

# INHIBITORII DE TELOMERAZĂ - O PROVOCARE ÎN TERAPIA CANCERULUI

R. G. Hertzog\*\*\*, V. A. Voicu\*

## REZUMAT

În celulele somatice normale, telomerele se scurtează cu fiecare diviziune celulară. În schimb, în celulele tumorale, lungimea telomerelor este menținută prin reactivarea telomerazei. Inhibitorii de telomerază constituie o nouă clasă de agenți anti-tumorali capabili să oprească proliferarea nelimitată a celulelor canceroase. În prezent, moleculele antisens, inhibitorii de revers-transcriptază și agenții capabili să interacționeze cu și să stabilizeze cvartetele G reprezintă principalele strategii de supresie telomerazică. Dacă, în acest moment, telomeraza este considerată un marker biochimic esențial în diagnosticul, prognosticul și monitorizarea răspunsului tumoral la tratament, în schimb, utilizarea, în terapia cancerului a primei generații de medicamente bazate pe inhibitori de telomerază necesită numeroase studii farmacologice și toxicologice.

**Cuvinte cheie:** telomere, telomerază, inhibitori, terapia cancerului

## ABSTRACT

### Telomerase inhibitors - a challenge in cancer therapy

In normal somatic cells, the telomeres shorten with each cell division. By contrast, in tumour cells, telomere length is maintained through the reactivation of the telomerase. Telomerase inhibitors constitute a new class of anti-tumour agents able to cease the unlimited proliferation of the cancer cells. In present, antisense molecules, reverse-transcriptase inhibitors and the agents able to interact with and stabilise G quartet represent the main strategies of telomerase suppression. If, in this moment, the telomerase could be consider an essential biochemical marker in diagnosis, prognosis and monitoring tumour response to therapy, by contrast, the use of the first drugs' generation, based on telomerase inhibitors, in cancer therapy, request a lot of pharmacological and toxicological studies.

**Key words:** telomeres, telomerase, inhibitors, cancer therapy

1. Introducere
2. Lungimea telomerelor - un factor critic în viața celulelor
3. Telomeraza - biomarker tumoral
4. Inhibarea telomerazei - o nouă strategie terapeutică a cancerului
5. Acțiunea sinergică a inhibitorilor de telomerază în tratamentul cancerului

## 1. Introducere

În prezent cele mai multe medicamente folosite în chimiotreapia cancerului sunt molecule destul de slab selective. Deși asemenea tratamente au rezultate relativ bune, majoritatea tumorilor solide nu răspund la aceste medicamente și implicit supraviețuirea este redusă. Cercetările recente în domeniul terapiei cancerului țintesc cel puțin 6 din capacitățile achiziționate de celula canceroasă: auto-semnalizare a creșterii, insensibilitate la semnale anti-creștere, potențial replicativ nelimitat, eludarea morții celulare programate (apoptoza), angiogeneză susținută, invazie și metastazare<sup>(1)</sup>. Genele și proteinele ce conferă aceste caracteristici ale celulei tumorale pot constitui noi ținte promițătoare în descoperirea unor medicamente antitumorale cu adevărat selective. Astfel, blocarea activității

telomerazei pare să fie esențială în combaterea capacității replicative indefinite a celulei canceroase.

## 2. Lungimea telomerelor - un factor critic în viața celulelor

Telomerele, structuri nucleoproteice aflate la capetele cromozomilor, sunt constituite dintr-un număr mare de secvențe (TTAGGG) repetate în tandem<sup>(2)</sup>. La om, lungimea telomerelor variază între 5 și 20 Kbaze în funcție de tipul de țesut și vârstă<sup>(3)</sup>. Telomerul se termină printr-o extensie monocatenară la capătul 3' de ~150 nucleotide<sup>(4)</sup>, care, *in vitro*, în prezența ionilor de Na<sup>+</sup> și K<sup>+</sup> se poate organiza în structuri tetra-catenare (cvadruplex sau cvartet G) rezultate prin împerecherea bazelor G<sup>(5)</sup>.

\* Acad. Prof. Dr. V. A. Voicu - Șeful catedrei de Toxicologie și Farmacologie Clinică, UMF "Carol Davila"; Centrul de cercetări științifice medico-militare

\*\* Dr. R. G. Hertzog - Centrul de cercetări științifice medico-militare



expusă, regiunea matriță din cadrul subunității ARN a telomerazei este cea mai importantă țintă pentru terapia antisens.

