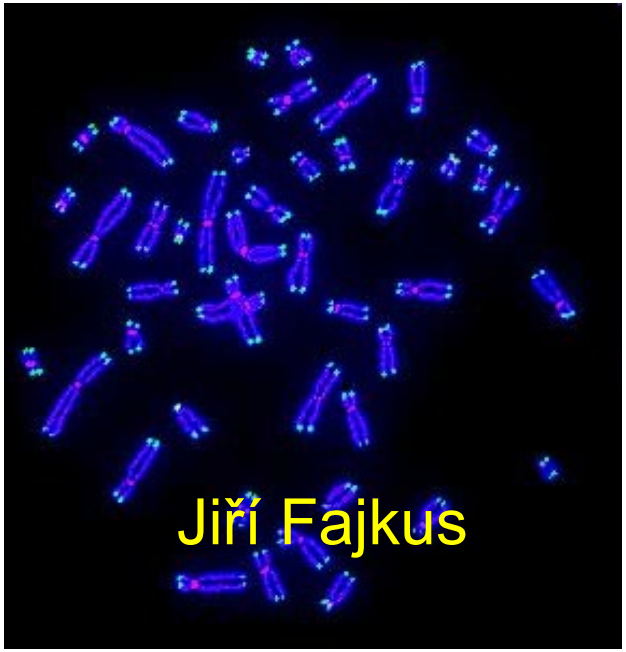
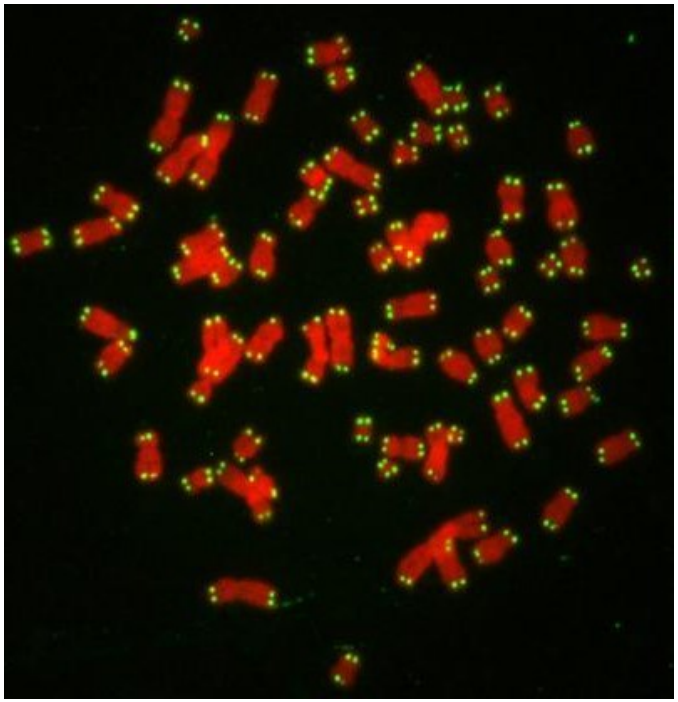
Telomery – začátky a konce chromozomů

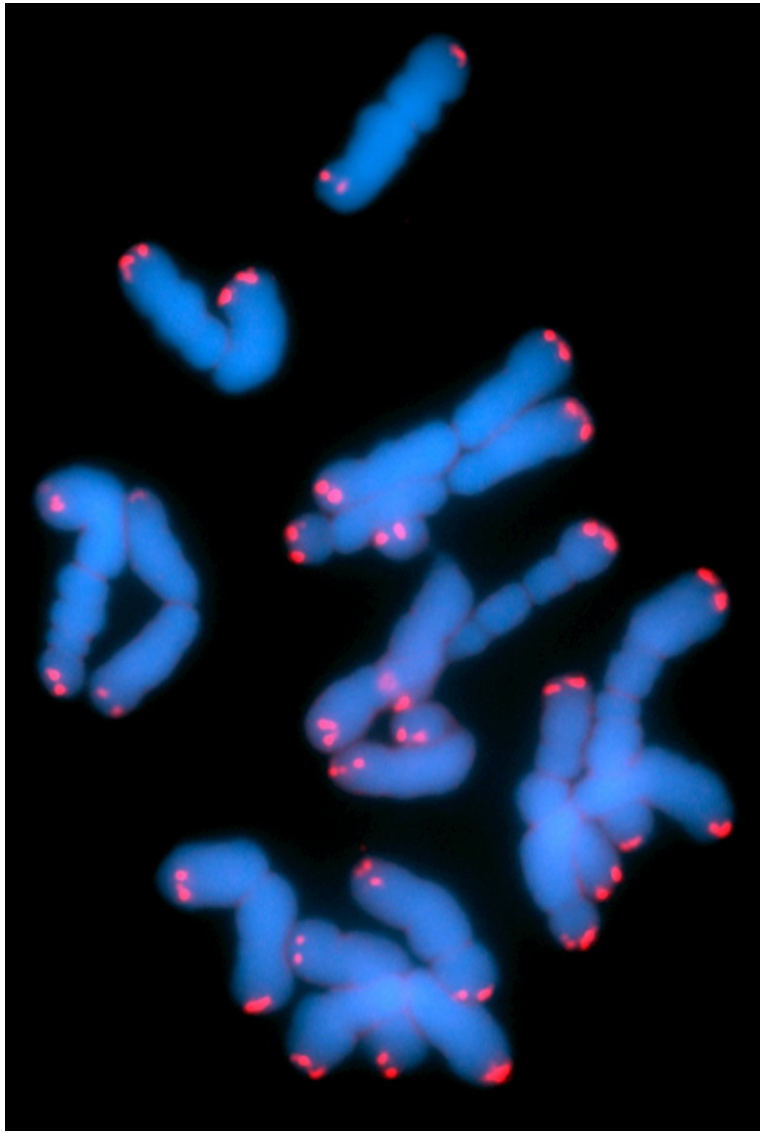


EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

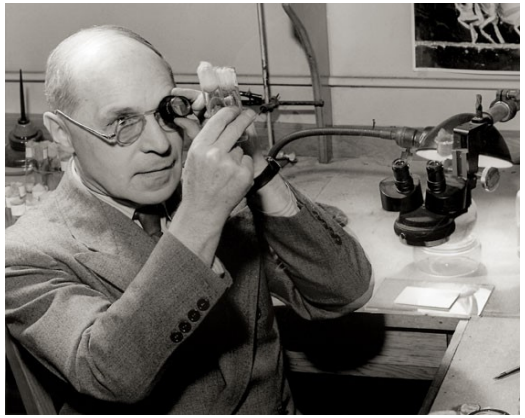
Osnova:

1. Úvodní část (drozofila, kukuřice, Hayflickův limit)
2. Nástup molekulární biologie telomer
3. Příklady z praxe
4. Závěr





EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



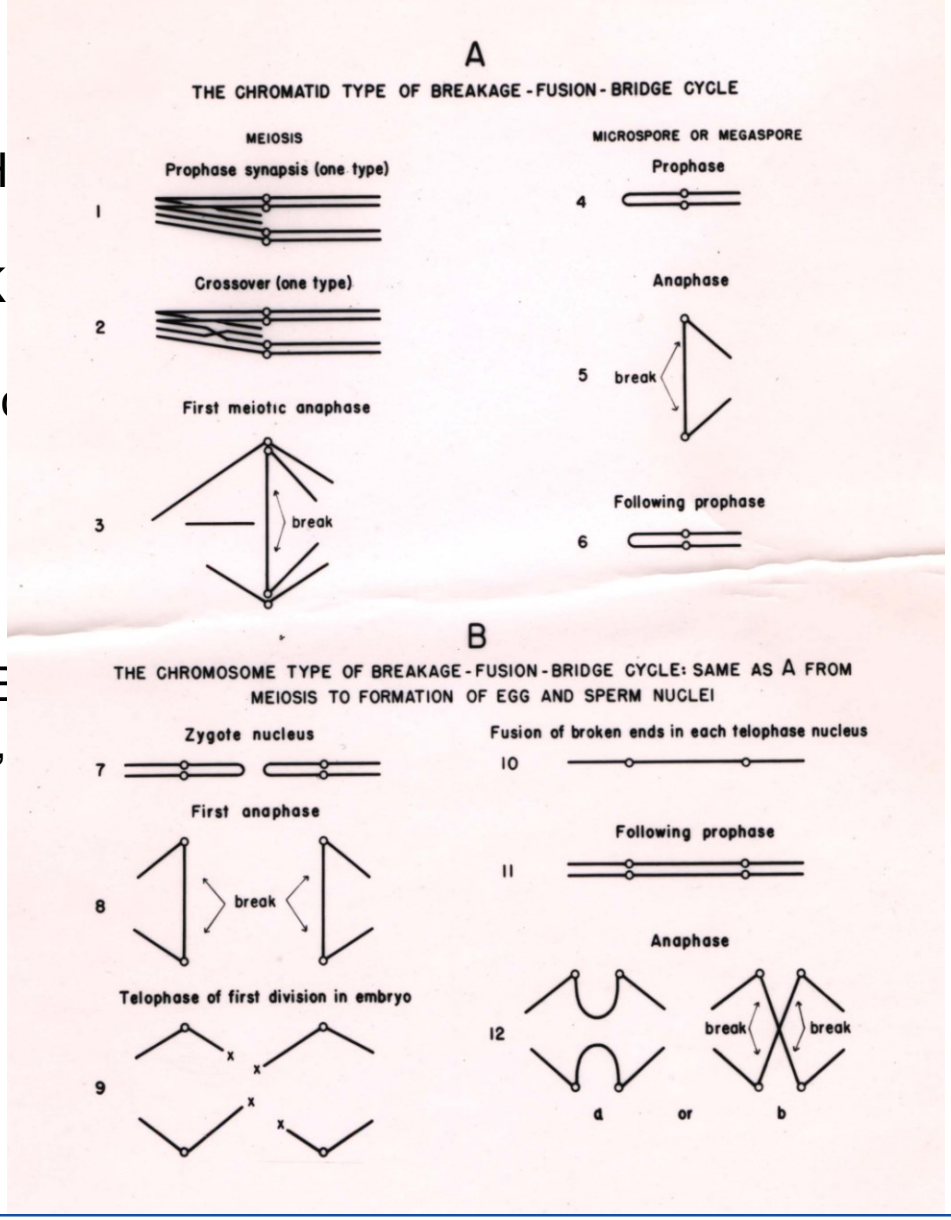
H

K

p

E

”



EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

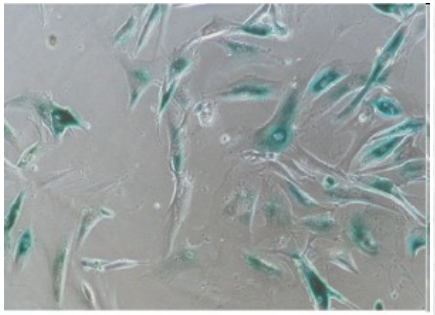
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS

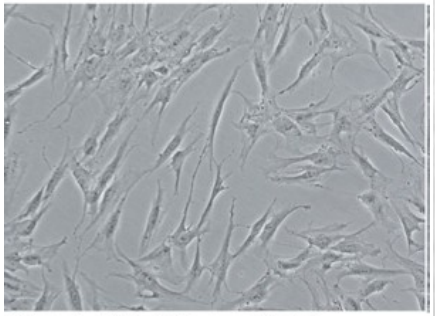
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

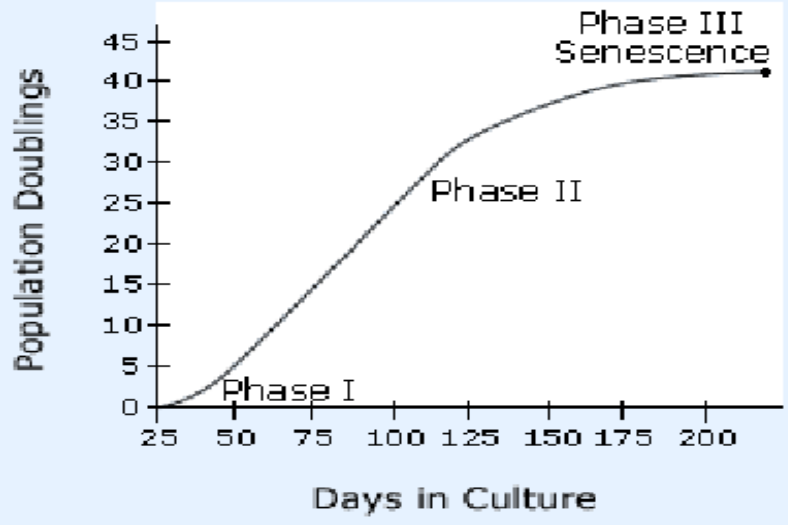
Lidské buňky nejsou nesmrtelné ! ..... *Hayflick a Moorhead, 1961*

