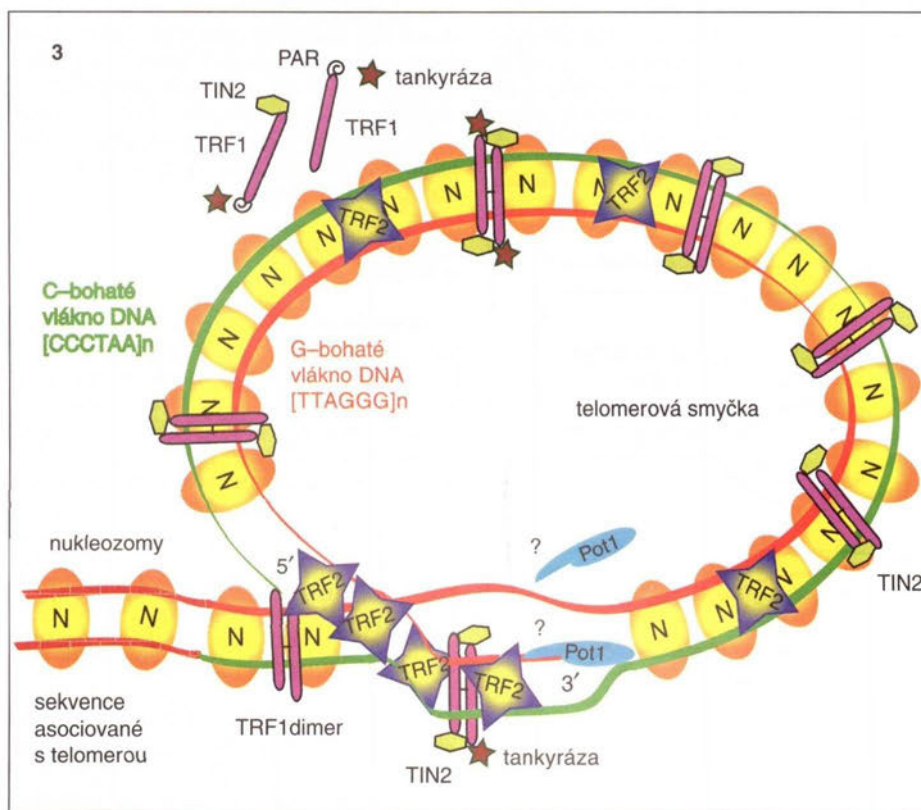
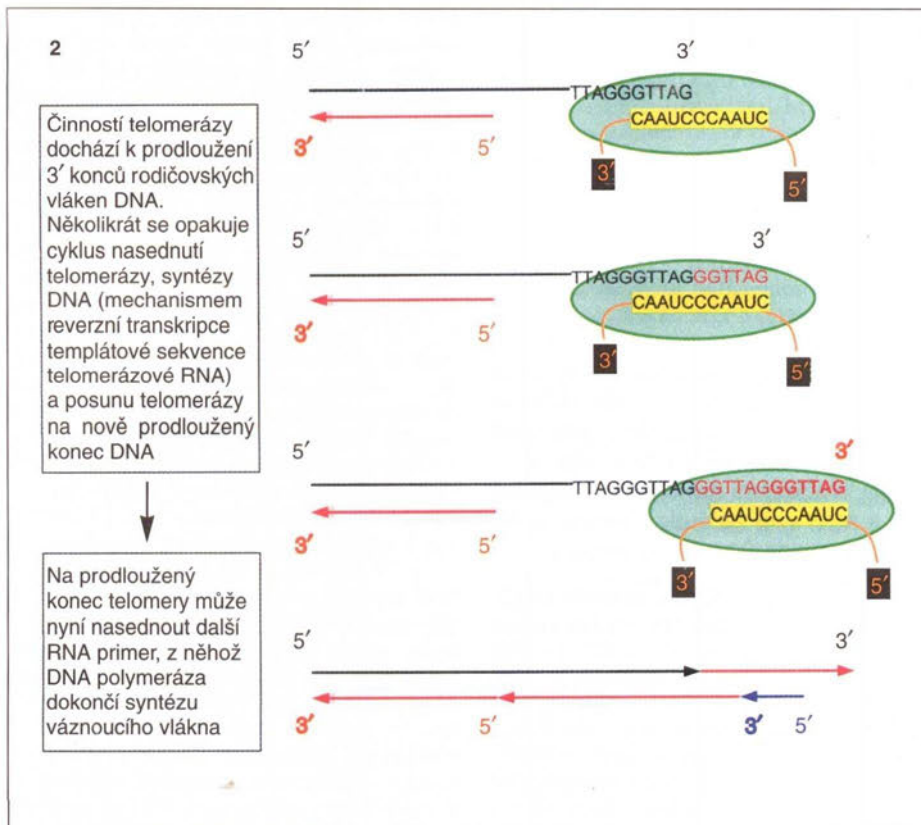




