

JACEK M. WITKOWSKI

Katedra i Zakład Fizjopatologii
Akademia Medyczna w Gdańsku
Dębinki 7, 80-211 Gdańsk
e-mail: jawit@amedec.amg.gda.pl.

„Nie jest zaś prawdopodobne, by natura, która wszystkie poprzednie okresy życia doskonale przeprowadziła, niby akty pięknej sztuki, zlekceważyła, jak niewprawy poeta, jego akt ostatni.”

(Cyceron, Katon Starszy o starości. wyd. Unia Wydawnicza „Verum”, Warszawa 1996)

GENETYKA DŁUGOWIECZNOŚCI — CZY CHCEMY I MOŻEMY POWSTRZYMAĆ STARZENIE SIĘ

WSTĘP

Powyższe słowa włożył Rzymianin Cyceron w usta Katona Starszego ponad dwa tysiące lat temu. Brzmia one aktualnie także dzisiaj, gdyż wyrażają przekonanie o naturalnej — a więc biologicznej — kontroli wszystkich etapów ludzkiego życia i funkcjonowania organizmów na różnych poziomach od narządowego, poprzez tkankowy i komórkowy, aż na molekularnym kończąc. Koresponduje z nim wyrażana przez większość gerontologów opinia, że czas przeżycia osobników danego gatunku jest nie tylko funkcją wielkości ciała, pozycji w łańcuchu pokarmowym oraz swoistych dla tego gatunku patologii, ale przede wszystkim cechą dziedziczną, wytworzoną w czasie ewolucji prowadzącej do jego powstania.

Obecnie istnieje kilkaset (!) teorii próbujących wyjaśnić przyczyny zachodzenia zjawisk, które określamy jako starzenie się organizmów i które, jak się przyjmuje, prowadzą do ich śmierci i zastępowania pokoleń, nawet w przypadku braku śmiertelnych procesów chorobowych i wypadków. Jedną z wiodących przez wiele lat teorii dotyczących przyczyn starzenia się była teoria nagromadzenia mutacji somatycznych, a więc zachodzących w komórkach innych niż rozrodcze i, nie przekazywanych w związku z tym z pokolenia na pokolenie. Jednak pomimo intensywnych, częściowo skutecznych poszukiwań takich mutacji, zebrane na ten temat dane są bardzo skąpe w porównaniu na

przykład z obfitością danych dotyczących somatycznej genetyki nowotworów. Praktycznie, brak jak dotychczas przykładów swoistych, zależnych od wieku uszkodzeń genomu komórkowego (SCHACHTER 1998), z wyjątkiem danych mówiących o znacznych zmianach w chromosomach fibroblastów, które przestały się już dzielić w hodowlach *in vitro* (MACIEIRA-COELHO 1995). Z innych najbardziej znanych starszych teorii można wymienić teorię lawiny (czy kaskady) błędów w odczycie informacji genetycznej, teorię gromadzenia się nieusuwalnych produktów odpadowych przemiany materii, które ostatecznie uniemożliwiają (lub czynnie hamują) prawidłowy metabolizm, i wreszcie teorię zegara biologicznego. Ta ostatnia stanowi, że starzenie się jest naturalnym składnikiem życia wymuszonym przez procesy ewolucyjne i kontrolowanym przez mniej lub bardziej specyficzne mechanizmy komórkowe. A te z kolei zależą od czynności genów, co sprowadza ową teorię do założenia, że w każdej komórce istnieje gen lub zespół genów, których „fizjologiczną” czynnością jest taka przemiana metabolizmu tejże komórki, która powoduje jej biologiczną starość i w konsekwencji śmierć. Nasilenie tych procesów u osobników w zaawansowanym (dla danego gatunku) wieku prowadzi do osobniczego starzenia się. Oczywiście, że sformułowanie takiej teorii zrodziło natychmiast próby określenia, jaki to gen czy ich zespół jest odpowiedzial-

ny za starzenie się. Aby jednak mówić o genie — czy genach — starzenia, należy wprawdzie określić, jakie zjawiska są rzeczywistymi składnika-

mi tego procesu, a jakie są „tylko” nałożoną nań patologią.

NA CZYM POLEGA STARZENIE SIĘ KOMÓREK?

Wszystkie procesy jakie zachodzą podczas naszego życia, a w szczególności te kształtujące nasz organizm i podtrzymujące jego trwanie, zależą bezpośrednio od precyzyjnego w czasie i przestrzeni odwzorowania informacji zawartej w kodzie genetycznym, zapisanym trójkami nukleotydów w łańcuchach DNA na białka. Te zaś są zarówno elementami budulcowymi, jak i narzędziami do budowy; odbiornikami, jak i nadajnikami biologicznie ważnych sygnałów, czyli wszystkim, co decyduje o przejawach życia jakie znamy. A przejawy te na poziomie komórkowym, to przede wszystkim zdolność do wymiany informacji i materii z otoczeniem, do wzrostu i do podziału. I właśnie te podstawowe dla życia komórek procesy — a przez to również dla naszego osobniczego biologicznego życia — są w mniejszym lub większym stopniu upośledzone u osobników, których czas życia przekroczył 3/4 średniego czasu przeżycia charakterystycznego dla danego gatunku. Populacja osobników w tym okresie życia, określanym jako „starość”, charakteryzuje się bardzo wysokim współczynnikiem ryzyka umieralności co w uproszczeniu oznacza, że osoby w podeszłym wieku umierają częściej niż młodzi ludzie. Kluczowym parametrem tego współczynnika jest tak zwany czas podwajania umieralności (ang. mortality rate doubling time, MRDT). Wynosi on dla ludzi około 8 lat, podczas gdy dla myszy tylko około 4 miesiące. Ciekawe, że wśród naczelnych wielkość MRDT jest zbliżona (np. u makaków wynosi prawie dokładnie 8 lat, a więc tyle samo co u ludzi), podczas gdy maksymalny czas przeżycia osobników gatunku jest zróżnicowany i wspomniane makaki żyją średnio trzykrotnie krócej niż ludzie. O szybkości starzenia się wydają się więc decydować także inne właściwości biologiczne gatunku (MILLER 1993).

