

Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1

Bas van Steensel & Titia de Lange

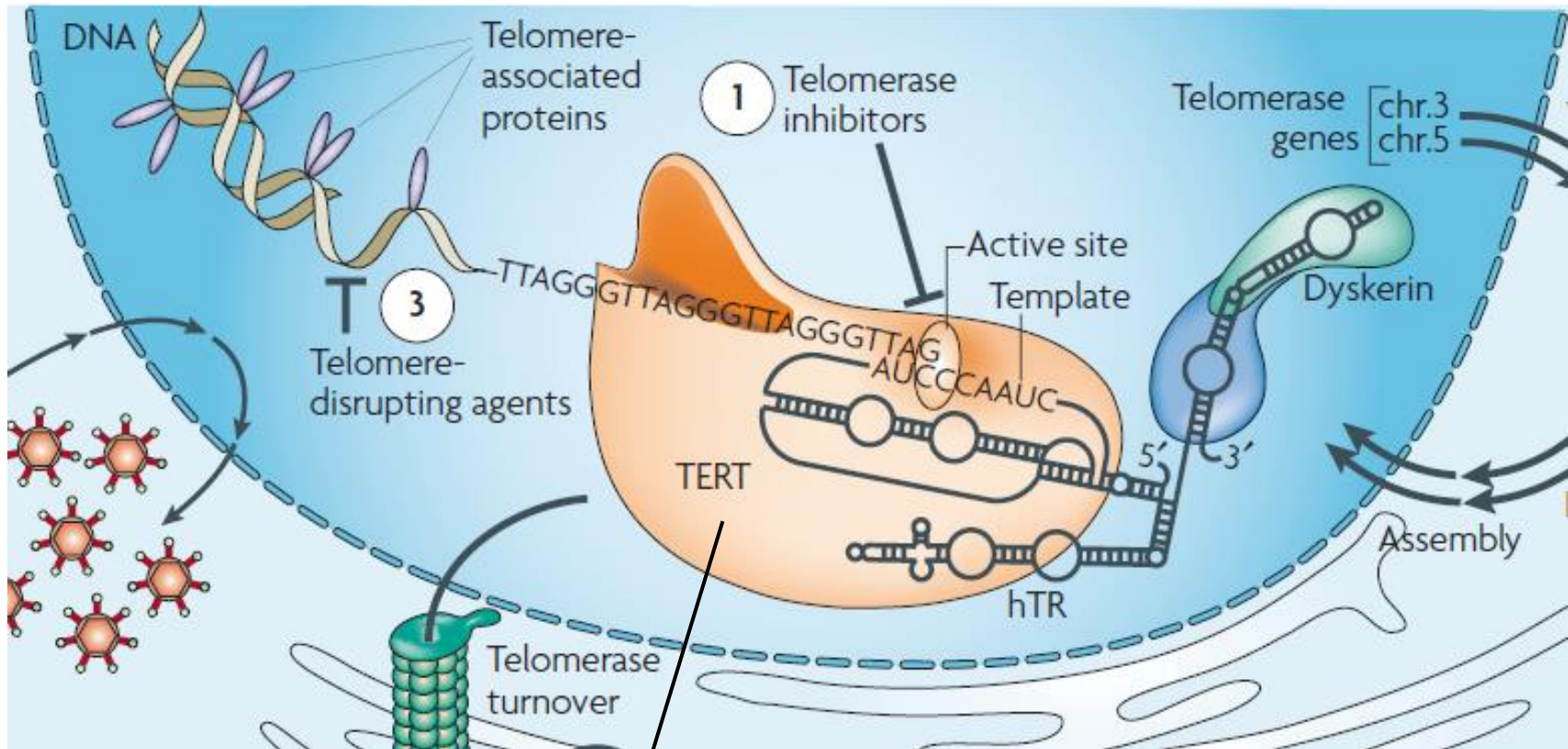
The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, New York 10021, USA



Impact factor 2016: 38.14

TELOMERASA

- ✓ Los cromosomas eucariotas poseen en sus extremos estructuras llamadas telómeros.
- ✓ En mamíferos, los telómeros están formados por repeticiones en tandem de la secuencia TTAGGG.
- ✓ La longitud del ADN telomérico es reducida luego de cada ciclo de replicación (*end replication problem*)
- ✓ La telomerasa es una transcriptasa reversa que posee un templado de RNA incorporado a la enzima.
- ✓ Sintetiza ADN telomérico, confiriendo estabilidad a los cromosomas.



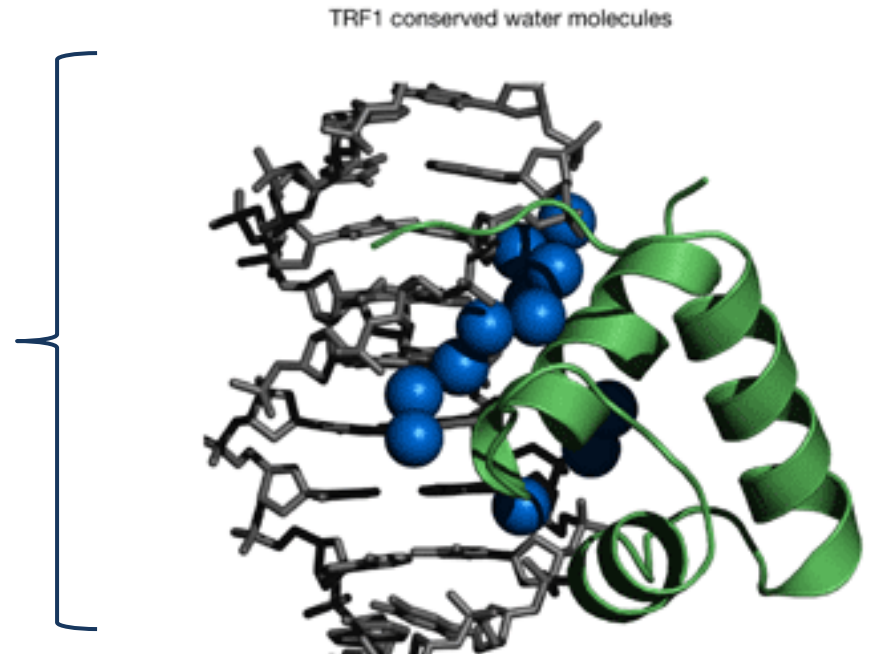
Harley CB, 2008, Nature Rev Cancer 8: 161

TERT: telomerase reverse transcriptase.