siněk *Saccharomyces cerevisiae*, prvoků a jednobuněčných řas, až 10⁵ bp např. u myši, tabáku nebo rýže). Rozdíly v délkách telomer existují ale také uvnitř druhů (např. u různých kultivarů kulturních rostlin), mezi různými typy tkání téhož jedince a především mezi jednotlivými telomerami v rámci téže buňky. Na tomto místě je vhodné zmínit, že specifická regulace délky telomer na jednotlivých raménkách chromozomů téže buňky patří mezi dosud nevyřešené problémy biologie telomer.

Pro funkci telomery však není zcela zásadní délka telomerové DNA (pokud dosahuje alespoň jakési minimální kritické délky), ale spíše celková struktura, které

nabývá telomerová DNA v komplexu s proteiny. Svou roli zde plní jednak obecně se vyskytující histonové a nehistonové proteiny, které pomáhají (stejně jako v případě vnitřních částí chromozomů) sbalovat telomerovou DNA do nukleozomů a vyšších úrovní kondenzované chromatinové struktury (jinak by se přibližně 2 m genomové DNA člověka vůbec nevešly do buněčného jádra o rozměrech v desítkách mikrometrů), jednak specifické telomer-vazebné proteiny, které společně s telomerovou DNA vytvářejí charakteristickou čepičku. Právě tato čepička umožňuje kontrolním mechanismům buňky rozpoznat telomery jako přirozené konce chromozomů od ne-

Obr. 2 Schéma činnosti telomerázy. Telomeráza, skládající se z proteinové (katalytické) podjednotky s aktivitou reverzní transkriptázy (zelený ovál) a templátové RNA podjednotky (oranžové vlákno, templátová sekvence zvýrazněna žlutě), prodlužuje 3' konec rodičovského vlákna DNA (sekvence vyznačená červeně). Takto prodloužený konec vytváří místo pro doplnění váznučního řetězce o další Okazakiho fragment. Replikativní zkracování je přitom podle aktivity telomerázy kompenzováno buď částečně nebo úplně, event. může dojít i k prodloužení telomery (jak je znázorněno zde) ♦

Obr. 3 Současná představa struktury lidské telomery. Většina dvojvláknové telomerové DNA tvoří nukleozomy (N) ve spojení s histony. Ohybem chromatinového vlákna telomery (za účasti telomer-vazebných proteinů TRF1 a TRF2) vzniká telomerová smyčka. Jednovláknový přesah G-vlákna vniká do dvojvláknové oblasti telomerové DNA za účasti proteinu TRF2. Na tento jednovláknový přesah se váže ochranný protein Pot1. Vazba proteinu TRF1 může být ovlivněna buď negativně jeho poly-ADP-ribosylací (PAR) prostřednictvím enzymu tankyrázy, nebo pozitivně vazbou proteinu TIN2. Orig. J. Fajkuse

opravených chromozomálních zlomů, které vznikají např. účinkem mutagenních faktorů (ionizující záření aj.).

