

Министерство образования и науки Российской Федерации
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт биомедицинских систем и технологий

Работа допущена к защите
Заведующий кафедрой
_____ О.Л. Власова
«___» _____ 2019 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРА

ВЫБОР РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ДЛИН ТЕЛОМЕР

по направлению 16.04.01 Техническая физика
образовательной программы 16.04.01_16 Физико-химическая биология клетки и
биотехнология

Выполнил

студент гр.24741/3 _____ К. В. Мастерова

Руководитель

доцент кафедры МФ, к.б.н., доцент _____ И. М. Спивак

Консультант

доцент кафедры МФ, к.б.н., доцент _____ И. М. Спивак

Консультант

по нормоконтролю

доцент кафедры МФ, к.ф-м.н., доцент _____ В. П. Октябрьский

Санкт-Петербург

2019

РЕФЕРАТ

На 45 с., 9 рисунков, 3 таблицы

ТЕЛОМЕРА, КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР, ИЗМЕРЕНИЕ ТЕЛОМЕР, TOP1, 36B4, РЕФЕРЕНСНЫЙ ГЕН

В данной работе даны общие понятия о теломерах, их строении и свойствах. Произведен анализ литературы и определена важность дальнейшего изучения теломер относительно процесса старения и ряда заболеваний. В работе описываются подходы к изучению метода измерения длины теломер, на основе которых были проведены эксперименты по определению длины теломер с помощью различных референсных генов (36B4 и TOP1).

THE ABSTRACT

45 pages, 9 pictures, 3 table

TELOMERE, QUANTITATIVE PCR, MEASUREMENT TELOMERE, TOP1, 36B4, REFERENCE GENE

This paper provides general concepts about telomeres, their structure and properties. An analysis of the literature has been carried out and the importance of further studying the telomere regarding the aging process and a number of diseases has been determined. The paper describes the approaches to the study of the method of measuring the length of telomeres, on the basis of which experiments were carried out to determine the length of telomeres using various reference genes (36B4 and TOP1).

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЛИТРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1. Теломера	8
1.1.1. Строение и функции теломер	8
1.1.2. Белки шелтеринового комплекса	11
1.1.3. Укорочение теломер.....	14
1.1.4. Теломерные удлинительные механизмы регуляции	15
1.1.5. Теломераза и теломеразозависимое удлинение теломер	16
1.1.6. Теломеразное независимое удлинение (механизм ALT)	17
1.1.7. Болезни, связанные с теломерами	18
1.2. Измерение длин теломер.....	20
1.3. Топоизомераза 1	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1. Материалы	24
2.2. Методы.....	24
2.2.1. Выделение ДНК из периферической крови	24
2.2.2. Измерение длин теломер.....	25
2.2.3. Статистическая обработка	31
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	36
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	39

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы вопросами старения и продолжительности жизни интересуется все больше количество людей. Гипотеза о роли теломер в старении клеток и развитии опухолевого роста, а также других серьезных заболеваний стала получать все большую экспериментальную и клиническую поддержку.

Теломеры представляют собой специализированные нуклеопротеиновые структуры, присутствующие на концах каждой хромосомы, которые функционируют для поддержания стабильности генома. Эукариотические теломеры обычно оканчиваются выступом 3'-одноцепочечной ДНК. Он способен изменять свою конформацию и образовывать структуру T- и D-петли. Их основной функцией является предотвращение слипания хромосом друг с другом, а также защита от узнавания системами репарации теломерных участков как повреждения ДНК. Эта 3'-одноцепочечная повторяющаяся ДНК закичивается назад и отжигается до двухцепочечной, образуя большую физическую структуру петли, называемую теломерной петлей (также называемой T-петлей). Теломеры могут связываться с несколькими белками, которые называются комплексом шелтерина, который позволяет клеткам отличать теломеры от участков повреждения ДНК и регулировать удлинение теломер. Шелтерин может влиять на длину теломер, блокируя действие теломеразы. Когда теломера слишком длинная, к повторным массивам TTAGGG присоединяется больше шелтерина для ингибирования теломеразы. При слишком короткой теломере шелтерин становится расслабленным, так что теломераза может восстановить свою длину.

Хорошо известно, что постепенное уменьшение длины теломер связано с процессом клеточного старения и, следовательно, с патобиологией возрастных заболеваний. Кроме того, локализация теломер на периферии ядра играет важную роль в пространственно-временной организации генома и в обеспечении достоверной сегрегации хромосом во время мейоза.

К настоящему времени проведено множество исследований, в которых описывается корреляция между длиной теломер и длительными психологическими стрессами и психическими расстройствами, а также различными заболеваниями, в том числе онкологическими. До сих пор достоверно неясно, что первично: укорочение длин теломер или патологическое состояние.

С тех пор, как Алексей Оловников сформулировал теорию теломер в 1971 году, открылась новая эра, и возникла необходимость в точном измерении длины теломер. В 2002 году Р. Каутон разработал простой протокол измерения длины теломер с использованием технологии ПЦР в реальном времени. Чтобы усилить повторы теломер, Каутон также предложил специальный дизайн праймеров. Это было связано с невозможностью использования полностью комплементарных теломерных праймеров. Полная комплементарность приводит к образованию димеров праймеров и их эффективной амплификации в ущерб амплификации теломер. Чтобы уменьшить вероятность амплификации димеров праймеров, Каутон предложил использовать праймеры, которые связываются с сегментами теломерных повторов, обогащенными G / C, с одним несоответствием на других основаниях с теломерами и двумя несоответствиями между собой. Суть метода заключается в том, что относительная средняя длина теломер оценивается путем определения отношения числа копий последовательностей повторов теломер к числу копий эталонного гена с известным фиксированным числом копий на геном. В качестве эталонного гена Каутон предложил использовать RPLP0 (кодирующий субъединицу латерального стебля рибосомного белка P0), который был упомянут как 36B4 в его протоколе. Во время разработки протокола в 2002 году 36B4 считался геном единственной копии. Однако недавно было продемонстрировано, что RPLP0 (36B4) является типичным рибосомным геном с множеством обработанных псевдогенов в геноме человека [предоставлено RefSeq, июль 2008]. Метод, описанный в данной работе, основан на использовании другого гена в качестве эталона, TOP1. Здесь мы приводим подробный протокол о том, как измерять

длину теломер с использованием TOP1-праймеров, которые строго специфичны для SCG (single-copy gene) и не образуют димеры.

Целью данного исследования являлось сравнение результатов измерения длин теломер, полученных оригинальным протоком [21, 54], где в качестве референсного гена использовался ген 36B4, и нового гена TOP1.

Задачи:

- 1) Выделить ДНК из периферической крови у 20 пациентов гериатрического центра.
- 2) Измерить длину теломер периферической крови методом кПЦР с помощью генов 36B4 и TOP1.
- 3) Сравнить полученные результаты.

ГЛАВА 1. ЛИТРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Теломера

1.1.1. Строение и функции теломер

Теломеры являются специализированными концевыми структурами на конце эукариотических хромосом, состоящими из повторов TTAGGG и различных белков, таких как шелтерин и теломераза. В 1938 году термин «теломера» (от греческих слов «*telos*» – конец и «*meros*» - часть) впервые предложил Герман Меллер. Он изучал разрывы хромосом *Drosophilamelanogaster*, индуцированные рентгеновским излучением. Так как фрагментированные хромосомы часто сливались друг с другом, в отличие от нормальных, он выдвинул предположение о наличии особых концевых участков на хромосомах, которые предотвращают это слияние.

Теломеры обеспечивают стабильность хромосом и защищают концы от деградации и от слияния с другими хромосомами. Они выступают в качестве гарантий предотвращения потери важной генетической информации во время репликации ДНК из-за неспособности ДНК-полимеразы реплицировать ДНК на концах линейных хромосом [13].

Длина теломер сильно различается у разных видов, от приблизительно 300 пар оснований у дрожжей [61] до многих килобаз у людей (около 5-15 килобайт) и у мышей (20-30 килобайт). Хромосомы постепенно теряются с каждым раундом клеточного деления. Потеря теломерных повторов вызывает старение в клетках и предотвращает рак [67].

Таким образом, теломеры построены из дезокси-нуклеопротеидов, т.е. комплексов ДНК с белками (Рис. 1.1).

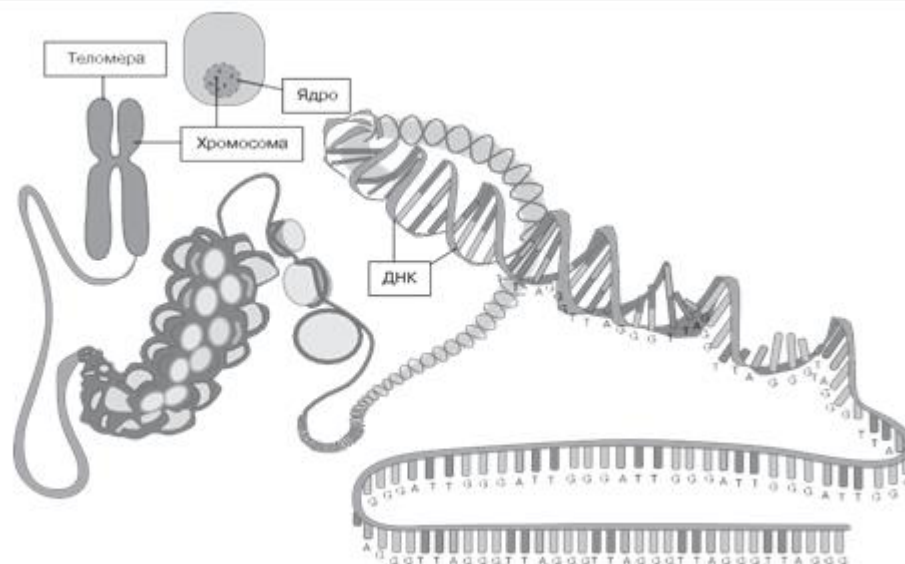


Рис. 1.1. Структура теломер и их расположение в хромосоме и в клетке [34].

