

# Telomeraza – enzym nieśmiertelności?

Adam Kołataj

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Jak wiadomo, w jądrze komórkowym *Eukaryota* znajdują się chromosomy zawierające materiał dziedziczny pod postacią swoistego DNA. Do niedawna przypuszczano, że struktura łańcucha DNA na końcach chromosomów ma charakter statyczny i nie zmienia się w związku z podziałami mitotycznymi. Od kilku lat jednak wiadomo, że owe „zakończenia” ulegają swoistym przeobrażeniom, przede wszystkim poprzez skracanie.

Jeszcze w latach czterdziestych, pracująca nad tzw. skaczącymi genami laureatka Nagrody Nobla Barbara McClintock z USA (1940) i Hermann Müller (pracujący także w USA i również laureat tej nagrody) odkryli, że chromosomy komórek ssaków, a także niektórych pozostałych gromad świata zwierzęcego, mają na swych końcach jakby specjalne „usztyniacze”, coś w rodzaju zacisków na końcach sznurowadeł. To właśnie Müller nazwał je telomerami, posługując się greckim słownictwem składającym wyrazy telos – koniec i mores – część. Pani McClintock szybko zauważyła, że bez owych telomerów chromosomy nie mają ostrych wyraźnych zakończeń, są lepkie, nie doprowadzają podczas podziałów do kompletnego rozdzielania się komórki i utrudniają prawidłową jej replikację.

Dopiero jednak w 1978 roku, a więc prawie czterdzieści lat później, Elizabeth Blackburn (1991) i Joseph Gall z uniwersytetu w Yale (USA) stwierdzili, że telomery to nic innego tylko specyficzne, zawsze krótkie sekwencje nukleotydowe – TTGGGG, powtórzone wielokrotnie na końcach chromosomowego DNA. Ich modelem badawczym był jednokomórkowy orzęsek *Tetrahymena thermophila*, żyjący w słodkich wodach. Tak więc, telomer to nukleotydowy zestaw w nitce DNA – kolejno tymina – tymina – guanozyna – guanozyna – guanozyna – guanozyna. U różnych innych gatunków, np. u zwykłej myszy czy *Homo sapiens* telomery mogą mieć inną sekwencję, np. TTAGGG, a u obleńców TTAGGC.

Telomery są obszarem heterochromatyny na końcach ramion chromosomów, a ich DNA stanowi specyficzne kompleksy z odpowiednimi białkami, które jakby usztynniają te końce. Jak widać DNA telomerów charakteryzuje się dużą zawartością guaniny, zwłaszcza w nici usytuowanej w kierunku 5'– 3'. I chociaż tandemowo powtarzają się tam sekwencje, jak wspomniano na przykład u człowieka TTAGGG, to rzecz dziwna, nie mają tych sekwencji w telomerach szkarłupnie, mięczaki, a także stawonogi.

Inny zdobywca Nagrody Nobla i odkrywca kodowej struktury kwasu deoksyrybonukleinowego James Watson, zauważył jeszcze w 1972 roku (pracując na Uniwersytecie Harvarda), że enzymy syntetyzujące nowe cząsteczki DNA, tzw. polime-

razy DNA, nie tworzą nowych kopii chromosomów do samego ich liniowego końca. Na tym końcu pozostaje jakby „niedotworzony” odcinek, będący, jak już dzisiaj wiemy, właśnie kawałkiem telomeru.

Od dawna sądzono, że aby podział komórki był adekwatny musi ona bardzo dokładnie zreplikować swoje geny, odtwarzając je co do jednego z wielką precyzją. Aby tak się stało, komórka powinna zadbać również o dokładną replikację nie tylko środkowej, zasadniczej części „ciała” chromosomów, ale także ich końców. Dopiero wtedy komórka potomna może otrzymać cały zestaw genów komórki macierzystej. Wiadomo też od 1914 roku, a więc od czasów Thomasa Morgana (znovu noblisty), że geny umieszczone są, jako specyficzne jednostki substancji dziedzicznej, nie gdzie indziej, a w chromosomach. A chromosomy zakończone są właśnie telomerami!

