

# Encim telomeraza – tarča za prihodnja zdravila?

Telomerase – future drug target enzyme?

Tomaž Langerholc

*Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede; Katedra za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo*

## Korespondenca/ Correspondence:

dr. Tomaž Langerholc, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede; Katedra za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo; Tel.: +386 2 3305872; Fax.: +386 2 3305861; E-mail: tomaz.langerholc@uni-mb.si

## Ključne besede:

telomeraza, imetelstat, cepivo, tumor, rak

## Key words:

telomerase, imetelstat, tumor, cancer, treatment

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81: 493–9

Prispelo: 28. dec. 2010,  
Sprejeto: 6. feb. 2012

## Izvillek

Problem pomnoževanja koncev evkariontskih kromosomov (telomer) so uspešno rešili z odkritjem encima telomeraze konec 80. let prejšnjega stoletja, za odkritje so leta 2009 podelili tudi Nobelovo nagrado za medicino in fiziologijo. Izražanje telomeraze pri rakavih boleznih in človeške sanje o večni mladosti so močno pospešile razvoj farmakoloških telomeraznih inhibitorjev in aktivatorjev, vendar pa kljub 15-letnemu raziskovanju zdravila še niso dostopna na trgu. V članku smo glede na podatke v svetovnih medijih in literaturi naredili pregled farmakoloških učinkovin v zgodnjih fazah kliničnih preskušanj, ki specifično uravnavajo aktivnost telomeraze. Načrtovana protitumorska zdravila večinoma ne bodo namenjena samostojni uporabi, saj telomerazne inhibitorje klinično preskušajo v kombinaciji z obstoječimi kemoterapevtskimi sredstvi, protitelomerazna cepiva pa v kombinaciji z imunostimulansi. Poleg raka in staranja v prispevku navajamo ostala bolezenska stanja, ki so povezana s telomerazo/telomerami, hkrati pa opisujemo tudi tehnično-pravne probleme pri razvoju novih zdravil. Glede na dinamiko razvoja lahko prva protitelomerazna zdravila na trgu pričakujemo v naslednjih petih letih.

## Abstract

Eucaryotic chromosome endings (telomeres) replication problem was solved in the 1980's by discovery of the telomerase enzyme. The Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded in 2009 for the discovery of telomerase. Altered telomerase expression in cancer, and human dream of eternal youth have accelerated the development of pharmacological telomerase inhibitors and activators. However, after 15 years of development they are still not available on the market. In the present article we reviewed pharmacological agents that target telomerase activity, which have entered clinical trials. Current drugs in development are mostly not intended to be used alone, as telomerase inhibitors under clinical trials are used in combination with the existing chemotherapeutics and anti-telomerase vaccines in combination with immuno-stimulants. Apart from cancer and aging, there are other diseases linked to deregulated activity of telomerase/telomeres and we also discuss technical and legal problems that researchers encounter in developing anti-telomerase therapy. Given the pace of development, first anti-telomerase drugs might appear on the market in the next 5 years.

## Telomeraza in telomere

Telomere so konci evkariontskih kromosomov, ki sliza svoje podvojevanje med delitvijo celice potrebujejo encim telomerazo. Zanimanje za to področje se je povečalo leta 2009, ko so Nobelovo nagrado za medicino ali fiziologijo podelili trem pionirjem na tem področju: Elizabeth Blackburn (University of California), Carol Greider (Johns Hopkins, Baltimore) in Jacku Szostaku (Harvard University, Cambridge). V zgodnjih 80. letih prejšnjega stoletja so omenjeni znanstveniki odkrili, kako se podvojujejo konci kromosomov pri celični delitvi, česar DNA polimeraza ne zmore. Konci kromosomov so pokriti s telomerami, ki imajo karakteristično ponavljajoča se zaporedja z visokim deležem gvanozina, pri človeku TTAGGG. Telomere preprečujejo prepoznavanje koncev kromosomov kot prekinitve DNA, ki bi lahko sprožile popravilne mehanizme DNA, nezaželeno encimsko razgradnjo DNA ali spajanje koncev kromosomov. Vsakokrat, ko se celica deli, se telomere skrajšajo. Ko dosežejo kritično dolžino, se sprožijo znotrajcelični signali za poškodbo DNA, ki prekinejo nadaljnjo delitev celice in povzročijo vstop celice v fazo senescence ali apoptozo. Krajšanje telomer preprečuje encim telomeraza, katerega delovanje podaljšuje telomere in s tem življenjsko dobo celice. Aktivno telomerazo najdemo v spolnih in embrionalnih zarodnih celicah, medtem ko je aktivnost nizka ali pa je ni mogoče zaznati v drugih somatskih celicah.<sup>1</sup>

