

EWA SIKORA

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

TELOMERY I TELOMERAZA – STARZENIE KOMÓRKOWE NAGRODA NOBLA Z FIZJOLOGII LUB MEDYCyny 2009

WPROWADZENIE

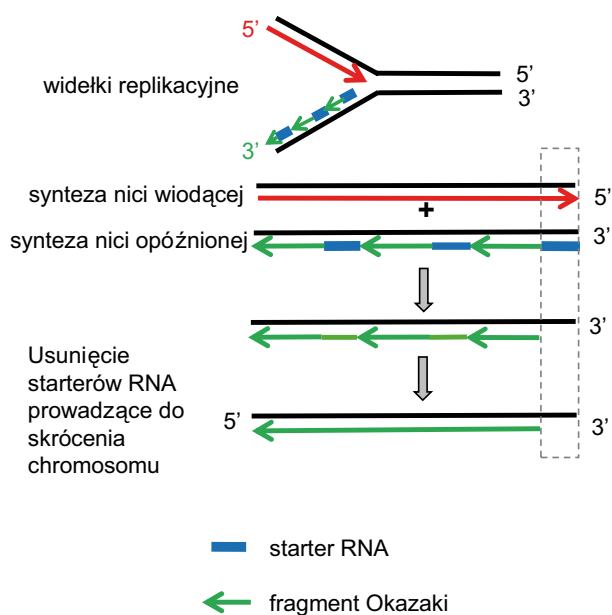
W 2009 r. Nagrodę Nobla z dziedziny Fizjologii lub Medycyny, za odkrycie, w jaki sposób telomery i enzym telomeraza chronią chromosomy, otrzymała trójka amerykańskich uczonych: Elizabeth H Blackburn, Jack W Szostak i Carol W Greiner. Ich badania, prowadzone na przełomie lat 70/80 ubiegłego wieku, pozwoliły odpowiedzieć na od dawna nurtujące pytanie, w jaki sposób krocówki chromosomów zabezpieczają je przed uszkodzeniami oraz wyjaśnić ich rolę jako licznika (replikometru) "zliczającego" podziały komórek do osiągnięcia ich limitu (starzenia replikacyjnego). W serii bardzo inteligentnych doświadczeń genetycznych pokazali oni, że końcówki chromosomów (telomery) mają zachowaną ewolucyjnie strukturę i funkcje. Następnie, dość żmudne badania biochemiczne pozwoliły na wykrycie enzymu telomerazy, która zapobiega skracaniu telomerów w ko-

mórkach nie podlegających procesowi starzenia replikacyjnego. Do takich należą komórki rozrodcze i nowotworowe. Badania zeszłorocznych noblistów, chociaż o charakterze czysto poznawczym, prowadzone głównie na jednokomórkowych organizmach jakim jest orzęsek i drożdże, mają jednak przełożenie aplikacyjne, gdyż wzbogacają naszą wiedzę z dziedziny starzenia, chorób nowotworowych oraz innych chorób związanych ze starzeniem, a także chorób genetycznych. Dały nowy, obiecujący cel terapii nowotworowej, a także nadzieję na przedłużenie życia człowieka, a nawet jego nieśmiertelność. Jednakże, jak to zwykle bywa w nauce, badania, które nastąpiły po tych odkryciach, zweryfikowały pogląd na rolę telomerazy w procesie starzenia i chorobach nowotworowych. Bynajmniej jej nie pomniejszając, lecz raczej komplikując.

STAN WIEDZY PRZED ODKRYCIEM TELOMERAZY

Na początku ubiegłego wieku Thomas Morgan (Nagroda Nobla w 1933 r.), mając za przedmiot badań muszkę owocową (*D. melanogaster*), wykazał, że dziedziczenie związane jest z chromosomami. Natomiast następni nobliści, Herman Muller i Barbara McClintock, opisali końcówki chromosomów (telomery) jako struktury chroniące chromosomy przed uszkodzeniami. Jedną z następnych

nagród Nobla została przyznana w 1962 r. za odkrycie struktury DNA (F.Crick, J.Watson i M.Wilkins), co miało miejsce w 1953 r. Trzy lata później, Arthur Kornberg odkrył polimerazę – enzym syntetyzujący cząsteczkę DNA z pojedynczych nukleotydów i otrzymał nagrodę Nobla jeszcze przed odkrywcami struktury DNA, bo w 1959 roku (<http://nobelprize.org>). Badania tych noblistów, w



Ryc. 1. Problem końca replikacji.