Jednym z najbardziej charakterystycznych zjawisk towarzyszących starzeniu się jest zmniejszona zdolność do proliferacji (namnażania się) komórek narządów i tkanek. Wiąże się z tym zmniejszenie ich masy i liczebności komórek je budujących. Konsekwencją tego może być zmniejszenie czynności danego narządu, zarówno w warunkach względnego spoczynku, jak też zwłaszcza w sytuacjach wymagających zwiększonej pracy (przy czym za „pracę” należy tu uważać nie tylko mechaniczną pracę mięśni, ale także na przykład metaboliczną pracę wą-

troby lub nadzorczą układu odpornościowego. Starzenie się, polegające na zmniejszaniu się czynności danej tkanki czy narządu, dotyczy jednak także i tych typów komórek, które w dojrzałym organizmie normalnie nie dzielą się. Najbardziej typowymi przykładami są tutaj komórki nerwowe — neurony, komórki wątroby — hepatocyty, a także te spośród limfocytów T, które po uzyskaniu kompetencji immunologicznej przez długi czas, nawet porównywalny z długością życia osobniczego, nie napotykały swoistego dla siebie antygeny. W takich komórkach starzenie się ma charakter zmian metabolicznych nie związanych z procesami replikacji DNA i podziału komórki. Uświadomienie sobie tego pozwala na wyróżnienie dwóch — częściowo dopełniających się — form procesu starzenia, które można określić jako starzenie proliferacyjne (ang. replicative senescence, stopniowa utrata zdolności do podziałów komórkowych) i starzenie metaboliczne (inne procesy, zmniejszające lub zaburzające wydolność życiową komórki, a przez to organizmu).

Pierwsza forma starzenia się określona jest przez tak zwany limit Hayflicka (HL) — skończoną liczbę podziałów, jakim może ulec (*in vitro*, a przypuszczalnie także *in vivo*) normalna (nie nowotworowa) komórka. Liczba ta jest mniejsza dla komórek pochodzących od organizmów z gatunków krótko żyjących, a większa dla komórek gatunków bardziej długowiecznych. Ponadto, hodowane *in vitro* komórki pochodzące od starych osobników danego gatunku dzielą się mniej razy, niż takie same komórki pochodzące od osobników młodych, które, jak się przypuszcza, w ciągu dotychczasowego życia osobnika „zużyły” mniejszą część z „zaprogramowanej” dla siebie liczby podziałów. Powstaje oczywiście pytanie, na czym polega to „zaprogramowanie” liczby podziałów komórkowych i gdzie w komórce znajduje się „licznik”, który je kalkuluje. Jak wynika z badań pochodzących z ostatnich kilku lat, takim licznikiem mogą być tak zwane telomery, a dokładnie proces ich skracania się związany z każdym podziałem komórki (EFFROS 1998). Telomery są to charakterystyczne, powtarzające się wielokrotnie sekwencje nukleotydów w DNA znajdującym się na końcach chromosomów, służące do stabilizacji ich struktury oraz przytwierdzenia końców chromosomów do otoczki jądrowej. Z mechanizmu replikacji DNA

poprzedzającej podział każdej komórki wynika, że odcinek telomeru, od którego rozpoczyna się replikacja danej nici podwójnej helisy DNA nie jest replikowany i ulega skróceniu z każdym podziałem o tę samą liczbę nukleotydów. Komórki dochodzące do limitu Hayflicka mają mieć telomery tak krótkie, że przestają one spełniać swoje biologiczne funkcje w procesie podziałowym i w komórce włączają się mechanizmy zatrzymujące dalsze podziały. Znałe są jednak komórki, w których skracaniu się telomerów przeciwdziała aktywność specyficznego enzymu — telomerazy, „dobudowującego” ich brakujące końce. Są to przede wszystkim komórki nowotworowe oraz komórki macierzyste (np. szpikowe) — stanowiące nieustannie dzielącą się pulę, z której różnicują się na przykład wszystkie krwinki. Wykrycie aktywności telomerazy w komórkach nie wykazujących cech nowotworowych dostarczyło bodźca do użycia tego enzymu jako czynnika przeciwdziałającego starzeniu proliferacyjnemu, poprzez wprowadzenie genu telomerazy do komórek, które osiągnęły właściwy dla siebie HL. Pozwoliło to na dodatkowe cykle podziałowe, a obecnie (początek 1999) trwają badania mające na celu wyjaśnienie, czy transfekcja genem telomerazy nie spowodowała transformacji nowotworowej badanych komórek. Najnowsze badania wskazują, że brak genu telomerazy jest skojarzony z fenotypem przyspieszonego starzenia, przynajmniej u transgenicznym myszy (KIPLING i FARRAGHER 1999).

