

Boštjan Luzar<sup>1</sup>, Nina Gale<sup>2</sup>, Mario Poljak<sup>3</sup>, Andrej Cör<sup>4</sup>

# Telomere in telomeraza pri človeku – zgradba, funkcija in vloga v procesu kancerogeneze

*Human Telomere and Telomerase: Structure, Function and Role in Cancerogenesis*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** telomere, telomeraza, kancerogeneza.

Z vsako celično delitvijo se telomere človeških somatskih celic skrajšajo. Kritično kratke telomere celični popravljalni mehanizmi spoznajo kot okvarjeno DNA in zaustavijo celično delitev. Celice vstopijo v obdobje staranja in odmrejo. Mutacije v genih, ki uravnavajo celično delitev, oziroma motnje v delovanju njihovih beljakovinskih pridelkov, omogočijo tako spremenjenim celicam nadaljevanje delitev. V obdobju podaljšane življenjske dobe celice lahko pridobijo dodatne genetske napake, telomere se še naprej krajšajo in genomska nestabilnost se povečuje. Zaradi izrazitega skrajšanja telomer, kopičenja genetskih napak in povečevanja genomske nestabilnosti večina celic vstopi v fazo krize in odmre. Celice, ki krajšanje telomer preprečijo, obdobje krize preživijo. Take celice so nesmrtnne, saj imajo zaradi uravnane dolžine telomer neomejeno možnost proliferacije. Encim telomeraza nadomesti izgubo telomer z njihovo ponovno sintezo in je do sedaj edini znani mehanizem uravnavanja dolžine telomer pri človeku. Večina normalnih somatskih celic nima dokazljive telomerni aktivnosti, njena ponovna aktivacija pa je dokazljiva v več kot 85 % malignih tumorjev. Razliko v telomerni aktivnosti med tumorskim tkivom in normalnimi tkivi bi zato lahko uporabili v diagnostiki malignih obolenj in pri načrtovanju novih načinov zdravljenja malignih tumorjev. V prispevku so opisana najnovejša spoznanja o telomernem kompleksu, njegovi zgradbi in delovanju pri človeku. Prikazana je zgradba, vloga in mehanizem delovanja telomeraze ter njen pomen v procesu kancerogeneze pri človeku.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** telomere, telomerase, cancerogenesis.

With each somatic cell division, the chromosomal ends, or telomeres, progressively shorten. Critically shortened telomeres are recognised by DNA repair systems as DNA damage, the cells are withdrawn from the cell cycle, senesce and eventually die. Mutations in the genes responsible for cell division cycle control, or repression of their protein products, enable cells to continue their proliferation. In the period of the so-called extended life span the cells acquire

---

<sup>1</sup> Asist. Boštjan Luzar, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

<sup>2</sup> Prof. dr. Nina Gale, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

<sup>3</sup> Doc. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

<sup>4</sup> Doc. dr. Andrej Cör, dr. med., Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

additional genetic mutations, telomeres progressively shorten, and genomic instability increases. Due to the extremely shortened telomeres accompanied by accumulation of genetic abnormalities and increased genomic instability, most cells enter the period of crisis and die. Those cells that can prevent telomere shortening escape crisis and continue to proliferate. Due to the stabilised telomeres they have the ability to proliferate indefinitely. The only known mechanism so far by which human cells can regulate the length of telomeres is by the action of the enzyme telomerase. Detection of telomerase activity in the overwhelming majority of advanced and metastatic human cancer but not in most somatic cells implies that telomerase dependent immortalization could contribute to the development of malignancy. Thus, repression of telomerase activity may be a novel adjuvant therapy for the treatment of human cancer and detection of telomerase activity may be important for cancer diagnostics. In the present review we have described the most recent advances in the field of telomeres and telomere related proteins, the so-called telomeric complex, its structure and function. Furthermore, we have also outlined the structure, function and mechanisms, by which telomerase regulates the length of human telomeres. Finally, the current views on the role of telomerase in human cancerogenesis are presented.

## UVOD

Telomere so specifična ponavljajoča se zaporedja nukleotidov na koncih linearnih kromosomov. Pri človeku je zaporedje zgrajeno iz šestih nukleotidov, (TTAGGG)<sub>n</sub>, ki se ponavljajo na 3'-koncu molekule DNA v dolžini od 8–15 kilobaznih parov (1). Na dvojnovijač na telomerna zaporedja se vežejo različne regulatorne beljakovine, ki skupaj s telomernimi zaporedji tvorijo telomerni kompleks. Zaradi svoje značilne zgradbe in prostorske ureditve telomerni kompleks omogoča, da celični popravljalni mehanizmi normalne konce linearnih kromosomov ločijo od naključnih prelomov DNA (2). Ti povzročijo aktivacijo celičnih popravljalnih mehanizmov, ki odstranijo nastale napake. Telomerni kompleks zagotavlja stabilnost kromosomov, preprečuje njihovo razgradnjo, medsebojno zlepljanje koncev linearnih kromosomov ter omogoči normalno ločevanje kromosomov med procesom celične delitve (3). Telomerna zaporedja tvorijo tudi čvrste povezave z jedrnim matriksom, zato imajo verjetno pomembno vlogo v vzdrževanju ustrezne strukture jedra (4).

