

Struktura telomere i uloga telomernih proteina

Markulin, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:645998>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-05-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

**Struktura telomere i uloga telomernih proteina
Structure of telomere and role of telomeric proteins**

Dora Markulin
Preddiplomski studij molekularne biologije
Undergraduate Study of Molecular Biology
Mentor: doc. dr. sc. Maja Matulić

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Struktura telomera.....	2
3. Šelterin: proteinski kompleks koji oblikuje i štiti humane telomere.....	4
3. 1. Podjedinice shelterina: TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 i POT1.....	5
3. 1. 1. TRF1.....	5
3. 1. 2. TRF2.....	5
3. 1. 3. TIN2 i Rap1.....	9
3. 1. 4. TPP1.....	9
3. 1. 5. POT1.....	10
3. 2. Uloga šelterina.....	11
4. Nespecifični telomerni proteini	14
5. Represija homologne rekombinacije	14
6. Funkcija poli (ADP- riboze) polimeraze u kontroli duljine telomera i stabilnosti kromosoma.....	15
7. TERRA.....	15
8. Literatura.....	16
9. Sažetak.....	19
10. Summary.....	19

1. Uvod

Telomere su specijalizirane strukture na krajevima eukariotskih kromosoma koje pomažu u stabilizaciji i zaštiti krajeva linearnih krajeva DNA od degradacije. Cijela struktura na krajevima kromosoma obuhvaća tzv. subtelomerni, heterokromatinski dio i telomerni dio s uzastopnim ponavljanjem heksanukleotidne sekvence koja oblikuje omčastu strukturu uz pomoć specifičnih proteina.

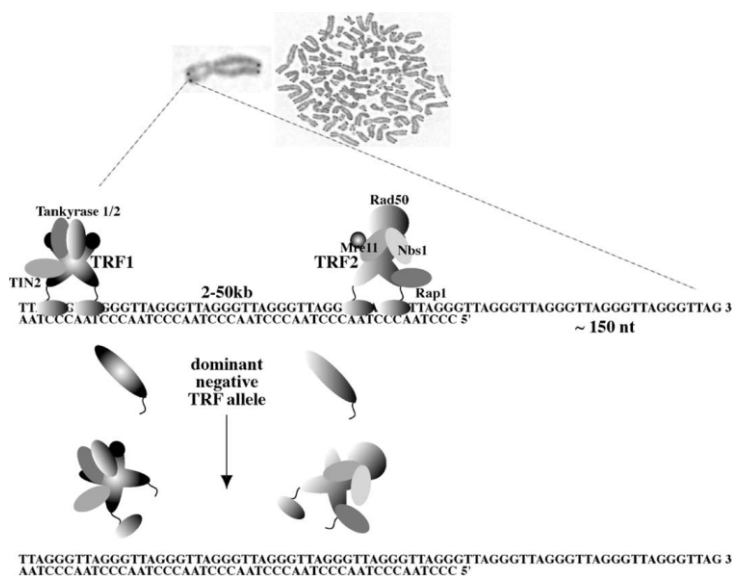
Osim zaštitne uloge, telomere imaju bitnu ulogu u samoj regulaciji staničnog života i smrti. Naime, krajevi se kromosoma tijekom svakog staničnog ciklusa skraćuju, zbog prirode mehanizma djelovanja DNA polimeraze. Budući da polimeraza djeluje u smjeru 5'-3', sinteza zaostajućeg lanca na replikacijskoj viljušci teče diskontinuirano, povezivanjem kratkih DNA fragmenata čija polimerizacija zahtijeva nastanak kratkih RNA klica. Na krajevima linearnih kromosoma nema mjesta za kratku RNA klicu potrebnu za zadnji Okazakijev fragment, pa će ostati mala jednolančana sekvenca nereplicirana. Nakon niza generacija, telomere skraćene na oko 3 kb uzrokuju trajno zaustavljanje ciklusa i tzv. replikativno starenje. Ovaj mehanizam predstavlja zaštitu od nekontrolirane stanične proliferacije i karcinogeneze. Ujedno, duljina telomere je u takvim stanicama «mjerilo» duljine životnog vijeka i «brojač» staničnih dioba.

Za razliku od somatskih stanica koje stare skraćivanjem telomera, postoje stanice koje mogu produžavati svoje telomere i tako izbjeći proces starenja te postati besmrtni. To su matične i tumorske stanice koje eksprimiraju enzim telomerazu. Telomeraza prepoznaje 3' kraj jednolančane telomerne sekvence i produžuje ga, koristeći RNA kalup koji je njen sastavni dio. Na dovoljno produženoj jednolančanoj DNA bit će moguća sinteza odsječka zaostajuće niti pomoću DNA polimeraze. Po mehanizmu djelovanja telomeraza je reverzna transkriptaza, RNA ovisna DNA polimeraza, a njena je ekspresija u stanici strogo regulirana.

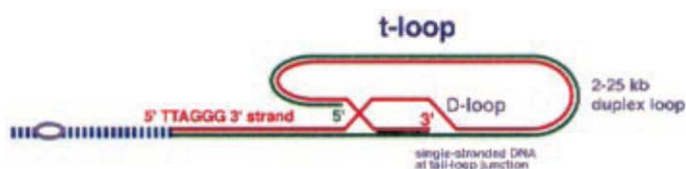
2. Struktura telomera

Da bi mogle vršiti svoju ulogu, te da ih stanica ne bi prepoznala kao dvolančani lom, telomere imaju specifičan oblik i strukturu. Po svom sastavu su nukleoproteinski kompleks sastavljen od DNA i specifičnih proteina. Kod sisavaca za telomere su karakteristična TTAGGG ponavljanja (Slika 1.) (Karlseder *i sur.*, 2002.). Kod ljudi duljina je takvih telomernih sljedova od 3 do 20 kb, dok kod miša može biti duljine do 150 kb. Ukupna duljina telomerne DNA je promjenjiva, ali i specifična za svaku vrstu. Ponavljajući sljedovi dvolančane DNA završavaju tako jednolančanim produžetkom 3' lanca bogatog gvaninom