Aczkolwiek bardzo efektowne, wyjaśnienie za pomocą teorii skracania telomerów procesów prowadzących do proliferacyjnej starości komórek nie jest jedynym możliwym i badanym. Proces replikacji DNA i podziału komórki (nie w pełni zresztą jeszcze zrozumiały) wymaga interakcji setek białek o różnych właściwościach i funkcjach. Szczególną grupę stanowią tu tak zwane cykliny oraz związane z nimi kinazy — kompleksy białek decydujących o przejściu komórki z jednej fazy cyklu do kolejnej. Jedną z kluczowych cyklin, od której zależy progresja cyklu komórkowego z fazy G1 do S jest cyklina D1. Wykazano, że jej ekspresja, a także aktywność kinazy CDK2 ulega zmniejszeniu w komórkach wątrobowych (hepatocytach) starych szczurów (LIU i współaut. 1998). Bardzo ciekawe są obserwacje dotyczące roli fizjologicznych inhibitorów aktywności kompleksów cyklina-kinaza w uzyskiwaniu przez komórki „starego”, post-replikacyjnego fenotypu. Już kilka lat temu SMITH i PEREIRA-SMITH wykazali, że w hodowanych *in vitro* fibroblastach gromadzi się białko o masie cząsteczkowej około 21 kDa, które nazwali p21sdi. Później stwierdzono, że jest ono

identyczne z białkiem p21cip, którego ekspresja w komórce zależy od aktywacji anty-onkogenu p53 (SMITH i PEREIRA-SMITH 1996) i jest upośledzona w komórkach nowotworowych. Czynność tego białka polega na wiązaniu się z kompleksami cyklina-kinaza i hamowaniu aktywności cdk, a przez to blokowaniu progresji cyklu komórkowego. Nadmiar białka p21sdi/cip może więc należeć do przyczyn proliferacyjnej starości komórek. Niedawno MCCONNELL i współaut. (1998) wykazali, że nadmierna, wywołana drogą transfekcji, ekspresja genu *p21sdi/cip* w młodych ludzkich fibroblastach prowadziła do nabywania przez nie fenotypu starych komórek, na który składało się zmniejszenie zdolności do proliferacji, charakterystyczne zmiany kształtu, pojawienie się formy nie ufosforylowanej (hamującej podziały komórkowe) innego anty-onkogenu — białka Rb, nasiloną ekspresją inhibitora aktywatora plazminogenu PAI-1 (patrz niżej) oraz aktywność specyficznego enzymu — beta-galaktozydazy związanej ze starzeniem komórki (SA-beta-gal). Podobne są obserwacje dotyczące limfocytów T podatnych na toczeń (chorobę autoimmunizacyjną) myszy BXSb, w których zgodnie z teorią autorów kolejne rundy aktywacji i proliferacji prowadzą do gromadzenia się białka p21sdi/cip1, a także innych inhibitorów kinaz zależnych od cyklin, takich jak p18INK4 oraz p27Kip1, co wywołuje w tych komórkach objawy starości proliferacyjnej i zmniejsza ich podatność na programowaną śmierć — apoptozę (SABZEVARİ i współaut. 1997).

Powyższe przykłady wskazują, że z fenotypem starzejącej się komórki może być skojarzona zarówno obniżona, jak też nadmierna aktywność niektórych białek. Należy więc podkreślić, że proces starzenia się nie jest tylko „wygaszaniem” metabolicznych funkcji komórki i organizmu. Na poziomie genetycznym objawia się to jako obniżona ekspresja jednych genów przy wzmożonej ekspresji innych. Ten ostatni efekt może jednak zależeć od akumulacji produktu danego genu(ów), a nie od nasilenia jego transkrypcji, a więc może być raczej epigenetycznym procesem niż skutkiem genetycznej struktury organizmu. Jedną z przyczyn takiego gromadzenia może być obserwowane w starzejących się komórkach zmniejszenie aktywności enzymów proteolitycznych które, oprócz roli czysto „trawiennej”, mają także w cytoplazmie ważne zadania regulacyjne, polegające między innymi na usuwaniu białek, które w danym momencie nie są już komórce potrzebne. Przykładem może tu być zmniejszona aktywność proteasomów (wielkich kompleksów enzymów proteolitycznych w cytoplazmie). W limfocytach T obserwowano, że zależne od wieku zmniejszenie produ-

kcji interleukiny2 (IL-2) i innych cytokin może mieć związek ze zmniejszeniem w tych komórkach degradacji białka I-kappa B dokonywanej przez proteasomy; I-kappa B to inhibitor aktyw-

ności czynnika transkrypcyjnego NFkappaB, niezbędnego dla „uruchomienia” syntezy IL-2 (PONNAPPAN 1998).

ZIDENTYFIKOWANE GENY STARZENIA I DŁUGOWIECZNOŚCI

Trzeba rozróżnić geny starzenia, a więc takie, których aktywacja prowokuje w organizmie zmiany odpowiadające fenotypowi starzenia oraz geny długowieczności, o dokładnie przeciwnym działaniu. Możliwe zresztą, że są to allele tych samych genów; wskazują na to między innymi badania na nicieniu *Caenorhabditis elegans*. Należy jednak powiedzieć od razu na wstępie, że tylko niektóre opisane niżej „geny starzenia” wykryte u „niższych” organizmów mają swoje odpowiedniki u zwierząt wyższych i człowieka; dlatego też wielu gerontologów dzieli je na „publiczne”, a więc mające prawdopodobnie uniwersalne, ponadgatunkowe działanie związane z mechanizmami starzenia się i „prywatne”, czyli w jakimś stopniu odpowiedzialne za towarzyszące starzeniu się zmiany występujące wyłącznie u osobników danego gatunku. *C. elegans* jest bardzo dobrym modelem do badań nad genetycznymi wykładnikami wszystkich zjawisk biologicznych (w tym oczywiście procesu starzenia się) ze względu na osiągniętą już przez badaczy tego organizmu kompletną znajomość jego kodu genetycznego, a także losów każdej z mniej niż tysiąca komórek, z których składa się dorosły osobnik tego gatunku. Stosunkowo łatwo więc ustalono drogą selektywnych krzyżówek, że w populacji tych robaków występują polimorficzne allele genów, które w różnych kombinacjach mogą prowadzić do znacznego wzrostu czasu przeżycia osobników. Później wykryto u *C. elegans* gen, którego mutacja doprowadza do wzrostu maksymalnego czasu życia robaków i nazwano go *age-1* (MURAKAMI i JOHNSON 1996). Zgodnie z przewidywaniami ewolucyjnej teorii starzenia, gen *age-1* kontroluje płodność i mutacja wydłużająca czas życia prowadzi do jej zmniejszenia, co odbywa się prawdopodobnie poprzez kontrolę działania innego genu lub genów (MILLER 1993 i JAŻWIŃSKI 1996). W następnych latach odkryto jeszcze około 10 genów, które wydają się wpływać na długowieczność *C. elegans*, w tym między innymi *daf-2*, czyli receptor czynnika wzrostowego homologiczny do ludzkiego receptora insulino-podobnego czynnika wzrostu, czynnik transkrypcyjny *daf-16*, a także całą grupę genów *clk* (JAŻWIŃSKI 1996). Świadczy to o tym, że nawet u najbardziej prymitywnych wielokomórkowców starzenie się i długowieczność są kontrolo-

