Uloga telomernog područja u starenju i bolestima čovjeka

Prepeluh, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:961832

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Uloga telomernog područja u starenju i bolestima čovjeka

The role of telomeric sequence in ageing and human diseases

SEMINARSKI RAD

Ivan Prepeluh

Preddiplomski studij Znanosti o okolišu

Mentor: prof.dr.sc. Vlatka Zoldoš

Zagreb, 2014.

SADRŽAJ

1. Uvod……....2
2. Struktura telomera čovjeka.……...…3
3. Hayflickov limit…….5
4. Replikacija linearnih molekula DNA predstavlja problem…….….6
5. Telomeraza……....7
6. Besmrtne stanice……...8
7. Sindromi povezani s preuranjenim starenjem.……..……..…9
8. Sažetak…….....10
9. Summary……..10
10. Literatura……...11

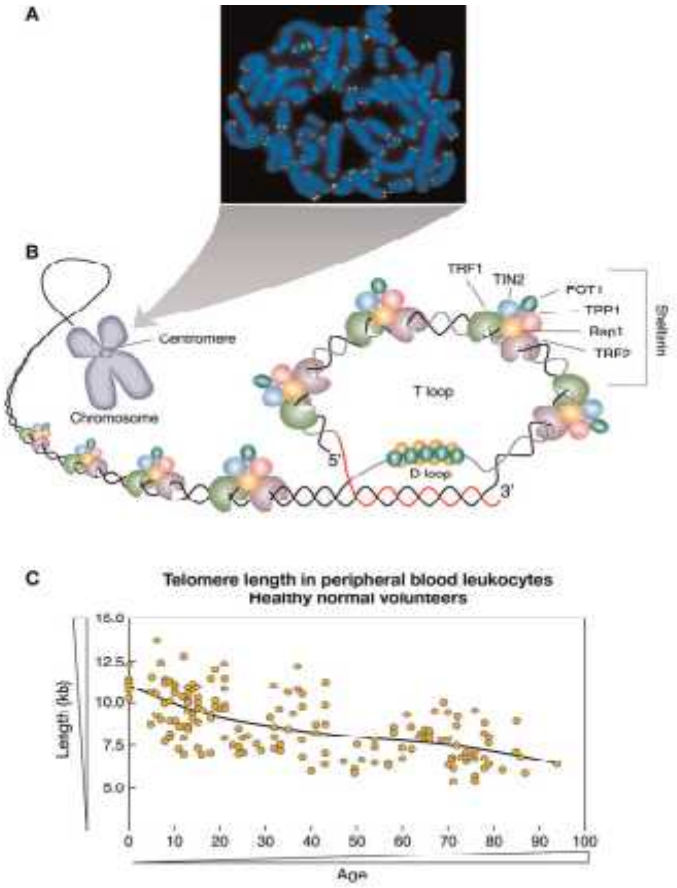
1. Uvod

Dok su genomi svih prokariota cirkularni, genom čovjeka i ostalih eukariota je organiziran u linearne strukture (kromosome), čiji krajevi završavaju sa jedinstvenom nukleotidnom sekvencom, poznatom kao telomerna sekvenca. Telomere (od grč. *telos,* što znači kraj) ne označavaju samo krajeve kromatida, već imaju nekoliko bitnih funkcija koje su neophodne za očuvanje stabilnosti i integriteta cijelog genoma. Njihova funkcija je da štite kromosome od razgradnje egzonukleazama, omoguće pravilnu replikaciju kromosoma te da spriječe sljepljivanje krajeva kromosoma (stvaranje prstenastih kromosoma) i kromosomskih rearanžmana koji su povezani s rakom i raznih abnormalnosti te starenja.

