

URSZULA GAĞAŁA, KATARZYNA ANDRASZEK, EWA WÓJCIK, ELŻBIETA SMALEC

*Instytut Bioinżynierii i Hodowli Zwierząt  
Akademia Podlaska  
B. Prusa 14, 08-110 Siedlce  
E-mail: ula.gagala@op.pl  
          andrasz@ap.siedlce.pl  
          wojcik@ap.siedlce.pl  
          esmalec@ap.siedlce.pl*

## TELOMERY – DUŻA ROLA MAŁYCH SEKWENCJI

Badania genetyczne, szczególnie w zakresie nauk podstawowych, są ukierunkowane między innymi na poznanie szczegółowej organizacji genomów oraz opisanie i określenie funkcji struktur składających się na nie, do których zaliczamy także telomery. Telomery są to wyspecjalizowane nukleoproteinowe struktury znajdujące się na końcach wszystkich liniowych chromosomów eukariotycznych. Nie zawierają żadnych genów i nie kodują żadnych białek. Po raz pierwszy zostały odkryte i opisane przez Müllera w 1938 r., podczas jego badań dotyczących wpływu promieniowania jonizującego na genom muszki owocowej (*Drosophilla melanogaster*) (BIESSMAN i MASON 1994). Wtedy też powstała nazwa zakończeń chromosomów od greckich słów *telo* – koniec i *mere* – część. Ich istnienie zostało następnie potwierdzone

przez McClintock, prowadzącą badania na kukurydzy (*Zea mays*) (BLACKBURN 2001).

Podczas ostatniej dekady biologia telomerów przerodziła się z pobocznej, aczkolwiek interesującej dyscypliny wśród nauk o komórce, w dziedzinę, którą zajmują się laboratoria na całym świecie. Rozwój nowych technik pozwolił na błyskawiczne poznanie struktury i funkcji telomerów. Dodatkowo, znaczenie telomerów zwiększa ich powiązanie ze starzeniem komórkowym i rakiem. W celu uzyskania informacji dotyczących tych struktur badano różne organizmy modelowe (np. drożdże, pierwotniaki, owady, kręgowce i rośliny), co umożliwiło porównanie telomerowych sekwencji między oraz wewnątrz różnych grup organizmów (FAJKUS i współaut. 2005).

## STRUKTURA TELOMERÓW

Badanie sekwencji telomerowych zapoczątkowała identyfikacja ciągu powtórzeń (TTAGGG)<sub>n</sub> w zakończeniach rDNA makronukleusa (jądra wegetatywnego) urzęsionego pierwotniaka *Tetrachymena thermophila* w 1978 r. (DRETS 2000). Rozpoczęto wtedy badania mające na celu wyjaśnienie, czy jest to sekwencja stała czy specyficzna gatunkowo. Istnienie powtarzalnych sekwencji zostało potwierdzone u innych organizmów, począwszy od jednokomórkowych, a skończywszy na

ssakach i roślinach wyższych. Dalsze prace nad tym zagadnieniem pozwoliły stwierdzić, że w większości przypadków telomery składają się z krótkich, tandemowo powtarzających się sekwencji dwuniciowego DNA, bogatego w guaninę na nici biegnącej w kierunku 5'-3' i cytozynę na nici przeciwległej. Chromatyna telomerowa zbudowana jest z nukleosomów, ale różni się od większości chromatyny jądrowej tym, że są one o 30–40 pz krótsze (TOMMERUP i współaut. 1994). Sekwencja telome-

rowa, mimo że wykazuje silny konserwatyzm, jest zróżnicowana zależnie od gatunku (HARLEY i VILLEPONTEAU 1995). Sekwencje powtórzeń 5' TTAGGG 3' po raz pierwszy zidentyfikowali na końcach ludzkich chromosomów MOYZIS i współaut.(1988); jest to sekwencja charakterystyczna dla wszystkich kręgowców (ZAKIAN 1989). Istnieją też wyjątki od przyjętego za charakterystyczny dla danej grupy organizmów wzorca, np. występujące u roślin sekwencje (TTTAGGG)<sub>n</sub> nie są wszechobecne. Przykładem są Alliaceae, rodzina roślin jednoliściennych, do których należy cebula (*Allium cepa*). PICH i współaut.(1996), stosując metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* przy wykorzystaniu sondy o sekwencji (TTTAGGG)<sub>n</sub> do różnych gatunków cebuli, nie uzyskali żadnego sygnału sondy. Brak sygnałów u Aliaceae jest związany z zastąpieniem sekwencji telomerowych sekwencjami satelitarnymi lub rDNA.

#### DŁUGOŚĆ TELOMERÓW

Telomery wykazują silny konserwatyzm gatunkowy pod względem długości sekwencji. Jest ona jednak zależna również od fazy cyklu komórkowego, wieku, rodzaju komórki oraz od czynników środowiskowych. U orzęsków *Oxytricha* dwuniciowy telomerowy DNA wynosi tylko 20 par zasad, u drożdży kilkaset, podczas gdy u kręgowców indywidualne telomery mogą wynosić nawet ponad 100 kpz, np. w niektórych komórkach myszy (ZAKIAN 1989). Średnia długość ludzkich telomerów mieści się w przedziale 5–15 kpz (CROSS i współaut. 1989).

Ponadto badania dowiodły zróżnicowanie długości powtórzeń telomerowych na końcach poszczególnych chromosomów w danej komórce człowieka, jak i myszy, oraz uwarunkowanie genetyczne tej cechy (LONDOÑO-VALLEJO 2004). Mysie chromosomy 2p i 11p oraz kilka innych, mają krótkie telomery niezależnie od tkanki w jakiej występują (SLIJEPCEVIC 2001).

Badania kariotypu myszy dowiodły, że na długość telomerów wpływa też prawdopodobnie efekt pozycyjny centromerów (ang. centromere position effect, CPE). Te, które są położone bliżej centromeru (ramię p) są znacząco krótsze niż te, położone na końcach ramion q. Myszy są wyjątkowym modelem w badaniach CPE, ponieważ na ich kariotyp składają się prawie wyłącznie chromosomy akrocentryczne, w których telomery z ramienia p bezpośrednio sąsiadują z centromerami. Podobna sytuacja występuje

u bydła i kóz. W komórkach człowieka, jak i innych organizmów charakteryzujących się nieakrocentrycznymi chromosomami w kariotypach ta zależność jest słabsza (SLIJEPCEVIC i współaut. 1997, SLIJEPCEVIC 1998). W genomie człowieka najdłuższe telomery występują na chromosomie 4, a najkrótsze na chromosomie 17 (BOLZAN i BIANCHI 2006).

