

G-KVADRUPLEXY V OBLASTI LIDSKÝCH TELOMER A JEJICH TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL

PAVLA HUBÁLKOVÁ^{a,b}

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Fyziologický ústav Akademie věd České republiky v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
pavla.hubalkova@fgu.cas.cz

Došlo 17.4.15, přijato 1.6.15.

Klíčová slova: G-kvadruplex, telomery, nádorová onemocnění

Obsah

1. Úvod
2. G-kvadruplexy a jejich terapeutický potenciál
 - 2.1. G-kvadruplexy
 - 2.2. G-kvadruplexy v oblasti telomer
 - 2.3. Stabilizace telomerického G-kvadruplexu – možný přístup k léčbě nádorových onemocnění
3. Závěr

1. Úvod

G-kvadruplexům je věnována zvýšená pozornost, především jako možnému cíli pro léčbu zhoubných nádorových onemocnění. Současná léčba s sebou stále nese mnoho komplikací a vedlejších účinků. Jedním z největších problémů je neselektivní působení a negativní účinek na normální zdravé buňky. G-kvadruplexy jsou typem sekundární struktury nukleových kyselin. Vyskytují se v sekvencích bohatých na guanin, jako jsou promotorové oblasti genů nebo na koncích chromosomů v oblastech zvaných telomery. Pomocí vhodného ligandu, který by stabilizoval pouze určitý typ G-kvadruplexu, by mohlo být dosaženo úspěšné a selektivní léčby nádorových onemocnění.

2. G-kvadruplexy a jejich terapeutický potenciál

2.1. G-kvadruplexy

Nejznámějším typem sekundární struktury nukleových kyselin, DNA a RNA, jsou šroubovice a vlásenky. Existují ale i další typy sekundární struktury nukleových kyselin, mezi které patří G-kvadruplexy. G-kvadruplexy se vyskytují v DNA i RNA v oblastech bohatých na purinovou bázi guanin. Spojením čtyř guaninových bází Hoogstenovým párováním vznikne planární G-kvartet

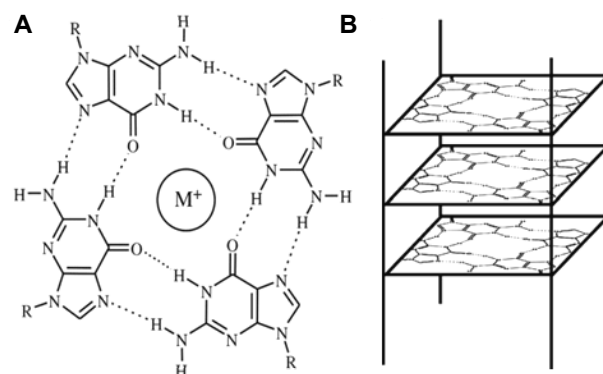
(obr. 1A). Každý guanin je zde akceptorem a donorem dvou vodíkových vazeb. Uspořádáním několika takových G-kvartetů nad sebou vznikne G-kvadruplex (obr. 1B). Celá struktura G-kvadruplexu je stabilizována pomocí jednomocných kationtů, v organismech nejčastěji K^+ (cit. 1–3).

Podle počtu a orientace vláken rozlišujeme několik typů G-kvadruplexů (obr. 2). Intramolekulární G-kvadruplexy (obr. 2 C–F) jsou tvořeny jedním vláknem nukleové kyseliny, které obsahuje minimálně čtyři úseky bohaté na guanin. Ze dvou (obr. 2B) až ze čtyř (obr. 2A) různých vláken nukleové kyseliny jsou tvořeny intermolekulární G-kvadruplexy. Podle orientace vláken rozlišujeme G-kvadruplexy paralelní (všechna vlákna mají stejnou orientaci, obr. 2A,D), antiparalelní (dvě vlákna jsou orientována v jednom směru, další dvě v opačném, obr. 2B,C,E) a smíšené (tři vlákna jsou orientována jedním směrem, čtvrté vlákno opačným, obr. 2F)³.

