

Telomere - čimbenici genetičke nestabilnosti

Veseljak, Damira

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:180976>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**TELOMERE –
ČIMBENICI GENETIČKE NESTABILNOSTI**

**TELOMERES –
THE FACTORS OF GENETIC INSTABILITY**

SEMINARSKI RAD

Damira Veseljak

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentorica: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2017.

SADRŽAJ:

1.	Uvod.....	3
2.	Telomere i posljedice njihova skraćivanja.....	3
3.	Mehanizmi produljivanja telomera.....	7
3.1	Telomeraza.....	7
3.2	Alternativno produljenje telomera (ALT).....	8
4.	Uloga disfunkcije telomera u razvoju tumora.....	9
4.1	Rak dojke.....	9
4.2	Tumor pločastih stanica glave i vrata (HNSCC).....	10
4.3	Maligne novotvorine limfnih tkiva.....	10
5.	Telomeraza kao meta antitumorskih lijekova.....	11
5.1	Imetelstat (GRN163L).....	11
5.2	Anti-telomerazni imunoterapeutici.....	12
5.3	Inhibicija telomerazne aktivnosti analozima baza.....	12
6.	Zaključak.....	13
7.	Literatura.....	14
8.	Sažetak.....	16
9.	Summary.....	16

1. UVOD

Genetička je nestabilnost definirana kao visoki omjer genomskih promjena stečenih staničnim diobama u nestabilnim stanicama u usporedbi s genomskim promjenama u normalnim stanicama. Postoji više tipova genetičke nestabilnosti: kromosomska nestabilnost (CIN), mikrosatelitska nestabilnost (MSI) i mutacije parova baza (Cagnetta i sur. 2015). Izvori kromosomske nestabilnosti leže u kromosomskim pogreškama nastalim tijekom rekombinacije, replikacije i popravka DNA, ali i u nepravilnim organizacijama diobenog vretena. Važan izvor kromosomske nestabilnosti može se pronaći i u disfunkciji telomera (Krem i sur. 2015).

Telomere su specifične DNA – proteinske strukture koje se sastoje od ponavljajućih TTAGGG sljedova nukleotida i štite krajeve linearnih eukariotskih kromosoma od mehanizama popravka dvolančanih lomova. Čine to formiranjem D-omče (gvaninom bogati krajnji sljedovi nukleotida nejednako se repliciraju te napadaju dvolančanu DNA) (Ayouaz i sur. 2008). Stabilizacija i nastanak D-omče potpomognuta je TRF2 proteinom (engl. *Telomeric repeat-binding factor 2*), komponentom kromosomskog proteinskog kompleksa nazvanog šelterin. Šelterin se sastoji od 6 podjedinica. U kompleksu se nalaze i TRF1 (engl. *Telomeric repeat-binding factor 1*) i POT1 (engl. *Protection of telomeres protein 1*) proteini koji zajedno s već spomenutim TRF2 proteinom omogućuju prepoznavanje TTAGGG slijeda te TIN2 (engl. *TRF1-interacting nuclear protein 2*) - telomerno specifična komponenta šelterinskog kompleksa, TPP1 (engl. *Telomere-binding protein 1*) i Rap1 (engl. *Repressor activator protein 1*). Svih 6 proteinskih podjedinica zajedno omogućavaju stanici razlikovanje telomera od mjesta DNA oštećenja (Lange 2005).

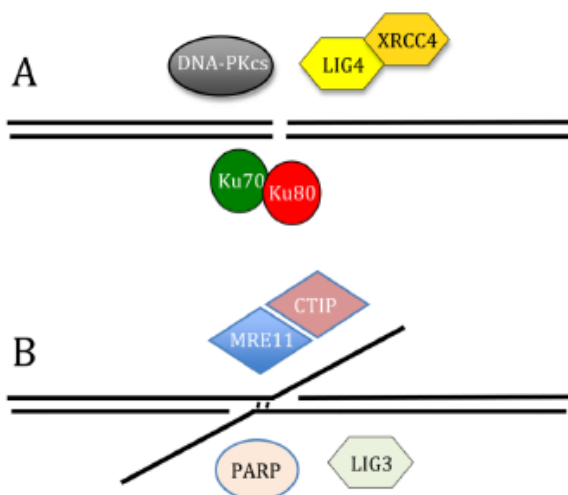
Osim zaštite eukariotskih kromosoma od mehanizama popravka dvolančanih lomova, telomere su u stanicama zadužene i za brojne druge fiziološke procese uključene u održavanje kromosomske stabilnosti i transkripcijske aktivnosti gena uključujući i segregaciju kromosoma tijekom anafaze, homolognu rekombinaciju u mejotskim stanicama i popravak dvolančanih oštećenja DNA (Raynaud i sur. 2008).