Tridesetih godina prošlog stoljeća, Hermann Muller i Barbara McClintock, prilikom analiziranja fragmenata odlomljenih kromosoma kukuruza vidjeli su da fragmenti imaju tendenciju da se međusobno spoje što nije karakteristika, normalnih, intaktnih kromosoma. Međusobno su došli do zaključka da pri tome važnu ulogu imaju krajevi kromosoma, koje je Muller nazvao telomerama (Calado i Young, 2012). Alexey Olovnikov, 1973. godine je predložio model po kojem stanice gube mali dio DNK nakon svake replikacije zbog nemogućnosti DNA polimeraze da u potpunosti replicira krajeve kromosoma (telomere) te da postepena delecija telomernih ponavljanja dovodi do stanične smrti (Harley, 1991). Strukturu telomera prvi su otkrili Elizabeth Bleckburn i Joesph Gall, 1978. godine izoliravši telomere iz stanica vrste *Tetrahymena*. Strukturu telomera sačinjava visoko ponavljajuća nekodirajuća nukleotidna sekvenca – satelitna DNA. Nakon što su izolirali telomerne sekvence čovjeka 1988. godine, znanstvenici su uvidjeli da je ona visoko konzervirana unutar eukariota. U čovjeka se telomerna sekvenca TTAGGG, ponavlja 300 do 5,000 puta na kraju svakog kromosoma (Tamarin, 2002).

2. Struktura telomera čovjeka

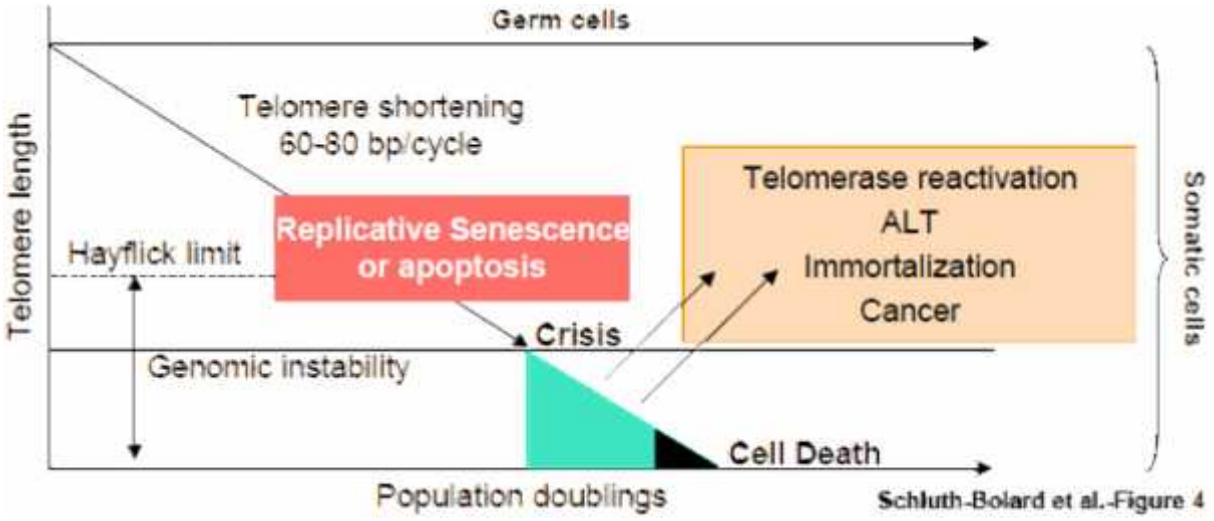
Telomere se sastoje od heksamernih nukleotidnih sekvenca koje se ponavljaju od nekoliko stotina do nekoliko tisuća puta (TTAGGG kod ljudi) na krajevima svakog kromosoma(sl. 1A). Eukariotska dvolančana DNA je različite dužine te je jedan lanac malo duži od drugoga. Taj lanac je bogat G-nukelotidima na 3' kraju. Kod čovjeka se ponavlja G-bogata sekvenca AGGGTT. Iako se struktura telomera intenzivno istražuje, najnoviji dokazi upućuju na formiranje velikih dvolančanih omči. Takve omče ili petlje još se nazivaju T- petlje (telomerne petlje), a veličina im ovisi o duljini telomera. Znanstvenici smatraju da jednolančana regija na samom kraju strukture čini povratnu petlju , te da nastaje dvolančana DNA s drugim dijelom ponavljajućeg slijeda, pri čemu dolazi do premještanja dijelova izvorne telomerne dvolančane strukture (Berg, Tymoczko, Stryer, 2007). Uklanjanje RNA početnice ostavlja slobodnim G-bogati jednolančani 3'-kraj telomerne DNK koji onda napravi invaziju u duplex DNA te formira malu D-petlju (eng. *displacement loop*) (Griffith i sur., 1999). U nastajanju i stabilizaciji petlja sudjeluju posebni proteini koji se vežu na jednolančanu i dvolančanu telomernu DNA. Ti proteini (engl. *shelterin proteins*) štite telomere od nepravilne replikacije DNA kada se telomere ne produljuju (sl. 1B). Neki od tih proteina olakšavaju produljivanje telomerne DNA kada na nju djeluje enzim telomeraza. Kod ljudi ti proteini čine kompleks(eng. *shelterin complex*) od šest proteina: TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 i RAP1 (Kibe i sur., 2009). Telomerne sekvence ne sadrže gene, zahvaljujući čemu prilikom njihovog skraćivanja tijekom svaki diobe stanice nema gubitka genskog materijala. Prilikom rođenja leukocitne telomere su dovoljno duge da omoguće 200 dioba prije nego što u potpusnosti nestanu. Prilikom starenja, ljudske stanice (i one izolirane u kulturi) se dijele znatno rjeđe (sl. 1C). Kada duljina telomera dosegne kritičnu točku, jezgra šalje stanici signal da zaustavi daljnju proliferaciju, izazivajući stanično starenje (eng. *senescence*) ili apoptozu (stanična smrti). Ta pojava se naziva Hayflickov limit ili Hayflickov fenomen.



