

Л10. Теломераза – обратная транскриптаза

Зачем нужна клетке и как её используют раковые клетки.
Мишень для терапии многих видов рака.

План

1. Функция OT = RT
2. Кому и зачем нужна (вирусы, прокариоты, эукариоты)
3. Кто у кого заимствовал – тёмная история для биоинформатиков
4. Кольцевая хромосома
5. Репликация линейной хромосомы.
6. РЕПЛИКАЦИЯ
7. Строение концов хромосом – теломеры
8. Функция hTERT
9. Значение экспрессии hTERT для деления клеток
10. Регуляция экспрессии hTERT
11. Возраст клеток человека
12. Раковые клетки
13. Идея терапии на снижение экспрессии hTERT

1. ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПТАЗА



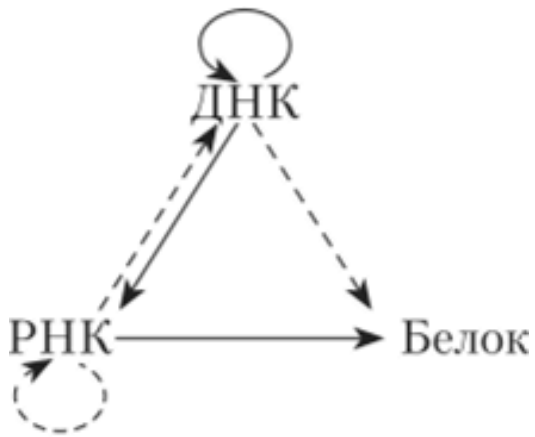
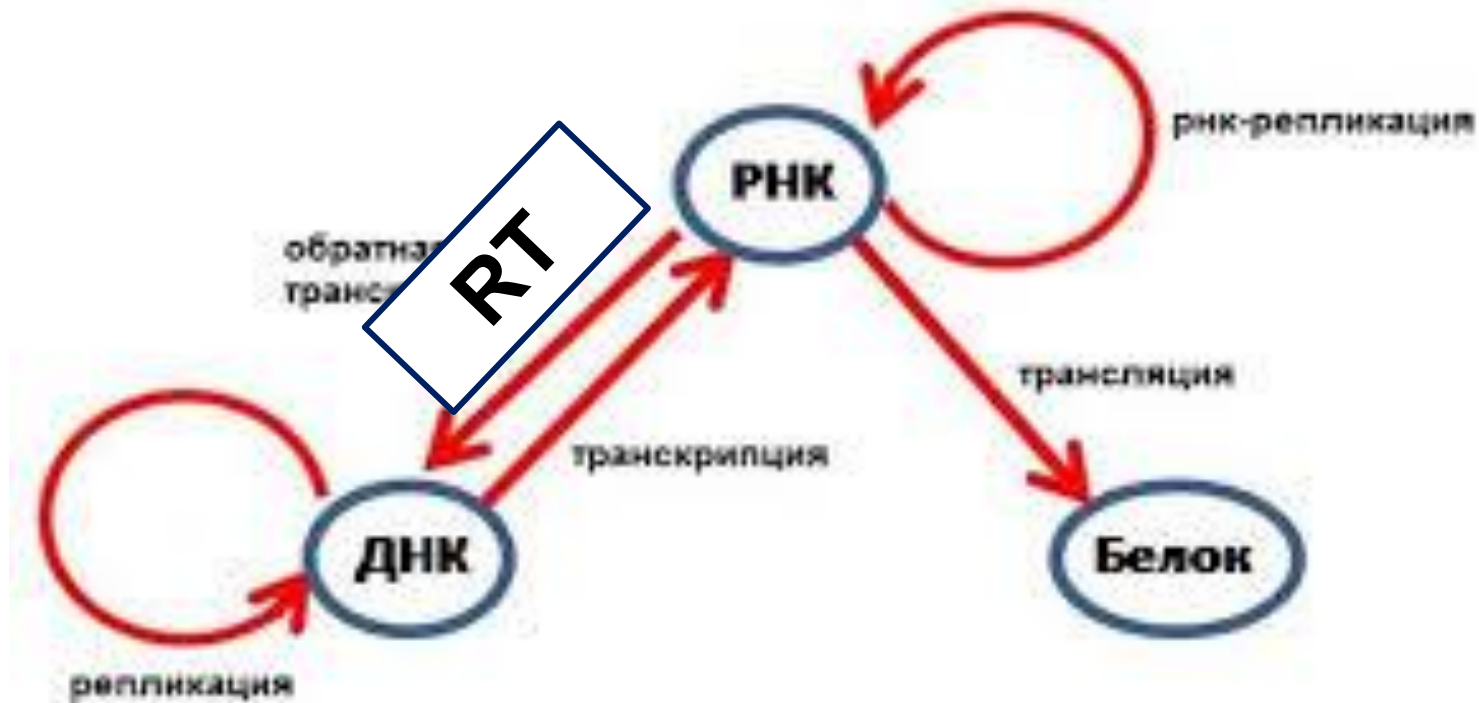
The Central Dogma

This states that once 'information' has passed into protein *it cannot get out again*. In more detail, the transfer of information from nucleic acid to nucleic acid, or from nucleic acid to protein may be possible, but transfer from protein to protein, or from protein to nucleic acid is impossible. Information means here the *precise* determination of sequence, either of bases in the nucleic acid or of amino acid residues in the protein.

This is by no means universally held—Sir Macfarlane Burnet, for example, does not subscribe to it—but many workers now think along these lines. As far as I know it has not been *explicitly* stated before.

F.Crick, 1958

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПТАЗА (RT)



Такой рисунок называют “Треугольником Крика” хотя он его не рисовал(((

2. Кому и зачем нужна обратная транскрипция: РНК => ДНК?

- **Некоторым РНК вирусам, например, ВИЧ.** Для размножения РНК ВИЧ попадает в клетку. В клетке ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПТАЗА вируса делает из своей РНК цепочку ДНК. дц.ДНК проникает в ядро и другой вирусный белок встраивает эту дцДНК в геном хозяина.
- **Бактериям и археям** для размножения “эгоистичных” элементов (интроны группы II) и для защиты от фагов (ретроны)
- **Молекулярным биологам** для секвенирования РНК
- У нас, эукариот,
 - **Для эгоистичных ретротранспозонов**
 - **Теломераза** участвует в репликации хромосом

3. Происхождение обратной транскриптазы RT- reverse transcriptase

- Есть во всех ветвях жизни
- Можно предположить, что она была у гипотетического общего предка живого – LUCA
- Хотя, у неё нет ОДНОЙ ПОНЯТНОЙ биологической роли. Часто она является мобильным эгоистичным генетическим элементом (прокариоты, эукариоты).
- У живого всё лишнее приобретает новую роль (ИМ) – теломераза, вирусы, ретроны.
- Кто у кого заимствовал RT – тёмная история
- Опубликованы спекуляции, что при возникновении эукариот RT имели важную роль
- На будущее – работа для эволюционистов, биоинформатиков и др.))) сравнить последовательности консервативных участков RT

BOX 1.

Role of group II introns in the origin of eukaryotic life

RTs may have played a key role in the transition from the simplest RNA molecules to the current DNA world (Iyer, Koonin and Aravind [2003](#); Mustafin and Khusnutdinova [2019](#)).

RNA-dependent RNA polymerases (RdRP) are thought to be the evolutionary ancestors of the RT protein family (Ellefson *et al.* [2016](#); Koonin *et al.* [2020](#)).

There has been considerable speculation about the evolution of RTs since the most recent common ancestor (Eickbush [1997](#); Curcio and Belfort [2007](#)). In this scenario, **group II introns are believed to be one of the drivers of eukaryotic evolution,**

González-Delgado et al., Prokaryotic reverse transcriptases: from retroelements to specialized defense systems. 2021

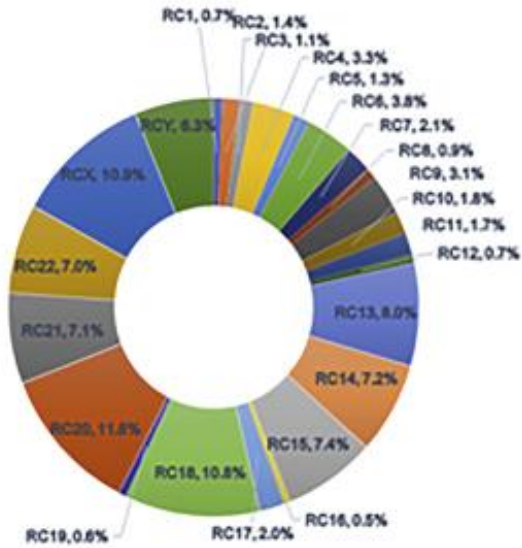
4. У эукариот (нас) хромосомы все линейные

- Точно?
- НЕТ – это биология.
- У людей бывают кольцевые хромосомы, произошедшие из обычных хромосом!!
- Вызывают патологии

Кольцевые хромосомы человека

- Human ring chromosomes (RCs) are rare diseases with an estimated newborn incidence of 1/50,000 and an annual occurrence of 2,800 patients globally.
- Ring syndrome featuring severe growth retardation and variable intellectual disability has been considered as general clinical presentations for all RCs due to the cellular losses from the dynamic mosaicism of RC instability through mitosis.
- Clinical heterogeneity, including chromosome-specific deletion and duplication syndromes, gene-related organ and tissue defects, cancer predisposition to different types of tumors, and reproductive failure, has been reported in the literature. However, the patients with RCs reported in the literature accounted for less than 1% of its occurrence.
- On the analysis of 207 patients with a ring autosome, approximately 20% of them showed extreme growth failure, no major malformations, none or only a few unspecific minor anomalies, and/or otherwise almost normal appearance, which could be regarded as ring syndrome
- УСТОЙЧИВОСТЬ ЖИВОЙ СИСТЕМЫ!!!

