

EWA JARUGA

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: karla@nencki.gov.pl.

„Są rzeczy, które się dostrzega tylko dlatego,
że do niczego nie pasują”
Canetti

UDZIAŁ TELOMERÓW W REGULACJI PODZIAŁÓW KOMÓRKOWYCH I STARZENIU

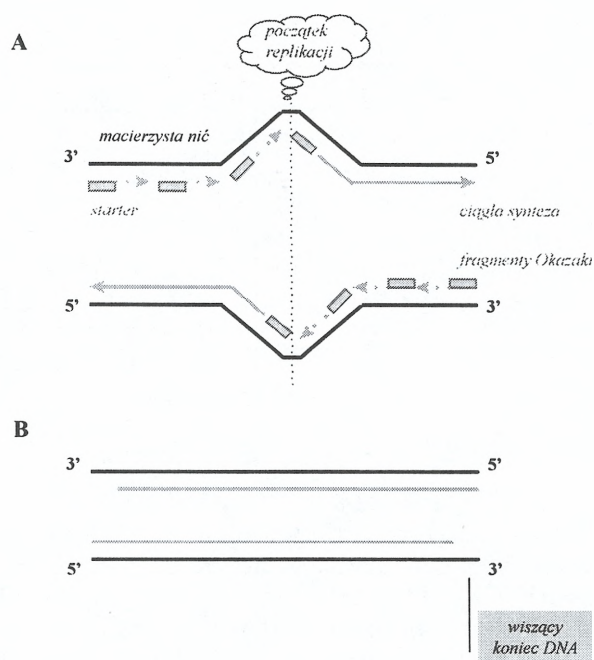
Naukowcy tworzą teorię stawiając i weryfikując doświadczalnie kolejne hipotezy. Z niepokojem spodziewają się odkrycia czegoś, co zupełnie do tej teorii nie pasuje. Bywa, że wierni do końca posuwają się wręcz do paradoksalnych wyjaśnień istnienia wyjątków. Czasem jednak, te zaskakujące odkrycia stymulują tak bardzo, że odważają się wyznaczać nowe kierunki badań.

Tak było w 1961 roku, kiedy HAYFLICK i MOORHEAD obalili mit o nieśmiertelności prawidłowych komórek hodowanych *in vitro*. Wykazali, że komórki w hodowli starzeją się, czego odzwierciedleniem jest zanik ich zdolności replikacyjnych. Co ciekawsze, długość życia komórki w hodowli nie zależy od rzeczywistego czasu prowadzenia hodowli, lecz najwyraźniej jest odmierzana liczbą podziałów komórkowych (HAYFLICK i MOORHEAD 1961, HAYFLICK 1965)! Jakież więc mechanizm odpowiada za liczenie podziałów w komórce?

W 1973 roku, OLOVNIKOV zwrócił uwagę na problem replikacji końca w liniowym DNA. Zauważył, że każda potomna cząsteczka DNA ma niekompletny koniec 5'. Wynika to z właściwości polimerazy DNA, która syntetyzując wyłącznie w kierunku 5'–3' nie może wypełniać luki po usunięciu starterze RNA (Ryc. 1). Prowadzi to do obserwowanego w komórkach somatycznych zjawiska skracania terminalnych fragmentów chromosomów (tzw. telomerów) i to w tempie 50–150 par zasad na rundę replikacyjną (GREIDER i HARLEY 1996)!

Jednakże, założenie przekazywania zygocie pełnej informacji genetycznej w komórkach rozrodczych wykluczało możliwość skracania tam telomerów. Zasugerowano więc istnienie me-

chanizmu przeciwdziałającego systematycznej utracie DNA. Spodziewano się go znaleźć nie tylko w komórkach rozrodczych, ale także w

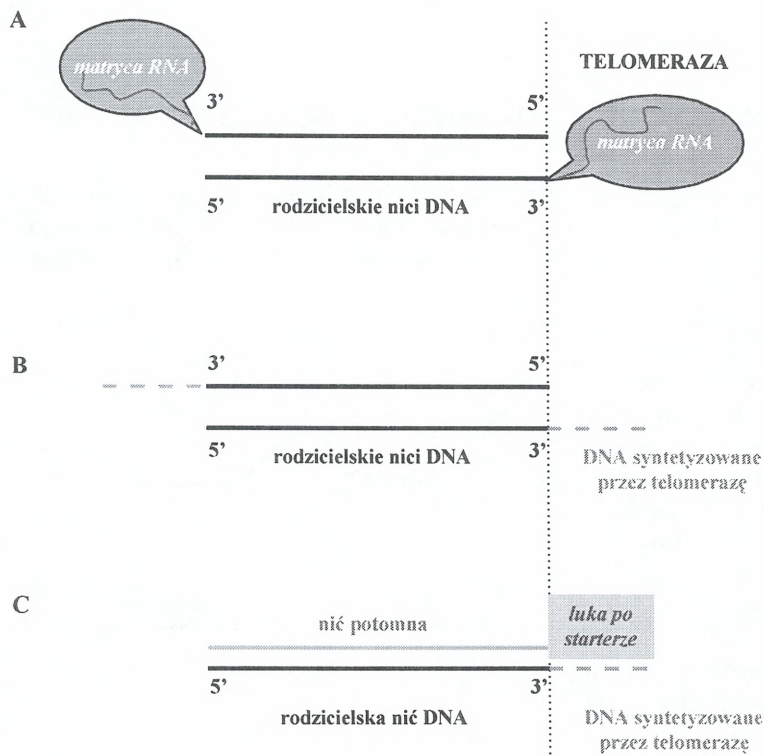


Ryc. 1. Zjawisko niepełnej replikacji liniowego DNA.

A. Synteza potomnego DNA (szary) w kierunku 5'–3' zachodzi równocześnie na obu niciach macierzystego DNA (czarnej). Widelki replikacyjne rozchodzą się w przeciwnych kierunkach od miejsca rozpoczęcia replikacji, co oznacza, że każda nić potomna jest syntetyzowana po części w sposób ciągły i po części za pomocą fragmentów Okazaki. B. Rozpoczynanie syntezy DNA od krótkich fragmentów RNA (starter) i jej przebieg wyłącznie w kierunku 5'–3' uniemożliwia wypełnienie luki po usunięciu końcowych starterów z nici potomnych.

tych, gdzie nie obserwuje się skracania telomerów na przykład w drożdżach czy orzęskach. W 1985 roku GREIDER i BLACKBURN zidentyfikowały u jednego z gatunków orzęska, *Tetrahymena thermophila*, terminalną transferazę telomerową, w skrócie — telomerazę. Enzym o aktywności odwrotnej transkryptazy specyficznie wydłuża wystający koniec 3' DNA na podstawie wewnętrznej matrycy RNA (Ryc. 2). Aktywność telomerazową stwierdzono także w komórkach nowotworowych wiążąc z tym ich cechę nieśmiertelności, czyli zdolności do nieograniczonego podziałów w hodowli (SHAY 1997).

podziałów (limit Hayflicka) powoduje zatrzymanie proliferacji. Oczywiście możliwe jest przekroczenie limitu podziałów na drodze mutacji czy ekspresji genów białek onkogennych lub genów supresorów nowotworu. Jednak bez wyłączenia licznika podziałów przez aktywację telomerazy, prowadziłoby to do dalszego skracania telomerów, a w następstwie do kolejnej blokady podziałów i śmierci. Immortalizacja (unieśmiertelnienie) komórek wymaga więc stałego sygnału do proliferacji, zatrzymania sygnału do kontrolowanej śmierci komórki (apoptozy) oraz aktywacji telomerazy.



