

Długość telomerów jako marker prognostyczny w raku piersi i raku płuca

Wojciech Barczak, Błażej Rubiś

Komórki nowotworowe charakteryzuje podwyższona aktywność telomerazy. Enzym ten jest odpowiedzialny za odbudowę telomerów. Telomery, jako wyspecjalizowane nukleoproteiny występujące na końcach chromosomów, pełnią istotną rolę w utrzymaniu stabilności i integralności genomu. Najważniejszym skutkiem ich ciągłej odbudowy w komórkach nowotworowych przy udziale telomerazy jest nadawanie im nieśmiertelności. Badania prowadzone w ostatnich latach nad aktywnością telomerazy oraz długością telomerów wskazują, że ich regulacja odbywa się przy udziale czynników uwalnianych podczas procesu karcinogenezy, tj. hormonów i cytokin. Czynniki te z kolei modulują telomerazę i telomery także w pozostałych, prawidłowych komórkach. Powoduje to, że zmiany zachodzące w organizmie człowieka nawet w skali lokalnej (inicjacja nowotworu na poziomie pojedynczej komórki) mogą mieć swoje odzwierciedlenie na szczeblu molekularnym w całym organizmie (w tym w leukocytach) i odwrotnie.

Najnowsze badania wskazują na pewne różnice w długości telomerów mierzonych w leukocytach pomiędzy chorymi na nowotwory typu *adenocarcinoma* a osobami z grupy kontrolnej. Biorąc pod uwagę rezultaty dotychczasowych badań, słusznym wydaje się więc przyjęcie tezy, że długość telomerów (lub aktywność telomerazy) w leukocytach może być postrzegana jako marker procesu nowotworzenia zachodzącego na bardzo wczesnym etapie karcinogenezy. Wydaje się więc, że ocena długości telomerów w leukocytach, jako badanie o niskiej inwazyjności, mogłaby stać się metodą wczesnego wykrywania zmian nowotworowych zachodzących w organizmie człowieka.

W pracy podjęliśmy się przedyskutowania problemu możliwości wykorzystania analizy długości telomerów jako parametru prognostycznego na wczesnym etapie rozwoju nowotworów na przykładzie raka piersi i raka płuca. Prezentujemy też kilka powszechnie do tego celu wykorzystywanych metod z analizą ich mocnych i słabych stron.

Telomere length as a prognostic marker in breast and lung cancer

Cancer cells are characterized by an increased telomerase activity. The enzyme is responsible for reconstruction of telomeres. Telomeres, as specialized nucleoproteins that are located at the end of chromosomes, provide genome stability and integrity. The most important consequence of their restore in cancer cells is their immortality. The studies carried out within last few years on telomerase and telomere length indicate that their regulation is controlled by factors released during carcinogenesis i.e. hormones and cytokines. Consequently, those factors also modulate telomerase also in normal cells.

This causes changes in the human organism even at the local area (cancer initiation at a single cell level) which may be reflected by alterations in whole organism (including leukocytes). The latest studies point to some differences in the measured telomere length in leukocytes between adenocarcinoma patients and control subjects. Considering the results of previous studies it seems justified to adopt the thesis that telomere length (or telomerase activity) in leukocytes can be evaluated as a marker of tumor occurring at a very early stage of carcinogenesis. Thus, it seems that telomere length measurement in leukocytes, as a low-invasive method, might be a good method for predictive assessment of carcinogenesis. In this work we focused on potential application of telomere length analysis as a pro-

gnostic parameter at the early stage of cancer development in breast and lung cancer. We also report on numerous methods of telomere length analysis showing their strengths and weaknesses.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2012; 62, 5: 376–384

Słowa kluczowe: telomery, telomeraza, rak piersi, rak płuca, qPCR

Key words: telomeres, telomerase, breast cancer, lung cancer, qPCR

Praca powstała podczas realizacji projektu N N402 598040

Wstęp

Jedną z cech charakterystycznych komórek nowotworowych jest podwyższona aktywność telomerazy. Enzym ten jest aktywny w około 80–90% wszystkich nowotworów, takich jak np. nowotwór trofoblastu związanego z ciążą, a także w komórkach płaskonabłonkowego raka jamy ustnej, komórkach raka płuca z popłuczyn oskrzelowych, komórkach jelita grubego, a także w 100% przypadków *adenocarcinoma*, ale zazwyczaj nie w komórkach somatycznych [1, 2]. Wyjątkiem od tej reguły są małe populacje samoodnawialnych komórek macierzystych, takie jak hematopoetyczne komórki pnia, które zachowują aktywność telomerazy [1]. Aktywność tego enzymu, a właściwie jego brak w większości komórek prawidłowych, związany jest z problemem replikacji końca, który wynika z braku możliwości polimerazy DNA do pełnej replikacji chromosomu. Jednokierunkowa natura procesu replikacji DNA (5' do 3' końca) oraz zapotrzebowanie na starter w celu inicjacji syntezy nowej nici (*primer*) powodują, że końce chromosomów tracą odcinek sekwencji DNA, a w konsekwencji skracają się z każdym cyklem mitotycznym [3, 4]. Chromosomy prawidłowych komórek tracą około 50–100 par zasad na 5' końcu podczas każdego podziału komórki [5]. Bez mechanizmu ochronnego to skracanie będzie ostatecznie prowadziło do utraty informacji genetycznej, a w efekcie do śmierci komórki na drodze apoptozy lub do ich starzenia się w sposób zależny od białka p53 [6]. U bakterii problem ten nie występuje w związku z obecnością kolistego chromosomalnego DNA. Z kolei u eukariota tylko w nielicznych komórkach, w tym w komórkach nowotworowych, telomery odbudowywane są przy udziale kompleksu rybonukleoproteiny, jaką jest telomeraza [6, 7].

Telomery

Telomery są wyspecjalizowanymi nukleoproteinami obecnymi na końcach chromosomów i pełnią ważną rolę w utrzymaniu stabilności i integralności genomu [8, 9]. Telomerowe DNA u ludzi jest zbudowane z heksamerowych powtórzeń (5'-TTAGGG-3') w nici zawierającej koniec 3'. Ta nić nosi nazwę nici G, podczas gdy zawierająca koniec 5' komplementarna nić jest znana jako nić C (odpowiednio nici bogate w nukleotydy guanylowe lub cytydynowe) [10]. Telomery człowieka mają w przybliżeniu 500 do 2000 kopii

powtórzeń sześci nukleotydowych, co daje 3 do 12 tysięcy par zasad [5]. W 1999 roku Griffith oraz de Lange zaprezentowali koncepcję struktury telomerów, która funkcjonuje do dziś. Opisali, używając mikroskopii elektronowej, strukturę „pętli t” (*t-loop*). Jak wykazali, długie odcinki dwuniciowego telomerowego DNA są zapętlone, a jednoniciowy koniec jest zapętlony i zlokalizowany w rejonie dwuniciowej cząsteczki DNA, co skutkuje lepszą ochroną zakończenia telomeru [11].

