

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
Інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доц. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 2021 р.

**ІНГІБУВАННЯ ТЕЛОМЕРАЗИ ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИМИ
ГОМОЛОГАМИ ТЕЛОМЕРНОЇ ДНК *in vitro***

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 162 Біотехнології
та біоінженерія

Троц Валентини Адамівни

Науковий керівник:

с.н.с, к.б.н.

Негруцька Валентина

Володимирівна

Оцінка захисту роботи

РЕФЕРАТ

Метою роботи було дослідити можливість поєднаного впливу інгібіторів двох типів, що діють на різні елементи системи теломерази (сам фермент і його субстрат), на синтез теломерних повторів у безклітинній системі TRAP. В якості інгібіторів, що безпосередньо впливають на активність фермента, було взято олігонуклеотиди – гомологи теломерної ДНК, а низькомолекулярні похідні акридину та порфірину натомість взаємодіяли з субстратом теломерази.

В роботі були використані такі методи дослідження: отримання лізату клітин лінії MCF-7, визначення концентрації тотального білку за допомогою методу Бредфорд, метод TRAP, гель-електрофорез у ПААГ.

Було показано здатність олігонуклеотидних гомологів теломерної ДНК інгібувати теломеразу в системі TRAP в наномолярних концентраціях. Далі було проведено тестування 2 похідних акридину та похідної порфірину в системі синтезу теломерів *in vitro* TRAP та визначено їхні значення IC_{50} . В результаті роботи було встановлено, що олігонуклеотиди GRN163 та T-oligo зменшують значення IC_{50} як мінімум удвічі, тобто діють як синергісти низькомолекулярних інгібіторів теломерази. На основі цього можна стверджувати, що запропонований підхід до інгібування активності теломерази є перспективним і потребує подальших досліджень.

Робота містить 16 ілюстрацій та 1 таблицю, має обсяг 44 сторінки. Для її написання було опрацьовано 64 літературні джерела.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Будова та функції теломер	8
1.2. Теломераза	9
1.2.1. Теломеразна РНК	10
1.2.2. Зворотна транскриптаза теломери	11
1.2.3. Збирання теломери	11
1.2.4. Реакційний цикл теломери.....	12
1.2.5. Активність теломери та зв'язок з онкогенезом	13
1.3. Теломеразна терапія.....	14
1.3.1. Стратегії, що базуються на теломерах	14
1.3.1.1. Стабілізатори G-квадруплексів.....	14
1.3.1.2. T-oligo	15
1.3.1.3. Інгібітори танкірази	15
1.3.2. Пряме інгібування теломери.....	16
1.3.3. Теломеразна інтерференція.....	16
1.3.4. TERT або TR промоторна терапія	17
1.3.4.1. Онколітичний вірус.....	17
1.3.4.2. Суїцидальна генна терапія	17
1.3.5. Теломеразна імунотерапія.....	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	19
2.1. Матеріали та обладнання.....	19
2.2. Отримання лізату клітин	20
2.3. Визначення концентрації тотального білку в лізаті клітин за допомогою методу Бредфорд	21
2.4. Преінкубація клітинного лізату з олігонуклеотидами	22
2.5. Приготування розчинів досліджуваних речовин та проб	22

2.6. Метод TRAP.....	23
2.6.1. Елонгація TS-праймера.....	23
2.6.2. Фенольна очистка.....	23
2.6.3. Полімеразна ланцюгова реакція	24
2.6.4. Електрофорез у ПААГ	24
2.7. Кількісний обрахунок зображень та визначення IC_{50}	25
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	26
3.1. Перевірка здатності олігонуклеотидів інгібувати теломеразу	26
3.2. Відпрацювання умов експерименту та підбір робочої концентрації олігонуклеотидів	27
3.3. Визначення IC_{50} похідних акридину та порфірину.....	30
3.4. Дослідження впливу олігонуклеотидів на інгібувальну здатність інгібіторів теломерази.....	33
ВИСНОВКИ.....	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	39

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ALT – alternative lengthening of the telomeres, альтернативне подовження теломер

BSA – бичачий сироватковий альбумін

DDRs – DNA damage responses, відповіді на пошкодження ДНК

DMSO – ДМСО, диметилсульфоксид

dNTPs – дезоксинуклеозидтрифосфати

TBE – тріс-боратний буфер

TERT – telomerase reverse transcriptase, теломеразна зворотна транскриптаза

TR – теломеразна РНК

TRAP – telomeric repeat amplification protocol, метод ампліфікації теломерних повторів

ПААГ – поліакриламідний гель

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РНП – рибонуклеопротейн

ВСТУП

Теломераза – рибонуклеопротейновий ензим, функціями якого є подовження особливих кінцевих ділянок хромосом (теломер) та, як наслідок, захист генетичного матеріалу від вкорочення, що відбувається в результаті кінцевої недореplikації ДНК. Активність цього ферменту забезпечує клітинне безсмертя, знімаючи обмеження кількості ділення, назване «лімітом Хейфліка».

Теломераза наявна лише у зародкових, стовбурових та статевих клітинах і практично неактивна у соматичних клітинах здорового організму. Натомість вона активується у 85% пухлин, що робить її привабливою терапевтичною мішенню для новітніх протипухлинних засобів.

Існує два основних підходи, спрямовані на інгібування теломеразної активності: прямий та непрямий. Пряме інгібування ґрунтується на безпосередній взаємодії речовин-інгібіторів з теломеразою. Непрямий підхід використовує опосередкований шлях пригнічення теломеразної дії – зв'язування низькомолекулярних сполук з теломерною ДНК та перешкоджання приєднання та транслокації теломерази.

Обидва підходи були широко досліджені в науковій літературі окремо один від одного. Дію непрямих низькомолекулярних інгібіторів показували як *in vivo*, так *in vitro* (в останньому випадку для пошуку інгібіторів теломерази використовували передусім систему TRAP – telomeric repeat amplification protocol, метод ампліфікації теломерних повторів). В якості інгібіторів прямої дії використовували, зокрема, модифіковані нуклеозиди та інші низькомолекулярні сполуки, а також олігонуклеотидні послідовності, які є гомологами теломерної ДНК. Останній підхід досліджувався в основному в клітинних системах.

Новизною даної роботи є дослідження одночасного впливу інгібіторів прямої (олігонуклеотидних гомологів теломерної ДНК) та непрямой

(похідних акридину та порфірину) дії на активність теломерази в безклітинній системі *in vitro*.

Метою цієї роботи було дослідити можливість поєданого впливу інгібіторів двох типів, що діють на різні елементи системи теломерази (сам фермент і його субстрат), на синтез теломерних повторів у безклітинній системі TRAP.

У зв'язку з поставленою метою необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Оцінити активність олігонуклеотидів – гомологів теломерної ДНК – в *in vitro* тест-системі TRAP.
2. Визначити інгібувальну дію щодо теломерази в системі TRAP низькомолекулярних сполук – 2 похідних акридину та похідної порфірину.
3. Дослідити вплив олігонуклеотидів на активність низькомолекулярних інгібіторів теломерази при їх одночасній дії.

Ключові слова: теломерази, система TRAP, олігонуклеотиди, інгібування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Будова та функції теломер

Кінці хромосом закінчуються захисними структурами, що містять ДНК та ДНК-зв'язуючі білки і називаються теломерами [1]. В дорослих соматичних клітинах теломери складаються з довгих некодуючих послідовностей, що містять приблизно 1000-2000 тандемних повторів TTAGGG. В інших клітинах довжина теломер підтримується на сталому рівні, тому вони можуть бути значно довшими – стовбурові клітини дорослої людини можуть містити 500-5000 повторів [2]. Під час кожного циклу поділу теломери не до кінця реплікуються і як наслідок вкорочуються. Коли такі теломери досягають критично малої довжини, відповіді на пошкодження ДНК (DNA damage responses, DDRs), такі як апоптоз та клітинне старіння, індуються [3]. Таким чином теломери грають роль «біологічного годинника» і лімітують проліферативний потенціал більшості нормальних клітин [4].

Було показано, що теломери існують в вторинній структурі, відомій як t-петля (t-loop), що формується інвазією 3' виступаючого ланцюга в дуплексну частину теломери та стабілізується комплексом з 6 білків (shelterin complex) – TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 та Rap1 (Рис. 1.1) [5]. Даний комплекс запобігає деградації теломери нуклеазами та перешкоджає розгортанню теломери та індукуванню DDRs [6].

Дволанцюгові області теломер зв'язуються з білками TRF1 та TRF2, які специфічно розпізнають теломерні повтори, грають вирішальну роль в перешкоджанні розпізнати теломери як сайти пошкодження ДНК та залучають решту білків захисного комплексу [7]. TIN2 зв'язується з TRF1 та TRF2 і є проміжною ланкою між білками теломерного комплексу, які

зв'язуються з дволанцюговою та одноланцюговою ДНК [8]. Білок POT1 специфічно зв'язується з одноланцюговим 3' кінцем теломери, а також через TPP1 має зв'язок з TIN2 [9]. Ще однією функцією TPP1 є розпізнавання теломеразою [8].

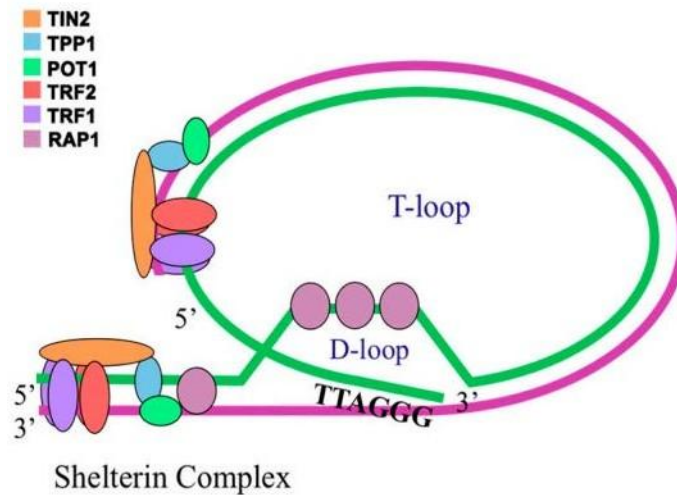


Рис. 1.1. Структура теломери [1]

T-петля також стабілізується G-квадруплексною структурою, що утворюється на 3' кінці за рахунок зв'язування водневими зв'язками гуанінових залишків з формуванням тетрад [10]. Ці G-квадруплекси складаються разом в D-петлі (D-loop) – області, де 3' кінець теломери проникає в дуплексну частину. Вважається, що G-квадруплекси грають вирішальну роль в блокуванні доступу теломери для ензиму теломеразі [11].

1.2. Теломераза

Теломераза (або термінальна трансфераза) – ДНК полімераза, що каталізує утворення теломерних повторів ДНК на 3' кінці лінійних хромосом, тим самим забезпечуючи сталість геному [12]. Вона є рибонуклеопротейном (РНП) та складається з РНК (TR), зворотної транскриптази (TERT) та допоміжних білків: дискерину, NOP10, NHP2 та

GAR1 (Рис. 1.2) [13]. Теломераза відрізняється від інших РНК-залежних ДНК полімераз наявністю специфічної області в її РНК – матриці для подовження теломер [14]. Утворення теломеразного РНП – багатостадійний процес, який потребує додаткових кофакторів [15].

1.2.1. Теломеразна РНК.