Ryc. 2. Mechanizm przeciwdziałania skracaniu telomerów.

A. Przed replikacją, do końca 3' macierzystego DNA dołącza telomeraza — enzym o aktywności odwrotnej transkryptazy z wbudowaną matrycą RNA. B. Na podstawie wewnętrznej matrycy RNA, telomeraza syntetyzuje fragment DNA (szara, przerywana linia). C. Luka po usuniętym starterze znajduje się na wysokości fragmentu DNA syntetyzowanego przez telomerazę, nie zaś macierzystego DNA.

W 1992 roku HARLEY i współautorzy sformułowali telomerową hipotezę starzenia komórek somatycznych. Założyli oni, że aktywna w komórkach płciowych telomeraza utrzymuje stałą długość telomerów i zapewnia przekazanie zygocie pełnej informacji genetycznej. Represja aktywności telomerazy w komórkach somatycznych przyczynia się do skracania telomerów z każdą rundą replikacyjną. Uzyskanie krytycznej długości telomerów po określonej liczbie

Nadal bez odpowiedzi pozostają pytania dotyczące mechanizmów kontroli długości telomerów, ich udziału w regulacji cyklu komórkowego podczas starzenia *in vitro* i immortalizacji. Artykuł ten ma na celu przybliżenie molekularnych podstaw telomerowej teorii starzenia ze szczególnym uwzględnieniem możliwości przekazywania sygnałów od skracanych telomerów do białek regulujących cykl komórkowy.

CYKL CYKLOWI NIERÓWNY?

W świetle telomerowej teorii starzenia wydaje się, że metabolizm telomerów wyznacza etapy życia komórki przez określenie tempa proliferacji,

limitu podziałów czy możliwości immortalizacji. W jaki sposób systematyczne skracanie telomerów mogłoby wpływać na regulację cyklu

komórkowego? Możliwe są następujące odpowiedzi:

- zatrzymanie podziałów stanowi blokadę cyklu w określonym punkcie kontrolnym (restrykcyjnym) w odpowiedzi na skrócenie telomerów poniżej pewnej krytycznej długości (starzenie komórkowe *in vitro* jako proces nieliniowy),
- zatrzymanie podziałów jest końcowym etapem ciągłego procesu w czasie hodowli, kiedy molekularne mechanizmy zaangażowane w regulację cyklu komórkowego ulegają zmianie z cyklu na cykl wraz ze skracającymi się telomerami (starzenie komórkowe *in vitro* jako proces liniowy).

Podstawą w rozwiązaniu tego problemu jest ustalenie modelu cyklu komórkowego. Powszechnie akceptowany model Pardee zakłada, że komórki zwykle są w fazie spoczynkowej G₀, a proliferacja jest zjawiskiem przejściowym, indukowanym mitogenem i zachodzącym po przejściu punktów restrykcyjnych cyklu. Starzenie komórkowe w świetle tego modelu, polega na zatrzymaniu cyklu w punkcie restrykcyjnym G₁/S mimo obecności w pożywce mitoge-

nów. Konkurencyjny model cyklu przedstawił Baisch. Uważa on, że proliferacja jest ciągłym procesem modyfikowanym w czasie w ten sposób, że poszczególne fazy cyklu to znaczy G₁, S, G₂ ulegają wydłużaniu, a komórki starząc się „przechodzą” z wydłużonej fazy G₁ do fazy spoczynkowej G₀ (SHACKNEY i SHANKEY 1999).

Dzięki analizie cytometrycznej tempa proliferacji wykazano, że komórka starząc się *in vitro* rzeczywiście zmniejsza szybkość syntezy DNA. Obserwowano, bowiem heterogenną, pod względem długości poszczególnych faz cyklu, pulę komórek w hodowli. Odpowiadałoby to modelowi cyklu komórkowego Baisch’a, w którym utrata zdolności do proliferacji jest końcowym etapem wydłużania faz cyklu, nie zaś raptownym zatrzymaniem podziałów (BAISCH i OTTO 1993). W związku z tym rodzą się pytania:

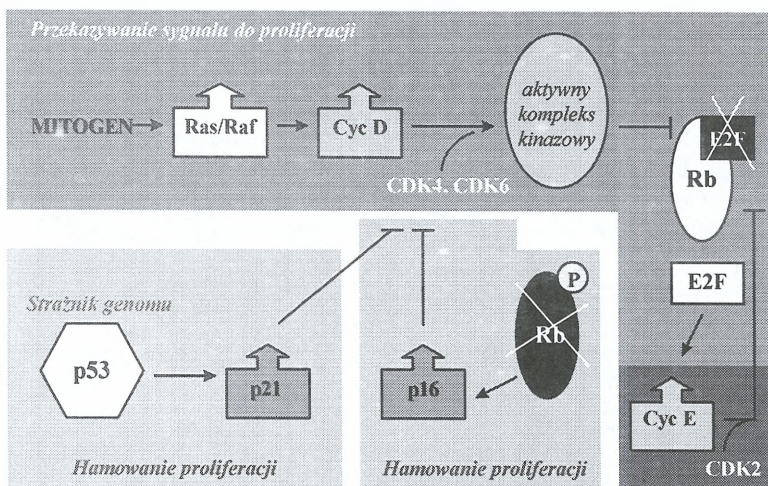
- Co powoduje wydłużanie poszczególnych faz cyklu wraz z kolejnymi podziałami?
- Czy te same mechanizmy odpowiadają za wydłużanie faz i zatrzymanie proliferacji?
- Czy są to mechanizmy odwracalne i w związku z tym prowadzą do immortalizacji komórek?

REGULACJA TEMPA PROLIFERACJI

Na „decyzję” komórki o proliferacji ma wpływ szereg czynników, które można uporządkować w podstawowe trzy szlaki: (1) szlak przekazywania sygnału do proliferacji, (2) szlak przekazywania sygnału wyłączającego proliferację, (3) szlak do apoptozy.

