MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

ÚSTAV BIOCHEMIE

Telomer-vazebné proteiny a jejich subcelulární funkce

Bakalářská práce

Alžbeta Kusová

Vedoucí práce: Mgr. Petra Procházková Schrumpfová, Ph.D. **Brno 2018**

Bibliografický záznam

Autor:	Alžbeta Kusová
	Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
	Ústav biochemie
Název práce:	Telomer-vazebné proteiny a jejich subcelulární funkce
Studijní program:	Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Vedoucí práce:	Mgr. Petra Procházková Schrumpfová, Ph.D.
Akademický rok:	2017/2018
Počet stran:	48
Klíčová slova:	telomery, telomeráza, telomer-vazebné proteiny, TRB proteiny, *Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrella patens,* křížení

Bibliografický záznam

Autor:	Alžbeta Kusová
	Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita
	Ústav biochémie
Názov práce:	Telomér-väzbové proteíny a ich subcelulárne funkcie
Študijný program:	Biochémia
Študijný obor:	Biochémia
Vedúci práce:	Mgr. Petra Procházková Schrumpfová, Ph.D.
Akademický rok:	2017/2018
Počet strán:	48
Kľúčové slová:	teloméry, telomeráza, telomér-väzbové proteíny, TRB proteíny, *Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrella patens,* kríženie

Bibliographic Entry:

Author:	Alžbeta Kusová
	Faculty of Science, Masaryk University
	Department of biochemistry
Title of Thesis:	Telomere-binding proteins and their subcellular function
Degree Programme:	Biochemistry
Field of Study:	Biochemistry
Supervisor:	Mgr. Petra Procházková Schrumpfová, Ph.D.
Academic Year:	2017/2018
Number of Pages:	48
Keywords:	telomeres, telomerase, telomere-binding proteins, TRB proteins, *Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrella patens*, cross

Abstrakt

Telomery jsou nukleoproteinové struktury nacházející se na koncích lineárních eukaryotických chromozomů. V oblasti telomér se nachází enzym telomeráza, který je tvořen dvěma podjednotkami: telomerázovou RNA (TR) a telomerázovou reverzní transkriptázou (TERT). Jeho hlavním úkolem je ochrana a prodlužování telomér. Avšak předpokládá se, že telomeráza má i mnoho netelomerických funkcí spojených například s regulací buněčného cyklu. Na ochraně telomér se však podílí i velké množství jiných proteinů a proteinových komplexů. U živočichů tuto funkci vykonává proteinový komplex zvaný Shelterin.

V této bakalářské práci se zabývám telomer-vazebnými proteiny rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Physcomitrella patens,* konkrétně telomere-repeat binding (TRB) proteinem patřícím do single-Myb-histone (SMH) skupiny. Tyto proteiny zastávají u rostlin podobnou funkci jako proteiny Shelterin komplexu. Cílem této práce bylo získání dvojitých mutantů TRB1-TERT vhodných pro další analýzy procesů spojených s regulací telomer u rostliny *A. thaliana* a také příprava rekombinantní DNA telomer-repeat binding proteinů pro klonování a následnou charakterizaci těchto proteinů u rostliny *P. patens.*

Abstrakt

Teloméry sú nukleoproteínové štruktúry nachádzajúce sa na koncoch lineárnych eukaryotických chromozómov. V oblasti telomér sa nachádza enzým telomeráza, ktorý je tvorený dvomi podjednotkami: telomerázovou RNA (TR) a telomerázovou reverznou transkriptázou (TERT). Jeho hlavnou úlohou je ochrana a predlžovanie telomér. Avšak predpokladá sa, že telomeráza má i mnoho netelomerických funkcií spojených napríklad s reguláciou bunkového cyklu. Na ochrane telomér sa však podieľa i veľké množstvo iných proteínov či proteínových komplexov. U živočíchov túto funkciu vykonáva proteínový komplex nazývaný Shelterin.

V tejto bakalárskej práci sa venujem telomér-väzbovým proteínom rastlín *Arabidopsis thaliana* a *Physcomitrella patens*, konkrétne telomere-repeat binding (TRB) proteínom patriacich do single-Myb-histone (SMH) skupiny. Tieto proteíny zastávajú u rastlín podobnú funkciu ako proteíny Shelterin komplexu. Cieľom tejto práce bolo získanie dvojitých mutantov TRB1-TERT vhodných pre ďalšie analýzy procesov spojených s reguláciou telomér u rastliny *A. thaliana* a taktiež príprava rekombinantnej DNA telomere-repeat binding proteínov pre klonovanie a následnú charakterizáciu týchto proteínov u rastliny *P. patens.*

Abstract

Telomeres are nucleoprotein structures situated at the end of linear eukaryotic chromosomes. The telomerase enzyme is localised in proximity to telomeres and is composed of two subunits: telomerase RNA (TR) and telomerase reverse transcriptase (TERT). The main function of telomerase is the protection and elongation of telomeres. However, it is assumed that telomerase has also some non-telomeric functions, such as the regulation of cell cycle. The protection of telomeres involves also some other proteins and protein complexes. In animal cells, Shelterin is a well characterised protein complex which protects telomeres.

This bachelor thesis deals with telomere-binding proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitella patens* plants, specifically telomere-repeat bonding (TRB) proteins, belonging to single-Myb-histone (SMH) group. These proteins have a similar function to the function of Shelterin complex in animal cells. The aim of this thesis is to obtain double mutants TRB1-TERT suitable for further analysis of the telomere regulation process in *A. thaliana,* as well as the preparation of recombinant DNA telomere-repeat binding proteins for cloning and a further characterisation of these proteins in *P. patens*.

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2017/2018

Ústav: Národní centrum pro výzkum biomolekul

Studentka: Alžbeta Kusová

Program: Biochemie

Obor: Biochemie

Ředitel *Národního centra pro výzkum biomolekul* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce: Telomer-vazebné proteiny a jejich subcelulární funkce

Název práce anglicky: Telomere-binding proteins and their subcellular function

Oficiální zadání:
Telomery jsou nukleoproteinové struktury lokalizované na koncích lineárních eukaryotických chromozomů, které jsou u savců chráněny komplexem proteinů zvaným „Shelterin". V nedávné době byly, také díky naší laboratoři, popsány jedny z prvních proteinů asociovaných s rostlinnými telomerickými sekvencemi (Telomere repeat binding - TRB) (Schrumpfova et al. 2004; Mozgova et al. 2008; Schrumpfova et al. 2014; Arora et al. 2016; Dreissing et al., 2017). Tyto proteiny však kromě přímé asociace s fyzickými konci chromosomů, zastávají v rostlinných buňkách i jiné funkce – jsou asociovány s promotorovými sekvencemi genů zapojených v transkripční/translační mašinérii či jsou asociovány s proteiny, které se mohou podílet na skládání telomerázy (Schrumpfova, Vychodilova et al. 2016; Zhou, Hartwig et al. 2016, shrnuto v Prochazkova Schrumpfova, Schorova et al. 2016). V rámci bakalářské práce bude provedeno křížení rostlin mutantních pro některé z proteinů zapojených do regulace délky telomer. Také se bude studentka podílet na analýzách týkajících se detailnější charakterizace telomerické či netelomerické funkce proteinů asociovaných s telomerami či telomerázou. Arora, A., M. A. Beilstein, et al. (2016). Nucleic Acids Res. 16;44(20):9821-9830 Dreissig, S., Schiml, S., et al. (2017), Plant J., 91(4): 565–573. Mozgova, I., P. P. Schrumpfova, et al. (2008). Phytochemistry 69(9): 1814-1819. Schrumpfova, P., M. Kuchar, et al. (2004).." Genome 47(2): 316-324. Schrumpfova, P. P., I. Vychodilova, et al. (2014). Plant J 77(5): 770-781. Schrumpfova, P. P., I. Vychodilova, et al. (2016). Plant Mol Biol 90(1-2): 189-206. Schrumpfova, P.P., S. Schorova, et al. (2016). Front Plant Sci 7: 851. Zhou, Y., B. Hartwig, et al. (2016). Plant Cell 28(1): 87-101

Literatura:

SCHRUMPFOVÁ, Petra, Milan KUCHAŘ, Gabriela ROTKOVÁ, Lenka SKŘÍŠOVSKÁ, Tatiana KUBIČÁROVÁ a Jiří FAJKUS. *Characterization of two Arabidopsis thaliana myb-like proteins showing affinity to telomeric DNA sequence. Genome*, CANADA: NATL RESEARCH COUNCIL CANADA, 2004, roč. 47, March 2004, s. 316-324. ISSN 0831-2796.

MOZGOVÁ, Iva, Petra PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFOVÁ, Ctirad HOFR a Jiří FAJKUS. *Functional characterization of domains in AtTRB1, a putative telomere-binding protein in Arabidopsis thaliana. Phytochemistry*, England: Pergamon-Elsevier Science Ltd, 2008, roč. 69, č. 9, s. 1814-1819. ISSN 0031-9422.

PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFOVÁ, Petra, Milan KUCHAŘ, Jan PALEČEK a Jiří FAJKUS. *Mapping of interaction domains of putative telomere-binding proteins AtTRB1 and AtPOT1b from Arabidopsis thaliana. FEBS LETT*, Netherlands: Elsevier Science BV, 2008, roč. 582, č. 10, s. 1400-1406. ISSN 0014-5793.

MAJERSKÁ, Jana, Petra PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFOVÁ, Ladislav DOKLADAL, Šárka SCHOŘOVÁ, Karel STEJSKAL, Michal OBOŘIL, David HONYS, Lucie KOZÁKOVÁ, Pavlína SLOVÁKOVÁ a Eva SYKOROVA. *Tandem affinity purification of AtTERT reveals putative interaction partners of plant telomerase in vivo. Protoplasma*, Wien: Springer-Verlag, 2017, roč. 254, č. 4, s. 1547-1562. ISSN 0033-183X. doi:10.1007/s00709-016-1042-3.

PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFOVÁ, Petra, Ivona STRAŽICKÁ, Jan HAPALA, Šárka SCHOŘOVÁ, Vojtěch DVOŘÁČEK a Jiří FAJKUS. *Telomere binding protein TRB1 is associated with promoters of translation machinery genes in vivo. Plant Molecular Biology*, Dordrecht: SPRINGER, 2016, roč. 90, 1-2, s. 189-206. ISSN 0167-4412. doi:10.1007/s11103-015-0409-8.

PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFOVÁ, Petra, Ivona VYCHODILOVÁ, Martina DVOŘÁČKOVÁ, Jana MAJERSKÁ, Ladislav DOKLÁDAL, Šárka SCHOŘOVÁ a Jiří FAJKUS. *Telomere repeat binding proteins are functional components of Arabidopsis telomeres and interact with telomerase*. *The Plant Journal*, Hoboken (USA): Blackwell Science, 2014, roč. 77, č. 5, s. 770-781. ISSN 0960-7412. doi:10.1111/tpj.12428.

PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFOVÁ, Petra, Šárka SCHOŘOVÁ a Jiří FAJKUS. *Telomere- and Telomerase-Associated Proteins and Their Functions in the Plant Cell*. *Frontiers in Plant Science*, Lausanne: Frontiers Media SA, 2016, roč. 7, June, s. nestránkováno. ISSN 1664-462X. doi:10.3389/fpls.2016.00851.

Jazyk závěrečné práce: slovenština

Vedoucí práce: Mgr. Petra Procházková Schrumpfová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Šárka Schořová

Datum zadání práce: 12. 10. 2017

V Brně dne: 31. 10. 2017

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

.....	.....	.....
Alžbeta Kusová	Mgr. Petra Procházková Schrumpfová, Ph.D.	doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.
studentka	**vedoucí práce**	**zástupce ředitele Národního centra pro výzkum biomolekul pro pedagogické záležitosti**

Poďakovanie

Na tomto mieste by som chcela poďakovať vedúcej svojej práce Mgr. Petre Procházkovej Schrumpfovej, Ph.D. za príležitosť vypracovať túto prácu na oddelení NCBR (National Center for Biomolecul Research) a taktiež Mgr. Šárke Schořovej za pomoc, ochotu a rady pri vypracovávaní praktickej časti bakalárskej práce.

Vyhlásenie

Vyhlasujem, že som túto prácu vypracovala samostatne pod vedením vedúcej bakalárskej práce a s využitím informačných zdrojov, ktoré sú v práci citované.

Brno ....

