

Na straży genomu: telomery i telomeraza – od odkrycia po badania kliniczne

Guardians of the genome: telomeres and telomerase – from discovery to clinical studies

Natalia Lipińska, Błażej Rubiś*

Poznań

Streszczenie: Gdy w 1869 roku po raz pierwszy wyizolowano DNA nikt nie przypuszczał jak skomplikowana może być jego struktura i organizacja. Dziś już wiemy, że nawet najmniejsza zmiana w genomie może prowadzić do poważnych konsekwencji dla całego organizmu, a nawet gatunku. Z każdym podziałem komórki dochodzi do przekazania informacji genetycznej komórce potomnej w postaci zestawu chromosomów które ulegają powieleniu przed podziałem. Ze względu na ograniczenia enzymów biorących udział w tym procesie, w każdym podziale końce chromosomów ulegają skróceniu. Aby zapobiec utracie cennej informacji genetycznej na końcach każdego z chromosomów znajdują się telomery, syntetyzowane przez enzym telomerazę. Obecność zarówno telomerów jak i telomerazy wpływa bezpośrednio na zdolności komórek do dzielenia się, a także na procesy powstawania nowotworów, starzenia i śmierci komórek. Droga do odkrycia tych zależności była jednak bardzo długa. Niniejsze opracowanie przedstawia historię poznania natury telomerów oraz historię badań których efektem jest wykorzystanie wiedzy o telomerach i telomerazie w praktyce klinicznej.

Abstract: When in 1869 DNA was isolated first time, no one imagined how complicated is its structure and organization. Today we know that even small change in the genome can lead to serious consequences for the human body. In each cell division chromosomes are amplified which allows the transfer of genetic information. Due to the limitations of the replication with each cell division chromosome ends are shortened. However telomeres, synthesized by the enzyme telomerase, prevent loss of genetic information. The presence of both the telomeres and telomerase gives the ability of cells to divide and also affects the processes of carcinogenesis, aging and cell death. Nowadays we know a lot of about telomere and telomerase however the discovery of these relationships was very long. This paper presents the history of research of the nature of telomeres and telomerase leading to the use of this knowledge in clinical practice.

Słowa kluczowe: historia genetyki, telomery, telomeraza

Keywords: history of genetics, telomeres, telomerase

Wstęp

Pierwsze odkrycia w dziedzinie biologii molekularnej są zwykle kojarzone z momentem, w którym James Watson i Francis Crick opisali budowę przestrzenną

* Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

podwójnej helisy DNA, za co w 1962 roku otrzymali nagrodę Nobla. Jednak historia telomerów i telomerazy, jak i samej biologii molekularnej, rozpoczyna się dużo wcześniej. Starannie wykonane przez Theodora Boveri w 1910 roku rysunki obrazu mikroskopowego ukazały pierwsze wizualizacje struktury chromosomów, łącznie z ich zakończeniami. Najważniejszym odkryciem Boveri'ego było ustalenie że jednostki dziedziczenia znajdują się na chromosomach, jednak jedna z obserwacji mówiła również o regeneracji zakończeń chromosomów i ich utrzymywaniu się w trakcie całego życia organizmu¹. Dziś już wiadomo, że zakończenia chromosomów utworzone są z wielokrotnie powtórzonej sekwencji nukleotydów 3'-TTAGGG-5' i nazywane są telomerami, a za ich syntezę i regenerację odpowiedzialny jest enzym telomeraza.