Centralnym punktem podejmowania decyzji jest białko Rb będące produktem genu supresoru nowotworu (recesywna mutacja Rb odpowiada za powstawanie nowotworu siatkówki oka — retinoblastomy). Z jednej strony, Rb leży na drodze przekazywania sygnału do proliferacji przez oddziaływanie z niezbędnym dla syn-

tezy DNA czynnikiem transkrypcyjnym E2F, a z drugiej strony niesie informację o wyłączeniu sygnału do proliferacji za pośrednictwem białka p16^{INK4a} (kompetycyjnego inhibitora kinaz CDK4 i CDK6 zależnych od cyklin D). Ten układ (Ryc. 3), jeśli działa poprawnie, gwarantuje przekazanie sygnału od mitogenu przez białka Ras/Raf, kompleks cykliny D z kinazami CDK4 lub CDK6 (CDK4/6) i prowadzi do zależnej od mitogenu fosforylacji białka Rb. Ufosforylowane białko Rb przestaje już być aktywnym inhibitorem czynnika transkrypcyjnego E2F. Uwolniony czynnik E2F uruchamia transkrypcję genów



Ryc. 3. Schemat regulacji proliferacji.

Sygnał od mitogenu przekazywany jest na drodze Ras/Raf i kinaz zależnych od cykliny D do czynnika transkrypcyjnego E2F. Z chwilą aktywacji transkrypcji genu dla cykliny E, sygnał do proliferacji uniezależnia się od mitogenu. Jednocześnie, w obecności ufosforylowanego białka Rb wzrasta poziom transkryptów dla białka p16, które jest inhibitorem cykliczno-zależnych kinaz CDK4/6. Dodatkowo, w sytuacji uszkodzenia DNA, sygnał do proliferacji może być zatrzymany przez białko p21 zależne od p53.

niezbędnych dla syntezy DNA. E2F powoduje także wzrost poziomu cykliny E, która w kompleksie z kinazą CDK2 wspomaga kompleksy cykliny D z CDK4/6 w fosforylacji (inaktywacji) Rb. Tym razem jednak, fosforylacja Rb jest niezależna od mitogenu, a sygnał do proliferacji zostaje spotęgowany. Z drugiej strony, w obecności ufosforylowanej formy Rb obserwuje się wzrost poziomu białka p16^{INK4a}, będącego inhibitorem kinaz CDK4/6. Następuje sprzężenie zwrotne – hamowanie fosforylacji białka Rb, co przerywa sygnał do proliferacji. Jednocześnie, zachodzi defosforylacja białka Rb przywracająca stan wyjściowy komórce i umożliwiającą ponowne odebranie sygnału do proliferacji w obecności mitogenu.

W regulacji cyklu komórkowego, prócz węgła Rb, istotną rolę odgrywa także system p53. Stanowi on strażnicę genomu, gdyż w obecności uszkodzonego DNA zatrzymuje proliferację, uruchamia mechanizmy naprawcze, a w przypadku niemożliwości naprawy — przekazuje sygnał włączający apoptozę. Białka zaangażowane w te procesy są koordynowane właśnie przez czynnik transkrypcyjny p53. Jego poziom w normalnych warunkach jest bardzo niski. Pod wpływem uszkodzenia DNA, wzrasta ilość białka p53 oraz jego zdolność wiązania DNA i aktywacji transkrypcji genów. Białko p53 zwiększa ekspresję między innymi białka p21^{Cip1} będącego produktem genu *WAF1/Cip1*. Białko p21^{Cip1} jest inhibitorem cyklino-zależnych kinaz między innymi CDK4/6 i należy do grupy negatywnych regulatorów proliferacji, podobnie jak wcześniej opisywane białko p16^{INK4a} (dokładny opis regulacji cyklu komórkowego podczas starzenia znaleźć można w artykule EWY RADZISZEWSKIEJ w tym numerze KOSMOSU).

Warto zauważyć, że ten sam efekt zatrzymania podziałów może nastąpić zarówno w wyniku braku czynników wzrostowych, uszkodzenia, jak i starzenia komórki. Jednak mechanizmy wywołujące ten efekt wydają się być różne. Obserwuje się bowiem podstawowe różnice w odwracalności blokad proliferacyjnych i możliwości wywołania programu apoptozy (o apoptozie: patrz CUMMINGS i współaut. 1997).

1. Molekularnym podłożem zatrzymania podziałów komórek głodzonych jest aktywne (nie-ufosforylowane) białko Rb. Dostarczenie czynników wzrostowych prowadzące do inaktywacji

(fosforylacji) Rb zwalnia blokadę. Generalnie, włączenie sygnału do proliferacji przez mitogen, a więc aktywacja drogi Ras/Raf, chroni komórkę przed apoptozą. Aktywowane są bowiem antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 (KELEKAR i THOMPSON 1998). Brak czynników wzrostowych często prowadzi natomiast do programowanej śmierci komórki (SIKORA 1994, PANDEY i WANG 1995, EVAN i współaut. 1995).

2. Zatrzymanie proliferacji komórek w wyniku uszkodzenia DNA odbywa się przez wzrost poziomu i aktywności czynnika transkrypcyjnego p53 oraz indukowany przezeń wzrost poziomu białka p21^{Cip1}. Jednocześnie, przekazywany jest sygnał do apoptozy między innymi przez inaktywację antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (HARRIS 1996, KOUZARIDES 1995).

3. W starych komórkach obserwuje się podwyższony poziom i aktywność białka p53 oraz podwyższony poziom białek p21^{Cip1} i p16^{INK4a} (BOND i współaut. 1996, SEKIGUCHI i HUNTER 1998, ROBLES i ADAMI 1998). Co ciekawe, zwiększanie poziomu tych białek nie zachodzi równocześnie! Komórki w stadium tuż przed zatrzymaniem podziałów (ang. pre-senescence) wykazują wysoki poziom białka p53 o wysokiej zdolności wiązania DNA i transaktywacji genu *WAF/Cip1*. Aktywność ta zaczyna spadać po wejściu komórek w etap blokady proliferacji (ang. senescence). W tym czasie obserwuje się także przejściowy wzrost poziomu białka p21^{Cip1}. Dopiero gdy ten ostatni zaczyna spadać, jako trzeci w kolejności wzrasta poziom białka p16^{INK4a}. W przeciwieństwie do p53 i p21^{Cip1}, białko p16^{INK4a} utrzymuje wysoki poziom podczas trwania nieproliferacyjnej fazy hodowli komórek (ROBLES i ADAMI 1998). Ciekawe, że komórki stare, w porównaniu z młodymi, mniej chętnie włączają program apoptozy (SIKORA 1993, 1994).