РНК теломерази має різну довжину залежно від виду: близько 150 нуклеотидів в інфузорій, 450 в хребетних та аж до 1300 нуклеотидів в різних дріжджах [16]. Хоча розмір та послідовність TR не високо консервативні, але в усіх організмах наявні чотири функціональні складові: матриця для зворотної транскрипції, псевдовузол, стебло-петля, яка взаємодіє з TERT, та елементи на 3' кінці, необхідні для стабільності РНК [17].

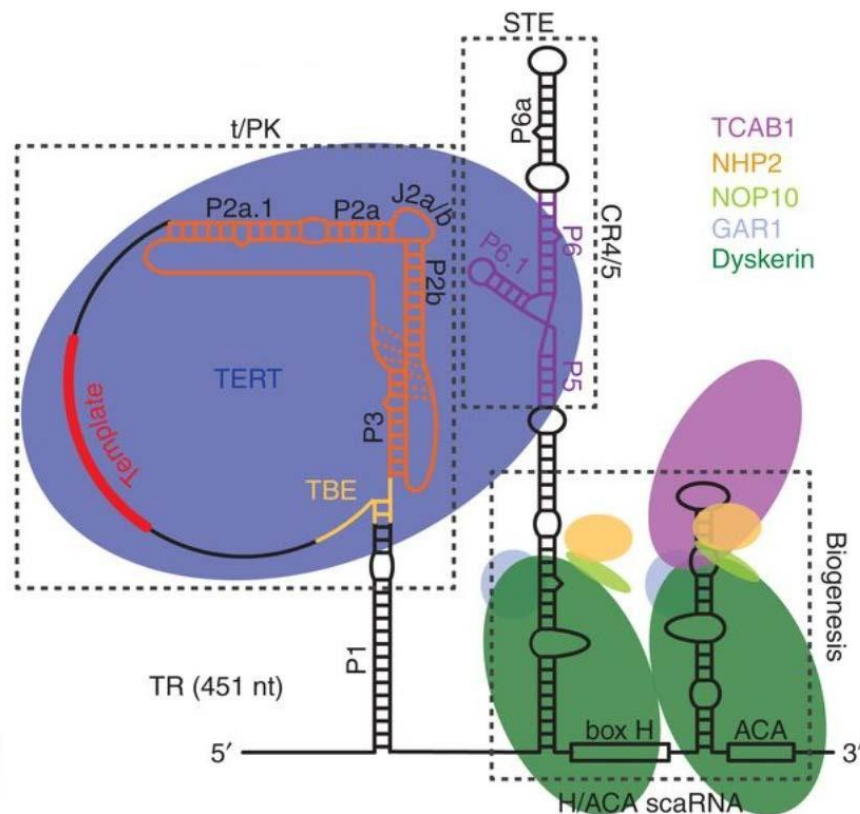


Рис. 1.2. Схематичне зображення теломерази людини [18]

Теломеразна РНК людини (hTR) має 451 нуклеотид, елементом на 3' кінці є H/ACA мотив [12]. hTR транскрибується РНК полімеразою II, тетрамерний комплекс з допоміжних білків (дискерин–NOP10–NHP2–NAF1)

приєднується одночасно з транскрипцією, NAF1 згодом замінюється GAR1 [15].

1.2.2. Зворотна транскриптаза теломерази.

Білкова частина TERT в більшості організмів містить чотири функціональні домени: теломеразний N-кінцевий домен (TEN), TR-зв'язуючий домен (TRBD), домен зворотної транскриптази та C-кінцевий домен (CTE) [19]. В людини домен TEN відіграє ключову роль в зв'язуванні з теломерами та бере участь в каталізі синтезу теломерних повторів [20]. TRBD та домен зворотної транскриптази мають сайти взаємодії з hTR. Зворотна транскриптаза містить активний сайт ферменту теломерази, який гомологічний домену зворотної транскриптази ретротранспозонів та ретровірусів [21].

1.2.3. Збирання теломерази.

hTERT з'єднується з шаперонами HSP90 та p23, а також з AAA+ АТФазами понтином та рептином. Хімічне інгібування HSP90 зменшує теломеразну активність, а нокдаун гену понтину, крім цього, також зменшує рівень hTR в клітині [22]. Рептин та понтин взаємодіють з дискерином та є важливими при складанні H/ACA в РНП [23]. В клітинах людини ще не до кінця вивчено, чи hTR експортується з ядра для збірки з hTERT або навпаки hTERT направляється в ядро для складання теломерази [15]. Далі сформовані теломерази переміщуються в тільця Кахаля (Cajal bodies, CBs) під дією білка TCAB1, де і локалізуються більшу частину клітинного циклу [24, 25]. В пізній S фазі теломераза залучається до синтезу теломерних повторів (Рис. 1.3) [20].

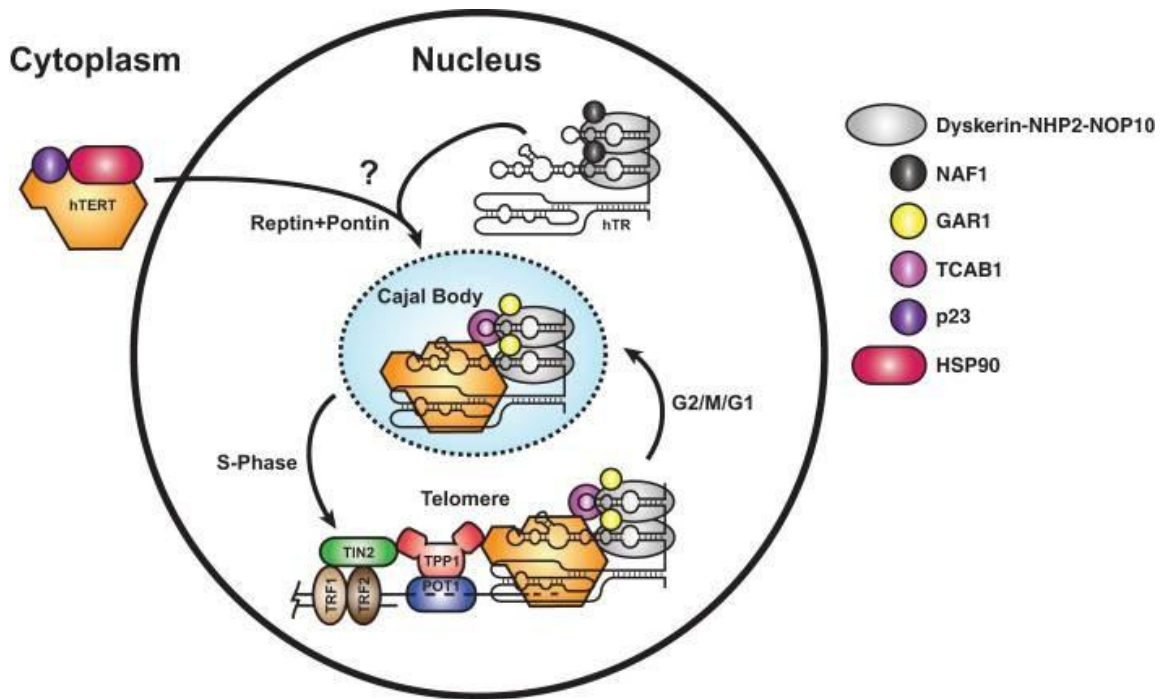


Рис. 1.3. Збирання, дозрівання теломерази та взаємодія з теломерами [15]

1.2.4. Реакційний цикл теломерази.

Цикл реакцій теломерази включає в себе наступні стадії: зв'язування праймера, елонгація, транслокація та дисоціація (Рис. 1.4).

Спочатку теломераза зв'язується зі своїм субстратом – теломерною ДНК – за допомогою гібридних РНК-ДНК взаємодій та додаткових зв'язків з 5'-кінцем ДНК (i). Одразу ж відбувається швидкий синтез одного теломерного повтору та перегруповування гібриду РНК-ДНК (ii). В наступному етапі, найповільнішому, перегрупований гібрид РНК-ДНК переміщується в теломеразному активному сайті та 5'-кінець ДНК праймера виштовхується з ензимного комплексу (iii). Далі відбувається наступний цикл синтезу теломерного повтору або дисоціація теломерази [13, 26].

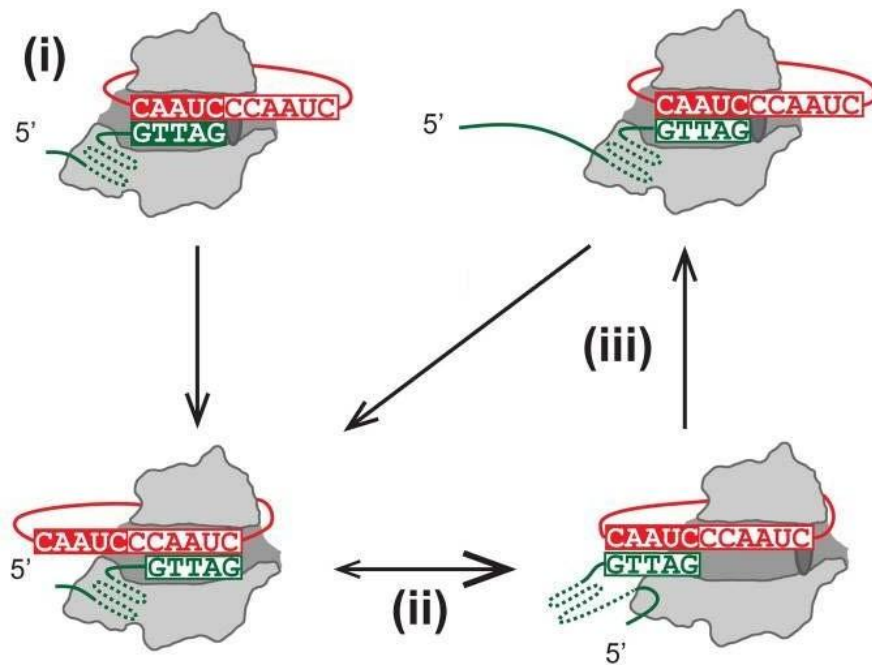


Рис. 1.4. Реакційний цикл теломерази [26].

1.2.5. Активність теломерази та зв'язок з онкогенезом.

Теломераза активна лише в недиференційованих клітинах організму (стовбурових, зародкових та статевих) [27]. Крім цього, теломераза експресується в майже 85% видів раку і рівень її активності вищий в розвинутих метастазуючих пухлинах, що робить її чудовим біомаркером раку та терапевтичною мішенню [1]. В інших випадках (менше 15%) підтримка довжини теломер на сталому рівні відбувається за допомогою альтернативного шляху подовження теломер (alternative lengthening of the telomeres, ALT) без участі теломерази – за рахунок гомологічної рекомбінації [28].

Важливість теломерази в онкогенезі доводиться фактом, що рекурентні мутації в промоторі гену теломеразного протеїнового компоненту hTERT є найбільш частими мутаціями в деяких видах раку [29]. Вони спричиняють підвищений рівень експресії hTERT, збільшують теломеразну активність та довжину теломер [30]. З іншої сторони, зменшення активності теломерази, перешкоди при її збірці та приєднанні до теломер асоціюються з такими захворюваннями, як апластична анемія та вроджений дискератоз [31].

1.3. Теломеразна терапія

У зв'язку з тим, що теломераза має високий рівень експресії в більшості пухлин та майже неактивна у соматичних клітинах [27], вона є унікальним біомаркером раку та є основою декількох протипухлинних терапевтичних стратегій, які зараз знаходяться на різних стадіях досліджень. За механізмами дії їх можна розділити на дві групи:

1) ті, основним завданням яких є інгібувати теломеразну активність або прямим шляхом, діючи на сам фермент теломеразу, або непрямим, зв'язуючись з субстратом цього ензиму (теломерами);

2) стратегії, що використовують теломеразну активність ракових клітин для їх знищення (теломеразна інтерференція, TERT або TR промоторна терапія, теломеразні вакцини) [32].

