







Molekulární biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie, FN Brno
Přírodovědecká fakulta MU Brno
Lékařská fakulta MU Brno
2011

7. Telomery, telomeráza a nádory

Šest získaných vlastností maligního nádoru

získaná schopnost	příklad
 Soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace <i>H-ras</i>
 Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.	ztráta RB
 poškození apoptózy	produkce IGF
 Neomezený replikační potenciál	aktivace telomerázy
 Posílení angiogeneze	produkce VEGF
 Tvorba metastáz	inaktivace E-kadherinu

Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn.

Stárnutí buněk

- Normální diploidní buňky se nemohou v kultuře dělit nekonečně, ale naopak mají naprogramovaný (tzn. určený vnitřními faktory) **konečný počet buněčných dělení**, kterými mohou projít (L. Hayflick, 1961). Pro lidské diploidní fibroblasty (HDF) je to asi 50-60 cyklů.
- Po dosažení tohoto počtu dělení se u buněk vyvine **senescentní** fenotyp: buňky změně morfolonii, jsou nadále metabolicky aktivní, ale nedělí se. S tím souvisí jiné expresní profily. Blok buněčného cyklu je ve stárnoucích buňkách udržován signalizací přes proteiny **p53/p21** a **p16/RB**.
- Jsou-li vyřazeny tyto dráhy, buňky se dále (20 až 30x) dělí, až dosáhnou **krize**. I potom se buňky mohou dělit, ale díky velkým chromozomálním aberacím vstupují často do apoptózy.
- Vzácně (1×10^{-7}) mohou buňky uniknout krizi a stát se **nesmrtelnými**.

„Telomerová hypotéza“

Telomery jsou repetitivní sekvence na koncích lineárních chromozomů, na které se váží proteinové komplexy. Jejich hlavní funkcí je ochrana konců lineárních chromozomů (poprvé pozorováno 1938).

telos = konec (end)

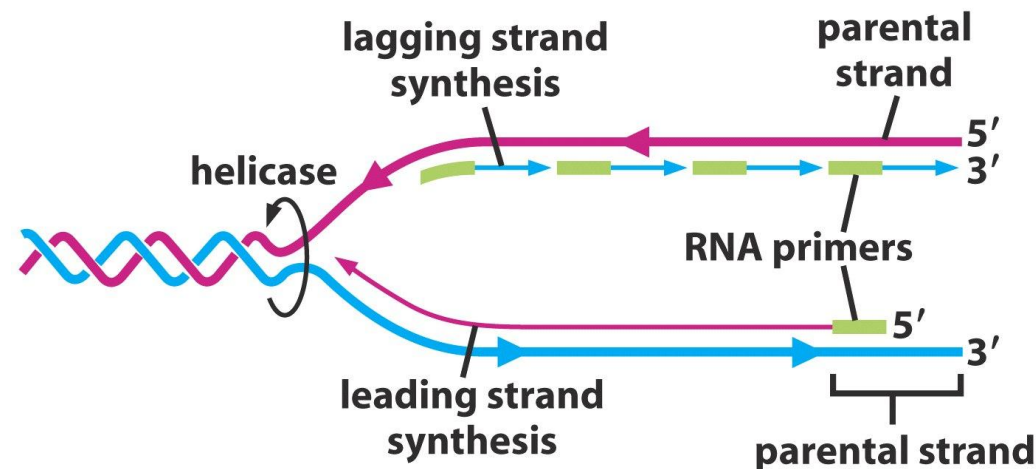
meros = část (part)

Telomeráza je ribonukleoproteinový enzym, který je nutný pro kompletní replikaci konců DNA, tj. pro udržování stabilní délky telomer.

- Většina buněk neexprimuje telomerázu a telomery se proto progresivně zkracují při každém buněčném dělení. To souvisí s problémem neúplné replikace chromozomů:

Problém neúplné replikace chromozomů

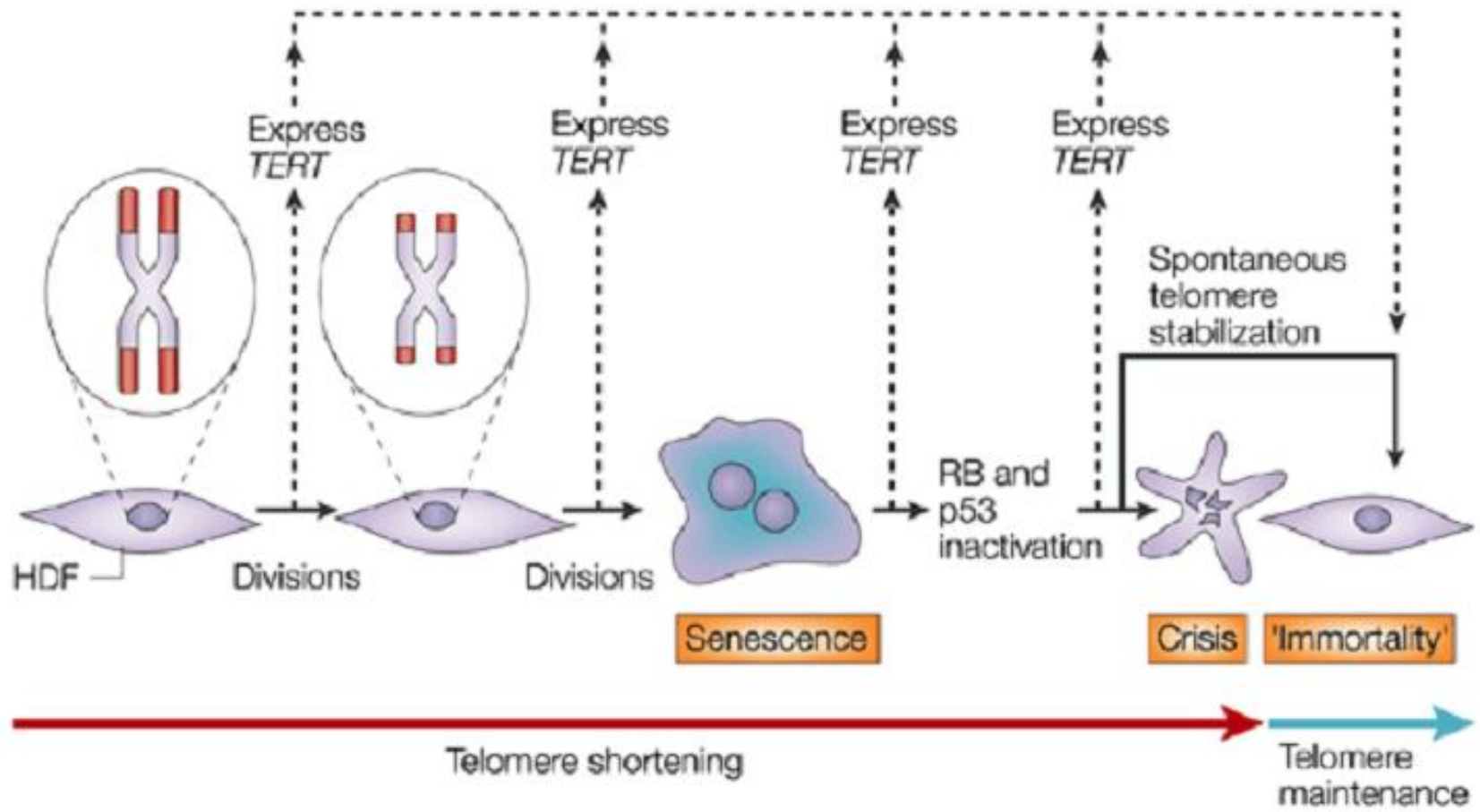
- DNA polymeráza katalyzuje prodlužování řetězce jen ve směru 5' → 3'.
- Proto se jedno vlákno uvnitř replikační vidlice syntetizuje kontinuálně a jedno diskontinuálně po Okazakiho fragmentech z RNA primeru.
- RNA primery jsou potom odstraněny a nahrazeny sekvencí DNA.
- Jen na 5'-koncích dceřinného vlákna zůstává nedosyntetizovaná část vlákna ⇒ zkrácení při každé replikaci.



Telomerová hypotéza

- Při dosažení **kritické délky telomer** jsou indukovány signály, které navodí stav **senescence** (**M1** - „mortality stage 1“). Při dalším dělení (inaktivace p53 a RB) se telomery dále zkracují a způsobují chromozomální nestabilitu, která vyvolá **krizi** (**M2** - „mortality stage 2“).
- ⇒ Zkracování telomer funguje jako mitotické počítadlo, které určuje proliferativní kapacitu všech buněčných typů, které nemají telomerázovou aktivitu.

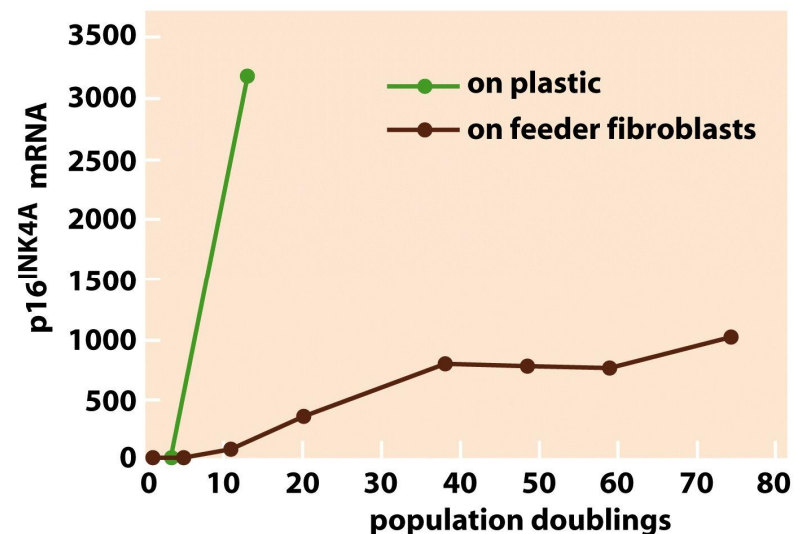
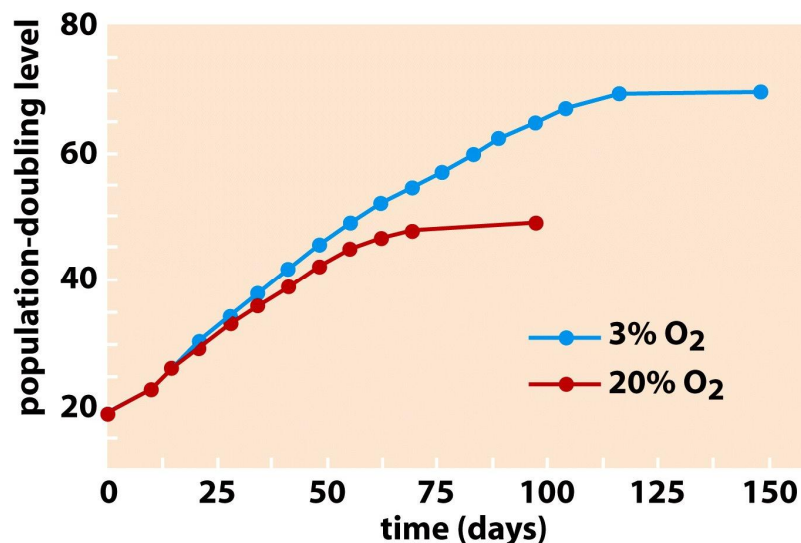
Délka telomer určuje replikativní potenciál HDFs



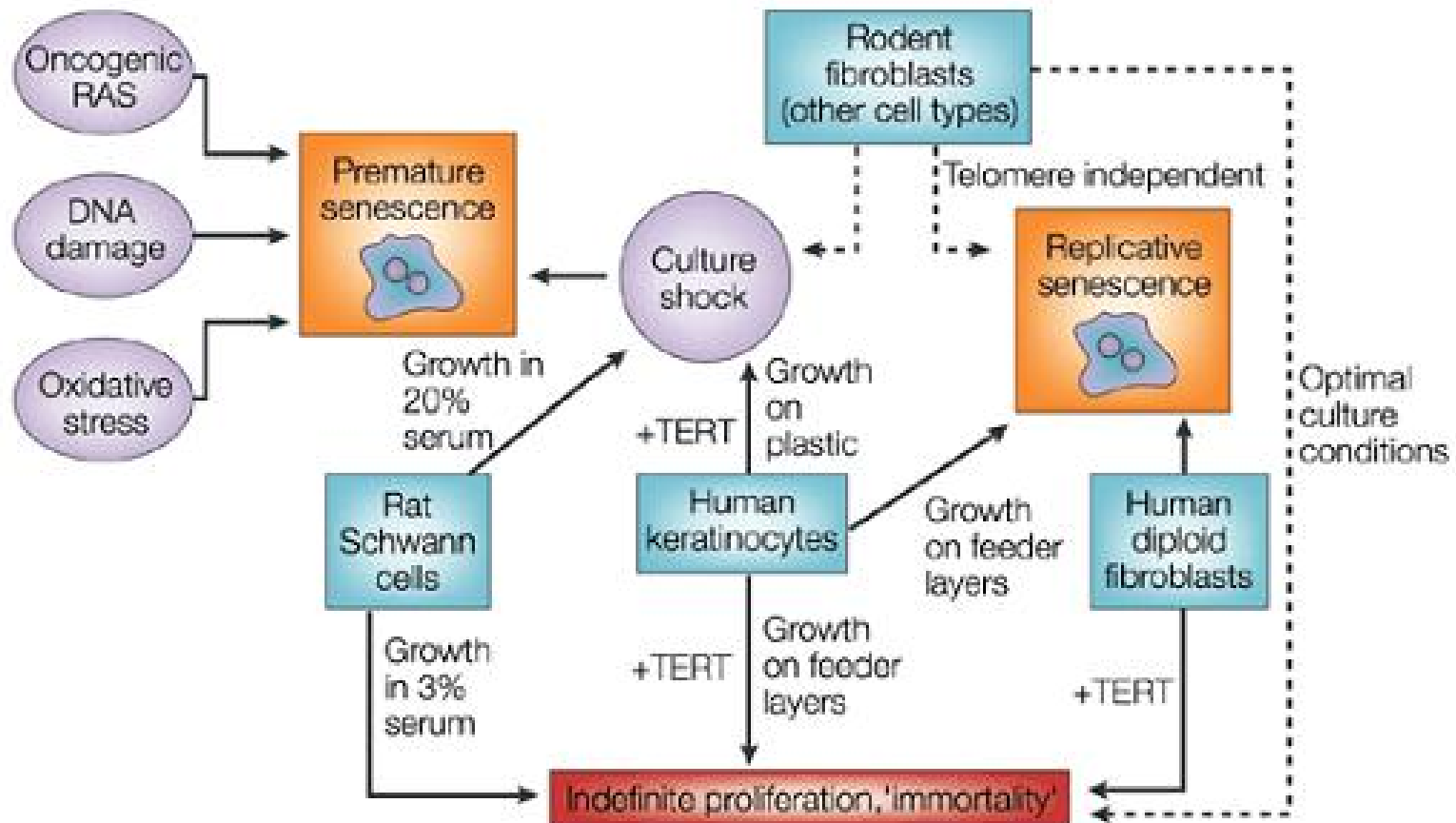
Senescence nezávislá na délce telomer

Senescenci mohou navodit i jiné (externí) podněty než kritické zkrácení telomer (**předčasná senescence** X **replikativní senescence**):

