

# Inhibitory telomerazy jako potencjalne leki przeciwnowotworowe

Łukasz Sobotta<sup>1</sup>, Marcin Wierchowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Adres do korespondencji: Łukasz Sobotta, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, tel. 061 854 66 14, e-mail: utak1x@wp.pl

Choroba nowotworowa stanowi coraz większy problem dla ludzkości, szacuje się dwukrotny wzrost zachorowań do roku 2050 [1]. Problem ten od tysięcy lat nabierał znaczenia wraz z postępem cywilizacji i zmniejszającą się ilością zgonów wywołanych innymi chorobami. Pierwszy opis raka stworzyli Egipcjanie pomiędzy 1500 a 3000 rokiem p.n.e. Choroby nowotworowe nie są domeną jedynie człowieka i występowały prawdopodobnie od początku istnienia organizmów wielokomórkowych. Najwcześniejsze znane dowody na istnienie tego typu schorzeń odnotowano analizując szczątki dinozaurów sprzed 150 milionów lat. Medycyna praktycznie od samego początku starała się znaleźć przyczynę występowania nowotworów. Początkowo uważano, że przyczyną jest brak równowagi między krwią, flegmą, żółtą żółcią i czarną żółcią. W XVIII wieku powiązano nowotwór ze stanem zapalnym. Wilhelm Waldeyer (1836–1921) położył fundamenty pod bieżącą wiedzę o nowotworach. Stwierdził, że rak powstaje w wyniku transformacji zdrowych komórek w komórki złośliwe, wywołanej czynnikami zewnętrznymi (kancerogeny), a mechanizm rozprzestrzeniania się polega na transporcie komórek nowotworowych przez krew i limfę w odległe części organizmu. Następnie powiązano powstawanie nowotworów z działaniem wirusów [2]. Nowoczesną teorię tłumaczącą wpływ wirusów na proces nowotworzenia podali Robert Hubner (ur. 1914) i George Todaro (ur. 1937), którzy twierdzili, że części RNA wirusa są wbudowane do genomu i są obecne przez długi czas jako „cicha infekcja”. Ten odcinek genomu może być uaktywniony przez różne kancerogeny. Ustalono, że zdrowe komórki mogą przenosić

**Telomerase inhibitors as potential anticancer drugs** · The most important problem in pathophysiology of cancer is immortality of cells. Mechanisms of chromosome ends elongation are responsible for this phenomenon. In most of cancer cells ends of chromosome are growing longer by enzyme – telomerase. The main purpose of this paper is a review of known methods inhibiting telomerase activity, especially by stabilization of G – quadruplex.

**Keywords:** cancer cells, immortality, telomerase, G – quadruplex, anthraquinone.

© Farm Pol, 2009, 65(9): 617-622

geny hamujące wzrost komórek złośliwych, a kiedy czynniki hamujące zostaną inaktywowane, wówczas może mieć miejsce wzrost komórek nowotworowych [2]. W ostatnich latach trwają intensywne badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów nowotworzenia. Uważa się, że krytycznymi momentami w procesie nowotworzenia jest proces angiogenezy i ekspresja enzymu telomerazy.

Nowe naczynia oplatające guz nowotworowy są niezbędne do dostarczania substancji odżywczych dla komórek; natomiast telomeraza, która pozwala na bezustanny wzrost, może być warunkiem do złośliwienia zdrowych komórek [2]. Telomeraza to enzym przedłużający telomery, wyspecjalizowane struktury, które chronią końce chromosomów eukariotycznych. Struktury te z każdym cyklem replikacyjnym ulegają skróceniu, wyznaczając tym samym ilość podziałów komórki (limit Hayflicka u człowieka wynosi około 7 do 13 kb »tysięcy par zasad«) przed wejściem w fazę starzenia. Powodem skracania DNA

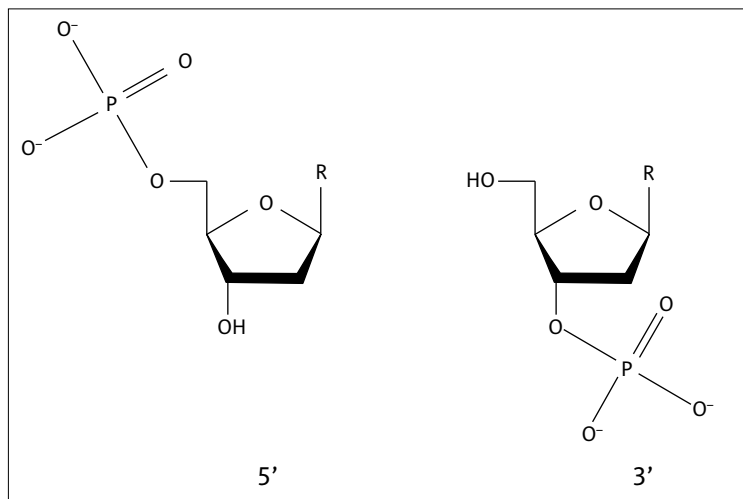
jest usuwanie startera z nici opóźnionej, co powoduje powstanie potomnej cząsteczki z niekompletnym końcem 5' (koniec 5' i 3' wskazuje, przy którym atomie węgla deoksyrybozy jest wolna grupa fosforanowa; **rycina 1**).