Telomeraza je sestavljena iz dveh komponent: RNA (*angl.* TERC; human telomerase RNA, hTR), ki se veže na telomere<sup>2</sup> in proteinskega dela (*angl.* human telomerase reverse transcriptase, hTERT), ki deluje kot reverzna transkriptaza.<sup>3</sup> hTERT je glavna katalitska enota, ki uravnava telomerazno aktivnost, njeno izražanje pa se nadzira preko kompleksne znotrajcelične signalizacijske mreže. Za delovanje telomeraze sta potrebni obe enoti, pri čemer se hTR preko Watson-Crickovih interakcij med baznimi pari veže na obstoječe telomere. Za povezavo obeh komponent v stabilen encim je odgovoren protein diskernin,<sup>4</sup> z njim pa interagira TCAB1, ki je bistvenega pomena za

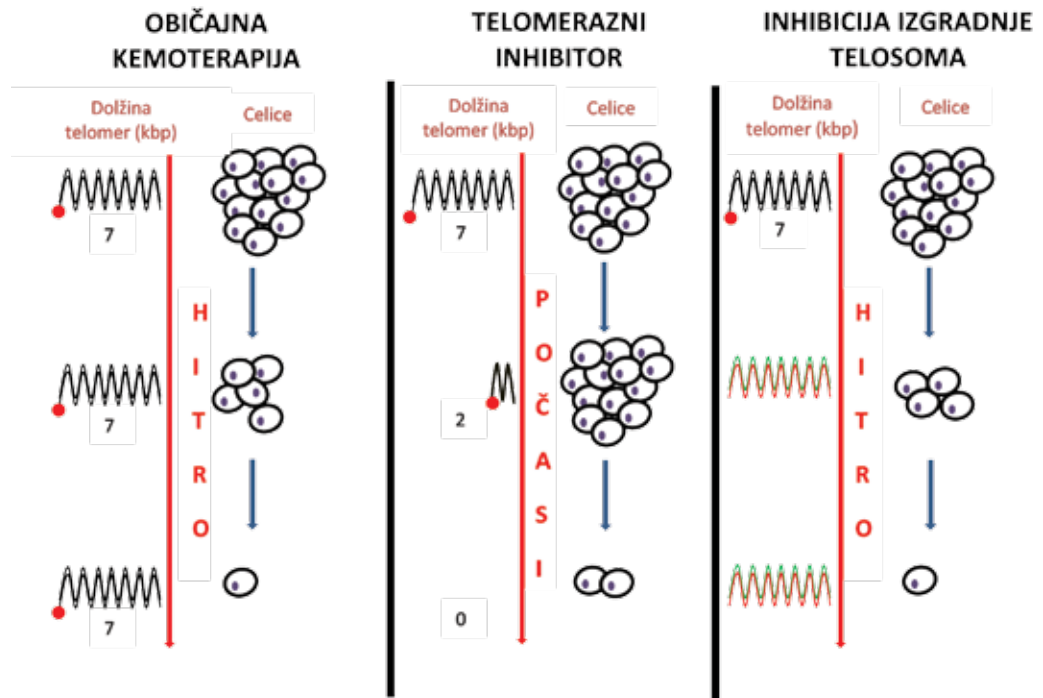
transport telomeraze v Cajalova telesca in za vzdrževanje telomer.<sup>5</sup> Poleg telomeraznega kompleksa so za vzdrževanje in zaščito telomer pomembni še proteini TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 in Rap1<sup>6,7</sup>, ki na telomerah skupaj sestavljajo telosom (t. i. shelterin).