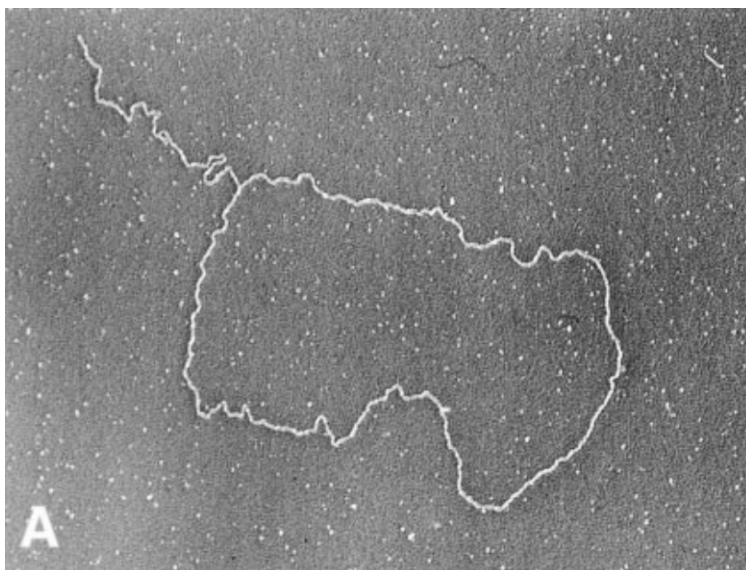
dugim 75-300 kb nukleotida. Takav kraj stvara petlju invazijom u područje telomerne DNA te nastaje tzv. T petlja (Slika 2.). Veličina petlje varira, od 0.3 kb kod tripanosome do 30 kb u mišjim stanicama (Griffith *i sur.*, 1999.; Munoz- Jordan *i sur.*, 2001.; Murti i Prescott, 1999.). Još nije poznata točna struktura pri bazi T petlje, ali se zna da postoji kratki segment jednolančane DNA vjerojatno predstavljajući D petlju TTAGGG ponavljanja koja su istisnuta prilikom invazije 3' kraja (de Lange i Petrini, 2000.; Griffith *i sur.*, 1999.). Cijela struktura pokazuje sličnost strukturama nastalim mehanizmom homologne rekombinacije. Telomerni proteini stabiliziraju T petlju telomera specifično se vežući za dvolančanu ili jednolančanu telomernu sekvencu. Osim specifičnih telomernih proteina, ovdje se nalaze i mnogi proteini uključeni u popravak dvolančanih lomova. Danas se intenzivno istražuju mehanizmi koji štite neoštećene telomere od aktivacije puteva popravka.



Slika 1. Shematski prikaz humanih telomera. (Karlseder *i sur.*, 2002.).



Slika 2. Shematski prikaz T petlje (van Steensel *i sur.*, 1998.)



Slika 3. Elektronsko mikroskopska snimka T petlje. (Griffith *i sur.*, 1999.)

U somatskim humanim stanicama telomere se skraćuju prilikom svake diobe stanice. Kad se telomere ljudi skrate na duljinu od oko 3 kb, šalju signal za prestanak diobi i replikativno starenje, te prestaje stanična proliferacija. Međutim, matične stanice, kao i tumorske, imaju sposobnost produživanja telomera i time besmrtnosti i upravo je u njima eksprimirana telomeraza. Sam proces replikativnog starenja bi se mogao tako protumačiti kao potencijalni mehanizam supresije tumorigeneze budući da se stanice starenjem prestaju dijeliti (Karlseder *i sur.*, 2002.).

U slučaju da je funkcija telomera poremećena, može uslijediti potencijalno letalan odgovor na oštećenje DNA, ili, s druge strane, aktivnosti povezane s popravkom DNA mogu ugroziti integritet kromosomskih krajeva i postoji mogućnost velike nestabilnosti genoma. Za sada nije u potpunosti poznato kako se struktura telomernih krajeva razlikuje od mjesta oštećenja DNA i kako telomere štite krajeve kromosoma od aktivnosti DNA popravka.

Zaštita kromosomskih krajeva kod ljudi primarno ovisi o telomernom proteinu TRF2, te stvaranje telomerne kape uključuje formaciju telomerne petlje ili T petlje.

3. Šelterin: proteinski kompleks koji oblikuje i štiti humane telomere

TTAGGG ponavljanja, koja dodaje telomeraza, određuju krajeve humanih kromosoma. Proteinski kompleks koji se sastoji od šest proteina specifičnih za telomere udružuje se zajedno s takvom sekvencom i štiti krajeve kromosoma, te je nazvan šelterin. Tri od šest podjedinica kompleksa direktno prepoznaje TTAGGG ponavljanja, a to su TRF1, TRF2 i POT1. Oni su međusobno povezani pomoću tri dodatna proteina TIN2, TPP1 i Rap1 pri čemu nastaje kompleks. Kako su svi proteini kompleksa međusobno povezani protein-protein interakcijama, šelterin ima sposobnost prepoznavanja telomerne DNA s najmanje pet domena koje vežu DNA (jedna u POT1, te u dimerima TRF1 i TRF2). Upravo kao posljedica toga, šelterin ima jedinstvenu sposobnost da prepozna telomere između svih drugih krajeva DNA. Bez zaštitne uloge šelterina, telomere više nisu sakrivene od nadzora oštećenja DNA i krajevi kromosoma se nepravilno procesiraju putevima popravka DNA. Podaci istraživanja pokazuju da šelterin nije statična strukturalna komponenta telomere, nego proteinski kompleks koji ima remodelirajuću ulogu DNA i reagira s proteinima popravka.

3. 1. Podjedinice shelterina: TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 i POT1

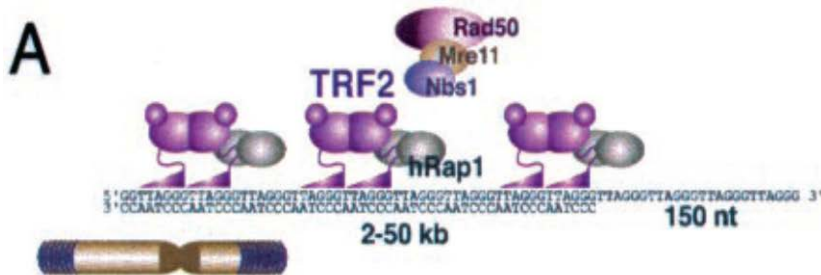
3. 1. 1. TRF1

Humani TRF1 protein je izoliran na temelju njegove specifičnosti *in vitro* za dvolančana TTAGGG ponavljanja karakteristična za telomere vertebrata (Zhong *i sur.*, 1992.; Chong *i sur.*, 1995.). Prilikom vezanja za TTAGGG ponavljanja ne pokazuje jaku kooperativnost (Bianchi *i sur.*, 1997.). Za nastanak homodimera, odgovorna je velika konzervirana domena blizu N-kraja proteina. Kao i TRF2, zajedno se s drugim proteinima veže za telomernu DNA, a otkriveno je da veže Tin2, tankirazu 1 i 2, PINX1. U *in vitro* uvjetima, može savinuti za oko 120°, zaokružiti i spariti telomerna ponavljanja što može potaknuti pakiranje telomera *in vivo* (Bianchi *i sur.* 1997.; Griffith *i sur.* 1998.). Također se ponaša kao negativni regulator održavanja telomera sprječavajući pristup telomerazi.