Alžbeta Kusová

Obsah

Zoznam skratiek 13

1. Úvod 14

2. Teloméry 15

3. Telomeráza 15

3.1. TERT podjednotka 16

3.2. RNA podjednotka 18

3.3. Netelomerické funkcie telomerázy v bunke 18

4. Proteíny asociované s telomérami 19

4.1. Shelterin komplex 19

4.2. CST komplex 22

4.3. Proteínový komplex telomér u rastliny Arabidopsis thaliana 23

4.3.1. Proteíny viažuce sa na ssDNA telomér 23

4.3.2. TRFL skupina proteínov 24

4.3.3. SMH skupina proteínov 24

4.3.3.1. Netelomerická funkcia TRB proteínov 25

4.4. Proteínový komplex telomér u rastliny Physcomitrella patens 26

5. Cieľ práce 27

6. Materiál 28

6.1. Modelový organizmus 28

6.2. Primery 28

6.3. Roztoky, média, pufry, chemikálie 28

6.4. Prístrojové vybavenie 29

7. Metódy 30

7.1. Získanie dvojitých mutantov AtTRB1 – AtTERT rastliny Arabidopsis thaliana 30

7.1.1. Vysievanie rastlinného materiálu 30

7.1.2. Kríženie rastlín 30

7.1.3. Izolácia genómovej DNA 31

7.1.4. Genotypovacia PCR 32

7.2. Klonovanie génov kódujúcich TRB proteíny u rastliny Physcomitrella patens 33

7.2.1. Syntéza cDNA (complementary DNA) 33

7.2.2. Príprava kódujúcej sekvencie s rekombinačnými miestami 34

8. Výsledky 36

8.1. Získanie dvojitého mutanta AtTRB1 – AtTERT rastliny A. thaliana 36

8.2. Klonovanie génov pre TRB proteíny u rastliny P. patens 40

9. Diskusia 42

10. Zhrnutie 44

11. Zoznam použitej literatúry 45

Zoznam skratiek

ATM (Ataxia telangiectasia mutated protein)

ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein)

AtTRB (*Arabidopsis thaliana* Telomere-Repeat Binding protein)

AtXXX (*Arabidopsis thaliana* XXX)

bp, kb (base pair, kilo base)

Cdc13 (Cell division control protein 13)

CST komplex (Cdc13/CTC1-Stn1-Ten1 komplex)

CTC1 (Conserved telomere maintenance component 1)

CTE (C-terminal extension)

DSBs (double-strand breaks)

ds/ss DNA (double-stranded/ single-stranded DNA)

eEF-1 (Eukaryotic Elongation Factor 1)

eIF (Eukaryotic Initiation Factor)

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Est2 (ever-shortening telomeres protein 2)

HR (Homologous recombination)

hXXX (human XXX)

IFD (insertion in fingers domain)

kDa (kilodalton)

LHP1 (Like Heterochromatin Protein 1)

mRNA (messenger RNA)

Myb (Myeloblastosis)

NHEJ (Nonhomologous End Joining)

nt (nucleotide)

OB (oligosaccharide/ oligonucleotide binding)

PINX1 (PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1)

Pot1 (Protection Of Telomeres 1)

PpXXX (*Physcomitrella patens* XXX)

pRB (Retinoblastoma protein)

Rap1 (Repressor Activator Protein 1)

RBD (RNA Binding Domain)

RPA (Replication protein A)

scaRNA (Small Cajal body-specific)

SMH (single-Myb Histone)

snoRNA (Small Nucleolar RNA)

STEP1 (single-stranded telomere-binding protein1)

Stn1 (Supressor of cdc13)

TBE (Template Boundary Element)

TBP (telomere-binding protein)

TEBPα/β protein (Telomere End Binding Protein)
TEN (N-terminal domain)
Ten1 (Telomeric pathways with Stn1)

TEP (telomere end-protection)

TERT (Telomerase Reverse Transcriptase)

TIN2 (TRF1-Interacting Nuclear Protein2)

TPP1 (Tripeptidyl Peptidase 1)

TR, TER (Telomerase RNA)

TRBD (Telomerase RNA-binding domain)

TRFH doména (TRF-homology)

TRFL (TRF-like proteín)

TRF (Telomeric Repeat binding Factor)

1. Úvod

Konce lineárnych chromozómov sa nazývajú teloméry a sú to vysoko špecializované štruktúry nevyhnutné pre stabilitu celého genómu. Teloméry taktiež slúžia ako riešenie problému replikácie koncov lineárnych chromozómov (the end replication problem). DNA polymeráza nie je schopná kompletne doreplikovať DNA na úplných koncoch a tak počas replikácie malé množstvo DNA na 3´konci lineárneho chromozómu ostáva nedoreplikované. Dôsledkom toho sa konce chromozómov postupne skracujú počas každej replikácie. Toto skracovanie má za následok postupné starnutie buniek (senescencia), ktoré môže viesť až k ich smrti. Vo väčšine organizmov sa na udržovaní dĺžky telomér podieľa špeciálny enzým telomeráza, ktorý predlžuje 3´koniec vedúceho reťazca, zatiaľ čo komplementárne vlákno je doreplikované pomocou DNA-polymerázy. Telomeráza je ribonukleoproteinový komplex tvorený dvomi podjednotkami: telomerázovou reverznou transkriptázou (TERT) a telomerázovou RNA (TR), ktorá slúži ako templát pre novo vznikajúci reťazec DNA. Aktivita telomerázy je prísne regulovaná, jej najväčšiu aktivitu nachádzame v bunkách počas embryonálneho vývoja a u dospelého jedinca napríklad v kmeňových bunkách krvotvornej kostnej dreni. Telomerázová aktivita je taktiež zvýšená v nádorových bunkách, čo prispieva k ich neobmedzenému deliacemu potenciálu. U rastlín je aktivita telomerázy sústredená v aktívne sa deliacich bunkách apikálneho a koreňového meristému, v listoch je jej aktivita nižšia.

Pre správne fungovanie telomér je potreba špeciálnych proteínových komplexov zahrňujúcich proteíny viažuce sa na dvojvláknovú oblasť telomerickej DNA ale i na 3´- jednovláknový presah. V živočíšnych bunkách túto funkciu zastáva pomerne dobre charakterizovaný komplex proteínov nazývaný Shelterin. Tieto proteíny sú významné pri vytváraní telomérových štruktúr a tým i pri regulácii dĺžky telomér zmenou prístupnosti väzbových miest pre telomerázu. Na rozdiel od telomerického interaktómu živočíchov či kvasiniek, telomerický interaktóm rastlín nie je doposiaľ tak detailne charakterizovaný. V tejto bakalárskej práci sa budem venovať charakterizácii funkcie proteínov asociovaných s telomérami či telomerázou u modelového organizmu rastliny *Arabidospis thaliana* a mojou úlohou je tiež začať klonovanie génov kódujúcich homológy proteínov TRB z rastliny *Physcomitrella patens* do príslušných donorových vektorov.

2. Teloméry

Na začiatku tridsiatych rokov minulého storočia bolo zistené, že konce lineárnych chromozómov majú odlišnú štruktúru od zbytku chromozómu, ktorá bráni reparačným mechanizmom bunky rozpoznať tieto konce ako chromozomálne zlomy DNA. Genetik Hermann Muller nazval túto štruktúru teloméra, názov odvodený od gréckych slov „telos“ – koniec a „meros“ – časť. Teloméry sú špeciálne nukleoproteínové štruktúry nachádzajúce sa na koncoch lineárnych chromozómov, ktoré ich chránia pred neprirodzeným chromozomálnym usporiadaním a rozpoznaním endogénnymi nukleázami [1].

Teloméry eukaryotických chromozómov majú jedinečné štruktúry, ktoré obsahujú krátke sekvencie nukleotidov – tandemové repetitívne sekvencie. Aj keď sa tieto sekvencie u jednotlivých organizmov líšia, základnú opakujúcu sa jednotku môžeme zovšeobecniť na vzorec 5´-$T_{1-4}A_{0-1}G_{1-8}$-3´. Ako príklad môžeme uviesť sekvenciu tvoriacu teloméry človeka – TTAGGG a rastliny *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) – TTTAGGG [2]. Dĺžka telomerickej DNA je druhovo špecifická, u kvasiniek je to cca 300 bp [3], u *A. thaliana* 2-4 kb a extrémne dlhé teloméry má druh *Mus musculus* 40-150 kb [4]. Konce telomér sú tvorené jednovláknovým presahom bohatým na guanín, nazývaný 3´-presah. Dĺžka sa u organizmov líši, u človeka je tvorená 125 – 275 bázami [2].

Predĺžením G-bohatého vlákna vzniká už spomenutý 3´- jednovláknový presah, ktorý môže tvoriť sekundárne štruktúry známe ako t-slučka (telomere-loop) a vďaka vysokej koncentrácii guanínu i štruktúry zvané G-kvadruplexy. T-slučky boli prvýkrát identifikované v ľudských a myších bunkách pomocou elektrónovej mikroskopie reštrikčných fragmentov telomér [5]. T-slučka vzniká ohnutím dvojvláknovej DNA telomér späť za súčasnej tvorby lasovitej štruktúry. Jednovláknový 3´-presah sa zanorí do dvojvláknovej oblasti telomér a vytvorí D-slučku (displacement-loop), čím sa stáva nedostupným pre telomerázu a tým bráni predlžovaniu telomér a taktiež rozpoznaniu telomér ako zlomov v DNA [6].

3. Telomeráza

Nevyhnutnou súčasťou pri replikácii lineárnych koncov DNA je enzým telomeráza, ktorý predlžuje 3´-jednovláknový presah telomér. Telomeráza je ribonukleoproteínový komplex tvorený dvomi základnými podjednotkami: telomerázovou RNA podjednotkou (TR), tvorenou templátovou sekvenciou komplementárnou ku G-vláknu telomér, a telomerázovou

reverznou transkriptázou (TERT) s katalytickou aktivitou. Na fungovaní celého telomerázového komplexu sa *in vivo* podieľa mnoho ďalších komponentov. Niektoré z nich majú za úlohu pripevnenie telomerázy k teloméram, iné sú zodpovedné za reguláciu telomerázovej aktivity v bunkách [7].

Funkčná telomeráza má *in vivo* viacero vzájomne prepojených funkcií ako sú napríklad RNA-proteínové interakcie (prepojenie TR a TERT podjednotiek), DNA-proteínové interakcie (väzba na substrát), reverzne transkriptázová aktivita a proteín-proteínové interakcie (uplatňujúce sa napríklad pri tvorbe dimérov) [8].

Pri predlžovaní 3´konca telomér sa uplatňuje reverzne transkriptázová aktivita. Väčšina DNA sa predlžuje semikonzervatívnym spôsobom. DNA-polymeráza vďaka RNA-primerom, ktoré obsahujú voľnu 3´-OH skupinu, začne syntézu nového DNA reťazca v smere 5´→3´. Z tohto dôvodu sa oneskorené vlákno syntetizuje v tzv. Okazakiho fragmentoch. Po odstránení posledného RNA-primeru oneskoreného vlákna vzniká na jeho matrici 3´presah, pretože DNA-polymeráze chýba voľná 3´-OH skupina. Telomeráza sa na základe komplementarity báz jej RNA zložky naviaže na tento presah a predĺži toto vlákno. Po niekoľkých translokáciách telomerázy a tým pádom dostatočnom predĺžení matricového reťazca sa naviaže nový RNA-primer, vďaka ktorému DNA-polymeráza môže dosyntetizovať 3´→5´ reťazec, čím zabráni skracovaniu telomér.

3.1. TERT podjednotka

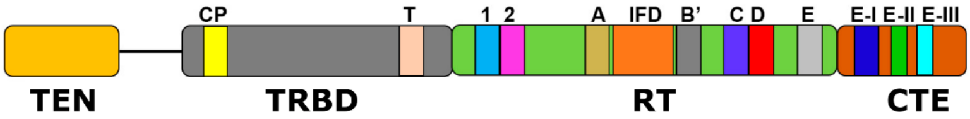
Podjednotka TERT a jej funkčné motívy boli objavené porovnávaním sekvencie s ever-shortening telomeres protein 2 (Est2) z *S. cerevisiae*, ktorý bol pokladaný za nevyhnutný pri udržovaní dĺžky telomér, a telomerázového proteínu z nálevníka *Euplotes aediculatus*. TERT sa skladá z troch častí: N-terminálna doména, RT doména a C-terminálna doména (CTE) [9]. Štruktúrne rozdiely medzi TERT podjednotkami rôznych organizmov sa týkajú hlavne N- a C-terminálnych častí [7].

N-terminálna časť je vo väčšine TERT podjednotiek tvorená dvomi doménami: TEN a TRBD doménou. Medzi týmito dvomi doménami sa nachádza relatívne dlhá spojovacia oblasť, ktorá môže hrať úlohu v konformačnej flexibilite celého holoenzýmu [10]. TEN doména sa viaže na ssDNA a hrá dôležitú rolu v rozpoznávaní DNA substrátu. Tiež môže nešpecificky viazať RNA [7]. TRBD doména obsahuje CP, T a QFP motívy. CP a T motívy sú

zodpovedné za rozpoznanie a väzbu na RNA. Taktiež je v spojení s TBE (Template Boundary Element) časťou RNA podjednotky. TRBD-TER interakcia hrá dôležitú úlohu v správnom zbalení a enzymatickej aktivite celého holoenzýmu [11].

RT (reverzne transkriptázová) doména je najlepšie charakterizovanou časťou TERT podjednotky a obsahuje sedem konzervovaných motívov typických pre reverzné transkriptázy: 1, 2, A-E [10]. Telomerázová RT doména môže obsahovať aj dva špecifické motívy, ktoré sa v iných reverzných transkriptázach nenachádzajú a to motív 3 a Insertion in Fingers Domain (IFD), ktorý je vsunutý medzi A a B motív a zúčastňuje sa na stabilizácii RT domény [9].

C-terminálna doména vykazuje iba slabú sekvenčnú podobnosť medzi druhmi. Prítomnosť CTE domény je nevyhnutná pre aktivitu telomerázy u *T. thermophila* a u ľudí, u kvasiniek však jej prítomnosť nie je nutná a u niektorých organizmov sa nevyskytuje vôbec [10].



Obrázok 1: Schematická štruktúra domén a motívov TERT podjednotky telomerázy (prevzaté, upravené podľa A.Dey, K.Chakrabarti, 2018)

Intramolekulárna interakcia TRBD s CTE doménou ohýba oblasť TRBD-RT-CTE domén do tvaru kruhu na rozdiel od tvaru podkovy typického pre reverzné transkriptázy. TERT viacerých organizmov neobsahuje TEN doménu, telomeráza *S. cerevisiae* je funkčná *in vivo* aj bez TEN domény a ľudská telomeráza dokáže katalyzovať pridávanie tandemových repetícií aj bez prítomnosti TEN [9].

TERT podjednotka interaguje s veľkým množstvom proteínov, ktoré sa podieľajú na regulácii telomerázovej aktivity. Avšak regulácia prebieha už na transkripčnej a posttranskripčnej úrovni [12]. Expresia ľudskej TERT podjednotky je nízka vo väčšine somatických buniek, aktivovaná je len počas embryonálneho vývoja, v niektorých somatických bunkách a vo väčšine nádorových buniek. Posttranskripčné pochody ako alternatívny zostrih mRNA kódujúci proteínovú podjednotku TERT, fosforylácia či ubikvitinácia enzýmu tiež vplývajú na reguláciu telomerázy [13].

