

암과 Telomerase

삼성의료원 이비인후과
백 정 환

Telomerase and Cancer

Chung-Hwan Baek, M.D.

Department of ORL-HNS, Samsung Medical Center

진핵 생물의 염색체 말단은 간단하면서도 잘 보존되어 있는 반복된 DNA 염기 서열로 인한 특이한 구조를 가진 telomere에 의해 보호되고 있다^{1,2,3}. Telomere의 기능은 telomere DNA의 특이한 구조로 인해 다른 염색체로부터 DNA의 말단이 잘못 결합되거나 분해되는 것을 막아 주며 핵막에 염색체가 직접적으로 접근하는 것을 도와준다^{1,4}. 이와 같이 염색체를 안정화시키는 telomere는 종마다 특징적으로 반복된 염기 서열과 길이를 가지고 있다. Telomere가 제대로 기능을 하기 위해선 이런 반복된 정확한 염기 서열이 필수적이다. 사람을 비롯한 여러 척추동물에서는 TTAGGG, *Tetrahymena*에서는 TTGGGG, *Euplotes*에서는 TTTTGGGG의 반복된 서열을 가지고 있으며, 말단 부분의 길이도 yeast나 ciliates에서는 100bp 정도이며 척추동물에서는 수 kb정도가 된다. 염색체 말단의 DNA 가닥은 아주 잘 보존되어 있는 G-rich 가닥과 여기에 상보적인 염기 서열을 가진 C-rich 가닥으로 이루어져 있다. G-rich 가닥은 염색체 말단에 대해 일정한 방향을 가져 5'에서 3'쪽으로 위치하고 상보적인 C-rich 가닥보다 12~16 nucleotide 정도가 더 돌출되어 있다(Fig. 1). 인간에서는 약 5~15kb 정도의

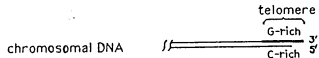


Fig. 1. Eukaryotic chromosomal telomeres

TTAGGG 반복 서열을 가진 telomere가 모든 염색체에서 발견되며^{5,6}, 인간의 생식세포에는 telomere의 반복 서열이 15~20kb 정도이다⁴.

Telomere DNA는 telomerase라는 효소에 의해 새롭게 합성된다. Telomerase는 RNA와 단백질로 구성된 리보핵산단백질로서 염색체 말단에 있는 telomere DNA를 합성하며, telomere의 G-rich 가닥을 연장시키기 위해 template로 telomerase의 자체 구성성분인 RNA를 이용하는 Reverse Transcriptase이다⁷. 이러한 Telomerase의 활성도를 측정하기 위하여 증합연쇄반응이 이용되며, 증합연쇄반응을 위해 사용되는 DNA primer로는 *in vivo*에서는 염색체 말단의 돌출된 단일 가닥의 G-rich telomere DNA의 반복된 염기 서열을, *in vitro*에서는 telomere와 유사한 다양한 DNA 염기 서열을 사용할 수 있다. Telomerase는 이 primer의 3'

KEY WORDS : Telomere · Telomerase · Cancer

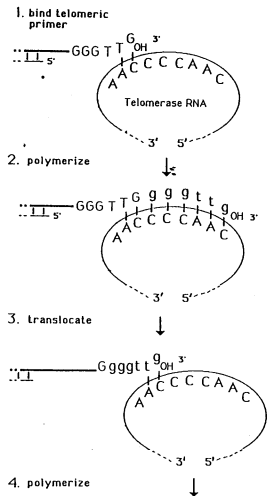


Fig. 2. Synthesis of telomeric DNA by the ribonucleoprotein enzyme telomerase

말단을 인식하여 telomere를 합성해 나간다. Telomerase에 의한 telomere DNA 합성의 제안된 기작은 다음과 같다(Fig. 2). 제일 먼저 internal template로 작용하는 telomerase의 RNA에 telomere와 상보적인 염기 서열을 가진 telomere primer가 결합한 뒤 6 nucleotide의 반복적인 telomere DNA를 합성해 가면서 증합연쇄반응이 일어난다. 그 다음은 translocation이 일어나면서 이런 반복적인 DNA 염기 서열을 가진 연장된 telomere가 합성되어진다.