Эукариотические теломеры обычно оканчиваются выступом 3'-одноцепочечной ДНК. Эта 3'-одноцепочечная повторяющаяся ДНК зацикливается назад и отжигается до двухцепочечной, образуя большую физическую структуру петли, называемую теломерной петлей (также называемой T-петлей). T-петли были впервые идентифицированы с помощью электронной микроскопии очищенных теломерных рестрикционных фрагментов из клеток человека и мыши [31]. T-петли могут обеспечить общий механизм для маскировки концов теломер от клеточных активностей, которые могут воздействовать на концы ДНК и регулировать удлинение и укорочение теломер [31]. В структуре T-петли было предложено, чтобы 3'-выступ имел место для проникновения в двухцепочечную теломерную ДНК на основе спаривания с C-цепью и смещения G-цепочки, образуя D-петлю (петлю смещения). Вторжение нитей происходит на расстоянии от физического конца теломер и, следовательно, приводит к большой структуре T-петли. Они являются консервативным аспектом структуры теломер и были предположены для защиты теломер и регуляции теломеразы [42]. В нормальных соматических клетках теломеры укорачиваются после каждого деления клетки из-за проблемы с конечной репликацией и отсутствия активности теломеразы [3]. Однако теломера может удлиняться теломеразой, когда она активируется в

клетках зародышевой линии, стволовых клетках и опухолевых клетках [27]. Помимо этого, существует альтернативный механизм (ALT) [14], который также может поддерживать длину теломер. Помимо роли защиты концов хромосом, структура Т-петель также может привести к удлинению или укорочению теломер. Потому что вторжение 3'-выступающей нити в Т-петлях похоже на структуру в рекомбинационной зависимой репликации (Рис. 1.2). И небольшая линейная или круглая теломерная ДНК может образоваться из-за неправильного разрешения Т-петель [48].

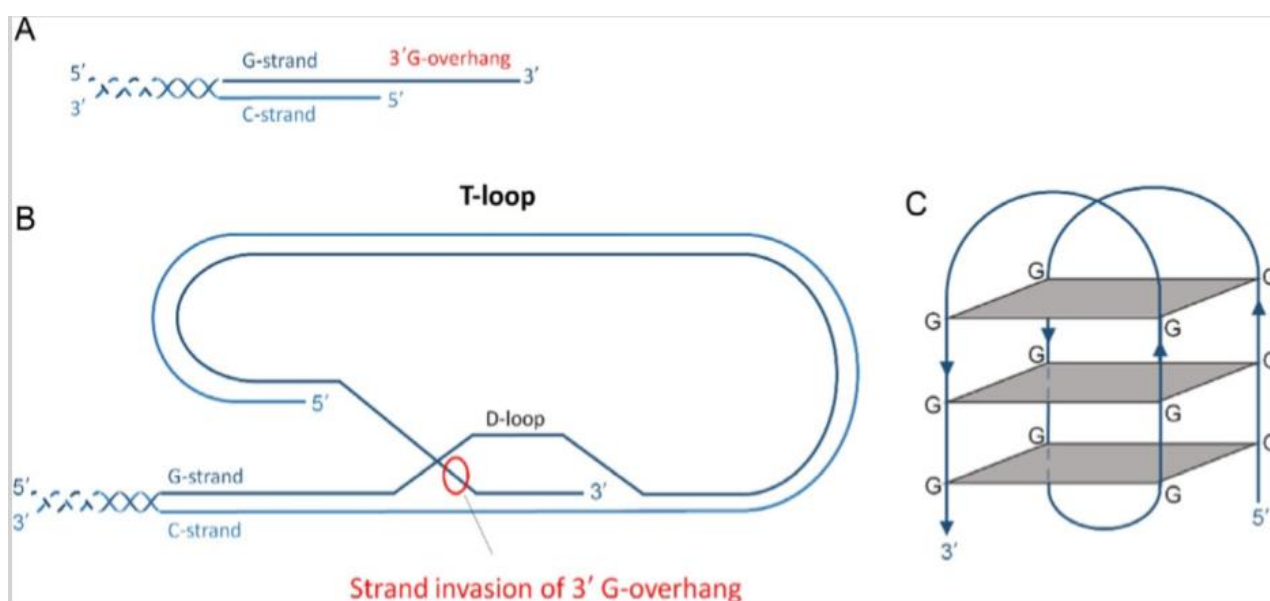


Рис. 1.2. Различные конфигурации теломер [26].

Основными функциями теломер являются:

1. Стабилизационная:

- а) наличие теломер предохраняет генетически значимые отделы клетки от недорепликации при отсутствии теломеразы;
- б) при наличии в клетке теломеразной активности представляется возможной стабилизация концов разорванных хромосом. К местам разрыва присоединяется теломерная ДНК. Это позволяет хромосомным фрагментам стабилизироваться и функционировать.

2. Механическая: теломеры участвуют в фиксации хромосом к ядерному матриксу.

3. Влияние на экспрессию генов: активность генов, расположенных рядом с

теломерами, репрессирована. При значительном укорочении теломер эффект положения пропадает, и прителомерные гены активируются.

4. «Счетная» функция: теломерные отделы ДНК отсчитывают число делений клетки после исчезновения теломеразной активности. После этого нарушается клеточный цикл и, в итоге, клетка погибает [50].

1.1.2. Белки шелтеринового комплекса

Как упоминалось выше, теломеры представляют собой особые последовательности ДНК. В клетках млекопитающих теломера состоит из двухцепочечной области и одноцепочечного 3'-выступа. Теломеры могут связываться с несколькими белками, которые называются комплексом шелтерина. Теломерный шелтерин состоит из шести теломер-специфических белков (Trf1 (Telomere repeat binding factor 1), Trf2 (Telomere repeat binding factor 2), Pot1 (Protection of telomeres 1), TPP1 (Telomere protected protein 1), TIN2 (TRF1-interacted nuclear protein 2) и Rap1 (Rif-associated protein 1). Три протеина шелтерина, Trf1, Trf2 и Pot1, напрямую связываются с последовательностями теломер. Три других компонента шелтерина, Tin2, Tpp1 и Rap1, не могут напрямую распознавать теломерную ДНК, но вместе с Trf1, Trf2 и Pot1 они образуют комплекс, который позволяет клеткам отличать теломеры от участков повреждения ДНК и регулировать удлинение теломер [42]. Шелтерин может влиять на длину теломер, блокируя действие теломеразы. Когда теломера слишком длинная, к повторным массивам TTAGGG присоединяется больше шелтерина для ингибирования теломеразы. При слишком короткой теломере шелтерин становится расслабленным, так что теломераза может восстановить свою длину [42].

Двухцепочечная теломерная ДНК в теломерах млекопитающих связана с двумя белками, связанными с шелтеринном, факторами связывания повторов TTAGGG (Trf1 и Trf2) [16, 31], Среди них Trf1 был первым выделенным белком на основе его специфичности к двухцепочечным повторам TTAGGG [70]. Trf1 может индуцировать небольшой изгиб в дуплексных повторах

TTAGGG и может стимулировать складывание теломер. Trf1 связывает ДНК в качестве димера с использованием большого консервативного домена вблизи N-конца белка для взаимодействия Trf1-Trf1 [12]. Trf1 является подавителем удлинения теломер. Исследования показали, что длительная сверхэкспрессия Trf1 в теломераз-позитивной опухолевой клеточной линии приводит к постепенному и постепенному укорочению теломер. Наоборот, удлинение теломер индуцируется экспрессией доминантно-негативного мутанта Trf1, который ингибирует связывание Trf1 с теломерами. Trf1 не оказывает заметного влияния на экспрессию активности теломеразы, возможно, связывание Trf1 контролирует длину теломер путем ингибирования действия теломеразы на концах отдельных теломер [62]. Tin2 может усилить некоторые архитектурные эффекты Trf1 [39]. Как мы описали выше, теломерная ДНК *in vitro* может быть выделена в виде больших дуплексных петель, называемых T-петлями. Подразделение шелтерина Trf2 является основным игроком в создании T-петель. Trf2 также играет ключевую роль в подавлении реакции повреждения теломерной ДНК (Рис. 1.3).

