

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Alena Náprstková

Strukturní a funkční komponenty telomer u rostlin
Structural and functional components of telomeres in plants

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. David Honys, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2014

.....

Alena Náprstková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat školiteli RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce a Mgr. Pavlu Bokvajovi za získání prvních zkušeností v laboratorní praxi. Za konzultace, objasnění problémů při studování materiálů a zaučení v Laboratoři biologie pylu děkuji Mgr. Rajivu Ranovi.

Abstrakt

Telomery jsou esenciální oblasti na koncích lineárních chromozomů eukaryotních organismů. Jsou tvořeny souborem proteinů interagujících s telomerickou DNA a slouží k ochraně chromozomů před rozeznáním poškozujícími enzymy, kterými mohou být nukleázy a rekombinázy. Pro jejich správnou funkci je u rostlin a jiných organismů vyžadována činnost telomerázy a přítomnost rozličných proteinových struktur, jež se účastní ochrany konců, spouštění signálních kaskád při poškození a následujících oprav DNA.

Pro živočišné organismy je výzkum struktury, tvorby a dynamiky na vysoké úrovni, zatímco rostlinný výzkum za nimi zaostává. Předložená práce shrnuje současné poznatky o telomerických komponentách u modelových rostlin a třídí je do funkčních celků, které mohou být pro rostliny specifické, zmnožené o jednotlivé proteiny s rozrůzněnými funkcemi nebo funkčně i strukturně homologní s živočišnými. Dále jsou zde tyto proteiny popsány na úrovních sekvencí, sekundárních a terciárních struktur, interakčních partnerů a funkcí, čímž je dokreslen stávající model telomer.

Klíčová slova: telomery, telomeráza, telomerické proteiny, rostliny, huseníček rolní

Abstract

Telomeres are essential structures at the ends of linear chromosomes in eucaryotes. They are made up of DNA-binding protein composition and serves to protect the chromosomes against nucleolytic enzymes recognition, which may be nucleases and recombinases. Telomerase activity and the presence of different protein structures participating on the ends protection are required for correct function of telomeres in plants and other organisms, they start the signaling cascades induced by DNA damage and DNA repair.

For animals, knowledge is in this field at high level, while plant research remains behind. This work summarizes the current knowledge of telomeric components in model plants and sorts them into functional units that can be plant-specific, multiplied by the unicate proteins with different functions or functionally and structurally diversified animal homologs. Furthermore, these proteins are described here in the sequence level, secondary and tertiary structures, interaction partners and functions, so they illustrate the current model of telomeres.

Key words: telomeres, telomerase, telomeric proteins, plants, *Arabidopsis thaliana*

Obsah

2. Úvod.....	6
3. Problém replikace.....	6
4. Struktura telomer.....	7
4.1 Telomerické sekvence	8
4.2 Sekvence podobné telomerám.....	9
4.3 Konformace telomerického chromatinu	10
4.4 Struktura chromatinu	11
5. Komplex telomerázy.....	12
5.1 Regulace telomerázy na úrovni organismu	14
5.2 Regulace epigenetickým značením genu <i>TERT</i>	14
5.3 Regulace telomerázy transkripčními faktory	15
5.4 Posttranskripční a posttranslační regulace.....	16
5.5 Regulace <i>TERRA</i> transkripty	16
6. Ochrana telomer.....	18
6.1 Proteinové komplexy účastnící se ochrany telomer	19
6.2 Proteiny podobné shelterinu	19
6.3 Proteiny DNA oprav.....	22
6.4 Komplex CST.....	23
7. Závěr.....	25
8. Seznam literatury	26

1. Úvod

Předkládaná práce pojednává o koncových oblastech eukaryotních chromozomů, tzv. telomerách, o jejich struktuře, dynamice a procesech, které jsou nezbytné pro jejich funkci u rostlin, a zejména u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) jako dosud nejprozkoumanějšího modelového druhu. Všechny těchto funkcí se účastní proteiny a jejich komplexy, jež jsou společně schopné zajišťovat homeostázu telomerických konců a při vyřazení své činnosti aktivují příslušné dráhy signalizující poškození. Telomery jsou esenciální nukleoproteinové struktury na koncích lineárních chromozomů, tvořené jednovláknovými a dvouvláknovými úseky DNA a proteiny, které se na ně vážou. Stabilizací jejich struktury a funkce je zajištěna ochrana chromozomů před degradační aktivitou exonukleáz. Na zachování oblastí telomer se nejvíce podílí enzymatický komplex telomerázy (RNA-dependent DNA polymerase) reverzní transkriptázy, který je ochraňuje a prodlužuje. Holoenzym telomerázy je vysoce konzervovaný v základních komponentách i mezi evolučně velmi vzdálenými organismy jako jsou kvasinky, obratlovci a rostliny. Neměnná je zejména jeho funkce v obnově telomer. Telomerázy různých organismů jsou však rozdílné v základních rysech sekundárních struktur podjednotek a jejich primárních sekvencích (Greider and Blackburn, 1989; Lin *et al.*, 2004; Chen and Greider, 2004). Potenciál různorodosti je nejpatrnější u huseníčku, u něhož došlo k duplikaci genu pro jednu podjednotku, čímž vznikla unikátní škála regulací (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2011).

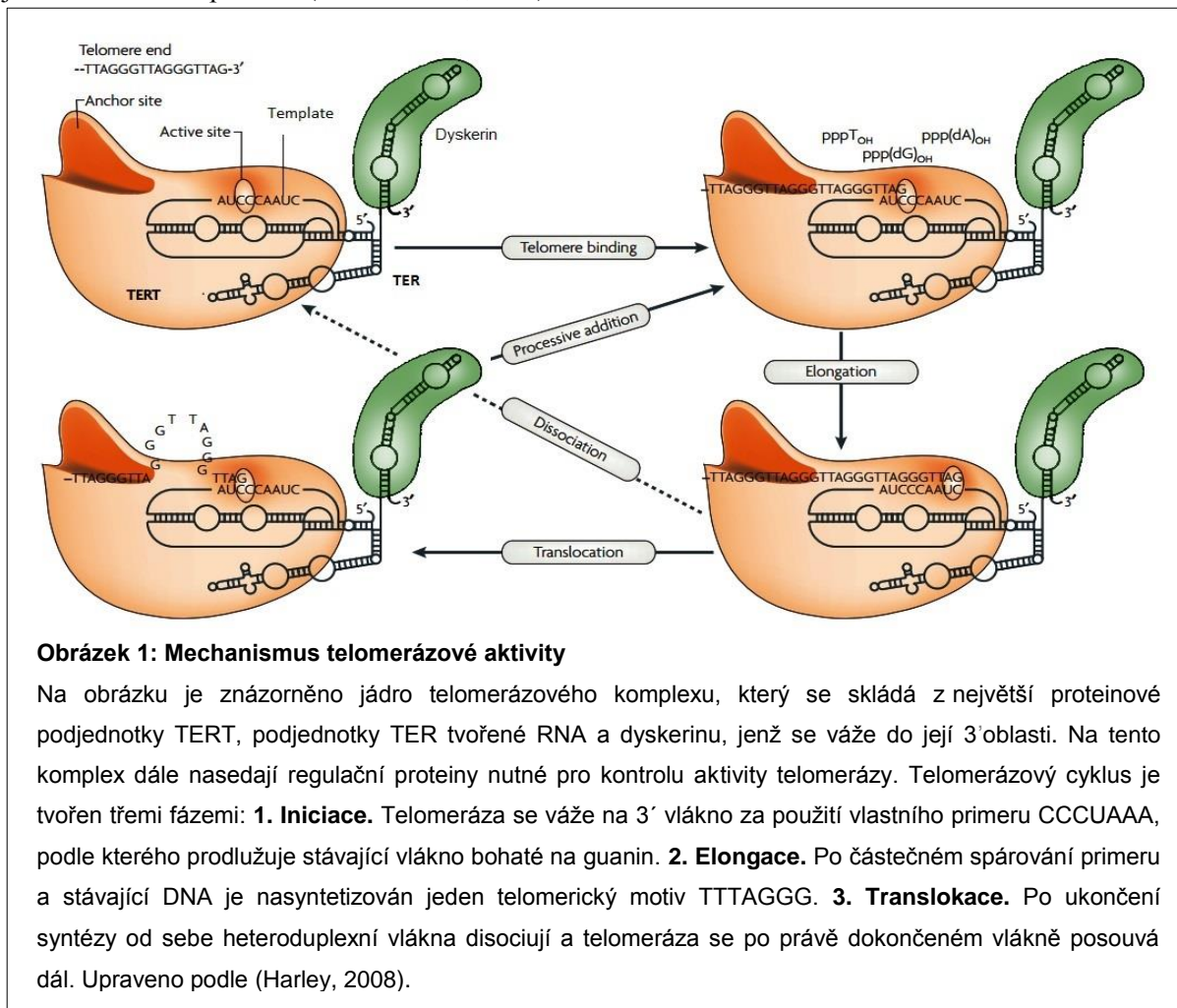
Ne všechny organismy však využívají aktivitu telomerázy. U některých byla její funkce zastoupena proteinovými komplexy, které umožňují prodlužování telomer alternativní dráhou. Struktura telomerázového komplexu a dalších komponent zajišťujících integritu chromozomů je nejlépe popsána v živočišné říši, zejména u člověka (Pollard *et al.*, 2007). Tím se povědomí o ochranných procesech telomer ostatních organismů stává informačně značně chudším. Tento trend je nejviditelnější u rostlin, včetně huseníčku, u kterého zatím není možné určit přesné působení a interakce jednotlivých komplexů ani celkový proces ochrany a udržování telomerických oblastí. Dosud získané poznatky z huseníčku a několika dalších modelových rostlin poukazují na jisté odlišnosti v přítomných proteinech, proteinových komplexech a jejich funkcích (Karamysheva *et al.*, 2004). Proto se studium procesů v okolí telomer potřebuje nutně rozšířit o další modelové organismy z rostlinné říše a zjistit širší variability, jež se skrývá v zajištění, udržení a obnově aktivního modelu telomerických struktur.

2. Problém replikace

Replikace DNA probíhá vždy jen ve směru od 5' konce k 3' konci nově syntetizovaného vlákna. Vedoucí vlákno syntetizované v této orientaci je tvořeno bez přerušení aktivity katalytického enzymu DNA-dependentní DNA polymerázy. Naopak zpožďující se vlákno, kde není 3' očko nutné pro iniciaci replikace, je syntetizováno s využitím aktivity DNA primázy (DNA-dependent RNA

polymerase) tvořící krátké úseky RNA primerů, které jsou rozeznávány DNA polymerázami. Prodlužováním primerů DNA polymerázou vznikají tzv. Okazakiho fragmenty, jejichž elongace probíhá až do rozpoznání předchozího nasyntetizovaného úseku DNA. Mezi tím jsou krátké sekvence RNA odbourány a právě v odstranění poslední spočívá celý replikační problém zkracování chromozomů, který je způsoben absencí 3' očka pro iniciaci syntézy (Pollard *et al.*, 2007).

V každém kole replikace by takto docházelo ke zkracování chromozomového konce, a tak se u organismů vyvinul způsob, jak tomu zabránit. Bylo popsáno několik úspěšných řešení, avšak nejrozšířenějším je využití enzymatické funkce telomerázy s vlastním primerem (viz Obrázek 1). Tento primer částečně páruje se stávajícím 3' koncem chromozomu a umožňuje prodlužování jednovláknového přesahu (Pollard *et al.*, 2007).



3. Struktura telomer

Struktura a velikost telomer představují velmi variabilní a dynamické znaky, které mohou být pro určitý druh typické. Mezi živočichy se rozsah délek telomerických repetitiv pohybuje od několika stovek párů bází po více než 50 kb (Mason *et al.*, 2008). Značné rozpětí telomerických sekvencí bylo pozorováno také mezi jedinci a mezi jednotlivými tkáněmi stejného organismu (Friedrich *et al.*, 2000).

Rostliny z tohoto hlediska představují více heterogenní skupinu než živočichové. Zmíněná divergence se může velmi lišit mezi rostlinnými druhy, ale i na úrovni jediné buňky, kde byla popsána nestejná délka telomer dokonce mezi jednotlivými raménky chromozomu. Vzhledem ke stabilní délce telomer v průběhu vývoje rostliny lze tento fakt dále uplatnit pro identifikaci chromozomových ramének (Říha *et al.*, 1998; Sýkorová *et al.*, 2003).

