



MECHANIZMY POWSTANIA CHOROBY

Choroby telomerów

Rodrigo T. Calado, MD, PhD, Neal S. Young, MD

N Engl J Med 2009; 361: 2353-2365.

Dr Calado, Hematology Branch,
National Heart, Lung,
and Blood Institute,
National Institutes of Health,
Bethesda, MD,
Stany Zjednoczone.

Dr Young, Hematology Branch,
National Heart, Lung,
and Blood Institute,
National Institutes of Health,
Bethesda, MD,
Stany Zjednoczone.

Adres do korespondencji:
Dr Calado, 10 Center Dr.,
Bldg. 10/CRC, Rm. 3E-5140,
Bethesda, MD 20892-1202;
e-mail: calador@nhlbi.nih.gov

W 2009 r. laureatami Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny zostali Elizabeth Blackburn, Jack Szostak i Carol Greider za wyjaśnienie struktury i ochrony telomerów (zakończeń chromosomów). Badacze ci wykazali, że telomery są sekwencjami DNA o strukturze zapewniającej ochronę chromosomów przed skracaniem, a także, że swoisty enzym, telomeraza, uczestniczy w naprawianiu telomerów po mitozie.^{1,2} W niniejszym artykule przeglądowym omówiono medyczne skutki tych odkryć.

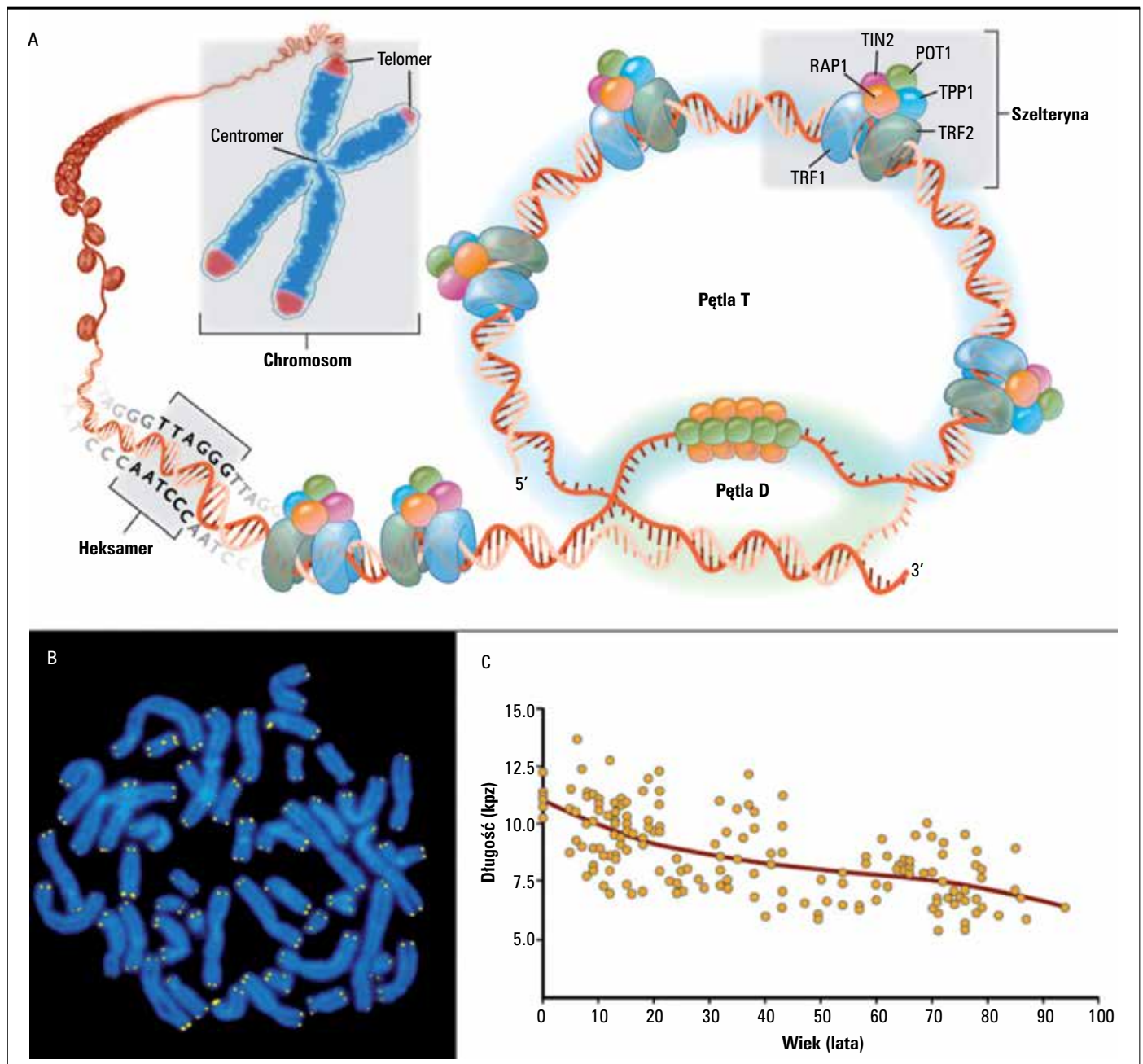
Telomery po raz pierwszy powiązane z powstawaniem chorób u ludzi, gdy wykryto mutacje genu *DKC1* w pewnej rzadko występującej chorobie szpiku kostnego.³ Gen *DKC1* koduje białko współtworzące kompleks telomerazy.⁴ Wykazano, że u wielu chorych na dziedziczną lub nabytą niedokrwistość aplastyczną telomery są krótkie. U tych chorych stwierdzono również mutacje wpływające na funkcjonowanie telomerazy. Mutacje telomerazy są też związane ze zwłóknieniem płuc i wątroby. Ponadto locus genu kodującego telomerazę jest jednocześnie związany z ryzykiem rozwoju nowotworów, a krótkie telomery mogą być czynnikiem ryzyka powstawania schorzeń sercowo-naczyniowych. Wydaje się zatem, że wiele schorzeń ma wspólne podłoże molekularne. Zrozumienie roli telomerazy w patogenezie chorób ma zasadniczy wpływ na diagnostykę, poradnictwo genetyczne i postępowanie z chorym.

TELOMERY I TELOMERAZA

Telomery i telomeraza chronią genom przed niebezpieczeństwami wynikającymi z asymetrycznej replikacji DNA. Gdyby nie było telomerów, podczas każdej rundy replikacji genomu część DNA byłaby nieodwracalnie tracona. Wynika to z faktu, że replikacyjna polimeraza DNA wymaga do rozpoczęcia syntezy DNA startera RNA z wolną donorową grupą 3'-hydroksylową. Rezultatem takiego mechanizmu są jednak problemy z replikacją końców sekwencji DNA.⁵ Usunięcie startera pozostawia fragment jednoniciowej matrycy, pozostawiając tym samym niesynteżowany fragment DNA na zakończeniu chromosomów. Powstająca nowa sekwencja DNA jest zatem krótsza niż matryca wyjściowa. Zbudowane z powtarzającej się, niekodującej sekwencji telomery pozwalają uniknąć utraty materiału genetycznego podczas mitozy.

Telomery to skomplikowana struktura zbudowana z wielokrotnie powtarzanej sekwencji DNA opłaszczona białkami osłaniającymi (w skrócie ten białkowy kompleks jest nazywany szelterywą) umiejscowiona na końcach liniowych chromosomów (ryc. 1). W komórkach ludzkich telomery składają się z setek lub tysięcy kopii powtórzenia tandemowego TTAGGG w łańcuchu wiodącym.⁷ Zakończony grupą 3'-hydroksylową jednoniciowy wystający koniec jest tworzony przez katalityczne dodawanie sekwencji telomerowej do końca 3' oraz poreplikacyjne dojrzewanie nici opóźniającej. Białka szelterywni pokrywające sekwencję telomerowego DNA⁸ odgrywają rolę swoistego sygnału mole-

