

# Molekulární a buněčná biologie nádorů

**Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.**

Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta  
MU Brno

**Bi9910**

středa 14.00 – 16.00

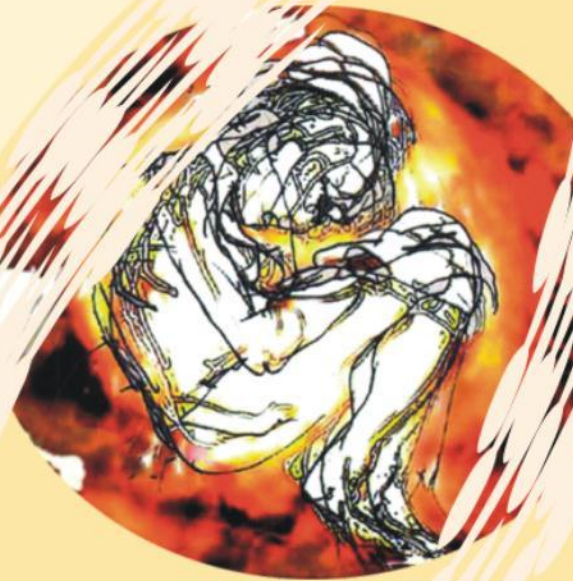
A11 – č. 306

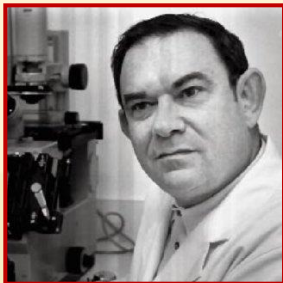


**2020**

# Molekulární a buněčná biologie nádorů

8. Telomery,  
telomeráza, buněčná  
senescence a nádory





# Stárnutí buněk



- Normální diploidní buňky se nemohou v kultuře dělit donekonečna. Mají naprogramovaný (tzn. vnitřními faktory určený) **konečný počet buněčných dělení**, kterými mohou projít (Leonard Hayflick, 1961). Pro lidské diploidní fibroblasty (HDF) je to asi **50-60 cyklů**.
- Po dosažení tohoto počtu dělení se u buněk vyvine **senescentní** fenotyp (**M1** – „mortality stage 1“): buňky změní morfologii, jsou nadále metabolicky aktivní, ale nedělí se. Blok buněčného cyklu je udržován signalizací přes proteiny **p53/p21** a **p16/RB**.
- Jsou-li vyřazeny tyto dráhy, buňky se dále (**20 až 30x**) dělí, až dosáhnou **krize** (**M2** – „mortality stage 2“). I potom se mohou dělit, ale díky velkým chromozomálním aberacím vstupují často do apoptózy.
- Vzácně (s pravděpodobností asi  $10^{-6}$ ) mohou buňky uniknout krizi a stát se **nesmrtelnými**.

# „Telomerová hypotéza“



**Telomery** jsou repetitivní sekvence **DNA** na koncích lineárních chromozomů, na které se váží **proteinové komplexy**. Jejich hlavní funkcí je ochrana konců lineárních chromozomů.

telos = konec (end)

meros = část (part)

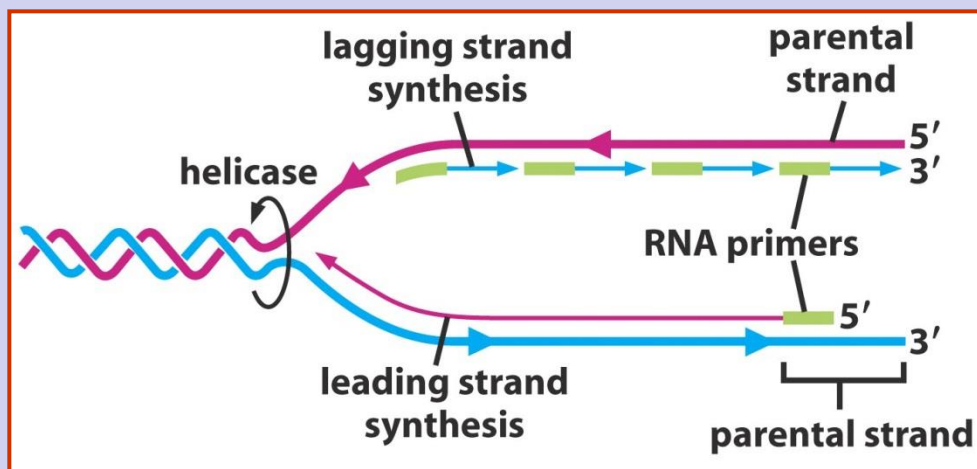
**Telomeráza** je ribonukleoproteinový enzym, který je nutný pro kompletní replikaci konců DNA, tj. pro udržování stabilní délky telomer.

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

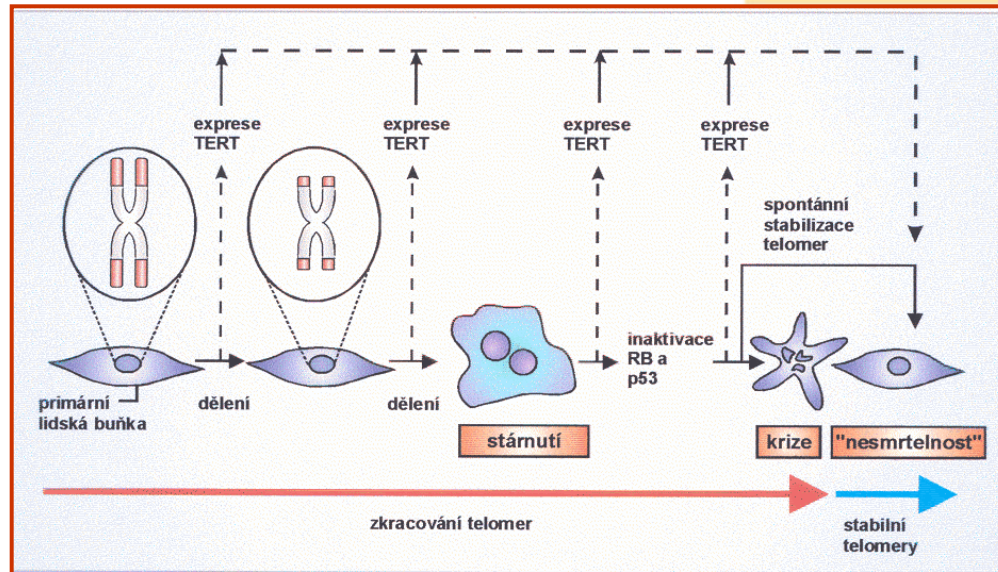


# Problém neúplné replikace chromozomů

- 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 dceřiného vlákna zůstává nedosyntetizovaná část vlákna ⇒ zkrácení při každé replikaci



# Délka telomer určuje replikativní potenciál buněk



## Telomerová hypotéza

Zkracování telomer funguje jako mitotické počítadlo, které určuje proliferativní kapacitu všech buněčných typů, které nemají telomerázovou aktivitu.

# Elizabeth Helen Blackburn

## Nobelova cena 2009

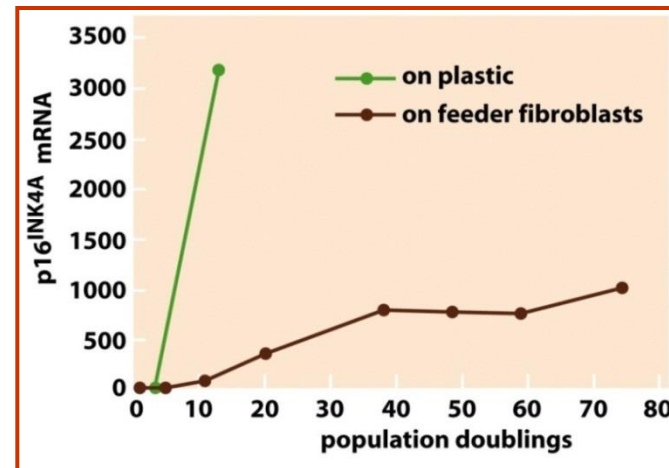
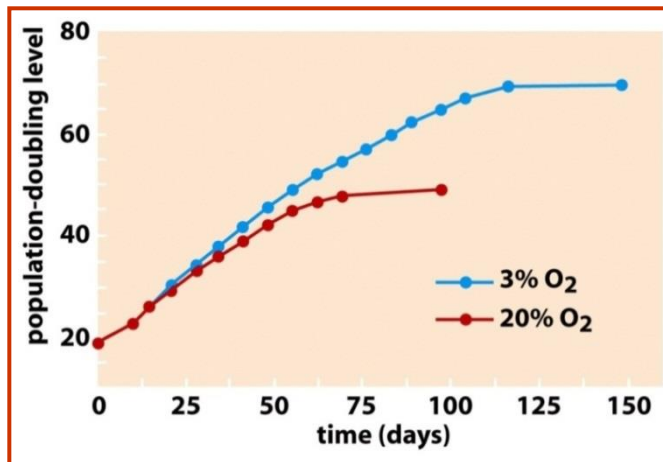
- narodila se (26.11.1948) v Austrálii, studovala v Melbourne a v Cambridge
- v současnosti je prezidentkou Salk Institute, La Jolla, Ca, USA
- studuje telomery, je spoluobjevitelkou telomerázy (1985) – za tento objev získala Nobelovu cenu za lékařství a fyziologii 2009 společně s **Jackem Szostakem** a svou bývalou studentkou **Carol Greiderovou**



# 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 buněčné senescence: co ji indukuje



## ➤ **replikativní senescence**

- krátké telomery

## ➤ **„předčasná“ senescence**

- aktivace (i inaktivace) některých onkogenů (*oncogene-induced senescence* - OIS) (např. K-Ras, B-Raf, MYC)
- inaktivace (i up-regulace) některých nádorových supresorů (např. PTEN, TSC2, NF1, VHL)
- cytokiny
- reaktivní kyslíkové radikály
- poškozená DNA (genotoxický stres)
- nedostatek nukleotidů
- metabolický šok
- ... kulturační šok

# Co indukuje buněčnou senescenci



## ➤ **replikativní senescence**

- krátké telomery

## ➤ **„předčasná“ senescence**

- onkogenní stres (OIS), cytokiny, reaktivní kyslíkové radikály, genotoxický stres, metabolický šok, ...

## ➤ **fyziologická senescence**

- embryogeneze
- remodelace tkání
- hojení ran

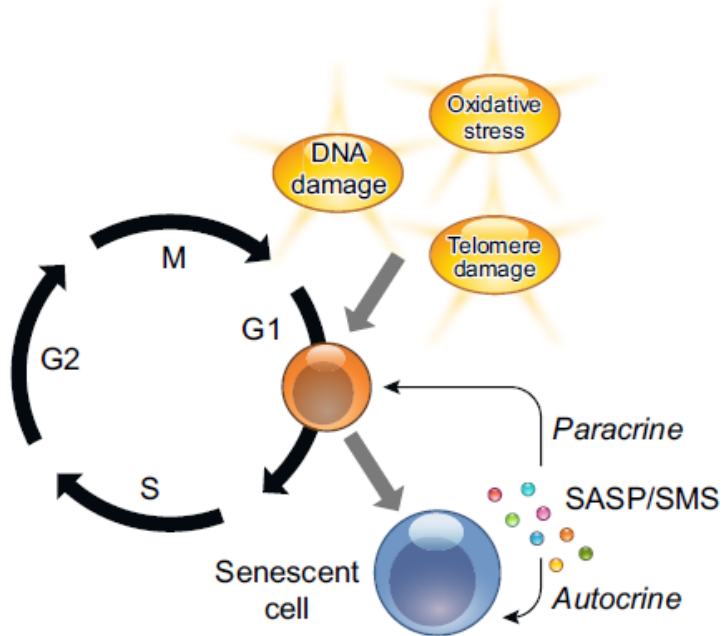
## ➤ **terapií indukovaná senescence (TIS)**

# Buněčná senescence



- **ireverzibilní, nevratná ztráta možnosti buněčného dělení**
- senescentní buňky se ale liší od jiných nedělících se buněk, například quiescentních nebo terminálně diferencovaných, mají své specifické znaky :
- exprimují proteiny, které navozují senescentní fenotyp a blokují buněčné dělení (**p16**)
- produkují a secernují látky, které stimulují zánětlivou reakci; intenzita a sestava těchto faktorů je pro senescentní buňky tak charakteristická, že se označuje jako **SASP - sekreční fenotyp spojený se senescencí** („*senescence-associated secretory phenotype*“)

# Buněčná senescence



↑  $\beta$ -gal activity

↑ p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP1</sup>, p27

↑ p19<sup>ARF</sup>, p53, PAI-1

↓ LaminB1

↑ NF- $\kappa$ B signaling

- buněčná senescence může být indukovaná oxidativním stresem, poškozením DNA nebo telomer
- senescentní buňky mají permanentní blok buněčného dělení, zvýšenou expresi inhibitorů buněčného cyklu a změněné buněčné struktury a expresi proteinů
- senescence může být autokrinně posilována a může se parakrinně šířit na sousední buňky prostřednictvím SASP a SMS (*senescence-messaging secretome*)



