

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/um:nbn:hr:217:961832>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



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 ovjeka
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 ovjeka.....	3
3. Hayflickov limit.....	5
4. Replikacija linearnih molekula DNA predstavlja problem.....	6
5. Telomeraza.....	7
6. Besmrtnе stanice.....	8
7. Sindromi povezani s preuranjenim starenjem.....	9
8. Sažetak.....	10
9. Summary.....	10
10. Literatura.....	11

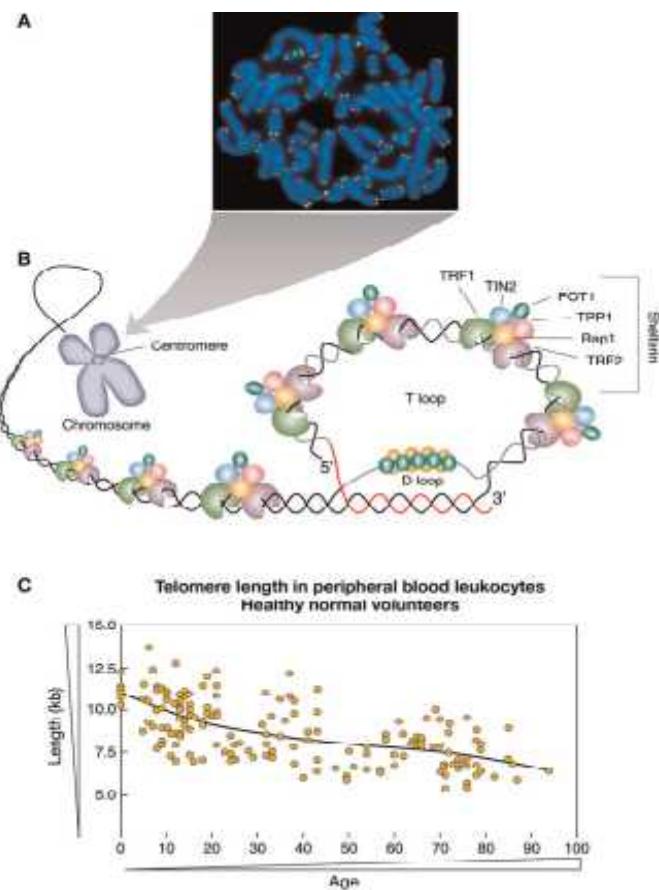
1. Uvod

Dok su genomi svih prokariota cirkularni, genom ovjeka i ostalih eukariota je organiziran u linearne strukture (kromosome), iji krajevi završavaju sa jedinstvenom nukleotidnom sekvencom, poznatom kao telomerna sekvenca. Telomere (od gr. *telos*, što znači kraj) ne označavaju samo krajeve kromatida, već imaju nekoliko bitnih funkcija koje su neophodne za održavanje stabilnosti i integriteta cijelog genoma. Njihova funkcija je da štite kromosome od razgradnje egzonukleazama, omogućavajući pravilnu replikaciju kromosoma te da spriječi 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 Blackburn i Joesph Gall, 1978. godine izoliravši telomere iz stanica vrste *Tetrahymena*. Strukturu telomera sa injavom visoko ponavljaju a ne kodiraju a nukleotidna sekvenca – satelitna DNA. Nakon što su izolirali telomerne sekvence ovjeka 1988. godine, znanstvenici su uvidjeli da je ona visoko konzervirana unutar eukariota. U ovjeka se telomerna sekvenca TTAGGG, ponavlja 300 do 5,000 puta na kraju svakog kromosoma (Tamarin, 2002).