Oligodezoxinucleotidele antisens (ODN) sunt extinderi scurte de ADN, care sunt complementare cu secvența matriță a ARN-ului telomerazic. Mecanismul lor de acțiune constă în hibridizarea cu ARN-ul complementar, prin formarea de perechi de baze Watson-Crick, și în inhibiția traducerii printr-un proces pasiv sau activ. Inhibiția pasivă apare prin legare competitivă a ODN la ARN, în timp ce mecanismul activ mobilizează RN-aza H pentru a degrada ARNm o dată ce apare hibridizarea ODN-ARN<sup>(26)</sup>.

Câteva studii descriu folosirea 2', 5'-oligoadenilat (2-5A)<sup>(27)</sup> care se atașează în parte la ODN. Există o serie de dovezi potrivit cărora folosirea ODN împotriva matriței ARN este mult mai eficientă decât inhibarea traducerii ARNm țintă.

Acizii nucleici peptidici sau PNA „peptide nucleic acids“ sunt analogi ai ADN sau ARN în care scheletul pentoză-fosfat este înlocuit de un oligomer al N-(2-aminoetil) glicină. Acest schelet neutru conferă oligomerilor PNA o înaltă stabilitate termică, specificitate și afinitate crescută în hibridizarea cu ARN țintă, rezistență la nucleaze și proteaze<sup>(28)</sup>. PNA sunt molecule foarte instabile care pot fi rapid modificate prin adăugarea de peptide saturate pentru a facilita accesul lor la celule și țintirea nucleilor.

2'-O-alkil-ARN, o clasă de oligonucleotide antisens de generația II-a, cu schelet fosforotioat, prezintă capacitate de recunoaștere și afinitate relativ scăzute față de secvențele țintă complementare. În schimb, inhibiția telomerazei, de către 2'-O-metil-ARN, este mult mai puternică decât PNA<sup>(29)</sup>.

Ribozimele sunt molecule mici de ARN, care posedă activitate endoribonucleazică specifică. Ele sunt alcătuite dintr-un miez catalitic flancat de secvențe antisens cu rolul de a recunoaște situsul țintă. Ribozimele inhibă expresia genelor prin hidroliza directă ARNm țintă. Acest eveniment este posibil deoarece ribozimele conțin un model secvențial în formă de „ciocan“, „hammerhead“, care este capabil să producă hidroliza transmoleculară<sup>(30)</sup>.

2. O altă clasă a inhibitorilor inactivează telomeraza prin supresia funcției revers-transcriptazice (RT) a subunității catalitice hTERT. Inhibitorii de RT (IRT) sunt folosiți mai ales în tratamentul SIDA.

3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT), carbovir și alți analogi nucleozidici [ex: didezoxiguanozin trifosfat (ddGTP), didehidrotimidină (d4T)] inhibă telomeraza și diminuează creșterea celulelor în culturi, dar nu induc eroziunea telomerelor și blocarea ciclului celular. Probabil expunerea prelungită la IRT, printr-un efect citotoxic, ar putea determina o scădere a viabilității celulare<sup>(31)</sup>.

Combinății hTERT dominant-negative (mutante care sunt catalitic inactive dar capabile să se lege și să sechestreze subunitatea ARN - hTR) inhibă efectiv telomeraza atât *in vitro* cât și *in vivo*, induce scurtarea telomerelor și cauzează apoptoza în special în celulele cu telomere scurte<sup>(32)</sup>. Aceste rezultate conduc spre ideea că momentul inițierii morții celulare poate fi dependent de lungimea telomerelor. Mutantele dominant-negative au fost create prin substituirea resturilor de acid aspartic și valină din pozițiile 710 și 711 cu alanină, respectiv izoleucină. Celulele care conțin hTERT de tip sălbatic „wt“ și vectorii de control formează rapid tumori, în timp ce celulele cu hTERT dominant-negativ nu intervin în tumorigeneză.

Descoperirea antigenelor asociate tumorilor a intensificat

eforturile pentru țintirea acestor antigene în strategii cum ar fi vaccinarea și în generarea răspunsurilor citotoxice antitumorale ale limfocitelor T (CTL). Telomeraza este un excelent candidat la un antigen universal asociat tumorilor. A fost identificat un peptid derivat hTERT care se leagă la antigenul uman leucocitar (HLA) A2.1. Această alelă, ce aparține complexului major de histocompatibilitate (CMH) clasa I, este exprimată în aproximativ 50% din populație, ceea ce o face o țintă atractivă. Se știe că moleculele HLA de clasă I interacționează cu moleculele CD8 ale unei populații de limfocite T. Astfel, s-a observat un răspuns CTL specific al celulelor CD8<sup>+</sup> de la donatori HLA A2.1 normali, în celulele tumorale care au exprimat hTERT. În schimb răspunsul CTL n-a fost prezent în celulele telomero-negative și în cele fără alela HLA -A2.1<sup>(33)</sup>.

