Telomere i njihove funkcije

Jelušić, Barbara

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:786288

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Telomere i njihove funkcije

Telomeres and Their Functions

SEMINARSKI RAD

Barbara Jelušić
Preddiplomski studij molekularne biologije
Undergraduate Study of Molecular biology
Mentor: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Zagreb, 2012.

Sadržaj

1. Uvod.....1

2. Kromosomi 1

3. Otkriće telomera 2

4. Struktura telomera 3

5. Mjerenje duljine telomera.....6

6. Zaštita kromosoma od NHEJ-a 6

7. Proteini koji se vežu na telomere.....7

8. Replikacija DNA i skraćivanje telomera 10

9. Replikativna senescencija i starenje organizma 13

10. Telomeraza 16

11. Telomere i rak 20

11.1 Alternativno produljenje telomera 20

11.2 Telomeraza u stanicama raka i matičnim stanicama.....22

12. Ljudsko zdravlje i telomere 23

13. Literatura.....24

14. Sažetak 26

15. Summary.....26

1. Uvod

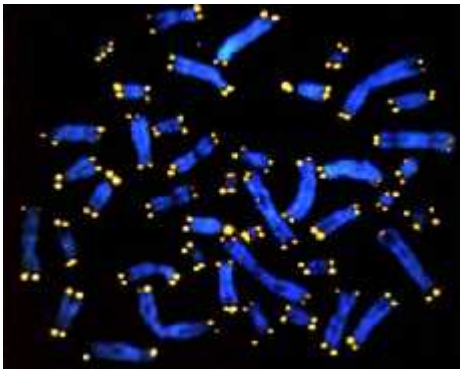
Nitko ne može sa sigurnošću reći što je smisao života. Možda je odgovor jednostavan – da je to život sam. Od prvih organizama koji su se pojavili na Zemlji, priroda je pronalazila različite mehanizme kako da se njihov život održi, te da se informacija o tome prenese dalje. Informacije su sadržane u genima, dijelovima molekule DNA koja služi kao uputa za vlastitu besmrtnost i nastavak vrste. S vremenom, život se mijenjao i usavršavao, noseći sa sobom kroz evoluciju najuspješnije značajke. Neki su se mehanizmi pokazali toliko uspješnima da ih dijeli većina sadašnje populacije Zemlje, no to ne znači da su sami savršeni. Neki se procesi u stanicama moraju ispravljati ili nadopunjavati drugim procesima, koji se moraju regulirati nekim drugim procesima, i tako dalje, što zajedno čini gotovo savršen sustav. I tako se informacija prenosi dalje. Jedan od vrlo bitnih čimbenika koji štiti informaciju, odnosno gene, jesu telomere. To su dijelovi DNA koji imaju zaštitnu ulogu i ne kodiraju za proteine, već se nalaze na samim krajevima kromosoma organizirani u kratkim ponavljanjima te čuvaju gene od oštećenja uzrokovanih problemima u replikaciji DNA. Telomere svojom strukturom također štite kromosome od međusobna spajanja i nepoželjne reorganizacije. Pri svakoj replikaciji DNA i dijeljenju stanice, telomere se, štiteći gene, skraćuju.. Kada se potroše do određene granice, stanice se prestaju dijeliti i dolazi do senescencije, odnosno starenja stanica. Zbog toga ih neki nazivaju unutrašnjim satom na navijanje, pretpostavljajući da one određuju maksimalnu duljinu naših života. Ono što može spriječiti nestanak telomera i obnoviti ih kako bi određene linije stanica mogle neograničeno nastaviti proliferirati jest enzim telomeraza. No, besmrtnost stanica ponekad nije dobra stvar, već pogoduje anarhiji u organizmu kada nastupi bolest koja se naziva rak.

2. Kromosomi

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je polimer nukleotida koji se sastoji od purinske ili pirimidinske baze (gvanina, adenina, citozina ili timina), te šećera deoksiriboze i fosfatne skupine. Nukleotidi su međusobno povezani fosfodiesterskom vezom između fosfatne grupe na atomu ugljika broj 5 i hidroksilne grupe na atomu ugljika broj 3 drugog nukleotida. Molekula ribonukleinske kiseline (RNA) sadrži šećer ribozu umjesto deoksiriboze i bazu uracil (U) umjesto timina. Dva antiparalelna lanca nukleotida međusobno su spojena vodikovim vezama između komplementarnih baza. Krajevi lanaca označuju se s 5’ ili 3’: 5’ kraj ima slobodnu fosfatnu skupinu, a 3’ kraj slobodnu hidroksilnu

skupinu na trećem atomu ugljika šećera. Geni su bilo koji slijed nukleotida na DNA koji kodira za protein ili za molekulu RNA sa strukturnom ili katalitičkom funkcijom. Kompleksniji genomi, npr. oni eukariota, posloženi su u kromosome više organizacije kako bi bili kompaktniji i kako bi se omogućila bolja regulacija prijenosa informacije tj. proizvodnje produkata gena. Ne transkribiraju se svi dijelovi DNA. U ljudskom genomu geni čine tek 30%, a od toga samo 1,5% kodira izravno za neki produkt. Ostalo su tzv. introni, sekvence koje se izrezuju prilikom prijenosa genske informacije. 3% ljudskog genoma čine visoko ponavljajuće sekvence (SSR – engl. simple sequence repeats, jednostavne ponavljajuće sekvence), obično manje od deset parova baza, koje se ponavljaju milijun i više puta u stanici. Nazivamo ih i satelitskom DNA. Istraživanja su pokazala da SSR ne kodiraju za proteine ili RNA, no imaju određene funkcije u strukturi kromosoma – one čine centromere i telomere. Kromosom se sastoji od kromatina. Osnovna struktura kromatina kojega čini molekula DNA koja se namata oko histonskog oktamera je nukleosom. Kromosomi postaju uočljivi tek prilikom jače kondenzacije tijekom stanične diobe, mitoze.

U središtu eukariotskih kromosoma centromera služi kao mjesto vezanja proteina koji povezuju kromosome s diobenim vretenom i razdvajaju ih tijekom mitoze. Telomere (grčki *telos*, ”kraj”, i *meros*, ”dio”) su sekvence na krajevima kromosoma koje pomažu u njegovoj stabilizaciji (Slika 1) (Nelson, Cox 2009).



Slika 1. Kromosomi u najjačem stupnju kondenzacije. Telomere su označene žutom bojom. (Izvor: http://camillaschemistryadventure.blogspot.com)

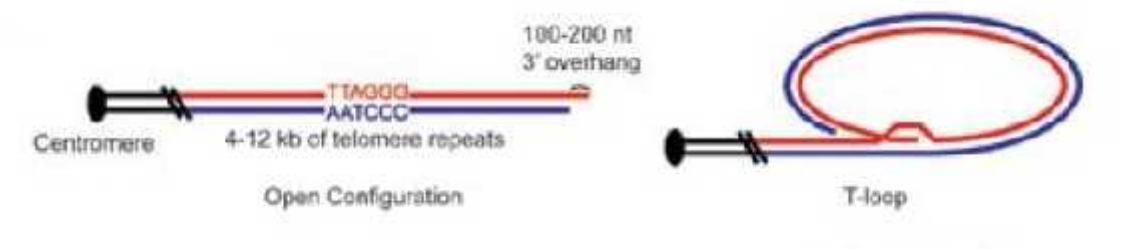
3. Otkriće telomera

U sedamdesetim godinama prošlog stoljeća, ruski teoretičar Alexei Olovnikov otkrio je da kromosomi ne mogu u potpunosti replicirati svoje krajeve. Imajući na umu teoriju

Leonarda Hayflicka o ograničenoj replikaciji somatskih stanica, Olovnikov je zaključio da se dijelovi DNA gube sa svakom replikacijom stanice, odnosno DNA, sve dok gubitak ne dosegne kritičnu točku, i tada stanice prestaju s diobama. Elizabeth Blackburn i Joseph Gall u razdoblju od 1975. do 1977. na Sveučilištu Yale proučavali su neobičnu prirodu telomera, kratkih ponavljajućih sekvenci koji čine krajeve kromosoma. Elizabeth Blackburn, Carol Greider i Jack Szostak 2009. dobili su Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu za otkriće zaštitne uloge telomera i enzima telomeraze (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere).

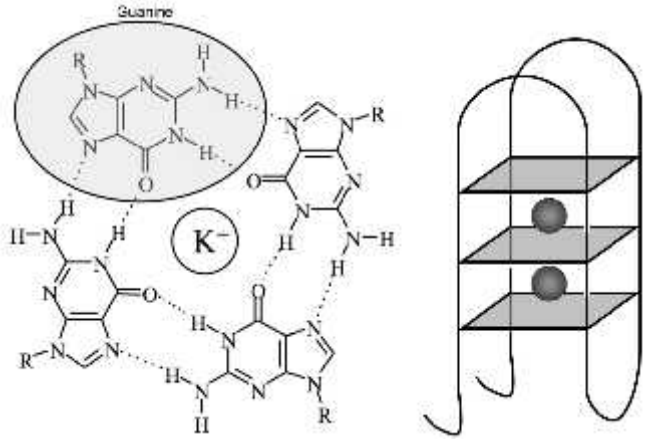
4. Struktura telomera

Kako se telomere nalaze na krajevima linearnih kromosoma, većina prokariota, budući da nema takvo linearno uređenje, nema telomere. Cirkularni kromosomi nemaju problem replikacije krajeva pa telomere nisu potrebne. Mali je udio bakterijskih kromosoma (npr. u *Streptomyces* i *Borrelia*) linearan i posjeduje telomere, koje se bitno razlikuju od eukariotskih u strukturi i funkciji. Dužina telomera veoma se razlikuje između vrsta, pa tako plijesan sadrži oko 300 telomernih parova baza, *Arabidopsis* 3 000 pb ili 3 kilobaze, glodavci 15 – 50 kb, dok duhan ima 100 kb telomernih ponavljanja. Obično se sastoje od vrlo kratkih sekvenci bogatih gvaninom koje se ponavljaju jedna za drugom (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere). Otkriveno je da dužina telomera utječe na ekspresiju gena u blizini telomerne domene (subtelomerna domena) s pomoću kontrolirane heterokromatinizacije, dok u isto vrijeme konformacijske promjene heterokromatina utječu na regulaciju duljine telomera (Fajkus i sur. 2008). Eukariotske telomere obično završavaju jednolančanom DNA s 3’ krajem, što je bitno za njihovo održavanje i strukturu, te je posljedica DNA replikacije. Jednolančani je kraj kod ljudi dugačak 100 – 200 nukleotida. Telomere tvore velike omče nazvane T-omče (Slika 2) (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere). T-omče mogu tvoriti ekstrakromosomalne T-krugove koji su povezani s alternativnim produljenjem telomera (ALT). Na kraju T-omče jednolančana se telomerna DNA uvuče u regiju dvolančane DNA, između dva lanca, remeteći njihovu strukturu. Ta trolančana struktura stabilizirana je proteinima i naziva se D-omča (Compton i sur. 2008).