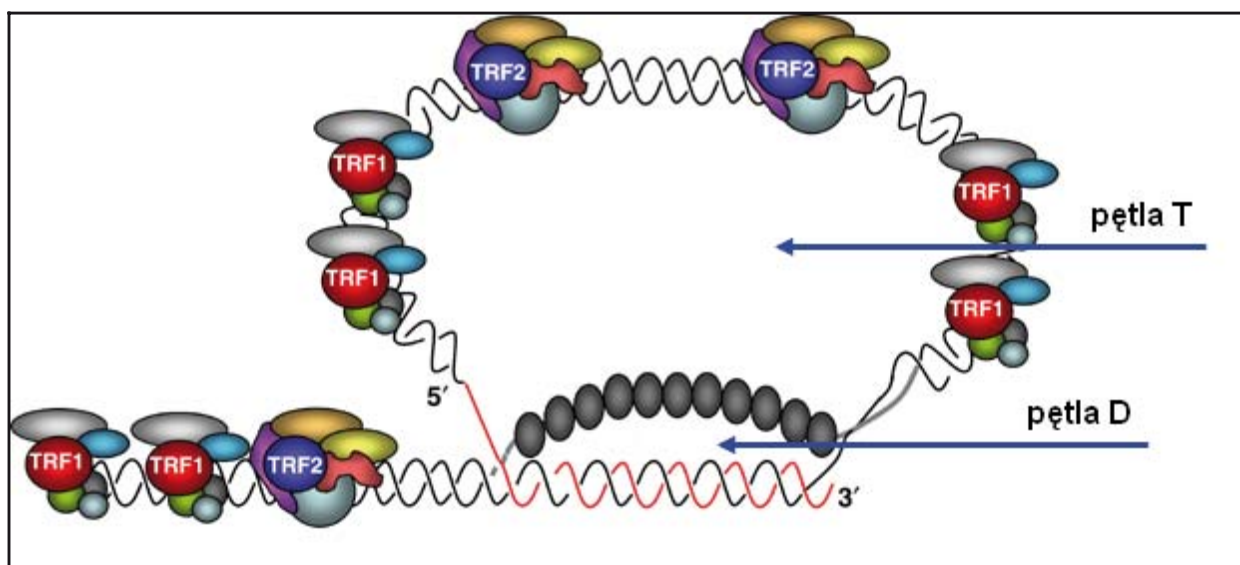
#### BIAŁKA TELOMEROWE

Telomery ssaków tworzą na końcach duże dwuniciowe pętle – pętle T, zaś jednoniciowy DNA zawija się i wnika do utworzonej pętli tworząc małe pętle D (Ryc. 1). Dzieje się to przy udziale wymienionych poniżej białek, które reorganizują liniową budowę telomerów (GRIFFITH i współaut. 1999, STANSEL i współaut. 2001). Występujący w chromosomach ssaków kompleks sześciu białek związanych z telomerowym DNA został określony terminem „shelterin” (Ryc. 2). Trzy z nich bezpośrednio rozpoznają sekwencje TTAGGG, są to TRF1, TRF2 i POT1. Są one wzajemnie połączone przez trzy dodatkowe białka TIN2, TPP1 i RAP1 (DE LANGE 2002, 2005). Z telomerowym DNA związane są także białka TANK, MRN i KU.

Białka TRF1 i TRF2 są związane z dwuniciowym DNA pętli T i są zaangażowane w regulowanie długości telomerów *in vivo*. Białka TRF1 i TRF2 różnią się od siebie sekwencją końca aminowego (N-koniec), która w TRF1 ma charakter kwaśny, natomiast w TRF2 charakter zasadowy. Aktywność białek TRF jest wyższa w telomerach o większej liczbie powtórzeń podstawowej sekwencji TTAGGG. Białka TRF1 i TRF2 nie wpływają na aktywność telomerazy – enzymu odpowiedzialnego za replikację telomerów. Nadekspresja białka TRF1 w komórkach z aktywną telomerazą prowadzi do stopniowego skracania telomerów, natomiast przy zahamowaniu ekspresji TRF1 dochodzi do wydłużania telomerów. Na podstawie tych obserwacji białko TRF1 jest traktowane jako negatywny regulator długości telomerów (SMOGORZEWSKA i współaut. 2000, CARLSEDER 2003).

W procesie regulowania długości telomerów z białkiem TRF1 musi współdziałać białko TIN2, które oddziałuje z TRF1 zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Zmutowana forma TIN2, nie posiadająca sekwencji końca N, może wydłużać telomery niezależnie od telomerazy (SKÓRZYŃSKA i współaut. 2003).

Białko TRF2 jest podstawowym białkiem gwarantującym stabilność telomerów. Na-

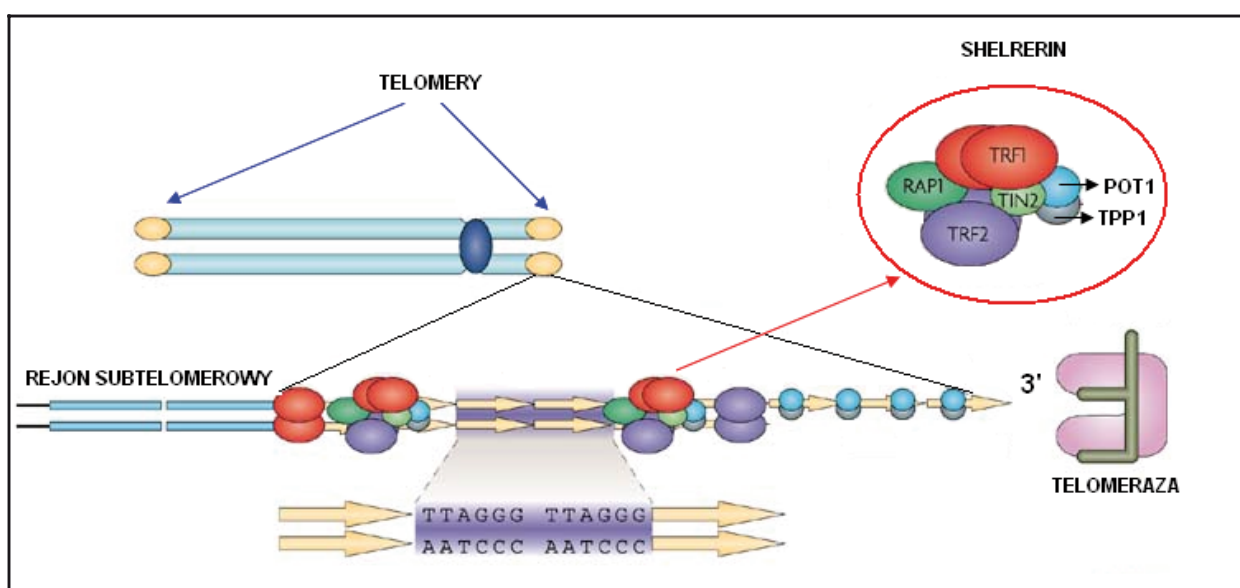


Ryc. 1. Schemat pętli telomerowych u ssaków (wg BLASCO 2005).

