

CUVÂNTUL AUTORULUI

De la descoperirea lor în 1938 de către Herman J. Muller și până în prezent, interesul științific pentru capetele cromozomilor a avut o evoluție interesantă. Dacă la început, interesul pentru studiul terminațiilor cromozomilor a fost foarte scăzut, imediat după demonstrarea rolului lor în menținerea integrității cromozomilor de către Barbara McClintock în anul 1940, interesul oamenilor de știință a crescut din ce în ce mai mult atingând un punct maxim în anii 2000 când a fost evidențiat rolul disfuncției telomerilor în senescență, în dezvoltarea cancerului și a bolilor asociate procesului de îmbătrânire.

Ca multe alte descoperiri majore care la început au provocat amuzamentul publicului sau mai grav persecutarea autorilor, discuțiile despre existența microcosmosului telomeric nu ar fi stârnit poate decât râsul în urmă cu 100 de ani. Cu toate acestea, în menținerea lungimii telomerilor stă puterea de care are nevoie viața pentru a se împotrivi morții.

Numeroase studii despre factorii cauzativi ai procesului de îmbătrânire și ai bolilor asociate au revoluționat domeniul telomeric al cromozomilor umani și au deschis noi căi de abordare a mecanismelor moleculare și celulare ale proceselor de îmbătrânire și tumorigeneză. De altfel, progresele realizate în domeniul cunoașterii bolilor asociate îmbătrânirii au condus în mare parte la înțelegerea fenomenelor fundamentale care caracterizează acest proces.

Îmbătrânirea organismului și dezvoltarea bolilor asociate acestui proces preocupă deopotrivă atât oamenii de știință cât și simpli cetățeni. Tot mai mult apare întrebarea: este posibil ca procesul de îmbătrânire să fie întârziat și speranța de viață să fie extinsă? Înainte de a se răspunde la această întrebare, ar fi bine să ne amintim de celebra maximă a lui Cicero *“Pugnandum tamquam contra morbum sic contra senectutem”* (Să luptăm împotriva senectuții așa cum luptăm împotriva morții) și să acționăm în consecință. Pentru aceasta este nevoie să se înțeleagă mai întâi mecanismele moleculare și celulare care stau la baza evoluției procesului de îmbătrânire și apoi să se dezvolte strategii eficiente care să conducă la

întârzierea apariției bolilor bătrâneții, care sunt principalele cauze ale morții, dar fără să crească riscul de apariție a cancerului, deopotrivă o boală a bătrâneții.

O carte despre structura și funcțiile telomerilor în contextul senescentei celulare și al îmbătrânirii este mai mult decât necesară în țara noastră unde acest domeniu spectaculos al telomerilor și telomerazei ocupă un spațiu redus în cercetarea științifică. Deși în ultimii ani s-au făcut progrese însemnate în cunoașterea structurii și a funcțiilor telomerilor dar și în domeniul celor mai multe dintre proteinele asociate acestora, există încă o mulțime de necunoscute cu privire la funcțiile unora dintre ele, la mecanismele moleculare prin care mutații ale genelor lor declanșează o anumită patologie.

Nu este încă bine înțeles mecanismul maturării hTR cum nu este clară reglarea expresiei hTR. Funcția biologică a cvadruplexului G rămâne puțin cunoscută. De asemenea, nu este încă bine stabilită structura hTERT, iar mecanismul prin care scurtarea telomerilor cauzează blocarea diviziunii celulare rămâne încă necunoscut. Nu în ultimul rând, scurtarea telomerilor reprezintă cauza sau este doar consecința îmbătrânirii?

Câteva provocări în acest domeniu sunt de foarte mare actualitate.

Studiul rolului factorilor epigenetici și al moleculelor TERRA în dezvoltarea cancerului este o arie de foarte mare interes. Studiul mutațiilor genelor pentru proteinele asociate telomerilor ar putea conduce la descoperirea altor condiții patologice alături de cele cunoscute.

Senescenta celulară este un alt subiect de dezbatere științifică pentru că nu s-au făcut încă progrese remarcabile în înțelegerea și ingineria mecanismelor moleculare ale senescentei. Descifrarea căilor de semnalizare ale senescentei celulare constituie un obiectiv important al cercetării științifice internaționale.

Un alt domeniu incitant îl constituie ingineria tisulară care urmărește restabilirea, menținerea funcțiilor țesuturilor în urma unor boli sau procese traumatice.

De asemenea, este important să se cerceteze rolurile hTERT în mitocondrii ținând seama de importanța acestora în celule.

Telomeraza, prin cantitate, dar mai ales prin activitate, reprezintă un reglator al vitezei cu care viața se îndreaptă către eșafod.