OBJETIVOS

- ✓ Estudiar el rol de la proteína TRF1 en la regulación de la longitud de los telómeros.
- ✓ Para ello, se estudió el efecto causado por la sobreexpresión de TRF1 wild-type y del dominante negativo TRF1⁶⁶⁻³⁸⁵
- ✓ El dominante negativo TRF1⁶⁶⁻³⁸⁵ posee sólo los aminoácidos 66 a 385 y carece del resto. La región faltante incluye el dominio Myb de unión a DNA de esta proteína.

TRF1: telomeric repeat
binding factor 1
(proteína de unión a regiones
teloméricas del ADN)



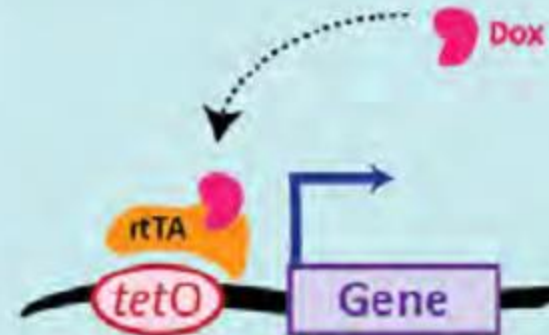
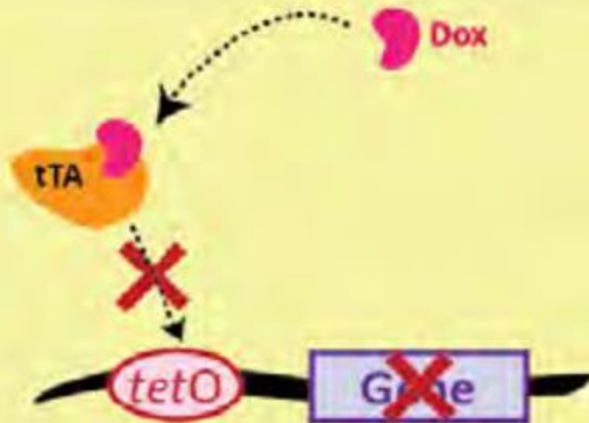
Regulación de la expresión génica mediante el sistema Tet

Permite el control de la expresión genética mediante el uso de un factor de transcripción recombinante regulado por tetraciclina (o por su derivado Doxycycline)