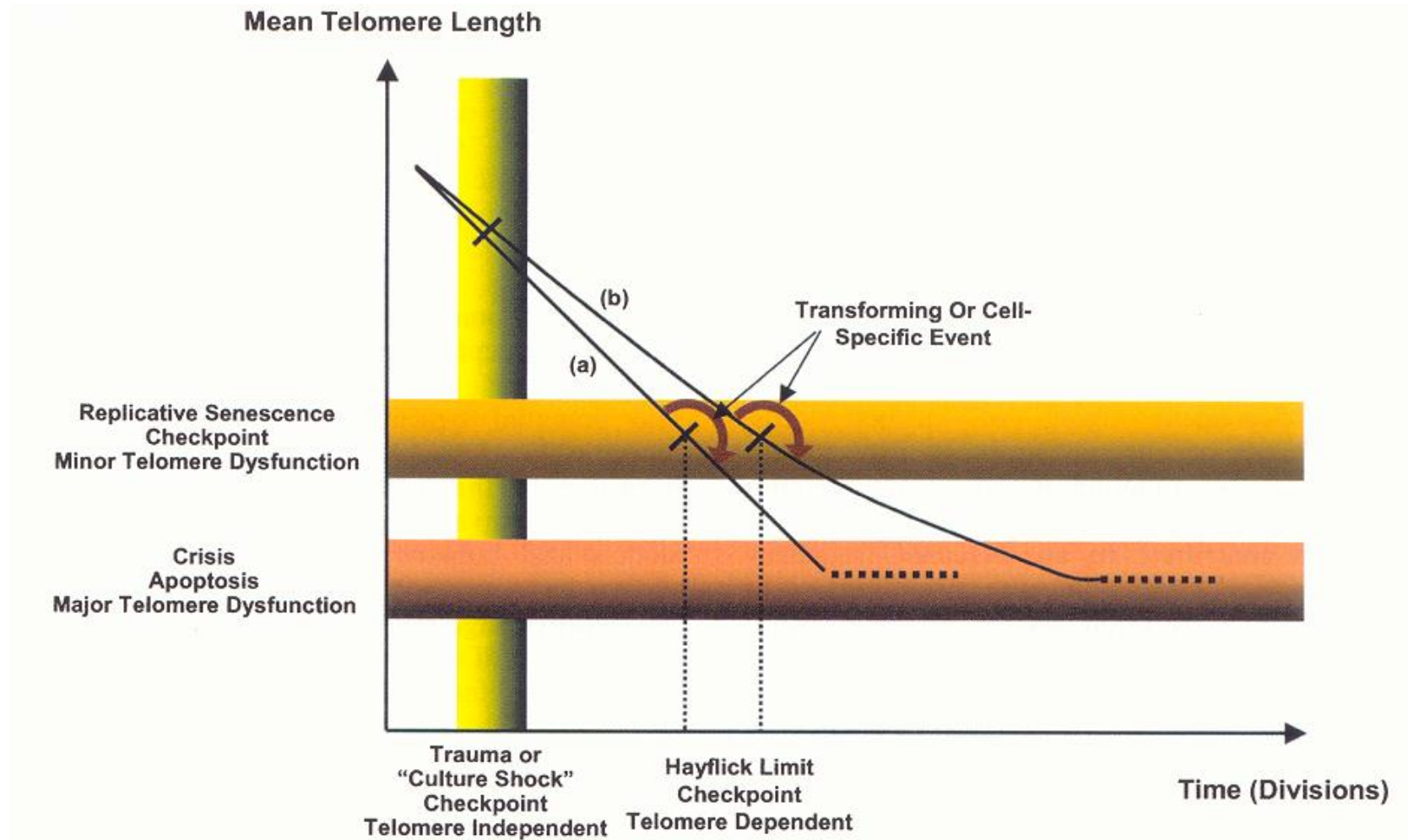
- látky poškozující DNA
- oxidativní stres
- aktivace mitogenních signálních drah (např. aktivace Ras)
- kumulativní trauma *in vitro* kultur („**culture shock**“ - kulturační šok)
- náhlá změna kulturačních podmínek



Typy senescence



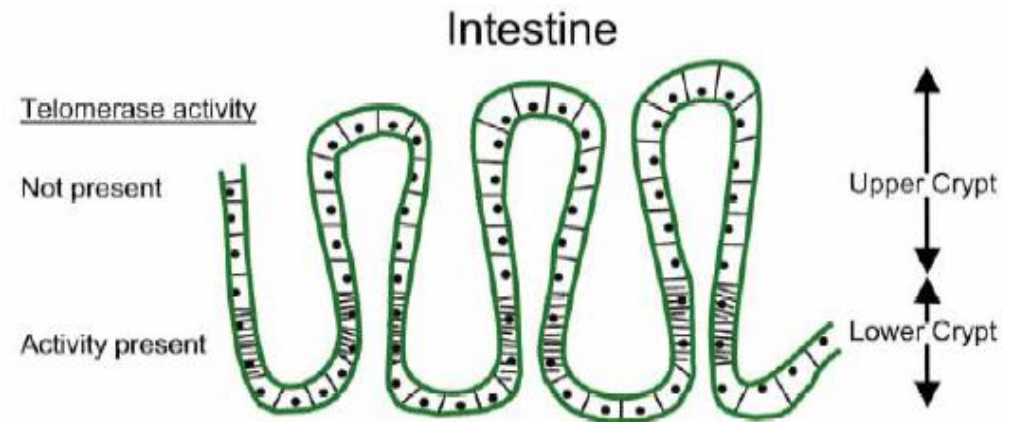
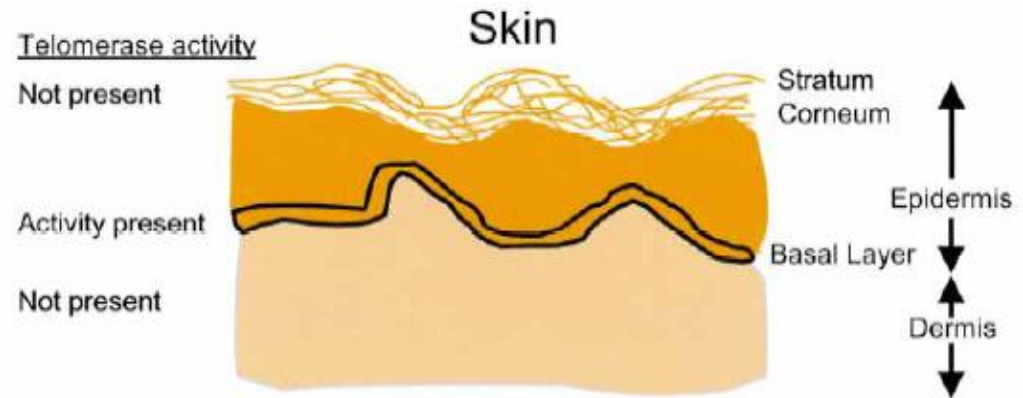
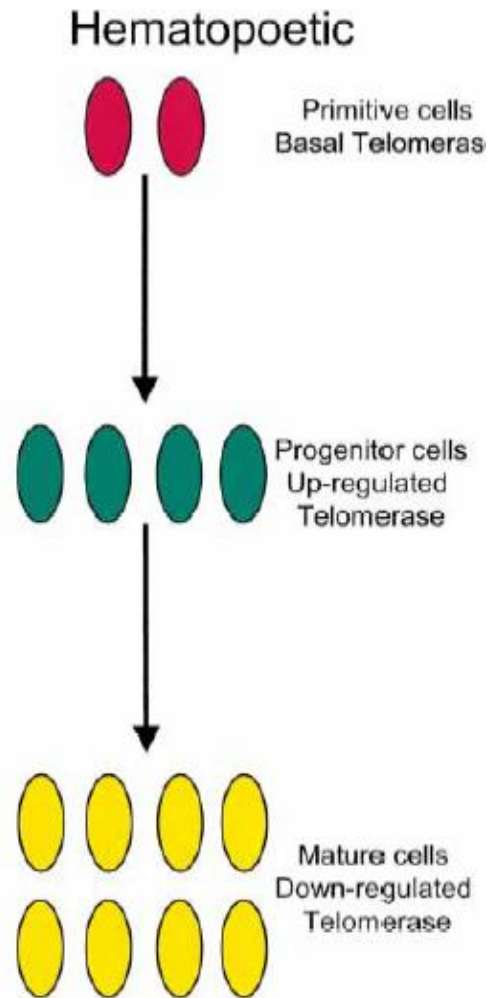
Telomerová hypotéza: **smrtné** buňky



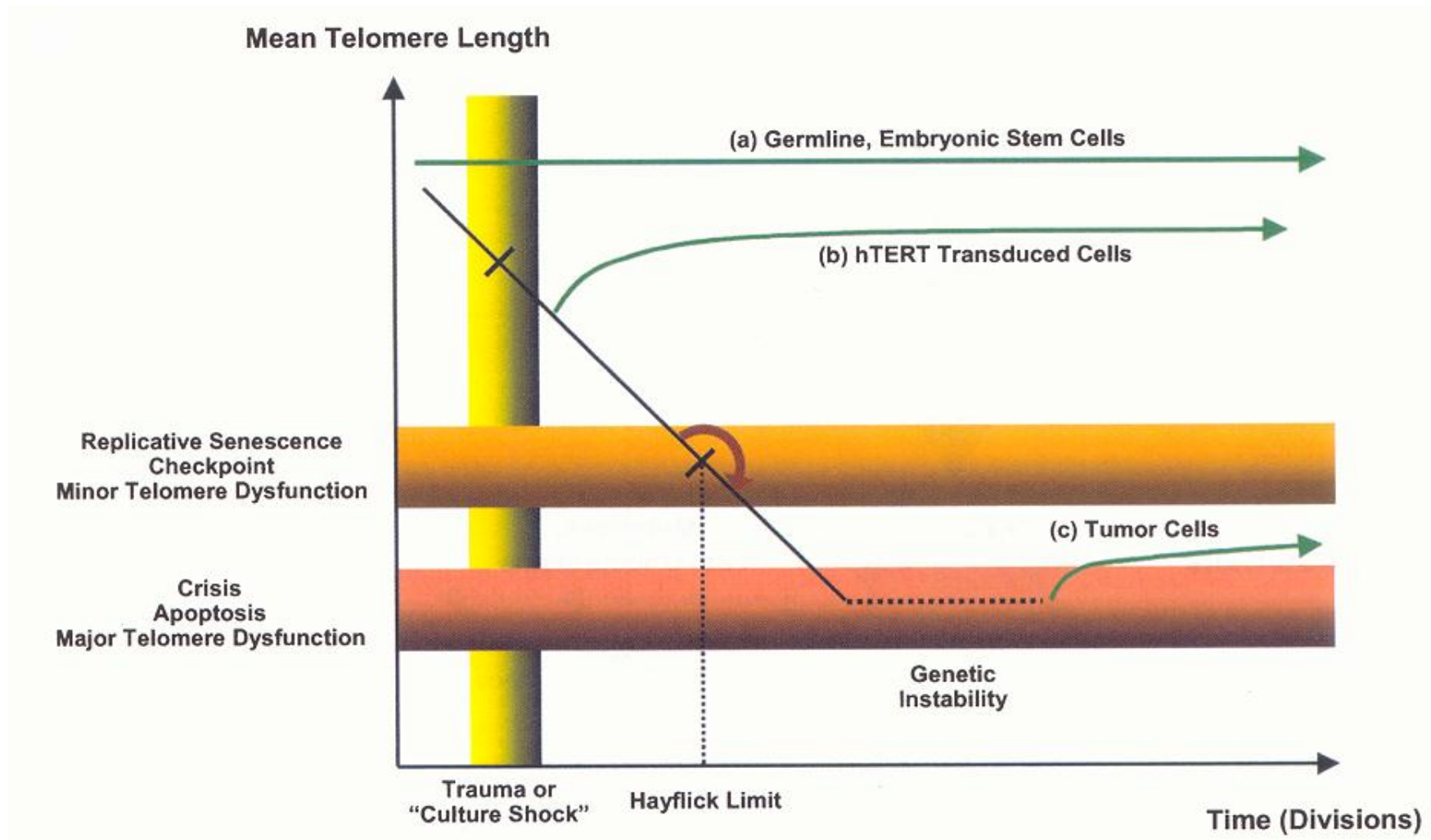
Buňky s aktivní telomerázou

- **Zárodečné** buňky
- Některé **kmenové** buňky
- Některé **somatické** buňky za určitých fyziologických podmínek:
 - buňky endometria ve vztahu k proliferaci během menstruačního cyklu
 - mitogenně stimulované lymfocyty
 - buňky v proliferativní zóně střevních krypt
 - buňky proliferativní bazální vrstvy kůže
 - buňky lobulárního endotelia prsu během těhotenství
- **Nádorové buňky**: 85-90% všech nádorových buněk má aktivní telomerázu!