2. TELOMERE I POSLJEDICE NJIHOVA SKRAĆIVANJA

Iako je učinkovitost DNA replikacijskih proteina veoma visoka, telomere se ne mogu u potpunosti replicirati. Svakim replikacijskim ciklusom u somatskoj ljudskoj stanici iz

telomerne regije se izgubi 50 - 200 baza te nakon nekog vremena telomere postaju prekratke i blokiraju proliferaciju stanice. Taj se fenomen naziva replikativna senescencija te uzrokuje p53 ovisni zastoj staničnog ciklusa u G1 fazi. Replikativnu senescenciju može uzrokovati samo jedna nezaštićena ili prekratka telomera što nam govori o važnosti telomera kao unutarstaničnih regulatora broja staničnog ciklusa (Raynaud i sur. 2008).

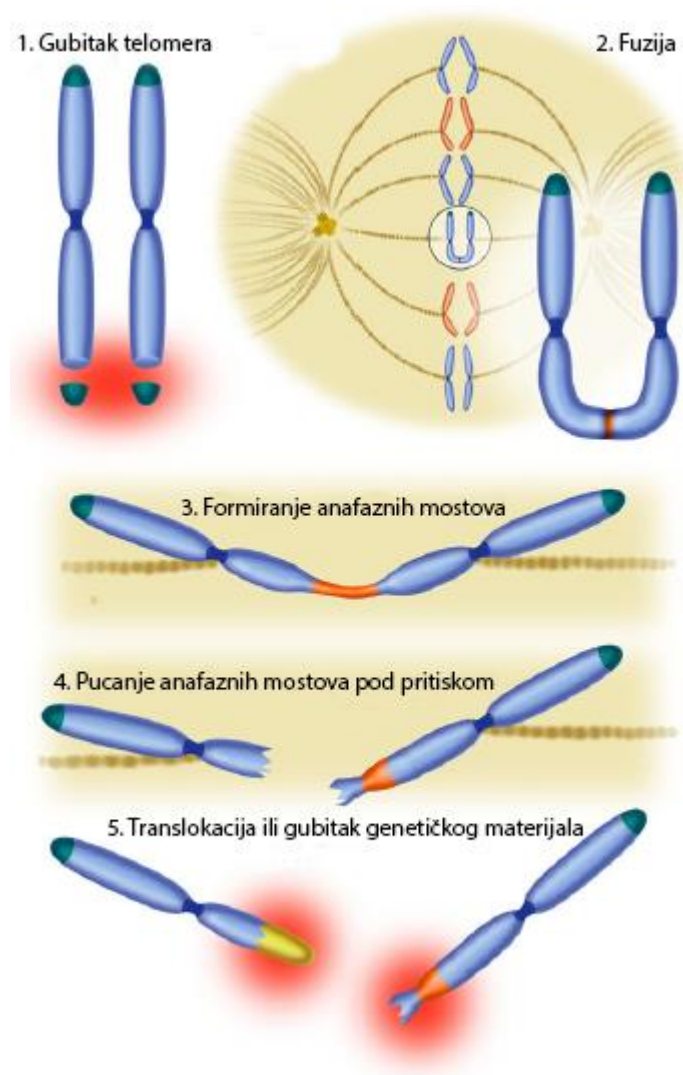
Zaustavljanjem replikativne senescencije uvođenjem viralnih onkogeni koji inaktiviraju p53, stanica se nastavlja replicirati usprkos telomerama koje su veoma kratke. Daljnje skraćivanje dovodi do nezaštićenih kromosomskih krajeva koji postaju supstrati popravka DNA što naposljetku dovodi do fuzije kromosoma (Londoño-Vallejo 2008). Fuzija se odvija pomoću popravka dvolančanih lomova DNA nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ). Iako u stanicama postoje dva puta NHEJ-a (klasični C-NHEJ i alternativni A-NHEJ), gotovo sav popravak, kao i fuzija se odvijaju C-NHEJ putem u koji su uključeni enzimi i proteini Ku70, Ku80, DNA-PKcs, LIG4 i XRCC4. Do aktivacije C-NHEJ dolazi pomanjkanjem TRF2 proteina na telomernim krajevima. U A-NHEJ putu sudjeluju enzimi i proteini PARP-1 (engl. *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*), MRE11 (engl. *Double-strand break repair nuclease*), CtIP (engl. *C-terminal binding protein 1*) i LIG3 (engl. *DNA ligase 3*), a aktivira se nakon velikih delecija i premještanja dijelova kromosoma (Murnane 2013). Razlike u mehanizmima C-NHEJ i A-NHEJ popravka vidljive su na Slici 1.



Slika 1. Razlike između C-NHEJ (A) i A-NHEJ (B) popravka. Preuzeto i prilagođeno prema Murnane 2013.

