

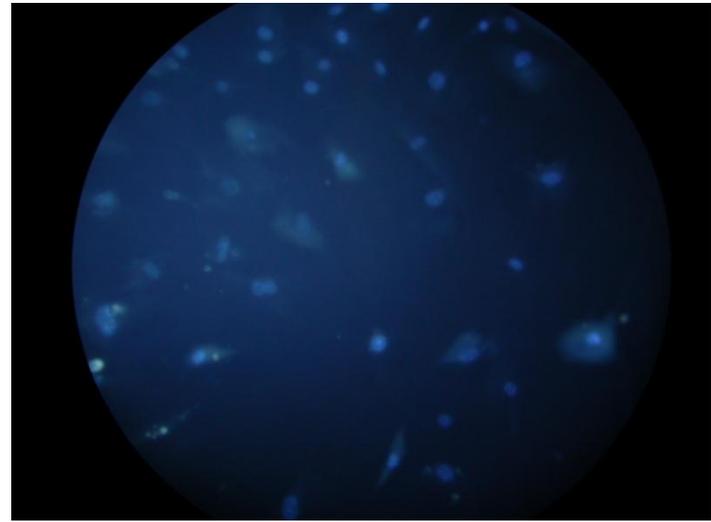
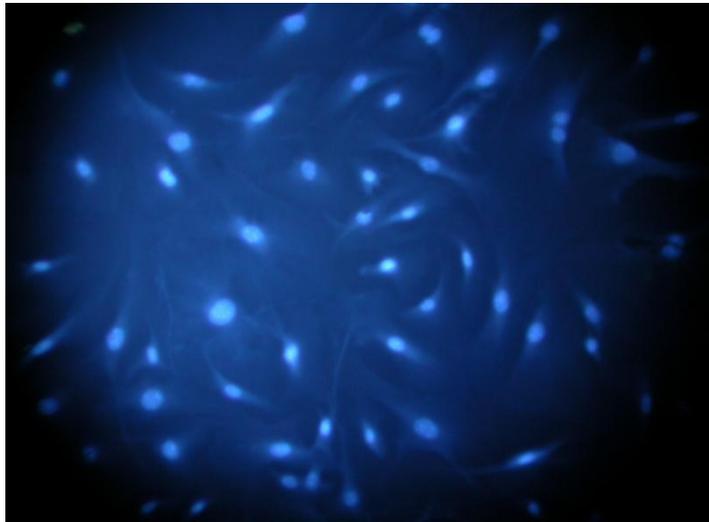
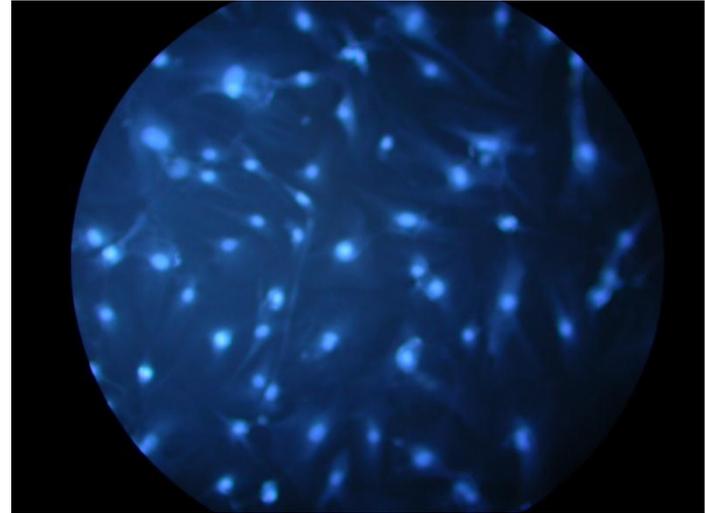
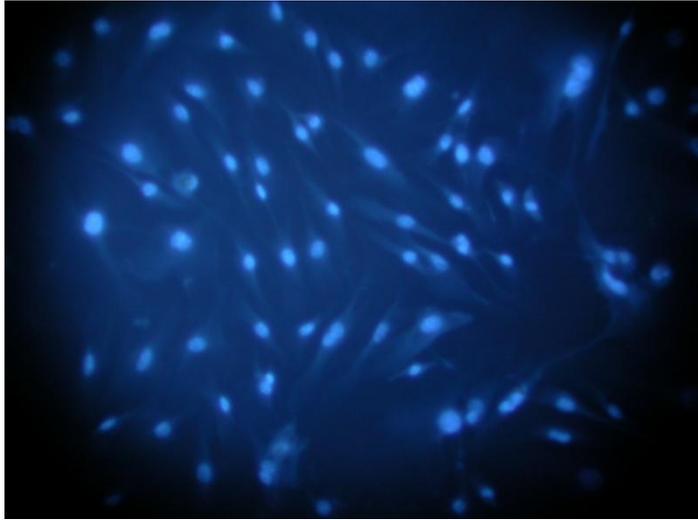
Терминация репликации.

Теломеры.

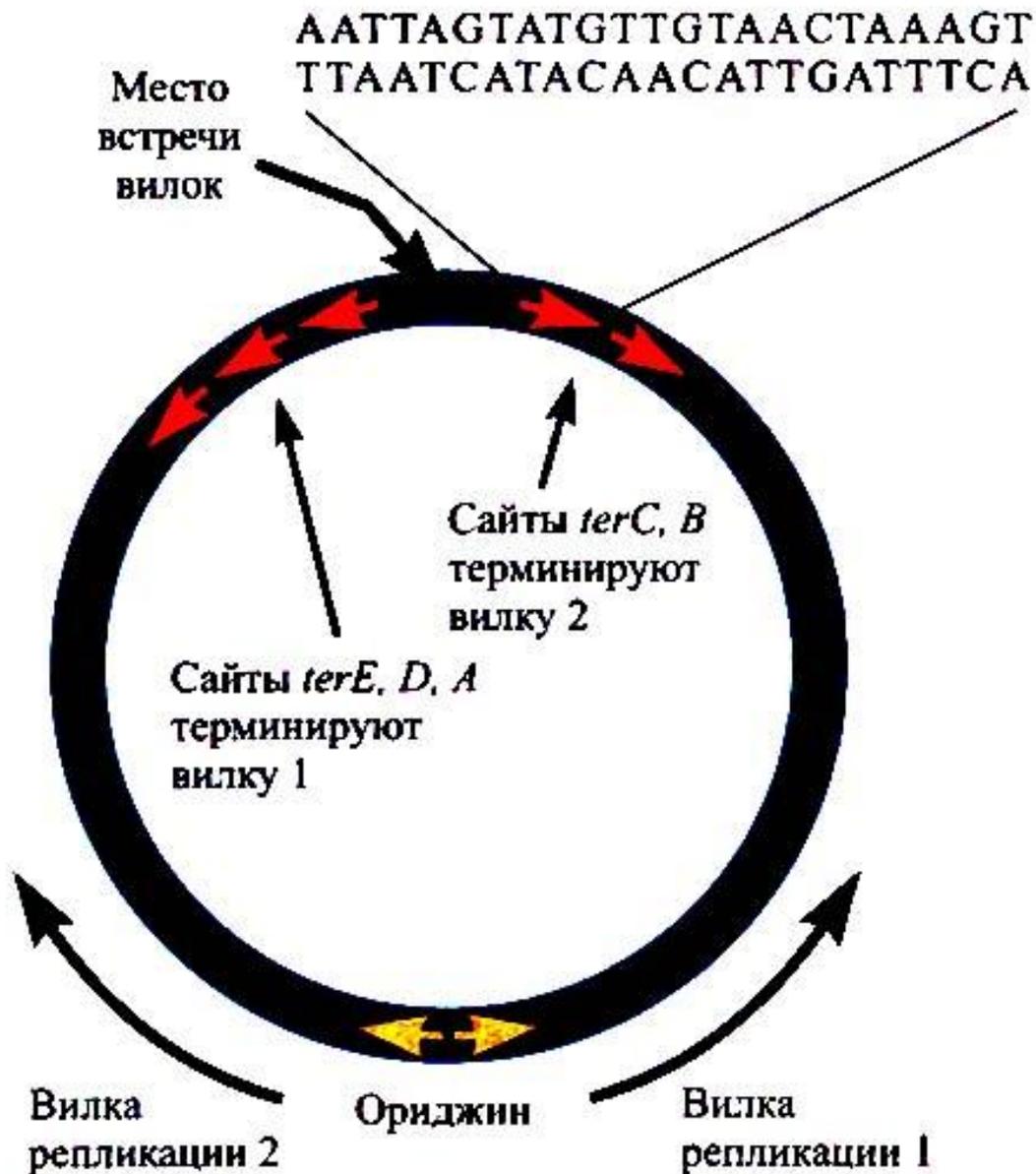
**Их репликация и роль в
функционировании
эукариотической клетки**

- Primary non-transformed cell cultures tend to change with every passage. Population doubling time increases, cell morphology alters, larger rotund cells appear, which are regarded as older, in comparison with smaller oblong ones (Mikhelson, 1984; Lorenzini et al., 2005). Biochemical markers appear simultaneously with morphological alterations. They characterize aging cells in culture, defined as “aging markers”, which include changes in chromatin, nucleus and cytoplasmatic skeleton, high level of non-repaired DNA damages, etc. (Campisi, 2005); as well as in cell instability towards action of damaging agents, primarily hydrogen peroxide (Chen et al., 1998, Ryter et al., 2007).

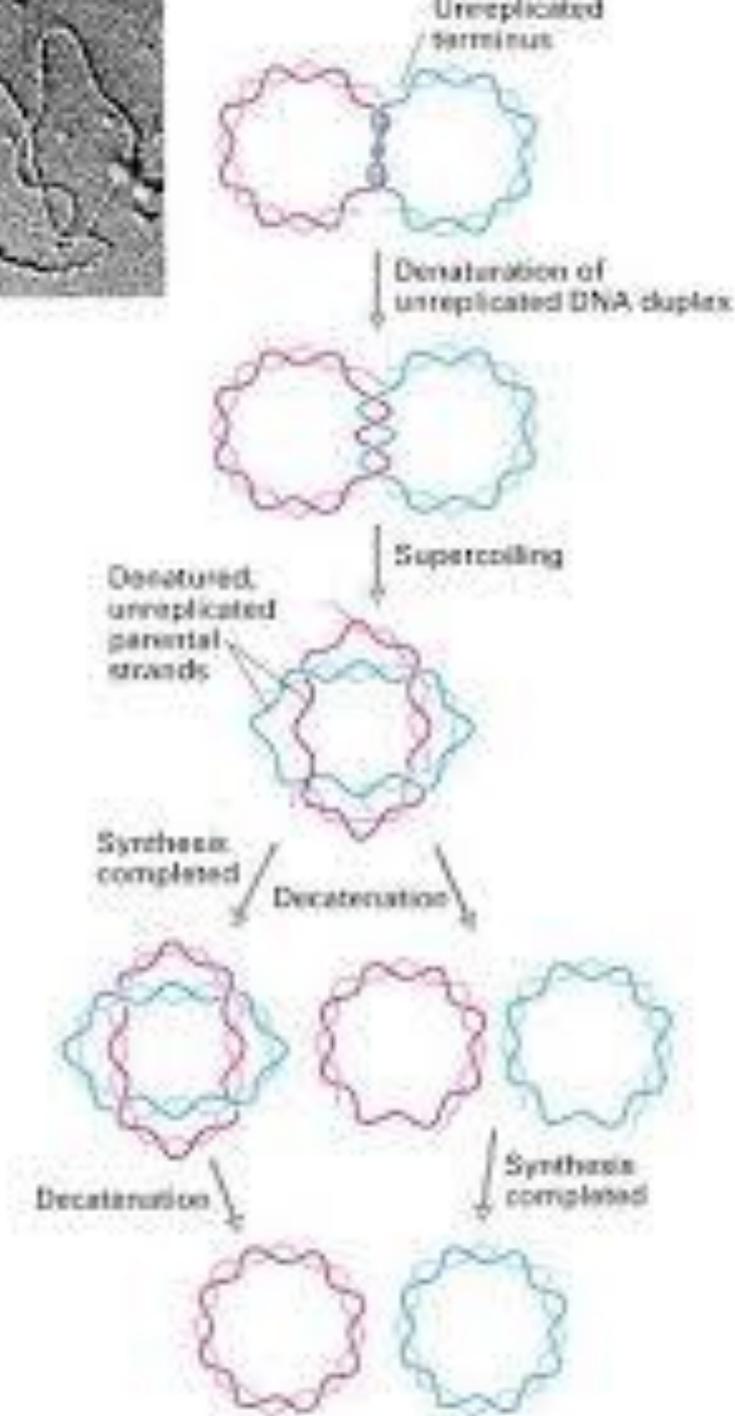
Cells in Culture (5, 10, 15 and 40 p)



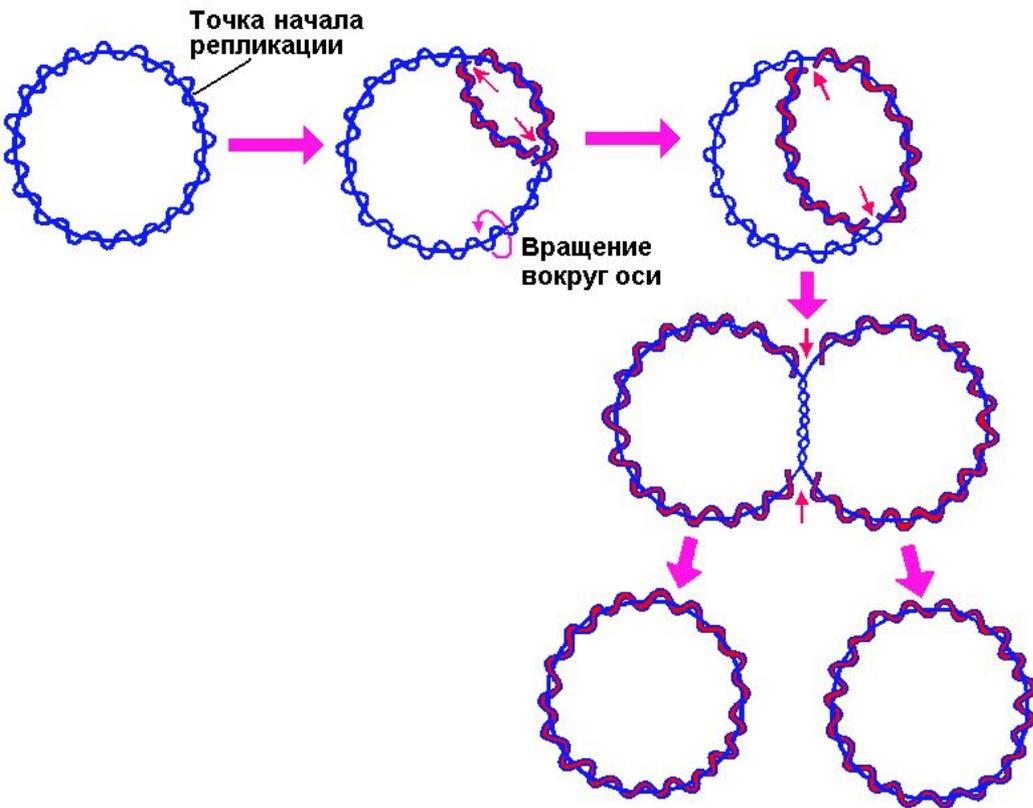
Терминация репликации у *E.coli*



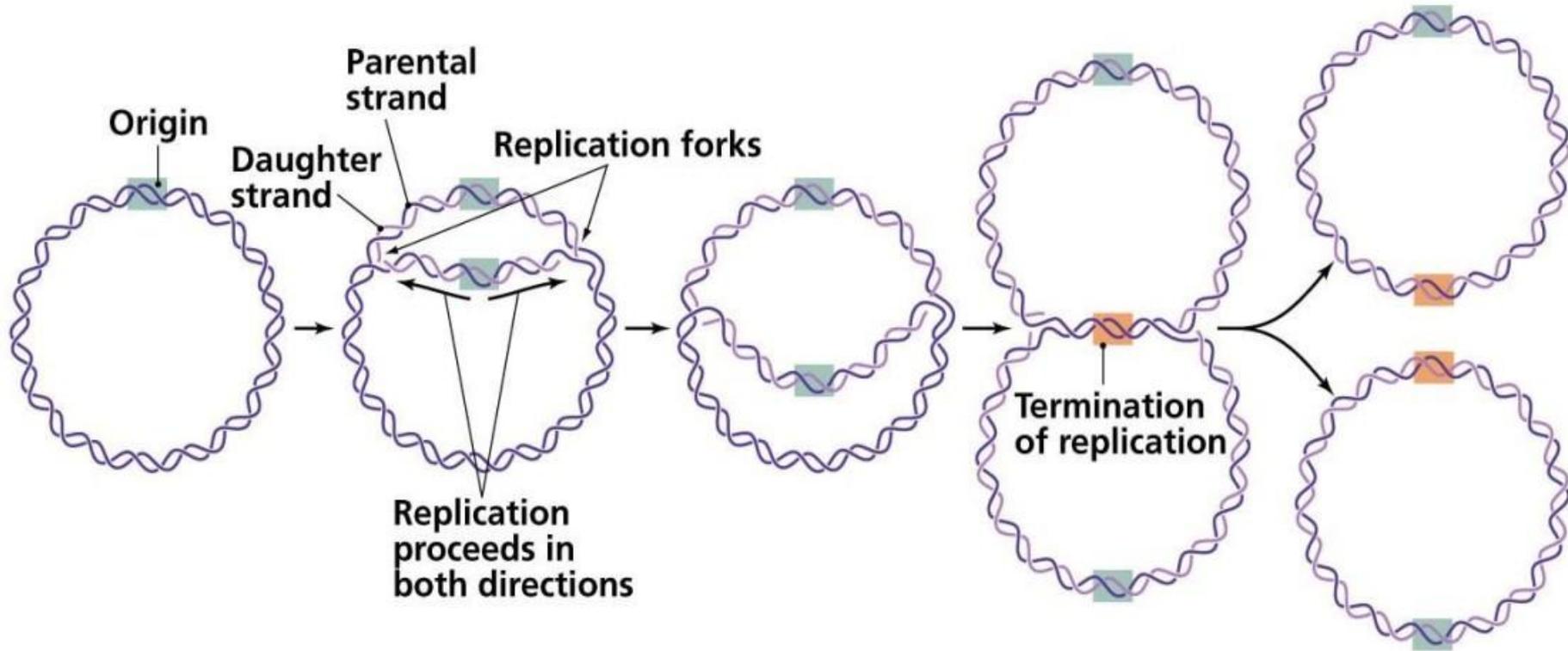
- Последовательности, которые обеспечивают терминацию, у *E.coli* называются *ter*-сайтами. Они содержат короткую (около 23 пн) последовательность. В участке терминации находится несколько *ter*-сайтов. Они располагаются примерно на 100 тпн дальше точки, в которой встречаются вилки репликации. Для терминации необходим продукт гена *tus*, который опознает эту последовательность, связывается с ней и предотвращает дальнейшее продвижение вилки репликации.



- Движение репликативных вилок навстречу друг другу сопровождается гомологичной рекомбинацией между дочерними хроматидами. В том случае, если количество произошедших рекомбинаций нечетное, образуется димер бактериальной хромосомы, тогда как при четном числе рекомбинаций - две катенированные (зацепленные друг за друга) хромосомы. Во втором случае разделение катенанов с помощью топоизомеразы IV (*parC* и *parD*) при участии топоизомеразы II (*gyrase*, *gyrA* и *gyrB*) приводит к полному разделению дочерних хромосом, тогда как в случае димера бактериальной хромосомы этого недостаточно. Разделение димера с образованием мономеров происходит в результате сайт-специфической рекомбинации в локусе *dif* под действием резольвазы (сайт-специфической рекомбиназы) XerCD.

