Сигналы в геноме
Как клетки регулируют сколько раз делиться, теломераза (hTERT)

Андрей Владимирович Алексеевский

Геном – носитель всей информации, передаваемой от предка к потомку.

Информация имеет значение только для читателей!

Светофор на пустынном шоссе
Знаю шоссе такое со светофорами для перехода

“Читатели” генома – белки клетки.
Они нужны для правильного выполнения инструкций в геномах (ДНК) от мамы и от папы в оплодотворенной яйцеклетки. От них тоже зависит развитие.

Как много наука знает об информации, закодированной в геноме!!!

- **Гены белков** – участки ДНК, кодирующие химическую формулу белка без модификаций (=аминокислотную последовательность).

- **Гены молекул РНК**
  - мРНК рРНК тмРНК тРНК
  - Рибозимы, некодирующие РНК, в т.ч. малые РНК

- **Функции многих белков и метаболических путей**

- **Многие сигналы,** закодированные в геноме и адресованные белкам или комплексам белков и РНК

I. Сигналы в геноме

Закодированные последовательностью нуклеотидов.

Как сигналы закодированы в геноме

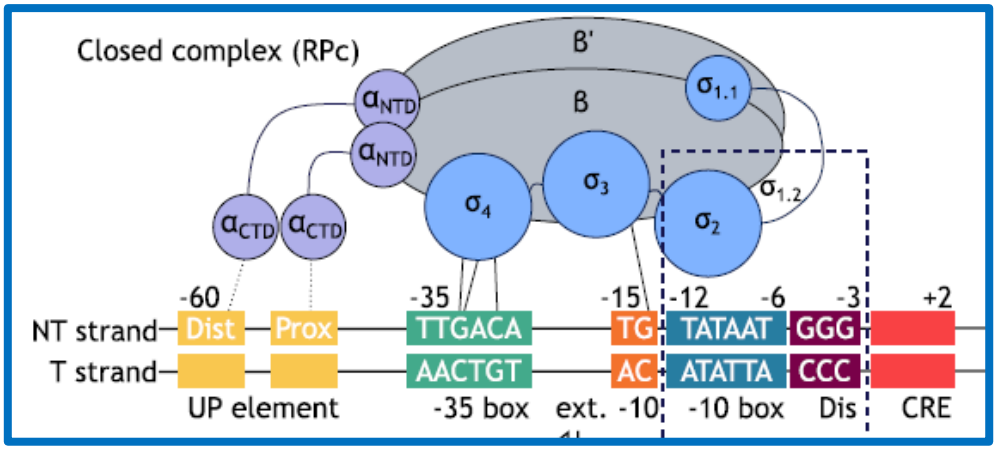
Способ 1. Последовательностью нуклеотидов. “Читатель” – белок - узнаёт последовательность и связывается с ДНК в этом месте. ПРИМЕР

Сигнал старта транскрипции матричной РНК белка у бактерий

Транскрипция – процесс переписывания с ДНК на РНК

Промотор – участок перед стартом транскрипции гена, примерно 200 п.н.

Транскрипция начинается с того, что белок σ-субъединица РНК-полимеразы связывается с двумя сигналами **-10(TATAAT) и -35(TTGACA)**



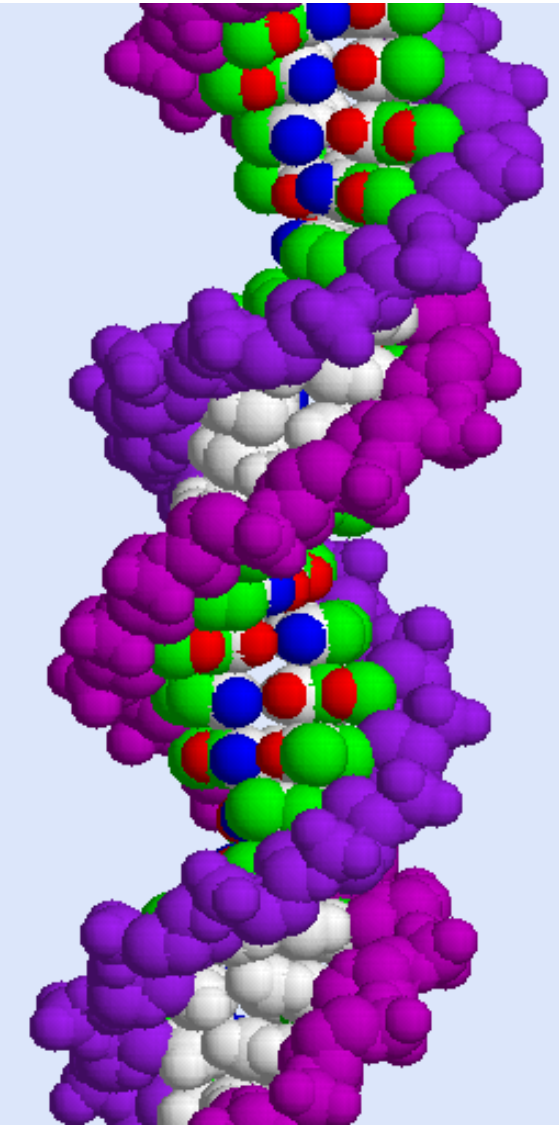
Сборка РНК-полимеразы, состоящей из 6 белков α α β β’ ω σ после связывания σ-субъединицы с сигналами -10 и -35 в ДНК

Белки состоят из доменов, частей несущих отдельные функции. Домены одного белка изображены кружками одного цвета. У σ-субъед. σ_4 связывается с -35 боксом, σ_2 с -10 боксом.

Сигналы -10 и -35 могут иметь отличающиеся последовательности. Долгий разговор, опустим

Deal C et al., Towards a rational approach to promoter engineering: understanding the complexity of transcription initiation in prokaryotes. FEMS Microbiol Rev. 2024

Как белки опознают последовательность ДНК? НИКАК, они не знают A, T, G, C! Они узнают код, определённый положениями разных атомов в большой бороздке (не расплетая ДНК).



Двойная спираль ДНК

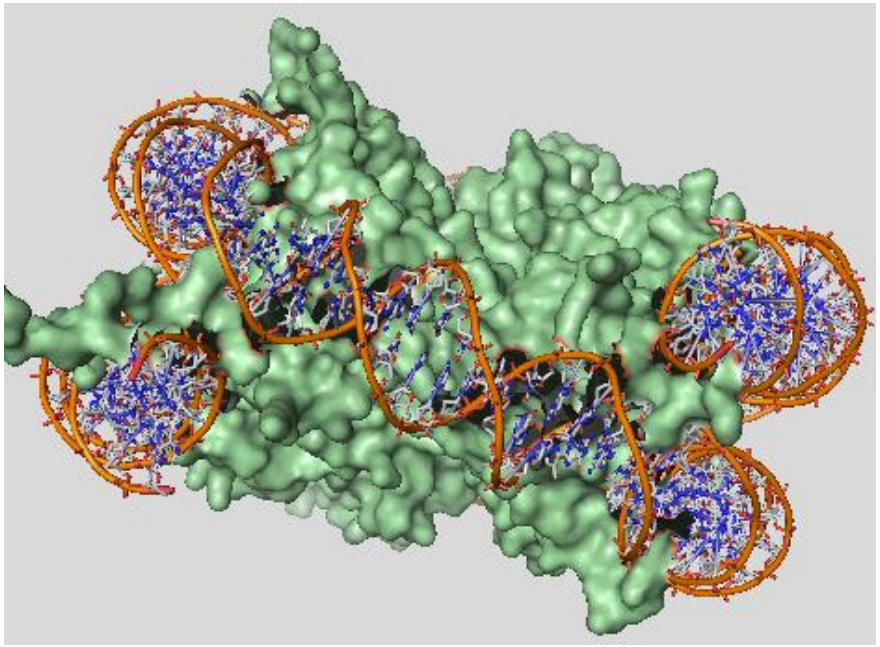
Остов одинаков. Атомы на поверхности малой бороздка (светло серые) почти не зависят от последовательности

Разница оснований закодирована разностью атомов в большой бороздке:

Синий – азот
красный – кислород
Зелёный - углерод

Сигнал, по существу, трехмерный. В дополнение, конформация остова ДНК немножко зависит от последовательности оснований

Для эукариот дело усложняется доступностью ДНК для белков



Нуклеосома:
ДНК человека на “катушке” из гистонов: вид сбоку (гистоны – такие белки)

PDB код забыл
3LEL тоже X-ray нуклеосомы, 2019 год

Ещё сложнее с доступностью на более высоких уровнях организации хроматина.

Как мало наука знает об информации, закодированной в геноме!

Как закодирована в геноме информация о

* фенотипе будущего взрослого человека – в геноме зародыша!
(черты лица, пропорции тела и конечностей, характера; часто дети похожи на родителей, т.е. это записано в геноме, как?)

* составах протеомов в клетках разных тканей

* поведении пчёл и пчелиного роя

Клетки разных тканей человека

- Имеют одинаковый геном (модификации не в счёт) С оговорками
- Протеом – совокупность разных белков в клетке и их процентное соотношение
- Протеомы клеток из разных тканей существенно различаются (эпидермис, мускулы, сетчатка глаз, нервы, разные клетки крови, ….)

Где и как записаны в геноме зародыша составы протеомов в клетках разных тканей? НЕИЗВЕСТНО

Данные о протеомах разных тканей собираются в проекте HUPO Human Proteome Project

Современные технологии позволяют определять протеомы клеток отдельных тканей человека.

Фантазии. Может, когда-нибудь, мутируя методами генной инженерии геном мышиного зародыша, можно будет направлено изменять состав протеома миоцитов - мускул??? Это было бы торжество науки!!!

IOmenn GS et al., The 2022 Report on the Human Proteome from the HUPO Human Proteome Project. J Proteome Res. 2023

Adhikari S, A high-stringency blueprint of the human proteome. Nat Commun. 2020

Как поддерживается разница протеомов в клетках разных тканей - ИЗВЕСТНО

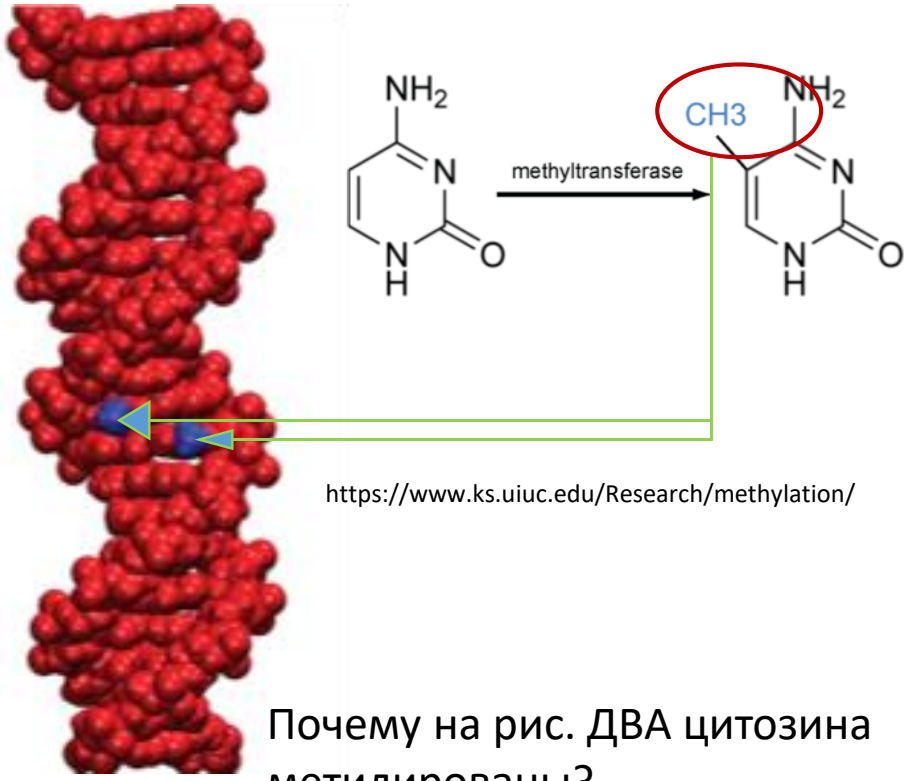
Эпигеномика - наследуемая (при делении клеток) информация СВЕРХ последовательности ДНК генома

Два основных способа, хорощо изученные на сегодня

- Метилирование динуклеотидов CpG. Немножко расскажу.
- Химические модификации N-концевых участков белков - гистонов, на которые намотаны ДНК

- Оба этих механизма работают для инактивации всех генов одной из двух Х-хромосом в оплодотворённой яйцеклетке самки. Процесс называется импринтинг. Напомню:
  X, Y - самец, X, X - самка; работает одна Х

CpG[1)]-methylation in mammals



https://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation/

Почему на рис. ДВА цитозина метилированы?

5’ C - p - G 3’
| |
3’ G - p - C 5’

Метилирование цитозина типа mC5 см. на рисунке.

У млекопитающих 60-80% сайтов CpG метилированы.

Метилированные цитозины смотрят в большую борозду ДНК, и не нарушают структуру ДНК

Метилированные цитозины меняют код в большой бороздке ДНК, узнаваемый “читателями” – белками.

В ДНК либо оба цитозина в CpG заметилированы или оба - НЕТ

[1)] CpG – динуклеотид; p значит фосфат, чтобы не путать с комплементарной парой CG

Метилирование промотора гена человека изменяет экспрессию[1)] белка. В данном случае – транскрипцию его гена

Не обязательно метилируется сигнал начала транскрипции.

В промоторах много сигналов факторов транскрипции (TF), регулирующих транскрипцию гена: активаторов (ген экспрессируется чаще) и репрессоров (ген экспрессируется реже или вообще не экспрессируется)

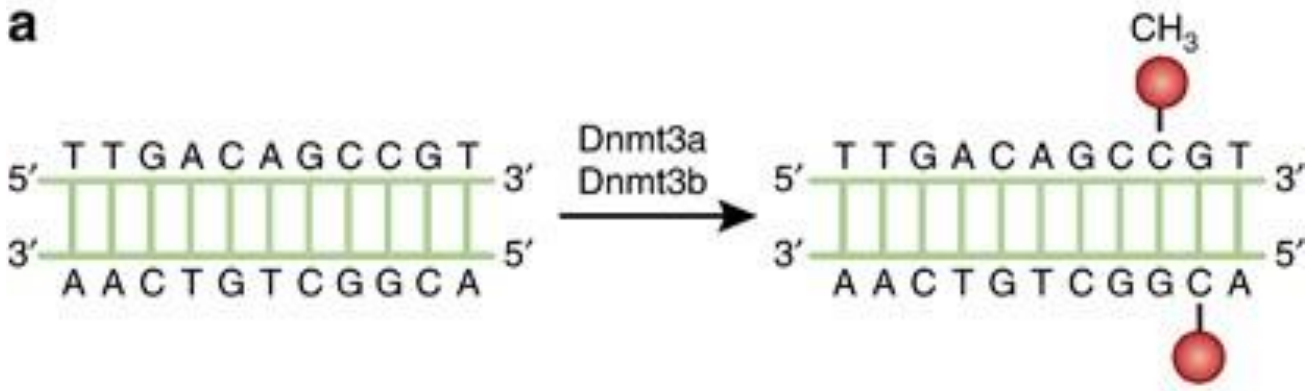
Многие CpG сайты собираются в CpG острова. Паттерн метилирования в островах может одновременно остановить транскрипцию многих генов.

