

# 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/um:nbn:hr:217:786288>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



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

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Kromosomi .....</b>	<b>1</b>
<b>3. Otkriće telomera .....</b>	<b>2</b>
<b>4. Struktura telomera .....</b>	<b>3</b>
<b>5. Mjerenje duljine telomera.....</b>	<b>6</b>
<b>6. Zaštita kromosoma od NHEJ-a .....</b>	<b>6</b>
<b>7. Proteini koji se vežu na telomere.....</b>	<b>7</b>
<b>8. Replikacija DNA i skraćivanje telomera .....</b>	<b>10</b>
<b>9. Replikativna senescencija i starenje organizma .....</b>	<b>13</b>
<b>10. Telomeraza .....</b>	<b>16</b>
<b>11. Telomere i rak .....</b>	<b>20</b>
<b>    11.1 Alternativno produljenje telomera .....</b>	<b>20</b>
<b>    11.2 Telomeraza u stanicama raka i matnim stanicama.....</b>	<b>22</b>
<b>12. Ljudsko zdravlje i telomere .....</b>	<b>23</b>
<b>13. Literatura.....</b>	<b>24</b>
<b>14. Sažetak .....</b>	<b>26</b>
<b>15. Summary.....</b>	<b>26</b>

## 1. Uvod

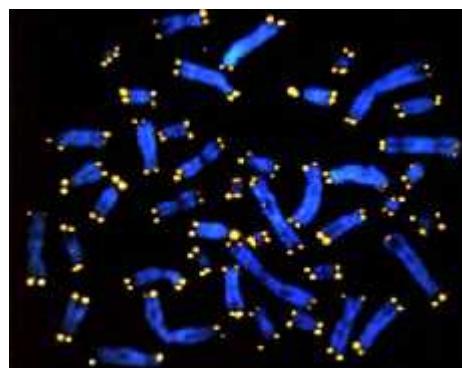
Nitko ne može sa sigurnoš u re i što je smisao života. Možda je odgovor jednostavan – da je to život sam. Od prvih organizama koji su se pojavili na Zemlji, priroda je pronalazila razliite mehanizme kako da se njihov život održi, te da se informacija o tome prenese dalje. Informacije su sadržane u genima, 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 imenika 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 uključuju gene od oštete enja uzrokovanih problemima u replikaciji DNA. Telomere svojom strukturom tako čušte kromosome od međusobna spajanja i nepoželjne reorganizacije. Pri svakoj replikaciji DNA i dijeljenju stanice, telomere se, štite i gene, skraćuju. Kada se potroše do odredene 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 odredene 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 (guanina, adenina, citozina ili timina), te se sastoji 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 četiri 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 sa 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 omoguila 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 izrežu prilikom prijenosa genske informacije. 3% ljudskog genoma ine visoko ponavljaju e sekvence (SSR – engl. simple sequence repeats, jednostavne ponavljaju e 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 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 uočljivi tek prilikom jačene 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 (gr. *telos*, "kraj", i *meros*, "dio") su sekvence na krajevima kromosoma koje pomažu u njegovojoj stabilizaciji (Slika 1) (Nelson, Cox 2009).



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

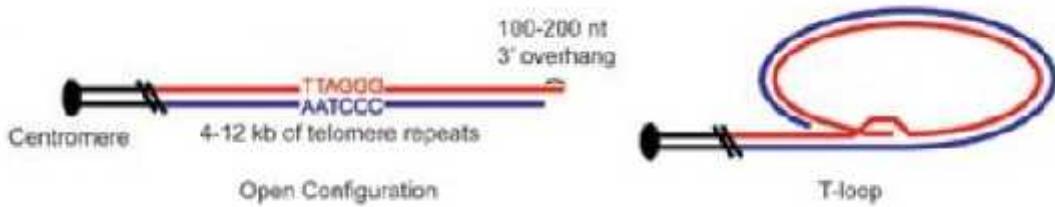
### 3. Otkriće telomera

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

Leonarda Hayflicka o ograni enoj replikaciji somatskih stanica, Olovnikov je zaklju io da se dijelovi DNA gube sa svakom replikacijom stanice, odnosno DNA, sve dok gubitak ne dosegne kriti nu to ku, i tada stanice prestaju s diobama. Elizabeth Blackburn i Joseph Gall u razdoblju od 1975. do 1977. na Sveu ilištu Yale prou avali su neobi nu prirodu telomera, kratkih ponavlja ih sekvenci koji ine krajeve kromosoma. Elizabeth Blackburn, Carol Greider i Jack Szostak 2009. dobili su Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu za otkri e zaštitne uloge telomera i enzima telomeraze (<http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere>).

## 4. Struktura telomera

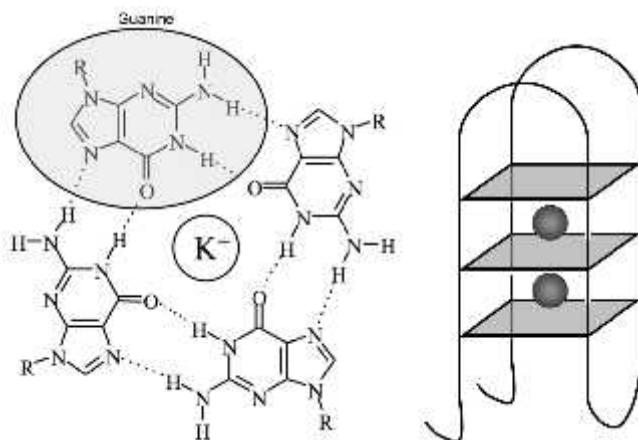
Kako se telomere nalaze na krajevima linearnih kromosoma, ve ina prokariota, budu i da nema takvo linearne ure enje, nema telomere. Cirkularni kromosomi nemaju problem replikacije krajeva pa telomere nisu potrebne. Mali je udio bakterijskih kromosoma (npr. u *Streptomyces* i *Borrelia*) linearan i posjeduje telomere, koje se bitno razlikuju od eukariotskih u strukturi i funkciji. Dužina telomera veoma se razlikuje izme u vrsta, pa tako pljesan sadrži oko 300 telomernih parova baza, *Arabidopsis* 3 000 pb ili 3 kilobaze, glodavci 15 – 50 kb, dok duhan ima 100 kb telomernih ponavljanja. Obi no 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 utje e na ekspresiju gena u blizini telomerne domene (subtelomerna domena) s pomo u kontrolirane heterokromatinizacije, dok u isto vrijeme konformacijske promjene heterokromatina utje u na regulaciju duljine telomera (Fajkus i sur. 2008). Eukariotske telomere obi no završavaju jednolan anom DNA s 3' krajem, što je bitno za njihovo održavanje i strukturu, te je posljedica DNA replikacije. Jednolan ani je kraj kod ljudi duga ak 100 – 200 nukleotida. Telomere tvore velike om e nazvane T-om e (Slika 2) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere>). T-om e mogu tvoriti ekstrakromosomalne T-krugove koji su povezani s alternativnim produljenjem telomera (ALT). Na kraju T-om e jednolan ana se telomerna DNA uvu e u regiju dvolan ane DNA, izme u dva lanca, remete i njihovu strukturu. Ta trolan ana struktura stabilizirana je proteinima i naziva se D-om a (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 ava 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 tetrade gvanina spojenih vodikovim vezama neuobi ajenim Hoogsteen sparivanjem. Tetrade su postavljene jedna povrh druge te tako ine kvadriplekse (Burge i sur. 2006). (Slika 3).