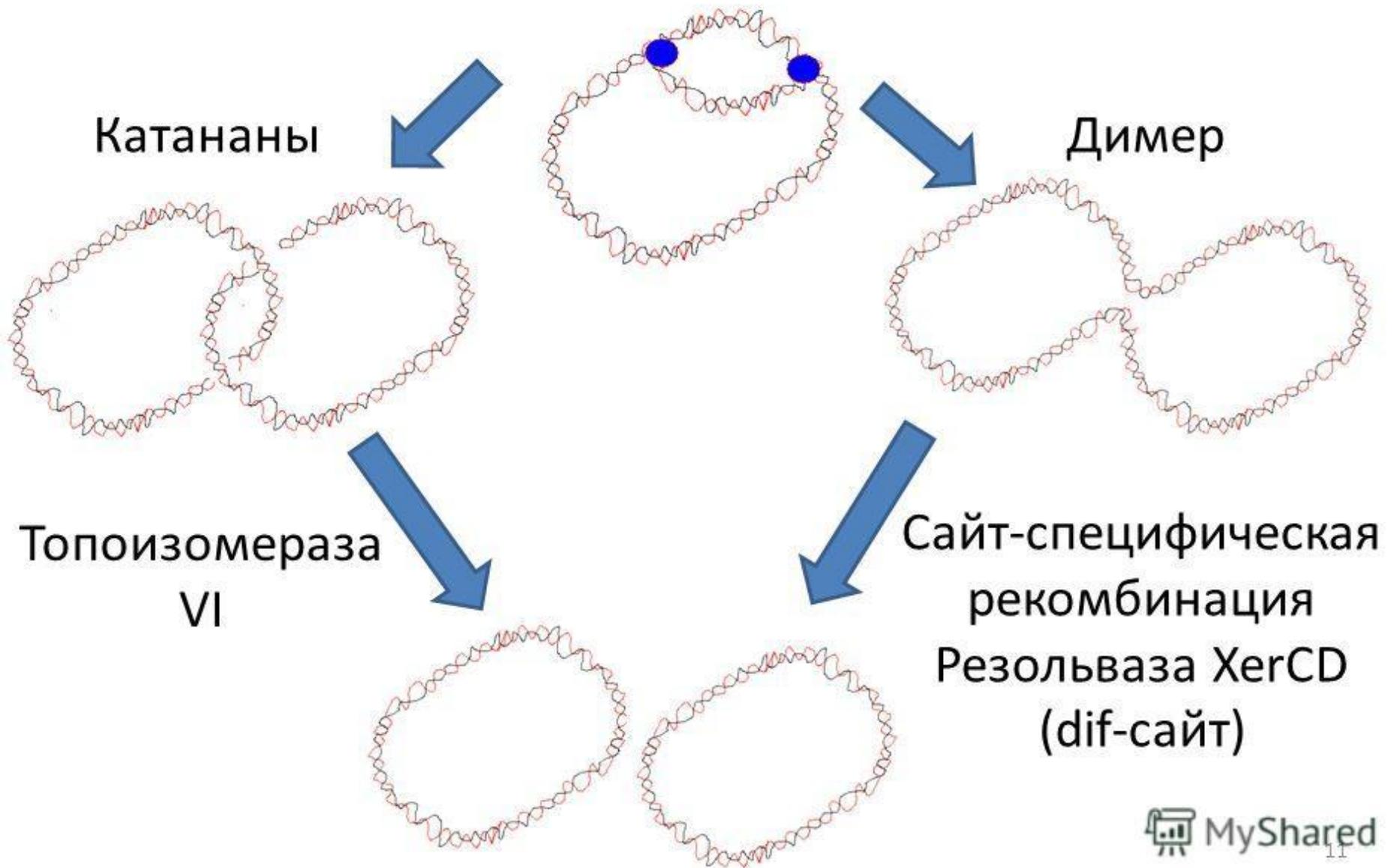


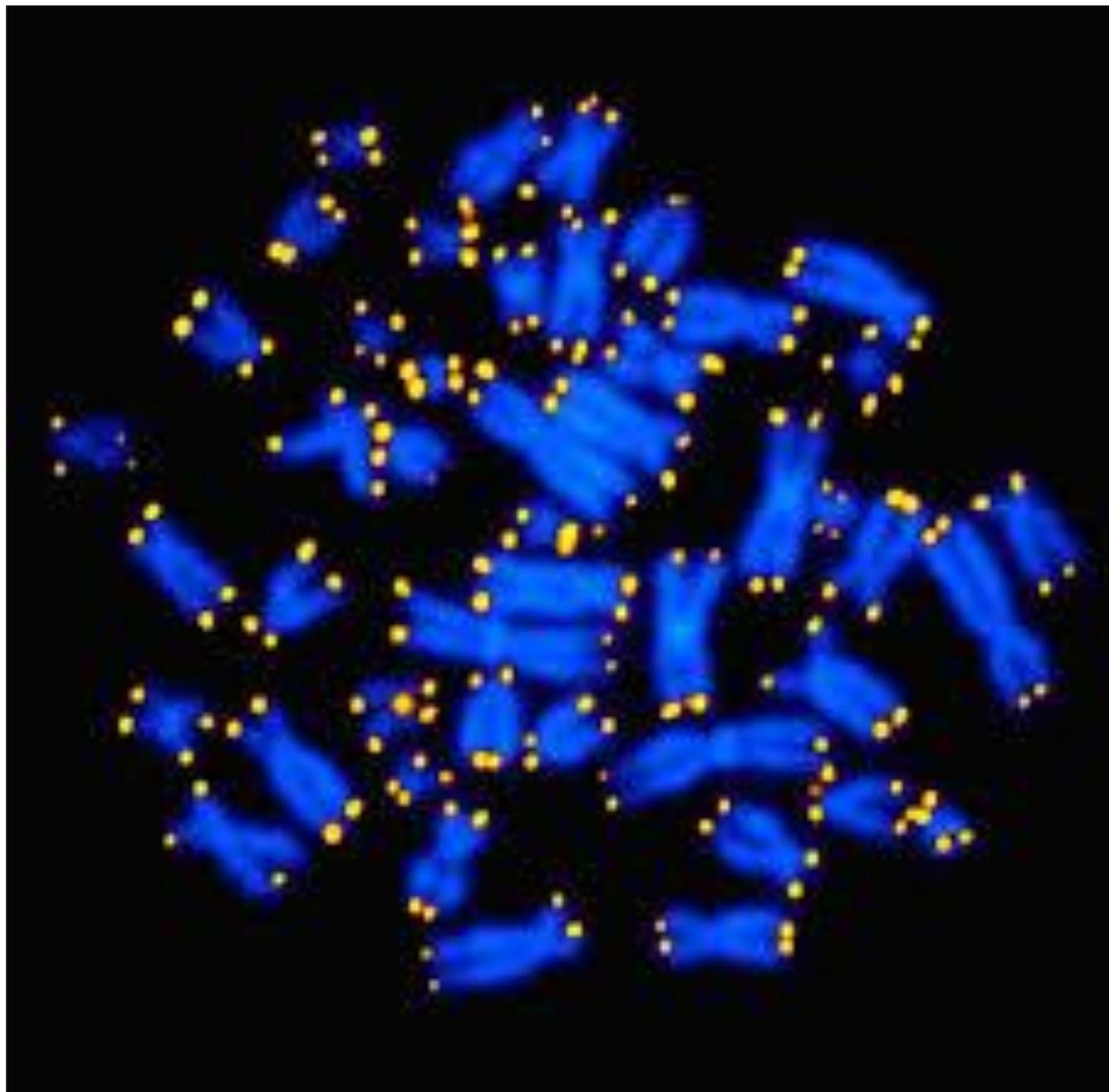
- Окончание репликации *ter* (terminus) находится на противоположной стороне от ориджина кольцевой хромосомы *E. coli*. *Ter* сайты работают как ловушки: репликационная вилка попадает и не выходит из этой области в 450 тысяч пн.. Синтез ведущей цепи ДНК останавливается в 1 нуклеотиде от места связывания белка Tus. *Ter* сайты работают только в одном направлении. Для каждого раунда репликации обычно используется только один сайт терминации. Остановившаяся на сайте терминации вилка ждет другую вилку, которая придет с другой стороны.



- Встреча двух репликативных вилок в конце цикла репликации бактериальной хромосомы сопровождается несколькими событиями, которые необходимы для полного разделения двух образовавшихся бактериальных хромосом до деления клетки.

Терминация репликации



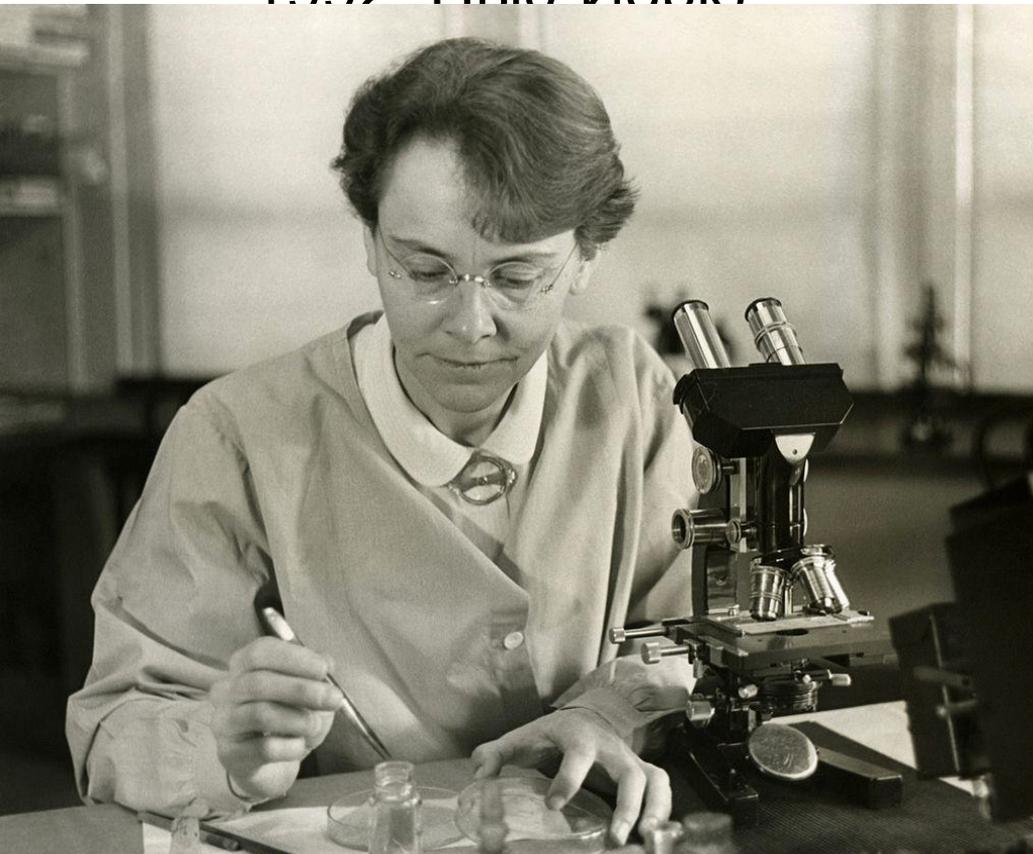


Герман Джозеф Мёллер (*Hermann Joseph "H. J." Muller*; декабрь 1890, Нью-Йорк — апрель 1967, Индианаполис)



- Американский генетик, ученик Томаса Ханта Моргана, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине («За открытие появления мутаций под влиянием рентгеновского облучения» 1946). Наиболее известен своими работами в области мутагенного действия рентгеновских лучей и радикальными политическими взглядами.
- Член-корреспондент АН ССРР (1933—1949, с 1990). 24 сентября 1948 г. направил в адрес АН СССР письмо с отказом от звания в знак протеста против преследования генетики в СССР; в январе 1949 г. был лишён звания; в 1990 году звание восстановлено
- В 1955 году Мёллер был в числе одиннадцати деятелей науки, подписавших Манифест Рассела-Эйнштейна.
- двоюродный дядя Урсулы Ле Гуин

Барбара Мак-Клинтон (*Barbara McClintock*; июнь 1902, Коннектикут сентябрь 1992 Нью-Йорк)



- Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине «За открытие мобильных генетических элементов» 1983г. Мак-Клинтон занималась главным образом исследованием цитогенетики кукурузы. В 1951 г. Мак-Клинтон открыла транспозоны. Её работы получили признание в 1970 гг., когда был изучен механизм регуляции генов, открытой Мак-Клинтон в 1940-е годы
«Спустя годы я обнаружила, что сложно, если не невозможно, донести до сознания другого человека сущность его предположений, в то время как я пришла к ним опытным путём. Это стало мне мучительно очевидно в 1950-х годах, когда я пыталась убедить генетиков в том, что работа генов может и должна контролироваться. Сейчас так же тяжело осознавать предубежденность многих насчёт природы контролирующих элементов кукурузы и их работы. Приходится выжидать, пока сменится общее представление.»

История расшифровки механизма естественного старения

- Вплоть до конца прошлого века механизмы старения оставались совершенно непонятными. Несмотря на это, само старение шло безотказно: для человека – редко чуть более 100 лет, и точка.
- Если за последние полтора века средняя продолжительность жизни человека выросла с 35-40 лет (во времена Пушкина) до более 80 лет в наиболее благополучных странах – Норвегии и Японии в наши дни, то максимальная (видовая для человека) продолжительность жизни какая была у древних египтян в III тысячелетии до н.э., такая и сейчас – порядка 100 лет.
- Это значит, что существуют некие биологические законы, не позволяющие человеку жить дольше.
- Было предложено более 100 теорий и гипотез о механизмах старения – все неверные. Первым открытием, сдвинувшим наши представления о механизмах старения с мертвой точки, было открытие **Леонарда Хейфлика: в 1961 г. он обнаружил, что клетки человека не могут делиться бесконечно: проходят *in vitro* \approx 50 удвоений и прекращают пролиферацию.**

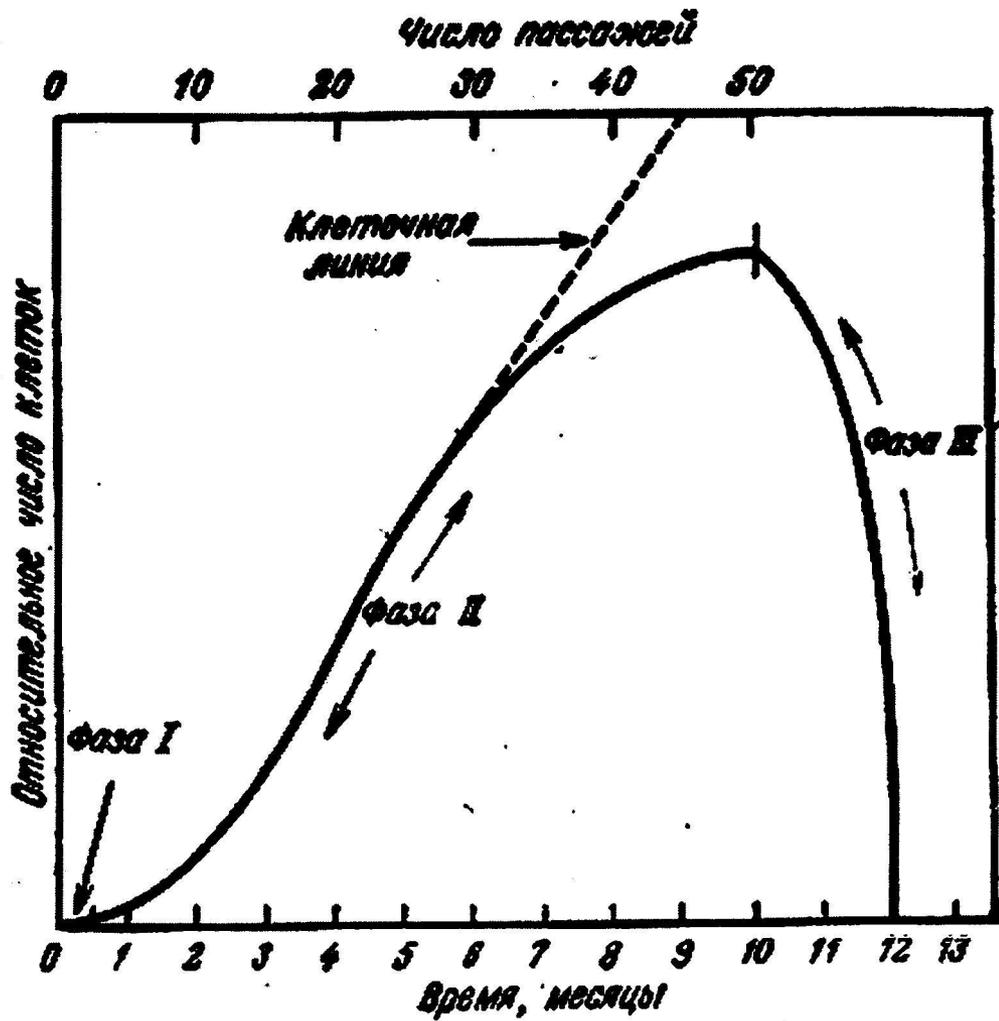
Леонард Хейфлик (*Leonard Hayflick*) 20 мая 1928, Филадельфия



- Медаль Джона Скотта (1914)

Лимит Хейфлика

- Хейфлик культивировал клетки легкого эмбриона человека и обнаружил, что нормальные диплоидные клетки в культуре неспособны поделиться более 50 раз, после чего пролиферация останавливается.
- Эта цифра (50 удвоений) получила название лимита Хейфлика для человека.
- Позже выяснилось, что лимит Хейфлика для клеток других видов животных хорошо коррелирует с их максимальной (видовой) продолжительностью жизни.



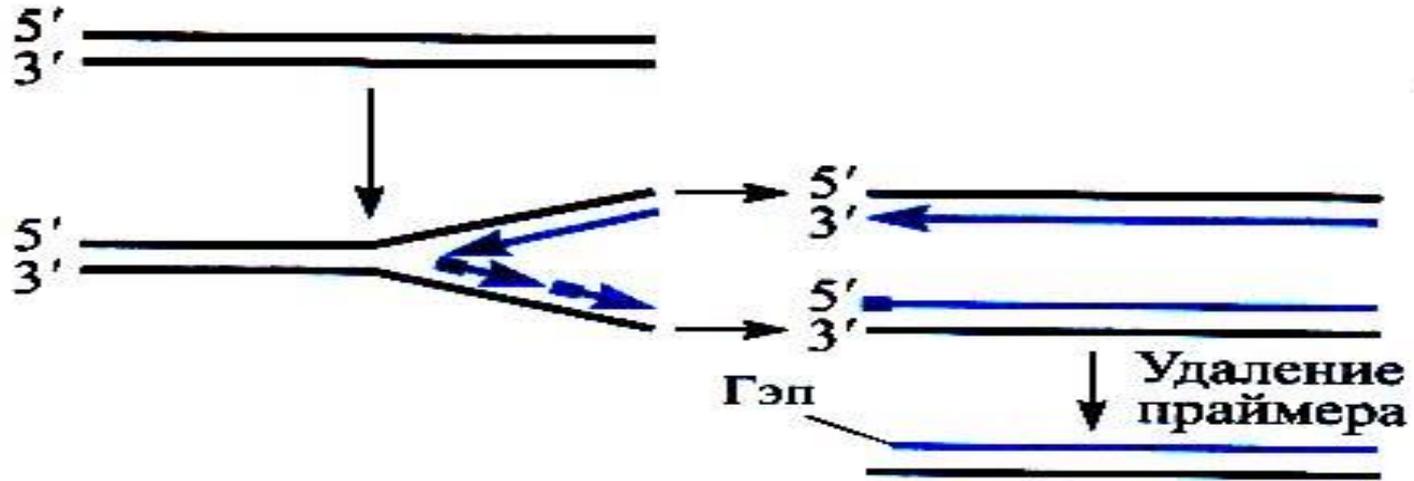
Пролиферация клеток in vitro по Хейфлику (Hayflick, 1961)

- В результате работ Хейфлика стало ясно, что причина ограниченной способности клеток к пролиферации лежит в самих клетках, а не в условиях их культивирования: клетка каким-то образом «знает», сколько раз она уже поделилась.
- Т.е., при каждом делении в клетке что-то меняется: либо закономерно накапливается, либо безвозвратно теряется.
- На вопрос, что же это такое, ответил в 1971 г., через 10 лет после Хейфлика и за 16 лет до Блекборн, российский (тогда – советский) исследователь **Алексей Матвеевич ОЛОВНИКОВ**

А.М. ОЛОВНИКОВ



Недорепликация теломер



- Прямоугольниками на отстающей нити изображены РНК-праймеры
- Короткие стрелки – фрагменты Оказаки

Теория Оловникова

А. М. Оловников в 1971 г. предложил формулу для расчета продолжительности жизни любого клона клеток *in vitro*:

- $T = k(l_t/l_m - n)$

где T — срок предстоящей жизни клеток; k — коэффициент корреляции между сроком жизни клона клеток и числом репликаций ДНК; l_t — длина теломерного участка; l_m — длина фрагмента ДНК, утрачиваемого в ходе каждого цикла репликации; n — число уже прошедших репликаций.

Теломерная теория старения

- Старение происходит на клеточном уровне: при каждой репликации укорачиваются теломеры хромосом, т.е. дочерняя ДНК оказывается короче материнской. После определенного числа делений, при минимальной длине теломер клетка теряет возможность делиться (лимит Хейфлика). Остановка деления клеток в тканях ведет к старению организма.
- Это четко подтверждается на клетках больных преждевременным старением

Теория недорепликации

- Процесс удвоения отстающей цепи ДНК начинается с синтеза коротких РНК-праймеров, или затравок, с 3'-концов которых синтезируются отрезки ДНК — фрагменты Оказаки. Затем РНК-праймер удаляется, образовавшиеся бреши (гэпы) заполняются фрагментами ДНК которые синтезируются, используя в качестве праймеров 3'-концы ранее синтезированных фрагментов Оказаки. Поскольку для синтеза крайнего участка нет такого фрагмента Оказаки - праймера, вновь образованная цепь оказывается на 8-12 нуклеотидов (длина РНК-праймера) короче исходной. В результате после каждого цикла репликации молекула ДНК должна становиться все короче: одна из четырех цепей укоротилась на 8 -12 пн

Нобелевская премия 2009 г. в области физиологии и медицины

- Ученые из США Элайзабет Блекборн, Керол Грейдер и Джек Шостак удостоены Нобелевской премии 2009 г. «за открытие теломерной защиты хромосом и фермента теломеразы». Эти работы публиковались начиная с 1987 г.