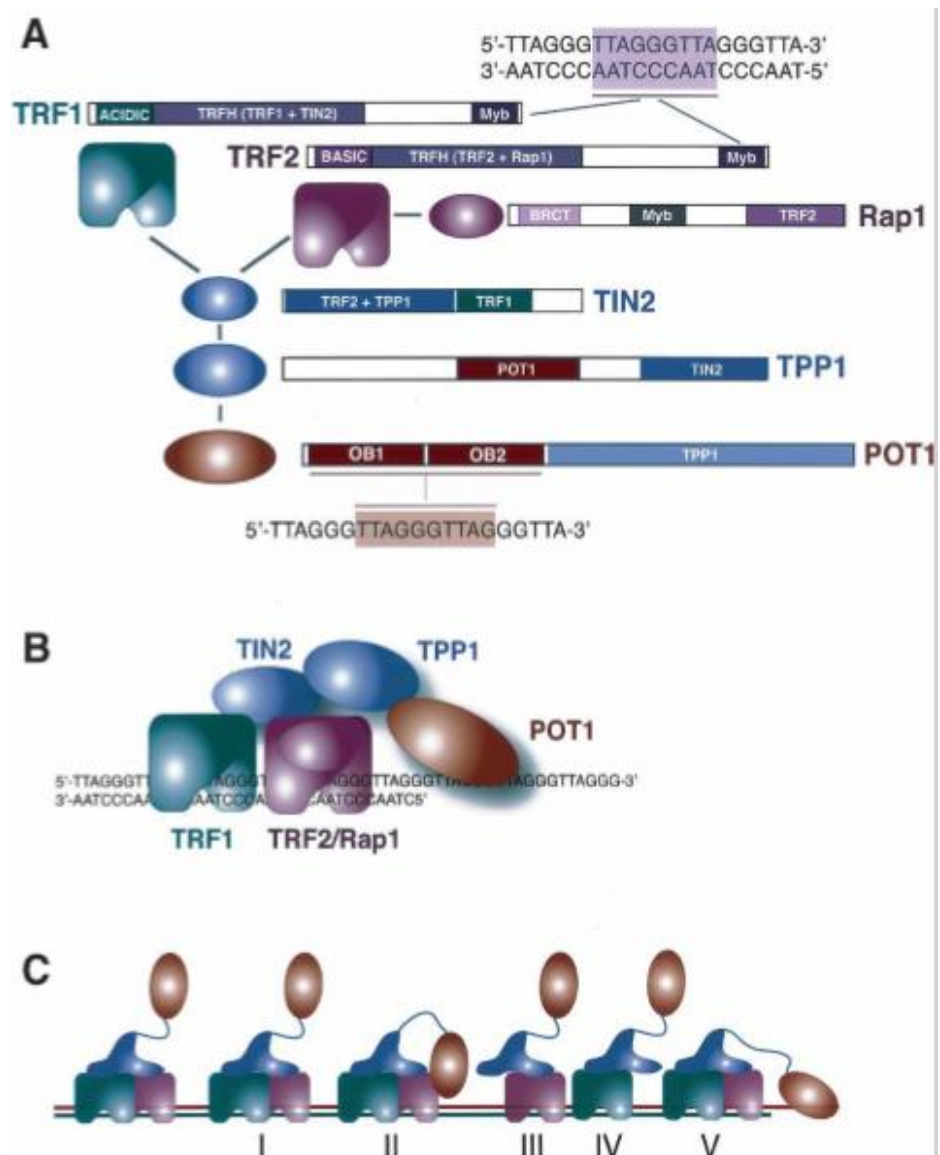


Рис.1.3. Белки шелтерины. (А) Домены белков и их взаимодействие с другими белками и ДНК. (В) Сборка комплекса на теломере. (С) Различные субкомплексы и возможные их взаимодействия с теломерной ДНК [42].

Pot1 (защита теломер) был идентифицирован как наиболее консервативный компонент комплекса шелтерин [11]. В отличие от связывания Trf1 и Trf2 с двухцепочечной теломерой, Pot1 специфически связывает свесы одноцепочечной ДНК (ssDNA) на концах теломер и подавляет нежелательные действия по восстановлению ДНК [47].

Trp1 не может напрямую связываться с последовательностью теломер, но связывается с комплексом Pot1-ssDNA и усиливает взаимодействие Pot1-ssDNA. Он идентифицирован как связывающий партнер Pot1. Ассоциация

Trp1-Pot1 усиливает аффинность Pot1 к одноцепочечной теломерной ДНК [11, 66, 68]. Связывание комплекса Pot1-Trp1 с теломерной ssДНК служит для захвата концов теломер и предотвращения доступа теломеразы к матрице ssДНК. Trp1 и Tin2 также необходимы для связывания комплексов Trf1 и Trf2. Сверхэкспрессия Trp1 усиливает ассоциацию Tin2-Trf2. И наоборот, нокаун Trp1 снижал способность эндогенного Trf1 связываться с комплексом Trf2. Скоординированные взаимодействия между Trp1, Tin2, Trf1 и Trf2 могут обеспечить надежную сборку телосомы, нацеливание ее теломер и, в конечном итоге, регулируемое поддержание теломер [55].

Rap1 тесно связан с Trf2. Хотя Rap1 может связываться с ДНК-матрицами в отсутствие Trf2 с предпочтением двухцепочечного одноцепочечного соединения, когда Trf2 и Rap1 находятся в комплексе, его сродство к двухцепочечным теломерным последовательностям в 2 раза выше, чем у одного только Trf2 и более чем в 10 раз выше для теломерных 3'-концов [5]. Соответственно, Rap1 был незаменим для основных функций Trf2. Он участвует в репрессии передачи сигналов ATM, NHEJ (негомологичное присоединение конца) и HDR (гомологичное восстановление) [46]. Особенно Rap1 имел решающее значение для подавления гомологически направленного восстановления (HDR), которое может изменять длину теломер. Человеческий Rap1 влияет на гомеостаз длины теломер, и эксперимент предполагает, что Rap1 может подавлять слияния теломер [45].

1.1.3. Укорочение теломер

Теломеры не могут быть полностью продублированы во время деления клеток из-за проблемы конечной репликации, и эта недостаточность вызывает укорочение теломер со скоростью 30-50 п.н. на деление клеток [48]. Эта проблема вызвана тем, что ДНК-полимераза требует, чтобы РНК-праймер инициировал дупликацию. Когда праймер РНК связывается с самыми последними нуклеотидами (оканчивающимися на 3'-ОН) ведущей цепи, полимеразы связывается с двойной цепью гетеродуплекса ДНК-РНК и начинает

полимеризацию, двигаясь вдоль цепи ДНК. Когда ДНК-полимераза удаляется, праймер РНК диссоциирует, оставляя за собой разрыв (не дублированная цепь ДНК), поэтому вновь синтезированная цепь, таким образом, короче, чем матричная цепь, соответствующая размеру праймера РНК [19]. Это основная причина укорочения теломер. Кроме того, клеточная среда также играет важную роль в регулировании длины теломер и активности теломеразы. Окислительный стресс может укорачивать теломеры. Подавление окислительного стресса антиоксидантными агентами, такими как витамин С, продлевает репликативную продолжительность жизни за счет снижения скорости укорочения теломер [69]. Хронический психологический стресс может также привести к укорочению теломер и снижению функции теломеразы [28].

Когда теломеры укорачиваются достаточно, клетка начинает запускать начальные фазы старения. Таким образом, длина теломер может служить молекулярными часами процесса старения или потенциалом дальнейшего клеточного деления. С одной стороны, это может увеличить инициацию опухоли, вызывая хромосомную нестабильность и генетические изменения, которые приводят к клеточной трансформации. С другой стороны, опухолевые клетки должны стабилизировать укорочение теломер, чтобы избежать накопления слишком высоких уровней нестабильности, которые в конечном итоге убили бы раковые клетки. Эта гипотеза согласуется с наблюдением, что большинство раковых заболеваний человека имеют критически короткие теломеры, но в то же время показывают реактивацию теломеразы [37].

1.1.4. Теломерные удлинительные механизмы регуляции

На длину теломер влияют изменения активности теломеразы, обратной транскриптазы, которая удлиняет теломеры [30], а также так называемое альтернативное удлинение теломер (путь ALT), которое связывается с гомологичной рекомбинацией между теломерными последовательностями известный как теломерный обмен сестринскими хроматидами (T-SCE) [26].

1.1.5. Теломераза и теломеразозависимое удлинение теломер

Теломеры постепенно теряются с каждым раундом деления клеток, которое может быть расширено теломеразой. Теломераза представляет собой обратную транскриптазу (РНК-зависимая полимераза). Теломераза состоит из белка и РНК-субъединицы, которая удлиняет хромосомы путем добавления последовательностей TTAGGG к концу существующих хромосом. Теломеразу также называют теломерной терминальной трансферазой. Теломераза представляет собой рибонуклеопротеин, состоящий из дискерина, каталитической субъединицы Tert (обратная транскриптаза теломеразы) и Terc (компонент РНК теломеразы), которые служат матрицей для синтеза ДНК теломер. Белок дискерина стабилизирует комплекс теломеразы [30]. Теломераза добавляет теломерные повторы к концам хромосом, чтобы компенсировать потерю последовательностей теломер, которая происходит из-за проблемы с конечной репликацией, неспособности ДНК-полимеразы полностью реплицировать отстающие цепи ДНК [49]. В отсутствие достаточных уровней теломеразы теломеры постепенно укорачиваются с делением клеток, что в конечном итоге приводит к потере защиты теломер и реакции на повреждение ДНК, которая вызывает старение или гибель клеток. Штамм Terc-нокаутных мышей лишен функциональной теломеразы и характеризуется непрерывным укорочением теломер от одного поколения к другому, что в конечном итоге приводит к дисфункции теломер, преждевременному старению и сокращению продолжительности жизни [44].

Чтобы избежать эрозии теломер, некоторые клетки зародышевой линии, стволовые клетки и раковые клетки активируют активность теломеразы [30]. Экспрессия теломеразы ограничена эмбриональным развитием, а также компартаментами взрослых стволовых клеток. В соматических клетках активность теломеразы очень низкая, почти не обнаруживается. Так теломера укорачивается с каждым делением клетки. Когда длина теломер достигает точки, это приводит к старению клеток и их гибели.

1.1.6. Теломеразное независимое удлинение (механизм ALT)

В некоторых раковых клетках млекопитающих и иммортализованных клеточных линиях теломеры удлиняются независимо от теломеразы. Такой механизм называется ALT (Альтернативное удлинение теломер). Было высказано предположение, что механизм ALT основан на гомологичной рекомбинации ДНК [26, 56]. Гомологическую рекомбинацию теломер обычно проводят с репликацией теломер. Теломеры представляют собой повторяющиеся последовательности ДНК и, таким образом, имеют множество сайтов гомологии, необходимых для гомологичной рекомбинации. Клетки ALT содержат высокие уровни ECTR (внехромосомных теломерных повторов), которые могут быть как линейными, так и круговыми (Т-петлевыми) [22, 63]. Согласно различным шаблонам, механизм ALT может быть классифицирован на 4 типа, а именно межтеломерная рекомбинация [36], зависящая от Т-петель рекомбинация, зависящая от вращающегося круга рекомбинация и линейная ECTR ДНК-зависимая рекомбинация. При межтеломерной рекомбинации одна теломера проникает в двухцепочечную ДНК другой теломеры и использует ее в качестве копирующей матрицы, что приводит к чистому увеличению теломерной ДНК внутри клетки [36]. Теломера может быть удлинена путем копирования собственных последовательностей без необходимости использования другой теломеры в качестве шаблона копирования. Метка теломер может быть усилена без участия других теломер, что указывает на то, что удлинение теломер также может происходить при внутрителомерном копировании ДНК. Это первое прямое доказательство того, что механизм ALT включает в себя более одного метода удлинения теломер [51]. В зависимости от вращающегося круга рекомбинации участвуют зависимый Т-круг (круг ДНК ECTR) и хроматин. 3'-одноцепочечный выступ хроматина вторгается в дуплексный Т-образный круг и использует его в качестве вращающегося шаблона для удлинения теломер без ограничений [57]. В одном аспекте линейные внехромосомные теломерные повторы (линейный ECTR) являются продуктами механизма ALT. В другом

аспекте линейные ECTR могут быть использованы для удлинения теломер путем реакций присоединения концов или путем гомологичной рекомбинации и копирования шаблона [36].

