

Telomer to jednostka strukturalno-funkcyjna obecna na końcach chromosomów. W ostatnich latach, dzięki lepszemu poznaniu budowy i funkcji telomeru i telomerazy wzrosło ich znaczenie w zrozumieniu procesu nowotworzenia. W onkogenezie telomer działa jako supresor nowotworowy. Zaburzenie jego funkcji i deregulacja aktywności telomerazy może być istotnym czynnikiem dla nowotworzenia.

Obecnie dzięki zdobytej wiedzy dotyczącej telomeru i telomerazy możliwe stało się projektowanie różnych leków i schematów terapii. Zapoczątkowano również hodowlę złożonych tkanek dla transplantologii.

Badania nad telomerem i telomerazą rozwijają się bardzo dynamicznie i na pewno ostatnie słowo w tym temacie nie zostało powiedziane.

**Słowa kluczowe:** telomer, telomeraza, onkogeneza.

## Telomer i telomeraza w onkogenezie

### *Telomeres and telomerase in oncogenesis*

Aldona Kowalska<sup>1</sup>, Artur Kowalik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dział Endokrynologii, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach, <sup>2</sup>Zakład Patologii Nowotworów, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach

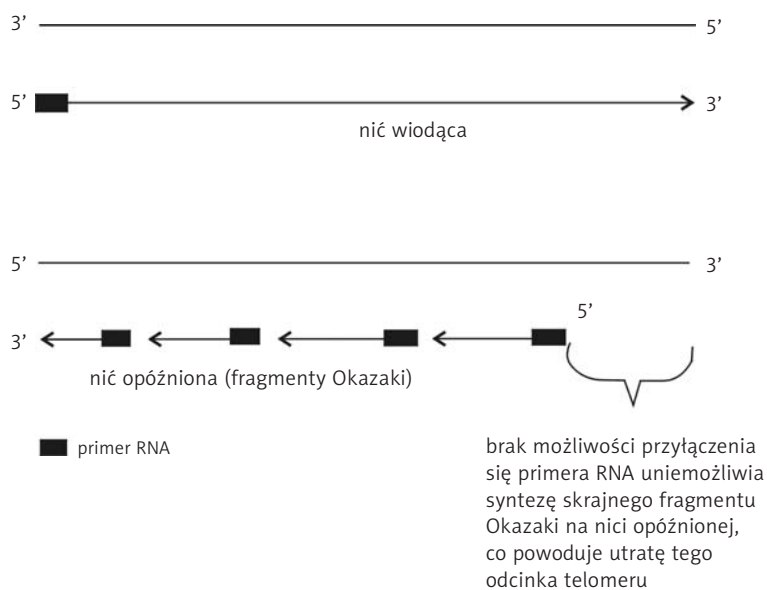
### Wstęp

Kancerogeneza to skomplikowany i wieloetapowy proces biologiczny, którego integralną częścią w większości nowotworów jest reaktywacja telomerazy. Poznanie funkcji i budowy telomerazy oraz telomeru jest więc niezbędne dla zrozumienia procesu nowotworzenia i onkogenezy.

### Rys historyczny

Pierwszy opis i nazwa telomeru (gr. *telos* – koniec; *meros* – część) pochodzi z prac Hermana J. Mullera i Barbary McClintock z lat 30. XX w. Autorzy przypisywali mu rolę ochronną dla końcowych odcinków chromosomów [1, 2]. W 1972 r. James D. Watson wykazał, że podczas procesów replikacji dochodzi do skracania chromosomów. Spowodowane jest to niepełną replikacją nici DNA przy końcu 5' [3] (ryc. 1).

Nieco wcześniej, w latach 60. Leonard Hayflick przedstawił biologiczne spojrzenie na proces starzenia. Wykazał, że ludzka komórka diploidalna może ulegać podziałowi tylko ograniczoną liczbę razy (*Hayflick limit* – ok. 60 podziałów). Jeśli komórka odbędzie ściśle zaprogramowaną, maksymalną liczbę podziałów, zachodzą w niej morfologiczne i biochemiczne zmiany blokujące proliferację. Stan ten nazwał spoczynkiem (*sencence*) [4, 5].



**Ryc. 1.** Problem replikacji końca 5' nici opóźnionej  
**Fig. 1.** End replication problem

The telomere is a structural and functional entity that is present on the ends of chromosomes. In the past few years the significance of telomeres and telomerase in neoplasia has grown due to better understanding of their structure and function.

In the process of oncogenesis telomeres act as tumour suppressors. Disturbance of their function and deregulation of telomerase activity are important factors for oncogenesis.

The present knowledge about telomerase and telomeres allows for designing drugs and therapeutic schemes useful in cancer. Composite tissue cultures useful for transplantology have also been developed.

Studies on telomeres and telomerase are developing dynamically and surely the last word has not been said.

**Key words:** telomere, telomerase, oncogenesis.

W latach 70. Aleksiej Ołownikow powiązał problem skracania chromosomu ze stanem uśpienia komórki. W jego teorii skracanie się telomeru jest wewnętrznym zegarem starzenia, który odlicza liczbę podziałów komórkowych zanim doprowadzi do zatrzymania komórki w fazie spoczynku [6].

Pierwsze badania struktury molekularnej telomeru u pierwotniaka *Tetrahymena pyriformis* przeprowadziła w 1978 r. Elizabeth Blackburn [7]. Sekwencję telomeru ludzkiego ustaliła Robin Allshire w 1988 r. [8]. W 1985 r. Carol Greider wyizolowała enzym telomerazę, który powodował wydłużanie telomerów [9]. W 1989 r. Gregg B. Morin opisał obecność telomerazy w ludzkich komórkach nowotworowych i powiązał jej aktywność z nieśmiertelnością tych komórek. Równocześnie ukazały się doniesienia C. Greider o braku telomerazy w zdrowych komórkach somatycznych [10, 11].

W latach 90. Jerry Shay i wsp. wykryli telomerazę w 90 na 101 badanych próbek komórek z ludzkich nowotworów i nie wykazali obecności telomerazy w żadnej z 50 różnych, prawidłowych komórek somatycznych. Obserwacje te wskazywały na istotną rolę telomerazy w procesie onkogenezy [12].

W 1997 r. Robert A. Weinberg i wsp. sklonowali gen odwrotnej transkryptazy telomerazy [13]. W 1997 r. Andrea G. Bodnar i wsp. wykazali, że ludzkie komórki, do których wprowadzi się gen telomerazy, podejmują produkcję tego enzymu i dzielą się podobnie jak komórki nowotworowe. W badanych hodowlach komórki dzieliły się prawie 100 razy, podczas gdy zdrowe komórki ludzkie są zdolne średnio do 70 podziałów [14]. To odkrycie naukowców amerykańskich dało nadzieję na potencjalne zastosowanie telomerazy w opóźnieniu procesu starzenia i wydłużeniu życia.

### Budowa telomeru

Telomer to element strukturalny chromosomów. Każdy chromosom ma dwa telomery umieszczone na jego końcach. W diploidalnej komórce ludzkiej znajdują się więc 92 telomery. Telomery nie zawierają żadnych genów i nie kodują białek. Są one zbudowane z tysięcy powtarzających się sekwencji 6 nukleotydów TTAGGG połączonych z białkami TBP (ang. *telomere binding proteins*). Wcześniejszy model telomeru zakładał jego prostą, liniową budowę (ryc. 2.). Składał się on z białek oraz telomerowej dwuniciowej sekwencji z wystającym jednoniciowym końcem 3' (o długości ok. 150 do 200 par zasad), bogatym w guaninę. Obecnie obowiązujący model, opracowany na podstawie badań z użyciem mikroskopu elektronowego jest bardziej skomplikowany w swojej przestrzennej strukturze – składa się z dwóch pętli, tj. D i T (ang. *D-Loop* i *T-Loop*) [15] (ryc. 3.).

Struktura przestrzenna telomeru powstaje prawdopodobnie z wystającej nici 3', która wypiera jedną z nici dupleksu kilkaset nukleotydów wcześniej, tworząc mniejszą pętlę D i większą T. W tworzeniu tej struktury (*capping*) i jej stabilizacji biorą udział wspomniane już wcześniej białka TBP [15]. Białka TBP są niejednorodną grupą protein, które tworzą dwa główne kompleksy białkowe TRF1 i TRF2 (ang. *telomere repeat factor 1* i *telomere repeat factor 2*). Kompleks białkowy TRF1 blokuje wydłużanie telomerów przez telomerazę, jak również ma swoje funkcje w regulacji wrzeciona mitotycznego. Przypuszcza się, że TRF1 może uczestniczyć w odpowiedzi systemów naprawczych na dwuni-



**Ryc. 2.** Pierwszy, klasyczny model budowy telomeru  
**Fig. 2.** First, "classical" model of telomere structure

ciowe uszkodzenia DNA. TRF2 jest regulatorem długości telomerów, jego nadekspresja powoduje ich skracanie. Brak aktywności tego kompleksu prowadzi do apoptozy i niehomologicznego łączenia końców (NHEJ – *nonhomologous end joining*) telomerów. Podjednostki białkowe TRF2 są kodowane m.in. przez geny (*MRE11/NBS1/RAD50*, *ATM*, *WRN*, *BLM*), których mutacje wiązane są z zespołami przedwczesnego starzenia [16].

Integralną częścią struktury telomerowej jest enzym telomeraza, który wydłuża telomer. Składa się z komponentu białkowego odwrotnej transkryptazy (hTERT) i nici RNA (hTERC/hTR) służącej za matrycę przy syntezie telomeru (gen *hTERC* stale ulega ekspresji w komórkach) [16].

