

ОБЗОРНЫЕ  
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.24

ПЕРСПЕКТИВЫ БОРЬБЫ СО СТАРЕНИЕМ МОЗГА: РЕДАКТИРОВАНИЕ  
ГЕНА ТЕЛОМЕРАЗЫ В НЕРВНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ *in vivo*

© 2020 г. Н. М. Немирович-Данченко<sup>1</sup>, \*, М. Ю. Ходанович<sup>1</sup>, \*\*

<sup>1</sup>Томский государственный университет, Научно-исследовательский институт  
биологии и биофизики, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: nmn-d@mail.ru

\*\*e-mail: khodanovich@mail.tsu.ru

Поступила в редакцию 12.04.2019 г.

После доработки 15.06.2019 г.

Принята к публикации 23.07.2019 г.

Возрастное укорочение теломер в нервных стволовых клетках сегодня рассматривается в качестве одного из ключевых факторов старения мозга. В связи с этим представляется перспективным поиск способов искусственного удлинения теломер в этих клетках. Подходы, основанные на усилении экспрессии теломеразы в стволовых клетках, показали свою несостоятельность из-за высокого риска возникновения раковых опухолей, неизбежно сопровождающего высокий уровень экспрессии теломеразы. Вместе с тем возможна принципиально иная стратегия повышения теломеразной активности, которая состоит в отмене альтернативного сплайсинга теломеразы. Показано, что только один из 22 сплайс-вариантов теломеразы обладает собственно теломеразной активностью, а другие варианты этого фермента способны его ингибировать и в то же время обладают канцерогенной активностью. Предлагаемая в настоящем обзоре стратегия состоит в редактировании гена теломеразы таким образом, чтобы повысить эффективность удлинения теломер за счет исключения альтернативного сплайсинга. Такой механизм усиления теломеразной активности сохранит безопасный уровень экспрессии теломеразы и исключит повышение вероятности канцерогенеза. Есть основания полагать, что редактирование гена теломеразы в нервных стволовых клетках мозга приведет к усилению нейрогенеза во взрослом мозге и к замедлению возрастных изменений в нервной деятельности. Это перспективное направление исследований в будущем может стать основой для разработки генной терапии, направленной на замедление старения мозга.

*Ключевые слова:* нейрогенез, нервные стволовые клетки, старение, теломераза, альтернативный сплайсинг, генная инженерия.

DOI: 10.31857/S0016675820040098

Мозг взрослых млекопитающих, включая человека, имеет крайне ограниченный эндогенный регенеративный потенциал. Этот потенциал, прежде всего, связывают с сохранением во взрослом возрасте нейрогенеза — процесса образования новых нейронов, их миграции, созревания и интеграции в нейрональную сеть. Нейрогенез во взрослом мозге животных и человека возможен благодаря сохранению ограниченной популяции нервных стволовых клеток (НСК) [1], его связывают с когнитивными процессами, а также с регенерацией поврежденной нервной ткани [2–12]. Значительное число научных групп во всем мире исследуют возможности регуляции нейрогенеза. Известно, что и без того скудные возможности регенерации мозга существенно снижаются с возрастом, что объясняется, в первую очередь, истощением пула нервных стволовых клеток в нейрогенных нишах [13].

Одной из вероятных причин уменьшения пула НСК в мозге может быть укорочение теломер. Укорочение теломер в стволовых клетках сегодня рассматривается в качестве одного из основных механизмов старения. Теломеры постепенно укорачиваются с каждым новым клеточным делением [14–16]. Достижение теломерами критически малой длины останавливает клеточные деления, и в дальнейшем клетка либо подвергается апоптозу, либо встает на путь клеточного старения [17–21]. Укорочение теломер компенсируется работой фермента теломеразы, которая удлиняет теломеры [22–26]. Во взрослом организме теломераза синтезируется почти исключительно в стволовых клетках, в частности — в НСК [27–32]. По этой причине средняя длина теломер в стволовых клетках выше, чем в дифференцированных [31]. Тем не менее даже в стволовых клетках уровень экспрессии гена теломеразы недостаточно

высок, чтобы полностью остановить укорочение теломер. С возрастом теломеры в стволовых клетках становятся все более короткими, что приводит к снижению регенеративной способности тканей организма. На сегодняшний день это рассматривается в качестве основного механизма старения [30, 33–36].

Показано, что процесс укорочения теломер с возрастом происходит в НСК и это ведет к нарушению нейрогенеза [37]. Кроме того, с укорочением теломер коррелирует риск развития возрастных заболеваний ЦНС, таких как болезнь Альцгеймера [38], болезнь Паркинсона [39, 40] и инсульт [41]. С другой стороны, многочисленными работами подтверждено, что воздействия, повышающие пролиферацию и выживание нейробластов, интеграцию в сеть молодых нейронов, в свою очередь, улучшают память и замедляют процесс старения мозга [42–45].

К сожалению, уже первые попытки усилить экспрессию гена теломеразы, поместив этот ген под контроль сильного промотора, привели к крайне нежелательным последствиям – развитию раковых опухолей [46–48]. Обнаруженный эффект объяснялся тем, что теломераза повышает активность группы генов, которые потенциально ведут к развитию раковой опухоли. При этом риск канцерогенеза зависит от уровня экспрессии теломеразы. Умеренный уровень экспрессии гена теломеразы, который в норме имеет место во взрослых стволовых клетках, совместим с устойчивой регуляцией клеточных делений, но повышенный уровень ведет к неадекватно интенсивной и неконтролируемой пролиферации и к возникновению рака [49–52].

Частично эту проблему удалось решить в работах с введением гена теломеразы в составе вирусов, не способных к интеграции в геном клетки [53–56]. Этот подход оказался безопасным с точки зрения канцерогенеза, поскольку ДНК вируса, не интегрированная в геном клетки, утрачивается клеткой в процессе последовательных клеточных делений. Однако вместе с исчезновением угрозы рака исчезла и возможность стабильно поддерживать длинные теломеры в делящихся стволовых клетках, поскольку в процессе клеточных делений привнесенный ген теломеразы утрачивался стволовыми клетками и их потомками. Другой подход заключался в усилении экспрессии теломеразы у онкостойчивых линий мышей [39]. Хотя этот подход был успешно реализован, он по понятным причинам имеет невысокий потенциал трансляции в клинику.

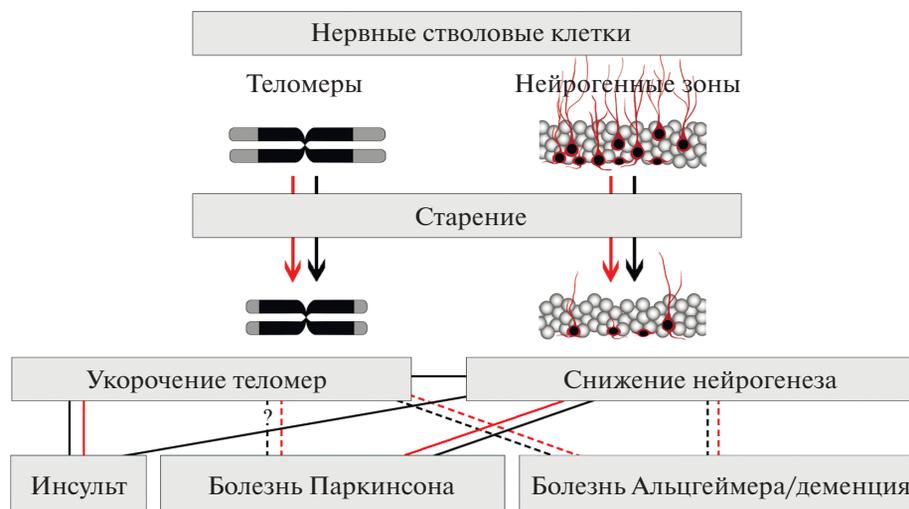
Принципиально иная стратегия, состоящая в том, чтобы повысить не общий уровень экспрессии гена теломеразы, а эффективность удлинения теломер за счет исключения альтернативного сплайсинга, предлагается в настоящей теоретиче-

ской статье. Здесь рассматриваются предпосылки возникновения этой идеи: данные о роли нейрогенеза и теломеразной активности в возрастных изменениях мозга; данные о связи теломеразной активности с канцерогенезом; результаты попыток преодолеть укорочение теломер с возрастом путем повышения уровня экспрессии теломеразы. Далее в статье описывается новый подход к решению проблемы укорочения теломер, основанный на исключении альтернативного сплайсинга теломеразы, а также современные методы генной инженерии, которые могут быть применены для этого.

## 1. УСИЛЕНИЕ НЕЙРОГЕНЕЗА ВО ВЗРОСЛОМ МОЗГЕ – СТРАТЕГИЯ, НАПРАВЛЕННАЯ НА ЗАМЕДЛЕНИЕ СТАРЕНИЯ МОЗГА

### *1.1. Нейрогенез во взрослом мозге – источник пластичности и регенерации нервной ткани*

Образование новых нейронов в мозге млекопитающих не ограничивается эмбриональным и ранним постнатальным периодом, а продолжается в течение всей жизни [1]. Во взрослом мозге сохраняются две главные нейрогенные зоны, где присутствуют НСК, – зубчатая извилина гиппокампа и субвентрикулярная зона боковых желудочков. Нейрональные предшественники, появляющиеся в зубчатой извилине, остаются в пределах этой зоны и, становясь нейронами, включаются в местную нейрональную сеть [57–59]. В отличие от них предшественники, образующиеся в субвентрикулярной зоне, мигрируют оттуда в обонятельную луковицу [59], а также, в меньшей степени, в другие зоны мозга, включающие стриатум, кору и гиппокамп [60–63]. При повреждениях мозга, таких как инсульт или черепно-мозговая травма, усиливаются пролиферация в нейрогенных зонах и миграция нейрональных предшественников в зоны повреждения [60, 64–76]. Кроме того, в самих поврежденных зонах, например в коре, могут появляться резидентные нейрональные предшественники [77–80], образующиеся, вероятно, из других типов клеток вследствие репрограммирования под влиянием их микроокружения. Однако экспериментальные исследования на моделях инсульта показали, что только небольшая часть новых нейронов, мигрирующих в зону поражения или образующихся в ней, замещает собой погибшие взрослые нейроны и интегрируется в существующие нейрональные сети [81]. При этом долговременные наблюдения свидетельствуют о дальнейшем снижении нейрогенеза и пула НСК [82]. Нейродегенеративные, демиелинизирующие и психические заболевания также влияют на нейрогенез взрослого мозга. Так, снижение нейрогенеза обнаружено в клинических исследованиях и на моделях таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера



**Рис. 1.** Взаимосвязь между укорочением теломер, снижением нейрогенеза и старением мозга. Стрелки и линии обозначают связи и корреляции, обнаруженные для мыши (черный цвет) и человека (красный цвет). Сплошными линиями обозначены твердо установленные отношения, прерывистыми — отношения, подтвержденные только частью исследований. Прерывистая линия со знаком вопроса обозначает предполагаемое отношение, которое пока не исследовано.