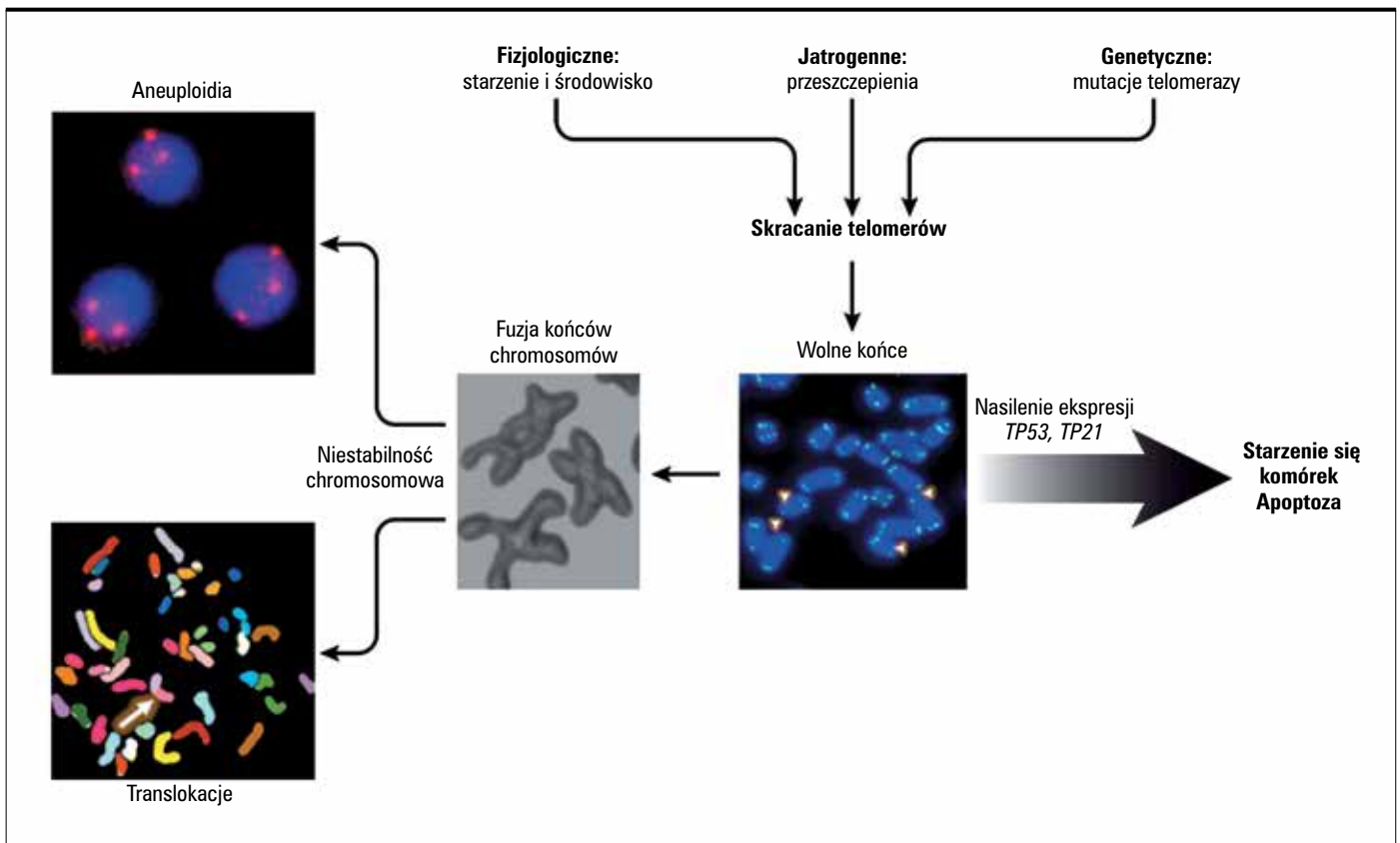
RYCINA 1



Struktura telomeru.

Jak przedstawiono w części A, telomery leżą na końcach liniowych chromosomów. W genomie ludzkim telomery składają się z setek lub tysięcy powtórzonej tandemowo heksamerowej sekwencji TTAGGG w łańcuchu wiodącym oraz CCCTAA w łańcuchu opóźniającym. Białka ochronne związane z telomerowym DNA, tzw. białka osłonowe telomerów, białka tarczy telomerowej, określa się wspólnym mianem szelteryny (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 oraz RAP1). 3'-koniec łańcucha wiodącego telomerów jest wysunięty przed łańcuch opóźniony, który odgina się i tworzy strukturę pętli T z dwuniciową helisą odcinka poprzedzającego. Jak pokazano w części B, telomery mogą być uwidocznione w mikroskopie jako świecące punkty na końcach chromosomów w płycie metafazalnej. Na każdy chromosom przypadają cztery sygnały telomerów, widoczne dzięki zastosowaniu techniki fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH) (mikrofotografia wykonana przez dr. Petera Lansdorpa, MD, PhD). Średnią długość telomerów można mierzyć różnymi metodami, np. techniką łączącą cytometrię przepływową i FISH (flow-FISH), z użyciem hybrydizacji Southern lub metody ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (quantitative polymerase-chain-reaction, qPCR). Badanie flow-FISH umożliwia pomiar długości telomerów w różnych podklasach komórek, takich jak granulocyty lub limfocyty CD4+, hybrydizacja Southern pozwala na pomiar heterogenności długości telomerów, a analiza qPCR jest bardzo szybkim testem, wykorzystującym niewielkie ilości DNA. Jak widać w części C, średnia długość telomerów w ludzkich leukocytach waha się od około 11 kbp w momencie urodzin (krew pępowinowa) do 6 kbp w 90. r.ż. Najbardziej obserwuje się skracanie telomerów we wczesnych okresach życia organizmu, a w trakcie życia skracanie nie następuje liniowo, lecz zgodnie z trendem wielomianowym trzeciego stopnia. Dane za Yamaguchi i wsp.⁶

RYCINA 2



Wpływ skracania telomerów na komórki.

Telomery nieuchronnie skracają się wraz z każdym podziałem komórki i jest to naturalny skutek procesu starzenia się organizmu. Skracanie telomerów odbywa się też z przyczyn jatrogennych, np. po przeszczepieniu szpiku kostnego, gdy macierzyste komórki układu krwiotwórczego, obdarzone silną skłonnością do dzielenia się, a także komórki progenitorowe odtwarzają hematopoezę. Czynniki środowiskowe mogą przyspieszać utratę telomerów. Ponadto na skracanie się telomerów wpływają też czynniki genetyczne, w tym wrodzona niezdolność telomerów do wydłużania się, będąca skutkiem mutacji składowych kompleksu telomerazy. Gdy telomery stają się wybitnie krótkie, pojawiają się chromosomy o nieprawidłowych zakończeniach lub pozbawione telomerów, co powoduje starzenie się komórek lub apoptozę. Jeśli komórkom uda się obejść szlak wiodący do apoptozy, to kontynuują podziały (np. z powodu braku aktywności białka TP53). W takich komórkach chromosomy pozbawione zakończeń telomerowych mogą się łączyć tworząc różne aberracje chromosomowe (ogon-do-ogona, głowa-do-ogona, dicentryki lub różnego typu translokacje i aneuploidie).

kularnego zapobiegającego potraktowaniu DNA telomerów jako DNA zawierającego dwuniciowe przerwy przez komórkową maszynę naprawiającą DNA.

Zbyt krótkie telomery są sygnałem do zatrzymania podziałów komórkowych, indukcji procesu starzenia i apoptozy. Zjawisko to tłumaczy ograniczenie liczby podziałów ludzkich komórek w hodowlach czyli tzw. limit Hayflicka (ryc. 2).⁹ Gdy mechanizmy ochronne indukowane za pośrednictwem *TP53* są nieaktywne, komórki mogą się dzielić w sposób nieograniczony. W konsekwencji ich telomery stają się wyjątkowo krótkie, co przyczynia się do łączenia się końców chromosomów i niestabilności całego genomu. Przeciwnie, komórki transfekowane genem kodującym telomerazę mogą się dzielić w nieskończoność.¹⁰

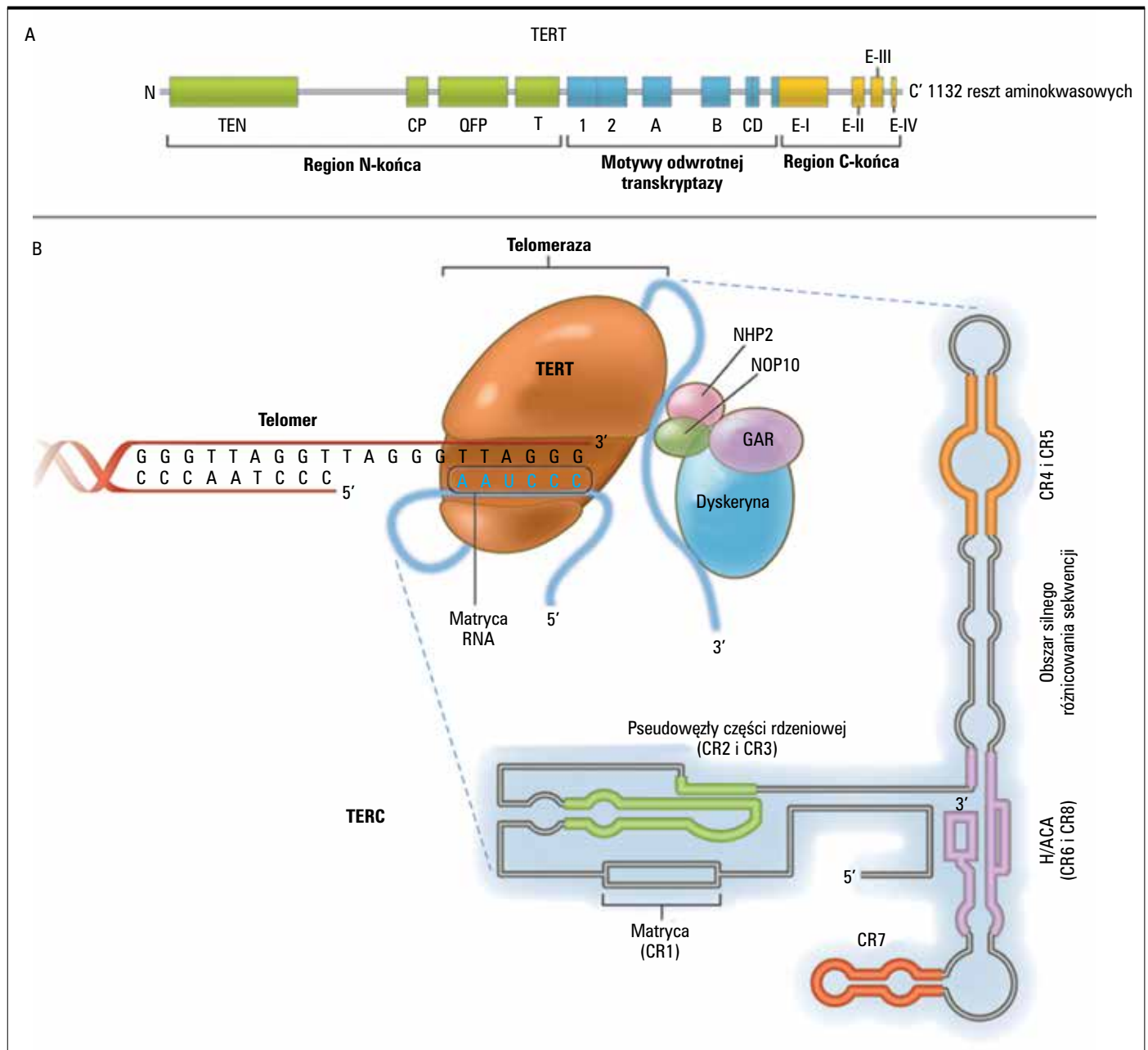
Aby zapobiec skracaniu telomerów, komórki zarodkowe i niektóre komórki somatyczne wytwarzają telomerazę, enzym katalizujący syntezę telomerowego DNA