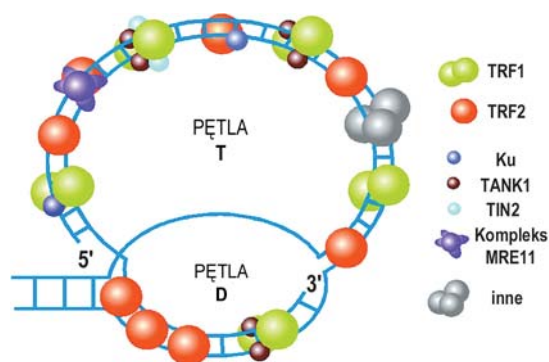
Telomeraza jest aktywna w komórkach embrjonalnych, u mężczyzn także w komórkach linii płciowej. Nie stwierdzono aktywności telomerazy w komórkach somatycznych, z wyjątkiem tkanek mających zdolność do odnawiania się, a mianowicie komórek macierzystych skóry, hematopoetycznych komórek macierzystych, aktywnych limfocytów, komórek krypt jelitowych [17].

W przeciwieństwie do zdrowych komórek somatycznych, komórki nowotworowe w znacznym odsetku wykazują aktywność telomerazy – w 90% typów nowotworów [17]. Komórki somatyczne, posiadające aktywną telomerazę (np. komórki krypt jelitowych) cechują się stałą zdolnością do proliferacji, co sprzyja gromadzeniu mutacji w genach istotnych dla procesu nowotworzenia. Należy nadmienić, że samo uniesmiertelnienie komórki (obecność wydłużającej telomer telomerazy) nie jest równoznaczne z fenotypem nowotworowym [14, 18], ale jest jedynie okolicznością, sprzyjającą uzyskaniu przez komórkę cech nowotworowych. Reaktywacja telomerazy w prawidłowych komórkach somatycznych (przed rozpoczęciem fazy M1) powoduje, że taka komórka dzieli się dłużej, nie wykazując cech nowotworowych, co wykorzystuje się w inżynierii biomedycznej (patrz niżej).

Obecność telomerazy nie jest jedynym sposobem na wydłużanie telomerów. Potwierdziły to badania na fibroblastach pochodzących od myszy z nieaktywnymi genami telomerazy, w których wykazano obecność alternatywnego mechanizmu wydłużania telomerów (ang. *alternative lengthening of telomeres* – ALT), niezależnego od telomerazy [19]. Mechanizm ten opiera się prawdopodobnie na homologicznej rekombinacji między siostrzanymi chromatydami [20] i może występować w komórce równocześnie z aktywną telomerazą [21].

### Funkcje telomeru

- Dzięki obecności telomeru komórka nie ma problemu z kompletną replikacją nici opóźnionej, a tym samym żadna część informacji genetycznej nie jest tracona podczas podziału. Skróceniu ulega jedynie telomer o ok. 50–150 par zasad.
- Struktura telomeru (ang. *capping*) chroni końce chromosomów przed atakiem egzonuklaz, które inaczej trawiłyby skrajne fragmenty DNA, degradując tym samym sekwencje kodujące informację genetyczną [16].
- Chroni chromosomy przed niehomologicznym łączeniem końców (NHEJ), tym samym zapobiegając niestabilnościom chromosomowym, w tym translokacjom, amplifikacjom i delecjom [22–24].
- Struktura telomeru pomaga systemom naprawczym rozróżnić uszkodzenie DNA od końca chromosomu [16].



Ryc. 3. Aktualny model struktury telomeru  
Fig. 3. Current model of telomere structure

- Telomer jest molekularnym zegarem, który informuje komórkę o przekroczeniu krytycznej liczby podziałów (skrócenie telomerów uniemożliwia utrzymanie właściwej struktury przestrzennej telomerów – ang. *uncapping*) i kieruje ją na drogę spoczynku (ang. *senescence*) lub apoptozy [25, 26].

### Telomer i telomeraza w onkogenezie

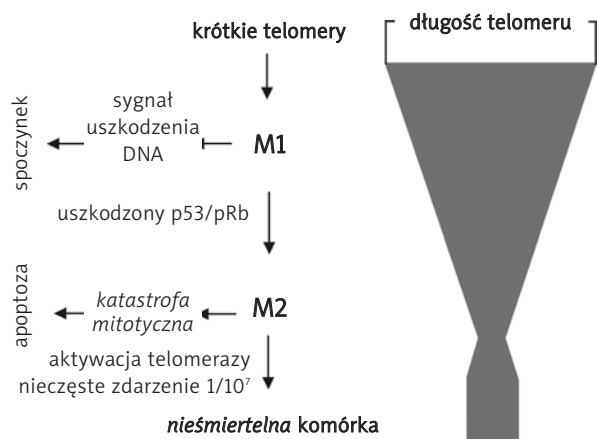
#### Reperacja czy prokreacja

Celem życia organizmów jest przekazanie materiału genetycznego i utrzymanie ciągłości gatunku. Dla utrzymania życia organizmu w jego ciele muszą zachodzić ściśle skoordynowane procesy naprawy, syntezy i kontrolowanej śmierci komórki – apoptozy.

Według teorii Kirkwooda (*Disposable Soma Theory*) ciało (*soma*) jest tylko przenośnikiem materiału genetycznego. Jeśli więcej energii jest przeznaczane na reperację ciała, tym mniej zostaje jej na reprodukcję i na odwrót. Bilans pomiędzy tymi dwoma procesami ma wpływ na szybkość starzenia i zależy od środowiska, w jakim dany organizm żyje. Organizmy mające wielu naturalnych wrogów (np. gryzonie) przeznaczają większą ilość energii na wczesną reprodukcję niż na naprawę ciała, które – co wysoce prawdopodobne – może paść łupem drapieżcy. Dla rodzaju ludzkiego, który wraz z postępem cywilizacji tak naprawdę nie ma naturalnych wrogów, a życia jest coraz dłuższe, korzystniejsze wydaje się być wydatkowanie większej części energii na procesy reperacyjne ciała (*soma*) niż reprodukcyjne. Zwiększająca się długość życia ludzi zwiększa jednak ryzyko powstawania nowotworów, co jest wynikiem wydłużenia okresu działania czynników onkogennych na komórki organizmu. Powstawanie nowotworów jest więc ceną, jaką płacimy za wydłużanie życia [27].

#### Telomer jako supresor nowotworowy

Czynnikiem ograniczającym liczbę podziałów są telomery. Działają one jak supresor procesu nowotworzenia, ponieważ ograniczona liczba podziałów zapobiega nagromadzeniu się krytycznej liczby (4–6) mutacji prowadzących do rozwoju nowotworu. Każda mutacja pojawia się w jednej komórce, z której powstający klon komórkowy (20–30 podziałów, ok. 1 mln komórek) ma większe szanse na nabycie kolejnej krytycznej mutacji. Ograniczanie liczby podzia-



**Ryc. 4.** Dwa krytyczne punkty kontrolne (M1 i M2) jakie komórka musi przejść, aby ulec nieśmiertelnieniu (zmodyfikowane z [86])  
**Fig. 4.** Two critical control points (M1 and M2) which a cell must pass to be immortal (modified from [86])

tów do ok. 60–70 jest więc mechanizmem supresji nowotworzenia, prowadzącym komórkę do wspomnianego już wcześniej spoczynku (faza M1) (ryc. 4.) [25, 26]. Badania wskazują, że nie średnia długość telomerów, ale najkrótsze z nich wywołują zatrzymanie podziałów komórkowych [28].

Podziały komórek prowadzą do systematycznego skracania się telomerów i zaburzenia ich przestrzennej struktury – *uncapping* – co aktywuje szlaki wykrywające uszkodzenia struktury DNA i prowadzi do zatrzymania podziałów komórek (uśpienie). Komórki w fazie uśpienia pozostają jednak aktywne metabolicznie. Jeżeli zaś komórka nabędzie bądź dziedziczy zmiany w kluczowych białkach (p53/pRb) dla wykrywania krótkich telomerów, komórki będą się dalej dzielić, a telomery będą się dalej skracać, aż komórka osiągnie fazę M2 (ryc. 4.). W fazie M2 krótkie telomery uruchamiają szlaki reperacyjne DNA (HR – *homologous recombination*, NHEJ), co powoduje łączenie się końców różnych chromosomów ze sobą i prowadzi do patologicznych mitoz, a w rezultacie do tzw. katastrofy mitotycznej (utrata żywotności komórki z powodu licznych aberracji chromosomowych). Komórka w fazie M2 jest kierowana na drogę apoptozy lub innego mechanizmu powodującego jej śmierć. Nie wszystkie komórki, które osiągną fazę M2 ulegają śmierci. Niektóre z nich ( $1/10^7$ ) dzięki zaburzeniom związanym z katastrofą mitotyczną, czy dziedzicznym skłonnościami (mutacje w supresorach i/lub onkogenach), pobudzają aktywność telomerazy lub ALT przez co osiągają nieograniczoną możliwość rozrostu i stają się nieśmiertelne [25, 26].

Należy nadmienić, że oprócz reaktywacji telomerazy do onkogenezy mogą się przyczyniać patologiczne zmiany w białkach (TRF1, TRF2 czy TANK1 i TANK2) współtworzących wspomnianą wyżej strukturę telomeru [16].

