

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Telomere i njihove funkcije
Telomeres and Their Functions
SEMINARSKI RAD

Barbara Jeluši
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. Otkri e 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 skra ivanje 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 mati nim stanicama.....	22
12. Ljudsko zdravlje i telomere	23
13. Literatura.....	24
14. Sažetak	26
15. Summary	26

1. Uvod

Nitko ne može sa sigurnoš u re i 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, nose i sa sobom kroz evoluciju najuspješnije značajke. Neki su se mehanizmi pokazali toliko uspješnima da ih dijelove ina sadašnje populacije Zemlje, no to ne zna i 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 elemenata 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 štite 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 štite i gene, skrću se. 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, pretpostavljaju i da one određuju maksimalnu duljinu naših života. Ono što može spriječiti nestanak telomera i obnoviti ih kako bi određene stanice 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 (guanina, 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 tre em atomu ugljika še era. Geni su bilo koji slijed nukleotida na DNA koji kodira za protein ili za molekulu RNA sa strukturnom ili kataliti kom funkcijom. Kompleksniji genomi, npr. oni eukariota, posloženi su u kromosome više organizacije kako bi bili kompaktniji i kako bi se omogu ila bolja regulacija prijenosa informacije tj. proizvodnje produkata gena. Ne transkribiraju se svi dijelovi DNA. U ljudskom genomu geni ine 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 ine visoko ponavljaju e sekvence (SSR – engl. simple sequence repeats, jednostavne ponavljaju e sekvence), obi no 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 odre ene funkcije u strukturi kromosoma – one ine centromere i telomere. Kromosom se sastoji od kromatina. Osnovna struktura kromatina kojega ini molekula DNA koja se namata oko histonskog oktamera je nukleosom. Kromosomi postaju uo ljivi tek prilikom ja e kondenzacije tijekom stani ne diobe, mitoze.

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



Slika 1. Kromosomi u najja em stupnju kondenzacije. Telomere su ozna ene žutom bojom.
(Izvor: <http://camillaschemistryadventure.blogspot.com>)

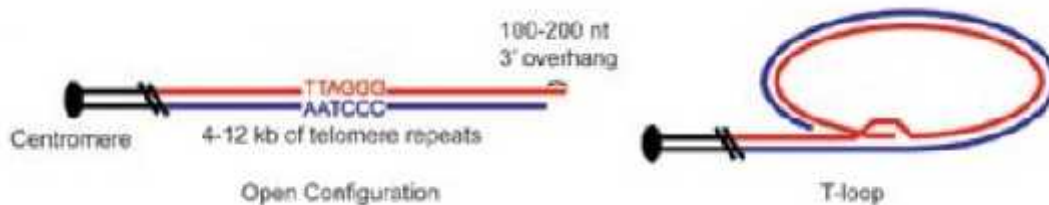
3. Otkri e telomera

U sedamdesetim godinama prošlog stolje a, ruski teoreti ar Alexei Olovnikov otkrio je da kromosomi ne mogu u potpunosti replicirati svoje krajeve. Imaju i 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 ponavljanja ih sekvenci koje 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

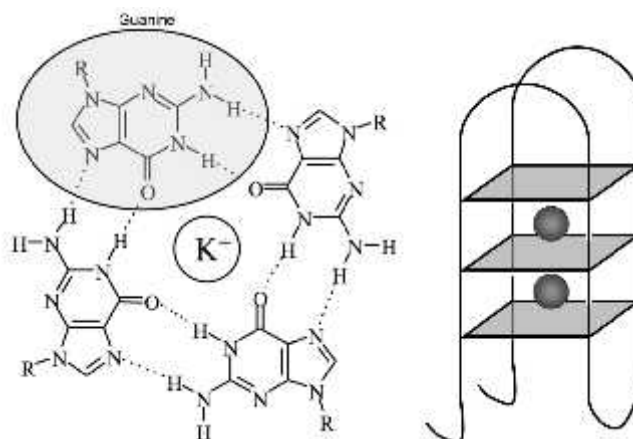
Kako se telomere nalaze na krajevima linearnih kromosoma, veina prokariota, budu i da nema takvo linearno uređenje, nema telomere. Cirkularni kromosomi nemaju problem replikacije krajeva pa telomere nisu potrebne. Mali je udio bakterijskih kromosoma (npr. u *Streptomyces* i *Borrelia*) linearan i posjeduje telomere, koje se bitno razlikuju od eukariotskih u strukturi i funkciji. Dužina telomera veoma se razlikuje između vrsta, pa takopljesan 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 omene nazvane T-omene (Slika 2) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere>). T-omene mogu tvoriti ekstrakromosomalne T-krugove koji su povezani s alternativnim produljenjem telomera (ALT). Na kraju T-omene jednolančana se telomerna DNA uvučuje u regiju dvolančane DNA, između dva lanca, remete i njihovu strukturu. Trolančana struktura stabilizirana je proteinima i naziva se D-omana (Compton i sur. 2008).