3. 1. 2. TRF2

TRF2 je identificiran kao paralog TRF1 (Bilaud *i sur.*, 1997.; Broccoli *i sur.*, 1997.). Smatra se glavnim faktorom u telomernoj zaštiti. Omata sve humane telomere u svim stadijima staničnog ciklusa (Slika 4.) (Bilaud *i sur.*, 1997.; Broccoli *i sur.*, 1997.). Smatra se da je takav mali, svugdje eksprimiran protein, prisutan u više od 100 kopija po

kromosomskom kraju, te se veže direktno na tandemski raspored TTAGGG ponavljanja. Važnost TRF2 u zaštiti telomera pokazana je eksperimentom u kojem je mutirana telomeraza dodavala sekvence na kromosomske krajeve bez veznih mjesta za TRF2, što je rezultiralo fenotipom sličnom onom kao kod TRF2 inhibicije.



Slika 4. Shematski prikaz telomera sisavaca koje sadrže TRF2 kompleks. (Huffman *i sur.*, 2000. ; Makarov *i sur.*, 1997.; McElligott i Wellinger, 1997.; Wright *i sur.*, 1997.).

Inhibicija TRF2 se postiže koristeći dominantni negativni alel TRF2^{ΔBΔM}. Ovaj alel se veže za endogeni TRF2 i formira inaktivni heterodimer koji nema mogućnost vezanja za DNA (Slika 5.) (van Steensel *i sur.*, 1998.). Da bi mogle vršiti svoju ulogu, te da ih stanica ne bi prepoznala kao dvolančani lom, telomere imaju specifičan oblik i strukturu. TRF2^{ΔBΔM} blokira akumulaciju TRF2 na krajevima kromosoma i uspješno uklanja TRF2 i proteine koji s njim reagiraju s telomere (Li *i sur.*, 2000.; van Steensel *i sur.*, 1998.; Zhu *i sur.*, 2000.), ali ne utječe na druge telomerne faktore koji se vežu za DNA kao što je to TRF1.



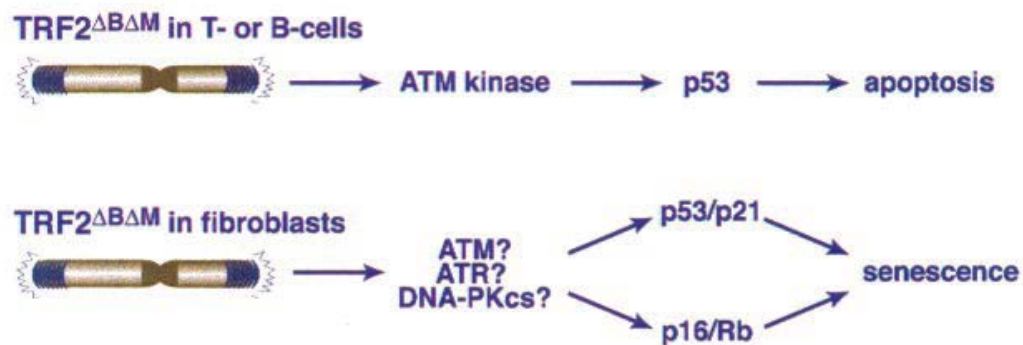
Slika 5. Inhibicija TRF2 uzrokovana dominantnim negativnim alelom kojemu nedostaje N- terminalna domena i DNA vezujuća domena na C- terminalnom dijelu. (van Steensel *i sur.*, 1998.).

Nedostatak TRF2 ne dovodi samo do drastičnih molekularnih i kromosomskih defekata, nego utječe i na rast stanice. Ovisno o tipu stanica, odgovor može biti apoptoza ili starenje (Karlseder *i sur.* 1999.).

Disfunkcija telomera

Stanične posljedice disfunkcije telomera: apoptoza i starenje

Kod većine staničnih tipova, uključujući primarne limfocite, inhibicija TRF2 dovodi do direktne indukcije apoptoze (Slika 6.) (Karlseder *i sur.*, 1999.). Apoptoza je popraćena stabilizacijom i aktivacijom proteina p53 rezultirajući ekspresijom njegovih nizvodnih meta p21 i Bax. Osim p53, u proces prepoznavanja telomera kao dvolančanog loma, kao inicijator uključena je i ATM kinaza. Ukoliko se inhibicija TRF2 dogodi u stanicama u G1 fazi ciklusa, apoptoza se odvija prije sinteze DNA i replikacije telomera.



Slika 6. Posljedice inhibicije TRF2 i gubitka zaštite telomera (Karlseder *i sur.*, 1999.).