wane przez większą liczbę genów, która u ssaków i człowieka może osiągać setki, co przepowiedział już CUTLER w połowie lat 70-tych (CUTLER 1975).

Pojedynczy gen *lag1* (ang. longevity assurance gene), którego mutacja zapewnia długowieczność, opisano u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (D'MELLO i współaut. 1994); jego ekspresja zmniejsza się z wiekiem drożdży ocenianym na podstawie liczby podziałów komórki. Sekwencje zbliżone do *lag1* znaleziono także w genomach ssaków, w tym i człowieka (D'MELLO i współaut. 1994). Delecja genu *lag1* w komórkach haploidalnych wydłuża średni i maksymalny czas przeżycia drożdży nawet o 50%, w drodze zwiększenia liczby podziałów jakim może ulec komórka. Gen ten koduje białko transmembranowe zbudowane z 411 aminokwasów, o nie poznany przeznaczeniu.

Niedawno wykryto w mysim genomie gen, któremu nadano wymowną, mitologiczną nazwę *klotho*, a którego mutacja prowadzi do zespołu objawów przypominających proces starzenia się, począwszy od skrócenia okresu przeżycia, poprzez bezpłodność, nasiloną miażdżycę, zaniki skóry, osteoporozę, rozedmę płuc i zaburzenia immunologiczne — w szczególności zanik grasicy (KURO-O i współaut. 1997). Gen *klotho* koduje białko błonowe o jak dotychczas nieznaną funkcję, ale wykazujące pewne cechy receptora błonowego a także enzymu z grupy laktaz.

Jedną z przesłanek, które mogą sugerować genetyczną kontrolę nad zespołem zjawisk metabolicznych, określanym jako starzenie się, może być obserwacja zmian identycznych z „fizjologicznym” starzeniem się, ale dotyczących osób, których metrykalny wiek jest młody, a nawet bardzo młody. W stosunku do wszystkich znanych zaburzeń tego typu poznane jest mniej lub bardziej dokładnie ich genetyczne podłoże — gen lub zespół genów ulegających zmianom o charakterze mutacji. Należy tu wymienić progerię, czyli zespół Hutchinsona-Gilforda, zespół Wernera (mutacja genu *RecQ*-helikazy, enzymu związanego z mechanizmem replikacji DNA (JAŻWIŃSKI 1996) oraz zespół Downa, którego znaną przyczyną jest trisomia chromosomu 21, a który uważany jest również za zespół przyspieszonego starzenia się (MARTIN 1978). Zespoły te

jednak są przez część gerontologów uważane za „naśladujące starzenie”, a nie będące jego przyspieszonym odpowiednikiem.

Znanym ludzkim genem, którego allele kojarzone są z czasem przeżycia, jest gen kodujący izoformę apolipoproteiny E (*APO-E2*) — białka biorącego udział w transporcie, składowaniu i utylizacji cholesterolu w organizmie. Jego wpływ na czas przeżycia może zależeć od zmieniającej się z wiekiem fizjologicznej roli cholesterolu: od znanego, najpoważniejszego czynnika zawału serca w 4 i 5 dekadzie życia do czynnika, którego poziom negatywnie koreluje z częstością występowania nowotworów i śmiertelnością w 9 dekadzie (WEVERLING-RIJNSBURGER i współaut. 1997). Występuje tu efekt tak zwanej kompensacyjnej adaptacji (KA), definiowanej jako długotrwała kompensacja występująca w systemie czy narządzie organizmu w odpowiedzi na niedobory w tym lub innych systemach. Konsekwencją KA jest zmiana wartości lub roli fizjologicznej jakiejś cechy homeostatycznej organizmu, często w kierunku — stanu odległego od tego, który został „zoptymalizowany” przez naturalną selekcję.

Od dawna postulowana jest zależność między długowiecznością a posiadaniem pewnych określonych haplotypów antygenów zgodności tkankowej *HLA* (SCHACHTER 1998), jednak doniesienia badaczy zajmujących się tym problemem były jak dotychczas kontrowersyjne, a nawet wzajemnie się wykluczały. Dopiero w 1998 roku ustalono, że trzy allele mają ścisły związek z długowiecznością: *HLA-DR7*, *DR11* i *DR13* (SCHACHTER 1998). Pierwsze dwa wpływają na czas przeżycia w relacji do płci osobnika. Ta obserwacja jest podobna do swoistej, związanej z płcią modulacji czasu przeżycia muszki owocowej *Drosophila* przez loci *QTL* (cech ilościowych) (NUZHDIIN i współaut. 1997). Ostatnio wykazano także istnienie swoistego, występującego dopiero w dziesiątej dekadzie życia, wpływu różnych alleli *HLA-DR* na czas przeżycia. Wydaje się, że integralna rola białek zgodności tkankowej *HLA* dla prawidłowej funkcji układu odpornościowego, a przez to dla utrzymania

jego wysokiej sprawności nawet w bardzo podeszłym wieku może tu być decydującym czynnikiem.