# Úkoly buněčné senescence - SASP



## SASP:

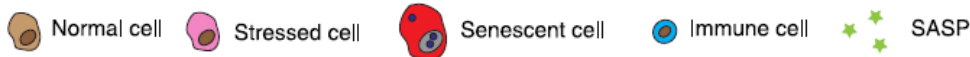
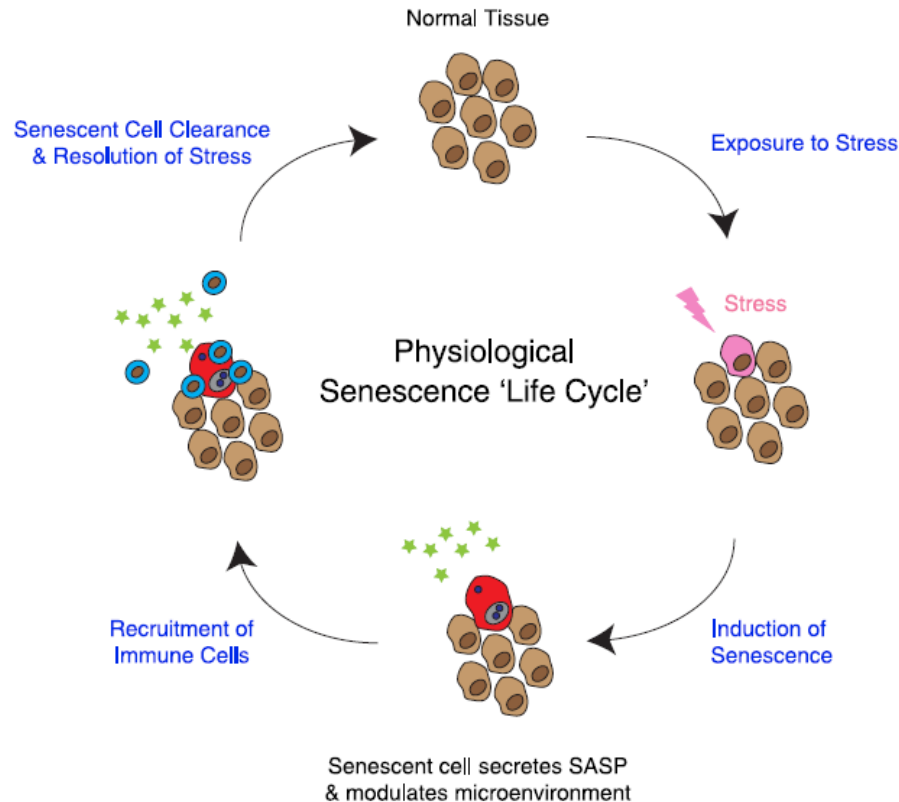
- stimulace imunitního systému (→ odklízení)
- udržování integrity tkání (např. přepnutí fibronektického do fibrolytického režimu (ochrana proti fibróze)
- bariéra proti vzniku iPSC
- pomáhá udržovat SC niche
  
- stimulace vývoje nádorů!! SASP stimuluje:
  - vaskularizaci
  - EMT
  - invazivitu
  - buněčnou plasticitu

# Senescence a stárnutí organismu



- Účelem senescence je předejít množení poškozených buněk a indukovat jejich odstranění imunitním systémem. Senescence je tak užitečnou kompenzační odpovědí, která pomáhá tkáním zbavit se poškozených a potenciálně onkogenních buněk. Tento kontrolní mechanismus ale vyžaduje efektivní nahrazování buněk, které je podmíněno odstraněním senescentních buněk a mobilizací progenitorů, které zajistí znovunastavení počtu buněk.
- To zajištěno završením celé sekvence událostí: „**senescence-odklizení-regenerace**“.

# „Životní cyklus“ senescence



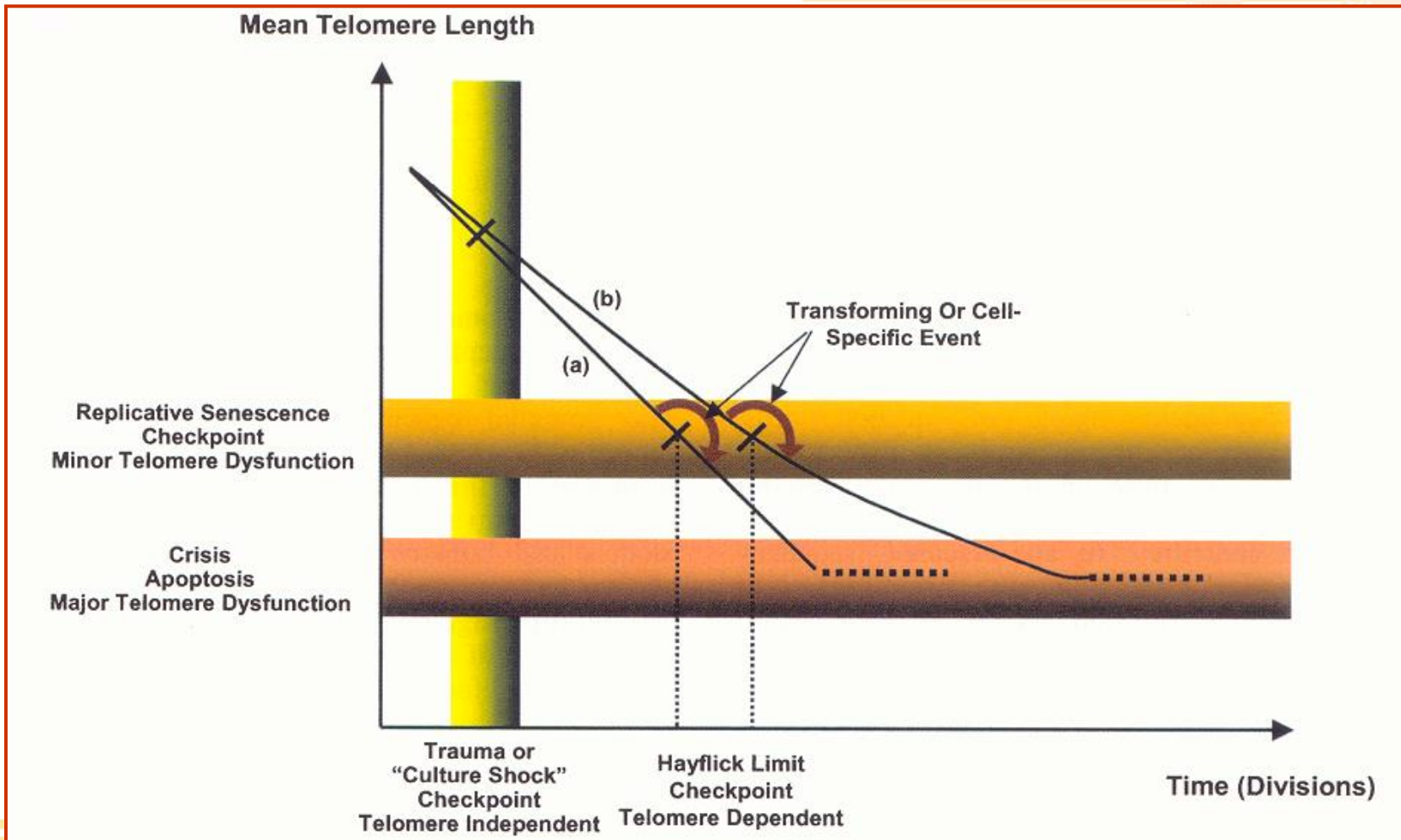
# Senescence a stárnutí organismu



- S přibývajícím věkem roste pravděpodobnost, že řetězec „senescence-odklizení-regenerace“ nebude efektivně dokončen a bude docházet k akumulaci senescentních buněk. Ty pak mohou zhoršovat poškození a tím přispívat ke stárnutí organismu namísto toho, aby pomáhaly stárnutí předcházet (← SASP).
- *Proč přírodní selekce, která optimalizuje přežívání a reprodukční úspěch, umožnila přenos senescence na potomky??*
- Jako výsledek této duality je senescence považována za příklad tzv. **antagonistické pleiotropie**.
- Podle hypotézy antagonistické pleiotropie **mohou geny nebo procesy, které se vyvinuly, protože podporují zdraví nebo zdatnost mladého organismu, mít zhoubný efekt u staršího organismu, a tak přispívat ke stárnutí**. Někdy se senescence označuje jako **antagonistický znak stárnutí**.



# Telomerová hypotéza: smrtelné (somatické) buňky

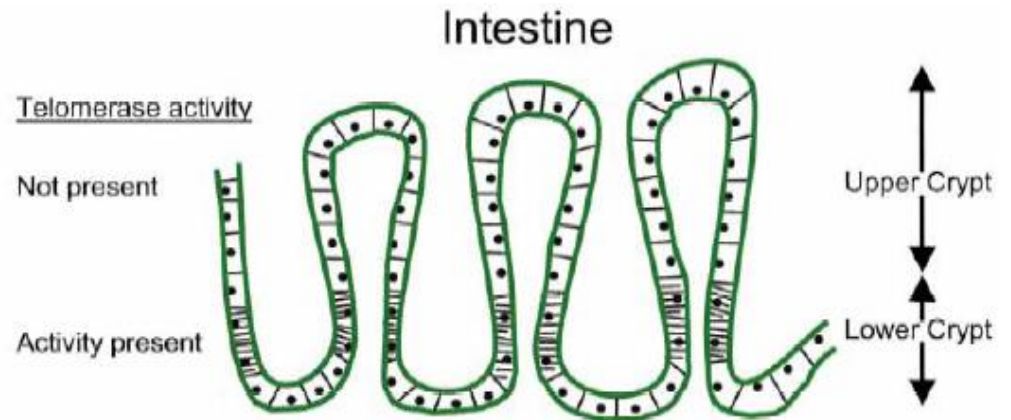
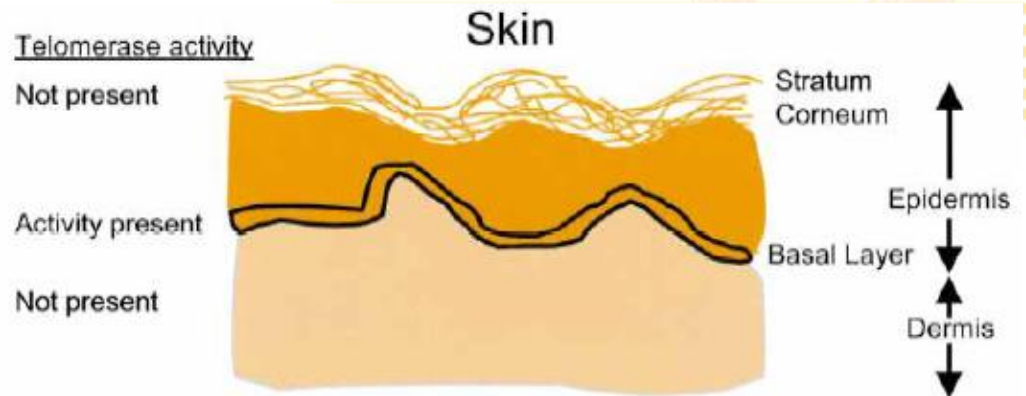
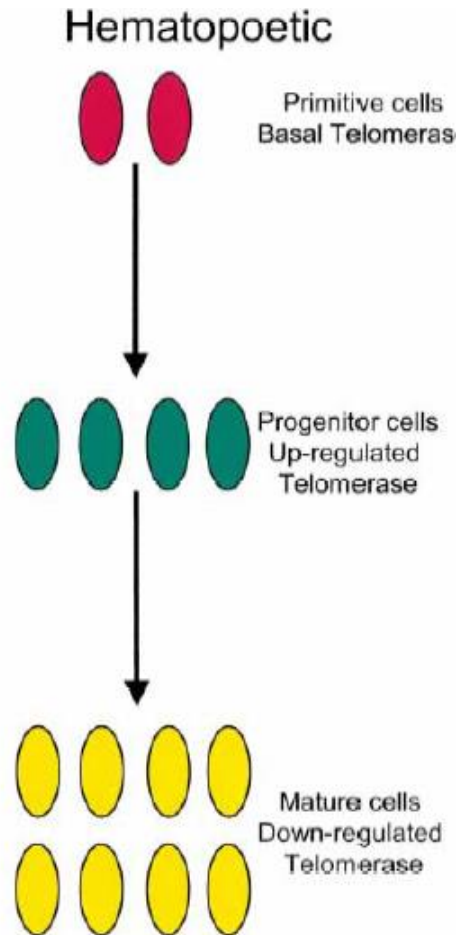