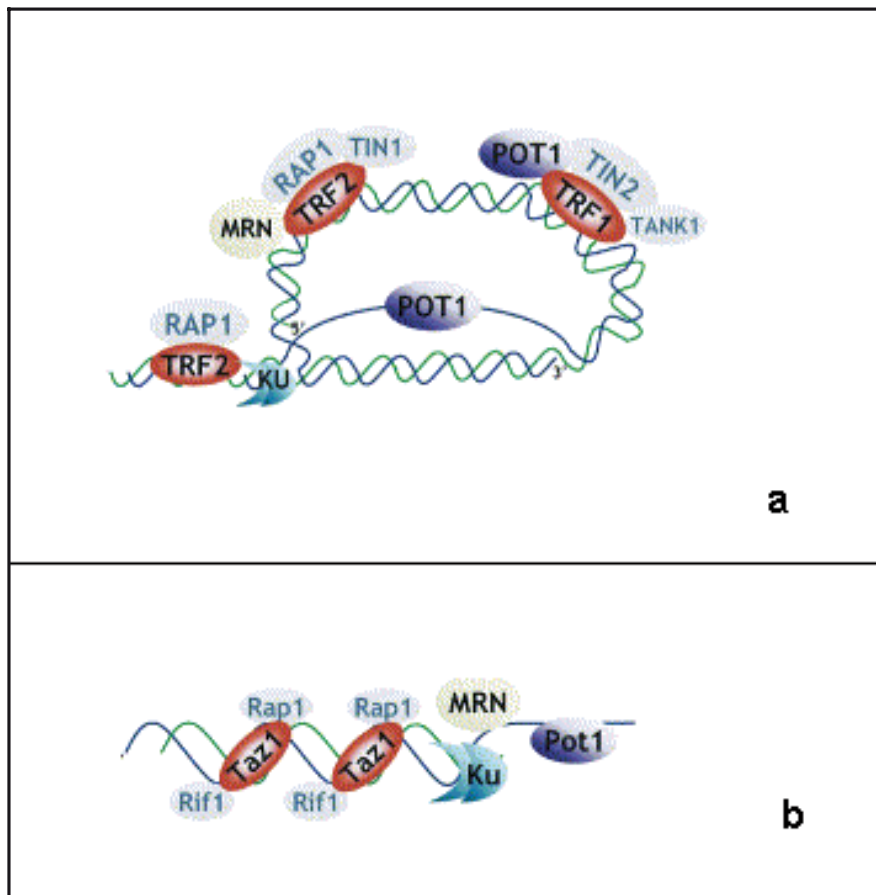
dekspresja białka TRF2 w komórkach z nieaktywną telomerazą przyspiesza skracanie telomerów (BIANCHI i współaut. 1997). Zahamowanie aktywności tego białka powoduje utratę zdolności komórki do rozróżniania naturalnych końców DNA od pęknięć i odcięcie jednoniciowego łańcucha na końcu 3', i w efekcie do dysfunkcji telomerów. Uszkodzone telomery szczególnie łatwo rekombinują, co może doprowadzić do fuzji. Powstają chromosomy dicentryczne (fuzja ramion

p lub q dwóch niehomologicznych chromosomów) oraz translokacje robertsonowskie (VAN STEENSEL i współaut. 1998).

Białko POT1 jest związane z jednoniciowym, bogatym w guaninę, końcem telomeru. Pełni funkcję ochronną przed atakiem egzonukleaz, a jego brak powoduje niehomologiczną fuzję końców chromosomów (DE LANGE 2002, 2005). Białko TPP1 początkowo przypisywano rolę partnera białka POT1, dzięki któremu mógł powstać sześciobiałko-



Ryc. 2. Struktura telomeru ssaków (wg BLASCO 2007).



Ryc. 3. Białka telomero-  
rowe u człowieka (a) i  
drożdży (b).

Zaznaczone na kolorowo  
białka biorą udział w tworzeniu kompleksu ochronnego. Białka oznaczone kolorem szarym pełnią funkcje w regulacji długości telomerów (wg FERREIRY i współaut. 2004).

wy kompleks shelterin. Najnowsze badania sugerują, że TPP1 jest podjednostką białka POT1 i oba białka mogą działać hamująco na telomerazę, w efekcie hamować wydłużanie telomerów (WANG i współaut. 2007).

Białko RAP1 jest związane z dwuniciowym DNA telomerów, może wpływać na strukturę telomerów, co z kolei zapobiega dołączaniu telomerazy. RAP1 jest określane jako negatywny regulator telomerazy. Eksperymentalne usunięcie RAP1 z komórki powoduje drastyczne skracanie telomerów, natomiast mutacje RAP1 powodują gwałtowne wydłużanie telomerów (SZALATA i SŁOMSKI 2000, O'CONNOR i współaut. 2004).

Białko Ku jest związane z dwuniciowym DNA telomerów oraz subtelomerową heterochromatyną. Razem z białkiem TRF2 współdziała w tworzeniu pętli T. Tworzy także kompleks z białkiem RAP1, który uczestniczy w mechanizmach naprawy dwuniciowych uszkodzeń DNA (BIANCHI i DE LANGE 1999).

MRN jest właściwie kompleksem trzech białek (Mre11/Rad50/NBS1), które, podobnie jak białko Ku, współdziałają z białkami TRF2 i RAP1 w naprawie dwuniciowych pęknięć w DNA (DE LANGE 2002).

Białko TANK1 współdziała z białkiem TRF1 i wchodzi w skład białkowego kompleksu telomerów. Nadekspresja białka TANK1 powoduje nadmierne wydłużanie się telomerów; białko to przyczynia się także do ochrony telomerów przed niewłaściwymi procesami naprawczymi. Białko TANK1 występuje na końcach telomerów tylko w komórkach, które wykazują nadekspresję białka TRF1. Białko to przeważnie jest zlokalizowane w porach błony jądrowej, wokół jądra komórkowego i w pęcherzykach Golgiego (SKÓRZYŃSKA i współaut. 2003).

Białko TANK2 występuje w cytoplazmie okołojądrowej. Podobnie jak TANK1 współdziała z białkiem TRF1. Nadekspresja TANK2 powoduje gwałtowną śmierć komórki w wyniku nagłej utraty potencjału błony mitochondriów (SKÓRZYŃSKA i współaut. 2003).