Normalne komórki są zdolne, w zależności od rodzaju, do 50–70 podziałów. Gdyby zakończenia

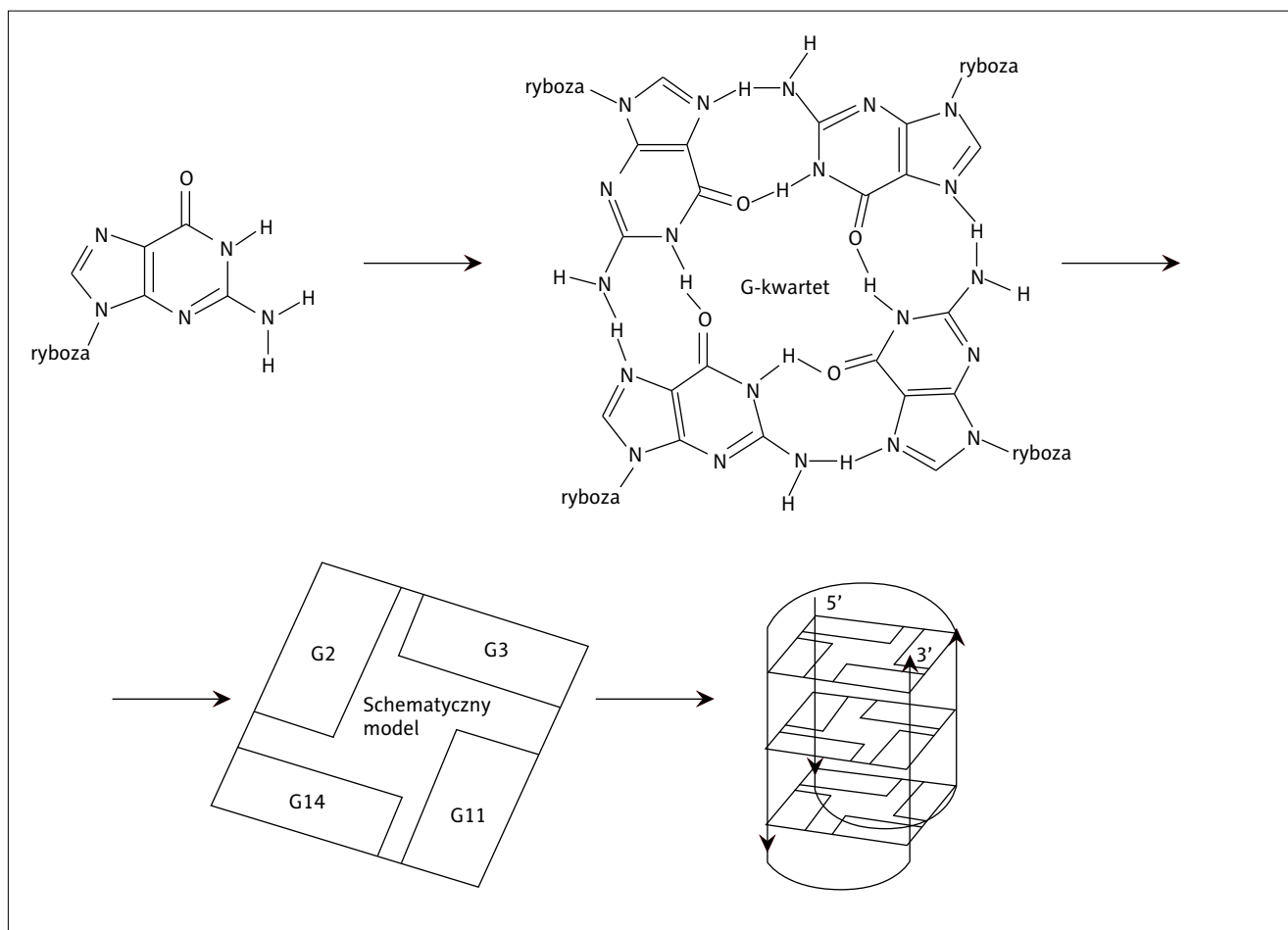
chromosomów nie były chronione, dochodziłoby do utraty pewnej ilości informacji genetycznej wraz z każdym cyklem, fakt taki miałby katastrofalne następstwa.

Telomery są zbudowane z tandemowych, krótkich powtórzeń, bogatych w guaninę i tyminę o powtarzającej się sekwencji 5'-TTAGGG-3'. U człowieka mają długość około 25 kb. W przeważającej części DNA telomerowe jest dwuniciowe, jednak koniec 3' jest strukturą jednoniciową, która w wyniku oddziaływań wewnątrz i zewnątrz molekularnych, tworzy strukturę zwaną G-kwartetem (**rycina 2**). Dwuniciowa część na końcach telomerów tworzy charakterystyczne pętle t, które są właściwymi „strażnikami” genomu. Z telomerami są zassocjowane białka, które pełnią szereg funkcji, a największe znaczenie mają: TRF1 i TRF2 i obydwa są zaangażowane w regulowanie długości. Wykazano, że TRF1 bezpośrednio reguluje długość telomerów – powoduje ich skracanie. Zadaniem TRF2 jest ochrona końców chromosomów, oraz możliwość tworzenia pętli t [3–6].

