



Возраст клеток как
фаза клеточного
цикла

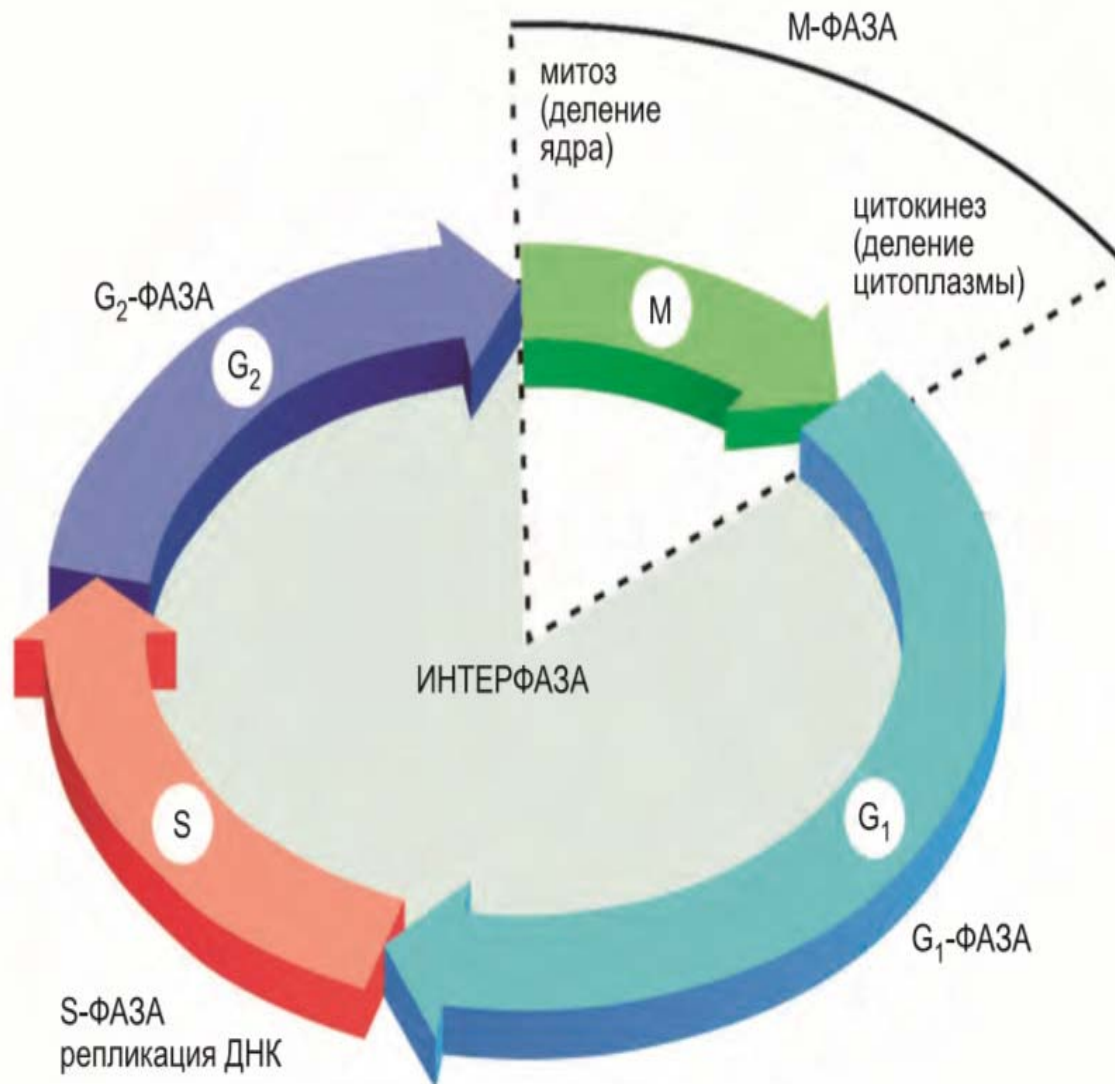
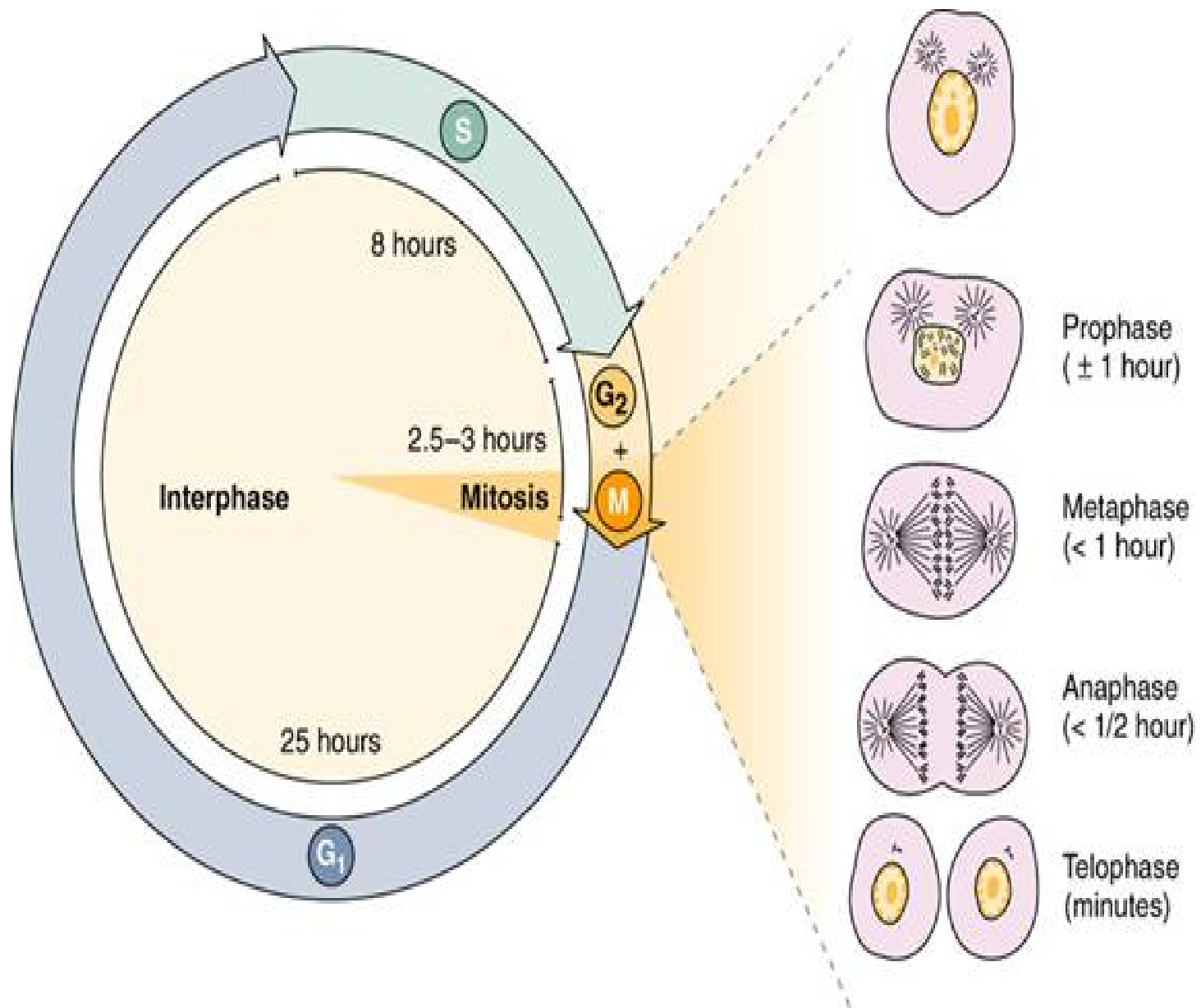


Рис. 17.4. Четыре фазы клеточного цикла. В большинстве клеток промежуточные фазы разделяют основные события S-фазы и М-фазы. G₁ — это промежуток между М-фазой и S-фазой, а G₂ — между S-фазой и М-фазой.