Telomerové proteiny je možno rozdělit na ty, které se vážou na jednovláknové přesahy G-bohatého vlákna telomerové DNA, proteiny s vazbou na dvojvláknovou oblast telomerové DNA a další proteiny, které s těmito proteiny interagují. Výsledkem je vznik složitého nukleoproteinového komplexu, ve kterém je telomerová DNA sbalena do stabilní čtyřřetězce struktury (např. u prvoků *Oxytricha nova* a *Euplotes crassus*, ale tuto schopnost má většina telomerových sekvencí včetně lidské), nebo — v případě delších telomer (typicky u mnohobuněčných eukaryot včetně člověka) do tzv. telomerové smyčky (obr. 3). V ní je dvojvláknová oblast telomerové DNA za účasti proteinů (TRF1, TRF2) ohnuta zpět a zanořením svého jednovláknového přesahu (za účasti proteinu TRF2) do dvojvláknové části telomerové DNA tvoří lasovitou strukturu. Takto je konec telomery nejen odlišen od neopravených chromozomálních zlomů, ale současně uzavřen pro přístup telomerázy. To představuje důležitý kontrolní bod v regulaci syntézy telomer (viz dále). Dojde-li vlivem neúplné replikace v nepřítomnosti telomerázy k takovému zkrácení telomer, kdy již tvorba telomerové smyčky není možná, zastavuje se buněčné dělení a buňka přechází do stavu senescence, čili buněčného stárnutí. Tento stav je charakteristický změnou v zastoupení buněčných proteinů, která vede k následným poruchám metabolismu buňky a zastavení růstu. Ačkoli role telomer jako „počítadla replikací“ byla navržena již před 30 lety, přímý důkaz účasti telomer v buněčném stárnutí byl získán teprve v r. 1998, kdy bylo vnesením genu kódujícího katalytickou podjednotku lidské telomerázy uměle dosaženo prodloužování telomer a následně i neomezeného dělení buněk; podařilo se tak obejít buněčné stárnutí.

V normálních buňkách dochází k zastavení dělení kvůli zkracování telomer ve dvou fázích. První stadium M1 (mortality stage 1) nastává v době, kdy na většině chromozomů zbývá ještě několik kilobází telomerové DNA a je zřejmě zahájeno sig-

Obr. 4 Označení telomer na lidských chromozomech pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Chromozomy jsou barveny propidium-jodidem (červená), telomery s navázanou sondou (značenou fluoresceinem) se jeví jako žluté tečky. Foto M. Skleničková

nalizací poškozené DNA z jedné nebo několika nejkratších telomer. Zastavení růstu je způsobeno tumor-supresorovými proteiny p16/pRB a p53 (Živa 2001, 5: 197–200). Je-li účinek těchto faktorů blokován, buňka pokračuje v dělení a zkracování telomer se prohlubuje, dokud nezačne stadium M2. V této fázi telomery již zcela ztratily svoji ochrannou funkci a jsou rozpoznávány jako neopravené chromozomální zlomy. Další degradace telomer a pokusy opravit krátké telomery pak mají za následek spojování a přeuspořádání chromozomů a rozsáhlou nestabilitu genomu. V této fázi může někdy dojít k aktivaci telomerázy nebo v extrémně vzácných případech k alternativnímu (na telomeráze nezávislému) prodlužování telomer (ALT). Základním mechanismem syntézy telomer v lidských buňkách je však telomeráza.

Lidská telomeráza a její regulace

U člověka je telomeráza aktivní v embryonálních tkáních, v zárodečných buňkách a v buňkách nádorových. Nižší aktivity jsou kromě toho přítomny v obnovujících se tkáních s vysokou schopností růstu a regenerace. Aktivita telomerázy je regulována během vývoje organismu a ve většině somatických tkání dospělého člověka je potlačena na téměř nedetekovatelnou úroveň. Nepřítomnost telomerázy v somatických buňkách má za následek jejich stárnutí, což následně přispívá ke stárnutí tkání, orgánů a těla. Naproti tomu její vysoká aktivita v nádorových buňkách zajišťuje těmto buňkám nesmrtelnost. Proto není divu, že se telomeráza stala žádoucím objektem ve výzkumu stárnutí a rakoviny.