Fuzionirani dicentrični kromosomi predstavljaju problem za stanicu. Tijekom sljedeće diobe stanice u anafazi centromere fuzioniranih kromosoma bivaju odvlačene na suprotne strane stanice stvarajući pritom tzv. mostove (Slika 2). Fuzionirani kromosomi pod pritiskom

pucaju kako bi se mitoza mogla nastaviti stvarajući tako stanice kćeri s dvolančanim lomovima na kraju kromosoma. Takvi se kromosomi ponovno fuzioniraju nastavljajući ciklus lom-fuzija- most (B/F/B) (Londoño-Vallejo 2008).



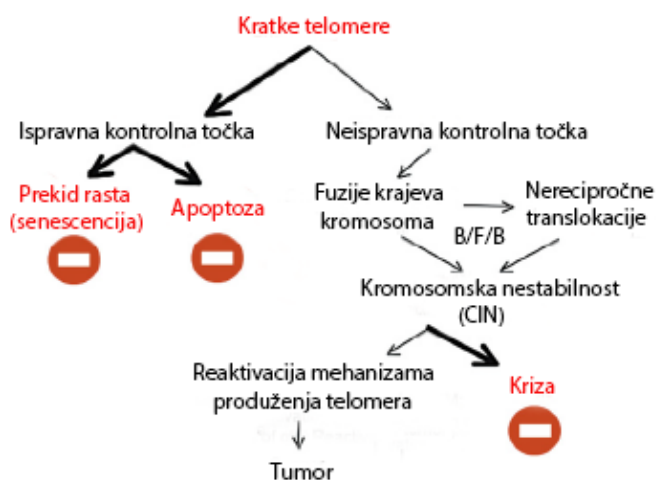
Slika 2. B/F/B ciklus. Preuzeto i prilagođeno prema Krem i sur. 2015.

Posljedice B/F/B ciklusa razlikuju se ovisno o tome je li se fuzija dogodila između sestrinskih kromatida ili različitih kromosoma. Ako se gubitak telomera događa tijekom DNA replikacije ili ako je skraćivanje telomera slabo, favorizira se fuzioniranje sestrinskih kromatida. Takvom fuzijom nastaju invertne repeticije na krajevima jedne kromatide i velike terminalne delecije u kromatidi druge stanice kćeri. Daljnjom fuzijom takvih kromatida mogu nastati ogromne količine invertnih repeticija ili pak terminalne delecije ili amplifikacije daleko od originalnog kraja kromosoma. Suprotno tome, ako se gubitak telomera događa prije

replikacije DNA ili je skraćivanje telomera intenzivno, fuzionirat će se različiti kromosomi. Fuzijom kromosoma dolazi do prijenosa DNA s jednog na drugi kromosom kada dođe do pucanja fuzija (Murnane 2013).

Analizom individualnih biljega na kromosomima, došlo se do zaključka da se fuzije događaju prvenstveno među sestrinskim kromatidama. U nekim populacijama B/F/B ciklusi se događaju generacijama što rezultira učestalim amplifikacijama subtelomerne DNA. Ciklusi prestaju tek kad kromosom stekne novu telomeru i na taj način se stabilizira. Stjecanje nove telomere često se događa neregularnom translokacijom pri čemu se nova telomera stabilizira, ali se genetička nestabilnost prenosi na kromosom koji je novu telomeru donirao (Slika 3). Dokaz je to kako gubitak jedne telomere može uzrokovati kromosomsku nestabilnost na više mjesta u genomu (Murnane i sur. 2005).

Osim neregularnih translokacija, genetička nestabilnost uzrokovana skraćivanjem telomera i B/F/B ciklusom očituje se i u fragmentaciji genoma koja je popraćena fuzijom genetičkog materijala proizašlog iz različitih kromosomskih regija. Također moguće su i duplikacije cijelih kromosoma ili čak cijelog genoma što uzrokuje preveliku količinu nestabilnih kromosoma te se stanice zato više ne mogu dijeliti bez gubitka vitalnog genetičkog materijala. Posljedice svih navedenih nestabilnosti su mitotička katastrofa i stanična smrt (Londoño-Vallejo 2008).



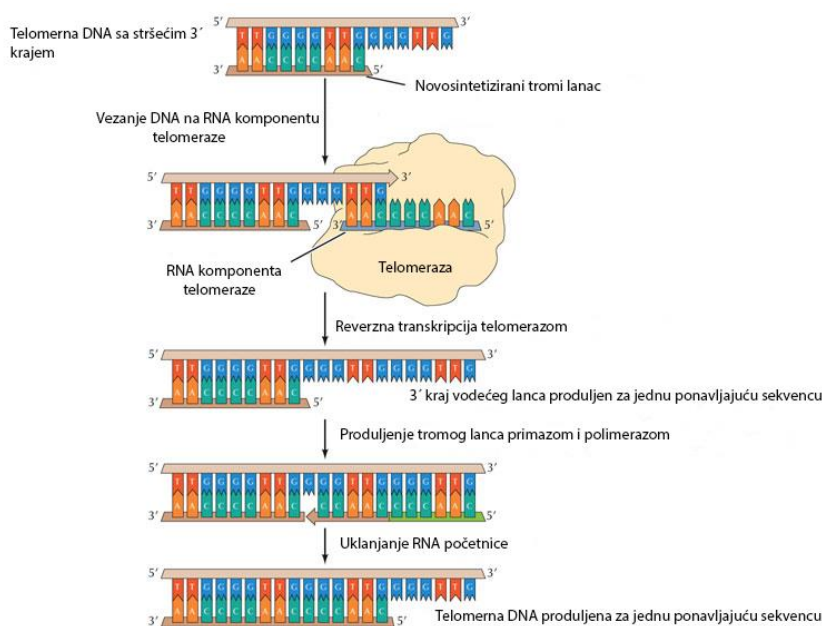
Slika 3. Posljedice skraćivanja telomera. Preuzeto i prilagođeno prema Londoño-Vallejo 2008. Debele strelice prikazuju anti-tumorske uloge, a tanke tumorske.