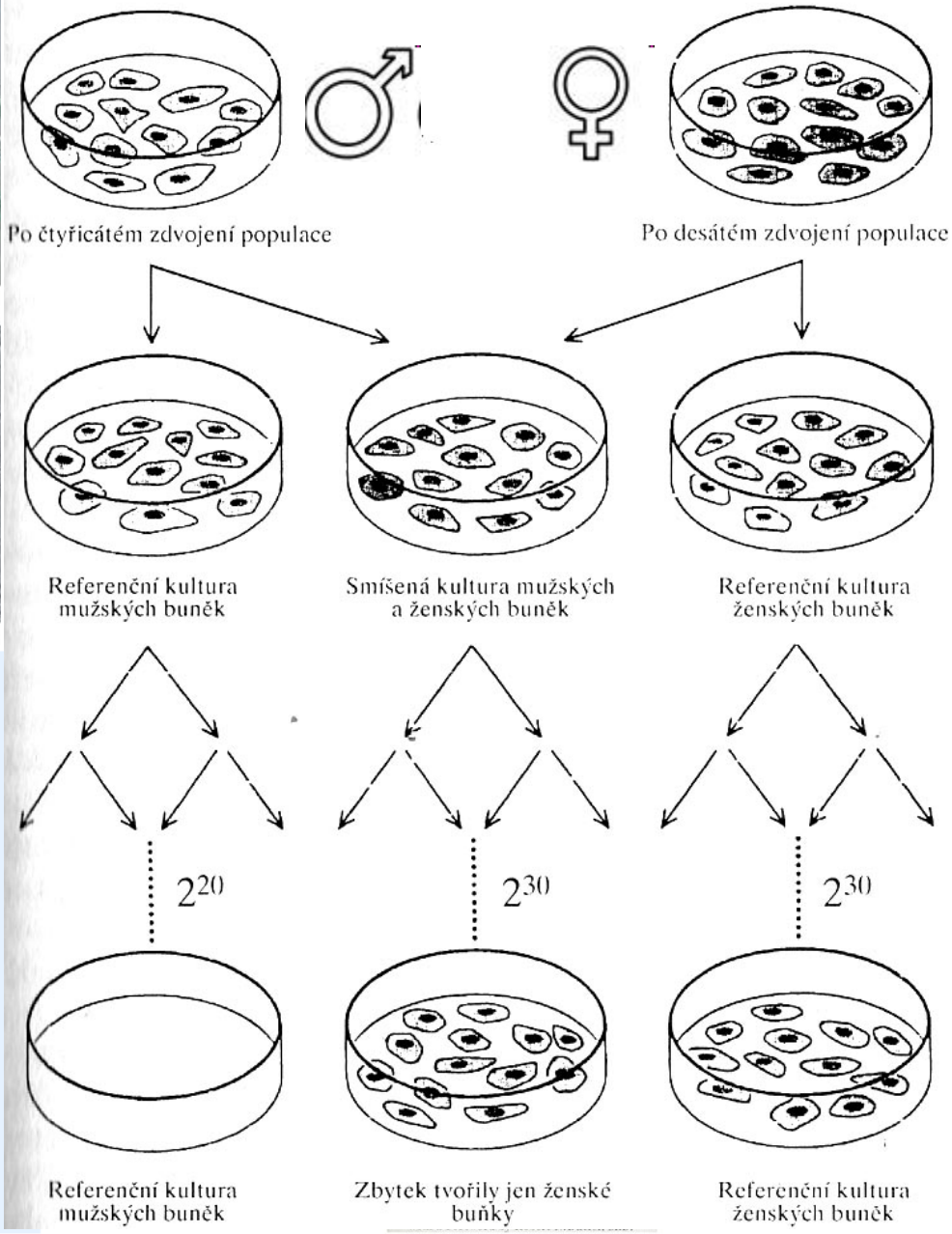


A. Human Foreskin Fibroblasts passage 28 (senescent cells)



B. Human Foreskin Fibroblasts passage 5 (control)





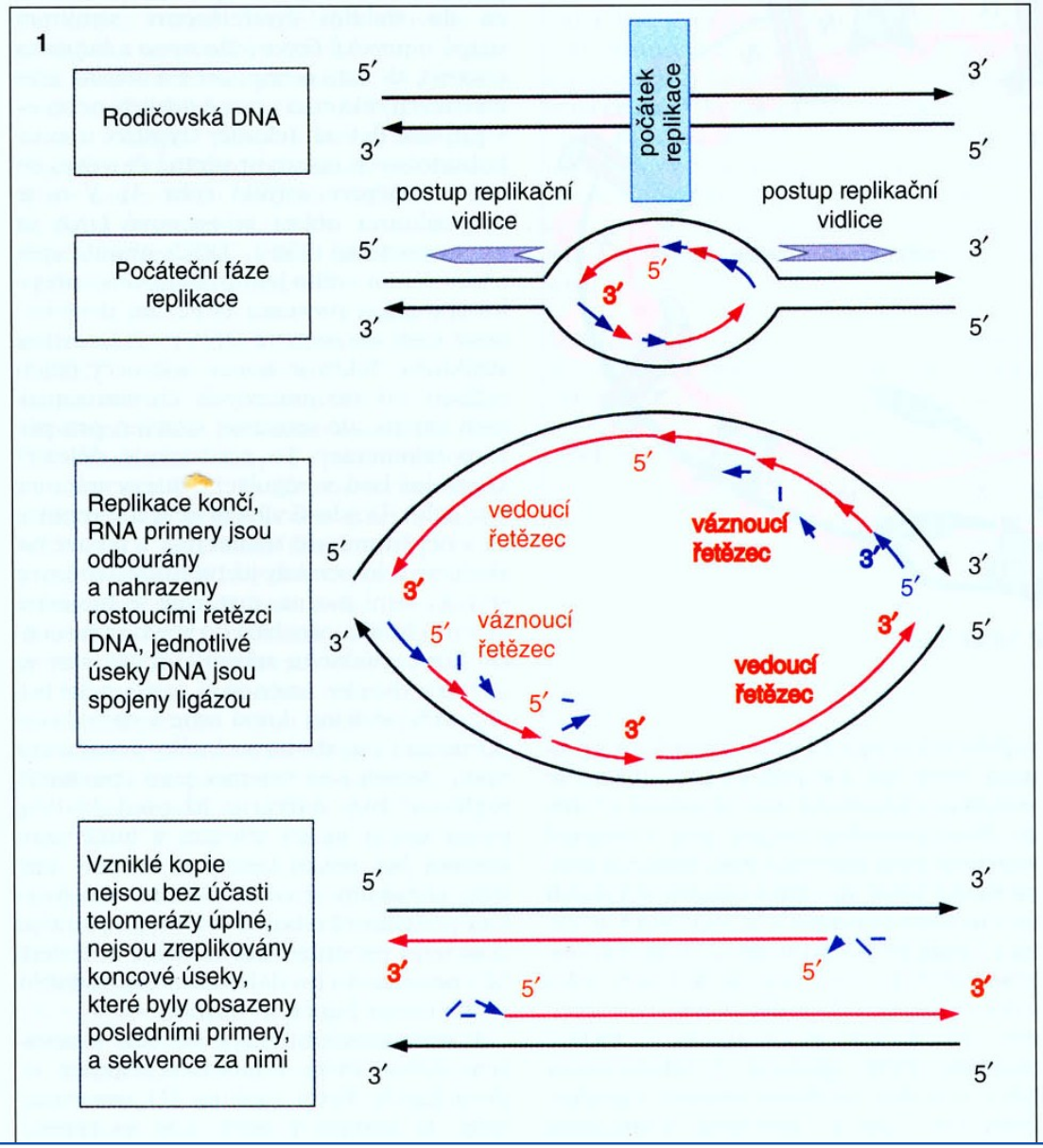
Alexej Olovnikov – 1971-
Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides.

James D. Watson – 1972
- Origin of concatemeric T7 DNA

⇒ Formulace problému neúplné replikace konců chromozomů (u opožď. vlákna)

souvislost s Hyflickovým limitem ? – **Telomerová hypotéza stárnutí**

⇒ renesance zájmu o telomery



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Nástup molekulární biologie telomer

•DNA telomer je u prvoka *Tetrahymena* tvořena **krátkou opakující se sekvencí DNA -** [TTGGGG] (*E. Blackburn, J. Gall, 1978*)

Syntézu telomer provádí *Telomerová terminální transferáza,* syntéza je citlivá k proteináze i RNáze (*C. Geider, E. Blackburn, 1985*).

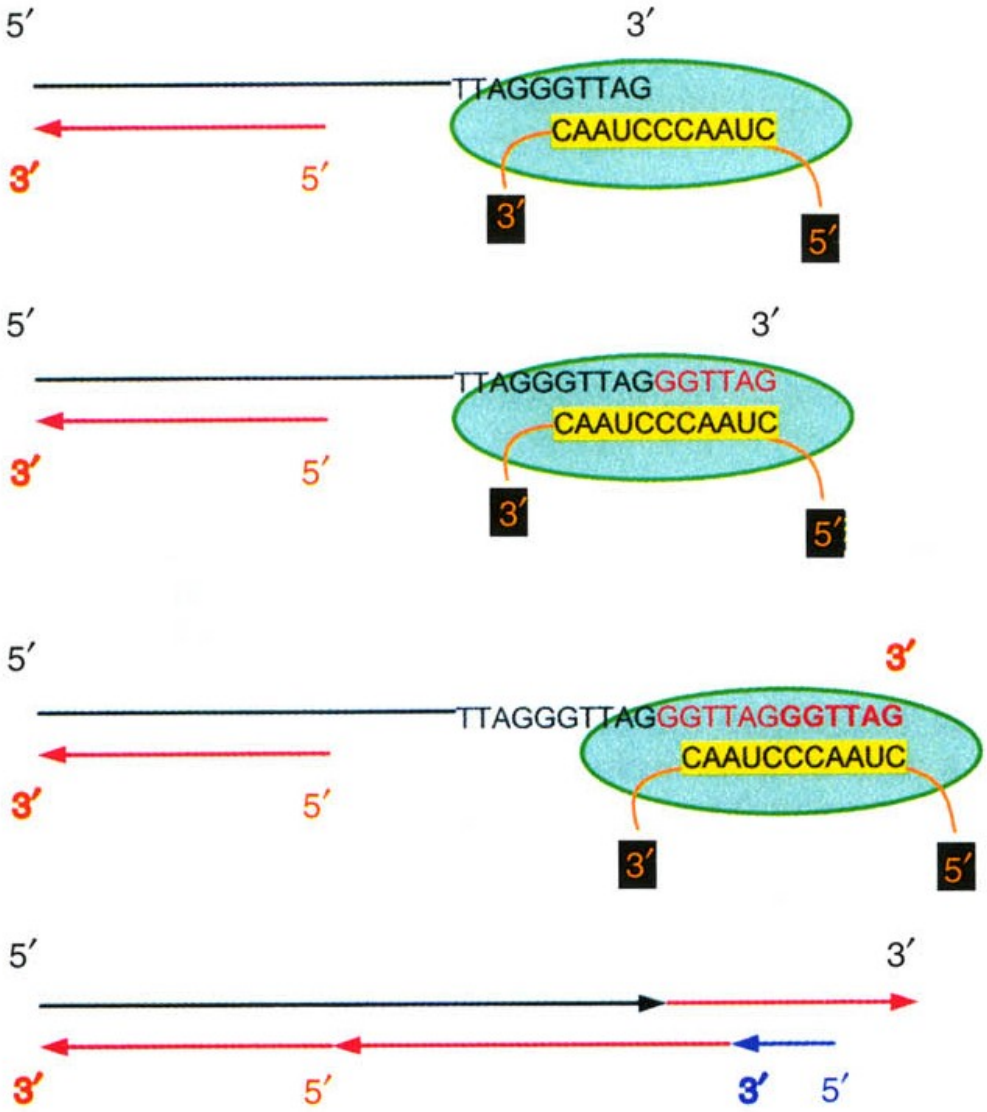
•Syntéza telomer probíhá jako **reverzní transkripce,** tj. přepisem sekvence RNA do sekvence DNA. Provádí ji komplex RNA a proteinu, zvaný **TELOMERÁZA** (Greider & Blackburn, 1989)

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

2

Činností telomerázy dochází k prodloužení 3′ konců rodičovských vláken DNA. Několikrát se opakuje cyklus nasednutí telomerázy, syntézy DNA (mechanismem reverzní transkripce templátové sekvence telomerázové RNA) a posunu telomerázy na nově prodloužený konec DNA

Na prodloužený konec telomery může nyní nasednout další RNA primer, z něhož DNA polymeráza dokončí syntézu váznoucího vlákna



