

Received: 2013.06.08  
Accepted: 2013.09.07  
Published: 2013.12.17

## Zachowanie długości telomerów

### Maintaining telomere length

**Barbara Wysoczańska**

Laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN  
im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Telomery chronią końce chromosomów utrzymując stabilność genomu. Długość telomerów jest regulowana poprzez aktywność enzymatyczną telomerazy lub alternatywnie przez proces rekombinacji. Brak tych mechanizmów powoduje, że telomery ulegają nadmiernemu skróceniu osiągając krytyczną długość. Telomery o krytycznej długości nie chronią chromosomów, cykl podziałowy komórki ulega zatrzymaniu, a uspienie procesu replikacyjnego generuje starzenie komórkowe lub wymusza śmierć komórki. Jednak nadmiernie skrócone telomery sprzyjają powstawaniu niestabilności chromosomowych, których utrwalenie może prowadzić do nowotworzenia. W procesie tym aktywność enzymatyczna telomerazy ulega reaktywacji. W celu utrzymania ochrony końców chromosomów telomery wiążą stabilizujący kompleks białek ochronnych, którego obecność zapobiega wystąpieniu niepożądanych uszkodzeń DNA i uruchomieniu szlaku systemów naprawczych. Współczesne technologie biologii molekularnej umożliwiają ocenę długości telomerów, pozwalają na ocenę aktywności i ekspresji telomerazy oraz identyfikację polimorfizmów, mutacji i zmian epigenetycznych genów związanych z kompleksem telomer - białka ochronne - telomeraza. Obecnie prowadzi się badania mające na celu opisanie mechanizmów regulujących długości telomerów oraz określenie ich wpływu na pojawienie się zaburzeń związanych z uszkodzeniem szpiku, rozwojem chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, chorób neurodegeneracyjnych oraz innych schorzeń związanych z niestabilnością chromosomową. Model współczesnych terapii opartych na biologii telomerów wyjaśnia znaczenie zachowania długości telomerów w procesie starzenia komórkowego i nowotworzenia.

**Słowa kluczowe:**

**długość telomerów • aktywność telomerazy • starzenie komórkowe • replikacja DNA • naprawa uszkodzeń DNA**

#### Summary

Telomeres protect the ends of chromosomes maintaining genome stability. The activity of telomerase enzyme, or alternatively the process of recombination, regulates the length of telomeres. In the absence of these mechanisms, excessive shortening of telomeres reach its critical level. Excessively shortened telomeres do not protect chromosome ends, the cell division cycle is stopped while the inactivity of replication process generates cellular senescence and cell death. On the other hand, critically shortened telomeres may promote chromosomal instability. These changes can lead to the development of carcinogenesis. In this process enzymatic activity of telomerase is reactivated. To maintain the protection of the chromosome ends, telomeres bind the stabilizing protein complex (shelterin). The presence of these protective proteins prevents undesirable DNA damage and initiates the repair system pathways. Molecular technologies enable the evaluation of telomere lengths, the analysis of telomerase expression and activity, and detection of mutations, polymorphic and epigenetic changes in telomere - shelterin - telomerase complex related genes. The purpose of research is to descri-

	be new mechanisms that affect the biology of telomere lengths, and to determine the impact on bone marrow failures, development of haematological malignancies, neurodegenerative diseases and others disorders associated with chromosomal instability. The model of modern therapies based on telomere biology explains the significance of the maintenance of telomere lengths in the process of cellular senescence and carcinogenesis.
<b>Key words:</b>	<b>telomere length • telomerase activity • senescence • DNA replication • DNA repair</b>
<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1081034">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1081034</a>
<b>Word count:</b>	5413
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	1
<b>References:</b>	99

**Adres autorki:** dr Barbara Wysoczańska, Laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: wysocz@iitd.pan.wroc.pl

## WSTĘP

Genom organizmów *Eucaryota* to linearna struktura DNA, która wymaga mechanizmów zabezpieczających końce chromosomów przed uszkodzeniami oraz fuzją. Ochronę końcowej sekwencji DNA chromosomów przed włączeniem mechanizmów naprawczych gwarantują struktury zwane telomerami [44]. U kręgowców telomery zbudowane są ze zmiennej liczby powtarzających się sekwencji sześciu nukleotydów (5'-TTAGGG-3')<sub>n</sub>, które wraz z grupą białek ochronnych shelterin (shelter, schronienie) stabilizują genom przed wystąpieniem niepożądanych uszkodzeń. Sekwencje telomerowe wspomagają zachowanie integralności informacji genetycznej oraz gwarantują odpowiednią dostępność dla telomerazy, enzymu kontrolującego liczbę powtórzeń [69]. Długość powtórzeń telomerowych jest zależna od rodzaju chromosomu, typu komórki oraz jej statusu biologicznego [86]. Jeśli brak aktywności telomerazy (np. w komórkach somatycznych) telomery ulegają skróceniu [32,78]. Skracanie długości telomerów następuje z każdym cyklem podziałowym komórki i jest wyrazem postępującego procesu starzenia komórkowego. Dysfunkcja telomerów związana z osiągnięciem krytycznej liczby powtórzeń telomerowych (<100 powtórzeń) ma związek z limitem podziałowym Hayflicka, który wynosi około 80 podziałów komórkowych [52,72]. Krytyczna długość telomeru generuje procesy starzenia komórkowego, wymusza replikacyjny stan spoczynkowy lub apoptozę, stanowiąc tym samym supresję dla procesu nowotworzenia [96]. Aktywność telomerazy jest ściśle skorelowana z etapami życiowymi komórek. Duża aktywność telomerazy obserwowana jest w komórkach zarodkowych i wielopotencjalnych o wysokim indeksie proliferacyjnym oraz we frakcji komórek aktywowanych. W większości komórek somatycznych nie stwierdza się aktywności telomerazy, natomiast w komórkach nowotworowych obserwuje się reaktywację tej aktywności [5]. Poszczególne składowe kompleksu telomer/białka ochronne/telomeraza są wzajemnie powiązane czynnościowo. Obecność zmian mutacyjnych wy-

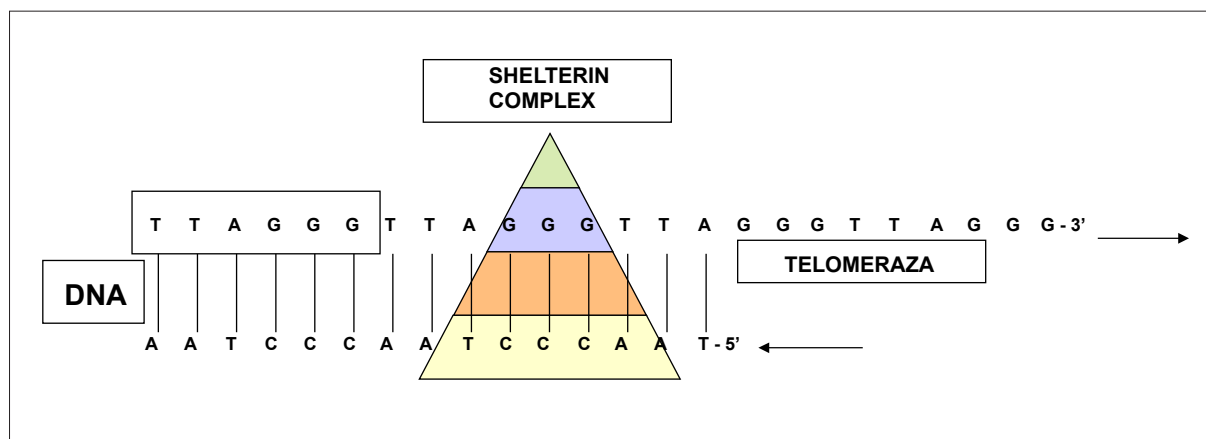
stępujących w poszczególnych podjednostkach telomerazy lub kompleksie białkowym może mieć wpływ na pojawienie się określonych zaburzeń związanych z uszkodzeniem szpiku, rozwojem chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, chorób neurodegeneracyjnych oraz licznych schorzeń związanych z niestabilnością chromosomową [46,71]. Obecnie dąży się do wyjaśnienia roli telomerów w patogenezie wielu chorób np. chorób neurodegeneracyjnych, zwłaszcza związanych z podeszłym wiekiem. W wielu przypadkach klinicznych wykazano związek między długością telomerów, aktywnością telomerazy a wystąpieniem procesów nowotworowych [39,79]. Telomeropatie są obecnie przyjętym terminem do opisu chorób związanych z dysfunkcją telomerów [3,4,98]. Znaczący postęp współczesnych technologii biomedycznych umożliwia opracowanie i wdrożenie nowatorskich metod molekularnych i bioanalitycznych o wysokiej czułości i rozdzielczości, które pozwalają ocenić długość telomerów, wyznaczyć aktywność i ekspresję telomerazy oraz zidentyfikować obecność mutacji i zmian polimorficznych genów związanych z kompleksem telomer/białka ochronne/telomeraza [7,95]. Prowadzone badania wykonywane na poziomie genu, identyfikują zmiany dotyczące regionów telomerowych i subtelomerowych na poziomie chromosomu, w zmienionych chorobowo komórkach, tkankach lub płynach ustrojowych uzupełniając tym samym wiedzę na temat biologii telomerów. Monitorowanie długości telomerów, ocena aktywności telomerazy i stabilności kompleksu shelterin mogą być pomocne w przewidywaniu ryzyka pojawienia się wielu chorób nowotworowych [6,64]. Ważnym jest, aby komórkom będącym w fazie przednowotworowej z krytyczną długością telomerów umożliwić wdrożenie nowych ukierunkowanych terapii opartych na zastosowaniu właściwych inhibitorów enzymu telomerazy bądź innych nowatorskich strategii leczniczych [23]. Wskazane nowe markery procesu związanego z dysfunkcją telomerów będą miały istotne znaczenie w ocenie klinicznej chorego oraz w charakterystyce procesu starzenia komórkowego. Proces starzenia związany jest ze stopniowym zmniejszaniem wydolności funkcjonal-

