

## **Telomeraasin rooli syövän kantasoluissa**

Milla Lehto

Luonnontieteiden kandidaatin tutkielma

Turun yliopisto

Biolääketieteen koulutusohjelma

Lääketieteellinen tiedekunta

Biolääketieteen laitos

30.5.2024

Kandidaatintutkielma

**Oppiaine:** Biolääketiede

**Tekijä:** Milla Lehto

**Otsikko:** Telomeraasin rooli syövän kantasoluissa

**Ohjaaja:** Elisa Närvä, Yliopisto-opettaja, Kantasolutieteen Dosentti

**Sivumäärä:** 37 sivua

**Päivämäärä:** 30.5.2024

Telomeerit suojaavat kromosomien päitä lopetusjaksoina, jotka lyhenevät jokaisessa solunjakautumisessa. Kun telomeerit ovat lyhentyneet kriittisesti, solu ei voi enää jakautua. Telomeraasi on ribonukleoproteiinientsyymi, jonka avulla kromosomien telomeerien lyhentyminen voidaan kuitenkin estää. Telomeraasi koostuu telomeraasin käänteiskopioijaentsyymistä (TERT), joka syntetisoi RNA-templaattista DNA:ta, sekä RNA-alayksiköstä (TERC), joka sisältää templaatin telomeeritoiston lisäystä varten.

Useimmissa somaattisissa soluissa telomeraasi ei ole aktiivinen, mutta se voi aktivoitua mutaation seurauksena. Tällöin solu muuttuu kuolemattomaksi. Telomeraasi mahdollistaa kantasolujen, syöpäsolujen ja syövän kantasolujen rajoittamattoman jakautumisen lisäämällä kromosomin päihin toistuvia telomeerisekvenssejä. Tällöin kromosomien telomeerit pysyvät suunnilleen vakiomittaisina. Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että telomeraasin aktivoituminen ja TERT-lähetti-RNA:n esiintyminen solussa on merkki solujen kuolemattomuudesta ja syövän kehittymisestä. Telomeraasi on aktiivinen 85–90 prosentissa syöpäkasvaimista, kun taas 10–15 prosentissa syöpäkasvaimista telomeereja pidennetään erilaisilla rekombinaatioon perustuvilla tavoilla.

Syövän kantasolut kykenevät uudistumaan, erilaistumaan ja muodostamaan etäpesäkkeitä. Niitä sisältäviä populaatioita on kuvattu lähes kaikissa syöpätyypeissä. Syövän uusiutumisen uskotaankin osittain johtuvan syövän kantasoluista, jotka ovat välttyneet hoidoilta. Lisäksi syövän kantasolujen osuus kaikista syöpäsoluista näyttää ennakoivan syövän aggressiivisuutta ja uusiutumispotentiaalia. Näin ollen onkin tärkeää kehittää hoitomuotoja syövän kantasoluja vastaan.

Telomeraasin estäminen ja siten telomeerien pidentämisen estäminen voisi auttaa rajoittamaan syöpäsolujen ja syövän kantasolujen jakautumista. Tämä onkin tärkeä terapeuttilinen kohde syövän hoidossa. Telomeraasiin kohdistetuilla rokotteilla ja lääkkeillä, kuten telomeraasin vastavaikuttajilla, voidaan estää telomeraasin toimintaa syöpäsoluissa ja syövän kantasoluissa. Esimerkiksi imetelstat on kilpaileva telomeraasin vastavaikuttaja, joka kilpailee sitoutumisesta telomeraasin RNA-komponentin (TERC) templaattialueelle, jolloin se estää telomeraasin toimintaa ja siten johtaa telomeerien lyhenemiseen. Tutkimuksissa onkin osoitettu, että imetelstatin yhdistäminen sädehoitoon ja solunsalpaajaan lisää terapeutista tehokkuutta.

Syövän kantasoluihin kohdistuvilla hoidoilla saattaisi olla ratkaiseva merkitys tulevaisuudessa, sillä niiden avulla voidaan mahdollisesti ehkäistä syövän uusiutumista ja etäpesäkkeiden muodostumista. Syövän kantasoluihin kohdistuvat hoidot olisivat myös tärkeitä syövän täydellisen remission saavuttamisen kannalta.

**Avainsanat:** telomeraasi, telomeerit, syövän kantasolut, telomeraasin vastavaikuttajat

## Lyhenneluettelo

5-FdU	5-fluoro-2'-deoksiuridiinitrifosfaatti
6-tio-dG	6-tio-2'-deoksiguanosiini
Akt	Proteiinikinaasi B
ALT	Vaihtoehtoinen telomeerien pidentämismekanismi
BMP	Luun morfogeneettinen proteiini
CAB-laatikko	Cajalin kappalelaatikko
CTE	Telomeraasin käänteiskopioijaentsyymin C-terminaalinen jatke
DNA	Deoksiribonukleinihappo
EGFR	Epidermaalisen kasvutekijän reseptori
E-laatikko	Tehostajalaatikko
EpCAM	Epiteelisolujen kiinnittymismolekyyl
ERK	Solunulkoisen signaalin säätelämä kinaasi
GnRH	Gonadotropiineja vapauttava hormoni
HLA	Ihmisen leukosyyttiantigeeni
IFN $\gamma$	Interferoni $\gamma$
iPS-solu	Indusoitu pluripotentti kantasolu
Jak	Janus-kinaasi
MAPK	Mitogeeni-aktivoitu proteiinikinaasi
MEK	MAPK/ERK-kinaasi
MICAL3	Mikrotubulukseen liittyvä mono-oksigenaasi 3, kalponiinin ja LIM-alueen sisältävä
mTOR	Rapamysiinin mekaaninen kohde
Myc	Myelosytomatoosin onkogeeni
Nanog	Nanog-homeolaatikkoproteiini
NF- $\kappa$ B	Tumatekijä kappan B
NFX-1	X-laatikkaa sitova proteiini 1
NHP2	Ei-histoniproteiini 2
NOP10	Nukleolaarinen proteiini 10
OCT3/4	Oktameeria sitova transkriptiotekijä 3/4
PI3K	Fosfoinositidi-3-kinaasi
POT1	Telomeerien suojausproteiini 1
pRB	Retinoblastoomaproteiini

RAP1	Rotan sarkoomaviruksen (RAS) onkogeenin proteiiniin liittyvä proteiini 1
RNA	Ribonukleiinihappo
SMAD	TGF- $\beta$ -perheen reseptorien signaalinmuuntaja
STAT	Transkription signaalinmuuntaja ja aktivaattori
TAZ	Transkription koaktivaattori, jolla on PDZ (hermoliitoksenjälkeinen tiheysproteiini, <i>Drosophila</i> levyn suuri kasvaimen kasvunrajoittaja, tiiviin liitoksen proteiini 1) -sidontamotiivi
TEN	Telomeraasin käänteiskopioijaentsyymien N-terminaalinen alue
TERC	Telomeraasin RNA-alayksikkö
TERT	Telomeraasin käänteiskopioijaentsyymi
TGF- $\beta$	Kasvainkasvutekijä $\beta$
Th1	Tyypin 1 auttaja-T-solu
TIN2	TRF1-vuorovaikutteinen tumatekijä 2
TNF- $\alpha$	Tuumorinekroositekijä $\alpha$
TPP1	Tripeptidyylipeptidaasi 1
TRF1	Telomeeritoistoja sitova tekijä 1
TRF2	Telomeeritoistoja sitova tekijä 2
VEGF-A	Verisuonten endoteelikasvutekijä A
VEGFR-2	Verisuonten endoteelikasvutekijän reseptori 2
VE-kadheriini	Verisuonten endoteelin kadheriini
Wnt	Siivettömyyteen liittyvä yhdistymiskohta
YAP	Kyllä-tyrosiiniproteiinikinaasiin liittyvä proteiini

## **Sisällysluettelo**

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Telomeerit ja telomeraasi</b>	<b>7</b>
2.1	Telomeerit	7
2.2	Telomeraasi	8
<b>3</b>	<b>Kantasolut ja syövän kantasolut</b>	<b>11</b>
3.1	Kantasolut	11
3.2	Syövän kantasolut	12
<b>4</b>	<b>Telomeerien ja telomeraasin merkitys syövässä</b>	<b>16</b>
4.1	Telomeerien merkitys syövässä	16
4.2	Telomeraasin merkitys syövässä	16
<b>5</b>	<b>Telomeraasiin kohdistuvat lääkkeet ja rokotteet</b>	<b>18</b>
5.1	Yleistä telomeraasiin kohdennetuista lääkkeistä ja rokotteista	18
5.2	Imetelstat	19
5.3	BIBR1532	21
5.4	GV1001-rokote	22
5.5	INVAC-1-rokote	23
<b>6</b>	<b>Yhteenveto ja johtopäätökset</b>	<b>25</b>
	<b>Lähteet</b>	<b>28</b>

# 1 Johdanto

Syövälle on ominaista solujen hallitsematon jakautuminen ja immuunijärjestelmän poikkeava tunnistaminen. Perinteisiä hoitoja, kuten leikkausta, kemoterapiaa ja sädehoitoa, on käytetty yhdessä uudempien hoitojen, kuten immunoterapian kanssa. Tämä on pidentänyt syöpäpotilaiden elossaoloaika, mutta osalla syöpä on kuitenkin uusiutunut. (Yin ym., 2021)

Syövän kantasolut saattavat usein olla syynä syövän uusiutumiseen, etäpesäkkeiden muodostumiseen tai hoitoresistenssiin (Eun ym., 2017; Marian ym., 2010; Shay & Wright, 2010). Syövän uusiutuminen monesti johtuu syövän kantasoluista, jotka ovat jääneet eloon syöpähoidoista huolimatta (Marian ym., 2010). Koska ne ovat myös resistenttejä monille syöpähoidoille (Eun ym., 2017), olisi tärkeää kehittää lääkkeitä, jotka tehoavat myös syövän kantasoluihin.

Syövän kantasolut pystyvät jakautumaan rajattomasti, sillä telomeraasientsyymi on niissä aktiivinen kuten tavallisissakin syöpäsoluissa (Kusoglu ym., 2020). Telomeraasin onkin osoitettu olevan aktiivinen noin 85–90 %:ssa syövistä (De Vitis ym., 2018).

Koska syövän kantasolut ovat ongelmana monissa syövissä, niitä vastaan olisi tärkeää kehittää lääkkeitä. Telomeraasin estäminen saattaisi rajoittaa syöpäsolujen ja syövän kantasolujen jakautumista ja siten syövän etenemistä. Telomeraasi voisi siten olla hyvä lääkekehityksen kohde. Telomeraasia kohtaan on kehitetty monia lääkkeitä ja rokotteita, jotka esimerkiksi estävät telomeraasin entsyymäistä aktiivisuutta, telomeraasin kiinnittymistä telomeeriin tai käynnistävät soluja tuhoavan vasteen telomeraasia kohtaan. Useilla telomeraasiin kohdistuvilla lääkkeillä ja rokotteilla on jo saatu lupaavia tuloksia.

Tämän kirjallisuuskatsauksen tavoitteena on tarkastella telomeraasin ja syövän yhteyttä sekä telomeraasin merkitystä syövän kantasoluissa. Koska syövän kantasolut tekevät syövän hoidosta hankalampaa ja huonontavat ennustetta syövästä parantumiseen, on tärkeää kehittää niihin tehoavia hoitoja. Tässä kirjallisuuskatsauksessa esitellään muutamia lääkkeitä ja rokotteita, jotka kohdistuvat telomeraasiin ja siten syövän kantasoluihin.