1.1.7. Болезни, связанные с теломерами

Широко известно, что теломера укорачивается с каждым делением клеток и, наконец, приводит к старению клеток. Ряд возрастных патологий и синдромов преждевременного старения также характеризуются укорочением теломер, и это указывает на то, что короткая теломера может провоцировать старение. Укорочение теломер способствует старению, может вызывать апоптоз и остановку клеточного цикла, а затем приводит к потере клеток и дисфункции тканей [14, 15]. Предыдущие исследования показали, что у мышей *mTerc* - / - наблюдается прогрессирующее укорочение теломер и потеря пролиферативных типов клеток с каждым прогрессирующим поколением [44, 58]. Короткие теломеры напрямую связаны с фундаментальной особенностью старения: сниженной способностью реагировать на острые и хронические заболевания [29].

Некоторые синдромы преждевременного старения человека характеризуются более высокой скоростью истощения теломер с возрастом, и они дают важную информацию о последствиях потери теломер. Одним из таких синдромов является врожденный дискератоз (ДК). Врожденный дискератоз - это редкое заболевание, для которого характерна триада клинических симптомов: дистрофические ногти, гиперпигментация кожи и лейкоплакия полости рта [20]. Все формы врожденного дискератоза связаны с очень короткими теломерами в лимфоцитах периферической крови [4]. Мутации в трех основных компонентах голофермента теломеразы, TERC и TERT, а также дискерина (DKC) были связаны с заболеванием [20]. Дефекты в длине теломер были вовлечены в патологию ряда возрастных заболеваний и синдромов преждевременного старения. Некоторые мышинные модели, у которых дефицит активности теломеразы, также демонстрируют, что короткие теломеры у мыши

могут приводить к таким же болезненным состояниям, которые связаны с синдромами как нормального, так и преждевременного старения у человека [14]. Заболеваемость и смертность от этого заболевания, как правило, связаны с недостаточностью костного мозга, но также встречаются идиопатический легочный фиброз и повышенная предрасположенность к раку.

Идиопатический легочный фиброз (IPF) является хроническим прогрессирующим заболеванием легких, характеризующимся кашлем, одышкой, нарушением газообмена и уменьшением объема легких, что в конечном итоге приводит к дыхательной недостаточности и смерти в течение 3-5 лет [41]. Это также возрастное заболевание. Подробные эксперименты показали, что два компонента комплекса теломеразы, TERT и TERC, являются наиболее часто идентифицируемым генетическим фактором риска при IPF [41]. Комплексы TERT и TERC действуют как компоненты теломеразы, они оказывают определенное влияние на длину теломер и мутации в них составляют одну шестую семейства легочных фиброзов [2]. Предполагается, что дисфункция теломер может вызывать необратимую недостаточность стволовых клеток в альвеолярных эпителиальных клетках, а затем приводить к IPF [6]. Однако пациенты с IPF имеют короткие теломеры, даже если мутации в теломеразе не обнаружено. Спорадический IPF - это тот самый случай (те, кто не сообщал об истории семьи), у которого теломеры значительно короче, чем у контрольных по возрасту контролей с интактной теломеразой [2, 23]. Таким образом, теломераза не может быть прямой причиной этого прогрессирующего ухудшающегося заболевания. Поскольку ранее упоминавшийся IPF является дегенеративным заболеванием, он имеет значительную потребность в интактном регенеративном потенциале для поддержания высоких требований оборота, и, наконец, приводит к значительной эрозии теломер и сквозному слиянию [44, 58]. Так что именно короткие теломеры, а не уровень теломеразы, вызывают идиопатический легочный фиброз. Поэтому одного только теломеразы недостаточно для опосредования дегенеративного заболевания [34].

Другое заболевание, связанное с теломерой, - опухоль. В соматических клетках теломеразная активность отсутствует. Их теломеры постепенно укорачиваются с каждым делением клетки. Когда одна или несколько теломер достигают критически короткой длины, незащищенные концы хромосом распознаются факторами реакции повреждения ДНК, такими как p53 и p16. Когда функция p53 нормальная, результатом обычно является старение, при котором клетки продолжают жить, но необратимо блокируются от дальнейшего деления клеток. Эти клетки вступают в старение. Воздействие теломер резко изменяется при нарушении путей контрольных точек, что имеет важное значение для биологии рака. В частности, клетки с мутацией p53, обходом репликативного старения и дальнейшим истощением теломер. Несмотря на наличие критически коротких теломер, удаление функции p53 спасло многие клеточные дефекты, включая остановку роста в культуре клеток, атрофию яичек и апоптоз кишечника и половых клеток. В отсутствие p53 теломеры укорачиваются, и результирующая нестабильность генома способствует онкогенезу. Укорочение теломер способствует развитию рака в условиях дефицита p53. Интактный путь p53 ингибирует развитие опухоли в условиях короткой теломеры [25].

1.2. Измерение длин теломер

Как говорилось выше, измерение длины теломер является полезным маркером репликативной истории и потенциала клеток [32].

В качестве первоначального метода определения длины теломер использовали саузерн-гибридизацию для определения средней длины концевой рестрикционного фрагмента (TRF) [35]. Поскольку метод сложный, трудоемкий и отнимает много времени, были найдены различные альтернативные методы измерения, в том числе слот-блоттинг (TRF), основанный на том, что под действием мелко шипящих рестриктаз вся ДНК будет расщиплена на мелкие фрагменты, кроме теломерных последовательностей, которые не имеют соответствующих сайтов рестрикции.

При последующем электрофорезе и саузерн-блот анализе, выявляется теломерная ДНК [17], методы, основанные на гибридизации [52] и проточная цитометрия [9]. В 2002 году Sawthon опубликовал метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для определения длины теломер [21]. Ранее предполагалось, что измерение повторов теломер с помощью ПЦР будет невозможно из-за полученных из праймеров продуктов, которые будут генерироваться в реакции олигонуклеотидными праймерами, предназначенными для гибридизации с последовательностями повторов теломеров TTAGGG и CCCTAA. Метод, опубликованный Sawthon, использует теломерные праймеры, состоящие из повторяющегося набора из шести оснований, содержащих четыре последовательных парных основания, за которыми следуют два несовпадающих основания и уникальная 5'-последовательность. Отдельные реакции проводят для каждого образца, один амплифицирующий теломер повторяется, а другой - копия с одним геном, служащая количественным контролем. Методика измеряет коэффициент, по которому отношение количества повторных копий теломер к количеству копий одного гена (референсного гена) различается между образцом и образцом сравнения ДНК. Используя традиционный метод длины TRF параллельно с недавно разработанным методом ПЦР в реальном времени, Sawthon показал, что сгенерированный ПЦР коэффициент пропорционален средней длине теломер. Измерение длины теломер с использованием ПЦР в реальном времени является быстрым и простым, и анализ нескольких образцов может быть выполнен за короткое время по сравнению с методами, не основанными на ПЦР[65].

В качестве эталонного гена Каутон предложил использовать RPLP0 (кодирующий субъединицу латерального стебля рибосомного белка P0), который был упомянут как 36B4 в его протоколе.

Основываясь на количественном анализе ПЦР в реальном времени, проведенном Sawthon, в методе O'Callaghan используется стандарт олигомеров,

который можно использовать для получения абсолютных значений длины теломер, а не относительного количественного определения. Способность генерировать абсолютные значения длины теломер позволила произвести более прямое сравнение результатов между экспериментами внутри и между лабораториями. Команда O'Callaghan разработала простой и воспроизводимый метод измерения абсолютной длины теломер [54]. Этот метод основан на количественном анализе ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) Sawthon, который в своем первоначальном формате дает относительную меру длины теломер [21]. Стандартная кривая была получена путем разбавления известных количеств синтезированного 84-мерного олигонуклеотида, содержащего только повторы TTAGGG. Стандартную кривую получали путем выполнения серийных разведений стандарта А (от 10^{-1} до 10^{-6} разведения). Стандартная кривая была использована для измерения содержания теломерной последовательности на образец в Килобазах. Количество ДНК тестируемого образца на реакцию корректировали таким образом, чтобы пороговые значения цикла (СТ) находились в линейном диапазоне стандартной кривой.

1.3. Топоизомераза 1

Во время разработки протокола в 2002 году 36B4 считался геном единственной копии. Однако недавно было продемонстрировано, что RPLP0 (36B4) является типичным рибосомным геном с множеством обработанных псевдогенов в геноме человека [предоставлено RefSeq, июль 2008]. Праймеры для 36B4, первоначально описанные в статье Sawthon, полностью комплементарны геномным последовательностям на хромосомах 12, 2 и 5, а также очень гомологичны хромосомам 1, 14 и 18. На кривой плавления продукт ПЦР дает множество пиков [58].

В 2009 году в Руководстве по минимальной информации для публикации количественных экспериментов ПЦР в реальном времени (MIQE) было предложено, что необходимо выбрать несколько подходящих эталонных генов для надежной нормализации в qRT-ПЦР [18].