1.3.1. Стратегії, що базуються на теломерах.

Дані підходи засновані на прямій взаємодії з теломерами, без впливу на теломеразу. Це є значною перевагою, оскільки ці стратегії можуть бути ефективними навіть при злоякісних пухлинах, в яких підтримання довжини теломер відбувається без залучення теломеразу – за допомогою альтернативного механізму подовження з використанням гомологічної рекомбінації (ALT) [33].

1.3.1.1. Стабілізатори G-квадруплексів.

Під час подовження 3' кінця теломеразою відбувається часткове розплетення структури G-квадруплекса. Звідси, зв'язування з G-квадруплексом так званих стабілізаторів блокує розмотування та запобігає подовженню теломери теломеразою або ALT [34]. Завдяки цьому пришвидшується вкорочення теломер, а отже і клітинна смерть. Дослідження деяких з найбільш обіцяючих стабілізаторів G4, включаючи теломестатин [35], похідних акридину BRACO-19 [36] та RHPS4 [37], похідного порфірину

ТМРyP4 [38], показали зростання стабільності G-квадруплексів та збільшення регуляції DDRs в ракових клітинах [1].

1.3.1.2. T-oligo.

T-oligo (T11) – 11-мерний олігонуклеотид, що є гомологом 3' звисаючого теломерного кінця. Введення T-oligo в ракові клітини індукує DDRs, опосередковану ATM, p53, E2F1, cdk2, та p95/NBS1, що призводить до диференціації, зупинки клітинного циклу, старіння та апоптозу [39].

Було запропоновано два потенційні шляхи, якими T-oligo активує DDRs: модель дисоціації комплексу білків теломери (shelterin dissociation model, SDM) та модель імітації відкритої теломери (exposed telomere mimicry model, ETM). Перша модель припускає, що введений T-oligo в ядро витісняє комплекс білків з теломери на себе, тим самим відбувається відкриття t-петлі та ініціалізація DDRs, апоптоз та аутофагія. Друга модель припускає, що T-oligo накопичується в ядрі та розпізнається як незакрита або пошкоджена теломера, тому запускається DDRs [1].

Дослідження, виконані на клітинах меланоми, показали, що T-oligo підвищує активність p53, що призводить до клітинної диференціації та апоптозу. Також було показано, що танкіраза-1, позитивний регулятор подовження теломер, необхідний для T-oligo-опосередкованої відповіді на пошкодження [40]. Лікування за допомогою T-oligo в комплексі з інгібітором тирозинкінази або гістонової деацетилази досліджується наразі клінічно та демонструє адитивне інгібування росту ракових клітин [41]. Якщо ж застосовувати T-oligo разом з іонізуючим випромінюванням, то відбувається збільшення радіочутливості та синергетичне інгібування росту пухлини *in vitro* та *in vivo* [42].

1.3.1.3. Інгібітори танкірази.

Танкіраза полегшує дисоціацію TRF1 та теломери через полі-АДФ-рибозилування TRF1, що веде до його убіквітин-залежної деградації [43].

Таким чином, інгібування танкірази зменшує дисоціацію TRF1 та перешкоджає зв'язуванню теломерази з теломерою. Одними з виявлених інгібіторів танкірази є IWR1, IWR2, JW55, флавіон та XAV939 [44].

1.3.2. Пряме інгібування теломерази.

В 2003 році компанією Geron, Inc. був розроблений перший у своєму класі модифікований олігонуклеотид GRN163L (Imetelstat) як новий протипухлинний засіб [45]. GRN163L – 13-мерний олігонуклеотид, що комплементарний до РНК компонента теломерази, конкурує з теломерним праймером за зв'язування і показав максимальне інгібування в серії [46]. Модифікація N3'→P5' тіо-фосфорамідатом (NPS) забезпечила краще зв'язування GRN163L до мішені та покращила проникнення в клітини та тканини [45]. *In vitro* використання GRN163L призводить до укорочення теломер та клітинної смерті. Ці результати спонукали до проведення ряду клінічних досліджень з пацієнтами з недрібноклітинним раком легенів, раком молочної залози, мієлофіброзом [32]. У більшості досліджень спостерігався позитивний ефект після прийому GRN163L, однак механізм дії препарату не є чітко зрозумілим і може бути пов'язаним з модифікацією тіо-фосфорамідатом, що спричиняє зв'язування з рецептором TLR9 (toll like receptor 9) та індукує міелосупресивний ефект [46].

1.3.3. Теломеразна інтерференція.

У ранніх дослідженнях, присвячених з'ясуванню фундаментальної ролі РНК теломерази в *Tetrahymena*, були розроблені мутації в області матриці TR, що призводило до мутацій у новосинтезованих теломерах і дозволило зробити висновок про функціонування теломерази як зворотної транскриптази [47]. Таким чином внесені аберації індукували фенотипові зміни та старіння клітини, що відбувалося через неможливість зв'язування асоційованих з теломерами білків з видозміненими теломерними послідовностями [48]. Введені до ракових клітин ссавців такі змінені матриці

TR індукують вогнища пошкодження ДНК в теломерах та характерні «анафазні містки», спричинені злиттям теломер, що врешті призводить до апоптозу та зменшення проліферації *in vitro* [49]. Такий ефект мутантної TR доповнювався одночасним виснаженням TR дикого типу. Хоча ця стратегія швидко діє проти багатьох типів раку, ефективна доставка та експресія зміненого TR в ракові клітини залишаються проблематичними для цього терапевтичного підходу [50].

1.3.4. TERT або TR промоторна терапія.

Підвищена активність промотора TERT та його експресія є однією з ознак більшості типів раку. Нещодавно описана мутація промотору TERT утворює унікальний сайт зв'язування протеїнового комплексу, що посилює експресію TERT та підвищує активність теломерази. Дана мутація може бути виправлена за допомогою методу редагування генів [51].

1.3.4.1. Онколітичний вірус.

Був сконструйований аденовірус, гени якого знаходяться під контролем промотора людини TERT. При зараженні гени аденовірусу експресуються, індукується реплікація вірусу і клітинний лізис лише в ракових клітинах з активним промотором TERT [52]. *In vitro* онколітичний вірус вибірково лізує клітини раку легенів та шлунку. Наразі відбуваються 1-2 фази дослідження даної терапевтичної стратегії [53].

1.3.4.2. Суїцидальна генна терапія.

Ця стратегія використовує високоактивний промотор TERT або TR в клітинах пухлини для експресії цитотоксичних продуктів. Аденовірусна система була побудована шляхом інженерії бактеріальної нітроредуктази (NTR) під контролем промотору TERT або TR [54]. Вироблена раковими клітинами з активними промоторами TERT/TR NTR перетворює попередник СВ1954 в активні цитотоксичні 2- та 4-гідроксиламінові похідні, які

утворюють ДНК-зшивки та спричиняють клітинну смерть [55]. В літературі також описані дослідження з вбудовуванням схожим чином генів карбоксипептидази G2 та цитозин деамінази [32, 53].

1.3.5. Теломеразна імунотерапія.

Дана стратегія має на меті використати відносно високий рівень експресії теломерази в ракових клітинах як пухлинний антиген для знищення клітин за участі імунітету. В таких клітинах пептиди з TERT обробляються та презентуються на поверхні клітини в складі головного комплексу гістосумісності I (MHC I). В ракових клітинах з активною теломеразою наявні лише декілька сотень білків TERT в клітині, що створює складність для імунотерапії [56]. Незважаючи на це, було показано, що TERT є антигеном, асоційованим з пухлиною (tumor-associated antigen, TAA), і здатний викликати протипухлинну відповідь CD8⁺ цитотоксичних Т-лімфоцитів при багатьох типах раку [32, 57].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали та обладнання

В даній роботі використовувались такі реактиви: тріс-гідроксиметиламінометан (Tris) фірми “Sigma” (США), етиленгліколь тетраацетат (EGTA), 3-((3-холамідопропіл)-диметиламоній)-1-пропансульфонат (CHAPS), тріс-гідроксиметиламінометан гідрохлорид (Tris-HCl), дезоксинуклеозидтрифосфати (АТФ, ЦТФ, ГТФ і ТТФ) (dNTPs), глікоген фірми “Fermentas” (Литва); Таq ДНК полімераза фірми “BioLab”, барвники бромфеноловий синій та SYBR Green I, олігонуклеотиди GRN163 [5'-TAGGGTTAGACAA-3'], GRN137227 [5'-TAGGTGTAAGCAA-3'], T-oligo [5'-GTTAGGGTTAG-3'], C-oligo [5'-СТААС-ССТААС-3'] та D1 [5'-ССAGTTCGTAGТААССС-3'] фірми “Metabion International AG” (Німеччина), праймери TS [5'-ААТССГТЦГАГСАГАГТТ-3'] і CXext [5'-GTGCCСТТАС-ССТТАСССТТАСССТАА-3'] фірми “Eurogentec” (Бельгія).

Досліджувані низькомолекулярні сполуки Acr1 (9-((3-(диметиламіно)пропіл)аміно)-5-метил-N-(піридин-2-іл)акридин-4-карбоксамід) та Acr2 (9-((3-(диметиламіно)пропіл)аміно)-5-оксометил-N-(піридин-2-іл)акридин-4-карбоксамід) було синтезовано у відділі синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, похідну порфірину TMPyP4 (тетра(N-метилпіридиній)порфірин) отримано від фірми “Sigma” (США).

Також у роботі використано реагенти та розчинники кваліфікації “осч” і “хч” вітчизняного виробництва (“Макрохім”, “Хімлаборреактив”).

Водні розчини готувались з використанням дистильованої води.

Досліджувані речовини розчинялися у 100% DMSO фірми “Sigma” (США).

Для проведення експериментів були приготовані такі буфери та реагенти:

- 1) лізуючий буфер: 10мМ Tris-HCl, pH 7.5; 1мМ MgCl₂; 1мМ EGTA; 0.5% CHAPS; 10% гліцерол; 5мМ β-меркаптоетанол та 0.1мМ AEBSF у DEPC воді; β-меркаптоетанол та AEBSF додаються одразу перед використанням буферу;
- 2) реагент Бредфорд: 0.01% Кумасі G-250, 4.75% етанолу, 8.5% ортофосфорної кислоти;
- 3) TRAP буфер: 20мМ Tris-HCl, pH 8.3; 1.5мМ MgCl₂; 68мМ KCl; 0.05% Tween 20; 1мМ EGTA;
- 4) 5X тріс-боратний буфер (TBE): 0.445 М Tris, 0.445 М борна кислота, 10мМ EDTA.

Обладнання: ампліфікатор фірми “Терцик” (Росія), автоматичний сканер гелів ChemiDoc System (Bio-Rad Laboratories, США), спектрофотометр Biomate 5 (Thermoscientific, США), прилад для вертикального електрофорезу Helicon (Росія).

Було використано наступне програмне забезпечення: TotalLab v2.01 (Nonlinear Dynamics Ltd., Великобританія), Origin 5.0 (OriginLab, США), Microsoft Excel (США).