Z punktu widzenia klasyfikacji enzymów telomeraza jest odwrotną transkryptazą, składającą się z podjednostki białkowej zwanej hTERT i komponenty RNA zwanej hTER lub hTR. Najważniejszą funkcją



**Rycina 1.** Koniec 5' i 3' łańcucha DNA



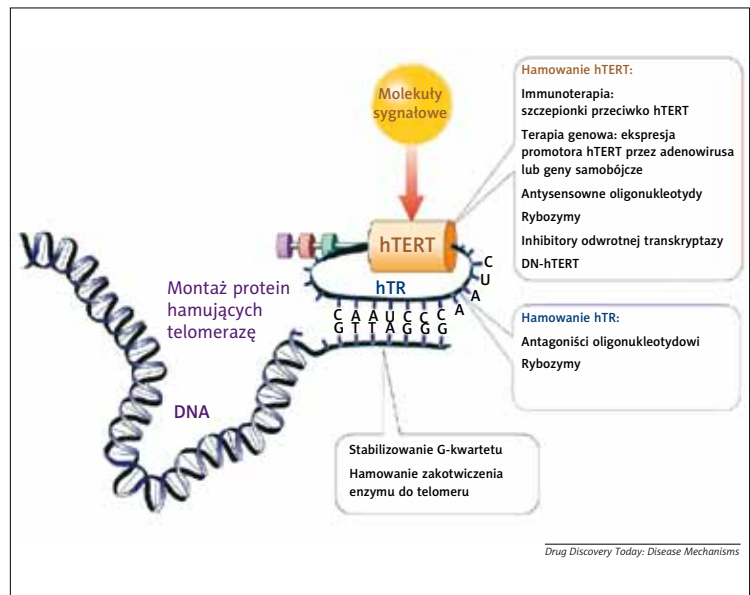
**Rycina 2.** Tworzenie G-kwartetu [5]

podjednostki hTERT jest katalizowanie polimeryzacji nukleotydów.

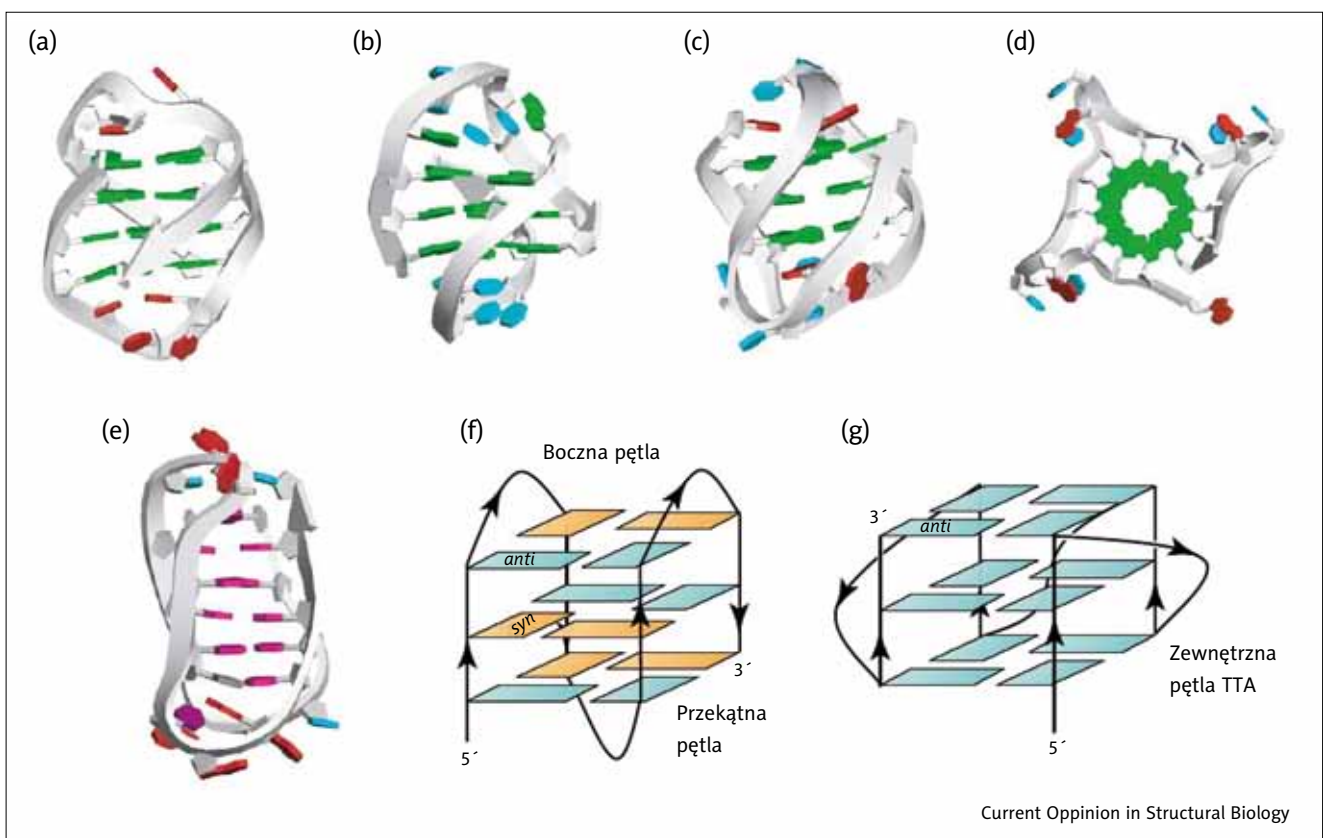
Telomeraza to enzym przedłużający telomery, co w sprzyjających warunkach nadaje komórkom cechy nieśmiertelności. Matrycą do przedłużania telomerów jest RNA (komplementarną nić dodaje polimeraza DNA). Enzym wiąże się matrycą RNA do jednoniciowego końca 3', dodając sześć deoksyrybonukleotydów. Następuje odszczepienie i zakotwiczenie na przedłużonym starterze i zachodzi kolejna synteza. Enzym jest bardzo wydajny, dołącza setki rybonukleotydów zanim ostatecznie się odłączy. Do zakotwiczenia telomerazy wymagana jest pojedyncza nić końca 3', która może tworzyć G-kwartet uniemożliwiający rozpoczęcie syntezy kolejnych powtórzeń.

