

Praktická úloha č.2

Téma: Genetika a molekulárna biológia - Genetické aspekty starnutia

Starnutie organizmov je komplexný proces, ktorý dodnes nie je úplne preštudovaný. Podľa súčasných poznatkov môže istú úlohu v starnutí organizmov zohrávať stav a funkčnosť telomér (koncev chromozómov) a takisto aj funkčnosť mitochondrií.

Teloméry sú štruktúry na koncoch eukaryotických chromozómov. Ide o repetitívne oblasti DNA, u stavovcov môžu byť dlhé niekoľko desiatok kilobáz, kde sa mnohokrát opakuje tá istá sekvencia (u cicavcov je to hexanukleotid TTAGGG). DNA polymerázy, ktoré v bunkách zabezpečujú kopírovanie DNA počas replikácie, nie sú schopné kopírovať chromozómy až do úplného konca, takže teloméry sa prirodzene skracujú s každým bunkovým delením. Teloméry predlžuje špeciálny enzým – telomeráza. Somatické bunky človeka väčšinou nemajú telomerázu, ich teloméry sa teda progresívne skracujú až na kritickú úroveň, kedy dochádza k zastaveniu bunkového delenia. Niektoré bunky – somatické aj embryonálne kmeňové bunky – však majú telomerázu prítomnú. Na začiatku štúdia telomér v 80. rokoch minulého storočia nebolo jasné, akým mechanizmom sú teloméry skutočne predlžované. Dnes vieme, že telomeráza je enzým, ktorého katalytickú funkciu vykonáva proteínová podjednotka, no ako templát pre syntézu telomér slúži RNA podjednotka (Obr. 1).



Obrázok 1. Telomeráza

Obe podjednotky sú esenciálne pre funkciu tohto enzýmu. V raných štúdiách biológie telomér bol na odhalenie podstaty telomerázy vykonaný experiment opísaný v úlohe 1.

1. úloha: Z jednobunkovca *Tetrahymena thermophila* bol získaný bunkový extrakt, o ktorom sa zistilo, že niektorá jeho zložka dokáže predlžovať teloméry. Na identifikáciu biochemickej podstaty telomér bol tento extrakt vystavený pôsobeniu rôznych typov podmienok a činidiel, ktoré mohli meniť jeho vlastnosti. Bunkový extrakt bol po ošetrení pridaný k telomerickéj sekvencii

v skúmavke a bolo sledované, či je stále schopný predĺženia telomér. Typy ošetrovania bunkového extraktu sú uvedené v Tab. 1. Vyplňte tabuľku na základe vašich vedomostí o mechanizme predlžovania telomér. Do každého prázdneho políčka uveďte „áno“ ak bunkový extrakt zostáva schopný predĺženia telomér alebo „nie“ ak túto schopnosť stráca. (Pomôcka: MNáza je mikrokokálna nukleáza izolovaná z baktérie *Staphylococcus aureus*. Tento enzým je nešpecifická nukleáza, to znamená, že štiepi všetky typy nukleových kyselín. RNázín je inhibítor Rnázy.)

Typ ošetrovania bunkového extraktu	Došlo k predĺženiu telomér?
žiadne ošetrovanie	áno
MNáza	
DNáza	
RNáza	
Rnáza + RNázín	
proteináza	
povarenie (5 min., 95 °C)	

Tabuľka 1.

2. úloha: U kvasiniek *S. cerevisiae* sa pri géne pre telomerázovú RNA (*TLC1*) prejavuje efekt známy ako haploinsuficiencia – jedna funkčná kópia *TLC1* nie je postačujúca pre udržanie normálnej dĺžky telomér.