Telomeraza

W 1965 r. Hayflick wykazał, że fibroblasty posiadają limit podziałów ustalony na około 50 podwojeń populacji w hodowli komórek *in vitro*, a następnie komórki przechodzą nieodwracalne zatrzymanie cyklu (starzenie, kryzys mitotyczny, śmierć) [12]. Zjawisko limitu Hayflicka wynika z faktu skracania telomerów podczas każdej replikacji komórek. Jednakże wiele komórek nie mnoży się regularnie i w konsekwencji nie traci sekwencji telomerowej [13]. Za odbudowę telomerów odpowiedzialna jest telomeraza. Jest to wyspecjalizowana polimeraza DNA o aktywności odwrotnej transtryptazy, która syntetyzuje powtórzenia telomerowe *de novo* [14]. Enzym ten składa się z dwóch kluczowych podjednostek: podjednostki zbudowanej z łańcucha RNA (TR) oraz równie istotnej podjednostki TERT [15]. TERT, podjednostka o aktywności odwrotnej transkryptazy, posiada zdolność do wydłużania telomerów w celu utrzymania integralności chromosomów oraz w pewnym sensie reguluje długość życia komórek [16]. Pełni istotną rolę w proliferacji, różnicowaniu, kancerogenezie oraz starzeniu się komórek [17]. Podjednostki TR i TERT tworzą razem rdzeń enzymu. Podjednostka TR (ulegająca konstytutywnej ekspresji) dodatkowo pełni rolę matrycy niezbędnej do elongacji sekwencji telomeru [18]. Ważnym elementem kompleksu telomerazy jest także dyskeryna. Białko to jest niezbędne dla utrzymania struktury przestrzennej telomerów i jest istotnym jąderkowym białkiem potrzebnym do biogenezy rybonukleoprotein, które zawierają małe jąderkowe RNA (H/ACA RNA) [19]. Zasadniczo jednak podjednostki TERT i TR są wystarczające dla zapewnienia funkcjonalnej aktywności telomerazy *in vitro* [20]. W warunkach *in vivo* konieczne jest zapewnienie ochrony kompleksu, którą stanowi kompleks szeregu białek dodatkowych i pomocniczych, tzw. szeltryna [21–23].

Badanie telomerazy i telomerów

Zainteresowanie badaczy możliwością regulacji aktywności telomerazy w komórkach, a także pomiaru długości telomerów wynika z faktu, że na aktywność telomerazy oraz długość telomerów istotny wpływ mają czynniki uwalniane podczas procesów nowotworowych, takie jak hormony, cytokiny oraz ligandy receptorów jądrowych [6, 24]. Do czynników indukujących ekspresję telomerazy należą między innymi: c-Myc, NF- κ B, Ets czy NFAT. C-Myc jest podstawowym czynnikiem transkrypcyjnym typu helisa-pętla-helisa. Białko to odgrywa rolę w aktywacji ekspresji genu *TERT*. Ponadto czynnik c-Myc należy do grupy protoonkogenów i najprawdopodobniej działa poprzez indukcję globalnej acetylacji histonów [25]. Z kolei jądrowy czynnik NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) to czynnik transkrypcyjny, który wiąże się z promotorem genu łańcucha lekkiego (κ) immunoglobulin w dojrziałych limfocytach B i odgrywa istotną rolę w procesach odpornościowych (odporność wrodzona i nabyta) oraz zapalnych [26]. Dowiedziono, że jest on bardzo powszechnym czynnikiem transkrypcyjnym, występującym we wszystkich typach komórek, od muszki owocowej *Drosophila melanogaster* do człowieka, oraz że jest zaangażowany w procesy proliferacji i apoptozy [27]. Jak wykazano, jego aktywacja podczas uszkodzeń naczyń prowadzi do podwyższenia poziomu *TERT* w komórkach mięśni gładkich. Dowiedziono, że w tym procesie uczestniczy również c-Myc. Z kolei zahamowanie NF- κ B w obu błonach komórek mięśni gładkich oraz uszkodzenie tętnicy osłabia aktywność transkrypcyjną *TERT* przez obniżenie ekspresji c-Myc [28]. Kolejny istotny dla regulacji telomerazy czynnik transkrypcyjny — Ets — jest jednym z ponad 30 białek, które posiadają charakterystyczną domenę ETS (*erythroblast transformation specific*). Ets2 jest kluczowym dla indukcji ekspresji genu *TERT* oraz dla proliferacji komórek raka piersi. Jak wykazano, wyciszenie Ets2 skutkuje obniżeniem ekspresji *TERT*, co w konsekwencji prowadzi do indukcji śmierci komórek raka piersi [29]. Nie mniej ważnym czynnikiem biorącym udział w regulacji ekspresji telomerazy jest jądrowy czynnik aktywowanych komórek T, NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*). Pełni on istotną rolę w aktywacji limfocytów poprzez stymulację promotora *TERT*. Udowodniono, że zahamowanie ekspresji NFAT1 w komórkach nowotworowych powoduje spadek poziomu mRNA *TERT*, co wskazuje na rolę w regulacji ekspresji/aktywności telomerazy [30], a także, jak pokazano na udziały w spowalnianiu etapu promocji raka piersi poprzez zmniejszenie indukcji cyklooksygenazy-2 (COX-2), a przez to produkcji prostaglandyn [31].

