

Nobelpriset om telomerers skyddsfunktion kan ge stor klinisk nytta

Flera forskningsmål i sikte ...
inte bara nya cancerterapi



GÖRAN ROOS, professor, överläkare
goran.roos@medbio.umu.se
PIA OSTERMAN, forsknings-

ingenjör; båda institutionen för
medicinsk biovetenskap, en-
heten för patologi, Umeå universi-
tet

2009 års Nobelpris i fysiologi eller medicin – som tilldelats Elizabeth H Blackburn, Carol W Greider och Jack W Szostak för upptäckten av »hur kromosomerna skyddas av telomerer och enzymet telomeras« – belönar fynd som fått stort genomslag inom skilda biomedicinska forskningsfält.

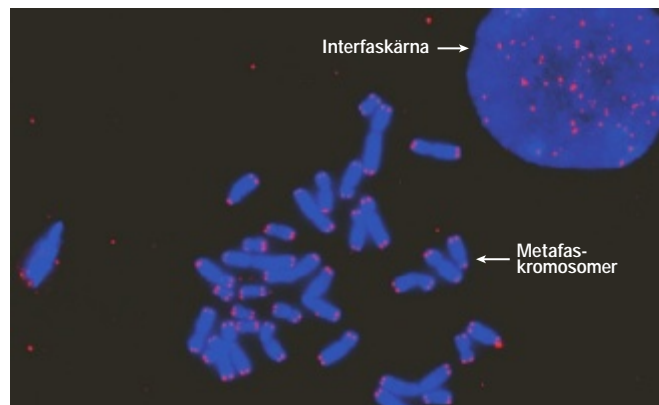
Den belönade upptäckten gjordes på 1980-talet under studier av jästceller och Tetrahymena, en protozo med riklig mängd kromosomer lämpliga för cellbiologiska analyser av kromosomernas uppbyggnad och funktion. I de första publikationerna [1, 2] beskrevs strukturen av kromosomernas ändpartier, telomererna, vilka visades vara uppbyggda av repetitiva DNA-sekvenser ($[(TTAGGG/CCCTAA)_n]$ hos människa). Telomerernas längd varierar mellan olika kromosomer, i olika celltyper och bland olika arter och är i medeltal hos människa 6 000–10 000 baser långa.

In situ-hybridisering av celler i metafase med användning av en fluorokrommärkt telomerprob illustrerar vackert telomerernas position och att de varierar i längd (här = signalstyrka) mellan olika kromosomändar (Figur 1). Deras huvudsakliga funktion har senare visats vara att stabilisera och skydda kromosomerna från nedbrytning.

Ungefär samtidigt visade studier av cellkulturer (främst av bindvävsceller) att telomererna förkortas för varje celledelning, ett fenomen som tidigare på teoretiska grunder förutsetts kunna ske [3].

I normala humana celler tappar nämligen kromosomerna 50–200 baspar i slutet av telomeren för varje celledelning, beroende på att DNA-sekvensen inte kan replikeras fullt ut, det sk ändreplikationsproblemet (Figur 2). Telomeren kan anses vara uppbyggd av »skräp-DNA«, som inte kodar för något protein men som kan fungera som en »klocka« för cellens ålder. Ju kortare telomererna är, desto fler celledelningar har cellen genomgått.

Man kunde också visa en stark koppling mellan korta telomerer och när normala celler slutar dela sig; dvs vid en kritisk



Figur 1. Fluorescent in situ-hybridisering (FISH) av normala celler i metafase och interfase. Signalstyrkan är proportionell mot telomerlängden.

FISH-preparation: Sofie Degerman, institutionen för medicinsk biovetenskap, Umeå universitet, och Katarina Nordfjäll, ST-läkare, Östersunds sjukhus.

gräns tillåts inte fler delningar, och cellen börjar åldras för att slutligen dö.

Telomeras ger cellen förmåga till evigt liv

För att celler ska kunna genomgå ett stort antal celledelningar krävs en mekanism som gör att telomerernas längd upprätthålls. Denna mekanism var okänd fram till 1985 då Carol Greider och Elizabeth Blackburn publicerade en artikel [4] där de beskrev att enzymaktivitet i proteinextrakt från Tetrahymena kunde förlänga och skapa nya telomerändar (Figur 2). Denna aktivitet kom senare att kallas telomeras och visade sig vara ett omvänt transkriptas, dvs förutom en proteindel med katalytisk aktivitet bär det med sig en RNA-komponent som fungerar som en mall för den nukleotidsekvens som adderas till kromosomändarna (Figur 3). Blackburn och Greider var även de första att påvisa RNA-komponentens funktion och betydelse [5]. Inom medicinen har påvisandet av telomerers biologi har visats vara viktig även för uppkomst av andra sjukdomar.