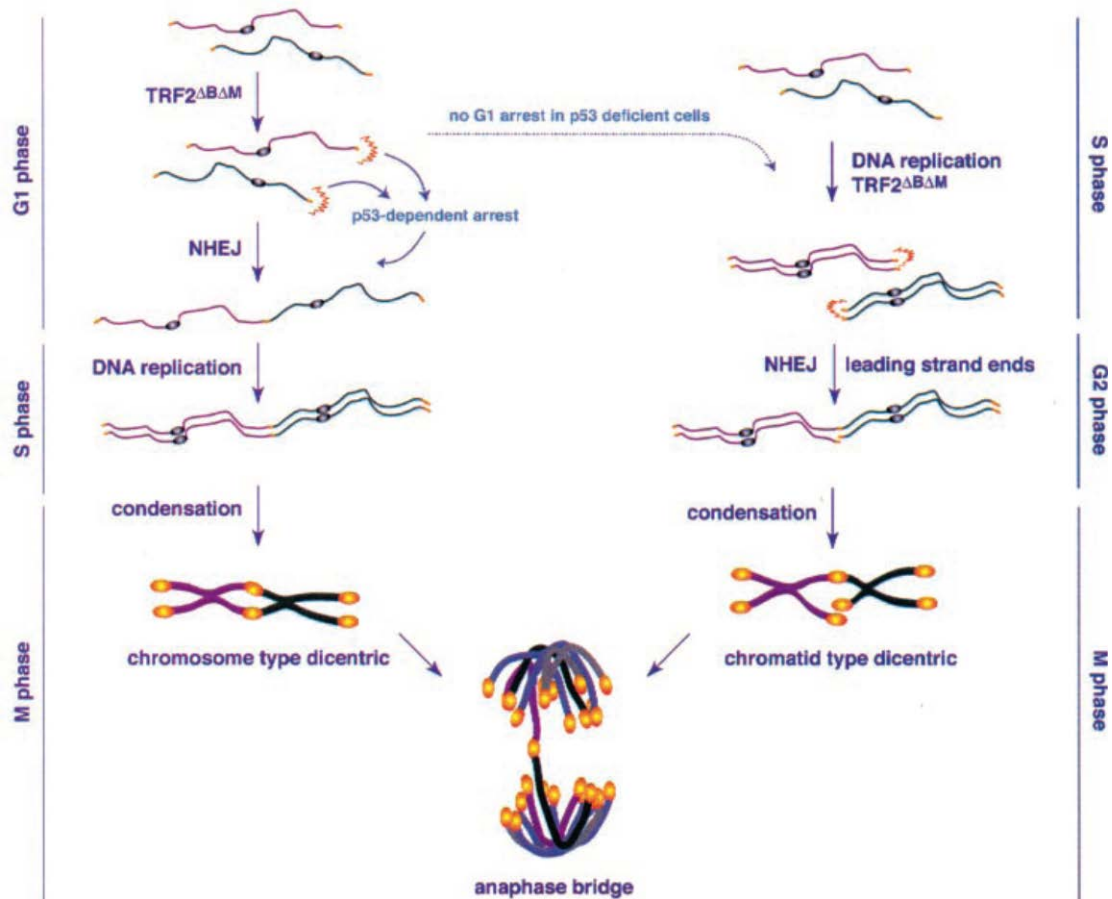
Kod humanih fibroblasta, s druge strane, inhibicija TRF2 rezultira češće starenjem nego apoptozom (Slika 6.) (Karlseder *i sur.*, 1999.). Takve stanice pokazuju sve morfološke i molekularne znakove starenja, uključujući velike i plosnate stanične oblike, česte pojave više jezgara, 2n ili 4n sadržaj DNA, te se bojaju markerom za starenje tzv. SA-β-gal. Put koji dovodi do takvog odgovora slični indukciji starenja uzrokovane skraćivanjem telomera.

Posljedice na molekularnoj razini: gubitak 3' telomerne jednolančane DNA i NHEJ

Jedna od posljedica inhibicije TRF2 je i fuzija telomera dvaju kromosoma (van Steensel *i sur.*, 1998.). Takve fuzionirane telomere se mogu detektirati u genomskim blotovima kao novoformirani DNA fragmenti dvostruko veće molekularne težine od originalnih telomera. Fuzije nastaju ligacijom DNA, pretpostavlja se nehomolognim sparivanjem krajeva (NHEJ). To je dokazano eksperimentom u kojem je nedostatak ligaze IV u mišjim stanicama smanjio postotak fuzioniranih telomera (Smogorzewska *i sur.*, 2002.). Fuzija kromosoma nastala kao posljedica nefunkcionalnog TRF2 pokazala je da stanica ostaje i bez jednolančane 3' telomerne sekvence, pa bi tako bila bolji supstrat za NHEJ (Huffman *i sur.*, 2000.; Makarov *i sur.*, 1997.; McElligott i Wellinger, 1997.; Wright *i sur.*, 1997.).

Kromosomske posljedice: fuzija kromosomskih krajeva i odgovarajuće aberacije

Telomere koje u stanicama ekspimiraju TRF2^{ΔBΔM} postaju fuzogene i omogućuju povezivanje krajeva kromosoma koji se mogu detektirati kao dicentrični ili multicentrični kromosomi u metafaznoj ploči (van Steensel *i sur.*, 1998.). Fuzija telomera se može dogoditi prije i poslije sinteze DNA (Slika 7.). Ukoliko se fuzija kromosoma odvije prije duplikacije kromosoma, obje kromatide metafaznog kromosoma će se povezati s drugim kromosomom rezultirajući tzv. dicentikom kromosomskog tipa, dok dicentrik kromatidskog tipa nastaje kada se fuzija odvije nakon sinteze DNA i samo se jedna od dvije kromatide spaja s drugim telomerom. S obzirom da se mnoge stanice s disfunkcionalnim telomerama zaustave prije mitoze, samo se dio fuzija može detektirati analizom metafaznih kromosoma. I doista, molekularne analize pokazuju da i do 20% telomera fuzionira nakon uklanjanja TRF2, dok je tek oko 1% kromosomskih krajeva, promatranih u metafaznim stanicama, fuzionirano (van Steensel *i sur.*, 1998.).



Slika 7. Kromosomske posljedice inhibicije TRF2 (van Steensel *i sur.*, 1998.).

Dicentični kromosomi su obično nestabilni prilikom mitoze. Ukoliko se centromere, koje su dio kromosoma fuzioniranih preko krajeva, vežu za suprotne polove, nastat će anafazni most (Slika 7.), te da bi se stanična dioba nastavila, potreban je lom u kromosomu ili pukotina u povezujućim mikrotubulima.

S obzirom da je TRF2 stabilizator T petlji, manjak telomernog TRF2 dovodi do otvaranja T petlji što može potaknuti starenje. Ukoliko se na krajevima telomera nalazi veća količina TRF2 zbog prekomjerne ekspresije proteina, kratke telomere mogu biti zaštićenije i odgoditi starenje (Karlseder *i sur.* 1999.).

Uloga interakcije TRF2 s drugim proteinima

Iako TRF2 može samostalno stvarati T petlje *in vitro*, vrlo je vjerojatno da su za njegovu ulogu na telomerama u uvjetima *in vivo* potrebne interakcije s drugim proteinima. Poznato je nekoliko TRF2 vezujućih proteina (Slika 4.).

Humani Rap1 pridonosi regulaciji duljine telomera (Li *i sur.*, 2000.) pri čemu se ne veže za DNA već za TRF2 protein.