- Ktoré z nasledujúcich typov vzťahu medzi alelami by mohol vykazovať gén pre telomerázovú RNA u tejto kvasinky? (Pomôcka: pozorovaný znak je dĺžka telomér.)
 - úplná dominancia – štandardná alela je dominantná a mutovaná (znefunkčnená) alela je recesívna
 - neúplná dominancia
 - dedičnosť viazaná na autozómy
- Normálna dĺžka telomér u *S. cerevisiae* je približne 300 bp a diploidné bunky s dvoma mutovanými alelami *TLC1* (*tlc1Δ/tlc1Δ*) majú po každom bunkovom cykle skrácované teloméry až na istú minimálnu hranicu (pár desiatok bp). Ktorý z nasledujúcich fenotypov môže byť pozorovaný u heterozygota (*TLC1/tlc1Δ*)?
 - teloméry dĺžky v priemere 260 bp
 - teloméry skrátene viac ako u dvojitého mutanta (*tlc1Δ/tlc1Δ*)
 - teloméry dĺžky v priemere 350 bp
- Po krížení dvoch diploidných kvasiniek s genotypom *TLC1/tlc1Δ* vznikne potomstvo s tromi rozličnými fenotypmi (tri rôzne dĺžky telomér). Uveďte schému kríženia takýchto kvasiniek (parentálna generácia (P), gaméty aj prvá filiálna generácia (F1)), uveďte, v akom pomere budú vznikať jednotlivé fenotypové triedy v potomstve a napíšte, aký fenotyp (dĺžka telomér v bp) zodpovedá jednotlivým genotypovým triedam. Predpokladajte, že teloméry kvasiniek úplne bez funkčnej telomerázy sú skrátene na minimálnu možnú dĺžku.

Schéma kríženia:

P:

gaméty:

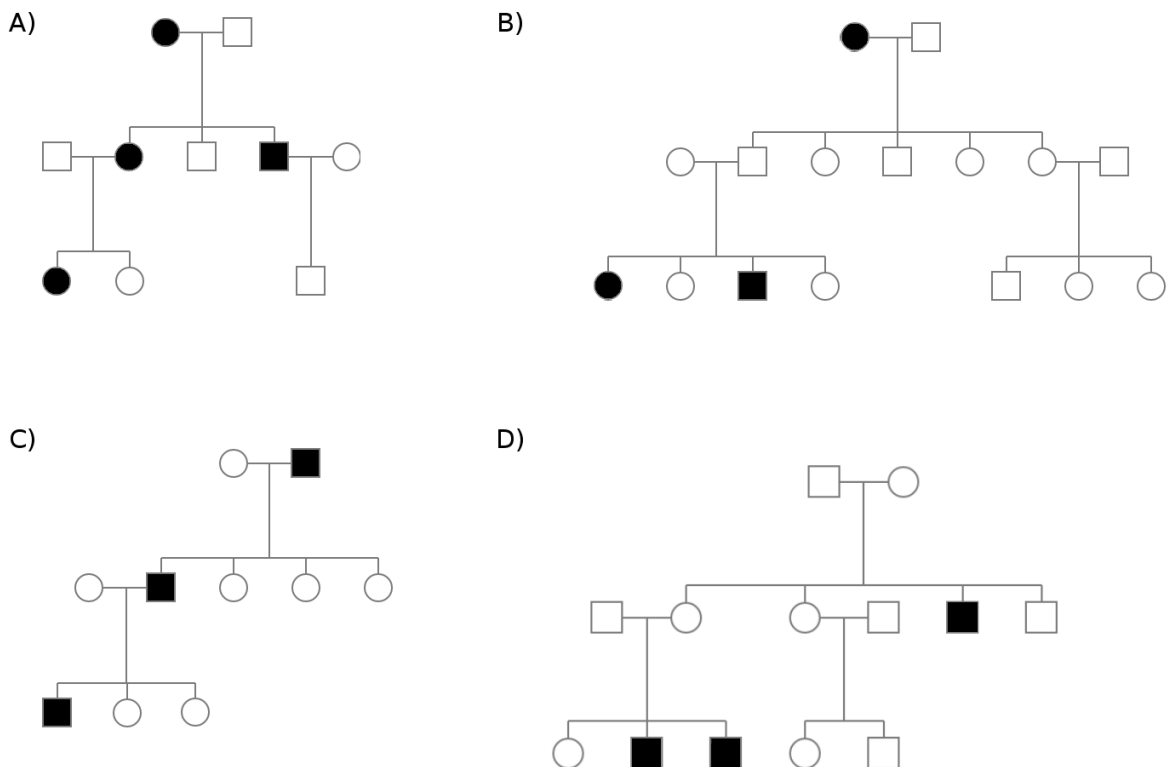
F1:

Aký fenotyp zodpovedá jednotlivým genotypovým triedam potomstva?

