

**Изменчивость генома.  
Рекомбинации и  
модификации генома.**

# Теломераза и старение

- Проблемы концевой недорепликации ДНК
- Эффект Хейфлика

# Эффект Хейфлика



Рис. 1.21. Схема культивирования клеток по Хейфлику

- Монослой – нормальные соматические клетки прикрепленные ко дну сосуда, инкубируемые в термостате
- Контактное ингибирование-важнейшее свойство неопухолевых клеток.
- Пересев при увеличении числа клеток монослоя в 2 раза.

# Эффект Хейфлика

- **Нормальные фибробласты, взятые от человеческого эмбриона, не могут делиться сколь угодно долго.**
- **Многочисленные проверки показали, что деления прекращаются примерно после 50 пересевов (клеточных удвоений).**
- **В итоге жизненный цикл клеточной популяции разбивался на 3 фазы. Из них последняя (фаза III) знаменовалась тем, что у клеток замедлялась скорость деления, и они в конце концов погибали.**

# Эффект Хейфлика

- Линия делящихся соматических клеток вовсе не бессмертна; **старение — это свойство самих клеток** (его проявлением служит фаза III), причем оно даже **запрограммировано** в геноме клеток, поскольку наступает после определенного числа делений.
- Это критическое число делений получило название **лимита Хейфлика**.

# Эффект Хейфлика

- В экспериментах клетки отделяли друг от друга с помощью трипсина, а потом инкубировали в присутствии сыворотки. Но оба эти агента не так уж безобидны. В случае сперматогенных клеток **трипсин и сывороточные белки** существенно влияют на стабильность плазмолеммы и ядерной оболочки.
- Трипсин влияет и на фибробласты: **вызывает деградацию мембранных белков, полисом** (в цитоплазме) и **негистоновых белков** (в ядре).
- Можно представить, что не внутренние часы, а именно 50-кратная обработка клеток трипсином приводит культуру к гибели.

# Эффект Хейфлика

- а) В первоначальных опытах исходные клетки (фибробласты) получали из человеческого эмбриона - и они делились около 50 раз.
- Но если получать фибробласты от взрослого человека, то число делений клеток до гибели популяции оказывается меньше 50. Причем имеется явная зависимость от возраста донора: **чем старше донор, тем меньше число делений.**
- Подобная закономерность установлена для самых разных клеток, в т. ч. эпителиоцитов, гладких миоцитов и лимфоцитов.
- Следовательно, *in vivo* в клетках тоже функционирует некий счетчик, фиксирующий количество делений.

# Эффект Хейфлика

- И при переносе клеток *in vitro* он продолжает счет, а не начинает его сначала.
- Выяснена и конкретная количественная связь: **с увеличением возраста человека (донора) на один год количество возможных делений фибробластов в культуре уменьшается в среднем на 0,2.**
- Отсюда следует интереснейший вывод. За 100 лет жизни человека репликативный потенциал фибробластов снижается всего на 20 делений. А весь этот потенциал израсходуется (при сохранении тех же темпов) только за 250 лет.



# Эффект Хейфлика

- б) Клетки «запоминают» количество прошедших делений. «Память» об этом сохраняется и в том случае, если клетки на длительный срок (вплоть до нескольких десятков лет) подвергнуть глубокому замораживанию.
- После размораживания клетки возобновляют деления и делятся именно столько раз, сколько им оставалось делиться до замораживания.
- в) Еще одна показательная корреляция — между видовой продолжительностью жизни животного и количеством делений его клеток в культуре.

# Эффект Хейфлика

- г) Важным аргументом служит изучение клеток, вошедших в фазу III.
- Еще за несколько делений до остановки размножения рост популяции плавно замедляется и **меняется морфология** клеток: они становятся более крупными (из-за увеличения промежутков времени между делениями) и распластываются по стеклу (из-за снижения тургора).
- **Меняются** многие **биохимические показатели** - активность ферментов, интенсивность макромолекулярных синтезов и т. д. Часто аналогичные изменения обнаруживают и ***in vivo*** - при старении целостного организма.

# Эффект Хейфлика

- Фаза III — **старение** клеток *in vitro*.
- Делящимся клеткам человека и животных соответствует некий **генетически детерминированный лимит делений**, при приближении к которому в клетках наступают глубокие изменения, вызывающие в конечном счете прекращение делений и гибель клеток

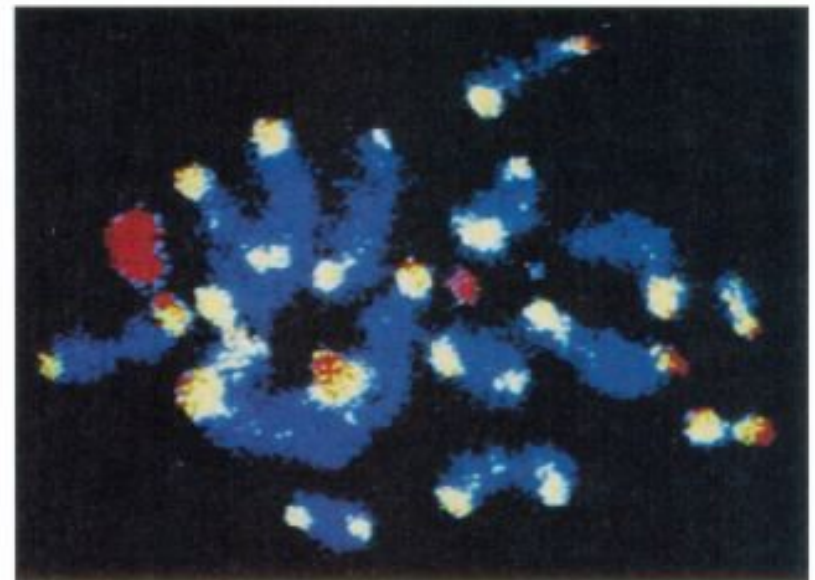
# Теломерная теория старения

- Теломерная теория старения (теория маргинотомии).
- Гипотеза «билетиков» для объяснения функционирования молекул мРНК. Последние имеют с одного из концов участок (полиА-фрагмент), не содержащий генетическую информацию. При каждом «прочтении» мРНК на рибосоме полиА-фрагмент укорачивается на 10-15 нуклеотидов (как бы отрывается один «билетик»). Когда же длина полиА-фрагмента достигает критически короткой величины (50 нуклеотидов), мРНК становится доступной для РНКазы и разрушается.
- Теория маргинотомии, призванная объяснить старение, являлась полным аналогом гипотезы «билетиков», только отнесенной не к мРНК, а к ДНК.



(a)

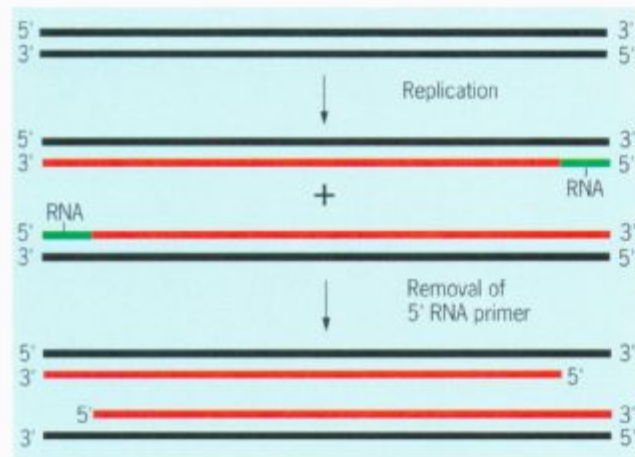
**FIGURE 12.19 Telomeres.** (a) In situ hybridization of a DNA probe containing the sequence TTAGGG, which localizes to the telomeres of human chromosomes. (b) Demonstration that certain proteins bind specifically to telomeric DNA. These chromosomes were



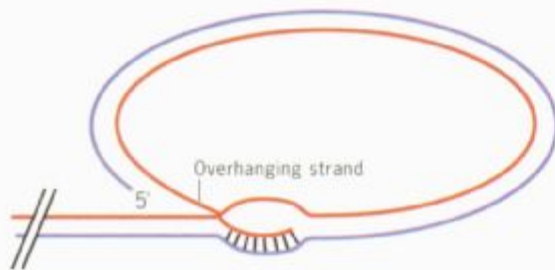
(b)

2  $\mu$ m

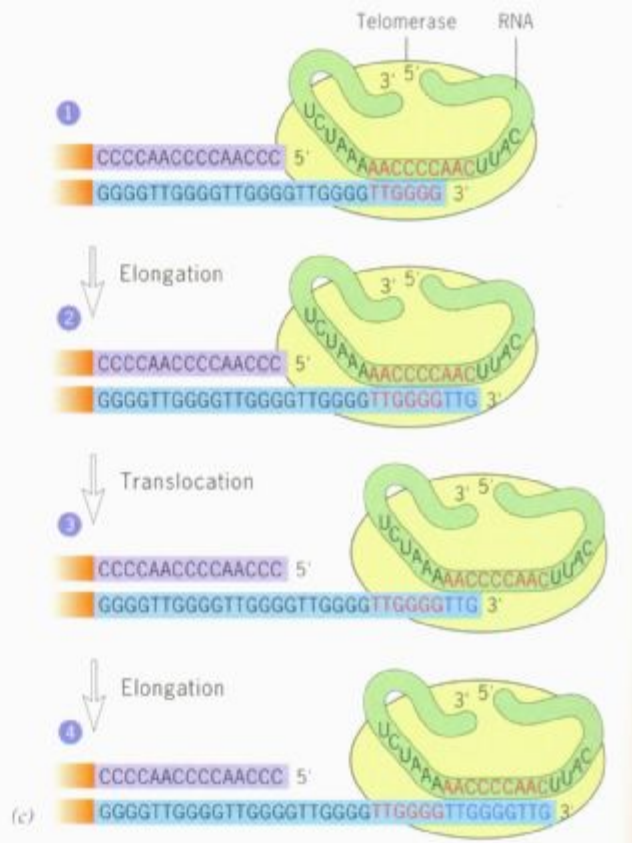
prepared from a meiotic nucleus of a yeast cell and incubated with the protein RAP1, which was subsequently localized at the telomeres by a fluorescent anti-RAP1 antibody. Blue areas indicate DNA staining, yellow areas represent anti-RAP1 antibody labeling, and red shows RNA stained with propidium iodide. Humans have a homologous telomere protein called hRAP1. (A: FROM J. MEYNE, IN R. P. WAGNER, CHROMOSOMES: A SYNTHESIS, COPYRIGHT © 1993. REPRINTED BY PERMISSION OF WILEY-LISS, INC., A SUBSIDIARY OF JOHN WILEY & SONS, INC.; B: FROM FRANZ KLEIN ET AL., J. CELL BIOL. 117:940, 1992, COURTESY OF SUSAN M. GASSER; BY COPYRIGHT PERMISSION OF THE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)



(a)



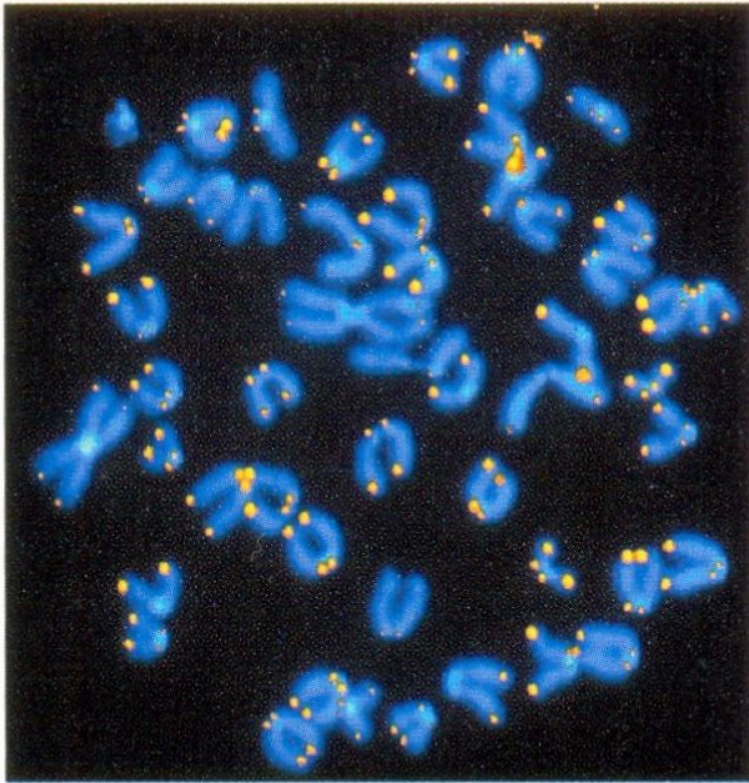
(b)



(c)

**FIGURE 12.20 The end-replication problem and the role of telomerase.** (a) When the DNA of a chromosome is replicated, the 5' ends of the newly synthesized strands (red) contain a short segment of RNA (green), which had functioned as a primer for synthesis of the adjoining DNA. Once this RNA is removed, the 5' end of the DNA becomes shorter relative to that of the previous generation. (b) Electron micrographs reveal that the single-stranded overhang does not remain as a free extension, but invades the duplex as shown here, displacing one of the strands, which forms a loop. The loop is a binding site for specific telomere-capping proteins (e.g., TRF2). (c) The mechanism of action of telomerase. The enzyme contains an RNA molecule that is complementary to the end of the G-rich strand, which extends past the C-

rich strand, forming an overhang. The RNA binds to the protruding end of the G-rich strand (step 1) and then serves as a template for the addition of nucleotides onto the 3' terminus of the strand (step 2). After a segment of DNA is synthesized, the telomeric RNA slides to the new end of the strand being elongated (step 3) and serves as the template for the incorporation of additional nucleotides (step 4). The gap in the complementary strand is filled by the cell's conventional replication machinery. (The TTGGGG sequence depicted in this drawing is that of the ciliated protist *Tetrahymena*, which is the organism in which telomerase was first discovered.) (C: AFTER C. W. GREIDER AND E. H. BLACKBURN, REPRINTED WITH PERMISSION FROM NATURE 337:336, 1989; © COPYRIGHT 1989, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)



**FIGURE 12.21** The importance of telomerase in maintaining chromosome integrity. The chromosomes in this micrograph are from the cell of a knockout mouse that lacks a functional gene for the enzyme telomerase. The telomeres appear as yellow spots following in situ hybridization with a fluorescently labeled telomere probe. It can

be seen that some chromosomes lack telomeres entirely, and that a number of chromosomes have fused to one another at their ends. Chromosome fusion produces chromosomes with more than one centromere, which in turn leads to chromosome breakage during cell division. The genetic instability resulting from loss of a telomere may be a major cause of cells becoming cancerous. (FROM MARIA A. BLASCO, ET AL., COURTESY OF CAROL W. GREIDER, *CELL*, VOL. 91, COVER #1, 1997; BY PERMISSION OF CELL PRESS.)

# Теломерная теория старения

- При каждом делении нормальных клеток в культуре длина теломерных последовательностей сокращается на 50-100 н. п. За все же 50 делений человеческих фибробластов **укорочение составляет 2-3 тысячи н. п.**
- По сравнению с общей длиной теломерной ДНК – **10-15 тысяч н. п.** - это не так уж и много: примерно одна пятая часть.



# Теломерная теория старения

- Укорочение теломер для клеток *in vivo*.
- В лимфоцитах по мере увеличения возраста человека теломеры оказываются все короче и короче — в среднем на 40 н. п. за один год.
- У больных же синдромом Дауна, отличающихся преждевременным иммунным старением лимфоцитов, соответственно оказывается выше и скорость укорочения теломер в лимфоцитах - по 133 н. п. в год.
- Исследованы также половые клетки. В них теломеры оказались длиннее, чем в соматических клетках того же индивидуума. Причем с возрастом человека теломеры в зрелых половых клетках остаются стабильными.