3.2. RNA podjednotka

Táto podjednotka slúži ako matrica pri predlžovaní koncov telomér. Jej sekvencia a dĺžka sa u rôznych organizmov líši. U nálevníkov je to v rozmedzí 147-205 nt, u stavovcov 312-559 nt a u kvasiniek dosahuje dĺžku od 779-2030 nt [14]. Všetky RNA podjednotky obsahujú templátovú oblasť, avšak s rôznou dĺžkou a sekvenciou. Ďalšie motívy nachádzajúce sa v RNA podjednotke sú pseudouzol či vlásenky so slučkou [9]. U cicavcov je pseudouzol zapojený v interakcii s TERT podjednotkou, konkrétne s TEN doménou [7].

Ľudská RNA podjednotka telomerázy je tvorená tromi doménami: templátovou doménou/pseudouzlom, CR4/CR5 a H/ACA doménami. Templátová a CR4/CR5 doména nezávisle viažu TERT podjednotku. H/ACA má za úlohu reguláciu telomerázového holoenzýmu *in vivo*, stabilitu podjednotky a H/ACA scaRNA oblasť viaže proteíny ako dyskerin, Gar1,Nop10 a Nhp2 [14].

RNA podjednotka *A. thaliana* je nezvyčajná tým, že je kódovaná tromi TER génmi: TER1, TER2 a TER2s, ktorý predstavuje skrátenú formu TER2. TER1 a TER2 obsahujú dve sekvenčne podobné oblasti CR1 a CR2 (conserved region 1/2). Sekvencia kódujúca TER1 sa nachádza na chromozóme 1 a je tvorená 748 nt RNA. TER2 je kódovaný sekvenciou na chromozóme 5 a tvorený 784 nt RNA. Obe tieto jednotky interagujú s TERT podjednotkou *in vitro* [15]. Čo sa týka kontroly aktivity telomerázy, majú opačné pôsobenie. TER1 slúži ako templát potrebný pri udržiavaní dĺžky telomér *in vivo* a u rastlín mutantných v géne kódujúcom TER1 pozorujeme ich postupné skracovanie. Naopak, u rastlín mutantných v géne kódujúcom TER2 je aktivita telomerázy zvýšená [16].

3.3. Netelomerické funkcie telomerázy v bunke

Podjednotky telomerázy však nie sú lokalizované iba na fyzických koncoch lineárnych chromozómov. Predpokladá sa, že telomeráza má taktiež viacero netelomerických funkcií. Ľudská podjednotka TERT je napríklad lokalizovaná v mitochondriách. Bolo preukázané, že prítomnosť TERT podjednotky v mitochondriách spôsobuje zníženie bunkového oxidatívneho stresu či menší stupeň poškodenia jadrovej a mitochondriálnej DNA. Presnejšie mechanizmy týchto netelomerických funkcií zatiaľ nie sú úplne jasné, avšak bolo navrhnutých viacero možností, ako napríklad väzba TERT na mitochondriálnu DNA, zvyšovanie aktivity mitochondriálneho komplexu I a reverzne transkriptázovej aktivity TERT asociáciou s mitochondriálnymi RNA [17].

Telomeráza sa taktiež podieľa na regulácii bunkového cyklu a to napríklad skrz reguláciu expresie D-cyklínu alebo hyperfosforyláciu pRB (Retinoblastomový proteín). Tieto mechanizmy, vrátane ďalších funkcií telomerázy, ako je napríklad inhibícia apoptózy pomocou ligandov EGFR (epidermal growth factor receptor), nie sú doposiaľ úplne objasnené [18].

4. Proteíny asociované s telomérami

V okolí telomér sa okrem telomerázy nachádza veľké množstvo iných proteínov, ktoré sa zúčastňujú na ochrane telomér, formovaní ich sekundárnych štruktúr a sprostredkovaní väzby samotnej telomerázy na telomerickú DNA. Tieto proteíny sú pripojené na telomerickú DNA buď priamo alebo pomocou proteín-proteínových interakcií. Priamo viažuce sa proteíny sa delia podľa toho, či sa viažu na dvojvláknovú DNA telomér alebo na 3´-jednovláknový presah.

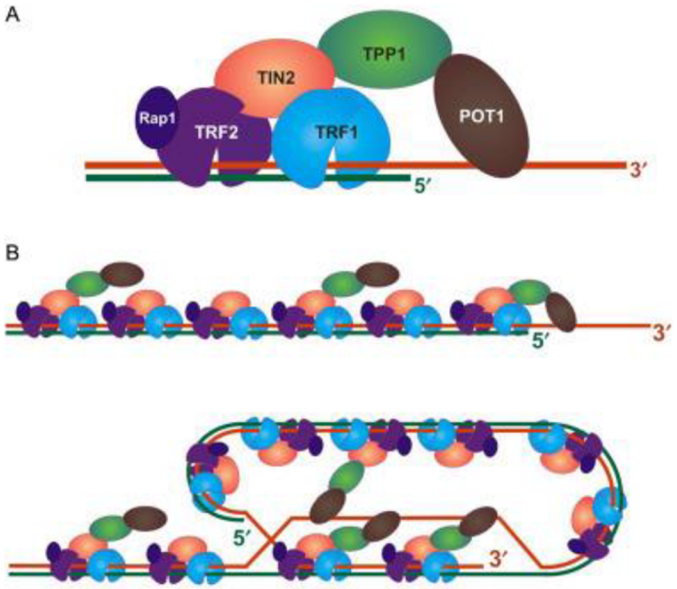
TEP (telomere end-protection) proteíny sa všeobecne viažu na jednovláknovú DNA pomocou OB (oligosaccharide/ oligonucleotide binding) fold domény. Prvý identifikovaný ssDNA viažuci proteín TEBP je z nálevníka *Oxytricha nova.* Skladá sa z dvoch podjednotiek, α a β (TEBPα/β). Na základe sekvenčnej podobnosti s TEBPα bol následne identifikovaný proteín Pot1 (Protection Of Telomeres 1) u človeka [19], ktorý sa viaže na ssDNA telomér ako súčasť Shelterinového komplexu. U kvasiniek bol identifikovaný proteín Cdc13 (Cell division control protein 13) ako súčasť CST komplexu [20].

Za väzbu na dsDNA je zodpovedná Myb-doména obsahujúca motív helix-turn-helix. Tento motív bol pôvodne nájdený v c-Myb transkripčnom aktivátore a býva súčasťou mnohých transkripčných faktorov. Minimálne dva Myb-motívy sú potrebné pre naviazanie na dsDNA, avšak nemusia pochádzať z rovnakej proteínovej podjednotky.

4.1. Shelterin komplex

Ľudský Shelterinový komplex je tvorený šiestimi špecifickými proteínmi, ktoré sú asociované s DNA sekvenciou telomér. Umožňuje bunkám rozoznať ich prirodzené chromozómové konce od DNA zlomov, potláča opravy DNA a reguluje udržiavanie telomér [21]. TTAGGG sekvencia je priamo rozpoznávaná tromi proteínmi: Telomeric Repeat binding Factor 1 a 2 (TRF1 a TRF2), ktoré sa viažu na dvojvláknovú telomerickú DNA a Protection Of

Telomeres 1 (POT1), ktorý sa viaže na jednovláknový presah telomér. Tie sú navzájom prepojené pomocou ďalších troch proteínov TRF1-Interacting Nuclear Protein 2 (TIN2), Tripeptidyl Peptidase 1 (TPP1) a Repressor Activator Protein 1 (Rap1) [21], [22].



Obrázok 2: Schematické usporiadanie proteínov tvoriacich Shelterin a ich proteínové interakcie uplatňujúce sa pri tvorbe t - slučky [23]

TRF1 a TRF2 sa na dsDNA viažu ako homodiméry, táto dimerizácia je sprostredkovaná TRF-homológnou (TRFH) doménou. Okrem tejto domény sa na ich C-konci nachádza Myb doména (DNA-väzbová doména), ktorá je potrebná pre ich priamu väzbu na dsDNA [24]. TRF1 sa viaže na dlhé dvojvláknové úseky DNA [25]. Predpokladá sa, že TRF1 sa podieľa na zmene dĺžky telomerových repetícií interakciami s TIN2, TPP1 a POT1 a tiež s inhibítorom telomerázy, proteínom PINX1. PINX1 sa naviaže na teloméry prostredníctvom priamej interakcie s TRF1 a tým negatívne reguluje dĺžku telomér. TRF2 stabilizuje t-slučku a chráni konce telomér [22].

Rap1 je priamym interakčným partnerom TRF2, prítomnosť ktorého je nevyhnutná pre naviazanie Rap1 na teloméry. Spolu s TRF2 sa podieľa na ochrane telomér. Má tri domény: Myb doména (ktorá môže byť zodpovedná za proteín-proteínové interakcie so zatiaľ neznámym partnerom), N-terminálny BRCT motív a C-terminálnu doménu zodpovednú za väzbu s TRF2.

TIN2 sa viaže s TRF1, TRF2 a zároveň s TPP1 a tým prepojuje zložky Shelterinu viažuce sa na dvojvláknovú a jednovláknovú DNA telomér. Neprítomnosť TIN2 sa výrazne prejavuje na nestabilite komplexu.

TPP1 spája POT1 s TIN2 cez jeho centrálnu POT1 interakčnú doménu a C-terminálnu TIN2 interakčnú doménu. Na jeho N-konci sa nachádza OB-fold doména, ktorou interaguje s telomerázou. TPP1/TIN2 sa považuje za hlavné prepojenie proteínu POT1 s proteínmi TRF1 a TRF2. Predpokladá sa, že spojenie POT1-TPP1 zvyšuje procesivitu telomerázovej podjednotky TERT *in vitro* [22]. Aj keď sa TPP1 neviaže priamo na DNA, zvyšuje väzbovú afinitu POT1 na jednovláknovú DNA [26].

Proteín POT1 bol charakterizovaný na základe jeho sekvenčnej podobnosti s alfa podjednotkou TEBPα/β – telomér-väzbového komplexu u nálevníka *Oxytricha nova* [19, s. 1]. Na N-konci obsahuje dve OB-fold domény zodpovedné za rozpoznanie jednovláknovej DNA vrátane 3´-presahu telomér. POT1 vykazuje silnú špecifickú väzbu k jednovláknovej sekvencii 5´-TAGGGTTAG-3´.

Pokiaľ teloméry nie sú chránené proteínmi Shelterinu, môžu byť bunkou rozpoznané ako dvojvláknové chromozomálne zlomy (DSBs – double-strand breaks) a spracované DNA reparačnými mechanizmami: NHEJ (Nonhomologous End Joining) a HR (Homologous recombination). Aj keď sa na ochrane chromozomálnych koncov podieľa všetkých šesť proteínov Shelterinu, TRF2 a POT1 hrajú v tejto ochrane kľúčovú rolu. POT1 zabraňuje aktivácii ATR (ATR – mediated DNA damage response, ATR – Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) reparačného mechanizmu tým, že sa naviaže na jednovláknovú DNA telomér a tým blokuje väzbu proteínu RPA (Replication protein A), ktorý sprostredkováva naviazanie a aktiváciu ATR. TRF2 potláča odpoveď na poškodenie DNA sprostredkovanú ATM kinázou (ATM – mediated DNA damage reponse, ATM – Ataxia telangiectasia mutated protein) [22]. Proteíny Shelterinu interagujú s množstvom iných proteínov, ktoré môžu mať tiež vplyv na udržovaní a ochrane chromozomálnych koncov. Sú to tzv. „Shelterin accessory factors“. Množstvo týchto faktorov spĺňa tiež netelomerické funkcie a ich lokalizácie nie je obmedzená na bunkové jadro [21].

Väčšina týchto faktorov je zapojená v oprave DNA (Ku70/80, Apollo, Mre11 komplex), v signalizácii poškodenia DNA (Mre11 komplex) či DNA replikácii (RecQ helikáza) [21]. Jedným z TRF2 – interakčných partnerov je i MRN komplex (Mre11-Rad50-NBS1), ktorý je zapojený v rekombinácii i kontrole dĺžky telomér a je dôležitý pri aktivácii ATM kinázy. Pomocou kvasinkového dvojhybridného systému bol objavený aj TRF1 – interakčný partner Tankyrase, ktorý pôsobí ako pozitívny regulátor dĺžky telomér tým, že ruší väzbu TRF1

s telomérami. V cytoplazme ma však i iné funkcie - asociuje sa s Golgiho aparátom v procese dôležitom pre transport inzulínu [27].

4.2. CST komplex

CST je komplex skladajúci sa z Cdc13 (Cell Division Control protein13), Stn1 (Supressor of cdc Thirteen) a Ten1 (Telomeric pathways with Stn1) u kvasiniek a z CTC1 (Conserved telomere maintenance component 1), STN1 a TEN1 u vyšších eukaryot. Tento komplex sa viaže na jednovláknovú DNA telomér, vrátane telomerického presahu, kde je zapojený v ochrane chromozomálnych koncov a regulácii dĺžky telomér. Predpokladá sa, že proteínový sub-komplex Stn1-Ten1 má i mimotelomerickú funkciu. Rozpoznanie a väzba na jednovláknový presah je sprostredkovaná OB-fold doménou nachádzajúcou sa vo všetkých troch podjednotkách komplexu [28].

Cdc13 u kvasiniek napomáha naviazaniu telomerázy na teloméry interakciou s Est1, zložkou kvasinkového telomerázového holoenzýmu a taktiež sa ukázalo, že sa zúčastňuje väzby polymerázy α na teloméry [29]. Naopak, ľudský CTC1 priamo inhibuje naviazanie telomerázy. Cdc13 vykazuje i slabú nešpecifickú DNA-väzbovú aktivitu, ktorá môže hrať dôležitú úlohu pri regulácii prístupu telomerázy na teloméry alebo pri naviazaní polα-primázy na teloméry počas syntézy C-vlákna.

Stn1 a Ten1 spolu tvoria stabilný komplex *in vitro*. Ten1 je najmenším proteínom komplexu a na rozdiel od ostatných dvoch obsahuje iba jednu OB-fold doménu. Ľudský TEN1 sa, na rozdiel od kvasinkového, neviaže na jednovláknovú DNA [30]. Cdc13, CTC1 i Stn1 sú zapojené v proteín-proteínových interakciách, ktoré napomáhajú naviazaniu telomerázy i polα-primázy na teloméry.