Slika 2. Lijevo: otvorena struktura („Open Configuration“) ljudske telomerne DNA s prikazanom ponavljajućom sekvencom veličine 4-12 kb („4-12 kb of telomere repeats“) i jednolančanim stršećim 3’ krajem duljine 100-200 nukleotida („100-200 nt 3’ overhang“). Crni krug označava centromeru („Centromere“). Desno: zatvorena telomerna struktura, T-omča („T-loop“).
(Izvor: Cesare 2008)

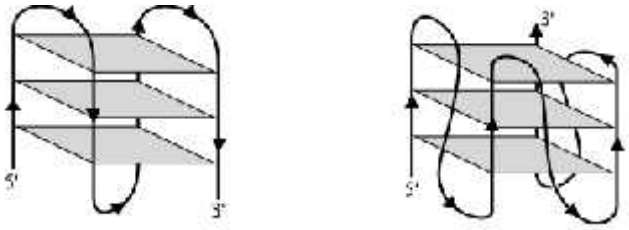
Kako su telomere bogate G bazama, na jednolančanom kraju telomera mogu se stvarati G-kvadripleksi. To su strukture koje se sastoje od DNA (ili RNA) konstruirane od sekvenci bogatih gvaninom koje su postavljene tako da tvore tetrade gvanina spojenih vodikovim vezama neuobičajenim Hoogsteen sparivanjem. Tetrade su postavljene jedna povrh druge te tako čine kvadriplekse (Burge i sur. 2006). (Slika 3).



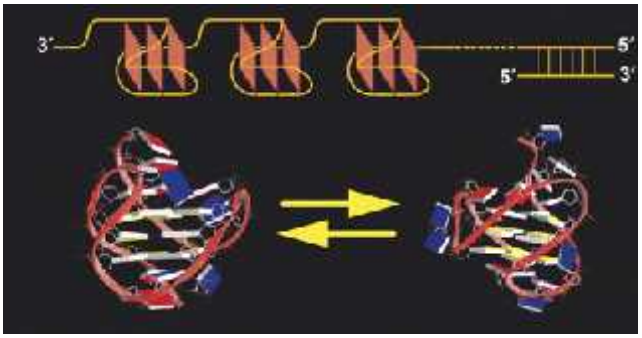
Slika 3. Lijevo: tetrada gvanina („Guanine“) u kompleksu s kationom K^+. Desno: tetrade posložene jedna povrh druge u G-kvadripleks kojeg čini jedna molekula DNA.
(Izvor: http://www.bss.phy.cam.ac.uk/~jlh29/)

Lanci koji ih čine mogu biti orijentirani na različite načine i ne moraju potjecati od iste DNA (ili RNA) molekule. G-kvadripleksi nađeni su i u telomernoj i u ne-telomernoj DNA. Ljudske telomerne sekvence d[$AG_3(TTAGGG)_3$] tvore antiparalelne G-kvadriplekse u Na^+ otopini, dok u K^+ otopini tvore kvadriplekse s paralelnom orijentacijom lanaca (Slika 4). Način slaganja dakle ovisi o mediju, samom procesu kristalizacije i duljini sekvence, iako su zabilježeni različiti topološki oblici za gotovo istu duljinu sekvenci – razlika u energiji

slaganja očito je vrlo mala i time su omogućene varijacije (Slika 5). Točnija topologija i struktura još se treba istražiti.



Slika 4. Lijevo: antiparalelna orijentacija lanaca telomernog G-kvadripleksa u Na^+ otopini. Desno: paralelna orijentacija lanaca u K^+ otopini.
(Izvor: **http://www.mnhn.fr/mnhn/bpy/team3/previousachievment_team3.htm**)



Slika 5. Gore: model G-kvadripleksa u ljudskoj telomernoj DNA. Dolje: trodimenzionalna struktura dvaju mogućih oblika G-kvadripleksa u K^+ otopini.
(Izvor: http://nar.oxfordjournals.org/content/35/15.cover-expansion)

Neki prokarioti, poput roda *Streptomyces*, imaju linearne kromosome s repetitivnom DNA na krajevima koja sadrži palindromske sekvence i može tvoriti ukosnice i ostale kompleksne sekundarne strukture (Burge i sur. 2006). Druga vrsta prokariotskih telomera zapravo su proteini kovalentno vezani za 5' kraj linearnoga bakterijskog kromosoma. Osim zaštitne, protein ima ulogu u započinjanju DNA replikacije. Prilikom replikacije bakterijskog kromosoma koji ima telomerne ukosnice na krajevima, enzim protelomeraza razrješuje replicirane ukosnice. Oba navedena sistema telomera postoje ne samo u bakterijama nego i u bakteriofagima (Sherwood i sur. 2008).

5. Mjerenje duljine telomera

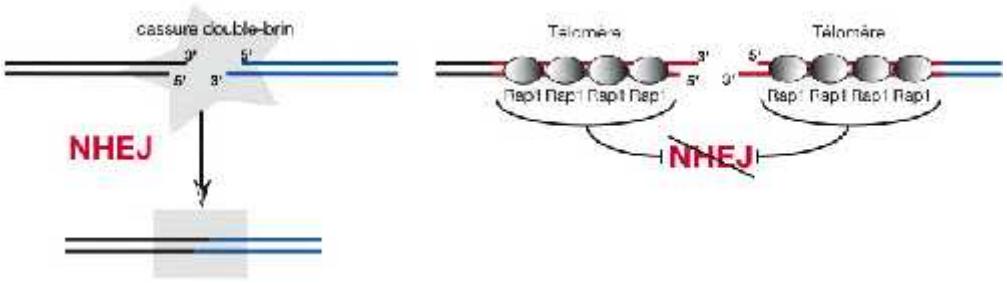
Rabi se nekoliko tehnika za određivanje duljine telomera u eukariotskim organizmima. Najčešća je metoda „TRF (engl. Terminal Restriction Fragment) southern blot“, što uključuje hibridizaciju radioaktivnog oligonukleotida ^{32}P-(TTAGGG)$_n$ na procesuiranu genomsku DNA vezanu za najlonsku membranu. Vizualizacija probe koja se vezala za telomernu DNA postiže se autoradiografijom ili tzv. „phosphoimager“ skeniranjem.

Druga je histokemijska metoda Q-FISH, modificirana metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije, koja zahtijeva veliku količinu genomske DNA (2 – 20 mikrograma). Također se rabi qPCR koji služi za kvantitativno određivanje materijala, a u ovom se slučaju određuje omjer telomera naprema jedne kopije gena (T/S omjer) koji se pokazao proporcionalnim prosječnoj duljini telomera u stanici.

2003. Duncan Bird razvio je još jednu tehniku koja se naziva STELA (engl. Single Telomere Elongation Lenght Analysis), kojom se mogu odrediti duljine specifičnih telomernih krajeva, što se nije moglo TRF analizom. Nedostatak ove metode u usporedbi s TRF-om jest u tome što se zbog uporabe PCR-a ne mogu mjeriti telomere veće od 25 kb (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere).

6. Zaštita kromosoma od NHEJ-a

Osim zaštite od gubitka gena prilikom replikacije, što će biti objašnjeno, telomere imaju još jednu zaštitnu funkciju. Nehomologno sparivanje krajeva (NHEJ, engl. Non-homologous end joining) jest put kojim se popravljaju dvolančani lomovi DNA. Termin ”nehomologno” označava da se krajevi izravno spajaju, bez potrebe za homolognim, komplementarnim DNA ili RNA kalupom, koji mora postojati u homolognoj rekombinaciji. Ipak, NHEJ obično upotrebljava vrlo kratke homologne sekvence DNA za vođenje popravka. Te mikrohomologne regije često su jednolančani stršeći krajevi na mjestu gdje se dogodio dvolančani lom.



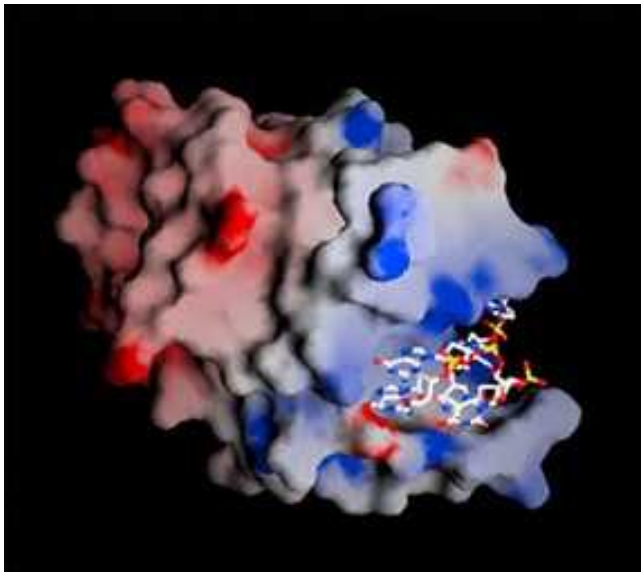
Slika 6. Lijevo: spajanje krajeva DNA nakon dvolančanog loma („ceassure double-brin“) pomoću NHEJ popravka. Desno: krajevi kromosoma su od NHEJ zaštićeni telomernom strukturom (T-omčom – nije prikazana na slici) i proteinima, posebice Rap1.
(Izvor: http://www-dsv.cea.fr/en/institutes/institute-of-cellular-and-molecular-radiation-biology-ircm/productions/scientific-results/the-protein-rap1-protects-genome-integrity-by-preventing-chromosomal-fusions)

Kad su s obje strane loma ti jednolančani stršeći krajevi potpuno komplementarni, odnosno homologni, popravak je vrlo precizan. Neprecizni popravak krajeva koji nisu potpuno homologni može dovesti do translokacija dijelova DNA i fuzije telomera, što su obilježja tumorskih stanica (http://en.wikipedia.org/wiki/NHEJ). Da telomere i njihovi proteini ne postoje, NHEJ put bi krajeve kromosoma, ili kromosoma i dvolančanog loma, prepoznao kao dvolančane lomove koji se trebaju popraviti, što bi rezultiralo kromosomskom fuzijom (Slika 6). Postoji više načina kako se to sprječava. Npr., u plijesni *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein izravno veže telomerne sekvence te je potreban za inhibiciju NHEJ-a. Njegova C-terminalna domena (kraj proteina koji završava karboksilnom skupinom) djeluje u dva paralelna NHEJ-inhibitorna puta s pomoću proteina Rif2 i Sir4. Nadalje, središnja domena Rap1 uspostavlja nekoliko drugih nezavisnih putova za sprječavanje telomerne fuzije (Marcand i sur. 2008). U sljedećem su poglavlju navedeni ostali proteini koji sudjeluju u zaštiti i i funkciji telomera.