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009

"for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase"



Photo: Gerbil, Licensed by Attribution Share Alike 3.0

Elizabeth H. Blackburn



Photo: Gerbil, Licensed by Attribution Share Alike 3.0

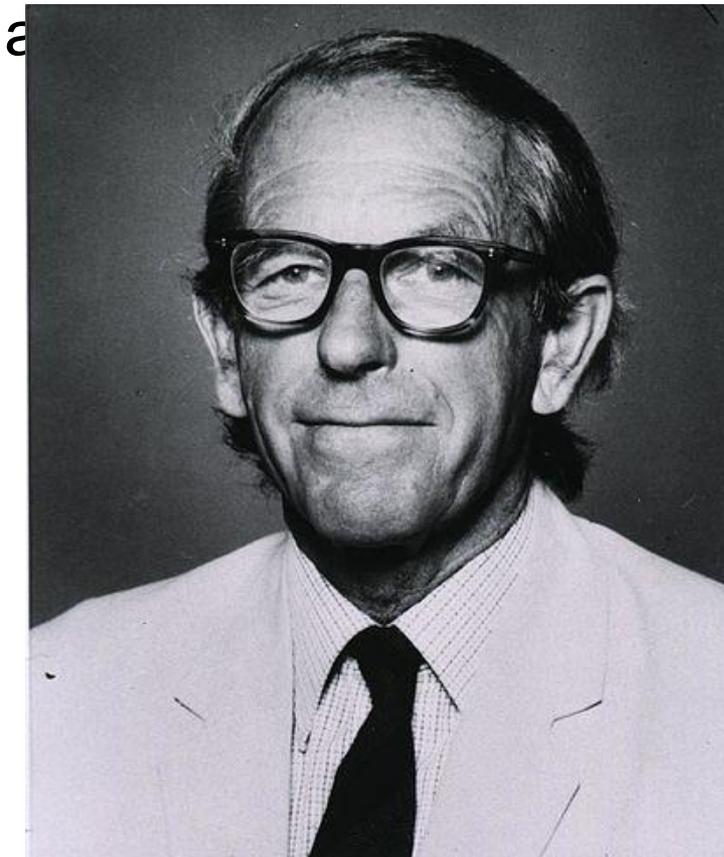
Carol W. Greider



Photo: Jussi Pukkonen

Jack W. Szostak

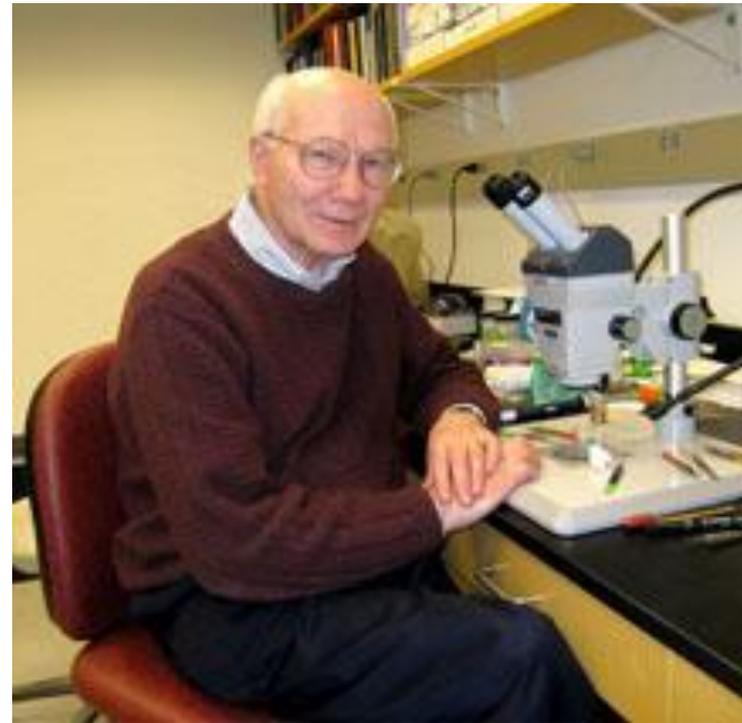
Фредерик Сенгер
Frederick Sanger



13

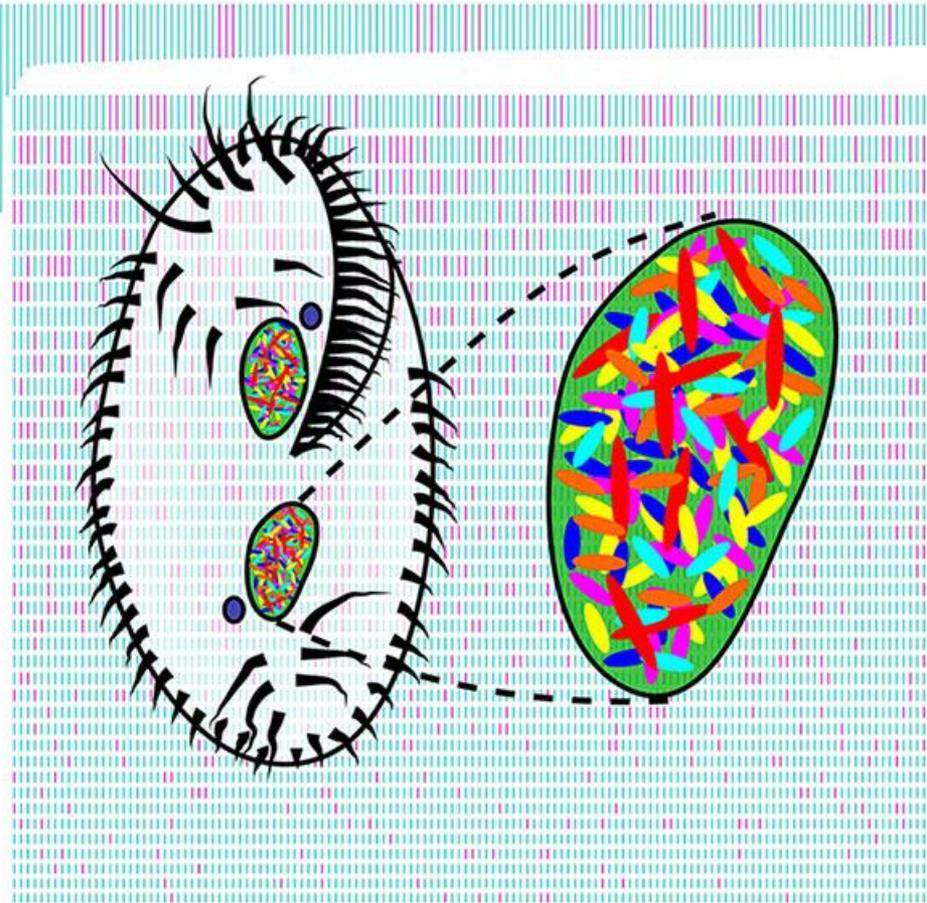
Джожеф Галл
Joseph Gall

апрель 1928



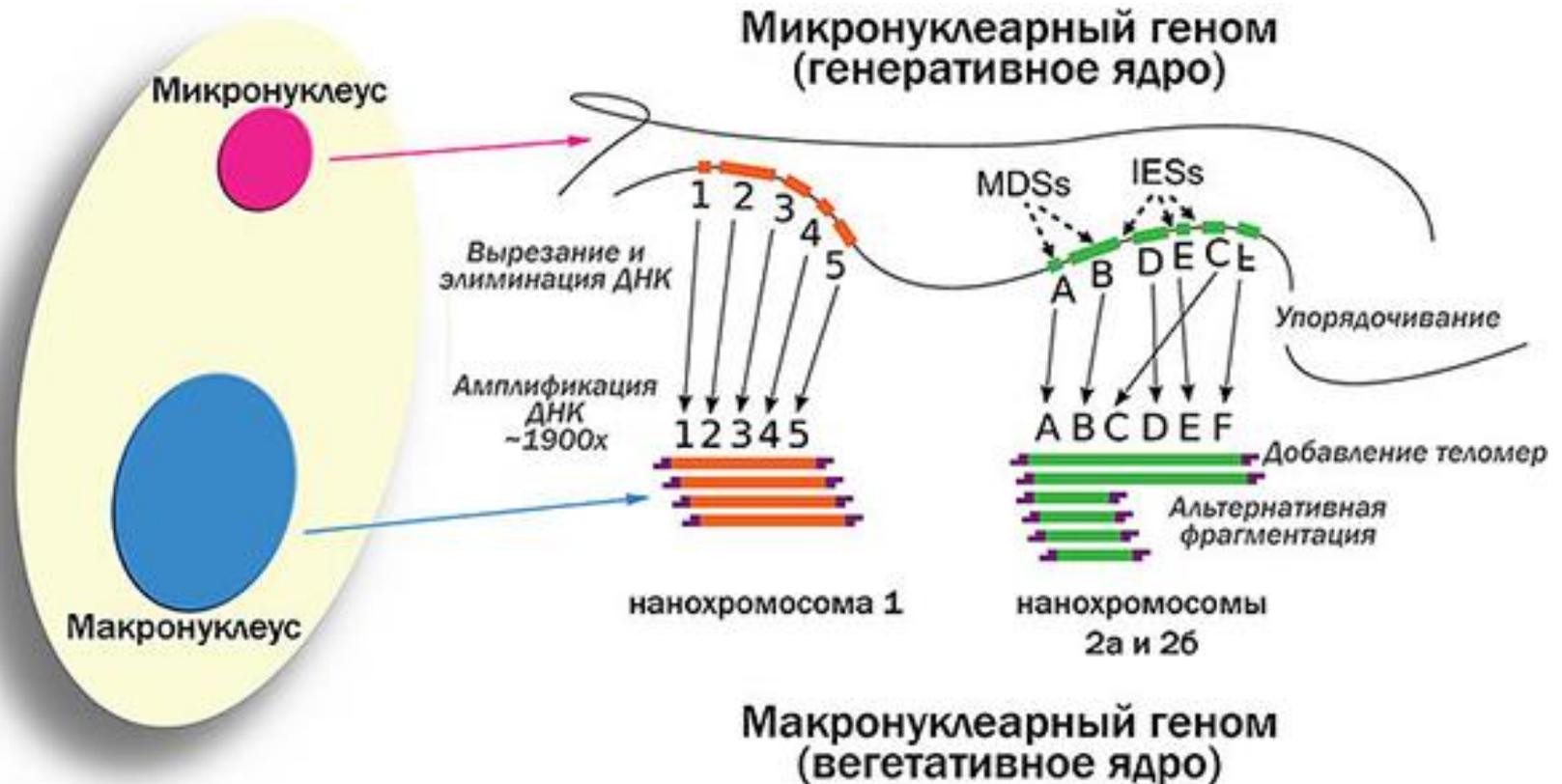
две Нобелевские премии по химии — в **1958**
(строение инсулина) и **1980** (совместно с У.
Гилбертом и П.Бергом) — за секвенирование

Схематичное изображение инфузории *Oxytricha trifallax* и ее уникального генома на обложке номера журнала **PLOS Biology**

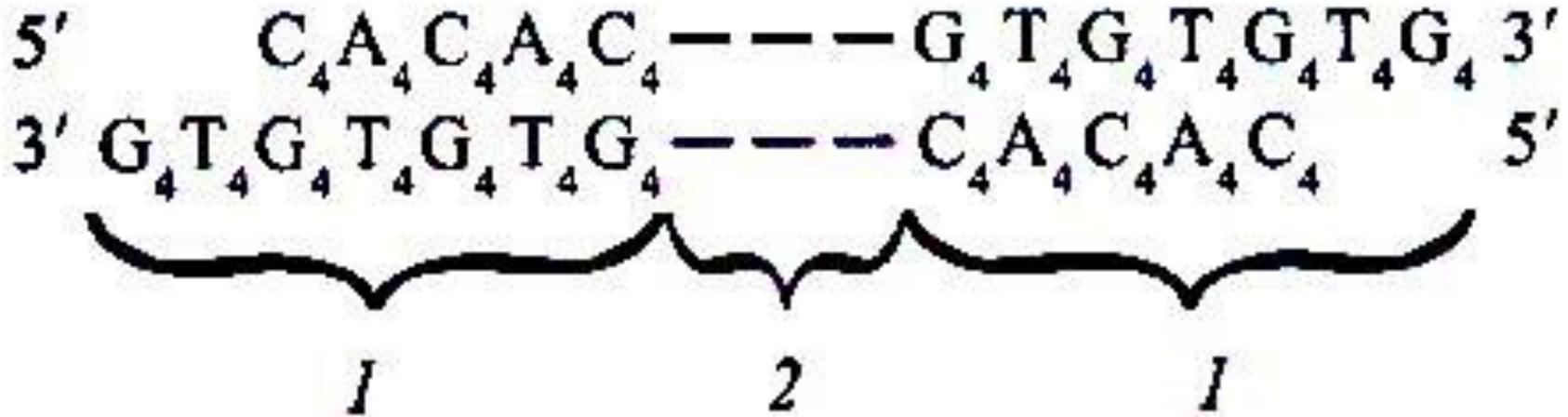


- Рабочий геном макронуклеуса получается из неактивного микронуклеуса, причем этому процессу сопутствует почти полное уничтожение ДНК микронуклеуса и массовые перестройки с участием некодирующих РНК. Группа американских исследователей расшифровала геном макронуклеуса окситрихи и обнаружила, что количество хромосом у нее приближается к 16 000. Около 10% хромосом имеют изоформы (разные варианты), образующиеся в результате альтернативной сборки кусочков ДНК. Весь геном представлен почти 2000 копиями, то есть одновременно в ядре содержатся миллионы хромосом.

- Схема геномных перестроек, происходящих в процессе развития макронуклеуса из микронуклеуса у *Oxytricha*. Часть последовательностей (IES, internally eliminated sequences) удаляется из генома, оставшиеся последовательности (MDS, macronuclear destined sequences) собираются в правильном порядке («расшифровка»), и формируются нанохромосомы. Часть нанохромосом имеет изоформы, то есть разные варианты, образующиеся при альтернативной сборке кусочков ДНК. Геном подвергается значительной амплификации, в результате чего количество копий нанохромосом достигает 2000. John R. Bracht, Wenwen Fang, Aaron David Goldman, Egor Dolzhenko, Elizabeth M. Stein, Laura F. Landweber. [Genomes on the edge: programmed genome instability in ciliates](#) // *Cell*. 31 January 2013. V. 152. Issue 3. P. 406–416.



Структура теломерного повтора инфузории окситрихи

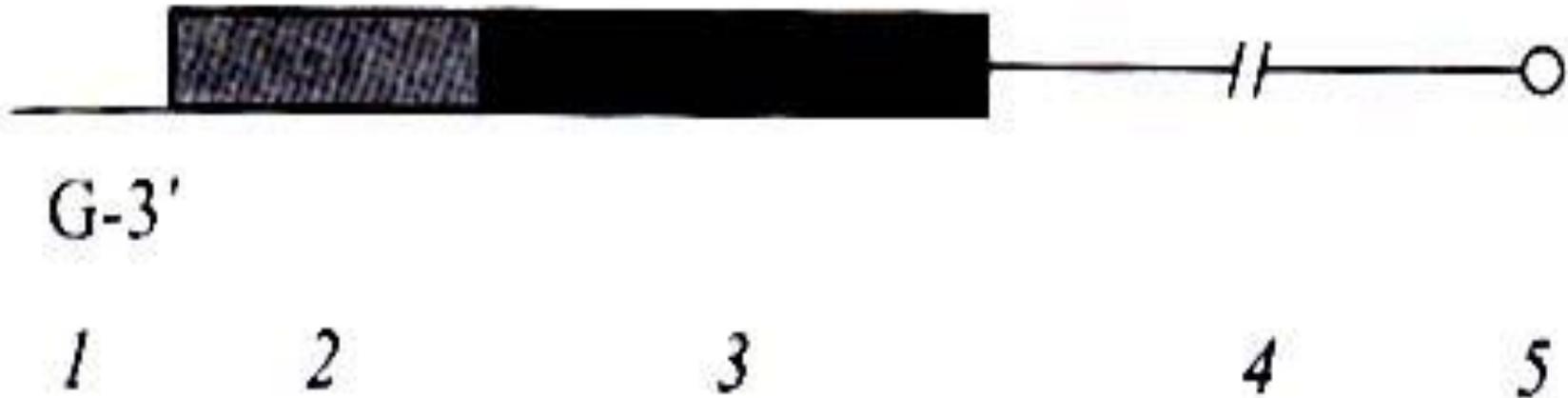


- У окситрихи повторяющейся единицей является октамер 5'-CCCCAAAA-3'/ 3'-GGGGTTTT-3', расположенный на концах хромосом особым образом, так что часть G-цепи ДНК остается одиночной из-за отсутствия второй цепи.
- 1 – теломерные повторы
- 2 – собственно хромосома
- **Выступающие концы нитей ДНК обнаружены в теломерах всех организмов**

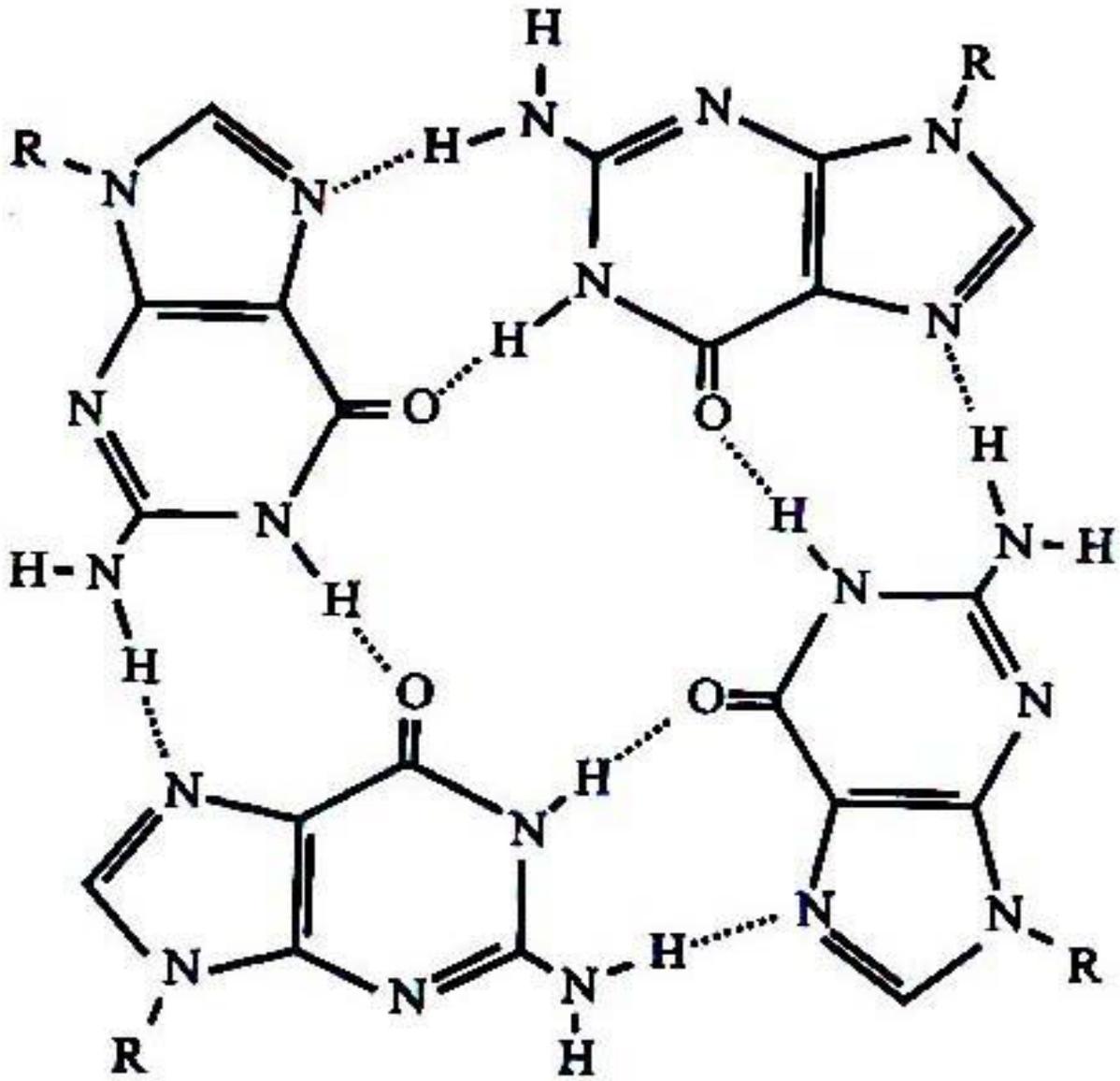
Теломерные повторы

Таксон	Вид	Последовательность нуклеотидов 5'→3'
Простейшие	Euplotes	TTTTGGGG
Слизневые грибы	Phusarum	TTTAGGG
Жгутиковые	Trypanosoma	TTAGGG
Споровики	Plasmodium	TT(T/C)AGGG
Грибы	Neurospora Candida maltosa	TTAGGG ACGGATGGAGACTCGCTTGGTGT
Нематоды	Ascaris	TTAGGC
Насекомые	Bombus mori	TTAGG
Водоросли	Chlamidomonas	TTTTAGGG
Высшие растения	Arabidopsis	TTTAGGG
Позвоночные животные	Homo sapiens	TTAGGG

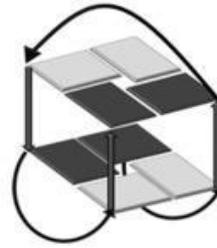
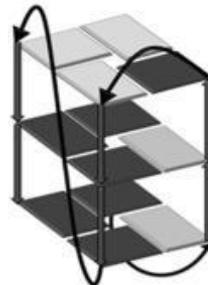
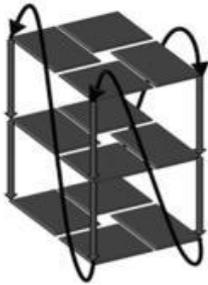
Схема организации теломерного конца хромосомы у окситрихи