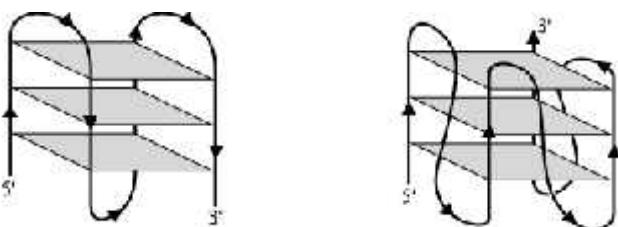


**Slika 3.** Lijevo: tetrada gvanina („Guanine“) u kompleksu s kationom  $\text{K}^+$ . Desno: tetrade posložene jedna povrh druge u G-kvadripleks kojeg ini jedna molekula DNA.

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

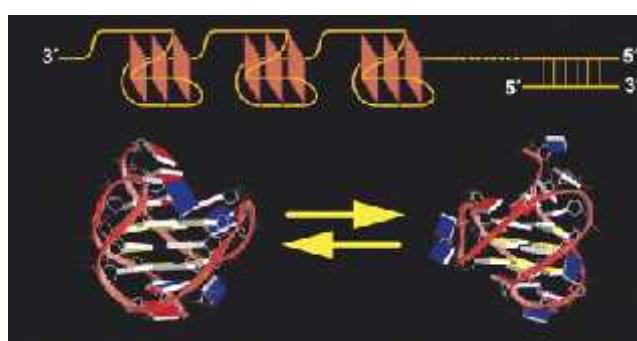
Lanci koji ih ine mogu biti orijentirani na razli ite na ine i ne moraju potjecati od iste DNA (ili RNA) molekule. G-kvadripleksi na eni su i u telomernoj i u ne-telomernoj DNA. Ljudske telomerne sekvene d[AG<sub>3</sub>(TTAGGG)<sub>3</sub>] tvore antiparalelne G-kvadriplekse u  $\text{Na}^+$  otopini, dok u  $\text{K}^+$  otopini tvore kvadriplekse s paralelnom orijentacijom lanaca (Slika 4). Na in slaganja dakle ovisi o mediju, samom procesu kristalizacije i duljini sekvene, iako su zabilježeni razli iti topološki oblici za gotovo istu duljinu sekveni – razlika u energiji

slaganja o ito je vrlo mala i time su omoguene varijacije (Slika 5). To nije topologija i struktura još se treba istražiti.



**Slika 4.** Lijevo: antiparalelna orijentacija lanaca telomernog G-kvadripleksa u  $\text{Na}^+$  otopini. Desno: paralelna orijentacija lanaca u  $\text{K}^+$  otopini.

(Izvor: [http://www.mnhn.fr/mnhn/bpy/team3/previousachievement\\_team3.htm](http://www.mnhn.fr/mnhn/bpy/team3/previousachievement_team3.htm))



**Slika 5.** Gore: model G-kvadripleksa u ljudskoj telomernoj DNA. Dolje: trodimenzionalna struktura dvaju mogućih oblika G-kvadripleksa u  $\text{K}^+$  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 sekvene 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**

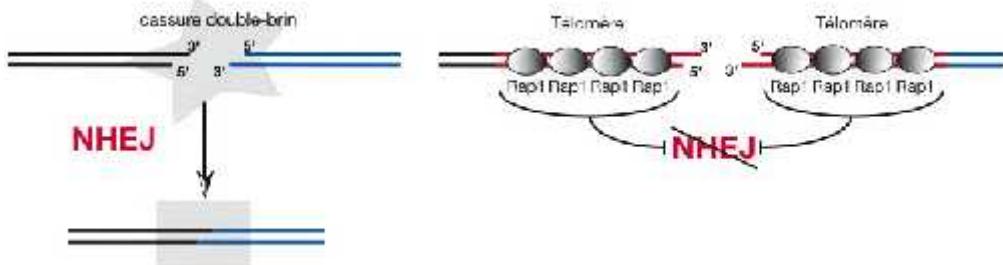
Rabi se nekoliko tehnika za određivanje duljine telomera u eukariotskim organizmima. Najčešća je metoda „TRF (engl. Terminal Restriction Fragment) southern blot“, što uključuje hibridizaciju radioaktivnog oligonukleotida  $^{32}\text{P}$ -(TTAGGG)<sub>n</sub> na procesuiranu genomsku DNA vezanu za najljonsku 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). Takođe 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 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 je biti objašnjeno, telomere imaju još jednu zaštitnu funkciju. Nehomologno sparivanje krajeva (NHEJ, engl. Non-homologous end joining) jest put kojim se popravljaju dvolani i 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 sekvene DNA za vođenje popravka. Te mikrohomologne regije često su jednolani i strši i krajevi na mjestu gdje se dogodio dvolan i lom.



**Slika 6.** Lijevo: spajanje krajeva DNA nakon dvolan anog loma („ceassure double-brin“) pomo u NHEJ popravka. Desno: krajevi kromosoma su od NHEJ zašti eni telomernom strukturu (T-om om – nije prikazana na slici) i proteinima, posebice Rap1.