# Теломерная теория старения

- В культивируемые клетки был введен (методами генной инженерии) **ген TERT**, кодирующий каталитическую субъединицу **теломеразы**. После чего в своих делениях клетки намного (на 20 делений) превысили лимит Хейфлика.
- Поддержание длины теломер предупредило остановку делений и гибель культуры.

# Теломерная теория старения

- Обычно рассматривают два взаимно противоположных варианта:
- в одном случае «негатив» **состоит в активации «плохих» генов** - т. н. генов **AGE**, отвечающих за старение;
- в других случаях происходит **инактивация «хороших» генов**, необходимых для полноценного функционирования клетки.
- а) Первый вариант обычно исходит из **эффекта положения**, который экспериментально выявлен у некоторых организмов: достаточно длинные теломеры вызывают **сайленсинг** (репрессию активности) прилежащих генов. При укорочении теломер эти гены активируются.

# Теломерная теория старения

- б) Второй возможный вариант влияния длины теломер на состояние клетки (предполагающий **инактивацию «хороших» генов**).
- Он возник из исходного представления, что процесс укорочения хромосом при клеточных делениях в конечном счете достигает структурных генов.
- В местах прикрепления теломер к внутренней ядерной мембране имеются  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, и поток ионов через них создает своего рода «душ», необходимый для функционирования генов. При значительном же укорочении теломер теряется связь хромосом с мембраной, отчего гены оказываются дальше от ионного «душа» - с соответствующими негагивными последствиями.

# Теломерная теория старения

- Теоретические предсказания А. М. Оловникова нашли экспериментальное подтверждение.
- а) Предсказание о том, что должен существовать специальный **механизм поддержания длины теломер**. Подтверждено открытием теломеразы и альтернативного механизма (ALT).
- б) Предсказание об **укорочении теломер в соматических клетках**. Подтверждено для многих делящихся клеток - в культуре и *in vivo*.
- в) Предсказание о том, что **в зрелых половых клетках длина теломер не должна зависеть от возраста**. Подтверждено.
- г) Предсказание о том, что именно **укорочение теломер приводит к прекращению делений клеток в культуре**. Подтверждено экспериментом, в котором лимит Хейфлика преодолен путем введения в клетки гена теломеразы.
- д) Сделаны и подтвердились также еще несколько смежных предсказаний - например, о **наличии теломеразы в опухолевых клетках** (чем и объясняется их способность к неограниченным делениям).

# **Критика теломерной теории старения**

- а) В большинстве клеток мышей - довольно высокая активность теломеразы, отчего теломерные последовательности очень длинные и весьма мало укорачиваются при делениях клеток. Тем не менее, лимит Хейфлика составляет здесь всего 20 делений.**
- б) Кроме того, клетки человека, зараженные вирусом SV40, совершают 20-60 делений сверх лимита Хейфлика. И все это время у них отсутствует теломераза и продолжается укорочение теломер. Значит, к моменту совершения определенных лимитом 50 делений теломеры еще не достигли критически короткой длины, и прекращение делений вызвано каким-то иным обстоятельством.**

# Критика теломерной теории старения

- в) В ряде случаев (кератиноциты, клетки молочной железы) введение в клетки гена теломеразы (TERT) вызывает удлинение теломер, но не увеличивает лимит Хейфлика.
- Тем не менее, если не во всех, то, по крайней мере, в каких-то клеточных культурах теломеры выполняют роль счетчиков (**репликометров**), «отсчитывающих» количество прошедших и количество еще возможных делений

# **Критика теломерной теории старения**

- **Но можно ли утверждать, что старение и смерть целостного организма определяются именно этим обстоятельством? На этот счет имеются большие сомнения.**
- **а) Во-первых, в организме, кроме делящихся, имеется немало неделящихся клеток. Причем последние тоже стареют и, по многим данным, не медленней, а даже быстрее делящихся клеток.**
- **Клетки мозга, печени, мышечные волокна и т. д.: с одной стороны, они существуют, не делясь, десятки лет - и эффективно функционируют; с другой стороны, во всех них обнаружены и описаны те или иные возрастные изменения.**



# Критика теломерной теории старения

- б) Во-вторых, возьмем обновляющиеся ткани - например, эпидермис.
- В культуре эффект Хейфлика проявляется как бы скачкообразно: на протяжении нескольких десятков делений нет никаких изменений, и лишь в самом конце состояние клеток резко ухудшается.
- *In vivo* старение эпидермиса (и подлежащей дермы) происходит совершенно иначе - не скачкообразно, а постепенно. Не случайно по состоянию кожи можно достаточно определенно судить о возрасте человека.
- Значит, и здесь старение обусловлено вовсе не приближением к критическому пределу, а иными - постоянно действующими - причинами.

# Критика теломерной теории старения

- в) О том же свидетельствуют экспериментальные данные, согласно которым даже у пожилых людей репликативный потенциал делящихся клеток далеко не исчерпан.
- Фибробласты, выделенные у 90-летних доноров, делились в культуре всего на 20 раз меньше, чем фибробласты плодов человека. Тогда как лимит, по Хейфлику, равен 50 делениям.
- Следовательно, «старыми» делящиеся клетки становятся у стариков не потому, что слишком много делились.

# Критика теломерной теории старения

- г) Не все ясно и с самим лимитом Хейфлика. Положение о том, что *in vivo* тоже (как и *in vitro*) деления соматических клеток ограничены неким пределом, кажется достаточно естественным и обоснованным. Но действительно ли этот предел примерно равен 50?
- В только что упоминавшихся экспериментах исследовались фибробласты.
- Произведем приблизительные расчеты для клеток эритропоэтического ряда.

# Критика теломерной теории старения

- Начнем с того, что в организме новорожденного ребенка - порядка  $10^{12}$  всевозможных клеток. Из соотношения  $2 \times 10^{12}$  находим, что для их образования из зиготы должно было произойти около 40 циклов митотических делений.
- Но это лишь при условии, что все вновь образующиеся клетки тоже непременно делятся. На самом деле какие-то клетки в эмбриогенезе погибают, а еще часть клеток вступает в дифференцировку и не делится. Так что фактически в «предыстории» многих клеток новорожденного (в т. ч. эритропоэтических) не 40, а больше делений.

# Критика теломерной теории старения

- Теперь обратимся к гемопоэтическим клеткам. Среди них содержится некоторое количество стволовых клеток. Всю жизнь человека их популяция должна самоподдерживаться, для чего необходимы редкие деления по типу:
  - *1 клетка, идентичная исходной + 1 дифференцирующаяся клетка.*
- По некоторым данным, можно полагать, что у взрослого человека:
  - а) в красном костном мозге - примерно  $10^{13}$  гемопоэтических клеток,
  - б) доля стволовых клеток среди них близка к  $10^3$ ,
  - в) для обеспечения нормальной скорости эритропоэза в деления вышеуказанного типа ежедневно должно вступать около  $2 \times 10^8$  стволовых клеток.

# **Критика теломерной теории старения**

- **При гомопластическом эритропоэзе основным источником эритроцитов являются деления эритробластов. Однако для поддержания системы в стационарном состоянии необходимо, чтобы пул несамоподдерживающихся эритробластов все время пополнялся со стороны стволовых клеток.**
- **Каждая из стволовых клеток делится в среднем один раз в 50 суток. Это весьма редко и вполне соответствует имеющимся представлениям.**

# Критика теломерной теории старения

- Но это же означает, что, например, за 60 лет жизни человека стволовые клетки делятся более чем по  $7 \times 60 = 400$  раз!
- Наконец, еще следует добавить примерно 10 делений в ходе собственно эритропоэза (большая часть этих делений приходится на эритробласты).
- Итого, общая сумма делений, предшествующих образованию эритроцитов у 60-летнего человека, составляет примерно:
  - 450, если начинать считать от зиготы, и
  - 400, если считать от рождения.

# Критика теломерной теории старения

- Это приблизительные оценки, но они намного больше лимита Хейфлика, установленного для эмбриональных фибробластов человека (при том, что у прочих клеток способность к размножению *in vitro* еще меньше, чем у фибробластов).
- Обычно в качестве доказательства, что 50-60 делений вполне достаточно, приводят простейший расчет типа:  $2^{60} = 10^{18}$ , результат которого на несколько порядков превосходит количество всех клеток взрослого человека ( $10^{14}$ ).
- Но на примере эритропоэза мы видим, что механически возводить 2 в ту или иную степень нельзя: надо еще хотя бы приближенно учитывать реальные особенности целостного организма.
- В итоге, остается совершенно неясным, каково же на самом деле предельно допустимое количество делений *in vivo* для клеток человека.



# Критика теломерной теории старения

- **Этот предел (если он, действительно, существует) для разных клеток может быть совершенно различным.**
- **Действительно, многие делящиеся клетки обладают теломеразной активностью и, в зависимости от ее уровня, в одних случаях критическое укорочение теломер наступит после меньшего, а в других случаях - после гораздо большего числа делений.**

# Критика теломерной теории старения

- а) лимит делений *in vivo* для различных клеток неизвестен;
- б) старение *in vivo*, скорее всего, не связано с приближением делящихся клеток к этому лимиту.
- Показательно, что второй из сделанных выводов полностью поддерживается и самим Хейфликом. Вот его собственные слова:
- «...я не верю в то, что старение и смерть людей наступают вследствие прекращения деления их клеток ».

# Укорочение теломер – причина старения

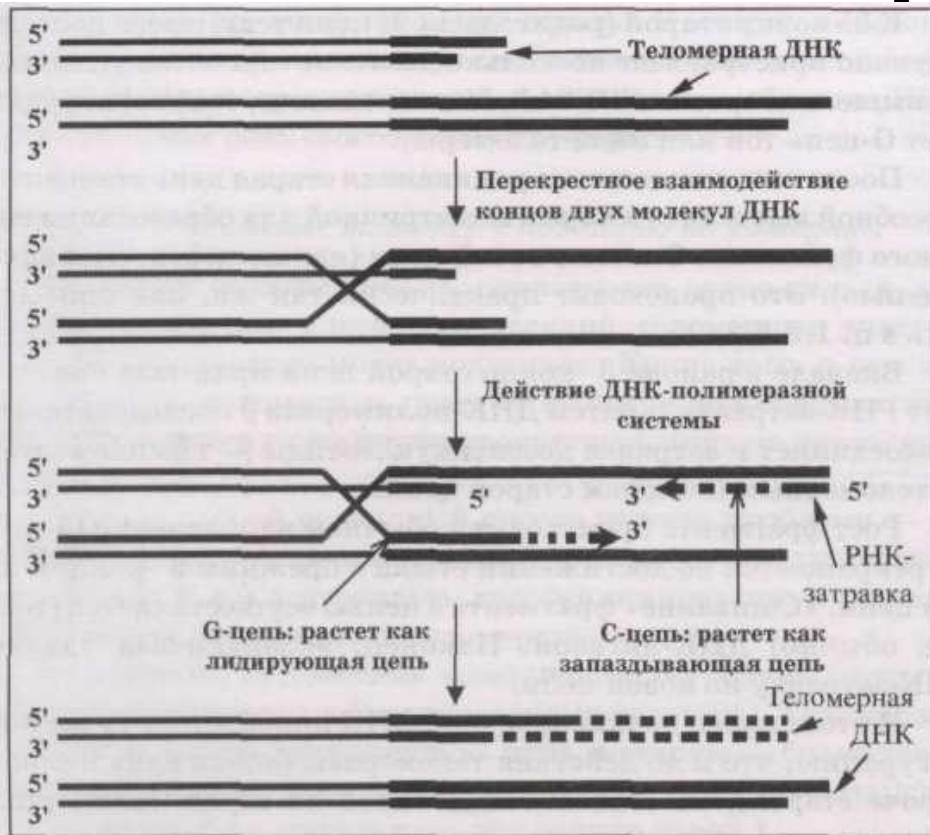


Рис. 1.16. Удлинение теломерной ДНК путём рекомбинации

Укорочение теломер может происходить не только в делящихся клетках - из-за **концевой недорепликации**, - но и в неделящихся клетках – из-за **концевой недорепарации**.

- Система репарации ДНК - совокупность ферментов, занимающихся поиском повреждений в структуре молекул ДНК и их исправлением. **Исправление** заключается в **вырезании участка поврежденной цепи** и его **повторном синтезе** с использованием второй цепи в качестве матричной
- И если данный участок находится на 5-конце поврежденной цепи, то возникает та же проблема, что и при репликации т. е. вновь необходима теломераза.

# Причины старения

**С возрастом происходит не только укорочение теломер, но и другие изменения:**

- увеличение числа разрывов в цепях ДНК, а также накопление прочих дефектов структуры;**
- уменьшение содержания 5-метилцитозина в ДНК;**
- усиление прочности связывания белков с ДНК;**
- снижение активности ферментов, функционирующих на хромосомах (в т. ч. ферментов репарации ДНК).**

# Теории старения

**Выдвинуто 2 группы теорий старения.**

1. Старение - это результат **изнашивания** или повреждения каких-то структур под влиянием различных ; **стохастических** (случайных) факторов - внешнего облучения, свободных радикалов, локальных всплесков температуры и т. д.
2. Старение - **запрограммировано**: все дело в некоей генетической программе, определяющей продолжительность жизни.

**Теломерная теория** - типичный пример такого типа: здесь программа состоит в выключении теломеразы в соматических клетках. Но это не может объяснить других возрастных изменений хромосом, не говоря о бесконечном числе прочих возрастных явлений

# Теории старения

- В организме имеется целая совокупность различных защитных систем. На внутриклеточном уровне это:
    - **система репарации ДНК,**
    - **система теломер и теломераза,**
    - **антиоксидантная система (обезвреживающая свободные радикалы),**
    - **система шаперонов (белков теплового шока),** восстанавливающая третичную структуру белков при ее нарушении вследствие, например, локального всплеска температуры.
    - **Система метилирования ДНК.**
- Если старение действительно запрограммировано, то программа, скорее всего, состоит в постепенном ослаблении деятельности вышеперечисленных защитных систем.**

# Теории старения

- Тогда становится понятно, почему, несмотря на эффективную систему репарации, в структуре ДНК с возрастом накапливаются разрывы и другие дефекты.
- Или почему в культуре фибробластов по мере делений белки теплового шока индуцируются все хуже и хуже.
- Или почему уменьшается количество 5-метилцитозина в ДНК.
- И в этом же ряду - снижение активности теломеразы в делящихся клетках.
- Т. е. это всего один из элементов единого и гораздо более сложного процесса.

# Теории старения

*В линии половых клеток старение отсутствует*

- Теломерная теория его полностью воспроизводит, утверждая, что в линии половых клеток всегда эффективно функционирует теломераза и потому теломеры имеют постоянную длину
- Что следует понимать под линией половых клеток?
- Например, линия мужских половых клеток, то ее **полный жизненный цикл** («от зиготы до зиготы») включает следующие этапы:



# Теории старения

- Первые недели эмбрионального развития, **в зародыше обособляются первичные половые клетки (гоноциты)**;
- Половую дифференциацию этих клеток и несколько периодов деления, сменяемых фазами покоя; в итоге **образуется пул изолированных сперматогоний - стволовых клеток**;
- Длительное (в течение нескольких десятилетий) **существование изолированных сперматогоний в семенных канальцах яичек**; в это время, видимо, **регулярно происходят деления самоподдержания** и так же **регулярно** (после полового созревания организма) **какая-то часть сперматогоний вступает в дифференцировку**;

**Сперматогенез, продолжающийся у человека 75 суток, включает митотическое размножение сперматогоний, мейотическое деление сперматоцитов и преобразование сперматид в сперматозоиды**

# Теории старения

- В 1978- 1980 гг были обнаружены **достоверные биохимические различия между одноименными сперматогенными клетками**, полученными из мышей разного возраста.
- Предполагается, что в линии половых клеток, несмотря на митотические деления и действие защитных систем, постепенно **накапливаются возрастные изменения**. Особенно важны изменения структуры хромосом.
- Но на одной из стадий цикла происходит «капитальный ремонт», или **«омоложение»**, клеток. В первую очередь, «ремонтные работы» должны касаться, разумеется, хромосом.