Drugi protein koji interagira s TRF2 je Mre11 kompleks koji se sastoji od proteina Mre11, Rad50 i Nbs1 (Zhu *i sur.*, 2000.). Moguće je da Mre11 kompleks sudjeluje u formiranju jednolančanog telomernog produžetka (de Lange i Petrini, 2000.; Diede i Gottschling, 2001.) i time u nastajanju, održavanju i procesiranju T petlji, iako njegova nukleazna aktivnost ima 3'-5' polarnost *in vitro* (Paull i Gellert, 1998.).

3. 1. 3. TIN2 i Rap1

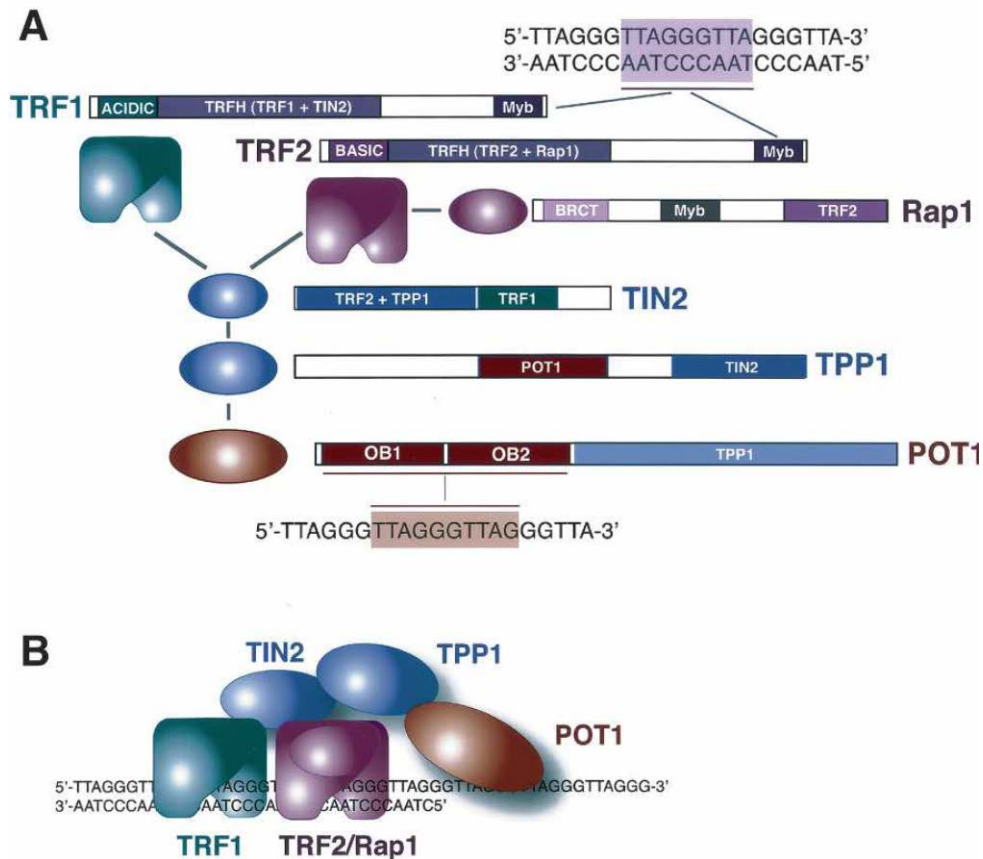
TIN2 i Rap 1 su sastavni dio šelterina telomera. Nađeni su u kompleksu s TRF1 i TRF2 (Kim *i sur.*, 1999.; Li *i sur.*, 2000.). Za TIN2 se kaže da je zakovica šelterina jer veže TPP1/ POT1 za TRF1 i TRF2. Njegova sposobnost da veže TRF1 i TRF2 omogućuje da nastane veza koja pridonosi stabilnosti telomere (Liu *i sur.*, 2004a.; Ye *i sur.*, 2004a.). Također može i pojačati neke efekte TRF1 vezane uz strukturu telomere (Kim *i sur.* 2003.).

3. 1. 4. TPP1

Ovaj je protein ranije nosio nazive TINT1, PTOP, PIP1 (Houghtaling *i sur.* 2004.; Liu *i sur.* 2004.; Ye *i sur.* 2004.) i ima ulogu u povezivanju POT1 s TINT1- TRF1 kompleksom. Djeluje kao negativni regulator duljine telomere čije uklanjanje olakšava njeno produživanje.

3. 1. 5. POT1

POT1 protein je najviše konzervirana komponenta šelterina, a identificiran je na temelju homologije sekvence s faktorima koji se vežu na krajeve telomera kod jednostaničnih eukariota. Ima jaku specifičnost za jednolančanu 5'-(T)TAGGGTTAG-3' sekvencu, jednolančani produžetak telomerne sekvence, a preko ostalih se proteina kompleksa (TPP1) specifično lokalizira na telomerama (Slika 8.) (Lei *i sur.*, 2004.; Loayza *i sur.*, 2004.). Njegovo bi vezanje moglo stabilizirati T petlju i spriječiti početak rekombinacije ili prepoznavanje DNA enzimima popravka (Hockemeyer *i sur.*, 2005.).



Slika 8. Šelterin. (A) Prikaz šest podjedinica šelterina, njihove glavne strukture, proteinskih interakcija i DNA vezujućih mjesta. POT1 se može vezati za 3' kraj i na unutarnjim mjestima. (B) Shematski prikaz šelterina na telomernoj DNA. Iako se POT1 veže i za 3' kraj, zbog jednostavnosti je prikazano samo njegovo vezanje za mjesto bliže dvolančanoj telomernoj DNA. (Lei *i sur.*, 2004.; Loayza *i sur.*, 2004.).