## Bolezni, povezane s telomerazo/telomerami

### Rak

Že od odkritja telomereze je encim potencialna tarča za zdravila proti raku, saj je izražena v visokih koncentracijah pri 80–90 % tumorjev vseh tipov. 10–15 % tumorjev vzdržuje telomere preko rekombinacije (*angl.* alternative lengthening of telomeres, ALT), ki je od telomeraze neodvisen proces.<sup>8</sup> Mehanizem ALT najdemo predvsem pri tumorjih nevroepitelnega in mezenhimalnega izvora in redko pri tumorjih epitelnega izvora.<sup>9</sup> Pri starejši populaciji je večina tumorjev posledica karcinoma dojke, pljuč in debelega črevesa, ki izhajajo iz epitela. Epitel je hitro obnavljajoče se tkivo, zato se ob nezadostni telomerazni aktivnosti telomere skrajšajo na kritično dolžino. Kratke telomere so značilne za zgodnjo stopnjo humane karcinogeneze.<sup>10</sup> Nastala poškodba DNA aktivira tumor supresorski protein p53. V primeru mutacij ali delecije v genu za p53 se izgubi kontrolna celična točka zaradi poškodbe DNA, celica pa se deli še naprej; zaradi nezaščitenih telomer pride do genomske nestabilnosti, fuzije kromosomov, translokacij in sprememb v kopijah genov. Večino karcinomov zaznamujejo mutacije v genu p53,<sup>11</sup> njegova izguba pa v kombinaciji z nefunkcionalnimi telomerami običajno sovpadajo s prehodom iz normalnega epitela v invazivni karcinom. Ponovno aktiviranje telomeraze omogoči tumorskim celicam genomsko stabilnost, neomejeno delitev in napredovanje bolezni.<sup>12</sup> Celoten proces karcinogeneze torej zajema dve stopnji: v prvi pomanjkanje telomeraze povzroči genomsko nestabilnost, v drugi stopnji pa omogoči napredovanje in stabilnost tumorjev.

**Slika 1:** Mehanizmi ubijanja rakavih celic glede na dolžino telomer. Običajna kemoterapija povzroča citotoksične učinke na tarčne celice, vendar pri tem ne vpliva na dolžino telomer. Telomerazni inhibitorji povzročijo propad celic, ko se telomere skrajšajo na kritično dolžino. Zdravila, ki bi preprečevala vzpostavitev telosoma, bi povzročila razpad kromosomov. Vsi trije mehanizmi privedejo do ubijanja celic, le da pri uporabi telomeraznih inhibitorjev potrebujemo več celičnih delitev, preden celice začnejo propadati. Dolžino telomer izražamo v kilobaznih parih (kbp), telosom pa z rdečim krogom.



### Staranje

Obstaja več sindromov, ki nastanejo kot posledica nefunkcionalnih telomer/proteinov, ki vzdržujejo telomere/telomeraze: Wernerjev sindrom, ataxia telangiectasia, Bloomov sindrom, Fanconijeva anemija, dyskeratosis congenita itd.<sup>13</sup> Omenjeni sindromi so redki, fenotipski znaki pa so različni in povezani s prezgodnjim staranjem tkiv, spremembami na koži, kromosomsko nestabilnostjo in z nastankom neoplazem.<sup>13</sup> Kromatinske spremembe v območju telomer imajo prav tako vlogo v bolezni.<sup>14</sup> V literaturi najdemo nasprotujoče si podatke o možnem telomeraznem zdravljenju proti staranju, saj njena vloga pri normalnem staranju še vedno ni jasna. Pri genetsko spremenjenih miših s konstitutivnim izražanjem telomeraze so pogostejše rakave bolezni, vendar imajo kljub temu za 10 % daljšo povprečno življenjsko dobo kot divji tip miši.<sup>15</sup> Transgene miši brez telomeraze so bolj odporne proti tumorjem, vendar pa se njihova najvišja in povprečna življenjska doba krajšata iz generacije v generacijo.<sup>16</sup> Ker telomeraza pospešuje kancerogenezo, je njen potencial za upočasnevanje staranja omejen.