3. Stabilizarea cvartetelor G prin molecule mici constituie a altă posibilă strategie în terapia cancerului. Aceste conformații cvadruple blochează legarea telomerazei la extensia monocatenară 3' a ADN-ului telomeric. Astfel, medicamentele care induc și mențin aceste structuri ar putea deveni agenți chimioterapici eficienți în lupta contra cancerului. A fost identificată o serie de agenți, cu trăsături farmacologice, care interacționează și stabilizează cvartetele G, inducând astfel inhibiția telomerazei.

Dintre derivații acridinici cei 3,6,9 - trisubstituiți prezintă o selectivitate semnificativă pentru quartetul G. Ei se ancorează la situsul AG, între bucla T<sub>2</sub>A și segmentul GGG. În vârful canalului central al cvartetului G există o regiune cu potențial electrostatic negativ datorată celor 6 atomi de oxigen din guanină (G). Substituentul anilino, în poziția 9 a cromoforului acridinic, asigură o creștere a energiilor interacțiilor electrostatice dintre ligand și cvartetul G<sup>(34)</sup>.

Amido-antrachinonele 2,6 și 2,7-disubstituite induc formarea și stabilizarea cvartetelor G. Amido-fluorenonele 2,7-disubstituite au o acțiune inhibitorie asupra telomerazei de 3 ori mai redusă decât antrachinonele, dar nu au un efect citotoxic pronunțat. Din clasa sistemelor triciclice se evidențiază amido-acridinele 2,7-disubstituite care, printr-o sarcină pozitivă a cromoforului, induce o inhibiție telomerazică superioară. S-a demonstrat că adăugarea unui alt grup aromatic la cel triciclic sporește interacțiunea cu telomerul și inhibiția telomerazei. Compusul reprezentativ din acest sistem tetraciclic este bazat pe un cromofor benzo[b]naftol[2,3-d]furan-6,11-dion ce posedă un singur substituent dietil-aminoetoxi<sup>(35)</sup>.

Porfirinele cationice sunt alți agenți inhibitori de telomerază datorită interactivității lor cu cvartetele G. Cel mai studiat este TMPyP4 care blochează creșterea celulară și activitatea telomerazei la concentrații scăzute micromolare. În plus aceste porfirine induc rapid supresia telomerazei (~15 zile) și nu au efecte toxice asupra celulei<sup>(36)</sup>.

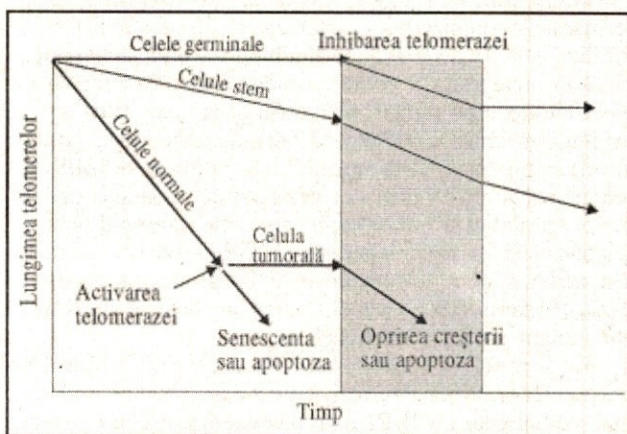
4. Alți inhibitori de telomerază al căror mecanism de acțiune nu este încă cunoscut au fost identificați în baza de date a unui program de screening orientat pe tipul de cancer. Programele informatice de bioanaliză permit îmbunătățirea structurilor chimice ale inhibitorilor de telomerază deja cunoscuți. Astfel de compuși sunt derivații de izotiazolonă (TMPI), de rodocianină (FJ5002) și un component catechinic al ceaiului verde. Dintre aceștia, FJ5002 este cel mai puternic inhibitor de telomerază, inducând eroziunea telomerelor, aberații cromozomiale, oprirea creșterii și senescența celulară<sup>(37)</sup>.