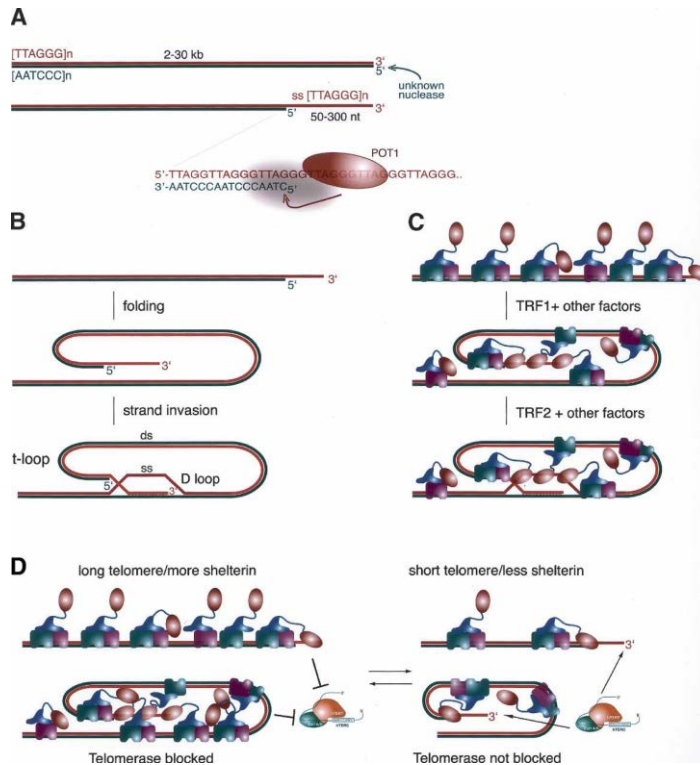
Šelterin je u izobilju na krajevima kromosoma, ali se ne akumulira na drugim mjestima, te je i njegova funkcija ograničena na područje telomera. Prisutan je na telomerama tijekom staničnog ciklusa. S druge strane, postoje funkcionalno važni proteini na telomerama koji nisu dio šelterina (Tablica 1.).

Tablica 1. Primjeri proteina koji nisu dio šelterina na humanim telomerama.
(napravljeno prema de Lange 2005.).

Proteinski kompleksi	Netelomerna funkcija	Efekti na telomerama	Interakcije
Mre11/ Rad50/ Nbs1	rekombinacijski popravak senzor oštećenja DNA	homologna rekombinacija	povezan sa šelterinom
ERCC1/ XPF	NER, unakrsni popravak 3' endonukleaza	procesiranje jednolančanog kraja nakon gubitka TRF2	povezan sa šelterinom
helikaza WRN	migracija ogranka	deficijencija rezultira gubitkom telomerne vodeće niti	TRF2
helikaza BLM	migracija ogranka represija prekriženja	nastanak/ rezolucija T petlji	TRF2
DNA- PK	NHEJ	deficijencija uzrokuje fuziju krajeva	povezan sa šelterinom
PARP- 2	BER	nepoznato	TRF2
tankiraza	uloga u mitozu	pozitivni regulator telomerne duljine preko inhibicije TRF1	TRF1
Rad51D	nepoznato, možda HR	deficijencija dovodi do fuzijskog fenotipa	nepoznato

3. 2. Uloga šelterina

Uloga šelterina je višestruka: determinira strukturu kraja telomera, utječe na nastajanje T petlji, te kontrolira sintezu telomerne DNA pomoću telomeraze (Slika 9.).



Slika 9. Šelterin regulira pristup telomeraze telomeri (preuzeto iz de Lange 2005.)

Način za koji se smatra da šelterin utječe na strukturu telomerne DNA je stvaranje T petlji (Slika 9.) (Griffith *i sur.*, 1999.; Stansel *i sur.*, 2001.). Telomere posjeduju jednolančana ponavljanja TTAGGG na 3' kraju (Makarov *i sur.*, 1997.). Za tu se sekvencu smatra da napada dvolančanu telomernu DNA pri čemu se baze sparuju s C lancem i G lanac se istisne. Rezultat invazije je dvolančana lariatna struktura, odnosno T petlja (Slika 9.). *In vitro* je pokazano da TRF2 može remodelirati umjetne telomerne supstrate u T petlje (Griffith *i sur.*, 1999.; Stansel *i sur.*, 2001.). Pretpostavlja se da su u *in vivo* uvjetima uz TRF2 potrebni i drugi faktori, moguće oni koji su uključeni u rekombinacijski popravak (Tablica 1.) (de Lange i Petrini 2000.).

Glavno svojstvo T petlje je što je njezin krajnji dio uvučen. Veličina kružnog dijela vjerojatno nije toliko bitna s obzirom da su u humanim stanicama pronađene i velike i male T petlje. Šelterin utječe na strukturu 3' kraja. Kada je inhibiran TRF2 ili POT1, ukupna količina jednolančanih TTAGGG ponavljanja se smanji za 30%-50% (van Steensel *i sur.*, 1998.; Hochmeyer *i sur.*, 2005.). U slučaju inhibicije TRF2, gubitak jednolančane TTAGGG DNA posredovan je nukleazom ERCC1/ XPF (Zhu *i sur.*, 2003.). Vezanje POT1 za jednolančanu DNA može spriječiti njenu nukleolitičku degradaciju (Hockmeyer *i sur.* 2005.; Lei *i sur.*

2005.; Yang *i sur.* 2005.).

Jednolančani 3' krajevi telomera nastaju kao posljedica potrebe za RNA klicom pri DNA polimeriziranju. Međutim, na telomeri dolazi do dodatnog nukleolitičkog procesiranja 5' kraja. Dok je 3' kraj više ili manje nasumično pozicioniran unutar TTAGGG ponavljanja, 5' kraj je precizno smješten (Slika 9. A). Gotovo svi humani kromosomi sadrže sekvencu 3'-AATCCCAATC-5' što dokazuje da je nukleolitičko procesiranje regulirano. Kada je POT1 inhibiran, 5' krajevi gube svoju homogenost i tada su im završni nukleotidi slučajni (Hockemeyer *i sur.*, 2005.).

Šelterin oblikuje telomere i na način da održava duljinu telomere (Slika 9. D). Kod kvasaca i sisavaca telomere se održavaju negativnom povratnom spregom koja blokira aktivnost telomeraze na individualnim krajevima kromosoma. Pretpostavlja se da kod dugih telomera, takav cis- djelujući mehanizam onemogućava djelovanje telomeraze. POT1 bi mogao imati ulogu u regulaciji pristupa telomeraze. Mutant POT1 koji se ne veže za jednolančanu DNA dovodi do nastanka vrlo dugačkih telomera (Loazya i de Lange 2003.).

Šelterin bi morao imati i mehanizam za sprječavanje detekcije telomera od strane nadzora za oštećenje DNA. Zanimljiva je mogućnost da telomere stvaraju nukleosomalnu organizaciju koja sakriva krajeve kromosoma.

Podjedinica šelterina TRF2 može reagirati s ATM kinazom (Karlseder *i sur.*, 2004.). TRF2 se veže za regiju na ATM koja sadrži Ser 1981 koji se autofosforilira kao odgovor na oštećenje DNA (Bakkenist i Kastan 2003.). Moguće je da je šelterin, tj. TRF2, inhibitor aktivacije ATM na telomerima (Karlseder *i sur.*, 2004.).