Tak więc profesor James Watson bardzo zadziwił się swym odkryciem, gdyż wynikało z niego, iż technologia replikowania komórki, zostawiając na końcu chromosomu niewielki, nieskopiowany odcinek, nie jest precyzyjna. Tym nieskopiowanym odcinkiem byłby albo cały, albo tylko kawałek telomeru. Gdyby to zjawisko było tylko tak proste, wynikałoby stąd spostrzeżenie, że za każdym kolejnym podziałem komórki jej chromosomy się skracają! Każdemu więc kolejnemu podziałowi komórkowemu danej linii komórkowej towarzyszyłaby utrata niewielkiego końcowego odcinka każdego chromosomu, owego telomeru, a komórka osiągnęłaby taki stan, w którym nie mogłaby się skutecznie dzielić, bo nie miałaby już telomerów. Im dalej, po każdym podziale, skracaliby się chromosomy, tym szybciej komórka starzałaby się, aż doszłaby do momentu zupełnej starości, nie mając telomerów! Musiałaby wtedy zatrzymać program podziałów na komórki potomne. Na tej kanwie powstała tzw. hipoteza telomerowa starzenia się komórek i całych organizmów, zyskująca sobie od kilku lat coraz więcej zwolenników.

Przy okazji badań nad starzeniem się komórki wykryto, że komórki rozrodcze, a także komórki nowotworowe, nie starzeją się, gdyż właśnie one mają mechanizmy zapobiegające utratom telomerów. Duża liczba badaczy skłania się ku takiej hipotezie. Zagadnienie to jest tym bardziej ciekawe, iż w danych komórkach zauważono występowanie pewnych istotnych zależności między długością telomerów a liczbą podziałów komórkowych.

Z powyższych spostrzeżeń wynika fakt, że komórki powinny posiadać jakiś mechanizm kompensacyjny, zapobiegający skracaniu się ich chromosomów za każdym podziałem, gdyż eliminacja telomerów to wszak eliminacja także niektórych genów. Przy którymś kolejnym podziale, w odpowiednim pokoleniu, mogłoby się zdarzyć, że komórki macierzyste musiałyby umrzeć nie wytwarzając np. danej linii komórkowej. Dotyczyłoby to przede wszystkim jednokomórkowców, które rozmnażają się poprzez kolejne podziały. Dotyczyłoby to też komórek płciowych, będących prekursorami jaj i plemników, które przecie są odpowiedzialne za ewolucyjne przetrwanie swoich gatunków. Muszą one po prostu chronić swoje telomery! Jak to czynią?

Otóż, rzeczywiście telomery skracają się w czasie danego podziału komórkowego, ale w następnym etapie popodziało-

wym mogą odbudować swoją długość, poprzez syntezę i przyłączanie nowych podjednostek telomerowych. Dzieje się tak dzięki enzymowi telomerazie, który jest zdolny do przedłużania pojedynczych nici DNA bez matrycy istniejącego DNA, niejako na zasadzie „logicznej improwizacji”. Telomeraza nie jest więc typową, znaną od lat normalną polimerazą DNA – DNA zależną. Jest to terminalna transferaza telomerowa o aktywności odwrotnej transkryptazy. Wydłuża ona „występujący” koniec 3’ nici DNA na kanwie swojej wewnętrznej matrycy RNA (Harley i wsp., 1992). Z badań wspomnianej profesor Blackburn (1991) wynika, że jest to enzym bardzo specyficzny, gdyż oprócz białka w swojej molekułe zawiera pojedynczą cząsteczkę RNA. Ta cząsteczka RNA służy jako matryca nukleotydowa do odbudowywania podjednostek telomerowych. Jej działanie jest dość „chytre”, bo polega na „inteligentnym” postępowaniu kombinacyjnym. Otóż umieszcza ona końce jednej nici DNA na swojej własnej nici RNA tak „manipulując”, by nic DNA ściśle do niej przylegała, a gdy to nastąpi dodaje, jakby kolejno do „tkanej” całości na zasadzie fastrygowania, po jednym nukleotydzie, aż odbuduje pełną podjednostkę telomerową. Gdy zbuduje podjednostkę, może przyłączyć następną i tak przesuwać się wzdłuż odtwarzanego chromosomu.

Badania nad telomerazą udowodniły, że normalne, standardowe sposoby replikacji chromosomów nie potrafią odtworzyć ich do końca na całej długości. Klasyczne polimerazy DNA kopiuje wprawdzie obie oryginalne matryce rodzicielskie, ale jakby nie były zdolne wykonać swej pracy do samego końca i dzięki tej „niedbałości” każda nic potomna DNA jest skrócona na swoim końcu. Telomeraza naprawia ten „brak rzetelności”, ale jak to się dzieje, mimo przedstawionych sugestii, do dzisiaj tak dokładnie nie wiadomo.