3. MEHANIZMI PRODULJIVANJA TELOMERA

Kako bi izbjegle smrt uzrokovanu skraćivanjem telomera, stanice *in vitro* moraju razviti mehanizme stabilizacije i produživanja telomera te time i immortalizaciju. Takvi mehanizmi mogu dovesti do daljnje genetičke nestabilnosti i formiranja tumora *in vivo* (Londoño-Vallejo 2008).

3.1 TELOMERAZA

Zbog prirode replikacije DNA i karakteristika DNA polimeraze, 3' kraj tromog lanca ne može se u cijelosti sintetizirati. Normalne somatske stanice tako se mogu dijeliti ograničenim brojem dioba. Enzim koji rješava problem skraćivanja lanca DNA u telomernoj regiji dodavanjem nukleotida na krajeve linearnih kromosoma naziva se telomeraza. Telomeraza je RNA-ovisna DNA polimeraza sastavljena od dvije funkcionalne domene (Slika 4). Prva je funkcionalna RNA komponenta kod ljudi nazvana hTERC (engl. *human telomerase RNA gene*) koja služi kao kalup za sintezu telomerne DNA, a druga katalitička proteinska domena pod nazivom hTERT (engl. *human telomerase reverse transcriptase*) s reverzno-transkripcijskom aktivnošću (Cong i sur. 2002).



THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.16 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Slika 4. Mehanizam telomeraze. Preuzeto i prilagođeno prema <http://oregonstate.edu/instruction/bi314/summer09/dnafix.html>

Telomerazna aktivnost prisutna je u embrionalnim, hematopoetskim, matičnim i ostalim brzo replicirajućim stanicama, ali je veoma niska ili čak nepostojeća u somatskim stanicama (Shammas 2011). U *in vitro* uvjetima ponovna ekspresija hTERT gena zaslužna je za reaktivaciju telomeraze. Time se postiže stabilizacija telomera te stječe predispozicija za imortalizaciju stanica. Usprkos tome razina spontane imortalizacije transformiranih stanica *in vitro* je niska jer enzim, iako produžuje telomere, nije pouzdan za rješavanje intersticijskih lomova ili sprečavanje novih B/F/B ciklusa (Londoño-Vallejo 2008).

U normalnim somatskim stanicama hTERT gen je utišan. Ekspresija gena porasta na gotovo 90% kod stanica tumora. Mehanizmi hTERT aktivacije u tumorskim stanicama još nisu u potpunosti istraženi, ali zna se da podrazumijevaju mutacije u hTERT promotoru, promjene u prekrajanju hTERT pre-miRNA, hTERT amplifikacije, epigenetičke promjene i promjene u sustavu za održavanje pozicije telomera. Posebnu ulogu u stvaranju tumora imaju dvije mutacije u hTERT promotoru koje se nalaze na mjestu -124 pb ili -146 pb od mjesta početka translacije TERT-a (Jafri i sur. 2016).

3.2 ALTERNATIVNO PRODULJENJE TELOMERA (ALT)

Postojanje ALT mehanizma potvrđeno je samo u abnormalnim situacijama kao što su ljudski tumori, imortalne ljudske stanične linije i mišjim stanicama null-mutantima za telomerazu. ALT mehanizam je specifičan jer za svoje djelovanje produljenja telomera ne koristi telomerazu. Kod stanica imortaliziranih telomerazom i normalnih somatskih stanica, pronađeni su represori ALT aktivnosti, a u stanicama s aktivnim ALT mehanizmom nedostaje ekspresija hTERT gena. Ekspresija hTERT je u tim stanicama regulirana metilacijom hTERT gena na području CpG otoka (Henson i sur. 2002).

Dosadašnja istraživanja pokazuju kako ALT mehanizam uključuje replikaciju DNA posredovanu homolognom rekombinacijom te kako mu je za normalnu funkciju potreban MRE11/RAD50/NBS1 rekombinacijski kompleks (Cesare i Reddel 2013).