Slika 2. Lijevo: otvorena struktura („Open Configuration“) ljudske telomerne DNA s prikazanom ponavljanju om sekvencom veli ine 4-12 kb („4-12 kb of telomere repeats“) i jednolan anim strše im 3' krajem duljine 100-200 nukleotida („100-200 nt 3' overhang“). Crni krug ozna vava centromeru („Centromere“). Desno: zatvorena telomerna struktura, T-om a („T-loop“).

(Izvor: Cesare 2008)

Kako su telomere bogate G bazama, na jednolan anom 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 tetrađe gvanina spojenih vodikovim vezama neobi ajenim Hoogsteen sparivanjem. Tetrađe su postavljene jedna povrh druge te tako ine kvadriplekse (Burge i sur. 2006). (Slika 3).

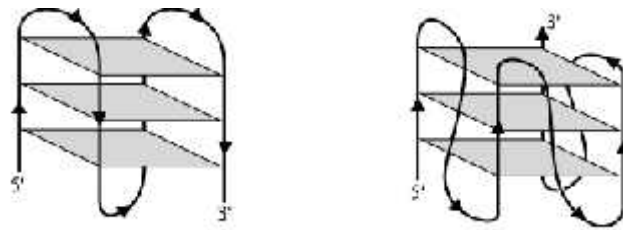


Slika 3. Lijevo: tetrađa gvanina („Guanine“) u kompleksu s kationom K^+ . Desno: tetrađe posložene jedna povrh druge u G-kvadripleks kojeg ini jedna molekula DNA.

(Izvor: <http://www.bss.phy.cam.ac.uk/~jlh29/>)

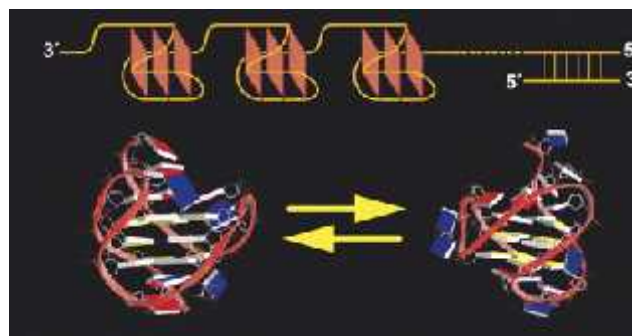
Lanci koji ih ine mogu biti orijentirani na razli ite na ine i ne moraju potjecati od iste DNA (ili RNA) molekule. G-kvadripleksi na eni su i u telomernoj i u ne-telomernoj DNA. Ljudske telomerne sekvence $d[AG_3(TTAGGG)_3]$ tvore antiparalelne G-kvadriplekse u Na^+ otopini, dok u K^+ otopini tvore kvadriplekse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

slaganja o to je vrlo mala i time su omogu ene varijacije (Slika 5). To nija 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/previousachievement_team3.htm)



Slika 5. Gore: model G-kvadripleksa u ljudskoj telomernoj DNA. Dolje: trodimenzionalna struktura dvaju mogu ih 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 zapo injanju 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

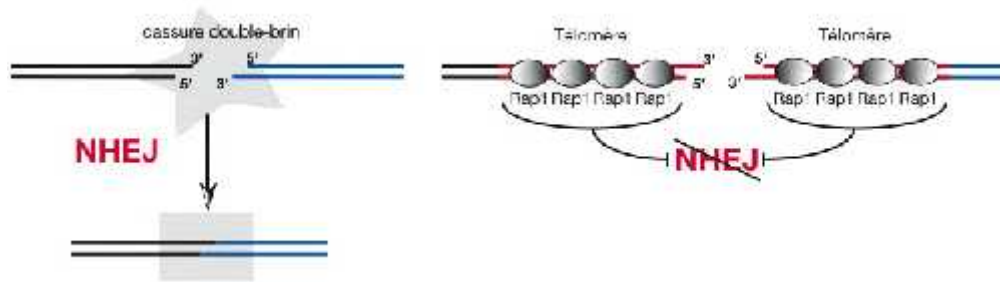
Rabi se nekoliko tehnika za određivanje duljine telomera u eukariotskim organizmima. Najčešća je metoda „TRF (engl. Terminal Restriction Fragment) southern blot“, što uključuje hibridizaciju radioaktivnog oligonukleotida ^{32}P -(TTAGGG)_n na procesuiranu genomsku DNA vezanu za najlonsku membranu. Vizualizacija probe koja se vezala za telomernu DNA postiže se autoradiografijom ili tzv. „phosphorimager“ 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 slučaju određuje omjer telomera naprema jedne kopije gena (T/S omjer) koji se pokazao proporcionalnim prosječnom duljini telomera u stanici.

2003. Duncan Bird razvio je još jednu tehniku koja se naziva STELA (engl. Single Telomere Elongation Length 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 dvostrani 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 svođenje popravka. Te mikrohomologe regije često su jednostrani stršci i krajevi na mjestu gdje se dogodio dvostrani lom.



Slika 6. Lijevo: spajanje krajeva DNA nakon dvostranog loma („cassure double-brin“) pomoću NHEJ popravka. Desno: krajevi kromosoma su od NHEJ zaštićeni telomernom strukturom (T-omom – nije prikazana na slici) i proteinima, posebice Rap1.