Предел Хейфлика



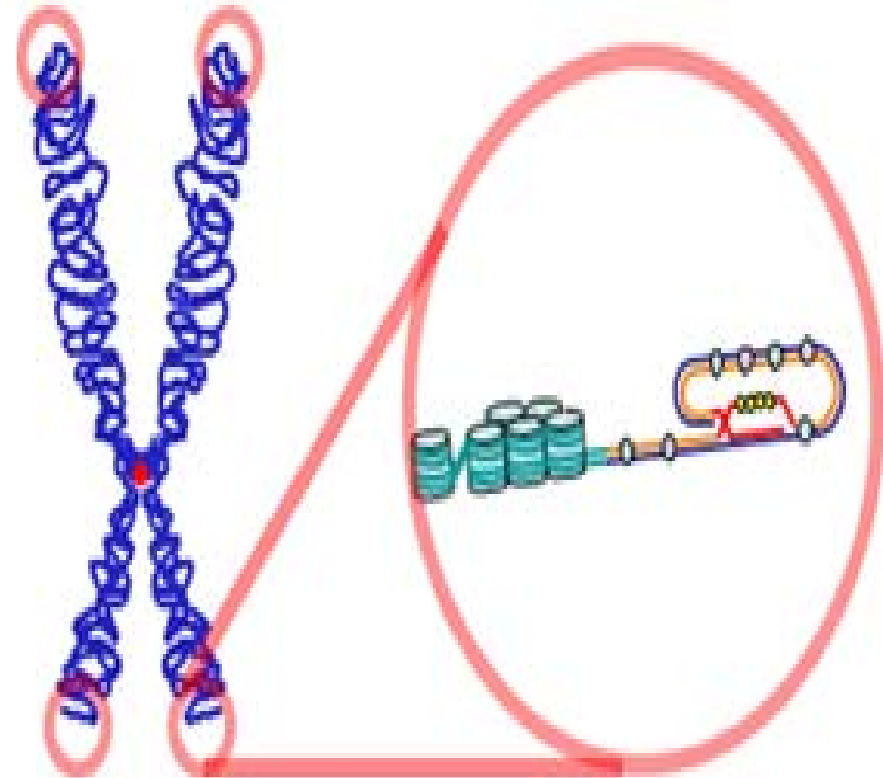
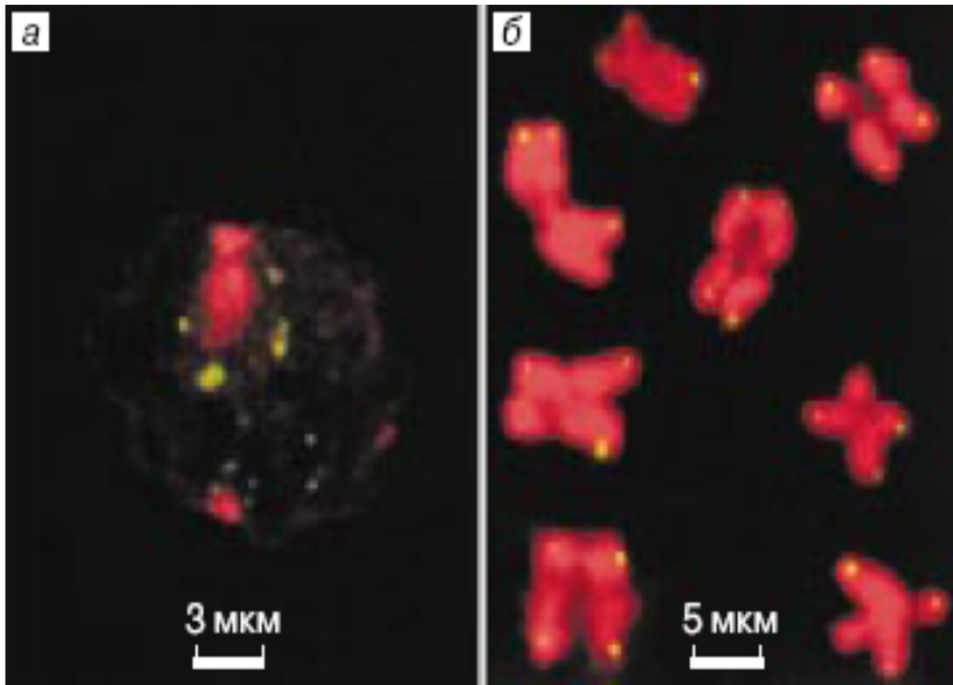
Леонард Хейфлик

В ходе проведенных Хейфликом экспериментов было выяснено:

- Клетки культуры фибробластов кожи человека делятся определенное конечное число раз (около 50)
- Если получить фибробласты от взрослого человека, то число делений клеток до гибели популяции оказывается меньше 50.
- С увеличением возраста донора на один год, количество возможных делений фибробластов в культуре уменьшается в среднем на 0.2. Итого, за 100 лет жизни человека репликативный потенциал фибробластов снижается только на 20 делений, а весь потенциал израсходуется только за 250 лет.
- Даже после глубокого заморозения, клетки делятся столько раз, сколько им оставалось делиться.
- Также была выявлена корреляция между видовой продолжительностью жизни животного и количеством делений его клеток в культуре.

Теломеры

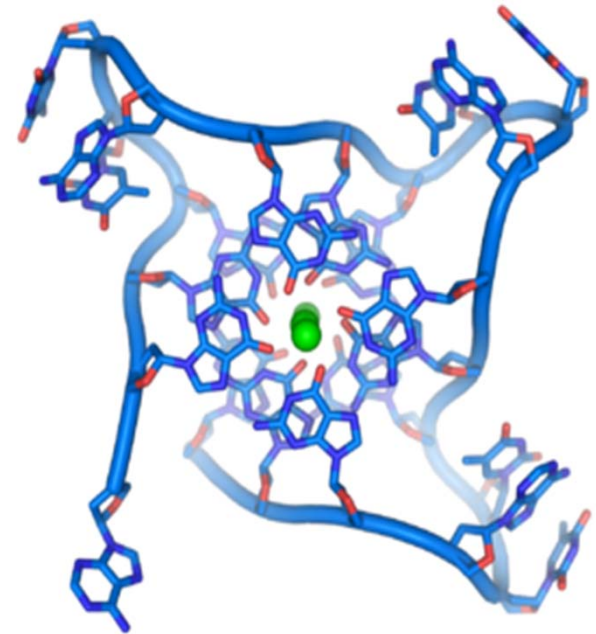
- Теломеры - некодирующие концевые участки хромосом, которые состоят из повторяющейся последовательности ДНК и комплекса белков.