# Теории старения

- Наиболее вероятной стадией, используемой для этого, является весьма **продолжительная профза мейоза**. В это время происходят сложные преобразования хромосом (конъюгация, кроссинговер), в процессе которых может совершаться полное восстановление нормальной структуры генома.

## **О подобной роли мейоза свидетельствуют такие факты:**

- Некоторые простейшие (инфузории) размножаются и половым, и бесполом путем. При этом половое деление ядер (мейоз) и последующий половой процесс (слияние гаплоидных ядер) резко активизируют культуру: клетки начинают чаще делиться, в них интенсифицируется обмен веществ.
- Другой широко известный факт - **с клонированием**. Знаменитая овечка Долли получила хромосомы соматической клетки, т. е. не прошедшие мейоз. В результате у нее **развились преждевременное старение**.

# Теории старения

- Принципиально возможные варианты:  
**G** - это **биологический возраст клетки**, т. е. некая интегральная характеристика, учитывающая **возрастные** изменения всевозможных клеточных параметров. И показаны графики возможного изменения **G** в полном цикле линии половых клеток (от зиготы одного поколения до зиготы следующего поколения).

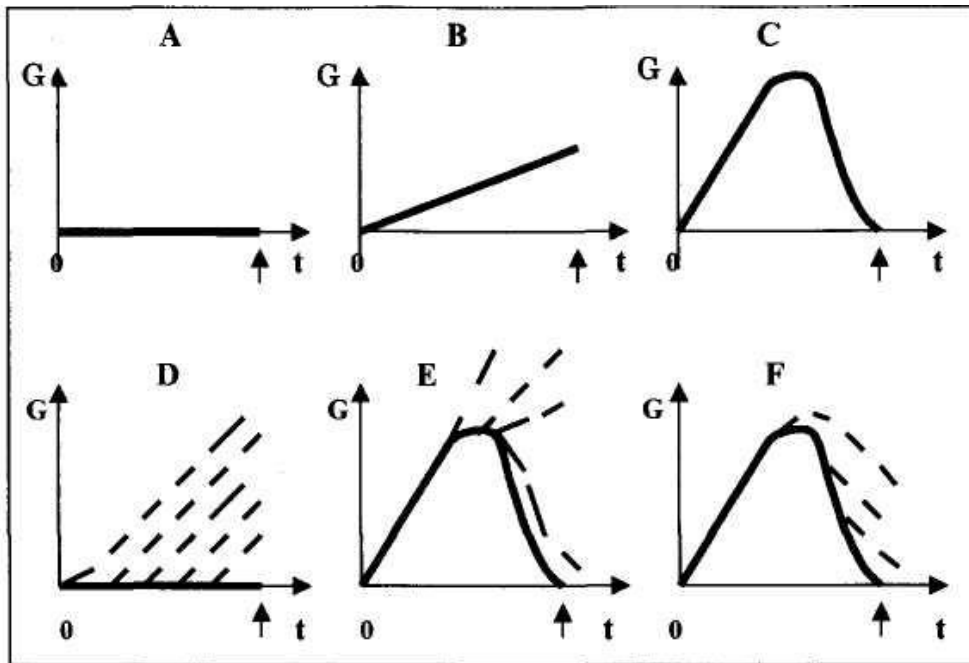


Рис. 1.22. Возможные варианты изменения биологического возраста в линии половых клеток

# Теории старения

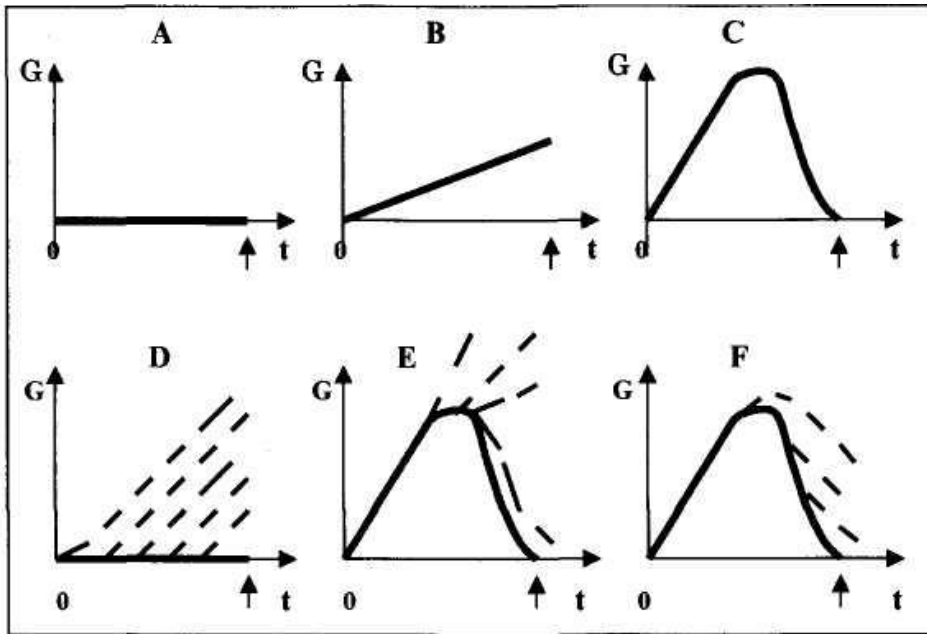


Рис. 1.22. Возможные варианты изменения биологического возраста в линии половых клеток

- Постулат Вейсмана отражается графиком **A**, а в модифицированном (и более вероятном) виде - графиком **D**.
- Предполагается, что в общей массе стареющих клеток сохраняется какое-то (все уменьшающееся) количество клеток с интактным геномом, которые и используются для оплодотворения.
- Графики **C**, **F** и **E** - разные модификации гипотезы «омоложения»: **C** - нестатистический, а два последних - статистические варианты.
- В варианте **F** биологический возраст уменьшается у всех клеток, но у одних - более эффективно, у других - менее.

# Теории старения

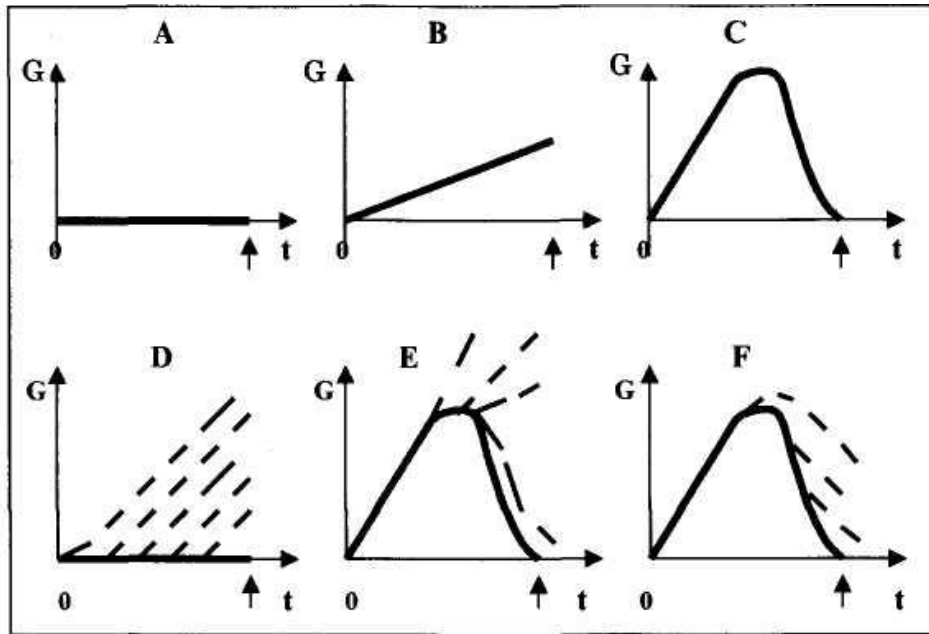


Рис. 1.22. Возможные варианты изменения биологического возраста в линии половых клеток

- Вариант же **Е** допускает, что «омоложение» одних клеток может происходить за счет других. О такой возможности заставляет думать мейоз в оогенезе, где на одну яйцеклетку образуется три редукционных тельца.
- Что же касается графика **В**, то он отражает маловероятную ситуацию: зиготы каждого последующего поколения старше, чем зиготы предыдущего поколения.
- В таком случае биологический вид был бы обречен на постепенную деградацию и вымирание.

# Теломераза и онкогенез

- Кроме старения, теломеры и теломераза связаны с другой важнейшей биологической проблемой - **проблемой опухолевого роста (онкогенезом)**.

# Теломераза и онкогенез

## Получение линий опухолевых клеток

- Нормальные соматические клетки делятся в культуре ограниченное количество раз.
- Опухолевые клетки в своих делениях не имеют какого-либо предела: их популяция может удваиваться бесконечно. Чтобы подчеркнуть данную особенность таких клеток, их часто называют **иммортизированными («бессмертными»)**.
- Получить «бессмертные» линии можно двумя способами:
  - либо трансформировать нормальные клетки *in vitro*,
  - либо выделить клетки из опухоли, растущей *in vivo*.



# Теломераза и онкогенез

- В обоих случаях культивировать иммортализованную линию можно опять-таки двумя способами:
- *in vitro*, т. е. путем пересева клеток в новые флаконы после каждого удвоения популяции,
- *in vivo* - путем регулярного пересева клеток здоровым животным.
- Трансформированные *in vitro* клетки нередко вводят в организм животного, где они вызывают опухоль.
- И наоборот: выделенные из первичной опухоли клетки десятилетиями культивируют *in vitro*.
- Наиболее известной из таких длительно поддерживаемых культур является линия HeLa. Ее клетки получены в 1952 г. из опухоли шейки матки женщины и названы по инициалам пациентки.

# Теломераза и онкогенез

## *Иммортпализация in vitro*

- Иммортализация *in vitro* бывает **спонтанной и индуцированной**.  
В случае мышинных фибробластов **спонтанная трансформация** происходит следующим образом:
- Эмбриональные фибробласты мышей делятся в культуре примерно 20 раз. При этом последние деления совершаются все реже, а размер клеток увеличивается. Но и после завершающего удвоения клетки еще длительно (в течение нескольких месяцев) остаются живыми.
- В такой **неделяющейся культуре через 2-3 месяца могут возникать отдельные фокусы роста**. Количество клеток в фокусе начинает увеличиваться в геометрической прогрессии. Это и означает, что **произошла спонтанная трансформация** какой-то переживающей «старой» клетки, дающая начало новому клону.

# Теломераза и онкогенез

**Клоны трансформантов бывают двух видов:**

- Одни клоны имеют **ограниченный пролиферативный потенциал**: совершают еще 20-30 удвоений популяции и подвергаются **повторному старению**.
- Другая часть трансформированных клонов оказывается **иммортилизованной**: удваивается неограниченное число раз.
- В отличие от клеток мышей, нормальные **клетки человека крайне редко претерпевают спонтанную трансформацию *in vitro***.
- Однако трансформацию можно **надежно вызвать онкогенными ДНК-содержащими вирусами** - например, вирусом **SV40**.

# Теломераза и онкогенез

**В этом процессе различают две стадии:**

- Первая стадия - **временное удлинение жизни культуры**, после заражения вирусом клетки меняют свою морфологию и совершают на 20-60 делений больше, чем нормальные клетки. Эта стадия кончается **кризисом** - прекращением роста популяции. Большая часть клеток после этого погибает.
- Но единичные клетки (их доля варьирует от  $10^9$  до  $10^5$ ) проходят вторую стадию, в ходе которой становятся **иммортизированными**.
- Таким образом, у клеток мышей временное удлинение жизни культуры и иммортализация - два независимых варианта трансформации.
- А у клеток человека временное удлинение жизни и иммортализация - две последовательные стадии трансформации, которая в подавляющем большинстве случаев ограничивается только первой стадией.

# Теломераза и онкогенез

## Теломеры и теломераза в трансформированных клетках

- Иммуортализация обусловлена **индукцией теломеразы** - восстановление теломер и постоянное поддержание их длины после очередных делений.
- Опухолевые клетки, как и клетки половой линии, должны содержать высокую активность теломеразы.

# Теломераза и онкогенез

## *Клеточные линии:*

- а) При вирусной трансформации клеток человека на первой стадии (**до кризиса**) продолжается укорочение теломер по мере деления клеток.
- Это обстоятельство свидетельствует против того, что остановка делений на лимите Хейфлика вызвана недостаточной длиной теломер. Ведь при трансформации деления продолжают и при большем укорочении теломер.
- Но последующий **кризис** обусловлен предельным укорочением теломер. Об этом говорят как прямые определения их длины, так и наблюдаемое в это время слияние концов хромосом во многих клетках.
- Одной из функций теломер является стабилизация концов хромосом; **недостаточность этой функции и приводит к объединению хромосом.**

# Теломераза и онкогенез

В клетках, преодолевших кризис, наблюдается увеличение длины теломер.

- б) Длина теломер стабилизируется за счет **появления теломеразной активности**. Последняя обнаружена в подавляющем большинстве иммортализованных линий, в то время как в докризисных клетках теломеразы нет.
- А что будет при воздействии на иммортализованные клетки **ингибиторами теломеразы**?
- В качестве такого **ингибитора** успешно выступает **3'-азидо-3'-дезокситимидин** - ингибитор всех обратных транскриптаз (лечение СПИДа). Теломераза тоже относится к этой группе ферментов, ингибитор подавляет ее активность.
- **Свойство иммортализации пропадает**: клетки, в конце концов, перестают делиться и демонстрируют все признаки старения в культуре.
- **Обязательным условием иммортализации является поддержание длины теломер**.

# Теломераза и онкогенез

- **Появляется новое направление в лекарственной терапии опухолей.** Следует использовать не тотальные ингибиторы синтеза ДНК, а более специализированные ингибиторы теломеразы: в этом случае будет меньше побочного влияния на нормальные клетки.
- **в) Еще один интересный экспериментальный подход - получение гибрида нормальной и иммортализованной клеток.**
- **Теломеразная активность в гибриде отсутствует.** В нормальной клетке имеются некие **репрессоры генов теломеразы**, а при иммортализации эти репрессоры утрачиваются. В гибридной же клетке репрессоры подавляют активность теломеразных генов из обеих исходных клеток.



# Теломераза и онкогенез

- г) Однако не всегда в иммортализованных клетках обнаруживается теломеразная активность.
- Примерно в 25 % случаев длина теломер в таких клетках стабилизируется (иногда даже на уровне, превышающем нормальный), а активность теломеразы - отсутствует.
- Очевидно, здесь **действует** один из альтернативных механизмов удлинения теломер (**ALT**).

# Теломераза и онкогенез

- д) В то же время иммортализацию ни в коем случае нельзя сводить только к восстановлению теломер.
- Для иммортализации же должны произойти и **другие события** - **снижение** или полное **исчезновение активности определенных белков**: например, **p53** и **pRb** (участвующих в регуляции клеточного цикла в нормальных клетках), **прохибитина** (супрессора роста), **ферментов репарации ДНК** и т. д.
- Причем в совокупности эти события не возвращают клетку к исходному («молодому») состоянию, а делают ее во многом иной. Поэтому **нельзя считать их следствием удлинения теломер**.

# Теломераза и онкогенез

- **Удлинение теломер** - лишь одно из ключевых событий иммортализации, необходимое: без него иммортализация невозможна.
- Но это не инициирующее событие, и тем более не достаточное.
- Инициирующие события совсем иные: они придают клетке качества, еще не присущие ей в прежней истории.