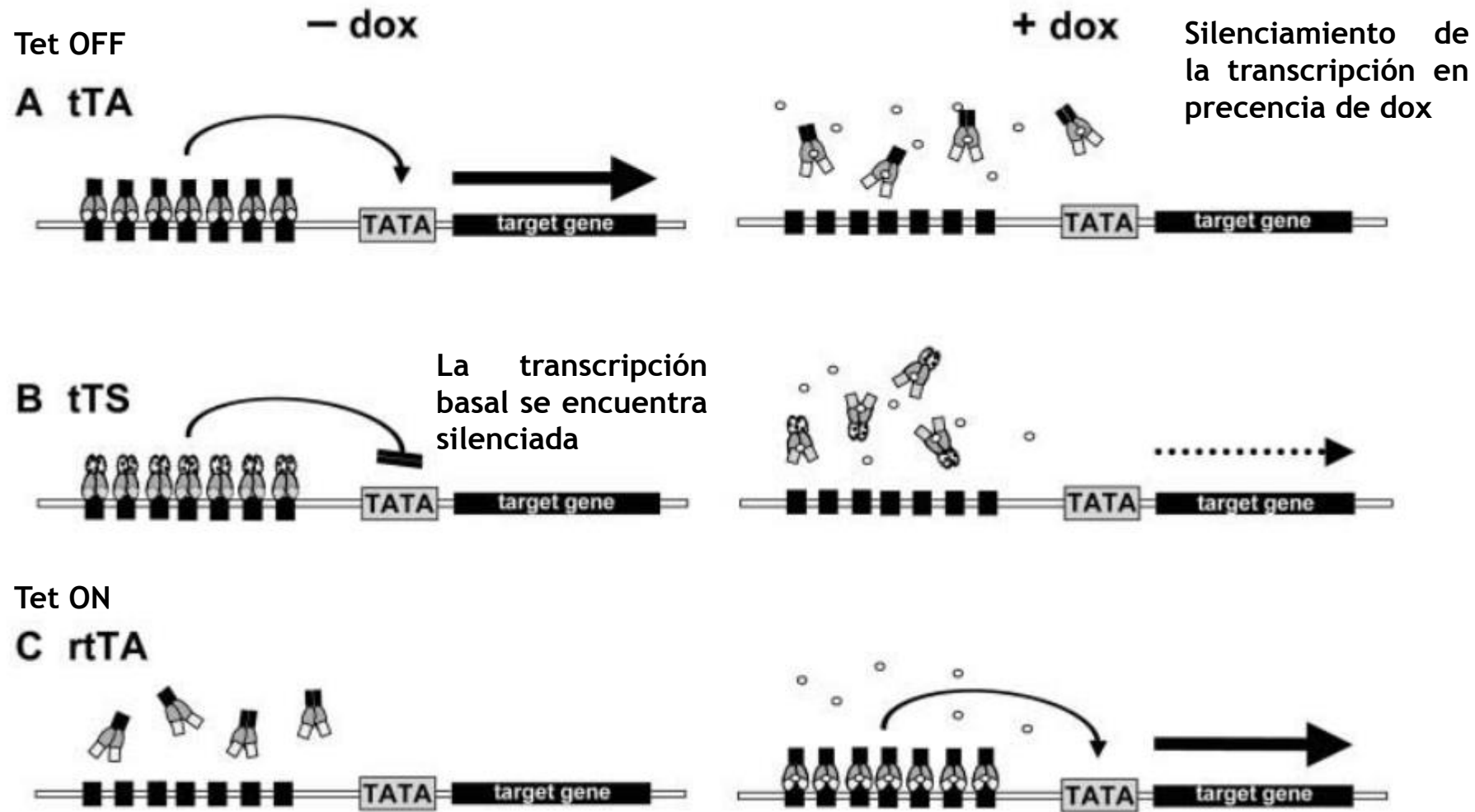
Tet-off Dox turns off gene function



Tet-on Dox turns on gene function



Regulación de la expresión génica mediante el sistema Tet



tTA, tetracycline-dependent trans-activator

tTS, tetracycline-dependent trans-silencer

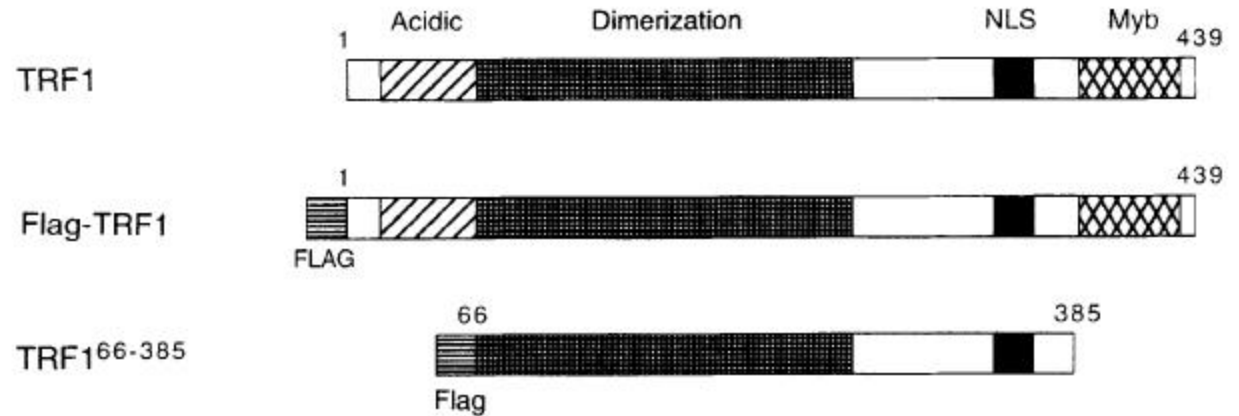
rtTA, reverse tetracycline-dependent trans-activator

FIGURA 1: Expresión de las proteínas TRF1 usadas en el presente estudio

Tetracycline controlled gene expression system in the human fibrosarcoma cell line HT1080 (telomerase-positive tumor cell line)