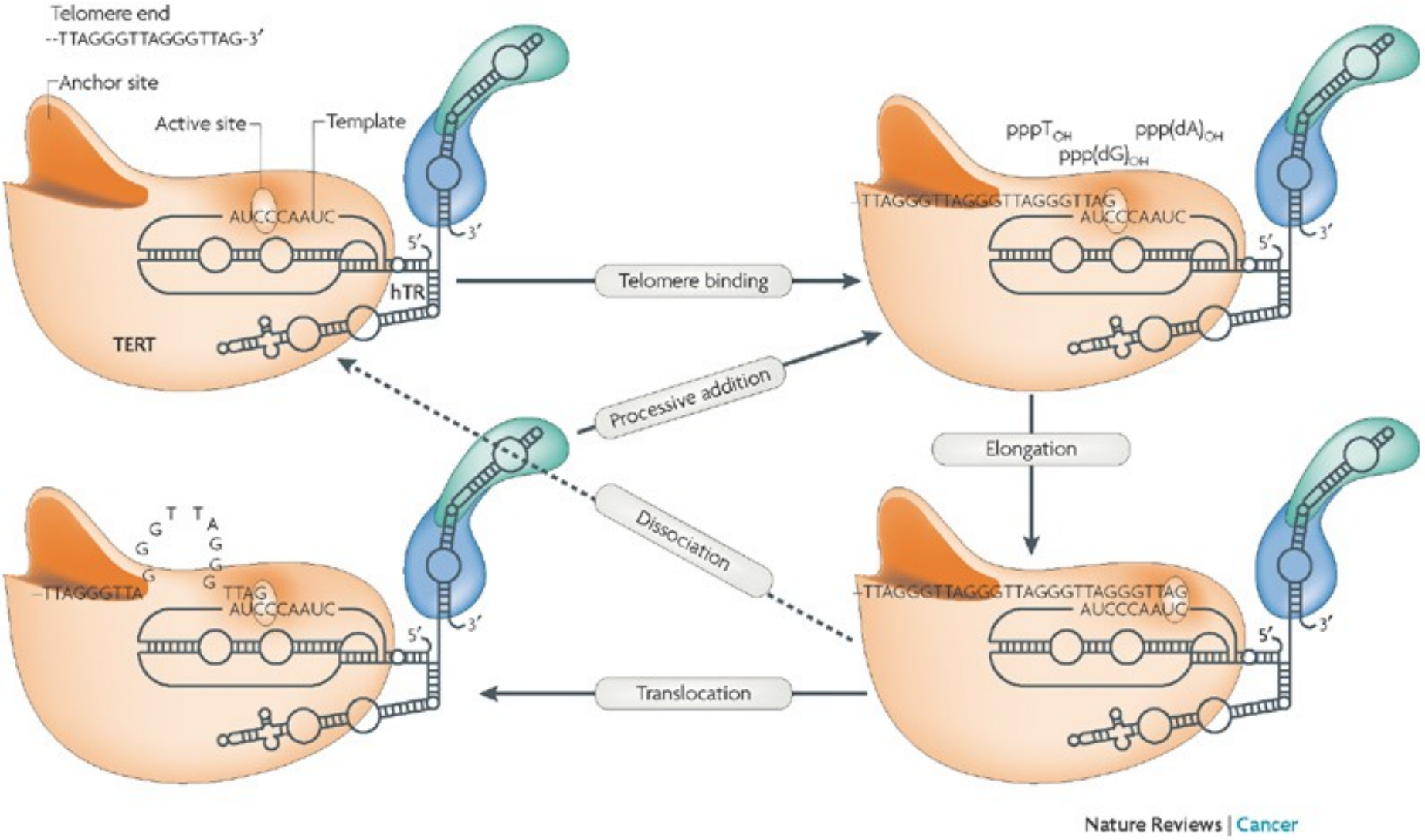
EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

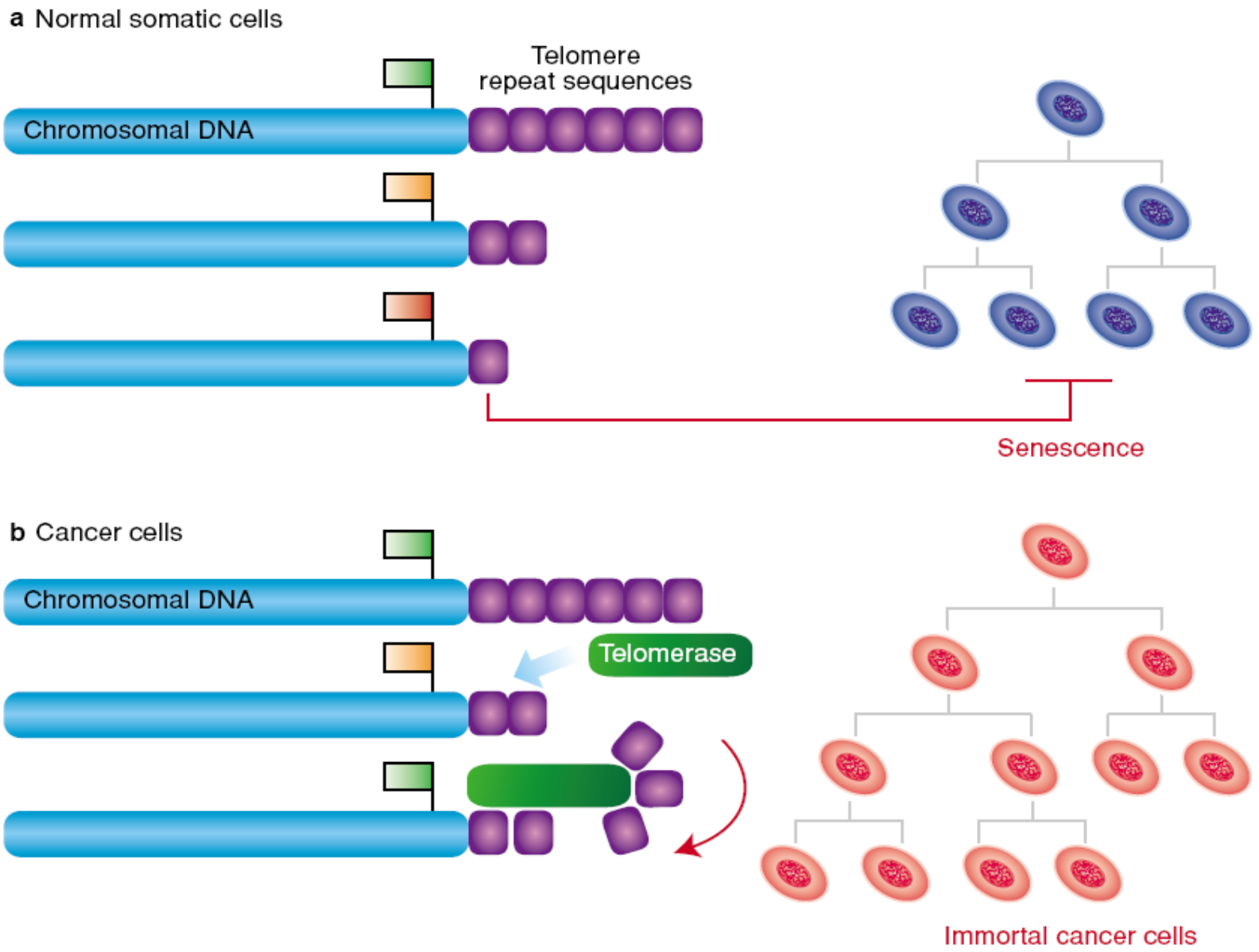
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Telomeráza je RNA-dependentní reverzní transkriptáza jejíž templátová RNA (telomerase RNA component (TR)) je součástí enzymu.



Regulation of telomere length in normal and cancer cells by telomerase

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2002 Cambridge University Press

Základní poznatky na počátku 90. let 20. století:

1. Telomery = nukleoproteinové struktury na koncích chromozomů, které odlišují přirozené konce chromozomů od neopravených chromozomových zlomů, a chrání konce chromozomů před vzájemným spojováním (a následným lámáním)

2. Telomery jsou tvořeny nekódujícími sekvencemi; jejich částečná ztráta v důsledku neúplné replikace není proto pro buňku (do určité míry) kritická, ani když nefunguje telomeráza

3. Telomeráza je schopná telomery prodlužovat a tím zrušit funkci telomer jako počítadla buněčných dělení

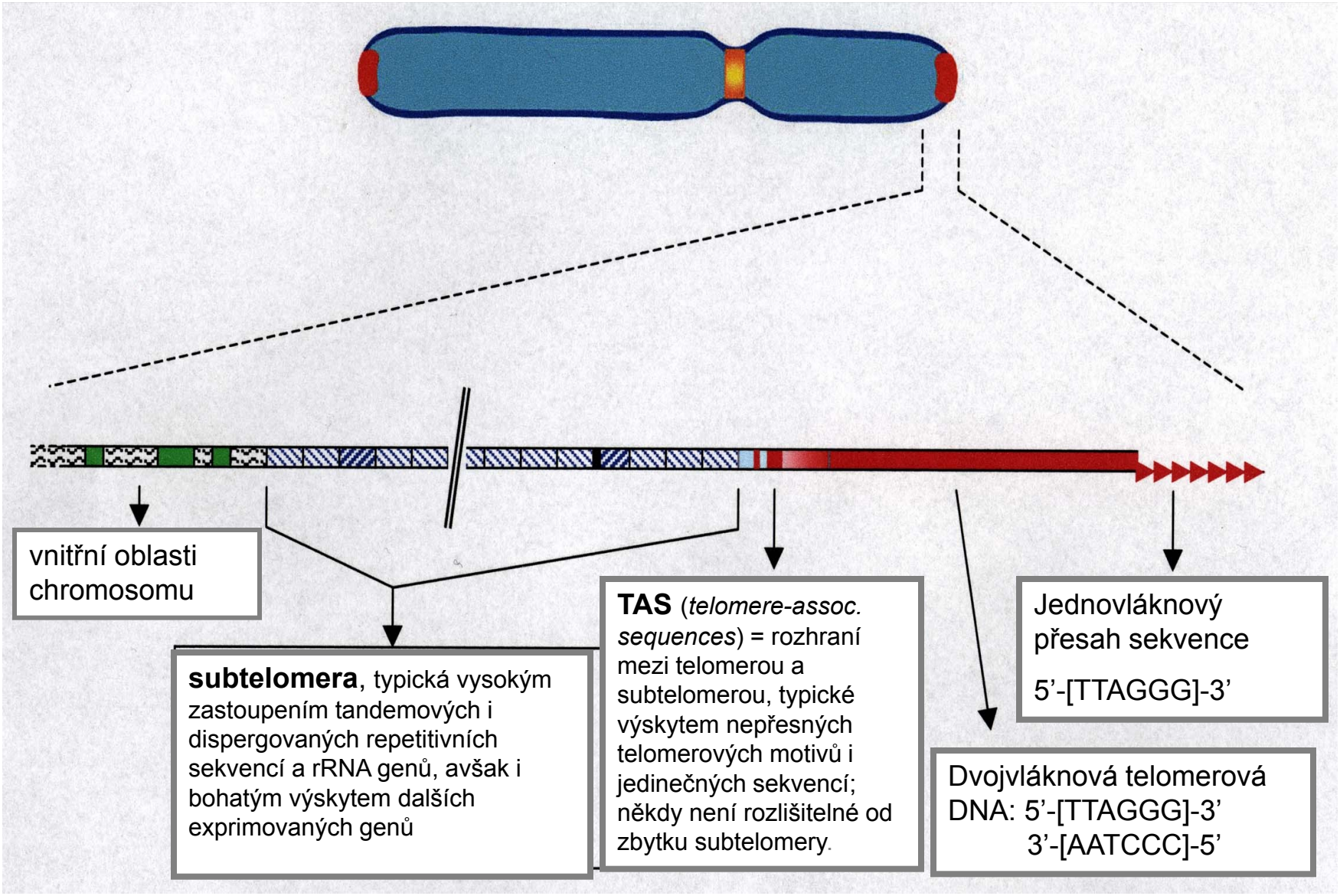
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

2. část – detaily ze života telomer

1. **Struktura telomer:** telomery, stejně jako ostatní části chromozomů, jsou chromatinové, tedy nukleoproteinové struktury.
2. **Regulace udržování telomer:** telomeráza, její aktivita a exprese, přístupnost/struktura telomer aj. faktory
3. **Telomery a odpověď na poškození DNA:** jak rozpozná buňka přirozené konce chromozomů od neopravených chromoz. zlomů? Co rozhoduje o tom, zda je telomera „funkční“
4. **Zajímavosti ze studia rostlinných telomer**

Nukleoproteinová struktura telomer

Schéma uspořádání sekvencí DNA na koncích chromozomů



Telomery tvoří smyčky (t-smyčky) *J, Griffith, 1999*

G4 ?

