

Nejvyšší ocenění koncům chromozomů

Telomery a telomeráza

Ačkoli v některých oborech vyvolalo zveřejnění letošních laureátů Nobelových cen živé diskuse o objektivitě Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství. Uznání se dočkali Elizabeth H. Blackburnová, Carol W. Greiderová a Jack W. Szostak za objev toho, jak jsou chromozomy chráněny telomery a telomerázou. Zpravodajské servery vydaly okamžitě řadu zpráv, v nichž jsme se mohli dočíst, že „američtí vědci zjistili, proč klony stárnou rychleji“, nebo že cena byla udělena „za objev podstaty stárnutí“. To jsou jen okrajové a poněkud zavádějící postřehy, tato problematika si zaslouží trochu přesnější rozbor.

Konce chromozomů se chovají jinak

Toho, že se konce chromozomů chovají jinak než neopravené chromozomové zlomy vyvolané rentgenovým zářením, si koncem třicátých let minulého století všimli nezávisle na sobě Hermann J. Muller (u drozofily) a Barbara McClintocková (u kukuřice). Konce chromozomů totiž nejevily tendenci k vzájemnému spojování, tak jako tomu bylo v případě neopravených zlomů. Muller proto vyslovil názor, že „koncové geny“ (v té době se předpokládalo, že celý chromozom je vyplněn geny) se liší od „vnitřních genů“ tím, že díky své specifické struktuře nepotřebují pro svou stabilitu sousední geny z obou stran. Tehdejší dostupné nástroje však ještě neumožňovaly analyzovat strukturu konců chromozomů na molekulární úrovni, a tak zůstalo jen u zajímavých hypotéz a pozorování chromozomů poškozených zářením. Tehdy také Muller zavedl pro označení konců chromozomů termín telomer a z ř. *telos* – koncový, *meros* – část.

Oba zmínění vědci později získali Nobelovu cenu – H. J. Muller r. 1946 za objev vzniku mutací působením rentgenových paprsků a B. McClintocková (viz Vesmír 80, 392, 2001/7) r. 1983 za objev mobilních elementů a jevu zvaného genetická transpozice (viz Vesmír 79, 273, 2000/5).

1) J. D. Watson, F. Crick, M. Wilkins a R. Franklinová, první tři jmenovaní získali za tento objev r. 1962 Nobelovu cenu.

2) A. Kornberg a S. Ochoa, Nobelova cena r. 1959.

3) F. Sanger, W. Gilbert a A. Maxam, Nobelova cena v r. 1980.

4) To provedli nezávisle na sobě Alexej Olovnikov a James D. Watson v letech 1971-1973.

5) Viz např. Živa XL [LXXXVIII], 245-248, 2002/6.

6) Tehdy postdoktorandka v laboratoři Josepha Galla (předtím Ph.D. studentka v Sangerově laboratoři).

Dalším důležitým milníkem na cestě k poznání funkce telomer byl objev dvojice vědců Leonarda Hayflicka a Paula Moorheada, kteří r. 1961 prokázali, že normální lidské buňky rostoucí v kultuře se nemohou množit donekonečna (na rozdíl např. od bakterií) a že zástava jejich růstu je naprosto přirozeným jevem, vyplývajícím ze samotné podstaty buněk (nikoli důsledkem neschopnosti experimentátorů zajistit buňkám dostatečný přísun živin a odvod zplodin metabolismu). Jedním z rozhodujících pokusů bylo tehdy smíchání různých starých buněk (tj. těch, které měly za sebou různý počet dělení) mužského a ženského pohlaví, aby bylo možné obě populace od sebe odlišit. Ke 40. generaci mužských buněk přidali ženské buňky, které prodělaly jen 10 buněčných dělení. Jako kontroly si ponechali obě původní kultury nesmíchané. Když se starší kultura mužských buněk přestala dělit, analyzovali smíchanou kulturu a našli v ní pouze ženské buňky. Pokus samozřejmě opakovali i v opačném uspořádání – se starší ženskou kulturou a mladší mužskou. Opět po několika děleních přežily jen mladší – v tomto případě mužské – buňky. Tak tito vědci ukázali, že staré buňky si nějakým způsobem „pamatuji“, že jsou staré, i když jsou obklopené mladými, a že technické problémy nebo virové infekce nejsou příčinou selektivního vymření starších buněk.