nej narządów i tkanek. Dochodzi wówczas do zmniejszenia liczby komórek spełniających określone funkcje. Limit Hayflicka jest wyznacznikiem starzenia się komórki [52]. Starzejące się komórki somatyczne wykazujące mutacje zawierają potencjał transformacji nowotworowej, jednak procesy starzenia ostatecznie doprowadzają do śmierci komórki, a nie do jej zmian związanych z nowotworzeniem. Starzejące się komórki, które nie dzielą się pozostają w dalszym ciągu metabolicznie aktywne. Wytwarzają wiele czynników, które mogą stymulować lub hamować wzrost innych komórek i tkanek. Zmiany występujące w starzejących się komórkach wpływają zarówno na homeostazę, jak i na możliwe procesy nowotworzenia. Istnieje wiele danych wskazujących, że dobrym markerem starzenia komórek są skracające się telomery [8,90]. Z wiekiem obniżają się zdolności do regeneracji prawidłowych komórek oraz pojawiają się cechy degeneracji tkanek. Proces starzenia jest procesem złożonym, związanym z licznymi zaburzeniami programu genetycznego, czego wyrazem jest nadmierne kumulowanie niekorzystnych zmian. Starzenie komórkowe charakteryzuje się zmniejszeniem metabolizmu komórkowego oraz zmniejszeniem zdolności do naprawy uszkodzeń DNA. Niektóre geny supresji nowotworowej nie tylko regulują przebieg cyklu komórkowego, ale są konieczne do indukcji starzenia komórki. Mutacja genu *TP53* lub *RB* może być wystarczająca dla rozwoju komórek nowotworowych, które mogą ulegać starzeniu lub apoptozie [12,42,47,88].

## TELOMERY, STRUKTURA I FUNKCJA

Liniowa struktura DNA u *Eucaryota* wymaga mechanizmów zabezpieczających przed utratą informacji genetycznej. Telomery zawarte na końcach chromosomów spełniają te funkcje, a ponadto chronią przed niepożądanymi uszkodzeniami i włączeniem systemów naprawczych DSB (double-strand-breaks), których działanie może prowadzić do powstania licznych niestabilności genetycznych. Telomery u ssaków stanowią powtórzenia heksametrowej sekwencji (5'-TTAGGG-3')<sub>n</sub> o długości ~5-15 tysięcy par zasad [73]. Powtórzenia te w naturalny sposób chronią końce chromosomów przed degradacją, modyfikacją i fuzją [37]. Sekwencja powtórzeń telomerowych zawarta jest w podwójnej nici

DNA (dsDNA) o długości około 10-20 tysięcy par zasad bogatych w cytozynę (C) oraz w nici pojedynczej (ssDNA) bogatej w guaninę (G). Nić ssDNA jest fragmentem nici nadwieszanej 3' o długości 50-300 nukleotydów [8,9]. Nić nadwieszona zostaje włączona do homologicznego regionu dsDNA zamkniętą się w postaci swoistej pętli (t-loop). Struktura ta zapewnia niedostępność do DNA końca chromosomów dla niepożądanych czynników mogących spowodować trwałe uszkodzenia nici DNA [37,38]. Powtarzalne sekwencje telomerowe zawarte w dsDNA i ssDNA wiążą kompleks białek ochronnych, który stabilizuje strukturę telomerów i reguluje dostępność telomerazy [31,36,71,75,86]. Na ryc. 1. przedstawiono schemat budowy telomeru wraz z białkowym kompleksem ochronnym oraz kompleksem podjednostek enzymu telomerazy. Opisano i scharakteryzowano wiele metod pozwalających na określenie długości telomerów [7,95]. Wielu badaczy skupia swą uwagę na określeniu długości telomerów w różnych sytuacjach biologii i kliniki człowieka. Określenie długości telomerów jest pomocne w badaniach nad procesem starzenia się komórki, uwarunkowaniem rozwoju choroby i określeniem biomarkerów związanych z procesem nowotworzenia [7,95]. Na przykład badania Benetosa i wsp. wykazały, że u kobiet długość telomerów jest większa niż u mężczyzn [13]. Sądzi się, że na proces skracania długości telomerów mogą mieć wpływ hormony płciowe [26]. Badania wykonane w zróżnicowanych populacjach komórkowych wykazały, że długość telomerów ulega skróceniu w większym tempie w populacji limfocytów w porównaniu do populacji granulocytów niezależnie od wieku [6,81]. Prace Auberta i wsp. dowiodły, że w odpowiednich grupach wiekowych u ludzi zdrowych można wykazać określoną długość telomerów oraz wyznaczyć ich stopień skracania [6]. Badania te wykonane w zróżnicowanych populacjach komórkowych wykazały, że skrócenie długości telomerów przebiega najbardziej dynamicznie w przedziale wiekowym 0-1 roku, oraz że skrócenie długości telomerów przebiega w największym tempie w populacji limfocytów w porównaniu do populacji granulocytów niezależnie od wieku [6,81]. Ta sama grupa badawcza wykazała istotne różnice w zachowaniu długości telomerów w populacji komórkowej limfocytów o fenotypie komórki B, komórki T pamięci, komórki NK/T oraz komórki naiwnej w określonych przedziałach wiekowych [6].



Ryc. 1. Telomer jest strukturą złożoną z powtórzeń heksamerowych (5'-TTAGGG-3')<sub>n</sub>, chronioną przez kompleks białek - shelterin i regulowaną przez enzym telomerazę

Badania innej grupy badawczej wykazały istotne różnice w zachowaniu długości telomerów dla komórek B pamięci i B dziewiczych [66].

Obecność telomerów na końcach chromosomów ma spełnić dwa podstawowe zadania:

- ochronić końce liniowego DNA od włączenia niepożądanego maszynierii sygnałowej uszkodzeń DNA - DSB oraz
- zachować stabilność, ciągłość i integralność genomu, nie podejmując utraty informacji genetycznej.

Wypracowane enzymatyczne mechanizmy ochrony (telomeraza) i obecne struktury białkowe (shelterin) związane z telomerami sprzyjają utrzymaniu stabilizacji końców chromosomów [75]. Skracanie długości telomerów jest procesem dynamicznym, zachodzącym na poszczególnych etapach związanych z cyklem życiowym komórki [44]. W komórkach somatycznych, dojrzałych i zróżnicowanych obserwuje się sukcesywne skracanie długości telomerów związane z cyklem podziałowym komórki i zaawansowanym procesem replikacyjnym. W razie braku aktywności telomerazy odbywa się to w sposób regularny i dotyczy każdego procesu podziałowego komórki [44]. Proces skracania telomerów może być dodatkowo wzmocniony przez działanie zewnętrznych bodźców środowiskowych, takich jak stres genotoksyczny i oksydacyjny komórki oraz obecność defektów genetycznych związanych ze zmianami mutacyjnymi struktur towarzyszących [63,76,84].

Telomery są nazywane molekularnym zegarem, który informuje komórkę o przekroczeniu krytycznej liczby podziałów (80x, limit Hayflicka) [52]. Skrócenie telomerów poniżej wartości krytycznej (<100 powtórzeń) uniemożliwia utrzymanie właściwej struktury przestrzennej pętli (t-loop) oraz powoduje brak możliwości wiązania się białek ochronnych do telomerów [35,75]. Zbyt krótkie telomery są sygnałem informującym o starzeniu komórkowym, mogą być rozpoznawane przez mechanizmy regulujące cykl komórkowy jako moment sygnalizujący konieczność wstrzymania dalszych podziałów - komórka przechodzi wówczas do stanu spoczynkowego (senescence) lub może ulec apoptozie [44,72]. W procesie starzenia komórkowego ustają podziały, przyspieszony zostaje proces degeneracyjny komórki, podatność organizmu na choroby wzrasta. Starzenie komórkowe może stanowić barierę dla rozwoju nowotworu. Komórki, które osiągnęły stan trwałego zatrzymania podziałów nie muszą poddać się transformacji nowotworowej, jednak badania wskazują, że na tym etapie może dochodzić do stymulacji i wzrostu komórek przednowotworowych [55].