- 1 – повтор из гуаниновых нуклеотидов,
- 2 – теломерный концевой повтор (TR),
- 3 – последовательности, ассоциированные с теломерой (TAS),
- 4 – собственно хромосома,
- 5 - центромера



Четыре молекулы гуанина на выступающем конце, не имеющие возможности контактировать с молекулами цитозина, как это бывает в обычной молекуле ДНК, все же спариваются. Они располагаются в одной плоскости и образуют водородные связи между собой. Каждая молекула гуанина соединена с двумя соседними (Гипотеза о плоскостном расположении молекул гуанина в теломерном повторе)



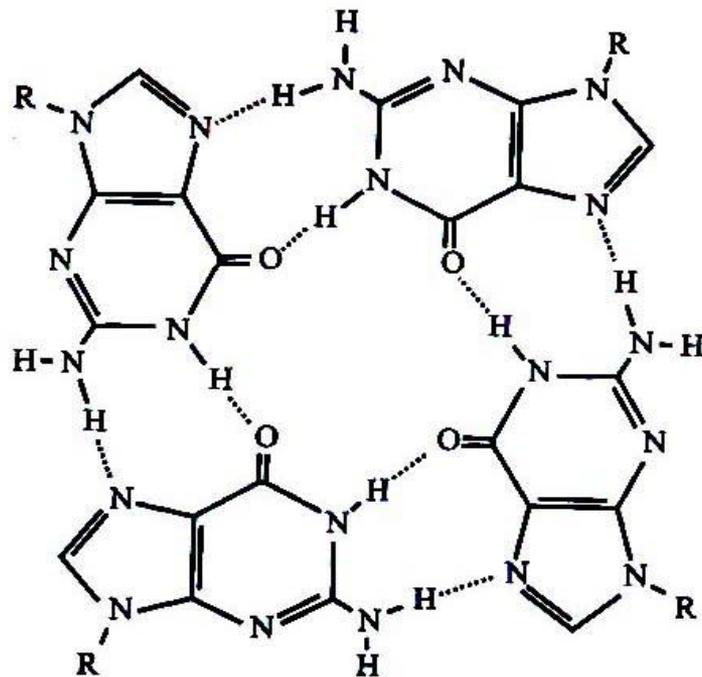
Antiparallel Basket

Parallel Propeller

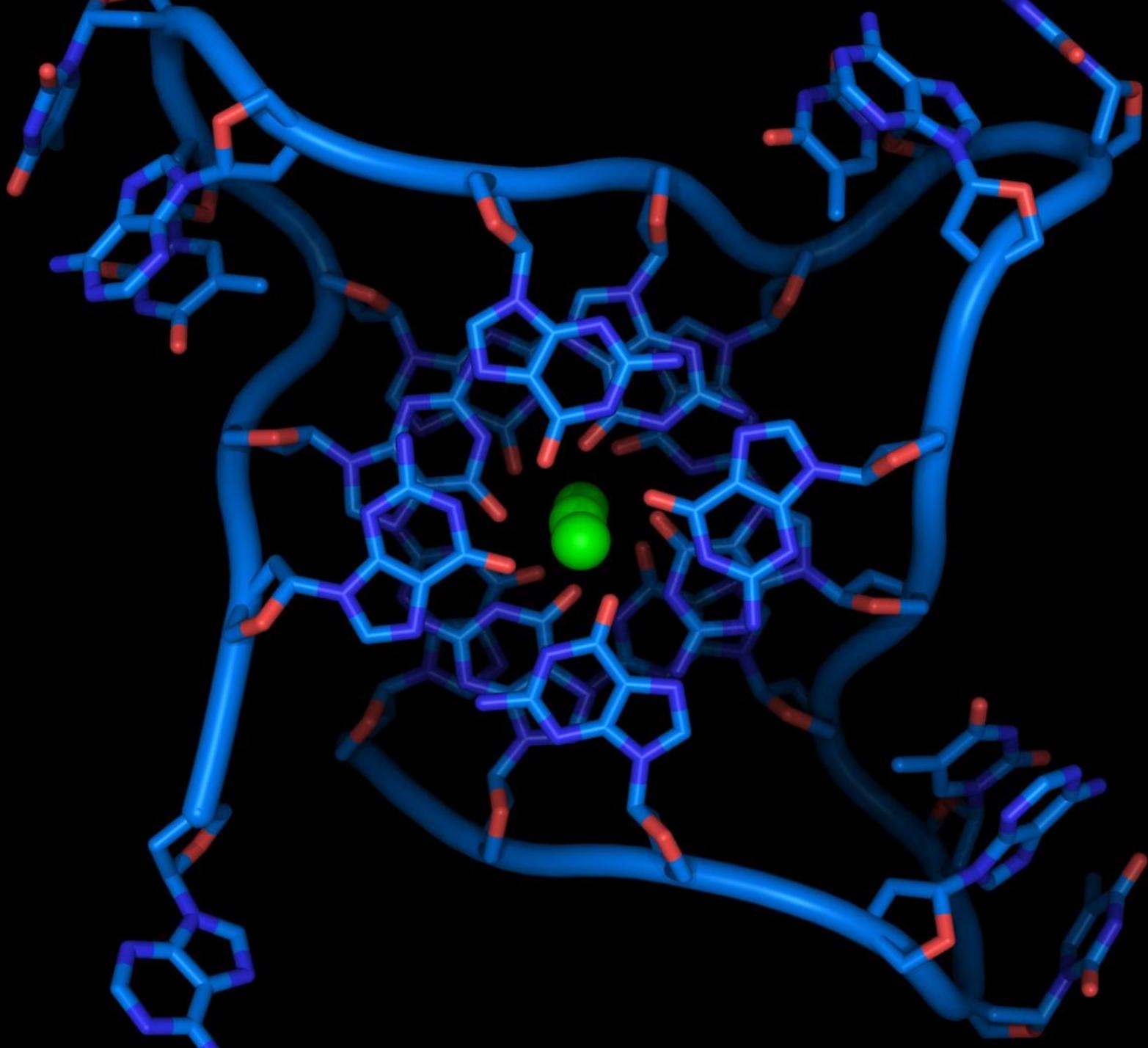
Hybrid-1

Hybrid-2

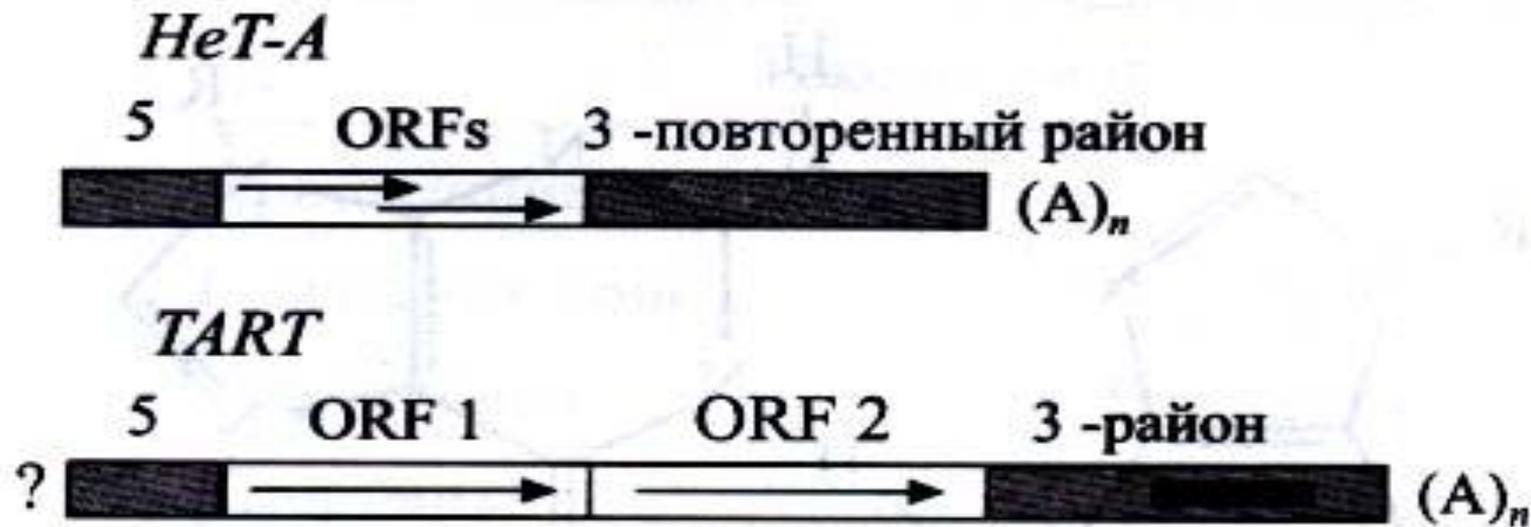
2-Tetrad Antiparallel Basket



- Четыре молекулы гуанина на выступающем конце, не имеющие возможности контактировать с молекулами цитозина, как это бывает в обычной молекуле ДНК, все же спариваются. Они располагаются в одной плоскости и образуют водородные связи между собой. Каждая молекула гуанина соединена с двумя соседними
- (Гипотеза о плоскостном расположении молекул гуанина в теломерном повторе)



Теломеры дрозофилы



- У дрозофилы на концах хромосом расположены теломероспецифичные ретротранспозоны, *HeT-A* и *TART*. Они имеют похожее строение. У обоих на 5'-конце присутствуют небольшие повторенные последовательности, а на 3'-конце — более протяженный повтор, завершающийся длинным фрагментом, содержащим только нуклеотиды с аденином $(A)_n$. *HeT-A* имеет две частично наложенные одна на другую рамки считывания (ORFs), кодирующие белки. *TART* ~ ORF1 и ORF2, расположенные тандемно. Оба ретротранспозона присутствуют во многих копиях, главным образом в прицентромерных районах.

НЕРЕГУЛЯРНЫЕ ТЕЛОМЕРНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ



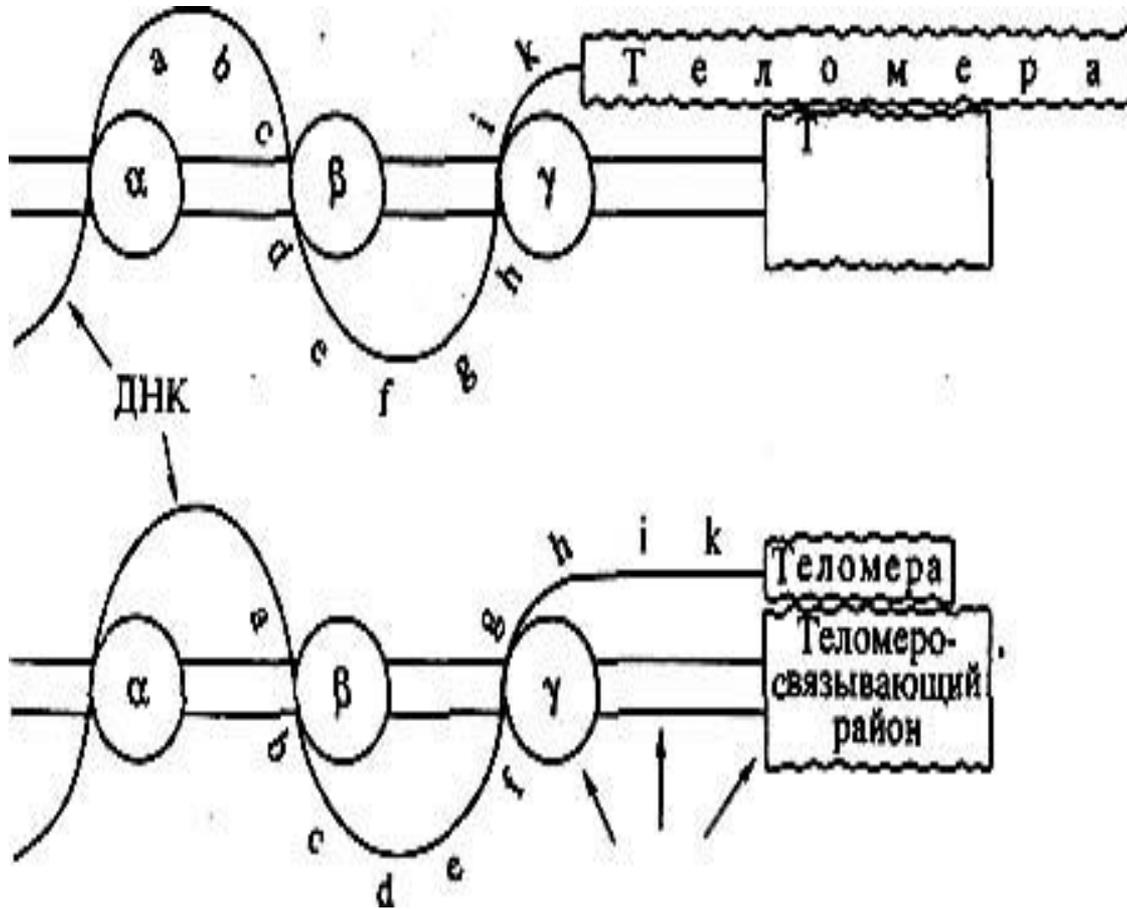
Строение теломер

- Теломеры человека содержат от 4 до 15 тысяч пар оснований и состоят из повторяющихся последовательностей TTAGGG; теломера заканчивается однонитевым TTAGGG-3' нависающим концом, завернутым назад на себя, в структуру, называемую «t-петлей»
- Теломеры генетически пусты – не кодируют никаких белков. Поэтому укорочение теломер до определенного минимума никак не влияет на жизнь клетки. Но достижение этого минимума длины теломеры приводит к ее разрушению и «декепированию» (обезглавливанию) хромосомы и гибели клетки (Э. Блекборн, 2001)
- Впервые теломеры были обозначены как отдельная структура хромосом в 1930-х гг. американцем Г.Мёллером, работавшим в СССР, и советским генетиком Ф.Добжанским, работавшим в США.

Динамика укорочения теломер

- в первичной культуре фибробластов, растущих *in vitro*, каждое удвоение количества клеток сопровождается уменьшением теломер на 48 ± 21 пар нуклеотидов
- фибробласты человека *in vivo* имеют среднюю величину укорочения теломер равной -75 пар оснований на один акт митоза
- теломеры периферических клеток крови детей теряют более 1000 пар нуклеотидов в год.
- в возрасте от 4 до 20 лет теломеры укорачиваются все медленнее, а в зрелом и пожилом возрасте их длина падает с практически постоянной скоростью около 30—60 пар нуклеотидов ежегодно
- критическая длина теломер фибробластов человека при которой наступает репликативное старение (торможение и полное прекращение пролиферации), не более 5 -7 тыс. пар оснований

Гипотеза изменения взаимодействий ДНК и ядерного матрикса при укорачивании теломер

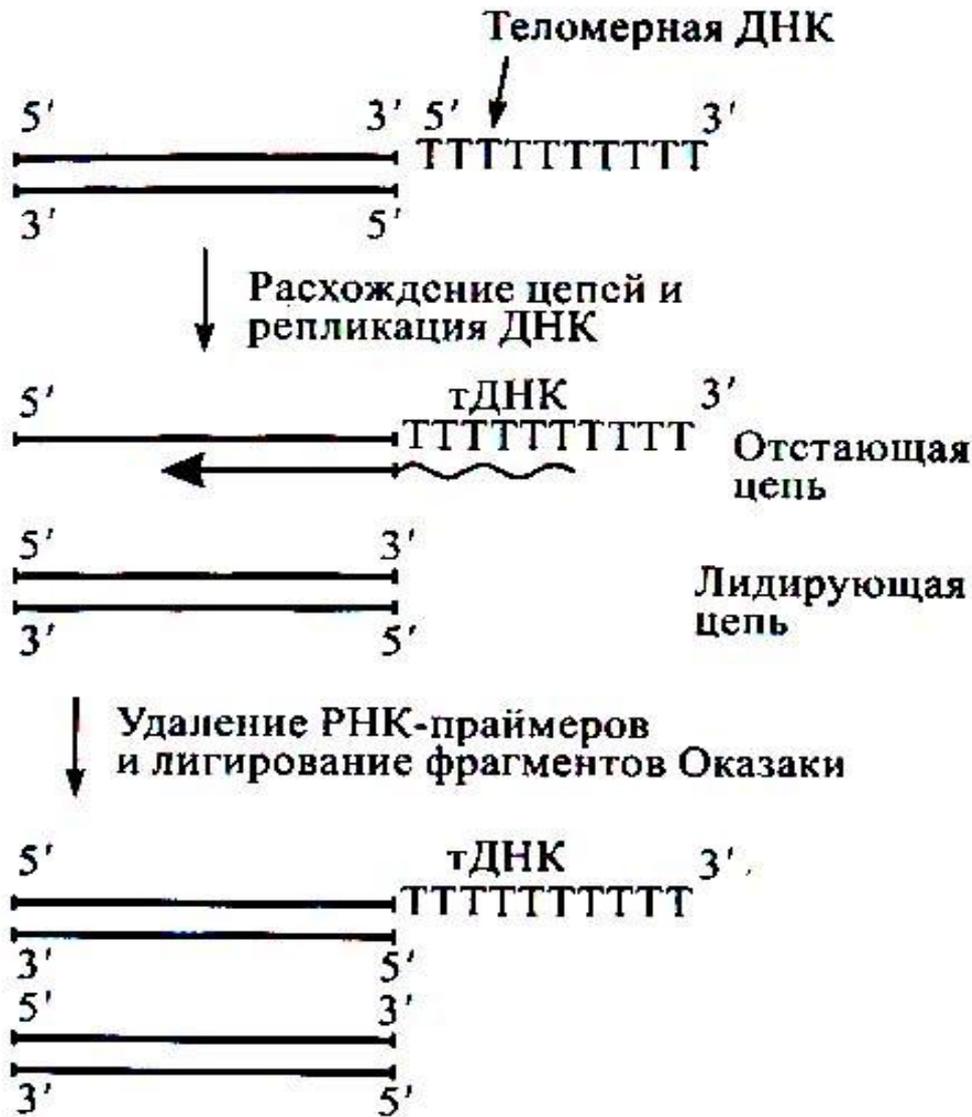


- При укорачивании теломер происходит сдвиг ДНК относительно матрикса. При этом генные локусы (α, β, γ) меняют свое положение относительно участков связывания ДНК-матрикса (греческие буквы). Укорачивание теломер должно приводить к ослаблению связи теломер с ядерным матриксом и к изменению связей ДНК-матрикс внутри хромосомы. Такие процессы приводят к плавным изменениям в упаковке ДНК, а значит, и к изменениям в экспрессии генов. Можно предположить, что эти изменения максимальны в прителомерных областях, а при приближении к центромерам должны уменьшаться.

Предсказание теломеразы А.М. Оловниковым

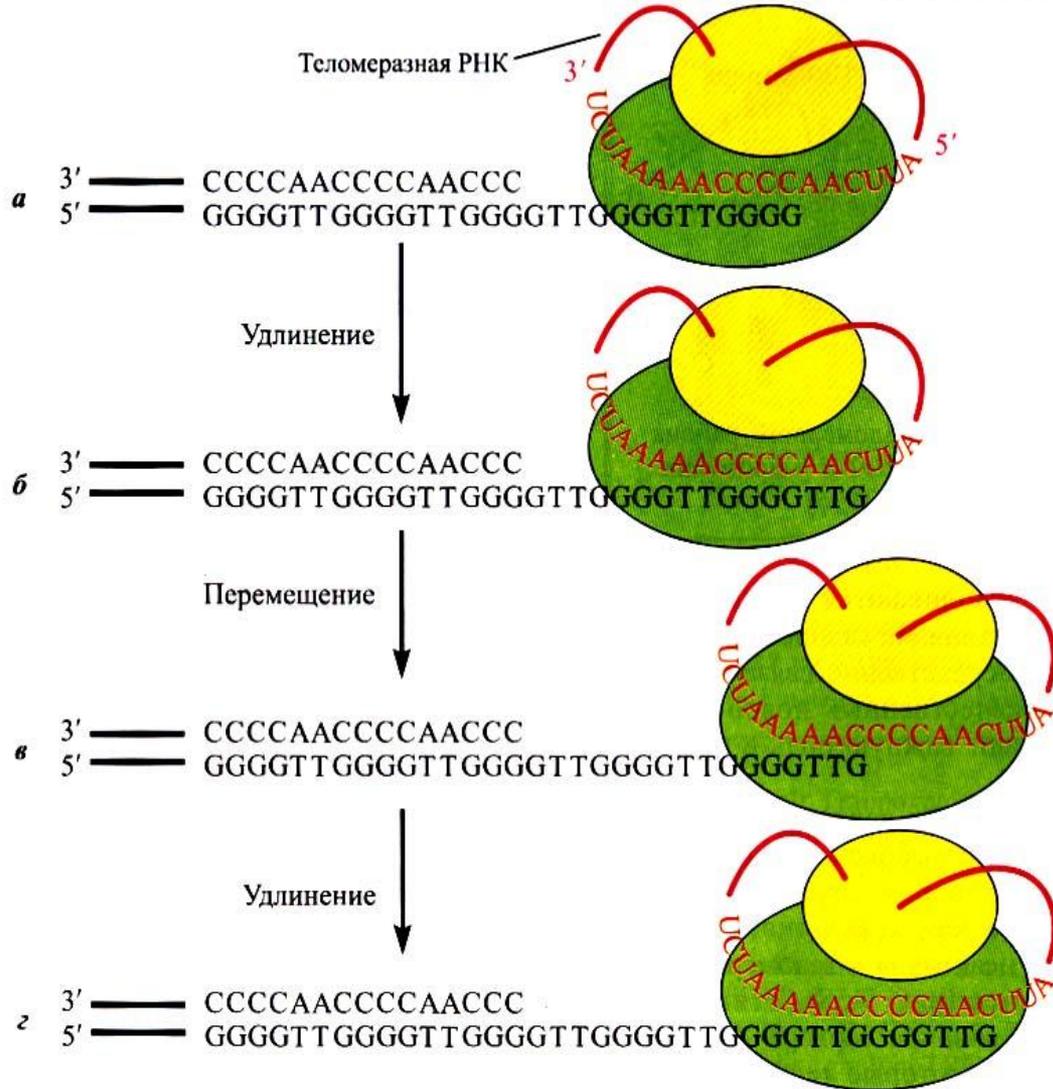
- Термин «теломераза» ввела Э.Блекборн в 1987 г., однако необходимость существования такого фермента предсказал опять же А.М.Оловников еще в первой своей теоретической работе 1971 г. в Докладах АН СССР. Он назвал этот фермент «тандем-полимеразой»
- Вот цитата из этой работы: «Тандем-полимераза или ее изозимы должны присутствовать в клетках, способных к бесконечному удвоению генома, например, в опухолевых клетках, половых и в ряде других».

