

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2014**

**Kamila Jahodíková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



# **Netelomerické funkce enzymu telomeráza**

**Bakalářská práce**

**Kamila Jahodíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

**Vedoucí práce: Mgr. Juraj Kramara Ph.D.**

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce a citované literatury.“

V Olomouci dne 9. května 2014

Podpis.....

## Souhrn

Telomery jsou specifické nukleoproteinové struktury na koncích eukaryontních chromozomů. Zabezpečují stabilitu konců lineárních chromozomů tím, že řeší koncový replikační problém a maskují konce chromozomů před buněčnými mechanismy opravy dvouvláknových zlomů DNA. Klíčovou roli v údržbě telomer hraje enzym telomeráza. Tento enzym syntetizuje telomerickou DNA sestávající z krátkých tandemových repetitiv a ovlivňuje tak jejich délku. Dostatečná délka telomer je základním předpokladem jejich správné funkce, přičemž zkrácení pod kritickou délku způsobí buněčnou senescenci a smrt buňky. V posledních letech byly ovšem objeveny i takzvané netelomerické funkce tohoto enzymu, které ovlivňují regulaci buněčné smrti, mohou regulovat transkripci a hrají i roli při odpovědi na poškození DNA. Tyto alternativní funkce by mohly být v budoucnu využity při genové terapii a mít důležitou roli při léčbě rakoviny. Jednou z těchto alternativních funkcí je zapojení katalytické podjednotky telomerázy – TERT do signální dráhy Wnt, která může za přítomnosti specifického proteinu  $\beta$ -kateninu regulovat genovou transkripci a zpětnou vazbou regulovat expresi TERT. Součástí experimentální části je pozorování sensitivity telomerizovaných buněčných linií na specifické inhibitory enzymů z rodiny poly (ADP-ribóza) polymeráz (PARP), zejména na inhibitor KU- 58948, který působí jako inhibitor PARP1. Cílem bylo prozkoumat podíl Wnt dráhy indukované ektopickou expresí TERT na rezistenci vůči inhibitorům PARP.

## Summary

Telomeres are specific nucleoprotein structures at the ends of eukaryotic chromosomes. They maintain the stability of the ends of linear chromosomes by providing solution to the end replication problem and masking the ends of chromosomes from the cellular DNA repair mechanisms. A key role in telomere maintenance is played by the enzyme telomerase. Telomerase synthesizes telomeric DNA consisting of short tandem repeats and thus affects their length. Sufficient telomere length is an essential prerequisite for their proper function while shortening below a critical length causes cellular senescence and cell death. Interestingly, novel non - telomeric function of the telomerase enzyme have been discovered - which affect the regulation of cell death, transcription of specific genes and DNA damage response. These alternative functions could be used in the future for gene therapy and treatment of cancer. One of the newly discovered alternative functions is the involvement of telomerase catalytic subunit – TERT in the Wnt signaling pathway. Along with the key regulator of the pathway –  $\beta$ -catenin TERT regulates transcription of Wnt genes and creates feedback loop that in turn regulates TERT expression via the Wnt pathway. The aim of the experimental part of the work is to test the sensitivity of certain cell lines ectopically expressing telomerase to the specific inhibitor of the poly (ADP ribose) polymerase (PARP1) enzyme. In particular, we wanted to assess the role of TERT induced Wnt signalling in resistance to PARP inhibitors.

Touto cestou bych chtěla vyjádřit velké poděkování vedoucímu bakalářské práce Mgr. Juraji Kramarovi Ph.D. za základy práce s tkáňovými kulturami, za trpělivost při vysvětlování dané problematiky a za cenné rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat i kolektivu Laboratoře Integrity genomu na Ústavu Molekulární a Translační medicíny v Olomouci za umožnění zpracování experimentů na tomto pracovišti.

## Obsah

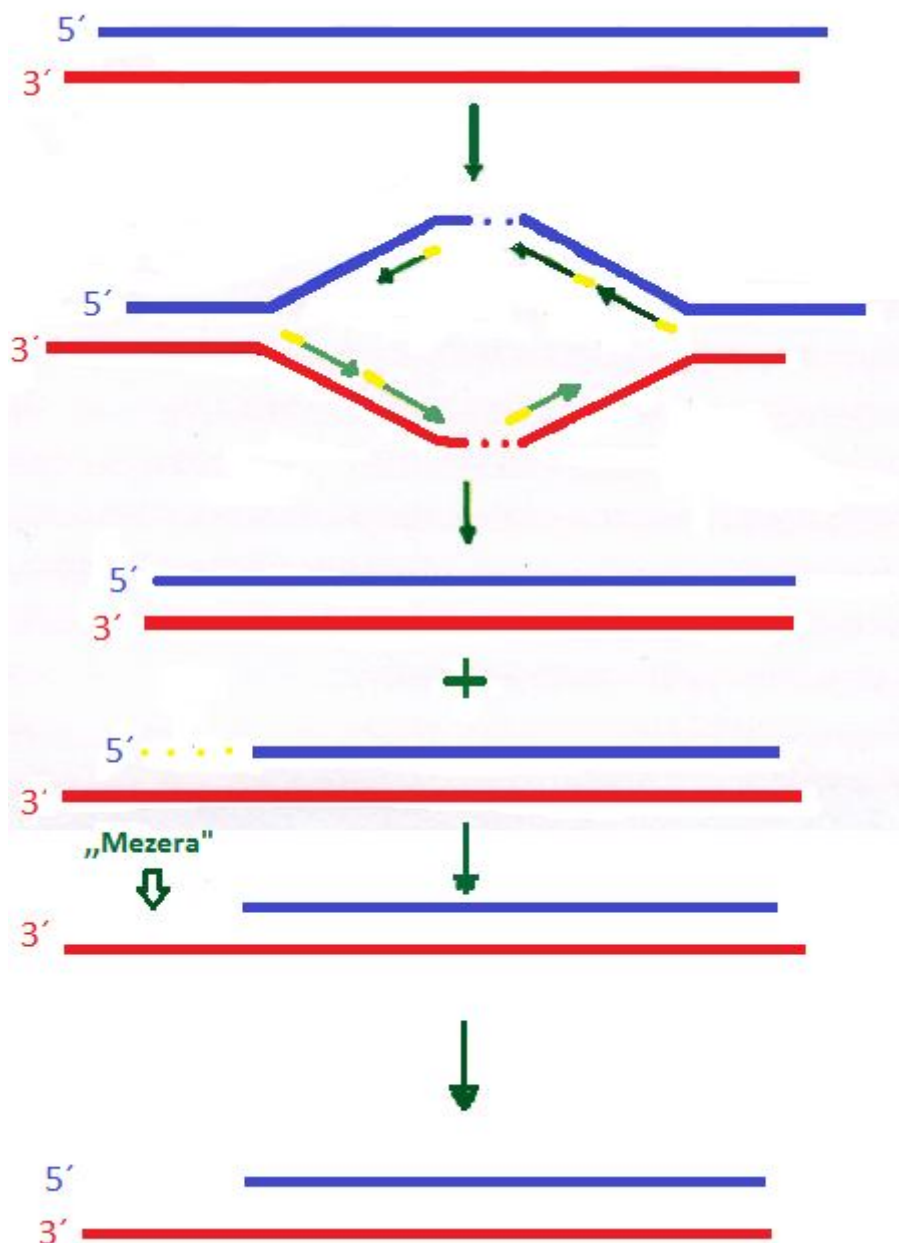
1	Úvod.....	9
2	Současný stav řešené problematiky.....	13
2.1	Telomeráza reverzní transkriptáza.....	13
2.1.1	Struktura TERT.....	13
2.1.2	Katalytický cyklus TERT.....	15
2.1.3	Proteiny asociující s TERT.....	15
2.2	Telomerázová RNA.....	16
2.2.1	Sekundární struktura.....	17
2.3	Telomeráza v nádorových onemocněních.....	18
2.3.1	Imunoterapie a genová terapie.....	18
2.3.2	Inhibitory telomerázy.....	20
2.4	Netelomerické funkce.....	21
2.4.1	RNA dependentní RNA polymeráza.....	21
2.4.2	DNA opravy.....	21
2.4.3	Mitochondriální funkce.....	22
2.5	TERT a Wnt/ $\beta$ -katenin signální dráha.....	22
2.5.1	$\beta$ – katenin.....	23
2.5.2	Regulace Wnt/ $\beta$ -katenin signální dráhy TERT.....	24
2.5.3	Wnt/ $\beta$ -kateninová dráha reguluje expresi TERT.....	25
3	Cíl práce.....	28
4	Materiál a metody.....	29
4.1	Přístroje.....	29
4.2	Chemikálie.....	29
4.2.1	Protilátky.....	30
4.3	Roztoky.....	30
4.4	Buněčné linie.....	30
4.5	Kultivace buněk.....	31
4.6	Kolonyformní esej.....	31
4.7	Měření viability (Survival test).....	31
4.8	Tvorba klonů.....	31
4.9	SDS PAGE a Western blotting (semi-dry).....	32
5	Výsledky.....	34

5.1	Míra exprese TERT u klonů linie U2OS TERT a U2OS TERT DN.....	34
5.2	Viabilita buněčných linií U2OS .....	35
5.3	Viabilita buněčných linií HCT 116.....	37
6	Diskuze .....	39
7	Závěr.....	41
8	Literatura.....	42
9	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	46



# 1 Úvod

V roce 1932 vědci Barbara McClintock a Hermann Müller poprvé definovali přirozené zakončení chromozomu, v jejich případě u kukuřice (McClintock, 1931; Müller, 1938). Tato zakončení byla označena pojmem telomery, což jsou specifické nukleoproteinové struktury lokalizované na koncích eukaryotických chromozomů (de Lange, 2009). Prvořadou funkcí těchto struktur je chránit konce lineárních chromozomů před degradací a fúzí. Konec chromozomu totiž představuje přirozený dvouvláknový zlom, jehož oprava by však, na rozdíl od zlomů jinde v genomu, mohla mít fatální následky např. v podobě fúze celých chromozomů. Telomery jsou tedy nepostradatelné pro stabilizaci eukaryotních lineárních genomů (de Lange, 2009). Další velmi důležitou funkcí telomer je řešení tzv. koncového replikačního problému (the end replication problem), tj. umožnit kompletní replikaci lineární chromozomální DNA bez ztráty 5' koncových bazí (Blackburn, 1991). V brzkých 70. letech minulého století, ruský teoretik Alexei Olovnikov poprvé rozpoznal, že chromozomy nemohou úplně replikovat jejich konce (Olovnikov, 1973). Konvenční DNA polymeráza má schopnost replikace pouze ve směru 5'→3', může prodloužit jen existující polynukleotidové řetězce a potřebuje komplementární vlákno poskytující templát. Z toho důvodu je 5'→3' vlákno replikováno diskontinuálně ve formě tzv. Okazakiho fragmentů syntetizovaných z krátkých RNA primerů, které jsou posléze odstraněny (viz Obr. 1). Tudíž DNA polymeráza nemůže dosyntetizovat nejzazší 5' konce tupého konce DNA molekuly. Dokonce, i když je RNA primer párován s nejzazším bodem 3' konce DNA templátu a je po iniciaci syntézy odstraněn, vznikají dceřiné molekuly s 5' terminální mezerou. Koncový replikační problém je tak možné považovat za problém neúplné syntézy opoždujícího se vlákna díky odstranění terminálního RNA primeru (Lingner a kol., 1995).

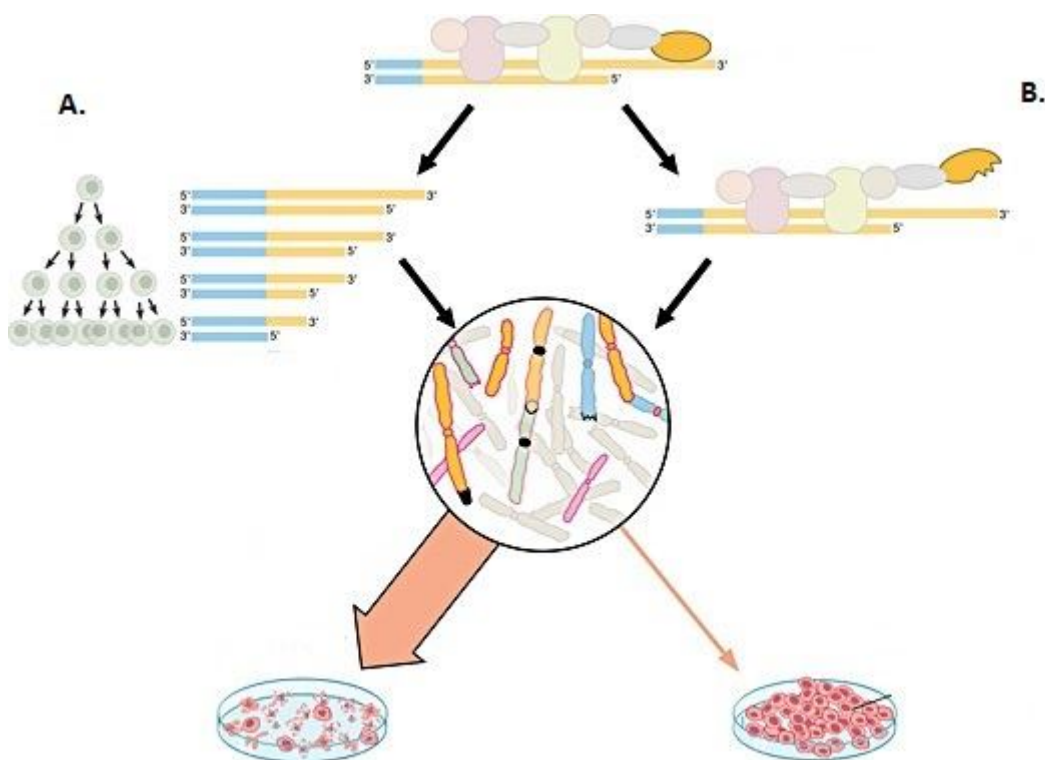


**Obr. 1:** Koncový replikační problém (upraveno dle Lingner a kol., 1995)

DNA polymerázy nemohou replikovat chromozomy až k úplnému konci, proto část vlákna na 5' konci zůstává nedosyntetizovaná. (Lingner a kol., 1995).