Inhibiția și/sau reactivarea telomerazei au revoluționat medicina curativă. Dezvoltarea unor produse medicamentoase sau a unor strategii de represie telomerazică în scop terapeutic sunt domenii de cercetare cu foarte mare impact asupra persoanelor afectate de boala canceroasă.

Structura telomerilor trebuie să fie o țintă nouă a terapiei anticanceroase. Reactivarea telomerazei în celulele normale are un impact major pentru viitorul medicinei geriatrice. Dezvoltarea unor activatori ai telomerazei, fără ca aceștia să inducă o transformare celulară, este un obiectiv major al companiilor farmaceutice.

Deși am încercat să cuprind sintetic în această carte tot ce este legat de lungimea, structura, integritatea, funcțiile și disfuncțiile telomerilor, vreau să transmit cititorilor interesați că unele subiecte pot avea lacune deoarece, așa cum am menționat mai sus, cercetarea în acest domeniu este în plină ascensiune și informațiile apar permanent.

Am văzut că de câte ori apare o tehnologie sau o terapie, ca rezultat al cercetării științifice făcută onest, cu bună credință, de către oamenii de știință, nu întârzie să apară indivizi care socotesc să folosească beneficiile științei în interes personal. Nu este de mirare faptul că terapiile care urmăresc blocarea activității miostatinei (o proteină care reglează negativ creșterea masei musculare), utilizate în miopatii (ex. distrofia musculară Duchenne), au atras mai mult pe practicanții de culturism decât pe cei cu afecțiuni degenerative. Parcă în același mod în care sunt reprezentate cele două fețe ale zeului roman Janus, utilizarea variantei negative din dualitatea oricărei inovații reprezintă un risc permanent pentru specia umană.

Dincolo de beneficiile aduse calității vieții oamenilor sau de mirajul imortalității, metodele de întârziere a îmbătrânirii prin senolitice, terapii cu celule stem, mijloace non-farmacologice, folosirea telomerazei sau manipularea mecanismelor de modulare a lungimii telomerilor, s-ar putea dovedi extrem de periculoase pentru evoluția omului, dar nu atât din motive medicale cât mai ales sociale, oferind oportunitatea prelungirii duratei de viață tocmai pentru unii indivizi care nu ar fi meritat să se nască, alimentându-se astfel rezerva de dictatori și tirani. Poate nu întâmplător durata de viață este limitată.

Nemurirea nu este și nu va fi un câștig pentru umanitate în general, dar mai ales dacă permitem să se strecoare personaje dezechilibrate care pândesc să obțină tot ceea ce oferă știința mai bun.

Cu toate acestea, omenirea are nevoie de un vis, așa de frumos evocat în folclorul românesc, „tinerețe fără bătrânețe și viață fără de moarte”.

Autorul

CUPRINS

Foreword	5
Cuvântul autorului	7
Abrevieri	16
1. Telomerul	19
1.1. Istoria telomerilor	19
1.2. Telomerii la nivel celular	20
1.2.1. Lungimea telomerilor.....	22
1.2.2. Durata de viață.....	27
1.2.3. Interacțiunea telomerilor cu structurile nucleare.....	30
1.3. Funcțiile telomerilor	31
1.4. Telomerii la nivel molecular	32
1.4.1. ADN telomeric.....	32
1.4.1.1. Cvadrupelexuri G.....	34
1.4.2. Proteinele telomerice.....	35
1.4.2.1. Complexul șelterin	36
1.4.2.2. Alte proteine telomerice.....	45
1.4.3. Interacțiuni telomerice.....	51
1.5. Efectul de poziție al telomerilor.....	54
1.6. Cromatina telomerilor	56
1.7. Telomerii celulelor meiotice	60
2. Telomeraza	64
2.1. Arhitectura telomerazei	65
2.1.1. Subunitatea ARN	65
2.1.2. Subunitatea catalitică	72
2.1.3. Proteine asociate telomerazei.....	75
2.2. Gena hTERT	77
2.2.1. Structura genei hTERT	78
2.2.2. Reglarea expresiei genei hTERT.....	79
2.2.2.1. Reglarea transcripției genei hTERT	80
2.2.2.2. Reglarea expresiei hTERT prin splicing alternativ	84
2.2.2.3. Reglarea post-tranlațională a hTERT	85
2.3. Importul nuclear al hTERT.....	88

