

PRÊMIO NOBEL DE MEDICINA

O PRÊMIO NOBEL DE FISILOGIA E MEDICINA DE 2009: O PAPEL DOS TELÔMEROS E DA TELOMERASE NA MANUTENÇÃO DOS CROMOSSOMOS

THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2009: MAINTENANCE OF CHROMOSOMES BY TELOMERES AND THE ENZYME TELOMERASE

Laura Bannach Jardim^{1,3,4}, Patrícia Ashton-Prolla^{2,3,5}, Sharbel Weidner Maluf³

Rev HCPA 2009;29(3):271-275

Elizabeth H Blackburn, Jack W Szostak e Carol W Greider foram os ganhadores do Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 2009, por terem descoberto como os cromossomos são protegidos, em suas extremidades, pelos telômeros e pela enzima telomerase. Os editores da presente revista nos pediram para fazer uma breve resenha que explicasse a importância do prêmio. Para isso, nós primeiro resumiremos alguns dos argumentos que o Instituto Karolinska apresentou ao atribuir o prêmio (1), e depois refletiremos um pouco sobre os seus desdobramentos para a ciência médica em geral e no país, também.

Blackburn, Szostak e Greider responderam uma pergunta que assombrava há anos a biologia: como as terminações dos cromossomos são poupadas da erosão e dos rearranjos durante as divisões celulares?

A própria pergunta é difícil de ser compreendida, sem revisarmos um pouco a história do conhecimento sobre os cromossomos. A descoberta de sua função rendeu um primeiro Prêmio Nobel a Thomas H Morgan em 1933. Um segundo e um terceiro premiados, Hermann Muller (1946) e Barbara McClintock (1983) subsequentemente descobririam que cromossomos “quebrados” eram instáveis e muito propensos a rearranjos. Mas Hermann Muller já notava que as pontas constitucionais dos cromossomos impediam ou dificultavam esses eventos danosos. Foi ele que as denominou de “telômeros” - do grego telos - término - e meros - parte.

O enigma tornou-se mais complexo, naturalmente, quando a estrutura do DNA foi desvendada (rendendo o Nobel para Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins em 1962) e quando as enzimas que replicam o DNA, as DNA polimerases, foram descobertas (Nobel para Arthur Kornberg em 1959). Por quê?

Porque as DNA polimerases só iniciam a replicação (ou cópia) do DNA se, no início da sequência a ser copiada, estiver presente um trecho específico que se parecia com um *primer* ou iniciador de RNA. Esse sítio de reconhecimento - essencial para qualquer replicação - determina, *per se*, que ao menos a extremidade inicial

de uma fita de DNA (ou seja, de um cromossomo) jamais seja copiada. A Figura 1 tenta descrever este raciocínio. Viviam-se em um paradoxo: segundo o mecanismo de ação das DNA polimerases, a síntese completa das terminações do DNA linear seria impossível. Postulava-se que essa “replicação incompleta” acabaria levando a um encurtamento dos cromossomos na medida em que o tempo passasse e a uma redução da viabilidade da célula. O “problema da replicação da ponta” na verdade precisava de uma solução satisfatória e a aguardava, tanto quanto a teoria quântica e a relatividade geral (um paradoxo muito mais famoso, convenhamos) ainda esperam hoje em dia por uma unificação. A solução teria de vir, por ser a replicação completa do material genético um requerimento fundamental de qualquer divisão celular.

Em 1975, Elizabeth Blackburn começou a trabalhar em Yale com as recém detectadas sequências repetitivas nas terminações do DNA linear de eucariotos. Usando um ciliado unicelular chamado de *Tetrahymena thermophila*, ela descobriu que os terminos do DNA continham sequências repetitivas do hexanucleotídeo CCCCAA. Na mesma época, Jack Szostak se estabelecia em Harvard e descobria que se as terminações do DNA de plasmídios fossem introduzidas em células fúngicas, produziam-se intensos rearranjos e recombinações na integração dos mesmos com os do hospedeiro, o que acabava impedindo a manutenção da colônia celular por muito tempo. Esse achado tornou-se um modelo de estudo da já postulada relação entre cromossomos quebrados e perda da vitalidade.