[83, 84], болезнь Паркинсона [85], рассеянный склероз [86] и шизофрения [87]. Схематически изменения нейрогенеза при старении и его связь с возрастными неврологическими заболеваниями представлены на рис. 1.

Хотя большинство работ, посвященных нейрогенезу во взрослом мозге, было проведено на грызунах, в ряде исследований убедительно продемонстрировано, что интенсивный нейрогенез имеет место и в мозге взрослого человека, хотя данные различных исследований противоречат друг другу. Например, Moreno-Jiménez с соавт. (2019) обнаружили тысячи молодых нейронов в гиппокампе здоровых людей в возрасте от 43 до 87 лет [84]. В то же время в другом недавнем исследовании авторам практически не удалось обнаружить молодых нейронов в гиппокампе у взрослых людей [88]. В этой связи следует подчеркнуть, что выявление молодых нейронов у человека представляет методически значительно более трудную задачу по сравнению с исследованием лабораторных животных. Это обусловлено тем, что ткани мозга человека, как правило, не проходят своевременную и достаточно качественную обработку, необходимую для сохранения антигенов, характерных для молодых нейронов. Moreno-Jiménez с соавт. (2019), а также Kempertmann с соавт. (2018) в своих работах убедительно показывают, что различия по выявляемому уровню нейрогенеза существенно зависят от деталей посмертной обработки тканей мозга, и приходят к общему заключению, что фактически очень высокий уровень нейрогенеза у человека сильно занижен во многих исследованиях, применявших менее эффективную

обработку тканей или менее избирательно подходов к первичному отбору материалов [84, 89]. Кроме гиппокампа, в мозге взрослых людей многочисленные нейроны обнаруживаются также в стриатуме, куда они, по всей видимости, мигрируют из субвентрикулярной зоны [90].

Молодые нейроны отличаются повышенной пластичностью — как физиологической (изменение функциональных свойств синапсов), так и структурной (образование новых и исчезновение старых синапсов, рост аксонов, изменение формы дендритов) [5–12]. По этой причине нейрогенез играет важную роль в процессах обучения. Обучение усиливает нейрогенез, а также повышает выживаемость и включение в сеть новых нейронов [2–4]. С другой стороны, искусственное снижение или выключение нейрогенеза различными методами (радиоактивное облучение, введение антимитотических веществ, генетическое выключение) уменьшают способность животных к обучению. Соответственно, улучшение когнитивных способностей вызывается факторами, усиливающими нейрогенез, такими как физические упражнения [42], информационно обогащенная среда [3], умеренное снижение пищевого рациона [43].

### 1.2. Возрастное ослабление нейрогенеза и старение мозга

С возрастом происходит снижение уровня нейрогенеза в мозге [43–45]. Более того, у пациентов с возрастными нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, нейрогенез снижается еще в боль-

шей степени, чем у здоровых возрастных пациентов [83–85, 91]. Это критически сказывается на функционировании мозга в связи с важной ролью молодых нейронов в регенерации ткани мозга и в обучении. Снижение способности к регенерации, а также снижение уровня пластичности являются характерными проявлениями старения мозга. С другой стороны, внешние факторы, замедляющие возрастное угасание нейрогенеза, одновременно замедляют и снижение когнитивных способностей [42–45]. Кроме того, возрастное ухудшение памяти удается замедлить и даже обратить с помощью трансплантации искусственно полученных нервных стволовых клеток в стареющий мозг [44, 92]. Но этот подход имеет серьезные недостатки, такие как высокая инвазивность и риск развития раковой опухоли [92]. Поэтому сейчас усилия многих научных групп направлены на поиск способов усиления внутреннего нейрогенного потенциала мозга. В качестве потенциальных фармакологических средств, направленных на сохранение или восстановление высокого уровня нейрогенеза в стареющем мозге, исследуются регуляторные молекулы, такие как GDF11, TGF- $\beta$ , антиоксиданты, такие как  $\alpha$ -токоферол, и противовоспалительные препараты, как например индометацин [44]. Введение перечисленных факторов в организм стареющих животных приводит к частичному восстановлению нейрогенного потенциала и к улучшению когнитивных способностей [44]. Эти данные подтверждают, что существенную роль в возрастном снижении нейрогенеза играют нарушение регуляции эндогенной стволовой ниши, повышение уровня свободных радикалов и воспалительные процессы.

Однако перечисленные терапевтические воздействия в лучшем случае только на время замедляют или приостанавливают процесс старения мозга. Наши исследования показали, что первоначальное существенное усиление нейрогенеза, вызванное ишемией мозга, снижается на более длительных сроках наблюдения [82]. Поэтому задача предотвращения старения мозга и восстановления его регенерационного потенциала требует исследования фундаментальных механизмов старения организма. Хотя на данный момент не существует однозначного понимания механизмов старения, в качестве одного из наиболее вероятных механизмов рассматривается укорочение теломер в делящихся клетках.

Таким образом, эндогенная способность мозга к воспроизводству новых нейронов, связанная с существованием в мозге НСК, существенно снижается с возрастом и связана с нейродегенеративными заболеваниями. В свою очередь, способность НСК генерировать новые нейроны существенно зависит от работы теломеразы (рис. 1).

## 2. ДВОЙСТВЕННАЯ РОЛЬ ТЕЛОМЕРАЗЫ КАК ФАКТОРА, ЗАМЕДЛЯЮЩЕГО СТАРЕНИЕ И ПРОВОЦИРУЮЩЕГО РАК

### 2.1. Связь укорочения теломер со старением мозга

Белковые комплексы, которые осуществляют репликацию ДНК в эукариотических клетках, не способны эффективно реплицировать концы хромосом [93–96]. Поэтому в ходе последовательных клеточных делений происходит постепенное укорочение концевых участков хромосом – теломер [14–16]. Теломераза способна заново достраивать теломеры [22–26, 97]. Фермент теломеразы состоит из двух субъединиц: TERC – молекула РНК, участок которой служит матрицей для синтеза теломерной ДНК; и TERT – обратная транскриптаза, синтезирующая теломерную ДНК на матрице TERC [98–101]. Ген РНК-компонента теломеразы TERC активно экспрессируется в большинстве тканей организма на всех этапах жизни [102]. Однако ген белкового компонента теломеразы TERT (который мы ниже для упрощения будем называть геном теломеразы) высоко активен только на этапе эмбриогенеза [27, 103–105]. Вскоре после рождения уровень экспрессии гена теломеразы резко падает, и в течение всей последующей жизни белок теломеразы синтезируется, главным образом, в региональных стволовых клетках [27–32], в частности – в НСК в субвентрикулярной зоне и в гиппокампе [29, 106–108]. По этой причине в региональных стволовых клетках средняя длина теломер существенно выше, чем в дифференцированных клетках [31]. Редким исключением из этого правила являются взрослые нейроны, в которых наблюдается экспрессия теломеразы, с чем, вероятно, связано долгожитие этих клеток [109]. Однако в процессе последующего постнатального развития уровня экспрессии гена теломеразы в стволовых клетках оказывается недостаточно для того, чтобы полностью остановить укорочение теломер [30, 33–35, 110]. В частности, с возрастом происходит укорочение теломер в НСК в субвентрикулярной зоне, которое коррелирует с ослаблением нейрогенеза [31, 108] (рис. 1).

Укорочение теломер в стволовых клетках признано одним из основных механизмов старения [36]. Когда теломеры хромосом достигают критически малой длины, прекращаются клеточные деления, и клетка либо подвергается апоптозу, либо становится на путь клеточного старения с формированием характерного метаболизма и секреторного профиля стареющей клетки [17–21]. Истощение популяций способных к делениям клеток – прежде всего стволовых – приводит к постепенному снижению регенерационного потенциала во всех тканях организма [111]. В то же время стареющие клетки секретируют провоспалительные факторы [112]. В совокупности это определяет снижение качества жизни, характерное для пожилого возраста. Ста-

статистические данные демонстрируют сильную корреляцию процента клеток с укороченными теломерами с частотой встречаемости заболеваний, связанных с пожилым возрастом [113]. Кроме того, с укорочением теломер коррелирует риск развития неврологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [38], болезнь Паркинсона [39, 40], рассеянный склероз [114] и инсульт [41] (рис. 1).

## 2.2. Связь теломеразы с канцерогенезом

Осознание роли укорочения теломер при старении дало толчок работам, в которых исследовалась возможность замедлить или остановить старение с помощью искусственного повышения экспрессии гена теломеразы. Однако это направление исследований сразу столкнулось с серьезной проблемой: существенное повышение уровня экспрессии гена теломеразы вызывает развитие рака.