niezbędną do utrzymania odpowiedniej długości telomerów. Telomeraza to enzym o aktywności odwrotnej transkryptazy (telomerase reverse transcriptase, TERT) wykorzystujący wewnętrzną matrycę RNA (TERC) niezbędną do zsyntezowania telomerowego DNA (ryc. 3). Centrum katalityczne telomerazy zawiera po dwie kopie podjednostki TERT, podjednostkę TERC i białko dyskerynę (kodowaną przez gen *DKC1*) oraz inne białka stabilizujące kompleks.

Badania wykazały, że funkcja biologiczna telomerazy nie ogranicza się jedynie do wydłużania telomerów.¹¹ Na przykład nadekspresja telomerazy w organizmach dorosłych myszy mobilizuje komórki macierzyste i indukuje ich rozplęm przez modulowanie szlaku sygnałowego WNT/ β -katenina.¹²

Myszy z wyłączonym genem kodującym telomerazę służą jako model podczas badań, oceniających rolę wspo-

RYCINA 3



Kompleks telomerazy i jego składniki.

Enzym składa się z podjednostki o aktywności odwrotnej transkryptazy (TERT), wewnętrznej matrycy RNA (TERC), białka dyskeryny oraz pozostałych białek (NHP2, NOP10 i GAR1) związanych w wielobiałkowy kompleks zwany telomerazą. Telomeraza dodaje katalitycznie heksamerowe powtórzenia nukleotydowe (TTAGGG) do końca 3'-hydroksylowego nici wiodącej telomeru, wykorzystując jako matrycę swoistą sekwencję składnika RNA telomerazy. TERT zawiera trzy główne domeny białkowe: region N-końca, motywy odwrotnej transkryptazy oraz region C-końca. Wszystkie domeny mają motywy konserwowane ewolucyjnie. TERC zawiera 451 nukleotydów w siedmiu regionach konserwowanych (CR1 do CR7), włączając w to region matrycy (CR1), H/ACA box oraz pętlę typu harpin (szpilki do włosów), charakterystyczną dla małych, jądrowych RNA (snoRNA) uczestniczących w dojrzewaniu RNA.

mnianych genów w organizmach wyższych. Jednak różnice w biologii mysich i ludzkich telomerów nie pozwalają na prostą ekstrapolację danych otrzymanych na podstawie modelu mysiego. Ponadto, w odróżnieniu

od myszy żyjących na swobodzie, komórki myszy laboratoryjnych mają bardzo długie telomery. Zatem w pierwszym pokoleniu myszy modelowych nie obserwuje się genotypowego wpływu skrócenia telomerów.

Nieprawidłowości w tkankach pojawiają się zwykle w piątym pokoleniu myszy, od szóstego pokolenia myszy są nieplodne, dochodzi też do uszkodzenia komórek macierzystych ich układu krwiotwórczego.

CHOROBY ZWIĄZANE Z TELOMERAMI

Niewydolność szpiku kostnego

Zaburzenia czynności układu krwiotwórczego spowodowane uszkodzeniem struktury i naprawy telomerów charakteryzuje szerokie spektrum objawów klinicznych. Pierwsze objawy mogą się pojawiać w chwili urodzenia i trwać aż do późnej dojrzałości. Ich nasilenie bywa różne, od braku nieprawidłowości przez niewielkie zaburzenia układu krwiotwórczego do krytycznej pancytopenii. Niekiedy mogą im towarzyszyć wady wrodzone, np. wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka. Mutacje telomerowe są dziedziczne, ale stopień penetracji może się znacznie różnić u poszczególnych chorych, a nawet wśród członków tej samej rodziny.

Wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka

Wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka jest jedną z postaci dysplazji ektodermalnej. Cechuje się występowaniem triady objawów: dystroficznych paznokci, obszarów przebarwień skóry oraz leukoplakia jamy ustnej (ryc. 4). Zmiany błon śluzowych i skóry pojawiają się już w okresie niemowlęcym. Do uszkodzeń szpiku kostnego dochodzi w pierwszej lub drugiej dekadzie życia. Przyczyną zgonu jest najczęściej niedokrwistość aplastyczna. Obraz kliniczny jest różnorodny, niekiedy współistnieją schorzenia innych układów narządowych, a zajęcie płuc może nawet powodować zgon.¹⁴ Odmianą wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka o szczególnie ciężkim przebiegu jest zespół Hoyeraala-Hreidarssona, na który składają się postępująca pancytopenia, objawy neurologiczne wywołane małopłóciem, ataksja oraz opóźnienie wzrostu u młodszych dzieci. Czasem wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka rozpoznaje się dopiero w połowie życia, a objawy ze strony układu krwiotwórczego są zaledwie minimalne.¹⁵

Badania rodzin obciążonych ryzykiem przyczyniły się do wykrycia mutacji wpływających na utrzymanie sekwencji telomerów. Wadliwe rogowacenie naskórka występuje na ogół u chłopców. Analiza genetyczna przeprowadzona u wielu członków rodziny doprowadziła do powiązania fenotypu choroby z regionem q28 chromosomu X (Xq28), w którym znajduje się m.in. gen *DKC1*.³ Kodowana przez ten dyskeryna jest niewielkim jądrowym białkiem wiążącym się z RNA (włączając w to rRNA i TERC) i wpływającym na szereg funkcji komórkowych.

Po odkryciu mutacji genu *DKC1* u wszystkich chorych z wadliwym rogowaceniem naskórka wykryto bar-

RYCINA 4. (na sąsiedniej stronie)

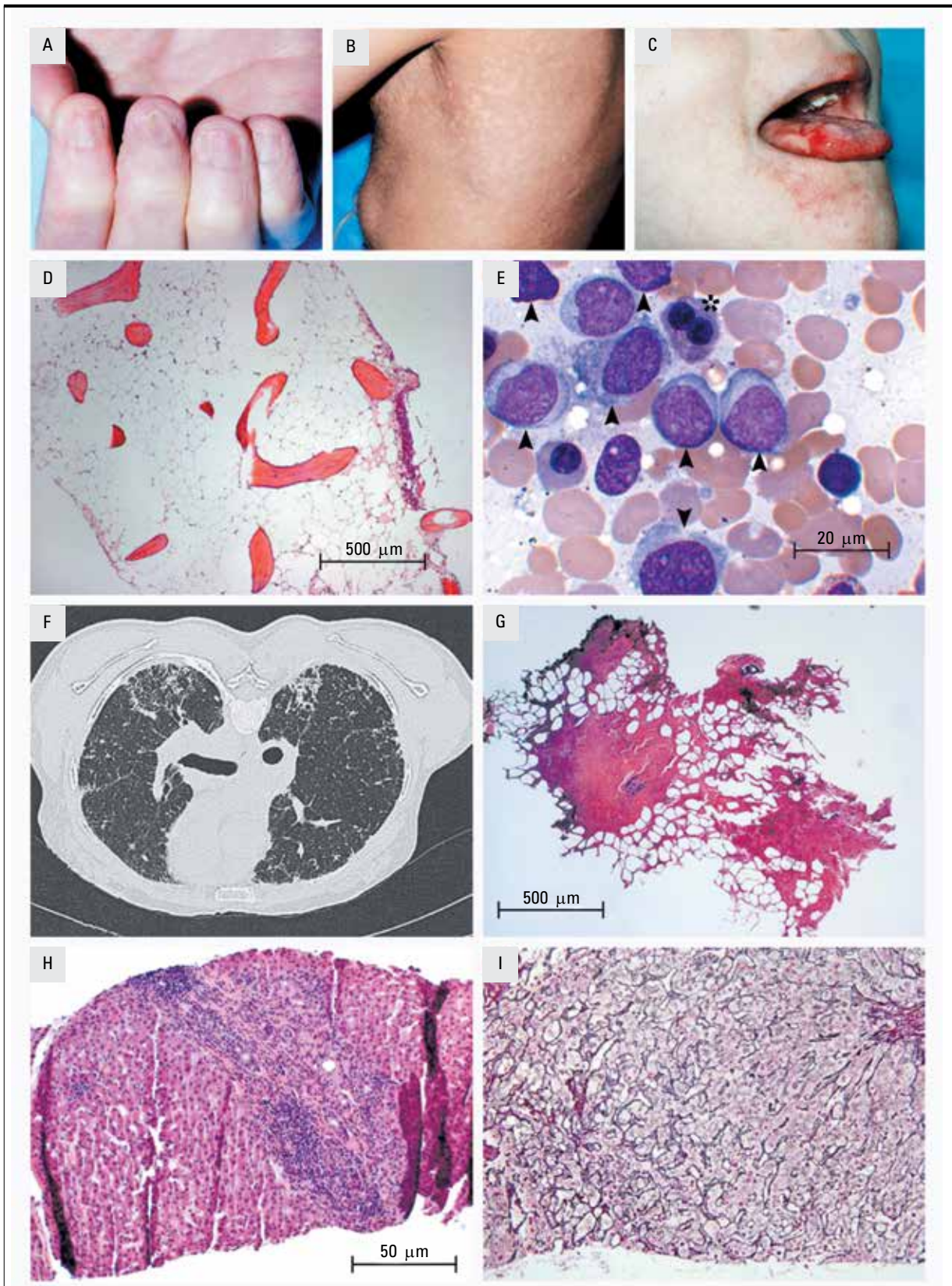
Patologiczne konsekwencje nieprawidłowego skracania telomerów.