V návaznosti na objev Alexeje Olovnikova, Leonard Hayflick začal přemýšlet o omezeném limitu buněčného dělení. Při zkracování telomer tedy dochází k tzv. Hayflickovu limitu. Podle této teorie, kterou Dr. Hayflick publikoval v roce 1961, je buňka schopna se rozdělit pouze cca 50x, poté se dělení úplně zastaví (Hayflick a Moorhead, 1961). Jak ukázal pozdější výzkum, buňka se poté dostává do stavu senescence, následně dochází ke krizi a dojde

k masivní buněčné smrti neboli apoptóze, a to z důvodu úplného zkrácení telomer na konci chromozomů. Frakce buněk umí tento stav obejít reaktivací telomerázy, což je první krok k transformaci na nádorové buňky (viz Obr. 2) (Rubtsova a kol., 2012).



**Obr. 2:** Důsledky zkracování telomer na koncích chromozomů při buněčném dělení (<http://telomereinformation.com/nobelprize112.php?user=admin>). A) Pokud se telomera zkrátí pod limit, přestává být chráněna, chromozomy jsou v genomu nestabilní a buňka se dostává do apoptózy, B) Některé buňky však reaktivují telomerázu a tím se stávají nesmrtelné a potenciálně i nádorové.

Při nepřítomnosti telomerázy, která byla pozorována u většiny lidských somatických buněk, dochází při každém buněčném dělení ke ztrátě 50-200 párů bazí (Harley a kol., 1990; Cong a Shay, 2008). Součástí řešení koncového replikačního problému je však i enzym telomeráza, který telomery syntetizuje (Rubtsova a kol., 2012).

Aktivita telomerázy byla poprvé pozorována v roce 1985 Elizabeth Blackburn a její studentkou Carol Greider (v laboratoři Josepha Galla) zabývajících se v té době prací na obrvených prvocích *Tetrahymena thermophila*. Ve svých experimentech detekovaly aktivitu terminální transferázy, která byla specifická pro telomerické substráty, tedy enzym, který přidává telomerické repetice na konce chromozomů. Další výzkum ukázal, že telomeráza je specifická reverzní transkriptáza asociovaná s RNA templátem, který je enzymem kopírován na konec chromozomu. Telomeráza tak představuje nedílnou součást řešení koncového

replikačního problému a stabilizace eukaryotních lineárních chromozomů (Greider a Blackburn, 1985; Kang a kol., 2004; Masutomi a kol., 2003). Tento objev vynesl Elizabeth Blackburn i Carol Greider v roce 2009 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. U člověka je telomeráza aktivována v průběhu zárodečného vývoje, v dospělých zárodečných tkáních a u většiny nádorů (Ulaner a kol., 1998). Při vzniku většiny nádorů hraje klíčovou roli reaktivace telomerázy umožňující obejít replikativní senescenci a tedy i neomezené dělení nádorových buněk (Blackburn, 2005). V embryonálních kmenových buňkách je telomeráza aktivována, ale pouze na velice nízké úrovni (Hiyama a Hiyama, 2007). Vzhledem k tomu, že telomeráza je reaktivována u 90 % nádorů, představuje atraktivní cíl pro protinádorová léčiva. Dosud bylo vyvinuto několik inhibitorů, přičemž část z nich je již ve fázi klinického testování (viz níže) (Smiraldo a kol., 2012).

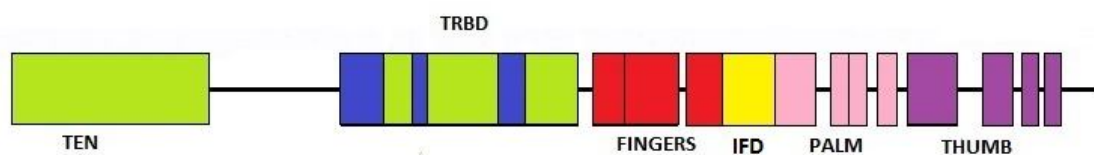
## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Telomeráza reverzní transkriptáza

Lidská telomeráza reverzní transkriptáza (dále jen hTERT) je katalytickou podjednotkou holoenzymu telomerázy (Skordalakes a Lue, 2012). TERT vykazuje významnou podobnost s jinými reverzními transkriptázami např. s reverzní transkriptázou (RT) retrovirového původu nebo retrotranspozomální RT (Skordalakes a Lue, 2012). Struktura TERTu však také vykazuje rysy charakteristické pro tento enzym, které jsou zodpovědné za jedinečné enzymatické vlastnosti telomerázy (Autexier a Lue, 2006). U lidských diploidních buněk je gen katalytické podjednotky přítomen jako jediná kopie vzdálená 2 Mb od telomery (Bryce a kol., 2000). hTERT gen se skládá z 16 exonů, 15 intronů a jeho velikost je vyšší než 40 kb (Cong a kol., 1999). hTERT má několik transkripčních variant, některé se projevují v průběhu lidského vývoje ve tkáních, nicméně za katalytickou aktivitu telomerázy zodpovídá pouze transkript plné délky (Ulaner a kol., 1998).

#### 2.1.1 Struktura TERT

Struktura TERT má nejbližší k retrovirálním reverzním transkriptázám, nicméně sdílí podobnost s virovými RNA polymerázami i B - rodinou DNA polymeráz bakteriofágů. hTERT obsahuje tři hlavní prvky předpokládané lineární struktury (viz Obr. 3): i) N-terminální část, která zahrnuje konzervované DNA a RNA vazebné domény; ii) centrální katalytická doména RT; iii) krátká C-terminální část (Wyatt a kol., 2010). N-terminální část TERT zahrnuje dvě konzervované domény, TEN a RNA vazebnou doménu telomerázy (TRBD). Mezi oběma doménami je dlouhá a nestrukturovaná „*linker*“ oblast, která může být důležitá pro konformační flexibilitu celého holoenzymu. TRBD doména lokalizovaná mezi TEN a RT doménou, je obecně konzervována a je nezbytná pro funkci telomerázy (Bosoy a kol., 2003; Lai a kol., 2001). N-terminální část obsahuje i několik konzervovaných specifických motivů telomerázy včetně CP, GFP a TS. Tyto oblasti jsou důležité zejména pro rychlost kopírování templátu během syntézy na telomerách. Katalytická doména TERT obsahuje sedm evolučně konzervovaných motivů RT nezbytných pro enzymatickou aktivitu (Wyatt a kol., 2010).



**Obr. 3:** Předpokládaná lineární struktura lidské telomerázy (upraveno dle Wyatt a kol., 2010). Struktura lidské telomerázy se skládá ze tří subdomén a to ze subdomény prsty (*fingers*), dlaň (*palm*) a palec (*thumb*)

Telomerázová RT doména (viz Obr. 4) je tvořena dvěma subdoménama připomínající prsty (*fingers*) a dlaň (*palm*). Oblasti jsou propojeny smyčkou zahrnující konzervovanou „*primergrip*“ oblast motivu E (Wyatt a kol., 2010). Doména prstu je potřebná pro navázání nukleotidů a nukleových kyselin stejně tak jako pro regulaci procesivity (Bosoy a Lue, 2001, Miller a kol., 2000). C-terminální část TERT vykazuje pouze slabou konzervovanost sekvence naznačující, že může mít specifické funkce pro daný druh, nebo že se různé aminokyselinové sekvence vyvinuly ke složení v podobné strukturní domény. Tato oblast představuje palec (*thumb*) doménu telomerázy (Wyat a kol., 2010). Doména palce je zásadní pro navázání nukleotidů a nukleových kyselin při procesu elongace (Skordalakes a Lue 2012). Na rozdíl od jiných polymeráz, telomeráza existuje ve stabilním komplexu RNP (*ribonucleoprotein-ribonukleoprotein*), který vzniká vazbou RNA podjednotky RNA vazebné domény (TRBD) (Mitchell a kol., 2010).

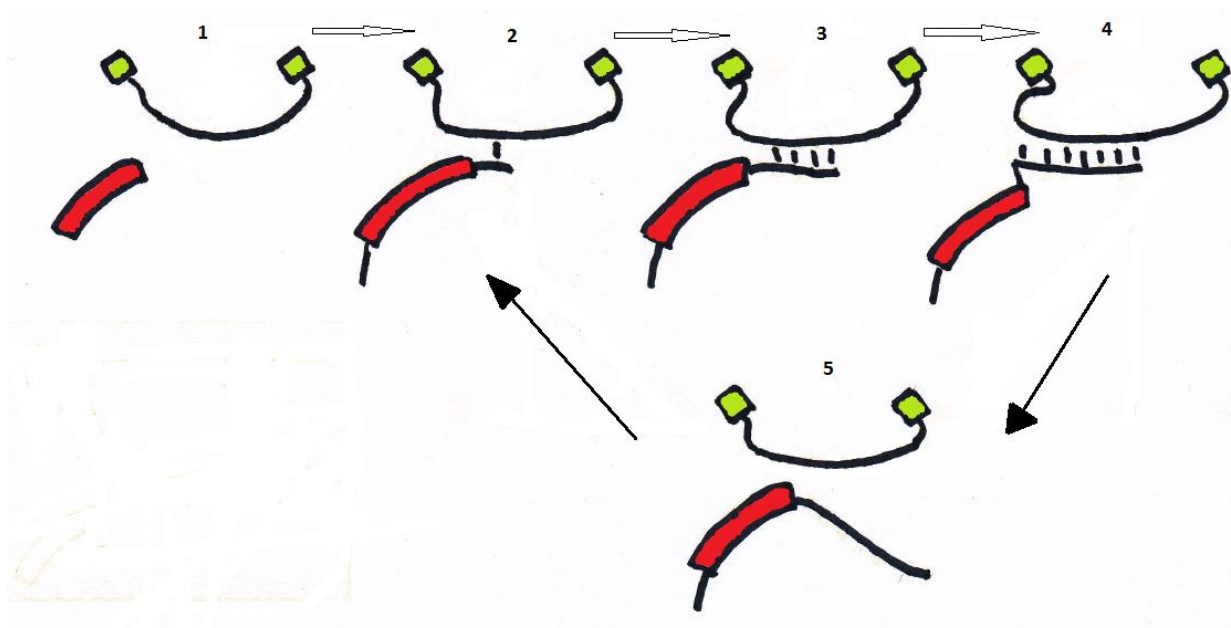


**Obr. 4:** TERT komplex asociován s DNA a RNA (upraveno dle Mitchell a kol., 2010)

Modrá barva označuje TRBD, oranžová doménu prsty (*fingers*), vínová doménu palec (*thumb*) a běžová doménu dlaň (*palm*).

### 2.1.2 Katalytický cyklus TERT

Telomeráza má roli reverzní transkriptázy a kopírováním templátu vytváří telomerické opakování. Templát je poskytnut RNA podjednotkou telomerázy (Greider a Blackburn, 1989). Při tomto procesu dochází k tomu, že telomeráza se naváže na 3'konec telomery, který je komplementární s RNA templátem, pomocí něhož jsou na základě komplementarity přidávány na opačné vlákno báze, až do okamžiku, dokud neprodlouží 3'konec. DNA polymeráza poté dosyntetizovává opožděující se vlákno (Tzfati a Chen, 2012). Bylo prokázáno, že telomeráza postupně syntetizuje mnohonásobné repetice, kde hraje podstatnou roli translokační krok (viz Obr. 5) (Greider, 1991).



**Obr. 5:** Katalytický cyklus telomerázy u *Tetrahymena thermophila* (upraveno dle Collins, 2006). Červeně je znázorněna templátová sekvence, žlutě konce telomerázové RNA 1)+2) Nasednutí substrátu do aktivního místa telomerázy 3) Dochází k prodloužení substrátu 4) Disociace před 5'koncem templátu 5) Uvolnění produktu od templátu. Produkt se může párovat s 3'koncem templátu a k celé syntéze dochází znova.

### 2.1.3 Proteiny asociující s TERT

TERT asociující proteiny p43, p65, p23, Hsp90 a TEP1 hrají důležitou roli při katalytické aktivitě telomerázy. Purifikace telomerázy u *Euplotes* vedla k identifikaci proteinu p43, jehož homolog, La protein je asociován se savčí telomerázou (Harrington a kol., 1997; Le a kol., 2000). Protein p43 je stechiometrický s TERT a TERC. Má strukturní funkci, ale zároveň se

podílí na ukotvení enzymatického komplexu telomerázy při replikaci telomer (Möllenbeck a kol., 2003). La protein se vyskytuje na 3' konci transkriptů RNA polymerázy III, stabilizuje histony mRNA, chrání 3' konce před štěpením exonukleázou a je klíčový při metabolismu, maturaci, zpracování, skládání a subcelulární lokalizaci regulačních nekódujících RNA prekurzorů (McLaren a kol., 1997; Le a kol., 2000; Martino a kol., 2012). Protein p65 napomáhá vazbě TERT na TERC (Richards a kol., 2006). Chaperony p23 a Hsp90 jsou asociovány s aktivní hTERT (Le a kol., 2000). Dyskerin je esenciální, 58 kDa velký, nukleolární RNA protein důležitý při biogenezi telomerázy. Tvoří základní komplex, který se váže na nekódující H/ACA RNA, včetně telomerázové RNA a podjednotky malé nukleolární RNA (snoRNA) a RNA Cajalových tělísek. Ztrátou funkce dyskerinu dochází ke snížení telomerázové aktivity, která vede k předčasnému zkrácování telomer (Alawi a Lin, 2011). Onemocnění z nedostatku dyskerinu se nazývá *Dyskeratosis congenita* projevující se trojicí klasických, nikoliv však charakteristických, příznaků jako dystrofie nehtů, nepravidelná retikulární pigmentace kůže a slizniční leukoplakie (Savage a Alter, 2009). Dyskerin hraje i důležitou roli při ribozomální biogenezi, jeho vazba na H/ACA snoRNA nepostradatelná pro posttranskripční zpracování prekurzoru rRNA (Alawi a Lin, 2011). Evolučně konzervované dyskerin vazebné proteiny NHP2, NOP10 a GAR1 byly identifikovány jako faktory potřebné pro složení H/ACA ribonukleoproteinů včetně telomerázy (Venteicher a kol., 2009).

