

МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА, ОРДЕНА ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ
И ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет

Ажибек Дулат Мейирбекович

Ингибирование теломеразы человека

диссертация на соискание учёной степени

кандидата химических наук

02.00.10-биоорганическая химия

Научные руководители:

к.х.н., доц. Зверева М.Э.

член-корр. РАН, проф. Донцова О.А.

МОСКВА

2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Введение в обзор литературы.....	10
1.2 Иммунотерапия.....	12
1.3 Генная терапия.....	15
1.4 Ингибирование работы теломеразы.....	16
1.4.1 Методы измерения теломеразной активности.....	18
1.4.1.1 ТРАП анализ.....	18
1.4.1.2 Устранение ингибирования ПЦР.....	24
1.4.1.3 <i>In vivo</i> ТРАП.....	25
1.4.2 Низкомолекулярные вещества и Иметелстат.....	26
1.5 Ингибирование биогенеза теломеразы.....	32
1.5.1 Ингибирование транскрипции hTERT.....	32
1.5.2 Ингибирование пострансляционной модификации hTERT.....	35
1.5.3 Уменьшение доступности теломер для теломеразы.....	36
1.5.4 Олигонуклеотиды для ингибирования теломеразы.....	43
1.5.4.1 Применение олигонуклеотидов, взаимодействующих с мРНК hTERT.....	45
1.5.4.2 Воздействие олигонуклеотидных ингибиторов теломеразы на hTR.....	47
1.5.4.3 Олигонуклеотидные ингибиторы, нарушающие сборку теломеразы.....	48

1.6 Заключение.....	48
2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	50
2.1 Разработка метода детекции теломеразной активности.....	50
2.1.1 Очистка теломеразного экстракта.....	50
2.1.2 Устранение ингибирования ПЦР.....	56
2.1.3 Проверка метода на низкомолекулярных G4-квадруплекс лигандах... 61	
2.1.4 Ингибирование теломеразы новым металлоорганическим соединением, содержащим медь.....	63
2.1.5 Рекомбинантная экспрессия теломеразы и вальпроевая кислота.....	66
2.2 Разработка новых подходов к ингибированию теломеразы.....	71
2.2.1 Дизайн химерных бифункциональных олигонуклеотидов.....	71
2.2.2 Ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами <i>in vitro</i> ..76	
2.2.3 Ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами <i>in vivo</i> ..79	
2.2.3.1 Проверка ингибирования ПЦР для <i>in vivo</i> ТРАП метода.....	81
2.2.3.2 Стабильность химерных олигонуклеотидов в клеточных линиях и защита 5'-конца.....	83
2.2.3.3 Длина и расположение линкера.....	84
2.2.3.4 Специфичность химерных олигонуклеотидов.....	85
2.2.3.5 Токсичность химерных олигонуклеотидов.....	87
2.2.3.6 Уровень теломеразной РНК в системе <i>in vivo</i> в присутствии химерных олигонуклеотидов.....	87
2.2.3.7. Сборка теломеразного комплекса в присутствии химерных олигонуклеотидов в условиях <i>in vivo</i>	89
2.3 Заключение.....	93
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	95

3.1 Реактивы и биопрепараты.....	95
3.2 Получение S100 экстракта.....	100
3.3 Проверка деградации олигонуклеотида в S100.....	100
3.4 ТРАП с визуализацией в полиакриламидном геле («Классический» ТРАП)	100
3.5 Клонирование.....	101
3.5.1 Получение конструкций для рекомбинантной экспрессии теломеразы.....	101
3.5.2 ПЦР.....	102
3.5.3 Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле.....	103
3.5.4 Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля.....	103
3.5.5 Приготовление векторов и вставок.....	104
3.5.6 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	105
3.5.7 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	105
3.5.8 Выделение плазмидной ДНК для клонирования.....	106
3.6 Выделение плазмидной ДНК для трансфекции в эукариотические клетки.....	106
3.7 Трансфекция плазмид в эукариотические клетки для анализа и обработка вальпроевой кислотой (ВПА).....	108
3.8 Экспрессия и очистка теломеразы.....	109
3.9 Метод измерения ингибирования теломеразы <i>in vitro</i> (RQ-ТРАП).....	110
3.10 Прямой метод измерения теломеразной активности.....	111
3.11 Введение радиоактивной метки на 5'-конец олигонуклеотида 15bpLC.....	112
3.12 Трансфекция клеток ингибиторными олигонуклеотидами и получение клеточного экстракта.....	112
3.13 <i>In vivo</i> RQ-ТРАП.....	113

3.14 Проверка сборки теломеразы.....	113
3.15 Определение количества hTR с помощью метода обратной транскрипции сопряженной с ПЦР (RQ-ПЦР).....	114
3.16 Получение hTR методом <i>in vitro</i> T7-транскрипции.....	115
3.17 Определение уровни hTR в клетках с помощью RQ-ПЦР.....	115
3.18 МТТ анализ цитотоксичности олигонуклеотидов.....	116
4 ВЫВОДЫ.....	117
5 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
6 ПРИЛОЖЕНИЕ.....	133
Приложение 1.....	133
Приложение 2.....	137
Приложение 3.....	141

Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотреитол

мРНК – матричная РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКаза – рибонуклеаза

dNTP – смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов

TR – теломеразная РНК (Telomerase RNA)

TERT – белок теломеразной обратной транскриптазы (Telomerase reverse transcriptase), hTERT – TERT человека

ТРАП – протокол амплификации теломерных повторов

FDA - (Food and Drug Administration - Министерства здравоохранения и социальных служб США, занимающееся контролем качества пищевых продуктов, лекарственных препаратов)

G4-лиганды – соединения, связывающиеся с G4-квадруплексами

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ВПА – вальпроевая кислота

ПНК – пептидная нуклеиновая кислота

Введение

Число вновь диагностируемых онкологических заболеваний увеличивается с каждым годом. Как причина смертности онкозаболевания являются первыми в экономически развитых и стоят на втором месте в развивающихся странах [1]. Получение данных, позволяющих в дальнейшем разработать новые подходы для лечения таких заболеваний, несомненно, актуальная задача.

Причиной онкологических заболеваний являются свои же клетки организма, в которых происходит нарушение механизма контроля числа делений, что приводит к неограниченному росту клеток. Это делает сложным диагностику на ранних стадиях заболевания и последующую селективную борьбу с такими клетками. Перерождение соматических клеток в опухолевые достаточно сложный и долгий процесс, который еще до конца не изучен для всех известных типов клеток. До появления злокачественной опухоли в составляющих ее клетках происходит появление многочисленных нарушений генома, приводящих к активации или подавлению функций генов. Мутации, приводящие к перерождению, могут быть различны для каждого типа клеток, поэтому даже для одного органа может встречаться большое количество видов и субтипов опухоли [2].

Подавление работы генов, которые активированы в опухолях – это современный подход к терапии онкологических заболеваний, который называется целевой или таргетной терапией. При целевой терапии обычно ингибируется процесс или нейтрализуется белок (его мРНК) без которых опухолевая клетка не сможет жить. Такие процессы и белки (мРНК) называются мишенями. Спектр возможных мишеней и разрабатываемых к ним направленных препаратов для терапии онкозаболеваний достаточно широкий.

Однако из-за гетерогенности опухоли в ней могут присутствовать опухолевые клетки различных типов с разными мишенями, поэтому наибольший интерес представляет исследование мишеней, встречающихся в различных типах опухолевых клеток. Чем универсальнее мишень, тем больше типов опухолевых клеток будет подвергаться терапии. К таким универсальным мишеням относится теломераза, поддерживающая длину теломер [3].

Концы хромосом млекопитающих не содержат генов и состоят из повторяющихся последовательностей TTAGGG, связанных с различными специфическими белками. Такие концевые ДНК-белковые структуры называются теломерами. ДНК компонент теломер состоит из повторяющихся двухцепочечных участков и имеет 3'- выступающий G-богатый конец длиной 50-400 н.о. [4].

При каждом делении клетки длина теломер укорачивается. Механизм укорочения заключается в недорепликации ДНК. В прошлом веке стало известно, что большинство соматических клеток делится ограниченное количество раз [5], так как в клетках присутствуют механизмы ареста продвижения по клеточному циклу, не допускающие критического укорочения теломер. При критическом укорочении структура теломер теряется, что приводит к апоптозу. Клетки, потерявшие механизмы ареста клеточного цикла, продолжают делиться до критического укорочения теломер [6]. При потере теломерами своей структуры концы хромосом начинают объединяться путем слияния концов, что приводит к гибели клетки [7]. Некоторые из таких клеток могут избежать гибели за счет активации теломеразы. Клетки, потерявшие механизмы ареста и избежавшие дальнейшей гибели, могут переродиться в опухолевые клетки.

Теломераза человека – это рибонуклеопротеиновый комплекс, основными компонентами которого являются теломеразная РНК (hTR), каталитическая

обратная транскриптаза (hTERT), а так же другие дополнительные белки [8]. Теломераза обладает обратнo-транскриптазной активностью и *de novo* синтезирует теломерные повторы на концах существующих теломер

Не все компоненты теломеразы, необходимые для ее функционирования в клетке, можно рассматривать как потенциальные мишени для ингибирования теломеразы [9], только воздействие hTERT и hTR абсолютно необходимы для теломеразной активности. Остальные компоненты теломер участвует в биогенезе теломеразы и не являются необходимым для активности теломеразы.

Теломераза экспрессируется в 80-90% типов опухолевых клеток [10]. Выключение работы теломеразы приводит к исчезновению одного из признаков опухолевой клетки – неограниченного деления [2]. Целью литературного обзора стало обобщение данных об использовании теломеразы как мишени для разработки противоопухолевых препаратов. Диссертационная работа посвящена поиску новых ингибиторов теломеразы и подходов для их создания.

1. Обзор литературы

1.1. Введение в обзор литературы

Активирование теломеразы препятствует укорочению хромосом в процессе репликации и обеспечивает неограниченный потенциал деления клеток [11]. Известно, что теломераза активна в эмбриональных, стволовых, половых и опухолевых клетках [12,13]. Теломераза является перспективной мишенью для противораковой терапии. Однако, использование ингибиторов теломеразы может сопровождаться побочными эффектами, затрагивающими, в первую очередь, стволовые клетки, в которых теломераза активна и необходима для поддержания регенеративного потенциала и жизнеспособности. Несмотря на это, различные подходы к ингибированию теломеразы разрабатываются уже более десяти лет [14].

Для блокирования работы теломеразы можно влиять на биосинтез компонентов комплекса, созревание, сборку или корректное взаимодействие между компонентами теломеразы, на взаимодействие комплекса в целом с субстратом. На рис. 1 представлены основные этапы, на которых можно заблокировать функционирование теломеразы, и мишени для их воздействия. Такими основными мишенями являются процессы, связанные с транскрипцией гена hTERT (рис. 1, цифра 1), изменение направления сплайсинга мРНК hTERT (рис. 1, цифра 2), деградация транскриптов hTERT и hTR (рис. 1, цифра 3 и 4), ингибирование посттрансляционной модификации (рис.1, цифра 6), а так же нарушение сборки теломеразного комплекса (рис. 1, цифра 7), ингибирование ферментативной активности собранного теломеразного комплекса и потеря концами теломер доступности для взаимодействия с теломеразой (отмечено на рисунке 1 цифрой 8). Созревание первичного транскрипта hTR еще не изучено, поэтому использование этой стадии в качестве мишени не является возможным.

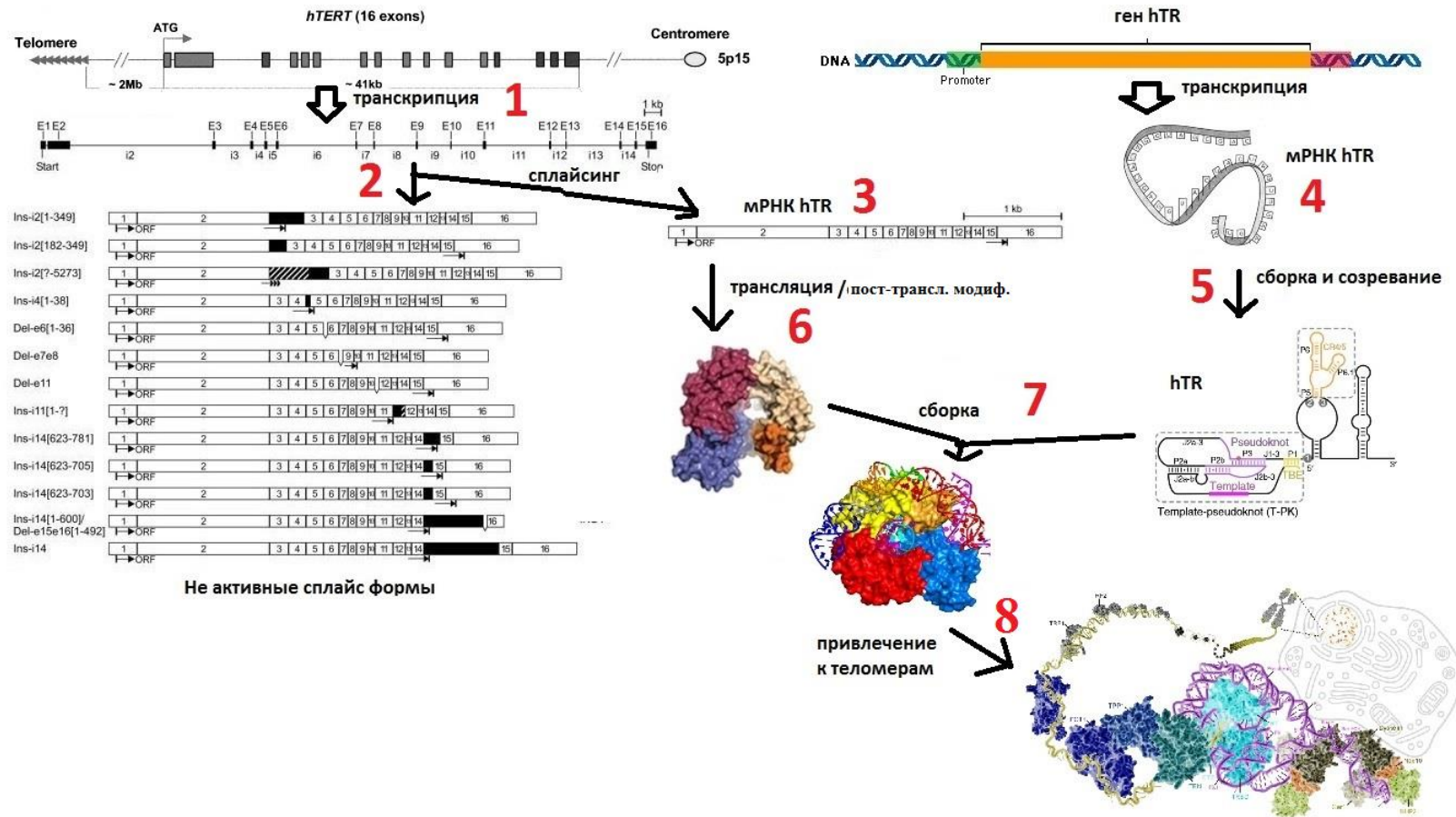


Рис. 1. Общая схема биогенеза теломеразы и уровни воздействия. 1 – ингибирование транскрипции гена hTERT, деградация первичного транскрипта и генная терапия; 2 – перенаправление сплайсинга мРНК hTERT в сторону форм, не кодирующих белок; 3 – деградация зрелой формы мРНК hTERT; 4 – деградация первичного транскрипта hTR; 5 – созревания первичного транскрипта hTR; 6 – посттрансляционная модификация и иммунотерапия; 7 – нарушение сборки теломеразного комплекса; 8 – уменьшение доступности концов теломер для теломеразы и ингибирование активной теломеразы.

Недавно ряд ингибиторов теломеразы перешли в стадию клинических испытаний, и полученные данные свидетельствуют о перспективности использования ингибиторов теломеразы [15]. В данном обзоре нами будет рассмотрено ингибирование работы теломеразы в целом [16], а так же иммунотерапия и генная терапия, нарушение биогенеза теломеразы. Иммунотерапия является на данный момент наиболее успешным подходом.

1.2 Иммунотерапия

Теломераза является РНК-белковым комплексом, состоящим в основном из hTERT и hTR. В клетке экспрессия hTERT коррелирует с активностью теломеразы, тогда как hTR присутствует, предположительно, во всех тканях [17]. В связи с этим hTERT считается наиболее селективной мишенью среди всех компонентов теломеразы. Использование hTERT как мишени предполагает на два подхода: иммунотерапию и генную терапию.

Иммунотерапия – это стимуляция иммунной системы пациента для атаки опухолевых клеток. Иммунотерапия является наиболее успешной из всех разрабатываемых направленных на теломеразу стратегий. Суть метода заключается в том, что используют пептид, несущий часть последовательности hTERT. В результате активируются CD8⁺ и/или CD4⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), специфически распознающие hTERT-позитивные опухолевые клетки. Были выявлены более 30-ти последовательностей пептидов из hTERT, вызывающих иммунный ответ как *in vitro*, так и *in vivo* [18], наиболее успешными и известными из них оказались GRNVAC1 и GV1001 [19]. Основными задачами при разработке таких пептидов - является увеличение их иммуногенности и подавление иммунологической

толерантности к пептиду, т.к. антигены hTERT для человеческого организма является «своими». В двух вышеприведенных препаратах используются два разных подхода.

GV1001 (KAEL-GemVax Co. Ltd., Gangnam-gu Seoul, Republic of Korea) представляет собой 16-звенный пептид, имеющий последовательность соответствующую области 611-626 аминокислот hTERT. Пептид используется вместе с адьювантами, такими как гранулоцит-моноцит стимулирующий фактор или толл-подобный рецептор 7. Это предотвращает быструю деградацию пептида до его распознавания антиген-представляющей клеткой и усиливает иммуногенность пептида [19]. После более чем 8-ми лет клинических испытаний I/II фазы был сделан вывод, что GV1001 необходимо использовать в комбинации с химиотерапией, т.к. сам по себе GV1001 не достаточно эффективен [20,21]. Однако последние клинические испытания III фазы этого препарата совместно с применяемыми химиотерапевтическими препаратами (гемцитабин и капецитабин) не показали эффективность GV1001 [22].

В организме пациента может содержаться несколько и/или множество эпитопов ЦТЛ против hTERT. Препараты, основанные на введении пептида, могут активировать только один из эпитопов ЦТЛ, тем самым вызывая только моноклональный ответ. Для активации различных эпитопов ЦТЛ против hTERT можно использовать дендритные клетки. Известно, что дендритные клетки являются наиболее сильными антиген представляющими клетками и продуцирует антигены для широкого круга главного комплекса гистосовместимости (МНС) [23], тем самым вызывая поликлональный ЦТЛ ответ. Использование дендритных клеток элиминирует тестирование эффективности разных участков hTERT в виде пептида на пациентах. GRNVAC1 терапия заключается в следующем: молодая дендритная клетка

выделяется из крови пациента методом лейкофореза, затем в условиях *ex vivo* (проведение экспериментов в живой ткани, перенесённой из организма в искусственную внешнюю среду) в клетку вводится мРНК, кодирующая hTERT, и часть лизосомального мембранного белка (LAMP). Такая модифицированная клетка созревает в условиях *ex vivo* и вводится обратно пациенту [24]. LAMP необходим для направления hTERT пептида в лизосому для его деградации и специфической активации CD4+ пути (рис.2А) [25]. CD4+ механизм заключается в активации Т-хелперных клеток, которые, в свою очередь, активирует как производство антител, так и ЦТЛ. Такой механизм вызывает более широкий иммунный ответ по сравнению с CD8+ путем (рис.2Б) [26].

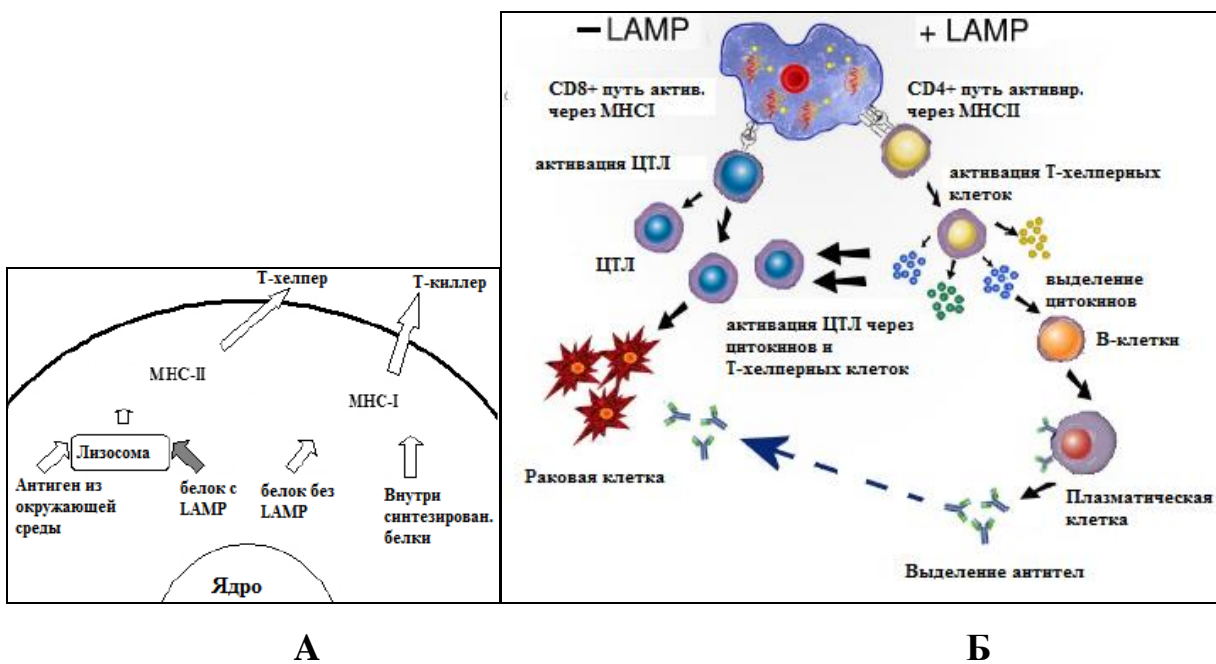


Рис. 2. Механизм действия hTERT-LAMP вакцины. А – внутриклеточные механизмы приводящие к активации ЦТЛ. Б – общая схема представления механизма активации ЦТЛ дендритными клетками.

Для этой терапии было проведено всего одно клиническое испытание II фазы, начатое в 2007 год. Была показана эффективность GRNVAC1 (была

достигнута ремиссия у 19 пациентов из 21 с дальнейшим рецидивом), однако дальнейшие исследования были остановлены, возможно, из-за дороговизны такой терапии [27].

Основная проблема иммунотерапии при лечении онкозаболевании, вставшая перед разработчиками нового терапевтического подхода, заключается в сильной зависимости от иммунитета больного. Некоторые типы опухолевых клеток, выделяя иммуносупрессоры, подавляют иммунитет и препятствуют такой терапии [28].

1.3. Генная терапия

Для генной терапии предполагается использовать искусственный вирус, либо являющийся литическим вирусом, либо содержащий «суицидный» ген под промотором, который специфически активен в опухолевых клетках. Преимуществом генной терапии является быстрая гибель клеток, что было показано *in vitro* [29]. Кроме того, можно использовать несколько промоторов одновременно, что показано в работе [30]. Примером может служить литический вирус CG5757, который содержит промоторы hTERT и E2F1. E2F1 является транскрипционным фактором и активирован в видах опухолей, не экспрессирующих белок ретинобластомы (т.к. преимущественно находится в комплексе с этим белком), составляющих 85% всех типов опухолевых поражений. Одной из основных проблем генной терапии является доставка вируса во все клетки организма и появление иммунного ответа к вирусу, что сильно ограничивает использование такого подхода [18]. Первые поколения аденовирусов создавались неспособными к репликации, чтобы обеспечить биологическую безопасность. Примером такого аденовируса является

Ad/TRAIL-F/RGD, в котором ген лиганда фактора некроза опухоли, который вызывает апоптоз (TRAIL), экспрессируется под hTERT промотором [29]. Однако эффект от использования аденовирусов первого поколения оказался коротким.

Второе поколение аденовирусов имеет индуцированную репликацию в клетках, в которых активен промотор hTERT. Для репликации аденовирусам необходимы белки E1A и E1B, закодированные в гене E1. Если поменять собственный промотор E1 гена на hTERT промотор, то такой вирус будет реплицироваться и убивать только клетки, экспрессирующие hTERT. Примером такого вируса является ОВР-301 (препарат под названием Теломелизин), прошедший I стадию клинического испытания, в котором он показал хорошую переносимость [31]. Планируется II стадия клинического испытания в случае гепатокарциномы (опухоль печени) [32]. Успех такого препарата связан с тем, что такой полноценно размножающийся вирус однократно вводился внутрь опухоли. Вирусы размножаются и лизируют опухолевые клетки, новые вирусы преимущественно заражают соседние опухолевые клетки. Альтернативой распознаванию клеток, экспрессирующих hTERT, рассматривается прямое ингибирование теломеразы.

1.4. Ингибирование работы теломеразы

Теломераза активна в половых, стволовых и опухолевых клетках. При ингибировании теломеразы опухолевые клетки продолжают делиться некоторое время до критического укорочения теломер, после которого вступают в апоптоз [33]. Период между началом ингибирования теломеразы и индуцированным укорочением теломер и апоптозом, называют лаг-временем.

Этот период может составить до 100 дней в зависимости от типа клеток [34]. Однако, если длина теломер в опухолевых клетках изначально короткая, то апоптоз наступает раньше, чем у стволовых клеток (рис.3).

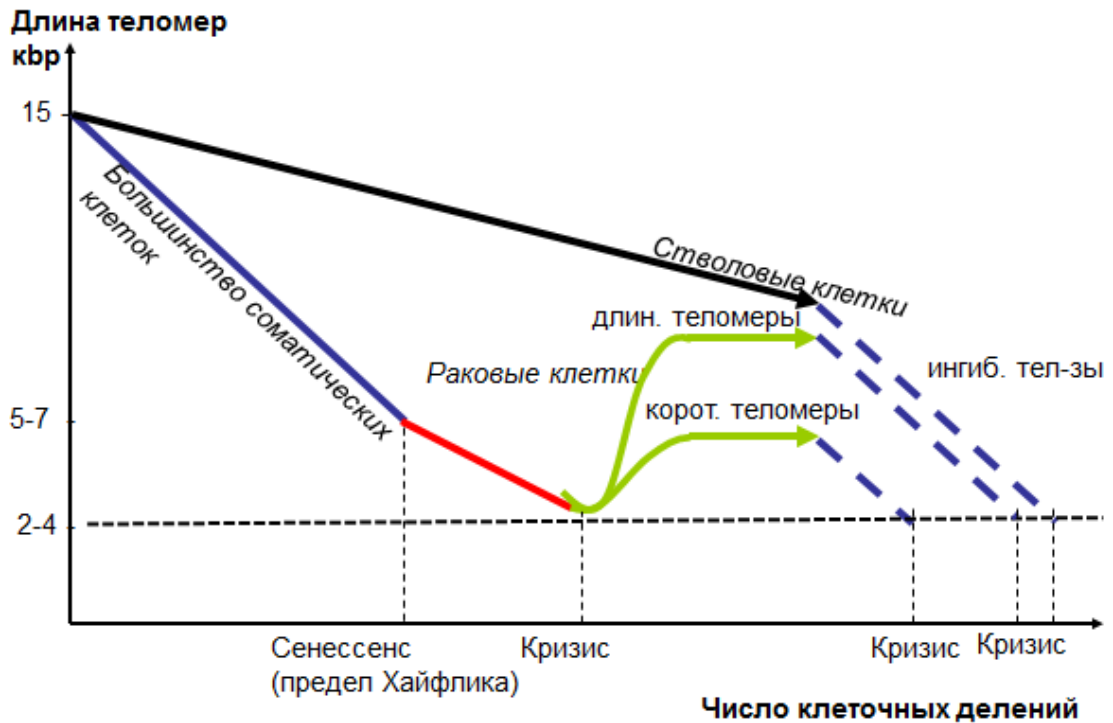


Рис. 3. Схематическое представление корреляции изменения длины теломер и биологических процессов.

В связи с этим длина теломер опухолевой клетки является основным критерием выбора системы для тестирования препарата, ингибирующего теломеразу [19]. Перед тем как рассматривать и сравнивать различные ингибиторы теломеразной активности необходимо понять, как определяют способность веществ блокировать работу теломеразы.

1.4.1. Методы измерения теломеразной активности

Для исследования ингибирования теломеразы, в первую очередь, необходим надежный метод. Из-за низкой концентрации теломеразы в клетке (100 молекул на 1 клетку) [35] детекция компонентов теломеразы и ее активности становится сложным процессом. Первым для исследования теломеразы использовался прямой метод детекции теломеразной активности [36]. Этот метод основан на удлинении праймера теломеразой в клеточном экстракте в присутствии радиоактивно меченого нуклеотида, который включается в теломерный повтор. Далее продукты удлинения анализируют электрофорезом. Этот метод очень надежный, показывает не только активность, но и количество добавленных теломерных повторов. Однако у этого метода очень низкая чувствительность, из-за чего необходимо большое количество теломеразы и радиоактивного материала, что невозможно для обычного использования в обычных исследовательских лабораториях [37].

1.4.1.1. ТРАП анализ

Исследование теломеразы начало бурно развиваться после разработки метода амплификации теломерных повторов (ТРАП) в 90-е годы прошлого столетия [38]. ТРАП состоит из 3 основных шагов: удлинение праймера теломеразой, амплификация получившегося продукта (продуктов) и детекция. На шаге удлинения теломерные повторы прибавляются теломеразой, присутствующей в клеточном экстракте, к олигонуклеотиду TS (telomerase substrate) – теломеразному субстрату. Отличительная особенность этого

праймера в том, что он не имеет теломерных повторов (5'-ААТССГТССГАГСАГАГТТ-3'), хотя и узнается теломеразой как субстрат. Следующий шаг – увеличение количества продукта с помощью специфических праймеров методом ПЦР. Затем следует детекция, как правило, методом электрофоретического разделения и последующего фотографирования. Получаются полосы, самая нижняя из которых соответствует одному добавленному теломерному повтору. Следующая полоса соответствует двум добавленным теломерным повторам и т.д. (рис.4) [39]. Этот вариант считают «классическим» вариантом метода ТРАП.



Рис. 4. Схематическое представление метода ТРАП.

За счет усиления сигнала методом ПЦР, ТРАП является высоко чувствительным методом. Для анализа достаточно от 10 до 1000 клеток. Однако есть работы [40, 41], в которых было показано, что при использовании ТРАП в исследовании ингибирования теломеразы *in vitro* происходит и ингибирование ПЦР. Стандартным методом проверки ингибирования ПЦР является внутренний контроль (ITAS), это олигонуклеотид не имеющий теломерной последовательности (рис. 5), который исходно присутствует в смеси и амплифицируется на шаге ПЦР с помощью TS присутствующего в

смеси и дополнительно добавленного NT-праймера. Было показано, что если есть вещества, взаимодействующее с теломерной последовательностью, то они ингибируют амплификацию продуктов удлинения теломеразой на шаге ПЦР, но не ингибируют амплификацию ITAS контроля [40,41].

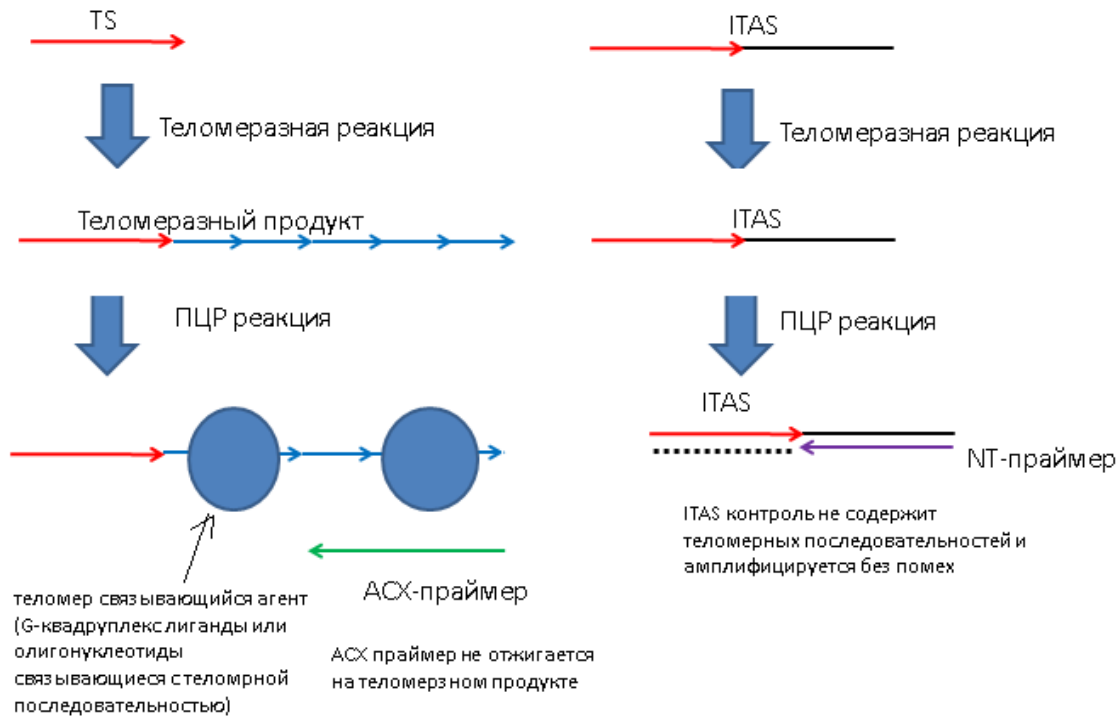


Рис. 5. Схематический рисунок, показывающий, что амплификация внутреннего контроля ITAS не ингибируется теломер связывающими агентами, тогда как амплификация теломеразного продукта ингибируется.

Необходимо учитывать, что «классический» ТРАП – это полуколичественный метод. Это наглядно видно на примере ингибитора теломеразы VIBR1532 (табл. 1). Ингибирование теломеразы обычно оценивается с помощью IC50 – концентрация ингибитора, при которой активность теломеразы составляет 50% от исходной. Наиболее надежный прямой метод определения теломеразной активности дает IC50 в пределах 0,1мкМ, тогда как ТРАП с последующим использованием геля для детекции дает IC50 в пределах 5мкМ.

Табл. 1.

Данные об ингибировании теломеразы (IC50) веществом BIBR1532.

Метод измерения	IC50, мкМ	ссылка
прямой метод	~0.1	[42]
прямой метод	0.083	[43]
TRAP	5.62	[44]
TRAP	5-20	[41]
TRAP	5	[45]
TRAP	4.6	[46]

Такое различие связано с тем, что после усиления сигнала ПЦР в геле детектируется количество амплифицированной ДНК, а ДНК амплифицируется до выхода на плато. При детекции с использованием гель-электрофореза фактически детектируется только плато, что хорошо иллюстрируется кривыми ПЦР реального времени (рис. 6). Например, при концентрации 0,1 мкМ BIBR1532 ингибирует теломеразу наполовину, однако при амплификации теломеразного продукта его количество выходит на насыщение (рис. 6А). Соответственно, при дальнейшей детекции в геле разница между не ингибированной теломеразой и наполовину ингибированной будет намного меньше, чем в 2 раза (рис. 6Б).

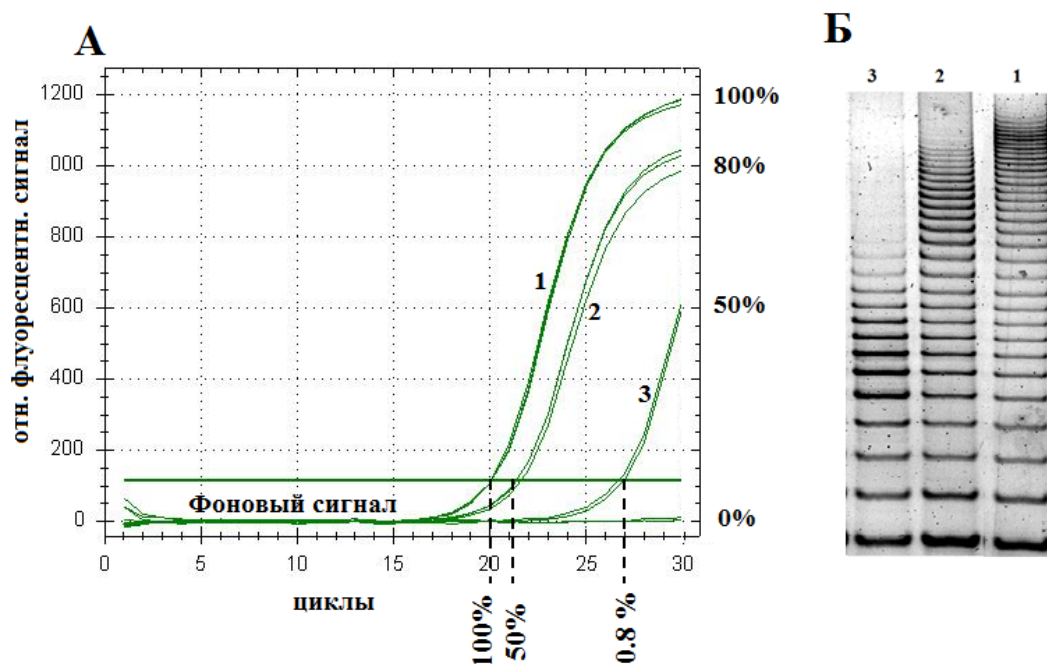


Рис. 6. Схематический рисунок, демонстрирующий разницу в детекции между RQ-ТРАП (А) и обычным ТРАП (Б). 1 – теломеразная активность в отсутствие BIBR1532, 2 – в присутствии 0,1мкМ BIBR1532, 3 – в присутствии 5мкМ BIBR1532.

Проблема полу-количественности в ТРАП устраняется путем замены шага ПЦР на ПЦР реального времени. Такой метод называется RQ-ТРАП (real quantitative – количественный ТРАП) (рис. 6А) [47]. На данный момент широко используется два вида RQ-ТРАП основанных на двух разных видах детекции в ПЦР: 1) детекция с помощью флуоресцентного красителя SYBR Green I [47], и 2) использование шпилечного олигонуклеотида, основанное на флуоресцентном резонансном переносе энергии [48]. В первом случае на шаге ПЦР в реакционную смесь дополнительно добавляют SYBR Green I, который связывается с ДНК ПЦР продукта, тем самым усиливается флуоресценция, которая детектируется прибором. Преимуществом такой детекции является низкая стоимость. Минусом является возможность образования димера праймеров. SYBR Green I, неспецифически связываясь со всеми

двухцепочечными ДНК, также детектирует димеры праймеров, если они образуются.