Dziecięcy zespół wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka cechuje się triadą objawów klinicznych ze strony błon śluzowych i skóry, w tym dystrofią paznokci (część A), siateczkowatymi przebarwieniami i odbarwieniami skóry (część B) oraz leukoplakia (część C) (Przedrukowano z Alter,¹³ za zgodą wydawcy). Skracanie telomerów w szpiku kostnym predysponuje do niedokrwistości aplastycznej (część D, barwienie metodą Giemsy) oraz rozwoju mielodysplazji i ostrej białaczki szpikowej (część E, barwienie metodą Giemsy). Białaczkowy szpik kostny cechuje się zwiększoną liczbą nowotworowych komórek blastycznych (zaznaczone strzałką) oraz dysplazją lub nieprawidłowym dojrzewaniem krwinek czerwonych (gwiazdki). W płucach skracanie telomerów może się ujawniać klinicznie zwłóknieniem płuc, w obrazie radiologicznym widzianym jako rozproszone zwłóknienia, zwłaszcza pod opłucną (część F). W badaniu histopatologicznym strefy zwłókniałe przedziela mniej zwłókniał miąższ (część G, barwienie hematoksyliną i eozyną). Skracanie telomerów w wątrobie powoduje powstanie różnych zmian patologicznych, w tym marskości wątroby (część H, barwienie hematoksyliną i eozyną) oraz guzkowaty rozrost regeneracyjny wątroby (część I, barwienie retykulina).

do krótkie telomery.¹⁶ Mutacji poszukiwano następnie w genie kodującym matrycowy RNA, w rodzinach, w których choroba dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący.^{4,17} W rodzinach tych wykryto heterozygotyczne mutacje w *TERC*, mutacje homozygotyczne w *NOP10*¹⁸ i *NHP2*¹⁹ (geny te, podobnie jak gen dyskeryny, kodują białka będące składnikami kompleksu). Mutacje wykryto ponadto w genie *TERT*. Niedawno wykryto mutacje *TINF2* w przebiegu nieprawidłowego rogowacenia naskórka dziedziczonego autosomalnie dominująco.²⁰ Utrata białka *TINF2* z kompleksu szelteryny sprawia, że telomery są wyjątkowo krótkie.⁸ Nie stwierdzono wyraźnego związku między konkretnymi mutacjami a fenotypem, niemniej u chorych z najkrótszymi telomerami (np. zespół Hoyeraala-Hreidarssona) przebieg choroby jest znacznie ostrzejszy. Dane te wskazują, że wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka jest wynikiem niewłaściwej naprawy lub nieskutecznej ochrony telomerów. Podłoże choroby jest jednak bardzo złożone, o czym świadczy fakt, że u większości dotkniętych nią osób dotychczas nie wykryto mutacji genetycznych.

Ponieważ nie uzgodniono wspólnej definicji wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka, również charakterystyka chorego przez mutację jest niepewna. Naszym zdaniem nazwa wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka powinna być zarezerwowana dla choroby występującej wśród krewnych należących do ściśle określonych rodzin, u których występują zmiany skórne i wcześniej doszło do zajęcia narządów trzewnych. Trudność sprawa również rozpoznanie wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka na podstawie wyników badań laboratoryjnych. Wydaje się jednak, że wykrycie w leu-

RYCINA 4



kocytach znacznie skróconych telomerów, opierając się na stosowanych w komercyjnym laboratorium metodach cytometrii przepływowej i hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ*, pozwoliłoby na odróżnienie tej choroby od innych zespołów zaburzeń układowych, na które składa się również niewydolność szpiku kostnego.²¹

Zaburzenie czynności telomerów prowadzi do kilku charakterystycznych i ważnych klinicznie skutków. W niektórych rodzinach występuje antycypacja, czyli nasilanie się klinicznych objawów choroby w kolejnych pokoleniach krewnych w wyniku niewłaściwej naprawy telomerów w komórkach linii płciowej.²² Z wyjątkiem zaburzeń związanych z uszkodzeniem *DKC1*, białka kodowanego przez gen sprzężony z chromosomem X, wadliwa naprawa telomerów, wywołana heterozygotycznymi mutacjami *TERC* i *TERT*, jest wynikiem haploinsuficencji (niewydolności, np. braku wystarczającego produktu, związanej z haplotypem obecności pojedynczego allele).²³ W niektórych przypadkach pozostały prawidłowy allel można indukować (np. leczeniem hormonami płciowymi), by skompensować zjawisko haploinsuficencji. Zarówno męskie, jak i żeńskie hormony płciowe zwiększają ekspresję *TERT* oraz funkcjonowanie telomerazy w hodowli komórek układu krwiotwórczego.²⁴ W rodzinach obciążonych ryzykiem krewni z prawidłowym genotypem mogą dziedziczyć krótkie telomery od jednego z rodziców, nie wiadomo jednak, czy prawidłowa zdolność naprawy telomerów chroni ich przed rozwojem choroby. Interpretacja sposobu dziedziczenia w konkretnej rodzinie może być utrudniona występowaniem mozaicyzmu, gdy u dziewcząt i kobiet z pojedynczą losową mutacją genu *DKC1*, związanego z chromosomem X, występuje fenotyp łagodny.¹⁴

Nie przeprowadzono systematycznych badań oceniających wyniki leczenia wrodzonego wadliwego rogowacenia skóry. Podawanie androgenów poprawia obraz krwi u około 60% chorych.¹⁵ Doświadczenia z przeszczepianiem szpiku kostnego takim chorym są ograniczone; wydaje się, że są one skuteczne, u dzieci często jednak obserwuje się powikłania wielonarządowe.^{25,26} Niezależnie od ostrości przebiegu zmian w szpiku kostnym oraz zastosowanej metody leczenia konieczne jest monitorowanie chorych przez całe życie w kierunku rozwoju nowotworów.^{27,28}

Nabyta niedokrwistość aplastyczna

Pomiary długości telomerów w komórkach układu krwiotwórczego poprzedziły odkrycie mutacji powodujących nadmierne rogowacenie skóry. Badania próbek klinicznych nabrały tempa, gdy odkryto znaczenie telomerów jako tzw. zegara mitotycznego czyli markera zastępczego podziałów komórkowych.²⁹ Na przykład telomery leukocytów są krótsze u biorców przeszczepów niż u dawców, przynajmniej przejściowo.^{30,31} Wyniki badań sugerowały, że skrócenie telomerów u chorych na niedokrwistość aplastyczną jest prawdopodobnie

związane ze stresem proliferacyjnym spowodowanym ograniczoną liczbą komórek układu krwiotwórczego.^{32,33} Po odkryciu przyczyny powstawania wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka to wyjaśnienie uznano za niewystarczające.

Systematyczne wykonywanie badań przesiewowych u chorych z wyraźną nabytą niewydolnością szpiku kostnego wykazało u kilku z nich mutacje *TERC*.³⁴ Nabytą chorobę rozpoznano u nich w wieku dorosłym, nie występowały też objawy wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka.³⁵ Ewentualne zaburzenia układu krwiotwórczego obserwowane u innych członków rodziny z mutacjami *TERC* były często łagodne i nie pogłębiały się, ale szpik kostny był ubogokomórkowy, znacznie zmniejszyła się liczba komórek macierzystych, zwiększyły natomiast stężenia czynników wzrostu komórek krwi. Przeszczepienie szpiku kostnego od rodzeństwa zgodnego pod względem antygenowym z nierozpoznaną mutacją *TERC* spowodowało szybką śmierć jednego z chorych z powodu odrzucenia przeszczepu. Ten wynik wskazywał na konieczność poszukiwania dawcy niespokrewnionego.