O *turning point* se deu quando os dois pesquisadores decidiram colaborar e se propuseram a verificar o que aconteceria com a adição das sequências repetitivas terminais CCCCAA dos cromossomos da *Tetrahymena* aos plasmídios de Szostak. A hipótese era a de que eles estabilizariam as terminações cromossômicas do plasmídio e permitiriam a replicação (Figura 2). O experimento funcionou às maravilhas, sendo publicado na *Cell* em 1982 (2).

1. Departamentos de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2. Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS.

3. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

4. Laboratório de Identificação Humana, Centro de Pesquisa Experimental (CPE), HCPA.

5. Laboratório de Medicina Genômica, CPE, HCPA.

Contato: Laura B Jardim. E-mail: ljardim@hcpa.ufrgs.br (Porto Alegre, RS, Brasil).

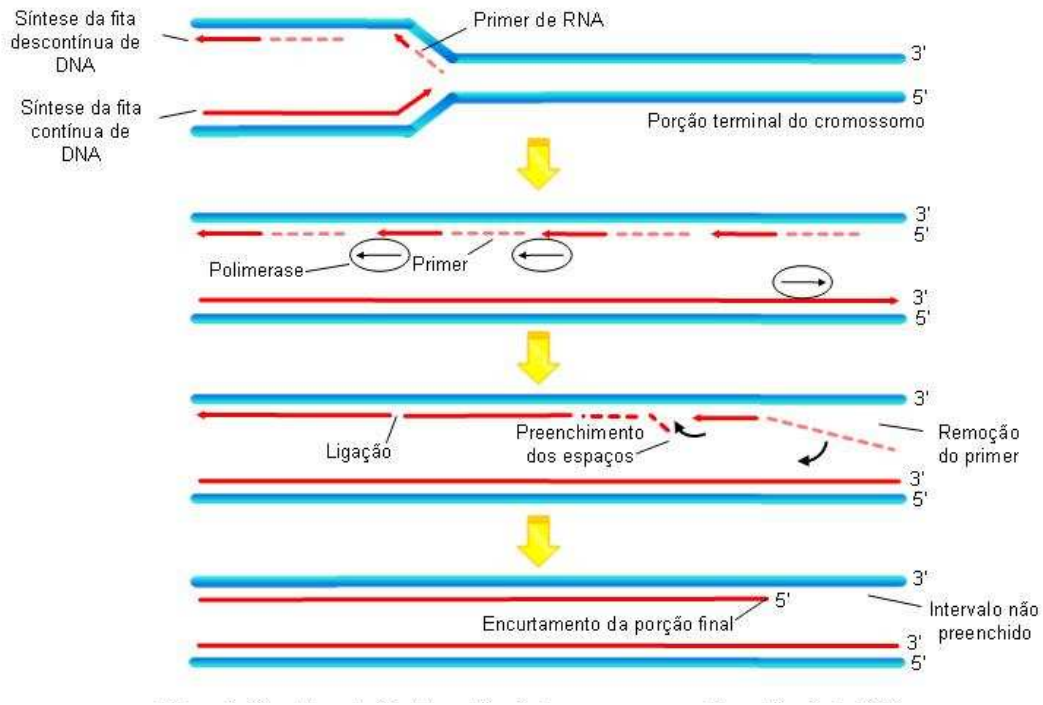


Figura 1. O problema do final da replicação dos cromossomos. Na replicação do DNA, uma das fitas é copiada de maneira descontínua pela DNA polimerase, que necessita de primers de RNA, que são degradados após o alongamento da cadeia neossintetizada de DNA. Os espaços são preenchidos e ligados, para produzir uma molécula de DNA intacta. Na porção terminal da fita de DNA, a DNA polimerase não consegue preencher a falha deixada pelo primer de RNA, resultando no encurtamento da fita de DNA a cada ciclo de replicação. (Adaptada de Nobelförsamlingen, 2009)