Во втором случае детекции в ТРАП методе на шаге ПЦР в качестве обратного праймера используется шпилечный олигонуклеотид. При включении в ПЦР продукт, шпилька разворачивается, тем самым увеличивается расстояние между флуорофором и тушителем, что приводит к появлению флуоресценции (рис. 7). Такой шпилечный олигонуклеотид называется AmpliFluor-RP. За счет шпилечной структуры обратного праймера образование димеров праймеров исключено.

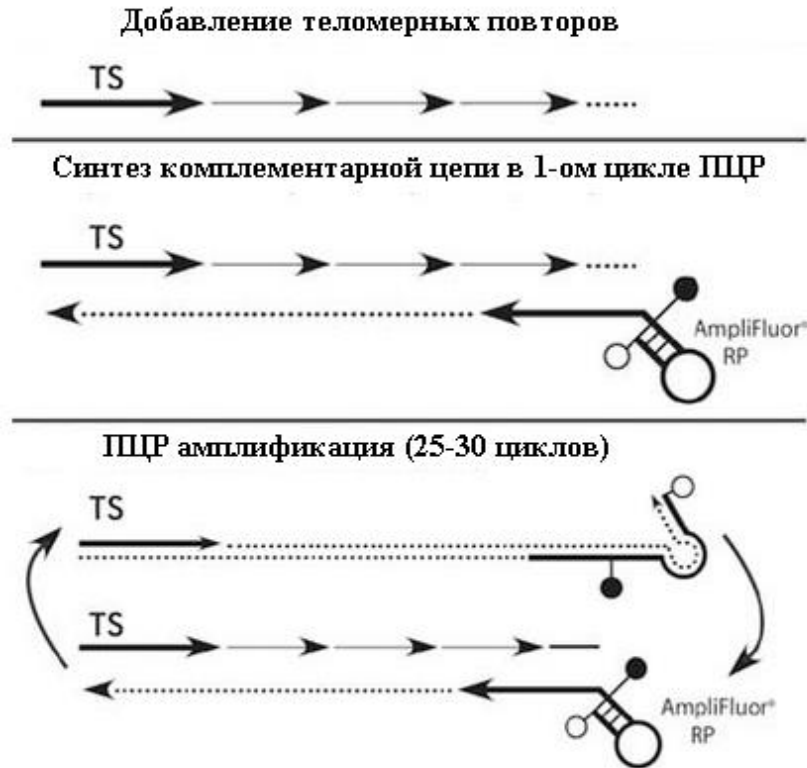


Рис. 7. Схематическое представление RQ-ТРАП, в котором используется шпилечный обратный праймер AmpliFluor-RP.

Использование ПЦР реального времени сокращает время анализа, т.к. нет необходимости проводить гель электрофорез. Из-за отсутствия электрофореза RQ-ТРАП является высокоэффективным, может быть автоматизирован и использован для скрининга ингибиторов теломеразы.

1.4.1.2. Устранение ингибирования ПЦР

Большинство лабораторий для устранения ингибирования ПЦР используют очистку продуктов удлинения теломеразой перед ПЦР. Есть несколько видов очистки перед ПЦР: фенольная депротенинизация с последующим осаждением (Ф/О) [49,50], очистка продуктов удлинения теломеразой на колонке [51], аффинная очистка [52].

При методе Ф/О реакционную смесь после теломеразной реакции обрабатывают насыщенным раствором фенола для депротенинизации, и осаждают теломеразный продукт. Очищенный продукт удлинения праймера теломеразой подвергают ПЦР. Такой метод очистки трудоемок и не подходит для скринингов ингибиторов теломеразы.

Очистка продукта удлинения праймера теломеразой на колонке заключается в использовании spin-колонок из оксида кремния. В большинстве случаев при таком методе необходимо использовать киты для выделения ДНК, что стоит достаточно дорого.

Аффинная очистка (рис. 8) продукта удлинения праймера теломеразой состоит в том, что продукт выделяется с помощью биотинилированного комплементарного олигонуклеотида b-CCСТААСССТАА, иммобилизованного на магнитные шарики. Прогревание до 75°C разрушает комплементарную связь между иммобилизованным олигонуклеотидом и продуктом удлинения

праймера теломеразой, что позволяет снять его с магнитных шариков. Однако если ингибиторы теломеразы способны связываться с теломерной последовательностью в продукте удлинения праймера теломеразой, то такая очистка не подойдет.

На настоящий момент отсутствует универсальный метод очистки теломеразного продукта, подходящий для всех классов ингибиторов теломераз.

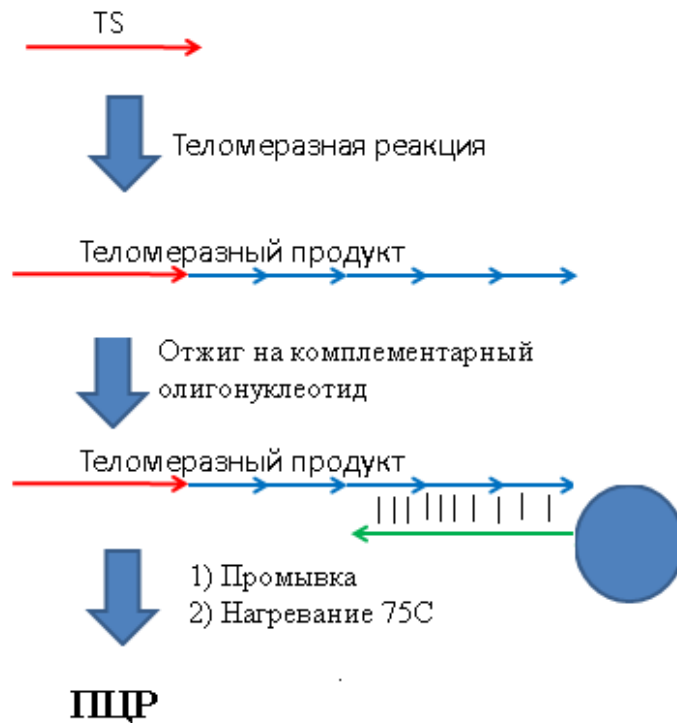


Рис. 8. Схематическое представление аффинной очистки продукта удлинения праймера теломеразой перед ПЦР шагом.

1.4.1.3. «*In vivo* ТРАП»

Измерение теломеразной активности прямо в клетке осуществляется в условиях *in situ* [53]. Под названием «*in vivo* ТРАП» подразумевается манипуляция с теломеразой в клетке с последующим выделением

теломеразного экстракта и проведением ТРАП [54]. Для этого клетку обрабатывают ингибитором теломеразы и культивируют в течение нескольких дней. Обработанные клетки лизируют и получают экстракт, содержащий теломеразу. Далее экстракт анализируют по протоколу *in vitro* ТРАП (рис.9). Такой метод позволяет учитывать влияние веществ на синтез компонентов теломеразы, их стабильность, сборку теломеразного комплекса, проникновение веществ в клетку.



Рис. 9. Схематическое представление, демонстрирующее разницу *in vivo* и *in vitro* методов ТРАП.

1.4.2. Низкомолекулярные вещества и Иметелстат

Низкомолекулярные вещества как ингибиторы теломераз обладают рядом преимуществ. Их производить и транспортировать намного легче, чем антитела, пептиды, ДНК, бактериофаги и т.д., из-за этого их стоимость намного ниже. Также есть возможность модификации химической структуры низкомолекулярных веществ, чтобы улучшить фармакокинетику, специфичность и т.д. Порядка 90% лекарственных препаратов на мировом рынке фармакологических препаратов являются низкомолекулярными веществами [55].

Так как теломераза по своей природе относится к классу ферментов обратных транскриптаз, в первую очередь в качестве ингибиторов теломеразы были протестированы ингибиторы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Такие соединения уже протестированы в клинических испытаниях и были одобрены министерством здравоохранения и социальных служб США, занимающимся контролем качества пищевых продуктов, лекарственных препаратов (FDA), в качестве лекарственных средств. Наиболее известные из них – это AZT и TDG-TP (рис.10) [56].

AZT был протестирован *in vitro* на клеточных линиях, и было показано ингибирование теломеразы. TDG-TP показал более сильное ингибирование теломеразы ($IC_{50}=60\text{нМ}$) [57]. Однако дальнейшее использование этих веществ как противоопухолевых препаратов не произошло, т.к. нет корреляции их применения в клинике со снижением числа онкологических заболеваний у больных синдромом иммунодефицита (СПИД) [58-61].

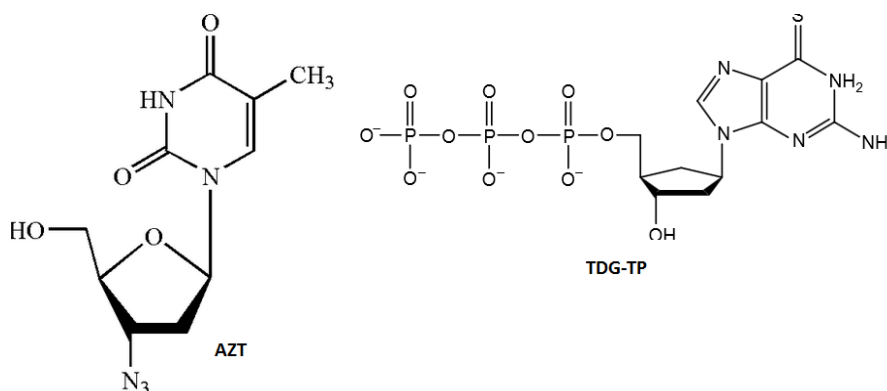


Рис. 10. Структурные формулы AZT и TDG-TP.

Одним из самых известных низкомолекулярных ингибиторов активной теломеразы является BIBR1532 (рис. 11), который считается первым действующим по не-конкурентному механизму в *in vitro* условиях, с IC_{50} равной 93 нМ [43]. Однако при культивировании клеток в присутствии

VIBR1532 и измерении теломеразной активности в клеточном экстракте его ингибирующая способность оказалась в 50 раз ниже [45]. Вывод авторов [43] о не конкурентном механизме ингибирования, возможно, не является правильным, так как они применили уравнение Михаэлиса-Ментен для расчетов. Известно, что система, не подчиняющиеся уравнению Михаэлиса-Ментен, всегда показывает не конкурентное ингибирование при использовании этого уравнения. Например, известно, что теломераза человека в условиях *in vitro* является димером [62], а димерные ферменты не подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен [46].

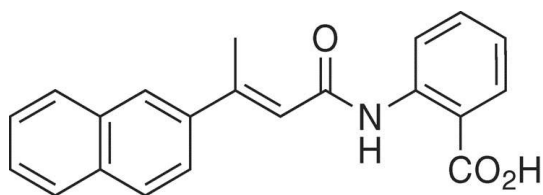


Рис. 11. Структурная формула VIBR1532.

Тестирование VIBR1532 на клеточных линиях не оправдало себя. Критическое укорочение теломер наблюдалось только после 120 дней инкубации для клеточной линии немелкоклеточного опухоли легких (NCI-H460) [43]. Дальнейшие испытания были остановлены, так как такой долгий лаг ответ неприемлем для последующей разработки терапевтических препаратов. Было обнаружено, что заведомо высокие концентрации этого вещества селективно цитотоксичны для клеток лейкемии, таких как острый миелоидный лейкоз и хронический лимфолейкоз [63].

Geron и другие компании проскринировали миллионы низкомолекулярных соединений, однако специфичного и нетоксичного ингибитора теломеразы не было найдено [32].

На данный момент единственным успешным проектом прямого ингибирования теломеразы является препарат Иметелстат (GRN163L), разрабатываемый компанией Geron. Иметелстат (GRN163L) – олигонуклеотид длиной 13 нуклеотидов, имеющий тио-фосфоамидатный остов и пальмитиновую кислоту на 5'-конце последовательности TAGGTGTAAGCAA (рис. 12). Липидная модификация увеличивает проницаемость олигонуклеотида в клетку, однако уменьшает ингибирующую способность. Показанная на рис. 12 модификация была выбрана в соответствии с наилучшим эффектом при проникновении в клетку и с наименьшим уменьшением ингибирующей способности [64]. Это соединение ингибирует теломеразу за счет связывания с матричным участком hTR, тем самым блокируя работу каталитической субъединицы теломеразы (рис. 13).

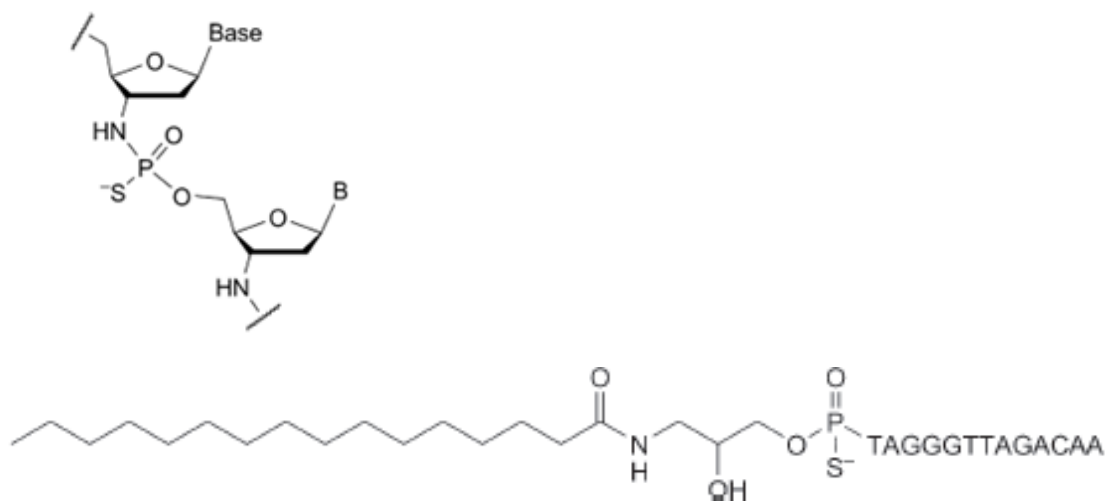


Рис. 12. Структурная формула Иметелстата.



Рис. 13. Схематическое представление ингибирования теломеразы человека препаратом Иметелстат (GRN163L). Иметелстат, связываясь с матричным участком hTR за счет комплементарного взаимодействия, блокирует его. Это препятствует удлинению и повторному взаимодействию теломеры и теломеразы.

В 2005 году после до-клинических испытаний были начаты клинические испытания GRN163L, которые доказали хорошую фармакокинетику и фармакодинамику, эффективность и безопасность препарата [65]. В 2010 году Geron инициировал II фазу клинических испытаний на немелкоклеточном раке легких [66], злокачественной опухоли молочной железы и тромбоцитемии/истинной полицитемии (Т/ИП). В первом случае Иметелстат не показал достаточного эффекта. В случае с опухолью молочной железы, Иметелстат показал обратный эффект (выживаемость среди пациентов, принимавших Иметелстат, была ниже, чем в контрольной группе). В связи с этим осенью 2012 года корпорация Geron объявила, что прерывает эти испытания [67]. Известно, что одним из побочных эффектов Иметелстата является тромбоцитопения, которая усиливает эффект терапии против опухолевых клеток крови [68]. В связи с этим единственным многообещающим направлением использования Иметелстата является клиническое испытание на больных миелофиброзом, начатое в 2012 году. Было уже объявлено о полном исцелении одного из больных [69].

GRN163L способен образовывать квадруплекс в близких к физиологическим условиям. Предполагается, что этот квадруплекс состоит из параллельно взаимодействующих четырех молекул. Параллельность обусловлена гидрофобным взаимодействием между липидными хвостами, которое также стабилизирует квадруплекс [70]. Таким образом, препарат может вытеснять белки, взаимодействующие с квадруплексами, и иметь побочные действия. Кроме антителомеразной активности GRN163L влияет на цитоскелет клетки, тем самым изменяя морфологию. Такая активность ассоциируется с образованием квадруплекса, так как олигонуклеотид, который содержит нуклеотидную замену и не имеет GGG мотива (5'-Palm-TAGGTGTAAGCAA), не влияет на морфологию клеток [71]. Также стало известно, что GRN163L уменьшает экспрессию кадгерина и матриксной металлопротеиназы-2, которые необходимы для ангиогенеза и метастазирования опухолевых клеток [72]. Это еще раз говорит о перспективности использования GRN163L в качестве хорошего дополнения к другим противоопухолевым препаратам.

В процессе разработки Иметелстата были найдены альтернативные кандидаты. Изначально при скринировании пептидных олигонуклеотидов (ПНК) для блокирования матричного участка hTR были выявлены две последовательности с одинаковой длиной 5'-CAGTTAGGGTTAG-3' и 5'-TAGGGTTAGACAA-3', комплементарные к участкам hTR 46-58 и 42-54, соответственно, эффективно ингибирующие теломеразу. Ингибирующие способности теломеразы как в системе *in vitro* [73], так и *in vivo* на клеточных линиях [74] для обеих последовательностей одинаковы. Олигонуклеотид, комплементарный к участку 42-54 hTR, в последующем модифицировался до препарата Иметелстат, тогда как олигонуклеотид, комплементарный к участку

46-58 hTR, несущий 2'-метоксиэтил и фосфоротиоатные модификации, превратился в ISIS24961.

Было показано, что ингибиторный олигонуклеотид ISIS24961 укорачивает длину теломер на модельных системах онкологических заболеваний у мышей [75]. Однако дальнейшие исследования пока не проведены. Еще одним альтернативным GRN163L олигонуклеотидом является «Т-олиго», который имеет последовательность 5'- GTTAGGGTTAG-3' и на два нуклеотида короче, чем ISIS24961, механизм его действия не определен [76]. Изучение уже найденных прямых ингибиторов теломеразы позволяет сделать вывод о перспективности разработки препаратов, ингибирующих теломеразу.

1.5. Ингибирование биогенеза теломеразы

В клетках активная теломераза появляется в результате сложного процесса, объединяющего синтез, процессинг и сборку компонентов теломеразы. В связи с этим мишенями для ингибирования теломеразы могут быть не только компоненты теломеразы, но и процессы синтеза и сборки этого комплекса (рис.1). Однако необходимо учитывать, что механизмы биогенеза теломеразы не до конца изучены. На данный момент отсутствуют целенаправленно разработанные и ингибирующие биогенез теломеразы, дошедшие до клинических испытаний на человеке, препараты. Оказалось, что существует очень много лекарственных препаратов, в том числе и противоопухолевых, которые ингибируют биогенез теломеразы.

1.5.1. Ингибирование транскрипции hTERT

Экспрессия мРНК hTERT характерна для опухолевых клеток [77], тогда как роста экспрессии hTR нет. В связи с этим считается, что экспрессия hTERT

является основным механизмом регуляции теломеразы, поэтому транскрипция обратной транскриптазы теломеразы – привлекательная мишень для ингибирования теломеразы. Последовательность, необходимая для активности промотора hTERT, имеет длину порядка 200 п.о. и GC-богата (рис.14).

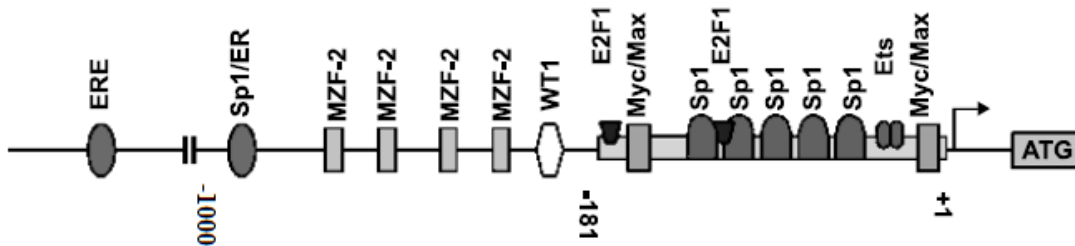


Рис. 14. Схематическое представление промотора hTERT. На рисунке приведены сайты посадки транскрипционных факторов. Участок промотора от +1 до -181 является важным для его активности. ERE – сайт посадки эстрогена [78].

Промотор hTERT регулируется различными факторами, однако особое внимание исследователей привлекает онкогенный фактор Мус. Экспрессия Мус коррелирует с экспрессией теломеразы, также промотор гена Мус содержит теломерную последовательность. Неудивительно, что ингибиторы Мус, такие как бутеин [79], гамбийская кислота [80], генистеин [81] (рис.15), также приводят к снижению количества теломеразы в клетке. Белок Sp1 вместе с Мус инициирует транскрипцию hTERT [82]. Соответственно, ингибиторы тирозинкиназ – иматиниб, дасатиниб, нилотиниб (рис.15) снижают транскрипцию hTERT через уменьшение соотношения Sp1/Sp3 факторов [83]. Также известно, что эстроген активирует теломеразу, соответственно, антагонист эстрогена под названием тамоксифен ингибирует теломеразу [84,85]. Следовательно большинство противоопухолевых препаратов, кроме собственных мишеней, действуют и на транскрипцию hTERT.

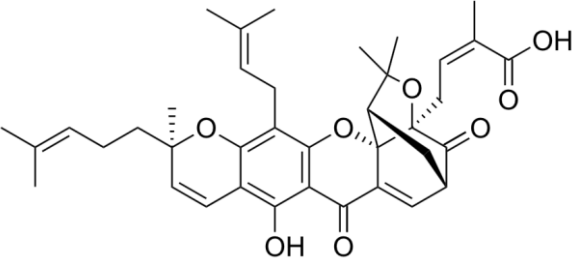
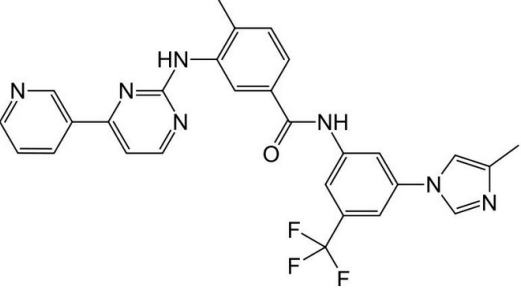
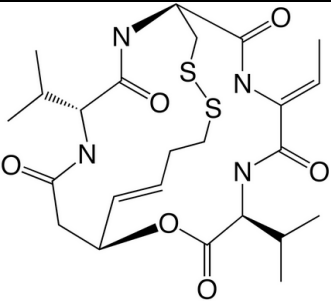
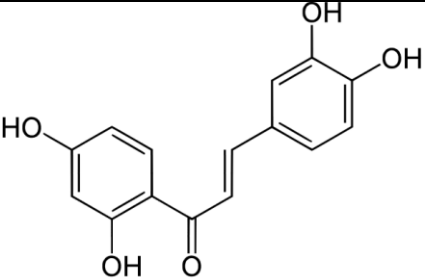
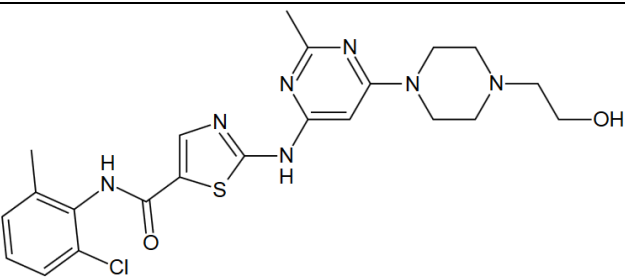
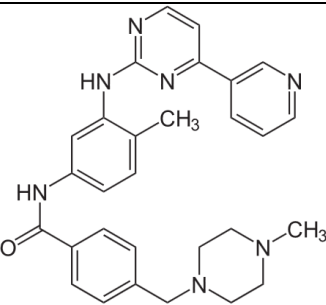
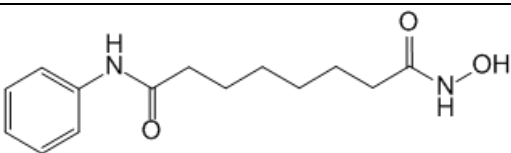
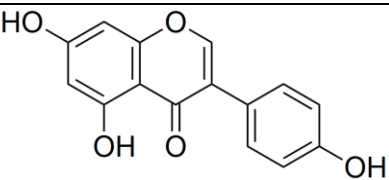
 <p>Гамбийская кислота</p>	 <p>Нилотиниб</p>
 <p>Ромидепсин</p>	 <p>Бутеин</p>
 <p>Дасатиниб</p>	 <p>Иматиниб</p>
 <p>Ворнистат</p>	 <p>Генистеин</p>

Рис. 15. Структурные формулы некоторых известных низкомолекулярных веществ, ингибирующих теломеразу через репрессию гена hTERT.

1.5.2. Ингибирование посттрансляционной модификации hTERT

Известно, что теломеразная обратная транскриптаза hTERT фосфорилируется и это необходимо для активности и клеточной локализации теломеразы [86]. Следовательно, фосфатазные и киназные ингибиторы могут непосредственно влиять на теломеразу. Например, окадаевая кислота (рис. 16) является ингибитором фосфатазы 2А. Известно, что фосфатаза 2А ингибирует теломеразу. Обработка клеточной линии опухоли молочной железы окадаевой кислотой приводила к активации теломеразы [87].

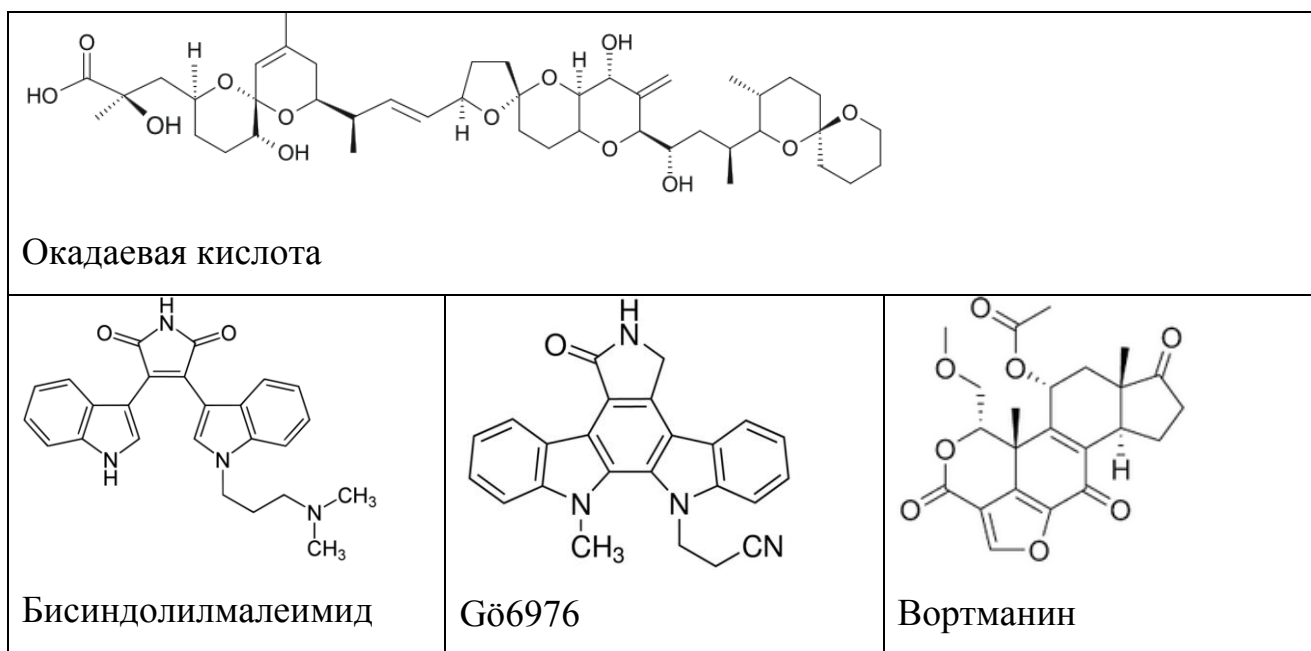


Рис. 16. Структурные формулы веществ, ингибиторов фосфатазы (верхний ряд) и тирозинкиназ (нижний ряд).

Протеин киназа С (PKC) увеличивает теломеразную активность в некоторых типах опухолевых клеток. Использование ингибитора этого фермента бисиндолилмалеимида (рис. 16) привело к ингибированию теломеразы в клетках назофарингиальной карциномы [88]. В работе [89]

показали ингибирование теломеразы в клетках нескольких клеточных линиях опухолей шейки матки после их обработки препаратом Gö6976 (рис.16), который также являющимся ингибитором РКС. Известный препарат Иматиниб (Гливек), являющийся ингибитором тирозинкиназ, также уменьшает теломеразную активность и пролиферацию клеток экспрессирующих теломеразу [90].

Еще одним ферментом, участвующим в пострансляционной модификации hTERT, является АКТ-киназа. Это киназа не только участвует в активации теломеразы, но и, фосфорилируя серин в 227-ом положении, определяет локализацию hTERT в ядре [91]. Ингибирование этой киназы неспецифичным ингибитором киназ – вортманином (рис. 16) привело к ингибированию теломеразы в клетках [92].

1.5.3. Уменьшение доступности теломер для теломеразы

Отличительная особенность ДНК теломер в том, что она G-богата и состоит из повторяющихся последовательностей, за счет чего нуклеотиды G находятся на одинаковом расстоянии друг от друга. Это позволяет одноцепочечному концу теломер образовывать G-квартеты (рис.17А) и G-квадруплексы (рис.17Б) [93].

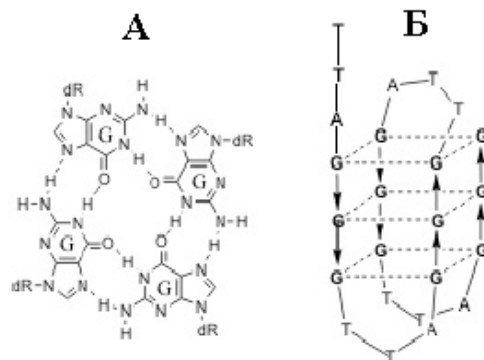


Рис. 17. Структура: А – G-квартета, Б – G-квадруплекса.

Соединения, связывающиеся с G-квадруплексами и стабилизирующие их, называются лигандами G-квадруплексов (G4-лиганды). Известно, что 3'-конец теломеры, свернутый в квадруплекс, не распознается как субстрат для теломеразы [94]. Поэтому такие G4-лиганды блокируют доступность теломер для теломеразы (рис. 1, цифра 8). Основное требование к таким соединениям – хорошее связывание с квадруплексом (с константой ассоциации K_a порядка 10^6) и плохое связывание с ДНК дуплексом ($K_a \sim 10^2$), т.к. неспецифическое связывание с двухцепочечной ДНК приводит к токсичности [95]. По структурным особенностям G4-лиганды делятся на два вида: 1 – антархинон и акридиновые производные, 2 – полициклические и не слитые циклы. Основная структурная особенность таких лигандов – это наличие гетероциклических ядер, расположенных в одной плоскости, позволяющей реализовать стэкинг взаимодействие с плоским G-квартетом квадруплекса (рис. 17А).

Известно, что 10% типов опухолевых клеток поддерживают длину теломер за счет альтернативной теломеразе системы, основанной на рекомбинации теломер, минуя активацию теломеразы [96]. Для таких типов опухолевых клеток мишенью может стать сама теломера. Именно G4-лиганды будут взаимодействовать с G-богатой цепью теломер. Такие вещества, связываясь с теломерами, как предполагается, нарушают их функцию, тем самым приводя к гибели клеток. На настоящий момент синтезированы и охарактеризованы более 1000 G4-лигандов [97]. Однако наиболее известные и изученные G4-лиганды это BRACO-19, RHPS4, TMPyP4, Quarfloxin, Telomestatin, AS1410 (рис. 18).

Первыми открытыми G4-лигандами были антрахиноновые производные. Однако основной недостаток этих соединений – низкая растворимость в водной среде. В связи с этим были разработаны двузамещенные акридиновые производные (рис.19) [98]. В этих соединениях атом азота, находящийся в

центре молекулы, протонирован и заряжен при физиологических условиях, поэтому такое соединение более растворимо в водной среде. За счет дефицита электронов в атоме азота, находящегося в гетероциклическом ядре, увеличивается аффинность к квадруплексу.

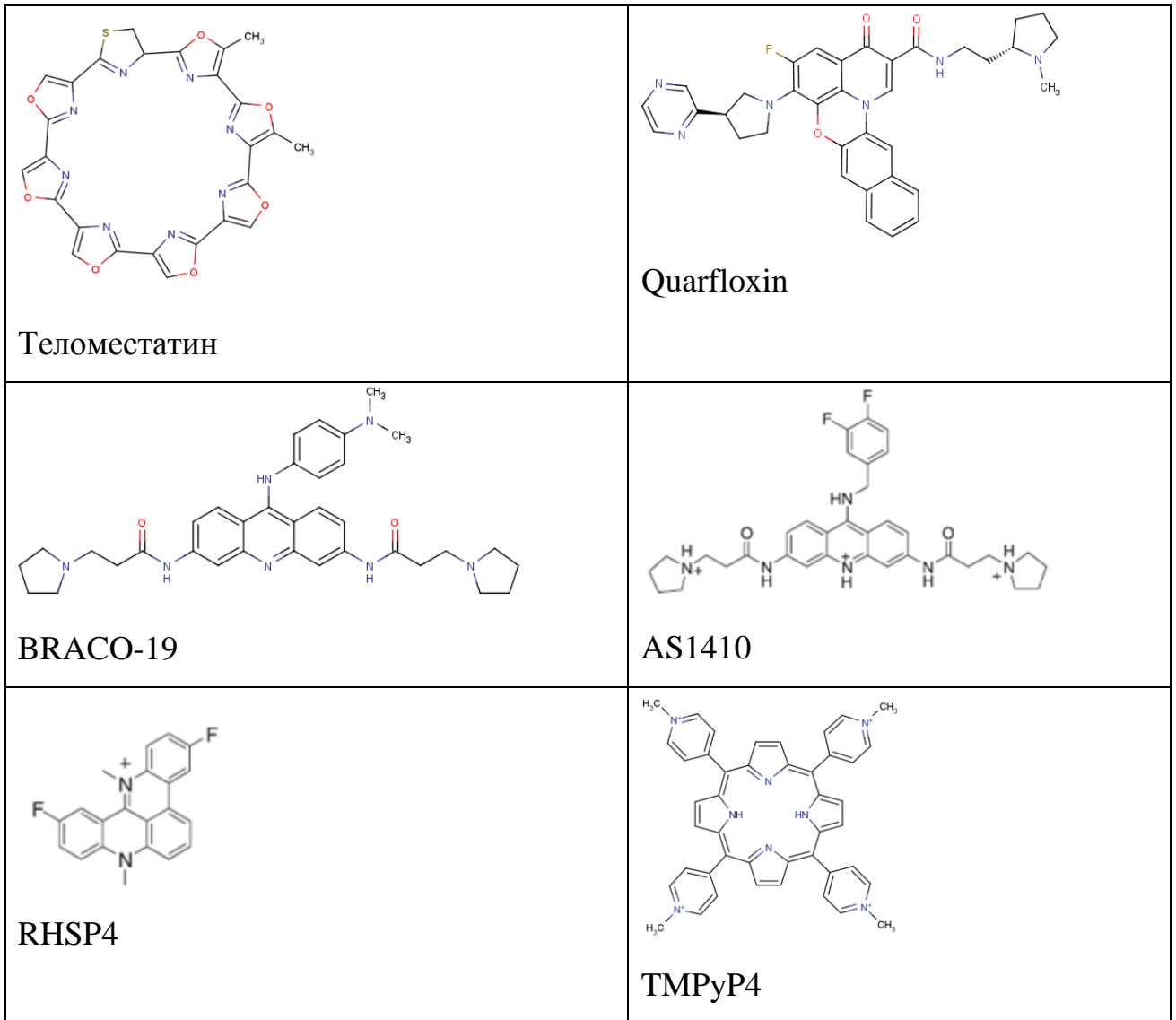


Рис. 18. Структурные формулы наиболее известных G4-лигандов.

Антрахиноновые производные

Акридиновые производные

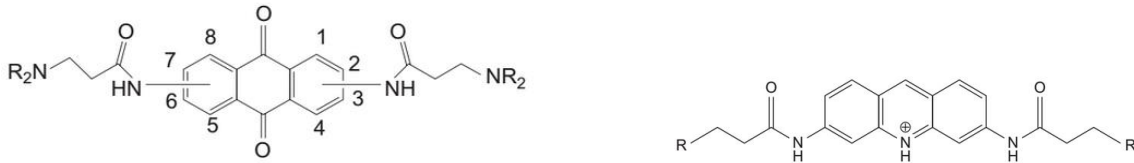


Рис. 19. Структурные формулы двузамещенных антрахиноновых и акридиновых производных.

Эти соединения взаимодействуют не только с G4-квадруплексами, но и с двуцепочечной ДНК. Известно, что двуцепочечная ДНК имеет две бороздки, тогда как у G4-квадруплекса их четыре. Предполагалось, что замещенные группы по бокам акридина взаимодействуют с бороздками ДНК (рис. 20). В соответствии с этим был синтезирован трехзамещенный акридин BRACO-19 (рис. 18), который преимущественно взаимодействует с квадруплексом. BRACO-19 сильнее ингибировал теломеразу и имел меньшую токсичность для клеток (табл. 2) [99].

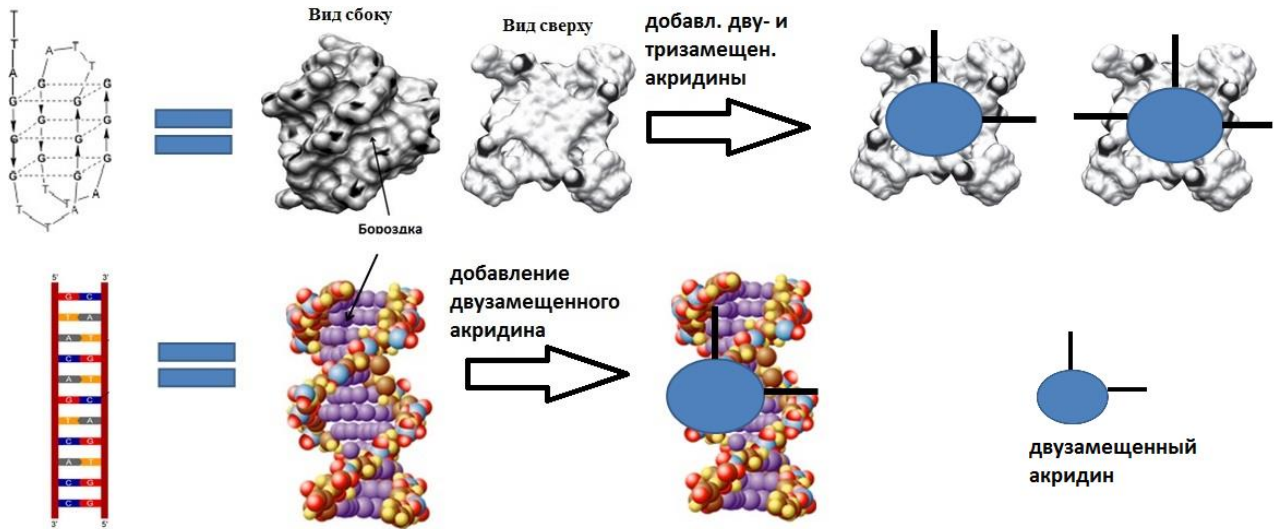


Рис. 20. Схематическое представление взаимодействия акридиновых производных с двуцепочечной ДНК и G4-квадруплексом. Предполагается, что боковые группы акридиновых производных, взаимодействуя с бороздками квадруплекса, увеличивают аффинность к нему.