Oblasti aktivní telomerázy



Telomerová hypotéza: nesmrtelné buňky



Telomery

- Telomery jsou tvořeny DNA a proteiny.

DNA:

- tandemové sekvence **(TTAGGG)_n** (Moyzis 1988)
- při každé replikaci dochází ke zkrácení telomery v důsledku problému neúplné replikace chromozomů (při každém dělení asi o 50 až 200 pb)
- podstatná část telomer (až 15 kb) je tvořena dvouřetězcovou DNA, samotný konec telomer tvoří 3' -vlákno DNA, bohaté na G, zakončené často 2 až 4 G („G-přesahovák“): konec telomery musí tvořit správnou strukturu tak, aby nebyl zaměněn za dvouřetězcové zlomy DNA!!

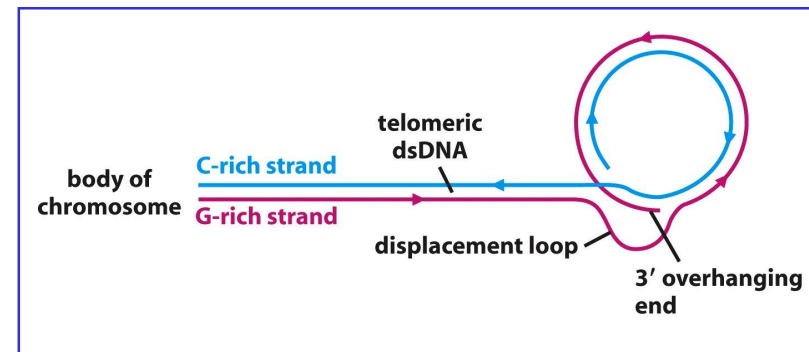
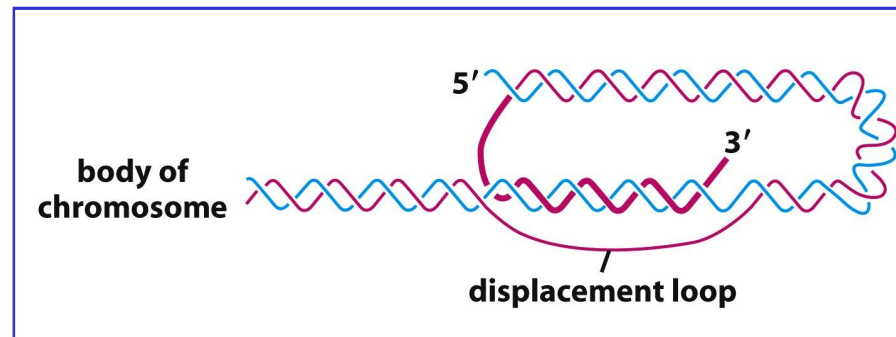
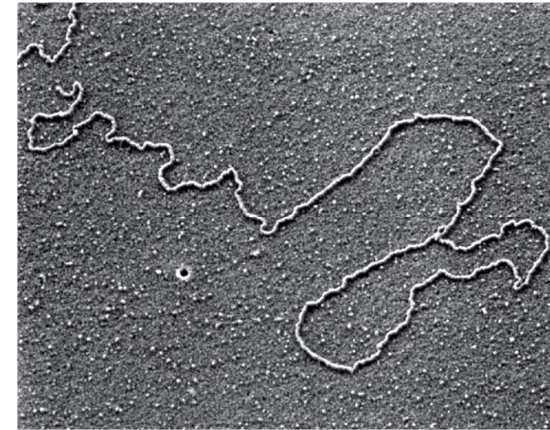
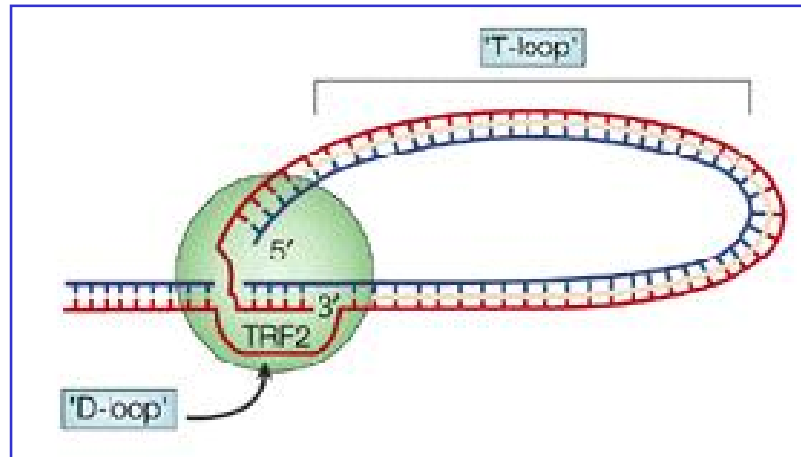
Struktura konce telomery



3' -jednovláknový konec telomery:

G-bohaté vlákno telomerické DNA přesahuje C-bohaté vlákno a tak je vytvořen tzv. 3' přesah/G-přesah. Ten je dlouhý několik set nukleotidů (délka dvouřetězcového úseku telomery je asi 5 až 10 kb).

Struktura konce telomery



3' -jednovláknový konec telomery se balí dovnitř, hybridizuje v dvouřetězcové oblasti s příslušnou sekvencí, ze které vytlačuje původní vlákno a tvoří **D-smyčku**. Dvouřetězcová část konce telomery tvoří strukturu **T-smyčky**. Struktura je stabilizována vazbou některých proteinů, např. **TRF2**.

Struktura konce telomery

3' přesah:

- zatím se neví, jak přesně se - postreplikačně - jednovláknový konec tvoří
- jeho význam spočívá v tom, že po „zanoření“ do dvouvláknové struktury nevyvolává odpověď/signál jako jednořetězcový zlom DNA

Proteinový komplex

- tzv. **shelterin (telosom)**
- váže se v mnoha kopiích (100 - 1000) na telomerové „repeaty“
- funkce: ochrana chromozomů a regulace délky telomer

Nukleosomy

- s modifikacemi histonů typickými pro heterochromatin

Telomery

Proteiny:

TRF1 a TRF2 („telomere repeat factor“)

- první identifikované faktory vázající se na telomery
- podílejí se na tvorbě správné struktury telomer
- váže se na dvouřetězcovou část telomer
- funguje jako represor telomerázy (overexprese TRF1 vede ke zkracování telomer i v přítomnosti aktivní telomerázy)
- Kooperace TRF1 a 2 podobná spolupráci dvou rukou při zavazování tkaniček: TRF1 tvoří smyčku a TRF2 ji utahuje a zabezpečuje.

TIN2 interaguje s TRF1 a 2

(jeho identifikace vedla ke konceptu multiproteinových komplexů na telomerách, kdy je obtížné určit efekt jediného proteinu bez souvislosti s ostatními proteiny komplexu)

Telomery

Proteiny:

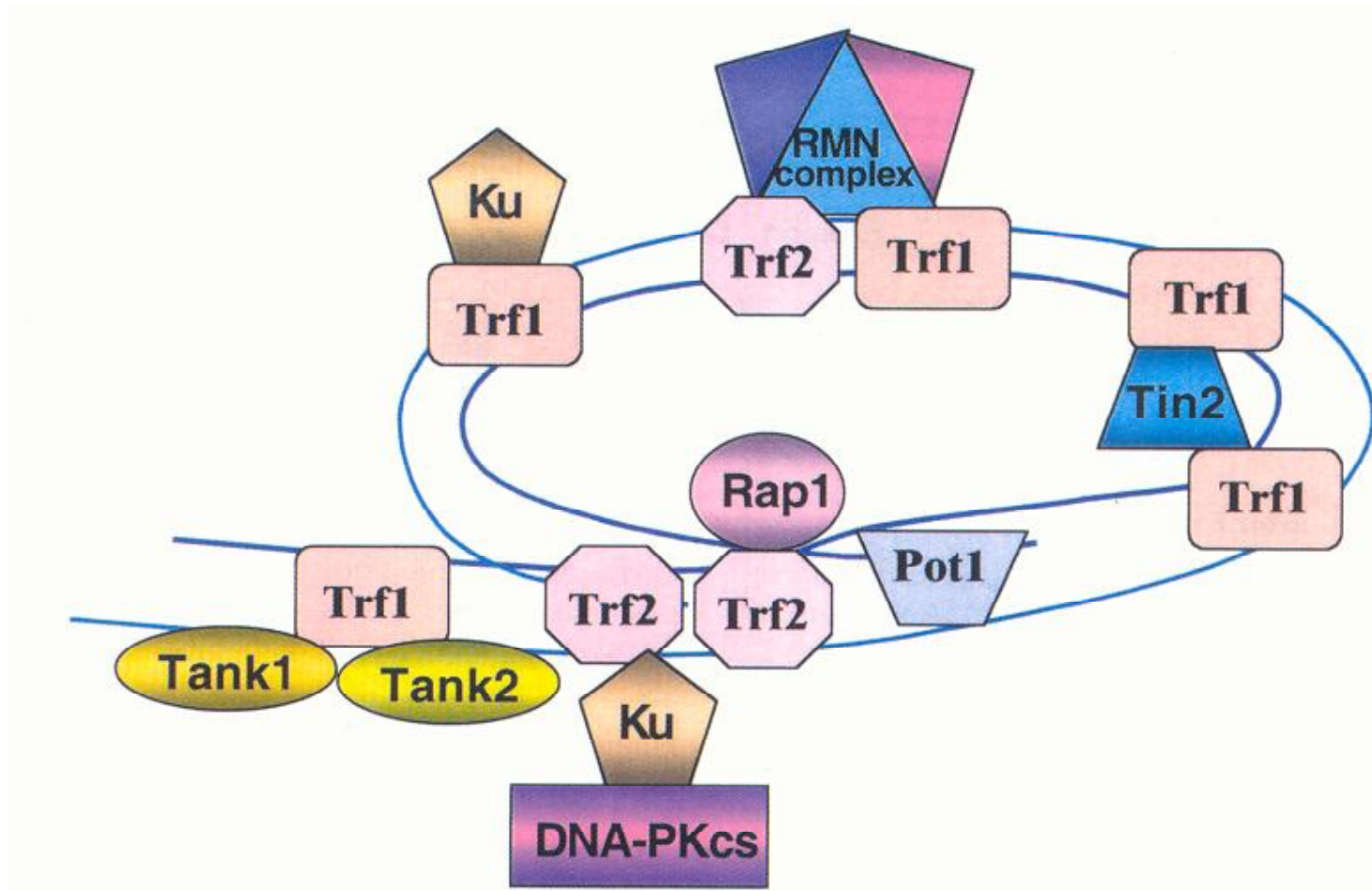
Tankyráza

- interaguje s TRF1, ale má i další netelomerické funkce
- může ADP-ribozylovat TRF1 - TRF1 je po ADP-ribozylaci rychle ubikvitinován a degradován
- především cytoplasmatický protein, který se do jádra dostává prostřednictvím interakce s TRF1 během S fáze b.c.

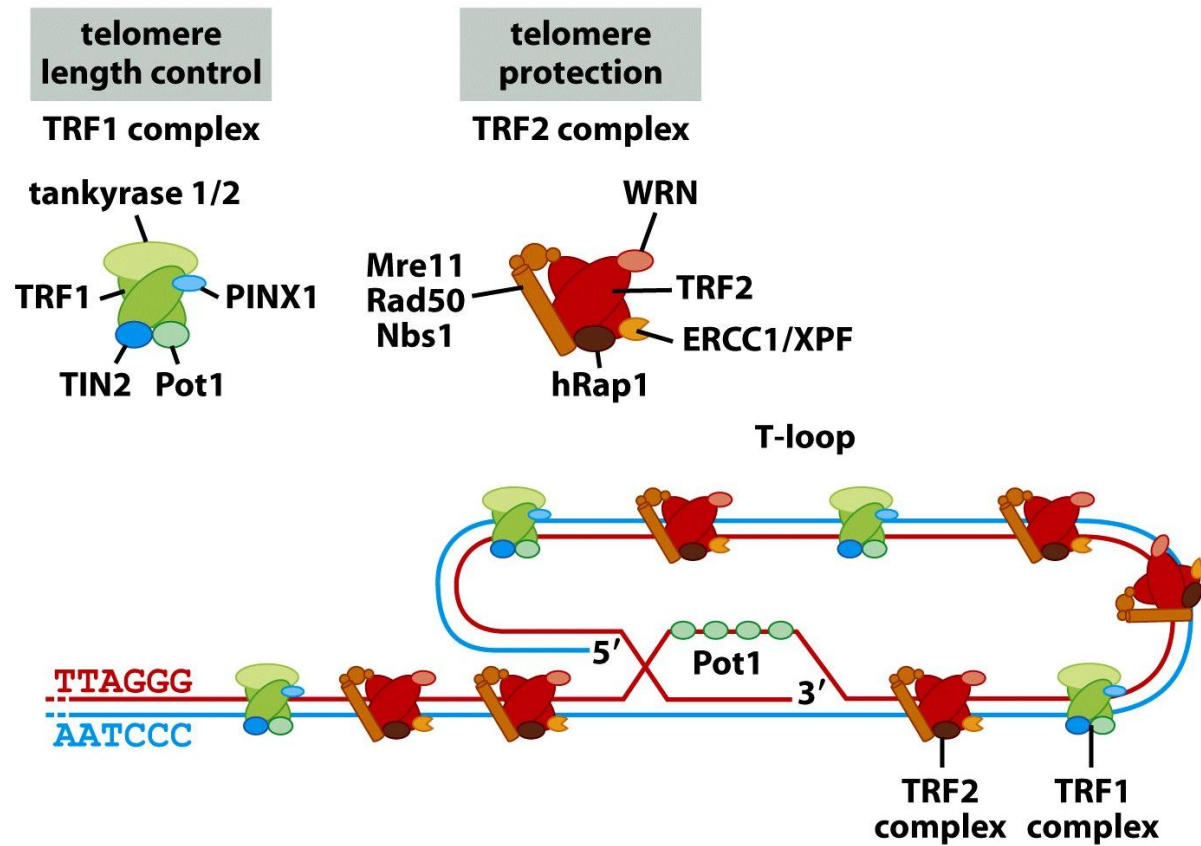
Pot1 („protection of telomeres“) se váže na G-
přesahovák a tím chrání konce telomer.