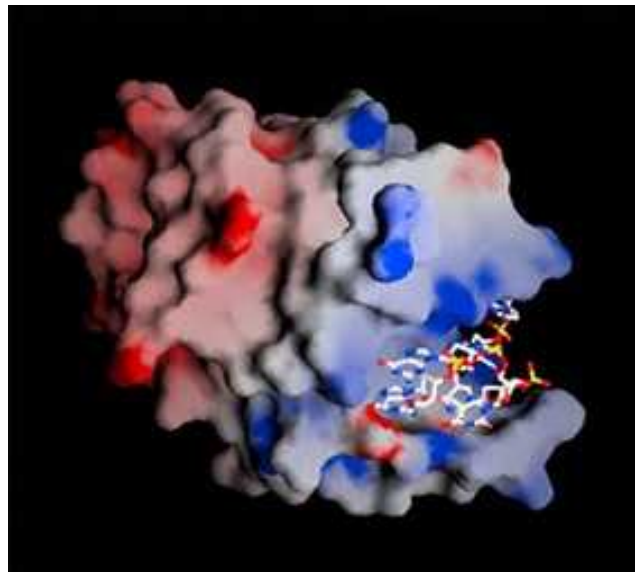
(Izvor: <http://www-dsv.cea.fr/en/institutes/institute-of-cellular-and-molecular-radiation-biology-ircm/productions/scientific-results/the-protein-rap1-protects-genome-integrity-by-preventing-chromosomal-fusions>)

Kad su s obje strane loma ti jednolanani ili strše i 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 dvostranog loma, prepoznao kao dvostrane 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 funkciji telomera.

7. Proteini koji se vežu na telomere

Postoji veliki broj proteina koji se vežu za telomere, uključujući i POT1 (engl. protection of telomeres 1, protein za zaštitu telomera 1), koji se veže na jednolanani dio telomera kako bi ga zaštitio od degradacije, te TRF1 (engl. TTAGGG repeat binding factor 1, faktor vezanja za ponavljajuć i slijed TTAGGG), koji se veže za dvostranani 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 proširavanje. 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 utora u koji se veže mali dio jednolanane 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 utorama (engl. oligonucleotide-binding folds, utori koji vežu oligonukleotide) (Horvath 2008).

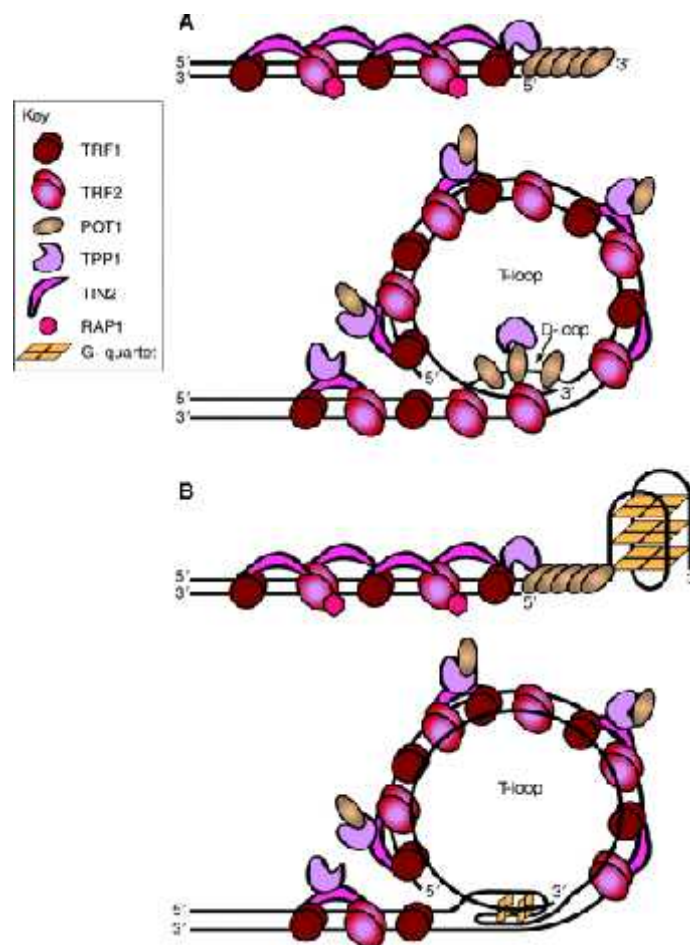


Slika 7. Protein Pot1 iz *S. pombe* s odsjekom telomerne DNA u OB utoru.

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

Ostali proteini koji vežu jednolanane telomerni 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 dvostrani dio telomera sa svojom myb-homeodomnom te im regulira duljinu. Kada su telomere kratke, manji je broj i TRF1 proteina, te se telomera aktivira i produljuje sekvence. Kada su telomere duge, TRF1

inhibira telomerazu. TRF1 vjerojatno reagira s kompleksom proteina kako bi se potaknulo vezanje POT1 na jednolanani dio telomera, štite i je od telomeraze. TRF2 dimeri služe za stabilizaciju T-om e. U plijesni (*S. cerevisiae*), za dvolan anu DNA veže se protein Rap1 i Taz1, dok su to u biljkama proteini TBP1, TRP1 i Smh1. U T-om ama, POT1 se veže za jednolanane dijelove – jedan od tri lanca u podru ju D-om e, te za slobodni 3' kraj koji izlazi nakon D-om e (http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html). Protein EST1 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 jednolananog stršeg kraja. Ispod je prikazana T-om a („T-loop“) s D-om om („D-loop“). B: Antiparalelni G-kvadrupleks („G-quartet“), u linearnoj strukturi telomere ili u T-om i, može pružiti dodatnu zaštitu kromosomskog završetka od degradacije enzimima ili produljenja pomoću telomeraze ili ALT-a.