#### Poziom aktywności telomerazy jako marker diagnostyczny kancerogenezy

Telomeraza ulega aktywacji w komórkach 85–90% nowotworów [17]. Nie wykrywa się natomiast aktywności telome-

razy w komórkach somatycznych, z wyjątkiem komórek macierzystych gamet, skóry, jelita czy komórek układu immunologicznego [17]. Długość telomeru w komórkach nowotworowych jest zdecydowanie mniejsza niż w komórkach prawidłowych, dlatego też komórki nowotworowe potrzebują stałej aktywności telomerazy do procesów podziału, w przeciwieństwie do komórek somatycznych, które przez pewien czas mogą przetrwać bez aktywności tego enzymu [29, 30].

Obecnie dostępne są różne metody wykrywania obecności i aktywności telomerazy [31] począwszy od pierwszej opartej na technice PCR, tzw. TRAP (ang. *Telomeric Repeat Amplification Protocol*) [12]. Są one stosunkowo mało skomplikowane, czego rezultatem są próby ich adaptacji jako dodatkowego narzędzia diagnostycznego, umożliwiającego wykrycie, czy monitorowanie procesu nowotworowego metodą nieinwazyjną, np. nowotwory układu moczowego (diagnostyka z moczu) [32] czy mało inwazyjną za pomocą resztek materiału biologicznego uzyskanego za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (BAC) [33] i gruboigłowej [34].

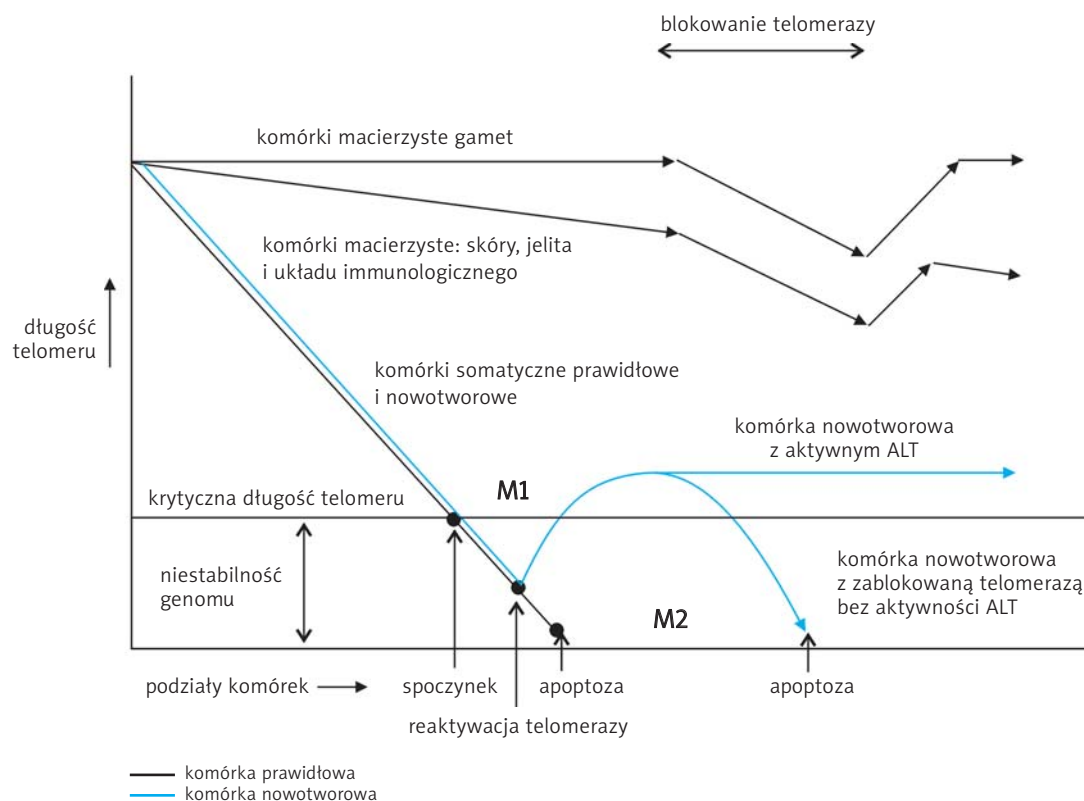
Problemem w diagnostyce cytologicznej są często małe ilości materiału, które generują trudności w stawianiu rozpoznania z tego typu preparatów. Próbuje się więc wykorzystać pomiar aktywności telomerazy (metoda: TRAP) bądź poziom transkrypcji *hTERT* (metoda: RT-PCR, ISH – hybridyzacja *in situ*) w celu rozróżnienia rozrostów łagodnych od rakowych w resztkach materiału pobopsyjnego, np. w przypadku diagnostyki zmian tarczycy [35, 36]. Badano również ekspresję *hTERT* mRNA za pomocą ISH w komórkach uzyskanych z płynów z opłucnej i otrzewnej, co okazało się również pomocne w uściśleniu rozpoznania na poziomie cytologii w rozróżnieniu zmian łagodnych i złośliwych [34].

Próbuje się również korelować obecność lub brak aktywności telomerazy z klasycznymi czynnikami prognostycznymi w celu optymalizacji i odpowiedniej selekcji pacjentów do określonej terapii [37, 38].

Poremba i wsp. [39] analizowali ekspresję białka hTRET (metoda: IHC – immunohistochemia) oraz genu *hTR/hTERT* (ISH) w 611 przypadkach raka piersi za pomocą macierzy tkankowych (TMA). Wykazali, że pacjentki z nowotworami o wysokiej ekspresji obu genów miały krótszy całkowity czas przeżycia w porównaniu z kobietami z niższą ekspresją.

Kamori i wsp. [40] w materiale pochodzącym z mastektomii wykryli telomerazę w 56/64 gruczolakorakach, ale w żadnym z dwóch guzów liściastych piersi. Nie wykryto żadnej korelacji pomiędzy ekspresją *hTERT* (mierzoną IHC i ISH) a czynnikami klinicznopatologicznymi (wiek, typ histologiczny, wielkość guza, stan węzłów chłonnych, nawroty, ekspresja ER i PR). Zaobserwowano wysoką korelację ( $p < 0,005$ ) pomiędzy ekspresją mRNA (*hTERT*) mierzoną ISH a ekspresją białka (*hTERT*) telomerazy mierzoną IHC, co może ułatwić wprowadzenie telomerazy jako markera diagnostycznego ze względu na standardowość metody IHC.

Heaphy i wsp. [41], analizując obok niestabilności mikrosatelitarnych zawartość telomerowego DNA (z ang. *TC – telomere DNA content*), będącego surogatem długości telomerów, wykazali, że w histologicznie normalnej tkance piersi długość telomerów wzrasta wraz z odległością od tkanki nowotworowej. W odległości 1 cm (standardowa wielkość marginesu chirurgicznego) od tkanki nowotworowej długość telomerów jest podobna jak w nowotworze, a w odle-



**Ryc. 5.** Długość telomeru w komórkach prawidłowych i nowotworowych przed, w trakcie i po terapii inhibitorem blokującym aktywność telomerazy, a nie blokującym ALT (zmodyfikowane z [30])

**Fig. 5.** *Telomere length in normal and cancer cells before, in the course of and after inhibitor treatment that blocks telomerase activity and does not block ALT (modified from [30])*

głości 5 cm telomery osiągają wymiary porównywalne z telomerami z komórek krwi obwodowej. Gradient długości telomerów może mieć związek ze znaną od lat 50. tzw. teorią rakowacenia pola (ang. *field cancerization*) [42]. Jeśli rezultaty badań Heaphy i wsp. [41] zostaną potwierdzone w innych wieloosrodkowych badaniach, to będą mogły wpływać na ustalanie szerokości marginesów w tumorektomiach, a sama analiza długości telomeru może się stać istotnym markerem w chirurgii onkologicznej.

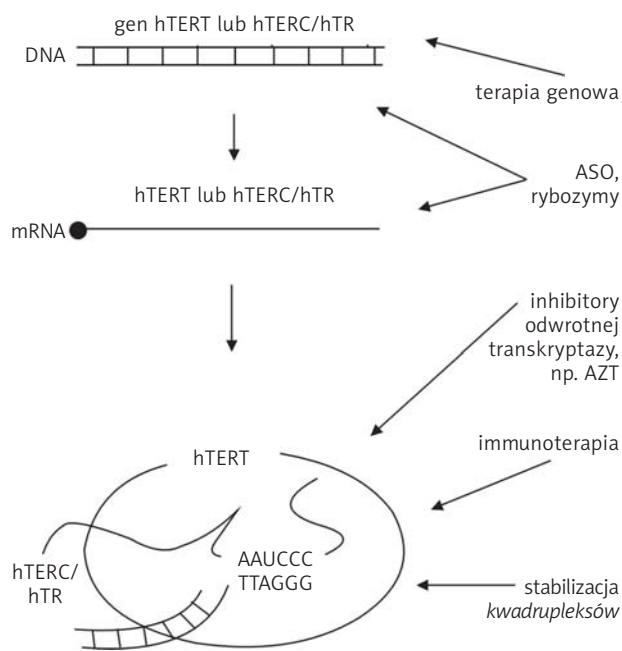
### Telomeraza jako cel terapii

Komórki nowotworowe mają krótkie telomery w porównaniu z komórkami prawidłowymi i są całkowicie zależne od aktywności telomerazy (wyjątek: komórki wykorzystujące niezależny od telomerazy mechanizm ALT [19]) – ryc. 5. Stwarza to możliwość blokowania procesu nowotworowego poprzez blokowanie aktywności telomerazy praktycznie bez skutków ubocznych dla normalnych komórek. Komórki prawidłowe zależne od aktywności telomerazy (patrz wyżej) *przetrzymają* okres działania inhibitora telomerazy, a po jego odstawieniu naturalna aktywność tego enzymu odbuduje fizjologiczną długość telomeru (okienko terapeutyczne) [29] (ryc. 5.).