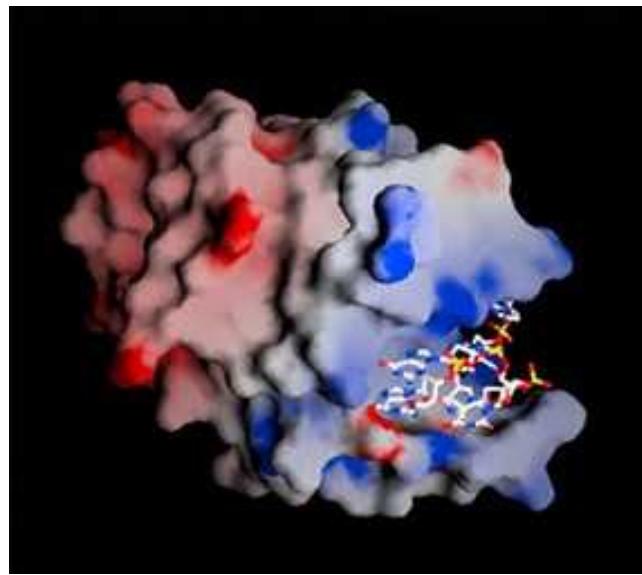
(Izvor: <http://www-dsv.cea.fr/en/institutes/institute-of-cellular-and-molecular-radiation-biology-ircm/productions/scientific-results/the-protein-rap1-protects-genome-integrity-by-preventing-chromosomal-fusions>)

Kad su s obje strane loma ti jednolan ani 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 dvolan anog loma, prepoznao kao dvolan ane lomove koji se trebaju popraviti, što bi rezultiralo kromosomskom fuzijom (Slika 6). Postoji više na ina kako se to sprje ava. Npr., u pljesni *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein izravno veže telomerne sekvene 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 pomo u proteina Rif2 i Sir4. Nadalje, središnja domena Rap1 uspostavlja nekoliko drugih nezavisnih putova za sprje avanje telomerne fuzije (Marcand i sur. 2008). U sljede em su poglavljju navedeni ostali proteini koji sudjeluju u zaštiti i i funkciji telomera.

## 7. Proteini koji se vežu na telomere

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

uspješno pro iš avanje. Zbog toga su za njihovo otkri e zaslužne bioinformati ke metode. U genomu pljesni *Schizosaccharomyces pombe* otkrivene su sekvene velike sli nosti (40% sekvenci gena) sa sekvcama trepetljikaša koje kodiraju telomere-vezuju e proteine. Gen u pljesni nazvan je *pot1*. Kulture pljesni kojima je odstranjen *pot1* stvarale su vrlo male kolonije, što ukazuje na problem u diobi stanica. Tako er, njihovoj DNA nedostajali su telomerni sljedovi. To je dokaz da je *pot1* zaista gen koji kodira za telomere-vezuju i protein. Ljudski POT1 otkriven je usporedbom sa sekvcama proteina pljesni – geni im dijele 48% sli nosti. Protein Pot1 u pljesni *S. pombe* ima utor u koji se veže mali dio jednolan ane telomerne DNA sekvene GGTTAC, koji je tako zašti en od degradacije i modifikacije (Slika 7). Ljudski POT1 ima dva utora, te svaki veže sekvenu TTAGGGTTAG, ili, sli nim afinitetom, GGTTAGGTTAG, što ini dva telomerna ponavljanja. Utori tih proteina još se nazivaju OB utorima (engl. oligonucleotid-binding folds, utori koji vežu oligonukleotide) (Horvath 2008).



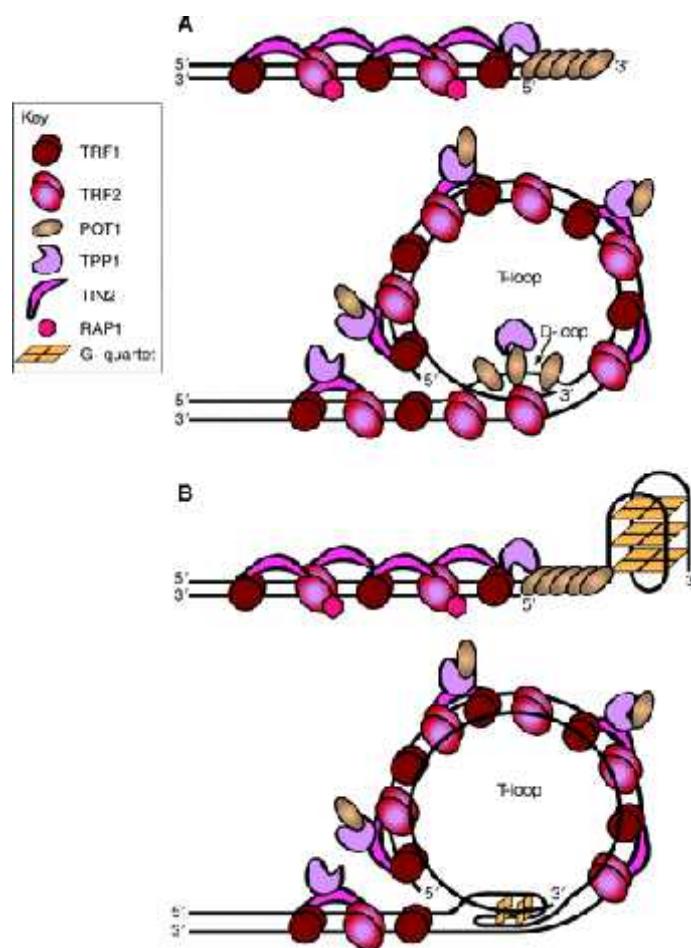
**Slika 7.** Protein Pot1 iz *S. pombe* s odsje kom telomerne DNA u OB utoru.

(Izvor: [http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna\\_telomeres/01.html](http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html))

Ostali proteini koji vežu jednolan ane telomerne sljedove uklju uju TEBP u trepetljikašima, Cdc13 u pljesni *Saccharomyces cerevisiae*, te ve opisani Pot1, koji je raširen u pljesni *Schizosaccharomyces pombe*, kralješnjacima i biljkama. Spomenuti se ljudski protein TRF1 kao dimer veže na dvolan ani dio telomera sa svojom myb-homeodomenu te im regulira duljinu. Kada su telomere kratke, manji je broj i TRF1 proteina, te se telomeraza aktivira i produžuje sekvene. Kada su telomere duge, TRF1

inhibira telomerazu. TRF1 vjerojatno reagira s kompleksom proteina kako bi se potaknulo vezanje POT1 na jednolan an i dio telomera, štite i je od telomeraze. TRF2 dimeri služe za stabilizaciju T-om e. U pljesni (*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 jednolan ane dijelove – jedan od tri lanca u podruju D-om e, te za slobodni 3' kraj koji izlazi nakon D-om e ([http://www.hhmi.org/bioInteractive/rna/rna\\_telomeres/01.html](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 jednolanog stržege kraja. Ispod je prikazana T-om a („T-loop“) s D-om („D-loop“). B: Antiparalelni G-kvadripleks („G-quartet“), u linearnoj strukturi telomere ili u T-om i, može pružiti dodatnu zaštitu kromosomskog završetka od degradacije enzimima ili produljenja pomo u telomeraze ili ALT-a.