Tabákové telomery (*Nicotiana tabacum*) se se svojí velikostí pohybují v širším rozpětí než živočišné, a to mezi 20 kb a 160 kb (Fajkus *et al.*, 1995). Naopak huseníček ve srovnání s tabákem patří k rostlinám s menším genomem a také menšími telomerickými strukturami, z nichž nejkratší se pohybují na hraně 1,6 kb a nejdelší až kolem 5,5 kb (Shakirov and Shippen, 2004). Mohlo by se zdát, že s takto krátkými telomery je huseníček značně znevýhodněn, avšak celková velikost telomer není hlavním kritériem pro posouzení jejich správné funkce. Kvalitativní funkčnost telomer je závislá na jejich spolupráci především s funkčním komplexem telomerázy a dalšími proteiny a proteinovými komplexy (Heacock *et al.*, 2007).

Telomerické proteiny se tak podílejí na ustavení a následném udržování homeostázy telomer. Modulacemi pozic a vazbou různých proteinů může docházet ke změnám konformací telomer (Pisano *et al.*, 2007). Důsledkem je vysoká strukturní dynamika telomerického chromatinu řízená hlavně epigenetickými značkami a telomerickými proteiny vázajícími jednovláknové i dvouvláknové úseky DNA (Fitzgerald *et al.*, 1996; Peška *et al.*, 2011).

3.1 Telomerické sekvence

V koncových strukturách lineárních chromozomů se mohou vyskytovat vlásenky s kovalentně vázanými proteiny nalezenými u virů. Dále mohou být tvořeny vysoce repetitivními sekvencemi s navázanými proteiny, které jsou typické pro telomerické oblasti eukaryot. V živočišných telomerech byly popsány retrotranspozony a palindromy, u některých jsou dokonce hlavními telomerickými sekvencemi (Nosek *et al.*, 2006; Tomaska *et al.*, 2009). Nejčastěji jsou však telomery vyšších eukaryotních organismů tvořeny nukleoproteinovým komplexem tandemových repetitivních DNA bohatých na guanin a telomerických proteinů (viz Tabulka 1). Tyto minisatelitní repetice jsou u živočichů tvořeny sekvencemi hexanukleotidů TTAGGG a u rostlin nejčastěji sekvencí heptanukleotidů TTTAGGG (Adams *et al.*, 2001; Peška *et al.*, 2011).

Telomerické repetice

Tabulka 1: Variabilita telomerických sekvencí u různých organismů. Citováno z (Petracek *et al.*, 1990)

Organism	Telomere repeat (ref.)	G+C in telomere,* %	G+C in genome, % (ref.)
<i>Dictyostelium</i>	AG ₁₋₈ (4)	83	22 (5)
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG (6)	67	25 (5)
<i>Sa. cerevisiae</i>	(TG) ₁₋₃ [TGG(G)] (7, 8)	62	39 (5)
<i>Plasmodium berghei</i>	TTYAGGG (9)	52	41 (5)
<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG (10)	50	40 (11)
<i>Physarum</i>	TTAGGG (12)	50	42 (5)
<i>Oxytricha nova</i>	TTTTGGGG (13)	50	42 (14)
<i>Trypanosoma</i>	TTAGGG (15)	50	50 (5)
<i>Neurospora</i>	TTAGGG (16)	50	54 (5)
<i>A. thaliana</i>	TTTAGRG (17)	42	41 (18)
<i>Lysopersicum esculentum</i>	TTWAGGG [†]	42	37 [‡]
<i>Ch. reinhardtii</i>	TTTTAGGG	37.5	64 (5)

Y, thymine or cytosine; R, guanine or adenine; W, thymine or adenine.

*When sequences varied, G+C content was calculated from the available published telomere sequences.

[†]M. Ganai, personal communication.

[‡]R. Messeguer, personal communication.

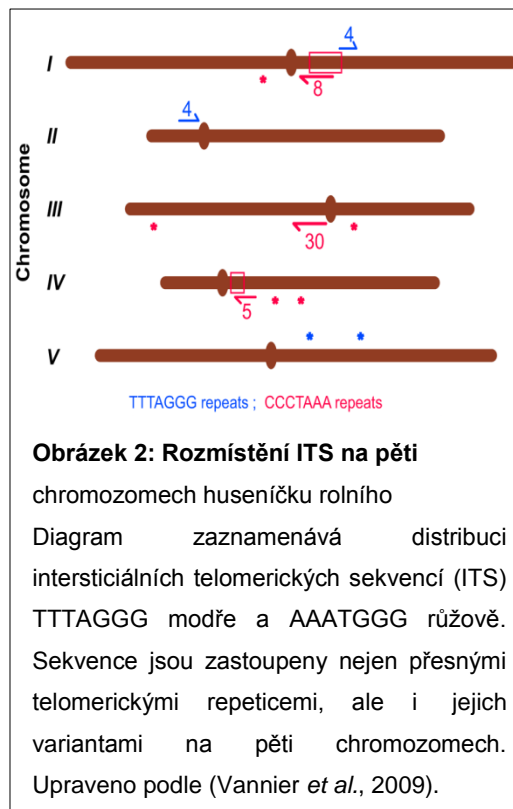
některých rostlin vykazují různé odchylky od kanonických sekvencí. U rodu *Chlamydomonas* tato divergence spočívá v navýšení opakované sekvence o jeden nukleotid na oktanukleotidové repetice TTTTAGGG (Petracek *et al.*, 1990). Některé druhy řádu Asparagales disponují savčí konsenzuální sekvencí TTAGGG, která pravděpodobně vznikla mutací telomerázové RNA podjednotky (Adams *et al.*, 2001).

3.2 Sekvence podobné telomerám

Telomerické sekvence byly nalezeny také mimo oblastí telomer (viz Obrázek 2). Ukázalo se, že nejsou lokalizovány výhradně jen na koncích chromozomů, ale i v oblastech centromer, jejich okolí a na různých místech chromozomových ramének (Bernatavichute *et al.*, 2008; Fajkus *et al.*, 2005). Zde se vyskytují roztroušeně a představují, vzhledem ke své četnosti, místa častých rekombinačních událostí (Vannier *et al.*, 2009). Tyto sekvence, tzv. teloboxy (označení pro krátké telomerické motivy) byly popsány v promotorových oblastech některých genů, kde mají roli v regulaci transkripce (Trémousaygue *et al.*, 1999). Do této skupiny genů s teloboxy v promotorech patří také ty, které kódují některé enzymy patrně

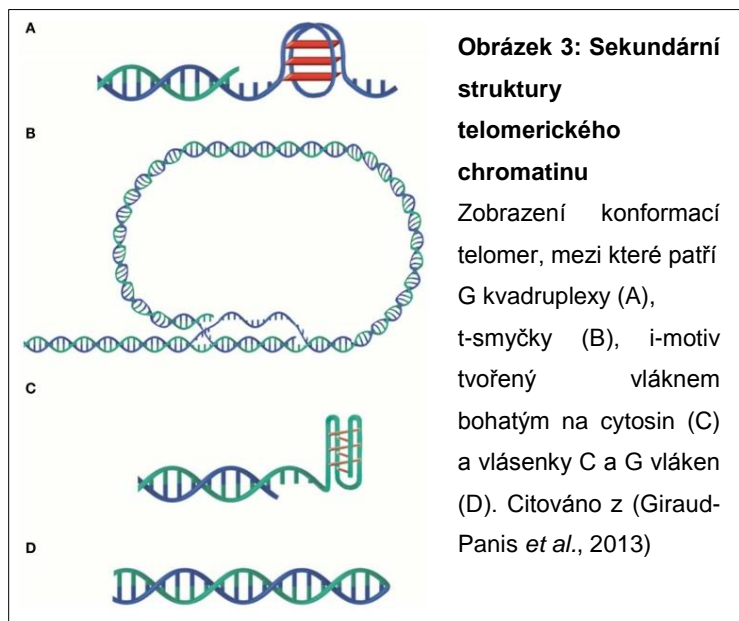
exprimované v dělicích se buňkách a v pylu (Trémousaygue *et al.*, 2003), (Šolcová a Honys, nepublikovaná data). Teloboxy byly popsány také v oblastech proti proudu genů pro ribozomální proteiny a v genech pro faktory účastníci se zrání pre-rRNA. Dále se uplatňují při spouštění transkripce ve spolupráci se sekvencemi dalších cis-elementů (Trémousaygue *et al.*, 2003).

Popsané sekvenční motivy obecně spadají do skupiny intersticiálních telomerických sekvencí (ITS) (Vaquero-Sedas *et al.* 2011), jež jsou tandemovými repeticemi kanonických telomerických sekvencí a jejich variací, které mohou vznikat substitucemi, delecemi nebo inzercemi a také fúzováním chromozomů. Podle délky, sekvence a lokalizace se rozdělují do čtyř tříd: krátké ITS, dlouhé subtelomerické ITS, fúzní ITS a pericentromerické ITS. Dále se na jejich šíření mohou podílet DNA polymerázy při opravách dvouvláknových zlomů (Azzalin *et al.*, 2001). Intersticiální telomerické sekvence u huseníčku mohou tvořit regiony, které se přednostně podílejí na rekombinacích a následném vzniku chromozomových aberací. Proto se nacházejí hlavně v místech konstitutivního heterochromatinu, mezi která patří telomery, subtelomery a centromery (Balajee *et al.*, 1994). Dokonce vykazují vyšší stupeň kondenzace heterochromatinu a pevnější sbalení než samotné kanonické telomerické sekvence (Vaquero-Sedas *et al.*, 2012).



3.3 Konformace telomerického chromatinu

Nejčastěji se na koncích telomer vyskytují přesahující jednovláknové úseky DNA vznikající činností telomerázy. Tyto přesahy jsou svojí velikostí velmi různorodé, délka vláken bohatých na guanin se pohybuje mezi 16 a 200 nukleotidy (Říha *et al.*, 2000; Kazda *et al.*, 2012). Z těchto vláken mohou vznikat rozdílné struktury podle jejich sekvence a schopnosti interakce jednotlivých nukleotidů (viz Obrázek 3). *In vitro* byla popsána tvorba vlásenek z jednovláknových regionů bohatých na guanin a také z koncových



sekvencí bohatých na cytosin (Laporte and Thomas, 1998; Ahmed and Henderson, 1992). Z G-přesahů také vznikají G-kvadruplexy, což jsou planární struktury čtyř guaninů, stabilizované kladně nabitým kovovým iontem. Nukleotidové konformace kvadruplexů mohou mít výrazný vliv na aktivitu telomerázy a vést až k její inhibici (Zahler *et al.*, 1991).

Výše popsaná úroveň sbalení však není dostatečně pevná pro zprostředkování ochrany konců. Telomery zaujímající tyto konformace mohou být chybně rozpoznány faktory vázajícími dvouvláknové zlomy, které spouští dráhu signalizující toto poškození (Jazayeri *et al.*, 2006). Uvedené sekundární struktury DNA mohou být také velmi snadno rozvolněny aktivitou helikáz katalyzujících rozmotávání DNA, čímž je usnadněn přístup pro nukleázy (Sun *et al.*, 1999). Tento problém linearitu konců a jejich ochrany před degradací je vyřešen změnou konformace a jejím udržením DNA-vazebnými proteiny, stabilizací protein-proteinovými interakcemi a umožněním vzniku t-smyčky. T-smyčka vzniká invází jednovláknových řetězců (bohatých na cytidin i guanidin) do dvouvláknových úseků telomer za tvorby cyklického zakončení (Verdun and Karlseder, 2006). Struktura t-smyčky však u rostlin není jediným ochranným mechanismem chromozomových konců před degradací. Překvapivě, na rozdíl od nejvíce popsaných modelových živočichů, některé telomery huseníčku nepodléhají nukleolytické degradaci. Po dosyntetizování zpoždujícího vlákna DNA polymerázou zůstávají konce tupé, neupravené exonukleázou (Chow *et al.*, 2012; Kazda *et al.*, 2012). Následně jsou rozeznány heterodimerem Ku70/80 a jeho vazbou ochráněny před degradací vlákna bohatého na cytosin (viz Obrázek 4). Nicméně ani proteinové komplexy Ku nemusí být úplně spolehlivé. Jejich sklouznutím po DNA může dojít k odhalení konců telomer, které jsou následně přístupné pro nukleázy. Degradální nukleolytické enzymy upravují tupá zakončení při inaktivaci komplexu CST

(CTC1, STN1, TEN1) odbouráním nukleotidů, a proto by se mohly podílet také na tvorbě krátkých 1-3 nukleotidových G-přesahů. Tato jednovláknová zakončení vznikají nezávisle na enzimech rozpoznávajících neupravené konce, exonukleázách EXO1 a MRE11. Inaktivací proteinů Ku je umožněn přístup pro nukleázy, jejichž aktivitu mohou následovat homologní rekombinace, nebo telomerázou prodloužované G-přesahy (Lingner and Cech, 1996; Kazda *et al.*, 2012).