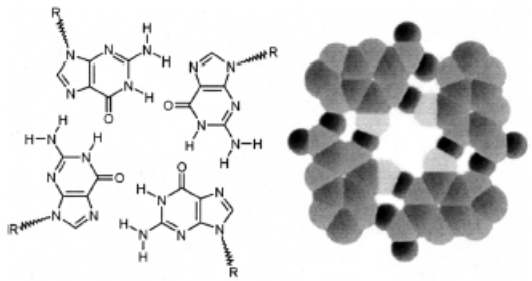


Fig. 1 The Guanine Tetrad Motif and Its Hydrogen Bonding Scheme (Left) and a Space Filling Model Revealing the Hollow Center (Right).

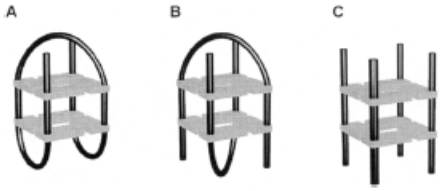


Fig. 2 Various Strand Stoichiometries of G-Quadruplex Structures.
(A) A one-stranded structure yields a unimolecular G-quadruplex. (B) Two strands render a bimolecular G-quadruplex. (C) Four separate strands produce a quadrimolecular G-quadruplex.

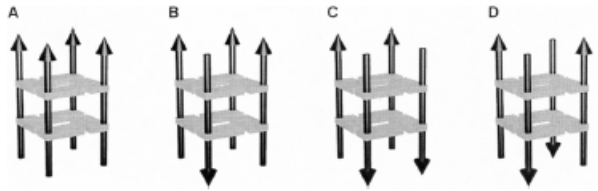
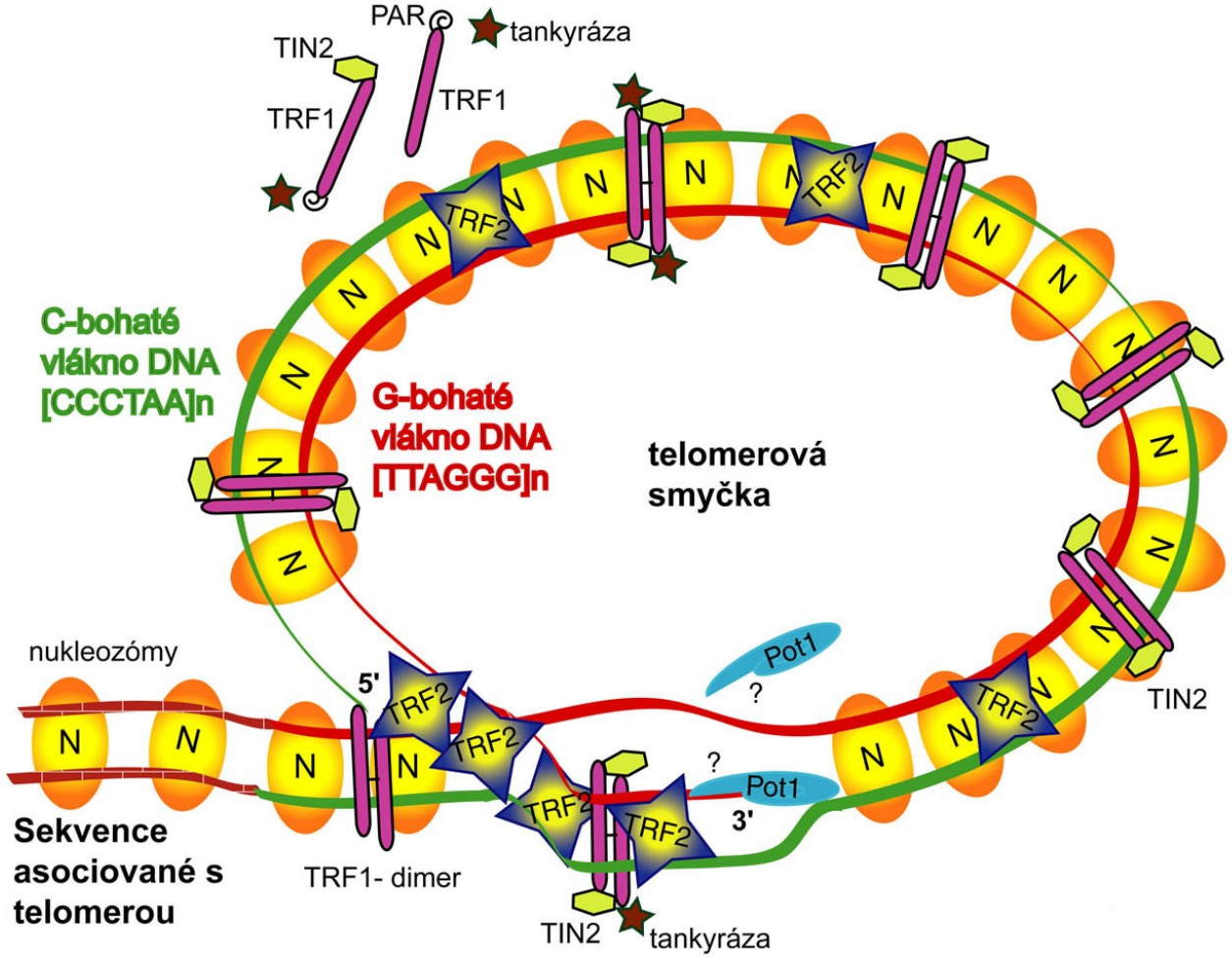
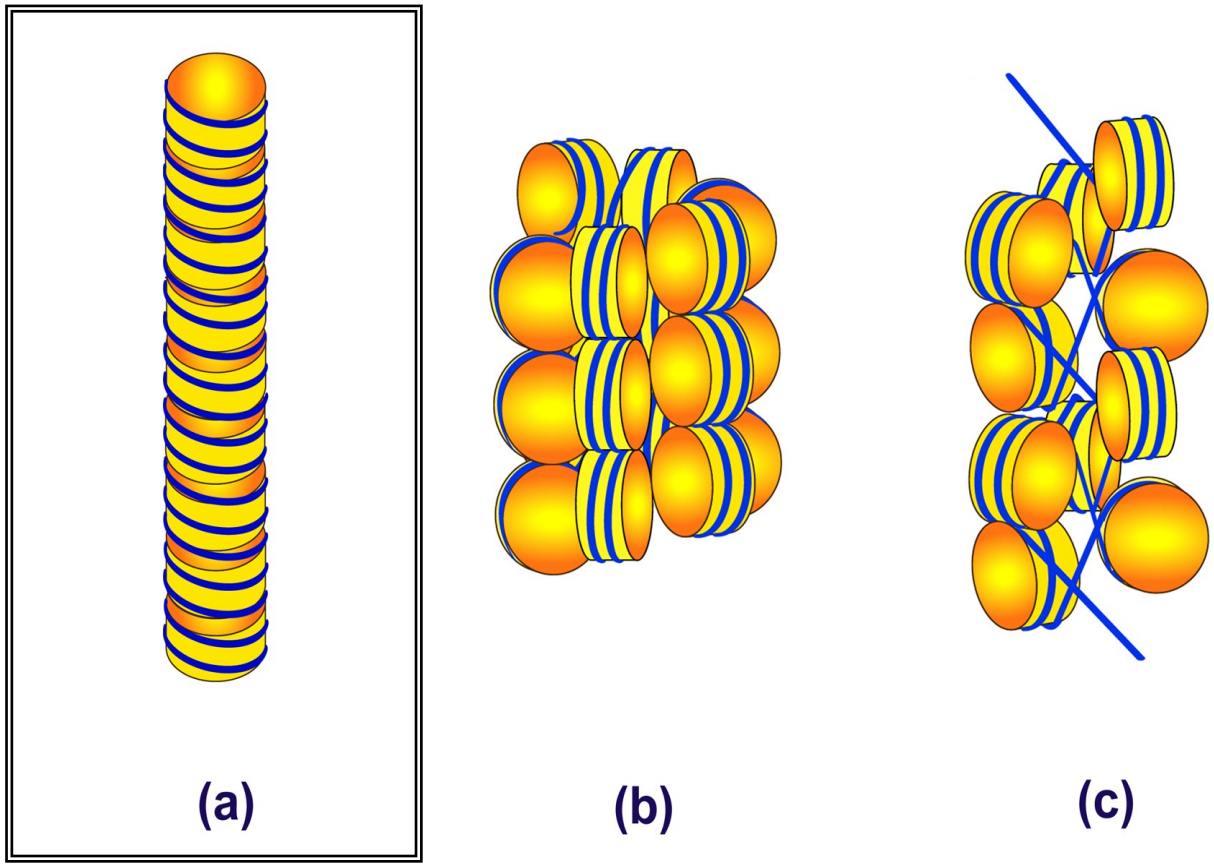


Fig. 3 Different Strand Polarity Arrangements of G-Quadruplexes.
(A) All strands parallell. (B) Three parallell strands and one strand antiparallell. (C) Two pairs of adjacent parallell strands. (D) Alternating antiparallell strands. Arrows indicate 5'→3' polarity.



t-smyčku netvoří *in vivo* DNA, ale **chromatin**

Fajkus et al., 2001, 2002



Sloupcová struktura tel. chromatinu

Fajkus & Trifonov, 2001

Na základě jakých experimentálních údajů bylo navrženo sloupcové uspořádání telomerových nukleozomů?

1. Extrémně krátká periodicita tel. chromatinu (pozorovaná u telomer obratlovců (Makarov et al. 1993, Lejnine et al. 1995, Tommerup et al.1994), rostlin (Fajkus et al.1995) i prvoků (Cohen& Blackburn, 1998, Figueiredo et al.2000) - sloupcový model nabízí uspořádání nukleozomů takové, aby spojovací DNA měla minimální délku

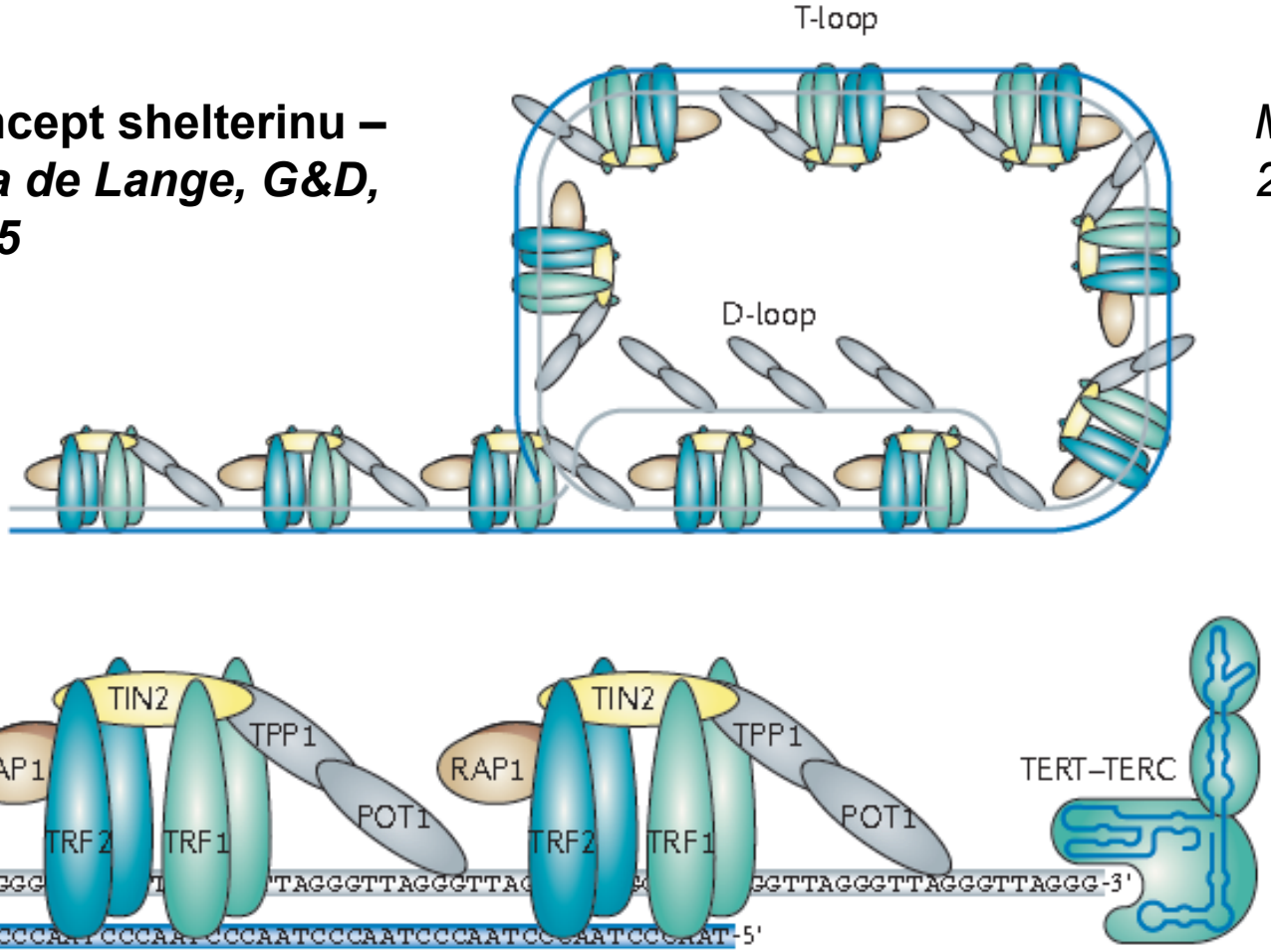
2. Pravidelnost struktury a její stabilita v případě dlouhých vláken, zatímco krátké oligonukleozomální fragmenty nestabilní - důsledek absence specifické rotační a translační polohy nukleozomů v případě 6-8 bp telomerové sekvence a slabé interakce mezi DNA a oktamerem histonů (počítačová predikce - Fajkus et al., 1995, experimentálně Rossetti et al., 1998)

3. „Staré“, neprávem pozapomenuté výsledky (Voordouw & Eisenberg, 1978, Eisenberg & Felsenfeld, 1981) ukazující tvorbu „dimerů“ nukleozomů interakcí mezi H3/H4 tetramery; dále sloupcové struktury spontánně tvořené dřeňovými částicemi v krystalech (Richmond et al. 1984) a tekutých krystalech (Leforestier & Livolant 1997; Livolant & Leforestier 2000)

Struktura je pravidelná, DNA je rovnoměrně vinuta kolem sloupce histonových oktamerů, jejichž interakce jsou klíčové pro stabilizaci struktury. V této struktuře je potlačeno individuální klouzání nukleozomů, na rozdíl od klasických modelů. Pro stabilitu struktury je nezbytná určitá minimální délka sloupce.