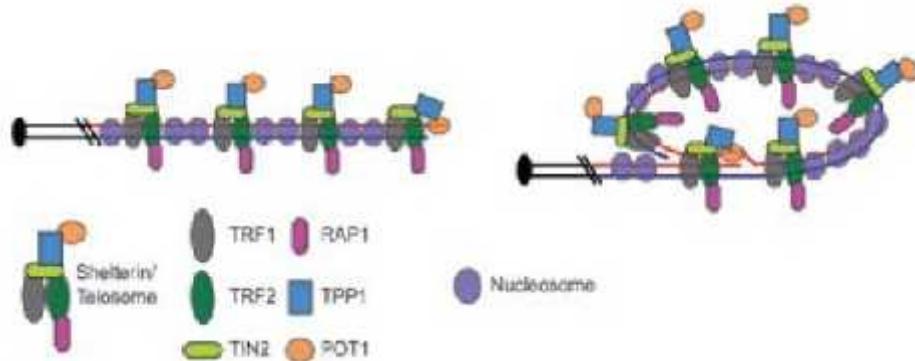
(Izvor: <http://jcs.biologists.org/content/122/22/4013/F1.expansion.html>)

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

Prepostavlja se da su se proteini koji vežu dvolanane 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 jednolanu DNA prilikom popravka i replikacije, zbog velike sličnosti u trodimenzionalnoj strukturi i funkciji (Horvath 2008).

Telomerna DNA ima neobična svojstva replikacije. To nije, replikacijska vilica ponekad grijesi 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 imaju telomernu interaktom (Xin i sur. 2008).

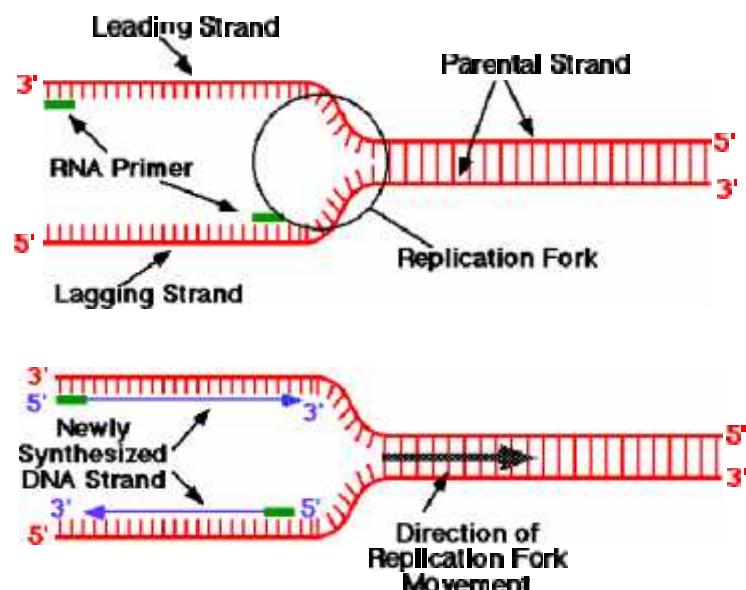


**Slika 9.** Shelterin kompleks (telosom) („Shelterin/Telosome“) na otvorenoj i zatvorenoj strukturi telomera. Nukleosomi („Nucleosome“) su osnovne strukture kromatina.  
(Izvor: Cesare 2008)

## 8. Replikacija DNA i skraćivanje telomera

Jedna od najbitnijih 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 nane replikacije. Sinteza nove DNA uvek se odvija u istom smjeru – od 5' kraja prema 3', što znači da se novi lanac gradi na -OH skupini 3' kraja, te kako

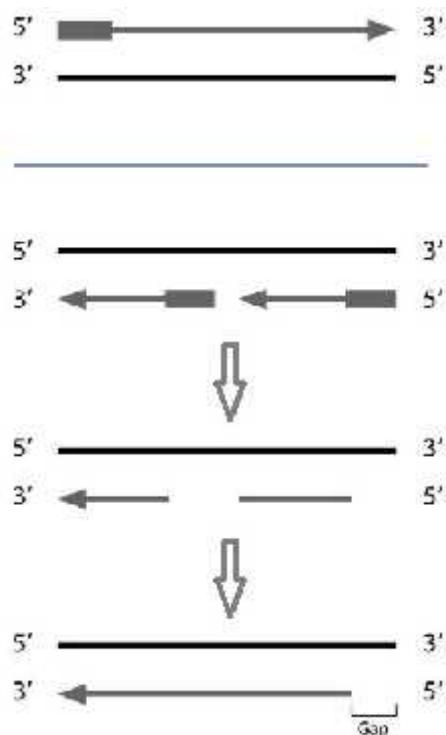
su komplementarni lanci antiparalelni, lanac koji služi kao kalup ita se od 3' kraja prema 5'. Postoji razlika u na inu sinteze dva lanca jer se sinteza mora doga ati na istom mjestu u isto vrijeme. Da se dva lanca sintetiziraju kontinuirano, jedan bi se morao nadogra ivati u 3' 5' smjeru. Taj su problem 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 vode im. Diskontinuirani lanac tako er 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 ve postoje eg 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 zapo eti nov lanac. Svaki Okazakijev fragment zapo inje stvaranjem klice (Slika 10). Klica se poslije razgradi, te se praznina ispuni s DNA s pomo u 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 (ljubi asto, „Newly Synthesized DNA Strand“) i po etnicama (zeleno, „RNA primer“). „Leading Strand“ = vode i lanac; „Lagging Strand“ = diskontinuirani lanac. Kako se replikacijska vilica kre e udesno („Direction of Replication Fork Movement“) za diskontinuirani lanac e biti potrebna nova po etnica, te e 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 kra i za duljinu klice (Slika 11). Kromosom se tako prilikom svakog dijeljenja stanice, svake mitoze, odnosno kopiranja DNA, skra uje ([http://www.hhmi.org/biointerative/rna/rna\\_telomeres/01.html](http://www.hhmi.org/biointerative/rna/rna_telomeres/01.html)).



**Slika 11.** Novosintetizirani lanci su sive boje, a po etnici su podebljane. Iznad plave linije: replikacija vode eg lanca. Ispod: replikacija diskontinuiranog lanca. Na slici su dva Okazakijeva fragmenta. Na kraju kromosoma ostaje praznina (gap) koja se nije mogla popuniti.

