

Pomen telomeraz pri staranju organizma in razvoju malignih tumorjev

Boštjan Luzar, Mario Poljak, Ulrika Klopčič, Nina Gale

UVOD

Telomere so ponavljajoča se zaporedja šestih nukleotidov (TTAGGG)_n v dolžini 8–15 kilobaznih parov na 3'-koncu linearnih kromosomov. Zaradi tako imenovanega problema podvajanja koncev linearnih kromosomov se telomere normalnih somatskih celic z vsako celično delitvijo skrajšajo za 50–200 baznih parov (Slika 1).

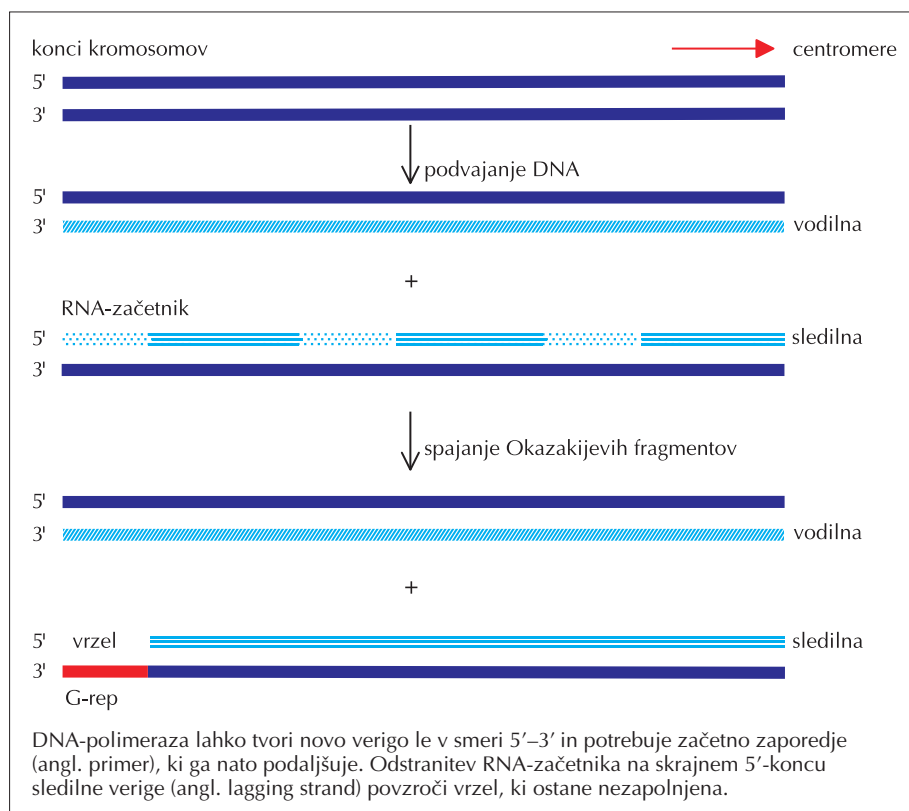
celic sovpada z diferenciacijo tkiv. Po rojstvu se telomeraza nahaja le v kličnih celicah (angl. germline cells), ki vzdržujejo nespremenjeno dolžino telomer, in matičnih celicah (angl. stem cells), medtem ko je v somatskih celicah večinoma ni. Izjema so specifične proliferirajoče epiteljske celice različnih tkiv (npr. bazalnega sloja epidermisa in lasnih mešičkov, črevesnega

epitelija, dojke, endometrija) in celice, ki so namenjene klonalni razširitvi (npr. aktivirani limfociti). Majhna telomerazna aktivnost v teh celicah pa ne zadostuje za vzdrževanje dolžine telomer.

TELOMERNO-TELOMERAZNA HIPOTEZA O STARANJU IN RAZVOJU RAKA

Krajšanje telomer s posledičnim končnim številom celičnih delitev je učinkovit mehanizem, ki zavira tumorje. Predvidevamo, da ima celica dve nadzorni točki, ki preprečita neomejeno delitveno sposobnost normalnih celic: mortalitetni stadij 1 (M1) in mortalitetni stadij 2 (M2). Da bi celica postala nesmrtna, s čimer bi dosegla neomejeno sposobnost celičnih delitev, mora zaobiti oba stadija (Slika 2).