Метод, описанный в данной работе, основан на использовании другого гена в качестве эталона SCG, TOP1. Этот ген кодирует ДНК-топоизомеразу, фермент, который контролирует и изменяет топологические состояния ДНК во время транскрипции. Фермент катализирует кратковременное разрушение и соединение одной нити ДНК, что позволяет цепям проходить друг через друга, изменяя тем самым топологию ДНК. Этот ген локализован в хромосоме 20 и содержит псевдогены, которые находятся в хромосомах 1 и 22. [предоставлено RefSeq, июль 2008]. В работе приведен подробный протокол о том, как измерять длину теломер с использованием TOP1-праймеров, которые строго специфичны для SCG и не образуют димеры.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

В исследуемую группу, состоящую из 20 человек (7 мужчин и 13 женщин), вошли пациенты Санкт-Петербургского городского гериатрического центра в возрасте от 47 до 99 лет (средний возраст \pm SD = 83,3 \pm 10,32 лет), проживающие на Северо-Западе России.

Все респонденты были психически здоровы и участвовали в исследовании добровольно. В качестве материала использовалась лимфоцитарная фракция периферической крови.

2.2. Методы

2.2.1. Выделение ДНК из периферической крови

Кровь была собрана в пластиковые пробирки с антикоагулянтом 0,5 М раствора EDTA-K3 (pH 7,3) в соотношении кровь/антикоагулянт 1/50.

Выделение ДНК произведено при помощи набора компании Синтол (Россия), согласно приложенному протоколу выделения:

1. Внесение образца:

- во все пробирки внести по 200мкл цельной периферической крови пациентов.

2. Лизис:

- во все пробирки внести 10мкл протеиназы К и 200мкл лизирующего раствора. Перемешать содержимое на вортексе Personal spin-vortex microspin FV-2400 компании Biosan (Латвия);

- смесь инкубировать при температуре 65°C в течении 15 мин., периодически перемешивая содержимое пробирок. В случае, если кровь содержала сгустки образцов цельной крови, увеличить время лизиса до 30 мин.

3. Осаждение ДНК:

- сбросить капли с крышки краткосрочным центрифугированием, добавить 200мкл осаждающего раствора. Перемешать содержимое пробирок на вортексе;
- сбросить капли с крышки краткосрочным центрифугированием. Перенести весь объем на колонку;
- центрифугировать при помощи центрифуги для микропробирок MiniSpin компании Eppendorf (Германия) 1 мин при 8000 об/мин. Удалить жидкость из коллектора колонки при помощи микропипетки.

4. Промывка и элюция ДНК:

- нанести на колонку 400мкл промывочного раствора №1. Центрифугировать 1 мин при 8000 об/мин. Удалить жидкость из коллектора колонки;
- нанести на колонку 400мкл промывочного раствора №2. Центрифугировать 1 мин при 8000 об/мин;
- нанести на колонку 200мкл промывочного раствора №2. Центрифугировать 2 мин при 13000 об/мин. Перенести колонки в чистые пробирки;
- добавить 150 мкл элюирующего раствора, предварительно прогретого до 70°C. Инкубировать 2 минуты;
- центрифугировать 1 мин при 8000 об/мин. ДНК хранить при -20 °C.

2.2.2. Измерение длин теломер

Измерение длин теломер производили по методике, описанной Sawthon [21]. Метод количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК. При помощи кПЦР можно измерить длину теломер как в относительных, так и абсолютных величинах. Метод ПЦР в реальном времени включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесённой ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце [64].

Для детекции сигнала при проведении реакции использовали интеркалирующий краситель SybrGreen I, флуоресценция которого многократно возрастает при связывании с малой бороздкой двунитовой ДНК. Регистрируемый сигнал пропорционален количеству двунитовой ДНК в реакционной смеси, а процесс накопления продукта амплификации можно описать кинетической кривой, на которой четко выделяется 3 стадии: экспоненциальный рост, линейный рост и насыщение. Для количественного анализа важна стадия экспоненциального роста, определяющая пороговый цикл (C_t), в котором уровень флуоресценции достоверно превышает фоновый уровень. Для определения количества продукта важна стадия экспоненциального роста, которая описывается уравнением:

$$P_n = P_0 \cdot E_n, \quad (2.1)$$

где P_n – количество молекул амплифицируемого продукта, накопившегося к N -му циклу (интенсивность сигнала флуоресценции на N -ом цикле);

P_0 – исходное количество копий целевой последовательности ДНК в исследуемом образце;

E – эффективность амплификации (в идеальных условиях $E = 2$).

В соответствии с этим в идеальных условиях на каждом цикле амплифицированного продукта становится в 2 раза больше, чем в предыдущем [1].

Стадия экспоненциального роста определяет пороговый цикл (C_t) – номер цикла N , при котором регистрируется увеличение сигнала, достоверно превышающий уровень фона. Он зависит от исходного количества копий целевой последовательности ДНК в образце: чем C_t больше, тем раньше наблюдается начало роста флуоресценции и тем меньше значение порогового цикла (Рис. 2.1).

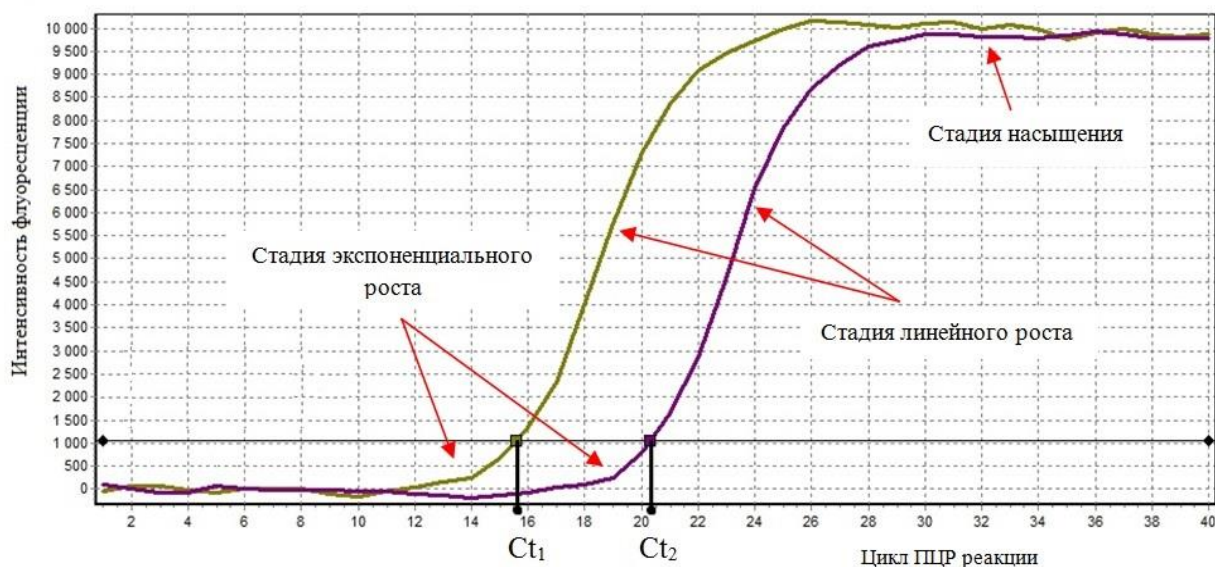


Рис. 2.1. Кинетические кривые ПЦР в реальном времени.

Если прологарифмировать обе части уравнения (2.1) и преобразовать их, можно получить следующее равенство для порогового цикла C_t :

$$C_t = - (1/\log E) \cdot \log P_0 + \log P_{C_t} / \log E. \quad (2.2)$$

Таким образом, зависимость между C_t и логарифмом исходного количества копий является линейной.

Для оценки длины теломер (как относительной, так и абсолютной) можно построить калибровочную прямую, отражающую эту зависимость (Рис. 2.1). Для этого нужно иметь раствор с известной концентрацией ДНК, который последовательно разведен несколько раз. Его используют в качестве линейки или калибратора. Необходимо, чтобы пороговый цикл каждого образца находился в интервалах значений, полученных в результате разбавления ДНК известной концентрации. Затем подставляя значение C_t в уравнение соответствующей прямой, определяется количество специфических последовательностей ДНК. Угол наклона калибровочной прямой отражает эффективность амплификации.

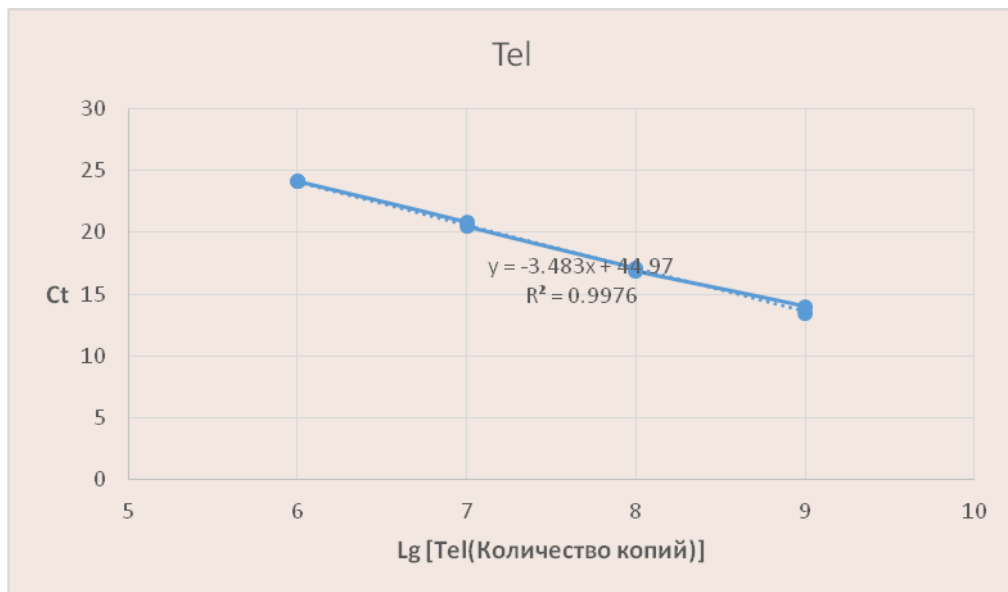


Рис. 2.2. Калибровочная кривая, полученная после кПЦР для разведений ДНК с теломерной последовательностью.