Komórki nowotworowe mające krótkie telomery, przestaną się dzielić i będą kierowane np. na drogę apoptozy,

z wyjątkiem komórek mających aktywny mechanizm ALT (ryc. 5.). Główne metody blokowania telomerazy:

- immunoterapia – szczepionki przeciwko telomerazie,
- terapia genowa:
  - a) geny samobójcze lub geny wirusów onkolitycznych (np. CG5757), będących pod kontrolą promotora genu *hTERT*, ekspresja nieaktywnej katalitycznie podjednostki telomerazy hTERT (DN-hTERT z ang. *dominant negative hTERT*),
  - b) antysensowne oligonukleotydy (ang. *antisense oligonucleotide* – ASO) to chemicznie zmodyfikowane, DNA podobne, RNA podobne jednoniciowe cząsteczki o długości ok. 17–22 nukleotydów, specyficznie blokujące ekspresję danego genu, np. GRN163L [43],
  - c) siRNA (z ang. *small interference RNA*) – oligonukleotydy występujące naturalnie i mogą być syntetyzowane *in vitro* mające zdolność do tworzenia kompleksu z białkami, które mogą specyficznie degradować mRNA lub blokować jego translację, wyciszając tym samym ekspresję danego genu [43],
  - d) rybozomy (typu *hammerhead*) to krótkie (ok. 40 nukleotydów) sekwencje RNA, mające zdolność do specyficznego przecinania innego danego RNA [43],
- inhibitory odwrotnej transkryptazy – małe cząsteczki syntetyzowane chemicznie, np. AZT,



**Ryc. 6.** Główne metody blokowania telomerazy i ich konkretne cele  
**Fig. 6.** Main methods of telomerase blocking and their targets

- stabilizacja *kwadrupleksów* (przestrzenna konformacja formowana przez jednoniciowy telomerowy DNA bogaty w guaninę [44]), np. BRACO – 19,
- blokowanie dostępu telomerazy do telomeru [45–48] (ryc. 6.).

### Immunoterapia

Najbardziej zaawansowane prace dotyczą immunoterapii, kiedy to jako antygen stosuje się krótkie peptydy pochodzące z podjednostki katalitycznej telomerazy.

W 1997 r. Vonderheide i wsp. zidentyfikowali 9-amino-kwasowy peptyd (ILAKFLHWL), który oznaczyli jako I540. Epitop ten wykazywał dużą immunogenność i wiązany był przez powszechny typ MHC klasy I (z ang. *major histocompatibility complex* – główny układ zgodności tkankowej), tj. HLA-A2 [49]. Ta sama grupa badaczy wykazała w badaniach przedklinicznych, że komórki dendrytyczne prezentujące kompleks I540-HLA-A2 aktywowały *ex vivo* limfocyty cytotoksyczne CD8+ (CTL), pochodzące zarówno od pacjentów zdrowych, jak i z chorobą nowotworową. Uaktywnione w ten sposób CTL *in vitro* niszczyły komórki nowotworowe z ekspresją telomerazy pochodzące z linii komórkowych nowotworowych, jak i izolowane z guzów pobranych od pacjentów [50]. W badaniach przeprowadzonych na pacjentach z zaawansowanym rakiem piersi i prostaty, u części (4/7) uzyskano aktywność limfocytów cytotoksycznych przeciwko telomerazie, szczepiąc kilkakrotnie (6 dawek, 1 dawka/tydz.) chorych, autologicznymi (w obrębie jednego organizmu) komórkami dendrytycznymi prezentującymi kompleks I540-HLA-A2. Nie zaobserwowano poważnych skutków niepożądanych, a nawet rozmary pochodzące ze szpików pacjentów nie wykazywały żadnych zmian [51].

Su i wsp. [52] przeprowadzili badanie kliniczne I fazy, szczepiąc komórkami dendrytycznymi (DC – z ang. *dendri-*

*tic cells*) transfekowanymi mRNA *hTERT* lub chimerycznym mRNA kodującym białko związane z błoną lizosomu (LAMP – *lysosome-associated membrane protein-1*) i *hTERT* 20 pacjentów z zaawansowanym rakiem prostaty. 12 pacjentów szczepiono przez 3 tyg. (1 dawka na tydz.) w tym 6 DC + *hTERT* i 6 DC + LAMP-*hTERT*, a 8 przez 6 tyg. (1 dawka na tydz.), w tym 5 DC + *hTERT* i 3 DC + LAMP-*hTERT*. U 19/20 pacjentów zaktivowano CTL (CD8+), a w grupie szczepionej z komponentem chimerycznego mRNA zaobserwowano także aktywację limfocytów CD4+ oprócz CD8+. U pacjentów szczepionych 6 dawkami z chimerycznym mRNA wykazano przejściowy spadek poziomu PSA, jak również ilości komórek nowotworowych krążących we krwi chorych. W trakcie i po szczepieniu u żadnego z pacjentów nie wykryto poważnych skutków ubocznych, jednakże 6/20 pacjentów zmarło z powodu progresji choroby. Należy nadmienić, że celem tego badania było sprawdzenie bezpieczeństwa stosowania tego typu szczepionki, jak również jej skuteczności w indukowaniu odpowiedzi klinicznej [52].

Obecnie prace dotyczące immunoterapii przeciwko telomerazie osiągnęły fazę I/II, a nawet II i III badań klinicznych [53]. Grupa badaczy z Norwegii [54] przeprowadziła niedawno szczepienie 26 pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc. Szczepionka miała postać mieszanki dwóch peptydów pochodzących z podjednostki katalitycznej telomerazy (GV1001-*hTERT*:611-626 i HR2822-*hTERT*:540-548 identyczny z I540 [49]) oraz czynnika stymulującego kolonie granulocytów i makrofagów (GM – CSF). W ok. 50% przypadków, uzyskano aktywację układu immunologicznego, skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym. U 1 pacjenta stwierdzono całkowitą remisję nowotworu. Pacjent ten produkował limfocyty cytotoksyczne, specyficznie rozpoznające jeden z peptydów szczepionki. U żadnego ze szczepionych pacjentów nie wystąpiły poważne skutki niepożądane [54].

Należy nadmienić, że norweska grupa badaczy stosuje inny typ szczepienia, a mianowicie komórki dendrytyczne z wprowadzonym mRNA: z guza (czerniak) [55], z linii komórkowych nowotworowych (prostata) [56]. U większości pacjentów biorących udział w badaniach I/II fazy zaobserwowano odpowiedź kliniczną (np. spadek poziomu PSA [56]), związaną z działaniem szczepionki, nie obserwując poważnych skutków niepożądanych [55, 56].

Gaudernack i wsp. planują badanie kliniczne z wykorzystaniem DC transfekowanych mRNA z guza danego pacjenta oraz syntetycznym mRNA *hTERT* jako szczepionkę [57]. Jednakże, aby myśleć o wprowadzeniu tych szczepionek do leczenia pacjentów, muszą zostać przeprowadzone badania II i III fazy klinicznej, w tym kombinacje ze standardowymi chemioterapeutykami [53], czy regulatorami układu immunologicznego [54], aby przez dłuższy czas podtrzymać aktywność układu immunologicznego. Z regulatorami układu immunologicznego należy jednak zachować ostrożność, jak pokazało badanie kliniczne na zdrowych ochotnikach dotyczące agonistycznego przeciwciała (TGN1412) dla receptora CD28, które wywołało tzw. burzę cytokinową (z ang. *cytokine storm*), która mogła doprowadzić do śmierci wszystkich 6 ochotników [58].

Dotychczas nie udało się uzyskać trwałej odpowiedzi klinicznej, jednak do kontynuacji badań zachęca brak istot-

nych niepożądanych skutków i występująca przejściowa odpowiedź kliniczna.

### Terapia genowa

Równie pręźnie rozwija się terapia genowa skierowana na wybiórcze niszczenie komórek z ekspresją telomerazy. Jak wspomniano wyżej, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, w większości komórek nowotworowych telomeraza jest aktywna [17], co sugeruje, że promotor genu kodującego katalityczną podjednostkę telomerazy (hTERT) jest bardzo aktywny. Tę aktywność promotora próbuje się wykorzystać do celów terapii genowej, łącząc go z sekwencją kodującą białka prowadzące do apoptozy, enzymy metabolizujące protoksyny, czy kluczowe białka dla cyklu życiowego wirusa litycznego [46]. Tak powstający gen chimeryczny (promotor genu *hTERT* + sekwencja kodująca dane białko pośrednio lub bezpośrednio niszczące komórkę) powinien ulegać ekspresji w większości komórek nowotworowych, zabijając je w ten sposób wysoce selektywnie, ze znikomymi skutkami ubocznymi dla komórek prawidłowych [46]. Szczególnie zaawansowane prace dotyczą wirusa onkolitycznego o enigmatycznej nazwie CG5757. CG5757 to zmodyfikowany adenowirus, który powstał po zamianie promotorów typu dzikiego dla genów E1A i E1B (kierują cyklem życiowym wirusa), odpowiednio na promotory dla E2F1 i hTERT (promotor dla E2F1 jest aktywny w komórkach z defektem białka Rb-85% nowotworów, a gen hTERT ulega ekspresji w ok. 90% nowotworów – patrz wyżej) [59]. Tak zmodyfikowane wirusy wykorzystano w badaniach przedklinicznych (w tym na myszach), uzyskując bardzo obiecujące rezultaty [59].