Slika 1: (A) Telomere detektirane pomoću fluorescentne hibridizacije *in situ*(FISH) na krajevima metafaznih kromosoma. (B) Shematski prikaz kromosoma i telomera koji prikazuje da se teleomere sastoje od nekoliko tisuća tandemski ponovljenih sljedova od po šest nukleotida. Kompleks proteina koji štite telomernu DNA (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 i RAP1). (C) Graf prikazuje smanjenje duljine telomera prilikom starenja, pogotovo u prva dva desetljeća života. (Calado i Young, 2012).

3.Hayflickov limit

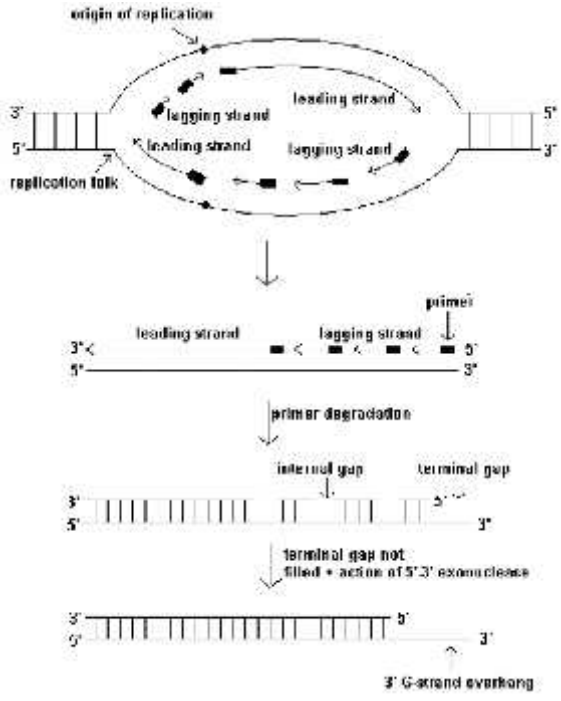
Skraćivanje telomera limitira broj dioba koji stanica može postići prije nego što dosegne kritičnu točku i prestane se dijeliti. Zbog toga se duljina telomera može smatrati, mitotičkim satom“, tj. kao mjera proliferacije stanice. Nakon dosegnute kritične točke dvije su moguće sudbine stanice. Stanica može ući u proces starenja ili u proces apoptoze. Ukoliko se stanica nastavi dijeliti telomere gube svoju osnovnu funkciju te dolazi do gubitka gena u subtelomernom području, a što je još važnije, dolazi do kromosomske nestabilnosti što dovodi do rekombinacije između kromosoma, rearanžmana te maligne transformacije. Kada populacija stanica uđe u proces starenja, više se ne može dijeliti te se to odnosi i na starenje cijelog organizam. L. Heyflick je objasnio da ovaj mehanizam spriječava genetsku nestabilnost. Telomerno skraćivanje sprječava pojavu malignog fenotipa u starijim stanicama na način da smanjuje broj mitotskih dioba stanice. Paradoksalno, skraćivanje telomera onemogućuje osnovnu funkciju telomera, te pridonosi nastanku malignog fenotipa (Calado i Young, 2012). Stanice germinativne linije (uključujući embrionalne stanice), neke matične stanice odraslog organizma te tumorske stanice su imortalne jer imaju enzim telomerazu koja održava duljinu telomera na krajevima kromosoma tih stanica.