dziedzinie nowoczesnej genetyki i biochemii, przyczyniły się bez wątpienia do wyjaśnienia roli telomerów i telomerazy w ochronie chromosomów. W międzyczasie, jednego z najważniejszych odkryć biologii komórki, dokonał Leonard Hayflick, który wykazał, że

prawidłowe komórki somatyczne (fibroblasty), hodowane *in vitro*, przestają się dzielić, w dodatku nie po określonym czasie, ale po przebyciu 50–70 skumulowanych podwojeń populacji (HAYFLICK i MOORHEAD 1961). Limit ten później nazwano limitem HAYFLICKA, ale on sam opisane zjawisko nazwał starzeniem replikacyjnym (ang. replicative senescence). Niezależnie od siebie WATSON (1972) i OLOVNIKOV (1973) przewidzieli, że taki wewnętrzny „replikometr” może mieć związek z tak zwanym problemem końca replikacji, co przedstawiono na Ryc. 1. Polimeraza syntetyzująca DNA dołącza do siebie nukleotydy poczynając zawsze od końca 5'. Tak więc, jeśli matrycą jest nić tak zwana opóźniona, której synteza zachodzi poprzez fragmenty Okazaki, to po wycięciu startera, końcówka nowo-syntetyzowanego DNA pozostaje krótsza i proces ten powtarza się z każdym podziałem, aż do osiągnięcia krytycznej długości telomerów, co stanowi sygnał do zatrzymania podziałów. W tym czasie jednak nikt nie wiedział w jaki sposób krótkie telomery przekazują sygnał, aby zatrzymać podziały prawidłowych komórek, oraz w jaki sposób komórki nowotworowe, które mogą dzielić się w hodowli w nieskończoność, radzą sobie z tym problemem.

BADANIA BLACKBURN, GREINER I SZOSTAKA

Na początku lat 70. zeszłego wieku Liz Blackburn zainteresowała się strukturą telomerów. Przedmiotem jej badań były tak zwane minichromosomy pierwotniaka, orzęska *Tetrahymena*. Są one znacznie krótsze od chromosomów ssaków i łatwiej było analizować ich strukturę ówczesnymi metodami. Otóż okazało się, że te bardzo krótkie chromosomy mają bardzo długie liniowe zakończenia o powtarzającej się tandemowej sekwencji CCCAA-TTGGGG. Co ciekawe, te same sekwencje znalazła ona później w innych chromosomach orzęska, a inni potwierdzili ich obecność u innych gatunków orzęsków. Następnie, współpraca BLACKBURN z SZOSTAKIEM doprowadziła do wykazania, że sekwencja telomerowa orzęska doskonale chroni liniowy plazmid drożdży piekarskich

przed zlepianiem i pęknięciami. Co ciekawe, telomery z orzęska, wprowadzone do komórek drożdży, ulegały wydłużeniu o sekwencje charakterystyczne dla normalnych, drożdżowych chromosomów (SZOSTAK i BLACKBURN 1982, SHAMPAY i współaut. 1984, BLACKBURN i współaut. 2006). Był to dobry moment, aby zacząć poszukiwania enzymu, który potrafi dołączać nukleotydy do liniowego DNA na końcach chromosomów. Liz Blackburn dokonała tego razem ze swoją doktorantką Carol Greiner i w 1989 r. opublikowały, do dziś aktualny, model syntezy telomerów przez enzym nazwany przez nie telomerazą. Telomeraza jest odwrotną transkryptazą i składa się z matrycy RNA oraz białkowej części katalitycznej (GREIDER i BLACKBURN 1989, BLACKBURN i współaut. 2006).

TELOMERY I TELOMERAZA 20 LAT PÓŹNIEJ

Badania trójki noblistów były podyktowane ciekawością naukową i nie myśleli oni o

zastosowaniu wyników tych badań w praktyce, zwłaszcza że prowadzone były na organi-

zmach jednokomórkowych. Jednakże wkrótce po opublikowaniu pracy dwóch zeszłorocznych noblistek (BLACKBURN i Greiner) wykazano, że replikacyjne starzenie fibroblastów związane jest ze skracaniem się telomerów, spowodowanym brakiem aktywności telomerazy w tych komórkach, która występuje w komórkach linii płciowej (HARLEY i współaut. 1990) oraz większości komórek unieśmiertelnionych i nowotworowych (KIM i współaut. 1994). Odkrycie telomerazy natychmiast przydało miano replikometru lub molekularnego zegara, zliczającego podziały prawidłowych komórek. Zwłaszcza że transfekcja fibroblastów genem kodującym aktywną podjednostką katalityczną telomerazy spowodowała obejście przez komórki limitu HAYFLICKA i wejście na ścieżkę nieograniczonych podziałów (BODNAR i współaut. 1998).