2.4.	Gena hTR.....	90
2.4.1.	Reglarea expresiei genei hTR	90
2.4.2.	Maturarea hTR	91
2.5.	Asamblarea complexului telomerazic.....	92
2.6.	Recrutarea telomerazei la telomeri	94
2.7.	Funcțiile telomerazei.....	96
2.7.1.	Elongația telomerilor.....	97
2.7.2.	Alte funcții ale telomerazei	102
3.	Senescenta celulară.....	106
3.1.	Senescenta replicativă	107
3.1.1.	Scurtarea telomerilor	108
3.2.	Senescenta prematură	112
3.3.	Caracteristicile senescentei celulare.....	113
3.3.1.	Blocarea ciclului celular.....	114
3.3.2.	Modificări morfologice	117
3.3.3.	Fenotipul secretor asociat senescentei și autofagia ...	119
3.3.4.	Modificări biochimice.....	121
3.3.5.	Modificări ale expresiei genelor.....	124
3.3.6.	Modificări cromatiniene.....	125
3.3.7.	Căile de semnalizare în senescenta celulară.....	127
3.3.8.	Modificări ale ADN	129
3.4.	Telomeropatii	130
3.4.1.	Telomeropatii primare.....	133
3.4.2.	Telomeropatii secundare.....	136
3.4.3.	Bolile asociate îmbătrânirii.....	141
4.	De la senescenta celulară la îmbătrânirea organismului	149
4.1.	Teorii privind cauzele îmbătrânirii.....	151
4.1.1.	Teorii programate.....	153
4.1.2.	Teorii non – programate.....	154
4.2.	Caracteristicile îmbătrânirii	160
4.2.1.	Instabilitatea genetică	160
4.2.2.	Scurtarea telomerilor	163
4.2.3.	Alterări epigenetice.....	165
4.2.4.	Pierderea proteostaziei	168
4.2.5.	Răspunsul dereglat la nutrienți.....	169
4.2.6.	Disfuncția mitocondrială	171
4.2.7.	Senescenta celulară.....	172
4.2.8.	Epuizarea celulelor stem	173
4.2.9.	Comunicare intercelulară alterată.....	174

4.3.	Terapii privind extinderea speranței de viață	175
4.3.1.	Prevenția primară.....	176
4.3.2.	Hormesis.....	176
4.3.3.	Suplimente și produse farmaceutice.....	177
4.3.4.	Terapii hormonale	179
4.3.5.	Terapii bazate pe telomerază	180
4.3.6.	Folosirea celulelor stem	181
4.3.7.	ALT-711	182
4.3.8.	Parabioza heterocronică.....	182
5.	Telomeri, telomerază, tumorigeneză	184
5.1.	Disfuncția telomerilor și dezvoltarea tumorilor.....	184
5.1.1.	Criza telomerică.....	186
5.2.	Controlul hTERT în cancer	189
5.2.1.	Amplificarea genică	190
5.2.2.	Variante structurale ale hTERT	191
5.2.3.	Rearanjamente genomice	194
5.2.4.	Mutații ale promotorului genei hTERT.....	194
5.2.5.	Modificări epigenetice ale promotorului genei hTERT .	197
6.	Terapii care țintesc telomerii și telomeraza	202
6.1.	Legătura dintre senescentă, imortalizare și tumorigeneză.....	202
6.1.1.	Senescentă – imortalizare	202
6.1.2.	Imortalizare – tumorigeneză	205
6.2.	Telomeraza – țintă terapeutică	207
6.2.1.	Telomeraza în terapia bolilor asociate senescentei	208
6.2.2.	Telomeraza în medicina regenerativă	210
6.2.3.	Telomerii și telomeraza în terapia cancerului	213
6.2.3.1.	Inhibitori ai telomerazei.....	213
6.2.3.2.	Oligonucleotide omoloage telomerilor.....	217
6.2.3.3.	hTERT – țintă imunoterapeutică	218
6.2.3.4.	Proteine telomerice – ținta unei noi strategii anticanceroase	221
6.2.3.5.	Telomeraza – țintă în terapia genică a cancerului	222
6.3.	Avantaje și riscuri	224
7.	Metode de investigare a telomerilor și telomerazei	227
7.1.	Metode de evaluare a telomerilor.....	227
7.2.	Metode de evaluare a telomerazei.....	235
	Bibliografie.....	241