## 2 Telomeerit ja telomeraasi

### 2.1 Telomeerit

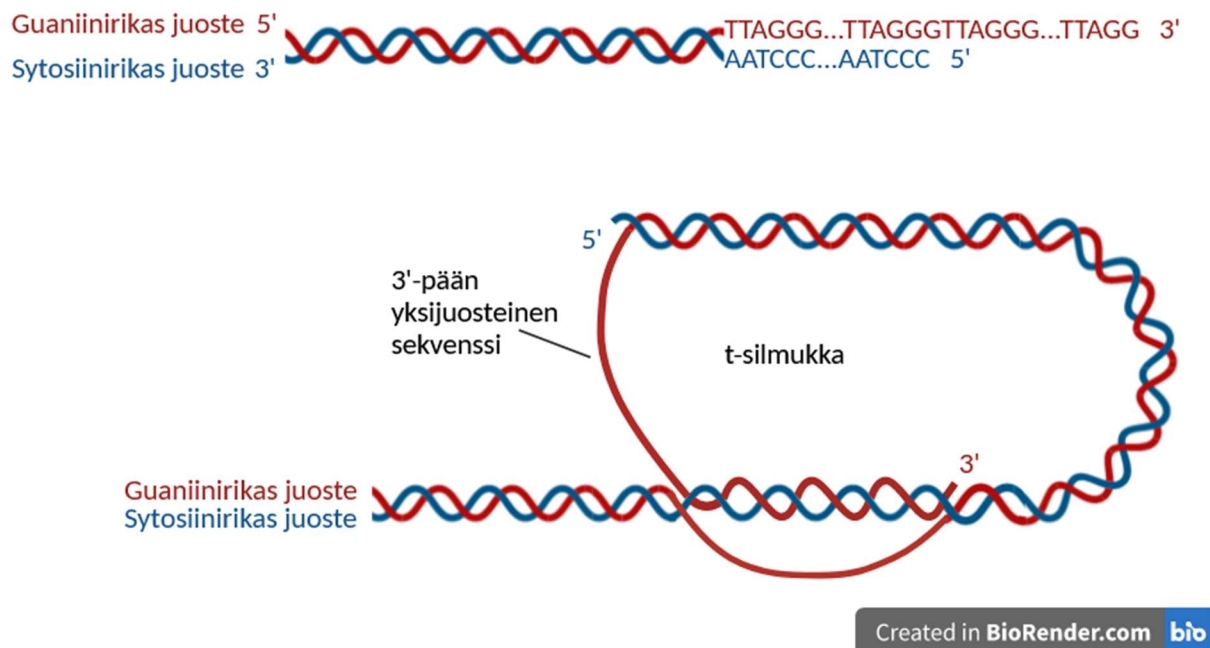
Telomeerit ovat kromosomien molemmissa päissä olevia rakenteita, jotka nisäkkäillä koostuvat toistuvista 5'-TTAGGG-3'-sekvensseistä (guaniinirikas juoste) ja komplementaarisen juosteen sekvensseistä 5'-CCCTAA-3' (sytosiinirikas juoste) sekä niihin liittyvistä proteiineista (Kuva 1.) (Cimino-Reale ym., 2001; Koeneman ym., 1998; Y. Wang ym., 2019). Kuusi proteiinia (telomeeritoistoja sitova tekijä 1 (TRF1), telomeeritoistoja sitova tekijä 2 (TRF2), rotan sarkoomaviruksen (RAS) onkogeenin proteiiniin liittyvä proteiini 1 (Rap1), TRF1-vuorovaikutteinen tumatekijä 2 (TIN2), tripeptidyylipeptidaasi 1 (TPP1) ja telomeerien suojausproteiini 1 (POT1)) muodostavat kompleksin, jota kutsutaan shelteriiniksi (Negrini ym., 2020). Tämä shelteriinikompleksi suojaa telomeerien päitä estämällä vapaisiin deoksiribonukleiinihapon (DNA) päihin kohdistuvia korjausvasteita (Roake & Artandi, 2020).

Ihmisen soluissa telomeerisekvenssien toistoja voi olla jopa 500–3000 kappaletta (Makarov ym., 1997), joten pituudeltaan niitä voi olla 3–18 kiloemäsparia (Cimino-Reale ym., 2001). Guaniinirikas juoste on noin 125–275 nukleotidia pidempi kuin sytosiinirikas juoste (Cimino-Reale ym., 2001; Makarov ym., 1997; Wright ym., 1997), minkä takia 3'-päässä on pitkä yksijuosteinen sekvenssi (Blackburn & Collins, 2011), joka muodostaa t-silmukan (Kuva 1.). T-silmukka suojaa kromosomien päitä yhdistymiseltä (de Lange, 2004).

Telomeerit suojaavat ja vakauttavat kromosomien päitä sekä estävät solua tunnistamasta niitä DNA:n kaksoiskierteen katkoksiksi (Meeker ym., 2002). Ne lyhenevät jokaisessa solunjakautumisessa (Meeker ym., 2002), mutta ne voivat lyhentyä myös telomeereja sitovien proteiinien häviämisen (Smogorzewska ym., 2000) tai oksidatiivisen stressin (von Zglinicki ym., 2000) seurauksena. Telomeerien lyhentymisen seurauksena solut menevät häiriötilaan (engl. *crisis*), jossa telomeerit muodostavat kromosomeja, joilla on kaksi sentromeeria, ja lopulta solut menevät apoptoosiin (T. T. Lin ym., 2010). Liian lyhyet telomeerit aiheuttavat kromosomien epävakautta, mikäli DNA-vaurioiden korjausmekanismit eivät toimi. Tämä voi johtaa syöpään kromosomien yhdistymisen, hajoamisen tai uudelleenjärjestymisen seurauksena. (Meeker ym., 2002)

Telomeerit voivat pidentyä rekombinaation tai telomeraasientsyymin avulla, joista jälkimmäistä monet syöpäkasvaimet hyödyntävät (Greider & Blackburn, 1985). Vain noin 10–15 % syöivistä käyttää telomeerien pidentämiseen muuta tapaa kuin telomeraasia (Recagni ym., 2020). Muita tapoja ovat

vaihtoehtoinen telomeerien pidentämismekanismi (ALT) (Cesare & Reddel, 2010) tai homologinen rekombinaatio (Pickett & Reddel, 2015).



**Kuva 1. Telomeerien rakenne.** Telomeerit koostuvat toistuvista 5'-TTAGGG-3'- (guaniinirikas juoste) ja 5'-CCCTAA-3'-sekvensseistä (sytosiinirikas juoste) (Cimino-Reale ym., 2001; Koeneman ym., 1998). Guaniinirikas juoste on noin 125–275 nukleotidia pidempi kuin sytosiinirikas juoste (Cimino-Reale ym., 2001; Makarov ym., 1997; Wright ym., 1997), mistä johtuen telomeerin 3'-päässä on pitkä yksijuosteinen sekvenssi (Blackburn & Collins, 2011). Se muodostaa kromosomin päähän t-silmukan, joka suojaa kromosomin päätä yhdistymiseltä (de Lange, 2004).

## 2.2 Telomeraasi

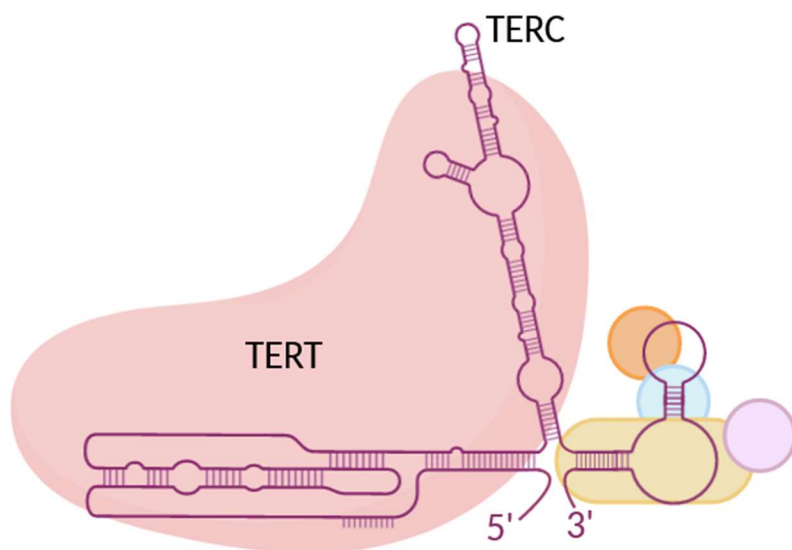
Telomeraasi on ribonukleoproteiini, joka pidentää telomeerien 3'-päitä (Greider & Blackburn, 1987). Sen toiminta on ribonukleinihaposta (RNA) riippuvaista (Koeneman ym., 1998). Telomeraasientsyymi koostuu telomeraasin käänteiskopioijaentsyymistä (TERT), joka toimii DNA-polymeraasina eli syntetisoi RNA-templaattista DNA:ta, ja 451 nukleotidin pituisesta RNA-alayksiköstä (TERC) (Kuva 2.) (Choi ym., 2022; Meeker & Argani, 2004; Roake ym., 2019). TERC sisältää alukkeen TERT:lle telomeeritoiston lisäystä varten (Meeker & Argani, 2004), sillä niin kuin muutkin DNA-polymeraasit, myös TERT tarvitsee alukkeen DNA:n syntetisoimiseen, sillä se pystyy syntetisoimaan DNA:ta vain 5'-3'-suunnassa (Watson, 1972). TERT:iin kuuluu N-terminaalinen alue (TEN) ja C-terminaalinen jatke (CTE). TERC sisältää H/ACA-alueen, johon kuuluu yksijuosteinen sarana eli H-laatikko (engl. *H-box*), konservoitunut neljän nukleotidin sekvenssi eli Cajalin kappalelaatikko (CAB-laatikko, engl. *CAB-box*) ja



ACA-sekvenssi. Lisäksi telomeraasiin on liittynyt proteiineja, joita kutsutaan dyskeriinikompleksiksi. Se sisältää dyskeriinin, nukleolaarisen proteiini 10:n (NOP10) ja ei-histoniproteiini 2:n (NHP2). Dyskeriinikompleksi sitoutuu TERC:in H/ACA-alueeseen. (Roake & Artandi, 2020)

Tavallisesti kantasoluissa ja sukusoluissa telomeraasi on aktiivinen (Herbert ym., 2001), joten ne pystyvät jakautumaan rajattomasti. Telomeraasi on tärkeä solujen elinkelpoisuuden kannalta alkionkehityksen aikana, mutta telomeraasi kytketään pois päältä kypsissä soluissa (Mitchell ym., 2010). Näin ollen telomeraasiaktiivisuus puuttuu useimmilta ihmisen somaattisilta soluilta, minkä takia niiden telomeerinen DNA lyhenee 50–100 emäsparin verran jokaisessa solunjakautumisessa, sillä DNA:ta ei pystytä kahdentamaan aivan juosteiden päihin asti (Koeneman ym., 1998). Kun kromosomit ovat merkittävästi lyhentyneet, solujen kasvu pysähtyy ja ne siirtyvät senesenssiin, joka on solujen vanhenemiseen liittyvä tila, jossa solujen kasvu ja jakautuminen pysähtyy (Herbert ym., 2001). Lisäksi telomeerien lyhenemisen seurauksena solu tulee elinkyvyttömäksi ja menee häiriötilaan (Counter ym., 1992). Häiriötilan seurauksena elossa olevien solujen määrä vähenee (Herbert ym., 2001). Sen sijaan mutaatio voi aktivoida telomeraasin, jolloin solu voi selvitä häiriötilasta ja muuttua kuolemattomaksi (Counter ym., 1992; Herbert ym., 2001). Näin ollen useimmilla syöpäsoluilla telomeraasi on aktiivinen, joten niiden telomeerit pysyvät suunnilleen vakiomittaisina (Koeneman ym., 1998).

Telomeraasilla on muitakin tehtäviä kuin telomeerien pidentäminen (Romaniuk ym., 2019). Telomeraasi osallistuu esimerkiksi solunjakautumiseen, kromatiinirakenteen uudelleenmuokkaukseen, angiogeneesin stimulointiin, Wnt (siivettömyyteen liittyvä yhdistymiskohta) / $\beta$ -kateniini -signalointiin, NF- $\kappa$ B (tumatekijä kappa B) -signalointiin, stressin poistamiseen ja resistenssiin ionisoivaa säteilyä vastaan (Bruedigam ym., 2024; Romaniuk ym., 2019). Telomeraasi auttaa myös välttämään apoptoosia ja edistää kasvaimen invaasiota (Teixeira ym., 2020). Lisäksi telomeraasi aiheuttaa epidermaalisen kasvutekijän reseptorin (EGFR) ilmentymistä syövän kantasoluissa, jotta ne säilyttävät kantasolujen ominaisuudet (Beck ym., 2011).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

**Kuva 2. Telomeraasin rakenne.** Telomeraasientsyymi koostuu telomeraasin käänteiskopioijaentsymistä (TERT), RNA-alayksiköstä (TERC) ja siihen liittyneistä proteiineista eli dyskeriinikompleksista (Meeker & Argani, 2004; Roake & Artandi, 2020). TERT syntetisoi telomeeritoistojaksoja TERC:n sisältämän RNA-alukkeen avulla (Meeker & Argani, 2004).

## 3 Kantasolut ja syövän kantasolut

### 3.1 Kantasolut

Kantasolut ovat erilaistumattomia soluja, jotka voivat yleensä jakautua rajattomasti ja erilaistua (Karam ym., 2020; Pirsadeghi ym., 2024). Kantasoluja esiintyy ihmisellä alkiovaiheesta kuolemaan asti (Pirsadeghi ym., 2024). Kantasoluja säilyy kudoksen kantasoluina muun muassa luuytimessä, luussa, ihossa, maksassa ja aivoissa (Vats ym., 2005). Kantasolut voidaan luokitella alkuperänsä mukaan alkion kantasoluiksi, aikuisen kantasoluiksi ja indusoiduiksi pluripotenteiksi kantasoluiksi (iPS-solut) (Smith ym., 2015).