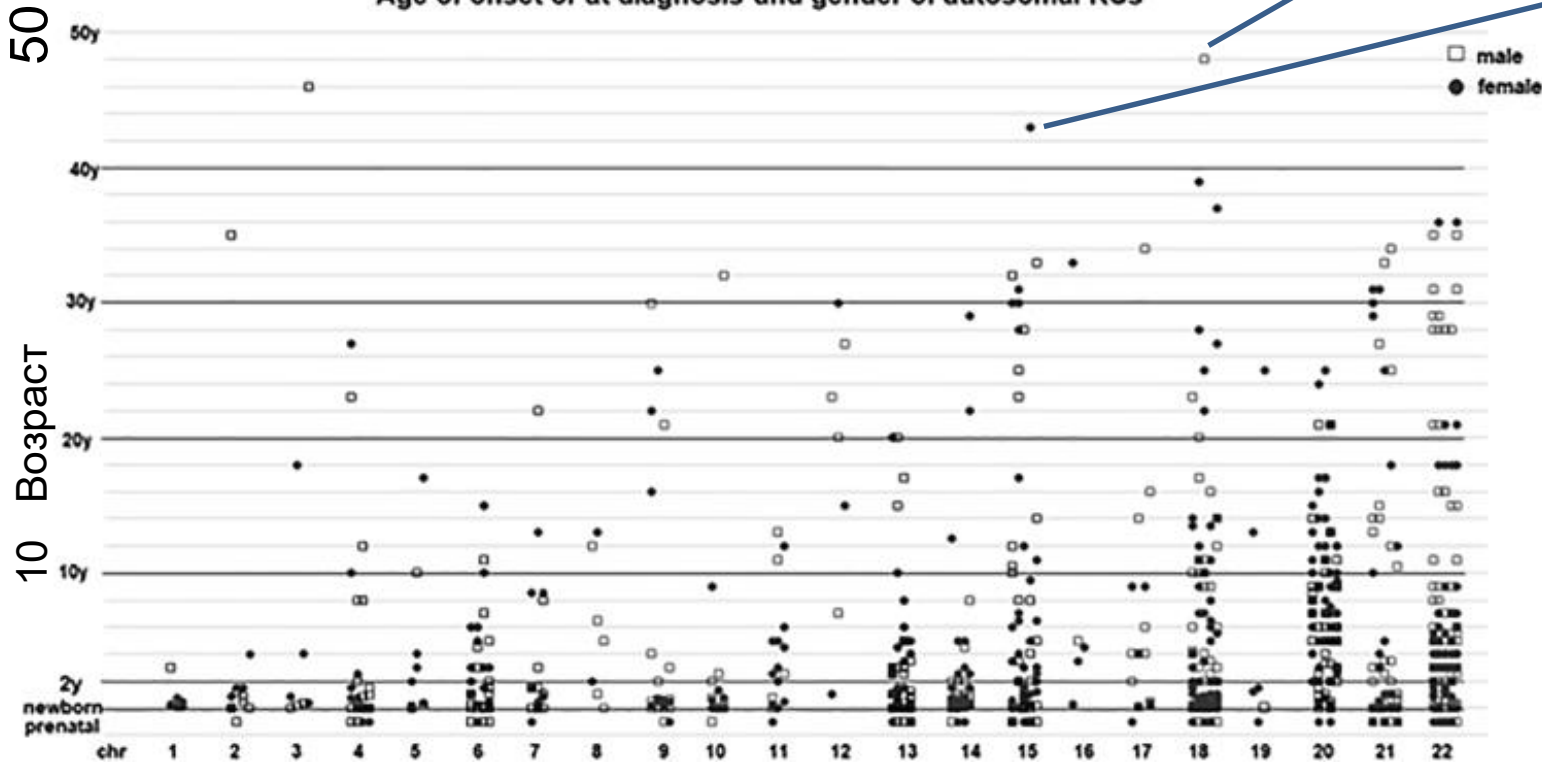
Relative Frequency of RCs



Gene Number and Relative Frequency of RCs



Age of onset or at diagnosis and gender of autosomal RCs

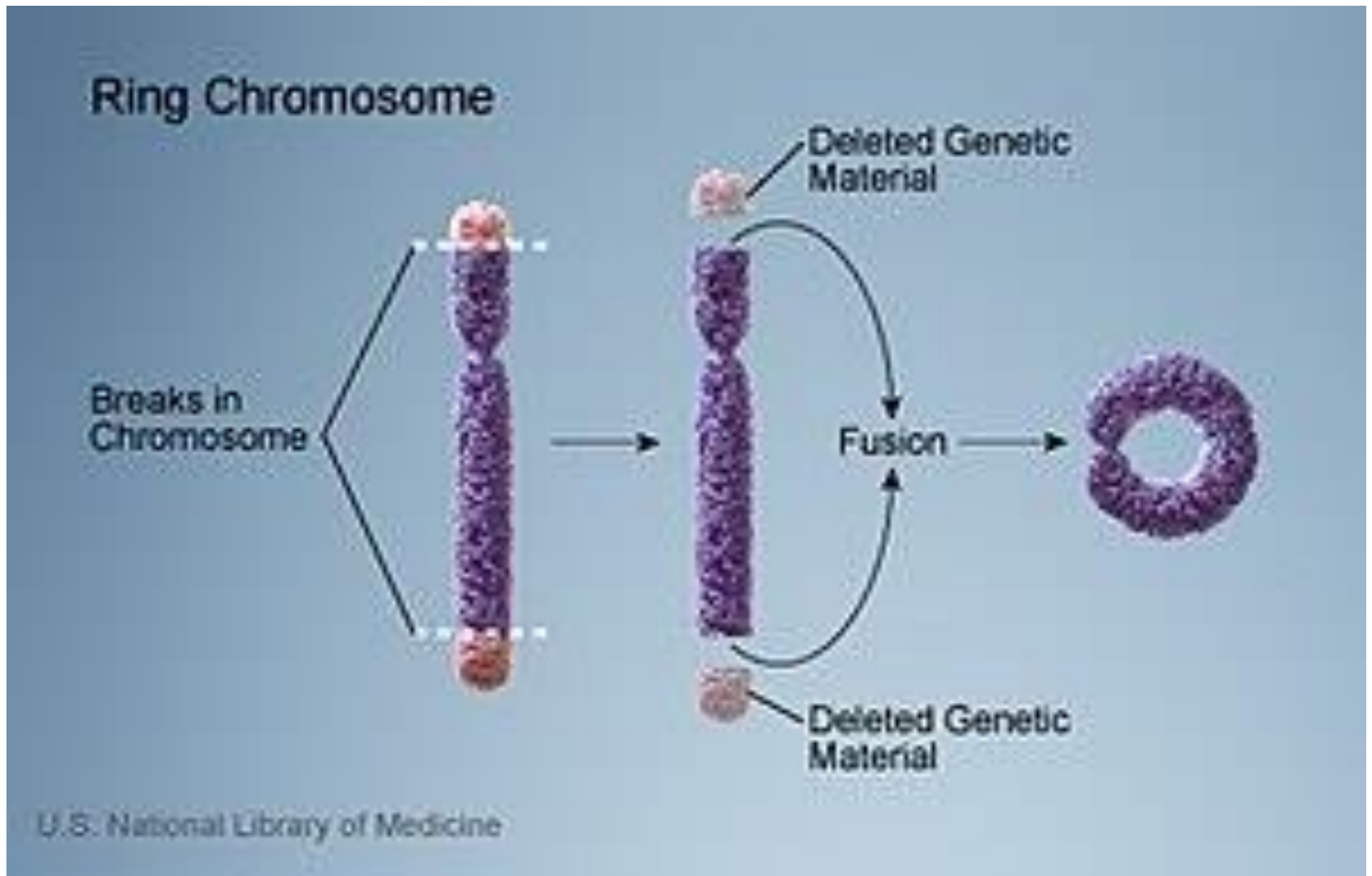


Male

Female

Li et al. The past, present, and future for constitutional ring chromosomes: A report of the international consortium for human ring chromosomes. HGG Adv. 2022

Образование кольцевых хромосом



5. Репликация линейной хромосомы.

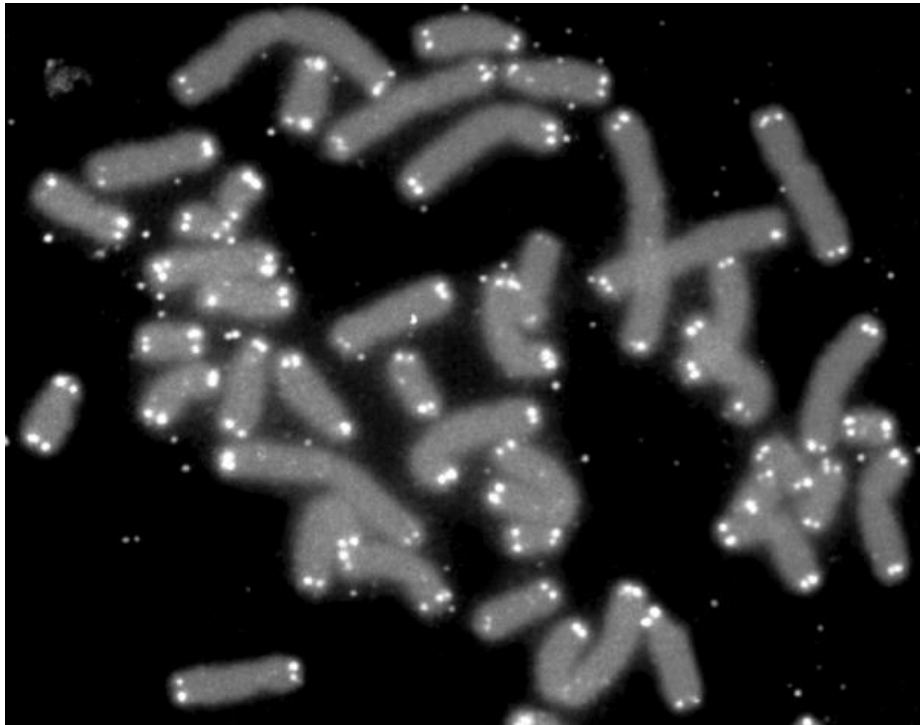
- Для деления клетки необходима репликация (удвоение) всех ДНК в ядре клетки – хромосом.
- Репликаза – комплекс белков, удваивающий ДНК хромосомы, – не в состоянии реплицировать “один к одному” концы линейной хромосомы. В результате ДНК хромосомы укорачивается примерно на несколько десятков п.н.
- Укорочение ДНК грозит гибелью клетки. Дойдёт до урезания генов и кранты.
- В эволюции эукариот нашелся выход. Для восстановления длины ДНК была приспособлена обратная транскриптаза TERT.
Из головы не придумаешь как))) (Оловников придумал)
- Изобретение в эволюции простое по задумке и сложное по реализации.
- TE в TERT от слова Теломераза.