(Izvor: prilago eno iz <http://www.grin.com/en/doc/235582/cryptic-subtelomeric-rearrangements-and-studies-of-telomere-length>)

Skra ivanje kromosoma zna i gubitak geneti kog 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>). Stotine koje imaju telomere duljine 10-12 kb dijele se 50-60 puta (<http://mcb.berkeley.edu/courses/mcb135k/telomeres.html>). Taj fenomen ograničava broj dijeljenja stanica prvi je primijetio Leonard Hayflick, te se naziva Hayflickova granica. S druge strane, postoji još jedan razlog skra ivanja 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 mitozi zbog problema replikacije krajeva kromosoma (oko 20 pb), i stvarne brzine skra ivanja (50 – 100 pb) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere>).

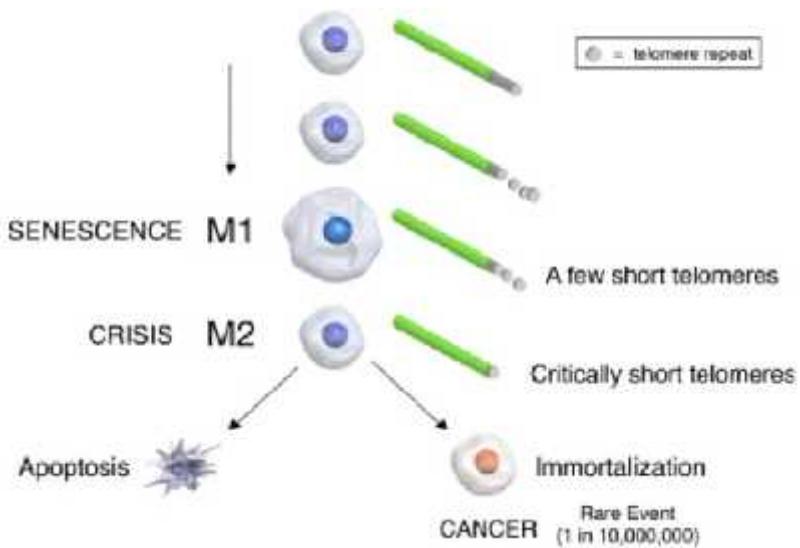
injenica da postoji odre en broj mitoza koje stanice mogu podnijeti s obzirom na duljinu svojih telomera govori o tome da stanice imaju ograni en rok trajanja, odre en životni vijek. Normalne, ne-tumorske stanice ne rastu beskona no u stani noj kulturi. Stanice novoro en eta stavljene u kulturu podijelit e se gotovo stotinu puta. U razdoblju netom prije odumiranja cijele kulture, broj mitoza 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 mlađih 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 (Haussmann 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 kornja e (*Geochelone*

*nigra*), koja živi više od jednog stolje a, podijele se oko stotinu i deset puta, dok se one od miša podijele oko 15 puta ([http://www.senescence.info/cell\\_aging.html](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](http://www.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html)). Krajevi kromosoma tada sadrže manje od 13 telomernih ponavljanja,ime se gubi njihova zaštitna funkcija, te može do i do abnormalnosti kromosoma i raka. To se može izbjegi i ako stanica osjeti svoje stanje koje je opasno za organizam i odabire jedan od dva puta – prestanak dioba ili apoptozu, programiranu stani nu smrt.

Stani na senescenciju može se opisati kao stabilan i stalni prestanak proliferacije stanica unato vijabilnosti i održanoj metaboli koj aktivnosti. Ona je najvažniji na in borbe protiv tumorigeneze, odnosno nastanka raka, djeluju i zajedno sa sustavom programirane stani ne smrti. Replikativna senescencija oznaava prestanak dijeljenja upravo zbog skra ivanja telomera do Hayflickove granice. Kao što je ve spomenuto, telomere djeluju kao unutarnji molekularni sat koji govori o povijesti dijeljenja primarne stanice, te je jedan od imbenika koji odre uju duljinu naših života. Kada telomere dosegnu svoju minimalnu duljinu, aktivira se stani ni odgovor na ošte enje DNA. Neki su od proteina koji se pojavljuju u takvima stanicama 53BP1, NBS1, MDC1, te kinaze ATM i ATR, koje aktiviraju kinaze CHK1 i CHK2. Komunikacija izme u stani nog metabolizma i stani nog odgovora na ošte enje DNA odvija se putem fosforilacije odre enih proteina stani nog ciklusa, uklju uju i CDC25 i p53. Sve te promjene zajedno poti u zaustavljanje proliferacije kako bi se ošte enje DNA moglo popraviti. Ako nastala šteta premašuje odre enu granicu i mogu nost popravka, stanicama slijedi ili senescencija ili apoptoza. imbenici koji upu uju stanicu u jedno od ova dva stanja još uvijek nisu potpuno razjašnjeni, no prepostavlja se da su tip stanica, intenzitet i trajanje signala, aktivacija odre enih putova, kao i tip ošte enja, bitni pri odre ivanju sudbine takve ošte ene stanice. Uz p53, replikativna senescencija povezana je s RB tumor-supresorom i njegovim signaliziraju im molekulama, uklju uju i kinazu p16<sup>INK4A</sup>. Aktivacija ta dva puta (p53 i pRB put) esencijalna je za indukciju senescencije u mnogim tipovima ljudskih stanic (Kuilman i sur. 2010). U slu aju da je pRB put neaktivovan, a p53 aktivovan, stanice e u i u apoptozi (Kim i sur. 2002). Neke stanicne izbjegnu u inak tih putova i replikativnu senescenciju, no to dovodi samo do ograni enog nastavka proliferacije. Takve stanicne, naposljetku, u i u takozvanu telomernu krizu, koja e rezultirati kromosomskom nestabilnoš u i smr u (Kuilman i sur. 2010), ili, umjesto smrti, izlaska iz krize u obliku stanice raka (Slika 12).



**Slika 12.** „Telomere repeat“ = telomerne 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, dođe i do uskoro do krize stanice („crisis“) koja će zbog genomske nestabilnosti stanicu dovesti do smrti. Rijetke stanice iz krize izlaze kao besmrtnе stanice raka („cancer“). Immortalizacija („Immortalization“) je događaj ija je vjerojatnost 1:10000000 („Rare Event, 1 in 10000000“).