Mutacje *TERT* odkryto po raz pierwszy u chorych na niedokrwistość aplastyczną.^{6,36} Podobnie jak w *TERC*, mutacje występowały na ogół u dorosłych, u których niedawno rozpoznano niewydolność szpiku kostnego. U niektórych chorych obserwowano zaostrzenie objawów od łagodnej do ostrej pancytopenii, u pozostałych zaś obraz krwi pozostawał bez zmian. Nie zawsze też choroba ujawniała się rodzinnie, choć fenotypowanie w obrębie rodzin wykazało zróżnicowanie obrazu krwi u nosicieli mutacji *TERT*. Poza zaburzeniami szpiku kostnego u osób z mutacjami *TERT* obserwowano niewydolność innych narządów, w tym wątroby i płuc.

Mutacje w genach związanych z telomerazą (poza *DKC1*) wydają się wyjaśniać występowanie krótkich telomerów u około 10% chorych na niedokrwistość aplastyczną. Mutacje wiązały się ze skróceniem telomerów leukocytów krwi obwodowej (po uwzględnieniu wieku chorego). Aktywność enzymatyczna zmutowanej telomerazy jest zmniejszona. Podobnie jak wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka, choroba rozwija się u heterozygot na drodze dominującego mechanizmu haploinsuficencji.

Zwłóknienie płuc

W przebiegu samoistnego zwłóknienia płuc występują kaszel i duszność, upośledzenie wymiany gazowej oraz zmniejszenie pojemności płuc. Objawy są skutkiem powstania obszarów zwłóknienia płuc oraz śródmiąższowego stanu zapalnego, naprzemiennego rozmieszczenia zdrowej i zmienionej chorobowo tkanki płuc oraz odkładania się kolagenu (ryc. 4F i 4G). U około 20% chorych na wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka w miarę zwłóknienia tkanki płucnej powstają w końcu powikłania ze strony płuc,¹⁵ a wśród członków rodziny występowa-

Skracanie telomerów i choroby występujące u ludzi.

Część A przedstawia diagram Venna mutacji kompleksu telomerazy oraz choroby telomerowe u ludzi. Wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka to najbardziej widoczny i najpoważniejszy skutek mutacji powodujących dysfunkcję telomerazy, cechuje się dużą penetracją i ujawnia klinicznie jako choroba wrodzona. Gdy penetracja mutacji telomerazy jest niewielka nie występują klasyczne objawy wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka, wywiad rodzinny jest bez znaczenia, a choroba ujawnia się u osoby dorosłej.

W takich przypadkach uszkodzenie dotyczy pojedynczego narządu. Mutacje telomerazy są zatem czynnikami ryzyka rozwoju choroby, a nie zmianami genetycznymi odpowiadającymi za wystąpienie niedokrwistości aplastycznej, zwłóknienia płuc lub marskości wątroby. Powstawaniu zmian sprzyjają w tej grupie chorych również czynniki środowiskowe, epigenetyczne oraz inne czynniki genetyczne. W części B przedstawiono zależności między skracaniem telomerów a ryzykiem rozwoju nowotworu.

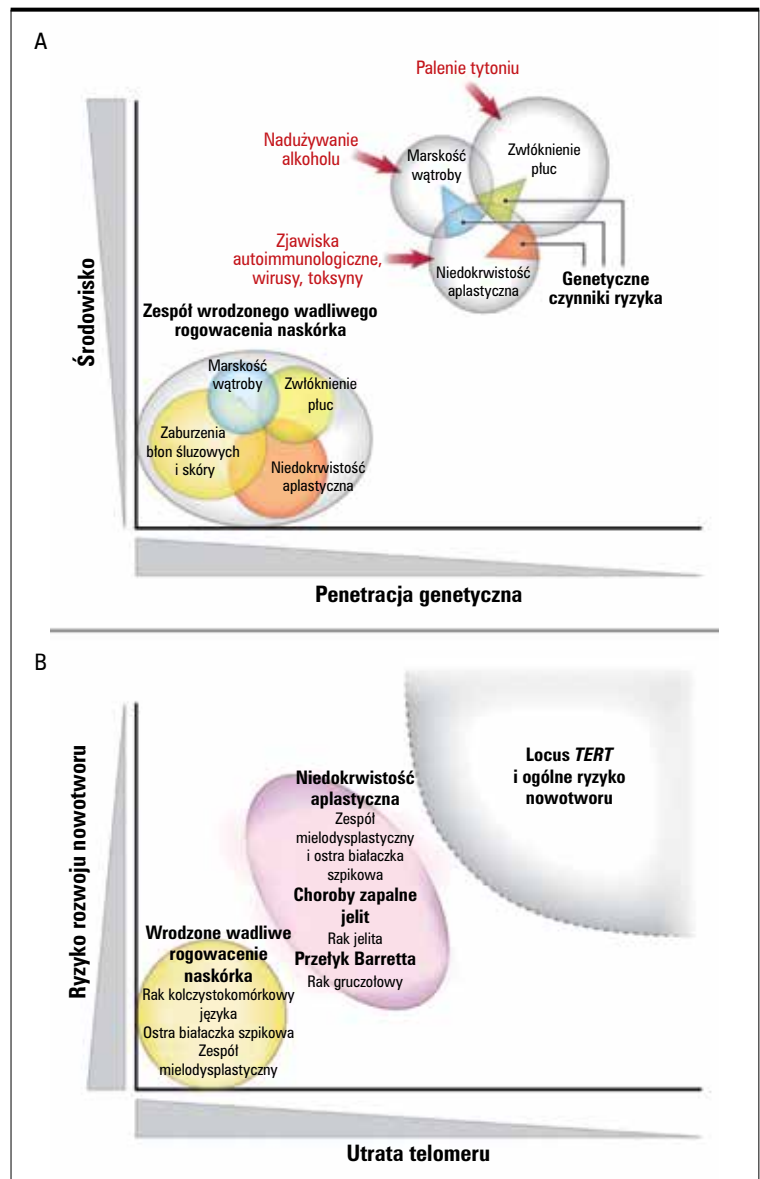
W przebiegu wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka z dużą penetracją zwiększa się też ryzyko rozwoju nowotworu, zwłaszcza płaskonabłonkowego raka narządów głowy i szyi oraz ostrej białaczki szpikowej. Ponadto chorzy z niedokrwistością aplastyczną są bardziej zagrożeni powstawaniem klonów komórek złośliwych, ale ryzyko to jest mniejsze niż u chorych na wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka. Skrócenie telomerów wydaje się również przewodzić progresję przewlekłych stanów zapalnych przewodu pokarmowego do raka gruczołowego. Podczas wielu badań asocjacyjnych całego genomu wykazano, że locus *TERT* jest ważnym locus podatności na powstawanie różnych nowotworów złośliwych, ale ilorazy szans są stosunkowo niewielkie. Obszary zacięniowane odpowiadają chorobom i stanom chorobowym nieujętych w skali.

to śródmiąższowe zapalenie płuc.^{17,37,38} Niewydolność oddechowa jest również powodującym zgon powikłaniem przeszczepienia komórek macierzystych szpiku kostnego u chorych na nieprawidłowe rogowacenie skóry.^{26,39} Ten związek stał się powodem poszukiwania mutacji w genie kodującym telomerazę. Wykryto ją u około 15% chorych na rodzinne samoistne zwłóknienie płuc.⁴⁰⁻⁴² U krewnych nosicieli mutacji często rozpoznawano również niewydolność szpiku kostnego lub marskość wątroby.^{41,43} Większość chorych to palacze tytoniu, co wskazuje na znaczenie czynników środowiskowych w rozwoju choroby. U chorych na sporadyczne samoistne zwłóknienie płuc występują też niekiedy mutacje telomerazy.⁴¹ Jednak u znacznie większej liczby chorych stwierdza się skrócenie telomerów. Można się zatem spodziewać, że w przebiegu tego schorzenia częste są jeszcze inne, nierozpoznane dotąd nieprawidłowości genetyczne.⁴³

Choroby wątroby

U części chorych na wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka występują zaburzenia wątroby, a niektórzy z nich umierają z powodu powikłań ze strony wątroby po przeszczepieniu szpiku kostnego.^{15,39} Wśród chorych na zwłóknienie płuc, którzy mają krótkie telomery, rozpoznaje się też niekiedy skrytopochodną marskość w

RYCINA 5



troby, co świadczy o wpływie skrócenia telomerów na włóknienie w przebiegu obu tych zaburzeń. Nasze badania potwierdzają występowanie chorób wątroby u wielu krewnych osób z niedokrwistością aplastyczną i mutacją telomerazy.⁴⁴ Z mutacjami *TERT* i *TERC* współistnieją głównie zmiany włókniste i zapalne oraz guzkowy rozrost regeneracyjny (ryc. 4H i 4I). Wspólnym podłożem genetycznym swoistym dla współistnienia chorób szpiku kostnego, wątroby i płuc^{38,45,46} są skrócenie telomerów oraz mutacje telomerazy.

Podsumowując, choroby związane z telomerami można postrzegać jako cały szereg zaburzeń, od determinowanego mutacjami genów wadliwego rogowacenia

skóry do niewydolności i zwłóknienia różnych narządów pod wpływem działania genetycznych czynników ryzyka (ryc. 5A).