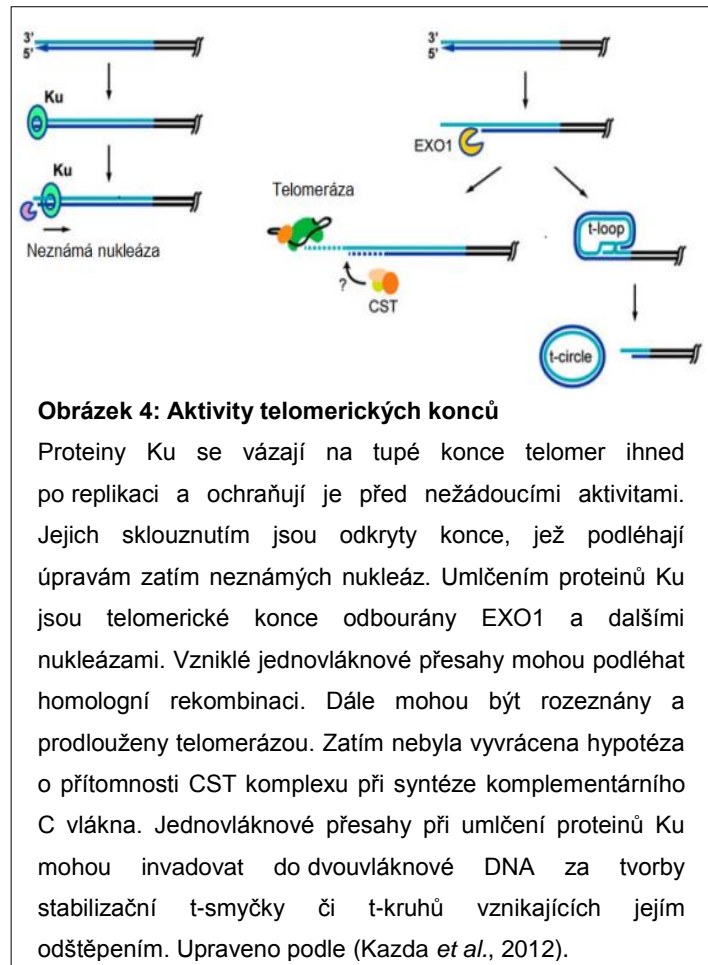
Zde předloženými mechanismy vznikají minimálně dvě skupiny telomer. Prvními se stávají mezi organismy velmi rozšířené telomerické struktury s dlouhými guanosinovými přesahy syntetizovanými telomerázou.

Tento typ telomer je u huseníčku následován nedávno popsány telomerami s tupými konci a 3' přesahy několika nukleotidů, které jsou příliš krátké pro tvorbu t-smyčky či vazbu oligonukleotid-vazebných (OB)-fold proteinů (Murzin, 1993; Kazda *et al.*, 2012). Navíc zatím není vyvrácena ani účast Ku heterodimeru na tomto ojedinělém způsobu uspořádání telomer u rostlin. Popsaný typ chromozomové ochrany se tak může stát novým modelem nezávislým na jednovláknovém mechanismu (Kazda *et al.*, 2012).

3.4 Struktura chromatinu

Chromatin se v buněčném jádře vyskytuje ve dvou základních formách, euchromatinu a heterochromatinu, které se liší stupněm kondenzace a s ním související transkripční aktivitou (Fischer *et al.* 2006). Telomerické oblasti jsou obecně tvořeny specializovaným heterochromatinem. Nicméně se ukázalo, že tento stav neplatí pro všechny organismy. Analýza telomerických značek histonů u huseníčku přinesla v tomto směru velice zajímavé výsledky (Vaquero-Sedas *et al.*, 2011).

Telomerický heterochromatin huseníčku vykazuje nižší stupeň kondenzace než centromerický. Též zde bylo identifikováno vyšší množství histonu H3 oproti centromerickým oblastem. Z tohoto poznatku vyplývá možný podíl H3 na odlišném uspořádání telomer, které se na rozdíl od ostatního chromatinu vyznačují menšími vzdálenostmi mezi nukleozomy, které jsou zkrácené o 10 až 35 bází



z přibližně 180 bp na 157 bp (Sýkorová *et al.*, 2001; Pisano *et al.*, 2008; Vaquero-Sedas *et al.*, 2012). Histon H3 je nejvíce modifikovaným histonem, může být několikastupňově metylován, acetylován nebo například ubikvitinylován. Podle histonových modifikací popsaných v oblastech telomer se ukázalo, že telomerické histony nemají jen heterochromatinové modifikace, ale i typické značky pro euchromatin. Podle dvanácti epigenetických značek byly definovány čtyři hlavní chromatinové stavy (CS1 – CS4). Pro telomery se stal nejvíce charakterizujícím stav CS2, ve kterém se nachází také 23% genů, většinou umlčených nebo slabě exprimovaných (Roudier *et al.*, 2011). Telomerický chromatin huseníčku lze na základě těchto výsledků považovat spíše za přechodný než konstitutivní typ heterochromatinu (Habu *et al.*, 2006).

Dalším stupněm procesu umlčování chromatinu je metylace DNA, kterou v tomto případě vykonává pro rostliny unikátní enzym. Je jím RdDM (RNA-dependent DNA methylase), která zodpovídá za asymetrickou metylaci cytosinu u rostlin (Matzke *et al.*, 2009). U telomerického chromatinu je zmíněnou metylázou modifikován cytosin na třetí pozici sekvence CCCTAAA. Enzym RdDM ke své činnosti vyžaduje siRNA (small interfering RNA), která je schopna za pomoci proteinových komplexů vázat komplementární úseky DNA a spolu s metylázou se podílí na umlčování chromatinu (Pikaard *et al.*, 2008; Vrbský *et al.*, 2010).

Telomery jako ochranné struktury chromozomů jsou velice dynamické délkou a primární sekvencí. Od těchto parametrů se dále odvíjí jejich sekundární struktury, afinita proteinových komplexů a celková dynamika v čase. Charakter telomerické DNA má zásadní vliv na celkovou strukturu telomer, přičemž odchylky od konsenzu hrají roli v následujícím alternativním uspořádání chromozomových konců, a proto lze považovat za jedinečné struktury s unikátní regulací a aktivitou.

4. Komplex telomerázy

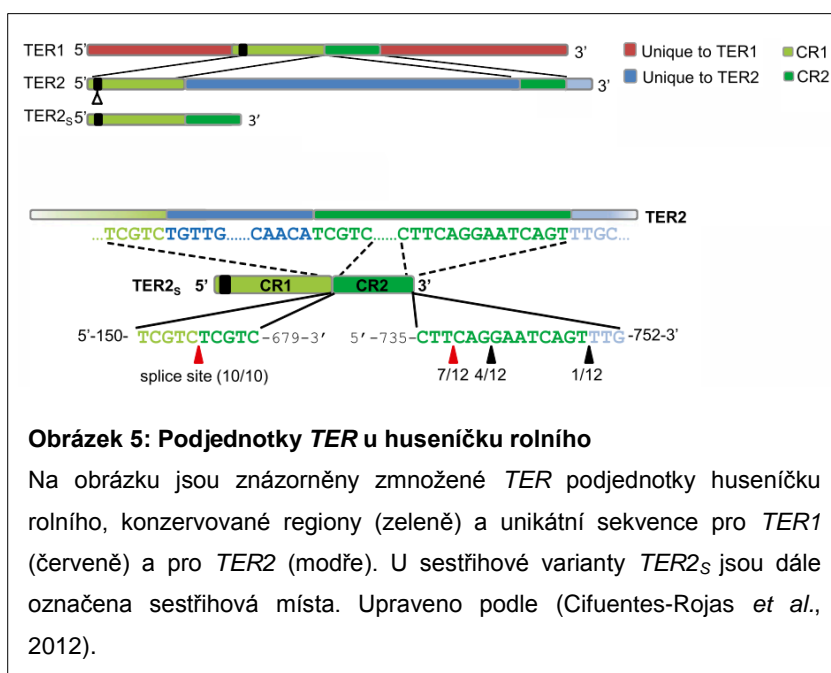
Enzymatický komplex telomerázy se skládá ze dvou hlavních složek, kterými jsou RNA podjednotka s telomerickým motivem (*TER*) a proteinová podjednotka (*TERT*) s katalytickou aktivitou reverzní transkriptázy. Telomerázová RNA je využívána jako templát pro syntézu 3' vlákna, a sice jejím částečným párováním se stávající sekvencí. Telomerázová katalytická podjednotka váže *TER* a vytváří nové vlákno podle její předlohy. Jádro komplexu telomerázového holoenzymu se skládá z centrálních podjednotek *TERT*, *TER* a dyskerinu, který se *in vitro* váže do oblasti 3' konce podjednotky *TER* (Kannan *et al.*, 2008). S telomerázou reagují i další faktory, jež zajišťují její správnou aktivitu a vícestupňovou regulaci.

V literatuře je nejlépe popsána struktura podjednotky *TERT* u rýže. Má jedenáct intronů a dvanáct exonů, z nichž nejstudovanějším a nejbohatším na epigenetické značení je exon 5 (Heller-Uszynska *et al.*, 2002). Pro usnadnění interakce s kyselou kostrou DNA má proteinová podjednotka

obecně bazický charakter (Lingner, 1997). U huseníčku se na N-konci nachází funkčně důležitý motiv a jaderný lokalizační signál (Rossignol *et al.*, 2007), který je rozpoznáván transportním systémem a umožňuje průchod přes jaderné póry do jádra. Tato podjednotka je u různých organismů regulována na mnoha stupních, například alternativním sestřihem, sbalením pomocí chaperonů, vazbou různých *TER* podjednotek a fosforylací indukovanou fytohormony (Zachová *et al.*, 2013).

RNA podjednotka telomerázy se u huseníčku, na rozdíl od všech ostatních dosud popsanych organismů, vyskytuje ve dvou kopiích *TER1* a *TER2* (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2011). Z tohoto poznatku lze usoudit, že její evoluční vývoj byl jiný než u kvasinek, či obratlovců. K jejímu zdvojení došlo pravděpodobně během duplikace genomu, přestaveb a redukce počtu chromozomů (Lysák *et al.*, 2009). Sekvenčně jsou si obě tyto podjednotky podobné v konzervovaných oblastech CR1 a CR2, které jsou u každé *TER* odlišně lokalizované a uspořádané, ale nejméně z 85% identické. V obou podjednotkách se nachází deset nukleotidová sekvence se 1,5 opakováním kanonické repetyce v konzervovaných oblastech. Oba transkripty *TER1* i *TER2* jsou *in vitro* vázány podjednotkou TERT, avšak pro plně funkční komplex telomerázy je nutná jen podjednotka *TER1* s dalšími faktory. Výběr podjednotky může být závislý na unikátních oblastech a lokalizaci kódujícího regionu (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2011; Beilstein *et al.*, 2012).

Kódující region *TER1* je u huseníčku lokalizován na chromozomu 1. Nachází se v sekvenci otevřeného čtecího rámce huseníčkového homologu *RAD52*. S tímto lokusem se částečně překrývá také v oblastech konzervovaných regionů. Podjednotka *TER1* po své maturaci interaguje s faktorem POT1a. Nicméně se zatím nepodařilo zjistit nic o specifičnosti této vazby, a proto se uvažuje o tvorbě *TER1*-POT1a dimeru na základě konzervované sekundární struktury. Gen pro druhou podjednotku *TER2* se nachází na chromozomu 5. Sekvence je prepisována v opačné orientaci překrývající 5' UTR oblast genu pro tRNA-adenosindeaminázu 3 (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2011). Podjednotka *TER2* zůstává po své transkripci v plné délce ncRNA nebo může být sestřižena do izoformy *TER2_S* (viz Obrázek 5). Zmíněné alternativní podjednotky *TER2* a *TER2_S* se ve vysoké míře vyskytují při signalizaci poškození DNA. Vyšší afinita RNA podjednotky



TER2 k *TERT* může bránit interakci proteinové podjednotky s *TER1* a aktivaci komplexu telomerázy (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2012).

U dalších druhů čeledi Brassicaceae byly popsány homology *TER*, které se sekvenčně blíží *AtTER1*. Podobně, jako u této podjednotky, u nich byly identifikovány domény CR1 a CR2 a i podobný přesah čtecího rámce s kódující sekvencí homologu RAD52. Avšak u některých z těchto rostlin došlo k mutacím v templátové sekvenci a podjednotka se tak stala nefunkční. Muselo tedy dojít k rychlému zastoupení jiným genem, protože tyto rostliny mají kanonickou telomerickou sekvenci (Beilstein *et al.*, 2012).

Dyskerin je konzervovaný RNA-vazebný protein schopný vazby s podjednotkami *TER1* i *TER2* a specifické interakce s POT1a. Jeho mutací, která má u člověka vážné následky, dochází ke snížení aktivity reverzní transkriptázy *in vitro* (Kannan *et al.*, 2008). V důsledku vyřazení telomerázy nejsou telomery prodlužovány, a tak postupně dochází k jejich zkracování (Pollard *et al.*, 2007).