Telomere somatskih celic se z vsako celično delitvijo skrajšajo za 50–200 baznih parov (5). Vzrok za ta pojav je problem podvajanja koncev linearnih kromosomov, ki ga je Olovnikov opisal že leta 1973 (6) (slika 1).

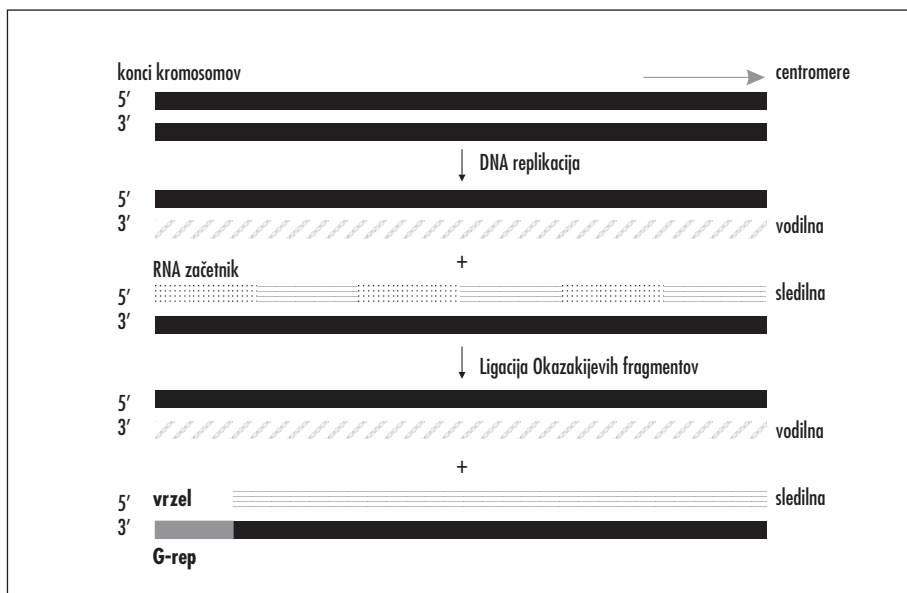
Izguba telomernih zaporedij na 5'-koncu sledilne verige je večja, kot bi pričakovali, če bi prišlo do izgube TTAGGG-zaporedij le zaradi

problema podvajanja koncev linearnih kromosomov. Pri krajšanju telomer sodeluje tudi eksonukleaza 5'–3', ki deluje sama ali pa kot sestavni del DNA-polimeraze (7) in ima verjetno pomembno vlogo v razgradnji RNA-začetnikov na sledilni verigi (8). Dolžina 3'-previsa ni enaka v vseh celicah in je sorazmerna s stopnjo krajšanja telomer (9). 3'-previs je dolg približno 300 nukleotidov v celicah, ki pri celični delitvi izgubijo okrog 100 baznih parov telomernih zaporedij, in le 150 nukleotidov v celicah, ki izgubijo 50 baznih parov telomernih zaporedij na celično delitev. Ko se telomere skrajšajo na kritično dolžino, pride do aktivacije popravljalnih procesov na DNA, ki ustavijo celični cikel in sprožijo staranje celice (10) ali pa progamirano celično smrt, apoptozo (11). Vse več je dokazov, da prav dolžina telomer določa proliferacijsko aktivnost celice (12), zato telomere imenujemo tudi mitotično uro.

Dolžina telomernih zaporedij je odvisna od vrste tkiva (13). Zarodne celice (klične celice) (14), kot tudi nesmrtno celične vrste v kulturi, vzdržujejo nespremenjeno dolžino telomer. Ugotovili so, da je v njih prisoten encim telomeraza, ki nadomesti izgubo koncev kromosomov med vsako celično delitvijo z njihovo ponovno sintezo.