Kantasolut voidaan lisäksi luokitella erilaistumispotentiaalinsa mukaan toti-, pluri-, multi- ja unipotentteihin kantasoluihin (Pirsadeghi ym., 2024). Totipotentit kantasolut voivat erilaistua alkion solutyypeiksi ja alkion ulkopuolisiksi kudoksiksi sekä muodostaa elinkelpoisen organismin (Lu & Zhang, 2015). Alkion kantasolut ja iPS-solut ovat pluripotentteja eli ne voivat erilaistua kolmen alkiokerroksen eli ektodermin, endodermin tai mesodermin soluiksi (Yamanaka, 2020). Multipotentit kantasolut voivat erilaistua vain tietyn kudostyyppin soluiksi (Pirsadeghi ym., 2024). Esimerkiksi mesenkymaaliset kantasolut voivat erilaistua vain sidekudoksen, luun, ruston sekä verenkierron ja imusuoniston soluiksi. Aikuisen kantasolut ovat yleensä multi- tai unipotentteja. Unipotentteilla kantasoluilla on suppein erilaistumismahdollisuus. Ne voivat erilaistua vain yhdeksi solutyypiksi, kuten lihaksen kantasolut vain lihassoluiksi. (Ilic & Polak, 2011)

Kantasoluilla on kyky uudistua, jakautua rajattomasti ja erilaistua eri solutyypeiksi (Karam ym., 2020; Pirsadeghi ym., 2024). Kantasolut ovat lisäksi emosolunsa klooneja. Kantasolujen ominaisuudet voivat kuitenkin vaihdella eri kantasolujen välillä. Esimerkiksi alkion kantasoluilla on parempi kyky uudistua ja erilaistua eri solutyypeiksi, kun taas aikuisen kantasoluilla on heikompi kyky uudistua ja ne voivat erilaistua vain tietyn kudoksen soluiksi. Syntymän jälkeen näitä kudosspesifisiä kantasoluja on erilaistuneissa elimissä, ja ne osallistuvat elinten vaurioiden korjaamiseen. (Kolios & Moodley, 2012)

Kantasolut voivat jakautua joko symmetrisesti tai epäsymmetrisesti (Yan ym., 2023). Symmetrisessä jakautumisessa syntyy joko kaksi identtistä kantasolua tai erilaistunutta tytärsolua. Epäsymmetrisessä jakautumisessa syntyy yksi kantasolu ja yksi muu kuin kantasolu, kuten erilaistunut solu, tai kaksi erilaista erilaistunutta tytärsolua. Esimerkiksi alkion organogeneesin aikana kudosten kantasolut jakautuvat siten, että syntyy kantasolu ja erilaistunut solu. Nämä kantasolujen erilaistuneet solut ilmentävät runsaasti telomeraasia toisin kuin jakautumisessa syntyneet tytärkantasolut, jotka muuttuvat nopeasti rauhallisiksi eivätkä jakaudu tai jakautuvat todella hitaasti. (Majumdar & Liu, 2020; Shay & Wright, 2010; Yan ym., 2023)

## 3.2 Syövän kantasolut

Kasvaimet koostuvat soluista, joilla on erilaisia tehtäviä kasvaimen kasvussa (J. Ye ym., 2014). Pieni osa näistä soluista on syövän kantasoluja, jotka ovat tärkeitä juuri kasvaimen kasvun etenemisessä (J. Ye ym., 2014). Syövän kantasoluiksi kutsutaan syöpäsolujen joukkoa, jolla on kyky käynnistää kasvaimen muodostuminen (Plaks ym., 2015). Ne sijaitsevat yleensä kantasolulokeroissa (engl. *niche*) eli anatomisesti erillisissä alueissa kasvaimen mikroympäristössä (Plaks ym., 2015), mutta ne voivat myös muodostaa kolmiulotteisia irrallisia pallomaisia rakenteita (Bahmad ym., 2018; Shishido ym., 2018).

Kasvaimen mikroympäristöön kuuluvat kantasolulokeron lisäksi soluväliaine, mesenkymaaliset kantasolut, endoteelisolut, kudosspesifiset fibroblastit, immuunisolut, sytokiinit ja kasvutekijät (Korkaya ym., 2011; J. Ye ym., 2014). Kantasolulokerot ylläpitävät syövän kantasolujen uudistumis- ja jakautumispotentiaalia, vaikuttavat erilaistumiseen (Oskarsson ym., 2014), säilyttävät muovautuvuuden (Shibue & Weinberg, 2017), suojaavat immuunijärjestelmältä (J. Ye ym., 2014) ja edistävät syöpäsolujen vaeltamista ja leviämistä etäpesäkkein (Shibue & Weinberg, 2017).

Yhä useammassa tutkimuksessa on havaittu, että syövän kantasolut saattaisivat elää matalahappisessa mikroympäristössä, mikä saattaa mahdollistaa niiden säilymisen lähes kaikissa kudoksissa (J. Ye ym., 2014). Mikroympäristö toimii kiinnitysalustana syövän kantasoluille ja solujen välisessä viestinnässä (J. Ye ym., 2014). Mikroympäristön signaalien avulla syövän kantasolujen tytärsolut voivat erilaistua, mutta myös muut solut kuin syövän kantasolut voivat muuttua syövän kantasoluiksi (Vaiopoulos ym., 2012; J. Ye ym., 2014). Tietyissä syöpätyypeissä esimerkiksi sytokiinit tai stressitilat, kuten happaman pH:n aiheuttama stressitila, voivat aiheuttaa muiden solujen muuttumisen syövän kantasoluiksi (Oskarsson ym., 2014). Lisäksi syövän kantasolut voivat syntyä siten, että aikuisen kantasolut muuntuvat syövän kantasoluiksi tai erilaistuneet syöpäsolut uudelleenohjelmoidaan syövän kantasoluksi (Plaks ym., 2015).

Syövän kantasolut voivat jakautua joko symmetrisesti tai epäsymmetrisesti. Symmetrisessä jakautumisessa syntyy kaksi identtistä syövän kantasolua. Epäsymmetrisessä jakautumisessa syntyy siirtymäsolu (engl. *transit amplifying cell*), joka on välimuoto kantasolun ja erilaistuneen solun välillä, tai esisolu ja syövän kantasolu. Epäsymmetrinen jakautuminen mahdollistaa kasvaimen heterogeenisyyden ja samalla säilyttää syövän kantasolujen uusiutumisen. Eri tekijät voivat vaikuttaa siihen, kumpi jakautuminen tapahtuu. Esimerkiksi stimulaatio sytokiineilla voi aktivoida kalponiinin ja LIM-alueen sisältävän mikrotubulukseen liittyvän mono-oksigenaasi 3:n (MICAL3), jonka aktivaatio taas saa aikaan symmetrisen jakautumisen. (Majumdar & Liu, 2020; Tominaga ym., 2019)

Siirtymäsolun tai esisolun erilaistuneet muodot muodostavat suurimman osan syöpäkasvaimesta. Syövän kantasolut voivat pysyä pitkään lepotilassa jakautumatta, mutta esisolut ja massasyöpäsolut (engl. *bulk cancer cells*) jakautuvat ja kasvattavat syöpäkasvainta. Koska epäsymmetrinen jakautuminen tuottaa jakautuvaa solua vastaavan syövän kantasolun ja erilaisen tytärsolun, se ei ole kovin nopea kasvaimen kasvutapa. Nopean jakautumisen ajatellaan siten tapahtuvan symmetrisen jakautumisen kautta. Suurimman osan kasvaimesta muodostavat massasyöpäsolut jakautuvatkin ensisijaisesti symmetrisesti. Syöpäkasvaimen kehittyminen edellyttää solujen heterogeenisyyttä ja solujen lisääntymistä, joten sekä epäsymmetristä että symmetristä jakautumista täytyy tapahtua etenkin stressiolosuhteissa, kuten syöpähoitojen tai etäpesäkkeiden syntymisen aikana. Lisäksi muuntuneiden normaalien kantasolujen uskotaan pystyvän tuottamaan onkogeenisii siirtymäsoluja, jotka taas voivat ohjata kasvaimen muodostumista ja muodostaa heterogeenisen solupopulaation, mikä on tavallista syövässä. (Majumdar & Liu, 2020; Moore & Lyle, 2011; Reya ym., 2001)

Niin kuin normaaleilla kantasoluilla, myös syövän kantasoluilla telomeraasi on aktiivinen (Kusoglu ym., 2020). Kuitenkin lepotilassa olevilla syövän kantasoluilla telomeraasiaktiivisuus on alhainen. Ne ylläpitävät syövän kantasolubarastoa ja voivat muodostaa jakautuvia syöpäsoluja. (H. Wang ym., 2021)

Syövän kantasoluilla on kyky muovautua eli erilaistuneet syövän kantasolut voivat vaihtaa useiden välitilojen välillä ja ne voivat saada multipotenttien kantasolujen ominaisuudet ulkopuolelta tai sisäpuolelta tulevien merkkien vaikutuksesta ja erilaistuneisuuden taantumisen (engl. *dedifferentiation*) avulla. Erilaistumisen taantuminen voi johtua transkriptiotekijöistä, kasvutekijöistä, epigeneettisistä muutoksista tai syövän mikroympäristön fysikaalisista olosuhteista, kuten happamuudesta tai matalahappisuudesta. Tämä lisää kasvaimen heterogeenisuutta ja parantaa kasvaimen selviytymistä. (Majumdar & Liu, 2020)

Syövän kantasoluilla on voimakas uudistumis-, erilaistumis- ja kasvaimen muodostamiskyky (Ward & Dirks, 2007). Monissa syöpätyypeissä syövän kantasolut ovat ainoa solutyyppi, joilla on pitkäaikainen uudistumiskyky (Oskarsson ym., 2014). Uudistumiskykyä on voitu testata sarjasiirrekokeilla, joissa toistamiseen eristettyjä syövän kantasoluja siirretään uudelle vastaanottajalle, jossa solut muodostavat kasvaimen. Erilaistumiskyvyllä taas tarkoitetaan sitä, että syntyvät kasvaimet ovat alkuperäisen kaltaisia, sisältäen myös erilaistuneita heterogeenisiä soluja. Jo hyvin pieni syövän kantasolujen määrä voi muodostaa kasvaimia immuunipuutteisissa hiirissä, mikä osoittaa suurta kasvaimen käynnistämiskykyä. (Shay & Wright, 2010)

Syövän kantasolut pystyvät myös muodostamaan etäpesäkkeitä (Shay & Wright, 2010). Tämä on havaittu esimerkiksi tutkimuksessa, jossa rintasyöpäpotilaan verestä eristettiin kantasolumerkkiaineita ilmentäviä syöpäsoluja, jotka siirrettiin immuunipuutteisiin hiiriin. Nämä solut

muodostivat hiirissä luu-, maksa- ja keuhkosyöpäetäpesäkkeitä (Bacelli ym., 2013). Tutkimuksissa on lisäksi osoitettu, että etäpesäkkeitä muodostavat solut voivat saada kantasolujen ominaisuuksia esimerkiksi epiteeli-mesenkymaalisen siirtymisen kautta (X. Ye ym., 2015). On ehdotettu, että kasvaimen eteneminen, etäpesäkkeiden muodostuminen ja uusiutuminen hoidon jälkeen saattaisi johtua näistä uudistumiskykyisistä syövän kantasoluista (Shay & Wright, 2010).

Uskotaan, että syövän uusiutuminen johtuu syövän kantasolujen populaatioista, jotka ovat välttyneet hoidoilta (Marian ym., 2010). Resistenssi syöpähoidoille onkin kliinisesti tärkeä syövän kantasolujen ominaisuus (Eun ym., 2017; Kusoglu ym., 2020). Vaikka sädehoito ja solunsalpaajat tappavatkin suurimman osan syöpäsoluista, ne eivät yleensä tehoa syövän kantasoluihin (J. Ye ym., 2014). Lepotilassa olevien syövän kantasolujen resistenssi syöpälääkkeille tai sädehoidoille saattaa johtua siitä, että hoidot tehoavat vain aktiivisesti jakautuviin soluihin (Majumdar & Liu, 2020; Moore & Lyle, 2011). Lisäksi syövän kantasolut voivat selviytyä hoidoista erilaisilla resistenssimekanismeilla, kuten aktivoimalla anti-apoptoottisia reittejä, lisäämällä solukalvon kuljetusmolekyylien aktiivisuutta ja tehostamalla DNA:n korjauskykyä (Singh ym., 2003; J. Wang ym., 2008). Lisäksi syövän kantasolut voivat aiheuttaa kasvaimen heterogeenisiä solupopulaatioita, mikä lisää sen mahdollisuutta, että syöpäsoluja jää eloon vielä hoitojen jälkeen (Brooks ym., 2015).