Табл. 2.

Сравнение двузамещенного акридина и трехзамещенного BRACO-19.

Соединение	Ка двуцепочечная ДНК	Ка квадруплекс	IC50, μM теломераза	IC50*, μM рост клеток, клеточная линия A2780
Двузамещен. акридин	1.1×10^6	1.3×10^6	5.2	2.65
BRACO-19	5.0×10^5	1.6×10^7	0.06	>25

* - концентрация вещества, при которой время удвоения клеток возрастает в 2 раза.

При культивировании клеточной линии рака шейки матки (UXF1138L), которая имеет очень короткие теломеры (2,7тыс. п.о.), в присутствии BRACO-19 старение клеток начиналось на 15-ый день обработки [100]. Этого времени не достаточно для прохождения числа делений, которое бы приводило к значимому укорочению теломер. Оказалось, что G4-лиганды действуют по механизму, который активирует ответ на появление двуцепочечного разрыва. В клетках с теломерой связываются многочисленные белки [101]. G4-лиганды, взаимодействуя с теломерной последовательностью, должны препятствовать связыванию этих белков с ней. Однако, было показано, что суперэкспрессии белков POT1 и hTERT достаточно для появления у клеток резистентности к G4-лигандам [102,103]. На основании этого сделали вывод, что отсутствие hPOT1 и hTERT на теломерах – это признак действия G4-лигандов [95]. Соединение AS1410 (рис.18) является модификацией BRACO-19. В нем третья боковая группа, состоящая из анилинового производного, была заменена на фторпроизводное для уменьшения окисления и улучшения фармакокинетики препарата. В результате время полужизни AS1410 была в два раза больше, чем

у BRACO-19 [104], однако противоопухолевые способности не улучшились [93].

Quarfloxin (также известный под названием CX-3545), структура которого приведена на рис.18, является соединением первого поколения G4-лигандов, взаимодействующих с квадруплексом, и единственным дошедшим до клинических испытаний [95,105]. Остальные лиганды обладали цитотоксичностью, предположительно, обусловленной неспецифическим связыванием лигандов с двухцепочечной ДНК, и не соответствовали критериям, предъявляемым к лекарственным средствам: эффективное и селективное проникновение препарата в опухоли, приемлемая фармакокинетика и метаболизм, широкое терапевтическое окно [95]. Quarfloxin является производным флуорохиналона, который имеет как G-квадруплекс стабилизирующие, так и топоизомераза II связывающие свойства. Компания Cylene Pharmaceuticals успешно провела модификацию этого соединения, увеличив специфичность к связыванию с G-квадруплексом. Изначально считалось, что это соединение будет уменьшать экспрессию онкогена c-myc, связываясь с последовательностью его промотора, содержащий теломерные повторы. Однако, неожиданно было найдено, что Quarfloxin концентрируется в ядрышке и селективно ингибирует работу полимеразы I. Механизм ингибирования прост – промотор рибосомного гена содержит последовательность TTAGGG, с которой связывается нуклеолин и активирует транскрипцию. Quarfloxin, связываясь с этой последовательностью, не подпускает нуклеолин, тем самым транскрипция гена выключается. Свободный нуклеолин локализуется в нуклеоплазме, что является признаком стресса клетки и индуцирует апоптоз [106]. Этот препарат участвовал в двух клинических испытаниях II фазы и был изъят. Данные испытаний были закрыты (номер клинических испытаний NCT00780663 и NCT00485966).

Возможные другие уровни воздействия на биогенез теломеразы (рис. 1) менее удачны в плане поиска низкомолекулярных веществ, приводящих к снижению теломеразной активности, так как в этих случаях мишенью в основном являются РНК. Соответственно, для влияния на эти процессы удобно использовать олигонуклеотиды. Преимуществом ингибирования теломеразы олигонуклеотидами является возможность предварительного дизайна олигонуклеотидов. Для низкомолекулярных веществ пока такой возможности нет из-за отсутствия модели структуры высокого разрешения теломеразы человека.

1.5.4. Олигонуклеотиды для ингибирования теломеразы

Олигонуклеотиды являются эффективными инструментами в молекулярной диагностике [107] и функциональной геномике [108], а главное, рассматриваются, как перспективные терапевтические средства [109]. Технологии регулирования клеточных процессов на основе олигонуклеотидов продемонстрировали свою эффективность *in vitro* и *in vivo* [110,111]. На сегодняшний день используются различные подходы: антисмысловая технология, РНК-интерференция, аптамеры, анти-микроРНК, CRISPR и другие. Основные проблемы, возникающие при использовании олигонуклеотидов в качестве терапевтических агентов, сопряжены с их низкой стабильностью *in vivo* и со сложностью их селективной доставки в ткани и клетки [112]. Из многочисленных исследованных потенциальных олигонуклеотидных препаратов на данный момент всего три одобрено FDA: витравен (1998), макуген (2004), мипомерсен (2013) [113]. Однако более 20-и клинических испытаний, находящихся на III фазе, дают надежду широкого внедрения технологии. Витравен является фосфоротиоатным олигонуклеотидом, его

производство было прекращено из-за низкого спроса. Другие два препарата являются химерными олигонуклеотидами. Рассмотрим преимущество и недостатки химических модификаций олигонуклеотидов. Химически модифицированные олигонуклеотиды существенно более стабильны и эффективнее проникают в клетки при сохранении биологической активности [114]. Присоединение различных лигандов позволяет добиться специфичности доставки конъюгатов в определенные клетки за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза [115]. При создании олигонуклеотидных ингибиторов теломеразы были использованы различные модификации сахаро-фосфатного остова, а именно 2'-О-алкилрибонуклеотиды и олигонуклеотиды с тиофосфатной, фосфамидной и тиофосфамидной межнуклеотидными связями, а также пептидонуклеиновые кислоты (ПНК) [116] (рис. 21).

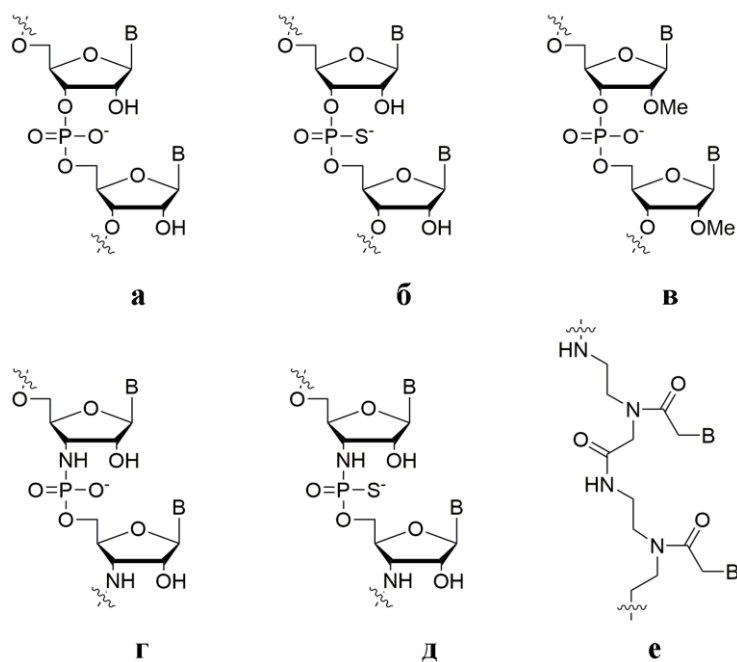


Рис. 21. Химические модификации углево-фосфатного остова олигонуклеотидов: а – природный динуклеотид с фосфодиэфирной связью, б – тиофосфатный динуклеотид, в – 2'-О-метилдинуклеотид, г – динуклеотид с N3'→P5'-фосфамидной связью, д - динуклеотид с N3'→P5'-тиофосфамидной связью, е – ПНК.

2'-О-Метил и 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ) содержащие олигонуклеотиды [117] образуют более стабильные дуплексы с комплементарными мишенями и ингибируют теломеразу уже в наномолярных концентрациях [118]. 2'-МОЕ-модификации, кроме значительной стабилизации дуплекса, также способствуют улучшению фармакокинетики олигомера.

Тиофосфатные олигонуклеотиды (рис. 21б) – самый распространенный тип модифицированных олигонуклеотидов [119], также были использованы для ингибирования теломеразы. Они имеют высокую нуклеазную стабильность, но при попытке их использования для ингибирования теломеразы наблюдалось неспецифичное ингибирование. Например, тиофосфатный олигонуклеотид S-ODNS ингибирует теломеразу за счет связывания с белком hTERT, а не с РНК [120]. Более того, было показано, что 20-звенный тиофосфатный олигонуклеотид ингибирует теломеразу независимо от нуклеотидной последовательности [121]. Кроме того, из-за неспецифического связывания с белками такие олигонуклеотиды являются иммуностимулирующими [122]. Таким образом, перспективным представляется использование для ингибирования теломеразы олигонуклеотидов с небольшим количеством тиофосфатных модификаций, что позволит сохранить специфичность при увеличении нуклеазной стабильности.

В фосфамидных олигонуклеотидах атом кислорода в 3'-положении углеводного остатка заменен на атом азота (рис. 21г) [65]. Такие олигонуклеотиды образуют более стабильный дуплекс с комплементарной мишенью по сравнению с природными ДНК и при этом сохраняют специфичность. Следует отметить, что дуплексы таких олигонуклеотидов с РНК не являются субстратами РНКазы H. Тиофосфамидные олигонуклеотиды более стабильны к действию нуклеаз, чем фосфамидные олигонуклеотиды, что приводит к заметному увеличению ингибирования теломеразы [123]. Наиболее

известный ингибитор этого класса – вышеупомянутый конъюгат тиофосфамидного олигонуклеотида с пальмитиновой кислотой GRN163L или Imetelstat.

Пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) построены на основе N-(2-аминоэтил)-глицинового остова и не имеют отрицательного заряда (Рис. 21e). Пептидные нуклеотиды связываются с комплементарными нуклеиновыми кислотами с высокой афинностью и специфичностью [124,125]. Как правило, для увеличения растворимости в водных растворах ПНК синтезируют в виде конъюгатов с пептидами. Еще одним подход для доставки *in vitro* основан на использовании дуплекса ПНК с комплементарным олигонуклеотидом, что позволяет использовать традиционные катионные липиды [126]. Далее в эндосомах олигонуклеотид в составе дуплекса расщепляется нуклеазами, а освобожденная ПНК может взаимодействовать с мишенью. Несмотря на отличные результаты *in vitro*, результаты *in vivo* не столь значительны, что связано с высокой токсичностью таких олигомеров. Тем не менее, использование гетеродуплекса ПНК с конъюгатом олигонуклеотида с асиалофетуином позволило эффективно доставлять ПНК в гепатоциты мышам при внутривенном введении с помощью асиалогликопротеино-рецептор-опосредованного эндоцитоза [127].

Рассмотрим подробнее олигонуклеотидные ингибиторы теломеразы, классифицировав их на основе механизма действия.

1.5.4.1. Применение олигонуклеотидов, взаимодействующих с мРНК hTERT

В большинстве случаев именно экспрессия каталитической субъединицы hTERT коррелирует с активностью теломеразы [17], а мРНК hTERT

используется в качестве маркера опухолевого процесса. Применение антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных мРНК hTERT, инактивирует теломеразу, что препятствует пролиферации опухолевых клеток, а при достижении критической длины теломер в них индуцируется апоптоз. Было показано, что олигонуклеотид (Cantide), комплементарный 3'-нетранслируемой области человеческой мРНК hTERT, специфично снижает уровень активной теломеразы в культуре клеток HepG2 [128] в 5 раз по сравнению с необработанными клетками, что способствовало индукции апоптоза и приводило к гибели более чем половины клеток. Кроме того, была продемонстрирована противоопухолевая активность этого олигонуклеотида на ксенотрансплантатах опухолей в иммунодефицитных мышах [129]. На моделях ксенотрансплантата гепатоцеллюлярной карциномы у мышей и первичной лимфомы печени иммунодефицитных мышей было показано, что рост и вес опухоли снижается при увеличении концентрации олигонуклеотида Cantide что приводит к увеличению выживаемости мышей [130]. Рассмотренные олигонуклеотиды ингибируют теломеразу по пути, отмеченному цифрой 3 на рис. 1.

Второй путь уменьшения теломеразной активности с помощью антисмысловых олигонуклеотидов к мРНК hTERT – изменение направления сплайсинга этой РНК (рис. 1, цифра 2). мРНК hTERT имеет несколько сплайс-форм, при этом только с двух из них синтезируется белок, и только один из этих белков функционально активен [131]. Второй белок не содержит в активном центре фермента важные для синтеза теломерного повтора аминокислоты (доминантно-негативная мутантная форма hTERT). При экспрессии только доминантно-негативной мутантной формы hTERT клетки погибают по причине укорочения теломер [131]. В процессе неопластической трансформации при возникновении опухоли шейки матки соотношение сплайс-

форм оставалось постоянным [132]. Несмотря на это, искусственное перенаправление альтернативного сплайсинга в сторону увеличения нефункциональных сплайс-форм мРНК hTERT – это один из возможных путей снижения теломеразной активности в опухолевой клетке [133]. Недостатком такого метода является продолжительность процесса (иногда – месяцы), т.к. опухолевые клетки погибают лишь при достижении критической длины теломер. В течение всего этого времени необходимо постоянно применять терапию. При полной потере hTERT клетки подвергаются апоптозу, минуя укорочение теломер. Это связано с тем, что hTERT участвует в других клеточных процессах – активация Wnt, NF-κB путей, ингибирование апоптоза и других [134].

1.5.4.2. Воздействие олигонуклеотидных ингибиторов теломеразы на hTR

Олигонуклеотиды, комплементарные теломеразной РНК hTR, ингибируют теломеразу несколькими способами: например, уменьшая время жизни hTR в клетке [135], блокируя сборку теломеразы [136] или ингибируя полимеразную активность теломеразы *in vitro* [137]. Именно к последнему типу относятся, рассмотренные выше в странице 29, антагонисты матричного участка теломеразной РНК.

Уменьшение времени жизни hTR в клетке может быть достигнуто деградацией с помощью РНКазой L [137]. 5'-фосфорилированный 2'-5'-олигоаденилат (2-5A), который активирует в клетке РНКазу L, гидролизующую одноцепочечную РНК, эффективно с высокой специфичностью стимулирует деградацию комплементарной РНК, тем самым увеличивая эффективность ингибирования в 20 раз [135].

1.5.4.3. Олигонуклеотидные ингибиторы, нарушающие сборку теломеразы

Ингибирование сборки теломеразы основано на блокировании взаимодействия теломеразной РНК и каталитической субъединицы. Олигонуклеотиды, комплементарные участкам hTR, необходимым для взаимодействия с компонентами теломеразного комплекса, нарушают сборку теломеразы. В этом случае подавление теломеразной активности в клетках достигается за счет уменьшения количества корректно собранной активной теломеразы [136]. Нарушение сборки теломеразы может приводить не только к потере теломеразной активности, но и к увеличению деградации теломеразной РНК в клетке из-за ее доступности нуклеазам. Кроме стерического блокирования участков hTR от взаимодействия с другими необходимыми для функционирования теломеразы компонентами комплекса, возможно нарушение сборки пространственной структуры РНК, важной для работы теломеразы, например, псевдоузла [139].

Преимуществом подхода ингибирования теломеразного комплекса за счет сборки является сохранение экспрессии теломеразных компонентов в клетке, что позволяет сохранить альтернативные от поддержания длины теломер функции теломеразных компонентов [140]. Это позволяет предположить меньшее число побочных эффектов при использовании такого подхода к ингибированию теломеразы.

1.6. Заключение

Из литературного обзора можно сделать вывод о том, что разработка новых подходов к ингибированию теломеразы актуальна и перспективна для создания новых противоопухолевых препаратов. На данный момент нет ни

одного одобренного FDA препарата, влияющего на теломеразу. Многие находятся на стадии клинических испытаниях, однако их успешность не гарантирована. По статистике, только 7% испытываемых онкологических препаратов доходят до одобрения с I фазы клинического испытания и 28% и 45% со II и III фазы, соответственно [141], так что шансы на появление на рынке новых препаратов на основе некоторых из теломеразных ингибиторов существуют.

2. Результаты и обсуждения

Основной задачей работы была разработка новых подходов для ингибирования теломеразы. Самым первым и важным этапом был выбор метода исследования. Для скрининга ингибирующей способности веществ необходим надежный метод тестирования. Самым доступным и простым методом для исследования ингибирования теломеразы является ТРАП метод. Однако, как было показано в литературном обзоре, этот метод имеет недостатки, связанные с ингибированием ПЦР. На данный момент нет универсального способа устранения ингибирования ПЦР.

2.1. Разработка метода детекции теломеразной активности

В связи с этим, появилась необходимость по модификации ТРАП для исследования ингибирования теломеразы веществами различной природы, в том числе олигонуклеотидами. Существует три важных аспекта для успешной реализации ТРАП: 1 – чистота теломеразы, 2 – отсутствие ингибирования ПЦР, 3 – количественность анализа. Проблема количественности анализа была рассмотрена в литературном обзоре, она решается с помощью использования ПЦР в реальном времени.

2.1.1. Очистка теломеразного экстракта

Большинство исследователей в качестве источника теломеразы на первом этапе используют клеточные экстракты. Самым известным является S100 экстракт. Для его получения вначале клетки лизируют, полученный лизат центрифугируют при низких скоростях, обычно это до 16000g. Это дает возможность избавиться от клеточного дебриса. Супернатант, полученный

после центрифугирования клеточного лизата, называется S16 экстрактом. Далее S16 экстракт центрифугируют при 100 000g для избавления от рибосом. Полученный супернатант называется S100 экстрактом [142]. Такой экстракт являются неочищенным и содержит многочисленные компоненты клетки, среди которых есть ингибиторы ПЦР, нуклеазы, гидролизующие олигонуклеотиды (теломеро-подобный праймер и ингибиторные олигонуклеотиды) и другие вещества, влияющие на результат ингибирования теломеразы [143]. Чистота теломеразы зависит от ее источника, чем выше чистота препарата, тем меньше побочных процессов происходит при работе с ним. Обычно для детекции теломеразной активности методом ТРАП используют S100 экстракт. Однако, ДНК и РНК олигонуклеотиды неустойчивы в неочищенных лизатах [144]. Для защиты олигонуклеотидов от действия нуклеаз их обычно модифицируют. Мы проверили устойчивость 3'-NH₂ защищенного олигонуклеотида «N» (с последовательностью GTTGCCCCGGCCGACCGCG) в S100 экстракте (рис. 22). Для этого олигонуклеотид «N» инкубировался с S100 экстрактом в солевых условиях теломеразной реакции в течение разных промежутков времени. В дальнейшем смесь депротенизировали и подвергали электрофорезу с последующим окрашиванием SYBR Green I. Оказалось, что олигонуклеотид полностью деградирует в течение 60 минут (рис. 22А). Следовательно, использование S100 экстракта для анализа олигонуклеотидов как ингибиторов теломеразы методом ТРАП неприемлемо.

Как было описано в литературном обзоре, самым надежным методом измерения теломеразной активности является прямой метод детекции. Было проведено ингибирование теломеразы олигонуклеотидом «N» в прямом методе, в качестве источника теломеразы также был использован S100 экстракт. В этом методе используют радиоактивный нуклеотид, который включается в

теломерный продукт за счет теломеразной реакции. Полученный теломерный продукт анализируют с помощью гель-электрофореза. Длина теломерного субстрата составляет 18 нуклеотидов, теломераза добавляет на первом шаге 4 нуклеотида, а в дальнейшем еще по 6 нуклеотидов. Соответственно длина теломеразного продукта не может быть ниже 22 нуклеотидов. Однако при использовании олигонуклеотида «N» появляются сигналы более коротких продуктов, что свидетельствует о деградации ДНК (рис. 22Б). Следовательно, вместо S100 экстракта необходимо использовать более чистый источник теломеразы.

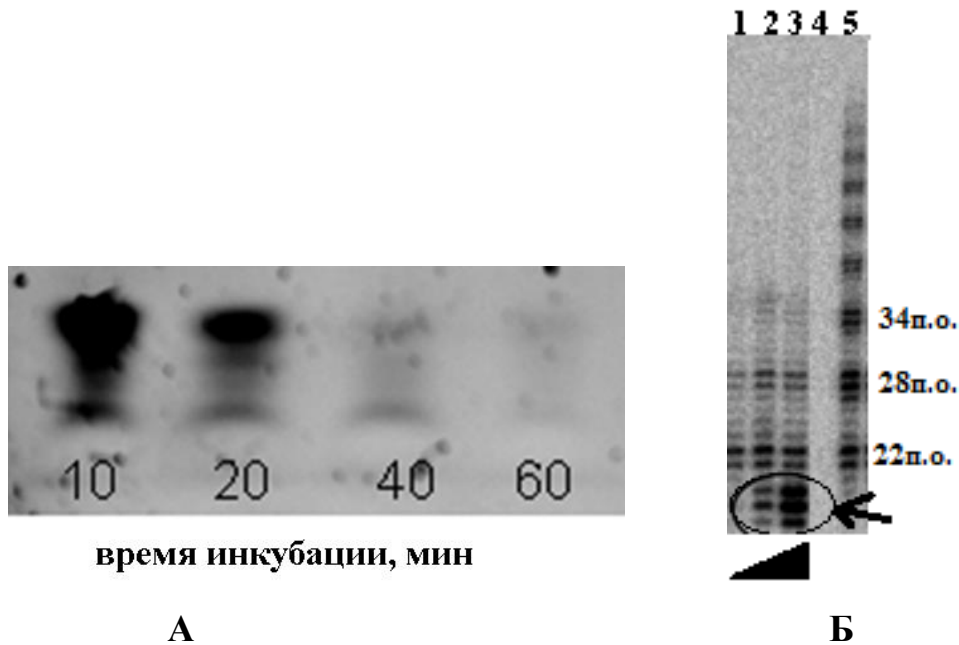


Рис. 22. А – Деградация ДНК-олигонуклеотида, защищенного с 3'-конца NH₂-группой, в S100 экстракте в зависимости от времени. Б – ДНК-олигонуклеотид «N» защищенный с 3'-конца NH₂-группой в прямом методе детекции теломеразной активности в S100 экстракта. Дорожка 1, 2, 3 – олигонуклеотид «N» присутствовал в теломеразной реакции при различной концентрации. 4 – отрицательный контроль, в котором отсутствовал S100 экстракт. 5 – положительный контроль. Стрелкой отмечены продукты деградации.

Основная проблема очистки теломеразы – низкое ее содержание в клетке. На сегодняшний день самый используемый метод очистки теломеразы основан на ее аффинном выделении за счет субстрата теломеразы [145]. Однако элюция теломеразы со смолы с помощью олигонуклеотида высокой концентрации делает такой метод очистки не пригодным для измерения ингибирования олигонуклеотидами без дополнительного этапа очистки.

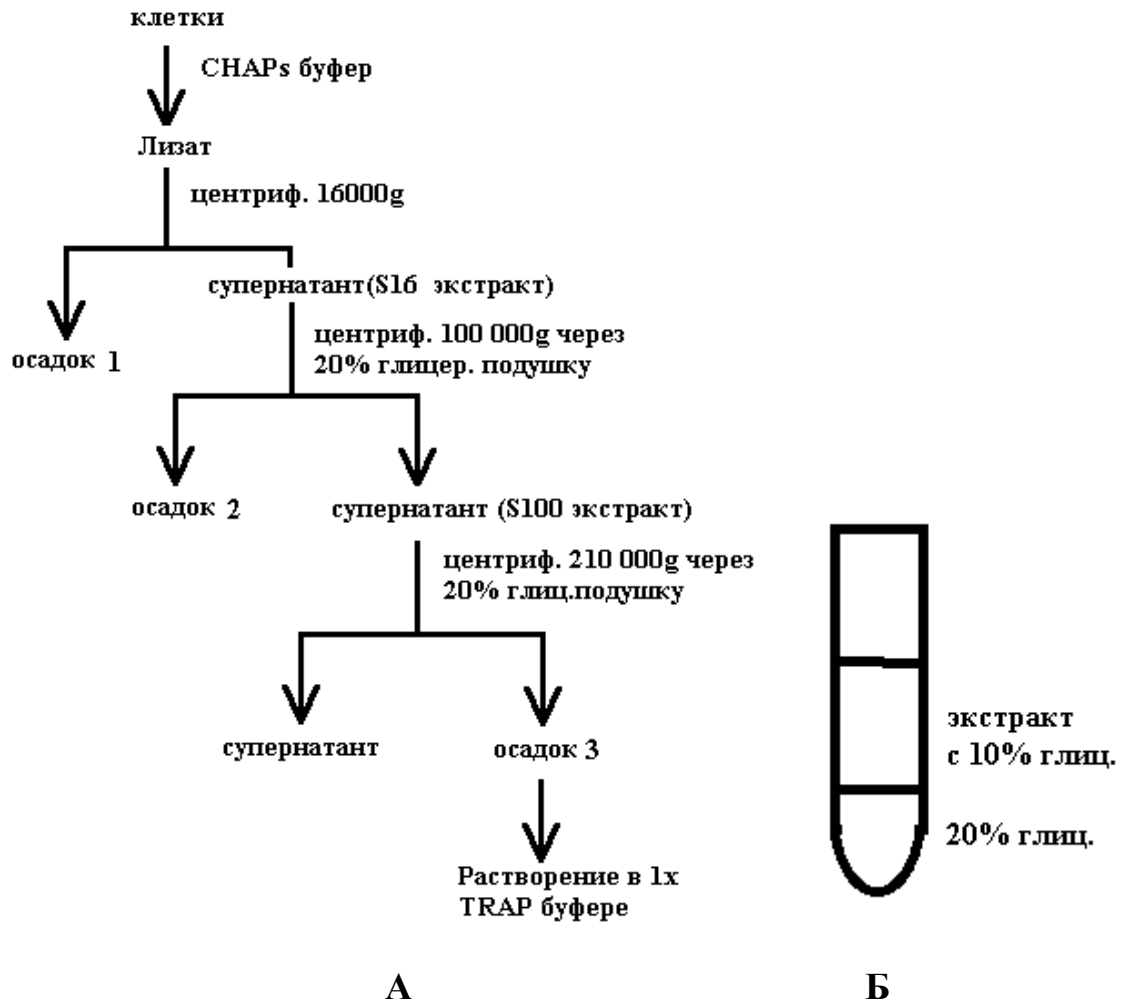


Рис. 23. А – Схема очистки теломеразы методом дифференциального центрифугирования. Б – Схематическое представление глицериновой подушки.

Первой задачей работы стала разработка метода очистки теломеразы. Для этого решили использовать метод дифференциального осаждения (рис. 23). В литературе отсутствуют работы, в которых проводили бы осаждение теломеразы. Известно, что теломераза человека при градиентном центрифугировании перемещается с тироглобулином, который имеет коэффициент седиментации (Сведберга) равный 20. Исходя из этих данных, используя онлайн калькулятор по подсчету времени седиментаций [146] оценили время необходимое для осаждения. Оно составило примерно 2 часа.

На первом этапе выделения теломеразы из клеток (рис. 23) получали S16 экстракт, чтобы избавиться от клеточного дебриса и ДНК. После этого теломеразу очищали от более тяжелых молекул центрифугированием через 20% глицериновую подушку получая S100 экстракт (рис. 23Б). S16 экстракт содержит 10% глицерина, соответственно, буфер с 20% глицерином имеет большую плотность, и молекулы осаждаются в нем медленнее, т.е. в условиях центрифугирования теломераза остается в 10% глицериновом экстракте, тогда как более тяжелые молекулы проходят через 20% глицериновую подушку и оказываются в осадке. Без подушки ~50% теломеразы оказывалось в осадке 2 (рис. 26А). На следующем этапе центрифугирования ставилась обратная задача – осадить теломеразу и препятствовать осаждению более легких молекул. В этом случае так же подходит 20% глицериновая подушка, однако скорость осаждения необходимо увеличить до 210000 g. Почти вся теломераза оказывалась в осадке 3 (рис. 23А). В дальнейшем этот осадок растворяли в 1х ТРАП буфере с 10% глицерином, т.к. он является реакционным при тестировании ингибирования теломеразы.

Так как теломераза является сложным комплексом, измерение выхода и чистоты полученных препаратов проводили по двум параметрам теломеразы: по активности теломеразы и по количеству теломеразной РНК. Теломеразную

активность измеряли методом RQ-ТРАП, выход по активности считали делением суммарной активности очищенной теломеразы на суммарную активность S16 экстракта, он составил 55% (табл.3). Относительное количество hTR измеряли методом ПЦР реального времени с обратной транскрипцией. Выход по hTR составил 31% (табл. 3). Такое различие в выходах может быть обусловлено тем, что в ходе очистки теломеразы были удалены ее внутриклеточные ингибиторы, что привело к увеличению ее активности по сравнению с неочищенным S16 экстрактом [147].

Табл. 3.

Параметры очистки теломеразы. Теломеразная активность была измерена методом RQ-ТРАП. Относительное количество hTR было измерено ПЦР-ом реального времени с использованием обратной транскрипции.

	белок, мг	Теломеразная активность				hTR			
		Сумм. активн, ОЕ	уд.актив н ОЕ/ мг	Фактор очист.	Вых од%	сумм hTR, U	уд. hTR/ U/мг	Фактор очист.	Выхо д%
S16	5.99	12	2	1	100	12	2	1	100
осадок 3	0.46	6.64	14.4	7.2	55	3.73	8.19	4.1	31

ОЕ – относительные единицы.

Фактор очистки активной теломеразы был рассчитан отношением удельной активности очищенной теломеразы (на единицу массы белка) к удельной активности S16 экстракта и составил 7. Однако по количеству hTR фактор очистки составил 4. Такое различие также можно объяснить увеличением активности теломеразы из-за очистки от внутриклеточных ингибиторов теломеразы. Для сравнения, фактор очистки при использовании аффинного выделения теломеразы составляет ~70 [145]. В полученном нами

частично очищенном и обогащенном теломеразном экстракте олигонуклеотид оказался устойчивыми в течение 60 минут. Степень концентрирования теломеразы предложенным нами методом зависит от объёма растворителя, используемого для растворения осадка 3 (рис. 23А), и не превышает десяти.

2.1.2. Устранение ингибирования ПЦР

При скринингах ингибиторов теломеразы методом ТРАП очистка теломеразного продукта перед ПЦР абсолютно необходима, т.к. ингибиторы теломеразы обычно ингибируют и ПЦР. Теломераза и ДНК-полимеразы являются полимеразами и имеют сходные структуры. Одной из целей нашей работы было исследование ингибирования теломеразы олигонуклеотидами, которые по своей природе одинаковы с продуктом теломеразы, из-за чего очистка с помощью депротеинизации/осаждения и/или выделения на spin-колонках не подходят.

На первом этапе нужно было проверить возможность использования метода ТРАП. Для оценки ингибирования ПЦР олигонуклеотидами в качестве модельных олигонуклеотидов мы решили использовать РНК олигонуклеотиды NuG2R (5'-UUAGGGUUAGGG-NH₂-3') и NuG4R (5'-(UUAGGG)₄-NH₂-3'), имеющие теломерные последовательности и максимально схожие с теломерным продуктом. Из литературных данных известно, что такие олигонуклеотиды ингибируют теломеразу, т.к. являются аналогами TERRA – природного ингибитора теломераз [148]. Контроль влияния ингибиторов на ПЦР проводили, добавляя ингибитор в ПЦР после удлинения субстрата теломеразой. Если сигнал будет таким же, как и в отсутствие ингибитора, то это означает, что ингибитор не влияет на ПЦР. Результаты представлены на рис. 24. Видно, что РНК-олигонуклеотиды ингибируют ПЦР реакцию (рис. 24,

сравнить дорожки 1 и 2 с дорожкой 3). Следовательно, стадия очистки продуктов удлинения от тестируемых олигонуклеотидов до ПЦР необходима.

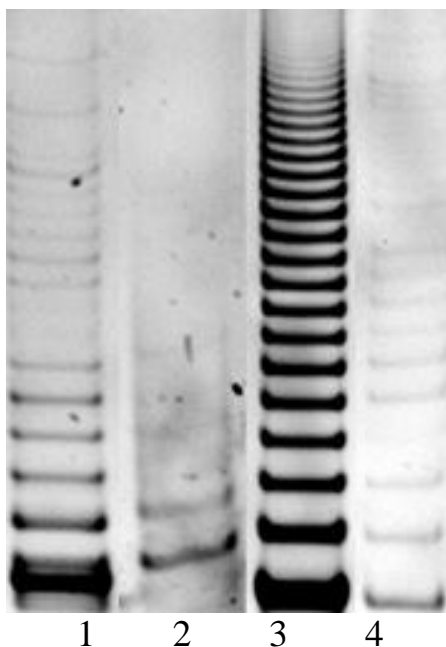


Рис. 24. Ингибирование ПЦР реакции в ТРАП методе теломерными РНК олигонуклеотидами. Дорожки 1 и 2 – добавление NuG2R и NuG4R в ПЦР реакцию, соответственно. Дорожка 3 – ПЦР в отсутствие РНК-олигонуклеотидов. Дорожка 4 – негативный контроль.

Метод очистки теломеразного продукта за счёт аффинного выделения с помощью иммобилизованного комплементарного олигонуклеотида (см. лит обзор, стр. 24-25) также не подходит, т.к. такое выделение проводят при комнатной температуре, и наши исследуемые олигонуклеотиды могут со- выделяться за счет образования квадруплексов или комплементарного взаимодействия с иммобилизованным олигонуклеотидом.

Известно, что любые активные вещества, например, яды (а также ингибиторы, ферменты, катализаторы и т.д.) имеют предел допустимой концентрации (ПДК) действия, ниже которого перестают действовать [149].

Чтобы решить проблему ингибирования ПЦР, мы добавили этап разбавления теломеразного продукта после проведения реакции удлинения перед ПЦР. При разбавлении можно снизить концентрацию ингибиторов ниже ПДК и ингибиторы перестают ингибировать ПЦР. При этом в ПЦР теломеразный продукт амплифицируется.

Основным параметром исследования ингибирования теломеразы в этой работе являлось IC50. Для его расчетов необходим количественный метод детекции. В связи с этим был использован RQ-ТРАП, т.е. ТРАП с использованием ПЦР реального времени (рис. 25Б), в котором ПЦР продукт детектируется с помощью краски SYBR Green I, интеркалированный в него.

Во-первых, был построен калибровочный график (рис. 25А). Для его получения использовали олигонуклеотид TSR8 [150] имеющий 8 теломерных повторов и имитирующий теломеразный продукт (рис.25 Б). Эти данные использовали для количественной оценки теломеразной активности. Перед использованием разбавления для исключения ингибирования ПЦР необходимо было убедиться, что разбавление теломеразного продукта не повлияет на линейность сигнала от количества материала. Результат опыта представлен на рис. 25В. Видно, что при 2-х кратном серийном разбавлении продуктов теломеразной реакции линейность зависимости сигнала от количества теломеразного экстракта сохраняется.

IC50 рассчитывается по логарифмической кривой ингибирования теломеразы. Для этого измеряли относительную теломеразную активность в присутствии разной концентрации ингибитора и строили график (рис. 26), для правильного расчета IC50 необходимо выявить его верхний и нижний пределы, т.к. ингибирование ПЦР не должно начаться до достижения нижнего плато ингибирования теломеразы (рис. 26А)..

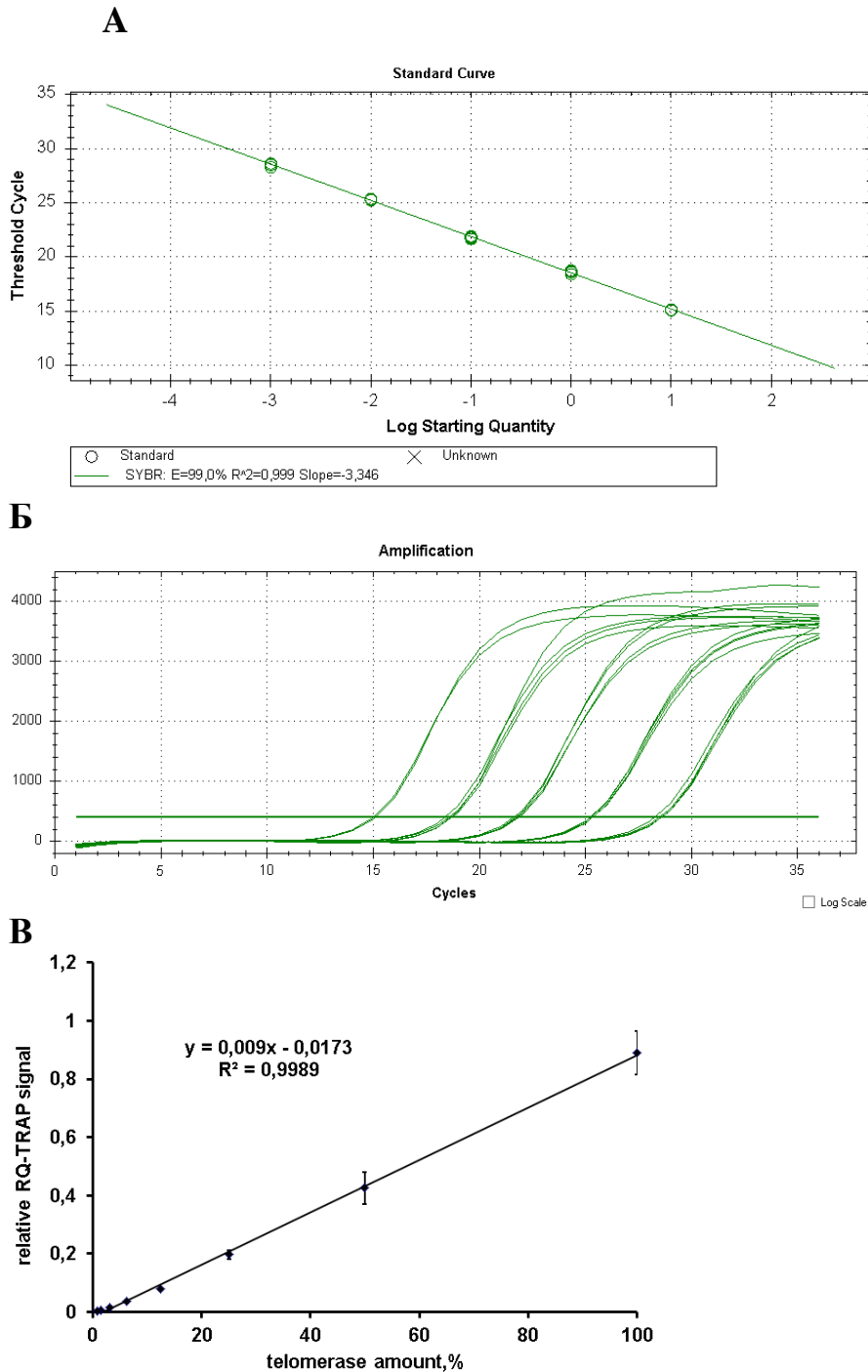
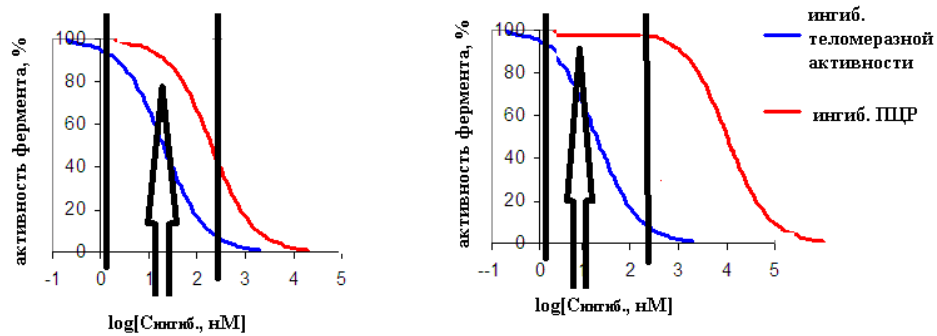


Рис. 25. Линейность сигнала от олигонуклеотида TSR8 (А) и теломеразы (В) в ТРАП методе с использованием разбавления. А – Калибровочная кривая и Б – Оригинальная кривая амплификаций, полученных при 10-кратном разбавлении TSR8. В – Проверочная кривая, полученная путем двухкратного серийного разбавления теломеразного экстракта.