7. Proteini koji se vežu na telomere

Postoji veći broj proteina koji se vežu za telomere, uključujući POT1 (engl. protection of telomeres 1, protein za zaštitu telomera 1), koji se veže na jednolančani dio telomera kako bi ga zaštitio od degradacije, te TRF1 (engl. TTAGGG repeat binding factor 1, faktor vezanja za ponavljajući slijed TTAGGG), koji se veže za dvolančani dio. Oba proteina reguliraju aktivnost enzima telomeraze. Prvi otkriveni proteini s afinitetom za telomere bili su izolirani iz trepetljikaša *Oxytricha*. To je bilo moguće jer *Oxytricha* ima milijune malih kromosoma. Ljudski kromosomi, kojih ima samo 23 para, nisu imali dovoljno traženih proteina za

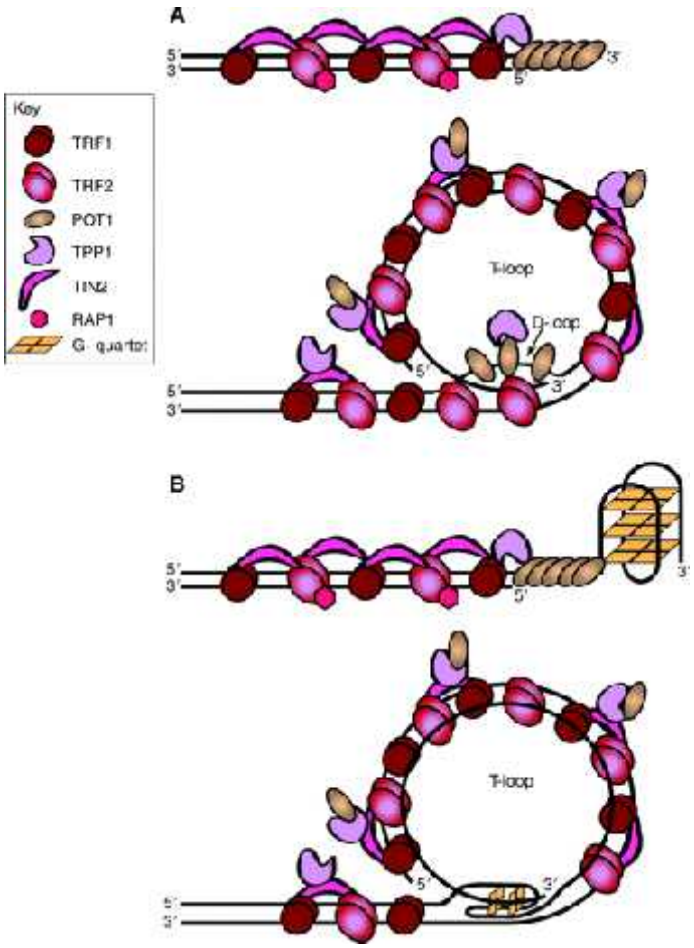
uspješno pročišćavanje. Zbog toga su za njihovo otkriće zaslužne bioinformatičke metode. U genomu plijesni *Schizosaccharomyces pombe* otkrivene su sekvence velike sličnosti (40% sekvenci gena) sa sekvencama trepetljikaša koje kodiraju telomere-vezujuće proteine. Gen u plijesni nazvan je *pot1*. Kulture plijesni kojima je odstranjen *pot1* stvarale su vrlo male kolonije, što ukazuje na problem u diobi stanica. Također, njihovoj DNA nedostajali su telomerni sljedovi. To je dokaz da je *pot1* zaista gen koji kodira za telomere-vezujući protein. Ljudski POT1 otkriven je usporedbom sa sekvencama proteina plijesni – geni im dijele 48% sličnosti. Protein Pot1 u plijesni *S. pombe* ima utor u koji se veže mali dio jednolančane telomerne DNA sekvence GGTTAC, koji je tako zaštićen od degradacije i modifikacije (Slika 7). Ljudski POT1 ima dva utora, te svaki veže sekvencu TTAGGGTTAG, ili, sličnim afinitetom, GGTTAGGTTAG, što čini dva telomerna ponavljanja. Utori tih proteina još se nazivaju OB utorima (engl. oligonucleotid-binding folds, utori koji vežu oligonukleotide) (Horvath 2008).



Slika 7. Protein Pot1 iz *S. pombe* s odsječkom telomerne DNA u OB utoru.
(Izvor: http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html)

Ostali proteini koji vežu jednolančane telomerne sljedove uključuju TEBP u trepetljikašima, Cdc13 u plijesni *Saccharomyces cerevisiae*, te već opisani Pot1, koji je raširen u plijesni *Schizosaccharomyces pombe*, kralješnjacima i biljkama. Spomenuti se ljudski protein TRF1 kao dimer veže na dvolančani dio telomera sa svojom myb-homeodomenom te im regulira duljinu. Kada su telomere kratke, manji je broj i TRF1 proteina, te se telomeraza aktivira i produljuje sekvence. Kada su telomere duge, TRF1

inhibira telomerazu. TRF1 vjerojatno reagira s kompleksom proteina kako bi se potaknulo vezanje POT1 na jednolančani dio telomera, štiteći je od telomeraze. TRF2 dimeri služe za stabilizaciju T-omče. U plijesni (*S. cerevisiae*), za dvolančanu DNA veže se protein Rap1 i Taz1, dok su to u biljkama proteini TBP1, TRP1 i Smh1. U T-omčama, POT1 se veže za jednolančane dijelove – jedan od tri lanca u području D-omče, te za slobodni 3' kraj koji izlazi nakon D-omče (http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html). Protein ESTI je vrlo bitan za aktivnost telomeraze.



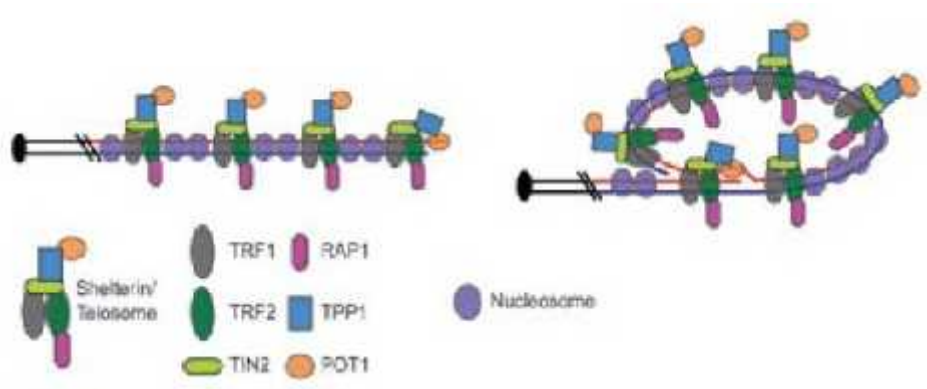
Slika 8. Shematski prikaz kraja kromosoma s proteinima shelterin kompleksa. A: U linearnom obliku telomerne strukture POT1 može biti dovoljan za zaštitu jednolančanog stršećeg kraja. Ispod je prikazana T-omča („T-loop") s D-omčom („D-loop"). B: Antiparalelni G-kvadripleks („G-quartet"), u linearnoj strukturi telomere ili u T-omči, može pružiti dodatnu zaštitu kromosomskog završetka od degradacije enzimima ili produljenja pomoću telomeraze ili ALT-a.
(Izvor: http://jcs.biologists.org/content/122/22/4013/F1.expansion.html)

Ukratko, proteini koji se vežu za telomere (tzv. shelterin kompleks u ljudskim stanicama) služe kao sredstvo za razlikovanje dvolančanog loma i krajeva kromosoma, štiteći ih od NHEJ-a, te za regulaciju duljine telomera djelujući na telomerazu (Slika 8).

Pretpostavlja se da su se proteini koji vežu dvolančane dijelove telomera, dakle koji sadrže myb-domenu, razvili iz transkripcijskih faktora – regulatora ekspresije gena. Proteini s OB utorom vjerojatno su se razvili iz SSB proteina koji štite jednolančanu DNA prilikom popravka i replikacije, zbog velike sličnosti u trodimenzionalnoj strukturi i funkciji (Horvath 2008).

Telomerna DNA ima neobična svojstva replikacije. Točnije, replikacijska vilica ponekad griješi na mjestima vrlo kratkih DNA ponavljanja. Kako bi se taj problem riješio pri replikaciji telomera, replikacijska vilica u interakciji je s određenim proteinima koji vežu telomere, kao što je TRF2, koji mogu spriječiti proklizavanje i netočno prepisivanje replikacijske vilice (Compton i sur. 2008).

Šest proteina koji sudjeluju u održavanju telomerne strukture i signalizacije u ljudskim stanicama nazivaju se shelterin kompleksom ili telosomom (Slika 9). Oni uključuju TRF1, TRF2, POT1, TIN1 (engl. TRF1-interacting protein 1, protein 1 koji djeluje s TRF1, dakle ne veže izravno DNA), TIN2 (engl. TRF1-interacting protein 2, protein 2 koji djeluje s TRF1) i TPP1. Proteini koji se dalje nadovezuju i komuniciraju s telosomom čine telomerni interaktom (Xin i sur. 2008).