Дело в том, что белок теломеразы, помимо его канонической роли в удлинении теломер, выполняет в клетке множество дополнительных функций, которые независимы от теломеразной активности, но могут способствовать канцерогенезу. Прежде всего теломераза взаимодействует с сигнальным путем *wnt/β-catenin* и участвует в активации ряда генов, ответственных за пролиферацию клеток, в частности генов *c-Myc* и *Cyclin-D1*. Кроме того, теломераза непосредственно активирует ген *NF-κB* и совместно с ним участвует в активации подконтрольных ему генов, которые связаны с возникновением устойчивости к апоптозу и с воспалением. Наконец, теломераза напрямую активирует ген *VEGF*, отвечающий за усиление роста сосудов. Одновременно по нескольким независимым механизмам теломераза вызывает у клетки устойчивость к факторам, сдерживающим рост, в частности к действию гормона TGF-β [49–52].

Таким образом, теломераза занимает положение одного из центральных регуляторов возникновения и поддержания раковой опухоли. Действительно, примерно 90% всех раковых опухолей сопровождаются повышением экспрессии гена теломеразы [49–52]. В частности, высокая теломеразная активность показана для глиомы [115]. Показано, что искусственное повышение экспрессии гена теломеразы провоцирует образование раковых опухолей, а последующее выключение этого гена приводит к прекращению их развития [46–48].

Необходимо подчеркнуть, что согласно многочисленным данным канцерогенный эффект теломеразы не зависит от удлинения теломер [49, 116]. Более того, у линии мышей с искусственно удлиненными теломерами не наблюдается повышения риска возникновения рака, и из этого следу-

ет, что само по себе удлинение теломер не является канцерогенным фактором [117]. Господствующее до недавнего времени мнение, что канцерогенным действием обладает само удлинение теломер, было основано на том, что для длительной и интенсивной пролиферации раковых клеток необходима постоянная достройка теломер. Действительно, прекращение удлинения теломер в раковых клетках ведет к прекращению клеточных делений и к апоптозу [118–121]. Однако формирование раковой опухоли под действием белка теломеразы происходит еще до того как начинает наблюдаться удлинение теломер [48]. Более того, различные мутантные варианты теломеразы, а также ее альтернативные сплайс-варианты, не обладающие теломеразной активностью, также провоцируют рак, как и активная теломераза [116, 122–126]. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что белок теломеразы стимулирует пролиферацию в отсутствие РНК-компонента теломеразы TERC, без которого невозможна теломеразная активность [127].

## 2.3. Искусственное повышение экспрессии гена теломеразы: возможности и ограничения

В первых работах, выполненных на линии трансгенных мышей с повышенной экспрессией гена теломеразы, смертность животных была повышена из-за развития множественных опухолей [46–48, 128]. Тем не менее для таких животных была продемонстрирована повышенная максимальная продолжительность жизни, а в тканях этих животных наблюдалось повышение средней длины теломер [15, 129]. Это мотивировало исследователей искать подходы к тому, чтобы каким-то образом компенсировать канцерогенный эффект теломеразы. Первая удачная работа была проведена Tomas-Loba с соавт. (2008) [39], создавшими трансгенных мышей с геном теломеразы под контролем промотора кератина, которые в то же время были онкоустойчивыми, потому что имели в геноме тройную дозу генов онкосупрессоров *p-53*, *p-16* и *Arf*. У этих мышей наблюдался повышенный синтез теломеразы в эпителиальных тканях, прежде всего в стволовых клетках эпителия, в связи с чем в клетках эпителия была повышена средняя длина теломер и снижен процент критически коротких теломер. Эти животные жили в среднем примерно на 40% дольше, чем контрольные животные, и у них не наблюдалось повышения вероятности развития рака [39].

Bernardes de Jesus с соавт. (2012) нашли другое решение этой проблемы [53]. Они вводили экспериментальным животным ген теломеразы в составе нереплицирующегося аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированные вирусы характеризуются слабой вероятностью интеграции в геном зараженной клетки. Поэтому повышен-

ная экспрессия гена теломеразы у зараженных таким вирусом животных не может существенно поддерживать развитие рака: деление клетки, которое может быть спровоцировано экспрессией теломеразы в зараженной клетке, с высокой вероятностью приводит к потере вирусной ДНК дочерними клетками и не приводит к увеличению копийности вируса. Следовательно, в делящихся клетках экспрессия теломеразы неизбежно затухает. Однократное внутривенное введение такого вируса мышам привело к повышению средней длины теломер в клетках различных органов (в том числе в мозге) и повысило среднюю и максимальную продолжительность жизни на 20% при введении в возрасте одного года и на 13% — при введении в возрасте двух лет. Вместе с тем не наблюдалось повышения риска развития раковых опухолей [53]. Эта же группа в дальнейшем продемонстрировала, что данный метод генной терапии способствует эффективному восстановлению сердца после инфаркта [54]. Кроме того, еще в одной работе было показано, что введение данного вируса с геном теломеразы не ускоряет прогрессию уже имеющейся опухоли в легком. Полученный факт свидетельствует в пользу того, что данный метод терапии не будет повышать риск развития рака даже у тех индивидов, в тканях которых уже имеются предпосылки к канцерогенезу [55].

С точки зрения роли теломеразы в нейрогенезе особенно интересны работы, в которых в гиппокамп взрослых животных вводили не способный к интеграции в геном аденовирус с геном теломеразы. В результате происходило усиление нейрогенеза и повышение когнитивных способностей без повышения риска развития рака [56, 107]. Упомянутые исследования ясно продемонстрировали, что изменение экспрессии гена теломеразы имеет значительный терапевтический потенциал как средство замедления старения и, в частности, замедления старения мозга через поддержание эндогенной популяции НСК.

Тем не менее разработанные подходы имеют очевидные ограничения. Безопасное, с точки зрения развития рака, введение гена теломеразы в составе не способных к интеграции вирусов может обеспечить только временное удлинение теломер в популяции стволовых клеток, поскольку в процессе клеточных делений привнесенный ген теломеразы будет утрачиваться. С другой стороны, встройка в геном стволовых клеток конструкции с геном теломеразы требует дополнительных мер по предотвращению рака. Учитывая эти результаты, можно предложить принципиально иную стратегию удлинения теломер в стволовых клетках, связанную с альтернативным сплайсингом теломеразы, не примененную пока ни в одном из проведенных исследований.

### 3. ЗНАЧЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА ТЕЛОМЕРАЗЫ

Альтернативный сплайсинг является одним из источников разнообразия белков у эукариот. Поскольку в эукариотических генах последовательность, кодирующая белок, поделена на экзоны, которые чередуются с интронами, избирательное вырезание интронов и сшивка экзонов могут приводить в конечном счете к разным вариантам аминокислотной последовательности белков, различающимся по функциональным свойствам [130].

В гене теломеразы 16 экзонов и 15 интронов, что создает возможность синтеза очень большого числа вариантов белка теломеразы [131] (рис. 2). Сейчас известно 22 варианта теломеразы, и из них только один вариант обладает теломеразной активностью — способен достраивать теломеры. Это так называемая полноразмерная теломераза, которая содержит все экзоны в правильной последовательности, без вставок интронов [132–138]. Большой процент единиц белка теломеразы в стволовых и раковых клетках приходится на  $\beta$ -вариант, в котором отсутствуют экзоны 7 и 8, а также сдвигается рамка считывания, благодаря чему появляется преждевременный стоп-кодон [135, 137, 139–143]. Доля полноразмерной теломеразы в ряде работ оценивается примерно в 5% [102, 134, 135]. Таким образом, подавляющее большинство единиц белка теломеразы в клетке не способны достраивать теломеры. Кроме того, многие из альтернативных вариантов теломеразы ингибируют каталитическую активность полноразмерного варианта — препятствуют удлинению теломер [141–146]. В частности, ингибитором теломеразной активности является наиболее представленный  $\beta$ -вариант [141–143].

Ингибирование полноразмерной теломеразы ее альтернативными формами осуществляется по множеству механизмов.  $\beta$ -вариант связывается с матрицей TERC и поэтому конкурирует с полноразмерной теломеразой за связывание с TERC [141]. Однако, поскольку TERC в избытке синтезируется в большинстве клеток [102], многие авторы предполагают, что такая конкуренция не должна быть ограничивающим фактором [135, 137]. С другой стороны, было высказано предположение о том, что  $\beta$ -вариант может осуществлять ингибирование и по другому механизму [143]. Показано, что теломераза осуществляет удлинение теломер, действуя в виде димера. В белке теломеразы имеется специальный домен для связывания с другим белком теломеразы. Этот домен присутствует в  $\beta$ -варианте. По этой причине  $\beta$ -вариант может ингибировать активность полноразмерной теломеразы, ассоциируясь с ней и конкурируя с другими единицами полноразмерной формы за ассоциацию [143]. Известно еще несколько вариантов теломеразы, затрудняющих удлинение теломер, в их

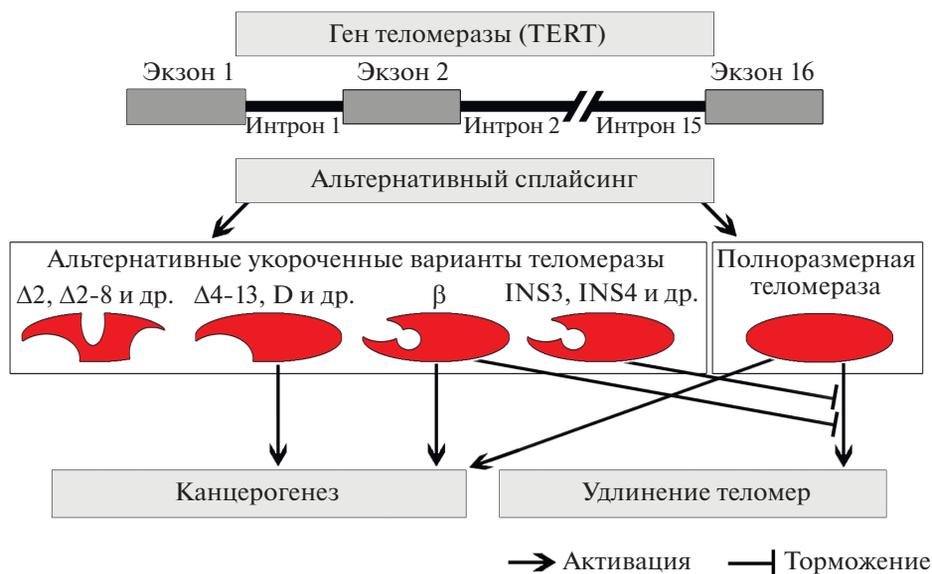


Рис. 2. Роль различных вариантов белка теломеразы (TERT) в удлинении теломер и канцерогенезе.

