

УДК 615.014.23.417

## ВОЗМОЖНОСТИ И ЭФФЕКТЫ АКТИВАЦИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ

© 2013 г. Н. А. Коваленко<sup>1\*</sup>, Д. Д. Жданов<sup>2</sup>, Т. Ф. Коваленко<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова  
Министерства здравоохранения РФ, Москва, 119992

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича  
Российской академии медицинских наук, Москва, 119121

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук Москва, 117997

Поступила в редакцию 25.09.2012 г.

Принята к печати 14.01.2013 г.

В представленном обзоре кратко описаны современные представления о механизмах регуляции активности теломеразы (преимущественно теломеразы человека). Рассмотрены локализация компонентов теломеразного комплекса в клетке и проявления активности фермента, не связанные с удлинением теломера. Описаны заболевания человека, связанные с пониженной активностью теломеразы, короткими теломерами и ускоренным укорачиванием теломер. Детально обсуждаются возможности активации транскрипции гена *hTERT* различными природными и синтетическими соединениями, а также эффекты трансфекции активного гена *hTERT* в клетки. Экзогенная активация транскрипции гена *hTERT* приводит к повышению пролиферативного потенциала клеток, что может использоваться в клеточной терапии. Необходимо отметить, что повышенная экспрессия гена *hTERT*, особенно при его трансдукции, может приводить к малигнизации клеток, что необходимо учитывать при выборе способа активации теломеразы в лечебных целях.

**Ключевые слова:** теломераза человека, активаторы теломеразы, ген *hTERT*.

POSSIBILITIES AND EFFECTS OF TELOMERASE ACTIVATION, by N. A. Kovalenko<sup>1\*</sup>, D. D. Zhdanov<sup>2</sup>, T. F. Kovalenko<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119992 Russia; \*e-mail: vartala@yandex.ru; <sup>2</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119121 Russia; <sup>3</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia). In this review we briefly describe recent knowledge of telomerase (predominately human telomerase) activity regulation mechanisms. We also point telomerase complex components localization in cells and discuss the enzyme activities that are independent of telomere elongation. The paper includes the overview of human diseases correlating with reduced telomerase activity, short telomeres and rapid telomeres shortening. We describe in details the possibilities of exogenous *hTERT* gene transcription activation by different natural and synthetic compounds as well as *hTERT* gene transfection effects. Such exogenous activation cause increasing proliferative potential of the cells and might be used in cell therapy. It must be noticed that elevated *hTERT* gene expression, especially in the case of *hTERT* gene transfection, might be the cause of cell malignesation. In this regard strict constraining criteria in medical application of different methods of telomerase activation must be developed.

**Keywords:** human telomerase, telomerase activators, *hTERT* gene.

DOI: 10.7868/S0026898413040071

### ВВЕДЕНИЕ

На концах хромосом всех эукариотических и некоторых прокариотических организмов с линейной ДНК расположены ДНК-белковые комплексы – теломеры. У позвоночных животных, в

том числе и у человека, теломеры имеют длину 2–30 т.п.н. и состоят из двухцепочечных гексануклеотидных повторов 5'-(TTAGGG)<sub>n</sub>-3', которые заканчиваются на 3'-конце одноцепочечной последовательностью из 50–300 н. [1, 2]. За каждый цикл репликации длина теломер уменьшается на

Принятые сокращения: TR – теломеразная РНК (telomerase RNA); HSP – белок теплового шока (Heat Shock Protein); siРНК – короткие интерферирующие РНК (short interfering RNA).

\*Эл. почта: vartala@yandex.ru

50–200 н., что ограничивает число репликаций, к которым способны те или иные клетки (“предел Хейфлика”) [3]. Некоторые клетки могут поддерживать длину теломер с помощью фермента теломеразы, активность которой увеличивает предел Хейфлика, а, следовательно, и пролиферативный потенциал клетки.

Теломераза – высокомолекулярный (около 1000 кДа у позвоночных) рибонуклеопротеидный комплекс – синтезирует теломерные повторы на концах линейных хромосом и поддерживает структуру теломер в клетках [4]. Для проявления ферментативной активности *in vitro* достаточно двух основных компонентов теломеразного комплекса: обратной транскриптазы (TERT, telomerase reverse transcriptase) и теломеразной РНК (TR, telomerase RNA), содержащей матричный участок для синтеза теломерных повторов. Активность фермента *in vivo* обеспечивают также многочисленные дополнительные компоненты теломеразного комплекса [5]. Так, белок дискерин (dyskerin, DKC1 – dyskeratosis congenita), участвующий во взаимодействии отдельных компонентов теломеразы и ДНК, обеспечивает локализацию TR и, возможно, всего теломеразного комплекса в тельцах Кахаля. Шапероны HSP90 (Heat Shock Protein 90), а именно: HSP90 $\alpha$ 1 [6] и белок P23, необходимы для присоединения TERT к другим компонентам комплекса и поддержания всей структуры теломеразы. Последний из главных компонентов теломеразы – ассоциированный с теломеразой белок TEP1 (telomerase-associated protein 1), как полагают, также обеспечивает правильную конформацию теломеразы, опосредуя взаимодействия между основными ее компонентами. На уровень теломеразной активности, безусловно, влияют также теломерные белки, или белки шелтеринового комплекса, которые участвуют в образовании и поддержании особой структуры концов теломеры – Т- и Д-петель, которые защищают хромосомы от распознавания системой репарации ДНК в качестве участка, содержащего повреждение. Белки шелтеринового комплекса участвуют в регуляции синтеза теломер теломеразой [7–11]. На уровень теломеразной активности влияет РНК, которая синтезируется на теломерных последовательностях (TERRA) [12], а также белки, вовлеченные в репликацию и осуществление других жизненно важных функций в клетке.

Функции каталитической субъединицы теломеразы – TERT – не ограничены удлинением теломер. Установлено, что hTERT (TERT человека) стабилизирует теломеры, вызывает усиление пролиферации клеток и повышение их жизнеспособности, участвует в регуляции экспрессии некоторых генов, а также в регуляции ответа на повреждение ДНК [13, 14]. В опытах *in vivo* показано,

что для синтеза первой цепи ДНК TERT может использовать различные РНК [15], как и для синтеза двухцепочечных РНК (дцРНК) [14], т.е. hTERT обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы и hTR-независимой обратной транскриптазы. Продуктами РНК-полимеразной активности являются дцРНК, в результате процессинга которых образуются малые интерферирующие РНК (siРНК), влияющие на транскрипционную активность генов-мишеней [14]. Митохондриальная hTERT использует в качестве матрицы РНК-компонент эндорибонуклеазы [14]. Ее активность не связана с удлинением теломер (мтДНК имеет кольцевую структуру и не содержит теломерных повторов). В митохондриях нет TR, но они содержат 10–20% клеточной hTERT, остальные 80–90% находятся в ядре. В hTERT обнаружены сигналы ядерной и митохондриальной локализации. Митохондриальная hTERT связана с ДНК и в обычных условиях защищает ее от воздействия различных повреждающих агентов [15]. Предполагается, что фермент может принимать участие в репарации повреждений мтДНК [15]. На внутриклеточное распределение и активность hTERT влияют специфические стимулы и посттрансляционная модификация (фосфорилирование и дефосфорилирование) [16, 17]. hTERT повышает устойчивость клеток к химиотерапевтическим средствам и проапоптотическим стимулам, блокируя, по-видимому, митохондриальный путь апоптоза [14, 18].

Таким образом, в TERT имеются структуры, ответственные за ее локализацию и такие функции, как синтез теломерной ДНК, синтез РНК на РНК-матрице, усиление клеточной пролиферации, подавление апоптоза, регуляция ответа на повреждение ДНК, увеличение срока жизни клетки. Механизмы, необходимые для выполнения отдельных функций, изучены не полностью. Особенно интересным представляется сопряжение пролиферативного эффекта с продолжительностью жизни клетки и энергообеспечением.