SKRACANIE TELOMERÓW A POWSTAWANIE NOWOTWORÓW

Modele zwierzęce procesów utrzymywania prawidłowej długości telomerów i niestabilność chromosomów

W 1914 r. Boveri postulował, że jedną z zasadniczych przyczyn powstawania nowotworów jest niestabilność chromosomów.⁴⁷ Jego hipoteza była oparta na wynikach badań nad jeźwocami, ale nadal znajduje zastosowanie w opisie rearanzacji chromosomalnych ilościowych i strukturalnych w większości nowotworów. Badania doświadczalne i badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych przyczyniły się do sformułowania kolejnej hipotezy, zgodnie z którą skracanie telomerów leży u podstaw delekcji i addycji chromosomowych.⁴⁸⁻⁵² W badaniach na drożdżach wykazano, że jeśli zostają zakłócone procesy odpowiedzialne za zachowanie prawidłowej długości telomerów, w nielicznych komórkach, które uniknęły procesu starzenia, obserwuje się aberracje chromosomowe. W takich komórkach zwiększa się liczba mutacji (delekcji) oraz rearanzacji wynikających z pękania i łączenia się chromosomów.⁵³ W późnych pokoleniach myszy z nokautem genu *Terc* krótkie telomery powodują niestabilność chromosomalną w wyniku łączenia się końców chromosomów. Większość wspomnianych komórek ulega apoptozie, ale zakłócenie naturalnych procesów kontrolnych części z nich umożliwia przetrwanie. Dlatego myszy *Terc*^{-/-}, u których jednocześnie występuje delekcja *TP53*, cechuje skłonność do rozwoju różnych nowotworów powstających w wyniku różnych rearanzacji. Podobne procesy obserwuje się u ludzi.⁵⁴

Przyspieszone skracanie telomerów, stan zapalny i transformacja nowotworowa

U ludzi badania są często ograniczone z konieczności do pomiarów długości telomerów w leukocytach. Brakuje bowiem ustaleń dotyczących znaczenia zmian długości telomerów w komórkach nowotworowych (w których dochodzi do wzrostu ekspresji telomerazy lub uaktywnienia alternatywnych szlaków naprawy telomerów, co może skutkować wzrostem potencjału proliferacyjnego i co za tym idzie, wstrzymaniem procesu starzenia). Ograniczenia wynikają także z trudności w prowadzeniu długotrwałych badań przekrojowych. Niemniej jednak związek długości telomerów z kilkunastoma rodzajami nowotworów wydaje się nie podlegać dyskusji. Obecność krótkich telomerów u chorych na raka jelita grubego sugeruje, że ich skrócenie jest związane z procesem nowotworzenia i niestabilnością genetycz-

ną transformowanych komórek.⁵⁵ Skrócenie telomerów wykrywano także w prawidłowych pod względem budowy histologicznej preparatach błony śluzowej chorych z przewlekłymi zmianami zapalnymi jelita grubego (przy czym komórki nowotworowe cechuje duża ekspresja telomerazy).⁵⁶ Utrata chromosomów w tkance bez cech dysplazji, pochodzącej od chorych na wrzodziejące zapalenie okrężnicy, współistniała ze skracaniem telomerów i pojawianiem się mostków anafazowych, zwłaszcza u chorych, u których obserwowano rozwój nowotworu.⁵⁷

Głównym czynnikiem ryzyka raka przełyku jest przewlekły stan zapalny w przebiegu przełyku Barretta. W jednym z badań długość telomerów w leukocytach podczas pierwszej oceny klinicznej chorego była odwrotnie proporcjonalna do ryzyka rozwoju raka przełyku. Prawdopodobnym wyjaśnieniem było istnienie predyspozycji genetycznych do niewłaściwej naprawy DNA w błonie śluzowej lub długotrwała ekspozycja na stres oksydacyjny, przyspieszający podział komórek.⁵⁸ Krótkie telomery, ujawniane bezpośrednio techniką barwienia fluorescencyjnego wycinków pobranych drogą biopsji od chorych z przełykiem Barretta, a także niestabilność chromosomowa związana ze zmianami dysplastycznymi sugerują, że oba te zjawiska występują we wczesnym okresie rozwoju raka przełyku.⁵⁹ Skrócenie telomerów w leukocytach w stosunku do normy dla wieku uznaje się za czynnik ryzyka.^{60,61} Może też być uznane jako marker biologiczny wielu, choć nie wszystkich, nowotworów litych. Do wyjątków zaliczamy m.in. raka piersi.⁶⁰⁻⁶³

U chorych z nieprawidłowościami szpiku kostnego rozwijają się głównie, choć nie jedynie, nowotwory układu krwiotwórczego. Analiza 50 chorych na klasyczną postać wrodzonego wadliwego rogowacenia naskórka przeprowadzona przez autorów z National Cancer Institute wykazała istnienie w tej grupie znacznie zwiększonego ryzyka powstawania nowotworów (ogółem około 11-krotnie większego w porównaniu z obserwowanym w populacji ogólnej), zwłaszcza płaskonabłonkowych raków narządów głowy i szyi, raków skóry, odbytnicy i odbytu, a także ostrej białaczki szpikowej.⁶⁴ W przeprowadzonym przez nas badaniu z udziałem chorych na nabytą niedokrwistość aplastyczną długość telomerów w leukocytach była głównym czynnikiem przepowiadającym rozrost klonalny; niemal wszyscy chorzy, u których rozwinął się zespół mielodysplastycznej monosomii chromosomu 7 lub ostra białaczka szpikowa znajdowali się w najniższym kwartylu pod względem długości telomerów podczas pierwszego załamania czynności szpiku kostnego.⁶⁵ Ponieważ w niektórych rodzinach występowanie białaczki wiąże się z mutacjami *TERT* i *TERC*, przeprowadziliśmy badania przesiewowe dużych kohort chorych na ostrą białaczkę szpikową.⁶⁶ Mutacje *TERT* wykryto u około 9% spośród tych chorych i były one silnie związane z ryzykiem występowania nieprawidłowości cytogenetycznych.

W niewielkim badaniu ustaliliśmy, że skrócenie telomerów zwiększało ryzyko transformacji z mielodysplazji w kierunku białaczki u chorych po chemioterapii i autologicznym przeszczepieniu komórek układu krwiotwórczego,⁶⁷⁻⁶⁹ zaś występowanie krótkich telomerów i komórek blastycznych korelowało z nieprawidłowościami chromosomalnymi.^{70,71}

TERT i ryzyko rozwoju nowotworu

Badania asocjacyjne całego genomu wykazały, że u chorych na nowotwory częściej występują polimorfizmy genu *TERT*. Ryzyko związane z polimorfizmami w *TERT* jest jednak mniejsze niż dla poszczególnych chorób lub w populacjach chorych ocenianych seryjnie, jeśli nowotwór rozwija się w przebiegu zapalenia. Na przykład duże badanie kontrolne całego genomu, przeprowadzone z udziałem 30 000 chorych na nowotwór Europejczyków i 45 000 osób z grupy kontrolnej, wykazały związek między locus *TERT* a 5 spośród 16 nowotworów, w tym podstawniokomórkowym rakiem skóry oraz rakami płuca, pęcherza moczowego, gruczołu krokowego i szyjki macicy (na rozwój wszystkich tych nowotworów wpływały częściowo czynniki środowiskowe). Ryzyko całkowite było stosunkowo niewielkie (ryzyko względne od 1,12 do 1,21), ale zgodne w różnych populacjach etnicznych.⁷² Podobne zależności statystyczne powtórzyły się w badaniach asocjacyjnych całego genomu przeprowadzonych w dużych populacjach europejskich⁷³ oraz wśród Chińczyków, u których również stwierdzono związek ze skróceniem telomerów.⁷⁴ Polimorfizmy locus *TERT* wiązały się też z podatnością na rozwój glejaków^{73,75} i raka nerkowokomórkowego,⁷⁶ a także względną opornością na czerniaka⁷⁷ i raka piersi.⁷⁸

Podsumowując, skracanie telomerów może zwiększać ryzyko powstawania różnych nowotworów, poczynając od dużej częstości występowania swoistych nowotworów w przebiegu wrodzonego nieprawidłowego rogowacenia naskórka, do umiarkowanego wpływu na nowotworzenie w ogóle. W przebiegu niektórych swoistych stanów zapalnych lub chorób immunologicznych skrócenie telomerów może być zasadniczym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi nowotworu (ryc. 5B).