Fenotip stanica s aktivnim ALT mehanizmom uključuje heterogenu veličinu telomera (od nepostojećih do abnormalno velikih) i ALT-povezana PML tjelešca koja u sebi sadrže izvankromosomsku telomernu DNA, specifične telomerno vezujuće proteine i proteine zadužene za DNA rekombinaciju i replikaciju (Henson i sur. 2002).

4. ULOGA DISFUNKCIJE TELOMERA U RAZVOJU TUMORA

Skraćivanje telomera i reaktivacija telomeraze pokazuju snažnu korelaciju s razvojem tumora. Telomeraza je prisutna u preko 90% tumorskih stanica te je to čini jednom od najčešćih staničnih anomalija povezanih uz razvoj tumora. Isto tako skraćivanje telomera obično se događa rano u razvojnog putu karcinoma u brojnim neinvazivnim prekursorskim lezijama (Prescott i sur. 2012). Uloga telomerne disfunkcije u razvoju tumora obrađena je na primjerima raka dojke, tumoru pločastih stanica glave i vrata (HNSCC) i malignih novotvorina limfnog sustava.

4.1 RAK DOJKE

Ispitivanjem normalnog i visoko rizičnog tkiva dojke dokazano je kako je karcinogeneza popraćena genetičkim nestabilnostima uzrokovanim skraćivanjem telomera i reaktivacijom telomeraze. Istraživanja su pokazala kraće telomere i nebalansirane lokuse prisutne u 50 – 75% tumorsko povezanog tkiva, okolnim normalnim stanicama i stanicama udaljenim najmanje 1 cm od ruba tumora. Što je udaljenost od tumora bila veća, smanjilo se skraćivanje telomera (Danforth 2016).

Slična je korelacija potvrđena i u istraživanjima aktivnosti telomeraze u visokorizičnom tkivu dojke. Ekspresija je bila najviša u tkivima 1 cm od tumorskog tkiva te je padala s udaljenošću, a povezana je s promotorom hTERT gena. Porast u mRNA transkriptu hTERT gena popraćen je i rastom aktivnosti brojnih gena koji kodiraju za faktore rasta u staničnom ciklusu i mitozu što promovira daljnje genetičke nestabilnosti. Pronađene su epitelne stanice u normalnom tkivu s povećanom količinom hTERT mRNA i pretpostavlja se da se tumor dojke razvija iz tih TERT eksprimiranih epitelnih stanica (Danforth 2016).

Telomernu disfunkciju mogu uzrokovati i mutacije u genima p53 i p16^{INK4A}. Inaktivacijom p16^{INK4A} pomoću hipermetilacije može doći do kontinuiranih replikacija DNA i samim time do skraćivanja telomera. Mutacije u p53 mogu dovesti do 20-30 dioba više nego stanica to može podnijeti i u kombinaciji s aktivnom telomerazom može dovesti do imortalizacije stanica. Gubitak funkcije p53 i p16^{INK4A} u tkivu dojke visokog rizika može tako dovesti do genetičke nestabilnosti i karcinogeneze (Danforth 2016).

4.2 TUMOR PLOČASTIH STANICA GLAVE I VRATA (HNSCC)

HNSCC je često letalna heterogena bolest povezana s alkoholizmom, konzumiranjem duhana i humanim papilloma virusom (HPV). Bolest obično primarno zahvaća limfne čvorove vrata te nakon toga može metastazirati na unutarnje organe. Istraživanja su vršena na sluznici koja okružuje HNSCC. Pokazano je kako HNSCC prekursori pokazuju značajno skraćene telomere, a aktivacija telomeraze snažno je povezana s HNSCC slučajevima. Aktivacija i ekspresija telomeraze u tim je slučajevima povezana s genetičkim i epigenetičkim kontekstom pacijenta, a gen zadužen za ekspresiju je ponovno hTERT. Dokazana je povećana količina hTERT mRNA u plazmi pacijenata u usporedbi s kontrolnom grupom te su predložena dodatna istraživanja kako bi se istražile mogućnosti korištenja slobodno kružećih mRNA hTERT transkripata kao neinvazivne metode ranog otkrivanja karcinoma (Boscolo-Rizzo i sur. 2016).

4.3 MALIGNNE NOVOTVORINE LIMFNIH TKIVA

Limfni sustav karakterizira velika raznolikost tkiva, stanica i organa. Fiziološku i anatomsku raznolikost prati i širok spektar zloćudnih bolesti izvedenih iz limfnih tkiva (Dalla-Favera 2012). Kod nekih od tih bolesti razvoj je povezan s disfunkcijom telomera i telomeraze, ali na različitim razinama. Razlike u duljini telomera ovise o tipu limfoma što je vjerojatno povezano s različitom ekspresijom telomeraze u razvojnim stadijima B-stanica. (Krem i sur. 2015).

