

ПРОМОТОР *TERT*: РЕШАЮЩИЙ ИГРОК В БОРЬБЕ ЗА БЕССМЕРТИЕ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКИ

© 2023 г. Т. Н. ГАСАНОВ¹, Э. П. ПИСАРЕВ^{1,2},
О. В. КИСИЛЬ³, М. Э. ЗВЕРЕВА^{1*}

¹ Кафедра химии природных соединений, Химический
факультет Московского государственного университета имени
М.В. Ломоносова, Москва

² Факультет Биоинженерии и Биоинформатики Московского
государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию
новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва

I. Введение. II. Теория опухолевых стволовых клеток. III. Теломераза: рабочий инструмент опухолевых стволовых клеток. IV. Мутации промотора *TERT* придают опухолевым клеткам «бессмертный» фенотип. V. Структура промотора *TERT*. VI. Регуляция экспрессии *TERT* на уровне разнонаправленной транскрипции с промотора. VII Регуляция экспрессии *TERT* на уровне инициации транскрипции. VIII. Мутации *TERTp* приводят к возникновению *de novo* сайтов связывания факторов транскрипции. IX. Регуляция экспрессии *TERT* через метилирование промотора *TERTp*. X. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Развитие неопластической трансформации включает прогрессирующее накопление генетических и эпигенетических изменений, которые позволяют клеткам уклоняться от апоптотических механизмов гибели и вторгаться в окружающие ткани. В последние годы растущее количество исследований выявило важную роль стабильности генома, связанной со структурой и функцией теломер в причинах появления, восприимчивости к лечению и прогнозированию опухолей различного генеза.

Принятые сокращения: ЦНС – центральная нервная система; *TERT* – обратная транскриптаза теломеразы; *TERTp* – промоторная область гена *TERT*; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ОБ – общая выживаемость.

*Адрес для корреспонденции: mzvereva@chem.msu.ru

К примеру, при исследовании глиом, полногеномные ассоциативные исследования выявили регионы, генетический полиморфизм которых является подтвержденным фактором риска этого типа опухолевого заболевания: *TERC*, *TERT*, *EGFR*, *CCDC26*, *CDKN2B*, *PHLDB1*, *TP53*, *RTEL1* [1]. Три из этих локусов риска содержат гены, участвующие в поддержании стабильности теломер (*TERC*, *TERT*, *RTEL1*).

Определяющей характеристикой опухолевых клеток является их способность обходить многочисленные регуляторные механизмы, которые ограничивают клеточную пролиферацию: одним из таких механизмов является репликативное укорочение теломер [2]. Предположительно, активация системы поддержания длины теломер является основным биологическим путем преодоления ограниченного репликативным укорочением теломер пролиферативного клеточного потенциала. Чаще всего для этого опухолевые клетки активируют рибонуклеиновый комплекс – теломеразу, которая удлиняет короткие теломеры, обеспечивая непрерывный рост опухоли. Теломераза, состоит из каталитической субъединицы, кодируемой геном обратной транскриптазы теломеразы (*TERT*), и теломеразной РНК, кодируется геном *TERC*, которая используется в качестве матрицы для обратной транскрипции во время удлинения теломер. Результаты, накопленные за последние годы, показали, что регуляция транскрипции каталитической субъединицы теломеразы происходит на нескольких уровнях под воздействием различных транскрипционных факторов или изменения сигнальных путей. Промоторная область *TERT* (*TERTp*) содержит участки связывания многих транскрипционных факторов: Sp1, c-Мyc, Mad-1, HIF-1, AP-2, β -катенина, NF- κ B, E-26 (Ets), WT1. Подавление экспрессии *TERT* реализуется в большинстве соматических клеток, однако в опухолевых клетках наблюдается повышение экспрессии положительных регуляторов транскрипции и/или снижение экспрессии отрицательных [3, 4].

Существуют различные механизмы, приводящие к активации систем поддержания длины теломер. Это не только увеличение экспрессии *TERT* при опухолях различного генеза, но и включение альтернативного удлинения теломер на основе рекомбинации. Увеличение экспрессии *TERT* обеспечивается гиперметилированием промоторной области *TERT*, образованием соматических мутаций в *TERTp*. Мутации в *TERTp*, приводящие к повышению активности теломеразы в опухолях, описаны достаточно недавно. Однако при этом, они послужили поводом для проведения значительного количества исследований, дающих исчерпывающую картину их распространен-

ности среди различных видов рака, и пониманию их биологической роли [5]. Мутации *TERTp* зарегистрированы в широком диапазоне опухолей различных типов: в первичных глиомах и мультиформных глиобластомах, олигодендроглиомах и астроцитомах, раке кожи, в т.ч. меланом, миксоидных липосаркомах, уротелиальном раке, гепатоцеллюлярной карциноме и раке щитовидной железы, а также плоскоклеточном раке полости рта и шейки матки [6]. Ряд работ продемонстрировал, что мутации *TERTp* могут возникать и в предраковых поражениях [7–12]. Это первый пример изменения некодирующей области генома, которое можно обнаружить за 10 лет до постановки клинического диагноза как было показано на примере рака мочевого пузыря [7]. Стоит отметить, что мутации в *TERTp* являются одними из наиболее распространенных генетических изменений, наблюдаемых в опухолях ЦНС. Осуществляя опосредованные и независимые от удлинения теломер действия, экспрессия *TERT*, обусловленная измененным промотором, способствует развитию и прогрессии опухоли, придавая клеткам «бессмертный» фенотип. Таким образом опухолевые клетки приобретают возможность бесконечно делиться, т.е. происходит клеточная иммортализация за счет сбоя в работе механизмов запрограммированной гибели клеток.

II. ТЕОРИЯ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Одна из современных теорий онкогенеза базируется на теории опухолевых стволовых клеток (ОСК), что хорошо проиллюстрировано на примере опухолей центральной нервной системы [13, 14]. Эта теория предполагает, что клетки, обеспечивающие рецидивирование и устойчивость опухоли, встречаются в измененной популяции клеток редко и обладают некоторыми свойствами стволовых клеток. Именно свойства стволовых клеток обеспечивают клеткам опухоли возможность быть родоначальниками клеточных линий с различными свойствами, то есть некоторые из клеток опухоли обладают мультипотентной природой. Предполагается, что свойство мультипотентности лежит в основе клеточной гетерогенности опухоли. Таким образом, ОСК в отличие от остальных опухолевых клеток находятся в основании пирамиды генетической гетерогенности и позволяют приобрести устойчивость опухоли к терапии в процессе эволюции опухоли. Основной проблемой теории ОСК является отсутствие согласованности позиции исследователей в определении того, что считать признаками ОСК или их популяции [15, 16]. Во-первых, основные функциональные свойства ОСК – самообновление и распространение

опухоли – являются отличительными чертами многих раковых клеток, что стирает различие между злокачественными новообразованиями и особенностями ОСК. Во-вторых, множество маркеров, используемых для выделения ОСК, определяет множество клеток в разных клеточных состояниях с разными генотипами. ОСК вызывают у исследователей интерес как возможная цель для разработки таргетной терапии. Предполагается совместное использование таких агентов с известными противоопухолевыми препаратами, так как именно ОСК обеспечивают терапевтическую резистентность опухоли к противоопухолевым препаратам за счет генетической изменчивости [17].

Идея ОСК была описана для различных видов опухолевых клеток [15]. В силу наибольшей представленности изменений в промоторной области каталитической субъединицы теломеразы в опухолях ЦНС рассмотрим концепцию ОСК на этом примере подробнее. Для опухолей ЦНС концепция ОСК была впервые представлена Игнатовой и соавторами, которые выделили стволовые клетки, формирующие нейросферу, из мультиформной глиобластомы человека [18]. Показано, что клетки нейросферы имеют маркеры стволовых клеток, и после трансплантации в мозг новорожденных крыс способны пролиферировать, мигрировать и продуцировать нейроны и глию, что служит подтверждением их свойства мультипотентности [19]. Так же для других опухолевых процессов ЦНС, а именно при медуллобластоме и глиобластоме была показана возможность для одной пятой части популяции опухолевых клеток образовывать нейросферы [20]. Способность к формированию нейросфер в глиобластоме коррелирует с более неблагоприятными исходами для пациентов [21, 22]. Из этих наблюдений можно сделать предположение, что именно ОСК играют центральную роль в формировании терапевтической резистентности для глиальных опухолей [23]. Также известно, что ОСК играют ведущую роль в формировании опухоли, ее росте и в создании терапевтической резистентности в раке щитовидной железы [24], раке кожи [25], раке мочевого пузыря [26], раке груди [27] и других [28].

Подобно стволовым клеткам «нормальных» тканей, ОСК дают начало потомству с ограниченной способностью к дифференцировке, которое может иметь свойство самообновления. Предположительно, свойство самообновления может передаваться к ОСК от исходной («нормальной») стволовой клетки без промежуточной клеточной дифференциации, либо может возникнуть у клетки, уже определившейся с областью своей специализации, но еще не дошедшей до последней стадии дифференцировки. В этом случае полный или частичный фенотип стволовых клеток будет воспроизведен одновременно

со свойством к самообновлению и превращением «нормальных» стволовых клеток в ОСК [29]. Torres-Montaner в обзоре 2021 года показывает что, по крайней мере, большинство видов рака происходят из клеток, уже определившихся с областью своей специализации, но ещё не дошедших до последней стадии дифференцировки, а не «нормальных» стволовых клеток. Предположительно, окончательная неопластическая трансформация происходит в постстволовых/предифференцированных клетках, которые подверглись некоторой степени сокращения длины (эрозии) теломер с последующей реактивацией теломеразы. Известно, что постепенное укорачивание теломер происходит после каждого клеточного деления, приводя «нормальные» соматические клетки к клеточному старению и запрограммированной гибели [30]. Однако, за счет включения активного поддержания длины своих теломер некоторые клетки могут избежать гибели и приобрести неограниченный репликативный потенциал. Этот процесс, известный как клеточная иммортализация, является решающим этапом в канцерогенезе.

III. ТЕЛОМЕРАЗА: РАБОЧИЙ ИНСТРУМЕНТ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Термин «теломеры», образован из греческих существительных *телос* – «конец» и *мерос* – «часть», определяет ДНК-белковые структуры на концах эукариотических хромосом [2]. Как и эглет – конец шнурка, защищающий его от истирания, теломеры охраняют целостность концов линейных хромосом, препятствуя потере генетической информации, возникающей в результате укорочения (недорепликации) запаздывающей цепи во время репликации ДНК [31]. Теломеры укорачиваются с каждым делением в клеточном цикле. Как только в результате последовательных делений клеток длина теломер достигает критически короткого размера, при котором теряется особая пространственная структура теломер (предел Хейфлика), нормальные клетки претерпевают необратимую остановку клеточного цикла, наступает клеточное старение, и клетка запрограммированно погибает. Клеточное старение предотвращает дальнейшую репликацию ДНК и пролиферацию клеток, защищая их от накопления генетических мутаций и опосредованных слиянием концов хромосом хромосомных перестроек, так как такие генетические изменения могут привести к онкогенезу.

Постепенному укорачиванию теломер из-за недорепликации ДНК противодействует теломераза [6]. Теломераза – это многокомпонент-

ный комплекс, являющийся рибонуклеопротеидом, синтезирующий теломерные повторы на концах хромосом и, таким образом, поддерживающий длину теломер. Большинство соматических тканей человека и «взрослых» стволовых клеток не экспрессируют достаточное количество активной теломеразы для бесконечного поддержания длины теломер и, следовательно, клетки претерпевают постепенное укорочение теломер. Ферментативная активность теломеразы показана в стволовых клетках, клетках ткани зародышевой линии (яичник и семенник), лимфоидных клетках-предшественниках, периферических лейкоцитах (включая лимфоциты) и клетках костного мозга [32].

В большинстве опухолевых клеток реактивация ферментативной активности теломеразы – повсеместный процесс, который служит одним из основных признаков трансформации клетки в опухолевую. Аберрантная ферментативная активность теломеразы позволяет опухолевым клеткам преодолевать антипролиферативный барьер, создаваемый короткими теломерами.