Telomeras är egentligen ett multiprotein-RNA-komplex, vars beståndsdelar varierar mellan olika arter. Det aktiva komplexet hos människa utgörs av dimerer av den katalytiska subenheten (hTERT), RNA-komponenten (hTR) och dyskerin, ett protein som binder till RNA-molekylen. Förutom dessa beståndsdelar har en mängd olika proteiner visats kun-

■ sammanfattat

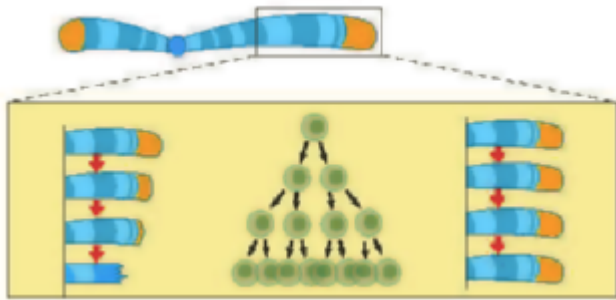
Genom upptäckten av telomerens struktur och telomerasetts funktion lades grunden för ett forskningsfält, som under de senaste 25 åren vuxit närmast exponentiellt om man ser till antalet publicerade artiklar.

Det som startade med studier av repetitiva DNA-sekvenser hos en encellig organism har initierat en mycket bred forskning av såväl experimentell som klinisk natur. **Denna forskning** har visat att

telomerer och telomeras är funktionellt konserverade i olika organismer och att telomerer är viktiga för cellers naturliga åldrande.

Mutationer i telomeraskomplexets gener är sjukdomsframkallande.

En central egenskap för cancerceller är förmågan att upprätthålla en viss telomerlängd, och telomeraskomplexet utgör ett potentiellt mål för nya cancerterapi.



Figur 2. Normala celler förlorar sina telomerer, och maligna, telomeraspositiva celler behåller sina telomerer för varje celledning. Utan telomeras förkortas kromosomen varje gång cellen delar sig. Slutligen bryts den ner. Telomeras förlänger telomererna och säkerställer därmed att kromosomen inte blir kortare.

Grafik: Annika Röhl/Nobelkommittén för fysiologi eller medicin

na interagera med telomeraskomplexet. Att telomeras är viktigt för encelliga organismer, som kan anses odödliga, bevisas av att om man muterar telomeraset förkortas telomererna, och cellerna dör.

Telomerasaktivitet kan påvisas i spermier, i blastocyststadiet och i de flesta embryonala vävnader tidigt under graviditeten för att därefter försvinna. Telomeras uttrycks vanligtvis inte i vuxna normala kroppsceller. Undantag är stamceller och progenitorceller i epitel och benmärg samt aktiverade lymfocyter i blod och lymfkörtlar. Som regel rör det sig om celler i vävnader som ständigt förnyas under livet och där det är en fördel att ibland kunna ge ett nyttillskott av telomerasekvenser. Telomerasaktiviteten är ofta övergående och nedregleras när cellerna differentierar.

Den telomerasaktivitet som kan detekteras i normala celler är vanligtvis inte tillräckligt hög för att förhindra förkortning av telomerlängd med stigande ålder. Ett undantag är spermatogenesis, där telomerasets aktivitet med ökande ålder faktiskt leder till viss förlängning av spermernas telomerer. Det är naturligtvis av yttersta vikt att det DNA som ska bidra till framtida generationer är så stabilt som möjligt, och till detta bidrar ett fungerande »telomerskydd« för spermie-DNA:t.

Flertal proteiner med i processen

Den cellulära regleringen av telomerlängden, som är mycket komplex, är i dagsläget inte helt klarlagd. Förutom telomeras finns det ett flertal proteiner som binder till telomererna och reglerar deras längd och tillgänglighet för telomeras. Bland de mest studerade är sex proteiner som tillsammans bildar shelterinkomplexet (TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1 och Pot-1) [6]. Sammansättningen av shelterinkomplexet är viktig för strukturen av telomererna och hjälper cellen att skilja funktionella kromosomändar från DNA-skador.

Telomeren kan ses i två konformationer, antingen som »öppen« eller upprullad i en T-loop (telomerloop). I T-loopsstrukturen har telomerändan invaderat sin egen telomerasekvens och blir på så vis skyddad.