Promieniowanie rentgenowskie a telomery

W 1895 roku Wilhelm Roentgen odkrył istnienie promieni X, zwanych popularnie promieniami rentgena. Promienie X bardzo szybko stały się obiektem zainteresowania naukowców i znalazły swoje pierwsze zastosowania w różnych dziedzinach medycyny. Równoległe do zastosowania promieniowania trwały badania nad ich wpływem na funkcjonowanie żywych komórek. Hermann J. Muller w latach 20' XX wieku wykorzystał promieniowanie X do wywołania mutagenyzy w organizmach muszek owocówek z gatunku *Drosophila melanogaster* i opisał zależność ilościową pomiędzy dawką promieniowania a pojawieniem się śmiertelnych mutacji w materiale genetycznym. Na podstawie obserwacji mikroskopowych Muller zauważył również, że końce chromosomów w napromieniowanych komórkach różnią się od pozostałej części chromosomu. Nie występują w nich charakterystyczne mutacje takie jak delecje czy insercje, ponadto tzw. „wolne końce” (ang. *free ends*) nie uczestniczą w naprawie pęknięć DNA. Badacz przypuszczał, że końce chromosomów są w pewien sposób chronione przez występowanie „czapeczki” (ang. *cap*) lub specyficznego genu. Struktury na końcach chromosomów zostały przez Mullera po raz pierwszy nazwane telomerami (gr. *telos* – koniec, *meros* – część)².

W tym samym czasie badania nad strukturą i uszkodzeniami chromosomów prowadziła Barbara McClintock w Kanadzie. Modelem badawczym były w tym przypadku komórki kukurydzy, a opracowana metoda obrazowania mikroskopowego pozwoliła na obserwację poszczególnych chromosomów w komórkach. McClintock zaobserwowała, że uszkodzenie chromosomów prowadzi do powstania m.in. translokacji i utraty części materiału genetycznego wskutek fuzji uszkodzonych końców chromosomów (ang. *broken ends*). Podobnie jak u Muller'a, wyniki prowadzonych badań wskazywały że w komórkach może dochodzić do łączenia powstałych wolnych zakończeń, jednak nie dochodzi do łączenia fragmentów chromosomów z ich zakoń-

¹ A. Balmain, *Cancer Genetics: From Boveri and Mendel to Microarrays*, "Nature Reviews", 2001, 1, s. 77-82.

² H.J. Muller, *The remaking of chromosomes*, "Collecting Net", 1938, 13, s. 181-198.

zeniami, ani też do fuzji samych zakończeń. Tym samym potwierdziło się przypuszczenie mówiące o innej strukturze i funkcji fragmentów znajdujących się na końcach chromosomów. Podczas eksperymentów przeprowadzonych w 1932 roku McClintock odkryła że w niektórych młodych komórkach embrionalnych dochodzi do naprawy uszkodzeń chromosomów, lecz tylko tych uszkodzeń które znajdują się w obrębie ich zakończeń³. Były to pierwsze obserwacje wskazujące na możliwość formowania lub odbudowy telomerów na drodze aktywnego procesu w komórce, co ważne już wtedy zauważono że procesy te w przypadku komórek kukurydzy zachodziły najczęściej w młodych komórkach embrionalnych.

Problem replikacji końca

Pomimo trwających w latach 1930-1960 intensywnych badań nad strukturą genomu zagadnienie telomerów i ich funkcji wciąż stanowiło jedną z wielu niewiadomych. W lutym 1953 roku James Watson i Francis Crick dokonali odkrycia budowy cząsteczki DNA, jak się później okazało było to przełomowe odkrycie dla całej medycyny. Jednak dla badań nad telomerami i telomerazą ważniejszym okazały się prace nad wyjaśnieniem mechanizmu replikacji nici DNA prowadzone przez Watsona. To on pierwszy w 1972 roku sformułował problem replikacji końca (ang. *end-replication problem*). Wszystkie znane polimerazy DNA (enzymy katalizujące syntezę DNA) wymagają obecności polinukleotydowego startera do rozpoczęcia syntezy nowej nici DNA i dobudowują nić wyłącznie w kierunku 5'→3'. Synteza nowej nici DNA wiodącej (5'→3') przebiega w sposób ciągły aż do zakończenia chromosomu. Jednak w przypadku nici opóźnionej (3'→5') polimeraza syntetyzuje krótkie odcinki, zwane fragmentami Okazaki, z których każdy posiada własny starter. Pod koniec replikacji startery te są usuwane, a powstałe fragmenty są łączone dzięki działaniu ligazy. Jak się okazało ligaza nie ma jednak możliwości uzupełnienia luki pozostałej po obecności ostatniego startera na końcu 3' przez co nowo syntezowana nić potomna jest krótsza od nici macierzystej i z każdym podziałem komórki powinno dochodzić do skracania chromosomu. Watson zakładał, że w komórkach istnieje specjalny mechanizm ochronny, który zapobiega skracaniu chromosomów, jego natura nadal nie była jednak znana⁴.