2.2. Отримання лізату клітин

Джерелом активної теломерази були клітини лінії MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7, клітини інвазивної карциноми молочної залози людини), активність теломерази в яких становить 99%. Клітини тричі промили холодним PBS, додали льодяного лізуючого буфера CHAPS у розрахунку 1 мкл на 10 тис. клітин. Після додавання лізуючого буферу суміш поміщали на лід на 30 хвилин і періодично перемішували. Згодом було проведено центрифугування на холоді при 12000 g протягом 30 хвилин. Надосад було

відібрано та розфасовано в чисті пробірки. Аліквоти зберігалися при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в кельвінаторі.

2.3. Визначення концентрації тотального білку в лізаті клітин за допомогою методу Бредфорд

Щоб уникнути інгібування *Taq*-полімерази під час проведення ПЛР, кількість білку у реакції повинна бути в межах 0.1-1.0 мкг [58]. Також знання точної концентрації білку необхідне для подальшого розрахунку концентрації олігонуклеотидів, яка використовуватиметься в преінкубації з лізатом клітин. Саме тому було застосовано метод Бредфорд для визначення концентрації тотального білку в отриманому лізаті для подальшого обрахунку необхідної кратності його розведення. Процедура визначення була виконана згідно протоколу фірми “Sigma” [59].

У кювету спектрофотометра дослідний зразок та реагент Бредфорд змішувалися у співвідношенні 1:1. Через 5 хвилин взаємодії речовин відбувалося вимірювання на приладі.

Використовуючи розведення BSA відомої концентрації (1, 2, 4, 6, 8 та 10 мкг/мл), була побудована калібрувальна крива (Рис. 2.1). На її основі була розрахована концентрація білку в лізаті клітин. Концентрація білку склала 3.528 мг/мл.

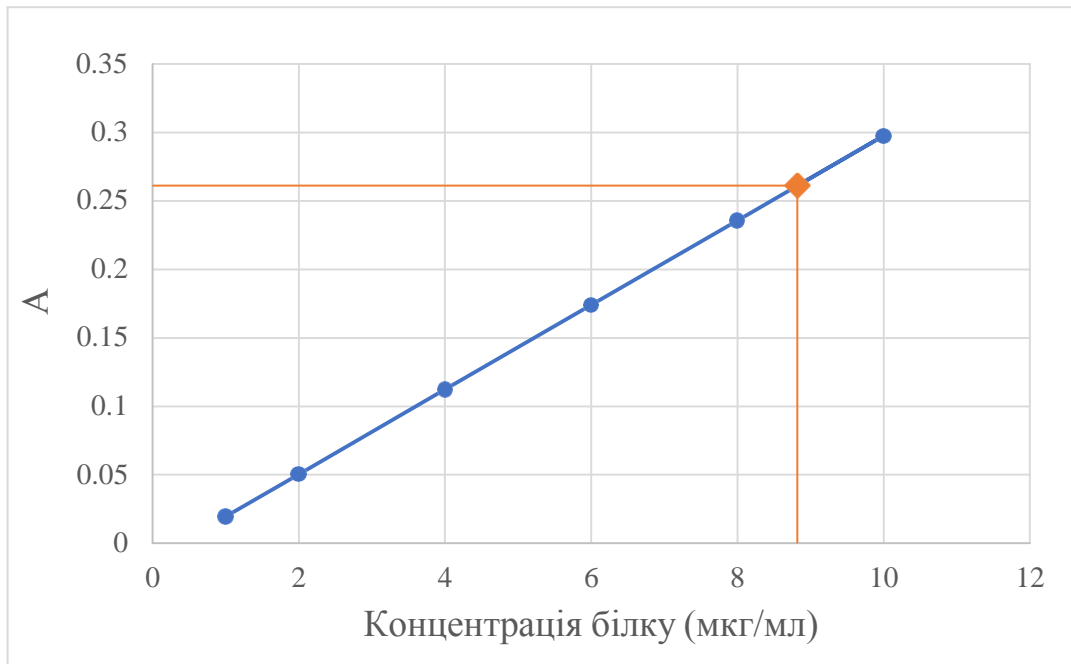


Рис. 2.1. Калібрувальна крива (●) та визначена концентрація білку в лізаті клітин, розведеному в 400 разів (◆). $R^2=0.9907$.

2.4. Преінкубація клітинного лізату з олігонуклеотидами

Кожен з досліджуваних олігонуклеотидів (GRN163, GRN137227, T-oligo, C-oligo) в концентрації 25-500 нМ інкубували з розведеним у 40 разів лізатом клітин протягом 30 хв. за температури 30°C. В якості контролю проводилась інкубація з олігонуклеотидною послідовністю D1.

2.5. Приготування розчинів досліджуваних речовин та проб

Досліджувані речовини розчинялися у 100% DMSO “Sigma” (США) для досягнення концентрації 2мМ. Методом поступових двократних розведень у DMSO досягалися робочі концентрації. Вміст DMSO в дослідних та контрольних зразках становив 5% (при наявності цього розчинника >10% відбувається інгібування ферментів).

Досліджувані речовини вносили по 1 мкл у відповідній концентрації в кожну пробірку на етапі подовження TS праймеру теломеразою. Контрольна реакція містила чистий DMSO у такій самій концентрації. Загальна реакційна суміш готувалась з урахуванням об'єму розчину сполуки (1мкл) та об'єму лізату клітин (2мкл).

2.6. Метод TRAP

Даний метод дозволяє визначити активність теломерази в досліджуваних пробах і включає в себе три етапи: нарощування теломерних повторів, ампліфікація отриманого на першому етапі продукту, візуалізація продуктів реакцій.

2.6.1. Елонгація TS-праймера.

До реакційної суміші, яка містила 50мкМ dNTPs, 0.45 мкМ праймеру TS, 0.45 мкМ праймеру CXext в TRAP буфері, 2 мкл лізату клітин (кількість білка 0.353 мкг) після інкубування з відповідним олігонуклеотидом, додавали досліджувану сполуку відповідної концентрації. Контрольний зразок містив чистий DMSO у тій самій концентрації, що і експериментальний. Загальний об'єм реакції становив 50 мкл. Інкубували 30 хвилин в термостаті за температури 37°C.

2.6.2. Фенольна очистка.

Щоб уникнути інгібування *Taq*-полімерази досліджуваними сполуками, їх було екстраговано фенол-хлороформеною сумішшю перед етапом ПЛР. Після додавання до реакційної суміші води та суміші фенол-хлороформ у рівних об'ємах було проведено розділення фаз центрифугуванням і відібрання верхньої фази. Після додавання до відібраної фази рівного об'єму

хлороформу було проведено повторне центрифугування і відібрання верхньої фази.

Для осадження ДНК до отриманої суміші було додано глікоген, NaAc у співвідношенні 1:10 та охолоджений 100% етанол у співвідношенні 2.5:1. Після експозиції при -20°C протягом ночі, осад було осаджено центрифугуванням на холоді (4°C) при 11000 g протягом 20 хвилин. Отриманий спиртовий осад промивали 70% охолодженим етанолом і підсушували на повітрі за кімнатної температури.

2.6.3. Полімеразна ланцюгова реакція.

До отриманого осаду була додана реакційна суміш, що містила 50 мкМ dNTPs, 0.45 мкМ праймеру TS, 0.45 мкМ праймеру CXext, TRAP буфер та *Taq*-полімерази. Після покриття сумішеш мінеральною олією пробірки було поміщені у термоциклер. ПЛР відбувалася за такою програмою: 94°C , 2 хв.; 94°C , 10 с. – 50°C , 25 с. – 72°C , 30 с. протягом 30 циклів; кінцева елонгація 94°C , 15 с. – 50°C , 25 с. – 72°C , 1 хв.

2.6.4. Електрофорез у ПААГ.

Для розділення фрагментів ДНК проводився електрофорез у ПААГ: 10% поліакриламід (акриламід та біс-акриламід у співвідношенні 19:1), 0.5x TBE (трис-боратний буфер), 0.03% персульфат амонію, 0.9 мкл TEMED на 1 мл гелю. Бромфеноловий синій використовувався в якості лідерного барвника. Електрофорез відбувався у 0.5x TBE при 180В під час пробігу по першій третині гелю та при 300В решту відстані.

Фарбування гелю відбувалося барвником SYBR Green I за протоколом виробника. Візуалізація результатів здійснювалася за допомогою апарату ChemiDoc System (Bio-Rad Laboratories, США).

2.7. Кількісний обрахунок зображень та визначення IC₅₀

Кожний експеримент повторювали не менше 3 разів.

Отримані електрофореграми проходили комп'ютерну обробку та обрахунок за допомогою програми TotalLab за таким алгоритмом:

1. завантажується зображення електрофореграми (чорно-білий негатив);
2. обирається область, в якій знаходяться продукти ампліфікації теломерних повторів;
3. автоматично або вручну визначаються окремі доріжки;
4. програма сумує інтенсивність пікселів в кожній горизонтальній лінії та будує профіль кожної доріжки;
5. одним з обраних методів віднімається фон;
6. вручну в кожній доріжці обираються окремі смуги з нанесеним матеріалом, щоб підрахувати їх інтенсивність;
7. в результаті кожна доріжка представляється в числовому форматі, що відповідає кількості наявного матеріалу на гелі.

Отримані після цього числові дані використовувались у програмах Microsoft Excel та Origin для побудови графіків залежності ступеня інгібування теломерази від концентрації досліджуваних речовин та визначення концентрацій інгібіторів, при яких активність теломерази становить 50% (IC₅₀).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Досліджувались 2 олігонуклеотиди на здатність інгібувати теломеразу та інші 2 як контрольні в безклітинній системі *in vitro* за стандартним протоколом TRAP, але з додатковою преінкубацією клітинного лізату з цими олігонуклеотидами. В роботі були використані 13-нуклеотидні послідовності (GRN163, що за літературними даними працює як «матричний антагоніст», і GRN137227 з 3 замінами відносно GRN163, що використовувалась в якості контролю) [45] та 11-основні олігонуклеотиди (T-oligo, гомологічний 3'-кінцю теломери, та компліментарний до нього C-oligo у якості контролю) [60].

3.1. Перевірка здатності олігонуклеотидів інгібувати теломеразу

GRN163	GRN137227	T-oligo	C-oligo	K
--------	-----------	---------	---------	---



Рис. 3.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації теломерних повторів з преінкубацією в присутності олігонуклеотидів (К – контрольна реакція за відсутності олігонуклеотидів)

Була проведена преінкубація клітинного лізату з олігонуклеотидами в концентрації 100нМ з подальшою елонгацією та ампліфікацією теломерних повторів (Рис. 3.1). Т-oligo і GRN163 показали зменшення синтезу теломерних послідовностей відносно контролів (С-oligo і GRN137227 відповідно). В свою чергу С-oligo і GRN137227 мали відмінність в кількості синтезу теломерних повторів в межах похибки порівняно з контрольним синтезом за відсутності олігонуклеотидів (Рис. 3.2).