А

до разбавления

после разбавления



Б

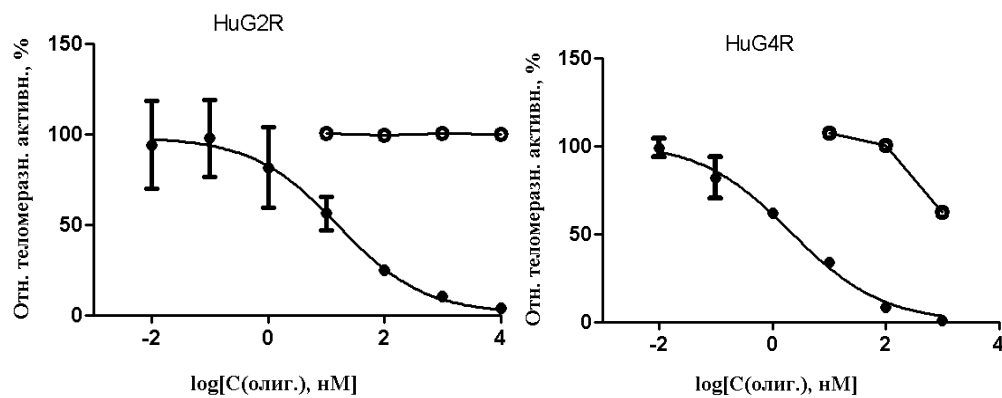


Рис. 26. Разбавление теломеразного продукта. А – схематическое представление графика ингибирования теломеразы до и после разбавления теломеразного продукта перед ПЦР. Б – график ингибирования теломеразы олигонуклеотидами HuG2R и HuG4R измеренный методом RQ-ТРАП. Ингибирование теломеразы отмечено как (•), ингибирование ПЦР как (o).

При проверке ингибирования ПЦР ингибиторы были добавлены после теломеразной реакции перед разбавлением и ПЦР. После разбавления теломеразного продукта кривая ингибирования смещается (рис. 26А)

Разбавление теломеразного продукта в 40 раз решило проблему ингибирования ПЦР для РНК олигонуклеотидов (рис. 26Б). В случае HuG4R

видно, что при увеличении концентрации олигонуклеотид начинает ингибировать ПЦР уже в отсутствие теломеразного продукта.

Таким образом, измерить ингибирование теломеразы олигонуклеотидами или другими веществами, влияющим на ПЦР, без выделения продуктов удлинения теломеразой можно с помощью введения дополнительного шага разбавления после теломеразной реакции до усиления сигнала ПЦР.

2.1.3. Проверка метода на низкомолекулярных G4-квадруплекс лигандах

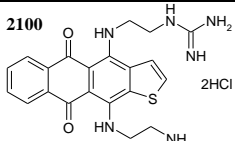
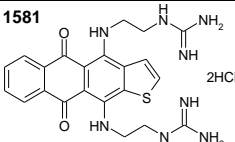
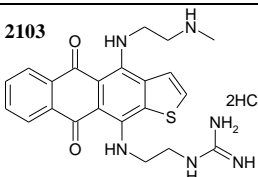
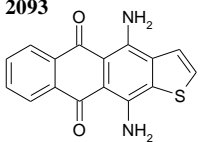
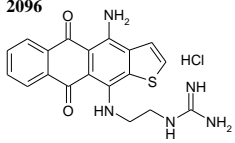
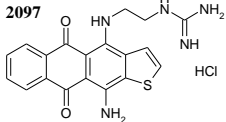
Адекватность предложенного подхода проверили, используя соединения с известным IC₅₀, определенным ранее другими методами. Для этого выбрали низкомолекулярное соединение VIBR1532. Его IC₅₀ составило 0,214±0.038мкМ, что намного лучше соответствует результатам измерения прямым теломеразным методом (IC₅₀~0,1мкМ), чем обычным ТРАП методом (IC₅₀ 4-5мкМ) (см. литобзор стр.21).

Однако известно, что VIBR1532 не ингибирует ПЦР [41]. Чтобы проверить возможность использования метода для низкомолекулярных ингибиторов ПЦР, являющихся G4-лигандами, проверили известные соединения ингибирующие теломеразу, LCTA-1120 и LCTA-1581 [151] (табл. 4). Другие производные антрахинонового ряда (табл. 4) были синтезированы в лаборатории Н.С.Ильинского – с целью улучшения их способности взаимодействовать с G4-квадруплексами [152]. Большинство соединений ингибирует ПЦР в пределах концентрации 0,05-0,15 мкМ, тогда как теломеразу в 4-7 раза слабее (табл. 4). Использование 2000 кратного разбавления полностью элиминирует влияния ингибиторов на ПЦР. По полученным данным видно, что модификация боковых групп не сильно влияет на способность ингибировать теломеразу.

Табл. 4.

Названия, IC50 ингибирования теломеразы и структурные формулы антрахиноновых производных.

Название соединений	IC50, мкМ теломеразы	IC50, мкМ ПЦР	Структурная формула
LCTA-1794	0,47±0.14	0,27±0,07	<p>1794</p>
LCTA-2082	0.49±0.26	не опред.	<p>2082</p>
LCTA-1815	0.57±0.21	не опред.	<p>1815</p>
LCTA-2102	0,63±0.24	0,3±0,07	<p>2102</p>
LCTA-2413	0,68±0.25	0,36±0,27	<p>2413</p>
LCTA-1120	0,69±0.24	0,45±0,14	<p>1120</p>
LCTA-1816	0.71±0.21	не опред.	<p>1816</p>
LCTA-2106	0.72±0.23	0,070±0,045	<p>2106</p>

LCTA-2100	0.83 ± 0.23	$0,098 \pm 0,056$	<p>2100</p> 
LCTA-1581	0.92 ± 0.45	$0,075 \pm 0,08$	<p>1581</p> 
LCTA-2103	1.1 ± 0.5	$0,049 \pm 0,026$	<p>2103</p> 
LCTA-2093	10 ± 2	33 ± 23	<p>2093</p> 
LCTA-2096	3 ± 0.9	0.5 ± 0.3	<p>2096</p> 
LCTA-2097	2 ± 0.7	0.9 ± 0.3	<p>2097</p> 

2.1.4. Ингибирование теломеразы новым металлорганическим соединением, содержащим медь

Разработанный нами метод был дополнительно протестирован на новом металлорганическом соединений. Открытие цисплатина привело к росту исследований в области применения металло-лекарств в противоопухолевой терапии. Из не-платиновых соединений большой интерес вызывают соединения меди, т.к. ее координационные свойства хорошо изучены, а также показано, что цитотоксичность некоторых металлорганических соединении меди обусловлена механизмами активации апоптоза [153]. Для более широкого изучения медных комплексов на кафедре органической химии химического факультета МГУ в

лаборатории профессора Зыка Н.В. в группе Мажуги А.С. было синтезировано новое соединение 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он (рис. 27А), которое образует комплекс с двумя атомами меди в двух разных степенях окисления (рис. 27Б). В дальнейшем соединение вне комплекса с медью будем называть «лиганд». Нами было протестировано ингибирование теломеразы лигандом и его комплексом.

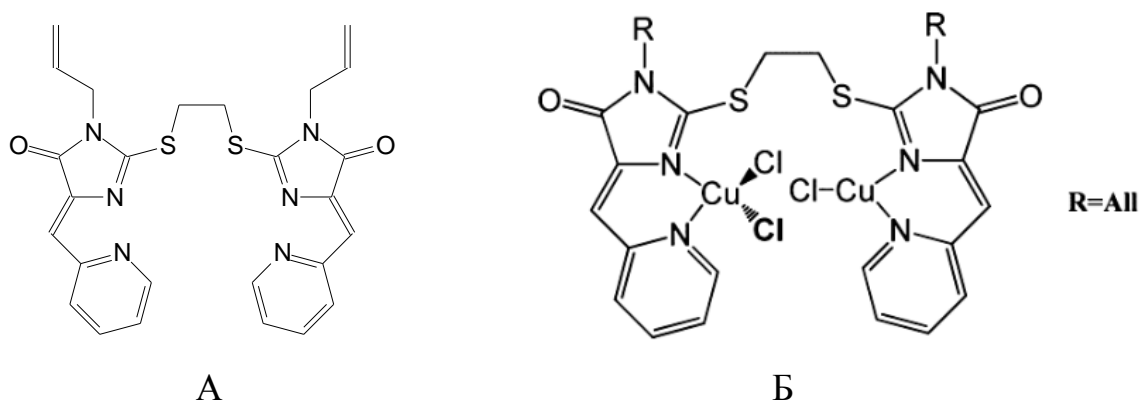


Рис.27. Структурная формула 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он (А) и его комплекса с медью (Б). R – заместитель аллильного радикала.

Этот комплекс (рис. 27Б) ингибировал теломеразу с IC50 13 мкМ по ТРАП методу (табл. 5) и с IC50 20мкМ по прямому методу детекции теломеразной активности (рис. 28). Такое различие в результатах можно объяснить разными способами, например, различные количества используемой теломеразы в методах, разные субстраты, разные солевые условия в теломеразной реакции и т.д. Однако возник вопрос о степени стабильности комплекса в разных солевых условиях. Для этого решено было проверить ингибирует ли теломеразу лиганд сам по себе и двухвалентная медь. Оказалось, что двухвалентная медь ингибирует теломеразу с IC50 равной 9мкМ. Лиганд без меди также ингибирует теломеразу на том же уровне, что и комплекс (табл. 5). Можно

сделать предположение, что расположение меди в комплексе критически не влияет на ингибирующую способность соединения. Кроме того, полученные данные говорят о необходимости подтверждения ингибирующей способности выбранных по результатам RQ-ТРАП соединений прямым методом определения ингибирования теломеразы.

Табл. 5.

Ингибирование теломеразы комплексным соединением 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он. Данные получены методом RQ-ТРАП.

соединение	IC ₅₀ , мкМ
лиганд	12±6
лиганд +CuCl ₂ (комплекс)	13±2
CuCl ₂	9±1

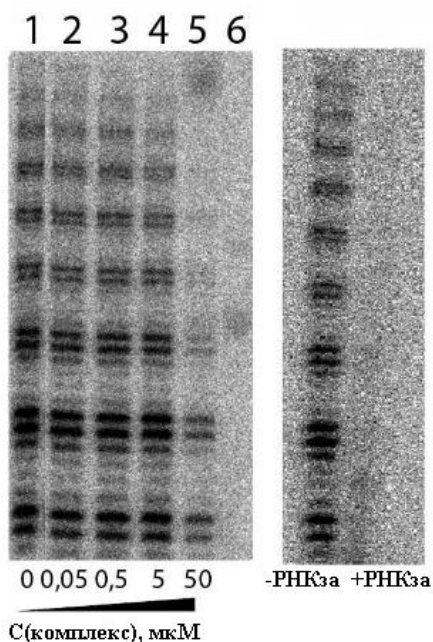


Рис. 28. Результаты прямого метода тестирования теломеразной активности при исследовании ингибирования теломеразы комплексом лиганда 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он с медью.

2.1.5. Рекомбинантная экспрессия теломеразы и вальпроевая кислота

Недостаток использования разбавления для исключения ингибирования шага ПЦР в методе ТРАП исследуемыми веществами заключается в том, что при сильном разведении концентрация теломеразного продукта становится меньше предела чувствительности ПЦР, в результате на шаге ПЦР не происходит амплификация теломеразного продукта. В связи с этим необходимо повышать концентрацию теломеразного продукта. Для этого необходимо повысить концентрацию теломеразы в теломеразной реакции, т.к. изначально концентрации теломеразного субстрата (TS) и нуклеотидов заведомо выше, чем теломеразы. Решается такая проблема путем увеличения количество теломеразы в клетке. Это возможно за счет рекомбинантной экспрессии теломеразы исходно в клетке перед получением теломеразного экстракта. На данный момент в мире для увеличения экспрессии теломеразы в основном используется генно-инженерная конструкция, созданная в лаборатории профессора Лингнера [154]. В этой конструкции два компонента теломеразы hTR и hTERT синтезируются с двух разных плазмид. В одной кДНК hTR под промотором U1 встроена в вектор pBluescript II, в другой кДНК hTERT вставлена в вектор pcDNA6/myc-His C. Эти плазмиды транзитарно экспрессируются в клетках HEK293T с течением времени. Основная проблема при транзитарной экспрессии – уменьшение транскрипции трансфицированных плазмид в клетке во времени. Основными механизмами уменьшения транскрипции являются метилирование ДНК и деацетилирование гистонов [155,156]. Одним из способов борьбы с этим явлением является использование ингибиторов этих процессов. Ингибиторы деацетилаз гистонов хорошо известны. Один из эффективных ингибиторов деацетилаз – это вальпроевая кислота (ВПА) [155]. Мы проверили транзитарную экспрессию теломеразы в

присутствии и отсутствие ВПА. В наших условиях добавление ВПА увеличило временную экспрессию теломеразы в 2 раза (рис. 29). При использовании ВПА мы наблюдали остановку деления обработанных клеток.

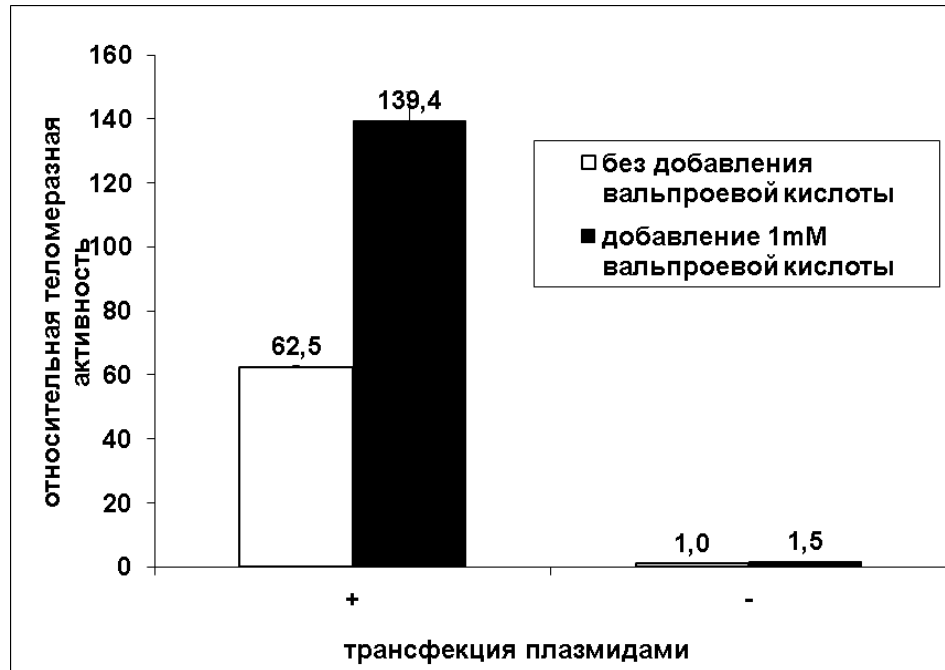


Рис. 29. Увеличение экспрессии теломеразы с помощью добавления ВПА. «+» - трансфицированные в клетки НЕК293Т плазмидами профессора И. Лингнера. «-» - не трансфицированные клетки.

Вторым способом борьбы с уменьшением транскрипции генов на плазмидах, внесенных в клетку, является эписомальная репликация плазмиды. Известно, что ДНК-содержащие вирусы умеют реплицироваться в клетке. Такие вирусы кодирует белок, который специфически связывается с ориджином репликации вируса и привлекает репликативную машину клетки. Разработанная в лаборатории профессора Лингнера система экспрессии теломеразы основана на использовании клеток НЕК293Т, которые являются сублинией клеток НЕК293, и экспрессируют SV40-антиген вируса SV40. Этот белок отвечает за репликацию плазмиды, содержащий ориджин репликации

вируса SV-40 [157]. Вектор pcDNA6/myc-His C имеет SV40-ориджин репликации. За счет этого плазмиды, содержащая hTERT, реплицируются в клетке. Однако в векторе pBluescript II, несущем ген hTR, такой ориджин отсутствует. Основным недостатком SV-40 конструкций является конкуренция репликации с транскрипцией. SV-40 антиген, избыточно связываясь с плазмидой, уменьшает экспрессию, существуют работы в которых показано, что SV-40 уменьшает экспрессию белка [158]. Для экспрессии теломеразы мы решили использовать клетки HEK293E, содержащие антиген вируса EBV (Ebstein Baar virus) под названием EBNA-1. Ориджин репликации этого вируса работает синхронно с делением клетки, поэтому репликация плазмиды не конкурирует с его транскрипцией [159]. Размер ориджина EBV большой (~2000 п.о.), он содержит два основных элемента FR и DS (diad symmetry) [160]. Известно, что чем меньше размер плазмиды, тем больше ее можно трансфицировать в клетки и тем устойчивее будет система плазмиды-клетка [161]. Есть данные о том, что DS (200 п.о.) элемент достаточен для репликации плазмиды [162]. Мы поместили DS элемент между сайтами KpnI и SalI плазмиды pBSK-U1-hTR-U2/U5, содержащей кДНК hTR под U1 промотором и с 3'-U1 терминатором (любезно предоставлена Ли Шанг). Полученная плаزمиды названа pBSK-DS-U1-hTR. Также мы поместили DS элемент в SalI сайт плазмиды p-SFFV-hTERT несущей кДНК hTERT под промотором SFFV (содержится в spleen focus-forming вирусе). Известно, что промотор SFFV эффективно работает в различных видах тканей [163]. Полученная конструкция названа p-DS-SFFV-hTERT. В результате экспрессии конструкций pBSK-DS-U1-hTR и p-DS-SFFV-hTERT активность теломеразы увеличилась в 3-4 раза (рис. 30). В качестве контроля плазмиды трансфицировали в другую сублинию клеток 293T, не имеющих EBNA-1 белка. Видно, что DS элемент не работает в этих клетках. Направление вставки DS элемента в плазмиде p-DS-SFFV-hTERT

не влияет на экспрессию теломеразы, т.к. DS элемент симметричен. Отсюда следует, что при использовании репликации плазмиды экспрессия теломеразы выше, чем при использовании ингибитора деацетилаз.

Для проверки синергичности двух подходов, трансфицированные плазмидами pBSK-DS-U1-hTR и p-DS-SFFV-hTERT клетки HEK293E были обработаны вальпроевой кислотой. Использование одновременно вальпроевой кислоты и репликации плазмид pBSK-DS-U1-hTR и p-DS-SFFV-hTERT не дало существенного увеличения экспрессии по сравнению с применением двух подходов по отдельности. Учитывая вышеприведенные данные, мы остановили выбор на использовании эписомальной репликации плазмиды в качестве способа увеличения рекомбинантной экспрессии теломеразы.

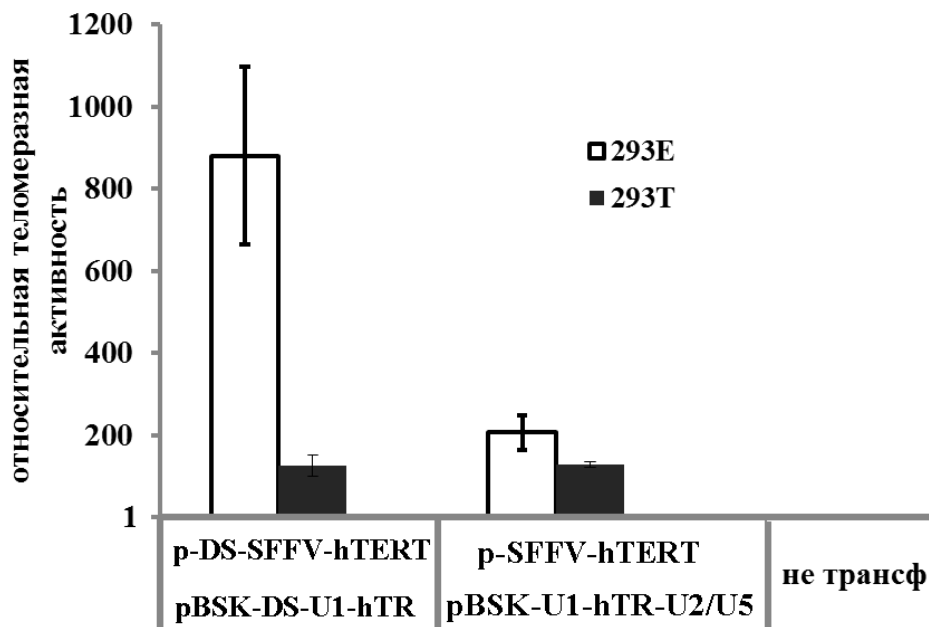


Рис. 30. Экспрессия теломеразы в сублиниях клеток HEK293: HEK293E – отмечены пустыми столбцами, HEK293T – отмечены темными столбцами. По оси абсцисс приведены названия плазмид, трансфицированных в клетки. Относительная теломеразная активность приведена по отношению к не трансфицированным клеткам.

Известно, что большинство ученых для исследования ингибирования теломеразы используют клеточный S100 экстракт, так как получать его легко и быстро. Однако степень чистоты такого экстракта не подходит для измерения ингибирования теломеразы олигонуклеотидами. Нами был разработан быстрый метод очистки теломеразы, дающий необходимую для такого анализа степень чистоты.

Разработанная методика RQ-ТРАП с разбавлением позволяет количественно измерять ингибирование теломеразы соединениями различной природы, включая олигонуклеотиды и вещества, непосредственно взаимодействующие с последовательностями теломерных повторов. Учитывая простоту устранения ингибирования ПЦР, RQ-ТРАП с разбавлением подходит для использования в скринингах ингибиторов теломераз. Приемлемость RQ-ТРАП с разбавлением была проверена сравнением работы известных соединений – ингибиторов теломеразы, этим методом и методом прямого ингибирования теломеразы. С помощью RQ-ТРАП метода были измерены ингибирующие способности новых веществ.

Мы впервые применили эписомальную репликацию, основанную на ориджине репликации вируса EBV, для рекомбинантной экспрессии теломеразы. Это привело к повышению количества теломеразы в клетке и обогащению теломеразного экстракта. Введенные дополнительные стадии очистки клеточного экстракта центрифугированием через глицериновую подушку и концентрирование теломеразного комплекса осаждением позволили получить обогащенный теломеразой экстракт и использовать его в методе RQ-ТРАП с более высоким уровнем разбавления, что расширило возможности метода, позволяя тестировать ингибирование теломеразы веществами, которые ингибируют ПЦР в наномолярных концентрациях.

2.2. Разработка новых подходов к ингибированию теломеразы

2.2.1. Дизайн химерных бифункциональных олигонуклеотидов

Основной целью нашей работы была разработка новых подходов ингибирования теломеразы. Известно, что теломеразная РНК имеет два домена, связывающиеся с hTERT и необходимые для работы теломеразы: псевдоузел и CR4/CR5. Было показано, что теломераза не теряет свою активность при экспрессии этих доменов отдельно друг от друга [164]. Также известно, что в условиях *in vitro* теломераза является димером, и эта димеризация, предположительно, необходима для работы теломеразы [62]. Существует работа, в которой с помощью УФ сшивания показали, что два домена, псевдоузел и CR4/CR5, сближаются друг с другом в теломеразном комплексе [165]. Сближение может дать возможность кросс связыванию доменов через объединенные комплементарные этим доменам олигонуклеотиды. В связи с этим мы решили разработать химерные олигонуклеотиды, состоящие из двух олигонуклеотидных частей, соединенных не нуклеотидным линкером. Этот химерный олигонуклеотид связывался бы одновременно с двумя участками hTR внутримолекулярно и/или межмолекулярно. Такое связывание, возможно, нарушило бы структуру или динамику hTR и/или теломеразного комплекса (рис. 31), что привело бы к ингибированию теломеразы.

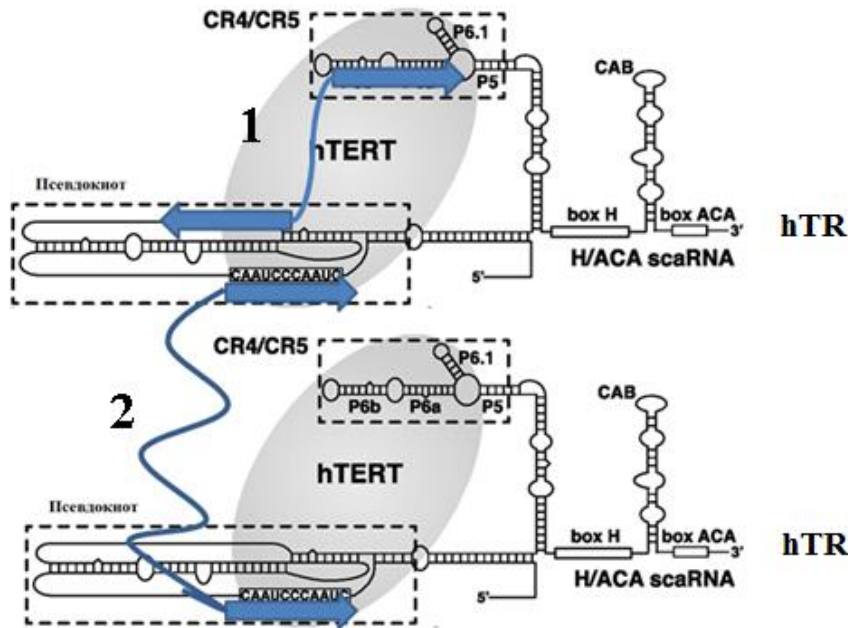


Рис. 31. Общая схема представления предполагаемого механизма ингибирования теломеразы химерными олигонуклеотидами. Синей стрелкой отмечен олигонуклеотид, комплементарный к участку hTR. Волнистая синяя линия является линкером связывающий два олигонуклеотида. hTERT отмечен как серый овал. 1. ингибирование внутримолекулярное, 2. межмолекулярное.

Химерные олигонуклеотиды были составлены из следующих частей: М – олигонуклеотид комплементарный к матричной части (hTR область 46-65); J (hTR область 152-168) – комплементарен к одноцепочечной части псевдоузла; N – является комплементарным к CR4/CR5 домену hTR (рис. 32А). Также олигонуклеотид N имеет дополнительные 3 нуклеотида на 5'-конце, предоставляющие возможность отделять два соединенных комплементарных участка в таких олигонуклеотидах, как MN или JN. Во избежание деградации нуклеазами и элонгации полимеразми все олигонуклеотиды были 2'-ОМе модифицированы и защищены с 3'-конца 6-аминогексанолом. Кроме того модификация 2'-ОМе не вызывает расщепление мишеней РНК-зой H, т.е. элиминирует действие олигонуклеотида по антисенс механизму.

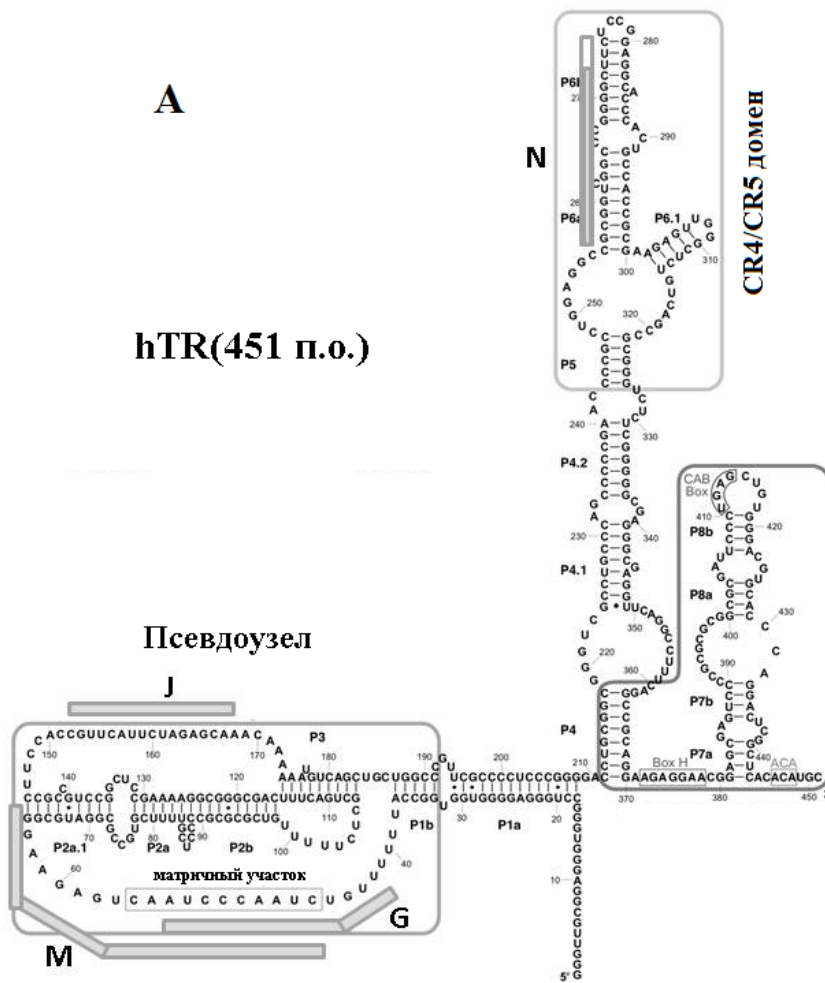


Рис. 32. А. Положение олигонуклеотидных частей химер на вторичной структуре hTR. Олигонуклеотиды М, J, G и N окрашены в серый цвет. Б. Схематическое представление химер.

Длины олигонуклеотидов составляют примерно 20 н.о. Это связано с ограничениями синтеза. Олигонуклеотид М подобен олигонуклеотиду ISIS24961, однако на 7 нуклеотидов больше с 5'-конца, чтобы обеспечить прочное взаимодействие. 5'-конец был выбран по причине того, что при разработке GRN163L (Иметелстат) конъюгата 5'-конец меньше мешал ингибированию [64].

Олигонуклеотид J, комплементарный к участку 168-152 hTR, был выбран потому, что siРНК и shРНК к этому району hTR вызывали наибольший биологический эффект – ингибировали теломеразу и приводили к укорочению теломер [137]. Кроме того, в системе *in vivo* на клеточных линиях HEK293E олигонуклеотид J сильнее ингибировал теломеразу, чем олигонуклеотид имеющий последовательность Иметелстат (табл. 6), что свидетельствует о том, что участок 152-168 hTR наиболее доступен в клетке.

Химерные олигонуклеотиды были соединены 3'-5', или 3'-3', или 5'-5' концами через 1,3-пропандиоловый линкер (с3) (Рис. 32Б). Если М, N, J олигонуклеотиды использовались индивидуально, то с3 линкер был добавлен на 5'-конец, а в случае с М также и на 3'-конец. Олигонуклеотид G (Рис. 32А) (hTR область 42-54), который имеет последовательность, идентичную с GRN163L и связывается с матричной частью hTR, несет модификации, описанные выше, и был использован в качестве контроля для ингибирования теломеразы. Все последовательности протестированных олигонуклеотидов представлены в табл. 6. Для каждого была измерена теломеразная активность как *in vitro*, так и в *in vivo* условиях. Примеры начальных графиков даны в приложении.

Табл. 6.

Последовательности и количественные характеристики ингибирования
теломеразы олигонуклеотидами.

олигонуклеотид \химер	Последовательность 2'-О-метил олигонуклеотидов, позиция комплементарного участка hTR	IC ₅₀ , нМ	
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
c3N	C3-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ 272-256	не ингиб.	41.1±7.4
c3M	C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ 65-46	100±20	5.2±0.9
c3J	C3-UUGCUCUAGAAUGAACG-NH ₂ 168-152	19±16 6.8±0,8*	43±21
c3G	C3-UAGGGUUAGACAA-NH ₂ 54-42	11.6±5.6 5.5±0,6*	67±33
Mc3	CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-C3 65-46	75±57 77.4±10*	175±137
Mc3N	CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-C3- GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ 65-46&272-256	35±18 118±20*	2.2±0.8
MNc3	CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG- GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -C3 65-46-272-256	не ингиб.	18.4±5.6
c3MN	C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG- GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -NH ₂ 65-46-272-256	не ингиб.	1.2±0.4
M*c3N	(3'-NH ₂ -GAUUGGGAUUGACUCUCCC-5')-C3- GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ 46-65&272-256	15.7±8.2 72±8*	0.51±0.11
Mc3N*	CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-C3-(3'- GCGCCAGCCGGGCCCCGUUG-5')	13.5±3.4	7±1
c3Mc3N	C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-C3- GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ 65-46&272-256	184±58	0.7±0.5
Nc3M	GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -C3- CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ 256-272&46-65	76±21 27±3*	1.3±0.9
Nc3J	GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -C3- UUGCUCUAGAAUGAACG-NH ₂ 272-256&168-152	не ингиб.	1.5±0.7
N*c3J	(3'-NH ₂ -GCGCCAGCCGGGCCCCGUUG-5')-C3- UUGCUCUAGAAUGAACG-NH ₂	не ингиб.	1.3±0.6

	256-272&168-152		
Jc3N	UUGCUCUAGAAUGAACG –C3- GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ 168-152&272-256	229±72	3.9±1.7
Nmisc3J	GUUCGCCCCGCGCCGACGCCG-C3- UUGCUCUAGAAUGAACG-NH ₂ 272-256&168-152	не ингиб.	8.5±3.5
Nc3Jmis	GUUGCCCCGGGCCGACCGCG -C3- UUGUCCUAAGAUGACAG-NH ₂ 272-256&168-152	не ингиб.	11.2±0.8
Nmisc3Jmis	GUUCGCCCCGCGCCGACGCCG-C3- UUGUCCUAAGAUGACAG-NH ₂ 272-256&168-152	не ингиб.	18.4±3.2
compNc3J	CGCGGUCGGCCGCGGCAAC-C3- CGUUCAUUCUAGAGCAA-NH ₂ 256-272(complem)& 152-168 (complem)	не ингиб.	не ингиб.
Mc3M	CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-C3- CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ 65-46&65-46	221±10	1.4±0.3
M*c3M	(3'-NH ₂ -GAUUGGGAUUGACUCUCCCC-5')-C3- CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ 46-65&65-46	11.9±0.3 19.3±2.5*	0.3±0.1
MMc3	CCCUUCUCAGUUAGGGUUAGCCCUUCUCA GUUAGGGUUAG-C3 65-46-65-46	42±1 26.7±3*	4.5±0.9
c3Mc3M	C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-C3- CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG-NH ₂ 65-46&65-46	44±12	0.31±0.04

*-IC₅₀ из прямого теломерного метода, в остальных случаях IC₅₀ определен с помощью RQ-ТРАП.

не ингиб.-IC₅₀ больше, чем 500нМ.

2.2.2. Ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами *in vitro*

Для каждого олигонуклеотида при каждом измерении было проведено параллельное тестирование влияния на ПЦР реакцию. Влияние на ПЦР проверяли добавлением ингибиторных олигонуклеотидов после проведения

теломеразной реакции. При этом если олигонуклеотид ингибирует ПЦР, то сигнал по сравнению с контролем, в котором отсутствует олигонуклеотид, будет ниже. Олигонуклеотиды М и J по отдельности достаточно хорошо ингибируют теломеразу *in vitro* (IC₅₀ 100 нМ и 19 нМ, соответственно). Как и предполагалось, олигонуклеотид G показал лучшее ингибирование чем М (IC₅₀ 11нМ) (табл. 6).

При сравнении ингибирующей способности Mc3M и M*c3M видно усиление ингибирования в 10-20 раз при инверсии олигонуклеотида М. Этот эффект можно объяснить внутримолекулярным взаимодействием с 3'-конца двух конъюгированных М олигонуклеотидов с димерной формой теломеразы. В случае олигонуклеотида М расположение модификации с3 как на 5'-, так и на 3'-концах не влияет на ингибирование теломеразы (табл. 6). Дополнительным доказательством может служить разница в ингибировании Mc3M и c3M (или Mc3). Олигонуклеотиды c3M и Mc3 могут взаимодействовать по отдельности с двумя субъединицами димерной теломеразы, тогда как в олигонуклеотиде Mc3M 5'-конец Mc3 части пространственно будет мешать связыванию 3'-конца c3M части с одной из субъединиц теломеразы. Из-за этого Mc3M ингибирует теломеразу хуже (IC₅₀=220нМ), чем Mc3 в отдельности (IC₅₀~75нМ), а M*c3M ингибирует лучше (IC₅₀~10нМ) (рис. 33).

Олигонуклеотид N в системе *in vitro* не ингибирует теломеразу (табл. 6). Однако при конъюгировании олигонуклеотидов N и M, ингибирующая способность таких химерных олигонуклеотидов становится больше, чем олигонуклеотида М в отдельности. Например, химера Mc3N в два раза лучше ингибирует теломеразу, чем c3M, тогда как M*c3N и Mc3N* ингибируют в 5 раз лучше. Такой эффект увеличения ингибирующей способности можно объяснить за счет внутримолекулярного взаимодействия. Например, в активном теломеразном комплексе домен CR4/CR5 hTR связан с белком hTERT, и это

взаимодействие сильнее, чем межмолекулярное взаимодействие CR4/CR5 домена с олигонуклеотидом N. Однако, в химере M с N, с теломеразой сначала взаимодействует олигонуклеотид M. В связи с чем взаимодействие олигонуклеотида N с доменом CR4/CR5 hTR становится внутримолекулярным и может пересилить взаимодействие hTERT с доменом CR4/CR5. По сравнению с химерой M и M, в химере M с N нет корреляции положения и ориентации олигонуклеотида N с ингибирующей способностью теломеразы. Возможные причины – это умение взаимодействовать олигонуклеотида N с обоими доменами CR4/CR5 hTR в димерной форме теломеразы и/или высокая конформационная подвижность домена CR4/CR5 hTR в активном теломеразном комплексе.