Wirus CG5757 od 100 do 10 tys. razy efektywniej replikował w komórkach nowotworowych, w porównaniu z komórkami prawidłowymi, niszcząc bardzo selektywnie te pierwsze. Po dożylnym wprowadzeniu wirusa do organizmu myszy pozbawionych odporności nie obserwowano poważnych skutków ubocznych (przejściowa utrata masy ciała i nieznacznie podwyższona aktywność enzymów wątrobowych) [59]. Skuteczność działania CG5757 badano na myszach z podskórnymi implantowanymi ludzkimi komórkami nowotworowymi z raka pęcherza lub płuc (myszy z tzw. ksenograficznym nowotworem), którym bezpośrednio do guza podawano wirusa. W 4. tyg. od pierwszej iniekcji zaobserwowano zmniejszenie o ok. 30% objętości wyjściowej nowotworu pierwotnego w porównaniu z nowotworem kontrolnym, którego objętość w tym czasie wzrosła ponaddziesięciokrotnie, a ok. 50% nowotworów całkowicie zanikło [59]. Analizowano również skuteczność wirusa podawanego dożylnie (1. i 4. dnia eksperymentu) myszom z implantowanym podskórnym ludzkim nowotworem prostaty, a po 6 tyg. obserwowano spowolnienie wzrostu nowotworu o ok. 72% w porównaniu z myszą, której aplikowano *placebo* [59].

Wirth i wsp. [60] wykazali, że adenowirus (Ad) z wprowadzonym promotorem hTERT zamiast promotora dla E1A (hTERT-Ad) wykazywał dużą selektywność replikacji i rozprzestrzenienia infekcji tylko w komórkach linii nowotworowych z ekspresją hTERT, czego nie zaobserwowano w hepatocytach bez ekspresji telomerazy. Po jednorazowej aplikacji takiego wirusa do guza myszom z ksenograficznym nowotworem (komórki linii nowotworu wątroby) w 4. tyg.

zaobserwowano znaczne spowolnienie, a ostatecznie całkowite zahamowanie wzrostu nowotworu.

Ta sama grupa badaczy [61] pokazała skuteczność aplikowania hTERT-Ad w przezwyciężeniu oporności na leczenie chemioterapią (doksorubicyna) i TRAIL (czynnik martwicy nowotworów związany z ligandem indukującym apoptozę – ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) myszy z ksenograficznym nowotworem (pierwotny rak wątroby – HCC). Należy nadmienić, że chemioterapia nie blokowała wirusii Ad-hTERT. Po upływie tygodnia od ostatniej iniekcji obserwowano dalsze namnażanie i rozprzestrzenianie się hTERT-Ad w komórkach nowotworu. Zaobserwowano również nieznaczne podwyższenie aktywności enzymów wątrobowych w surowicy myszy poddanych terapii wirusem w stosunku do myszy kontrolnych. Aby badać systemową toksyczność wirusa myszom podawano dożylnie hTERT-Ad i wykryto jego obecność za pomocą PCR w wątrobie, śledzionie i szpiku. Nie wykazano długoterminowej toksyczności w obrazie krwi, pomimo aktywności telomerazy w komórkach macierzystych (krwiotwórczych) [61]. Może to związek ze wspomnianą przez ten sam zespół małą skłonnością do zakażenia przez wirus komórek nienabłonkowych, takich jak komórki macierzyste [60].

Z przeprowadzonych analiz wynika [59–61], że zmodyfikowany adenowirus jest wysoce selektywny, jednakże nie wiadomo, czy po podaniu wirusa człowiek nie wytworzy silnej (niekontrolowanej) odpowiedzi immunologicznej przeciwko niemu, zmniejszając jego skuteczność i niszcząc przy okazji własne komórki. Arbitralnym rozwiązaniem może być przedstawione w ww. eksperymentach [59–61] podawanie wirusa bezpośrednio do guza, co wydaje się być skuteczniejsze niż aplikowanie dożylnie. Może to być skuteczna forma terapii dla nowotworów litych rosnących miejscowo (wczesne stadium choroby), lub w połączeniu z klasycznymi chemioterapeutykami (osłabiają – *modulują* odporność immunologiczną pacjenta) jako terapia systemowa zaawansowanych nowotworów litych i nowotworów układu krwiotwórczego. Należy nadmienić, że zanim terapia genowa trafi do kliniki, musi pokonać niemałą dozę sceptycyzmu wywołanego niepowodzeniami w jej wdrażaniu podczas ostatniej dekady (śmierć 18-letniego Jessego Gelsingera w ciągu 96 godz. od podania *leczniczych* adenowirusów 17 września 1999 r.).

Zmodyfikowany oligonukleotyd (ISIS 24691) to anty-sensowy [43] inhibitor, blokujący telomerazę, wiążąc się do hTERT/hTR. ISIS 24691 użyto w przedklinicznych badaniach na liniach komórkowych raka prostaty o genotypach (DU145-Rb<sup>-</sup>, p53<sup>-</sup> i LNCaP-Rb<sup>+</sup>, p53<sup>+</sup>) [64]. ISIS 24691 nie blokował natychmiast proliferacji, ale po ok. 70–80 dniach podawania leku wywoływał skracanie telomerów. Komórki linii LNCaP szybciej były kierowane na drogę apoptozy i wcześniej traciły zdolność do tworzenia kolonii na agarze w porównaniu z DU145. Prawdopodobnie ma to związek z genotypami tych linii komórkowych (patrz wyżej). Wykonano też analizy na myszach z implantowanymi podskórnymi komórkami z ww. linii (model ksenograficzny), które wcześniej hodowano w obecności ISIS 24691. I tak myszy z implantowanymi komórkami LNCaP rozwijały małe nowotwory lub nie rozwijały ich w ogóle, a myszy z implantowanymi komórkami DU145 rozwijały nowotwory mniejsze w porównaniu z myszami kontrolnymi (bez hodowli w obecności ISIS 24691). Traktowanie komórek LNCaP ISIS 24691 przed implantowaniem

do myszy znacznie obniżało ilość wydzielanego PSA w porównaniu z myszami kontrolnymi [62]. Krótkie działanie ISIS 24691 (1 dzień) nie wzmagalo hamującego działania klasycznych chemioterapeutyków (cisplatyny, karboplatyny, doksorubicyny, etopozydu lub paklitakselu) na proliferację komórek (LNCaP i DU145), co – jak sugerują autorzy – może być wynikiem powolnego skracania telomerów zanim osiągną one krytyczną długość. Dłuższe traktowanie (ok. 60 dni) komórek DU145 oligonukleotydem ISIS 24691 uczulało na leczenie cisplatyną i karboplatyną, a niespodziewanie nie miało wpływu na komórki LNCaP, co może mieć związek, jak przypuszczają autorzy, z tłem genetycznym użytych linii komórkowych (patrz wyżej) [62]. Mankamentem użycia tej metody jest długi czas (ok. 2 mies.) zanim dojdzie do zatrzymania podziałów, co może sprzyjać aktywacji ALT.

Spośród inhibitorów telomerazy duże nadzieje wiąże się ze zmodyfikowanym antysensowym oligonukleotydem (13 nukleotydów – GRN163L), również blokującym część matrycową (hTERC/hTR) telomerazy. Jak wykazały badania na liniach komórkowych i zwierzętach, dzięki swej budowie chemicznej (oligonukleotydlipid jest rozpuszczalny w wodzie, oporny na nukleazy, silnie wiąże się z docelową sekwencją i łatwo przenika przez błony komórkowe), dobrze się wchłania i jest skuteczny w minimalnych dawkach, zmniejszając radykalnie wystąpienie toksycznych skutków ubocznych [63]. GRN163L silnie blokuje podziały komórkowe i zapobiega tworzeniu kolonii przez komórki raka piersi [64] i płuc [63], już po tygodniowej ekspozycji 1  $\mu$ M inhibitora [63, 64], bez względu na długość telomerów. Podawany również przezskórnym blokuje przerzuty u myszy z zaindukowanym rakiem płuc, nie powodując u nich systemowej toksyczności [63]. Zaletą inhibitora jest szybkie zatrzymanie podziałów niesprzyjające aktywacji ALT, jak również niski poziom dawki skutecznej. Wynika to prawdopodobnie z ww. właściwości tego oligonukleotydlipidu, co może zwiastować rychłe wprowadzenie tego leku do badań klinicznych.

Li i wsp. [65] wykazali, że po wprowadzeniu DNA kodującego zmutowaną podjednostkę hTERC (MT-hTERC), za pomocą zmodyfikowanego, bardzo wydajnie infekującego wirusa HIV (HIV-MT-hTERC), do linii komórkowych LOX (czerniak) i UM-UC-3 (rak pęcherza moczowego) z aktywną telomerazą (ściślej z ekspresją *hTERT*) spowodowało, że telomeraza syntetyzowała telomerowy DNA o sekwencji nierozpoznawalnej przez białka uczestniczące w metabolizmie telomerów, co powodowało *uncapping*. W rezultacie już po 5 i 8 dniach od infekcji obserwowano bardzo szybkie zatrzymanie podziałów i apoptozę, bez masowej utraty telomerowego DNA oraz silną aktywację szlaków związanych z odpowiedzią na uszkodzenie DNA (nadekspresja p21 czy GADD45). Efekt ten był niezależny od statusu (prawidłowe czy zmutowane) białka p53. Infekcja HIV-MT-hTERC linii komórkowej VA13 bez aktywnej telomerazy (wykorzystuje szlak ALT) nie blokuje wzrostu komórek [65].