Регуляции уровня теломеразной активности посвящены многие экспериментальные работы и несколько обзоров [5, 19–21].

Активный теломеразный комплекс включает несколько белков, экспрессия генов которых контролируется на уровне транскрипции и эпигенетически. мРНК этих белков могут подвергаться альтернативному сплайсингу, а сами белки – посттрансляционным модификациям. Активность теломеразы зависит и от белков шелтеринового комплекса, например от танкиразы, и белков, участвующих в миграции теломеразы в определенные компартменты клетки. В свою очередь, синтез и активность этих белков также подвергаются регуляции. Однако для проявления теломеразной активности достаточно экспрессии гена

*TERT*. Особенно нужно отметить, что *TERT* модулирует экспрессию многих генов, контролирующих рост [22, 23].

В представленном обзоре мы попытались обобщить данные о возможности активации теломеразы (преимущественно теломеразы человека), а также биосинтеза отдельных компонентов теломеразного комплекса различными экзогенными соединениями.

### АКТИВНОСТЬ ТЕЛОМЕРАЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Теломеры укорачиваются при каждом цикле репликации. Укорачивание длины теломер до 5–8 т.п.н. вызывает переход клеток в состояние репликативного старения, при котором наблюдается замедление или полная остановка пролиферации, а активация теломеразы увеличивает продолжительность жизни клеток [24]. Нормальные клетки зародыша, эмбриональные и другие стволовые клетки, кроветворные клетки, активированные лимфоциты, клетки базального слоя кожи, волосяных фолликулов и тонкого кишечника способны поддерживать длину теломер с помощью теломеразы. В большинстве соматических клеток человека теломераза либо вовсе неактивна, либо имеет невысокую активность (в фибробластах, ткани молочной железы, в клетках печени) [4, 13]. Теломераза активна в 85–90% опухолевых клеток [25]. Из приведенных в обзоре [26] данных видно, что поиску специфических ингибиторов теломеразы и изучению их влияния на рост опухолевых клеток и выживаемость животных посвящены многие работы. Некоторые ингибиторы проходят доклинические и клинические испытания в качестве противоопухолевых средств [27, 28].

Преждевременное репликативное старение клеток может вызываться нарушениями в формировании активного теломеразного комплекса, в результате чего в соматических клетках, не обладающих теломеразной активностью, образуются короткие теломеры. Ускорение укорачивания теломер также может служить причиной развития некоторых патологических состояний.

Старение организма можно определить как серию возрастных физиологических изменений, которые снижают функциональные возможности организма. На молекулярном уровне старение связано со снижением активности хроматина и биосинтеза белков. Согласно одной из теорий, старение организма связывают со старением клеток и с функционированием системы теломеры–теломеразы [29]. К этому, вероятно, можно добавить значимость энергетического обеспечения клеток, т.е. состояния и количества митохондрий,

в регуляции функционирования которых участвует *TERT* [15].

Ускоренное старение как клеток, так и всего организма наблюдается при синдроме Вернера (Werner syndrome). Считается, что в основе патогенеза этого синдрома лежат нарушения гена АТФ-зависимой хеликазы – фермента, участвующего в репарации и репликации ДНК. Однако при синдроме Вернера происходит также ускорение укорачивания теломер [30, 31]. Другое редкое заболевание, связанное с преждевременным старением (замедление роста, болезни суставов, морщинистость кожи, раннее развитие атеросклероза и пр.) и сокращением продолжительности жизни – синдром Хатчинсона–Гилфорда (Hutchinson–Gilford syndrome). Теломеры в фибробластах таких больных более короткие, чем у здоровых лиц того же возраста [32]. При синдроме Дауна (Down's syndrome) также наблюдается раннее старение со всеми его характерными проявлениями, включая болезнь Альцгеймера, и ускорение укорачивания теломер в лимфоцитах [33]. Предполагается, что укороченные до критической длины теломеры вносят важный вклад в развитие некоторых форм апластической анемии [34] и анемии Фанкони (Fanconi's anemia) [35].

С недостаточной активностью теломеразы стволовых клеток связан ряд врожденных патологий. Дискератоз (dyskeratosis congenita) – наследственное заболевание кожи с пойкилодермией, лейкоплакией слизистой оболочки рта, дистрофией ногтей, ладонно-подошвенным гипергидрозом, закупоркой или атрезией слезно-носовых каналов и прогрессирующей апластической анемией. Различают X-сцепленную форму, при которой мутации в гене дискерина нарушают сборку теломеразного комплекса, и аутосомно-доминантную форму, обусловленную мутацией, затрагивающей H/ACA-домен hTR. Встречаются также мутации в гене *hTERT* [36, 37], которые приводят к снижению теломеразной активности в стволовых клетках и, как следствие, к появлению в соматических клетках укороченных теломер [38].

Укороченные теломеры обнаружены в лейкоцитах периферической крови больных гипертонией, при инсулинорезистентности, окислительном стрессе [39], а также у пожилых людей, особенно при риске хронической ишемии сердца [40], остеопорозе у женщин [41], длительном воздействии стресса и хронических инфекционных заболеваниях [42]. Способность иммунных клеток усиливать теломеразную активность подавляется гормоном стресса – кортизолом. Длительное поддержание высокого уровня этого гормона в крови истощает иммунную систему и повышает предрасположенность к различным заболеваниям.

ям [43]. Поскольку укороченные теломеры ассоциированы со старением, многими возрастными и другими патологиями, возможность увеличить теломеразную активность и, следовательно, длину теломер вызывает большой интерес [24, 42, 44].

### ЭНДОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Теломеразная активность зависит от количества фермента в клетке, что во многом определяется уровнем экспрессии генов, прежде всего генов коровых субъединиц теломеразы (*hTERT* и *hTR*), представленных в геноме человека только одной копией. Время полужизни *hTERT* (24 ч) гораздо короче, чем у *hTR* (5 дней) [19], которая находится в клетке и в отсутствие теломеразной активности [45]. Это, возможно, дает ядерной *hTR* конкурентные преимущества перед другими РНК и реализацию в ядре именно теломеразной активности *TERT*. Иначе говоря, разнообразные про-

явления активности *TERT* зависят, в первую очередь, от экспрессии гена *hTERT*. Показано также, что введение гена *hTERT* в клетки приводит к появлению в них теломеразной активности и обеспечивает выполнение других функций *TERT*.

В регуляции экспрессии гена *hTERT* участвуют многие факторы транскрипции (таблица). Некоторые факторы, стимулирующие экспрессию *hTERT*, могут активировать онкогены. Например, фактор *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription), который фосфорилируется киназами *Src* и *Jak*, при взаимодействии мембранных рецепторов с факторами роста и цитокинами активирует непосредственно *hTERT* в нормальных и опухолевых клетках, причем *STAT3* может активировать и онкогены [46]. Амплификация хромосомного локуса, который кодирует *hTERT* или *hTR*, коррелирует с повышением уровня активного фермента в клетках и их онкотрансформацией [47, 48].