2. Struktura telomera ovjeka

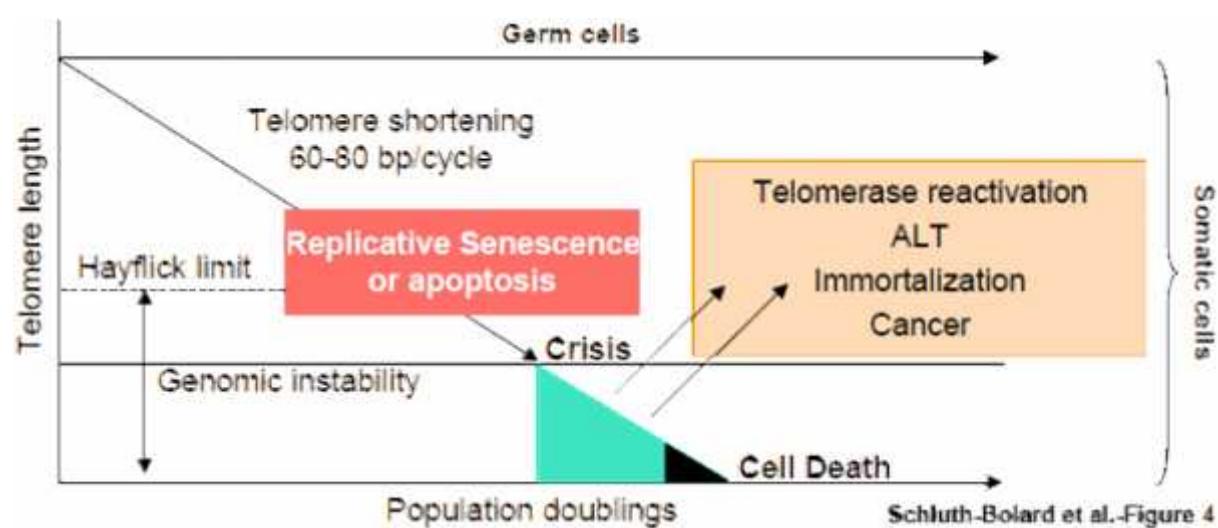
Telomere se sastoje od heksamernih nukleotidnih sekvenca koje se ponavljaju od nekoliko stotina do nekoliko tisuća puta (TTAGGG kod ljudi) na krajevima svakog kromosoma (sl. 1A). Eukariotska dvolanana DNA je različite dužine te je jedan lanac malo duži od drugoga. Taj lanac je bogat G-nukelotidima na 3' kraju. Kod ovjeka se ponavlja G-bogata sekvenca AGGGTT. Iako se struktura telomera intenzivno istražuje, najnoviji dokazi upućuju na formiranje velikih dvolanana regija. Takve forme ili petlje još se nazivaju T-petlje (telomerne petlje), a veličina im ovisi o duljini telomera. Znanstvenici smatraju da jednolanana regija na samom kraju strukture ima povratnu petlju, te da nastaje dvolanana DNA sa drugim dijelom ponavljajućeg slijeda, pri čemu dolazi do premještanja dijelova izvorne telomerne dvolanane strukture (Berg, Tymoczko, Stryer, 2007). Uklanjanje RNA početnice ostavlja slobodnim G-bogati jednolanani 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 jednolanu i dvolanu 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 sekvene ne sadrže gene, zahvaljujući čemu prilikom njihovog skraćivanja tijekom svaki diobe stanice nema gubitka genskog materijala. Prilikom rasta leukocitne telomere su dovoljno duge da omoguće 200 dioba prije nego što u potpunosti nestanu. Prilikom starenja, ljudske stanice (i one izolirane u kulturi) se dijele znatno rjeđe (sl. 1C). Kada duljina telomera dosegne kritičnu točku, jekra šalje stanicama signal da zaustavi daljnju proliferaciju, izazivajući stanično starenje (eng. *senescence*) ili apoptozu (stanična smrt). Ta pojava se naziva Hayflickov limit ili Hayflickov fenomen.



Slika 1: (A) Telomere detektirane pomo u fluorescentne hibridizacije *in situ* (FISH) na krajevima metafaznih kromosoma. (B) Shematski prikaz kromosoma i telomera koji prikazuje da se teleomere sastoje od nekoliko tisu a 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 desetlje a života. (Calado i Young, 2012).