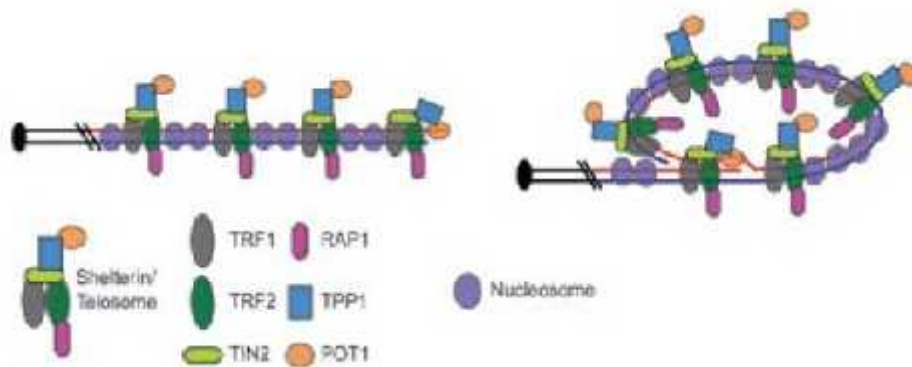
(Izvor: <http://jcs.biologists.org/content/122/22/4013/F1.expansion.html>)

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

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

Telomerna DNA ima neobičajna svojstva replikacije. To nije, 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 neto no 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).

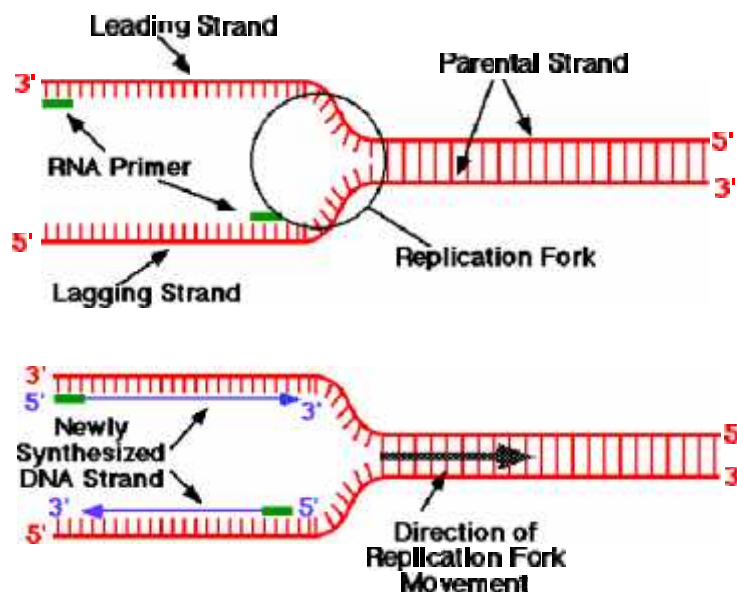


Slika 9. Shelterin kompleks (telosom) („Shelterin/Telosome“) na otvorenoj i zatvorenoj strukturi telomera. Nukleosomi („Nucleosome“) su osnovne strukture kromatina.
(Izvor: Cesare 2008)

8. Replikacija DNA i skraćivanje telomera

Jedna od najosobitijih 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 neto skraćivanja pri replikaciji. 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

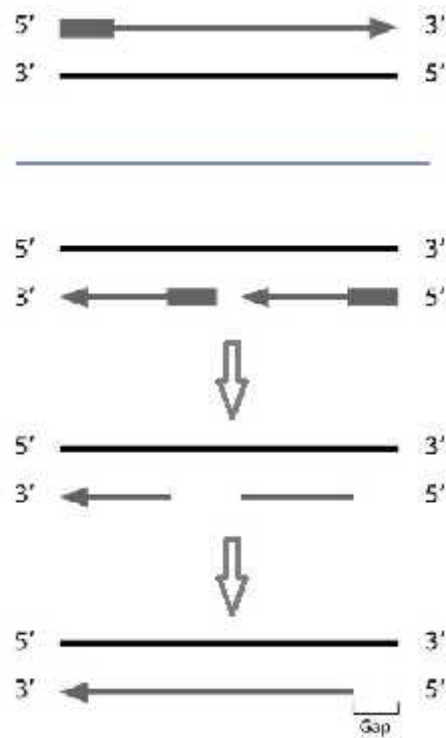
su komplementarni lanci antiparalelni, lanac koji služi kao kalup ita se od 3' kraja prema 5'. Postoji razlika u načinu sinteze dva lanca jer se sinteza mora događati na istom mjestu u isto vrijeme. Da se dva lanca sintetiziraju kontinuirano, jedan bi se morao nadograđivati u 3' 5' smjeru. Taj su problem 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 vodeći. 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 ako postoje već DNA ili RNA lanca, i zbog toga postoji enzim primaza koji na lancu kalupu sintetizira mali slijed RNA – klicu ili po etnicu. Na klici DNA polimeraza sada može započeti novi 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 po etnicama (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 je bitna potrebna nova po etnica, te se nastaju novi Okazakijevi fragmenti.