Работа теломеразы(1)



- Перед началом цикла репликации ДНК теломераза добавляет несколько копий теломерных повторов на 3'-конец ДНК. После этого репликация идет в обычном порядке. На отстающей цепи синтезируются РНК-праймеры, при этом наиболее важно то, что **концевой праймер синтезируется на «досинтезированном» теломерном повторе**. После завершения репликации остается незаполненным только участок РНК-праймера, синтезированного на «досинтезированной» теломерной ДНК. В результате кодирующие части дочерних цепей ДНК получают той же длины, что и родительских.

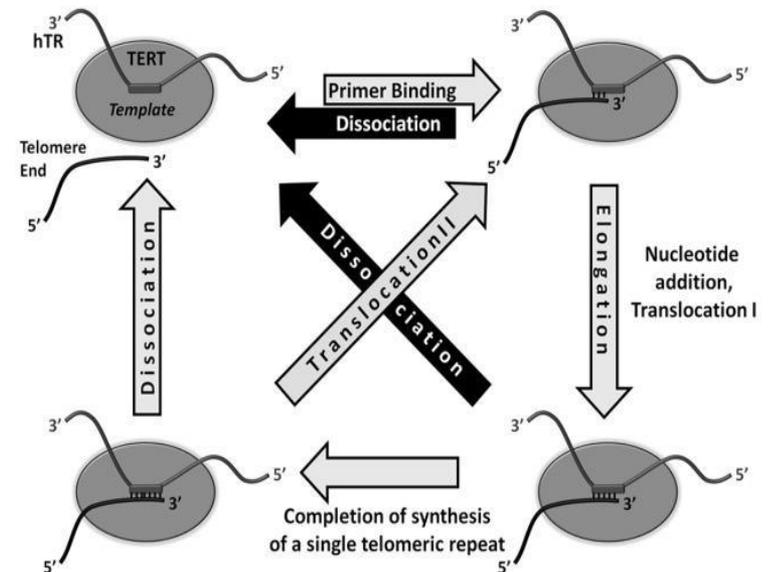
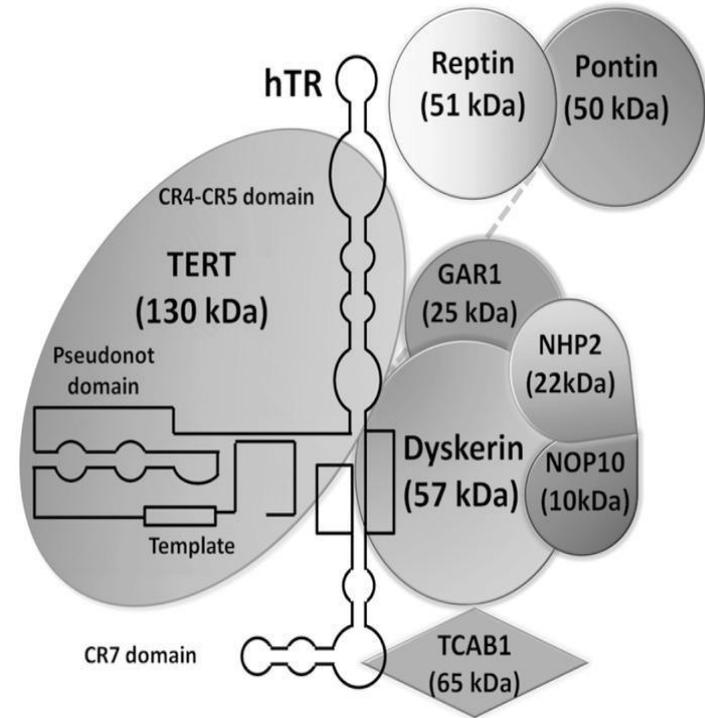
Удлинение теломер теломеразой у тетрахимены



- Теломераза обладает своей молекулой РНК, имеющей матричный участок, с помощью которого фермент распознает теломерный повтор. Последовательность 5'-ААССССААС-3' в составе молекулы теломеразы спаривается с последовательностью теломерного повтора 5'-ТТGGGG-3'. Нуклеотиды ААС в РНК теломеразы остаются неспаренными, и на них достраиваются ТТГ. Фермент перемещается на самый конец теломерной последовательности, т. е. на всю длину ТТGGGGTTG, и нуклеотиды ААС из молекулы теломеразной РНК спариваются с ТТГ теломерной ДНК, после чего достраивается вся последовательность повтора.

Теломераза

- **Теломераза** - крупный фермент, состоящий из двух основных субъединиц, кодируемых разными генами:
- **1. TR (hTR) или hTER - (human) Telomerase RNA component - Матричная теломеразная РНК**
- **2. TERT (hTERT) - (human) Telomerase Reverse Transcriptase - Теломеразная обратная транскриптаза.**
- Теломераза восстанавливает укоротившиеся теломеры до исходной длины, т.е. предотвращает старение.
- TR экспрессируется во всех клетках, TERT - только в гаметях и трансформированных клетках, а также ограниченно в стволовых клетках.
- Теломераза была открыта Э.Блекборн и сотрудниками сначала в клетках простейших – тетрахимены, позже и у других организмов и человека.



Роль теломеразной РНК

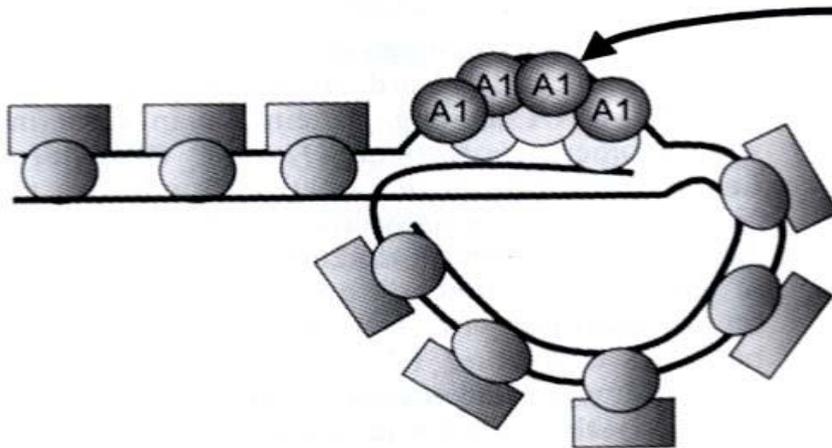
1. Изменение специфических оснований у *Тетрахимены* или дрожжей путем внесения мутации в матрицу теломеразной РНК свидетельствует, что эти основания крайне важны для ферментативной активности теломеразы
2. При определенном изменении теломерной последовательности наблюдается полное блокирование микронуклеусов *Tetrahymena* в анафазе;
3. Специфические мутации в гене теломеразной РНК ведут к увеличению теломер у *Tetrahymena* и дрожжей *Kluuveromyces lactis*.

hnRNP

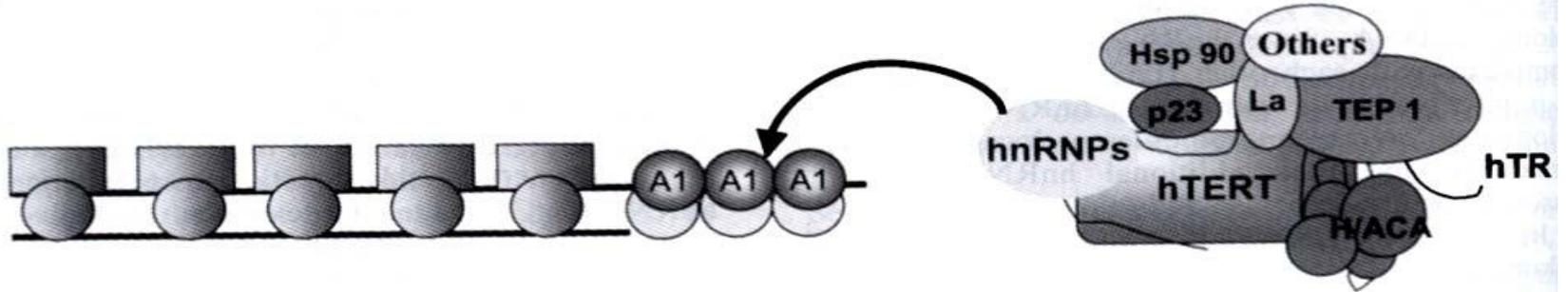
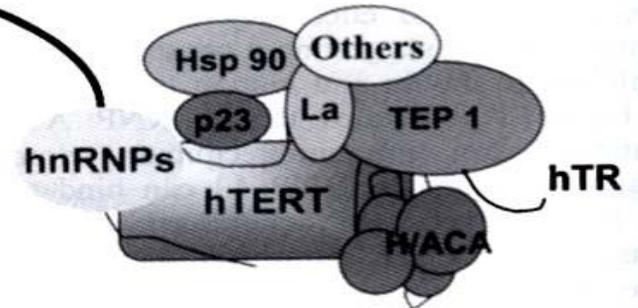
- **hnRNPs – heterogeneous nuclear ribonucleoproteins** – обширное семейство связывающихся с нуклеиновыми кислотами белков часто обнаруживаемые в 40S рибонуклеопротеиновых частицах. Часть имеет строго ядерную локализацию, часть челночно перемещается из цитоплазмы в ядро. Играть роль в регуляции теломеразы и строения теломер. hnRNPs, связанные с теломерами – hnRNP A1, A2-B1, D, E. С теломеразой - hnRNP A1, C1/C2, D. Взаимосвязываясь, hnRNP облегчают связь теломеразы с теломерами.

Взаимодействие теломер с теломеразой

Telomere Complex



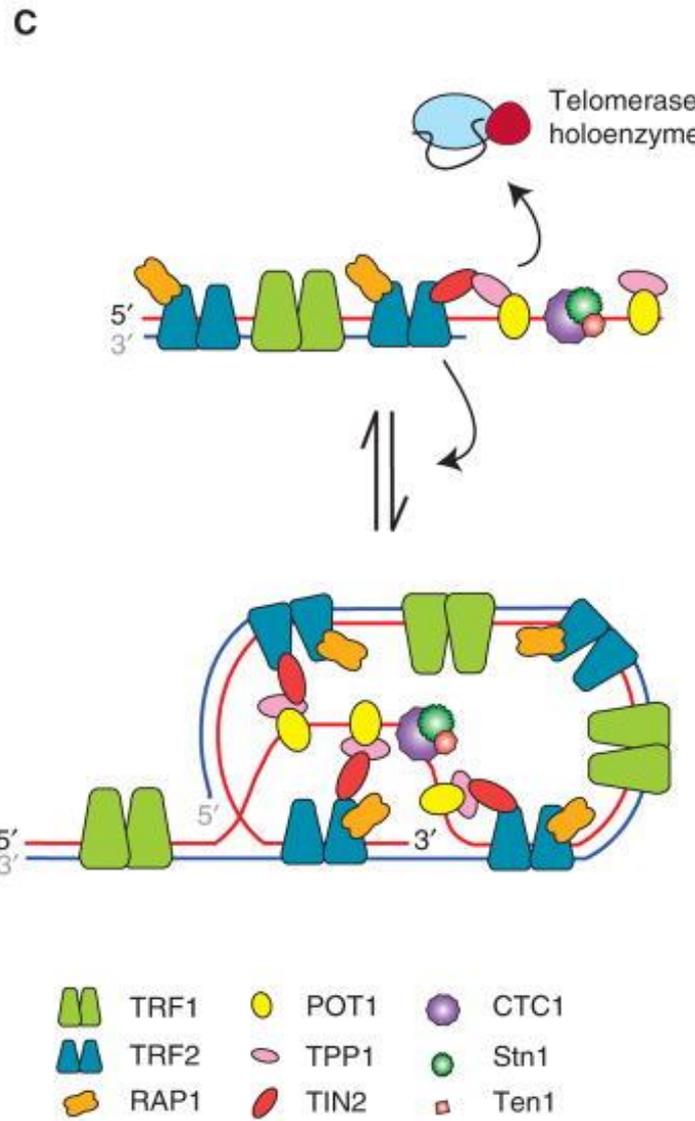
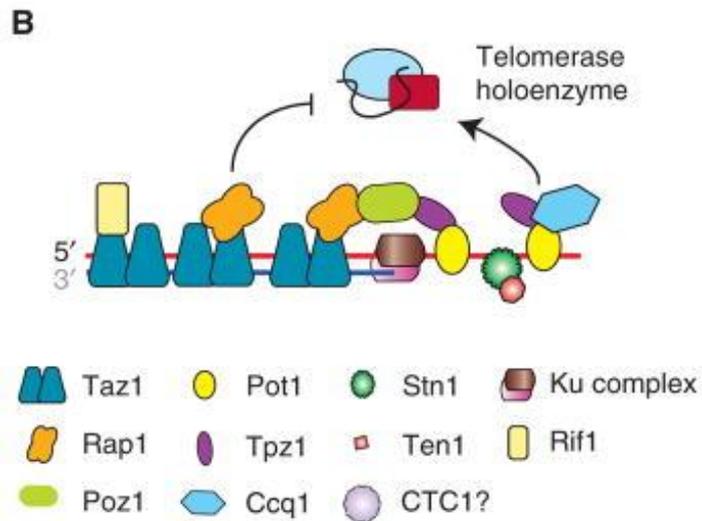
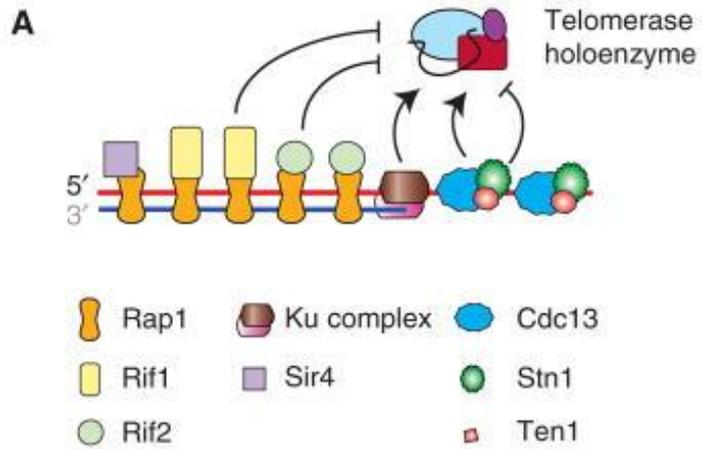
Telomerase RNP