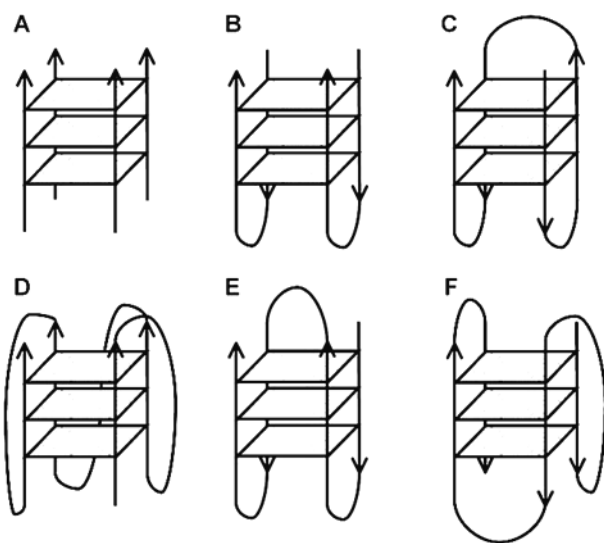
Který typ G-kvadruplexu na vláknech studované nukleové kyseliny v *in vitro* podmínkách vznikne, závisí na mnoha faktorech, například na délce vlákna, sekvenci bází, složení rozpouštědla a na druhu kationtu stabilizujícího G-kvadruplex^{4,5}. Význam a mechanismus vzniku G-kvadruplexů v živých systémech není ještě zcela pochopen. *In vivo* byl potvrzen výskyt G-kvadruplexů v promotorových oblastech některých genů⁶ a také v oblasti lidských telomer⁷. Předpokládá se, že G-kvadruplexy hrají roli v regulaci genové exprese a jejich tvorba a zánik také souvisí s aktivitou enzymu telomerasy a tím i s délkou telomer^{8–10}.

2.2. G-kvadruplexy v oblasti telomer

Telomery jsou koncové části eukaryotických chromosomů. Jejich hlavní funkcí je ochrana genomu před ztrátou dědičné informace a odlišení koncových oblastí



Obr. 1. Struktura G-kvartetu vzniklá interakcí čtyř guaninových bází Hoogstenovým párováním (A), uspořádání několika G-kvartetů nad sebou za vzniku G-kvadruplexu (B)³



Obr. 2. Možnosti uspořádání G-kvadruplexů podle počtu a uspořádání vláken nukleových kyselin; tetramolekulární paralelní (A), bimolekulární antiparalelní (B), monomolekulární antiparalelní (C), monomolekulární paralelní (D), monomolekulární antiparalelní (E), monomolekulární smíšený (F) G-kvadruplex³

chromosomů od míst poškození DNA a tím chrání před spuštěním odpovědi na poškození DNA^{11,12}.

Strukturně jsou telomery nukleoproteinové komplexy tvořené repetitivními úseky DNA bohatými na guanin a souborem specifických proteinů, který se nazývá shelterin¹³. Délka a sekvence telomerické DNA je specifická pro každý organismus. Lidské telomery jsou při narození dlouhé přibližně 15–20 kbp a obsahují repetitivní sekvenci 5'-(TTAGGG)_n-3' s jednořetězcovým přesahem na 3'-konci^{14,15}.

Délka telomer určuje počet buněčných dělení. S každým buněčným dělením dochází ke ztrátě 50–100 nukleotidů, protože DNA-polymerasa není při replikaci schopná prodlužovat opoždující vlákno DNA až do konce¹⁶. Tento jev vede k omezenému počtu buněčných dělení, kterému se říká Hayflickův limit¹⁷.

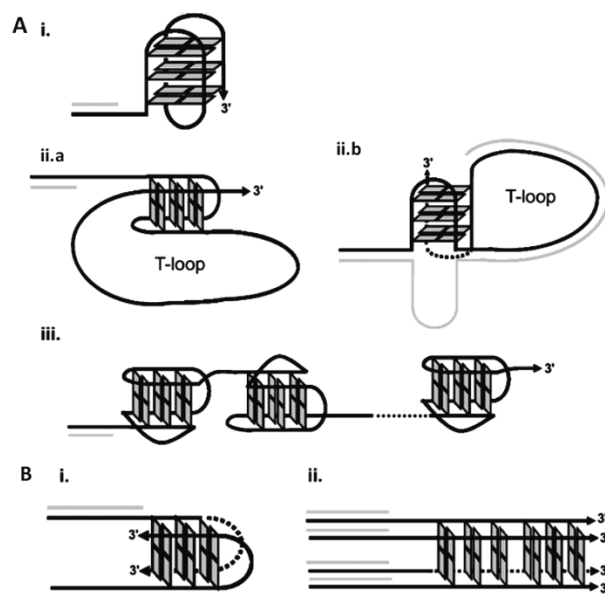
V některých buňkách je délka telomer udržována pomocí enzymu telomerasy, který přidává krátké repetitivní DNA sekvence na 3'-konec telomer. Lidská telomerasa se skládá ze dvou podjednotek – proteinové podjednotky s vlastnostmi reverzní transkriptasy hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) a RNA podjednotky hTR (human Telomerase RNA), která slouží jako vzor pro prodlužování telomerického 3'-konce¹⁸. Za fyziologických podmínek je telomerasa aktivní v embryonálních a kmenových buňkách. Patologicky je aktivita telomerasy zvýšena u 85–95 % nádorových buněk a umožňuje jejich neomezené dělení^{19,20}. Ve většině somatických buněk se telomerasa nevyskytuje, výjimku tvoří pouze buňky s vysokou schopností růstu a regenerace, jako jsou bazální buňky epidermis²¹, hematopoetické^{22,23} a endoteliální