Локализация теломер в клеточном ядре и на митотических хромосомах человека

Строение теломер

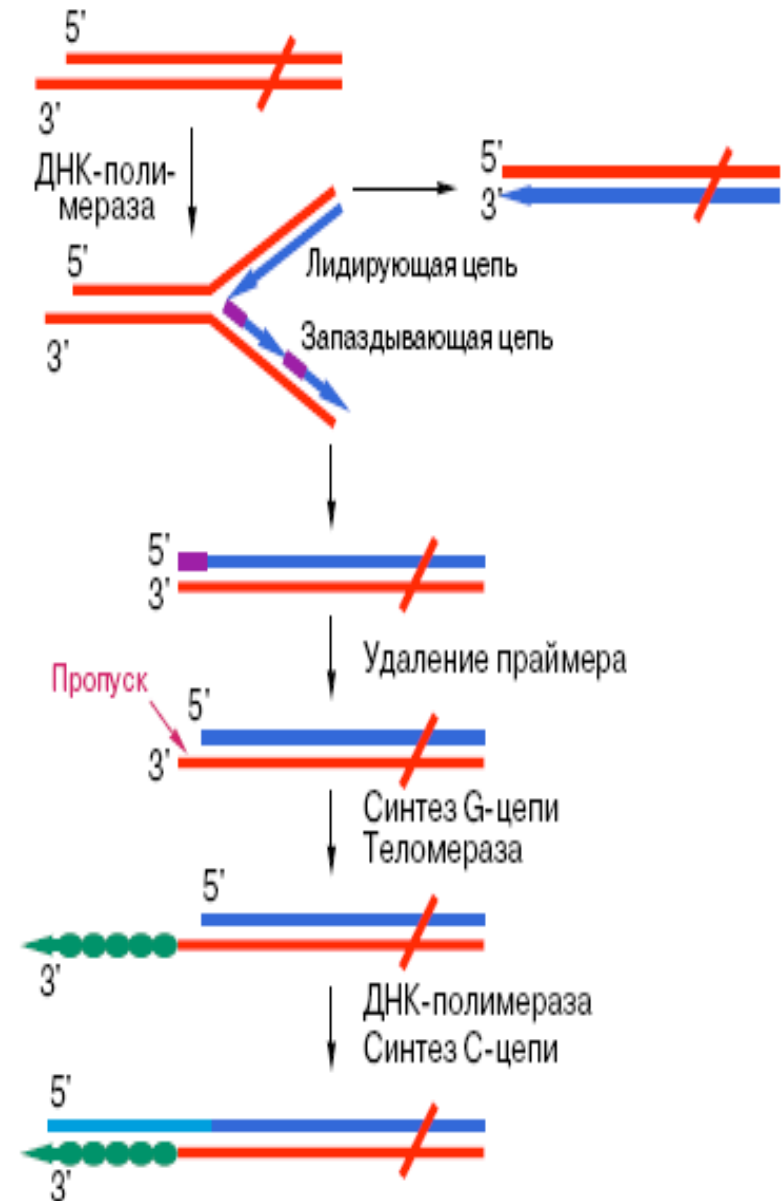
- В клетках человека теломеры обычно представлены одноцепочечной ДНК и состоят из несколько тысяч повторяющихся единиц последовательности ТТАГГГ. Эти последовательности с высоким содержанием гуанина стабилизируют концы хромосом, формируя очень необычные структуры, называемые G-квадруплексами и состоящие из четырёх взаимодействующих оснований. Четыре гуаниновых основания, все атомы которых находятся в одной плоскости, образуют пластинку, стабилизированную водородными связями между основаниями и хелатированием в центре неё иона металла (чаще всего калия). Эти пластинки располагаются стопкой друг над другом.



Структура теломер. Зелёным цветом показан ион металла, хелатированный в центре структуры

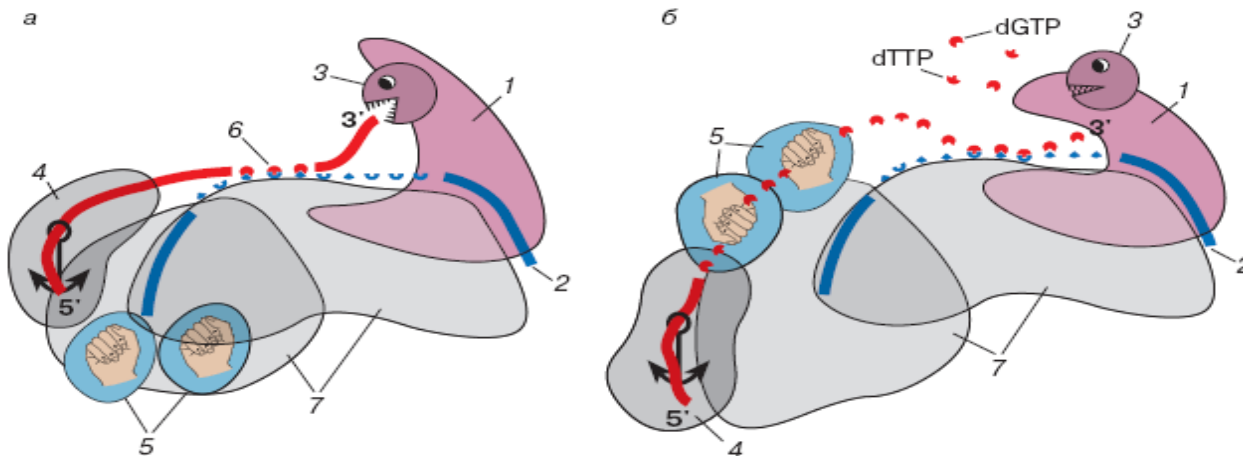
Концевая недорепликация ДНК

- ДНК-полимеразы, синтезируя дочернюю цепь ДНК, прочитывают родительскую цепь в направлении от ее 3'-конца к 5'-концу. Соответственно дочерняя цепь синтезируется в направлении 5' 3'. В противоположном направлении синтез цепи ДНК фермент катализировать не может.
 - ДНК-полимераза начинает синтез только со специального РНК-праймера - короткой РНК-затравки, комплементарной ДНК.
 - После окончания синтеза ДНК РНК-праймеры удаляются, а пропуски в одной из дочерних цепей ДНК заполняются ДНК-полимеразой. Однако на 3'-конце ДНК такой пропуск заполнен быть не может, и поэтому 3'-концевые участки ДНК остаются однотяжевыми, а их 5'-концевые участки - недореплицированными.
 - Отсюда ясно, что каждый раунд репликации хромосом будет приводить к их укорочению.
- Прежде всего должна сокращаться длина теломерной ДНК