(Izvor: Shay 2012)

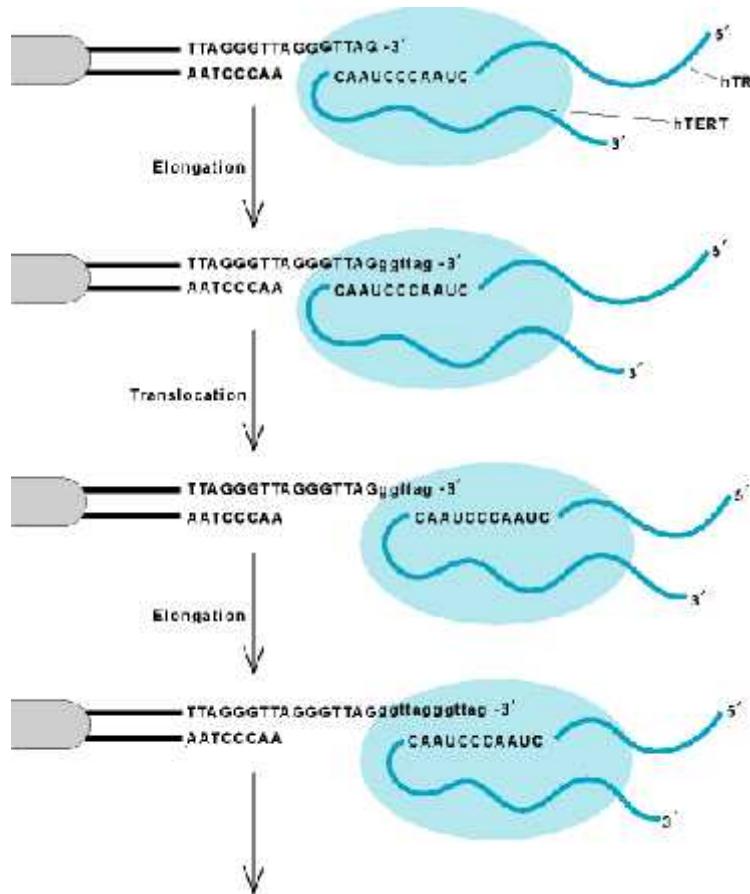
Stanice u senescenciji negativno utječu na tkivo oko sebe, oslobađajući citokine i ostale imbenike koji mogu poremetiti homeostazu i funkciju tkiva ([http://www.senescence.info/cell\\_aging.html](http://www.senescence.info/cell_aging.html)). Odstranjivanje stanica u senescenciji dokazano može spriječiti 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 poremećaje u regulatoru staničnog ciklusa te su zbog toga brže starjeli, što je možda bitno u interpretiranju rezultata. Također, miševima život nije prodljen – 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](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 otečivana povećanja u estalosti 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

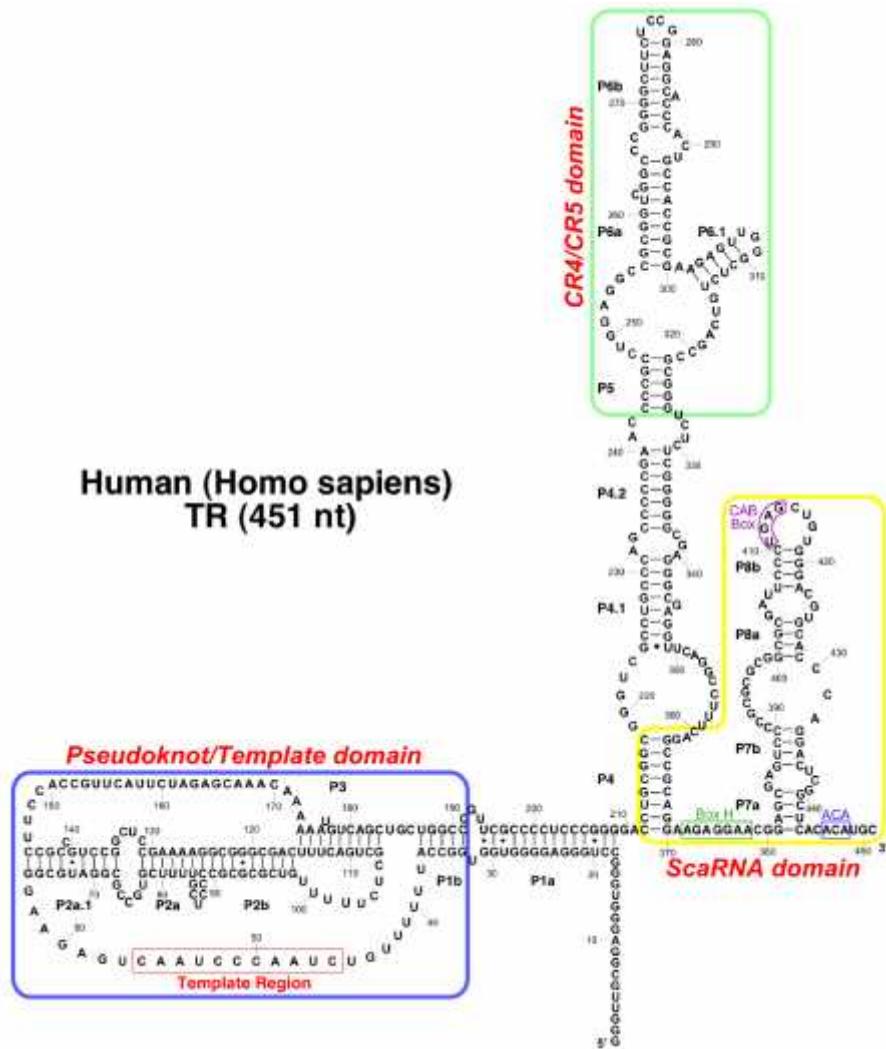
senescenciju. One se nazivaju besmrtnima, te uklju uju germinativne stanice, rane embrijske stanice, mati ne stanice te stanice raka. Prona ene su neke stanice štakora koje su tako er izbjegle senescenciju, te mišje stanice kojima je potaknuta besmrtnost pod odre enim uvjetima u kulturi ([http://www.senescence.info/cell\\_aging.html](http://www.senescence.info/cell_aging.html)). Neki jednostani ni organizmi, kao što je trepetljikaš *Tetrahymena thermophila*, tako er ne ulaze u replikativnu senescenciju. Svi ti tipovi stanica imaju sposobnost održavanja duljine svojih telomera, a to ine (naj eš e) s pomo u 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 iznena uju e, jer život se nastavlja unato stalnu skra ivanju 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 po etnicu u uobi ajenu 5'->3' smjeru, s ostatkom RNA dijela kao kalupom. Nakon što enzim sintetizira jednu kopiju ponavljanju eg slijeda telomera, pomi e se dalje kako bi se produljivanje moglo nastaviti (Slika 13). Telomerazom se produljuje dakle jedan lanac DNA, a drugi lanac se sintetizira s pomo u stani nih DNA polimeraza, po evši od RNA po etnice (Slika 14) (Nelson, Cox 2009). Postojanje mehanizma koji e kompenzirati skra ivanje telomera prvi je predvio sovjetski biolog Alexey Olovnikov 1973., koji je tako er telomere doveo u vezu sa starenjem i rakom. Telomerazu su otkrili Carol W. Greider i Elizabeth Blackburn 1984. u ve spomenutome jednostani nom trepetljikašu *Tetrahymena*.