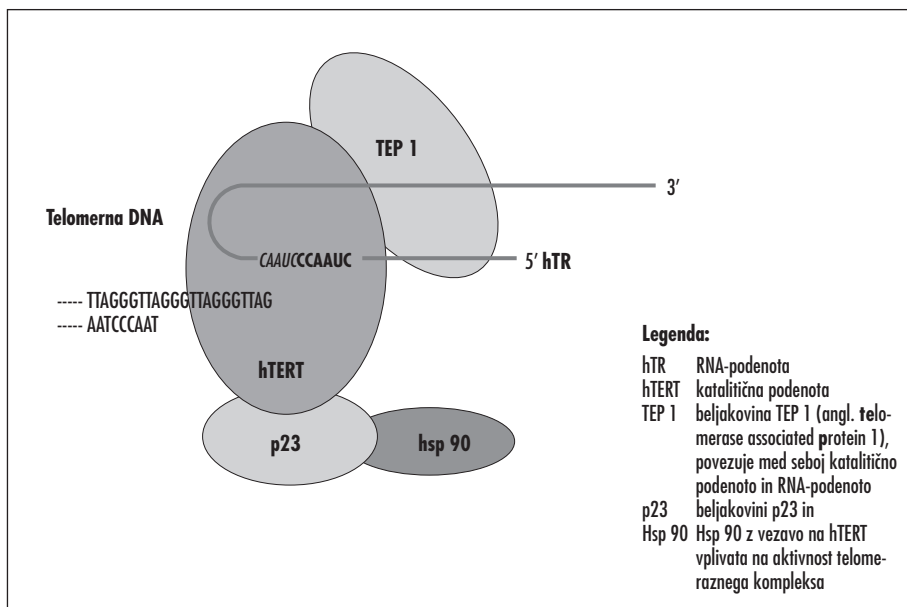
## ENCIM TELOMERAZA – ZGRADBA IN FUNKCIJA

Telomeraza je encimski kompleks, zgrajen iz več podenot (slika 2). Njena zgradba še ni



Slika 1. Problem podvajanja koncev linearnih kromosomov. DNA-polimeraza lahko tvori novo verigo le v smeri 5'–3' in potrebuje začetno zaporedje (angl. primer), ki ga nato podaljšuje. Sinteza vodilne verige poteka v smeri 5'–3' neprekinjeno. Sinteza verige, ki sledi (angl. lagging strand), poteka prav tako v smeri 5'–3', vendar prekinjeno, v obliki kratkih 100–200 nukleotidov dolgih odsekov – Okazakijevih fragmentov. Vsak tak odsek se začne s kratkim RNA začetnikom dolžine 8–12 baznih parov, ki ga sintetizira RNA-primaza in nato podaljša DNA-polimeraza. RNA-začetniki se iz sledilne verige hitro odstranijo, vrzel pa zapolni DNA-polimeraza. Odstranitev RNA-začetnika na skrajnem 5'-koncu sledilne verige ima za posledico vrzel, ki ostane nezapolnjena, ker DNA-polimeraza nima začetnika, ki bi omogočil njeno normalno delovanje. Zaradi problema podvajanja koncev linearnih kromosomov ostane na 3'-koncu molekule DNA linearna enovijačna DNA, bogata z gvaninskimi nukleotidi – 3'-previs oz. 3' G-rep.

273



Slika 2. Hipotetični prikaz zgradbe aktivnega telomeraznega kompleksa.

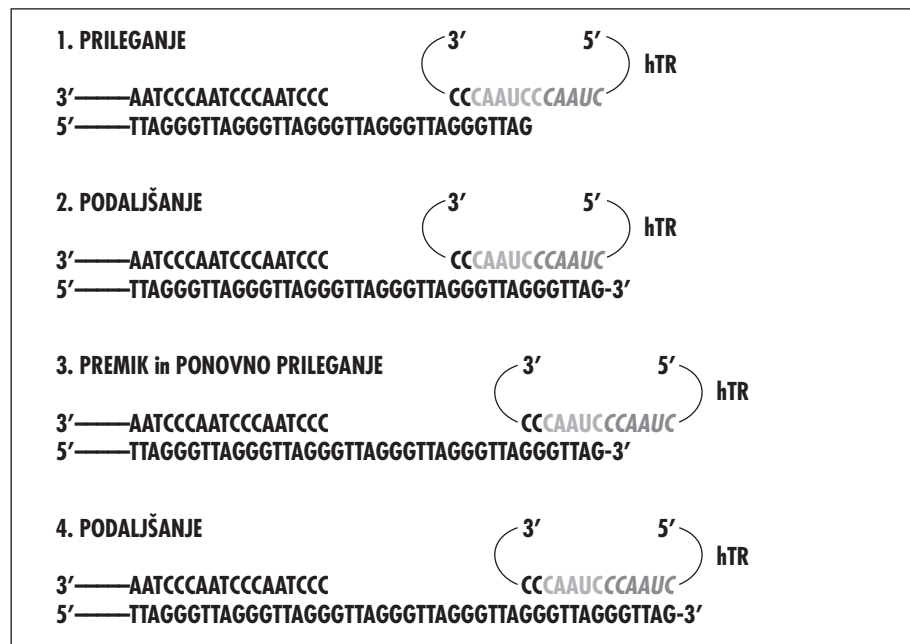
v celoti poznana. Glavni podenoti telomera-ze sta RNA in katalitična podenota (15, 16), ki sta med seboj povezani z beljakovino TEP 1 (angl. *telomerase associated protein 1*) (17, 18). Za normalno delovanje telomeraze sta ključni obe podenoti. Od stopnje aktivnosti telomeraze je odvisno, ali bodo telomere po delitvi celic krajše, enako dolge ali daljše.