Koncept shelterinu – ***Titia de Lange, G&D, 2005***

Martinez & Blasco, 2011

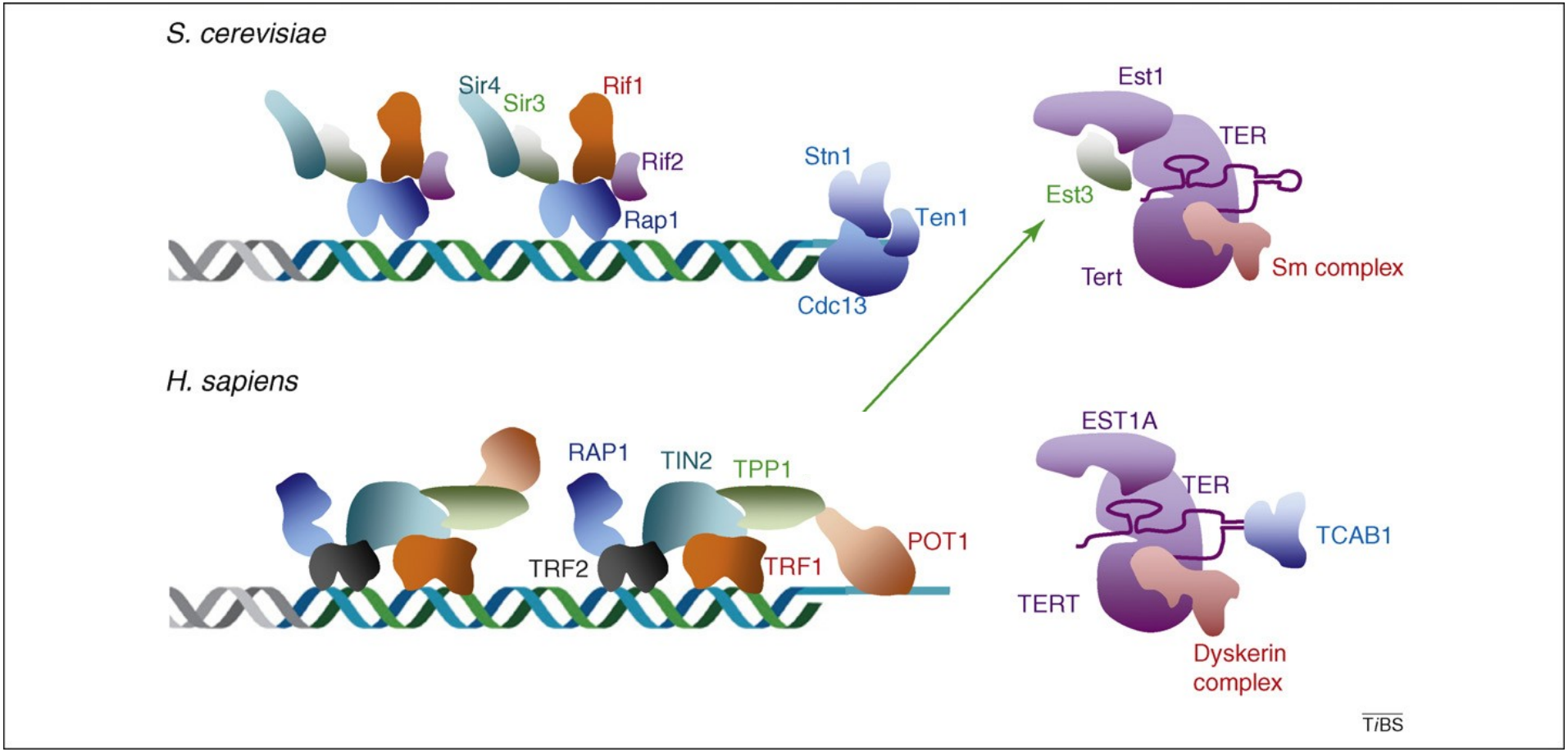


Telomeric roles

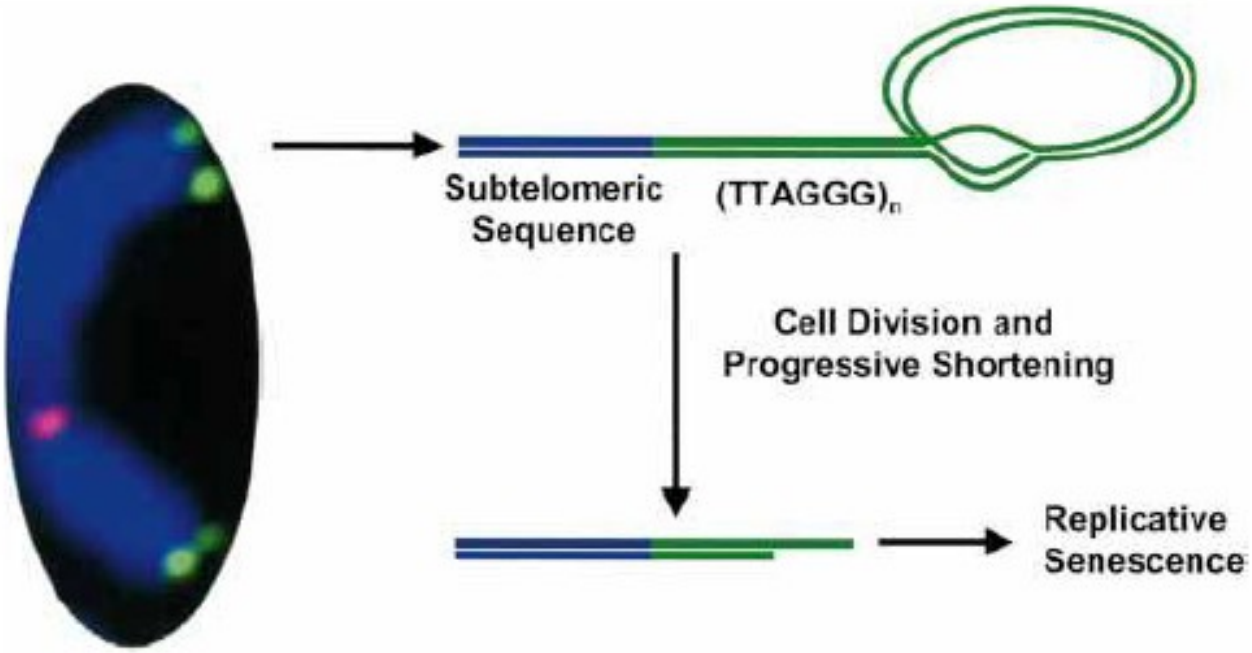
- Protection and recombination (TRF2, TRF1, TIN2, TPP1 and RAP1)[8,12,36]
- G-strand protection (POT1)[31,35,75]
- Length regulation (TRF2, TRF1, TIN2, TPP1 and RAP1)[8,12,36]
- Inhibition DDR (TRF2, TRF1, POT1 and RAP1)[8,36,44,84]
- Telomere replication (TRF1)[37,85]
- Telomerase recruitment (TPP1)[43,39]
- Telomere lengthening (TERT–TERC)[10]

Extra-telomeric roles

- Subtelomeric silencing (RAP1)[44]
- Transcriptional regulation (RAP1)[44,45]
- NF-κB signalling (RAP1)[45]
- Wnt signalling (TERT)[25,27]
- RNA polymerase (TERT–RMRP)[26]
- Stem cell mobilization (TERT)[22,28]



Porovnání komponent lidských a kvasinkových telomer (*Lue, TIBS 2010*)



Telomery, které nejsou dostatečně dlouhé pro tvorbu t-smyčky přestávají fungovat jako ochranné čepičky a v nepřítomnosti telomerázy jsou kontrolními mechanismy rozpoznány jako neopravené chromosomální zlomy

Podle vztahu k aktivitě telomerázy můžeme rozlišit *(dle Forsyth et al., 2002)*:

1. buňky „telomerase-silent“- postrádají aktivitu telomerázy bez ohledu na proliferační aktivitu (např. terminálně diferencované buňky většiny lids. tkání)

2. buňky „telomerase-competent“ - postrádají tel. akt. v klidovém stavu, ale re-exprimují ji při proliferaci (např. rostlinné buňky, u člověka imunit. systém, bazální vrstva kůže, spermatocyty...)

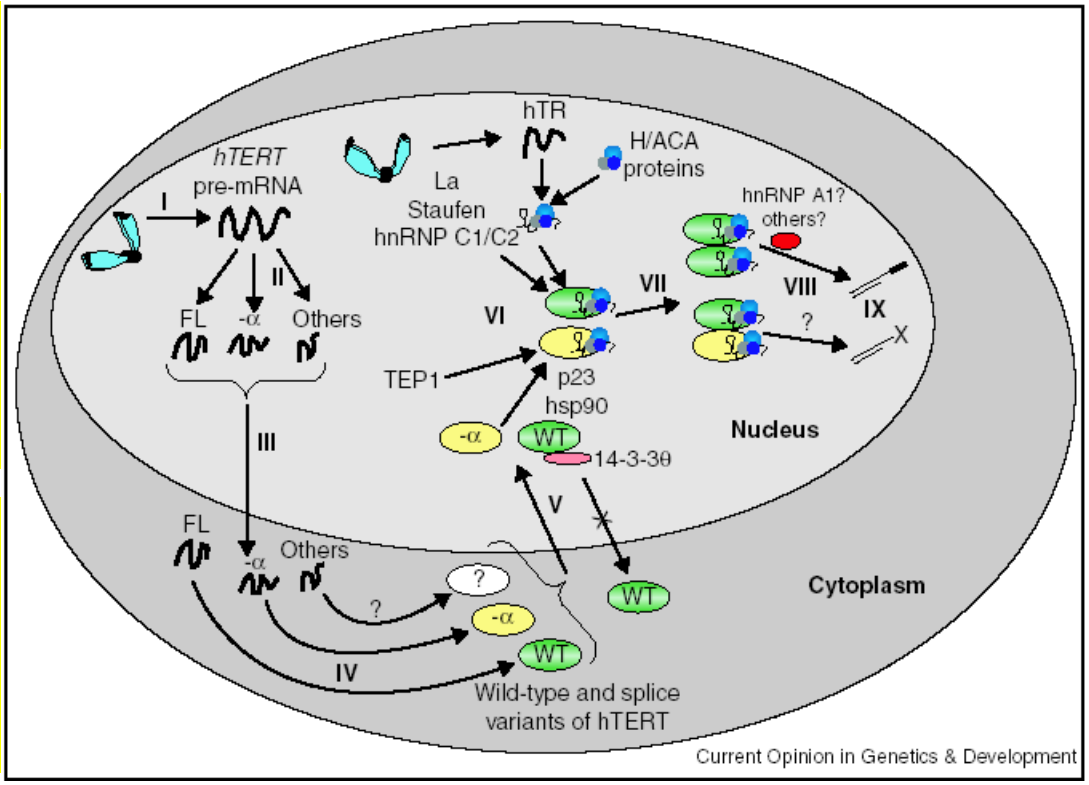
Jak je údržba telomer řízena?