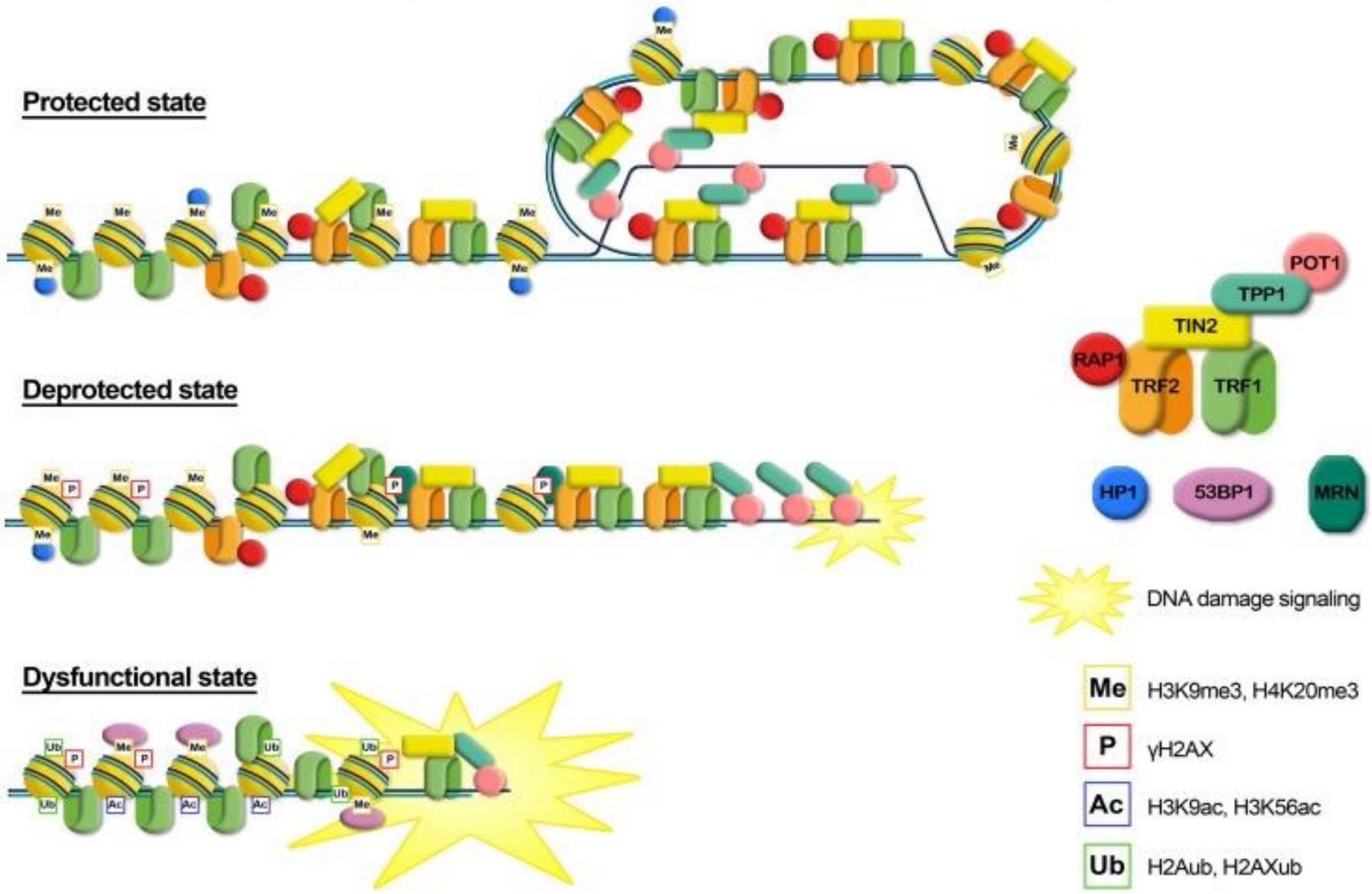
hnRNP A2-B1+D+E 

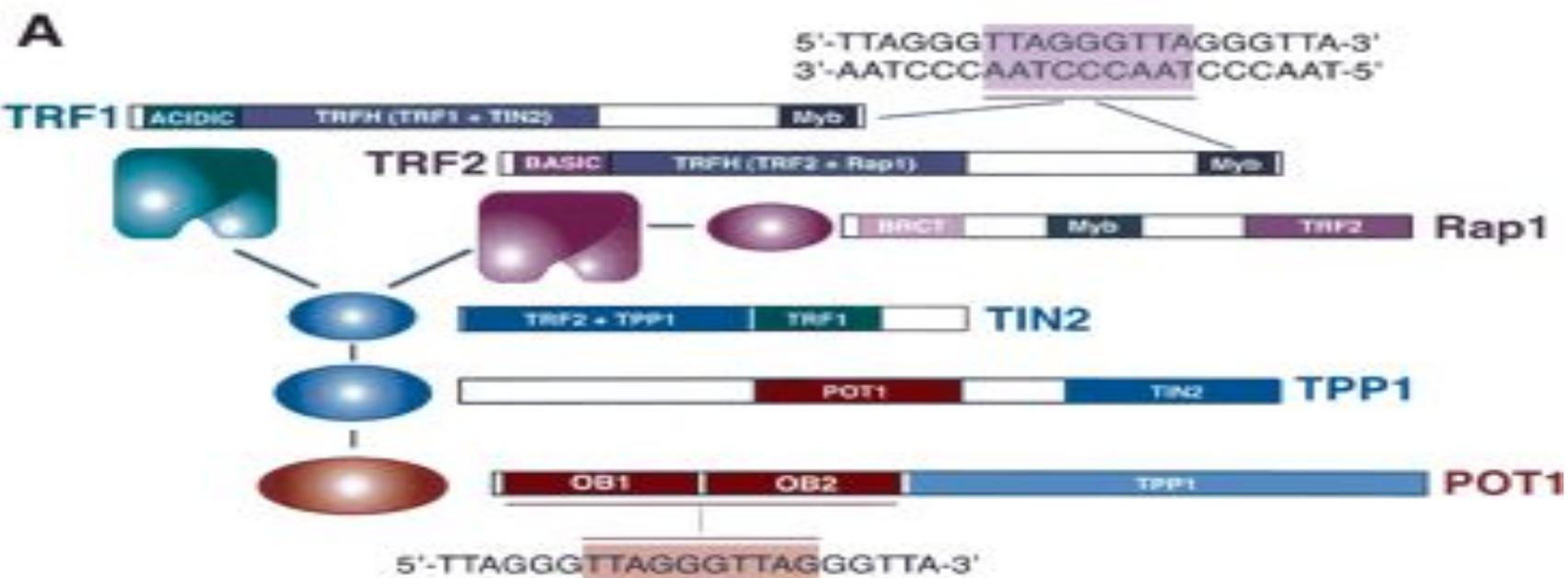
Telomere binding proteins 

Теломеры человека и дрожжей

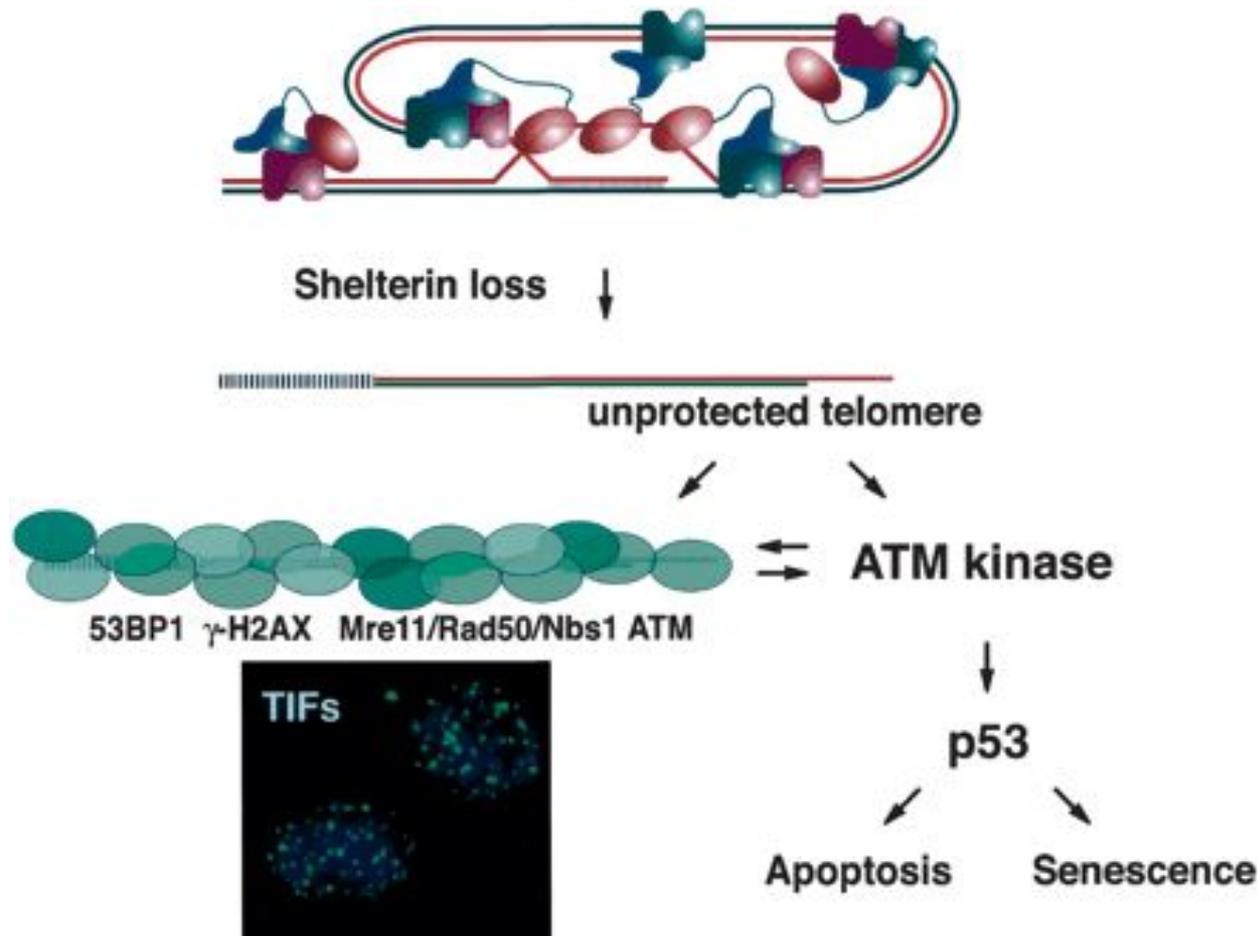


Теломеры в процессе старения





Сигнал от открытой теломеры





Shelterin loss ↓ TRF2-DN or TRF2-/-

NHEJ complex ↓ unprotected telomeres



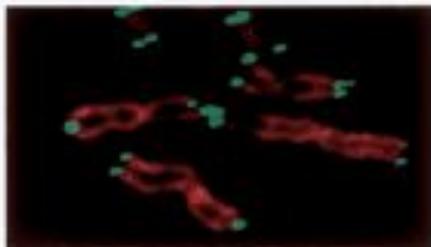
ERCC1/XPF ↓ Recruitment (and/or activation) of ERCC1/XPF



↓ Overhang cleavage

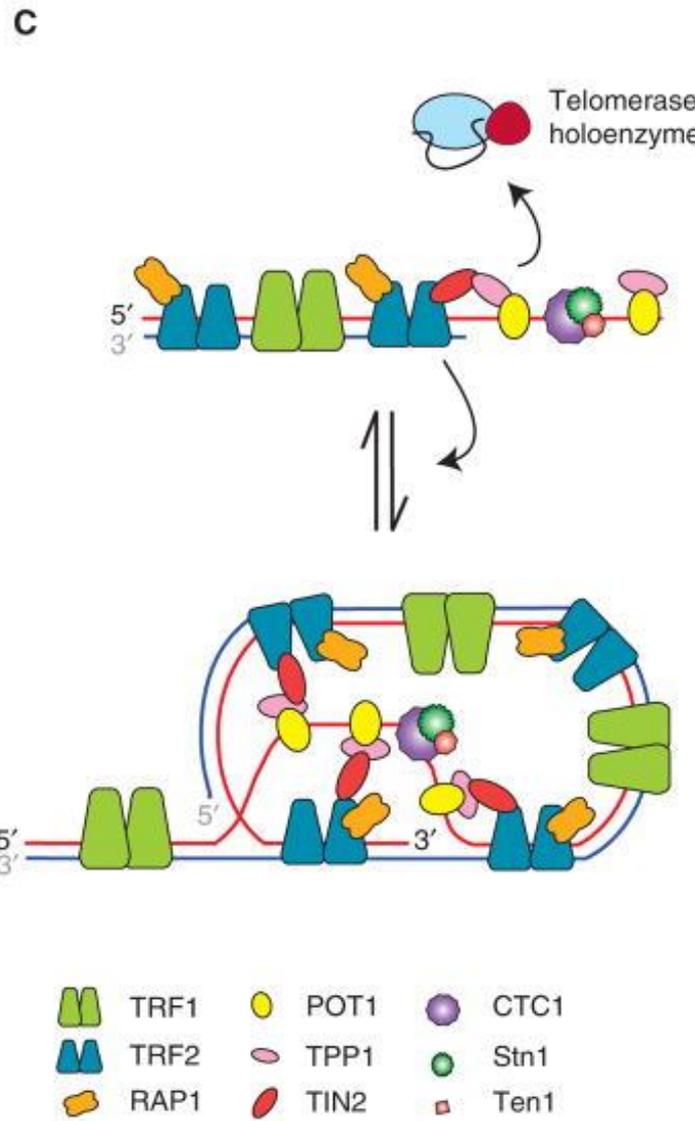
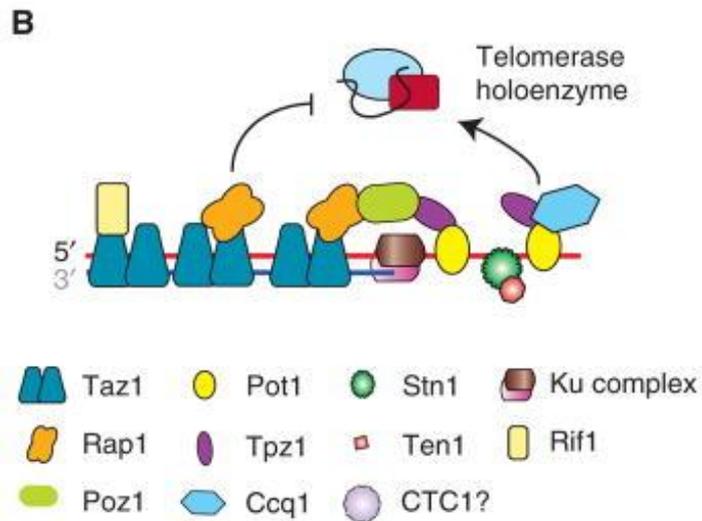
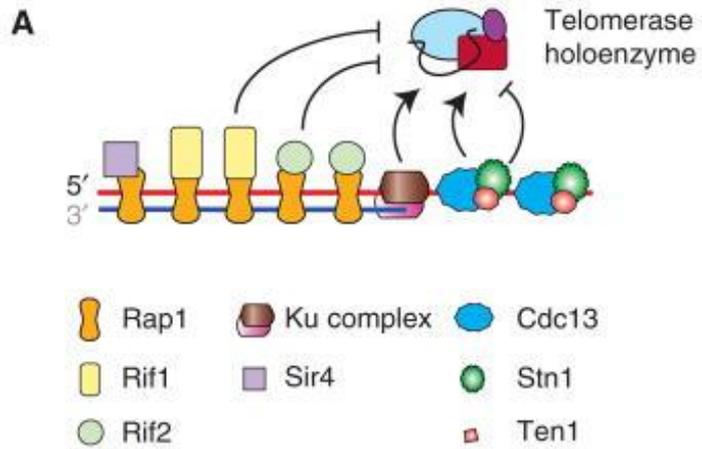


↓ End-joining



Объединение
концов
«незащищенных»
хромосом

Теломеры человека и дрожжей

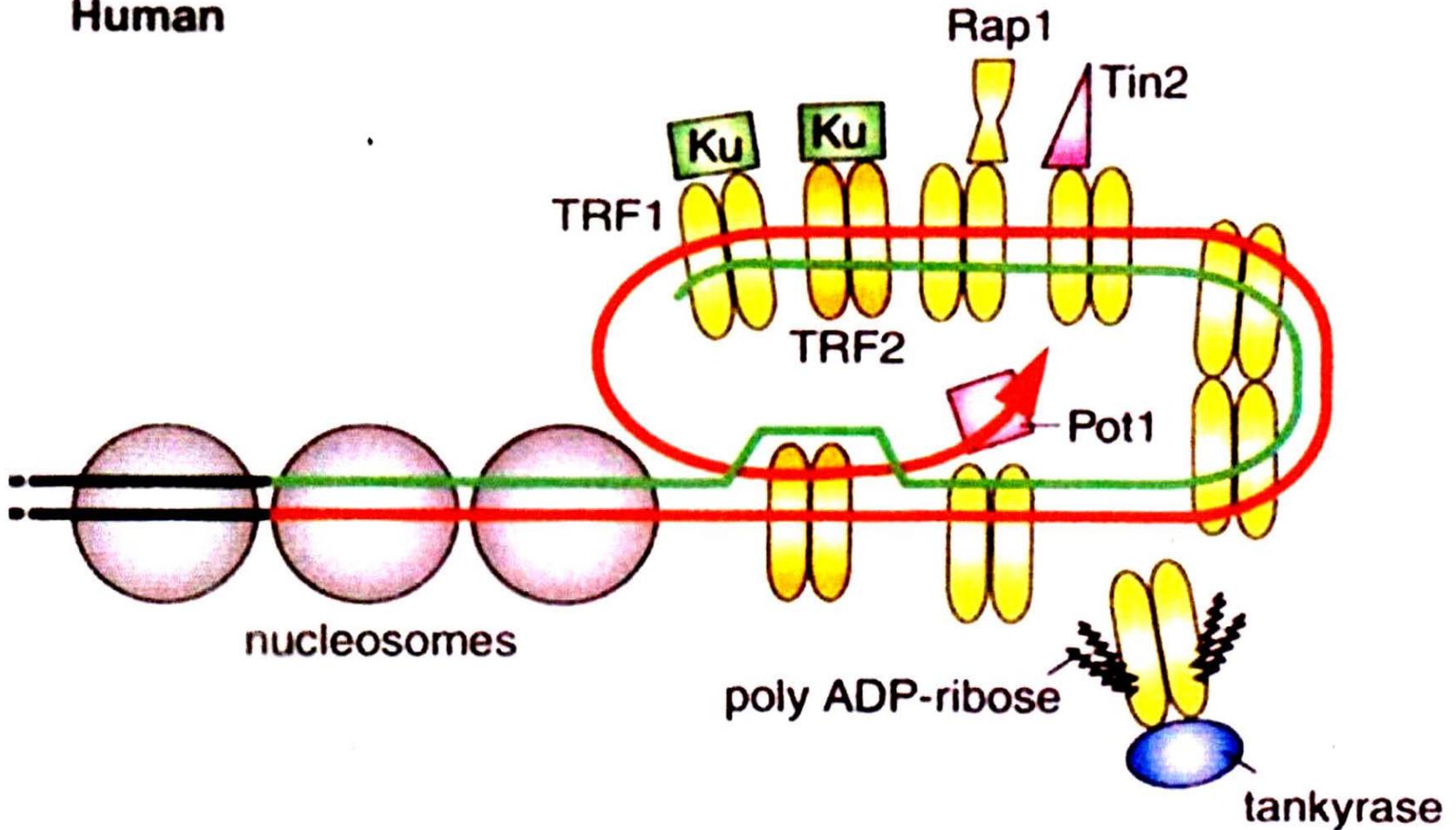


Белки, связанные с теломерами

- 1. Поддерживающие пространственную структуру теломер - семейство **TRF** и другие белки с телобоксом.
- 2. Обеспечивающие и регулирующие образование теломерного гетерохроматина, модулирующие активность генов, прилегающих к теломерам, путем их включения в гетерохроматин - **Rap, Sir, Rif**. гистоновые ацетилазы, метилтрансферазы и др.
- 3. Отвечающие за подготовку теломер к репликации и взаимодействию с теломеразой - танкираза и белки, регулирующие непосредственно теломеразу: **PinX1**, комплекс **Stn1/Cdc13/Ten1** у дрожжей.
- 4. Осуществляющие репарацию повреждений теломер и, возможно, негативно регулирующие их длину, т.е. нуклеазы - **Rad50/Mre11/NBS1** и **Ku**.
- 5. Передающие информацию о защите или повреждениях теломер в другие субклеточные компартменты, инициирующие клеточное старение и апоптоз - **ATM, p53, p16INK4, pRb** и другие белки сигнальных путей, регулирующих пролиферацию.

Теломерные белки у человека

Human



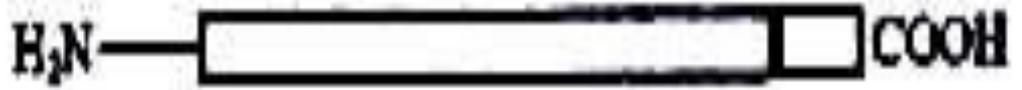
Белки, связанные с теломерами в клетках человека

- **TRF1** - **Telomere repeat binding factor 1 (Pin2)**. Негативный регулятор длины теломер. Препятствует действию теломеразы.
- **TRF2** - **Telomere repeat binding factor 2**. Защищает теломеры от слияния друг с другом путем образования **t**-петли.
- **TNKS** - **Танкираза 1** - человеческая теломерная поли(АДФ-рибозо) полимераза (**PARP**). Риболизует и тем самым дезактивирует **TRF1** (и, вероятно, удаляет с теломер **TIN2**) и т.о. способствует удлинению теломер в раковых и других клетках, где функционирует теломераза.
- **TIN2** - **TRF1-interacting nuclear protein 2**. Отрицательный регулятор длины теломер, препятствующий присоединению теломеразы
- **Pot1** - **Protection of telomeres** - защищает **G**-богатую нависающую однонитевую теломерную ДНК.
- **Rap1** - **Repressor-activator protein** присоединяется к **TRF2**, взаимодействует с С-концом белка. При образовании **t**-петли белок **Rap1**, возможно, образует поперечные сшивки с теломерной и даже субтеломерной ДНК, чем и удерживается **t**-петля.

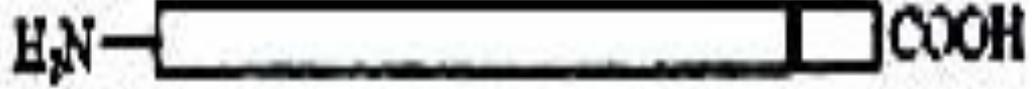
Белки TRF1 и TRF2



TRF1



TRF2



TERF

MYB

TRF 1

- Резкое увеличение концентрации TRF1 при его экспрессии в культуре клеток под вирусным промотором приводит к преждевременному вступлению в митоз и последующей гибели клетки - TRF1 необходим для упаковки митотических хромосом. Чтобы отложить митоз, например, когда ДНК нуждается в репарации, этот белок может быть фосфорилирован протеинкиназой ATM; той же самой протеинкиназой, которая активирует p53 и индуцирует апоптоз и клеточное старение по p53-зависимому механизму
- Ингибирование TRF1 в клетках, экспрессирующих теломеразу, сопровождается медленным увеличением длины теломер
- Очевидно, TRF1, способствуя образованию t-петли, тем самым препятствует удлинению теломер за счет теломеразной активности
- Механизм действия TRF1 на теломерах вряд ли заключается только в закручивании ДНК в суперспираль и облегчении последующего образования t-петли. Благодаря взаимодействию с множеством регуляторных белков, TRF1 может концентрировать их близ теломер.

TRF 1

- Первое сообщение о белке **TRF 1** (Telomeric repeat binding factor 1) было опубликовано в 1992 г. В 1997 г. определена его аминокислотная последовательность. Есть два продукта одного и того же гена, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга РНК; **TRF1**, а другой **Pin2**. Хотя расчетные молекулярные массы продуктов составляют 50 и 48 кДа соответственно, их кажущиеся массы, определяемые при электрофорезе, — 63 и 61 кДа.
- На С-конце этой молекулы имеется ДНК-связывающий домен типа Mub. Чтобы белок взаимодействовал с нуклеиновой кислотой, необходима олигомеризация полипептидов, для которой служит **TRF** домен. По данным электронной микроскопии, тетрамер **TRF1** с высокой специфичностью связывает до 12 теломерных повторов ДНК позвоночных. В отношении однонитевой ДНК, расположенной на конце теломер человека TRF1 не активен. В насыщающей концентрации этот белок покрывает теломеры как сплошная оболочка 10-нм толщины. Каждая молекула **TRF1** изгибает ДНК под углом около 120°, что указывает на роль этого белка в образовании пространственной структуры теломер. В последовательности ДНК белок связывает два сайта 5'-TAGGGTT-3', которые могут быть расположены на разном расстоянии и под разным углом, в связи с чем предполагается, что ДНК-связывающие участки **TRF1** связаны с остальной частью белковой молекулы регионами, обладающими повышенной эластичностью.

TRF2

- Белок **TRF2** был найден в конце 90-х годов. По структуре он сходен с **TRF1**, но его TRF домен не взаимодействует с гомологичным доменом **TRF1**, так что оба белка в клетке могут существовать в виде гомо-, но не гетеромеров. У **TRF2**, как и у **TRF1**, в результате альтернативного сплайсинга образуются два варианта, 65 и 69 кДа.
- На теломерах белок **TRF2** связывается в существенно меньшем количестве, чем **TRF1**. Для связывания **TRF2** на конце хромосомы необходим однонитчатый участок теломерной ДНК длиной не менее одного повтора из шести нуклеотидов TTAGGG. Наличие более одного повтора в однонитчатом участке улучшает связывание. Добавленный в избытке этот белок связывается на теломерах в количестве не менее 3, а в среднем около 10 димеров. **TRF2** расположен в узле, образующемся в точке касания конца теломер со «стволом».
- Ингибирование **TRF2** может приводить к активации **ATM/p53**-зависимого пути ответа клетки на повреждение ДНК и затем к апоптозу.
- Функция белка **TRF2** - защита хромосомы от нуклеаз, слияния и последующих разрывов при митозе.