Na telomerách se vyskytují také proteiny, které se účastní oprav a rekombinace DNA: **Rad50**, **Rad51**, **Rad52**, **Ku70/Ku86**, **NBS1**, **MRE11** a další.

Struktura telomer



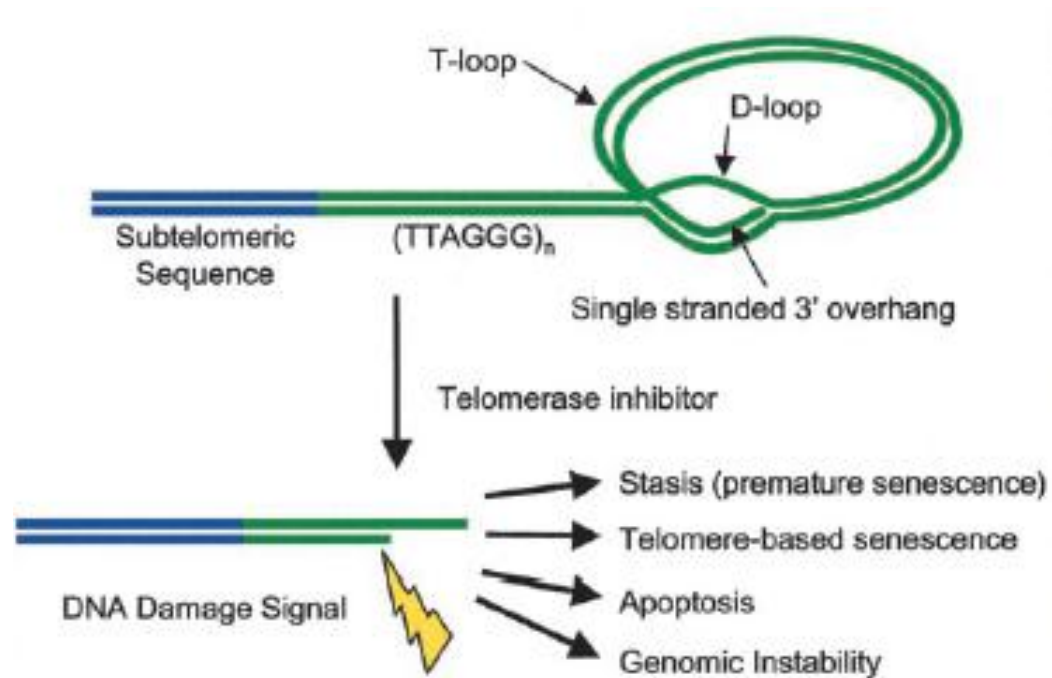
Struktura telomer



Telomery

- Blok buněčného cyklu je ve stárnoucích buňkách udržován signalizací přes proteiny **p53/p21** a **p16/RB**.
- Telomera zkrácená na kritickou délku je signálem ke spuštění signálních drah, které vedou k bloku buněčného cyklu:
 - signalizuje nejkratší telomera
 - telomeráza má afinitu k nejkratší telomeřeSignalizace se účastní např. **Ku** (účast v NHEJ), **RAD50/MRE11/NBS1, ATM**

Možné dopady zkracování telomer



Telomeráza: podjednotka hTR

Složena ze dvou podjednotek: hTERT a hTR.

hTR: RNA podjednotka, která slouží jako templát pro syntézu telomerových sekvencí.

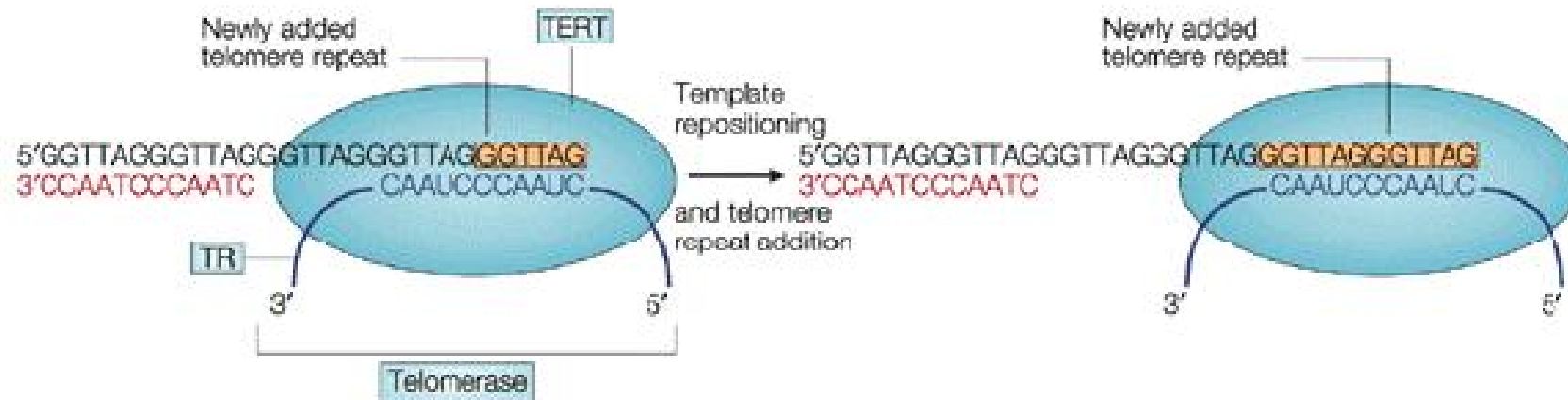
- Je 451 nt dlouhá, bez polyadenylace.
- Templátová oblast je tvořena **11 nt** sekvencí **5' - CUAACCCUAAC - 3'** (1 kompletní a 1 částečná sekvence telomerového „repeatu“)
- Gen je lokalizován v oblasti 3q26.3
- V promotoru CpG ostrůvky (u ALT+ buněk metylován)

Telomeráza: podjednotka hTR

- Na řízení transkripce se podílejí: Nf- γ (esenciální), Sp1 a RB (aktivátory), Sp3 (represor).
- **Dyskerin*** - protein, který interaguje s hTR a je nutný pro správné fungování telomerázy.

*Nepřítomnost nebo poškození dyskerinu je jednou z příčin vzácného vrozeného onemocnění *Dyskeratosis congenita*: křehké kosti, nepřítomnost vlasů, progresivní dystrofie nehtů, nedostatečně vyvinuté genitálie, abnormality trávicího traktu, plicní fibróza, imunitní dysfunkce a zvýšené riziko nádorů kůže.

Podjednotka hTR slouží jako templát při prodlužování telomer telomerázou



Telomeráza: podjednotka hTERT

hTERT: katalytická podjednotka s aktivitou reverzní transkriptázy

- 127kDa protein, 1132 AA, limitující součást telomerázy.

Aktivita \Leftrightarrow exprese (hTERT) telomerázy.

- Gen je lokalizován v oblasti **5p15.33***.
- Promotor může být metylován.
- Řízení transkripce se účastní: **c-Myc**, **Sp1** a estrogen (pozitivní regulace), **MZF-2** a **Mad** (negativní regulace). Nepřímo se účastní také **IFN- α** (přes downregulaci c-Myc) a **p53** (inhibuje vyvázáním faktoru Sp1).
- Holoenzym telomeráza potřebuje ke správnému foldingu *in vivo* chaperony: **p23**, **hsp90**

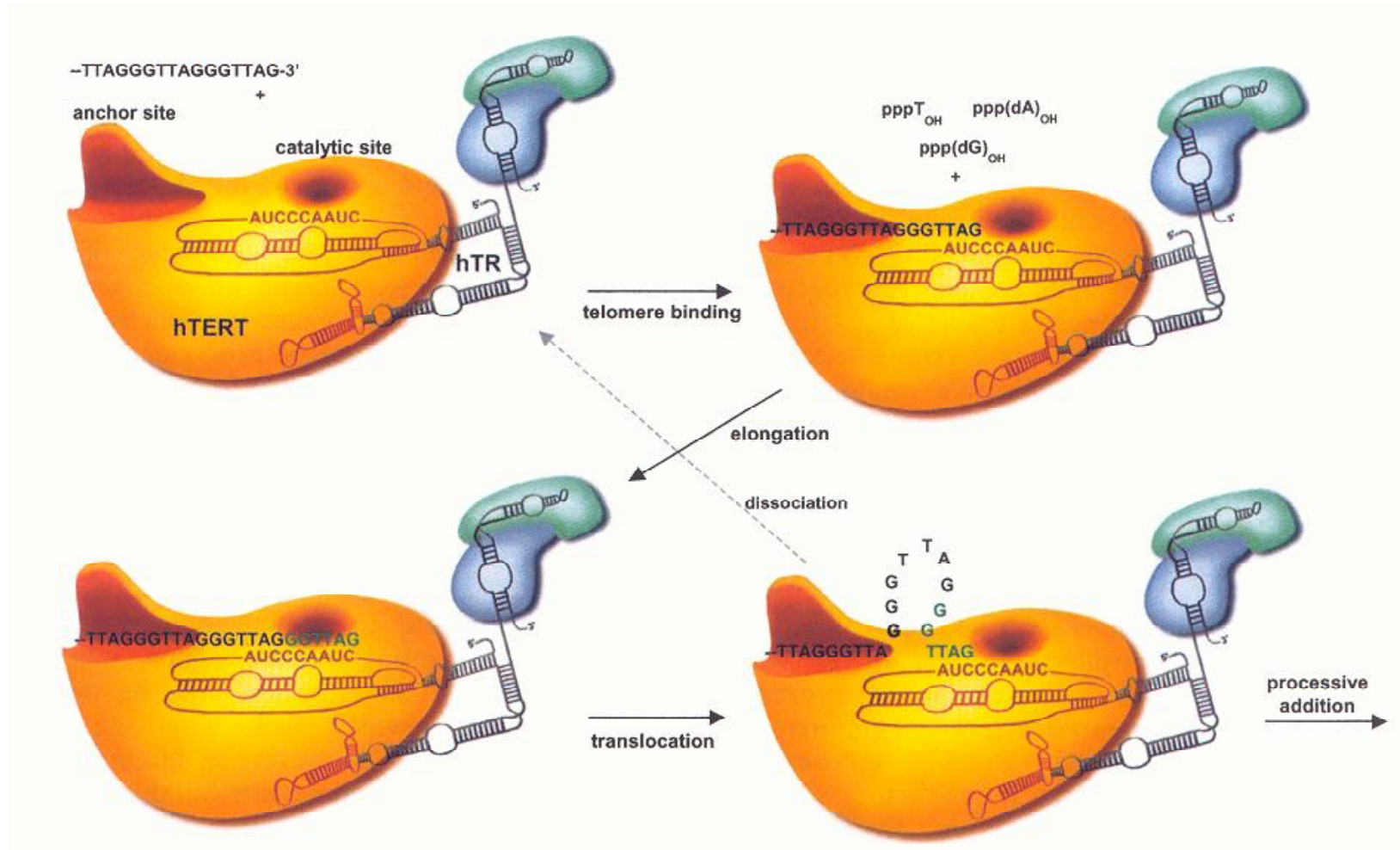
Telomeráza

- Aktivita telomerázy dále kontrolována na posttranskripční a posttranslační úrovni (fosforylace - role i p16, p15).

Funkční domény podjednotky hTERT:

- „**anchor**“ doména - váže konec telomery
- **katalytická** doména - vlastní polymerace nukleotidů

Mechanismus fungování telomerázy

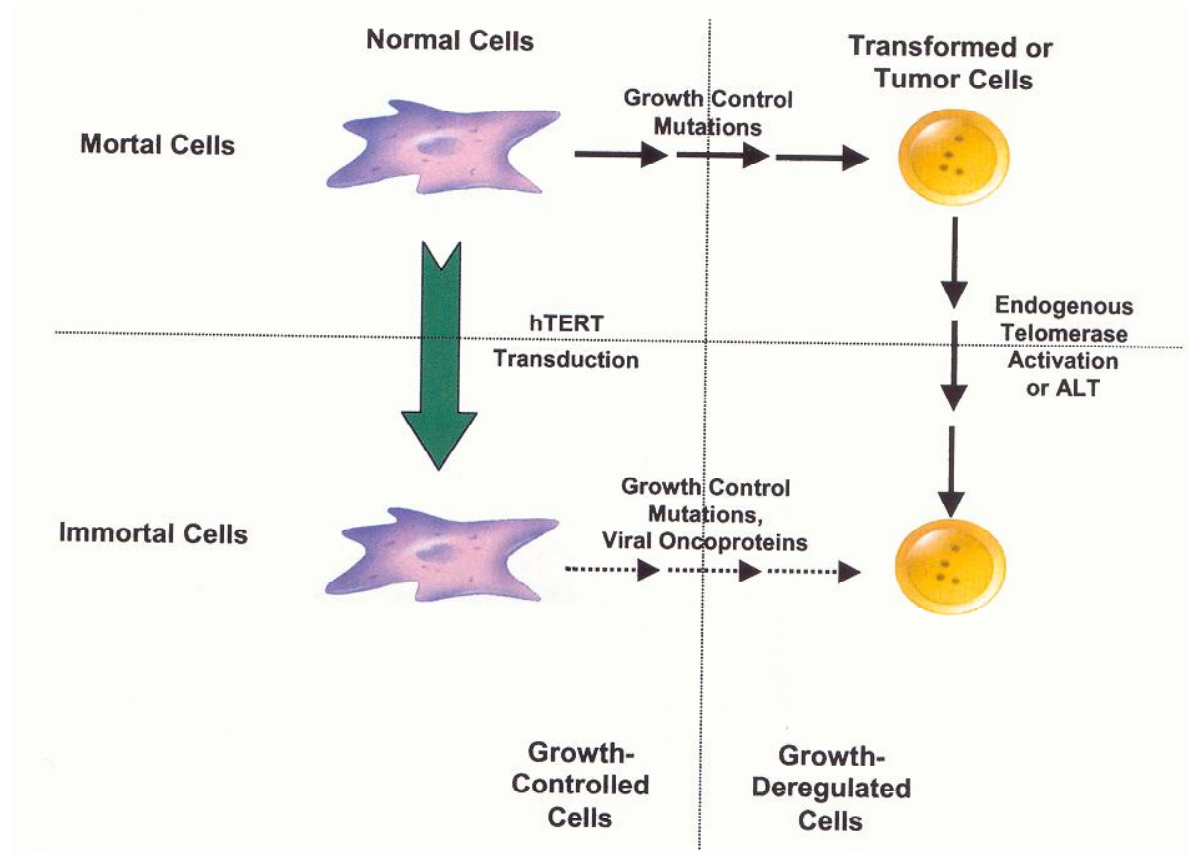


vazba telomery → elongace → translokace → → disociace

Nádory, telomery a aktivní telomeráza

- 85 až 90% nádorů má aktivní telomerázu.
- K aktivaci telomerázy dochází v pozdních stadiích kancerogeneze.
- Ektopická exprese telomerázy nemá transformační účinek.

