

Долго ли, коротко ли..., или Нобелевская премия за будущее бессмертие

Валерий Юдин

по материалам www.sciencedaily.com; nobelprize.org; www.nature.com; www.humbio.ru

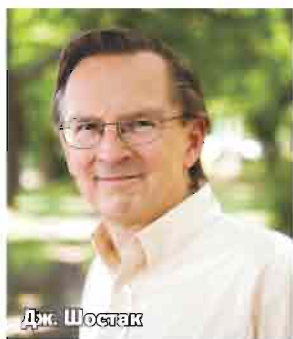
Фото и иллюстрации: © nobelprize.org

Впервые опубликовано в «Еженедельнике АПТЕКА» №49 (720) от 14.12.2009 г. (www.apteka.ua)

Человечество всю свою историю было подвержено множеству различных заболеваний, среди которых сотни неизлечимых или опасных. Однако не столько возможность чем-то заболеть пугает нас больше всего. Нас беспокоят больше всего изменения в организме, которые происходят со временем. Изменения эти называются старость... И тут невольно вспоминаешь Фаину Георгиевну Раневскую, сказавшую как-то: «Стареть скучно, но это единственный способ жить долго».



Д. Блэкберн



Д. Шостаков



К. Грейдер

Более века тому назад, в 1889 г., немецкий зоолог Август Вейсман (Friedrich Leopold August Weismann) в своем «Эссе о вопросах наследственности и биологии родства» («Essays upon Heredity and Kindred Biological Problems») впервые попытался с научной точки зрения объяснить эту проблему — проблему старения. Будучи сторонником теории эволюции, А. Вейсман старость тоже считал результатом эволюции: нестареющие организмы не только не являются полезными, но и вредны, поскольку занимают место молодых. Именно поэтому, по его мнению, эволюция должна была привести живые организмы к старению.

Его идею старения как результата эволюции развенчал другой ученый, английский биолог Питер Брайан Медавар (Sir Peter Brian Medawar)¹, который в 1951 г. перед Лондонским королевским обществом сделал доклад, называвшийся «Нерешенная проблема биологии» («An Unresolved Problem in Biology»). В этом докладе он отметил, что животные в природе редко доживают до старости, поэтому ход эволюции никак не может оказывать влияние на процесс старения.

¹В 1960 г. совместно с австралийским вирусологом Фрэнком Макфарлейном Бернетом (Sir Frank Macfarlane Burnet) получил Нобелевскую премию по физиологии или медицине «За открытие искусственной иммунной толерантности (переносимости)».

Однако ничего конкретного относительно причин старения эти описательные теории объяснить так и не смогли. Мало что смогла прояснить и расшифровка структуры ДНК в 1953 г., а только лишь поставила перед учеными еще больше вопросов со многими неизвестными², что порождало все больше и больше теорий старения. В те годы ученые склонялись к мнению, что человеческие клетки, способные к пролиферации в организме, могут бесконечно долго воспроизводиться в культуре. Однако если бы это было на самом деле так, то это бы значило, что люди стареют и умирают не в соответствии с присущей им программой клеточной деградации, а в силу внеклеточных процессов, происходящих на некотором более высоком физиологическом уровне (Квитко О.В., Конева И.И. и соавт., 2000). И только лишь 40 лет спустя ученые стали приходить к более-менее общим взглядам относительно теории старения.

Одна из таких теорий была заложена почти полвека тому назад: в 1961 г. американский ученый Леонард Хейфлик (Leonard

²За расшифровку структуры ДНК в 1962 г. ученым — британскому биологу Фрэнсису Крику (Francis Crick), американскому биологу Джеймсу Уотсону (James Dewey Watson) и британско-новозеландскому ученому Морису Уилкинсу (Maurice Hugh Frederick Wilkins), была присуждена Нобелевская премия по физиологии или медицине.

Hayflick)³, профессор анатомии Калифорнийского университета (University of California) в Сан-Франциско, обнаружил, что даже в идеальных условиях клетки способны делиться лишь ограниченное количество раз, а при приближении к лимиту проявляют признаки старения (Hayflick L., Moorhead P.S., 1961). Такой лимит делений был установлен для клеток практически всех многоклеточных организмов. Максимальное число делений различно и зависит от типа клеток, и еще сильнее различается в зависимости от организма. Так, было выяснено, что для большинства человеческих клеток этот предел составляет 52 деления. Более того, оказалось, что с увеличением возраста донора число делений, которые были способны совершить клетки организма, существенно уменьшалось. То есть в организме любого живого существа находится нечто вроде «биологических часов», счетчика делений, которым установлен лимит общего количества делений клеток нашего организма... (Hayflick L., 1998) Этот предел был назван лимитом Хейфлика.