Z chwilą wykazania – mimo pewnych różnic gatunkowych – uniwersalności telomerazy obudziła się nadzieja, z jednej strony na przedłużanie życia komórek, a tym samym organizmu poprzez transfekcje komórek genem telomerazy, a z drugiej strony, na szybki postęp w leczeniu choroby nowotworowej poprzez hamowanie aktywności telomerazy. Postępujące badania zweryfikowały te oczekiwania pokazując, że skracanie telomerów, prowadzące do starzenia komórkowego, stanowi mechanizm protekcyjny przed transformacją nowotworową i, odwrotnie, wydłużanie telomerów poprzez wznowienie aktywności telomerazy jest czynnikiem sprzyjającym powstawaniu nowotworów (COLLADO i współaut. 2007). Tak więc, zwiększenie liczby podziałów prawidłowych komórek niesie ze sobą ryzyko ich transformacji do komórek nowotworowych. Ponadto, zasto-

sowanie czulszych metod pozwoliło na wykrycie aktywnej telomerazy nie tylko w komórkach o nieograniczonych podziałach, ale także w prawidłowych komórkach człowieka o dużym potencjale regeneracyjnym, takich jak komórki szpiku kostnego, skóry, układu pokarmowego, aktywowanych limfocytów, a w szczególności komórkach macierzystych i progenitorowych. Aczkolwiek aktywność telomerazy jest niewystarczająca do utrzymania długości telomerów w tych komórkach i obserwuje się ich skracanie wraz z wiekiem organizmu (ARTANDI i DEPINHO 2010). Z drugiej strony, nie wszystkie komórki nowotworowe wyrażają ekspresję telomerazy wystarczającą do utrzymania długości telomerów, natomiast posiadają inny mechanizm ich wydłużania zwany ALT (ang. alternative lengthening telomere) (MUNTONI i REDDEL 2005).

Co ciekawe, aktywność telomerazy gryzoni laboratoryjnych utrzymuje się na wysokim poziomie we wszystkich komórkach somatycznych i nie występuje u nich zjawisko skracania telomerów, jednak zwierzęta te starzeją się, a długość ich życia stanowi zaledwie niewielką część długości życia człowieka. Natomiast myszy transgeniczne z wyciszoną telomerazą charakteryzują się krótszym życiem, w porównaniu do zwierząt kontrolnych, już w pierwszym pokoleniu, a począwszy od szóstego pokolenia wzrasta u nich zachorowalność na nowotwory, czego powodem jest brak ochrony chromosomów przez telomery. Chromosomy bez ochrony w postaci dostatecznie długich telomerów ulegają łatwo fuzji i są łamliwe, co prowadzi do nieprawidłowych podziałów i niestabilności genomowej (BLASCO i współaut. 1997).

TELOMERY A STARZENIE KOMÓRKOWE I NOWOTWÓR

Telomery chronią końcówki chromosomów. Są zbudowane z bogatych w guaninę powtórzeń nukleotydów. U kręgowców telomery składają się z nukleotydów o sekwencji TTAGGG, w postaci podwójnej nici o długości wielu tysięcy par zasad, ale kończą się kilkuset-zasadową, pojedynczą nicią o końcu 3', która poprzez „wtargnięcie” w strukturę dwuniciowego telomeru tworzy charakterystyczną, podobną do lassa pętlę (GRIFFITH i współaut. 1999). Struktura telomeru utrzymywana jest dzięki obecności kompleksu wielu białek nazywanych shelteriną, od angielskie-

go słowa shelter (osłona, osłaniać). Także telomeraza, jak się okazuje, jest dużą rybo-proteina, która oprócz matrycy RNA (ang. telomerase RNA component, TERC) i części katalitycznej (ang. telomerase reverse transcriptase, TERT) zawiera kilka innych białek niezbędnych do jej funkcjonowania. Mutacja jednego z nich (ang. disceritin) powoduje bardzo ciężkie schorzenie (ang. dyskeratosis cognita), którego jednym z najgroźniejszych objawów jest anemia aplastyczna (ARTANDI i DEPINHO 2010). Ilościowe i jakościowe zmiany innych białek zarówno kompleksu

telomerazy, jak i shelteriny prowadzą do zaburzeń w funkcjonowaniu enzymu i niewłaściwej protekcji chromosomów (ARTANDI i DEPINHO 2010).

Związek pomiędzy telomerami, telomerażą a starzeniem komórkowym i transformacją nowotworową wydaje się być oczywisty, ale wcale nie taki łatwy do wyjaśnienia. Bardzo wiele w badaniach tychże powiązań pomogły myszy transgeniczne, których jest w tej chwili już bardzo dużo, z różnymi kombinacjami wyłączania różnych genów na czele ze składnikami kompleksu telomerazy i genów supresorów nowotworu. Czytelnika odsyłam do wyśmienitych prac przeglądowych (DENG i współaut. 2008, BLASCO 2005, ARTANDI i DEPINHO 2010), natomiast w tym miejscu skupię się głównie na wynikach tych badań w odniesieniu do mechanizmów zachodzących w komórkach człowieka. Nie zapominajmy bowiem, że gryzonie, w tym mysz laboratoryjna, wykazują wysoką aktywność telomerazy w komórkach somatycznych i brak skracania telomerów. Oczywiście ma to swoje pozytywne strony, gdyż poprzez knockout genu telomerazy można badać efekt skracania telomerów.