CONTENTS

Foreword	5
Author's word	7
Abbreviations	16
1. The telomere	19
1.1. The history of telomeres.....	19
1.2. Telomeres at the cellular level.....	20
1.2.1. Telomeres length.....	22
1.2.2. The lifespan	27
1.2.3. The interaction of telomeres with nuclear structures ..	30
1.3. Functions of telomeres	31
1.4. Telomeres at the molecular level.....	32
1.4.1. Telomere DNA	32
1.4.1.1. G-quadruplexes	34
1.4.2. Telomere proteins	35
1.4.2.1. Shelterin complex	36
1.4.2.2. Other telomere proteins	45
1.4.3. Telomere interactions	51
1.5. Telomere position effect	54
1.6. Telomere chromatin.....	56
1.7. Telomeres of meiotic cells	60
2. Telomerase	64
2.1. Telomerase structure	65
2.1.1. RNA subunit.....	65
2.1.2. Catalytic subunit.....	72
2.1.3. Telomerase-associated proteins.....	75
2.2. hTERT gene.....	77
2.2.1. Structure of hTERT gene.....	78
2.2.2. Regulation of hTERT gene	79
2.2.2.1. Transcriptional regulation of hTERT gene	80
2.2.2.2. hTERT regulation by alternative splicing.....	84
2.2.2.3. Post-translational regulation of hTERT	85
2.3. Nuclear import of hTERT.....	88
2.4. hTR gene	90

2.4.1.	Regulation of hTR gene expression	90
2.4.2.	hTR maturation	91
2.5.	Assembly of telomerase complex	92
2.6.	Telomerase recruitment to telomeres	94
2.7.	Telomerase functions	96
2.7.1.	Elongation of telomeres	97
2.7.2.	Other functions of telomerase	102
3.	Cell senescence	106
3.1.	Replicative senescence	107
3.1.1.	Telomeres shortening.....	108
3.2.	Premature senescence.....	112
3.3.	Hallmarks of cellular senescence	113
3.3.1.	Cell cycle arrest	114
3.3.2.	Morphological changes	117
3.3.3.	Senescence-associated secretory phenotype and autophagy	119
3.3.4.	Biochemical changes.....	121
3.3.5.	Changes in gene expression	124
3.3.6.	Chromatin damage.....	125
3.3.7.	Signaling pathways in cellular senescence.....	127
3.3.8.	DNA damages.....	129
3.4.	Telomeropathies	130
3.4.1.	Primary telomeropathies	133
3.4.2.	Secondary telomeropathies	136
3.4.3.	Aging-associated diseases	141
4.	From cellular senescence to body aging	149
4.1.	Theories on the causes of aging.....	151
4.1.1.	Programmed theories	153
4.1.2.	Non-programmed theories	154
4.2.	Hallmarks of aging.....	160
4.2.1.	Genetic instability	160
4.2.2.	Telomeres shortening.....	163
4.2.3.	Epigenetic alterations.....	165
4.2.4.	Loss of proteostatis	168
4.2.5.	Deregulated nutrient sensing.....	169
4.2.6.	Mitochondrial dysfunction.....	171
4.2.7.	Cellular senescence.....	172
4.2.8.	Stem cells depletion.....	173
4.2.9.	Altered intercellular communications.....	174
4.3.	Therapies on the lifespan extention	175

4.3.1. Primary prevention	176
4.3.2. Hormesis.....	176
4.3.3. Supplements and pharmaceutical products	177
4.3.4. Hormonal therapies	179
4.3.5. Telomerase-based therapies	180
4.3.6. Use of stem cells.....	181
4.3.7. ALT – 711	182
4.3.8. Heterochronic parabiosis	182
5. Telomeres, telomerase, tumorigenesis	184
5.1. Telomere dysfunction and tumor development.....	184
5.1.1. Telomere crisis.....	186
5.2. hTERT control in the cancer	189
5.2.1. Gene amplification	190
5.2.2. Structural variants of hTERT	191
5.2.3. Genomic rearrangements	194
5.2.4. Mutations of hTERT gene promoter.....	194
5.2.5. Epigenetic alterations of hTERT gene promoter	197
6. Therapies targeting telomeres and telomerase	202
6.1. The relationship between senescence, immortalization and tumorigenesis	202
6.1.1. Senescence – immortalization	202
6.1.2. Immortalization – tumorigenesis	205
6.2. Telomerase – therapeutic target.....	207
6.2.1. Telomerase in the therapy of diseases associated with aging	208
6.2.2. Telomeres in the regenerative medicine.....	210
6.2.3. Telomeres and telomerase in the cancer therapy.....	213
6.2.3.1. Telomerase inhibitors.....	213
6.2.3.2. Telomeres homolog oligonucleotides	217
6.2.3.3. hTERT – immunotherapeutic target.....	218
6.2.3.4. Telomere proteins – the target of a new anticancer strategy.....	221
6.2.3.5. Telomerase – target in the gene therapy of cancer.....	222
6.3. Advantages and risks.....	224
7. Methods for investigating telomeres and telomerase	227
7.1. Methods of telomeres assessment.....	227
7.2. Methods of telomerase assessment.....	235
Bibliography	241