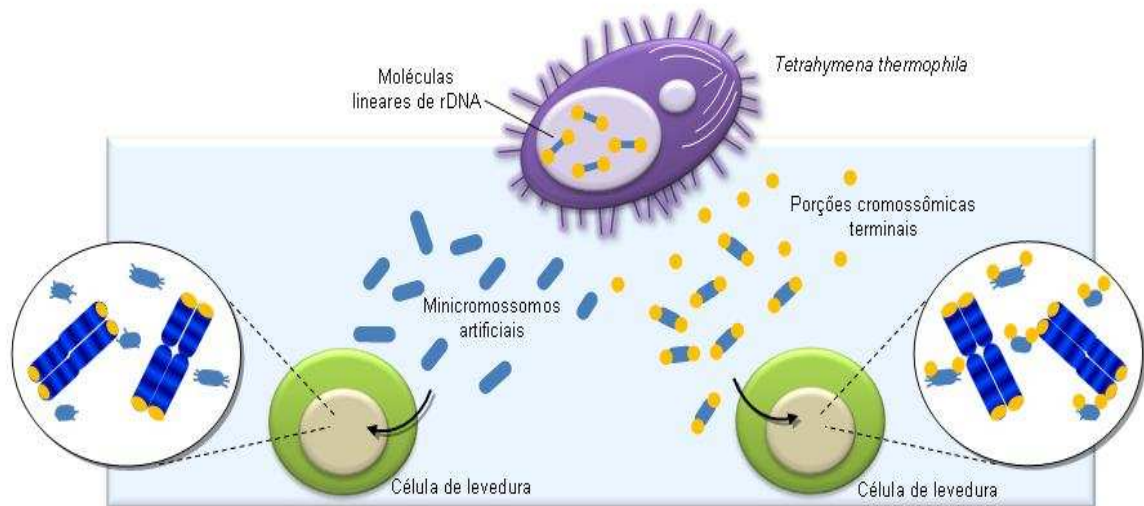


Figura 2. A sequência terminal de DNA de *Tetrahymena* adicionadas a cromossomos artificiais mantém a estabilidade em levedura: a conservação da estrutura e função das extremidades cromossômicas entre espécies muito distantes evolutivamente é forte. (Adaptada de Nobelförsamlingen, 2009)

As propriedades altamente conservadas da terminação do DNA da *Tetrahymena* conferiam estabilidade a um cromossomo. Deduziu-se que tais sequências repetitivas terminais correspondiam como tal aos telômeros de Muller.

Uma vez descoberto o telômero, permanecia a questão principal de como ele se replicava.

Vários modelos já tinham sido propostos, como o envolvimento da recombinação, dos transposons, a presença de sequências palindrômicas, ou mesmo uma determinada função enzimática que sintetizasse um telômero *de novo*. Essa enzima teria de ser diferente de todas as até então conhecidas.

Carol Greider era estudante de graduação de Elizabeth Blackburn, agora em Berkeley, e ambas passaram a buscar tal enzima. Como a sequência repetitiva final de um cromossomo já era bem conhecida - a CCCCAA repetida várias vezes - Carol Greider produziu o oligonucleotídeo sintético correspondente, um (TTGGGG)₄, que em cultura com aquelas células, seria usado como o *primer* específico dessa região misteriosa (a ponta) para iniciar a síntese do DNA. Usando um elaborado ensaio, ela descobriu não só que essa adição acontecia como o previsto, mas também que a atividade enzimática término transferase-like que a realizava era também única ao adicionar essa sequência isolada à fita de DNA sem necessidade de nenhuma fita molde. Essa descoberta resolvia a questão sobre como se mantariam os telômeros, e foi publicada pelas duas pesquisadoras em 1985 na *Cell* (3).