Badania wykazały, że telomeraza jest obecna zarówno w 85% nowotworów, jak i w zdrowych komórkach – są to komórki linii płciowej, komórki bazalnej warstwy naskórka, aktywowane limfocyty i komórki hematopoetyczne [5–9]. Wydłużanie telomerów w około 15% przypadków nowotworów ma miejsce na innej drodze. Komórki te wykorzystują do wydłużania ALT (aminotransferazę alaninową), która zasocjowana jest z ciałkami PML (*promyelocytic leukaemia bodies* – ciałka białaczki promielocytowej)

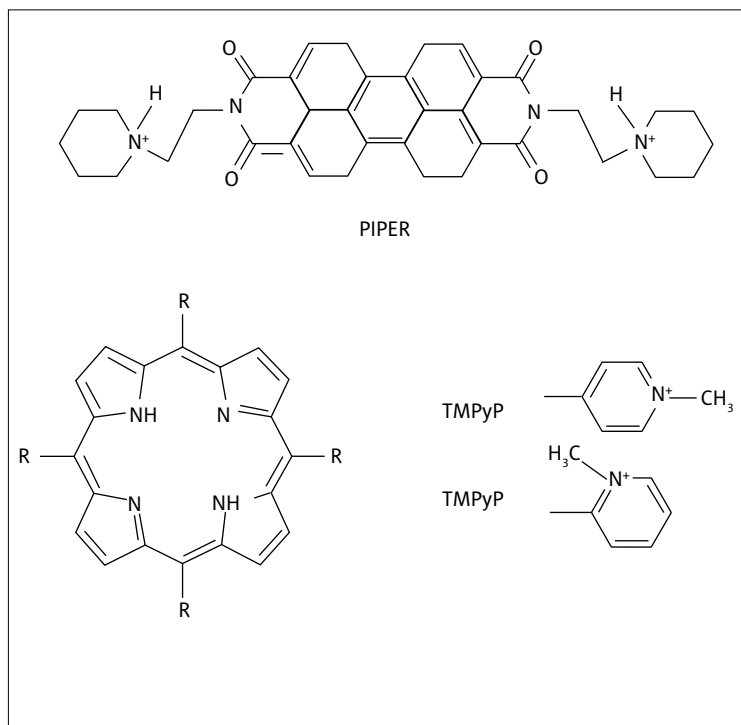
[10]. Aktywność telomerazy wydaje się być kluczową przyczyną nieśmiertelności komórek nowotworowych telomero- pozytywnych, dlatego opracowano pewne strategie hamowania aktywności tego enzymu.