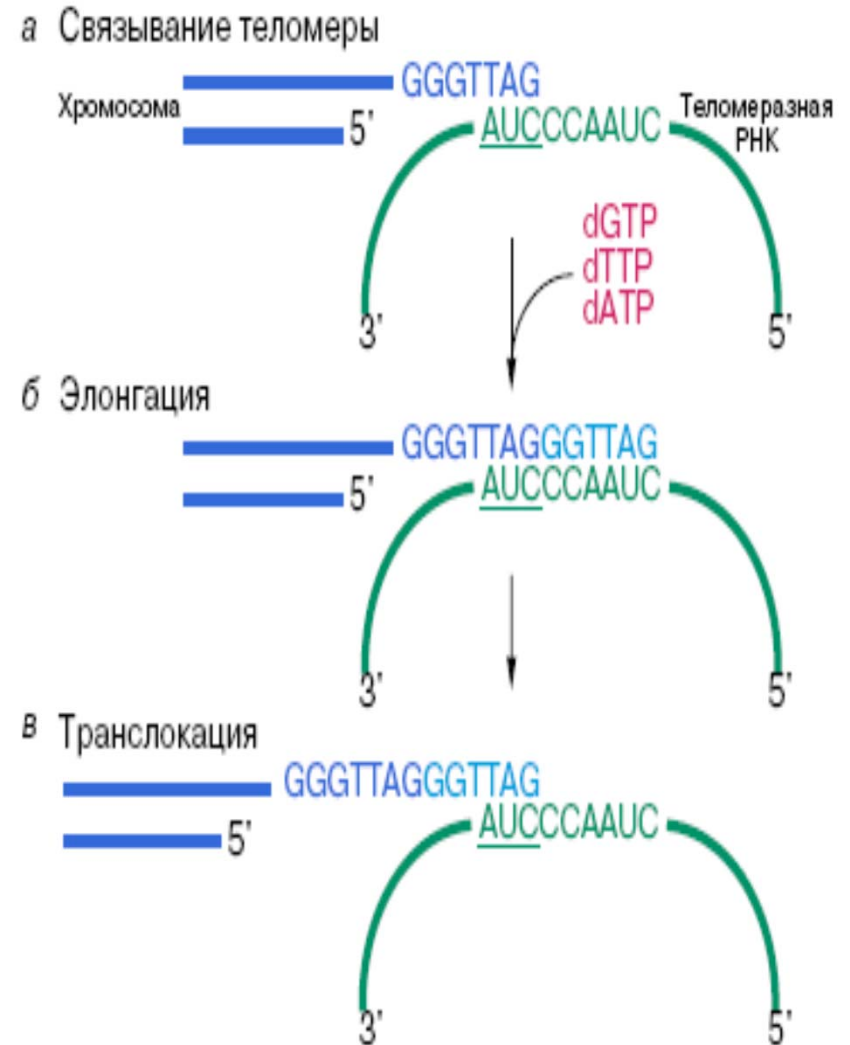
Теломераза

- Длина теломер напрямую связана с активностью теломеразы – фермента, который способен поддерживать их длину.
- Теломеразы являются рибонуклеиновыми ферментами. РНК-компонент теломераз содержит короткий район (матрицу), комплементарный одному повтору G-богатой цепи теломерной ДНК.
- Теломераза добавляет особые повторяющиеся последовательности ДНК к 3'-концу цепи ДНК на участках теломер.
- Длина теломерных участков хромосом увеличивается или сохраняется на постоянном уровне, компенсируя таким образом концевую недорепликацию и позволяя клетке делиться неограниченно долго.

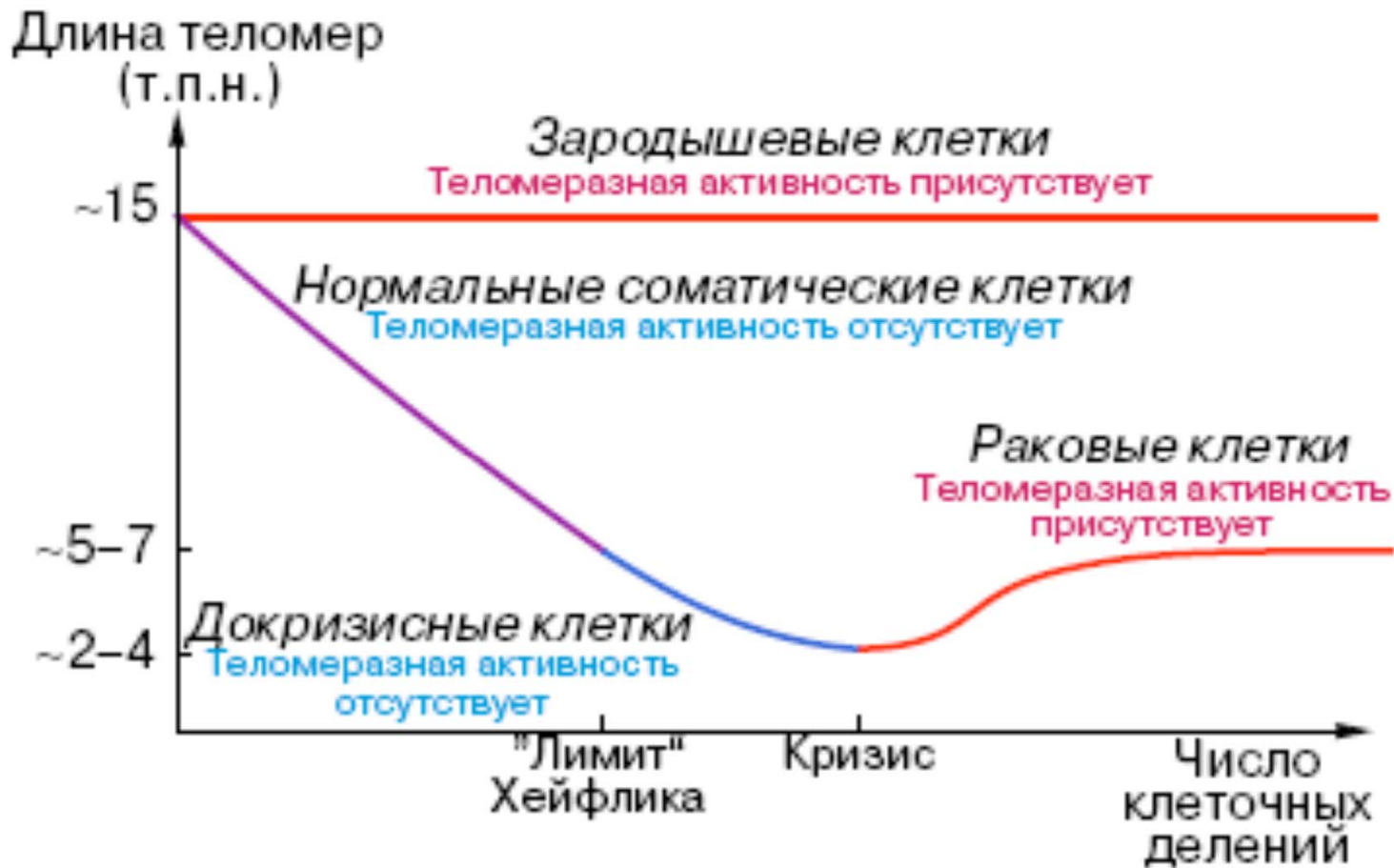


Механизм работы теломеразы

- Повторное копирование матрицы, включающее этап элонгации, когда дезоксирибонуклеотиды последовательно добавляются к 3'-концу G-богатой цепи теломеры
- Этап транслокации фермента на конец новообразованной цепи.
- В результате действия теломеразы образуется достаточно длинный 3'-конец, по которому затем достраивается комплементарная цепь. В итоге теломера становится длиннее.