## MECHANIZM REPLIKACJI TELOMERÓW

Podczas procesu powielenia materiału genetycznego rodzicielska nić DNA jest kopiowana tylko w jednym kierunku ponieważ polimeraza DNA przesuwa się w kierunku od 3' do 5' końca, dobudowując nową nić zawsze od 5' do 3' końca. Wyjaśnienie, dlaczego komórki tracą sekwencje telomerowe w każdym podziale komórkowym wymaga przybliżenia szczegółów procesu replikacji [75].

Replikacja telomerów jest procesem semi-konserwatywnym. Oznacza to, że synteza nowych nici DNA może się odbywać tylko z udziałem nici rodzicielskich, służących jako matryce. Aby dobudować komplementarną nić DNA musi zadziałać kompleks składowy enzymów: helikaza, prymaza (synteza 10 nukleotydowych odcinków RNA - startery replikacji), polimeraza DNA (dobudowa kolejnych nukleotydów w kierunku od 5' do 3' końca nici DNA). Nici DNA są zwrócone do siebie przeciwnoległe, a replikacja DNA łańcucha wiodącego (5'-3') i opóźnionego (3'-5') przebiega w odmienny sposób. Nić wiodąca jest rozbudowywana w sposób ciągły, druga nić opóźniona jest dobudowywana fragmentami Okazaki [75,82]. W czasie podziału komórkowego polimeraza DNA nie replikuje końca łańcucha opóźnionego. Jest to tzw. „problem replikacji końca” (end replication problem). Brak replikacji końca łańcucha opóźnionego powoduje zatem skracanie telomerów. Po zakończeniu dobudowy nici przez polimerazę DNA, następuje usuwanie niepotrzebnych starterów przez nukleazę, następnie ligaza łączy powstałe fragmenty DNA, umożliwiając w ten sposób zachowanie ciągłości nici potomnej. Podczas procesu replikacji dochodzi do skrócenia sekwencji DNA, formowana jest nadwieszona nić 3', która wymaga działania wielu egz nukleaz np. Apollo, EXO1, MRE11 [82]. Maszynieria replikacyjna działa według opisanego wyżej schematu, a z powodu braku możliwości odtworzenia odcinków DNA w miejscu wyciętego startera następuje skracanie długości telomerów przy każdym podziale komórkowym. Chromosomy myszy i człowieka skracają się o 50-150 par zasad podczas jednego podziału. Skracanie długości DNA chromosomów podczas replikacji to tylko jeden z problemów wynikających z istnienia wolnych końców DNA. Inne procesy związane z replikacją to rozpoznawanie końców nici DNA jako miejsc objętych uszkodzeniami, degradacja końców DNA przez nukleazy, a także łączenie się końców ze sobą i tworzenie fuzji chromosomów. Skracanie chromosomów ogranicza liczbę podziałów komórkowych [14]. Tylko aktywność telomerazy lub alternatywny mechanizm wydłużania telomeru ALT może mieć wpływ na regulację i zachowanie długości telomeru [61,96]. Nadmierne skracanie długości telomerów oraz wydłużanie telomerów przez telomerazę w określonych sytuacjach cyklu komórkowego ma znaczenie kliniczne dla człowieka. Proces generowania nici-G i jej nadwieszania odbywa się niezależnie od ekspresji telomerazy. Niezbędne jest trawienie nukleaz, aby zostały wygenerowane nadwieszania. Ze względu na powtarzalność sekwencji telomerowego DNA proces replikacji jest utrudniony i wymaga działania wspomagającego wielu dodatkowych białek, np. TRF1, RecQ helikaza, BLM, WRN, FANCD1, RTEL, FEN1 [86]. Rekrutacja telomerazy do miejsca wydłużania telomeru przebiega z udziałem białek Cajala oraz interakcji z TPP1 (składowa kompleksu shelterin). Każdy telomer jest wydłużany o 50-60 nukleotydów (nt), podobnie jak wydłużanie nici DNA *in vitro* przez telomerazę RNP wspomagane przez składowe POT1/TPP1 [86].

## KOMPLEKS BIAŁEK OCHRONNYCH — SHELTERIN

Kompleks białek ochronnych shelterin to złożona wielobiałkowa struktura związana z telomerami. Białka te rozpoznają organizację końca chromosomów i związane z nimi sekwen-

cje telomerowe. Białka shelterin chronią przed niepożądanymi aktywnościami szlaków naprawczych, a swoją obecnością zapewniają stabilność genomu [34,35,36]. W skład kompleksu shelterin wchodzi następujące białka: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 oraz POT1 [41,75,90]. Białka shelterin wiążą się wzajemnie wiązaniem białko-białko: RAP1-TRF2, TPP1-POT1, TIN2-TRF1-TRF2-TPP1 oraz wiązaniem białko-DNA. Shelterin przytwierdza się do podwójnej nici dsDNA telomerów poprzez TRF1 i TRF2 lub do nici pojedynczej ssDNA poprzez składową POT1 [11]. Shelterin tworzą stabilną i zwartą strukturę, promując formowanie pętli t-loop zabezpieczając w ten sposób genom przed włączeniem niepożądanych szlaków naprawczych [74]. Wykazano, że brak TRF2 wpływa destabilizując na nadwieszoną nić-G, aktywując szlak naprawy DNA poprzez ATM/P53 [86]. Natomiast brak podjednostki POT1 uruchamia szlak naprawy poprzez ATR (ataxia telangiectasia) [37]. Udokumentowano, że rekrutacja enzymu telomerazy jest zależna od składowych kompleksu shelterin: POT1, TPP1, TIN2 [35,36]. Struktura telomerów oraz białek ochronnych może występować w postaciach „zamkniętej” niedostępnej dla telomerazy oraz „otwartej” umożliwiającej w ten sposób dostęp enzymu, celem wydłużania i dobudowywania powtarzalnych sekwencji telomerowych [8].

### MECHANIZMY NAPRAWCZE USZKODZEŃ DNA

Uszkodzenia obu nici DNA, gdy oba łańcuchy nukleotydomy w podwójnej helisie zostają przerwane są szczególnie niebezpieczne dla komórki, gdyż mogą prowadzić do nieodwracalnych zmian w genomie. Wyróżnia się trzy szlaki naprawy uszkodzeń DNA: HRR (homologous recombination repair), C-NHEJ (classical nonhomologous end joining) oraz A-NHEJ (alternative NHEJ) [71]. Powodzenie naprawy DNA zależy od wielu czynników, np. typu i wieku komórki oraz środowiska pozakomórkowego. W komórce, w której duża ilość DNA uległa uszkodzeniu lub w której mechanizmy naprawy DNA nie są wystarczająco efektywne, może dojść do nieodwracalnego stanu wygaśnięcia aktywności komórki (starzenie komórkowe), apoptozy oraz do uruchomienia niekontrolowanych podziałów komórkowych, prowadzących do powstania nowotworu. Nadmiernie skrócona długość telomerów lub brak jednego z komponentów białkowych shelterin spowodowany np. zmianą mutacyjną, prowadzi do odsłonięcia końca chromosomu, ułatwiając możliwość rozpoznania uszkodzeń genomu [72]. Włączenie odpowiedniego mechanizmu naprawczego wywołanego zmianą długości telomerów może prowadzić do propagacji nowotworzenia [96]. Proces naprawy uszkodzeń odbywa się z udziałem białek ATM/ATR (ataxia telangiectasia mutated protein/ataxia telangiectasia) i regulowany jest czynnikami cyklu komórkowego z udziałem szlaku p53, p16/Rb [12,32,42,47,88]. Jeśli naprawa uszkodzeń DNA wiedzie poprzez typowe szlaki naprawcze np. NHEJ mogą powstawać liczne niestabilności chromosomowe związane z fuzjami genów oraz licznymi translokacjami charakterystycznymi dla zmian nowotworowych [34]. Zmiany mutacyjne w poszczególnych składowych kompleksu białek shelterin odgrywają również znaczącą rolę w przebiegu utrzymania równowagi między supresją nowotworową a propagacją nowotworzenia [34]. Zaburzenia TRF2 aktywują białko ATM, które jest zaangażowane w na-

prawę uszkodzeń DNA, związane z fuzją telomerów, a także z homologiczną rekombinacją HRR [71]. Gdy stwierdza się brak składowej POT1, komórki odpowiadają poprzez mechanizm związany ze szlakiem naprawy wiodącym poprzez białko ATR [38].

### TELOMERAZA

Telomeraza jest holoenzymem o aktywności odwrotnej transkryptazy odpowiedzialnym za wydłużanie sekwencji telomerowych [78]. Aktywność tego wysoce wyspecjalizowanego enzymu rekompensuje ubytek sekwencji DNA telomerów [86]. W komórkach somatycznych nie stwierdza się obecności telomerazy. Komórki o wysokim potencjale proliferacyjnym i komórki zarodkowe, macierzyste, progenitorowe układu krwiotwórczego, skóry i krypt jelitowych charakteryzują się dużą aktywnością telomerazy [19]. Ta aktywność stwierdzana jest ponownie w komórkach zmienionych nowotworowo [32]. Telomeraza jest rybonukleoproteiną zbudowaną z podjednostki katalitycznej TERT o aktywności odwrotnej transkryptazy (telomerase reverse transcriptase), podjednostki RNA - TERC stanowiącej swoisty wzorec telomerowego DNA oraz wielu innych składowych, w tym białka dyskeriny [33].