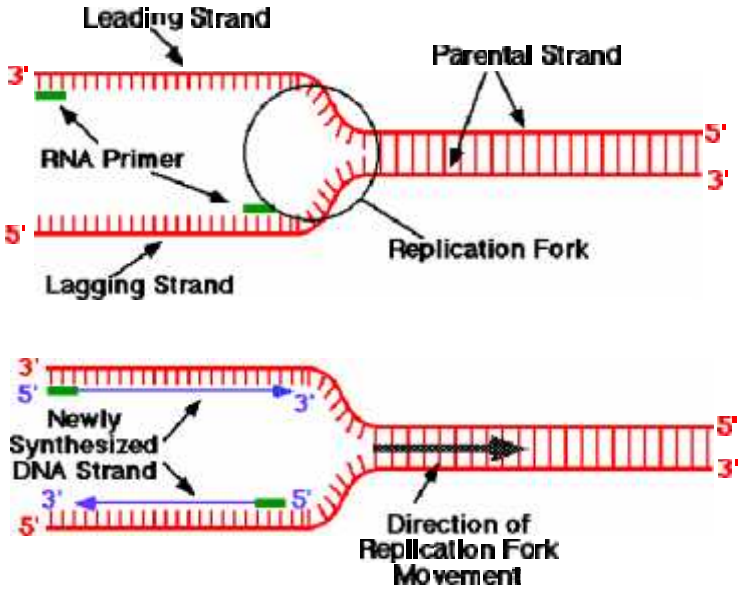


Slika 9. Shelterin kompleks (telosom) („Shelterin/Telosome“) na otvorenoj i zatvorenoj strukturi telomera. Nukleosomi („Nucleosome“) su osnovne strukture kromatina.
(Izvor: Cesare 2008)

8. Replikacija DNA i skraćivanje telomera

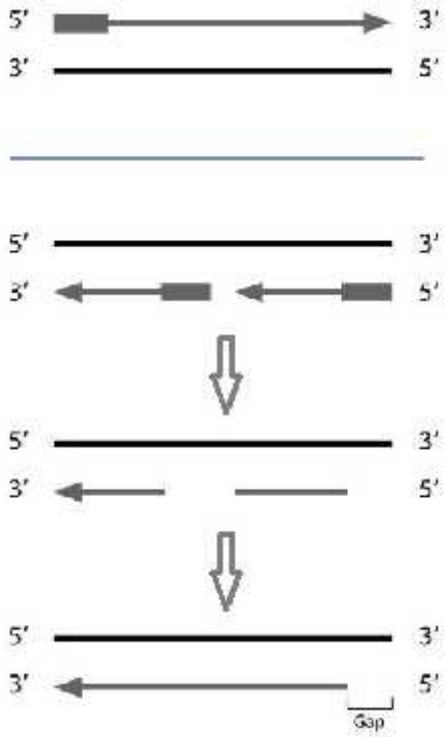
Jedna od najočitijih funkcija telomera jest zaštita od gubitka gena koji bi se dogodili prirodnim procesima u stanici. Kod eukariota, prilikom replikacije DNA dolazi do skraćivanja kromosoma zbog načina replikacije. Sinteza nove DNA uvijek se odvija u istom smjeru – od 5’ kraja prema 3’, što znači da se novi lanac gradi na -OH skupini 3’ kraja, te kako

su komplementarni lanci antiparalelni, lanac koji služi kao kalup čita se od 3' kraja prema 5'. Postoji razlika u načinu sinteze dva lanca jer se sinteza mora događati na istom mjestu u isto vrijeme. Da se dva lanca sintetiziraju kontinuirano, jedan bi se morao nadograđivati u 3'→5' smjeru. Taj su problem riješili Relji Okazaki i suradnici 1960-ih godina. Otkrili su da, dok se jedan lanac sintetizira kontinuirano, drugi lanac to radi diskontinuirano – malo-pomalo, u fragmentima. Kontinuirani lanac produljuje se u 5'→3' smjeru, i to u istom smjeru kojim putuje replikacijska vilica, te se taj lanac naziva vodećim. Diskontinuirani lanac također se sintetizira od 5' prema 3' kraju, no kako je antiparalelan, taj je smjer suprotan od pomicanja replikacijske vilice (Nelson i Cox 2009). Enzim koji dodaje nukleotide i vrši replikaciju naziva se DNA polimeraza. Ona može dodavati nukleotide na OH skupinu 3' kraja samo već postojećeg DNA ili RNA lanca, i zbog toga postoji enzim primaza koji na lancu kalupu sintetizira mali slijed RNA – klicu ili početnicu. Na klici DNA polimeraza sada može započeti nov lanac. Svaki Okazakijev fragment započinje stvaranjem klice (Slika 10). Klica se poslije razgradi, te se praznina ispuni s DNA s pomoću DNA polimeraze i fragmenti se spoje ligazom.



Slika 10. Replikacija DNA s prikazanom replikacijskom vilicom (zaokruženo, „Replication Fork"), lancima kalupima (crveno, „Parental Strand"), novosintetiziranim lancima (ljubičasto, „Newly Synthesized DNA Strand") i početnicama (zeleno, „RNA primer"). „Leading Strand" = vodeći lanac; „Lagging Strand" = diskontinuirani lanac. Kako se replikacijska vilica kreće udesno („Direction of Replication Fork Movement") za diskontinuirani lanac će biti potrebna nova početnica, te će nastati novi Okazakijev fragment.
(Izvor: http://niki-nowhere.tistory.com/249)

Kako se klica stvara na 5' kraju Okazakijeva fragmenta, do problema dolazi na kraju kromosoma na diskontinuiranom lancu. Nakon što se na kraju kromosoma klica razgradi, praznina ostaje, te se ne može popuniti s DNA – jedan lanac ostaje kraći za duljinu klice (Slika 11). Kromosom se tako prilikom svakog dijeljenja stanice, svake mitoze, odnosno kopiranja DNA, skraćuje (http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html).



Slika 11. Novosintetizirani lanci su sive boje, a početnice su podebljane. Iznad plave linije: replikacija vodećeg lanca. Ispod: replikacija diskontinuiranog lanca. Na slici su dva Okazakijeva fragmenta. Na kraju kromosoma ostaje praznina (gap) koja se nije mogla popuniti.
(Izvor: prilagođeno iz http://www.grin.com/en/doc/235582/cryptic-subtelomeric-rearrangements-and-studies-of-telomere-length)

Skraćivanje kromosoma znači gubitak genetičkog materijala, i kako bi to stanici nanijelo što manje štete, materijal koji se gubi nisu vitalni geni, nego telomerni sljedovi. Procjenjuje se da se prilikom svake mitoze u ljudskim stanicama tako ne prepiše oko 100 parova baza telomerne DNA. Tom brzinom, nakon 125 dijeljenja, telomere bi potpuno nestale (http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Telomeres.html). Stanice koje imaju telomere duljine 10-12 kb dijele se 50-60 puta (http://mcb.berkeley.edu/courses/mcb135k/telomeres.html). Taj fenomen ograničavanja broja dijeljenja stanica prvi je primijetio Leonard Hayflick, te se naziva Hayflickova granica. S druge strane, postoji još jedan razlog skraćivanja telomera, a to je oksidacijski stres, što je

pokazalo *in vitro* istraživanje. Oštećenja od slobodnih radikala lošije se popravljaju u telomernoj DNA nego drugdje u kromosomu, što ubrzava skraćivanje telomera, dok ga antioksidansi usporavaju (Von Zglinicki 2000). Skraćivanje telomera zbog slobodnih radikala objašnjava razliku između očekivanog gubitka po mitozi zbog problema replikacije krajeva kromosoma (oko 20 pb), i stvarne brzine skraćivanja (50 – 100 pb) (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere).

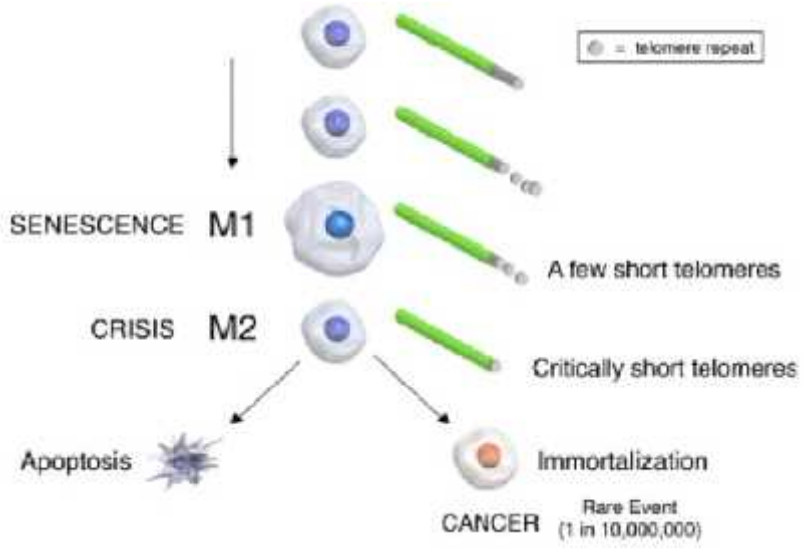
Činjenica da postoji određen broj mitoza koje stanice mogu podnijeti s obzirom na duljinu svojih telomera govori o tome da stanice imaju ograničen rok trajanja, određen životni vijek. Normalne, ne-tumorske stanice ne rastu beskonačno u staničnoj kulturi. Stanice novorođenčeta stavljene u kulturu podijelit će se gotovo stotinu puta. U razdoblju netom prije odumiranja cijele kulture, broj mitoza će se smanjiti. S druge strane, ako stanice u kulturi potječu od osamdesetogodišnjaka, dijelit će se nekoliko desetaka puta prije nego što se prestanu dijeliti i umru. Taj se fenomen zove replikativna senescencija – starenje stanica zbog broja replikacija (http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Telomeres.html). Budući da se stanice u mozgu gotovo ne dijele i ne obnavljaju novima, duljina telomera ne mijenja im se s vremenom (Shay i Wright 2010). Istraživanje na zebama (*Fringillidae*) pokazalo je da postoji izravna veza između početne duljine telomera jedinki i duljine njihova života (Heidinger 2012).