**RNA-podenota (hTR).** Imenujemo jo tudi funkcionalna oz. matrična (angl. *template*) RNA (Shay JW, osebna komunikacija) in je posebna oblika mRNA (informacijska RNA, angl. *messenger RNA*), saj jo najverjetneje sintetizira RNA-polimeraza II (19). RNA-polimeraza II prepisuje gene, katerih mRNA je namenjena sintezi beljakovin v citoplazmi (20). Preden iz primarnega prepisa RNA-polimeraze II nastane mRNA, pride do kovalentne modifikacije na koncu 5' in 3' primarnega prepisa. Poliadenilacija 3'-konca ima ključno vlogo pri prenosu mRNA v citoplazmo, metilacija G-nukleotida na 5'-koncu pa je pomembna za začetek sinteze beljakovin v citoplazmi (20). hTR nima 3'-poliadenilira-

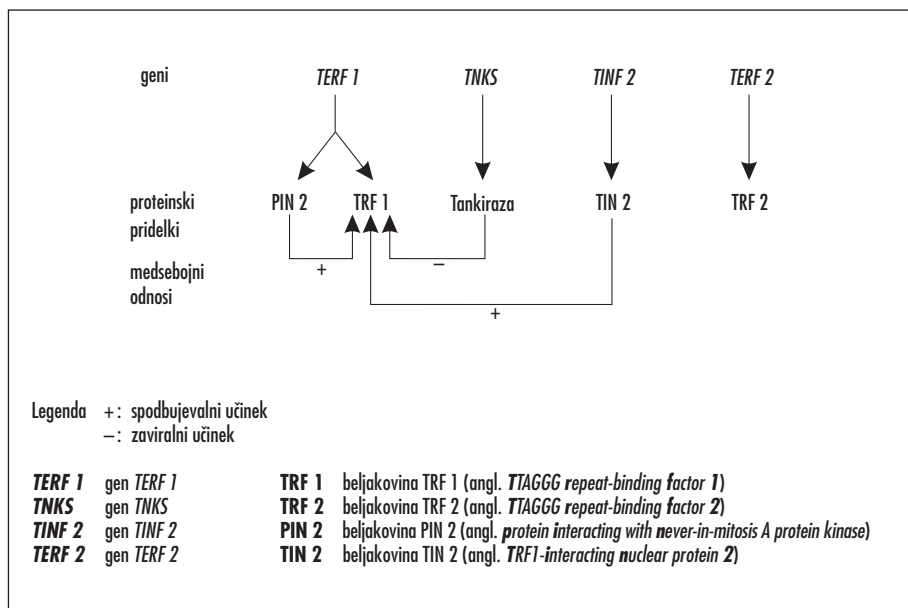
nega konca, zato nikoli ne zapusti jedra (19) (Shay JW, osebna komunikacija).

Aktivno mesto v hTR je funkcijsko razdeljeno na dva dela. Zaporedje, ki je bližje 3'-koncu hTR, prepoznavna komplementarna telomerna zaporedja na 3'-previsu, z njimi tvori bazne pare ter tako omogoči prileganje telomeraznega kompleksa. Zaporedje, ki je bližje 5'-koncu hTR je matrica katalitični podenoti pri sintezi komplementarnega zaporedja na 3'-previsu. (15) (slika 3). Celoten encimski kompleks se nato premakne v 3'-smeri previsa in postopek se ponovi. Sinteza komplementarne verige na 5'-koncu DNA pa poteka po klasični poti z DNA polimerazo.

**Katalitična podenota (beljakovina hTERT).** Deluje kot reverzna transkriptaza (21). Gen *hTERT*, ki vsebuje zapis za katalitično podenoto, je v genomu le v eni kopiji (22). Prisotni pa so številni različni mRNA-prepisi tega gena, ki verjetno nastanejo z mehanizmom alternativnega izrezovanja intronov v primarnem DNA-prepisu (angl. *alternative*



Slika 3. Model delovanja RNA-podenote telomeraznega kompleksa. Aktivno mesto v hTR (tj. RNA-podenota telomeraznega kompleksa) je funkcijsko razdeljeno na dva dela: zaporedje bližje 3' hTR (označeno ■), omogoča prileganje hTR na enovijaini 3' DNA-previs (prileganje). Zaporedje bližje 5' hTR (označeno ■), deluje kot matrica katalitični podenoti za sintezo komplementarnega zaporedja na koncu 3'-previsa (podaljšanje). hTR se nato premakne v 3'-smeri G-repa (premik). Celoten postopek se nato ponovi.