Sjukdomsframkallande telomerasmutationer

Mutationer i telomerasets olika komponenter har visat sig ge

»Mutationer i telomerasets olika komponenter har visat sig ge allvarliga effekter i många celltyper och organ...«

allvarliga effekter i många celltyper och organ och kan bidra till uppkomst av skilda sjukdomar. Gemensamt för många av dessa sjukdomar är påverkan på benmärgens celler, vilka hos dessa patienter har kortare telomerer än vad motsvarande friska personer har. Mutationer i hTR- eller hTERT-generna förekommer hos bla patienter med diagnosen idiopatisk aplastisk anemi eller myelodysplastiskt syndrom [7].

Dyskeratosis congenita är en multisystemsjukdom associerad med kutan pigmentering, nagelförändringar, leukoplaki i munslemhinnan, atresi av tårkanalen, aplastisk anemi, lungfibros och hos manliga patienter som regel testikelatrofi. Vid denna sjukdom är antingen genen för dyskerin (DKC1) eller hTERT- eller hTR-genen muterad. Vanligast är mutationer i DKC1-genen (35 procent) [8].

Mutationer i DKC1-genen hittar man även hos patienter med Höyeraal-Hreidarssons syndrom, en multisystemsjukdom som karakteriseras av aplastisk anemi, immunbrist, mikrocefali och tillväxtstörning [9].

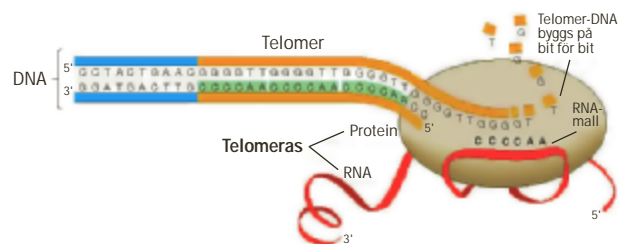
Idiopatisk lungfibros debuterar i vuxen ålder och leder till letal bindvävsomvandling av lungparenkymet. Såväl ärftliga som sporadiska former av sjukdomen finns. Nyligen har visats att mutationer i hTERT- eller hTR-generna resulterar i telomerförkortning, vilken med tiden bidrar till ökad känslighet för att utveckla idiopatisk lungfibros [10].

Koppling mellan telomerer och cancer

Kromosomer utan telomerer kan liknas vid en DNA-skada, ett dubbelsträngsbrott, som cellen försöker att reparera. Ett sätt kan vara att olika kromosomändar sätts ihop så att dicentriska kromosomer bildas. Vid celledning riskerar de att brytas sönder, varvid det genetiska materialet fördelas ojämnt mellan dottercellerna. På detta vis kan kromosomala avvikelser uppstå, vilka teoretiskt kan bidra till tumöruppkomst. Det har också visat sig att tumörer har kortare telomerer än motsvarande normalvävnad, vilket kunde förklaras med att tumörcellerna genomgått ett jämförelsevis större antal celledningar än normalvävnaden.

Vi studerade i början av 1990-talet njurcancer och antog att antalet cellcykler som tumörerna hade genomgått skulle kunna bedömas retrospektivt genom att analysera deras telomerlängd. Resultatet var som väntat att de flesta tumörerna hade kortare telomerer än normal njurvävnad, och utifrån dessa data gjordes beräkningar av antal genomgångna celledningar [11]. Vi fann dock att det inte fanns någon koppling mellan antal beräknade celledningar och tumörstorlek och föreslog att det kunde bero på telomerasaktivitet, som man då ännu inte påvisat i tumörer men väl i kulturer av maligna celler in vitro.

Samma år påvisades också för första gången aktivt telomeras i humana maligniteter [12, 13]. För att kunna visa denna



Figur 3. Principskiss av hur telomeras förlänger telomerer. Angiven DNA-sekvens för telomeren avser Tetrahymena. Enzymet telomeras arbetar på kromosomens ände; det består av ett protein och en RNA-sekvens. RNA-delen är mall när telomer-DNA bildas i änden på kromosomen.

Grafik: Annika Röhl/Nobelkommittén för fysiologi eller medicin

»En viktigare faktor än telomerasaktivitet verkar den faktiska telomerlängden i tumörcellerna vara.«

aktivitet användes konventionell molekylärbiologisk metodik, som var tidsödande, relativt okänslig och krävde många celler. Snart därefter presenterades en PCR-baserad teknik med vilken telomerasprodukten (nybildade telomerasekvenser) kan mångfaldigas och därigenom visualiseras [14]. PCR-metoden har mycket högre känslighet, och så lite som 50–100 telomeraspositiva celler kan detekteras. Därefter startade en snabb utveckling av telomerbiologisk forskning, där data från skilda modellorganismer berikat studier av mänskliga celler på ett mycket positivt sätt.