# Теломераза и онкогенез

## *Первичные опухоли*

- Были протестированы на теломеразную активность несколько тысяч образцов опухолей человека.
- В подавляющем большинстве (**85 %**) **злокачественных** новообразований обнаружена теломеразная активность. Некоторым исключением оказался ряд злокачественных опухолей головы, где фермент был выявлен лишь в 40-60 % случаев.
- В **доброкачественных** опухолях частота обнаружения фермента в целом такая же, как в нормальных тканях (**27%**).
- На этом основании **теломеразу считают биохимическим маркером злокачественных опухолей человека.**

# Метилирование ДНК

## Метилирование цитозина в ДНК эукариот

- В ядрах (и митохондриях) эукариот существуют ферменты ДНК-метилазы. Они катализируют перенос метильной группы от активной формы метионина (S-аденозилметионина, или SAM) на определенные азотистые основания ДНК.

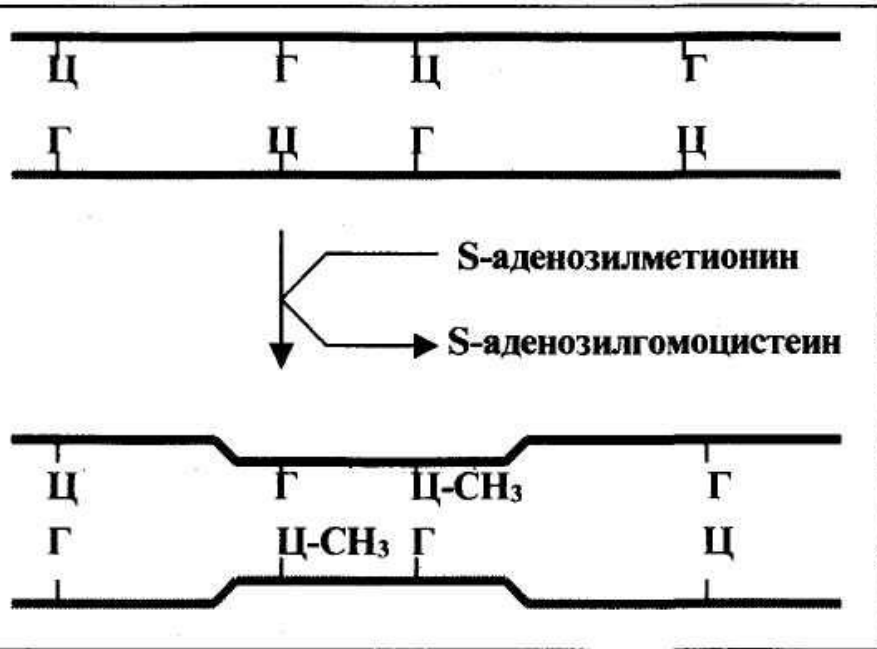


Рис. 1.23. Схема метилирования ДНК по цитозину

# Метилирование ДНК

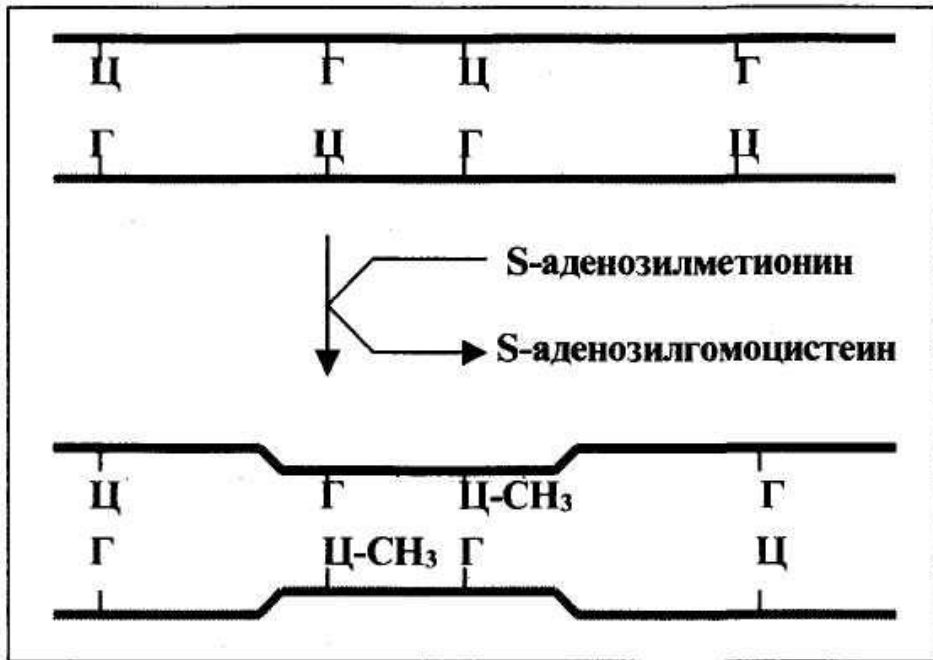


Рис. 1.23. Схема метилирования ДНК по цитозину

- Долгое время у эукариот была известна лишь одна **ДНК-метилаза**; она **метирует** в ДНК **остатки цитозина, превращая их в 5-метилцитозин (5-МЦ)**.
- Метилированию подвергаются около 5% остатков цитозина, т. е. один из 20. При этом **5-МЦ** в ДНК расположены не равномерно, а **сгруппированы в определенных локусах**.

# Метилирование ДНК

- К ним относятся **центромерные отделы ДНК** и **промоторные последовательности отдельных генов** (места связывания РНК-полимеразы).
- 5-МЦ локализованы в **спейсерных (межнуклеосомных) участках ДНК.**

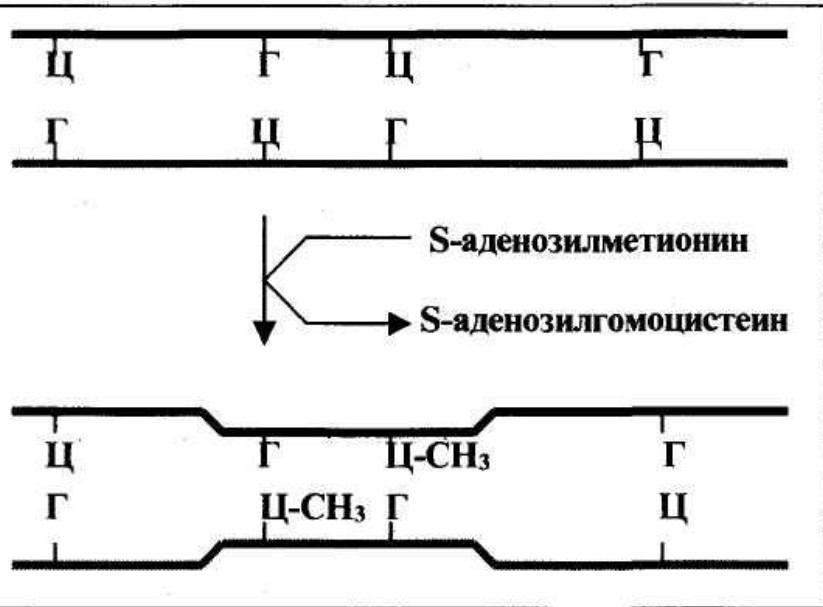


Рис. 1.23. Схема метилирования ДНК по цитозину

# Метилирование ДНК

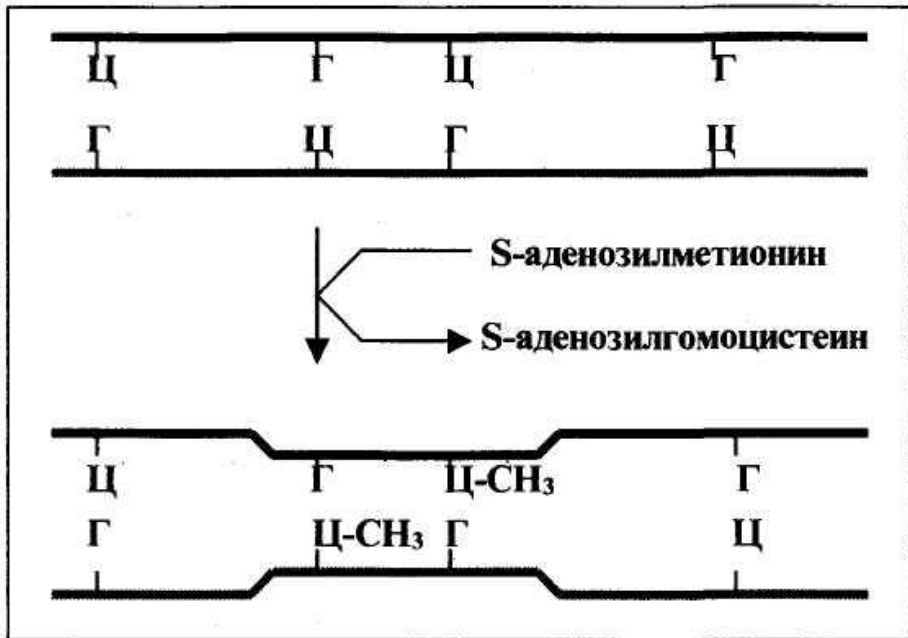
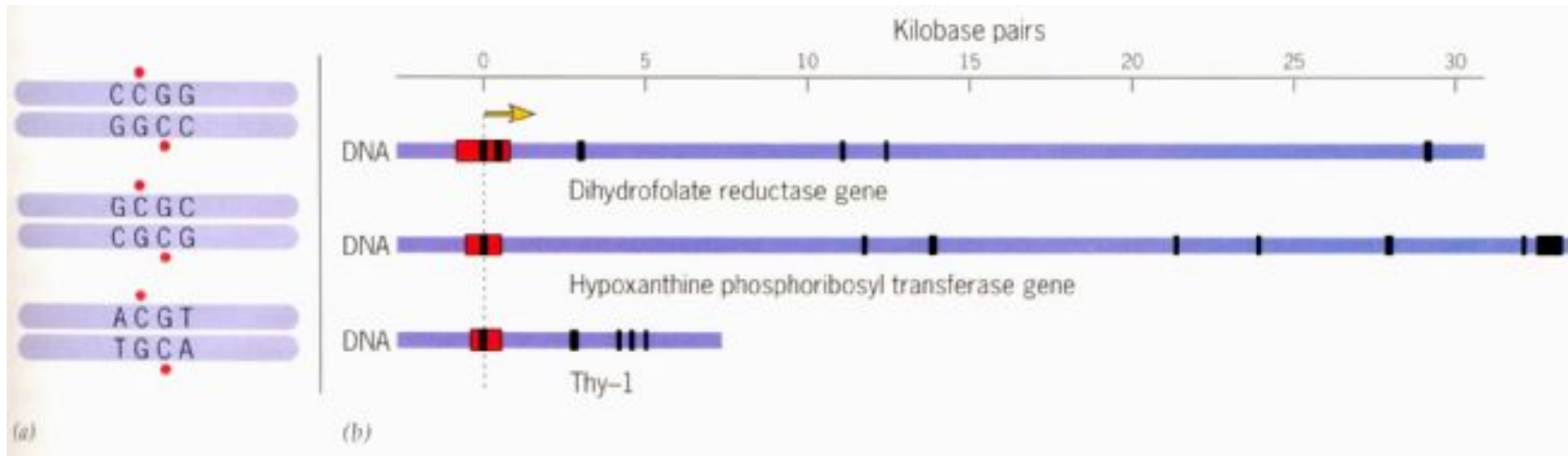


Рис. 1.23. Схема метилирования ДНК по цитозину

- Другая аналогичная пара- **урацил, тимин**. Тимин комплементарно взаимодействует сильнее, чем урацил.
- **Цитозин** также усиливает взаимодействие с гуанином и пара **Ц-Г** более прочная, чем **А-Т**.

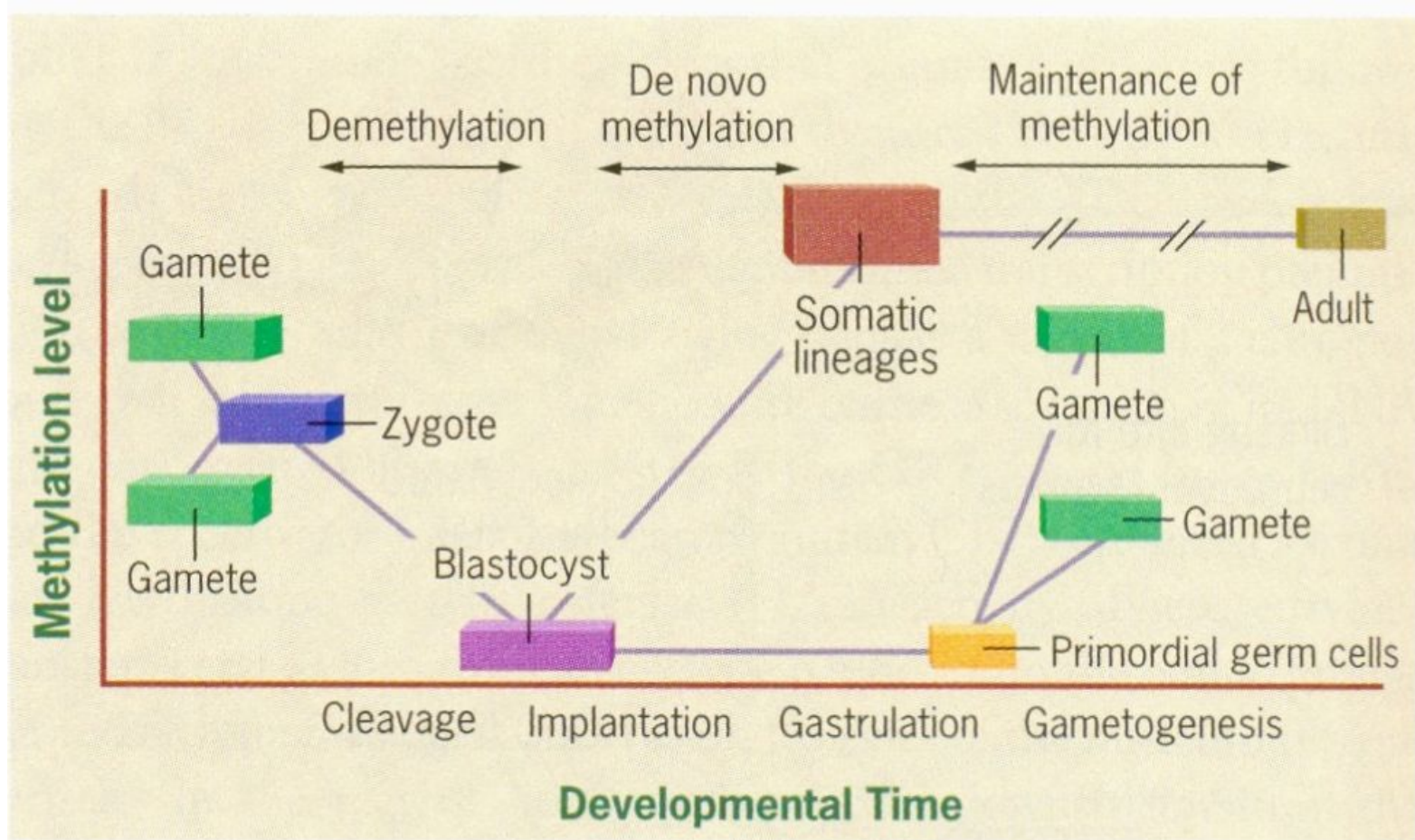


# Метилирование ДНК



**FIGURE 12.49 DNA methylation.** (a) Examples of the most common methylated nucleotide sequences in DNA. Colored dots indicate the position of the methyl groups, all of which occur at 5'-CpG-3' dinucleotides. (b) Examples of CG-rich islands in the promoter regions of

three mammalian genes. The lengths of the islands are indicated by the width of the red boxes. The widths of the exons are indicated in black; it is evident that the intervening sequences constitute the great bulk of each gene, as is usually the case. (FROM A. P. BIRD, TRENDS GENET. 3:343, 1987.)