4.1 Regulace telomerázy na úrovni organismu

Rostlinné telomery se v důsledku neaktivity telomerázy během ontogeneze zkracují jako u člověka. Na rozdíl od lidí však u rostlin může být její enzymatická činnost za specifických podmínek reaktivována, což umožňuje udržení buněčné totipotence. V rostlinách je tento enzym činný v meristémeh a v reprodukčních orgánech; jeho aktivita však nebyla detekována v diferencovaných vegetativních částech rostliny (Fitzgerald *et al.*, 1996; Tamura *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2004). Vzhledem k totipotenci rostlinných buněk může být zpětná aktivace telomerázy stimulována v dediferencovaných pletivech. Z hlediska vývoje jedince je proto regulace rostlinné telomerázy velmi dynamickým procesem (Fajkus *et al.*, 1998).

U tabákových kultur se na změnách aktivity telomerázového holoenzymu navíc podílí některé fytohormony. Jeden z nejdůležitějších hormonů, auxin, zvyšuje expresi telomerázy v časně S-fázi buněčného cyklu za možného spolupůsobení cyklindependentní kinázy 2 (Tamura *et al.*, 1999). Vzhledem k signalizaci auxinu přes degradaci v proteazomu je možné, že se tento nevratný způsob modifikace uplatňuje v regulaci telomerázy na úrovni transkripčních faktorů u huseníčku (Ren *et al.*, 2004). Přidáním exogenního auxinu k transgenním rostlinám může dojít k aktivaci telomerázy v listech (Tamura *et al.*, 1999). Antagonista auxinu v tabákových kulturách, kyselina abscisová, naopak snižuje aktivitu *TERT* (Yang *et al.*, 2001). Důsledkem jejího působení je zastavení prodlužování telomer při buněčném dělení, což vede k jejich zkracování (Pollard *et al.*, 2007).

4.2 Regulace epigenetickým značením genu *TERT*

Regulace telomerázy na epigenetické úrovni zahrnuje velké množství histonových modifikací, na které navazují modifikace deoxyribonukleové kyseliny. Obecně se u konstitutivně přepisovaných genů huseníčku vyskytují symetrické CG metylace v exprimovaných oblastech, které jsou přítomné,

i přes vývojovou regulaci, také v kódujícím regionu *AtTERT* (Aceituno *et al.*, 2008; Ogrocká *et al.*, 2012). Naproti tomu metylace v promotoru, které se u proteinové podjednotky nevyskytují, jsou charakteristické pro geny, jež jsou tkáňově více specifické (Zhang *et al.*, 2006). Z těchto pozorování vyplývá velmi komplexní histonový modifikační model, který se podílí na regulaci telomerázy.

Na základě pozorování byly stanoveny kombinace dvanácti epigenetických značek, které charakterizují aktivně transkribované geny, reprimované geny, interchromozomální oblasti a umlčené elementy u huseníčku, podle kterých byl popsán modifikační motiv genu pro TERT (Roudier *et al.*, 2011). Velmi heterogenní epigenetické značení sekvence *TERT* bylo nalezeno v oblasti proti proudu a v exonu 5. Během ontogeneze se v těchto oblastech vyskytují modifikace charakteristické pro umlčené transponovatelné elementy a konstitutivní heterochromatin, ale i značky typické pro euchromatin. Ostatní modifikace těchto úseků byly srovnatelné v tkáních pozitivních i negativních na aktivitu telomerázy (Ogrocká *et al.*, 2012).

Se zvyšující se přítomností represivní značky H3K27me3 vývojově umlčeného heterochromatinu v oblasti proti proudu *TERT* regionu a exonu 5 klesala aktivita telomerázy v důsledku zvyšující se metylace cytosinu na třetí pozici. Přímá spojitost mezi H3K27me3 a metylací DNA však nebyla prokázána a také význam symetrické metylace exonu 5 zůstává zatím neobjasněn z důvodu vývojové regulace telomerázy. Navzdory tomuto metylačnímu motivu a vývojové deregulaci si chromatin v kódující oblasti *AtTERT* zachovává euchromatinové modifikace (Ogrocká *et al.*, 2012).

4.3 Regulace telomerázy transkripčními faktory

Telomerázový komplex je u rostlin regulován na mnoha úrovních, od transkripce a posttranskripčních modifikací *TERT* přes translaci až po interakce s regulačními proteiny. Aktivita telomerázy u huseníčku odpovídá hladině transkriptu *TERT* (Fitzgerald *et al.*, 1999). Hlavním regulačním bodem se tak stává exprese reverzní transkriptázy, na jejíž aktivaci se v listech transgenních rostlin podílí dvoukomponentní dráha proteinů TAC1 a BT2. V důsledku této signalizace byla pozorovatelná činnost telomerázy i v pletivech, která u rostlin divokého typu nejeví známky její aktivity (Ren *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2007). TAC1 (Telomerase activator 1) z rodiny Superman-like je transkripční faktor s DNA-vazebným motivem zinkového prstu (Ren *et al.*, 2004). *In vitro* byla prokázána jeho vazba do promotoru genu *BT2*, která je velmi specifická a citlivá k mutacím centrálního tripletu bází v konzervované oblasti. Činností TAC1 vzrůstá množství transkriptů *BT2* v cytoplazmě jeho přímou interakcí s promotorovou oblastí nebo nepřímo aktivací příslušných transkripčních faktorů (Ren *et al.*, 2007). Nadměrnou expresí transkripčního faktoru TAC1 je narušeno vnímání auxinu a dochází k aktivaci telomerázy v diferencovaných pletivech transformovaných rostlin. Naopak úplné vyřazení tohoto faktoru nemá pozorovatelný vliv na činnost telomerázy. Proto se uvažuje mimo jiné o zastoupení funkce jiným proteinem z rodiny Superman-like (Ren *et al.*, 2004).

Protein BT2 má několik protein-interakčních domén, jednou z nich je kalmodulin-vazebná doména, která přes vazbu kalmodulinu vycytává vápníkové ionty (Du and Poovaiah, 2004). Jejich koncentrace pravděpodobně může regulovat činnost telomerázy. Dále byla potvrzena schopnost BT2 rozpoznat hormon auxin *in vitro*. *In vivo* s největší pravděpodobností interaguje s proteiny s bromodomény, které jsou typické pro transkripční faktory, což by znamenalo i schopnost kontroly exprese regulátorů telomerázy. Konstitutivní exprese proteinu BT2 v transformovaných rostlinách vede k aktivaci reverzní transkriptázy v listech. Celkový mechanismus výše popsané regulace a transkripční faktory vázající se do oblasti promotoru *TERT* zůstávají zatím neznámé (Ren *et al.*, 2007; Zeng and Zhou, 2002).

4.4 Posttranskripční a posttranslační regulace

Podobná regulace exprese jako u huseníčku byla popsána u rýže, u níž však hrají hlavní roli modifikace na posttranskripční úrovni. Sestřihem může vznikat množství variant, které soutěží o vazbu *TER* a vazebných proteinů (Oguchi *et al.*, 2004). U huseníčku byla popsána interakce faktoru POT1a s transkripční variantou AtTERT V(I8), a proto se očekává prokázání biologické role alternativních transkriptů také u ostatních rostlin (Rossignol *et al.*, 2007). Přepisy různých exonů a delších sestřihových variant byly identifikovány u transgenních rostlin (Fojtová *et al.*, 2011). V tabákových kulturách byla popsána regulace telomerázy hlavně na úrovni posttranslačních modifikací. Enzym zůstává neaktivní bez specifické fosforylace dosud neznámou kinázou, jejíž aktivita je v průběhu S-fáze snížena inhibítoem (Yang *et al.*, 2001). Nejvyšší aktivita kinázy byla zaznamenána v pozdní S-fázi buněčného cyklu, kdy dochází k replikaci chromozomové DNA (Tamura *et al.*, 1999). Naopak specifická inaktivace telomerázy je zajištěna působením protein-fosfatázy 2A, která ji zpětně defosforyluje. U buněk rýže byla zjištěna podobná regulace fosforylací dvou míst AKT-kinázou, avšak jejich počet se může lišit v závislosti na alternativním sestřihu (Oguchi *et al.*, 2004).

O transportu telomerázy na telomery u rostlin není v literatuře mnoho dostupných informací. Homolog faktoru EST1, který se účastní jejího vycytávání u kvasinek, se na něm u vyšších eukaryot nepodílí (Conti and Izaurralde, 2005). Rostliny disponují zřejmě jiným způsobem vycytávání telomerázy a její vazbou na telomery, jenž je pravděpodobně zprostředkován faktorem POT1a interagujícím s telomerázou (Surovtseva *et al.*, 2007). Pro navázání reverzní transkriptázy na telomerické konce je vyžadována jejich správná lokální konformace, která může usnadnit nebo zamezit interakci enzymu s DNA (Majerová *et al.*, 2011).

4.5 Regulace *TERRA* transkripty

Při hypometylaci telomer může dojít k rozvolnění chromatinu a zpřístupnění DNA enzymům jako jsou RNA polymerázy (Majerová *et al.*, 2011). Nejdříve byl objev telomerických transkriptů popsán u zvířat, později následoval také v rostlinné říši (Vrbský *et al.*, 2010). U savců vznikají nekódující transkripty *TERRA* (telomeric repeat-containing RNA) z telomerických vláken bohatých

na cytosin přepisem RNA polymerázou II ve velikostním rozpětí 100 bp až 9 kb. Dále jsou jako pre-mRNA upravovány přidáním 7-metylguanositové čepičky a část z těchto transkriptů je i polyadenylována. Vazby s chromatinem se však účastní jen vlákna -RNA bez poly(A) řetězce (Porro *et al.*, 2010).

U rostlin se *TERRA* účastní metylace DNA ve formě malých interferenčních RNA (Vrbský *et al.*, 2010). Transkripce *TERRA* je iniciována v oblastech subtelomer, které slouží jako promotory a RNA polymeráza se z nich postupně pročitá až do telomer. Lze předpokládat, že se v tomto případě jedná o RNA polymerázu V, jež se účastní syntézy dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) u rostlin (Vaquero-Sedas and Vega-Palas, 2011). Pro doplnění příslušné hypotézy byly nalezeny sekvence *TERRA* (UUUAGGG) i *ARRET* (CCCUAAA) pouze u rostlin (Vrbský *et al.*, 2010). U huseníčku byly popsány dva typy velikostně velmi heterogenních *TERRA* transkriptů, jejichž délka se pohybuje od několika stovek nukleotidů po produkty mnohonásobně delší. Tato různorodost však není pozorována jen v jejich velikosti, ale i v expresi. Frekvence transkripce se může lišit na úrovni organismu mezi tkáněmi a v rámci jedné buňky mezi raménky chromozomů. Některá chromozomová raménka dávají vzniknout jen *TERRA* nebo *ARRET*, jiná jsou přepisována v obou směrech, ale existují i trvale umlčená (Vrbský *et al.*, 2010). Transkripty *TERRA* mohou vznikat nejen z telomerických a subtelomerických regionů, ale i z oblasti centromer, kde se vyskytují sekvence podobné telomerám (Procházková Schrupfová *et al.*, 2011).

Vzhledem k tomu, že *TERRA* a *ARRET* jsou antiparalelní vlákna, mohou mezi sebou párovat a vytvářet dvouvláknové fragmenty. Tyto dvouvláknové RNA váže komplex AGO4, který je schopen je od sebe odlišit a přednostně vybírat transkripty bohaté na guanin. Zatímco z úseku bohatého na cytosin, který přesáhne délku 14 nukleotidů, vzniká produkt o 24 až 25 nukleotidech, z produktu bohatého na guanin vzniká pouze 23 až 24 nukleotidová siRNA. Po vzniku malých interferenčních RNA úpravou Dicerem není možné odlišit transkripty pocházející z centromerických a telomerických oblastí. Zralé produkty *TERRA* jsou dále využity jako guide RNA pro navedení RNA-dependentní DNA metyltransferázy na komplementární sekvence a jejich asymetrickou metylaci cytosinu na pozici 3 CCCUAAA (Vrbský *et al.*, 2010; Matzke *et al.*, 2009; Cokus *et al.*, 2008).

Regulace aktivity telomerázy je velmi komplexní proces kontrolovaný mnoha způsoby. Konzervovaná struktura jádra telomerázy podléhá změnám, které jsou zajištěny interakcemi s různými proteiny. Neméně důležitou roli mají její modulace na úrovni transkripce a posttranskripčních modifikací. Zde popsanými mechanismy byla nastíněna variabilita důležitosti jednotlivých kroků, a tak je možné pozorovat zatím nejširší spektrum regulačních pochodů právě u rostlin. Nicméně výzkum v této oblasti není na takové úrovni, aby byly zřejmé regulační dráhy, a proto ani celkový mechanismus působení telomerázy.