Jednakże pierwsze doświadczenia potwierdzające rolę telomerów w starzeniu komórkowym zostały przeprowadzone na fibroblastach człowieka (SHAY i współaut. 1991). Zgodnie z obserwacjami HAYFLICKA, o których pozwolę sobie przypomnieć w tym miejscu, fibroblasty człowieka dzielą się w hodowli kilkadziesiąt razy i wchodzą w bezpodziałową fazę zwaną starzeniem (ang. replicative senescence) (HAYFLICK i MOORHEAD 1961). Dzisiaj wiemy, że komórki stare nie tylko się nie dzielą, ale są dużo większe i bardziej ziarniste niż komórki młode oraz mają podwyższoną aktywność kwaśnej β -galaktozydazy, tak zwanej SA- β -Gal (ang. senescence associated- β -galactosidase). Zgromadzono już wiele danych pokazujących, że nie tylko fibroblasty, ale także wiele innych komórek somatycznych człowieka ulega replikacyjnemu starzeniu *in vitro*. Są to komórki skóry – keratynocyty i melanocyty (BANDYOPADHYAY i współaut. 2001), limfocyty (EF-

FROS i współaut. 2003), komórki nabłonkowe (ROMANOV i współaut. 2001), śródbłonkowe (ERUSALIMSKY i SKENE 2009), mięśni gładkich naczyń (GORENNE i współaut. 2006) oraz komórki mezenchymalne i macierzyste (SHIBATA i współaut. 2007). Stare komórki nie dzielą się pomimo obecności w pożywce wszystkich niezbędnych składników, ale też nie umierają i są w pełni funkcjonalne (CAMPISI 2001). Proces starzenia komórek *in vitro*, niezależnie od tych wspólnych cech, charakteryzuje się pewnymi komórkowo-specyficznymi cechami. Na przykład limfocyty człowieka, które wyczerpały limit podziałów nie posiadają na swej powierzchni receptora CD28 (BRZEZINSKA i współaut. 2004, 2003), a komórki nabłonkowe charakteryzują się tak zwanym dwufazowym starzeniem (GARBE i współaut. 2007).

Wracając jednak do fibroblastów, prawie 20 lat temu wykazano, że zainfekowanie ich wirusem SV40 powoduje inaktywację białek genów supresorów nowotworu, blokujących cykl komórkowy, to znaczy p53 i Rb, i zwiększa liczbę podziałów fibroblastów, które przyczyniają się z kolei do postępującego skracania się telomerów. Jednakże komórki wchodzą w końcu w tak zwany kryzys. W czasie kryzysu większość z nich umiera, a tylko niewielka część staje się komórkami nieśmiertelnymi o wysokiej aktywności telomerazy (SHAY i współaut. 1991). Do dzisiaj nieznanym jest mechanizm aktywacji telomerazy w tych komórkach, natomiast doświadczenie to wskazało na rolę p53 i Rb w starzeniu komórkowym oraz na to, iż bardzo krótkie telomery przestają chronić chromosomy, które ulegają zlepianiu, łamaniu i prowadzą do niestabilności chromosomowej, tak charakterystycznej dla komórek nowotworowych (FINKEL i współaut. 2007). Teraz już tylko pozostało znaleźć mechanizm, który pokazałby jak powiązać skracanie telomerów i aktywacją białek (p53, Rb) zatrzymujących komórki w fazie G1 cyklu komórkowego.

Niezwykle pomocne tutaj okazały się badania nad mechanizmem odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA.

TELOMERY CZY USZKODZENIA DNA?

Mysie fibroblasty embrionalne, pomimo aktywnej telomerazy, także ulegają replikacyjnemu starzeniu, gdyż w hodowli przechodzą ograniczoną liczbę podziałów i, co ciekawe,

jest ona mniejsza niż fibroblastów człowieka (BLASCO i współaut. 1997). Bazując na tym fakcie RUBIN (1997) podważył znaczenie replikacyjnego starzenia komórek *in vitro*

twierdząc, że zahamowanie podziałów jest wynikiem stresu, jakie komórki przeżywają w niekorzystnym środowisku, w którym stężenie tlenu przewyższa znacznie to występujące w organizmie. Faktycznie, okazało się, że mysie komórki embrionalne nie wykazują limitu podziałów kiedy rosną w środowisku o stężeniu tlenu podobnym do występującego w organizmie (PARRINELLO i współaut. 2003). Ponadto wykazano, że nie tyle skracanie telomerów, co utrata ich funkcjonalności, spowodowana na przykład odłączeniem od nich białek budujących kompleks shelteriny, jest sygnałem do starzenia komórek (VON ZGLINICKI 2003).