Syövän kantasolut säilyttävät kantasolujen ominaisuutensa aktivoimalla uudestaan alkionkehityksessä toimivia signaalireittejä, kuten Wnt/ $\beta$ -kateniini, Notch, Hedgehog, reseptorityrosiinikinaasivälitteinen PI3K (fosfoinositidi-3-kinaasi) /Akt (proteiinikinaasi B) /mTOR (rapamysiinin mekaaninen kohde), sytokiinireseptorivälitteinen Jak (Janus-kinaasi) /STAT (transkription signaalinmuuntaja ja aktivaattori), TNF- $\alpha$  (tuumorinekroositekijä  $\alpha$ ), reseptorivälitteinen NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$  (kasvainkasvutekijä  $\beta$ ) /BMP (luun morfogeneettinen proteiini), reseptorivälitteinen SMAD (TGF- $\beta$ -perheen reseptorien signaalinmuuntaja) ja Hippo-YAP (Kyllä-tyrosiiniproteiinikinaasiin liittyvä proteiini) /TAZ (transkription koaktivaattori, jolla on PDZ (hermoliitoksenjälkeinen tiheysproteiini, *Drosophila* levyn suuri kasvaimen kasvunrajoittaja, tiiviin liitoksen proteiini 1) -sidontamotiivi) (Terali & Yilmazer, 2016). Esimerkiksi PI3K/Akt/mTOR-reitti säätelee solujen kasvua ja jakautumista (Dogan & Biray Avci, 2018). Lisäksi mTOR:n fosforylaatio edistää kasvaimen invaasiota ja etäpesäkkeiden muodostumista (C. Gao ym., 2020).

Näiden signaalireittien aktivoituminen ja viestintä lisäävät esimerkiksi solunpinnan proteiinien, kuten CD133:n, CD44:n ja epiteelisolujen kiinnittymismolekyylin (EpCAM) ilmentymistä (Shi ym., 2024; Terali & Yilmazer, 2016). Nämä toimivat siten myös syövän kantasolujen biomarkkereina (Mimeault & Batra, 2014). Lisäksi signaalireittien aktivoituminen ja viestintä lisäävät indusoituun pluripotenssiin liittyvien transkriptiotekijöiden, kuten myelosytomatoosin onkogeenin (Myc), oktameeria sitovan

transkriptiotekijä 3/4:n (OCT3/4) ja Nanog-homeolaatikkoproteiinin (Nanog), ilmentymistä (Shi ym., 2024; Terali & Yilmazer, 2016).

Syövän kantasoluja on löydetty lähes kaikista syöivistä (Kreso & Dick, 2014). Ensimmäisen kerran syövän kantasolut tunnistettiin akuutissa myelooisessa leukemiassa (Lapidot ym., 1994). Syövän kantasoluja on osoitettu olevan esimerkiksi rinta- (Al-Hajj ym., 2003), eturauhas- (X. Wang ym., 2009), keuhko- (Eramo ym., 2008), aivo- (Singh ym., 2004), paksusuoli- (Ricci-Vitiani ym., 2007), munasarja- (M.-Q. Gao ym., 2010), iho- (Malanchi ym., 2008) ja haimasyövässä (Li ym., 2007). Syövän kantasolujen osuus kasvaimesta voi olla 0,02 %–25 % riippuen kasvaintyyppistä (Ishizawa ym., 2010; Quintana ym., 2010; Visvader & Lindeman, 2012). Niiden osuus on yleensä suurempi erilaistumattomissa kasvaimissa (Toledo-Guzmán ym., 2018).

Syövän kantasolujen esiintyminen kasvaimessa ennakoi huonompaa kliinistä ennustetta (Eun ym., 2017). Lisäksi monissa tutkimuksissa on osoitettu, että niiden esiintyminen edistää kasvaimen invaasiota ja etäpesäkkeiden muodostumista (Charafe-Jauffret ym., 2009; Chen ym., 2014; Jiao ym., 2010).

## 4 Telomeerien ja telomeraasin merkitys syövässä

### 4.1 Telomeerien merkitys syövässä

On havaittu, että solut saavuttavat häiriötilan, kun telomeerien sekvenssien toistot ovat pituudeltaan enää keskimäärin 1,5 kiloemäsparia ja solussa on paljon kromosomeja, joilla on kaksi sentromeeria (Counter ym., 1992). Kuolemattomissa soluissa kuitenkin telomeerien pituus ja kaksisentromeeristen kromosomien määrä vakiintuvat häiriötilan jälkeen (Counter ym., 1992). Kaksisentromeeristen kromosomien on huomattu aiheuttavan genomien epävakauteen eli suurentunutta taipumusta mutaatioiden tapahtumiselle solunjakautumisen aikana (T. T. Lin ym., 2010).

Telomeerien asteittainen lyheneminen johtaa kromosomien tai niiden päiden yhdistymisiin, anafaasisiltoihin ja kromosomien hajoamiseen solusykliissä (Shay & Wright, 2010). Se voi johtaa myös genomiseen epävakauteen, joka onkin ominaista useimmille syöpäsoluille (Shay & Wright, 2010). Sekä telomeerien lyheneminen että sitä seuraava telomeerien yhdistyminen edistävät syövän syntymistä ja etenemistä (T. T. Lin ym., 2010). Monissa syövässä, kuten rinta-, eturauhas-, paksusuoli- ja peräsuolisyövässä, onkin huomattu telomeerien olevan lyhyempiä kuin normaalissa kudoksessa (Hastie ym., 1990; Meeker ym., 2002; Meeker & Argani, 2004).

Telomeerien pituutta säätelee kasvurajoiteproteiini p53 ja retinoblastoomaproteiini (pRB), jotka käynnistävät senesenssin tai apoptoosin, kun telomeerit ovat liian lyhyet (Meeker ym., 2002). Jos nämä tarkistuspisteet inaktivoituvat ja telomeerit lyhenevät kriittisesti, kromosomien päät voivat yhdistyä, jolloin syntyy kaksisentromeerisia tai rengasmaisia kromosomeja (Counter ym., 1992). Nämä taas usein katkeavat tai erkaantuvat virheellisesti mitoosissa (Counter ym., 1992). Telomeerien toimintahäiriöt voivat täten olla syynä kasvainten syntyyn, sillä ne lisäävät geneettistä epävakauteen (T. T. Lin ym., 2010).

### 4.2 Telomeraasin merkitys syövässä

Tutkimusten mukaan telomeraasiaktiivisuuden uudelleenaktivoituminen ennakoii kasvaimen pahanlaatuisuutta (Koeneman ym., 1998). Counterin ym. tutkimuksessa (Counter ym., 1992) osoitettiin, että kuolemattomissa solupopulaatioissa telomeraasi oli aktiivinen, toisin kuin verrokki-solupopulaatioissa. Siten kuolemattomissa soluissa telomeerien lyheneminen pysähtyy (Counter ym., 1992). Telomeraasiaktiivisuus ja TERT-lähetin-RNA:n esiintyminen onkin solujen kuolemattomuuden ja siten syövän tunnusmerkki (Momeni-Boroujeni ym., 2022). Telomeraasin



uudelleenaktivoituminen mahdollistaa syöpäsolujen rajoittamattoman jakautumisen, apoptoosin välttämisen ja kuolemattomuuden (Dogan & Biray Avci, 2018).

Telomeraasin yli-ilmentyminen syöpäsoluissa saattaa johtua mutaatioista promoottorialueella, kromosomaalisista uudelleenjärjestelyistä tai lisääntyneestä Myc-geenin ilmentymisestä (Teixeira ym., 2020). On osoitettu, että TERT-geenin promoottorialueelle syntyneet pistemutaatiot voivat lisätä TERT:n ilmentymistä (Hafezi & Perez Bercoff, 2020). TERT:n promoottorialue sisältää sitoutumiskohdan monille transkriptioaktivaattoreille, kuten Myc:lle ja  $\beta$ -kateniinille, ja transkriptiovaimentajille, kuten p53:lle ja X-laatikkoa sitovalle proteiini 1:lle (NFX-1) (Hafezi & Perez Bercoff, 2020). Esisyöpägeeni Myc on TERT-geenin ensisijainen transkriptiotekijä ja se säätelee geenin ilmentymistä sitomalla tehostajalaatikon (E-laatikko) DNA-sekvenssejä (Xu ym., 2008). Myc aiheuttaa siis telomeraasin ilmentymisen (J. Wang ym., 1998). Esimerkiksi fibroblasteissa ja epiteelisoluissa Myc:n ilmentyminen aiheuttaa TERT:n ilmentymisen ja lisää telomeraasiaktiivisuutta (J. Wang ym., 1998). Hoffmeyer ym. osoittivat tutkimuksessaan (Hoffmeyer ym., 2012), että  $\beta$ -kateniini säätelee TERT:n ilmentymistä kanta- ja syöpäsoluissa. Siten mutaatiot  $\beta$ -kateniinigeenissä voivat aiheuttaa lisääntynyttä TERT:n ilmentymistä syövässä (Hoffmeyer ym., 2012).  $\beta$ -kateniinireitin aktivoituminen TERT-promoottorimutaation vaikutuksesta voisi siten olla yksi telomeraasin uudelleenaktivoitumisen mekanismeista (Akincilar ym., 2016). Lisäksi esimerkiksi mTOR säätelee telomeraasin translaatiota ja sen jälkeistä telomeraasitasoa (Sundin ym., 2013).

Tärkein telomeraasiaktiivisuutta rajoittava tekijä on TERT:n transkriptiivinen säätely (Greider & Blackburn, 1985). Näin ollen telomeraasin esto voisi olla tehokas hoitomenetelmä syövän kantasoluja vastaan. Hoito kohdistuisi syövän kantasolujen lisäksi myös muihin syöpäsoluihin, sillä niissäkin telomeraasi on aktiivinen. (Shay & Wright, 2010)

## 5 Telomeraasiin kohdistuvat lääkkeet ja rokotteet

### 5.1 Yleistä telomeraasiin kohdennetuista lääkkeistä ja rokotteista

Telomeraasia kohtaan on kehitetty monia lääkkeitä (Taulukko 1.). Näitä ovat esimerkiksi oligonukleotidiestäjät, kuten imetelstat (Marian ym., 2010), pienimolekyyliset estäjät, kuten BIBR1532 (Zhang ym., 2023), telomeraasin kaperoniproteiineihin kohdistuvat lääkkeet, kuten alvespimycin (Hu ym., 2015), ja onkolyttiset virukset, kuten telomelysin (Z.-Z. Lin ym., 2023). Lisäksi on kehitetty nukleosidianalogeja, kuten 6-tio-2'-deoksiguanosiini (6-tio-dG) (Eglenen-Polat ym., 2024) ja 5-fluoro-2'-deoksiuridiinitrifosfaatti (5-FdU), jotka liittyvät telomeereihin ja aiheuttavat solukuoleman telomeraasia ilmentävissä soluissa (Zeng ym., 2018). On kehitetty myös G-kvadrupleksistabilisaattoreita, kuten BRACO-19 (Zhou ym., 2016), RHPS4 (Berardinelli ym., 2015), telomestatin (Hasegawa ym., 2016) ja TMPyP4 (Garnique ym., 2023). Ne estävät telomeraasin toimintaa sitoutumalla telomeereihin (Berardinelli ym., 2015). Lisäksi on kehitetty telomeraasiin kohdennettuja rokotteita. Niitä ovat esimerkiksi GV1001 (Moon ym., 2018), INVAC-1 (Thalmensi ym., 2015), p540 (Hunger ym., 2011), UV1 (Haakensen ym., 2024), GRNVAC1 (Khoury ym., 2010), Vx-001 (Pateras ym., 2021) ja GX301 (Filaci ym., 2021).

Useimmat kasvaimeen liittyvät antigeenit ilmentyvät vain tietyissä kasvaintyypeissä (Hunger ym., 2011). Kuitenkin TERT ilmentyy lähes kaikissa kasvaimissa (Hunger ym., 2011), joten sitä kohtaan voidaan kehittää lääkkeitä ja rokotteita, jotka tehoavat useimpiin syöpäkasvaimiin. Telomeraasi onkin tärkeä terapeuttinen kohde syövän hoidossa (Marian ym., 2010). Telomeraasilla on tärkeä rooli kasvaimen kasvussa ja kehityksessä, joten TERT:n vaimennus on usein haitallista syöpäsoluille (Negrini ym., 2020). Lisäksi telomeraasin aktivoituminen saattaa olla välttämätöntä kuolemattomien solujen syntymiselle, joten telomeraasi voisi olla hyvä syöpähoitojen ja syövän ennaltaehkäisyn kohde (Herbert ym., 2001). Tässä kirjallisuuskatsauksessa kerrotaan yksityiskohtaisemmin paljon tutkituista imetelstat- ja BIBR1532-lääkkeistä ja GV1001-rokotteesta sekä hieman vähemmän tutkitusta INVAC-1-rokotteesta, sillä nämä saattaisivat olla yksiä lupaavimmista lääkkeistä ja rokotteista telomeraasia kohtaan.

**Taulukko 1. Telomeraasiin kohdistuvat lääkkeet ja rokotteet.** Telomeraasiin kohdistetut rokotteet ja lääkkeet luokiteltuna toimintamekanisminsa perusteella.