Регуляция экспрессии гена *hTERT* и активности теломеразы\*

Позитивная регуляция	Негативная регуляция
Транскрипционный и посттранскрипционный уровень	
<p>Фактор транскрипции <i>Sp1</i> взаимодействует с пятью GC-боксами в промоторе <i>hTERT</i></p> <p>Продукт онкогена <i>c-Myc</i> (гомолог онкогена <i>v-myc</i> вируса миелоцитоматоза) взаимодействует с E-боксами промотора <i>hTERT</i> – CACGTC</p> <p>ER (рецептор эстрогенов) <math>\alpha</math> и <math>\beta</math></p> <p>NF-<math>\kappa</math>B (ядерный фактор <math>\kappa</math>B) трансактивирует <i>hTERT</i></p> <p>USF (вышележащий стимулирующий фактор) 1 и 2 взаимодействует с E-боксами в промоторе <i>hTERT</i></p> <p>E6 (белок E6 папилломавируса человека типа 16) активирует <i>hTERT</i> через E-боксы и GC-боксы промотора</p> <p>LANA (ассоциированный с латентностью ядерный антиген герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши) активирует <i>hTERT</i> при взаимодействии с <i>SP1</i> в промоторе</p> <p><i>STAT3</i> (переносчик сигнала и активатор транскрипции) активирует экспрессию гена <i>hTERT</i> при взаимодействии с консенсусной последовательностью в его промоторе TTCNNNGAAA (три сайта), опосредует влияние факторов роста, цитокинов (интерлейкинов 6 и 2), онкогенов</p> <p>Метилирование промотора <i>hTERT</i> на участке –441...–218.</p> <p>Метилирование экзона 1</p>	<p>Опухолевый супрессор <i>WT1</i> (взаимодействует с промотором гена <i>hTERT</i>)</p> <p>Фактор <i>CTCF</i> (взаимодействует с экзонами 1 и 2 гена <i>hTERT</i>)</p> <p>Метилирование ДНК в области кор-промотора <i>hTERT</i></p> <p>Антисмысловая РНК <i>TERRA</i> (содержит теломерные и субтеломерные последовательности, ингибирует РНК-компонент теломеразы)</p> <p>Альтернативный транскрипт <i>hTERT<math>\alpha</math></i> (трансляция с этой мРНК приводит к образованию белка со сниженной активностью)</p>
Посттрансляционный уровень	
<p>Киназа <i>Akt</i> (фосфорилирование повышает активность теломеразы)</p> <p>Белок <i>TSCA1</i> (осуществляет перенос РНК-компонента теломеразы в ядро)</p> <p>Белок <i>TRP1</i> (предположительно участвует в доставке теломеразы к теломерам и увеличивает процессивность теломеразы)</p>	<p>Киназа <i>c-Ab1</i> (фосфорилирование приводит к трехкратному снижению активности)</p> <p>Убиквитинирование с помощью <i>MKRN1</i> приводит к деградации теломеразы</p> <p>Взаимодействие <i>CHIP</i> (C-концевой домен белка, взаимодействующего с <i>Hsc70</i>) с теломеразой вызывает ее полиубиквитинирование</p>

\* Использованы данные [5, 19, 21, 46, 50–53].

Активировать экспрессию гена *hTERT* могут природные регуляторные пептиды, например комплекс пептидов эпифиза [49].

Известно, что метилирование ДНК приводит к снижению экспрессии генов [54]. Однако влияние этой эпигенетической модификации на транскрипцию гена *hTERT* неоднозначно и зависит от расположения сайтов метилирования. Так, не выявлено взаимосвязи между степенью метилирования участка размером 550 п.н. гена *hTERT* (–500...+50) и уровнем экспрессии этого гена [55]. Гиперметилирование участка –441...–218 в промоторе гена *hTERT* обнаружено во всех клеточных линиях, обладающих теломеразной активностью, а во всех негативных по теломеразе образцах отмечено гипометилирование этого участка [50]. Причины этого явления не установлены. Позднее показали, что ген *hTERT* успешно экспрессируется, если область его кор-промотора остается неметилированной. Эта область представляет собой участок гена *hTERT* (–160...–80), содержащий три из четырех сайтов связывания фактора Sp1 – активатора транскрипции гена *hTERT* [19, 51]. Экспрессия гена *hTERT* зависит от метилирования не только его промоторной области, но и кодирующих последовательностей. Экзоны 1 и 2 этого гена содержат сайты связывания ингибитора CTCF [52]. Если эти последовательности метилированы, то связывание ингибитора происходит с очень низкой эффективностью. Если же ДНК в районе сайтов связывания гипометилирована, то фактор CTCF взаимодействует с геном *hTERT*, что приводит к подавлению транскрипции [51].

мРНК *hTERT* подвергается тканеспецифичному сплайсингу. Всего идентифицировано около 10 вариантов сплайсинга мРНК *hTERT*. Наиболее часто встречаются варианты  $\alpha$  (делеция 36 п.н. в экзоне 6) и  $\beta$  (делеция 182 п.н. в экзонах 7 и 8, инсерция 36 п.н.), причем активный фермент кодируется полноразмерным транскриптом. Некоторые варианты мРНК *hTERT* также транслируются, но при этом синтезируются белки, обладающие меньшей каталитической активностью. Варианты сплайсинга  $\alpha$  и  $\beta$  выполняют, вероятно, регуляторные функции, они ингибируют активность теломеразы при ее повышенной экспрессии в нормальных и опухолевых клетках, по-видимому, поддерживают длину теломер, а также осуществляют и иные функции, присущие *hTERT*. На экспрессию гена *hTERT* влияют трансформирующий фактор  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) и с-Мус, который стабилизирует  $\beta$ -вариант сплайсинга. Более подробно сплайсинг мРНК *hTERT* обсуждается в обзоре [53].

Экспорт теломеразы из клеточного ядра приводит к снижению в нем теломеразной активности. Этому противодействует тирозинфосфатаза Shp2, способствующая тем самым продлению жиз-

ни клетки. В цитоплазме Shp2 участвует в модуляции клеточного роста, развития, тканевого воспаления, хемотаксиса. В ядре тирозинфосфатаза ассоциирована с активатором транскрипции белком STAT5. Таким же способом Shp2 затрудняет выход *hTERT* из митохондрий и замедляет старение, индуцируемое активными формами кислорода [56]. В условиях окислительного стресса содержание *hTERT* в митохондриях возрастает [13, 15]. В отсутствие теломеразы структура митохондрий нарушается, а содержание свободных радикалов в них увеличивается [15]. Предполагается, что теломераза участвует в регуляции числа митохондрий в клетке. В обычных условиях фермент защищает мтДНК от повреждений и тем самым поддерживает стабильное количество органелл в клетке. В условиях окислительного стресса митохондрии с поврежденной ДНК подвергаются деградациии [57].

На локализацию теломеразы оказывает влияние полифункциональный белок нуклеолин, основная функция которого состоит в регуляции транскрипции рибосомной ДНК. Нуклеолин участвует также в созревании рибосом и транспорте компонентов рибосомы из ядра в цитоплазму [58]. Этот фосфопротеин связывает весь теломеразный комплекс посредством белок-белковых и РНК-белковых взаимодействий. В нормальных фибробластах теломераза вместе с нуклеолином локализуется в ядрышке [59]. Функции, структура и посттрансляционные модификации нуклеолина подробно рассмотрены в обзоре [58]. Приведены данные о том, что в ядре нуклеолин участвует в регуляции клеточного цикла и транскрипции многих генов, в стабилизации теломер (путем связывания с одноцепочечными G-богатыми участками), а также в репликативном старении клеток. Вне ядра этот белок способен взаимодействовать со многими белками. Он регулирует активность факторов транскрипции и протеинкиназ, влияя таким образом на пролиферацию клеток. В гликозилированном состоянии нуклеолин образует кластеры на поверхности клеток и выполняет рецепторные функции. С его участием происходит передача сигналов факторов роста и цитокинов, а также эндоцитоз вирусных белков [59].