**FIGURE 12.51** Changes in DNA methylation levels during mammalian development. The DNA of the zygote is substantially methylated. During cleavage, the genome undergoes global demethylation. Interestingly, DNA inherited from one's father undergoes demethylation at an earlier stage and by a different mechanism than DNA inherited from one's mother. After implantation, the DNA is subjected to new (de novo) methylation in cells that give rise to the embryo, whereas the DNA of the primordial germ cells, which give rise to the gametes in the adult, remains unmethylated. The DNA of the germ cells becomes methylated at later stages of gamete formation. The general level of methylation is maintained in the somatic (nongerm) cells at a high level throughout the remainder of development and adulthood. (FROM R. JAENISCH, *TRENDS GENET.* 13:325, 1997; COPYRIGHT 1997, WITH PERMISSION OF ELSEVIER SCIENCE.)

# Метилирование ДНК

Активность ДНК-метилазы и содержание 5-МЦ в ДНК зависят от ряда обстоятельств:

- а) В культуре фибробластов по мере деления клеток, уровень 5-МЦ в ДНК и активность ДНК-метилазы снижаются. Одновременно уменьшается длина теломер.
- б) С возрастом у животных и человека содержание 5-МЦ в ДНК снижается. Особенно это выражено в мозгу и сердце. Снижение 5-МЦ- одно из очень немногих проявлений старения на уровне ДНК.
- Другое из таких проявлений - укорочение теломер в делящихся клетках. На этом фоне падение уровня 5-МЦ представляется более универсальным возрастным событием.

# Метилирование ДНК

- в) Третья параллель касается **опухолевой трансформации** клеток. Эта трансформация сопровождается не только появлением теломеразной активности, но и **активацией ДНК-метилазы** с возрастанием содержания 5-МЦ. Данный феномен наблюдается при иммортализации как *in vitro*, так и *in vivo*.
- Но в случае трансформации *in vitro* вирусом SV40 между изменениями длины теломер и уровня 5-МЦ имеется различие.

# Метилирование ДНК

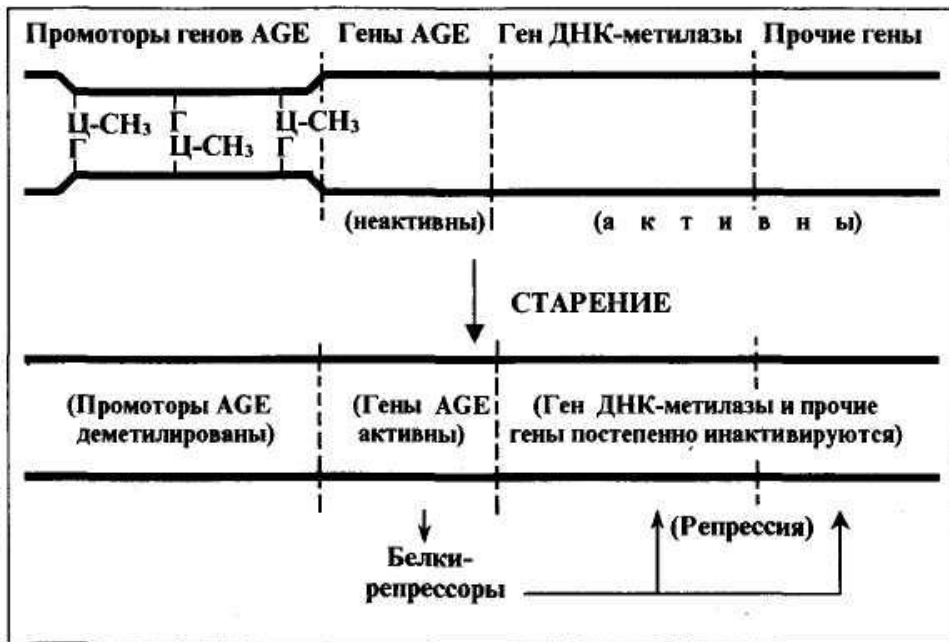
- Метилирование ДНК вовлечено в **одно из начальных событий трансформации**, которые обеспечивают преодоление старения и лимита Хейфлика.
- Метилирование ДНК, очевидно, не предупреждает развитие кризиса в культуре трансформированных клеток.
- Восстановление уровня 5-МЦ - **необходимое, но недостаточное условие опухолевого перерождения**.
- Но эти необходимые события совершаются на разных этапах трансформации: одно - на первом (при преодолении лимита Хейфлика), другое - на втором (при преодолении кризиса).

# Функции метилирования ДНК

- а) **Участие в регуляции активности генов.** Имеется положительная корреляция между функциональной активностью клеток и содержанием 5-МЦ.
- **Наиболее метилированной является ДНК мозга и печени,** в мозгу - ДНК больших полушарий и коры мозжечка. В процессе выработки условного рефлекса у крыс в ДНК коры и гиппокампа содержание 5-МЦ возрастает на 35-40 %. Гормональная стимуляция мозга дексаметазоном приводит к усилению синтеза РНК (рРНК) и увеличению степени метилированности ДНК.
- **Блокирование промоторных последовательностей,** т. е. участков ДНК, которые предшествуют структурным генам и с которыми связываются молекулы РНК-полимеразы (осуществляющие синтез РНК). При связывании РНК-полимеразы должно происходить локальное расплетение ДНК, а метилирование затрудняет расхождение цепей.

# Функции метилирования ДНК

- Метилируются промоторы генов регуляторных белков (р53), которые репрессируют функциональную активность клетки. Тогда торможение торможения, достигаемое метилированием, действительно приведет к повышению клеточной активности.



- В числе метилируемых генов могут быть и гены группы **AGE**, отвечающие за старение. Уменьшение с возрастом содержания 5-МЦ в их промоторах будет постепенно активировать эти гены.
- Чтобы в неделящихся клетках происходило снижение содержания 5-МЦ, необходимы **два условия** - **потеря молекулами ДНК уже включенных метильных групп** и **уменьшение активности ДНК-метилазы**.

•

Рис. 1.24. Возможная связь метилирования ДНК с активностью генов и процессами старения

# Функции метилирования ДНК

Исчезновение 5-МЦ осуществляется тремя способами:

1. **истинное деметилирование**, т. е. обратное превращение 5-МЦ в цитозин.
2. **эксцизионное удаление 5-МЦ**, т. е. вырезание из цепи ДНК небольшого фрагмента с 5-МЦ и замена его неметилированным участком - так, как это делает система репарации с повреждениями ДНК. Вариант этого способа - **вырезание** сразу двухцепочечного фрагмента - **ферментом** типа **Ca, Mg-зависимой эндонуклеазы**.
3. **гидролитическое дезаминирование 5-МЦ**, которое может происходить неферментативным путем (спонтанно) и приводит к превращению 5-МЦ в обычное основание тимин. Комплементарная пара 5-МЦ-Г превращается в некомплементарную пару Т-Г.



# Функции метилирования ДНК

- Диметилирование приводит к активации генов супрессорных белков, то можно предположить, что среди объектов действия этих супрессоров находится и ген ДНК-метилазы. В таком случае причиной снижения активности ДНК-метилазы является первичная потеря молекулами ДНК метильных групп.

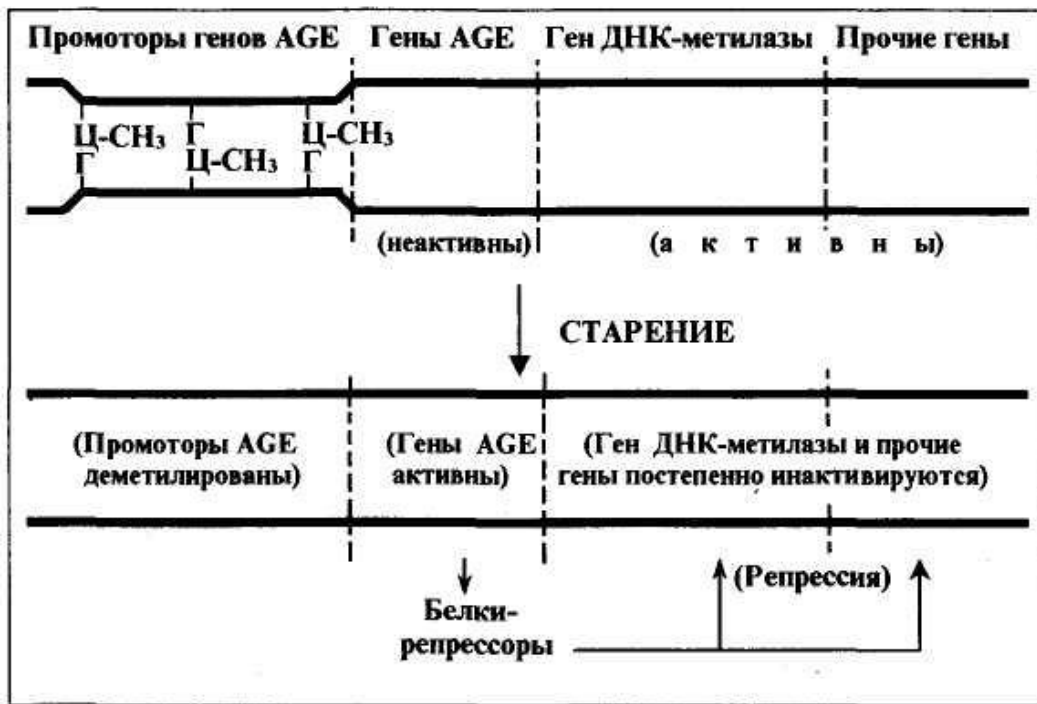


Рис. 1.24. Возможная связь метилирования ДНК с активностью генов и процессами старения

# Функции метилирования ДНК



Рис. 1.25. Ожидаемый характер изменения со временем содержания 5-МЦ в ДНК

- Образуется порочный круг: **недометилованность ДНК снижает активность ДНК-метилазы.**
- **Падение содержания 5-МЦ ( и снижение жизнеспособности клетки) будет происходить не линейно, а по гиперболическому закону: вначале -медленно, а затем - с быстро увеличивающейся скоростью.**

# Функции метилирования ДНК



Рис. 1.25. Ожидаемый характер изменения со временем содержания 5-МЦ в ДНК

- В митотических клетках на баланс метильных групп влияет еще одно обстоятельство - **образование новых цепей ДНК**, первоначально совсем лишенных 5-МЦ.
- Если при делении потребности новых цепей в метильных группах и потери их старыми цепями не компенсируются полностью ДНК-метилазой, то все больше усугубляется недометилирование ДНК.
- **Уровень 5-МЦ в ДНК вновь падает по гиперболическому закону**; только теперь в качестве аргумента удобней рассматривать не время, а количество удвоений культуры.

# Функции метилирования ДНК

- При трансформации клеток **ген ДНК-метиلاзы** тем или иным способом необратимо высвобождается из-под супрессорного действия генов AGE.
- Поэтому уровень 5-МЦ в ДНК возрастает и стабилизируется - **гены AGE блокируются**, а функциональная активность клеток возрастает. Клетки вновь оказываются способными к делению.
- Но длина теломер продолжает укорачиваться. **Требуется** второе ключевое событие - **активация теломеразы**, которая происходит в незначительном числе клеток во время кризиса

# Функции метилирования ДНК

- б) Особенно богаты 5-метилцитозином центромерные отделы ДНК. Данные отделы реплицируются не в S-фазе, а непосредственно перед расхождением хроматид - в начале анафазы митоза.
- Можно предположить: метилирование центромерных областей предупреждает их преждевременную репликацию. Для репликации необходимо расплетение цепей ДНК, а высокая степень метилированности препятствует этому.
- В начале же анафазы блок каким-то образом преодолевается - либо за счет включения более мощного расплетающего механизма, либо путем деметилирования.

# Система рестрикции и модификации у бактерий

Функциональная роль метилирования ДНК у бактерий была выяснена еще в 60-х годах XX века

- Бактериальная ДНК-метиلاза входит в систему рестрикции и модификации. Второй компонент этой системы - особый вид эндонуклеаз, **рестриктазы**.
- Весной 1974 года, когда о генной инженерии еще мало кто думал, группа известных западных ученых опубликовала письмо-обращение. В нем указывалось на потенциальные опасности зарождающегося научного направления и содержался призыв наложить мораторий на соответствующие исследования. Письмо сыграло прямо противоположную роль: интерес к данной тематике резко увеличился, и количество работ по рестриктазам, другим эндонуклеазам, а также ДНК-метилазам стало расти.

# Система рестрикции и модификации у бактерий

## *Принцип функционирования системы*

- Ключевая особенность бактериальных ДНК-метиляз и эндонуклеаз (рестриктаз) состоит в том, что данные ферменты являются **сайт-специфичными**.
- Они узнают в молекулах ДНК строго **определенные сайты** - последовательности из 4-6 нуклеотидных пар. И только при наличии таких сайтов осуществляют свое действие.

# Система рестрикции и модификации у бактерий

- При этом метилаза ДНК, узнав «свой» сайт, метилирует в нем опять-таки строго определенный нуклеотид. Чаще всего метилированию подвергается **аденин** по аминогруппе, в результате чего образуется 6-N-метиладенин, или 6-N-метиламинопурин (**6-МАП**). Реже происходит превращение цитозина в 5-метилцитозин (5-МЦ). Донором метильной группы всегда является S-AM (S аденозил метионин).
- **Метилирование сайта предупреждает воздействие на ДНК рестриктазы с той же сайт-специфичностью.** Поэтому собственная ДНК бактерии не подвергается разрушению рестриктазой.



# Система рестрикции и модификации у бактерий

- Проникшая в клетку чужеродная (вирусная) ДНК не защищена в этих локусах. ДНК будет расщеплена на несколько фрагментов, что лишит ее биологической активности.
- Система рестрикции и модификации служит **для защиты бактерий от вирусов** (бактериофагов). А роль метилирования - мечение своей ДНК в строго определенных местах.
- **Сайт-специфичность ДНК-метиلاзы и рестриктазы** у каждого вида и даже штамма бактерий своя. Разные пары ферментов (ДНК-метилаза и рестриктаза) настроены на узнавание разных сайтов.
- Некоторые бактерии имеют сразу несколько систем с разной сайт-специфичностью.

# Действие ДНК-метилаз и рестриктаз

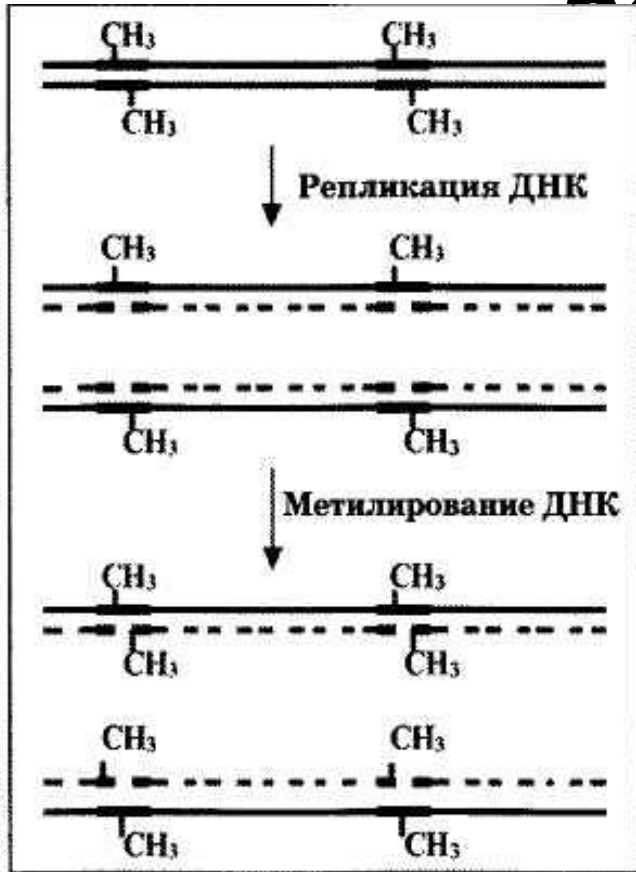


Рис. 1.26. Схема постреплика- тивного метилирования соб- ственной бактериальной ДНК

Сразу после репликации дочерние молекулы ДНК содержат метильные группы лишь в «старых» (родительских) цепях. Этого достаточно, чтобы защитить соответствующие сайты от рестриктаз.