Telomeraasiin kohdistetut lääkkeet	
Oligonukleotidiestäjät	Imetelstat
Pienimolekyyliset estäjät	BIBR1532

Nukleosidianalogit	6-tio-2'-deoksiguanosiini (6-tio-dG)
	5-fluoro-2'-deoksiuridiinitrifosfaatti (5-FdU)
G-kvadrupleksistabilisaattorit	BRACO-19
	RHPS4
	Telomestatin
	TMPyP4
Telomeraasin kaperoniproteiineihin kohdistuvat lääkkeet	Alvespimycin
Onkolyttiset virukset	Telomelysin
Telomeraasiin kohdistetut rokotteet	GV1001
	INVAC-1
	p540
	UV1
	GRNVAC1
	Vx-001
	GX301

## 5.2 Imetelstat

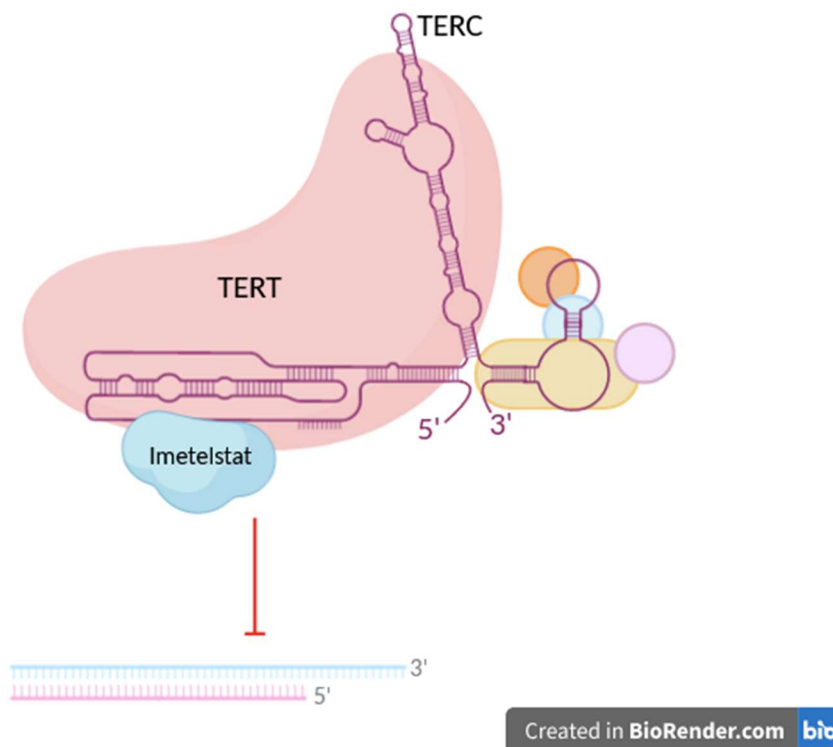
Imetelstat on kilpaileva telomeraasin vastavaikuttaja, joka estää telomeraasin toimintaa, mikä taas johtaa telomeerien asteittaiseen lyhenemiseen (Marian ym., 2010). Se on 13 nukleotidia sisältävä tiofosforamidaatti-oligonukleotidi, johon on liitetty lipidiketju (Asai ym., 2003). Se kilpailee sitoutumisesta TERC:n templaattialueelle, jonka kanssa se on komplementaarinen 13 nukleotidin pituiselle alueelle ja johon sillä on korkea affiniteetti (Kuva 3.) (Asai ym., 2003; Marian ym., 2010). Imetelstat pääsee erinomaisesti soluihin ja kudoksiin 5'-palmitoyylilipidiketjunsä ansiosta (Herbert ym., 2005). Vaiheen I kliinisissä tutkimuksissa sillä on huomattu olevan erittäin suotuisa farmakokineettinen profiili ja vähäiset sivuvaikutukset (Marian ym., 2010).

Marian ym. (Marian ym., 2010) huomasivat *in vitro* -tutkimuksissaan, että imetelstat aiheuttaa palautuvan telomeraasiaktiivisuuden eston primaarisissa glioblastooman kantasoluissa. Esto oli annosriippuvainen ja pitkäaikainen imetelstatannostus aiheutti telomeerien lyhenemistä, asteittaista kasvun hidastumista ja lopulta solukuolemaa. 4 µM:n imetelstatannos esti telomeraasiaktiivisuuden kokonaan. Telomeerit lyhenivät noin 3,5 kiloemäsparista alle 2,0 kiloemäspariin.

Telomeraasiaktiivisuuden esto poistui 12 päivän kuluessa, kun imetelstatin lisääminen soluviljelmään lopetettiin. Tutkimuksessa huomattiin myös, että imetelstatin yhdistäminen sädehoitoon ja temotsolomidi-solunsalpaajaan lisäsi terapeutista tehokkuutta *in vitro*. (Marian ym., 2010)

Lisäksi lääkkeen vastetta *in vivo* testattiin nude-hiirimalleissa ortotooppisiin ihmisen glioblastooman vieraslajisiirrekasvaimiin. Kliinisesti merkityksellisinä annoksina vatsaonteloon annosteltuna imetelstat pystyi läpäisemään veri-aivoesteen ja estämään telomeraasiaktiivisuutta ja vähentämään kasvaimen kasvunopeutta. (Marian ym., 2010)

Bruedigam ym. osoittivat tutkimuksessaan (Bruedigam ym., 2024), että imetelstat aiheutti myös ferroptoosia eli raudasta riippuvaista solukuolemaa *in vivo* akuutin myeloosien leukemiapotilaiden näytteistä peräisin olevissa vieraslajisiirrekasvaimissa. Lisäksi imetelstat on antanut lupaavia tuloksia kliinisissä tutkimuksissa. Se pidensi potilaiden elossaoloaikaa verrattuna verrokkiryhmään, kun imetelstatia annettiin 9,4 mg/kg kolmen viikon välein. (Kuykendall ym., 2022)



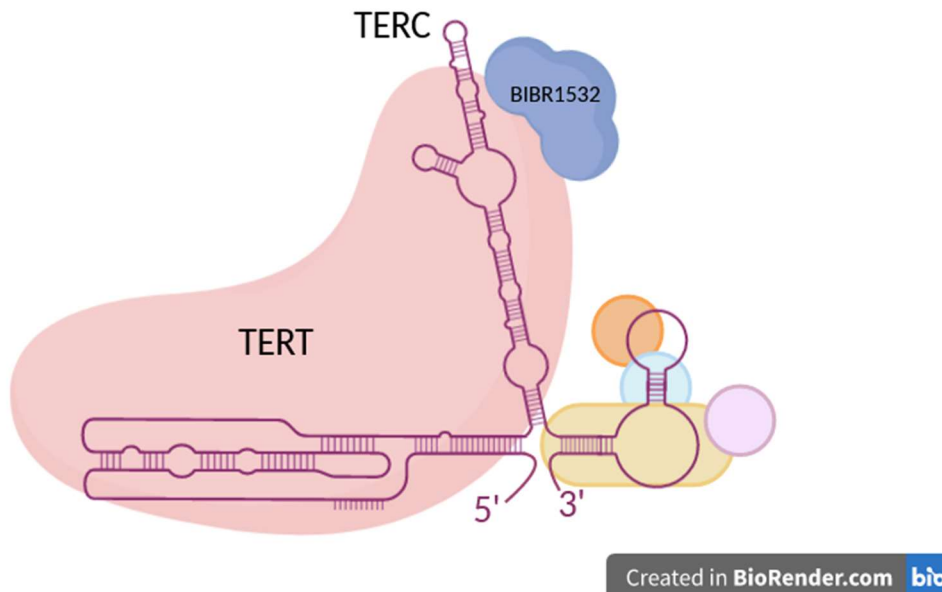
**Kuva 3. Imetelstatin toimintamekanismi.** Imetelstat on lyhytketjuinen oligonukleotidi ja telomeraasin kilpaileva vastavaikuttaja. Se estää telomeraasin toimintaa sitoutumalla TERC:n templaattialueelle. (Marian ym., 2010)

### 5.3 BIBR1532

BIBR1532 (2-[(E)-3-naftaleeni-2-yyli-but-2-enoyyliamino]-bentsoehappo) on ei-kilpaileva ja ei-nukleosidinen pienimolekyylinen telomeraasin estäjä, joka sitoutuu TERT:n aktiiviseen kohtaan ja estää telomeraasin entsyymaattista aktiivisuutta (Kuva 4.) (Bryan ym., 2015). BIBR1532:lla on syövän vastaisia vaikutuksia, jotka liittyvät sekä telomeerien pidentämisen estämiseen että muihin telomeraasin tehtävien estämiseen. Se estää telomeraasiaktiivisuutta esimerkiksi rajoittamalla telomeerien pidentämiseen käytettävissä olevien nukleotiditoistojen määrää. BIBR1532-lääkkeen on osoitettu myös vähentävän Myc:n ilmentymistä ja siten TERT-lähetti-RNA:n ilmentymistä. Lisäksi lääkkeen osoitettiin alentavan EGFR:n lähetti-RNA- ja proteiinitasoja. (Altamura ym., 2021)

Bryanin ym. tutkimuksessa (Bryan ym., 2015) BIBR1532 johti syöpäsolujen telomeerien asteittaiseen lyhenemiseen, solujen jakautumisen pysähtymiseen ja senesenssiin. Myös Altamuran ym. tutkimuksessa (Altamura ym., 2021) BIBR1532 pysäytti syöpäsolujen kasvun annosriippuvaisesti ja Zhangin ym. tutkimuksessa (Zhang ym., 2023) se esti syöpäsolujen eloonjäämistä annos- ja aikariippuvaisesti. Zhao ym. havaitsivat, että BIBR1532 esti myös syöpäsolujen vaeltamista ja invaasiota (Zhao ym., 2023).

Zhangin ym. tutkimuksen (Zhang ym., 2023) mukaan BIBR1532 esti solujen jakautumista ja edisti apoptoosia, mikä vahvistui, kun lääkepitoisuutta nostettiin. Lisäksi se esti TERT:n ja Myc:n ilmentymistä sekä PI3K-/Akt-/mTOR-fosforylaatiota, ja edisti ERK1/2:n (solunulkoisen signaalin säätelämä kinaasi 1/2) ja MAPK:n (mitogeneeni-aktivoitu proteiinkinaasi) fosforylaatiota. Tutkimuksessa myös osoitettiin, että BIBR1532 yhdistettynä doksorubisiiniin ja bortetsomibiin oli tehokkaampi vähentämään telomeraasiaktiivisuutta, TERT- ja Myc-ilmentymistä *in vitro*, kuin doksorubisiini tai bortetsomibi yksinään. (Zhang ym., 2023)



**Kuva 4. BBR1532:n toimintamekanismi.** BBR1532 (2-[(E)-3-naftaleeni-2-yyli-but-2-enoyyliamino]-bentsoehappo) on ei-kilpaileva pienimolekyylinen telomeraasin estäjä. Se estää telomeraasin entsyymaattista aktiivisuutta sitoutumalla TERT:n aktiiviseen kohtaan. (Bryan ym., 2015)

#### 5.4 GV1001-rokote

GV1001 on synteettinen peptidikappale, joka on kehitetty TERT:n katalyyttisestä alayksiköstä ja se sisältää 16 aminohappoa TERT:n aminohappokohdasta 611–626 (EARPALLTSRLRFIPK) (Hunger ym., 2011; Jo ym., 2024; Moon ym., 2018). GV1001 pystyy sitoutumaan molekyyliin, joita koodaavat ihmisen leukosyyttiantigeenin (HLA) luokan II kaikkien kolmen lokuksen useat alleelit (Hunger ym., 2011). Lisäksi GV1001 voidaan muuntaa soluja tappavien T-solujen epitopeiksi (Hunger ym., 2011). Rokotetta voidaan käyttää telomeraasia ilmentävien syöpien aktiivisena immunoterapiana. GV1001:n vaikutusmekanismiksi on ehdotettu gonadotropiineja vapauttavan hormonin (GnRH) ja 5 $\alpha$ -reduktaasin estoa. (Moon ym., 2018)

Lisäksi Kimin ym. tutkimuksen (Kim ym., 2022) mukaan GV1001 estää verisuonten endoteelin kadheriinin (VE-kadheriini) fosforylaatiota ja indusoi sen lokalisoitumista solu-solukontaktissa, mitkä estävät verisuonten endoteelikasvutekijä A:n (VEGF-A) stimuloimaa endoteelisolujen läpäisevyyttä. Siten GV1001 säätelee VEGF-A:n indusoimia endoteelisoluvasteita, kuten läpäisevyyttä, jakautumista, vaeltamista, invaasiota ja kapillaarimaisen rakenteen muodostumista *in vitro* ja verisuonten uudismuodostumista *ex vivo*. (Kim ym., 2022)

Moonin ym. tutkimuksessa (Moon ym., 2018) GV1001:n kuvattiin sitoutuvan GnRH-reseptoriin ja aiheuttavan apoptoosia eturauhaskudoksessa. GV1001-hoito vaikutti hyvin siedetyltä.