Jednocześnie pokazano, że stres oksydacyjny może prowadzić do przedwczesnego starzenia, tak zwanego SIPS (ang. stress induced premature senescence) fibroblastów i komórek nabłonkowych człowieka (TOUSSAINT i współaut. 2000; SERRANO i BLASCO 2001), które daje podobne symptomy jak starzenie replikacyjne, ale zachodzi w ciągu kilku dni od zadziałania bodźca (np. nadtlenu wodoru) i nie wymaga skracania telomerów. Tak więc obecnie, chociaż rozróżnia się starzenie replikacyjne, SIPS, i jeszcze w dodatku OIS (ang. oncogene induced senescence), to prawdopodobnie punktem wyjścia do nieodwracalnego zatrzymania podziałów, zwanego starzeniem komórkowym, są trwałe, nie reperowane uszkodzenia DNA.

Starzenie komórkowe indukowane onkogenem Ras (H-RasV12) wykazał po raz pierwszy SERRANO i współaut. (1997). Podobnie, przedwczesne starzenie komórkowe indukują inne aktywowane onkogeny, jak Raf, MEK i BRAF (PRIEUR i PEEPER 2008). W 2005 r. cztery grupy niezależnie, w tym samym czasie wykazały, że w nowotworach indukowanych wirusami w stadium początkowym, występują *in vivo* komórki charakteryzowane jako stare (SA- β -Gal-pozytywne), dając dowód temu, że starzenie komórek stanowi barierę dla rozwoju nowotworu. Wykazano to w przypadku gruczolaka myszy, białaczki limfocytarnej, raka prostaty i niezłośliwych znamion człowieka (BRAIG i współaut. 2005, CHEN i współaut. 2005, COLLADO i współaut. 2005, MICHALOGLOU i współaut. 2005). Tak więc wydaje się, że starzenie komórkowe można śmiało traktować jako odpowiedź komórki na stres, a nie proces zaprogramowany, jak wcześniej sądzono (SHAY i RONINSON 2004). W tym kontekście starzenie na skutek skracania telomerów można również uznać za odpowiedź na stres (VON ZGLINICKI

i współaut. 2003), o czym będzie mowa w dalszej części.

Jeśli słuszne jest założenie teorii ewolucyjnej, że starzenie polega na stopniowym gromadzeniu uszkodzonych w wyniku stresu (głównie oksydacyjnego, ale nie tylko) cząstek i komórek (KIRKWOOD 2008b), to w starzejącym się organizmie powinno być coraz więcej komórek o fenotypie „starej komórki”. Rzeczywiście znaleziono takie komórki w skórze człowieka, pawiana i myszy, a także w naczyniach krwionośnych gryzoni i człowieka i to wśród komórek śródbłonkowych, jak i mięśni gładkich, w wątrobie i tkance tłuszczowej (JEYAPALAN i SEDIVY 2008). Ostatnio grupa von Zglinickiego wykazała obecność starych komórek w wielu narządach starych myszy (WANG i współaut. 2009).

W dodatku okazało się, że niezależnie od tego, czy starzenie występuje na skutek skracania telomerów, czy też pozbawienia ich białek ochronnych lub w wyniku stresu oksydacyjnego, czy też genotoksycznego, to zasadniczo pierwotną przyczyną są podwójne uszkodzenia DNA, które mogą zachodzić zarówno w telomerowym, jak i nietelomerowym odcinku DNA (SEDELNIKOVA i współaut. 2004). Aktywują one ścieżkę przekazywania sygnału, która poprzez białka sensorowe (kompleks MRN) i kinazy białkowe: ATM, ATR, CHK1 i CHK2, aktywuje białko p53, które jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym bądź geny białek proapoptotycznych, bądź inhibitor cyklino-zależnych kinaz, p21 który prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego (D'ADDA DI FAGAGNA 2008, PRIEUR i PEEPER 2008).

Kolokalizację podwójnych uszkodzeń DNA z aktywną SA- β -Gal obserwowano zarówno *in vitro* (NAKAMURA i współaut. 2008), jak i *in vivo* (HERBIG i współaut. 2006, SEDELNIKOVA i współaut. 2008). Wydaje się, że również starzenie indukowane onkogenami zachodzi poprzez uszkodzenia DNA spowodowane hiperproliferacją (MICHALOGLOU i współaut. 2008).

Wracając do roli telomerów w starzeniu, to wydaje się, że ich skracanie, powodujące w którymś momencie podwójne uszkodzenia DNA, prowadzi do aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej, która jest zwana DDR (ang. DNA damage response) i ma działanie dobroczynne. Mutacje p53 są niezwykle częste w nowotworach. Jeśli więc nastąpi skrócenie telomerów, a sygnał nie będzie przekazany do p53, komórki nie zatrzymają podziałów, co może skutkować niestabilnością chromosomową.

Widzimy teraz, że terapia przeciwnowotworowa polegająca na hamowaniu aktywności telomerazy może spowodować efekt odwrotny od zamierzonego.

Znaczenie uszkodzeń DNA w procesie starzenia organizmu potwierdzono na bardzo wielu mysich modelach z różnymi genetycznymi defektami powodującymi wzrost uszkodzeń i/lub zmniejszoną naprawę DNA (GARINIS i współaut. 2008).