buňky²⁴, aktivované lymfocyty²⁵, epitheliální buňky střevní sliznice²⁶ a buňky vlasových folikulů²⁷. V těchto buňkách je ale aktivita telomerasy nižší než u nádorových buněk, nedokáže udržovat plnou délku telomer, a dochází pouze ke zpomalení zkracování telomer a tím k prodloužení životnosti buněk^{26,28,29}.

Jednořetězcový přesah na 3'-konci telomer je po většinu buněčného cyklu sbalen v podobě shelterinového komplexu a brání tak rozpoznání konců chromosomů jako dvouřetězcových zlomů a spuštění opravných mechanismů, dále chrání před rekombinací, degradací exonukleasami a fúzí s dalšími chromosomy³⁰. Původně se uvažovalo pouze o vytvoření jednoduché T-smyčky^{31,32}. Nyní se ukazuje, že repetitivní na guanin bohatá sekvence telomerické DNA může tvořit G-kvadruplexy^{33,34}.

In vivo byla existence G-kvadruplexů v telomerické oblasti poprvé prokázána u nálevníka *Stylonychia lemnae*. Tento prvek je vyhledávaný modelový organismus pro studium telomer, jeho makronukleus obsahuje miliony chromosomů, tedy i mnohem větší množství telomerické DNA než ostatní organismy³⁵. V případě lidských telomer byly G-kvadruplexy *in vivo* poprvé prokázány radioaktivně značeným G-kvadruplexovým ligandem ³H-360A (cit.⁷).

V oblasti telomer se uvažuje několik možností sbalení G-kvadruplexů (obr. 3). Intramolekulární G-kvadruplex by mohl být tvořen místo T-smyčky na konci jednořetězcového přesahu (obr. 3Ai), případně by se G-kvadruplex mohl tvořit jako součást T-smyčky (obr. 3Aii.a a 3Aii.b). Za účelem kondenzace telomerického jednořetězcového pře-



Obr. 3. Předpokládané možnosti sbalení G-kvadruplexů v oblasti telomer. Monomolekulární G-kvadruplex místo T-smyčky (Ai), jako součást T-smyčky (Aii), několik G-kvadruplexů za sebou (Aiii), bimolekulární (Bi) a tetramolekulární (Bii) G-kvadruplex³⁶

sahu je možno předpokládat vytvoření i několika G-kvadruplexů za sebou (obr. 3Aiii). Intermolekulární (bimolekulární (obr. 3Bi) nebo tetramolekulární (obr. 3Bii) sbalování telomerických přesahů G-kvadruplexů by mohlo hrát roli při meiose. Případně by také mohly tvořit ochrannou strukturu na koncích telomer, pokud by telomerické vlákno bylo příliš krátké a nemohlo by samostatně vytvořit intramolekulární G-kvadruplex nebo T-smyčku. G-kvadruplex by se mohl tvořit i v dvouřetězcové oblasti telomerické DNA. Komplementární na cytosin bohaté vlákno by se stejně jako v promotorových oblastech genů mohlo sbalit do struktury označované jako i-motiv^{12,36}.