Kompleks telomerazy zawiera więc polimerazę i własną matrycę. Trzy podjednostki telomerazy kodowane są przez oddzielne geny zlokalizowane na różnych chromosomach. TERT kodowana jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 5p15.33, TERC na chromosomie 3q21-28, a TP1 na chromosomie 14q11.12. Podłoże molekularne regulujące aktywność telomerazy jest złożone i stanowi wielopoziomowy system nadzorujący [32]. Regulacja aktywności enzymu może przebiegać na poziomie transkrypcji, potranskrypcyjnie oraz potranslacyjnie [32]. Rekrutacja telomerazy do miejsca końcowego chromosomu jest modulowana przez białko ochronne shelterin związane z telomerami. Rojas i wsp. opisali zależności między składowymi poszczególnych podjednostek i domen shelterin oraz enzymu telomerazy np. TEN1, TPP1, POT1 [32,75]. Opisano szczegółowo procesy regulacji telomerazy poprzez RAP (repeat addition processivity) oraz TERRA (transcript term telomeric repeat containing RNA) [32,77]. Poszczególne składowe białek shelterin stanowią swoistą gwardię dla fundamentalnej roli telomerów i telomerazy [34, 35,36]. Dostępne metody biologii molekularnej pozwalają na badanie genetycznego podłoża aktywności telomerazy, co ma znaczenie szczególnie w przypadkach nowotworzenia, kiedy to ponownie stwierdza się aktywność tego kompleksu [40,45,54,99]. Dotyczy to zarówno rozrostu układu krwiotwórczego, jak i innych nowotworów [5,39,65]. Obecnie identyfikuje się mutacje oraz polimorfizmy jednonukleotydowe SNP (single nucleotide polymorphism) w poszczególnych podjednostkach telomerazy [60,67]. W badaniach dotyczących wystąpienia nowotworów układu nerwowego, płuc oraz pęcherza wykazano, że obecność zmian polimorficznych w podjednostkach telomerazy hTERT oraz hTERC ma wpływ na długość telomerów [50,67,91]. Niektóre ze współczesnych terapii znajdujące się obecnie w zaawansowanej fazie klinicznej oparte są na inhibitorach telomerazy [20,23,58,65,97]. Reeksprcja aktywno-

ności enzymatycznej telomerazy jest uznawana za krytyczny czynnik w procesie nowotworzenia. Wykazano, że tylko w 10-15% przypadków nowotworów stwierdza się brak telomerazy, ale wówczas prawdopodobnie działa mechanizm alternatywnego wydłużania telomerów (ALT). Toteż dla prawie wszystkich nowotworów telomeraza jest uniwersalnym markerem diagnostycznym. Aktywność telomerazy wykazano zarówno w nowotworach narządowych (rak piersi, płuc, krtni, jelita grubego, żołądka, pęcherza moczowego), jak również w schorzeniach układu krwiotwórczego, chorobach limfoproliferacyjnych (białaczkach i chłoniakach). Badanie ekspresji i aktywności telomerazy może mieć znaczenie dla stratyfikacji i oceny efektywności leczenia i prognozowania choroby nowotworowej. Nieprawidłowa ekspresja telomerazy jest zapewne jednym z wielu czynników wpływających na pojawienie się zmian prowadzących do transformacji nowotworowej.

### TELOMER JAKO STRUKTURA EPIGENETYCZNA

Telomery chronią informację genetyczną, nie mają wpływu na kodowanie swoistych białek. Pełniąc rolę gwardii genomu, jednocześnie wymagają dodatkowych mechanizmów regulujących ich długość związanych ze zmianami epigenetycznymi [16,59,96]. Zmiany te warunkują stopień dostępności telomerazy do struktury heterochromatynowej telomeru. W stadium zwartej struktury (telomery długie, pętla t-loop) brak jest dostępności dla telomerazy i procesu rekombinacji, natomiast rozluźnienie struktury (telomery krótkie) sprzyja i zwiększa dostępność dla telomerazy i rekombinacji celem wydłużenia telomeru [96]. Opisane struktury nukleosomu i heterochromatyny są niezbędne w utrzymaniu funkcji telomerów, np. zmiany związane z metylotransferazą są następstwem zmian konformacyjnych i powodują bardziej „otwartą” strukturę podatną na procesy rekombinacji [48]. Epigenetyczny status telomerów jest więc kolejnym ważnym elementem wpływającym na zachowanie integralności genomu końca chromosomu [16]. Skracanie telomerów ma istotny wpływ na ekspresję genów. Skracaniu telomerów towarzyszy reaktywacja genów, które wcześniej nie ulegały ekspresji. Efekt pozycji telomeru tłumaczy modyfikację ekspresji genów obserwowanych w starzejących się komórkach, toteż nie bez znaczenia jest badanie zmian w regionie subtelomerowym. Innym mechanizmem prowadzącym do zatrzymania podziałów komórkowych może być sygnał z uszkodzonego telomerowego DNA. Sygnał ten jest odpowiedzialny za wytwarzanie fosforylowanych wariantów histonu 2A (gamma H2AX), związanych z miejscami uszkodzeń obu nici DNA. Fosforylowane histony umieszczone dookoła miejsc uszkodzeń DNA powodują akumulację czynników naprawczych, będących produktami genów *BRCA1*, *NBS1*, *MDC1*, *MRE11*, *RAD50* [34,75]. Wyniki wielu badań wskazują na korelację między skracaniem telomerów a stopniowym upośledzeniem zdolności proliferacyjnej komórek. Wraz z kolejnymi podziałami komórek oprócz skracania telomerów można zaobserwować zmiany w białkach. W fibroblastach dochodzi do zwiększenia syntezy prokolagenazy, aktywatora plazminogenu, stromeliny z jednoczesnym obniżeniem syntezy prokolagenu i tkankowych inhibitorów metaloproteazy.

### TELOMERY A NOWOTWORZENIE

Od czasu, kiedy w 2009 roku w dziedzinie fizjologii i medycyny przyznano Nagrodę Nobla dla Elizabeth H. Blackburn, Jacka W. Szostaka i Carol W. Greider za badania nad telomerami i telomerazą, obszar zainteresowania badaczy został uznany za znaczący dla wielu dziedzin nauki. Zakres badań dotyczy określenia dysfunkcji telomerów szczególnie w kontekście nowotworzenia, na wybranych modelowo liniach komórkowych mysich lub tkankach ludzkich [28,40,80]. Rezultaty tych badań wskazują jednoznacznie, iż biologia telomerów odgrywa rolę w supresji nowotworu prowadząc komórkę w stan apoptozy lub uśpienia (senescence), a także pod wpływem aktywności telomerazy promuje procesy nowotworzenia. Wyniki wielu prac badawczych wskazują na znaczenie długości telomerów związanych z ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej [50,79]. Współczesne badania w tej dziedzinie dotyczą obecnie roli jaką pełni telomeraza w mechanizmie niezależnym od telomerów w proliferacji komórkowej i w rozwoju nowotworu [96]. Ponadto, badacze skupiają swoją uwagę na roli czynników epigenetycznych i szlaku ALT (niezależnym od telomerazy) w promowaniu nowych szlaków kojarzonych z nowotworzeniem [53].

Aktywacja onkogenów, obecność recesywnych zmian w genach supresorowych oraz postępująca klonalna ekspansja komórkowa mogą stanowić ryzyko wystąpienia niestabilności genomu. Akumulacja licznych mutacji i związane z proliferacją utrwalenie zmian prowadzi do stadium przed- i/lub nowotworowego. Aby doszło do transformacji nowotworowej w komórce musi zajść co najmniej 4-6 mutacji. Po wystąpieniu mutacji dochodzi do ekspansji zmutowanego klonu komórek, w których po kilkunastu lub kilkudziesięciu podziałach może zajść kolejna mutacja. Przyjmuje się, że komórka musi się podzielić 80-200 razy, żeby powstała zmutowana komórka nowotworowa. Wiadomo jednak, że 80 podziałów stanowi górną granicę liczby podziałów komórki (limit Hayflicka), toteż część komórek z mutacjami musi ulec starzeniu replikacyjnemu i apoptozie [5,8,16]. Komórki nowotworowe w przeciwieństwie do prawidłowych nie skracają telomerów w kolejnych podziałach, co sugeruje, że stabilność telomerów może być wymagana w rozwoju procesu nowotworowego i uniknięcia starzenia i śmierci komórki. Pojawienie się reekspresji telomerazy i jej zwiększona aktywność może być krytycznym czynnikiem w procesie nowotworzenia [19,43,78]. Na rozwój procesu nowotworzenia mają wpływ czynniki genetyczne oraz epigenetyczne, które nie zależą od pierwotnej sekwencji DNA. Telomery są właśnie takimi strukturami spełniającymi pośrednio oba te kryteria [16]. Sekwencje telomerowe, mimo iż związane z genomem nie mają cech genu, nie kodują produktu białkowego. Ich cechą znaną jest związana z cyklem proliferacyjnym zmiana długości wpływająca na funkcjonalność komórki, a osiągnięcie krytycznej długości prowadzi do pojawienia się wielu zaburzeń biologii komórki [53]. Badania ludzkich fibroblastów wskazują na starzenie komórkowe, kiedy niechronione końce chromosomów są rozpoznawalne przez DSB [68]. W komórkach nowotworowych utrzymanie długości telomerów przebiega z udziałem telomerazy, jedynie w 10% jest zaangażowany niezależny od telomerazy szlak ALT [61].