# Buňky s aktivní telomerázou

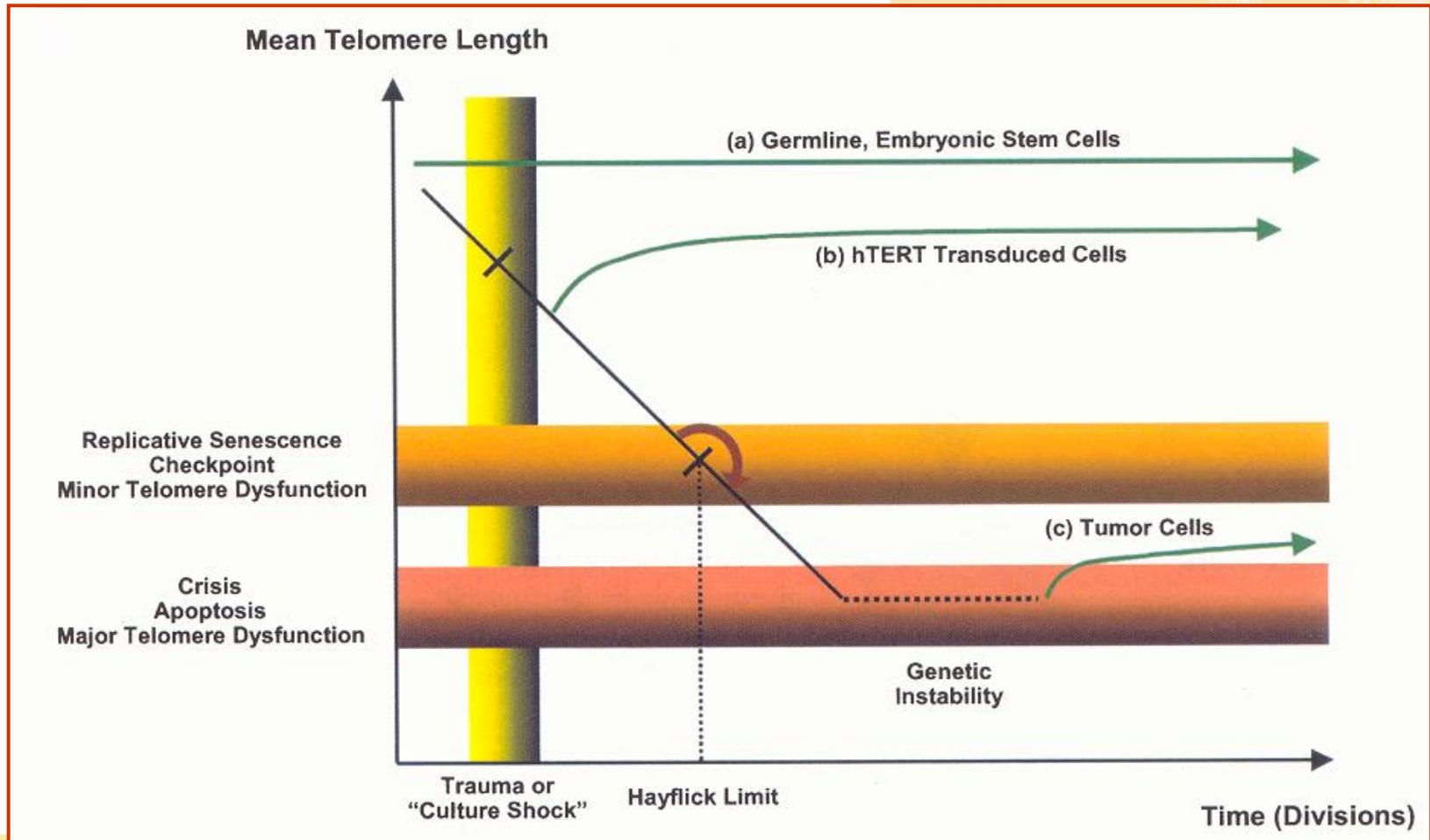


- **zárodečné** buňky
- **kmenové** buňky
- některé **somatické** buňky za určitých fyziologických podmínek:
  - buňky endometria ve vztahu k proliferaci během menstruačního cyklu
  - mitogenně stimulované lymfocyty
  - buňky v proliferativní zóně střevních krypt
  - buňky proliferativní bazální vrstvy 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)<sub>n</sub>** (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-přesah“): konec telomery musí tvořit správnou strukturu tak, aby nebyl zaměněn za dvouřetězcové zlomy DNA!!

# Struktura konce telomery



**non-telomeric  
DNA of  
chromosome  
(many megabase  
pairs long)**

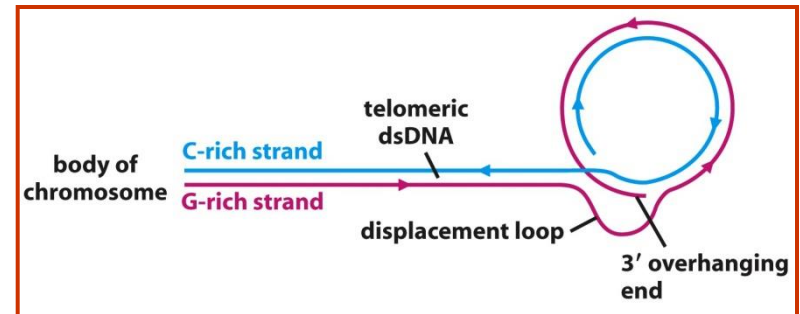
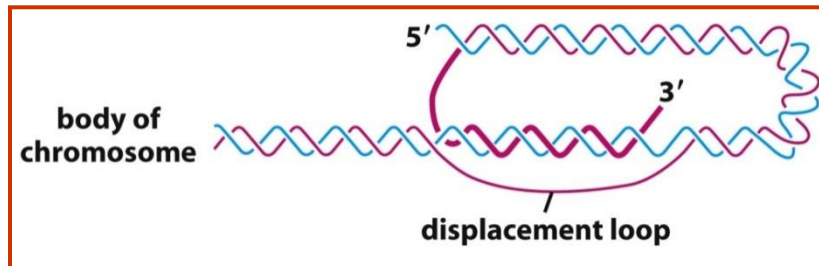
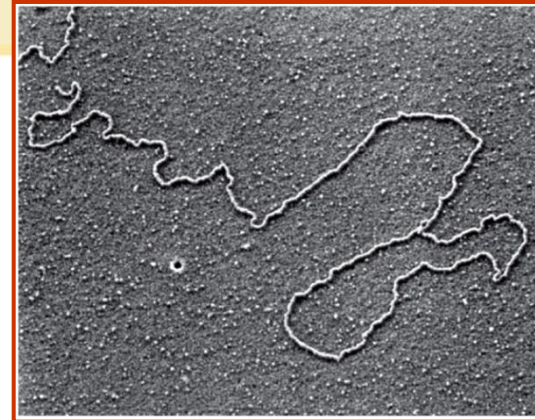
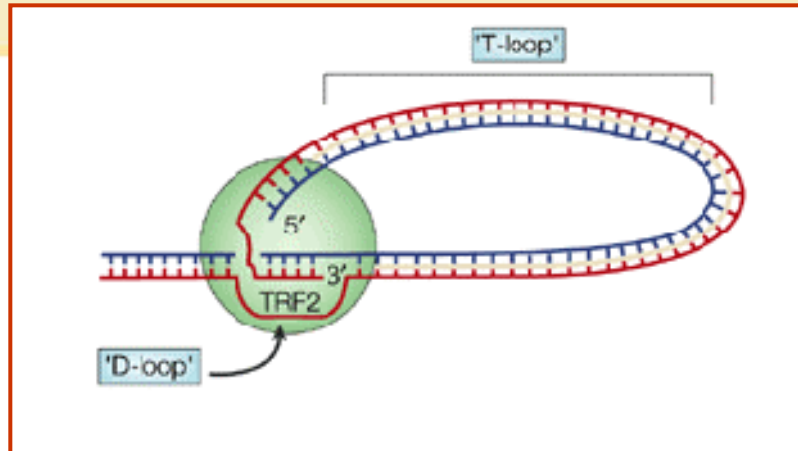
**double-stranded  
region of  
telomeric DNA  
(5–10 kbp long)**

**single-stranded  
3' overhang of  
G-rich strand of  
telomeric DNA  
(several hundred  
bases long)**

## 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 to tvoří **D-smyčku**; dvouřetězcová část konce telomery tvoří strukturu **T-smyčky**; struktura je stabilizována vazbou specifických proteinů

# Struktura konce telomery



## 3' přesah:

- po „zanoření“ do dvouvláknové struktury nevyvolává odpověď/signál jako jednořetězcový zlom DNA

## Proteinový komplex

- tzv. **shelterin** (**telosom**); 6 proteinů: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1, Pot1
- váže se v mnoha kopiích (100 – 1000) na telomerové „repeaty“
- funkce: ochrana chromozomů a regulace délky telomer

## Nukleosomy

- s modifikacemi histonů typickými pro heterochromatin



# Proteiny shelterinu



## 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 represeur 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)

# Proteiny shelterinu



## Pot1

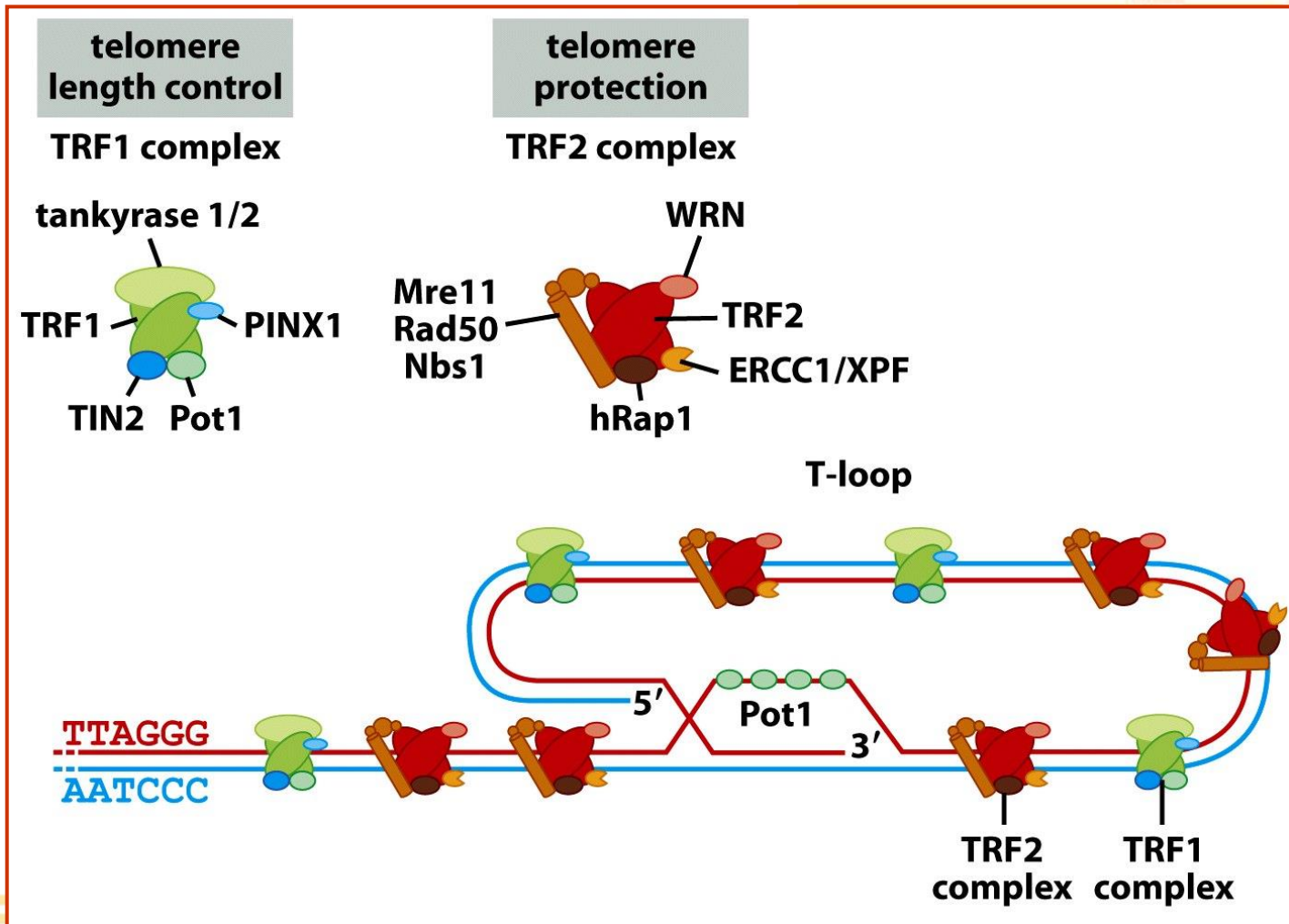
- („protection of telomeres“) se váže na G-přesah (ssDNA) a tím chrání konce telomer; chrání telomery před ATM- a ATR-dependentní reakcí na poškození DNA

## 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 buněčného cyklu

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

# 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 k aktivaci 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**

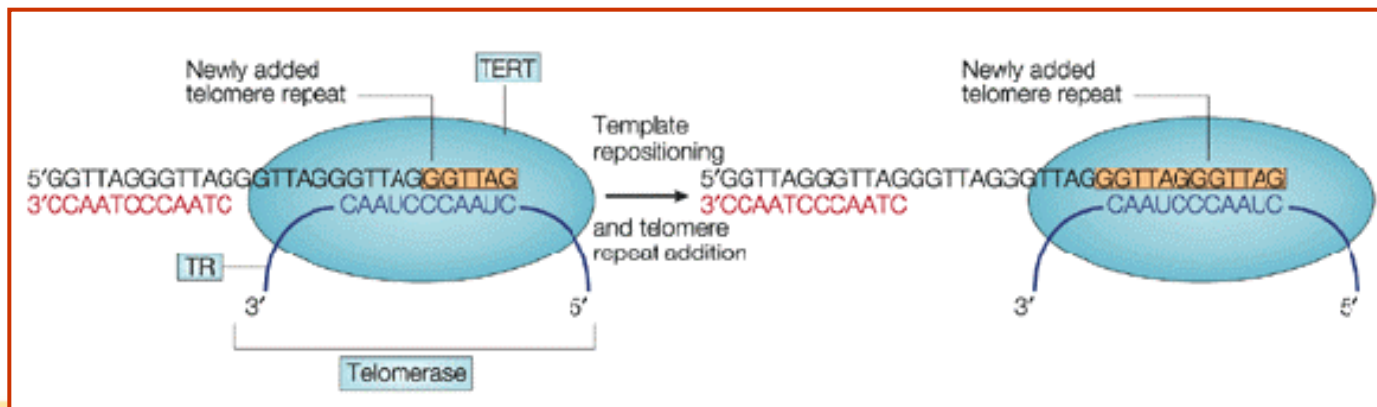
# Telomeráza: podjednotka hTR



- 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-Y** (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.