Ektopická exprese telomerázy nemá transformační účinek



Zkracování telomer brání vzniku nádorů

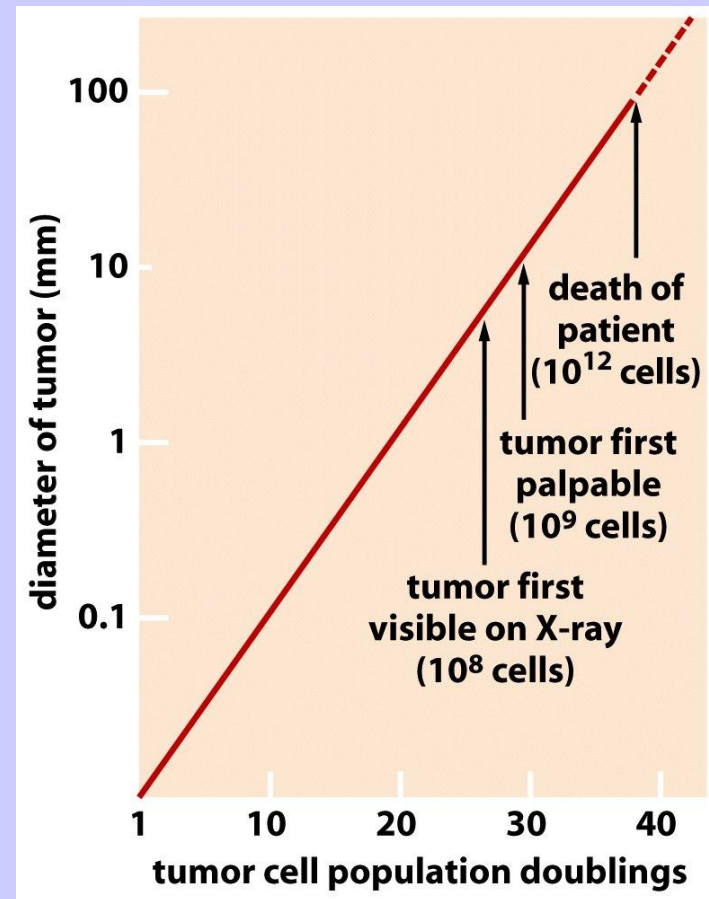
- Zkracování telomer v buňkách bez aktivní telomerázy suprimuje tvorbu nádorů tím, že limituje, kolikrát se buňka může rozdělit; omezením replikační kapacity snižuje šanci na „úspěšnou, dokonanou kancerogenezi“.
Je těžké určit, kolikrát se buňka musí být schopná rozdělit, aby měla dostatečnou kapacitu k vývoji nádoru!
- Stabilizace telomer je nutnou podmínkou vývoje nádoru.
- Telomery nádorových buněk jsou často kratší než telomery ostatních buněk (⇒ ke stabilizaci telomer dochází až v některé pokročilejší fázi vývoje nádoru).
- Např. myš „knock-out“ pouze v *Cdkn2a* (p16, *Arf*) má vyšší výskyt nádorů a v mladším věku než myš knock-out v *Cdkn2a* a s krátkými telomery (podobně myš *Apc^{Min}* - pouze adenomy).

Brání zkracování telomer vzniku nádorů?

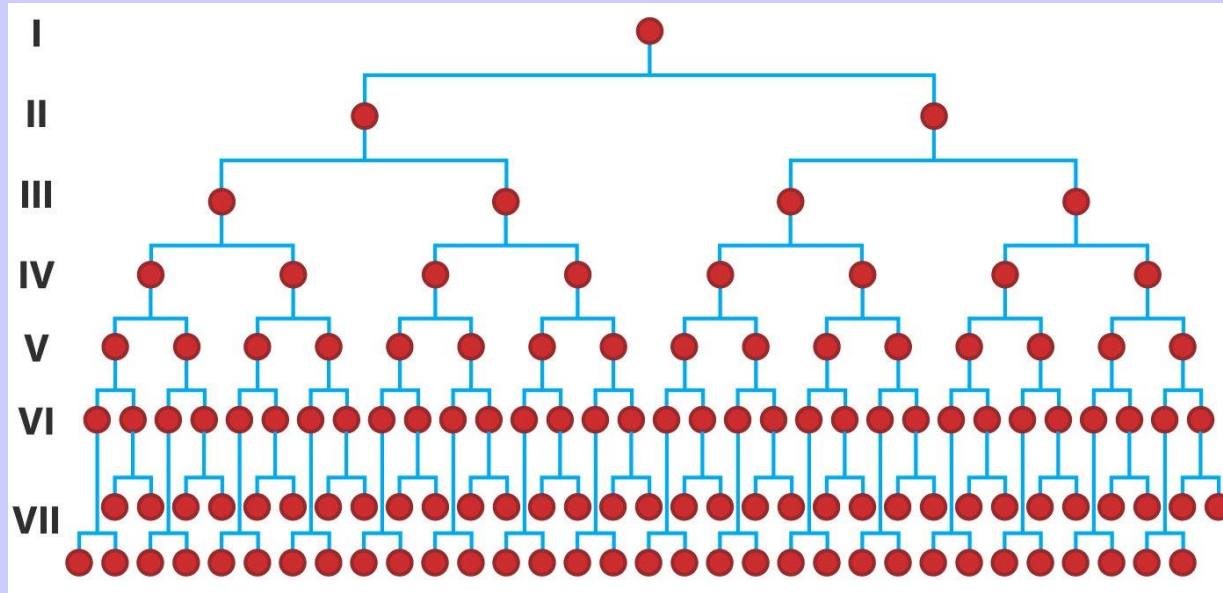
1. nádory jsou klonální, vznikají z jediné buňky
2. 1 cm³ tkáně obsahuje asi 10⁹ buněk
3. průměrný život ohrožující nádor je velký asi 10³ cm³, tj. asi 10¹² buněk

⇒ tj. 40 cyklů exponenciálního růstu a dělení, tedy 40 generací buněk

in vitro je možných 50-60 cyklů, **to by vyšlo!!**



Tak brání zkracování telomer vzniku nádorů nebo ne?

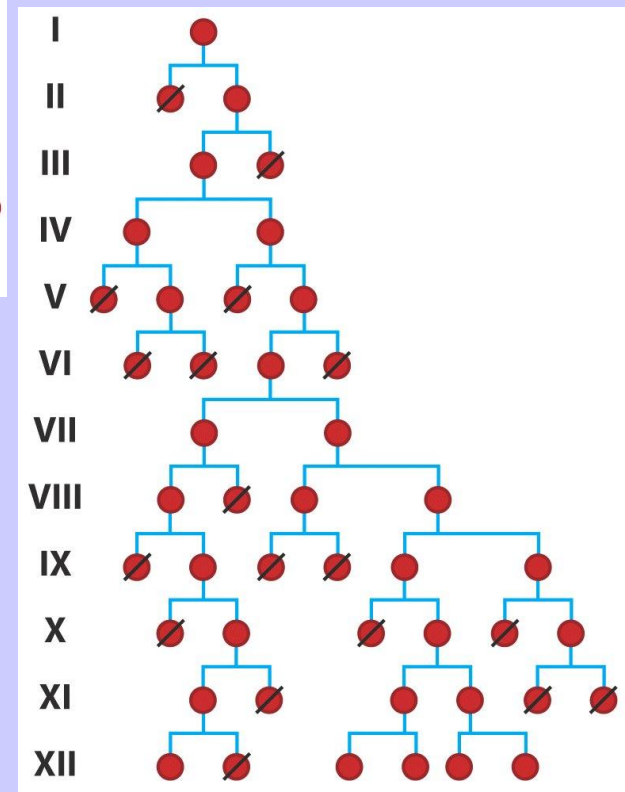


← toto je ideální představa

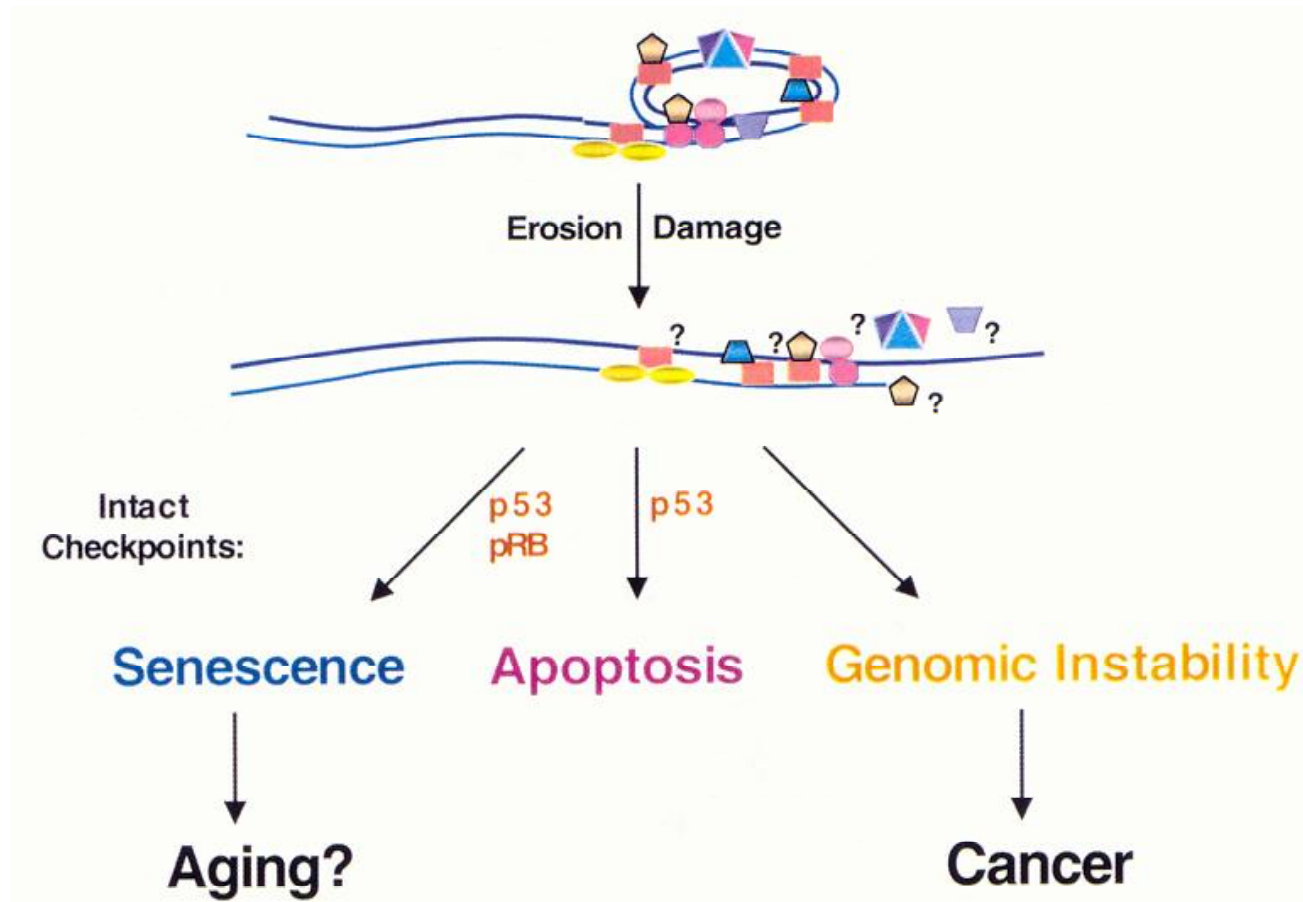
realita vypadá takto →

v mnohobuněčném organismu existují ochranné bariéry a mnoho buněk zemře (nedostatek růstových faktorů, kyslíku, přítomnost odpadů, atd.)

