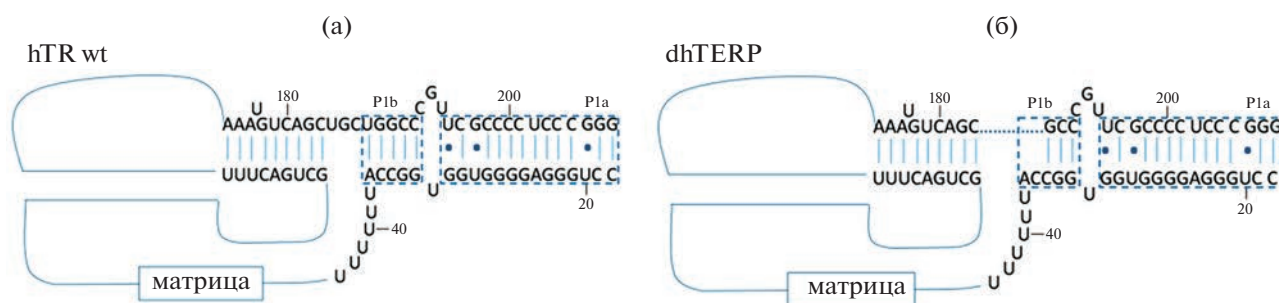


Рис. 5. Схема фрагмента вторичной структуры hTR (по [6, 7, 10]). (а) Фрагмент вторичной структуры hTR клеток HEK293T дикого типа. (б) Фрагмент вторичной структуры hTR клеток HEK293TdhTERP.

Нуклеотиды 184–186 hTR располагаются в линкерной области сразу после псевдоузла до спирали P1b (три нуклеотида), а 187–188 входят в состав самой спирали (рис. 5). Мутация приводит к удлинению линкерного участка, но спираль P1b по-прежнему продолжает формироваться (хотя и в более коротком варианте — остается 3 комплементарные пары из 5) и тем самым ограничение матрицы по-прежнему присутствует. Удаление одноцепочечного участка из трех нуклеотидов между псевдоузлом и спиралью P1b может быть скомпенсировано за счет линкерного участка между матрицей и спиралью P1b и hTERT по-прежнему может связываться с hTR и оставаться активной.

Из полученных нами данных видно, что уровень экспрессии, локализация hTERT и активность теломеразы не отличаются в клетках HEK293T дикого типа и в клетках HEK293TdhTERP. Данные результаты позволяют утверждать, что делеция нуклеотидов 184–188 спирали P1 не приводит к глобальным пространственным перестройкам вторичной структуры hTR — матрица для синтеза теломерных повторов остается доступной для фермента и нет пространственных затруднений для сборки теломеразного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Делеция нуклеотидов 184–188 в P1 спирали теломеразной РНК человека не вызвала статистически значимого изменения уровня экспрессии hTERT, локализации и каталитической активности hTERT. Можно заключить, что все эффекты, наблюдаемые в клетках HEK293TdhTERP, вызваны именно отсутствием белка hTERP, а не изменениями в функционировании теломеразы, которые могли возникнуть из-за модификаций hTR.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00006). Флюоресцентный микроскоп, использованный в ра-

боте, входит в список оборудования Программы развития МГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов у авторов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grill S., Nandakumar J. Molecular mechanisms of telomere biology disorders // J Biol Chem. 2021. V. 296. P. 100064.
2. Blackburn E.H., Collins K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011. V. 3. P. 1–9.
3. Zhang Q., Kim N.K., Feigon J. Architecture of human telomerase RNA // Proc Natl Acad Sci U S A. 2011. V. 108. P. 20325–20332.
4. Cifuentes-Rojas C., Shippen D.E. Telomerase Regulation // Mutat Res. 2012. V. 730. P. 20–27.
5. Raghunandan M., Decottignies A. The multifaceted hTR telomerase RNA from a structural perspective // Bio-Essays. 2021. V. 43. P. 2100099.
6. Nguyen T.H.D., Tam J., Wu R.A., et al. Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme // Nature. 2018. V. 557. P. 190–195.
7. Rubtsova M., Naraykina Y., Vasilkova D., et al. Protein encoded in human telomerase RNA is involved in cell protective pathways // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 8966–8977.
8. Pakhomova T., Moshareva M., Vasilkova D., et al. Role of RNA Biogenesis Factors in the Processing and Transport of Human Telomerase RNA // Biomed. 2022. V. 10. P. 1275.
9. Xing J., Liu H., Jiang W., et al. LncRNA-Encoded Peptide: Functions and Predicting Methods // Front. Oncol. 2021. V. 10. P. 3071.
10. Anderson D.M., Anderson K.M., Chang C.L., et al. A Micropeptide Encoded by a Putative Long Non-coding RNA Regulates Muscle Performance // Cell. 2015. V. 160. P. 595–606.
11. D'Lima N.G., Ma J., Winkler L., et al. A human microprotein that interacts with the mRNA decapping complex // Nat. Chem. Biol. 2017. V. 13. P. 174–180.