3.Hayflickov limit

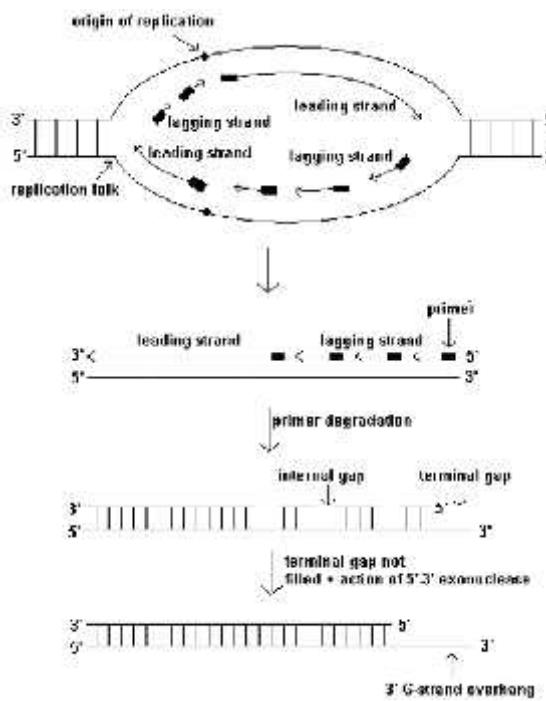
Skra ivanje telomera limitira broj dioba koji stanica može posti i prije nego što dosegne kritičnu dužinu i prestane se dijeliti. Zbog toga se duljina telomera može smatrati, mitotim somatom“, tj. kao mjeru proliferacije stanice. Nakon dosegнуте kritične dužine dvije su moguće sudbine stanice. Stanica 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 ući u proces starenja, više se ne može dijeliti te se to odnosi i na starenje cijelog organizma. L. Hayflick je objasnio da ovaj mehanizam sprijeava genetsku nestabilnost. Telomerno skra ivanje sprjeava pojavu malignog fenotipa u starijim stanicama na način da smanjuje broj mitotskih dioba stanice. Paradoksalno, skra ivanje telomera onemogućuje osnovnu funkciju telomera, te pridonosi nastanku malignog fenotipa (Calado i Young, 2012). Stanice germinativne linije (uključujući i embrionalne stanice), neke mati neke stanice odraslog организма te tumorske stanice su imortalne jer imaju enzim telomerazu koja održava duljinu telomera na krajevima kromosoma tih stanica.



Slika 2. Duljina telomera i moguće sudbine stanice

4. Replikacija linearnih molekula DNA predstavlja problem

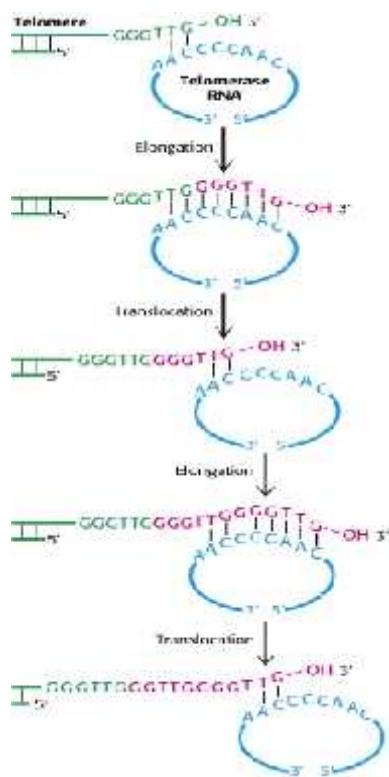
Replikacijske polimeraze poput DNA- polimeraze III istodobno sintetiziraju trome i vode lance u replikacijskim viljuškama. Sve DNA-polimeraze kre u se u smjeru 3'-5'. DNA polimeraza III zapo inje sintezu vode eg lanca po evši od RNA-po etnice, koju je na inila primaza u smjeru 3'-5' (Berg i sur., 2012). Za razliku od sinteze vode eg lanca koja može te i do kraja, sinteza tromog lanca ide u smjeru 5'-3', prilikom koje DNA polimeraza koristi kratke sekvene RNA koje se ponašaju kao po etnice te se vežu za tromi lanac. To dovodi do stvaranja Okazakijevih fragenata u tromom lancu. Kada se zadnja po etnica pripoji, DNA-polimeraza i DNA-ligaza se udruže kako bi prevele RNA u DNA i povezali fragmente. Jazove me u fragmentima nedovršenog tromog lanca popunjava DNA-polimeraza I. Taj enzim također upotrebljava svoju 5'-3' egzonukleaznu aktivnost za odstranjivanje RNA-po etnice koja se nalazi ispred polimerizacijskog mesta. 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 proliferiraju im stanicama telomerna sekvenca 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 po etnici 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 integralni 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 po etnicu 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. Besmrтne stanice