числе варианты  $\alpha$ , INS3 и INS4, которые конкурируют с полноразмерной теломеразой за связывание с теломерной ДНК, и  $\gamma$ -вариант, ингибирующий теломеразную активность по неизвестному механизму [136, 144–146].

На поздних этапах эмбрионального развития происходит сдвиг баланса в сторону большей представленности неактивных ингибирующих форм теломеразы. С этим сдвигом коррелирует начало укорочения теломер в клетках [139]. Во взрослых стволовых клетках небольшой доли теломеразы, с учетом наличия ингибирующих форм, оказывается недостаточно для поддержания стабильной длины теломер. Происходит постепенное укорочение теломер в стволовых клетках и снижение потенциала популяций стволовых клеток к самообновлению и к регенерации соматических тканей [30, 33–35, 110], в частности происходит истощение потенциала НСК в мозге [31, 108].

Хотя только один вариант теломеразы – полноразмерная форма – способна удлинять теломеры, многие из альтернативных форм обладают, как и полноразмерная теломераза, канцерогенным эффектом [49, 126, 141] (рис. 2). В частности, вариант  $\Delta 4-13$ , как и полноразмерная теломераза, стимулирует пролиферацию, а  $\beta$ -вариант подавляет апоптоз [126, 141].

Регуляция сплайсинга теломеразы обладает гомеостатичностью: попытка искусственно сдвинуть баланс в сторону полноразмерной формы может вызвать компенсирующие сдвиги в сплайсинге. Kim (2017) [143] обнаружил в культуре клеток, что введение вектора, экспрессирующего полноразмерную теломеразу (в введенном гене теломеразы были удалены интроны) под контро-

лем доксициклинового промотора, приводит к сдвигу в сплайсинге внутреннего гена теломеразы в сторону ингибирующего  $\beta$ -варианта. В результате введение вектора с геном полноразмерной теломеразы привело не к повышению, а к снижению теломеразной активности [143]. Radan с соавт. (2014) [147] обнаружили, что искусственное подавление сплайсинга, ведущего к образованию вариантов  $\beta$  и  $\alpha$ , вопреки ожиданиям, не повышает, а снижает теломеразную активность, что, как предполагают авторы, может быть связано с компенсаторным усилением сплайсинга на других участках теломеразной РНК [147].

#### 4. НОВЫЙ ПОДХОД К УСИЛЕНИЮ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ: УДАЛЕНИЕ ИНТРОНОВ ИЗ ГЕНА ТЕЛОМЕРАЗЫ

Описанные в предыдущих разделах аспекты биологии теломеразы необходимо учитывать при разработке подходов к искусственному усилению теломеразной активности. В разделе 2.3 были упомянуты работы по введению в организм дополнительного гена теломеразы с целью повышения теломеразной активности и удлинения теломер. Во всех этих исследованиях привнесенный ген теломеразы был лишен интронов и, как следствие, образовывал только полноразмерную теломеразу. Тем не менее даже в работе Tomas-Loba с соавт., где привнесенный ген полноразмерной теломеразы экспрессировался во всех эпителиальных клетках, в них все равно происходило укорочение теломер, хотя оно и существенно замедлилось по сравнению с контролем [39]. Вероятная причина низкой эффективности этой стратегии

была в том, что в геноме оставался также и дикий ген теломеразы, экспрессия которого приводила к образованию ингибирующих форм. Присутствие этих форм теломеразы должно было снизить эффективность работы привнесенной теломеразы, особенно если предположить, что избыток полноразмерной формы дал толчок к компенсаторному сдвигу в сплайсинге дикого гена теломеразы, как было показано в работе Kim [143]. Более того, есть основания предполагать, что экспрессия привнесенного гена теломеразы могла усилить экспрессию дикого гена теломеразы. Исследования функциональных связей гена теломеразы с другими генами показывают, что в регуляции активности гена теломеразы имеется много петель с положительной обратной связью, когда ген, который активируется теломеразой, в свою очередь напрямую и через посредников повышает активность гена теломеразы. В частности, такие связи есть между геном теломеразы и генами *c-Myc1*,  *$\beta$ -catenin*, *NF- $\kappa$ B* и *VEGF* [50]. Таким образом, присутствие в геноме экспериментальных животных дикого гена теломеразы может существенно снижать эффект от работы привнесенного гена.

Задача по специальному подавлению альтернативного сплайсинга теломеразы представляется трудновыполнимой в связи с большим числом интронов в гене теломеразы и существованием компенсаторной регуляции ее сплайсинга [143, 147]. Поэтому наиболее перспективной стратегией представляется редактирование дикого гена теломеразы: замена в геноме животных дикой кодирующей последовательности, содержащей интроны, на кодирующую последовательность с удаленными интронами. Это приведет к тому, что в стволовых клетках будет синтезироваться только полноразмерная теломераза, что при сохранении обычного уровня экспрессии гена теломеразы приведет к повышению эффективности удлинения теломер. Сохранение умеренного уровня экспрессии гена теломеразы означает сохранение низкого риска развития рака. Более того, следует принять во внимание, что развитие рака является не следствием теломеразной активности, а результатом дополнительных функций теломеразы, которые выполняются не только активной теломеразой, но также и многими ее альтернативными сплайс-вариантами. Поэтому следует ожидать, что 100%-ный сдвиг в сторону активной полноразмерной теломеразы не приведет к существенному повышению риска развития раковой опухоли.

Важно также принять во внимание, что эффективная работа теломеразы не означает неконтролируемое удлинение теломер. В эмбриональных стволовых, а также в раковых клетках, где работа теломеразы эффективно удлиняет теломеры, активируются специальные механизмы, предотвращающие возникновение слишком длинных теломер [148, 149]. Эти механизмы пока

не полностью изучены, но известно, что в них задействован белок TZAP1, который связывается с теломерной ДНК, конкурируя за связывание с белком комплекса shelterin TRF1 и TRF2 [150, 151]. Поэтому есть основания ожидать, что достижение во взрослых стволовых клетках той же эффективности удлинения теломер, которая имеет место в эмбриональных стволовых и раковых клетках, запустит те же самые стабилизирующие механизмы и в результате во взрослых стволовых клетках будет стабильно поддерживаться оптимальная длина теломер.

Несмотря на приведенные выше аргументы в пользу предлагаемой стратегии, следует подчеркнуть, что речь идет о достаточно сильном вмешательстве в важные и тонкие молекулярно-генетические процессы, детали механизмы которых не полностью изучены. Поэтому только эксперименты могут показать реальную перспективность или ошибочность данного подхода.

Таким образом, предлагаемая стратегия генной терапии старения мозга состоит в том, чтобы вводить в организм генетические векторы, которые будут в НСК заменять исходный ген теломеразы на ген с удаленными интронами. Есть основания полагать, что это вмешательство существенно повысит эффективность удлинения теломер и даже может привести к стабилизации их длины, что существенно замедлит старение мозга в связи с усилением нейрогенного потенциала.

## 5. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Сформулированная задача соответствует современному уровню генной инженерии. В этом разделе не будет полного описания существующих генно-инженерных методов. Вместо этого мы обсудим подходы, которые могут быть применены для решения сформулированной задачи.

### 5.1. Типы и серотипы вирусных векторов

В исследованиях центральной нервной системы методами генной инженерии широко используются генетические векторы на основе аденоассоциированных вирусов, аденовирусов, HIV лентивируса и MLV ретровируса. Использование аденоассоциированных векторов предпочтительно, поскольку они признаны наиболее безопасными в получении и использовании, поскольку они вызывают слабый иммунный ответ и с низкой вероятностью интегрируются в геном [152–155]. Недостатком этих вирусов является низкая пакующая способность, но, как будет описано ниже, это не является большим препятствием для их использования в целях редактирования генов *in vivo*.

Группа аденоассоциированных векторов включает порядка 100 серотипов, но наиболее широко применяются серотипы AAV2/1, AAV2/2, AAV2/4, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/8, AAV2/9 [152, 153]. Серотипы различаются по своей способности внедряться в те или иные виды клеток. Одна из целей создания новых серотипов состоит в том, чтобы обеспечить попадание вируса в клетки того или иного типа. К настоящему моменту уже созданы два серотипа аденоассоциированных вирусов, AAV r3.45 и SCH9, которые с высокой специфичностью и эффективностью заражают нервные стволовые клетки в мозге [156–158]. Авторы, создавшие эти серотипы, вводили их животным непосредственно в мозг, интрацеребрально [157, 158]. Пока неизвестно, могут ли эти серотипы проникать через гематоэнцефалический барьер — и, соответственно, можно ли их также использовать для внутривенного введения. Подчеркнем, что внутривенное введение крайне желательной для возможности внедрения нового вида генной терапии в клинику. С другой стороны, существует серотип AAV2/9, который проникает через гематоэнцефалический барьер и с высокой эффективностью заражает клетки мозга после внутривенного введения [154]. К сожалению, он эффективно заражает нейроны, астроциты, но в меньшей степени нервные стволовые клетки [154]. Тем не менее этот серотип тоже может быть использован для редактирования гена теломеразы в мозге — потому что астроциты в мозге способны в некоторых условиях терять дифференцированное состояние и приобретать стволовость [78, 79]. Следовательно, можно допустить, что редактирование гена теломеразы и удлинение теломера в небольшом числе астроцитов приведут к формированию в мозге стволовой популяции, происходящей из бывших астроцитов. В недавней работе Smith с соавт. (2018) [159] удалось выделить серотип аденоассоциированного вируса AAVHSC, который обладает рядом преимуществ для выполнения сформулированной задачи. Во-первых, векторы на основе этого серотипа проникают через гематоэнцефалический барьер и эффективно заражают клетки мозга после внутривенной инъекции [159]. Во-вторых, авторами продемонстрирован новый, простой в исполнении (без помощи эндонуклеаз, см. ниже) способ редактирования генома с помощью вектора этого серотипа.