사람의 정상적인 체세포에서는 *in vivo*와 *in vitro*에서 세포 분열이 일어날 때마다 telomere가 짧아진다(50~200 nucleotides/cell di-

vision). 이는 반보존적 DNA 복제로부터 DNA 분자의 lagging strand의 5' 말단의 복제가 불가능하기 때문에 발생하게 되는 필연적인 결과이다¹⁰⁾. 이렇게 염색체 말단에 있는 telomere의 지속적인 손실은 세포 분열의 능력에 한계를 가져오며^{11,12,13)} *in vitro*에서의 세포 노화를 결정하는 분자적 척도가 된다고 생각되고 있다^{14,15,16)}. 그래서 이와 같이 telomere가 짧아지는 현상은 결국 세포의 죽음에까지 이르게 되며 체세포의 제한적인 분열에서 기인된 세포 노화에 중요한 역할을 할 것이라 제안되고 있다. 세포가 노화됨에 따라 telomere가 짧아진다는 사실은 immortalized cell은 안정한 telomere를 가져야 함을 의미하기도 한다. 그러므로 단세포 생물이나 생식 세포에서는 이들이 비제한적으로 분열하는 능력을 갖기 위해선 염색체 말단의 불안정한 복제를 보완할 수 있는 다른 기작이 있어야 한다. 염색체 말단의 완전한 복제를 위해서는 telomerase가 반드시 필요하다고 본다. 이것을 입증할 수 있는 근거로 나이가 들면서 telomere가 짧아지고 있는 사람의 모든 체세포 조직에서는 telomerase 활성이 관찰되지 않으나^{17,18,19)} 안정된 telomere 길이를 유지하고 있는 단핵의 진핵생물에서는 telomerase 활성이 관찰되었으며^{6,20,21)} 암세포나 immortal cells에서도 telomerase 활성이 관찰되었다^{16,17)}. 세포의 노화는 carcinogen이나 virus에 의한 형질 전환으로 변화된 형태와 성장 특성에 의해 어느 정도 부분적으로나마 보완되어 질 수 있으나 대부분의 형질 전환된 사람의 세포는 연장된 수명을 가짐에도 불구하고 결국은 분열을 멈추고 죽게 된다(crisis). 많은 암세포에서 일정히 안정하게 유지되는 telomere가 관찰되나, 종종 telomere의 반복된 염기 서열의 길이가 원래 조직에서의 길이보다 더 짧은 telomere가 관찰되기도 한다.^{6,22,23)} 암세포에서 발견된 짧아진 telomere로부터 telomere의 안정화와 telomerase 활성에 대한 발현은 oncogenesis 동안 상대적으로 늦은 시기에 일어나기 때문이라 생각된다. 따라서 telomere의 길이와 telomerase 활성의 정도가 항

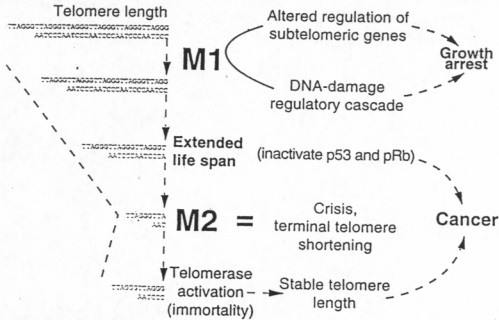


Fig. 3. Aging and cancer are telomeres the connection ?

상 상관 관계가 있는 것이 아님을 알 수 있다. 또한 telomerase의 활성은 많은 세포 분열 후에야만 일게 되는 다수의 돌연변이의 결과에 의해서 나타난다고 본다. 이와 같은 사실을 근거로 telomerase 발현의 재활성은 세포 노화를 극복하는데 중요한 역할을 할 것이며 영구성을 유지하기 위해 암세포는 telomere를 안정화시킬 수 있는 telomerase를 발현해야만 한다¹⁹⁾. 또한 정상적인 조직의 세포에서는 암으로 변화되는 것을 막기 위해 telomerase의 발현이 저지되어야 할 것이다. 이와 같이 telomerase는 세포의 노화와 영구적인 세포로 가는 암과 밀접한 상관관계가 있다. Fig. 3의 모델은 이런 관계를 잘 설명해 주고 있다²⁰⁾. Telomere는 세포 분열 때마다 짧아지며, 세포 노화는 수 kb의 telomere 반복 서열이 남아 있을 때부터 시작하게 된다. 이 반복된 서열의 손실로부터 기인된 DNA-damage signals은 더 이상의 세포 분열을 막으며 성장을 멈추게 한다(Mortality stage 1, M1). 또한 p53과 pRb에 돌연변이가 생기든지 혹은 tumor virus(SV40 T-antigen 혹은 human papillomavirus 16 E6/E7)에서 발현되는 viral oncoprotein이 p53과 pRb에 결합