Chociaż telomerazę wykryto w 1984 roku, właśnie w laboratorium Elizabeth Blackburn w Berkeley, to dopiero w 1989 roku odszukano ją w ludzkiej linii komórek nowotworowych. W tych latach wykryto też telomerazę u wielu innych orzęsków, poza *Tetrahymena*, a także u drożdży, żab i myszy. Obecnie wysuwa się przekonanie, że telomeraza jest syntetyzowana prawie przez wszystkie organizmy, których komórki mają jądra. I chociaż jej struktura przestrzenna zmienia się w zależności od gatunku, to wszystkie jej rodzaje zawierają gatunkowo specyficzne matryce RNA, na podstawie których odbudowywana jest podjednostka telomeru.

Dzięki telomerazie możemy mówić o wszystkich jednokomórkowcach, że są nieśmiertelne, gdyż mogą dzielić się w nieskończoność. Wykazano też, że gdy telomeraza, np. u *Tetrahymena* jest mutacyjnie zmieniona, telomery nie odbudowują się i w efekcie po kilku podziałach komórka umiera. Podobnie dzieje się u drożdży.

Ku zdumieniu wielu badaczy okazało się, że liczne komórki *Homo sapiens* nie zawierają telomerazy. Odkrycie to interpretowano początkowo na tle doniesienia Leonarda Hayflicka, który w latach 1961-1965 (Hayflick, 1965; Hayflick i Moorehead, 1961) wprowadził ciekawe pojęcie tzw. limitu podziałowego. Mówi ono, że normalnie zbudowana komórka, a więc prawidłowa, ma ograniczoną zdolność do podziałów, np. linie ludzkich fibroblastów płodowych dzielą się około 50 razy, po czym umierają nie dzieląc się już dalej. Można je hodować

najwyżej do 2 lat. Komórki ptaków oraz niektórych gryzoni także umierają w hodowli po określonej liczbie podziałów. Dotyczy to komórek nabłonka, mięśni gładkich, soczewki, a także limfocytów. Hayflick wysunął hipotezę, że liczba podziałów danych linii komórkowych jest wprost proporcjonalna do średniej długości życia osobnika danego gatunku, od którego pochodzi, a co jest też bardzo ważne – odwrotnie proporcjonalna do wieku tego osobnika. Tylko komórki nowotworowe i tzw. uniesmiertelnione dzielą się w sposób nieograniczony i nie wykazują objawów starzenia. Na tym tle nowotworzenie nazywamy często ucieczką od starzenia, co oczywiście jest marną pociechą!

Mimo wcześniejszych sugestii, dopiero w ostatnich kilku latach postanowiono dokładnie sprawdzić, czy w komórkach człowieka telomery rzeczywiście skracają się po kolejnych podziałach. Oczekiwania się spełniły – w normalnych somatycznych komórkach, podczas hodowli tkankowej, po podziałach telomery skracają się rzeczywiście. Stało się to jednym z dowodów, że komórki te nie mają telomerazy. Odkryto też, że telomery są tym krótsze, im dzielące się komórki są starsze. Jedynie komórki linii płciowych miały nienaruszone telomery po podziałach. Czy te zjawiska mogą być przyczyną starzenia się ludzi nie zostało jeszcze udowodnione. Przykłady miażdżycy czy gojenia się ran zdają się świadczyć, że tak.

W latach 1990-1994 zaproponowano pogląd, że funkcja telomerazy jest istotna dla procesów powstawania raka, bo o ile nie mają jej prawidłowe komórki somatyczne, to mają ją komórki nowotworowe. Dzięki temu mogą dzielić się w nieskończoność i nieść ze sobą niebezpieczeństwo guza i przerzutów, a w konsekwencji śmierci. Może tu właśnie należy doszukiwać się punktu zaczepienia leków przeciwnowotworowych?

Tak więc, dzięki tego rodzaju faktom okazało się, że stara, bo pochodząca aż z 1912 roku hipoteza Carrela o nieśmiertelności komórek w sztucznych hodowlach, nie jest prawdziwa. Spróbujmy przypatrzeć się nowym spostrzeżeniom na ten temat.