W świetle tych wyników, starzenie replikacyjne prawidłowych komórek w hodowli jest nieodwracalnym zatrzymaniem podziałów, czemu towarzyszy między innymi wzrost poziomu białek p53, p21^{Cip1} i p16^{INK4a}. To rodzi kolejne pytania:

- Co powoduje wzrost poziomu białek p53, p21^{Cip1} i p16^{INK4a} w późnej fazie replikacyjnego życia komórek?
- Czy wzrost poziomu p53, p21^{Cip1} i p16^{INK4a} ma związek ze skracaniem telomerów?

PIERWOTNA PRZYCZYNA MOLEKULARNYCH OBJAWÓW STARZENIA — USZKODZENIE DNA CZY ZMIANA STRUKTURY CHROMATYNY?

Niewątpliwie niedoskonałość procesu replikacji DNA sugestywnie wskazuje na skracanie

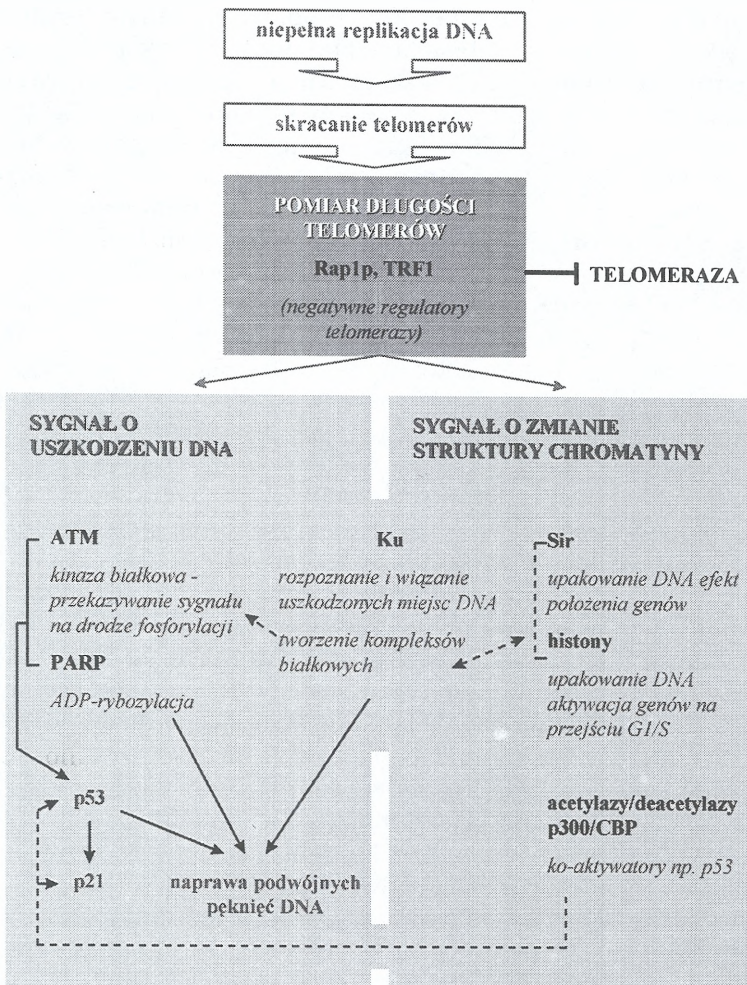
telomerów, jako pierwotną przyczynę procesu starzenia komórek. Wiemy, że telomery pełnią

istotne funkcje w życiu komórki takie jak ochrona przed fuzją i degradacją chromosomów, zakotwiczenie ich w otocze jądrowej, udział w segregacji chromosomów podczas mitozy i regulacja aktywności genów (McCLINTOCK 1940, BLACKBURN 1991, KURENOWA i MASON 1997). O ile pierwsze trzy zadania sugerują jedynie mechaniczne znaczenie zakończeń chromosomów, o tyle ostatnie podnosi sprawę ich aktywnego wpływu na geny. W jaki sposób komórka odbiera informację o długości telomerów? Czy mechanizm „wyczuwający” zmiany długości może także przekazać sygnał do wzrostu aktywności białka p53? Czy na „poinformowaniu” jedynie się kończy, czy też ten sam mechanizm potrafi przeciwdziałać skracaniu telomerów (np. przez aktywację telomerazy)? Odpowiedź na te pytania określiłaby udział telomerów w zjawiskach zarówno prawidłowego zatrzymania proliferacji po czasie wyliczonym podziałami jak i w nieprawidłowym przekroczeniu limitu Hayflicka i uniesmiertelnianiu komórek.

Dane literaturowe wskazują na dwa sposoby zatrzymywania proliferacji przez skracające się telomery: (1) na drodze przekazywania sygnału o uszkodzeniu DNA oraz (2) poprzez zmia-

nę stanu funkcjonalnego chromatyny z transkrypcyjnie nieaktywnego w aktywny (WRIGHT i SHAY 1995). Nie jest wykluczone, że oba te mechanizmy w rzeczywistości współdziałają ze sobą (Ryc. 4).

W pierwszym przypadku, mechanizm „wyczuwający” zmianę długości telomerów generowałby sygnał o uszkodzeniu DNA, który prowadziłby do aktywacji czynnika transkrypcyjnego p53. Ekspresja zależnego od p53 białka p21^{Cip1} uniemożliwiłaby przeprowadzenie fosforylacji białka Rb, a tym samym zablokowałaby syntezę DNA (Ryc. 3). Cykl komórkowy zatrzymałby się w fazie G₁. Tymczasem, p53 powodowałoby także wzrost ekspresji białek uczestniczących w procesach naprawczych DNA (np. GADD45, ang. growth arrest and DNA damage inducible) (MARX 1994, HARRIS 1996). O ile wydarzenia zależne od p53 są dość znane, nadal otwartym pozostaje pytanie, co znajduje się pomiędzy uszkodzeniem DNA (tu: skróconym telomerem) a białkiem p53? Poszukiwane białko powinno mieć domenę rozpoznającą uszkodzony fragment DNA oraz domenę wiążącą DNA. Powinno także wykazywać aktywność katalityczną umożliwiającą post-translacyjną modyfikację na



Rys. 4. Molekularne podstawy telomero-
wej hipotezy starzenia komórek.

Skracanie telomerów w wyniku niepełnej replikacji liniowego DNA może być odbierane jako sygnał o uszkodzeniu DNA lub jako sygnał o zmianie struktury chromatyny. Elementy obu tych szlaków oddziałują na siebie, przy czym białkiem „na rozdrożu” jest Ku.

przykład fosforylację, rozpoczynającą kaskadę sygnałów do efektorów (np. p53, Rb).

Sądzi się, że w rozpoznawaniu uszkodzeń DNA i przekazywaniu sygnału do p53 biorą udział co najmniej dwa białka: ATM (ang. AT mutated, produkt genu *ATM*, którego mutacja prowadzi do zespołu ataxia telangiectasia) oraz PARP (ang. poly ADP-ribose polymerase, enzym przenoszący grupę ADP-rybozy z NAD^+ na substrat). Oba występują w jądrach komórkowych u większości Eukaryota, z wyjątkiem drożdży, które nie posiadają PARP.