[1)] экспрессия белка – производство молекул белка в клетке

Фрагмент паттерна метилирования

https://www.labclinics.com/wp-content/uploads/2022/12/DNA_Methylation_figure_1-1024x357-1024x357-1.png

CpG метилирование de novo.

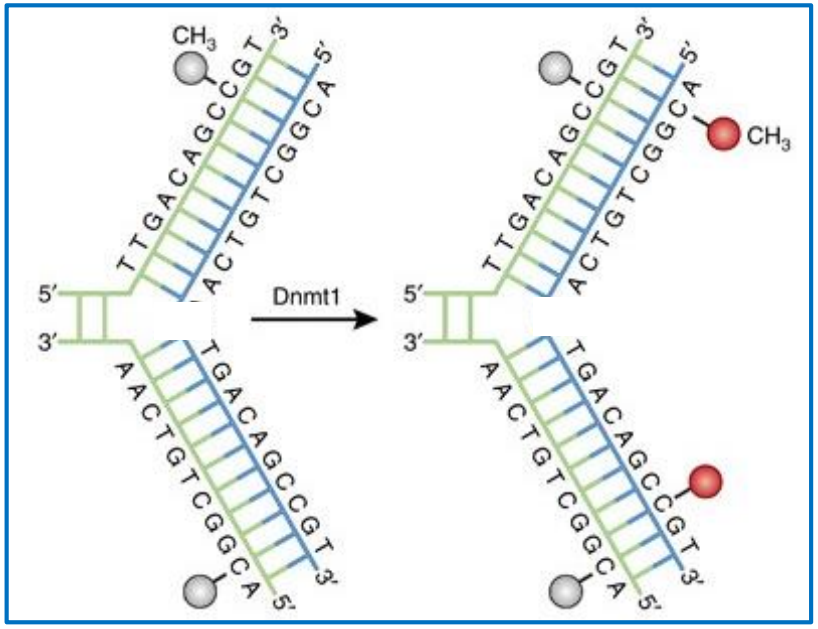


Функции белков DNMT3a и DNMT3b совпадают. Каждый из них способен метилировать оба цитозина в CpG

Различие между ними в процессивности – частоте метилирования сайтов.

Как регулируется активности белков DNMT3a и DNMT3b – в каких условиях, какие сайты должны метилировать – изучено недостаточно

Поддержание статуса метилирования при делении клетки



При репикации в обоих дочерних ДНК материнская цепочка – зелёная - метилирована а новая – нет!

ДНК метилтрансфераза DNMT1 ищет такие полуметилировнные сайты и метилирует их по второй цепочке

Репликация метилированного CpG.
ДНК материнской цепочки – зелёная линия.
Достраиваемая цепочка ДНК у дочки - синяя

Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology. 2013

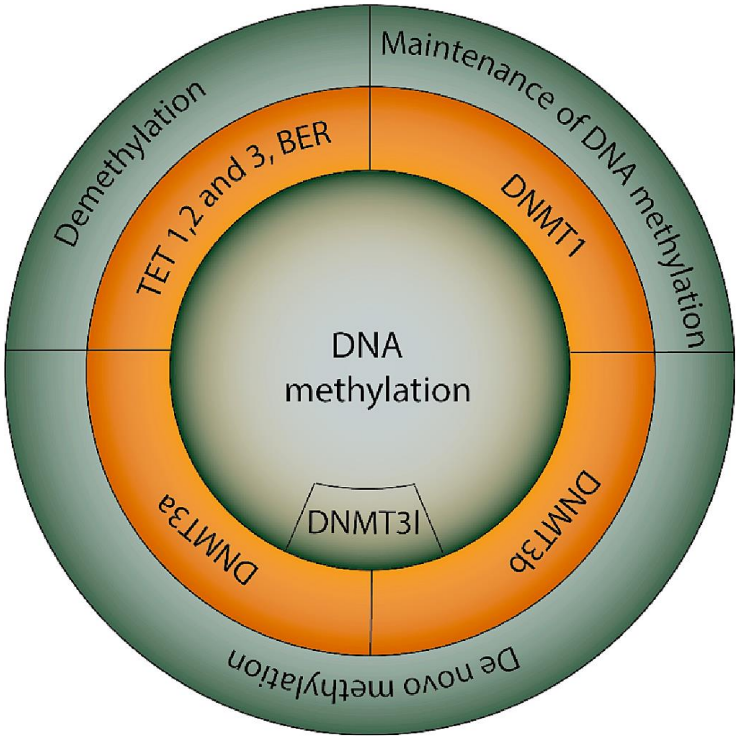
Метилирование CpG обратимо.

Существуют ферменты BER, TET1, TET2 деметилирующие метилированные сайты CpG. Схема деметилирования сложна, состоит из нескольких последовательных реакций.
Поэтому, наверное, регуляция деметилирования сложнее

Эпигенетические часы

У людей и др. млекопитающих изменения статуса метилирования зависят от возраста. По отобранным паттернам метилирования CpG были придуманы эпигенетические часы биологического возраста человека
(Horvath 2013a; Levine et al. 2018) Часы Horvath основаны на определении метилирования 353 определенных сайтов CpG в геномах людей.
Они были применены также к разным категориям людей, в том числе больных раком, прогерией и др. Часы могут быть применены для предсказания ускорения или замедления старения в зависимости от диеты, занятий спортом и др. (Quach et al. 2017).

Три процесса связанные с CpG-метилированием

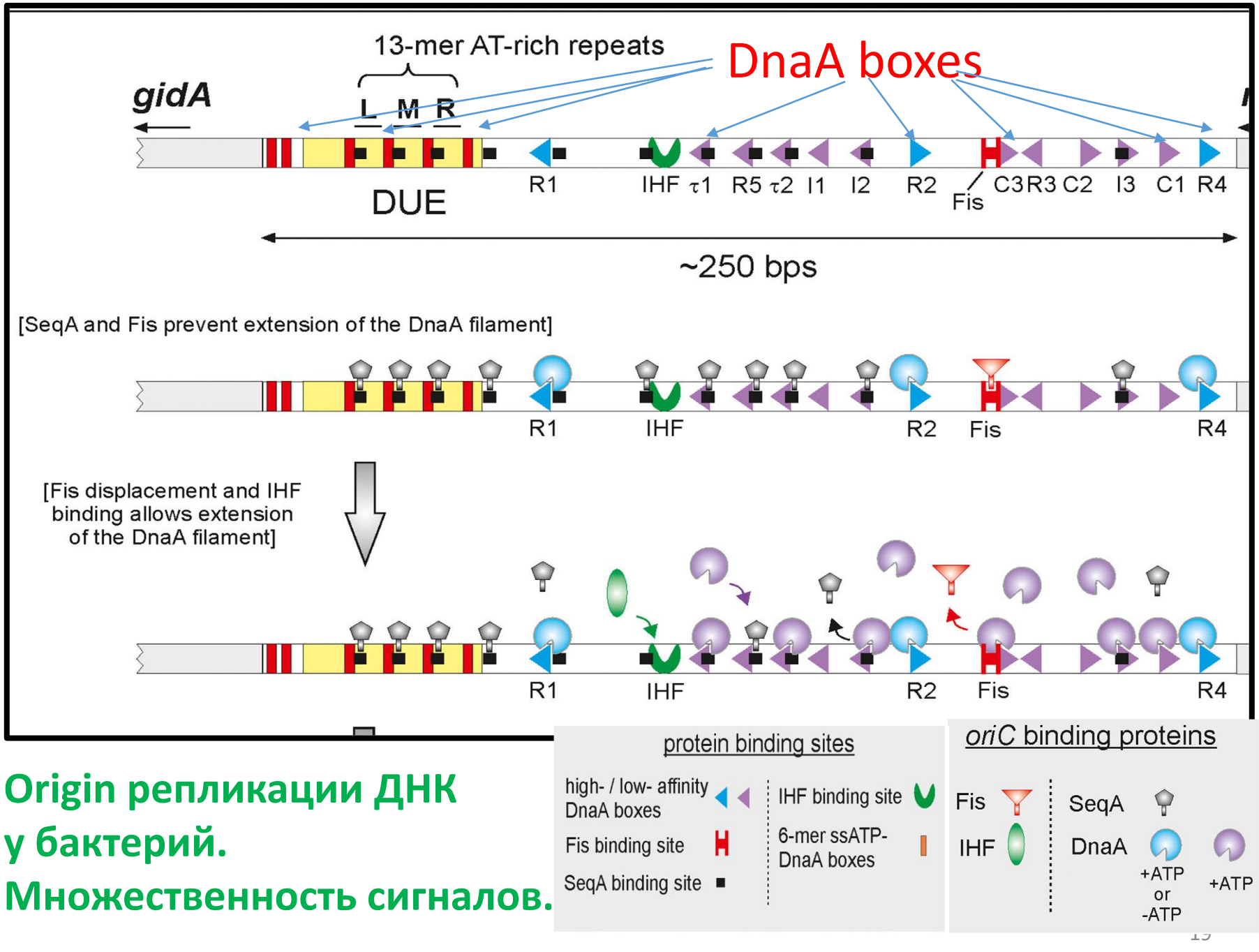


1. Метилирование CpG сайтов и паттернов CpG *de novo* для регуляции экспрессии генов (белки DNMT3a, DNMT3b)
2. Поддержка паттерна метилирования при делении клеток (DNMT1)
3. Деметилирование CpG – участвую несколько белков (BER, TET1, TET2). Значит, и регуляция деметилирования сложнее.

Поиск сигналов – сложная задача. Эксперимент и биоинформатика

Некоторые сигналы, закодированные последовательностью ДНК

- Старт репликации ДНК (Origin)
- Старт транскрипции ген в ДНК => матричная РНК
- Терминация транскипции
- Последовательности в промоторе перед геном узнаваемые и свзязывамые белками, регулирующими транскрипцию (факторами транскрипции).
  АКТИВАТОРЫ – способствуют экспрессии.
  РЕПРЕССОРЫ – замедляют или прекращают экспрессию гена
- Энхансеры: сигналы,связываемые регуляторами транскрипции, но расположенные далеко по последовательности от старт транскрипции, но близко в пространстве!
- в мРНК: старт трансляции белка (Shine-Dalgarno у бактерий)
- сайты метилирования ДНК
- Сигналы регуляции доступности участка ДНК для транскрипции
- И многие сотни и тысячи других



Origin репликации ДНК у бактерий. Множественность сигналов.

Пример роли метилирования для человека

Непереносимость молока (лактозы) во взрослом возрасте (Лактазная недостаточность)

Распространённость лактазной недостаточности по миру по официальной медицинской статистике стран

Чем краснее кружок, тем выше частота непереносимости. Чем синее – тем выше частота переносимости.

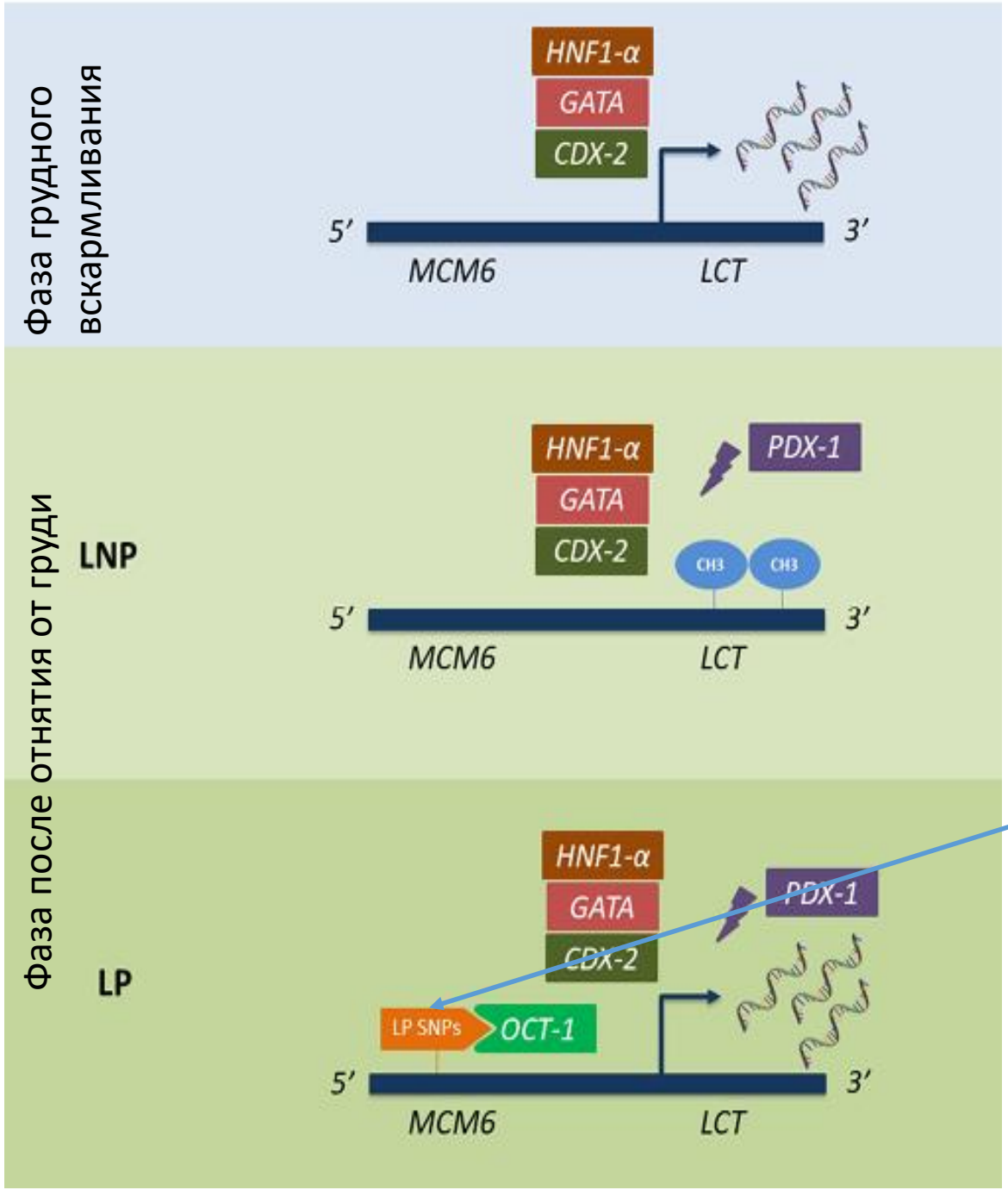
Лактазная недостаточность – НОРМА для взрослого человека!

