TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOINFORMAATIKA ÕPPETOOL

Telomeeride keskmise pikkuse hindamine teise generatsiooni sekveneerimisandmetest

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Karl-Sander Erss

Juhendaja Tarmo Puurand

TARTU 2017

# **Sissejuhatus**

# Kirjanduse ülevaade

## Telomeerid

Telomeerid on spetsiaalsete valkudega seotud tandemkordused kromosoomide otstes, mis kaistsevad neid lagundamise ja kokkukleepumise eest. Telomeerid esinevad vaid lineaarsetes kromosoomides. (Witzany, 2008)

### Struktuur

Imetajate telomeerid koosnevad TTAGGG kordustest ja valgukompleksist nimega *shelterin*. (Martínez & Blasco, 2010)

Telomeeride pikkus on erinevatel liikidel erinev – inimesel 10-15 Kb, hiirtel 25-50 Kb. Telomeeri otsale on iseloomulik 150-200 nukleotiidi pikkune üleulatuv G-rikas 3’ ahel, mis keerab lõpuosa T-linguks. Üleulatuv osa tungib kaheahelalise osa vahele ja moodustub D-ling. (Martínez & Blasco, 2010)

*Shelterin* koosneb kuuest ühikust:

* telomeeri kordusseonduvad faktorid (*telomeric repeat binding factors*) TRF1 ja TRF2
* TRF-1 interakteeruv valk 2 TIN2
* kaitsev valk POT1
* POT1-TIN2-ograniseeriv valk TPP1
* repressor/aktivaator valk RAP1.

TRF1, TRF2 ja POT1 seonduvad otse telomeersele DNA-le. kusjuures viimane ainult üleulatuvale ahelale. TIN2 seondub ühe TRF valguga ja on vajalik TPP1-POT1 kompleksi seondumiseks.

### Funktsioon

### Otsa replikatsioon probleem

DNA polümeraasid paljundavad DNA-d vaid 5’ – 3’ suunal ja seega ei saa viivisahelat pidevalt paljundada. DNA paljundamisel toimub replikatsioonikahvlist tagasisuunalisel DNA ahelal DNA süntees lühikeste juppide, Okazaki fragmentide, kaupa. Selleks, et DNA pülmeraas saaks Okazaki fragmendi sünteesi alustada, seondub matriitsahelaga RNA-praimer. Nende praimerite asemele sünteesitakse hiljem 5’ – 3’ suunal DNA. Kuna pärast RNA eemaldamist DNA juppide sünteesiks läheb vaja 3’ OH otsa, aga kromosoomi otsas, viimase RNA praimeri järel rohkem DNA-d ei ole, jääb kromosoomi lõpust matriitsahelaga komplementaarne DNA sünteesimata. (Witzany, 2008)

### Telomeraas

Telomeraas on ribonukleoproteiin, mis koosneb telomeraasi RNA-st (TER) ja telomeraasi pöördtranskriptaasist (TERT). Telomeraas katalüüsib üleulatuva G-otsa uute telomeeri-korduste sünteesi. Telomeraasi aktiivsus on enamuses somaatilistes rakkudes madal või tuvastamatu, kuid umbes 85%-s vähirakkudes ülesreguleeritud. See telomeraasne aktiivsus panustab vähirakkude surematusse. (Tian, Chen, & Liu, 2009)

#### Telomeraasi aktiivsuse regulatsioon

Telomeraasi TER komponenti ekspresseeritakse kõikides rakkudes ühesugusel määral, kuid katalüütilist TERT subühikut ekspresseeritakse vaid vähirakkudes. TTAGGG korduste lisamine kromosoomi otsa toimub kahes etapis – esmalt sünteesitakse TER komponendiga komplementaarne DNA jupp ning pausi järel liigub ensüüm edasi. hTERT (*human TERT*) geen asub viienda kromosoomi lühema õla otsas. (Tian et al., 2009) Arvatakse, et TERT peamine regulatsioonimehhanism on transkriptsiooniline kontroll. Mitmete onkogeenide (nt c-Myc) ja kasvajate supressiooni geenide (WT1, p53) produktid avaldavad üleekspresseerimise korral mõju hTERT transkriptsioonile. (Horikawa & Barrett, 2003)