Slika 2. Duljina telomera i moguća sudbina stanice

4. Replikacija linearnih molekula DNA predstavlja problem

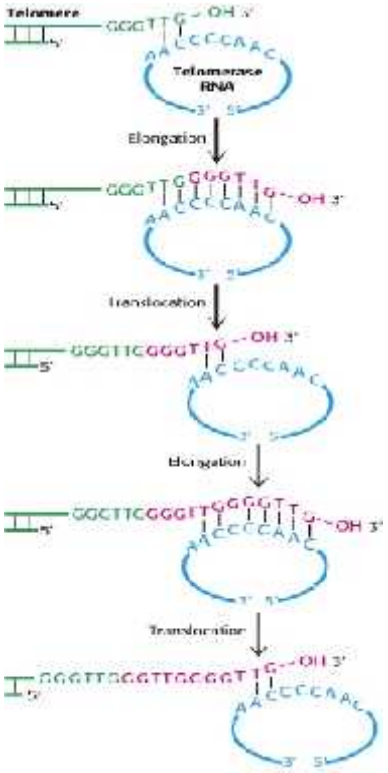
Replikacijske polimeraze poput DNA- polimeraze III istodobno sintetiziraju trome i vodeće lance u replikacijskim viljuškama. Sve DNA-polimeraze kreću se u smjeru 3'-5'. DNA polimeraza III započinje sintezu vodećeg lanca počevši od RNA-početnice, koju je načinila primaza u smijeru 3'-5' (Berg i sur., 2012). Za razliku od sinteze vodećeg lanca koja može teći do kraja, sinteza tromog lanca ide u smjeru 5'-3', prilikom koje DNA polimeraza koristi kratke sekvence RNA koje se ponašaju kao početnice te se vežu za tromi lanac. To dovodi do stvaranja Okazakijevih fragenata u tromom lancu. Kada se zadnja početnica pripoji, DNA-polimeraza i DNA-ligaza se udruže kako bi prevele RNA u DNA i povezali fragmente. Jazove među fragmentima nedovršenog tromog lanca popunjava DNA-polimeraza I. Taj enzim također upotrebljava svoju 5'-3' egzonukleaznu aktivnost za odstranjivanje RNA-početnice koja se nalazi ispred polimerizacijskog mjesta. Kada replikacijska viljuška dođe do kraja kromosoma, nema više kalupa da bi se sinteza nastavila te 5'-kraj novo sintetiziranog lanca nije kompletan. Svaki od sestrinskih kromosoma imat će nakon mitotske diobe skraćene telomere. Lanac koji zaostaje je bogati G-nukleotidima na 3' kraju.