Koekspresja siRNAhTERC (siRNA hTERC degraduje mRNA hTERC) z MT-hTERC (HIV-siRNA hTERC/MT-hTERC) wzmagala działanie tego ostatniego. Komórki linii UM-UC-3 infekowane HIV-siRNAhTERC/MT-hTERC w 18. dniu po podskórnym implantowaniu myszom tworzyły mniejszą objętość nowotworu o słabym unaczynieniu (zatrzymanie wzrostu i redukcja angiogenezy) w porównaniu z ksenograficznym

modelem kontrolnym [65]. Ta sama grupa badaczy [66] wykazała, że infekcja zmodyfikowanym wirusem HIV z ekspresją siRNAhTERC (HIV-siRNAhTERC) również powodowała bardzo szybkie zatrzymanie wzrostu i apoptozę (w ciągu kilku podziałów) różnych linii komórek nowotworowych (LOX, HCT116, MCF-7, BT474 LNCa; wyj VA13 mechanizm ALT) [66]. Ekspresja siRNAhTERC, podobnie jak ekspresja MT-hTERC nie powodowała masowego skracania telomerów i nie wzmagala funkcjonalnego białka p53. Ekspresja siRNA nie wywoływała natomiast *uncapping* czy aktywacji szlaków związanych z uszkodzeniem DNA (nie przypomina fenotypu *senescence*) w przeciwieństwie do ekspresji MT-hTERC [66].

Po 5 dniach od infekcji HIV-siRNAhTERC komórek linii HCT116 (rak jelita) mierzono ekspresję genów za pomocą mikromacierzy i wykazano, że siRNAhTERC obniża ekspresję genów związanych z progresją cyklu komórkowego (cyklina G2 czy Cdc27), jak również ekspresję genów związanych ze wzrostem nowotworu, angiogenezą, przerzutowaniem (np. integryna  $\alpha$ V czy protoonkogen Met). Nie wykryto aktywacji genów związanych z odpowiedzią na interferon, co wskazuje na małą toksyczność wektora *per se* i daje potencjalne szanse na zastosowanie w terapii genowej [66].

Należy nadmienić, że globalny profil ekspresji genów komórek zainfekowanych wirusem powodującym ekspresję siRNAhTERC był zasadniczo różny od komórek z ekspresją MT-hTERC [66], czego rezultatem są zapewne różnice w mechanizmach powodujących zatrzymanie podziałów komórkowych (patrz wyżej). Blokowanie podziałów za pomocą siRNAhTERC/MT-hTERC wydaje się być bardzo obiecujące w terapii, ponieważ działa na aktywną telomerazę (90% nowotworów ma aktywną telomerazę), jej wynik jest niezależny od białka p53 (bardzo często zmutowane w nowotworach), długości telomerów, tempa ich skracania, a wektor (zmodyfikowany HIV) nie wywołuje skutków ubocznych. Powyższe wyniki opierają się jednak głównie na badaniach *in vitro* (kultury komórkowe) i ksenograficznym modelu nowotworu.

Jak wspomniano wyżej, infekcja wektorem powodującym koekspresję siRNAhTERC/MT-hTERC (HIV-siRNAhTERC/MT-hTERC) wywoływała szybkie zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę komórek. Goldkorn i Blackburn [67] wykazali, że koekspresja siRNAhTERC/MT-hTERC blokuje szybko (już 3 dni po infekcji) podziały tylko wtedy, jeżeli telomeraza może aktywnie wydłużać telomer, a dopiero po 9 dniach, gdy jest nieaktywna katalitycznie (mutacja D668A DN-hTERT) i nie osiąga statystycznej istotności, kiedy jest aktywna katalitycznie, ale nie może się wiązać z telomerem (mutacja N125A + T126A).

Wyciszenie ekspresji białek związanych z telomerem (TRF2 czy hRap1) wzmagala działanie konstruktów siRNAhTERC/MT-hTERC, co potwierdza hipotezę, że mutacja sekwencji telomeru uniemożliwia przyłączanie się do niego białek fizjologicznie związanych z sekwencją telomeru [67].

Inni badacze [68] analizowali wpływ blokowania ekspresji hTERT okligonukleotydami antysensowymi (ASO) transfekując komórki linii raka pęcherza moczowego (EJ28). Transfekcja ASO powodowała indukcję genów odpowiedzi na stres (np. IL6, IL8, EGR1 czy GADD45 i GADD34), a więc genów niezwiązanych bezpośrednio ze specyficznym blokowaniem ekspresji hTERT (pomimo braku istotnych homo-



logii użytego ASO do sekwencji innych niż *hTERT* mRNA). ASO obniżały ilość mRNA *hTERT* o ok. 50%, a wzrost komórek w ciągu 24 godz. o ok. 33%. Dla porównania, autorzy blokowali ekspresję za pomocą siRNA *hTERT* i wykazali, że w ciągu 24 godz. zmniejszają poziom mRNA *hTERT* o ok. 55% w porównaniu z kontrolą, ale w przeciwieństwie do ASO nie obserwowano żadnych zmian w żywotności, proliferacji komórek lub częstości występowania apoptozy w ciągu 24 godz. od transfekcji. Analiza za pomocą mikromacierzy wykazała, że siRNA *hTERT* hamował m.in. ekspresję dwóch protoonkogenów EGFR i FOSL1 [(FRA1) – komponent kompleksu transkrypcyjnego AP1]. Jak pokazały mikromacierze, ASO i siRNA wywoływały zupełnie inne zmiany w profilach ekspresji genów. Oba inhibitory (siRNA i ASO *hTERT*) redukowały istotnie poziom mRNA *hTERT*, ale tylko ten ostatni powodował szybkie zatrzymanie podziałów komórek, co może mieć związek z aktywacją genów związanych ze stresem komórkowym, a nie bezpośrednio z obniżeniem ekspresji mRNA telomerazy [68]. Badano również kombinacje siRNA *hTERT* z chemioterapeutykami. I tak np. cisplatyna i mitomycyna w połączeniu z transfekcją siRNA powodowała 50-procentową redukcję liczby komórek nowotworowych w porównaniu z kontrolą (mitomycyna czy cisplatyna + niespecyficzny siRNA), w ciągu 72 godz. i ponadto zwiększyła się częstość apoptozy [68].

Ekspozycja linii komórkowej raka prostaty (DU145) na zmodyfikowany antysensowy oligonukleotyd RNA, blokujący prawidłowe dojrzewanie pre-mRNA *hTERT* powodowała wczesne zmniejszanie tempa podziałów oraz apoptozę bez oznak dużej utraty długości telomerów [69].

Zmodyfikowany antysensowy oligonukleotyd RNA szybko (już w ciągu 18 godz.) powodował zmniejszenie ekspresji *hTERT*, co objawiało się spadkiem aktywności telomerazy (18 godz. 45% – 72 godz. 95%), a ostatecznie zwiększoną liczbą komórek (o ok. 50%) ulegających apoptozie. Ekspresja *hTERT*, jak i aktywność telomerazy stopniowo spadała w ciągu 72 godz. od usunięcia inhibitora z pożywki, a apoptoza najczęściej następowała w 48. godz., a stopniowo spadała w ciągu kolejnych 24 godz. po usunięciu oligonukleotydu [69]. 18-godzinna ekspozycja na 0,5 uM antysensowy oligonukleotyd hamowała wzrost komórek wraz z upływem czasu osiągając 78% 48–72 godz. po usunięciu inhibitora. Oligonukleotyd specyficznie blokował splajsing pre-mRNA *hTERT*, ponieważ nie wpływał na wzrost komórek z ekspresją cDNA *hTERT* (linia komórkowa US-OS – *human osteogenic sarcoma*). Oligonukleotyd nie powodował masowej erozji telomerów [69]. Należy nadmienić, że blokowanie innym specyficznym ASO, tyle że podjednostki RNA telomerazy (*hTERC/hTR*) wykazało, że 5 uM oligonukleotydu (w 10-krotnie większym stężeniu w porównaniu z oligonukleotydem blokującym *hTERT*) hamowało aktywność telomerazy efektywnie w 1. dobie po odstawieniu inhibitora, przy czym z upływem czasu jego wpływ zaczął zanikać. Pomimo blokady aktywności telomerazy oligomer nie redukował proliferacji komórek DU145 (p53<sup>-</sup>) ani nie indukował znaczącej ilości apoptozy [69].

Apoptoza wywołana przez blokowanie ekspresji *hTERT* może mieć swoje źródło w funkcjach tego ostatniego, niezależnych od wydłużania telomerów. Całkowite wyciszenie ekspresji *hTERT* za pomocą siRNA nie miało wpływu na pro-

liferację komórek, ale uczuła je na chemioterapię, która wywoływała apoptozę związaną z mitochondriami. Wywołanie apoptozy było niezależne od białka p53, a zależało od białka Bax. Reasumując, *hTERT* blokuje szlak apoptozy związany z mitochondriami [70].

Potrzebne są dalsze badania dotyczące swoistości blokowania *hTERT* metodami siRNA i ASO i ich ewentualnych skutków ubocznych, zanim te metody można będzie wprowadzić do kliniki.

Wśród wymienionych wyżej inhibitorów stosowanie rybozymów niszczących transkrypty (mRNA) [43] genów kodujących podjednostki telomerazy (*hTERT* i/lub *hTERC/hTR*) w różnych komórkach nowotworowych przyniosło obiecujące rezultaty [47]. I tak np. degradacja *hTERC/hTR* w komórkach raka piersi powodowała blokadę aktywności telomerazy, skracanie telomerów, spowolnienie podziałów komórek i apoptozę w większości analizowanych klonów komórkowych [71]. Należy nadmienić, że badania przeprowadzono *in vitro* (na linii komórkowej MCF-7), jednak zastosowana metoda dostarczania rybozymu do komórek (kationowy liposom DOTAP) niesie duże nadzieje ze względu na ich możliwości selektywnego dostarczania swej zawartości do komórek docelowych [72].