Теломеры и теломераза

- У **ПОЗВОНОЧНЫХ** конец ДНК хромосомы состоит из десятков, сотен, тысяч повторов би нуклеотидов:

5'..... **TTAGGG** TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG 3'

- У других типов (например, **насекомых**) тоже **есть повторы**, но **последовательность другая**



Теломеры представлены яркими пятнами на концах каждой хромосомы на микрофотографии

6. РЕПЛИКАЦИЯ

- Цепочка ДНК устроена так, что достраиваться может только с 3' конца
- При репликации **лидирующая цепочка ДНК** – та, которая направлена от 3' конца к 5' концу, – достраивается ДНК полимеразой до дц ДНК непрерывно до конца ДНК.
- **Отстающая цепочка ДНК** – та, которая направлена от 5' конца к 3' концу, – достраивается ДНК полимеразой до дц ДНК фрагментами Оказаки

см. след. слайд

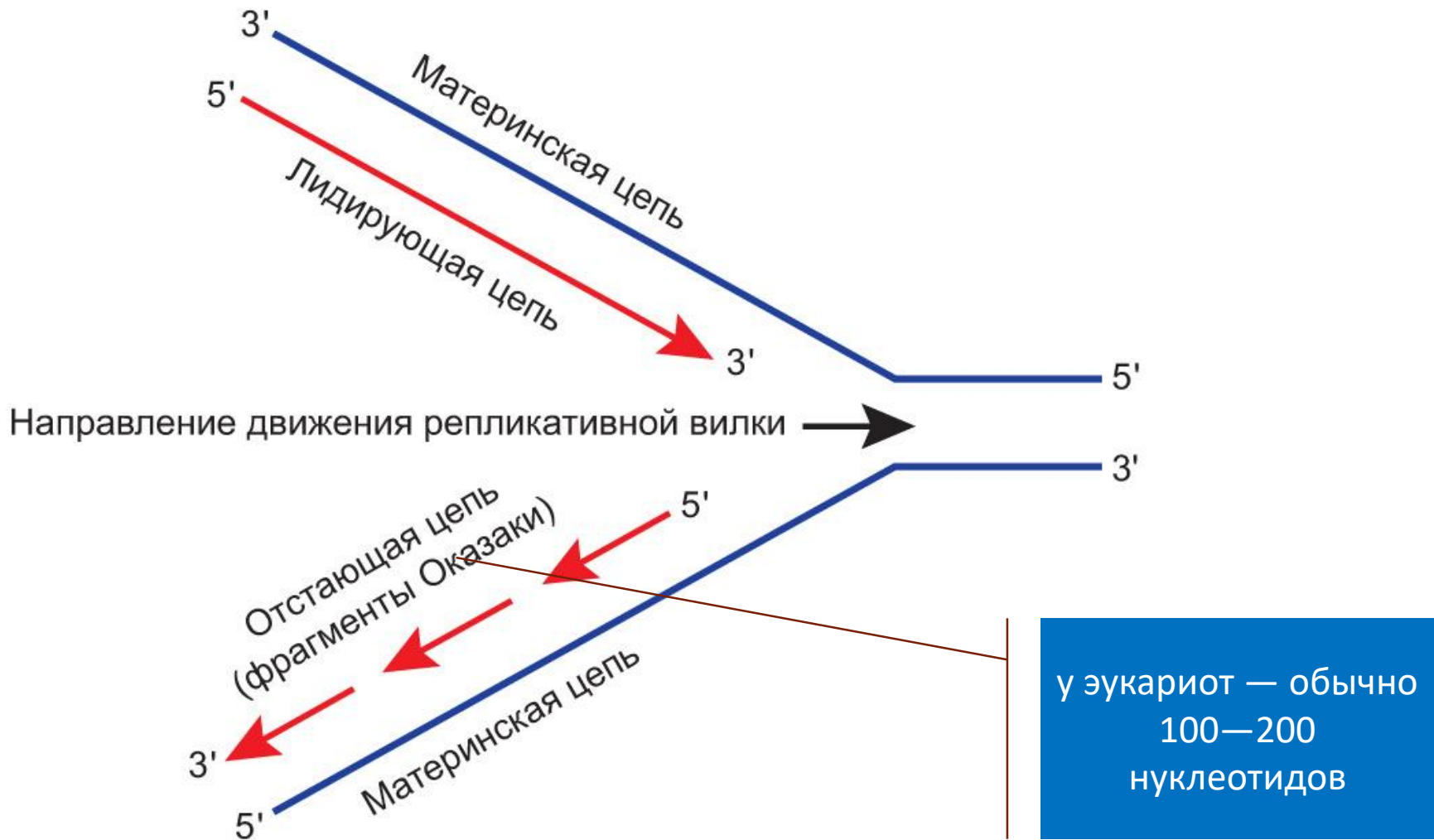
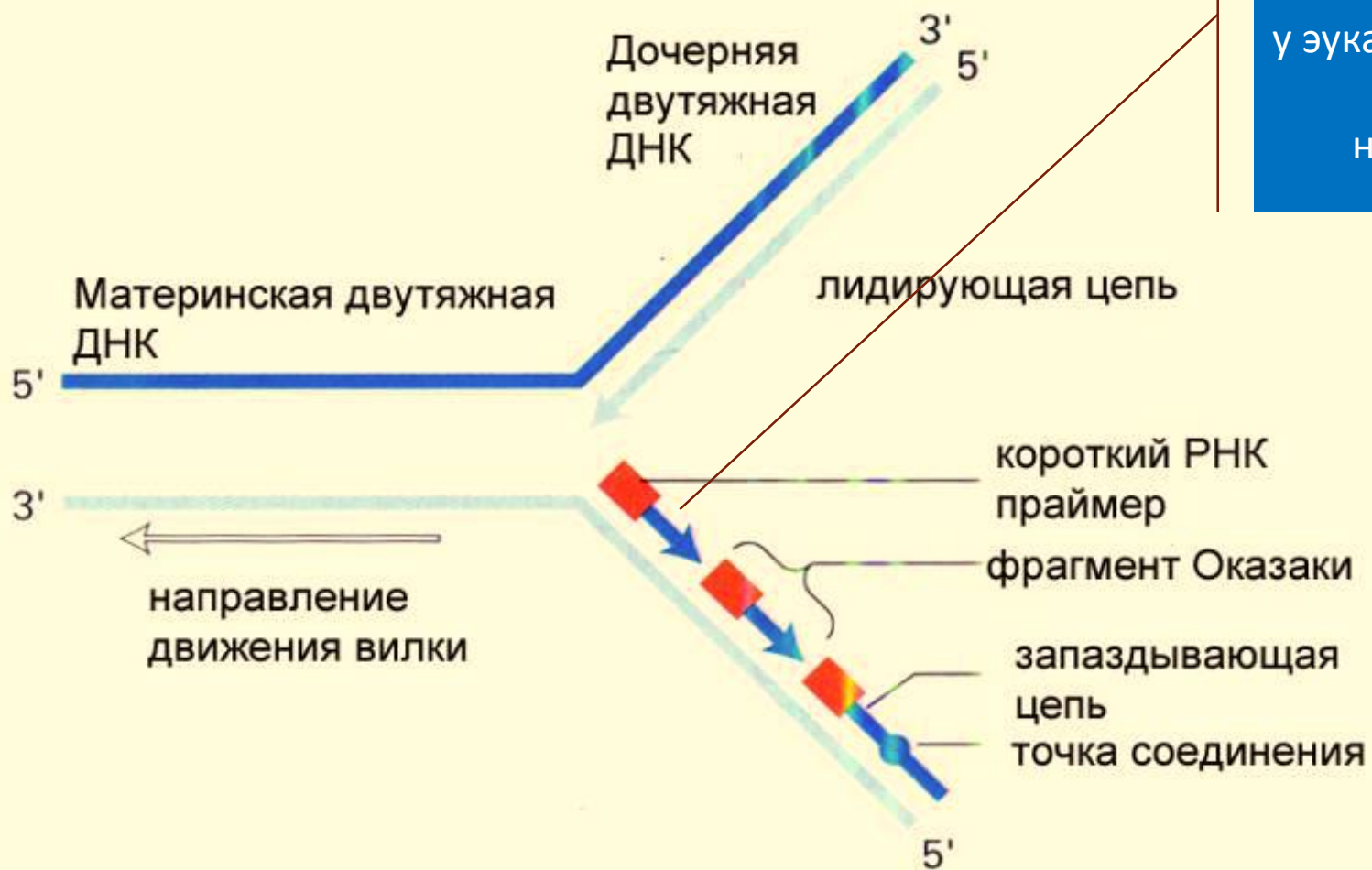


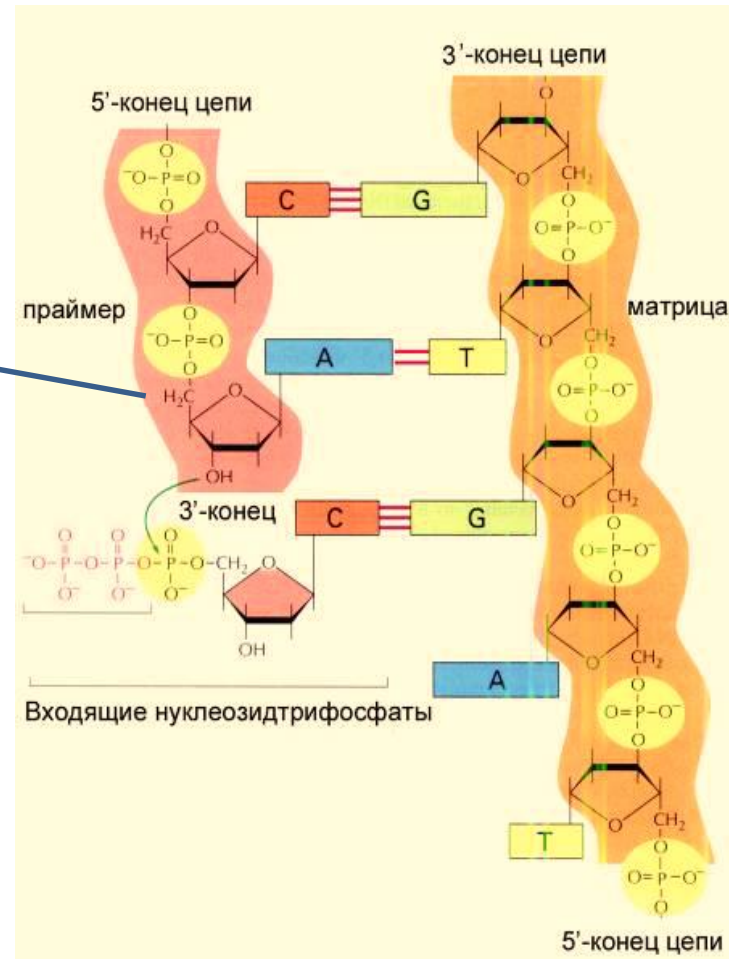
Рис. 16.5. Схема наращивания дочерних цепей ДНК в процессе репликации