W tym samym czasie (1971 r.) problemem replikacji końca zajmował się rosyjski uczony Aleksei Matveevich Olovnikov. Postawił on tezę mówiącą o tym że skracanie telomerów jest bezpośrednio powiązane z liczbą podziałów komórkowych przez które może przejść komórka. W tym sposób Olovnikov powiązał odkrycie Leonarda Hayflick'a (1961 r.) o maksymalnej liczbie podziałów komórki z problemem replikacji końca i długością telomerów. Proponowany model zakładał, że telomery stanowią swoisty zegar dla komórki a ich skracanie związane jest ze starzeniem

³ B. McClintock, *The stability of broken ends of chromosomes in Zea mays*, "Genetics", 1941, 26, s. 234-282.

⁴ J. D. Watson, *Origin of concatemeric T7 DNA*, "Nature New Biology", 1972, 239, s. 197-201.

komórki^{5,6}. Jak się później okazało model ten był niezwykle trafny i zaledwie kilka lat później pozwolił na rozwiązanie „zagadki telomerów”.

Tetrahymena thermophila i kobieta z Australii

W 1975 roku pochodząca z Tasmanii Elizabeth Blackburn rozpoczęła badania nad telomerami w organizmie pierwotniaka *Tetrahymena thermophila*. Blackburn zidentyfikowała w obrębie końca chromosomów struktury zawierające powtarzającą się średnio 50 razy sekwencję CCCAA o nieznannej funkcji⁷. W 1980 roku australijska uczona zaprezentowała swoje wyniki na konferencji, gdzie zainteresował się nimi Jack Szostak z Harvard Medical School. Prowadził on badania mające na celu skonstruowanie sztucznych liniowych mini-chromosomów, które pozwalałaby na sklonowanie genów po ich wprowadzeniu do komórek drożdży. Szostak napotkał jednak na spory problem, uzyskane w ten sposób liniowe cząsteczki DNA były niestabilne i nie ulegały replikacji, przypuszczalnie z powodu braku telomerów na ich końcach. Nawiązanie współpracy z Blackburn pozwoliło na skonstruowanie mini-chromosomów zawierających na końcach powtarzające się sekwencje telomerowe z komórek *T. thermophila*. Rezultat był zaskakujący: sekwencje te nie tylko chroniły liniowe cząsteczki DNA przed degradacją ale również ulegały replikacji i wydłużeniu. W ten sposób w 1982 roku uczeni przeprowadzili pierwszy test wskazujący bezpośrednio na funkcje telomerów. Blackburn i Szostak doszli do wniosku że mechanizm odpowiadający za występowanie i utrzymywanie sekwencji telomerowych ma charakter uniwersalny i ewolucyjnie fundamentalny, ze względu na jego obecność w tak różnych ewolucyjnie gatunkach⁸. Sekwencje telomerowe okazały się jednocześnie niezbędne do zaprojektowania stabilnego zrekombinowanego chromosomu drożdżowego (YAC, ang. *yeast artificial chromosome*), który w kolejnych latach posłużył do stworzenia pierwszego wektora klonującego sekwencje DNA. YAC został wykorzystany między innymi do zsekwencjonowania pierwszego genomu organizmu wielokomórkowego oraz odegrał olbrzymią rolę w projekcie poznania ludzkiego genomu (ang. *Human Genome Project*).

Pomimo tak znaczącego odkrycia niewiadomą nadal pozostawała przyczyna wydłużania plazmidowych telomerów po replikacji w komórkach drożdży. Blackburn oraz jej studentka Carol Greider przyjęły założenie że za syntezę powtórzeń telomerowych odpowiedzialny jest enzym. Po kilku latach badań, w grudniu 1984 roku, Greider wykryła ślady aktywności enzymatycznej w ekstrakcie komórkowym.