함으로써 p53과 pRb를 불활성화시켜 M1 단계를 넘어서 세포는 telomere가 아주 짧아져 더 이상 복제가 불가능할 때까지 계속 분열한다(Mortality stage 2, M2). 이때 telomerase가 발현되게 되면 손상된 염색체 말단이 복구되면서 telomere는 안정한 길이를 유지하며 immortal cells로 된다. 대부분의 암에서의 telomerase 발현은 이러한 경로를 통해 일어날 것이라 제안되고 있다. 그래서 최근에는 telomere의 짧아짐과 세포의 노화, telomerase의 발현, 암을 연결시켜 주는 경로를 찾는 데 많은 관심을 갖고 연구하고 있다. 만일 telomerase의 기작을 명확히 밝힐 수 있다면 telomerase의 발현을 조절할 수 있는 단계까지 이르게 되어 telomerase의 활성을 조절하여 telomere의 길이를 조작할 수 있게 될 것이다. 이렇게 되면 세포의 노화 속도를 임의로 변형시킬 수 있을 뿐만 아니라 인간의 암치료에도 많은 기여를 할 것이라 생각한다. 또한 telomerase에 선택적으로 결합하는 telomerase inhibitor를 개발한다면 이는 항암제로 중요한 역할을 하리라 기대된다.

Telomerase activity를 assay하는 기존의 방

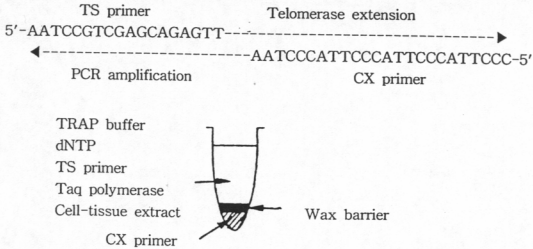


Fig. 4. Schematic of the PCR-based telomerase assay (TRAP assay)

법으로는 많은 수의 세포가 요구되며 sensitivity 역시 낮았으나 최근에 개발된 PCR을 기초로한 telomerase assay 「TRAP assay : telomeric repeat amplification protocol」 방법은 아주 작은 조직(50~100mg)을 가지고도 분석이 가능하기 때문에 10⁶ cells 중에 1개가 immortal이라도 telomerase 활성이 검출되는 아주 민감하면서도 효율이 대단히 높은 방법이라 하겠다¹⁰⁾. TRAP assay는 detergent lysis 방법으로 추출한 cell extract에 telomerase가 존재한다면 이 효소에 의해 TTAGGG 반복 서열이 첨가되어 가면서 연장된 생산물을 만들게 되어 결국은 6 bp씩 첨가된 생산물이 생기게 된다. 5' primer로 telomerase substrate (TS) oligonucleotides가 사용되며 3' primer로는 telomere의 반복 서열에 결합할 수 있는 oligonucleotides (CX)를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 생산물을 얻게 된다. 이 실험에서는 wax를 이용함으로써 처음에는 wax층 아래로 CX primer를 반응 혼합물로부터 분리시켜 상층에서는 telomerase 반응이 먼저 일어나게 한 뒤 wax를 녹여 CX primer와 섞어 줌으로써 telomerase 생산물이 PCR로 증폭할 수 있게 하는 두 가지 반응을 한 tube에서 일어나게 함으로써 보다 손쉽고 반응 효율을 높이고 있다. TRAP assay를 위해 디자인된 primers와 단일 tube 반응에 대한 모식도는 Fig. 4에 잘 보여

주고 있다. 이 방법으로 많은 사람들의 다른 조직으로부터 유래한 다양한 immortal cell line과 정상적인 체세포에 대한 telomerase 활성을 관찰하였다 (Table 1). 다른 사람의 18개의 조직에서 키운 cells에서 100개의 immortal 중에 98개에서 telomerase 활성이 관찰되었으며 22개의 mortal cell line에서는 전혀 telomerase 활성이 관찰되지 않았다. 또한 많은 다른 사람의 tumor type에 있어서 telomerase 활성과 tumor의 진전 정도가 상당한 상관관계가 있었다. 악성종양일수록 더욱 강한 telomerase 활성을 나타내었고, 이것은 악성종양으로의 진전이 telomerase 활성에 크게 의존함을 나타낸다고 볼 수 있다. 이 실험에서 immortal cell line 중에 98%가 telomerase 활성이 나타났고, primary tumor에서는 90%에서 telomerase 활성이 관찰되었다. 최근의 TRAP assay에 의한 방법으로 얻은 결과로부터 telomerase는 암세포를 진단할 수 있는 강력한 marker로 사용할 수 있으며 악성의 진전 정도를 알 수 있는 immortalization에 대한 진단 marker로 현재까지의 방법 중에 가장 유효한 방법임을 알 수 있다. 더 나아가 telomerase inhibitor를 찾아낸다면 cancer therapy에도 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