W przewlekłej białaczce limfatycznej (CLL), wraz z progresją choroby obserwuje się skracanie telomerów, natomiast aktywność telomerazy nie odzwierciedla tego procesu [87]. Mechanizm pojawiania się niestabilności chromosomów następuje, kiedy dochodzi np. do B/F/B (breakage-fusion-bridge) i pojawiają się 2 centromery na skutek fuzji dwóch chromosomów lub chromatyd siostrzanych [72]. Obecność DSB w pobliżu telomerów, w ludzkich komórkach nowotworowych (np. linia komórkowa EJ-30) powoduje starzenie komórkowe. Wykazano, że odpowiednia długość telomeru ma znaczenie w procesie pojawiania się wielu chorób, w tym hematologicznych [39]. Obecnie zaburzenia związane z destrukcją telomerów zwane są ogólnie syndromem telomerów (telomere syndrome) [3,4]. Telomery przez swą długość i aktywny mechanizm ochronny shelterin stanowią swoisty mechanizm regulacji supresji pojawiania się stanu przednowotworowego. W komórkach nowotworowych akumulacja mutacji w protoonkogenach i w genach przeciwnowotworowych (supresji nowotworowej) prowadzi do zablokowania sygnałów hamujących podziały komórkowe. W rozwoju nowotworu komórka najpierw starzeje się, następnie łatwiej niż młoda ulega transformacji nowotworowej. Krytyczna liczba powtórzeń telomerycznych zwiększa podatność chromosomów do fuzji i ich łamliwości [29,43]. Brak aktywności genów supresorowych szlaku p53, p16/Rb sprzyja genetycznym zmianom prowadząc do procesu nowotworzenia [43,44]. Jeżeli dochodzi do uruchomienia procesów naprawczych nadmiernie skrócone telomery nie zabezpieczają DNA przed rearanżacjami prowadzącymi do niestabilności genomu i nieprawidłowościami w kariotypie, nie chroniąc chromosomów przed zmianą struktury oraz fuzją [29,62]. Brak telomerazy (komórki somatyczne) prowadzi do osiągnięcia krytycznej długości telomerów i uruchomienia dwóch punktów kontrolnych M1 (starzenie komórkowe, spoczynek) oraz M2 (katastrofa mitotyczna, apoptoza) [23]. Na etapie M1 dochodzi do zatrzymania podziałów komórkowych mediowanych poprzez białka kodowane przez geny supresorowe *TP16*, *RB* i *TP53*. W przypadku zablokowania działania wymienionych genów, poprzez mutacje lub białka wirusowe, komórki dzielą się nadal skracając telomery (stadium M2). Telomery stają się na tyle krótkie, że nie stanowią już zabezpieczenia końców chromosomów przed uszkodzeniami. Stadium M2 charakteryzuje się niestabilnością genomu, degradacją DNA i fuzją końców chromosomów. W warunkach *in vitro* wśród części obumierających komórek można napotkać skupiska dzielących się komórek, w których stwierdza się reaktywację telomerazy pozwalającą na odbudowę telomerów i uniesmiertelnienie komórek, które wykazują cechy charakterystyczne dla komórek nowotworowych.

#### TELOMERY A CHOROBY ROZROSTOWE UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

W ostrych białaczkach limfatycznych i szpikowych (ALL, AML) stwierdza się obecność wielu zmian chromosomalnych (abberacje delecje, duplikacje). Zmiany te są w wielu przypadkach swoiste, toteż stanowią dogodny marker diagnostyczny i prognostyczny [70]. Mechanizm powodujący niestabilność genomową prowadzący do selekcji klonalnej i rozrostu komórek białaczkowych nie jest do końca wyjaśniony i poznany. Oba typy białaczek różnią się zmienioną

linią komórkową oraz liczbą i specyfiką rozrastających się komórek, jednak w wielu przypadkach stwierdza się zmianę w długości telomerów i związaną z tym ich dysfunkcją [39,57]. Zmiany w długości telomerów mogą stanowić mechanizm wpływający na niestabilność chromosomową obserwowaną w przypadku ostrych białaczek. Podczas gdy u 55% pacjentów z AML w czasie rozpoznania wykrywa się zmiany cytogenetyczne, to u pozostałych 45% stwierdza się kariotyp niezmienny [70]. Bardziej szczegółowa analiza z wykorzystaniem sond subtelerowych u 50% pacjentów z kariotypem prawidłowym wykazuje obecność utraty lub duplikacji regionów DNA subtelerowych wielkości ok. 600 kb [49]. Subtelerowe delecje mogą być konsekwencją złamań chromosomalnych (subteleromic DBS), które wynikają z podatności danego regionu na uszkodzenia lub z zaburzeń związanych z obecnością krótkich telomerów generowanych podczas replikacji lub stochastycznego telomerowego usunięcia [68]. Subtelerowe złamania mogą być usunięte jedynie przez dodanie motywu TTAGGG przez telomerazę, kreującą nowy telomer, stabilny i niepodatny na delecję [9]. Obecnie dobrze udokumentowano, iż u pacjentów z ostrą białaczką obserwuje się znaczne skrócenie długości telomerów w porównaniu z kontrolami zdrowych [30]. Ponadto oprócz skracania telomerów u tych pacjentów obserwuje się wzrost aktywności telomerazy [30,92]. Z badań wynika, że aktywność telomerazy jest większa u pacjentów z ostrą białaczką mieloidalną (AML) w porównaniu do pacjentów z ostrą białaczką limfocytarną (ALL), jest to konsekwencją metylacji genu *TERT* w regionie promotorowym [17,30]. Długość telomerów oznaczana podczas rozpoznania choroby jest zróżnicowana u pacjentów z ALL. U pacjentów z B-ALL telomery są krótsze w porównaniu do pacjentów z rozpoznaniem białaczki linii T (T-ALL). Aktywność telomerazy towarzysząca krótkim telomerom jest duża u pacjentów ze wznową choroby [92]. Świadczy to o dość późnym procesie związanym z patologią choroby i potwierdza teorię związku klonalności komórek białaczkowych z bardzo krótkimi telomerami. Długość telomerów jest zróżnicowana u pacjentów z AML, kiedy uwzględni się podział na podtypy choroby French-American-British (FAB) i u pacjentów w stadium choroby M5, u pacjentów z mutacją w genie *FLT3*, u pacjentów ze zmianami w kariotypie [51]. Zmiany genetyczne w podjednostce *TERT* są uznawane za czynnik limitujący aktywność telomerazy [30]. Zmiana w *locus TERT* wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia wielu typów nowotworów [10]. Wystąpienie wielu wariantów w linii zarodkowej *TERT* i *TERC* związane jest z ryzykiem wystąpienia AML [25]. Niektóre z nich okazały się specyficzne do odróżnienia zespołu mielodysplastycznego, który następnie rozwija się w AML [60]. Wykazano związek zmian ekspresji innych białek z kompleksu białek ochronnych w ostrych białaczkach. Na przykład ekspresja *ACD*, *TERF2IP*, *XRCC6* i *PINX1* jest zwiększona u pacjentów B-ALL w porównaniu z T-ALL i AML, ma to również znaczenie i wpływa na przeżycie tych pacjentów [30]. Obserwacje te mogą mieć wpływ na terapie oparte na wybranych cząsteczkach lub genach kodujących. Ma to znaczenie w utrzymaniu równowagi między telomerazą a kompleksem shelterin. Krótsze telomery związane z deregulacją telomerazy mają związek z patologią ostrej

białaczki. Istotnym jest zauważenie, że ubytki w sekwencjach telomerów związane są z ich dysfunkcją i przyczyniają się do niestabilności genomu, klonalności komórek swoistych dla ostrych białaczek, są znacznikiem proliferacji komórkowej i pełnią rolę w rozwoju nowotworu. Wyniki badań dotyczące przewlekłej białaczki szpikowej (CML), choroby o rozroście komórek linii mieloidalnej ze znacznikiem obecności chromosomu Ph<sup>+</sup> również potwierdzają rolę telomerów w zmienionej populacji blastów. Długość telomerów koreluje ze stadiem choroby oraz z obecnością chromosomu Philadelphia [18]. Aktywność telomerazy jest większa u pacjentów w stadium kryzy blastycznej, wskazuje to na progresję choroby i wpływa na krótszy czas przeżycia [87]. Aktywność telomerazy związana jest z cyklem komórkowym. W stadium G0 aktywność enzymu jest mniejsza w porównaniu do fazy S/G2/M. Ekspresja TERT jest mniejsza w populacji komórek CD34<sup>+</sup> u pacjentów CML w porównaniu do zdrowych komórek z grupy kontrolnej. Campbell i wsp. wskazała na związek choroby CML ze zmianami czynników związanych z telomerami [28].