reálně je třeba mnohem více buněk, aby uspěly ve snaze vytvořit nádor

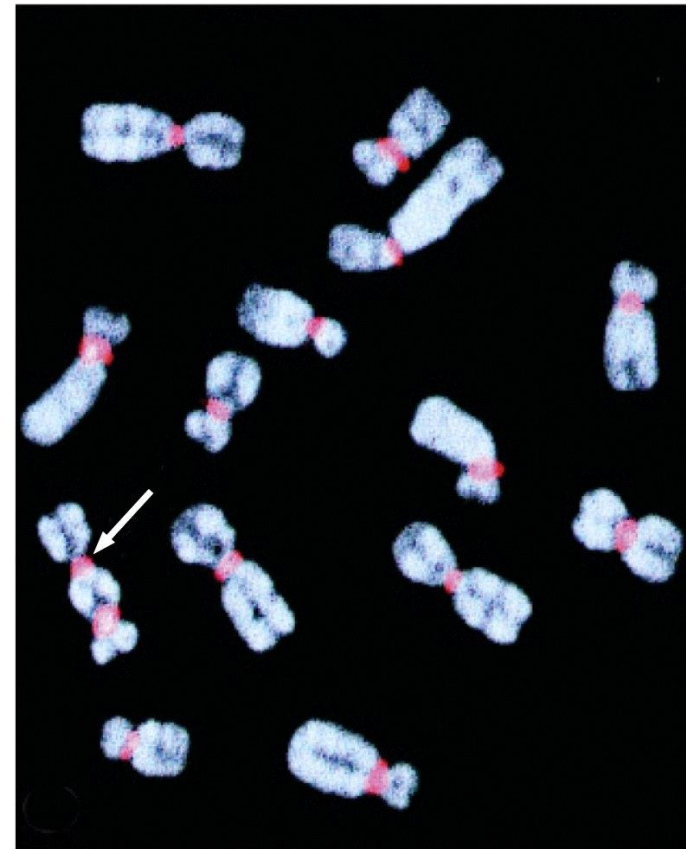


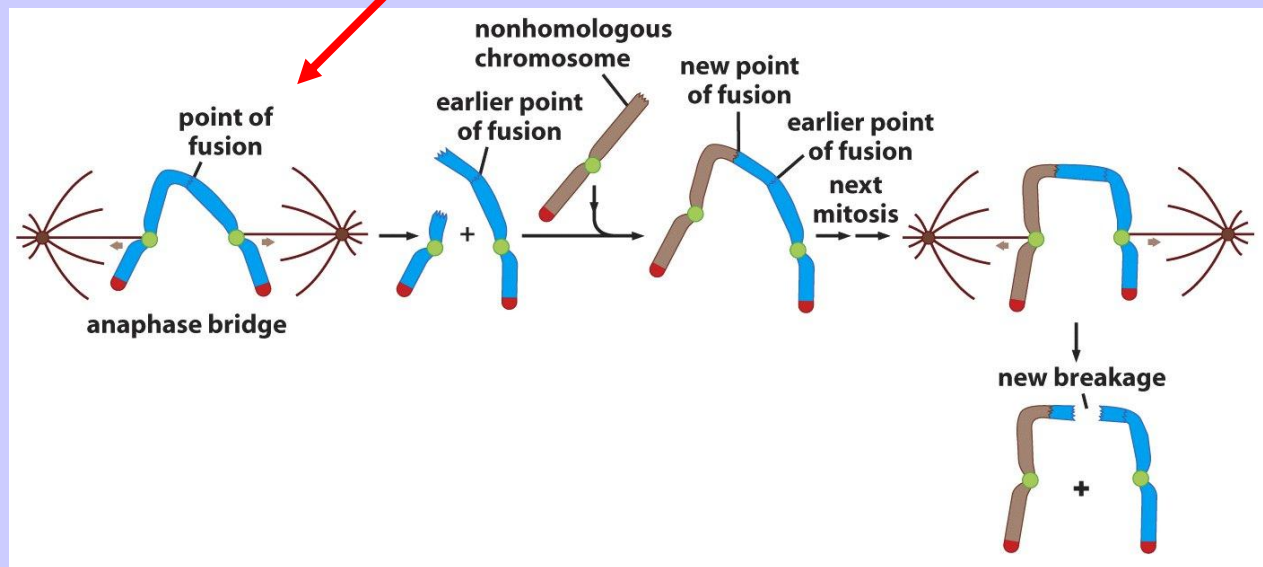
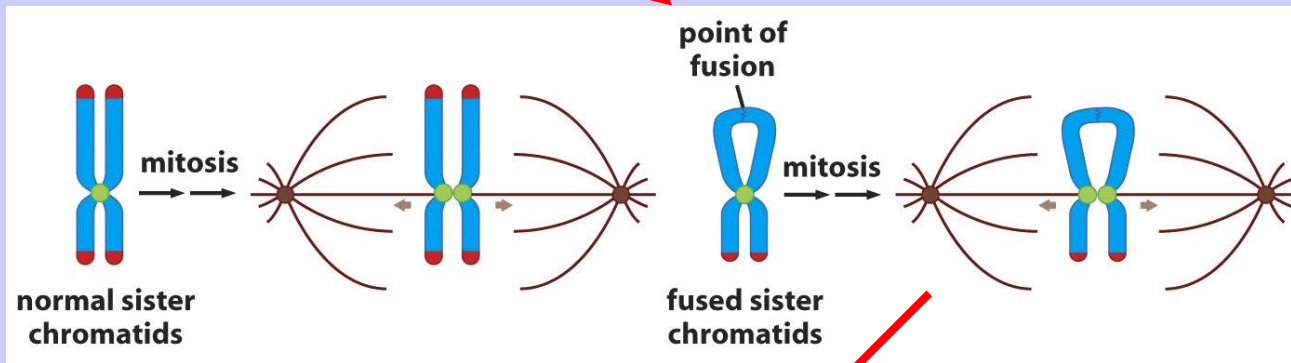
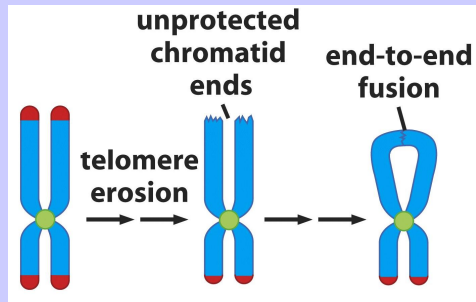
Důsledky kritického zkrácení telomer



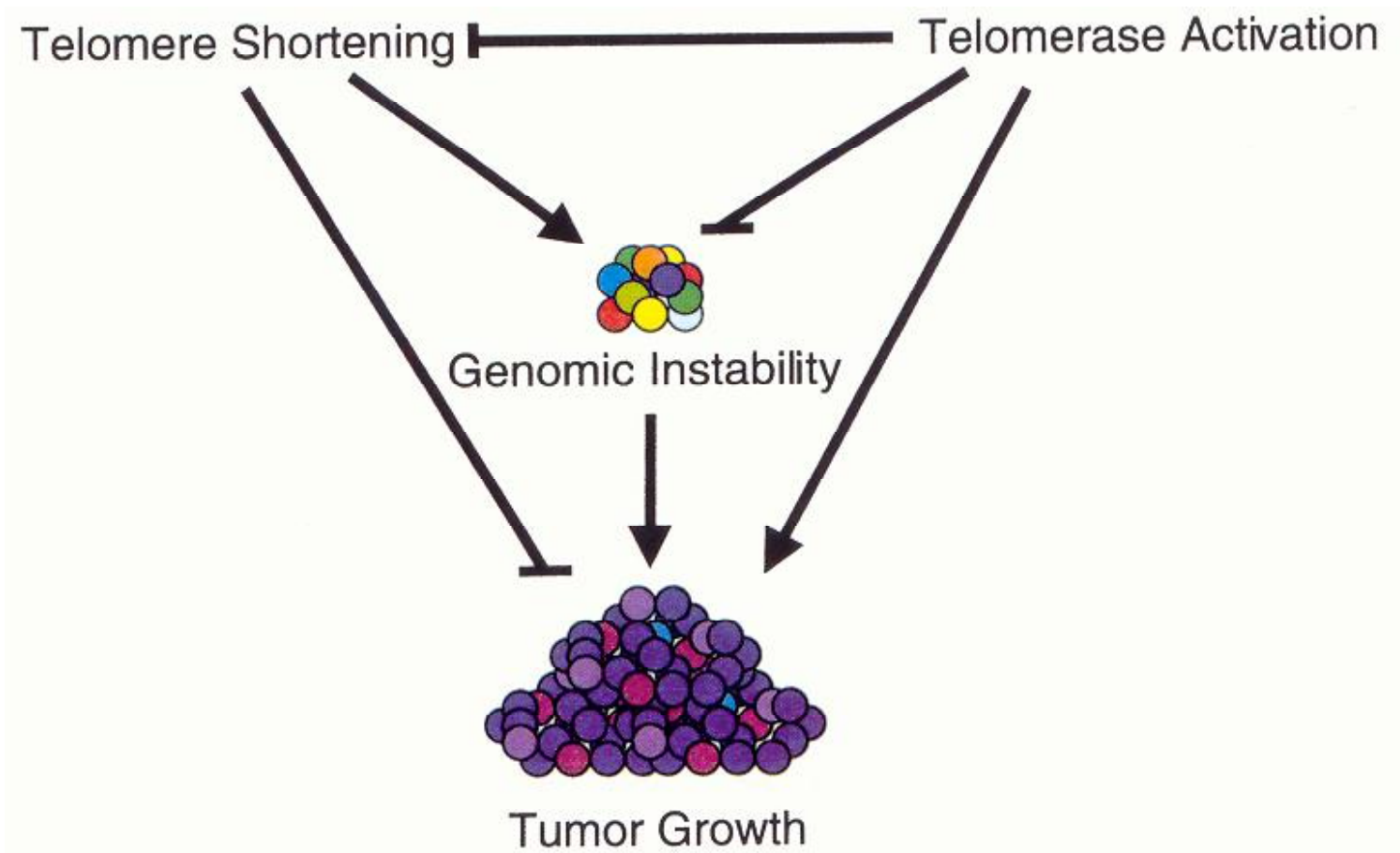
Zkracování telomer přispívá vzniku nádorů

- Zkracování telomer zvyšuje genetickou nestabilitu, a tím přispívá k tvorbě nádorů.
- Typickým projevem kriticky zkrácených telomer je vznik „end-to-end“ fúzí a tvorba multicentrických chromozomů, které se potom lámou během mitózy (Barbara McClintock, 1941!).

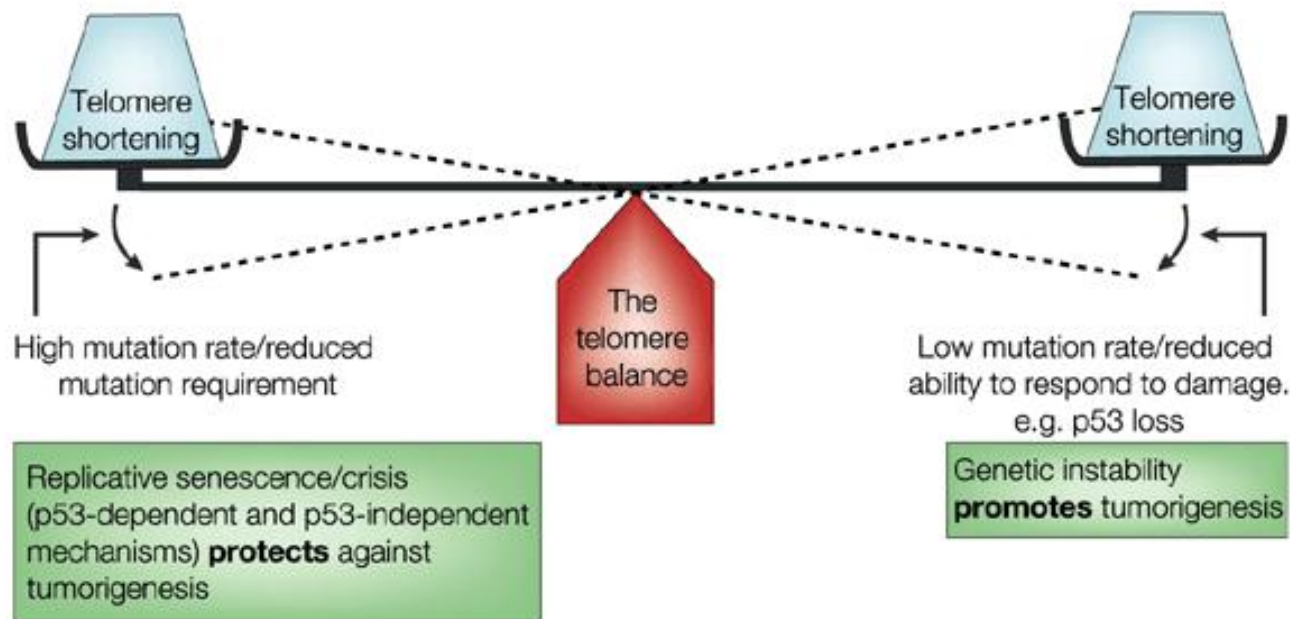




Dvojí role telomerázy a telomerové dysfunkce v genetické nestabilitě a růstu nádoru



Telomerová rovnováha



Nature Reviews | [Cancer](#)

Zdá se, že úloha zkracování telomer v kancerogenezi je nakonec vybalancována: podle genetického kontextu zkracování telomer buď přispívá nebo brzdí kancerogenezi.

Myší modely úlohy telomer v kancerogenezi

mTR-/-

- zvýšená frekvence spontánních nádorů (hlavně v proliferativních tkáních) ve srovnání s wt.