TRF2

- Пороговая для сенильного торможения пролиферации длина теломер у контрольных клеток составляет 6—7 тыс. пар нуклеотидов. При экспрессии большого количества **TRF2**, этот порог на 2—2,7 тыс. пар оснований ниже, что позволяет клеткам пройти еще около 15 делений, прежде чем наступает старение.
- В клетках с критически короткими теломерами, сенильных или мутантных по **p53** и **pRb**, повышенная экспрессия **TRF2** предотвращает слияния и разрывы хромосом. Это значит, что не длина теломер важна для индукции клеточного старения, а их состояние, связанное с защитной функцией белка **TRF2**. Сенильные теломеры могут быть недостаточно длинными для маскирования конца хромосомы в узловой точке t-петли, но при повышенной концентрации **TRF2** вероятность образования нормальной t-петли возрастает.
- У животных рецепторы инсулина и факторов роста могут контролировать теломеры через танкиразу. Короткие теломеры могут передавать информацию о своем состоянии на сигнальный путь, начинающийся от рецепторов факторов роста и ведущий к танкиразе. **p53** регулирует передачу сигнала от указанных рецепторов через адапторный белок **p66-Shc**. Мутации в генах **p53** и **Shc** могут приводить к изменению продолжительности жизни мышей

TNKS и TNKL

- У человека и позвоночных животных имеется два изоэима танкиразы, (142 и 127 кДа в немодифицированном состоянии), TNKL или танкираза 1 и TNKS или танкираза 2. Кроме энзиматического домена, гомологичного соответствующему домену PARP, у танкиразы имеется большой анкириновый домен, состоящий из 24 повторов, а так же SAM домен; оба участвующие в различных белок-белковых взаимодействиях. Ни один из изоэимов не имеет собственного сигнала ядерной локализации, поэтому большая часть фермента находится в цитоплазме. Танкираза фосфорилируется и активируется **MAP-киназой**. **MAP-киназа** через сигнальный путь **Ras-MAPK** регулируется **инсулином и факторами роста**; поэтому следует предположить, что с помощью танкиразы организм держит теломеры всех клеток под контролем гормонов.

TRF 1

- **TRF1** может быть поли-ADP-рибозилирован, что сопровождается его диссоциацией от ДНК. Эту посттрансляционную модификацию катализирует танкираза (теломерная анкириновая поли-ADP-рибоза-полимераза), Это партнер TRF1, вместе с ним проникающий в ядро в неактивном состоянии. После активации танкираза подвергает поли-ADP-рибозилированию себя и **TRF1**, что приводит к распаду нуклеопротеидного комплекса и освобождению теломер. В результате последние могут быть доступны для теломеразы и других ферментов.
- **TNKL** (танкираза 1) и **TNKS** (танкираза 2)

Белки, взаимодействующие с TRF1

- Теломерный белок **TINF2** или **TIN2 (TRF1 intracting nuclear factor 2)** - 40кДа, по структуре напоминает белки TRF, так как имеет ДНК-связывающий домен типа Myb на С-конце. TINF2 опосредует действие TRF1.
- **TRF1** связывает мощный ингибитор теломеразы, белок **PinX1**, который действует непосредственно на фермент, в отличие от остальных модуляторов, влияющих на доступность теломер.
- с **TRF1** взаимодействует **Pot1** (71 кДа), который защищает особенно уязвимую со стороны нуклеаз, облучения и химических агентов однонитевую ДНК, (**Protection of telomeres**). Влияя на связывание Pot1, белок TRF1, концентрация которого пропорциональна длине теломер, передает на однонитевые концы информацию об общей протяженности теломерной ДНК.

Теломерная теория старения объясняет многие давно известные, но без нее непонятные факты

- 1. Почему злокачественные клетки делятся неограниченно
- 2. Почему наши дети начинают стареть каждый раз с нуля, а не с того уровня, до которого успели постареть их родители и их клетки к моменту зачатия
- 3. Связь старения с размножением («В чем смысл жизни?») и возможность «бессмертия», предоставляемая природой всем живым организмам. Ограниченные возможности клонирования.

Трудности теломерной теории

- 1. Теломеры в клетках мыши ~ в 10 раз длиннее, чем в клетках человека, но мышь живет не более 3 лет, а человек - заметно больше.
- 2. Длина теломер в фибробластах человека и их пролиферативный потенциал не отчетливо коррелируют с возрастом донора.
- 3. Хромосомы фибробластов глубоких стариков сохраняют в среднем достаточно длинные теломеры.

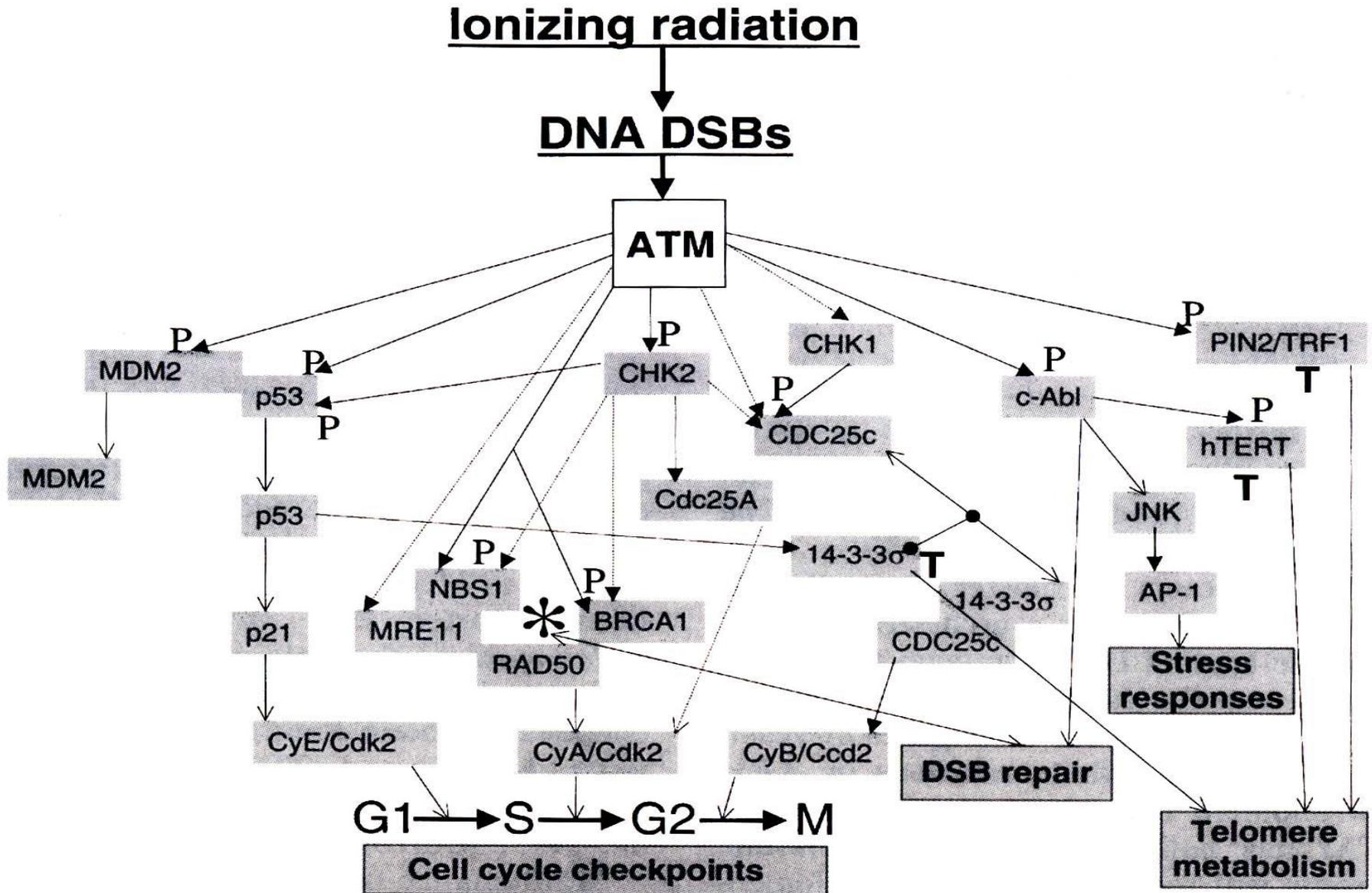
Возможное объяснение трудностей теломерной теории старения

- Для старения и смерти от старости вовсе не обязательно, чтобы лимит Хейфлика исчерпался во **всех** тканях организма. Достаточно истощения пролиферативного потенциала в каком-то отдельном участке какого-либо органа или ткани. Это повысит вероятность одной из характерных возрастных болезней. Совокупность этих болезней и есть старение. Никто не умирает от самого увеличения возраста. Люди умирают от болезней, вероятность которых с возрастом увеличивается. Таких болезней, являющихся самыми частыми причинами смерти, немного: рак, инсульт и сердечная недостаточность (инфаркт). Они приводят к смерти чаще всего в возрасте до 70 лет. Если человеку повезло избежать этих заболеваний, он вполне может прожить до 100 лет и скончаться от истощения пролиферативного потенциала в других тканях – коже, мышцах, и т.д. – это ведет к постепенному одряхлению (*senescence*) и смерти в глубокой старости.

Репарационные белки, связанные с теломерами

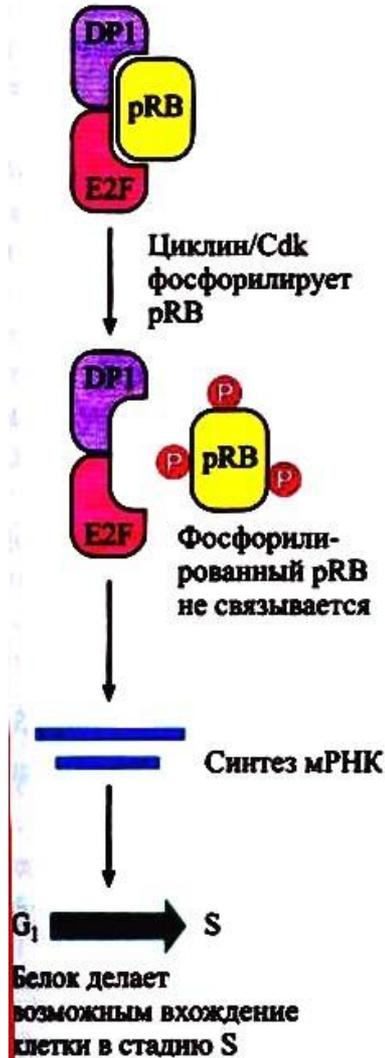
- **Ku** (состоит из субъединиц Ku 70 и Ki 80(86) - аутоантиген, участвующий в репарации двунитевых разрывов ДНК, путем негомологичного соединения концов. Присоединяется к TRF1. Способствует работе теломеразы. В отсутствие Ku происходят слияния теломер-теломер.
- **RAD50 (Rad50) Radiation mutant 50** - постоянно присутствует в теломерах.
- **MRE11 meiotic recombination 11**
- **NBS1** -Nijmegen breakage syndrome 1 экспрессируется только в S-фазе цикла.
- **АТМ-киназа** (Ataxia-telangiectasia mutated)-киназа - фосфорилирует **NBS1(нибрин)**, активируя изменение ДНК на концах теломер, что делает ее доступной для теломеразы. Мутация по гену АТМ вызывает одну из болезней старения - атаксию-телеангиэктазию (синдром Луи-Барр).
- **DNA-РКcs** – ДНК-зависимая протеинкиназа

Влияние ATM



Роль белка ретинобластомы в клеточном цикле

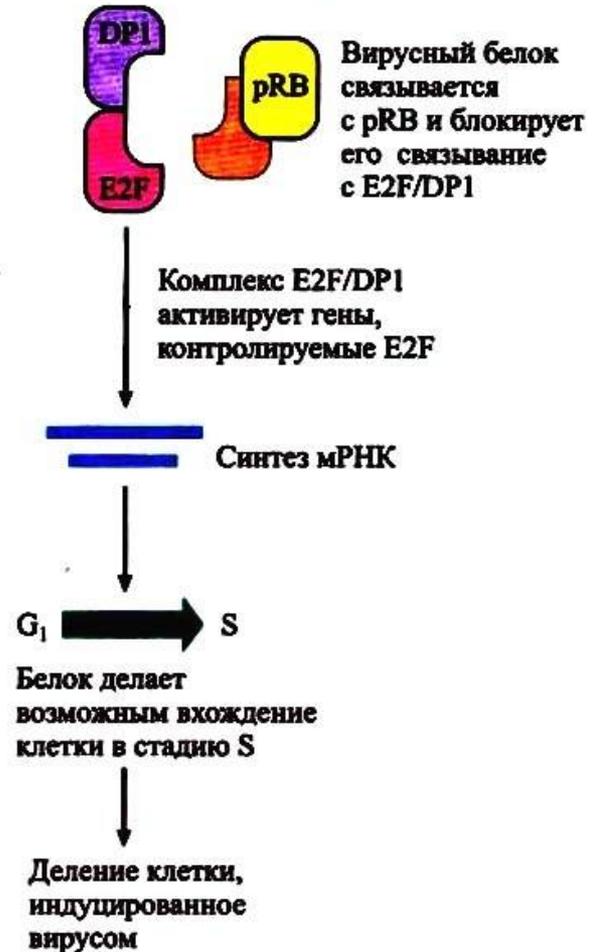
а Нормальная клетка



б Клетка, гомозиготная по мутации Rb

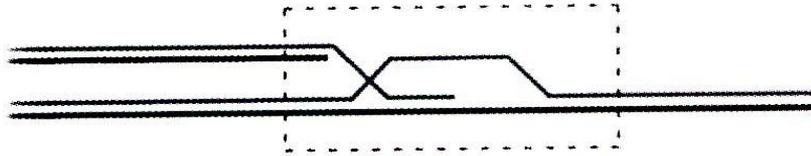


в Клетка, инфицированная ДНК онкологических вирусов

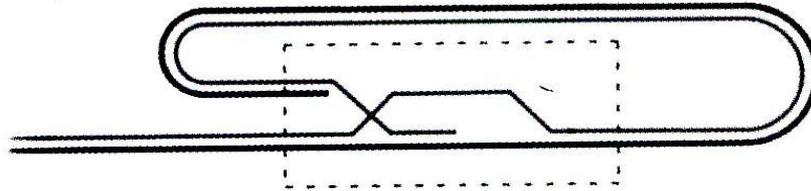


Репликация теломер, зависящая от гомологической рекомбинации при ALT

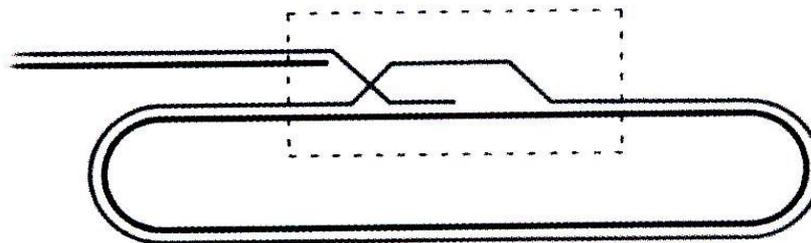
Intertelomeric



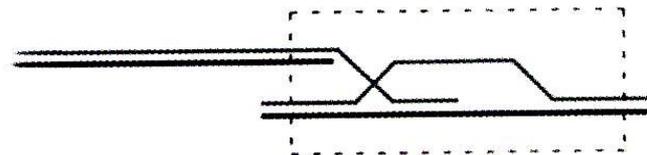
T-loop



Rolling Circle



ECTR



- Возможны четыре различных механизма, в зависимости от вовлеченных в образование D-петли ДНК-структур:
- 1. Внутрителомерная ДНК
- 2. Т-петля
- 3. Кольцевая ДНК
- 4. Extrachromosomal telomeric repeats (ECTR)
- Все эти структуры имеют локальное сходство и связаны со сходными механизмами. Отстающая нить может иметь матрицей для синтеза D-петлю с последующим кроссоверным разрешением или вновь синтезированный 3'-конец с последующей миграцией нити

Белки, вовлеченные в процесс альтернативного удлинения теломер и находящиеся во внутриядерных PML-тельцах

- **RAD52** – Связывается с двунитевыми концами ДНК и способствует активности RAD51. Колокализуется в общих фокусах с RAD51 и с MRE11/RAD50, которые образуются во время репарации двунитевых разрывов. В клетках *S. Cerevisiae* RAD52 необходим для гомологической рекомбинации, вовлеченной в оба известных пути выживаемости безтеломерных штаммов, а также для образования миниколец рибосомальной ДНК
- **RAD51** – RecA-подобный белок, способный к перемещению нити ДНК, вовлеченный в репарацию одно- и двунитевых разрывов ДНК с участием гомологической рекомбинации. Ассоциируется с белками RPA, BLM и PML, образуя фокусы в районе разрывов ДНК и внепланового синтеза. У дрожжей Rad51 белковый комплекс необходим для генной конверсии, когда донорная ДНК транскрипционно неактивна (подавлена) и вовлечен только в путь I выживаемости безтеломерных штаммов

Белки, вовлеченные в процесс альтернативного удлинения теломер и находящиеся во внутриядерных PML-тельцах (2)

- **MRE11/RAD50/NBS1 (MRN-комплекс)** – Функционально значим для репарации двойных разрывов ДНК обоими путями, для поддержания геномной стабильности и чекпойнт-контроля S-фазы. В нормальных клетках находится в течение всего клеточного цикла в области теломер. MRE11 *in vitro* является 3'-5' ДНК-эксонуклеазой и односторонней ДНК-эндонуклеазой. Сочетание этих активностей с ДНК-геликазным действием RAD50 может быть востребовано в эксонуклеазной деятельности *in vivo*. NBS1 ответственен за фосфорилирование и активацию всего комплекса, хотя обычно находится в комплексе только в S-фазе. Его локализация в PML-тельцах может служить доказательством активного синтеза ДНК в них. У дрожжей RAD50 необходим для II пути выживаемости безтеломерных штаммов, а гомологи MRN участвуют в рекомбинации.
- **RPA** - Белок, связывающийся с односторонней ДНК, облегчающий раскручивание ДНК и модулирующий активность других белков. Играет основную, а, возможно, и координирующую роль в репликации, рекомбинации и репарации ДНК. У дрожжей, дефектных по этому белку, сохраняются нормальные теломеры.

Белки, вовлеченные в процесс альтернативного удлинения теломер и находящиеся во внутриядерных PML-тельцах (3)

- **WRN и BLM** – Геликазы типа RecQ, вовлеченные в репликацию ДНК. Могут, в зависимости от контекста, облегчать или усложнять гомологическую рекомбинацию. Гомологичны Sgs1, RecQ-геликазе дрожжей, которая необходима для II пути выживаемости безтеломерных штаммов и является ключевым белком дрожжевого «старения». Способны связываться с 3'-концами и G-квадриplexами ДНК. BLM способен связываться с трех- и четырехнитевыми объединениями и взаимодействовать с топоизомеразой III и RPA.
- **P53** облегчает накопление BLM в PML-тельцах, но ингибирует экзонуклеазную активность WRN.
- **TRF1 и TRF2** – Специфически связывающиеся с теломерными повторами белки. Негативные регуляторы длины теломер, играют роль в структурной организации теломер и их связыванием с ядерным матриксом. Увеличение или уменьшение количества TRF1 может соответственно участвовать в контроле входа клетки в митоз и выхода из него. TRF2 вовлечен в поддержание стабильности теломер. Ингибирование его связывания с теломерами приводит к потере 3'-выступающего конца, слиянию теломер и активации P53-зависимого чекпойнта, вызванного повреждениями ДНК (G1).

Белки, связанные с теломерами

- 1. Поддерживающие пространственную структуру теломер - семейство **TRF** и другие белки с телобоксом.
- 2. Обеспечивающие и регулирующие образование теломерного гетерохроматина, модулирующие активность генов, прилегающих к теломерам, путем их включения в гетерохроматин - **Rap, Sir, Rif**. гистоновые ацетилазы, метилтрансферазы и др.
- 3. Отвечающие за подготовку теломер к репликации и взаимодействию с теломеразой - **танкираза** и белки, регулирующие непосредственно теломеразу: **PinX1**, комплекс **Stn1/Cdc13/Ten1** у дрожжей.
- 4. Осуществляющие репарацию повреждений теломер и, возможно, негативно регулирующие их длину, т.е. нуклеазы - **Rad50/Mre11/NBS1** и **Ku**.
- 5. Передающие информацию о защите или повреждениях теломер в другие субклеточные компартменты, инициирующие клеточное старение и апоптоз - **ATM, p53, p16, pRb** и другие белки сигнальных путей, регулирующих пролиферацию.

Гомологи белков человека, ассоциированных с теломерами

TRF1 TRF2	<i>Taz1 (Schizosaccharomyces pombe)</i>
TINF2	<u>AAH 30347</u> (<i>Mus musculus</i>)
-	<i>Tbf1 (Saccharomyces cerevisiae)</i>
Pot1	<i>Pot1 (Saccharomyces cerevisiae)</i>
-	<i>Cdc13 (Saccharomyces cerevisiae)</i>
Rap1	<i>Rap1 (Saccharomyces cerevisiae)</i>
TNKS	<u>NP 651410</u> (<i>Drosophila melanogaster</i>)
TNKL	<i>Sir1 (Saccharomyces cerevisiae)</i>
SIRT1-7	<i>Sir2 (Saccharomyces cerevisiae)</i> <i>Hst 1- 4 (Saccharomyces cerevisiae)</i>
-	<i>Sir3 (Saccharomyces cerevisiae)</i>

Гомологи белков человека, ассоциированных с теломерами (2)

-	Sir4 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<u>BAB143 13</u> hRif1	Rif1 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)
ALL-1/HRX/M LL	Set1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) COMPASS (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
ASH2L	Cps60
YAR003	Cps50
YPL138	Cps40
YKL018	Cps35
YBR175	Cps30
YDR469	Cps25
Dot1L	Dot1 (<i>Sachcaromyces cerevisiae</i>)

Гомологи белков человека, ассоциированных с теломерами (3)

ATM	Tel1 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)
Chk2	Tel2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) Clk2 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
Ки70	Hdf1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Ки80	Hdf2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
PinX1	PinX1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Rad50	Rad50 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Mre11	Mre11 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
NBS1	<u>AAP56684</u> (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>)
	Xrs2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

- при отсутствии функциональных характеристик вместо тривиального названия приводится лишь ссылка на номер гомологичной последовательности в базе данных Genbank.