Среди белков шелтеринового комплекса с активностью теломеразы наиболее тесно связана танкираза – поли(ADP-рибозо)полимераза. Удлинение теломер, катализируемое теломеразой, ингибируется белком TRF1, связывающим теломерные повторы (telomere repeat binding factor 1). Танкираза 1 (TNKS1) поли(ADP)-рибозилирует TRF1, что приводит к отделению этого белка от теломер, которые становятся доступными для взаимодействия с теломеразой. В свою очередь, функция TNKS1 регулируется путем фосфорилирования polo-подобной киназой 1 (Polo-like kinase 1 – Plk1)

[60]. Отмечается прямая корреляционная связь между экспрессией генов *TNKS1* и *hTERT*, при этом уровень экспрессии обоих генов увеличен при раке [61]. Накоплены доказательства в пользу того, что во многих клетках *TNKS1* (и, вероятно, *TNKS2*) является основным компонентом сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин [62, 63]. Ингибирование *TNKS1* ускоряет укорачивание теломер, вызванное подавлением теломеразной активности. Все это позволяет предполагать, что при онкологических заболеваниях наиболее успешной будет комбинированная терапия, направленная на ингибирование активности обоих ферментов [64]. Танкиразы 1 и 2 – ферменты, участвующие в посттрансляционной модификации. Танкиразы могут взаимодействовать с различными белками, влияя на протекающие в клетке процессы, в том числе на перемещение рецептора GLUT-4, что отражается на стимулируемом инсулином поглощении глюкозы клетками, т.е. на энергетическом метаболизме. Танкиразы 1 и 2, вероятно, взаимозаменяемы в случае взаимодействия с TRF1 и IRAP (insulin-responsive aminopeptidase) [65]. Однако наличие у *TNKS1* некоторых структурных особенностей позволяет специфически влиять (например, ингибировать) именно на этот фермент [66]. Таким образом, танкираза как сама по себе, так и вместе с теломеразой может служить мишенью для противоопухолевой терапии. Увеличение теломеразной активности и параллельное повышение уровня танкиразы с ее разнообразными эффектами, особенно на энергетический метаболизм, и приводит, возможно, к “улучшению качества жизни” клетки, о чем будет сказано далее.

Некоторые особенности метаболизма, потенциальные факторы риска развития опухолевых заболеваний способствуют активации теломеразы или стимулируют ее биосинтез. Белок лептин и его мембранные рецепторы играют центральную роль в регуляции массы тела, а экспрессия гена лептина коррелирует с экспрессией *hTERT*. Сигналы лептина передаются преимущественно через JAK/STAT (Janus-activated Kinase/signal transducers and activators of transcription), что приводит к повышению экспрессии гена *hTERT* и продукции таких важных регуляторов клеточного цикла и выживаемости клеток, как циклин D1, c-Мус и сурвивин. В опосредуемой лептином регуляции экспрессии *hTERT* участвуют также Мус/Max/Mad, что в ряде случаев связано с ацетилированием гистонов в проксимальном участке промотора гена *hTERT* [67].

Холестерин (в составе липопротеинов) и его специфический поверхностный рецептор –  $C_k$  – вовлечен в регуляцию транскрипции *hTERT* в мононуклеарных клетках периферической крови

человека. Активация этого рецептора приводит к подавлению экспрессии гена *hTERT* в результате репрессии генов *c-Myc* и *PPAR $\gamma$*  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ), кодирующего фактор транскрипции, вовлеченный в регуляцию адипогенеза, гомеостаза глюкозы, а также клеточной дифференцировки и пролиферации, экспрессии многих генов, связанных с канцерогенезом [68, 69]. Следовательно, существует обратная связь между активированным рецептором холестерина и экспрессией гена *hTERT* [68].

Таким образом, на экспрессию *hTERT* влияют определенные метаболиты, причем преимущественно энергетического и липидного обмена.

Возможно, существуют не только общие, но и тканеспецифичные механизмы активации экспрессии гена *hTERT*. Например, в CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах аденозиндезаминаза повышает экспрессию генов *CD28* и *hTERT*, а аденозин, напротив, стимулирует снижение содержания CD28, падение уровня теломеразы и ускорение клеточного старения [70].

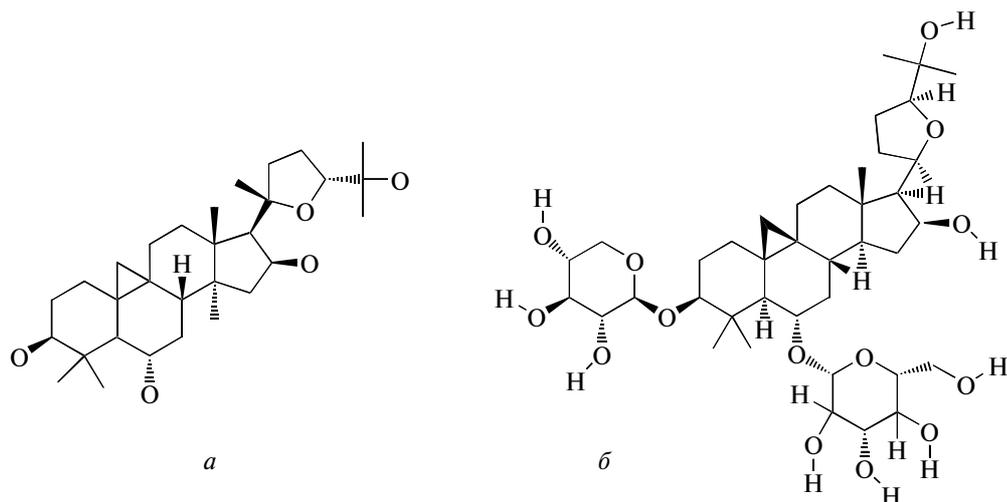
Предполагается, что активировать теломеразу и ее каталитическую субъединицу, обладающую значимыми самостоятельными биологическими активностями, можно воздействуя на экспрессию гена *hTERT* и формирование ферментативных комплексов, а также на локализацию TERT и ее взаимодействие с другими компонентами клетки.

### ПОВЫШЕНИЕ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Установлено, что фитогормоны обладают способностью стимулировать теломеразную активность. Ауксин (индолилуксусная кислота) индуцирует теломеразную активность в тех органах растений, где она обычно отсутствует. Способность к индукции связана с модификацией ауксином белка, регулирующего транскрипцию гена *TERT* [71].

На уровень теломеразной активности у человека влияет синтетический пептид эпیتالон (Ala-Glu-Asp-Gly), первичная структура которого соответствует структуре пептидов эпифиза. Этот пептид связывается с промотором гена *hTERT* [49]. Эпیتالон активировал ген *hTERT* в культивируемых фетальных фибробластах человека, в которых этот ген обычно не экспрессируется. В клетках, обработанных эпیتالоном, длина теломер увеличена приблизительно на 33%. Такие клетки способны к более длительной пролиферации, превышающей предел Хейфлика, без проявлений признаков онкотрансформации [72, 73].

В результате эмпирического скрининга активаторов теломеразы обнаружили, что подобной активностью обладает циклоастрогенол (cycloas-



Циклоастратегенол (а) и астрагалозид IV (б).

tragenol-CAG, TAT-2), выделенный из растения *Astragalus membranaceus*, применяемого в китайской медицине. TAT-2 является агликоном, производным астрагалозида IV (рисунок), он быстро проникает в клетки путем пассивной диффузии, как показано на культивируемых клетках. В микросомах печени крыс и человека TAT-2 подвергается моногидроксилированию и окислению, а продукты окисления гидроксилируются. После инкубации с микросомами в течение 30 мин неметаболизированным остается лишь 10–20% TAT-2 [74].

Известно, что в процессе иммунного ответа в Т- и В-лимфоцитах возрастает теломеразная активность [75, 76]. Оказалось, что активатор TAT-2 может замедлять укорачивание теломер, повышать репликативный потенциал и иммунные функции CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов: продукцию цитокинов и хемокинов, противовирусную активность. Такое действие особенно выражено в случае CD8<sup>+</sup>Т-клеток, полученных от HIV-инфицированных индивидов. Известно, что Т-лимфоциты HIV-инфицированных теряют способность к пролиферации, и связано это именно с активностью теломеразы, так как конкурентный ингибитор теломеразы GRN163L, последовательность нуклеотидов которого комплементарна матричному участку hTR, препятствует эффектам TAT-2 [77]. Оказалось, что TAT-2 повышает экспрессию гена *hTERT* с использованием сигнального пути MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase). TAT-2 влияет также на посттрансляционное фосфорилирование hTERT, которое активирует фермент [77].