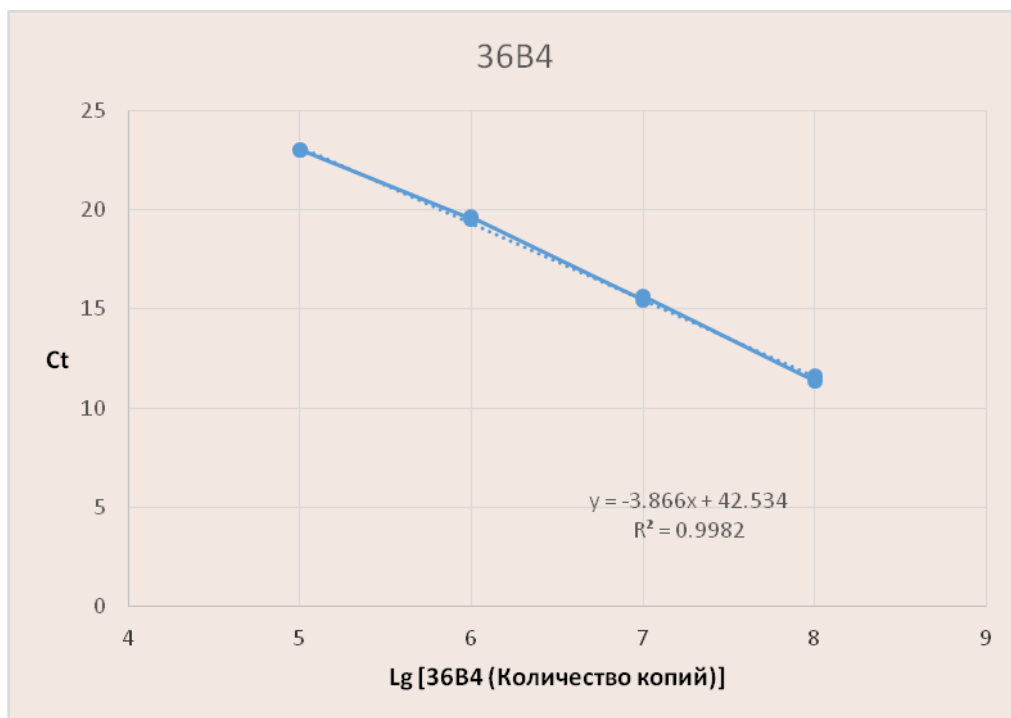


Рис. 2.3. Калибровочная кривая, полученная после кПЦР для разведений ДНК с фрагментом однокопийного гена 36B4.

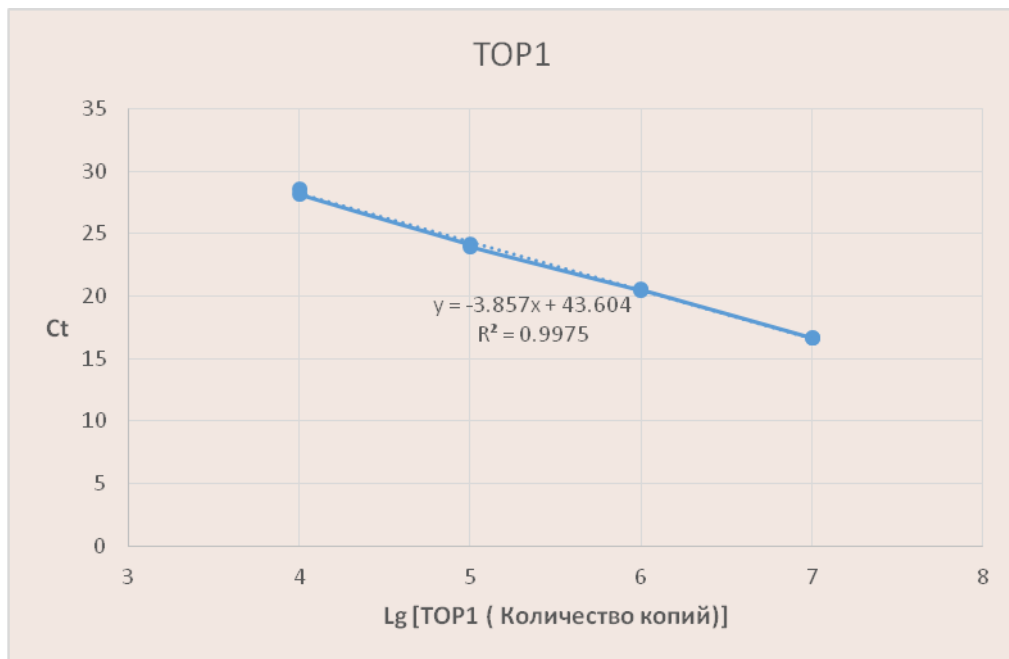


Рис. 2.4. Калибровочная кривая, полученная после кПЦР для разведений ДНК с фрагментом однокопийного гена TOP1.

Для определения абсолютной длины теломер необходимо определить отношение количества копий теломерных повторов к количеству копий участка, представленного в геноме только один раз (T/S). Отношение T/S показывает, во сколько раз количество теломерных повторов в образце отличается от количества копий единичного гена в том же образце. Для этого проводили кПЦР для теломерной последовательности, однокопийного гена рибосомального фосфопротеина PO 36B4, расположенного в 12 хромосоме, и гена TOP1, локализованного в хромосоме 20. Об этих величинах так же судят по уровню их флуоресценции. Для обеих величин находили пороговые циклы для каждого исследуемого образца, по ним определяли количество амплифицированного продукта, то есть число копий теломерных повторов (T) и единичных генов (S_1 , S_2), затем строили калибровочные прямые.

Для определения всей теломерной последовательности в геноме необходимо величину T/S умножить на 84, то есть на длину фрагмента теломерной последовательности TTAGGG, повторенной 14 раз. Чтобы узнать длину теломер на одном конце хромосомы, полученное число делили на 46, так

как в гаплоидном геноме ген представлен 1 раз, а теломеры по две на каждой из 23 хромосом.

В качестве калибровочных растворов ДНК использовали растворы с известным количеством синтезированных олигонуклеотидов: фрагменты гена 36B4 (73 н.), гена TOP1(88 н.) и олигонуклеотида (84 н.), представленного теломерной последовательностью TTAGGG, повторенной 14 раз [54].

кПЦ проводили на приборе Applied Biosystems 7900HTFastReal-TimePCRSystem.

Набор для проведения кПЦР : 2,5x реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I и референсного красителя ROX ЗАО «Синтол». Все синтезированные олигонуклеотиды так же были заказаны в ЗАО «Синтол».

кПЦР для каждого образца проводилась в повторности 2.

Последовательность праймеров к теломерной последовательности:

T1:5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3'

T2:5'- GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT -3'

Последовательность праймеров к единичному гену 36B4:

36B4u: 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC -3'

36B4d: 5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A -3'

Последовательность праймеров к единичному генуTOP1:

TOP1-F: 5'- ACAACTGCTGGGGTCTGT TC -3'

TOP1-R:5'- GAGACTCCAGAAACGGCTGA -3'

Состав реакционной смеси на 20 мкл:

Деионизированная H ₂ O	5мкл
ПЦР – Микс	8мкл
Праймер1 (2 мкМ)	1 мкл
Праймер 2 (2 мкМ)	1 мкл
ДНК-матрица (10нг/мкл)	5 мкл

Состав смеси для кПЦР теломерной последовательности и генов 36В4 и TOP1 отличались только праймерами.

После добавления всех компонентов реакционную смесь перемешивали на вортексе, капли сбрасывали коротким центрифугированием и переносили в пробирки объемом 0,2 мл.

Температурные режимы для кПЦР теломерной последовательности и генов 36В4 и TOP1 также не отличались:

1. 95°C (10 мин)	1 цикл
2. 95°C (15 сек) 60°C (1 мин)	40 циклов 40 циклов

2.2.3. Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили в программном пакете MicrosoftExcel 2010 (Microsoft Corporation, 2010). Использованные методы: расчёт средней арифметической величины, среднего квадратичного отклонения, определение значения статистических различий при помощи t-критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Целью данного исследования являлось сравнение двух референсных генов 36В4 и TOP1 при постановке метода измерения длин теломер кПЦР, предложенного O'Callaghan.

При использовании референсного гена 36В4 мы получили удовлетворяющий результат. При постановке нескольких экспериментов мы получали идентичный результаты с небольшой погрешностью (± 10 пар нуклеотидов). Кроме того, длины теломер у разных проб не отличались на порядки.

Таблица 3.1

Результаты измерения длин теломер методом кПЦР с использованием гена 36В4

№ п/п	Измерение 1, п. н.	Измерение 2, п. н.	Измерение 3, п. н.	Среднее значение, п. н.	Среднеквадратическое отклонение
1	3957	3950	3954	3953.67	3.51
2	5293	5293	5294	5293.33	0.58
3	6715	6714	6712	6713.67	1.53
4	5767	5767	5766	5766.67	0.58
5	7692	7695	7690	7692.33	2.52
6	3489	3492	3488	3489.67	2.08
7	7499	7496	7505	7500.00	4.58
8	2107	2107	2105	2106.33	1.15
9	2409	2408	2408	2408.33	0.58
10	3628	3627	3630	3628.33	1.53
11	4202	4199	4202	4201.00	1.73
12	6622	6622	6622	6622.00	0.00
13	1745	1743	1744	1744.00	1.00
14	1695	1696	1695	1695.33	0.58
15	8794	8791	8791	8792.00	1.73
16	2949	2950	2949	2949.33	0.58
17	4232	4233	4232	4232.33	0.58
18	1743	1738	1742	1741.00	2.65
19	8623	8620	8624	8622.33	2.08
20	7587	7585	7588	7586.67	1.53

При использовании гена TOP1 при постановке метода к ПЦР для одного образца длины теломер отличались на несколько порядков. В одном эксперименте длины варьировали от десятков до десятков тысяч пар нуклеотидов.

При построении графика зависимости порогового цикла от номера цикла стандартов линейной зависимости не наблюдалось.