Стоит отметить, что биология теломер и теломеразы сложно и порой неоднозначно переплетается с возникновением и прогрессированием опухоли. Дисфункция теломер, возникающая в результате репликативного истощения, с одной стороны, сдерживает рост опухоли, а с другой стороны, способствует опухолевому генезису, вызывая онкогенные хромосомные перестройки [31]. Некоторые виды злокачественных образований удлиняют теломеры с помощью независимых от активации теломеразы альтернативных механизмов [33]. В свою очередь, теломераза, помимо поддержания длины теломер, может способствовать росту опухоли, взаимодействуя с факторами ремоделирования хроматина и участвуя в аберрантном метилировании ДНК [4]. В работе Nafezi и соавторов было высказано предположение, что существует узкое (кинетическое и количественное) окно для экспрессии ферментативно активной теломеразы на уровне, позволяющем защитить клетку от запрограммированной гибели и не потерять контроль над переходом к неограниченному делению. Ниже этого окна клетки поддаются теломерному кризису и повреждению ДНК, выше – клетки претерпевают значимые генетические и метаболические изменения [6].

Удлинение теломер. Длина теломер клеток и ферментативная активность теломеразы сильно зависят от возраста организма и не так явно от других факторов: окислительного стресса, курения, пола, диеты, физических упражнений, а также наследованных и приобретенных генетических изменений [34, 35]. Эти факторы объясняют различие в длине теломер у индивидуумов одного возраста. И хотя

длина теломер демонстрирует существенную индивидуальную вариабельность, в пределах одного организма в разных тканях она низка [36]. Логичным было предположение, что средняя длина теломер клеток одного типа (например, лейкоцитов) может быть индикатором риска предрасположенности к возникновению рака. Вопрос о том, связаны ли более длинные или более короткие теломеры с повышенным риском заболевания – давний вопрос в эпидемиологии опухолевых заболеваний, поскольку обе возможности подтверждаются данными наблюдений. Более короткая длина теломер обычно считается маркером старения и плохого здоровья, кроме того, короткие или незащищенные теломеры могут способствовать объединению концов хромосом за счет их распознавания системами репарации как двуцепочечных разрывов (теломерные слияния), что приводит к нестабильности генома и может стать предпосылкой к перерождению клетки. В свою очередь, предрасположенность к длинным теломерам может позволить клеткам избежать остановки деления и подвергнуться неопластической трансформации.

На примере работы Walsh и соавторов по исследованию развития глиом [1] можно проиллюстрировать взаимосвязь между организацией теломер, теломеразным комплексом, альтернативным путем поддержания теломер и риском заболевания на примере соответствующих генетических изменений, наследуемых и приобретенных: наследуемые вариации в связанных с теломерами генах коррелируют с риском глиомы, относятся к редким и влияют на пространственную организацию теломер (*POT1*), а также на теломеразную активность и эффективность удлинения теломер (*TERC*, *TERT*, *RTEL1*); одними из наиболее повторяющихся соматических событий, наблюдаемых в глиомах мутации являются изменения влияющие на пути поддержания теломер (мутации в *TERT* – основной путь за счет повышения ферментативной активности теломеразы и активации альтернативного пути поддержания длины теломер – *ATR*). Стоит отметить, что все вышеперечисленные наследственные и соматические генетические варианты в первую очередь вызывают удлинение, а не укорочение теломер. На сегодняшний день, поддержание длины теломер признано фундаментальным признаком онкогенеза глиом, при этом более протяженная длина теломер увеличивает риск глиомы [37]. Растущее количество доказательств связи между глиомой и изменениями в генах ответственных за поддержание длины теломер даёт интересную возможность оценивать глиому как болезнь дисрегуляции теломер. Похожие закономерности наблюдаются и для рака груди [38], рака кожи [39, 40], других видов рака [41, 42].

IV. МУТАЦИИ ПРОМОТОРА *TERT* ПРИДАЮТ ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ «БЕССМЕРТНЫЙ» ФЕНОТИП

Повышенная ферментативная активность теломеразы в соматических клетках регулируется через ее промотор – *TERTp*. Чтобы активировать экспрессию *TERT*, большинство видов рака «приобретают» соматические точечные мутации в *TERTp*. Эти изменения не многочисленные, точечные и могут быть ранним событием. Изменения в *TERTp* рано детектируются в случае опухолей ЦНС. Например, данные мульти-секторного секвенирования глиобластомы показали, что мутации *TERTp* являются одинаковыми во всех секторах опухоли и взаимо-исключающими, то есть встречается вариант с мутацией C228T или вариант с C250T. Таким образом, наблюдается клональность, то есть каждый сектор опухоли образован потомками одной клетки [43]. Мутации *TERTp* при онкогенезе в основном моноаллельные, вероятно, реактивация *TERT* на одном из аллелей, достаточна для обеспечения удлинения или поддержания постоянной длины теломер в опухолевых клетках [44].

«Горячие» точки мутаций *TERTp*. На сегодняшний день соматические мутации в *TERTp* в случае опухолевых заболеваний – это преимущественно C>T и показаны в позициях: – 124 п.н. (chr5:1,295,228 (по GRCh37.p13) далее по тексту обозначается C228T) или – 146 п.н. (chr5:1,295,250 (по GRCh37.p13) обозначается C250T) от иницирующего трансляцию кодона ATG мРНК каталитической субъединицы теломеразы [45, 46]. Для глиобластомы, были детектированы мутации *TERTp*, которые представляли собой tandemные дупликации в 22 нуклеотида: с -100 по -79 н.п. и с -110 по -89 н.п. [47]. Такая дупликация согласно анализу *in silico* приводит к образованию на *TERTp* двух новых сайтов узнавания для факторов транскрипции семейства Ets. Для других видов рака известны редко встречаемые мутации *TERTp* в положениях: 125/124 н.п CC>TT; 139/138 н.п CC>TT и 57 н.п C>T [48, 49]. Barthel и соавторы проанализировали опубликованные данные о соматических мутациях из когорты в 18430 образцов от 9127 пациентов с 31 видами рака и выявили, что в среднем 27% первичных опухолей несут мутации C228T или C250T, которые являются наиболее распространенными мутациями некодирующих регуляторных областей у человека [50]. Высокий процент мутаций в промоторной области *TERTp* был найден при раке мочевого пузыря (70%), меланоме (72%) и наиболее представлен в глиобластоме (89%). Как и ожидалось, опухоли, несущие мутацию *TERTp*, продуцируют более высокие уровни мРНК *TERT* и показывают

повышенную теломеразную активность [50]. Данные из других статей также подтверждают высокий процент присутствия мутаций в *TERTp* в раке мочевого пузыря [51–53], раке щитовидной железы [54, 55] и раке кожи [56–60].

Искусственно создав мутацию C228T в *TERTp* с использованием метода CRISPR в плюрипотентных стволовых клетках человека, Chiba и соавторы установили, что такие клетки конститутивно продуцируют *TERT* даже после терминальной дифференцировки, что резко контрастирует с потомками, полученными из стволовых клеток, несущими *TERTp* дикого типа, где транскрипция *TERT* была отключена после клеточной дифференцировки [61]. Более того, дифференцированные клетки с мутантным *TERTp* содержали более длинные теломеры и «устраняли» репликативное старение, вызванное укорочением теломер. Аналогично, Li и соавторы, введя с использованием метода CRISPR мутацию C228T в *TERTp* в нормальные уротелиальные стволовые клетки человека, индуцировали в них повышенную активность теломеразы [62]. И наоборот, обратная коррекция, исправление до дикого типа, мутированного по C228T *TERTp*, снизила активность *TERT* и индуцировала старение опухолевых клеток и остановку пролиферации [63]. Таким образом, вышеописанные результаты дают прямые доказательства того, что наличие мутации C228T или C250T придает клеткам устойчивый потенциал пролиферации за счет активации теломеразы. Можно сказать, что эти мутации действуют как онко-промоторы некоторых видов рака.

Показано, что присутствие мутации C228T или C250T в клетках опухоли ЦНС является взаимоисключающим, при этом мутация C228T более распространена [6]. Hafezi и соавторы попытались прояснить более низкую распространенность C250T и отсутствие двойной мутации *in vivo*. Была сконструирована панель репортерных векторов, несущих рекомбинантный ген люциферазы под контролем промотора *TERTp* с мутациями C228T и C250T отдельно или в комбинации [64]. Показано, что и мутация C228T, и мутация C250T приводят к сходному увеличению транскрипции в 2–4 раза и что обе мутации, присутствуя вместе, увеличивают транскрипцию аддитивным образом. В то же время разнонаправленная транскрипция с промотора, приводящая к общему снижению уровня *TERT*, увеличилась только мутацией C250T в *TERTp*. Было высказано предположение, что в естественных условиях именно мутация C250T более эффективно позволяет преодолеть снижение активности *TERTp*, вызванное разнонаправленной транскрипцией с промотора. Промотор

TERT определяет транскрипцию в двух направлениях – непосредственно РНК *TERT* и РНК *TAPAS*, которые обсуждаются в VI главе.

При первичных глиальных новообразованиях у взрослых частота мутаций *TERTp* коррелирует со степенью тяжести заболевания. Частота встречаемости мутаций *TERTp* коррелирует со степенью поражения: глиобластома (IV степень по классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) имеет самую высокую частоту мутаций (80% пациентов с установленным диагнозом имеют мутации в *TERTp*), поражения II и III степени, такие как олигодендроглиомы, имеют относительно более низкую частоту мутаций *TERTp* (60–70%), а опухоли I степени, такие как астроцитомы, – наименьшую частоту мутаций *TERT* (30–40%) [65]. У пациентов с менингиомами мутации *TERTp* частота мутаций коррелирует со степенью поражения: 1,7% при поражении степени I по классификации ВОЗ, 5,7% – при II степени и 20% при рецидиве с повышением степени злокачественности [66]. Для других видов рака наблюдается похожая картина: для хондросаркомы [67], для рака щитовидной железы [68], рака мочевого пузыря [69].

В целом, мутации *TERTp* более распространены при опухолевых заболеваниях ЦНС, раках щитовидной железы, мочевого пузыря и кожи. Анализ 1230 опухолей 60 типов рака, проведенный Killela и соавторами позволил выделить 2 отдельные группы раковых заболеваний – с высокой ($\geq 15\%$) или низкой ($< 15\%$) частотой мутаций *TERTp* [5]. Все виды рака в группе с высокой частотой мутаций в *TERTp* возникают из клеток, которые не являются постоянно самообновляющимися, таких как нейроны, глиальные клетки, фибробласты, гепатоциты, эпителиальные клетки протоков поджелудочной железы, где они обеспечивают немедленное конкурентное преимущество клеткам, которые их приобретают. При новообразованиях кроветворной или лимфоидной системы, раке эпителия желудочно-кишечного тракта, раке кожи или костного мозга, которые происходят из компартментов с высоким клеточным обновлением и высокой внутренней теломеразной активностью мутации *TERTp* оказывают меньшее влияние на экспрессию *TERT*, поскольку эти ткани уже экспрессируют *TERT*. Логично, что частота мутаций *TERTp* при этих формах рака невысока ($< 15\%$). При видах рака, где доля мутаций *TERTp* невысока удлинение теломер обеспечивается за счет альтернативного механизма удлинения длины теломер либо увеличением числа копий *TERT* [6].

Взаимосвязь наличия мутаций *TERTp* и длины теломер в опухолевых клетках неоднозначная, так как присутствие мутаций приводит

не только к повышению количества *TERT*, что влияет на активацию теломеразного комплекса и на взаимодействие теломеразы с другими компонентами клетки, но и изменяет количество всех РНК, транскрибируемых под контролем этой промоторной области. Эта неоднозначность отражается в независимости предсказательной способности общей выживаемости (ОВ) от присутствия мутаций *TERTp* и длины теломер, вместе и по отдельности. Показано, что мутации *TERTp* и более длинные теломеры являются предикторами плохой ОВ для пациентов с глиомой независимо от пола, возраста, степени тяжести по классификации ВОЗ, общепринятых маркеров – статуса *IDH1* и *MGMTp*, лучевой терапии и химиотерапии [70]. Одновременно определяемые мутации *TERTp* и выявленное удлинение теломер, рассматриваемые вместе, связаны с худшей ОВ пациентов в большей степени, чем каждый из параметров по отдельности. Так пациенты с мутациями в *TERTp*, особенно с C228T, или удлинёнными теломерами, имеют опухолевые поражения, которые более устойчивы к воздействию лучевой терапии [70].