4. Nespecifični telomerni proteini

Niz proteina popravka oštećenja DNA postoji na telomerama, međutim su neaktivni i ne okidaju odgovor stanice i zaustavljanje ciklusa. Tu se nalaze enzimi homologne rekombinacije (NMR, Rad51) i NHEJ (DNA PK sa svoja tri dijela), ATM, PARP- 1 i dr. Telomere se trebaju štititi kako od NHEJ, tako i od homologne rekombinacije.

5. Represija homologne rekombinacije

Prvi tip homologne rekombinacije je rekombinacija između sestrinskih telomera nazvana T-SCE (Telomere Sister Chromatid Exchange). T-SCE može biti štetna za stanice ukoliko izmjenjujuće sekvence nisu jednake po duljini. Jedna se sestrinska telomera može

produljiti na račun druge sestrinske telomere.

Druga reakcija homologne rekombinacije za koju se smatra da prijete telomerama je nazvana T petlja homologne rekombinacije (Wang *i sur.*, 2004.). T petlje su ugrožene kod razrješavanja Hollidayeve veze pomoću rezolvaze ukoliko se baze 5' kraja telomere spare s istisnutom petljom (D petlja). Pomicanjem ukriženja u smjeru centromere može nastati dvostuka Hollidayeva veza i razrješenje takve strukture krossoverom dovelo bi do delecije cijelog segmenta petlje ostavljajući drastično skraćenu telomeru na kraju kromosoma.

Moguće postoji i treći tip homologne rekombinacije koja ima štetne posljedice na krajeve kromosoma, rekombinacija između telomere i intersticijske telomerne DNA. Kromosomska unutrašnja DNA nije česta u humanim stanicama, ali se u stanicama drugih vertebrata takve sekvence nalaze u izobilju duž kromosoma. Rekombinacija između telomera i takvih elemenata može dovesti do terminalnih delecija, ekstrakromosomskih fragmenata, inverzija i translokacija.

6. Funkcija poli (ADP- riboze) polimeraze u kontroli duljine telomera i stabilnosti kromosoma

Poli ADP ribozilacija je proces dodavanja jedinica ADP- riboze na supstrat, kataliziran enzimima iz obitelji poli (ADP- riboza) polimeraza (PARP). Jedan je dio članova te obitelji uključen u modifikaciju histona i regrutaciju enzima popravka DNA kod oštećenja. S druge strane, specifične PARP polimeraze sudjeluju u regulaciji duljine telomere. Smatra se da tankiraza, PAR polimeraza, modificira TRF1, smanjuje njegov afinitet prema telomeri i omogućava pristup telomerazi i produžavanje telomera (Smith *i sur.*, 1998.). PARP-1 je međutim uključen u procese popravka i održavanje integriteta genoma, ali također i u procese održavanja telomera.

7. TERRA

Najnovija istraživanja su dokazala da na telomerama postoji TERRA (telomeric repeat containing RNA), velika heterogena nekodirajuća RNA koja stvara cjelovitu komponentu telomernog heterokromatina, a sastoji se od subtelomernih i telomernih sekvenci. Sve testirane individualne telomere sisavaca imaju sposobnost i doista proizvode transkripte TERRA, te je TERRA eksprimirana u većini tkiva (Azzalin *i sur.*, 2007.; Azzalin i Lingner 2008.; Schoeftner i Blasco 2008.). Transkripcija TERRA se odvija na većini ili na svim krajevima kromosoma kao odgovor na promjene u duljini telomera, te je regulirana pomoću

RNA nadzornih faktora. Nalazi se u jezgri i transkribira u smjeru od centromere prema telomeri pokazujući da se mjesto početka transkripcije nalazi unutar subtelomerne sekvence. Transkripcija se odvija pomoću RNA polimeraze II (RNAPII). Iako RNAPII ima značajnu funkciju u poticanju transkripcije TERRA, rezultati pokazuju da možda postoji druga RNA polimeraza (RNAPI ili RNAPIII) koja bi potencijalno mogla imati funkciju u telomernoj transkripciji kod sisavaca. Kao i većina produkata transkripcije pomoću RNAPII, TERRA je također poliadenilirana na 3' kraju (Azzalin i Lingner 2008.; Luke *i sur.*, 2008.; Schoeftner i Blasco 2008.). Humana TERRA je poliadenilirana u samo 7% (Azzalin i Lingner 2008.), dok kod kvasca većina ili sva TERRA nosi poliA rep (Luke *i sur.*, 2008.). Iako specifični transkripcijski faktori koji su odgovorni za regulaciju transkripcije TERRA još nisu razjašnjeni, postoji pretpostavka da su neki od telomernih proteina regulatori heterokromatinizacije. Funkcije TERRA ukazuju da je takva RNA uključena u regulaciju enzima telomeraze i remodeliranje kromatina tijekom razvoja i diferencijacije stanice. TERRA je, s druge strane, u humanim stanicama istisnuta ili degradirana na telomerama pomoću NMD faktora (nonsense-mediated RNA decay (Azzalin *i sur.*, 2007.)). Neki od tih faktora fizički reagiraju s telomerazom, stoga se pretpostavlja da bi njihovo uklanjanje TERRA sekvence s telomere moglo regulirati telomerazu. Velike nuklearne RNA mogu sudjelovati u epigenetskim promjenama privlačeći remodelirajuće kromatinske komplekse. Moguće je i da TERRA djeluje tako što regrutira modificirajuće faktore na telomerama kako bi uspostavile ili stabilizirale heterokromatinsko stanje. Moguća je i uloga u procesima diferencijacije. Međutim, prekomjerno nakupljanje TERRA na telomerama bi moglo poremetiti normalnu replikaciju telomere i dovesti do njezinog iznenadnog gubitka.

Ogroman je broj saznanja sakupljen posljednja dva desetljeća o telomerama, iako je složen mehanizam njihove regulacije još uvijek dijelom nepoznat. Svakodnevno se međutim ta slika upotpunjuje, a njeno poznavanje omogućilo bi i neke odgovore vezane za procese starenja, kako stanice, tako i organizma, imortalnosti, nastanka i liječenja raka i drugih bolesti.