### Telomeeride pikkus

#### Telomeeride pikkus vananemise biomarkerina

Vananemise biomarkerite olulisus seisneb pigem inimese vanusest sõltuva tervise ja funktsionaalse oleku hindamises kui kronoloogilise vanuse määramises. Samuti vanusest tulenevate haiguste, suremisriski ning vananemisvastaste sekkumiste efektiivsuse hindamiseks.(Mather, Jorm, Parslow, & Christensen, 2011)

Telomeeride puhul on leitud, et telomeeride pikkus ja inimese vanus on negatiivselt korrelatsioonis. Ka on leitud seoseid telomeeride pikkuse ja muude vanusest sõltuvate näitajate, haiguste ning suremuse vahel, kuid tulemuste tõlgendused on ebaselged.

Näiteks üle 60 aastaste inimeste sead oli kõige lühemate telomeeridega grupil suurem suremus – kolm korda suurem suremus südamehaigustest ning kaheksa korda suurem nakkushaigustest. Kui sama uuringu andmeid analüüsiti aga vanusevahemike kaupa, ei olnud tulemus enam üle 74 aastaste seas statistiliselt oluline. Seda võib seletada ellujääja-efektiga – kui lühemate telomeeridega inimesed sureks varem, ei ole neid vanemates vahemikes. (Mather et al., 2011)

Longituuduuringute puhul on saadud väga varieeruvaid tulemusi – telomeeride pikkus võib aja jooksul nii suureneda kui väheneda. (Mather et al., 2011)

### Telomeeride pikkust mõjutavad faktorid

Telomeeride pikkust võib mõjutada isa vanus järglase sünni ajal, põletikreaktsioonid, suitsetamine, füüsiline aktiivsus, sugu, klass, kehamassiindeks, multivitamiinide tarbimine, antioksüdantide tarbimine, alkoholi tarbimine, hormooniasendusteraapa ning rass. (Mather et al., 2011)

### Telomeeride pikkuse laboratoorne mõõtmine

#### Terminaalsete restriktsioonifragmentide analüüs - TRF

Selle meetodi kasutamise jaoks on vaja vähemalt 3ug puhastatud DNA-d. Järgmisena on oluline hinnata, kas eraldatud DNA on analüüsiks sobiv, kuna proovide kogumisel, hoiustamisel ning transpordil võib esineda mitmeid proove degradeerivaid asjaolusid. Selle jaoks analüüsitakse eraldatud DNA-d geelektroforeesil ning kinnitatakse, et proov visualiseerub tiheda ja mitte laialivalgunud vöödina. Katkiste DNA proovide analüüs selle meetodiga annab tulemuseks tegelikust lühema telomeeri pikkuse. (Kimura et al., 2010)

DNA lõigtakse restritsiooniensüümidega (*Hinf*I ja *RsaI*), millel pole äratundmiskohti ei telomeeri sees ega telomeeri-eelses alas. See protsess rikastab proovid pikkade telomeersete fraktsioonidega – ülejäänud genoom lõigatakse kuni 800bp pikkusteks tükkideks ning eraldatakse agaroosgeelil ning visualiseeritakse southern blot meetodiga. Visualiseerimiseks kasutatakse TTAGGG komplementaarseid märgistatud oligonukleotiide. Telomeeride pikkused saadakse *ladder*-DNA-ga võrdlemisel või eelnevalt valmistatud ruudustiku abil. (Kimura et al., 2010)