Do grupy czynników obniżających ekspresję telomerazy należą między innymi: Menin, WT1, p53 czy p73. Menin, który jest supresorem nowotworów, hamuje aktywność promotora *TERT* poprzez wiązanie z nim niezależnej sekwencji. Sugeruje się także pośredni udział tego białka w regulacji aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych oraz

komórkach prawidłowych [32], pomimo iż badania prowadzone na komórkach raka piersi linii MCF7 nie wykazały zmian w ekspresji *TERT* w związku z nadekspresją Menin [33]. Z kolei białko WT1 (*Wilm's tumor 1*) wiąże się w sposób specyficzny do sekwencji promotora *TERT* i w efekcie hamuje ekspresję i aktywność telomerazy [34]. Także białko p53 oraz p73 wpływają na obniżenie ekspresji telomerazy. Białko p53 hamuje tę ekspresję poprzez obniżenie transkrypcji *TERT* oraz przez interakcje białka z Sp1 lub z innymi czynnikiemami transkrypcyjnymi. Badania nad tymi czynnikiemami i ich wpływem na aktywność i ekspresję telomerazy pokazały, że enzym ten może być celem w terapii przeciwnowotworowej [35]. Złożoność procesu regulacji telomerazy i jego powiązanie z inicjacją procesu nowotworzenia wynika z faktu, że zmiany zachodzące w organizmie człowieka nawet w skali lokalnej (inicjacja nowotworu na poziomie pojedynczej komórki) mają odzwierciedlenie na szczeblu molekularnym w całym organizmie (w tym w leukocytach) i odwrotnie. Dlatego zmiany aktywności telomerazy oraz długości telomerów mogą być markerem zmian zachodzących w naszym organizmie (proces kancerogenezy) oraz wskaźnikiem prognostycznym rozwijających się chorób. Analizę tych zmian z kolei można prowadzić za pomocą metod biologii molekularnej, których rozwój spowodował zwiększenie ich czułości i profilu zastosowań. Przyspieszyło to czas diagnozowania zmian chorobowych, a przez to zwiększyło szanse na skuteczność leczenia. W zależności od rodzaju materiału, jakim dysponujemy (jego ilości, rodzaju sprzętu do analizy długości telomerów) możemy zastosować różne metody (np. Southern blot, Q-FISH, FLOW-FISH, STELA, Real-time PCR, MMq-PCR).

Długość telomerów w raku piersi

Rak piersi zajmuje pierwsze miejsce pod względem występowania nowotworów złośliwych u kobiet [36]. W ostatnich latach coraz więcej badań koncentruje się na identyfikacji długości telomerów jako markera ryzyka zachorowania na nowotwory. Jednakże ta korelacja jest cały czas niejasna. De Vivo i wsp. dokonali pomiaru względnej długości telomerów w genomowym DNA wyizolowanym z leukocytów krwi i przebadali związek tego parametru z ryzykiem raka piersi u kobiet po menopauzie. Wykazali, że względna długość telomerów (RTL, *relative telomere length*) nie jest skorelowana ze znaczącym wzrostem ryzyka wystąpienia postmenopauzalnego raka piersi. Co więcej, ustalili, że czynniki ryzyka raka piersi (historia rodziny i historia łagodnych chorób piersi) nie były związane ze zmianami RTL [37]. Z kolei Svenson i wsp. w badaniach z udziałem pacjentek z rakiem piersi (n = 265) i osób kontrolnych (n = 446) oraz z zastosowaniem techniki qPCR wykazali znacząco dłuższe telomery w grupie badanej niż w grupie kontrolnej [38]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach Gramatgesa i wsp., gdzie przebadano 102 pacjentki ze zdiagnozowanym

rakiem piersi (40 pacjentek — negatywny wywiad rodzinny w kierunku raka piersi; 62 — pozytywny wywiad rodzinny w kierunku raka piersi) oraz 50 kobiet z grupy kontrolnej [39]. Obydwa badania zostały przeprowadzone za pomocą metody Real-Time PCR z wykorzystaniem DNA wyizolowanego z leukocytów. W obydwu grupach badawczych wykazano obecność znacznie dłuższych telomerów w grupie badanej niż w grupie kontrolnej. Ponadto wykazano, że pomiar względnej długości telomerów niesie ze sobą prognostyczną informację dla pacjentów z zaawansowanym rakiem piersi.

Większość badaczy wskazuje na słuszność hipotezy zakładającej, że długość telomerów koreluje z większym ryzykiem zachorowania na raka piersi. Radpour i wsp. dokonali pomiaru długości telomerów przy użyciu qPCR u 104 kobiet (52 pacjentki z rakiem piersi i 52 kobiety z grupy kontrolnej), w DNA wyizolowanym z tkanek utrwalonych w skrawkach parafinowych [40]. Martinez-Delgado i wsp. przebadali 198 kobiet z rakiem piersi i z pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku raka piersi (klasyfikacja według mutacji w genach: 48 — *BRCA1*, 45 — *BRCA2*, 105 — *BRCA1/2*), 267 kobiet kontrolnych oraz 71 kobiet z niedziedzicznym rakiem piersi, oceniając długość telomerów w leukocytach krwi obwodowej, używając techniki qPCR. Wyniki badań pokazały, że to dziedziczny rak piersi — w przeciwieństwie do niedziedzicznego — charakteryzuje się krótszymi telomerami, oraz że skracanie telomerów wiąże się z wcześniejszym wiekiem zachorowania na raka piersi w następnych pokoleniach w danej rodzinie [41]. Jak się podejrzewa, zjawisko to może wynikać z faktu, że w takich przypadkach istotne znaczenie dla skracania telomerów może mieć niestabilność genomu wynikająca z kolei z obecności u tych pacjentów mutacji w genach istotnych dla procesów naprawczych (w tym *BRCA1/2*). Dodatkowo niestabilność ta może przyczynić się do indukcji tetraploidyzacji, co indukuje kancerogenezę [42].

Z kolei Looi i wsp. przebadali długość telomerów w populacji malezyjskich kobiet zakwalifikowanych do 3 grup, tj.: kobiety z inwazyjnym rakiem przewodowym ($n = 23$; IDC), z gruczolakowłóknikiem ($n = 12$; FA) oraz osoby z grupy kontrolnej ($n = 14$). Średnia długość telomerów dla IDC wyniosła 1,2 kpz, a dla FA i prób kontrolnych było to odpowiednio 2,2 kpz i 2,9 kpz. Wyniki te wskazują, że w przypadkach IDC telomery są znacząco krótsze w porównaniu do FA i grupy kontrolnej, a tym samym, że skracanie telomerów może przebiegać w różny sposób zależnie od typu nowotworu [43]. Ciekawe badania przeprowadził Arbeev i wsp. Zbadali oni korelację pomiędzy wiekiem ojca w momencie urodzin córek, a długością telomerów w leukocytach potomstwa. Wykazano, że córki starszych ojców charakteryzowały się zwiększoną zachorowalnością na raka piersi w porównaniu z córkami ojców młodszych [44], natomiast w niektórych przypadkach korelacja ta nie była istotna statystycznie