Logo a seguir, as duas ainda mostraram que a enzima era um complexo de ribonucleoproteínas, que elas passaram a chamar de telomerase, na qual o papel do componente RNA era fundamental. Esse componente continua de fato a sequência CAACCCAA. Portanto, a telomerase em si contém a fita única e é o próprio molde para a síntese das repetições TTGGGG que dão início à síntese da ponta do DNA. Ao bloquearem a disponibilidade desse RNA, Greider e Blackburn conseguiram comprometer a função da telomerase, publicando essas evidências na *Nature* em 1989 (4).

Durante esse período, Szostak também tentava identificar a telomerase e acabou levantando outras evidências importantes. Ele isolou um mutante nas suas células fúngicas chamado EST1 (*ever shorter telomeres*). Esse mutante apresentava uma perda progressiva de sequências teloméricas, o que se acompanhava de uma frequência cada vez maior de quebras cromossômicas e de progressão para senescência nas suas células em cultura (5).

A descoberta de Greider e Blackburn foi fundamental e demonstrava que a telomerase era um tipo único de transcriptase reversa, que associava um componente catalítico proteico a

uma fita molde de RNA intrínseco. O mecanismo da síntese do telômero estava esclarecido. Enquanto isso, a descoberta de Szostak confirmava que a perda do DNA telomérico nas divisões celulares estava associada à redução do número de futuras divisões celulares de uma linhagem – ou seja, à senescência.

SIGNIFICÂNCIA DAS DESCOBERTAS PARA A PESQUISA DO ENVELHECIMENTO HUMANO

Desde os primeiros experimentos desenvolvidos em fibroblastos humanos, a associação entre o encurtamento dos telômeros e a redução do tempo de vida replicativa das células em cultura se repetiu, confirmando os achados anteriores (2,6,7). O experimento complementar, ou seja, a introdução da telomerase em células humanas normais em cultura aumentou o tempo de vida celular (8).

Hoje sabemos que o comprimento dos telômeros vai progressivamente diminuindo durante sucessivos ciclos de divisão celular, levando as células à senescência e esta, finalmente, à interrupção das divisões celulares. Os telômeros podem chegar a um tamanho que os torna ineficientes para a proteção das extremidades cromossômicas, resultando na crise - ou seja, em fusão dos cromossomos e morte celular apoptótica. No entanto, raríssimos clones celulares podem emergir de uma população celular em crise. Esses clones nos revelam dados muito interessantes: eles mantêm tamanhos teloméricos estáveis, em primeiro lugar. Em segundo, isso se dá através da ativação da expressão da própria telomerase (hTERT ou simplesmente TERT) ou de mecanismos alternativos de alongamento dos telômeros (ALT) (9). É natural que esses mecanismos sejam muito estudados, pois a sua manipulação teoricamente poderá tornar as células mais longevas.

A interpretação dos resultados de estudos com expressão aumentada da proteína da telomerase humana, TERT, não é tão linear, no entanto. Ela é complicada pelo fato de a TERT ter outras atividades não relacionadas à manutenção do telômero e que podem, além do mais, contribuir para a proliferação celular (9). Além disso, se a função do telômero estiver comprometida, pode ocorrer degeneração do tecido e apoptose sem o concomitante encurtamento dos telômeros (7).

Sem dúvida, a manutenção do comprimento e a proteção dos telômeros são fatores importantes no controle do tempo de vida celular, embora o envelhecimento do organismo seja um processo muito mais complexo do que somente isso. A atividade de pesquisa dessa área encontra-se intensa. No Brasil, o grupo da Professora Marília Smith, do Departamento de Morfologia

da UNIFESP/EPM, é um dos que têm publicado estudos nessa área (10).

SIGNIFICÂNCIA DAS DESCOBERTAS PARA A PESQUISA DO CÂNCER

A inativação de sistemas de controle, como o p53 e o Rb, leva à continuação das divisões celulares e ao encurtamento extra dos telômeros.