I. transkripce genů pro hTR a hTERT

VI. sestavování fčního komplexu telomerázy (hTR+hTERT) za účasti proteinových a RNP faktorů

VII. dimerizace

II. sestřih hTERT



VIII. transport k telomerám

III. transport mRNA hTERT z jádra do cytoplasmy

IX. zpřístupnění telomer (uvolnění t-loop, chromatinová struktura)

IV. translace úplné a altern. sestřižené mRNA

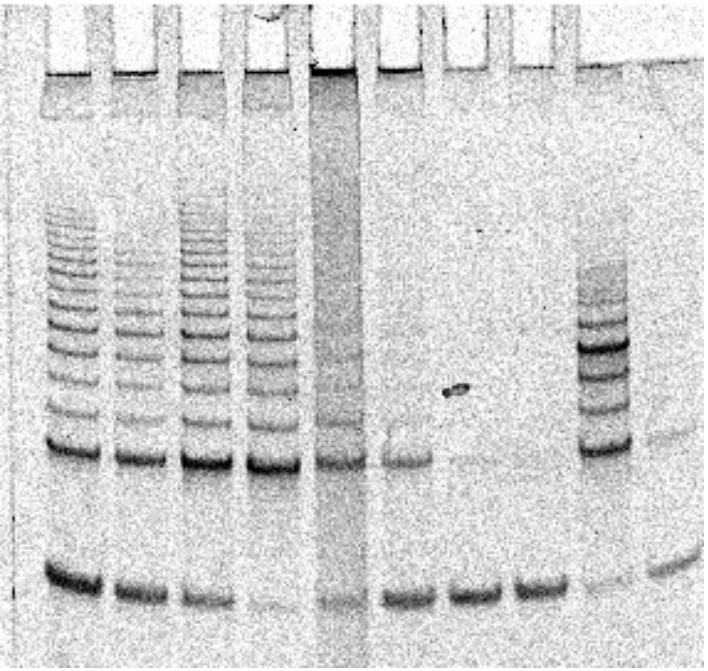
V. import translačních produktů do jádra

další vlivy: např. fosforylace hTERT proteinu

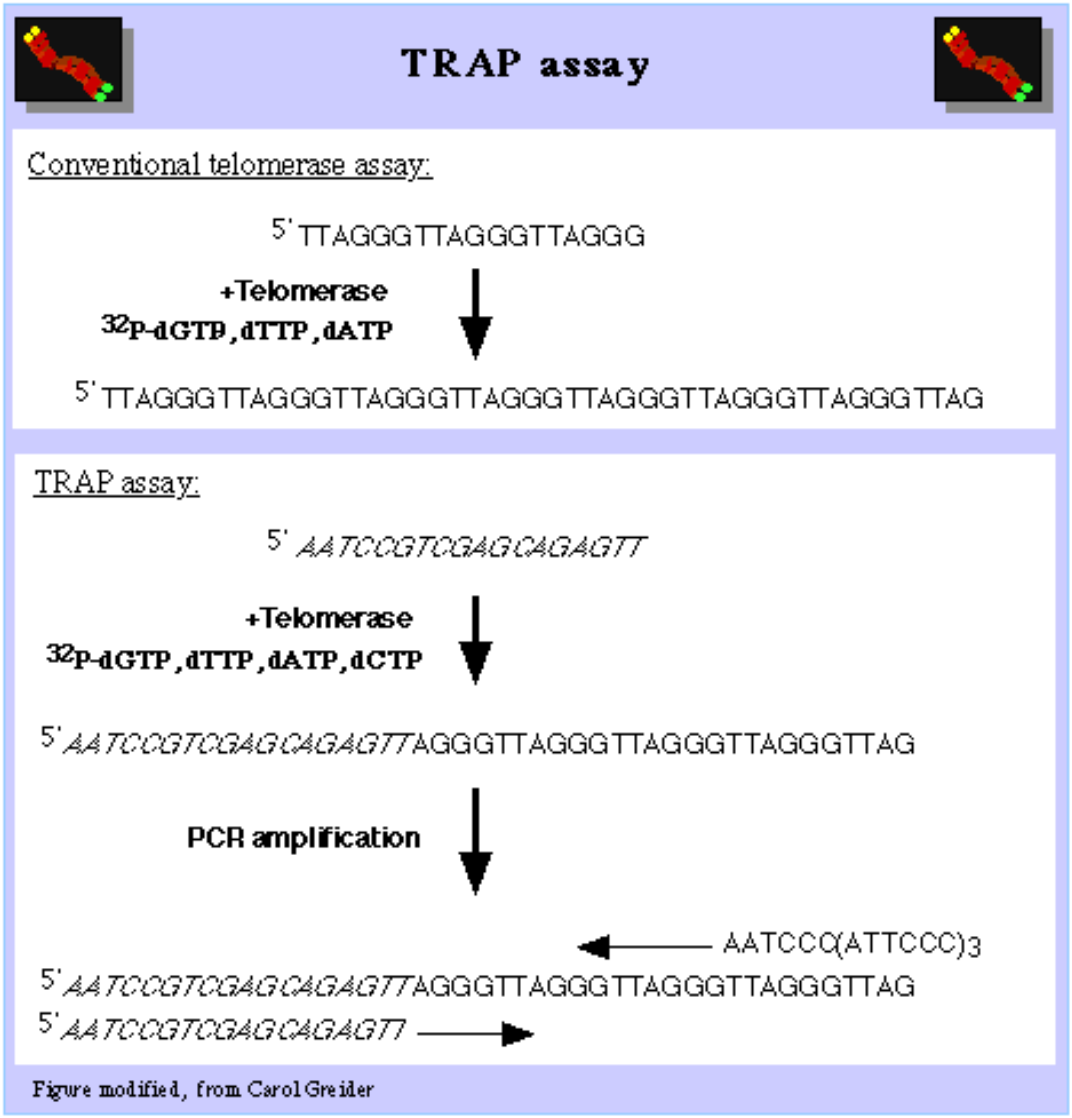
Využití poznatků z oblasti biologie telomer

• **Diagnostika nádorových onemocnění** - telomeráza jako nejuniverzálnější známý rakovinný marker (a slibný antigen pro IT)

1. Stanovení aktivity telomerázy - TRAP

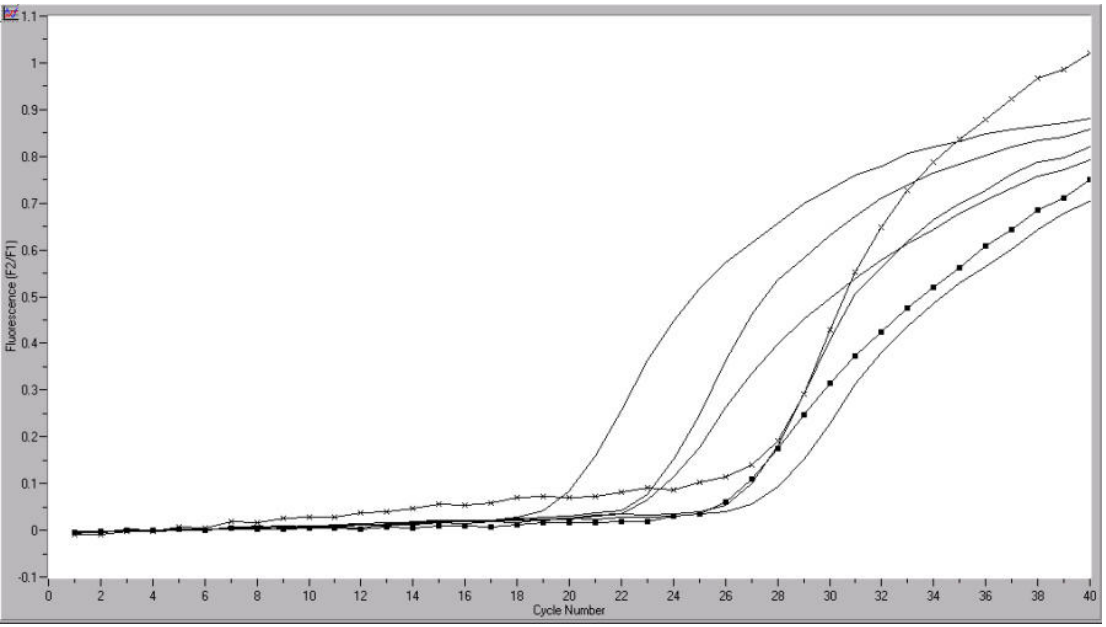


tel. akt. v buňkách MM



Detekce / stanovení exprese hTERT, event. hTR, tel-vazebných proteinů...

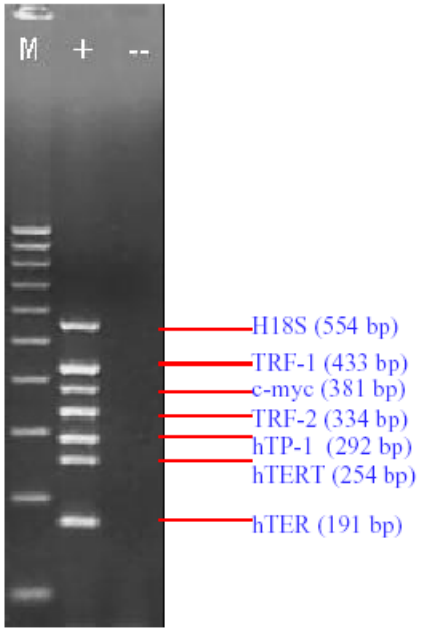
RT-PCR, RQ-RT-PCR



NEW Telomerase Genes

MPCR Kit Cat #: TEL-M050S, TEL-M010S

• *hTER* • *hTERT* • *hTP-1* • *TRT-1* • *TRT-2* • *c-myc* • *H18S*

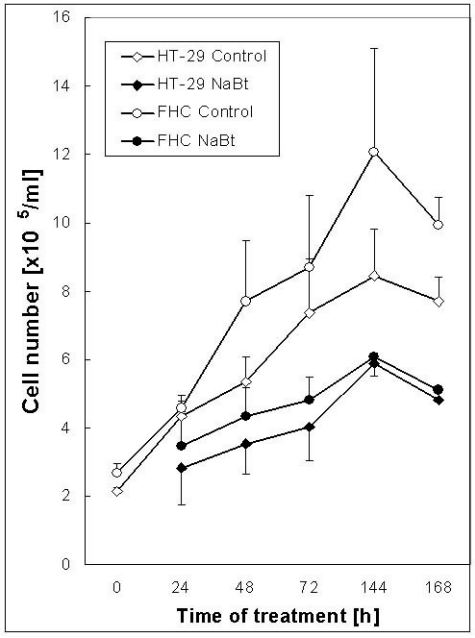


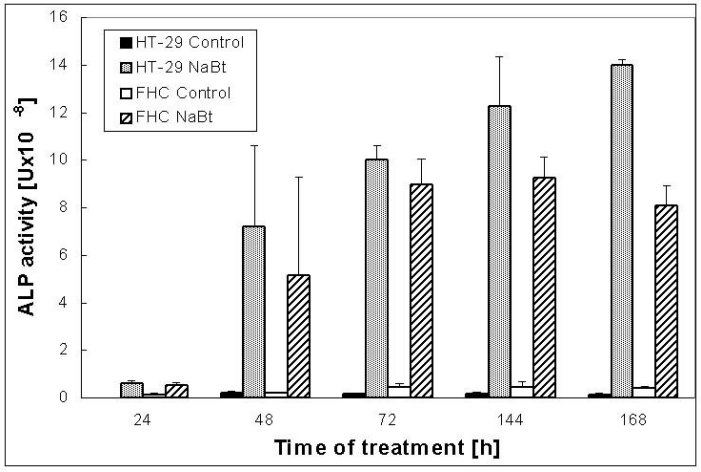
Problém! - alternativní sestřih hTERT mRNA (varianta hTERTα-)

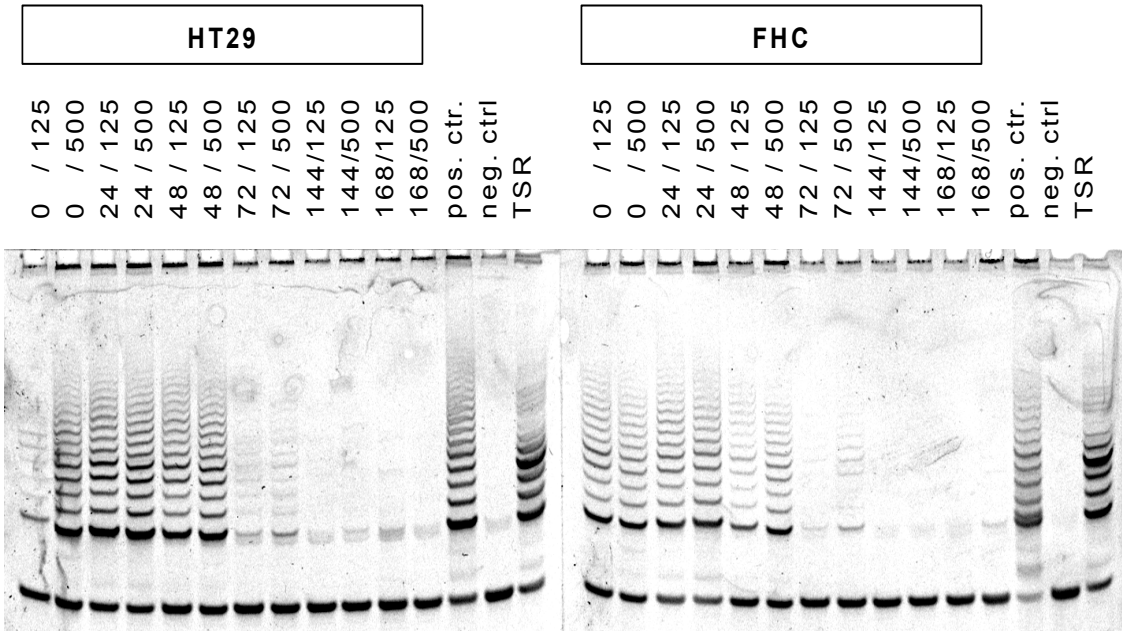
v případě rozporu s výsledkem TRAP je nutné analyzovat sestřihové varianty!