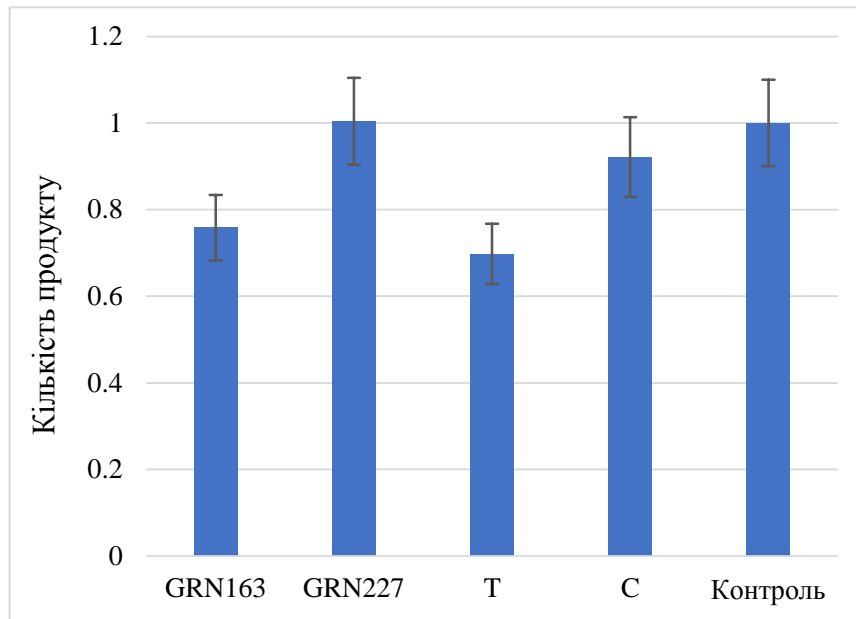


Рис. 3.2. Діаграма порівняння кількості продуктів ампліфікації теломерних повторів у присутності олігонуклеотидів (Контроль – за відсутності олігонуклеотидів)

3.2. Відпрацювання умов експерименту та підбір робочої концентрації олігонуклеотидів

Було поставлено ряд експериментів з олігонуклеотидами в різній концентрації (25-100 нМ) (Рис. 3.3). Для проведення наступних досліджень було обрано концентрацію олігонуклеотидів 85 нМ, оскільки за цієї концентрації теломераза має середню активність: зменшення кількості продукту в порівнянні з контролем візуально помітне й одночасно активність теломерици ще достатня для додаткового інгібування.

100 нМ
50 нМ
25 нМ
100 нМ
50 нМ
25 нМ
К

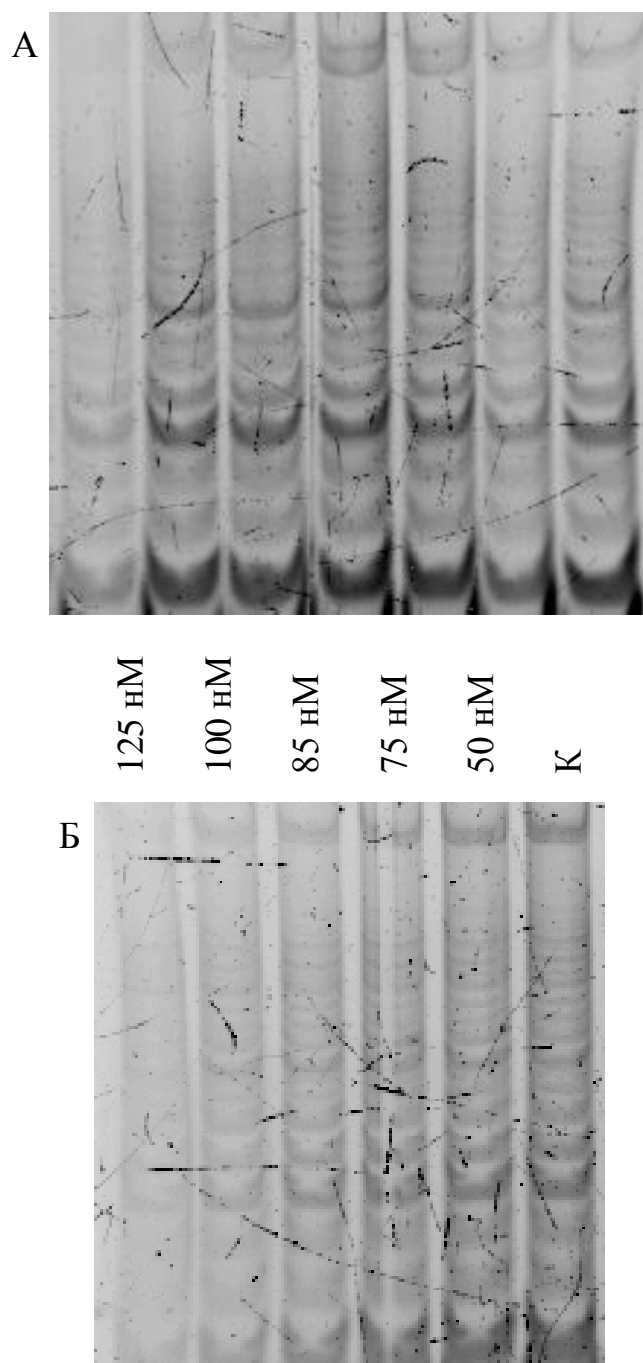


Рис. 3.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації теломерних повторів з преінкубацією в присутності олігонуклеотидів різної концентрації: А) GRN163 (1-3 доріжки) та GRN137227 (4-6 доріжки); Б) T-oligo (К – контрольна реакція за відсутності олігонуклеотидів)

Також було перевірено вплив концентрації олігонуклеотидів на роботу теломерази. Для цього був взятий олігонуклеотид D1 з довільною послідовністю, що ніяк не взаємодіє з РНК теломерази та праймерами, що використовуються в реакції (Рис. 3.4). На електрофореграмі видно, що

наявність олігонуклеотиду D1 будь-якої концентрації ніяк не впливає на кількість синтезованих теломерних повторів.

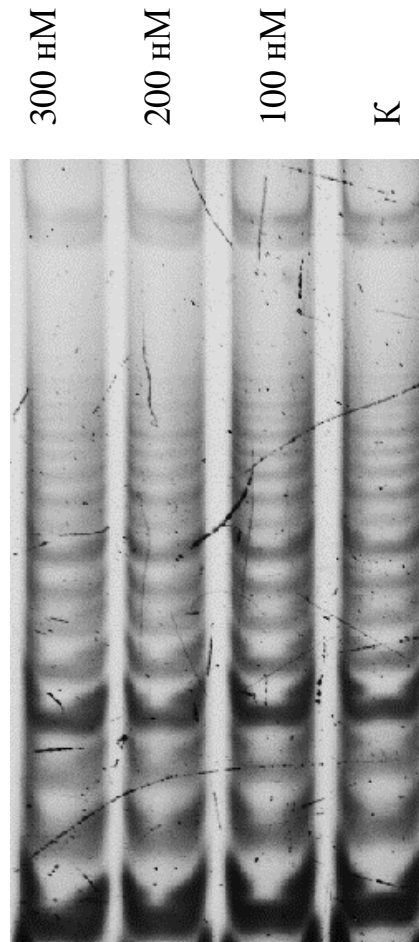


Рис. 3.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації теломерних повторів з преінкубацією в присутності різної концентрації D1 (К – контрольна реакція за відсутності олігонуклеотидів)

Отже, були підібрані оптимальні умови постановки експерименту за участі олігонуклеотидів, було обрано їхню робочу концентрацію (85 нМ) та знайдено олігонуклеотидну послідовність D1, яка за даної концентрації може бути використана в якості контролю.

3.3. Визначення IC_{50} похідних акридину та порфірину

Для дослідження поєданого впливу олігонуклеотидів та відомих інгібіторів теломерази на синтез теломерних повторів було обрано з двох класів речовин три сполуки (Рис. 3.5): дві похідні акридину (Acr1 та Acr2) та похідна порфірину TMPyP4. Похідні акридину є поліароматичними сполуками, які утворюють сильні π - π стекінг-взаємодії з квадруплексною ДНК, але водночас зв'язуються також з дволанцюговою ДНК [61-63]. Натомість порфірини характеризуються високою селективністю до G4 ДНК та інгібують теломеразну активність в мікромольних та субмікромольних концентраціях [64].

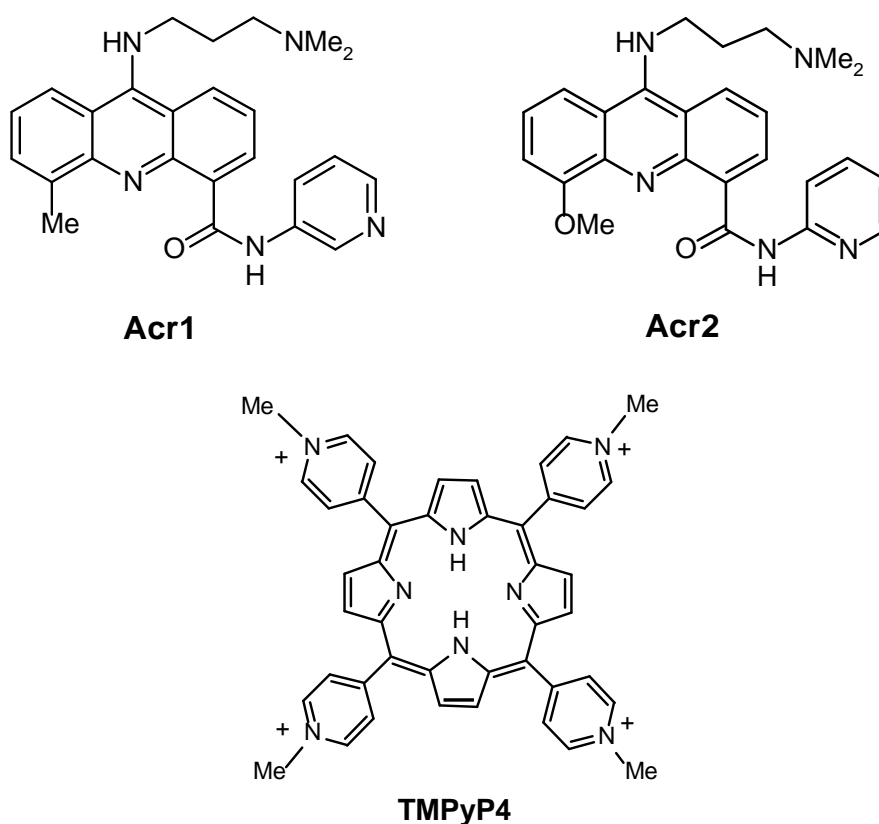


Рис. 3.5. Похідні акридину Acr1 і Acr2 та похідна порфірину TMPyP4

Спочатку було визначено IC_{50} обраних інгібіторів теломерази. Отримані в результаті експериментів електрофореграми (Рис. 3.6) обраховувались за допомогою програми TotalLab. Побудова графіків та визначення концентрації напівмаксимального інгібування проводилися в програмі Origin (Рис. 3.7).