Можно было ожидать, что, поскольку мутации *TERTp* являются причиной повышенной активности теломеразы, теломеры будут длиннее в клетках с изменённым *TERTp*. Как это ни парадоксально, показано, что при глиомах, раке мочевого пузыря и щитовидной железы, теломеры неизменно короче в случае соматических мутаций *TERTp* [2]. В работе Barthel и соавторы изучили длину теломер и соматические изменения при 31 типе рака в когорте из 18430 образцов [50]. Теломеры были короче в опухолевых тканях, по сравнению с нормальными, и длиннее в саркомах и глиомах, по сравнению с другими видами рака. Вероятно, давление отбора, ведущее к приобретению мутаций *TERTp* и реактивации теломеразы для преодоления теломерного кризиса, обеспечивает условия для стабилизации поддержания более коротких теломер в глиомах, содержащих мутации *TERTp*. Однако, тот факт, что, несмотря на повышенную экспрессию теломеразы, опухоли с мутациями *TERTp* имеют более короткие теломеры, чем соответствующие контрольные образцы, допускает, что эти мутации могут составлять более позднее событие в онкогенезе, когда теломеры истощены [71].

Мутация промотора *TERT* как раннее генетическое событие во время канцерогенеза. Являются ли мутации *TERTp* ранним или поздним событием в каждом из опухолевых заболеваний, в которых детектируются, в частности в генезе опухолей ЦНС, еще полностью не выяснено и требует дополнительных исследований. Можно утверждать однозначно только для рака мочевого пузыря, что это

раннее необратимое событие [7]. Так, мутации *TERTp* могут возникать в предопухолевых поражениях. Анализ пациентов с раком мочевого пузыря показал, что мутации в *TERTp* могли быть обнаружены в образцах ДНК, выделенных из мочи (это внеклеточная ДНК и геномная ДНК отшелушенных клеток) за 10 лет до первичной клинической диагностики заболевания и отсутствовали среди сопоставимых контрольных групп, в которых не развился никакой рак в течение 10 лет после взятия образцов [7]. Wang и соавторы детектировали мутации в *TERTp* как в доброкачественной фолликулярной аденоме щитовидной железы, так и в предраковых поражениях или фолликулярных опухолях с атипичной аденомой щитовидной железы или с неопределенным потенциалом злокачественности [8, 9]. Мутации *TERTp* в вышеназванных предраковых образованиях были обнаружены у 17% пациентов, что было сопоставимо с его полностью трансформированным аналогом фолликулярной карциномы щитовидной железы. Так же мутация *TERTp* была идентифицирована как раннее событие при гепатоцеллюлярной карциноме, циррозе печени, меланоме и уротериальной папилеме [10–12]. Важно отметить, что во всех проанализированных опухолевых образцах, несущих мутации *TERTp*, была выявлена мРНК *TERT* и теломеразная активность. В настоящее время неясно, как именно мутации *TERTp* могут возникать в ранних онкогенных поражениях и полностью трансформированных клетках, возможно, соматические мутации в клетках накапливаются с постоянной скоростью на протяжении всей жизни [71].

V. СТРУКТУРА ПРОМОТОРА *TERT*

Промотор *TERT* определяют как участок генома, расположенный в окрестностях старта инициации транскрипции TSS (transcriptional start site) *TERT* и задают транскрипцию в двух направлениях – непосредственно РНК *TERT* и РНК *TAPAS* (рис.1А). Эту область генома разделяют на протяженный проксимальный участок и коровый участок промотора, непосредственно окружающий TSS *TERT* [72]. Коровый участок представляет собой минимальную последовательность ДНК, способную обеспечивать точную инициацию транскрипции РНК-полимеразой I *TERT*. На сегодняшний день это соответствует участку промотора *TERT* в пределах 330 п. п. выше по течению и 37 п. п. ниже по течению от ATG (от -330 до +37) [73] (рис.1А).

Метилирование проксимальной области выше по течению от корового *TERTp* участвует в регуляции транскрипции *TERT* [74].

Показано, что связывание CCCTC-связывающего фактора (CTCF) ниже по течению от *TERT_p* к области, охватывающей примерно первый экзон, ухудшает транскрипцию *TERT* [75]. В коровом *TERT_p* содержатся два потенциальных участка узнавания CTCF (CCCTC), однако связывание с ними для CTCF не показано. Схема *TERT_p* человека приведена (рис.1Б).

VI. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *TERT* НА УРОВНЕ РАЗНОНАПРАВЛЕННОЙ ТРАНСКРИПЦИИ С ПРОМОТОРА

В коровом *TERT_p* отсутствуют TATA-бокс и CAAT-бокс, при этом он содержит массив из пяти GC-боксов, окруженных двумя E-боксами (CACGTG) [76]. Как и у многих промоторов, у которых отсутствуют TATA- или CAAT-боксы, *TERT_p* является двунаправленным [77] (рис. 1Б).

Таким образом эта области генома активирует транскрипцию в двух противоположных направлениях, что приводит к синтезу двух различных РНК: матричной РНК *TERT* и РНК *TAPAS*. Ген *TAPAS* получил такое название, поскольку приводит к образованию некодирующей РНК, синтезирующейся по разнонаправленной транскрипции с промоторной области гена *TERT* РНК (*TAPAS*). Транскрипция *TAPAS* начинается с положения -167 от TSS *TERT*. Согласно данным ENCODE Consortium такой транскрипт заметно присутствует в линиях В-клеточных лимфом (GM12878 и OCI-LY7), несколько слабее в линиях эмбриональных стволовых клеток человека (H1-hESC), в ещё меньшей степени в линии гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2), и наконец отсутствует в линиях опухоли шейки матки (HeLa) и лейкемии (K562) [78]. С использованием данных, полученных из атласа опухолевого генома, было предсказано, что примерная длина транскрипта составляет 1,6 тыс.п.н., что в последствии было подтверждено авторами на примере линии HEK-293 с помощью анализа ПЦР в реальном времени [79]. В соответствии с полученными данными, транскрипт *TAPAS* представляет собой цельный несплайсированный экзон. Интересным является тот факт, что, хотя данный транскрипт и проявляет свойства некодирующей РНК (отсутствует открытая рамка считывания, предсказывается формирование стабильной вторичной структуры), он представлен в polyA⁺ и polyA⁻ формах. В В-клеточных лимфомах обе формы представлены в ядре, но только полиаденилированная форма содержится в цитоплазме.

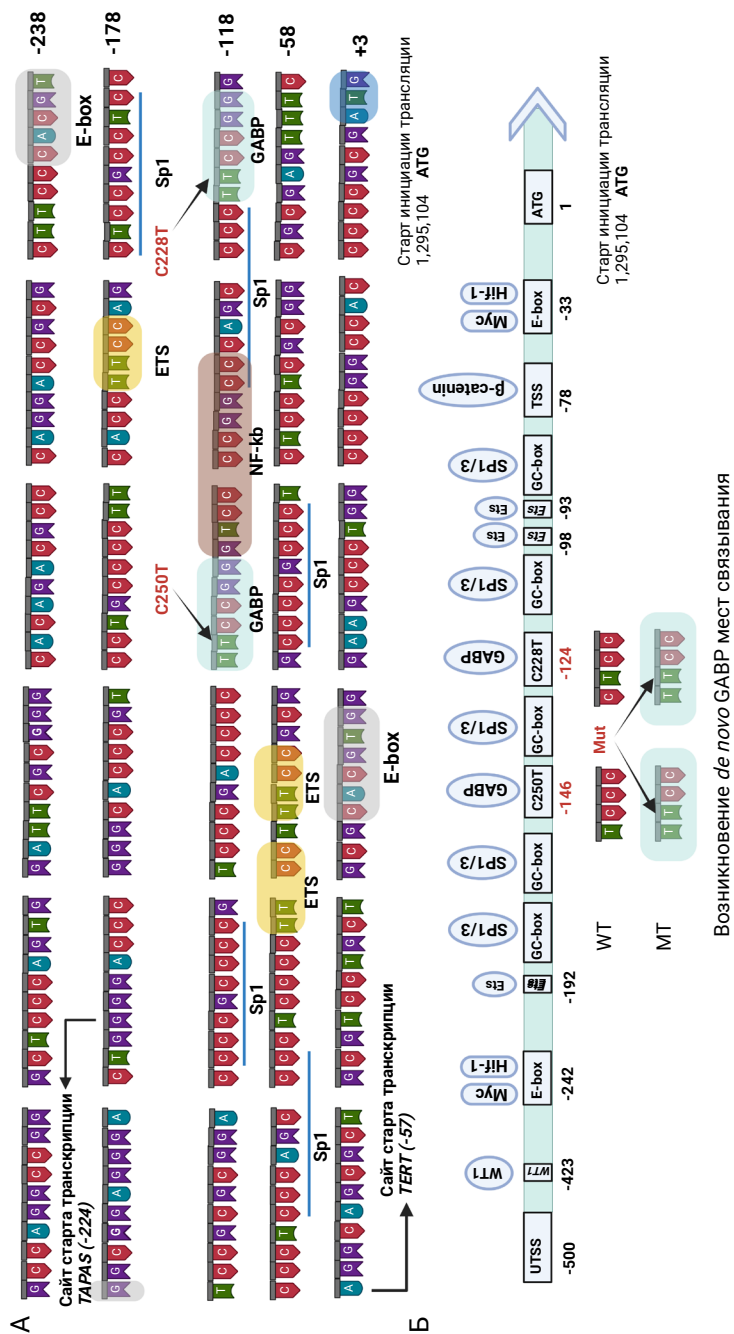


Рис 1. Подпись к рисунку 1 см. на сл. стр.

Рис 1. (А) Последовательность *TERT* человека с консенсусными мотивами для сайтов связывания транскрипционных факторов.

(Б) Схема *TERT* с обозначением местоположения транскрипционных факторов и их участков узнавания.

Местоположение сайтов на схеме промотора не соответствует реальному масштабу. Прямоугольниками обозначены – сайты узнавания транскрипционных факторов SP1, WT1, Ets и SP1, а также GC боксы и E-боксы. Белки показаны в виде овалов. TSS – сайт начала транскрипции. ATG-инициирующий кодон. Мутации в положениях, -124 и -146 п.н. от стартового сайта ATG приводят к возникновению *de novo* Ets-связывающие мотивов для белка GABP (красные пунктирные овалы). Сайты старта транскрипции с указанием направления транскрипции для *hTERT* и *hTAPAS* также представлены. Цифра «1» указывает на первый 5' нуклеотид от начала трансляции. UTSS – специфическая регуляторная дальняя область промотора *TERT*.

В рисунке использованы данные статей [2, 76].

На коллекции клинических образцов восьми различных типах рака было показано, что только в 20% опухолей наблюдается одновременная транскрипция *TERT* и *TAPAS*, притом высокий уровень ко-экспрессии наблюдается в случаях рака мочевого пузыря и печени, а также в лимфомах [64].

Нокдаун РНК *TAPAS* в линии HEK-293 приводит к снижению её уровня экспрессии в 4 раза, сопряжённому с повышением уровня экспрессии *TERT* в 1,8 раз. Сравнение данных секвенирования РНК (метод RNA-seq) восьми различных клеточных линий гепатоцеллюлярной карциномы позволило выдвинуть предположение, что мутация C228T, повышающая уровень активности *TERT* в организме человека, никак не влияет на экспрессию *TAPAS*. С использованием синтетических конструкций на основе люциферазного репортера это предположение было дополнительно доказано на линии HEK-293. Количественный анализ показал, что 70-кратный подъём экспрессии *TAPAS* приводит к 2-кратному снижению уровня экспрессии *TERT*.

Последние данные [64] указывают на то, что наличие C250T, но не C228T усиливает помимо транскрипции *TERT* транскрипцию *TAPAS*. Исследование проводили на линиях HEK-293T и HeLa с помощью синтетических конструкций, содержащих люциферазный репортер и различные участки области *TERT*: ближнюю промоторную область (-295 – -23), её же с добавлением первого экзона (-295 – +81), с добавлением первых экзона, интрона и фрагмента второго экзона (-295 – +359), ближнюю область с захватом регуляторных последовательностей (-499 – -23), дальнюю промоторную область (-1822 – -23) и весь участок от дальней области до неполного второго экзона (-1822 – +359). В результате был обнаружен необычно высокий уро-

вень транскрипции по смысловой цепи конструкции, содержащей ближнюю промоторную область, и первый экзон. Кроме того, полученные данные позволяют сделать вывод, что одновременное присутствие двух мутаций ещё более стимулирует транскрипцию по обеим цепям. В этой же работе было показано присутствие *TAPAS* в линиях происхождения U87 (несущий мутацию C228T) и T98G (несущий мутацию C250T).

Открытие РНК *TAPAS* показывает, что механизм изменения эффективности *TERTp* в случае присутствия мутаций более сложный, чем появление нового сайта связывания транскрипционных факторов и требует дальнейшего изучения.