## AZT

AZT od dawna wykorzystywany w terapii ludzi zakażonych HIV użyty w kombinacji z paklitaksem wzmacniał działanie antynowotworowe *in vitro* i *in vivo* tego ostatniego [73].

Paklitaksel indukował apoptozę, a także erozję telomerów (w komórkach będących w fazie mitozy, a nie w interfazie), przejściowo wzmacniał aktywność telomerazy (erozja telomerów wzmacnia aktywność telomerazy – sprzężenie zwrotne) w komórkach linii nowotworowej krtani (FaDu). AZT powodował stopniowe skracanie telomerów i spowalniał wzrost komórek, podobnie działał antysensowy *hTERC* (ASO *hTERC*). Kombinacja paklitakselu z AZT czy antysensowym *hTERC* wzmacniała działanie tego pierwszego. AZT nie miał wpływu na komórki pozbawione aktywności telomerazy, a wykorzystujące ALT (Saos-2 – linia komórkowa ludzkiego kostniakomięsaka), ani na komórki FaDu które były wcześniej traktowane antysensowym *hTERC*, co sugeruje, że obie substancje blokują aktywność telomerazy, ale w różny sposób [73].

Kombinacji AZT z paklitaksem użyto w terapii nowotworu zaindukowanego u myszy, co powodowało zmniejszenie wielkości nowotworu (w kontroli 4 razy zwiększenie), 2–4 razy zwiększenie frakcji komórek będących w apoptozie i wydłużenie czasu przeżycia bez toksyczności dla komórek prawidłowych [73].

Synergistyczne działanie leków (AZT + paklitaksel, czy antysensowy *hTERC* + paklitaksel) pozwala na zmniejszenie dawki skutecznej obu składników, a tym samym ograniczenie występowania skutków niepożądanych. Poza tym AZT jest już sprawdzony po względem klinicznego zastosowania w terapii HIV/AIDS.

## Stabilizatory kwadrupleksów

Obecnie toczą się zaawansowane badania nad stabilizatorem kwadrupleksów [44] (BRACO-19), który w dawkach subcytotoksycznych wysoce selektywnie blokuje podzia-

ty komórek oraz indukował *spoczynek* i apoptozę w komórkach pochodzących z różnych ludzkich linii nowotworowych (nowotwory prostaty i macicy) [74, 75]. BRACO-19 w ciągu 7 dni indukował *spoczynek* (50% komórek, wzrost ekspresji p21 i p16<sup>INK4a</sup>) oraz apoptozę [75], a także radykalnie zmniejszał ekspresję hTERT, któremu towarzyszyły atypowe mitozy [74]. BRACO19 ma więc przewagę nad inhibitorami blokującymi tylko aktywność telomerazy, ponieważ zatrzymanie podziałów nie zależy od długości telomerów i tempa, w jakim się skracają. Należy nadmienić, że BRACO-19 blokuje również mechanizm ALT [75]. W modelu ksenograficznym (linia raka macicy) przezskórne podawanie BRACO-19 było najefektywniejsze we wczesnej fazie rozwoju nowotworu, czego rezultatem była całkowita regresja 5/12 (40%) nowotworów [74]. Lek podawano myszom również doustnie (ponad 2 razy większa dawka niż przezskórnie), co powodowało spadek ekspresji hTERT i wzrost liczby atypowych mitoz, pomimo braku bloku wzrostu nowotworu [74]. Nie obserwowano istotnej toksyczności dla komórek pochodzących z nienowotworowych linii komórkowych [75].

Inny typ stabilizatora kwadrupleksów wydaje się być obiecującym lekiem w leczeniu ostrej białaczki. Telomestatina, podobnie jak BRACO19, ma niewielki wpływ toksyczny na normalne komórki, a blokuje podziały komórek z aktywną telomerazą i ALT. Dłuższe działanie tego stabilizatora na komórki linii ludzkiej ostrej białaczki mielomonocytovej (U937) przejawiało się indukcją białek apoptotycznych (kaspazy-3, PARP czy p38 MAP kinazy) i spowolnieniem wzrostu. Iniekcje wewnątrztrzewnowe (2/tydzień przez 4 tyg.) z telomestatyny ponad 4-krotnie opóźniały wzrost ksenograficznego nowotworu (U937) w porównaniu z kontrolą. Powodowały także ok. 90-procentowy spadek aktywności telomerazy oraz istotny wzrost odsetka komórek apoptotycznych. Redukowały również przerzuty komórek nowotworu do szpiku. U myszy nie obserwowano skutków ubocznych [76]. Należy zaznaczyć, że podobnie jak BRACO-19 telomestatina szybko wywołuje zatrzymanie podziałów i apoptozę niezależnie od długości telomerów, jak również nie wywołuje jawnych klinicznie skutków ubocznych. Te cechy obu stabilizatorów umożliwią w niedalekiej przyszłości rozpoczęcie badań klinicznych. Szczególnie interesujące będzie zastosowanie tego typu inhibitorów w terapii mięsaków, często opornych na chemio- czy radioterapię, często mających aktywny mechanizm ALT [77].

### Blokowanie dostępu telomerazy do telomeru

Blokowanie dostępu telomerazy do telomeru również wydaje się być obiecującą formą terapii. Tankyrazy1 to białko, które reguluje dostęp telomerazy do telomeru poprzez zmniejszenie ilości białka TRF1 związanego z telomerem [78].

Tankyrazy1 powoduje oporność na inhibitor telomerazy MST-312 (pochodna związku chemicznego izolowanego z zielonej herbaty) poprzez ułatwienie dostępu resztkom niezablokowanej telomerazy do telomeru (blokowanie telomerazy to stan bardzo dynamiczny). Zablockowanie tankyrazy1 inhibitorem 3ab (3-aminobenzamid) przywracało natomiast inhibicyjny wpływ MST-312 na telomerazę, prowadząc do progresywnego skracania telomerów [78].

Tankyrazy1 wywiera wpływ tylko w komórkach z aktywną katalitycznie telomerazą, natomiast w komórkach nowotworowych niezależnych od aktywności telomerazy (li-

nia GM847) i normalnych komórkach (fibroblasty skóry) inhibitor tankyrazy1 (3ab) nie wzmacniał skracania telomerów [78]. Seimiya i wsp. [78] wykazali, że jednoczesne blokowanie tankyrazy1 i telomerazy inhibitorami (odpowiednio 3ab i MST-312) osiągnięto dawkami subcytotoksycznymi, co sugeruje, że tego typu kombinacja może być efektywna terapeutycznie sprowadzając skutki niepożądane do minimum.

### Komórki macierzyste nowotworu a telomeraza

W ostatnich latach coraz powszechniej akceptowana jest teoria komórek macierzystych nowotworu (CSC – ang. *cancer stem cells*), które odpowiadają za jego wzrost, wznowy czy zdolność do przerzutowania. CSC są bardzo nieliczne i występują w proporcjach 1 do 10<sup>3</sup>–10<sup>5</sup> [79, 80] i mają aktywne geny nadające oporność wielolekową [81], co jest prawdopodobnie powodem oporności na chemioterapeutyki, które niszczą większość komórek nowotworowych szybko dzielących się [29], a pozostawiają nietknięte komórki CSC (rzadziej ulegają podziałom) [79, 80]. Jak pokazały doświadczenia CSC, w liczbie ok. 100 są w stanie odbudować całą masę guza [82], prawdopodobnie łącznie z klonami opornymi na aplikowaną następną chemioterapię (oporność wznów). Opracowano już metody izolacji komórek macierzystych nowotworu [82]. CSC wykazują aktywność telomerazy [83], więc mogą z powodzeniem stać się celem różnych opisanych typów terapii.

Blokowanie aktywności telomerazy prawdopodobnie przyniesie w niedalekiej przyszłości kilka skutecznych leków dla pacjentów cierpiących z powodu różnych chorób nowotworowych, jak również umożliwi chemoprewencję [84]. Pomimo tak zachęcających wyników, dotyczących różnych sposobów blokowania aktywności telomerazy bardziej prawdopodobne wydaje się używanie wyżej opisanych sposobów w kombinacji z klasycznymi chemioterapeutykami, wysoko specyficznymi inhibitorami (np. Herceptyna czy Gleevec), czy blokowaniem innych składników kompleksu telomer-telomeraza [29, 78]. Takie połączenie może powodować zmniejszenie wymaganej skutecznej dawki obecnie stosowanych leków, a tym samym zmniejszenie niepożądanych skutków, co radykalnie poprawi jakość życia pacjentów i pozwoli myśleć o chorobie nowotworowej, jak o chorobie przewlekłej poddającej się kontroli, np. o cukrzycy.

### Nadzieje związane z telomerazą – bioinżynieria

Poznanie budowy i funkcji telomeru i telomerazy stworzyło możliwości do hodowli złożonych tkanek dla celów transplantologii [85]. Dzięki zaindukowaniu aktywności telomerazy w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego, a następnie posianiu ich na żel zawierający ludzkie fibroblasty płuc udało się wyhodować trójwymiarową tkankę nabłonkową składającą się z trzech typów komórek: rzęskowych, wydzielających śluz i podstawnych [85, 86] co stwarza duże możliwości hodowli bardziej złożonych narządów (np. wątroby) dla transplantologii.

Jak wynika z powyższych rozważań, poznanie struktury telomeru i sposobu działania telomerazy stwarza nadzieje na nowe formy leczenia przeciwnowotworowego i zapoczątk-

kowanie hodowli złożonych tkanek dla transplantologii. Badania nad telomerem i telomerazą rozwijają się bardzo dynamicznie i na pewno ostatnie słowo w tym temacie nie zostało jeszcze powiedziane.