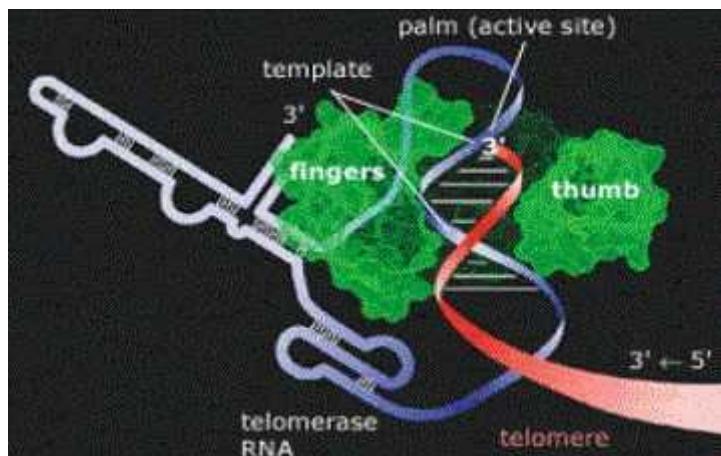
nedostatak kod ljudi povezan s kromosomskim poremećajem Cri du chat, gdje nedostaje dio kraja kraka kromosoma 5. Unatoč sličnosti s drugim RNA-ovisnim polimerazama, telomeraze spadaju u posebnu podskupinu proteina zbog vrlo velike sličnosti između različitih organizama (<http://en.wikipedia.org/wiki/TERT>). TERC se dosta razlikuje u sekvenci i strukturi između u kralježnjaka, trepteljikaša i plijesni, no ono što svi dijele jest pseudovor na 5' kraju lanca, blizu sekvencie 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 pseudovara 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 pseudovara („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 jednolan anu DNA koriste i se jednolan anom RNA kao kalupom. Za razliku od ostalih reverznih transkriptaza, TERT sa sobom nosi vlastiti kalup, TERCl – 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* (1). Struktura je pokazala četiri konzervirane domene – RNA-vezujuća domena, prsti, dlani 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 TERCl-u služi kao kalup jest 3'-CAAUCCCAAUC-5'. Telomeraza veže prvih nekoliko nukleotida za 3' kraj DNA, dodaje novi telomerni ponavljanju i slijed (5'-GGTTAG-3'), otpušta se s DNA, pomicajući 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 kolonijama možemo je naći u germinativnim stanicama, embrijskim matičnim stanicama, nekim jednostanim eukariotima kao što je *Tetrahymena*, u vjerojatno svim odraslim matičnim stanicama, te prastanicama određenih staničnih linija (prastanice se mogu diferencirati u određene tipove stanica, oligopotentne su). Kada se normalne somatske stanice u laboratoriju

transformiraju s DNA koja eksprimira velike koli iine telomeraze, one se nastavljaju mitotski dijeliti dugo nakon što se trebala pojaviti replikativna senescencija, i to iine bez dalnjih gubitaka telomera. To su prvi primijetili Bodnar i suradnici 1998., pružaju i vrst dokaz da su telomeraza i održavanje duljine telomera klju za besmrtnost stanica (<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Telomeres.html>). Telomeraza je eksprimirana u aktiviranim ljudskim T-stanicama, no unato tome, i one nakon nekog vremena izgube svoje telomere i u u u senescenciju. U nekim slu ajevima telomeraza nije dovoljna da bi sprije ila odumiranje stanica. Npr., sam enzim ne može sprije iti fibroblaste u kojima postoji signal (prevelika ošte enja DNA, ili mutirani RAS protein koji bez prestanka signalizira stanicu da se nekontrolirano dijeli – ija je posljedica rak) da u u u senescenciju. Kao što je ve zaklju eno, senescencija je vjerojatno evoluirala na na in da sprije i tumorigenezu (Kim 2002).

Osim navedenih stani nih tipova, još jedna vrsta stanica eksprimira telomerazu u velikim koli inama – 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, ve druga iji na in produljenja telomera – ALT (engl. alternative lenghtening of telomeres, alternativno produljenje telomera).

## 11. Telomere i rak

Kao što je ve spomenuto, stanice koje inaktiviraju p53 i pRB putove, odnosno uspiju na neki na in ne u i u senescenciju, ulaze u krizu. Kriza je okarakterizirana velikim kromosomskim promjenama i rearanžmanima, i genomskom nestabilnoš u, što dovodi do smrti ve iine stanica. One stanice koje prežive krizu postale su besmrtnе – s pomo u telomeraze ili ALT-a, produljuju i svoje telomere.

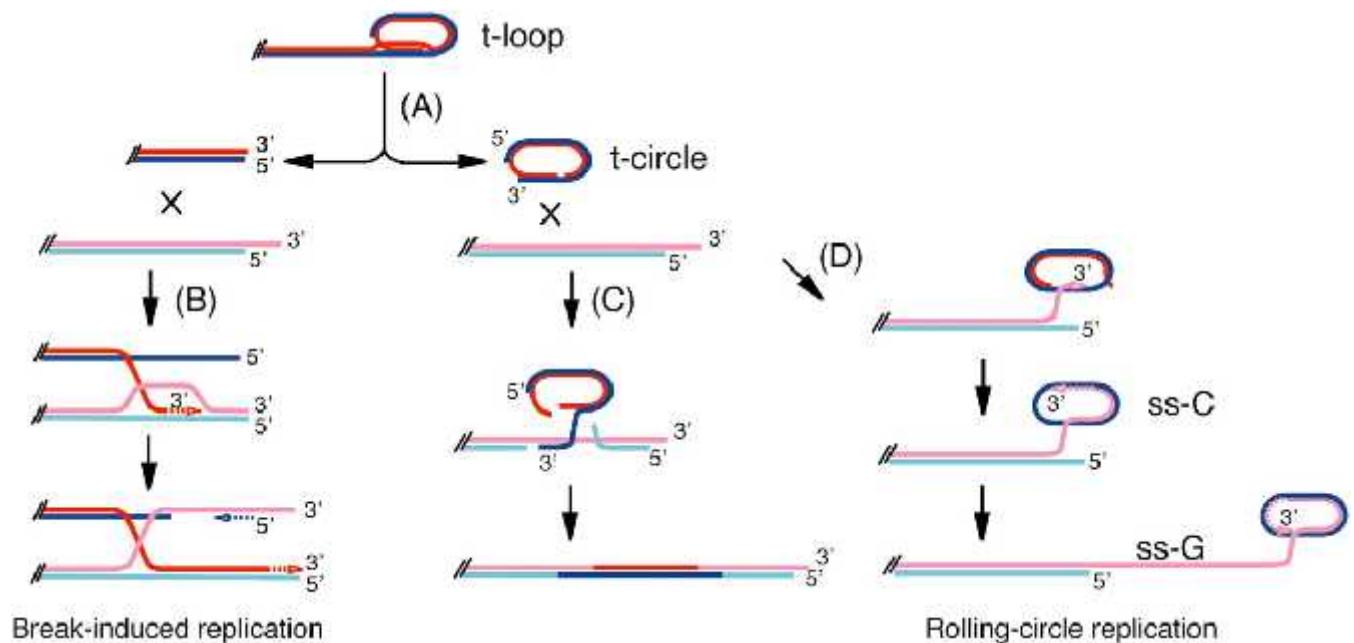
### 11.1 Alternativno produljenje telomera