## 2.2 Telomerázová RNA

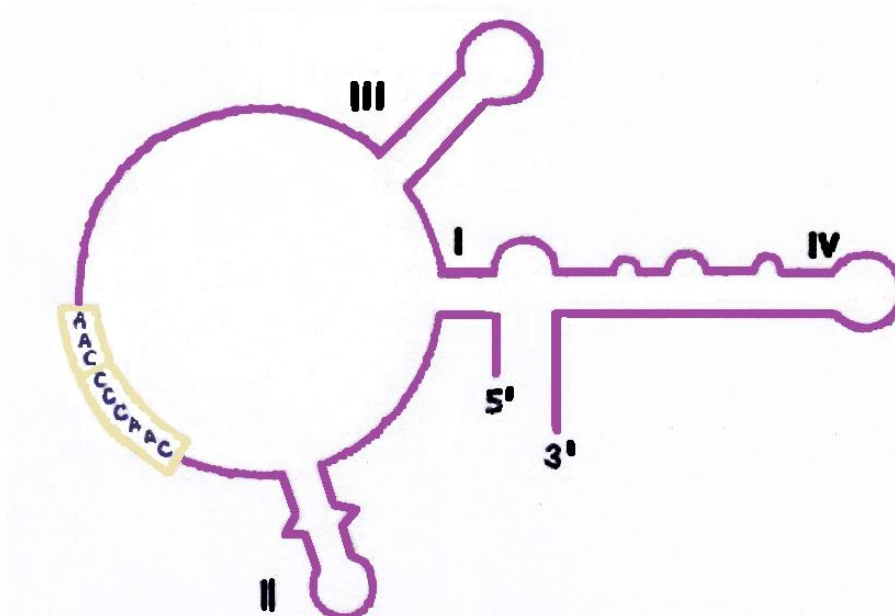
Integrální součástí telomerázy je telomerázová RNA (dále jen TERC – *Telomerase RNA component*). TERC se u různých druhů liší svou velikostí i primární strukturou (Liu a kol., 2012). Navzdory těmto rozdílům, si TERC v průběhu evoluce zachovala sekundární a terciární strukturu, která je klíčová pro katalytickou aktivitu. TERC obsahuje konzervované motivy, jako třeba RNA- *templating* oblast nezbytnou pro selektivitu a navázání nukleotidů. Tyto konzervované prvky jsou důkazem pro existenci společných mechanismů replikace telomer u různých fylogenetických skupin (Mitchell a kol., 2010). V roce 1987 Greider a Blackburn objevily možné vlastnosti TERC, které zahrnují zejména strukturní úlohy při tvorbě aktivního enzymatického komplexu, poskytnutí templátu pro syntézu telomer, rozpoznání substrátu telomerázy – 3' konec telomery a účast vlastní polymerační reakce (Tzfati a Chen, 2012). V roce 1987 bylo těmito vědkyněmi zjištěno, že telomerázová RNA obsahuje sekvenci CAACCCCAA u *T.thermophyla*, která je komplementární s kopiemi telomerického opakování (Greider a Blackburn, 1989). Tímto objevem bylo poskytnuto



vysvětlení, že TERC slouží jako templát pro syntézu telomerického opakování. Konec templátu je kopírován na konec telomery, konec telomery se rozvolní, translokuje, přemístí na začátek templátu a je znova prodloužen pomocí kopírování zbytku templátu. TERC má u všech druhů stejné jádro pojmenované jako pseudouzelná templátová doména (*pseudoknot-template domain*), které je nezbytné pro katalytickou funkci telomerázy (Tzfati a Chen, 2012).

### 2.2.1 Sekundární struktura

Jak již bylo zmíněno, délka TERC a její primární sekvence je velmi proměnlivá v porovnání s jinými nekódujícími RNA, avšak její sekundární struktura je evolučně konzervovaná, což je klíčové pro funkci TERC (Zaug a Cech, 1995; Tzfati a Chen, 2012; Chen a kol., 2000). Sekundární struktura TERC obsahuje čtyři šroubovice označené I-IV (viz Obr. 6), z nichž každá má svou vlastní specifickou funkci při aktivitě telomerázy. Šroubovice I je důležitá pro vysoce afinitní vazbu na katalytickou podjednotku TERT (Tzfati a Chen, 2012). Šroubovice II obsahuje část motivu, označovaného jako TBE, který je potřebný pro lokalizaci 5' templátu. Mezi šroubovicemi II a III je jednovláknová oblast obsahující templát 5'-CAACCCCAA-3'. Šroubovice IV je důležitá pro procesivitu holoenzymu, interaguje s N-terminální oblastí TERT a umožňuje kontakt s rozpoznávací částí 3' templátu. Dále váže protein p65, který asociuje s telomerázou a pomáhá při vazbě TERT na TERC (Richards a kol., 2006).



**Obr. 6:** Sekundární konzervovaná struktura TERC znázorněna se čtyřmi šroubovicemi a templátem (upraveno dle Bhattacharyya a Blackburn, 1994)

## 2.3 Telomeráza v nádorových onemocněních

Zvýšená aktivita telomerázy je snadno detekovatelná ve většině lidských nádorových tkáních (Zhou a Lu, 2001). Po absolvování jistého počtu dělení (viz Hayflickův limit výše) se telomery somatických buněk zkrátí natolik, že již nedovedou zabezpečit stabilitu chromozomu. Konec chromozomu je rozpoznán jako dvouvláknový zlom a jsou aktivovány mechanismy odpovědi na poškození DNA, které spustí senescenční program vedoucí až k apoptóze takovýchto buněk (de Lange, 2009). V bodě, kdy dochází ke zkrácení telomer pod limit, pokračuje buněčná proliferace a chromosomy jsou nestabilní. Tento jev se nazývá buněčná krize (Pruzan a kol., 2002). Právě v této fázi může v důsledku nestability genomu dojít k přestavbám v genomu reaktivujícím telomerázu, což buňku činí nesmrtelnou. Překonání replikační bariéry je jedním ze základních předpokladů nádorové transformace a je nevyhnutelný i pro další proliferaci nádoru (Hahn a kol., 1999; Hanahan a Weinberg, 2011). Tím se telomeráza ukázala jako univerzální cíl pro léčbu rakoviny. Navíc, vzhledem k tomu, že ve většině lidských somatických buněk je telomeráza nepřítomná, by byla taková terapie cílená, méně toxická a ve srovnání s běžnými chemoterapeutickými přístupy by měla méně vedlejších účinků (Smiraldo a kol., 2012). Genová terapie má za cíl iniciovat apoptózu buněk exprimujících telomerázu nebo zabít tyto buňky pomocí adenovirů (Shay a Keith, 2008). Imunoterapie využívá přístupu způsobující regresi nádoru (Vonderheide, 2002) a inhibitory telomerázy ve formě malých molekul nebo oligonukleotidů zabraňují telomeráze prodlužovat a udržovat délku telomer (Harley, 2008).

### 2.3.1 Imunoterapie a genová terapie

Mezi obecné strategie jak zasáhnout telomerázu patří imunoterapie, jejímž cílem je proteinová podjednotka telomerázy hTERT (Smiraldo a kol., 2012). Imunoterapeutické přístupy způsobují regresi nádoru. Co se vysvětluje tím, že většina, ne-li všechny nádory exprimují antigeny rozpoznatelné T-lymfocyty, které způsobí lyzi buněk exprimujících daný antigen (Vonderheide, 2002). Výhodou imunoterapeutické strategie je, že smrt nádorových buněk může být okamžitá. Jednou z hlavní překážek je identifikovat antigeny, které jsou specifické pro rakovinné buňky a použitelné pro širokou škálu typů nádorů (Smiraldo a kol., 2012). Telomeráza je nezbytná pro dlouhodobý růst nádorových buněk, proto je hTERT slibným cílem v nádorové imunoterapii. Peptidy odvozené od hTERT jsou přirozeně zpracovány nádorovými buňkami, přítomny jako epitopy hlavního histokompatibilního komplexu (MHC-

*Major histocompatibility complex*) a slouží jako cíl antigen-specifických cytotoxických T-lymfocytů (Minev a kol., 2000; Vonderheide a kol., 1999). Jsou dva přístupy, které pokročily do klinických testů (Smiraldo a kol., 2012). První je *ex vivo* proces, při kterém jsou pacientovi z krve izolovány nezralé dendritické buňky, které jsou vystaveny pulzu TERT mRNA. Následně jsou vráceny zpět do těla, kde aktivují cytotoxické T-lymfocyty, které zabijí nádorové buňky exprimující telomerázu a vystavující epitopy telomerázy (Su a kol., 2005). Druhá možnost využívá injekční přípravek ze široké škály peptidů odvozených z aktivního místa hTERT. Po imunizaci, imunitní systém rozpozná hTERT peptidy jako cizorodé antigeny a začne ničit telomeráza pozitivní nádorové buňky, které jsou představeny jako epitop (Smiraldo a kol., 2012). Pokud se prokáže, že telomerázová imunoterapie je účinná při léčbě rakoviny, mohlo by se v budoucnu začít s preventivní imunoterapií. Vzhledem k tomu, že přibližně 90% nádorů exprimuje hTERT gen, vakcína by mohla být využitelná pro zdravé pacienty s vysokým rizikem vývoje rakoviny na základě genetických faktorů nebo na základě lékařské anamnézy (Shay a Keith, 2008).

Přístupy genové terapie, při léčbě rakoviny, se snaží využít specifických faktorů, které jsou různě exprimovány v nádorových buňkách, ve srovnání s normálními buňkami. Nádorové buňky exprimují telomerázu, a proto potenciální strategií je kontrolovat molekulární mechanismy odpovědné za regulaci exprese telomerázy a použít je k řízené expresi sebevražedného (*suicide*) genu nebo k replikaci komponentu adenoviru, a tím rychle zabít buňky exprimující telomerázu. Popsaných strategií využívajících sebevražedné geny v nádorových buňkách je více (Smiraldo a kol., 2012). Jedním z přístupů je využití transkripčních regulačních sekvencí hTERT a genů hTR k regulaci exprese bakteriálního enzymu nitroreduktázy v kombinaci s pro-léčivem CB1954 při strategii genové sebevraždy v genové terapii. Jen buňky, které exprimují telomerázu, exprimují gen nitroreduktázy, který převádí pro-léčivo CB1954 do cytotoxické formy, a tak zabíjí nádorové buňky (Plumb a kol., 2001). Pro klinické testy jsou výhodné pouze nádory, které exprimují vysoké hladiny telomerázy, protože jsou dostatečně citlivé pro léčbu touto strategií (Smiraldo a kol., 2012). Alternativní strategií genové terapie může být využití adenovirů, které byly manipulovány, aby selektivně označily a zničily telomerázově-pozitivní nádorové buňky. Specifičnost přístupu vůči nádorovým buňkám se provádí pomocí využití promotorové oblasti genu hTERT k regulaci replikace adenoviru. Nádorové buňky exprimující telomerázu infikované tímto upraveným adenovirem budou replikovat virus, lyzují a šíří virus dál. Když stejně

upravené buňky infikují somatické buňky, které neexprimují telomerázu, nedojde k žádné následné replikaci viru nebo smrti buňky (Smiraldo a kol., 2012).

### **2.3.2 Inhibitory telomerázy**

Cílem použití malých molekul a oligonukleotidů, jako inhibitorů telomerázy při léčbě rakoviny, je narušení schopnosti telomerázy prodlužovat a udržovat délku telomer (Harley, 2008). Pokud je v nádorových buňkách aktivita telomerázy inhibována, dochází k postupnému zkracování telomer, což vede ke krizi a následné smrti buňky. Telomeráza je vhodným cílem pro inhibitory na bázi oligonukleotidů, protože pro funkci telomerázy je důležitá schopnost hTERC vytvářet páry bazí dle Watsona a Cricka s telomerickým substrátem (Corey, 2002).

Jedním z oligonukleotidových inhibitorů telomerázy, který je v klinických testech, je Imetelstat (GRN163L) firmy Geron. Jedná se o antisense oligonukleotid s chemickými modifikacemi zabezpečujícími snazší přechod buněčnou membránou a zvýšenou odolnost proti nukleolytické degradaci. GRN163L se váže na aktivní místo a přímo blokuje schopnost telomerázy prodlužovat telomerické substráty. Studie účinnosti GRN163L byly prováděny na myších xenograftových modelech, se širokou škálou typů rakoviny včetně rakoviny plic, prsu, prostaty, mozku, močového měchýře a rakoviny krvetvorby. Dále vstoupil GRN163L do klinických testů u chronické lymfatické leukémie, mnohočetného myelomu a různých solidních nádorů, jako nemalobuněčný karcinom plic a karcinom prsu (Smiraldo a kol., 2012). Využívaným oligonukleotidem je Fomivirsen, který byl schválen jako léčivo CMV retinitidy a je podáván intraokulární injekcí (Corey, 2002). Přehled dalších oligonukleotidů je uveden v Tab. I. Jedním z problémů je, že terapie pomocí inhibice telomerázy, by mohla mít vliv na normální reprodukční buňky a také na proliferující buňky obnovující tkáň. Oba typy totiž exprimují telomerázu (Smiraldo a kol., 2012). Další z překážek může být fenotypová prodleva nebo opoždění buněčné smrti, rakovinné buňky tak musí podstoupit několik dělicích cyklů, aby se telomery staly dostatečně krátkými, a aby došlo k buněčné krizi (Shay a Wright, 2005).

**Tab. I:** Oligonukleotidy inhibující telomerázu (Corey, 2002; Cheson, 2007; <http://news.cancerconnect.com>)

<b>Oligonukleotid</b>	<b>Typ tumoru</b>
Oblimersen (Genasense)	chronická lymfocytická leukémie
ISIS 3521	játra
ISIS 5132	vaječníky (fáze II klinického testu)
ISIS 2503	slinivka břišní (fáze II klinického testu)
Gem 231	pevné tumory (fáze II klinického testu)

## **2.4 Netelomerické funkce**

Nedávné studie ukazují, že hTERT má roli při základních buněčných procesech nezávislých na telomerech (Cong a Shay, 2008). Podstatou je, zda mají různě sestříhané hTERT transkripty i netelomerickou funkci (Bryce a kol., 2000). Specifická exprese jednotlivých forem sestříhu během vývoje naznačuje, že případy sestříhu nejsou náhodné a mohou mít fyziologické funkce v buňkách (Cong a Shay, 2008). V posledních letech byly tyto funkce zaznamenány při Wnt signalizaci, opravě DNA, v mitochondriích a u RNA dependentní polymerázy (Martínez a Blasco, 2011; Maida a kol., 2009).