Slika 4. Geni, ki so udeleženi pri uravnavanju dolžine telomer, njihovi beljakovinski pridelki in do sedaj poznani medsebojni odnosi.

*mRNA splicing*) (23). To je pogost način uravnavanja izraženosti genov pri višjih evkariotih (24). Biološki pomen različic hTERT-beljakovin, ki jih lahko dokažemo med embriogenezo v celicah različnih tkiv in imajo najverjetneje tudi drugačne biokemične lastnosti, do sedaj ni poznan (25).

V celicah, ki nimajo dokazljive telomerazne aktivnosti, se lahko z aktivacijo *hTERT*-gena njena aktivnost ponovno vzpostavi. Zato sklepamo, da je hTERT-beljakovina ključni regulator telomerazne encimske aktivnosti.

Poznamo dve beljakovini, ki se vežeta na katalitično podenoto in vplivata na telomerazno aktivnost: p23 in Hsp90 (26). Če preprečimo vezavo p23 ali pa Hsp90 na hTERT, onemogočimo nastanek aktivnega telomeraznega kompleksa.

**Beljakovina TEP 1 (TP1).** Ima vezavna mesta za hTERT in hTR. Domnevajo, da je pomembna za vzdrževanje ustrezne strukture oz. za združevanje posameznih enot telomeraznega ribonukleobeljakovinskega kompleksa in s tem posredno vpliva na funkcijo telomeraze (17).

**Uravnavanje dolžine telomer.** Na dvojnovijska telomerna zaporedja se vežejo različne regulatorne beljakovine, ki uravnavajo dolžino telomer. Do sedaj so odkrili štiri

gene, ki vsebujejo zapise za telomerne regulatorne beljakovine (slika 4). *TERF1* določa beljakovini TRF 1 (**TTAGGG Repeat-binding Factor**) in PIN 2 (27, 28). Različna pridelka istega gena nastaneta zaradi mehanizma alternativnega izrezovanja intronov v primarnem DNA-prepisu (27). TRF 1 in PIN 2 nadzorujeta dolžino telomer (27, 28). Gen *TERF2* določa beljakovino TRF 2, ki vzdržuje stabilnost kromosomov z zagotavljanjem ustrezne strukture na koncih telomer (28–30). Gen *TNKS* določa beljakovino tankirazo, ki je negativni regulator TRF 1 (31). Gen *TINF2* (*TIN2*) kodira beljakovino TIN 2, ki je nujno potrebna za normalno delovanje TRF 1 (32).

Beljakovini TRF 1 in TRF 2 se kot homodimera specifično vežeta na dvojnovijska telomerna DNA-zaporedja, tankiraza, TIN 2 in PIN 2 pa z vezavo na TRF 1 vplivajo na njeno funkcijo.

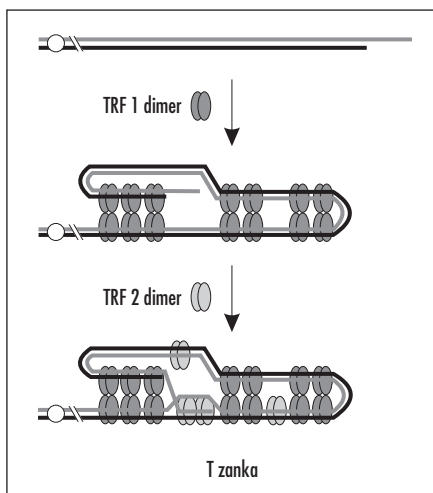
**Beljakovina TRF 1** je negativni regulator dolžine telomer. Vezava zadostne količine beljakovine TRF 1 vzdolž dvojnovijskih telomernih zaporedij zavre telomerazo. Daljše telomere vežejo več telomeraznega zaviralca TRF 1 kot krajše, zato je tudi skupni zaviralni učinek večji (28, 33). Beljakovina TRF 1 lahko učinkovito vpliva na dolžino telomere

le, če je nanj vezana beljakovina TIN 2. TRF 1 in TIN 2 s tvorbo različnih intratelomernih povezav omogočita ustrezno konformacijo telomer (2), ki telomerazi prepreči dostop na 3'-previs (32). Na TRF 1 se lahko veže tudi tankiraza, ki je strukturno podobna ankirinom in katalitični podenoti poli (adenozin-difosfat-riboza) polimeraze (PARP). Ankirini so udeleženi v medsebojnih interakcijah med različnimi beljakovinami, PARP pa je sestavni del popravljalnih mehanizmov okvarjene DNA. PARP katalizira ADP-ribozilacijo beljakovin in uporablja kot substrat nikotin-amid-dinukleotid (NAD<sup>+</sup>). ADP-ribozilacija večinoma inaktivira beljakovine (31). Med podvajanjem DNA oziroma po njem tankiraza, ki ima lastno PARP-aktivnost, inaktivira tako TRF 1 kot tudi sebe. Neaktivna beljakovina TRF 1 se odcepi iz molekule DNA in omogoči dostop telomeraze na konce kromosomov (31, 33) in s tem njeno delovanje.