Следует отметить, что, хотя внутривенное введение вирусных векторов безусловно предпочтительнее для клиники по сравнению с прямым введением в мозг, его минусом является возможность побочного заражения различных клеток вне мозга. Например, серотип AAV2/9, эффективно заражающий нейроны и астроциты в мозге, также заражает широкий спектр клеток в различных органах [152]. Решение данной проблемы в будущем будет определяться разработкой новых

высокоспецифичных серотипов вирусных векторов, обеспечивающих специфичность заражения НСК даже после внутривенного введения.

### 5.2. Методы редактирования генома

Наиболее часто применяемым механизмом редактирования генов является использование сайт-специфичных эндонуклеаз [155]. Сайт-специфичные эндонуклеазы разрезают ДНК в определенном месте, которое они распознают с той или иной степенью специфичности. Из четырех применяемых сайт-специфичных эндонуклеаз — мегануклеазы, ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9 — последняя является наиболее легкой в конструировании при высокой специфичности распознавания сайта рестрикции, которая достигается благодаря комплементарному спариванию ДНК целевого сайта с направляющей РНК [155]. Фермент CRISPR/Cas9, полученный из бактерии *Streptococcus pyogenes*, чаще применяется, но размер его гена слишком велик для встройки в аденоассоциированный вирус [155]. Фермент CRISPR/Cas9, полученный из бактерии *Staphylococcus aureus*, существенно компактнее и помещается в аденоассоциированный вирус, в связи с чем он более перспективен для редактирования генов *in vivo* [160].

После того как эндонуклеаза распознает нужный сайт и разрезает молекулу ДНК, в ответ запускаются эндогенные репарационные механизмы, которые заново сшивают образовавшиеся концы. Однако этот процесс может быть модифицирован, если в клетке присутствует экстрахромосомная ДНК, имеющая участки, комплементарные сайту разрыва. В этом случае с некоторой вероятностью репарация происходит вместе со встраиванием этой ДНК. Экстрахромосомной ДНК может быть ДНК аденоассоциированного вируса, несущая генетическую последовательность, которую требуется вставить в данный участок генома. Последовательность, предназначенная для вставки в сайт разрезания эндонуклеазой, в вирусе помещается между двумя участками, комплементарными соответствующим участкам по обе стороны от разрыва в геномной ДНК. Это обеспечивает комплементарное спаривание ДНК вируса с геномной ДНК по обе стороны от разрыва, а затем и встройку целевой последовательности в разрыв [155].

Описанная выше система позволяет эффективно редактировать гены как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако ее работа в клетке может иметь нежелательные побочные следствия. Во-первых, с некоторой вероятностью возможно образование разрывов ДНК в незапланированных сайтах, с неизвестными последствиями для жизнедеятельности клетки. Во-вторых, разрыв ДНК с некоторой вероятностью может завершаться не встройкой целевой ДНК, а репарацией с возникновением небольших вставок или делеций, что может нару-

шать функцию того локуса, куда планируется встройка [155].

Альтернативой является редактирование гена без использования эндонуклеаз. Это может быть осуществлено с использованием одной только вирусной ДНК, имеющей частичную комплементарность к определенному участку генома. Эта ДНК должна иметь такую же структуру, как и в методе с эндонуклеазами. Последовательность, предназначенная для встройки в геном, в вирусе помещается между двумя локусами, которые комплементарны двум локусам в геноме. Если в геноме эти локусы следуют сразу один за другим, то результатом может быть встройка целевой последовательности между ними. Если в геноме эти локусы разделены участком, то результатом может быть замена данного участка на целевую последовательность [159, 161–163]. В недавней работе Smith с соавт. (2018) [159] удалось применить эту технологию с использованием AAVHSC серотипа аденоассоциированного вируса, который без помощи эндонуклеаз обеспечивает встройку целевых фрагментов *in vivo* с беспрецедентной частотой и точностью. Преимущество данного метода, по сравнению с эндонуклеазным, состоит в высокой безопасности (крайне низкая вероятность незапланированных изменений в геноме), а также в простоте выполнения: генно-инженерная система, которую необходимо доставить в клетку, состоит из одного компонента — ДНК аденоассоциированного вируса AAVHSC со встроенной целевой последовательностью. Данный серотип эффективен в отношении широкого спектра тканей и органов (в том числе мозга), эффективен в отношении как делящихся, так и не делящихся клеток. Тем не менее следует иметь в виду, что данный метод пока был применен только одной научной группой, и его эффективность требует дальнейшей проверки.

Таким образом, наиболее предпочтительным методом для редактирования гена теломеразы в нервных стволовых клетках *in vivo*, особенно с учетом дальнейших перспектив использования в клинике, по-видимому, является описанный выше альтернативный метод редактирования генома без использования эндонуклеаз [159].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Усиление нейрогенного потенциала взрослого мозга — важнейшее направление исследований в современной биологии и биомедицине. Поскольку укорочение теломер признано одним из главных факторов, ограничивающих регенерационный потенциал организма в целом и мозга — в частности, перспективной задачей представляется искусственное повышение теломеразной активности *in vivo*. Попытки решить эту задачу через повышение уровня экспрессии гена теломеразы

столкнулись с проблемой канцерогенеза. В то же время существует иной путь повышения теломеразной активности — через отмену альтернативного сплайсинга теломеразы. Этот подход в будущем может позволить повышать теломеразную активность в нервных стволовых клетках мозга без повышения риска возникновения рака. Развитие данной стратегии в будущем может стать основой для разработки нового направления в генной терапии.

Авторы благодарят С.В. Кильдяеву за профессиональный перевод аннотации статьи, а также Т.В. Ананьину за подготовку превосходных иллюстраций.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ, проект № 18-15-00229, и государственного задания, проект № 18.2583.2017/4.6.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abrous D.N., Koehl M., Le Moal M.* Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. № 322. P. 523–569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2003>
2. *Kee N., Teixeira C.M., Wang A.H., Frankland P.W.* Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus // *Nat. Neurosci.* 2007. V. 10. № 3. P. 355–362. <https://doi.org/10.1038/nn1847>
3. *Tashiro A., Makino H., Gage F.H.* Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: A critical period during an immature stage // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 12. P. 3252–3259. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4941-06.2007>
4. *Trouche S., Bontempi B., Roulet P., Rampon C.* Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 14. P. 5919–5924. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811054106>
5. *Wang S., Scott B.W., Wojtowicz J.M.* Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat // *J. Neurobiol.* 2000. V. 42. № 2. P. 248–257.
6. *Schmidt-Hieber C., Jonas P., Bischofberger J.* Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus // *Nature.* 2004. V. 429. № 6988. P. 184–187. <https://doi.org/10.1038/nature02553>
7. *Zhao C., Teng E.M., Summers Jr. et al.* Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 1. P. 3–11. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3648-05.2006>

8. *Ge S., Yang C., Hsu K. et al.* A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain // *Neuron*. 2007. V. 54. № 4. P. 559–566.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.002>
9. *Toni N., Teng E.M., Bushong E.A. et al.* Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus // *Nat. Neurosci.* 2007. V. 10. № 6. P. 727–734.  
<https://doi.org/10.1038/nn1908>
10. *Toni N., Laplagne D.A., Zhao C. et al.* Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells // *Nat. Neurosci.* 2008. V. 11. № 8. P. 901–907.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2156>
11. *Faulkner R.L., Jang M.-H., Liu X.-B. et al.* Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 37. P. 14157–14162.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0806658105>
12. *Kron M.M., Zhang H., Parent J.M.* The developmental stage of dentate granule cells dictates their contribution to seizure-induced plasticity // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 6. P. 2051–2059.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.5655-09.2010>
13. *Encinas J.M., Michurina T.V., Peunova N. et al.* Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. // *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc. 2011. V. 8. № 5. P. 566–579.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
14. *Blackburn E.H.* The end of the (DNA) line // *Nat. Struct. Biol.* 2000. V. 7. № 10. P. 847–850.  
<https://doi.org/10.1038/79594>
15. *Blasco M.A.* Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. № 8. P. 611–622.  
<https://doi.org/10.1038/nrg1656>
16. *Sfeir A.J., Chai W., Shay J.W., Wright W.E.* Telomere-end processing: The terminal nucleotides of human chromosomes // *Mol. Cell*. 2005. V. 18. № 1. P. 131–138.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.035>
17. *Dhabhar F.S., Morrow J.D., Adler N.E. et al.* Accelerated telomere shortening in response to life stress // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 49. P. 17312–17315.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407162101>
18. *Herbig U., Jobling W.A., Chen B.P.C. et al.* Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a // *Mol. Cell*. 2004. V. 14. № 4. P. 501–513.  
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00256-4)
19. *Canela A., Vera E., Klatt P., Blasco M.A.* High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 13. P. 5300–5305.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0609367104>
20. *Jiang H., Ju Z., Rudolph K.L.* Telomere shortening and ageing // *Z. Gerontol. Geriatr.* 2007. V. 40. № 5. P. 314–324.  
<https://doi.org/10.1007/s00391-007-0480-0>
21. *Jesus B.B. De, Blasco M.A.* Assessing cell and organ senescence biomarkers // *Circ. Res.* 2016. V. 111. № 1. P. 97–109.  
<https://doi.org/10.1161/circresaha.111.247866>
22. *Greider C.W., Blackburn E.H.* Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts // *Cell*. 1985. V. 43. № 2. P. 405–413.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9)
23. *Morin G.B.* The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats // *Cell*. 1989. V. 59. № 3. P. 521–529.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90035-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90035-4)
24. *Hackett J.A., Greider C.W.* Balancing instability: Dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis // *Oncogene*. 2002. V. 21. № 4. P. 619–626.  
<https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205061>
25. *Fajkus J.* Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives // *Clin. Chim. Acta*. 2006. V. 371. № 1–2. P. 25–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.039>
26. *Gallardo F., Laterreur N., Cusanelli E. et al.* Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres // *Mol. Cell*. Elsevier Inc. 2011. V. 44. № 5. P. 819–827.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.020>
27. *Wright W.E., Piatyszek M.A., Rainey W.E. et al.* Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells // *Dev. Genet.* 1996. V. 18. № 2. P. 173–179.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6408\(1996\)18:2<173::aid-dvg10>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6408(1996)18:2<173::aid-dvg10>3.0.co;2-3)
28. *Greenberg R.A., Allsopp R.C., Chin L. et al.* Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation // *Oncogene*. 1998. V. 16. № 13. P. 1723–1730.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201933>
29. *Martin-Rivera L., Herrera E., Albar J.P., Blasco M.A.* Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 18. P. 10471–10476.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10471>
30. *Flores I., Benetti R., Blasco M.A.* Telomerase regulation and stem cell behaviour // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006. V. 18. № 3. P. 254–260.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.03.003>
31. *Flores I., Canela A., Vera E. et al.* The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 5. P. 654–667.  
<https://doi.org/10.1101/gad.451008>
32. *van der Harst P., van Veldhuisen D.J., Samani N.J.* Expanding the concept of telomere dysfunction in cardiovascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. № 5. P. 807–808.  
<https://doi.org/10.1161/atvbaha.108.164434>
33. *Vaziri H., Dragowska W., Allsopp R.C. et al.* Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. № 21. P. 9857–9860.
34. *Herbig U., Ferreira M., Condel L. et al.* Cellular senescence in aging primates // *Science*. 2006. V. 311. № 5765. P. 1257.  
<https://doi.org/10.1126/science.1122446>
35. *Seeger F., Dietz K., Hoffmann J. et al.* Telomere gap between granulocytes and lymphocytes is a determinant for