### **2.4.1 RNA dependentní RNA polymeráza**

V roce 2009 Maida a kol. popsali schopnost TERT vytvářet komplex s nekódující mitochondriální RNA RMRP. Komplex vykazoval aktivitu RNA dependentní RNA polymerázy (RdRP) (Masutomi a Hahn, 2012). Podobně jako jiné RdRP syntetizuje i komplex hTERT-RMRP dvouvláknovou RNA, která se podílí na posttranskripčním genovém umlčování mechanismem RNA interference. Tímto způsobem je zpětnou vazbou regulována hladina samotné RMRP. K iniciaci syntézy dsDNA dochází pravděpodobně tak, že templát vytvoří strukturu s volným 3'-OH koncem, který následně slouží jako primer. Ukazuje se, že defekt v komplexu hTERT-RMRP by mohl hrát roli v patogenezi některých onemocnění. U hypoplasmie chrupavek a vlasů byly totiž objeveny mutace v RMRP, které by mohly způsobovat rozpad komplexu (Maida a kol., 2009).

### **2.4.2 DNA opravy**

Senescence lidské buňky dokazují aktivaci signální dráhy, která odpovídá na poškození DNA (Masutomi a kol., 2005). hTERT interaguje s telomery a ovlivňuje interakce telomer s jadernou matrix. To vede k transkripčním změnám spolu se zvýšenou stabilitou G1

chromozomu a zvýšenými DNA opravami (Sharma a kol., 2003). Konstitutivní nadměrná exprese hTERT usnadňuje maligní transformaci nezávisle na vlivu celkové délky telomer a činí buňky více rezistentní k apoptóze. Lidská TERT může přispět k buněčné odpovědi na genotoxické poškození. Masutomi a kol. ukázali, že v diploidních fibroblastech při absenci hTERT nedochází k řádné odpovědi na DNA poškození po vystavení buněk ionizujícímu záření. Po ozáření absentovala fosforylace některých klíčových komponent odpovědi na DNA poškození (DDR) včetně histonu H2A a Chk1 kinázy. Zdá se tedy, že telomeráza je důležitým hráčem v přenosu DDR signálu, stále však nebyl objasněn přesný mechanismus této funkce telomerázy (Masutomi a kol., 2005).

### **2.4.3 Mitochondriální funkce**

Další netelomerickou funkcí je i ochrana mitochondrií před oxidativním stresem (Ahmed a kol., 2008). Exogenně i endogenně indukovaný oxidativní stres vede k translokaci endogenního i nadměrně exprimovaného hTERT z jádra do mitochondrií (Haendeler a kol., 2003). Exprese TERT, při působení oxidativního stresu, snižuje poškození mitochondriální DNA a zlepšuje mitochondriální funkci. Ochrana mitochondrií je důležitá funkce telomerázy pro přežívání buněk (Ahmed a kol., 2008). V jiné práci byla zjištěna korelace mezi jaderně lokalizovanou telomerázou a vysokým množstvím poškozené jaderné DNA. Na druhé straně buňky, exprimující telomerázu, která byla vyloučena z jádra, neukázaly žádné nebo velmi nízké poškození jaderné DNA (Singhapol a kol., 2013). Singhapol a kol. poukazují na možnost ochrany nádorových buněk před apoptózou právě díky mitochondriální telomeráze.

## **2.5 TERT a Wnt/ $\beta$ -katenin signální dráha**

Wnt signální dráha hraje důležitou roli v regulaci pluripotence v embryonálních i dospělých kmenových buňkách v různých typech tkání (Hoffmeyer a kol., 2012). Abnormální aktivace Wnt signální dráhy může vést k rozvoji kolorektálních tumorů. Hlavní efektor této dráhy je dvojdílný transkripční faktor  $\beta$ -katenin/T-buněčný faktor (Jin, 2008). V letech 2009 a 2012 se objevily dvě zásadní práce poukazující na funkci TERT ve Wnt signální dráze. Zatím co jedna hovoří o regulaci dráhy prostřednictvím TERT (Park a kol., 2009), druhá naopak tvrdí, že hladina TERT je regulována přes  $\beta$ -katenin a Wnt dráhu (Hoffmeyer a kol., 2012).

Wnt signální dráha je zapojena ve fyziologických a patofyziologických aktivitách (Jin, 2008). Na buněčné úrovni, tato dráha reguluje proliferaci, morfologii, motilitu a smrt (Kikuchi, 1999). Poprvé byla rozpoznána v buňkách rakoviny střeva a ve studiích

embryonálního vývoje *Drosophily melanogaster* a žáby *Xenopus laevis*. Intracelulární signalizace Wnt dráhy se rozvětjuje na nejméně tři odvětví:

i)  $\beta$ -katenin dráha

- kanonická Wnt dráha, která aktivuje cílové genu v jádře

ii) Dráha rovinné buněčné polarity

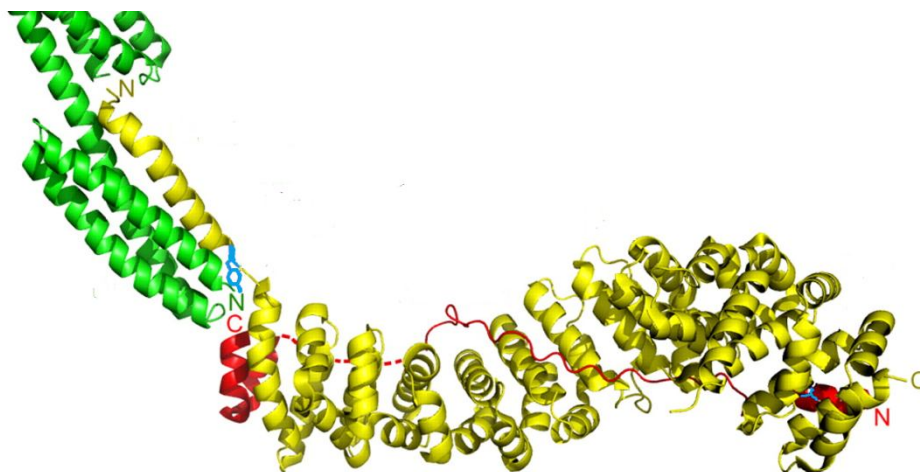
- zapojuje Jun N-koncovou kinázu (JNK) a cytoskeletální přesmyky

iii) Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  dráha

i) Wnt jsou sekretované glykoproteiny, které se vážou k frizzled proteinům, obsahujícím sedm transmembránových domén (Huelsen a Behrens, 2002). Tyto proteiny mohou být asociovány heterotrimerními G- proteiny. Pro aktivaci Wnt signální dráhy je podstatná interakce Wnt proteinu (G-proteiny) a frizzled proteinů, jako je interakce mezi LRP, receptorem tyrosinkinázy a ROR2. Aktivované *Dishvelled* proteiny modulované kinázou PAR1, umožňují Wnt aktivaci  $\beta$ -kateninové dráhy (Huelsen a Behrens, 2002). Stabilizovaný  $\beta$ -katenin vstupuje do buněčného jádra a spojuje LEF/TCF transkripční faktory, což vede k transkripci Wnt cílových genů. Transkripční aktivace je zprostředkována interakcí  $\beta$ -kateninu s histon acetyl transferázou, SWI/SNF komplexem a Bcl9 vázaným na protein Pygopus. Různé sekretované faktory jako jsou Cerberus (Cer) a FrzB se vážou na Wnt receptory a blokují interakci s frizzled proteiny. Dickkopf (Dkk) je antagonistou Wnt signalingu blokováním přístupu k LRP koreceptoru a iniciací LRP endocytózy ve spolupráci s kremenem. Intracelulárně, Wnt signalizace vede ke stabilizaci cytosolického  $\beta$ -kateninu. Při absenci Wnt signalizace je  $\beta$ -katenin fosforylován kasein kinázou Ia ( $\text{CKI}\alpha$ ), anebo  $\text{CKI}\epsilon$  na Ser45. Fosforylace posledních dvou zmíněných zbytků spouští ubikvitinaci  $\beta$ -kateninu a následnou degradaci v proteazomu. Degradace  $\beta$ -kateninu je modulována multipodjednotkovou serin/treonin fosfatázou (Huelsen a Behrens, 2002). ii) V dráze rovinné buněčné polarity frizzled aktivuje JNK a usměrňuje asymetrické cytoskeletální organizace a koordinuje polarizaci buněk v rovině epiteliálních listů. Produkt Wnt cílového genu *naked* byl identifikován jako antagonist Wnt signalizace, který se navazuje na Dsh a blokuje  $\beta$ -katenin, ale stimuluje JNK dráhu (Huelsen a Behrens, 2002). iii) Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  draha uvolňuje intracelulární vápník nejspíše prostřednictvím G-proteinů. Tato dráha zahrnuje aktivaci fosfolipázy C a protein kinázy C. Zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů může aktivovat fosfatázu kalcineurin, což vede k defosforylaci transkripčního faktoru NF-AT a jeho akumulaci v jádře (Huelsen a Behrens, 2002).

## 2.5.1 $\beta$ – katenin

$\beta$ - katenin patří do rodiny kateninových proteinů, které byly izolovány v roce 1980 u buněk závislých na vápník, jako proteiny asociované s E-kadherinem. Spolu s  $\beta$ - kateninem byly izolovány  $\alpha$ -katenin a  $\gamma$ -katenin/plakoblobin (viz Obr. 7).  $\beta$ -katenin má dvě odlišné hlavní funkce – strukturní a signální. Strukturní funkce je důležitá pro schopnost mezibuněčné adheze. Signální funkce byla objevena u *Drosophily* ve spojení s Wnt signální dráhou (Valenta a kol., 2012).  $\beta$ - katenin je klíčový komponent této signální dráhy, přičemž vytváří komplex se členy TCF rodiny, které patří mezi jaderné, kontrolující transkripci cílových genů (Hoffmeyer, 2012).



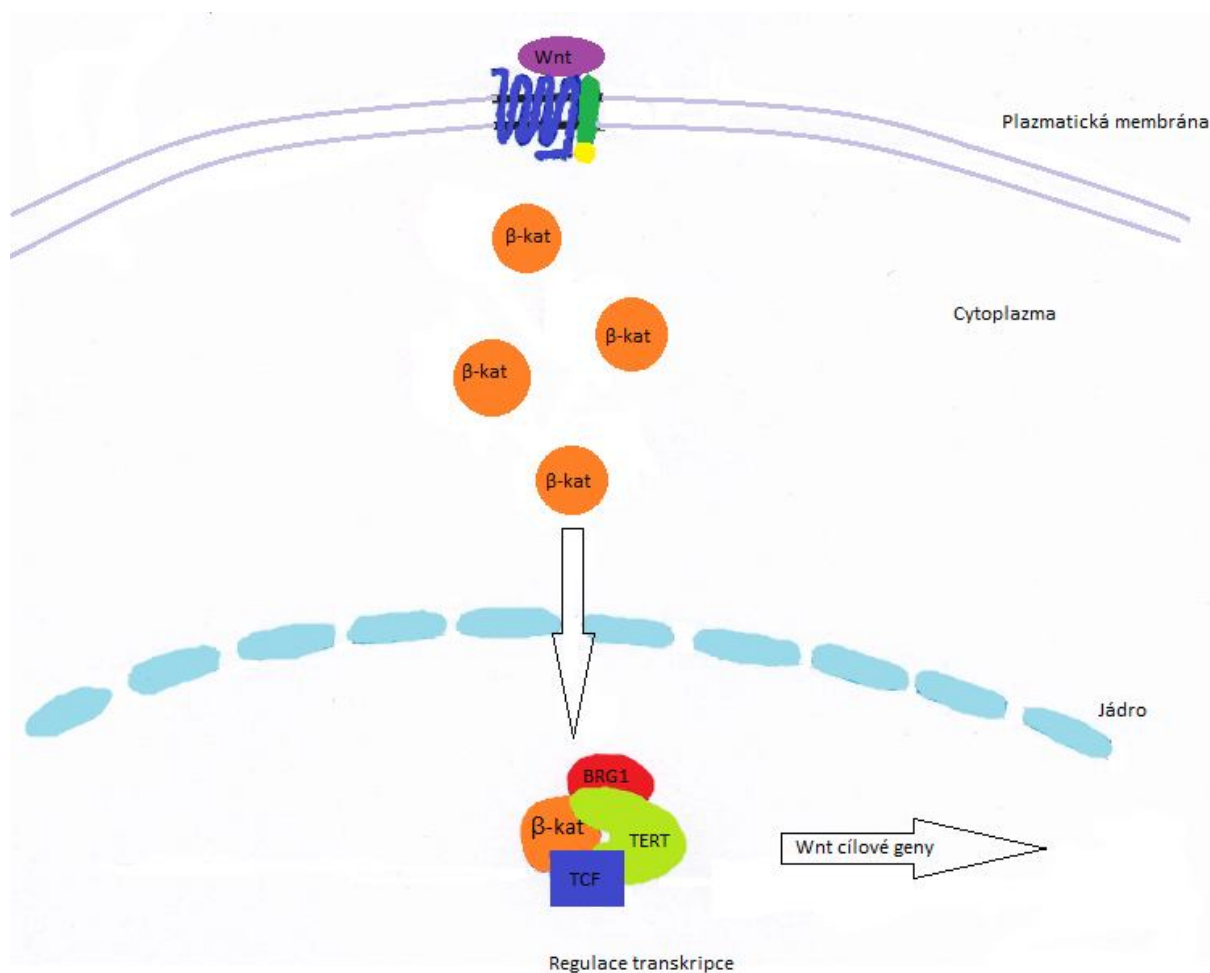
**Obr. 7:** Struktura kateninových proteinů. Žlutě  $\beta$ -katenin, zeleně  $\alpha$ -katenin, červeně E-kadhezin a modře  $\gamma$ -katenin (upraveno dle jcs.biologist.org).