Лактаза - ген LCT белок LCH_HUMAN

Лактаза необходима для гидролиза лактозы из молока.

Лактаза работает у грудничков, и лет до пяти.

Если не экспрессируется у взрослых, то возникают проблемы с потреблением молока.



LP – переносимость лактозы
LNP – непереносимость лактозы

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ

АКТИВАТОРЫ - способствуют экспрессии LCT
HNF1-α
GATA
CDX2
OCT-1
CDX-2: caudal type homeobox 2;
HNF1-α: hepatocyte nuclear factor 1α;
OCT-1: octamer-binding protein 1;
PDX-1: pancreatic and duodenal homeobox 1.

РЕПРЕССОРЫ – предотвращают экспрессию ген PDX-1

Голубые кружочки CH3 – метилированные ди-нуклеотиды CpG

Одно-нуклеотидные полиморфизмы (SNP)
Некоторые из полиморфизмов на оранжевом участке способствуют LP потому, что образуется сайт связывания активатора OCT-1.

Нетривиальность в том, что этот сайт находится за 14 тыс. п.н. до LCT.
Такое называется ЭНХАНСЕРОМ. Влияние ТФ на экспрессию связано с образованием петли ДНК

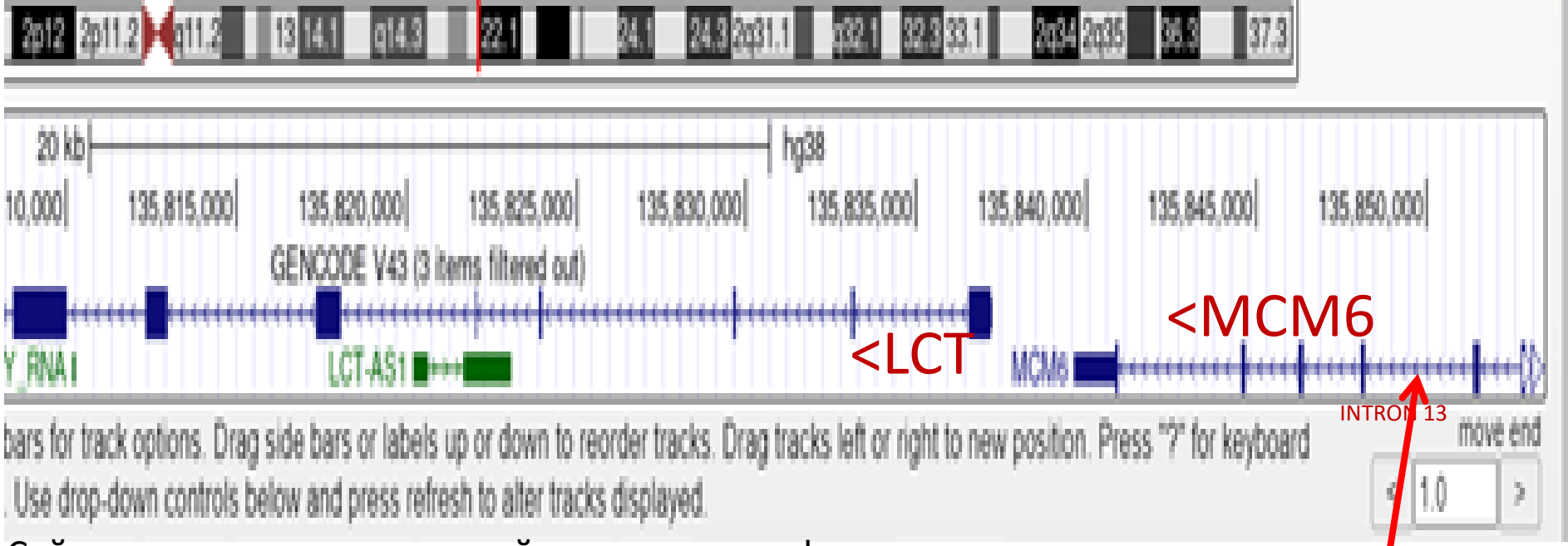
Anguita-Ruiz A et al., Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. Nutrients. 2020

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ
АКТИВАТОРЫ - способствуют экспрессии LCT
HNF1-α
GATA
CDX2
OCT-1

РЕПРЕССОРЫ – предотвращают экспрессию гена
PDX-1

Голубые кружочки CH3 –
метилированные ди-нуклеотиды CpG

LP SNPs different LP-associated alleles described in MCM6,
and responsible for binding to OCT-1,
are represented in orange



Сайленсеры и энхансеры – сайты связывания факторов транскрипции, удалённые на значительное расстояние от старта транскрипции

Позиция 13910 п.н. до старта транскрипции гена лактозы LCT. В сайленсере (гипотеза) гена LCT

T – переносимость лактозы у взрослого

C – непереносимость лактозы у взрослого (гомозигота)

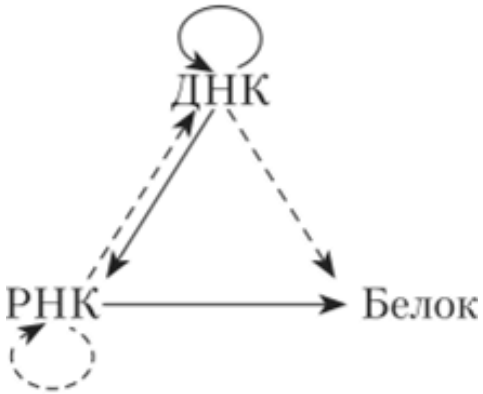
Hanson HE, Liebl AL. The Mutagenic Consequences of DNA Methylation within and across Generations. Epigenomes. 2022

Olds and Sibley, Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element, 2003

II. hTERT Теломераза – обратная транскриптаза

Зачем нужна клетке и как её используют раковые клетки. Мишень для терапии многих видов рака.

1. ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПТАЗА (RT)



Такой рисунок называют “Треугольником Крика” хотя он его не рисовал(((

2. Кому и зачем нужна обратная транскрипция: РНК => ДНК?

- Некоторым РНК вирусам, например, ВИЧ. Для размножения РНК ВИЧ попадает в клетку. В клетке ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПТАЗА вируса делает из своей РНК цепочку ДНК. дц.ДНК проникает в ядро и другой вирусный белок встраивает эту дцДНК в геном хозяина.
- Бактериям и археям для размножения “эгоистичных” элементов и для защиты от фагов (ретроны)
- Молекулярным биологам для секвенирования РНК
- У нас, эукариот,
  - Теломераза участвует в репликации хромосом
  - Для эгоистичных ретротранспозонов

3. Происхождение обратной транскриптазы RT- reverse transcriptase

- Есть во всех ветвях жизни
- Можно предположить, что она была у гипотетического общего предка живого – LUCA
- Хотя, у неё нет ОДНОЙ ПОНЯТНОЙ биологической роли. Часто она является мобильным эгоистичным генетическим элементом (прокариоты, эукариоты).
- “У живого всё лишнее приобретает новую роль” (И.М.Гельфанд) – теломераза, вирусы, ретроны.
- Кто у кого заимствовал RT – тёмная история
- Опубликованы спекуляции, что при возникновении эукариот RT имели важную роль
- На будущее – работа для эволюционистов, биоинформатиков и др.)))

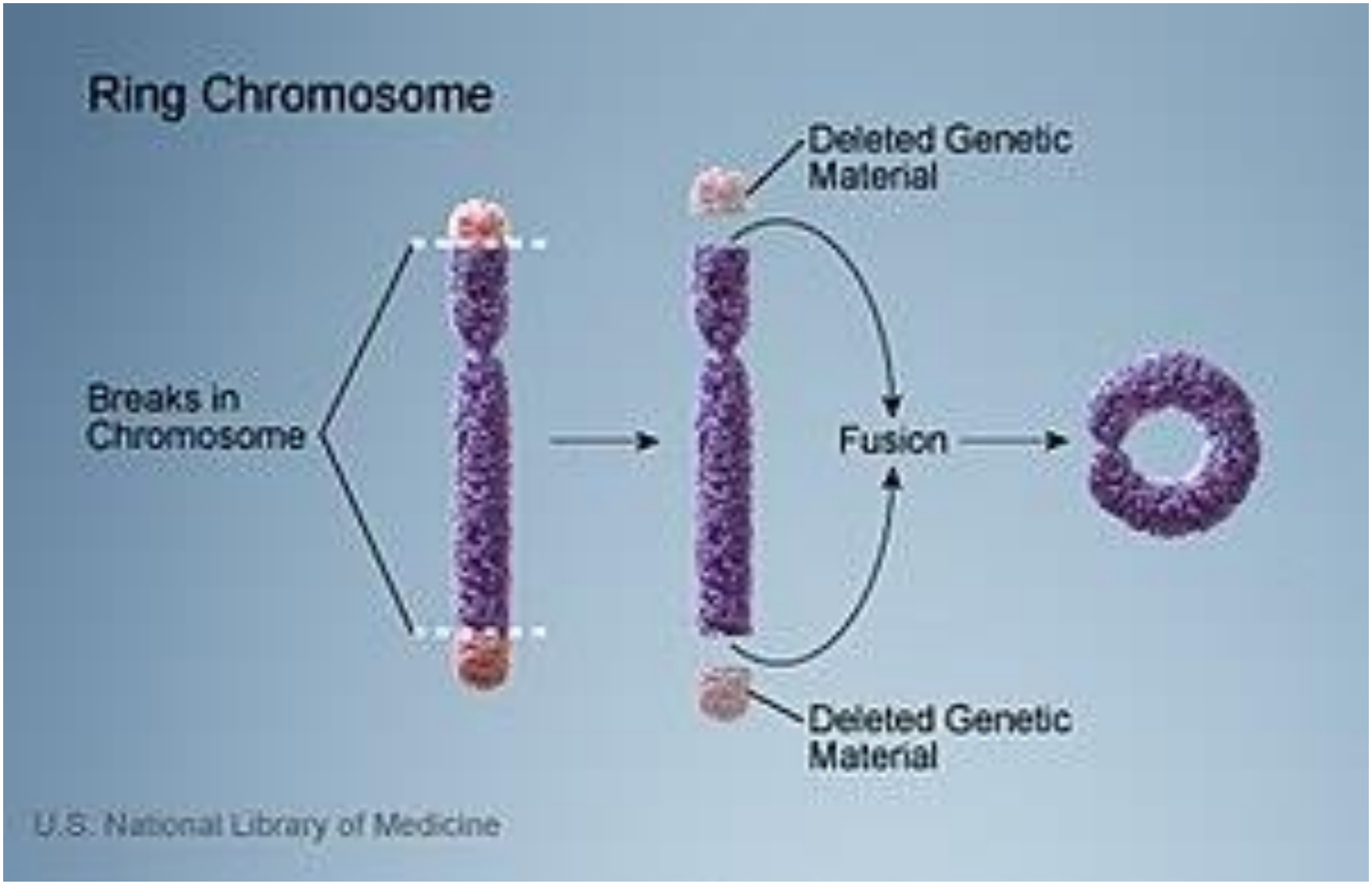
сравнить последовательности консервативных участков RT

4. У эукариот (нас) хромосомы все линейные

- Точно?
- НЕТ – это биология.
- У людей бывают кольцевые хромосомы, произошедшие из обычных хромосом!!!
- Вызывают патологии

Не говоря о том, что ДНК митохондрий кольцевая.
Митохондрии произошли в результате симбиоза с хозяином – предком эукариот.

Образование кольцевых хромосом



Кольцевые хромосомы человека (RC)

- Редкая патология человека. Среди новорожденных по оценкам 1/50,000. Ежегодно ставится примерно 2 800 диагнозов по миру.
- RC синдром проявляется врождёнными тяжелыми аномалиями, отставанием в развитии, включая интеллектуальное, невозможность иметь детей.
- Тем не менее, у отдельных пациентов из проанализированных 207 с доказанной кольцевой хромосомой, почти нормальное развитие. Тяжёлая патология установлена у 20% пациентов.
  У трех пациентов диагноз поставлен в возрасте 40-50 лет.

- По оценкам, диагноз поставлен у 1% от людей с такой патологией.

УДИВИТЕЛЬНА УСТОЙЧИВОСТЬ ЖИВЫХ СИСТЕМ к казалось бы, КРИТИЧЕСКИМ ПЕРЕСТРОЙКАМ ГЕНОМНОЙ ДНК!!!