# Telomeráza: podjednotka hTERT

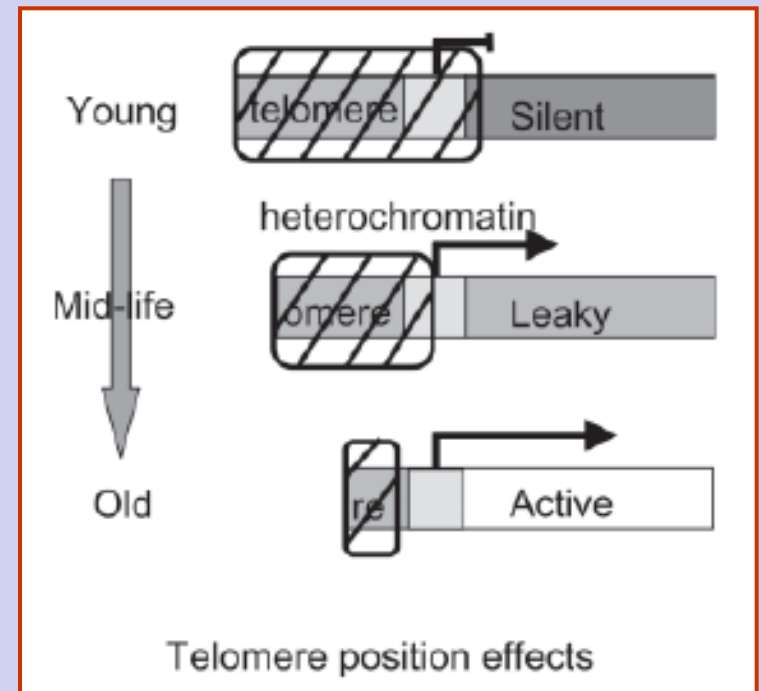


**hTERT**: katalytická podjednotka s aktivitou reverzní transkriptázy

- 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- $\alpha$**  (přes downregulaci c-Myc) a **p53** (inhibuje vyvázáním faktoru Sp1)
- holoenzym telomeráza potřebuje ke správnému sbalení *in vivo* chaperony: **p23**, **hsp90**

# \* Model „telomere position effect“

- gen pro hTERT lokalizován v pozici 5p15.33 – jeden z nejdálčejší lokalizovaných genů na chromozomu 5 (pouze několik set kb od telomer) - proto otázka, zda exprese hTERT není regulována mechanismem „telomere position effect“ (**TPE**)
- jak buňky stárnou a telomery se zkracují, může docházet k de-represi genů v blízkosti telomer nebo naopak k reaktivaci původně utlumených genů

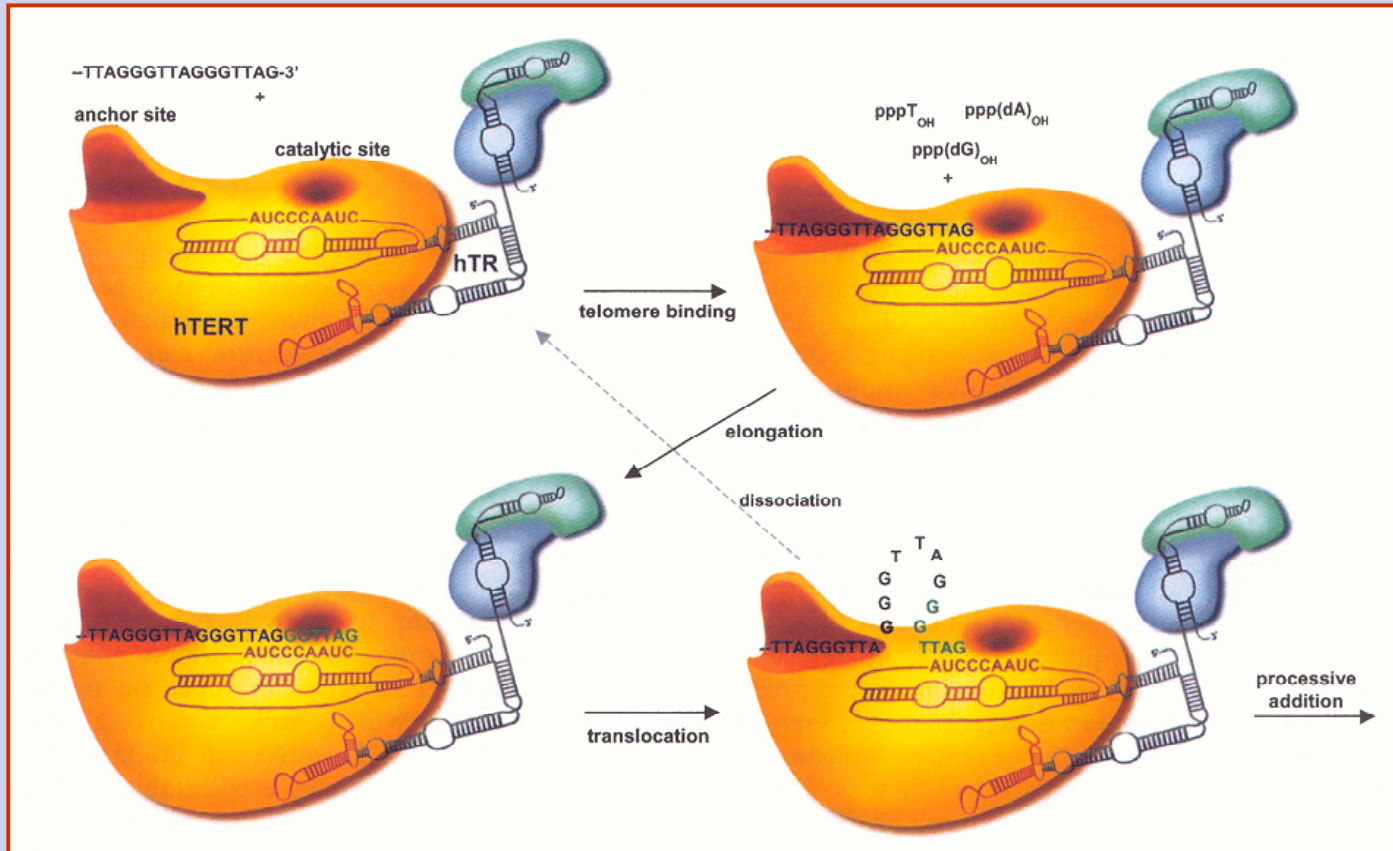


# „Telomere position effect“ (TPE)



- vliv (silent) konformace telomerového chromatinu na expresi genů lokalizovaných v těsné blízkosti telomer (okolo **1 Mb**)
- **Telomere position effect over long distances (TPE-OLD)** - vliv konformace telomerového chromatinu na expresi genů lokalizovaných až ve vzdálenosti **10 Mb**
- možná i regulace transkripce v závislosti na délce telomer některých genů **po celém genomu**

# Mechanismus fungování telomerázy



vazba telomery → elongace → translokace → → disociace

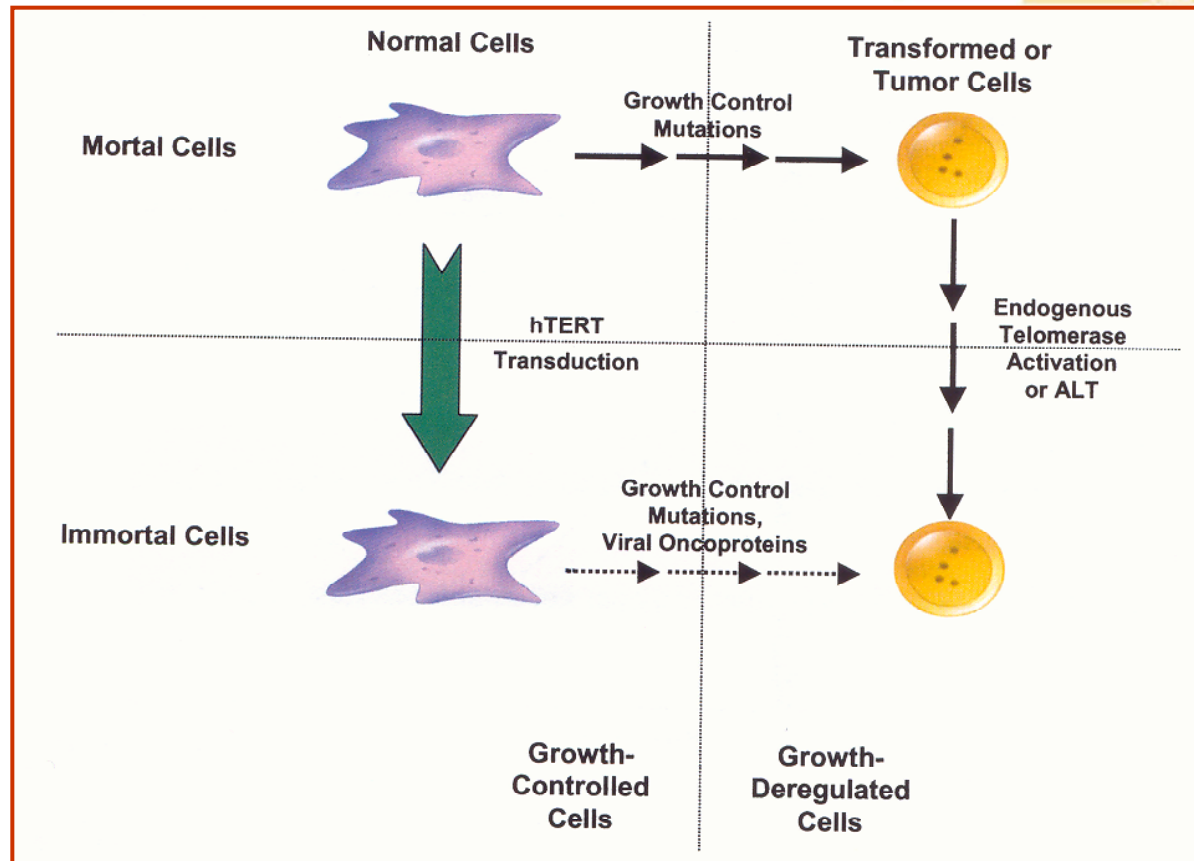


# Nádory, telomery a aktivní telomeráza



- **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



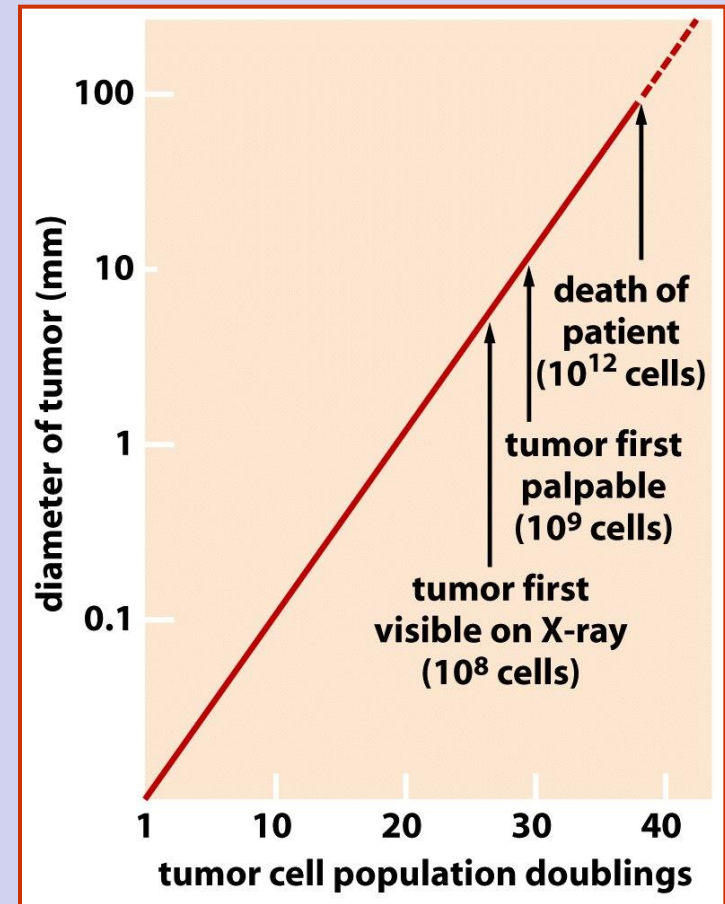
# Zkracování telomer brání vzniku nádorů



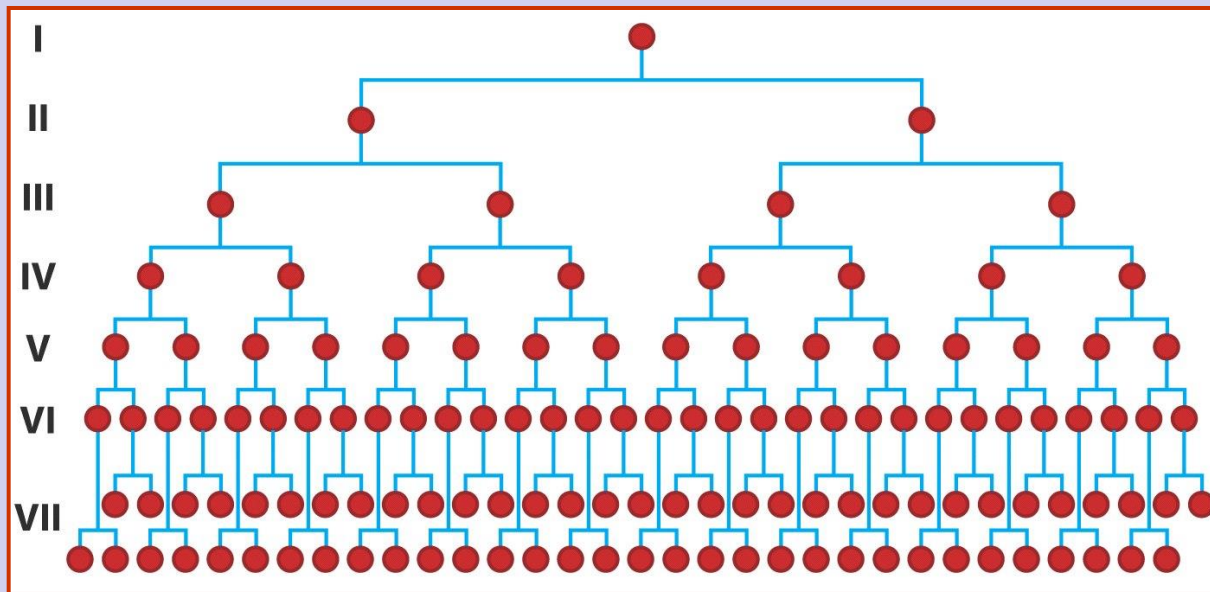
- Zkracování telomer v buňkách bez aktivní telomerázy suprimuje tvorbu nádorů tím, že limituje, kolikrát se buňka může rozdělit; omezením replikační kapacity snižuje šanci na „úspěšnou, dokonanou kancerogenezi“.  
Je těžké určit, kolikrát se buňka musí být schopná rozdělit, aby měla dostatečnou kapacitu 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<sup>Min</sup>* - pouze adenomy).