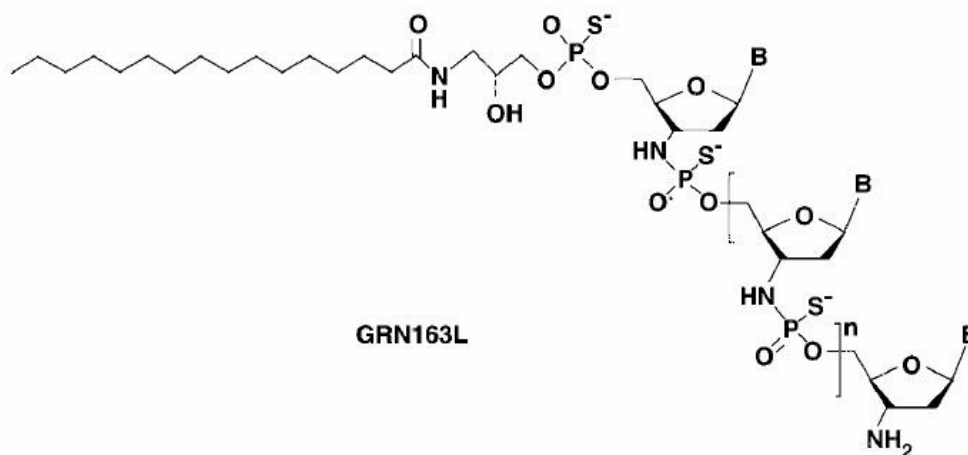
Različit utjecaj genetičke nestabilnosti uzrokovane telomerama vidljiv je u primjerima prekursorske B-stanične akutne limfocitne leukemije i kronične limfatičke leukemije (CLL). Kod prekursorske B-stanične akutne limfocitne leukemije kromosom 21 važan je citogenetički biljeg. Na sebi sadrži gen RUNX1 (engl. *Runt-related transcription factor 1*) koji kodira za hematopoetski transkripcijski faktor nužan za hematopoezu. Njegova je amplifikacija snažno povezana s leukemogenezom, a često se amplificira B/F/B ciklusima. Osim B/F/B ciklusa kod malignih novotvorina limfnih tkiva bitna je i regulacija ekspresije telomeraze. Tako je kod kronične limfatičke leukemije (CLL) ekspresija telomeraze smanjena. Telomere su kod te bolesti ipak povećane zbog mutacije u ADC (engl. *Adrenocortical dysplasia homolog*) komponenti proteina šelterina te je i kod CLL prisutna genetička nestabilnost uzrokovana telomerama (Krem i sur. 2015).

5. TELOMERAZA KAO META ANTITUMORSKIH LIJEKOVA

Telomeraza je jedna od primarnih meta antitumorskih lijekova. Izražena je u gotovo svim tumorskim stanicama, a u normalnim somatskim stanicama nema ekspresije što smanjuje mogućnost skraćivanja telomera u tim stanicama zbog djelovanja lijekova na telomerazu. Cilj anti-telomeraznih lijekova je ciljano potaknuti apoptozu i staničnu smrt u stanicama tumora te istovremeno minimizirati štetu na ostalim stanicama. Rješavanju tog problema pristupa se na razne načine: razvojem cjepiva, antisense oligonukleotidima i malim molekularnim inhibitorima hTERT (Jafri i sur. 2016).

5.1 IMETELSTAT (GRN163L)

Imetelstat (Slika 5) je kompetitivni inhibitor telomerase i razvijen je za intravenoznu upotrebu i liječenje raznih tipova tumora. Sastoji se od oligonukleotidnog slijeda povezanog s palmitinskom kiselinom preko tio-fosfatne veze. Lipidni dio molekule odgovoran je za poboljšanje unosa lijeka u stanicu, zadržavanje u stanici i učinkovitost dok je oligonukleotidni dio antisense hTERC domeni enzima te vezanjem inhibira aktivno mjesto (Jafri i sur. 2016).



Slika 5. Struktura imetelstata. Preuzeto s

<http://rnaitherapeutics.blogspot.hr/2014/03/imetelstat-off-target-mechanism-might.html>

Imetelstat se pokazao učinkovitim i potaknuo skraćivanje telomera u širokom spektru staničnih linija uključujući i tumore mokraćnog mjehura, prostate, dojke, jetre, pluća i gušterače. *In vivo* imetelstat je testiran na miševima zaraženim tumorom koji su nakon obrade

pokazali inhibiciju telomeraznog djelovanja što je dovelo do smanjenja tumora i sprečavanja nastanka metastaza (Jafri i sur. 2016).

Kod obrade tkiva raka dojke imetelstatom pokazano je kako djeluje sinergistički s trastuzumabom, anti-tumorskim lijekom koji se koristi za obradu raka dojke, ali i želuca (<http://www.macmillan.org.uk/cancerinformation/cancertreatment/treatmenttypes/biologicaltherapies/monoclonalantibodies/trastuzumab.aspx>). Uz to pokazano je i kako je imetelstat povratio učinak trastuzumaba u rezistentnim staničnim linijama (Holysz i sur. 2013)

Trenutno se provodi nekolicina kliničkih istraživanja koje istražuju učinak imetelstata na ljudima (<https://imetelstat.eu>).