VII. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *TERT* НА УРОВНЕ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

TERTp содержит специфические последовательности ДНК, необходимые для связывания множества активаторов и репрессоров транскрипции *TERT*, а именно Sp1, с-Мус, Mad-1, HIF-1, AP-2, β-катенин, NF-κB, E-26 (Ets), WT1 (рис 1) [73]. Эти транскрипционные факторы не только помогают *TERTp* поддерживать транскрипцию каталитической субъединицы теломеразы, но и участвуют в пролиферации опухолевых клеток посредством теломер-независимых механизмов. Все вышеперечисленные регуляторы транскрипции координированно контролируют *TERTp*, обеспечивая отсутствие его активности в большинстве соматических клеток, однако данный баланс выключается в опухолевых клетках из-за аномальной экспрессии положительных регуляторов или подавления отрицательных [3].

Регуляция теломеразы в онкогенезе исследуется много лет [80], в настоящем обзоре проведены основные регуляторы транскрипции *TERT* и актуализация данных по ним.

Мус/Max/Mad1. Белки Мус и Mad представляющие собой транскрипционные факторы семейства «спираль-петля-спираль»/«лейциновые молнии», участвуют в контроле пролиферации, дифференцировки и апоптозе клеток. В норме Мус присутствует в клетках всех типов тканей, основная функция Мус — модуляция экспрессии генов. Считается, что под непосредственным контролем с-Мус находится экспрессия около 15 % всего человеческого генома [81]. Мус формирует комплекс с белком Max: образованный гетеродимер связывается с участками узнавания, которые перекрываются с Е-боксами *TERTp*. Показано, что непосредственное взаимодействие с-Мус с Е-боксами на *TERTp* (вероятно, в сочетании с белками семейства

SP1) приводит к активации транскрипции *TERT* [82-84]. В противодействие с-Мус белки Mad репрессируют транскрипцию репортерных генов, содержащих E-бокс. Таким образом, Mad1, ингибирует трансформацию опухолевых клеток, опосредованную с-Мус.

Присутствие других транскрипционных факторов может влиять на Мус-опосредованную транскрипцию *TERT*. Показано, что белок Ets-2 необходим для экспрессии с-Мус при раке молочной железы. Выключение гена Ets-2 приводило к уменьшению мРНК с-Мус [85, 86]. Показано, что связывание с-Мус с E-боксом носит кооперативный характер и зависит от связывания Ets-2 с участком узнавания Ets на *TERT*.

SP1/SP3. Другими отличительными нуклеотидными последовательностями для *TERT* являются GC-боксы, являющиеся сайтами связывания фактора Sp1. Sp1 (как и Sp3) принадлежит к семейству транскрипционных факторов Sp/KLF и узнает последовательность (CCGCCC). Белок имеет структурный мотив «цинковый палец», позволяющий напрямую связываться с ДНК и усиливать уровень транскрипции генов. В коровом *TERT* находится по меньшей мере пять GC-боксов – представляющих собой сайты узнавания Sp1 [87]. Введение мутаций в GC-боксы *TERT* приводит к резкому снижению активности промотора, а мутации всех пяти GC-боксов полностью исключают его транскрипционную активность [88] (рис. 2). При этом ни мутации GC-боксов, ни нокдаун эндогенного Sp1 не влияют на связывание *TERT* другими факторами транскрипции, включая белки, связывающиеся с E-боксами. Таким образом, связывание *TERT* с Sp1/Sp3 является хотя и важным, но не ограничивающим этапом для транскрипции *TERT*. Следует отметить, Sp1 проявляет активность в широком спектре нормальных клеток и поэтому не является значимым кандидатом на то, чтобы вызывать специфичную для злокачественных опухолей экспрессию *TERT*.

HIF. Гипоксией индусцированный фактор (HIF) является специфическим регуляторным белком, активность которого увеличивается при снижении содержания кислорода в крови. HIF играет главную роль в системном ответе организма на гипоксию. HIF представляет собой гетеродимер, состоящий из конститутивно экспрессируемой субъединицы HIF-1 β и регулируемой кислородом субъединицы HIF-1 α [89]. Известно, что снижения содержания внутриклеточного кислорода происходит в результате внутриопухолевой гипоксии. Это приводит к изменениям в органах и тканях, это относится и к гипоксии опухолевых клеток. Поскольку в опухолевых тканях ангиогенез протекает очень интенсивно, и является одной из причин быстрого

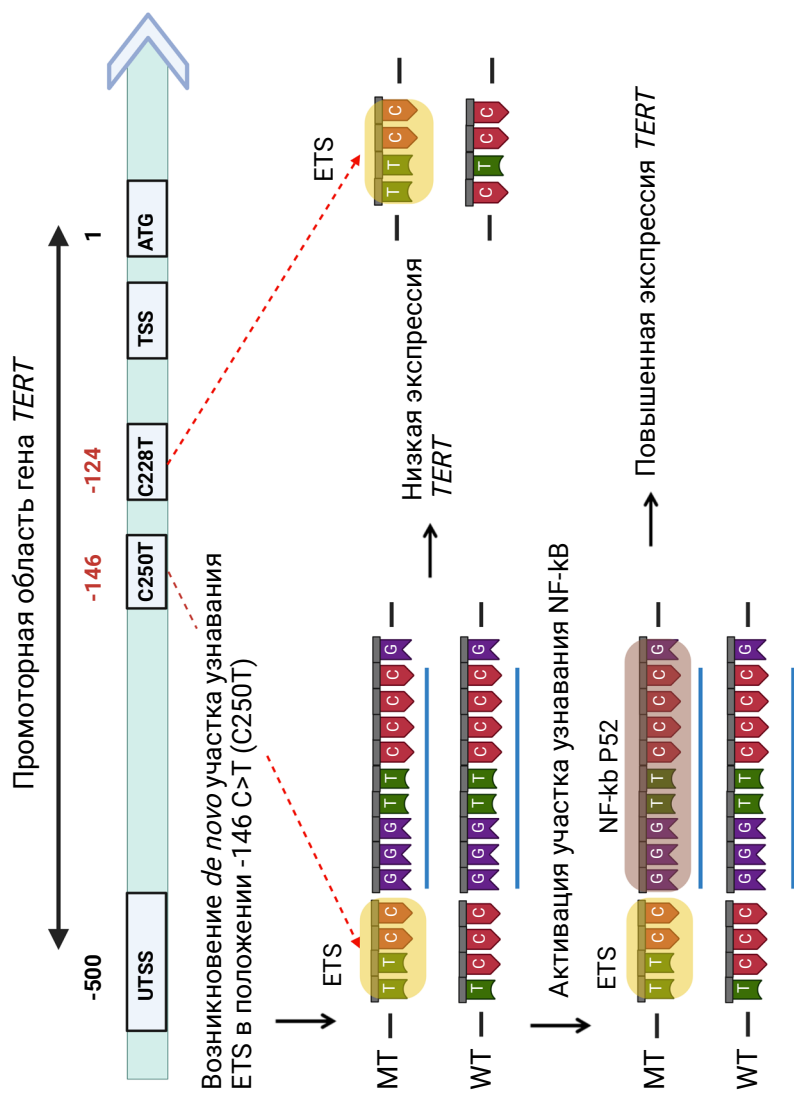


Рис. 2. Предлагаемая модель активации теломеразы при мутации C250T в *TERT* p52 субъединица NF-κB (бледно-фиолетовый овал) взаимодействует с транскрипционным фактором ETS 1/2 (жёлтый овал). Мутационная точка C > T выделена красной пунктирной линией.

роста опухолей, дополнительное влияние внутриопухолевой гипоксии существенно ухудшает прогноз заболевания ввиду стимулирования пролиферации опухолевых клеток и ускорении роста опухоли в другие ткани. [90]. Кроме того, усиленный ангиогенез в опухоли способствует метастазированию её клеток, что, в конечном счете, увеличивает смертность среди пациентов. Способствуя ангиогенезу, HIF-1 играет принципиальную роль в прогрессировании, инвазивности и метастазировании злокачественных заболеваний.

Показано, что HIF-1 α вовлечен в регуляцию транскрипции *TERT*, однако в различных исследованиях были получены противоречивые результаты. Компьютерный анализ выявил наличие в *TERTp* двух консенсусных последовательностей ACGTG, с которыми связывается HIF-1 и которые частично перекрываются с двумя E-боксами (CACGTG). Использование репортерных плазмид, содержащих *TERTp*, с люциферазой вместо TERT показал, что транскрипция значительно активировалась при гипоксии и сверхэкспрессии *HIF-1*, и что два предполагаемых сайта связывания HIF-1 в *TERTp* ответственны за эту активацию. Показано, специфическое связывание HIF-1 α с этими сайтами, усиливающееся при гипоксии и конкурирующее с c-Мус [91, 92]. В то же время, Koshiji и соавторы наблюдали, что HIF-1 не активировал, а подавлял экспрессию *TERT* в клетках рака толстой кишки [93]. Причины этого расхождения остаются неясными. Lou и соавторы обнаружили, что как HIF-1 α , так и его паралог HIF-2 α были способны значительно активировать экспрессию *TERT* в клеточных линиях почечно-клеточного рака [89]. Однако в той же работе было показано, что в клеточных линиях глиомы HIF-1 α стимулировал, тогда как HIF-2 α ингибировал активность *TERTp*. Эти результаты лишний раз демонстрируют сложный баланс регуляции активности теломеразы, обеспечиваемый транскрипционными факторами в опухолевых клетках.

β -катенин. Сигнальный путь, опосредуемый белками Wnt, представляет собой каскад реакций, которые регулируют нормальное эмбриональное развитие, а также участвуют в процессах поддержания клеточного гомеостаза в течение всей жизни организма, затрагивая большинство органов и тканей. Принято считать, что Wnt/ β -катенин играет решающую роль в нейрогенезе и глиогенезе в неокортексе, нарушения функционирования сигнального пути Wnt приводят к онкологическим заболеваниям [94, 95]. Канонический сигнальный путь Wnt характеризуется накоплением β -катенина в ядре клетки. Как элемент канонического пути Wnt, β -катенин может контролировать клеточную пролиферацию в различных типах клеток. В отсутствие

сигнального пути Wnt/ β -катенина уровень последнего жестко регулируется комплексом деградации белков. Показано, что β -катенин непосредственно связывается с участком TSS в *TERT* и активирует транскрипцию *TERT* [96]. Нокдаун β -катенина в значительной степени подавляет транскрипцию *TERT* в опухолевых клетках [97].

Детальный анализ взаимосвязи *TERT* и пути Wnt/ β -катенин, включая опосредованное влияние циклина D1 и с-Мус проведено в работе [95]. Следует отметить, что с-Мус (смотри влияние на *TERT* выше) может так же регулироваться через Wnt/ β -катениновый путь. Таким образом, с одной стороны, *TERT* можно рассматривать как одну из ключевых мишеней этого сигнального пути. С другой стороны, теломераза обладает способностью взаимодействовать с геном-1, связанным с *brahma* (BRG1), фактором ремоделирования хроматина, и облегчает привлечение BRG1 к генам, кодирующим β -катенин для активации их транскрипции [98]. Учитывая факт, что теломераза может положительно регулировать экспрессию гена, кодирующего β -катенин, предположено существование обратной связи между уровнями *TERT* и β -катенином в стволовых и опухолевых клетках. Возможно, *TERT* и β -катенин способствуют функциональной активности друг друга из-за их общего/перекрывающегося влияния на биологию стволовых клеток и канцерогенез [99].

WT1. Ген опухоли Вильмса 1, *WT1*, кодирует белок, относящийся к семейству «цинковые пальцы» и являющийся транскрипционным репрессором *TERT*. *WT1* был впервые обнаружен как ген-супрессор в опухоли Вильмса, злокачественном эмбриональном новообразовании почки. Методом делеционного анализа на *TERT* был идентифицирован участок взаимодействия с WT1 (GCGCGGGCG) между -307 и -423 п.н. [100]. Показано, что повышенная активность WT1 подавляет транскрипцию *TERT* в опухолевых клетках, а замены в сайте связывания WT1 с *TERT* ингибируют взаимодействие WT1 с ДНК. Повышенная экспрессия *WT1* в клеточной линии ясенклеточного почечно-клеточного рака снижала уровни мРНК *TERT* за счет прямого связывания WT1 с *TERT* [101]. Кроме того, для данного вида рака повышенная экспрессия *WT1* подавляла с-Мус на уровне транскрипции, в то время как выключение *WT1* приводило к увеличению активности с-Мус (с-Мус является активатором экспрессии *TERT*, см. выше). Увеличение экспрессии *WT1* было обнаружено в глиомах высокой степени злокачественности [102, 103]. Oji и соавторы показали, что продукция белка WT1 была значительно выше в опухолях ЦНС высокой степени злокачественности, чем в опухолях низкой степени злокачественности, и что обработка антисмысловыми пос-

ледовательностями к *WT1* специфически ингибировала рост клеточных линий U87-MG, A172, и T-98G, суммарно данные говорят о значимости этого фактора в онкогастроцитарных опухолей [104].