Telomeráza je enzymový komplex tvořený proteinovou katalytickou podjednotkou (hTERT) s aktivitou reverzní transkriptázy (tj. provádí syntézu řetězce DNA podle RNA předlohy) a RNA podjednotkou (hTR), jejíž část slouží jako vzor pro syntézu telomerní sekvence (obr. 2). Kromě těchto nepostradatelných podjednotek tvoří komplex telomerázy ještě další asociované faktory, které se podílejí na sestavování komplexu a modulují jeho aktivitu, avšak pro samotnou reakci nejsou na rozdíl od hTERT a hTR nezbytné. Obě nepostradatelné podjednotky telomerázy jsou regulovány především na úrovni přepisu svých genů do RNA. Přitom, podobně jako u jiných genů, hraje klíčovou roli tzv. promotorová sekvence, z níž přepis genů začíná. Úroveň přepisu je pak výsledkem soutěže o obsazení vazebných míst pro transkripční faktory na promotorové sekvenci. Zatímco RNA podjednotka se vyskytuje, byť ve snížené míře i v buňkách bez aktivity telomerázy, gen pro katalytickou podjednotku je ve většině somatických buněk potlačen a podjednotka hTERT je proto považována za limitující pro aktivitu telomerázy. Kromě regulace na úrovni promotoru se u genu *hTERT* uplatňuje i regulace na úrovni sestřihu primárního transkriptu (hnRNA) do výsledné mRNA. Dalšími regulačními kroky na cestě od genu



hTERT k aktivní telomeráze jsou transportní děje, posttranslační úpravy (fosforylace) a sestavování celého komplexu telomerázy. Avšak i v přítomnosti aktivní telomerázy může být její činnost dále omezena sníženou dostupností konce telomery, např. ve čtyřřetězcové struktuře nebo v telomerní smyčce (obr. 3), jak již bylo uvedeno. Tvorbu a stabilitu těchto struktur spoluurčují telomer-vazebné proteiny. Je tedy zřejmé, že biologie telomer je atraktivním, ale současně i velmi komplexním problémem, jehož postupné řešení odhaluje možné aplikace v medicíně.

Telomery a telomeráza při množení, diferenciaci, stárnutí buněk a při vzniku rakoviny

Kromě úlohy telomer v časoměře buněčného stárnutí byla nedávno potvrzena i možnost „vynulování“ tohoto počítadla. Bylo např. ukázáno, že telomery somatických buněk jsou kratší než telomery zárodečných buněk a zkracují se s věkem jedince. U dětí s vrozeným syndromem časného stárnutí (progerie) jsou telomery podstatně kratší než u stejně starých zdravých jedinců. Pokud je do takových buněk v kultuře vnesen konstrukt kódující katalytickou podjednotku telomerázy, dojde k prodloužení telomer a zvýšení růstové kapacity buněk, aniž by došlo k jejich nekontrolovatelnému nádorovému růstu. Tyto výsledky tak nejen ukazují silnou vazbu mezi aktivitou telomerázy a buněčným růstem, ale současně i to, že aktivace telomerázy pozorovaná u většiny nádorů (viz níže) není sama příčinou maligního zvrhnutí.

Oproti původním očekáváním byla telomeráza nalezena i v některých normálních množících se (proliferujících) somatických buňkách: např. mitogenní stimulace lymfocytů způsobuje aktivaci telomerázy; telomeráza byla dále odhalena v buňkách bazál-

ní vrstvy kůže, děložní a střevní sliznice. Naopak řada primárních buněčných typů, jako jsou fibroblasty, buňky prsního epitelu nebo embryonální buňky ledvin neexprimují telomerázu, ani když se množí.

Při diferenciaci dochází k útlumu telomerázy, což lze pozorovat na úrovni tkání i u různých buněčných linií při navození diferenciaci chemickými činidly; to ukazuje protikladný vztah hladiny telomerázy k procesům bujení a diferenciaci.