(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 stanice nanijele 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 prepíše 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. Ošte enja od slobodnih radikala lošije se popravljaju u telomernoj DNA nego drugdje u kromosomu, što ubrzava skra ivanje telomera, dok ga antioksidansi usporavaju (Von Zglinicki 2000). Skra ivanje telomera zbog slobodnih radikala objašnjava razliku izme u o ekivanog gubitka po mitozu zbog problema replikacije krajeva kromosoma (oko 20 pb), i stvarne brzine skra ivanja (50 – 100 pb) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere>).

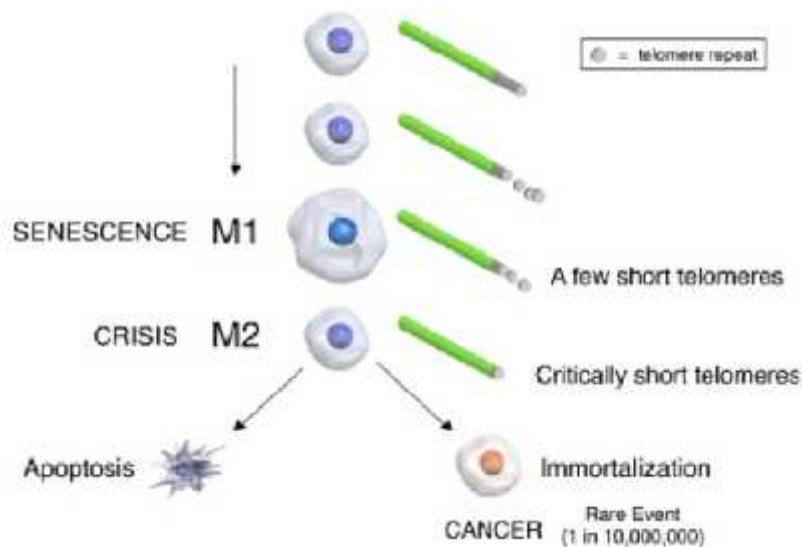
injenica da postoji odre en broj mitozu koje stanice mogu podnijeti s obzirom na duljinu svojih telomera govori o tome da stanice imaju ograni en rok trajanja, odre en životni vijek. Normalne, ne-tumorske stanice ne rastu beskona no u stani noj kulturi. Stanice novoro en eta stavljene u kulturu podijelit e se gotovo stotinu puta. U razdoblju netom prije odumiranja cijele kulture, broj mitozu e se smanjiti. S druge strane, ako stanice u kulturi potje u od osamdesetogodišnjaka, dijelit e 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>). Budu i 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 izme u po etne 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. Op enito, kromosomi starijih životinja imaju mnogo kra e telomere nego kromosomi mladih životinja. Tako er, telomere se brže troše kod vrsta koje žive kra e. Ovdje se može navesti jedna iznimka – lastorepa burnica, *Oceanodroma leucorhoa*, živi mnogo duže od srodnih vrsta te od ptica iste veli ine – 20 godina u prosjeku. Njezine se telomere s vremenom ne skra uju, nego produljuju (Hausmann i sur. 2003). Nadalje, zaklju eno je kako se kod nekih drugih vrsta ptica (jedna je od njih *Fregata minor*) ne može odrediti starost na temelju duljine telomera jer duljine zna ajno variraju izme u jedinki iste starosti, te se brzina trošenja telomera smanjuje kod starijih ptica (Juola i sur. 2006). Kod kloniranih životinja duljina telomera može biti kra a jer su se stanice ve 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 kornjace (*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, gubi se 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 mehanizam u borbi protiv tumorigeneze, odnosno nastanka raka, djeluju i 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 faktora 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 stanice i odgovora na oštećenje DNA odvija se putem fosforilacije određenih proteina staničnog ciklusa, uključujući i 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. Faktori koji upućuju stanicu u jedno od ova dva stanja još uvijek nisu potpuno razjašnjeni, no pretpostavlja se da su tip stanice, intenzitet i trajanje signala, aktivacija određenih puteva, 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 i 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 ulaze u apoptozu (Kim i sur. 2002). Neke stanice izbjegnu u inak tih puteva i replikativnu senescenciju, no to dovodi samo do ograničenog nastavka proliferacije. Takve stanice, naposljetku, ulaze 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 besmrtno stanice raka („cancer“). Imortalizacija („Immortalization“) je događaj čija je vjerojatnost 1:10000000 („Rare Event, 1 in 10000000“).