U drożdży *Saccharomyces* sp. odpowiednikiem białek TRF1 i TRF2 jest dwuskładnikowy kompleks białkowy Taz1 (Ryc. 3). Jego brak prowadzi do przeorganizowania struktury telomeru, włączając wydłużanie zarówno podwójnego, jak i pojedynczego łańcucha sekwencji powtarzalnych, oraz zakłócenia w telomerowej chromatynie. W przypadku, kie-



dy nastąpi zahamowanie aktywności Taz1, kolejne związane z telomerami białko Ku aktywuje proces niehomologicznego łączenia końców (COOPER i współaut. 1997). Głównym białkiem tworzącym u tych organizmów chromatynę telomerową jest Rap1, występujące np. u *Saccharomyces cerevisiae*. Mutacje tego białka powodują intensywny wzrost długości telomerów. Rap1p prawdopodobnie

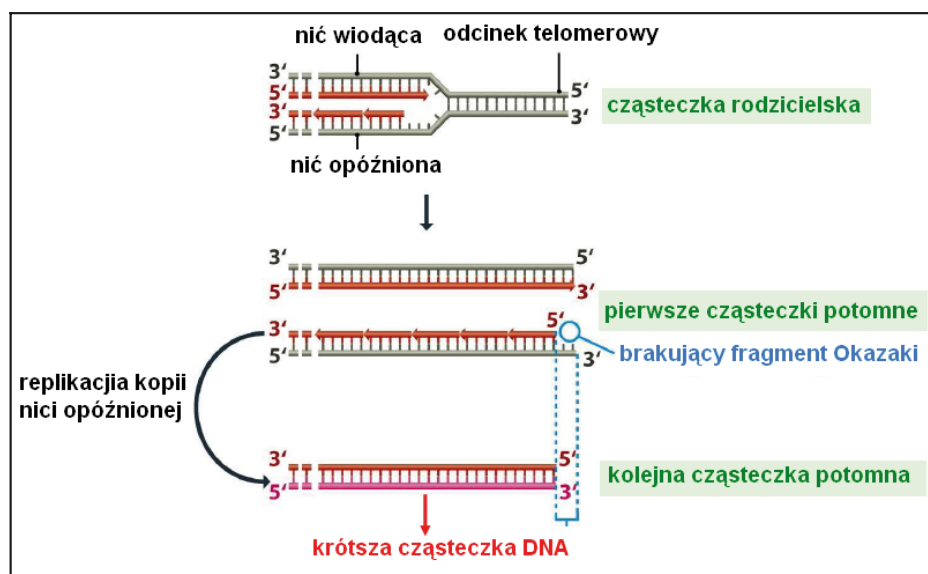
zapobiega także tworzeniu pętli T u drożdży. Oprócz niego występują też dwa kompleksy: białko Ku oraz Mre11/Rad50/Xrs2, biorące udział w łączeniu końców chromosomów oraz utrzymaniu telomerów. Z pojedynczym łańcuchem u drożdży połączone są jeszcze białka Cdc13p i Est1p (MARCAND i współaut. 1997, FERREIRA i współaut. 2004).

### REPLIKACJA TELOMERÓW

Telomery muszą być także w pełni replikowane. W komórkach ssaków replikacja telomerów zachodzi podczas fazy S cyklu komórkowego, w charakterystycznym momencie dla każdej z tych struktur, tzn. telomery wszystkich chromosomów nie replikują się w tym samym czasie. Niektóre telomery replikują podczas wczesnej fazy S i ramiona p i q określonego chromosomu nie robią tego synchronicznie. Proces ten przebiega inaczej u drożdży, gdzie wszystkie telomery są replikowane w późnej fazie S i synchronicznie na obu końcach chromosomu (BOLZAN i BIANCHI 2006).

Za proces replikacji DNA w głównej mierze odpowiada specjalny enzym – telomeraza. Telomeraza, czyli polimeraza DNA zależna od RNA, składa się z podjednostki katalitycznej, będącej telomerową odwrotną transkryptazą (ang. telomerase reverse transkriptase, TERT), matrycowego RNA (ang. template RNA, TR) oraz białek połączonych z enzymem. Telomeraza została odkryta przez Greider i Blackburn w 1985 r. u *Tetrahymena thermophila*. Stwierdzono, że może ona

rekompensować niekompletną replikację i utrzymać długość telomerów (JENNINGS i współaut. 2000). Dzieje się to dzięki wykorzystaniu części własnego RNA jako matrycy do tworzenia powtórzeń telomerowych (GREIDER i BLACKBURN 1989). Telomeraza ma również drugą funkcję, jaką jest „leczenie chromosomów”, czyli dodawanie sekwencji w miejscach złamań i uszkodzeń chromosomów. Zjawisko to zostało po raz pierwszy zauważone u *Tetrahymena thermophilus*, a następnie u drożdży, pierwotniaków, robaków, roślin oraz człowieka (GREIDER 1994). Telomeraza działa wydajnie tylko na nici biegnącej w kierunku 5'-3'. Więc od momentu rozplecenia DNA przez helikazę tylko jedna nić może być replikowana w sposób ciągły, tzw. nić wiodąca, natomiast nić opóźniona replikuje się przez tworzenie licznych fragmentów Okazaki, wymagających krótkich starterów zbudowanych z RNA (około 8-12 pz). Po dotarciu widełek replikacyjnych do końca chromosomu pojawia się problem braku miejsca, w którym mógłby przyłączyć się starter RNA do rozpoczęcia syntezy frag-



Ryc. 4. Schemat replikacji telomerowego DNA (wg BROWNA 2001).

mentu Okazaki. W wyniku takiej replikacji każda potomna cząsteczka DNA zawiera niesparowany koniec 3', czyli nie opóźniona nie jest całkowicie replikowana. Zjawisko to nosi nazwę problemu replikacji końca. Taki stan rzeczy mógłby spowodować utratę fragmentu DNA na końcach chromosomów po każdej replikacji, a wraz z nim wielu cennych genów (Ryc. 4). Funkcję zabezpieczającą komórkę przed skutkami utraty informacji genetycznej pełnią sekwencje telomerowe. U człowieka tempo skracania się telomerów w komórkach somatycznych wynosi od 50–150 pz na jedną replikację (HARLEY i współaut. 1990).

Aktywność telomerazy jest zróżnicowana w komórkach różnych tkanek. Nie stwierdzono aktywności enzymu w komórkach somatycznych, z wyjątkiem tkanek mających zdolność do odnawiania się, a mianowicie komórek macierzystych skóry, hematopoetycznych komórek macierzystych, aktywnych limfocytów, komórek krypt jelitowych. Aktywność telomerazy obserwuje się w komórkach linii płciowej (od rozpoczęcia mejozy, poprzez dojrzewanie gamet, aż do zapłodnienia) oraz

komórkach embrionalnych. Aktywność telomerazowa jest relatywnie niska na tych etapach embriogenezy, w których liczba komórek wynosi 2–4 oraz 8–16. Wysoki poziom aktywności enzymu obserwuje się na etapie moruli i osiąga on plateau na etapie blastocysty. W pierwszym trymestrze rozwoju ludzkiego embrionu aktywność telomerazy jest bardzo wysoka w niemal wszystkich tkankach. W miarę upływu czasu telomeraza jest stopniowo hamowana na specyficznych etapach, które zbiegają się z różnicowaniem tkanek, np. aktywność telomerazy jest hamowana w 12 tygodniu rozwoju osobniczego w sercu, w 16 tygodniu w nerkach i mózgu a w 21 tygodniu w wątrobie, płucach i śledzionie. Po urodzeniu aktywność telomerazy jest niewykrywalna w większości normalnych komórek somatycznych (SHAY i BACCHETTI 1997, NOWIS i GOŁĄB 2001, BEKAERT i współaut. 2004, DONG i współaut. 2005). Stwierdzono także różną aktywność telomerazy u mężczyzn i u kobiet. Przypuszczalnie ma to związek z różnym poziomem estrogenów, który może stymulować telomerazę (AVIV 2002).