Однако каким образом работает этот самый «счетчик»? Гипотезу о его работе в 1971 г. выдвинул русский советский ученый Алексей Оловников. На основании появившихся к тому времени данных о принципах синтеза ДНК в клетках он пред-

³В 1997 г. Л. Хейфлик был избран почетным академиком АМН Украины.

ложил теорию маргинотомии (the theory of marginotomy), которая бы объясняла механизм работы такого «счетчика». По мнению А. Оловникова, при матричном синтезе полинуклеотидов ДНК-полимераза не в состоянии полностью воспроизвести линейную матрицу, реплика получается всегда короче в ее начальной части. Таким образом, при каждом делении клетки ее ДНК укорачивается, что ограничивает пролиферативный потенциал клеток и, очевидно, является тем «счетчиком» количества делений и, соответственно, продолжительности жизни клетки (Оловников А.М., 1971) (рис. 1).

Прошло более 10 лет, прежде чем догадку А. Оловникова подтвердила серия открытий, сделанных в конце 1980-х годов тремя учеными: Элизабет Блэкберн (Elizabeth H. Blackburn), Джеком Шостаком (Jack W. Szostak) и Кэрол Грейдер (Carol W. Greider). Именно эти трое были удостоены в 2009 г. Нобелевской премии в области физиологии или медицины за то, что им удалось выяснить механизм, благодаря которому хромосомы во время деления клетки копируются полностью, а также они выяснили и то, каким образом хромосомы защищены от деградации.

Решение этой загадки было найдено на концах хромосом, участках, которые были названы *теломерами*⁴, а также ферменте, который формирует их, — *теломеразе*: длинные спирали молекул ДНК, несущие в себе нашу генную информацию, «упакованы» в хромосомы, на концах которых находятся те самые теломеры, располагающиеся там, как защитные «колпачки» (рис. 2а). Э. Блэкберн и Дж. Шостак обнаружили, что уникальная последовательность ДНК, содержащихся в хромосомах, защищена от деградации посредством этих самых «колпачков». К. Грейдер и Э. Блэкберн обнаружили также теломеразу — фермент, достраивающий теломеры на концах хромосомы, которые неизбежно укорачиваются каждый раз, когда она делится (рис. 2б).

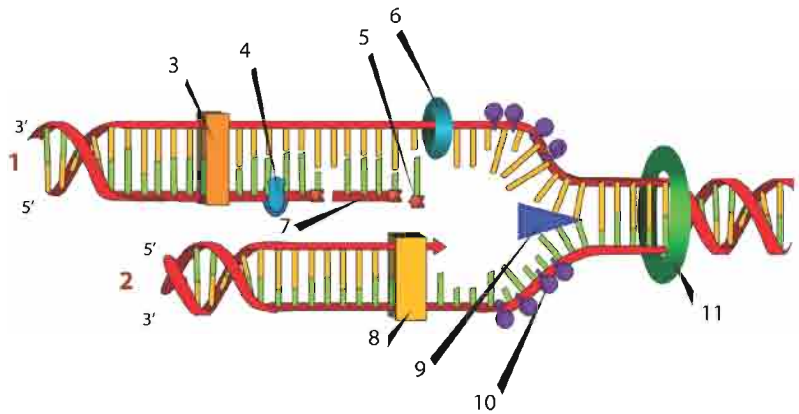
Учеными было также отмечено, что чем короче теломеры, тем старше клетка, и наоборот: если активность теломеразы, достраивающей теломеры, высока и постоянно поддерживается одинаковая длина теломера, — клетка не стареет. По последнему «сценарию» развиваются раковые клетки, которые, как предполагают ученые, практически бессмертны; а определенные наследственные заболевания, напротив, характеризуются наличием дефектных теломераз, что приводит к быстрому старению клетки. Таким образом, Нобелевская премия признала выявление этого механизма открытием фундаментального значения, которое может стимулировать развитие новых терапевтических стратегий.