Stanje, v katerem so celice sicer vitalne, se pa ne delijo več, imenujemo M1 oz. replikativno staranje. Vzrok za aktivacijo nadzorne točke M1 so kritično kratke telomere, ki spremenijo izraženost sicer normalno neaktivnih subteloernih regulatornih genov. Celični DNA popravljalni mehanizmi prepoznajo kritično kratke telomere kot okvarjeno DNA, ustavijo celično delitev in sprožijo staranje celice ali pa progamirano celično smrt, apoptozo. Za ustavitev celičnih delitev v M1 je nujno normalno delovanje genov *p53* in *Rb*, ki zavirajo tumorje, oz. njihovih beljakovinskih pridelkov, *p53* in *pRb*. Virusni onkoproteini, kot sta E6 in E7 humanega virusa papiloma 16 in veliki T-antigen virusa SV40, vežejo beljakovini *p53* in *pRb*, s čimer omogočijo nadaljevanje celičnega cikla oz. delitev celice.



Slika 1. Problem podvajanja koncev linearnih kromosomov.

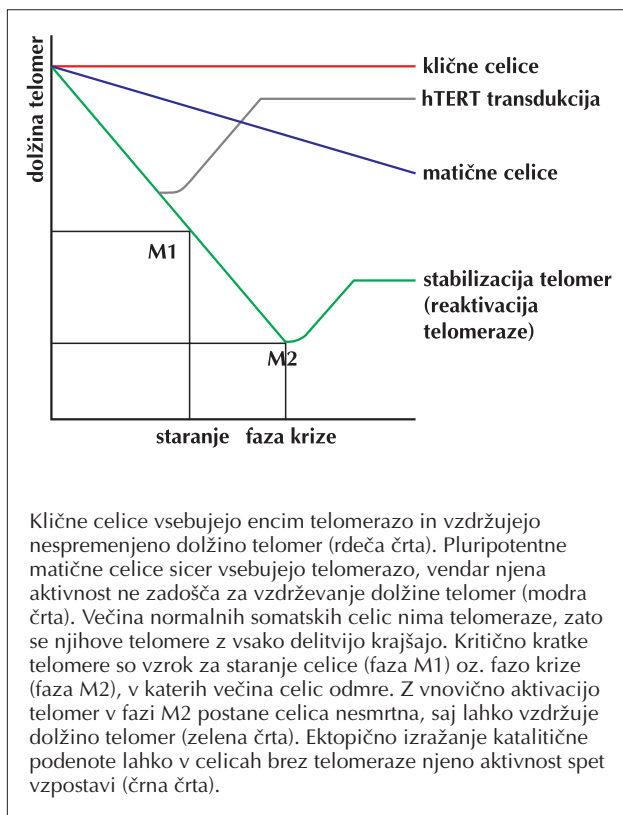
Celični popravljalni mehanizmi spoznajo kritično kratke telomere kot okvarjeno molekulo DNA in zaustavijo celično delitev. Dolžina telomer tako določa število celičnih delitev in življenjsko dobo celice, zato telomere imenujemo tudi celična mitotična ura. Dolžina telomernih zaporedij je odvisna od vrste tkiva in starosti človeka ter se z leti zmanjšuje.

TELOMERAZNA AKTIVNOST V NORMALNIH CELICAH

Telomeraza je v zgodnjih fazah embriogeneze prisotna v večini celic, tudi somatskih. Njeno zavrtje v večini

Celice, ki preživijo M1, vstopijo v obdobje t. i. podaljšane življenjske dobe. Njihova delitvena sposobnost je ohranjena, telomere se še naprej krajšajo. Po nadaljnjih 30 do 40 delitvah nastopi stanje krize oz. druga nadzorna točka celičnih delitev, M2.