Naviazanie kvasinkového CST komplexu na jednovláknový presah bráni prístupu telomerázy a tým i predlžovaniu telomér. Na toto naviazanie sú potrebné funkčné všetky tri podjednotky tohto komplexu. Mutácie v ľudskom CTC1 proteíne majú za následok genetické poruchy vyvolávajúce onemocnenia známe ako Dyskeratosis Congenita či Coats plus syndróm [31].

4.3. Proteínový komplex telomér u rastliny *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana slúži ako modelový organizmus v rastlinnej genetike práve vďaka malej veľkosti genómu (5 chromozómov o veľkosti cca 135 Mbp). Bola to prvá rastlina, ktorej genóm bol v roku 2000 kompletne osekvenovaný. Taktiež malá dĺžka telomerických sekvencií (2-4 kb), malá veľkosť rastliny, krátka generačná doba a veľké množstvo semien vytvárajú priaznivé podmienky pre prácu s touto rastlinou. Doposiaľ bolo identifikovaných niekoľko skupín proteínov viažucich sa na telomerické repetície jednovláknovej i dvojvláknovej DNA u *A. thaliana*. Bližšia identifikácia a charakterizácia funkcie týchto proteínov uľahčí pochopenie či objasnenie funkcie telomér.

Na základe sekvenčnej homológie s ľudskými proteínmi hTRF1 a hTRF2 boli charakterizované dve skupiny proteínov obsahujúce Myb-like doménu zodpovednú za väzbu na dvojvláknovú DNA telomér. Taktiež bolo identifikovaných niekoľko telomerických proteínov viažucich sa na jednovláknový presah telomér.

4.3.1. Proteíny viažuce sa na ssDNA telomér

Proteín STEP1 (single-stranded telomere-binding protein 1) sa špecificky viaže na jednovláknovú DNA telomér. Je to skrátená verzia proteínu nachádzajúceho sa v chloroplastoch, ten sa však na ssDNA neviaže. AtSTEP1 väzbou na 3´-presah telomér inhibuje ich predlžovanie pomocou telomerázy. Táto väzba je sprostredkovaná dvomi RNA-väzbovými doménami RBD1 a RBD2, ktoré sa nachádzajú na C-konci proteínu a na naviazanie je potrebná prítomnosť oboch domén. Pre väzbu proteínu na jednovláknový presah je nevyhnutná prítomnosť troch alebo viacerých TTTAGGG repetícií [32].

U *A. thaliana* boli charakterizované dva Pot-like proteíny s plnou dĺžkou: AtPot1a a AtPot1b a jeden skrátený AtPot1c s jednou OB-fold doménou. Proteíny AtPot1a a AtPot1b obsahujú dve OB-fold domény, ktoré sú zodpovedné za väzbu na jednovláknovú DNA. AtPot1a interaguje s TER1 (RNA podjednotka telomerázy u *A. thaliana*) a zúčastňuje sa na regulácii dĺžky telomér. AtPot1b priamo interaguje s Myb-like proteínmi AtTRB1-3 (patriace do SMH skupiny proteínov), spája sa s TER2 a TER2s podjednotkami telomerázy a je zapojený v ochrane chromozomálnych koncov [33], [34].

4.3.2. TRFL skupina proteínov

TRFL skupina proteínov má Myb-like doménu umiestnenú na C-konci. TRFL proteíny môžeme ďalej rozdeliť do dvoch podskupín podľa prítomnosti Myb-ext domény: TRFL1 a 2. Podskupina TRFL1 obsahuje okrem Myb-like domény tiež Myb-ext doménu. Proteíny patriace do tejto podskupiny (TBP1, TRP1, TRFL1, TRFL2, TRFL4 a TRFL9) sú schopné viazať telomerickú dsDNA *in vitro* a tvoria homodiméry a heterodiméry. Podskupina TRFL2 zahŕňa tieto proteíny: TRFL3, TRFL5-8 a TRFL10 a obsahuje iba Myb-like doménu. Neprítomnosť Myb-ext domény sa prejavuje na neschopnosti týchto proteínov viazať dsDNA telomér [35].

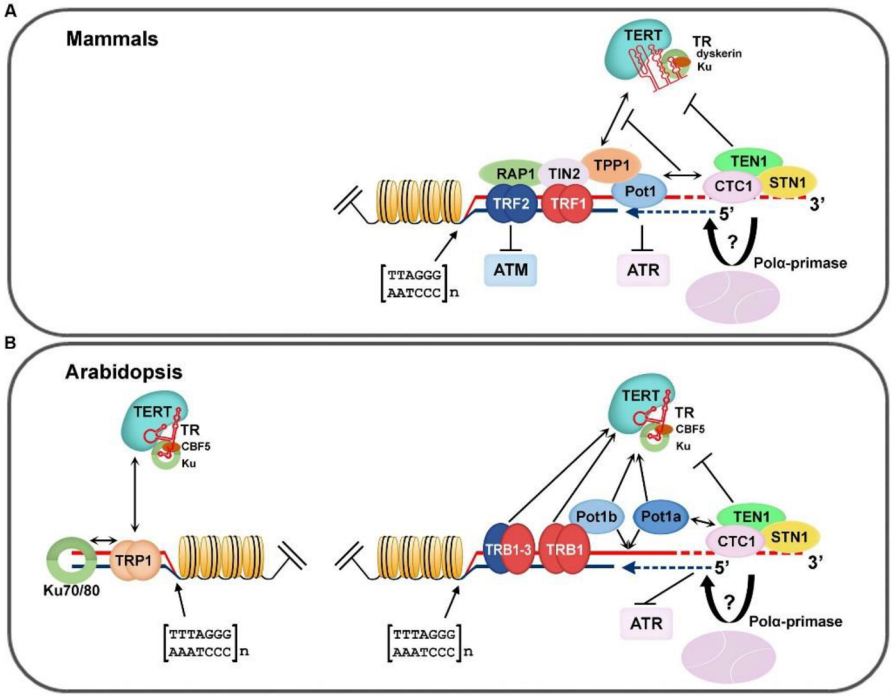
Proteín AtTBP1 (*A. thaliana* telomere-binding protein 1) je kódovaný sekvenciou na chromozóme 5. Oblasť proteínu obsahujúca Myb doménu sa špecificky viaže na dsDNA štyroch telomerických repetícií TTTAGGG ako homomultimér. Sekvencia kódujúca AtTRP1 (*A. thaliana* telomere relating protein 1) sa tiež nachádza na piatom chromozóme v *A. thaliana* [32]. AtTRP1 interaguje s AtKu70, taktiež potvrdená bola interakcia medzi ľudskými proteínmi hTRF2 a Ku70 [36]. Práve interakcia s AtKu proteínmi naznačuje, že proteíny skupiny TRFL by mohli byť súčasťou komplexu proteínov rozpoznávajúceho tupé konce telomér u *A. thaliana.*

4.3.3. SMH skupina proteínov

SMH (single-Myb-histone) skupina proteínov je charakteristická prítomnosťou troch domén: N-terminálna Myb doména, centrálna globulárna histone H1/5 doména a C-terminálne coiled-coil doména. U *A. thaliana* bolo zatiaľ identifikovaných päť proteínov patriacich do tejto skupiny: AtTRB1 – AtTRB5 (telomere-repeat binding proteins) a doposiaľ bližšie charakterizované boli prvé tri. Veľkosť proteínu AtTRB1 je 35,2 kDa a je kódovaný 300 aminokyselinami, AtTRB2 je kódovaný 299 aminokyselinami s celkovou veľkosťou 33 kDa a veľkosť AtTRB3 je 32 kDa a kóduje ho 295 aminokyselín [37], [38].

Za väzbu AtTRB proteínov na dvojvláknovú DNA je zodpovedná Myb-like doména. Na túto väzbu sú postačujúce dve telomerické repetície. Centrálna H1/H5-like doména sprostredkováva proteín-proteínové interakcie a taktiež sa podieľa v nešpecifickej interakcii s DNA. Predpokladá sa, že C-terminálna doména má tiež úlohu v proteín-proteínových interakciách [39]. Vďaka H1/5 doméne proteín AtTRB1 interaguje sám so sebou a tvorí homomultiméry a cez túto doménu interaguje i ďalšími dvomi proteínmi, AtTRB2 a AtTRB3 [40]. Pomocou kvasinkového dvojhybridného systému bola potvrdená interakcia proteínov

AtTRB1-3 s katalytickou podjednotkou telomerázy, AtTERT. Nebolo potvrdené, že by táto interakcia ovplyvňovala aktivitu telomerázy. Skôr sa predpokladá, že AtTRB proteíny hrajú úlohu v naviazaní telomerázy na teloméry [41]. AtTRB proteíny interagujú i s AtPot1b proteínom. Za túto interakciu je zodpovedná H1/H5-like doména TRB proteínov a N-terminálna časť Pot-like proteínu, kde sa nachádza OB-fold doména [40]. Neprítomnosť proteínu AtTRB1 vedie k postupnému skracovaniu telomér.



Obrázok 3: Schematické znázornenie proteínových komplexov telomér u cicavcov (A) a u rastliny A. thaliana (B) [34]

Zistené interakcie AtTRB proteínov s telomerázovou katalytickou podjednotkou i s proteínom Pot1b, či prítomnosť Myb-like domény naznačujú, že v prípade SMH skupiny proteínov by sa mohlo jednať o súčasť Shelterin-like komplexu u *A. thaliana*.

4.3.3.1. Netelomerická funkcia TRB proteínov

TRB proteíny majú okrem telomerickej funkcie i mnoho iných, netelomerických funkcií. U AtTRB1 proteínu bola preukázaná asociácia s promotórmi génov spojených s translačnou mašinériou (gény kódujúce snoRNA, eEF-1 a eIFs, ribozomálne proteíny), ktoré obsahujú intersticiálne lokalizované telomerické sekvencie. Toto zistenie naznačuje, že TRB1 proteín by mohol fungovať i ako transkripčný faktor niekoľkých génov [42]. TRB1 proteín sa tiež spolu s LHP1 proteínom (Like Heterochromatin Protein 1) podieľa na represii určitých génov a je taktiež zapojený vo zvyšovaní expresie génov spojených s primárnym

metabolizmom [43]. Taktiež bola preukázaná interakcia TRB2 proteínu s histón deacetylázami HDT4 a HDT6. Predpokladá sa, že HDT4 v spojení s TRB2 proteínom sa podieľajú na regulácii chromatínovej štruktúry a taktiež usporiadaní telomér u rastliny *A. thaliana* [44].

4.4. Proteínový komplex telomér u rastliny *Physcomitrella patens*

Mach *Physcomitrella patens* (*P. patens*) v poslednej dobe taktiež patrí medzi dôležité rastlinné modelové organizmy, ktorého genóm bol osekvenovaný v roku 2008 (27 chromozómov o veľkosti cca 500 Mbp) [45]. Jeho teloméry sú tvorené tandemovými repetíciami s rovnakou sekvenciou ako u *A. thaliana* – TTTAGGG. Avšak čo sa týka dĺžky, teloméry u *P. patens* sú približne dvojnásobne kratšie – okolo 500 bp [46]. Bližšia charakterizácia telomer-väzbových proteínov u tejto rastliny môže, spolu s vedomosťami o telomérach a telomér-väzbových proteínoch u *A. thaliana*, dopomôcť k lepšiemu pochopeniu a objasneniu funkcie telomér.

Jedným z mála identifikovaných telomerických proteínov u *P. patens* na základe sekvenčnej podobnosti s AtPot1a a AtPot1b bol homológ PpPot1. Tento proteín je kódovaný 497 aminokyselinami s cca 50% sekvenčnou podobnosťou k proteínom AtPot1a a AtPot1b. Predpokladá sa, že na svojom N-konci obsahuje až dve OB-fold domény sprostredkujúce väzbu na jednovláknovú DNA. Pomocou metódy EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) bolo zistené, že na naviazanie na ssDNA je potrebná prítomnosť sekvencie GTTTAGGGTTTAGGGT. PpPot1 sa tiež zúčastňuje na regulácii dĺžky telomér. Rastliny mutantné v géne kódujúcom proteín Pot1 vykazovali rozsiahle skracovanie telomér [46].

V našom laboratóriu sa venujeme charakterizácii proteínov SMH skupiny – Telomere - repeat binding (TRB) proteínom. Chceli by sme zistiť, či funkcia TRB proteínov je evolučne konzervovaná a proteíny zastávajú rovnakú funkciu u vyšších (*A. thaliana*) i u nižších rastlín (*P. patens*).