у эукариот — обычно
100—200
нуклеотидов

Для начала репликации фрагмента Оказаки нужен **праймер** - короткий фрагмент ДНК или РНК комплементарный ДНК и связанный с ней по комплементарности

Праймер

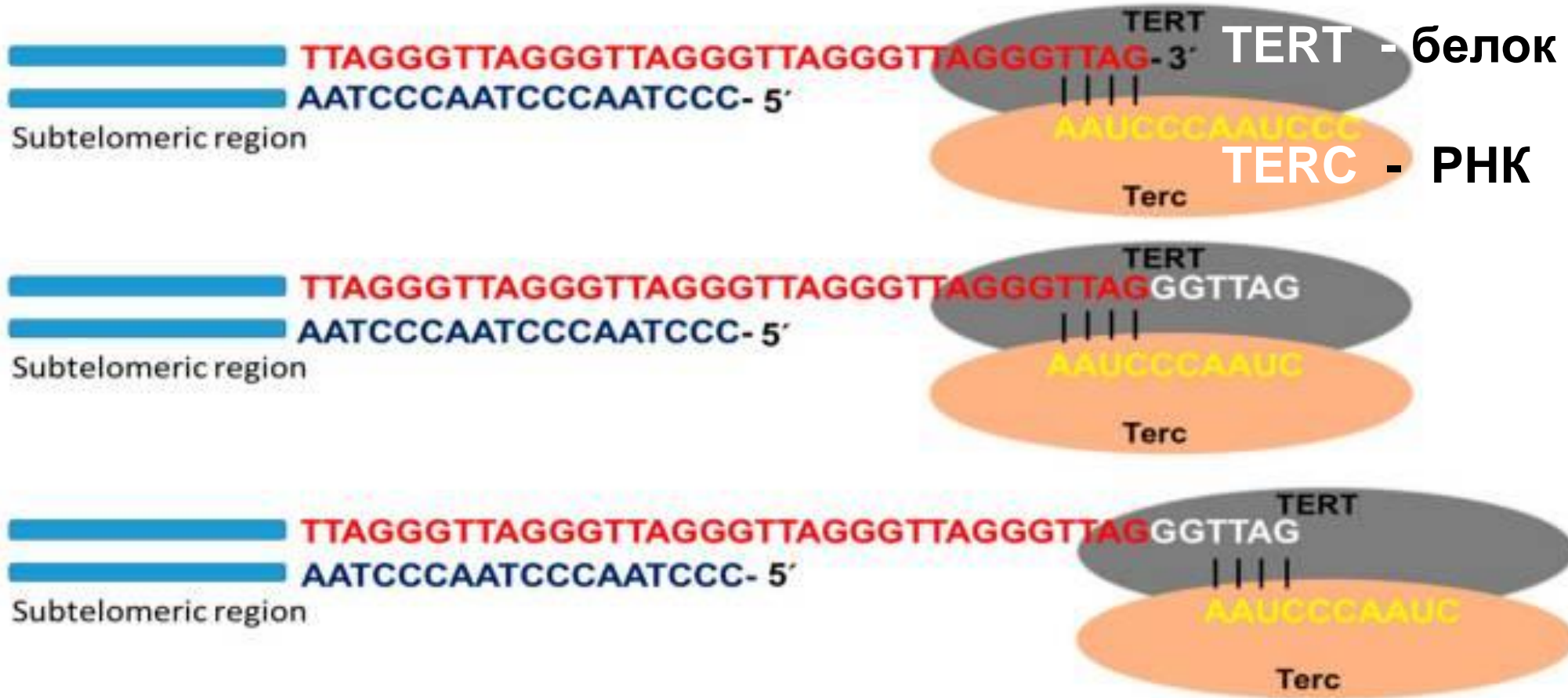


7. Теломеры и теломераза

- Лидирующая цепочка ДНК достраивается до конца
- Отстающая цепочка ДНК не может быть достроена до конца, так как нет места для фрагмента Оказаки.
- Terminate with 3' single-stranded-DNA overhang ranging from 75 to 300 bases
- Теломераза достраивает **3' конец отстающей цепи** для того, чтобы образовался участок одноцепочечной материнской цепи, достаточный для праймера и фрагмента Оказаки
- Для достройки, белок TERT связан с РНК **TERC**, в которой есть участок комплементарный последовательности теломера.

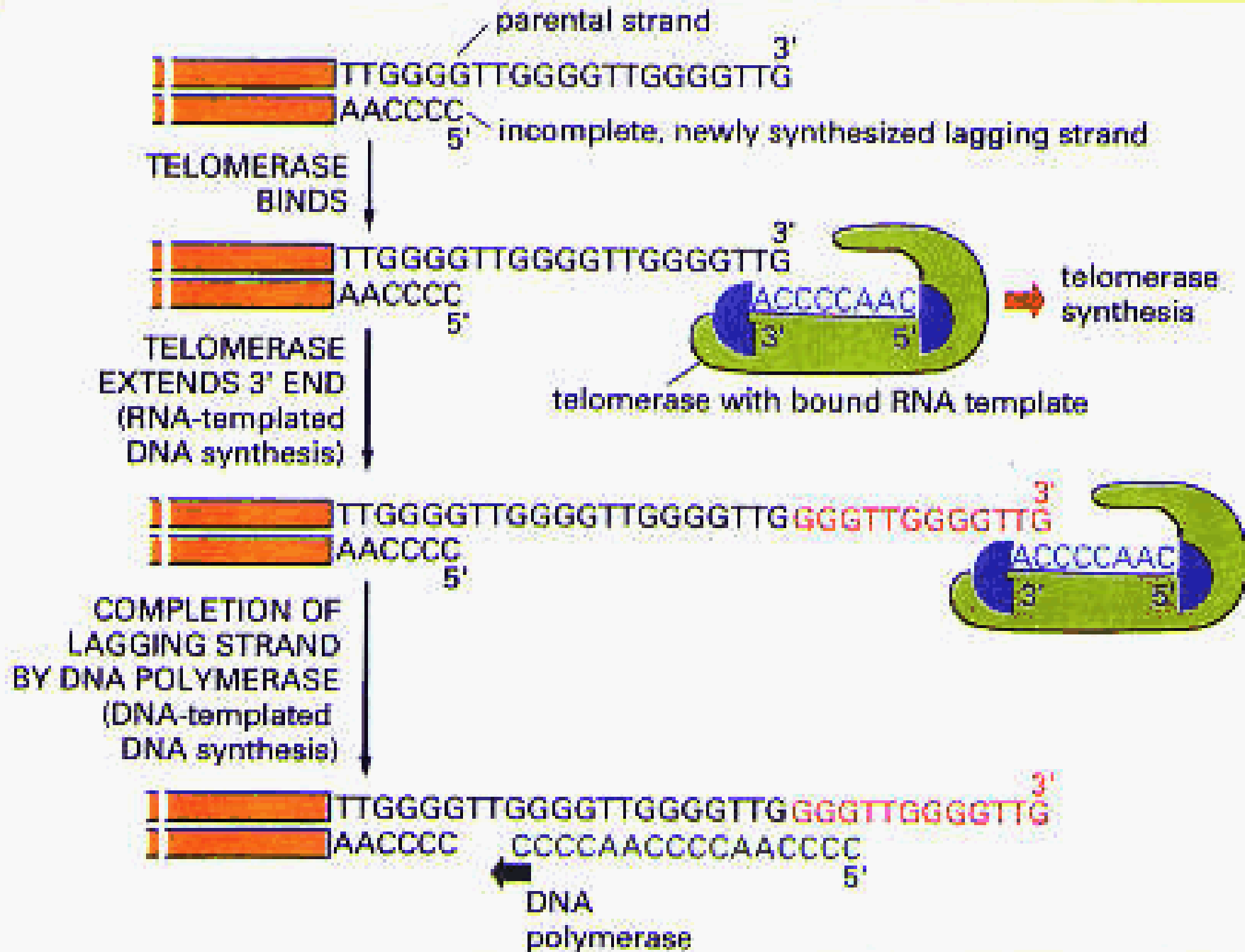
Теломер TTAGGG**TTAGGGTTAGGG**
TERC **AAUCCCAAUC** (451 нукл)

U- урацил, заменяющий Т в РНК



de Bardet et al. Cell immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention. BioTech (Basel). 2023

Здесь **альтернативная посл. теломеров** из опухолевых клеток



Существование механизма, компенсирующего укорочение теломер (теломеразы), было предсказано в 1973 году **А. М. Оловниковым**.



Теломераза является **обратной транскриптазой**, причём с ней связана особая молекула **РНК**, которая используется в качестве матрицы для обратной транскрипции во время удлинения теломер.

За открытие защитных механизмов хромосом от концевой недорепликации с помощью теломер и теломеразы в 2009 году присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине австралийке, работающей в США, **Элизабет Блэкбёрн**, американке **Кэрол Грейдер** и её соотечественнику **Джеку Шостаку**.



8. Предел Хейфлика

Клетки человека, делящиеся в **клеточной культуре**, умирают приблизительно после 50 делений и проявляют признаки **старения** при приближении к этой границе. (Хейфлик, 1961)

Граница Хейфлика найдена в культурах соматических клеток других **многоклеточных организмов**. **Максимальное число делений** клетки **различно в зависимости от её типа** и ещё сильнее различается в зависимости **от вида организма**, которому эта клетка принадлежит.

Граница Хейфлика связана с сокращением числа теломер. При каждом делении теломеры укорачиваются.

Теломеры человека в лимфоцитах периферической крови укорачиваются со скоростью **примерно 70 пар нуклеотидов в год**,

Теломеры мышей укорачиваются со скоростью **7000 пар нуклеотидов в год**.

У людей теломеры длиной **от 5 до 15 тысяч пар нуклеотидов**,

У мышей длина теломер может составлять **около 50 тысяч пар нуклеотидов**.