5. Ochrana telomer

Telomery je nutné chránit před rozpoznáním degradačními enzymy a rekombinačními faktory, dále musí být zajištěno jejich prodlužování po každém buněčném dělení před ztrátou posledních nukleotidů. Navíc vyřazením těchto primárních ochranných komponent musí být aktivovány další signální kaskády, jež nahrazují jejich funkci. Telomerické proteiny mají esenciální úlohu při tvorbě a udržování architektury telomer, jejímž ustavením zabraňují interchromozomálním rekombinacím (Lee and Kim, 2010). U savců se na ochraně telomerických konců podílí komplex šesti proteinů, shelterin (Liu *et al.*, 2004). Jeho komponenty preventivně vážou replikační protein A (RPA), který má redundantní funkci s některými telomerickými komponentami a spouští dráhu signalizující dvouvláknové zlomy (Denchi and de Lange, 2007). Pro identifikaci proteinů interagujících s telomery bylo u rostlin použito několik přístupů, které odhalily například huseníčkové proteiny STEP1 (Kwon and Chung, 2003), homolog PURa (White *et al.*, 2010), proteinovou rodinu podobnou SMH (Marian *et al.*, 2003) a homology savčího POT1 (Surovtseva *et al.*, 2007).

K dysfunkci telomer dochází po zkrácení telomerických repetit až na kritickou délku, při které již nefungují ochranné mechanismy zabraňující nežádoucím aktivitám telomerických konců (Říha and Shippen, 2003). Zjištěním tohoto problému zprostředkovaného signalizací telomer se aktivují příslušné dráhy, které vedou až k přerušení buněčného cyklu. Úplný rozsah účinku se následně projevuje zastavením dělení meristematických tkání, který však není patrný u somatických buněk. Příčinou kritického zkrácení telomer se mohou stát fyzikální faktory, mezi které patří také ionizační záření. Jeho působení má vliv jen na aktivní meristémy na rozdíl od diferencovaných buněk (Hefner *et al.*, 2006).

U transgenních rostlin huseníčku vede zkracování telomer k tvorbě chromozomových mostů v anafázi a po té i k fúzím chromozomů, čímž vznikají dicentrické chromozomy spojené svými konci v oblasti telomer (Vespa *et al.*, 2005). Popsaným způsobem může docházet k masivním reorganizacím chromozomů a celého genomu. Na sekvenční úrovni tyto procesy přispívají k tvorbě intersticiálních telomerických sekvencí (ITS), jež jsou generovány také činností telomerázy, opravami dvouvláknových zlomů a pravděpodobně i rekombinacemi (Azzalin *et al.*, 2001).

K dalším způsobům studia se využívá vyřazení telomerázy, jehož následkem se neobnovuje délka telomer při buněčném dělení. Při sledování deseti generací transgenních rostlin bez telomerázy se u posledních pěti vyskytly vývojové vady vegetativních a generativních orgánů. Mutantní rostliny byly rozděleny do čtyř tříd podle fenotypu. Do první třídy byly zařazeny rostliny podobné divokému typu. Skupinu I tvořily jedinci s mírnými vadami v morfologii listů převážně z 6. a 7. generace. Skupina II byla zastoupena rostlinami se středně závažnými až závažnými negativními změnami v morfologii listů, struktuře stonku a sníženou klíčivostí v generacích 8 a 9. Poslední skupina T, rostliny s přerušným vegetativním růstem nebo s abortovanými semeny, byla pozorována u 9. a 10. generace bez aktivní telomerázy. V každé generaci buňky přicházely jen o 250 až 500 nukleotidů

(Fitzgerald *et al.*, 1996; Říha *et al.*, 2001). Původní velká ztráta bází je zredukována na toto rozpětí činností alternativní dráhy prodlužující telomery (Růčková *et al.*, 2008).

5.1 Proteinové komplexy účastníci se ochrany telomer

Bílkovinnou složku, jež má vliv na správnou funkci telomer a interaguje s jejich upravenými i neupravenými konci, tvoří několik komplexů nezbytných pro správnou činnost telomerických oblastí. Tyto komponenty lze rozdělit do tří skupin sekvenčně příbuzných proteinů. Mohou jimi být proteiny podobné živočišnému shelterinovému heterohexameru, u rostlin zastoupené rodinami proteinů TRB, TRFL a POT. Druhá skupina zahrnuje faktory, které se podílí na opravách zlomů DNA: proteiny Ku a komplex MRN, a dráhy závislé na proteinkinázách ATM a ATR. Posledním funkčním seskupením se stává heterotrimerní komplex CST (Watson and Říha, 2010).

5.2 Proteiny podobné shelterinu

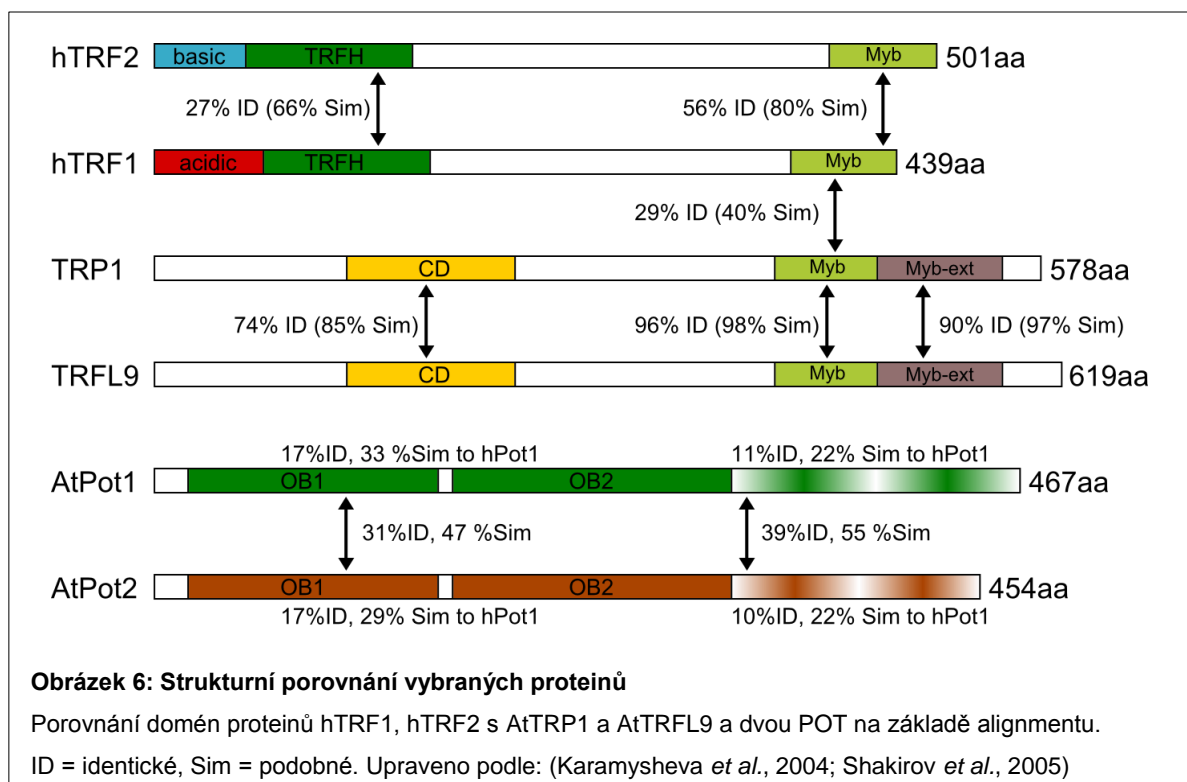
První skupina proteinů je zastoupena dvěma rodinami proteinů podobných SMH (Single-Myb-histone). Mají obdobné vazebné charakteristiky jako lidské TRF (Terminal restriction fragments) podjednotky shelterinu (Palm & de Lange, 2008b), a disponují také typickou sekundární strukturou v podobě teloboxové Myb domény na N-konci, přes kterou jsou schopny vázat jednovláknové i dvouvláknové úseky telomer (Schrumpfová *et al.*, 2004). Tyto struktury jsou dále charakteristické centrální globulární histonovou (H1/5) doménou, přes kterou mohou interagovat se širokou škálou proteinů (například s oligosacharid/oligonukleotid-vazebnými (OB-fold) doménami AtPOT1b) a nescificky se vázat na dvouvláknovou telomerickou DNA (Schrumpfová *et al.*, 2004; Procházková Schrumpfová *et al.*, 2008). Mezi SMH-like proteiny patří rodina proteinů TRB (telomere-repeat-binding factor) (Marian *et al.*, 2003).

U huseničky bylo dosud popsáno pět proteinů TRB, které mohou vytvářet komplexy homodimerů, heterodimerů a dokonce i multimerů interakcemi histonových domén (Hofr *et al.*, 2009; Kuchař and Fajkus, 2004). Na dvouvláknovou a jednovláknovou DNA se vážou specificky N-terminální doménou, přičemž jejich regulace závisí na struktuře chromatinu (Schrumpfová *et al.*, 2004). TRB1 (telomere-repeat-binding factor 1) interaguje přímo s jednou hexanukleotidovou jednotkou telomerických repetitiv (Hofr *et al.*, 2009) a proteinem POT1b (Protection of telomeres 1b), jež by mohl být prostředníkem interakce proteinu TRB1 s telomerázovou podjednotkou TERT (Procházková Schrumpfová *et al.*, 2008; Procházková Schrumpfová *et al.*, 2014). Na druhou stranu TRB1 je schopen fyzické interakce s N-koncem TERT. Transgenní rostliny bez TRB1 mají telomery zkrácené, což má také vliv na specifitu vazby TRB1 a TRB3, jež vyžadují minimálně dvě vazebná místa pro asociaci dvou dimerů TRB (Hofr *et al.*, 2009; Procházková Schrumpfová *et al.*, 2014). Podmínka většího množství telomerických repetitiv také omezuje jejich vazbu na krátké sekvence podobné telomerám různě roztroušené po genomu (Hofr *et al.*, 2009). Vzhledem k účasti těchto

faktorů v ochraně telomer jsou považovány za kandidátní proteiny rostlinného komplexu podobného shelterinu (Procházková Schrupfová *et al.*, 2014).

Dalšími popsány faktory jsou ortology lidských proteinů TRF, dvě pro rostliny specifické rodiny TRF-like 1 (TRFL1) a TRF-like 2 (TRFL2). Dosud bylo identifikováno dvanáct proteinů TRFL, které sdílí sekvenci prodloužené domény Myb pro vazbu dvouvláknové DNA, která je u rostlin specificky umístěna na C-konci (Myb-ext doména) a je též nejkonzervovanější oblastí s vysokou sekvenční podobností k shelterinovým komponentům hTRF1 a hTRF2 (viz Obrázek 6). Proteiny rodiny TRFL1 se mohou seskupovat *in vitro* v heterodimery u kukuřice a v homodimery specificky vázající telomery u huseníčku. Do této třídy u huseníčku patří šest proteinů, v jejichž sekvenci se nachází vysoce konzervované domény Myb-ext a centrální doména (Karamysheva *et al.*, 2004). Jedním z členů této rodiny je i TRP1 (Telomeric repeat-binding protein 1), který má redundantní funkci s telomerickými Myb-podobnými proteiny, společně se podílející na negativní regulaci telomer (Karamysheva *et al.*, 2004; Peška *et al.*, 2011).

Dalším popsáným proteinem této rodiny je protein TBP1 (Telomeric DNA-binding protein 1), který váže jednováknovou i dvouvláknovou DNA a mohl by být homologem proteinů hTRF (Chen *et al.*, 2001; Karamysheva *et al.*, 2004). Vyřazením proteinů TBP1 – u huseníčku AtTBP1 (Hwang and Cho, 2007), rýže RTBP1 (Rice telomere binding protein 1) (Yang *et al.*, 2004) a tabáku (*Nicotiana glutinosa*) NgTRF1 (Tobacco Telomere-Binding Protein) (Yang *et al.*, 2004) – se telomery těchto rostlin prodlužují. U *tbp1* mutantních rostlin huseníčku bylo pozorováno prodlužování telomer až na 10 kb (Hwang and Cho, 2007) a u rýže navíc anomálie v růstovém vývoji vedoucí ke snížení fertility



(Hong *et al.*, 2007). Na rozdíl od živočichů nemají mutace těchto proteinů u huseníčku takové následky jako u myši, zřejmě z důvodu možné redundance s dosud nepopsanými proteiny (Karamysheva *et al.*, 2004).

