

## Nóbelsverðlaunin í lífeðlis- og læknisfræði 2009: Litningaendar og lífhvatinn telómerasi

Sigurður Ingvarsson

Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Fyrir rúmlega fjörutíu árum var lítið vitað um litningaenda og þá lífhvatavirkni sem tekur þátt í starfsemi þeirra. Vitað var að litningarnir, sem staðsettir eru í frumukjörnum, bera erfðaupplýsingarnar, DNA byggingu hafði verið lýst og DNA-fjöllidunarlífhvatinn var þekktur. Nokkru áður sýndu rannsóknir á ávaxtaflugu og maís að brotnir litningar eru óstöðugir og þeim hættir til að endurraðast, en litningaendar lenda ekki í slíkum vandamálum og þeir eru stöðugri (Muller 1938 og McClintock 1941). Þrátt fyrir að eftirmyndun DNA væri þekkt frá því á sjöunda áratug síðustu aldar var alls ekki ljóst hvernig mætti eftirmynda sitthvorn enda á línulegri DNA-sameind, en litningar í heilkjarnafrumum eru af þeirri gerð. Þetta vandamál tengist því að DNA-eftirmyndun er háð lausum hýdroxý-hóp, en RNA-prímasi og DNA-fjöllidunarlífhvati ráða ekki við að setja upp slíkan hóp á bláenda DNA-sameindar. Þetta veldur því að litningaendar styttest í hvert sinn sem fruma skiptir sér og eftir ákveðinn fjölda frumuskiptinga eru litningaendar orðnir það stuttir að fruman getur ekki skipt sér lengur. Slíkt er kallað frumuöldrun. Hayflick (1961) hafði lýst af nákvæmni öldrun fruma, þ.e. að fjöldi frumuskiptinga er takmarkaður. Síðar kom Olovnikov með þær hugmyndir að slík öldrun tengdist styttingu litningaenda (1971), en það var staðfest síðar með rannsóknarniðurstöðum (Harley *et al.* 1990). Stungið var upp á því að slík öldrun fruma væri mikilvæg sem náttúruleg klukka og liður í að eyða frumum sem ekki eru æskilegar lengur fyrir fjöllumulífveru. Liður í þessari hugmyndafræði er að frumur með uppsafnaða galla í erfðaeftirmyndun og starfsemi ættu ekki að geta skipt sér ótakmarkað og



E.H. Blackburn



C.W. Greider



J.W. Szostak

að ódauðlegir frumustofnar eru vandamál ef þeir vaxa taumlaust og gætu t.d. myndað æxli með afdrifaríkum afleiðingum. Þannig gæti stytting litningaenda átt þátt í sameindafræðilegum ferlum frumuöldrunar og lengd litningaenda getur ákvarðað eftirmyndunarmöguleika fruma (Allsopp *et al.* 1992). Frumum í rækt sem hafa stutta litningaenda og óstöðugt erfðaeftirmyndunarmöguleika er yfirleitt eytt, en sumar þeirra geta lifað af slíkt kreppuástand, oftast með því að auka tjáningu á telómerasa og verða þær jafnvel “ódauðlegar” (Counter *et al.* 1992).

Nóbelsverðlaunin í lífeðlis- og læknisfræði 2009 skiptust jafnt á milli þriggja Bandaríkjamanna, þeirra Elizabeth H. Blackburn (University of California, San Francisco), Carol W. Greider (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore) og Jack W. Szostak (Harvard Medical School Boston; Howard Hughes Medical Institute). Verðlaunin voru veitt fyrir uppgötvun á byggingu og starfsemi litningaenda og ensímsins telómerasa. Fyrstu rannsóknir byggðu á notkun einfrumunga. Niðurstöður verðlaunahafanna leystu m.a. tvö vandamál lífefnafræðinnar sem tengjast því að litningar eru línulegar sameindir, þ.e. hvernig litningar eru varðir fyrir niðurbroti og hvernig eftirmyndun á litningaendum á sér stað.