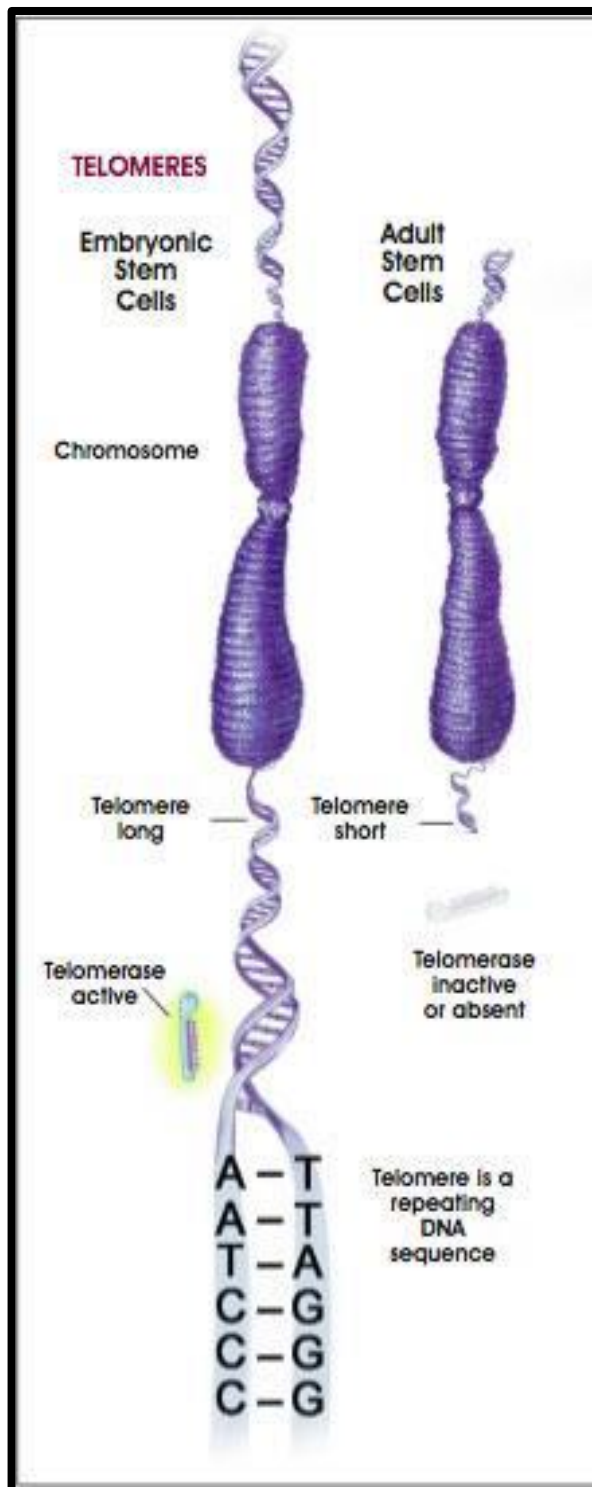
Предел Хейфлика wiki

8. Предел Хейфлика

- After 50 or 60 cell cycles, telomeric shortening leads to replicative senescence due to genomic instability associated with fusion events and chromosomal breakage. A small part of the cell population acquires immortality through this pathway and proceeds to carcinogenesis
- Embryonic stem cells and cancer cells can keep the length of their telomeres stable, evading senescence and apoptosis and acquiring cellular immortality.
- Two molecular mechanisms associated with the maintenance of telomeric length have been elucidated in early studies:
 - (1) transcriptional activation of the telomerase enzyme (90% of cancer cells)
 - (2) alternative lengthening of telomeres (ALT) (the remaining percent)

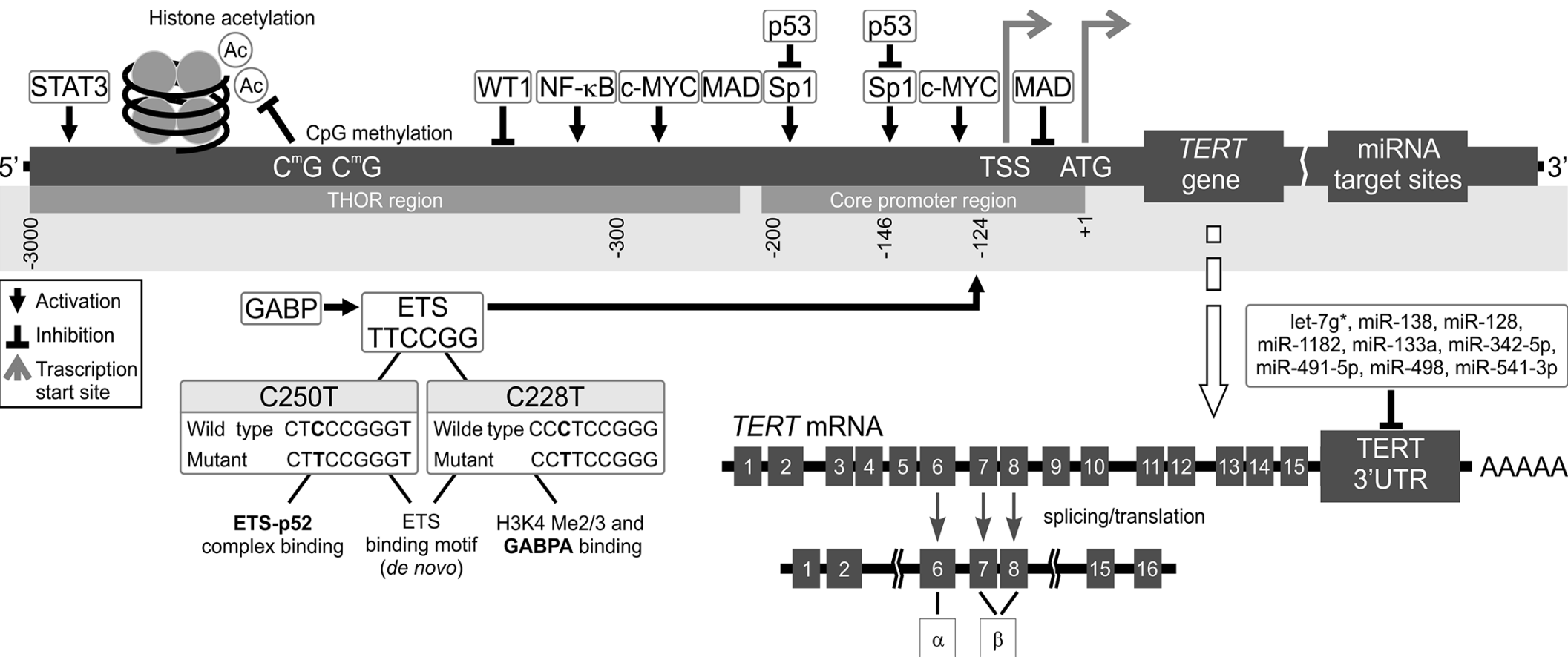
de Bardet et al. Cell immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention. BioTech (Basel). 2023

Длина Теломерных повторов в стволовых клетках эмбриона и взрослого человека



8. Регуляция экспрессии TERT

- Чем больше белков TERT в ядре клетки (экспрессия TERT выше) тем лучше восстанавливается длина теломер при делении.
- Тем дольше живет ткань и быстрее растет!
- Пример – раковые опухоли. 90% раковых опухолей имеют повышенную экспрессию TERT
- **ВАЖНОСТЬ ИЗУЧЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ TERT**
- Из-за жизненной важности теломеразы, в клетке её экспрессия строго регулируется на разных уровнях, **тем не менее ошибки бывают.**



Области промотора:

Ядро – место посадки полимераз для транскрипции - 200п.н.

Проксимальная часть – места связывания многочисленных регуляторов транскрипции – до 400 п.н.

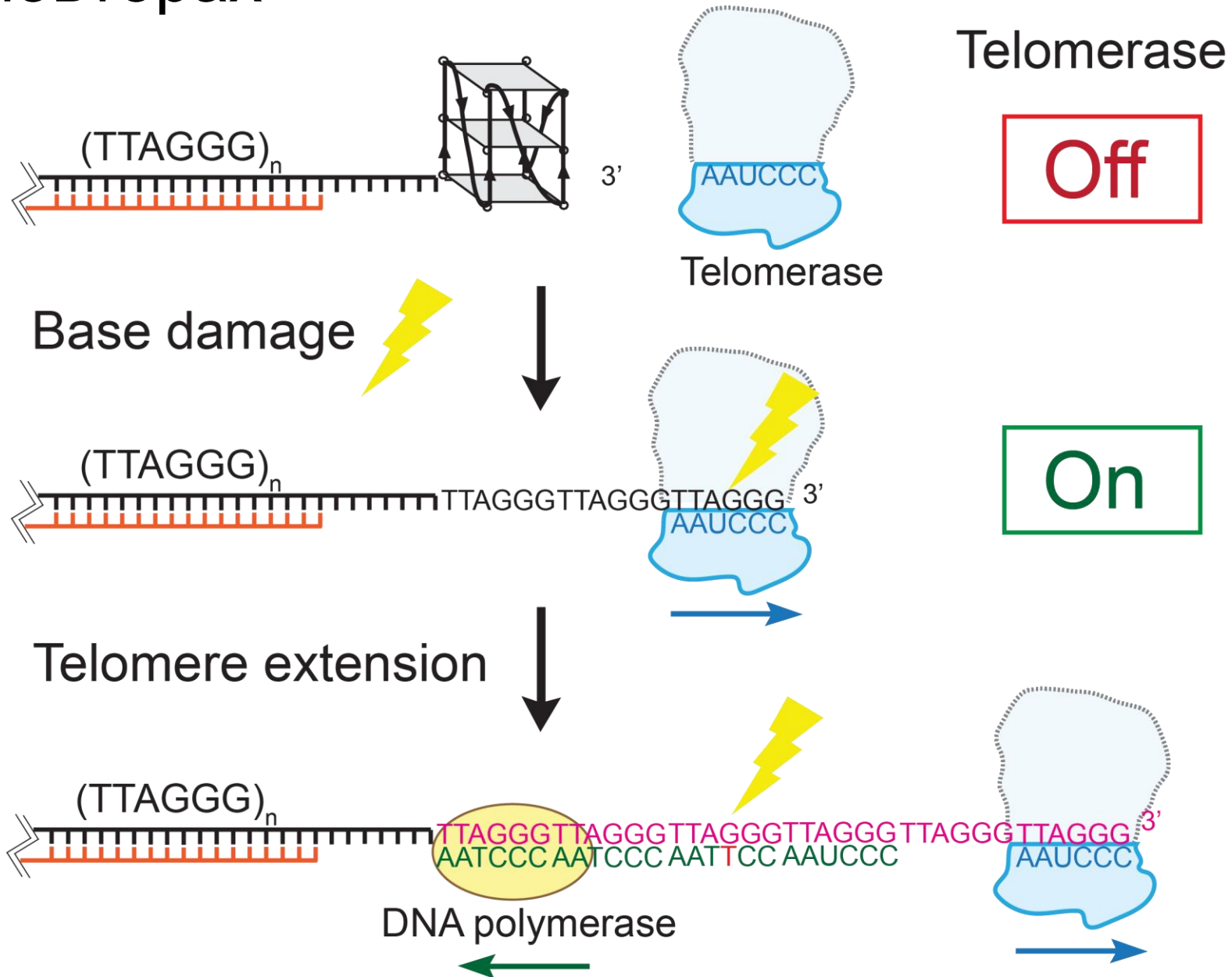
Дистальная – область метилирования влияющего на транскрипцию – до 1000 п.н.