A relação entre alterações teloméricas e o desenvolvimento de câncer foi proposta há bastante tempo, já que na maioria dos tumores os telômeros apresentam atividade, estrutura e/ou tamanho anormal (11-13). Não se sabe claramente por que essas anormalidades teloméricas acontecem durante a oncogênese. Eventualmente elas podem ser marcadores de um número aumentado de divisões celulares. O modelo atual enfatiza mais as consequências das alterações teloméricas na cascata de eventos oncogênicos. Ele propõe que o encurtamento e/ou exposição (erosão) de telômeros contribui para um aumento significativo da instabilidade genômica e a partir daí a célula pode seguir dois caminhos: um deles, mediado por p53, é o da senescência e apoptose, e o outro, associado com forte atividade telomérica reativa, o da transformação maligna (14).

O “primeiro caminho” – o da senescência – começa a ser demonstrado experimentalmente. Um bom exemplo é o estudo recente de Flores e Blasco que indica a existência de uma resposta à senescência dependente de p53 em células-tronco progenitoras com telômeros disfuncionais em modelo murino com atividade deficiente da telomerase (15).

O “segundo caminho” – o da transformação maligna – fundamenta-se em diversas evidências. Uma delas é a de que os tumores sem atividade de telomerase frequentemente apresentam ativação de um mecanismo de expansão alternativa de telômeros (*Alternative Lengthening of Telomeres*, ALT). O ALT, por sua vez, se associa à propriedade de capacidade replicativa ilimitada destas células tumorais (16,17).

O próprio gene da telomerase, ou TERT, poderia ser considerado um gene de suscetibilidade ao câncer. Variantes polimórficas ou mutacionais podem reduzir significativamente a atividade da enzima e com isso modificar o prognóstico de tumores, especialmente os sólidos (pele, sistema nervoso central, pulmão) e as leucemias. Ao contrário, o aumento de atividade da enzima, identificado em alguns tipos de tumores, pode sinalizar a progressão da doença. Em leucemias, a associação da atividade da telomerase com fatores prognósticos foi descrita tanto na leucemia mielóide aguda, quanto na leucemia linfóide aguda.

Todas essas descobertas estimularam a busca por estratégias terapêuticas envolvendo a telomerase, seja pela inibição de sua atividade enzimática, seja pelo desenvolvimento de vacinas direcionadas à destruição de células tumorais que superexpressam telomerase. Vários ensaios clínicos estão em andamento (clinicaltrials.gov; <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=telomerase>), no aguardo ainda de resultados conclusivos.

O papel da telomerase no câncer tem sido campo de estudos de pesquisadores brasileiros. Entre estes, um grupo de pesquisadores do INCA relacionou a atividade da telomerase com o carcinoma de células escamosas do pênis em 2001 (18). Logo depois, um estudo de associação entre mutações da hTERT e a anemia de Fanconi foi realizado na USP de Ribeirão Preto (19). Na mesma instituição, a telomerase foi investigada como um marcador de prognóstico dos cânceres de mama (20,21); na UNIFESP, como um marcador dos melanomas (22). A relação da telomerase com a detecção do câncer cervical tem sido objeto de estudos tanto de pesquisadores da UFMG (23,24), como do grupo de epidemiologistas da UFRGS (25). Também no Hospital de Clínicas, em recente estudo desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisas em Câncer do Centro de Pesquisa Experimental e pelo Instituto do Câncer Infantil do RS, foi demonstrado aumento na expressão de hTERT em pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda, quando comparados com controles de mesma idade (26).

As especulações de Blackburn, Szostak e Greider tornaram-se realidades, através da demonstração científica das suas hipóteses. E todos esses pesquisadores brasileiros, entre outros, têm juntado as suas evidências a essa linhagem do conhecimento. Ela sem dúvida continuará crescendo. Da busca do entendimento sobre o envolvimento dos telômeros na transformação maligna e no envelhecimento, sem dúvida mais jovens cientistas brasileiros acabarão por participar.

Agradecimentos

A Roberta Palazzo, pela confecção das figuras.