- hematopoietic progenitor cell impairment in patients with previous myocardial infarction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. № 5. P. 968–974.  
<https://doi.org/10.1161/atvbaha.107.160846>
36. *López-otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M.* The Hallmarks of Aging // *Cell.* 2013. V. 153. № 6. P. 1194–1217.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
  37. *Blasco M.A., Marques-Torrejon M.A., Mira H. et al.* Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neurogenesis // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 46. P. 14394–14407.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3836-09.2009>
  38. *Forero D.A., González-Giraldo Y., López-Quintero C. et al.* Meta-analysis of telomere length in Alzheimer's disease // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2016. V. 71. № 8. P. 1069–1073.  
<https://doi.org/10.1093/gerona/glw053>
  39. *Tomás-Loba A., Flores I., Fernández-Marcos P.J. et al.* Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice // *Cell.* 2008. V. 135. № 4. P. 609–622.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.034>
  40. *Guan J.Z., Maeda T., Sugano M. et al.* A percentage analysis of the telomere length in Parkinson's disease patients // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2008. V. 63. № 5. P. 467–473.  
<https://doi.org/10.1093/gerona/63.5.467>
  41. *Jin X., Pan B., Dang X. et al.* Relationship between short telomere length and stroke: A meta-analysis // *Medicine (Baltimore).* 2018. V. 97. № 39. P. 1–7.  
<https://doi.org/10.1097/md.00000000000012489>
  42. *Ma C.L., Ma X.T., Wang J.J. et al.* Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline // *Behav. Brain Res.* 2017. V. 317. P. 332–339.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.067>
  43. *Fidaleo M., Cavallucci V., Pani G.* Nutrients, neurogenesis and brain ageing: From disease mechanisms to therapeutic opportunities // *Biochem. Pharmacol.* 2017. V. 141. P. 63–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.05.016>
  44. *Apple D.M., Solano-Fonseca R., Kokovay E.* Neurogenesis in the aging brain // *Biochem. Pharmacol.* 2017. V. 141. P. 77–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.116>
  45. *Katsimpardi L., Lledo P.M.* Regulation of neurogenesis in the adult and aging brain // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2018. V. 53. P. 131–138.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.07.006>
  46. *Gonzalez-Suarez E., Samper E., Ramirez A. et al.* Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes // *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 2001. V. 20. № 11. P. 2619–2630
  47. *Artandi S.E., Alson S., Tietze M.K. et al.* Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 12. P. 8191.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.112515399>
  48. *Canela A., Martin-Caballero J., Flores J.M., Blasco M.A.* constitutive expression of tert in thymocytes leads to increased incidence and dissemination of T-cell lymphoma in lck-tert mice // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 10. P. 4275–4293.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.24.10.4275-4293.2004>
  49. *Low K.C., Tergaonkar V.* Telomerase: Central regulator of all of the hallmarks of cancer // *Trends Biochem. Sci.* 2013. V. 38. № 9. P. 426–434.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.07.001>
  50. *Tian Y., He Y., Liu X. et al.* Feedback regulation of telomerase reverse transcriptase: new insight into the evolving field of telomerase in cancer // *Cell. Signal.* 2013. V. 25. № 12. P. 2462–2468.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.009>
  51. *Jesus B.B. De, Blasco M.A.* Telomerase at the intersection of cancer and aging // *Trends Genet.* 2014. V. 29. № 9. P. 513–520.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.007.telomerase>
  52. *Terali K., Yilmazer A.* New surprises from an old favourite: The emergence of telomerase as a key player in the regulation of cancer stemness // *Biochimie.* 2016. V. 121. P. 170–178.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.12.001>
  53. *Jesus B., Vera E., Schneeberger K. et al.* Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer // *EMBO Mol. Med.* 2012. V. 4. № 8. P. 691–704.  
<https://doi.org/10.1002/emmm.201200245>
  54. *Bär C., Serrano R., Pisano D. et al.* Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. № 1. P. 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms6863>
  55. *Muñoz-Lorente M.A., Martínez P., Tejera Á. et al.* AAV9-mediated telomerase activation does not accelerate tumorigenesis in the context of oncogenic K-Ras-induced lung cancer // *PLoS Genet.* 2018. V. 14. № 8. P. 1–25.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007562>
  56. *Zhou Q.G., Liu M.Y., Lee H.W. et al.* Hippocampal TERT regulates spatial memory formation through modulation of neural development // *Stem Cell Reports.* 2017. V. 9. № 2. P. 543–556.  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.014>
  57. *Gage F.H.* Mammalian neural stem cells // *Science.* 2000. V. 287. № 5457. P. 1433–1438.  
<https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433>
  58. *Duan X., Kang E., Liu C.Y. et al.* Development of neural stem cell in the adult brain // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2008. V. 18. № 1. P. 108–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.04.001>
  59. *Imayoshi I., Sakamoto M., Ohtsuka T. et al.* Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain // *Nat. Neurosci.* 2008. V. 11. № 10. P. 1153–1161.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2185>
  60. *Nakatomi H., Nakatomi H., Kuriu T. et al.* Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors // *Cell.* 2002. V. 110. P. 429–441.
  61. *Dayer A.G., Cleaver K.M., Abouantoun T., Cameron H.A.* New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors // *J. Cell*