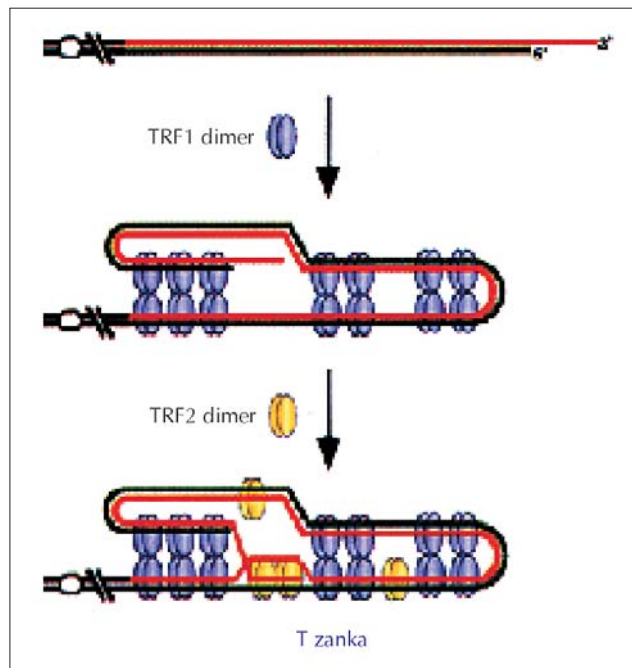
M2 označujejo izredno kratke, t. i. ultrakratke telomere in huda kromosomska nestabilnost z medsebojnim zlepljanjem kromosomov. Večina celic v tej fazi odmre. Celica lahko prepreči izgubo genetske informacije in preživi M2 tako, da prepreči nadaljnje krajšanje telomernih zaporedij. Le ena od 10^7 celic preživi stanje krize. Za take celice pravimo, da so nesmrtni, saj imajo neomejeno proliferacijsko sposobnost, ki omogoči njihovo klonalno razširitev. V večini primerov postane celica nesmrtna z reaktivacijo telomeraze.



Slika 2. Dvostopenjska hipoteza o staranju in nesmrtnosti celic.

PROSTORSKA UREDITEV TELOMER

Telomerne beljakovine z vezavo na telomerno DNA zagotovijo ustrezno prostorsko ureditev koncev linearnih kromosomov (Slika 3) in tako omogočijo njihovo razlikovanje od naključnih prelomov DNA-molekul. S preprečevanjem razgradnje in medsebojnega zlepljanja koncev linearnih kromosomov zagotovijo normalno ločevanje kromosomov med celično delitvijo, zagotavljajo stabilnost kromosomov in s tem tudi stabilnost celičnega genoma. Telomere tvorijo povezave z jedrnim matriksom in tako pomembno vplivajo na vzdrževanje ustrezne strukture jedra.

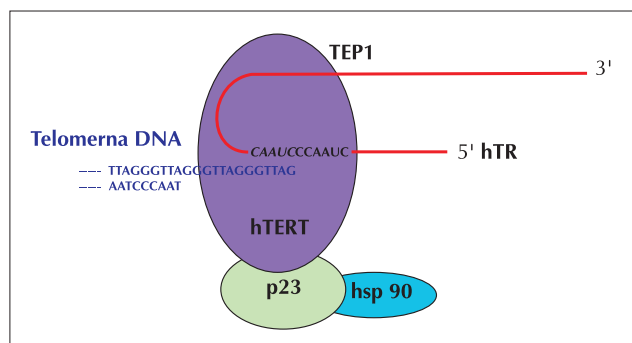


Slika 3. Prostorska ureditev telomernega kompleksa, ponatis z dovoljenjem avtorja.

Legenda: TRF1 in TRF2 sta telomerni beljakovini.

TELOMERAZA

Telomeraza je encimski kompleks, zgrajen iz več podenot (Slika 3). Glavne podenote so katalitična (hTERT), telomerazna RNA in beljakovina TEP 1 (angl. telomerase associated protein 1). Medtem ko sta telomerazna RNA in beljakovina TEP 1 prisotni v vseh celicah, je izražanje gena *hTERT* natančno uravnano in povezano s pojavom telomerazne aktivnosti v celici. Beljakovina hTERT deluje kot reverzna transkriptaza, ki matrico v RNA-podenoti uporablja za sintezo komplementarnih telomernih zaporedij.



Slika 4. Hipotetični prikaz zgradbe aktivnega telomeraznega kompleksa.

Legenda: hTR: RNA-podenota, hTERT: katalitična podenota, TEP1: beljakovina TEP 1 (angl. telomerase associated protein 1), p23 in Hsp90: beljakovini p23 in Hsp90.