SIRT-белки (сиртуины)

- Известно, что в клетках каждой ткани функционируют только те гены, которые экспрессируют белки, нужные для работы этой ткани. Остальные гены молчат. Их молчание обеспечивают специальные белки – сиртуины, или SIRT-белки (Silent Information Regulators). Химически это – гистоновые деацетилазы, которые экспрессируются генами *SIRT*.
- В ходе старения (вызываемого все-таки укорочением теломер), а также при повреждении ДНК, может изменяться экспрессия генов. В результате этих эпигенетических изменений сиртуины могут отсоединяться от локусов молчащих генов и перемещаться к поврежденным участкам ДНК, где способствуют их репарации (в этом – вторая функция сиртуинов). Освободившиеся от сиртуинов молчащие гены перестают быть молчащими, и экспрессируемые ими не нужные в данной ткани белки нарушают нормальную работу ее клеток, и тем способствуют ускорению старения и дополнительно изменяют экспрессию генов, что в свою очередь способствует освобождению от сиртуинов новых ранее молчавших генов, и тем еще более ускоряют старение, и т.д. (порочный круг).
- Т.о., разблокирование молчащих генов в результате отсоединения сиртуинов – не самостоятельный механизм старения, а результат укорочения теломер.

сиртуин	внутри-клеточная локализация	известная активность	субстраты	функции	Патология (Sirtp-/-)
Sirt1p	ядро	деацетилаза ADPR	NF-κB , Ku70 и другие	метаболизм, стресс	дефект развития
Sirt2p	цитозоль	деацетилаза ADPR	Tubulin , H4 и другие	клеточный цикл	норма развития
Sirt3p	митохондрии	деацетилаза ADPR	GDH , Complex I	термогенез, продукция АТФ	норма развития
Sirt4p	митохондрии	деацетилаза ADPR	GDH	секреция инсулина	норма развития
Sirt5p	митохондрии	деацетилаза ADPR	CPS1	цикл мочевины	норма развития
Sirt6p	ядро	деацетилаза ADPR	H3 , NF-κB	BER, стресс	старение
Sirt7p	ядрышко	ADPR	Pol I	транскрипция rDNA	короткая жизнь

Таблица 1. Расположение и функциональные особенности сиртуинов млекопитающих.
(по Haigis et al., 2010.)

ADPR, АДФ-рибозилазная активность; **CPS1**, carbamoyl phosphate synthetase 1; **GDH**, glutamate dehydrogenase; **NF- κ B**, nuclear factor kappa B; **Pol I**, DNA polymerase I; rDNA, ribosomal DNA

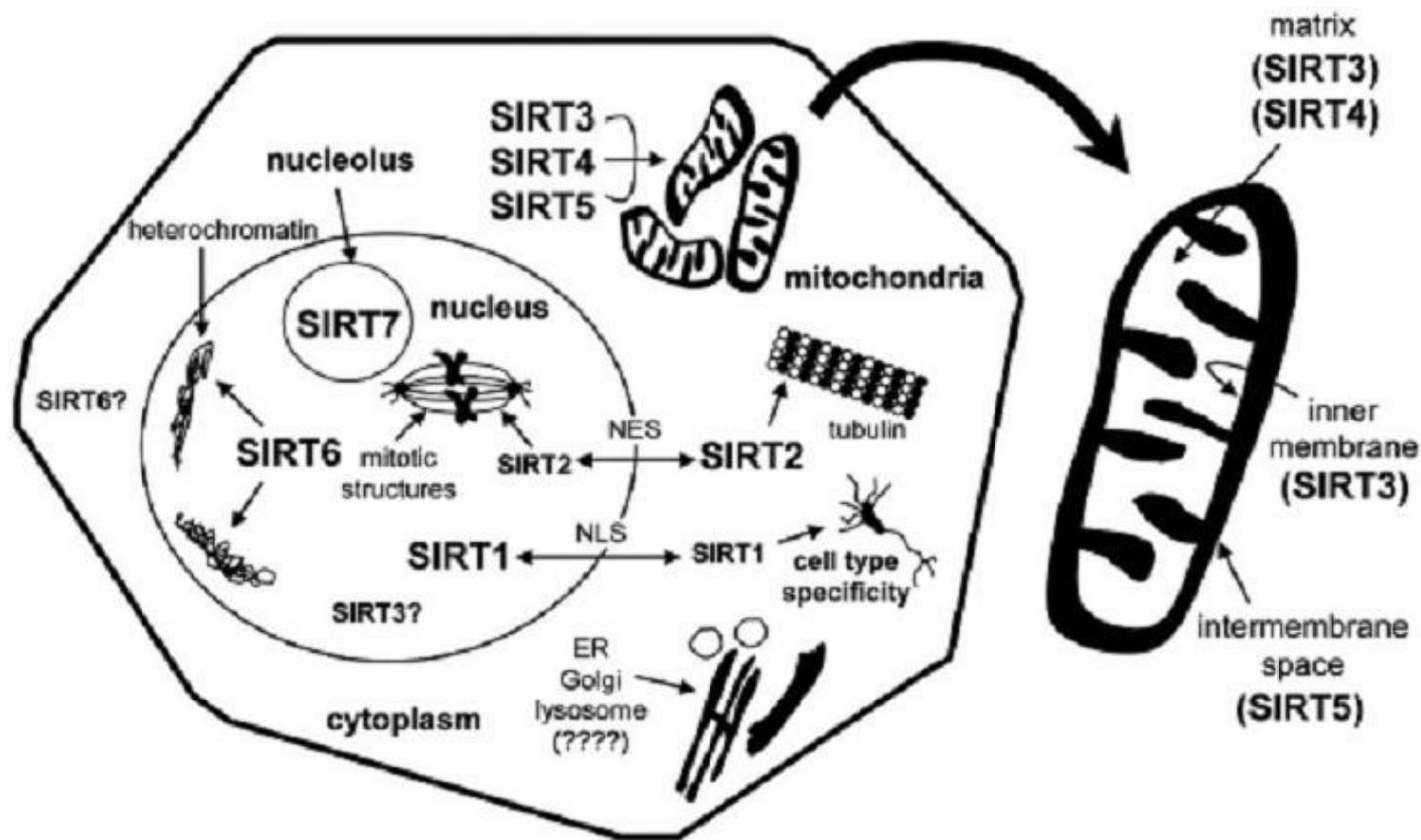


Рис.1. Внутриклеточная локализация сиртуинов, из Taylor et al., 2008, без изменений

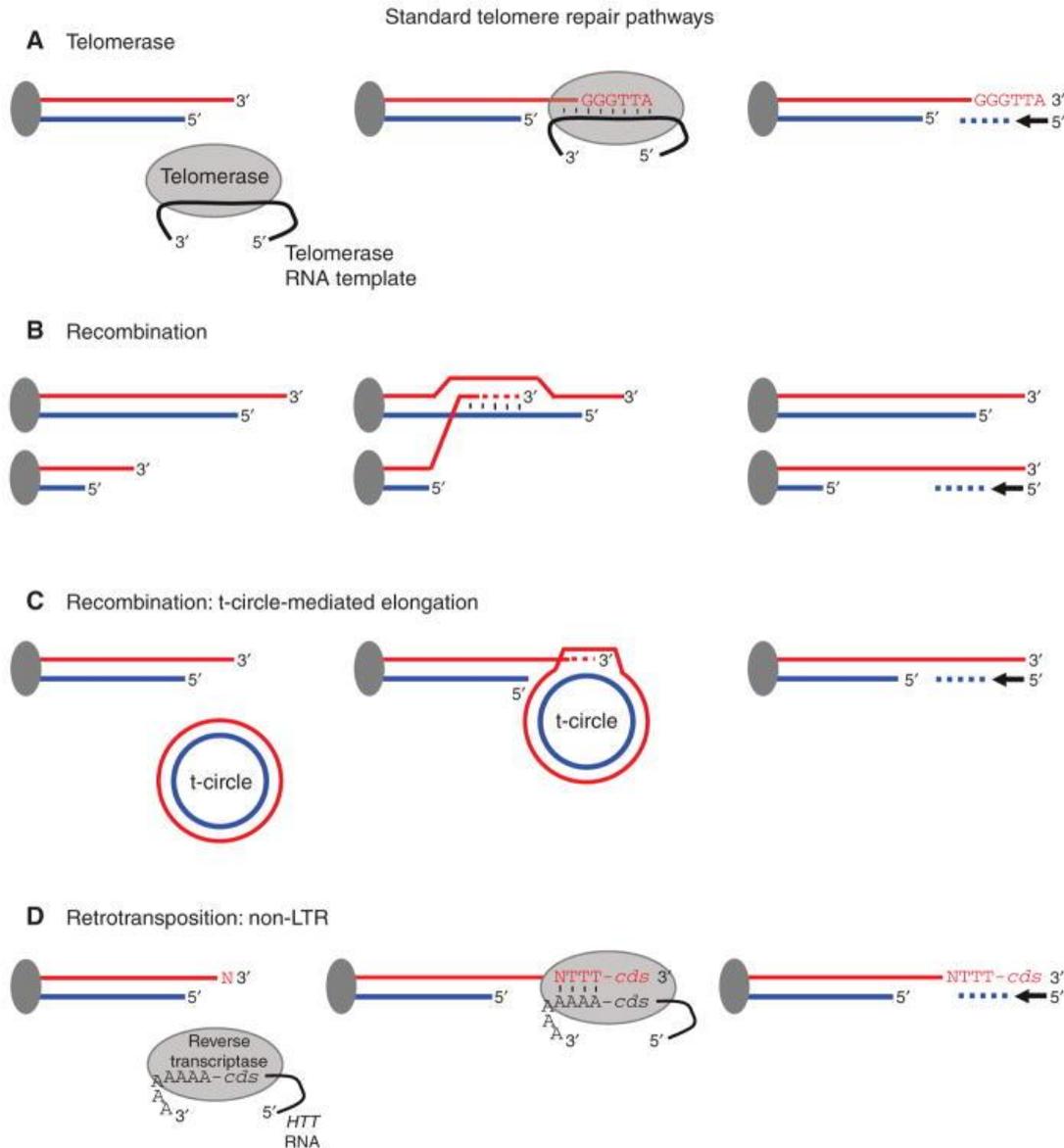
Недорепарация теломер

- теломерная ДНК повреждается в среднем сильнее, чем ДНК из внутренних областей хромосом.
- имеются сведения о почти полном отсутствии репарации при повреждении теломер.
- в теломерах неделящихся клеток в состоянии контактного торможения накапливаются однонитевые разрывы
- вероятно, теломеры являются универсальными аккумуляторами разнообразных повреждений, т.е. самым слабым местом в ДНК

Причины недорепарации

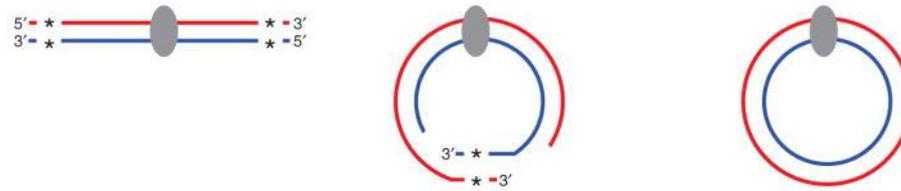
1. Репарация концов ДНК может встречать те же трудности, что и репликация.
2. Теломеры могут не репарироваться в том случае, если образующийся в результате двойного разрыва проксимальный фрагмент имеет достаточную длину, чтобы не индуцировать остановку пролиферации клеток.
3. Разрыв теломеры, в отличие от внутреннего разрыва, не ведет к потерям генов, а значит клетка с таким разрывом не элиминируется из популяции.

Репарация теломер

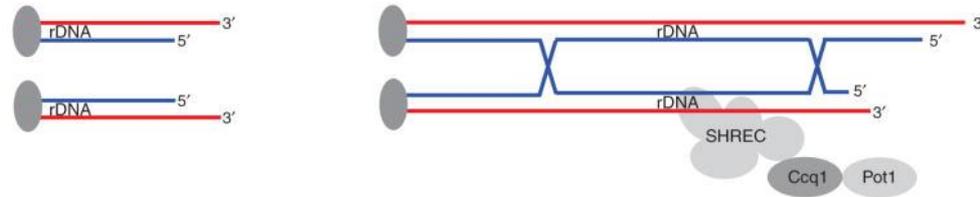


Baroque telomere repair pathways

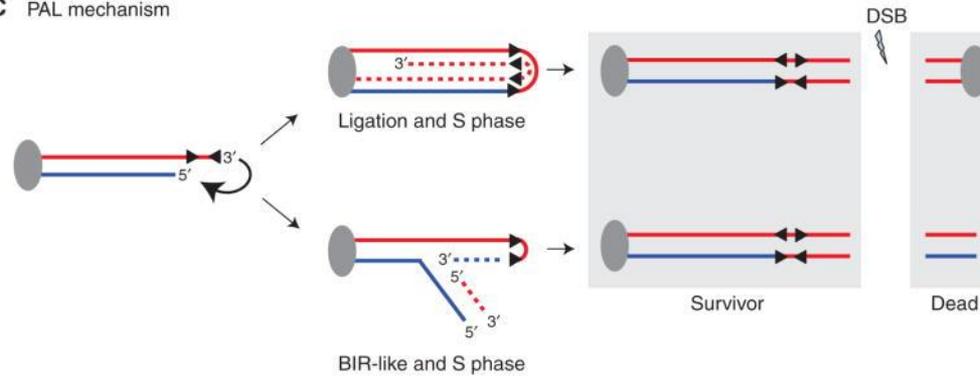
A SSA recombination: Chromosome circularization:



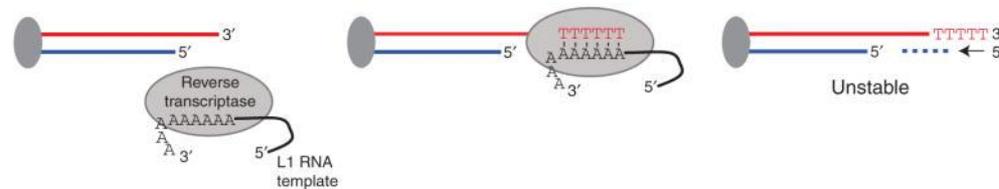
B Recombination: HAATI

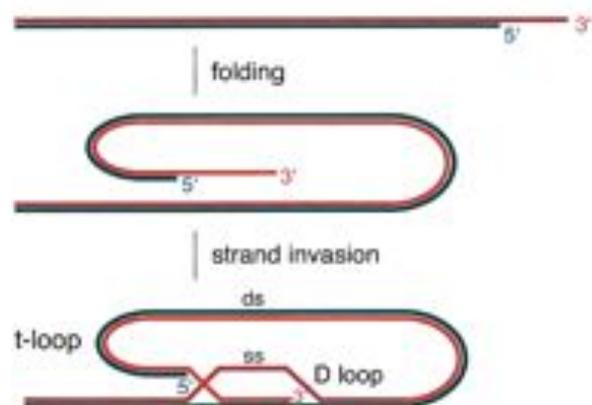
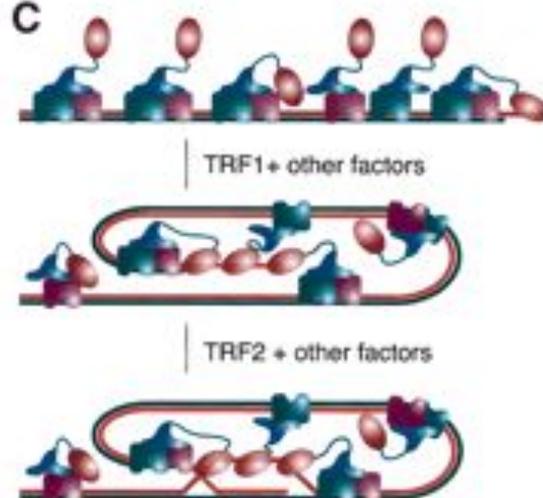
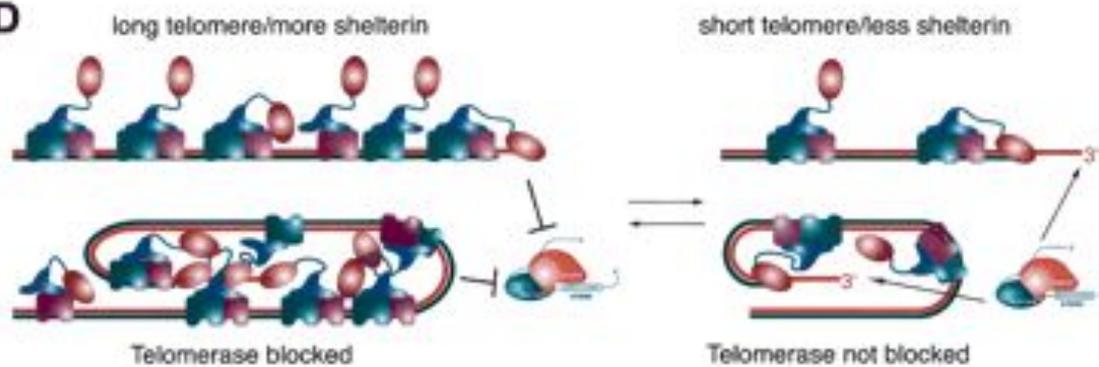


C PAL mechanism

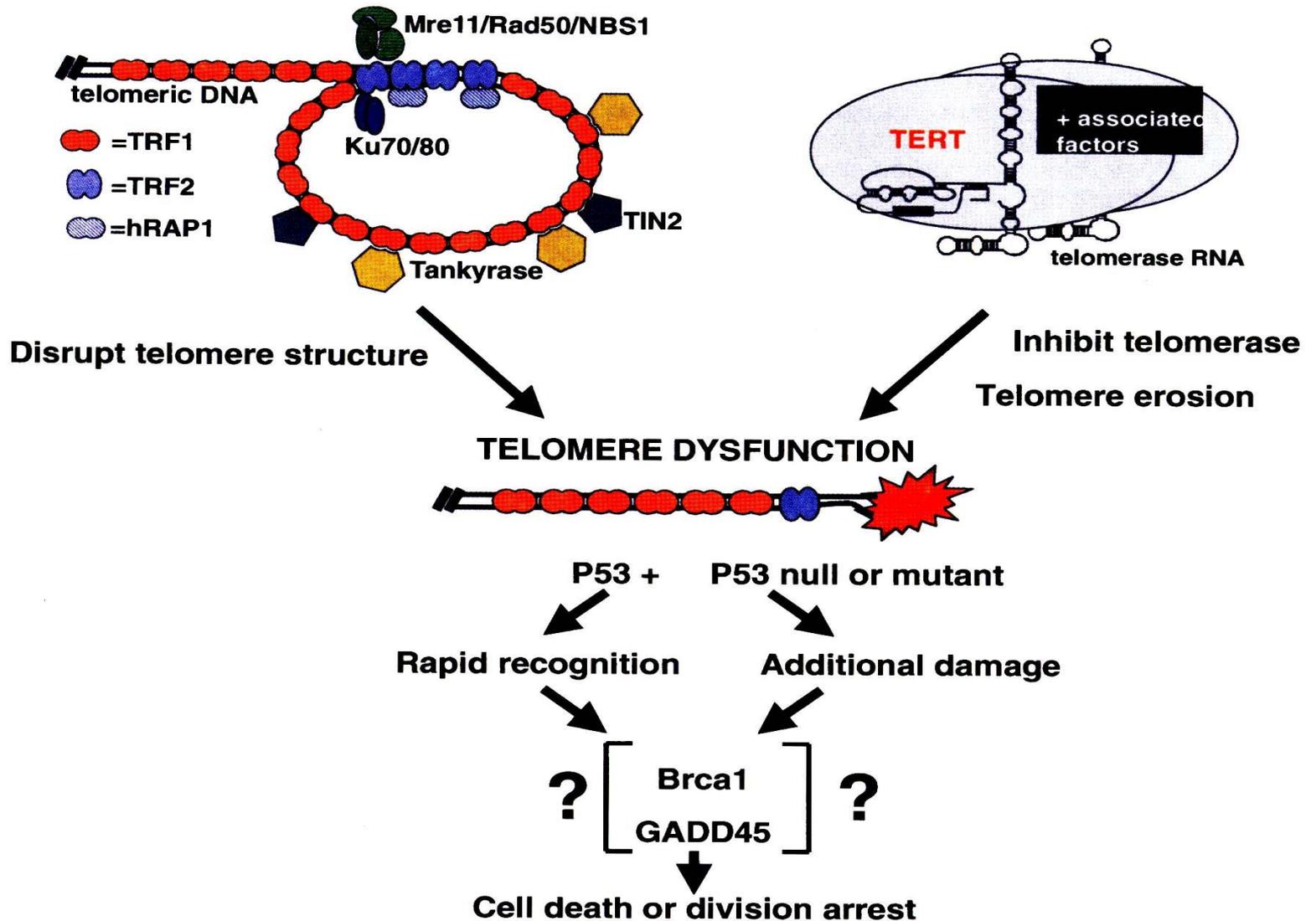


D Transposition: LINE-1



A**B****C****D**

Нарушение функции теломер



- "Senescence is provoked by many stimuli that have nothing of cell ageing" (появление признаков старения может быть вызвано многими причинами, не имеющими отношения к клеточному старению).

Роберт Вайнберг

- Поэтому необходимо различать старение клеток и различные варианты появления стареющего фенотипа.