Rycina 3. Strategie hamowania aktywności telomerazy (modyfikacja wg [11])



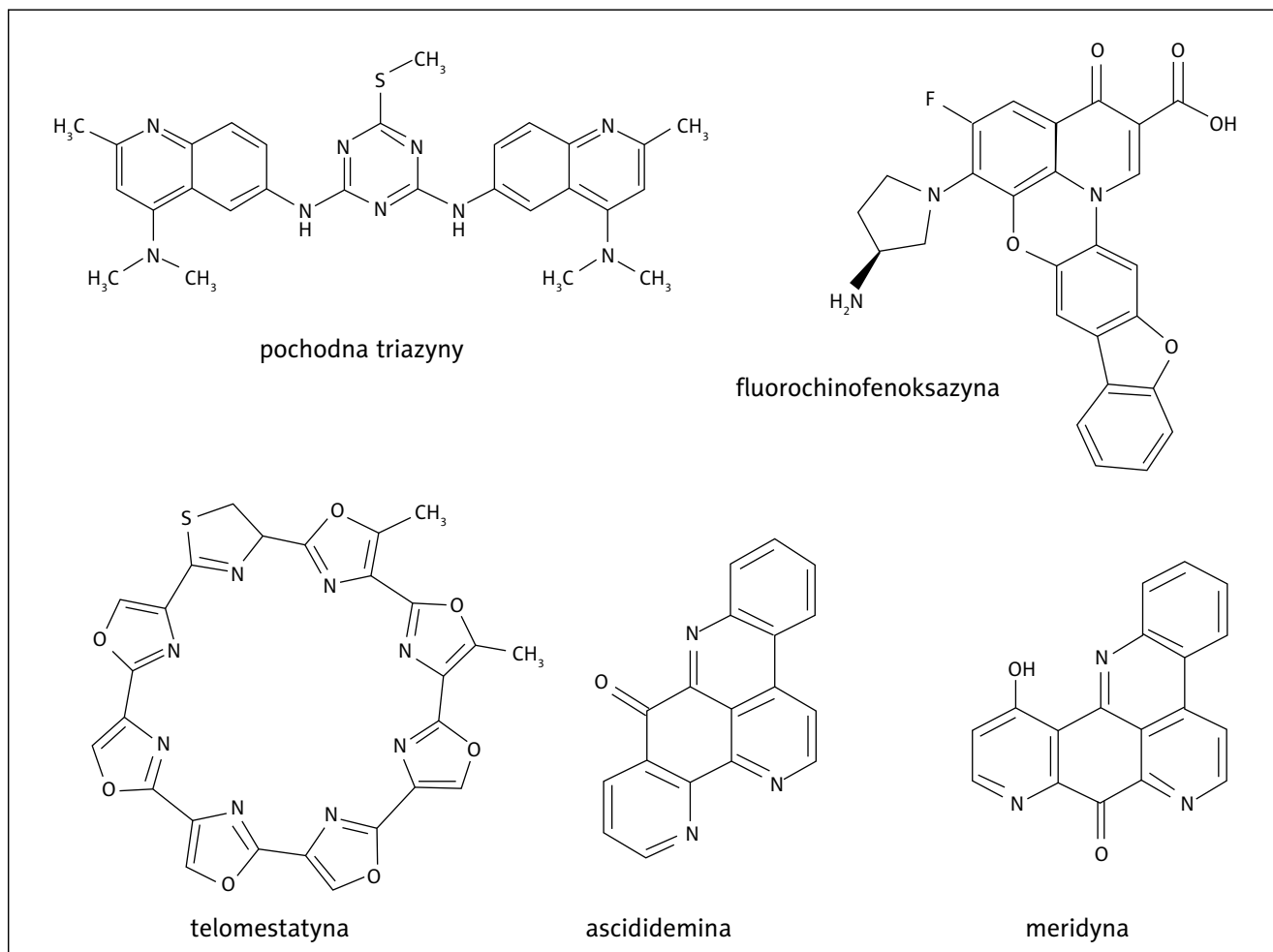
Rycina 4. Wstążkowe modele telomerycznego DNA na końcu nici 3' (G-kwartety): (a)  $d(G_4T_4G_4)$  z *Oxyricha*, organizmu, u którego pierwszy raz zauważono takie struktury, (b)  $d(G_4T_4G_3)$ , (c)  $d[AG_3(T_2AG_3)_3]$  w roztworze jonów  $Na^+$ , (d)  $d[AG_3(T_2AG_3)_3]$  stabilizowane jonami  $K^+$  w fazie krystalicznej, (e)  $d(C_2AT_2C_2AT_2C_2T_3C_2)$  w roztworze, (f, g) schematy struktur (c, d) (zmodyfikowane wg [12]).