Þegar Elizabeth hóf störf sem nýdoktor við Yale háskólann í Bandaríkjunum árið 1975 beindist áhuginn að raðgreiningu á endurteknum röðum í rDNA sameindum á litningaendum bifdýrsins Tetrahymena, sem er einfrumungur. Fyrstu niðurstöður þeirra rannsókna voru birtar 1978 (Blackburn and Gall) og þar er greint frá því að DNA-röðin er endurtekning á GGGTTG-kirnum. Endurtekningarnar á litningaendum gátu verið 300-500 kirni að lengd, þ.e. endurteknar 50-80 sinnum. Síðar kom í ljós að slíkar eða svipaðar endurtekningar á litningaendum eiga sér stað í öllu lífríkinu þar sem línulegir litningar koma við sögu og að þessar endurtekningar eru lykilatriði í starfi litningaenda. Í mönnum geta slíkar raðir verið endurteknar nokkur þúsund sinnum.



Starfseminni er lýst á mynd 1. Virkni telómerasa flokkast sem víxlritavirkni, því notað er RNA-mót til að byggja nýtt DNA.

En hvernig eru þá litningaendarnir samsettir? Á bláendanum er einþátta 3'-DNA sem er ríkt af G-kinnum. Allmörg prótein tengjast litningaendunum og mynda próteinflóka þar. Próteinin geta bæði bundið tvíþátta og einþátta DNA-ið á litningaendanum. Ekki er um að ræða hefðbundna þökkun með histónum á litningaendunum, sem annars einkenna byggingu litninga. Litningaendar geta myndað lykkjur (sjá yfirlit í Blackburn 2001). Þessi byggingarform eru talin vernda litningaendana fyrir niðurbroti, tengingum við aðra litninga og endurröðun. Einnig eru stjórnunarprótein staðsett þar, en þau taka þátt í ákvörðun um lengd litningaenda. Það gera þau með samskiptum við telómerasa. Stjórnunarpróteinin miðla einnig boðum til innanfrumubodleiða sem taka m.a. þátt í frumskiptingu og skipulegum frumudauða (apoptosis). Á rannsóknastofu Jack voru stökkbrigði gerfrumu einangruð, m.a. Est1 (ever shorter telomeres). Það kom fram tap á litningaendum í stökkbrigðinu, auk litningabreytinga og seinkunar á frumuöldrunareinkennum (Lundblad and Szostak 1989). Með þessum rannsóknunum komu frekari skýringar á hvernig litningaendar taka þátt í að viðhalda stöðugleika erfðamengisins og lífvænleika fruma. Frumuöldrun og kjarnaskemmdir komu einnig fram á rannsóknastofu Elizabeth hjá bifdýrinu *Tetrahymena* með stökkbreytt *Terc* (Yu *et al.* 1990). Síðar kom í ljós að Est1 gegnir stjórnunarhlutverki í telómerasa-flókanum og er hluti af honum (Nugent and Lundblad 1998). *Cdc13* bindur einþátta DNA á litningaenda og getur tengst Est1 í telómerasa-próteinflókanum (Pennock *et al.* 2001). Það gegnir tvöföldu hlutverki, annars vegar að vernda litningaendann og hins vegar að tengja telómerasa við hann. Með rafeindasmásjártækni sýndu Griffith (*et al.* 1999) fram á að litningaendar geta myndað stóra T-lykkju (T = telomere) og smærri D-lykkju (D = DNA). Þetta er talið gerast með þeim hætti að einþátta 3'-endinn þáttaparast inn í DNA tvöfaldann helix, sem opnast við það og myndar D-lykkjuna. Í yfirlitsgrein Blackburn (2001) má fá nánari upplýsingar um byggingu DNA og próteina á litningaenda og einnig um starf og stjórnun þar. Frekari rannsóknir á Est1 stökkbrigðinu í gerfrumum leiddi síðar í ljós að frumur geta notað önnur ferli til að viðhalda litningaendum,

sem byggja ekki á telómerasavirkni (Lundblad and Blackburn 1993).