## FUNKCJE TELOMERÓW

Główną rolą telomerów jest zapewnienie integralności chromosomów, czyli ich ochrona przed degradacją, rekombinacją oraz fuzją. Ponadto telomery uczestniczą także w przestrzennej organizacji jądra komórkowego, segregacji chromosomów podczas podziałów komórki oraz regulacji transkrypcji genów zlokalizowanych w subteloimerowych rejonach chromosomów (NOWIS i GOŁĄB 2001).

Telomery mają zdolność do dynamicznego łączenia się ze sobą (MOLENAAR i współaut. 2003). Ta tendencja może być odpowiedzialna za wysoką częstotliwość chromosomowych rearanżacji w sub- i telomerowych regionach komórek somatycznych oraz wewnątrzchromosomowych wymian DNA telomerowego w komórkach, które utrzymują telomery za pomocą mechanizmu niezależnego od telomerazy (ALT). Dowodem istnienia alternatywnego mechanizmu wydłużania telomerów były wyniki badań prowadzonych na fibroblastach pochodzących od myszy z nieaktywnymi genami telomerazy. Mechanizm ALT opiera się prawdopodobnie na homologicznej re-

kombinacji między siostrzanymi chromatydami i może występować w komórce równocześnie z aktywną telomerazą (DUNHAM i współaut. 2000, MUNTONI i REDDEL 2005, KOWALSKA i KOWALIK 2006).

Telomery posiadają ciekawą właściwość, jaką jest wyciszanie telomerowe wynikające z telomerowego efektu pozycyjnego. Wyciszanie telomerowe polega na transkrypcyjnej represji genów znajdujących się w obrębie lub w pobliżu telomerów. U drożdży TPE funkcjonuje dzięki połączeniu białka telomerowego RAP1 z kompleksem białek Sir 2, 3 i 4. Jeśli taki kompleks otoczy DNA, to uniemożliwia jego transkrypcję, przez co tworzy się heterochromatyna – nieaktywna forma chromatyny (KENNEDY i współaut. 1997). Białko Sir2 jest enzymem o aktywności deacetylazy histonów. Usunięcie grup acetylowych z histonów powoduje, że DNA staje się bardziej upakowane i tym samym staje się niedostępne dla enzymów biorących udział np. w rekombinacji i wycinaniu fragmentów DNA (proces wyciszania genów) (SHORE 2001, SKÓRZYŃSKA i współaut. 2003).

### ZWIĄZEK TELOMERÓW ZE STARZENIEM KOMÓRKOWYM

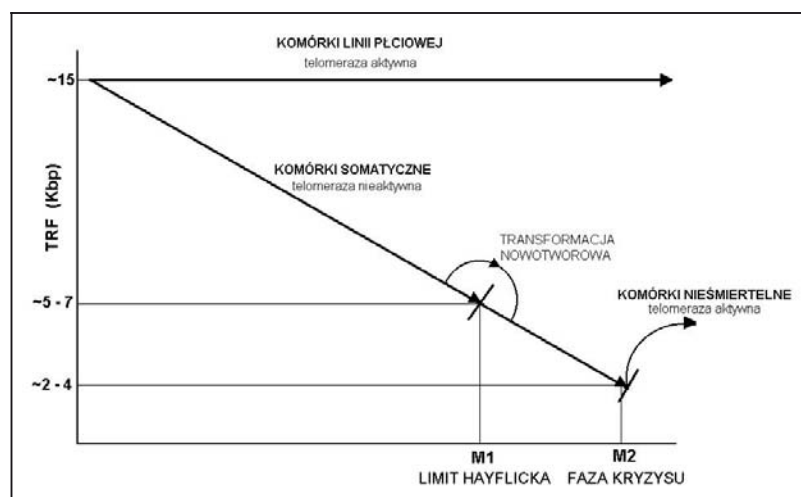
Do lat 60. XX w. istniała hipoteza, że komórki hodowane *in vitro* mogą dzielić się w nieskończoność, jednak w 1961 r. podważono ją udowadniając, że fibroblasty wyizolowane z ludzkiej skóry mogą dzielić się tylko 40–50 razy, a potem następuje zahamowanie podziałów komórkowych i inicjowanie procesu starzenia się komórki. Odkryto w ten sposób, że komórki mają zaprogramowaną pewną liczbę możliwych podziałów, która od nazwiska odkrywcy została określona terminem limit (lub liczba) Hayflicka (HAYFLICK i MOORHEAD 1961, HAYFLICK 2003). Limit Hayflicka jest typowy dla gatunku; gatunki dłużej żyjące mają wyższą liczbę Hayflicka niż krótko żyjące. W latach 70. ubiegłego stulecia Olovnikov powiązał problem skracania telomerów z aktywnością replikacyjną DNA komórki (OLOVNIKOV 1973). Dopiero jednak HARLEY (1991) powiązał koncepcję Olovnikova z wynikami badań nad strukturą i funkcją telomerów. Stopniowa utrata telomerowego DNA jest kluczowym mechanizmem odliczającym wiek komórki – komórki młode mają dłuższe telomery (większą liczbę powtórzeń sekwencji podstawowej), starsze komórki mają krótsze telomery (HARLEY 1991, HARLEY i VILLEPONTEAU 1995, MORIN 1997).

W kolejnych badaniach okazało się, że można powiązać trzy procesy, jakimi są problem replikacji końca, skracanie telomerów i starzenie komórkowe.

Model mechanizmu starzenia komórkowego zależny od długości telomerów i aktywności telomerazy zaproponowali Wright i Shay (Ryc. 5) (WRIGHT i SHAY 1992a, b; SHAY i współaut. 1993).

W komórkach niezawierających telomerazy następuje sukcesywne skracanie telomerów. Teoria ta znana jest jako telomerowa hipoteza starzenia komórek. Kiedy telomery osiągną krytyczną długość, następuje kres aktywności replikacyjnej i komórka wchodzi w etap zwany starzeniem, w literaturze określanym jako punkt M1 (ang. mortality stage 1) (HAYFLICK i MOORHEAD 1961). Niektóre komórki mogą ominąć punkt M1, ale ich telomery nadal się skracają do czasu osiągnięcia punktu M2 (ang. mortality stage 2), określanego jako punkt kryzysu, gdzie następuje masowa śmierć komórek. W fazie M2 krótkie telomery są sygnałem do uruchomienia mechanizmów naprawy DNA (rekombinacji homologicznej lub niehomologicznego łączenia końców chromosomów), co powoduje łączenie się końców różnych chromosomów ze sobą prowadząc do nieprawidłowych podziałów mitotycznych, a w rezultacie do tzw. katastrofy mitotycznej i komórka jest kierowana na drogę apoptozy (MORIN 1997). Nie wszystkie komórki, które osiągną fazę M2 giną. Niektóre z nich, komórki nowotworowe, unikają ograniczenia podziałów przez aktywację mechanizmów utrzymujących długość telomerów (ang. telomere maintenance mechanism, TMM). Znaczna większość osiąga to dzięki działaniu telomerazy (85–90%) lub mechanizmu ALT. Niektóre nowotwory posiadają obydwa mechanizmy utrzymywania telomerów (REDDEL 2003).