# Brání zkracování telomer vzniku nádorů?

1. nádory jsou klonální, vznikají z jediné buňky
  2. 1 cm<sup>3</sup> tkáně obsahuje asi 10<sup>9</sup> buněk
  3. průměrný život ohrožující nádor je velký asi 10 cm<sup>3</sup>, tj. asi 10<sup>12</sup> 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?

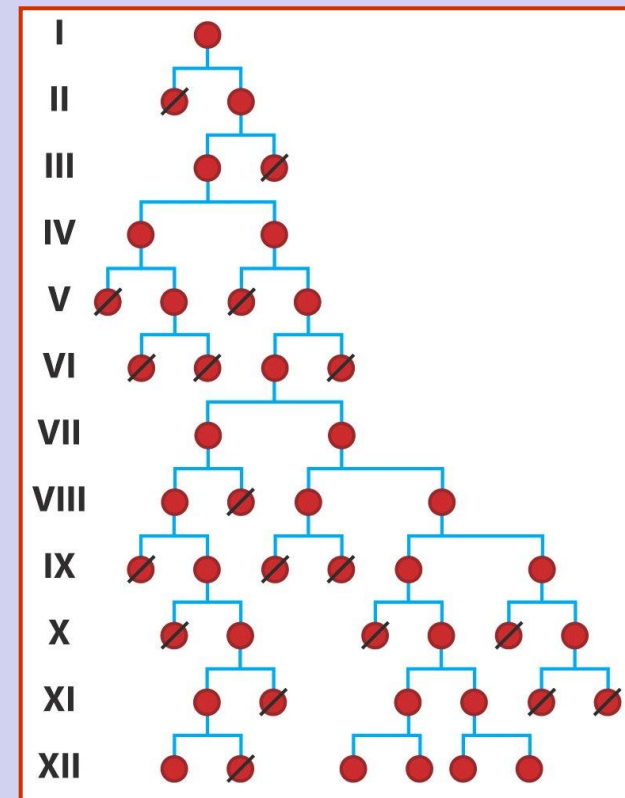


realita vypadá takto →

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

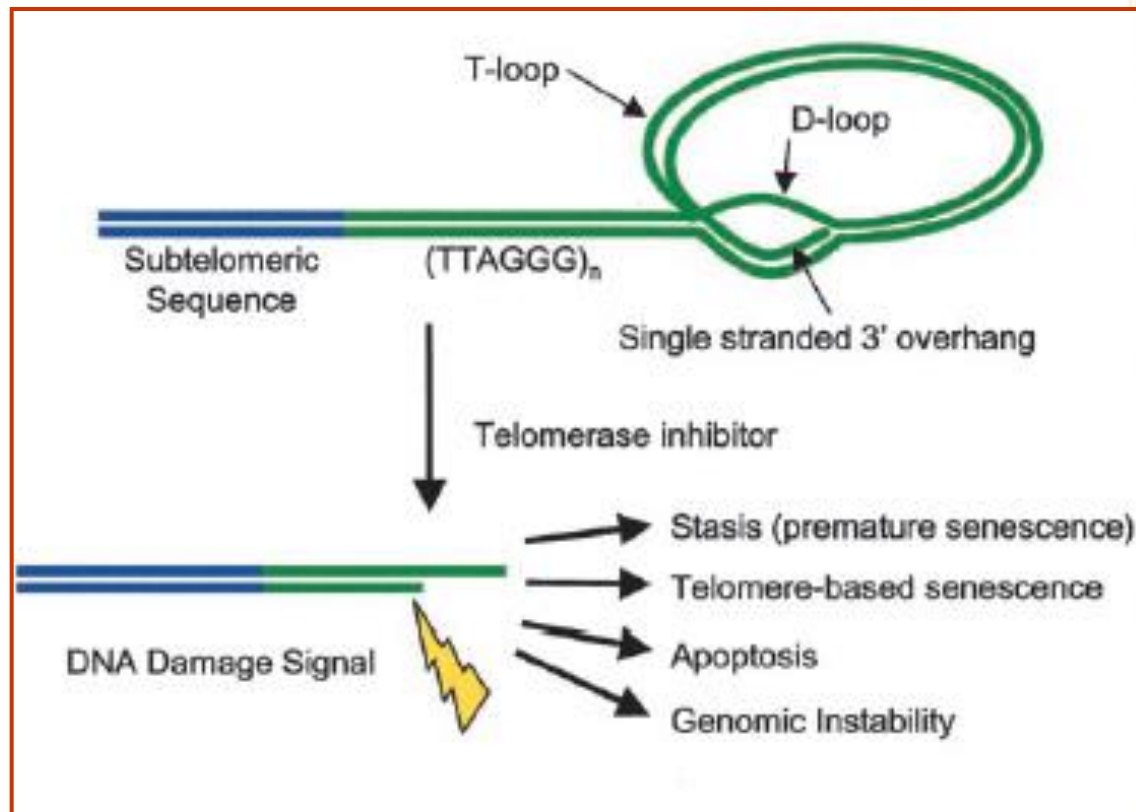
**reálně** je třeba mnohem více buněk, aby uspěly ve snaze vytvořit nádor