(Izvor: Shay 2012)

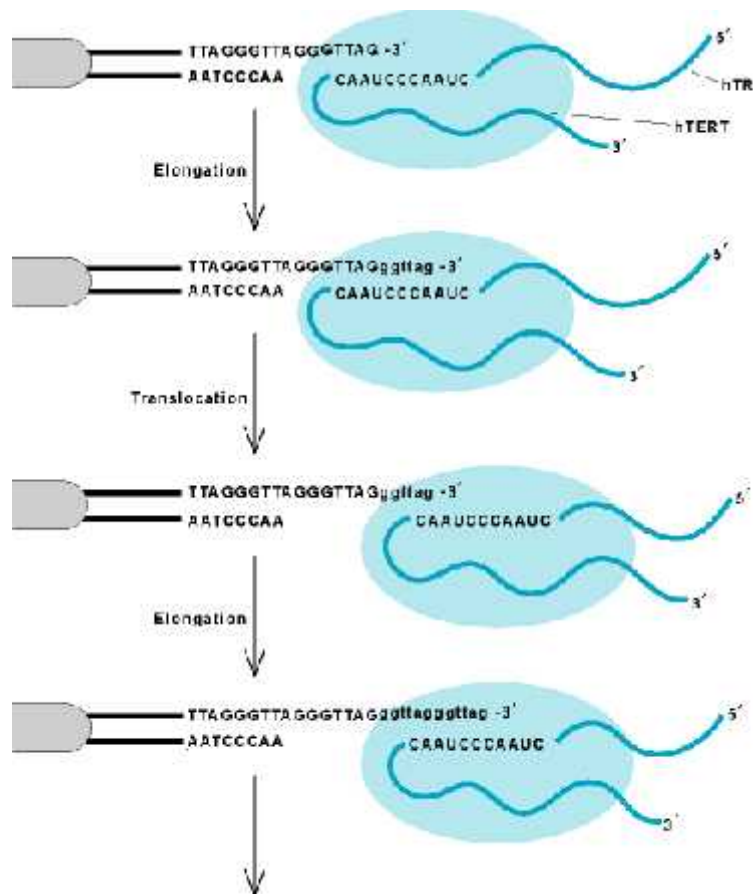
Stanice u senescenciji negativno utječu na tkivo oko sebe, oslobađaju citokine i ostale imbenike koji mogu poremetiti homeostazu i funkciju tkiva (http://www.senescence.info/cell_aging.html). Odstranjivanje stanica u senescenciji dokazano može spriječiti ili odgoditi oštećenje tkiva koje dolazi sa starošću u organizmu 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 pomoćju virusa u miševu starije dobi smanjilo osteoporozu i netoleranciju na glukozu povezanu sa starenjem, poboljšalo je neuromuskulatornu funkciju i djelomično je poboljšalo pamćenje miševa, i to bez otkrivane povezanosti u nastanku 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

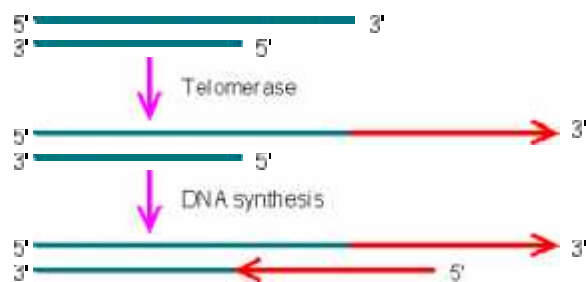
senescenciju. One se nazivaju besmrtnima, te uključuju germinativne stanice, rane embrijske stanice, matične stanice te stanice raka. Pronađene su neke stanice štakora koje su tako er izbjegle senescenciju, te mišje stanice kojima je potaknuta besmrtnost pod određenim uvjetima u kulturi (http://www.senescence.info/cell_aging.html). Neki jednostani 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 stalnoj 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 običnu 5'→3' smjeru, s ostatkom RNA dijela kao kalupom. Nakon što enzim sintetizira jednu kopiju ponavljanja 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, po eviši od RNA početnice (Slika 14) (Nelson, Cox 2009). Postojanje mehanizma kojim se kompenzirati skraćivanje telomera prvi je previdio 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 vešpomenutom jednostaničnom trepetljikašu *Tetrahymena*.