Таблица 3.2

Результаты измерения длин теломер методом кПЦР с использованием гена TOP1

№ п/п	Измерение 1, п. н.	Измерение 2, п. н.	Измерение 3, п. н.	Среднее значение, п. н.	Среднеквадратическое отклонение
1	386	2158	1257	1267.00	886.04
2	859	2130	852	1280.33	735.84
3	248	1567	58569	20128.00	33297.41
4	17652	866	2458	6992.00	9266.08
5	96	3599	5965	3220.00	2952.80
6	8082	16945	3289	9438.67	6928.35
7	99	1993	4896	2329.33	2416.12
8	3547	666	5896	3369.67	2619.51
9	1605	6237	15	2619.00	3232.56
10	25896	7956	87451	40434.33	41693.96
11	15883	502	8784	8389.67	7698.08
12	78	10774	785	3879.00	5981.70
13	7520	6141	4852	6171.00	1334.25
14	116	42	58962	19706.67	33996.14
15	38962	15523	4625	19703.33	17546.05
16	74562	85656	896	53704.67	46068.81
17	57	39	755	283.67	408.29
18	3578	36325	2274	14059.00	19293.94
19	1451	862	28965	10426.00	16057.95
20	4335	8563	25658	12852.00	11290.01

Для исследуемой выборки были известны не только длины теломер, но и возраст респондентов, который составил $83,3 \pm 10,32$ лет. Построив модель линейной регрессии, обнаружили, что достоверной зависимости длины теломер от возраста у испытуемых не наблюдается ($R^2 = 0,0394$).

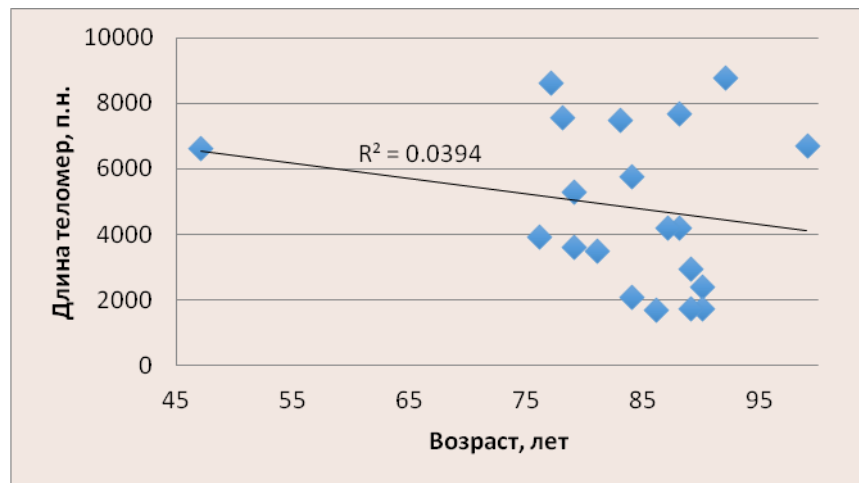


Рис. 3.1. Длины теломер в зависимости от возраста.

Так как несколько лет назад в лаборатории было показано, что достоверная обратная корреляция имеется только у лиц старше 85 лет, мы так же решили это проверить. Данную зависимость не была обнаружена, однако рассмотрев лиц старше 90 лет, заметили, что длина теломер у них с возрастом достоверно увеличивается ($R^2 = 0,302$).

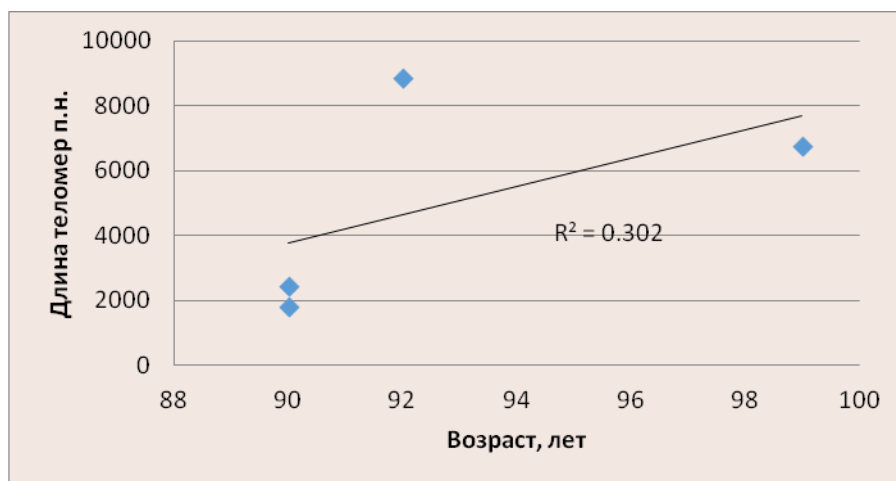


Рис. 3.2. Длины теломер у пожилых лиц, старше 90 лет.

Определив длину теломер в лимфоцитах периферической крови у исследуемой выборки, мы получили высокую вариабельность результатов: от 1 695 п.н. до 8 794 п.н. Средняя длина теломер \pm SD для всей выборки

составила $4\,837 \pm 2\,420$ п.н., для мужчин – $4\,268 \pm 2\,769$ п.н., а для женщин – $5\,143 \pm 2\,269$ п.н (Таблица 3.3). Средняя длина у женщин достоверно больше, чем у мужчин ($p < 0.05$).

Таблица 3.3

Результаты измерения длин теломер

	Все (n=20)	Мужчины (n=7)	Женщины (n=3)
Средний возраст (\pm) SD, лет	83,3 \pm 10,32	85 \pm 4,98	82,38 \pm 12,3
Минимальная длина теломер, п.н.	1695	1743	1695
Максимальная длина теломер, п.н.	8794	8623	8794
Средняя длина теломер(\pm SD)п.н.	4837 \pm 2420	4268 \pm 2769	5143 \pm 2269
Коэффициент вариации %(CV)	50	64,8	44,1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализу связи длины теломер с возрастом посвящено большое количество работ. Как и ожидалось, в целом, показано снижение длины теломер с возрастом, но такая корреляция наблюдается только до 75 лет. У лиц старше 75 лет возраст, напротив, положительно коррелировал с более длинными теломерами, что свидетельствует об ассоциации более длинных теломер с долгожительством [43]. Эти данные хорошо согласуются с полученными нами материалами. Вне зависимости от того, находят эту связь или нет, ни депрессивные, ни тревожные расстройства не были непосредственно связаны с длиной теломер у молодых людей [53]. В то же время надежно показано, что стрессы в детстве негативно влияют на длину теломер в среднем возрасте. Результат мета-анализа (16 238 пациентов в 27 независимых исследованиях) показал достоверное укорочение теломер у лиц, переживших стресс в раннем возрасте [33]. Стресс матери во время беременности, но не ее образ жизни, также приводят к укорочению длины теломер у новорожденного. Тот факт, что связь между материнским пренатальным стрессом и длиной наблюдалась у потомства, но не у матерей, может быть объяснено высокой уязвимостью к стрессу созревающего организма во время внутриутробного развития [60].

Различия в длине теломер особенно ярко выражены у людей молодого и среднего возраста, так как именно в этом возрасте крайне остро осознается свое социально-экономическое положение [59]. В то же время анализ более 100 000 проб показал, что дисперсия длин теломер с возрастом только возрастает [43]. Это также соответствует полученным нами результатам, так как разброс длин теломер у пожилых людей меньше, чем в целом в популяции [1].

Для дальнейшего развития работ, связанных с изучением длин теломер, необходимо найти более точный способ их определения, что и было предпринято в настоящем исследовании. В исследованиях на людях использовалось несколько методов для измерения длины теломер (ДТ). Трудно

было напрямую сравнить результаты этих исследований из-за различий в лабораторных методах и выходных параметрах. Несколько методов измерения ДТ, включая Саузерн-блот, FISH и количественную полимеразную цепную реакцию (КПЦР), были разработаны для использования в различных клинических и исследовательских условиях. Выбор метода измерения ДТ обычно зависит от вопроса исследования и изучаемой популяции. Каждый метод измерения ДТ имеет свои сильные и слабые стороны [8, 10]. Вкратце, измерение концевой рестрикционного фрагмента (TRF) с помощью Саузерн-блоттинга использует ферменты рестрикции для разрезания ДНК на субтеломере. Он измеряет размер разрешенных фрагментов теломерной ДНК и субтеломерной области до ближайшего сайта рестрикции в килобазах (кб) [40]. Измерение ДТ с помощью Саузерн-блоттинга трудоемко, требует относительно больших количеств ДНК (2–3 мкг / цикл) и требует значительного опыта для получения точных и надежных результатов [40]. Метод на основе КПЦР определяет относительное содержание теломерной ДНК в данном образце, выраженное как отношение амплифицированных теломерных повторов к амплифицированным повторам гена с одной копией (T / S: продукты ПЦР гена теломерной / единственной копии (36B4)). Этот метод широко используется в крупных эпидемиологических исследованиях из-за его высокой пропускной способности и небольших требований к ДНК (~ 20 нг / образец). Тем не менее, измерения относительной ДТ КПЦР не были оптимизированы в разных лабораториях, и они ограничены относительно высокой погрешностью измерений и низкой чувствительностью к идентификации лиц с очень коротким ДТ. Поток FISH позволяет измерять ДТ в подгруппах лейкоцитов, но требует жизнеспособных клеток. Это трудоемкий процесс, его выполняют несколько лабораторий по всему миру, и он относительно дорогой [7]. Проведенное FISH исследование ДТ более 800 здоровых людей показало различия в ДТ по подгруппам лейкоцитов [7], что может повлиять на средние показатели ДТ в ДНК из лейкоцитов с помощью Саузерн-блоттинга или КПЦР. Это несоответствие особенно важно в исследованиях ДТ заболеваний, при которых

различия лейкоцитов во время измерения ДТ могут отличаться от таковых у здоровых людей, таких как иммунодефицит.