Slika 3. Problem replikacije telomerne DNA

5. **Telomeraza**

Tijekom istraživanja telomera, Elizabeth Blackburn i Carol Greider su primjetile da se u nekim proliferirajućim stanicama telomerna sekvence dodaje *de novo* uz pomoć enzima kojeg su nazvali telomeraza (Blackburn i Gall). Prilikom pokusa kojeg su izvele Blackburn i Greider, izoliranom enzimu dodana je početnica koja završava na GGTT u prisutnosti deoksiribonukleozid-trifosfata te je nastala sekvenca GGTTAGGGTT, ali i duža sekvenca GGTTAGGGTTAGGGTT. Otkriveno je da enzim sadrži molekulu RNA, koja služi kao kalup za produljivanje lanca bogatog G-nukleotidima (Berg i sur., 2012). Segment RNA kojeg sadrži telomeraza je integrali dio enzima veličine 160 pb te sadrži regiju koja je komplementarna lancu bogatom G-nukleotidima na krajevima telomerne sekvence. Telomeraza je specijalizirana reverzna transkriptaza koja koristi vlastitu RNA kao početnicu da polimerizira nukleotide telomerne DNA. Telomeraza je ribonukleoprotein koji se sastoji od dvije komponente; RNA segmenta (TERC,eng. *Telomere RNA Component*) i proteinske komponente (TERT,eng. *Telomere Reverse Transcriptase*) koja ima katalitičku aktivnost.



Slika 4. Mehanizam sinteze telomerne DNA na lancu koji je bogat G-nukleotidima

6. Besmrtne stanice

Kod praživotinja, kvasca i ostalih jednostaničnih organizama, telomeraza je aktivna, održavajući duljinu krajeva kromosoma. Te stanice teoretski imaju potencijal da se vječno dijele. Za razliku od jednostaničnih organizama, u stanicama viših organizama telomeraza nije aktivna te se krajevi kromosoma skraćuju svakom mitotskom diobom. Kada telomere u stanicama dosegnu kritičnu duljinu, stanice se prestanu dijeliti. Ukoliko dođe do aktivacije telomeraze u stanicama te se telomere produlje, jezgra šalje signal stanici da se nastavi dijeliti. Stanice koje sadrže telomerazu, su stanice germinativne linije (uključujući embrionalne stanice), neke matične stanice odraslog organizma te tumorske stanice. Telomeraza čovjeka je izolirana iz linije besmrtnih stanica (HeLa) cervikalnog raka. Stanice tumora za produljivanje telomera koriste dva mehanizma; aktivnost telomeraze i alternativni put produljivanja telomera (ALT, eng. *Alternative Lengthening of Telomeres*). Put alternativnog produljivanja telomera, njegove komponente i regulacija nisu još u potpunosti objašnjeni, no smatra se da ALT ovisi o rekombinaciji između telomera (Calado i Young, 2012). Saznanja o mehanizmima pomoću kojih stanice raka produljuju svoje telomere, primijenjena su u kliničkom liječenju pacijenata oboljelih od malignih bolesti. Ključni mehanizam pomoću kojeg se onemogućuje stanici tumora da se dalje dijeli je inaktivacija telomerazne aktivnosti (Tamarin, 2002). Kandidat za anti-tumorsku terapiju je transkripcijski kontrolni element TelRNA/TERRA koji inhibira aktivnost telomeraze (Zoldoš, 2010).

7. Sindromi povezani s preuranjenim starenjem

Ubrzano skraćivanje telomera je povezano sa načinom života (pušenje, nezdrava prehrana, i stres). Mnoga su istraživanja pokazala da se oštećenja DNA nakupljaju s vremenom u matičnim stanicama i organima kao što su mozak, jetra i bubrezi te uzrokuju starenje cjelokupnog organizma. Također, otkriveno je prilikom pokusa na sisavcima, da zdrava i uravnotežena prehrana pridonosi smanjenju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*) i samim time smanjenju oksidativnog stresa, koji se smatra jedim od glavnih uzročnika oštećenja strukture DNA (Calado i Young, 2012). Smanjenje oštećenja telomerne DNA pospješuje životni vijek jedinke. Prilikom oštećenja telomerne DNA dolazi do mutacija koje vode k raznim patofiziološkim stanjima – progerijama. Progeroidni sindromi (PS) su skupina rijetkih genskih poremećaja koji vode k bržem starenju organizma. Kod Alzheimerove i Parkinsonove bolesti koje također spadaju u ovu skupinu bolesti dolazi do oštećenja samo jedne skupine tkiva (unimodalni progeroidni sindromi). Progeroidni sindromi obično se odnose na one bolesti u kojima je zahvaćeno više vrsta tikiva. Najproučavaniji progeroidni sindromi su: Wernerov sindrom, Hutchinsnon-Gilford sindrom, Bloom sindrom, Cockayne sindrom te Rothmund-Thomson sundrom. Kod svih progerija je ustanovljena ista mutacija koje dovodi do defekta mehanizma popravka DNA. Fenotip osoba s progerijama često varira, no svima je zajednička jedna karakteristika; starost, tj. izgled stare osobe (Navarro, Cau, Levy, 2006).