Paradoksalnie, udało się także stwierdzić podwyższoną częstość występowania u osób w wieku bardzo zaawansowanym (w tym u ludzi powyżej 95 roku życia) alleli genów, których ekspresja w młodszy (na przykład średni) wiek jest skojarzona z występowaniem pewnych chorób i generalnie ze skróceniem czasu przeżycia. Ciekawym przykładem jest tutaj stwierdzona u włoskich stulatków wysoka częstość genetycznego wariantu inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (*PAI-1*), którego ekspresja w średnim wieku wiąże się z podwyższonym ryzykiem zawału serca (MANUCCI i współaut. 1997). Podobnie, jak wcześniejsze obserwacje Schachtera dotyczące polimorfizmu genu konwertazy angiotensyny (*ACE*) u stulatków francuskich, badania MANUCCIEGO zgadzają się i dostarczają genetycznego „tła” dla dość niespodziewanego występowania nadkrzepliwości krwi u ludzi dożywających sędziwego wieku. (MARI i współaut. 1995, SCHACHTER 1998). Dotychczas nie jest znany związek między nadkrzepliwością krwi a wydłużeniem czasu przeżycia.

Cztery wspomniane wyżej geny, dotychczas kojarzone z kontrolą długowieczności u człowieka, a więc *APO-E2*, *HLA-DR*, *PAI-1* i *ACE* mają pewne cechy wspólne: ich produkty wpływają na cechy pośrednie, takie jak poziom białka homeostatycznego (*PAI-1*) lub odpowiedzi immunologicznej (*HLA-DR*); ponadto w normalnej dorosłej populacji wykazują one silną interakcję gen-środowisko. Taka charakterystyka dotyczy także pewnych chorób o wieloczynnikowym podłożu genetycznym i środowiskowym, będących ważnymi przyczynami umieralności (a więc skracających przeżywalność). Można więc wnioskować, że wymienione wyżej geny modulują osobniczą odpowiedź wobec zagrażających życiu zaburzeń, a nie są bezpośrednimi regulatorami maksymalnego czasu przeżycia (SCHACHTER 1998).

MITOCHONDRIALNE DNA

Materiał genetyczny zawarty jest nie tylko w DNA skupionym w jądrze komórkowym, ale także w stosunkowo niewielkich, natomiast licznych „porcjach” znajduje się on w mitochondriach — organellach komórkowych wyspecjalizowanych w produkcji wysokoenergetycznego związku — ATP. Już dwie dekady temu postulowano, że starzenie się może być związane z

uszkodzeniami w mitochondrialnym (mt) DNA. Jest to o tyle uzasadnione, że mtDNA jest „nagie”, a więc nie związane z ochronnymi białkami i narażone na stały kontakt ze względnie wysokimi stężeniami reaktywnych form tlenu (wolnych rodników), powstających w związku z funkcjonowaniem łańcucha oddechowego oraz innych procesów metabolicznych zachodzących

w mitochondriach. Rzeczywiście, w mtDNA występują dość liczne mutacje o charakterze delecji, a także mutacje punktowe (WALLACE 1992). Te ostatnie gromadzą się u osobników w zaawansowanym wieku, w szczególności w komórkach nie dzielących się, a równocześnie wykazujących wysoki poziom oddychania tlenowego, takich jak neurony i komórki mięśniowe (w tym mięśniówka serca). Jest to jeden z przykładów wspomnianej wyżej, a typowej dla starzejących się osobników kompensacyjnej adaptacji; zwiększenie zapotrzebowania na produkcję energii wynikające z „pierwotnego” uszkodzenia niektórych mitochondriów prowadzi do ich namnażania i ostatecznie utraty komórki. Uszkodzenie mitochondrialnego łańcucha oddechowego może powodować wzrost poziomu zredukowanych nukleotydów nikotynamidowych i koenzymu CoQ, co prowadzi do wzmożonej produkcji wolnych rodników tlenowych, a to z kolei powoduje głębsze uszkodzenia zarówno materiału genetycznego mitochondriów i ich pozostałych składników, jak też i innych elementów komórki, w tym DNA chromosomalnego, a także białek, RNA i fosfolipidów (SKULACHEV 1998). Ten „oksydatywny stres”, a konkretnie powodowane przezeń uszkodzenia materiału genetycznego, są uważane przez wielu gerontologów za podłoże procesów starzenia się. Wykazano między innymi, że mutanty *Drosophila melanogaster* i *C. elegans*, charakteryzujące się wydłużonym czasem przeżycia, wykazują podwyższoną oporność na działanie wolnych rodników tlenowych i inne formy stresu (MARTIN i współaut. 1996).

Jednym z ostatnio proponowanych genetycznych mechanizmów komórkowego starzenia się *in vivo* i *in vitro* ma być jednak nie (postulowane wcześniej) gromadzenie somatycznych

mutacji, ale zjawisko polegające na utracie funkcjonalnego (prawidłowego) produktu genu kodowanego przez określone locus, nazywane utratą heterozygotyczności (ang. loss of heterozygosity, LOH) (TISCHFIELD 1997). Dotyczy ono w szczególności komórek intensywnie dzielących się, takich jak fibroblasty czy limfocyty T *in vitro*, a także komórki nowotworowe. Przykładami genów, dla których może zachodzić szeroko pojęta utrata heterozygotyczności w trakcie osobniczego starzenia się są geny fosforybozylotransferazy adeninowej *APRT* i hipoksantynowo-guaninowej *HPRT*, a także gen zgodności tkankowej *HLA-A2* (SCHACHTER 1998). Dowodem na występowanie LOH w przypadku dwóch pierwszych genów może być znaczne, liniowe zmniejszenie stosunku aktywności do ilości enzymów w fibroblastach ludzkich starzejących się *in vitro* (PAZ i współaut. 1981). Także w przypadku alleli genów *HLA-DR*, wspomnianych wcześniej jako skojarzone z długowiecznością, przyczyną ich podwyższonej częstości występowania u osób w bardzo podeszłym wieku może być właśnie proces LOH.

Wreszcie, bardzo interesującym modelem dla oceny roli uszkodzeń DNA w procesie starzenia się mogą być loci zawarte w chromosomach X, ze względu na ich funkcjonalną hemizygotyczność u obu płci. Niedawno opublikowane badania genealogiczne GAVRILOVA, który próbował obserwować korelacje między wiekiem rodziców w momencie poczęcia dziecka a czasem przeżycia tegoż dziecka, wskazują na znaczne skrócenie czasu przeżycia córek, ale nie synów starych ojców. Dane te wskazują, że uszkodzenia materiału genetycznego w chromosomach X gromadzą się z wiekiem i mogą ograniczać czas przeżycia — wpływać na długowieczność (GAVRILOV i współaut. 1997).

EWOLUCYJNE POCHODZENIE PROCESU STARZENIA SIĘ

Zebrane powyżej przykłady wskazują, że jesteśmy w stanie skojarzyć aktywność konkretnych genów lub ich alleli z fenotypowymi zmianami obserwowanymi w starzeniu. Czy istnieją więc obecnie dowody, że starzenie się ma przyczyny — przynajmniej część z nich — które można uznać za „genetyczne”, a nie epigenetyczne, a więc zależne od „treści” zapisu genetycznego, a nie od jego „odczytania”? Jakie fakty wskazują na możliwość, że starzenie się nie jest tylko zależnym od rosnącej entropii zużyciem mechanizmów komórkowej homeostazy, ale mniej lub bardziej aktywnym procesem, zależnym — jak wszystkie inne, zachodzące w żywych komórkach — od uruchomienia odpow-

wiednich, swoistych elementów kodu zapisanego w komórkowym DNA — genów? Należy przyznać, że do dzisiaj gerontolodzy nie są zgodni w opinii o epi- i genetycznym podłożu procesów starzenia. Część z nich przyjmuje, że maksymalne czasy przeżycia osobników danego gatunku są zdeterminowane genetycznie (BROWN 1979). Badacze ci utrzymują, że szybkość ewolucji maksymalnego czasu przeżycia człowieka (z istotnymi zmianami w ciągu ostatnich 5000 lat, a więc w okresie historycznym) sugeruje stosunkowo niewielką liczbę genów zaangażowanych w kontrolę długowieczności (BROWN 1979). Przeciwny pogląd głosi, że po pierwsze, patofizjologiczne mechanizmy starzenia

się mogą być specyficzne dla gatunku, a nie uniwersalne (czyli „prywatne” w przeciwieństwie do „publicznych”), a po drugie, analiza *loci*, które mogą modulować różnorodne aspekty procesu starzenia wskazuje, że takich *loci* mogą być setki, jeśli nie tysiące, co stawia pod znakiem zapytania celowość poszukiwania kluczowych genów starzenia (MARTIN 1997). Wreszcie ostatnia grupa prezentuje pogląd, że większość eksperymentalnie potwierdzonych mechanizmów czy procesów związanych ze starzeniem się kręgowców, a zwłaszcza człowieka to procesy epigenetyczne, takie jak w szczególności reakcja Maillarda i uszkodzenia zależne od „ataku” pochodzących z niej pośrednio wolnych rodników (ROBERT 1997). To z kolei poddaje w wątpliwość szukanie analogii między procesami starzenia się na przykład drożdży czy nicieni a starzeniem się człowieka, nawet pomimo znalezienia dość licznych homologii między sekwencjami DNA genów kontrolujących starzenie się u tych „prostszych” organizmów a genami ludzkimi (JAŻWINSKI 1996).

Przejawy fizjologicznego starzenia się kontrolowane są więc najprawdopodobniej przez wiele genów, które w tym celu ewoluowały w trakcie rozwoju gatunków. Rozważania ewolucyjne wskazują, że we wszystkich gatunkach, u których można odróżnić komórki rozrodcze od linii somatycznych, powinien wyewoluować fenotyp starzenia się, w którym ryzyko umieralności będzie wzrastać w czasie jako konsekwencja: 1) ciśnienia selekcyjnego dla genów, których korzystne wczesne efekty co najmniej kompensują późne efekty niekorzystne, występujące w wieku podeszłym (antagonistyczny pleiotropizm) i 2) braku ciśnienia selekcyjnego przeciwko tym genom, których efekty, chociażby całkowicie negatywne dla organizmu, występują w późnym okresie życia (MILLER 1993). Według ewolucyjnej teorii starzenia, zaawansowany wiek osobniczy prowadzi więc do osłabienia siły selekcji naturalnej, co umożliwia niektórym genom osiągnięcie stopnia ekspresji, który jest pośrednio lub bezpośrednio szkodliwy dla osobnika. Przykłady w populacjach ludzkich obejmują między innymi zaćmę, chorobę Alzheimera i inne formy demencji towarzyszące podeszłemu wiekowi, cukrzycę typu II i miażdżycę (MARTIN 1980, 1989, 1997). Kluczowym dla tej teorii