← toto je **ideální** představa

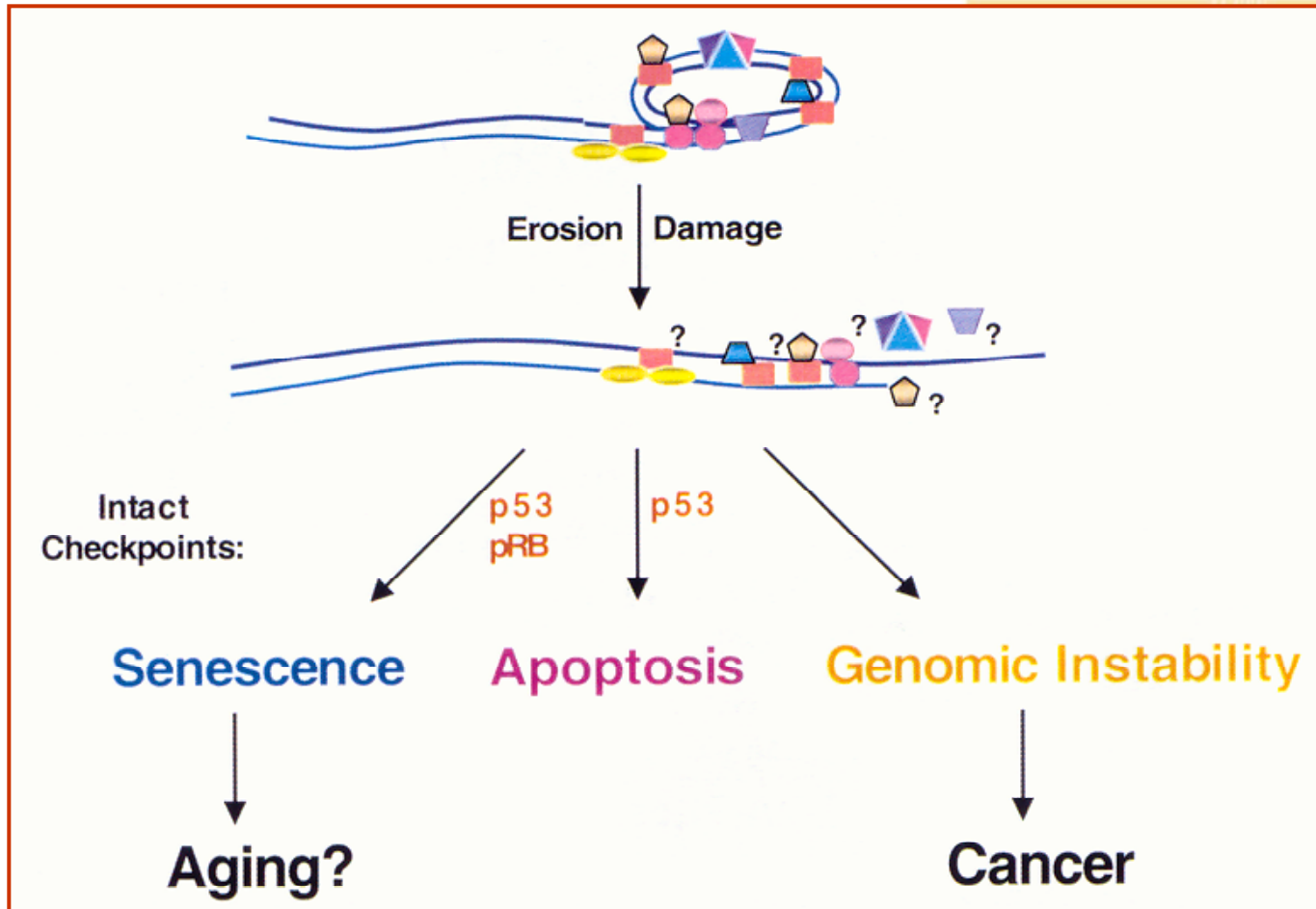




# Možné dopady zkracování telomer



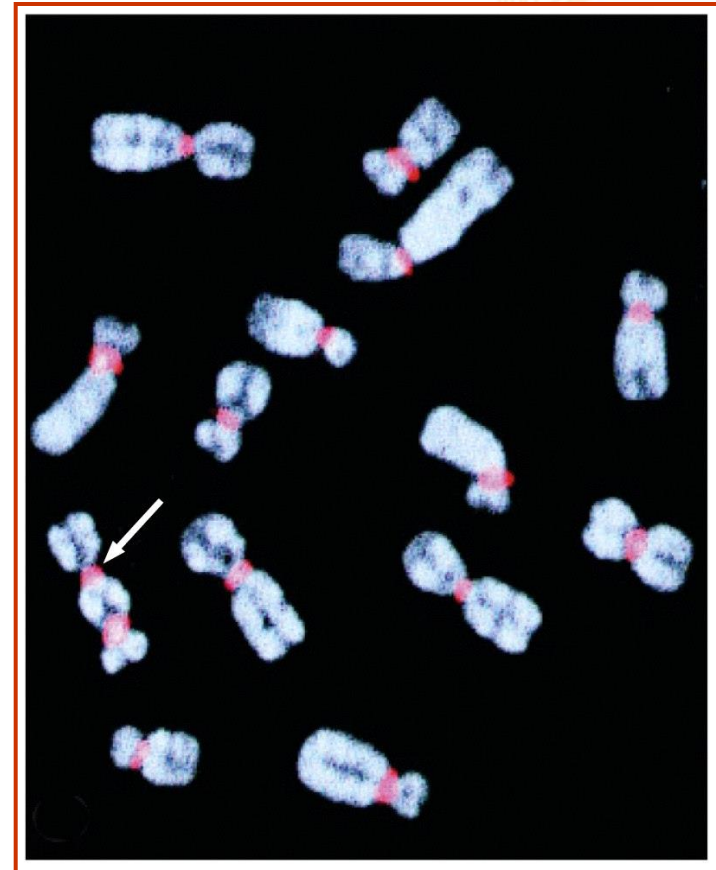
# Důsledky kritického zkrácení telomer



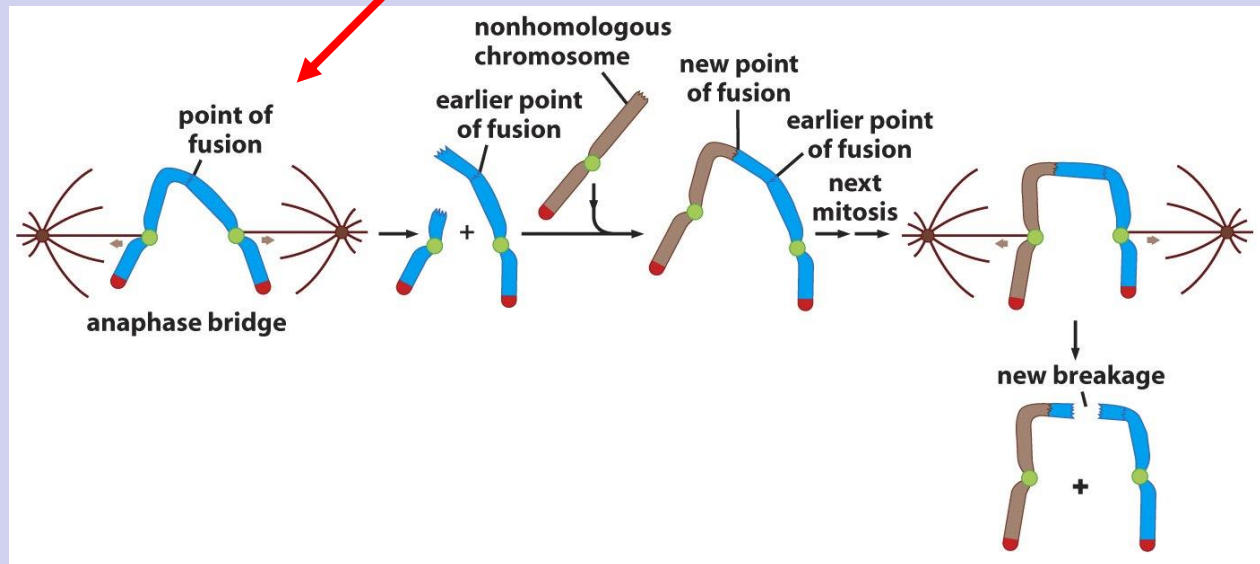
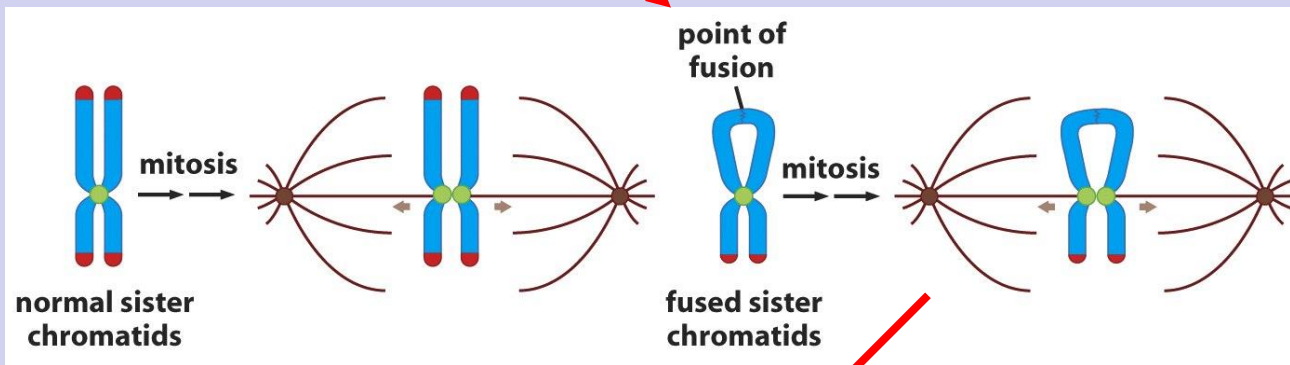
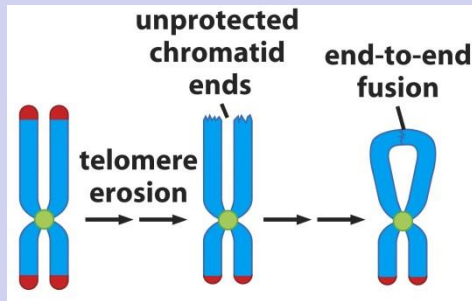
# Zkracování telomer přispívá vzniku nádorů



- 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!**).



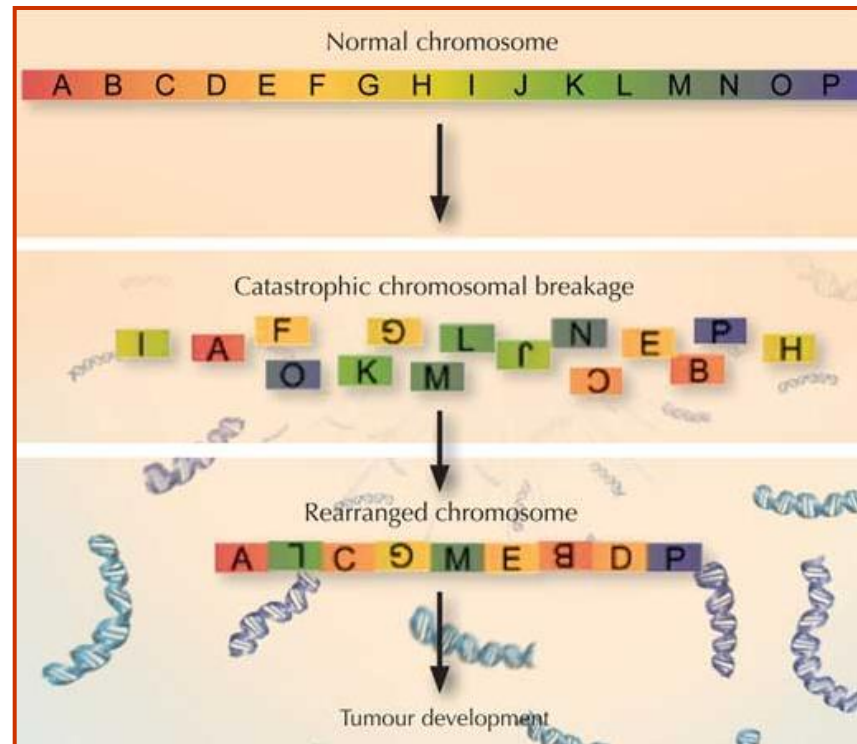
# Zkracování telomer přispívá ke vzniku nádorů zvýšením genetické nestability



# Chromotripse



- Jeden, případně dva chromozomy „explodují“ a rozpadnou se na bezpočet malých kousků; následně jsou znovu složeny, ale některé kousky chybějí, některé jsou špatně uspořádány.





# Chromotripse



- jednou z příčin chromotripse může být pravděpodobně **mutace TP53**: mohlo by to souviset s nesprávnou funkcí **telomer**: chromozomy jsou do sebe „zaklesnuté“ a během mitózy jsou roztrženy jako korálky
- při snaze opravit chromozomy chybí díky mutaci *TP53* patřičná kontrola
- při známkách chromotripse je třeba hledat vrozenou mutaci *TP53*
- odhaduje se, že asi 2 až 3% případů rakoviny je vyvoláno chromotripsí

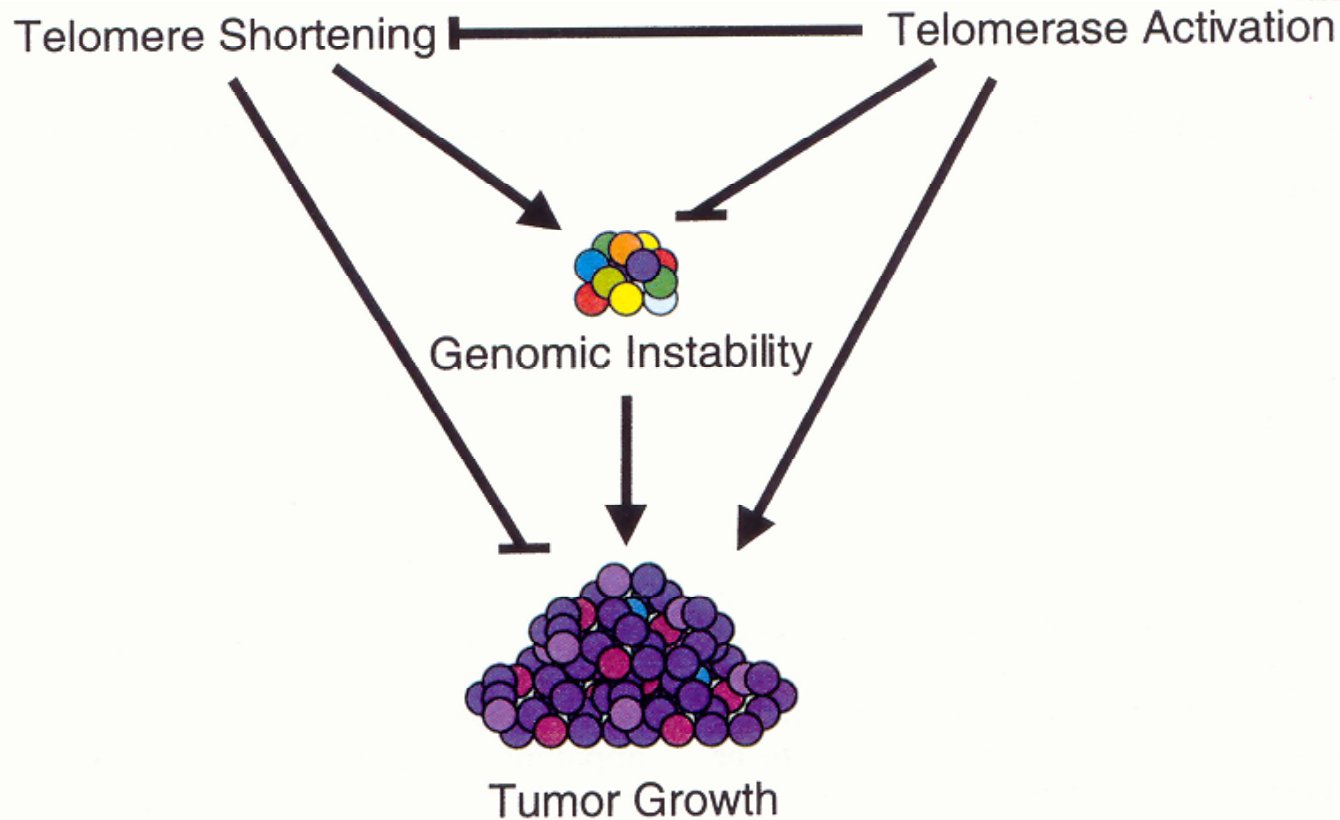


# Chromotripse a neuroblastomy

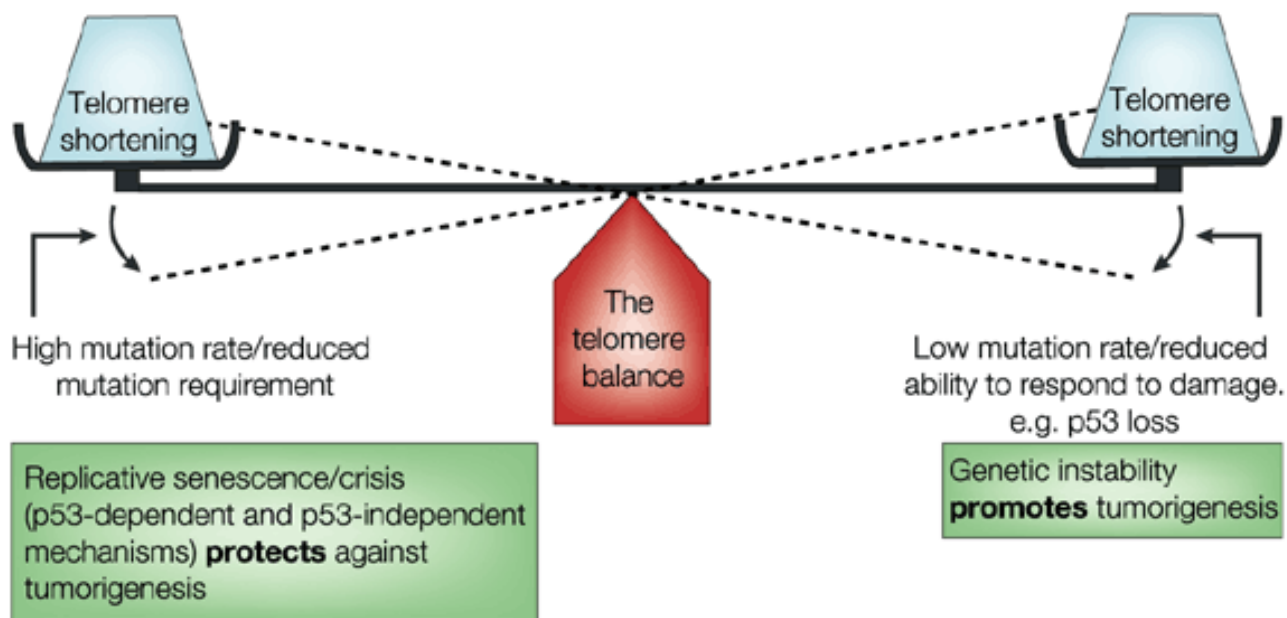
- celogenomovým sekvenováním studováno 87 primárních neuroblastomů (a lymfocytů – jako negativních kontrol)
- 18% neuroblastomů (10/55) vysokého stadia (3 a 4) mělo lokální poškození chromozomů – chromotrypsi; ani jeden případ stadia 1 a 2
- u dvou případů nalezena mutace postihující geny typu *FAN* (*FANCM* a *FAN1*)



# Dvojitá role telomerázy a telomerové dysfunkce v genetické nestabilitě a růstu nádoru



# Telomerová rovnováha



Zkracování telomer může procesu kancerogeneze jak přispívat, tak jej brzdit – zdá se, že úloha zkracování telomer je v procesu kancerogeneze vybalancována.