PRINCIP DOLOČANJA TELOMERAZNE AKTIVNOSTI

Test TRAP (angl. telomeric repeat amplification protocol)

Leta 1994 je Kim s sodelavci razvil test za določanje telomerazne aktivnosti v svežih oz. zaledenelih tkivnih vzorcih, ki zahteva prisotnost aktivnega telomeraznega encimskega kompleksa v preiskovanem vzorcu – t. i. test TRAP. Temeljni princip testa je naslednji: del homogeniziranega in razgrajenega tkivnega vzorca dodamo reakcijski mešanici, ki vsebuje sintetični telomeram podoben začetnik. Če je v vzorcu telomeraza, bo na sintetični začetnik dodajala zaporedja šestih nukleotidov. Mešanico reakcijskih pridelkov, ki se med seboj v dolžini razlikujejo za mnogokratnik števila 6, nato v klasični reakciji z verižno reakcijo pomnožimo s polimerazo. V poliakrilamidnem gelu pridelke med seboj ločimo; če je v preiskovanem vzorcu telomeraza, dobimo na gelu značilne trakove, ki se med seboj ločijo za 6 baznih parov.

Že kmalu po prvi objavi in z začetkom množične uporabe testa TRAP so bile opisane tudi nekatere njegove pomanjkljivosti. Ker je za učinkovitost tega testa potreben aktivni telomerazni funkcijski kompleks, je test podvržen delovanju različnih encimskih inhibitorjev, lažno pozitivni rezultati so lahko posledica tvorbe dimerov med specifičnimi začetniki (angl. primer dimer), težavno pa je tudi natančno merjenje stopnje telomerazne aktivnosti.

Določanje števila kopij mRNA katalitične podenote

Znano je, da količina mRNA telomerazne katalitične podenote odraža stopnjo telomerazne aktivnosti. Določanje količine mRNA hTERT z reverzno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) je tudi zaradi opisanih omejitev testa TRAP do zdaj najbolj specifičen in najbolj občutljivejši test za oceno telomerazne aktivnosti v celicah oz. tkivih.

Pomanjkljivost tega testa in tudi RT-PCR je v uničenju tkivne morfologije. Pričakujemo, da bosta v bližnji prihodnosti izpopolnjeni predvsem hibridizacijska tehnika "in-situ" za dokaz izražanja gena *hTERT* ter imunohistokemijski prikaz beljakovine hTERT, ki bosta omogočila določanje katalitične podenote na arhivskih tkivnih vzorcih, fiksiranih v formalinu.

KLINIČNI POMEN DOLOČANJA TELOMERAZNE AKTIVNOSTI

S številnimi raziskavami o vlogi telomeraze v razvoju malignih tumorjev so dokazali, da pride pri človeku do vnovične sprožitve delovanja encima telomeraze v 85–90 % primarnih malignih tumorjev. Reaktivacija telomeraze, ki povzroči stabilizacijo telomer in razvoj celične nesmrtnosti, je zato ključen in večinoma nujen dogodek v razvoju malignih tumorjev, ki izbranim celicam zagotovi neomejeno delitveno sposobnost in omogoči kopičenje dodatnih mutacij v večstopenjskem procesu razvoja malignih tumorjev.

Pri vseh najpogostejših primarnih malignih tumorjih, npr. pri tumorjih dojke, rodil in spolovil, prebavil, centralnega živčnega sistema, pljuč, ustne votline, žrela in grla,

najdemo telomerazno aktivnost, medtem ko je v normalnih tkivih, v katerih se razvijejo, večinoma ni oz. je majhna. Vse več je dokazov, da ima zato določanje stopnje telomerazne aktivnosti in predvsem količine mRNA za katalitično podenoto encima telomeraze napovedno in celo diagnostično vrednost.

V naslednjih podpoglavjih so prikazani izsledki pomembnejših raziskav o vlogi telomeraze in njene katalitične podenote v razvoju tumorjev različnih organskih sistemov, pri čemer so posebno poudarjene diagnostične in napovedne vrednosti telomerazne aktivnosti oz. določanje relativne koncentracije hTERT mRNA v tkivnih vzorcih.

Telomeraza v tumorjih dojke

Telomerazna aktivnost v karcinomih dojke je povezana z agresivnejšo rastjo tumorja, z zasevki v področnih bezgavkah in hitrejšim napredovanjem bolezni. Z določanjem količine mRNA katalitične podenote v karcinomih dojke so ugotovili, da so velike vrednosti hTERT mRNA povezane s slabšo diferenciranostjo tumorja, agresivnejšo rastjo, odsotnostjo progesteronskih in estrogenskih receptorjev v tumorskih celicah in neugodno napovedjo poteka bolezni.