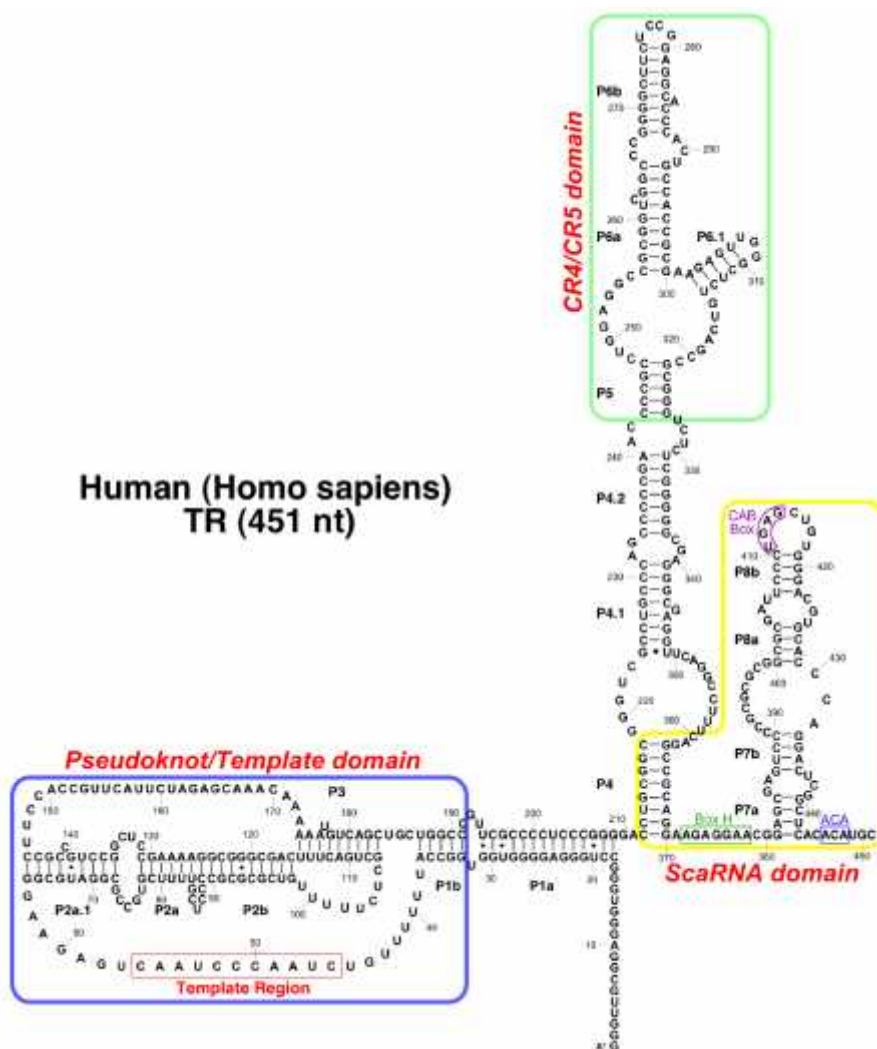
Slika 13. Shematski prikaz mehanizma djelovanja telomeraze. Enzim je označen plavim krugom (proteinska domena) i plavom linijom (enzimska RNA). Malim slovima su označeni novi nukleotidi. Elongacija („Elongation“), translokacija („Translocation“), te novi proces elongacije. (Izvor: <http://accessscience.com/search.aspx?rootID=800188>)



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 diskarina (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

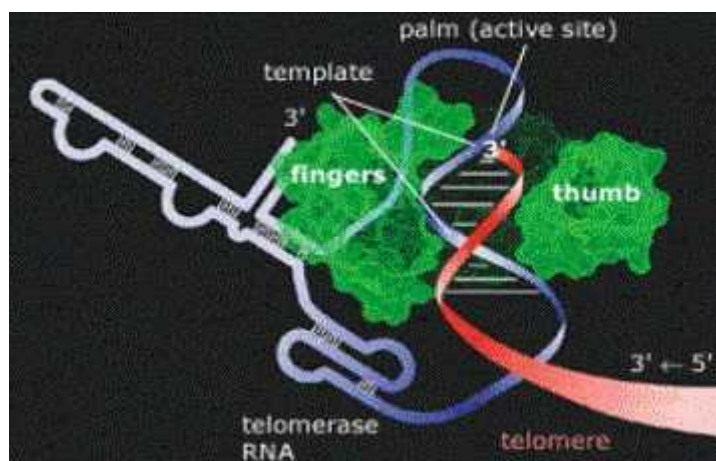
nedostatak kod ljudi povezan s kromosomskim poremećajem Cri du chat, gdje nedostaje dio kraćeg kraja kromosoma 5. Unatoč sličnosti s drugim RNA-ovisnim polimerazama, telomeraze spadaju u posebnu podskupinu proteina zbog vrlo velike sličnosti između različitih organizama (<http://en.wikipedia.org/wiki/TERT>). TERC se dosta razlikuje u sekvenci i strukturi između kraljevnjaka, trepetljikaša i plijesni, no ono što svi dijele jest pseudovor na 5' kraju lanca, blizu sekvence kalupa. Pseudovorovi, 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 pseudo vora 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 pseudo vora („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 reverzних 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 ponavljanje i slijedi (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 i 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 određeni 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 i bez daljnjih gubitaka telomera. To su prvi primijetili Bodnar i suradnici 1998., pružaju i vrst dokaz da su telomeraza i održavanje duljine telomera ključni za besmrtnost stanica (<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Telomeres.html>). Telomeraza je ekspimirana u aktiviranim ljudskim T-stanicama, no unatoč tome, i one nakon nekog vremena izgube svoje telomere i ulaze 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 – to je posljedica raka) da ulaze u senescenciju. Kao što je već zaključeno, senescencija je vjerojatno evoluirala na način da spriječi i tumorigenezu (Kim 2002).

Osim navedenih stanica njihovih 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 drugu metodu na način produljenja telomera – ALT (engl. alternative lengthening 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 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, produljuju i svoje telomere.