Pomer zastúpenia fenotypových kategórií v potomstve:

3. úloha: Štúdium telomerázovej RNA u kvasiniek je výhodné aj preto, že predstavujú dobrý model pre štúdium ľudských ochorení súvisiacich s telomerázovou nedostatočnosťou. Dyskeratosis congenita (DC) je dedičné ochorenie, pri ktorom dochádza k poškodeniu kože, nechtov, slizníc a k zlyhaniu kostnej drene. Dedičnosť tejto choroby môže byť rôzneho typu, no autozomálne dominantne dedená DC je zapríčinená mutáciou v jednej kópii génu pre telomerázovú RNA (u človeka sa tento gén nazýva *TERC*).

1. Ktorý z nasledujúcich rodokmeňov reprezentuje formu DC zapríčinenú mutáciou v géne *TERC*?



2. Dyskeratosis congenita môže vzniknúť aj ako dôsledok mutácie v niektorom z génov, ktoré kódujú proteíny viažuce sa na telomérovú DNA. Príkladom je mutácia v géne *TINF2*. Pri podrobnej genetickej analýze bolo zistené, že takíto pacienti spravidla nededia uvedenú mutáciu od svojich rodičov. Ktoré z nasledujúcich možností vysvetľujú, prečo je táto mutácia prítomná v ich tkanivách?

- A) Títo pacienti mohli uvedenú mutáciu zdediť od iných rodinných príslušníkov.
- B) Táto mutácia sa vyskytla už v zárodočných tkanivách rodičov pacienta, ale nebola prenesená do jeho tkanív.
- C) Táto mutácia sa vyskytla iba v tkanivách pacienta počas jeho života.

- D) Ide o somatickú mutáciu.
- E) Musí ísť o gametickú mutáciu.
3. Niektoré ochorenia, ktoré sú spojené s telomérmi a telomerázou, vznikajú v dôsledku mutácie v promótoře génu pre proteínovú podjednotku telomerázy (gén *TERT*). Týka sa to napríklad aj niektorých druhov rakoviny, pri ktorých je mutácia v promótoře zodpovedná za to, že sa gén *TERT* exprimuje aj v bunkách, kde normálne telomeráza nie je prítomná. Ktorá z nasledujúcich možností správne opisuje, čo sa deje po vzniku takejto mutácie?
- A) Expresia telomerázy je aktivovaná v embryonálnych a somatických kmeňových bunkách.
- B) V bunkách, v ktorých mutácia spôsobí expresiu telomerázy, nebude možné ďalej predlžovať teloméry.
- C) Bunky s touto mutáciou budú mať progresívne skracované teloméry a rozdelia sa menší počet krát ako bunky bez tejto mutácie.
- D) Bunky, ktoré by sa bez mutácie delili iba obmedzený počet krát, po vzniku mutácie majú k dispozícii telomerázu, ktorá predlžuje ich teloméry a umožňuje im tak deliť sa neobmedzene.
4. Aj keď zo štúdií na kvasinkách je známe, že skracovanie telomér môže viesť k bunkovému starnutiu a zastaveniu bunkového delenia, nie je celkom jasné, ako teloméry súvisia so starnutím mnohobunkových organizmov. U zdravých ľudí sa teloméry s vekom prirodzene skracujú. Prirodzený proces starnutia je do istej miery imitovaný u ľudí s ochorením zvaným progéria. Títo ľudia starnú oveľa rýchlejšie, ako zdravý človek – v skorom veku vykazujú známky starnutia a dožívajú sa v priemere veku ranej puberty. Jeden typ takéhoto ochorenia, Hutchinsonov-Gilfordov progériový syndróm (HGPS) je spôsobený mutáciou v géne pre proteín jadrovej membrány, lamín A. Tento proteín sa okrem iného pravdepodobne podieľa na ukotvení DNA na jadrovú membránu zvnútra. Na štúdium úlohy telomér v rozvoji progérie bol vykonaný experiment s metódou FISH (fluorescenčná *in situ* hybridizácia). Metafázne chromozómy z fibroblastov zdravého človeka (kontrola) aj pacientov s HGPS boli fixované na podložnom sklíčku a obmyté krátkymi oligonukleotidmi komplementárnymi k telomérovej sekvencii, na ktorých boli pripevnené fluorescenčné farbičky. Po komplementárnom naviazaní oligonukleotidov bola zvyšná nenaviazaná DNA odmytá a bunky boli sledované vo fluorescenčnom mikroskope. Tab. 2 uvádza výsledky tohto experimentu. Ak tieto dáta považujete za reprezentatívne, ktoré z uvedených odpovedí môžu byť na základe týchto údajov pravdivé?