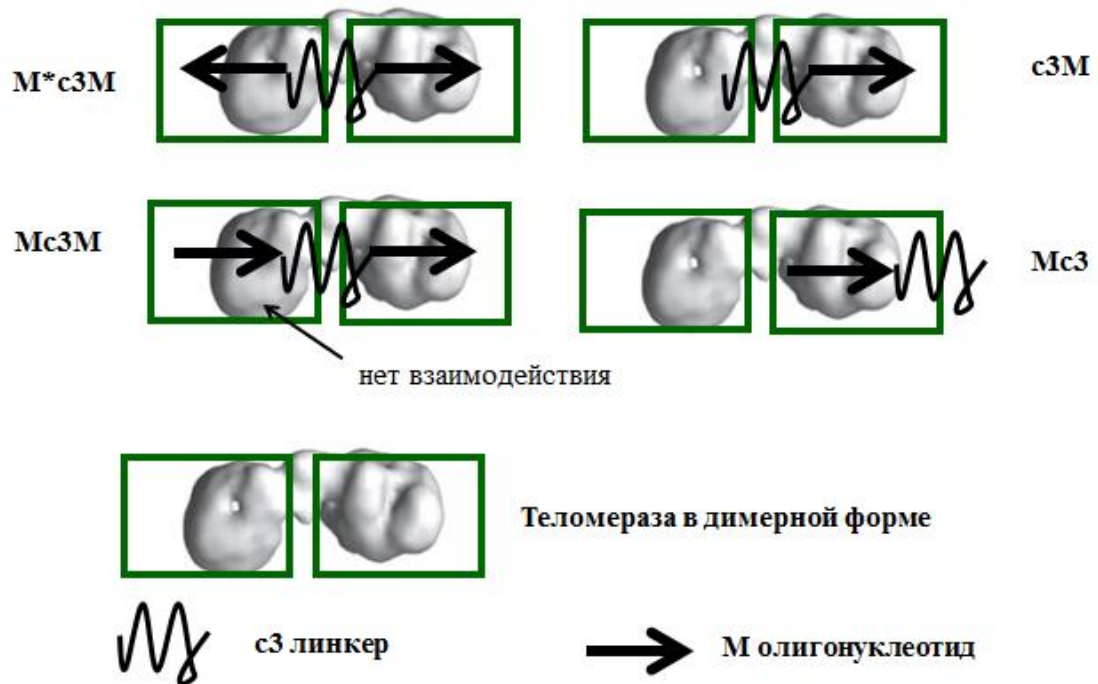


Рис. 33. Схематическое представление, объясняющее разницу в ингибировании теломеразы олигонуклеотидами c3M, Mc3, Mc3M и M*c3M.

Были синтезированы химерные олигонуклеотиды состоящие из олигонуклеотидов J и N. Такие химерные олигонуклеотиды интересны тем, что не содержат частей, комплементарных к матричной части hTR, и не имеют теломерной последовательности. Олигонуклеотид J в отдельности сильно ингибирует теломеразу, почти на уровне олигонуклеотида G. Однако при конъюгировании с N ингибирующая способность сильно уменьшается или полностью теряется (табл. 6). Единственным объяснением может быть пространственное затруднение взаимодействия олигонуклеотида J с теломеразным комплексом в J и N химерах. Для проверки правильности данных полученных методом ТРАП, для некоторых олигонуклеотидов был дополнительно сделан анализ прямым теломеразным методом (рис. 34). Полученные данные двумя разными методами данные согласуются друг с другом.

2.2.3. Ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами *in vivo*

Учитывая что олигонуклеотидные части химер могут мешать сборке теломераз, мы изучили их влияние на теломеразную активность в условиях *in vivo* на клеточной линии. Для этого клетки *HEK293* были трансфицированы этими олигонуклеотидами и культивированы в течение двух дней. Затем теломеразная активность полученных клеточных экстрактов была измерена методом RQ-ТРАП. Полученные данные приведены в табл. 6. Примеры начальных графиков даны в приложении 2.

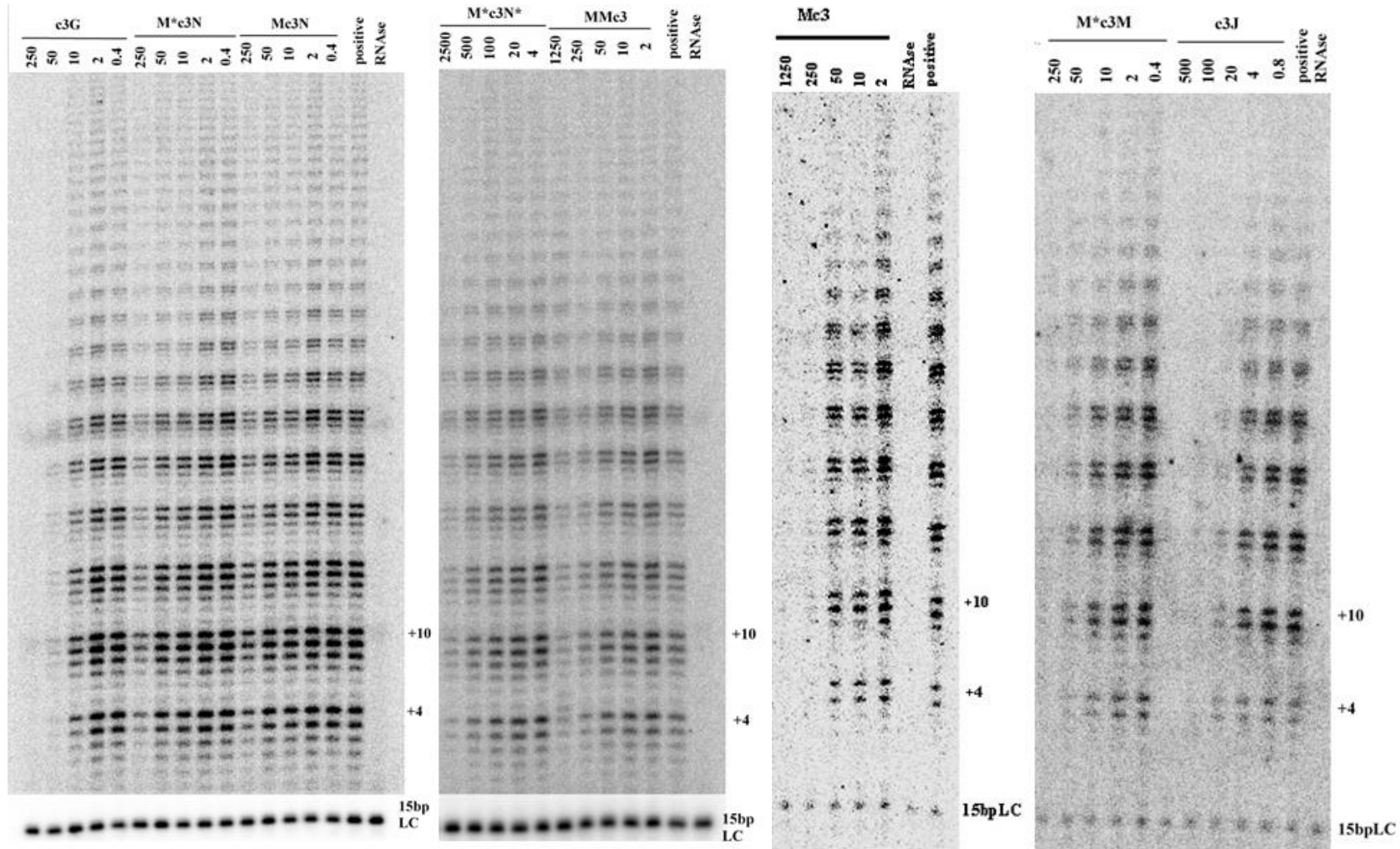


Рис. 34. Измерение ингибирования теломеразы олигонуклеотидами прямым методом измерения теломеразной активности. Числа с правой стороны означают количество добавленных нуклеотидов. Числа расположенные сверху геля означают концентрацию олигонуклеотидов (в нМ). **Positive** – теломеразная активность в отсутствие ингибитора. **RNase** – теломераза, обработанная РНК-зой А (2мг/мл в образце). 15bpLC – внутренний контроль нанесения, использованный при количественной оценке.

В условиях *in vivo* получены отличные от *in vitro* данные ингибирования теломеразы выбранными олигонуклеотидами. Причиной является то, что теломеразная РНК hTR в клетке встречается как в составе активного теломеразного комплекса, так и в свободном виде. Кроме того, свободная hTR участвует в образовании активной теломеразы. Следовательно, из-за влияния ингибиторов на биогенез теломеразы в условиях *in vivo* нет возможности сделать какие-то выводы о взаимосвязи между ингибирующей способностью олигонуклеотидов и структурным расположением теломеразных компонентов, как это было сделано для данных *in vitro*. В системе *in vivo* ингибирование теломеразы зависит от стабильности олигонуклеотидов и ингибирования биогенеза, которые рассмотрены в дальнейших разделах. Кроме этого, необходимо исключить возможность ингибирования ПЦР амплификации сигнала в *in vivo* ТРАП.

2.2.3.1. Проверка ингибирования ПЦР реакции для *in vivo* ТРАП метода

Хорошо известно, что ингибиторы теломеразы могут также ингибировать шаг ПЦР в ТРАП *in vitro* [40,41]. Однако на данный момент отсутствуют работы, в которых проверялось бы ингибирование ПЦР для метода ТРАП *in vivo*. Существует предположение, что олигонуклеотиды могут адсорбироваться на поверхности цитоплазматической мембраны, не проникая внутрь клетки, совыделяться с теломеразой и ингибировать теломеразу при дальнейшей постановке ТРАП [166]. Контроль, проверяющий ингибирование ПЦР в случае с *in vitro* ТРАП не подходит, т.к. такой контроль не учитывает *in vivo* процессы. Например, олигонуклеотид может деградировать в клетке и в последующем не ингибировать ПЦР. В связи с этим мы разработали новый метод проверки ингибирования ПЦР для *in vivo* ТРАП, основанный на принципе метода

добавок в аналитической химии [167]. При такой проверке после лизирования клеток и получения клеточных экстрактов другая очищенная теломераза в 20-и кратном избытке дополнительно добавляется в теломеразную реакцию. Если в лизате присутствует олигонуклеотиды, то они ингибирует и ПЦР, и теломеразную реакцию. Тем самым можно судить, проходило ли ингибирование теломеразы в клетке или при постановке ТРАП.

Мы проанализировали ингибирование шага ПЦР в методе *in vivo* RQ-ТРАП для некоторых ингибиторных олигонуклеотидов, введенных в клетки НЕК293Е при максимальной использованной ранее концентрации 10мкМ (табл. 7). Видно, что ни один из этих олигонуклеотидов не ингибирует ПЦР и теломеразу *in vitro*. На основании этого можно предположить, что эти олигонуклеотиды успевают деградировать в клетке до проведения анализа *in vitro*. Эффект ингибирования теломеразы в методе *in vivo* ТРАП обусловлен событиями, происходящими внутри клетки.

Табл. 7.

Проверка ингибирования ПЦР в *in vivo* ТРАП.

олигонуклеотид	активность,%*
c3N	95.0±3.4
c3M	88,7
c3J	87.3±9.9
Nc3M	102.6±13.4
Jc3N	85±9.5
Nmisc3J	94±2.6
Nmisc3Jmis	109.1±3.4
compNc3J	100±20
M*c3M	95.5±14.7

2.2.3.2. Стабильность химерных олигонуклеотидов в клеточных линиях и защита 5'-конца

На данный момент не существует корректных универсальных методов определения стабильности олигонуклеотидов в клетке. В основном о стабильности олигонуклеотидов судят по функциональному анализу. Известно, что олигонуклеотиды могут деградировать как внутри, так и с 3'- и 5'-конца. С 3'-конца мы защитили олигонуклеотиды амиолинкером и исследовали стабильность, связанную с 5'-концом. Олигонуклеотиды Mc3N* и M*c3N ингибируют теломеразу одинаково в условиях *in vitro*. В первом олигонуклеотиде оба 5'-конца не защищены, во втором защищены полностью. Соответственно в условиях *in vivo* их ингибирующие активности различаются в 10 раз. Существует корреляция между защитой 5'-конца и ингибирующей способностью в условиях *in vivo* (рис. 35). Тот же эффект проявляется для олигонуклеотида Mc3M (табл. 6).

Наиболее сильный эффект при защите 5'-конца проявляется на олигонуклеотиде M. В условиях *in vitro* различия в ингибировании между c3M и Mc3 не было. Однако в условиях *in vivo* IC50 для 5'-защищенного c3M составляет 5,2 нМ, тогда как для 5'-незащищенного Mc3 – 175 нМ, что дает различие больше, чем в 30 раз. Для химерных олигонуклеотидов это отличие составляет всего 3-4 раза. Возможная причина заключается в том, что химерные олигонуклеотиды состоят из 2-х частей и 5'-защита во втором олигонуклеотиде сильно замедляет деградацию. Однако для олигонуклеотидов Nc3J и N*c3J ингибирующие эффекты были одинаковы. Это может быть объяснено худшей ингибирующей способностью N*c3J по сравнению с Nc3J.

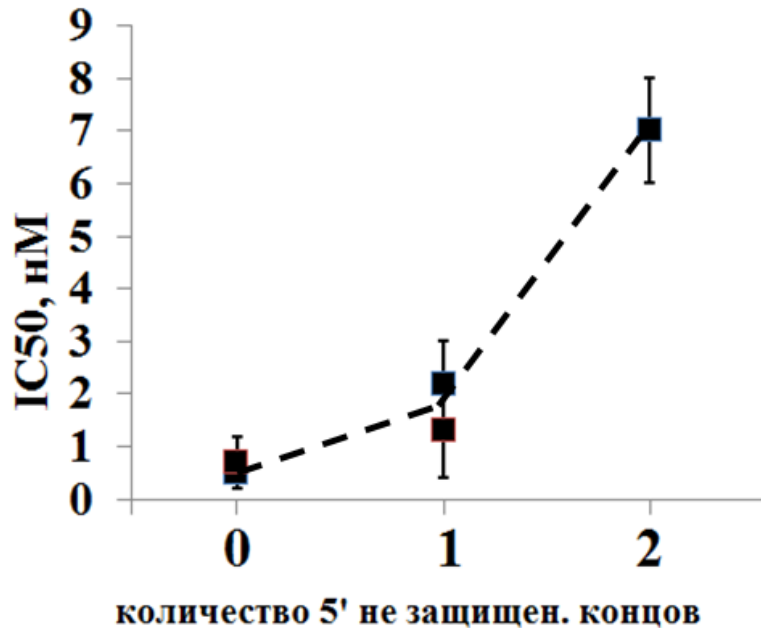


Рис. 35. Корреляция числа незащищенных 5'-концов и ингибирования теломеразы. Для представления были использованы химерные олигонуклеотиды, составленные из М и N частей: Mc3N* (количество 5'-незащищенных концов – 2), Mc3N и Nc3M (количество 5'-незащищенных концов – 1), M*c3N и c3Mc3N (количество 5'-незащищенных концов – 0).

2.2.3.3. Длина и расположение линкера

Для исследования влияния длины линкера на ингибирующую способность кроме химеры Mc3N, были синтезированы олигонуклеотиды, соединенные через триэтилен и гексаэтилен гликоль. MNc3 был использован как контроль с нулевой длиной линкера. Во всех олигонуклеотидах 5'-конец не защищен. Результаты представлены на рис. 36. Полученные данные показывают, что длина линкера между олигонуклеотидами не влияет на их ингибирующую способность.

Присутствие линкера с 5'-конца уменьшает IC50 в 10 раз (рис. 36). Линкер в этом случае выступает в качестве защиты 5'-конца и препятствует полной деградации химерного олигонуклеотида.

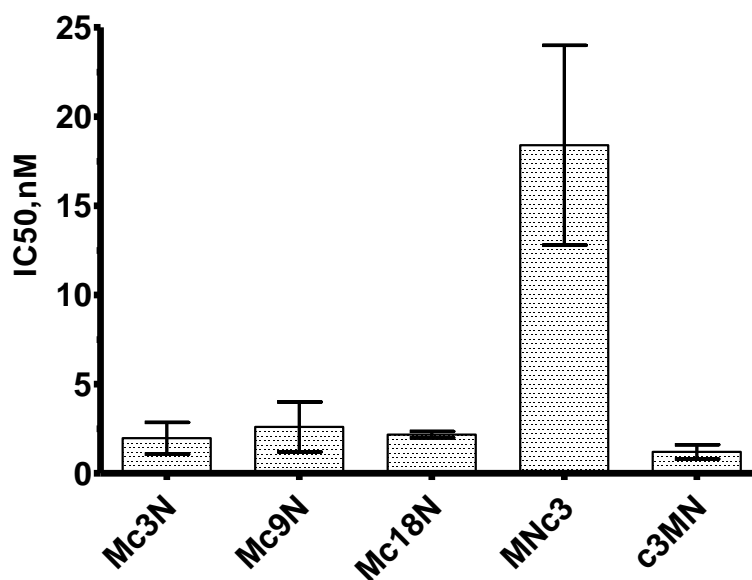


Рис. 36. Влияние длины линкера и позиции в химерных олигонуклеотидах на ингибирование теломеразы *in vivo*.

2.2.3.4. Специфичность химерных олигонуклеотидов

Химерные олигонуклеотиды ингибируют теломеразу в условиях *in vivo* намного эффективнее, чем в *in vitro* (табл. 6). Известно, что 2'-алкил модификация олигонуклеотидов увеличивает их специфичность [168]. Однако наше подозрение в специфичности вызвали химерные олигонуклеотиды состоящие из N и J частей. Так как в условиях *in vitro* эти олигонуклеотиды не ингибируют теломеразу, тогда как в системе *in vivo* сравнимы с остальными химерными олигонуклеотидами.

Для проверки специфичности ингибирования в условиях *in vivo* за счет комплементарности олигонуклеотида были введены нуклеотидные замены в каждую часть химеры Nc3J (Nmisc3J, Nc3Jmis, Nmisc3Jmis) (табл. 6), нарушающие такое взаимодействие. Количество нуклеотидных замен составило 5-6 на каждую часть. Корреляция количества замен и ингибирующей способности оказалось линейной (рис.37). Возможно, есть и другие механизмы, по которым действуют эти химерные олигонуклеотиды, так как показано, что введения всего двух нуклеотидных замен для 2'-алкил модифицированных олигонуклеотидов с последовательностью CAGUUAGGGUUAG достаточно для уменьшения ингибирования теломеразы в 1000 раз [118]. Замена N и J частей в Nc3J химере на комплементарные (compNc3compJ) (табл. 6) привела к полной потере ингибирующей способности в условиях *in vivo*. Это говорит о том, что ингибирующий эффект, основанный на комплементарных взаимодействиях олигонуклеотидных частей химер и hTR, присутствует.

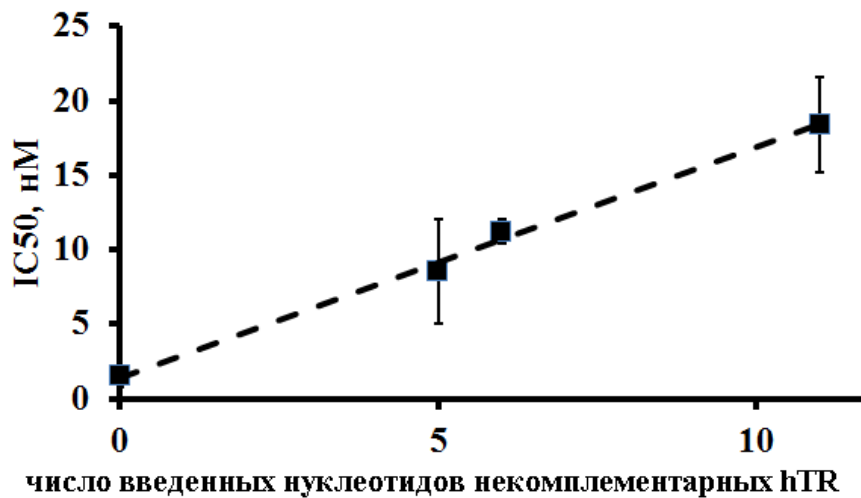


Рис. 37. Корреляция зависимости ингибирующей способности химерных нуклеотидов в условиях *in vivo* от числа введенных нуклеотидов некомплементарных hTR.

2.2.3.5. Токсичность химерных олигонуклеотидов

Для подтверждения специфичности действия химерных олигонуклеотидов только на теломеразу также была проверена токсичность наиболее активных химерных олигонуклеотидов на клетки НЕК293Е методом МТТ (рис. 38), так как ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами *in vivo* может быть обусловлено их цитотоксическим действием. В случае М*с3N и N*с3J (рис. 38 Д и Е) виден незначительный спад выживаемости. Он начинается с концентрации 10 нМ и не доходит до 50%. Однако эти олигонуклеотиды снижают теломеразную активность наполовину при концентрации менее 1нМ. Следовательно, влиянием токсичности при оценке ингибирования теломеразы *in vivo* можно пренебречь.

2.2.3.6. Уровень теломеразной РНК в системе *in vivo* в присутствии химерных олигонуклеотидов

Известно, что 2'-алкильные олигонуклеотиды не являются субстратом для РНКзы-Н и не вызывают деградацию РНК мишени. Однако выше мы показали, что из-за недостаточной специфичности, возможно, химерные олигонуклеотиды имеют другие пути ингибирования теломеразы. Один из возможных путей – деградация hTR. В связи с этим мы решили проверить стабильность hTR в клетках в присутствии химерных олигонуклеотидов.

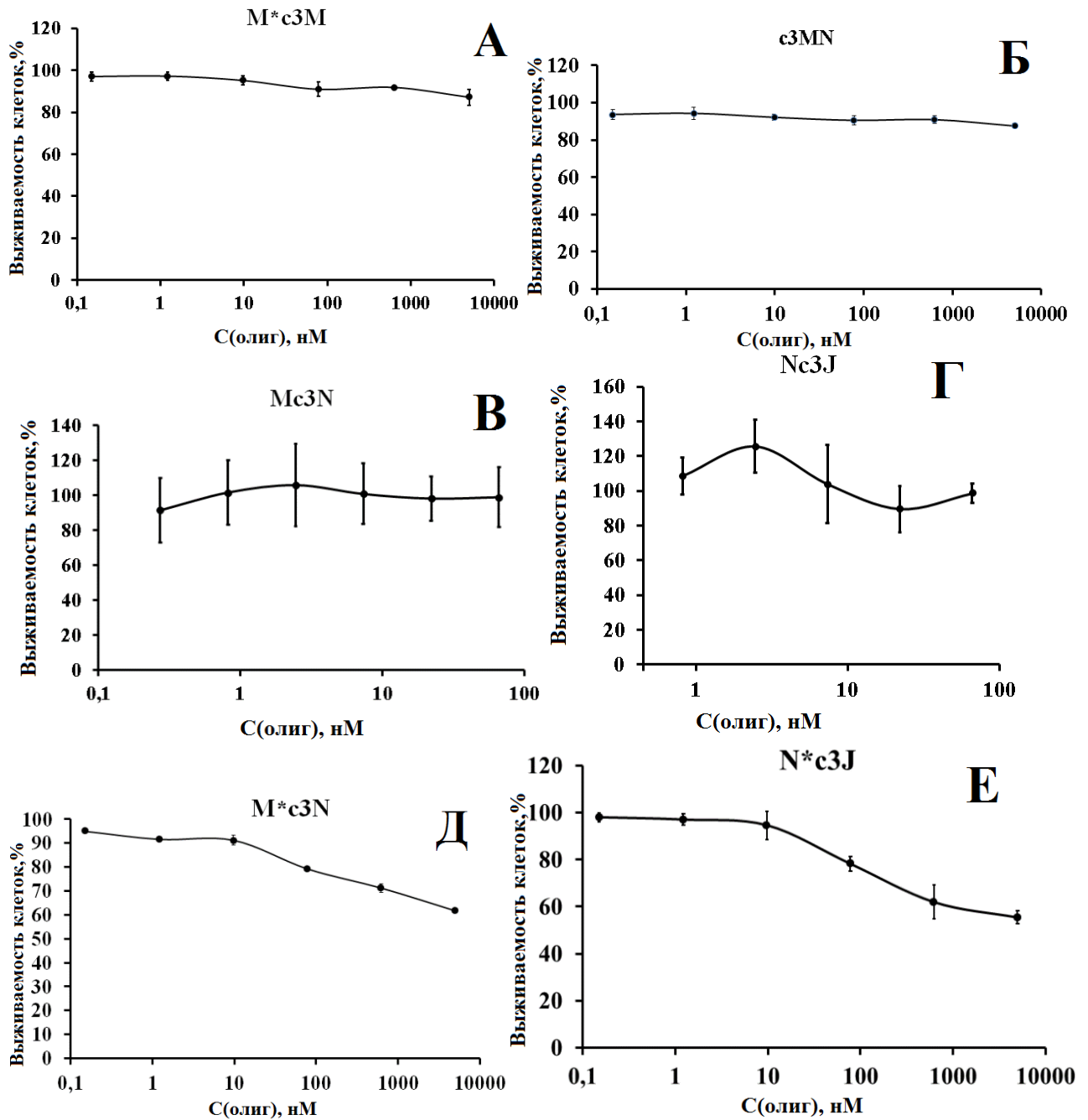


Рис. 38. МТТ анализ цитотоксичности химерных олигонуклеотидов при разной концентрации на клетках НЕК293Е. А - M*c3M, Б – c3MN, В- Mc3N, Г – Nc3J, Д – M*c3N, Е – N*c3J.

Количество hTR в клетках HEK293E, культивируемых в присутствии различных концентрации химерных олигонуклеотидов было измерено методом ПЦР реального времени с обратной транскрипцией (RQ-ПЦР) с использованием GAPDH мРНК как внутреннего контроля, также как в работе [169]. Для этого из клеток, культивированных в присутствии олигонуклеотидов, получали экстракт. Далее проводили обратную транскрипцию в присутствии экстракта с последующей ПЦР в реальном времени. Относительное количество полученной hTR нормировалось на количество GAPDH.

Для олигонуклеотидов Nc3J, Nmisc3Jmis, Nc3Jmis, c3MN, Mc3N и M*c3M при увеличении их концентрации при трансфекции уровень hTR в клетке значимо не менялся (рис. 39) и не коррелировал с изменением теломеразной активности. Следовательно, химерные олигонуклеотиды не влияют на стабильность hTR.

2.2.3.7. Сборка теломеразного комплекса в присутствии химерных олигонуклеотидов в условиях *in vivo*

Из предыдущих данных видно, что химерные олигонуклеотиды не ингибируют теломеразу за счет деградации hTR и не имеют цитотоксического воздействия на клетки. Если эти олигонуклеотиды запускают какие-то сигнальные пути, то могут ингибировать теломеразу за счет подавления экспрессии или пост-трансляционной модификации hTERT. Однако наиболее вероятный и простой механизм ингибирования теломеразы в клетке - возможное нарушение сборки за счет блокирования взаимодействия hTERT и hTR. Известно, что олигонуклеотиды, не ингибирующие собранную активную теломеразу, могут ингибировать ее за счет нарушения сборки теломеразных компонентов [126,136].

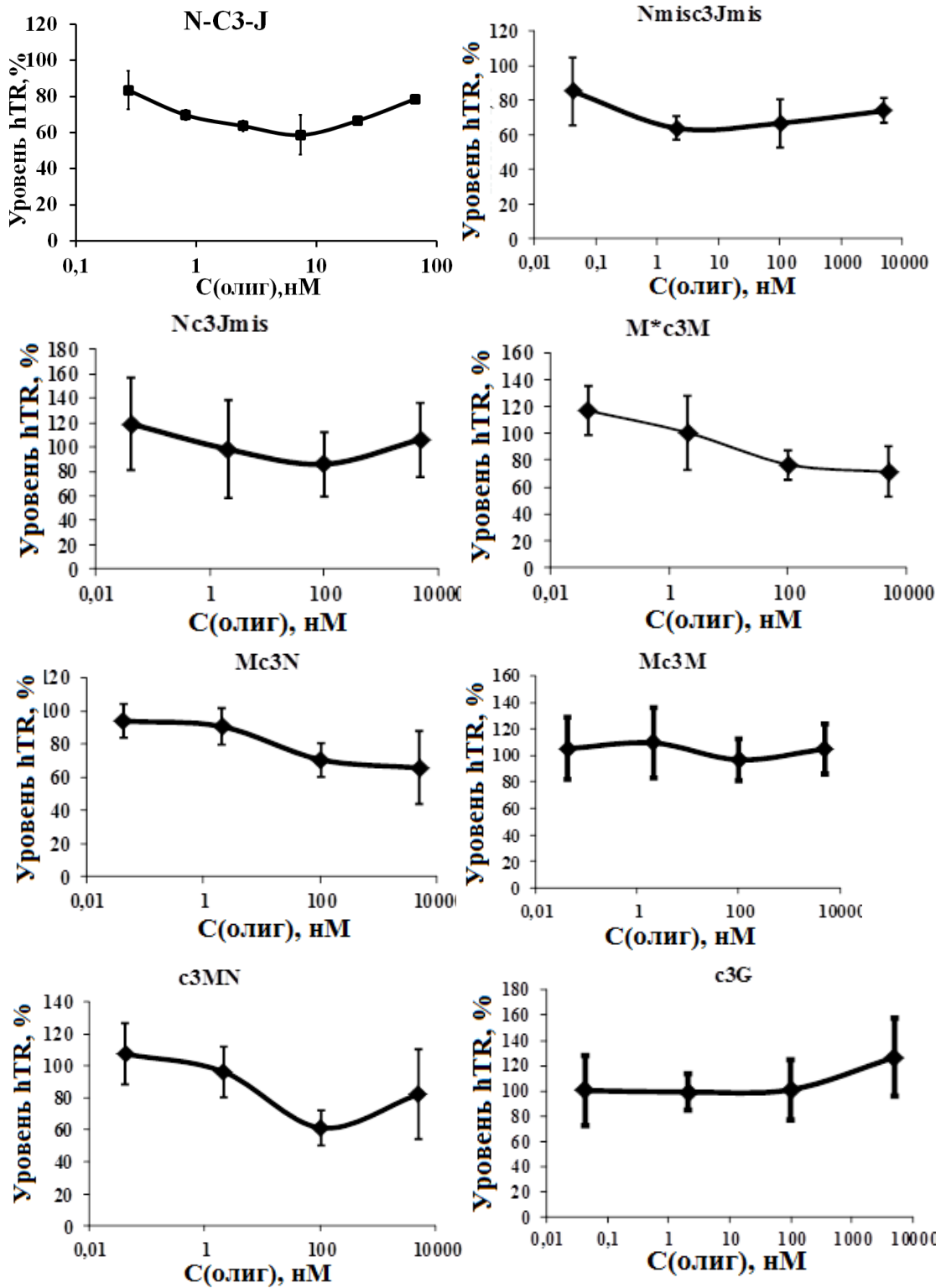


Рис. 39. Стабильность теломеразной РНК в условиях *in vivo* в присутствии химерных олигонуклеотидов разной концентрации.

Для проверки возможного влияния химер на сборку теломеразы было проведено центрифугирование в сахарозном градиенте клеточных экстрактов, полученных после трансфекций клеток олигонуклеотидами, концентрация которых была больше, чем IC_{50} . Это привело к разделению собранного теломеразного комплекса и свободной hTR. Фракции после разделения были собраны, начиная с более тяжелых. В каждой фракции было измерено количество hTR и теломеразная активность. Данные показаны на рис. 40.

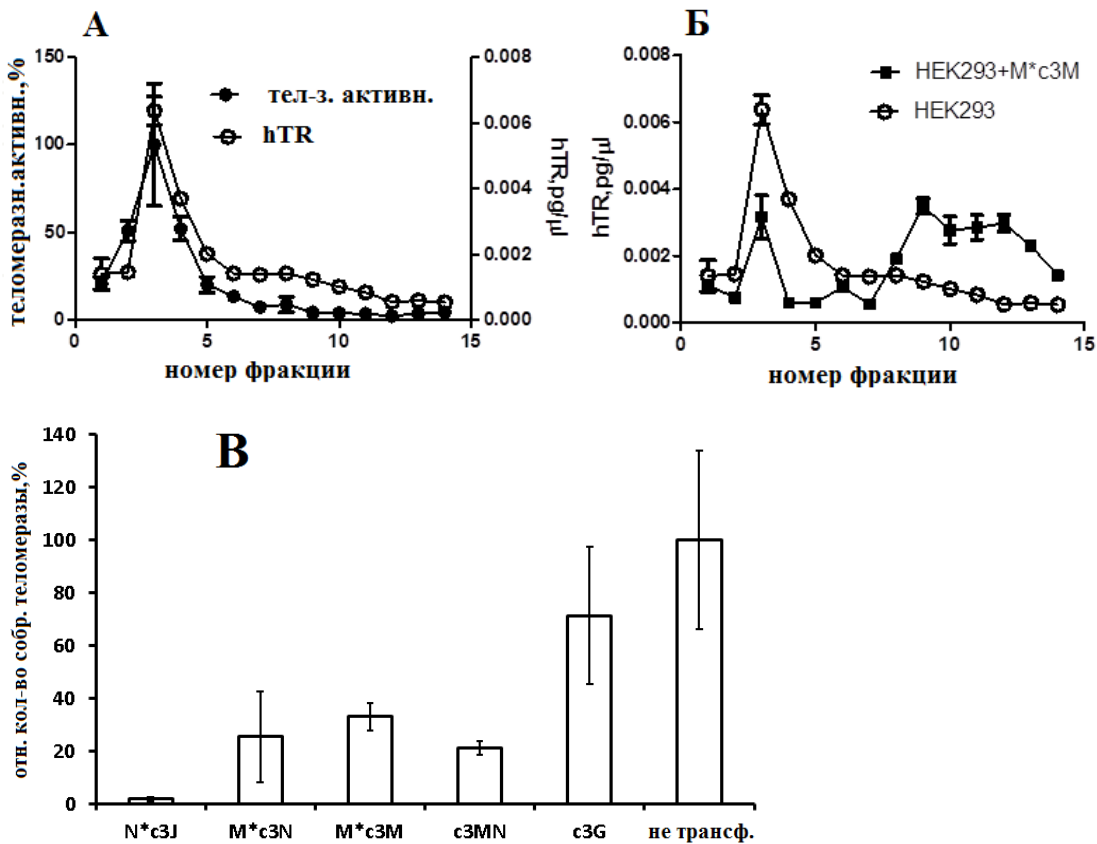


Рис. 40. Оценка сборки теломеразы. А. Распределение hTR и теломеразной активности по фракциям градиента, полученного после градиентном центрифугировании клеточного экстракта HEK293. Б. Распределение hTR после градиентного центрифугирования экстрактов полученных из клеток HEK293 и HEK293, трансфицированных M*c3M химерным олигонуклеотидом. В. Количество собранной теломеразы, оставшейся после трансфекции химерными олигонуклеотидами *in vivo*.

Для клеток HEK293 пик количества hTR совпадает с пиком теломеразной активности (рис. 40А). Это означает, что этот пик принадлежит собранной теломеразе. Для сравнения, распределение hTR для клеток HEK293 и клеток, инкубированных в присутствии M*c3M химеры (наиболее сильный теломеразный ингибитор в системе *in vivo*), показано на рис. 40Б. Видно, что количество hTR сильно уменьшается (до 22%) в пике с собранной теломеразой. Данные для c3J и других эффективных химер Nc3J, M*c3N, c3MN суммированы на рис. 40С. Все наиболее активные химеры ощутимо влияют на сборку теломеразы. Самый сильный эффект показала химера Nc3J, для которой почти не детектировался собранный теломеразный комплекс. Необходимо отметить, что c3G почти не влиял на сборку теломеразы (рис. 40В).

В ходе разработки новых подходов ингибирования теломеразы были созданы химерные олигонуклеотиды, состоящие из двух модифицированных олигонуклеотидов, соединенных не нуклеотидным линкером и комплементарных к разным участкам hTR. Было показано, что эти олигонуклеотиды не цитотоксичны и не вызывают деградации мишени hTR в клетке. Был определен механизм действия таких химер, заключающийся в ингибировании сборки теломеразы. Также было показано, что усиление ингибирования теломеразы в клетке химерными олигонуклеотидами обеспечивается увеличением их стабильности за счет защиты на 5'-конце.

При анализе ингибирующих способностей химер *in vitro* оказалось, что химеры состоящие только из разнонаправленных M частей, ингибируют теломеразу в 7 раз лучше, чем индивидуальный M. Это дополнительно подтверждает, что в условиях *in vitro* теломераза является димером, такая димеризация способствует ингибированию теломеразы химерным

олигонуклеотидом М*сЗМ. Разница для тех же химер и отдельного М при анализе *in vivo* составила несколько порядков, что свидетельствует в пользу димеризаций hTR в процессе сборки.

В условиях *in vitro* химерные олигонуклеотиды состоящие из М и N частей ингибировали теломеразу, тогда как слитый MN не ингибировал. Отсюда следует, что разработанные химерные олигонуклеотиды состоящие из М и N, М и М частей уменьшают активность теломеразы в клетке за счет ее прямого ингибирования и за счет блокирования сборки теломеразы одновременно. Такое синергичное действие усиливает ингибирующую способность химерного олигонуклеотида примерно в 3 раза. В ходе работы также была проверена специфичность действия химерных олигонуклеотидов в клетке.

Были проанализированы химеры, содержащие части N и J. Такие химеры не содержат последовательностей, комплементарных матричному участку, и за счет этого лишены отрицательных эффектов, показанных для Иметелстата. Эффективность химер JN при тестировании ингибирования теломеразной активности в клетке выше, чем у олигонуклеотида с последовательностью Иметелстата, почти в 30 раз. Доказанный механизм действия, а именно, блокирование сборки теломеразы является несомненным плюсом для последующей разработки.

2.3. Заключение

Ингибирование ПЦР в ТРАП методе определения теломеразной активности является одной из серьезных проблем при скринировании потенциальных ингибиторов теломеразы. На данный момент отсутствует универсальный метод устранения ингибирования ПЦР квадруплекс

стабилизирующими препаратами, а для олигонуклеотидных ингибиторов таких методов вовсе нет. В данной работе был разработан универсальный метод устранения ингибирования ПЦР, основанный на разбавлении теломеразного продукта в ТРАП после шага теломеразной реакции до амплификации. Использование разбавления пригодно для тестирования ингибиторов различной природы, при условии достаточного для амплификации количества теломеразного продукта.

В ходе работы впервые была создана и использована эписомальная конструкция для экспрессии hTR. При ее использовании количество теломеразы увеличилось в три раза по сравнению с описанной на данный момент системой [154]. Это позволило повысить выход содержания теломеразы при выделении и количество продукта удлинения теломеразой теломеразного субстрата на первом шаге ТРАП теста.

В работе были разработаны новые подходы ингибирования теломеразы олигонуклеотидами. Для этого были предложены химерные олигонуклеотиды, состоящих из двух последовательностей, соединенных нуклеотидным линкером. Показано, что химерные олигонуклеотиды эффективно ингибируют как работу теломеразы в системе *in vitro*, так и ее сборку в клетке. Ингибирование активной теломеразы химерным олигонуклеотидом М*сЗМ еще раз доказывает, что теломераза существует в димерной форме в условиях *in vitro*.