#### Kvantitatiivne PCR - qPCR

Vähem DNA materjali kui TRF analüüsi jaoks, kulub qPCR-põhiste meetoditega telomeeride pikkuse mõõtmiseks. qPCR meetodid põhinevad fluorofooride kasutamisel. Fluorofoorid annavad fluorestsents-signaali, kui huvipakkuv järjestus paljundatakase ning võimaldavad paljundatavat DNA-d kvantifitseerida. qPCR põhiste meetodite peamine keerukus seisneb selles, et telomeeri-spetsiifilised praimerid on üksteisega komplementaarsed ning moodustavad omavahel dimeere. (Montpetit et al., 2014)

Praimerite dimeeride tekkimise vastu aitas spetsiaalsete praimerite disain, mille puhul DNA polümeraas paljundas käivitus vaid siis, kui praimer oli seondunud telomeeriga, mitte teise praimeriga. Lisaks mõõdetakse selle meetodi puhul lisaks telomeeri amplifikatsiooni produktile (T) ka ühe *single-copy* geeni hulk (S). Nende põhjal saadakse T/S suhe, mis korreleerub keskmise telomeeri pikkusega. (Cawthon, 2002) Esimese qPCR põhise telomeeride pikkuse mõõtmise meetodi puuduseks oli mõõtmise ebatäpsus mis tekib T ja S võimenduste eraldi reaktsioonidest mõõtmisest. Selle ebatäpsuse vältimiseks tehakse meetodi edasiarendatud versioonis reaktsioon ühes tuubis – T signaal kogutakse PCR varajastes tsüklites, enne kui S signaal detekteerimispiiri ületab. (Cawthon, 2009)

#### Üksiku telomeeri pikkuse analüüs - STELA

TRF ja PCR põhiste meetoditega saab mõõta vaid telomeeride keskmist pikkust proovist. Kuna on näidatud, et ka üksiku või mõne telomeeri kriitiline lühenemine võib esile kutsuda rakujagunemise lõppemist või apoptoosi, võib üksikute telomeeride pikkuse mõõtmine olla rohkemate praktiliste kasutusaladega. STELA meetod täiendab tavalist qPCR põhist meetodit nii, et kasutab telomeeri-eelsele alale seonduvat praimerit. Selle meetodiga saab mõõta vaid nende kromosoomide telomeere, mille telomeeri-eelne ala on unikaalne (XpYp, 2p, 11q, 12q, and 17p). (Montpetit et al., 2014)

#### Hübridisatsiooni-kaitse meetod – HPA

See meetod võimaldab mõõta keskmist telomeeride pikkust nii puhastatud DNA-st kui ka rakulüsaadist. Erinevalt TRF meetodist, ei pea DNA intaktne olema. Meetod põhineb telomeersete korduste töötlemises komplementaarsete oligonukleotiididega, mis on märgistatud *acridinium* estri molekulidega. Hübridiseerumata märgistatud oligonukleotiidid inaktiveeritakse hüdrolüüsi-lahuse abil, kuid hübridiseerunud märgised on hüdrolüüsi eest kaitstud. Telomeerne DNA-lt mõõdetakse kemoluminestsents-signaal (T). Selleks, et saadud signaali põhjal telomeeride pikkust hinnata, mõõdetakse ka luminestsents-signaal, mis tekib mõne Alu-järjestusega komplementaarse märgistatud oligonukleotiidiga (A). Analoogselt qPCR meetodiga, saadakse TA-suhe. Kui võrreldi samast proovist saadud TRF analüüsi tulemust HPA meetodi TA suhtega, leiti, et Alu-element TGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGC vastab TA suhe 0,01 umbes 2000 aluspaari pikkusele TR fragmendile. (Nakamura et al., 1999)

### Telomeeride pikkuse in silico mõõtmine

## K-mer metoodika sekveneerimisandmete analüüsis

## SRA ja SRA Toolkit

# Eksperimentaalosa

## Töö eesmärgid

Selle töö peamine eesmärk on määrata teise generatsiooni sekveneerimisandmete kogu põhjal keskmised telomeeride pikkused. Lisaks uurida, kas leiab kinnitust hüpotees, et nendest sekveneerimisandmetest on võimalik hinnata inimese vanust.

## Metoodika

## Tulemused

## Arutelu