Поиск сигналов – сложная задача. Эксперимент и биоинформатика

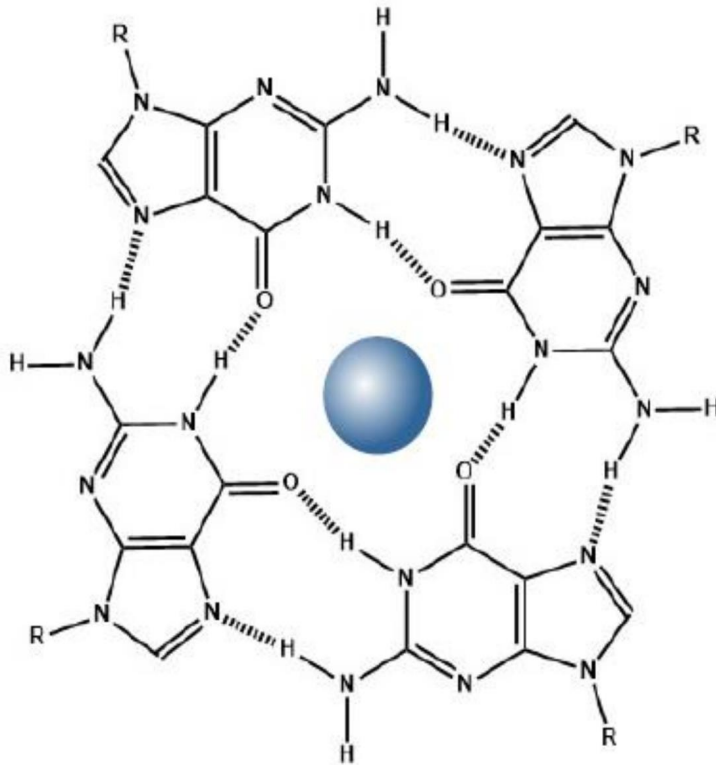
Сигнал

- последовательность, с которой связывается РНК полимераза и регуляторные белки
- энхансеры
- сайты метилирования ДНК
- доступность участка ДНК для транскрипции
- и др.

Регуляция активности TERT в теломерных повторах

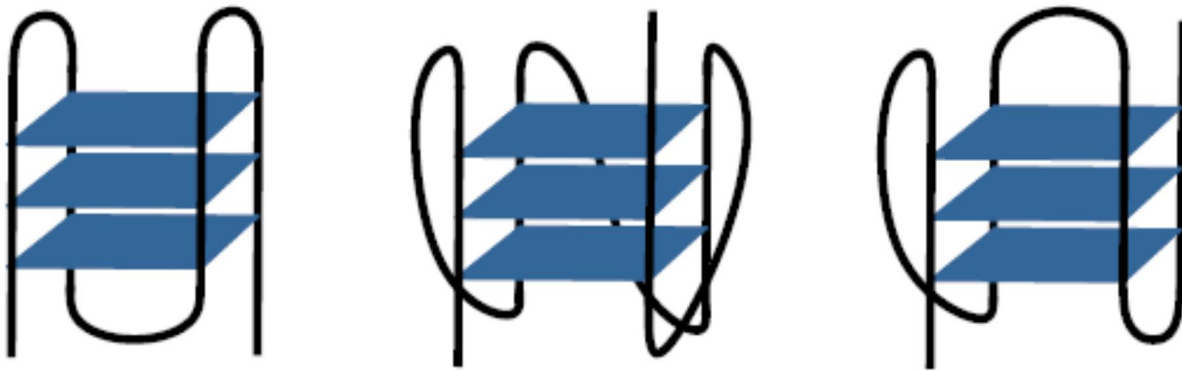


G-квадруплексы



(a)

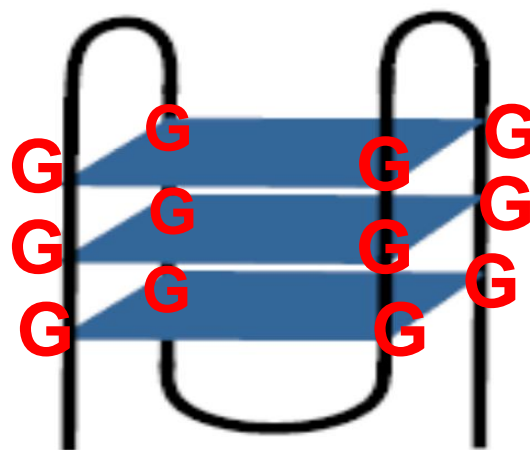
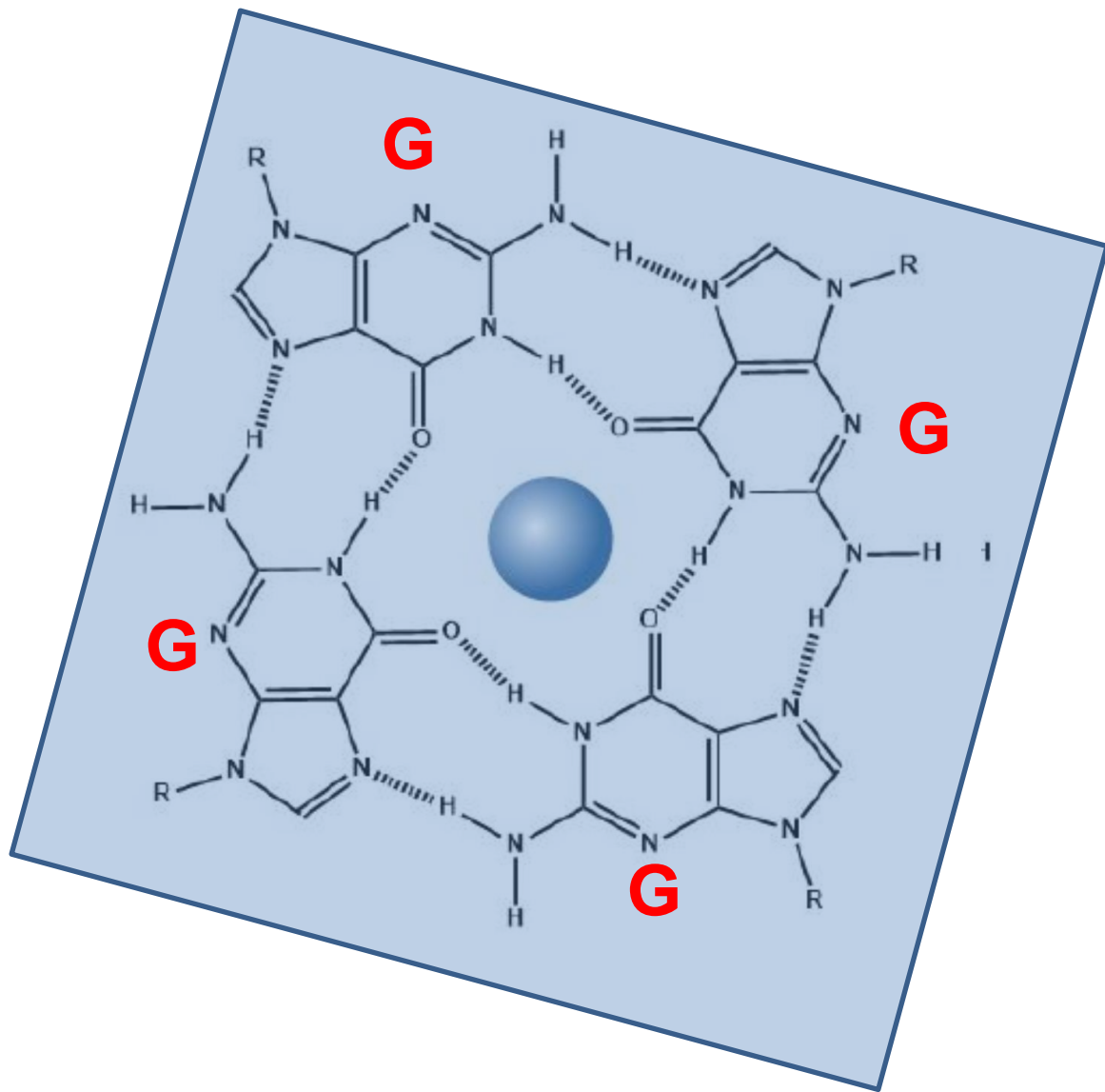
5'..... TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG 3'



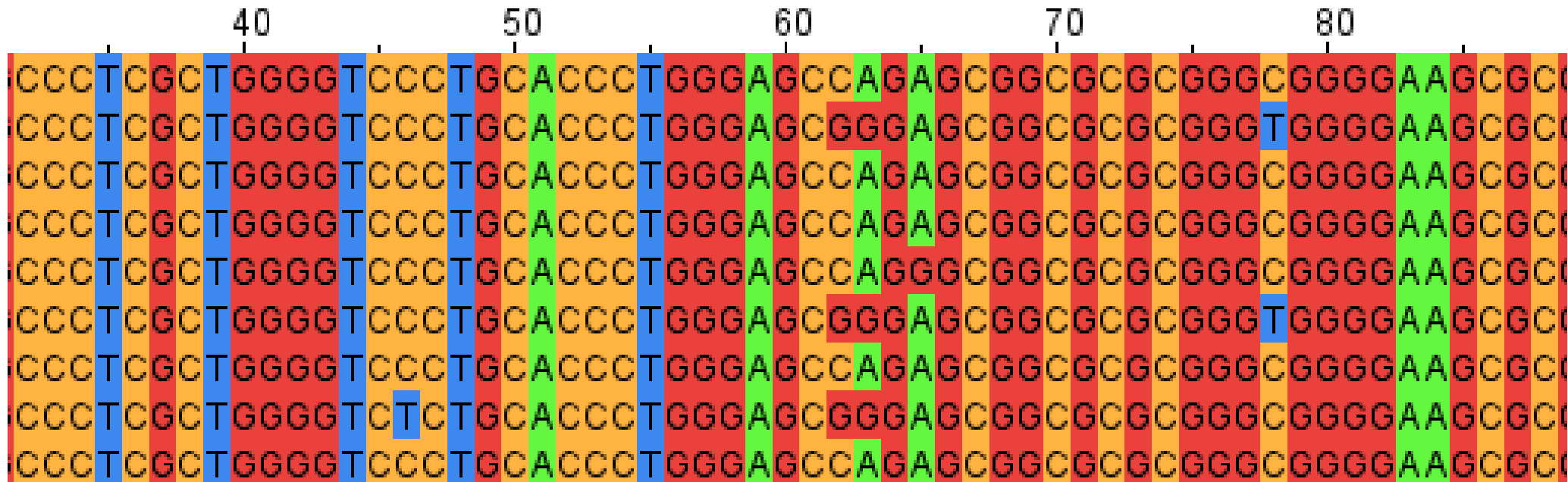
(b)