- Вскоре метилируются сайты и новых цепей ДНК. Это обеспечивает целостность будущего «поколения» ДНК, которое образуется после репликации в дочерних клетках.

# Система рестрикции и модификации у бактерий

- У бактерий **метилование** собственной ДНК происходит **вскоре после** ее **репликации** и затрагивает **лишь новообразованные цепи**.
- Рестриктаза наносит **два одноцепочечных разрыва** - в самом сайте или на определенном расстоянии от него. В результате линейная ДНК расщепляется на  $n+1$  фрагментов, где  $n$  - количество в молекуле сайтов данного вида.

## Различают два типа систем рестрикции и модификации:

- **Системы типа I**. Функционирует единый ферментный комплекс, включающий три субъединицы - **сайт-узнающую, метилирующую и рестриктирующую**. Разрыв же чужеродной ДНК осуществляется на сравнительно большом расстоянии (порядка 1000 н. п.) от сайта узнавания (и метилирования) и в произвольном месте.

# Система рестрикции и модификации у бактерий

## Системы типа II.

- сайты являются **палиндромами**, т. е. читаются одинаково с обеих сторон (с учетом полярности цепей);
- метилаза и рестриктаза - **отдельные ферменты**;
- гидролиз производится в области сайта узнавания (и метилирования), **в строго определенном месте**;
- места гидролиза на обеих цепях ДНК не вполне совпадают, отчего образующиеся фрагменты ДНК имеют т. н. **«липкие» концы** (небольшие одноцепочечные участки, способные к спариванию).

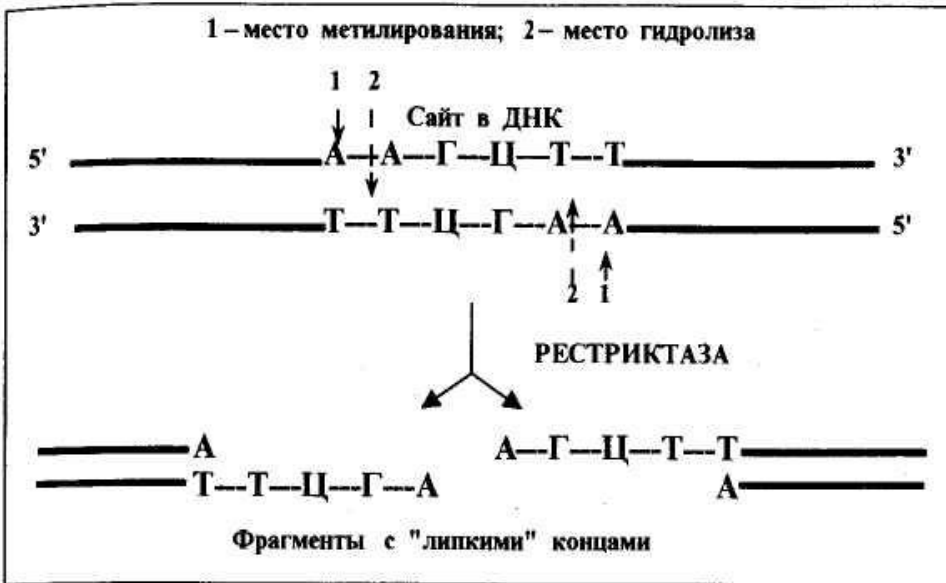


Рис. 1.27. Система рестрикции и модификации типа II: структура сайта и действие рестриктазы

# Система рестрикции и модификации у бактерий

Именно **рестриктазы типа II** стали незаменимым инструментом в генно-инженерных работах.

- Места их действия на ДНК строго определены, с их помощью можно производить фрагментирование исследуемой ДНК с «хирургической» точностью.

- Наличие же у образующихся фрагментов «липких» концов облегчает их «сшивание» с другими молекулами ДНК.

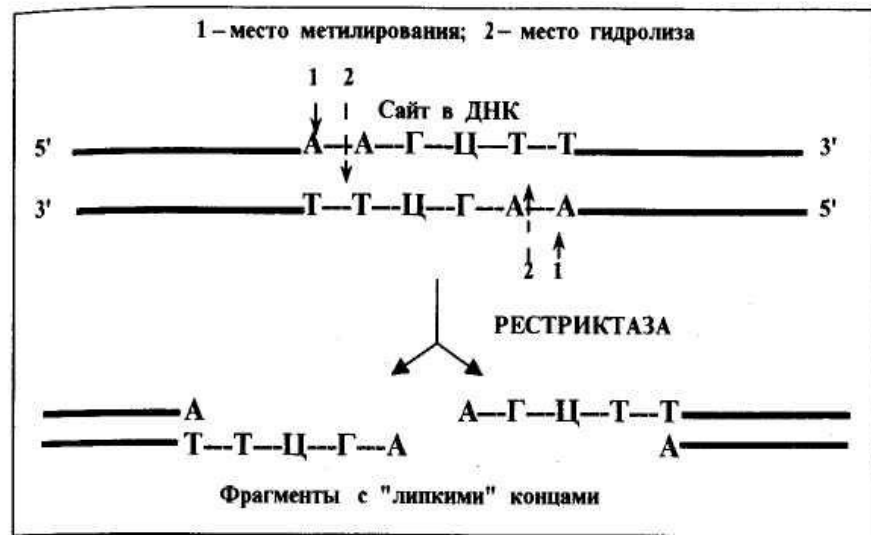


Рис. 1.27. Система рестрикции и модификации типа II: структура сайта и действие рестриктазы

# Система рестрикции и модификации у бактерий

- Как же при наличии у бактерий такой защитной системы бактериофаги все-таки сохраняются в природе?
- Системы защиты (репарационная, антиоксидантная и пр.), и данная **система** тоже **не является абсолютной**.
- При попадании в бактерии фаговая ДНК в большинстве случаев разрушается.
- В 1 случае из  $10^5$  она успевает прометиловаться бактериальной ДНК-метилазой.
- Она становится «своей» для рестриктазы и реплицируется в клетке. Фаговые ДНК несут на своих «старых» цепях метильные группы, защищены от рестрикции и поэтому вновь подвергаются метилированию.
- Все потомки бактериофага становятся резистентными к рестриктазам данного штамма бактерий. Это позволяет им беспрепятственно размножаться в других клетках этого штамма.

# Метилирование ДНК, связанное с репарацией ошибок репликации

- Имеется еще один вид метилирования ДНК, связанный сразу и с репликацией, и с репарацией ДНК.
- **Акцептором метильной группы в ДНК** при этом является пуриновое основание: **у бактерий - аденин**, находящийся в последовательности ГАТЦ; **у эукариот - гуанин**. Образуются, соответственно, 6-N-метиладенин и 6-O-метилгуанин.
- Эти основания служат **«метками» родительской цепи** при репарации ошибок репликации.
- Второй уровень контроля - **специальная** система репарации.
- Если в дочерней цепи все-таки оказывается «неправильный» (с точки зрения комплементарности) нуклеотид, то это вызывает **нарушение структуры двойной спирали**, что распознается указанной системой.

# Метилирование ДНК, связанное с репарацией ошибок репликации

- Система должна распознать - какая из цепей является родительской (правильной), а какая - дочерней.
- **Репарационный комплекс начинает перемещаться по дуплексу ДНК, пока не находит на одной из цепей неметилированную последовательность (5')ГАТЦ(3')** (у бактерий). Отсюда следует, что данная цепь - новосинтезированная.
- «Выяснив» это, репарационный комплекс разрывает здесь указанную цепь и начинает обратное движение к месту дефекта спиральной структуры, последовательно **отщепляя от новой цепи нуклеотиды - за счет 3'-5'-экзонуклеазной активности.**

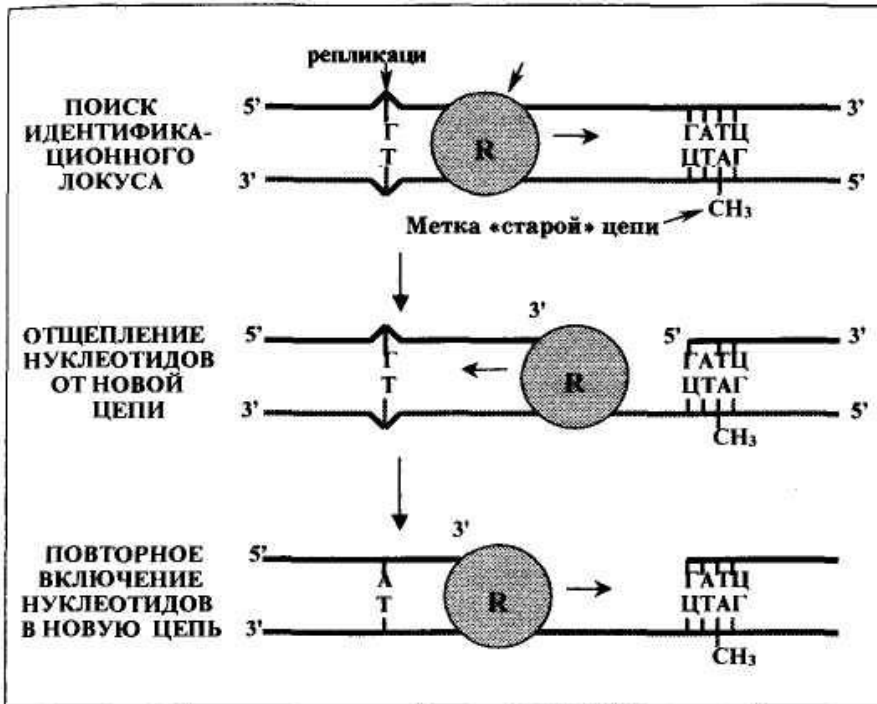


Рис. 1.28. Роль метилирования ДНК в репарации ошибок репликации



# Метилирование ДНК, связанное с репарацией ошибок репликации

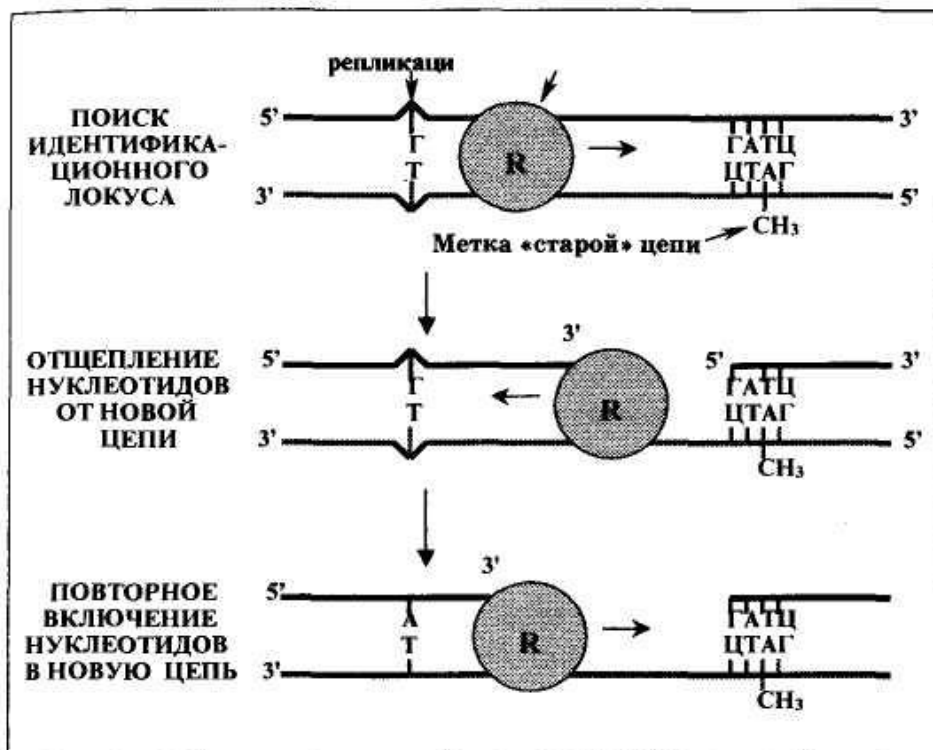


Рис. 1.28. Роль метилирования ДНК в репарации ошибок репликации

- После того как будет пройдено место ошибки, ферментный комплекс останавливается, а в дочерней цепи **оказывается большая брешь** (порой в несколько тысяч нуклеотидов) - от места разрыва цепи до места ошибки.
- Эта брешь **застраивается за счет включения ДНК-полимеразной активности**.
- **Ферментный комплекс** (или только его ДНК-полимеразный компонент) **перемещается** теперь **в противоположном направлении** - от места исправленной ошибки к месту первоначального разрыва дочерней цепи.

# Метилирование ДНК, связанное с репарацией ошибок репликации

Завершает репарацию ДНК-лигаза образующая межнуклеотидную связь в месте разрыва.

- Репарационный комплекс, исправляющий ошибки репликации, при обнаружении одной такой ошибки совершает по ДНК трехкратное перемещение:
  - от места дефекта к месту, позволяющему идентифицировать цепи,
  - назад к месту ошибки,
  - к идентификационному локусу.

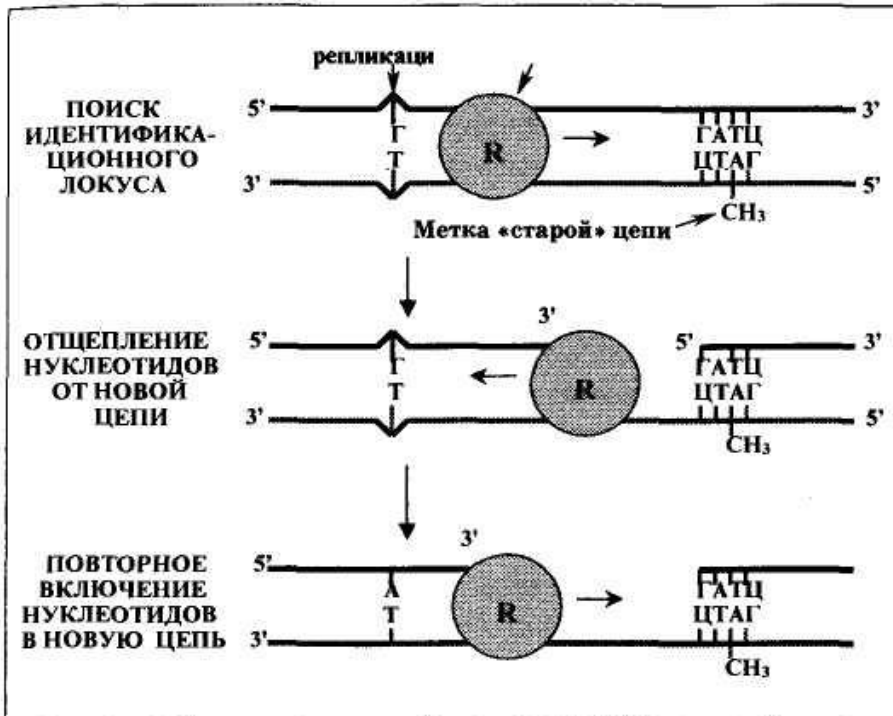


Рис. 1.28. Роль метилирования ДНК в репарации ошибок репликации

Ключевую же роль в идентификации цепей играет наличие или отсутствие в соответствующем месте метильной группы.