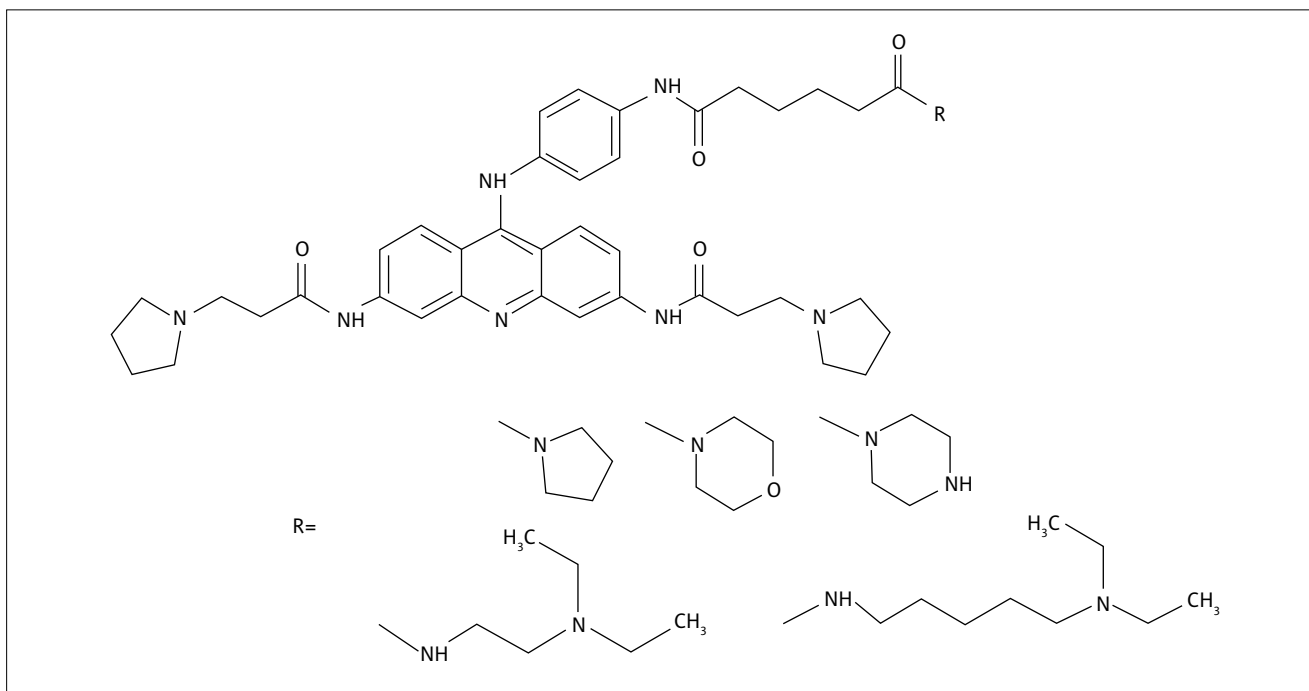
Rycina 5. Wielopierścieniowe stabilizatory G-kwartetu

Strategie hamowania aktywności telomerazy podaje **rycina 3**.

1. Immunoterapia: polegać ma na wytworzeniu szczepionki przeciw hTERT i hTR. Zaobserwowano u pacjentów z zaawansowanym rakiem piersi i prostaty indukowanie cytotoksycznych T-limfocytów, skierowanych przeciwko tym strukturom.
2. Terapia genowa: wykryto, że wprowadzenie do komórek nowotworowych określonego genu wywołuje apoptozę komórek telomero-pozytywnych.
3. Antysensowne oligonukleotydy: zsyntetyzowano oligonukleotydy, które będąc komplementarne do matrycy RNA telomerazy, są w stanie zablokować ten enzym, np. 5'-GTTAGGGTTAG.
4. Inhibitory odwrotnej transkryptazy: otrzymano inhibitor telomerazy AZT-TP, który hamuje aktywność tego enzymu w liniach komórkowych CHO w stężeniu 500  $\mu\text{M}$ .
5. Rybozomy: są to małe specyficzne molekuły powodujące rozłam RNA.
6. Negatywny DN-hTERT: zdolny jest do katalitycznej inaktywacji hTERT.
7. Stabilizowanie struktury G-kwartetu: jak już wspomniano struktura G-kwartetu, która w normalnych



Rycina 6. Wielopierścieniowe stabilizatory G-kwartetu



Rycina 7. Pochodne akrydyny stabilizujące G-kwartet

warunkach może się „rozwijać” w postać liniową, uniemożliwia zakotwiczenie telomerazy, dlatego też wydaje się obiecującą metodą leczenia poprzez stabilizację tej struktury (rycina 4) [5, 11].

Syntetycznie otrzymanymi molekułami stabilizującymi G-kwartet są:

1. Pochodne wielopierścieniowe, takie jak: pochodna perylenu (PIPER), pochodne porfiryn (TMPyP4 i TMPyP2) (rycina 5) [13].

Kolejnymi przykładami są: pochodna triazyny, fluorochinofenoksazyna, telomestatylna, WP631, ascididemia, meridyna (rycina 6) [14,15].

2. Pochodne akrydyny: Schultes i wsp. stwierdzili aktywność pochodnych akrydyny w hamowaniu telomerazy poprzez stabilizację G-kwartetu (rycina 7) [16].