## 5. Acțiunea sinergică a inhibitorilor de telomerază în tratamentul cancerului

Este de acum bine cunoscut faptul că telomeraza este singura enzimă răspunzătoare de adăugarea repetițiilor T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub> la capătul 3' al cromozomilor celulelor tumorale<sup>(38)</sup>, ea nefiind depistată în țesutul adiacent tumorii. În acest sens, s-a formulat ideea că menținerea lungimii telomerelor, de către telomerază sau ALT, este o condiție esențială pentru ca o celulă să prolifereze dincolo de limitele senescentei.

Pot fi însă inhibitorii de telomerază, administrați ca monoterapie, o strategie validă împotriva cancerului? Cel mai probabil, ei vor fi folosiți într-o schemă complexă de tratament în combinație cu chirurgia, radioterapia, chimioterapia clasică, precum și alături de agenți noi cum ar fi inhibitorii de angiogeneză<sup>(39)</sup>.

Alegerea momentului de administrare a inhibitorilor de telomerază este dificil, deoarece expunerea prelungită la agenți anti-telomerazici ar putea avea efecte negative (ex: sterilitate, depleția măduvei hematogene, atrofia vilozităților intestinale, dermatite erozive)<sup>(40)</sup> asupra celulelor normale telomerozo-pozitive. În plus, dobândirea rezistenței la aceste medicamente, cu apariția ALT, este o limitare majoră a folosirii cu succes a inhibitorilor de telomerază. De aceea, tratamentul cu inhibitori de telomerază trebuie să fie inițiat atunci când celulele țesutului tumoral prezintă telomere scurte. Această terapie se adresează în special tumorilor cu proliferare rapidă. Scopul acestui model terapeutic, care trebuie să fie de scurtă durată, pentru limitarea efectelor adverse, este continuarea scurtării telomerelor, ce conduce la o instabilitate genomică<sup>(41)</sup>, care, la rândul ei, induce moartea celulară apoptotică<sup>(42)</sup> (fig.2)..



**Figura 2. Un model terapeutic de utilizare a inhibitorilor de telomerază**

Dacă inhibiția telomerazei este o cale viabilă pentru tratamentul cancerului rămâne o problemă pentru viitor. Evaluarea efectelor inhibitorilor de telomerază la șoareci pune o problemă legată de folosirea la om, deoarece telomerele la șoareci sunt mult mai lungi (~150kpb) decât ale omului<sup>(43)</sup>.

Prin urmare, telomeraza este o țintă nu numai pentru diagnosticul și monitorizarea evoluției bolii canceroase<sup>(44)</sup>, dar și pentru numeroasele studii farmacologice și toxicologice care ar avea ca rezultat prima generație de inhibitori de telomerază.

## BIBLIOGRAFIE

- Hanahan D., Weinberg R.A., *The hallmarks of cancer*, Cell, 100:57-70, 2000.
- McElligott R., Wellinger R.J., *The terminal DNA structure of mammalian telomeres*, The EMBO J., 16, 12:3705-3714, 1997.
- Zakian V.A., *Telomeres: Beginning to understand the end*, Science, 270:1601-1607, 1995.
- Makarov V.L., Hirose Y., Langmore J.P., *Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening*, Cell, 88:657-666, 1997.
- Williamson J.R., Raghuraman M.K., Cech T.R., *Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model*, Cell, 59:871-880, 1989.
- van Steensel B., Smogorzewska A., de Lange T., *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*, Cell, 92:401-413, 1998.
- Dubrana K., Perrod S., Gasser S.M., *Turning telomeres off and on*, Curr.Opin. Cell.Biol., 13:281-289, 2001.
- Greenberg R.A., Chin L., Femino A., Lee K.H., Gottlieb G.J., Singer R.H., Greider C.W., DePinho R.A., *Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a<sup>+/+</sup> cancer-prone mouse*, Cell, 97:515-525, 1999.
- Blasco M.A., Gasser S.M., Lingner J., *Telomeres and telomerase*, Genes Dev., 13, 18:2353-2359, 1999.
- Wright W.E., Shay J.W., *Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting*, Curr.Opin. Genet Dev., 11:98-103, 2001.
- Chin L., Artandi S.E., Shen Q., Tam A., Lee Sh-L., et al., *p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis*, Cell, 97:527-538, 1999.
- Halvorsen T.L., Leibowitz G., Levine F., *Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis*, Mol. Cell. Biol., 19, 3:1864-1870, 1999.
- Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., Beijersbergen R.L., Brooks M.W., Weinberg R.A., *Creation of human tumour cells with defined genetic elements*, Nature, 400:464-468, 1999.
- Weitzman J.B., Yaniv M., *Rebuilding the road to cancer*, Nature, 400:401-402, 1999.
- Belair C.D., Yeager T.R., Lopez P.M., Reznikoff C.A., *Telomerase activity: A biomarker of cell proliferation, not malignant transformation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:13677-13682, 1997.
- Liu J.P., *Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity*, FASEB J., 13, 15:2091-2104, 1999.
- Bryan T.M., Englezou A., Dalla-Pozza L., Dunham M.A., Reddel R.R., *Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines*, Nature Med., 3, 11:1271-1274, 1997.
- Lee H.W., Blasco M.A., Gottlieb G.J., Horner J.W.II, Greider C.W., dePinho R.A., *Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs*, Nature, 392, 569-574, 1998.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L.C., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W., *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*, Science, 266:2011-2015, 1994.