Транскрипционные факторы семейства Ets. Белки Ets играют важную роль в регуляции транскрипции многих эукариотических генов. Они имеют характерную структуру, известную как erythroblast transformation specific (ETS). Клеточный предшественник онкогенных Ets был впервые обнаружен в 1983 году как белок, экспрессируемый птичьим ретровирусом E26, что так же нашло отражение в обозначении семейства. В настоящее время для человека обнаружено 27 белков Ets разделенных на 11 подсемейств. Факторы тройного комплекса (TCF), вероятно, являются наиболее изученным подсемейством Ets [105]. В отличие от многих других факторов транскрипции белки Ets связываются с ДНК в виде мономеров. Белки Ets имеют общий высококонсервативный участок узнавания ДНК, состоящий из богатой пуринами центральной основной последовательности ((T/A) TCC) и более вариабельных окружающих последовательностей, которые и способствуют специфичности связывания. Так же для достижения функциональной специфичности белки Ets взаимодействуют с определенными белками-партнерами, при этом сильное взаимодействие с белком-партнером может даже заставить белки Ets связываться с неблагоприятным сайтом связывания ДНК, таким как СТСС [106]. Показано, что в результате белок-белковых взаимодействий транскрипционная активность белков Ets при различных видах рака часто увеличивается [107].

Помимо участия в нормальном росте и развитии, белки Ets, посредством регуляции клеточной пролиферации, участвуют в формировании и прогрессировании рака. Избыточная экспрессия Ets часто коррелирует с повышенной инвазией, более высокой градацией опухоли и неблагоприятным прогнозом [105, 108]. Значимая роль Ets в онкогенезе человека подтверждается тем, что гены, кодирующие транскрипционные факторы Ets, приобретают точечные мутации (показано для Spi-1, Ets-1), подвержены геномной амплификации (Ets-1, Ets-2, Erg), повышенной (Ets-1, Ets-2) или пониженной (Spdif, Self) экспрессии или перестройкам (Etv-6, Fli-1, Erg) при прогрессировании опухолевых заболеваний. Это в свою очередь приводит к изменению активности соответствующих белков [109]. За последнее десятилетие стало очевидным, что факторы транскрипции Ets значимо участвуют в регуляции экспрессии теломеразы при онкогенезе [110]. Анализ последовательности *TERTp*, выявил три нативных сайта связывания Ets. Интересен механизм, с помощью

которого белки Ets усиливают транскрипцию *TERT* при соматических мутациях промотора, по меньшей мере в 2 раза. Он заключается в возникновении новых сайтов связывания на *TERTp* вследствие мутации в положениях -146 и -124 [46, 111]. Среди транскрипционных факторов Ets связывание с возникшими *de novo* сайтами показано для Ets-1/2 и GA-связывающего белка (GABP) [112, 113].

VIII. МУТАЦИИ *TERTp* ПРИВОДЯТ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ *DE NOVO* САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ

В отличие от других членов семейства Ets, GABP представляет собой мультимер, состоящий из ДНК-связывающей субъединицы GABP α и трансактивирующей субъединицы GABP β . Полнофункциональный фактор транскрипции, который может как связывать ДНК, так и активировать транскрипцию образуется за счет димеризации субъединиц с образованием гетеротетрамера GABP α 2 β 2. Для связывания GABP нужны два близлежащих ДНК-мотива (TTCC), расположенных на 1, 2 или n витков спирали друг от друга или сближенных петель ДНК [46, 112, 113]. На сегодняшний день установлено, что мутации в *TERTp* в положениях -124 и -146, приводящие к замене С на Т (С228Т и С250Т) создают сайты связывания для GABP α в клеточных линиях глиобластомы [46].

Проверка влияния на транскрипцию *TERT* 13 транскрипционных факторов семейства Ets, экспрессированных в глиобластоме, с использованием малых интерферирующих РНК показала, что именно GABP действует, как главный активатор для измененного *TERTp*, способствуя транскрипции *TERT*. Нокдаун GABP α значительно снижал активность *TERTp* с мутациями, не влияя на активность промотора дикого типа [46]. Показано, что именно, GABP α , а не другие члены Ets, связывается с мутированным *TERTp*. Более того, GABP α селективно узнает мутантный аллель, несущий С228Т, что приводит к аллель-специфической активации транскрипции *TERT*. Выше уже упоминалось, что для связывания GABP нужны два близлежащих сайта узнавания Ets. Чтобы оценить, какие конкретно сайты связывания Ets *TERTp* участвуют в связывании GABP, был проведен их сайт-направленный мутагенез, причем был использован *TERTp* как с мутациями в положениях -124 С>Т или -146 С>Т, так и неизмененный *TERTp*. Мутации в участках сайтов связывания Ets в положениях -93 или -98 снижали транскрипционную активность обычного промотора, и значительно снижали активность измененного

мутациями *TERTp*. Напротив, мутации в участке сайта связывания Ets -192 не влияла на активность промотора в контексте мутации -146 C>T, не смотря на то что, он находится ближе, чем Ets -93 или Ets -98 (рис. 1Б). Эти данные демонстрируют, что именно участки узнавания Ets -93 или Ets -98 необходимы для привлечения GABP [46].

Показано, что в клетках глиобластомы, содержащих мутации *TERTp*, но лишенных активности GABP β 1L, происходит снижение экспрессии *TERT*, активности теломеразы и, в конечном итоге, канцерогенного потенциала [114]. Нокаут изоформы *GABP β 1L* *in vivo* и полный нокаут *in vitro* приводят к кратковременному (но клинически значимому по времени) замедлению роста клеток с мутациями в *TERTp*. Показано, что специфическое для опухолевых клеток глиобластомы ингибирование несущего мутации *TERTp* за счет снижения уровня GABP β 1L приводит к повышенной чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии темозоломидом [115]. Однако при опухоли щитовидной железы или раке мочевого пузыря GABP α действует как опухолевый супрессор, несмотря на его стимулирующее действие на экспрессию *TERT* в глиобlastомах [116, 117]. Клинические исследования показывают, что у пациентов с опухолями щитовидной железы и раком мочевого пузыря низкая экспрессия GABP α сильно коррелирует с большими размерами опухоли, поздними стадиями, местными и отдаленными метастазами и худшими прогнозами выживаемости. Следует отметить, что повышенное метилирование промотора GABP α и/или делеция гена приводящие к подавлению экспрессии GABP α , чаще наблюдается в агрессивных опухолях. Это дополнительно подтверждает, что GABP α является супрессором определенных видов опухоли, поскольку aberrантное метилирование ДНК и делеции вызывают инактивацию генов-супрессоров опухолей в клетках [4].

Возможно, снижение экспрессии GABP α может следовать, а не предшествовать мутациям *TERTp*. В таком случае речь идет о клеточной адаптации, которая дает избирательное преимущество клеткам с мутациями в *TERTp*, сдерживая реактивацию *TERT*. То есть снижение активности GABP α может быть адаптацией к TERT-индуцированной пролиферации и следовать за снижением экспрессии *TERT* [4]. Если же экспрессия GABP α постепенно подавляется, в то время как экспрессия *TERT* увеличивается в поэтапном канцерогенезе от предопухолевого поражения до полностью трансформированного состояния, то взаимодействие между мутантным *TERTp* и GABP α больше не является критически важным [6]. В этом случае активируются иные множественные пути, способствующие экспрессии *TERT*.

Хочется отметить, область вокруг положений -124 и -146, мутации в которых меняют регуляцию *TERTp*, является GC-богатой, что предполагает возможность образования неканонических структур ДНК, в частности G-квадруплексов, которые также могут регулировать экспрессию генов. Потенциальное влияние мутаций *TERTp* на эту прогнозируемую неканоническую структуру и взаимосвязь с рекрутированием GABP и также может сыграть роль в дерегулировании экспрессии *TERT* [46].

NF-κB. Семейство ядерных факторов κB (NF-κB) представляет собой группу индуцируемых факторов транскрипции, регулирующих многие клеточные пути, включая онкогенез. В *TERTp* были идентифицированы два потенциальных мотива узнавания NF-κB [118]. Li и соавторы показали, что взаимодействие субъединицы p52 NF-κB с одним из участков узнавания на *TERTp*, приводит к кооперативному связыванию фактора транскрипции Ets1 или Ets2 (Ets1/2), с сайтом узнавания, возникающим *de novo* на *TERTp* в результате мутации в положении -146 [119] (рис. 2). То есть в отличие от GABP, связывание только Ets1/2 с *TERTp*, несущим мутацию C228T и C250T недостаточно для активации экспрессии гена: для эффективной реактивации требуется кооперация Ets факторов с субъединицей p52 NF-κB. Показано, что именно мутация в положении -146, а не -124, взаимосвязана с неканонической передачей сигналов NF-κB. Неканоническая активация сигнального пути NF-κB основана на регуляции ограниченного протеолиза предшественника NF-κB и протекает при помощи димера p52 NF-κB/RelB [119].

Мутация -124 C>T имеет более высокую распространенность, чем мутация -146 C>T для всех видов рака ЦНС. Хотя обе эти мутации генерируют идентичные последовательности, обеспечивают связывание GABPα и одинаково эффективны в увеличении транскрипции *TERT in vitro*, *in vivo* конкретно мутация -124 C>T связана с более высокой экспрессией *TERT* в глиобластоме [46, 120]. Это указывает на то, что сайт узнавания для белков семейства Ets, возникающий *de novo* в результате мутации в положении -124 формирует более благоприятное/доступное место для GABP [121] (рис. 2).

Таким образом, несмотря на сходные эффекты, две канонические мутации *TERTp* могут отчетливо изменять экспрессию *TERT* по-разному. Механизм(ы), опосредующие индукцию транскрипции *TERT* этими мутациями, остается плохо изученным. Очевидно, что мутации легко нарушают функциональную целостность *TERTp* из-за его перегруженности регуляторными элементами, взаимодействующими

с факторами транскрипции. Возможно две ключевые для глиомы мутации *TERTp*, генерирующие один и тот же сайт связывания Ets, функционально различны в том смысле, что – 146 C> T, в отличие от –124 C> T, кооперируется с неканонической передачей сигналов NF-κB.

Суммируя данные, можно сделать вывод, что механизмы активации *TERTp*, несущих различные соматические мутации, требуют отдельного исследования для каждого типа опухолевого поражения и дальнейшего изучения.

IX. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *TERT* ЧЕРЕЗ МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРА *TERTp*

Гиперметиличирование *TERT* недавно было идентифицировано, как дополнительный фактор активации экспрессии *TERT* в опухолевых клетках [74, 122]. Обычно гиперметиличирование промоторной области приводит к подавлению транскрипции. Однако, парадоксально, но для некоторых форм рака транскрипция *TERT* связана с повышенным содержанием 5mC в CpG-островках *TERT*. Lee и соавторы в своем исследовании описывают гиперметиличированный геномный участок длиной 433 п.н. (от –218 до –650 от ATG Chr5: 1,295,321 – 1,295,753) расположенный непосредственно перед *TERTp*, получивший название THOR (TERT Hypermethylated Oncological Region) [74, 123], (рис. 3). THOR включает в себя 52 CpG динуклеотида, его метилирование приводит к усилению транскрипции *TERT* в некоторых видах опухолей. Анализ метилирования THOR в 1352 опухолях человека выявил частое (> 45%) гиперметиличирование ДНК, связанное со злокачественными опухолями. Проявление специфического гиперметиличирования в THOR, сопровождается пониженным метилированием непосредственно той коровой области *TERTp*, которая несет соматические мутации. Важно отметить, что гиперметиличирование THOR приводит к увеличению экспрессии *TERT* независимо от мутационного статуса *TERTp* и активирующие эффекты мутаций *TERTp* снижаются, когда THOR не метилирован [74].

Эти данные позволяют предположить независимый от мутаций в *TERTp* механизм усиления экспрессии *TERT*. Хотя гиперметиличирование THOR при раке с низкой частотой мутаций *TERTp*, тем не менее, гиперметиличирование THOR наблюдается и при раке с высокой частотой промоторных мутаций.