Интересно, что стабилизация длины теломер, повышение пролиферативного потенциала, увеличение теломеразной и противовирусной актив-

ности наблюдалось также при трансдукции гена *hTERT* в Т-лимфоциты HIV-инфицированных индивидов [78].

Выделено также несколько аналогов циклоастратегенола. Показано, что астрагалозид IV оказывает положительное действие при ишемии головного мозга и сердца крыс [79], регулирует уровень глюкозы в крови [80], проявляет кардиопротекторную активность [81], однако не известно, как эти факторы связаны с активацией теломеразы.

TA-65<sup>®</sup> – активатор теломеразы, также выделенный из растения *A. membranaceus*, индуцирует экспрессию гена *hTERT*, дозозависимо увеличивает теломеразную активность и длину теломер в неонатальных кератиноцитах и фибробластах человека [82]. TA-65<sup>®</sup> способен увеличивать среднюю длину теломер и уменьшать долю критически коротких теломер и повреждений ДНК в фибробластах мыши. TA-65<sup>®</sup> не повышает теломеразную активность и не удлиняет теломеры в фибробластах мышей с нокаутом гена *mTERT*. У мышей, получавших TA-65<sup>®</sup>, улучшалось состояние кожи и костей, возросла толерантность к глюкозе. Частота злокачественных заболеваний при этом не возрастала [83]. У людей, принимавших TA-65<sup>®</sup> (10–50 мг ежедневно в течение 3–6 мес) и наблюдавшихся в течение года, улучшались показатели иммунной системы: уменьшалось количество стареющих цитотоксических (CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup>) Т-лимфоцитов и натуральных киллерных клеток, значительно меньше стало клеток с короткими теломерами, хотя средняя длина теломер не изменилась. Более выраженные изменения отмечены у серопозитивных в отношении цитомегаловирусов индивидов. Негативных изменений выявлено не было. Предполагается проведение контро-

лируемых рандомизированных испытаний, направленных на оценку специфичности действия ТА-65 на человека [82].

Генистеин — изофлавоон, выделенный из сои, лугового клевера и других растений, обладает фитостероидной активностью. Генистеин регулирует транскрипцию гена *hTERT* [84]. На клетках рака предстательной железы показано, что в низких концентрациях генистеин повышает теломеразную активность, а в высоких — подавляет ее.

Ресвератрол, которым богат красный виноград и ряд других растений, относится к фитоалексинам, веществам фенольной природы, защищающим растения от грибной инфекции. Ресвератрол влияет на посттрансляционную модификацию и локализацию теломеразы, ингибирует фермент в опухолевых клетках и увеличивает его активность в предшественниках эпителиальных и эндотелиальных клеток [85–87].

Препараты из группы статинов, применяемые для снижения уровня холестерина при атеросклерозе, замедляли укорачивание теломер в лейкоцитах периферической крови больных, активность теломеразы при этом не изучали [88].

Таким образом, влияние на теломеразную активность может зависеть как от дозы вещества, так и от направления и стадии дифференцировки клеток. Можно согласиться с авторами обзора [89], что, вероятно, существует возможность регуляции теломеразной активности при помощи лекарственных средств, однако очень многое еще предстоит выяснить.

### ТРАНСДУКЦИЯ ГЕНА *hTERT*

Перед клеточной терапией стоят задачи повышения способности тканей к регенерации, а также получения необходимого количества клеток нужного фенотипа для замещения поврежденных клеток и клеток-переносчиков для направленной доставки нужных генов. Большие надежды связывают с использованием веществ, стимулирующих теломеразную активность, либо с трансфекцией каталитической субъединицы теломеразы.

Мезенхимные стволовые клетки человека (hMSC) обладают способностью к остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировке при определенных условиях *in vivo* и *in vitro*. Однако в костном мозге, обычном источнике hMSC, их содержание не превышает 0.01%, а выращиванию в культуре мешает репликативное старение с падением теломеразной активности [90, 91]. У культивируемых hMSC предел Хейфлика равен 40 удвоениям, далее клетки теряют пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке [92, 93]. Трансфекция гена *hTERT* с помощью ретровирусного вектора в ряде случаев приводила не

только к желаемому росту клеток, но и к их онкотрансформации [94]. Однако в некоторых случаях удавалось сохранять исходный фенотип клеток при трансфекции гена *hTERT* в составе ретровирусного вектора и при длительном культивировании [95]. Успешным оказалось использование лентивирусного вектора. Получен клон hMSC, в котором в течение длительного времени сохранялась экспрессия генов-супрессоров (т.е. исходный фенотип) и способность к последующей дифференцировке, как и у исходных клеток [94]. В другом опыте иммортализованные MSC, существовавшие в культуре в течение 6 нед и более, сохраняли первичный фенотип (CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, SH2<sup>+</sup>(CD105), SH3<sup>+</sup>(CD73). Внутривенное введение таких клеток животным с ишемическими повреждениями головного и спинного мозга оказывало терапевтический эффект [96]. Многие клетки, как известно, отвечают на трансфекцию гена *hTERT* повышением репликативного потенциала, способности к дифференцировке и резистентности к повреждающим воздействиям (остеобласты, нейроны и их предшественники, эпителиальные клетки, хондроциты, клетки коры надпочечников, кератиноциты, пигментный эпителий сетчатки глаза, фибробласты, кардиомиоциты, цитотоксические Т-лимфоциты, гемопоэтические стволовые клетки, гепатоциты, холангиоциты, скелетные миоциты и др.) [42].

В hMSC, экспрессирующих ген *hTERT* в составе ретровирусного вектора, выявлено 20 белков, содержание которых отличалось от содержания в исходных hMSC на определенных стадиях роста (прошедших определенное число удвоений популяции). Экспрессия генов большей части этих белков также изменялась. Изменения затрагивали белки, выполняющие различные функции: Са-связывающие, структурные белки, шапероны, участвующие в фолдинге других белков, антиоксидантные белки, белки, связанные с транскрипцией, трансляцией, метаболизмом, образованием энергии и с трансдукцией сигнала [97].

Можно отметить некоторые особенности, наблюдаемые в ряде случаев при трансдукции гена *hTERT*.

Иммортализация глиальных клеток обонятельной луковицы человека достигалась путем трансфекции генов *BMI1* (polycomb ring finger oncogene) и *hTERT*. Популяция клеток, трансфицированных геном *TERT*, была менее однородной со значительным количеством стареющих и покоящихся клеток, тогда как клетки, трансфицированные одновременно генами *BMI1* и *hTERT*, сохраняли исходный кариотип, генетическую стабильность и уровень маркеров клеточного старения (т.е. пролиферативный потенциал) даже после 300 дней культивирования [98].

Иммортализованные геном *hTERT* клетки коры надпочечников оказались пригодными для проведения заместительной терапии адреналэктомированным мышам с иммунодефицитом. Трансфекция только гена *hTERT* не сопровождалась опухолевой трансформацией и увеличением экспрессии онкогенов, но приводила к изменению активности других генов, а клетки становились более устойчивыми к различным воздействиям [99].

Введение гена *hTERT* в культивируемые нормальные фибробласты легкого и клетки НерG2 оказывало терапевтический эффект и предупреждало острое повреждение клеток такими токсичными веществами, как четыреххлористый углерод, *D*-галактозамин и др. [100].