Estructura de las proteínas usadas

a



Análisis de la expresión mediante western blot

Whole-cell extracts from induced and uninduced cells were analysed

b

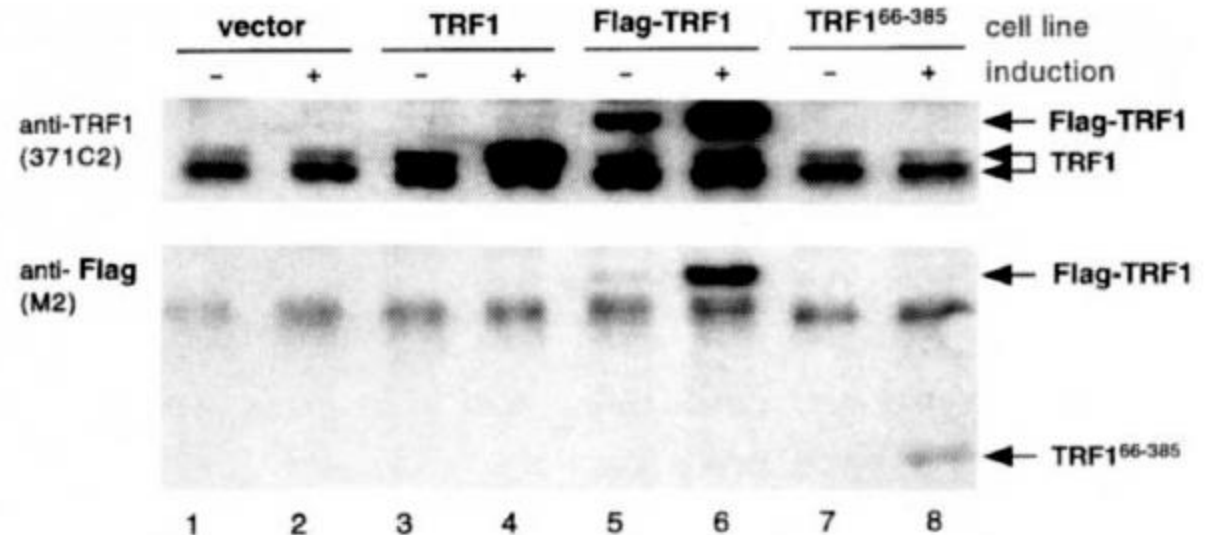


FIGURA 2: Caracterización de la actividad de TRF1⁶⁶⁻³⁸⁵

TRF1⁶⁶⁻³⁸⁵ compite e inhibe la unión a DNA de TRF1 wild-type

Immunofluorescent labelling + FISH

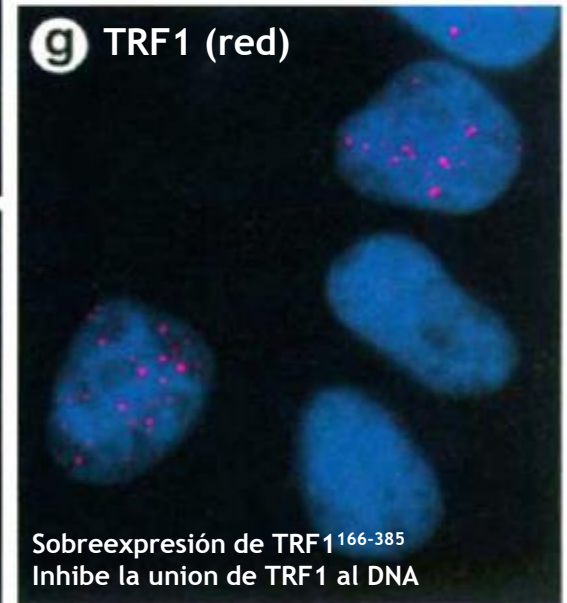
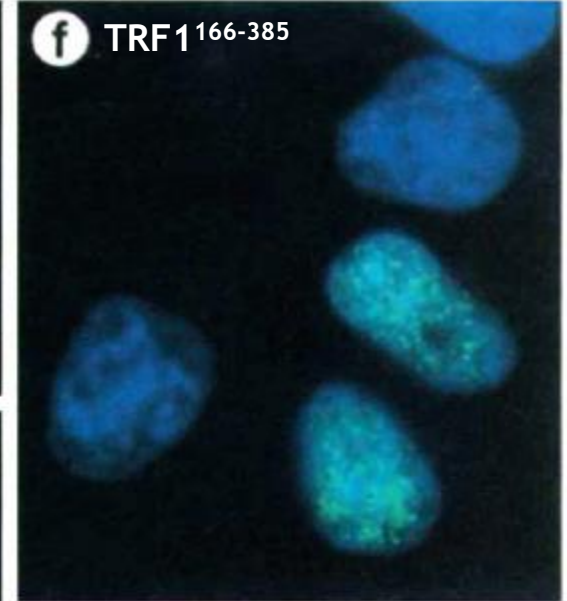
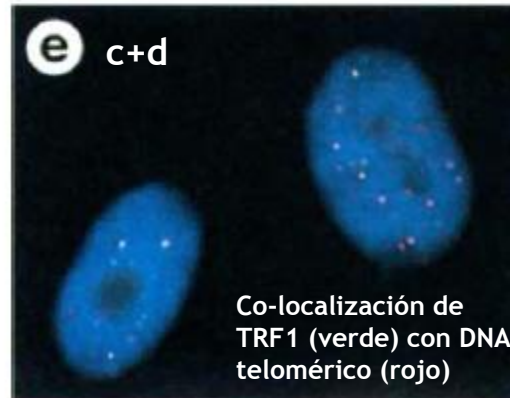
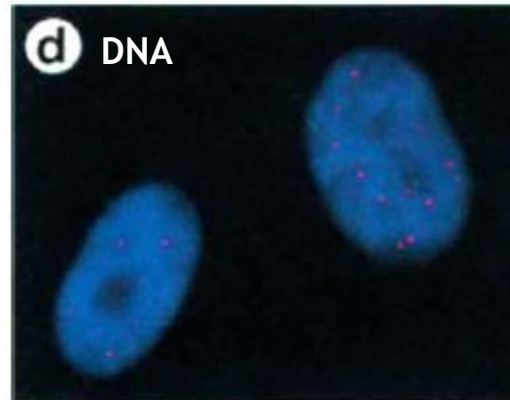
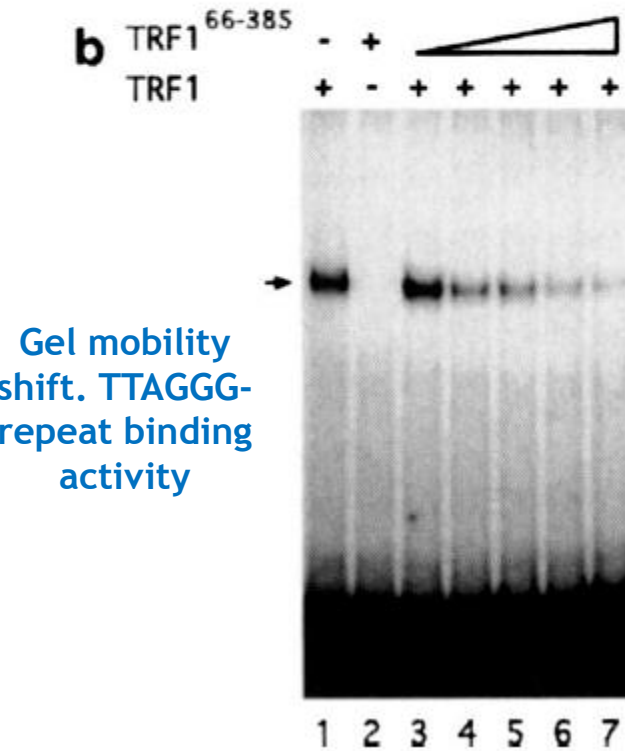
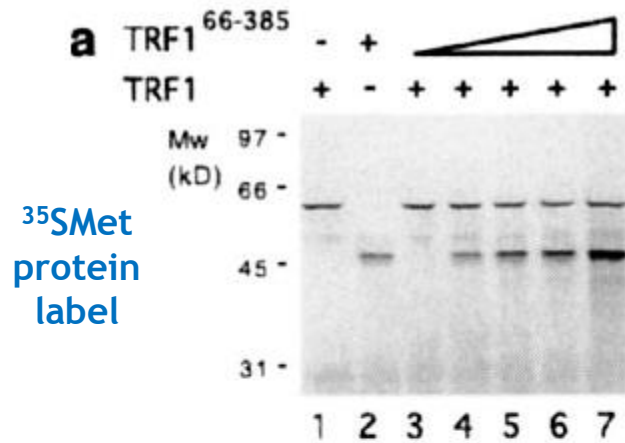
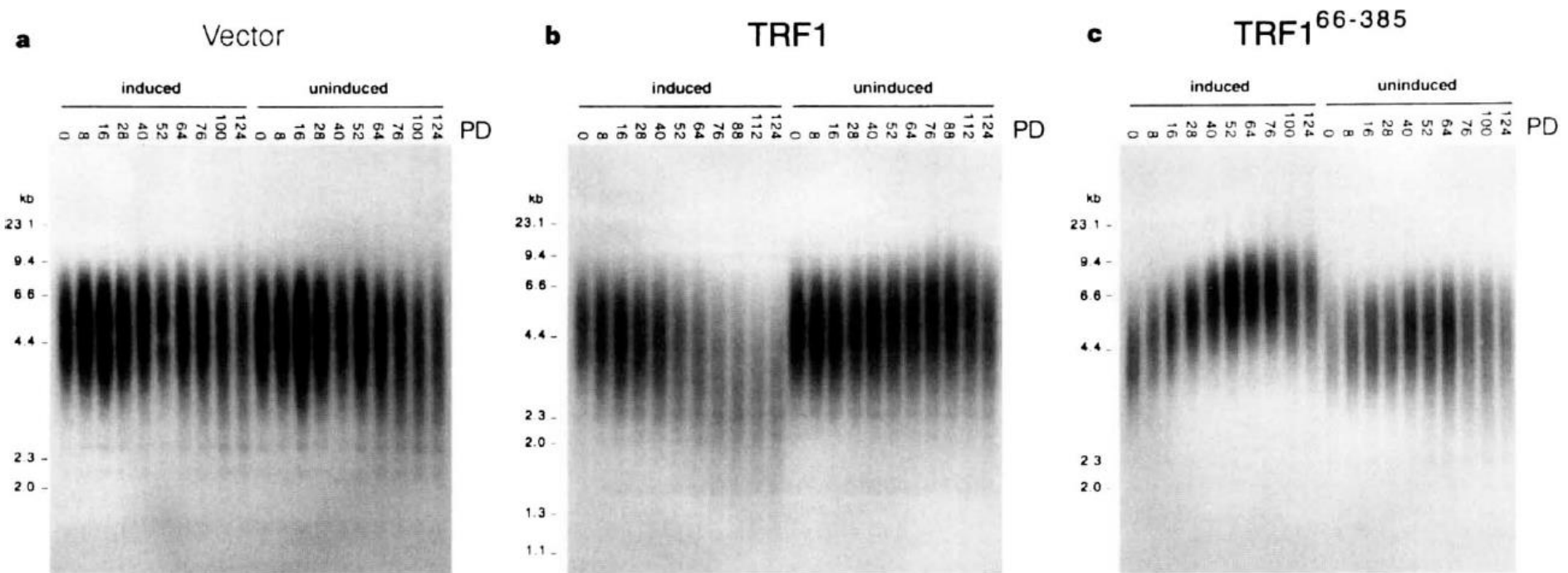