3. Pochodne antrachinonów: uważa się, że pochodne antrachinonów dzięki ugrupowaniu chromoforu, atakują struktury G-kwartetu i w procesie pseudointerkalacji powodują ich stabilizację. Neidle i wsp. ustalili wstępną zależność budowy pochodnych antrachinonowych i ich aktywności w stosunku do G-kwartetu, podając główne założenia:

- a) aktywność jest uwarunkowana obecnością dwóch bocznych łańcuchów alifatycznych,
- b) optymalną długością łańcucha pochodnych amidowych jest jednostka dwuwęglowa,
- c) wymagana jest grupa amidowa,
- d) optymalnymi grupami końcowymi w łańcuchach bocznych są grupy piperidynowa i piroolidynowa,
- e) ważnym czynnikiem jest ładunek dodatni w łańcuchu bocznym,

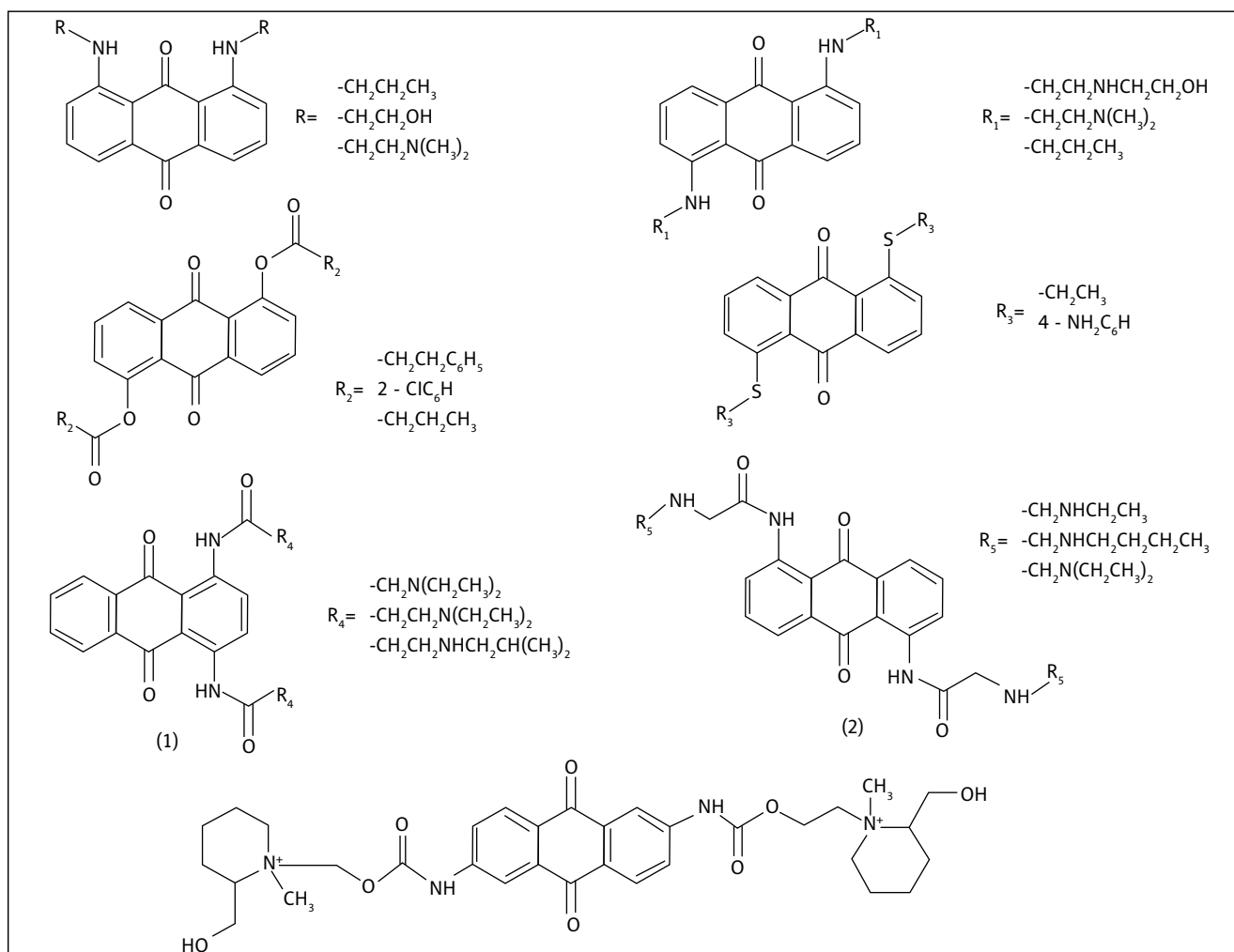
f) rodzaj podstawnika w łańcuchu amidowym nie jest ważny,

g) nie ma znaczącej korelacji między aktywnością telomerazy, a cytotoksycznością.

Z wcześniejszych badań przeprowadzonych przez Read'a i wsp. wynika, iż końcowe grupy o objętości większej niż cykloheptan indukują zniekształcenia w strukturze G-kwartetu [17]. W ostatnich latach Huang i wsp. donieśli stabilizację G-kwartetu przez pochodne antrachinonów podstawionych w pozycjach 1,4; 1,5; 1,8 przez podstawniki acyloksy, tio, amino i amido. Stwierdzono, iż pochodne 1,4-diamido są bardziej cytotoksyczne niż odpowiednie pochodne 1,5-diamido, 1,5-diamino, 1,5-diacyloksy oraz 1,5-ditio. Ogólną strukturę i wybrane podstawniki, związków zsyntetyzowanych przez Huang'a i wsp. w 2005 i 2006 roku przedstawia rycina 8 [18–20].