12. *Matsumoto A., Pasut A., Matsumoto M., et al.* mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide // *Nature*. 2017. V. 541. P. 228–232.
13. *Spencer H.L., Sanders R., Boulberdaa M., et al.* The LINC00961 transcript and its encoded micropeptide, small regulatory polypeptide of amino acid response, regulate endothelial cell function // *Cardiovasc. Res*. 2020. V. 116. P. 1981–1994.
14. *Huang J.Z., Chen M., Chen D., et al.* A Peptide Encoded by a Putative lncRNA HOXB-AS3 Suppresses Colon Cancer Growth // *Mol. Cell*. 2017. V. 68. P. 171–184.
15. *Jiang W., Kai J., Li D., et al.* lncRNA HOXB-AS3 exacerbates proliferation, migration, and invasion of lung cancer via activating the PI3K-AKT pathway // *J. Cell. Physiol*. 2020. V. 235. P. 7194–7203.
16. *Shliapina V., Koriagina M., Vasilkova D., et al.* Human Telomerase RNA Protein Encoded by Telomerase RNA is Involved in Metabolic Responses // *Front Cell Dev Biol*. 2021. V. 9. P. 754611.
17. *Rubtsova M., Dontsova O.* How Structural Features Define Biogenesis and Function of Human Telomerase RNA Primary Transcript // *Biomed*. 2022. V. 10. P. 1650.
18. *Liu B., He Y., Wang Y., et al.* Structure of active human telomerase with telomere shelterin protein TPP1 // *Nature*. 2022. V. 604. P. 578–583.
19. *Chen J.L., Blasco M.A., Greider C.W.* Secondary structure of vertebrate telomerase RNA // *Cell*. 2000. V. 100. P. 503–514.
20. *Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer // *Science*. 1994. V. 266. P. 2011–2015.
21. *Chen J.L., Greider C.W.* Template boundary definition in mammalian telomerase // *Genes Dev*. 2003. V. 17. P. 2747–2752.
22. *Booy E.P., Meier M., Okun N., et al.* The RNA helicase RHAU (DHX36) unwinds a G4-quadruplex in human telomerase RNA and promotes the formation of the P1 helix template boundary // *Nucleic Acids Res*. 2012. V. 40. P. 4110–4124.
23. *Kyo S., Masutomi K., Maida Y., et al.* Significance of Immunological Detection of Human Telomerase Reverse Transcriptase: Re-Evaluation of Expression and Localization of Human Telomerase Reverse Transcriptase // *Am J Pathol*. 2003 V. 163. P. 859–867.
24. *Laudadio I., Carissimi C., Fulci V.* How RNAi machinery enters the world of telomerase // *Cell Cycle*. 2019. V. 18. P. 1056–1067.

184–188 NUCLEOTIDES DELETION OF HUMAN TELOMERASE RNA DOES NOT AFFECT ON THE TELOMERASE FUNCTIONING

V. L. Shliapina^{a,b,#}, Academician of the RAS O. A. Dontsova^{a,b,c,d}, and M. P. Rubtsova^{a,b}

^a *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b *Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russian Federation*

^c *A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russian Federation*

^d *Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: vikyl4es@gmail.com*

Telomerase is a ribonucleoprotein complex, the main components of which are telomerase RNA and reverse transcriptase. Previously, it was shown in our laboratory that human telomerase RNA contains an open reading frame, starting at adenine in position 176. The open reading frame encodes the hTERP protein, and the deletion of nucleotides 184–188 of human telomerase RNA disrupts the open reading frame and leads to the absence of hTERP. Human telomerase RNA has a conserved structure, changes in which affect telomerase activity. In this work, we have shown that the deletion of nucleotides 184–188 of telomerase RNA does not affect the functioning of telomerase.

Keywords: telomerase RNA, hTR, helix P1, hTERP