**Beljakovina TRF 2** je strukturno podobna TRF 1 in ima ključno vlogo pri vzdrževanju enovijačnega z gvaninom bogatega 3'-DNA previsa. Zavrtju beljakovine TRF 2 sledi izguba 3'-previsa, dvojnovijačni konci linearnih kromosomov se zaradi nemotenega delovanje ligaz oz. drugih popravljalnih mehanizmov na DNA kovalentno povežejo med seboj (28). Na mestu združitve koncev najdemo dvojnovijačno telomerna zaporedja. Očitno je, da je 3'-previs pomemben za zaščito dvojnovijačnih telomernih zaporedij. Mehanizem, s katerim 3'-previs zagotavlja stabilnost telomer in preprečuje njihovo medsebojno spajanje, še ni v celoti poznan. Griffith in sodelavci menijo, da sta TRF 1 in TRF 2 odgovorna za nastanek ključnih konformacijskih sprememb telomerne DNA, ki omogočijo tvorbo tako imenovanih zank T in D (2).

## TELOMERE TVORIJO ZANKE T IN D

T-zanka je nazaj zavihana dvojnovijačna telomerna DNA (2). TRF 1 in nanj vezan TIN 2 povzročita zavihanje dvojnovijačne telomerne DNA okoli TRF 1 – TIN 2 beljakovinskega kompleksa, ki tako enovijačni 3'-previs približa dvojnovijačni telomerni DNA (slika 5) (2, 28, 33). TRF 2, ki je najver-



Slika 5. Telomerni kompleks s svojo značilno zgradbo in prostorsko ureditvijo omogoča ločevanje med normalimi konci linearnih kromosomov in naključnimi prelomi DNA molekule. Za podrobnosti glej besedilo v članku. (Modificirana slika iz članka Griffith J, et al. *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell 1999; 97: 503–14, z dovoljenjem avtorja in založnika).

jetneje vezan na dvojnovijačno telomerno DNA na mestu stika med nastalo T-zanko in enovijačnim 3'-previsom, povzroči delno odvitje dvojnovijačne telomerne DNA in omogoči bazno parjenje med 3'-previsom in telomerno DNA. Nastane D-zanka (angl. *displacement loop*) (2, 34). TRF 2 verjetno zagotovi tudi stabilnost novonastale povezave. Natančno mesto, na katerem se 3'-previs pogrezne v dvojnovijačno telomerno DNA, ni poznano. Daljše telomere tvorijo daljše T-zanke, ne morejo pa jih tvoriti kritično kratke telomere (34). Te ne zaščitijo več učinkovito kromosomskih koncev in zvečujejo genomsko nestabilnost (2, 34).

## NADZOR PROLIFERACIJSKE AKTIVNOSTI – TELOMERE SO CELIČNA MITOTIČNA URA

Normalne človeške diploidne celice v kulturi imajo brez telomerazne aktivnosti omejeno proliferacijsko zmogljivost. Po določenem končnem številu delitev preidejo v obdobje staranja (ang. *senescence*), ki ga označuje pre-

nehanje celičnih delitev. To stopnjo celičnega ciklusa imenujemo tudi Hayflickova meja oz. mortalitetni stadij 1 (M1) (35). Vzrok za aktivacijo antiproliferacijskega kontrolnega mortalitetnega stadija M1 je kritično skrajšanje telomer, ki spremeni tudi izraženost sicer normalno neaktivnih subtelomernih regulatornih genov. Celični DNA popravljalni mehanizmi prepoznajo kritično skrajšanje telomer kot okvaro DNA in zato zaustavijo celično delitev (35). Za zaustavitev v stadiju M1 je torej ključna normalna funkcija p53 in Rb tumorje zavirajočih genov oz. njunih beljakovinskih pridelkov; p53 in pRb (36, 37). Dodatne mutacije v genih za nadzor celičnega ciklusa oz. zavrtje delovanja njihovih produktov z virusnimi onkoproteini omogočijo nadaljevanje celičnega ciklusa oz. delitev celice in s tem klonalno razširitev tako okvarjenih celic (38). Celice vstopijo v fazo podaljšane življenjske dobe (angl. *extended life span*) in nadaljujejo s celičnimi delitvami (35). V tem obdobju pridobijo še dodatne genetske napake, telomere se še naprej krajšajo in genomska nestabilnost se povečuje. Celice se lahko delijo toliko časa, dokler ne nastopi drugi antiproliferacijski kontrolni stadij, to je faza krize oz. mortalitetni stadij 2 (M2) (3). Vstop v M2 je posledica ekstremnega skrajšanja telomernih zaporedij. Nezaščiteni konci linearnih kromosomov se zlepljajo med seboj, kar skupaj z nakopičenimi dodatnimi genetskimi napakami povzroči, da večina celic v fazi krize odmre. S stabilizacijo dolžine telomer lahko celica kljub prekomernim mutacijam prepreči zastoj celičnega ciklusa v M2 (39). Celice, ki preživijo M2, so nesmrtnne, saj imajo neomejeno proliferacijsko sposobnost, ki omogoči njihovo klonalno razširitev (39). V večini primerov postane celica nesmrtna z reaktivacijo telomeraze (40). Reaktivacija telomeraze je posledica izgube specifičnega(-ih) represivnega(-ih) gena(-ov), ki običajno zavira(jo) ekspresijo telomeraze (38). Osnovni pomen telomeraze v procesu kancerogeneze je stabilizacija telomer in s tem preprečevanje izgube kromosomskih koncev, kar celicam omogoči neomejeno delitev – celično nesmrtnost, njihovo klonalno razširitev in kopičenje dodatnih mutacij.