Terapia oparta na nieczynieniu funkcji telomerazy wydaje się być obiecującą perspektywą w leczeniu nowotworów. Należy jednak podchodzić z dystansem do tej metody, ponieważ nie wiadomo w jaki sposób związki wykazujące aktywność *in vitro* będą się zachowywać w warunkach *in vivo*. Pozostaje również wiele pytań, na które nie znamy jeszcze odpowiedzi, np.: czy związki zachowają swoje właściwości inaktywujące w warunkach *in vivo*, czy zadziałają na organizm wg innego, nieznanego mechanizmu, na inne cele molekularne, czy inaktywowanie telomerazy w zdrowych komórkach

Telomeraza to enzym przedłużający telomery, wyspecjalizowane struktury, które chronią końce chromosomów eukariotycznych. Struktury te z każdym cyklem replikacyjnym ulegają skróceniu wyznaczając tym samym ilość podziałów komórki.



**Rycina 8.** Przykłady pochodnych antrachinonów stabilizujących strukturę G-kwartetu

organizmu, choć nielicznych wpłynie ujemnie, jeśli tak to w jakim stopniu, czy zmiany w funkcjonowaniu owych komórek będą trwałe? Po odpowiedzi na te i inne ważne pytania można będzie stwierdzić, czy nowa koncepcja terapii będzie lepsza od schematów leczenia stosowanych dotychczas.

Otrzymano: 2009.06.24 · Zaakceptowano: 2009.07.06

### Piśmiennictwo

- Parkin D.M.: Global cancer statistics in the year 2000. *The Lanc. Oncol.* 2001, 2, 533–542.
- Stone M.J.: MD History of the Baylor Charles A. Sammons Cancer Center. *BUMC Proc.* 2003, 16, 30–58.
- Blackburn E.H.: Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.* 2005, 579, 859–862.
- Haendeler J., Hoffmann J., Rahman S., Zeiher A.M., Dimmeler S.: Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation. *FEBS Lett.* 2003, 536, 180–186.
- Lavelle F., Riou J., Laoui A., Mailliet P.: Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? *Crit. Rev. in Oncol./Hemat.* 2000, 34, 111–126.
- Burge S., Parkinson G.N., Hazel P., Todd A.K., Neidle S.: Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucl. Ac. Res.* 2006, 1–14.
- Harrington L.: Biochemical aspects of telomerase function. *Canc. Lett.* 2003, 194, 139–154.
- Haider S.M., Parkinson G.N., Neidle S.: Structure of a G-quadruplex – Ligand Complex. *J. Molec. Biol.* 2003, 326, 117–125.
- Stryer L.: *Biochemia*. PWN, 2003, 1042–1043.
- Dong C.K., Masutomi K., Hahn W.C.: Telomerase: regulation, function and transformation. *Crit. Rev. in Oncol./Hemat.* 2005, 54, 85–93.
- Gellert C.G., Jackson S.R., Dikmen Z.G., Wright W.E., Shay J.W.: Telomerase as a therapeutic target in cancer. *D. D. T.: Disease Mechanisms.* 2005, 2, 159–163.
- Neidle S., Parkinson G.N.: The structure of telomeric DNA. *Cur. Op. in Str. Biol.* 2003, 13, 275–283.
- Hurley L.H., Wheelhouse R.T., Sun D., Kerwin S.M., Salazar M., Fedorof O.Y., Han F.X., Han H., Izbicka E., Von Hoff D.D.: G-quadruplexes as targets for drug design. *Pharm. & Ther.* 2000, 85, 141–158.
- Guittat L., Cian A.De, Rosu F., Gabelica V., Pauw E.De, Delfourne E., Mergny J.L.: Ascidemin and meridine stabilize G-quadruplexes and inhibit telomerase in vitro. *Bioch. et Bioph. Act.* 2005, 1724, 375–384.
- Rezler E.M., Bearss D.J., Hurley L.H.: Telomeres and telomerases as drug targets. *Curr. Opin. in Pharm.* 2002, 2, 415–423.
- Schultes C.M., Guyen B., Cuesta J., Neidle S.: Synthesis, biophysical and biological evaluation of 3,6-bis-amidoacridines with extended 9-anilino substituents as potent G-quadruplex-binding telomerase inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 4347–4351.
- Neidle S., Harrison R.J., Reszka A.P., Read M.A.: Structure-activity relationships among guanine-quadruplex telomerase inhibitors. *Pharm. & Therap.* 2000, 85, 133–139.
- Huang H., Chiu H., Lu W., Yuan C.: Synthesis and Antitumor Activity of 1,8-Diaminoanthraquinone Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, 53, 1136–1139.
- Han H., Hurley L.H., Salazar M.: A DNA polymerase stop assay for G-quadruplex-interactive compounds. *Nucl. Ac. Res.* 1999, 27, 537–542.
- Huang H., Chiu H., Tao C., Chen I.: Synthesis and Antitumor Evaluation of Symmetrical 1,5-diaminoanthraquinone Derivatives as Compared to Their Disubstituted Homologues. *Chem. Pharm. Bull.* 2006, 54, 458–464.