20. Feng J. și col., *The RNA component of human telomerase*, Science, 269: 1236-1241, 1995.
21. Nugent C.I., Lundblad V., *The telomerase reverse transcriptase: components and regulation*, Genes Dev., 12, 8:1073-1085, 1998.
22. Harrington L., McPhail T., Mar V., Zhou W., Oulton R., Bass M.B., Arruda I., Robinson M.O., *A mammalian telomerase - associated protein*, Science, 275: 973-977, 1997.
23. Fitzgerald M.S., Riha K., Gao F., Ren S., McKnight T.D., Shippen D.E., *Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from Arabidopsis inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 26: 14813-14818, 1999.
24. Kelland L.R., *Telomerase: biology and phase I trials*, Lancet, 2:95-102, 2001.
25. Autexier C., *Telomerase as a possible target for anticancer therapy*, Chem Biol., 6, 11:299-303, 1999.
26. Tendian S.W., Parker W.B., *Interaction of deoxyguanosine nucleotide analogs with human telomerase*, Mol. Pharmacol., 57:695-699, 1999.
27. Kondo S., Kondo Y., Li G. și col., *Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA*, Oncogene, 16:3323-3330, 1998.
28. Shammam M.A., Simmons C.G., Corey D.R., Reis R.J.S., *Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses "immortality" of transformed human cells*, Oncogene, 18: 6191-6200, 1999.
29. Pitts A.E., Corey D.R., *Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:11549-11554, 1998.
30. Hughes M.D., Hussain M., Nawaz Q., Sayyed P., Akhtar S., *The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes*, Drug Discovery Today, 6, 6:303-315, 2001.
31. Strahl C., Blackburn E.H., *Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortal cell lines*, Mol. Cell. Biol., 16, 1:53-65, 1996.
32. Zhang X., Mar V., Zhou W., Harrington L., Robinson M.O., *Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells*, Genes Dev., 13, 18:2388-2399, 1999.
33. Vonderheide R.H. și col., *The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes*, Immunity, 10:673-679, 1999.
34. Read M. și col., *Structure - based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 9:4844-4849, 2001.
35. Neidle S., Harrison R.J., Reszka A.P., Read M.A., *Structure-activity relationships among guanine-quadruplex telomerase inhibitors*, Pharmacol. Ther., 85:133-139, 2000.
36. Izbicka E. și col., *Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells*, Cancer Res., 59:639-644, 1999.
37. Naasani I., Seimiya H., Yamori T., Tsuruo T., *FJ5002: A potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease-oriented screening program with COMPARE analysis*, Cancer Res., 59:4004-4011, 1999.
38. Bryan T.M., Cech T.R., *Telomerase and the maintenance of chromosome ends*, Curr.Opin. Cell. Biol., 11:318-324, 1999.
39. White L., Wright W.E., Shay J.W., *Telomerase inhibitors*, Trends Biotech., 19, 3:114-120, 2001.
40. Rudolph K.L., Chang S., Lee H.W., Blasco M., Gottlieb G.J., Greider C., DePinho R.A., *Longevity, stress response and cancer in aging telomerase-deficient mice*, Cell, 96:701-712, 1999.
41. Counter C.M., Avilion A.A., LeFeuvre C.E., Stewart N.G., Greider C.W., Harley C.B., Bacchetti S., *Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity*, EMBO J., 11, 5:1921-1929, 1992.
42. Oulton R., Harrington L., *Telomeres, telomerase, and cancer: life on the edge of genomic stability*, Curr.Opin. Oncol., 12, 1:74-81, 2000.
43. Kipling D., Cooke H.J., *Hypervariable ultra-long telomeres in mice*, Nature, 347:400-402, 1990.
44. McKenzie K.E., Umbricht C.B., Sukumar S., *Applications of telomerase research in the fight against cancer*, Mol. Med. Today, 114-122, 1999.