### 2.5.2 Regulace Wnt/ $\beta$ -katenin signální dráhy TERT

TERT přímo reguluje Wnt/ $\beta$ -katenin signální dráhu na úrovni transkripce tím, že slouží jako kofaktor v transkripčním komplexu zahrnujícím  $\beta$ -katenin (viz Obr. 8). Imunoprecipitační experimenty ukázaly, že TERT interaguje s BRG1, který slouží jako aktivátor transkripce Wnt genů. Navíc bylo ukázáno, že TERT společně s BRG1 aktivuje Wnt reportéry (Park a kol., 2009). Experimenty s katalyticky inaktivní verzí telomerázy ukázaly, že k aktivaci Wnt promotorů není potřebná katalytická aktivita telomerázy. TERT<sup>-/-</sup> myši vykazovaly vývojové defekty somitů vzhledem k defektní aktivaci Wnt dráhy při vývoji plodu (Park a kol., 2009). Wnt signalizace má rozhodující roli při vývoji, proliferaci tkáně progenitorových buněk a při nádorové transformaci. V nepřítomnosti Wnt signálu dochází k utlumení exprese Wnt regulovaných genů v důsledku vazby represorů do oblasti promotorů těchto genů.  $\beta$ -katenin vytlačuje tyto represory a zprostředkuje vazbu proteinů, které pomáhají v transkripční aktivaci na TCF (transkripční faktory) vazebných místech. Je pravděpodobné, že některé kofaktory mohou být kontextově specifické a vysvětlit jak Wnt signalizace vede k buněčné krizi,



proliferaci a diferenciaci buněk. Telomeráza představuje v progenitorových buňkách jeden takový kofaktor, který usnadňuje regulaci Wnt při sebeobnově, proliferaci nebo přežívání (Park a kol., 2009).

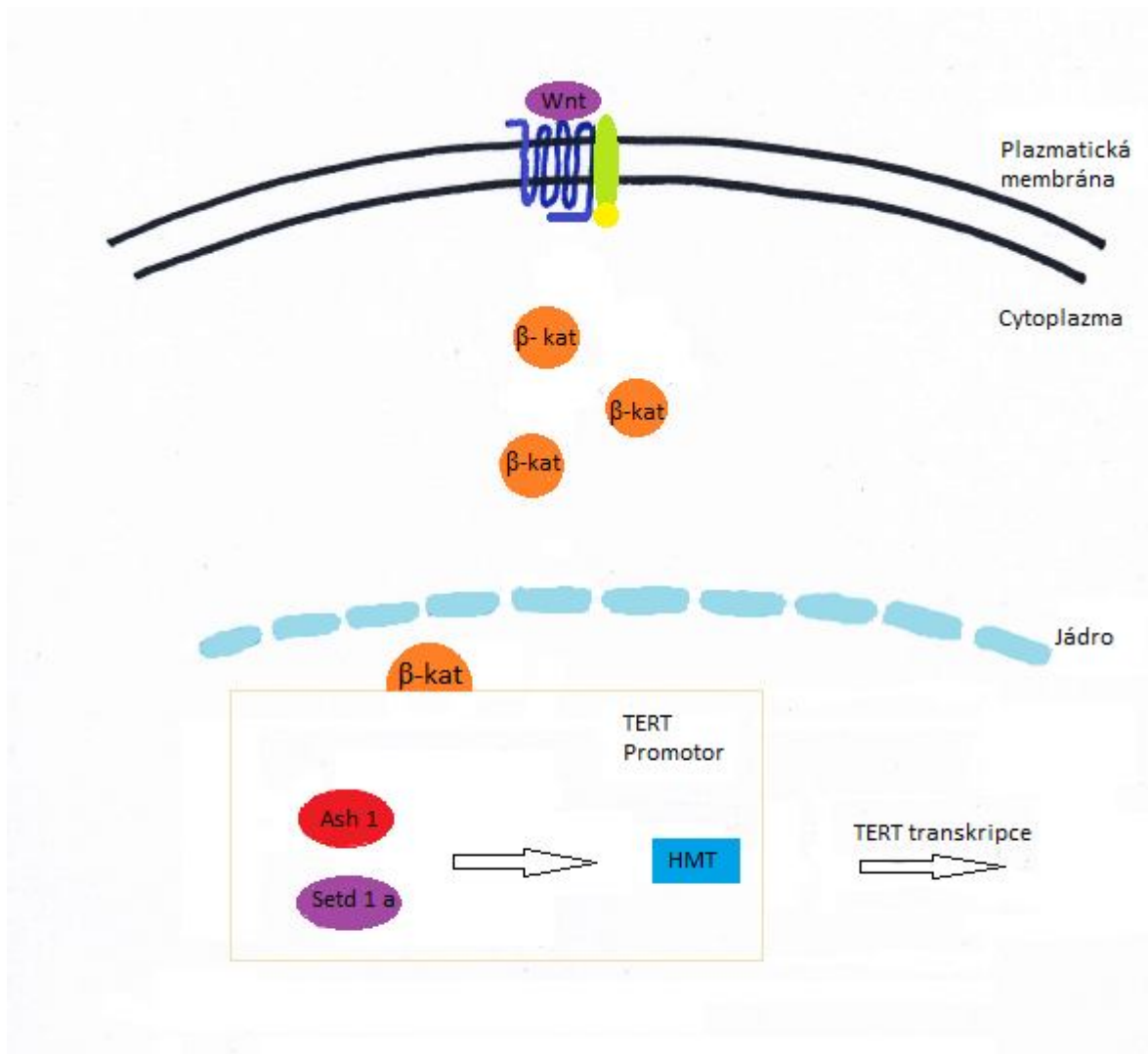


**Obr. 8:** Regulace Wnt/ $\beta$ -katenin dráhy TERT (upraveno dle Martínez a Blasco, 2011) Přítomnost Wnt signálu má za následek akumulaci  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě.  $\beta$ -katenin interaguje s transkripčními faktory rodiny TCF, s BRG1 a s TERT podjednotkou telomerázy což má za následek ovlivnění exprese Wnt cílových genů.

### 2.5.3 Wnt/ $\beta$ -kateninová dráha reguluje expresi TERT

Hoffmeyer a kol. ukázali, že Wnt/ $\beta$ -kateninová dráha reguluje hladinu exprese TERT v myších kmenových buňkách (viz Obr. 9). Zatímco v buňkách neexprimujících  $\beta$ -

cat<sup>-/-</sup>) byla hladina TERT mRNA významně redukována, kmenové buňky exprimující aktivovanou verzi  $\beta$ -kateninu ( $\beta$ -cat<sup>Ex3/+</sup>) vykazovaly výrazně zvýšenou hladinu TERT mRNA. Tudiž změny v množství hladiny  $\beta$ -kateninu mohou ovlivnit expresi TERT a vést k odlišnostem v aktivitě telomerázy. Aktivita telomerázy významně roste u buněk s aktivním  $\beta$ -kateninem v porovnání s normálními buňkami a je redukována u  $\beta$ -cat<sup>-/-</sup>. Změny v expresi TERT a následně v aktivitě telomerázy mají za následek odlišnou délku telomer u buněk s různými verzemi  $\beta$ -kateninu. Regulace exprese TERT prostřednictvím Wnt/ $\beta$ -kateninové dráhy hraje významnou roli u lidských nádorů. Obě zkoumané nádorové linie (embryonální karcinom NTera2 a kolorektální karcinom SW40) vykazovaly zvýšenou hladinu  $\beta$ -kateninu v důsledku defektního proteinu APC, který reguluje hladinu  $\beta$ -kateninu. Navíc *knock-out*  $\beta$ -kateninu v uvedených buněčných liniích pomocí malých interferujících RNA (siRNA) snižuje expresi TERT a aktivitu telomerázy.  $\beta$ -katenin reguluje expresi TERT přímo, vazbou na TERT promotor. V místě počátku transkripce TERT bylo po expresi konstitutivně aktivního  $\beta$ -kateninu resp. po aktivaci Wnt dráhy zaznamenáno signifikantní zvýšení hladiny RNA polymerázy II (aktivované fosforylací na Ser5) a některých specifických transkripčních faktorů. Zároveň byly v místě startu transkripce zvýšeny hladiny některých proteinů odpovědných za modifikaci chromatinu. Byli to především dva členové trithorax skupiny proteinů, Ash21 a Setd 1a, které vykazují aktivitu histonmethyltransferáz (HMT). HMT aktivované  $\beta$ -kateninem regulují modifikace chromatinu potřebné k iniciaci TERT transkripce (Hoffmeyer a kol., 2012).



**Obr. 9:** Wnt/ $\beta$ -katenin zprostředkovaná regulace TERT transkripce (upraveno dle Martínez a Blasco, 2011)  $\beta$ -katenin aktivované signálem z Wnt dráhy je potřebný pro aktivaci členů TrxG proteinů, a to konkrétně Ash 1 a Setd 1a proteinů. Ash 1 a Setd 1a jsou lokalizovány v promotoru TERT a aktivují histonmetyltransferázu potřebnou pro regulaci modifikace chromatinu.

### 3 Cíl práce

Předchozí výzkum ukázal, že telomerizované linie vykazují rezistenci na inhibitory PARP1. Jedním z možných mechanismů této rezistence je telomerázou zprostředkovaná aktivace Wnt dráhy, která všeobecně zvyšuje přežívání buněk. Druhou možností je, že mechanismus rezistence na PARP inhibitory přímo souvisí s údržbou telomer a katalytickou aktivitou telomerázy. Pro odlišení těchto dvou možností byl testován panel linií exprimující různé katalyticky aktivní i neaktivní verze telomerázy na citlivost vůči PARP inhibitorům. Protože aktivace Wnt signální dráhy pomocí TERT nezávisí na katalytické aktivitě enzymu, je na základě citlivosti testovaných linií možno usoudit zda má na rezistenci podíl aktivace Wnt dráhy nebo katalytická aktivita telomerázy.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Přístroje

Analyzátor buněčné viability Vi-Cell XR (Beckman Coulter)

Blotovací aparatura Trans-Blot SD (BioRad)

Centrifuga (Hanil)

CO<sub>2</sub> inkubátor HeraCell (Thermoscientific)

Flow box s horizontálním prouděním vzduch (Thermoscientific)

ChemiDoc (BioRad)

Komůrka pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN (BioRad)

Laboratorní váhy (KERN)

Světelný mikroskop (Zeiss)

Třepačka (BioSan)

### 4.2 Chemikálie

90% ethanol

Akrylamid (BioRad)

Amonium persulfát (Sigma)

Dimetylsulfoxid (Sigma)

Dodecylsírán sodný (Sigma)

Doxycyklin (Calbiochem)

EDTA (Sigma)

Chemiluminiscenční substrát West Pico luminal (Thermo Fisher)

Chemiluminiscenční substrát West Pico stable peroxide solution (Thermo Fisher)

Inhibitor Ku 58948 (Astra Zeneca)

Krystalová violet (Sigma)

Médium DMEM (GE Healthcare)

PONCEAU (Sigma)

Puromycin (Sigma)

TEMED (Sigma)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma)

TrypLe (Invitrogen)

Sušené mléko (Laktimo)

## 4.2.1 Protilátky

Tab. II.: Použité protilátky

Název protilátky	Typ protilátky	Ředění
Protilátka GAPDH (GeneTex)	primární	1:500
Protilátka hTERT (Rockland)	primární	1:500
Protilátka Anti-rabbit (GE Healthcare)	sekundární	1:1000
Protilátka Anti-mouse (GE Healthcare)	sekundární	1:1000

## 4.3 Roztoky

Blokovací roztok – 5% (w/v) sušené mléko v 1x TBS

LSB – Laemmli sample buffer - 60 mmol/l Tris-Cl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v)  $\beta$ -merkaptoethanol, 0.01% (w/v) bromfenolová modř

PBS - 3.2 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.3 mmol/l KCl, 135 mmol/l NaCl (pH 7,2)

TBS - 25 mmol/l Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4

PBST/TBST – 1x TBS/PBS s 0,5% (v/v) Tween 20

## 4.4 Buněčné linie

U2OS – adherentní buněčná linie izolovaná z lidského osteosarkomu

U2OS TERT – Stabilní buněčná linie odvozená od U2OS konstitutivně exprimující proteinovou podjednotku lidské telomerázy TERT

U2OS TERT DN – stabilní buněčná linie odvozená od U2OS konstitutivně exprimující dominantně negativní verzi proteinové podjednotky lidské telomerázy

HCT 116 pBabe Puro – adherentní buněčná linie izolovaná z lidského kolorektálního karcinomu stabilně transdukována prázdným vektorem pBabe Puro

HCT 116 shTERT – buněčná linie odvozená od HCT 116 stabilně transdukována vektorem pro indukibilní expresi TERT shRNA (tet-pLKO systém)

HCT 116 TERT DN – stabilně transdukovaná buněčná linie odvozená od HCT 116 exprimující dominantně negativní verzi proteinové podjednotky lidské telomerázy

HCT 116 NT - stabilně transdukovaná buněčná linie dvozená od HCT116 exprimující kontrolní (*non-targeting*, NT) shRNA

#### **4.5 Kultivace buněk**

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích, při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a při vlhkosti 90 %. Byly kultivovány v DMEM (*Dulbecco's Eagle's Medium*) doplněným o 100 U/ml penicilinu, streptomycinu a 10% (v/v) fetálním bovinním sérem (FBS). Pasáž buněk byla prováděna krátce před koncem exponenciální fáze růstu.

#### **4.6 Kolonyformní esej**

Do 6 jamkového panelu bylo vysazeno 200 buněk/jamka. Druhý den bylo růstové médium vyměněno za médium s inhibitorem resp. rozpouštědlem. Po 10 dnech byly buňky zafixovány 6 ml 70 % ledového etanolu (30-45 min) a barveny 6 ml krystalové violeti (30 min). Celá esej byla vyhodnocena spočítáním vzniklých kolonií v ovlivněné části panelu a v kontrole s následným zprůměrováním a odečtením.

#### **4.7 Měření viability (Survival test)**

Na Petriho misky, o průměru 6 cm, bylo vysazeno 100 000 (200 000 pro HCT 116) buněk v případě krátkodobého experimentu a 10 000 buněk pro dlouhodobý experiment. Po uplynutí jednoho dne byly buňky ovlivněny inhibitorem resp. rozpouštědlem. Po 48 hod. byly buňky trypsinizovány a spočítány na přístroji ViCell (BeckmanCoulter). U dlouhodobého experimentu byla doba kultivace buněk pouze prodloužena na 10 dní, s výměnou média s čerstvým inhibitorem v půlce experimentu.

#### **4.8 Tvorba klonů**

Pro vytvoření klonů bylo na Petriho misku o průměru 10 cm vysazeno cca 1000 buněk. Po 14 dnech byly vzniklé kolonie promyty roztokem 5 mmol/l EDTA v PBS po dobu 10 s a následně pomocí plastové špičky přeneseny do 12 jamkového panelu s 1 ml kultivačního média se selekčním antibiotikem.