Таинственная теломера

Хромосомы содержат наш геном, носителем которого являются молекулы ДНК.

⁴Термин *теломера* (от греч. *telos* — конец и *meros* — часть) предложил Герман Джозеф Меллер в 1932 г.

Рис. 1

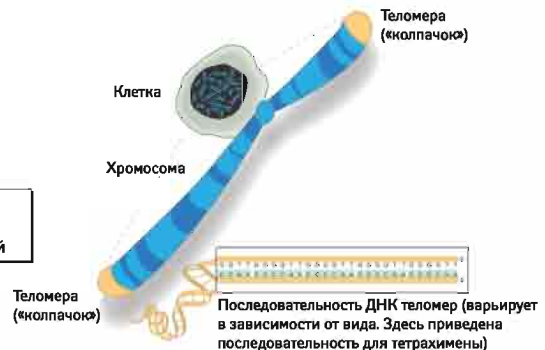


1. Отстающая цепь, 2. Лидирующая цепь, 3. и 8. ДНК-полимераза, 4. ДНК-лигаза, 5. РНК-праймер, 6. ДНК-праймаза, 7. Фрагмент Оказаки, 9. Хеликаза, 10. Однонитевые ДНК-связывающие домены, 11. Топоизомераза.

Рис. 2а

Теломера функции и синтез

А. Тайна теломеры
Теломеры защищают хромосомы от повреждений



Еще в 1930-е годы американский генетик Герман Джозеф Меллер (Hermapf Joseph Muller)⁵, а затем и Барбара МакКлинток (Barbara McClintock)⁶ заметили, что структуры на концах хромосом, так называемые теломеры, препятствовали тому, чтобы хромосомы сцеплялись между собой. Они предположили, что теломеры могут выполнять защитную роль, но то, как они работают, оставалось загадкой.

Ежегодно в начале декабря в Стокгольме проходит Нобелевская неделя, включающая пресс-конференции и лекции Нобелевских лауреатов, Нобелевский концерт, и заканчивается церемонией награждения и банкетом

После того как ученые в середине XX в. научились понимать, как идет копирование генов, возникла другая проблема: во время

⁵Лауреат Нобелевской премии в области физиологии или медицины 1946 г.; получил премию «За открытие появления мутаций под влиянием рентгеновского облучения».

⁶Лауреат Нобелевской премии в области физиологии или медицины 1983 г.; получила премию «За открытие транспозирующих генетических систем».

деления клетки происходит «расширение» спирали ДНК на две цепочки и ее копирование ферментом ДНК-полимеразой (см. рис. 1). Однако конец одной из двух цепочек ДНК не может быть скопирован ДНК-полимеразой, поскольку этому мешает наличие на его конце AP-сайта⁷. Логично предположить, что вследствие этого длина хромосомы должна уменьшаться каждый раз, когда клетка делится. Однако на деле этого не происходит. Почему?

На этот вопрос был дан ответ, когда Нобелевские лауреаты этого года установили, каким образом функционирует теломера, и обнаружили фермент теломеразу, который копирует ее.

Теломера защищает хромосомы

В начале своей исследовательской карьеры Э. Блэкберн занималась тем, что картировала последовательности ДНК, изучая хромосомы пресноводной ресниччатой инфузории рода *Tetrahymena*, не-

⁷AP-сайт (от апури-апиримидиновый сайт); к его возникновению приводит расщепление N-гликозидной связи дезоксирибонуклеотидов в составе ДНК. Из-за невозможности образовывать канонические пары оснований AP-сайты эффективно блокируют действие ДНК-полимераз. Многие ДНК-полимеразы при достижении AP-сайтов ДНК-матрицы останавливаются, после чего диссоциируют.