Telomeras spelar dubbelroll i tumörutveckling

Telomeras verkar alltså kunna spela dubbla roller. Å ena sidan är dess funktion att förhindra uppkomst av tumörer genom att det nedregleras i de flesta celltyper efter födseln. Dessa celler kan genomgå ett begränsat antal celldelningar innan telomeraserna blir kritiskt korta och cellen får signaler som leder till tillväxtstopp. Å andra sidan bidrar telomeras till tumöruppkomst genom att det vid aktivering stabiliserar/förlänger telomerlängden, vilket möjliggör fler celldelningar och i princip obegränsad tillväxt.

I en ofta citerad översiktsartikel identifierade Hanahan och Weinberg [15] »cancers kännetecken«, och ett av dessa var »obegränsad replikativ potential«, dvs förmåga till obegränsat antal celldelningar. För denna förmåga krävs att en viss telomerlängd behålls intakt, och i ett stort antal studier har visats att 80–90 procent av alla maligna tumörer har aktivt telomeras och alltså förmåga att bibehålla sina telomeras. Som påpekats ovan är telomerlängden i tumörer ofta kortare än i motsvarande normal vävnad, trots närvaro av telomeras.

Man kan här spekulera om huruvida telomerasaktivering är en sen händelse i tumörutvecklingen. Ett tänkbart scenario är att cellerna erhåller mutationer som stimulerar dem att växa okontrollerat och inte reagera på normala bromsande signaler. De förkortar sina telomeras och erhåller fler genetiska förändringar, som kan leda till bl a aktivering av telomeras. Telomeraset stabiliserar härefter den korta telomerlängden och möjliggör obegränsad celldelning.

Telomerasnegativa tumörer är alltså ovanliga, och de har ofta utvecklats en annan mekanism för att upprätthålla telomerlängden. Denna mekanism bygger på homolog rekombination och kallas ALT (alternative lengthening of telomeres). ALT-mekanismen ses framför allt i sarkom och hjärntumörer. Det är inte känt hur stor andel av de telomerasnegativa tumörerna som använder sig av ALT och huruvida bägge mekanismerna (ALT och telomeras) kan samexistera i tumörer. In vitro, i cellinjer, har man kunnat kombinera dessa två system.

Ett stort antal studier har analyserat telomerasaktivitet i humana tumörer i relation till kliniskt förlopp och prognos. Resultaten är motstridiga för de flesta tumörformer, och tidiga data som fann en koppling mellan höga telomerasnivåer och dålig prognos har inte visat sig hålla.

Telomerernas längd kanske viktigare än telomerasaktivitet

En viktigare faktor än telomerasaktivitet verkar den faktiska telomerlängden i tumörcellerna vara. Detta gäller speciellt hematopoetiska maligniteter för vilka ett genomgående fynd är att korta telomeras är associerade med progressiv sjukdom.

Den mest studerade sjukdomen i detta avseende är kronisk lymfatisk leukemi där telomerlängd (och hög telomerasakti-

vit) visats vara en oberoende prognostisk biomarkör. Liknande fynd har gjorts vid multipelt myelom och myelodysplastiskt syndrom. Här indikerar korta telomeras snabbare utveckling till akut leukemi. I referens 16 ges en översikt av telomerlängd som biomarkör vid malignitet.

Telomeras som mål för cancerterapi

Eftersom telomeras är aktiverat i merparten av maligna tumörer och saknas i de flesta normala celler, är telomeras ett teoretiskt attraktivt mål för cancerterapi. Skilda tillvägagångssätt testas nu experimentellt och i kliniska försök [17]. Hämmning av telomeras bör leda till telomeraförkortning och slutligen cellens död, men det kan behövas (alltför) många celldelningar innan denna effekt uppnås. Därför har en tanke varit att använda telomerashämmare efter kirurgi och cellgiftsbehandling för att »ta hand om« eventuella kvarvarande tumörceller. Det har bedömts att normala celler med övergående aktivering av telomeras inte påverkas allvarligt av sådan behandling.

Man kan även tänka sig framtida terapeutiska ansatser, där effekten är direkt toxisk i celler som uttrycker telomeras. Kliniska försök pågår i dagsläget med telomerasinhibitorer och även med TERT-immunterapi, där tanken är att stimulera immunförsvaret att »städa bort« tumörceller som uttrycker telomeras.