Ген *hTERT*, кодирующий активную и неактивную (мутантную) каталитическую субъединицу теломеразы человека, вводили мышам. Оказалось, что у животных, содержащих активную TERT, увеличилась продолжительность жизни. Усиление пролиферации наблюдали в опытах с культивируемыми кардиомиоцитами, трансфицированными активной TERT [101]. Согласно некоторым сообщениям, в клетках, не обладающих теломеразной активностью, *hTERT* вовлечена в ответ на двухцепочечные разрывы ДНК [102]. Показано, что продукция TERT усиливала рост клеток и их пролиферацию независимо от элонгации теломер [103]. Следует отметить, что многие представления о разнообразных функциях каталитической субъединицы теломеразы появились благодаря экспериментам, в которых клетки трансфицировали геном *TERT* либо использовали трансгенных животных. У трансгенных мышей при сверхпродукции *mTERT* возникали опухоли молочной железы – интраэпителиальные неоплазии, переходящие в дальнейшем в инвазивный рак [104], что явно связано не с удлинением теломер. У мышей теломеры длиннее, чем у человека [105], поэтому после генетической инактивации теломеразы могут нормально существовать четыре поколения потомков этих мышей [106]. Кроме того, нормальные соматические клетки мышей содержат активную теломеразу [107]. Показано, что каталитическая субъединица *mTERT* активирует экспрессию генов, вовлеченных в сигнальный путь Wnt, и таким образом влияет на пролиферацию клеток [108, 109].

Возможно, что TERT влияет на клеточную пролиферацию при помощи другого механизма. Например, трансдукция *hTERT* вызывает увеличение пролиферации эпителиальных клеток молочной железы человека (НМЕС), изменяя уровень таких регуляторных белков, как циклин D1, A2, E2F, pRB, причем для этого необходим неповрежденный каталитический домен TERT [14].

Малигнизацию клеток можно объяснить увеличением дозы экспрессируемого гена и эктопической экспрессией гена *mTERT*. Предполагается, что TERT может стимулировать рост опухолевых стволовых клеток, и эта функция не зависит от функции поддержания теломер [110]. Пролиферацию стволовых клеток и их малигнизацию при сверхпродукции TERT, по-видимому, можно объяснить взаимодействием TERT с фактором транскрипции BRG1, в результате которого ремодулируется связывание  $\beta$ -катенина и включается Wnt-сигнализация, характерная для стволовых и опухолевых клеток [111]. Кроме того, TERT, предположительно, взаимодействует с тем же промоторным элементом, что и BRG1 и активирует сигнальный путь Wnt [108, 109].

Таким образом, активация теломеразы в различных клетках при трансдукции гена *TERT* приводит к противоречивым результатам. Эти противоречия сохраняются даже в практически идентичных опытах, в которых в разных тканях трансгенных мышей постоянно экспрессируется экзогенный ген *TERT*. В одних работах [112] у таких мышей наблюдали развитие почечной патологии, связанной с усилением пролиферации почечных подоцитов и активацией Wnt-сигнализации, что не зависело от удлинения теломер. В других работах не обнаруживали почечной (и какой-либо другой) патологии, а TERT влияла на увеличение продолжительности жизни животных, их здоровье и омоложение [113]. Эти эффекты были связаны с удлинением теломер в результате экспрессии *TERT*.

Распространяются ли выводы о практически непосредственном участии теломеразы (TERT) в малигнизации на ситуации, когда доза экспрессируемого гена не превышена, и экспрессия гена контролируется обычными клеточными механизмами, еще предстоит выяснить. От этих выводов и конкретных условий, которые позволили бы избежать малигнизации клеток при активации теломеразы, зависит возможность использования теломеразы в клинических целях.

Результаты опытов по переносу *hTERT* в разные клетки и опытов, проведенных на трансгенных животных, позволяют сделать некоторые выводы:

1) в настоящее время используются разные способы трансдукции *hTERT*, и каждый эксперимент уникален;

2) путем трансдукции удастся вызвать появление или увеличение теломеразной активности в клетках с различным фенотипом, повысить их пролиферативный потенциал и устойчивость к повреждающим воздействиям;

3) путем трансдукции *TERT* достигается им-мортализация и пролиферация клеток, что в ряде случаев способствует их малигнизации. Это ставит под вопрос возможность использования таких клеток для регенерации (т.е. клеточной терапии) *in vivo*. Возможно, исключение представляют случаи иммунной реакции на белки векторных вирусов, приводящие к элиминации иммортализованных клеток;

4) транскрипция гена *hTERT*, а также кодируемая им каталитическая субъединица теломеразы влияют как на содержание и активность компонентов теломеразного комплекса, так и на экспрессию многих генов;

5) эктопическая экспрессия *TERT* может вызывать изменение в распределении белка в клетке и в иерархии регуляторных влияний на функции каталитической субъединицы.

Известно, что для ингибирования активности теломеразы достаточно исключить из теломеразного комплекса один из его компонентов, например HSP90 [28], тогда как при активации экспрессии одного гена *hTERT* возможна реактивация всего комплекса. Согласно более ранним [114–116] и последним данным [14], именно *hTERT* оказывает антиапоптотическое действие и повышает выживаемость клеток даже в отсутствие теломеразной активности. Белок *hTERT* способен стимулировать экспрессию не только компонентов теломеразного комплекса, но и других генов. Механизмы влияния экспрессии гена *hTERT* на активность других генов изучены недостаточно. Модуляция клеточной пролиферации опосредуется, вероятно, также малыми интерферирующими РНК, производными продуктов РНК-зависимой РНК-полимеразной активности *TERT*.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первоначально казалось, что действие ингибиторов теломеразной активности, независимо от их механизма, приводит к одному и тому же результату – укорачиванию теломер и последующей гибели клеток. Предполагается, что способность укорачивать теломеры, в первую очередь, можно использовать в терапии опухолей. Применению ингибиторов теломеразной активности должно предшествовать изучение их физико-химических свойств и специфичности действия, так как наиболее специфичные соединения будут, по-видимому, и менее токсичными.

Вполне вероятной представляется возможность неоднозначного ответа клеток на применение активаторов теломеразы. Различия в клеточном ответе могут быть связаны с тем, что разные клетки или обладают разными регуляторными механизмами поддержания способности к проли-

ферации в зависимости от типа и степени дифференцировки, или способны активировать такие механизмы. Особенно серьезные опасения возникают при трансдукции гена *hTERT*, прежде всего, потому, что экспрессия этого гена способна усиливать экспрессию других генов, участвующих в пролиферации клетки, а также, предположительно, “молчащего” гена *hTERT* клетки-хозяина. Таким образом, увеличение дозы этого гена может создать предпосылки для малигнизации. Необходимость в выработке строгих и надежных критериев безопасности применения активаторов теломеразы и трансдукции гена *hTERT* нуждается, по-видимому, в широком обсуждении.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., et al. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. **97** (4), 503–514.
2. Blachburn E.H. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature*. **350**, 569–573.
3. Hayflick L. 1976. The cell biology of human aging. *N. Engl. J. Med.* **295**, 1302–1308.
4. Masutomi K., Yu E.Y., Khurts S., et al. 2003. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*. **114** (2), 241–253.
5. Зверева М.Э., Щербакова Д.М., Донцова О.А. 2010. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности. *Успехи биол. химии*. **50**, 155–202.
6. Жданов Д.Д., Коваленко Н.А., Хоробрых Т.В. и др. 2009. Теломеразная активность и ее связь с экспрессией транскрипционных вариантов гена *HSP90α* и гена каталитической субъединицы теломеразы при опухолевых заболеваниях желудка и кишечника. *Молекуляр. медицина*. **6**, 37–41.
7. Robart A.R., Collins K. 2010. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using disease-linked subunit variants. *J. Biol. Chem.* **285**, 4375–4386.
8. De Boeck G., Forsyth R.G., Praet M., et al. 2009. Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J. Pathol.* **217**, 327–344.
9. De Lange T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100–2110.
10. Loayza D., De Lange T. 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*. **423**, 1013–1018.
11. Smogorzewska A., van Steensel B., Bianchi A., et al. 2000. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1659–1668.
12. Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoriauli L., et al. 2007. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*. **318**, 798–801.