Haittavaikutusten määrässä ei ollut merkittäviä eroja hoitoryhmien ja verrokkiryhmien välillä. Lisäksi Moonin ym. tutkimuksessa GV1001-rokote pienensi eturauhassyövän kokoa. Se aiheutti apoptoosia eturauhaskudoksessa ja saattoi vähentää 5 $\alpha$ -reduktaasin lähetti-RNA-tasoa eturauhaskudoksessa. GV1001 annosteltiin 0,4 mg tai 0,56 mg joko kahden tai neljän viikon välein, riippuen hoitoryhmästä. (Moon ym., 2018)

Kimin ym. tutkimuksen (Kim ym., 2022) mukaan GV1001 estää verisuonten uudismuodostusta estämällä VEGF-A/VEGFR-2 (verisuonten endoteelikasvutekijän reseptori 2) alavirran puoleisia (engl. *downstream*) signalointireittejä, kuten MAPK/ERK-kinaasia (MEK), ERK:iä ja Akt:ta, uudelleenjakamalla VE-kadheriini solu-solukontakteihin ja säätelemällä solusykliin liittyviä proteiineja, kuten VEGFR-2:a. Lisäksi tutkimus osoitti GV1001:llä olevan jakautumista ja invaasiota estäviä vaikutuksia syöpäsoluihin (Kim ym., 2022). Jon ym. tutkimuksessa (Jo ym., 2024) GV1001-hoito gemsitabiini/kapesitabiini-hoidon kanssa paransi eloonjäämistä haimasyöpäpotilailla, joilla oli korkea seerumin eotaksiinipitoisuus.

## 5.5 INVAC-1-rokote

INVAC-1 on DNA-plasmidi, joka koodaa muunneltua täyspitkää TERT-proteiinia, joka ei ole katalyyttisesti aktiivinen. Se on lisäksi fuusioitu ihmisen ubikitiiniin. Rokotteen DNA-plasmidi koodaa yhdeksän emäsparin pituisen deleetion, joka sisältää kolme TERT:n katalyyttiselle kohdalle tärkeää aminohappoa eli valiinia ja kahta asparagiinihappoa. INVAC-1:n sisältämä plasmidi ilmentää kahta TERT-spesifistä proteiinia: TERT-fuusioproteiinia, joka sisältää ubikitiinisekvenssin ja TERT-proteiinia, josta puuttuu ubikitiini. (Thalmensi ym., 2015)

Thalmensin ym. tutkimuksessa (Thalmensi ym., 2015) rokote käynnisti laajan ja voimakkaan TERT-spesifisen soluja tappavan ja tyyppin 1 auttaja-T-soluvälitteisen (Th1) immuunivasteen annettuna ihonsisäisesti eri hiirikannoissa *in vivo*. Tässä tutkimuksessa rokote käynnisti myös CD4<sup>+</sup>- ja CD8<sup>+</sup>-T-soluvasteen, joka sai aikaan interferoni  $\gamma$ :n (IFN $\gamma$ ) ja TNF:n tuoton hiirimallissa. TERT-spesifiset rokotteen stimuloimat CD8<sup>+</sup>-T-solut erittivät grantsyymi B:tä ja pystyivät tappamaan kohdesoluja *in vivo*. (Thalmensi ym., 2015)

Myös Teixeira ym. osoittivat tutkimuksessaan (Teixeira ym., 2020), että INVAC-1 kykeni indusoimaan TERT-spesifisiä CD4<sup>+</sup>-Th1- ja CD8<sup>+</sup>-muisti-T-solujen immuunivasteita. Tässä tutkimuksessa INVAC-1-rokote käynnisti soluja tappavan CD8-T-soluvasteen 25 %:lla potilaista ja CD4-T-soluvasteen 63 %:lla potilaista (Teixeira ym., 2020).

Lisäksi Teixeira ym. tutkimuksen (Teixeira ym., 2020) mukaan INVAC-1-rokote oli hyvin siedetty, eikä havaittu annosta rajoittavaa myrkyllisyyttä, kun rokotetta testattiin kolmella annostasolla. Rokote oli turvallinen ja vahvasti immunogeeninen annettaessa ihonsisäisesti potilaille, joilla oli uusiutunut tai vaikeahoitoinen syöpä. Yli puolella potilaista eli 58 %:lla syöpätilanne tasaantui hoitojakson aikana tai sen jälkeen. Teixeira ym. osoittivat tutkimuksessaan, että INVAC-1 oli entsymaattisesti inaktiivinen ja immunogeenisesti turvallinen. Se ei myöskään aiheuttanut immuunivasteen heikentymistä. (Teixeira ym., 2020)



## 6 Yhteenveto ja johtopäätökset

Kuten aiemmin todettiin, telomeraasi on aktiivinen syövän kantasoluissa. Siten telomeraasi mahdollistaa syövän kantasolujen rajattoman jakautumisen ja tekee niistä kuolemattomia. Telomeraasi ylläpitää syövän kantasolujen telomeereja riittävän pituisina jakautumiselle ja estää soluja menemästä häiriötilaan.

Koska telomeraasi osallistuu myös esimerkiksi angiogeneesin stimulointiin, se auttaa syöpäkasvainta muodostamaan verisuonia, jotta kasvain voisi kasvaa isommaksi. Telomeraasi osallistuu myös moniin signalointireitteihin. Esimerkiksi Wnt/ $\beta$ -kateniinireittiin osallistuminen voi mahdollistaa syövän kantasoluille jakautumisen ja erilaistumisen. NF- $\kappa$ B-reittiin osallistuminen taas saattaa mahdollistaa syövän kantasolujen suojautumisen immuunijärjestelmältä. Lisäksi telomeraasi auttaa syövän kantasoluja suojautumaan ionisoivalta säteilyltä. Tämä voi edesauttaa syövän kantasolujen resistenssiä sädehoitoja vastaan.

Lisäksi telomeraasi auttaa välttämään apoptoosia, mikä edesauttaa vielä lisää syövän kantasolujen elossapysymistä. Telomeraasin invasiota edistävä vaikutus taas mahdollistaa syövän kantasolujen leviämisen terveeseen kudokseen ja siten pahentaa syöpätilannetta. Koska telomeraasi aiheuttaa myös EGFR:n ilmentymisen syövän kantasoluissa, se auttaa niitä säilyttämään kantasolujen ominaisuutensa.

Telomeraasin yli-ilmentyminen saattaa myös vähentää kromosomaalista vakautta syövän kantasoluissa. Syövän kantasoluilla onkin usein aneuploidinen kromosomisto, toisin kuin esimerkiksi normaaleilla kantasoluilla (Dogan & Biray Avci, 2018).

Telomeraasia kohtaan kehitetyt lääkkeet tai rokotteet voisivat auttaa parantamaan syöpäpotilaiden ennustetta. Niillä voitaisiin saada tapettua hoitoresistenssiä, etäpesäkkeitä ja syövän uusiutumista aiheuttavat syövän kantasolut. Lisäksi hoitoresistenssiä aiheuttaa syövän kantasolujen heterogeenisyys, sillä osaan soluista hoidot eivät välttämättä tehoa. Olisikin tärkeää kehittää syövän kantasoluihin toimivia lääkkeitä, sillä siten voitaisiin välttää syövän uusiutuminen, hoitoresistenssi ja etäpesäkkeiden muodostuminen. Esimerkiksi Fumagallin ym. tutkimus (Fumagalli ym., 2020) osoitti, että etäpesäkkeet saattavat surkastua ja hävitä, jos syövän kantasolut tapetaan niistä. Lisäksi tutkimuksissa on osoitettu, että TERT:n ilmentymisen estäminen käynnisti apoptoosia (Barczak ym., 2018), joten telomeraasin estäminen voisi tälläkin tavalla vähentää syövän kantasolujen määrää kasvaimessa.

Telomeraasin estäjiin saattaa kuitenkin liittyä normaalien kantasolujen uusiutumiskykyä koskeva ongelma. Koska syöpäsoluilla ja normaaleilla kantasoluilla on sama telomeerien pidentymismekanismi, telomeraasin estäjät lyhentävät myös normaalien kantasolujen telomeereja ja siten heikentävät normaalien kantasolujen uusiutumiskykyä. Tämä on huolenaihe erityisesti elimissä, joissa on paljon usein uusiutuvia kantasoluja. Toisaalta, koska syöpäsoluissa on lyhyemmät telomeerit kuin normaaleissa kantasoluissa, syöpäsolujen telomeerien lyhentyessä kriittisen lyhyiksi normaalien kantasolujen telomeerit ovat vielä riittävän pituisia. Telomeraasiaktiivisuus myös palautui esimerkiksi imetelstathoidon jälkeen normaalille tasolle, joten telomeerien haitallinen lyheneminen normaaleissa kantasoluissa voi olla palautuvaa. Kemoterapioihin verrattuna tämä palautuminen on merkittävä etu, sillä kemoterapiat aiheuttavat usein peruuttamatonta vahinkoa kaikille jakautuville soluille. Lisäksi telomeraasin aktiivisuudessa on eroa normaalien ja syövän kantasolujen välillä, mikä voisi mahdollistaa hoitojen kohdistamisen syövän kantasoluihin välttämättä vaikutusta normaaleissa kantasoluissa. (Marian ym., 2010; Shay & Wright, 2010)

Lisäksi yhtenä huolenaiheena voi olla se, jos telomeraasiin kohdistetut hoidot aiheuttavat haittoja normaaleille kantasoluille ja sukusoluille ja hoito täytyy keskeyttää, se voi heikentää hoidon tehoa, sillä telomeraasi palautuu taas aktiiviseksi. Tämän vuoksi yhdistelmähoito eri syöpähoidoilla voisi olla hyvä vaihtoehto. Myöskään ei tiedetä tarkalleen, voiko esimerkiksi ALT aktivoitua syövän kantasoluissa, jos telomeraasia estetään. Tämä aiheuttaisi taas lisää hoitoresistenssiä, sillä syövän kantasolut voisivat pidentää telomeereja ALT:n avulla, eikä telomeraasin esto siten enää tehoa. Lisäksi ongelmana saattaa olla se, jos telomeraasinestäjät eivät tehoa lepotilassa oleviin syövän kantasoluihin, sillä niissä telomeraasiaktiivisuus on matala. Tämän seurauksena syövän kantasoluja jää kuitenkin kasvaimeen.

Imetelstat, BIBR1532, GV1001 ja INVAC-1 vaikuttavat kaikki lupaavilta hoidoilta telomeraasia kohtaan ja siten mahdollisesti syövän kantasoluja vastaan. Vielä on kuitenkin vaikea sanoa, mikä näistä olisi toimivin. Viime aikoina immunoterapialla on ylipäättään saatu lupaavia tuloksia syövän hoidossa, joten rokotteet voisivat olla toimiva hoitomenetelmä. Lääkkeet ja rokotteet saattaisivat tehotta hyvin syövän kantasoluihin, mutta vielä on tutkimatta, voisiko niillä olla myös vaikutusta lepotilassa oleviin syövän kantasoluihin, vaikka niillä on matala telomeraasiaktiivisuus.

Telomeraasin merkityksen ymmärtäminen syövän kantasoluissa on tärkeää, jotta pystytään kehittämään uusia lääkkeitä ja hoitoja syövän kantasoluja vastaan. Syövän kantasolut ovat ongelma useissa syövässä, sillä ne ovat osallisena hoitoresistenssissä, etäpesäkkeiden muodostumisessa ja syövän uusiutumisessa, ja siten ennakoivat huonompaa ennustetta syövästä parantumiseen. Nykyiset syöpähoidot kohdistuvat lähinnä jakautuviin soluihin, joten ne eivät välttämättä tehoa kaikkiin syövän kantasoluihin. Siten niitä voi jäädä henkiin syöpähoidoista huolimatta. Näin ollen olisi tärkeää kehittää

uusia hoitoja, jotka tehoaisivat myös syövän kantasoluihin. Telomeraasiin kohdistuvien lääkkeiden yhdistäminen muihin syöpälääkkeisiin tai -hoitoihin voisi tulevaisuudessa mahdollistaa yhä useampien potilaiden selviämisen syövästä, sillä näiden yhdistämisellä on saatu jo hyviä tuloksia useissa tutkimuksissa.