### Vloga telomeraze/telomer v ostalih bolezenskih/fizioloških stanjih

Čeprav telomere in telomerazo največkrat omenjajo v zvezi z nastankom raka in procesom normalnega staranja tkiva, raziskave v zadnjih letih kažejo na vlogo telomeraze v normalnih fizioloških procesih. Dolžine telomer so povezane s srčno-žilnimi boleznimi, aterosklerozo,<sup>17</sup> prezgodnjo odpovedjo jajčnikov pri ženskah<sup>18</sup> ter s prehranskimi navadami. Predelano meso v prehrani je obratno povezano z dolžino telomer;<sup>19</sup> uporaba multivitaminov v prehrani<sup>20</sup> in mikrohranil, kot so antioksidanti,<sup>21</sup> pa statistično dokazano podaljšuje njihovo dolžino. Telomerazna aktivnost se poviša pri akutnem psihološkem stresu,<sup>22</sup> kar kaže na pomembno vlogo telomer in telomeraze v fiziologiji celice, hkrati pa na njeno kompleksno uravnavanje.

### Inhibitorji telomerazne aktivnosti

V nasprotju s tradicionalnimi citostatiki in zaviralci celične delitve, ki ubije celice v nekaj urah po uporabi, potrebujejo inhibitorji telomeraze nekaj tednov za učinkovanje. Faza zamika je odvisna od dolžine telomer, ki so v tumorskih celicah dolge od

nekaj 100 do nekaj 1000 baznih parov (bp). Med vsako delitvijo se telomere skrajšajo za 50–100 bp, kar vodi do zapoznelega fenotipa na obravnavanih celicah in senescence. Zdravila, ki bi vplivala na integriteto telosoma, bi učinkovala hitro, saj bi povzročila poškodbe DNA na koncih kromosomov in apoptozo (Slika 1).<sup>23</sup>

Čeprav telomere in telomerozo poznamo že skoraj 30 let, se je v tem času v razvoju pojavilo malo potencialnih zdravil, ki so primerna tudi v terapevtske namene. Glede na podatke, dostopne v podatkovni zbirki Pharmaprojects,<sup>24</sup> so se v fazi predkliničnih preskušanj prvi inhibitorji telomeroze pojavili že 1995, npr. GRN-138098, po letu 1998 pa se je število hitro povečalo in doseglo leta 2001 število 12. Pri tem je šlo za ugotavljanje inhibitorne aktivnosti milijonov že obstoječih snovi iz knjižnic, kar je relativno poceni, vendar pa niso bile specifične za telomerozo ali pa preveč toksične za uporabo v klinični praksi. Od 2001 se je število postopno zmanjševalo in danes je v II. fazi kliničnih preskušanj ostal samo telomerozni inhibitor GRN163L kalifornijskega podjetja Geron Corporation. To podjetje praktično obvladuje trg raziskav telomeroze, metode odkrivanja njene aktivnosti in je nosilec več patentov na raziskovalnem ter aplikativnem področju. GRN163L ali imetelstat vsebuje kratkoverižni oligonukleotid, ki se komplementarno veže na matrico RNA telomeroze in jo s tem inhibira. Zaradi kemijske modifikacije oligonukletidov je odporen na razgradnjo z nukleazami v krvi in tkivu. Na koncu 5' RNA je oligonukleotid konjugiran s palmitilno lipidno enoto, kar molekuli omogoča dobro prehodnost in zadrževanje v tkivih in celicah.<sup>25</sup> Klinične študije potekajo pri raku dojke, pljuč, mielomu in kronični levkemiji, kjer se pojavljajo rakave zarodne celice kot povzročitelji bolezni ter hkrati kot nosilci odpornosti na zdravljenje. Propad zarodnih rakavih celic pri dajanju imetelstata so potrdili na modelih raka dojke in trebušne slinavke *in vitro*.<sup>26</sup> Ker imetelstat prehaja krvno-možgansko pregrado, so na mišjem modelu pokazali odlične rezultate pri zdravljenju glioblastoma multiforme.<sup>27</sup> 2-letno preživetje bolnikov z glioblastoma multiforme maligne stopnje III in IV po