Telomerernas biologi starkt kopplad till cellers åldrande

Som påpekats ovan finns i cellkulturer en stark koppling mellan telomeraförkortning och antal celldelningar. På samma sätt ses kortare telomeras i blodceller hos äldre individer än hos yngre personer. Det är också så att kvinnor i sina blodceller har något längre telomeras än män, varför det har varit naturligt att göra en koppling till kvinnors och mäns livslängd. Kvinnor tycks således förlora mindre telomerasekvens än män för varje celldelning inom hematopoesen.

Genetiskt modifierade möss som saknar fungerande telomeras visar initialt inga förändringar. Detta beror på att möss har mycket långa telomeras, och först efter fyra generationer har telomeraserna blivit så korta att fenotypiska förändringar uppträder. Mössen visar då gråhårig päls, dålig sårhäkning, slemhinneatrofi i mag-tarmkanalen, försämrade blodvärden och sterilitet, förändringar som delvis påminner om naturligt åldrande.

Det finns sjukdomar där ett av symtomen är för tidigt åldrande (ataxi-telangiektasisyndromet, Werners syndrom, Fanconis anemi), och dessa patienter uppvisar kortare telomeras än motsvarande friska individer. Bakomliggande orsak för dessa sjukdomar verkar vara mutationer i gener som bidrar till reparation av DNA-skador.

Telomerernas biologi är således starkt associerad med cellers replikativa förmåga och med cellulärt åldrande, men på organismnivå är åldrandeprocessen mycket mer komplicerad och påverkas av en rad skilda faktorer.

Blodcellers telomerlängd fungerar som biomarkör

För människa finns det många studier av telomerlängd i blodceller och dess relation till patofysiologiska och epidemiologiska faktorer samt till skilda sjukdomar. Kortare telomeras hos patienter än i matchade kontrollmaterial har beskrivits vid tex hypertoni, diabetes, cancer, fetma, abnorma blodlipi-

»... tanken är att stimulera immunförsvaret att 'städa bort' tumörceller som uttrycker telomeras.«

der, långvarig psykisk belastning, inaktivitet och hos rökare. Skilda publikationer är dock inte helt överensstämmande, och konsensus har knappats nåtts helt avseende någon av dessa faktorer.

En gemensam nämnare för många tillstånd/faktorer som kopplats till kortare telomerer är oxidativ stress, vilket är en känd faktor som kan bidra till ökade telomerförluster. Analyser av epidemiologisk natur är svåra, eftersom vår telomerlängd tidigt i livet till stor del bestäms av arvet (främst från fadern) för att senare påverkas av livsstil och omgivningsfaktorer. Ytterligare en komplicerande faktor är att den individuella telomerförlusten till en del bestäms av ursprungslängden på telomererna, på så sätt att individer med långa telomerer visat den mest uttalade telomerförkortningen under en viss tidsperiod.

Ett förvånande men intressant fynd är att telomerlängd i blod kan vara en prognostisk faktor vid cancer. Den patientgrupp som hade långa telomerer i buffy coat-celler (granulocyter, lymfocyter och monocytter) från perifert blod befanns nämligen ha sämre prognos än övriga patienter. Detta resultat har erhållits från patienter med såväl bröst- som njurcancer. I båda patientgrupperna var telomerlängd en signifikant oberoende prognostisk indikator [16]. Dessa data tyder ytterligare på att telomerlängden i blod inte är statisk utan kan påverkas, som i detta fall av tumörsjukdom. Mekanismerna bakom dessa förändringar är komplexa och har ännu inte klarlagts.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

REFERENSER

1. Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*. 1984;310(5973):154-7.
2. Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*. 1982;29(1):245-55.
3. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-60.
4. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43:405-13.
5. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989;337(6205):331-7.
6. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100-10.
7. Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PM, Chanock SJ, Nunez O, Sloand E, et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2003;102(3):916-8.
8. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. 1999;402(6761):551-5.
9. Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, Aalfs CM, McMahon C, Richmond P, et al. Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1. *Br J Haematol*. 1999;107(2):335-9.
10. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7552-7.
11. Mehle C, Ljungberg B, Roos G. Telomere shortening in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1994;54(1):236-41.
12. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(8):2900-4.
13. Nilsson P, Mehle C, Remes K, Roos G. Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene*. 1994;9(10):3043-8.
14. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266:2011-5.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
16. Svensson U, Roos G. Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(4):317-23.
17. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):167-79.