Очень редко крутые перестройки полезны и сохраняются в эволюции

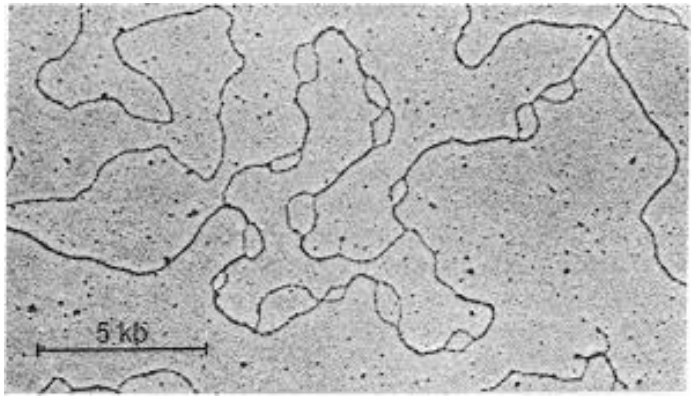
Li P et al., The past, present, and future for constitutional ring chromosomes: A report of the international consortium for human ring chromosomes. HGG Adv. 2022

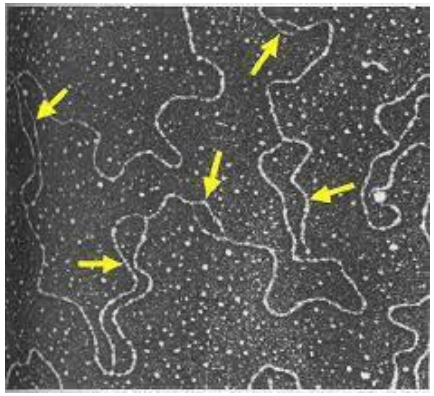
5. РЕПЛИКАЦИЯ линейной хромосомы

1) Для деления клетки необходима репликация (удвоение) всех ДНК (хромосом) в ядре клетки

2) В хромосоме имеются от сотен до тысяч сигналов начала репликации (Ori)
Это необходимо для ускорения репликации. Про покраску столбов вдоль шоссе

3) Когда клетке надо делиться, дцДНК во множестве Ori раскручивают белки пре-репликативного комплекса. Электронные микрофотографии:



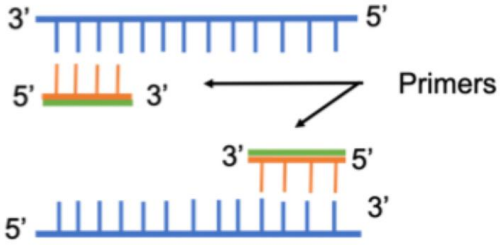


4) К каждой оцДНК получившейгося пузыря (bubble) полимеразы достраивают комплементарную цепочку в обе стороны. **Две проблемы**

i) полимеразы могут достраивать растущую цепь ДНК только с 3’ конца (закон химии)

ii) могут достраивать, но не могут начать в произвольном месте оцДНК.

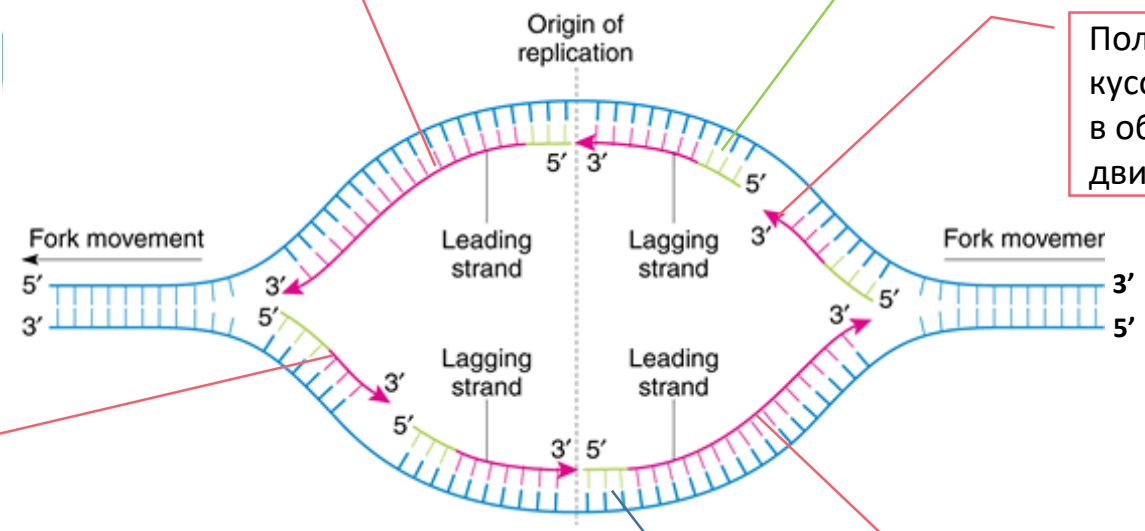
Им для начала необходим РНК или ДНК “праймер”:



Репликация в одном пузыре

Полимераза работает непрерывно

Светло зелёные – это РНК праймеры, которые вставляет белок праймаза



Полимераза удлиняет цепочку кусочками (фрагменты Оказаки) в обратную сторону против движения вилки

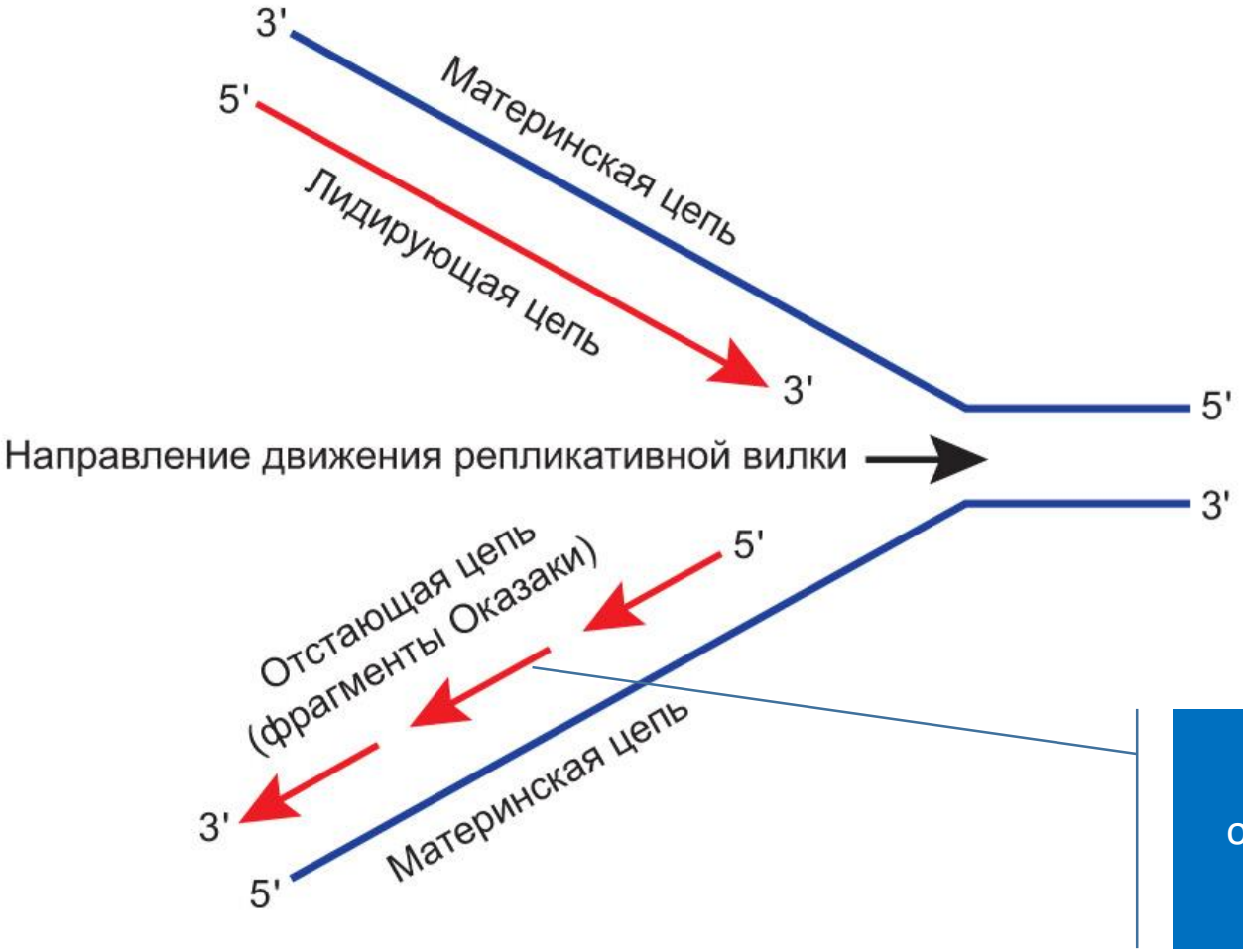
Полимераза удлиняет цепочку кусочками (фрагменты Оказаки) в обратную сторону против движения вилки

Ещё одна полимераза соединяет разрывы между фрагментами

Полимераза работает непрерывно

Полимеразы высоко специализированы. На каждое новое дело – свой тип полимеразы

Расширение пузыря (на рис направо)



у эукариот — обычно 100—200 нуклеотидов

Рис. 16.5. Схема наращивания дочерних цепей ДНК в процессе репликации

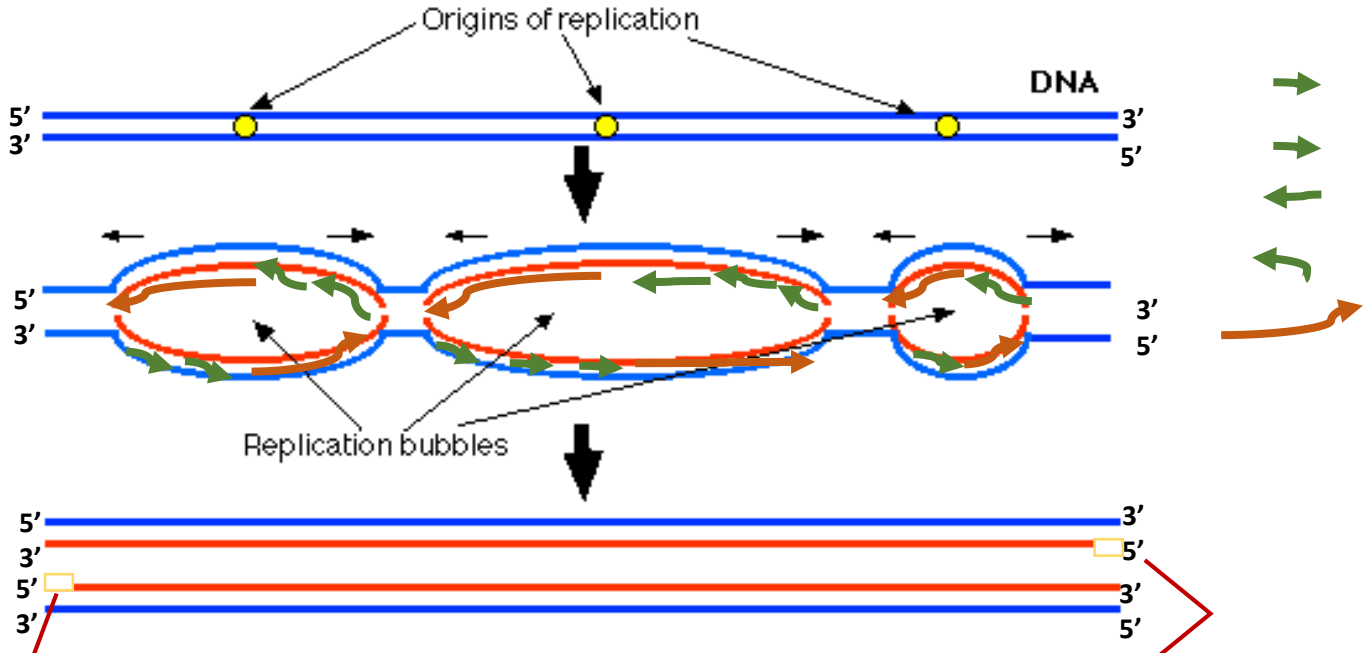
В итоге пузыри расширяются пока не сливаются.

Разрывы между фрагментами на стыке пузырей закрываются теми же полимеразами, что склеивают фрагменты Оказаки

Коричневые стрелки – непрерывная репликация (вплоть до слияния со встречным пузырем)

Зелёные стрелки – фрагменты Оказаки, направленные против расширения пузыря

Черные стрелки – направление расширения пузыря



Репликация линейной хромосомы.

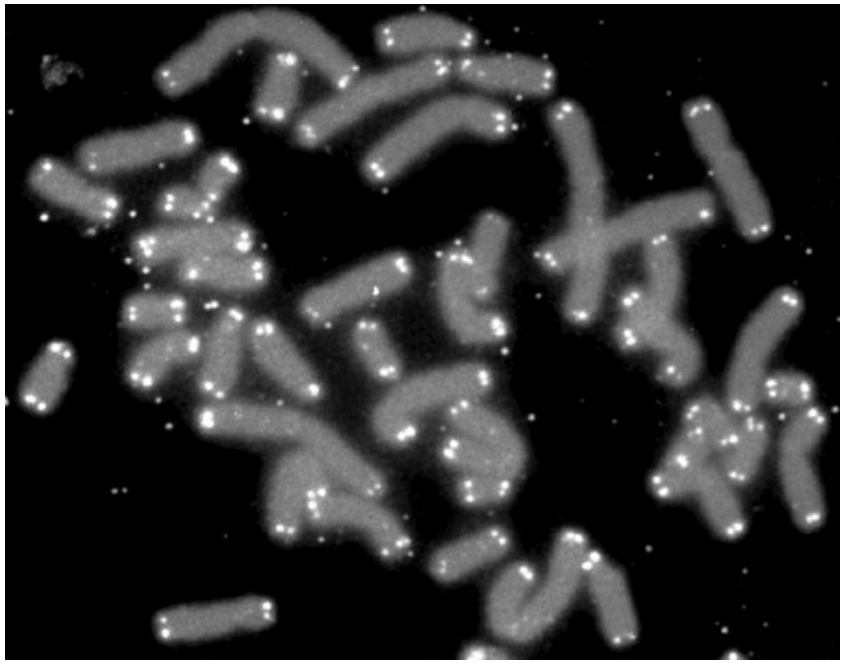
- Для 3’ концов обеих материнских цепочек не хватает места для РНК пріймера!!! Они достаиваются против расширения пузыря как фраменты Оказаки.
- Поэтому Репликаза – комплекс белков, удваивающий ДНК хромосомы, – не в состоянии реплицировать “один к одному” концы линейной хромосомы.
- В результате ДНК хромосомы укорачивается примерно на несколько десятков п.н. на одно деление
- Укорочение ДНК грозит гибелью клетки. Дойдёт до урезания генов и кранты клетке
- В эволюции эукариот нашелся выход.
  Для восстановления длины ДНК была приспособлена обратная транскриптаза TERT.
  Из головы не придумаешь как))) (А.М. Оловников придумал)
- Изобретение в эволюции простое по задумке и сложное по реализации.
- TE в слове TERT от Telomerase, RT – Reverse Transcriptase.

6. Теломеры и теломераза

- У позвоночных конец ДНК хромосомы состоит из десятков, сотен, тысяч повторов 6и нуклеотидов:

  5’….. **TTAGGG** TTAGGG TTAGGG TTAGGG 3’

- У других классов (например, насекомых) тоже есть повторы, но последовательность другая



Теломеры представлены яркими пятнами на концах каждой хромосомы на микрофотографии.
Как такое фото получить.