5. Cieľ práce

- Získanie dvojitých mutantov AtTRB1 – AtTERT modelového organizmu *Arabidopsis* thaliana, ktoré sú vhodné pre analýzu procesov spojených s reguláciou rastlinných telomér
- Príprava rekombinantných sekvencií génov TRB proteínov (PpTRB1, PpTRB2 a PpTRB3) u rastliny *Physcomitrella patens* pre následné klonovanie pomocou technológie Gateway

6. Materiál

6.1. Modelový organizmus

- *Arabidopsis thaliana,* ekotyp Columbia

6.2. Primery

- Forward primer AtTRB1:
  5´-ATG CCA CCA CAA TAA ATC TCG-3´
- Reverse primer AtTRB1:
  5´-TTA GCG GAG TCT TGT ACC TGC-3´
- Primer pre T-DNA inzerciu TRB1 génu:
  5´-TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G-3´
- Forward primer AtTERT:
  5´-CTT TAT TTG GGC CAT CTG TAG GTA C-3´
- Reverse primer AtTERT:
  5´-TGA TTC ACT GTG CAT TTC TCA TTT C-3´
- Primer pre T-DNA inzerciu TERT génu:
  5´- CAA CAC TCA ACC CTA TCT CGG-3´
- Génovo špecifický forward primer PpTRB1 (100 µM):
  5´-AAA AAG CAG GCT AC ATG GGA GCC CCC AAA CAG AAG T-3´
- Génovo špecifický forward primer PpTRB2 (100 µM):
  5´-AAA AAG CAG GCT AC ATG GGA GCT CCT AAA CAA AAG TGG-3´
- Génovo špecifický reverse primer PpTRB2(100 µM):
  5´-AGA AAG CTG GGT C TTA CCC GTT TAC TGC AAC TTC CTG-3´
- Génovo špecifický forward primer PpTRB3 (100 µM):
  5´-AAA AAG CAG GCT AC ATG GGA GCT CCC AAA CAG AAG T-3´
- Génovo špecifický reverse primer PpTRB3 (100 µM):
  5´-AGA AAG CTG GGT C TCA CTA CCC ATT CAC TGC GAC C-3´

6.3. Roztoky, média, pufry, chemikálie

- Agaróza; SERVA
- Ethydiumbromid; SERVA

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Fermentas
- GeneRuler™ 0,5 kb DNA Ladder, Fermentas
- 6x DNA Loading Dye; Fermentas
- EB roztok (100 mM TrisCl – pH 8, 50 mM EDTA – pH 8, 500 mM NaCl, 10 μM β-merkaptoetanol)
- BTE roztok (50 mM TrisCl – pH 8, 1 mM EDTA – pH 8)
- 1xTAE pufer (40 mM Tris-kyselina octová, 1 mM EDTA)
- MyTaq DNA polymerase (5 U/ μl); BIOLINE
- 5x MyTaq™ Reaction Buffer Colorless; BIOLINE
- M-MuLV reverse transcriptase (200 U/ μl); New England BIO LABS inc.
- dNTPs (10 mM); JENA BIOSCIENCE
- Náhodné nonaméry; Sigma
- Reverse Transcription 10x Buffer; Promega

6.4. Prístrojové vybavenie

- Centrifuga Mini Spin; Eppendorf
- Elektroforéza horizontálna SUB-CELL® GT; Bio-Rad
- Zdroj pre ELFO; Bio-Rad
- Flow-box, Biohazard
- Nanodrop; Implen
- Termocyklér DNA Engine Tetrad® 2; Bio-Rad
- SILAMANT® S6; Ivoclar Vivadent

7. Metódy

7.1. Získanie dvojitých mutantov AtTRB1 – AtTERT rastliny *Arabidopsis thaliana*

7.1.1. Vysievanie rastlinného materiálu

Vysievanie semien bolo prevedené vo flow-boxe Biohazard, ktorý bol najskôr vysterilizovaný UV žiarením spolu so všetkými potrebnými pomôckami na vysievanie vrátane misiek. Pred začatím vysievania bola prevedená sterilizácia semien:

- Malé množstvo semien v mikroskúmavke bolo po dobu 5 minút pretrepávané v 750 ml 70% etanolu, ktorý bol na konci odpipetovaný.
- Následne bolo pridaných 750 ml 96% etanol, pretrepanie po krátku dobu a odpipetovanie etanolu.
- Po odstránení etanolu boli semená rozklepané po stenách skúmaviek a nechané schnúť.

Vyschnuté semená boli nasypané na misky so stuhnutým kultivačným MS (Murashige and Skoog) médiom (1/2 MS média, 0,8% agar, 0,8% sacharóza), ktoré bolo najskôr sterilizované v tlakovom hrnci pri 180 °C po dobu 25 minút. Misky boli zalepené páskou (aby nedošlo k narušeniu sterility), obalené alobalom a ponechané 2 dni v tme pri 4 °C (vernalizácia). Následne boli misky premiestnené do boxu Percival s podmienkami:

- svetlo: 22 °C / 16 hodín
- tma: 19 °C / 8 hodín

Po 10 dňoch od premiestnenia do boxu boli klíčky presadené do pôdy.

7.1.2. Kríženie rastlín

A. thaliana je obojpohlavná rastlina, jej kvety obsahujú samčie (tyčinky) aj samičie (piestik) pohlavné bunky.

Na prípravu rastliny slúžiacej ako samičku využijeme rastlinu, ktorá ešte nemá rozvinutý kvet. Na stonke si necháme iba cca 3 najväčšie puky, ostatné odstránime. Z týchto

pukov taktiež odstránime okvetné lístky a tyčinky (aby nedošlo k samoopeleniu) tak, aby nám ostal iba piestik – takto pripravená rastlina je samička.

Ako samčeka využijeme rastlinu, ktorá má rozkvitnuté kvety a je teda ľahké sa dostať k tyčinkám s peľovými zrnkami. Kvet zachytíme pinzetou a odtrhneme tak, aby sa pootvoril. Obnažené tyčinky použijeme na opelenie samičej rastlinky tak, že kvetom niekoľkokrát prejdeme po blizne.

Takto sme krížili rastliny mutantné v géne pre TRB1 proteín s rastlinami mutantnými v géne pre katalytickú podjednotku telomerázy TERT podľa rozpisu:

- TERT ♀ x TRB1 ♂
- TRB1 ♀ x TERT ♂

Takto skríženú rastlinku necháme vyschnúť aby sme z nej získali semená, ktoré sme znova vysadili podľa postupu v predchádzajúcom kroku. Z týchto rastlín sme potom izolovali DNA.

7.1.3. Izolácia genómovej DNA

Z každej rastliny bol odobraný jeden až dva listy (podľa veľkosti) a daný do mikroskúmavky so sklenenými guličkami. Pre izoláciu DNA sme použili postup podľa Dellaportu:

- Rozdrviť listy v tekutom dusíku pomocou sklenených guličiek. Skúmavky ponechať v ľade.
- Do skúmavky pridať 500 µl EB roztoku a uložiť späť na ľad.
- Pridať 35 µl 20% SDS, zvortexovať a inkubovať vo vodnom kúpeli pri teplote 65-70 °C po dobu 10 minút.
- Pridať 130 µl 5M KAc a inkubovať 5 minút na ľade.
- Centrifugácia 14,5 rpm/ 10 minút.
- Odobrať supernatant a pridať ho do skúmavky obsahujúcej 60 µl 3M NaAc a 640 µl izopropanolu.
- Centrifugácia 14,5 rpm/ 10 minút.
- Zliať supernatant a precipitát opláchnuť 70% etanolom.

- Precipitát nechať vysušiť v inkubátore pri teplote 37 °C a následne ho rozpustiť v 200 µl BTE roztoku vo vodnom kúpeli pri 50 °C po dobu cca 1-2 hodín.
- Centrifugácia 14,5 rpm/ 5 minút.
- Získaný supernatant preniesť do čistých skúmaviek.
- Pridať 2 µl RNázy (10 mg/ ml).
- Inkubovať pri 37 °C/ 30 minút.
- Pridať 20 µl 3M NaAc a 440 µl etanolu, nechať zrážať pri -20 °C cca 1 hodinu.
- Centrifugácia 14,5 rpm/ 15 minút.
- Opláchnuť pelet 70% etanolom, vysušiť ho a rozpustiť v 20 µl milli-Q H_2O.

Výsledná koncentrácia izolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky pomocou prístroju Nanodrop.

7.1.4. Genotypovacia PCR

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) nám umožňuje získať sekvenciu DNA bez klonovania. Využíva základné rysy replikácie DNA – ako templát slúži ssDNA, podľa ktorej je syntetizovaný komplementárny reťazec.

Ako templát DNA sme využili vyizolovanú genómovú DNA (gDNA) z krížených rastlín *A. thaliana*. Počas genotypovacej PCR využívame kombinácie primerov, ktoré sú navrhnuté pre sekvenciu wild type ale i pre sekvenciu mutantnej DNA (sekvencie obsahujúce T-DNA inzercie). Podľa prítomnosti/ neprítomnosti produktu PCR zistíme, či je daná rastlina homozygot (-/-), heterozygot (+/-) alebo wild type (+/+).

Reakčná zmes obsahovala (objem jednej reakcie je 10 µl):

- 2 µl 5x My Taq pufru
- 5,3 µl Milli-Q H_2O
- 0,3 µl forward primeru (10 µM)
- 0,3 µl reverse primeru (10 µM)
- 0,1 µl My Taq polymerázy
- 2 µl templátovej DNA – gDNA vyizolovaná z listov *A. thaliana*

Tabuľka 1: Podmienky genotypovacej PCR

	°C	Čas	
Počiatočná denaturácia	95	1´	
Denaturácia	95	10´´	35 cyklov
Nasadanie primerov	55	30´´	
Extenzia	72	1´	
Konečná extenzia	72	10´	
Konečná teplota	10	-	

PCR produkty boli vizualizované pomocou horizontálnej agarózovej gélovej elektroforézy. Použité boli 1% a 2% agarózové gély obsahujúce etidiumbromid v konečnej koncentrácii 1 µg/ml.

7.2. Klonovanie génov kódujúcich TRB proteíny u rastliny *Physcomitrella patens*

7.2.1. Syntéza cDNA (complementary DNA)

cDNA sa získava reverznou transkriptázovou reakciou z príslušnej RNA.

Najskôr bolo zmiešaných 1,5 µg RNA s 11 µl RNase-free H_2O a 1 µl náhodných nonamérov. Nasledovala inkubácia tejto zmesi pri 70 °C po dobu 5 minút. Po inkubácii bola vzorka ochladená na ľade a bolo pridané:

- 0,5 µl 10 mM dNTPs
- 2 µl 10x 10x Reverse Transcription Buffer
- 1 µl M-MuLV reverznej transkriptázy
- doplniť do 20 µl objemu RNase-free H_2O (v tomto prípade 3 µl)

Nasledovala inkubácia zmesi pri 40 °C po dobu 90 minút. Deaktivácia reverznej transkriptázy prebehla pri zvýšení teploty na 65 °C po dobu 20 minút. Takto pripravená cDNA bola následne použitá pri adaptorových PCR.

7.2.2. Príprava kódujúcej sekvencie s rekombinačnými miestami

Najskôr bolo potrebné naamplifikovať dostatočné množstvo molekúl DNA kódujúcich požadovanú sekvenciu. Táto amplifikácia bola prevedená pomocou dvojnásobnej PCR.

Pomocou prvej adaptorovej PCR zmnožíme požadovanú sekvenciu z cDNA. Použité primery obsahujú okrem génovo špecifickej sekvencie aj sekvencie slúžiace ako rekombinačné miesta (tzv. attB miesta).

Reakčná zmes obsahovala (objem jednej reakcie je 50 µl):

- 25 µl Premix Taq
- 5 µl génovo špecifického forward primeru
- 5 µl génovo špecifického reverse primeru
- 2 µl templátovej DNA (cDNA)
- 13 µl Milli-Q H_2O

Tabuľka 2: Podmienky prvej adaptorovej PCR

	°C	Čas	
Počiatočná denaturácia	98	1´	
Denaturácia	98	30´´	30 cyklov
Nasadanie primerov	56	30´´	
Extenzia	72	1´	
Konečná extenzia	72	10´	
Konečná teplota	10	-	

PCR produkty boli vizualizované horizontálnou gélovou elektroforézou s použitím 1% agarózového gélu obsahujúceho etidiumbromid v konečnej koncentrácii 1 µg/ml. Veľkosť očakávaných produktov bola 1000 – 1056 bp.

Cieľom druhej adaptorovej PCR bolo pripojenie celého attB miesta k produktu prvej adaptorovej PCR. Tieto miesta sú kompatibilné s attP miestami vektoru.

Reakčná zmes obsahovala (objem jednej reakcie je 50 µl):

- 25 µl Premix Taq
- 5 µl génovo špecifického forward primeru
- 5 µl génovo špecifického reverse primeru
- 15 µl produktu 1. adaptorovej PCR

Tabuľka 3: Podmienky druhej adaptorovej PCR

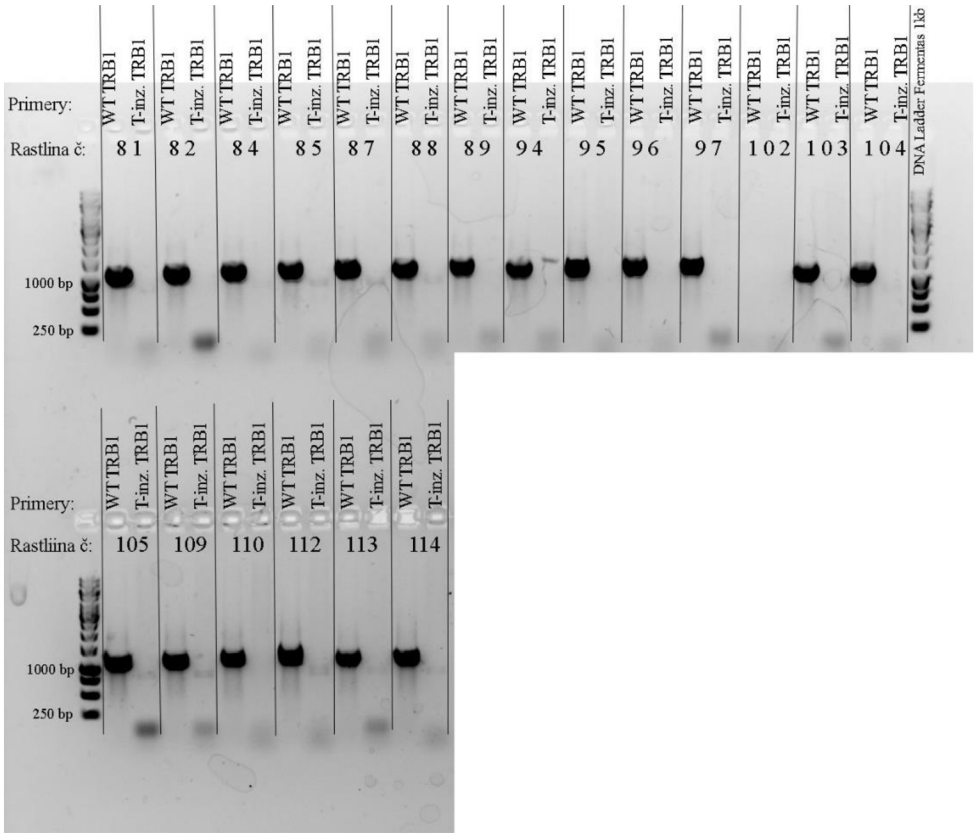
	Teplota (°C)	Čas	
Počiatočná denaturácia	98	1´	
Denaturácia 1	98	30´´	5 cyklov
Nasadanie primerov 1	45	30´´	
Extenzia1	72	1´	
Denaturácia 2	98	30´´	20 cyklov
Nasadanie primerov 2	55	30´´	
Extenzia 2	72	1´	
Extenzia 3	72	10´	
Konečná teplota	10	-	

PCR produkty boli overené pomocou horizontálnej gélovej elektroforézy na 1% agarózovom géle.