Cdkn2a-/- mTR-/-

- snížená frekvence mutageny indukovaných nádorů ve srovnání s mTR-/-

Apc^{Min}/mTR-/-

- zvýšená frekvence iniciace nádorů (mikroskopické adenomy)
- snížená frekvence a velikost makroskopických adenomů ve srovnání s Apc^{Min}

p53-/- mTR-/-

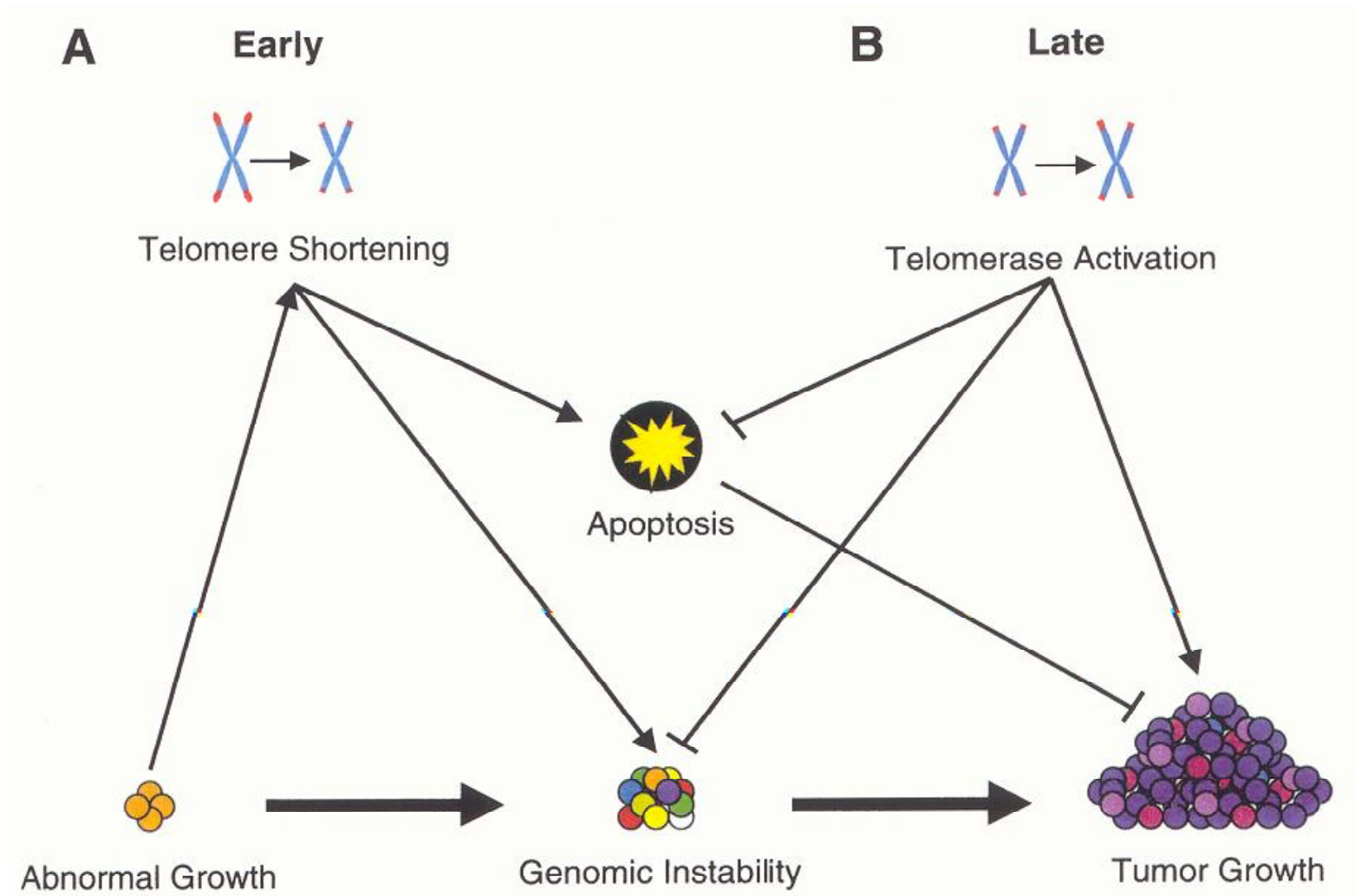
- zvýšená frekvence tvorby nádorů ve srovnání s p53-/- . Změna spektra nádorů - krátké telomery by mohly souviset s tvorbou epiteliálních nádorů (souvislost s výskytem nádorů u stárnoucích lidí).

Telomery a telomeráza v různých stádiích kancerogeneze

Buňky bez aktivní telomerázy:

- Zkracování telomer buď navodí genetickou nestabilitu nebo inhibuje růst nádoru senescencí* a/nebo apoptózou. Není zcela jasné, co rozhoduje, která z možností se uplatní.
 - Aktivace telomerázy může v další fázi omezit genetickou nestabilitu a umožnit růst nádoru.
 - Spojení buněk s aktivní telomerázou s pozdějšími agresivnějšími stadii může souviset se selekcí výrazně proliferujících buněk (klonální expanze).
- * Senescentní fibroblasty stimulují proliferaci neoplastických a preneoplastických buněk (růstové faktory, mezibuněčný kontakt)

Model úlohy telomer a telomerázy ve vývoji nádoru

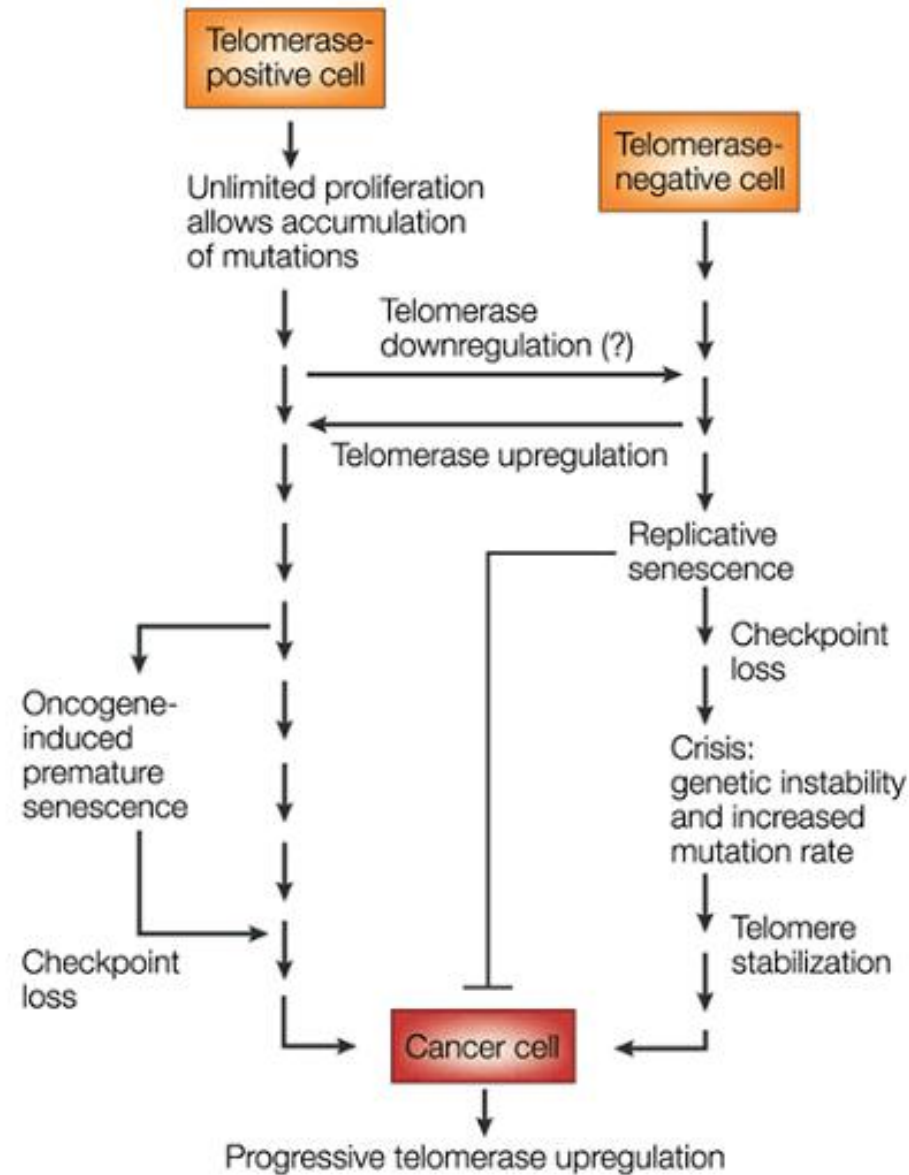


Telomery a telomeráza v různých stádiích kancerogeneze

Buňky s aktivní telomerázou:

- Vypnutí telomerázy může být jedním mechanismem, jak indukovat genetickou nestabilitu.
- Alternativní ochranou buňky proti kancerogenezi může být předčasná senescence nebo apoptóza navozená např. aktivovanými onkogeny.

Regulace telomerázy během kancerogeneze



Klinické využití poznatků o telomeráze

Asi 85 až 90% nádorů má aktivní telomerázu ⇒
klinické využití?

Aktivní telomerázou se buňky nádorové liší od většiny somatických buněk ⇒ využití v diagnostice:

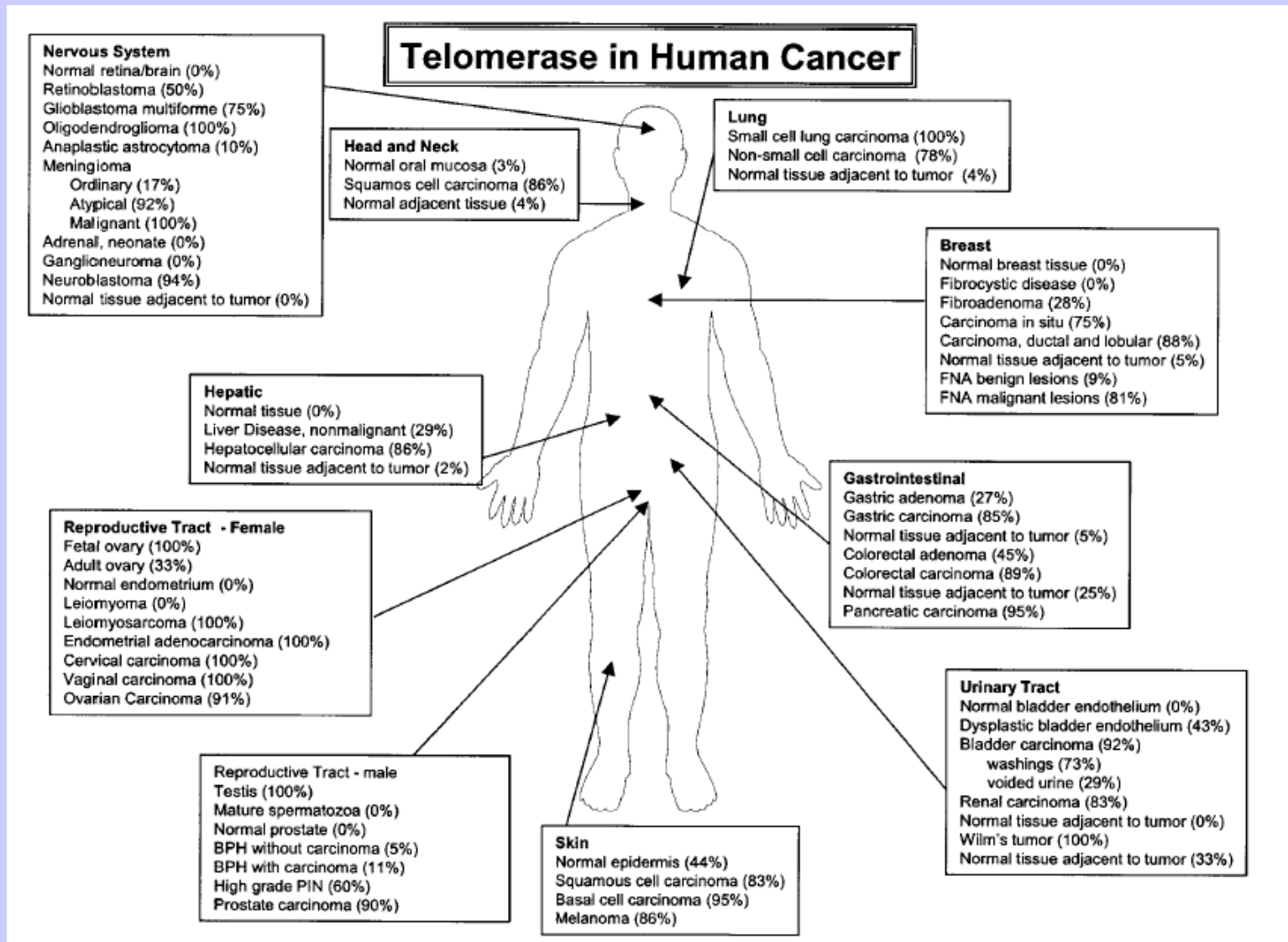
Inaktivace telomerázy může omezit růst nádorových buněk, zatímco většina „normálních“ buněk telomerázu nepotřebuje ⇒ využití pro terapii:

Využití telomer v diagnostice

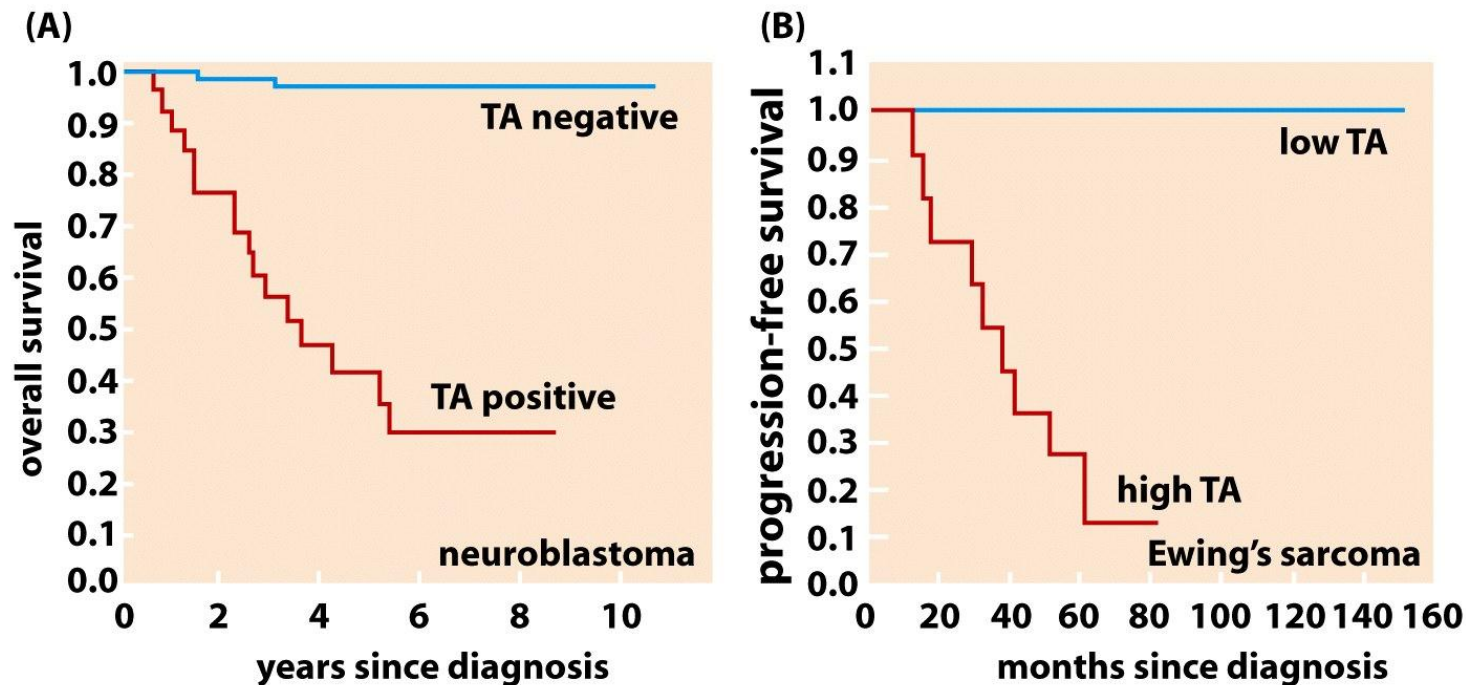
TRAP assay

- využívá PCR k amplifikaci produktů prodlužování telomerázou
- velmi citlivá: detekuje 0.01% pozitivních buněk
- tam kde tkáň/histologické prostředí nádoru přirozeně obsahuje aktivní telomerázu (střevní epitel) se za pozitivní považuje pouze hladina telomerázy vyšší než u odpovídající kontrolní tkáně

Využití telomer v diagnostice



Využití telomer v diagnostice



U některých dětských nádorů může aktivita telomerázy sloužit jako prognostický marker. Z Kaplan-Meierových křivek přežití vyplývá, že např. u **neuroblastomů** nebo **Ewingova sarkomu** je aktivní telomeráza výrazně negativním prognostickým faktorem.