Skracanie telomerów może być także wynikiem sporadycznych przypadków, takich jak nieprawidłowa naprawa uszkodzonego DNA lub problemy powstałe okazjonalnie podczas replikacji, naprawy lub rekombinacji. Udowodniono, że telomerowa część kwasu DNA bogata w guaninę jest 5–10 razy



Ryc. 5. Schemat mechanizmu starzenia komórkowego (wg MORINA 1997).

bardziej podatna na uszkodzenia spowodowane stresem oksydacyjnym niż inne regiony (KAWANISHI i OIKAWA 2004). Stała produkcja wolnych rodników tlenowych, będących produktem tlenowego metabolizmu mitochondrialnego, może również powodować uszkodzenia DNA, których nagromadzenie powoduje starzenie i skraca życie komórki. Badania wykazały także, że w wyniku narażenia na stres oksydacyjny wzrasta liczba przerw w jednoniciowym telomerowym DNA (JENNINGS i współaut. 2000). Odpowiedź komórki na uszkodzenie DNA zależy od stopnia uszkodzenia i rodzaju komórek. W przypadku lżejszych uszkodzeń komórka zahamowuje swoje podziały i uruchamia mechanizm naprawy DNA. W przypadku ciężkich uszkodzeń komórka wchodzi na szlak apoptozy (BELLAMY 1997).

#### ROLA SEKWENCJI TELOMEROWYCH W MEJOZIE

Na podstawie badań cytologicznych dowiedziano, że sekwencje telomerowe spełniają także ważną rolę podczas mejozy, a szczególnie podczas profazy pierwszego podziału mejotycznego. Sekwencje telomerowe są związane z procesem koniugacji chromosomów homologicznych oraz rekombinacji materiału genetycznego komórki. Koniugacja chromosomów homologicznych zachodzi z udziałem kompleksów synaptonemalnych. U ssaków formowanie kompleksów zawsze rozpoczyna się od regionów telomerowych i

jest związane z sekwencjami TTAGGG (PENKINA i współaut. 2002). Ponadto, sekwencje telomerowe działają jak gorące miejsca rekombinacji oraz są skorelowane z występowaniem chiasm (ASHLEY i WARD 1993, NANDA i współaut. 2002). Molekularne badania chromosomów mejotycznych, przeprowadzone na materiale pobranym od chomika amerykańskiego i kury domowej, wykazały obecność sekwencji TTAGGG w innych, nie tylko telomerowych rejonach chromosomów. Duża częstotliwość tych sekwencji w chromosomach ptaków, a szczególnie w mikrochromosomach, tłumaczy wysokie tempo rekombinacji ptasich chromosomów (RODIONOV 1996). Zdolność sekwencji telomerowych do pobudzania rekombinacji stwierdzono również u drożdży (PLUTA i ZAKIAN 1989).

Badania lokalizacji powtórzeń (TTAGGG)<sub>n</sub> w kariotypach znacznie różniących się gatunków ptaków mogą doprowadzić do odpowiedzi, czy wysoce zmienna liczba mikro- i makrochromosomów jest spowodowana zmianami kariotypu związanymi z telomerami. Telomery mogą być gubione lub mogą przyrastać podczas powstawania nowych gatunków w trakcie ewolucji kariotypu. Silny konserwatyzm sekwencji telomerowej i jej obecność na telomerowych i nietelomerowych obszarach może być narzędziem, które umożliwi rekonstrukcję ewolucyjnych rearanżacji kariotypowych dotyczących telomerów (NANDA i współaut. 2002).

#### METODY BADANIA TELOMERÓW

Telomery okazały się bardzo złożonymi i interesującymi strukturami, z tego powodu stale rozwijane są techniki umożliwiające dokładne ich badanie. Niektóre ze stosowanych metod to: analiza TRF, Q-PCR oraz FISH. Telomery i niekodujący obszar subtelomerowy mający niewielkie zmiany w typowej dla zakończeń chromosomów sekwencji tworzą wspólnie tzw. końcowy fragment restrykcyjny- (ang. terminal restriction fragment, TRF) (DRETS 2000). Mierzenie średniej długości terminalnego fragmentu restrykcyjnego należy do technik szeroko stosowanych, jednak ma kilka wad, które zmniejszają jej użyteczność. Główna, to fakt, że długość TRF w różnych komórkach oraz chromosomach jest zróżnicowana, ponieważ komórki mogą być w różnym wieku, a chromosomy charakteryzuje polimorfizm miejsc restrykcyjnych. Poza tym wymagana jest dość duża ilość materia-

łu genetycznego do badań (10 µg) oraz jest to metoda czasochłonna (BAIRD i współaut. 1995). Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR) unika wielu problemów powstałych przy analizie TRF, dzięki użyciu odpowiednio zaprojektowanych primerów, które hybrydują komplementarnie do telomerów kręgowców (BARID 2005).

Telomerowe powtórzenia wykrywa się również dzięki zastosowaniu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. fluorescence *in situ* hybridization, FISH), którą po raz pierwszy w identyfikacji sekwencji telomerowych zastosowali MOYZIS i współaut. w 1988 r. Badania można prowadzić na chromosomach będących w stadium profazy, metafazy lub interfazy. FISH opiera się na wykorzystaniu sond molekularnych komplementarnych do badanego regionu chromo-



somu. Konwencjonalne metody FISH zostały z sukcesem zaangażowane w proces detekcji *in situ* powtórzeń telomerowych w chromosomach różnych gatunków kręgowców, przy użyciu syntetycznych, oligonukleotydowych komplementarnych sond (TTAGGG lub CCC-TAA). Wydajność tych badań nie była jednak wystarczająca; użycie konwencjonalnej metody pozwoliło na wykrycie jedynie 75-82% telomerów w ludzkich limfocytach (WU i współaut. 1998).

Technika PRINS (ang. primed *in situ* labelling) oferuje szybką alternatywę. Polega na przyłączaniu *in situ* syntetycznych oligonukleotydów (CCTAA)<sub>n</sub> w celu detekcji telomerów. PRINS jest także metodą bardziej wydajną, ponieważ konwencjonalny FISH używający wyznakowanej fluorescencyjnie sondy do hybrydyzacji z (TTAGGG) generuje dużo niespecyficznych połączeń, przez co rezultaty są czasem trudne do analizy (COULIN i współaut. 2002).

Technika FISH-PNA jest szeroko stosowana w badaniach chromosomów człowieka oraz innych kręgowców, gdyż daje 100% detekcję sekwencji telomerowej. Szczególnie stosowana jest do oszacowania długości telomerów u różnych gatunków ptaków i chomika chińskiego. U tych zwierząt sekwencje telomerowe występują również w innych niż telomerowe regionach chromosomów (BOLZAN i BIANCHI 2006).