## Lähteet

- Akincilar, S. C., Unal, B., & Tergaonkar, V. (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(8), 1659–1670.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3983–3988.
- Altamura, G., degli Uberti, B., Galiero, G., De Luca, G., Power, K., Licenziato, L., Maiolino, P., & Borzacchiello, G. (2021). The Small Molecule BIBR1532 Exerts Potential Anti-cancer Activities in Preclinical Models of Feline Oral Squamous Cell Carcinoma Through Inhibition of Telomerase Activity and Down-Regulation of TERT. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*, 620776.
- Asai, A., Oshima, Y., Yamamoto, Y., Uochi, T., Kusaka, H., Akinaga, S., Yamashita, Y., Pongracz, K., Pruzan, R., Wunder, E., Piatyszek, M., Li, S., Chin, A. C., Harley, C. B., & Gryaznov, S. (2003). A Novel Telomerase Template Antagonist (GRN163) as a Potential Anticancer Agent1. *Cancer Research*, *63*(14), 3931–3939.
- Bacelli, I., Schneeweiss, A., Riethdorf, S., Stenzinger, A., Schillert, A., Vogel, V., Klein, C., Saini, M., Bäuerle, T., Wallwiener, M., Holland-Letz, T., Höfner, T., Sprick, M., Scharpff, M., Marmé, F., Sinn, H. P., Pantel, K., Weichert, W., & Trumpp, A. (2013). Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature Biotechnology*, *31*(6), 539–544.
- Bahmad, H. F., Cheaito, K., Chalhoub, R. M., Hadadeh, O., Monzer, A., Ballout, F., El-Hajj, A., Mukherji, D., Liu, Y.-N., Daoud, G., & Abou-Kheir, W. (2018). Sphere-Formation Assay: Three-Dimensional in vitro Culturing of Prostate Cancer Stem/Progenitor Sphere-Forming Cells. *Frontiers in Oncology*, *8*, 347.
- Barczak, W., Sobocka, A., Golusinski, P., Masternak, M. M., Rubis, B., Suchorska, W. M., & Golusinski, W. (2018). hTERT gene knockdown enhances response to radio- and chemotherapy in head and neck cancer cell lines through a DNA damage pathway modification. *Scientific Reports*, *8*, 5949.
- Beck, S., Jin, X., Sohn, Y.-W., Kim, J.-K., Kim, S.-H., Yin, J., Pian, X., Kim, S.-C., Nam, D.-H., Choi, Y.-J., & Kim, H. (2011). Telomerase Activity-Independent Function of TERT Allows Glioma Cells to Attain Cancer Stem Cell Characteristics by Inducing EGFR Expression. *Molecules and Cells*, *31*(1), 9–15.
- Berardinelli, F., Siteni, S., Tanzarella, C., Stevens, M. F., Sgura, A., & Antocchia, A. (2015). The G-quadruplex-stabilising agent RHP54 induces telomeric dysfunction and enhances radiosensitivity in glioblastoma cells. *DNA Repair*, *25*, 104–115.
- Blackburn, E. H., & Collins, K. (2011). Telomerase: An RNP Enzyme Synthesizes DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(5), a003558.

- Brooks, M. D., Burness, M. L., & Wicha, M. S. (2015). Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell stem cell*, *17*(3), 260–271.
- Bruedigam, C., Porter, A. H., Song, A., Vroeg in de Wei, G., Stoll, T., Straube, J., Cooper, L., Cheng, G., Kahl, V. F. S., Sobinoff, A. P., Ling, V. Y., Jebaraj, B. M. C., Janardhanan, Y., Haldar, R., Bray, L. J., Bullinger, L., Heidel, F. H., Kennedy, G. A., Hill, M. M., ... Lane, S. W. (2024). Imetelstat-mediated alterations in fatty acid metabolism to induce ferroptosis as a therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Nature Cancer*, *5*(1), 47–65.
- Bryan, C., Rice, C., Hoffman, H., Harkisheimer, M., Sweeny, M., & Skordalakes, E. (2015). Structural Basis of Telomerase Inhibition by the Highly Specific BIBR1532. *Structure (London, England : 1993)*, *23*(10), 1934–1942.
- Cesare, A. J., & Reddel, R. R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: Models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics*, *11*(5), 319–330.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.-H., Diebel, M. E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D., & Wicha, M. S. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer research*, *69*(4), 1302–1313.
- Chen, L., Fan, J., Chen, H., Meng, Z., Chen, Z., Wang, P., & Liu, L. (2014). The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. *Scientific Reports*, *4*, 5911.
- Choi, W. S., Weng, P. J., & Yang, W. (2022). Flexibility of telomerase in binding the RNA template and DNA telomeric repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(1), e2116159118.
- Cimino-Reale, G., Pascale, E., Battiloro, E., Starace, G., Verna, R., & D'Ambrosio, E. (2001). The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay. *Nucleic Acids Research*, *29*(7), e35.
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., & Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO Journal*, *11*(5), 1921–1929.
- de Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(4), 323–329.
- De Vitis, M., Berardinelli, F., & Sgura, A. (2018). Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 606.
- Dogan, F., & Biray Avci, C. (2018). Correlation between telomerase and mTOR pathway in cancer stem cells. *Gene*, *641*, 235–239.

- Eglenen-Polat, B., Kowash, R. R., Huang, H.-C., Siteni, S., Zhu, M., Chen, K., Bender, M. E., Mender, I., Stastny, V., Drapkin, B. J., Raj, P., Minna, J. D., Xu, L., Shay, J. W., & Akbay, E. A. (2024). A telomere-targeting drug depletes cancer initiating cells and promotes anti-tumor immunity in small cell lung cancer. *Nature Communications*, *15*(1), 672.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., & De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death & Differentiation*, *15*(3), 504–514.
- Eun, K., Ham, S. W., & Kim, H. (2017). Cancer stem cell heterogeneity: Origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Reports*, *50*(3), 117–125.
- Filaci, G., Fenoglio, D., Nolè, F., Zanardi, E., Tomasello, L., Aglietta, M., Del Conte, G., Carles, J., Morales-Barrera, R., Guglielmini, P., Scagliotti, G., Signori, A., Parodi, A., Kalli, F., Astone, G., Ferrera, F., Altosole, T., Lamperti, G., Criscuolo, D., ... Boccardo, F. (2021). Telomerase-based GX301 cancer vaccine in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: A randomized phase II trial. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *70*(12), 3679–3692.
- Fumagalli, A., Oost, K. C., Kester, L., Morgner, J., Bornes, L., Bruens, L., Spaargaren, L., Azkanaz, M., Schelfhorst, T., Beerling, E., Heinz, M. C., Postrach, D., Seinstra, D., Sieuwerts, A. M., Martens, J. W. M., van der Elst, S., van Baalen, M., Bhowmick, D., Vrisekoop, N., ... van Rhee, J. (2020). Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell*, *26*(4), 569-578.e7.
- Gao, C., Wei, J., Tang, T., & Huang, Z. (2020). Role of microRNA-33a in malignant cells. *Oncology Letters*, *20*(3), 2537–2556.
- Gao, M.-Q., Choi, Y.-P., Kang, S., Youn, J. H., & Cho, N.-H. (2010). CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene*, *29*(18), 2672–2680.
- Garnique, A. M. B., Rezende-Teixeira, P., & Machado-Santelli, G. M. (2023). Telomerase inhibitors TMPyP4 and thymoquinone decreased cell proliferation and induced cell death in the non-small cell lung cancer cell line LC-HK2, modifying the pattern of focal adhesion. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *56*, e12897.
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, *43*(2 Pt 1), 405–413.
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, *51*(6), 887–898.
- Haakensen, V. D., Öjlert, Å. K., Thunold, S., Farooqi, S., Nowak, A. K., Chin, W. L., Grundberg, O., Szejniuk, W. M., Cedres, S., Sørensen, J. B., Dalen, T. S., Lund-Iversen, M., Bjaanæs, M., & Helland, Å. (2024). UV1 telomerase vaccine with ipilimumab and nivolumab as second line treatment for pleural mesothelioma – A phase II randomised trial. *European Journal of Cancer*, *202*, 113973.
- Hafezi, F., & Perez Bercoff, D. (2020). The Solo Play of TERT Promoter Mutations. *Cells*, *9*(3), 749.

- Hasegawa, D., Okabe, S., Okamoto, K., Nakano, I., Shin-ya, K., & Seimiya, H. (2016). G-quadruplex ligand-induced DNA damage response coupled with telomere dysfunction and replication stress in glioma stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *471*(1), 75–81.
- Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., & Allshire, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, *346*(6287), 866–868. Scopus.
- Herbert, B.-S., Gellert, G. C., Hochreiter, A., Pongracz, K., Wright, W. E., Zielinska, D., Chin, A. C., Harley, C. B., Shay, J. W., & Gryaznov, S. M. (2005). Lipid modification of GRN163, an N3' → P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene*, *24*(33), Article 33.
- Herbert, B.-S., Wright, A. C., Passons, C. M., Wright, W. E., Ali, I. U., Kopelovich, L., & Shay, J. W. (2001). Effects of Chemopreventive and Antitelomerase Agents on the Spontaneous Immortalization of Breast Epithelial Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *93*(1), 39–45.
- Hoffmeyer, K., Raggioli, A., Rudloff, S., Anton, R., Hierholzer, A., Del Valle, I., Hein, K., Vogt, R., & Kemler, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Regulates Telomerase in Stem Cells and Cancer Cells. *Science*, *336*(6088), 1549–1554.
- Hu, Y., Bobb, D., He, J., Hill, D. A., & Dome, J. S. (2015). The HSP90 inhibitor alvespimycin enhances the potency of telomerase inhibition by imetelstat in human osteosarcoma. *Cancer Biology & Therapy*, *16*(6), 949–957.
- Hunger, R. E., Kernland Lang, K., Markowski, C. J., Trachsel, S., Møller, M., Eriksen, J. A., Rasmussen, A.-M., Braathen, L. R., & Gaudernack, G. (2011). Vaccination of patients with cutaneous melanoma with telomerase-specific peptides. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *60*(11), 1553–1564.
- Ilic, D., & Polak, J. M. (2011). Stem cells in regenerative medicine: Introduction. *British Medical Bulletin*, *98*(1), 117–126.
- Ishizawa, K., Rasheed, Z. A., Karisch, R., Wang, Q., Kowalski, J., Susky, E., Pereira, K., Karamboulas, C., Moghal, N., Rajeshkumar, N. V., Hidalgo, M., Tsao, M., Ailles, L., Waddell, T., Maitra, A., Neel, B. G., & Matsui, W. (2010). Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell stem cell*, *7*(3), 279–282.
- Jiao, X., Katiyar, S., Willmarth, N. E., Liu, M., Ma, X., Flomenberg, N., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2010). C-Jun Induces Mammary Epithelial Cellular Invasion and Breast Cancer Stem Cell Expansion. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(11), 8218–8226.
- Jo, J. H., Kim, Y.-T., Choi, H. S., Kim, H. G., Lee, H. S., Choi, Y. W., Kim, D. U., Lee, K. H., Kim, E. J., Han, J.-H., Lee, S. O., Park, C.-H., Choi, E. K., Kim, J. W., Cho, J. Y., Lee, W. J., Moon, H. R., Park, M.-S., Kim, S., & Song, S. Y. (2024). Efficacy of GV1001 with gemcitabine/capecitabine in previously untreated patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma having high serum eotaxin levels (KG4/2015): An open-label, randomised, Phase 3 trial. *British Journal of Cancer*, *130*(1), 43–52.

- Karam, M., Younis, I., Elareer, N. R., Nasser, S., & Abdelalim, E. M. (2020). Scalable Generation of Mesenchymal Stem Cells and Adipocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Cells*, *9*(3), Article 3.
- Khoury, H. J., Collins, R. H., Blum, W., Maness, L., Stiff, P., Kelsey, S. M., Reddy, A., Smith, J. A., & DiPersio, J. F. (2010). Prolonged Administration of the Telomerase Vaccine GRNVAC1 Is Well Tolerated and Appears to Be Associated with Favorable Outcomes In High-Risk Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*, *116*(21), 2190.
- Kim, J. H., Cho, Y.-R., Ahn, E.-K., Kim, S., Han, S., Kim, S. J., Bae, G.-U., Oh, J. S., & Seo, D.-W. (2022). A novel telomerase-derived peptide GV1001-mediated inhibition of angiogenesis: Regulation of VEGF/VEGFR-2 signaling pathways. *Translational Oncology*, *26*, 101546.
- Koeneman, K. S., Pan, C.-X., Jin, J.-K., Pyle, J. M., Flanigan, R. C., Shankey, T. V., & Diaz, M. O. (1998). Telomerase activity, telomere length, and DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *The Journal of Urology*, *160*(4), 1533–1539. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)62608-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)62608-9)
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2012). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, *85*(1), 3–10.
- Korkaya, H., Liu, S., & Wicha, M. S. (2011). Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(10), 3804–3809.
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*, *14*(3), 275–291.
- Kusoglu, A., Goker Bagca, B., Ozates Ay, N. P., Gunduz, C., & Biray Avci, C. (2020). Telomerase inhibition regulates EMT mechanism in breast cancer stem cells. *Gene*, *759*, 145001.
- Kuykendall, A. T., Sun, L., Mascarenhas, J., Kiladjian, J.-J., Vannucchi, A. M., Wang, J., Xia, Q., Zhu, E., Feller, F., Rizo, A., Bussolari, J., Wan, Y., & Komrokji, R. (2022). Favorable overall survival with imetelstat in relapsed/refractory myelofibrosis patients compared with real-world data. *Annals of Hematology*, *101*(1), 139–146.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645–648.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., & Simeone, D. M. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, *67*(3), 1030–1037.
- Lin, T. T., Letsolo, B. T., Jones, R. E., Rowson, J., Pratt, G., Hewamana, S., Fegan, C., Pepper, C., & Baird, D. M. (2010). Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: Evidence for a telomere crisis. *Blood*, *116*(11), 1899–1907.
- Lin, Z.-Z., Hu, M. C.-T., Hsu, C., Wu, Y.-M., Lu, Y.-S., Ho, J.-A. A., Yeh, S.-H., Chen, P.-J., & Cheng, A.-L. (2023). Synergistic efficacy of telomerase-specific oncolytic adenoviral therapy and histone deacetylase inhibition in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, *556*, 216063.