TELOMERY, CHOROBY ZWYRODNIENIOWE I STARZENIE

Telomery i choroby serca

Ocena zależności między długością telomeru a występowaniem powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego wydaje się sugerować istnienie pewnych korelacji. Jednak ze względu na fakt, że badania epidemiologiczne nie uwzględniają wszystkich zmiennych, nie udało się ustalić jednoznacznych zależności patofizjologicznych.⁷⁹⁻⁸⁴ W jednym z badań telomery śródbłonkowych komórek

macierzystych były krótsze u osób z chorobą wieńcową niż u zdrowych, a intensywne leczenie zmniejszające stężenia lipidów przyczyniło się do ograniczenia oksydacyjnych uszkodzeń DNA i zapobiegało dalszemu skracaniu telomerów.⁸⁵ W jednym z wielu badań epidemiologicznych osoby, u których obserwowano krótsze telomery w leukocytach, były obciążone zwiększonym ryzykiem występowania choroby wieńcowej, ale ryzyko to można było zmniejszyć dzięki leczeniu statynami.⁸⁶ W badaniach przeprowadzonych w ramach Cardiovascular Health Study skrócenie telomerów korelowało ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zawału mięśnia sercowego wśród chorych w młodszym wieku. Ryzyko to było trzykrotnie większe niż ryzyko u chorych starszych.⁸⁷ Natomiast w badaniu Heart and Soul Study krótsze telomery były biologicznym markerem ryzyka zgonu osób ze stabilną chorobą wieńcową.⁸⁸ Skrócenie telomerów stwierdzono podczas badania przeprowadzonego w grupie Brytyjczyków z wczesnym zawałem mięśnia sercowego.⁸⁹ Framingham Heart Study skrócenie telomerów korelowało z pogrubieniem błony wewnętrznej tętnicy szyjnej.⁹⁰

Telomery i starzenie

Czy biologia procesu skracania telomerów wyjaśnia fizjologiczny proces starzenia się ludzi?^{52,91} Skracanie telomerów prowadzi do starzenia komórek i występowania zjawiska Hayflicka. Uszkodzenia telomerazy wpływają na żywotność drożdży, replikację ich DNA, przyczyniają się też do skrócenia życia myszy pozbawionych funkcjonalnego genu telomerazy. Ponadto w określonych warunkach długość telomerów jest zegarem mitotycznym świadczącym o dotychczasowych podziałach komórek. Skrócenie telomerów jest związane z następującą z czasem akumulacją uszkodzeń oksydacyjnych w DNA. Sugeruje się, aby białka uwalniane w trakcie skracania telomerów uznać za biologiczne markery starzenia się i związanych z wiekiem chorób zwyrodnieniowych.⁹²

Wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka bywa czasem mylnie klasyfikowane jako zespół przedwczesnego starzenia, taki jak progeria Hutchinsona-Gilforda lub zespół Wernera. Na ogół jednak chorzy z wrodzonym wadliwym rogowaceniem naskórka nie wydają się przedwcześnie postarzali ani nie występują u nich przedwcześnie miażdżyca, choroba Alzheimera lub inne zaburzenia pojawiające się z wiekiem, takie jak osteopenia albo cukrzyca typu 2. Długość życia wielu osób z mutacjami *TERT* oraz *TERC* jest prawidłowa. Skrócenie telomerów nie jest jednakowe we wszystkich tkankach (np. w komórkach mózgu i serca jest stosunkowo niewielkie) ani w poszczególnych komórkach tej samej tkanki. Nie wiadomo, czy zmniejszająca się z wiekiem liczba komórek szpiku kostnego i podatność płuc, a także tworzenie się guzków, obserwowane w trakcie badań pośmiertnych osób w podeszłym wieku, to zjawiska wywołane fizjologicznym skróceniem telomerów. Myszy z chowu własobnego starzeją się przedwcześnie, mimo prawidłowej

długości telomerów. Obserwowane u ludzi skrócenie telomerów z wiekiem⁹³ nie oznacza, że odpowiada ono za starzenie organizmu.

MODULOWANIE AKTYWNOŚCI TELOMERAZY

Ponieważ w białaczkach i guzach litych następuje aktywacja telomerazy, punktem uchwytu leczenia chorych na te nowotwory stał się kompleks naprawczy DNA.⁷⁹ Skracanie telomerów jest czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworów u chorych na wrodzone wadliwe rogowacenie naskórka, choroby układu immunologicznego lub choroby zapalne, takie jak niedokrwiłość aplastyczna, wrzodzące zapalenie jelita grubego lub przeryk Barretta, aktywacja telomerazy może leżeć u podstaw wielu nowotworów złośliwych i chorób zwyrodnieniowych. Dlatego strategię zmierzającą do zachowania długości telomerów lub opóźniającą ich skrócenie mogą być skuteczne w leczeniu tych chorób. Zahamowanie postępującego skracania telomerów może się też okazać konieczne w celu zwiększenia skuteczności leczenia komórkami macierzystymi.⁸⁰

Zachowywanie długości telomerów i aktywacja telomerazy podlegają silnej regulacji. Chociaż w badaniach z udziałem bliźniąt długość telomerów była w dużym stopniu uwarunkowana genetycznie,^{81,82} pewien wpływ wywiera również środowisko.⁸³ Poddanie hodowli tkankowych działaniu reaktywnych form tlenu wydaje się przyspieszać skracanie telomerów.⁸⁴ W warunkach *in vitro* na aktywność telomerazy wpływają hormony i czynniki wzrostu,⁹⁴ w tym czynniki wzrostu komórek układu krwiotwórczego.^{95,96} Białko c-MYC może bezpośrednio aktywować *TERT*.⁹⁷ Z kolei na inne składowe kompleksu naprawczego mogą działać swoiste ligazy ubikwitynowe i kinazy białkowe. Dynamika skracania telomerów jest też związana z paleniem tytoniu, dietą, uwarunkowaniami społeczno-ekonomicznymi, nasileniem stresu oraz innymi czynnika-

mi wpływającymi na styl życia.^{62,98-100} Hormony płciowe bezpośrednio zwiększają transkrypcję *TERT* oraz aktywność telomerazy w komórkach ludzkich.^{24,101} Naturalne i syntetyczne androgeny mogą przywrócić prawidłową aktywność telomerazy w komórkach chorych z mutacjami *TERT* i *TERC*,²⁴ co prawdopodobnie tłumaczy ich korzystne działanie u chorych na zespoły przebiegające z niewydolnością układu krwiotwórczego. Hormony płciowe mogą się okazać przydatne w leczeniu osób z innymi chorobami telomerów, takimi jak zwłóknienie płuc i marskość wątroby, wobec których nie opracowano dotąd skutecznych metod. Ponadto zastępcza terapia hormonami płciowymi lub podawanie ich w dawkach farmakologicznych mogą wywierać leczniczy wpływ u chorych z przyspieszonym skracaniem telomerów i obciążonych ryzykiem wstępnego rozwoju nowotworów złośliwych (np. po intensywnej chemioterapii lub przeszczepieniu komórek macierzystych szpiku kostnego). Teoretyczna możliwość zastosowania hormonoterapii zastępczej u zdrowych osób w podeszłym wieku w celu zapobiegania ubytkom telomerów wymaga zachowania równowagi między ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych ze strony drugorzędowych narządów płciowych a znanym ryzykiem rozwoju nowotworów złośliwych.

Nie zgłoszono potencjalnych konfliktów interesu, które mogłyby mieć wpływ na niniejszy artykuł.

Dziękujemy dr. dr. Stephenowi Chanockowi, Cyntii Dunbar, Evie Hellström-Lindberg, Richardowi Hadesowi, Danowi Longo, Joelowi Mossowi i Davidowi Natanowi za staranne przeczytanie wcześniejszej wersji rękopisu i cenne uwagi.

From The New England Journal of Medicine 2009; 361: 2353-2365. Translated and reprinted in its entirety with permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright © 2009, 2010 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

PIŚMIENNICTWO

- szczególnie interesujące
- wyjątkowo interesujące

- 1 Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 1982;29:245-55.
- 2 Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43:405-13.
- 3 Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 1998;19:32-8.
- 4 Michell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999;402:551-5.
- 5 Olovnikov AM. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1971;201:1496-9. (In Russian.)
- 6 Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, et al. Mutations in *TERT*, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med* 2005;352:1413-24.
- 7 Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6622-6.
- 8 de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005;19:2100-10.
- 9 Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 2007;3:640-9.
- 10 Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;400:464-8.
- 11 Sarin KY, Cheung P, Gilson E, et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 2005;436:1048-52.
- 12 Choi J, Southworth LK, Sarin KY, et al. *TERT* promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet* 2008;4(1):e10.
- 13 Alter BP. Inherited bone marrow failure syndromes. In: Nathan DG, Orkin SH, Look AT, Ginsburg D, eds. *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003:280-365.
- 14 Knight S, Vulliamy T, Coppstone A, Gluckman E, Mason P, Dokal I. Dyskeratosis Congenita (DC) Registry: identification of new features of DC. *Br J Haematol* 1998;103:990-6.
- 15 Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol* 2000;110:768-79.
- 16 Vulliamy TJ, Knight SW, Mason PJ, Dokal I. Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:353-7.
- 17 Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 2001;413:432-5.