Теломеразная активность в различных клетках



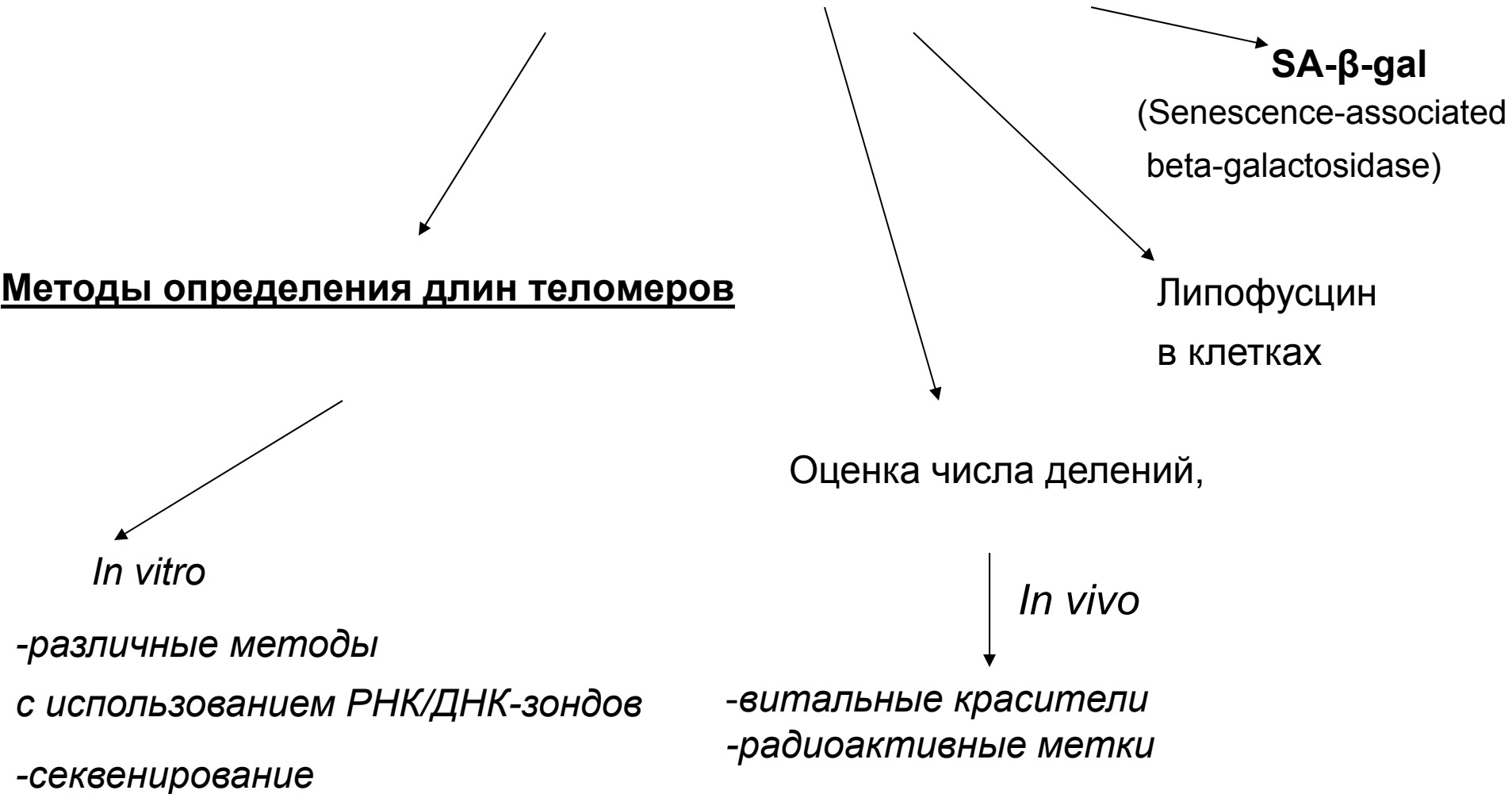
Теломеразная активность

- РНК-компонент теломеразы экспрессируется на постоянном уровне практически во всех клетках, и для индуцирования теломеразной активности необходима экспрессия белкового компонента, названного поэтому *каталитическим компонентом теломеразы*.
- Искусственно индуцированная экспрессия гена каталитического компонента теломеразы, делает клеточную культуру *иммортальной* (бессмертной), т.е. способной делиться неограниченно долго, отменяя тем самым для культуры предел Хейфлика.
- Теломераза экспрессируется в *стволовых, половых* и некоторых других типах клеток организма, которым необходимо постоянно делиться для функционирования определённых тканей.
- Клетки 85 % *раковых опухолей* обладают теломеразной активностью.
- В подавляющем большинстве соматических клеток человека на стадии раннего эмбриогенеза происходит выключение гена ее каталитической субъединицы (обратной транскриптазы), кодирующего теломеразу. Тем самым иницируется процесс прогрессивного укорочения теломер, или так называемого "репликативного" старения.
- Другие же составляющие теломеразы, включая теломеразную РНК, образуются в дифференцированных соматических клетках, хотя и в меньших количествах, чем в их "бессмертных" прародителях, но постоянно (или, как говорят, конститутивно).