Molekulární biologie nastupuje na scénu

Nástup molekulární biologie, nastartovaný popisem dvoušroubovicové struktury DNA,¹ následné objasnění mechanismu replikace DNA,² a zejména nástup technik sekvenování DNA v polovině sedmdesátých let³ umožnil posunout výzkum telomer na molekulární úroveň. Především byl formulován problém neúplné replikace (a následného zkracování) konců lineárních chromozomů.⁴ Problém s neúplnou replikací konců chromozomů vyplývá z toho, že všechny dosud známé DNA polymerázy provádějí syntézu ve směru od 5'-konce k 3'-konci, a syntéza DNA začíná jako prodlužování krátkého RNA primeru, který je později odbourán.⁵ Alexej Olovnikov navíc spojil problém replikativního zkracování chromozomů s výše zmíněným pozorováním konečného počtu možných dělení diferencovaných somatických buněk – s Hayflickovým limitem.

A v té chvíli přichází na scénu Elizabeth Blackburnová.⁶ Jejím úkolem v Gallově labo-

JIRÍ FAJKUS
EVA SÝKOROVÁ

Prof. RNDr. Jiří Fajkus, CSc., (*1964) vystudoval biochemii na Přírodovědecké fakultě MU (tehdy UJEP). Vede oddělení funkční genomiky a proteomiky v Ústavu experimentální biologie na Přírodovědecké fakultě MU a Laboratoř molekulárních komplexů DNA v Biofyzikálním ústavu AV ČR, v. v. i. Zabývá se biologií telomer a strukturou chromatinu.

Mgr. Eva Sýkorová, CSc., (*1970) vystudovala biochemii na PřF MU. Je vědeckou pracovnící Biofyzikálního ústavu AV ČR, v. v. i., a PřF MU. Zabývá se studiem rostlinných telomer a telomeráz.

ELIZABETH (LIZ) HELEN BLACKBURNOVÁ (*26. 11. 1948 v Hobartu na Tasmanii) vystudovala univerzitu v Melbourne, doktorát získala r. 1975 na Cambridžské univerzitě ve Velké Británii. Od roku 1990 je profesorkou biologie a fyziologie na Kalifornské univerzitě v San Francisku.

CAROL W. GREIDEROVÁ (*15. 4. 1961 v San Diegu v Kalifornii) je molekulární biologka působící na baltimorské medicíně Univerzity Johnse Hopkinse.

JACK W. SZOSTAK (*9. 11. 1952 v Londýně) je profesorem genetiky na medicíně Harvardovy univerzity a výzkumníkem na Massachusetts General Hospital v Bostonu.

ratoři bylo objasnit molekulární strukturu minichromozomů nesoucích geny kódující ribozomální RNA (rDNA geny) u prvoka *Tetrahymena thermophila*. To byla velmi šťastná volba modelového systému, neboť počet kopií těchto genů v buňce je vysoký, tudíž byl přístupný tehdejšími technikami analýzy,⁷ a dále proto, že genom v somatickém jádře (makronukleu) prvoků je fragmentován na jednotlivé transkripční jednotky, které tvoří minichromozomy. Elizabeth Blackburnová tedy pracovala na optimálním modelovém systému, ve kterém měla k dispozici deseti tisíce kopií jednoho typu minichromozomů (rDNA), z nichž každý měl dva konce.

V dnešní době, kdy vědec, který zrovna nepracuje na lidských nebo myších buňkách, musí trpělivě vysvětlovat grantovými agenturám i kolegům z oboru, že modelových systémů je více a na správné volbě modelového systému závisí proveditelnost výzkumu, je tento příklad docela poučný. Lze předpokládat, že při práci na lidských buňkách bychom si na objev sekvence DNA telomer museli tehdy počkat ještě minimálně 10 let.