13. Bollman F.M. 2008. The many faces of telomerase: merging extratelomeric effects. *Bio Essays* **30**, 728–732.
14. Mukherjee S., Firpo E.J., Wang Y., et al. 2011. Separation of telomerase function by reverse genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, E1363–E1371.
15. Sharma N.K., Reyes A., Green P., et al. 2012. Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria. *Nucl. Acids Res.* **40** (2), 712–725.
16. Ram R., Uziel O., Eldan O., et al. 2009. Ionizing radiation up-regulates telomerase activity in cancer cell lines by post-translational mechanism via ras/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Clin. Cancer Res.* **15** (3), 914–923.
17. Büchner N., Zschauer T.-C., Lukosz M., Altschmied J., Haendeler J. 2010. Downregulation of mitochondrial telomerase reverse transcriptase induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is Src kinase dependent. *Exp. Gerontol.* **45** (7–8), 558–562.
18. Lee J., Sung Y.H., Cheong C., Choi Y.S., Jeon H.K., Sun W., et al. 2008. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene*. **27**, 3754–3760.
19. Cifuentes-Rojas C., Shippen D.E. 2012. Telomerase regulation. *Mutat. Res.* **730**, 20–27.
20. Cairney C.J., Keith W.N. 2008. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochemie.* **90**, 13–23.
21. Kyo S., Takakura M., Fujiwara T., Inoue M. 2008. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci.* **99**, 1528–1538.
22. Zhu J., Zhao Y., Wang S. 2010. Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. *Protein Cell.* **1**, 22–32.
23. Smith L.L., Collier H.A., Roberts J.M. 2003. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 474–479.
24. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., et al. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. **279**, 349–352.
25. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., et al. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. **266**, 2011–2015.
26. Жданов Д.Д., Орлова Е.В. 2011. Ингибиторы функций теломер и теломеразы. *Молекуляр. медицина.* № 2, 3–17.
27. El-Daly H., Kull M., Zimmermann S., et al. 2005. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. *Blood*. **105**, 1742–1749.
28. Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Voutsinas G.E. 2007. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex. *Curr. Med. Chem.* **14**, 3122–3138.
29. Ahmed A., Tollefsbol T. 2001. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J. Am. Geriatrics Soc.* **49** (8), 1105–1109.
30. Crabbe L., Jauch A., Naeger C.M., et al. 2007. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104** (7), 2205–2210.
31. Crabbe L., Verdun R.E., Haggblom C.I., Karlseder J. 2004. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science*. **306** (5703), 1951–1953.
32. Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., et al. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89** (21), 10114–10118.
33. Vaziri H., Schächter F., Uchida I., et al. 1993. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **52** (4), 661–667.
34. Marrone A., Stevens D., Vulliamy T., et al. 2004. Heterozygous telomerase RNA mutations found in dyskeratosis congenita and aplastic anemia reduce telomerase activity via haploinsufficiency. *Blood*. **104** (13), 3936–3942.
35. Franco S., van de Vrugt H.J., Fernández P., et al. 2004. Telomere dynamics in Fancg-deficient mouse and human cells. *Blood*. **104** (13), 3927–3935.
36. Nelson N.D., Bertuch A.A. 2012. Dyskeratosis congenita as a disorder of telomere maintenance. *Mutat. Res.* **730** (1–2), 43–51.
37. Armanios M., Chen J.L., Chang Y.P., et al. 2005. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenital. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102** (44), 15960–15964.
38. Marrone A., Dokal I. 2004. Dyskeratosis congenita: molecular insights into telomerase function, ageing and cancer. *Exper. Rev. Mol. Med.* **6** (26), 1–23.
39. Demissie S., Levi D., Bendjamine E.J., et al. 2006. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham heart study. *Aging. Cell.* **5**, 325–330.
40. Starr J.M., McGurn B., Harris S.E., et al. 2007. Association between telomere length and heart disease in a narrow age cohort of older people. *Exp. Gerontol.* **42**, 571–573.
41. Valdes A.M., Richards J.B., Gardner J.P., et al. 2007. Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis. *Osteoporos. Int.* **18**, 1203–1210.
42. Harley C.B. 2005. Telomerase therapeutics for degenerative diseases. *Curr. Mol. Med.* **5**, 205–211.
43. Valenzuela H.F., Effros R.B. 2002. Divergent telomerase patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin. Immunol.* **105**, 117–125.
44. Harley C.B. 2002. Telomerase is not an oncogene. *Oncogene*. **21**, 494–502.

45. Natarajan S., Chen Z., Wancewicz E.V., et al. 2004. Telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and telomerase RNA (hTR) as targets for downregulation of telomerase activity. *Oligonucleotides*. **14**, 263–273.
46. Konnikova L., Simeone M.C., Kruger M.M., et al. 2005. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res*. **65**, 6516–6520.
47. Soder A.I., Hoare S.F., Muir S., et al. 1997. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene*. **14**, 1013–1021.
48. Saretzki G., Petersen S., Petersen I., et al. 2002. *hTERT* gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett*. **176**, 81–91.
49. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К., Чернова А.А. 2003. Влияние регуляторных пептидов на транскрипцию генов. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **136** (9), 328–330.
50. Guilleret I., Yan P., Grange F., et al. 2002. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int. J. Cancer*. **101**, 335–341.
51. Renaud S., Loukinov D., Abdullaev Z., et al. 2007. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucl. Acids Res*. **35** (4), 1245–1256.
52. Renaud S., Loukinov D., Bosman F.T., et al. 2005. CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucl. Acids Res*. **33**, 6850–6860.
53. Wojtyla A., Gladych M., Rubis B. 2011. Human telomerase activity regulation. *Mol. Biol. Rep.* **38** (5), 3339–3349.
54. Прохорчук А.В., Рузов А.С. 2000. Метилирование генома и его роль в функционировании эукариотического организма. *Генетика*. **36** (11), 1475–1486.
55. Devereux T.R., Horikawa I., Anna C.H., et al. 1999. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res*. **59**, 6087–6090.
56. Jakob S., Altschmied J., Haendeler J. 2009. Shping 2 different cellular localizations a potential new player in aging processes. *AGING*. **1** (7), 664–668.
57. Santos J.H., Meyer J.N., Van Houten B. 2006. Mitochondrial localization of hTERT as a determinant for hydrogen peroxide-induced mtDNA damage and apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1757–1768.
58. Tajrishli M.M., Tuteja R., Tuteja N. 2011. Nucleolin. The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integ. Biol.* **4** (3), 267–275.
59. Khurts S., Masutomi K., Delgermaa L., et al. 2004. Nucleolin interact with telomerase. *J. Biol. Chem.* **279**, 51508–51515.
60. Ha G.H., Kim H.S., Go H., et al. 2012. Tankyrase1 function at telomeres and during mitosis is regulated by Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation. *Cell. Death. Differ.* **19** (2), 321–332.
61. Gao J., Zhang J., Long Y., et al. 2011. Expression of tankyrase 1 in gastric cancer and its correlation with telomerase activity. *Pathol. Oncol. Res.* **17** (3), 685–690.
62. Tang B., Wang J., Fang J., Jiang B., et al. 2012. Expression of TNKS1 is correlated with pathologic grade and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human astrocytomas. *J. Clin. Neurosci.* **19** (1), 139–143.
63. Karner C.M., Merkel C.E., Dodge M., et al. 2010. Tankyrase is necessary for canonical Wnt signaling during kidney development. *Dev. Dyn.* **239** (7), 2014–2023.
64. Zhang H., Yang M.N., Zhao J.J., et al. 2010. Inhibition of tankyrase-1 in human gastric cancer cells enhances telomere shortening by telomerase inhibitors. *Oncol. Res.* **24** (4), 1059–1065.
65. Sbodio J.I., Lodish H.F., Chi N.W. 2002. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem. J.* **361** (Pt3), 451–459.
66. Chang Y.J., Hsiao S.J., Yver D., et al. 2008. Tankyrase-1 and tankyrase-2 are essential but redundant for mouse embryonic development. *PLoS One*. **3** (7), e2639.
67. Stefanou N., Papanikolaou V., Furukawa Y., et al. 2010. Leptin as a critical regulator of hepatocellular carcinoma development through modulation of human telomerase reverse transcriptase. *BMC Cancer*. **10**, 442–452.
68. Sikand K., Kaul D., Varma N. 2006. Receptor Ck-dependent signaling regulates hTERT gene transcription. *BMC Cell. Biol.* **7**, 2–14.
69. Fajas L., Debril M.B., Auwerx J. 2001. Peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$ : from adipogenesis to carcinogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* **27**, 1–9.
70. Parish S.T., Kim S., Sekhon R.K., et al. 2010. Adenosine deaminase modulation of telomerase activity and replicative senescence in human CD8 T lymphocytes. *J. Immunol.* **184**, 2847–2854.
71. Ren Sh., Mandani K., Boedeker A.L., et al. 2007. Regulation of telomerase in *Arabidopsis* by BT2, an apparent target of telomerase activator 1. *Plant Cell*. **19**, 23–31.
72. Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А. 2003. Пептид эпиталон индуцирует теломеразную активность и элонгацию теломер в соматических клетках человека. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **135** (6), 692–695.
73. Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А., Смирнова Т.Д. 2004. Пептид способствует преодолению лимита деления соматических клеток. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **137** (5), 573–576.
74. Zhu J., Lee S., Ho M.K., et al. 2010. *In vitro* intestinal absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of cycloastragenol, a potent small molecule telomerase activator. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **25** (5), 477–486.