### Piśmiennictwo

- Muller HJ. The remaking of chromosomes, Collecting Net 1938; 8: 182-195.
- McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*, Genetics 1941; 26: 234-282.
- Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. Nat New Biol 1972; 239: 197-201.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961; 25: 585-621.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1965; 37: 614-636.
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J Theor Biol 1973; 41: 181-90.
- Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. J Mol Biol 1978; 120: 33-53.
- Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. Nucleic Acids Res 1989; 17: 4611-27.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. Cell 1985; 43 (2 Pt 1): 405-13.
- Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell 1989; 59: 521-9.
- Greider CW. Telomeres. Curr Opin Cell Biol 1991; 3: 444-51.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266: 2011-5.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell 1997; 90: 785-95.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science 1998; 279: 349-52.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell 1999; 97: 503-4.
- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. Nat Rev Gen 2005; 6: 611-22.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer 1997; 33: 787-91.
- Jiang XR, Jimenez G, Chang E, et al. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. Nat Gen 1999; 21: 111-14.
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. EMBO J 1995; 14: 4240-8.
- Muntoni A, Reddel RR. The first molecular details of ALT in human tumor cells. Hum Mol Genet 2005; 14 Spec No. 2: R191-6.
- Cerone MA, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. Hum Mol Genet 2001; 10: 1945-52.
- Lo AW, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane JP. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. Neoplasia 2002; 4: 531-8.
- O'Hagan RC, Chang S, Maser RS, Mohan R, Artandi SE, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. Cancer Cell 2002; 2: 149-55.
- Bailey SM, Murnane JP. Telomeres, chromosome instability and cancer. Nucleic Acids Res 2006; 34: 2408-17.
- Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. Oncogene 2004; 23: 2919-33.
- Reddel RR. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. Carcinogenesis 2000; 21: 477-84.
- Wright WE, Shay JW. Telomere biology in aging and cancer. J Am Geriatr Soc 2005; 53 (9 Suppl): S292-4.
- Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. Cell 2001; 107: 67-77.
- Shay JW, Wright WE. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. Nat Rev Drug Discov 2006; 5: 577-84.
- Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. Breast Cancer Res 2001; 3: 146-9.
- Lin KW, Yan J. The telomere length dynamic and methods of its assessment. J Cell Mol Med 2005; 9: 977-89.
- Sanchini MA, Gunelli R, Nanni O, et al. Relevance of urine telomerase in the diagnosis of bladder cancer. JAMA 2005; 294: 2052-6.
- Mora J, Lerma E; Thyroid Neoplasia Study Group. Telomerase activity in thyroid fine needle aspirates. Acta Cytol 2004; 48: 818-24.
- Nieh S, Chen SF, Fu E, Jan CI, Lee WF. Detection of the human telomerase RNA component by in situ hybridization in cells from body fluids. Acta Cytol 2005; 49: 31-7.
- Saji M, Xydias S, Westra WH, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in thyroid neoplasms. Clin Cancer Res 1999; 5: 1483-9.
- Kammori M, Nakamura K, Hashimoto M, Ogawa T, Kaminishi M, Takubo K. Clinical application of human telomerase reverse transcriptase gene expression in thyroid follicular tumors by fine-needle aspirations using in situ hybridization. Int J Oncol 2003; 22: 985-91.
- Hoos A, Hepp HH, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallwiener D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. Int J Cancer 1998; 79: 8-12.
- Wang L, Wei Q, Wang LE, et al. Survival prediction in patients with glioblastoma multiforme by human telomerase genetic variation. J Clin Oncol 2006; 24: 1627-32.
- Poremba C, Heine B, Diallo R, et al. Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. J Pathol 2002; 198: 181-9.
- Kammori M, Izumiyama N, Hashimoto M, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase gene and protein, and of estrogen and progesterone receptors, in breast tumors: preliminary data from neo-adjuvant chemotherapy. Int J Oncol 2005; 27: 1257-63.
- Heaphy CM, Bisoffi M, Fordyce CA, Haaland CM, Hines WC, Joste NE, Griffith JK. Telomere DNA content and allelic imbalance demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. Int J Cancer 2006; 119: 108-16.
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. Cancer Res 2003; 63: 1727-30.
- Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. Eur J Biochem 2003; 270: 1628-44.
- Parkinson GN, Lee MP, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. Nature 2002; 417: 876-80.
- Ulaner GA. Telomere maintenance in clinical medicine. Am J Med 2004; 117: 262-9.
- Keith WN, Bilsland A, Hardie M, Evans TR. Drug insight: Cancer cell immortality-telomerase as a target for novel cancer gene therapies. Nat Clin Pract Oncol 2004; 1: 88-96.
- Gellert GC, Jackson SR, Dikmen ZG, Wright WE, Shay JW. Telomerase as a therapeutic target in cancer. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 2005; 2: 159-164.
- Shay JW. Meeting report: the role of telomeres and telomerase in cancer. Cancer Res 2005; 65: 3513-7.
- Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. Immunity 1999; 10: 673-9.
- Vonderheide RH, Schultze JL, Anderson KS, et al. Equivalent induction of telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-bearing patients and healthy individuals. Cancer Res 2001; 61: 8366-70.
- Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, et al. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. Clin Cancer Res 2004; 10: 828-39.
- Su Z, Dannull J, Yang BK, et al. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. J Immunol 2005; 174: 3798-807.

53. Gaudernack G. Prospects for vaccine therapy for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 299-314.
54. Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, et al. Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1553-64.
55. Kyte JA, Mu L, Aamdal S, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 905-18.
56. Mu LJ, Kyte JA, Kvalheim G, et al. Immunotherapy with allotumor mRNA-transfected dendritic cells in androgen-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer* 2005; 93: 749-56.
57. Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, Saeboe-Larsen S, Gaudernack G. Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 579-91.
58. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase I trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; 355: 1018-28.
59. Li Y, Idamakanti N, Arroyo T, et al. Dual promoter-controlled oncolytic adenovirus CG5757 has strong tumor selectivity and significant antitumor efficacy in preclinical models. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (24Pt1): 8845-55.
60. Wirth T, Zender L, Schulte B, et al. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3181-8.
61. Wirth T, Kuhnel F, Fleischmann-Mundt B, et al. Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. *Cancer Res* 2005; 65: 7393-402.
62. Chen Z, Koenenman KS, Corey DR. Consequences of telomerase inhibition and combination treatments for the proliferation of cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5917-25.
63. Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, Gryaznov S, Tressler R, Dogan P, Wright WE, Shay JW. In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. *Cancer Res* 2005; 65: 7866-73.
64. Gellert GC, Dikmen ZG, Wright WE, Gryaznov S, Shay JW. Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 96: 73-81.
65. Li S, Rosenberg JE, Donjacour AA, Botchkina IL, Horn YK, Cunha GR, Blackburn EH. Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA. *Cancer Res* 2004; 64: 4833-40.
66. Li S, Crothers J, Haqq CM, Blackburn EH. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA. *J Biol Chem* 2005; 280: 23709-17.
67. Goldkorn A, Blackburn EH. Assembly of mutant-template telomerase RNA into catalytically active telomerase ribonucleoprotein that can act on telomeres is required for apoptosis and cell cycle arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 5763-71.
68. Kraemer K, Schmidt U, Fuessel S, Herr A, Wirth MP, Meye A. Microarray analyses in bladder cancer cells: inhibition of hTERT expression down-regulates EGFR. *Int J Cancer* 2006; 119: 1276-84.
69. Folini M, Brambilla C, Villa R, Gandellini P, Vignati S, Paduano F, Daidone MG, Zaffaroni N. Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells. *Eur J Cancer* 2005; 41: 624-34.
70. Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, Larochette N, Metivier D, Sabatier L, Kroemer G, Soria JC. hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2006; 25: 4505-14.
71. Yeo M, Rha SY, Jeung HC, Hu SX, Yang SH, Kim YS, An SW, Chung HC. Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozyme targeting human telomerase RNA induces growth retardation and apoptosis in human breast tumor cells. *Int J Cancer* 2005; 114: 484-9.
72. Dass CR, Choong PF. Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: in vivo proof of applicability. *J Control Release* 2006; 113: 155-63.
73. Mo Y, Gan Y, Song S, Johnston J, Xiao X, Wientjes MG, Au JL. Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as a cancer therapeutic approach. *Cancer Res* 2003; 63: 579-85.
74. Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, Neidle S. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res* 2005; 65: 1489-96.
75. Incles CM, Schultes CM, Kempksi H, Koehler H, Kelland LR, Neidle S. A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1201-6.
76. Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Okabe S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene* 2006; 25: 5719-25.
77. Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 217-25.
78. Seimiya H, Muramatsu Y, Ohishi T, Tsuruo T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2005; 7: 25-37.
79. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
80. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006; 124: 1111-5.
81. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 275-84.
82. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-8.
83. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; 65: 5506-11.
84. Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002; 2: 257-65.
85. Vaughan MB, Ramirez RD, Wright WE, Minna JD, Shay JW. A three-dimensional model of differentiation of immortalized human bronchial epithelial cells. *Differentiation* 2006; 74: 141-8.
86. Shay JW, Wright WE. Use of telomerase to create bioengineered tissues. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1057: 479-91.

#### Adres do korespondencji

dr med. **Aldona Kowalska**  
 Dział Endokrynologii  
 Świętokrzyskie Centrum Onkologii  
 ul. Stanisława Artwińskiego 3  
 25-734 Kielce  
 tel. + 48 41 367 43 11  
 faks + 48 41 345 68 82  
 e-mail: AldonaKo@onkol.kielce.pl