Telomeráza při proliferaci a diferenciaci „normálních“ a nádorových buněk (FHC, resp. HT-29) indukované NaBt

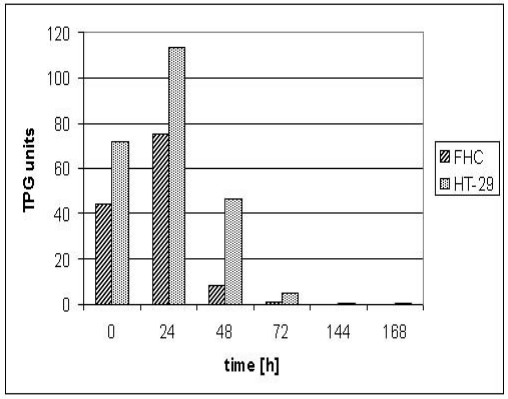
(Fajkus et al., Anticancer Res., 2003)



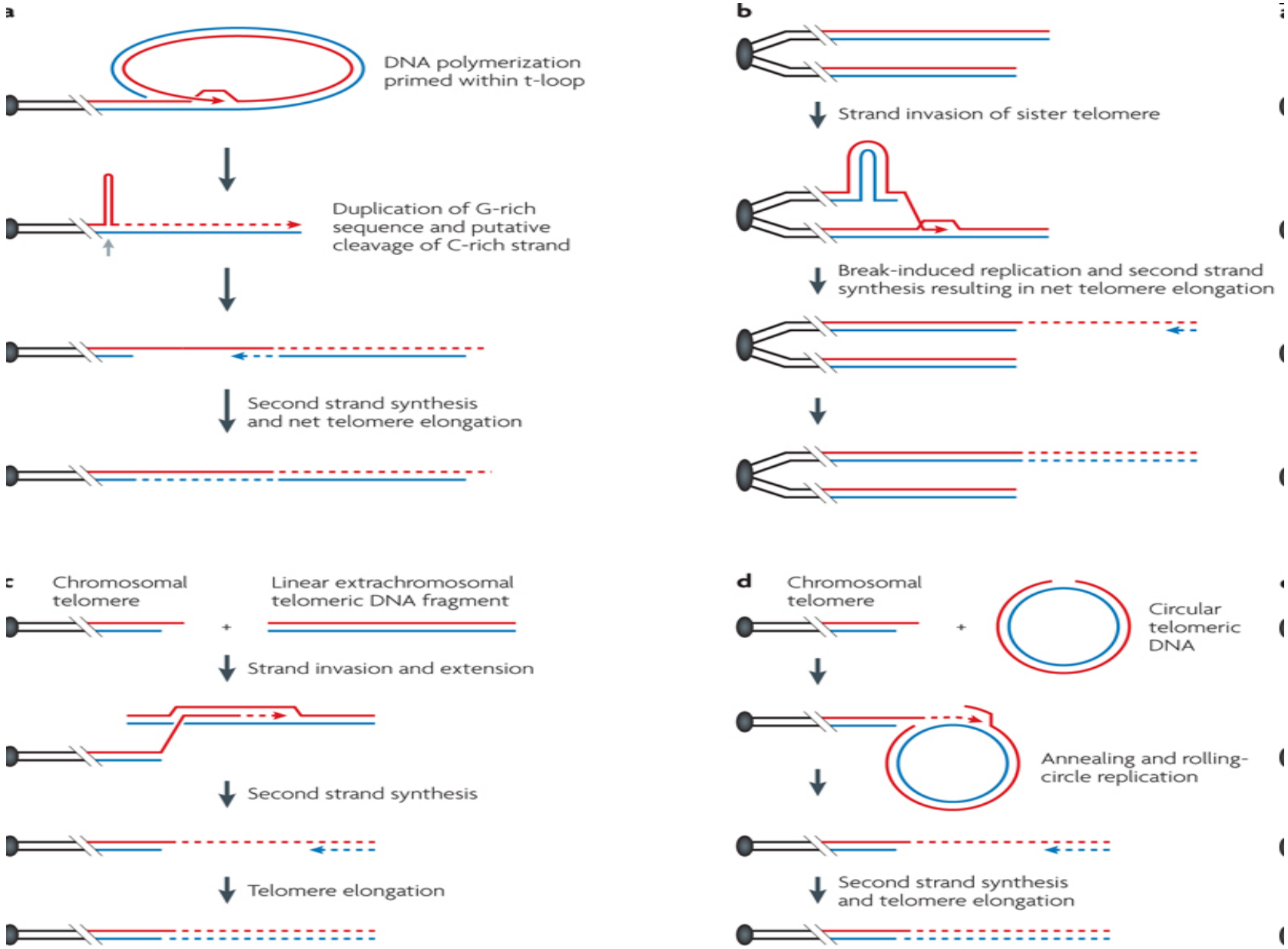




Útlum aktivity u obou linií, po 48 h je výraznější u FHC, zatímco u HT-29 zbývá téměř 50% aktivity



Alternativní prodlužování telomer (bez telomerázy) - ALT



Nature Reviews | Genetics

ALT objeven nejdříve u kvasinek s vyřazenou telomerázou (1993) – Lundblad a Blackburn, později u lidských (1997) – Bryan et al., 1997, a rostlinných buněk (2008) – Růčková et al.

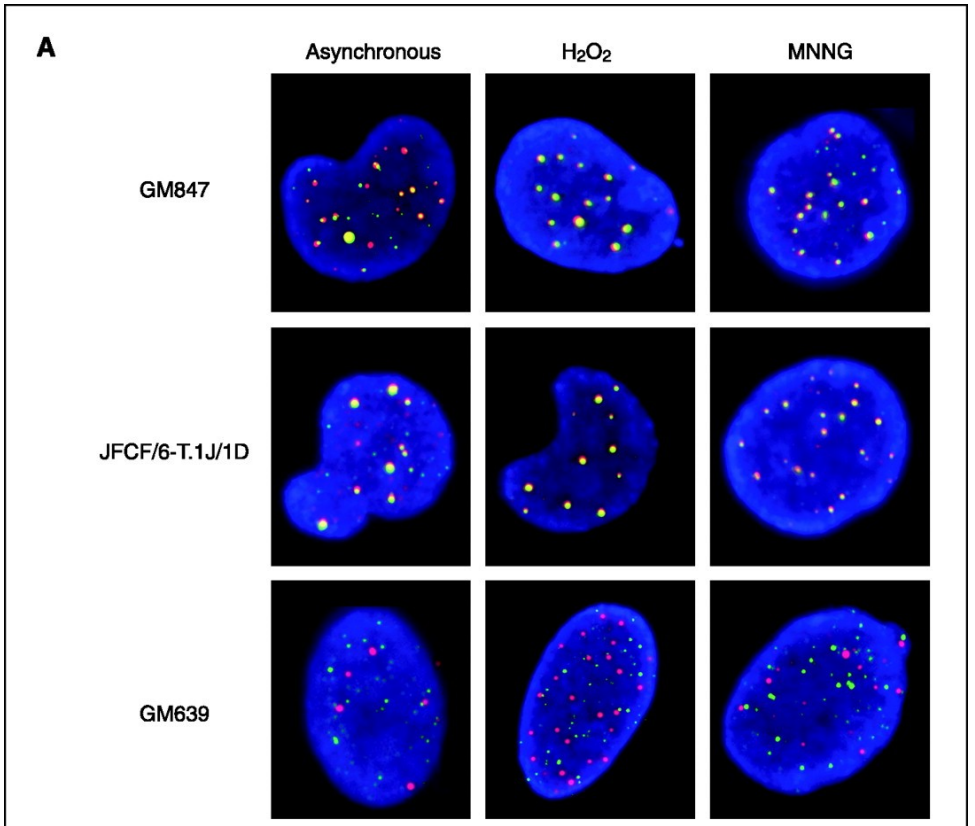
Společné rysy:

mechanismus zahrnuje homol. rekombinaci

telomery takto prodloužené se vyznačují délkovou a sekvenční heterogenitou

v ALT buňkách obvykle přítomny telomerové kroužky (telomeric circles)

v savčích buňkách se vyskytují tzv. APB tělíska (ALT-associated PML bodies)



B

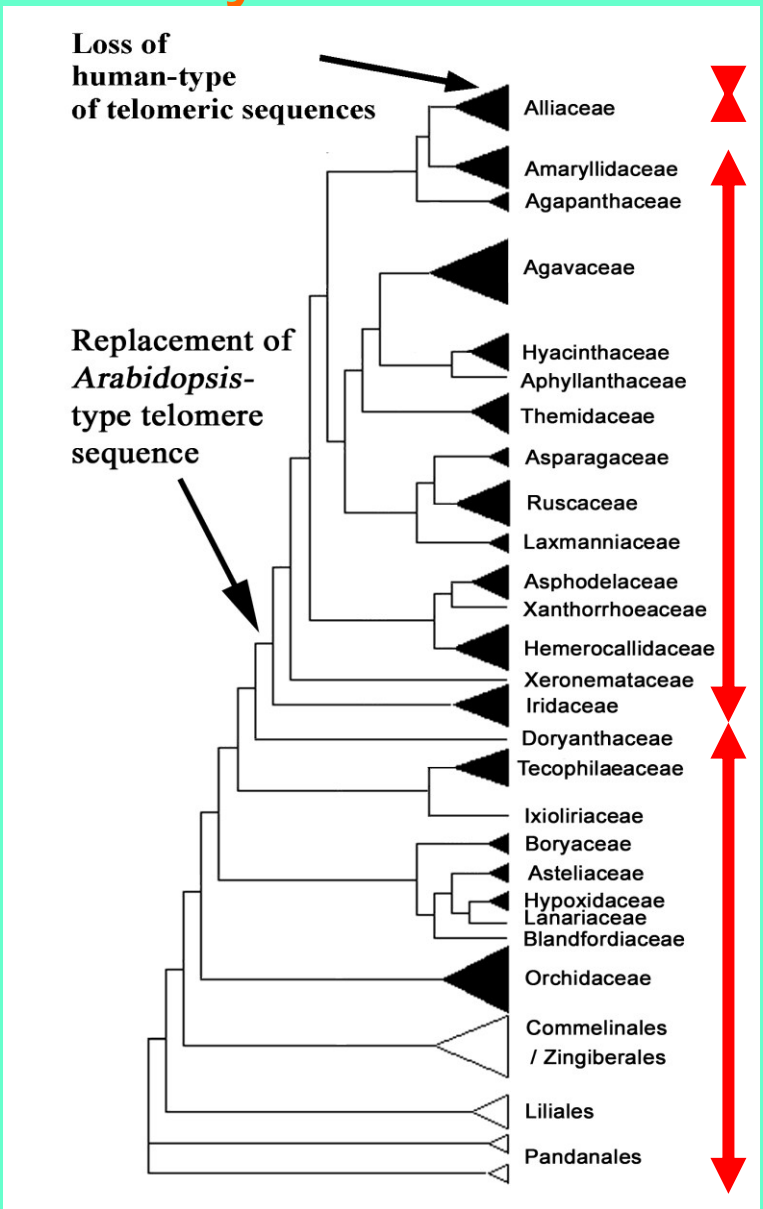
Cell lines	TMM	%APB-positive cells Asynchronous		%APB-positive cells H_2O_2 treated		%APB-positive cells MNNG treated	
		Large	Small	Large	Small	Large	Small
GM847	ALT+	11.7	52.1	32.3	83.5	26.5	75.0
JFCF/6-T.1J/1D	ALT+	21.5	64.7	33.9	86.6	60.3	84.6
GM639	Telomerase+	0	0	0	0	0	0

Fasching et al., 2007. Telomere FISH - zeleně, PML-Ab – červeně.

Telomery rostlin

- obvykle (TTTAGGG)n, ale existuje řada vyjímek - rostliny s lidským typem telomer (TTAGGG)n, rostliny s dosud neznámým typem telomer udržovaným zřejmě bez telomerázy (*Cestrum* – Solanaceae, *Allium* – Alliaceae)

A related group of plants - the **Asparagales** synthesize different types of telomeres.