Produkt genu *ATM* wykazuje aktywność kinazy białkowej zależnej od DNA. W komórkach ssaczych, stanowi katalityczną podjednostkę dużego kompleksu enzymatycznego, w skład którego wchodzi białko Ku, rozpoznające w DNA miejsca podwójnych pęknięć. Za sprawą białka Ku, kompleks wiąże się z tępyimi lub wystającymi końcami DNA oraz ze strukturami szpilki do włosów. Uczestniczy w procesach naprawy i rekombinacji DNA chroniąc je przed nukleolityczną degradacją (JACKSON i JEGGO 1995, SHORE 1998, BERTUCH i LUNDBLAD 1997). *ATM*, będąc kinazą białkową, może fosforylować substrat związany z DNA na przykład czynnik transkrypcyjny czy polimerazę. Niestety, brak bezpośrednich dowodów na to, że p53 jest dlań substratem.

O regulacyjnej funkcji *ATM* względem p53 wnosi się zatem na podstawie doświadczeń przeprowadzonych na fibroblastach ze zmutowanym genem *ATM* (w skrócie: fibroblasty AT). Fibroblasty AT wykazują upośledzenie mechanizmów naprawczych, niestabilność genomu, nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące, przyspieszony proces starzenia komórkowego i równie przyspieszone tempo skracania telomerów! Nie wykazano w nich typowej odpowiedzi na podwójne pęknięcia DNA — zamiast szybkiego wzrostu poziomu i aktywności białka p53, obserwowano opóźnioną i zredukowaną reakcję. Wyniki te sugerują, że uszkodzenie genu *ATM* wpływa na upośledzenie punktu kontrolnego cyklu, w którym p53 odgrywa kluczową rolę (ENOCH i NORBURY 1995).

Z drugiej strony, starzejące się fibroblasty AT wykazują podwyższoną aktywność transkrypcyjną p53, mimo niskiego poziomu tego białka. Powodem wzrostu aktywności bez akumulacji p53 może być jego post-translacyjna modyfikacja. Zwiększony okres półtrwania wykazuje także białko p21^{Cip1}. Oba te fakty wskazują na nieprawidłową regulację białek p53 i p21^{Cip1} przyspieszającą starzenie komórek ze zmutowanym genem *ATM*. O zależności białek p53 i p21^{Cip1} od *ATM* podczas starzenia *in vitro* świadczy także to, że fibroblasty AT pozbawione

ekspresji białek p53 lub p21^{Cip1} nie wykazują cech przyspieszonego starzenia i proliferują w tym samym tempie, co normalne fibroblasty (VAZIRI i współaut. 1997, Xu i współaut. 1998).

Drugim z proponowanych białek uczestniczących w przekazywaniu informacji o uszkodzeniu DNA jest PARP. Występuje ono w jądrach większości komórek eukaryotycznych z wyjątkiem drożdży. PARP wiąże się z uszkodzonym DNA i przeprowadza syntezę polimerów ADP-rybozy. Tworzą one ujemnie naładowane łańcuchy, które rozpychają nici DNA i ekspozycją miejsca przeznaczone do naprawy (LINDAHL i współaut. 1995). Rola PARP nie ogranicza się tylko do zmian struktury chromatyny. Pokazano, że zarówno *in vitro* jak i *in vivo* możliwe jest tworzenie kompleksów p53 z PARP. Zaproponowano, że poli ADP-rybozylacja zwiększa aktywność p53 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA i przyczynia się do zahamowania proliferacji. Potwierdzeniem tej hipotezy był fakt, że inhibitory PARP znosiły zależność od p53 ekspresję białka p21^{Cip1}, czemu towarzyszyło zwiększenie liczby podziałów komórki (VAZIRI i współaut. 1997).

Drugim wspomnianym sposobem zatrzymywania proliferacji przez skracający się telomer jest, jak się sugeruje, aktywacja genów leżących w subtelomerowym obszarze chromosomu (Ryc. 4). Obszar ten stanowi część wysoce skondensowanej, a więc transkrypcyjnie nieaktywnej struktury zwanej heterochromatyną, która ulega replikacji pod koniec fazy S (upakowanie DNA w komórce: KŁYSZEJKO-STAFANOWICZ 1995a). Wywołane skracaniem telomeru rozluźnienie chromatyny prowadziłoby do aktywacji wyciszonych genów kodujących na przykład kinazy czy fosfatazy białek regulatorowych cyklu komórkowego.

Poparcie tej hipotezy znaleziono obserwując drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Około-telomerowy obszar ich genomu utrzymywany jest w stanie transkrypcyjnie nieaktywnym dzięki współdziałaniu histonów i białek Sir (ang. silent information regulatory proteins), które wiążą dwuniciowy obszar telomerowego DNA (KURENOWA i MASON 1997). Histony H4, H3, H2A i H2B tworzą oktamer, przypominający dodatnio naładowaną szpulkę, na którą nawinięta jest ujemnie naładowana nić DNA. Za upakowanie chromatyny w struktury wyższego rzędu odpowiada kompleks białek Sir. Zaobserwowano, że represja aktywności genów nie zależy od rodzaju, ale od położenia tych genów (ang. telomere position effect). Gen wprowadzony w subtelomerowy obszar DNA ulega wyciszaniu, a najciekawsze jest to, że zasięg wyciszania (obszar heterochromatynowy) zależy od długości telomeru (GOTTSCHLING i współaut. 1990)!

Warto zwrócić uwagę na fakt, że białka Sir nie posiadają domeny wiążącej DNA (GRUNSTEIN 1997). Wymagają więc platformy, na której mogłyby spełniać swoje funkcje. Histony wiążąc DNA i tworząc kompleksy z białkami Sir stanowią miejsce regulacji struktury chromatyny. Na przykład acetylacja histonu H4, neutralizuje pozytywny ładunek białka, przyczyniając się do odłączenia par H2A z H2B z oktameru i osłabienia wiązania histon-DNA, co w rezultacie rozluźnia chromatynę odsłaniając miejsca regulatorowe dla czynników transkrypcyjnych (GRUNSTEIN 1992). Ale histony nie są jedynymi białkami, z którymi białka Sir tworzą kompleksy. Rolę platformy mogą bowiem spełniać cząsteczki białka Rap1p (ang. repressor-activator protein 1) uznane za podstawowy element mechanizmu określającego długość telomerów (MARCAND i współaut. 1997). Oznacza to, że istnieje związek między „wyczuwaniem” długości telomeru a kontrolą aktywności genów położonych w subtelomerowym obszarze. Uważa się, że właśnie białko Rap1p warunkuje istnienie heterochromatyny na terenie telomeru, gdyż na platformie Rap1p budowany jest wielobiałkowy kompleks białek Sir (Sir2, Sir 3, Sir4) stabilizowany histonami (H4, H3) (GRUNSTEIN 1997). Wraz ze skracaniem telomerów, obserwuje się zmniejszanie liczby związanych z DNA cząsteczek białka Rap1p, co ogranicza możliwość wiązania cząsteczek białka Sir, a tym samym wpływa na rozluźnianie struktury chromatyny.