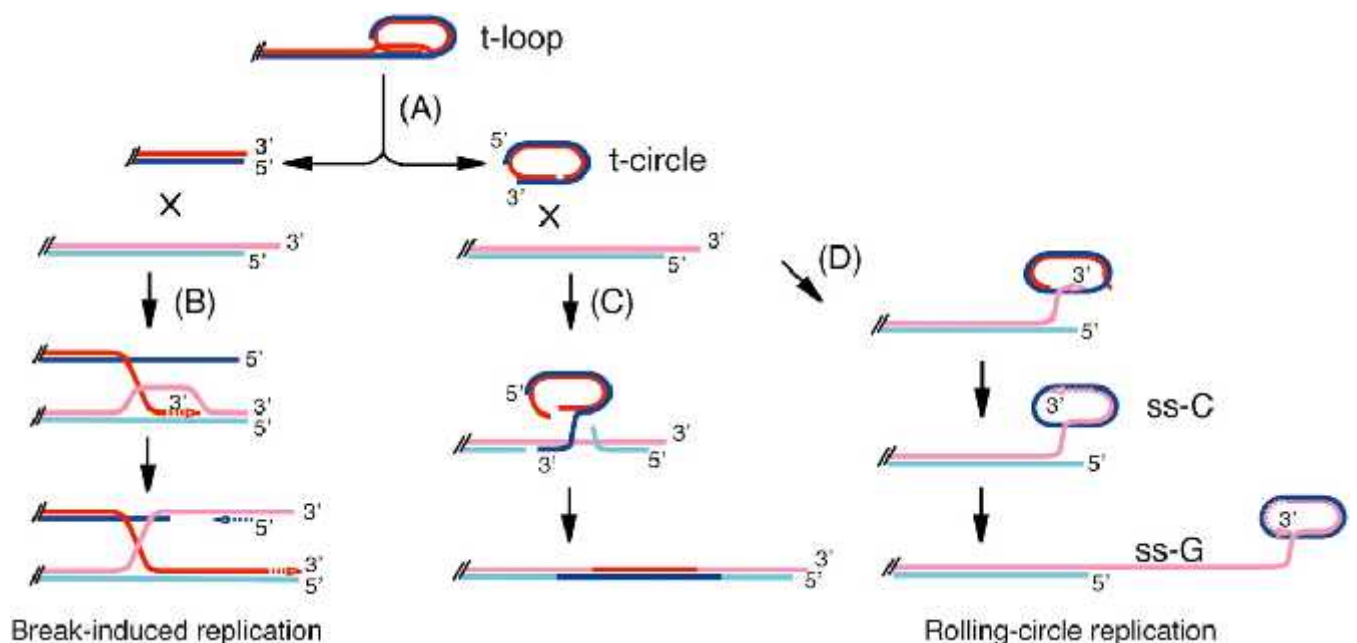
11.1 Alternativno produljenje telomera

Oko 10% tumorskih stanica upotrebljava ALT, no to varira u različitim vrstama raka. Stanicu 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, druga ije molekule DNA. Može se dogoditi između sli nih molekula DNA, kao što je homologna rekombinacija (HR) u, primjerice mejoznoj 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 telomerase 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-om i povezano je s TRF2 proteinom kojem nedostaje centralna domena, te s nedostatkom POT1, koji inače sprječavaju razrješenje T-om e, što potpomažu proteini NBS1 i XRCC3. Ta tri rekombinacijska događaja – produljenje, postreplikativne izmjene i razrješenje T-om e – 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 to ni mehanizmi još istražuju.



Slika 17. četiri tipa rekombinacijskih događaja u metabolizmu telomerne DNA u ALT stanicama. A: rekombinacija unutar T-om e („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-omije) 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 često 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.

Postoje mogućnosti 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 telomeraza 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 pažljivo 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-ki ostaje matična stanica, ulazi u mirujući stadij u kojem se ne dijeli, te se aktivnost telomeraze utiša. Druga stanica-ki postaje oligopotentna umnožavajući prastanica koja ima veći stupanj ekspresije telomeraze. Još nije

potpuno razjašnjeno kako se događaju i takva dioba. Prastanice nisu besmrtno kao što su mati ne jer poslije ulaze u diferencijaciju, pa je to njihov svojevrsan kraj.

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

12. Ljudsko zdravlje i telomere

Trenutno 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 i stanice koje se koriste ALT-om odumiru kad je telomeraza 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 uestalosti 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 poboljšavanje 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., Tchkonian 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., Tomáška 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., Tomáška 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., Tomáška L.: *Origin and Evolution of Telomeres*. Landes Bioscience, Austin.
- Hausmann 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., Tomáška L.: *Origin and Evolution of Telomeres*. Landes Bioscience, Austin.
- Juola F. A., Hausmann 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, Gratiás 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., Tomáška 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/previousachievement_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 nekodiraju i zaštitni sljedovi DNA, telomere. One ih kratke ponavljaju te sekvence, npr. TTAGGG kod kralješnjaka, te proteini koji ih štite i sudjeluju u njihovoj funkciji. Jedna od njih jest razlikovanje krajeva kromosoma od dvolanog loma kako ih stani ni 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 nezaštićenosti kromosoma. Neke stanice i nestani 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 ugaziti pRB i p53 putove koji dovode do senescencije stanica ili apoptoze, te povećati aktivnost telomeraze kako bi postale besmrtno. 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 budućnosti se istraživanjima možda pronađe 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 latter 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.