⁵ L. Hayflick, P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. "Experimental Cell Research", 1961, 25, s. 585-621.

⁶ A.M. Olovnikov, *A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon*, "Journal of Theoretical Biology", 1971, 41, s. 181-190.

⁷ E.H. Blackburn, J.G. Gall, *A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena*, "Journal of Molecular Biology", 1978, 120, s. 33-55.

⁸ J.W. Szostak, E.H. Blackburn, *Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors*, "Cell", 1982, 29, s. 245-255.

Badaczki użyły ekstraktów komórkowych wyizolowanych z *T. thermophila* oraz starterów zbudowanych z powtarzających się sekwencji, identycznych z sekwencjami telomerów w komórkach pierwotniaka. W efekcie zaobserwowano syntezę nowych powtórzeń TTGGGG które zostały dobudowane do zakończeń starterów dzięki aktywności nowo odkrytego enzymu. Greider i Blackburn nazwały ten enzym telomerazą (od ang. *telomere terminal transferase*)⁹. Po zidentyfikowaniu enzymu i jego izolacji dowiedziano że enzym ulega dezaktywacji zarówno w obecności rybonukleaz (trawiących RNA) oraz w obecności proteaz (trawiących białka). Na tej podstawie stwierdzono że telomeraza do pełnienia swojej funkcji wymaga zarówno obecności fragmentu RNA jak i komponenty białkowej, a cały proces syntezy powtórzeń telomerowych jest niezależny od replikacji pozostałych fragmentów chromosomu. Jak się okazało telomeraza swoje działanie opiera na reakcji odwrotnej transkrypcji, a matrycą do syntezy powtórzeń telomerowych stanowi fragment RNA o sekwencji komplementarnej do tandemowych powtórzeń telomerowych¹⁰.

W 2009 roku cała trójka uczonych: Elizabeth H. Blackburn, Jack W. Szostak i Carol W. Greider otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za odkrycie, jak zakończenia chromosomów chronione są przez telomery i enzym telomerazę.

Zagadka nieśmiertelności rozwiązana?

Odkrycia Blackburn i współpracowników spowodowały duże zainteresowanie badaniami nad telomerami w komórkach ludzkich. W 1988 roku Robert Moyzis jako pierwszy opublikował sekwencję ludzkich telomerów, która składa się z heksamerowych powtórzeń 5'-TTAGGG-3'¹¹. Rok później Gregg Morin wykazał aktywność telomerazy w komórkach linii komórkowej HeLa wywodzącej się z komórek raka szyjki macicy¹². Było to nie lada dokonanie ze względu na stosunkowo niską aktywność telomerazy w komórkach ludzkich w porównaniu z komórkami *T. thermophila*. Zaobserwowano również, że w komórkach nowotworowych aktywność telomerazy jest wielokrotnie wyższa niż w komórkach pochodzenia nienowotworowego, co nasunęło hipotezę o powiązaniu aktywności telomerazy z rozwojem nowotworów¹³. Aby móc potwierdzić tę teorię pojawiła się potrzeba stworzenia czułego testu który pozwalałby na wykrycie aktywności telomerazy w komórkach. W 1994 roku Shay i wsp.

⁹ C.W. Greider, E.H. Blackburn, *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*, "Cell", 1985, 43, s. 405-413.

¹⁰ C.W. Greider, E.H. Blackburn, *The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity*, "Cell", 1987, 51, s. 887-898.

¹¹ R.K. Moyzis, J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani i wsp., *A Highly Conserved Repetitive DNA Sequence, (TTAGGG)_n, Present at the Telomeres of Human Chromosomes*, "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 1988, 85, s. 6622-6626.

¹² G.B. Morin, *The Human Telomere Terminal Transferase Enzyme Is a Ribonucleoprotein That Synthesizes TTAGGG Repeats*, "Cell", 1989, 59, s. 521-529.