FIGURA 3: Cambios en la longitud de los telómeros en respuesta a TRF1



Control: no effect



Acortamiento de los fragmentos y reducción de la señal de hibridación



Gradual and progressive telomeric decline



Gradual increase in telomere length

Southern blot
(sonda: repeticiones TTAGGG)

Induced: absence of doxycyclin

Uninduced: presence of doxycyclin

TABLA 1: Cambios en la longitud de los telómeros en respuesta a TRF1

PD: population doubling



HTC75 clone	TRF1 construct	Δ Telomere length at PD88		
		+Dox	– Dox	
B6	Vector	– 0.1 kb	0.0 kb	} No effect
D4	Full-length TRF1	+0.2 kb	– 1.0 kb	
D16	Full-length TRF1	– 0.1 kb	– 0.6 kb	} Decrease in telomere length (in 4 of 5 cell lines)
D20	Full-length TRF1	+0.2 kb	+0.7 kb	
C14	Flag-TRF1	– 0.3 kb	– 0.3 kb	
C20	Flag-TRF1	+0.2 kb	– 0.6 kb	} Increase in telomere length
K4	TRF1 ⁶⁶⁻³⁸⁵	– 0.8 kb	+0.5 kb	
K10	TRF1 ⁶⁶⁻³⁸⁵	+0.1 kb	+2.4 kb	
K15	TRF1 ⁶⁶⁻³⁸⁵	+0.1 kb	+2.8 kb	
K16	TRF1 ⁶⁶⁻³⁸⁵	+0.7 kb	+2.9 kb	
K17	TRF1 ⁶⁶⁻³⁸⁵	+0.1 kb	+1.0 kb	

PD, population doubling; Dox, doxycyclin.

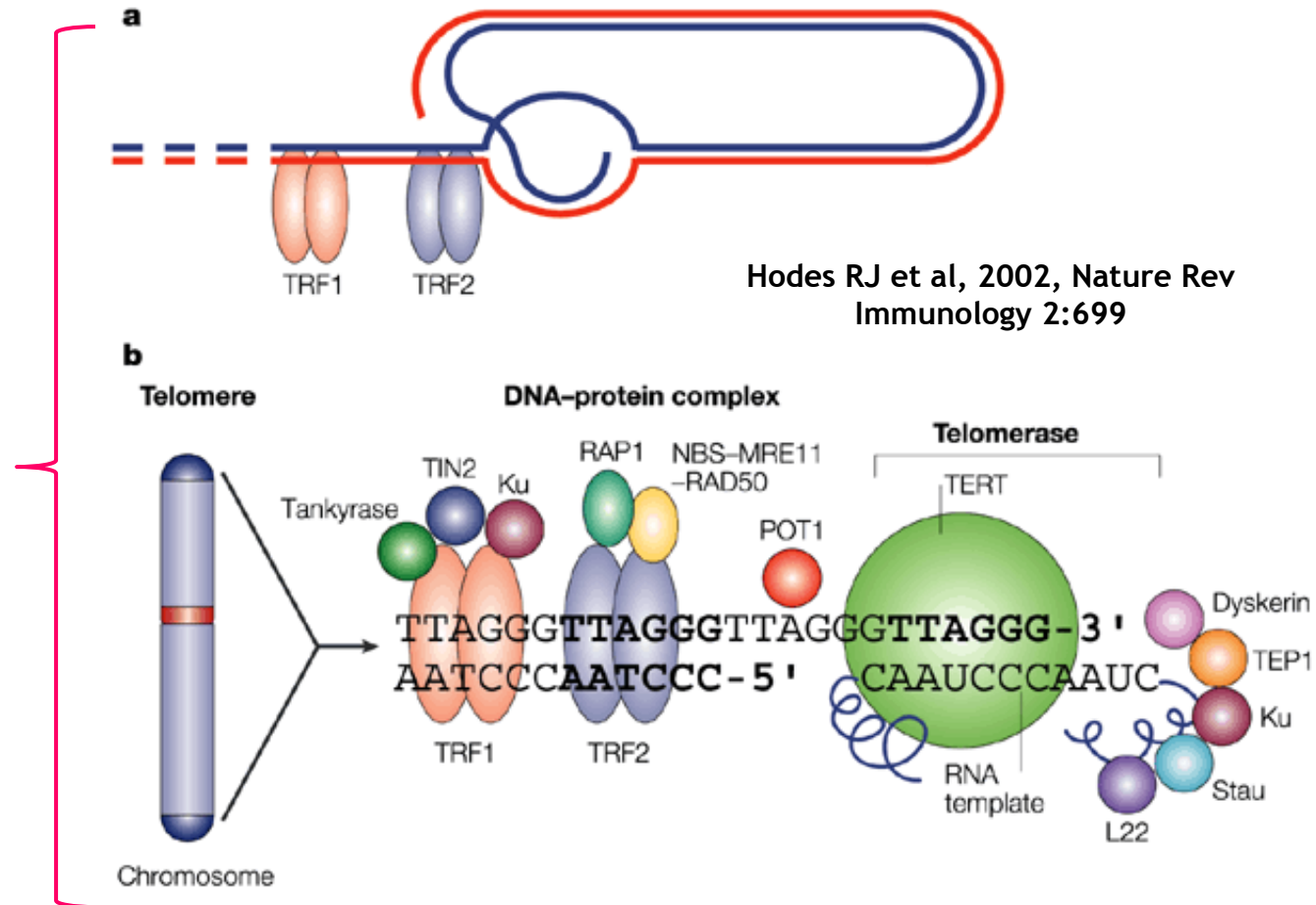
Similar telomerase activity was detected in each of the cell lines shown in Table 1. These results eliminated the possibility that TRF1 modulates telomere dynamics through a major effect on either the expression of telomerase or its activity.

PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP): permite detección de telomerasa (D Broccoli et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A. 92(20): 9082-9086).