8. Literatura

1. Azzalin CM, Lingner J (2008) Telomeres: the silence is broken. *Cell Cycle* 7: 1161.–1165.
2. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantuli L, Giulotto E, Lingner J (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318: 798.–801.
3. Bakkenist CJ., Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499.–506.
4. Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P, de Lange T (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* 16: 1785.–1794.
5. Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E (1997) Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* 17: 236.–239.
6. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17: 231.–235.
7. Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange, T (1995) A human telomeric protein. *Science* 270: 1663.–1667.
8. de Lange T, Petrini J (2000) A new connection at human telomeres: Association of the Mre11 complex with TRF2. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* LXV: 265.–273.
9. Diede SJ, Gottschling DE (2001) Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Curr. Biol.* 11: 1336.- 1340.
10. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503.- 514.
11. Griffith J, Bianchi A, de Lange T (1998) TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J. Mol. Biol.* 278: 79.–88.
12. Hockemeyer D, Sfeir AJ, Shay JW, Wright WE, de Lange T (2005) POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J.* 20: 2667.–2678.
13. Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S (2004) A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr. Biol.* 14: 1621.–1631.
14. Huffman KE, Levene SD, Tesmer VM, Shay JW, Wright WE (2000) Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J. Biol. Chem.* 275: 19719.- 19722.
15. Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, de Lange T (2004) The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol.* 2: E240
16. Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T, (2002) Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss, *Science* 295: 2446.–2449.
17. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T (1999) p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283: 1321.- 1325.
18. Kim SH, Han S, You YH, Chen DJ, Campisi J (2003) The human telomere-associated protein TIN2 stimulates interactions between telomeric DNA tracts in vitro. *EMBO Rep.* 4: 685.–691.
19. Kim SH, Kaminker P, Campisi J (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* 23: 405.–412.
20. Lei M, Zaug AJ, Podell ER, Cech TR (2005) Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *J. Biol. Chem.* 280: 20449.–20456.
21. Lei M, Podell ER, Cech TR (2004) Structure of human POT1 bound to telomeric

- single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 1223.–1229.
22. Li B, Oestreich S, de Lange T (2000) Identification of human Rap1: Implications for telomere evolution. *Cell* 101: 471.–483.
 23. Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z (2004a) Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J. Biol. Chem.* 279: 51338.– 51342.
 24. Loayza D, Parsons H, Donigian J, Hoke K, de Lange T (2004) DNA binding features of human POT1: A nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites. *J. Biol. Chem.* 279: 13241.– 13248.
 25. Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J (2008) The Rat1p 50 to 30 exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 32: 465.–477.
 26. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88: 657.–666.
 27. McElligott R, Wellinger RJ (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J.* 16: 3705.- 3714.
 28. Munoz- Jordan JL, Cross GA, de Lange T, Griffith JD (2001) T- loops at trypanosome telomeres. *EMBO J.* 20: 579.- 588.
 29. Murti KG, Prescott DM (1999) Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14436.- 14439.
 30. Paull TT, Gellert M (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell.* 1: 969.- 979.
 31. Schoeftner S, Blasco MA (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 10: 228.–236.
 32. Smogorzewska A, Karlseder J, Holtgreve- Grez H, Jauch A, de Lange T (2002) DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr. Biol.* 12: 1635.- 1644.
 33. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92: 401.- 413.
 34. Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T (2004) Homologous recombination generates T loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119: 355.–368.
 35. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW (1997) Normal human chromosomes have long G- rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* 11: 2801.- 2809.
 36. Yang Q, Zheng YL, Harris CC (2005) POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity. *Mol. Cell. Biol.* 25: 1070.–1080.
 37. Ye JZ, Donigian JR, Van Overbeek M, Loayza D, Luo Y, Krutchinsky AN, Chait BT, de Lange T (2004a) TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J. Biol. Chem.* 279: 47264.– 47271.
 38. Ye JZ, de Lange T (2004) TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nat. Genet.* 36: 618.–623.
 39. Zhong Z, Shiue L, Kaplan S, de Lange T (1992) A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4834.–4843.

40. Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, de Lange T (2003) ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol. Cell* 12: 1489.-1498.
41. Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, Lange T (2000) Cell- cycle- regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* 25: 347.- 352.

9. Sažetak

Telomere su zaštitne strukture na krajevima linearnih kromosoma koje su nužne na staničnoj razini za stabilnost genoma, dok na razini organizma sudjeluju u procesu starenja koji ima funkciju tumorske supresije. Telomere mogu regulirati duljinu životnog vijeka stanica i štite prirodne krajeve kromosoma od neželjenih aktivnosti popravka DNA kao što su nehomologno spajanje krajeva DNA i homologna rekombinacija. Kromosomi imaju na svojim krajevima telomernu DNA s uzastopnim ponavljanjem heksanukleotidne sekvence koja oblikuje omčastu strukturu uz pomoć specifičnih proteina, tzv. T petlju. Šelterin, zaštitni proteinski kompleks, sastoji se od šest proteina: TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 i POT1 koji su međusobno povezani i vežu telomernu sekvencu. Inhibicija TRF2 rezultira poremećajem telomernih struktura, aktivacijom p53 i procesima apoptoze ili starenja, odnosno fuzijom krajeva kromosoma, ovisno o tipu stanica. Najnovijim je istraživanjima dokazano da se na telomerama nalazi i velika nekodirajuća RNA koja stvara cjelovitu komponentu telomernog heterokromatina, TERRA. Na temelju njene funkcije, zaključeno je da je takva RNA uključena u regulaciju enzima telomeraze i remodeliranje kromatina tijekom razvoja i diferencijacije stanice.

10. Summary

Telomeres are protective structures at the ends of linear chromosomes. They are critical at the cellular level for maintenance of the genome stability. At the organismal level they may contribute to ageing, which is considered to be tumor suppressing mechanism. They can regulate the lifespan of cells and protect natural chromosome ends from unwanted DNA repair activities, such as non-homologous end joining and homologous recombination. The chromosomes end in telomeric DNA containing tandem hexanucleotid repeats in specific loop structure. The complex of specific proteins, named Shelterin, takes part in the maintenance of the T loop and telomere function. Shelterin consists of six proteins: TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 and POT1. The complex has a high affinity toward telomeric sequence. TRF2 inhibition compromises the structure of the telomeres and can cause p53 activation, apoptosis or cell senescence as well as chromosome end fusion, depending on the cell type. The recent investigations had identified telomeric repeat containing RNA, TERRA, a large noncoding RNA forming an integral component of telomeric heterochromatin. TERRA functions suggest important roles in the regulation of telomerase and in orchestrating chromatin remodelling

throughout development and cellular differentiation.