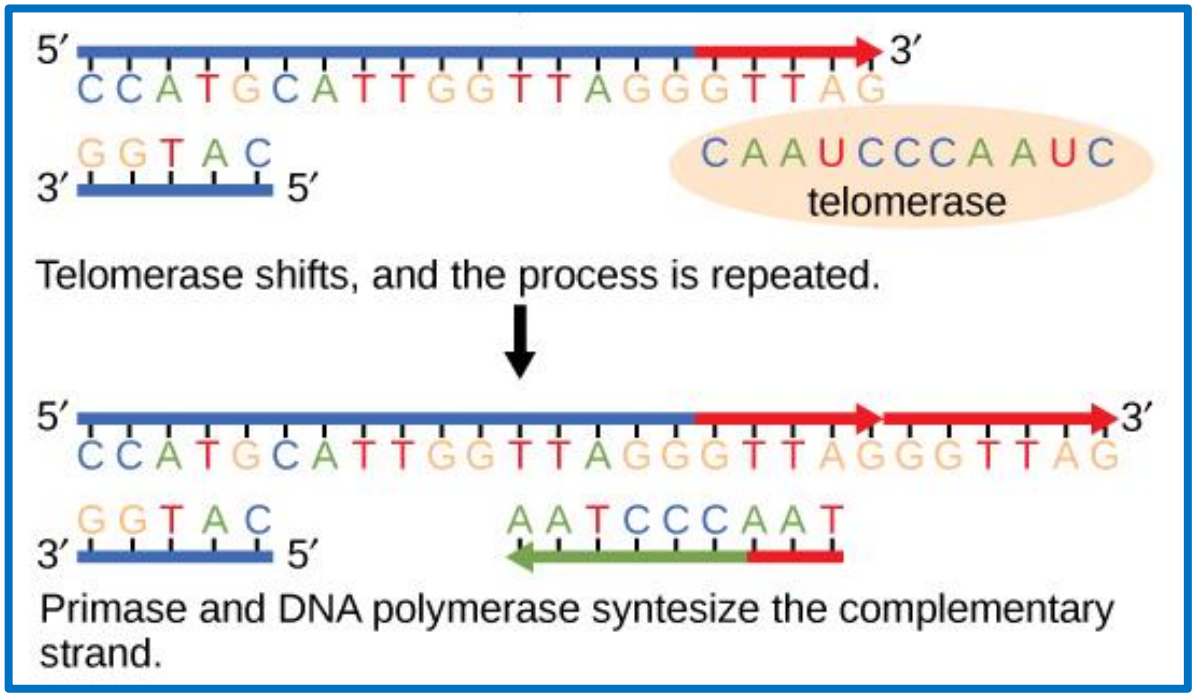
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Telomere_caps.gif

Теломеры и теломераза

- Лидирующая цепочка ДНК достраивается до конца
- Отстающая цепочка ДНК не может быть достроена до конца, так как нет места для фрагмента Оказаки. Остаются 75 – 300 нуклеотидов в состоянии оцДНК
- Теломераза достраивает 3’ конец отстающей цепи для того, чтобы образовался участок одноцепочечной материнской цепи, достаточный для праймера и фагмента Оказаки
- Для достройки, белок TERT связан с РНК TERC, в которой есть участок комплементарный последовательности теломера.

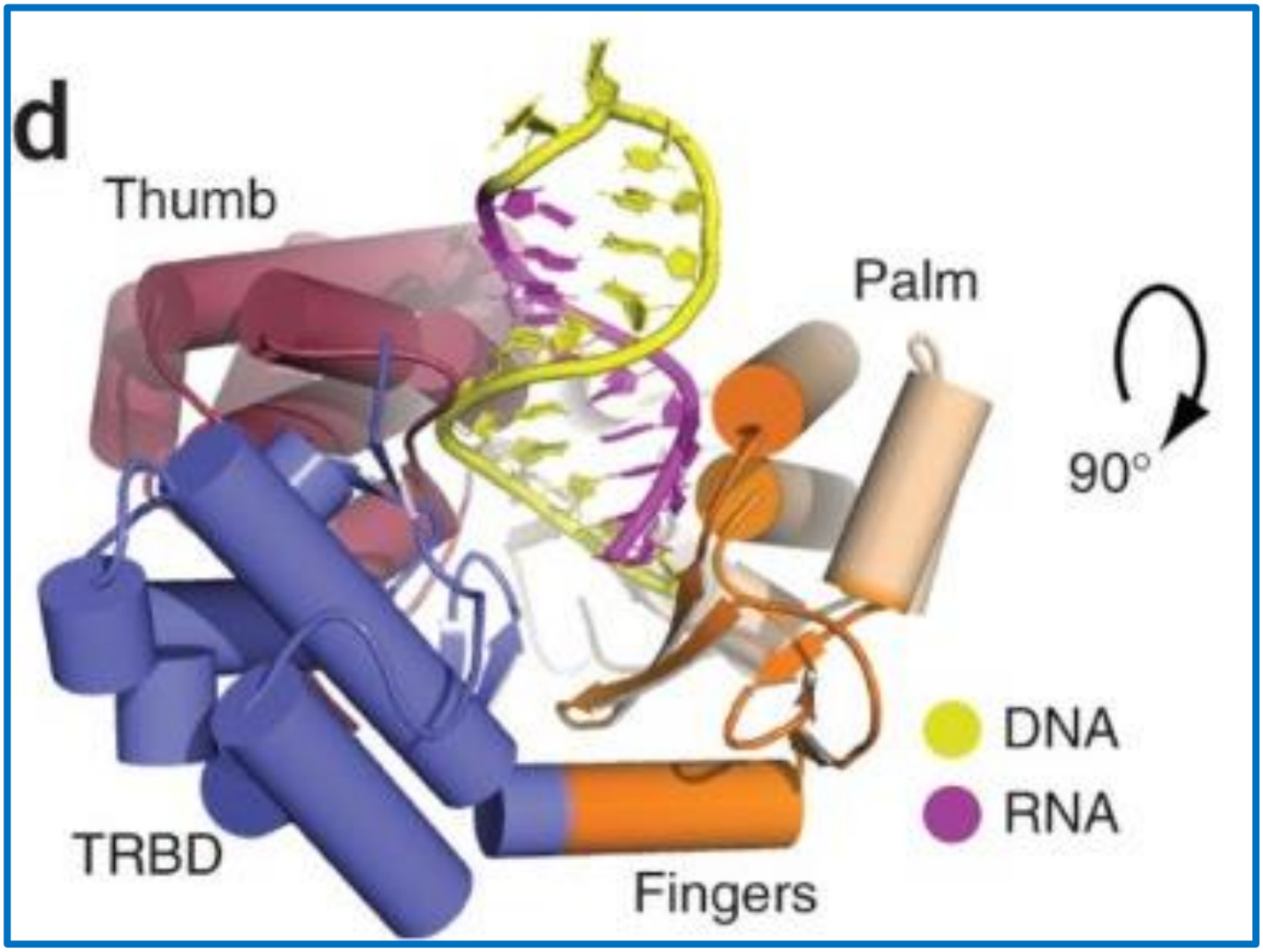
Теломер TTAGGGTTAGGGTTAGGG
TERC ……. AAUCCCAAUC . . ….. (451 нукл)

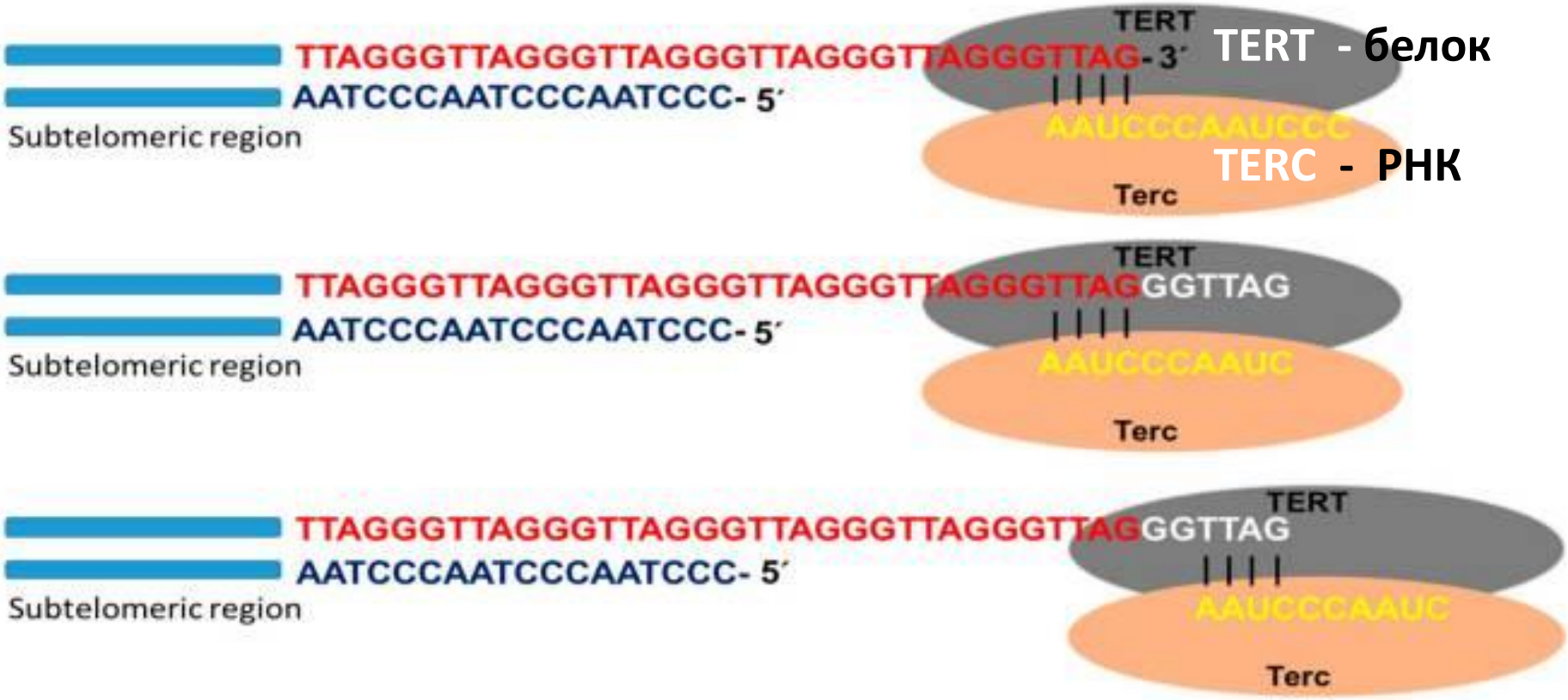
U- урацил, заменяющий Т в РНК



https://openstax.org/books/biology/pages/14-5-dna-replication-in-eukaryotes?query=Telomeres&target=%7B%22index%22%3A0%2C%22type%22%3A%22search%22%7D#fs-id1318769

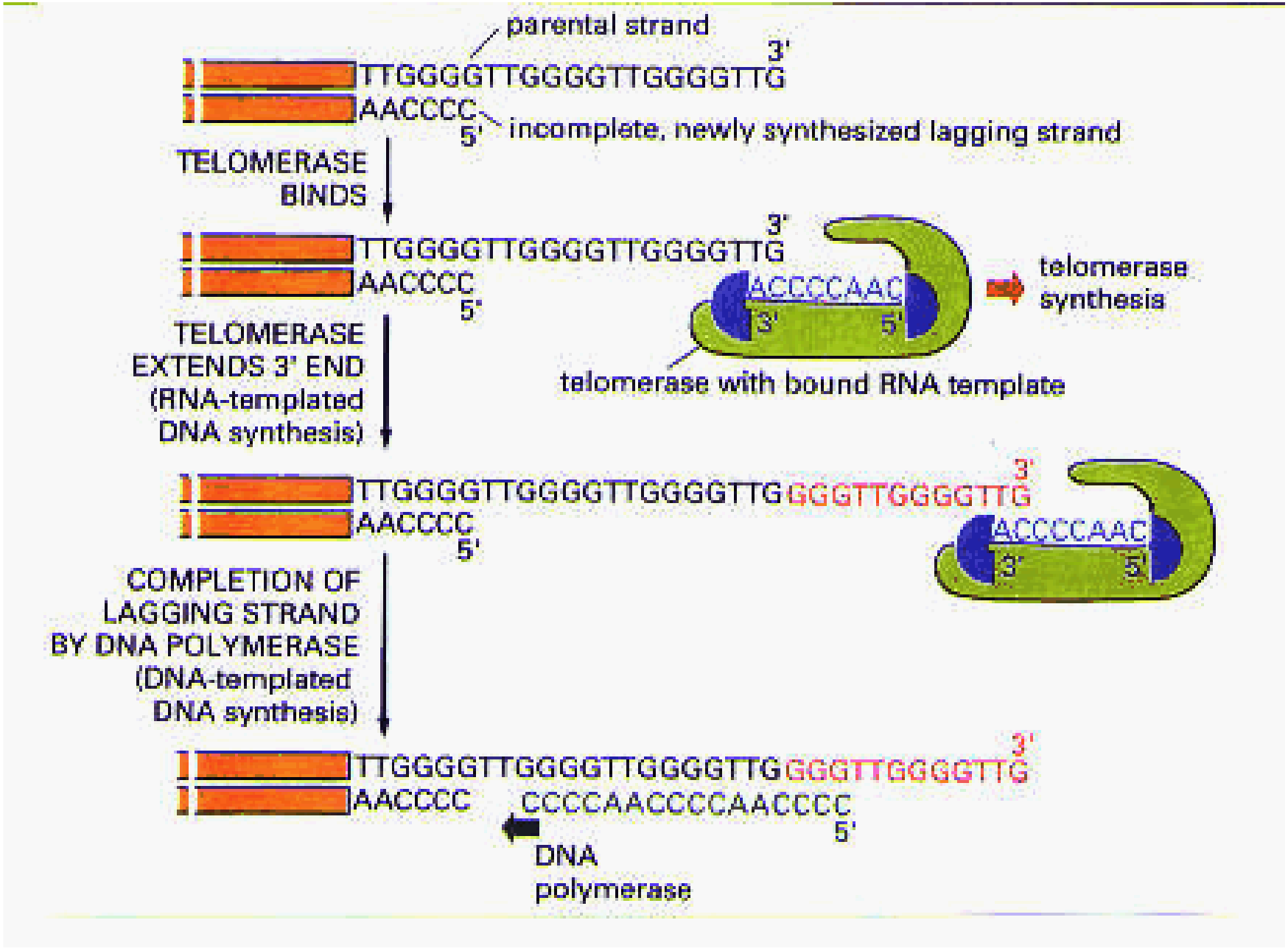
3D структура TERT с РНК и ДНК известна





de Bardet et al. Cell Immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention. BioTech (Basel). 2023

Здесь альтернативная посл. теломеров из опухолевых клеток



Существование механизма, компенсирующего укорочение теломер (теломеразы), было предсказано в 1973 году А. М. Оловниковым.