9. Replikativna senescencija i starenje organizma

Osim ako ne sadržavaju telomerazu, enzim koji može produljivati telomere, stanice gube krajeve kromosoma sa svakom mitozom. Općenito, kromosomi starijih životinja imaju mnogo kraće telomere nego kromosomi mladih životinja. Također, telomere se brže troše kod vrsta koje žive kraće. Ovdje se može navesti jedna iznimka – lastorepa burnica, *Oceanodroma leucorhoa*, živi mnogo duže od srodnih vrsta te od ptica iste veličine – 20 godina u prosjeku. Njezine se telomere s vremenom ne skraćuju, nego produljuju (Haussmann i sur. 2003). Nadalje, zaključeno je kako se kod nekih drugih vrsta ptica (jedna je od njih *Fregata minor*) ne može odrediti starost na temelju duljine telomera jer duljine značajno variraju između jedinki iste starosti, te se brzina trošenja telomera smanjuje kod starijih ptica (Juola i sur. 2006). Kod kloniranih životinja duljina telomera može biti kraća jer su se stanice već nebrojeno puta podijelile, no ponekad klonovi imaju duže krajeve kromosoma, što se može objasniti svojevrsnim reprogramiranjem stanica (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere). Stanice galapagoške kornjače (*Geochelone*

nigra), koja živi više od jednog stoljeća, podijele se oko stotinu i deset puta, dok se one od miša podijele oko 15 puta (http://www.senescence.info/cell_aging.html). Nakon što se u ljudskim stanicama izgubi nekoliko kilobaza telomera prilikom replikacijskih ciklusa, stanice se prestaju dijeliti (http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html). Krajevi kromosoma tada sadrže manje od 13 telomernih ponavljanja, čime se gubi njihova zaštitna funkcija, te može doći do abnormalnosti kromosoma i raka. To se može izbjeći ako stanica osjeti svoje stanje koje je opasno za organizam i odabire jedan od dva puta – prestanak dioba ili apoptozu, programiranu staničnu smrt.

Stanična senescencija može se opisati kao stabilan i stalan prestanak proliferacije stanica unatoč vijabilnosti i održanoj metaboličkoj aktivnosti. Ona je najvažniji način borbe protiv tumorigeneze, odnosno nastanka raka, djelujući zajedno sa sustavom programirane stanične smrti. Replikativna senescencija označava prestanak dijeljenja upravo zbog skraćivanja telomera do Hayflickove granice. Kao što je već spomenuto, telomere djeluju kao unutarnji molekularni sat koji govori o povijesti dijeljenja primarne stanice, te je jedan od čimbenika koji određuju duljinu naših života. Kada telomere dosegnu svoju minimalnu duljinu, aktivira se stanični odgovor na oštećenje DNA. Neki su od proteina koji se pojavljuju u takvim stanicama 53BP1, NBS1, MDC1, te kinaze ATM i ATR, koje aktiviraju kinaze CHK1 i CHK2. Komunikacija između staničnog metabolizma i staničnog odgovora na oštećenje DNA odvija se putem fosforilacije određenih proteina staničnog ciklusa, uključujući CDC25 i p53. Sve te promjene zajedno potiču zaustavljanje proliferacije kako bi se oštećenje DNA moglo popraviti. Ako nastala šteta premašuje određenu granicu i mogućnost popravka, stanicama slijedi ili senescencija ili apoptoza. Čimbenici koji upućuju stanicu u jedno od ova dva stanja još uvijek nisu potpuno razjašnjeni, no pretpostavlja se da su tip stanica, intenzitet i trajanje signala, aktivacija određenih putova, kao i tip oštećenja, bitni pri određivanju sudbine takve oštećene stanice. Uz p53, replikativna senescencija povezana je s RB tumor-supresorom i njegovim signalizirajućim molekulama, uključujući kinazu $p16^{INK4A}$. Aktivacija ta dva puta (p53 i pRB put) esencijalna je za indukciju senescencije u mnogim tipovima ljudskih stanica (Kuilman i sur. 2010). U slučaju da je pRB put neaktivan, a p53 aktivan, stanice će ući u apoptozu (Kim i sur. 2002). Neke stanice izbjegnu učinak tih putova i replikativnu senescenciju, no to dovodi samo do ograničenog nastavka proliferacije. Takve stanice će, naposljetku, ući u takozvanu telomernu krizu, koja će rezultirati kromosomskom nestabilnošću i smrću (Kuilman i sur. 2010), ili, umjesto smrti, izlaska iz krize u obliku stanice raka (Slika 12).



Slika 12. „Telomere repeat“ = telomerna ponavljanja. Stanice s vrlo kratkim telomerama ulaze u senescenciju („senescence“), kad je manji udio kratkih telomera („A few short telomeres“), ili apoptozu („Apoptosis“), kad su telomere kritično kratke („Critically short telomeres“). Ako izbjegnu ta dva puta, doći će uskoro do krize stanice („crisis“) koja će zbog genomske nestabilnosti stanicu dovesti do smrti. Rijetke stanice iz krize izlaze kao besmrtne stanice raka („cancer“). Imortalizacija („Immortalization“) je događaj čija je vjerojatnost 1:10000000 („Rare Event, 1 in 10000000“).
(Izvor: Shay 2012)

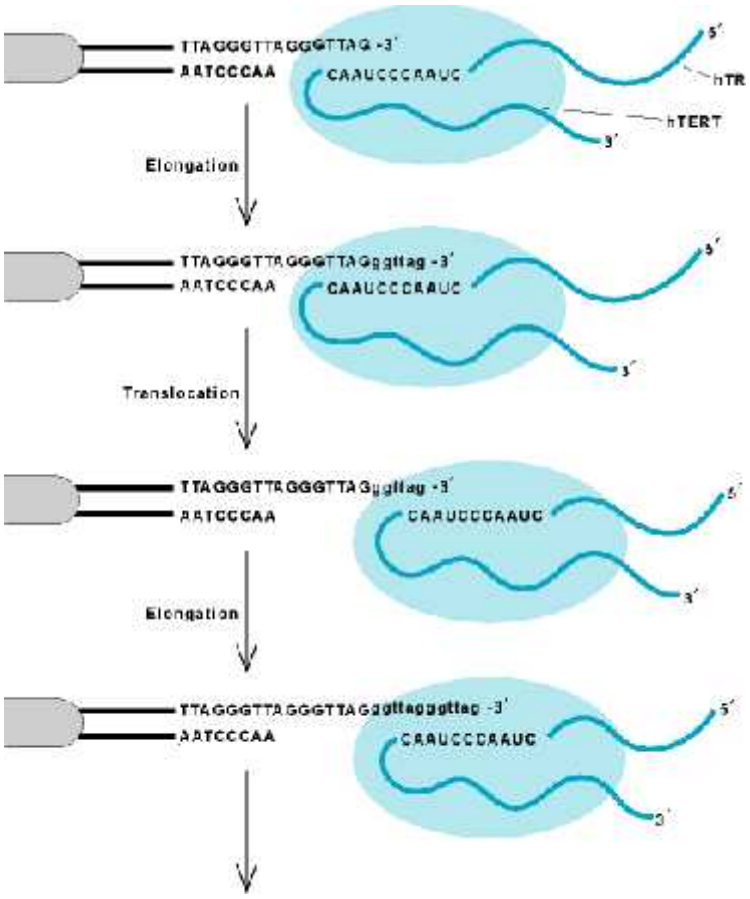
Stanice u senescenciji negativno utječu na tkivo oko sebe, oslobađajući citokine i ostale čimbenike koji mogu poremetiti homeostazu i funkciju tkiva (http://www.senescence.info/cell_aging.html). Odstranjivanje stanica u senescenciji dokazano može spriječiti ili odgoditi oštećenje tkiva koje dolazi sa starošću organizma i produžiti zdravlje miševa (Baker i sur. 2011). Potrebno je napomenuti da su miševi na kojima se provodilo istraživanje imali poremećaj u regulatoru staničnog ciklusa te su zbog toga brže starjeli, što je možda bitno u interpretiranju rezultata. Također, miševima život nije produljen – na kraju su umrli zbog srčanih problema, na što tretman nije utjecao. Može se zaključiti kako telomere igraju bitnu ulogu u starenju organizma, ali osim njih, postoje još mnogobrojni razlozi zašto starimo i umiremo (http://www.senescence.info/cell_aging.html). No vjeruje se da se starenje ipak može ”umjetno” odgoditi s pomoću telomera. Nedavno istraživanje pokazalo je da je uvođenje TERT-a (proteinskog dijela telomeraze) s pomoću virusa u miševe starije dobi smanjilo osteoporozu i netoleranciju na glukozu povezane sa starenjem, poboljšalo je neuromuskulatornu funkciju i djelomično je poboljšalo pamćenje miševa, i to bez očekivana povećanja učestalosti pojave tumora (Bernardes de Jesus i sur. 2012).

Što se tiče konstantnog skraćivanja telomera tijekom vremena, postoje iznimke među stanicama. Neke stanične linije dijele se bez prestanka i nikad ne dostižu replikativnu

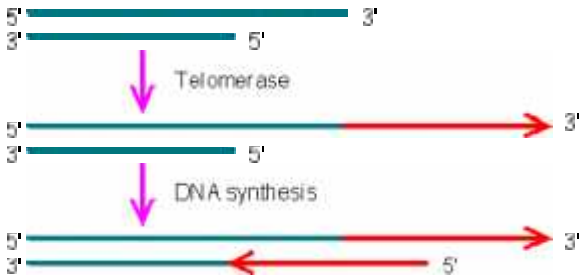
senescenciju. One se nazivaju besmrtnima, te uključuju germinativne stanice, rane embrijske stanice, matične stanice te stanice raka. Pronađene su neke stanice štakora koje su također izbjegle senescenciju, te mišje stanice kojima je potaknuta besmrtnost pod određenim uvjetima u kulturi (http://www.senescence.info/cell_aging.html). Neki jednostanični organizmi, kao što je trepetljikaš *Tetrahymena thermophila*, također ne ulaze u replikativnu senescenciju. Svi ti tipovi stanica imaju sposobnost održavanja duljine svojih telomera, a to čine (najčešće) s pomoću enzima telomeraze (http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Telomeres.html).