Inne, ostatnio rozwinięte techniki analizowania długości telomerów, to flow-FISH (połączenie cytometrii przepływowej i hybrydyzacji) (RUFER i współaut. 1998), analiza długości telomerów w indywidualnych chromosomach (ang. single telomere length analysis, STELA) oraz T-OLA (ang. telomeric- oligonucleotide ligation assays), technika pozwalająca mierzyć długość pojedynczego łańcucha bogatego w G na końcu 3' przez przyłączanie hybrydujących powtórzeń oligonukleotydowych (BAIRD 2005).

#### PODSUMOWANIE

Z powyższego przeglądu wynika doniosła rola telomerów w wielu procesach zachodzących w komórce. Dlatego obserwuje się znaczący postęp w tworzeniu nowych technik i ulepszaniu już istniejących, pozwalających wykrywać i mierzyć telomery, a także badać zmiany w nich zachodzące. Wiedza aktualna pozwala nam zrozumieć wiele procesów, ale liczne jeszcze pozostają do odkrycia. Badając telomery pod kątem struktury ich DNA należy zdawać sobie sprawę, że to nie tylko fizyczne końce chromosomów. Sekwencja

TTAGGG, określana powszechnie jako „telomerowa” u niektórych organizmów, występuje także w innych niż terminalne rejonach chromosomów. Jako powtarzalny, DNA staje się narzędziem w mapowaniu genomów i badaniach ewolucyjnych.

Obecnie trudno uwierzyć, że przed badaniami Barbary McClintock telomery uważano tylko za nic nie znaczące zakończenia chromosomów, a niekodujący telomerowy DNA, za tzw. śmieciowy DNA.

#### TELOMERES – A SIGNIFICANT ROLE OF SMALL SEQUENCES

##### Summary

Telomeres are distal structures of eukaryotic chromosomes, which are responsible for their stability and functioning. They assure complete replication of terminal fragments of chromosomes, prevent degradation and fusion of chromosomes. Telomeres of most chordates are comprised of tandem repeats of the basic unit 5'-(TTAGGG)<sub>n</sub>-3'. The number of repeats of the basic telomeric sequence differs between the chromosomes of one and the same cell. However, it remains within the strictly determined range for a given species, for man it ranges from

2 to 30 th pairs of nucleotides. Younger cells have got longer telomeres whereas the telomeres of older cells are shorter. Cytogenetic studies on telomeric regions of chromosomes have gained significance since the moment of the discovery that this chromosomal fragment actively participates in the process of cancer development, cell ageing and apoptosis. Telomeres consist of non-coding DNA sequences. They contain no genes and they code no proteins but their role in medicine, genetics and evolutionary studies is becoming more and more significant.

#### LITERATURA

ASHLEY T., WARD D. C., 1993. *A hot spot of recombination coincides with an interstitial telomeric*

*sequences in the Armenian hamster.* Cytogenet. Cell. Genet. 62, 169-171.

- AVIV A., 2002. *Telomeres, sex, reactive oxygen species, and human cardiovascular aging*. J. Mol. Med. 80, 689-695.
- BAIRD D. M., 2005. *New developments in telomere length analysis*. Exp. Gerontol. 40, 363-368.
- BAIRD D. M., JEFFREYS A. J., ROYLE N. J., 1995. *Mechanisms underlying telomere repeat turnover, revealed by hypervariable variant repeat distribution patterns in the human Xp/Yp telomere*. EMBO J. 14, 5433-5443.
- BEKAERT S., DERRADJI H., BAATOUT S., 2004. *Telomere biology in mammalian germ cells and during development*. Dev. Biol. 274, 15-30.
- BELLAMY C. O. C., 1997. *p53 and apoptosis*. Br. Med. Bull. 53, 522-538.
- BIANCHI A., DE LANGE T., 1999. *Ku binds telomeric DNA in vitro*. J. Biol. Chem. 274, 21223-21227.
- BIANCHI A., SMITH S., CHONG L., ELIAS P., DE LANGE T., 1997. *TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA*. EMBO J. 16, 1785-1794.
- BIESSMAN H., MASON J. M., 1994. *Telomeric repeat sequences*. Chromosoma 103, 154-161.
- BLACKBURN E. H., 2001. *Switching and signaling at the telomere*. Cell 106, 661-673.
- BLASCO M. A., 2005. *Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging*. EMBO J. 24, 1095-11038.
- BLASCO M. A., 2007. *The epigenetic regulation of mammalian telomeres*. Nat. Rev. Genet. 8, 299-309.
- BOLZAN A. D., BIANCHI M. S., 2006. *Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations*. Mutat. Res. 612, 189-241.
- BROWN T. A., 2001. *Genomy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- CARLSEDER J., 2003. *Telomere repeat binding factors: keeping the ends in check*. Cancer Lett. 194, 189-197.
- COOPER J. P., NIMMO E. R., ALLSHIRE R. C., CECH T. R., 1997. *Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast*. Nature 385, 744-747.
- COULLIN P., ROY L., PELLESTOR F., CANDELIER J. J., BEDHOM B., GUILLIER-GENCİK Z., BERNHEIM A., 2002. *PRINS, the other in situ DNA labeling method useful in cellular biology*. Am. J. Med. Genet. 107, 127-135.
- CROSS S. H., ALLSHIRE R. C., MCKAY S. J., COOKE H. J., 1989. *Cloning of human telomeres by complementation in yeast*. Nature 338, 771-774.
- DE LANGE T., 2002. *Protection of mammalian telomeres*. Oncogene 21, 523.
- DE LANGE T., 2005. *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Gene Dev. 19, 2100-2110.
- DONG C. K., MASUTOMI K., HAHN W. C., 2005. *Telomerase: regulation, function and transformation*. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 54, 85-93.
- DRETS M. E., 2000. *Insights into the structure of the subtelomeric chromosome segments*. Genet. Mol. Biol. 23, 1087-1093.
- DUNHAM M. A., NEUMANN A. A., FASCHING C. L., REDDEL R. R., 2000. *Telomere maintenance by recombination in human cells*. Nat. Genet. 26, 447-450.
- FAJKUS J., SYKOROVA E., LEITCH A. R., 2005. *Telomeres in evolution and evolution of telomeres*. Chromosome Res. 13, 469-479.
- FERREIRA M. G., MILLER K. M., PROMISEL COOPER J., 2004. *Indecent exposure: when telomeres become uncapped*. Mol Cell 13, 7-18.
- GREIDER C. W., 1994. *Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation, shortening and stabilisation*. Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 203-211.
- GREIDER C. W., BLACKBURN E. H., 1989. *A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeatsynthesis*. Nature 337, 331-337.
- GRIFFITH J. D., COMEAU L., ROSENFELD S., STANSEL R. M., BIANCHI A., MOSS H., DE LANGE T., 1999. *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell 97, 503-514.
- HARLEY C. B., 1991. *Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb?* Mutat. Res. 256, 271-282.
- HARLEY C. B., VILLEPONTEAU B., 1995. *Telomeres and telomerase in aging and cancer*. Curr. Opin. Gen. Dev. 5, 249-255.
- HARLEY C. B., FUTCHER A. B., GREIDER C. W., 1990. *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature 345, 458-460.
- HAYFLICK L., 2003. *Living forever and dying in the attempt*. Exp. Gerontol. 38, 1231-1241.
- HAYFLICK L., MOORHEAD P. S., 1961. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp. Cell Res. 25, 585-621.
- JENNINGS B. J., OZANNE S. E., HALES N. C., 2000. *Nutrition, Oxidative damage, telomere shortening, and cellular senescence: individual or connected agents of aging?* Mol. Genet. Metab. 71, 32-42.
- KAWANISHI S., OIKAWA S., 2004. *Mechanism of telomere shortening by oxidative stress*. Ann. Acad. Sci. 1019, 278-84.
- KENNEDY B. K., GOTTA M., SINCLAIR D. A., MILLS K., MCNABB D. S., MURTHY M., PAK S. M., LAROCHE T., GASSER S. M., GUARENTE L., 1997. *Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in S. cerevisiae*. Cell 89, 381-391.
- KOWALSKA A., KOWALIK A., 2006. *Telomer i telomeraza w onkogenezie*. Wsp. Onk. 10, 485-496.
- LONDO O-VALLEJO J. A., 2004. *Telomere length heterogeneity and chromosome instability*. Canc. Lett. 212, 135-144.
- MARCAND S., GILSON E., SHORE D., 1997. *A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast*. Science 275, 986-990.
- MOLENAAR C., WIESMEIJER K., VERWOERD N. P., KHAZEN S., EILS R., TANKE H. J., DIRKS R. W., 2003. *Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes*. EMBO J. 22, 6631-6641.
- MORIN G. B., 1997. *Telomere control of replicative lifespan*. Exp. Gerontol. 32, 375-382.
- MOYZIS R. K., BUCKINGHAM J. M., CRAM L. S., DANI M., DEAVEN L. L., JONES M. D., MEYNE J., RATLIFF R. L., WU J. R., 1988. *A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 85, 6622-6626.
- MUNTONI A., REDDEL R. R., 2005. *The first molecular details of ALT in human tumor cells*. Hum. Mol. Genet. 14, 191-196.
- NANDA I., SCHRAMA D., FEICHTINGER W., HAAF T., SCHARTL M., SCHMID M., 2002. *Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes*. Chromosoma 4, 215-227.
- NOWIS D., GOŁĄB J., 2001. *Rola telomerów i telomerazy w progresji nowotworów. Perspektywy diagnostyczne i terapeutyczne*. Post. Biol. Kom. 2, 243-261.
- O'CONNOR M.S., SAFARI A., LIU D., QIN J., SONGYANG Z., 2004. *The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length*. J. Biol. Chem. 279, 28585-28591.
- OLOVNIKOV A. M., 1973. *A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon*. J. Theor. Biol. 41, 181-90.
- PENKINA M. V., KARPOWA O. I., BOGDANOV F. Yu., 2002. *synaptonemal complex proteins: specific proteins of meiotic chromosomes*. Mol. Biol. 36, 304-313.