Hlavní úlohou telomerázy v nádorových buňkách je navození jejich nesmrtelnosti (imortalizace), která umožňuje jednak hromadění dalších mutací prohlubujících zhoubný charakter buněk, jednak neomezený růst nádorového klonu. Reaktivace nebo zvýšení hladiny telomerázy mohou být způsobeny mutacemi faktorů podílejících se na jejím potlačení. Bylo však jasně prokázáno, že ačkoli exprese telomerázy a následná imortalizace je jedním ze znaků maligních buněk, nezpůsobuje exprese telomerázy v normálních buňkách jejich přeměnu ve zhoubné nádorové buňky s typickými projevy, jako jsou ztráta kontaktní inhibice (inhibice pohybu a množení buněk v tkáňové kultuře, jež vyplývá z kontaktu s buňkami stejného typu), ztráta kontroly buněčného cyklu, nízké požadavky na růstové faktory nebo změny v karyotypu.

Aktivace telomerázy v nádorových buňkách je v současné době základem molekulární diagnostiky nádorů — dosavadní výzkum u přibližně 30 typů nádorů ukázal u jednotlivých typů výskyt telomerázy v rozmezí 70–96 % případů, což z telomerázy činí nejuniverzálnější známý nádorový marker. V praxi se používá nejčastěji stanovení aktivity telomerázy technikou TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol) v buněčných extraktech. Její princip spočívá v prodlužování krátkého řetězce DNA ve zkoumaném extraktu a následném pomnožení produktu pomocí polymerázové řetě-

zové reakce. Aktivita se zjistí z množství a délky vznikajících produktů. Kromě aktivity telomerázy je možné analyzovat také hladinu jejich podjednotek v buněčných extraktech nebo přímo v buňkách a na tkáňových řezech. V některých případech je žádoucí analýza délky telomer, která se provádí běžně na izolované DNA. Informativnější je ovšem analýza telomer přímo na jednotlivých chromozomech (*in situ*, obr. 4), která umožňuje detekci i přibližné vyhodnocení délky jednotlivých telomer, zejména pro zjištění případů jejich extrémního prodlužování mechanismem alternativního prodlužování (ALT). Vedle toho analýza délky telomer u většiny typů nádorů ukazuje přítomnost stabilních telomer zkrácených na zlomek jejich původní délky. To svědčí o tom, že k aktivaci telomerázy dochází zpravidla ve stadiu M2 (viz kapitola Struktura a funkce telomer). Primární příčinou maligního zvrhnutí tedy bývá mutace v kontrolních systémech zajišťujících jinak replikační blok již ve stadiu M1, takže klon buněk pokračuje v bujení až do kritického zkrácení telomer, a teprve v této fázi dochází v některých buňkách k aktivaci telomerázy a imortalizaci.

Protinádorová terapie založená na inhibici telomerázy

Vzhledem k tomu, že telomeráza je téměř univerzálním znakem a faktorem navozujícím nesmrtelnost nádorových buněk, stala se žádoucím cílem nejen v onkologické diagnostice, ale též v hledání nových léčebných přístupů v onkologii, které by mohly přinést požadovaný terapeutický efekt s minimálními vedlejšími účinky. Nicméně fakt, že telomeráza není přítomna pouze v nádorových buňkách, ale je potřebná v regenerujících se tkáních, kmenových buňkách a v zárodečných buňkách, vede k nutnosti řešit otázky nechtěných účinků protitelomerázové terapie.

Pro kmenové buňky je výhodou, že jejich telomery jsou několikanásobně delší než telomery nádorových buněk. Tento rozdíl by mohl představovat dostatečný prostor pro použití protitelomerázové léčby. Navíc kmenové buňky proliferují s dlouhými přestávkami a během klidového období jsou jejich požadavky na syntézu telomer minimální.