i może nie stanowić kluczowej wartości w prognostyce nowotworu [45–47]. Raynaud i wsp. zasugerowali nawet występowanie dwóch klas populacji nowotworów piersi w zależności od długości telomerów: nowotwory z długimi telomerami oraz nowotwory z bardzo krótkimi telomerami. Uzyskane w tych badaniach dane wskazują, że większość zdarzeń onkogennych, włączając kryzys telomerowy i utratę zdolności naprawy uszkodzonego DNA (DDR, *DNA damage repair*), występują pomiędzy fazą poprzedzającą rozwój nowotworu i samą chorobą nowotworową. Dystrybucja długości telomerów w raku piersi sugeruje więc istnienie 2 oddzielnych dróg ontogenezy, co pokazały wyniki wskazujące na występowanie bardzo krótkich telomerów w 39% prób, oraz bardzo długich — w innych 39% prób, a tylko u 5% przypadków telomerów o przeciętnej długości [48]. Istotną rolę w funkcjonowaniu telomerazy odgrywają także czynniki genetyczne. Jak wykazano, polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphism*, SNP) w genach kodujących białka związane z telomerami mogą wpływać na długość telomerów i stabilność chromosomu poprzez modulację ekspresji lub konfiguracji tych białek. Opublikowano kilka prac pokazujących tę zależność. Varadi i wsp. oraz Pooley i wsp. zbadali 15 potencjalnie funkcjonalnych i najbardziej informacyjnych SNP w dziewięciu genach związanych z telomerami (*TERT*, *TEP1*, *TERF1*, *TERF2*, *TERF2IP*, *ACD*, *POT1*, *TNKS* oraz *TNKS2*). Żaden z polimorfizmów nie wykazał znaczącej korelacji z przeżywalnością pacjentów z rakiem piersi [49, 50]. Kolejne badania przeprowadzone przez Shena i wsp. udowodniły natomiast, że z ryzykiem wystąpienia raka piersi są znacząco związane cztery polimorfizmy w genach *TERT* i *POT* [51]. W innych badaniach dokonano porównania długości telomerów na poszczególnych chromosomach. Zheng i wsp. mierzyli długość telomerów za pomocą ilościowej hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (Q-FISH) na krótkim ramieniu chromosomu 9. Wykazali oni obecność znacząco krótszych telomerów u pacjentów z rakiem piersi w porównaniu z grupą kontrolną, a także wywnioskowali, że długość telomerów na krótkim ramieniu chromosomu 9 jest silnie skorelowana z ryzykiem zachorowania na raka piersi [52]. Także Rashid-Kolvear próbował znaleźć ten związek, badając długie ramię chromosomu 17 jako jedno z ramion o najkrótszych telomerach w prawidłowym nabłonku gruczołu piersiowego, komórkach raka przewodowego *in situ* (DCIS) oraz w komórkach inwazyjnego raka przewodowego u 18 pacjentów. Długość telomerów została określona jako krótsza w DCIS oraz IDC w porównaniu z prawidłowymi komórkami nabłonkowymi gruczołu piersiowego. Zauważono także, że skracanie telomerów na długim ramieniu chromosomu 17 jest szybsze niż średnia skracania wszystkich telomerów, co sugeruje, że to zintensyfikowane tempo skracania telomerów na chromosomie 17 (ramię q) może być związane z niestabilnością chromosomu oraz z progresją DCIS [53].

Znaczenie badania długości telomerów w raku płuca

Rak płuca jest najczęściej występującym nowotworem na świecie zarówno u mężczyzn jak i u kobiet [54]. To pokazuje jak ważne jest przeprowadzanie badań szczególnie na poziomie molekularnym, np. pomiaru długości telomerów. Badania przeprowadzone przez Shena i wsp. pokazują, że większa długość telomerów może być związana z wyższym ryzykiem zachorowania na raka płuca wśród mężczyzn — palaczy [55]. Została stworzona baza danych na podstawie metaanalizy przeprowadzonej przez Ma i wsp. z wykorzystaniem ponad 12 tysięcy przypadków oraz ponad 13 tysięcy kontroli z 21 publikacji w celu określenia korelacji pomiędzy ogólnym ryzykiem zachorowania na raka i względną długością telomerów. Wyniki tej analizy pokazują, że obecność krótkich telomerów znacząco korelowała z ryzykiem wystąpienia raka w porównaniu z osobami o dłuższych telomerach (OR = 2,39, 95% CI = 1,18–4,88). Wyniki były istotne statystycznie dla kaukaskiej i azjatyckiej grupy etnicznej. To zasugerowało, że pomiar długości telomerów może być markerem dla podatności wystąpienia raka płuca [56]. Niedawne badania także pokazują taką korelację. Jang i wsp. wykazali znacząco mniejszą długość telomerów u pacjentów z rakiem płuca niż u ludzi zdrowych (rak płuca $1,59 \pm 0,75$ vs $2,16 \pm 1,10$, $p < 0,0001$ u osób kontrolnych). Dzieląc przypadki według histologii guza, wykazano związek skracania telomerów z ryzykiem wystąpienia raka drobnokomórkowego, podczas gdy zależność ta nie była tak wyraźna u pacjentów z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego czy gruczolakorakiem [57]. Tym samym proces skracania telomerów uznano nie za skutek, ale raczej za przyczynę wtórnego wzrostu niestabilności genomu (być może na skutek starzenia się komórek), a w efekcie wzrostu ryzyka zachorowania na raka płuc. Podobne badania prowadzone na niedrobnokomórkowym raku płuca pokazały również, że zjawisko skracania telomerów jest znacząco powiązane ze słabą odpowiedzią na leczenie pacjentów z tym rodzajem nowotworu. Co więcej, wyniki tej pracy sugerują związek pomiędzy utratą kilku genów naprawczych DNA i aktywnością telomerazy, co może być znaczące w patogenezie niedrobnokomórkowego raka płuca [58]. Pozostałe badania także potwierdzają powyższe wnioski, sugerując, że długość telomerów może odgrywać istotną rolę w patogenezie nowotworów płuca. Hosgood i wsp. przeprowadzili pomiar długości telomerów w populacji chińskiej na 120 pacjentach z nowotworem płuca (w komórkach nabłonkowych płuca i oskrzeli uzyskanych z płwociny), porównując je ze 110 osobami zdrowymi. Wyniki badań wykonanych metodą qPCR pokazały, że istnieje istotny statystycznie (OR = 1,58; 95% CI = 0,79–3,18) wzrost ryzyka wystąpienia raka płuca u osób z krótszymi telomerami. Jednakże badania te wykazały również znaczący statystycznie wzrost ryzyka zachorowania na nowotwór płuca w przypadku obecności