Proteiny druhé podrodiny mají na C-konci Myb-like doménu bez prodloužení, a proto nejsou schopné *in vitro* dimerizace ani vazby na DNA. Obě skupiny proteinů TRFL jsou si sekvenčně podobné jen v Myb doméně, což napovídá rozrůznění jejich funkcí. U rostlin mutovaných vždy v genu pro jeden protein nebyly pozorovány žádné růstové ani vývojové anomálie, a ani na úrovni buňky se neprojevil patrný vliv na délku telomer a stabilitu genomu (Karamysheva *et al.*, 2004).

Poslední skupinou rostlinného komplexu podobného shelterinu se staly proteiny sekvenčně velmi podobné živočišnému POT1 (Protection of telomeres 1). Při hledání rostlinných homologních proteinů tvořících u živočichů shelterinový komplex bylo nalezeno nejméně šest proteinů příbuzných proteinům Myb schopných vazby k dvouvláknové DNA *in vitro* (Karamysheva *et al.*, 2004). Jedním z nich je právě protein POT1, který se váže na jednovláknové konce (Surovtseva *et al.*, 2007). U huseníčku byly posléze nalezeny jeho hlavní homology POT1a a POT1b (Shakirov *et al.*, 2005). Tyto dva rostlinné POT proteiny se podílejí na kontrole délky telomer a přímé ochraně konců. I přes to nejsou považovány za hlavní telomerické proteiny vázající jednovláknovou DNA, a to z důvodu jejich nespecifické vazby (Shakirov *et al.*, 2009). Obecně se podílejí na represi ATR dráhy, která je indukována vazbou proteinů RPA na dvouvláknové zlomy, jež mohou telomery mimikovat při disociaci POT1 z DNA (Denchi and de Lange, 2007). Huseníček disponuje třemi paralogy POT1, jež se všechny funkčně vztahují k telomerám, avšak ne všechny se na ně vážou jako savčí POT1 (Shakirov *et al.*, 2005; Rossignol *et al.*, 2007).

Zmnožené proteiny POT1 vznikly pravděpodobně duplikací genomu a v důsledku velmi rychlé evoluce se jejich funkce stihly značně rozrůznit (Lee and Kim, 2010). V literatuře nejvíce popsané POT1a a POT1b jsou strukturně velmi podobné homologu POT1 obratlovců ve dvou OB-fold doménách a doméně na C konci (Nelson and Shippen, 2013). AtPOT1a se váže na telomery jen velmi krátce v průběhu S-fáze, což je v souladu s teorií o jeho funkci ve vychytávání telomerázy na G-přesahy. Také má pozitivní účinek na aktivní telomerázový komplex, jehož vazbou se zvyšuje účinnost enzymu. Určitý vliv POT1a na udržení homeostázy telomer je očividný u mutantních rostlin *pot1a*, u kterých dochází ke zkracování telomer v důsledku inaktivace telomerázy (Surovtseva *et al.*, 2007). Jeho paralog AtPOT1b ochraňuje telomerické konce před rozpoznáním exonukleázami a následnou resekci C-konce (Shakirov *et al.*, 2005). U mutantních rostlin *pot1b* byly pozorovány eroze telomer a chromozomové fúze následované morfologickými anomáliemi (Shakirov *et al.*, 2005).

Posledním popsáním paralogem POT1 u rostlin je malý zkrácený POT1c obsahující jen jednu OB-fold doménu. I přes tuto nezanedbatelnou změnu struktury si alespoň minimálně zachoval původní funkci v ochraně telomer avšak mechanismus jeho působení a konkrétní poznatky o něm zatím nejsou

známy. Jednou z jeho předpokládaných možných funkcí by mohlo být vychytávání POT1b na telomery (Rossignol *et al.*, 2007; Nelson and Shippen, 2013).

5.3 Proteiny DNA oprav

Mezi hlavní komplexy účastníci se ochrany telomerických konců patří proteinový dimer Ku70/80, který má významnou funkci v udržování stabilní délky telomer. Váže se přímo na dvouvláknové konce a zajišťuje jejich nerozeznatelnost pro nukleolytické enzymy a rekombinační faktory. Mutacemi jednotlivých podjednotek dochází k jeho vyřazení z funkce (Gallego *et al.*, 2013). Absence Ku70 vede u huseníčku k odbourání tupých konců exonukleázou EXO1 a dalšími nukleázami. Tyto enzymy generují jednovláknové přesahy, jež jsou schopny invaze do dvouvláknových oblastí, čímž umožňují rekombinaci nebo odštěpení t-kruhů. Ku80 působí zřejmě proti aktivitě telomerázy a přímo ji inhibuje. U pozdějších generací mutantů *ku80/tert* byly pozorovány chromozomové fúze a defekty ve vývoji vegetativních orgánů. Dvojité mutanti *ku70/80* disponují prodlouženými telomery takto zpřístupněnými pro telomerázu ve srovnání s divokým typem rostlin. Heterodimer má tedy pozitivní vliv na délku telomer a udržení homeostázy při dysfunkci telomerázy. Stabilizuje telomery a zajišťuje jejich prodlužování usnadněním nehomologního párování konců, které je přímo znemožněno činností telomerázy u kvetoucích rostlin. Telomeráza svoji přímou vazbou na telomery zamezuje navázání rekombináz (Kazda *et al.*, 2012). Proteiny Ku u rostlin asociují s telomerázou, konkrétně s její RNA podjednotkou *TER2* (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2012). Z výsledků je zřejmá velká flexibilita v oblasti ochrany rostlinných telomer (Kazda *et al.*, 2012).

Na rozpoznání dvouvláknových zlomů a spuštění signalizační dráhy se u různých organismů významně podílí komplex MRN (Vannier *et al.*, 2006). Tento enzymaticky aktivní proteinový trimer je nezbytný pro opravy DNA, rekombinace, replikaci DNA, účastní se také aktivace kontrolních bodů a udržování telomer (Lamarche *et al.*, 2011). Jeho nefunkčnost není pro huseníček letální, nicméně u těchto rostlin byla pozorovatelná nestabilita genomu fúzováním chromozomů. Komplex MRN tvoří protein NBS1 vázající dvě dimerní podjednotky MRE11 a RAD50 (Vannier *et al.*, 2006). Tyto homodimery s doménami vázajícími DNA tvoří dvě na sobě nezávislá místa přemostěná NBS1 (Najdekrová and Široký, 2012). Při vyřazení DNA-vazebných proteinů z funkce dochází ke zkracování telomer, které je kompenzováno fúzemi chromozomových konců. Rostlinná NBS1 podjednotka je menší než živočišná, ale má všechny důležité domény, doménu pro vazbu s replikační vidlicí, MRE11-vazebnou doménu, ATM-interagující doménu a další. Při samoopylování mutantů *tert/nbs1* byly pozorovány vývojové vady rostlin, které vedly až k jejich úplné sterilitě v šesté generaci. V anafázi samčích meiocytů huseníčku byly identifikovány chromozomové mosty mezi bivalenty v anafázi I a univalenty v anafázi II (Najdekrová and Široký, 2012). Spolu s proteiny RPA se komplex MRN významně podílí na aktivaci signalizace kinázami (Amiard *et al.*, 2010).

Poslední skupinou proteinů účastnících se oprav DNA jsou dvě dříve zmíněné proteinkinázy a na nich závislé fosforylační kaskády. U rostlin existují dvě hlavní signalizační dráhy rozpoznávající jednovláknová a dvouvláknová poškození. Vyřazení i jen jedné z nich má výrazný vliv na vývoj a stabilitu genomu v zárodečných buňkách s nefunkčními telomerickými proteiny. Signalizací o poškození telomer se spouští odpověď na rozeznání DNA zlomů. Primárními enzymy se v těchto kaskádách stávají dvě kinázy podobné fosfatidylinozitol-3 kinázám; ATM (Ataxia telangiectasia mutated) a ATR (ATM and Rad3 related). Jejich aktivací proteiny, jako například RPA, se spouští dráha signální transdukce, která končí zastavením buněčného dělení a následnou opravou DNA. Jejich účinkem jsou fosforylovány histonové varianty H2A.x v okolí zlomu, což vede k hromadění dalších faktorů. V důsledku působení kináz může být zastaven buněčný cyklus kontrolním bodem rozeznávajícím poškození DNA a následně spouštěna programovaná buněčná smrt. Tímto mechanismem pod kontrolou obou kináz mohou být selektovány buňky s poškozenou genetickou informací (Amiard *et al.*, 2010; Amiard *et al.*, 2011).

Ke spuštění drah ATM a ATR může dojít funkčním vyřazením proteinů zajišťujících ochranu telomer. ATM dráha je aktivována signalizací dvouvláknových zlomů a při deaktivaci telomerázy, a tak se uplatňuje v ochraně před náhodnými rekombinacemi. Mutace komponent ochranného komplexu CST také aktivují tuto alternativní dráhu udržující telomery. Poškozením podjednotky CTC1 jsou telomery zpřístupněny pro vazbu proteinu RPA, jenž aktivuje ATR kinázu. Následná fosforylace histonové varianty H2A.x je rozpoznávána opravnými faktory (Amiard *et al.*, 2011; Vespa *et al.*, 2007; Boltz *et al.*, 2012). Umlčením ATM kinázy je aktivována ATR odpověď. Vyřazením telomerázy a následným zkracováním telomer jsou aktivovány obě dráhy podílející se na udržení stability chromozomů při vyřazení funkce ochranných mechanismů (Amiard *et al.*, 2011). Jejich inhibice není pro rostliny letální (Garcia *et al.*, 2003), na rozdíl od saveců (Brown and Baltimore, 2000), a poukazuje na vzájemnou částečnou zastupitelnost jinými mechanismy (Heacock *et al.*, 2007).

5.4 Komplex CST

Posledním funkčním uskupením proteinů, které se podílí zejména na zabezpečení telomerických konců je komplex CST. Tento evolučně velmi konzervovaný trimer se účastní ochrany telomer před rozeznáním a spuštěním dráhy rozpoznávající dvouvláknové zlomy (Amiard *et al.*, 2011). Váže se nespecificky na jednovláknové úseky DNA a je schopen zajistit jejich ochranu před navázáním proteinů RPA. Také je možné, že se komplex CST u huseníčku podílí na replikaci DNA vazbou na DNA polymerázu α (Price *et al.*, 2010; Gong and de Lange, 2011). Tento heterotrimerický proteinový komplex je tvořen podjednotkami CTC1 (Conserved Telomere maintenance Component 1), STN1 a TEN1 (Song *et al.*, 2008; Surovtseva *et al.*, 2010). Protein CTC1 se přímo váže na podjednotku STN1, která asociuje s TEN1 (Bianchi and Shore, 2008). U proteinů RPA70 a CTC1 byla zaznamenána podobnost ve struktuře, ve vysokém počtu interakčních partnerů a přítomnosti několika DNA-vazebných OB-fold motivů (Price *et al.* 2010). U transgenních rostlin *ctc1*

a stn1 byla pozorována nestabilita genomu, která se projevovала zkracováním telomer, prodlužováním G-přesahů, rekombinacemi a fúzemi konců, a na úrovni organismu také defekty ve fenotypu. Komplex CST není úplně nezbytný pro přežití rostliny na rozdíl od savců, patrně z důvodu částečné redundance funkce s RPA (Surovtseva *et al.*, 2010).

Podjednotka STN1 je konzervovanou komponentou komplexu CST mezi eukaryotními organismy (Song *et al.*, 2008). Její funkce v oblasti telomer může být spojena se syntézou zpozdujícího se vlákna, při které se váže právě na DNA polymerázu α a působí jako její stimulační faktor (Grossi *et al.*, 2004). Inaktivací STN1 dochází ke ztrátě ochrany telomer, zkrácení telomerických repetitiv, fúzování chromozomů a zvětšování G-přesahů. Těmito aberacemi jsou však postiženy jen konce některých chromozomů, konkrétně se jedná pouze o telomery s G-přesahy (Song *et al.*, 2008). Navíc byla popsána možná paralelní ochrana a udržování telomer proteiny Ku. Tato teorie je podpořena většími defekty při vyřazení proteinů Ku z funkce zároveň s podjednotkou STN1 (Kazda *et al.*, 2012). Snížením aktivity CTC1 a STN1 dochází ke zkracování telomer a generování dlouhých G-přesahů, chromozomovým fúzím a aberantním telomerickým rekombinacím (Surovtseva *et al.*, 2010). V důsledku těchto změn se začínají tvořit nestandardní struktury extrachromozomálních telomerických t-kruhů (Zellinger *et al.*, 2007).