- Lu, F., & Zhang, Y. (2015). Cell totipotency: Molecular features, induction, and maintenance. *National Science Review*, 2(2), 217–225.
- Majumdar, S., & Liu, S.-T. (2020). Cell division symmetry control and cancer stem cells. *AIMS molecular science*, 7(2), 82–98.
- Makarov, V. L., Hirose, Y., & Langmore, J. P. (1997). Long G Tails at Both Ends of Human Chromosomes Suggest a C Strand Degradation Mechanism for Telomere Shortening. *Cell*, 88(5), 657–666.
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., Huber, M., Hohl, D., Cano, A., Birchmeier, W., & Huelsken, J. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on  $\beta$ -catenin signalling. *Nature*, 452(7187), 650–653.
- Marian, C. O., Cho, S. K., McEllin, B. M., Maher, E. A., Hatanpaa, K. J., Madden, C. J., Mickey, B. E., Wright, W. E., Shay, J. W., & Bachoo, R. M. (2010). The Telomerase Antagonist Imetelstat Efficiently Targets Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Leading to Decreased Proliferation and Tumor Growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(1), 154–163.
- Meeker, A. K., & Argani, P. (2004). Telomere Shortening Occurs Early During Breast Tumorigenesis: A Cause of Chromosome Destabilization Underlying Malignant Transformation? *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 9(3), 285–296.
- Meeker, A. K., Hicks, J. L., Platz, E. A., March, G. E., Bennett, C. J., Delannoy, M. J., & De Marzo, A. M. (2002). Telomere Shortening Is an Early Somatic DNA Alteration in Human Prostate Tumorigenesis. *Cancer Research*, 62(22), 6405–6409.
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2014). Molecular Biomarkers of Cancer Stem/Progenitor Cells Associated with Progression, Metastases, and Treatment Resistance of Aggressive Cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 23(2), 234–254.
- Mitchell, M., Gillis, A., Futahashi, M., Fujiwara, H., & Skordalakes, E. (2010). Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(4), 513–518.
- Momeni-Boroujeni, A., Yousefi, E., Gupta, S., Benayed, R., Berger, M. F., Ladanyi, M., Monroe, R., Kim, J., Jungbluth, A., Weigelt, B., & Park, K. J. (2022). Evaluation of TERT mRNA expression using RNAscope®: A potential histopathologic diagnostic and prognostic tool. *Pathology, research and practice*, 233, 153892.
- Moon, K. T., Yoo, T. K., Kwon, S. Y., Ha, J. Y., Byun, S. S., Kim, J. H., Chung, J. I., Kim, T. H., Moon, H. S., Kim, S. J., & Lee, K. S. (2018). A randomised, placebo-controlled, multicentre, Phase 2 clinical trial to evaluate the efficacy and safety of GV1001 in patients with benign prostatic hyperplasia. *BJU International*, 122(2), 283–292.

- Moore, N., & Lyle, S. (2011). Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance. *Journal of Oncology*, 2011, 396076.
- Negrini, S., De Palma, R., & Filaci, G. (2020). Anti-Cancer Immunotherapies Targeting Telomerase. *Cancers*, 12(8), 2260.
- Oskarsson, T., Batlle, E., & Massagué, J. (2014). Metastatic Stem Cells: Sources, Niches, and Vital Pathways. *Cell stem cell*, 14(3), 306–321.
- Pateras, I. S., Kotsakis, A., Avgeris, M., Baliou, E., Kouroupakis, P., Patsea, E., Georgoulas, V., Menez-Jamet, J., Kinet, J.-P., & Kosmatopoulos, K. (2021). Clinical Activity of an hTERT-Specific Cancer Vaccine (Vx-001) in “Immune Desert” NSCLC. *Cancers*, 13(7), 1658.
- Pickett, H. A., & Reddel, R. R. (2015). Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(11), 875–880.
- Pirsadeghi, A., Namakkoobi, N., Behzadi, M. S., Pourzinolabedin, H., Askari, F., Shahabinejad, E., Ghorbani, S., Asadi, F., Hosseini-Chegeni, A., Yousefi-Ahmadipour, A., & Kamrani, M. H. (2024). Therapeutic approaches of cell therapy based on stem cells and terminally differentiated cells: Potential and effectiveness. *Cells & Development*, 177, 203904.
- Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell stem cell*, 16(3), 225–238.
- Quintana, E., Shackleton, M., Foster, H. R., Fullen, D. R., Sabel, M. S., Johnson, T. M., & Morrison, S. J. (2010). Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer cell*, 18(5), 510–523.
- Recagni, M., Bidzinska, J., Zaffaroni, N., & Folini, M. (2020). The Role of Alternative Lengthening of Telomeres Mechanism in Cancer: Translational and Therapeutic Implications. *Cancers*, 12(4), 949.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111–115.
- Roake, C. M., & Artandi, S. E. (2020). Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(7), 384–397.
- Roake, C. M., Chen, L., Chakravarthy, A., Raffa, G. D., Ferrell, J. E., & Artandi, S. E. (2019). Disruption of telomerase RNA maturation kinetics precipitates disease. *Molecular cell*, 74(4), 688-700.e3.
- Romaniuk, A., Paszel-Jaworska, A., Totoń, E., Lisiak, N., Hołysz, H., Królak, A., Grodecka-Gazdecka, S., & Rubiś, B. (2019). The non-canonical functions of telomerase: To turn off or not to turn off. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 1401–1411.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2010). Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *Febs Letters*, 584(17), 3819–3825.

- Shi, X., Hu, Z., Bai, S., Zong, C., Xue, H., Li, Y., Li, F., Chen, L., Xuan, J., Xia, Y., Wei, L., Shen, F., & Wang, K. (2024). YBX1 promotes stemness and cisplatin insensitivity in intrahepatic cholangiocarcinoma via the AKT/ $\beta$ -catenin axis. *The Journal of Gene Medicine*, *26*(5), e3689.
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *14*(10), 611–629.
- Shishido, A., Mori, S., Yokoyama, Y., Hamada, Y., Minami, K., Qian, Y., Wang, J., Hirose, H., Wu, X., Kawaguchi, N., Nagumo, S., Matsuura, N., & Yamamoto, H. (2018). Mesothelial cells facilitate cancer stem-like properties in spheroids of ovarian cancer cells. *Oncology Reports*, *40*(4), 2105–2114.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Research*, *63*(18), 5821–5828.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*(7015), 396–401.
- Smith, M. J., Webber, B. R., Mohtashami, M., Stefanski, H. E., Zúñiga-Pflücker, J. C., & Blazar, B. R. (2015). Concise Review: In Vitro T-Cell Generation from Adult, Embryonic, and Induced Pluripotent Stem Cells: Many Roads to One Destination. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *33*(11), 3174–3180.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., & de Lange, T. (2000). Control of Human Telomere Length by TRF1 and TRF2. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(5), 1659–1668.
- Sundin, T., Peffley, D. M., & Hentosh, P. (2013). Disruption of an hTERT–mTOR–RAPTOR protein complex by a phytochemical perillyl alcohol and rapamycin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *375*(1), 97–104.
- Teixeira, L., Medioni, J., Garibal, J., Adotevi, O., Doucet, L., Durey, M.-A. D., Ghrieb, Z., Kiladjian, J.-J., Brizard, M., Laheurte, C., Wehbe, M., Pliquet, E., Escande, M., Defrance, R., Culine, S., Oudard, S., Wain-Hobson, S., Doppler, V., Huet, T., & Langlade-Demoyen, P. (2020). A First-in-Human Phase I Study of INVAC-1, an Optimized Human Telomerase DNA Vaccine in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, *26*(3), 588–597.
- Terali, K., & Yilmazer, A. (2016). New surprises from an old favourite: The emergence of telomerase as a key player in the regulation of cancer stemness. *Biochimie*, *121*, 170–178.
- Thalmensi, J., Pliquet, E., Liard, C., Escande, M., Bestetti, T., Julithe, M., Kostrzak, A., Pailhes-Jimenez, A.-S., Bourges, E., Loustau, M., Caumartin, J., Lachgar, A., Huet, T., Wain-Hobson, S., & Langlade-Demoyen, P. (2015). Anticancer DNA vaccine based on human telomerase reverse transcriptase generates a strong and specific T cell immune response. *Oncoimmunology*, *5*(3), e1083670.
- Toledo-Guzmán, M. E., Bigoni-Ordóñez, G. D., Ibáñez Hernández, M., & Ortiz-Sánchez, E. (2018). Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World Journal of Stem Cells*, *10*(12), 183–195.

- Tominaga, K., Minato, H., Murayama, T., Sasahara, A., Nishimura, T., Kiyokawa, E., Kanauchi, H., Shimizu, S., Sato, A., Nishioka, K., Tsuji, E., Yano, M., Ogawa, T., Ishii, H., Mori, M., Akashi, K., Okamoto, K., Tanabe, M., Tada, K., ... Gotoh, N. (2019). Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(2), 625–630.
- Vaiopoulos, A. G., Kostakis, I. D., Koutsilieris, M., & Papavassiliou, A. G. (2012). Colorectal Cancer Stem Cells. *Stem Cells*, *30*(3), 363–371.
- Vats, A., Bielby, R. C., Tolley, N. S., Nerem, R., & Polak, J. M. (2005). Stem cells. *Lancet (London, England)*, *366*(9485), 592–602.
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2012). Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell*, *10*(6), 717–728.
- von Zglinicki, T., Pilger, R., & Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, *28*(1), 64–74.
- Wang, H., Gong, P., Chen, T., Gao, S., Wu, Z., Wang, X., Li, J., Marjani, S. L., Costa, J., Weissman, S. M., Qi, F., Pan, X., & Liu, L. (2021). Colorectal Cancer Stem Cell States Uncovered by Simultaneous Single-Cell Analysis of Transcriptome and Telomeres. *Advanced Science*, *8*(8), 2004320.
- Wang, J., Sakariassen, P. Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S. O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røslund, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R., & Enger, P. Ø. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International Journal of Cancer*, *122*(4), 761–768.
- Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D., & Hannon, G. J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes & Development*, *12*(12), 1769–1774.
- Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K. D., Walker, D., Yu, H., Halili, M. V., Hu, Y.-P., Price, S. M., Abate-Shen, C., & Shen, M. M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature*, *461*(7263), 495–500.
- Wang, Y., Sušac, L., & Feigon, J. (2019). Structural Biology of Telomerase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(12), a032383.
- Ward, R. J., & Dirks, P. B. (2007). Cancer stem cells: At the headwaters of tumor development. *Annual Review of Pathology*, *2*, 175–189.
- Watson, J. D. (1972). Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature New Biology*, *239*(94), 197–201.
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., & Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & Development*, *11*(21), 2801–2809.

- Xu, D., Dwyer, J., Li, H., Duan, W., & Liu, J.-P. (2008). Ets2 Maintains hTERT Gene Expression and Breast Cancer Cell Proliferation by Interacting with c-Myc\*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 23567–23580.
- Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*, 27(4), 523–531.
- Yan, K., Wang, M., Qiu, Z., & Xu, M. (2023). A cell model about symmetric and asymmetric stem cell division. *Journal of Theoretical Biology*, 560, 111380.
- Ye, J., Wu, D., Wu, P., Chen, Z., & Huang, J. (2014). The cancer stem cell niche: Cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. *Tumor Biology*, 35(5), 3945–3951.
- Ye, X., Tam, W. L., Shibue, T., Kaygusuz, Y., Reinhardt, F., Eaton, E., & Weinberg, R. A. (2015). Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*, 525(7568), 256–260.
- Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 246(16), 1791–1801.
- Zeng, X., Hernandez-Sanchez, W., Xu, M., Whited, T. L., Baus, D., Zhang, J., Berdis, A. J., & Taylor, D. J. (2018). Administration of a Nucleoside Analog Promotes Cancer Cell Death in a Telomerase-Dependent Manner. *Cell reports*, 23(10), 3031–3041.
- Zhang, Y., Yang, X., Zhou, H., Yao, G., Zhou, L., & Qian, C. (2023). BIBR1532 inhibits proliferation and enhances apoptosis in multiple myeloma cells by reducing telomerase activity. *PeerJ*, 11, e16404.
- Zhao, X., Luo, D., Liu, T., Zhang, H., Xie, Y., & Kong, W. (2023). BIBR1532 Affects Endometrial Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Endometriosis via Telomerase Inhibition and MAPK Signaling. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 88(4), 226–239.
- Zhou, G., Liu, X., Li, Y., Xu, S., Ma, C., Wu, X., Cheng, Y., Yu, Z., Zhao, G., & Chen, Y. (2016). Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. *Oncotarget*, 7(12), 14925–14939.