Telomeraza v karcinogenizi tumorjev širokega črevesa, danke in želodca

Reaktivacija telomeraze je najverjetneje nujen dogodek v karcinogenizi širokega črevesa in danke, saj se pojavi v veliki večini adenomov s hudo stopnjo displazije epitelija in v veliki večini invazivnih karcinomov. Stopnja telomerazne aktivnosti in vrednosti hTERT mRNA so v invazivnih karcinomih širokega črevesa in danke bistveno večje kot v adenomih in netumorskih spremembah teh delov telesa, večja telomerazna aktivnost pa je povezana tudi z globino invazije in vensko invazijo. Velika telomerazna aktivnost v karcinomih širokega črevesa in danke je neodvisni napovedni dejavnik neugodnega poteka bolezni, razvoja zasevkov in krajšega obdobja remisije bolezni.

Preživetje bolnikov z rakom želodca, v katerem je telomeraza, je bistveno krajše kot v tumorjih želodca brez telomerazne aktivnosti.

Telomeraza v primarnih tumorjih jeter in trebušne slinavke

Dokaz vnovične aktivacije telomeraze v displastičnih jetrnih vozličih, ki so zgodnja sprememba v večstopenjskem razvoju primarnih jetrnih tumorjev, kaže, da ima encim telomeraze že zgodaj v procesu jetrne karcinogeneze osrednjo vlogo.

Telomerazna aktivnost v hepatocelularnem karcinomu je neodvisni napovedni dejavnik za ponovitev bolezni po delni odstranitvi jeter. Stopnja telomerazne aktivnosti je povezana z diferenciranostjo tumorja in preživetjem bolnikov. Razliko v vrednostih hTERT mRNA med netumorskimi in tumorskimi vzorci jeter bi lahko uporabili kot dodatno diagnostično metodo predvsem v primerih, ko z drugimi diagnostičnimi metodami ni mogoče opredeliti biološke narave spremembe v jetrih.

Količina hTERT mRNA v trebušni slinavki omogoča zanesljivo razlikovanje med normalnim tkivom, kroničnim vnetjem in karcinomom trebušne slinavke tako v tkivnih vzorcih kot tudi v vsebini iz glavnega voda trebušne slinavke.

Telomeraza v nedrobnoceličnih pljučnih karcinomih

Ploščatocelični karcinom pljuč se razvije v večstopenjskem procesu pljučne karcinogeneze, ki se morfološko odraža v hiperplastičnih in displastičnih spremembah, intraepitelijskem karcinomu in končno v obliki invazivne karcinomske rašče. Majhno telomerazno aktivnost lahko dokažemo že v normalnem večskladnem ploščatem epiteliju, njena aktivnost pa narašča v odvisnosti od stopnje sprememb epitelijskega tkiva in je največja v karcinomu. Podobne ugotovitve veljajo tudi za količino hTERT mRNA.

Telomerazna aktivnost in prisotnost hTERT mRNA v nedrobnoceličnih pljučnih karcinomih sta napovedna dejavnika, povezana s slabšo diferenciranostjo tumorjev, hitrejšo ponovitvijo bolezni, zasevki v oddaljenih bezgavkah in neugodnim izidom bolezni. Količina hTERT mRNA je označevalec, ki omogoči napoved agresivnosti rasti pljučnega raka. Bolniki z nedrobnoceličnim pljučnim rakom, v katerem je hTERT mRNA, imajo krajše preživetje kot bolniki s hTERT mRNA negativnimi pljučnimi karcinomi.

Telomeraza v tumorjih materničnega vratu in telesa maternice

Telomerazna aktivnost in količina hTERT mRNA v epitelijskih spremembah in ploščatoceličnih karcinomih ustja maternice sta odvisni od stopnje epitelijskih sprememb in diferenciranosti karcinoma. Velika telomerazna aktivnost v endometrijskem adenokarcinomu maternice je povezana s slabšo diferenciranostjo tumorja, lokalno razširjenostjo bolezni ter zasevki v pelvičnih bezgavkah. Telomerazna aktivnost in količina hTERT mRNA sta bistveno večji v endometrijskem adenokarcinomu maternice kot v normalnem endometriju, kjer tudi sicer najdemo telomerazno aktivnost in hTERT mRNA.