Ochrany telomerické DNA u rostlin se účastní velké množství proteinů. Některé jsou univerzální, konzervované i mezi evolučně vzdálenými organismy, jiné jsou zcela unikátní. Při objasnění problému ochrany telomer byly použity metody, které odhalily homology již známých proteinů. Avšak popis celého souboru telomerických proteinů u rostlin není jednoduchý právě pro jedinečnost mnohých z nich. Je pravděpodobné, že vzhledem k absenci základního ochranného komplexu shelterinu se u nich vyvinulo několik paralelních způsobů ochrany chromozomů. Navíc již známé dráhy ještě nejsou u rostlin úplně popsány, a proto jejich propojení s unikátními mechanismy zatím není možné objasnit.

6. Závěr

V předložené práci jsou popsány skupiny proteinů, které se vyskytují v oblastech telomer a zřejmě se podílejí na jejich biologické funkci. Některé z těchto proteinů jsou u rostlin (převážně huseníčku, rýže a tabáku) popsány jen na základě počítačových analýz a strukturního modelování *in silico* (Oguchi *et al.*, 2004), u jiných byly dokonce potvrzeny přímé interakce s telomerami nebo telomerázou (Rossignol *et al.*, 2007; Hofr *et al.*, 2009). Většina známých telomerických faktorů (jako například TAC1), jejich účinků a vazebných aktivit je známa především *in vitro* (Ren *et al.*, 2007). Funkce a vazební partneři již byli studováni např. u telomerázové podjednotky *TER1*, která je nutná pro udržení telomer *in vivo*, avšak ne u všech (*TER2*) byla potvrzena funkce *in vitro* (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2011). Mutantní rostliny některých proteinů homologních s živočišnými již byly kultivovány a pozorovány v několika generacích (Najdekrová and Široký, 2012). Na druhou stranu zde byly popsány proteiny unikátní pro rostlinnou říši s podobnými vazebnými charakteristikami chybějících savčích homologů (Karamysheva *et al.*, 2004).

U huseníčku je pozorovatelný jiný vývoj telomerických komponent poukazující na evoluční diverzitu a důležitost zachování funkčních celků telomer (Beilstein *et al.*, 2012). Nově popsané specifické faktory lze rozčlenit do několika tříd podle jejich homologie a funkce. Živočišné homologní proteiny mohou postrádat některé funkce, jež jsou zajištěny jinak nebo nemusí být zatím vůbec popsány (Najdekrová and Široký, 2012). Navíc se mohou velmi lišit v sekvenční a strukturní organizaci (Nelson and Shippen, 2013).

Z dosavadních výsledků vyplývá nedostatečná znalost telomerických struktur a jejich komponent u rostlin, jež nelze převzít z dosavadních zdrojů převážně savčí biologie telomer. Pro plné porozumění zde probíhajícím procesům a jejich mechanismům, je nutné nashromáždit více informací o této problematice a objasnit důležité reakční dráhy u další skupiny organismů, rostlin.

7. Seznam literatury

- Aceituno, F.F., Moseyko, N., Rhee, S.Y. and Gutiérrez, R.A.** (2008) The rules of gene expression in plants: organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, **14**, 438.
- Adams, S.P., Hartman, T.P., Lim, K.Y., Chase, M.W., Bennett, M.D., Leitch, I.J. and Leitch, a R.** (2001) Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere repeat sequences 5'-(TTTAGGG)(n)-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants. *Proc. Biol. Sci.*, **268**, 1541–6.
- Ahmed, S. and Henderson, E.** (1992) Formation of novel hairpin structures by telomeric C-strand oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 507–11.
- Amiard, S., Depeiges, A., Allain, E., White, C.I. and Gallego, M.E.** (2011) *Arabidopsis* ATM and ATR Kinases Prevent Propagation of Genome Damage Caused by Telomere Dysfunction. *Plant Cell*, **23**, 4254–4265.
- Amiard, S., Charbonnel, C., Allain, E., Depeiges, A., White, C.I. and Gallego, M.E.** (2010) Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22**, 3020–33.
- Azzalin, C.M., Nergadze, S.G. and Giulotto, E.** (2001) Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*, **110**, 75–82.
- Balajee, A.S., Oh, H.J. and Natarajan, A.T.** (1994) Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH. *Mutat. Res.*, **307**, 307–13.
- Beilstein, M.A., Brinegar, A.E. and Shippen, D.E.** (2012) Evolution of the *Arabidopsis* telomerase RNA. *Front. Genet.*, **3**, 188.
- Bernatavichute, Y. V, Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M. and Jacobsen, S.E.** (2008) Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **3**, e3156.
- Bianchi, A. and Shore, D.** (2008) How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol. Cell*, **31**, 153–65.
- Boltz, K.A., Leehy, K., Song, X., Nelson, A.D. and Shippen, D.E.** (2012) ATR cooperates with CTC1 and STN1 to maintain telomeres and genome integrity in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 1558–1568.
- Brown, E.J. and Baltimore, D.** (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.*, **14**, 397–402.
- Cifuentes-Rojas, C., Kannan, K., Tseng, L. and Shippen, D.E.** (2011) Two RNA subunits and POT1a are components of *Arabidopsis* telomerase. *PNAS*, **108**, 73–78.
- Cifuentes-Rojas, C., Nelson, A.D.L., Boltz, K.A., Kannan, K., She, X. and Shippen, D.E.** (2012) An alternative telomerase RNA in *Arabidopsis* modulates enzyme activity in response to DNA damage. *Genes Dev.*, **26**, 2512–2523.

- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., et al.** (2008) Shotgun bisulfite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, **452**, 215–219.
- Conti, E. and Izaurralde, E.** (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 316–25.
- Denchi, E.L. and Lange, T. de** (2007) Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, **448**, 1068–71.
- Du, L. and Poovaiah, B.W.** (2004) A novel family of Ca²⁺/calmodulin-binding proteins involved in transcriptional regulation: interaction with fsh/Ring3 class transcription activators. *Plant Mol. Biol.*, **54**, 549–69.
- Fajkus, J., Fulnečková, J., Hulánová, M., Berková, K., Říha, K. and Matyášek, R.** (1998) Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths. *Mol. Gen. Genet.*, **260**, 470–4.
- Fajkus, J., Kovařík, A., Královics, R. and Bezděk, M.** (1995) Organization of telomeric and subtelomeric chromatin in the higher plant *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.*, **247**, 633–8.
- Fajkus, J., Sýkorová, E. and Leitch, A.R.** (2005) Telomeres in evolution and evolution of telomeres. *Chromosome Res.*, **13**, 469–79.
- Fischer, A., Hofmann, I., Naumann, K. and Reuter, G.** (2006) Heterochromatin proteins and the control of heterochromatic gene silencing in Arabidopsis. *J. Plant Physiol.*, **163**, 358–68.
- Fitzgerald, M.S., McKnight, T.D. and Shippen, D.E.** (1996) Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 14422–14427.
- Fitzgerald, M.S., Říha, K., Gao, F., Ren, S., McKnight, T.D. and Shippen, D.E.** (1999) Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from Arabidopsis inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 14813–8.
- Fojtová, M., Peška, V., Dobšáková, Z., Mozgová, I., Fajkus, J. and Sýkorová, E.** (2011) Molecular analysis of T-DNA insertion mutants identified putative regulatory elements in the AtTERT gene. *J. Exp. Bot.*, **62**, 5531–5545.
- Friedrich, U., Griese, E.-U., Schwab, M., Fritz, P., Thon, K.-P. and Klotz, U.** (2000) Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech. Ageing Dev.*, **119**, 89–99.
- Garcia, V., Bruchet, H., Camescasse, D., Granier, F., Bouchez, D. and Tissier, A.** (2003) AtATM Is Essential for Meiosis and the Somatic Response to DNA Damage in Plants. *Plant Cell*, **15**, 119–132.
- Giraud-Panis, M.-J., Pisano, S., Benarroch-Popivker, D., Pei, B., Du, M.-H. Le and Gilson, E.** (2013) One identity or more for telomeres? *Front. Oncol.*, **3**, 48.
- Gong, Y. and Lange, T. de** (2011) A Shld1-controlled POT1a provides support for repression of ATR signalling at telomeres through RPA exclusion. *Mol. Cell*, **40**, 377–387.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H.** (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. , 331 – 337.

- Grossi, S., Puglisi, A., Dmitriev, P. V., Lopes, M. and Shore, D.** (2004) Pol12 , the B subunit of DNA polymerase alpha , functions in both telomere capping and length regulation. *Genes Dev.*, **1**, 992–1006.
- Habu, Y., Mathieu, O., Tariq, M., Probst, A. V., Smathajitt, C., Zhu, T. and Paszkowski, J.** (2006) Epigenetic regulation of transcription in intermediate heterochromatin. *EMBO Rep.*, **7**, 1279–84.
- Harley, C.B.** (2008) Telomerase and cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 167–79.
- Heacock, M.L., Idol, R.A., Friesner, J.D., Britt, A.B. and Shippen, D.E.** (2007) Telomere dynamics and fusion of critically shortened telomeres in plants lacking DNA ligase IV. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6490–500.
- Hefner, E., Huefner, N. and Britt, A.B.** (2006) Tissue-specific regulation of cell-cycle responses to DNA damage in Arabidopsis seedlings. *DNA Repair (Amst.)*, **5**, 102–10.
- Heller-Uszynska, K., Schnippenkoetter, W. and Kilian, A.** (2002) Cloning and characterization of rice (*Oryza sativa* L) telomerase reverse transcriptase, which reveals complex splicing patterns. *Plant J.*, **31**, 75–86.
- Hofr, C., Šultesová, P., Zimmermann, M., Mozgová, I., Procházková Schrupfová, P., Wimmerová, M. and Fajkus, J.** (2009) Single-Myb-histone proteins from Arabidopsis thaliana: a quantitative study of telomere-binding specificity and kinetics. *Biochem. J.*, **419**, 221–8, 2 p following 228.
- Hong, J.-P., Byun, M.Y., Koo, D.-H., An, K., Bang, J.-W., Chung, I.K., An, G. and Kim, W.T.** (2007) Suppression of RICE TELOMERE BINDING PROTEIN 1 results in severe and gradual developmental defects accompanied by genome instability in rice. *Plant Cell*, **19**, 1770–81.
- Hwang, M.G. and Cho, M.H.** (2007) Arabidopsis thaliana telomeric DNA-binding protein 1 is required for telomere length homeostasis and its Myb-extension domain stabilizes plant telomeric DNA binding. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1333–42.
- Chen, C.M., Wang, C.T. and Ho, C.H.** (2001) A plant gene encoding a Myb-like protein that binds telomeric GGTTTAG repeats in vitro. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16511–9.
- Chen, J.-L. and Greider, C.W.** (2004) An emerging consensus for telomerase RNA structure. *PNAS*, **101**, 10–13.
- Chow, T.T., Zhao, Y., Mak, S.S., Shay, J.W. and Wright, W.E.** (2012) Early and late steps in telomere overhang processing in normal human cells : the position of the final RNA primer drives telomere shortening. *Genes Dev.*, **26**, 1167–1178.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J. and Jackson, S.P.** (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 37–45.
- Kannan, K., Nelson, A.D.L. and Shippen, D.E.** (2008) Dyskerin is a component of the Arabidopsis telomerase RNP required for telomere maintenance. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 2332–41.

- Karamysheva, Z.N., Surovtseva, Y. V., Vespa, L., Shakirov, E. V. and Shippen, D.E.** (2004) A C-terminal Myb extension domain defines a novel family of double-strand telomeric DNA-binding proteins in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 47799–807.
- Kazda, A., Zellinger, B., Rössler, M., Derboven, E., Kusenda, B. and Říha, K.** (2012) Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. *Genes Dev.*, **26**, 1703–1713.
- Kuchař, M. and Fajkus, J.** (2004) Interactions of putative telomere-binding proteins in Arabidopsis thaliana: identification of functional TRF2 homolog in plants. *FEBS Lett.*, **578**, 311–5.
- Kwon, C. and Chung, I.K.** (2003) Interaction of an Arabidopsis RNA-binding Protein with Plant Single-stranded Telomeric DNA Modulates Telomerase Activity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12812–12818.
- Lamarche, B.J., Orazzlo, N.I. and Weltzman, M.D.** (2011) The MRN complex in Double-Strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.*, **584**, 3682–3695.
- Laporte, L. and Thomas, G.J.** (1998) A hairpin conformation for the 3' overhang of Oxytricha nova telomeric DNA. *J. Mol. Biol.*, **281**, 261–70.
- Lee, Y.W. and Kim, W.T.** (2010) Tobacco GTBP1, a homolog of human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, protects telomeres from aberrant homologous recombination. *Plant Cell*, **22**, 2781–2795.
- Lin, J., Ly, H., Hussain, A., Abraham, M., Pearl, S., Tzfati, Y., Parslow, T.G. and Blackburn, E.H.** (2004) A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 14713–14718.
- Lingner, J.** (1997) Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science* (80-), **276**, 561–567.
- Lingner, J. and Cech, T.R.** (1996) Purification of telomerase from Euplotes aediculatus: requirement of a primer 3' overhang. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 10712–7.
- Liu, D., O'Connor, M.S., Qin, J. and Songyang, Z.** (2004) Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J. Biol. Chem.*, **279**, 51338–42.
- Lysák, M. a, Koch, M. a, Beaulieu, J.M., Meister, A. and Leitch, I.J.** (2009) The dynamic ups and downs of genome size evolution in Brassicaceae. *Mol. Biol. Evol.*, **26**, 85–98.
- Majerová, E., Fojtová, M., Mozgová, I., Bittová, M. and Fajkus, J.** (2011) Hypomethylating drugs efficiently decrease cytosine methylation in telomeric DNA and activate telomerase without affecting telomere lengths in tobacco cells. *Plant Mol. Biol.*, **77**, 371–380.
- Marian, C.O., Bordoli, S.J., Goltz, M., Santarella, R.A., Jackson, L.P., Danilevskaya, O., Beckstette, M., Meeley, R. and Bass, H.W.** (2003) The Maize Single myb histone 1 Gene, Smh1, Belongs to a Novel Gene Family and Encodes a Protein That Binds Telomere DNA Repeats in Vitro. *Plant Physiol.*, **133**, 1336–1350.
- Mason, J.M., Frydrychová Čapková, R. and Biessmann, H.** (2008) Drosophila telomeres: an exception providing new insights. *Bioessays*, **30**, 25–37.

- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B. and Matzke, A.J.M.** (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 367–76.
- Murzin, A.G.** (1993) OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.*, **12**, 861–867.
- Najdekrová, L. and Šíroký, J.** (2012) NBS1 plays a synergistic role with telomerase in the maintenance of telomeres in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.*, **12**, 1.
- Nelson, A.D.L. and Shippen, D.E.** (2013) Surprises from the chromosome front: Lessons from *Arabidopsis* on telomeres and telomerase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **77**, 1–15.
- Nosek, J., Kosa, P. and Tomáška, L.** (2006) On the origin of telomeres: a glimpse at the pre-telomerase world. *Bioessays*, **28**, 182–90.
- Ogrocká, A., Sýkorová, E., Fajkus, J. and Fojtová, M.** (2012) Developmental silencing of the AtTERT gene is associated with increased H3K27me3 loading and maintenance of its euchromatic environment. *J. Exp. Bot.*, 1–9.
- Oguchi, K., Tamura, K. and Takahashi, H.** (2004) Characterization of *Oryza sativa* telomerase reverse transcriptase and possible role of its phosphorylation in the control of telomerase activity. *Gene*, **342**, 57–66.
- Peška, V., Procházková Schruppfová, P. and Fajkus, J.** (2011) Using the telobox to search for plant telomere binding proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **12**, 75–83.
- Petracek, M.E., Lefebvre, P.A., Silflow, C.D. and Berman, J.** (1990) Chlamydomonas telomere sequences are A+T-rich but contain three consecutive G-C base pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 8222–6.
- Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T. and Wierzbicki, A.T.** (2008) Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci.*, **13**, 390–7.
- Pisano, S., Galati, A. and Cacchione, S.** (2008) Telomeric nucleosomes: forgotten players at chromosome ends. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3553–63.
- Pisano, S., Marchioni, E., Galati, A., Mechelli, R., Savino, M. and Cacchione, S.** (2007) Telomeric nucleosomes are intrinsically mobile. *J. Mol. Biol.*, **369**, 1153–62.
- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C. and Lippincott-Schwartz, J.** (2007) *Cell biology* second edi.,.
- Porro, A., Feuerhahn, S., Reichenbach, P. and Lingner, J.** (2010) Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 4808–17.
- Price, C.M., Boltz, K.A., Chaiken, M.F., Stewart, J.A., Beilstein, M.A. and Shippen, D.E.** (2010) Evolution of CST function in telomere maintenance. *Cell Cycle*, **9**, 3157–65.
- Procházková Schruppfová, P., Fojtová, M., Mokroš, P., Grasser, K.D. and Fajkus, J.** (2011) Role of HMGB proteins in chromatin dynamics and telomere maintenance in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **12**, 105–111.

- Procházková Schrumpfová, P., Kuchař, M., Paleček, J. and Fajkus, J.** (2008) Mapping of interaction domains of putative telomere-binding proteins AtTRB1 and AtPOT1b from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **582**, 1400–6.
- Procházková Schrumpfová, P., Vychodilová, I., Dvořáčková, M., Majerská, J., Dokládál, L., Schořová, S. and Fajkus, J.** (2014) Telomere repeat binding proteins are functional components of *Arabidopsis* telomeres and interact with telomerase. *Plant J.*, **77**, 770–81.
- Ren, S., Johnston, J.S., Shippen, D.E. and Mcknight, T.D.** (2004) TELOMERASE ACTIVATOR1 Induces Telomerase Activity and Potentiates Responses to Auxin in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2910–2922.
- Ren, S., Mandadi, K.K., Boedeker, A.L., Rathore, K.S. and McKnight, T.D.** (2007) Regulation of telomerase in *Arabidopsis* by BT2, an apparent target of TELOMERASE ACTIVATOR1. *Plant Cell*, **19**, 23–31.
- Rossignol, P., Collier, S., Bush, M., Shaw, P. and Doonan, J.H.** (2007) *Arabidopsis* POT1A interacts with TERT-V(18), an N-terminal splicing variant of telomerase. *J. Cell Sci.*, **120**, 3678–87.
- Roudier, F., Ahmed, I., Bérard, C., et al.** (2011) Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, **30**, 1928–38.
- Růčková, E., Friml, J., Procházková Schrumpfová, P. and Fajkus, J.** (2008) Role of alternative telomere lengthening unmasked in telomerase knock-out mutant plants. *Plant Mol. Biol.*, **66**, 637–46.
- Říha, K., Fajkus, J., Široký, J. and Vyškot, B.** (1998) Developmental Control of Telomere Lengths and Telomerase Activity in Plants. *Plant Cell*, **10**, 1691–1698.
- Říha, K., McKnight, T.D., Fajkus, J., Vyškot, B. and Shippen, D.E.** (2000) Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures. *Plant J.*, **23**, 633–41.
- Říha, K., McKnight, T.D., Griffing, L. and Shippen, D.E.** (2001) Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. *Science*, **291**, 1797–800.
- Říha, K. and Shippen, D.E.** (2003) Telomere structure, function and maintenance in *Arabidopsis*. *Chromosome Res.*, **11**, 263–75.
- Shakirov, E. V., McKnight, T.D. and Shippen, D.E.** (2009) POT1-independent single-strand telomeric DNA binding activities in Brassicaceae. *Plant J.*, **58**, 1004–15.
- Shakirov, E. V. and Shippen, D.E.** (2004) Length Regulation and Dynamics of Individual Telomere Tracts in Wild-Type *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 1959–1967.
- Shakirov, E. V., Surovtseva, Y. V., Osburn, N. and Shippen, D.E.** (2005) The *Arabidopsis* Pot1 and Pot2 Proteins Function in Telomere Length Homeostasis and Chromosome End Protection. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 7725–7733.
- Schrumpfová, P., Kuchař, M., Miková, G., Skřišovská, L., Kubičárová, T. and Fajkus, J.** (2004) Characterization of two *Arabidopsis thaliana* myb- like proteins showing affinity to telomeric DNA sequence. *Genome*, **324**, 316–324.

- Song, X., Leehy, K., Warrington, R.T., Lamb, J.C., Surovtseva, Y. V. and Shippen, D.E.** (2008) STN1 protects chromosome ends in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, **105**, 7–12.
- Sun, H., Bennett, R.J. and Maizels, N.** (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1978–1984.
- Surovtseva, Y. V., Churikov, D., Boltz, K.A., et al.** (2010) Conserved Telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryots. *Mol. Cell*, **36**, 207–218.
- Surovtseva, Y. V., Shakirov, E. V., Vespa, L., Osburn, N., Song, X. and Shippen, D.E.** (2007) *Arabidopsis* POT1 associates with the telomerase RNP and is required for telomere maintenance. *EMBO J.*, **26**, 3653–61.
- Sýkorová, E., Cartagena, J., Horáková, M., Fukui, K. and Fajkus, J.** (2003) Characterization of telomere-subtelomere junctions in *Silene latifolia*. *Mol. Genet. Genomics*, **269**, 13–20.
- Sýkorová, E., Fajkus, J., Ito, M. and Fukui, K.** (2001) Transition between two forms of heterochromatin at plant subtelomeres. *Chromosome Res.*, **9**, 309–23.
- Tamura, K., Liu, H. and Takahashi, H.** (1999) Auxin Induction of Cell Cycle Regulated Activity of Tobacco Telomerase. *J. Biol. Chem.*, **274**.
- Tomaska, L., Nosek, J., Kramara, J. and Griffith, J.D.** (2009) Telomeric circles: universal players in telomere maintenance? *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1010–5.
- Trémousaygue, D., Garnier, L., Bardet, C., Dabos, P., Hervé, C. and Lescure, B.** (2003) Internal telomeric repeats and “TCP domain” protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.*, **33**, 957–66.
- Trémousaygue, D., Manevski, A., Bardet, C., Lescure, N. and Lescure, B.** (1999) Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J.*, **20**, 553–61.
- Vannier, J.-B., Depeiges, A., White, C. and Gallego, M.E.** (2009) ERCC1/XPF protects short telomeres from homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.*, **5**, e1000380.
- Vannier, J.-B., Depeiges, A., White, C. and Gallego, M.E.** (2006) Two roles for Rad50 in telomere maintenance. *EMBO J.*, **25**, 4577–85.
- Vaquero-Sedas, M.I., Gámez-Arjona, F.M. and Vega-Palás, M.A.** (2011) *Arabidopsis thaliana* telomeres exhibit euchromatic features. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2007–2017.
- Vaquero-Sedas, M.I., Luo, C. and Vega-Palás, M.A.** (2012) Analysis of the epigenetic status of telomeres by using ChIP-seq data. *Nucleic Acids Res.*, **40**, e163.
- Vaquero-Sedas, M.I. and Vega-Palás, M. a.** (2011) On the chromatin structure of eukaryotic telomeres. *Epigenetics*, **6**, 1055–1058.
- Verdun, R.E. and Karlseder, J.** (2006) The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell*, **127**, 709–20.

- Vespa, L., Couvillion, M., Spangler, E. and Shippen, D.E.** (2005) ATM and ATR make distinct contributions to chromosome end protection and the maintenance of telomeric DNA in *Arabidopsis*. *Genes (Basel)*, 2111–2115.
- Vespa, L., Warrington, R.T., Mokroš, P., Široký, J. and Shippen, D.E.** (2007) ATM regulates the length of individual telomere tracts in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 18145–50.
- Vrbský, J., Akimcheva, S., Watson, J.M., Turner, T.L., Daxinger, L., Vyškot, B., Aufsatz, W. and Říha, K.** (2010) siRNA-mediated methylation of *Arabidopsis* telomeres. *PLoS Genet.*, **6**, e1000986.
- Watson, M.J. and Říha, K.** (2010) Comparative biology of telomeres : Where plants stand. *FEBS Lett.*, **584**, 3752–3759.
- White, M.K., Johnson, E.M. and Khalili, K.** (2010) Multiple roles for Puralpha in cellular and viral regulation. *Cell Cycle*, **8**, 1–7.
- Yang, S.W., Jin, E., Chung, I.K. and Kim, W.T.** (2001) Cell cycle-dependent regulation of telomerase activity by auxin , abscisic acid and protein phosphorylation in tobacco BY-2 suspension culture cells. *Plant J.*, **29**, 617–626.
- Yang, S.W., Kim, S.K. and Kim, W.T.** (2004) Perturbation of NgTRF1 Expression Induces Apoptosis-Like Cell Death in Tobacco BY-2 Cells and Implicates NgTRF1 in the Control of Telomere Length and Stability. *Plant Cell*, **16**, 3370–3385.
- Zahler, A.M., Williamson, J.R., Cech, T.R. and Prescott, D.M.** (1991) Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*, **350**, 718–720.
- Zachová, D., Fojtová, M., Dvořáčková, M., Mozgová, I., Lermontova, I., Peška, V., Schubert, I., Fajkus, J. and Sýkorová, E.** (2013) Structure-function relationships during transgenic telomerase expression in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.*, **149**, 114–126.
- Zellinger, B., Akimcheva, S., Puizina, J., Schirato, M. and Říha, K.** (2007) Ku suppresses formation of telomeric circles and alternative telomere lengthening in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, **27**, 163–9.
- Zeng, L. and Zhou, M.-M.** (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.*, **513**, 124–8.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., et al.** (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, **126**, 1189–201.