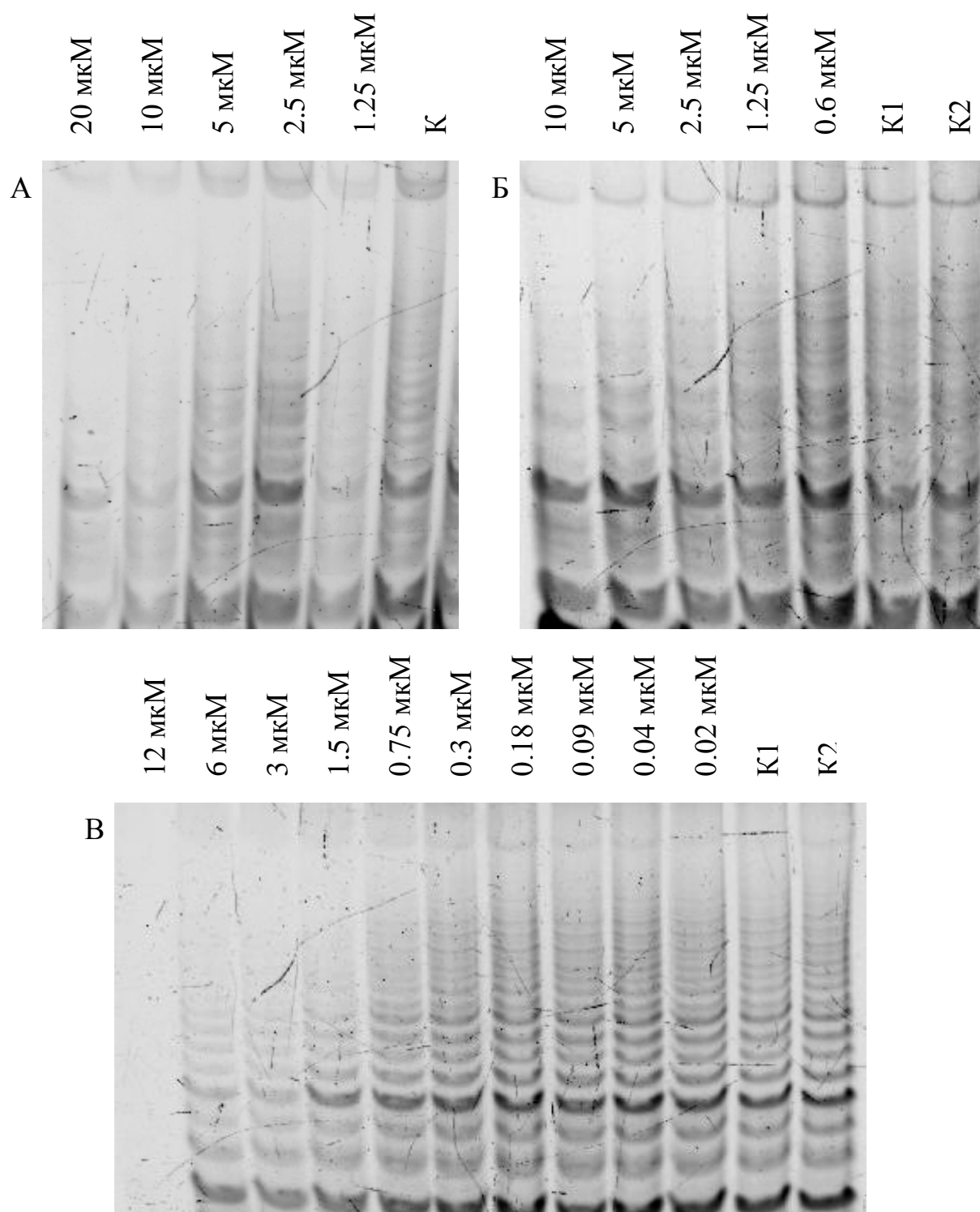


Рис. 3.6. Електрофореграми продуктів ампліфікації теломерних повторів з різною концентрацією досліджуваних речовин: А) Ac1; Б) Ac2; В) TMRyP4 (К, K1, K2 – контрольні реакції за відсутності цих сполук)

Найкращим інгібітором виявився TMRyP4, в якого IC_{50} становила 1.75 μM . За концентрації інгібітора 12 μM теломераза повністю переставала працювати, з пониженням концентрації ступінь інгібування зменшувався, і

лише за концентрації похідної порфірину 0.3 мкМ утворювалася кількість продукту, співставна з контролем. Наступним за активністю був Acr1 з IC_{50} 5.3 мкМ, у якого спостерігалось стрімке зростання ступеня інгібування теломерази, починаючи з концентрації 5 мкМ. У похідної акридину Acr2 концентрація напівмаксимального інгібування мала значення 9 мкМ, кількість продукту за концентрації інгібітора 1.25 мкМ була співставна з контролем, а за максимальної взятої концентрації похідної акридину 10 мкМ теломераза мала активність близько 48% (Таблиця 3.1).

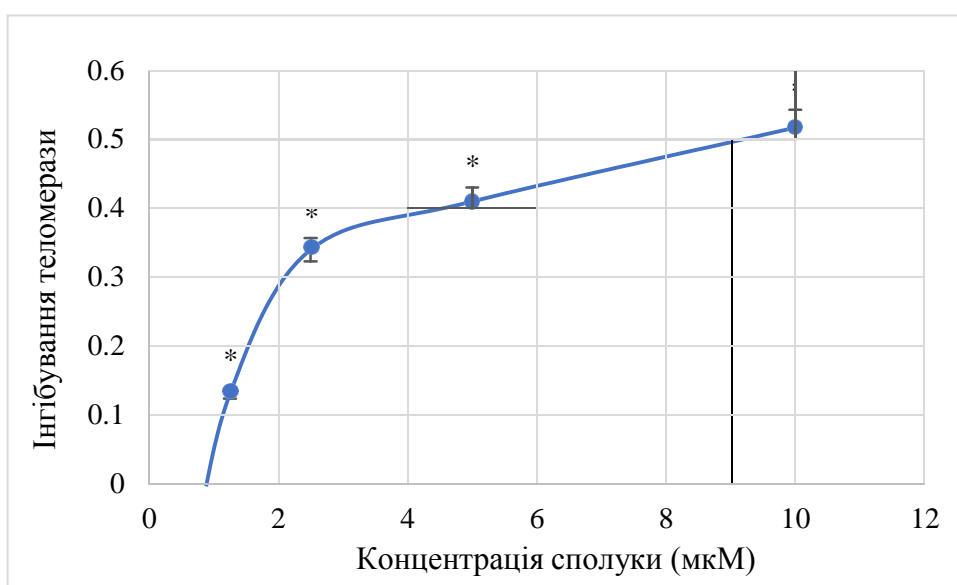


Рис. 3.7. Визначення IC_{50} для Acr2. * - $p < 0.05$

3.4. Дослідження впливу олігонуклеотидів на інгібувальну здатність інгібіторів теломерази

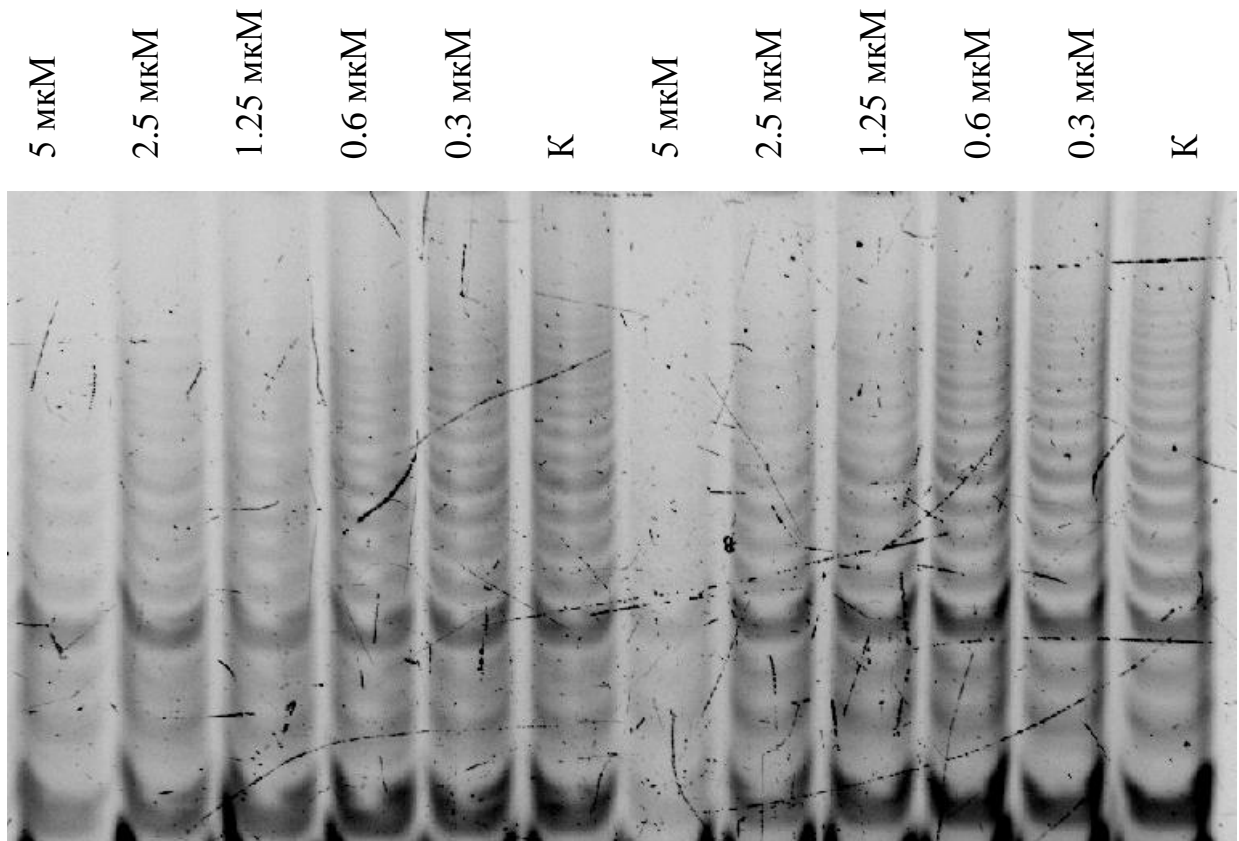


Рис. 3.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації теломерних повторів з преінкубацією в присутності 85 нМ олігонуклеотидів Т-oligo (1-6 доріжки) та С-oligo (7-12 доріжки) з різною концентрацією Acr1 (К – контрольна реакція за відсутності Acr1)

Спочатку було досліджено вплив олігонуклеотидів Т-oligo і С-oligo та GRN163 і GRN137227 (концентрація 85 нМ при преінкубації з клітинним лізатом) на інгібувальну активність сполуки Acr1 (Рис. 3.8, 3.9). Наявність Т-oligo зменшила IC_{50} похідної акридину до 2.65 мкМ, а GRN163 до 2.46 мкМ (Таблиця 3.1). С-oligo і GRN137227 також показали зменшення активності теломерази (наприклад, IC_{50} для С-oligo склала 2.16 мкМ). Причиною такої дії GRN137227 може бути те, що 3 заміни в послідовності недостатньо для відсутності взаємодії з теломеразою. С-oligo в літературних джерелах використовували в якості контролю в лише клітинних системах. Зважаючи на це, в наступних реакціях контрольною олігонуклеотидною послідовністю було обрано D1, яка ніяк не взаємодіє ні з ферментом, ні з субстратом теломеразної реакції.