Теломераза является обратной транскриптазой, причём с ней связана особая молекула РНК, которая используется в качестве матрицы для обратной транскрипции во время удлинения теломер.

За открытие защитных механизмов хромосом от концевой недорепликации с помощью теломер и теломеразы в 2009 году присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине австралийке, работающей в США, Элизабет Блэкбёрн, американке Кэрол Грейдер и её соотечественнику Джеку Шостаку.

7. Предел Хейфлика

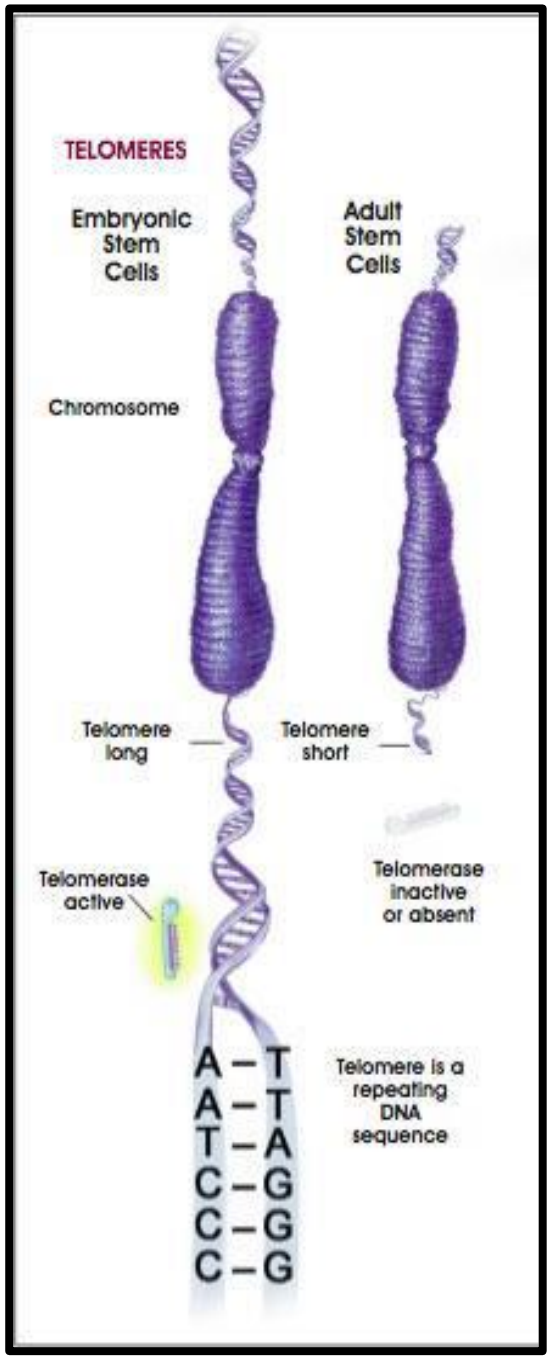
Клетки человека, делящиеся в клеточной культуре, умирают приблизительно после 50 делений и проявляют признаки старения при приближении к этой границе.(Хейфлик, 1961)

Граница Хейфлика найдена в культурах соматических клеток других многоклеточных организмов. Максимальное число делений клетки различно в зависимости от её типа и ещё сильнее различается в зависимости от вида организма, которому эта клетка принадлежит.

Граница Хейфлика связана с сокращением числа теломер. При каждом делении теломеры укорачиваются.
Теломеры человека в лимфоцитах периферической крови укорачиваются со скоростью примерно 70 пар нуклеотидов в год,
Теломеры мышей укорачиваются со скоростью 7000 пар нуклеотидов в год.

У людей теломеры длиной от 5 до 15 тысяч пар нуклеотидов,
У мышей длина теломер может составлять около 50 тысяч пар нуклеотидов.

Предел Хейфлика wiki

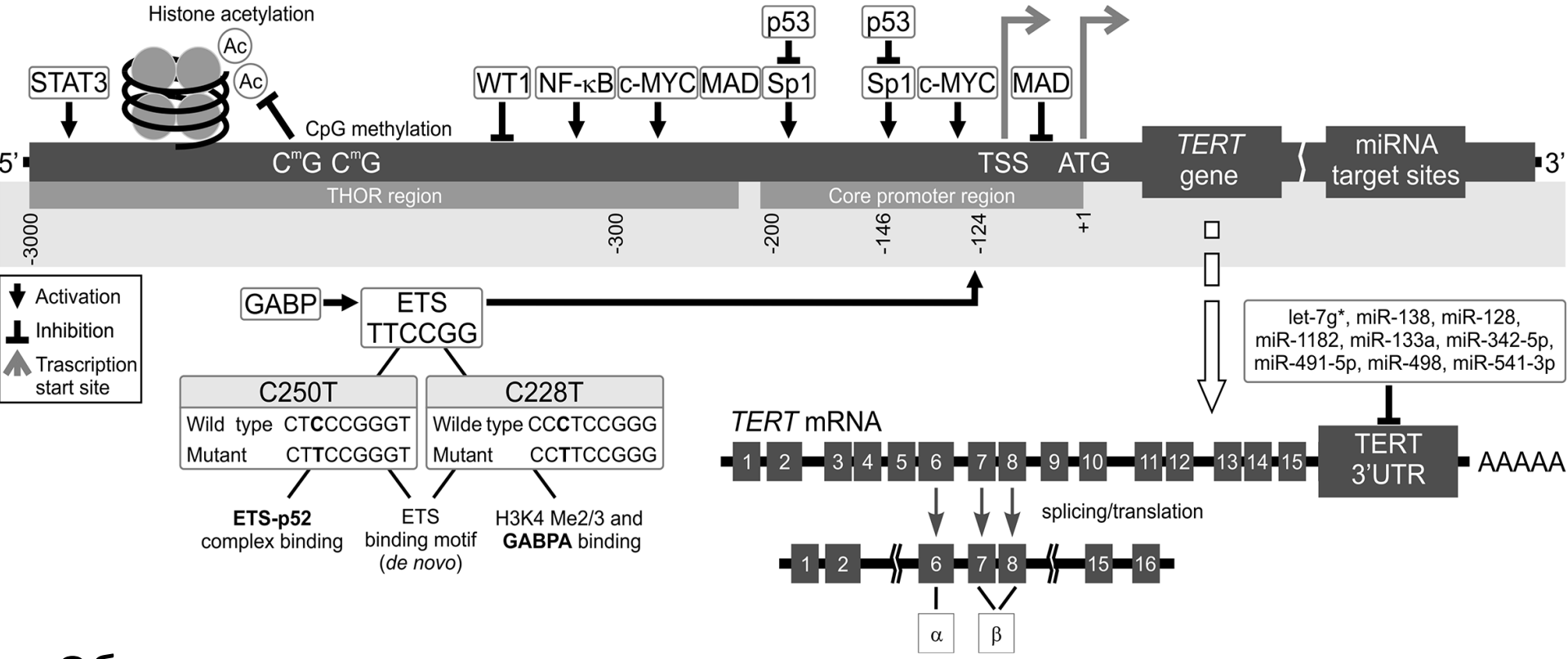


ДлинаТеломерных повторов в стволовых клетках эмбриона и взрослого человека

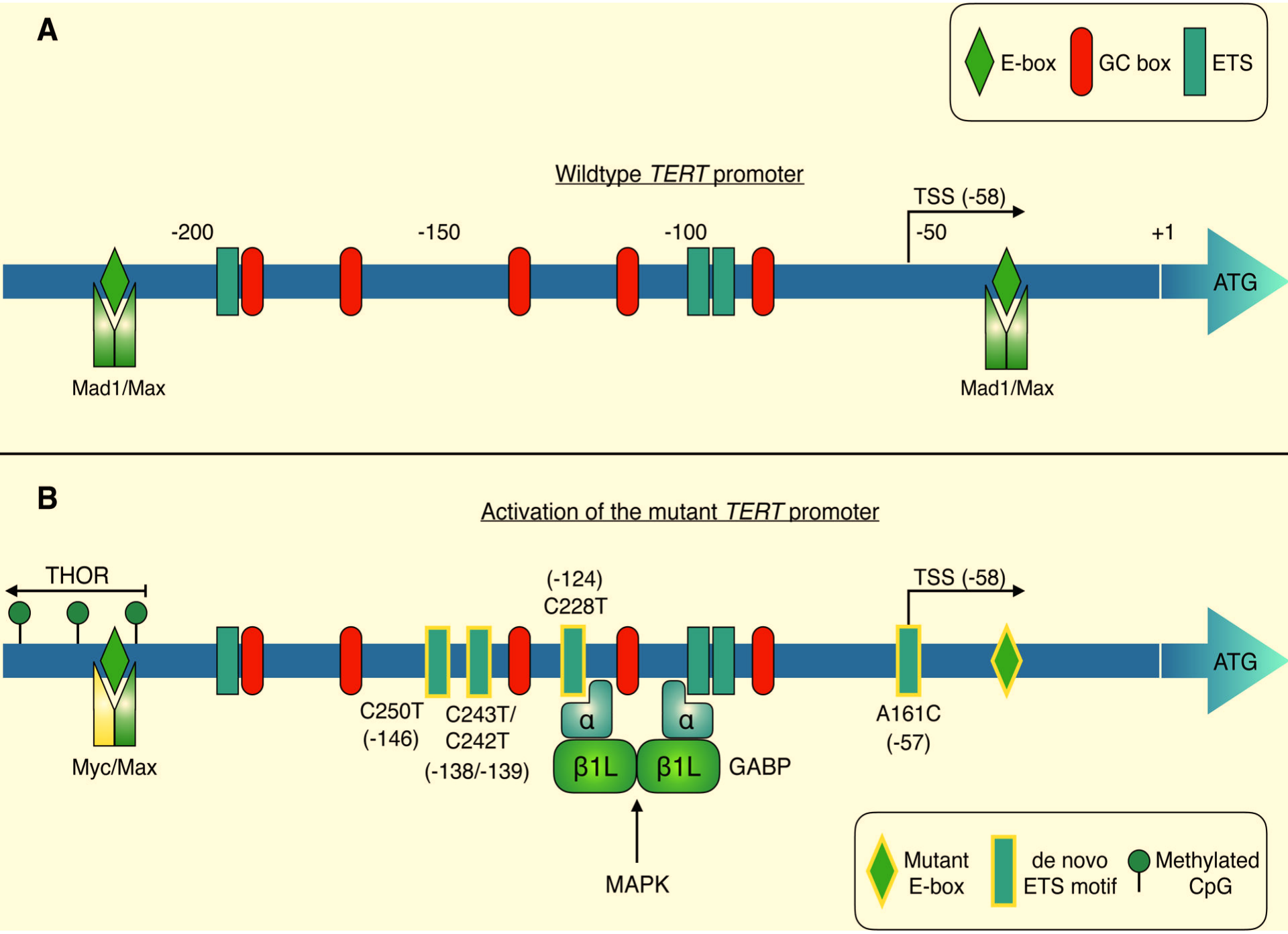
8. Регуляция экспрессии TERT

- Чем больше белков TERT в ядре клетки (экспрессия TERT выше) тем лучше восстанавливается длина теломер при делении.
- Тем дольше живет ткань и быстрее растет!
- Пример – раковые опухоли. 90% раковых опухолей имеют повышенную экспрессию TERT
- ВАЖНОСТЬ ИЗУЧЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ TERT
- Из-за жизненной важности теломеразы, в клетке её экспрессия строго регулируется на разных уровнях, тем не менее ошибки бывают.

Множественность сайтов регуляция транскрипции hTERT в промоторе – участке перед началом гена hTERT

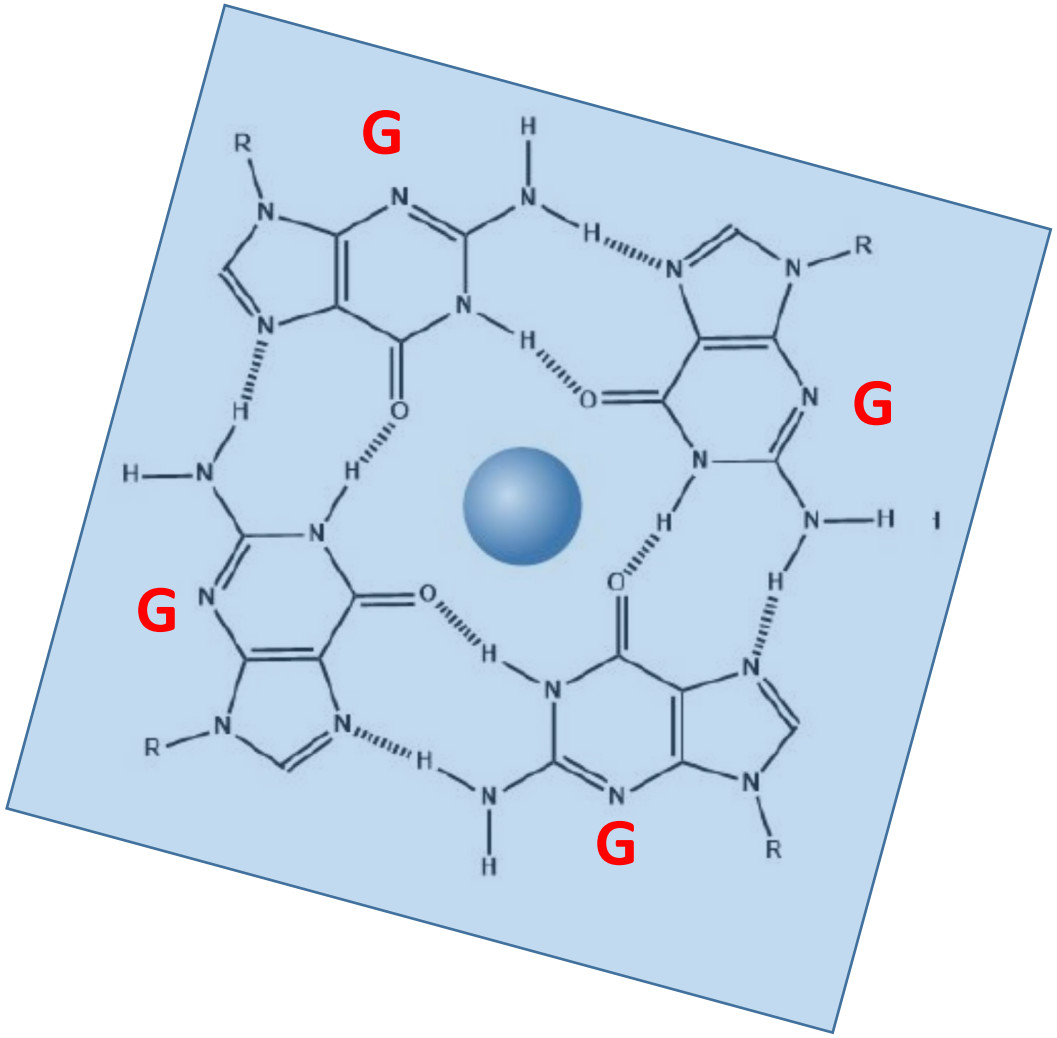


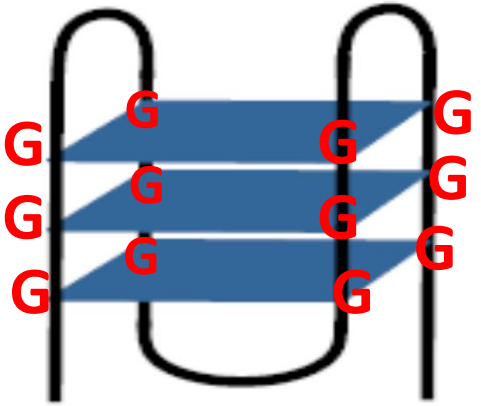
- Области промотора:
  - Ядро – место посадки полимераз для транскрипции - 200п.н.
  - Проксимальная часть – места связывания многочисленных регуляторов транскрипции – до 400 п.н.
  - Дистальная – область метилирования влияющего на транскрипцию – до 1000 п.н.