Telomeraza v urotelnih tumorjih sečnega mehurja

Količina hTERT mRNA je povezana s stopnjo diferenciranosti in razširjenostjo urotelnega karcinoma sečnega mehurja. Z ustrežno standardizacijo vrednosti hTERT mRNA je mogoče zanesljivo razlikovati med dobro, zmerno in slabo diferenciranimi urotelnimi karcinomi, kakor tudi med površinsko rastočimi tumorji in tistimi tumorji, ki se vraščajo globoko v mišično plast mehurja.

Citološki pregled seča oz. izpirka sečnega mehurja je uveljavljena metoda spremljanja morebitne ponovitve urotelnega karcinoma sečnega mehurja. Občutljivost citološke preiskave pri ugotavljanju slabo diferenciranih urotelnih karcinomih (stopnja 3) je približno 60 % in le 30 % pri dobro diferenciranih urotelnih karcinomih. Z določanjem hTERT mRNA v izpirku sečnega mehurja lahko predvsem pri ugotavljanju slabo diferenciranih urotelnih karcinomov občutljivost povečamo na približno 80 %.

Telomeraza v nevroblastomih

Velika telomerazna aktivnost v nevroblastomu je neugoden napovedni dejavnik poteka bolezni. Pri podtipu nevroblastoma, ki ga označuje napredovala bolezen z oddaljenimi zasevki (stadij IV-S), lahko po operaciji primarnega tumorja pride do regresije preostalega tumorskega tkiva. Zanimivo je, da v veliki večini takšnih primerov niso mogli dokazati telomerazne aktivnosti v nevroblastomu. Predvideva se, da je prav zavrtje telomerazne aktivnosti v nevroblastomih povezano z njihovo spontano regresijo.

Telomeraza v meningiomih

Telomerazna aktivnost in hTERT mRNA v meningiomih sta povezani z agresivnejšim potekom, ponovitvijo tumorja in pojavom malignih meningiomov. V klasičnih meningiomih, ki potekajo benigno, večinoma ni telomerazne aktivnosti in hTERT mRNA oz. so njune vrednosti manjše kot v agresivno rastočih meningiomih.

Telomerazna aktivnost in hTERT mRNA v serumu

Raziskava Chena s sod. in Kopreskega s sod. o tumorski RNA v serumu pri bolnikih s karcinomi dojke in malignim melanomom je odprla nove možnosti, kako uporabljati molekularne metode za zgodnje ugotavljanje in spremljanje poteka bolezni pri bolnikih z malignim tumorjem. Z določanjem hTERT mRNA v serumu bolnikov s karcinomom debelega črevesa in danke oz. folikularnim limfomom je bilo mogoče zanesljivo razlikovati med skupino bolnikov s tumorjem in skupino normalnih prostovoljcev. Soria s sod. je v krvi 90 % bolnikov z urotelnim karcinomom sečnega mehurja, ki se je že vraščal v mišično plast, dokazal telomerazno aktivnost, medtem ko nobeden izmed prostovoljcev ni imel dokazljive telomerazne aktivnosti v krvi. Posreden dokaz krožečih tumorskih celic z določanjem telomerazne aktivnosti in/ali hTERT mRNA bi lahko omogočilo odkritje tistih bolnikov, ki zaradi nevarnosti, da bi prišlo do razsoja bolezni, potrebujejo dodatno zdravljenje.

Telomerazna aktivnost in hTERT mRNA v ploščatoceličnih karcinomih ustne votline, žrela in grla

V naših raziskavah smo dokazali, da je vnovična aktivacija telomeraze zgodnji dogodek v karcinogenezi ploščatoceličnih karcinomov ustne votline, žrela in grla. Reaktivacija encima telomeraze se pojavi v 80–90 % ploščatoceličnih karcinomov ustne votline, žrela in grla, medtem ko v normalnem epiteliju tega predela telomerazne aktivnosti večinoma ni. Menimo, da bi lahko z določanjem relativnega števila kopij hTERT mRNA v tkivnem vzorcu dopolnili svetlobnomikroskopski pregled tkivnih vzorcev ustne votline, žrela in grla in natančneje opredelili predvsem tiste spremembe epitelijskega tkiva, pri katerih je verjetneje, da bodo napredovale v invazivni ploščatocelični karcinom.