5.2 ANTI-TELOMERAZNI IMUNOTERAPEUTICI

Razaranjem telomeraze pomoću proteosoma nastaju fragmenti peptida koji se na tumorskim stanicama predočavaju pomoću kompleksa gena tkivne podudarnosti (HLA, od engl. *Human leukocyte antigens*). Citotoksični T-limfociti prepoznaju te epitope te uništavaju tumorsku stanicu. Ciljevi anti-telomerazne imunoterapije temelje se na stimulaciji imunskog sustava na hTERT peptidne epitope koji će potaknuti proliferaciju hTERT specifičnih CD8⁺ stanica i na taj način ubijati tumorske stanice. Nadalje, razvojem cjepiva, primjerice, GV1001, Vx001 i GRNVAC1, uspješno je potaknut imunski odgovor. Iako su primjenom cjepiva pokazani minimalni učinci na zdrave stanice, dugoročna toksičnost ovih cjepiva se još mora utvrditi. Trenutno nisu odobrena klinička istraživanja za ove lijekove (Jafri i sur. 2016).

5.3 INHIBICIJA TELOMERAZNE AKTIVNOSTI ANALOZIMA BAZA

Problem lijekova koji kao mehanizam djelovanja koriste inhibiciju telomerazne aktivnosti je dugoročnost uzimanja te mogućnost reverzije učinaka nakon što pacijent prestane koristiti terapiju. Zbog toga se razvijaju lijekovi koji će djelovati brzo i učinkovito. Primjer takvog lijeka je 6-tio-2-deoksigvanozin (6-tio-dG), nukleozidni analog gvaninu. Ugradnja 6-tio-dG u telomere pomoću telomeraze uzrokuje poremećaje u strukturi telomera te aktivaciju DNA-popravka uzrokovanog oštećenjem telomera što dovodi do stanične smrti. 6-

tio-dG testiran je *in vivo* gdje se pokazalo kako su tumorske stanice brzo umrle, a normalne zdrave stanice su ostale gotovo netaknute. U drugim je istraživanjima pokazano kako je 6-tio-dG uzrokovao redukciju veličine tumora, a miševi obrađeni 6-tio-dG nakon mjesec dana nisu pokazivali hematološka, hepatitička ili renalna oštećenja. 6-tio-dG pruža sigurnu i učinkovitu alternativu liječenju karcinoma koju je potrebno potvrditi daljnjim kliničkim ispitivanjima (Jafri i sur. 2016).

6. ZAKLJUČAK

Disfunkcija telomera bitan je izvor kromosomske, a time i genetičke nestabilnosti. Genetička nestabilnost najčešće dovodi do nastanka tumora, a u preko 90% tumora nanovo je aktivirana telomeraza. To je čini jednom od rijetkih karakteristika koja je zajednička gotovo za sve poznate tumore. Budućnost razvoja lijekova za tumore širokoga spektra tako zasigurno leži u inhibiciji telomerazne aktivnosti. U ovom su radu navedena 3 primjera anti-telomeraznih lijekova: imetelstat, cjepiva (GV1001, Vx001 i GRNVAC1) te analozi baza (6-tio-dG) koji su otvoreni za daljnja istraživanja. Razvojem do stadija kliničkih ispitivanja riješio bi se velik problem nedostatka anti-tumorskih lijekova.

Osim telomeraze u produljenju telomera sudjeluje i mehanizam ALT koji je nedovoljno istražen. Do sad je poznato kako i njegovim djelovanjem nastaje kromosomska nestabilnost i abnormalno duge telomere, ali njegova uloga u karcinogenezi još nije do kraja razjašnjena. Pronalaskom načina inhibicije ALT mehanizma genetička nestabilnost uzrokovana disfunkcijom telomera mogla bi biti iskorijenjena.