ści polimorfizmu rs10244817 genu *POT1* [59]. Kawai i wsp. przebadali 35 zmian atypowej hiperplazji gruczołowej oraz 40 przypadków raka oskrzelikowo-pęcherzykowego przez pomiar techniką Southern blot, pokazując skracanie telomerów we wczesnych fazach kancerogenezy [60]. Podobne wyniki otrzymali Wu i wsp. Przebadali oni długość telomerów w leukocytach krwi obwodowej 54 pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem płuca. Pomiaru dokonano za pomocą analizy Southern blot, obserwując krótsze telomery u pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną (*ratio* pacjenci = 1,1; *ratio* grupy kontrolnej = 1,4; różnica = 0,3; 95% CI = 0,1 do 0,5; $p < 0,001$) [61]. Wydaje się więc, że cecha ta może być dobrym czynnikiem prognostycznym w analizie ryzyka zachorowania na raka płuca.

Metody pomiaru długości telomerów Southern blot

Istnieje kilka metod, które pozwalają na pomiar długości telomerów (tab. I). Historycznie pierwszą metodą zastosowaną do zmierzenia długości telomerów był Southern blot [62]. Metoda ta polega na trawieniu genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi w pierwszym etapie, najczęściej za pomocą *HinfI/RsaI* [63], które tną nietelomerowe DNA na wiele małych fragmentów. W rezultacie końcowe fragmenty restrykcyjne (*terminal restriction fragments*, TRF) pozostają nienaruszone. Fragmenty DNA są poddane elektroforezie w 1% żelu agarozowym [64], przeniesione na nylonową membranę (transfer), a następnie poddane hybrydyzacji z telomero-specyficznymi sondami w celu detekcji [65]. Powoduje to powstanie telomero-specyficznego wzoru, którego pomiaru dokonuje się poprzez porównanie z markerem o znanej wielkości w analizie densytometrycznej. Metoda ta jest łatwa do wykonania (nie jest wymagany żaden specjalistyczny sprzęt), aczkolwiek wymaga czasu oraz doświadczenia w analizie wyników. Minusem jest zdecydowanie niska precyzja i czułość metody oraz błąd wyniku spowodowany tym, że w miejscach cięcia enzymami restrykcyjnymi mogą znajdować się polimorfizmy zmieniające ich sekwencję. Poza tym stosowanie metody Southern blot wymaga obecności dużej ilości oraz dobrej jakości DNA w próbce, co nie zmienia faktu, że metoda ta jest nadal metodą referencyjną, używaną w procesie walidacji nowo wprowadzanych metod. Znane są jej modyfikacje, jak np. dot blot, która nie jest kosztowna i nie wymaga dużej ilości DNA. Jej zaletą jest łatwość wykonywania analizy, ale pozostaje obciążona podobnymi do Southern blot wadami [62–66].

Q-FISH

Ilościowa hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (*quantitative fluorescent in situ hybridization*, Q-FISH) jest oparta na zastosowaniu fluorescencyjnie (Cy3 lub pochodne fluoresceiny — FITC) znakowanych sond PNA [*peptide*

Tabela I. Porównanie metod oceny długości telomerów według [62] i [66], zmodyfikowano

Metoda	Zalety	Wady
Southern blot	Możliwość pomiaru dystrybucji telomerów Współczynnik zmienności < 2% Pomiar wyrażony w wartościach absolutnych (kb)	Pracochłonna Wymaga dużej ilości DNA w dobrej jakości Obecność subtelerowych fragmentów DNA Kosztowna
Q-FISH	Sondy PNA są bardziej stabilne niż duplekisy DNA\DNA Wyższa wydajność hybrydyzacji	Wyższe tło fluorescencji Czasochłonna Pracochłonna Wymaga specjalistycznego sprzętu Wymaga komórek metafazowych
Flow FISH	Możliwy pomiar średniej długości telomerów w każdej komórce Długość telomerów może być oszacowana w subpopulacjach komórek W przeciwieństwie do Q-FISH nie wymaga komórek hodowanych Szybsza do przeprowadzenia i analizy od Q-FISH	Przetwarzanie bardziej złożonych próbek Wymaga wysokich umiejętności Pracochłonna Kosztowna Pomiar wyrażony w wartościach względnych
STELA	Duża wydajność Nie wymaga specjalistycznego sprzętu	Pracochłonna Czasochłonna Wymagane dobrej jakości DNA
qPCR	Niski koszt Wysoka wydajność Wymagana mała ilość DNA (50 ng na próbkę) Bardziej dokładna metoda — sekwencja subtelerowa nie jest amplifikowana Nie wymaga dobrej jakości DNA	Tylko średnia długość telomerów jest mierzona Współczynnik zmienności > 2% Brak dobrych standardów powoduje trudności z pomiarem absolutnej długości telomerów Wymaga specjalistycznego sprzętu
MMQ-PCR	Wysoka wydajność Niższy koszt w porównaniu z qPCR Zmienność pomiaru zredukowana w porównaniu z qPCR	Wymaga obszernej optymalizacji

nucleid acid (CCCTAA)₃, hybrydujących do zdenaturowanego jednoniciowego telomerowego DNA, a następnie zastosowaniu odpowiednich algorytmów mających na celu ocenę ilościową poziomu fluorescencji [62, 67, 68]. Przewagą metody Q-FISH jest zdolność do pomiaru długości pojedynczych telomerów na pojedynczych chromosomach. Z pozostałych zalet powinny być odnotowane: możliwość ustalenia wewnątrzchromosomowej dystrybucji długości telomerów, identyfikacja nawet najkrótszych telomerów w danym kariotypie z wysoką rozdzielczością oraz ich lokalizacja w chromosomie, a także dokładne określenie średniej długości telomerów na wszystkich chromosomach [67, 68]. Wadą lub niedociągnięciem techniki Q-FISH jest z pewnością niemożność zbadania komórek starzejących się (brak komórek proliferujących, które są głównym przedmiotem analizy), niemożność dokonania pomiaru także subtelerowej sekwencji oraz niska wydajność [62], jakkolwiek metoda ta jest nadal szeroko stosowana ze względu na małą ilość komórek wymaganą do jej przeprowadzenia, a dzięki temu materiałem mogą być zarówno dobrze zachowane tkanki, jak również skrawki bloczków parafinowych.