## TELOMEROPATIE

Telomeropatie są chorobami związanymi z dysfunkcją telomerów [3,4,98]. Zachowanie odpowiedniej długości telomeru TMM (telomere maintenance mechanisms) ma na celu zapobieżenie utraci informacji genetycznej [33]. Zmiany związane z obecnymi mutacjami w składowych telomerazy niosą za sobą konsekwencje rozwoju wielu chorób zwanych „chorobami telomerowymi” [2,3,4,24,27,89]. Niektóre z chorób powodujące przedwczesne starzenie komórek, np. zespół Wernera lub inne choroby związane z uszkodzeniem szpiku, charakteryzują się nadmiernym skróceniem długości telomerów [21]. Wykazano zależność między długością telomerów a wystąpieniem wielu chorób związanych z wiekiem, w tym chorób hematologicznych oraz chorób neurodegeneracyjnych [16,53,54,57,94]. Opisano wpływ bodźca środowiskowego, takiego jak stres, dieta, styl życia, uzależnienia na długość telomerów [63,76,83,85]. Choroba genetyczna *dyskeratosis congenita* (DC - dyskeratoza wrodzona) jest chorobą spowodowaną defektem elementów systemu ochrony telomerów [89]. Podłoże genetyczne prawie połowy przypadków z DC stanowią mutacje 6 genów, o różnym typie dziedziczenia. W sposób autosomalny dziedziczone są mutacje genów: *TERC* (3q26) kodującego nie białko, lecz RNA - składnik telomerazy, *TERT* (5p15) kodującego odwrotną transkryptazę - enzymatyczny składnik kompleksu telomerazy oraz *TINF2* (14q12) kodujące białko TIN2, które przyłącza się do telomerów i jest niezbędne do prawidłowej regulacji ich długości. Mutacje tych genów zaburzają funkcję telomerazy, czego skutkiem jest szybsze skracanie telomerów [4]. Kolejną przyczyną choroby są recesywne mutacje położonego na chromosomie X (Xq28) genu *DKC1* kodującego dyskerinę - białko odpowiedzialne za stabilność różnych cząstek RNA w tym RNA telomerazy. Mutacja tego genu powoduje najcięższą postać choroby związaną z dysfunkcją rybosomów oraz telomerazy. Obserwuje się to w tkankach o cechach intensywnej proliferacji: nabłonki błon śluzowych, naskórek, układ krwiotwórczy. Objawami fenotypowymi DC są m.in. dysplastyczne pa-

znokcie i leukoplakia błony śluzowej jamy ustnej, niski wzrost, zwężenie przełyku, wady układu moczowego, wczesne siwienie, wypadanie włosów, osteoporoza oraz marskość wątroby. U około 10% chorych pierwszym objawem jest niedokrwistość aplastyczna. Badaniem przydatnym w wykrywaniu DC jest ocena długości telomerów w leukocytach metodą FISH [1]. Dyskeratoza wrodzona kojarzy się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów litych, zwłaszcza raka kolczystokomórkowego skóry oraz z ryzykiem wystąpienia białaczek.

Inne choroby związane z uszkodzeniem szpiku, takie jak anemia Fanconiego oraz syndrom Shwachmana-Diamonda objawiają się skróceniem telomerów oraz zwiększonym ryzykiem pojawienia się chorób rozrostowych układu krwiotwórczego MDS i AML [30]. Do chorób związanych z zaburzeniem długości telomerów należy również IPF (idiopathic pulmonary fibrosis), anemia aplastyczna oraz choroby układu sercowo-naczyniowego, w których telomery są nadmiernie skrócone [3,4]. Za czynniki sprzyjające skracaniu długości telomerów uznaje się liczne stany zapalne, stres oksydacyjny, zaburzenia mitochondrialne, styl życia oraz czynniki środowiskowe [63,83]. Zmiany związane z długością telomerów oraz wystąpienie mutacji w genach odpowiedzialnych za prawidłowości w białkach shelterin i innych stabilizujących sekwencje telomerowego DNA są stwierdzane u pacjentów z chorobami związanymi z uszkodzeniem szpiku BMF (inherited and acquired bone marrow failure syndromes) [1,83]. Zespoły telomerowe predysponują zatem do rozrostu komórkowego. Przykładem tego może być niedokrwistość aplastyczna (FA, anemia Fanconiego), wrodzony zespół aplastyczny spowodowany niestabilnością chromosomów, któremu towarzyszą nieprawidłowości anatomiczne z tendencją do rozwoju nowotworów, w tym chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Do najistotniejszych badań diagnostycznych u pacjentów z FA należy ocena nadwrażliwości na klastogenny (łamanie chromosomów) wpływ diepoksybutanu (DEB). Limfocyty chorego z FA wykazują 3-10-krotnie więcej złamań chromosomów niż limfocyty kontrolne. Obserwuje się u nich przyspieszone skracanie długości telomerów *in vitro* oraz zwiększoną fuzyję wolnych końców chromosomów. Dla tych pacjentów znamienne są również inne nieprawidłowości komórkowe, takie jak: wrażliwość na tlen, bezpośrednie defekty w naprawie DNA oraz defekty komórek macierzystych i szpiku.

## WSPÓŁCZESNE STRATEGIE TERAPEUTYCZNE

Poznanie biologii kompleksu telomerów/białek ochronnych/telomerazy pozwoli wykorzystać poszczególne szlaki istotne dla wykorzystania we współczesnej terapii nowotworów [15,20]. Wykorzystanie współczesnych technologii do badań określających długość telomerów, wsparte dodatkową analizą obecnych mutacji i różnic w ekspresji genów dotyczących białek shelterin i telomerazy pozwalają na dogłębne zrozumienie mechanizmów przedwczesnego starzenia komórkowego, etapu osiągnięcia stanu spoczynkowego komórki, apoptozy oraz procesu nowotworzenia. Fundamentalną cechą komórki nowotworowej jest jej nieograniczona możliwość do replikacji; jest



to możliwe z udziałem telomerazy, która utrzymuje odpowiednią długość telomerów. Wykazana długość telomeru nie musi wpływać na rozpoznanie i prognozowanie choroby, ale może być pomocna w zrozumieniu biologii komórki narażonej na stres środowiskowy oraz na bodziec genotoksyczny. Odpowiedź na zadane pytania wzbogaci wiedzę o biologii telomerów, nie tylko na poziomie komórkowym, ale może pomóc w podjęciu decyzji dotyczących zmian stylu życia danego organizmu. Współczesne doniesienia literaturowe wskazują na możliwości terapeutyczne uwzględniające składowe kompleksu telomerowego np. terapię z udziałem składowych telomerazy [93]. Stosowanie inhibitor telomerazy oparty na oligonukleotydowych sekwencjach GRN163L (Imetelstat) osiągnął już kolejną fazę kliniczną [23]. Immunoterapia z wykorzystaniem szczeni (GV10001 i GRNVAC1) jest obecnie w I/II fazie klinicznej w leczeniu raka płuca [22]. Prowadzi się również badania nad nowymi technologiami opartymi na antysensownych oligonukleotydach wiążących się specyficznym z matrycowym RNA telomerazy TERC, z matrycowym RNA dla *TERT* i/lub RNA dla białek kompleksu telomerazy, czyli technologie antysensowne oligonukleotydów, mogłyby być pomocne w zwalczaniu komórek nowotworowych pozostałych po zakończeniu konwencjonalnego leczenia.

## PODSUMOWANIE

Prowadzone badania naukowe pozwoliły wyjaśnić rolę telomerów w oparciu o ich biologię w wielu sytuacjach klinicznych człowieka. Wyniki tych prac odpowiedziały na wiele pytań związanych z mechanizmami utrzymywania długości telomerów na określonym poziomie [56]. Wiele zagadnień pozostaje nadal otwartymi: dlaczego mimo obecności białek ochronnych i telomerazy telomery ulegają sukcesywnemu skróceniu? Dlaczego dotąd nie udało się powstrzymać powstawania krytycznej długości telomerów? Czy w ogóle

istnieje taka możliwość? Odpowiedzi na te pytania są nieustannie uzupełniane o nowe elementy [91]. Dwa oblicza telomerów z jednej strony prowokują do procesu uspienia replikacji, starzenia komórkowego i apoptozy, aby chronić komórkę przed nowotworzeniem. Z drugiej zaś strony stale otwarta możliwość reaktywacji telomerazy w komórkach prawidłowych, która nie umożliwia im „wiecznej młodości”, ale przy braku supresji *via* geny *P53*, *RB* prowadzi do rozwoju procesu rozrostu nowotworowego.