Další šťastnou okolností bylo, že Blackburnová měla tu nejlepší možnou průpravu v sekvenování DNA přímo z laboratoře dvojnásobného nobelisty F. Sangera. I to jistě přispělo k jejímu průlomovému zjištění, že konce chromozomů u zmíněného prvoka jsou tvořeny několikrát opakovanou sekvencí.⁸ Stále však nebylo jasné, jak se tato sekvence doplňuje po své neúplné replikaci. Zjistit mechanismus syntézy telomer bylo úkolem Carol Greiderové, postgraduální studentky v laboratoři E. Blackburnové.

Na scénu vstupuje telomeráza

O Vánocích roku 1984 vyvolávala Carol Greiderová film exponovaný na sekvenačním gelu, na němž byly smíchány extrakt z *Tetrahymena thermophila*, syntetické oligonukleotidy o telomerové sekvenci a substráty pro syntézu.⁹ Na gelu našla proužky ukazující na přítomnost původních oligonukleotidů, prodloužených o celistvé násobky sekvence TTGGGG. Faktor, který byl za prodloužení odpovědný, nazvaly jeho objevitelky nejprve *telomerová terminální transferáza*, protože se domnívaly, že jde o obdobu tehdy již známé terminální transferázy, která ale nepřipojuje na konce chromozomů jednotlivé nukleotidy,¹⁰ nýbrž celé hexanukleotidy. Když se však ukázalo, že syntéza telomer je zablokována nejen po působení proteinázy,¹¹ nýbrž i působením RNázy, začaly se úvahy objevitelky ubírat jiným smě-

rem: syntézu telomer zřejmě zajišťuje komplex proteinu a RNA (ribonukleoprotein), přičemž RNA zřejmě poskytuje informaci o tom, jakou sekvenci má komplex syntetizovat, popřípadě rozpoznává sekvenci, k jejímuž prodloužení má dojít. Tuto RNA molekulu se jim skutečně podařilo izolovat v r. 1989 a skutečně obsahovala templátovou oblast pro syntézu telomerové sekvence. Pro celý komplex se vžil nový název – telomeráza.

Myšlenka o účasti RNA v enzymatické katalýze byla v té době velmi aktuální – vždyť počátkem osmdesátých let byly publikovány práce T. R. Cecha, ukazující (rovněž u prvoka *Tetrahymena*) samosestřih intronu z primárního transkriptu ribozomální RNA, a práce S. Altmana, který zjistil, že katalyticky aktivní složkou RNázy P, která upravuje primární transkripty tRNA, je rovněž RNA. Oba dostali Nobelovu cenu r. 1989.