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

DNA lanaca, nakon nega nastaju nove, druga ije molekule DNA. Može se dogoditi izme u sli nih molekula DNA, kao što je homologna rekombinacija (HR) u, primjerice mejotskoj diobi stanica, te izme u molekula koje ne dijele mnogo homologije, što se doga a u, npr., nehomolognom spajanju krajeva (NHEJ) (objašnjeno u 6. poglavljju).

Postojanje ALT-a potvr eno 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-om i povezano je s TRF2 proteinom kojem nedostaje centralna domena, te s nedostatkom POT1, koji ina e sprje avaju razrješenje T-om e, što potpomažu proteini NBS1 i XRCC3. Ta tri rekombinacijska doga aja – produljenje, postreplikativne izmjene i razrješenje T-om e – obilježja su telomera ALT stanica (Cesare i Reddel 2008).

Osim jednostavne HR, drugi tip ALT produljenja uo en je u plijesnima *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces lactis*. U tim se vrstama odvija tzv. replikacija kotrljaju eg kruga na T-krugovima, emu slijedi produljenje ostalih kromosomskih krajeva homolognom rekombinacijom – "roll and spread" model (Slika 17). Postoji više varijacija takve replikacije. To se vjerojatno doga a i u ALT stanicama sisavaca. Osim ova dva modela, postoji još mogu nosti alternativnog produljenja telomera u besmrtnim stanicama te se to ni mehanizmi još istražuju.



**Slika 17.** Četiri tipa rekombinacijskih doga aja u metabolizmu telomerne DNA u ALT stanicama. A: rekombinacija unutar T-om e („t-loop“) uzrokuje brzo skra ivanje telomera i formiranje

ekstrakromosomskih T-krugova („t-circle“). B: Rekombinacija između telomera različitih kromosoma potiče replikaciju koja ima za posrednika 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 koja trlja dugi 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-om) 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 šeću podliježu homolognoj rekombinaciji, što uključuje vrlo kratke, potrošene telomere koje više nemaju mnogo zaštitnih proteina (najbitniju ulogu ima gubitak TRF2) pa gube mogu nastati suzbijanja telomerne HR.

Postoji mogunost da se neke ljudske stanice, pogotovo one koje se dijele estom, koriste mehanizmom sličnim onom u ALT stanicama za popravak sluhajuće enih telomera, kako se ne bi trebala aktivirati telomeraza i tako riskirati da stаница 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 maternim stanicama

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

potpuno razjašnjeno kako se događa takva dioba. Prastanice nisu besmrtnе као што су мати нејер poslije ulaze u diferencijaciju, па је то njihov svojevrstan kraj.

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

## 12. Ljudsko zdravlje i telomere

Trenutno se razvijaju cjepiva za ljudi 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 akcijske stanice koje se koriste ALT-om odumiruju 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 sa pomoću telomeraze uspio obnoviti zdravlje organa miševa koji su degradirali zbog starosti, smatra da će se jednog dana terapija telomerazom uspešno kombinirati sa drugim terapijama koje ciljuju 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. poglavljiju, u nedavnom istraživanju uspjeli su produžiti život dvaju miševa, jednoga starog jednu godinu i drugog dvije, za 24 i 13%, i to bez povećanja u stalosti tumora u odnosu na kontrolne miševe (Bernardes de Jesus i sur. 2012).

Budući da istraživanja mogla bi otkriti vrijedne informacije za borbu protiv raka, ublažavanje i usporavanje starenja i poboljšavanja medicinskih terapija u različitim područjima, poput presa iivanja kože, transplantacije koštane srži i srčanih bolesti ([http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shay-wright/intro/facts/sw\\_facts.html](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://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.hhmi.org/biointeractive/rna/rna_telomeres/01.html)

[http://www.mnhn.fr/mnhn/bpy/team3/previousachievement\\_team3.htm](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://www.senescence.info/cell_aging.html)

[http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shay-wright/intro/facts/sw\\_facts.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 e sekvene, npr. TTAGGG kod kralješnjaka, te proteini koji ih štite i sudjeluju u njihovoj funkciji. Jedna od njih jest razlikovanje krajeva kromosoma od dvolan anog 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 skra uje prilikom svake stani ne diobe. Kako se ne bi gubili geni, gube se telomere, sve dok ne dostignu tzv. Hayflickovu granicu kada se stanica prestaje dijeliti zbog nezašti enih kromosoma. Neke stanice i nestani ni organizmi eksprimiraju enzim telomerazu koji produljuje telomere s pomo u svoje proteinske domene i RNA kalupa. Telomerazu eksprimiraju npr. mati ne stanice, te stanice raka. Potonje su uspjele ugasiti pRB i p53 putove koji dovode do senescencije stanica ili apoptoze, te pove ati aktivnost telomeraze kako bi postale besmrte. Tako er se koriste i alternativnim putovima produljenja telomera koji uklju uju homolognu rekombinaciju. Pretpostavlja se da je senescencija evoluirala kako bi se sprije ila tumorigeneza. Znanstvenici su, ipak, uspjeli usporiti starenje miševa s pomo u telomeraze bez pove anja u estalosti stvaranja tumora. Kako je skra ivanje telomera jedan od razloga zašto starimo, u budu im e se istraživanjima možda prona i na in kako da se produži ljudski život. Tako er, cijepiva za rak temeljena na telomerazi ve 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.