Aktivní telomeráza a neuroblastomy

Neuroblastomy dětí (nádory periferních nervů) mají obecně velmi variabilní výhled vývoje: některé spontánně regredují, zatímco jiné jsou agresivní, metastázuující... fatální.

Špatná prognóza silně souvisí s amplifikací genu N-myc.

Špatná prgnóza silně souvisí s aktivní telomerázou.

Podle některých patologů jsou neuroblastomy u dětí velmi běžné, ale většina spontánně eroduje a zanikne (⇐ nemají aktivní telomerázu a tak buňky progredují do senescence/krize a spontánně zaniknou).

Telomeráza jako terapeutický cíl

- inhibice telomerázy v kultivovaných nádorových buňkách indukuje krizi a apoptózu \Rightarrow inhibitory telomerázy jsou potenciálně účinné protinádorové látky
 - ? kmenové a další buňky s fyziologicky aktivní telomerázou ?
 - mají delší telomery než nádorové buňky
 - dělí se pomaleji než nádorové buňky, tj. zkracují se jim telomery pomaleji než nádorovým buňkám
- \Rightarrow dostatečné terapeutické okno

Telomeráza jako terapeutický cíl

- např. antisense oligonukleotidy komplementární k hTR (stabilizované /proti působení nukleáz/ chemickými modifikacemi např. 2'-O-methyl RNA)
- přenosem dominantně negativního genu hTERT
- použitím inhibitorů reverzní transkriptázy, např. AZT (používaných při léčbě HIV)

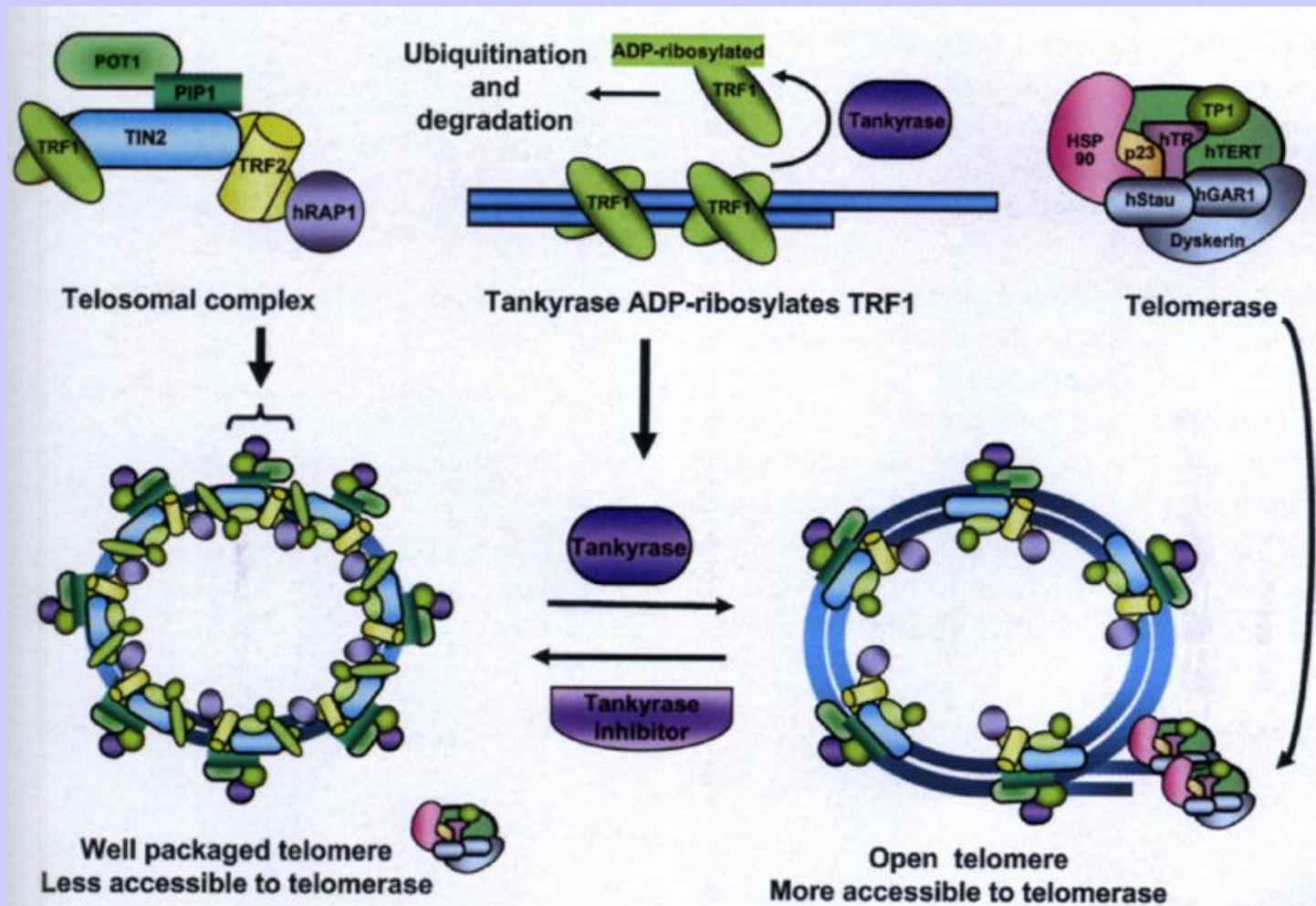
Telomeráza jako terapeutický cíl

- Vedle množství aktivní telomerázy ještě mnoho dalších faktorů rozhoduje o efektivitě, s jakou je telomeráza přiváděna k telomerám

Tankyráza

- může ADP-ribozylovat TRF1 - TRF1 je po ADP-ribozylaci rychle ubikvitinován a degradován
- ⇒ vytváří se otevřenější konfigurace proteinového komplexu na telomeře a zpřístupňuje se G-přesah pro telomerázu

Tankyráza a přístup telomerázy k telomerám



Vsuvka: Tankyráza jako cíl terapie

- overexprese tankyrázy vede k prodlužování telomer u buněk exprimujících aktivní telomerázu
 - i výrazně snížená aktivita telomerázy (o 80%) může zajistit stabilizaci telomer (nejkratší telomera má nejvyšší afinitu pro telomerázu - pravděpodobně kvůli snížené schopnosti vázat multiproteinový komplex)
- ⇒ kombinace inhibitorů telomerázy a tankyrázy je velmi účinná a umožňuje vyhnout se toxickým dávkám pouze jednoho nebo druhého inhibitoru

Alternativní způsob prodlužování telomer

Aktivní telomeráza detekována "jen" u 85-90% nádorových buněk - co těch zbylých 10 až 15%?

ALT - „Alternative Telomere Lengthening“ - založen na rekombinaci DNA

- ALT je spojen s velice heterogenní délkou telomer.
- Mechanismy ALT a telomeráza koexistují v buňce vedle sebe, ale aktivní telomeráza (exprese telomerázy) reprimuje mechanismy ALT (nezdá se ale, že by tím represorem byla přímo telomeráza).
- poprvé popsán u kvasinek

Alternativní způsob prodlužování telomer u kvasinek

Popsány dva typy prodlužování telomer:

- **I.** Rekombinací subtelomerických **Y'** elementů, kdy **G-konec** zůstává krátký. Spojeno s požadavkem na funkční **RAD51**. To vede k tvorbě velice dlouhých telomer, které mohou být příčinou růstové nevýhody takových buněk. → Mohou konvertovat na typ II.
- **II.** Rekombinací **G-bohatých konců** telomer. Spojeno s požadavkem na funkční **RAD50**.

⇒ Telomery v nepřítomnosti telomerázy mohou být substrátem pro různé typy rekombinací.

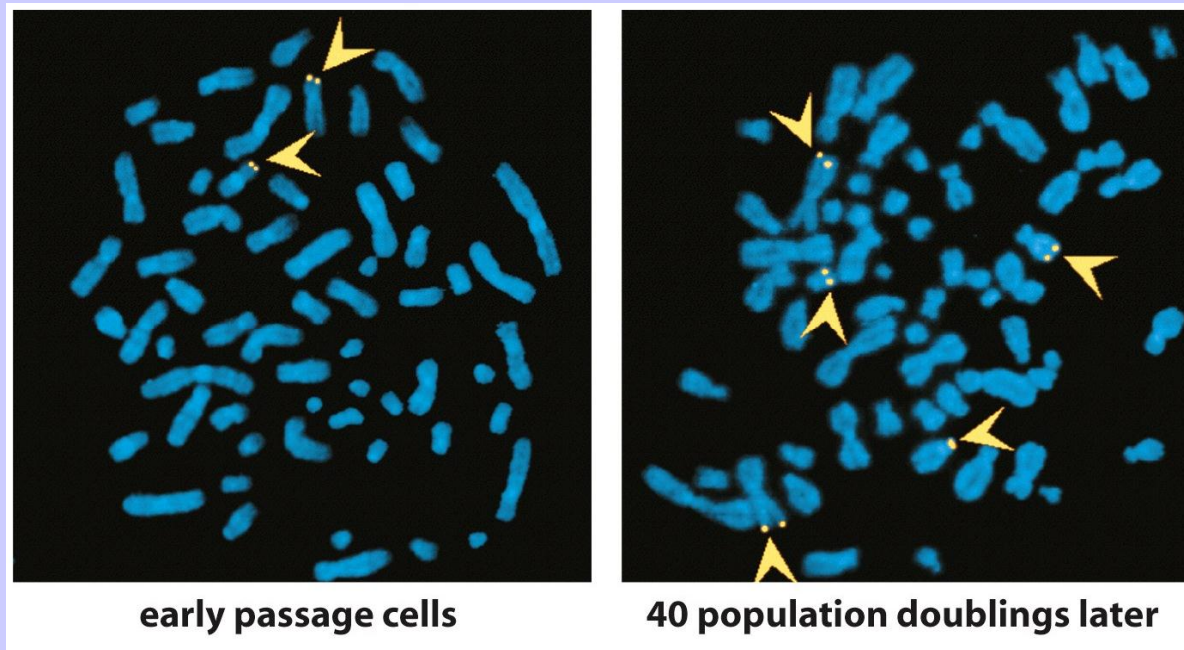
Modely ALT

Navrženy 4 modely udržování délky telomer rekombinací:

- Replikace indukovaná zlomy (BIR)
- Integrace extrachromozomální DNA
- Replikace otáčivou kružnicí
- Elongace t-smyčky

Genetické změny, které potencují rekombinaci (např. defekty v MMR), potencují také prodlužování délky telomer mechanismy ALT.

Prodlužování telomer rekombinací



Důkaz o rekombinaci jako mechanismu ALT: do jedné telomery jednoho chromozomu byla vložena specifická značka detekovatelná fluorescenční sondou. Po opakovaných děleních byla značka detekována v pěti různých chromozomech.

Telomery a stárnutí

Hutchison-Gilford progeria

- zrychlené stárnutí již od 2 let; kratší postava, abnormální držení těla, typický fenotyp stárnutí: holohlavost, ztuhlost kloubů, atrofická a vrásčitá kůže, ateroskleróza, stav cév - angina pectoris, infarkt myokardu...
- fibroblasty těchto pacientů mají kratší telomery než fibroblasty kontrol, vstupují do fáze senescence rychleji; po transfekci genu hTERT se stávají nesmrtelnými

Wernerův syndrom

- předčasné stárnutí včetně vaskulárních nemocí, diabetes mellitus, katarakta (šedý oční zákal), atrofie kůže, šedivé vlasy, nádory, průměrná délka života 47 let

Trisomie 21 - Downův syndrom

- zrychlené stárnutí
- délka telomer lymfocytů se zkracuje 3x rychleji než u zdravých jedinců

Telomery a stárnutí

Délku telomer (a možnost předčasného úmrtí) negativně ovlivňuje:

- kouření
- obezita
- dlouhodobý stres
- socioekonomický status

Krátké telomery disponují k:

- demenci
- poškození kognitivních schopností

Telomery a stárnutí

Syndromy charakteristické mutacemi v telomerových genech a v důsledku toho zrychleným zkracováním telomer:

- **Dyskeratosis congenita.** Mutace buď přímo v *TERT* nebo *TERC* (→ telomeráza), nebo v *DKC1* (→ interagující protein související se stabilitou telomerázy): malá postava, hypogonadismus, infertilita, defekty kůže a hematopoietického systému, selhání kostní dřeně, předčasná smrt, zvýšená genetická nestabilita, zvýšená incidence nádorů; anticipace onemocnění
- **Aplastická anemie.** Mutace *TERC* a *TERT*: předčasná smrt
- **Idiopatická pulmonární fibrosa:** respirační selhávání

KONEC