10. Telomeraza

Enzim koji dodaje telomerne sekvence na krajeve kromosoma (kod kralješnjaka je telomerni slijed 5'-TTAGGG-3') jest ribonukleoprotein telomeraza. Njegovo postojanje nije iznenađujuće, jer život se nastavlja unatoč stalnu skraćivanju krajeva kromosoma, no mehanizam kojim ovaj enzim djeluje jest. Enzim se sastoji od proteinskog dijela te RNA sekvence. RNA dio je dug oko 150 nukleotida i sadrži otprilike 1,5 kopija pripadnih telomernih ponavljanja. Mali dio RNA veže se za komplementarnu telomernu DNA na samom 3' kraju, te enzim dodaje nove nukleotide na tu početnicu u uobičajenu 5'->3' smjeru, s ostatkom RNA dijela kao kalupom. Nakon što enzim sintetizira jednu kopiju ponavljajućeg slijeda telomera, pomiče se dalje kako bi se produljivanje moglo nastaviti (Slika 13). Telomerazom se produljuje dakle jedan lanac DNA, a drugi lanac se sintetizira s pomoću staničnih DNA polimeraza, počevši od RNA početnice (Slika 14) (Nelson, Cox 2009). Postojanje mehanizma koji će kompenzirati skraćivanje telomera prvi je predvidio sovjetski biolog Alexey Olovnikov 1973., koji je također telomere doveo u vezu sa starenjem i rakom. Telomerazu su otkrili Carol W. Greider i Elizabeth Blackburn 1984. u već spomenutome jednostaničnom trepetljikašu *Tetrahymena*.



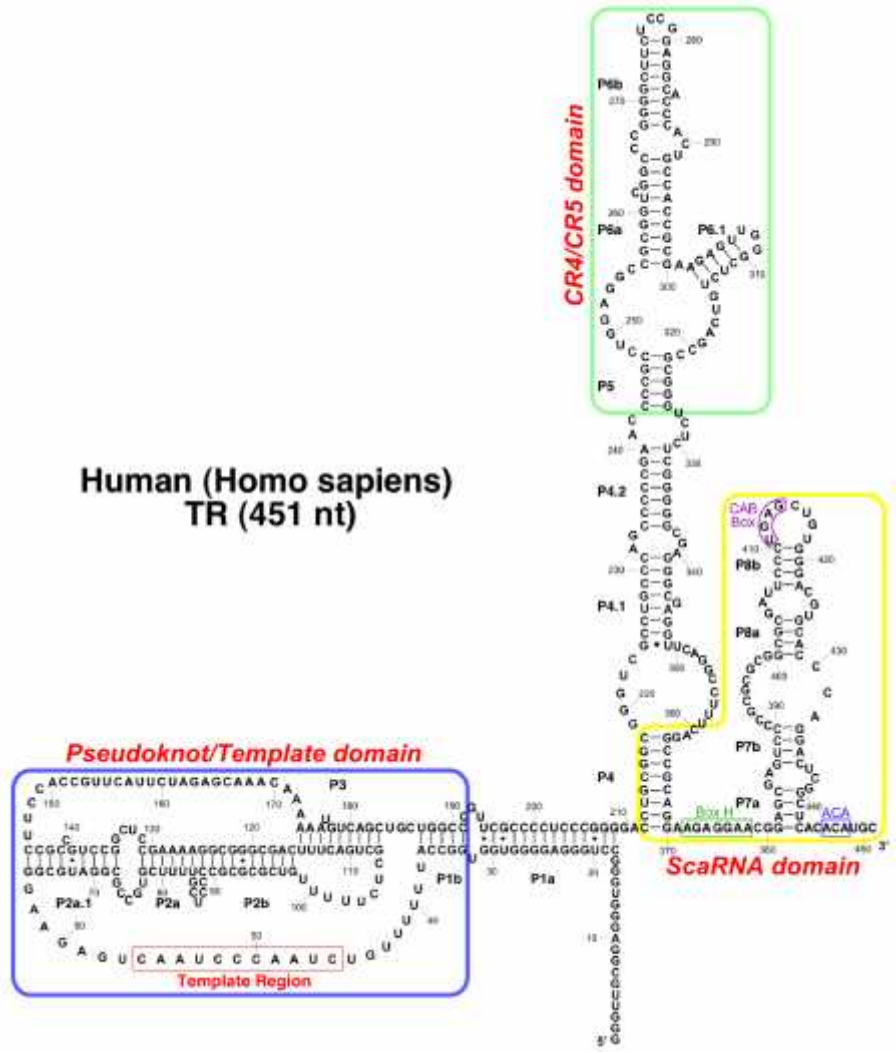
Slika 13. Shematski prikaz mehanizma djelovanja telomeraze. Enzim je označen plavim krugom (proteinska domena) i plavom linijom (enzimska RNA). Malim slovima su označeni novi nukleotidi. Elongacija („Elongation“), translokacija („Translocation“), te novi proces elongacije.
(Izvor: http://accessscience.com/search.aspx?rootID=800188)



Slika 14. Produljenje dva lanca telomera s pomoću telomeraze („Telomerase“) (prvi korak) i DNA polimeraze (drugi korak). „DNA synthesis“ = sinteza DNA.
(Izvor: http://luhurhutama.blogspot.com/2010/10/dna-replication-mutation-and-repair_3238.html)

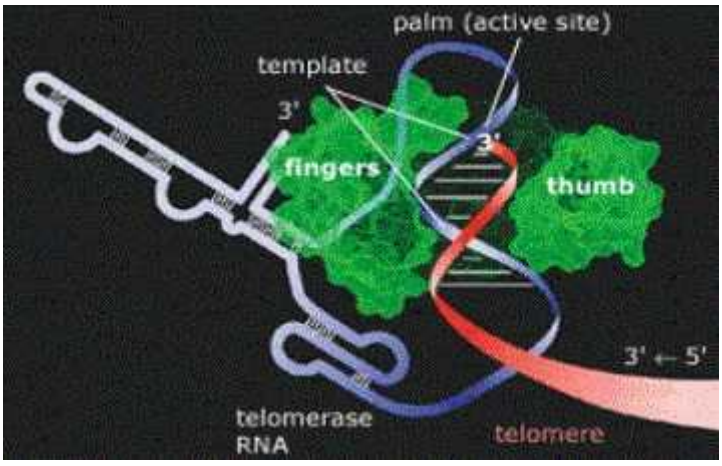
Ljudska telomeraza sastoji se od proteinskog dijela – telomeraze-reverzne transkriptaze (TERT), telomerazne RNA (TR ili TERC), te diskerina (DKC1). Geni za spomenute dijelove enzima razmješteni su na različitim kromosomima ljudskog genoma (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomerase). TERT je katalitička podjedinica enzima. Njezin je

nedostatak kod ljudi povezan s kromosomskim poremećajem Cri du chat, gdje nedostaje dio kraćeg kraka kromosoma 5. Unatoč sličnosti s drugim RNA-ovisnim polimerazama, telomeraze spadaju u posebnu podskupinu proteina zbog vrlo velike sličnosti između različitih organizama (http://en.wikipedia.org/wiki/TERT). TERC se dosta razlikuje u sekvenci i strukturi između kralješnjaka, trepetljikaša i plijesni, no ono što svi dijele jest pseudočvor na 5' kraju lanca, blizu sekvence kalupa. Pseudočvorovi, koji pripadaju sekundarnim strukturama nukleinskih kiselina, obično se nalaze na mjestima gdje je potrebna trodimenzionalna struktura koja se od njih posloži, te su vrlo dobro očuvani tijekom evolucije. Domena oko pseudočvora u telomerazi vitalna je za njezinu aktivnost – ondje se nalazi kalup za sintezu novih telomernih sljedova (Slika 15) (http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoknot).



Slika 15. Sekundarna struktura ljudske telomerazne RNA (hTR) koja sadrži 451 nukleotida. Prikazane su domene („domain") CR4/CR5, ScaRNA, domena pseudočvora („Pseudoknot)" i regija („Region") kalupne („Template") RNA.
(Izvor: http://telomerase.asu.edu/structures.html)

Kao što je već spomenuto, TERT je reverzna transkriptaza, što je klasa enzima koji stvaraju jednolančanu DNA koristeći se jednolančanom RNA kao kalupom. Za razliku od ostalih reverznih transkriptaza, TERT sa sobom nosi vlastiti kalup, TERC – što zajedno čini kompletan enzim telomerazu. Strukturu proteinskog dijela ljudske telomeraze 2007. su otkrili Scott Cohen i njegov tim, a godinu dana poslije, Emmanuel Skordalakes sa svojim timom dekodirao je i otkrio strukturu katalitičke podjedinice TERT-a kukca *Tribolium castaneum* (). Struktura je pokazala četiri konzervirane domene – RNA-vezujuća domena, prsti, dlan i palac – koje su organizirane u konformaciju prstena (Slika 16), te dijele svojstva retrovirusne reverzne transkriptaze, virusne RNA polimeraze i bakteriofagne DNA polimeraze tipa B. Regija koja u TERC-u služi kao kalup jest 3'-CAAUCCCAAUC-5'. Telomeraza veže prvih nekoliko nukleotida za 3' kraj DNA, dodaje novi telomerni ponavljajući slijed (5'-GGTTAG-3'), otpušta se s DNA, pomiče se i veže za novi 3' kraj DNA, te se proces ponavlja (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomerase).



Slika 16. Trodimenzionalna struktura aktivne telomeraze s domenama palca („thumb"), prstiju („fingers") i dlana (aktivno mjesto) („palm (active site)"), te enzimskom RNA (plavo, „telomerase RNA"). (Izvor: http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/parker/protein.html)

Geni za telomerazu, naravno, postoje u svim somatskim stanicama, no razina ekspresije preniska je da bi enzim mogao obavljati svoju funkciju. U relevantnim količinama možemo je naći u germinativnim stanicama, embrijskim matičnim stanicama, nekim jednostaničnim eukariotima kao što je *Tetrahymena*, u vjerojatno svim odraslim matičnim stanicama, te prastanicama određenih staničnih linija (prastanice se mogu diferencirati u određen tip stanica, oligopotentne su). Kada se normalne somatske stanice u laboratoriju

transformiraju s DNA koja eksprimira velike količine telomeraze, one se nastavljaju mitotski dijeliti dugo nakon što se trebala pojaviti replikativna senescencija, i to čine bez daljnjih gubitaka telomera. To su prvi primijetili Bodnar i suradnici 1998., pružajući čvrst dokaz da su telomeraza i održavanje duljine telomera ključ za besmrtnost stanica (http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Telomeres.html). Telomeraza je eksprimirana u aktiviranim ljudskim T-stanicama, no unatoč tome, i one nakon nekog vremena izgube svoje telomere i uđu u senescenciju. U nekim slučajevima telomeraza nije dovoljna da bi spriječila odumiranje stanica. Npr., sam enzim ne može spriječiti fibroblaste u kojima postoji signal (prevelika oštećenja DNA, ili mutirani RAS protein koji bez prestanka signalizira stanici da se nekontrolirano dijeli – čija je posljedica rak) da uđu u senescenciju. Kao što je već zaključeno, senescencija je vjerojatno evoluirala na način da spriječi tumorigenezu (Kim 2002).