A
E-box
GC box
ETS
Wildtype TERT promoter
TSS (-58)
-200
-150
-100
-50
+1
ATG
Mad1/Max
Mad1/Max
B
Activation of the mutant TERT promoter
THOR
(-124)
C228T
TSS (-58)
ATG
C250T
(-146)
C243T/
C242T
(-138/-139)
α
α
β1L
β1L
GABP
A161C
(-57)
Myc/Max
MAPK
Mutant
E-box
de novo
ETS motif
Methylated
CpG

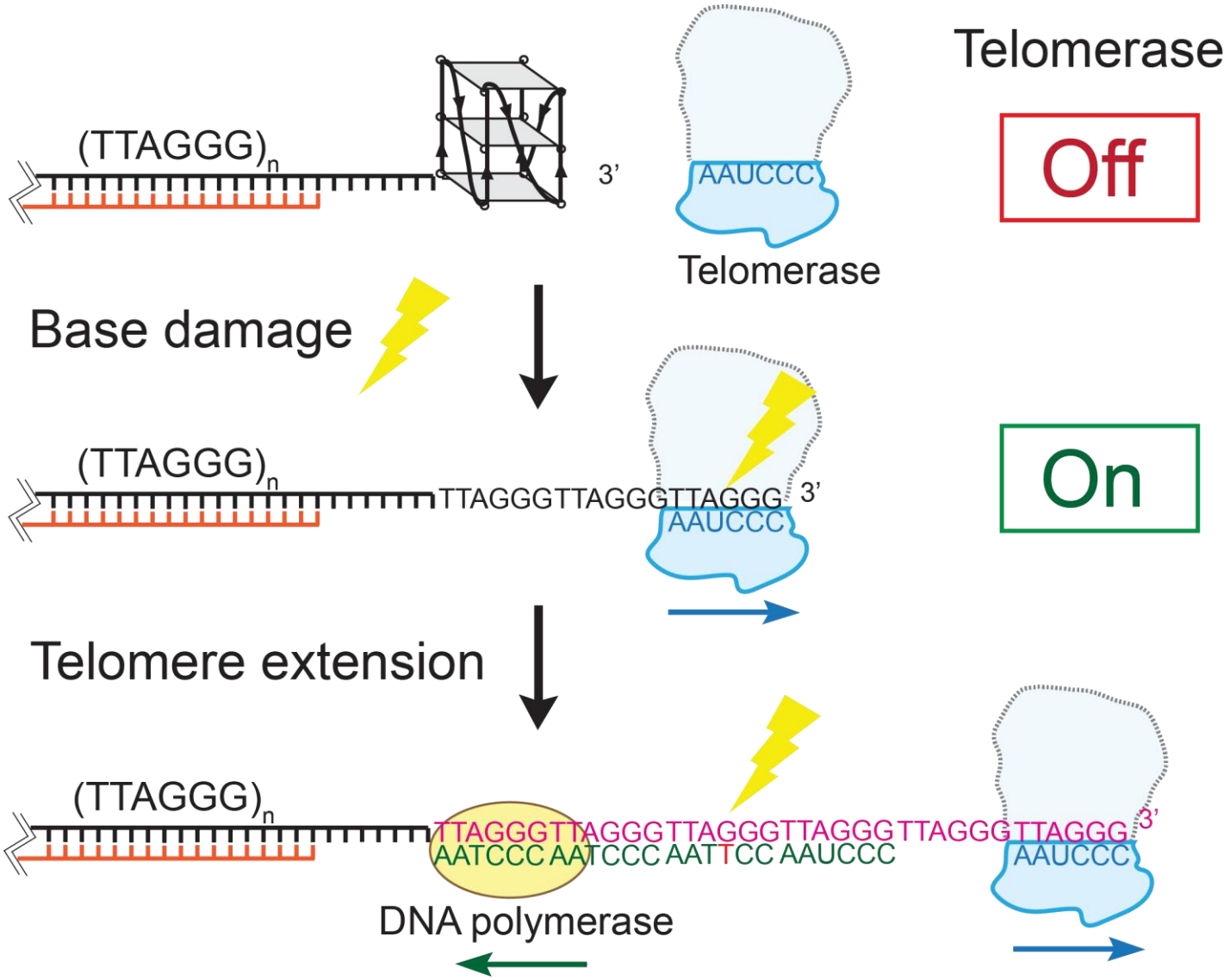
Потенциально, G-квадруплексы могут образовываться в теломерах

5’….. TTA**GGG** TTA**GGG** TTA**GGG** TTA**GGG** 3’

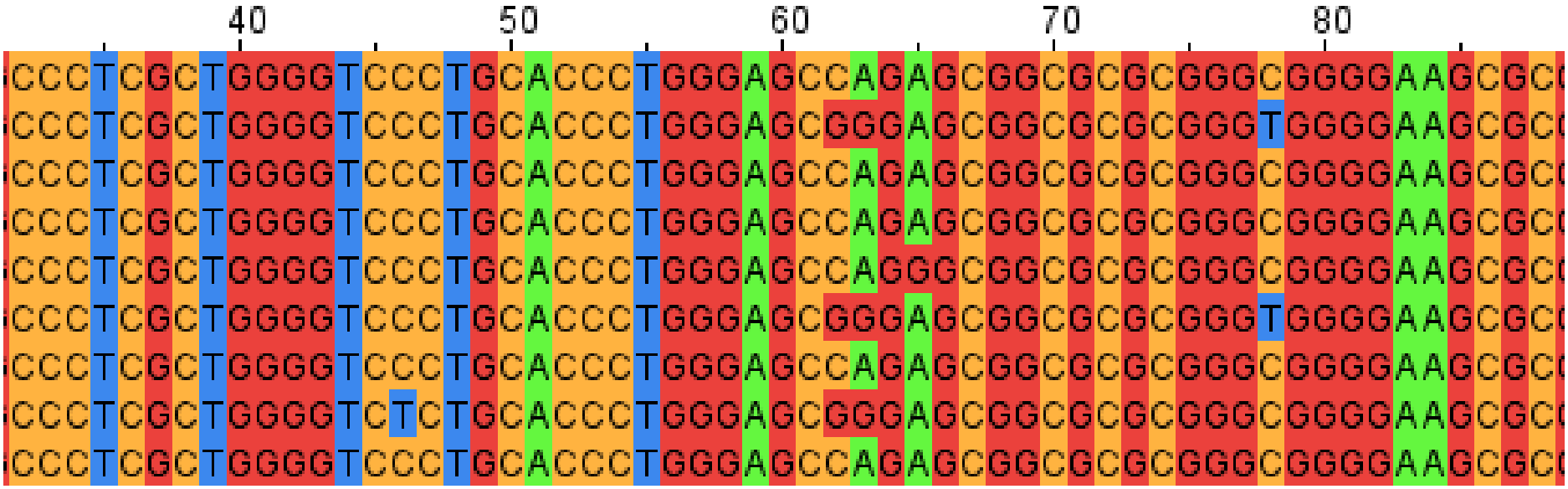




Регуляция активности TERT в теломерных повторах



G-квадруплексы могут образовываться в промоторах TERT. Их можно предсказывать по последовательности



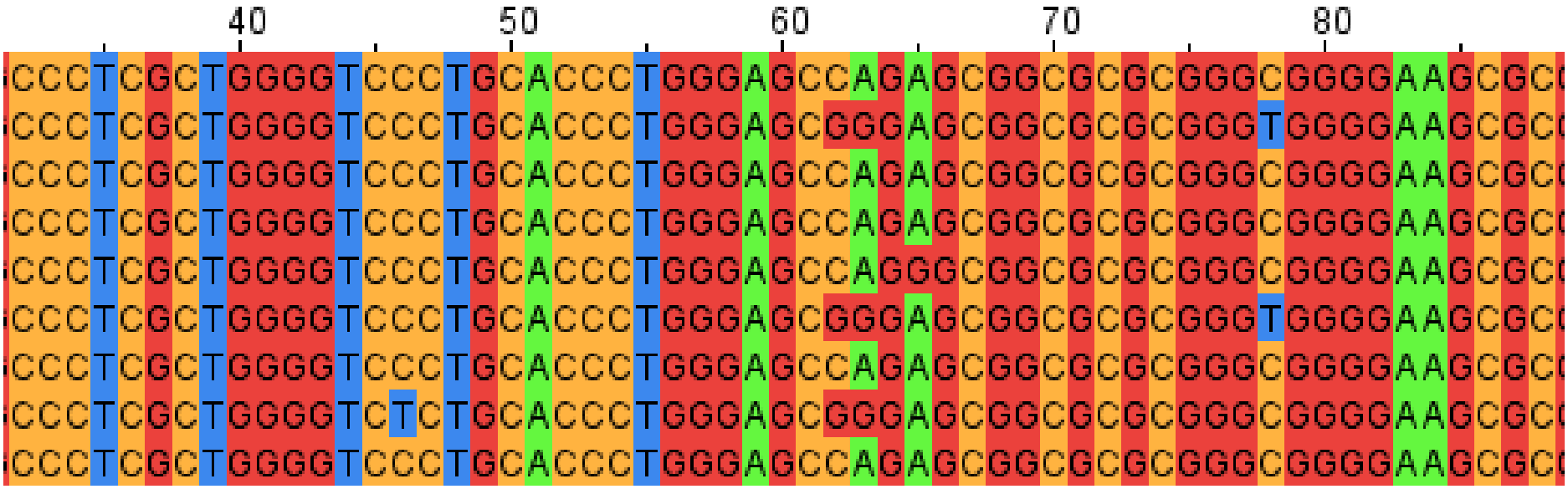
Четыре G-тракта по три гуанина G (красные) могут образовать G-квадруплекс.

G-квадруплекс в ядрах промотора у 9 обезъян, включая человека.

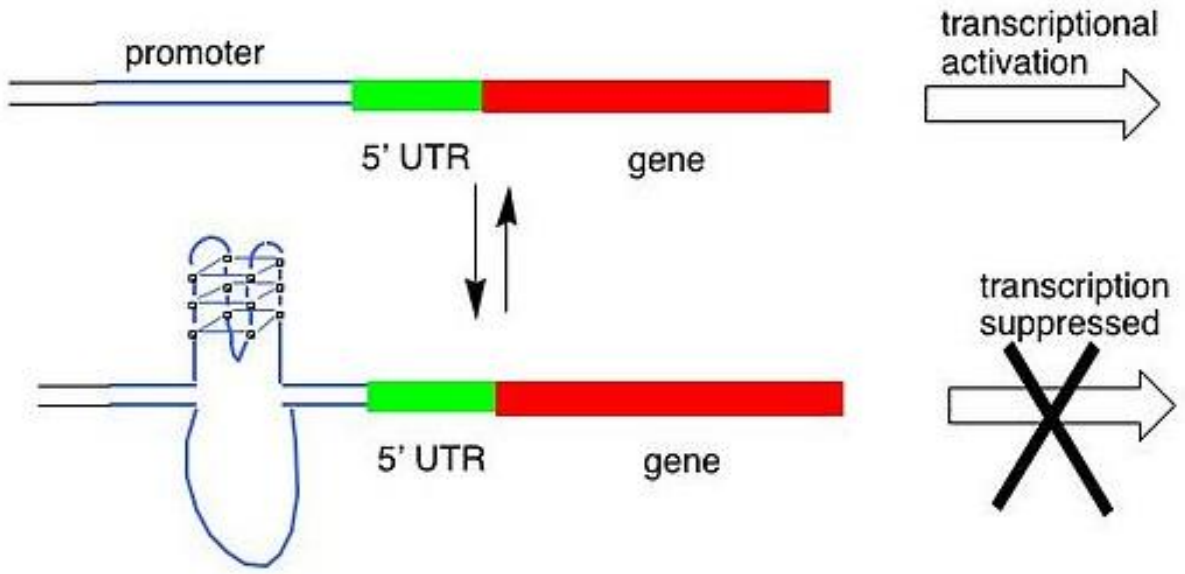
Консервативность G-квадруплекса свидетельствует об их важности

Паттерн для поиска G-квадруплеса

GGG.{1,7}GGG.{1,7}GGG.{1,7}GGG



G-квадруплексы могут регулируют транскрипцию гена



Проблема в регуляции образования G-квадруплекса.
Образовние G-квадруплексов в промоторе hTERT подтверждено экспериментально М.Э. Зверева с соавт. НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ

Предложение – стабилизировать образование G-квадруплекса малой РНК, комплементарной свободной цепи ДНК. В процессе…

9. Возраст клеток человека

- Дольше всего в человеческом организме живут клетки той области коры головного мозга, которая «отвечает» за зрение. Их возраст равен возрасту человека.
- По современным исследованиям, мышцы сердца полностью обновляются за 20 лет.
- ткани кишечника без учёта эпителия, то средний их возраст составит 15-16 лет.
- короткое существование у клеток эпителия желудка и кишечника - до 5 дней. Быстрый цикл обновления связан с воздействием желудочного сока, желчи и пищеварительных ферментов
- Клетки крови меняются каждые несколько месяцев.
- Эпидермис, поверхностный защитный слой кожи, обновляется каждые 2 недели. Новые клетки растут в нижнем слое кожного покрова и постепенно вытесняют старые.
- Обновление гепатоцитов занимает от 300 до 500 дней

10. hTERT как мишень терапии онкологических заболеваний

- Условием неограниченного роста раковой опухоли является неограниченное деление раковых клеток.
- Это достигается тем, что в 90% случаев раковых клеток из разных типов рака поддерживается активность гена hTERT: полноценных теломераз в раковой клетке достаточно для восстановления числа теломерных повторов в хромосомах после деления раковой клетки.
- Уровень TERT в соматических клетках взрослого низкий, они делятся редко.
- Перспектива.
  - При медикаментозном снижении активности TERT можно ожидать прекращение роста раковых опухолей и их деградацию.
  - И можно надеяться на отсутствие выраженных побочных эффектов
  - Потенциально такая терапия может иметь эффект при многих видах рака.
- Путь надежд и разочарований долог. Но он уже начат.