2.3. Stabilizace telomerického G-kvadruplexu – možný přístup k léčbě nádorových onemocnění

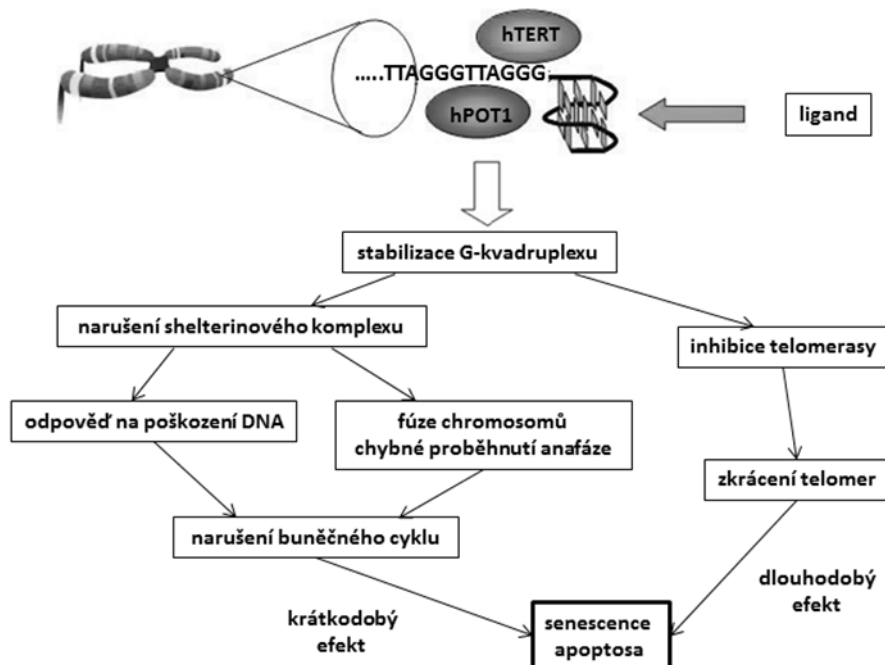
Mezi nejrozšířenější způsoby léčby zhoubných nádorových onemocnění patří chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie, radioterapie nebo biologická léčba. Často se používá kombinace několika léčebných přístupů, ale i tak je s léčbou spojeno mnoho komplikací a vedlejších účinků a účinnost léčby je stále nedostatečná. Největším problémem je neselektivní působení a poškození i normálních zdravých buněk. Proto se stále hledají nové, selektivní způsoby léčby. Významným rozdílem mezi normální zdravou a nádorovou buňkou je její replikační potenciál a rychlost buněčného dělení. Nádorové buňky mají oproti normálním nenádorovým buňkám obvykle velmi krátké telomery (2–5 kbp), které jsou ale prodlžovány enzymem telomerasou. Těchto rozdílů mezi nádorovými a nenádoro-

vými buňkami by mohlo být úspěšně využito v léčbě^{11,37}.

Jedním z možných přístupů selektivní léčby zhoubných nádorových onemocnění je stabilizace telomerického G-kvadruplexu pomocí malomolekulového ligandu^{37–39}. G-kvadruplexové ligandy by mohly selektivně omezovat růst pouze nádorových buněk, aniž by měly vliv na normální nenádorové buňky^{40,41}. Tato interakce zahrnuje dva možné mechanismy účinku – tzv. krátkodobý a dlouhodobý efekt (obr. 4)⁴².

Dlouhodobý efekt (obr. 4) je založen na zablokování interakce enzymu telomerasy s koncovou částí telomer. Pokud je telomerický jednořetězcový přesah sbalen do G-kvadruplexu, hTR podjednotka enzymu se nemůže navázat, a tím je zablokován první krok prodlužování telomer a s každým buněčným dělením dochází k jejich zkracování. Jelikož je délka telomer u nádorových buněk v porovnání s normálními nenádorovými buňkami výrazně kratší, docházelo by tak u nádorových buněk k rychlejším zániku bez negativního ovlivnění normálních nenádorových buněk^{36,39,43,44}.

Experimentálně je však prokázáno, že efekt některých ligandů je pozorovatelný již v mnohem kratší době, tzv. krátkodobý efekt (obr. 4), který je z terapeutického hlediska mnohem zajímavější. Stabilizací telomerického G-kvadruplexu vazbou malomolekulového ligandu dojde k narušení obvyklé struktury telomer a shelterinového komplexu, což vede ke spuštění odpovědi na poškození DNA a tvorbě dvouřetězcových zlomů, fúzi chromosomů, chybnému proběhnutí anafáze, k senescenci a k indukci apoptosy. Tento krátkodobý efekt se projeví v průměru



Obr. 4. Sled předpokládaných událostí po stabilizaci telomerického G-kvadruplexu malomolekulovým ligandem⁴²

za 5–10 dní a nedochází při něm k výraznému zkrácení telomer^{39,41,45,46}.