## 4.9 SDS PAGE a Western blotting (semi-dry)

Polyakrylamidový gel byl připraven podle níže uvedeného rozpisu (viz Tab. III) v aparatuře Mini Protean II (Bio-Rad).

**Tab. III. :** Roztoky pro přípravu 10% polyakrylamidového gelu

<b>Dělicí gel</b>	
roztoky	objem [ml]
30% Akrylamid/bisakrylamid 29:1	5
destilovaná voda	5,9
1,5g/ml Tris (pH= 8,8)	3,8
10% SDS	0,15
10% APS	0,15
TEMED	0,006
<b>Zaostřovací gel</b>	
destilovaná voda	2,7
30% Akrylamid/bisakrylamid 29:1	0,67
0,5 g/ml Tris (pH=6,8)	0,5
10% SDS	0,04
10% APS	0,04
TEMED	0,004

Proteiny byly separovány při napětí 250 V po dobu 60 min. Za použití přístroje Trans- Blot SD (Bio-Rad) pro přenos proteinů byl proveden přenos proteinů z elektroforetické separace na nitrocelulózovou membránu. Přenos proteinů probíhal při konstantním napětí 12 V po dobu 60 min. Po přenosu proteinů byla membrána obarvena roztokem barvy Ponceau, obarvená membrána byla nastříhána a zalita blokovacím roztokem. Po 30 minutové inkubaci s blokovacím roztokem byly na membránu naneseny primární protilátky. Po 1 hodině byla membrána promyta na třepačce v roztoku TBST. Na membránu byly naneseny sekundární protilátky ředěné 1:1000 v blokovacím roztoku. Inkubace probíhala po dobu 30 min.

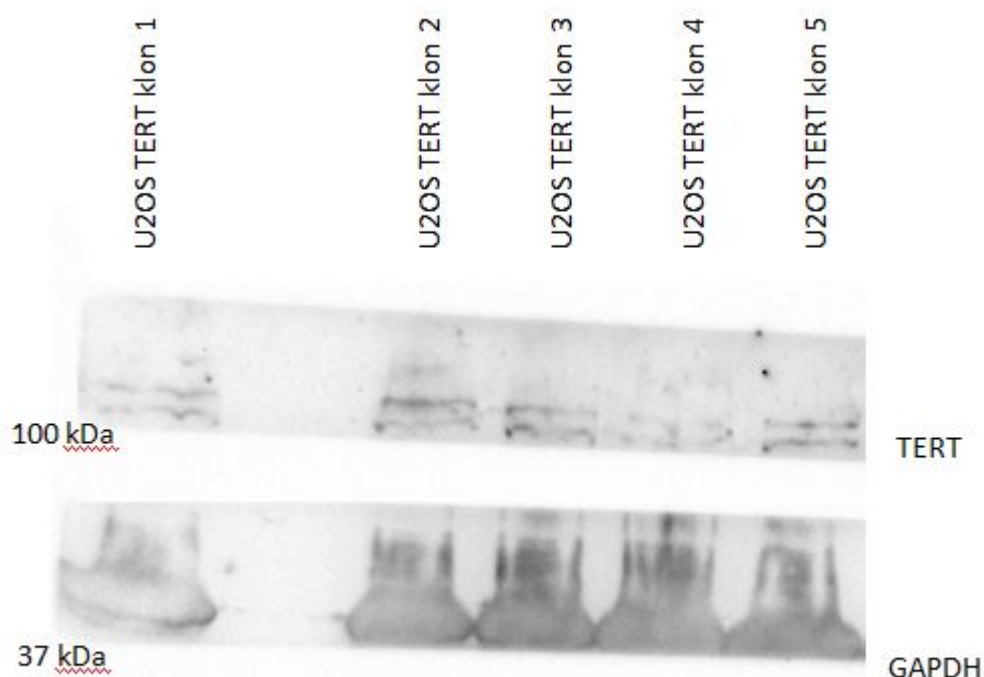


Membrána byla následně promyta na třepačce v roztoku TBST po dobu 5 min ve čtyřech opakováních. Pro chemiluminiscenční detekci byly použity West Pro Luminol a West Pico Stable Peroxid Solution dle doporučení výrobce. Signály byly následně odečítány přístrojem ChemiDoc.

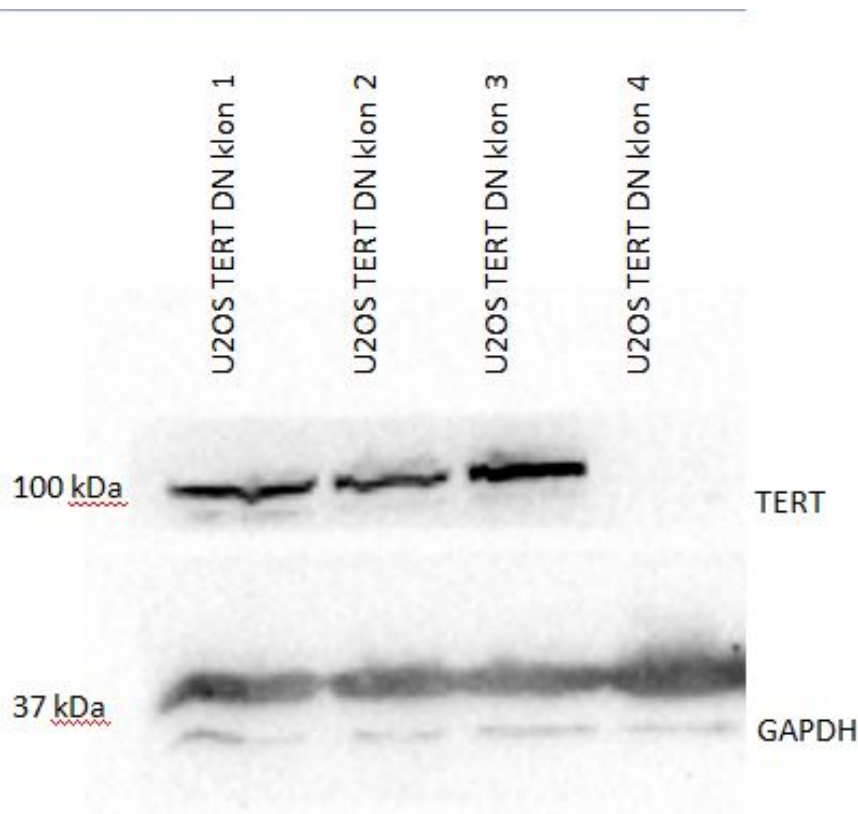
## 5 Výsledky

### 5.1 Míra exprese TERT u klonů linie U2OS TERT a U2OS TERT DN

Před testováním rezistence U2OS linií a katalyticky aktivní a neaktivní verzí telomerázy byly použité linie rozklonovány za účelem získání klonů s různou expresí telomerázy. Klony s podobnou expresí bylo možné navzájem porovnat a zároveň korelovat míru exprese TERT a rezistenci na PARPi. U vytvořených klonů buněčné linie U2OS TERT (katalyticky aktivní) a U2OS TERT DN (katalyticky neaktivní) byla míra exprese stanovena, pomocí Western blottingu. Protein byl exprimován u klonu 2, klonu 3 a klonu 5 linie U2OS TERT a u klonu 1, klonu 2 a klonu 3 linie U2OS TERT DN. U zbylých klonů nebyla zaznamenána žádná nebo velmi nízká exprese proteinu (viz Obr. 10, Obr. 11). Klony s vysokou expresí proteinu byly poté použity pro metodu měření viability.



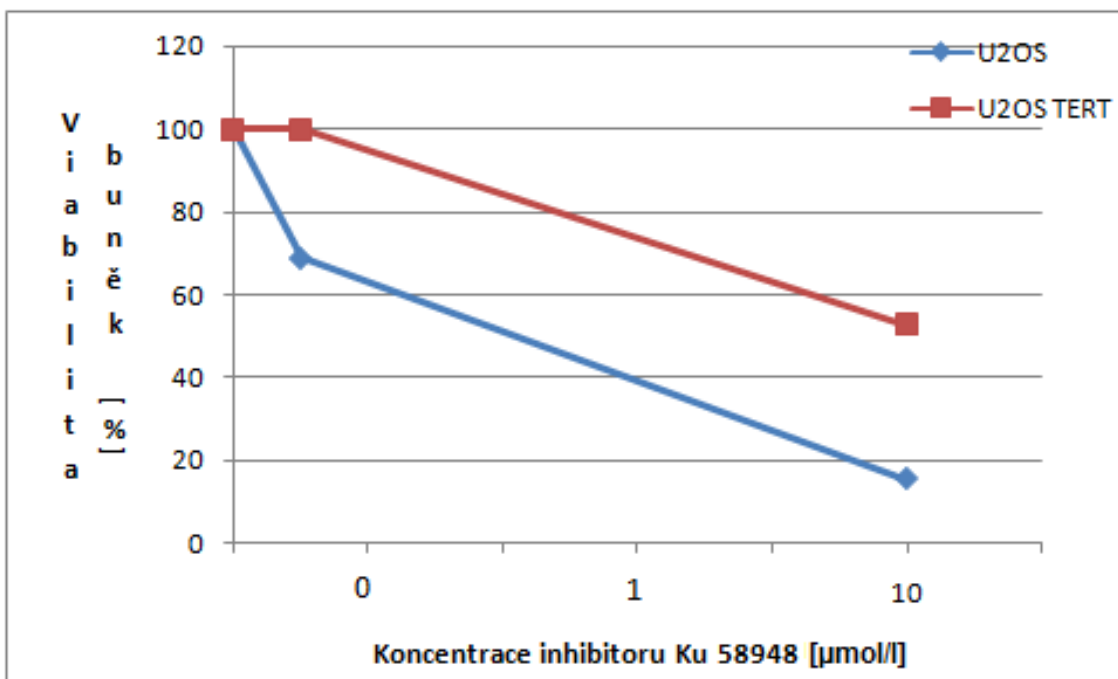
**Obr. 10:** Exprese TERT u klonů linie U2OS TERT



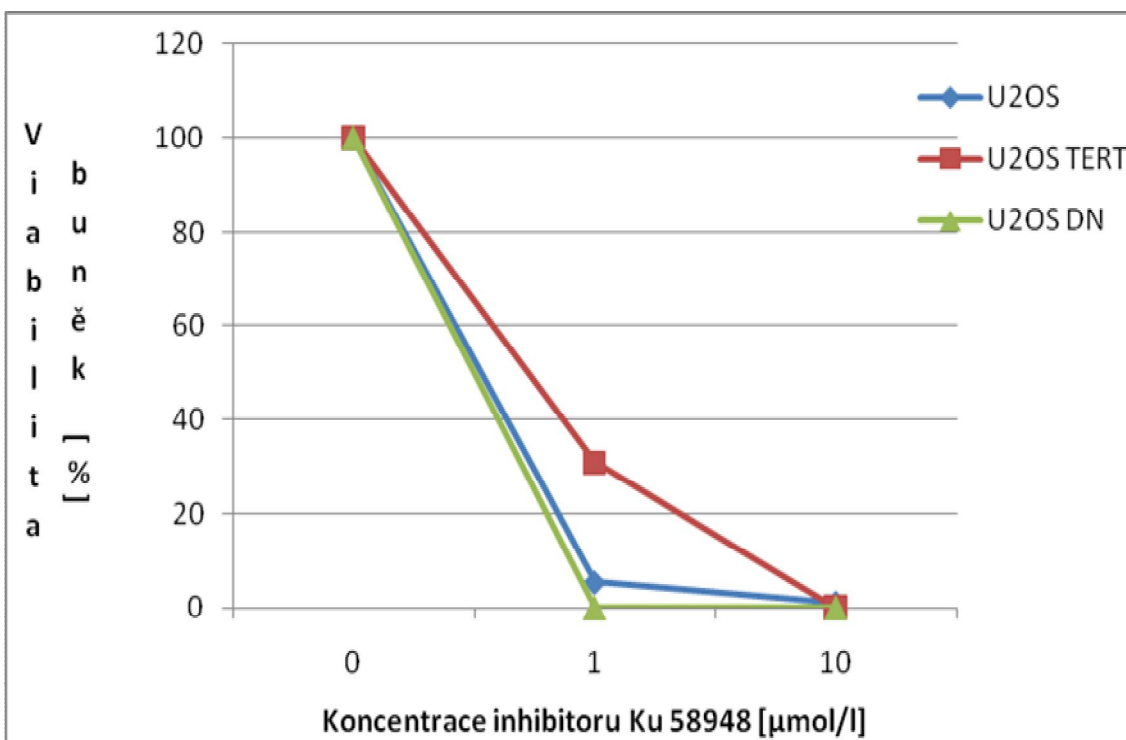
**Obr. 11:** Expresse TERT DN u klonů linie U2OS TERT DN

## 5.2 Viabilita buněčných linií U2OS

Buněčné linie U2OS prokázaly odlišnou rezistenci vůči inhibitoru PARP 1, v závislosti na exprimované verzi telomerázy. Linie U2OS TERT obsahující *wild type* TERT se ve výsledcích ukázala rezistentnější vůči inhibitoru než je tomu u kontroly bez telomerázy (U2OS), a U2OS TERT DN exprimující katalyticky neaktivní verzi TERT. Na základě těchto dat se tedy zdá, že rezistence telomerizovaných buněčných linií tedy nezávisí na aktivaci Wnt signální dráhy, ale na katalytické aktivitě telomerázy (viz Graf č. 1 a Graf č. 2).