# Telomery a telomeráza v různých stadiích kancerogeneze

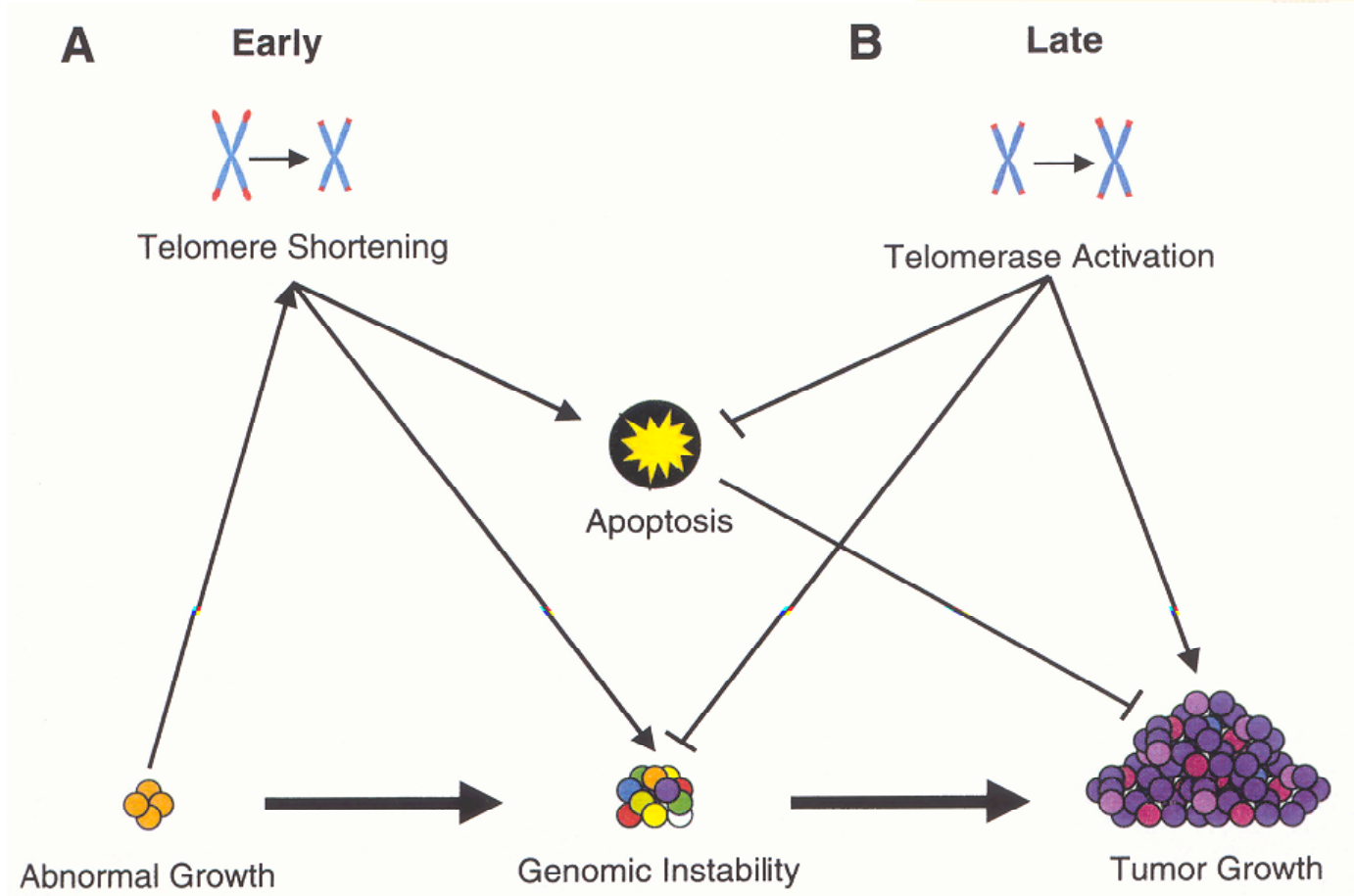


## Buňky bez aktivní telomerázy:

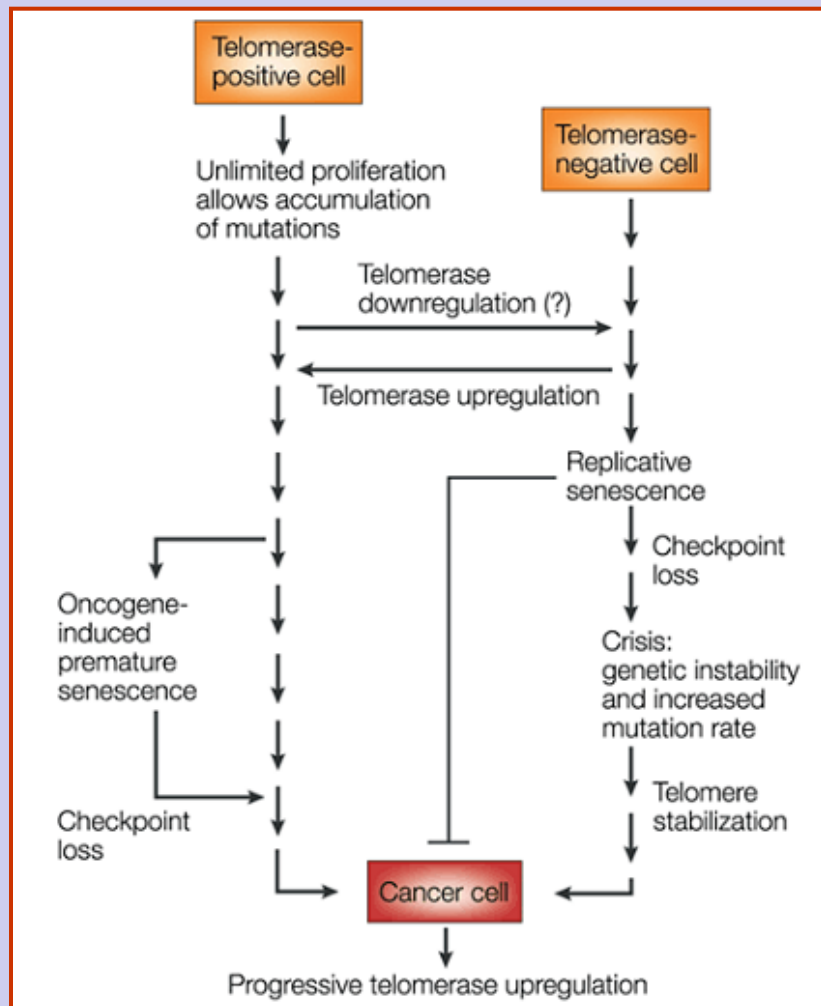
- zkracování telomer buď navodí genetickou nestabilitu nebo inhibuje růst nádoru senescencí a/nebo apoptózou
- aktivace telomerázy může v další fázi omezit genetickou nestabilitu a umožnit růst nádoru
- spojení buněk s aktivní telomerázou s pozdějšími agresivnějšími stadii může souviset se selekcí výrazně proliferujících buněk (klonální expanze)



# Model úlohy telomer a telomerázy ve vývoji nádoru



# Regulace telomerázy během 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

# Dvojí role senescence při vývoji nádorů



- Na jedné straně senescence funguje jako proces, který suprimuje vývoj nádorů. Prostřednictvím SASP indukuje parakrinně senescenci v sousedních (nádorových i nenádorových) buňkách. Stimuluje buňky imunitního systému k odklizení senescentních i proliferujících nádorových buněk.
- Na druhé straně, prostřednictvím SASP stimuluje progresi nádorů stimulací proliferace, angiogeneze,...

# Telomery a telomeráza v různých stadiích kancerogeneze

Komparativní analýza premaligních a maligních ložisek v lidském prsu:

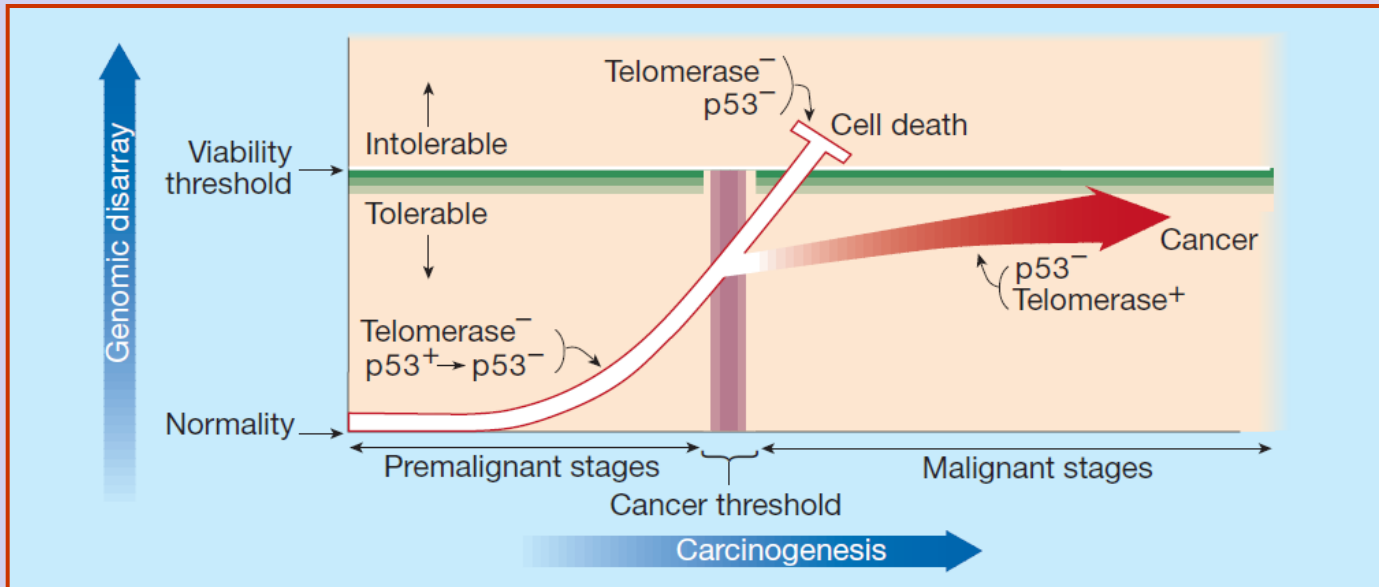
## **Premaligní léze:**

- neexprimovaly aktivní telomerázu
- telomery se zkracovaly
- vykazovaly neklonální chromozomální aberace

## **Karcinomy:**

- aktivní telomeráza
- stabilní délka telomer
- stabilní aberantní karyotyp (pravděpodobně klonální selekce)

# Souvislosti: funkce p53 a délka telomer



- kancerogeneze je provázána akumulací chyb v genomu v důsledku zvýšené genetické nestability
- (1) práh přežití: po jeho překročení nejsou buňky životaschopné
- (2) práh kancerogeneze: po jeho překročení se nádory vyvíjejí expanzivně
- „úspěšné“ nádory: telomeráza je „aktivována“ zhruba ve fázi dosažení (2), což stabilizuje telomery a umožní expanzivní proliferaci nádorových buněk



# Souvislosti: funkce p53, délka telomer, typ nádoru?

- **myši** s delecí **TP53** rychle vyvíjejí **sarkomy** a **lymfomy**, jen vzácně epiteliální nádory (karcinomy)
- asi 90% **lidských** nádorů jsou **karcinomy** a velmi často postrádají funkci p53
- myši mají **mnohem delší telomery** než člověk
- k dosažení „human-like“ délky telomer je nutná **inaktivace telomerázy** a následně **šest generací** myší
- myši s krátkými telomery, neaktivní telomerázou a heterozygotní  $p53^{+/-}$ : s věkem asi polovina myší vyvinula sarkom nebo lymfom, ale polovina vyvinula epiteliální nádor!

# Souvislosti: funkce p53, délka telomer, kancerogeneze

- CIN související s krátkými telomerami pohání epiteliální karcinogenezi, pokud selžou odpovídající kontrolní body:
- myšší buňky jsou v tomto závislé na funkci **p53**
- u lidských buněk musí být inaktivovány jak dráha **p53**, tak **RB**

# 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**:

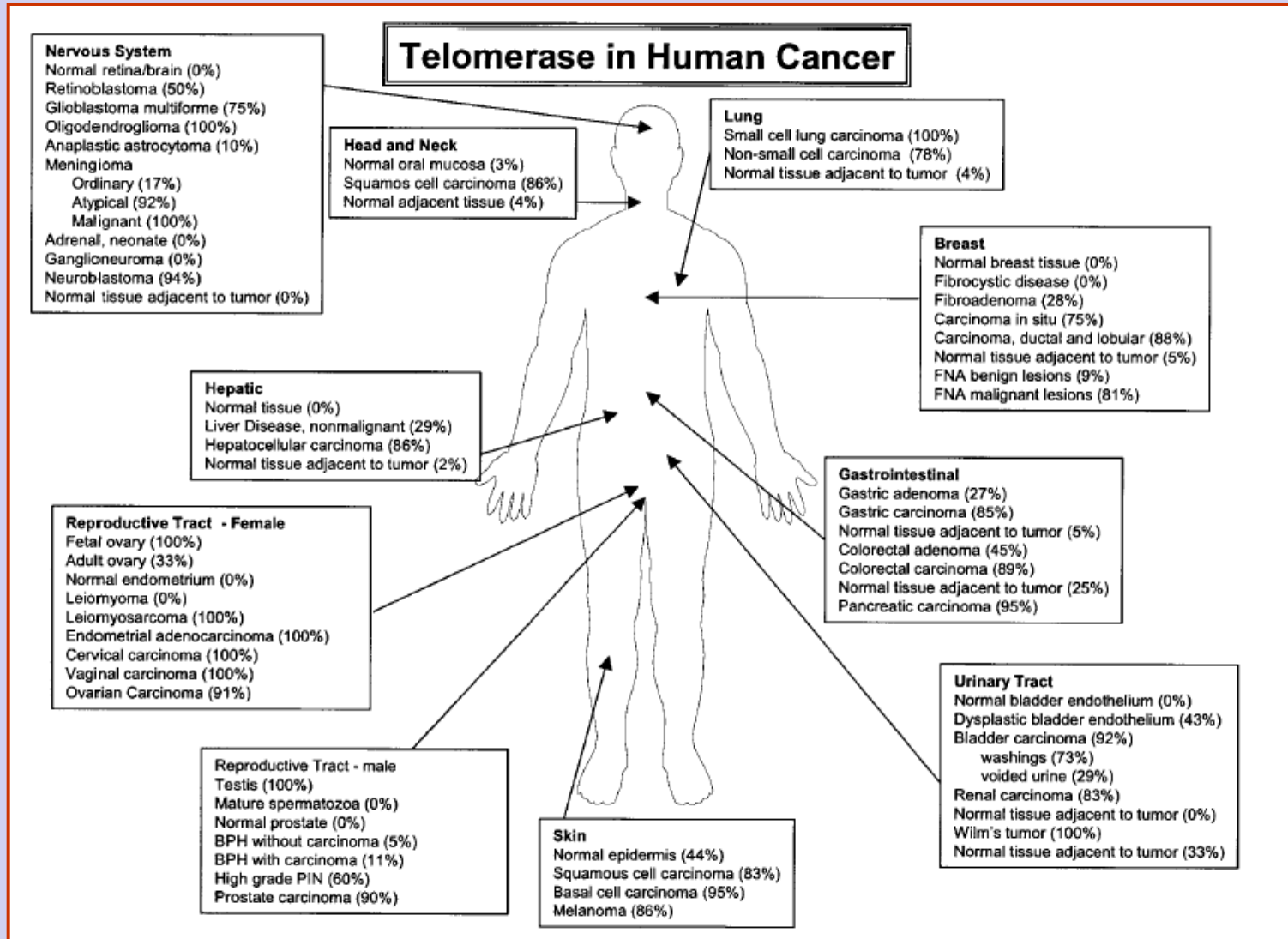
Inaktivace telomerázy může omezit růst nádorových buněk, zatímco většina „normálních“ buněk telomerázu nepotřebuje ⇒ využití pro **terapii**:

# Využití telomer v diagnostice

## TRAP assay

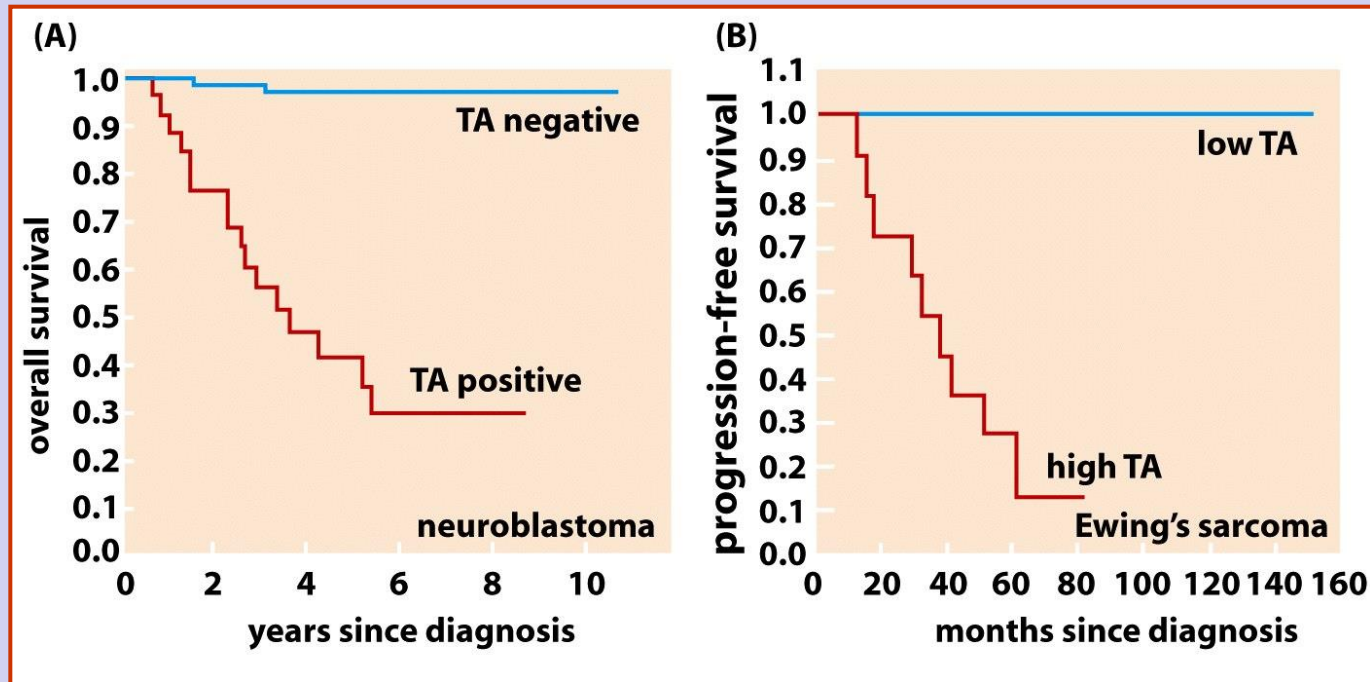
- využívá PCR k amplifikaci produktů prodlužování telomerázou
- velmi citlivá: detekuje 0.01% pozitivních buněk
- tam kde tkáň/histologické prostředí nádoru přirozeně obsahuje aktivní telomerázu (střevní epitel) se za pozitivní považuje pouze hladina telomerázy vyšší než u odpovídající kontrolní tkáně

# 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** (A) nebo **Ewingova sarkomu** (B) je aktivní telomeráza výrazně negativním prognostickým faktorem.

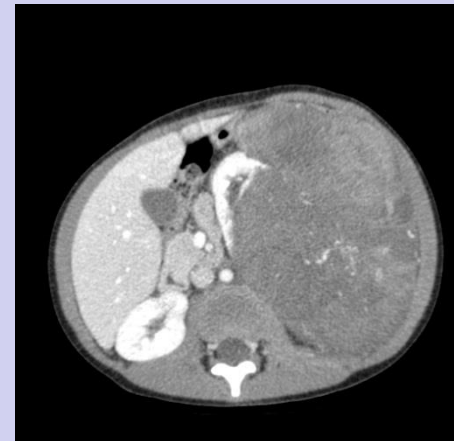
# Aktivní telomeráza a neuroblastomy

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

Špatná prognóza silně souvisí s amplifikací genu **N-myc**.

Špatná prognóza 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 ⇒ 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
- ⇒ dostatečné **terapeutické okno**
- 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; zidovudine, BIBR1532, GRN163L,...)

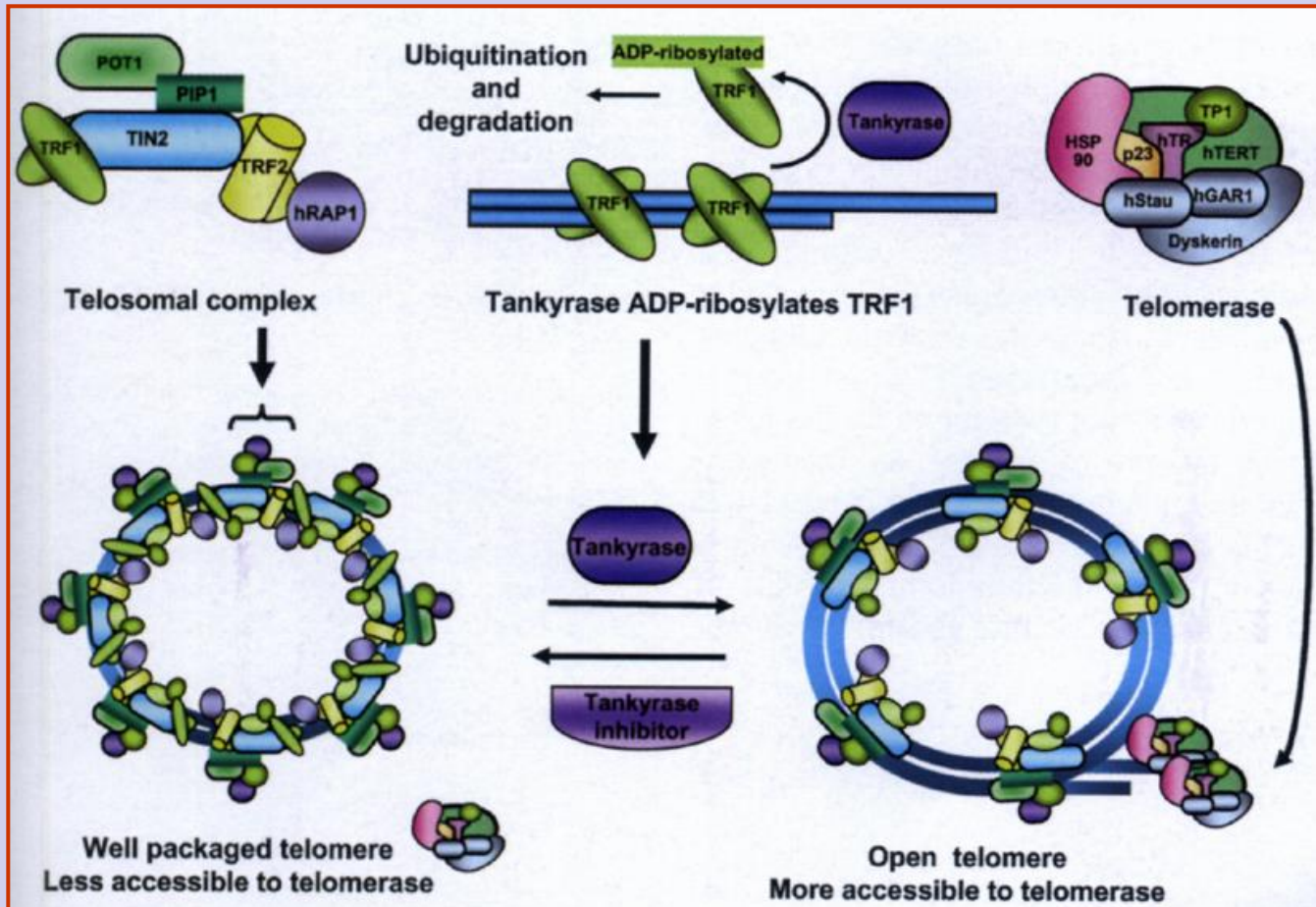
# Telomeráza jako terapeutický cíl

- díky komplexitě telomerázového komplexu mohou některá terapeutika mířit i na **další proteinové složky**
- vedle množství aktivní telomerázy ještě mnoho dalších faktorů rozhoduje o efektivitě, s jakou je telomeráza přiváděna k telomerám

## Tankyráza

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

# Tankyráza a přístup telomerázy k telomerám





# Tankyráza jako cíl terapie

- vysoká exprese tankyrázy vede k prodlužování telomer u buněk exprimujících aktivní telomerázu
  - výrazně snížená aktivita telomerázy (o 80%) může zajistit stabilizaci telomer
- ⇒ 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“ – výměnou telomerické DNA mezi chromozomy

- založen na rekombinaci DNA
- ALT je spojen s velice heterogenní délkou telomer
- mechanismy ALT a telomeráza koexistují v buňce vedle sebe, aktivní telomeráza (exprese telomerázy) zřejmě reprimuje mechanismy ALT (nezdá se ale, že by tím represorem byla přímo telomeráza)

# 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**.

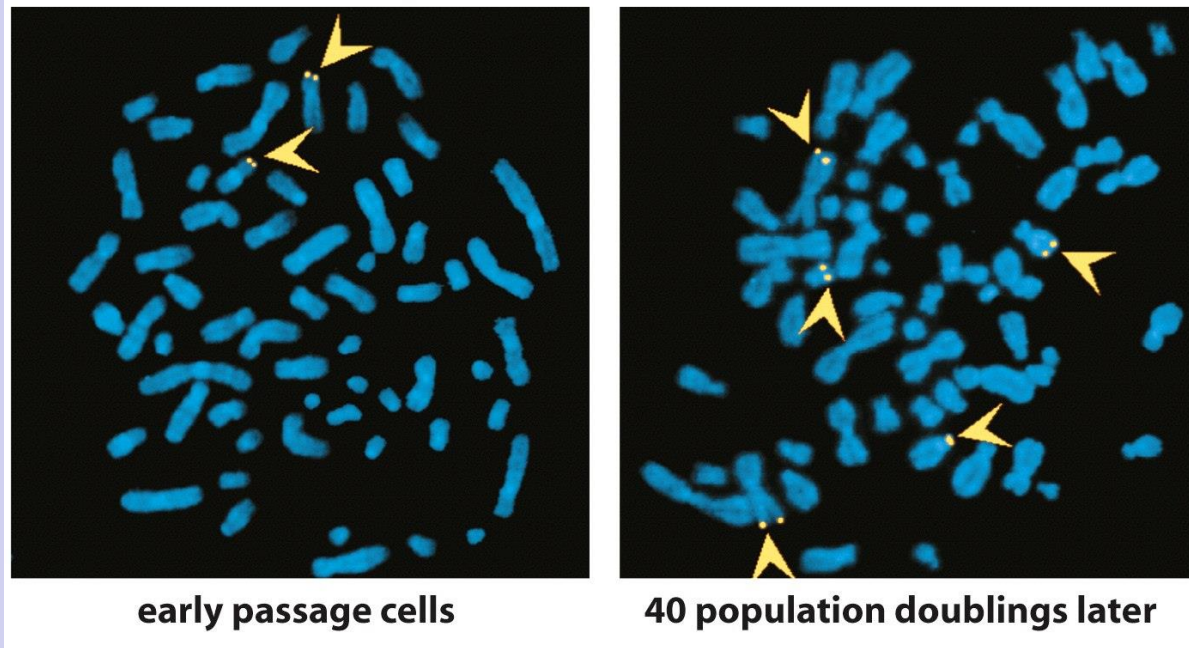
⇒ Telomery v nepřítomnosti telomerázy mohou být substrátem pro různé typy rekombinací.

# 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

Délku telomer (a možnost předčasného úmrtí) negativně ovlivňuje:

- kouření
- obezita
- dlouhodobý stres
- socioekonomický status

Krátké telomery disponují k:

- demenci
- poškození kognitivních schopností

# Telomery - stárnutí - nádory

## **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

## **Hutchison-Gilford progeria**



# Telomery - stárnutí - nádory

## 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
- V roce 2003 byly jako příčina zjištěny mutace genu pro protein jaderných filament lamin A (LMNA). Důsledkem je porucha prekurzorového štěpení prelaminu A se vznikem patologického progerinu a s následnou poruchou jaderného obalu, nukleoskeletu a chromosomální architektury.

# Telomery - stárnutí - nádory

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