G-квадруплексы

5'..... ТТА**GGG** ТТА**GGG** ТТА**GGG** ТТА**GGG** 3'



G-квадруплексы образуются в промоторах TERT.
Их можно предсказывать по последовательности

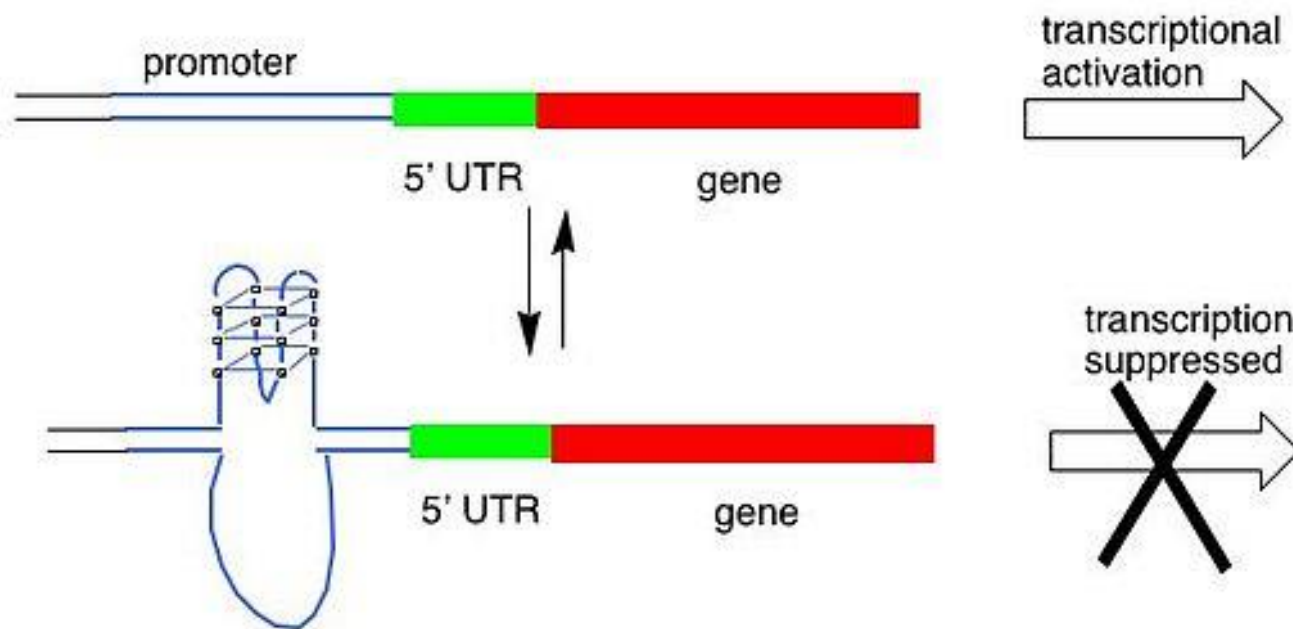


Четыре G-тракта по три гуанина G (красные) могут образовать G-квадруплекс.

G-квадруплекс в ядрах промотора у 9 обезьян, включая человека.

Консервативность G-квадруплекса свидетельствует о важности

G-квадруплексы регулируют транскрипцию гена



Telomeres terminate with a 50–200 nucleotide single-stranded 3' overhang that can invade preceding telomeric dsDNA to form a stable telomere loop (T-loop) structure with **shelterin** [4].

Each cell division results in the loss of 50–100 bp from telomeres due to the inability of DNA polymerases to replicate the end of the lagging strand, oxidative damage, and exonuclease resection [5] [6].

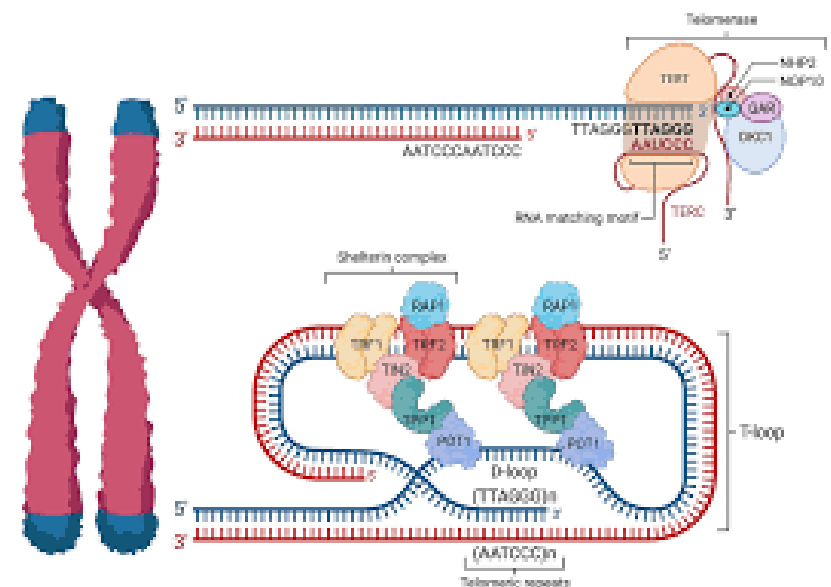
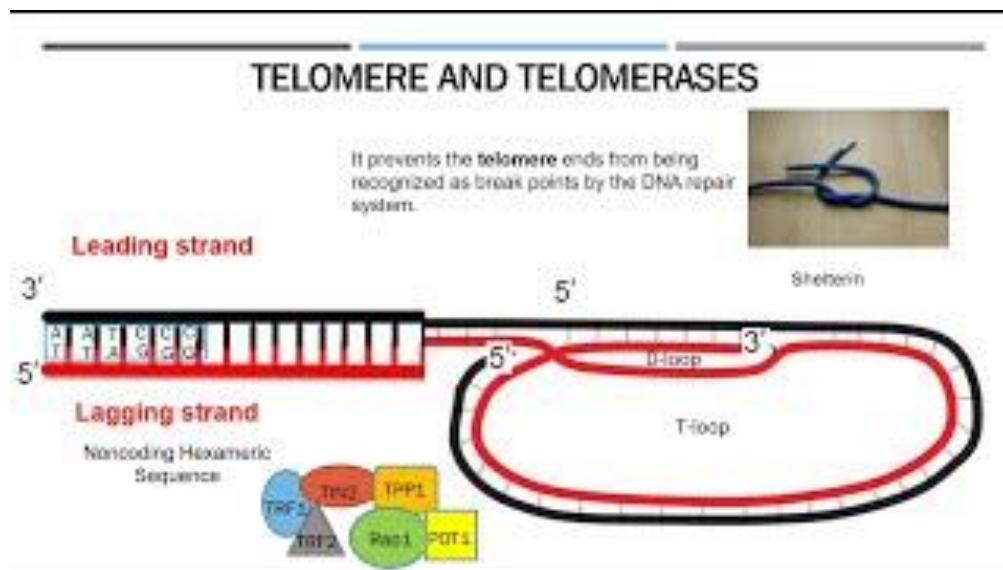
TERT expression is silenced during development, unlike TERC and other telomerase components which are constitutively expressed.

Consequently, TERT levels typically act as the limiting factor for telomerase activity in somatic human cells, although TERC can be limiting in some cancers and stem cells [9] [10] [11].

TERC levels have been found to be upregulated in certain cancer types, such as carcinomas of the cervix, ovary, head and neck, and lung, thereby providing a potential anti-tumour target [10] [11].

Shelterin (комплекс белков) предохраняет длинный одноцепочечный конец теломеров от деградации.
T-петля и D-петля

Shelterin привлекает TERT для достройки новых теломеров



9. Возраст клеток человека

- Долше всего в человеческом организме живут клетки той области коры головного мозга, которая «отвечает» за зрение. Их возраст равен возрасту человека.
- По современным исследованиям, мышцы сердца полностью обновляются за 20 лет.
- ткани кишечника без учёта эпителия, то средний их возраст составит 15-16 лет.
- короткое существование у клеток эпителия желудка и кишечника - до 5 дней. Быстрый цикл обновления связан с воздействием желудочного сока, желчи и пищеварительных ферментов
- Клетки крови меняются каждые несколько месяцев.
- Эпидермис, поверхностный защитный слой кожи, обновляется каждые 2 недели. Новые клетки растут в нижнем слое кожного покрова и постепенно вытесняют старые.
- Обновление гепатоцитов занимает от 300 до 500 дней

10. Раковые клетки

- Раковые клетки - бессмертны

11. hTERT как мишень терапии онкологических заболеваний

- Условием неограниченного роста раковой опухоли является неограниченный рост раковых клеток.
- Для роста опухоли раковые клетки должны делиться
- Для деления в опухолевой клетке должно быть достаточное число белков TERT и РНК TERC
- Раковые клетки - бессмертны

Telomere maintenance via telomerase reactivation is a nearly universal hallmark of cancer cells which enables replicative immortality. In contrast, telomerase activity is silenced in most adult somatic cells. Thus, telomerase represents an attractive target for highly selective cancer therapeutics.