8. Výsledky

8.1. Získanie dvojitého mutanta AtTRB1 – AtTERT rastliny *A. thaliana*

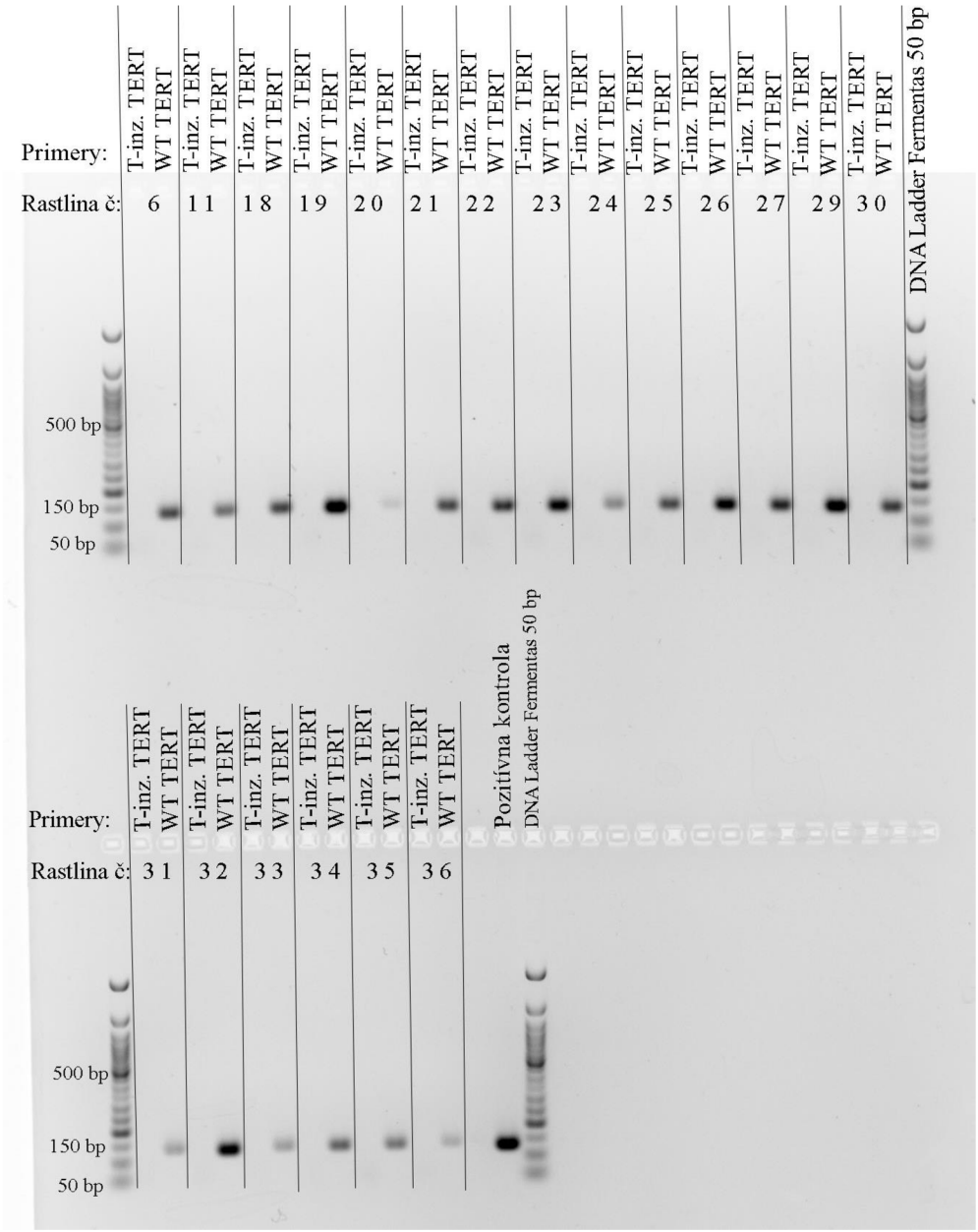
Z každého kríženia bolo vysadených 120 kvetín. Genotypovanie krížených rastlín sme vždy začali s kombináciou primerov pre menej pravdepodobný proteín – rastlina slúžiaca pri krížení ako samček. Pri každej PCR reakcii sme z DNA danej rastliny brali po dve vzorky: 1. vzorka pre kombináciu primerov daného génu navrhnutých pre wild type (WT) sekvenciu a 2. vzorka pre kombináciu primerov obsahujúcich T-DNA inzerciu v danom géne. Podľa prítomnosti alebo neprítomnosti produktu sme zhodnotili, či je daná rastlina v študovanom géne mutantná alebo nie.



Obrázok 4: Výsledok genotypovania rastlín z kríženia AtTERT ♀ x AtTRB1 ♂.

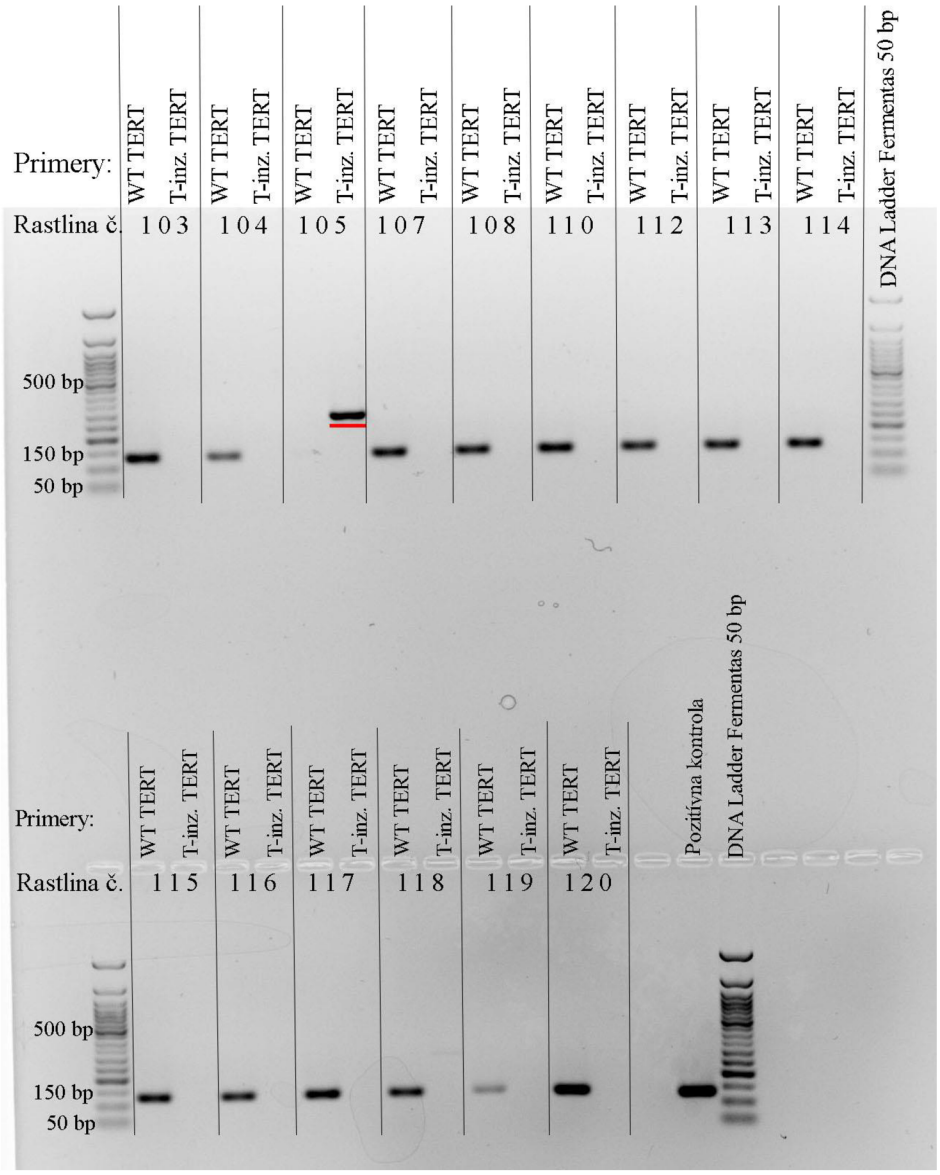
Na obrázku číslo 4 je ilustračný výsledok genotypovania rastlín číslo 81 – 114 z kríženia AtTERT ♀ x AtTRB1 ♂. Bohužiaľ, z tohto kríženia sme nezískali žiadneho dvojitého mutanta. Genotypovanie rastlín číslo 1 – 80 a 114 – 120 ukázalo rovnaké výsledky ako genotypovanie rastlín 81 – 114. Všetky rastliny (č. 1 – 120) okrem vzorky č. 102, kde bola najskôr chyba pipetovania, majú band iba pre kombináciu primerov pre wild type rastlinu (veľkosť cca 1 kb).

Ani v jednom prípade sme nepreukázali prítomnosť bandu, ktorý by naznačoval, že sú rastliny mutantné pre gén *Attrb1*.



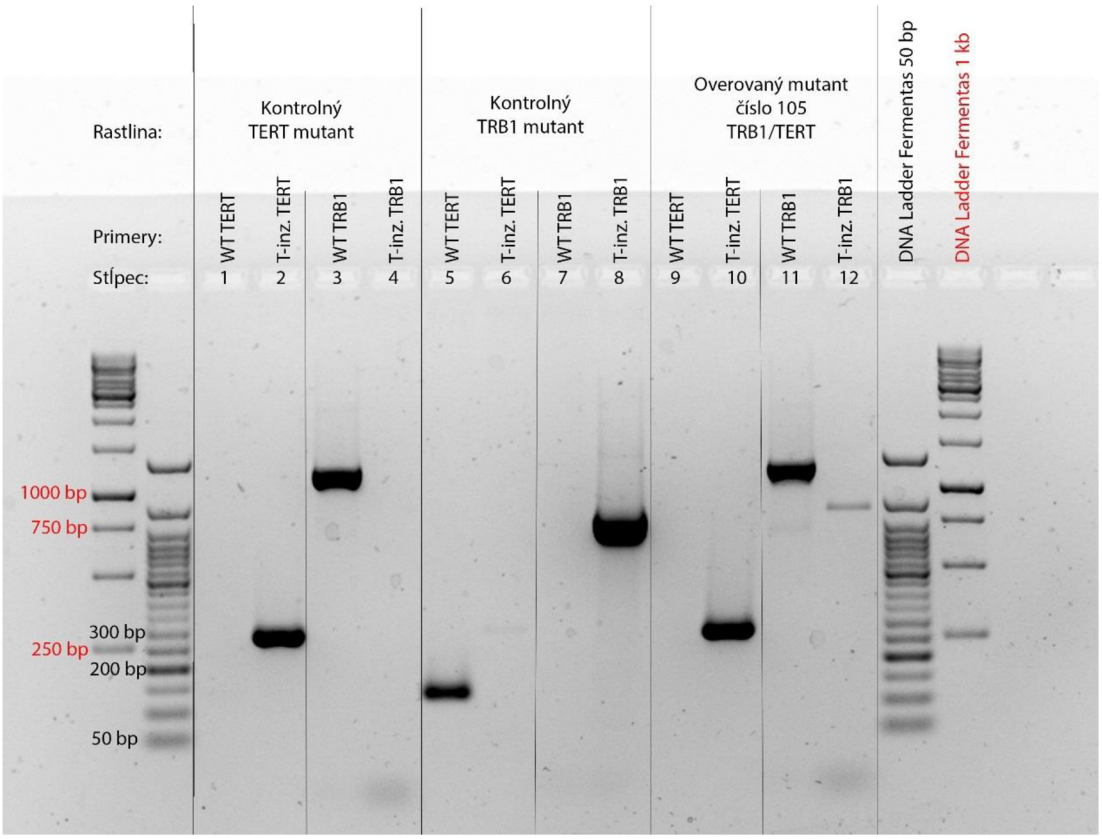
Obrázok 5: Výsledok genotypovania rastlín z kríženia AtTRB1 ♀ x AtTERT ♂ s použitím 2% agarózového gélu.

Na obrázku číslo 5 je príklad genotypovania nakrížených rastlín AtTRB1 ♀ x AtTERT ♂ (rastliny číslo 6 – 36). V tomto prípade bola oproti Obrázku 4 opačná kombinácia rastlín, ktoré slúžili ako samček či samička. Prvá kombinácia primerov v dvojici je pre T-DNA inzerciu v AtTERT géne, druhá je wild type kombinácia primerov pre AtTERT gén. Z tohto genotypovania nám však nevyšiel žiadny AtTERT mutant, keďže všetky bandy majú zhodnú veľkosť (cca 150 bp) s bandom pozitívnej kontroly (DNA z wild type rastliny).



Obrázok 6: Výsledok ďalšieho genotypovania rastlín z kríženia AtTRB1 ♀ x AtTERT ♂ s použitím 2% agarózového gélu. Pozitívny výsledok je podčiarknutý červeno.