- 18 Walne AJ, Vulliamy T, Marrone A, et al. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet* 2007;16:1619-29.
- 19 Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, et al. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:8073-8.
- 20 Savage SA, Giri N, Baerlocher GM, Orr N, Lansdorp PM, Alter BP. TIN2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* 2008;82:501-9.
- 21 Alter BP, Baerlocher GM, Savage SA, et al. Very short telomere length by flow fluorescence *in situ* hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood* 2007;110:1439-47.
- 22 Vulliamy T, Marrone A, Szydło R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet* 2004;36:447-9.
- 23 Marrone A, Stevens D, Vulliamy T, Dokal I, Mason PJ. Heterozygous telomerase RNA mutations found in dyskeratosis congenita and aplastic anemia reduce telomerase activity via haploinsufficiency. *Blood* 2004;104:3936-40.
- 24 Calado RT, Yewdell WT, Wilkerson KL, et al. Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood* 2009;114:2236-43.
- 25 Phillips RJ, Judge M, Webb D, Harper JI. Dyskeratosis congenita: delay in diagnosis and successful treatment of pancytopenia by bone marrow transplantation. *Br J Dermatol* 1992;127:278-80.
- 26 Langston AA, Sanders JE, Deeg HJ, et al. Allogeneic marrow transplantation for aplastic anaemia associated with dyskeratosis congenita. *Br J Haematol* 1996;92:758-65.
- 27 Baykal C, Kavak A, Gulcan P, Büyükbabani N. Dyskeratosis congenita associated with three malignancies. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17:216-8.
- 28 Savage SA, Dokal I, Armanios M, et al. Dyskeratosis congenita: the first NIH clinical research workshop. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:520-3.
- 29 Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9857-60.
- 30 Wynn RF, Cross MA, Hatton C, et al. Accelerated telomere shortening in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Lancet* 1998;351:178-81.
- 31 Notaro R, Cimmino A, Tabarini D, Rotoli B, Luzzatto L. *In vivo* telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13782-5.
- 32 Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Toozé JA, Marsh JCW, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* 1998;91:3582-92.
- 33 Brummendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, Young NS, Lansdorp PL. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood* 2001;97:895-900.
- 34 Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PM, et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2003;102:916-8.
- 35 Fogarty PF, Yamaguchi H, Wiestner A, et al. Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. *Lancet* 2003;362:1628-30.
- 36 Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood* 2008;111:4446-55.
- 37 Armanios M, Chen J-L, Chang Y-PC, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15960-4.
- 38 Qazilbash MH, Liu JM, Vlachos A, et al. A new syndrome of familial aplastic anemia and chronic liver disease. *Acta Haematol* 1997;97:164-7.
- 39 Rocha V, Devergie A, Socié G, et al. Unusual complications after bone marrow transplantation for dyskeratosis congenita. *Br J Haematol* 1998;103:243-8.
- 40 Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007;356:1317-26.
- 41 Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7552-7.
- 42 Mushihiro T, Wattanapokayakit S, Takahashi A, et al. A genome-wide association study identifies an association of a common variant in TERT with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. *J Med Genet* 2008;45:654-6.
- 43 Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13051-6.
- 44 Calado RT, Regal JA, Kleiner DE, et al. A spectrum of severe liver and blood disorders associated with telomerase mutations. *PLoS One* 2009;4(11):e7926.
- 45 Talbot-Smith A, Syn WK, MacQuillan G, Neil D, Elias E, Ryan P. Familial idiopathic pulmonary fibrosis in association with bone marrow hypoplasia and hepatic nodular regenerative hyperplasia: a new „trimorphic” syndrome. *Thorax* 2009;64:440-3.
- 46 González-Huezo MS, Villela LM, Zepeda-Florencio MC, Carrillo-Ponce CS, Mondragón-Sánchez RJ. Nodular regenerative hyperplasia associated to aplastic anemia: a case report and literature review. *Ann Hepatol* 2006;5:166-9.
- 47 Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press and The Company of Biologists, 2008.
- 48 Hackett JA, Greider CW. Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 2002;21:619-26.
- 49 Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 2004;113:160-8.
- 50 Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 2007;448:767-74.
- 51 de Lange T. Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70:197-204.
- 52 Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and ageing. *Nat Med* 2006;12:1133-8.
- 53 Hackett JA, Feldser DM, Greider CW. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 2001;106:275-86.
- 54 Artandi SE, Chang S, Lee S-L, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000;406:641-5.
- 55 Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990;346:866-8.
- 56 Usselman B, Newbold M, Morris AG, Nwokolo CU. Deficiency of colonic telomerase in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1106-12.
- 57 O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* 2002;32:280-4.
- 58 Risques RA, Vaughan TL, Li X, et al. Leukocyte telomere length predicts cancer risk in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:2649-55.
- 59 Finley JC, Reid BJ, Odze RD, et al. Chromosomal instability in Barrett's esophagus is related to telomere shortening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1451-7.
- 60 Liu X, Bao G, Huo T, Wang Z, He X, Dong G. Constitutive telomere length and gastric cancer risk: case-control analysis in Chinese Han population. *Cancer Sci* 2009;100:1300-5.
- 61 Jang JS, Choi YY, Lee WK, et al. Telomere length and the risk of lung cancer. *Cancer Sci* 2008;99:1385-9.
- 62 Mirabello L, Huang W-Y, Wong JY, et al. The association between leukocyte telomere length and cigarette smoking, dietary and physical variables, and risk of prostate cancer. *Aging Cell* 2009;8:405-13.
- 63 Gebre-Medhin S, Broberg K, Jonson T, et al. Telomeric associations correlate with telomere length reduction and clonal chromosome aberrations in giant cell tumor of bone. *Cytogenet Genome Res* 2009;124:121-7.
- 64 Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood* 2009;113:6549-57.
- 65 Cooper JN, Calado R, Wu C, Scheinberg P, Young N. Telomere length of peripheral blood leukocytes predicts relapse and clonal evolution after immunosuppressive therapy in severe aplastic anemia. Presented at the 50th annual meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, December 6-9, 2008. abstract.
- 66 Calado RT, Regal JA, Hills M, et al. Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1187-92.
- 67 Engelhardt M, Ozkaynak MF, Drullinsky P, et al. Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. *Leukemia* 1998;12:13-24.
- 68 Ohayashiki JH, Ohayashiki K, Fujimura T, et al. Telomere shortening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 1994;54:3557-60.
- 69 Chakraborty S, Sun C-L, Francisco L, et al. Accelerated telomere shortening precedes development of therapy-related myelodysplasia or acute myelogenous leukemia after autologous transplantation for lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:791-8.
- 70 Swiggers SJJ, Kuijpers MA, de Cort MJM, Beverloo HB, Zijlman MJM. Critically short telomeres in acute myeloid leukemia with loss or gain of parts of chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:247-56.
- 71 Sieglóvá Z, Zilovcová S, Cermák J, et al. Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leuk Res* 2004;28:1013-21.
- 72 Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, et al. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet* 2009;41:221-7.
- 73 McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, et al. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 2008;40:1404-6.
- 74 Hosgood HD III, Cawthon RM, He X, Chanock SJ, Lan Q. Genetic variation in telomere maintenance genes, telomere length, and lung cancer susceptibility. *Lung Cancer* 2009 March 12 (Epub ahead of print).
- 75 Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet* 2009;41:899-904.

- 76 Chen M, Ye Y, Yang H, et al. Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using highdensity single nucleotide polymorphism arrays. *Int J Cancer* 2009;125:2342-8.
- 77 Stacey SN, Sulem P, Masson G, et al. New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. *Nat Genet* 2009;41:909-14.
- 78 Savage SA, Chanock SJ, Lissowska J, et al. Genetic variation in five genes important in telomere biology and risk for breast cancer. *Br J Cancer* 2007;97:832-6.
- 79 Folini M, Gandellini P, Zaffaroni N. Targeting the telosome: therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:309-16.
- 80 Armstrong L, Saretzki G, Peters H, et al. Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* 2005;23:516-29.
- 81 Slagboom PE, Droog S, Boomsma DL. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 1994;55:876-82.
- 82 Graakjaer J, Pascoe L, Der-Sarkissian H, et al. The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell* 2004;3:97-102.
- 83 Huda N, Tanaka H, Herbert BS, Reed T, Gilley D. Shared environmental factors associated with telomere length maintenance in elderly male twins. *Aging Cell* 2007;6:709-13.
- 84 von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 2005;126:111-7.
- 85 Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)* 2009;116:827-35.
- 86 Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 2007;369:107-14.
- 87 Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JB, et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study. *Am J Epidemiol* 2007;165:14-21.
- 88 Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, Browner WS, Schiller NB, Whooley MA. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterio-scler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1379-84.
- 89 Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:842-6.
- 90 O'Donnell CJ, Demissie S, Kimura M, et al. Leukocyte telomere length and carotid artery intimal medial thickness: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1165-71.
- 91 Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:531-57.
- 92 Jiang H, Schiffer E, Song Z, et al. Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:11299-304.
- 93 Frenck RW Jr, Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5607-10.
- 94 Bayne S, Liu J-P. Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2005;240:11-22.
- 95 Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengel R, Han W, Moore MAS. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997;90:182-93.
- 96 Beyne-Rauzy O, Prade-Houdellier N, Demur C, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits hTERT gene expression in human myeloid normal and leukemic cells. *Blood* 2005;106:3200-5.
- 97 Wu K-J, Grandori C, Amacker M, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 1999;21:220-4.
- 98 Woo J, Suen EW, Leung JC, Tang NL, Ebrahim S. Older men with higher self-rated socioeconomic status have shorter telomeres. *Age Ageing* 2009;38:553-8.
- 99 Epel ES, Blackburn EH, Lin J, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17312-5.
- 100 Getliffe KM, Al Dulaimi D, Martin-Ruiz C, et al. Lymphocyte telomere dynamics and telomerase activity in inflammatory bowel disease: effect of drugs and smoking. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:121-31.
- 101 Nanni S, Narducci M, Della Pietra L, et al. Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer. *J Clin Invest* 2002;110:219-27.