Although much work remains to be done, effective strategies targeting telomerase will have a transformative impact for cancer therapy and the prospect of clinically effective drugs is boosted by recent advances in structural models of human telomerase

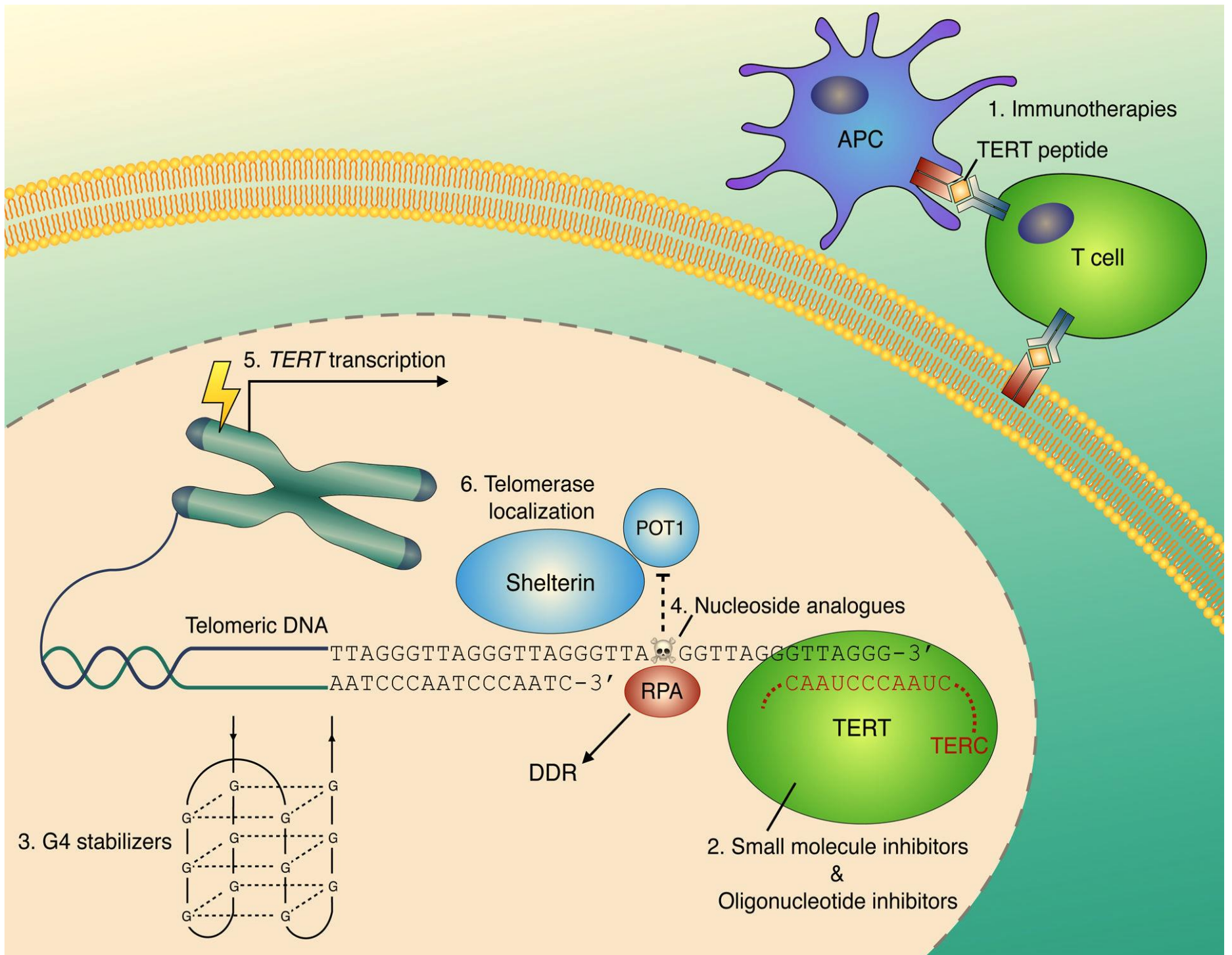
Furthermore, upregulation of telomerase is a nearly universal feature across diverse cancer types, suggesting that strategies targeting telomerase could have broad therapeutic applicability

Tumour cells are therefore expected to possess a limited capacity for resistance to telomerase therapies. Accordingly, significant effort has been directed towards developing drugs that target telomerase for cancer therapy.

Guterres AN, Villanueva J. Targeting telomerase for cancer therapy. *Oncogene*. 2020

12. Перспективы терапии рака нацеленной на TERT

- Снижение активности TERT может иметь эффект на большинстве форм рака
- Уровень TERT в соматических клетках взрослого низкий, и можно надеяться на отсутствие выраженных побочных эффектов



Anticancer strategies targeting telomerase. Clinical trials

- **Иммунотерапия**

Numerous TERT peptide vaccines have progressed to early stage clinical trials. For example, the TERT peptide vaccine UV1 elicited **an immune response in 86% of patients with metastatic hormone-naive prostate cancer** enrolled in a phase I/IIa trial [64]

However, immune responses to TERT vaccines have proved **insufficient to control disease progression**

- **Вирусная терапия**

Telomelysin is an oncolytic adenovirus designed to selectively replicate in cancer cells via E1 gene expression under the control of the hTERT promoter.

Anticancer strategies targeting telomerase

- **Oligonucleotide inhibitors**

Only a single direct telomerase inhibitor **imetelstat** has progressed to clinical trials. Clinical trials on patients with solid tumours uncovered **dose-limiting toxicity** due to haematological side effects

- **Small molecule inhibitors**

Small molecule inhibitors such as BIBR1532 have generated **promising preclinical results**.

- **G-quadruplex stabilizers in telomers**

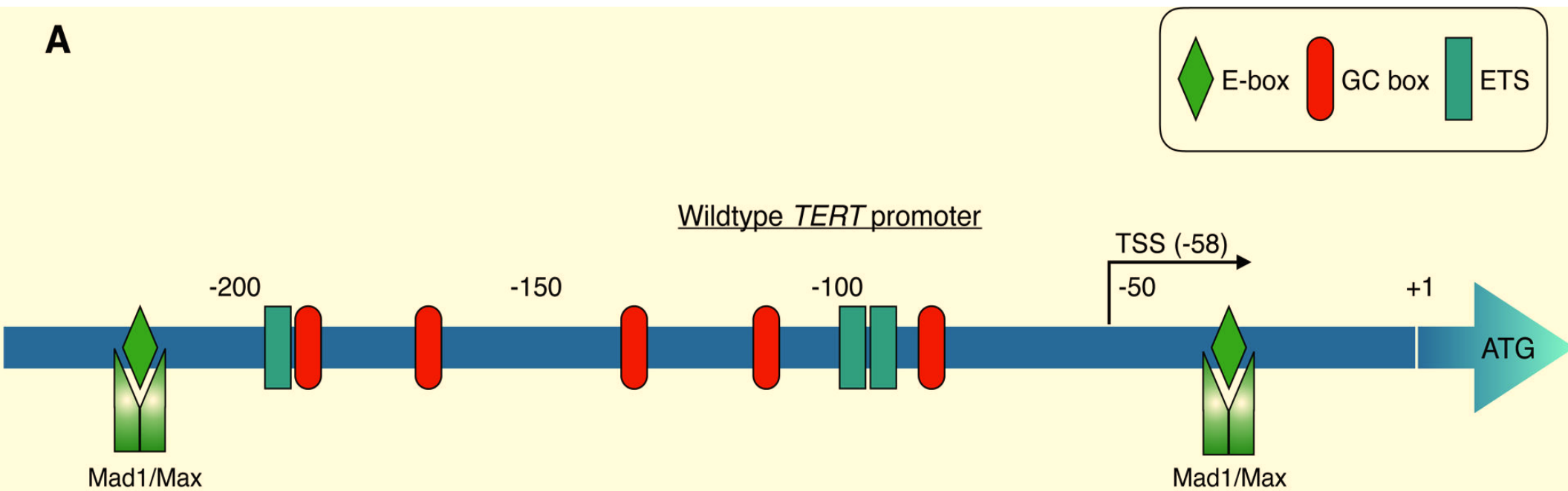
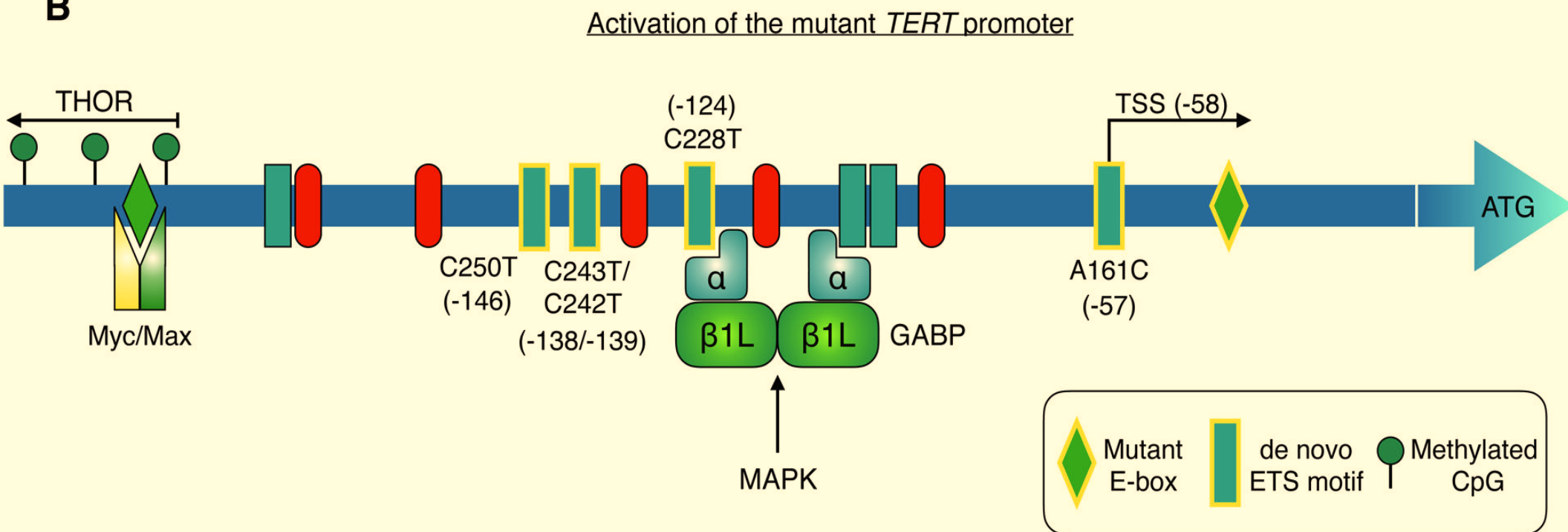
the G-quadruplex stabilizer telomestatin suppresses telomerase activity and tumour growth in leukaemia xenograft models [84]. However, affinity for non-telomeric G-quadruplexes may lead to unacceptable toxicity. Although G-quadruplex motifs are most over-represented at telomeres, computational analysis predicts potential G-quadruplex formation at over 300,000 sites in the human genome [86].

- **Nucleoside analogues**

Numerous TERT vaccines have proved **insufficient to control disease progression**

Anticancer strategies targeting telomerase

- **Targeting *TERT* gene expression** TERT expression is regulated by an atypical GC-rich promoter that harbours multiple binding sites for SP1 and c-Myc transcription factors, but lacks TATA and CAAT boxes (Figure 2). Approximately 15–25% of cancers appear to reactivate telomerase via mutations in the TERT promoter that generate de novo binding motifs for ETS transcription factors.
- **Regulation of telomerase localization and catalysis**

A**B**

КОНЕЦ ПРЕЗЕНТАЦИИ