Zdroj sledovanej vzorky	Pomer fluorescenčných signálov meraná vzorka: kontrola
zdravý človek, 45 rokov	1
pacient 1, 13 rokov	0,45
pacient 2, 8 rokov	0,56
pacient 3, 13 rokov	0,36

Tabuľka 2.

- A) HGPS pacienti majú v porovnaní so zdravými ľuďmi teloméry vždy predĺžené.
- B) Zdraví ľudia majú teloméry dlhšie ako pacienti s HGPS.

- C) Ak je ukotvenie telomér na jadrovú membránu funkčné, telomeráza sa k nim nevie dostať a teloméry sú v dôsledku toho skrátené.
- D) Uvoľnenie telomér z jadrovej membrány vždy vedie k ich predĺženiu.
- E) Telomeráza je neschopná predlžovať teloméry, ak nie sú viazané na jadrovú membránu.
- F) Teloméry nenaviazané na jadrovú membránu môžu byť prístupnejšie nukleázam, ktoré ich degradujú.

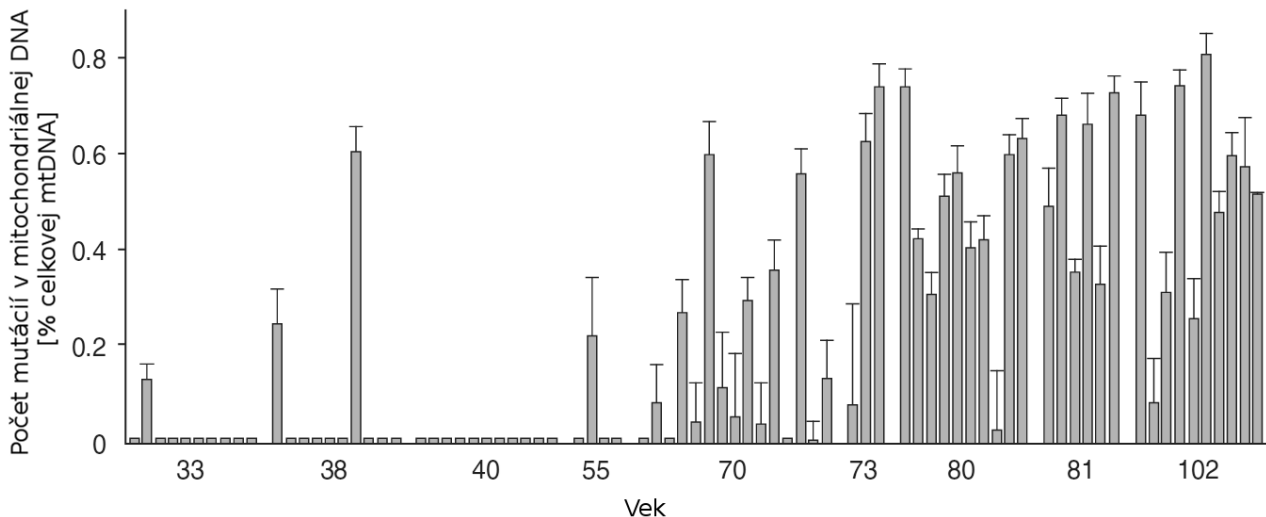
4. úloha: Aj keď stav telomér sa počas ontogenézy človeka mení, pravdepodobne nie je samotnou príčinou starnutia. Zaujímavým kandidátom na príčinu starnutia sú procesy prebiehajúce v mitochondriách.

1. Doplňte v nasledujúcom texte pojmy na vynechané miesta. Vyberte zo zoznamu pojmov uvedeného pod textom.

Mitochondrie sú eukaryotické organely, ktorých významnou úlohou v bunke je produkcia energie. Hlavnú rolu v tomto procese zohráva systém membránových proteínov – _____, ktoré vytvárajú protónový gradient využitý na produkciu ATP. Keďže pri tomto procese dochádza k presunu voľných elektrónov, dochádza ku vzniku _____. Tie môžu interagovať s rôznymi molekulami v bunke, čo vedie k ich nenávratnému poškodeniu a znefunkčneniu. Takisto sú dôvodom, prečo v _____ vzniká množstvo _____, čo je dôvodom rýchleho evolučného hromadenia zmien v tejto sekvencii. Hypotéza starnutia v dôsledku poškodenia mitochondrií predpokladá, že dôsledkom mechanizmu produkcie energie je tak aj progresívne poškodenie týchto organel, ktoré nie sú ďalej schopné vykonávať svoju esenciálnu funkciu v bunke.