lestvici WHO je manjše od 5%.<sup>28</sup> Pri tem tipu raka naj bi bile tumorske zarodne celice glavni razlog odpornosti na zdravljenje z običajno kemoterapijo, kar se odraža v slabi napovedi izida bolezni.<sup>29</sup> V kliničnih študijah imetelstata ne uporabljajo samostojno, pač pa predvsem v kombinaciji z obstoječimi kemoterapevtskimi sredstvi,<sup>30</sup> kot so paclitaxel in bevacizumab pri raku dojke ter paclitaxel/karboplatin pri nemaloceličnem pljučnem raku. Kombinirana kemoterapija s telomeroznim inhibitorjem bi povzročila krajšanje telomer tumorskih celic in njihovo smrt, kar bi podaljšalo učinke zdravljenja. Dosedanji rezultati kliničnih preskušanj kažejo na dobre farmakokinetične lastnosti imetelstata in malo stranskih učinkov. Visoki odmerki povzročijo motnje strjevanja krvi (podaljšanje aPTT), zelo visoki pa nevropenijo in trombocitopenijo.<sup>31</sup> Za proučevanje vpliva telomeroznih inhibitorjev na normalno tkivo bodo potrebne dodatne študije.

## Zaviralci izgradnje telosoma

Natrijev metaarzenit s komercialnim imenom KML001 je v II. fazi kliničnih preskušanj za zdravljenje raka na prostati (Univerza v Marylandu, ZDA) v kombinaciji s cisplatinom.<sup>30</sup> KML ne zavira aktivnosti telomeroze, vendar z vezavo na telomerna zaporedja povzroči translokacijo katalitske enote telomeroze iz jedra v citoplazmo.<sup>32</sup> V literaturi je precej poročil o razvoju G-kvadropleksnih ligandov, ki se vežejo na konce telomer.<sup>33</sup> S tem je onemogočena vezava telomere s telomerozo, slednja pa se iz celičnega jedra prenese v citoplazmo.<sup>32</sup> Klinična preskušanja s temi snovmi še ne potekajo.

## Cepiva proti telomerazi

Drugi način, kako vplivati na preživetje tumorskih celic, je uporaba terapevtskih cepiv proti telomerazi. Najdlje v kliničnih študijah raziskujejo GV-1001, v katerem je peptid iz aktivnega mesta telomeroze, ki aktivira citotoksične limfocite T.<sup>34–36</sup> Cepivo so že preizkusili pri nemaloceličnem pljučnem raku, raku trebušne slinavke in drugih tipih rakavih bolezni samostojno in v kombinaciji

s kemo- in radioterapevtskimi sredstvi ter z imunostimulatorji. Cepivo se je izkazalo kot varno, imunska odzivnost bolnikov pa znaša 50–80 %.<sup>35,36</sup> Cepivo ni imelo stranskih toksičnih učinkov niti pri ponovljenem cepljenju.<sup>37</sup> Cepivo je v III. klinični fazi preskušanja in je v lasti norveške farmacevtske družbe Lytix Bipharma in korejske KAEL-GemVax. Družbi sta v drugi polovici leta 2010 začeli izvajati klinične študije na bolnikih z različnimi tipi tumorjev s kombinacijo GV-1001 in LTX-315 (Oncopore™).<sup>38</sup> LTX-315 deluje kot adjuvans za ojačanje učinkovitosti cepiva, saj se je v predkliničnih preskušanjih izkazal kot aktivator prirojenega imunskega sistema.<sup>38</sup>