Dalším možným problémem je prodleva v účinku této terapie: její výsledek se dostaví až při úplné ztrátě funkčních telomer. Proto se předpokládá aplikace protitelomerázové terapie spíše na malá množství buněk (pro zabránění metastázám), zatímco u vyvinutých nádorů je žádoucí jejich předchozí chirurgické nebo chemoterapeutické odstranění.

Snad posledním zatím uvažovaným problémem je existence nádorů využívajících na telomeráze nezávislý ALT mechanismus (asi 10 % případů), které by byly k protitelomerázové terapii rezistentní; řešením je hledání účinných inhibitorů ALT pro dosažení úplné inhibice syntézy telomer.

Strategií pro útlum telomerázy, rozpracovávaných alespoň v experimentech na buněčných kulturách a experimentálních zvířatech, je v současné době celá řada. První skupina těchto přístupů je zaměřena proti katalytické podjednotce telomerázy hTERT. Patří sem v první řadě aplikace inhibitorů reverzní transkripce, jako je ddGTP nebo azidothymidin (AZT), které se použí-

vají i pro léčbu AIDS. U těchto činidel lze však stěží hovořit o specifickém účinku. Další možností je přeměna buněk konstruktů (cíleně upravenými nebo uměle připravenými úseky DNA, které po vnesení do cílových buněk zabezpečují — zpravidla kontrolovatelnou — syntézu požadovaného produktu, RNA nebo proteinu) exprimujícími dominantně-negativní (mutantní) hTERT, která postrádá katalytickou aktivitu, avšak váže hTR podjednotku a ta se pak nedostává pro sestavení funkční telomerázy. Katalytickou podjednotku nebo části její aminokyselinové sekvence je také možno použít jako antigen pro vyvolání imunitní reakce proti buňkám nádorů, kde je hTERT přítomna. Možným problémem této imunoterapie založené na vakcinaci hTERT-peptidy je autoimunní odpověď proti vlastním kmenovým a zárodečným buňkám. V dosud zveřejněných studiích k ní však nedošlo. Značnou výhodou tohoto přístupu je okamžitý účinek. Další možností je využít jako cíle promotor genu *bTERT*, který je pro expresi telomerázy rozhodující. Na tomto poli se testuje genová terapie pomocí konstruktů, v nichž je umístěn sebevražedný gen pod kontrolou *bTERT* promotoru. V nádorových buňkách dojde k aktivaci tohoto promotoru a k vyjádření sebevražedného genu. Výsledkem je specifická smrt nádorových buněk. Jinou variantou tohoto přístupu je použití thymidinkinázy jako sebevražedného genu pod kontrolou promotoru *bTERT*. Exprimující buňky se v tomto případě přímo nelyzují, ale stávají se citlivými na léčivo gancyklovir.

Další velká skupina protitelomerázových strategií je zaměřena proti RNA podjednotce telomerázy (hTR). Do ní patří konstrukty exprimující tzv. hammerhead ribozymy. Jsou to malé molekuly RNA vykazující endoribonukleázovou aktivitu (štěpení uvnitř řetězce RNA) přítomnou ve své katalytické doméně, a rozpoznávací sekvenci pro cílovou RNA — v tomto případě pro část hTR — ve zbytku své molekuly. Jiným, velmi přímočarým přístupem jsou nejruznější antisense strategie (protismyslové), při nichž se využívá buď konstruktů kódujících tvorbu antisense RNA (komplementární RNA) k hTR podjednotce v buňce, nebo přímé vnášení antisense oligonukleotidů, event. PNA (peptide-nucleic acids) do buněk. [PNA jsou molekuly o struktuře podobné nukleovým kyselinám, avšak na rozdíl od nich je cukr-fosfátová páteř řetězce nahrazena páteří peptidovou. Díky tomu jsou odolné k enzymům štěpícím nukleové kyseliny.]

Nadějným směrem je využití nízkomolekulárních látek interagujících s telomermi, zejména činidel stabilizujících čtyřřetězcovou strukturu G-přesahu telomerové DNA (deriváty antrachinonu, porfyriny, akridiny a fluorenony) a tím inhibujících činnost telomerázy. Bohužel však dosud testované látky vykazují rovněž určitou míru nespecifické vazby na DNA a RNA.