CONCLUSION

TRF1 regula la longitud de los telómeros, sin afectar directamente la actividad de la telomerasa

Actualmente se sabe que existen al menos 6 proteínas que se unen al ADN telomérico (proceso conocido como shelterin). Las proteínas son: TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 y RAP1



Telomeric roles

- Protection and recombination (TRF2, TRF1, TIN2, TPP1 and RAP1)^{8,12,36}
- G-strand protection (POT1)^{31,35,75}
- Length regulation (TRF2, TRF1, TIN2, TPP1 and RAP1)^{8,12,36}
- Inhibition DDR (TRF2, TRF1, POT1 and RAP1)^{8,36,44,84}
- Telomere replication (TRF1)^{37,85}
- Telomerase recruitment (TPP1)^{43,39}
- Telomere lengthening (TERT-TERC)¹⁰

Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast

**Julia Promisel Cooper^{*†}, Elaine R. Nimmo[‡],
Robin C. Allshire[‡] & Thomas R. Cech^{*}**

^{} Howard Hughes Medical Institute, Department of Chemistry and Biochemistry,
University of Colorado, Boulder, Colorado 80309, USA*

*[‡] MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Crewe Road,
Edinburgh EH4 2XU, UK*

*[†] Present address: Imperial Cancer Research Fund, Lincoln's Inn Fields,
London WC2A 3PX, UK.*



Schizosaccharomyces pombe

OBJETIVOS

- ✓ Estudiar la estructura de los telómeros de la levadura *S. pombe*.
- ✓ Identificar una proteína que regula la longitud de los telómeros en *S. pombe*.
- ✓ Determinar el efecto causado por la disrupción de esta proteína.



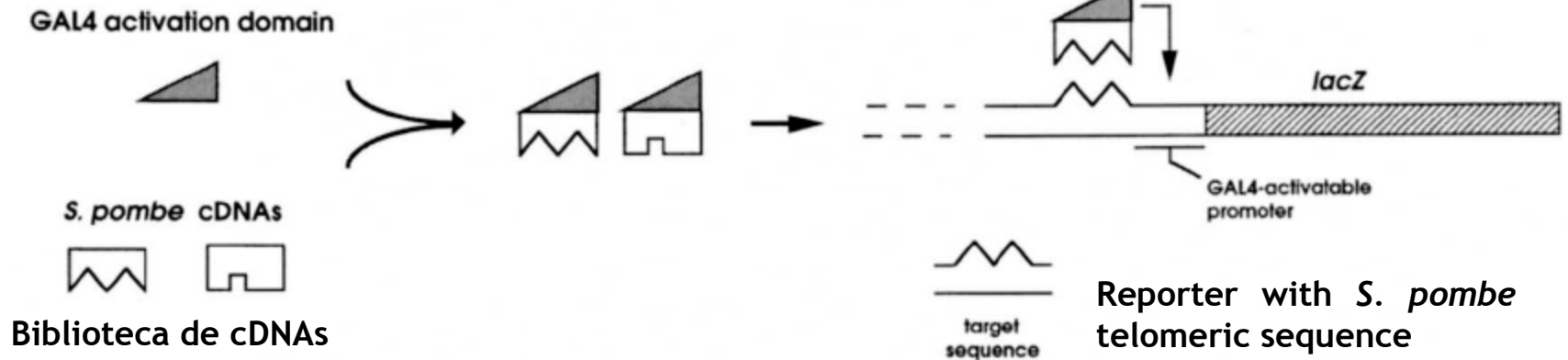
Schizosaccharomyces pombe
(fission yeast)

FIGURE 1: Técnica utilizada para identificar proteínas de unión a los telómeros

One-hybrid screen (para identificar proteínas que se unen específicamente a la secuencia telomérica)

Expression library of *S. pombe* cDNAs fused to DNA encoding GAL4

a Dominio de activación de la proteína GAL 4



b

Sequence
gatc <u>GGGTTACAAGGTTACGTGGTTACACGGTTACA</u> gatc
gatc GCTATGAATGCAGTAGTCGCGTAGTGTATCGA gatc
gatc <u>GGGTTACAAGGTTACG</u> gatc
gatc <u>TGGTTACACGGTTACA</u> gatc
gatc <u>GGTTACAGGTTACAGG</u> gatc
gatc <u>GGGTTACAGGGGTTAC</u> gatc

Colony colour

blue

white

blue

white

blue

blue

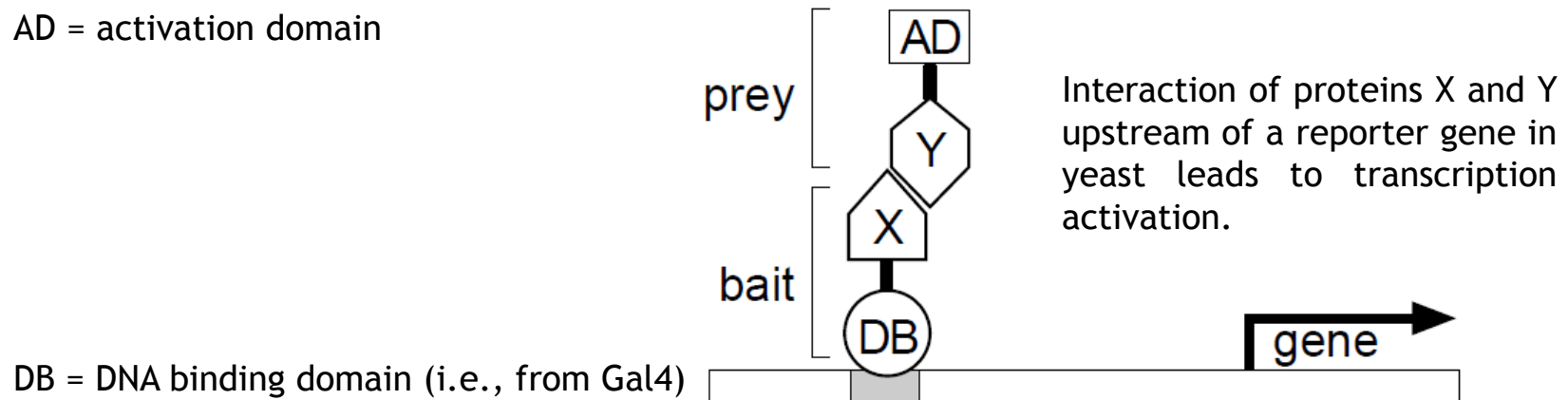
Of over a million colonies screened, 4 blue colonies were identified. All of them contained the gene Taz1+

Métodos de identificación

Yeast one-hybrid system → DNA-protein interactions

Yeast two-hybrid system → Protein-protein interactions

AD = activation domain



Yeast three-hybrid system → RNA-protein interactions

Explicado en: Brent R, Finley RL Jr. (1997). Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. Annu Rev Genet. 31:663-704.