Для педиатрических опухолей ЦНС Castelo-Branco и соавторы определили специфическую область *TERT* получившую название

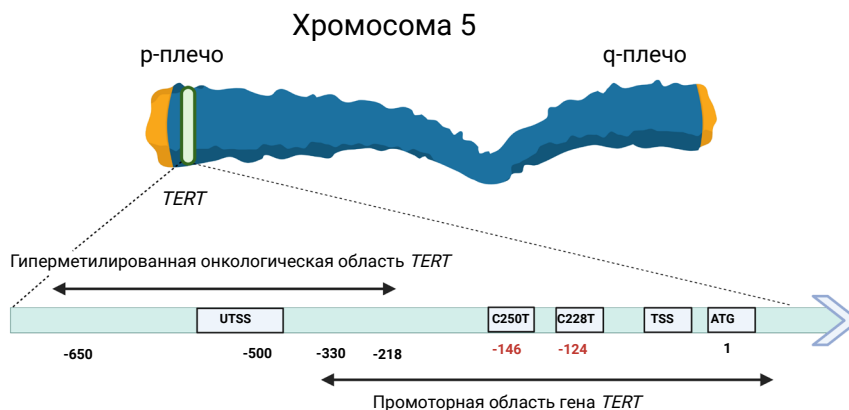


Рис. 3. Расположение гиперметилованного при онкологических заболеваниях участка THOR (TERT Hypermethylated Oncological Region) относительно *TERTp*.

Мутации в положениях, -124 и -146 п.н. от стартового сайта ATG выделены красным. Показаны сайт начала транскрипции (TSS) и иницирующий кодон (ATG).

В рисунке использованы данные статей [74, 123].

UTSS (upstream of the transcription start site) [124]. UTSS локализован внутри THOR и занимает 36 п.н., включая 5 сайтов CpG. Злокачественные опухоли, в которых UTSS не гиперметилован, не экспрессируют *TERT*, в то время как гиперметилирование UTSS связано с прогрессированием опухоли и плохим прогнозом ОБ.

Несмотря на некоторые исключения, опухоли обычно реализуют один механизм поддержания длины теломер. Причины такой избирательности до сих пор остаются спекулятивными. Одно из возможных объяснений состоит в том, что существует порог экспрессии *TERT*, выше которого теряется биологическое преимущество от дальнейшего увеличения: есть состояние, соответствующее преодолению барьера ограничения количества клеточных делений.

В случае наиболее изученных опухолевых поражений относительно мутационного статуса *TERTp* этот механизм является основным, с помощью которого *TERT* активируется. Такой вывод можно сделать для опухолевых поражений ЦНС. Данные Arita и соавторов показывают, что, по крайней мере, во взрослых глиомах мутации C228T и C250T в *TERTp*, являются основной движущей силой для активации теломеразы и поддержания длины теломер [125].

Х. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы поддержания длины теломер, активация которых происходит при иммортализации клеток, можно разделить на две группы: за счет повышения ферментативной активности теломеразы и альтернативное удлинение теломер на основе рекомбинации. Все они специфичны для опухолевых поражений по тканевому типу и на уровне отдельных клеток. При опухолевой трансформации чаще реализуется первый механизм преодоления ограничения количества клеточных делений. Его активируют различные геномные изменения, приводящие к увеличению экспрессии компонентов теломеразы и ее активаторов. Это в основном зародышевые и соматические мутации промоторной области *TERT*, а также амплификация генов теломерного комплекса и его активаторов, структурные перестройки, эпигенетические изменения промотора *TERT*.

На сегодняшний день основной механизм, с помощью которого экспрессия гена основной каталитической субъединицы теломеразы повышается при некоторых типах опухолевых заболеваний (ЦНС, мочевого пузыря и щитовидной железы, кожи) сузился до определенных соматических мутаций в его промоторе (в основном в позициях C228T и C250T). Эти критические мутации представляют собой ключевые генетические изменения, которые не только влияют на транскрипцию *TERT*, но и способствуют выживанию и пролиферации опухолевых клеток посредством механизмов, независимых от теломеразы.

Так как поддержание теломер посредством реактивации теломеразы является почти универсальной отличительной чертой опухолевых клеток, обеспечивающей репликативное бессмертие, обнаружение распространенных мутаций в *TERTp* во многих видах рака привело к возобновлению интереса к поиску и разработке новой направленной терапии, нацеленной на работу этого фермента [126].

Мутации *TERTp* являются наиболее частыми геномными изменениями некодирующей области генома и встречаются в ряде онкозаболеваний [127] и используются в целях клинической диагностики рака кожи [40, 60], рака щитовидной железы [128–130], рака мочевого пузыря [131–133]. Мутационный статус опухоли по *TERTp* не изменяется с течением времени, не смотря на рецидивы, или адъювантную терапию [6, 125, 134]. Вышесказанное позволяет рассматривать статус мутации *TERTp* как диагностический и прогностический фактор для опухолей ЦНС, а также других видов рака [127,

133–136]. Разработка новых методик определения мутационного статуса *TERT* и других клинически важных биомаркеров представляет большой научный и практический интерес [137].

Понимание роли этих критических мутаций и их взаимосвязи с другими механизмами регуляции TERT в онкогенезе, как мы надеемся, может способствовать дальнейшему прогрессу в скрининге и лечении данных сегментов заболеваний. Это направление имеет высокую актуальность для создания новых тестовых систем в целях медицинской диагностики.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, грант № 075-15-2021-1343 «Развитие биоресурсной коллекции опухолей нервной системы человека с молекулярно-генетической паспортизацией для персонифицированного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

ЛИТЕРАТУРА

- Walsh K.M., Wiencke J.K., Lachance D.H., Wiemels J.L., Molinaro A.M., Eckel-Passow J.E., Jenkins R.B., Wrensch M.R. (2015) Telomere maintenance and the etiology of adult glioma. *Neuro-Oncology*, **17** (11), 1445–1452.
- Heidenreich B., Kumar R. (2017) TERT promoter mutations in telomere biology *Mutation Research, Reviews in Mutation Research*, **771**, 15–31.
- Liu T., Yuan X., Xu D. (2016) Cancer-specific telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutations: biological and clinical implications, *Genes*, **7** (7), 38.
- Yuan X., Dai M., Xu D. (2020) TERT promoter mutations and GABP transcription factors in carcinogenesis: More foes than friends, *Cancer Letters*, **493**, 1–9.
- Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y., Bettegowda C., Agrawal N., Diaz L.A. Jr, Friedman A.H., et al. (2013) TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110** (15), 6021–6026.
- Hafezi F., Perez Bercoff D. (2020) The solo play of TERT promoter mutations, *Cells*, **9** (3), 749.
- Hosen M.I., Sheikh M., Zvereva M., Scelo G., Forey N., Durand G., Voegelé C., Poustchi et al. (2020) Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: Evidence from the Golestan Cohort Study, *EBioMedicine*, **53**, 102643.
- Wang N., Liu T., Sofiadis A., Juhlin C.C., Zedenius J., Höög A., Larsson C., Xu D. (2014) TERT promoter mutation as an early genetic event activating telomerase in follicular thyroid adenoma (FTA) and atypical FTA, *Cancer*, **120** (19), 2965–2979.
- Hysek M., Paulsson J.O., Jatta K., Shabo I., Stenman A., Höög A., Larsson C., Zedenius J., & Juhlin C.C. (2019), Clinical Routine TERT Promoter Mutational Screening of Follicular Thyroid Tumors of Uncertain Malignant Potential (FT-UMPs): A Useful Predictor of Metastatic Disease, *Cancers*, **11**(10), 1443.
- Nault J.C., Calderaro J., Di Tommaso L., Balabaud C., Zafrani E.S., Bioulac-Sage P., Roncalli M., Zucman-Rossi J. (2014) Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis, *Hepatology*, **60** (6), 1983–1992.
- Shain A.H., Yeh I., Kovalyshyn I., Sriharan A., Talevich E., Gagnon A., Dummer R., North J., Pincus L., Ruben B., Rickaby W., D'Arrigo C., Robson A., Bastian B.C. (2015) The genetic evolution of melanoma from precursor lesions, *The New England Journal of Medicine*, **373** (20), 1926–1936.
- Cheng L., Montironi R., Lopez-Beltran A. (2017) TERT Promoter Mutations Occur Frequently in Urothelial Papilloma and Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential, *European Urology*, **71** (3), 497–498.
- Rahman M., Deleyrolle L., Vedam-Mai V., Azari H., Abd-El-Barr M., Reynolds B.A. (2011) The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls, *Neurosurgery*, **68** (2), 531–545.
- Prager B.C., Bhargava S., Mahadev V., Hubert C.G., Rich J.N. (2020) Glioblastoma stem cells: driving resilience through chaos, *Trends Cancer*, **6** (3), 223–235.
- Walcher L., Kistenmacher A.K., Suo H., Kitte R., Dluczek S., Strauß A., Baudszun A.R., Yevsa T., Fricke S., & Kossatz-Boehlert,

- U. (2020) Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies, *Frontiers in Immunology*, **11**, 1280.
16. Suvà M.L., Tirosh I. (2020) The glioma stem cell model in the era of single-cell genomics, *Cancer Cell*, **37** (5), 630–636.
17. Crende O., García-Gallastegui P., Luzuriaga J., Badiola I., de la Hoz C., Unda F., Ibarretxe G., Pineda J.R. (2020) Is there such a thing as a genuine cancer stem cell marker? Perspectives from the gut, the brain and the dental pulp, *Biology*, **9** (12), 426.
18. Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A. (2002) Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro, *Glia*, **39** (3), 193–206.
19. Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A., Masterman-Smith M., Geschwind D.H., Bronner-Fraser M., Kornblum H.I. (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (25), 15178–15183.
20. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*, **432** (7015), 396–401.
21. Laks D.R., Masterman-Smith M., Visnyei K., Angenieux B., Orozco N.M., Foran I., Yong et al. (2009) Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma, *Stem Cells*, **27** (4), 980–987.
22. Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A., De Vitis S., Fiocco R., Foroni C., Dimeco F., Vescovi A. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma, *Cancer research*, **64** (19), 7011–7021.
23. Boyd N.H., Tran A.N., Bernstock J.D., Etminan T., Jones A.B., Gillespie G.Y., Friedman G.K., Hjelmeland A.B. (2021) Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment, *Theranostics*, **11** (2), 665–683.
24. Grassi, E.S., Ghiandai, V., & Persani, L. (2021) Thyroid Cancer Stem-Like Cells: From Microenvironmental Niches to Therapeutic Strategies, *Journal of Clinical Medicine*, **10**(7), 1455.
25. Jian, Z., Strait, A., Jimeno, A., & Wang, X. J. (2017) Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma, *The Journal of Investigative Dermatology*, **137** (1), 31–37.
26. Aghaalikhani, N., Rashtchizadeh, N., Shadpour, P., Allameh, A., & Mahmoodi, M. (2019) Cancer stem cells as a therapeutic target in bladder cancer, *Journal of Cellular Physiology*, **234** (4), 3197–3206.
27. O'Connor, C. J., Chen, T., González, I., Cao, D., & Peng, Y. (2018) Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker, *Biomarkers in Medicine*, **12** (7), 813–820.
28. Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019) Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy, *Journal of Cellular Physiology*, **234** (6), 8381–8395.
29. Boyd N.H., Tran A.N., Bernstock J.D., Etminan T., Jones A.B., Gillespie G.Y., Friedman G.K., Hjelmeland A.B. (2021) Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment, *Theranostics*, **11** (2), 665–683.
30. Torres-Montaner A. (2021) The telomere complex and the origin of the cancer stem cell, *Biomarker Research*, **9** (1), 81.
31. Blackburn E.H. (2005) Telomerase and Cancer: Kirk A. Landon--AACR