Kod praživotinja, kvasca i ostalih jednostani nih organizama, telomeraza je aktivna, održavaju i duljinu krajeva kromosoma. Te stanice teoretski imaju potencijal da se vje no dijeli. Za razliku od jednostani nih organizama, u stanicama viših organizama telomeraza nije aktivna te se krajevi kromosoma skra uju svakom mitotskom diobom. Kada telomere u stanicama dosegnu kriti nu duljinu, stanice se prestanu dijeliti. Ukoliko do e do aktivacije telomeraze u stanicama te se telomere prodluje, jezgra šalje signal stanicu da se nastavi dijeliti. Stanice koje sadrže telomerazu, su stanice germinativne linije (uklju uju i embrionalne stanice), neke mati ne stanice odraslog organizma te tumorske stanice. Telomeraza ovjeka je izolirana iz linije besmrtnih stanica (HeLa) cervikalnog raka. Stanice tumora za prodljivanje telomera koriste dva mehanizma; aktivnost telomeraze i alternativni put prodljivanja telomera (ALT, eng. *Alternative Lengthening of Telomeres*). Put alternativnog prodljivanja telomera, njegove komponente i regulacija nisu još u potpunosti objašnjeni, no smatra se da ALT ovisi o rekombinaciji izme u telomera (Calado i Young, 2012). Saznanja o mehanizmima pomo u kojih stanice raka prodluju svoje telomere, primjenjena su u klini kom lije enju pacijenata oboljelih od malignih bolesti. Klju ni mehanizam pomo u kojeg se onemogu uje stanci 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 preuranjem starenjem

Ubrzano skra ivanje telomera je povezano sa na inom života (pušenje, nezdrava prehrana, i stres). Mnoga su istraživanja pokazala da se ošte enja DNA nakupljaju s vremenom u mati nim stanicama i organima kao što su mozak, jetra i bubrezi te uzrokuju starenje cjelokupnog organizma. Tako er, 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 uzro nika ošte enja strukture DNA (Calado i Young, 2012). Smanjenje ošte enja telomerne DNA pospješuje životni vijek jedinke. Prilikom ošte enja telomerne DNA dolazi do mutacija koje vode k raznim patofiziološkim stanjima – progerijama. Progeroidni sindromi (PS) su skupina rijetkih genskih poreme aja koji vode k bržem starenju organizma. Kod Alzheimerove i Parkinsonove bolesti koje tako er spadaju u ovu skupinu bolesti dolazi do ošte enja samo jedne skupine tkiva (unimodalni progeroidni sindromi). Progeroidni sindromi obično se odnose na one bolesti u kojima je zahva eno više vrsta tkiva. Najprou avaniji 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 esto varira, no svima je zajedni ka jedna karakteristika; starost, tj. izgled stare osobe (Navarro, Cau, Levy, 2006).



Slika 5. Wernerov sindrom



Slika 6. Hutchinsnon-Gilford sindrom

8. Sažetak

Krajevi kromosoma ovjeka i ostalih eukariota završavaju telomerama, koje imaju ključnu ulogu u održavanju 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). Kratčenje telomera štiti stanicu od maligne transformacije, smanjujući i potencijal stanicu da se dijeli, no isto tako smanjenjem duljine, telomere gube svoju funkciju te može doći do nastanka malignog fenotipa. Maligne stotine imaju veću nižu replikacijsku potencijal zahvaljujući enzimu telomerazi koji služi kao kalup za prodljivanje lanca bogatog G-nukleotidima. Telomerno područje ne sadrži gene, no njegovim nestankom dolazi do razaranja strukture 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 telomeres 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 enters the phase of ageing (senescence) or enters 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, they 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 disappearance 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 uraševi , prof.dr.sc. Branimir Jernej, prof.dr.sc. Željko Ku an). 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.