pojęciem jest wspomniany wyżej antagonistyczny pleiotropizm działania genów, które według niej mogą być podłożem obserwowanego procesu starzenia. Polega on na korzystnym efekcie działania danego genu lub ich zespołu we wczesnych, poprzedzających rozród i prowadzących do niego fazach życia osobniczego (co zwiększa sukces reprodukcyjny osobnika i zapewnia przetrwanie genu/allelu w następnym pokoleniu) oraz na niekorzystnym efekcie działania tego samego genu po okresie rozrodczym (MILLER 1993). Przykładami antagonistycznego pleiotropizmu genów może być obserwacja Rose’a i współpracowników, którzy stwierdzili, że geny przyspieszające reprodukcję u muszki owocowej *D. melanogaster* przyspieszają również starzenie się tych owadów. Laboratoryjna selekcja wielu kolejnych pokoleń much, które mogły produkować potomstwo w późniejszym okresie życia doprowadziła do uzyskania populacji, która była mniej „dopasowana” w sensie Darwinowskim, a więc produkowała mniej potomstwa niż grupa wyjściowa, ale za to żyła dłużej (HUTCHINSON i współaut. 1991). Szczególnym przykładem tego samego zjawiska mogą być gatunki, u których wytwarzanie potomstwa następuje tylko jeden raz w życiu osobniczym, takie jak łosoś atlantycki czy mysz workowata, u których po jednorazowym, intensywnym akcie wytwarzania potomstwa dochodzi do dramatycznego i bardzo szybkiego zestarzenia się i śmierci (MILLER 1993).

Ciekawą hipotezę przedstawił ostatnio BOWLES (1998). Autor ten, wychodząc z pozycji ewolucjonisty uważa, że osobnicze starzenie się jest korzystne, ponieważ zwiększa częstość wymian populacji, co z kolei przyspiesza korzystne dla gatunku zmiany w puli genów, związane z dryfem genetycznym. W warunkach periodycznej presji selekcyjnej (głównie przez występowanie drapieżników a także niekorzystnych środowisk lokalnych) doszło w związku z tym do sekwencyjnej ewolucji „systemów starzenia”, do których zalicza on proces skracania telomerów, starzenie mitochondriów, gromadzenie się mutacji, ekspresję „genów starzenia” oraz atrofię (apoptozę) pewnych tkanek docelowych, w szczególności żeńskiej tkanki rozrodczej (BOWLES 1998).

ZAKOŃCZENIE: W JAKI SPOSÓB MOŻNA WPŁYNAĆ NA PROCES STARZENIA, JEŚLI JEST ON „ZAKODOWANY” W NASZYCH GENACH?

Podsumowując, starzenie się jest fenomenem ewolucyjnym, wpisanym w „historię życia” wielokomórkowych organizmów od ich powsta-

nia. Jego epigenetyczne przejawy mogą być do pewnego stopnia opóźniane, na przykład przez zredukowaną podaż kalorii, przyjmowanie

antyoksydantów chroniących komórki przed działaniem wolnych rodników i tym podobne. Na poziomie genetycznym jest ono najprawdopodobniej efektem zmienionych aktywności i interakcji wielu genów, kontrolujących różnorodne procesy życiowe komórki. Jedyną szansę na modulację czynności takich „defektywnych” genów, poprzez korekcję ewentualnych „błędów w zapisie”, daje (a raczej być może da w przyszłości) terapia genowa. Obecnie podejmowane są dwa rodzaje prób „odmłodzenia” genomów starych komórek. Po pierwsze, badacze próbują odtworzyć skrócone telomery przez dostarczenie starym komórkom aktywności telomerazy (FOSSEL 1998). Po drugie, skojarzenie fenotypu starzenia się komórek *in vitro* z defektami lub aktywacją „genów starzenia” w określonych chromosomach (np. wspomnianym wyżej chro-

mosomie X, a także w chromosomie 1 i 4) doprowadziło do pomysłu, aby stare komórki odmładzać przez wymianę całego (uszkodzonego?) chromosomu na pochodzący z komórek młodego osobnika (BARRETT i współaut. 1993). Obydwie metody, aczkolwiek według doniesień skuteczne *in vitro*, mają małą szansę praktycznego zastosowania. Na eliksir młodości z laboratoriów gerontologicznych trzeba więc jeszcze poczekać. W świetle wspomnianej wyżej teorii BOWLESA starzenie się jest jednym z warunków genetycznej różnorodności, którą tak cenimy wśród osobników naszego gatunku. Eliminacja procesów starzenia się doprowadziłaby być może do genetycznego ujednolicenia, co nie jest zbyt pociągającą perspektywą. Może więc dobrze, że jednak się starzejemy?

GENETICS OF AGEING AND LONGEVITY: CAN WE STOP AGEING AND DO WE WANT TO?

Summary

Ageing most probably evolved over eons to provide for faster interchange of genes between generations and for genetic drift; both leading to optimized adaptation and better survival measured as a reproductive success, and to intraspecies variability that is useful for the species, for its drive to fill as many ecological niches as possible. Ageing is a multifaceted phenomenon, impairing fitness and chances for survival of an old organism, of its tissues and cells, but happening mostly at the subcellular, molecular level. At the

cellular level, ageing — even that of simple invertebrates — is controlled by many genes; the predicted number of genes involved in many facets of human ageing is hundreds or more. Some of these genes, associated with either longevity or rapid ageing, are already known, although the mechanisms of their influence over the maximal lifespan remain obscure. Thus, our intervention into the ageing process at its genetic level is far from possible at the present state of our knowledge.