- prize for basic cancer research lecture, *Molecular Cancer Research*, **3** (9), 477–482.
32. Зверева М.Э., Щербакова Д.М., Донцова О.А. (2010) Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности, *Успехи биологической химии*, **50**, 155–202.
 33. Xu L., Li S., Stohr B.A. (2013) The role of telomere biology in cancer, *Annual Review of Pathology*, **8**, 49–78.
 34. Suram A., Kaplunov J., Patel P.L., Ruan H., Cerutti A., Boccardi V., Fumagalli M., Di Micco R., Mirani N., Gurung R.L., Hande M.P., d'Adda di Fagagna F., Herbig U. (2012) Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions, *The EMBO Journal*, **31** (13), 2839–2851.
 35. Bernadotte A., Mikhelson V.M., Spivak I.M. (2016) Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence, *Aging*, **8** (1), 3–11.
 36. Shay J.W. (2016) Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer, *Cancer Discovery*, **6** (6), 584–593.
 37. Saunders C.N., Kinnersley B., Culford R., Cornish A.J., Law P.J., Houlston R.S. (2022) Relationship between genetically determined telomere length and glioma risk, *Neuro-Oncology*, **24** (2), 171–181.
 38. Ennour-Idrissi, K., Maunsell, E., & Diorio, C. (2017) Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, **26** (1), 3–10.
 39. Caini, S., Raimondi, S., Johansson, H., De Giorgi, V., Zanna, I., Palli, D., & Gandini, S. (2015) Telomere length and the risk of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer: a review of the literature and meta-analysis, *Journal of Dermatological Science*, **80** (3), 168–174.
 40. Ventura, A., Pellegrini, C., Cardelli, L., Rocco, T., Ciciarelli, V., Peris, K., & Fagnoli, M.C. (2019). Telomeres and Telomerase in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma, *International Journal of Molecular Sciences*, **20** (6), 1333.
 41. De Vitis, M., Berardinelli, F., & Sgura, A. (2018) Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT), *International Journal of Molecular Sciences*, **19** (2), 606.
 42. Srinivas, N., Rachakonda, S., & Kumar, R. (2020). Telomeres and Telomere Length: A General Overview, *Cancers*, **12** (3), 558.
 43. Juratli T.A., Thiede C., Koerner M.V.A., Tummala S.S., Daubner D., Shankar G.M., Williams E.A., et al. (2017) Intratumoral heterogeneity and TERT promoter mutations in progressive/higher-grade meningiomas, *Oncotarget*, **8** (65), 109228–109237.
 44. Huang F.W., Bielski C.M., Rinne M.L., Hahn W.C., Sellers W.R., Stegmeier F., Garraway L.A., Kryukov G.V. (2015) TERT promoter mutations and monoallelic activation of TERT in cancer, *Oncogenesis*, **4** (12), e176.
 45. Brennan C.W., Verhaak R.G., McKenna A., Campos B., Nounshmehr H., Salama S.R., Zheng S., et al; (2013) TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma, *Cell*, **155** (2), 462–477.
 46. Bell R.J., Rube H.T., Kreig A., Mancini A., Fouse S.D., Nagarajan R.P., Choi S., Hong C., He D., Pekmezci M., et al. (2015) Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer, *Science*, **348** (6238), 1036–1039.
 47. Pierini T., Nardelli C., Lema Fernandez A.G., Pierini V., Pellanera F.,

- Nofrini V., Gorello P., Moretti M., Arniani S., Roti G., Wiencke J.K., Wensch M.R., Chang S.M., Walsh K.M., Myong S., Song J.S., Costello J.F. (2020) New somatic TERT promoter variants enhance the Telomerase activity in Glioblastoma, *Acta Neuropathology Communications*, **8** (1), 145.
48. Heidenreich B., Nagore E., Rachakonda P.S., Garcia-Casado Z., Requena C., Traves V., Becker J., Soufir N., Hemminki K., Kumar R. (2014) Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma, *Nature Communications*, **5**, 3401.
49. Xie H., Liu T., Wang N., Björnham V., Höög A., Larsson C., Lui W., Xu D. (2014) TERT promoter mutations and gene amplification: Promoting TERT expression in Merkel cell carcinoma, *Oncotarget*, **5**, 10048–10057.
50. Barthel F.P., Wei W., Tang M., Martinez-Ledesma E., Hu X., Amin S.B., Akdemir K.C., Seth S., Song X., Wang Q., Lichtenberg T., Hu J., Zhang J., Zheng S., Verhaak R.G. (2017) Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types, *Nature Genetics*, **49**, 349–357.
51. Dratwa, M., Wysoczańska, B., Łacina, P., Kubik, T., & Bogunia-Kubik, K. (2020) TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation, *Frontiers in Immunology*, **11**, 589929.
52. Günes, C., Wezel, F., Southgate, J., & Bolenz, C. (2018) Implications of TERT promoter mutations and telomerase activity in urothelial carcinogenesis, *Nature Reviews. Urology*, **15** (6), 386–393.
53. Sbizzera, M., Descotes, F., Arber, T., Neuville, P., & Ruffion, A. (2022) Bladder cancer detection in patients with neurogenic bladder: are cystoscopy and cytology effective, and are biomarkers pertinent as future diagnostic tools? A scoping review, *World Journal of Urology*, **40** (8), 1897–1913.
54. McKelvey, B.A., Umbricht, C.B., & Zeiger, M.A. (2020) Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Regulation in Thyroid Cancer: A Review, *Frontiers in Endocrinology*, **11**, 485.
55. Donati, B., & Ciarrocchi, A. (2019) Telomerase and Telomeres Biology in Thyroid Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **20** (12), 2887.
56. Romei, C., & Elisei, R. (2021) A Narrative Review of Genetic Alterations in Primary Thyroid Epithelial Cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, **22** (4), 1726.
57. Zanna, I., Caini, S., Raimondi, S., Saieva, C., Masala, G., Massi, D., Cocorocchio, E., Queirolo, P., Stanganelli, I., & Gandini, S. (2021) Germline MC1R variants and frequency of somatic BRAF, NRAS, and TERT mutations in melanoma: Literature review and meta-analysis, *Molecular Carcinogenesis*, **60** (3), 167–171.
58. Motaparthi, K., Kim, J., Andea, A.A., Missall, T.A., Novoa, R.A., Vidal, C.I., Fung, M.A., & Emanuel, P.O. (2020) TERT and TERT promoter in melanocytic neoplasms: Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and prognosis, *Journal of Cutaneous Pathology*, **47** (8), 710–719.
59. Griewank, K.G., Murali, R., Puig-Butlle, J.A., Schilling, B., Livingstone, E., Potrony, M., Carrera, et al (2014) TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma, *Journal of the National Cancer Institute*, **106** (9), dju246.
60. Gandini, S., Zanna, I., De Angelis, S., Palli, D., Raimondi, S., Ribero, S., Masala, G., Suppa, M., Bellerba, F., Corso, F., Nezi, L., Nagore, E., & Caini, S. (2021) TERT promoter mutations and melanoma survival: A comprehensive literature review and

- meta-analysis, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **160**, 103288.
61. Chiba K., Johnson J.Z., Vogan J.M., Costa B.M., Mancini A., Song J.S. (2015) Cancer-associated *TERT* promoter mutations abrogate telomerase silencing, *Elife*, **4**, e07918.
 62. Li C., Wu S., Wang H., Bi X., Yang Z., Du Y., He L., Cai Z., Wang J., Fan Z. (2015) The C228T mutation of *TERT* promoter frequently occurs in bladder cancer stem cells and contributes to tumorigenesis of bladder cancer, *Oncotarget*, **6**, 19542–19551.
 63. Li X., Qian X., Wang B., Xia Y., Zheng Y., Du L., Xu D., Xing D., DePinho R.A., Lu Z. (2020) Programmable base editing of mutated *TERT* promoter inhibits brain tumour growth, *Nature Cell Biology*, **22**, 282–288.
 64. Hafezi F., Jaxel L., Lemaire M., Turner J.D., Perez-Bercoff D. (2021) *TERT* Promoter Mutations Increase Sense and Antisense Transcription from the *TERT* Promoter, *Biomedicines*, **9** (12), 1773.
 65. Patel B., Taiwo R., Kim A.H., Dunn G.P. (2020) *TERT*, a promoter of CNS malignancies, *Neurooncology Advances*, **2** (1), vdaa025.
 66. Goutagny S., Nault J.C., Mallet M., Henin D., Rossi J.Z., Kalamarides M. (2014) High incidence of activating *TERT* promoter mutations in meningiomas undergoing malignant progression, *Brain Pathology*, **24** (2), 184–189.
 67. Zhang, Y., Chen, Y., Yang, C., Seger, N., Hesla, A.C., Tsagkozis, P., Larsson, O., Lin, Y., & Haglund, F. (2021) *TERT* promoter mutation is an objective clinical marker for disease progression in chondrosarcoma, *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **34** (11), 2020–2027.
 68. Paulsson, J.O., Mu, N., Shabo, I., Wang, N., Zedenius, J., Larsson, C., & Juhlin, C.C. (2018) *TERT* aberrancies: a screening tool for malignancy in follicular thyroid tumours, *Endocrine-Related Cancer*, **25** (7), 723–733.
 69. Rachakonda, P.S., Hosen, I., de Verdier, P.J., Fallah, M., Heidenreich, B., Ryk, C., Wiklund, N.P., Steineck, G., Schadendorf, D., Hemminki, K., & Kumar, R. (2013) *TERT* promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110** (43), 17426–17431.
 70. Gao K., Li G., Qu Y., Wang M., Cui B., Ji M., Shi B., Hou P. (2016) *TERT* promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas, *Oncotarget*, **7** (8), 8712–8725.
 71. Mitchell T.J., Turajlic S., Rowan A., Nicol D., Farmery J.H.R., O'Brien T., Martincorena I., Tarpey P., et al. (2018) TRACERx Renal Consortium. Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal, *Cell*, **173** (3), 611–623.e17.
 72. Патрушев Л.И., Коваленко Т.Ф. (2014) Функции некодирующих последовательностей генома млекопитающих, *Успехи биологической химии*, **54**, 39–102.
 73. Svahn F., Juhlin C.C., Paulsson J.O., Fotouhi O., Zedenius J., Larsson C., Stenman A. (2018) Telomerase reverse transcriptase promoter hypermethylation is associated with metastatic disease in abdominal paraganglioma, *Clinical Endocrinology*, **88** (2), 343–345.
 74. Lee D.D., Leão R., Komosa M., Gallo M., Zhang C.H., Lipman T., Remke M., Heidari A., Nunes N.M., et al. (2019) DNA hypermethylation within *TERT* promoter upregulates *TERT* expression in cancer, *The Journal of Clinical Investigation*, **129** (1), 223–229.

75. Renaud S., Loukinov D., Bosman F.T., Lobanenko V., Benhattar J. (2005) CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription, *Nucleic Acids Research*, **33** (21), 6850–6860.
76. Yuan X., Larsson C., Xu D. (2019) Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players, *Oncogene*, **38**, 6172–6183.
77. ZMalhotra S., Freeberg M.A., Winans S.J., Taylor J., Beemon K.L. (2017) A novel long non-coding RNA in the hTERT promoter region regulates hTERT expression, *Noncoding RNA*, **4** (1), 1.
78. ENCODE Project Consortium (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, *Nature*, **489** (7414), 57–74.
79. Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.R., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., & Stuart, J.M. (2013) The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project, *Nature Genetics*, **45**(10), 1113–1120.
80. Скворцов Д.А., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. (2009) Регуляция теломеразы в онкогенезе, *Acta Nature*, **51** (1), 1–17.
81. McDuff F.O., Naud J.F., Montagne M., Sauvé S., Lavigne P. (2009) The Max homodimeric b-HLH-LZ significantly interferes with the specific heterodimerization between the c-Myc and Max b-HLH-LZ in absence of DNA: a quantitative analysis, *Journal of Molecular Recognition: JMR*, **22** (4), 261–269.
82. Xu D., Popov N., Hou M., Wang Q., Björkholm M., Gruber A., Menkel A.R., Henriksson M. (2001) Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (7), 3826–3831.
83. Kyo S., Takakura M., Taira T., Kanaya T., Itoh H., Yutsudo M., Ariga H., Inoue M. (2000) Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT), *Nucleic Acids Research*, **28** (3), 669–677.
84. Kirkpatrick K.L., Ogunkolade W., Elkak A.E., Bustin S., Jenkins P., Ghilchick M., Newbold R.F., Mokbel K. hTERT expression in human breast cancer and non-cancerous breast tissue: correlation with tumour stage and c-Myc expression. *Breast Cancer Research. Treatment*. 2003. **77** (3), 277–284.
85. Dwyer J.M., Liu J.-P. (2010) Ets2 transcription factor, telomerase activity and breast cancer, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **37** (1), 83–87.
86. Xu D., Dwyer J., Li H., Duan W., Liu J.P. (2008) Ets2 maintains hTERT gene expression and breast cancer cell proliferation by interacting with c-Myc, *The Journal of Biological Chemistry*, **283** (35), 23567–23580.
87. Kyo S., Takakura M., Fujiwara T., Inoue M. (2008) Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers, *Cancer Science*, **99** (8), 1528–1538.
88. Cheng D., Zhao Y., Wang S., Jia W., Kang J, Zhu J. (2015) Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Transcription Requires Sp1/Sp3 Binding to the Promoter and a Permissive Chromatin Environment, *The Journal of Biological Chemistry*, **290** (50), 30193–30203.
89. Lou F., Chen X., Jalink M., Zhu Q., Ge N., Zhao S., Fang X., Fan Y., Björkholm M., Liu Z., Xu D. (2007) The opposing effect of hypoxia-