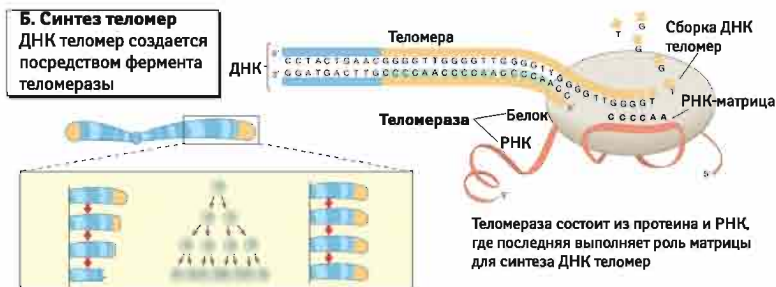
которые виды которой часто используются как модельные организмы в биологических и медицинских исследованиях. Ученая обнаружила в хромосоме этой инфузории повторяющиеся последовательности ДНК, которые можно записать в виде ССССАА. Функция этой последовательности была неясна. В то же самое время другой ученый — Дж. Шостак — сделал наблюдение, согласно которому линейная молекула ДНК, наподобие мини-хромосомы, введенная в клетку дрожжей, быстро деградировала (рис. 2в).

Оба ученых встретились на одной из конференций в 1980-х, где Э. Блэкберн представляла результаты своей работы. Они заинтересовали Дж. Шостака, и оба исследователя приняли решение выполнить общий эксперимент, в котором бы преодолевались барьеры между такими двумя очень далекими видами организмов, как инфузория и дрожжи. Итак, от ДНК инфузории тетрахимены Э. Блэкберн изолировала вышеупомянутую уже последовательность ССССАА, а Дж. Шостак присоединил эту последовательность к мини-хромосоме, которую поместил в клетку дрожжей (см. рис. 2в). Результаты, опубликованные в 1982 г., оказались поразительными — последовательность ССССАА ДНК теломеры защищала мини-хромосомы от деградации. Поскольку ДНК теломеры от одного организма (инфузории тетрахимены) защищали хромосомы совершенно иного организма (дрожжей), этот опыт продемонстрировал существование ранее неизвестного фундаментального механизма. Позже стало очевидно, что ДНК теломеры с характерной для нее последовательностью имеется у большинства растений и животных — от амёбы до человека.

Фермент, строящий теломеры

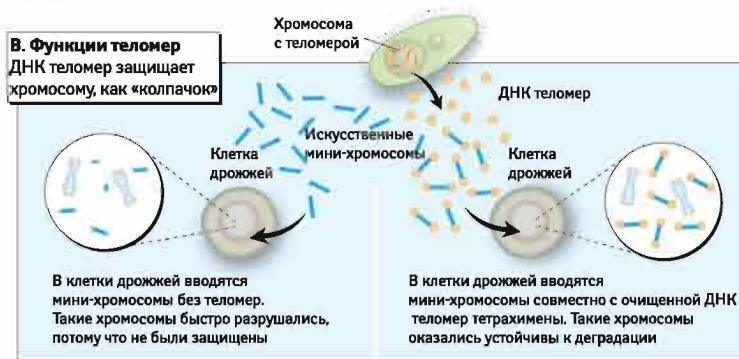
После обнаружения теломер возник вопрос об их природе. Необходимо было установить механизм, при котором они бы строились на концах хромосомы. К. Грейдер, работавшая под руководством уже упомянутой Э. Блэкберн, проводила исследование с целью выяснить, не участвует ли в формировании ДНК теломер какой-то неизвестный до этого времени фермент. В Рождественский день 1984 г. К. Грейдер обнаружила признаки ферментативной активности в клеточном экстракте. Обнаруженный энзим Э. Блэкберн и К. Грейдер назвали теломеразой. После его выделения и очистки ученые установили, что он состоит не только из протеина, но и РНК, которая содержит ту же последовательность ССССАА, что и теломера. Таким образом, РНК служит шаблоном для построения теломеры, в то время как белковый компонент фермента необходим непосредственно для ферментативной деятельности (см. рис. 2б). Теломераза удлинняет ДНК теломеры, обеспечивая платформу, которая в свою очередь позволяет ДНК-полимеразам скопировать хромосому по всей длине, без потери генетической информации. Таким образом, хромосома при копировании не укорачивается.

Рис. 2б



Если теломераза не достраивает теломер, хромосома укорачивается при каждом делении, пока теломера не разрушится и хромосома начинает деградировать. Теломераза поддерживает постоянную длину теломер. Поэтому хромосома копируется целиком, не укорачиваясь.

Рис. 2в



В клетки дрожжей вводятся мини-хромосомы без теломер. Такие хромосомы быстро разрушались, потому что не были защищены. В клетки дрожжей вводятся мини-хромосомы совместно с очищенной ДНК теломер тетрахимены. Такие хромосомы оказались устойчивыми к деградации.