Chyba najbardziej zaskakującym odkryciem z dziedziny metabolizmu telomerów było pokazanie możliwości powstawania kompleksu między białkami Sir i Ku (TSUKAMOTO i współaut. 1997)! Znalezione więc wspólne elementy szlaku wiodącego do zmian struktury chromatyny i szlaku naprawy podwójnych pęknięć DNA (JACKSON 1997). Pokazano, że nie ma pełnego efektu wyciszania genów przez białka Sir bez funkcjonalnego Ku i nie ma optymalnych warunków do naprawy podwójnych pęknięć DNA przez białko Ku, gdy nie towarzyszą mu białka Sir (TSUKAMOTO i współaut. 1997, BOULTON i JACKSON 1998). Zaproponowano, że białko Ku rekrutuje białka Sir do telomerowego DNA i w ten sposób wywołuje lokalną zmianę struktury chromatyny. Wydaje się, że pełny efekt wyci-

szania genów przez białka Sir możliwy jest dopiero po upakowaniu końca telomeru w heterochromatynową strukturę za sprawą kompleksu białek Sir i Ku. Z drugiej strony, zlokalizowane unieruchomienie DNA w miejscu rozpoznanego uszkodzenia ułatwia naprawę, gdyż ekspozycja na działanie enzymów naprawczych, a przy tym hamuje niesprzyjające naprawie procesy jak na przykład transkrypcja (JACKSON 1997).

U drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, białka Rap1p, Sir i Ku wydają się być pierwszymi efektorami zmian długości telomerów w związku z niepełną replikacją DNA. Na tym poziomie rozchodzą się drogi sygnału do naprawy DNA lub aktywacji wyciszonych genów. Czy te same mechanizmy zaangażowane są w regulację aktywności telomerazy? Dzięki zachowaniu równowagi między skracaniem telomerów w wyniku niepełnej replikacji a syntezą nowych odcinków po aktywacji telomerazy, długość telomerów drożdży utrzymywana jest na stałym poziomie (czego nie można powiedzieć o komórkach ssaczych!). Informacja o długości telomerów zawarta jest w liczbie cząsteczek białka Rap1p związanych z DNA. Te z nich, które nie są zaangażowane w tworzenie heterochromatyny z białkami Sir, tworzą kompleksy z białkami Rif1p i Rif2p (ang. Rap1p interacting factor proteins) pełniąc funkcję inhibitora telomerazy. Zmniejszenie liczby cząsteczek Rap1p na telomerowym DNA znosi blokadę enzymu. Telomeraza dosyntetyzuje powtórzenia TG₁₋₃ serwując miejsca dla wiązania brakujących Rap1p. Pod tym względem, komórka drożdżowa jest nieśmiertelna... Ciekawe, czy analogiczny proces aktywacji telomerazy można zaobserwować w przypadku unieśmiertelniania komórek ssaczych?

W komórkach ssaczych funkcję białka Rap1 pełni białko TRF1. Wspomniane wcześniej białko Ku nie działa niezależnie, ale jest podjednostką dużego kompleksu kinazy białkowej zależnej od DNA, będącej produktem genu z rodziny ATM. Nie stwierdzono natomiast w komórkach ssaczych obecności białek odpowiadających kompleksom Sir, choć znaleziono pewną homologię między białkiem Sir 4 a laminem blaszki jądrowej.

MOLEKULARNE PODSTAWY TELOMEROWEJ HIPOTEZY STARZENIA LUDZKICH KOMÓREK — PODSUMOWANIE

W świetle przedstawionych prac, metabolizm telomerów wpływa na regulację proliferacji. Dynamiczna równowaga między efektem nie-

pełnej replikacji a aktywacją telomerazy określa w życiu komórki różne fazy: (1) fazę podziałów komórkowych kontrolowanych sprawnymi sy-

stemami Rb/p16^{INK4a} i p53/p21^{Cip1} (2) fazę starzenia replikacyjnego z nadmiernymi aktywnościami p53, p21^{Cip1}, p16^{INK4a} oraz (3) fazę immortalizacji z zablokowaną drogą Rb/p16^{INK4a} i aktywną telomerazą.

Długie telomery młodych, prawidłowych komórek somatycznych są miejscem wiązania dużej liczby cząsteczek TRF1 hamujących aktywność telomerazy (STEENSEL i LANGE 1997). Negatywnym regulatorem telomerazy jest także funkcjonalne białko Rb (Xu i współaut. 1997). Rzeczywiście, w prawidłowych komórkach somatycznych aktywność telomerazy ulega represji lub jest utrzymywana na niskim poziomie (BUCHKOVICH i GREIDER 1996, PAN i współaut. 1997), przez co dynamiczna równowaga pomiędzy niepełną replikacją a syntezą DNA przesuwają się w stronę skracania telomerów.

Do wystających końców 3' DNA dołączają cząsteczki białka Ku z resztą kompleksu kinazy białkowej. Sugeruje się, że białko Ku lokalnie wycisza transkrypcję (inaktywacja polimerazy RNA II) i uczestniczy w tworzeniu obszarów heterochromatynowych unieruchamiających uszkodzone fragmenty DNA. Niewykluczone, że rolę drożdżowych białek Sir w komórkach ludzkich odgrywają białka blaszki jądrowej, które zakotwiczą domeny chromatynowe i są niezbędne do inicjacji replikacji DNA (o laminach patrz: KŁYSZEJKO-STAFANOWICZ 1995b).

Prolifercja trwa. Swoisty mecz na granicy G₁/S rozgrywają acetylazy i deacetylazy histonowe, których zadaniem jest kontrola upakowania chromatyny. Aktywne, nieufosforylowane białko Rb utrzymuje przy chromatynie deacetylazę histonową, która uszczelnia strukturę chromatyny czyniąc ją transkrypcyjnie nieaktywną (LUO i współaut. 1998). Pod wpływem kinaz, Rb ulega inaktywacji i zwalnia deacetylazę. Teraz możliwe jest przeprowadzenie acetylacji histonów przez białka z rodziny p300/CBP (SHIKAMA i współaut. 1997, GILES i współaut. 1998). Niewykluczone, że kinazą aktywującą białka p300/CBP jest właśnie ATM. Chromatyna staje się transkrypcyjnie aktywna (AIT-SI-ALI i współaut. 1998).