Химерные олигонуклеотиды могут стать основой для разработки новых более безопасных противоопухолевых препаратов. Например, химерный олигонуклеотид, содержащий последовательности N и J, не содержит теломерные последовательности, которые могут взаимодействовать с другими не-теломеразными мишенями.

3. Материалы и методы

3.1. Реактивы и биопрепараты

В работе были использованы следующие реактивы и препараты:

- NaCl, NaOAc, KCl, MgCl₂, NaOH, KOH, H₃BO₃, CuCl₂, пересульфат аммония, бромфеноловый синий, ксиленцианол, бромистый этидий, глицерин, Taq-полимераза фирм Merk, Германия и Helicon, Россия;
- Tween 20, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, 1,4-дителиотреитол (DTT), Кумасси R-250, Д-глюкоза, 2-меркаптоэтанол, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), Helicon, Россия
- фенол, уксусная кислота, соляная кислота, хлороформ фирмы Химмед, Россия;
- Triton X-100 фирмы Roth, Германия;
- этанол фирмы Ферейн, Россия;
- Triton X-114, бычий сывороточный альбумин (BSA), фенилметилсульфонилфлуорид (ПМСФ), спермидин, формамид, ампициллин, генетицин, РНКаза А фирмы Sigmaaldrich;
- этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), бакто-триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар, мочевиная, диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы Amersco, США;
- 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ соль), DMEM, 100х пен-стреп, 100х пируват натрия фирмы ПанЭко, Россия;
- эмбриональная сыворотка (FBS) фирмы HyClone;
- легкоплавкая агароза для электрофореза фирмы Life Technologies (США);

- GlutaMax 100x, Opti-MEM®I Medium, Lipofectamine 2000, SYBR Green I 10000x, набор реагентов для выделения плазмидной ДНК и набор реагентов для выделения ДНК из агарозного геля, ДНКаза I (DNase I, RNase-free), T4 ДНК-лигаза, Taq-полимераза, полинуклеотид киназа T4, эндонуклеазы рестрикции EcoRI, Sall, NotI, KpnI, Kpn2I, MfeI и фирменные буферные растворы к ним фирм Thermo Scientific и Invitrogen (США);
- [α -³²P]dGTP, [γ -³²P]АТФ фирмы «Изотоп», Россия;
- не модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы фирмой Синтол, Россия;
- модифицированные и химерные олигонуклеотиды были синтезированы Т.С. Зацепиным;
- Вальпроевая кислота (Конвулекс фирмы Gerot Pharmazeutika, Австрия)
- низкомолекулярное соединение 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он был синтезирован в кафедре органической химии химического факультета МГУ в лаборатории профессора Зыка Н.В. в группе Мажуги А.С., а антрахиноновые производные и его модификации были синтезированы в лаборатории института новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН.

Табл. 8.

Растворы, использовавшиеся в работе.

Название раствора	Состав раствора
среда LB, твердая среда LB	1% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl (1.5% бакто-агар для твердой среды)
среда ТВ	1.2% бакто-триптон, 2.4% дрожжевой экстракт, 0.4% глицерин, 0.231% KН ₂ PO ₄ , 1.254% K ₂ HPO ₄

10x буферный раствор для T4 ДНК-полимеразы (Thermo Scientific)	670 mM Tris-HCl pH 8.8, 66 mM MgCl ₂ , 10 mM ДТТ, 168 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
10x буферный раствор для T4 полинуклеотидкиназы (Thermo Scientific)	500 mM Tris-HCl (pH 8.2), 100 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 50 mM ДТТ, 1 mM спермидин
10x буферный раствор В (Thermo Scientific)	100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 1 мг/мл БСА
10x буферный раствор О (Thermo Scientific)	500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 1 мг/мл БСА
10x буф. р-р «Tango» (Thermo Scientific)	330 mM Tris-ацетат pH 7,9, 100 Mg(OAc) ₂ , 660 mM KOAc, 1 мг/мл БСА
10x KpnI буф. р-р (Thermo Scientific)	100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl ₂ , 0.2% Triton X-100, 1 мг/мл БСА.
10x ΔKpnI-SalI буф. р-р	400mM Tris-HCl (pH 8.3), 1 M NaCl
6x LA	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0,03% ксиленцианол, 0,03 % бромфеноловый синий, 60 mM ЭДТА, 60% глицерин
1xTBE	0,1 M Tris, 0,1 M H ₃ BO ₃ , 2 mM ЭДТА pH 8,3
1xPBS	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.3
CHAPS буфер	10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 0.1 mM ПМСФ, 5 mM β-меркаптоэтанол, 1mM

	ДТТ, 0.5% 3-[(3 холамидопропил-диметиламмоний)]-1-пропан сульфонат, 10% глицерин
1x ТРАП буфер	20мМ Tris-HCl (pH 8.3), 63 мМ KCl, 1.5 мМ MgCl ₂ , 0.1 мг/мл BSA, 0.002% Tween-20, 1мМ EGTA
mix1	1x ТРАП буфер, 0.3 μМ TS, 0.3 мМ dNTP.
mix2	1x ТРАП буфер, 0.4 μМ TS, 0.4 μМ ACX, 0.4x SYBR Green I (Invitrogen), 0.2мМ dNTP, 0.1 U Taq полимераза.
1x BW буфер	10 мМ Tris-HCl [pH 7.5], 1 мМ EDTA, 1 M NaCl
TE буфер	10 мМ Tris-HCl [pH 8.0], 1 мМ EDTA.
1x Pfu буфер (Thermo Scientific)	20 мМ Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 10 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 мМ KCl, 0,1% (объемн.) Triton X-100, 0,1мг/мл BSA.
1x Taq-буфер	10 мМ Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 50 мМ KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40
10x теломеразный буфер	500 мМ Tris-HCl [pH 8.0], 500 мМ KCl, 10 мМ спермидин, 50 мМ β-меркаптоэтанол, 10 мМ MgCl ₂ ,
5x RT буфер	250 мМ Tris-HCl (pH 8.3 при 25°C), 375 мМ KCl, 15 мМ MgCl ₂ , 50 мМ ДТТ
среда ДМЕМ	DMEM, 10% FBS, 1x GlutaMax, 1x пен-стреп, 1x пируват натрия

Табл. 9.

Олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название олигонуклеоти да	ДНК или РНК	Нуклеотидная последовательность
KpnI-forw-DS	ДНК	5'-TTGGTACCAAACCGTGACAGCTCATGG-3'
SallI-rev-DS	ДНК	5'-TTGTTCGACGAGGGCATTAGCAATAGTG-3'
SallI-forw-DS	ДНК	5'-TTGTTCGACAAACCGTGACAGCTCATGG-3'
rev-DS	ДНК	5'-GAGGGCATTAGCAATAGTG-3'
forw-DS	ДНК	5'-AAACCGTGACAGCTCATGG-3'
TS	ДНК	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
ACX	ДНК	5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTTA-3'
TSR8	ДНК	5'-AATCCGTCGAGCAGA(GTTAGG) ₈ -3'
hTR-F	ДНК	5'-GTGGTGGCCATTTTTTGTCTAAC-3'
hTR-R1	ДНК	5'-TGCTCTAGAATGAACGGTGGAA-3'
hTR-forward	ДНК	5'-GGGGAAGCTTTAATACGAC TCACTATAGGGTTGCGGAGGGTGGGCCTG-3'
hTR-reverse	ДНК	CCCCGGATCCTGCGCATGTGTGAGCCGAGTCC TGGG
Fw	ДНК	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
Rv	ДНК	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
15bpLC	ДНК	5'-CAAGTCATCTGTACA-биотин-3'
b-HUG3	ДНК	5'- биотин-TTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'
N	ДНК	5'-GTTGCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ -3'
HuG2R	РНК	5'-UUAGGGUUAGGG-NH ₂ -3'
HuG4R	РНК	5'-UUAGGGUUAGGGUUAGGGUAGGG -NH ₂ -3'

3.2. Получение S100 экстракта

HEK293T клетки, выращенные в 10 см чашке Петри промывали 1х PBS буфером, ресуспендировали в 2мл CHAPs буфере и инкубировали 30 мин во льду. Затем лизат центрифугировали при 100000g, 60мин, 4°C. Полученный S100 экстракт разаликвотили по 5-40 мкл и быстро заморозили в жидком азоте. Хранили при температуре -80°C.

3.3. Проверка деградации олигонуклеотидов в S100 экстракте

При проверке деградации олигонуклеотида, 20мкл смеси, содержащей 2мкл аликвоты S100 экстракта, 4мкл 5х ТРАП буфера и 1мкМ олигонуклеотида N, инкубировали разное время при 37С. После окончания инкубации смесь инактивировали добавлением 20 мкл фенола и перемешиванием с помощью вортекса. Центрифугировали 16000 g, 2мин. Отбирали водную фазу. К водной фазе добавили 4мкл 6х LD буфера. Электрофорез проводили в 20% денатурирующем полиакриламидном геле с 7М мочевиной в течении 1 часа при напряжении тока 210V в буфере 1х TBE, после разделения гель 10мин окрашивали раствором SYBR-Green I, приготовленный разбавлением исходного раствора SYBR-Green I в 10000раз буфером 1х TBE. Затем окрашенный гель детектировали на приборе PhosphoImager.

3.4. ТРАП с визуализацией в полиакриламидном геле («Классический» ТРАП)

Готовили смеси из 10 мкл 5хТРАП буфера, 1мкл TS-праймера 20мкМ, 2мкл dNTP (по 2.5 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), добавляли соответствующий олигонуклеотид для ингибирования и доводили до 49,5мкл деионизованной

водой. Приливали по 0,5мкл клеточного S100 экстракта, перемешивали, и инкубировали при 25°C на 30 мин. После шага удлинения праймера к смеси приливали 1мкл АСХ-праймера 20мкМ, 0,4мкл Таq-полимеразы (5u/мкл). Проводили 28 циклов ПЦР: 94°C 30сек; 50°C 30сек; 72°C 90сек. Продукты удлинения праймера теломеразой разделяли в 20% полиакриламидном геле в течении 3-х часов при напряжении тока 210V в буфере 1x TBE и 20 мин окрашивали раствором SYBR-Green I, который готовили разбавлением коммерчески доступного раствора SYBR-Green I в 10000 раз буфером 1x TBE. Затем окрашенный гель детектировали на приборе PhosphoImager.

3.5. Клонирование

3.5.1. Получение конструкции для рекомбинантной экспрессии теломеразы

Для экспрессии теломеразы человека были получены плазмиды для экспрессии основных компонентов теломеразы: для hTERT p-DS-SFFV-hTERT и для hTR pBSK-DS-U1-hTR. pBSK-DS-U1-hTR получали вставкой DS элемента в плазмиду pBSK-U1-hTR-U2/U5 (подарок от Shang Li [170], содержащая hTR ген под U1 промотор в pBluescript векторе), которую предварительно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции KpnI и SalI. DS элемент является частью ориджина репликации EBV вируса и его получали из pCEP4 вектора (Invitrogen) с помощью ПЦР, используя праймеры KpnI-forw-DS и SalI-rev-DS, с последовательной обработкой ПЦР продукта эндонуклеазами рестрикции KpnI и SalI. p-DS-SFFV-hTERT получали за счет вставки DS элемента в p-SFFV-hTERT плазмиду, которую предварительно обрабатывали эндонуклеазой рестрикции SalI. DS элемент получали ПЦР реакцией используя праймеры SalI-

forw-DS и SalI-rev-DS с последующей обработкой ПЦР продукта эндонуклеазой рестрикции SalI. Плазмиду p-SFFV-hTERT получали следующим образом: кДНК hTERT вставляли в вектор LeGO-iG2 [163], которую предварительно обработали эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NotI. Полученную плазмиду обработали эндонуклеазами рестрикции Kpn2I и NotI, затем обработали T4-ДНК полимеразой. Далее полученную плазмиду лигировали, затем еще раз обработали эндонуклеазой рестрикции MfeI и перелигировали. кДНК hTERT получили обработкой вектора pGRN145 (Geron) эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NotI. Лигирование проводили с помощью набора реагентов Rapid DNA Ligation Kit компании Thermo Scientific по методике производителя.

Детальное описание ПЦР, получения продуктов обработки эндонуклеазами рестрикции, разделение фрагментов и их выделение, и другие необходимые процедуры представлены ниже.

3.5.2. ПЦР

В пробирке 0,2 мл составляли следующую ПЦР смесь:

10x буферный раствор для Taq-полимеразы	5 мкл
матричная ДНК (плазмидная или геномная)	1 мкг
праймер 1	20 пмоль
праймер 2	20 пмоль
смесь dNTP	по 0,1 мМ каждого
MgCl ₂	1 мМ
Полимераза Taq или Taq:Pfu (10:1) (5 ед/мкл)	0.5 мкл
H ₂ O	до 50 мкл

Тщательно перемешивали и помещали в прибор для проведения ПЦР Mastercycler gradient фирмы Bio Rad. Параметры ПЦР 30 циклов: 94°C 30сек, 55°C 30 сек, 72°C 1мин.

После проведения ПЦР в смесь добавляли 10мкл 6х LA раствора, проводили разделение фрагментов ДНК в 0,8–1% агарозном геле. При необходимости проводили ПЦР с колонии клеток *E. coli*. Для этого 20 мкл ночной культуры, полученный из колонии клеток, центрифугировали при максимальной скорости на настольной центрифуге 1мин. Осадок подвергали ПЦР. Параметры ПЦР оставались такие же.

3.5.3. Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле

Для приготовления агарозного геля добавляли 0,8–1,0 г легкоплавкой агарозы к 100 мл раствора 1xTBE (табл.2). Раствор прогревали в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Полученный раствор охлаждали до ~ 40–60°C, добавляли 5 мкл водного раствора бромистого этидия 1 мг/мл, перемешивали, выливали в плашку. После застывания геля вносили образцы в ячейки и проводили электрофорез при напряжений тока ~ 100-150 В. Разделение фрагментов ДНК контролировали с помощью камеры с УФ лампой.

3.5.4. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора реагентов для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля фирмы Thermo Scientific (GeneJET Gel Extraction Kit) согласно протоколу с использованием фирменных реагентов. Полоску агарозного геля массой ~ 0.1-0.3 мг, содержащую нужный фрагмент ДНК, растворяли в 0.1-0.3 мл буферного раствора Binding buffer (GeneJET Gel Extraction Kit) при 50°C до

полного растворения геля. Перемешивали переворачиванием, пропускали через колонку для выделения ДНК. Промывали колонку 700 мкл буферного раствора Wash buffer (GeneJET Gel Extraction Kit), элюировали ДНК 25 мкл воды mQ. Концентрацию ДНК определяли по поглощению при 260 нм.

3.5.5. Приготовление векторов и вставок

Составляли следующую реакционную смесь:

ДНК (плазмидная или ПЦР-фрагмент)	3 мкг
10x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции (каталог фирмы MBI Fermentas)	2 мкл
эндонуклеаза рестрикции 1	10 ед
эндонуклеаза рестрикции 2	0 или 10 ед
H ₂ O	до 20 мкл

Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2–4 ч. Добавляли 2 мкл LA раствора, наносили на агарозный гель и приводили разделение фрагментов ДНК. ДНК-фрагмент нужной длины вырезали из геля и выделяли с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля (Thermo Scientific). При обработке двумя эндонуклеазами рестрикции KpnI и SalI, использовали последовательную обработку. Для этого после инкубации плазмиды или вставки эндонуклеазой рестрикции KpnI, дополнительно добавляли 2мкл 10x ΔKpnI-SalI буферный р-р и 10 ед. эндонуклеазы рестрикции SalI, и смесь инкубировали при 37°C еще 2-4 ч.

3.5.6. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Свежую колонию клеток *E. coli* штамма *JM109* помещали в 5 мл среды LB (табл.2) и инкубировали при 37°C ночь. 1мл ночной культуры добавлялось в 300мл LB и инкубировалось при температуре 16°C при перемешивании (200 об/мин) до оптической плотности $A_{600} \sim 0,5$. Культуру клеток выдерживали в течение 10 мин во льду, переносили в предварительно охлажденные центрифужные пробирки и осаждали центрифугированием в предварительно охлажденном роторе JA 14 при 5000 об/мин, 4°C в течение 10 мин. Супернатант сливали и ресуспендировали осадок в 100 мл охлажденного до 4°C буферного раствора ТВ (табл.2). Суспензию клеток инкубировали при помешивании при 0°C 10 мин. Клетки осаждали центрифугированием в роторе JA 14 при 5000 об/мин, 4°C 10 мин, промывали 100 мл охлажденным буферным раствором ТВ (табл.2), инкубировали при 0°C 10 мин и осаждали центрифугированием. Клетки ресуспендировали в 20 мл буферного раствора ТВ, добавляли 1,4 мл ДМСО (до 7%) и инкубировали 10 мин при 0°C. Суспензию клеток переносили по 100 мкл в 1,5 мл предварительно охлажденные стерильные пробирки и быстро замораживали в жидком азоте. Клетки хранили при температуре -70°C.

3.5.7. Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Пробирку с компетентными клетками размораживали во льду, добавляли 1–5 мкл раствора плазмидной ДНК (~ 0,1 мкг) в дистиллированной воде, инкубировали 30 мин при 0°C. Затем прогревали смесь на водяной бане в течение 40–50 сек при 42°C, охлаждали до 0°C, добавляли 800 мкл среды LB и инкубировали 1 час при 37°C. Аликвоту 10–20 мкл трансформационной смеси высевали на чашку Петри с твердой средой LB, содержащей соответствующие антибиотики. Инкубировали чашку при 37°C в течение 16 часов.

3.5.8. Выделение плазмидной ДНК для клонирования.

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора реагентов для выделения плазмидной ДНК GeneJET Plasmid Miniprep Kit фирмы Thermo Scientific согласно протоколу с использованием фирменных растворов.

Колонию клеток штамма *E. coli*, несущую определенную плазмиду, помещали в 5 мл среды LB, содержащей соответствующий антибиотик, и инкубировали при перемешивании в течение 16 ч на 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 7000 об/мин 5 мин, ресуспендировали в 250 мкл раствора Resuspension buffer (GeneJET Plasmid Miniprep Kit), добавляли 250 мкл раствора Lysis buffer (GeneJET Plasmid Miniprep Kit), перемешивали до образования вязкого раствора. К полученному раствору добавляли 350 мкл раствора Neutralization solution (GeneJET Plasmid Miniprep Kit), перемешивали до появления белых хлопьев. Суспензию осаждали центрифугированием при 14000 об/мин 5 мин, отбирали супернатант и пропускали его через колонку для выделения ДНК (GeneJET Plasmid Miniprep Kit), промывали эту колонку 500 мкл буферного раствора Wash buffer, затем повторили промывку. Элюировали с колонки ДНК 50 мкл водой mQ.

3.6. Выделение плазмидной ДНК для трансфекции в эукариотические клетки

Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток проводили с использованием набора реагентов для выделения плазмидной ДНК фирмы Thermo Scientific (GeneJET Plasmid Miniprep Kit). Колонию клеток *E. Coli* трансформированных плазмидой описанной выше в разделе 3.2.7, помещали в 100 мл среды LB, содержащей соответствующий антибиотик, и инкубировали

при перемешивании в ночь на 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин 10 мин, ресуспендировали в 1 мл Resuspension buffer (GeneJET Plasmid Miniprep Kit) и инкубировали при комн. темп. 15мин. Далее добавляли 2 мл Lysis buffer (GeneJET Plasmid Miniprep Kit), перемешивали до образования вязкого раствора и инкубировали 5-10 мин во льду. К полученному раствору добавляли 1,5 мл Neutralization solution (GeneJET Plasmid Miniprep Kit), перемешивали до появления белых хлопьев. Суспензию осаждали центрифугированием при 18000 об/мин 20 мин при 10°C. К супернатанту добавили 2,7 мл изопропанола, перемешали и инкубировали 20мин при комн. температуре. Далее осадок осаждали центрифугированием при 18000 об/мин, 30 мин при 20°C. Осадок промывали 70% этанолом, высушили и растворили в 1 мл воды mQ.

Для очистки плазмид от эндотоксинов для последующей трансфекции в эукариотические клетки использовали экстракцию эндотоксинов реагентом Triton X-114 [172,173]. К 1мл раствору плазмиды добавили 110 мкл 3 М NaOAc с pH 5.5. Далее проводили экстракцию, для этого добавили 20 мкл Triton X-114 и проинкубировали во льду с периодическим перемешиванием до полного растворения Triton X-114. Далее раствор проинкубировали при 55°C, 5мин. Водную фазу отделяли центрифугированием на настольной центрифуге при максимальной скорости и комн. температуре 5мин. Верхнюю водную фазу переносили в другую пробирку и повторяли экстракцию 3-4 раза. При экстракции необходимо использовать 1,5 мл пробирки с узким дном. После экстракции, плазмиду осаждали изопропанолом чтобы избавиться от остатков Triton X-114. Для этого к оставшемуся раствору добавили 0,7 объемов изопропанола, смешали и проинкубировали 20 мин при комн. температуре. Далее осаждали осадок на настольной центрифуге при максимальной скорости

и 4°C 20 мин. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в воде mQ. Концентрацию определяли по адсорбции при 260/280 нм.

3.7. Трансфекция плазмид в эукариотические клетки и обработка клеток вальпроевой кислотой (ВПА)

Трансфекцию проводили в 24-луночных плашках для культивирования клеток. Для этого смесь плазмид массой 0,5 мкг экспрессирующих hTERT и hTR, в массовом отношении 1:10 соответственно, разбавляли средой Opti-MEM®I Medium до объёма 25мкл. Далее разбавленная смесь плазмид смешивали с равным объемом Lipofectamine 2000, разбавленного в 25 раз средой Opti-MEM®I Medium. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре 15 мин и добавили в HEK293E или HEK293T клетки, которых предварительно посеяли в 24-луночной плашке и проинкубировали один день в среде DMEM при 37°C, 5% CO₂, во влажном воздухе.

Препарат Конвулекс разбавили средой ДМЕМ в 10 раз, в результате получили 200мМ раствор вальпроевой кислоты (ВПА). 2,5мкл 200мМ раствора ВПА добавили в среду с трансфецированными клетками.

Инкубацию клеток трансфецированных плазмидами и/или обработанными ВПА продолжили еще 2 дня. После этого клетки промывали 1x PBS буфером, ресуспендировали в 0,2мл CHAPS буфере и инкубировали 30 мин во льду. Затем полученный лизат центрифугировали при 16000g, 30 мин, 4°C. Полученный раствор использовали для анализа количества теломеразы в клетке (определяли уровень hTR и теломеразную активность).

3.8. Экспрессия и очистка теломеразы

Для экспрессии теломеразы клеточную линию HEK293E выращивали в среде DMEM при 37°C, 5% CO₂ и трансфецировали плазмидами p-DS-SFFV-hTERT и pBluescript-DS-U1-hTR. Для этого HEK293E клетки в 10см чашке петри трансфецировали 22 µг плазмидами и Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Для этого смесь плазмид массовом отношении 1:10 соответственно (2 мкг p-DS-SFFV-hTERT and 20 мкг pBluescript-DS-U1-hTR) разбавляли средой Opti-MEM®I Medium до объёма 1,5 мл. Далее разбавленная смесь плазмид смешивали с равным объемом Lipofectamine 2000, разбавленного в 26 раз средой Opti-MEM®I Medium. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре 15 мин и добавили в HEK293E клетки в 10 см чашке. После 2-х дней инкубации после трансфекции, клетки пересевали в T150 матрац и инкубировали еще 2 дня. Инкубацию проводили в среде DMEM при 37°C, 5% CO₂, во влажном воздухе.

После этого клетки промывали 1x PBS буфером, ресуспендировали в 10мл CHAPs буфере и инкубировали 30 мин во льду. Затем лизат центрифугировали при 16000g, 30мин, 4°C. Затем 5мл аликвоты полученного S16 экстракта центрифугировали при 100000g, 45мин, 4°C через 1мл CHAPs буфера содержащий 20% глицерин. Для этого S16 экстракт наслаивали перед центрифугированием на содержащий глицерин CHAPs буфер. Центрифужную пробирку предварительно обработали раствором 6 мг/мл BSA в течение 2-х часов. Полученный супернатант наносили на поверхность CHAPs буфера, содержащего 20% глицерин. Затем препарат центрифугировали при 210000g, 2 часа, MLA-80 ротор, 4°C в (Optima MAX-XP Ultracentrifugaion, Beckman Coulter). Осадок растворяли в 1мл ТРАП 1x буфере, содержащим 10% глицерина.

Полученный препарат аликвотили по 10-40 мкл и быстро заморозили в жидком азоте. Хранили при температуре -80°C .

3.9. Метод измерения ингибирования теломеразы *in vitro* (RQ-ТРАП)

Количественный RQ-ТРАП с разбавлением проводили в два этапа. На первом этапе к 5 мкл очищенной теломеразы (предварительно в 50 раз разбавленный препарат, полученный после выделения в 1х ТРАП буфере) добавили 5мкл исследуемого ингибитора в том же буфере. Смесь инкубировали 10мин при комнатной температуре, далее добавляли 5мкл mix1. Реакционную смесь инкубировали при 30°C , 30мин и инактивировали нагреванием на 80°C , 10мин. Затем 150 мкл ТРАП буфера добавляли для разбавления смеси. На втором этапе проводили ПЦР реакцию в объеме 10мкл смеси, содержащей 5мкл mix2 и 5 мкл разбавленного раствора, полученного на первом этапе. Приготовление ПЦР смеси проводили при 0°C . Смесь mix2 готовили в больших количествах во льду, аликвотили и хранили при -80°C . При каждом измерении использовали новую аликвоту. Амплификацию проводили в 384-луночных ПЦР плашках на приборе CFX-384 Real-Time System, C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad), за 30 циклов с этапами 30 сек при 95°C , 30 сек при 60°C и 60 сек при 72°C . Измерение флуоресценции SYBR Green проводили на шаге 60°C . Определение C_t величины проводили автоматически программой Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6.541.1028) с использованием «пороговой линии». Все расчеты, нелинейные аппроксимации и построение графиков проводили программой Graph-Pad prism. Для проверки влияния на ПЦР, ингибиторы теломеразы добавляли как до теломеразной реакции, так и после. Все измерения проводились по три раза. Также каждое измерение по крайней мере еще раз повторяли в другие дни.

Для определения линейности сигнала ПЦР в реальном времени от активности теломеразы, при каждом эксперименте использовали 2-х кратное последовательное разбавление очищенной теломеразы. Для получения стандартной кривой, необходимой для количественных расчетов, при каждом эксперименте использовали 10-ти кратное последовательное разбавление TSR8 олигонуклеотида. Исследуемые олигонуклеотиды использовали в интервале концентрации 0.01нМ-10мкМ.

3.10. Прямой метод измерения теломеразной активности

20мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл 10х теломеразного буфера, 2 мкл очищенной теломеразы, 40 мкМ dATP, 80 мкМ dTTP, 2 мкМ dGTP, 20 мкCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dGTP (3,000 Ci/ммоль) и 35 нМ 5'-биотинилированный теломерный праймер b-HuG3, а так же исследуемое на ингибирование активности теломеразы вещество инкубировали 45 мин при 30°C. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА, до конечной концентрации в смеси 25 мМ. Следовые количества 5'радиоактивно меченного праймера содержащего биотин на 3'-конце 15bpLC добавляли в реакционную смесь в качестве контроля нанесения и внутреннего стандарта. Не прореагировавший радиоактивный нуклеотидтрифосфат удаляли из реакционной смеси с помощью 5мкл стрептавидиновых магнитных шариков (Dyna), которые предварительно промывали 2х ВВ буфером и ресуспендировали в 20 мкл этого же буфера. Инкубацию взаимодействия биотинилированных праймеров с стрептавидиновыми магнитными шариками проводили в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем магнитные шарики промывали два раза 1х ВВ буфером и один раз ТЕ буфером. Затем промытые магнитные шарики ресуспендировали в 10мкл формамидной краски, нагреты до 95°C 5мин. 4мкл

аликвоты образца наносили на 10% денатурирующий полиакриламидный гель. Разделенные фрагменты ДНК визуализировали при помощи Typhoon FLA 9500. Денситометрический анализ изображения проводили с помощью программы TotalLab Quant. IC50 рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism.

3.11. Введение радиоактивной метки на 5'-конец олигонуклеотида 15bpLC

Реакцию проводили в 20 мкл. Реакционная смесь содержала 2 мкл 10х буферного раствора для T4 полинуклеотидкиназы, 20 пмоль 15bpLC, 10 ед. T4-полинуклеотидкиназы (MBI Fermentas, 10 ед./мкл) и 10 пмоль [γ - ^{32}P]АТФ (удельная активность 220 ТБк/ммоль или 6000 Ки/ммоль). Кинирование проводили при 37°C в течение 30 минут, после чего фермент инактивировали нагреванием в течение 15 минут при 75°C.

3.12. Трансфекция клеток ингибиторными олигонуклеотидами и получение клеточного экстракта

Трансфекцию проводили на НЕК293Е клетках с помощью Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в 96-луночных планках для культивирования эукариотических клеток. Олигонуклеотиды последовательно разбавляли средой Opti-MEM®I Medium до концентрации 220 мкМ, 22 мкМ, 2,2 мкМ, 220 нМ, 22 нМ, 2,2 нМ, 0,22 нМ, 0,022 нМ соответственно. В дальнейшем 5 мкл разбавленного олигонуклеотида смешивали с 5мкл Lipofectamine 2000, которую предварительно разбавляли в 17,7 раз средой Opti-MEM®I Medium в 96-луночной планке и проинкубировали 15мин при комнатной температуре. $2.5 \cdot 10^4$ НЕК293 клеток, ресуспендировали в 100мкл среды DMEM и добавляли

в каждую ячейку. После 2-х дней инкубации при 37°C в присутствии 5% CO₂, клетки промыли 1x PBS буфером, затем ресуспендировали в 100мкл CHAPS буфера и инкубировали 30мин во льду. От клеточного дебриса избавлялись центрифугированием при 2464g, 30мин при 4°C. Концентрацию белка определяли по стандартной методике Брэдфорд [173].

3.13. RQ-ТРАП *in vivo*

5мкл клеточного экстракта, полученного после трансфекции клеток олигонуклеотидами, разбавляли в 10раз 1x ТРАП буфером. Затем 5 мкл разбавленного экстракта добавляли к 5мкл смеси mix2 во льду. ТРАП анализ проводили в одну стадию инкубированием реакционной смеси при 10°C 1час с последующей ПЦР реакцией. ПЦР, обработка данных и использование калибровочной кривой описаны выше (раздел 3.8). Известно, что Taq-полимераза активна в интервале температур 15–100°C. Мы наблюдали сохранение активности теломеразы во льду. Следовательно, 10°C достаточно, чтобы поддерживать теломеразу активной, тогда как Taq-полимераза неактивна в этих условиях. При использовании буфера, вместо клеточного экстракта, сигнал появляется при 27–30 циклах. Не трансфецированный клеточный экстракт последовательно 2-х кратно разбавляли и использовали для проверки линейности сигнала от активности теломеразы.

3.14. Проверка сборки теломеразы

Для проверки сборки мы использовали клеточные экстракты полученные при трансфекции клеток 5мкМ олигонуклеотидами. 500 мкл 5-ти кратно

разбавленного ТРАП буфером клеточного экстракта центрифугировали в сахарозном градиенте. Сахарозный градиент получали 2-х кратным замораживанием-размораживанием 20% сахарозы в 1х ТРАП буфере. Центрифугирование проводили в SW-41 Ti роторе (Beckman) при 4°C, 20h, 111132g (30000 об/мин) в J2-NS Beckman центрифуге. Фракции по 500мкл собрали начиная со дна пробирки. Для проверки теломеразной активности с каждой фракции отбирали по 2,5мкл и использовали в RQ-ТРАП *in vivo*.

3.15. Определение количества hTR с помощью метода обратной транскрипции сопряженной с ПЦР (RQ-ПЦР)

К каждой фракции добавляли 2 мкл гликогена (20мг/мл, Roche Applied Science). Затем РНК экстрагировали смесью фенол/хлороформом (1:1), осаждали этанолом и растворяли в 50мкл mQ воды. Полученный раствор РНК подвергали обратной транскрипции. Реакцию проводили в объеме 10 мкл, содержащим 2 мкл 5x RT буфер, 2.5 мкл полученного раствора РНК, 1 мкМ олигонуклеотида hTR-R1, 0.5мМ dNTP, 0.2 мкл (1 ед.) Maxima Enzyme mix (Thermo Scientific) при 50°C, 2час. Затем реакционную смесь разбавили в 10раз mQ водой. 5 мкл разбавленного раствора использовали в ПЦР реакции, суммарный объем реакционной смеси составил 10мкл и содержал 1x Taq-буфер, 0.1 мМ dNTP, 0.2 мкМ hTR-F, 0.2 мкМ hTR-R1, 1.5 мМ MgCl₂, 0.04 U/мкл Taq-полимераза, 0.25x SYBR-Green I в приборе CFX-96 Real-Time System (Bio Rad), за 30 циклов (30 сек при 95°C, 30 сек 58°C и 60 сек при 72°C). Для получения калибровочной кривой использовали 10-ти кратное последовательное разбавление раствора *in vitro* синтезированной hTR РНК (см. раздел 3.16).

3.16. Получение hTR методом *in vitro* T7-транскрипции

Матрицу для T7-транскрипции получали с помощью ПЦР (30 циклов: 40сек 94°C, 20сек 58°C, 90сек 72°C) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1нг плазмиды pBluescript-DS-U1-hTR, 1x Pfu буфера (Fermentas), 0,5 мкМ T7-hTR-forward праймера, 0.5 мкМ hTR-reverse праймера, 0.2 мМ dNTP, 0.1 U Pfu полимеразы. ПЦР продукт очищали с помощью GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Затем РНК синтезировали с помощью MEGAScript-T7 Kit (Invitrogen). Синтезированную РНК экстрагировали последовательно насыщенным раствором фенола и хлороформом, осаждали этанолом, затем очищали на 5% поликариламидном геле в денатурирующих условиях. Для этого после электрофореза, гель окрашивали в течение 10мин раствором SYBR-Green I, который готовили разбавлением коммерческого раствора SYBR-Green I 10000x в 10000раз буфером 1x TBE. После разделения фрагменты визуализировали УФ лампой, соответствующую hTR полосу вырезали и РНК экстрагировали 1x TE буфером в присутствии фенола в течение ночи. РНК из полученного раствора осаждали этанолом, осадок растворяли в воде mQ. Концентрацию определяли по адсорбции при 260/280 нм на приборе Nano Drop 2000 (Thermo Scientific).

3.17. Определение уровня hTR в клетках с помощью RQ-ПЦР

2.5 мкл клеточного экстракта, полученного для измерения ингибирования олигонуклеотидами теломеразы в клетке, использовали для измерения уровня hTR в клетках, трансфицированных олигонуклеотидами. Обратную транскрипцию проводили по протоколу, описанному в разделе 3.15. Мы заметили, что клеточный экстракт не влияет на обратную транскрипционную

реакцию, однако ингибирует ПЦР. 7-ми кратное разбавление продукта обратно транскрипционной реакции mQ водой элиминировало эффект на ПЦР. 5 мкл разбавленный кДНК использовали в ПЦР как описано в разделе 3.15. Не трансфицированный клеточный экстракт последовательно 2-хкратно разбавляли, и использовали как позитивный контроль и для проверки линейности сигнала от количества клеточного экстракта. Полученные результаты по уровню hTR в клетке нормировали делением по уровню GAPDH, который параллельно анализировали по той же методике и на том же препарате с праймерами Fw и Rv. Для этого в анализе вместо праймеров hTR-R1 и hTR-F использовали праймеры Fw и Rv соответственно. Все ПЦР амплификации проводили трехкратно.

3.18. МТТ анализ цитотоксичности олигонуклеотидов

20мкл соли 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) с концентрацией 5 мг/мл (в PBS 1x) добавляли в НЕК293 клетки, трансфицированные олигонуклеотидными ингибиторами и инкубированные в течение 2-х дней по протоколу описанному в разделе 3.12.

После 3-х часов инкубации в присутствии МТТ соли при 37°C, 5% CO₂ среду удалили и добавили 150 мкл ДМСО с последующим перемешиванием. Флуоресценцию образцов измеряли при 555 нм, в качестве референсного сигнала использовали 670 нм. Затем сигнал, полученный при 670 нм отнимали от сигнала измеренного при 555 нм. Сигнал 670нм – соответствует возбуждению образца светом с длиной волны 607нм, 555нм – соответствует длине волны 555нм. Полученные данные нормализовали к сигналу, полученному от нетрансфицированных клеток. Сигнал от нетрансфицированных клеток принимали как 100%.

4. Выводы

1. Новая система экспрессии основных компонентов теломеразного комплекса человека позволяет повысить уровень теломеразы в клетках HEK293E по сравнению с описанными ранее.
2. Разработанный метод количественного определения теломеразной активности позволяет измерять ингибирование теломеразы веществами, влияющими на ПЦР и стабилизирующими G-квадруплексы.
3. Производные антра[2,3-b]тиофен-5,10-диона, 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он и его медь содержащий комплекс являются ингибиторами теломеразы.
4. Химерные олигонуклеотиды, состоящие из двух частей, комплементарных разным районам hTR и соединенных ненуклеотидным линкером, ингибируют сборку теломеразы.
5. Димеризация теломеразы человека подтверждена с помощью серии химерных олигонуклеотидов, ингибирующих активность теломеразы.

5. Список литературы

- [1] Jemal A., Bray F., Center M., Ferlay J. Global Cancer Statistics. // *CA CANCER J CLIN.* 2011. V. 61. P. 69–90.
- [2] Hanahan D., Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. // *Cell.* 2000. V. 100. P. 57–70.
- [3] Shay J., Wright W. Telomerase: a target for cancer therapeutics. // *Cancer Cell.* 2002. V. 2. P. 57-265.
- [4] Cimino-Reale G., Pascale E., Battiloro E., Starace G., Verna R., D'Ambrosio E. The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. E35.
- [5] Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. // *Exp Cell Res.* 1961. V. 25. P. 585-621.
- [6] Cong Y.S., Wright W.E., Shay J.W. Human telomerase and its regulation. // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002. V. 66. P. 407-425.
- [7] Celli G., de Lange T. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. // *Nature Cell Biology.* 2005. V. 7. P. 712 - 718.
- [8] Cohen S.B., Graham M.E., Lovrecz G.O., Bache N., Robinson P.J., Reddel R.R. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. // *Science.* 2007. V. 30. P. 1850-1853.
- [9] Weinrich S.L., Pruzan R., Ma L., Ouellette M., Tesmer V.M., Holt S.E., Bodnar A.G., Lichtsteiner S., Kim N.W., Trager J.B., Taylor R.D., Carlos R., Andrews W.H., Wright W.E., Shay J.W., Harley C.B., Morin G.B. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. // *Nat Genet.* 1997. V. 17. P. 498-502.
- [10] Заридзе Д. Канцерогенез. –М.: Медицина, 2004, 576с.
- [11] Zvereva M. I., Shcherbakova D. M., Dontsova O. A.. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. // *Biochemistry (Mosc).* 2010. V. 75. P. 1563-1583.
- [12] Blagoev K.B. Cell proliferation in the presence of telomerase. // *PLoS ONE.* 2009. V. 4. P. e4622.
- [13] Hamad N.M., Banik S.S., Counter C.M. Mutational analysis defines a minimum level of telomerase activity required for tumourigenic growth of human cells. // *Oncogene.* 2002. V. 21. P. 7121-7125.