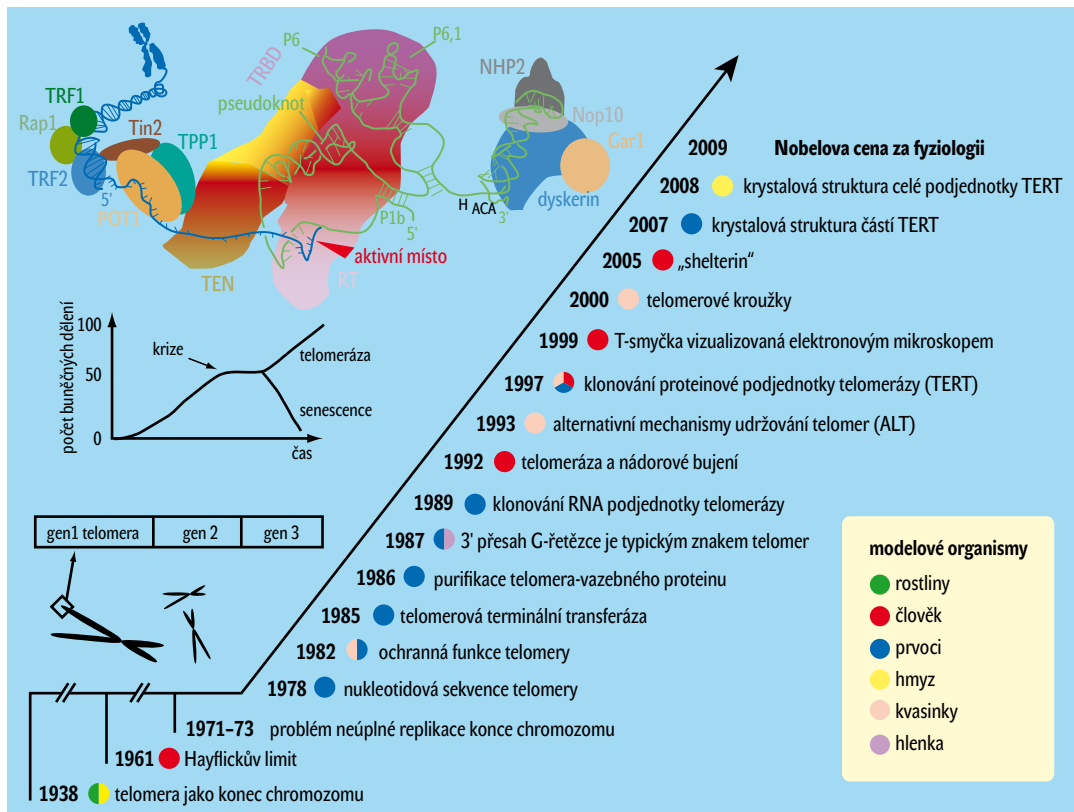
Poslední z trojice oceněných byl Jack W. Szostak, který ve spolupráci s E. Blackburnovou přispěl k poznání telomer ještě před objevem telomerázy. Získal od Blackburnové sekvence telomer z *Tetrahymena thermophila* a připojil je k izolovaným kvasinkovým minichromozomům. Na rozdíl od minichromozomů, které těmito sekvencemi vybaveny nebyly a byly degradovány, byly minichromozomy vybavené telomerami z *T. thermophila* stabilní. Tyto pokusy ukázaly na univerzální funkci telomer i mezi různými říšemi eukaryot. Szostak rovněž izoloval mutantní kvasinky se zkracujícími se telomerami. Ukázalo se, že jde o mutanty v některé z podjednotek telomerázy. Obdobné mutanty získala mutacemi v RNA podjednotce telomerázy *Tetrahymena* i E. Blackburnová. V obou případech se mutantní vyznačovali předčasným stárnutím buněk (senescencí).

Telomeráza středem pozornosti

Následovaly poznatky o spojení nádorových buněk s aktivací telomerázy, později o imortalizaci („znesmrtelnění“) normálních lidských buněk¹² telomerázou a o specifickém čtyřřetězcovém uspořádání telomerové DNA. Poté se výzkum telomer a jejich syntézy stal velmi atraktivním.

Sepětí telomerázy a nádorového bujení se stalo zároveň i polem pro tvorbu některých dogmat o fungování telomer a telomerázy. Telomeráza je enzym, který je v lidských buňkách aktivní v raných stádiích vývoje organismu a poté jen v nediferencovaných buňkách (např. v kmenových buňkách kostní dřeně), v ostatních buňkách se po diferenciaci¹³ „vypne“. Může se opět „zapnout“ u nádorových buněk, které se kvůli aktivitě telomerázy mohou množit neomezeně, stávají se nesmrtelnými. Zdálo by se proto, že by stačilo najít lék, který znemožní opětovou aktivaci telomerázy nebo sníží její aktivitu. Vědci však skoro v každém jednoduchém schématu najdou nějaké „ale“, v tomto případě jím je způsob, jakým se vypořádaly se ztrátou telomerázy kvasinky. U nich byl poprvé pozorován¹⁴ alternativní způsob prodloužení telomer (ALT). V pokusu s mutantními

Abstract: The highest award for chromosome ends by Jiří Fajkus and Eva Sýkorová. The article maps briefly the history of research of telomeres from its beginning in forties of the last century up to the presence. The story of research winning the Nobel Prize for Physiology or Medicine in 2009 is presented in its wider context, trying to emphasize important factors that had contributed to the breakthrough discoveries awarded.



Schematické znázornění vývoje klíčových poznatků o biologii telomer od jejich prvotního popisu v r. 1938 až po dnešní znalosti o jejich struktuře a funkci na molekulární úrovni. Vedle letopočtu je u jednotlivých objevů rovněž uvedeno, na jakém modelovém organismu byl poznatek získán (viz legendu uvnitř obrázku).

kvasinkami, kterým byla vyřazena telomeráza a podle očekávání většina buněk přestala růst, se objevilo několik klonů, které obnovily schopnost dělení a udržování telomer prostřednictvím homologní rekombinace. To se u přeživších kolonií projevilo zmožením úseků k telomerám přiléhajících (subtelomero-vých) repetice společně s krátkým úsekem telomerové repetice. Při jejich další kultivaci byl tento první typ přežívajících kolonií nahrazen jiným typem, u kterého se úseky telomer náhle prodlouží na mnohonásobek.