Geron vzporedno z imetelstatom razvija dve cepivi: GRNVAC<sub>1</sub> in GRNVAC<sub>2</sub>. GRNVAC<sub>1</sub> uporablja transfekcijo dendritičnih celic s kodirajočim zaporedjem za humano telomerozo *ex vivo*, celice pa nato intradermalno vrnejo bolniku. Cepivo je v II. fazi kliničnega preskušanja, pokazalo pa se je kot varno in neobremenjujoče za bolnike. GRNVAC<sub>2</sub> je v fazi predkliničnih preskušanj in uporablja alogenske dendritske celice, pripravljene iz embrionalnih zarodnih celic.<sup>39</sup> Tehnologijo priprave cepiva po licenci Geron razvija tudi Merck.

Vaxon Biotech vzporedno razvija več cepiv, imenovanih Vx-001, Vx-006 in Vbx-HLA. Cepivo temelji na kriptičnem imunogenem peptidu iz hTERT in se je v preskušanjih izkazalo kot varno in učinkovito. Bolniki v različnih stadijih nemaloceličnih pljučnih tumorjev so po cepljenju razvili specifični imunski odziv na telomerozo v 50–70 % primerov, kar se je odrazilo v boljšem preživetju bolnikov.<sup>40</sup> Vx-001 bo predvidoma v prvem četrtletju 2012 prešel v fazo IIb kliničnega preskušanja zdravljenja nemaloceličnih tipov pljučnih tumorjev.<sup>41</sup>

Na Univerzi v Pensilvaniji (ZDA) so pod vodstvom dr. Roberta Vonderheida razvili cepivo proti telomerazi, ki je v I/II fazi kliničnega preskušanja pri zdravljenju raka dojke. Pred cepljenjem v kliničnih preskušanjih bolnike stimulirajo z declizumabom ali s protitelesi proti CD25 za mobilizacijo CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> limfocitov T, ki ojačajo imunski odgovor.<sup>42</sup> Podrobnosti in rezultati preskušanj niso dostopni.

Cepivo z oznako CB-10-01 razvija tudi Cosmo Biotech in je v II. fazi kliničnega preskušanja za zdravljenje melanoma tretje faze. Za razliko od ostalih cepiv v razvoju gre pri CB-10-01 za transgeno imunizacijo limfocitov.<sup>24,30</sup> Rezultati preskušanj niso znani.

## Razvoj zdravil proti nerakavim boleznim

Geron skupaj s TA Therapeutics razvija telomerni aktivator TAT<sub>2</sub>, ki pa glede na poročila še ni prešel v klinične študije. Molekulo TAT<sub>2</sub> ali cikloastragenol so izolirali iz izvlečkov rastline *Astragalus verrucosus*, ki jo v kitajski tradicionalni medicini uporabljajo kot aktivator imunskega sistema. TAT<sub>2</sub> poveča izražanje telomerase v imunskih celicah.<sup>43</sup> V kulturi CD8<sup>+</sup> limfocitov T, izoliranih iz HIV-pozitivnih bolnikov in aktivatorja TAT-2, se je količina virusa HIV zmanjšala za 2,5-krat glede na kontrolno skupino.<sup>24</sup> V predkliničnih študijah virusa HIV se je pokazala stimulacija in povečana citolitska aktivnost CD8<sup>+</sup> limfocitov T ob dodatku TAT<sub>2</sub>.<sup>39</sup> Rezultati so spodbudni za načrtovanje zdravljenja bolnikov, okuženih z virusom HIV.