Na obrázku číslo 6 je výsledok genotypovania ďalších rastlín z kríženia AtTRB1 ♀ x AtTERT ♂ s použitím 2% agarózového gélu (rastliny číslo 103 – 120). Prvá kombinácia primerov v dvojici je pre wild type (WT) a druhá pre T-DNA inzerciu *AtTERT* génu. Jedine rastlina číslo 105 má produkt pre kombináciu primerov pre T-DNA inzerciu *AtTERT* génu. Túto rastlinu sme teda ďalej overovali, či obsahuje T-DNA inzerciu i v géne pre AtTRB1 proteín. Ostatné rastliny majú bandy iba pre WT kombináciu primerov a tieto bandy majú i zhodnú veľkosť s kontrolou (DNA z wild type rastliny).



Obrázok 7: Výsledok overovacej PCR pre dvojitého mutanta spolu s pozitívnymi kontrolami pre oba gény.

Urobili sme nové overenie rastliny č. 105, ktorá sa javila ako možný dvojitý mutant pre gény AtTRB1 a AtTERT, pomocou PCR. Pre porovnanie produktov sme na gél naniesli taktiež PCR produkty s DNA rastlín mutantných iba pre AtTERT či AtTRB1 proteín. Bohužiaľ, druhá PCR nepotvrdila domnienku, že naša krížená rastlina je dvojitý mutant. Detailná PCR iba preukázala, že daná rastlina je mutantná iba v géne pre proteínovú podjednotku telomerázy AtTERT.

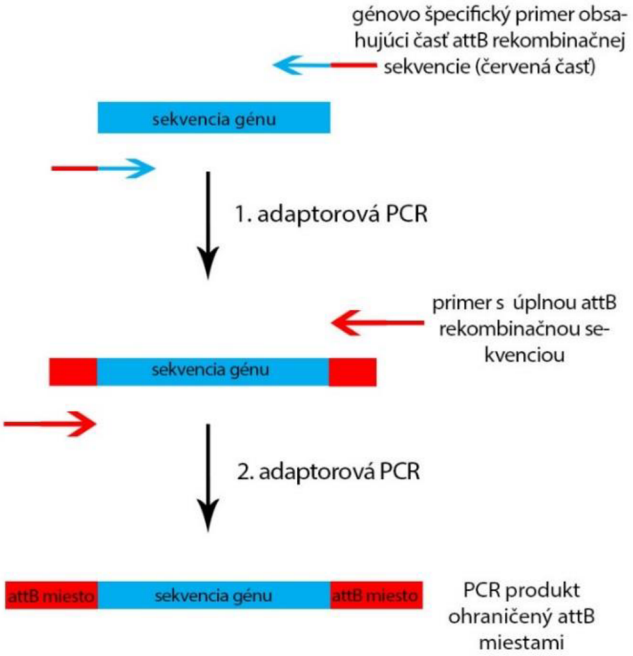
Môžeme vidieť, že veľkosť produktu pre T-DNA inzerciu TERT mutanta (stĺpec 2) je rovnaká ako veľkosť produktu našej overovanej rastliny s použitím primerov pre T-DNA inzerciu v AtTERT géne (stĺpec 10). Z toho vyplýva, že naša rastlina je mutantná v géne kódujúcom AtTERT proteín.

Pri skúmaní mutácie v AtTRB1 géne vidíme jasný band pre kombináciu wild type (stĺpec 11), ktorá je zhodná s veľkosťou produktu v stĺpci 3 – wild type rastlina v géne kódujúcom TRB1 proteín.

Čo sa týka slabého bandu v stĺpci 12, môže sa jednať o kontamináciu DNA, nie však o produkt pre T-DNA inzerciu v géne pre AtTRB1 proteín, pretože tento band má inú veľkosť ako produkt pre skutočnú TRB1 T-inzerčnú mutáciu (stĺpec 8).

8.2. Klonovanie génov pre TRB proteíny u rastliny *P. patens*

Pred samotným klonovaním je potrebné pripraviť sekvencie génov obsahujúce rekombinačné miesta, ktoré sú potrebné pre následné reakcie. To docielime prevedením tzv. dvoch adaptorových PCR. Počas prvej adaptorovej PCR sa použije génovo špecifický primer, ktorý okrem komplementárnej sekvencie obsahuje taktiež časť rekombinačnej sekvencie (tzv. *att*B miesta). Výsledkom tejto PCR je produkt ohraničený krátkymi rekombinančnými sekvenciami. Počas druhej adaptorovej PCR sa táto rekombinačná sekvencia skompletizuje za použitia primerov s úplnou *att*B rekombinačnou sekvenciou.

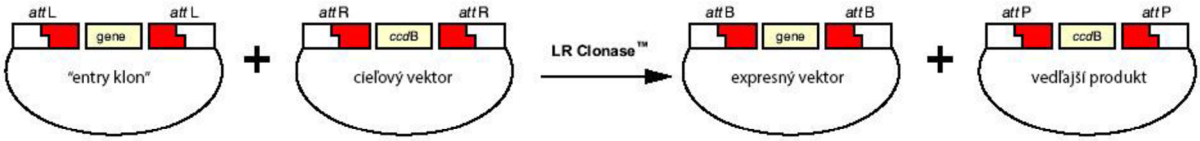


Obrázok 8: Schéma 1. a 2. adaptorovej PCR.

Následné klonovanie potom prebieha v dvoch krokoch. Prvá reakcia sa nazýva „BP reakcia“ a počas nej interaguje PCR produkt ohraničený *att*B sekvenciami, ktorý sme získali pomocou dvoch adaptorových PCR, s donor vektorom, ktorý obsahuje *att*P sekvencie a vzniká „entry klon“. Počas reakcie prebehne špecifická rekombinácia medzi *att*B sekvenciami PCR produktu a *att*P miestami vektoru a tým k prenosu kódujúcej sekvencie do vektoru za vzniku „entry klonu“.

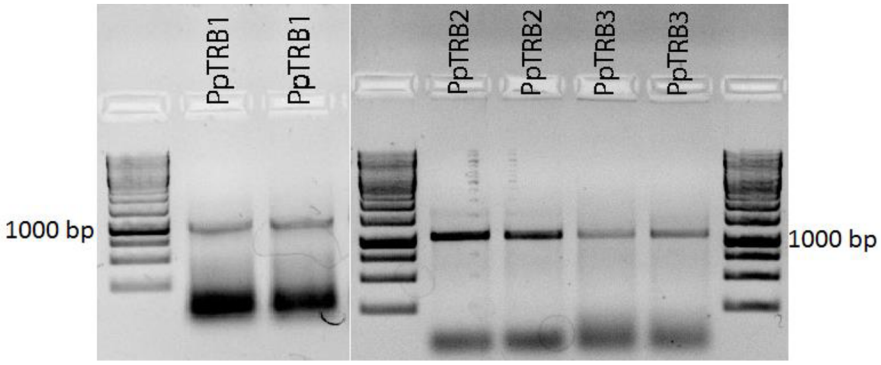
Obrázok 9: Schéma tvorby entry klonu počas BP reakcie technológiou Gateway.

Druhá reakcia sa nazýva „LR reakcia“ a počas nej interaguje entry klon získaný v predošlom kroku s cieľovým vektorom. Získame výsledný plazmid obsahujúci inzert, ktorý sa do vektoru začlenil namiesto génu *ccd*B. Tým sa zaistí prežitie buniek nesúcich vektor s inzertom.



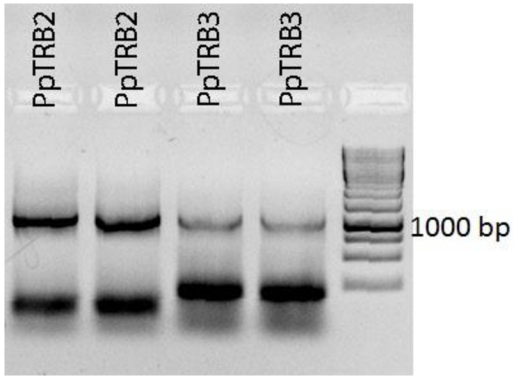
Obrázok 10: Schéma tvorby expresného vektoru technológiou Gateway.

Metóda bola zahájená syntézou cDNA z už vyizolovanej RNA (RNA poskytla Mgr. Š. Schořová). Túto cDNA sme použili ako templát pri 1. adaptorovej PCR. Prevedená bola 1. adaptorová PCR pre gény PpTRB1, PpTRB2 a PpTRB3 proteínov. Výsledkom tejto PCR by mali byť špecifické sekvencie génov obsahujúce aj časti sekvencií slúžiacich ako rekombinačné miesta (*att*B miesta). Očakávaná veľkosť PCR produktov bola cca 1000 bp.



Obrázok 11: Výsledok 1. adaptorovej PCR pre gény PpTRB1, PpTRB2 a PpTRB3 proteínov.

Ako templát pri 2. adaptorovej PCR sme použili PCR produkt z 1. adaptorovej reakcie. Výsledkom tejto PCR sú sekvencie génov ohraničené plnými sekvenciami *att*B rekombinačných miest, ktoré sú potrebné pre následné reakcie. Druhá adaptorová PCR bola prevedená pre gény PpTRB2 a PpTRB3 proteínov.



Obrázok 12: Výsledok 2. adaptorovej PCR pre gény PpTRB2 a PpTRB3 proteínov.

Po prevedení prvej a druhej adaptorovej PCR sme získali pre proteíny PpTRB2 a PpTRB3 produkty danej veľkosti (cca 1000 bp). Avšak na gély sa nám objavili i nechcené kratšie sekvencie, ktoré by pri následných reakciách mohli spôsobovať problémy (primery by mohli skôr nasadnúť na tieto kratšie sekvencie, čo nie je naším cieľom) a tak tieto produkty neboli použité pri ďalších reakciách.

9. Diskusia

V tejto práci sme sa snažili získať rastliny *A. thaliana* mutantné v géne pre proteínovú podjednotku telomerázy TERT a v géne pre telomere-repeat binding protein TRB1. Získanie týchto dvojitých mutantov je prínosné pre ďalšie analýzy týkajúce sa regulácie rastlinných telomér. Taktiež sme sa pokúsili získať rekombinantné sekvencie génov kódujúcich TRB proteíny u rastliny *Physcomitrella patens*, ktorá v poslednej dobe slúži ako nový rastlinný modelový organizmus a bližšia charakterizácia týchto proteínov by bola vhodná pre porovnanie funkcií TRB proteínov v týchto rastlinných modelových organizmoch.

V blízkosti telomér sa nachádza veľké množstvo proteínov, ktoré sprostredkúvajú správne fungovanie telomér. V živočíšnych bunkách túto funkciu spĺňa proteínový komplex zvaný Shelterin. U rastlín zatiaľ nebol charakterizovaný žiadny telomerický komplex proteínov, avšak predpokladá sa, že v prípade proteínov patriacich do skupiny single-Myb-histone (TRB proteíny) by sa mohlo jednať o Shelterin-like komplex u rastlín. U *A. thaliana* bola zistená interakcia týchto proteínov s TERT podjednotkou telomerázy i s ďalším telomér-väzbovým proteínom, Pot1. V rámci tejto skupiny proteínov boli u rastliny *A. thaliana* zistené i viaceré netelomerické funkcie – predpokladá sa, že proteín AtTRB1 by mohol zastávať aj funkciu transkripčného faktora niektorých génov. U rastliny *P. patens* naopak ešte nebola zistená ich presná funkcia. Bližšia charakterizácia týchto proteínov u tohto

druhého modelového organizmu môže dopomôcť k zisteniu, či je funkcia týchto proteínov evolučne konzervovaná a zastávajú rovnakú funkciu u vyšších (*A. thaliana*) i nižších (*P. patens*) rastlín.

V rámci bakalárskej práce bolo prevedené kríženie rastlín mutantných v géne kódujúcom TRB1 proteín a TERT podjednotku telomerázy s cieľom získať dvojitých mutantov pre ďalšie skúmanie proteín-proteínových interakcií. Z výsledkov plynie, že sa nám nepodarilo získať žiadneho dvojitého mutanta. Detailná PCR rastliny, ktorá sa javila ako možný dvojitý mutant, iba preukázala, že daná rastlina obsahuje T-DNA inzerciu iba v géne pre TERT proteín. Pri skúmaní mutácie v géne pre TRB1 proteín nám vyšiel band pre kombináciu primerov pre wild type rastlinu. Jedným z dôvodov neúspešného výsledku môže byť nie celkom priaznivý stav rastlín pred krížením – rastliny boli suchšie. Keďže sme nezískali žiadneho dvojitého mutanta, bude prevedené nové kríženie. Budeme sa snažiť optimalizovať podmienky pre kríženie – kríženie prevedieme s mladšími rastlinami, ktoré ešte nie sú natoľko rozkvitnuté. Tým zabezpečíme, že pri získavaní rastliny slúžiacej pri krížení ako samička nemôže dôjsť k samoopeleniu, ako to napríklad odporúčajú v protokole C. G. Price et al., 2018 [47]. K zvýšeniu pravdepodobnosti nájdenia dvojitého mutanta nám môže taktiež dopomôcť zväčšenie počtu skrížených rastlín.

Taktiež som sa podieľala na príprave rekombinantných sekvencií génov TRB proteínov u rastliny *Physcomitrella patens* s cieľom pripraviť vektory vhodné k expresii týchto proteínov a skúmaniu ich vzájomných interakcií v kvasinkovom či rastlinnom expresnom systéme. Klonovanie do pENTRY vektoru najskôr skúšala Mgr. Šárka Schořová, avšak z jej výsledkov nebol získaný žiadny pozitívny klon. Jednou z možností negatívneho výsledku mohla byť nefunkčná cDNA. Metódu sme preto zahájili syntézou novej cDNA, ktorú sme následne použili ako templát pri adaptorovej PCR. Po prevedení dvoch adaptorových PCR nám síce vyšiel produkt očakávanej veľkosti, ale na gély sa tiež objavili i produkty menšej veľkosti, ktoré by následne mohli spôsobovať problémy pri získaní stabilného donorového vektoru. PpTRB proteíny majú neštandardnú sekvenciu (úseky bohaté na báze guanín a adenín) a domnievame sa, že práve tieto sekvencie môžu spôsobovať problémy pri PCR či následnom klonovaní. Plánujeme vyskúšať klonovanie nie celej sekvencie daných proteínov, ale rozdelenie na fragmenty ako napríklad v článku Mozgová et al., 2008, kde pomocou tejto metódy analyzovali DNA-proteínové interakcie TRB1 homológu u rastliny *A. thaliana*.