Bylo popsáno i synergické působení G-kvadruplexových ligandů v kombinaci s běžně používanými chemoterapeutiky (například paclitaxel, imatinib). Kombinací G-kvadruplexový ligand-chemoterapeutikum bylo dosaženo lepších výsledků při léčbě nádorových onemocnění než při použití samotného chemoterapeutika^{39,47–49}.

3. Závěr

G-kvadruplexy jsou specifické struktury nukleových kyselin a vyskytují se v promotorových oblastech onkogenů a v telomerických oblastech na koncích chromosomů. Obě tyto oblasti hrají roli při vzniku a vývoji nádorových onemocnění. G-kvadruplexy jsou tak v současné době předmětem intenzivního studia jako možného cíle pro léčbu zhoubných nádorových onemocnění. Hledají se především nová léčiva – malomolekulové ligandy, které by specificky stabilizovaly určitý typ G-kvadruplexu, a tím by bylo dosaženo selektivní léčby nádorových onemocnění.

Ráda bych poděkovala panu prof. Martinu Fuskovi a dr. Filipovi Teplému za pomoc při psaní tohoto článku.

LITERATURA

- Bryan T. M., Baumann P.: *Mol. Biotechnol.* 49, 198 (2011).
- Davis J. T.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 43, 668 (2004).
- Huppert J. L.: *Chem. Soc. Rev.* 37, 1375 (2008).
- Palacky J., Vorlickova M., Kejnovska I., Mojzes P.: *Nucleic Acids Res.* 41, 1005 (2013).
- Vorlickova M., Chladkova J., Kejnovska I., Fialova M., Kypr J.: *Nucleic Acids Res.* 33, 5851 (2005).
- Balasubramanian S., Hurley L. H., Neidle S.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 10, 261 (2011).
- Granotier C., Pennarun G., Riou L., Hoffschir F., Gauthier L. R., De Cian A., Gomez D., Mandine E., Riou J. F., Mergny J. L., Mailliet P., Dutrillaux B., Boussin F. D.: *Nucleic Acids Res.* 33, 4182 (2005).
- Henderson A., Wu Y., Huang Y. C., Chavez E. A., Platt J., Johnson F. B., Brosh R. M., Jr., Sen D., Lansdorp P. M.: *Nucleic Acids Res.* 42, 860 (2014).
- Lam E. Y., Beraldi D., Tannahill D., Balasubramanian S.: *Nat. Commun.* 4, 1796 (2013).
- Lipps H. J., Rhodes D.: *Trends Cell Biol.* 19, 414 (2009).
- Gomez D. E., Armando R. G., Farina H. G., Menna P. L., Cerrudo C. S., Ghiringhelli P. D., Alonso D. F.: *Int. J. Oncol.* 41, 1561 (2012).
- Neidle S., Parkinson G. N.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 275 (2003).
- de Lange T.: *Genes Dev.* 19, 2100 (2005).
- Moyzis R. K., Buckingham J. M., Cram L. S., Dani M., Deaven L. L., Jones M. D., Meyne J., Ratliff R. L., Wu J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6622 (1988).
- Wright W. E., Tesmer V. M., Huffman K. E., Levene S. D., Shay J. W.: *Genes Dev.* 11, 2801 (1997).
- Olovnikov A. M.: *J. Theor. Biol.* 41, 181 (1973).
- Hayflick L., Moorhead P. S.: *Exp. Cell Res.* 25, 585 (1961).
- Meyerson M.: *J. Clin. Oncol.* 18, 2626 (2000).
- Hiyama E., Hiyama K.: *Cancer Lett.* 194, 221 (2003).
- Shay J. W.: *J. Cell. Physiol.* 173, 266 (1997).
- Harlebachor C., Boukamp P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6476 (1996).
- Chiu C. P., Dragowska W., Kim N. W., Vaziri H., Yui J., Thomas T. E., Harley C. B., Lansdorp P. M.: *Stem Cells* 14, 239 (1996).
- Broccoli D., Young J. W., Delange T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9082 (1995).
- Hsiao R. S., Sharma H. W., Ramakrishnan S., Keith E., Narayanan R.: *Anticancer Res.* 17, 827 (1997).
- Counter C. M., Gupta J., Harley C. B., Leber B., Bacchetti S.: *Blood* 85, 2315 (1995).
- Hiyama E., Tatsumoto N., Kodama T., Hiyama K., Shay J. W., Yokoyama T.: *Int. J. Oncol.* 9, 453 (1996).
- Ramirez R. D., Wright W. E., Shay J. W., Taylor R. S.: *J. Invest. Dermatol.* 108, 113 (1997).
- Yasumoto S., Kunitura C., Kikuchi K., Tahara H., Ohji H., Yamamoto H., Ide T., Utakoji T.: *Oncogene* 13, 433 (1996).
- Hiyama K., Hirai Y., Kyoizumi S., Akiyama M., Hiyama E., Piatyszek M. A., Shay J. W., Ishioka S., Yamakido M.: *J. Immunol.* 155, 3711 (1995).
- Blackburn E. H.: *Cell* 106, 661 (2001).
- Greider C. W.: *Cell* 97, 419 (1999).
- Griffith J. D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R. M., Bianchi A., Moss H., de Lange T.: *Cell* 97, 503 (1999).
- Phan A. T., Luu K. N., Patel D. J.: *Nucleic Acids Res.* 34, 5715 (2006).
- Lee J. Y., Okumus B., Kim D. S., Ha T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18938 (2005).
- Schaffitzel C., Berger I., Postberg J., Hanes J., Lipps H. J., Pluckthun A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8572 (2001).
- Oganesian L., Bryan T. M.: *BioEssays* 29, 155 (2007).
- Shay J. W., Wright W. E.: *Radiat. Res.* 155, 188 (2001).
- Buseman C. M., Wright W. E., Shay J. W.: *Mutat. Res.* 730, 90 (2012).
- Neidle S.: *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*. Elsevier, London 2012.
- Granotier C., F. C. Boussin, v knize: *DNA Repair and Human Health* (Vengrova S., ed), kap. 22. InTech, Croatia 2011.
- Tahara H., Shin-Ya K., Seimiya H., Yamada H., Tsuro T., Ide T.: *Oncogene* 25, 1955 (2006).
- Neidle S.: *FEBS J.* 277, 1118 (2010).
- Kelland L.: *Clin. Cancer Res.* 73, 4960 (2007).