Flow-fish

Ta metoda, wynaleziona przez Rufera, łącząc metodę FISH z cytometrią przepływową, zapewnia wysoką wydaj-

ność pomiaru średniej długości telomerów tysięcy komórek w populacji. W porównaniu z pomiarem długości telomerów przeprowadzonym metodą Southern blot, flow-FISH pozwala na pomiar fluorescencji telomerów w limfocytach i granulocytach w tym samym czasie oraz w tej samej próbce/próbkach. Co więcej, metoda ta pozwala identyfikować specyficzne subpopulacje komórek poprzez użycie różnych sond wzorcowych [62, 69]. Flow-FISH wymaga dużej liczby komórek [70], ale również pozwala przeanalizować próbki krwi, a więc w przeciwieństwie do Q-FISH nie wymaga komórek hodowanych, co skraca czas wykonania analizy. W związku z zastosowaniem fluorochromów, podobnie jak w Q-FISH, istnieje ryzyko ich fotowysyblania, a co za tym idzie może to powodować odchylenia w wynikach pomiędzy próbkami [62,68]. Niemniej jednak jest to dobra metoda o istotnym znaczeniu dla diagnostyki.

STELA

Metoda STELA została opracowana w celu zastosowania jej do wykrywania zakończeń indywidualnych chromosomów, a w szczególności do krótkich telomerów, które są w stanie wywołać starzenie replikacyjne. W odróżnieniu od Q-FISH metoda ta charakteryzuje się dużą wydajnością i nie wykrywa subtelerowych sekwencji. Jej atutem, w odróżnieniu od Flow-FISH, jest to, że nie wymaga specjalistycz-

nego sprzętu, co znacznie obniża koszty jej użycia. Metoda STELA jest techniką bardzo dokładną, opartą na reakcji PCR, natomiast jest wymagająca pod względem czasu- oraz pracochłonności. Stanowi przez to wyzwanie techniczne oraz ma swoje ograniczenia pod względem zastosowania tylko do chromosomów, których sekwencje subtelomerowe są znane, co wynika z faktu konieczności zaprojektowania specyficznych starterów. Koniecznym warunkiem do spełnienia jest dobrej jakości DNA, a telomery dłuższe niż 20 kbp nie mogą podlegać analizie, co preferencyjnie pozwala analizować telomery krótkie i może być powodem zafałszowania wyników [62]. Mimo wszystko STELA może znaleźć istotne zastosowanie w ocenie krótkich telomerów, jak również tych dłuższych, a przez niskie wymagania dotyczące sprzętu może stać się metodą używaną powszechnie w celach diagnostycznych.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Pierwszy protokół do pomiaru długości telomerów metodą Real-time PCR został opracowany przez Cawthona w 2002 r. Cawthon użył starterów dla telomerów zbudowanych z powtórzeń wzorca sześciu zasad zawierających cztery kolejne pary zasad, następnie dwie niedopasowane zasady oraz unikalną sekwencję 5' [71, 72]. Względna kwantyfikacja jest obliczana poprzez podzielenie kopii telomerowego DNA (T) przez poziom ekspresji genu referencyjnego, *albuminy* lub *B-globiny* (S), które są genami jednokopijnymi. Uzyskiwany wynik (tzw. T/S ratio) przedstawia ilość powtórzeń telomerowych w jednej komórce [62,73]. Zaletą metody qPCR jest wymaganie małej ilości DNA (50 ng w próbce) oraz to, że może być łatwo przeprowadzona z wysoką wydajnością, co jest istotne dla badań diagnostycznych o szerokim zakresie [62, 66, 73]. Pewnym problemem z metodą qPCR jest użycie barwnika SYBRgreen, który może prowadzić do wykrywania niespecyficznych produktów. Problem ten został jednak rozwiązany poprzez zastosowanie techniki analizy krzywej topnienia (*Tm calling*), pozwalającej na analizę temperatury topnienia produktów, a przez to rozróżnienie produktu oczekiwanego od niespecyficznego. Pewną niedogodnością metody qPCR jest również trudność pomiaru absolutnej długości telomerów spowodowana brakiem dobrych standardów [66, 73]. W porównaniu z metodą Southern blot, qPCR mierzy średnią długość telomerów w komórce, przez co nie pozwala na badanie pojedynczych chromosomów ani nie daje informacji o dystrybucji powtórzeń. Natomiast istotną przewagą metody qPCR nad metodą Southern blot jest brak amplifikacji sekwencji subtelomerowej, przez co metoda ta jest bardziej wiarygodna [62]. Co więcej, wysoka czułość oraz szybkość tej metody przemawiają za tym, iż znajduje ona, wraz ze swymi modyfikacjami zastosowanie w diagnostyce i może się stać w niedługim czasie podstawową metodą diagnostyczną chorób o podłożu genetycznym oraz wirusowym.

Ilościowa reakcja PCR multipleks z zastosowaniem jednego barwnika (monochrome multiplex quantitative PCR; MMq-PCR)

Kilka lat po opracowaniu protokołu dla qPCR do pomiaru absolutnej długości telomerów zmodyfikowano ją poprzez dostosowanie jej do wersji multipleks, przez co telomerowe DNA oraz gen jednokopijny mogą być poddane amplifikacji podczas tej samej reakcji [62, 74]. Zastosowanie MMq-PCR zredukowało różnice w pomiarze długości telomerów spowodowane błędami pipetowania w porównaniu ze zwykłym qPCR, gdzie zarówno telomery, jak i gen jednokopijny były amplifikowane w dwóch reakcjach. W MMq-PCR zauważono wzrost wydajności w czasie analizy źródłowego DNA w porównaniu z qPCR. Zaletą tej metody są także niższe koszty, biorąc pod uwagę fakt zużycia połowy odczynników [74, 75], jednakże stosowanie tej metody w szerokim zakresie wymaga bardziej obszernej i skomplikowanej optymalizacji. Dlatego wydaje się, że ze względów diagnostycznych zastosowanie metody qPCR może być bardziej rozpowszechnione ze względu na łatwiejszą optymalizację.