Теломера против старения клетки

Теперь ученые начали исследовать, какую роль теломера играет в клетке. Дж. Шостак с сотрудниками обнаружил, что в клетках дрожжей, имеющих мутации, теломера постепенно укорачивается; такие клетки очень плохо растут, а потом и вовсе прекращают делиться. Э. Блэкберн с сотрудниками подобную картину наблюдали в инфузории тетрахимене, если РНК теломеразы была подвергнута мутации. В обоих случаях это приводило к преждевременному клеточному старению. Напротив, нормально функционирующие теломеры предотвращали укорочение хромосом и задерживали клеточное старение. Позже К. Грейдер с сотрудниками установила, что подобный механизм работает и в клетках человека, где укорочению хромосом мешала теломераза. Благодаря проведению интенсивных исследований в этой области теперь нам известно, что последовательность ДНК в теломере «притягивает» белки, которые формируют защитный «колпачок» вокруг хрупких концов ДНК.

Важный элемент загадки: старение, заболевания и уровень жизни

Эти открытия имели в научном сообществе сильный резонанс. По мнению многих ученых, укорачивание теломеры может быть причиной не только клеточно-

го старения, но и старения всего организма в целом. В то же время процесс старения, как оказалось немного позже, намного более сложен, и он, как теперь полагают, зависит от многих различных факторов, среди которых теломера является одним из множества. Однако исследования в этой области продолжают с прежней интенсивностью.

Вместе с тем большинство клеток не делится настолько уж часто, поэтому их хромосомы не подвергаются риску укорочения в процессе митоза, и поэтому они не требуют высокой активности теломеразы. Напротив, раковые клетки обладают способностью делиться бесконечно и при этом все же сохраняют необходимую длину теломера (как оказалось, за счет высокой активности фермента теломеразы). Благодаря этому разрабатываются методы лечения онкологических и прочих заболеваний, основанные на ингибировании активности теломеразы, о чем речь более подробно пойдет ниже.

Однако длина теломера, как оказалась, может рассматриваться не только в медико-биологическом аспекте, но и, как ни удивительно это прозвучит, в социально-экономическом, а также с точки зрения качества жизни.

Все та же Э. Блэкберн с коллегами из Калифорнийского университета Сан-Франциско (University of California, San Francisco) в ходе пилотного исследования выявили, например, что матери, ухаживающие за своими тяжелобольными детьми, имели

более короткие теломеры в фазе наивысшей точки эмоционального стресса (*today.ucsf.edu*; Njajou O.T., Cawthon R.M., Damcott C.M., 2007).

Другое исследование, опубликованное в 2006 г. в журнале «Aging Cell», которое проводилось доктором Тимом Спектором (Dr Tim Spector) с коллегами из лондонского госпиталя «St Thomas's Hospital» и медицинского института НьюДжерси (New Jersey Medical School), показало, что люди из развивающихся стран имеют более короткие теломеры, чем те, кто живет в развитых (*www.reuters.com*; *news.bbc.co.uk*; Cherkas L.F., Aviv A., Valdes A.M., 2006).

Как уже было сказано выше, в настоящее время проходит несколько исследований, включая клинические испытания, в которых оценивается эффективность лекарственных средств, механизм действия которых так или иначе направлен на активность фермента теломеразы. Так, американская компания «Genop Corporation» проводит четыре клинических испытания с участием человека по исследованию препаратов, которые проявляют ингибирующие свойства в отношении теломеразы, а также возможности иммунизации человека вакциной, которая бы способствовала выработке антител к клеткам с гиперактивной теломеразой. Другая американская компания, «Merck&Co.», получила от «Genop» лицензионные права на одобрение заявки на исследуемое лекарственное средство (Investigation New Drug — IND) для еще одной похожей вакцины.