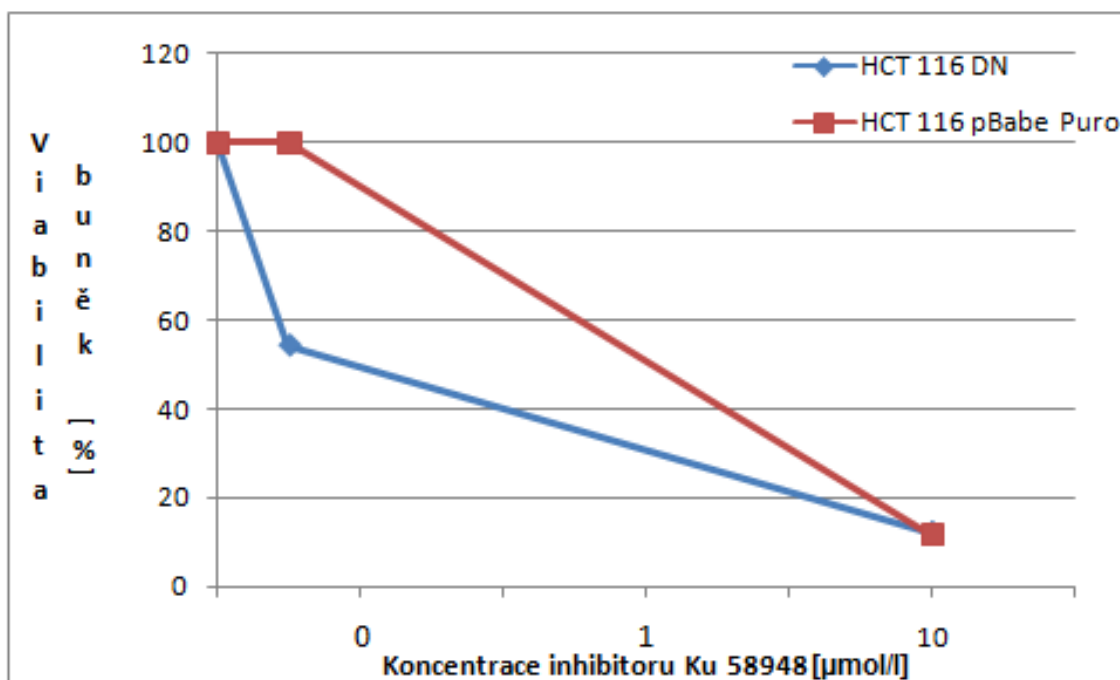
**Graf č. 1:** Viabilita linií U2OS a U2OS TERT, ovlivněných inhibitorem Ku 58948 v koncentracích 1  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$ , naměřená po 48 hodinách



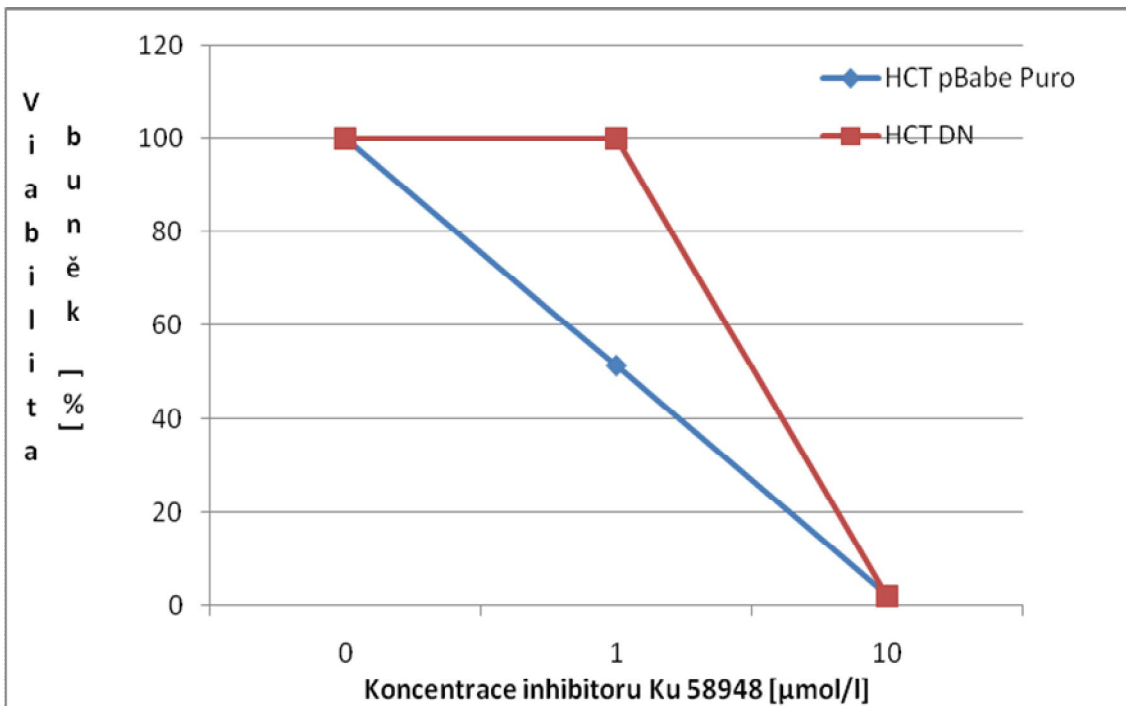
**Graf č. 2:** Viabilita linií U2OS, U2OS TERT a U2OS TERT DN ovlivněných inhibitorem Ku 58948 v koncentracích inhibitoru 1  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$  po desetidenním měření

### 5.3 Viabilita buněčných linií HCT 116

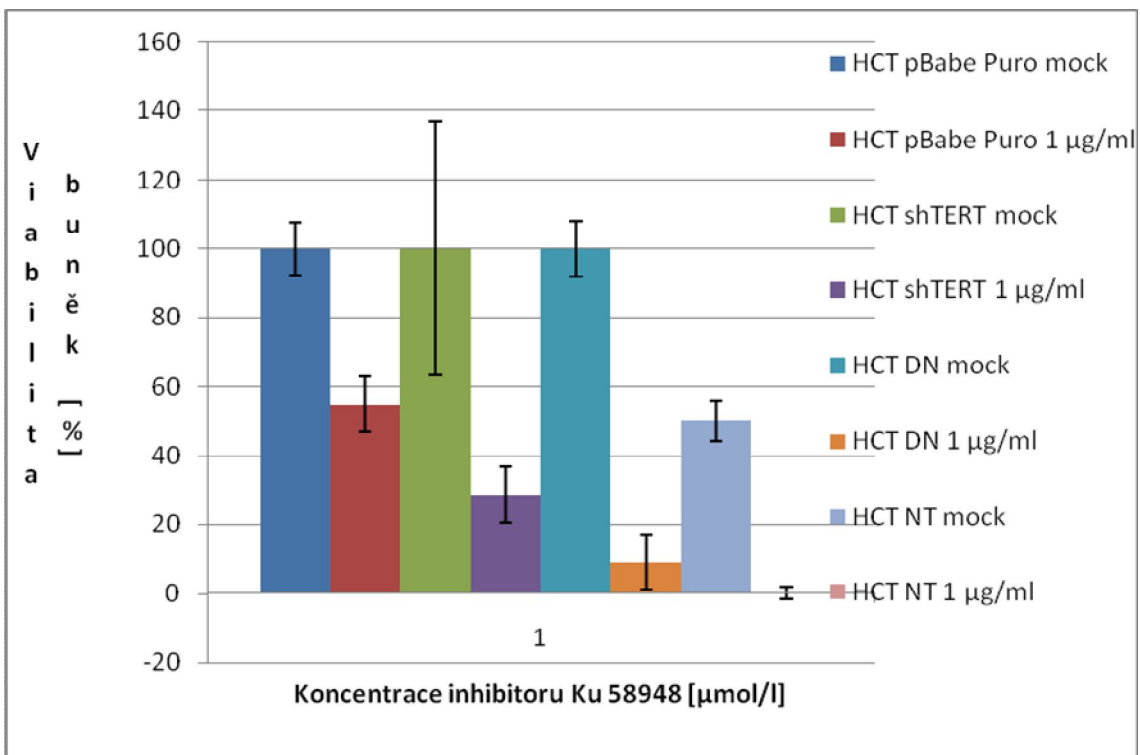
Experimenty s buněčnými liniemi odvozenými od U2OS byly zopakovány u linie HCT 116. Tato linie odvozená od kolorektálního karcinomu vykazuje přirozeně vysokou hladinu exprese TERT. Buněčné linie HCT 116 také prokázaly, při měření, odlišnou viabilitu po ovlivnění inhibitorem PARP - 1. Při krátkodobém experimentu byla zaznamenána rezistence linie HCT 116 pBabe Puro vůči inhibitoru PARP (viz Graf č. 3). Naproti tomu, HCT 116 TERT DN se ukázala být výrazně citlivá. Exprese dominantně negativní verze telomerázy TERT DN interferuje s endogenní telomerázou a ruší její katalytickou aktivitu, TERT DN je však schopná aktivovat Wnt signální dráhu. To by opětovně naznačovalo, že sledovaný fenotyp rezistence je závislý na katalytické aktivitě telomerázy. Dlouhodobé experimenty však neprokázaly odlišnost v přežívání obou linií (viz Graf č. 4). Rozdíly v dlouhodobém přežívání se navíc neprokázaly ani u linie HCT 116 sh - TERT s inducibilním *knock-downem* TERT (výsledky neuvedeny). Měření přežívání kolonyformní esejí ovšem naznačilo, že pokud je telomeráza „knock-outována“ dochází k výraznému poklesu růstu buněk ovlivněných inhibitorem (viz Graf č. 5). Dlouhodobé experimenty tedy zcela neprokázaly, jestli rezistence telomerizovaných buněčných linií závisí na katalytické aktivitě podjednotky telomerázy.



**Graf č. 3:** Viabilita linií HCT 116 pBabe Puro a HCT 116 TERT DN, ovlivněných inhibitorem Ku 58948 v koncentracích 1 µmol/l a 10 µmol/l, zaznamenaná po 48 hodinách.



**Graf č. 4:** Naměřená viabilita u linií HCT 116 pBabe Puro a HCT 116 TERT DN, ovlivněných inhibitorem Ku 58948 v koncentracích 1  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$ , po 10 dnech.



**Graf č. 5:** Viabilita vzniklých kolonií buněčných linií HCT 116 pBabe Puro, HCT 116 shTERT, HCT 116 TERT DN a HCT 116 NT ovlivněných inhibitorem Ku v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  měřená kolonyformní esejí.

## 6 Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo zjistit jakou roli hraje při přežívání buněčných linií aktivace Wnt signální dráhy a zda rezistence telomerizovaných buněčných linií závisí právě na Wnt signální dráze nebo na katalytické aktivitě telomerázy. Z toho důvodu je experimentální část práce založena *knockdownu* resp. expresi katalyticky neaktivní verze telomerázy u buněčných linií. Katalyticky neaktivní verze je schopna aktivovat Wnt, což mělo umožnit odlišení zkoumaných mechanismů rezistence (Park a kol., 2009). U buněčných linií U2OS TERT a U2OS TERT DN je pozorovatelný rozdíl ve viabilitě buněk (viz Graf č. 2). Při dlouhodobém experimentu byla zaznamenána zvýšená rezistence buněčné linie U2OS TERT mající katalytickou aktivitu telomerázy. Naproti tomu buněčná linie U2OS TERT DN neprokázala žádnou rezistenci na inhibitor PARP při tomto experimentu. Dominantně negativní verze katalytické podjednotky telomerázy měla prokázat, zda opravdu rezistence linií ovlivněných inhibitorem PARP závisí na katalytické aktivitě nebo na aktivaci Wnt signální dráhy. Krátkodobý experiment prokázal, že buněčná linie U2OS neexprimující telomerázu nevykazuje žádnou rezistenci vůči inhibitoru Ku 58948 (viz Graf č. 1).

Buněčné linie odvozené od HCT 116 prokázaly určité odlišnosti v naměřené viabilitě v závislosti od délky prováděného experimentu. Při krátkodobém experimentu linie HCT 116 pBabe Puro prokázala jistou rezistenci oproti linii HCT 116 TERT DN, která exprimuje dominantně negativní verzi telomerázy (viz Graf č. 3). Tyto data naznačily, že linie HCT 116 pBabe Puro byla zřejmě rezistentnější z důvodu zapojení katalytické aktivity telomerázy. Avšak dlouhodobý experiment prokázal opačný efekt, tj. větší rezistenci buněčné linie HCT 116 TERT DN (viz Graf č. 4). Důvodem by mohla být pozdější aktivace Wnt signální dráhy, která se při krátkodobém experimentu neprojevila. Další možností tohoto rozdílu může být i doba působení inhibitoru Ku 58948, který byl vyměněn v polovině experimentu, což nemuselo být dostačující. Stejně tak jako krátkodobý experiment i výsledky kolonyformní esej, po desetidenním měření, ukázaly, že buněčná linie HCT 116 pBabe Puro je více rezistentní na inhibitor PARP1 Ku 58948 než buněčná linie HCT 116 TERT DN. To by mohlo znamenat, že protichůdné výsledky krátko- a dlouhodobých experimentů skutečně způsobilo vyčerpání inhibitoru v případě dlouhodobého experimentu. U kolonyformních esejí je totiž klíčový počáteční efekt inhibitoru na vysazené buňky, který určí finální počet kolonií a to nezávisle na vyčerpání inhibitoru v pozdější fázi inkubace. Naopak u klasického měření viability je potřebný neustálý účinek inhibitoru na dělicí se buňky.

Hypotézu o účasti katalytické aktivity telomerázy na rezistenci vůči PARP inhibitoru potvrdily i experimenty s inducibilním *knock-outem* TERT. Při *knock-outu* telomerázy v buněčných liniích HCT 116 shTERT je totiž pozorovatelný jasný pokles viability buněk ovlivněných inhibitorem (viz Graf č. 5). Buněčná linie U2OS TERT v experimentu prokázala zvýšenou rezistenci na inhibitor PARP. Tento jev byl pozorovatelný i při krátkodobém experimentu pro linie HCT 116 a potvrzen desetidenním experimentem provedeným technikou kolonyformní eseje u stejného typu linie. Linie s *knock-outem* telomerázy však stejnou rezistenci jako linie konstitutivně exprimující podjednotku lidské TERT neprojevují, proto závisí rezistence nejspíše od katalytické aktivity telomerázy. Naopak linie s dominantně negativní verzí proteinové podjednotky telomerázy (bez katalytické aktivity) nevykazovaly rezistenci na inhibitor PARP1. Za rezistenci na PARP inhibitor tedy nejspíše nestojí aktivace Wnt dráhy, ale katalytická aktivita telomerázy. Další možností ověření, zda rezistence telomerizovaných linií závisí na aktivaci Wnt signální dráhy, nebo je závislá na katalytické aktivitě telomerázy, je současné použití inhibitorů PARP a Wnt. Tato kombinace by v případě, že je rezistence na inhibitor PARP závislá na Wnt, měla výrazně ovlivnit přežívání buněk. Komplex TRF1 nacházející se na konci chromozomů, jehož akumulace omezuje činnost telomerázy v prodlužování telomer, může být zainhibován právě pomocí inhibitoru PARP. Tento inhibitor může mít tedy určitý vliv na replikaci telomer (Ye a kol., 2004).