LITERATURA

- BARRETT J. C., ANNAB L. A., FUTREAL P. A., 1993. *Genetic and molecular basis for cellular senescence*. Adv. Exp. Med. Biol. 330, 27–43.
- BOWLES J. T., 1998. *The evolution of aging: a new approach to an old problem of biology*. Med. Hypotheses. 51, 179–221.
- BROWN W. T., 1979. *Human mutations affecting aging—a review*. Mech. Ageing. Dev. 9, 325–336.
- CUTLER R. G., 1975. *Evolution of human longevity and the genetic complexity governing aging rate*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 4664–4668.
- D'MELLO N. P., CHILDRESS A. M., FRANKLIN D. S., KALE S. P., PINSWASDI C., JAŻWIŃSKI S. M., 1994. *Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast*. J. Biol. Chem. 269, 15451–15459.
- EFFROS R., 1998. *Replicative senescence in the immune system: impact of the Hayflick limit on T-cell function in the elderly*. Am. J. Hum. Genet. 62, 1003–1007.
- FOSSEL M., 1998. *Telomerase and the aging cell: implications for human health*. JAMA 279, 1732–1735.
- GAVRILOV L. A., GAVRILOVA N. S., KROUTKO V. N., EVDOKUSHKINA G. N., SEMYONOVA V. G., GAVRILOVA A. L., LAPSHIN E. V., 1997. *Mutation load and human longevity*. Mutat. Res. 377, 61–62.
- HUTCHINSON E. W., SHAW A. J., ROSE M. R., 1991. *Quantitative genetics of postponed ageing in Drosophila melanogaster*. Genetics 127, 729–738.
- JAŻWIŃSKI S. M., 1996. *Longevity, genes, and aging*. Science 273, 54–59.
- KIPLING D., FARAGHER R. G. A., 1999. *Telomeres: aging hard or hardly aging?* Nature 398, 191.
- KURO-O M., MATSUMURA Y., AIZAWA H., KAWAGUCHI H., SUGA T., UTSUGI T., OHYAMA Y., KURABAYASHI M., KANAME T., KUME E. i współaut. 1997. *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing*. Nature 390, 45–51.
- LIU Y., GOROSPE M., KOKKONEN G. C., BOULY T. M. O., YOUNES A., MOCK Y. D., WANG X., ROTH G. S., HOLBROOK N. J., 1998. *Impairments in both p70 S6 kinase and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways contribute to the decline in proliferative capacity of aged hepatocytes*. Exp. Cell. Res. 240, 40–48.
- MACIEIRA-COELHO A., 1995. *The last mitoses of the human fibroblast proliferative life span, physiopathologic implications*. Mech. Ageing. Dev. 82, 91–104.
- MANUCCI P. M., MARI D., MERATI G., PEYVANDI F., TAGLIABUE L., SACCHI E., TAIOLI E., 1997. *Gene polymorphism predicting high plasma levels of coagulation and fibrinolysis proteins: a study in centenarians*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17, 755–759.
- MARI D., MANUCCI P. M., COPPOLA R., BOTASSO B., VENTURATI M., BAUER K. A., ROSENBERG R. D., 1995. *Hypercoagulability in centenarians: the paradox of successful aging*. Blood 85, 3144–3149.
- MARTIN G. M., 1978. *Genetic syndromes in man with potential relevance to the pathobiology of aging*. [W:] *Genetic Effects on Aging*. BERGSMAN D., HARRISON D. E. (red.). Liss, New York, str. 5–47.
- MARTIN G. M., 1980. *Genotropic theories of aging: an overview*. Adv. Pathobiol. 7, 5–20.
- MARTIN G. M., 1989. *Genetic modulation of the senescent phenotype in Homo sapiens*. Genome 31, 390–397.

- MARTIN G. M., 1997. *Genetics and the pathobiology of ageing*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 352, 1773–1780.
- MARTIN G. M., AUSTAD S. N., JOHNSON T. E., 1996. *Genetic analysis of aging: role of oxidative damage environmental*. Nat. Genet. 1, 25–34.
- MCCONNELL B. B., STARBORG M., BROOKES S., PETERS G., 1998. *Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts*. Curr. Biol. 8, 351–354.
- MILLER R. A., 1993. *The biology of aging and longevity*. [W:] *Handbook of the Biology of Aging*. SCHNEIDER E. L., ROWE R. W. (red.). Academic Press, San Diego, str. 3–18.
- MURAKAMI S., JOHNSON T. E., 1996. *A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in Caenorhabditis elegans*. Genetics 143, 1207–1218.
- NUZHDIIN S. V., PASYUKOVA E. G., DILDA C. L., ZENG Z. B., MACKAY T. F., 1997. *Sex-specific quantitative trait loci affecting longevity in Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 9734–9739.
- PAZ M. A., TORRELIO M., GALLOP P. M., 1981. *X-linked processes in serially passaged „aging” human diploid cells*. J. Gerontol. 36, 142–151.
- PONNAPPAN U., 1998. *Regulation of transcription factor Nfkap-pa B in immune senescence*. Front. Biosci. 3, D152–D168.
- ROBERT L., 1997. *Relation between genetic and epigenetic mechanisms in aging*. C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 191, 593–602.
- SABZEVARI H., PROPP S., KONO D. H., THEOFILOPOULOS A. N., 1997. *G1 arrest and high expression of cyclin kinase and apoptosis inhibitors in accumulated activated/memory phenotype CD4+ cells of older lupus mice*. Eur. J. Immunol. 27, 1901–1910.
- SCHACHTER F., 1998. *Causes, effects, and constraints in the genetics of human longevity*. Am. J. Hum. Genet. 62, 1008–1014.
- SKULACHEV V. P., 1998. *Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics*. Biochim. Biophys. Acta, 1363, 100–124.
- SMITH J. R., PEREIRA-SMITH O. M., 1996. *Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression*. Science 273, 63–67.
- TISCHFIELD J. A., 1997. *Loss of heterozygosity or: How I learned to stop worrying and love mitotic recombination*. Am. J. Hum. Genet. 61, 995–999.
- WALLACE D. C., 1992. *Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?* Science 256, 628–631.
- WEVERLING-RJNSBURGER A. W. E., BLAUW G. J., LAGAAY A. M., KNOOK D. L., MEINDERS A. E., WESTENDORP R. G. J., 1997. *Total cholesterol and risk of mortality in the oldest old*. Lancet 350, 1119–1123.