¹³ C.M. Counter, H.W. Hirte, S. Bacchetti, C.B. Harley, *Telomerase Activity in Human Ovarian Carcinoma*, "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 1994, 91, s. 2900-2904.

opracowali prosty test TRAP (ang. *telomeric repeat amplification protocol*), bazujący na technice PCR i pozwalający na wykrycie aktywności telomerazy nawet w kilku komórkach. Bardzo szybko potwierdziły się przypuszczenia dotyczące wysokiej aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych. Aktywność telomerazy obserwowano w większości nieśmiertelnych linii komórkowych oraz w komórkach nowotworowych, podczas gdy w większości komórek somatycznych telomeraza nie była aktywna^{14,15}. Otworzyło to ogromne perspektywy w kontekście potencjalnego wykorzystania telomerazy jako markera diagnostycznego oraz celu terapii przeciwnowotworowych, o czym świadczy gwałtowny wzrost liczby prowadzonych badań dotyczących tego zagadnienia. W roku 1994 pojawiło się zaledwie 29 publikacji dotyczących telomerazy, podczas gdy w roku 1998 było ich już 463.

Telomeraza jako cel terapii

W ślad za odkryciem wysokiej aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych rozpoczęły się próby zahamowania jej aktywności przy pomocy różnorodnych metod. Pierwsze próby przeprowadzone na nowotworowych liniach komórkowych przyniosły obiecujące efekty. W komórkach raka naskórka z wprowadzonym zmutowanym genem *hTERT* wykazano obniżoną aktywność telomerazy, skrócenie długości telomerów oraz wzrost apoptozy w komórkach¹⁶. Pierwsze badania *in vivo* dotyczące zahamowania telomerazy zostały przeprowadzone przez Marię Blasco w Cold Spring Harbor Laboratory w Nowym Jorku. Blasco dołączyła do zespołu prowadzonego przez noblistkę Carol Greider i jako pierwsza prowadziła badania na myszach pozbawionych genu kodującego podjednostkę RNA telomerazy. Jej badania wykazały, że komórki myszy pozbawione genu *mTR* nie wykazywały aktywności telomerazy, z każdym kolejnym pokoleniem średnia długość telomerów w komórkach ulegała skróceniu, a komórki wykazywały szereg aberracji chromosomowych i uszkodzeń. Co ciekawe wyizolowane z badanych myszy komórki nadal wykazywały zdolność do transformacji nowotworowej¹⁷.

Ze względu na ograniczenia możliwości wykorzystania terapii genowej w praktyce klinicznej od początku duże nadzieje wiązano z zastosowaniem związków hamujących pośrednio lub bezpośrednio aktywność telomerazy. W ciągu ostatnich 15 lat przebadano szereg związków, zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego, o potencjalnej zdolności do hamowania telomerazy.

¹⁴ N.W. Kim, M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley i wsp., *Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer*, "Science", 1994, 266, s. 2011-2015.

¹⁵ J.W. Shay, S. Bacchetti, *A survey of telomerase activity in human cancer*, *European "Journal of Cancer"*, 1997, 33, s. 787-791.

¹⁶ X. Zhang, V. Mar, W. Zhou, L. Harrington i wsp., *Telomere Shortening and Apoptosis in Telomerase-Inhibited Human Tumor Cells*, "Genes & Development", 1999, 13, s. 2388-2399.

¹⁷ M.A. Blasco, H.W. Lee, M.P. Hande, E. Samper i wsp., *Telomere Shortening and Tumor Formation by Mouse Cells Lacking Telomerase RNA*, "Cell", 1997, 91, s. 25-34.