- Biol. 2005. V. 168. № 3. P. 415–427.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200407053>
62. *Sundholm-Peters N.L., Yang H.K., Goings G.E. et al.* Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. // *J. Neurobiol. Exp. Neurol.* 2005. V. 64. № 12. P. 1089–1100.
  63. *Shapiro L.A., Ng K., Zhou Q.-Y., Ribak C.E.* SVZ-derived newly generated neurons populate several olfactory and limbic forebrain regions // *Magn. Reson. Imaging.* 2009. V. 31. № 3. P. 477–479.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>
  64. *Jin K., Sun Y., Xie L. et al.* Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum // *Mol. Cell. Neurosci.* 2003. V. 24. № 1. P. 171–189.  
[https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00159-3](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00159-3)
  65. *Zhang P., Liu Y., Li J. et al.* Ependymal/subventricular zone cells migrate to the peri-infarct region and differentiate into neurons and astrocytes after focal cerebral ischemia in adult rats // *J. First Mil. Med.* 2005. V. 4. P. 4–9.
  66. *Ramaswamy S., Goings G.E., Soderstrom K.E. et al.* Cellular proliferation and migration following a controlled cortical impact in the mouse // *Brain Res.* 2005. V. 1053. № 1–2. P. 38–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.06.042>
  67. *Yamashita T., Ninomiya M., Hernandez Acosta P. et al.* Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 24. P. 6627–6636.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.0149-06.2006>
  68. *Lan Zhang R., LeTourneau Y., Gregg S.R. et al.* Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: A study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 12. P. 3157–3162.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.4969-06.2007>
  69. *Hou S.W., Wang Y.Q., Xu M. et al.* Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain // *Stroke.* 2008. V. 39. № 10. P. 2837–2844.  
<https://doi.org/10.1161/strokeaha.107.510982>
  70. *Liu F., You Y., Li X. et al.* Brain injury does not alter the intrinsic differentiation potential of adult neuroblasts // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 16. P. 5075–5087.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.0201-09.2009>
  71. *Yoshikawa G., Momiyama T., Oya S. et al.* Induction of striatal neurogenesis and generation of region-specific functional mature neurons after ischemia by growth factors // *J. Neurosurg.* 2010. V. 113. № 4. P. 835–850.  
<https://doi.org/10.3171/2010.2.jns.09989>
  72. *Kojima T., Hirota Y., Ema M. et al.* Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum // *Stem Cells.* 2010. V. 28. № 3. P. 545–554.  
<https://doi.org/10.1002/stem.306>
  73. *Kreuzberg M., Kanov E., Timofeev O. et al.* Increased subventricular zone-derived cortical neurogenesis after ischemic lesion // *Exp. Neurol.* 2010. V. 226. № 1. P. 90–99.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.08.006>
  74. *Grade S., Weng Y.C., Snayyan M. et al.* Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055039>
  75. *Saha B., Peron S., Murray K. et al.* Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury // *Stem Cell Res.* 2013. V. 11. № 3. P. 965–977.  
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.06.006>
  76. *Faiz M., Sachewsky N., Gascón S. et al.* Adult neural stem cells from the subventricular zone give rise to reactive astrocytes in the cortex after stroke // *Cell Stem Cell.* 2015. V. 17. № 5. P. 624–634.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.002>
  77. *Ohira K., Furuta T., Hioki H. et al.* Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. № 2. P. 173–179.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2473>
  78. *Magnusson J.P., Göritz C., Tatarishvili J. et al.* A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse // *Science.* 2014. V. 346. № 6206. P. 237–241.  
<https://doi.org/10.1126/science.346.6206.237>
  79. *Nato G., Caramello A., Trova S. et al.* Striatal astrocytes produce neuroblasts in an excitotoxic model of Huntington’s disease // *Development.* 2015. V. 142. № 5. P. 840–845.  
<https://doi.org/10.1242/dev.116657>
  80. *Duan C.L., Liu C.W., Shen S.W. et al.* Striatal astrocytes transdifferentiate into functional mature neurons following ischemic brain injury // *Glia.* 2015. V. 63. № 9. P. 1660–1670.  
<https://doi.org/10.1002/glia.22837>
  81. *Arvidsson A., Collin T., Kirik D. et al.* Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke // *Nat. Med.* 2002. V. 9. № 5. P. 548–553.  
<https://doi.org/10.1038/nm747>
  82. *Khodanovich M., Kisel A., Kudabaeva M. et al.* Effects of fluoxetine on hippocampal neurogenesis and neuroprotection in the model of global cerebral ischemia in rats // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 1. P. 12–24.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19010162>
  83. *Rodríguez J.J., Verkhatsky A.* Neurogenesis in Alzheimer’s disease // *J. Anat.* 2011. V. 219. № 1. P. 78–89.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01343.x>
  84. *Moreno-Jiménez E.P., Flor-garcía M., Terreros-roncal J. et al.* Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer’s disease // *Nat. Med.* 2019. V. 25. № 4. P. 554–560.  
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
  85. *Lim J., Bang Y., Choi H.J.* Abnormal hippocampal neurogenesis in Parkinson’s disease: relevance to a new therapeutic target for depression with Parkinson’s disease // *Arch. Pharm. Res. Pharmaceutical Society of Korea.* 2018. V. 41. № 10. P. 943–954.  
<https://doi.org/10.1007/s12272-018-1063-x>

86. *Khodanovich M.Y., Pishchelko A.O., Glazacheva V.Y. et al.* Plant polyprenols reduce demyelination and recover impaired oligodendrogenesis and neurogenesis in the cuprizone murine model of multiple sclerosis // *Phyther. Res.* 2019. № 9. P. 1–11. <https://doi.org/10.1002/ptr.6327>
87. *Reif A., Schmitt A., Fritzen S., Lesch K.P.* Neurogenesis and schizophrenia: Dividing neurons in a divided mind? // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2007. V. 257. № 5. P. 290–299. <https://doi.org/10.1007/s00406-007-0733-3>
88. *Sorrells S.F., Paredes M.F., Cebrian-silla A. et al.* Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults // *Nature.* 2018. V. 555. № 7696. P. 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975.human>
89. *Kempermann G., Gage F.H., Aigner L. et al.* Human adult neurogenesis: evidence and remaining questions // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 23. № 1. P. 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>
90. *Ernst A., Alkass K., Bernard S. et al.* Neurogenesis in the striatum of the adult human brain // *Cell.* 2014. V. 156. № 5. P. 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>
91. *Thanseem I., Viswambharan V., Poovathinal S.A., Anitha A.* Is telomere length a biomarker of neurological disorders? // *Biomark. Med.* 2017. V. 11. № 9. P. 799–810. <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0032>
92. *Grochowski C., Radzikowska E., Maciejewski R.* Neural stem cell therapy – Brief review // *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2018. V. 173. P. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2018.07.013>
93. *Levy M.Z., Allsopp R.C., Fletcher A.B. et al.* Telomere end-replication problem and cell aging // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 225. № 4. P. 951–960. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90096-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90096-3)
94. *Menna P.L., Gomez D.E., Alonso D.F. et al.* Telomere structure and telomerase in health and disease // *Int. J. Oncol.* 2012. V. 41. № 5. P. 1561–1569. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1611>
95. *Galati A., Micheli E., Cacchione S.* Chromatin structure in telomere dynamics // *Front. Oncol.* 2013. V. 3. № 3. P. 1–16. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00046>
96. *Brazvan B., Ebrahimi-Kalan A., Velaei K. et al.* Telomerase activity and telomere on stem progeny senescence // *Biomed. Pharmacother. Elsevier.* 2018. V. 102. № 2. P. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.073>
97. *Greider C.W., Blackburn E.H.* The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity // *Cell.* 1987. V. 51. № 6. P. 887–898. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90576-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90576-9)
98. *Lingner J., Hughes T.R., Shevchenko A. et al.* Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase // *Science.* 1997. V. 276. № 5312. P. 561–567. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.561>
99. *Chang E., Adams R., Chiu C. et al.* The RNA component of human telomerase // *Science.* 2006. V. 269. № 5228. P. 1236–1241. <https://doi.org/10.1126/science.7544491>
100. *Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A.* Telomerase: structure, functions, and activity regulation // *Biochemistry (Mosc.).* 2010. V. 75. № 13. P. 1563–1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297910130055>
101. *Sandin S., Rhodes D.* Telomerase structure // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2014. V. 25. P. 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.02.003>
102. *Yi X.* Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 29. № 23. P. 4818–4825. <https://doi.org/10.1093/nar/29.23.4818>
103. *Fu W., Killen M., Culmsee C. et al.* The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function // *J. Mol. Neurosci.* 2000. V. 14. № 1–2. P. 3–15. <https://doi.org/10.1385/jmn:14:1-2:003>
104. *Klapper W., Shin T., Mattson M.P.* Differential regulation of telomerase activity and TERT expression during brain development in mice // *J. Neurosci. Res.* 2001. V. 64. № 3. P. 252–260. <https://doi.org/10.1002/jnr.1073>
105. *Aix E., Gutiérrez-Gutiérrez Ó., Sánchez-Ferrer C. et al.* Postnatal telomere dysfunction induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through p21 activation // *J. Cell Biol.* 2016. V. 213. № 5. P. 571–583. <https://doi.org/10.1083/jcb.201510091>
106. *Caporaso G.L., Lim D.A., Alvarez-Buylla A., Chao M.V.* Telomerase activity in the subventricular zone of adult mice // *Mol. Cell. Neurosci.* 2003. V. 23. № 4. P. 693–702. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00103-9](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00103-9)
107. *Chen C., Zhu D.-Y., Wu H.-Y. et al.* Hippocampal telomerase is involved in the modulation of depressive behaviors // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 34. P. 12258–12269. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0805-11.2011>
108. *Liu M.-Y., Nemes A., Zhou Q.-G.* The emerging roles for telomerase in the central nervous system // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. V. 11. № 5. P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00160>
109. *Eitan E., Tamar A., Yossi G. et al.* Expression of functional alternative telomerase RNA component gene in mouse brain and in motor neurons cells protects from oxidative stress // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 48. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13049>
110. *Wagner W., Bork S., Horn P. et al.* Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 6. P. 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005846>
111. *Flores I., Cayuela M.L., Blasco M.A.* Molecular biology: Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior // *Science.* 2005. V. 309. № 5738. P. 1253–1256. <https://doi.org/10.1126/science.1115025>
112. *Campisi J.* Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors // *Cell.* 2005. V. 120. № 4. P. 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.003>