Dyskusja i wnioski

Niepodważalnym faktem jest konieczność poszukiwania nowych, specyficznych markerów o wysokiej wydajności detekcji umożliwiających poprawę jakości diagnostyki nowotworów. Niestety, na dzień dzisiejszy nie istnieją doskonałe markery nowotworowe, natomiast wraz z rozwojem nauki i diagnostyki znajdują się nowe markery, bliskie tym wymaganiom. Najważniejszym kryterium wydaje się być niska inwazyjność badania, a także łatwa i szybka analiza przy dużej wydajności i czułości metody. Metoda powinna także pozwalać na wykrywanie nowotworu we wczesnych etapach rozwoju choroby, a zarazem być wiarygodna pod względem uzyskanego wyniku i właściwie zwalidowana. W tej sytuacji dobrym miernikiem wydaje się być test pozwalający na identyfikację długości telomerów jako czynnika prognostycznego w rozwoju *adenocarcinoma*. W wielu badaniach dowiedziono, że podwyższona aktywność telomerazy koreluje ze zmianami nowotworowymi [2, 76, 77], co w efekcie skutkuje nabywaniem przez komórki nowotworowe nieśmiertelności. Nie jest więc zaskoczeniem, że regulacja aktywności tego enzymu i efektów jego działania (odbudowa telomerów) w korelacji z ryzykiem zachorowania na nowotwory jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Część badaczy przedstawia wyniki mówiące o ewidentnym skracaniu telomerów w komórkach nowotworowych, podczas gdy inni wskazują na odwrotną tendencję, a jeszcze inni nie stwierdzają istotnej różnicy pomiędzy grupą kontrolną i badaną. Oznacza to, że długość telomerów jest najprawdopodobniej uzależniona od rodzaju i zaawansowania nowotworu. Wydaje się, że dalsza optymalizacja i wprowadzanie modyfikacji przytoczonych metod oraz pomiaru aktywności enzymu może przyczynić się do zwiększenia ich czułości oraz zwiększyć

wykrywalność chorób nowotworowych już we wczesnych stadiach ich rozwoju. Oczywiście jest, że różne nowotwory mogą powodować zmiany ogólnoustrojowe o różnym natężeniu. Metody te mogą więc nie być uniwersalne. Należy też pamiętać o pewnej puli komórek macierzystych, które również wykazują aktywność telomerazy i zostaną wliczone do puli średniej długości telomerów — oczywiście zależnie od stosowanej metody. Opierając się jednak na danych z literatury, wydaje się, że telomery (i telomeraza) mogą spełniać najbardziej restrykcyjne normy nakładane na markery nowotworowe. Z drugiej jednak strony należy mieć świadomość, że każdy przypadek nowotworu, nawet w rejonie tej samej tkanki, może znacząco różnić się od pozostałych. Nie ulega jednak wątpliwości, że nawet jeśli nie zmiany długości samych telomerów to przynajmniej uzupełnienie tych badań o identyfikację podstawowych zmian molekularnych, które odpowiadają za ich modulację, może prowadzić do odkrycia nowych biomarkerów pomocnych w diagnostyce nowotworów.

Dr n. biol. Błażej Rubiś

*Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
e-mail: blazejr@ump.edu.pl*

Otrzymano: 6 lutego 2012 r.

Przyjęto do druku: 22 maja 2012 r.

Piśmiennictwo

- Shtessel L, Ahmed S. Telomere dysfunction in human bone marrow failure syndromes. *Nucleus* 2011; 2: 24–29.
- Chen CH, Chen RJ. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc* 2011; 110: 275–289.
- Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH i wsp. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch* 2010; 459: 259–268.
- Watson JM, Riha K. Telomeres, aging, and plants: from weeds to Methuselah — a mini-review. *Gerontology* 2011; 57: 129–136.
- Gancarciková M, Zemanová Z, Brezinová J i wsp. The role of telomeres and telomerase complex in haematological neoplasia: the length of telomeres as a marker of carcinogenesis and prognosis of disease. *Prague Med Rep* 2010; 111: 91–105.
- Chan S, Blackburn EH. *Telomeres and telomerase*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359: 109–121.
- De Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 2009; 326: 948.
- Bibby MC. An introduction to telomeres and telomerase. *Mol Biotechnol* 2003; 24: 295–301.
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet* 2000; 34: 331–358.
- Hug N, Lingner J. Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 2006; 115: 413–425.
- Greider CW. Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 1999; 97: 419–422.
- Hayflick L. The illusion of cell immortality. *Br J Cancer* 2000; 83: 841–846.
- Blagosklonny MV. Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle* 2006; 5: 2087–2102.
- Bibby MC. An introduction to telomeres and telomerase. *Mol Biotechnol* 2003; 24: 295–301.
- Blackburn EH. The end of line. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 847–850.
- Nicholls C, Li H, Wang JQ i wsp. Molecular regulation of telomerase activity in aging. *Protein Cell* 2011; 2: 726–738.
- Cai Y, Ai Y, Zhao Q i wsp. Cloning and characterization of telomerase reverse transcriptase gene in *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res* 2011; 12.
- Dong CK, Masutomi K, Hahn WC. Telomerase: regulation, function and transformation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 54: 85–93.
- Alawi F, Lin P. Dyskerin is required for tumor cell growth through mechanisms that are independent of its role in telomerase and only partially related to its function in precursor rRNA processing. *Mol Carcinog* 2011; 50: 334–345.
- Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)* 2010; 13: 1563–1583.
- Choi KH, Farrell AS, Lakamp AS. Characterization of the DNA binding specificity of Shelterin complexes. *Ouellette MM Nucleic Acids Res* 2011; 18.
- Titia de Lange, Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19: 2100–2110.
- Kaminker PG, Kim SH, Desprez PY i wsp. A novel form of the telomere-associated protein TIN2 localizes to the nuclear matrix. *Cell Cycle* 2009; 8: 931–939.
- Liu JP, Chen SM, Cong YS i wsp. Regulation of telomerase activity by apparently opposing elements. *Ageing Res Rev* 2010; 9: 245–256.
- Fernandez P, Frank S, Wang L i wsp. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 2003; 17: 1115–1129.
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of k immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921–928.
- Aggarwal BB. Nuclear factor-κB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004; 6: 203–208.
- Bu DX, Johansson ME, Ren J i wsp. Nuclear factor (κ)B-mediated transactivation of telomerase prevents intimal smooth muscle cell from replicative senescence during vascular repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2604–2610.
- Xu D, Dwyer J, Li H i wsp. Ets2 maintains hTERT gene expression and breast cancer cell proliferation by interacting with c-Myc. *J Biol Chem* 2008; 283: 23567–23580.
- Chebel A, Rouault JP, Urbanowicz I i wsp. Transcriptional activation of hTERT, the human telomerase reverse transcriptase, by nuclear factor of activated T cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 35725–35734.
- Yiu GK, Tokar A. NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2006; 281: 12210–12217.
- Suhapeetiporn K, Grealley JM, Walpita D i wsp. MEN1 tumor-suppressor protein localizes to telomeres during meiosis. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 81–85.
- Hashimoto M, Kyo S, Hua X i wsp. Role of menin in the regulation of telomerase activity in normal and cancer cells. *Int J Oncol* 2008; 33: 333–340.
- Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 407–425.
- Toh WH, Kyo S, Sabapathy K. Relief of p53-mediated telomerase suppression by p73. *J Biol Chem* 2005; 280: 17329–17338.
- DeSantis C, Siegel R, Bandi P i wsp. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 409–418.
- De Vivo I, Prescott J, Wong JY i wsp. A prospective study of relative telomere length and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1152–1156.
- Svenson U, Nordfjäll K, Stegmayr B i wsp. Breast cancer survival is associated with telomere length in peripheral blood cells. *Cancer Res* 2008; 68: 3618–3623.
- Gramatges MM, Tellì ML, Balise R i wsp. Longer relative telomere length in blood from women with sporadic and familial breast cancer compared with healthy controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 605–613.
- Radpour R, Barekati Z, Haghghi MM i wsp. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. *Mod Pathol* 2010; 23: 763–772.
- Martinez-Delgado B, Yanowsky K, Inglada-Perez L i wsp. Genetic anticipation is associated with telomere shortening in hereditary breast cancer. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002182.
- Davoli T, Denchi EL, de Lange T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell* 2010; 141: 81–93.
- Looi LM, Cheah PL, Ng MH i wsp. Comparison of telomere length and telomerase activation between breast fibroadenoma and infiltrating ductal carcinoma in Malaysian women. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11: 713–716.
- Arbeev KG, Hunt SC, Kimura M i wsp. Leukocyte telomere length, breast cancer risk in the offspring: the relations with father's age at birth. *Mech Ageing Dev* 2011; 132: 149–153.
- Shen J, Terry MB, Gurvich I i wsp. Short telomere length and breast cancer risk: a study in sister sets. *Cancer Res* 2007; 67: 5538–5544.
- Zheng YL, Ambrosone C, Byrne C i wsp. Telomere length in blood cells and breast cancer risk: investigations in two case-control studies. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 769–775.
- Pooley KA, Sandhu MS, Tyrer J i wsp. Telomere length in prospective and retrospective cancer case-control studies. *Cancer Res* 2010; 70: 3170–3176.