Osim navedenih staničnih tipova, još jedna vrsta stanica eksprimira telomerazu u velikim količinama – 85 – 90% tumora koristi se telomerazom kako bi se stalno i nekontrolirano dijelile http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Telomeres.html). Ostali tumori za produljenje krajeva kromosoma ne upotrebljavaju telomerazu, već drugačiji način produljenja telomera – ALT (engl. alternative lenghtening of telomeres, alternativno produljenje telomera).

11. Telomere i rak

Kao što je već spomenuto, stanice koje inaktiviraju p53 i pRB putove, odnosno uspiju na neki način ne ući u senescenciju, ulaze u krizu. Kriza je okarakterizirana velikim kromosomskim promjenama i rearanžmanima, i genomskom nestabilnošću, što dovodi do smrti većine stanica. One stanice koje prežive krizu postale su besmrtne – s pomoću telomeraze ili ALT-a, produljujući svoje telomere.

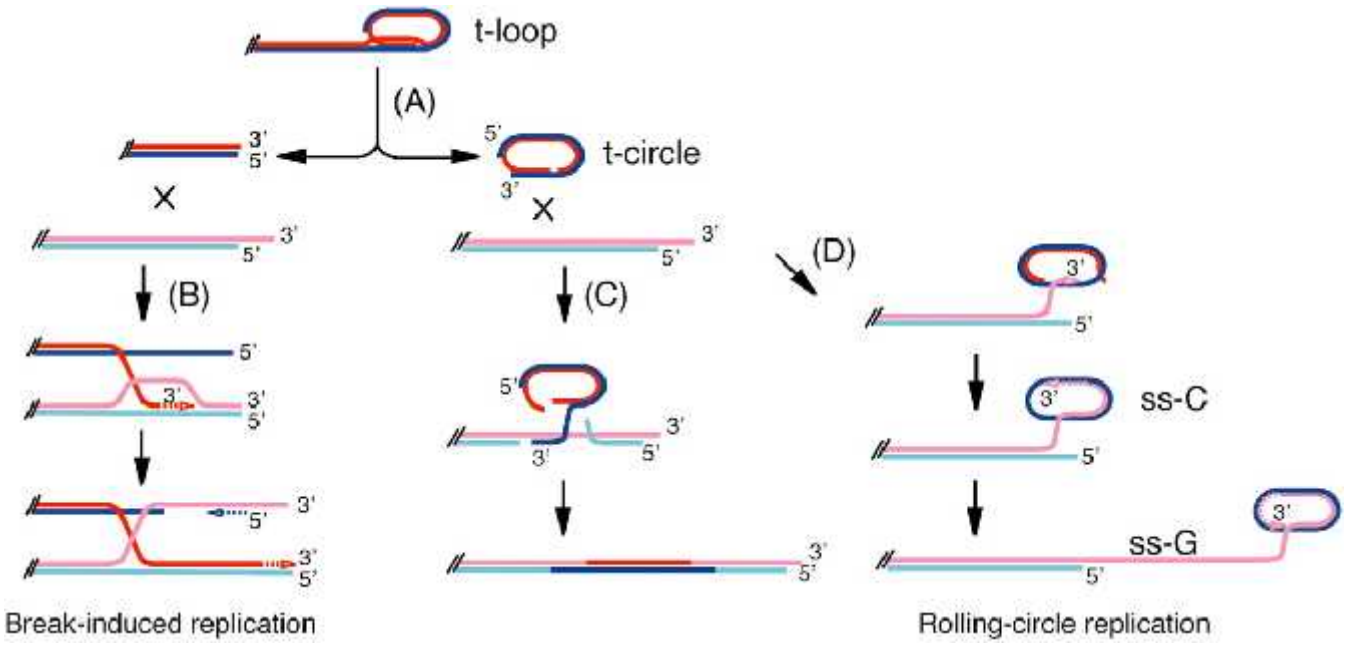
11.1 Alternativno produljenje telomera

Oko 10% tumorskih stanica upotrebljava ALT, no to varira u različitim vrstama raka. Staničnu liniju koja je prva upotrebljavala ALT opisao je tim Murnane i suradnika 1994., a opis je uključivao telomere koje su vrlo heterogene u svojim duljinama, te su pretpostavili da je ALT mehanizam koji uključuje rekombinaciju. Rekombinacija je lom i ponovno spajanje

DNA lanaca, nakon čega nastaju nove, drugačije molekule DNA. Može se dogoditi između sličnih molekula DNA, kao što je homologna rekombinacija (HR) u, primjerice mejotskoj diobi stanica, te između molekula koje ne dijele mnogo homologije, što se događa u, npr., nehomolognom spajanju krajeva (NHEJ) (objašnjeno u 6. poglavlju).

Postojanje ALT-a potvrđeno je na temelju promatranja duljine telomera stanica bez aktivnosti telomeraze kroz stotine njihovih dijeljenja. i to Telomere u ALT stanicama, za razliku od normalnih, prolaze kroz postreplikativne promjene – rekombinacijsku izmjenu sestrinskih ili nesestrinskih kromatida. Stvaranje ekstrakromosomalnih T-krugova iz T-omči povezano je s TRF2 proteinom kojem nedostaje centralna domena, te s nedostatkom POT1, koji inače sprječavaju razrješenje T-omče, što potpomažu proteini NBS1 i XRCC3. Ta tri rekombinacijska događaja – produljenje, postreplikativne izmjene i razrješenje T-omče – obilježja su telomera ALT stanica (Cesare i Reddel 2008).

Osim jednostavne HR, drugi tip ALT produljenja uočen je u plijesnima *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces lactis*. U tim se vrstama odvija tzv. replikacija kotrljajućeg kruga na T-krugovima, čemu slijedi produljenje ostalih kromosomskih krajeva homolognom rekombinacijom – ”roll and spread” model (Slika 17). Postoji više varijacija takve replikacije. To se vjerojatno događa i u ALT stanicama sisavaca. Osim ova dva modela, postoji još mogućnosti alternativnog produljenja telomera u besmrtnim stanicama te se točni mehanizmi još istražuju.



Slika 17. Četiri tipa rekombinacijskih događaja u metabolizmu telomerne DNA u ALT stanicama. A: rekombinacija unutar T-omče („t-loop“) uzrokuje brzo skraćivanje telomera i formiranje

ekstrakromosomskih T-krugova („t-circle“). B: Rekombinacija između telomera različitih kromosoma potiče replikaciju koja inače služi za popravak DNA lomova („Break-induced replication“). C: Prodiranje jednog lanca T-kruga u telomere započinje elongaciju sljedova. D: Invazija jednog lanca telomera u T-krug potiče ‘’roll and spread’’ model ALT-a, odnosno replikaciju kotrljajućeg kruga („Rolling-circle replication“). Ss-C označava jednolančanu DNA bogatu C bazama, a ss-G bogatu G bazama. (Izvor: **http://jb.oxfordjournals.org/content/149/1/5/F3.expansion.html**)

U normalnim stanicama HR je potrebna za obradu krajeva telomera (T-omče) nakon DNA replikacije, tako da se mora stalno održavati ravnoteža između poželjne HR i potiskivanja produljenja telomera s pomoću HR. Telomere bez dobre zaštite krajeva češće podliježu homolognoj rekombinaciji, što uključuje vrlo kratke, potrošene telomere koje više nemaju mnogo zaštitnih proteina (najbitniju ulogu ima gubitak TRF2) pa gube mogućnost suzbijanja telomerne HR.

Postoji mogućnost da se neke ljudske stanice, pogotovo one koje se dijele često, koriste mehanizmom sličnim onom u ALT stanicama za popravak slučajno oštećenih telomera, kako se ne bi trebala aktivirati telomeraza i tako riskirati da stanica postane besmrtna. U tom slučaju, regulacija popravka telomere homolognom rekombinacijom morala bi biti strogo kontrolirana iz istog razloga. Iz toga možemo pretpostaviti kako se ALT u tumorskim stanicama razvio zbog gubitka tih regulatornih mehanizama (Cesare i Reddel 2008).

11.2 Telomeraza u stanicama raka i matičnim stanicama

Razlika između telomera matičnih stanica, koje se *in vivo* ne dijele aktivno kao što to čine *in vitro*, i embrionalnih matičnih stanica jest da su u potonjim telomere stalne duljine, dok se u odraslim matičnim stanicama one ipak skraćuju s vremenom. To je zato što je telomeraza konstantno aktivna u embrionalnim matičnim stanicama, dok u odraslima njezina aktivnost nije dovoljno visoka da održava stalnu duljinu telomera. Bitna razlika između matičnih stanica i stanica raka je da matične stanice polako gube svoje telomere zbog pozorno regulirane aktivnosti i nekontinuirane ekspresije telomeraze, dok ih stanice raka ne gube. Kad se embrionalne matične stanice podijele, to čine simetrično – stanice koje nastanu imaju isti stupanj aktivnosti telomeraze. Tijekom kasnije organogeneze, tkivne matične stanice dijele se na asimetričan način tako da jedna stanica-kći ostaje matična stanica, ulazi u mirujući stadij u kojem se ne dijeli, te se aktivnost telomeraze utiša. Druga stanica-kći postaje oligopotentna umnožavajuća prastanica koja ima veći stupanj ekspresije telomeraze. Još nije

potpuno razjašnjeno kako se događa takva dioba. Prastanice nisu besmrtne kao što su matične jer poslije ulaze u diferencijaciju, pa je to njihov svojevrstan kraj.

Matične stanice raka sposobne su inicirati tumore i diferencirati se u različite linije tumorskih stanica. Terapija koja se ne bazira na uništavanju specifično tih tumorskih matičnih stanica najčešće dovodi do ponovnog pojavljivanja, progresije i metastaziranja raka. Postoje brojne razlike između normalnh i tumorskih matičnih stanica koje se još utvrđuju. Jedna od njih su i vrlo kratke telomere tumorskih matičnih stanica, što pogoduje teoriji da su se razvile iz normalnih matičnih stanica kada su trebale ući u senescenciju ili apoptozu zbog oštećenja telomera, no umjesto toga razvile su način kako da prežive, djelomično obnove telomere i počnu se aktivno dijeliti (Shay i Wright 2010).