## 7 Závěr

Prvotním cílem práce bylo zjištění, zda rezistence telomerizovaných buněčných linií na inhibitor PARP1 závisí na aktivaci Wnt signální dráhy nebo na katalytické aktivitě telomerázy. Buněčné linie U2OS exprimující verzi U2OS TERT prokázaly rezistenci vůči tomuto inhibitoru oproti buněčné linii U2OS TERT DN. Stejně výsledky byly zjištěny i u linií odvozených od HCT 116. Rezistence vůči inhibitoru PARP tedy nejspíše závisí na katalytické aktivitě telomerázy. Další možností v budoucnu, pro zjištění na čem tedy tato rezistence závisí, by mohlo být otestování dalších inhibitorů, popřípadě kombinace inhibitorů s inhibitorem PARP1 a dále následné zainhibování Wnt signální dráhy.

## 8 Literatura

Ahmed, S., Passos, J. F., Birket, M. J., Beckmann, T., Brings, S., Peters, H., Birch-Machin, M. A., von Zglinicki, T., Saretzki, G. (2008): Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *Journal of cell science* **121**, 1046-1053.

Alawi, F., Lin, P. (2011): Dyskerin is required for tumor cell growth through mechanisms that are independent of its role in telomerase and only partially related to its function in precursor rRNA processing. *Molecular carcinogenesis* **50**, 334-345.

Autexier, C., Lue, N. F. (2006): The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annual review of biochemistry* **75**, 493-517.

Bhattacharyya, A., Blackburn, E. H. (1994): Architecture of telomerase RNA. *The EMBO journal* **13**, 5721-5731.

Blackburn, E. H. (1991): Structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569-573

Blackburn, E. H. (2005): Telomerase and Cancer: Kirk A. Landon--AACR prize for basic cancer research lecture. *Molecular cancer research : MCR* **3**, 477-482.

Bosoy, D., Lue, N. F. (2001): Functional analysis of conserved residues in the putative "finger" domain of telomerase reverse transcriptase. *The Journal of biological chemistry* **276**, 46305-46312.

Bosoy, D., Peng, Y., Mian, I. S., Lue, N. F. (2003): Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. *The Journal of biological chemistry* **278**, 3882-3890.

Bryce, L. A., Morrison, N., Hoare, S. F., Muir, S., Keith, W. N. (2000): Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* **2**, 197-201.

Collins, K. (2006): The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 484-494.

Cong, Y. S., Wen, J. & Bacchetti, S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human molecular genetics* **8**, 137-142 (1999).

Cong, Y., Shay, J. W. (2008): Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell research* **18**, 725-732.

Corey, D. R. (2002): Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials. *Oncogene* **21**, 631-637.

de Lange, T. (2009): How telomeres solve the end-protection problem. *Science* **326**, 948-952.

Greider, C. W. (1991): Telomerase is processive. *Molecular and cellular biology* **11**, 4572-4580.

Greider, C. W., Blackburn, E. H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**, 405-413.

Greider, C. W., Blackburn, E. H. (1989): A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331-337.

Haendeler, J., Hoffmann, J., Brandes, R. P., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2003): Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707. *Molecular and cellular biology* **23**, 4598-4610.

Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., Weinberg, R. A. (1999): Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464-468.

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Harley, C. B. (2008): Telomerase and cancer therapeutics. *Nature reviews. Cancer* **8**, 167-179.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
- Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M. B., Arruda, I., Robinson, M. O. (1997): A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **275**, 973-977.
- Hayflick, L., Moorhead, P. S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* **25**, 585-621.
- Hiyama, E., Hiyama, K. (2007): Telomere and telomerase in stem cells. *British journal of cancer* **96**, 1020-1024.
- Hoffmeyer, K., Raggioli, A., Rudloff, S., Anton, R., Hierholzer, A., Del Valle, I., Hein, K., Vogt, R., Kemler, R. (2012): Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science* **336**, 1549-1554.
- Huelsken, J., Behrens, J. (2002): The Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* **115**, 3977-3978.
- Chen, J. L., Blasco, M. A., Greider, C. W. (2000): Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* **100**, 503-514.
- Cheson, B. D. (2007): Oblimersen for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Therapeutics and clinical risk management* **3**, 855-870.
- Jin, T. (2008): The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* **51**, 1771-1780.
- Kang, H. J., Choi, Y. S., Hong, S. B., Kim, K. W., Woo, R. S., Won, S. J., Kim, E. J., Jeon, H. K., Jo, S. Y., Kim, T. K., Bachoo, R., Reynolds, I. J., Gwag, B. J., Lee, H. W. (2004): Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 1280-1287.
- Kikuchi, A. (1999): Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cellular signalling* **11**, 777-788.
- Lai, C. K., Mitchell, J. R., Collins, K. (2001): RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Molecular and cellular biology* **21**, 990-1000.
- Le, S., Sternglanz, R., Greider, C. W. (2000): Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Molecular biology of the cell* **11**, 999-1010.
- Lingner, J., Cooper, J. P., Cech, T. R. (1995): Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* **269**, 1533-1534.
- Liu, F., Kim, Y., Cruickshank, C., Theimer, C. A. (2012): Thermodynamic characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA pseudoknot domain in vitro. *Rna* **18**, 973-991.
- Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W. C., Masutomi, K. (2009): An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* **461**, 230-235.
- Martínez, P., Blasco, M. A. (2011): Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature reviews. Cancer* **11**, 161-176.
- Martino, L., Pennell, S., Kelly, G., Bui, T. T., Kotik-Kogan, O., Smerdon, S. J., Drake, A. F., Curry, S., Conte, M. R. (2012): Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein. *Nucleic acids research* **40**, 1381-1394.

- Masutomi, K., Hahn, W. C. (2012): Off- telomere functions of telomerase. In: Lue, N., Autexier C., (ed.): *Telomerases: Chemistry, Biology, and Clinical Applications*, pp. 201-212 , John Wiley & Sons, Inc., New Jersey
- Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J. M., Currier, J. L., Tothova, Z., Manola, J. B., Ganesan, S., Lansdorp, P. M., Collins, K., Hahn, W. C. (2005): The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8222-8227.
- Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., Brooks, M. W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J. A., Weinberg, R. A., Stewart, S. A., Hahn, W. C. (2003): Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* **114**, 241-253.
- McClintock, B. (1931): Cytological observations of deficiencies involving known genes, translocations and an inversion in *Zea mays*. *Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin* **163**, 4-30.
- McLaren, R. S., Caruccio, N., Ross, J. (1997): Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Molecular and cellular biology* **17**, 3028-3036.
- Miller, M. C., Liu, J. K., Collins, K. (2000): Template definition by Tetrahymena telomerase reverse transcriptase. *The EMBO journal* **19**, 4412-4422.
- Minev, B., Hipp, J., Firat, H., Schmidt, J. D., Langlade-Demoyen, P., Zanetti, M. (2000): Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4796-4801.
- Mitchell, M., Gillis, A., Futahashi, M., Fujiwara, H., Skordalakes, E. (2010): Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nature structural & molecular biology* **17**, 513-518.
- Möllenbeck, M., Postberg, J., Paeschke, K., Rossbach, M., Jonsson, F., Lipps, H. J. (2003): The telomerase-associated protein p43 is involved in anchoring telomerase in the nucleus. *Journal of cell science* **116**, 1757-1761.
- Müller, H. J. (1938): The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **13**, 181-198
- Olovnikov, A. M. (1973): A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology* **41**, 181-190.
- Park, J. I., Venteicher, A. S., Hong, J. Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., McLaughlin, M., Veenstra, T. D., Nusse, R., McCrea, P. D., Artandi, S. E. (2009): Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* **460**, 66-72.
- Plumb, J. A., Bilsland, A., Kakani, R., Zhao, J., Glasspool, R. M., Knox, R. J., Evans, T. R., Keith, W. N. (2001): Telomerase-specific suicide gene therapy vectors expressing bacterial nitroreductase sensitize human cancer cells to the pro-drug CB1954. *Oncogene* **20**, 7797-7803.
- Pruzan, R., Pongracz, K., Gietzen, K., Wallweber, G., Gryaznov, S. (2002): Allosteric inhibitors of telomerase: oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates. *Nucleic acids research* **30**, 559-568.
- Richards, R. J., Theimer, C. A., Finger, L. D., Feigon, J. (2006): Structure of the Tetrahymena thermophila telomerase RNA helix II template boundary element. *Nucleic acids research* **34**, 816-825.
- Rubtsova, M. P., Vasilkova, D. P., Malyavko, A. N., Naraikina, Y. V., Zvereva, M. I., Dontsova, O. A. (2012): Telomere lengthening and other functions of telomerase. *Acta naturae* **4**, 44-61.
- Savage, S. A., Alter, B. P. (2009): Dyskeratosis congenita. *Hematology/oncology clinics of North America* **23**, 215-231.

- Sharma, G. G., Gupta, A., Wang, H., Scherthan, H., Dhar, S., Gandhi, V., Iliakis, G., Shay, J. W., Young, C. S., Pandita, T. K. (2003): hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* **22**.
- Shay, J. W., Keith, W. N. (2008): Targeting telomerase for cancer therapeutics. *British journal of cancer* **98**, 677-683.
- Shay, J. W., Wright, W. E. (2005): Mechanism-based combination telomerase inhibition therapy. *Cancer cell* **7**, 1-2.
- Singhapol, C., Pal, D., Czapiewski, R., Porika, M., Nelson, G., Saretzki, G. C. (2013): Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis. *PLoS one* **8**, e52989.
- Skordalakes, E., Lue, N. (2012): TERT structure, function, and molecular mechanisms. In: Lue, N., Autexier C., (ed.): *Telomerases: Chemistry, Biology, and Clinical Applications*, pp. 53-78 , John Wiley & Sons, Inc., New Jersey
- Smiraldo, P. G., Tang, J., Shay, J. W., Wright, W. E. (2012): Cellular senescence, telomerase, and cancer in human cells. In: Lue, N., Autexier C., (ed.): *Telomerases: Chemistry, Biology, and Clinical Applications*, pp. 243- 254 , John Wiley & Sons, Inc., New Jersey
- Su, Z., Dannull, J., Yang, B. K., Dahm, P., Coleman, D., Yancey, D., Sichi, S., Niedzwiecki, D., Boczkowski, D., Gilboa, E., Vieweg, J. (2005): Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *Journal of immunology* **174**, 3798-3807.
- Tzfati, Y., Chen, J. L. (2012): Telomerase RNA: Structure, function, and molecular mechanisms. In: Lue, N., Autexier C., (ed.): *Telomerases: Chemistry, Biology, and Clinical Applications*, pp. 23-51 , John Wiley & Sons, Inc., New Jersey
- Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C., Hoffman, A. R. (1998): Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer research* **58**, 4168-4172.
- Valenta, T., Hausmann, G., Basler, K. (2012): The many faces and functions of beta-catenin. *The EMBO journal* **31**, 2714-2736.
- Venteicher, A. S., Abreu, E. B., Meng, Z., McCann, K. E., Terns, R. M., Veenstra, T. D., Terns, M. P., Artandi, S. E. (2009): A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* **323**, 644-648.
- Vonderheide, R. H. (2002): Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene* **21**, 674-679.
- Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L., Nadler, L. M. (1999): The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **10**, 673-679.
- Wyatt, H. D., West, S. C., Beattie, T. L. (2010): InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic acids research* **38**, 5609-5622.
- Ye, J. Z., de Lange, T. (2004): TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nature genetics* **36**, 618-623.
- Zaug, A. J., Cech, T. R. (1995): Analysis of the structure of Tetrahymena nuclear RNAs in vivo: telomerase RNA, the self-splicing rRNA intron, and U2 snRNA. *Rna* **1**, 363-374.
- Zhou, X. Z., Lu, K. P. (2001): The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* **107**, 347-359.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ADP- *Adenosine diphosphate*

bp- *base pair*

BRG1 - *Brahma-related gene 1*

Cer – *Cerberus*

CKI- *Casein kinase I*

CMV- *Cytomegalovirus*

DDR - *DNA Damage Response*

Dish – *Dishvelled*

Dkk – *Dickkopf*

DMEM - *Dulbecco's Eagle's Medium*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

dsDNA – *Double – stranded DNA*

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid*

FrzB - *Frizzled-related protein*

HMT – *Histonmethyltransferase*

Hsp90 - *Heat shock protein 90*

hTERC – *Human telomerase RNA component*

hTERT - *Human telomerase reverse transcriptase*

hTR - *Human telomerase RNA*

IFD - *Insertion in fingers domain*

JNK- *Jun N-terminal kinase*

kb- *kilobase*

LRP- *Low-density lipoprotein receptor-related proteins*

LSB- *Laemmli sample buffer*

Mb - *Megabase*

MHC- *Major histocompatibility komplex*

mRNA- *Messenger RNA*

NF – AT - *Nuclear factor of activated T-cells*

PAR1- *Protease-activated receptor*

PARP - *Poly (ADP-ribose) polymerase*

PBS- *Phosphate-buffered saline*  
PBST - *Phosphate Buffered Saline with Tween*  
RdRP – *RNA dependent RNA polymerase*  
RMRP - *RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease*  
RNA – *Ribonucleic acid*  
RNP – *Ribonucleoprotein*  
ROR2 - *Receptor-related 2*  
RT – *Reverse transcriptase*  
siRNA - *Small interfering RNA*  
snoRNA - *Small nucleolar RNA*  
SWI/SNF - *Switch/sucrose nonfermentable*  
TBS- *Tris-buffered saline*  
TBST - *Tris Buffered Saline with Tween*  
TCF – *Transcription factors*  
TCF/ LEF - *T-cell factor/lymphocyte enhancer factor*  
TEN - *Telomerase N-terminal domain*  
TEP1 – *Telomerase protein component 1*  
TERC – *Telomerase RNA component*  
TERT – *Telomerase reverse transcriptase*  
TRBD - *Telomerase RNA Binding Domain*  
Tris- *Tris(hydroxymethyle) aminomethane*  
TrxG - *Trithorax Group*  
Wnt – *Wingless type protein*