10. Zhrnutie

V úvode práce boli zhrnuté informácie o telomérach, telomeráze a iných telomér - väzbových proteínoch či proteínových komplexoch. Čo sa týka telomerázy a telomér-väzbových proteínov, informácie boli zamerané na ich základné funkcie týkajúce sa ochrany telomér, avšak taktiež boli zdôraznené ich vedľajšie, netelomerické funkcie. Boli spomenuté zloženia a funkcie Shelterin a CST komplexu a ďalej sa práca zamerala na proteínové komplexy telomér u rastliny *Arabidopsis thaliana* a *Physcomitrella patens*. U proteínového komplexu telomér rastliny *A. thaliana* boli opísané proteíny viažuce sa na jednovláknovú i dvojvláknovú DNA telomér, zatiaľ čo u rastliny *P. patens* bol bližšie popísaný iba proteín Pot1.

Praktická časť bola zameraná na získanie dvojitých mutantov AtTRB1-AtTERT proteínov u modelového organizmu *A. thaliana.* Pri práci s rastlinným materiálom bolo najskôr potrebné vysiať rastliny, ktoré sú mutantné pre jednotlivé gény kódujúce proteíny AtTERT a AtTRB1. Tieto overené mutantné rastliny pre jednotlivé gény sme následne skrížili. Po vyrastení skrížených rastlín bola izolovaná DNA, ktorú sme použili ako templát pri genotypovacej PCR. Táto metóda funguje na princípe použitia kombinácie primerov ako pre wild-type rastlinu, tak i pre rastlinu obsahujúcu T-DNA inzerciu v skúmanom géne. Vizualizácia prebieha pomocou horizontálnej agarózovej elektroforézy a podľa prítomnosti alebo neprítomnosti produktu zistíme, či je daná rastlina v skúmanom géne mutantná alebo nie. Vďaka tejto metóde sme zistili, že žiadna zo skrížených rastlín neobsahuje mutáciu v oboch génoch, takže sme nezískali žiadneho dvojitého mutanta.

Mojou úlohou v praktickej časti bolo taktiež pripraviť rekombinantné sekvencie génov PpTRB proteínov u rastliny *P. patens*, ktoré by sa následne použili pre klonovanie do donorového a následne destinačného vektora pomocou technológie Gateway. Cieľom je príprava vektorov vhodných k expresii daných proteínov a skúmanie ich vzájomných interakcii v kvasinkovom či rastlinnom expresnom systéme. Príprava takýchto sekvencií spočíva v prevedení dvoch tzv. adaptorových PCR, kedy získame sekvenciu daného génu obsahujúcu na svojich koncoch tzv. *att*B rekombinačné miesta, ktoré sú kompatibilné s *att*P miestami donorového vektoru. Po prvej (pre PpTRB1 proteín) a druhej (pre PpTRB2 a PpTRB3 proteíny) adaptorovej PCR reakcii sme získali produkty danej veľkosti, avšak na géle sa nám taktiež objavili produkty menšej veľkosti, ktoré podľa našich skúseností nie sú zlučiteľné so získaním stabilného donorového vektoru.

11. Zoznam použitej literatúry

[1] D. A. Gewirtz, S. E. Holt, a S. Grant, Ed., *Apoptosis, senescence, and cancer*. Totowa, N.J: Humana Press, 2007.

[2] D. P. Snustad, M. J. Simmons, a A. Matalová, *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009.

[3] C. J. Webb, Y. Wu, a V. A. Zakian, "DNA Repair at Telomeres: Keeping the Ends Intact", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, roč. 5, č. 6, s. a012666–a012666, jún. 2013.

[4] M. S. Fitzgerald, K. Riha, F. Gao, S. Ren, T. D. McKnight, a D. E. Shippen, "Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from Arabidopsis inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 96, č. 26, s. 14813–14818, dec. 1999.

[5] J. D. Griffith *et al.*, "Mammalian telomeres end in a large duplex loop", *Cell*, roč. 97, č. 4, s. 503–514, máj. 1999.

[6] K. Paeschke, K. R. McDonald, a V. A. Zakian, "Telomeres: Structures in need of unwinding", *FEBS Lett.*, roč. 584, č. 17, s. 3760–3772, sep. 2010.

[7] M. I. Zvereva, D. M. Shcherbakova, a O. A. Dontsova, "Telomerase: Structure, functions, and activity regulation", *Biochem. Mosc.*, roč. 75, č. 13, s. 1563–1583, dec. 2010.

[8] E. Sýkorová a J. Fajkus, "Structure—function relationships in telomerase genes", *Biol. Cell*, roč. 101, č. 7, s. 375–406, júl. 2009.

[9] R. A. Wu, H. E. Upton, J. M. Vogan, a K. Collins, "Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis", *Annu. Rev. Biochem.*, roč. 86, č. 1, s. 439–460, jún. 2017.

[10] H. D. M. Wyatt, S. C. West, a T. L. Beattie, "InTERTpreting telomerase structure and function", *Nucleic Acids Res.*, roč. 38, č. 17, s. 5609–5622, sep. 2010.

[11] S. Rouda a E. Skordalakes, "Structure of the RNA-Binding Domain of Telomerase: Implications for RNA Recognition and Binding", *Structure*, roč. 15, č. 11, s. 1403–1412, nov. 2007.

[12] A. Wojtyla, M. Gladych, a B. Rubis, "Human telomerase activity regulation", *Mol. Biol. Rep.*, roč. 38, č. 5, s. 3339–3349, jún. 2011.

[13] J. L. Osterhage a K. L. Friedman, "Chromosome End Maintenance by Telomerase", *J. Biol. Chem.*, roč. 284, č. 24, s. 16061–16065, jún. 2009.

[14] Q. Zhang, N.-K. Kim, a J. Feigon, "Architecture of human telomerase RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 108, s. 20325–20332, aug. 2011.

[15] M. A. Beilstein, A. E. Brinegar, a D. E. Shippen, "Evolution of the Arabidopsis telomerase RNA", *Front. Genet.*, roč. 3, 2012.

[16] H. Xu, A. D. L. Nelson, a D. E. Shippen, “A Transposable Element within the Non-canonical Telomerase RNA of Arabidopsis thaliana Modulates Telomerase in Response to DNA Damage”, *PLOS Genet.*, roč. 11, č. 6, s. e1005281, jún. 2015.

[17] S. Miwa a G. Saretzki, “Telomerase and mTOR in the brain: the mitochondria connection”, *Neural Regen. Res.*, roč. 12, č. 3, s. 358, 2017.

[18] J. Majerská, E. Sýkorová, a J. Fajkus, “Non-telomeric activities of telomerase”, *Mol. Biosyst.*, roč. 7, č. 4, s. 1013, 2011.

[19] P. Baumann, “Pot1, the Putative Telomere End-Binding Protein in Fission Yeast and Humans”, *Science*, roč. 292, s. 1171–1175, máj. 2001.

[20] K. A. Lewis a D. S. Wuttke, “Telomerase and Telomere-Associated Proteins: Structural Insights into Mechanism and Evolution”, *Structure*, roč. 20, s. 28–39, jan. 2012.

[21] W. Palm a T. de Lange, “How Shelterin Protects Mammalian Telomeres”, *Annu. Rev. Genet.*, roč. 42, č. 1, s. 301–334, dec. 2008.

[22] H. Xin, D. Liu, a Z. Songyang, “The telosome/shelterin complex and its functions”, *Genome Biol.*, roč. 9, s. 232, sep. 2008.

[23] R. Donev, Ed., *Protein-Protein interactions in human disease. Part B: ...* Amsterdam Boston Heidelberg London: Elsevier, Academic Press, 2018.

[24] D. Broccoli, A. Smogorzewska, L. Chong, a T. de Lange, “Human telomeres contain two distinct Myb–related proteins, TRF1 and TRF2”, *Nat. Genet.*, roč. 17, s. 231–235, okt. 1997.

[25] R. M.Stansel, “T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3’ telomeric overhang”, *EMBO J.*, roč. 20, s. 5532–5540, okt. 2001.

[26] J. A. Stewart, M. F. Chaiken, F. Wang, a C. M. Price, “Maintaining the end: Roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation”, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, roč. 730, č. 1–2, s. 12–19, feb. 2012.

[27] R. Diotti a D. Loayza, “Shelterin complex and associated factors at human telomeres”, *Nucleus*, roč. 2, č. 2, s. 119–135, mar. 2011.

[28] M. Cohn, “OB Fold Contributes to Telomere Maintenance”, *Structure*, roč. 21, č. 1, s. 3–4, jan. 2013.

[29] J. Sun *et al.*, “Structural bases of dimerization of yeast telomere protein Cdc13 and its interaction with the catalytic subunit of DNA polymerase α”, *Cell Res.*, roč. 21, č. 2, s. 258–274, feb. 2011.

[30] C. Bryan, C. Rice, M. Harkisheimer, D. C. Schultz, a E. Skordalakes, “Structure of the Human Telomeric Stn1-Ten1 Capping Complex”, *PLoS ONE*, roč. 8, č. 6, s. e66756, jún. 2013.

[31] C. Rice a E. Skordalakes, “Structure and function of the telomeric CST complex”, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, roč. 14, s. 161–167, apr. 2016.

[32] M. Kuchar, “Plant telomere-binding proteins”, *Biol. Plant.*, roč. 50, č. 1, s. 1–7, mar. 2006.

[33] E. V. Shakirov, Y. V. Surovtseva, N. Osbun, a D. E. Shippen, “The Arabidopsis Pot1 and Pot2 Proteins Function in Telomere Length Homeostasis and Chromosome End Protection”, *Mol. Cell. Biol.*, roč. 25, č. 17, s. 7725–7733, sep. 2005.

[34] P. Procházková Schrumpfová, Š. Schořová, a J. Fajkus, “Telomere- and Telomerase-Associated Proteins and Their Functions in the Plant Cell”, *Front. Plant Sci.*, roč. 7, 2016.

[35] Z. N. Karamysheva, Y. V. Surovtseva, L. Vespa, E. V. Shakirov, a D. E. Shippen, “A C-terminal Myb Extension Domain Defines a Novel Family of Double-strand Telomeric DNA-binding Proteins in *Arabidopsis*”, *J. Biol. Chem.*, roč. 279, č. 46, s. 47799–47807, nov. 2004.

[36] M. Kuchař a J. Fajkus, “Interactions of putative telomere-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* : identification of functional TRF2 homolog in plants”, *FEBS Lett.*, roč. 578, č. 3, s. 311–315, dec. 2004.

[37] P. Schrumpfová, M. Kuchař, G. Miková, L. Skříš ovská, T. Kubičárová, a J. Fajkus, “Characterization of two *Arabidopsis thaliana* myb-like proteins showing affinity to telomeric DNA sequence”, *Genome*, roč. 47, č. 2, s. 316–324, apr. 2004.

[38] I. Mozgová, P. P. Schrumpfová, C. Hofr, a J. Fajkus, “Functional characterization of domains in AtTRB1, a putative telomere-binding protein in Arabidopsis thaliana”, *Phytochemistry*, roč. 69, č. 9, s. 1814–1819, jún. 2008.

[39] M. Dvořáčková, P. Rossignol, P. J. Shaw, O. A. Koroleva, J. H. Doonan, a J. Fajkus, “AtTRB1, a telomeric DNA-binding protein from Arabidopsis, is concentrated in the nucleolus and shows highly dynamic association with chromatin”, *Plant J.*, roč. 61, č. 4, s. 637–649, feb. 2010.

[40] P. P. Schrumpfová, M. Kuchař, J. Paleček, a J. Fajkus, “Mapping of interaction domains of putative telomere-binding proteins AtTRB1 and AtPOT1b from *Arabidopsis thaliana*”, *FEBS Lett.*, roč. 582, č. 10, s. 1400–1406, apr. 2008.

[41] P. Procházková Schrumpfová *et al.*, “Telomere repeat binding proteins are functional components of Arabidopsis telomeres and interact with telomerase”, *Plant J.*, roč. 77, č. 5, s. 770–781, mar. 2014.

[42] P. P. Schrumpfová, I. Vychodilová, J. Hapala, Š. Schořová, V. Dvořáček, a J. Fajkus, “Telomere binding protein TRB1 is associated with promoters of translation machinery genes in vivo”, *Plant Mol. Biol.*, roč. 90, č. 1–2, s. 189–206, jan. 2016.

[43] Y. Zhou, B. Hartwig, G. Velikkakam James, K. Schneeberger, a F. Turck, "Complementary activities of TELOMERE REPEAT BINDING proteins and Polycomb Group complexes in transcriptional regulation of target genes", *Plant Cell*, s. TPC2015-00787-RA, dec. 2015.

[44] W. K. Lee a M. H. Cho, "Telomere-binding protein regulates the chromosome ends through the interaction with histone deacetylases in *Arabidopsis thaliana*", *Nucleic Acids Res.*, roč. 44, č. 10, s. 4610–4624, jún. 2016.

[45] S. A. Rensing *et al.*, "The Physcomitrella Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants", *Science*, roč. 319, č. 5859, s. 64–69, jan. 2008.

[46] E. V. Shakirov, P.-F. Perroud, A. D. Nelson, M. E. Cannell, R. S. Quatrano, a D. E. Shippen, "Protection of Telomeres 1 Is Required for Telomere Integrity in the Moss *Physcomitrella patens*", *Plant Cell*, roč. 22, č. 6, s. 1838–1848, jún. 2010.

[47] C. G. Price *et al.*, "Following Phenotypes: An Exploration of Mendelian Genetics Using *Arabidopsis* Plants", *Am. Biol. Teach.*, roč. 80, č. 4, s. 291–300, apr. 2018.