Jedną z pierwszych strategii zastosowanych w celu zahamowania aktywności telomerazy była stabilizacja struktury G-kwadrupleksu w obrębie zakończeń telomerowych. Sekwencje telomerowe bogate w guaninę w obecności niektórych związków są w stanie tworzyć złożone struktury przestrzenne uniemożliwiając w ten sposób przyłączanie się telomerazy. W 2001 z bakterii *Streptomyces anulatus* wyizolowano telomestatinę i wykazano, że dzięki płaskiej strukturze cząsteczki telomestatina stabilizuje strukturę G-kwadrupleksu i prowadzi do zahamowania aktywności telomerazy¹⁸. Do najlepiej poznanych związków z tej grupy należą także pochodne akrydyny: BRACO-19 i RHPS4 oraz pochodne porfiryryny w tym TMPyP4. Badania *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzają, że związki te wykazują skuteczne działanie przeciwnowotworowe. W 2011 roku u chorych z nowotworami neuroendokrynnymi zakończyła się II faza badań klinicznych związku z grupy fluorochinolonów o nazwie Quarfloxin. Jednym z podstawowych mechanizmów działania tego leku jest również zahamowanie aktywności telomerazy¹⁹.

Wśród inhibitorów telomerazy o istotnym potencjalnie terapeutycznym należy także wymieść oligonukleotydy, których działanie polega na blokowaniu dostępu telomerów do podjednostki RNA telomerazy. W 2005 roku opublikowano pracę dotyczącą modyfikacji oligonukleotydu GRN163, która miała poprawić biodostępność tej cząsteczki²⁰. Badania potwierdziły skuteczność GRN163L w hamowaniu telomerazy i lek został bardzo szybko wprowadzony do I i II fazy badań klinicznych pod nazwą Imetelstat. Pomimo obiecujących wyników w listopadzie 2014 roku przerwano II fazę badań klinicznych ze względu na wysoką hepatotoksyczność leku²¹.

Podsumowanie

Obecnie prowadzonych jest ponad 70 różnych badań klinicznych dotyczących wykorzystania telomerazy i jej inhibitorów w praktyce klinicznej. Należy podkreślić że poza leczeniem nowotworów, związki oddziałujące z telomerazą (w tym także jej aktywatory) badane są również pod kątem zastosowania ich w leczeniu chorób związanych z odnową i starzeniem komórek, w tym komórek macierzystych. Ze względu na wieloczynnikowy charakter większości chorób, a w szczególności nowotworów, wciąż nie potwierdziły się tak obiecujące przewidywania dotyczące telomerazy jako uniwersalnego celu terapii. Współcześnie duże nadzieje pokłada się w personalizowanej terapii genowej. Modyfikacja działania telomerazy poprzez bezpośredni wpływ

¹⁸ K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani i wsp., *Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from Streptomyces Anulatus*, "Journal of the American Chemical Society", 2001, 123, s. 1262-1263.

¹⁹ J. Bidzinska, G. Cimino-Reale, N. Zaffaroni, M. Folini, *G-Quadruplex Structures in the Human Genome as Novel Therapeutic Targets*, "Molecules", 2013, 18, s. 12368-12395.

²⁰ H. Brittney-Shea, G.C. Gellert, A. Hochreiter, K. Pongracz i wsp., *Lipid Modification of GRN163, an N3'->P5' Thio-Phosphoramidate Oligonucleotide, Enhances the Potency of Telomerase Inhibition*, "Oncogene", 2005, 24, s. 5262-5268.

²¹ Developing imetelstat, [online] Geron Corporation [dostęp 04.01.2015]. Dostępny w internecie: <http://www.geron.com/imetelstat>.

na ekspresję genów ma szansę na uzyskanie pozytywnych efektów terapeutycznych. Wciąż jednak problemem pozostaje kwestia sposobu wprowadzenia modyfikowanych genów do komórek docelowych w organizmie człowieka. Przez ponad 30 lat od odkrycia Blackburn naukowcy dowiedzieli się wiele na temat struktury i funkcji telomerów i telomerazy. Wiedza ta jest obecnie bezpośrednio i pośrednio wykorzystywana w wielu dziedzinach medycyny, a stale rosnące zainteresowanie tą tematyką pozwala przypuszczać, że jeszcze nie raz naukowcy przypomną nam o telomerach i telomerazie.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2014/13/N/NZ7/00307, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.