48. Raynaud CM, Hernandez J, Llorca FP i wsp. DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *Am J Clin Oncol* 2010; 33: 341–345.
49. Pooley KA, Tyrer J, Shah M i wsp. No association between TERT-CLPTM1L single nucleotide polymorphism rs401681 and mean telomere length or cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 1862–1865.
50. Varadi V, Brendle A, Brandt A i wsp. Polymorphisms in telomere-associated genes, breast cancer susceptibility and prognosis. *Eur J Cancer* 2009; 45: 3008–3016.
51. Shen J, Gammon MD, Wu HC i wsp. Multiple genetic variants in telomere pathway genes and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 219–228.
52. Zheng YL, Loffredo CA, Shields PG i wsp. Chromosome 9 arm-specific telomere length and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1380–1386.
53. Rashid-Kolvear F, Pintilie M, Done SJ. Telomere length on chromosome 17q shortens more than global telomere length in the development of breast cancer. *Neoplasia* 2007; 9: 265–270.
54. O'Connor SJ. Review of the incidence, prevalence, mortality and causative factors for lung cancer in Europe. *Eur J Cancer* 2011; 47 Suppl 3: 346–347.
55. Shen M, Cawthon R, Rothman N i wsp. A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of lung cancer. *Lung Cancer* 2011; 73: 133–137.
56. Ma H, Zhou Z, Wei S i wsp. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6: 20466.
57. Jang JS, Choi YY, Lee WK i wsp. Telomere length and the risk of lung cancer. *Cancer Sci* 2008; 99: 1385–1389.
58. Frías C, García-Aranda C, De Juan C i wsp. Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 60: 416–425.
59. Hosgood HD 3rd, Cawthon R, He X i wsp. Genetic variation in telomere maintenance genes, telomere length, and lung cancer susceptibility. *Lung Cancer* 2009; 66: 157–161.
60. Kawai T, Hiroi S, Nakanishi K i wsp. Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 254–262.
61. Wu X, Amos CI, Zhu Y i wsp. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1211–1218.
62. Jodczyk S. Establishment and validation of a telomere length assay. University of Otago, Christchurch, New Zealand.
63. Kimura M, Aviv A. Measurement of telomere DNA content by dot blot analysis. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: e84.
64. Aviv A, Hunt SC, Lin J i wsp. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: e134.
65. Law H, Lau Y. Validation and development of quantitative flow cytometry-based fluorescence in situ hybridization for intercenter comparison of telomere length measurement. *Cytometry* 2001; 43: 150–153.
66. Kimura M, Stone RC, Hunt SC i wsp. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat Protoc* 2010; 5: 1596–1607.
67. Derradji H, Bekaert S, Van Oostveldt P i wsp. Comparison of different protocols for telomere length estimation by combination of quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) and flow cytometry in human cancer cell lines. *Anticancer Res* 2005; 25: 1039–1050.
68. Slijepcevic P. Telomere length measurement by Q-FISH. *Methods Cell Sci* 2001; 23: 17–22.
69. Baerlocher GM, Mak J, Tien T i wsp. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. *Cytometry* 2002; 47: 89–99.
70. Lauzon W, Sanchez Dardon J, Cameron DW i wsp. Flow cytometric measurement of telomere length. *Cytometry* 2000; 42: 159–164.
71. O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* 2011; 13: 3.
72. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e47.
73. O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online*. 2011; 13: 3.
74. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 21.
75. Kim S, Sandler DP, Carswell G i wsp. Reliability and short-term intra-individual variability of telomere length measurement using monochrome multiplexing quantitative PCR. *PLoS One* 2011; 6: 25774.
76. Matsuo T, Shimose S, Kubo T i wsp. Telomeres and telomerase in sarcomas. *Anticancer Res* 2009; 29: 3833–3836.
77. Keller G, Brassat U, Braig M i wsp. Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. *Hematol Oncol* 2009; 27: 123–129.