12. Ljudsko zdravlje i telomere

Trenutačno se razvijaju cjepiva za ljude kojima bi se inhibirala telomeraza u stanicama raka i tako ih vratila na prirodan put odumiranja nestabilnih stanica kratkih telomera. Cjepiva će naučiti imunološki sustav da prepozna i napadne stanice raka koje eksprimiraju telomerazu. U jednom istraživanju je otkriveno da čak i stanice koje se koriste ALT-om odumiru kad je telomerazi prilikom terapije mutirana RNA domena (http://en.wikipedia.org/wiki/Telomerase).

Neki znanstvenici predlažu telomerazu kao sredstvo pomlađivanja organizma, produljenja života i obnavljanja organa, te sprječavanja pojave raka. Drugi istraživači smatraju kako je vrlo opasno tako upotrebljavati telomerazu dok se ne pronađe siguran način kako da visoke razine telomeraze ne potaknu stvaranje raka. Ronald DePinho, onkološki genetičar koji je 2010. godine s pomoću telomeraze uspio obnoviti zdravlje organa miševa koji su degradirali zbog starosti, smatra da će se jednog dana terapija telomerazom uspješno kombinirati s drugim terapijama koje ciljaju na biološke putove starenja. To bi moglo produljiti život i zdravlje ljudi (http://www.nature.com/news/2010/101128/full/news.2010.635.html). Kao što je već spomenuto u 9. poglavlju, u nedavnom istraživanju uspjeli su produžiti život dvaju miševa, jednoga starog jednu godinu i drugog dvije, za 24 i 13%, i to bez povećanja učestalosti tumora u odnosu na kontrolne miševe (Bernardes de Jesus i sur. 2012).

Buduća istraživanja mogla bi otkriti vrijedne informacije za borbu protiv raka, ublažavanje i usporavanje starenja i poboljšavanja medicinskih terapija u različitim područjima, poput presađivanja kože, transplantacije koštane srži i srčanih bolesti (http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shay-wright/intro/facts/sw_facts.html).

13. Literatura

Baker D. J., Wijshake T., Tchkonia T., LeBrasseur N. K., Childs B. G., van de Sluis B, Kirkland J. L., van Deursen J. M. (2011): *Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders.* Nature; 479(7372): 232-6.

Bernardes de Jesus B., Vera E., Schneeberger K., Tejera A. M., Ayuso E., Bosch F., Blasco M. A. (2012): *Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer.* EMBO Mol Med; 4: 691-704.

Burge S., Parkinson G. N., Hazel P., Todd A. K., Neidle S. (2006): *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure.* Nucleic Acids Res. 34(19): 5402-5415.

Cesare A. J., Reddel R. (2008): *Alternative Lengthening of Telomeres in Mammalian Cells*. Iz knjige Nosek J., Tomáska L.: *Origin and Evolution of Telomeres*. Landes Bioscience, Austin.

Compton S. A., Cesare A. J., Fouche N., Ozgur S., Griffith J. D. (2008*)*: *T-Loops, T-Circles and Slippery Forks*. Iz knjige Nosek J., Tomáska L.: *Origin and Evolution of Telomeres*. Landes Bioscience, Austin.

Fajkus J., Leitch A. R., Chester M., Sýkorová E. (2008): *Evolution, Composition and Interrelated Functions of Telomeres and Subtelomeres: Lessons from Plants.* Iz knjige Nosek J., Tomáska L.: *Origin and Evolution of Telomeres.* Landes Bioscience, Austin.

Haussmann M. F., Winkler D. W., O'Reilly K. M., Huntington C. E., Nisbet I. C. T., Vleck C. M. (2003): *Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short–lived ones*. Proc. R. Soc. Lond. B; 270(1522): 1387-1392.

Heidinger B. J., Blount J. D., Boner W., Griffiths K., Metcalfe N. B., Monaghan P. (2012): *Telomere length in early life predicts lifespan*. PNAS; 109(5): 1743-1748.

Horvath M. P. (2008): *Evolution of Telomere Binding Proteins*. Iz knjige Nosek J., Tomáska L.: *Origin and Evolution of Telomeres*. Landes Bioscience, Austin.

Juola F. A., Haussmann M. F., Dearborn, D. C., Vleck, C. M. (2006): *Telomere shortening in a long-lived marine bird: Cross-sectional analysis and test of an aging tool*. The Auk; 123 (3): 775.

Kim S., Kaminker P., Campisi J. (2002): *Telomeres, aging and cancer: In search of a happy ending.* Oncogene; 21: 503-511.

Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W. J., Pepper D. S. (2010): *The essence of senescence*. Genes & Dev.; 24: 2463-2479.

Marcand S, Pardo B, Gratias A, Cahun S, Callebaut I. (2008): *Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres.* Genes Dev.; 22(9): 1153-8.

Nelson D. L., Cox M. M. (2009): *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York.

Shay J. W., Wright W. E. (2010): *Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells*. FEBS Letters; 584(17): 3819-3825.

Sherwood R., Casjens, Wai Mun Huang (2008): *Prokaryotic Telomeres: Replication Mechanisms and Evolution.* Iz knjige Nosek J., Tomáska L.: *Origin and Evolution of Telomeres.* Landes Bioscience, Austin.

Von Zglinicki, T. (2000): *Role of Oxidative Stress in Telomere Length Regulation and Replicative Senescence*. Annals of the New York Academy of Sciences; 908: 99-110.

Xin H., Liu D., Songyang Z. (2008): *The telosome/shelterin complex and its functions*. Genome Biol.; 9(9): 232.

http://accessscience.com/search.aspx?rootID=800188

http://camillaschemistryadventure.blogspot.com/

http://en.wikipedia.org/wiki/NHEJ

http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoknot

http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere

http://en.wikipedia.org/wiki/Telomerase

http://en.wikipedia.org/wiki/TERT

http://en.wikipedia.org/wiki/SnoRNA

http://jb.oxfordjournals.org/content/149/1/5/F3.expansion.html

http://jcs.biologists.org/content/122/22/4013/F1.expansion.html

http://luhurhutama.blogspot.com/2010/10/dna-replication-mutation-and-repair_3238.html

http://mcb.berkeley.edu/courses/mcb135k/telomeres.html

http://niki-nowhere.tistory.com/249

http://telomerase.asu.edu/structures.html

http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Telomeres.html

http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/parker/protein.html

http://www.bss.phy.cam.ac.uk/~jlh29/

http://www.grin.com/en/doc/235582/cryptic-subtelomeric-rearrangements-and-studies-of-telomere-length

http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html

http://www.mnhn.fr/mnhn/bpy/team3/previousachievment_team3.htm

http://www.nature.com/news/2010/101128/full/news.2010.635.html
http://www.senescence.info/cell_aging.html
http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shay-wright/intro/facts/sw_facts.html
http://www-dsv.cea.fr/en/institutes/institute-of-cellular-and-molecular-radiation-biology-ircm/productions/scientific-results/the-protein-rap1-protects-genome-integrity-by-preventing-chromosomal-fusions

14. Sažetak

Na krajevima linearnih kromosoma nalaze se nekodirajući zaštitni sljedovi DNA, telomere. Čine ih kratke ponavljajuće sekvence, npr. TTAGGG kod kralješnjaka, te proteini koji ih štite i sudjeluju u njihovoj funkciji. Jedna od njih jest razlikovanje krajeva kromosoma od dvolančanog loma kako ih stanični mehanizmi (NHEJ) ne bi "popravili" i uzrokovali fuzije kromosoma i nepoželjne rearanžmane koji bi doveli do krize stanice ili raka. Zbog problema replikacije krajeva kromosoma, DNA se skraćuje prilikom svake stanične diobe. Kako se ne bi gubili geni, gube se telomere, sve dok ne dostignu tzv. Hayflickovu granicu kada se stanica prestaje dijeliti zbog nezaštićenih kromosoma. Neke stanice i nestanični organizmi eksprimiraju enzim telomerazu koji produljuje telomere s pomoću svoje proteinske domene i RNA kalupa. Telomerazu eksprimiraju npr. matične stanice, te stanice raka. Potonje su uspjele ugasiti pRB i p53 putove koji dovode do senescencije stanica ili apoptoze, te povećati aktivnost telomeraze kako bi postale besmrtne. Također se koriste i alternativnim putovima produljenja telomera koji uključuju homolognu rekombinaciju. Pretpostavlja se da je senescencija evoluirala kako bi se spriječila tumorigeneza. Znanstvenici su, ipak, uspjeli usporiti starenje miševa s pomoću telomeraze bez povećanja učestalosti stvaranja tumora. Kako je skraćivanje telomera jedan od razloga zašto starimo, u budućim će se istraživanjima možda pronaći način kako da se produži ljudski život. Također, cjepiva za rak temeljena na telomerazi već se testiraju, s uspješnim rezultatima.

15. Summary

Telomeres are non-coding protective sequences found at the end of linear chromosomes. They are made of repeating sequences, for example TTAGGG in vertebrates, and proteins that protect them and participate in their function. One of their functions is to

distinguish the ends of the chromosomes from double-strand breaks – to prevent a cellular repair mechanism (NHEJ) from 'repairing' them which would lead to chromosome fusion and rearrangements, and, eventually, cell crisis or cancer. Because of the chromosome end replication problem, DNA is shortening with every cell division. In order to preserve genes from eroding, telomeres are the ones that are being lost, for until they reach the Hayflick limit when the cell stops dividing because of unprotected chromosomes. Some cells and non-cellular organisms express an enzyme called telomerase which lengthens telomeres with its RNA template and protein domain. Telomerase is expressed, for example, in stem and cancer cells. The later have succeeded to shut down pRB and p53 pathways that would lead to cellular senescence or apoptosis, and to increase the activity of telomerase, making themselves immortal. Cancer cells also use alternative telomere lengthening mechanisms that include homologous recombination. It is assumed that senescence has evolved in a way to prevent tumorigenesis. Scientists, however, have succeeded to slow down ageing in mice with telomerase, without an increase in tumour occurrence. Telomere shortening is one of the reasons why we age, so future research could find a way to expand human lifespan. Additionally, vaccines for cancer based on telomerase are already being tested, with successful results.