FIGURE 2: Secuencia de DNA de Taz1p y homología con el dominio Myb

a

```

1  misvQSTETI QKVLENEGDQ QFDKEVVQNS DSNIETGQIS DSLTKAVEER
51  AETESSNLS NFFTSESESS KPAYCFNSHS QNMAEGSISI PVISHSMNVE
101 NEVSTAEGQD SRTGESENDQ NAMIVRSIWD IEKASLLVND CQNIANMAEQ
151 KVMMVSAIFS ESSKDIVNPE SFSERLGKET VKDLYEFNEQ LTTYGGLEFR
201 TIFFSYIRKY DAYWCLFEDL EKPLKSIQFF TGLIDLLDNT NKHLTLRSIV
251 LDALLSADEE D↓SFYGDALVL FEELVIRYFG TDSNPSIDAS EFILSCLPYT
301 SLDALNVVCG QVWKSQKICD FLKSTIGNTS NSPLQLRAS FAFVNAVIHF
351 LLEFKNVRRL ERKDLSVKGM LYSDSQQIL NRLRERVSGS TAQSADEASG
401 HESDASEDTF SERTLGLNSI DNTEISEVVS LGLVSSALDK ITGLLSADNL
451 SETVSQARDF SHTLSKSLKS RAKSLSQKEA ANRSKLIKR GDNLRREASL
501 SSEQDDLSED FPPVRESDEQ ESRSGGRSSA MRVSIERSAA RSGTRRSQGN
551 PYEGYRTRRK WTDEEENELY EMISQHGCCW SKIIHIQKLE NGPLKTFGPT
601 QIKDKARLIK ARFMKQNLQ ELYSKSLNWK NVTVGQAYCE LHKIPYIAT
651 PPLLREELVN YQS
    
```

Dedución de la
secuencia de
aminoácidos a partir
de la secuencia de
cDNA

Región de homología
al dominio Myb

Alineamiento de los
dominios Myb entre
las proteínas Taz1p,
Tbflp y hTRF

b

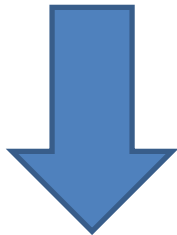
	Helix 1 Helix 2 Helix 3
Taz1p	RTRRKWTDEEENELYEMISQHG-CCWSKIIHIQKLENG---PLKTFGPTQIKDKARLIKAR
Tbflp	KAKRTWSKEEEALVEGLKEVG-PSWSKILDLYGPGGKITENLKNRTQVQLKDKARNWKLQ
hTRF	RKRQAWLWEEEDKNLRSGVRKYGEGNWSKILLHY-----KFNNRTSVMLKDRWRTMKKL

FIGURE 3: Elongación de telómeros en *taz1*-

***Taz1*⁻:** disruption of *taz1*⁺ in which 2/3 of the gene was deleted and replaced with the marker *ura4*

The ribosomal DNA (rDNA): consists of 100 to 200 copies of a 9.1-kb unit organized into a perinuclear tandem array, an arrangement reminiscent of the heterochromatin of higher eukaryotes.

La longitud de los telómeros
aumenta dramáticamente cuando
hay disrupción de *taz1*⁺



Por lo tanto, Taz1p podría actuar como un
regulador negativo de la longitud de los
telómeros

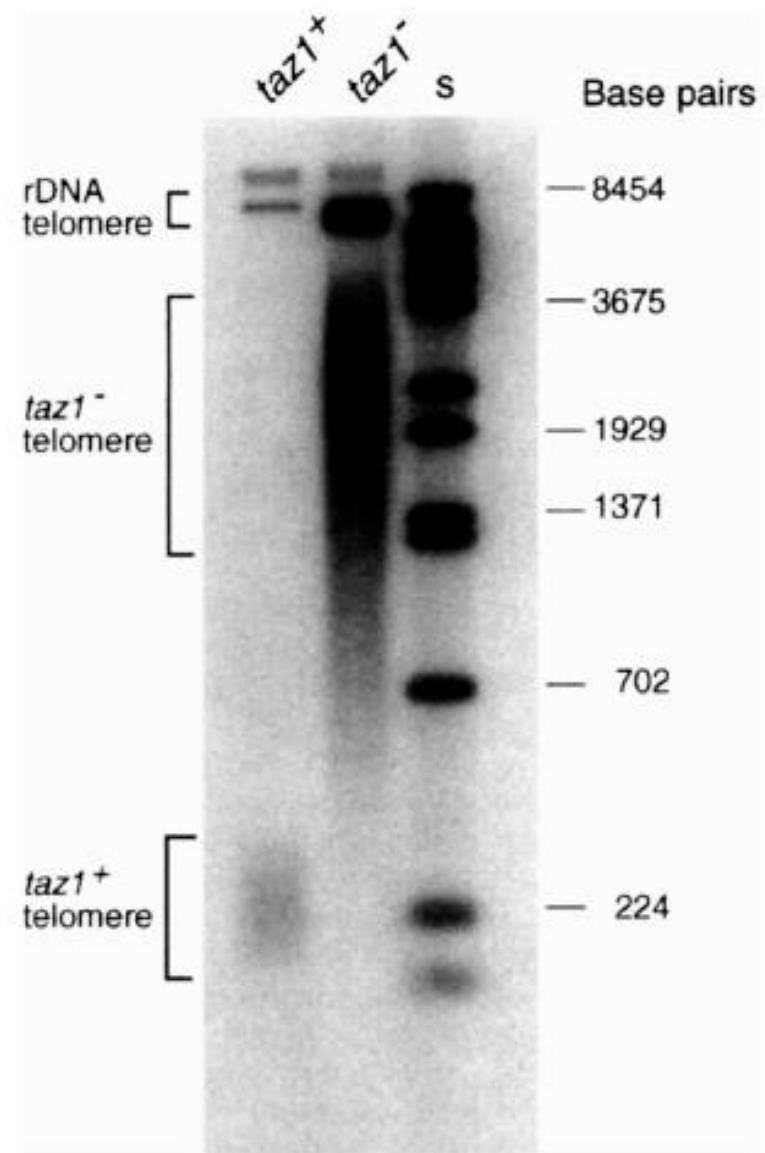
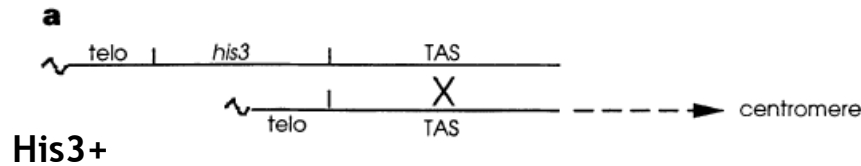
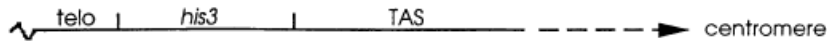


FIGURE 4: Clonado del gen *his3* en cercanías de los telómeros

In *S. cerevisiae* and *S. pombe*, genes that are transcriptionally active when located internally become subject to reversible transcriptional repression when placed adjacent to a telomere.