## Zaključki

Čeprav je komercialni potencial za protitelomerna zdravila zaradi razširjenosti rakavih bolezni velikanski, na trg dejansko vstopa sorazmerno malo podjetij. Največja težava se pojavlja na prehodu iz II. faze v III. fazo kliničnih študij. Težavam zaradi stranskih učinkov protitelomernega zdravljenja botruje pomanjkanje bazičnega znanja o vlogi telomerase, saj njena vloga ni omejena samo na rakave bolezni in staranje, ampak je verjetno vpletena tudi v signalno pot Wnt<sup>44</sup> in procesiranje RNA.<sup>45,46</sup> Dodatne zaplete pri zdravljenju raka povzročata mehanizem ALT, pri katerem je podaljševanje telomer neodvisno od aktivnosti telomerase.

Druga težava pri razvoju protitelomernih zdravil je pravne narave. Geron Corporation ima monopol na telomerozo glede intelektualne lastnine v mnogih državah in vključuje sam gen, imunogene telomerni peptide in analitske metode odkrivanja

njene aktivnosti. Glede na dosedanji potek razvoja lahko pričakujemo vstop protitelomeraznih zdravil za zdravljenje raka v naslednjih petih letih, medtem ko se telomerazni aktivatorji in z njimi povezane ideje o večni mladosti pomikajo dlje v prihodnost.

## Literatura

1. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(5): 787–91.
2. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269(5228): 1236–41.
3. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997; 90(4): 785–95.
4. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 2007; 315(5820): 1850–3.
5. Tycowski KT, Shu MD, Kukoyi A, Steitz JA. A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Mol Cell* 2009; 34(1): 47–57.
6. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19(18): 2100–10.
7. Luzar B, Gale N, Poljak M, Cör A. Telomere in telomeraza pri človeku–zgradba, funkcija in vloga v procesu kancerogeneze. *Med Razgl* 2000; 39: 271–279.
8. Morrish TA, Greider CW. Short telomeres initiate telomere recombination in primary and tumor cells. *PLoS Genet* 2009; 5(1): e1000357.
9. Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, 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(1): 217–25.
10. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3(11): 1931–41.
11. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54(18): 4855–78.
12. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31(1): 9–18.
13. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; 6(8): 611–22.
14. Gonzalo S, Garcia-Cao M, Fraga MF, Schotta G, Peters AH, Cotter SE, et al. Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat Cell Biol* 2005; 7(4): 420–8.
15. Gonzalez-Suarez E, Geserick C, Flores JM, Blasco MA. Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice. *Oncogene* 2005; 24(13): 2256–70.
16. Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366(1561): 76–84.
17. Butt HZ, Atturu G, London NJ, Sayers RD, Bown MJ. Telomere length dynamics in vascular disease: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010; 40(1): 17–26.