## TELOMERAZNA AKTIVNOST V RAZLIČNIH VRSTAH CELIC

Telomerazne aktivnosti v normalnih somatskih celicah večinoma ni, saj se med embriogenezo zavre njena aktivnost v večini celic. Zavrtje je lahko posledica popolne oz. delne zavore prepisovanja genov, odgovornih za nastanek telomeraznega kompleksa in njegovo delovanje. Nizka telomerazna aktivnost pa ostaja v proliferacijskih celicah regenerativnih tkiv, npr. aktiviranih limfocitih B in T, nezrelih predstopnjah hematopoetskih celic, bazalnih celicah kože, premenopavzalnem proliferacijskem endometriju, kriptnem epitelu črevesa in matičnih celicah (angl. *stem cells*) različnih tkiv (41). Nizka telomerazna aktivnost v teh celicah sicer upočasni izgubo telomernih zaporedij, je pa ne more v celoti preprečiti (35). Stopnja telomerazne aktivnosti je odvisna tudi od starosti človeka in se z leti zmanjšuje.

## VLOGA TELOMERAZE V KANCEROGENEZI PRI ČLOVEKU

V zadnjem času pripisujejo encimu telomerazi in njeni reaktivaciji ključno vlogo v procesu kancerogeneze. Ponovna aktivacija encima telomeraze je prisotna v 85–95 % primarnih malignih tumorjev pri človeku, kot npr. v tumorjih glave in vratu, spolovil, želodca, debelega črevesa, jeter, pljuč, centralnega živčnega sistema in drugih (37). Z določanjem telomerazne aktivnosti v 895 vzorcih malignih tumorjev in 646 vzorcih nemalignih tkiv (70 vzorcih normalnih somatskih tkiv, 310 vzorcih tkiva ob tumorju ter 266 vzorcih benignih in premalignih tkiv) so ugotovili, da je njena specifičnost 91 %, občutljivost 85 %, pozitivna napovedna vrednost 93 % in negativna napovedna vrednost 81 % (42). Telomerazne aktivnosti v večini normalnih somatskih celic ni, zato bi lahko bilo določanje njene aktivnosti ključni molekularno-biološki označevalec neoplastičnega procesa. Reaktivacija telomerazne aktivnosti nastopi že zgodaj v procesu kancerogeneze tumorjev dojke, glave in vratu, soncu izpostavljene kože ter jetrnega karcinoma in pozno v kan-

cerogenezi tumorjev trebušne slinavke, debelega črevesa in ščitnice (43).

Določanje stopnje telomerazne aktivnosti ima tudi napovedni pomen. Visoka telomerazna aktivnost v nevroblastomih, pri akutni mieloični levkemiji, karcinomih prebavnega trakta in dojke je povezana s slabo napovedjo (43). Z določanjem telomerazne aktivnosti pri bolnikih z nevroblastomom so ugotovili, da pri podtipu tega tumorja z napredovalo boleznijo in oddaljenimi zasevki (stadij IV-S) po operaciji primarnega tumorja lahko pride do spontane regresije preostalega tumorskega tkiva (44). V veliki večini teh primerov v nevroblastomu niso mogli dokazati telomerazne aktivnosti.