Þessi nýja þekking um litningaenda og telómerasa er mikilvæg til að skilja betur sjúkdóma og meðferð við þeim. Almennt er telómerasavirkni ekki til staðar í frumum, en finnst þó í kynfrumum, stofnfrumum og krabbameinsfrumum. Einn af líffræðilegum eiginleikum krabbameinsfrumu er ódauðleiki, þ.e. að geta skipt sér ótakmarkað og ljóst er að telómerasi gegnir þar lykilhlutverki. Einnig geta litningaendar lengst í æxlisfrumum með öðrum hætti, þ.e. með endurröðun frá öðrum litningaendum. Ekki er vitað í öllum tilfellum hvernig aukning á tjáningu telómerasa á sér stað í æxlum en vitað er að æxlispróteinið og umritunarþátturinn *Myc* binst við stýrisvæði *Tert* og eykur tjáningu. Til að forðast óstöðugleika í erfðamenginu er talið mikilvægt að fjarlægja frumur með skerta litningaenda. Þetta er gert með skipulegum frumudauða til að röskun verði sem minnst, m.a. fyrir tilstilli p53 umritunarþáttarins. Við afvirkjun á p53, sem er algennt í æxlum, er frumum með óstöðugt erfðamengi ekki eytt og þær geta því umbreytt í krabbameinsfrumur. Ljóst er að telómerasi kemur inn á fjölpætt kerfi sem taka þátt í verndun og varðveislu erfðaefnisins og einnig þegar þessi kerfi fara úr skorðum í æxlisvexti (sjá yfirlitsgrein til frekari skýringa: Ingvarsson 2004).

Kímínubreytingar í *Tert*, *Terc* eða genum próteina sem binda litningaenda geta valdið erfðasjúkdómum, m.a. æxlisvexti, stofnfrumugalla og skorti á vefjaviðhaldi (Blackburn *et al.* 2006). Einkennin eru m.a. blóðleysi, þykkun á þekjuvef og uppsöfnun á keratíni, misvöxtur í nöglum, hvítar skellur í munni, óeðlilegar ?freknur?, lungnatrefjun, hárlos/grátt hár, tannlos og beinþynning. Þótt sum þessara einkenna gætu flokkast sem öldrunareinkenni einstaklinga hefur verið erfitt að sýna fram á að starf telómerasa og litningaenda tengist ævilengd og gildir það almennt um spendýr. Nokkur dæmi eru í dýraríkinu um að lengd litningaenda tengist ævilengd, m.a. í fuglum. Hins vegar er besta dæmið um að lengri litningar tengist hærri aldri lífveru frá rannsóknunum á þráðorminum *C. elegans* (Joeng 2004).

## Heimildir

- [1] Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, B., Greider, C. W. and Harley, C. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10114-10118, 1992.

- [2] Blackburn, E. H. and Gall, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* **120**, 33-53, 1978.
- [3] Blackburn, E.H. Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661-673, 2001.
- [4] Blackburn, E.H., Greider, C. W. and Szostak, J. W. Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeasts to human cancer and aging. *Nat. Med.* **12**, 1133-1138, 2006.
- [5] Counter, C. M., Avilion, A. A., Lefevre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. and Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**, 1921-1929, 1992.
- [6] Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., Le, S., West, M. D., Harley, C. B., Andrews, W. H., Greider, C. W. and Villeponteau, B. The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241, 1995.
- [7] Greider, C. W. and Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**, 405-413, 1985.
- [8] Greider, C. W. and Blackburn, E. H. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**, 887-898, 1987.
- [9] Greider, C. W. and Blackburn, E. H. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331-337, 1989.
- [10] Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H. and de Lange, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514, 1999.
- [11] Harley, C. B., Flutcher, A. B. and Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460, 1990.
- [12] Hayflick, L. and Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621, 1961.
- [13] Ingvarsson, S. Genetics of breast cancer. *Drugs Today* **40**, 991-1002, 2004.
- [14] Joeng, K. S., Song, E. J., Lee, K. J. and Lee, J. Long lifespan in worms with long telomeric DNA. *Nature Genet.* **36**, 607-611, 2004.
- [15] Lundblad, V. and Szostak, J. W. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**, 633-643, 1989.
- [16] Lundblad, V. and Blackburn, E. H. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues Est1-senescence. *Cell* **73**, 347-360, 1993.
- [17] Muller, H. J. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **13**, 181-198, 1938.
- [18] McClintock, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**, 234-282, 1941.
- [19] Nugent, C. I. and Lundblad, V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* **12**, 1073-1085, 1998.
- [20] Olovnikov, A. M. 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, 1973.
- [21] Pennock, E., Buckley, K. and Lundblad, V. Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* **104**, 387-396, 2001.
- [22] Shampay, J., Szostak, J. W. and Blackburn, E. H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154-157, 1984.
- [23] Szostak, J. W. and Blackburn, E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**, 245-255, 1982.
- [24] Yu, G. L., Bradley, J. D., Attardi, L. D. and Blackburn, E. H. *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* **344**, 126-132, 1990.

---

Sigurður Ingvarsson  
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum  
v/Vesturlandsveg, 112 Reykjavík

siguring@hi.is