Ale z cyklu na cykl telomery skracają się. Towarzyszy temu zmniejszanie liczby związanych z DNA cząsteczek białka TRF1. Zmniejsza się także zapotrzebowanie na enzymy acetylujące histony (p300/CBP). Warto w tym miejscu zauważyć, że od stężenia dostępnych aktywnych cząsteczek p300/CBP zależy efekt aktywacji p53, a tym samym szybkość proliferacji (AIT-SI-ALI i współaut. 1998, AVANTAGGIATI i współaut. 1997, LILL i współaut. 1997). Rzeczy-

wiście, obserwuje się zależny od ATM wzrost aktywności białka p53, co może odpowiadać za wydłużanie fazy syntezy DNA z każdą rundą replikacyjną. Dodatkowo, nakłada się efekt akumulacji stabilnych transkryptów p16^{INK4a} w obecności ufosforylowanej, nieaktywnej formy Rb (ROBLES i ADAMI 1998).

Wraz ze skracaniem telomerów zmienia się ich oddziaływanie z laminami blaszki jądrowej, co prowadzi do zaburzeń struktury heterochromatyny telomerowej, a być może także sposobu zakotwiczenia chromosomów. ATM, dzięki aktywności kinazy białkowej, hamuje polimerazę RNA wyciszając lokalnie transkrypcję. Białko Ku rekrutuje enzymy naprawy podwójnych pęknięć DNA. Prawdopodobnie na tym etapie do telomerowego DNA dołącza także białko PARP. Syntetyzuje polimery ADP-rybozy eksponujące uszkodzone miejsca. Równocześnie modyfikacje post-translacyjne białka p53 (fosforylacja, ADP-rybozylacja, kompleksowanie z ko-aktywatorem p300) stabilizują je i uaktywniają. Wzrasta poziom zależnego od p53 białka p21^{Cip1}. Trwa akumulacja białka p16^{INK4a}. Komórka przestaje się dzielić.

Na starzeniu jednak rola telomerów się nie kończy. Wymuszenie dalszych podziałów na komórce przez na przykład inaktywację białka p53 za pomocą białka onkogenego HPV E6 oraz białka Rb za pomocą HPV E7, prowadzi do dalszego skracania telomerów, gdyż nadal występuje efekt niepełnej replikacji. Dochodzi do licznych aberracji chromosomowych w związku z łąčeniem końców skróconych telomerów i ich niewłaściwą segregacją podczas mitozy. Znacznie wzrasta śmiertelność wśród komórek. Do immortalizacji bowiem potrzebna jest oprócz inaktywacji drogi Rb/p16^{INK4a} także aktywacja telomerazy (KIYONO i współaut. 1998). A biorąc pod uwagę fakt, że pierwszy warunek spełniają białka onkogenne czy produkty genów supresorów nowotworu, a drugi jest możliwy do spełnienia, gdyż liczba cząsteczek TRF1 określających długość telomeru i blokujących aktywność telomerazy istotnie spadła — spełnienie snu o nieśmiertelności jest tuż tuż...

Regulacja aktywności telomerazy przez zmianę ilości cząsteczek TRF1 związanych z DNA, realizowana jest dzięki tankyrazie, enzymowi katalizującemu ADP-rybozylację (PENNISI 1998, SMITH i współaut. 1998). Tankyraza wiąże TRF1 i przenosi cząsteczkę ADP-rybozy z NAD⁺ na niego i siebie. Wtedy TRF1 po prostu „odpada” od DNA umożliwiając telomerazie wydłużenie końca 3 telomerowego DNA przed rozpoczęciem replikacji (Ryc. 2). Niekontrolowany syg-

nał do proliferacji przy włączonej ochronie genomu w postaci aktywnej telomerazy sprawia, że komórka staje się nieśmiertelna!

I pomyśleć, że przed Barbarą McClintock telomery uważano za nikomu niepotrzebne, za przeproszeniem, końcówki chromosomów...

TELOMERES IN REGULATION OF PROLIFERATION AND CELL AGEING

Summary

Cellular senescence is defined as the limited capacity of normal somatic cells to divide beyond a finite number of population doublings. The telomere hypothesis of cellular ageing provides a model of "molecular clock" that counts cell divisions. It is assumed that incomplete replication of linear DNA molecules causes progressive loss of chromosome termini (telomeres) and activates the pathway that results in cell exit from the cycle. The p53, p21^{Cip21}, Rb, p16^{INK4a} proteins and their downstream effectors are likely to be involved in the pathway of telomere length response.

The telomere length sensing mechanism has been shown to share components that are common with the machinery of chromatin organization and DNA repair. The linkage of proteins counting telomere length, Rap1p (*S. cerevisiae*) or TRF1 (human), to proteins that are upstream of p53 and Rb, namely ATM, PARP and Ku, is discussed. The review presents a hypothetical transduction of the signal induced by shortened telomeres to the cell cycle regulators, pointing out the particular role played by chromatin organization established by histones.