- inducible factor-2alpha on expression of telomerase reverse transcriptase, *Molecular Cancer Research*, **5** (8), 793–800.
90. Новиков В.Е., Левченкова О.С. (20013) Гипоксией индуцированный фактор (HIF-1 α) как мишень фармакологического воздействия, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **11** (2), 8–16.
91. Yatabe N., Kyo S., Maida Y., Nishi H., Nakamura M., Kanaya T., Tanaka M., Isaka K., Ogawa S., Inoue M. (2004) HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells, *Oncogene*, **23** (20), 3708–3715.
92. Nishi H., Nakada T., Kyo S., Inoue M., Shay J.W., Isaka K. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT), *Molecular Cell Biology*, **24** (13), 6076–6083.
93. Koshiji M., Kageyama Y., Pete E.A., Horikawa I., Barrett J.C., Huang L.E. (2004) HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc, *EMBO Journal*, **23** (9), 1949–1956.
94. Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А. (2016) Канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин: от истории открытия до клинического применения, *Терапевтический архив*, **88** (10), 74–81.
95. Behrooz A.B., Syahir A. (2021) Could we address the interplay between CD133, Wnt/ β -Catenin, and TERT signaling pathways as a potential target for glioblastoma therapy? *Frontiers in Oncology*, **11**, 642719.
96. Hoffmeyer K., Raggioli A., Rudloff S., Anton R., Hierholzer A., Del Valle I., Hein K., Vogt R., Kemler R. (2012) Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells, *Science*, **336** (6088), 1549–1554.
97. Zhang Y., Toh L., Lau P., Wang X. (2012) Human telomerase reverse transcriptase (Htert) is a novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in human cancer, *The Journal of Biological Chemistry*, **287** (39), 32494–32511.
98. Park, J.I., Venteicher, A. S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., McLaughlin, M., Veenstra, T.D., Nusse, R., McCrea, P.D., & Artandi, S.E. (2009) Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin, *Nature*, **460** (7251), 66–72.
99. Chen K., Chen L., Li L., Qu S., Yu B., Sun Y., Wan F., Chen X., Liang R., Zhu X. (2020) A positive feedback loop between Wnt/ β -catenin signaling and hTERT regulates the cancer stem cell-like traits in radioresistant nasopharyngeal carcinoma cells, *Journal Cell Biochemistry*, **121** (11), 4612–4622.
100. Oh S., Song Y., Yim J., Kim T.K. (1999) The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene, *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (52), 37473–37478.
101. Sitaram, R. T., Degerman, S., Ljungberg, B., Andersson, E., Oji, Y., Sugiyama, H., Roos, G., & Li, A. (2010) Wilms' tumour 1 can suppress hTERT gene expression and telomerase activity in clear cell renal cell carcinoma via multiple pathways, *British Journal of Cancer*, **103** (8), 1255–1262.
102. Kijima N., Hosen N., Kagawa N., Hashimoto N., Kinoshita M., Oji Y., Sugiyama H., Yoshimine T. (2014) Wilms' tumor 1 is involved in tumorigenicity of glioblastoma by regulating cell proliferation and apoptosis, *Anticancer Research*, **34** (1), 61–67.

103. Somasundaram A., Ardanowski N., Opalak C.F., Fillmore H.L., Chidambaram A., Broaddus W.C. (2014) Wilms tumor 1 gene, CD97, and the emerging biogenetic profile of glioblastoma, *Neurosurgery Focus*, **37**, 1–4.
104. Oji Y., Suzuki T., Nakano Y., Maruno M., Nakatsuka S., Jomgeow T., Abeno S., Tatsumi N., Yokota A., Aoyagi S., et al. (2004) Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors, *Cancer Science*, **95** (10), 822–827.
105. Buchwalter G., Gross C., Wasyluk B. (2004) Ets ternary complex transcription factors, *Gene*, **324**, 1–14.
106. Dittmer J. (2015) Ets transcription factors. Encyclopedia of Cancer. Ed. Schwab M. Berlin: Springer-Heidelberg, 1–4 pp.
107. Kar A., Gutierrez-Hartmann A. (2013) Molecular mechanisms of ETS transcription factor mediated tumorigenesis, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **48**, 522–543.
108. Sizemore G.M., Pitarresi J.R., Balakrishnan S., Ostrowski M.C. (2017) The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours, *Nature Reviews. Cancer*, **17**, 337–351.
109. Findlay V.J., LaRue A.C., Turner D.P., Watson P.M., Watson D.K. (2013) Understanding the role of ETS-mediated gene regulation in complex biological processes, *Advances in Cancer Research*, **119**, 1–61.
110. Zhang F., Wang S., Zhu J. (2020) ETS variant transcription factor 5 and c-Myc cooperate in derepressing the human telomerase gene promoter via composite ETS/E-box motifs, *The Journal of Biological Chemistry*, **295** (29), 10062–10075.
111. Viana-Pereira M., Almeida G.C., Stavale J.N., Malheiro S., Clara C., Lobo P., Pimentel J., Reis R.M. (2017) Study of hTERT and histone 3 mutations in medulloblastoma, *Pathobiology*, **84** (2), 108–113.
112. Stern J.L., Theodorescu D., Vogelstein B., Papadopoulos N., Cech T.R. (2015) Mutation of the *TERT* promoter, switch to active chromatin, and monoallelic TERT expression in multiple cancers, *Genes & Development*, **29** (21), 2219–2224.
113. Akıncılar S.C., Khattar E., Boon P.L., Unal B., Fullwood M.J., Tergaonkar V. (2016) Long-Range Chromatin Interactions Drive Mutant *TERT* Promoter Activation, *Cancer Discovery*, **6** (11), 1276–1291.
114. Mancini A., Xavier-Magalhães A., Woods W.S., Nguyen K.T., Amen A.M., Hayes J.L., et al. (2018) Disruption of the $\beta 1L$ Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a *TERT* Promoter Mutation-Dependent Manner, *Cancer Cell*, **34** (3), 513–528.e8.
115. Amen, A.M., Fellmann, C., Soczek, K.M., Ren, S.M., Lew, R.J., Knott, G.J., Park, J.E., McKinney, A.M., Mancini, A., Doudna, J.A., & Costello, J.F. (2021) Cancer-specific loss of TERT activation sensitizes glioblastoma to DNA damage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **118**(13), e2008772118.
116. Paulsson J.O., Wang N., Gao J., Stenman A., Zedenius J., Mu N., Lui W.O., Larsson C., Juhlin C.C. (2020) GABPA-dependent downregulation of DICER1 in follicular thyroid tumours, *Endocrine-Related cancer*, **27** (5), 295–308.
117. Guo Y., Yuan X., Li K., Dai M., Zhang L., Wu Y., Sun C., Chen Y., Cheng G., Liu C., Strååt K., Kong F., Zhao S., Björkholm M., Xu D. (2020) GABPA is a master

- regulator of luminal identity and restrains aggressive diseases in bladder cancer, *Cell Death and Differentiation*, **27**, 1862–1877.
118. Yin L., Hubbard A.K., Giardina C. (2000) NF- κ B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit, *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36671–36675.
119. Li Y., Zhou Q.L., Sun W., Chandrasekharan P., Cheng H.S., Ying Z., Lakshmanan M., Raju A., Tenen D.G., Cheng S.Y., Chuang K.H., Li J., Prabhakar S., Li M., Tergaonkar V. (2015) Non-canonical NF- κ B signalling and ETS1/2 cooperatively drive C250T mutant TERT promoter activation, *Nature Cell Biology*, **17** (10), 1327–1338.
120. Huang D.S., Wang Z., He X.J., Diplas B.H., Yang R., Killela P.J., Meng Q., Ye Z.Y., Wang W., et al. (2015) Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation, *European Journal of Cancer*, **51** (8), 969–976.
121. Heidenreich B., Rachakonda P.S., Hosen I., Volz F., Hemminki K., Weyerbrock A., Kumar R. (2015) TERT promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences, *Oncotarget*, **6**, 10617–10633.
122. Stern J.L., Pauczek R.D., Huang F.W., Ghandi M., Nwumeh R., Costello J.C., Cech T.R. (2017) Allele-specific DNA methylation and its interplay with repressive histone marks at promoter-mutant TERT genes, *Cell Reports*, **21** (13), 3700–3707.
123. Lee D.D., Komosa M., Nunes N.M., Tabori U. (2020) DNA methylation of the TERT promoter and its impact on human cancer, *Current opinion in genetics & development*, **60**, 17–24.
124. Castelo-Branco, P., Choufani, S., Mack, S., Gallagher, D., Zhang, C., Lipman, T., Zhukova, et al. (2013) Methylation of the TERT promoter and risk stratification of childhood brain tumours: an integrative genomic and molecular study, *The Lancet. Oncology*, **14**(6), 534–542.
125. Arita H., Narita Y., Takami H., Fukushima S., Matsushita Y., Yoshida A., Miyakita Y., Ohno M., Shibui S., Ichimura K. (2013) TERT promoter mutations rather than methylation are the main mechanism for TERT upregulation in adult gliomas, *Acta Neuropathology*, **126** (6), 939–941.
126. Guterres, A.N., & Villanueva, J. (2020) Targeting telomerase for cancer therapy, *Oncogene*, **39** (36), 5811–5824.
127. Vinagre, J., Almeida, A., Pópulo, H., Batista, R., Lyra, J., Pinto, V., Coelho, R., Celestino, R., et al (2013) Frequency of TERT promoter mutations in human cancers, *Nature Communications*, **4**, 2185.
128. Liu, R., & Xing, M. (2016) TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, **23** (3), R143–R155.
129. Chung J.H. (2020) BRAF and TERT promoter mutations: clinical application in thyroid cancer, *Endocrine Journal*, **67** (6), 577–584.
130. Panebianco, F., Nikitski, A. V., Nikiforova, M.N., & Nikiforov, Y.E. (2019) Spectrum of TERT promoter mutations and mechanisms of activation in thyroid cancer, *Cancer Medicine*, **8** (13), 5831–5839.
131. Zvereva, M., Pisarev, E., Hosen, I., Kisil, O., Matskeplishvili, S., Kubareva, E., Kamalov, D., Tivtkyan, A., Manel, A., Vian, E., Kamalov, A., Ecke, T., & Calvez-Kelm, F.L. (2020) Activating Telomerase TERT Promoter Mutations and Their Application for the Detection

- of Bladder Cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (17), 6034.
132. Batista, R., Vinagre, N., Meireles, S., Vinagre, J., Prazeres, H., Leão, R., Máximo, V., & Soares, P. (2020) Biomarkers for Bladder Cancer Diagnosis and Surveillance: A Comprehensive Review, *Diagnostics* (Basel, Switzerland), **10** (1), 39.
 133. Hayashi, Y., Fujita, K., Netto, G. J., & Nonomura, N. (2021) Clinical Application of *TERT* Promoter Mutations in Urothelial Carcinoma, *Frontiers in Oncology*, **11**, 705440.
 134. Pekmezci M., Rice T., Molinaro A.M., Walsh K.M., Decker P.A., Hansen H., Sicotte H., et al. (2017) Infiltrating gliomas in adults with complex diagnostics WHO 2016: additional prognostic roles of *ATRX* and *TERT*. *Neuropathology Acta*, **133** (6), 1001–1016.
 135. Motaparathi, K., Kim, J., Andea, A.A., Missall, T.A., Novoa, R.A., Vidal, C.I., Fung, M.A., & Emanuel, P.O. (2020) *TERT* and *TERT* promoter in melanocytic neoplasms: Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and prognosis, *Journal of Cutaneous Pathology*, **47** (8), 710–719.
 136. Śledzińska, P., Bebyn, M.G., Furtak, J., Kowalewski, J., & Lewandowska, M.A. (2021) Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas, *International Journal of Molecular Sciences*, **22** (19), 10373.
 137. Hasanau T., Pisarev E., Kisil O., Nonoguchi N., Le Calvez-Kelm F., Zvereva M. (2022) Detection of *TERT* Promoter Mutations as a Prognostic Biomarker in Gliomas: Methodology, Prospects, and Advances, *Biomedicines*, **10** (3), 728.