Podobný mechanismus, charakteristický rovněž vysokou frekvencí rekombinačních událostí na telomerách, byl posléze pozorován u některých linií lidských nádorových buněk. Ukázalo se bohužel také, že po vypnutí či potlačení telomerázy v původně telomeráza-pozitivních nádorových buňkách byl někdy aktivován mechanismus alternativního prodlužování. Je tedy třeba zjistit, jak se s tím vypořádá. Ukazuje se, že údržba telomer alternativním prodlužováním pravděpodobně z evolučního hlediska předcházela telomeráze – je totiž rozšířena u rostlin rodu *Allium*, jako jsou česnek nebo cibule) dosud zřejmě představuje jediný způsob prodlužování telomer, zatímco u většiny organismů převzal záložní funkci.

Telomerové smyčky a kroužky

Po objasnění replikace konců telomerové DNA a souvztažnosti mezi telomerami, stárnutím buněk a rakovinou teprve propukla mohutná kampaň. Začalo zkoumání druhé „složky“ telomer – proteinů, které na telomerech tvoří ochrannou strukturu, plní signální a regulační úlohy nebo rozhodují o umístění telomer v buněčném jádře. Mezi badateli

vynikla zejména Titia de Lange z Rockefellerovy univerzity v New Yorku. Krom toho, že publikovala původní vědecké práce o proteinech telomer, shrnula poznatky do konceptu *shelterinu*, komplexu nejméně 6 proteinů nezbytných pro ochrannou funkci telomer. Ve spolupráci se specialistou na elektronovou mikroskopii Jackem D. Griffithem z Univerzity Severní Karolíny objevila na koncích chromozomů smyčkovité struktury DNA (telomerové smyčky), které jednak objasňují, jakým způsobem je konec chromozomu sbalen, jednak nabízejí jedno z možných vysvětlení prodlužování telomer i bez telomerázy. Kromě smyček byly totiž v buňkách používajících alternativní prodlužování pozorovány kružnicové molekuly telomerové DNA (telomerové kroužky). U mitochondriálních telomer kvasinky *Candida parapsilosis* je našel tým Jozefa Noska a Lubomíra Tomášky z Univerzity Komenského v Bratislavě.

Kroužky mohou být produktem odštěpování smyček u nadměrně prodloužených telomer nebo předlohou (templátem) pro prodlužování zkrácených telomer mechanismem valivých kružnic, popřípadě obojí najednou (viz Vesmír 85, 542, 2006/9). Zajímavé jsou rovněž nedávné zprávy o regulační roli telomerových RNA transkriptů (TERRA), které zřejmě plní dosud ne zcela objasněné strukturální i regulační funkce. Novou oblast otevírají rovněž zprávy o netelomerových funkcích telomerázy, například o její úloze při ochraně mitochondriální DNA proti poškození kyslíkovými radikály. Překvapivé je zjištění, že katalytická podjednotka telomerázy působí jako transkripční faktor v signální dráze, která je významná pro správný embryonální vývoj. Příběh o koncích chromozomů tedy letošními „nobelovkami“ zdaleka nekončí.

7) Bez možnosti použití klonování nebo PCR.

8) (TTGGGG)_n / (CCCCAA)_n.

9) Čili dva deoxynukleotidtrifosfáty – dTTP a dGTP, z nichž dGTP byl radioaktivně značený.

10) Tak jako ostatní terminální transferázy.

11) Jak by se dalo předpokládat v případě jakéhokoli proteinového enzymu.

12) Fibroblastů, stejně jako v případě Hayflickových pokusů.

13) Tj. jakémsi dokončení vývoje buněk, které je předurčuje ke specializované funkci, např. svalové nebo nervové buňky.

14) Bylo to r. 1993 a pozorovali jej Victorie Lundbladová a Elizabeth Blackburnová.