# Метилирование ДНК, связанное с репарацией ошибок репликации

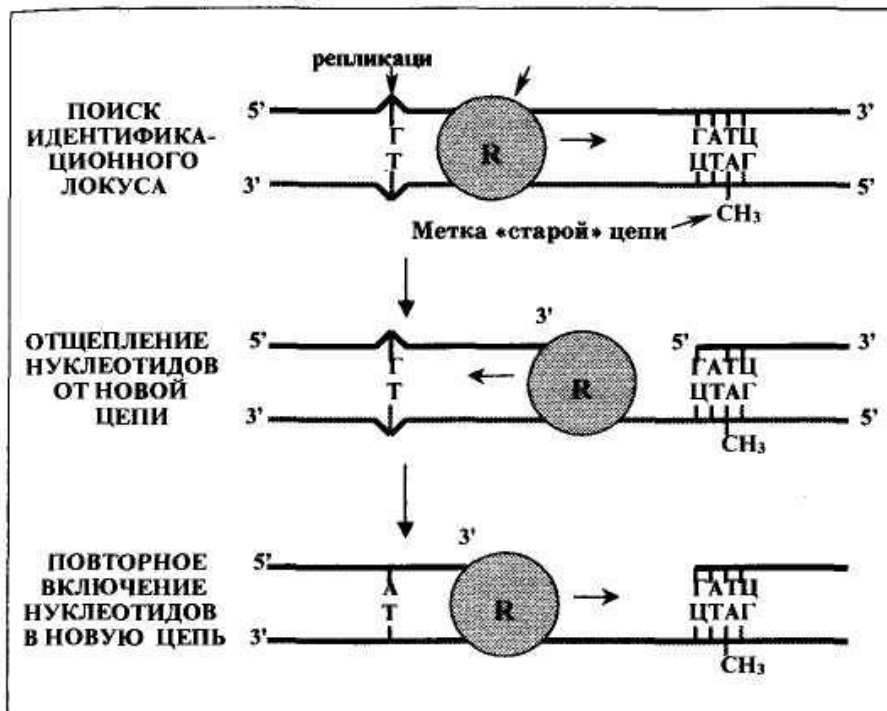


Рис. 1.28. Роль метилирования ДНК в репарации ошибок репликации

- Но после того, как репликация всей ДНК и ее проверка репарационной системой будут завершены новые цепи ДНК также должны подвергаться данному виду метилирования. Тогда в очередной S-фазе они смогут распознаваться как «старые», а значит «правильные», цепи.
- У эукариот наличие метилирования ДНК, связанного с репарацией ошибок репликации, выяснено достаточно определенно.

# Репарация повреждений ДНК

В клетках происходит репарация разнообразных повреждений ДНК, постоянно появляющихся под действием всевозможных факторов.

## Возможные повреждения ДНК

- **Агенты, вызывающие повреждения ДНК разнообразны: внешние облучения (ультрафиолетовое, инфракрасное, радиоактивное и пр.), самопроизвольные локальные изменения температуры, свободные радикалы, химические мутагены и т. д.**
- **Нередко есть связь между природой повреждающего воздействия и характером повреждений ДНК.**
- **Повреждения можно подразделить на два основных типа: повреждения оснований и повреждения цепей.**

# Репарация повреждений ДНК

## *Повреждения оснований*

- а) **Гидролитическое выщепление оснований**: происходит спонтанно, а также под действием вышеперечисленных факторов. Особенно велика скорость выщепления пуриновых оснований. В среднем за сутки в диплоидной клетке молекулы ДНК теряют  $5 \times 10^4$  таких оснований.
- Если бы эти потери не репарировались, то за 70 лет в каждой неделяющейся клетке организма молекулы ДНК лишились бы примерно 25% своих пуриновых оснований. Клетки потеряли бы свою жизнеспособность задолго до этого срока.
- Не менее драматичными были бы последствия и в делящихся клетках. Если бы сохранялся хотя бы один **депуринизированный нуклеотид**, то после репликации ДНК одна из дочерних цепей была бы лишена в данном месте уже целого нуклеотида. А после второй репликации появлялись бы молекулы ДНК, лишенные нуклеотидной пары. Что меняло бы весь смысл генетической информации за поврежденным местом.

# Репарация повреждений ДНК

- б) **Гидролитическое дезаминирование оснований**. В данном случае **теряется** не целое основание, а только его **аминогруппа**. В ходе такого процесса происходит следующее:
  - цитозин превращается в урацил - основание, которое в нормальных условиях содержится только в РНК;
  - 5-метилцитозин превращается в тимин - обычное основание ДНК;
  - аденин превращается в гипоксантин - основание, не встречающееся в норме ни в ДНК, ни в РНК.
- Такие переходы меняют генетический смысл локуса. В частности, урацил и тимин комплементарны уже не гуанину (как цитозин и 5-МЦ), а аденину. Это будет проявляться при синтезе РНК или ДНК.

# Репарация повреждений ДНК

- в) **Образование димеров тимина.** Иницируется **ультрафиолетовым облучением** и происходит там, где два тимидиловых нуклеотида соседствуют в цепи ДНК.
- При этом между их основаниями замыкаются две ковалентные связи. В результате в данном локусе ДНК нарушаются структура двойной спирали и способность последней участвовать в синтезе ДНК и РНК.

# Репарация повреждений ДНК

## *Повреждения цепей ДНК*

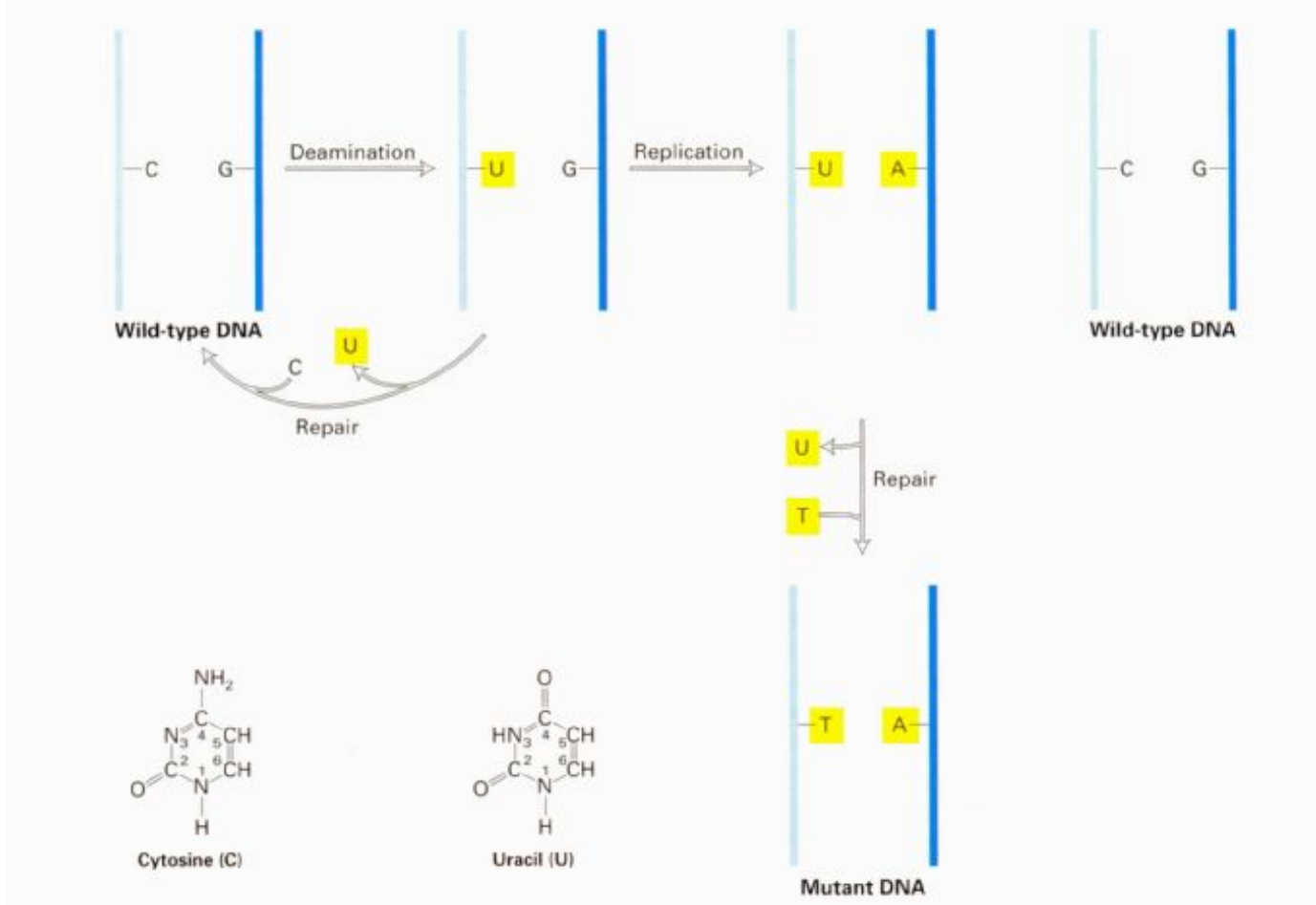
- а) **Одноцепочечные разрывы**: между соседними нуклеотидами цепи ДНК разрывается фосфодиэфирная связь (т. е. связь между фосфатной группой и дезоксирибозой). Особенно часто это происходит **под влиянием рентгеновского и радиоактивного облучения**. К такому же последствию может привести происшедшее до того **выщепление азотистого основания из цепи ДНК**.
- При накоплении в ДНК большого количества разрывов нарушается структура хромосом - появляются т. н. **хромосомные аберрации** (видимые повреждения хромосом).



# Репарация повреждений ДНК

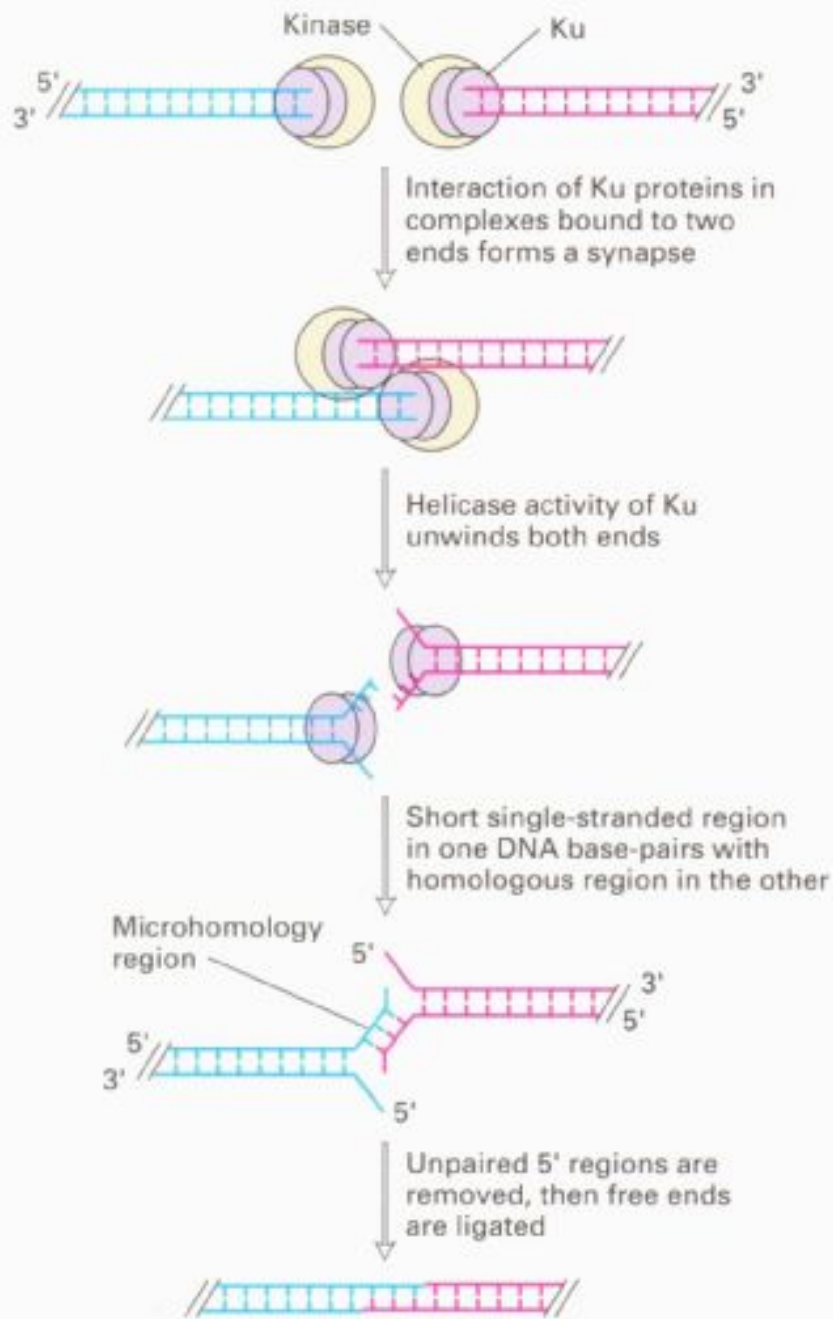
- б) **Поперечные сшивки**. Это ковалентные связи двух видов:
  - **ДНК-ДНК**, т. е. между основаниями двух цепей ДНК;
  - **ДНК-белок**, т. е. между цепью ДНК и каким-либо белком хромосомы.
- Такие **сшивки блокируют** в данном локусе **синтез ДНК и РНК**, поскольку в обоих этих процессах требуется расхождение цепей ДНК.
- Даже локальные повреждения структуры ДНК могут приводить к очень серьезным последствиям. Этим и объясняется наличие в клетках разнообразных систем репарации ДНК, специализирующихся на устранении определенных повреждений.

# Репарация повреждений ДНК



▲ **FIGURE 12-23 Formation of a spontaneous point mutation by deamination of cytosine (C) to form uracil (U).** If the resulting U·G base pair is not restored to the normal C·G base pair by repair mechanisms, it will be fixed in the DNA during replication.

After one round of replication, one daughter DNA molecule will have the mutant U·A base pair and the other will have the wild-type C·G base pair. The uracil is removed and replaced by thymine, generating a mutant DNA in which a T·A pair replaces a C·G pair.