지금까지 국내에서는 TRAP assay가 시도된 적이 없으나 국외에서는 최근까지 많은 사람

Table 1. Telomerase activity in normal and immortal cells

Tissue of origin	cell type	Telomerase activity (no. positive/no. tested)
Skin	Tumor	8/8
Skin	Normal	0/5
Connective	Tumor	1/1
Joint	Normal	0/1
Adipose	Tumor	1/1
Breast	Tumor	22/22
Breast	Normal	0/8
Lung	Tumor	18/18
Lung	Transformed	2/3
Lung	Normal	0/3
Stomach	Tumor	1/1
Pancreas	Tumor	3/3
Ovary	Tumor	5/5
Cervix	Tumor	3/3
Cervix	Normal	0/1
Uterus	Normal	0/1
Kidney	Tumor	8/8
Kidney	Transformed	1/1
Blader	Tumor	3/3
Blader	Normal	0/1
Colon	Tumor	7/7
Prostate	Tumor	2/2
Prostate	Transformed	0/1
Prostate	Normal	0/2
CNS	Tumor	3/3
Retina	Transformed	1/1
Blood	Tumor	9/9

들의 다양한 조직과 cancer에 대해 TRAP assay 방법을 사용하여 활발히 telomerase assay를 함으로써 암의 진단에 아주 좋은 결과들을 보고하고 있다. 하지만 현재까지 두경부종양에서의 telomerase assay에 대해서는 보고된 경우가 없다. 그러므로 우리 나라 사람들의 두경부 악성종양에 대한 TRAP assay를 시행함으로써 telomerase 활성이 어떻게 나타나는가를 관찰해 볼 가치가 있으리라 생각되며 이는 두경부종양의 진단과 조기 발견에 상당한 기여를 할

것으로 생각하며 더 나아가 cancer therapy에 한 가능성도 기대해 보고있다.

참 고 문 헌

- 1) Blackburn EH, Szostak JW: The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 163~194, 1984

- 2) Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK : Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7049~7053, 1989
- 3) Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR : A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6622~6626, 1988
- 4) Blackburn EH : Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569~573, 1991
- 5) Allshire RC, Gidsen JR, Cross SH, Cranston G, Rout D, Sugawara N, Szostak JW, Hastie ND : Telomeric repeat from *T. thermophila* cross hybridizes with human telomeres. *Nature*. 322, 656~659, 1988
- 6) de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE : Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 10, 518~527, 1990
- 7) Kipling D, Cooke HJ : Beginning or end ? , Telomere structure, genetics and biology. *Hum. Mol. Genet.* 1, 3~6, 1992
- 8) Blackburn EH : Telomerases. *Annu. Rev. Biochem* 61, 113~129, 1992
- 9) Watson JD : Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature New Biol.* 239, 197~201, 1972
- 10) Olovnikov AJ : A theory of marginotomy : the incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Theor. Biol.* 41, 181~190, 1973
- 11) Harley DB, Futcher AB, Greider CV : Telomeres shortening during aging of human fibroblasts. *Nature* 345, 458~460, 1990
- 12) Hastie ND : Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *et al Nature* 346, 866~868, 1990
- 13) Allsopp RC : Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblast. *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10114~10118, 1992
- 14) Harley CB : Telomere loss mitotic clock or genetic time bomb ? *Mutat. Res.* 256, 271~282, 1991
- 15) Wright WE, Shay JW : Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet.* 8, 193~197, 1992
- 16) Shay J, Wright WE, Werbin H : Defining the molecular mechanism of human cell immortalization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1072, 1~7, 1991
- 17) Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S : Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which expressed telomerase activity. *EMBO J.* 11, 1921~1929, 1992
- 18) Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB : Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2882~2885, 1994
- 19) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho pLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011~2015, 1994
- 20) Greider CW, Blackburn EH : Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405~413, 1985

- 21) Greider CW, Blackburn EH : A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331~337, 1989
- 22) Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC : Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 346, 866~868, 1990
- 23) Adamson DJA, King D J, Haites NE : Significant telomere shortening in childhood leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 61, 204~206, 1992
- 24) Wright WE, Shay JW : Time, Telomeres and tumors is cellular senescence more than an anticancer mechanism. *Trends in Cell Biol.* 5, 293~297, 1995