7. LITERATURA

- Ayouaz, A., Raynaud, C., Heride, C., Revaud, D. i Sabatier, L., 2008. Telomeres: Hallmarks of radiosensitivity. *Biochimie*, 90(1), 60–72.
- Boscolo-Rizzo, P., Da Mosto, M.C., Rampazzo, E., Giunco, S., Del Mistro, A., Menegaldo, A., Baboci, L., Mantovani, M., Tirelli, G. i De Rosi, A., 2016. Telomeres and telomerase in head and neck squamous cell carcinoma: from pathogenesis to clinical implications. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(3), 457–474.
- Cagnetta, A., Lovera, D., Grasso, R., Colombo, N., Canepa, L., Ballerini, F., Calvio M., Miglino, M., Gobbi, M., Lemoli, R. i Cea, M., 2015. Mechanisms and clinical applications of genome instability in multiple myeloma. *BioMed Research International*, 2015.
- Cesare, A.J. i Reddel, R.R., 2013. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2008, doi:10.1016/j.mad.2007.11.006, 598–610.
- Cong, Y., Wright, W.E. i Shay, J.W., 2002. Human telomerase and its regulation. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 407–425.
- Dalla-Favera, R., 2012. Lymphoid malignancies: Many tumor types, many altered genes, many therapeutic challenges. *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3396–3397.
- Danforth, D.N., 2016. Genomic changes in normal breast tissue in women at normal risk or at high risk for breast cancer. *Libertas Academica*, 10, 109–146.
- Henson, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R. i Reddel, R.R., 2002. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21, 598 - 610
- Holysz, H., Lipinska, N., Paszel-Jaworska, A. i Rubis, B., 2013. Telomerase as a useful target in cancer fighting - The breast cancer case. *Tumor Biology*, 34(3), 1371–1380.
- Jafri, M.A., Ansari, S.A., Alqathani, M.H. i Shay, J.W., 2016. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome medicine*, 8(1),69.

- Krem, M.M., Press, O.W., Horwitz, M.S. i Tidwell, T., 2015. Mechanisms and clinical applications of chromosomal instability in lymphoid malignancy. *British Journal of Haematology*, 171(1), 13–28.
- Lange, T. De, 2005. Shelterin : the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* 19, 2100–2110.
- Londoño-Vallejo, J.A., 2008. Telomere instability and cancer. *Biochimie*, 90(1), 73–82.
- Murnane, J.P., 2013. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation Research*, 730(415), 28–36.
- Murnane, J.P., Sabatier, L. i Ricoul, M., 2005. The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line. *Molecular Cancer Research* 2005, 3(March), 139–151.
- Prescott, J., Wentzensen, I.M., Savage, S.A. i De Vivo, I., 2012. Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutation Research*, 730(1-2): 75–84. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.06.009
- Raynaud, C.M., Sabatier, L., Philipot, O., Olausson, K.A. i Soria, J-C., 2008. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66(2), 99–117.
- Shammas, M.A., 2011. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(1), 28–34.
- <https://imetelstat.eu>
- <http://www.macmillan.org.uk/cancerinformation/cancertreatment/treatmenttypes/biologicaltherapies/monoclonalantibodies/trastuzumab.aspx>
- <http://oregonstate.edu/instruction/bi314/summer09/dnafix.html>
- <http://rnaitherapeutics.blogspot.hr/2014/03/imetelstat-off-target-mechanism-might.html>

8. SAŽETAK

Kako bi se od razaranja i mehanizama popravka dvolančanih lomova zaštitili linearni eukariotski kromosomi, na njihovim se krajevima nalaze telomere - specifične DNA – proteinske strukture sastavljene od ponavljajućih TTAGGG sljedova nukleotida. Zbog prirode replikacije DNA svakom diobom dolazi do skraćivanja telomera te je konačan broj dioba određen duljinom telomera. Kratke su telomere čimbenici genetičke nestabilnosti. Najveći je uzrok te nestabilnosti ciklus lom-fuzija- most (B/F/B) koji dovodi do neregipročnih translokacija, fragmentacije DNA i duplikacija cijelog kromosoma ili genoma. Stanice smrt uzrokovanu kratkim telomerama mogu izbjeći reaktivacijom telomeraze, RNA-ovisne DNA polimeraze koja je inače aktivna u embrionalnim stanicama, ili alternativnim mehanizmima produljenja telomera (ALT). U uvjetima *in vitro* reaktivacija telomeraze dovodi do imortalizacije stanica dok je *in vivo* velik čimbenik razvoja tumora. Telomeraza je aktivna u preko 90% svih tumora, a neaktivna u normalnim i zdravim somatskim stanicama. Inhibitori telomeraze zbog toga daju brojne mogućnosti u razvoju anti-tumorskih lijekova.

9. SUMMARY

To avoid degradation and the mechanisms of DNA double strain break repair, linear eukaryotic chromosomes have developed telomeres – the specific DNA-protein structures comprised of repetitive TTAGGG nucleotide sequences. Due to the nature of DNA replication every division makes telomeres shorter. Because of this, the number of divisions is set by telomere length. Short telomeres are factors of genetic instability. The most significant cause of genetic instability lies in the fusion-bridge-fusion cycle (B/F/B) which leads to nonreciprocal translocations, DNA fragmenting and duplications of the whole chromosome or even genome. Cells can escape death caused by short telomeres by reactivation of telomerase, RNA-dependent DNA polymerase usually active only in embryotic cells, or by the alternative lengthening of telomeres (ALT). *In vitro* reactivation of telomerase leads to cell immortalization while *in vivo* active telomerase means tumour development. Telomerase is active in over 90% of all tumours and inactive in normal healthy somatic cells. Because of this, telomerase inhibitors play a crucial role in the development of anti-cancer therapeutics.