- [14] Hodes R. Molecular targeting of cancer: telomeres as targets. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. V. 98. P. 7649-7651.
- [15] Ruden M., Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. // *Cancer Treatment Reviews*. 2013. V. 39. P. 444-456.
- [16] Chen H., Li Y., Tollefsbol T.O. Strategies targeting telomerase inhibition. // *Mol Biotechnol*. 2009. V. 41. P. 194-199.
- [17] Tominaga T., Kashimura H., Suzuki K., Nakahara A., Tanaka N., Noguchi M., Itabashi M., Ohkawa J. Telomerase activity and expression of human telomerase catalytic subunit gene in esophageal tissues. // *J Gastroenterol*. 2002. V. 37. P. 418-27.
- [18] Lü M.H., Liao Z.L., Zhao X.Y., Fan Y.H., Lin X.L., Fang D.C., Guo H., Yang S.M. hTERT-based therapy: A universal anticancer approach (Review). // *Oncology Reports*. 2012. V. 28. P. 1945-1952.
- [19] Harley C.B. Telomerase and cancer therapeutics. // *Nat Rev Cancer*. 2008. V. 8. P. 167-179.
- [20] Brunsvig P.F., Kyte J.A., Kersten C., Sundstrom S., Moller M., Nyakas M., Hansen G.L., Gaudernack G., Aamdal S. Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial. // *Clin Cancer Res*. 2011. V. 17. P. 6847-6857.
- [21] Williams S.C. No end in sight for telomerase-targeted cancer drugs. // *Nat Med*. 2013. V. 19. P. 6.
- [22] Middleton G., Silcocks P., Cox T., Valle J., Wadsley J., Propper D., Coxon F., Ross P., Madhusudan S., Roques T., Cunningham D., Falk S., Wadd N., Harrison M., Corrie P., Iveson T., Robinson A., McAdam K., Eatock M., Evans J., Archer C., Hickish T., Garcia-Alonso A., Nicolson M., Steward W., Anthony A., Greenhalf W., Shaw V., Costello E., Naisbitt D., Rawcliffe C., Nanson G., Neoptolemos J. Gemcitabine and capecitabine with or without telomerase peptide vaccine GV1001 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer (TeloVac): an open-label, randomised, phase 3 trial. // *Lancet Oncol*. 2014. V. 15. P. 829-840.
- [23] Huo L.F., Tang J.W., Huang J.J., Huang P.T., Huang C.F., Kung H.F., Lin M.C. Cancer immunotherapy targeting the telomerase reverse transcriptase. // *Cell Mol Immunol*. 2006. V. 3. P. 1-11.
- [24] DiPersio J.F., Collins Jr R.H., Blum W., Devetten M.P., Stiff P., Elias L., et al. Immune responses in AML patients following vaccination with GRNVAC1, autologous RNA transfected dendritic cells expressing telomerase catalytic subunit hTERT. // *ASH Annu Meeting Abstr*. 2009. V.

114. P. 633.
- [25] Su Z., Dannull J., Yang B.K., Dahm P., Coleman D., Yancey D., Sichi S., Niedzwiecki D., Boczkowski D., Gilboa E., Vieweg J. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. // *J Immunol.* 2005. V. 174. P. 3798-3807.
- [26] Su Z., Vieweg J., Weizer A.Z., Dahm P., Yancey D., Turaga V., et al. Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 5041-5048.
- [27] URL: <http://ir.geron.com/phoenix.zhtml?c=67323&p=irol-newsArticle&ID=1636173>.
- [28] Kobayashi A., Weinberg V., Darragh T., Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. // *Mucosal Immunol.* 2008. V. 1. P. 412-420.
- [29] Jacob D., Davis J., Zhu H., Zhang L., Teraishi F., Wu S., Marini F.C., Fang B. Suppressing orthotopic pancreatic tumor growth with a fiber-modified adenovector expressing the TRAIL gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter. // *Clin Cancer Res.* 2004. V. 10. P. 3535-3541.
- [30] Li Y., Idamakanti N., Arroyo T., Thorne S., Reid T., Nichols S., VanRoey M., Colbern G., Nguyen N., Tam O., Working P., Yu D.C. Dual promoter-controlled oncolytic adenovirus CG5757 has strong tumor selectivity and significant antitumor efficacy in preclinical models. // *Clin Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 8845-8855.
- [31] Nemunaitis J., Tong A.W., Nemunaitis M., Senzer N., Phadke A.P., Bedell C., Adams N., Zhang Y.A., Maples P.B., Chen S., Pappen B., Burke J., Ichimaru D., Urata Y., Fujiwara T. A Phase I Study of Telomerase-specific Replication Competent Oncolytic Adenovirus (Telomelysin) for Various Solid Tumors. // *Mol Ther.* 2009. V. 18. P. 429-34.
- [32] Brower V. Telomerase-Based Therapies Emerging Slowly. // *J Natl Cancer Inst.* 2010. V. 102. P. 520-521.
- [33] Boukamp P., Popp S., Krunic D. Telomere-dependent chromosomal instability. // *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2005. V. 10. P. 89-94.
- [34] Phatak P., Burger A.M. Telomerase and its potential for therapeutic intervention. // *Br J Pharmacol.* 2007. V. 152. P. 1003-1011.
- [35] Cao Y., Huschtscha L.I., Nouwens A.S., Pickett H.A., Neumann A.A., Chang A.C., Toouli C.D., Bryan T.M., Reddel R.R. Amplification of telomerase reverse transcriptase gene in human mammary epithelial cells with limiting

- telomerase RNA expression levels. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 3115–3123.
- [36] Morin G. The Human Telomere Terminal Transferase Enzyme Is a Ribonucleoprotein That Synthesizes TTAGGG Repeats. // *Cell.* 1989. V. 59. P. 521-529.
- [37] Fajkus J. Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. // *Clinica Chimica Acta.* 2006. V. 371. P. 25–31.
- [38] Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. // *Science.* 1994. V. 266. P. 2011-2015.
- [39] Kim N.W., Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2595-2597.
- [40] De Cian A., Cristofari G., Reichenbach P., De Lemos E., Monchaud D., Teulade-Fichou M.P., Shin-Ya K., Lacroix L., Lingner J., Mergny J.L. Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. V. 104. P. 17347-17352.
- [41] Piotrowska K., Kleideiter E., Mürdter T.E., Taetz S., Baldes C., Schaefer U., Lehr C.M., Klotz U. Optimization of the TRAP assay to evaluate specificity of telomerase inhibitors. // *Lab Invest.* 2005. P. 85. V. 1565-1569.
- [42] Pascolo E., Wenz C., Lingner J., Huel N., Priepke H., Kauffmann I., Garin-Chesa P., Rettig W.J., Damm K., Schnapp A. Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. // *J Biol Chem.* 2002. V. 277. P. 15566-15572.
- [43] Damm K., Hemmann U., Garin-Chesa P., Huel N., Kauffmann I., Priepke H., Niestroj C., Daiber C., Enenkel B., Guilliard B., Lauritsch I., Müller E., Pascolo E., Sauter G., Pantic M., Martens U.M., Wenz C., Lingner J., Kraut N., Rettig W.J., Schnapp A. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. // *EMBO.* 2002. V. 20. P. 6958–6968.
- [44] Wu K.L., Wilkinson S., Reich N.O., Pettus T.R. Facile synthesis of naphthoquinone spiroketals by diastereoselective oxidative [3 + 2] cycloaddition. // *Org Lett.* 2007. V. 9. P. 5537-5540.
- [45] Barma D.K., Elayadi A., Falck J.R., Corey D.R. Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues. // *Bioorg Med Chem Lett.* 2003. V. 13. P. 1333-1336.
- [46] Cohn E.P., Wu K.L., Pettus T.R., Reich N.O. A new strategy for detection and development of tractable telomerase inhibitors. // *J Med Chem.* 2002. V.

55. P. 3678-3686.
- [47] Wege H., Chui M.S., Le H.T., Tran J.M., Zern M.A. SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. E3-3.
- [48] Uehara H., Nardone G., Nazarenko I., Hohman R.J. Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection. // *Biotechniques.* 1999. V. 26. P. 552-558.
- [49] Rossetti L., Franceschin M., Bianco A., Ortaggi G., Savino M. Perylene diimides with different side chains are selective in inducing different G-quadruplex DNA structures and in inhibiting telomerase. // *Bioorg Med Chem Lett.* 2002. V. 12. P. 2527-2533.
- [50] Oda M., Ueno T., Kasai N., Takahashi H., Yoshida H., Sugawara F., Sakaguchi K., Hayashi H., Mizushina Y. Inhibition of telomerase by linear-chain fatty acids: a structural analysis. // *Biochem J.* 2002. V. 367. P. 329-334.
- [51] Reed J., Gunaratnam M., Beltran M., Reszka A.P., Vilar R., Neidle S. TRAP-LIG, a modified telomere repeat amplification protocol assay to quantitate telomerase inhibition by small molecules. // *Anal Biochem.* 2008. V. 380. P. 99-105.
- [52] Gollahon L.S., Holt S.E. Alternative methods of extracting telomerase activity from human tumor samples. // *Cancer Lett.* 2000. V. 159. P. 141-149.
- [53] Zendeck N., Dejmeck A. Telomere repeat amplification protocol (TRAP) in situ reveals telomerase activity in three cell types in effusions: malignant cells, proliferative mesothelial cells, and lymphocytes. // *Mod Pathol.* 2005. V. 18. P. 189-196.
- [54] Herbert B., Pitts A.E., Baker S.I., Hamilton S.E., Wright W.E., Shay J.W., Corey D.R. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. V. 96. P. 14276-14281.
- [55] Wishart D.S. Small molecules and disease. // *PLoS Comput Biol.* 2012. V. 8. P. e1002805.
- [56] Mergny J.L., Riou J.F., Mailliet P., Teulade-Fichou M.P., Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. P. 839-865.
- [57] Fletcher T.M., Cathers B.E., Ravikumar K.S., Mamiya B.M., Kerwin S.M. Inhibition of human telomerase by 7-deaza-2'-deoxyguanosine nucleoside triphosphate analogs: potent inhibition by 6-thio-7-deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate. // *Bioorg Chem.* 2001. V. 29. P. 36-55.
- [58] Grulich A.E., van Leeuwen M.T., Falster M.O., Vajdic C.M. Incidence of

- cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. // *Lancet*. 2007. V. 370. P. 59-67.
- [59] Chaturvedi A.K., Madeleine M.M., Biggar R.J., Engels E.A. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. // *Journal of the National Cancer Institute*. 2009. V. 101. P. 1120–1130.
- [60] Engels E.A., Biggar R.J., Hall H.I., Cross H., Crutchfield A., Finch J.L., Grigg R., Hylton T., Pawlish K.S., McNeel T.S., Goedert J.J. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. // *International Journal of Cancer*. 2008. V. 123. P. 187–194.
- [61] Engels E.A., Pfeiffer R.M., Goedert J.J., Virgo P., McNeel T.S., Scoppa S.M., Biggar R.J. Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980–2002. // *AIDS*. 2006. V. 20. P. 1645-1654.
- [62] Sauerwald A., Sandin S., Cristofari G., Scheres S.H., Lingner J., Rhodes D. Structure of active dimeric human telomerase. // *Nat Struct Mol Biol*. 2013. V. 20. P. 454-460.
- [63] El-Daly H., Kull M., Zimmermann S., Pantic M., Waller C.F., Martens U.M. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. // *Blood*. 2005. V. 104. P. 1742-1749.
- [64] Gryaznov S. US Patent No. 7,494,982 (24 February 2009).
- [65] Gryaznov S.M. Oligonucleotide N3'-P5' Phosphoramidates and Thio-Phosphoramidates as Potential Therapeutic Agents. // *Chemistry & Biodiversity*. 2010. V. 7. P. 477-493.
- [66] Url: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01137968?term=Geron&rank=8>
- [67] Url: <http://ir.geron.com/phoenix.zhtml?c=67323&p=irol-newsArticle&ID=1733274>
- [68] Thompson P.A., Drissi R., Muscal J.A., Panditharatna E., Fouladi M., Ingle A.M., Ahern C.H., Reid J.M., Lin T., Weigel B.J., Blaney S.M. A phase I trial of imetelstat in children with refractory or recurrent solid tumors: a Children's Oncology Group Phase I Consortium Study (ADVL1112). // *Clin Cancer Res*. 2013. V. 19. P. 6578-6584.
- [69] Tefferi A., Begna K., Laborde R., Patnaik M., Lasho T., Zblewski D., Finke C., Schimek L., LaPlant B., Hanson C., Stuart M., Pardanani A. Imetelstat, a Telomerase Inhibitor, Induces Morphologic and Molecular Remissions In Myelofibrosis and Reversal Of Bone Marrow Fibrosis. // *55th ASH Annual Meeting*. 2013. # 662.
- [70] Gryaznov S.M., Lloyd D.H. Modulation of oligonucleotide duplex and triplex stability via hydrophobic interactions. // *Nucleic Acids Res*. 1993. V. 21. P. 5909-5915.

- [71] Jackson S.R., Zhu C.H., Paulson V., Watkins L., Dikmen Z.G., Gryaznov S.M., Wright W.E., Shay J.W. Antiadhesive effects of GRN163L--an oligonucleotide N3'->P5' thio-phosphoramidate targeting telomerase. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 1121-1129.
- [72] Mender I., Senturk S., Ozgunes N., Akcali K.C., Kletsas D., Gryaznov S., Can A., Shay J.W., Dikmen Z.G. Imetelstat (a telomerase antagonist) exerts off-target effects on the cytoskeleton. // *International Journal Of Oncology.* 2013. V. 42. P. 1709-1715.
- [73] Asai A., Oshima Y., Yamamoto Y., Uochi T.A., Kusaka H., Akinaga S., Yamashita Y., Pongracz K., Pruzan R., Wunder E., Piatyszek M., Li S., Chin A.C., Harley C.B., Gryaznov S. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 3931-3939.
- [74] Canales B.K., Li Y., Thompson M.G., Gleason J.M., Chen Z., Malaeb B., Corey D.R., Herbert B.S., Shay J.W., Koeneman K.S. Small molecule, oligonucleotide-based telomerase template inhibition in combination with cytolytic therapy in an in vitro androgen-independent prostate cancer model. // *Urol Oncol.* 2006. V. 24. P. 141-151.
- [75] Bennett C., Ecker D., Vickers T., Wyatt J. US Patent No. US20070270363 A1 (22 November 2007).
- [76] Rankin A.M., Faller D.V., Spanjaard R.A. Telomerase inhibitors and 'T-oligo' as cancer therapeutics: contrasting molecular mechanisms of cytotoxicity. // *Anticancer Drugs.* 2008. V. 19. P. 329-338.
- [77] Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D., Ziaugra L., Beijersbergen R.L., Davidoff M.J., Liu Q., Bacchetti S., Haber D.A., Weinberg R.A. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. // *Cell.* 1997. V. 90. P. 785-795.
- [78] Glasspool R.M., Burns S., Hoare S.F., Svensson C., Keith W.N. The hTERT and hTERC telomerase gene promoters are activated by the second exon of the adenoviral protein, E1A, identifying the transcriptional corepressor CtBP as a potential repressor of both genes. // *Neoplasia.* 2005. V. 7. P. 614-622.
- [79] Moon D.O., Kim M.O., Lee J.D., Choi Y.H., Kim G.Y. Butein suppresses c-Myc-dependent transcription and Akt-dependent phosphorylation of hTERT in human leukemia cells. // *Cancer Lett.* 2009. V. 286. P. 172-179.
- [80] Guo Q.L., Lin S.S., You Q.D., Gu H.Y., Yu J., Zhao L., Qi Q., Liang F., Tan Z., Wang X. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. // *Life Sci.* 2006. V. 78. P. 1238-1245.

- [81] Jagadeesh S., Kyo S., Banerjee P.P. Genistein represses telomerase activity via both transcriptional and posttranslational mechanisms in human prostate cancer cells. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 2107-2115.
- [82] Kyo S., Takakura M., Taira T., Kanaya T., Itoh H., Yutsudo M., Ariga H., Inoue M. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 669-677.
- [83] Shapira S., Granot G., Mor-Tzuntz R., Raanani P., Uziel O., Lahav M., Shpilberg O. Second-generation tyrosine kinase inhibitors reduce telomerase activity in K562 cells. // *Cancer Lett.* 2012. V. 323. P. 223-231.
- [84] Nanni S., Narducci M., Della Pietra L., Moretti F., Grasselli A., De Carli P., Sacchi A., Pontecorvi A., Farsetti A. Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer. // *J Clin Invest.* 2002. V. 110. P. 219-227.
- [85] Aldous W.K., Marean A.J., DeHart M.J., Matej L.A., Moore K.H. Effects of tamoxifen on telomerase activity in breast carcinoma cell lines. // *Cancer.* 1999. V. 85. P. 1523-1529.
- [86] Sekaran V., Soares J., Jarstfer M.B. Telomere maintenance as a target for drug discovery. // *J Med Chem.* 2014. V. 57. P. 521-538.
- [87] Li H., Zhao L.L., Funder J.W., Liu J.P. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. // *J Biol Chem.* 1997. V. 272. P. 16729-16732.
- [88] Yu C.C., Lo S.C., Wang T.C. Telomerase is regulated by protein kinase C-zeta in human nasopharyngeal cancer cells. // *Biochem J.* 2001. V. 355. P. 459-464.
- [89] Kim Y.W., Hur S.Y., Kim T.E., Lee J.M., Namkoong S.E., Ki I.K., Kim J.W. Protein kinase C modulates telomerase activity in human cervical cancer cells. // *Exp Mol Med.* 2001. V. 33. P. 156-163.
- [90] Uziel O., Fenig E., Nordenberg J., Beery E., Reshef H., Sandbank J., Birenbaum M., Bakhanashvili M., Yerushalmi R., Luria D., Lahav M. Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. // *Br J Cancer.* 2005. V. 92. P. 1881-1891.
- [91] Chung J., Khadka P., Chung I.K. Nuclear import of hTERT requires a bipartite nuclear localization signal and Akt-mediated phosphorylation. // *J Cell Sci.* 2012. V. 125. P. 2684-2697.
- [92] Kang S.S., Kwon T., Kwon D.Y., Do S.I. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse

- transcriptase subunit. // *J Biol Chem*. 1999. V. 274. P. 13085-13090.
- [93] Neidle S. Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids. // Elsevier, 2012.
- [94] Zahler A.M., Williamson J.R., Cech T.R., Prescott D.M. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structure. // *Nature*. 1991. V. 350. P. 718-720.
- [95] Neidle S. Human telomeric G-quadruplex: The current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. // *FEBS Journal*. 2009. V. 277. P. 1118-1125.
- [96] Draskovic I., Londono Vallejo A. Telomere recombination and alternative telomere lengthening mechanisms. // *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013. V. 18. P. 1-20.
- [97] Li Q., Xiang J.F., Yang Q.F., Sun H.X., Guan A.J., Tang Y.L. G4LDB: a database for discovering and studying G-quadruplex ligands. // *Nucleic Acids Research*. 2013. V. 41. P. 1115-1123.
- [98] Harrison R.J., Gowan S.M., Kelland L.R., Neidle S. Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives. // *Bioorg Med Chem Lett*. 1999. V. 9. P. 2463-2468.
- [99] Read M., Harrison R.J., Romagnoli B., Tanious F.A., Gowan S.H., Reszka A.P., Wilson W.D., Kelland L.R., Neidle S. Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. V. 98. P. 4844-4849.
- [100] Gowan S.M., Harrison J.R., Patterson L., Valenti M., Read M.A., Neidle S., Kelland L.R. A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. // *Mol Pharmacol*. 2002. V. 61. P. 1154-1162.
- [101] Nandakumar J., Cech T.R. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013. V. 14. P. 69-82.
- [102] Salvati E., Leonetti C., Rizzo A., Scarsella M., Mottolese M., Galati R., et al. Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect. // *J. Clin. Investig*. 2007. V. 117. P. 3236–3247.
- [103] Gomez D., Aouali N., Renaud A., Douarre C., Shin-Ya K., Tazi J., et al. Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase. // *Cancer Res*. 2003. V. 63. P. 6149–6153.
- [104] Martins C., Gunaratnam M., Stuart J., Makwana V., Greciano O., Reszka A.P., Kelland L.R., Neidle S. Structure-based design of benzylamino-acridine compounds as G-quadruplex DNA telomere targeting agents. // *Bioorg Med Chem Lett*. 2007. V. 17. P. 2293–2298.

- [105] Url: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00955786>
- [106] Drygin D., Siddiqui-Jain A., O'Brien S., Schwaebe M., Lin A., Bliesath J., et al. Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. // *Cancer Res.* 2009. V. 71. P. 1418–1430.
- [107] Sadlak R.H., Jerome K.R. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. // *Diagn Microbial Infect Dis.* 2013. V. 75. P. 1-4.
- [108] Zhou Y., Zhu S., Cai C., Yuan P., Li C., Huang Y., Wei W. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. // *Nature.* 2014. V. 509. P. 487-491.
- [109] Martínez T., Wright N., López-Fraga M., Jiménez A.I., Pañeda C. Silencing human genetic diseases with oligonucleotide-based therapies. // *Hum Genet.* 2013. V. 132. P. 481-493.
- [110] Dassie J.P., Giangrande P.H. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics. // *Ther Deliv.* 2013. V. 4. P. 1527-1546.
- [111] Burnett J.C., Rossi J.J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. // *Chem Biol.* 2012. V. 19. P. 60-71.
- [112] Merdan T., Kopecek J., Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. // *Adv Drug Deliv Rev.* 2002. V. 54. P. 715-758.
- [113] Vivek K.S., Raman K.S., Sunil K.S. Antisense oligonucleotides: modifications and clinical trials. // *Med. Chem. Commun.* 2014. V. 5. P. 1454-1471.
- [114] Dirin M., Winkler J. Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides. // *Expert Opin Biol Ther.* 2013. V. 13. P. 875-888.
- [115] Juliano R.L., Carver K., Cao C., Ming X. Receptors, endocytosis, and trafficking: the biological basis of targeted delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. // *J Drug Target.* 2013. V. 21. P. 27-43.
- [116] Corey D.R. Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials. // *Oncogene.* 2002. V. 21. P. 631-637.
- [117] Prakash T.P., Bhat B. 2'-Modified oligonucleotides for antisense therapeutics. // *Curr Top Med Chem.* 2007. V. 7. P. 641-649.
- [118] Elayadi A.N., Demieville A., Wancewicz E.V., Monia B.P., Corey D.R. Inhibition of telomerase by 2'-O-(2-methoxyethyl) RNA oligomers: effect of length, phosphorothioate substitution and time inside cells. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 1683-1689.
- [119] Eckstein F. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000. V. 10.

- P. 117-121.
- [120] Saeki T., Takashima S., Tachibana M., Koga M., Hiyama E., Salomon D.S., Holland J.F., Ohnuma T. Inhibitory effect of telomere-mimic phosphorothioate oligodeoxy nucleotides (S-ODNS) on human tumor cell lines. // *Oncology*. 1999. V. 57. P. 27-36.
- [121] Pongracz K., Li S., Herbert B.S., Pruzan R., Wunder E., Chin A., Piatyszek M., Shay J., Gryaznov S.M. Novel short oligonucleotide conjugates as inhibitors of human telomerase. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2003. V. 22. P. 1627-1629.
- [122] Henry S.P., Novotny W., Leeds J., Auletta C., Kornbrust D.J. Inhibition of coagulation by a phosphorothioate oligonucleotide. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997. V. 7. P. 503-510.
- [123] Gryaznov S., Asai A., Oshima Y., Yamamoto Y., Pongracz K., Pruzan R., Wunder E., Piatyszek M., Li S., Chin A., Harley C., Akinaga S., Yamashita Y. Oligonucleotide N3' --> P5' thio-phosphoramidate telomerase template antagonists as potential anticancer agents. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2003. V. 23. P. 577-581.
- [124] С.И.А. Пептидно-нуклеиновые кислоты: структура, свойства, применение, стратегии и практика химического синтеза. –М.: Успехи химии, 2002.
- [125] Tarkanyi I., Aradi J. Pharmacological intervention strategies for affecting telomerase activity: future prospects to treat cancer and degenerative disease. // *Biochimie*. 2008. V. 90. P. 156-172.
- [126] Hamilton S.E., Simmons C.G., Kathiriya I.S., Corey D.R. Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase. // *Chem Biol*. 1999. V. 6. P. 343-351.
- [127] Ishihara T., Kano A., Obara K., Saito M., Chen X., Park T.G., Akaike T., Maruyama A. Nuclear localization and antisense effect of PNA internalized by ASGP-R-mediated endocytosis with protein/DNA conjugates. // *J Control Release*. 2011. V. 155. P. 34-39.
- [128] Du Q.Y., Wang X.B., Chen X.J., Zheng W., Wang S.Q. Antitumor mechanism of antisense cantide targeting human telomerase reverse transcriptase. // *World J Gastroenterol*. 2003. V. 9. P. 2030-2035.
- [129] Yang Y., Lv Q.J., Du Q.Y., Yang B.H., Lin R.X., Wang S.Q. Combined effects of Cantide and chemotherapeutic drugs on inhibition of tumor cells' growth in vitro and in vivo. // *World J Gastroenterol*. 2005. V. 11. P. 2491-2496.
- [130] Lin R.X., Tuo C.W., Lü Q.J., Zhang W., Wang S.Q. Inhibition of tumor

- growth and metastasis with antisense oligonucleotides (Cantide) targeting hTERT in an in situ human hepatocellular carcinoma model. // *Acta Pharmacol Sin.* 2005. V. 26. P. 762-768.
- [131] Skvortzov D.A., Rubzova M.P., Zvereva M.E., Kiselev F.L., Donzova O.A., The regulation of telomerase in oncogenesis. // *Acta Naturae.* 2009. V. 1. P. 51-67.
- [132] Petrenko A.A., Korolenkova L.I., Skvortsov D.A., Fedorova M.D., Skoblov M.U., Baranova A.V., Zvereva M.E., Rubtsova M.P., Kissel'jov F.L. Cervical intraepithelial neoplasia: Telomerase activity and splice pattern of hTERT mRNA. // *Biochimie.* 2010. V. 92. P. 1827-1831.
- [133] Wong M.S., Chen L., Foster C., Kainthla R., Shay J.W., Wright W.E. Regulation of telomerase alternative splicing: a target for chemotherapy. // *Cell Rep.* 2013. V. 3. P. 1028-1035.
- [134] Bernardes de Jesus B., Blasco M.A. Telomerase at the intersection of cancer and aging. // *Trends Genet.* 2013. V. 29. P. 513-520.
- [135] Mukai S., Kondo Y., Koga S., Komata T., Barna B.P., Kondo S. 2-5A antisense telomerase RNA therapy for intracranial malignant gliomas. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 4461-4467.
- [136] Keppler B.R., Jarstfer M.B. Inhibition of telomerase activity by preventing proper assemblage. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 334-343.
- [137] Vasilkova D.V., Azhibek D.M., Zatsepin T.S., Naraikina Y.V., Prassolov V.S., Prokofjeva M.M., Zvereva M.I., Rubtsova M.P. Dynamics of human telomerase RNA structure revealed by antisense oligonucleotide technique. // *Biochimie.* 2013. V. 95. P. 2423-2428.
- [138] Kondo Y., Kondo S. Telomerase RNA inhibition using antisense oligonucleotide against human telomerase RNA linked to a 2',5'-oligoadenylate. // *Methods Mol Biol.* 2007. P. 405. P. 97-112.
- [139] Gude L., Berkovitch S.S., Santos W.L., Kutchukian P.S., Pawloski A.R., Kuimelis R., McGall G., Verdine G.L. Mapping targetable sites on human telomerase RNA pseudoknot/template domain using 2'-OMe RNA-interacting polynucleotide (RIptide) microarrays. // *J Biol Chem.* 2012. V. 287. P. 18843-18853.
- [140] Rubtsova M.P., Vasilkova D.P., Malyavko A.N., Naraikina Y.V., Zvereva M.I., Dontsova O.A. Telomere lengthening and other functions of telomerase. // *Acta Naturae.* 2012. V. 4. P. 44-61.
- [141] Hay M., Thomas D.W., Craighead J.L., Economides C., Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. // *Nature Biotechnology.* 2014. V. 32. P. 40-51.

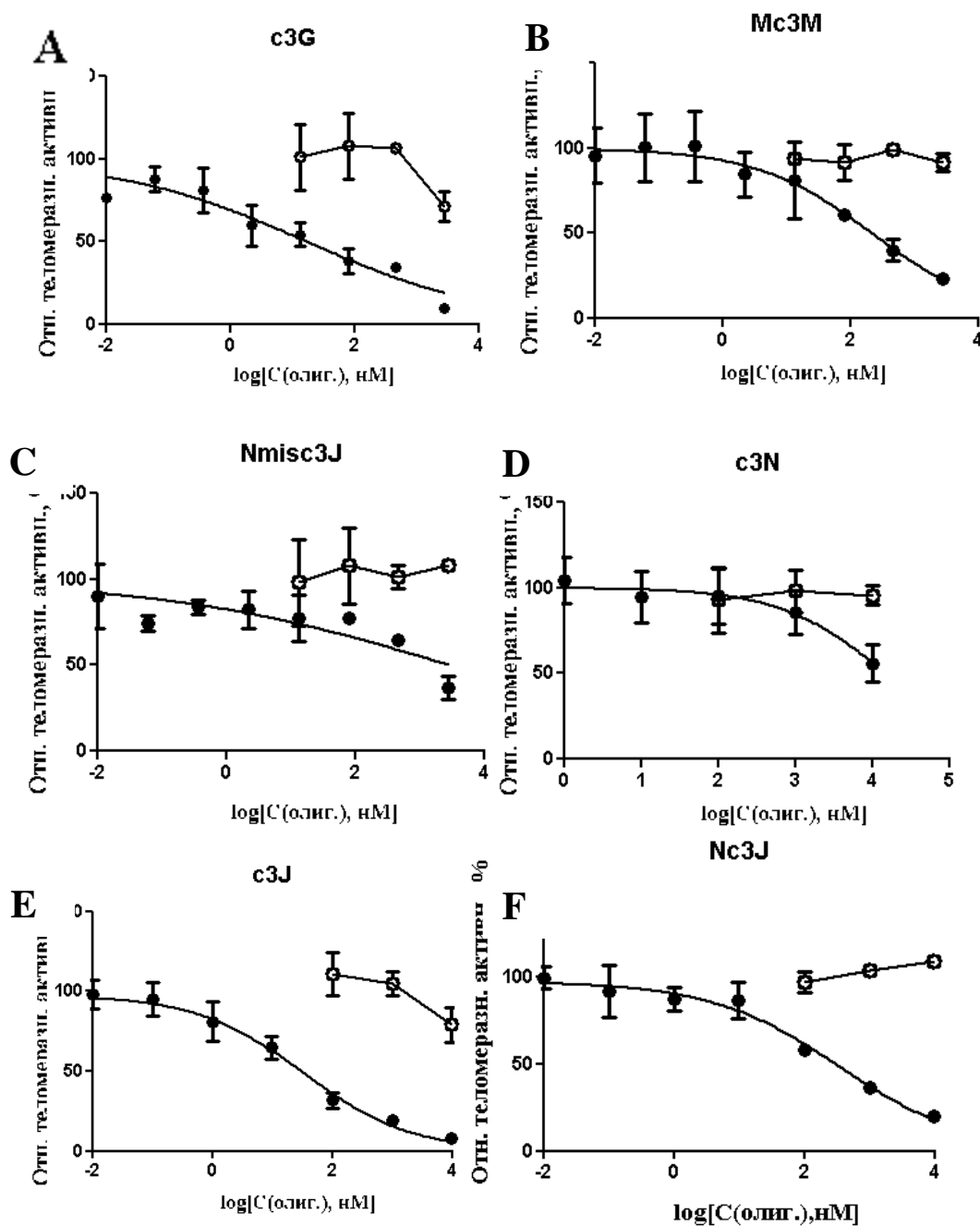
- [142] Counter C.M., Avilion A.A., LeFeuvre C.E., Stewart N.G., Greider C.W., Harley C.B., Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 1921-1929.
- [143] Pruzan R., Pongracz K., Gietzen K., Wallweber G., Gryaznov S. Allosteric inhibitors of telomerase: oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. P. 559-568.
- [144] Behlke M., Devor E.J., Goodchild J. Designing Antisense Oligonucleotides. // *Integrated DNA Technologies.* 2005. P. 1-17.
- [145] Kurth I., Cristofari G., Lingner K. An Affinity Oligonucleotide Displacement Strategy to Purify Ribonucleoprotein Complexes Applied to Human Telomerase. // *Methods Mol Biol.* 2008. V. 488. P. 9-22.
- [146] [Url:http://www.wolframalpha.com/widgets/view.jsp?id=b3caae6857cf5662d007d49b4ace0e05](http://www.wolframalpha.com/widgets/view.jsp?id=b3caae6857cf5662d007d49b4ace0e05).
- [147] Cohen S.B., Reddel R.R. A sensitive direct human telomerase activity assay. // *Nat Methods.* 2008. V. 5. P. 355-360.
- [148] Redon S., Reichenbach P., Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. // *Nucleic Acids Research.* 2010. V. 38. P. 1-10.
- [149] Беспмятное Г. П. и др. Предельно-допустимые концентрации вредных веществ в воздухе и воде. – М.: Химия, 1975. 455 с.
- [150] Uehara H. Real-time detection and quantification of telomerase activity utilizing energy transfer primers. // *Methods Mol Biol.* 2006. V. 335. P. 157-169.
- [151] Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhenkova L.G., Luzikov Y.N., Sinkevich Y.B., Kovalenko L.V., Buyanov V.N., Balzarini J., Huang F.C., Lin J.J., Huang H.S., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. Synthesis and cytotoxic properties of 4,11-bis[(aminoethyl)amino]anthra[2,3-b]thiophene-5,10-diones, novel analogues of antitumor anthracene-9,10-diones. // *Bioorg Med Chem.* 2009. V. 17. P. 1861-1869.
- [152] Ilyinsky N.S., Shchyolkina A.K., Borisova O.F., Mamaeva O.K., Zvereva M.I., Azhibek D.M., Livshits M.A., Mitkevich V.A., Balzarini J., Sinkevich Y.B., Luzikov Y.N., Dezhenkova L.G., Kolotova E.S., Shtil A.A., Shchekotikhin A.E., Kaluzhny D.N. Novel multi-targeting anthra[2,3-b]thiophene-5,10-diones with guanidine-containing side chains: Interaction with telomeric G-quadruplex, inhibition of telomerase and topoisomerase I and cytotoxic properties. // *Eur J Med Chem.* 2014. V. 85. P. 605-614.
- [153] Iakovidis I.; Delimaris I., Piperakis S. M. Copper and its complexes in

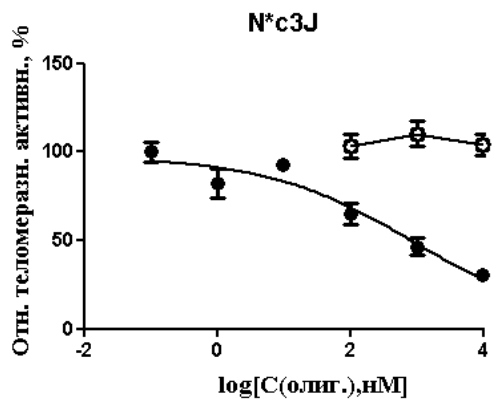
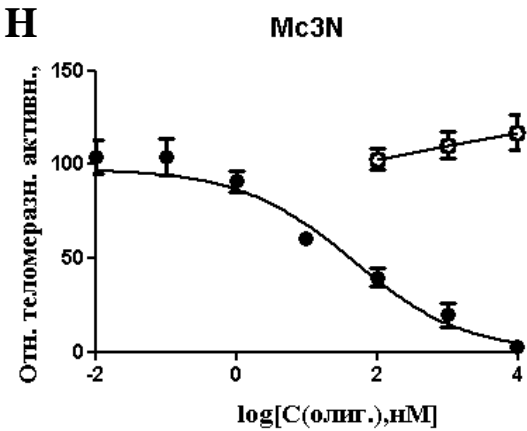
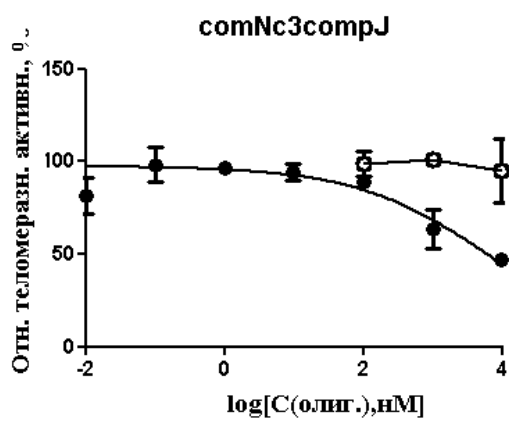
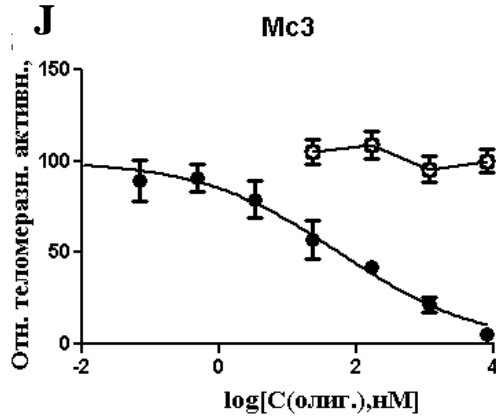
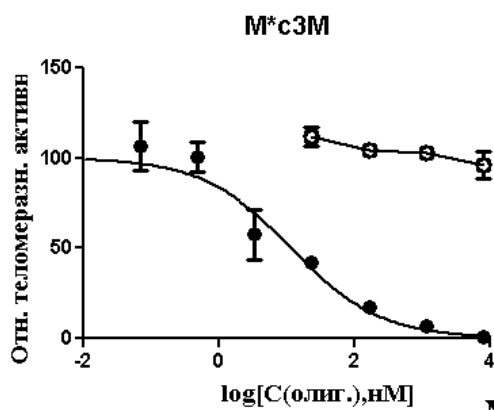
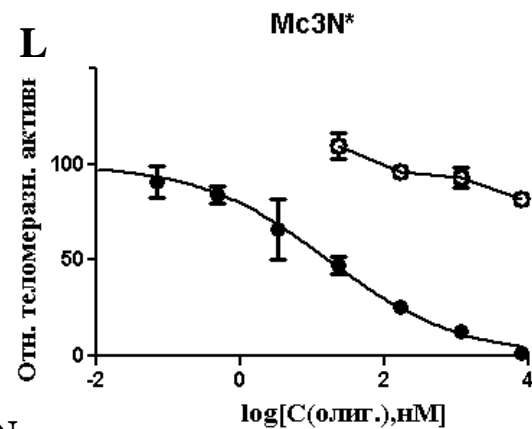
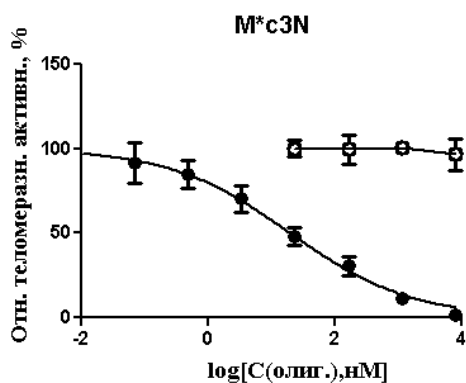
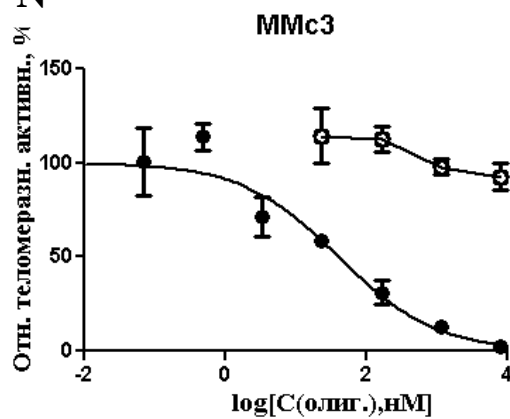
- medicine: a biochemical approach. // *Mol. Biol. Int.* 2011. P. 1-13.
- [154] Cristofari G., Lingner J. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 565-574.
- [155] Suzuki M., Kasai K., Saeki Y. Plasmid DNA sequences present in conventional herpes simplex virus amplicon vectors cause rapid transgene silencing by forming inactive chromatin. // *J Virol.* 2006. V. 80. P. 3293-300.
- [156] Backliwal G., Hildinger M., Chenuet S., Dejesus M., Wurm F.M. Coexpression of acidic fibroblast growth factor enhances specific productivity and antibody titers in transiently transfected HEK293 cells. // *N Biotechnol.* 2008. V. 25. P. 162-166.
- [157] Ali S.H., DeCaprio J.A. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. // *Semin Cancer Biol.* 2001. V. 11. P. 15-23.
- [158] Durocher Y., Perret S., Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. P. e9.
- [159] Van Craenenbroeck K., Vanhoenacker P., Haegeman G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. // *Eur J Biochem.* 2000. V. 267. P. 5665-5678.
- [160] Koons M.D., Van Scoy S., Hearing J. The replicator of the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication, oriP, is composed of multiple functional elements. // *J Virol.* 2000. V. 75. P. 10582-10592.
- [161] Darquet A.M., Cameron B., Wils P., Scherman D., Crouzet J. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. // *Gene Ther.* 1997. V. 14. P. 1341-1349.
- [162] Yates J.L., Camiolo S.M., Bashaw J.M. The Minimal Replicator of Epstein-Barr Virus oriP. // *Journal Of Virology.* 2000. V. 74. P. 4512-4522.
- [163] Weber K., Bartsch U., Stocking C., Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. // *Mol Ther.* 2008. V. 16. P. 689-706.
- [164] Chen J.L., Greider C.W. Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. V. 102. P. 8080-8085.
- [165] Ueda C.T., Roberts R.W. Analysis of a long-range interaction between conserved domains of human telomerase RNA. // *RNA.* 2014. V. 10. P. 139-147.
- [166] Chen Z., Monia B.P., Corey D.R. Telomerase inhibition, telomere shortening, and decreased cell proliferation by cell permeable 2'-O-methoxyethyl oligonucleotides. // *J Med Chem.* 2002. V. 45. P. 5423-5425.