Jednakże starzenie komórkowe, chociaż z jednej strony stanowi barierę dla nowotworu, gdyż komórki, które osiągnęły stan trwałego zatrzymania podziałów, nie ulegną transformacji nowotworowej, to z drugiej strony, może stymulować wzrost komórek przednowotworowych. Jak to się dzieje? Otóż nie zapominajmy, że podczas starzenia komórka

wchodzi nie tylko w etap trwałego zatrzymania podziałów, ale zmienia ona morfologię i funkcje; przechodzi swoiste przeprogramowanie (CAMPISI i D'ADDA DI FAGAGNA 2007). Stare komórki zaczynają wydzielać do środowiska rozmaite czynniki, w tym cytokiny prozapalne. Nowy, „sekrecyjny” fenotyp pojawia się w komórkach niezależnie od tego czy weszły w starzenie replikacyjne, czy też SIPS, w tym OIS (KUILMAN i PEEPER 2009). Cytokiny wydzielane przez komórki, które uległy starzeniu, przyczyniają się do powstania w organizmie chronicznego stanu zapalnego (ang. low grade inflammatory state), który może sprzyjać osłabieniu funkcji narządów, pojawianiu się chorób związanych z wiekiem, w tym choroby nowotworowej.

CZY BĘDZIEMY NIEŚMIERTELNI?

Nieśmiertelność! Odwieczne marzenie człowieka, przywilej bogów. A jednak żyjemy coraz dłużej, ale ma to swoją cenę. Długie życie sprzyja ujawnieniu się chorób związanych z wiekiem: choroby nowotworowej, choroby układu krążenia, chorób neurodegeneracyjnych, zespołu metabolicznego (HOLLIDAY 2006). Proces starzenia jest plastyczny, ale nieunikniony, gdyż spowodowany uszkodzeniami makrocząsteczek, w tym DNA, wynikającymi z przypadkowych błędów w replikacji oraz działania reaktywnych form tlenu powstających w trakcie oddychania komór-

kowego (KIRKWOOD 2008a). Jednakże plastyczność procesu starzenia daje obietnice możliwości modyfikowania go i przedłużania życia, z jednoczesnym oddaleniem w czasie chorób związanych ze starzeniem (BUTLER i współaut. 2008). O ile pomysł na wydłużanie życia poprzez zapobieganiu skracaniu telomerów wydaje się dzisiaj chybiony, o tyle oddziaływanie na uszkodzenia DNA oraz poprawę zdolności do jego naprawy, wydaje się bardzo obiecujące (MAHMOUDI i współaut. 2008).

TELOMERES, TELOMERASES AND CELLULAR SENESCENCE. 2009 NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE

Summary

The 2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to Elizabeth H BLACKBURN, Jack W SZOSTAK and Carol W GREIDER for their discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase. They solved a fundamental problem in biology, namely how can the ends of chromosomes (telomeres) avoid erosion during cellular divisions. First, working on unicellular organisms, such as yeast and ciliate, they demonstrated that chromosomal ends have an evolutionary conserved structure and function. Then, in a series of meticulous biochemical studies, they revealed the existence of a previously predicted enzyme, named telomerase, responsible for the synthesis of telomeres. Telomerase appeared to be a nucleoprotein, reverse transcriptase with an intrinsic RNA template. The active telomerase was shown by others in cancer but not in normal somatic cells and telomere erosion was immediately considered as a “replicom-

eter” or mitotic clock” counting divisions of somatic normal cells and inducing permanent cell growth arrest (replicative senescence). The discovery of telomerase has deeply influenced biomedical research and paved the way for the development of cancer therapies based on telomerase inhibition. However, subsequently it appeared that cellular senescence is beneficial because it protects the division of cells with short labile chromosomes being potentially prone to cancer transformation. Recently, it has been shown that senescence is a cell stress response to telomeric and nontelomeric DNA damage induced by oncogenic viruses, oxygen or genotoxic stress and critically short or nonfunctional telomeres, respectively. This reinforced the idea of cellular senescence as a cancer barrier but raised doubts in “replicometer” as a main cause of cellular senescence. However the story seems to be even more complicated and double-dealing as senescent cells

secrete a myriad of factors, including pro-inflammatory cytokines, creating a microenvironment supporting organismal ageing and the development of

age-related diseases, including cancer. Altogether, it seems, that the hopes put in telomerase as a key to eternal youth turned out to be vain.