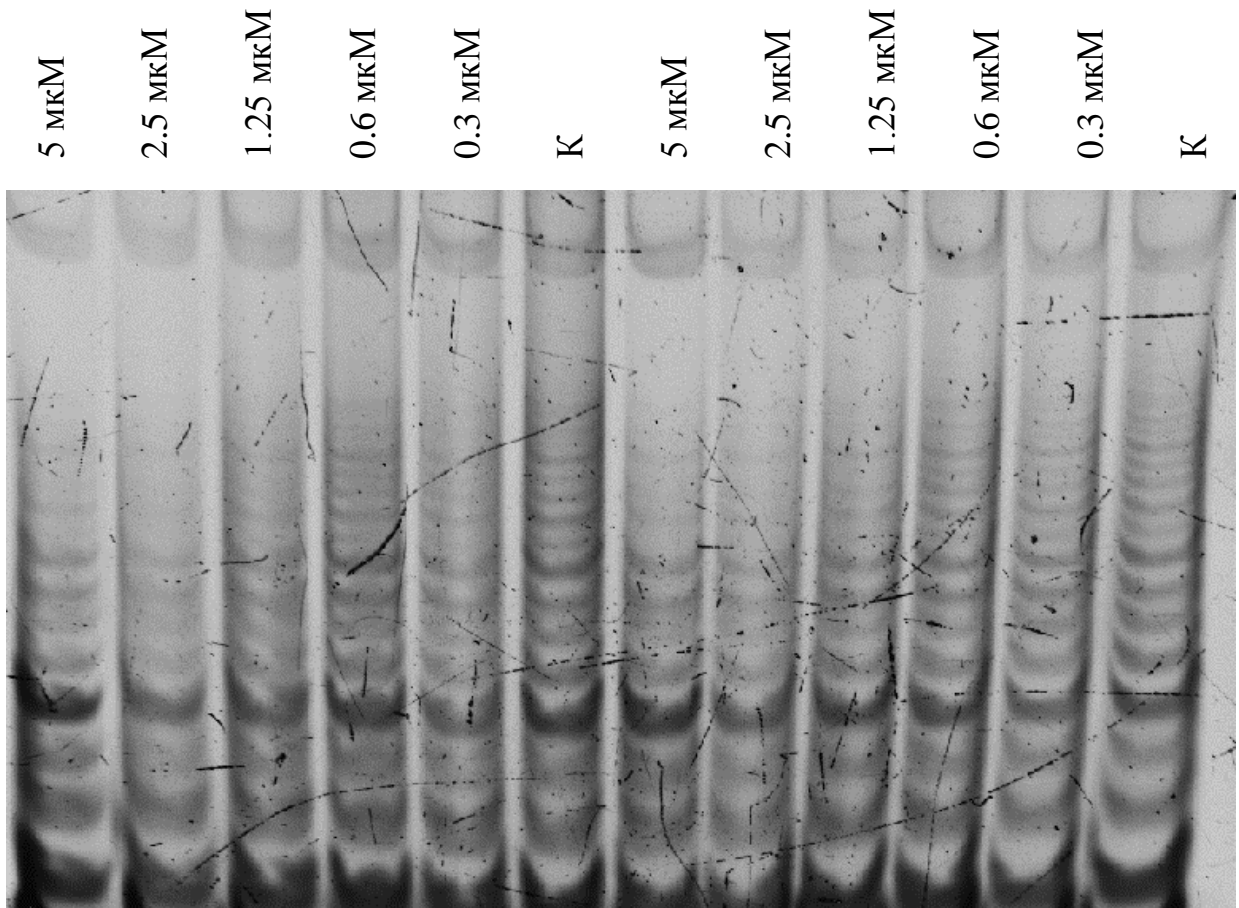


Рис. 3.9. Електрофореграма продуктів ампліфікації теломерних повторів з преінкубацією в присутності олігонуклеотидів GRN163 (1-6 доріжки) та GRN137227 (7-12 доріжки) 85 нМ з різною концентрацією Acr1 (К – контрольна реакція за відсутності Acr1)

Перевірка поєданого впливу досліджуваних олігонуклеотидів, як прямих інгібіторів теломерази, та активного низькомолекулярного непрямого інгібітора Acr2 з класу похідних акридину на синтез теломерних повторів показала зменшення IC_{50} активності теломерази при застосуванні T-oligo з та GRN163 з 9 мкМ до 5.42 мкМ та 4.5 мкМ відповідно (Рис. 3.10; Таблиця 3.1).

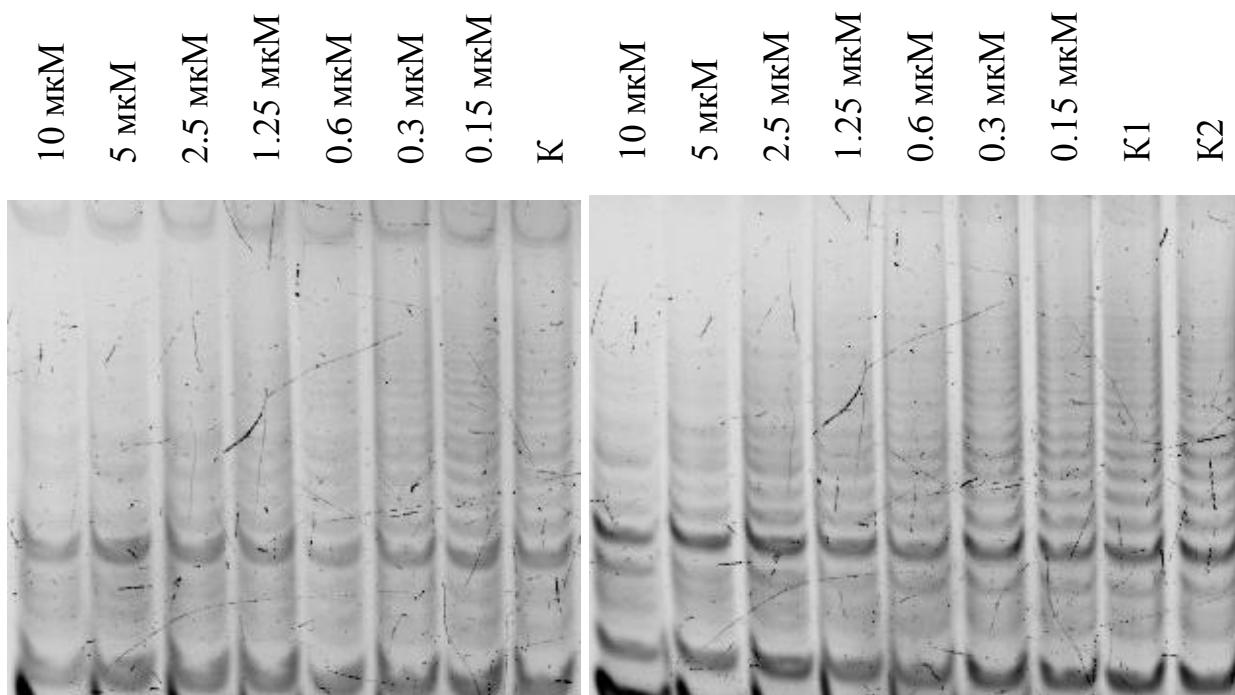


Рис. 3.10. Електрофореграми продуктів ампліфікації теломерних повторів з преінкубацією в присутності олігонуклеотидів GRN163 (зліва) та T-oligo (справа) 85 нМ з різною концентрацією Acr2 (К, К1, К2 – контрольні реакції за відсутності Acr2)

Дослідження впливу олігонуклеотидів на інгібувальну активність похідної порфірину ТМРур4 дало такий результат: спостерігалось зменшення значення IC_{50} з 1.75 мкМ до 1.08 мкМ при преінкубації з T-oligo та до 0.75 мкМ з GRN163 (Рис. 3.11; Таблиця 3.1).

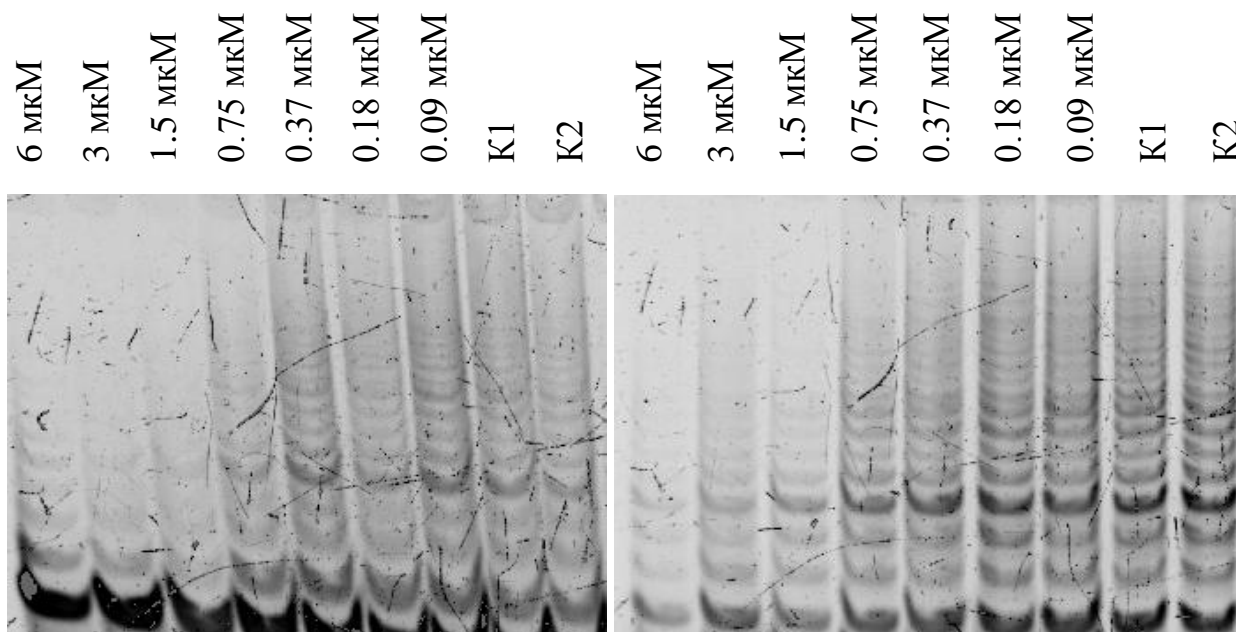


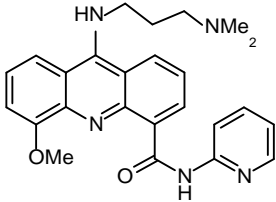
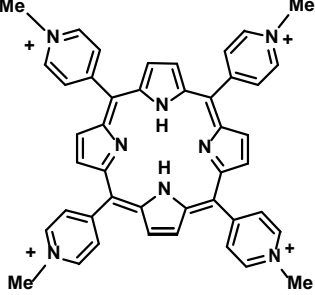
Рис. 3.11. Електрофореграми продуктів ампліфікації теломерних повторів з преінкубацією в присутності 85 нМ олігонуклеотидів GRN163 (зліва) та T-oligo (справа) з різною концентрацією TMRp4 (K1, K2 – контрольні реакції за відсутності TMRp4)

Результати впливу прямих інгібіторів теломерази (олігонуклеотидів) на інгібувальну здатність непрямих інгібіторів (похідних акридину та порфірину) наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Інгібуюча активність досліджуваних сполук за наявності олігонуклеотидів та без ($M \pm \sigma$)

Сполука	Формула	IC ₅₀ , мкМ		
		без олігонуклеотидів	з T-oligo	з GRN163
Acr1		5.3±0.27	2.65±0.13	2.46±0.12

Acr2		9±0.45	5.42±0.27	4.5±0.23
TMPyP4		1.75±0.09	1.08±0.05	0.75±0.04

Таким чином, в результаті дослідження поєданого впливу інгібіторів двох типів, що діють на різні елементи системи теломерази (сам фермент і його субстрат) відбувалося посилення інгібування синтезу теломерних повторів. Як видно із таблиці 3.1, зафіксовано зменшення значення IC_{50} , як мінімум, удвічі. У зв'язку з цим даний ефект можна назвати синергізмом. Такий ефект спостерігається для всіх досліджених низькомолекулярних інгібіторів, незалежно від структурного класу сполуки, що може свідчити про універсальність олігонуклеотидів як синергістів непрямих інгібіторів теломерази.