Выводы

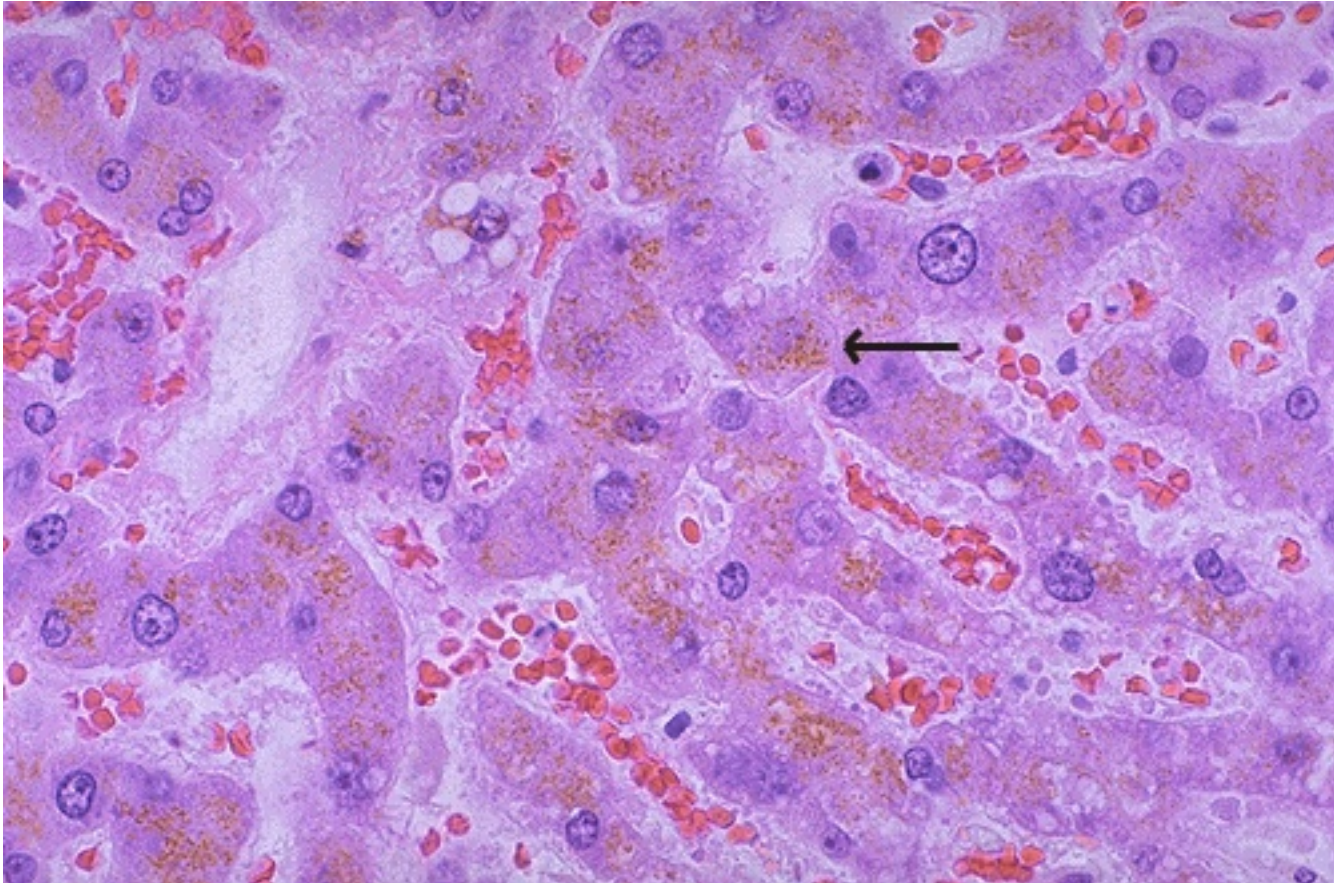
- Предел Хейфлика – максимально возможное число делений для большинства соматических клеток. Зависит от типа клетки и организма.
- Укорочение длины теломер с каждым делением клетки является ограничителем пролиферативного клеточного потенциала.
- Теломеры неизбежно укорачиваются вследствие концевой недорепликации ДНК.
- Длина теломер напрямую связана с активностью теломеразы – фермента, который способен поддерживать их длину. Уровень активности теломеразы различается в зависимости от типа клетки.
- Разделение клеток на возрастные группы с помощью показателя длины теломер и числа делений активно используется в лабораторной практике, в первую очередь, в исследованиях механизмов старения и в поиске новых средств лечения рака.

Оценка «возраста» клетки



Оценка старения клеток по липофусциновым гранулам.

Липофусцин в гепатоцитах



- - липофусциновые гранулы обнаруживают в клетках с низким уровнем обновления (печень, кардиомиоциты и др)
- - метод неколичественный

Оценка числа делений

-С использованием 3H-тимидина (анализ дает только среднее количество делений в популяции клеток)

-С использованием BrdU –Hoest, DAPI или некоторыми другими методами окрасивание + проточной цитофлуориметрии

Table 1

Sequential halving of CFSE fluorescence intensity of lymphocytes from a proliferating culture stimulated with an anti-CD3 monoclonal antibody

Peak	Mean FIU	Fraction of undivided cell fluorescence	
		Actual	Predicted
M1	2273	1.0	1.0
M2	1174	0.512	0.5
M3	589	0.259	0.25
M4	299	0.132	0.125
M5	154	0.068	0.0625

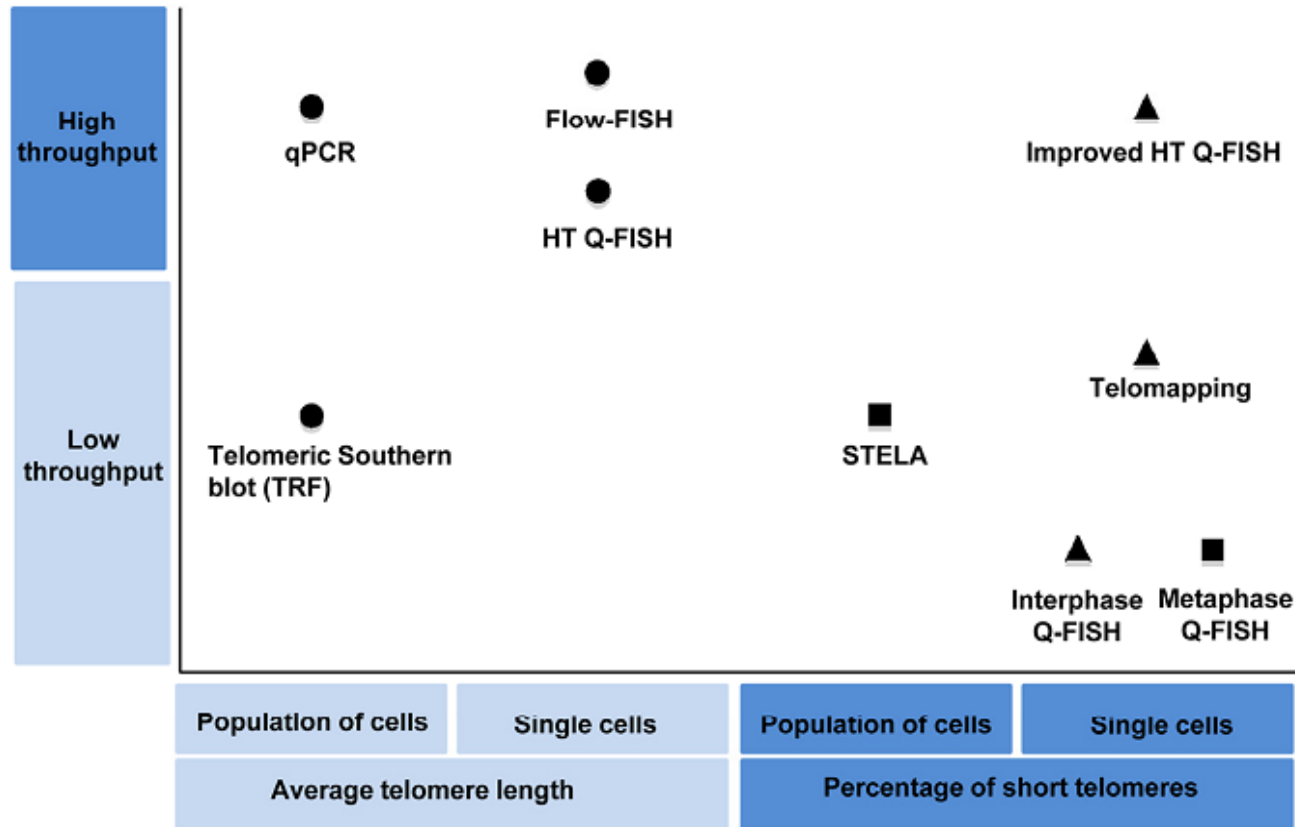
Comparison between mean fluorescence intensities of peaks in Fig. 1B.