Badania długości telomerów, aktywności telomerazy oraz kompleksu białek ochronnych są szeroko omawiane, dotyczą również badań nad zmienną długością telomerów. Pomiar aktywności telomerazy w kontekście zaobserwowanych mutacji, zmian polimorficznych i ich wpływu na rozwój chorób rozrostowych, w tym układu hematopoetycznego stwarza możliwości diagnostyczne i prognostyczne. Wiele doniesień dotyczy badań osób będących w podeszłym wieku, łącząc zaobserwowane zmiany długości telomerów ze znaczną podatnością na choroby np. neurodegeneracyjne. W badaniach na grupie pacjentów z depresją potwierdzone zostały wcześniejsze doniesienia dotyczące wpływu na długość telomerów przewlekłych procesów zapalnych, związanych ze stresem oksydacyjnym komórki [94].

Opisano wpływ skracania telomerów na powstawanie wielu chorób, w tym nowotworowych. Nagroda Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii przyznana w roku 2009, którą otrzymali: Elizabeth Blackburn, Carol Greider i Jack Szostak za opisanie telomerów u pierwotnika *Tetrahymena thermophila*, telomerazy oraz za wykazanie niestabilności liniowych cząsteczek DNA w komórkach pozbawionych telomerów stała się wyjątkowo mobilizującym tematem dla współczesnych badań naukowych, które są kontynuowane. Myślą przewodnią tych badań może być tytuł publikacji M. Einsteina „All’s well that ends well” [44].

## PIŚMIENICTWO

- [1] Alter B.P., Baerlocher G.M., Savage S.A., Chanock S.J., Weksler B.B., Willner J.P., Peters J.A., Giri N., Lansdorp P.M.: Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*, 2007; 110: 1439-1447
- [2] Alter B.P., Rosenberg P.S., Giri N., Baerlocher G.M., Lansdorp P.M., Savage S.A.: Telomere length is associated with disease severity and declines with age in dyskeratosis congenita. *Haematologica*, 2012; 97: 353-359
- [3] Armanios M.: Syndromes of telomere shortening. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2009; 10: 45-61
- [4] Armanios M., Blackburn E.H.: The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.*, 2012; 13: 693-704
- [5] Artandi S.E., DePinto R.A.: Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 2010; 31: 9-18
- [6] Aubert G., Baerlocher G.M., Vulto I., Poon S.S., Lansdorp P.M.: Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS Genet.*, 2012; 8: e1002696
- [7] Aubert G., Hills M., Lansdorp P.M.: Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat. Res.*, 2012; 730: 59-67
- [8] Aubert G., Lansdorp P.M.: Telomeres and aging. *Physiol. Rev.*, 2008; 88: 557-579
- [9] Baird D.M.: Mechanisms of telomeric instability. *Cytogenet. Genome Res.*, 2008; 122: 308-314
- [10] Baird D.M.: Variation at the TERT locus and predisposition for cancer. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2010; 12: e16
- [11] Baumann P., Cech T.R.: Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, 2001; 292: 1171-1175
- [12] Beliveau A., Bassett E., Lo A.T., Garbe J., Rubio M.A., Bissell M.J., Campisi J., Yaswen P.: p53-dependent integration of telomere and growth factor deprivation signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 4431-4436
- [13] Benetos A., Okuda K., Lajemi M., Kimura M., Thomas F., Skurnick J., Labat C., Bean K., Aviv A.: Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension*, 2001; 37: 381-385
- [14] Bianchi A., Shore D.: Telomeres: maintenance and replication. *Encyclopedia Biol. Chem.*, 2004; 4: 174-179

- [15] Bilstrand A.E., Cairney C.J., Keith W.N.: Targeting the telomere and shelterin complex for cancer therapy: current views and future perspectives. *J. Cell. Mol. Med.*, 2011; 15: 179-186
- [16] Blackburn E.H.: Walking the walk from genes through telomere maintenance to cancer risk. *Cancer Prev. Res.*, 2011; 4: 473-475
- [17] Borssén M., Cullman I., Norén-Nyström U., Sundström C., Porwit A., Forestier E., Roos G.: hTERT promoter methylation and telomere length in childhood acute lymphoblastic leukemia: associations with immunophenotype and cytogenetic subgroup. *Exp. Hematol.*, 2011; 39: 1144-1151
- [18] Boulwood J., Peniket A., Watkins F., Shepherd P., McGale P., Richards S., Fidler C., Littlewood T.J., Wainscoat J.S.: Telomere length shortening in chronic myelogenous leukemia is associated with reduced time to accelerated phase. *Blood*, 2000; 96: 358-361
- [19] Broccoli D., Young J.W., de Lange T.: Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 9082-9086
- [20] Brower V.: Telomerase-based therapies emerging slowly. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010; 102: 520-521
- [21] Brümmendorf T.H., Maciejewski J.P., Mak J., Young N.S., Lansdorp P.M.: Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood*, 2001; 97: 895-900
- [22] Brunsvig P.F., Aamdal S., Gjertsen M.K., Kvalheim G., Markowski-Grimsrud C.J., Sve I., Dyrhaug M., Trachsel S., Moller M., Eriksen J.A., Gaudernack G.: Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 1553-1564
- [23] Buseman C.M., Wright W.E., Shay J.W.: Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat. Res.*, 2012; 730: 90-97
- [24] Calado R.T.: Telomeres and marrow failure. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2009: 338-343
- [25] Calado R.T., Regal J.A., Hills M., Yewdell W.T., Dalmazzo L.F., Zago M.A., Lansdorp P.M., Hogge D., Chanock S.J., Estey E.H., Falcao R.P., Young N.S.: Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 1187-1192
- [26] Calado R.T., Yewdell W.T., Wilkerson K.L., Regal J.A., Kajigaya S., Stratakis C.A., Young N.S.: Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood*, 2009; 114: 2236-2243
- [27] Calado R.T., Young N.S.: Telomere diseases. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 361: 2353-2365
- [28] Campbell L.J., Fidler C., Eagleton H., Peniket A., Kusec R., Gal S., Littlewood T.J., Wainscoat J.S., Boulwood J.: hTERT, the catalytic component of telomerase, is downregulated in the haematopoietic stem cells of patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, 2006; 20: 671-679
- [29] Capper R., Britt-Compton B., Tankimanova M., Rowson J., Lettoso B., Man S., Haughton M., Baird D.M.: The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev.*, 2007; 21: 2495-2508
- [30] Capraro V., Zane L., Poncet D., Perol D., Galia P., Preudhomme C., Bonnefoy-Berard N., Gilson E., Thomas X., El-Hamri M., Chelghoun Y., Michallet M., Wattel E., Mortreux F., Sibon D.: Telomere deregulations possess cytogenetic, phenotype, and prognostic specificities in acute leukemias. *Exp. Hematol.*, 2011; 39: 195-202.e2
- [31] Chan S.S., Chang S.: Defending the end zone: studying the players involved in protecting chromosome ends. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 3773-3778
- [32] Cifuentes-Rojas C., Shippen D.E.: Telomerase regulation. *Mutat. Res.*, 2012; 730: 20-27
- [33] Cohen S.B., Graham M.E., Lovrecz G.O., Bache N., Robinson P.J., Reddel R.R.: Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*, 2007; 315: 1850-1853
- [34] De Boeck G., Forsyth R.G., Praet M., Hogendoorn P.C.: Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J. Pathol.*, 2009; 217: 327-344
- [35] de Lange T.: How telomeres solve the end-protection problem. *Science*, 2009; 326: 948-952
- [36] de Lange T.: Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.*, 2005; 19: 2100-2110
- [37] Denchi E.L.: Give me a break: how telomeres suppress the DNA damage response. *DNA Repair*, 2009; 8: 1118-1126
- [38] Denchi E.L., de Lange T.: Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, 2007; 448: 1068-1071
- [39] Deville L., Hillion J., Ségal-Bendirdjian E.: Telomerase regulation in hematological cancers: a matter of stemness? *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1792: 229-239
- [40] Ding Z., Wu C.J., Jaskelioff M., Ivanova E., Kost-Alimova M., Protopopov A., Chu G.C., Wang G., Lu X., Labrot E.S., Hu J., Wang W., Xiao Y., Zhang H., Zhang J. i wsp.: Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases. *Cell*, 2012; 148: 896-907
- [41] Diotti R., Loayza D.: Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*, 2011; 2: 119-135
- [42] Donehower L.A.: Does p53 affect organismal aging? *J. Cell. Physiol.*, 2002; 192: 23-33
- [43] Eisenberg D.T.: An evolutionary review of human telomere biology: the thrifty telomere hypothesis and notes on potential adaptive paternal effects. *Am. J. Hum. Biol.*, 2011; 23: 149-167
- [44] Eisenstein M.: Telomeres: all's well that ends well. *Nature*, 2011; 478: S13-S15
- [45] Fajkus J.: Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin. Chim. Acta*, 2006; 371: 25-31
- [46] Gomez D.E., Armando R.G., Farina H.G., Menna P.L., Cerrudo C.S., Ghiringhelli P.D., Alonso D.F.: Telomere structure and telomerase in health and disease. *Int. J. Oncol.*, 2012; 41: 1561-1569
- [47] González-Suárez E., Flores J.M., Blasco M.A.: Cooperation between p53 mutation and high telomerase transgenic expression in spontaneous cancer development. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 7291-7301
- [48] Gonzalo S., Jaco I., Fraga M.F., Chen T., Li E., Esteller M., Blasco M.A.: DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.*, 2006; 8: 416-424
- [49] Gross M., Mkrtychyan H., Glaser M., Fricke H.J., Höffken K., Heller A., Weise A., Liehr T.: Delineation of yet unknown cryptic subtelomere aberrations in 50% of acute myeloid leukemia with normal GTG-banding karyotype. *Int. J. Oncol.*, 2009; 34: 417-423
- [50] Gu J., Chen M., Shete S., Amos C.I., Kamat A., Ye Y., Lin J., Dinney C. P., Wu X.: A genome-wide association study identifies a locus on chromosome 14q21 as a predictor of leukocyte telomere length and as a marker of susceptibility for bladder cancer. *Cancer Prev. Res.*, 2011; 4: 514-521
- [51] Hartmann U., Brummendorf T.H., Balabanov S., Thiede C., Ilme T., Schaich M.: Telomere length and hTERT expression in patients with acute myeloid leukemia correlates with chromosomal abnormalities. *Haematologica*, 2005; 90: 307-316
- [52] Hayflick L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 1965; 37: 614-636