LITERATURA

- ARTANDI S. E., DEPINHO R. A., 2010. *Telomeres and telomerase in cancer*. *Carcinogenesis* 31, 9-18.
- BANDYOPADHYAY D., TIMCHENKO N., SUWA T., HORNSBY P. J., CAMPISI J., MEDRANO E. E., 2001. *The human melanocyte: a model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells*. *Exp. Gerontol.* 36, 1265-1275.
- BLACKBURN E. H., GREIDER C. W., SZOSTAK J. W., 2006. *Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging*. *Nat. Med.* 12, 1133-1138.
- BLASCO M. A., 2005. *Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging*. *Embo J.* 24, 1095-1103.
- BLASCO M. A., LEE H. W., HANDE M. P., SAMPER E., LANSDORP P. M., DEPINHO R. A., GREIDER C. W., 1997. *Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA*. *Cell* 91, 25-34.
- BODNAR A. G., OUELLETTE M., FROLKIS M., HOLT S. E., CHIU C. P., MORIN G. B., HARLEY C. B., SHAY J. W., LICHTSTEINER S., WRIGHT W. E., 1998. *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. *Science* 279, 349-352.
- BRAIG M., LEE S., LODDENKEMPER C., RUDOLPH C., PETERS A. H., SCHLEGELBERGER B., STEIN H., DORKEN B., JENUWEIN T., SCHMITT C. A., 2005. *Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development*. *Nature* 436, 660-665.
- BRZEZINSKA A., MAGALSKA A., SIKORA E., 2003. *Proliferation of CD8+ in culture of human T cells derived from peripheral blood of adult donors and cord blood of newborns*. *Mech. Ageing Dev.* 124, 379-387.
- BRZEZINSKA A., MAGALSKA A., SZYBINSKA A., SIKORA E., 2004. *Proliferation and apoptosis of human CD8(+)CD28(+) and CD8(+)CD28(-) lymphocytes during aging*. *Exp. Gerontol.* 39, 539-544.
- BUTLER R. N., MILLER R. A., PERRY D., CARNES B. A., WILLIAMS T. F., CASSEL C., BRODY J., BERNARD M. A., PARTRIDGE L., KIRKWOOD T., MARTIN G. M., OLSHANSKY S. J., 2008. *New model of health promotion and disease prevention for the 21st century*. *Bmj* 337, a399.
- CAMPISI J., 2001. *Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism*. *Trends Cell. Biol.* 11, S27-31.
- CAMPISI J., D'ADDA DI FAGAGNA F., 2007. *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 729-740.
- CHEN Z., TROTMAN L. C., SHAFFER D., LIN H. K., DOTAN Z. A., NIKI M., KOUTCHER J. A., SCHER H. I., LUDWIG T., GERALD W., CORDON-CARDO C., PANDOLFI P. P., 2005. *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. *Nature* 436, 725-730.
- COLLADO M., GIL J., EFYAN A., GUERRA C., SCHUHMACHER A. J., BARRADAS M., BENGURIA A., ZABALLOS A., FLORES J. M., BARBACID M., BEACH D., SERRANO M., 2005. *Tumour biology: senescence in premalignant tumours*. *Nature* 436, 642.
- COLLADO M., BLASCO M. A., SERRANO M., 2007. *Cellular senescence in cancer and aging*. *Cell* 130, 223-233.
- D'ADDA DI FAGAGNA F., 2008. *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. *Nat. Rev. Cancer* 8, 512-522.
- DENG Y., CHAN S. S., CHANG S., 2008. *Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection*. *Nat. Rev. Cancer* 8, 450-458.
- EFFROS R. B., DAGARAG M., VALENZUELA H. F., 2003. *In vitro senescence of immune cells*. *Exp Gerontol* 38, 1243-1249.
- ERUSALIMSKY J. D., SKENE C., 2009. *Mechanisms of endothelial senescence*. *Exp. Physiol.* 94, 299-304.
- FINKEL T., SERRANO M., BLASCO M. A., 2007. *The common biology of cancer and ageing*. *Nature* 448, 767-774.
- GARBE J. C., HOLST C. R., BASSETT E., TLSTY T., STAMPFER M. R., 2007. *Inactivation of p53 function in cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis*. *Cell Cycle* 6, 1927-1936.
- GARINIS G. A., VAN DER HORST G. T., VIJG J., HOEIJMAKERS J. H., 2008. *DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem*. *Nat. Cell. Biol.* 10, 1241-1247.
- GORENNE I., KAVURMA M., SCOTT S., BENNETT M., 2006. *Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis*. *Cardiovasc. Res.* 72, 9-17.
- GREIDER C. W., BLACKBURN E. H., 1989. *A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis*. *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., FUTCHER A. B., GREIDER C. W., 1990. *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. *Nature* 345, 458-460.
- HAYFLICK L., MOORHEAD P. S., 1961. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- HERBIG U., FERREIRA M., CONDEL L., CAREY D., SEDIVY J. M., 2006. *Cellular senescence in aging primates*. *Science* 311, 1257.
- HOLLIDAY R., 2006. *Ageing is no longer an unsolved problem in biology*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1067, 1-9.
- JEYAPALAN J. C., SEDIVY J. M., 2008. *Cellular senescence and organismal aging*. *Mech. Ageing Dev.* 129, 467-474.
- KIM N. W., PIATYSZEK M. A., PROWSE K. R., HARLEY C. B., WEST M. D., HO P. L., COVIELLO G. M., WRIGHT W. E., WEINRICH S. L., SHAY J. W., 1994. *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. *Science* 266, 2011-2015.
- KIRKWOOD T. B., 2008a. *A systematic look at an old problem*. *Nature* 451, 644-647.
- KIRKWOOD T. B., 2008b. *Understanding ageing from an evolutionary perspective*. *J. Intern. Med.* 263, 117-127.
- KUILMAN T., PEEPER D. S., 2009. *Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress*. *Nat. Rev. Cancer* 9, 81-94.
- MAHMOUDI M., GORENNE I., MERCER J., FIGG N., LITTLEWOOD T., BENNETT M., 2008. *Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent*

- pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells.* Circ. Res. 103, 717-725.
- MICHALOGLU C., VREDEVELD L. C., SOENGAS M. S., DE-NOYELLE C., KUILMAN T., VAN DER HORST C. M., MAJOUR D. M., SHAY J. W., MOOI W. J., PEEPER D. S., 2005. *BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi.* Nature 436, 720-724.
- MICHALOGLU C., VREDEVELD L. C., MOOI W. J., PEEPER D. S., 2008. *BRAF(E600) in benign and malignant human tumours.* Oncogene 27, 877-895.
- MUNTONI A., REDDEL R. R., 2005. *The first molecular details of ALT in human tumor cells.* Hum. Mol. Genet. 14, Spec No. 2, R191-196.
- NAKAMURA A. J., CHIANG Y. J., HATHCOCK K. S., HORIKAWA I., SEDELNIKOVA O. A., HODES R. J., BONNER W. M., 2008. *Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence.* Epigenetics Chromatin 1, 6.
- 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, 181-190.
- PARRINELLO S., SAMPER E., KRTOLOCA A., GOLDSTEIN J., MELOV S., CAMPISI J., 2003. *Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts.* Nat. Cell Biol. 5, 741-747.
- PRIEUR A., PEEPER D. S., 2008. *Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis.* Curr. Opin. Cell Biol. 20, 150-155.
- ROMANOV S. R., KOZAKIEWICZ B. K., HOLST C. R., STAMPFER M. R., HAUPT L. M., TLSTY T. D., 2001. *Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes.* Nature 409, 633-637.
- RUBIN H., 1997. *Cell aging in vivo and in vitro.* Mech. Ageing Dev. 98, 1-35.
- SEDELNIKOVA O. A., HORIKAWA I., ZIMONJIC D. B., POPESCU N. C., BONNER W. M., BARRETT J. C., 2004. *Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks.* Nat. Cell Biol. 6, 168-170.
- SEDELNIKOVA O. A., HORIKAWA I., REDON C., NAKAMURA A., ZIMONJIC D. B., POPESCU N. C., BONNER W. M., 2008. *Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging.* Aging Cell 7, 89-100.
- SERRANO M., BLASCO M. A., 2001. *Putting the stress on senescence.* Curr. Opin. Cell Biol. 13, 748-753.
- SERRANO M., LIN A. W., MCCURRACH M. E., BEACH D., LOWE S. W., 1997. *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.* Cell 88, 593-602.
- SHAMPAY J., SZOSTAK J. W., BLACKBURN E. H., 1984. *DNA sequences of telomeres maintained in yeast.* Nature 310, 154-157.
- SHAY J. W., RONINSON I. B., 2004. *Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy.* Oncogene 23, 2919-2933.
- SHAY J. W., PEREIRA-SMITH O. M., WRIGHT W. E., 1991. *A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence.* Exp. Cell Res. 196, 33-39.
- SHIBATA K. R., AOYAMA T., SHIMA Y., FUKIAGE K., OTSUKA S., FURU M., KOHNO Y., ITO K., FUJIBAYASHI S., NEO M., NAKAYAMA T., NAKAMURA T., TOGUCHIDA J., 2007. *Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion.* Stem Cells 25, 2371-2382.
- SZOSTAK J. W., BLACKBURN E. H., 1982. *Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors.* Cell 29, 245-255.
- TOUSSAINT O., MEDRANO E. E., VON ZGLINICKI T., 2000. *Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes.* Exp. Gerontol. 35, 927-945.
- VON ZGLINICKI T., 2003. *Replicative senescence and the art of counting.* Exp. Gerontol. 38, 1259-1264.
- VON ZGLINICKI T., PETRIE J., KIRKWOOD T. B., 2003. *Telomere-driven replicative senescence is a stress response.* Nat. Biotechnol. 21, 229-230.
- WANG C., JURK D., MADDICK M., NELSON G., MARTINRUIZ C., VON ZGLINICKI T., 2009. *DNA damage response and cellular senescence in tissues of ageing mice.* Aging Cell 8, 311-323.
- WATSON J. D., 1972. *Origin of concatemeric T7 DNA.* Nat. New Biol. 239, 197-201.