U řady jiných nízkomolekulárních látek, např. katechinů z čaje nebo berberinu a jeho derivátů syntetizovaných cíleně ke zvýšení inhibičního efektu není mechanismus zcela objasněn, avšak zřejmě interagují přímo s komplexem telomerázy. Výsledky jsou natolik povzbuzivé, že některé z těchto derivátů jsou již ve stadiu klinických zkoušek.

Lze předpokládat, že kromě uvedených intervenčních strategií je snad optimální

možností využít přímo buněčné faktory účastníci se přirozené regulace syntézy telomer v buňce.

Možnosti buněčného a tkáňového inženýrství

Ačkoli by se z předchozího textu mohlo zdát, že telomeráza představuje obávaného nepřítele, proti němuž je třeba bojovat, může být naopak obnova její aktivity velmi užitečná v řadě medicínských aplikací. Důkaz, že navozená exprese katalytické podjednotky (hTERT) postačuje k obnově aktivity telomerázy (určitá nízká exprese hTR zpravidla v buňce je) a zvýšení proliferativní kapacity buněk, umožnil imortalizovat normální buňky řady tkání, aniž by došlo k jejich zhoubné transformaci. Je tak možné vyvíjet lepší buněčné modely různých lidských onemocnění a produkovat v neomezené míře normální lidské buňky nejruznějších tkáňových typů. Možnost omlazení dárcovských buněk nebo přímo buněk pacienta může být nesmírně významná na poli genových terapií a transplantací.

Ukázalo se, že nízká exprese hTERT stabilizuje přednostně krátké telomery. Vnesení hTERT do buněk nemá za následek maligní transformaci — kontrola buněčného cyklu a další charakteristiky jsou u těchto buněk srovnatelné s kontrolními buňkami, a tyto buňky nezpůsobují nádory u myši s cíleně potlačenou imunitou. Pro transplantační účely byl vyvinut systém pro přechodnou expresi hTERT. Krátkodobá exprese hTERT s využitím tohoto systému v lidských fibroblastech je dostatečná pro zachování funkčních telomer a pokrývá zvýšení jejich proliferativní kapacity o 50 %. Byly již provedeny úspěšné transplantační pokusy, při nichž byly takto upravené hovězí buňky z kůry nadledvinek transplantovány myším s potlačenou imunitou. Z transplantovaných buněk se u myši vytvořila tkáň produkující hormon kortizol, a tato tkáň nevykazovala maligní znaky.

Tyto výsledky odrážejí současný stav buněčného a tkáňového inženýrství založeného na vnesení *bTERT* genu. Jeho budoucí perspektivy zahrnují přípravu medicínských a komerčně významných proteinů, oddálení či zpomalení stárnutí určitých tkání, omlazování hematopoetických kmenových buněk pro zlepšení transplantací kostní dřeně nebo zvýšení imunity starších pacientů. Tato technologie může být dále využita ke zvýšení proliferativní kapacity buněk při chronických kožních vředech, k navození nesmrtelnosti buněk tvořících chrupavku (chondrocytů) při nápravě poškozených kolenních kloubů, k přípravě buněk pro kostní štěpy a endoteliálních buněk pro tvorbu cévních náhrad. Telomerizované buňky oční sítnice by mohly být použity pro nápravu jejich degenerativních nebo poúrazových změn. Obecnou výhodou těchto přístupů by bylo použití vlastních buněk pacienta, a tím odstranění problémů s odvržením štěpu.

Naplnění perspektiv buněčného a tkáňového inženýrství, stejně jako účinné terapie nádorů na bázi útlumu telomerázy závisí především na detailním porozumění biologii telomer. Pokroky dosažené na tomto poli v poměrně krátké době od objevu telomer a telomerázy opravňují i přes množství zbývajících práce přinejmenším k opatrnému optimismu.