10 декабря, в день смерти Альфреда Нобеля, в Голубом зале городской ратуши Стокгольма проходит торжественная церемония вручения Нобелевской премии, которую лауреаты получают из рук шведского короля Карла XVI Густава

Платформа для создания подобных вакцин проходит тестирование (в настоящее время совместно с «Merck&Co.») по трем направлениям. По первому из них рассматривается вакцина на основе аденовирус/плазмиды; второе направление, по которому идет исследование, — попытка

создания вакцины на основе аутогенных дендритных клеток (autologous dendritic cell based vaccine) под названием GRNVAC1 (ранее — TVAX), которая в I фазе клинических исследований при раке простаты продемонстрировала значительное усиление T-клеточного ответа (*www.geron.com*). Третье направление касается создания вакцины на основе эмбриональных стволовых клеток дериватов дендритов, разработанной компанией «Genop» и проходящей в настоящее время доклиническое испытание. Эти методы вакцинации направлены на то, чтобы иммунная система человека сама научилась атаковать раковые клетки, экспрессирующие теломеразу.

Следующий подход, использующийся для разработки лекарственных средств, — создание ингибиторов теломеразы. Так, действие препарата GRN163L, разработанного компанией «Genop», направлено на то, чтобы остановить распространение раковой опухоли путем связывания теломеразы. Данный кандидат в препараты в настоящее время проходит начальную фазу клинических исследований с участием человека.

Однако не все так просто. Несмотря на то, что *in vitro* действительно удавалось добиться гибели популяции раковых клеток, тем не менее, существует несколько «но», например существование ALT-механизма (от англ. Alternative Lengthening of Telomeres — альтернативное удлинение теломер), что осложняет эффективность такой терапии (Bryan T.M., Englezou A., Gupta J., 1995; Henson J.D., Neumann A.A., Yeager T.R., 2002). Однако все та же «Genop» заявляет, что ее уже упоминавшийся выше препарат из группы ингибиторов теломеразы GRN163L показал высокую эффективность, вызывая гибель раковых стволовых клеток. Механизм его действия заключается в том, что он связывается непосредственно с РНК-матрицей теломеразы, тем самым блокируя ее способность к дальнейшему синтезу теломеры, способной, как «колпачек», защитить хромосому раковой клетки от деградации. При этом даже мутация РНК-матрицы теломеразы не в состоянии вернуть ей ее активность, говорят ученые. Такой подход, направленный именно на ингибирование РНК-матрицы энзима, по мнению Э. Блэкберн, является многообещающим для создания лекарственных средств в будущем. И не только для лечения раковых опухолей — ингибиторы теломеразы могут помочь справиться

ся и с некоторыми наследственными заболеваниями, которые, как стало теперь известно, вызваны дефективной теломеразой, включая определенные формы врожденной апластической анемии, заболевание, при котором резко угнетен или вообще отсутствует рост и созревание всех трех клеточных линий в костном мозгу. Некоторые унаследованные дерматологические и легочные заболевания также вызваны дефектами теломеразы.

Однако интерес вызывают не только ингибиторы, но и активаторы фермента теломеразы — компании все же не оставляют надежду на то, чтобы попытаться воздействовать на продолжительность жизни человека или хотя бы на скорость его старения (*www.sierrasci.com*). И здесь их попытки вполне оправданы: проведенное в 2009 г. исследование активности теломеразы у евреев ашкенази показало, что долгожители имеют гиперактивную теломеразу (*www.livescience.com*). Так, начиная с 2001 г., было обнаружено несколько соединений, которые активировали выработку этого фермента. Первой была калифорнийская компания «Genop», которая обнаружила вещество, названное ею TA-65™, которое ученые этой компании выделили из растения Астргал сходный (*Astragalus propinquus*). Это вещество показало свою эффективность в отношении активизирования теломеразы. В апреле 2007 г. «Genop» передала права на исследование его эффективности у человека нью-йоркской компании «Telomerase Activation Sciences Inc. — TA Sciences™» (*www.tasciences.com*; *www.lef.org*). В ноябре 2007 г. американская компания «Sierra Sciences LLC.» также заявила, что ею было обнаружено вещество под названием C0057684, вызывавшее высокий уровень активности теломеразы в соматических клетках; в 2009 г. эта же компания объявила об открытии еще 62 соединений, оказывающих подобное действие (Tanglao, Showna, et al., 2008).

Продолжение следует...

Открытия, сделанные Э. Блэкберн, К. Грейдер и Дж. Шостаком, способствовали формированию понимания нами новых аспектов клеточного деления, пролили свет на механизмы развития заболеваний и подтолкнули к разработке потенциально новых терапевтических методов, о вероятном практическом применении которых, мы уверены, напишем еще не один раз. ■