18. Košir Pogačnik R, Slabe N, Meden Vrtovec H. Telomere, telomeraza in prezgodnja odpoved jajčnikov. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 832–837.
19. Nettleton JA, Diez-Roux A, Jenny NS, Fitzpatrick AL, Jacobs DR, Jr. Dietary patterns, food groups, and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 2008; 88(5): 1405–12.
20. Xu Q, Parks CG, DeRoo LA, Cawthon RM, Sandler DP, Chen H. Multivitamin use and telomere length in women. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(6): 1857–63.
21. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2008; 44(3): 235–46.
22. Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Wolkowitz OM, Puterman E, Karan L, et al. Dynamics of telomerase activity in response to acute psychological stress. *Brain Behav Immun* 2010; 24(4): 531–9.
23. Folini M, Gandellini P, Zaffaroni N. Targeting the telosome: therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(4): 309–16.
24. Ruscoe P. Telomerase as a potential therapeutic target. *Pharmaprojects* Jun 2011. Dosegljivo na: <http://www.pharmaprojects.com/>
25. Herbert BS, Gellert GC, Hochreiter A, Pongracz K, Wright WE, Zielinska D, et al. Lipid modification of GRN163, an N3'—>P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene* 2005; 24(33): 5262–8.
26. Joseph I, Tressler R, Bassett E, Harley C, Buseman CM, Pattamatta P, et al. The telomerase inhibitor imetelstat depletes cancer stem cells in breast and pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9494–504.
27. Marian CO, Cho SK, McEllin BM, Maher EA, Hatanpaa KJ, Madden CJ, et al. The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. *Clin Cancer Res* 2010; 16(1): 154–63.
28. Buckner JC. Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol* 2003; 30(6 Suppl 19): 10–4.
29. Huang Z, Cheng L, Guryanova OA, Wu Q, Bao S. Cancer stem cells in glioblastoma—molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* 2010; 1(7): 638–55.
30. ClinicalTrials.gov, 2011. Dosegljivo na: <http://clinicaltrials.gov/>
31. Roth A, Harley CB, Baerlocher GM. Imetelstat (GRN163L)—telomerase-based cancer therapy. *Recent Results Cancer Res* 2010; 184: 221–34.
32. Phatak P, Dai F, Butler M, Nandakumar MP, Gutierrez PL, Edelman MJ, et al. KML001 cytotoxic activity is associated with its binding to telomeric sequences and telomere erosion in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14(14): 4593–602.
33. Gunaratnam M, Fuente Mde L, Hampel SM, Todd AK, Reszka AP, Schatzlein A, et al. Targeting pancreatic cancer with a G-quadruplex ligand. *Bioorg Med Chem* 2011; 19(23): 7151–7.
34. Kyte JA, Trachsel S, Risberg B, Straten P, Lilslerud K, Gaudernack G. Unconventional cytokine profiles and development of T cell memory in long-term survivors after cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58(10): 1609–26.
35. Bernhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, Moller M, Eriksen JA, Meo M, et al. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study. *Br J Cancer* 2006; 95(11): 1474–82.
36. Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, et al. Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(12): 1553–64.
37. Brunsvig PF, Kyte JA, Kersten C, Sundstrom S, Moller M, Nyakas M, et al. Telomerase Peptide Vaccination in NSCLC: A Phase II Trial in Stage III Patients Vaccinated after Chemoradiotherapy and an 8-Year Update on a Phase I/II Trial. *Clin Cancer Res* 2011; 17(21): 6847–57.
38. Lytix Biopharma, KAEL-GemVax granted approval for GV1001/LTX-315 combination cancer therapy study (editorial). *The Medical News*, Jun 2010. Dosegljivo na: <http://www.news-medical.net/>
39. Geron Corporation, 2010. Dosegljivo na: <http://www.geron.com/>
40. Vetsika EK, Konsolakis G, Aggouraki D, Kotsakis A, Papadimitraki E, Christou S, et al. Immunological responses in cancer patients after vaccination with the therapeutic telomerase-specific vaccine Vx-001. *Cancer Immunol Immunother* 2011.
41. Vaxon Biotech, Nov 2010. Dosegljivo na: <http://vaxon-biotech.com/>
42. Rapoport AP, Aquilina NA, Stadtmauer EA, Vogl DT, Fang HB, Cai L, et al. Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination based on hTERT and survivin following ASCT for myeloma. *Blood* 2010.
43. Fauci SR, Jamieson BD, Chin AC, Mitsuyasu RT, Parish ST, Ng HL, et al. Telomerase-based pharmacologic enhancement of antiviral function of human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 2008; 181(10): 7400–6.
44. Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkrel M, et al. Telomerase modulates Wnt signaling by association with target gene chromatin. *Nature* 2009; 460(7251): 66–72.
45. Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, et al. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 2009; 323(5914): 644–8.
46. Box JA, Bunch JT, Tang W, Baumann P. Spliceosomal cleavage generates the 3' end of telomerase RNA. *Nature* 2008; 456(7224): 910–4.