Найкраще себе показав олігонуклеотид GRN163, який в усіх експериментах давав сильніший ефект в реакціях у присутності похідних акридину та порфірину, ніж T-oligo, що можна пояснити різницею у два нуклеотиди в довжині їхніх послідовностей (13 та 11 нуклеотидів відповідно).

Можна вважати, що запропонований підхід до інгібування активності теломерази є перспективним і потребує подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Досліджена можливість поєданого впливу інгібіторів двох типів, що діють на різні елементи системи теломерази (сам фермент і його субстрат), на синтез теломерних повторів у безклітинній системі TRAP.
2. Було показано здатність олігонуклеотидних гомологів теломерної ДНК інгібувати теломеразу в системі TRAP в наномолярних концентраціях. Відпрацьовано оптимальні умови проведення експерименту за участі олігонуклеотидів, обрано їхню робочу концентрацію (85 нМ) та контрольну олігонуклеотидну послідовність.
3. Проведено тестування 2 похідних акридину та похідної порфірину в системі синтезу теломерів *in vitro* TRAP та визначено їхні значення IC_{50} : Acr1 – 5.3 мкМ, Acr2 – 9 мкМ, TMPyP4 – 1.75 мкМ.
4. Встановлено, що олігонуклеотиди GRN163 та T-oligo зменшують значення IC_{50} як мінімум удвічі, тобто діють як синергісти низькомолекулярних інгібіторів теломерази.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase / M. Ivancich [et al.]. // *Antioxidants* (Basel). – 2017. – Vol. 6, №1. – 15.
2. Thilagavathi J. Telomere length in reproduction / J. Thilagavathi, S. Venkatesh, R. Dada // *Andrologia*. – 2013. – Vol. 45. – P. 289–304.
3. O’Sullivan R.J. Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability / R.J. O’Sullivan, J. Karlseder // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 171–181.
4. De Lange T. Protection of mammalian telomeres / T. de Lange // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – P. 532–540.
5. TRF2 interaction with Ku heterotetramerization interface gives insight into c-NHEJ prevention at human telomeres / A. Ribes-Zamora [et al.]. // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 5. – P. 194–206.
6. Luke-Glaser S. Getting in (and out of) the loop: Regulating higher order telomere structures / S. Luke-Glaser, H. Poschke, B. Luke // *Front. Oncol.* – 2012. – Vol. 2. – 180.
7. Palm W. How shelterin protects mammalian telomeres / W. Palm, T. de Lange // *Annu Rev Genet.* – 2008. – Vol. 42. – P. 301–334.
8. TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo / E. Abreu [et al.]. // *Mol Cell Biol.* – 2010. – Vol. 30. – P. 2971–2982.
9. PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres / D. Liu [et al.]. // *Nat Cell Biol.* – 2004. – Vol. 6. – P. 673–680.
10. Sannohe Y. Overview of formation of G-quadruplex structures / Y. Sannohe, H. Sugiyama // *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* – 2010. – Chapter 17. – Unit 17.2.1-17.
11. Bochman M.L. DNA secondary structures: Stability and function of G-quadruplex structures / M.L. Bochman, K. Paeschke, V.A. Zakian // *Nat. Rev. Genet.* – 2012. – Vol. 13. – P. 770–780.

12. Zhang Q. Architecture of human telomerase RNA / Q. Zhang, N.K. Kim, J. Feigon // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – Vol. 108, №51. – P. 20325–20332.
13. Zvereva M.I. Telomerase: structure, functions, and activity regulation / M.I. Zvereva, D.M. Shcherbakova, O.A. Dontsova // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2010. – Vol. 75, №13. – P. 1563-83.
14. The secrets of telomerase: Retrospective analysis and future prospects / S. Kamal [et al.]. // *Life Sciences*. – 2020. – Vol. 257. – 118115.
15. Schmidt, J. C. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation / J. C. Schmidt, T. R. Cech // *Genes & Development*. – 2015. – Vol. 29, №11. – P. 1095–1105.
16. Cech T.R. Beginning to understand the end of the chromosome / T.R. Cech // *Cell*. – 2004. – Vol. 116, №2. – P. 273–279.
17. Theimer C.A. Structure and function of telomerase RNA / C.A. Theimer, J. Feigon // *Curr Opin Struct Biol*. – 2006. – Vol. 16. – P. 307–318.
18. Wang Y. Structural Biology of Telomerase / Y. Wang, L. Sušac, J. Feigon // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2019. – Vol. 11, №12. – a032383.
19. Blackburn E.H. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA / E.H. Blackburn, K. Collins // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. – Vol. 3, №5. – a003558.
20. Schmidt J.C. Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres / J.C. Schmidt, A.B. Dalby, T.R. Cech // *Elife*. – 2014. – Vol. 3. – e03563.
21. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human / T.M. Nakamura [et al.]. // *Science*. – 1997. – Vol. 277. – P. 955–959.
22. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly / A.S. Venteicher [et al.]. // *Cell*. – 2008. – Vol. 132. – P. 945–957.
23. A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP

- proteins / T.H. King [et al.]. // *Mol Cell Biol.* – 2001. – Vol. 21. – P. 7731–7746.
24. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis / A.S. Venteicher [et al.]. // *Science.* – 2009. – Vol. 323. – P. 644–648.
25. Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1 / A. Freund [et al.]. // *Cell.* – 2014. – Vol. 159. – P. 1389–1403.
26. Parks J.W. Coordinated DNA dynamics during the human telomerase catalytic cycle / J.W. Parks, M.D. Stone // *Nat Commun.* – 2014. – Vol. 5. – 4146.
27. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer / N. W. Kim [et al.]. // *Science.* – 1994. – Vol. 266. – P. 2011–2015.
28. Cesare A.J. Alternative lengthening of telomeres: Models, mechanisms and implications / A.J. Cesare, R.R. Reddel // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 319–330.
29. TERT promoter mutations in cancer development / B. Heidenreich [et al.]. // *Curr Opin Genet Dev.* – 2014. – Vol. 24. – P. 30–37.
30. Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer / S. Borah [et al.]. // *Science.* – 2015. – Vol. 347. – P. 1006–1010.
31. Armanios M. The telomere syndromes / M. Armanios, E.H. Blackburn // *Nat Rev Genet.* – 2012. – Vol. 13. – P. 693–704.
32. Xu Y. Telomere and Telomerase Therapeutics in Cancer / Y. Xu, A. Goldkorn // *Genes.* – 2016. – Vol. 7, №6. – 22.
33. Cesare A.J. Alternative Lengthening of Telomeres in Mammalian Cells / A.J. Cesare, R.R. Reddel. – Landes Bioscience (Austin, TX, USA), 2000.
34. G-quadruplex formation at the 3' end of telomere DNA inhibits its extension by telomerase, polymerase and unwinding by helicase / Q. Wang [et al.]. // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol. 39. – P. 6229–6237.
35. Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: In vitro and in vivo studies in acute leukemia / T. Tauchi [et al.]. // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25. – P. 5719–5725.

36. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function / A.M. Burger [et al.]. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 1489–1496.
37. Pharmacodynamics of the G-quadruplex-stabilizing telomerase inhibitor 3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8Hquino[4,3,2-kl]acridinium methosulfate (RHPS4) in vitro: Activity in human tumor cells correlates with telomere length and can be enhanced, or antagonized, with cytotoxic agents / J.C. Cookson [et al.]. // *Mol. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 68. – P. 1551–1558.
38. Antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines / J. Fujimori [et al.]. // *J. Orthop. Res.* – 2011. – Vol. 29. – P. 1707–1711.
39. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer / P.J. Bates [et al.]. // *Exp. Mol. Pathol.* – 2009. – Vol. 86. – P. 151–164.
40. Pitman R.T. Mechanism of DNA damage responses induced by exposure to an oligonucleotide homologous to the telomere overhang in melanoma / R.T. Pitman, L. Wojdyla, N. Puri // *Oncotarget.* – 2013. – Vol. 4. – P. 761–771.
41. T-oligo as an anticancer agent in colorectal cancer / L. Wojdyla [et al.]. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 446. – P. 596–601.
42. Radiosensitization of mammary carcinoma cells by telomere homolog oligonucleotide pretreatment / D. Weng [et al.]. // *Breast Cancer Res.* – 2010. – Vol. 12. – R71.
43. Her, Y.R. Ubiquitin ligase RLIM modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of TRF1 / Y.R. Her, I.K. Chung // *J. Boil. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 8557–8566.
44. Riffell J.L. Tankyrase-targeted therapeutics: Expanding opportunities in the parp family / J.L. Riffell, C.J. Lord, A. Ashworth // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2012. – Vol. 11. – P. 923–936.
45. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent / A. Asai [et al.]. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P. 3931–3939.

46. Armanios M. Treating myeloproliferation—On target or off? / M. Armanios, C.W. Greider // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373. – P. 965–966.
47. Collins K. Ciliate telomerase biochemistry / K. Collins // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol. 68. – P. 187–218.
48. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated tetrahymena telomerase RNAs / G.L. Yu [et al.]. // *Nature.* – 1990. – Vol. 344. – P. 126–132.
49. Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA / S. Li [et al.]. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 4833–4840.
50. Reprogramming murine telomerase rapidly inhibits the growth of mouse cancer cells in vitro and in vivo / T. Xu [et al.]. // *Mol. Cancer Ther.* – 2010. – Vol. 9. – P. 438–449.
51. Non-canonical NF- κ B signalling and ets1/2 cooperatively drive c250t mutant tert promoter activation / Y. Li [et al.]. // *Nat. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 17. – P. 1327–1338.
52. Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer / T. Kawashima [et al.]. // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 285–292.
53. Noninvasive and real-time monitoring of the therapeutic response of tumors in vivo with an optimized hTERT promoter / S.T. Yu [et al.]. // *Cancer.* – 2012. – Vol. 118. – P. 1884–1893.
54. Selective ablation of human cancer cells by telomerase-specific adenoviral suicide gene therapy vectors expressing bacterial nitroreductase / A.E. Bilslund [et al.]. // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 370–380.
55. Telomerase-specific suicide gene therapy vectors expressing bacterial nitroreductase sensitize human cancer cells to the pro-drug CB1954 / J.A. Plumb [et al.]. // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20. – P. 7797–7803.
56. Quantitative assessment of telomerase components in cancer cell lines / S.C. Akincilar [et al.]. // *FEBS Lett.* – 2015. – Vol. 589. – P. 974–984.

57. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes / R.H. Vonderheide [et al.]. // *Immunity*. – 1999. – Vol. 10. – P. 673–679.
58. *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution / M.L. Pardue [et al.]. // *Trends Genet.* – 1996. – Vol. 12. – P. 48–52.
59. Sigma-Aldrich. Bradford Reagent #B6916.
60. Therapeutic Potential of T-oligo and its Mechanism of Action / C. Bertram [et al.]. // *Metabolomics*. – 2012. – Vol. 3. – P. 1-7.
61. G-quadruplex structures in the human genome as novel therapeutic targets / J. Bidzinska [et al.]. // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18, №10. – P. 12368-12395.
62. Structural Basis of DNA Quadruplex Recognition by an Acridine Drug / N. H. Campbell [et al.]. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130, №21. – P. 6722–6724.
63. Arola A. Stabilisation of G-Quadruplex DNA by Small Molecules / A. Arola, R. Vilar // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 8. – P. 1405-1415.
64. Specific binding of anionic porphyrin and phthalocyanine to the G-quadruplex with a variety in vitro and in vivo application / H. Yaku [et al.]. // *Molecules*. – 2012. – Vol.17. – P. 10586-10613.