Pojmy: reaktívne formy kyslíka, dýchací reťazec, mutácia, mitochondriálna DNA (mtDNA), napätím regulovaný kanál, mitochondriálny nukleozóm, elektrochemický potenciál, promótor

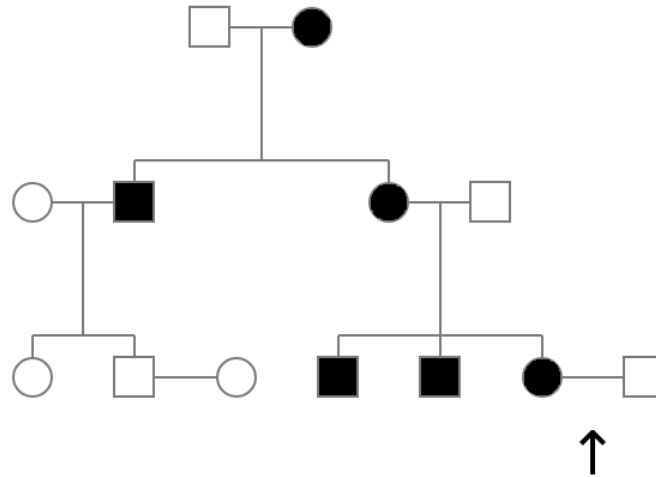
2. Vyššie opísaná hypotéza bola navrhnutá v 50. rokoch 20. storočia, no je aj predmetom novších výskumov. Graf na obr. 2 uvádza výsledky štúdie, v ktorej bolo sledované poškodenie DNA v dospelých neurónoch. (Každý stĺpček reprezentuje meranie u jedného človeka, vykonané na 30 neurónoch. Intervaly pri každom stĺpčeku znázorňujú rozptyl merania.)



Ktoré z nasledujúcich možností sú pravdivé na základe uvedených údajov?

- A) Počet mutácií v mitochondriálnej DNA narastá s vekom lineárne.
 - B) Počet mitochondriálnych mutácií je vyšší u ľudí po 60. roku života než u mladších.
 - C) Vyššie opísaná teória starnutia spôsobeného poškodením mitochondrií nemôže byť správna.
 - D) Namerané dáta potvrdzujú príčinný vzťah medzi mutáciami v mtDNA a starnutím – poškodené mitochondrie spôsobujú starnutie organizmu.
3. Spôsob, akým by bolo možné študovať úlohu mitochondrií v starnutí organizmu, je transplantácia mitochondrií. V prípade, že by mitochondrie starého jedinca boli prenesené do buniek mladého jedinca zbavených vlastných mitochondrií, aký výsledok by ste očakávali, ak platí vyššie opísaná hypotéza starnutia v dôsledku poškodenia mitochondrií?
- A) Donorové bunky budú prejavovať známky starnutia pomalšie ako recipientné bunky.
 - B) Jedinec, ktorý bude darcom mitochondrií, bude starnúť pomalšie, ako by bolo očakávané.
 - C) Jedinec, ktorý bude príjemcom mitochondrií, bude starnúť rýchlejšie a jeho fenotyp bude pripomínať ochorenie progériového typu.
 - D) Jedinec, ktorý bude príjemcom mitochondrií, bude starnúť pomalšie, vďaka efektívnejšiemu metabolizmu a nižšiemu poškodeniu v mladých mitochondriách.

5. úloha: Nasledujúci rodokmeň reprezentuje dokumentáciu rodiny, u ktorej bol študovaný syndróm predčasného starnutia.



1. Ktorá z nasledujúcich možností podľa vás môže správne vysvetľovať pôvod ochorenia v tejto rodine?

- A) Ide o predčasné starnutie spôsobené poškodením mtDNA – rodokmeň zobrazuje mitochondriálnu dedičnosť.
- B) Ide o predčasné starnutie spôsobené poškodením génu viazaného na Y chromozóm.
- C) Ide o predčasné starnutie spôsobené recesívnou mutáciou autozomálneho génu pre telomerázu (RNA alebo proteínovú podjednotku).
- D) Ide o maternálnu dedičnosť, poškodený gén môže byť viazaný na X-chromozóm, pričom mutácia je dominantná.

2. Aká je pravdepodobnosť, že šípkou označeným rodičom sa narodí syn s týmto syndrómom? Výsledok uveďte v percentách.