- [53] Heaphy C.M., Meeker A.K.: The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis. *J. Cell. Mol. Med.*, 2011; 15: 1227-1238
- [54] Hills M., Lansdorp P.M.: Short telomeres resulting from heritable mutations in the telomerase reverse transcriptase gene predispose for a variety of malignancies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009; 1176: 178-190
- [55] Hirai Y., Masutomi K., Ishikawa F.: Kinetics of DNA replication and telomerase reaction at a single-seeded telomere in human cells. *Genes Cells*, 2012; 17: 186-204
- [56] Hug N., Lingner J.: Telomere length homeostasis. *Chromosome*, 2006; 115: 413-425
- [57] Jones C.H., Pepper C., Baird D.M.: Telomere dysfunction and its role in haematological cancer. *Br. J. Haematol.*, 2012; 156: 573-587
- [58] Joseph I., Tressler R., Bassett E., Harley C., Buseman C.M., Patamatta P., Wright W.E., Shay J.W., Go N.F.: The telomerase inhibitor imetelstat depletes cancer stem cells in breast and pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res.*, 2010; 70: 9494-9504
- [59] Kim S., Parks C.G., Xu Z., Carswell G., DeRoo L.A., Sandler D.P., Taylor J.A.: Association between genetic variants in DNA and histone methylation and telomere length. *PLoS One*, 2012; 7: e40504
- [60] Kirwan M., Vulliamy T., Marrone A., Walne A.J., Beswick R., Hillmen P., Kelly R., Stewart A., Bowen D., Schonland S.O., Whittle A.M., McVerry A., Gillece M., Dokal I.: Defining the pathogenic role of telomerase mutations in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Hum. Mutat.*, 2009; 30: 1567-1573
- [61] Lau L.M., Dagg R.A., Henson J.D., Au A.Y., Royds J.A., Reddel R.R.: Detection of alternative lengthening of telomeres by telomere quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: e34
- [62] Letsolo B.T., Rowson J., Baird D.M.: Fusion of short telomeres in human cells is characterized by extensive deletion and microhomology, and can result in complex rearrangements. *Nucleic Acids Res.*, 2010; 38: 1841-1852
- [63] Lin J., Epel E., Blackburn E.: Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging. *Mutat. Res.*, 2012; 730: 85-89
- [64] Lundblad V.: Telomere end processing: unexpected complexity at the end game. *Genes Dev.*, 2012; 26: 1123-1127
- [65] Maritz M.F., Napier C.E., Wen V.W., MacKenzie K.L.: Targeting telomerase in hematologic malignancy. *Future Oncol.*, 2010; 6: 769-789
- [66] Martens U.M., Brass V., Sedlacek L., Pantic M., Exner C., Guo Y., Engelhardt M., Lansdorp P.M., Waller C.F., Lange W.: Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br. J. Haematol.*, 2002; 119: 810-818
- [67] Melin B.S., Nordfjäll K., Andersson U., Roos G.: hTERT cancer risk genotypes are associated with telomere length. *Genet. Epidemiol.*, 2012; 36: 368-372
- [68] Miller D., Reynolds G.E., Mejia R., Stark J.M., Murnane J.P.: Subtelomeric regions in mammalian cells are deficient in DNA double strand break repair. *DNA Repair*, 2011; 10: 536-544
- [69] 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.: A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 6622-6626
- [70] Mrózek K., Heerema N.A., Bloomfield C.D.: Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.*, 2004; 18: 115-136
- [71] Muraki K., Nyhan K., Han L., Murnane J.P.: Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front. Oncol.*, 2012; 2: 135
- [72] Murnane J.P.: Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat. Res.*, 2012; 730: 28-36
- [73] Neidle S., Parkinson G.N.: The structure of telomeric DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003; 13: 275-283
- [74] Nikitina T., Woodcock C.L.: Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. *J. Cell Biol.*, 2004; 166: 161-165
- [75] Palm W., de Lange T.: How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.*, 2008; 42: 301-334
- [76] Paul L.: Diet, nutrition and telomere length. *J. Nutr. Biochem.*, 2011; 22: 895-901
- [77] Pfeiffer V., Lingner J.: TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. *PLoS Genet.*, 2012; 8: e1002747
- [78] Podlevsky J.D., Chen J.J.: It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutat. Res.*, 2012; 730: 3-11
- [79] Prescott J., Wentzensen I.M., Savage S.A., De Vivo I.: Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutat. Res.*, 2012; 730: 75-84
- [80] Rudolph K.L., Millard M., Bosenberg M.W., DePinto R.A.: Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat. Genet.*, 2001; 28: 155-159
- [81] Rufer N., Brümmendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M.: Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 157-167
- [82] Sampathi S., Chai W.: Telomere replication: poised but puzzling. *J. Cell. Mol. Med.*, 2011; 15: 3-13
- [83] Savage S.A., Bertuch A.A.: The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet. Med.*, 2010; 12: 753-764
- [84] Shalev I.: Early life stress and telomere length: investigating the connection and possible mechanisms: a critical survey of the evidence base, research methodology and basic biology. *Bioessays*, 2012; 34: 943-952
- [85] Shammass M.A.: Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2011; 14: 28-34
- [86] Stewart J.A., Chaiken M.F., Wang F., Price C.M.: Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat. Res.*, 2012; 730: 12-19
- [87] Verstovsek S., Giles F.J., O'Brien S., Faderl S., Kantarjian H.M., Keating M.J., Albitar M.: Telomerase activity is not a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.*, 2004; 28: 707-711
- [88] Vousden K.H., Lane D.P.: p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 275-283
- [89] Vulliamy T., Beswick R., Kirwan M., Marrone A., Digweed M., Walne A., Dokal I.: Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 8073-8078
- [90] Walker J.R., Zhu X.D.: Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance. *Mech. Ageing Dev.*, 2012; 133: 421-434
- [91] Wang Y., Broderick P., Webb E., Wu X., Vijaykrishnan J., Matakidou A., Qureshi M., Dong Q., Gu X., Chen W.V., Spitz M.R., Eisen T., Amos C.I., Houlston R.S.: Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat. Genet.*, 2008; 40: 1407-1409
- [92] Wang Y., Fang M., Sun X., Sun J.: Telomerase activity and telomere length in acute leukemia: correlations with disease progression, subtypes and overall survival. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2010; 32: 230-238
- [93] White L.K., Wright W.E., Shay J.W.: Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol.*, 2001; 19: 114-120

- [94] Wolkowitz O.M., Mellon S.H., Epel E.S., Lin J., Dhabhar F.S., Su Y., Reus V.I., Rosser R., Burke H.M., Kupferman E., Compagnone M., Nelson J.C., Blackburn E.H.: Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress - preliminary findings. *PLoS One*, 2011; 6: e17837
- [95] Wysoczańska B.: Współczesne technologie identyfikacji długości telomerów. W: *Badania immunogenetyczne w transplantologii i diagnostyce*, red. K. Bogunia-Kubik, I-BIS, Wrocław 2012; 160-169
- [96] Xu L., Li S., Stohr B.A.: The role of telomere biology in cancer. *Annu. Rev. Pathol.*, 2013; 8: 49-78
- [97] Xu Y., He K., Goldkorn A.: Telomerase targeted therapy in cancer and cancer stem cells. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 2011; 9: 442-455
- [98] Young N.S.: Bone marrow failure and the new telomere diseases: practice and research. *Hematology*, 2012; 17 (Suppl. 1): S18-S21
- [99] Zhou X., Xing D.: Assays for human telomerase activity: progress and prospects. *Chem. Soc. Rev.*, 2012; 41: 4643-4656

---

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.