Исследования, сравнивающие методы измерения ДТ, являются сложными из-за различий в лабораторных методах и факторах предварительного измерения [7]. На значения РДТ КПЦР влияет метод экстракции ДНК, положение скважины и, возможно, другие технические факторы до анализа, которые еще не определены четко [24, 27].

Исследования показали переменные корреляции между ДТ, измеренным с помощью КПЦР, потока FISH и Саузерн-блоттинга, и наиболее сильные ассоциации были отмечены между потоком FISH и Саузерн-блоттингом [38]. Эти корреляционные данные и данные других опубликованных исследований могут быть неприменимы к анализам, проводимым в разных лабораториях. Широкий диапазон сообщенных корреляций методов в различных исследованиях подчеркивает важность проведения лабораторных внутренних проверок. Также данные показывают, что анализы потока FISH и Саузерн-блоттинга обеспечивают более надежные измерения. Исследования, направленные на понимание источников изменчивости и улучшение анализа ДТ КПЦР, оправданы, так как этот анализ лучше всего подходит для крупных эпидемиологических исследований.

Метод RT-PCR не является самым точным [38], но его большим преимуществом является то, что он позволяет работать с ранее собранными коллекциями ДНК. Так как метод RT-PCR основан на сравнении теломерных последовательностей с референсным геном, то его точность зависит от правильного выбора этого гена. Мы показали, что использование гена 36B4 дает более точные результаты, чем использование гена TOP1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова Т.Ю. [и др.]. Распределение структурных полиморфизмов генов ангиотензин-превращающего фермента и рецептора серотонина 5-НТ2А у долгожителей северо-запада России. *Успехи геронтологии // Успехи геронтологии*. 2011. № 12. С. 58–65.
2. Alder J.K. [и др.]. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. № 35 (105). С. 13051–13056.
3. Allsopp R.C. [и др.]. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992. № 21 (89). С. 10114–8.
4. Alter B.P. [и др.]. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. // *Blood*. 2007. № 5 (110). С. 1439–47.
5. Arat N.Ö., Griffith J.D. Human Rap1 interacts directly with telomeric DNA and regulates TRF2 localization at the telomere. // *The Journal of biological chemistry*. 2012. № 50 (287). С. 41583–94.
6. Armanios M.Y. [и др.]. Telomerase Mutations in Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *New England Journal of Medicine*. 2007. № 13 (356). С. 1317–1326.
7. Baerlocher G.M. [и др.]. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. // *Cytometry*. 2002. № 2 (47). С. 89–99.
8. Baumann P., Cech T.R. Pot1, the Putative Telomere End-Binding Protein in Fission Yeast and Humans // *Science*. 2001. № 5519 (292). С. 1171–1175.
9. Bianchi A. [и др.]. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. // *The EMBO journal*. 1997. № 7 (16). С. 1785–94.
10. Blackburn E.H. Switching and signaling at the telomere. // *Cell*. 2001. № 6 (106). С. 661–73.
11. Blasco M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond // *Nature*

- Reviews Genetics. 2005. № 8 (6). С. 611–622.
12. Blasco M.A. Telomere length, stem cells and aging // Nature Chemical Biology. 2007. № 10 (3). С. 640–649.
 13. Broccoli D. [и др.]. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. // Nature genetics. 1997. № 2 (17). С. 231–5.
 14. Bryan T.M. [и др.]. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. // Nature medicine. 1997. № 11 (3). С. 1271–4.
 15. Bryant J.E. [и др.]. Measurement of Telomeric DNA Content in Human Tissues // BioTechniques. 1997. № 3 (23). С. 476–484.
 16. Bustin S.A. [и др.]. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments // Clinical Chemistry. 2009. № 4 (55). С. 611–622.
 17. Calado R.T. Telomeres and marrow failure // Hematology. 2009. № 1 (2009). С. 338–343.
 18. Carroll K.A., Ly H. Telomere dysfunction in human diseases: the long and short of it! // International journal of clinical and experimental pathology. 2009. № 6 (2). С. 528–43.
 19. Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR // Nucleic Acids Research. 2002. № 10 (30). С. 47e – 47.
 20. Cesare A.J., Griffith J.D. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. // Molecular and cellular biology. 2004. № 22 (24). С. 9948–57.
 21. Cronkhite J.T. [и др.]. Telomere Shortening in Familial and Sporadic Pulmonary Fibrosis // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2008. № 7 (178). С. 729–737.
 22. Deng Y., Chan S.S., Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. // Nature reviews. Cancer. 2008. № 6 (8). С. 450–8.
 23. Dunham M.A. [и др.]. Telomere maintenance by recombination in human cells // Nature Genetics. 2000. № 4 (26). С. 447–450.

24. Epel E.S. [и др.]. Accelerated telomere shortening in response to life stress // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. № 49 (101). С. 17312–17315.
25. Flores I., Blasco M.A. A p53-dependent response limits epidermal stem cell functionality and organismal size in mice with short telomeres. // *PloS one*. 2009. № 3 (4). С. e4934.
26. Giardini M.A. [и др.]. *Telomere and Telomerase Biology* 2014. 1–40 с.
27. GOMEZ D.E. [и др.]. Telomere structure and telomerase in health and disease // *International Journal of Oncology*. 2012. № 5 (41). С. 1561–1569.
28. Greider C.W., Blackburn E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. // *Cell*. 1985. № 2 Pt 1 (43). С. 405–13.
29. Griffith J.D. [и др.]. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. // *Cell*. 1999. № 4 (97). С. 503–14.
30. Hahn W.C. Role of Telomeres and Telomerase in the Pathogenesis of Human Cancer // *Journal of Clinical Oncology*. 2003. № 10 (21). С. 2034–2043.
31. Hao L.-Y. [и др.]. Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity. // *Cell*. 2005. № 6 (123). С. 1121–31.
32. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // *Nature*. 1990. № 6274 (345). С. 458–460.
33. Henson J.D. [и др.]. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells // *Oncogene*. 2002. № 4 (21). С. 598–610.
34. Huzen J. [и др.]. [Telomeres and biological ageing in cardiovascular disease]. // *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2008. № 22 (152). С. 1265–70.
35. Jiang H., Ju Z., Rudolph K.L. Telomere shortening and ageing // *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*. 2007. № 5 (40). С. 314–324.
36. Kim S.-H. [и др.]. The human telomere-associated protein TIN2 stimulates interactions between telomeric DNA tracts in vitro. // *EMBO reports*. 2003. № 7 (4). С. 685–91.
37. Kropski J.A. [и др.]. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis // *Disease Models & Mechanisms*. 2013. № 1 (6). С. 9–

17.

38. Lange T. de Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. // *Genes & development*. 2005. № 18 (19). С. 2100–10.

39. Lee H.-W. [и др.]. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs // *Nature*. 1998. № 6676 (392). С. 569–574.

40. Li B., Lange T. de Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. // *Molecular biology of the cell*. 2003. № 12 (14). С. 5060–8.

41. Li B., Oestreich S., Lange T. de Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. // *Cell*. 2000. № 5 (101). С. 471–83.

42. Loayza D., Lange T. De POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. // *Nature*. 2003. № 6943 (423). С. 1013–8.

43. Martens U.M. [и др.]. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. // *Experimental cell research*. 2000. № 1 (256). С. 291–9.

44. Martínez P., Blasco M.A. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. // *Nature reviews. Cancer*. 2011. № 3 (11). С. 161–76.

45. Mikhelson V.M., Gamaley I.A. Telomere shortening is a sole mechanism of aging in mammals. // *Current aging science*. 2012. № 3 (5). С. 203–8.

46. Muntoni A. [и др.]. Telomere elongation involves intra-molecular DNA replication in cells utilizing alternative lengthening of telomeres. // *Human molecular genetics*. 2009. № 6 (18). С. 1017–27.

47. Nakamura Y. [и др.]. Simple, rapid, quantitative, and sensitive detection of telomere repeats in cell lysate by a hybridization protection assay. // *Clinical chemistry*. 1999. № 10 (45). С. 1718–24.

48. Nittis T., Guittat L., Stewart S.A. Alternative lengthening of telomeres (ALT) and chromatin: is there a connection? // *Biochimie*. 2008. № 1 (90). С. 5–12.

49. O’Callaghan N.J. [и др.]. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length // *BioTechniques*. 2008. № 6 (44). С. 807–809.

50. O’Connor M.S. [и др.]. A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. № 32 (103). С. 11874–9.

51. Reddel R.R. [и др.]. Alternative lengthening of telomeres in human cells. // *Radiation research*. 2001. № 1 Pt 2 (155). С. 194–200.
52. Regev A. [и др.]. Telomeric repeats on small polydisperse circular DNA (spcDNA) and genomic instability. // *Oncogene*. 1998. № 26 (17). С. 3455–61.
53. Rudolph K.L. [и др.]. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. // *Cell*. 1999. № 5 (96). С. 701–12.
54. Shampay J., Szostak J.W., Blackburn E.H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. // *Nature*. № 5973 (310). С. 154–7.
55. Steensel B. van, Lange T. de Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1 // *Nature*. 1997. № 6618 (385). С. 740–743.
56. Tokutake Y. [и др.]. Extra-Chromosomal Telomere Repeat DNA in Telomerase-Negative Immortalized Cell Lines // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998. № 3 (247). С. 765–772.
57. VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis // *BioTechniques*. 2008. № 5 (44). С. 619–626.
58. Vasilishina A. [и др.]. Relative Human Telomere Length Quantification by Real-Time PCR 2019. 39–44 с.
59. Wang F. [и др.]. The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor // *Nature*. 2007. № 7127 (445). С. 506–510.
60. Watson J.D. Origin of concatemeric T7 DNA. // *Nature: New biology*. 1972. № 94 (239). С. 197–201.
61. Xin H. [и др.]. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP- β and interacts with POT1 to recruit telomerase // *Nature*. 2007. № 7127 (445). С. 559–562.
62. Zglinicki T. von Oxidative stress shortens telomeres. // *Trends in biochemical sciences*. 2002. № 7 (27). С. 339–44.
63. Zhong Z. [и др.]. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. // *Molecular and cellular biology*. 1992. № 11 (12). С. 4834–43.