REFERÊNCIAS

1. Nobelförsamlingen, The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. Maintenance of chromosomes by telomeres and the enzyme telomerase. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009. <http://nobelprize.org>.
2. Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*. 1982;29(1):245-55.

3. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-13.
4. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989; 26;337(6205):331-7.
5. Lundblad V, Szostak JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*. 1989. 19;57(4):633-43.
6. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-60.
7. Yu GL, Bradley JD, Attardi LD, Blackburn EH. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature*. 1990;344(6262):126-32.
8. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998;279(5349):349-52.
9. Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:531-57.
10. Silva PN, Gigek CO, Leal MF, Bertolucci PH, de Labio RW, Payão SL, Smith Mde A. Promoter methylation analysis of SIRT3, SMARCA5, HTERT and CDH1 genes in aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008 Mar;13(2):173-6.
11. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990. 346(6287):866-8.
12. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994 266(5193):2011-5.
13. Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006 22:531-57.
14. Hainaut P, Wiman KG. 30 years and a long way into p53 research. *Lancet Oncol* 2009. 10(9):913-9.
15. Flores I, Blasco MA. A p53-dependent response limits epidermal stem cell functionality and organismal size in mice with short telomeres. *PLoS One*. 2009;4(3):e4934. Epub 2009 Mar 19.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
17. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 2000; 26(4):450-8.
18. Alves G, Fiedler W, Guenther E, Nascimento P, Campos MM, Ornellas AA. Determination of telomerase activity in squamous cell carcinoma of the penis. *Int J Oncol*. 2001 Jan;18(1):67-70.
19. Calado RT, Pintão MC, Rocha V, Falcão RP, Bitencourt MA, Silva WA Jr, Gluckman E, Pasquini R, Zago MA. Lack of mutations in the human telomerase RNA component (hTERC) gene in Fanconi's anemia. *Haematologica*. 2004 Aug;89(8):1012-3.
20. Ribeiro-Silva A, Moutinho MA, Moura HB, Vale FR, Zucoloto S. Expression of checkpoint kinase 2 in breast carcinomas: correlation with key regulators of tumor cell proliferation, angiogenesis, and survival. *Histol Histopathol*. 2006 Apr;21(4):373-82.
21. Ribeiro-Silva A, Becker de Moura H, Ribeiro do Vale F, Zucoloto S. The differential regulation of human telomerase reverse transcriptase and vascular endothelial growth factor may contribute to the clinically more aggressive behavior of p63-positive breast carcinomas. *Int J Biol Markers*. 2005 Oct-Dec;20(4):227-34.
22. Carvalho L, Lipay M, Belfort F, Santos I, Andrade J, Haddad A, Brunstein F, Ferreira L. Telomerase activity in prognostic histopathologic features of melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59(9):961-8.
23. Triginelli SA, Silva-Filho AL, Traiman P, Silva FM, Chaves-Dias MC, Oliveira GC, Cunha-Melo JR. Telomerase activity in the vaginal margins of radical hysterectomy in patients with carcinoma of the cervix: correlation with histology and human papillomavirus. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 May-Jun;16(3):1283-8.
24. Santos-Filho AS, Triginelli SA, Traiman P, Cunha-Melo JR, Silva-Filho AL. Missing association between telomerase activity and clinicopathological features in patients with early stage carcinoma of the cervix. *Arch Gynecol Obstet*. 2007 Jan;275(1):13-7. Epub 2006 Jul 21.
25. Rosa MI, Medeiros LR, Bozzetti MC, Fachel J, Wendland E, Zanini RR, Moraes AB, Rosa DD. Accuracy of telomerase in cervical lesions: a systematic review. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Nov-Dec;17(6):1205-14.
26. Abujamra AL, de Farias CB, de Castro Jr CG; Schwartzmann, G; Roesler R, Brunetto AL. A unidade catalítica da telomerase, hTERT, se encontra elevada em pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda. IX Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, 2008.

Recebido: 20/11/09

Aceito: 05/12/09