Jest już wiadomo, że komórka starzejąc się istotnie zmniejsza tempo syntezy swego DNA, a długość życia komórki hodowanej *in vitro* można ocenić na podstawie liczby jej podziałów. Greider i Harley w 1996 roku ostatecznie stwierdzili, że zjawisko skracania telomerów ujawnia się tempie 50-150 par zasad podczas jednej „zaszłości” replikacyjnej, czyli jednego podziału. W 1992 roku Harley i wsp. (1992) ujawnili, że w komórkach jajowych znajduje się telomeraza, a więc ich potomne komórki nie skracają swych telomerów i w ten sposób umożliwiają przekazywanie całości zasobów informacji genetycznej, komórki somatyczne zaś po wykorzystaniu limitu Hayflicka skracają swe chromosomy, gdyż właśnie nie mają telomerazy.

Obecnie istnieje kilka poglądów na regulacje szybkości proliferacji komórek, zapewne wartych odrębnego omówienia, począwszy od samego sygnału do podziału (skąd komórka ma „wiedzieć”, kiedy zacząć się dzielić), aż do momentu jego zakończenia, a nawet do samouśmiercania się komórki na drodze apoptozy. Powtórzmy, że telomery chronią komórkę przed zlepianiem się końców chromosomów, przed ich złaniem, czyli fuzją, przed ich degradacją, ułatwiają ich umiejscowienie się

w obszarze jądra komórkowego, ułatwiają też podczas podziałów ich segregację i wędrówkę. Ostatnio wypowiedzieli się obszerniej na ten temat Kurenowa i Mason (1997). Ale rodzi się też pytanie, skąd komórka „dowiaduje się” o skróceniu swoich chromosomów, a więc o długości swoich telomerów? Wright i Shay (1995) sądzą, że można zatrzymać w komórce podziały przez skracające się telomery dzięki informacjom o uszkodzeniu samej komórki lub gdy telomery skróciły się już tak dalece, że osiągnęły właśnie krytyczną długość. Ułatwiają to obserwacje starzenia się komórek *in vitro*, interpretowanego jako proces nieliniowy lub liniowy. Model Pardee sugeruje, że komórki „na co dzień” znajdują się zwykle w fazie spoczynkowej, tzw. G<sub>0</sub>, a ich podział jest zjawiskiem przejściowym, inicjowanym jakimiś mitogenami. Konsekwencją tej hipotezy jest przypuszczenie, że starzenie się komórki oparte jest na wstrzymaniu cyklu w punkcie G<sub>1</sub>/S (gap – przerwa<sub>1</sub>/synteza) nawet wtedy, gdy w komórkowej pożywce znajduje się pobudzający do podziałów mitogen. Shackney i Shankey (1999) sądzą jednak, że można przyjąć też odmienny model cyklu komórkowego (Baischa i Otto, 1993), że podział komórki, a właściwie jej proliferacja, jest procesem ciągłym, tylko w miarę starzenia wydłużają się fazy komórkowe – G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub>, aż w końcu komórka już stara dochodzi do fazy G<sub>0</sub>, a więc zupełnie spoczynkowej.

Jak wspomniano, starzejąca się komórka ma mniejsze tempo syntezy swego DNA. Ustaliły to cytometryczne analizy. Okazało się, że zasadniczym elementem decydującym o rozpoczęciu proliferacji w komórce jest specyficzne białko Rb. Jest to białko sprzężone w swym działaniu z szeregiem kinaz i tzw. cyklin D. Na szersze ich omówienie nie ma tu miejsca. Dzięki szeregom etapowych reakcji białko Rb ulega fosforylacji, uzależnionej od mitogenu i uruchamia właściwą transkrypcję genów. Ale cykl komórkowy, oprócz czynnika Rb, jest także uzależniony od tzw. systemu białka p53. System ten stoi na straży jakby całości komórkowego genomu, zwłaszcza wtedy, gdy np. DNA został uszkodzony i w interesie komórki nie leży jego synteza, wręcz przeciwnie „pojawienie się” go daje wskazania do zatrzymania proliferacji i uruchomienia działania układu naprawczego. Ciekawe jest to, że gdy mechanizmy naprawcze okażą się niemożliwe do włączenia, komórka może być skazana na śmierć przez apoptozę, czyli zaprogramowanie swego własnego unicestwienia. Normalnie, gdy w komórce jest wszystko „w porządku”, poziom czynnika transkrypcyjnego jest bardzo niski, a gwałtownie wzrasta właśnie wtedy, gdy DNA staje się uszkodzony. Zwiększa się też w tych okolicznościach jego zdolność wiązania DNA. I znowu włącza się cała kaskada reakcji powiązania białka p53 z innymi białkami, np. białkiem Cip1, które inhibuje odpowiednie kinazy, czy białkiem p16. Jest ciekawe też i to, że stare komórki mają podwyższoną koncentrację białka p53 oraz białek p21 i p16 (Robles i Adami, 1998; Sekiguchi i Hunter, 1998), a podwyższenie ich poziomu może zachodzić nierównocześnie. Między innymi na tej podstawie niektórzy badacze wysnuwają wniosek, że starzenie replikacyjne normalnych komórek *in vitro* jest po prostu nieodwracalnym zatrzymaniem podziałów, czemu towarzyszy właśnie podwyższenie