Journal of Immunological Methods vol.171 (1994) pp.131-137

Determination of lymphocyte division by flow cytometry

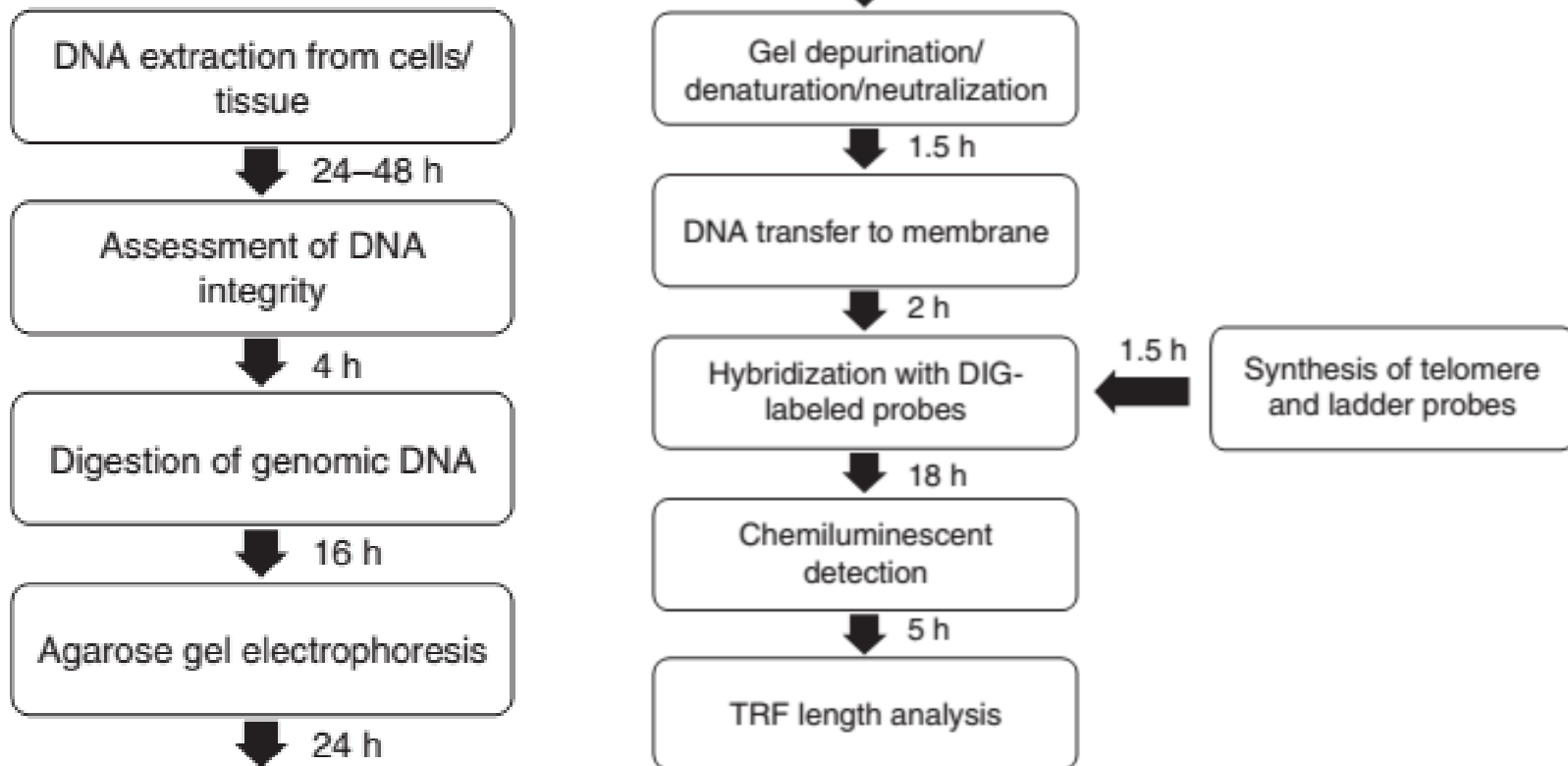
A. Bruce Lyons , Christopher R. Parish

Диаграмма-классификация методов определения длины теломеров



*Aging, June 2012, Vol. 4, No 6, Elsa Vera, Maria A.Blasco,
Beyond average: potential for measurement of short telomeres*

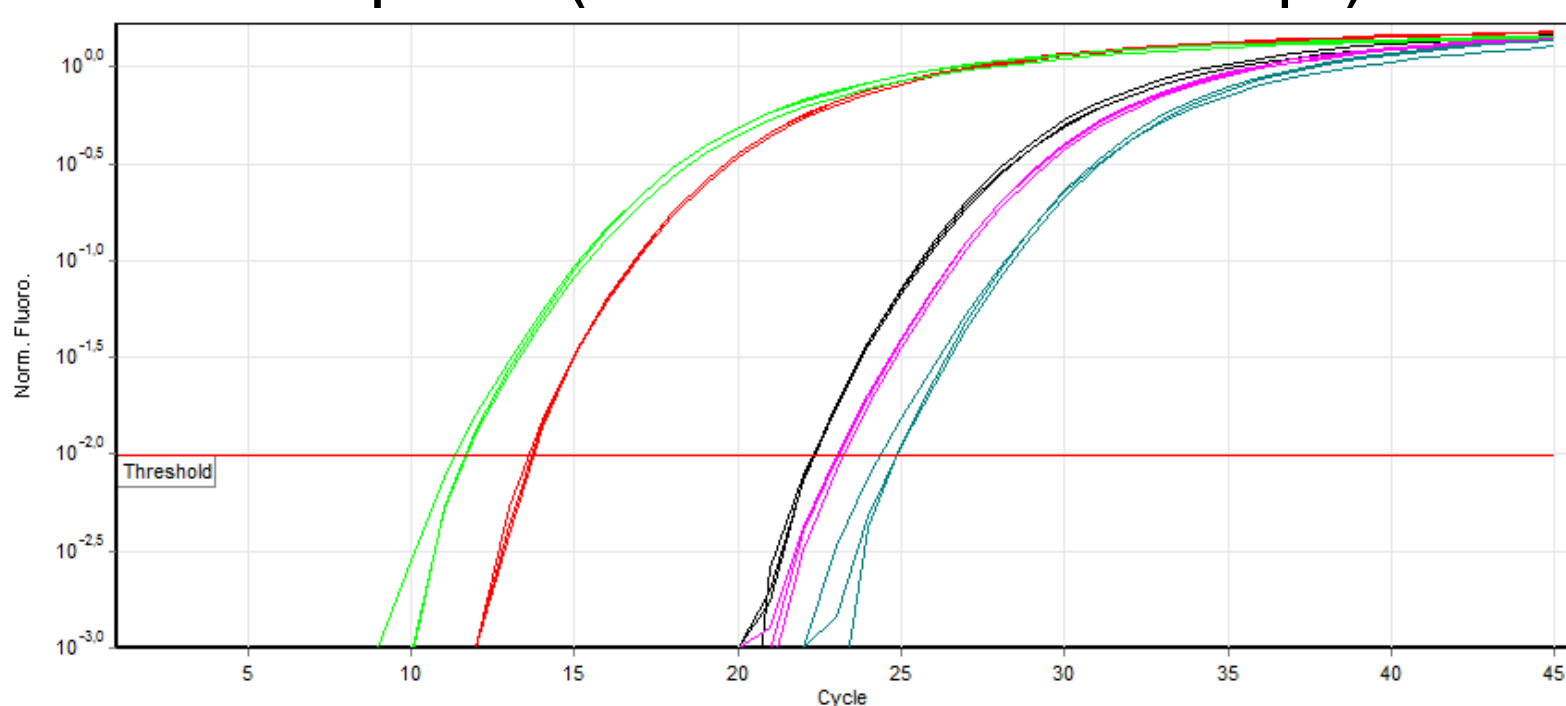
Southern blot TRF(terminal restriction fragments)