113. Wang Q., Zhan Y., Pedersen N.L. et al. telomere length and all-cause mortality: a meta-analysis // *Ageing Res. Rev.* 2018. V. 48. № 8. P. 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.09.002>
114. Guan J.Z., Guan W.P., Maeda T. et al. Patients with multiple sclerosis show increased oxidative stress markers and somatic telomere length shortening // *Mol. Cell. Biochem.* 2014. V. 400. № 1–2. P. 183–187. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2274-1>
115. Greider C.W., Zhu J.J., Black P.M. et al. Telomerase activity in human gliomas // *Neurosurgery.* 2004. V. 42. № 5. P. 1120–1124. <https://doi.org/10.1097/00006123-199805000-00099>
116. Stewart S.A., Hahn W.C., O'Connor B.F. et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 20. P. 12606–12611.
117. Varela E., Muñoz-Lorente M.A., Tejera A.M. et al. Generation of mice with longer and better preserved telomeres in the absence of genetic manipulations // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11739>
118. Harley C.B. Telomerase and cancer therapeutics // *Nat. Rev. Cancer.* 2008. V. 8. № 3. P. 167–179. <https://doi.org/10.1038/nrc2275>
119. Shay J.W., Keith W.N. Targeting telomerase for cancer therapeutics // *Br. J. Cancer.* 2008. V. 98. № 4. P. 677–683. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604209>
120. Ruden M., Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase // *Cancer Treat. Rev.* 2013. V. 39. № 5. P. 444–456. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.06.007>
121. Chen Y., Zhang Y. Functional and mechanistic analysis of telomerase: An antitumor drug target // *Pharmacol. Ther.* 2016. V. 163. P. 24–47. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.017>
122. Choi J., Southworth L.K., Sarin K.Y. et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. № 1. P. 124–138. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040010>
123. Zhou L., Zheng D., Wang M., Cong Y.S. Telomerase reverse transcriptase activates the expression of vascular endothelial growth factor independent of telomerase activity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 386. № 4. P. 739–743. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.116>
124. Beck S., Jin X., Sohn Y.W. et al. Telomerase activity-independent function of TERT allows glioma cells to attain cancer stem cell characteristics by inducing EGFR expression // *Mol. Cells.* 2011. V. 31. № 1. P. 9–15. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0008-8>
125. Mukherjee S., Firpo E.J., Wang Y., Roberts J.M. Separation of telomerase functions by reverse genetics // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 50. P. 1363–1371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112414108>
126. Hrdlickova R., Nehyba J., Bose H.R. Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation // *Mol. Cell. Biol.* 2012. V. 32. № 21. P. 4283–4296. <https://doi.org/10.1128/mcb.00550-12>
127. Sarin K.Y., Cheung P., Gilson D. et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells // *Nature.* 2005. V. 34. № 5. P. 880–886. <https://doi.org/10.1038/nature04371>
128. Gonzalez-Suarez E., Flores J.M., Blasco M.A. Cooperation between p53 mutation and high telomerase transgenic expression in spontaneous cancer development // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 20. P. 7291–7301. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.20.7291-7301.2002>
129. González-Suárez E., Gesserick C., Flores J.M., Blasco M.A. Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice // *Oncogene.* 2005. V. 24. № 13. P. 2256–2270. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208413>
130. Kelemen O., Convertini P., Zhang Z. et al. Function of alternative splicing // *Gene.* 2017. V. 514. № 1. P. 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.083.function>
131. Wick M., Zubov D., Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) // *Gene.* 1999. V. 232. № 1. P. 97–106. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00108-0)
132. Kilian A., Bowtell D.D.L., Abud H.E. et al. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. № 12. P. 2011–2019. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.12.2011>
133. Sæbøe-larsen S., Fosberg E., Gaudernack G. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues // *BMC Mol. Biol.* 2006. V. 10. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-26>
134. Withers J.B., Ashvetiya T., Beemon K.L. Exclusion of exon 2 is a common mRNA splice variant of primate telomerase reverse transcriptases // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 10. e48016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048016>
135. Bollmann F.M. Physiological and pathological significance of human telomerase reverse transcriptase splice variants // *Biochimie.* 2013. V. 95. № 11. P. 1965–1970. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.031>
136. Tsukada Y., Hisatomi H., Nagao K. et al. Expression profile of a  $\gamma$ -deletion variant of the human telomerase reverse transcriptase gene // *Neoplasia.* 2014. V. 5. № 3. P. 193–197. [https://doi.org/10.1016/s1476-5586\(03\)80051-9](https://doi.org/10.1016/s1476-5586(03)80051-9)
137. Wong M.S., Wright W.E., Shay J.W. Alternative splicing regulation of telomerase: A new paradigm? // *Trends Genet.* 2014. V. 30. № 10. P. 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.006>
138. Teichroeb J.H., Kim J., Betts D.H. The role of telomeres and telomerase reverse transcriptase isoforms in pluripotency induction and maintenance // *RNA Biol.* 2016. V. 13. № 8. P. 707–719. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1134413>

139. *Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H. et al.* Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development // *Int. J. Cancer.* 2001. V. 91. № 5. P. 644–649.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999::aid-ijc1103>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999::aid-ijc1103>3.0.co;2-v)
140. *Liu Y., Wu B., Zhong H. et al.* Quantification of alternative splicing variants of human telomerase reverse transcriptase and correlations with telomerase activity in lung cancer // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 6. P. 1–9.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038868>
141. *Listerman I., Sun J., Francesca S. et al.* The major reverse transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits telomerase activity but protects from apoptosis // *Cancer Res.* 2014. V. 40. № 8. P. 1394–1403.  
<https://doi.org/10.3899/jrheum.121180>
142. *Mudge L.-M., Hamilton C.S., Sakoff J.A. et al.* Quantification of hTERT splice variants in melanoma by SYBR green real-time polymerase chain reaction indicates a negative regulatory role for the  $\beta$  deletion variant // *Neoplasia.* 2015. V. 10. № 10. P. 1131–1137.  
<https://doi.org/10.1593/neo.08644>
143. *Kim J.* Alternative splicing and extra-telomeric role of telomerase reverse transcriptase isoforms in human embryonic stem cells: Dis. Master of science. Univ. Western Ontario, 2017. 148 p.
144. *Yi X., White D.M., Aisner D.L. et al.* An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity // *Neoplasia.* 2000. V. 2. № 5. P. 433–440.  
<https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900113>
145. *Reddel R.R., Colgin L.M., Wilkinso C. et al.* The hTERT $\alpha$  splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity // *Neoplasia.* 2002. V. 2. № 5. P. 426–432.  
<https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900112>
146. *Gandin V., Rousseau P., Autexier C. et al.* Inactive C-terminal telomerase reverse transcriptase insertion splicing variants are dominant-negative inhibitors of telomerase // *Biochimie.* 2014. V. 101. P. 93–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.023>
147. *Radan L., Postovit L.-M., Jewer M. et al.* Microenvironmental regulation of telomerase isoforms in human embryonic stem cells // *Stem Cells Dev.* 2014. V. 23. № 17. P. 2046–2066.  
<https://doi.org/10.1089/scd.2013.0373>
148. *Pickett H.A., Cesare A.J., Johnston R.L. et al.* Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 7. P. 799–809.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.42>
149. *Rivera T., Haggblom C., Cosconati S., Karlseder J.* A balance between elongation and trimming regulates telomere stability in stem cells // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. № 1. P. 30–39.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3335>
150. *Li J.S.Z., Denchi E.L.* How stem cells keep telomeres in check // *Differentiation.* 2018. V. 100. № 10. P. 21–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.01.004>
151. *Li J.S.Z., Fuste J.M., Simavorian T. et al.* TZAP: a telomere-associated protein involved in telomere length control // *Science.* 2018. V. 355. № 6325. P. 638–641.  
<https://doi.org/10.1126/science.aah6752.tzap>
152. *Wu Z., Asokan A., Samulski R.J.* Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy // *Mol. Ther.* 2006. V. 14. № 3. P. 316–327.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.009>
153. *Mingozzi F., High K.A.* Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges // *Nat. Rev. Genet. Nature Publ. Group.* 2011. V. 12. № 5. P. 341–355.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2988>
154. *Kantor B., Bailey R.M., Wimberly K. et al.* Methods for gene transfer to the central nervous system // *Adv. Genet.* 2015. V. 53. № 87. P. 125–197.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800149-3.00003-2>
155. *Porteus M.H.* Towards a new era in medicine: Therapeutic genome editing // *Genome Biol.* 2015. V. 16. № 1. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0859-y>
156. *Asuri P., Bartel M., Kwon I. et al.* An evolved adeno-associated viral variant enhances gene delivery and gene targeting in neural stem cells // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 4. P. 667–675.  
<https://doi.org/10.1038/mt.2010.287>
157. *Kotterman M.A., Vazin T., Schaffer D. V.* Enhanced selective gene delivery to neural stem cells *in vivo* by an adeno-associated viral variant // *Development.* 2015. V. 142. № 10. P. 1885–1892.  
<https://doi.org/10.1242/dev.115253>
158. *Ojala D.S., Sun S., Santiago-Ortiz J.L. et al.* *In vivo* selection of a computationally designed SCHEMA AAV library yields a novel variant for infection of adult neural stem cells in the SVZ // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 1. P. 304–319.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.006>
159. *Smith L.J., Wright J., Clark G. et al.* Stem cell-derived clade F AAVs mediate high-efficiency homologous recombination-based genome editing // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 31. P. E7379–E7388.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1802343115>
160. *Ran F.A., Cong L., Yan W.X. et al.* *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 // *Obs. Gynecol.* 2015. V. 520. № 7546. P. 186–191.  
<https://doi.org/10.1038/nature14299>
161. *Barzel A., Paulk N.K., Shi Y. et al.* Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice // *Nature.* 2016. V. 32. № 3. P. 178–182.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1563737>
162. *Barzel A., Muro A.F., Zentilin L. et al.* Promoterless gene targeting without nucleases rescues lethality of a Crigler–Najjar syndrome mouse model // *EMBO Mol. Med.* 2017. V. 9. № 10. P. 1346–1355.  
<https://doi.org/10.15252/emmm.201707601>
163. *Funk S.E., Russell D.W., Hirata R.K. et al.* Nuclease-free adeno-associated virus-mediated *Il2rg* gene editing in X-SCID mice // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 5. P. 1255–1265.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.02.028>

## **Telomerase Gene Editing in the Neural Stem Cells *in vivo* as a Possible New Therapy Against Brain Ageing**

**N. M. Nemirovich-Danchenko<sup>a,\*</sup> and M. Yu. Khodanovich<sup>a,\*\*</sup>**

<sup>a</sup>*Tomsk State University, Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk, 634050 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: nmn-d@mail.ru*

<sup>\*\*</sup>*e-mail: khodanovich@mail.tsu.ru*

Telomere shortening in neural stem cells is considered one of the main mechanisms of brain ageing. Therefore, the search for the ways to lengthen telomeres in neural stem cells appears as a promising research direction in neuromedicine. The approaches based on increasing the expression of telomerase in stem cells, proved ineffective due to higher risk of tumorigenesis which accompanies high levels of telomerase expression. There is another, fundamentally different strategy to increase telomerase activity by excluding alternative splicing. It has been shown that out of 22 splice variants of telomerase only one has telomerase activity, while the other variants of this enzyme are capable of inhibiting it, and at the same time, they promote cancer. We suggest editing the gene of telomerase in a way that increases the efficiency of telomere lengthening by excluding alternative splicing. This mechanism of enhancing telomerase activity will maintain telomerase expression at the safe level and will exclude a higher risk of carcinogenesis.

**Keywords:** neurogenesis, neural stem cells, aging, telomerase, alternative splicing, genetic engineering.