75. Roth A., Yssel H., Pene J., et al. 2003. Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes. *Blood*. **102**, 849–857.
76. Bodnar A.G., Kim N.W., Effros R.B., Chiu C.P. 1996. Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp. Cell. Res.* **228**, 58–64.
77. Fauci S.R., Jamieson B.D., Chin A.C., et al. 2008. Telomerase-based pharmacologic enhancement of antiviral function of human CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **181** (10), 7400–7406.
78. Dagarag M., Evazyan T., Rao N., Effros R.B. 2004. Genetic manipulation of telomerase in HIV-specific CD8+ T cells: enhanced antiviral functions accompany the increased proliferative potential and telomere length stabilization. *J. Immunol.* **173**, 6303–311.
79. Zhao Z., Wang W., Wang F., et al. 2009. Effects of astragaloside IV on heart failure in rats. *Chin. Med.* **4**, 6–9.
80. Lv L., Wu S.Y., Wang G.F., et al. 2010. Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Phytother. Res.* **24** (2), 219–224.
81. Zhang W.D., Chen H., Zhang C., et al. 2006. Astragaloside IV from *Astragalus membranaceus* shows cardioprotection during myocardial ischemia *in vivo* and *in vitro*. *Planta Med.* **72** (1), 4–8.
82. Harley C.B., Liu W., Blasco M., et al. 2011. A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program. *Rejuvenation Res.* **14** (1), 45–56.
83. de Jesus B.B., Schneeberger K., Vera E., et al. 2011. The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging. Cell.* **10** (4), 604–621.
84. Chan M.N., El Touny L.H., Yagadeesh S., Baneryee P.P. 2007. Physiologically achievable concentration of genistein enhance telomerase activity in prostate cancer cells via the activation of STAT3. *Carcinogenesis*. **28** (11), 2282–2290.
85. Lanzilli G., Euggetta M.P., Tricarico M., et al. 2006. Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells *in vitro*. *Int. J. Oncol.* **28**, 642–648.
86. Pears V.P., Sherrell J., Lou Z., et al. 2008. Immortalization of epithelial progenitor cells mediated by resveratrol. *Oncogene*. **27**, 2365–2374.
87. Xia L., Wang X.X., Hu X.S., et al. 2008. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 387–394.
88. Satoh M., Minami Y., Takahashi Y., et al. 2009. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Clin. Sci. (Lond)*. **116** (11), 827–835.
89. Sprouse A.A., Steding C.E., Herbert B.S. 2012. Pharmaceutical regulation of telomerase and its clinical potential. *J. Cell. Mol. Med.* **16** (1), 1–7.
90. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. **33**, 919–926.
91. Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., et al. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*. **17**, 1146–1149.
92. Banfi A., Muraglia A., Dozin B., et al. 2000. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* **28**, 707–755.
93. DiGirolamo C.M., Stokes D., Colter D., et al. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* **107**, 275–281.
94. Böcker W., Yin Zh., Drosse I., et al. 2008. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J. Cell. Mol. Med.* **12** (4), 1347–1359.
95. Huang G., Zheng Q., Sun J., et al. 2008. Stabilization of cellular properties and differentiation multipotential of human mesenchymal stem cells transduced with hTERT gene in a long-term culture. *J. Cell. Biochem.* **103**, 1256–1269.
96. Honma T., Honmou O., Iihoshi S., et al. 2006. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp. Neurol.* **199** (1), 56–66.
97. Huang G.P., Pan Z.J., Huang J.P., et al. 2008. Proteomic analysis of human bone marrow mesenchymal stem cells transduced with human telomerase reverse transcriptase gene during proliferation. *Cell Prolif.* **41**, 625–644.
98. Garcha-Escudero V., Garcha-Gomez A., Gargini R., et al. 2010. Prevention of senescence progression in reversibly immortalized human ensheathing glia permits their survival after deimmortalization. *Mol. Therapy*. **18** (2), 394–403.
99. Huang Q., Chen M., Liang S., et al. 2007. Improving cell therapy – experiments using transplanted telomerase-immortalized cells in immunodeficient mice. *Mech. Ageing Dev.* **128** (1), 25–30.
100. Song J.S., Murase N., Demetris A.J., et al. 2007. Protection from acute cellular injury using sleeping beauty mediated telomerase gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363** (2), 253–256.
101. Oh H., Taffet G.E., Youker K.A., et al. 2001. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *PNAS*. **98**, 10308–10313.
102. Masutomi K., Possemato R., Wong J.M., et al. 2005. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102** (23), 8222–8227.
103. Geserick C., Tejera A., Gonzalez-Suarez E., et al. 2006. Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase to transforming

- growth factor-beta signaling. *Oncogene*. **25**, 4310–4319.
104. Astandi S.E., Alson S., Tietze M.K., et al. 2002. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99** (12), 8191–8196.
105. Kipling D., Cooke H.J. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*. **347** (6291), 400–402.
106. Blasco M.A. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. **91**, 25–34.
107. Greenberg R.A., Allsopp R.C., Chin L., et al. 1998. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*. **16**, 1723–1730.
108. Park J.I., Venteicher A.S., Hong J.Y., et al. 2009. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. **460**, 66–72.
109. Barker N., Hurlstone A., Musisi H., Miles A., Bienz M., Clevers H. 2001. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J*. **20**, 4935–4943.
110. Okamoto N., Yasukawa M., Nguyen C., Kasim V., Maida Y., Possemato R., et al. 2011. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 20388–20393.
111. Hoffmeyer K., Raggioli A., Rudloff S., et al. 2012. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. **336**, 1549–1554.
112. Shkreli M., Sarin K.Y., Pech M.F., et al. 2012. Reversible cell-cycle entry in adult kidney podocytes through regulated control of telomerase and Wnt signaling. *Nat. Med*. **18**, 111–119.
113. Bernardes de Jesus B., Vera E., Schneeberger K., et al. 2012. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol. Med*. **4**, 691–704.
114. Park J.I., Venteicher A.S., Hong J.Y. 2009. Telomerase modulates Wnt signaling by association with target gene chromatin. *Nature*. **460** (7251), 66–72.
115. Lee J., Sung Y.H., Cheong C., et al. 2008. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene*. **27** (26), 3754–3760.
116. Rahman R., Latonen L., Wiman K.G. 2005. hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene*. **24** (8), 1320–1327.