Nature America, 2010, Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths Masayuki Kimura, Rivka C. Stone, Steven C. Hunt, Joan Skurnick, Xiaobin Lu, Xiaojian Cao, Calvin B Harley & Abraham Aviv

- Требуется много ДНК
- метод позволяет оценить распределение длин теломеров в популяции клеток
- количественный анализ

qPCR (количественный ПЦР)



$$[N_0]_A/[N_0]_B = (1+E)^{(CT_B-CT_A)} \quad E - \text{эффективность ПЦР (от 0.9 до 1)}$$

В – ДНК с известной последовательностью

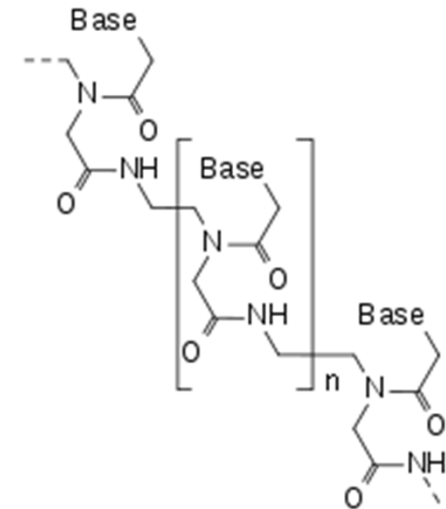
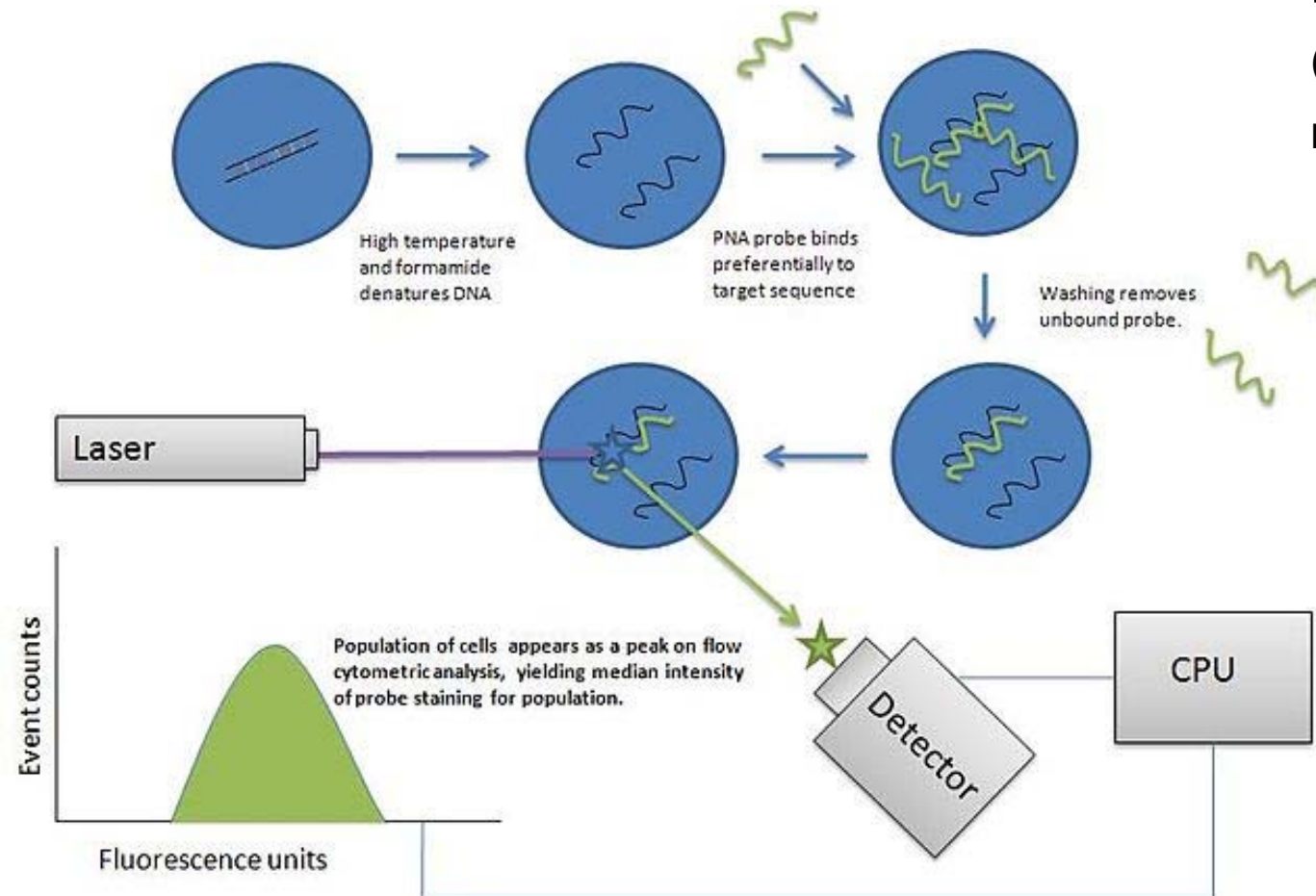
+ требуется мало ДНК (20 нг)

Только среднее значение длин теломер

Flow-FISH

PNA

(протид-нуклеиновая
кислота)



+ позволяет оценить среднее значение длин теломер в отдельной клетке из популяции

Примеры

- Длина теломеров изучалась методом Southern blot TRF. Средняя длина теломер фибробластов человека уменьшается в процессе пролиферации на 1500 п.н., что составляет 30% от размера теломер исходного фибробласта. Далее фибробласты закономерно теряли способность к пролиферации.

Согласно Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 89, pp. 10114-10118, November 1992 Biochemistry - Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts

- -Длина теломеров одной из изучавшихся популяций кератиноцитов уменьшилась от 14.18 до 12.65 тысяч п.н. за 40 дней. Признаки старения клеток проявились через 70 дней

Tissue Engineering, Differential effects of the extracellular microenvironment on human embryonic stem cells differentiation into keratinocytes and their subsequent replicative lifespan

Выводы

- Существует множество методов определения длины теломеров *in situ*. Эти методы можно применять для количественной оценки близости к состоянию остановки пролиферации (в некоторых клеточных линиях).
- Методы прижизненного мечения клеток помогают оценить число делений и оценивать близость отдельных клеток к пределу Хейфлика (в некоторых клеточных линиях).

Спасибо за внимание!