44. Shinohara K., Sannohe Y., Kaieda S., Tanaka K., Osuga H., Tahara H., Xu Y., Kawase T., Bando T., Sugiyama H.: *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 3778 (2010).
45. Gunaratnam M., Greciano O., Martins C., Reszka A. P., Schultes C. M., Morjani H., Riou J. F., Neidle S.: *Biochem. Pharmacol.* **74**, 679 (2007).
46. Incles C. M., Schultes C. M., Kempinski H., Koehler H., Kelland L. R., Neidle S.: *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1201 (2004).
47. Gowan S. M., Harrison J. R., Patterson L., Valenti M., Read M. A., Neidle S., Kelland L. R.: *Mol. Pharmacol.* **61**, 1154 (2002).
48. Phatak P., Burger A. M.: *Br. J. Pharmacol.* **152**, 1003 (2007).
49. Tauchi T., Shin-ya K., Sashida G., Sumi M., Nakajima A., Shimamoto T., Ohyashiki J. H., Ohyashiki K.: *Oncogene* **22**, 5338 (2003).

P. Hubálková (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **G-quadruplexes in Human Telomeric Region and Their Therapeutic Potential**

G-quadruplexes are types of secondary structures of nucleic acids, which are formed in guanine-rich regions. Their existence *in vivo* was confirmed in promoter regions of some genes and at the end of chromosomes in the telomeric regions. The specific structure of G-quadruplexes is a promising target in cancer treatment. There is a search for small ligands, which could stabilize a specific type of G-quadruplexes. Cancer cells are markedly different from normal cells in the telomeric region: the regions are profoundly shorter. Telomeric regions in cancer cells are prolonged by an enzyme telomerase, while this enzyme is inactive in almost all somatic cells. Stabilization of telomeric G-quadruplex by a specific small ligand induces disruption of a normal protective function of telomers leading to cell damage and its death. This approach could be successful in cancer treatment.