Zaviranje telomeraze je obetajoča metoda zdravljenja malignih tumorjev. Metoda temelji na predpostavki, da je encim reaktiviran pri večini malignih tumorjev. Z zavrtjem delovanja telomeraze v tumorskih celicah bi povzročili kritično skrajšanje telomer, kromosomsko nestabilnost in celično smrt (42). V poskusih na nesmrtnih celičnih kulturah so namreč ugotovili, da lahko z uporabo prepisov (angl. *transcripts*), ki so bili komplementarni hTR, povzročimo krajšanje telomer, vstop celic v faze krize in njihovo odmiranje (19, 45). Ker telomerazne aktivnosti v večini normalnih somatskih

celic ni, predvidevamo, da bi bili stranski učinki zdravljenja z zaviralci telomeraze manjši kot pri klasičnem citostatskem zdravljenju.

## ZAKLJUČEK

Vznik raka pri človeku je povezan s kopičenjem številnih genetskih sprememb v celici. Te vodijo v spremenjeno izraženost protoonkogenov, tumorje zavirajočih genov in genov, ki sodelujejo pri popravljanju napak v molekuli DNA (angl. *DNA mismatch repair genes*). Spremembe v njihovem delovanju povečujejo genomsko nestabilnost. Reaktivacijo encima telomeraze najdemo v večini malignih tumorjev pri človeku. Omogoči stabilizacijo koncev kromosomov, genomsko stabilnost in razvoj celične nesmrtnosti. Neomejena sposobnost proliferacije omogoči klonalno razširitev celic ter dodatno kopičenje genetskih napak. Telomerazne aktivnosti v večini normalnih somatskih celic ne zasledimo, zato bi telomerazno aktivnost lahko uporabili kot ključni molekularno-biološki označevalec neoplastičnega procesa. Nenazadnje, zdravljenje malignih tumorjev z zaviralci telomerazne aktivnosti je obetajoča metoda zdravljenja malignih tumorjev tudi zaradi pričakovanih manjših stranskih učinkov kakor pri sedanjem klasičnem citostatskem zdravljenju.

## LITERATURA

1. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569–73.
2. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999; 97: 503–14.
3. Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem* 1997; 43: 708–14.
4. Luderus ME, van Steensel B, Chong L, Sibon OC, Cremers FF, de Lange T. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* 1996; 135: 867–81.
5. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458–60.
6. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973; 41: 181–90.
7. Siegal G, Turchi JJ, Myers TW, Bambara RA. A 5' to 3' exonuclease functionally interacts with calf DNA polymerase epsilon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9377–81.
8. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997; 88: 657–66.
9. Huffman KE, Levene SD, Tesmer VM, Shay JW, Wright WE. Telomere shortening is proportional to the size of the 3'G-rich telomeric overhang. *J Biol Chem* 2000; 275: 19719–22.
10. Preston JR. Telomeres, telomerase and chromosome stability. *Radiation Res* 1997; 147: 529–34.
11. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999; 283: 1321–5.
12. Bodnar AG, Quellet M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349–52.
13. Autexier C, Greider CW. Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 387–91.

14. Cooke HJ, Smith BA. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 213–9.
15. Shippen-Lentz D, Blackburn EH. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 1990; 247: 546–52.
16. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Linger J, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997; 277: 955–9.
17. Kickhoefer VA, Stephen AG, Harrington L, Robinson MO, Rome LH. Vaults and telomerase share a common subunit, TEPI. *J Biol Chem* 1999; 274: 32712–7.
18. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, et al. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997; 275: 973–7.
19. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236–41.
20. Young RA. RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 689–715.
21. Linger J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997; 276: 561–7.
22. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, et al. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2011–9.
23. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternative splicing of hTERT transcript. *Cancer Res* 1998; 58: 4168–72.
24. Adams MD, Rudner DZ, Rio DC. Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 331–9.
25. Cong YS, Wen J, Baccetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Gen* 1999; 8: 137–42.
26. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 1999; 13: 817–26.
27. Shen M, Hagglblom C, Vogt M, Hunter T, Lu KP. Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF 1 suggest a role in mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13618–23.
28. van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997; 385: 740–3.
29. Billaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Glison E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* 1997; 17: 236–9.
30. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998; 92: 401–13.
31. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998; 282: 1484–7.
32. Kim SH, Kaminker P, Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 1999; 23: 405–12.
33. Pennisi E. A possible new partner for telomerase. *Science* 1998; 282: 1395–7.
34. Shore D. Different means to common ends. *Nature* 1997; 385: 676–7.
35. Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 1999; 180: 10–8.
36. Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D, van der Haegen BA. E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* 1993; 8: 1407–13.
37. Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 1996; 8: 66–71.
38. Shay JW, Wright WE, Werbin H. Loss of telomeric DNA during aging may predispose cells to cancer. *Int J Oncol* 1993; 3: 559–63.
39. Wright WE, Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 1992; 27: 383–9.
40. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011–5.
41. Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an update. *Virchows Arch* 2000; 437: 1–16.
42. Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 781–6.
43. Shay JW, Gazdar AF. Telomerase in early detection of cancer. *J Clin Pathol* 1997; 50: 106–9.
44. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; 1: 249–55.
45. Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, et al. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14276–81.