- PICH U., FUCHS J., SCHUBERT I., 1996. *How to Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTAGGG sequences?* Chromosome Res. 4, 207-213.
- PLUTA A.F., ZAKIAN V. A., 1989. *Recombination occurs during telomery formation in yeast.* Nature 337, 429-433.
- REDDER R. R., 2003. *Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer.* Cancer Lett. 194, 155-162.
- RODIONOV A. V., 1996. *Micro versus macro: a review of structure and functions of avian micro- and macrochromosomes.* Rus. J. Genet. 32, 517-527.
- RUFER N., DRAGOWSKA W., THORNBURY G., ROOSNEK E., LANSDORP P. M., 1998. *Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry.* Nat. Biotechnol. 16, 743-747.
- SHAY J. W., BACCETTI S., 1997. *A survey of telomerase activity in human cancer.* Eur. J. Cancer 33, 787-91.
- SHAY J. W., WRIGHT W. E., WERBIN H., 1993. *Loss of telomeric DNA during aging may predispose cells to cancer.* Int. J. Oncol. 3, 559-563.
- SHORE D., 2001. *Telomeric chromatin: replicating and wrapping up chromosome ends.* Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 189-198.
- SKÓRZYŃSKA K., KOLANO J., KOCKI J., WOJCIEROWSKI J., 2003. *Białka TRF1/TRF2 oraz TANK1/TANK2 i ich udział w regulacji długości telomerów.* Post. Biol. Kom. 30, 201-213.
- SLIJEPCEVIC P., 1998. *Telomere length regulation – a view from the individual chromosome perspective.* Exp. Cell Res. 244, 268-274.
- SLIJEPCEVIC P., 2001. *Telomere length measurement by Q-FISH.* Met. Cell Sci. 23, 17-22.
- SLIJEPCEVIC P., HANDE M. P., BOUFFLER S. D., LANSDORP P. M., BRYANT P. E., 1997. *Telomere length, chromatin structure and chromosome fusogenic potential.* Chromosoma 106, 413-421.
- SMOGRZEWSKA A., VAN STEENSEL B., BIANCHI A., OLEMANN S., SCHAEFER M. R., SCHNAPP G., DE LANGE T., 2000. *Control of human telomere length by TRF1 and TRF2.* Mol. Cell. Biol. 20, 1659-1668.
- STANSEL R. M., DE LANGE T., GRIFFITH J. D., 2001. *T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 30 telomeric overhang.* EMBO J. 20, 5532-5540.
- SZALATA M., SLOMSKI R., 2000. *Zakończenia chromosomów: telomery, telomeraza i białka współdziałające.* Post. Biol. Kom. 27, 95-117.
- TOMMERUP H., DOUSMANIS A., DE LANGE T., 1994. *Unusual chromatin in human telomeres.* Mol. Cell. Biol. 14, 5777-5785.
- VAN STEENSEL B., SMOGRZEWSKA A., DE LANGE T., 1998. *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions.* Cell 92, 401-413.
- WANG F., PODELL E. R., ZAUG A. J., YANG Y., BACIU P., CECH T. R., LEI M., 2007. *The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor.* Nature 445, 506-510.
- WRIGHT W. E., SHAY J. W., 1992a. *Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence.* Trends Genet. 8, 193-197.
- WRIGHT W. E., SHAY J. W., 1992b. *The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization.* Exp. Gerontol. 27, 383-389.
- WU H., GEORGE K., YANG T. C., 1998. *Estimate of true incomplete exchanges using fluorescence in situ hybridization with telomere probes.* Int. J. Radiat. Biol. 73, 521-527.
- ZAKIAN V. A., 1989. *Structure and function of telomeres.* Annu. Rev. Genet. 23, 579-604.