His3-telo



His3-telo reporter strain: endogenous *his3* genes was deleted and cloned adjacent to a chromosomal telomere.

Dramatic reduction in the number of colonies that grow without histidine

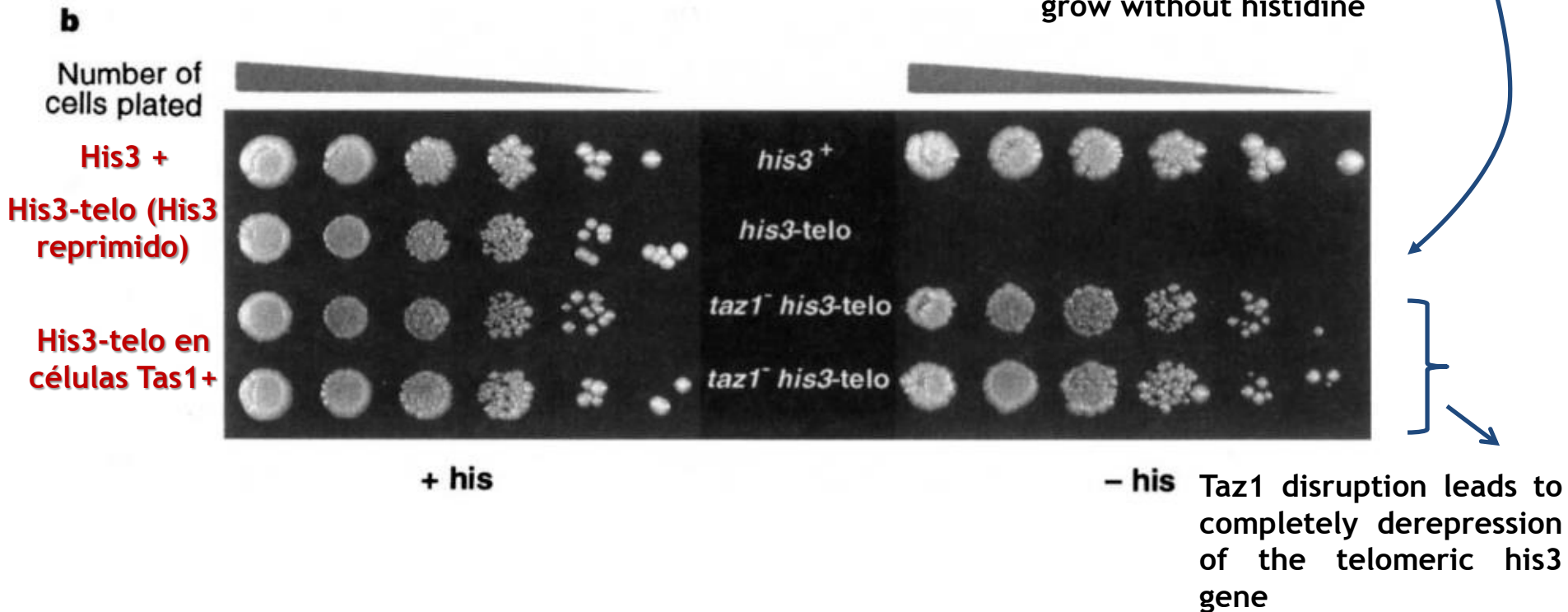
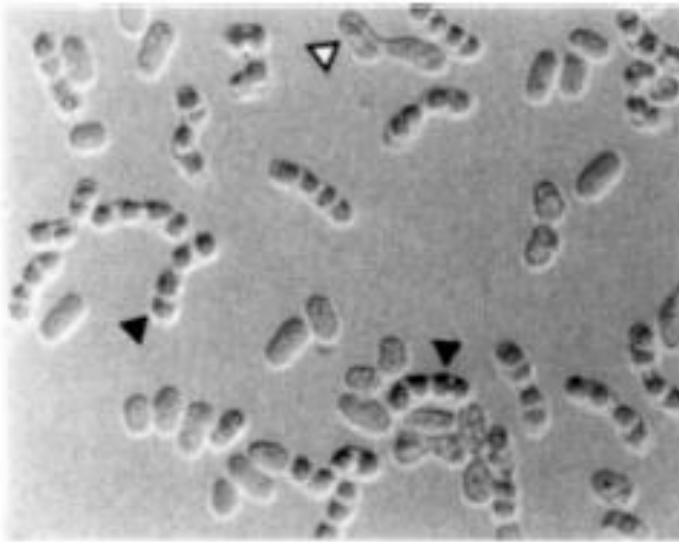
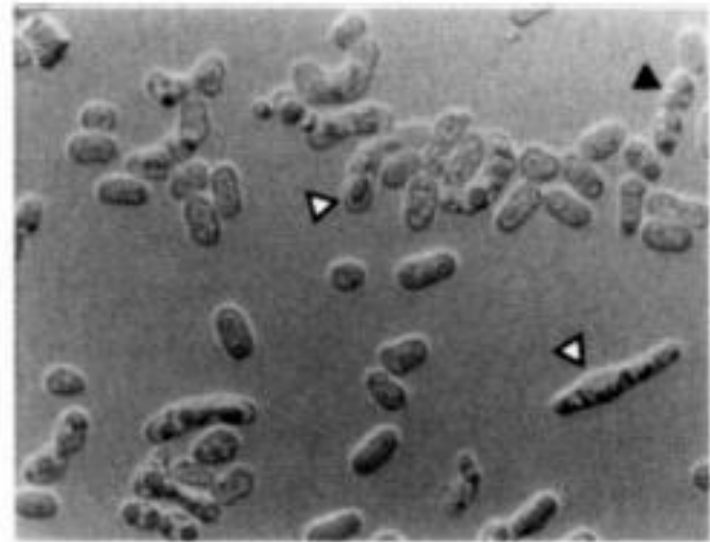


FIGURE 5: Defectos en esporulación y meiosis en células con *taz1*-



taz1⁺

Normal



taz1⁻

Aberrante



Taz1p is required for either efficient meiosis or sporulation