Mnenja o povezavi med telomerazno aktivnostjo in kliničnopatološkimi značilnostmi tumorja, kot so velikost, stopnja diferenciranosti tumorskih celic in napoved bolezni, niso enotna. V nekaterih raziskavah so dokazali, da je

stopnja telomerazne aktivnosti odvisna od diferenciranosti tumorskih celic in stadija tumorja, medtem ko te povezave z drugimi raziskavami niso uspeli potrditi. Thurnher s sod. je dokazal, da je velika telomerazna aktivnost v ploščatoceličnih karcinomih ustne votline, žrela in grla slab napovedni znak, saj je verjetnost zasevkov v bezgavkah na vratu večja, tumorske celice pa so tudi odpornejše proti različnim vrstam zdravljenja.

TELOMERAZA KOT POTENCIALNA TARČA ZA ZDRAVLJENJE MALIGNIH TUMORJEV

Telomerazne aktivnosti v veliki večini normalnih somatskih celic ni, najdemo pa jo v približno 90 % malignih tumorjev pri človeku. Zaviranje telomeraze je zato obetajoča metoda zdravljenja malignih tumorjev. Eksperimentalne študije na nesmrtnih celičnih kulturah, ki so izražale telomerazo, so pokazale, da z njenim zavrtjem povzročimo krajšanje telomer in smrt celic. Glede na daljše telomere v kličnih in matičnih celicah kot v tumorskih celicah in glede na bistveno večjo telomerazno aktivnost v tumorjih kot v normalnih tkivih predvidevamo, da bi bili stranski učinki zdravljenja z zaviralci telomeraze manjši kot pri klasičnem zdravljenju s citostatiki.

Potencialne zaviralce telomeraze lahko glede na mesto delovanja razvstimo v dve skupini: sestavine, ki vplivajo na telomerazo (npr. oligonukleotidi "antisense", peptidne nukleinske kisline, 2'-O-metil-RNA molekule), in sestavine, ki vplivajo na telomere (npr. G-kvadrupleks interaktivna sredstva).

Možne ovire pri zdravljenju z zaviralci telomeraz

Ena izmed mogočih ovir je tako imenovani fenotipski zamik; učinek zaviralcev telomeraz bi bil očiten šele po določenem številu celičnih delitev, ko bi se telomere kritično skrajšale. Vendar pa so s poskusi na tumorskih celicah v kulturi dokazali, da je učinek zaviralcev telomeraze viden hitro, saj so telomere tumorskih celic navadno krajše kot telomere normalnih celic.

Približno 10 % malignih tumorjev pri človeku nima dokazljive telomerazne aktivnosti in vzdržuje dolžino telomer s t. i. alternativnim mehanizmom, najpogosteje z rekombinacijo. Pri teh tumorjih zato lahko pričakujemo, da zdravljenje z zaviralci telomeraze ne bo uspešno.

SKLEP

Vnovična aktivacija encima telomeraze je ključni dogodek pri razvoju večine malignih tumorjev pri človeku in je povezana z razvojem celične nesmrtnosti. Odsotnost oz. majhna stopnja telomerazne aktivnosti v normalnih somatskih celicah nakazuje možnost, da bi lahko z zaviranjem telomerazne aktivnosti učinkovito posegali v zdravljenje malignih tumorjev.

Literatura:

1. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569–73.
2. Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 1999; 180: 10–8.
3. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18: 173–9.
4. Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an update. *Virchows Arch* 2000; 437: 1–16.
5. Shay JW, Wright WE, Werbin H. Loss of telomeric DNA during aging may predispose cells to cancer. *Int J Oncol* 1993; 3: 559–63.
6. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Linger J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997; 277: 955–9.
7. Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 1999; 232: 97–107.
8. De Kok JB, Ruers TJM, van Muijen GNP, van Bokhoven A, Willems HL, Swinkels DW. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. *Clin Chem* 2000; 46: 313–8.
9. Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Gale N. Telomerase re-activation is an early event in laryngeal carcinogenesis. *Mod Pathol* 2003; 16: 841–8.