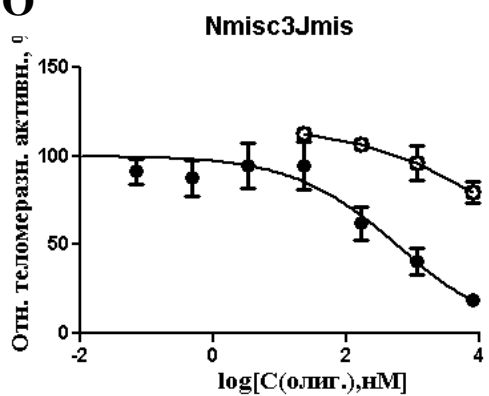
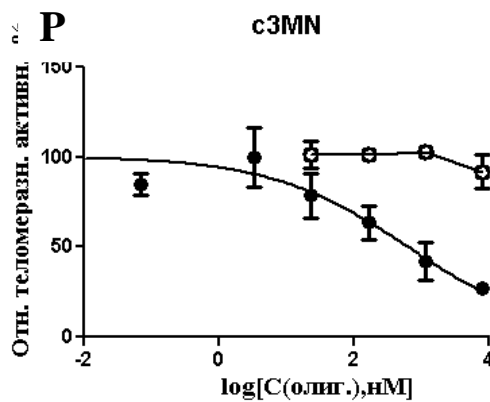
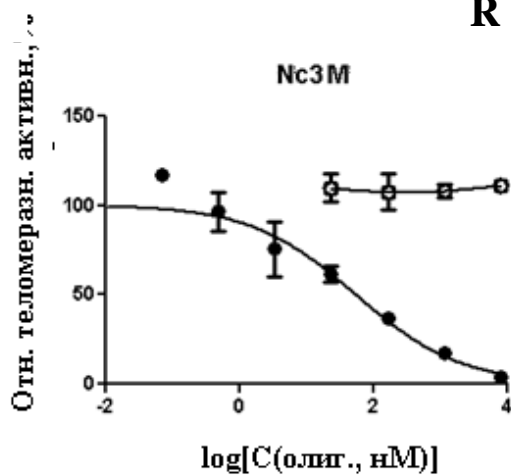
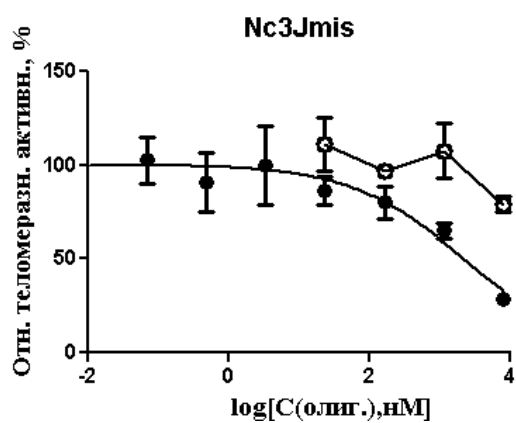
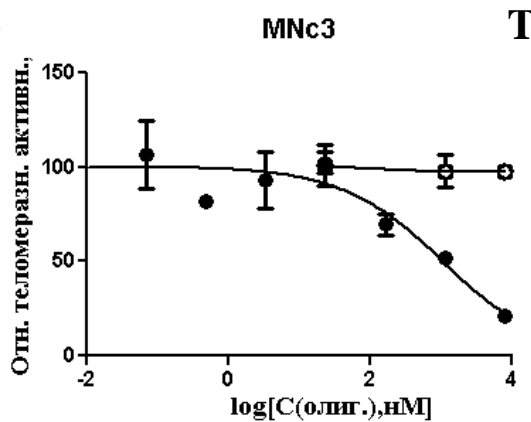
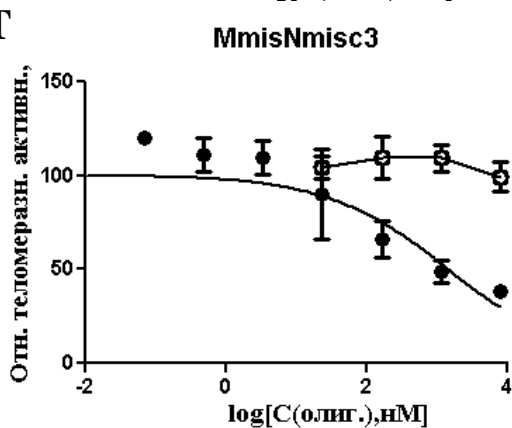
- [167] Золотов. Ю.А. Основы аналитической химии. – М.: Высшая школа, 2000.
- [168] Templeton N.S. Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies. // Taylor & Francis Group. 2009.
- [169] Varshney A., Ramakrishnan S.K., Sharma A., Santosh B., Bala J., Yadava P.K., Jaiswal R.K. Global expression profile of telomerase-associated genes in HeLa cells. // *Gene*. 2014. V. 547. P. 211-217.
- [170] Li S., Rosenberg J.E., Donjacour A.A., Botchkina I.L., Hom Y.K., Cunha G.R., Blackburn E.H. Rapid Inhibition of Cancer Cell Growth Induced by Lentiviral Delivery and Expression of Mutant-Template Telomerase RNA and Anti-telomerase Short-Interfering RNA. // *Cancer Res*. 2004. V. 64. P. 4833-4840.
- [171] Cotton M., Saltik M., Baker A. Transfection Complexes Generated with Adenovirus and Polyethylenimine-Condensed DNA. // *Adenovirus Methods and Protocols*. 1999. V. 21. P. 295-307.
- [172] Yasuda K., Ogawa Y., Yamane I., Nishikawa M., Takakura Y. Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. // *J Leukoc Biol*. 2005. V. 77. P. 71-79.
- [173] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal Biochem*. 1976. V. 72. P. 248-254.

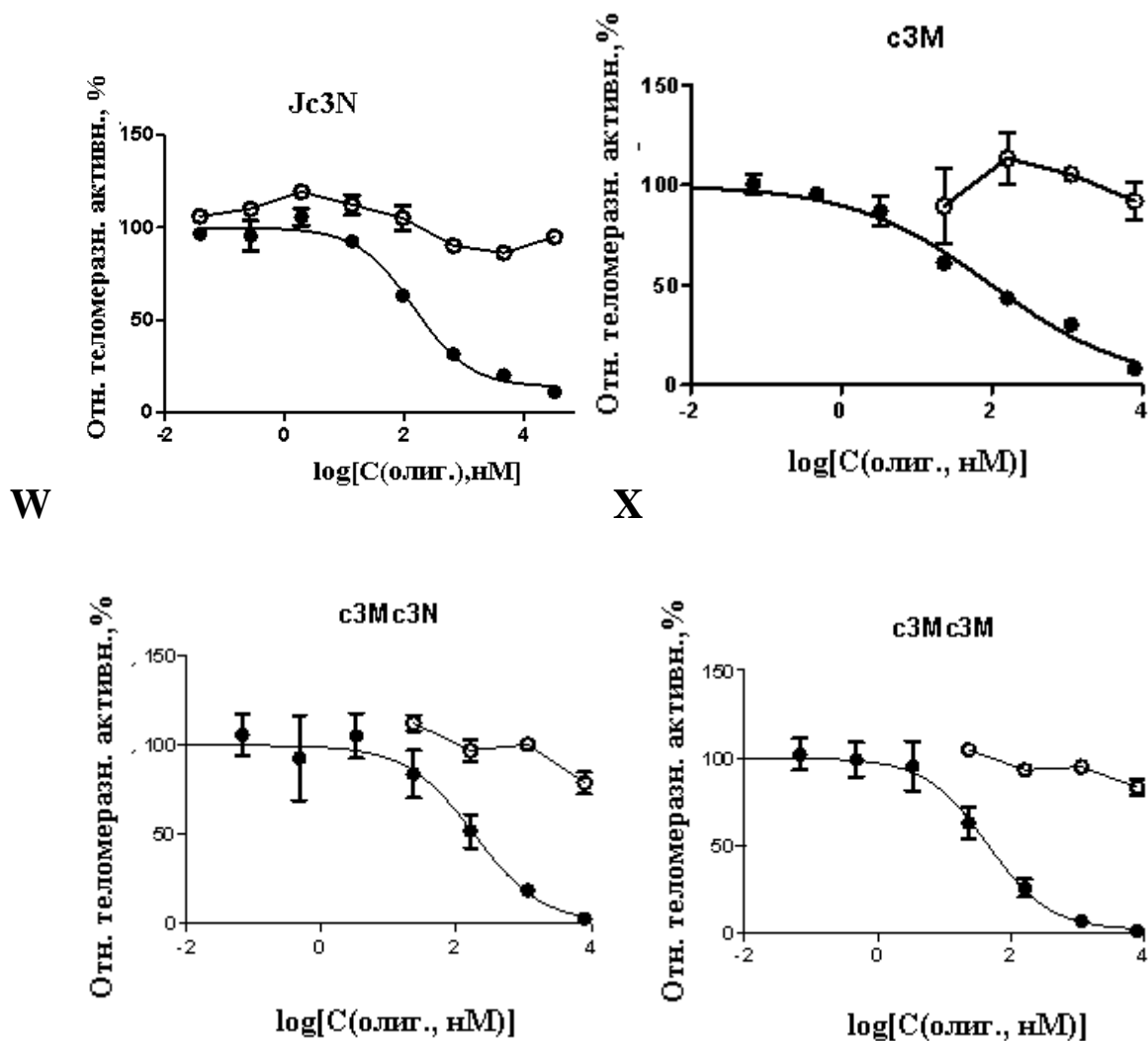
6. Приложение

Приложение 1



G**H****I****J****K****L****M****N**

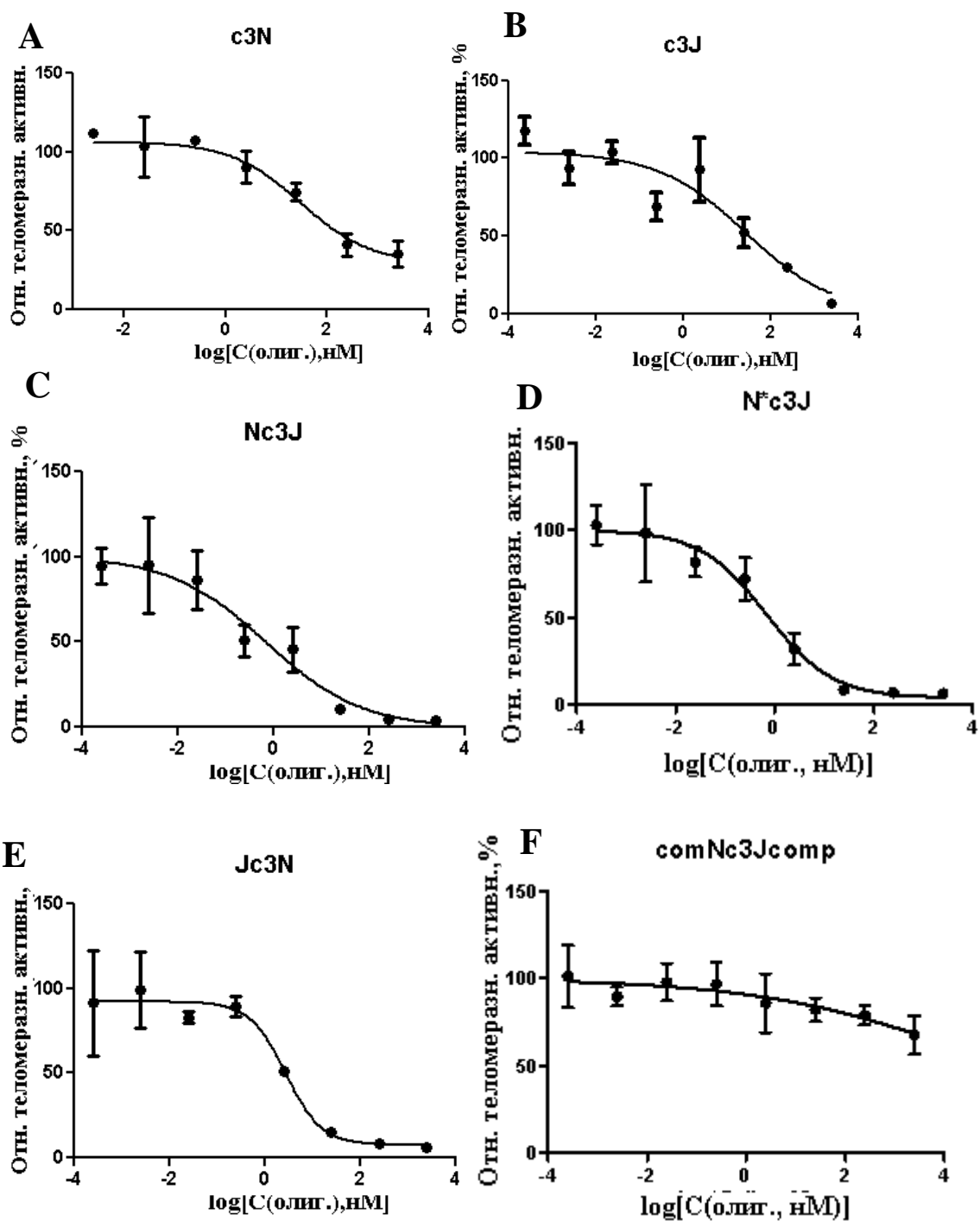
O**P****Q****R****S****T****U*****V**

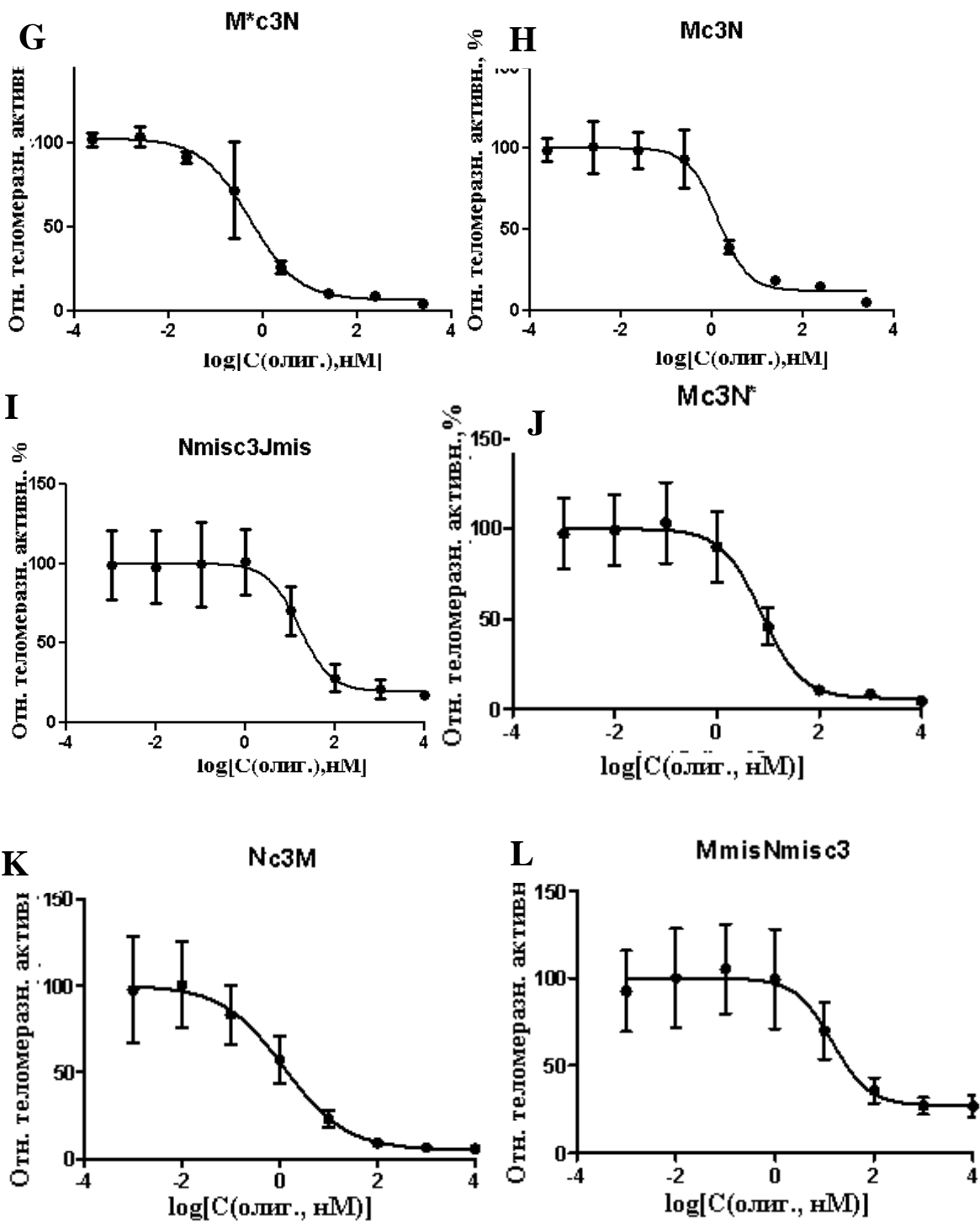


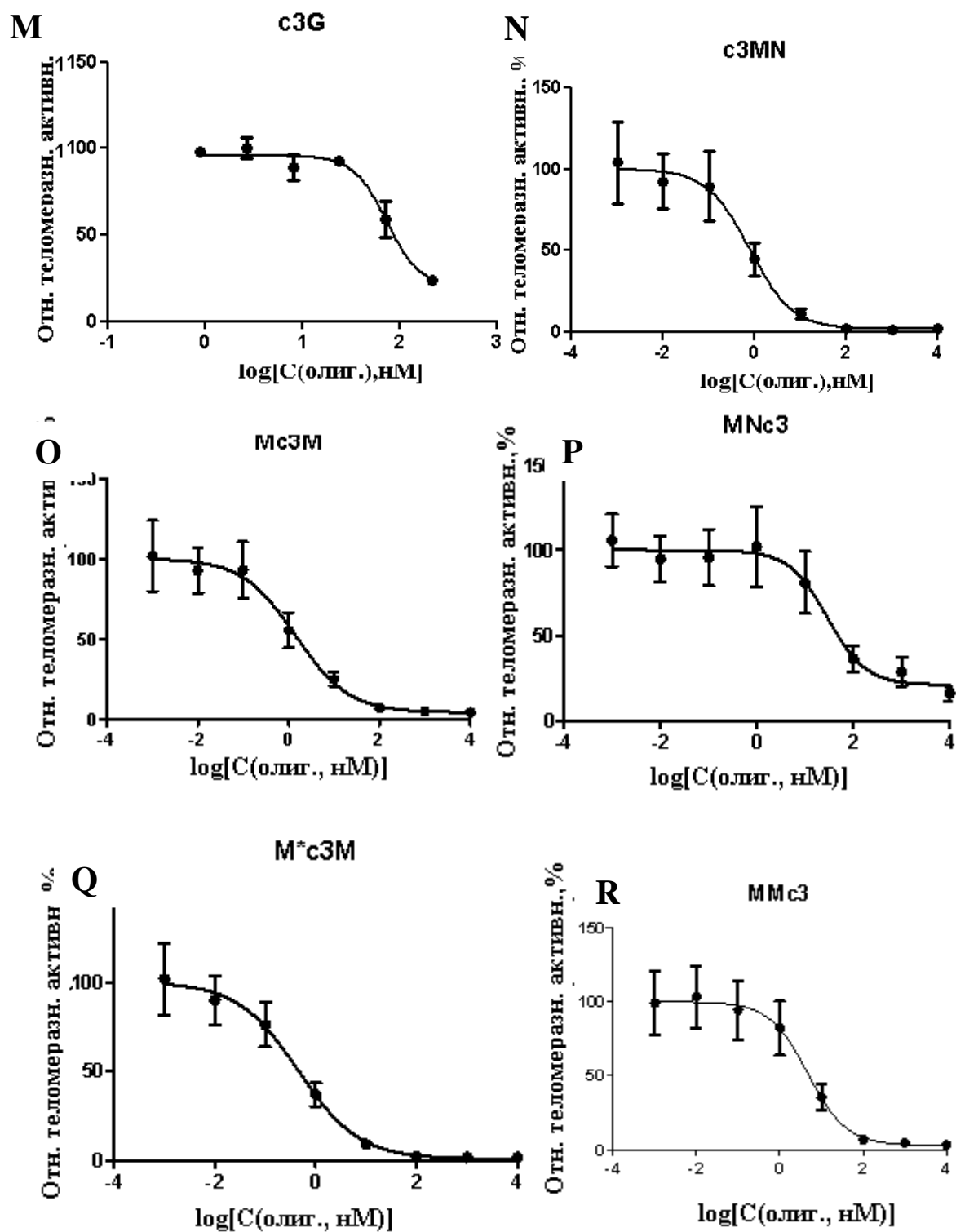
Ингибирование теломеразы модифицированными олигонуклеотидами в условиях *in vitro*. (●) – Ингибирование теломеразы, олигонуклеотиды были добавлены в теломеразную реакцию. (○) – Ингибирование ПЦР, олигонуклеотиды были добавлены после теломеразной реакции и перед ПЦР. А - c3G, В – Mc3M, С – Nmisc3J, D – c3N, Е – c3J, F – Nc3J, G – N*c3J, H- Mc3N, I - compNc3compJ, J – Mc3, K - M*c3M, L – Mc3N*, М – M*c3N, N – MMc3, О – Nmisc3Jmis, P – c3MN, Q – Nc3M, R – Nc3Jmis, S – MNc3, T – MmisNmisc3, U – Jc3N, V – c3M, W – c3Mc3N, X – c3Mc3M.

U*- для Jc3N было использовано 100 кратное разбавление.

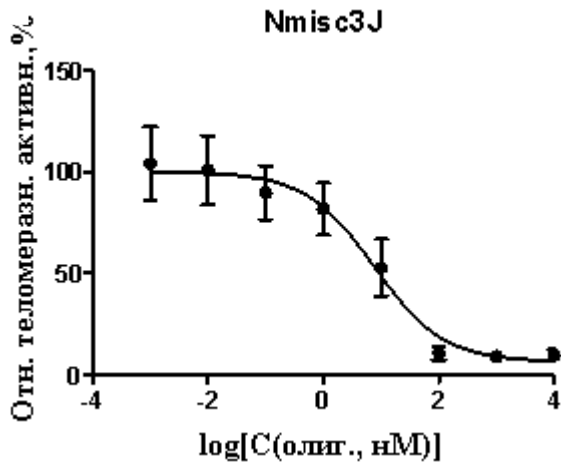
Приложение 2



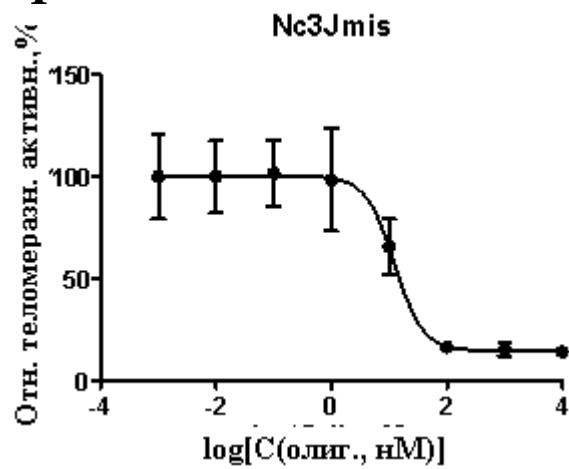




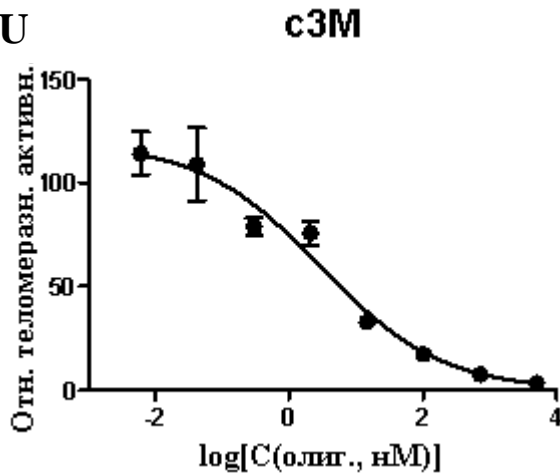
S



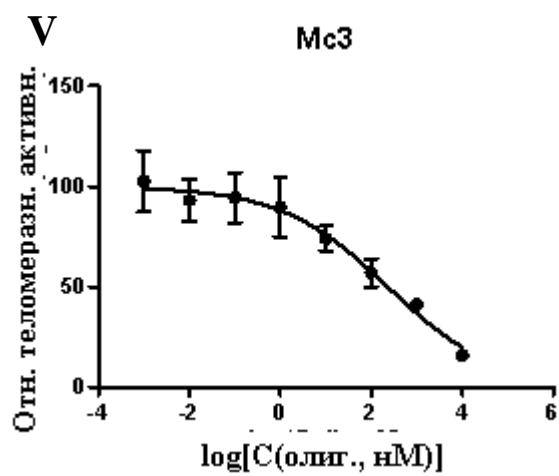
T



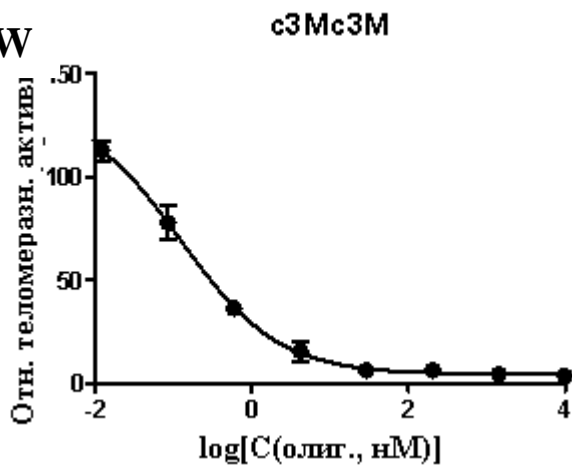
U



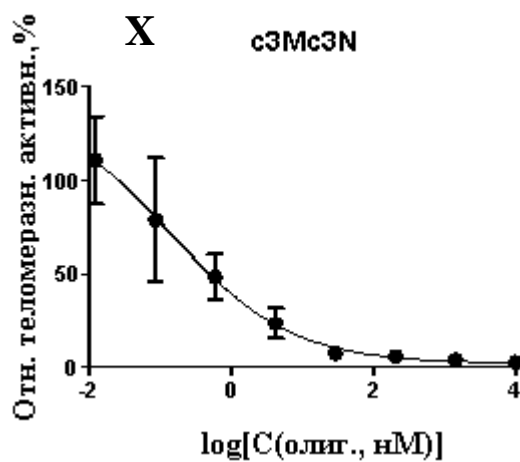
V



W

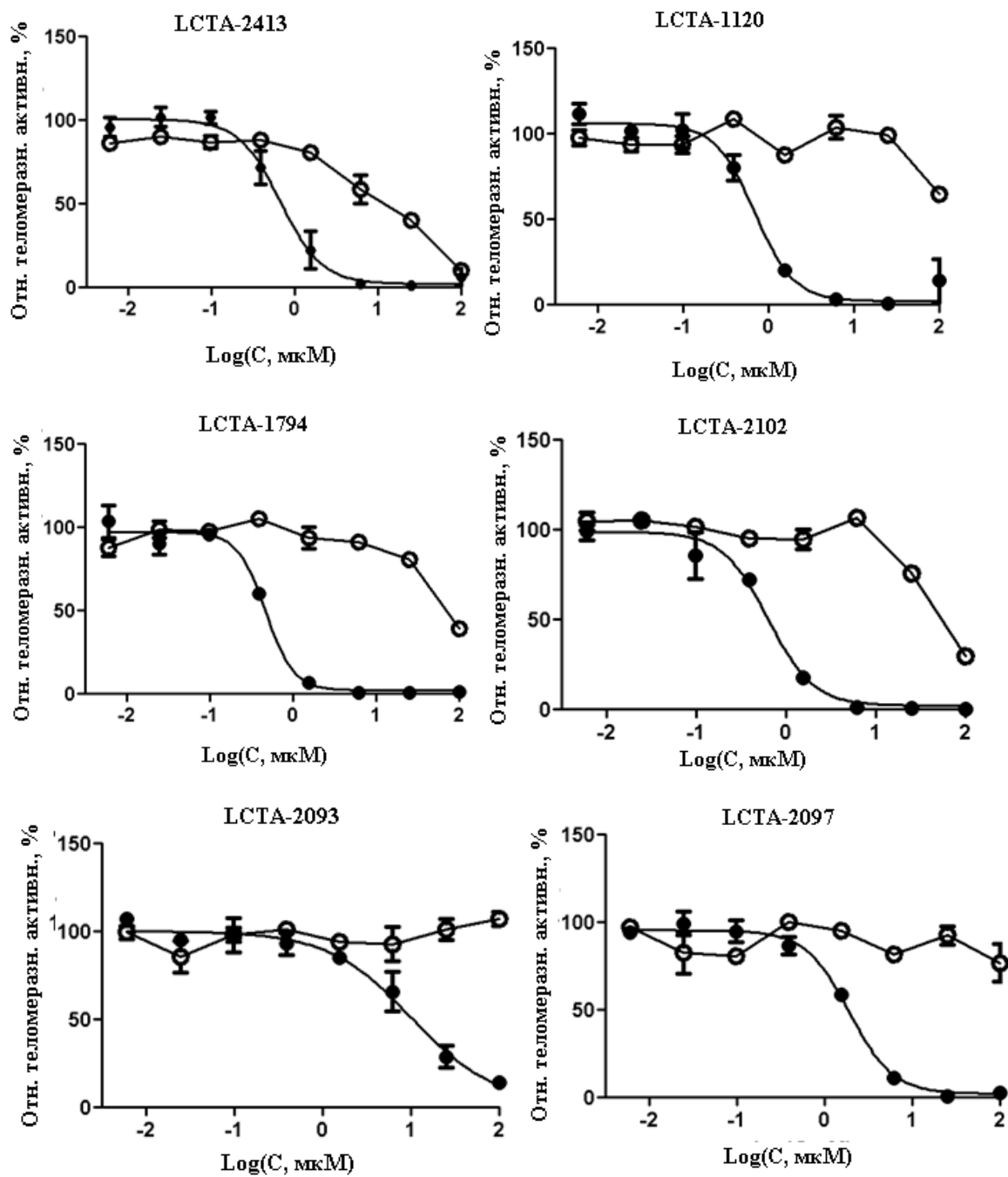


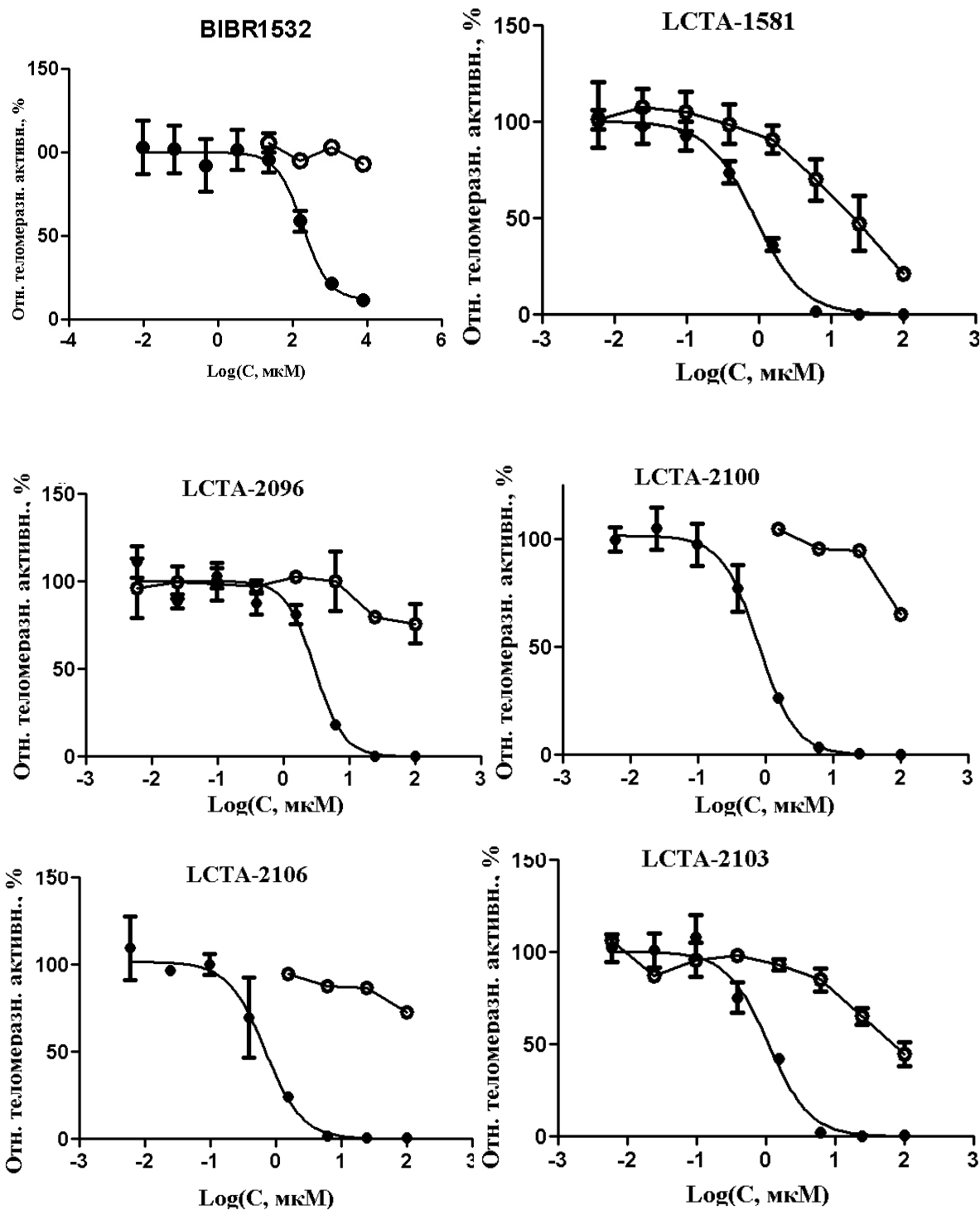
X



Ингибирование теломеразы модифицированными олигонуклеотидами в условиях *in vivo*. А - c3N, В - c3J, С - N3J, D - N*3J, Е - Jc3N, F - compNc3compJ, G - M*c3N, H- Mc3N, I - Nmisc3Jmis, J - Mc3N*, К - Nc3M, L - MmisNmisc3, М - c3G, N - c3MN, О - Mc3M, P - MNc3, Q - M*c3M, R - MMc3, S - Nmisc3J, T - Nc3Jmis, U - c3M, V - Mc3, W- c3Mc3M, X - c3Mc3N

Приложение 3.





Ингибирование теломеразы низкомолекулярными веществами в условиях *in vitro*. (●) – Ингибирование теломеразы, олигонуклеотиды были добавлены в теломеразную реакцию. (○) – Ингибирование ПЦР, олигонуклеотиды были добавлены после теломеразной реакции и перед ПЦР.