Group (iii)
??

maintenance

unknown, ALT?

Group (ii)
[TTAGGG]n

"human"

telomerase

Group (i)
[TTTAGGG]n

"Arabidopsis"

telomerase

Sýkorová et al., 2003

Jak je tomu s **délkou telomer** u různých rostlin, na různých raménkách chromozomů téže rostliny, během vývoje rostliny...?

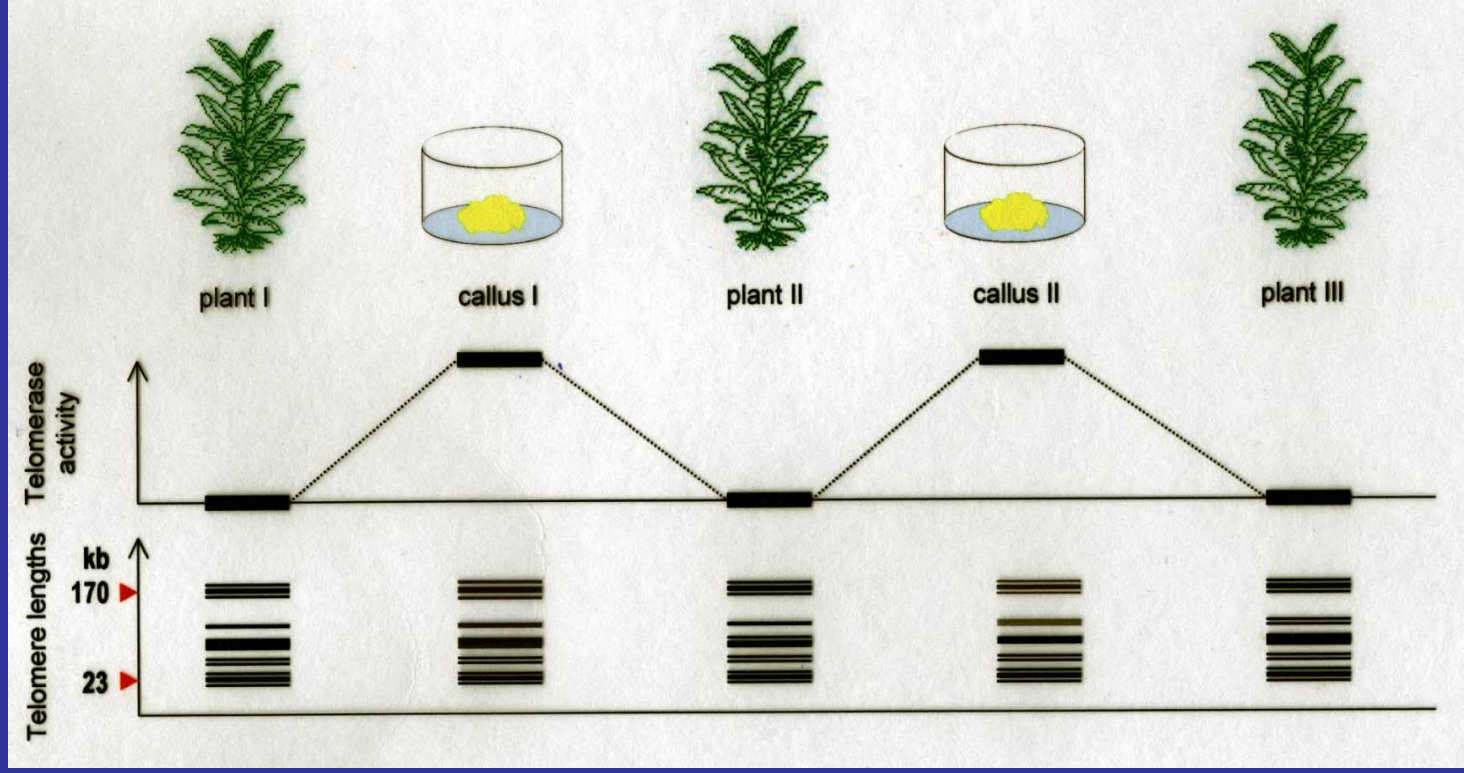
- délka telomer **silně variabilní,** a to i mezi příbuznými druhy - např. *Nicotiana sylvestris* - až 20-200kb, *N. tomentosiformis* - 20-50kb *(Kovařík et al., Theor. Appl. Genet 1996)*
- délka telomer na jednotlivých koncích chromozomů téže rostliny se liší více, než mezidruhově (viz výše) a na daném chromozomálním raménku je regulována v úzkém rozmezí (cca 1kb - *Říha et al., 2001, Říha et al., 2002*) - spektrum terminálních restrikčních fragmentů rostlin s dlouhými telomerami (např. *Nicotiana tabacum)* je tudíž „čarové" - výhoda pro další práci, rozdíl od lidských telomer *(Fajkus et al., Mol.Gen.Genet. 1995)*
- Neexistuje závislost mezi velikostí genomu nebo chromozomů, a délkou telomer - např. srovnatelně velké genomy *S. latifolia* a *N. tabacum* mají řádově rozdílné délky telomer (2.5-4.5kb x 23-160 kb) *(Říha et al., Plant Cell 1998; Fajkus et al., Mol. Gen. Genet. 1995)*

- V rostlinných buňkách existuje (podobně jako v živočišných) enzym **telomeráza,** který uskutečňuje syntézu telomer mechanismem reverzní transkripce *Fajkus et al. FEBS Lett. 1996, Heller et al. MGG 1996, Fitzgerald et al. PNAS 1996*

• Během opak. dediferenciace a diferenciace rostl. buněk se délka telomer výrazně **nemění**, zvýšená proliferace v kal. kultuře je vyvážena aktivací telomerázy.

Fajkus et al., Mol. Gen. Genet.,1998

⇒ přesná regulace



• Obdobné výsledky (stabilní délka telomer v růz. pletivech, aktivita telomerázy úměrná proliferační aktivitě) zjištěny v naší paralelní studii u *Silene latifolia* - *Říha et al., Plant Cell, 1998*

Zjištění o stabilní délce telomer během proliferace a diferenciace rostlinných buněk je v souladu s tzv. *totipotencí* rostl. buněk. Zatímco stavba živočišného těla je zhruba dokončena během embryonálního vývoje (gamety se tvoří již během gastrulace - zárodečná a somatická dráha se odděluje), u rostlin vznikají orgány (i reprodukční) diferenciací z apikálních meristémů (obdoba kmen. buněk) až během růstu rostliny a změna v genomu meristémové nebo i somatické buňky (včetně příp. zkrácení telomer) může být přenášena do gamet a následujícího pohlavního potomstva!! Rostlinné buňky jsou telomeráza-kompetentní

Jak je rostlinná telomeráza regulována ?

• Regulace **na úrovni transkripce a alternativního sestřihu** - *Fitzgerald et al., 1999, Oguchi et al., 1999, Heller-Uszynska et al., 2002*

• **Regulace fytohormony**: pozitivně - auxin (podporuje buň. dělení), negativně - abscisová kyselina (ABA) - aktivace **je závislá na fázi buň. cyklu (S-fáze),** lze inhibovat olomoucinem, staurosporinem (inhibitory Cdc2/Cdk2 ináz kontrolujících přechod z G1 do S-fáze buň. cyklu)

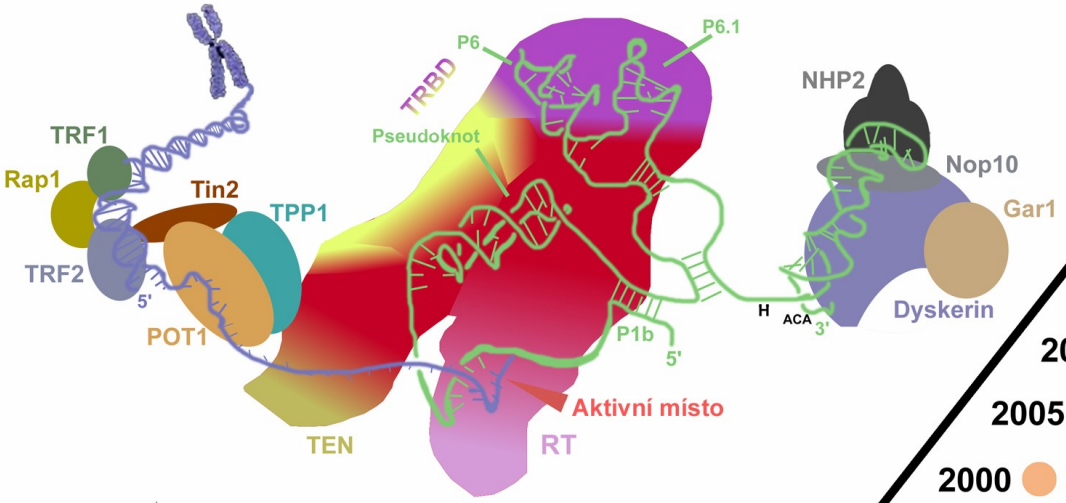
aktivaci lze prodloužit inhibitory protein-fosfatázy 2A (PP2A), nebo naopak odstranit přidáním exogenní PP2A

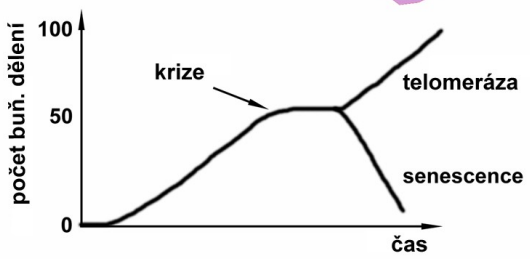
⇒ aktivita je regulována pomocí **fosforylačního stavu** katalytické podjednotky telomerázy *(Tamura et al., 1999; Yang et al., 2002)*

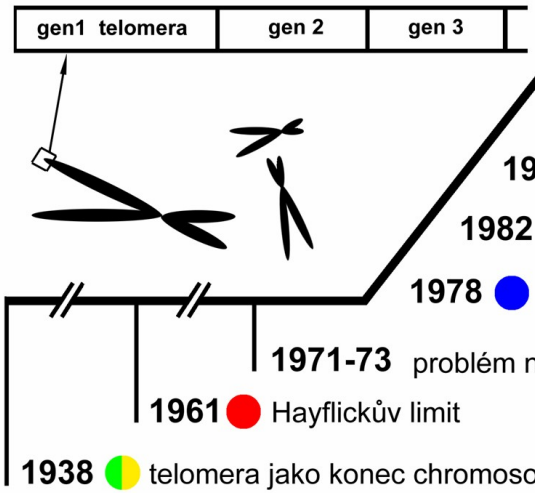
• Regulace **pomocí telomer-vazebných proteinů** - v neproliferujících tkáních je přítomen protein (40 kDa), který se specificky váže na jednovláknové přesahy G-vlákna telomer a tím blokuje přístup telomerázy k jejímu substrátu. Inhibice aktivity potvrzena *in vitro* - 1. rostlinný telomer-vazebný protein s regulační úlohou - *Fulnečková a Fajkus, FEBS Lett., 2000)*

Existence G-přesahů u rostlin prokázána na 50% telomer v dělivých buňkách a na 35% v nedělivých buňkách *(Říha et al., 2000)*

Regulace na úrovni dostupnosti konce telomery pro telomerázu může zprostředkovat hledaný stupeň zajišťující kvantitativně vyváženou syntézu telomer







2009 **Nobelova cena za fyziologii**

2008 krystalová struktura celé TERT podjednotky

2007 krystalová struktura částí TERT

2005 "shelterin"

2000 telomerové kroužky

1999 T-smyčka vizualizovaná elektronovým mikroskopem

1997 klonování proteinové podjednotky telomerázy (TERT)

1993 alternativní mechanismy udržování telomer (ALT)

1992 telomeráza a nádorové bujení

1989 klonování RNA podjednotky telomerázy

1987 3' přesah G-řetezce je typickým znakem telomer

1986 purifikace telomera-vazebného proteinu

1985 telomerová terminální transferáza

1982 ochranná funkce telomery

1978 nukleotidová sekvence telomery

1971-73 problém neúplné replikace konce chromosomu

1961 Hayflickův limit

1938 telomera jako konec chromosomu

modelové organizmy

- rostliny
- člověk
- prvoci
- hmyz
- kvasinky
- hlenka

Fajkus a Sýkorová, 2010

Závěr

- Telomery patří mezi nepostradatelné funkční domény lineárních chromozomů
- Tvořeny CHROMATINEM, nikoli pouze DNA
- Proteinová složka je významná v regulaci údržby telomer
- Kromě DNA a proteinů hraje významnou roli i RNA (jednak jako složka telomerázy TR, jednak telomerové transkripty TERRA, které ovlivňují heterochromatinizaci telomer a jejich dostupnost pro telomerázu)
- Nová témata ve studiu telomer: např. netelomerové role telomerázy