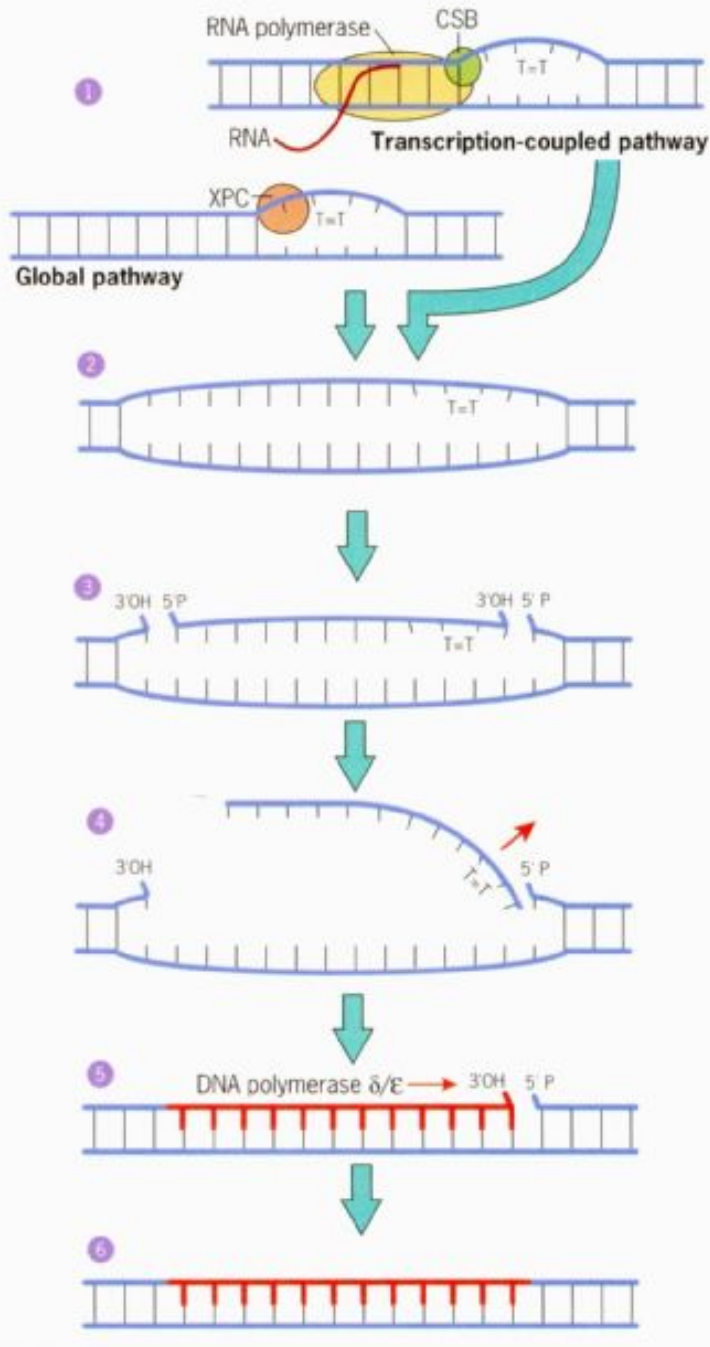
◀ **FIGURE 12-28 Repair of double-strand breaks by end-joining of nonhomologous DNAs (dark and light blue), that is, DNAs with dissimilar sequences at their ends.** These DNAs could be cut fragments from a single gene, or DNAs cut from different chromosomes. A complex of two proteins, Ku and DNA-dependent protein kinase, binds to the ends of a double-strand break. After formation of a synapse in which the broken ends overlap, Ku unwinds the ends, by chance revealing short homologous sequences in the two DNAs, which base-pair to yield a region of microhomology. The unpaired single-stranded 5' ends are removed by mechanisms that are not well understood, and the two double-stranded molecules ligated together. As a result, the double-strand break is repaired, but several base pairs at the site of the break are removed. [Adapted from G. Chu, 1997, *J. Biol. Chem.* **272**:24097; M. Lieber et al., 1997, *Curr. Opin. Genet. Devel.* **7**:99.]

# Примеры репарации ДНК

- Общий принцип репарации ДНК основан на том, что вероятность одновременного повреждения в одном локусе сразу обеих цепей весьма мала. Поэтому одна из цепей (неповрежденная) может служить в качестве матрицы при восстановлении нормальной структуры поврежденной цепи.

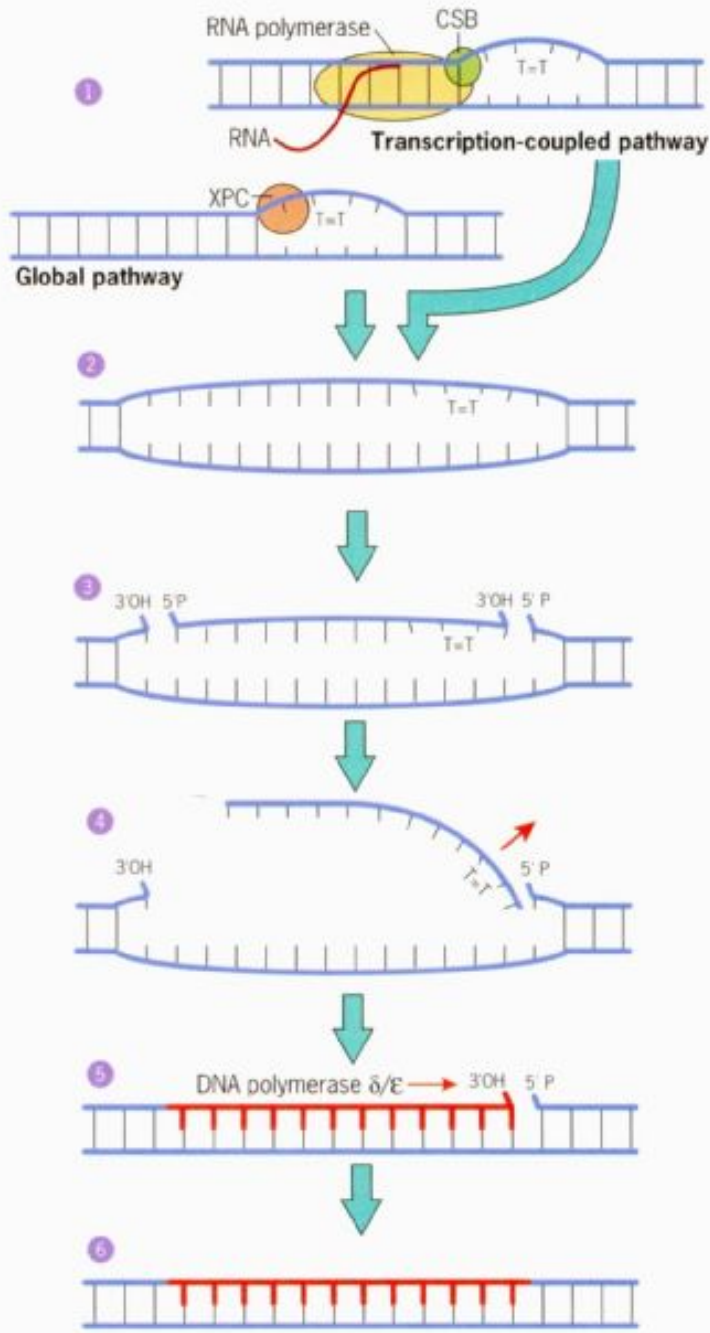
## *Удаление тиминового димера: репарация с эксцизией участка цепи*

- У растений и бактерий тиминные димеры могут удаляться с помощью **прямой фоторепарации**. Ее осуществляет фермент, который, используя энергию света, просто разрывает ковалентные связи между остатками тимина.
- У бактерий существует и другой механизм; видимо, аналогичный способ используется у животных и человека. Его суть:
- **вырезание (эксцизия) из поврежденной цепи фрагмента, содержащего тиминный димер, и**
- **ресинтез аналогичного фрагмента *de novo*.**



# Вырезание (эксцизия) из поврежденной цепи фрагмента

1. Фермент (**эксцинуклеаза**), находит место повреждения и
2. **разрывает по обе стороны** от него соответствующую **цепь ДНК**. Тем самым вырезается фрагмент из 12-13 нуклеотидов, включающий **тиминовый димер**
3. В процессе участвует **репарационная эндонуклеаза II**, которая разрывает межнуклеотидную связь **с одной стороны (5')** от димера



4. Затем специальная экзонуклеаза поочередно **отщепляет до 100 нуклеотидов.**
5. Ресинтез фрагмента осуществляется **ДНК-полимеразой P.**
6. Последняя межнуклеотидная связь образуется **ДНК-лигазой.**

# Примеры репарации ДНК



- Иногда встречаются генетические дефекты данной репарационной системы. Одна из таких наследственных болезней - **пигментная ксеродермия**. При этом кожа чрезвычайно чувствительна к свету, поскольку **УФ-облучение** провоцирует образование димеров тимина.

# Преждевременное старение

- Другой вариант - синдром преждевременного старения;
- Это подтверждает предположение о том, что и нормальное старение связано с ослаблением деятельности систем репарации ДНК (равно как и других защитных систем).

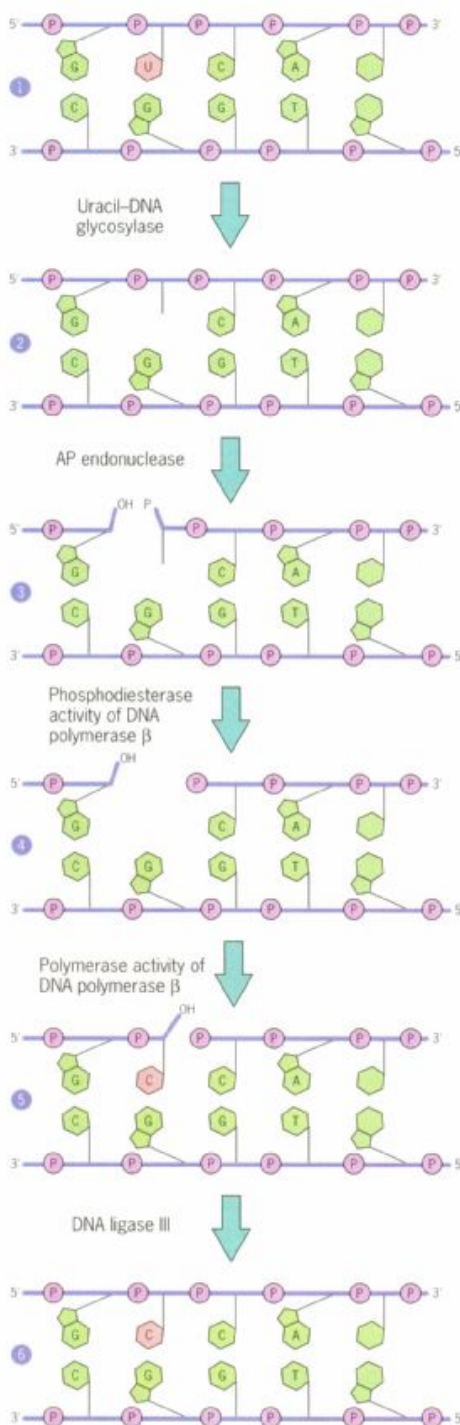




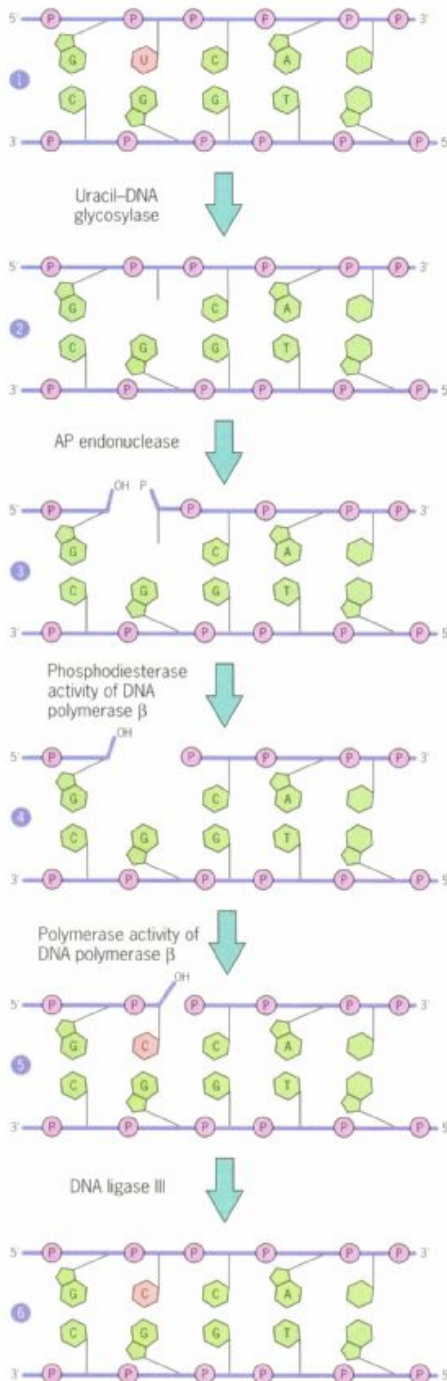
# Примеры репарации ДНК

*Удаление остатков урацила и репарация участков, лишенных основания*

1. Остатки урацила появляются в ДНК в результате гидролитического дезаминирования цитозина.
  - В репарации принимают участие 5 ферментов, из которых первый специфичен в отношении только данных нарушений.
2. Это **урацил-ДНК-гликозидаза**: обнаруживая урацил в ДНК, она выщепляет его путем разрыва связи с пентозо-фосфатным остовом цепи. Образуется **апиримидиновый сайт**.  
(Продолжается от 2 до 24 ч)



# Примеры репарации ДНК



3. Репарационная эндонуклеаза I расщепляет остов по месту отсутствия основания. По некоторым сведениям, апиридиновые и апуриновые локусы узнаются разными эндонуклеазами.

4. Затем экзонуклеаза отщепляет оставшийся дезоксирибозофосфат и, возможно, еще 1-2 нуклеотида. Таким образом, в отличие от репарации тиминовых димеров, здесь размер выщепляемого участка поврежденной цепи очень мал.

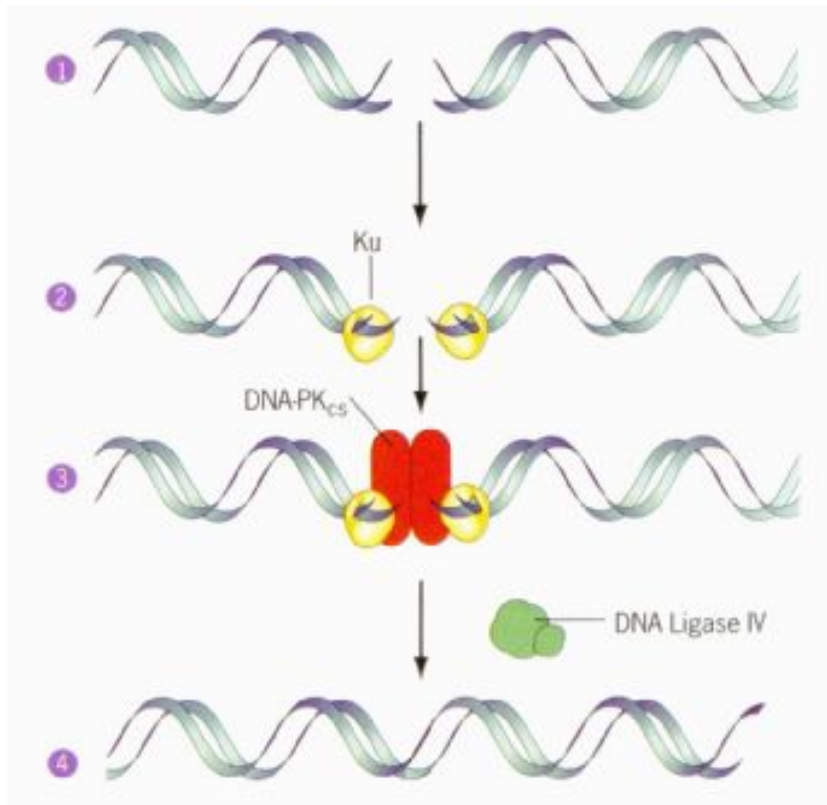
5. Далее ДНК-полимераза  $\beta$  достраивает репарируемую цепь (т. е. включает 1-3 нуклеотида),

6. ДНК-лигаза сшивает ее.

- По сравнению с предыдущим типом репарации (продолжающимся от 2 до 24 ч), данный процесс занимает гораздо меньше времени - от 5 мин до 2 ч.

# Примеры репарации ДНК

- Однако тот же механизм не может исправлять сходное повреждение - дезаминирование 5-метилцитозина с образованием тимина. Действительно, тимин - нормальное основание ДНК, и не существует фермента, настроенного на его выщепление.
- Репарация могла бы быть основана лишь на узнавании дефекта спаривания в паре Т-Г (заменившей пару 5-МЦ-Г) - примерно так же, как это происходит при репарации ошибок репликации. Но функционирует ли этот механизм вне S-фазы, неясно. Поэтому некоторые авторы считают, что **дезаминирование 5-МЦ не репарируется**.
- Спонтанное дезаминирование 5-МЦ в половых клетках, как бы редко оно ни происходило, меняет генетический смысл соответствующих локусов ДНК, и это передается в генотип потомства.



1. Распознавание повреждения
2. Детекция разорванных цепей гетеродимера протеином Ku
3. ДНК- Ku рекрутирует протеин ДНК-РК<sub>cs</sub> который катализирует сублиединицу ДНК-киназы
4. Восстановление и сшивание ДНК-лигазой