LITERATURA

- AIT-SI-ALI S., RAMIREZ S., BARRE F. X., DKHISI F., MAGNAGHI-JAULIN L., GIRAULT J. A., ROBIN P., KNIBIEHLER M., PRITCHARD L. L., DUCOMMUN B., TROUCHE D., HAREL-BELLAN A., 1998. *Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A*. *Nature* 396, 184-186.
- AVANTAGGIATI M. L., OGRYZKO V., GARDNER K., GIORDANO A., LEVINE A. S., KELLY K., 1997. *Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways*. *Cell* 89, 1175-1184.
- BAISCH H., OTTO U., 1993. *Intratumoral heterogeneity of S phase transition in solid tumours determined by bromodeoxyuridine labelling and flow cytometry*. *Cell Prolif.* 26, 439-448.
- BERTUCH A., LUNDBLAD V., 1997. *Telomeres and double-strand breaks: trying to make ends meet*. *Trends in Cell Biol.* 8, 339-341.
- BLACKBURN E. H., 1991. *Structure and function of telomeres*. *Nature* 350, 569-572.
- BOND J., HAUGHTON M., BLAYDES J., GIRE V., WYNFORD-THOMAS D., WYLLIE F., 1996. *Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence*. *Oncogene* 13, 2097-2104.
- BOULTON S. J., JACKSON S. P., 1998. *Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing*. *EMBO J.* 17, 1819-1828.
- BUCHKOVICH K. J., GREIDER C. W., 1996. *Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells*. *Molec. Biol. Cell* 7, 1443-1454.
- CUMMINGS M. C., WINTERFORD C. M., WALKER N. I., 1997. *Apoptosis*. *Am. J. Surgical Pathol.* 21, 88-101.
- ENOCH T., NORBURY C., 1995. *Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM*. *TIBS* 20, 426-430.
- EVAN G., BROWN L., WHYTE M., HARRINGTON E., 1995. *Apoptosis and the cell cycle*. *Curr. Opin. in Cell Biol.* 7, 825-834.
- GILES R. H., PETERS D. J., M., BREUNING M. H., 1998. *Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease*. *TIG* 14, 178-183.
- GOTTSCHLING D. E., APARICIO O. M., BILLINGTON B. L., ZAKIAN V. A., 1990. *Position effect at S. cerevisiae telomeres: reversible repression of PolII transcription*. *Cell* 63, 751-762.
- GREIDER C. V., BLACKBURN E. H., 1985. *Identification of specific terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. *Cell* 43, 405-413.
- GREIDER C. V., HARLEY C. V., 1996. *Telomeres and telomerase in Cell Senescence and immortalization*. [W:] *Cellular Aging and Cell Death*. Wiley-Lyss, Inc., str. 123-138.
- GRUNSTEIN M., 1992. *Histones as regulators of genes*. *Scientific American* (October), 40-47.
- GRUNSTEIN M., 1997. *Molecular models for heterochromatin in yeast*. *Curr. Opin. in Cell Biol.* 9, 383-387.
- HARLEY C. B., VAZIRI H., COUNTER C. M., ALLSOP R. C., 1992. *The telomere hypothesis of cellular aging*. *Exp. Gerontol.* 27, 375-382.
- HARRIS C. C., 1996. *Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies*. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1442-1455.
- HAYFLICK L., 1965. *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains*. *Exp. Cell Res.* 37, 614-636.
- HAYFLICK L., MOORHEAD P. S., 1961. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- JACKSON S. P., JEGGO P. A., 1995. *DNA double-strand break repair and D(V)J recombination: involvement of DNA-PK*. *TIBS* 20, 412-415.
- JACKSON S. P., 1997. *Silencing and DNA repair connect*. *Nature* 388, 829-830.
- KELEKAR A., THOMPSON C. B., 1998. *Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis*. *Trends in Cell Biol.* 8, 324-330.
- KIVONO T., FOSTER S., KOOP J. I., MCDUGALL J. K., GALLOWAY D. A., KLINGELHUTZ A. J., 1998. *Both Rb/p16^{INK4a} inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells*. *Nature* 96, 84-88.
- KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., 1995a. *Rozdz. 13 „Chromatyna jej struktura oraz DNA”* [W:] *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych*. PWN, Warszawa, str. 349-400.
- KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., 1995b. *Rozdz. 10 „Otoczka jądrowa”* [W:] *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych*. PWN, Warszawa, str. 276-282.
- KOUZARIDES T., 1995. *Functions of pRb and p53: what's the connection?* *Trends in Cell Biol.* 5, 448-450.
- KURENOWA E. W., MASON D. M., 1997. *O funkcjach telomerów*. *Biochimija* 62, 1453-1466.
- LILL N. L., GROSSMAN S. R., GINSBERG D., DECAPRIO J., LIVINGSTON D. M., 1997. *Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators*. *Nature* 387, 823-827.
- LINDAHL T., SATOH M. S., POIRIER G. G., KLUNGLAND A., 1995. *Post-translational modification of poly (ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks*. *TIBS* 20, 405-411.

- LUO R. X., POSTIGO A. A., DEAN D. C., 1998. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92, 463–473.
- LYDALL D., WEINERT T., 1995. Yeast Checkpoint Genes in DNA Damage Processing: Implications for Repair and Arrest. *Science* 270, 1488–1491.
- MARCAND S., GILSON E., SHORE D., 1997. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 275, 986–990.
- MARX J., 1994. New link found between p53 and DNA repair. *Science* 266, 1321–1322.
- MCCLINTOCK B., 1940. The stability of broken ends of chromosomes in *zea mays*. *Genetics* 26, 234–282.
- OLOVNIKOV A. M., 1973. A theory of Marginotomy. *J. Theoret. Biol.* 14, 181–190.
- PAN C., XUE B.-H., ELLIS T. M., PEACE D. J., DIAZ M. O., 1997. Changes in telomerase activity and telomere length during human T lymphocyte senescence. *Exp. Cell Res.* 231, 346–353.
- PANDEY S. i WANG E., 1995. Cells en route to apoptosis are characterized by the upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdc2 and Rb phosphorylation, resembling events of early cell cycle traverse. *J. Cellul. Biochem.* 58, 135–150.
- PENNISI E., 1998. A possible new partner for telomerase. *Science* 282, 1395–1396.
- ROBLES S. J., ADAMI G. R., 1998. Agents that cause double strand breaks lead to p16^{INK4a} enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113–1123.
- SEKIGUCHI T., HUNTER T., 1998. Induction of growth arrest and cell death by overexpression of the cyclin-cdk inhibitor p21 in hamster BHK21 cells. *Oncogene* 16, 369–380.
- SHACKNEY S. E., SHANKEY V., 1999. Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology: Exploring new dimensions. *Cytometry* 35, 97–116.
- SHAY J. W., 1997. Telomerase in human development and cancer. *J. Cellul. Physiol.* 173, 266–270.
- SHIKAMA N., LYON J., LA THANGUE B., 1997. The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends in Cell Biol.* 7, 230–236.
- SHORE D., 1998. Telomeres-unsticky ends. *Science* 281, 1818–1819.
- SIKORA E., 1993. Nieśmiertelność starzenie i śmierć komórek. Rola protoonkogenów, onkogenów i antyonkogenów. *Post. Biochem.* 39, 212–220.
- SIKORA E., 1994a. Transcription factors in cellular senescence and death. *Acta Biochim. Polon.* 40, 389–393.
- SIKORA E., 1994b. Apoptoza. *Post. Biochem.* 40, 150–160.
- SMITH S., GIRIAT I., SCHMITT A., DE LANGE T., 1998. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484–1487.
- STEENSEN VAN B., DE LANGE T., 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740–743.
- TSUKAMOTO Y., KATO J., IKEDA H., 1997. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 388, 900–903.
- VAZIRI H., WEST M. D., ALLSOPP R. C., DAVISON T. S., WU Y. S., ARROWSMITH C. H., POIRIER G. G., BENCHIMOL S., 1997. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly (ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* 16, 6018–6033.
- XU H. J., ZHOU Y., JI W., PERNG G. S., KRUELOCK R., KONG C. T., BAST R. C., MILLS G. B., LI J., HU. S. X., 1997. Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* 15, 2589–2596.
- XU Y., YANG E. M., BRUGAROLAS J., JACKS T., BALTIMORE D., 1998. Involvement of p53 and p21 in cellular defects and tumorigenesis in *Atm*^{-/-} mice. *Molec. Cellul. Biol.* 18, 4385–4390.
- WRIGHT W. E., SHAY J. W., 1995. Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends in Cell Biol.* 5, 293–296.