Перспективы терапии рака нацеленной на TERT

- Снижение активности TERT может иметь эффект на большинстве форм рака
- Уровень TERT в соматических клетках взрослого низкий, и можно надеяться на отсутствие выраженных побочных эффектов

Цитата из публикации в Oncogene 2020

Telomere maintenance via telomerase reactivation is a nearly universal hallmark of cancer cells which enables replicative immortality. In contrast, telomerase activity is silenced in most adult somatic cells. Thus, telomerase represents an attractive target for highly selective cancer therapeutics.

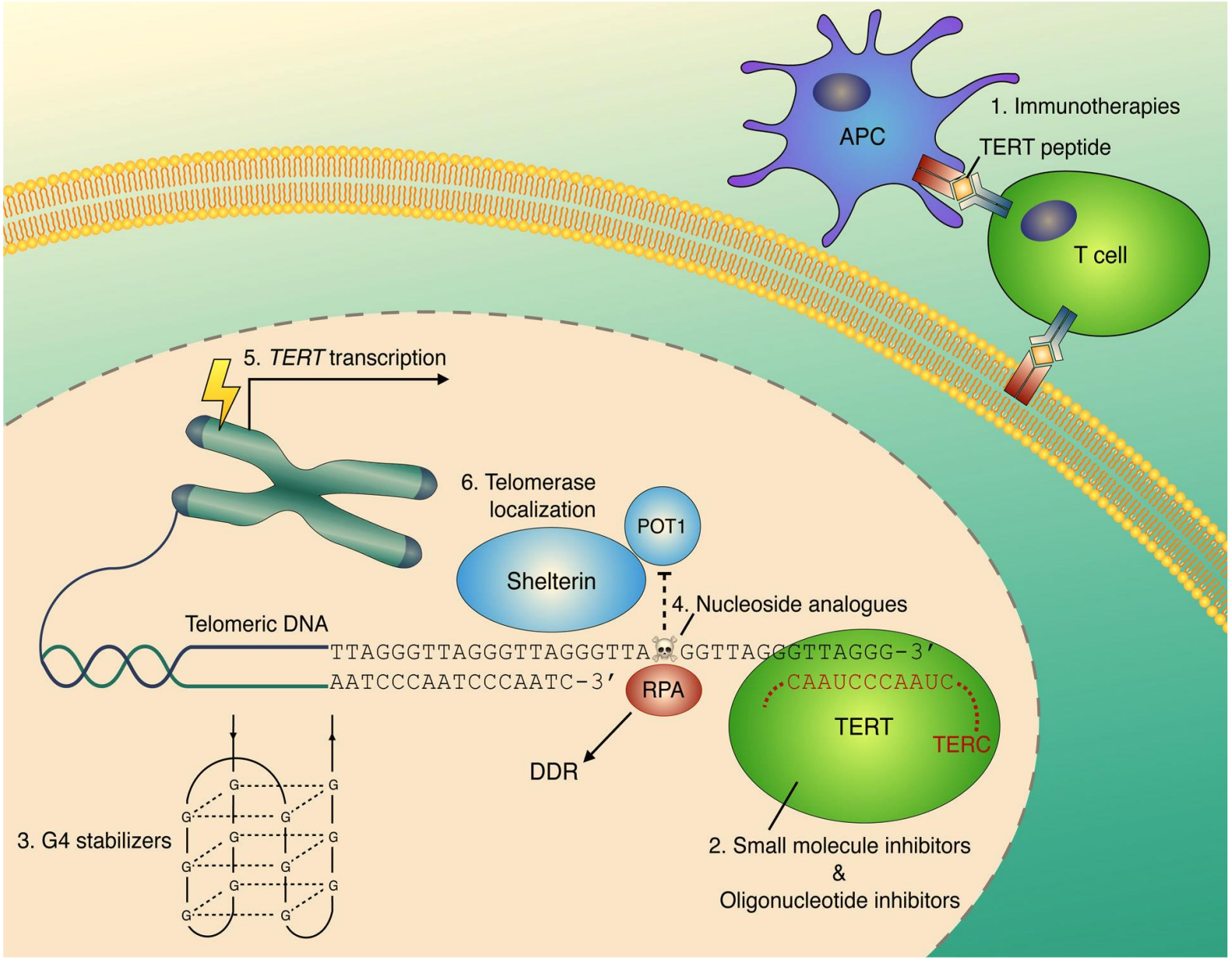
Although much work remains to be done, effective strategies targeting telomerase will have a transformative impact for cancer therapy and the prospect of clinically effective drugs is boosted by recent advances in structural models of human telomerase

Furthermore, upregulation of telomerase is a nearly universal feature across diverse cancer types, suggesting that strategies targeting telomerase could have broad therapeutic applicability

Tumour cells are therefore expected to possess a limited capacity for resistance to telomerase therapies. Accordingly, significant effort has been directed towards developing drugs that target telomerase for cancer therapy.

Guterres AN, Villanueva J. Targeting telomerase for cancer therapy. *Oncogene*. 2020

На каком уровне можно ингибировать активность hTERT



Anticancer strategies targeting telomerase. Clinical trials

- **Иммунотерапия**
  Numerous TERT peptide vaccines have progressed to early stage clinical trials. For example, the TERT peptide vaccine UV1 elicited an immune response in 86% of patients with metastatic hormone-naive prostate cancer enrolled in a phase I/IIa trial [64] However, immune responses to TERT vaccines have proved insufficient to control disease progression
- **Вирусная терапия**
  Telomelysin is an oncolytic adenovirus designed to selectively replicate in cancer cells via E1 gene expression under the control of the hTERT promoter. FDA-approved drug

Hescheler DA et al., Targeted Therapy for Adrenocortical Carcinoma: A Genomic-Based Search for Available and Emerging Options. Cancers (Basel). 2022

Telomelysin was tested as Targeted Therapy for Adrenocortical Carcinoma

Ellingsen EB, Bjørheim J, Gaudernack G. Therapeutic cancer vaccination against telomerase: clinical developments in melanoma. Curr Opin Oncol. 2023

"A phase II randomized clinical trial evaluating an hTERT-targeting vaccine in combination with nivolumab and ipilimumab is ongoing in frontline advanced melanoma, with read-out expected during 2023."

Eckburg A, Dein J, Berei J, Schrank Z, Puri N. Oligonucleotides and microRNAs Targeting Telomerase Subunits in Cancer Therapy. Cancers (Basel). 2020

Telomerase provides cancer cells with replicative immortality, and its overexpression serves as a near-universal marker of cancer. Anti-cancer therapeutics targeting telomerase have garnered interest as possible alternatives to chemotherapy and radiotherapy
Telomerase activity is relatively quiescent in most normal tissue;
however, studies have found it to be significantly increased in up to 90% of malignancies

Baerlocher GM et al., Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. N Engl J Med. 2015

Применялся в клиническом исследовании на 18 пациентах с Тромбоцитемией – повышенным уровнем тромбоцитов в крови. У всех был положительный отклик. Побочка 1 – 2 степеней была со стороны печени.

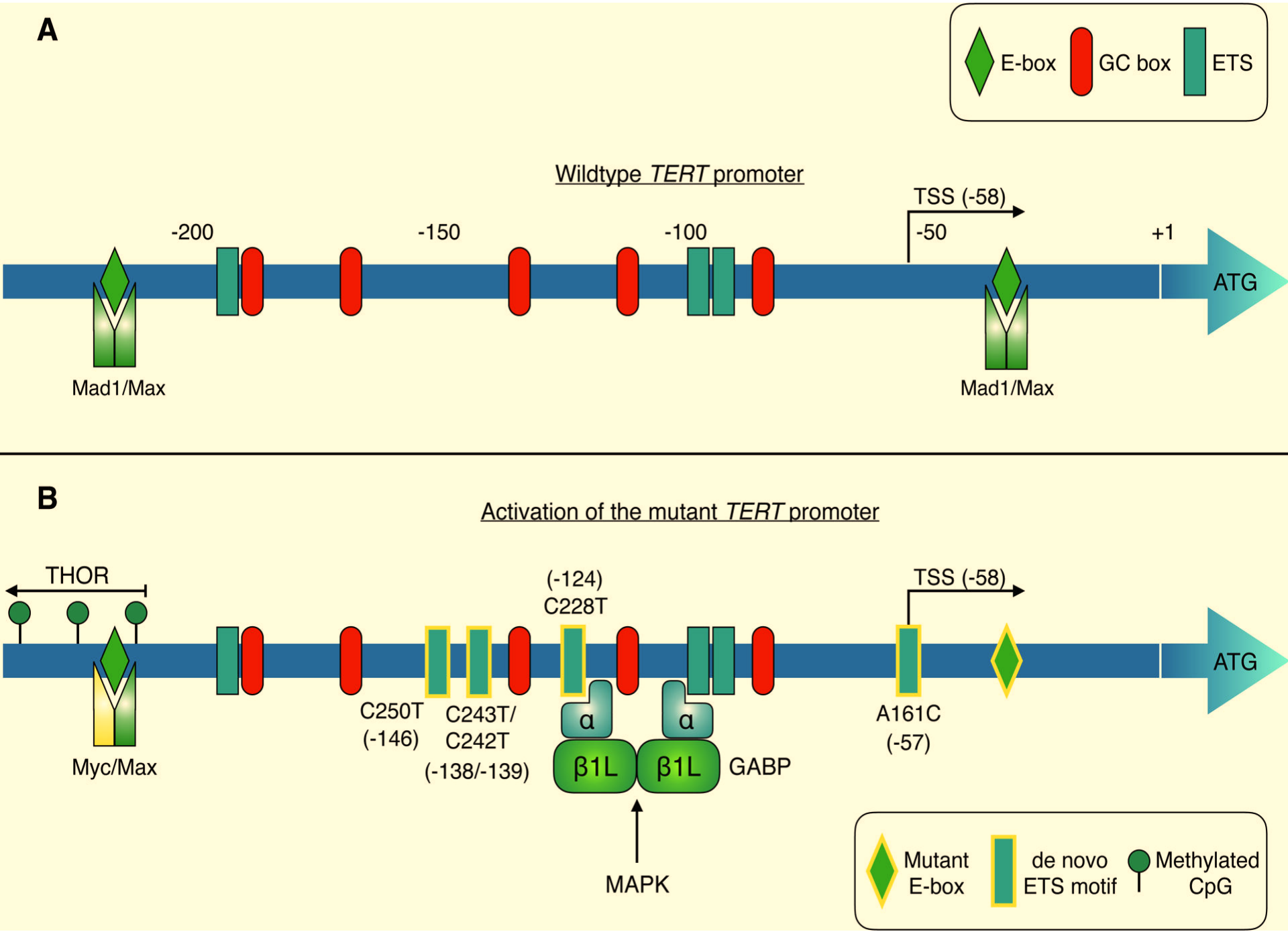
Anticancer strategies targeting telomerase

- **Oligonucleotide inhibitors**
  Only a single direct telomerase inhibitor **imetelstat** has progressed to clinical trials. Clinical trials on patients with solid tumours uncovered dose-limiting toxicity due to haematological side effects
- **Small molecule inhibitors**
  Small molecule inhibitors such as BIBR1532 have generated promising preclinical results.
- **G-quadruplex stabilizers in telomers**
  the G-quadruplex stabilizer telomestatin suppresses telomerase activity and tumour growth in leukaemia xenograft models [84]. However, affinity for non-telomeric G-quadruplexes may lead to unacceptable toxicity. Although G-quadruplex motifs are most over-represented at telomeres, computational analysis predicts potential G-quadruplex formation at over 300,000 sites in the human genome [86].
- **Nucleoside analogues**
  Numerous TERT TERT vaccines have proved insufficient to control disease progression

Anticancer strategies targeting telomerase

- **Targeting *TERT* gene expression** TERT expression is regulated by an atypical GC-rich promoter that harbours multiple binding sites for SP1 and c-Myc transcription factors, but lacks TATA and CAAT boxes (Figure 2). Approximately 15–25% of cancers appear to reactivate telomerase via mutations in the TERT promoter that generate de novo binding motifs for ETS transcription factors.

- **Regulation of telomerase localization and catalysis**


A
E-box
GC box
ETS
Wildtype TERT promoter
TSS (-58)
-200
-150
-100
-50
+1
ATG
Mad1/Max
Mad1/Max
B
Activation of the mutant TERT promoter
THOR
(-124)
C228T
TSS (-58)
ATG
C250T
(-146)
C243T/
C242T
(-138/-139)
α
α
β1L
β1L
GABP
A161C
(-57)
Myc/Max
MAPK
Mutant
E-box
de novo
ETS motif
Methylated
CpG

ЗАДАНИЯ

1. Ответить на вопросы, связанные с репликацией ДНК эукариот

- Что такое праймер, и зачем они нужны в процессе репликации ДНК
- Объясните что нужно полимеразе для начала репликаци оцДНК
- Что такое фрагменты Оказаки при репликации ДНК?

2. Найдите и опишите три вероятных G-квадруплекса в промоторах TERT у примат

- Сегодня напишу задание подробнее
- И предложу ещё одно 3.
- Зачёт при зачёте 2 из трех

КОНЕЦ ПРЕЗЕНТАЦИИ