zawartości białek p53, p21 i p16. Czy te wszystkie zjawiska mają związek ze skracaniem się telomerów? Czy sygnał o zmianie ich długości doprowadza do wzrostu poziomu np. białka p53? Otóż wydaje się, że związek taki właśnie istnieje, ale nie jest jeszcze jasne jakie elementy molekularne „leżą na trasie” pomiędzy uszkodzeniem DNA, poprzez właśnie skrócenie telomeru, a białkiem p53. Znalaziono tu wprawdzie dalsze białka pośredniczące – ATM i PARP, które występują w jądrach komórek *Eukaryota*, z wyjątkiem drożdży (które akurat nie mają PARP!), ale proces tego „pośrednictwa” jest znowu skomplikowany i wychodzi poza ramy naszych rozważań. Opisują go dokładniej Bertuch i Lundblad (1997), Shore (1998) oraz Vaziri i wsp. (1997). W proces ten mogą być także zaangażowane białka histonowe jądra komórkowego (Grundstein, 1997; Marcand i wsp., 1997) oraz zmiany w samej strukturze chromatyny. Wywołane poprzez skracanie się telomeru rozluźnienie chromatyny w subtelomerowej okolicy chromosomu (gdzie jest ona zwykle transkrypcyjnie nieaktywna), może doprowadzać do uaktywnienia „drzemiących”, czyli wyciszonych dotychczas genów. Mogą one kodować pewne fosfatazy i kinazy odpowiednich białek regulatorowych, nadzorujących cykl komórkowy (Kurenowa i Mason, 1997; Kłyszewko-Stefanowicz, 1995; Tsukamoto i wsp., 1997).

Nie ulega zatem wątpliwości, że na regulację podziału komórki wpływa swoisty system przemian białka telomerów, związany specyficznie z aktywnością telomerazy. Aby bardziej skomplikować interpretację należy dodać, że długie telomery, które ujawniają się w prawidłowych młodych komórkach somatycznych, zawierają jeszcze specyficzne białko TRF1, hamujące aktywność telomerazy, podobnie jak wspomniane już białko Rb. Tak sądzą Steensen i Lange (1997) oraz Xu i wsp. (1997). Ale zawsze, gdy aktywność telomerazy ulega represji, synteza normalnego DNA przesuwają się w kierunku skracania telomerów!

Podczas proliferacji komórkowej rozgrywają się ciekawe „zawody”. Na ten temat istnieje już obszerna literatura, jednak w dość skomplikowany sposób je opisująca (Luo i wsp. 1998; Shikama i wsp. 1997; Giles i Harley., 1996; Robles i Adami, 1998). Gdy skracają się telomery to wszak zmienia się dotychczasowy sposób umiejscowienia czy zakotwiczenia chromosomów w blaszce jądrowej oraz ulega zaburzeniu struktura telomerowej heterochromatyny. Może dochodzić do licznych aberacji chromosomowych, gdyż skrócone końce telomerów mogą uzależniać od siebie nieprawidłową segregację chromosomów w przebiegu mitotycznego podziału. Dzięki temu może wzrastać śmiertelność komórek (Kiyono i wsp., 1998). Dodajmy, że ostatnio odkryto (Pennisi 1998; Smith i wsp. 1998) specyficzny enzym – tankyrazę, zaangażowany w proces umożliwiający telomerazie wydłużanie końca 3' telomerowego DNA, przed rozpoczęciem replikacji. Czy dzięki temu będziemy wkrótce o przysłowiowy krok bliżej do lepszego zrozumienia działania aktywnej telomerazy, a tym samym do przybliżenia zrozumienia „tego czegoś”, co może sprawiać, że komórka ma szansę na nieśmiertelność?

**27 pozycji literatury do wglądu u Autora lub w Redakcji**