Slika 5. Wernerov sindrom



Slika 6. Hutchinsnon-Gilford sindrom

8. Sažetak

Krajevi kromosoma čovjeka i ostalih eukariota završavaju telomerama, koje imaju ključnu ulogu u očuvanju stabilnosti cijelog genoma. Eukariotski kromosomi su linearne strukture te prilikom replikacije njihovih telomera u svakoj mitotskoj diobi dolazi do gubitka dijela telomerne sekvence. Kada duljine telomera dosegnu kritičnu točku (Hayflickov limit), stanica se više ne dijeli te ulazi u fazu starenja (eng. *senescence*) ili ulazi u proces stanične smrti (apoptoza). Skraćivanje telomera štiti stanicu od maligne transformacije, smanjujući potencijal stanice da se dijeli, no isto tako smanjenjem duljine, telomere gube svoju funkciju te može doći do nastanka malignog fenotipa. Maligne stanice imaju vječni replikacijski potencijal zahvaljujući enzimu telomerazi koji služi kao kalup za produljivanje lanca bogatog G-nukleotidima. Telomerno područje ne sadrži gene, no njegovim nestankom dolazi do razaranja stukture subtelomernog područja koje je bogato genima. Oštećenjem DNA subtelomernog područja dolazi do raznih mutacija u genima koje imaju kao posljedicu nastanak raznih bolesti i abnormalnih fenotipova.

9. Summary

The ends of human and eukaryotic chromosomes terminate with telomeres, which play the key role in preserving the stability of the entire genome. Eukaryotic chromosomes are linear structures and during replication of their telomeras in each mitotic division, a part of their telomeric sequence is lost. When telomere length reaches a critical point (Hayflick limit), the cell no longer divides and enteres the phase of ageing (senescence) or enteres the process of cell death (apoptosis). Shortening of telomeres protects the cell from a malignant phenotype, reducing potential for cells to divide, however, with length loss, temorese lose their function and that can lead to the malignant phenotype. Malignant cells have eternal replication potential thanks to the telomerase enzyme that serves as a template for extending the chain of G-rich nucleotides. Telomeric area does not contain genes, but its disappearence leads to destruction of subtelomeric area which contains many genes. Because of damage in DNA of subtelomeric region there are many variety of mutations in genes that can occur and lead to various diseases and abnormal phenotypes.

10. Literatura

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2013): Biokemija (Prijevod prof.dr.sc Ivana Weygand Đurašević, prof.dr.sc. Branimir Jernej, prof.dr.sc. Željko Kućan). Školska knjiga, Zagreb, str. 803-804

Tamarin, H.R. (2002): Principles of Genetics. Eds. Mc Graw-Hill, str. 454-456

Calado, R., Young, N. (2012): Telomeres in disease. F1000 Medicine Reports 2012, 4:8, Sao Paulo

Kibe,T., Osawa,G.A., Keegan, C.E, de Lange,T. (2009): Telomere Protection by TPP1 Is Mediated by POT1a and POT1b. Laboratory for Cell Biology and Genetics, The Rockefeller University, New York, NY

Counter, C.M., Avilion,A., LeFeuvre, C.E., Stewart,N.G., Greider,C.W., Harley, C.B., Bacchetti, S. (1992): Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. The Embo Journal, str 1912-1929

Harley, C.B. (1991): Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? Department of Biochemistry, McMaster University, Canada

Griffith, J.D., Comeau, L., Rodenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Hoss, H., de Lange, T. (1999): Telomeres Do D-Loop –T-Loop. Cell, str 503-514

Navarro,C.L., Cau,P., Levy, N. (2006): Molecular bases of progeroid syndromes.

Blackburn, E.H., Gall, J.G. (1978): A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena.