

**Методические рекомендации по определению физиологического
резерва спортсмена на основе изучения теломеразной активности и длины
теломер клеток**

Москва 2013

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение.....	3
1. Структура и функции теломер клеток человека.....	5
2. Структура и функции теломеразы клеток человека.....	10
3. Влияние физической активности и занятий спортом на длину теломер и активность теломеразы.....	15
3.1. Влияние систематических физических нагрузок на длину теломер и активность теломеразы.....	16
3.2. Влияние уровня физической активности на длину теломер и активность теломеразы.....	18
3.3. Длина теломер и активность теломеразы у стайеров.....	20
3.4. Длина теломер и активность теломеразы у спортсменов, специализирующихся в силовых видах спорта.....	22
4. Методы анализа длины теломер.....	23
5. Методы определения теломеразной активности.....	25
Заключение.....	33

Введение

Теломераза - рибонуклеопротеин, который удлиняет концы хромосом (теломеры), укорачивающиеся при репликации ДНК. Активность теломеразы рассматривается как потенциальный маркер физиологического резерва организма: длительность активного функционирования клетки, пролиферативного потенциала, а длину теломер – «клеточными часами», ограничивающими число возможных делений клетки.

Физические нагрузки приводят к увеличению активности теломеразы и количества теломеразной обратной транскриптазы и белка TRF (Terminal Restriction Fragment) в миокарде, лейкоцитах и эндотелиальных клетках и к предотвращению укорочения теломер в них.

При миопатическом синдроме у спортсменов, сопровождающимся усталостью, средняя длина теломер в мышцах спортсменов меньше, чем у здоровых спортсменов, при этом у некоторых индивидов наблюдались экстремально короткие теломеры, что может объясняться повышенной частотой регенерации мышц у интенсивно тренирующихся спортсменов. Было установлено, что физические нагрузки силового характера также приводят к незначительному укорочению теломер в скелетных мышцах индивидов.

Одним из открытых вопросов на сегодня остается поиск биологических маркеров эффективности тренировок. Можно предположить, что изменения теломеразной активности как маркер пролиферативного потенциала может отражать эффективность тренировок. До настоящего времени проверялись, в основном, изменения теломеразной активности при долговременных тренировках.

Другой очень важной проблемой является оценка предела, до которого можно увеличивать интенсивность нагрузок, в частности, чтобы не возникало синдрома перетренированности. С целью поиска таких

показателей предлагается оценка средней длины теломер в скелетных мышцах, поскольку именно теломеры определяют резерв числа делений клеток.

Таким образом, разработка методических рекомендаций по определению физиологического резерва спортсмена на основе изучения теломеразной активности и длины теломер клеток является актуальной проблемой спортивной медицины.

1. Структура и функции теломер клеток человека

В клетках эукариот генетическая информация хранится в линейных молекулах ДНК – хромосомах. Еще в 1930-х гг. обнаружили, что целые хромосомы и их обломки по-разному ведут себя в клетках. Разорванные хромосомы сливаются друг с другом, перестраиваются и характеризуются нестабильностью. Тогда же предположили, что подобные различия обусловлены присутствием на концах хромосом специальных нуклеотидных последовательностей, которые назвали теломерами.

Теломеры состоят из повторяющихся последовательностей и набора специальных белков, которые взаимодействуют с такими повторами и организуют их в пространстве особым образом, образуя нуклеопротеидный комплекс – теломерный гетерохроматин (рис. 1-2).

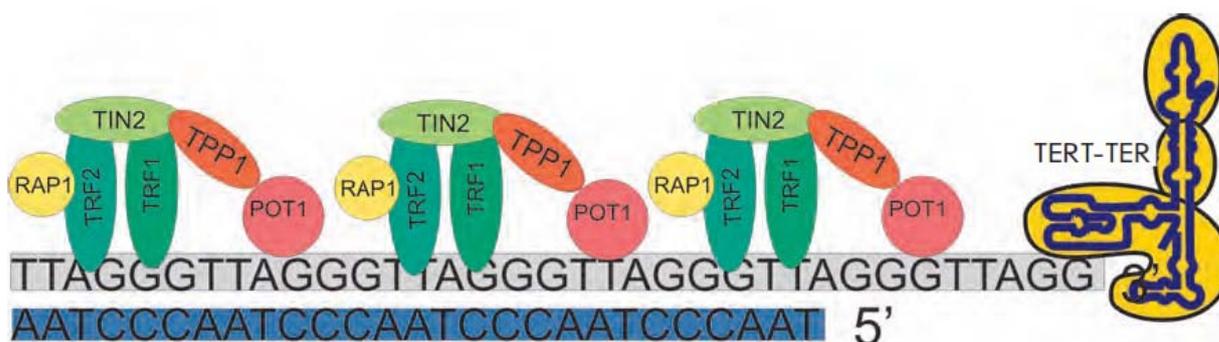


Рис. 1. Структура теломер. Схематическое изображение комплекса теломерной ДНК, белков шелтеринового комплекса и теломеразы.

В ходе репликации генома, происходящей при делении клеток, в результате удаления концевой РНК-затравки и, как следствие, неполной репликации линейных молекул ДНК наблюдается укорачивание 5'-конца дочерней цепи (рис. 3). Эту «проблему концевой недорепликации» в 1970-х гг. независимо сформулировали А.М. Оловников и Дж. Уотсон. Оловников предположил, что существует специальный фермент - теломераза, который

может компенсировать «проблему концевой недорепликации». Этот фермент был открыт в 1987 г. Э. Грейдер и К. Блэкберн.

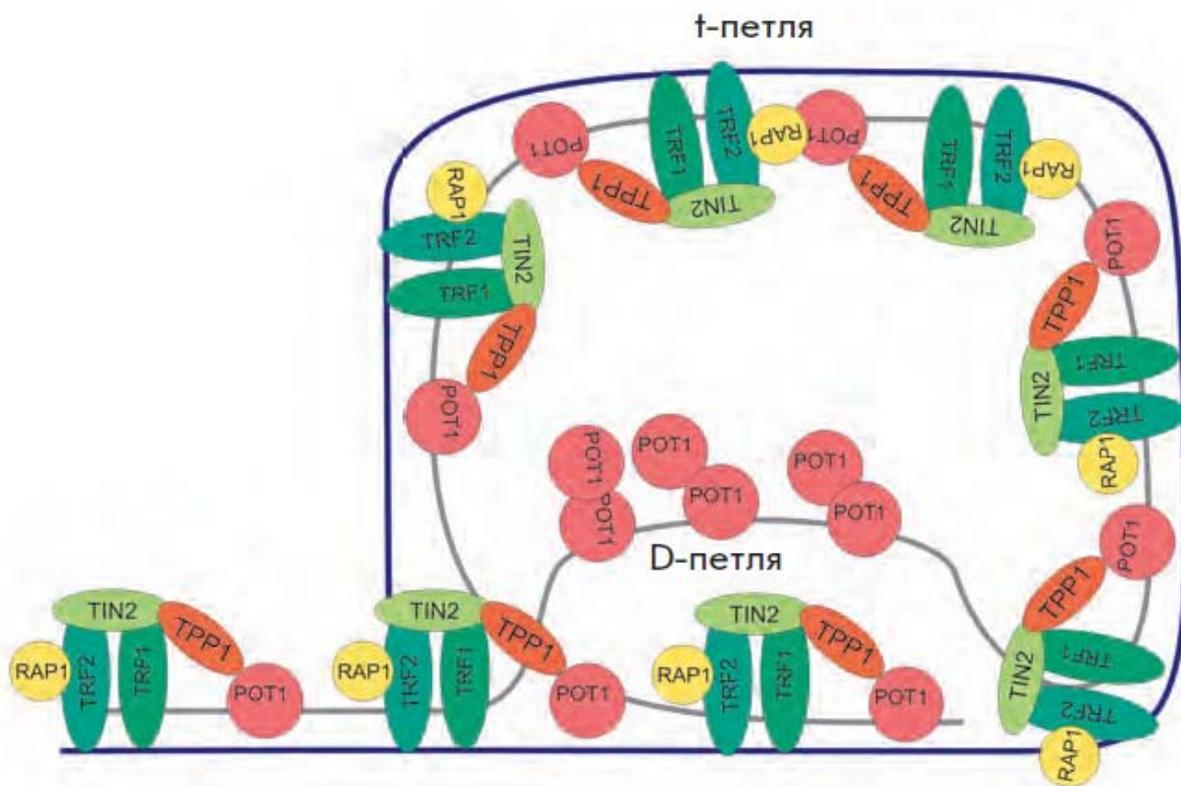


Рис. 2. Схематическое изображение шелтеринового комплекса, связанного с теломерной ДНК, в конформации t-петли.

В состав теломеразы входят два основных компонента – обратная транскриптаза (TERT) и теломеразная РНК (TER), содержащая матричный участок для синтеза теломерных повторов. Кроме того, в теломеразный комплекс входят многочисленные дополнительные компоненты, обеспечивающие активность фермента *in vivo*.

Дополнительные белки участвуют в разных процессах. Часть из них необходима для посадки теломеразы на теломеру в определенный момент клеточного цикла, другие белки регулируют активность фермента. Известно, что теломераза работает не во всех клетках высших эукариот, однако, ее компоненты присутствуют в клетке практически всегда. В последнее время

стали появляться данные о функциях компонентов теломеразы, не связанных с теломерами.

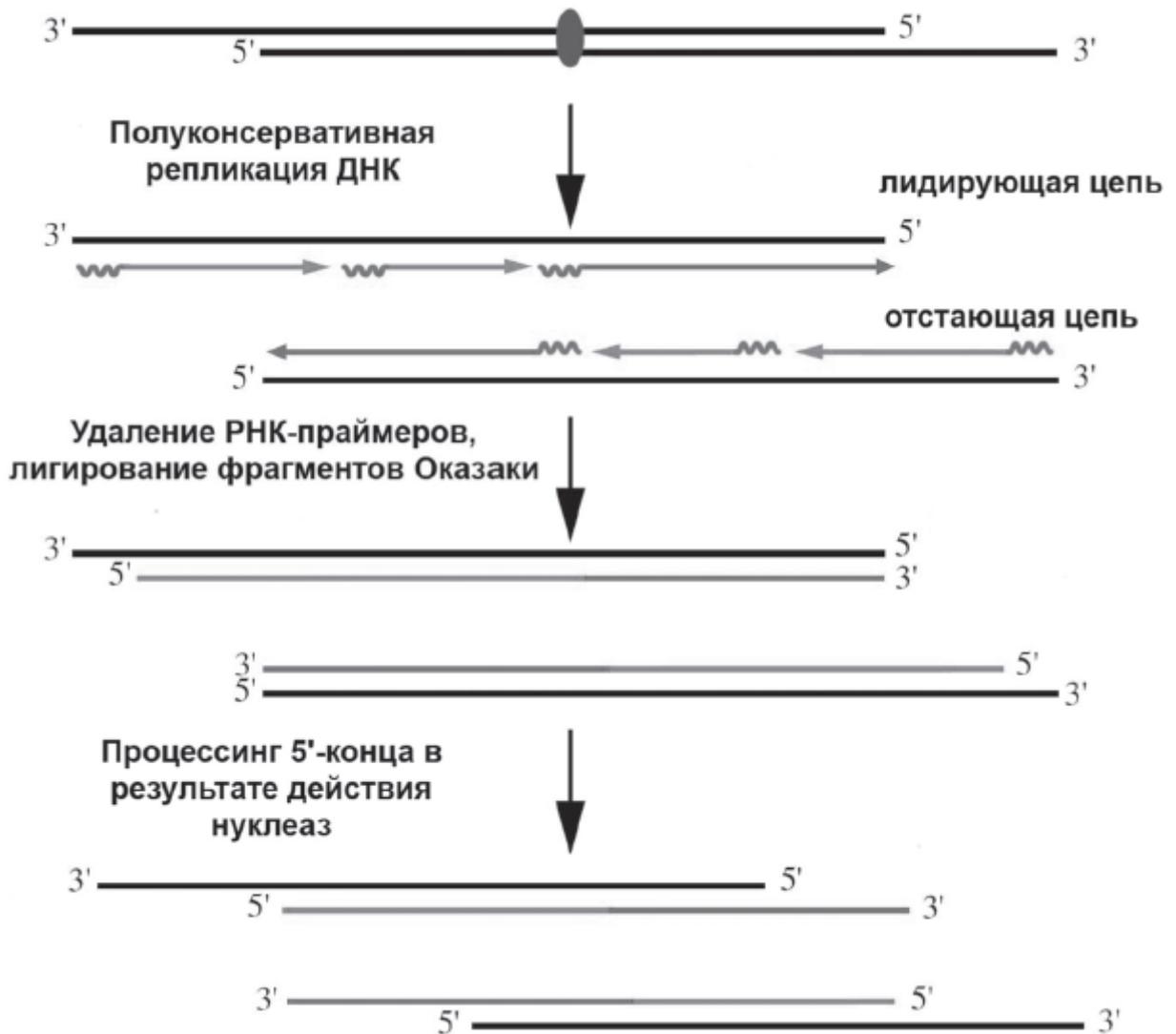


Рис. 3. Укорочение теломер в результате недорепликации и процессинга при делении клетки.

Теломеры представляют собой повторяющиеся нуклеотидные последовательности, с которыми связаны специальные белки, защищающие концы хромосом от деградации и систем репарации двухцепочечных разрывов. По мере накопления данных была высказана гипотеза о том, что теломеры состоят из трех частей. Они содержат, во-первых, так называемый

кеп – концевую структуру, которая защищает концы хромосом от деградации и системы репарации двухцепочечных разрывов (DDR – DNA damage response), а также контролирует удлинение теломер.

Основная часть теломеры представлена двухцепочечной ДНК (дцДНК), состоящей из повторяющихся и транскрибируемых последовательностей. Третью часть теломеры также занимают повторяющиеся последовательности, так называемые субтеломерные области. Нуклеотидная последовательность теломер обогащена остатками тимидина и гуанозина и достаточно консервативна. Теломеры млекопитающих представляют собой двухцепочечный участок, который состоит из повторов ТТ AGGG и 3'-выступающего участка G-цепи длиной 150–200 нуклеотидов.

Согласно одной из гипотез, выступающий участок G-цепи переплетается с двухцепочечным участком теломеры, образуя t-петлю. В месте взаимодействия выступающего 3'-конца с двухцепочечным участком образуется так называемая D-петля. t-Петли были обнаружены методом электронной микроскопии после выделения и специальной обработки ДНК. Однако существование таких структур в клетках однозначно не доказано, поэтому D-петли рассматриваются как предполагаемые структуры.

Функции теломер зависят от минимальной длины теломерных повторов и активности ассоциированного с ними белкового комплекса. Этот комплекс называется шелтерином и состоит из шести белков: TRF1, TR F2, POT1, TIN2, TPP1 и RAP1. Белки TRF1, TRF2 (telomeric repeat binding factor 1 и 2) и POT1 (protection of telomere protein 1) связаны с теломерной ДНК.

TRF1 и TRF2 связываются с двухцепочечными участками теломер, а POT1 – с 3'-выступающим одноцепочечным участком G-цепи. TR F1 и TR F2 связывают теломеры независимо, между собой они не взаимодействуют. Оба белка в виде гомодимера и олигомера специфично связывают ДНК-дуплекс с теломерной последовательностью 5'-YTAGGGTTR -3'.

POT1 высокоспецифично связывается с теломерной одноцепочечной ДНК (оцДНК) 3'-TAGGGTT AG-3', указывая на возможность взаимодействия как с выступающей G-цепью, так и с вытесняемой ею последовательностью D-петли. POT1 взаимодействует с TR F1. Считается, что таким образом TRF1 способствует связыванию POT1 с одноцепочечным участком теломеры.

Своими независимыми доменами TIN2 (TRF1-interacting protein 2) взаимодействует одновременно с TRF1 и TRF2, а также с комплексом TPP1–POT1, образуя мостик между компонентами шелтеринового комплекса. C-Концевой домен TPP1 связывается с TIN2, а центральный с POT1, привлекая таким образом POT1 на теломеры. Кроме того, на N -конце TPP1 находится домен, взаимодействующий с теломеразой. Этот факт подтверждает предположение о том, что TPP1 привлекает теломеразу на конец хромосомы. Белок RAP1 образует комплекс с TR F2 и с теломерой.

В работах нескольких групп показано, что RAP1 не важен для кепирования теломер, но он препятствует рекомбинации на теломерных участках и повышает их стабильность. Таким образом, RAP1, в отличие от TR F1, TR F2, POT1 и TPP1, не защищает теломеры.

2. Структура и функции теломеразы клеток человека

Сборка теломеразы, ее существование в клетке и посадка на теломеры – процессы, в чем-то сходные, а в чем-то отличные у эволюционно далеких организмов. Общие свойства обнаружены у всех компонентов теломеразы: обратной транскриптазы (TERT – telomerase reverse transcriptase), теломеразной РНК (TER – telomerase RNA) и TER-связывающих белков, которые стабилизируют РНК и способствуют сборке активного фермента. Необходимо отметить, что только TERT является высококонсервативным компонентом теломеразы. Результаты изучения компонентов, входящих в состав теломеразы, весьма противоречивы. По-видимому, в процессе жизнедеятельности теломераза, взаимодействуя с различными компонентами, может находиться в разных комплексах.

Теломеразная РНК – один из основных компонентов теломеразы, она содержит участок, который служит матрицей для синтеза теломер. Несмотря на различия в длине и нуклеотидной последовательности теломеразных РНК из разных организмов, вторичные структуры TER демонстрируют высокое сходство и содержат одинаковые структурные элементы.

Консервативными в структуре TER являются матричный участок, псевдоузел, транс-активируемый домен и домены, необходимые для стабильности *in vivo*. Таким образом, в состав TER входят элементы, необходимые для теломеразной активности, а также для сборки, локализации и стабильности РНК, но не требуемые для ферментативной активности. Матричный участок TER взаимодействует с 3'-выступающей частью G-цепи теломер и направляет синтез ДНК.

Этот участок должен быть одноцепочечным, хотя анализ вторичной структуры полученного *in vitro* транскрипта и TER в экспериментах *in vivo* выявляет различия в структуре, что свидетельствует о его взаимодействии с другими компонентами клетки.

Не так давно методом ЯМР получены данные об образовании триплексной структуры между элементами псевдоузла и матричным участком. Возможно, именно образованием этой структуры и объясняются различия в структуре матричного участка T_{ER}. Предполагается также, что в отсутствие T_{ERT} и других необходимых компонентов T_{ER} не образует правильную структуру.

Матричный участок фланкируют два элемента: 5'-матричный ограничивающий и 3'-матричный узнающий. 5'-Элемент представляет собой двухцепочечный участок, расположенный непосредственно перед матричным участком, он регулирует добавление нуклеотидов в ходе обратной транскрипции и, по-видимому, является участком связывания с T_{ERT}.

С помощью мутагенеза показали, что для эффективного функционирования теломеразы важна не нуклеотидная последовательность, а именно вторичная структура этого участка. 3'-Узнающий элемент – это одноцепочечная структура, расположенная после матричного участка, которая позволяет 3'-концу матрицы занять активный центр, стимулирует теломеразную активность и процессивность при добавлении повторов, а также содержит участок связывания N-конца T_{ERT}.

Из элементов вторичной структуры теломеразной РНК наиболее интенсивно изучается псевдоузел. Изменения стабильности псевдоузла приводят к снижению активности теломеразы, что указывает на важную биологическую роль этого структурного элемента. Полученные за последнее время результаты изучения олигонуклеотидов, имитирующих элементы структуры псевдоузла T_{ER}, методом ЯМР и молекулярного моделирования подтвердили, что именно динамика третичной структуры псевдоузла играет важную роль в функционировании теломеразы. Псевдоузел формируется благодаря образованию эволюционно консервативного Хугстеновского триплета U*А*U между U-богатой петлей 1 (J2b/3) и основной шпилькой в

стебле (P3), которая помогает поддерживать структурную целостность и требуется для активности теломеразы.

В то же время А-богатая петля 2 (часть J2a/3) вступает еще в два неканонических триплетных взаимодействия, которые способствуют стабилизации псевдоузла. Между этими двумя структурными элементами, состоящими из триплетов, находится еще одна Хугстеновская пара А*У, которая создает стэкинговое взаимодействие двух основных стеблей, что приводит к формированию окончательной структуры тройной спирали.

Мутации нуклеотидов внутри псевдоузла приводят к разрушению третичной структуры и значительно снижают активность теломеразы, а компенсаторные мутации восстанавливают теломеразную активность. Эти данные свидетельствуют о том, что третичная структура более существенно влияет на каталитическую активность фермента, чем последовательность нуклеотидов.

Предполагается, что псевдоузел позволяет правильно ориентировать дуплекс, состоящий из матрицы и праймера, в активном центре теломеразы. Возможно, что способность этой структуры существовать в двух конформациях – псевдоузла и шпильки – важна для функционирования теломеразы.

В отличие от псевдоузла, структура трансактивирующего домена ТЕР изучена менее подробно. Первичные структуры этого домена из разных организмов характеризуются высоким уровнем гомологии. Транс-активирующий домен представляет собой длинную шпильку из нескольких очень стабильных спиралей, разделенных асимметричными петлями и однонуклеотидными выпетливаниями. Этот домен необходим для правильного формирования псевдоузла, добавления нуклеотидов и процессивности теломеразы при добавлении повторов. Наиболее хорошо изучена спираль Р6.1 транс-активирующего домена ТЕР человека. Этот элемент крайне важен для работы фермента. Роль Р6.1 у позвоночных

понятна не до конца, но известно, что правильная структура этой спирали необходима для сборки теломеразы, а специфические последовательности в петлях играют важную роль в катализе. Считается, что в результате взаимодействия петли Р6.1 с матричным участком формируется третичная структура ТЕР, чем и объясняется роль этих элементов в активности и процессивности теломеразы.

На самом 3'-конце ТЕР позвоночных находится домен Н/АСА, который встречается в малых ядрышковых РНК (мякРНК, small nucleolar RN A) и в малых РНК, специфичных для телец Кахаля (мкаРНК, small Cajal body specific RN A). Н/АСА-домен представляет собой одноцепочечный участок, содержащий Н-бокс (ANANN A, где N – любой нуклеотид), следующую за ним шпильку, в которой находится САВ-бокс, и одноцепочечный 3'-конец, содержащий АСА-бокс. Н/АСА-домен необходим для стабильности теломеразной РНК *in vivo*. Внутри этого домена находится САВ-бокс, служащий сигналом локализации в тельцах Кахаля. САВ-бокс не участвует в 3'-концевом процессинге теломеразной РНК.

В последнее время стали появляться данные о том, что первые 17 нуклеотидов ТЕР человека очень важны для активности теломеразы, отсутствие этого участка или мутации в нем существенно снижают активность фермента. Показано, что рибоолиго-нуклеотид с такой последовательностью образует G-квадруплекс. Можно предположить, что структура этого элемента должна влиять на структуру спирали Р1 и позиционирование матричного участка теломеразной РНК.

Удлинение теломер

Основная активность теломеразы обеспечивает РНК-зависимое удлинение теломер. Каталитический цикл теломеразы состоит из нескольких последовательных стадий. После связывания субстрата происходит добавление одного теломерного повтора. Образовавшийся продукт может

диссоциировать из активного центра фермента, а может транслоцироваться с дальнейшим удлинением.

Способность теломеразы перемещать синтезируемую ДНК в начало матрицы позволяет описывать ее работу двумя типами процессивности. Добавление нуклеотида - процессивность типа I - присуща всем полимеразам, тогда как добавление повтора - процессивность типа II - уникальна для теломеразы и определяет способность фермента копировать матричный участок РНК много раз, удлиняя при этом одну молекулу субстрата.

Основная особенность теломеразы - способность к процессивному добавлению повторов. Механизм транслокации теломеразы после синтеза повтора остается неизвестным, не ясно также, нужна ли процессивность фермента этого типа для эффективного удлинения теломер или нет. Недавно обнаружили, что критически короткие теломеры удлиняются процессивно. В ходе работы теломеразы образуется набор продуктов, отличающихся друг от друга числом теломерных повторов. После добавления одного теломерного повтора реакция останавливается или замедляется, т.е. транслокация и отжиг матрицы являются скоростьюлимитирующими стадиями.

Известно, что теломераза активна не во всех клетках, тем не менее, теломеразная РНК представлена во всех клетках, а обратная транскриптаза - в большинстве клеток. Локализация компонентов теломеразы не всегда совпадает с местом ее «работы». Теломеразную РНК часто обнаруживают в цитоплазме, а обратную транскриптазу в митохондриях и других органеллах. Эти данные позволили предположить, что теломераза может не только поддерживать длину теломер, но и выполнять дополнительные функции в клетке.

3. Влияние физической активности и занятий спортом на длину теломер и активность теломеразы

Одним из открытых вопросов спортивной науки на сегодня остается поиск биологических маркеров эффективности тренировок. Можно предположить, что изменения теломеразной активности, как маркер пролиферативного потенциала, может отражать эффективность тренировок. До настоящего времени проверялись, в основном, изменения теломеразной активности при долговременных тренировках. Предполагается, что активность в моноцитарной фракции крови может меняться сравнительно быстро в ходе тренировок (например, как результат выброса клеток депо крови с отличной от кровотока активностью или как результат повышения уровня теломеразы в клетках) и после отдыха. В этом случае, при определении динамики активации циркулирующих лейкоцитов при тренировке и последующем отдыхе, теломеразная активность может стать критерием оценки эффективности тренировки спортсменов.

Другой очень важной проблемой является оценка предела, до которого можно наращивать интенсивность тренировки, в частности, чтобы не возникало синдромов перетренированности и миопатической усталости спортсменов. С целью поиска таких показателей можно предложить оценку средней длины теломер в скелетных мышцах либо в лейкоцитах крови, поскольку именно теломеры определяют резерв числа делений клеток. В целом установлено, что длина теломер положительно коррелирует с уровнем физической активности (главным образом, аэробной направленности) (Cherkas et al. 2008) и потреблением здоровых продуктов питания (Tiainen et al. 2012), и отрицательно взаимосвязана с возрастом и высоким потреблением животных жиров.

Для получения образца мышечной ткани проводится микробиопсия: под местным обезболиванием над исследуемой мышцей делается разрез

кожи и специальной иглой берется маленький кусочек мышцы объемом 2-3 мм³. С другой стороны, любой биоптат является потенциально травмоопасным для спортсменов, поэтому основываясь на предположении, что длина теломер в клетках периферической крови отражает степень износа организма (известный эффект укорочения теломер при старении) в качестве модели для исследования может быть выбрана ДНК из клеток крови.

Ниже представлены результаты исследований теломер и теломеразной активности в их связи с физическими нагрузками, степенью физической активности и спортом.

3.1. Влияние систематических физических нагрузок на длину теломер и активность теломеразы

При исследовании эффекта краткосрочных тренировок (21 день) на обычных мышцах было показано более чем двукратное увеличение активности сердечной теломеразы, увеличение экспрессии теломеразной обратной транскриптазы (TERT; telomerase reverse transcriptase), теломерного повтор-связывающего фактора (TRF; telomere repeat binding factor) в сердце и инсулиноподобного фактора роста (IGF1) (Werner et al., 2008). С другой стороны, уровень экспрессии проапоптических факторов, таких как Chk2 (киназа контрольной точки клеточного цикла 2), p53 и p16, уменьшился. Вместе с тем, у мышей, нокаутных по генам TERT и eNOS, таких изменений не наблюдалось. Интересно отметить, что прием IGF1 увеличил активность теломеразы миокарда в 14 раз (Werner et al., 2008).

Трехнедельные тренировки (бег внутри колеса) мышей приводят к увеличению активности теломеразы в циркулирующих лейкоцитах (моноцитах) и стенках сосудов брюшной аорты и к предотвращению укорочения теломер в них по сравнению с контрольной группой (Werner et al., 2009). Одновременно с этим, у тренированных мышей отмечена высокая экспрессия теломерного повтор-связывающего фактора 2 и Ku70 в стенках

сосудов, и снижение экспрессии факторов апоптоза клеток сосудов (киназа контрольной точки клеточного цикла 2, p16 и p53).

Физические упражнения системы Цигун продолжительностью 4 месяца привели к значительному повышению теломеразной активности среди 64 участников реабилитационной программы, у которых диагностировали признаки синдрома хронической усталости (Ho et al. 2012).

Ludlow и соавт. (2012) изучали влияние длительных тренировок (более года) на длину теломер у мышцей с короткими теломерами (в результате селекции). Тренировки значительно замедляли дальнейшее укорочение теломер в клетках печени и миокарда (по сравнению с физически не активными мышцами), в то время как теломеры скелетных мышц у них были подвержены укорочению в большей степени, чем у нетренированных мышцей. С другой стороны, активность теломеразы скелетных мышц существенно возросла у тренированных мышцей по сравнению с их малоподвижными сородичами.

Результаты сравнительного анализа на выборке 44 женщин в возрасте $58,1 \pm 6,8$ лет показали, что физически активные женщины (выполнявшие физические упражнения более 60 минут за тренировку, не менее 3 раз в неделю и на протяжении не менее 12 месяцев) имели более длинные теломеры, большее число копий митохондриальной ДНК, более высокие значения циркулирующего адипонектина и липопротеидов высокой плотности по сравнению с женщинами, ведущими малоподвижный образ жизни (Kim et al. 2012).

Было показано, что удлинение теломер у 9 физически активных мужчин после тренировки может происходить специфично в CD8+, но не CD4+ и CD3+ Т-клетках (Simpson et al., 2010).

Три месяца физической активности (ходьба не менее 30 минут в день, занятия йогой и психорелаксацией по 60 минут в день; 6 раз в неделю), и соблюдения правил рационального питания привели не только к

значительному улучшению здоровья 24 мужчин с раком простаты, но и к повышению теломеразной активности в лейкоцитах крови (Ornish et al. 2008). Чем выше была теломеразная активность у пациентов, тем ниже у них был уровень липопротеидов низкой плотности и лучше психологическое состояние.

3.2. Влияние уровня физической активности на длину теломер и активность теломеразы

Известно, что физическая активность благоприятно сказывается на здоровье человека. Cherkas и соавт. (2008) изучили влияние физической активности на длину теломер лейкоцитов (наблюдение более 12 месяцев) на большей выборке добровольцев ($n = 2401$). Было показано, что чем больше индивиды проявляли физическую активность, тем длиннее у них были длины теломер лейкоцитов ($P < 0.001$). У наиболее активных людей средние размеры теломер лейкоцитов были на 200 нуклеотидов длиннее, чем у наименее активных (7,1 против 6,9 килобаз; $P = 0.006$).

У людей зрелого и пожилого возраста теломеры в моноцитарной фракции клеток крови были значительно длиннее при среднем уровне физической активности (991-2340 ккал/нед.), по сравнению с группами с низким (0-990 ккал/нед.) или очень высоким (>3541 ккал/нед.) уровнем физической активности (уровень физической активности определялся по опроснику среди 69 человек в возрасте 50-70 лет) (Ludlow et al., 2008).

В работе Vendix и соавт. (2011) была выявлена положительная взаимосвязь между длиной теломер лейкоцитов у 548 пожилых людей ($78,8 \pm 0,18$ лет) и способностью выполнять разного рода физические нагрузки (подъем по лестнице, ношение тяжестей и т.п.; всего 11 параметров).

Изучив историю жизни и длины теломер лейкоцитов 204 пожилых мужчин (средний возраст 76 лет), Savela и соавт. (2013) пришли к выводу, что те индивиды, которые проявляли умеренную физическую активность в

1974 году (уровень физической активности установили с помощью опросника, когда у испытуемых средний возраст составлял 47 лет) имели более длинные теломеры, чем те мужчины, которые проявляли низкую или высокую физическую активность.

Афроамериканские подростки 14-18 лет имеют более длинные теломеры лейкоцитов, чем их ровесники европейского происхождения (Zhu et al. 2011). Кроме того, средняя длина теломер была значимо больше у девочек и девушек, чем у мальчиков и юношей той же возрастной группы. Вместе с тем, только у подростков женского пола длина теломер положительно коррелировала с уровнем физической активности (Zhu et al. 2011).

В работе Puterman и соавт. (2010) определяли влияние стресса и уровня физической активности в группе, состоящей из 63 здоровых женщин. Было установлено, что чем больше женщины, ведущие малоподвижный образ жизни, испытывали стресс, тем короче у них были теломеры. Такой закономерности среди физически активных женщин обнаружено не было (Puterman et al. 2010).

У 955 больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями определяли уровень физической активности и длину теломер лейкоцитов (Krauss et al. 2011). Длина теломер положительно коррелировала с уровнем физической активности: 5349 ± 3781 пар оснований в группе малоподвижных пациентов и 5566 ± 3829 пар оснований в группе с высокой физической активностью ($p < 0.001$).

В работе Du и соавт. (2012) эти результаты были подтверждены на выборке из 7813 женщин в возрасте 43-70 лет: женщины со средней или высокой физической активностью имели более длинные теломеры лейкоцитов, чем женщины с низкой активностью. Особенно эта закономерность наблюдалась у женщин, занимающихся аэробикой или ритмической гимнастикой.

Mason и соавт. (2013) изучали влияние 12-месячных аэробных нагрузок (45 минут в день, 5 дней в неделю) и низкокалорийной диеты на состав тела и длины теломер лейкоцитов 439 женщин в возрасте 50-75 лет. Исходные длины теломер отрицательно коррелировали с возрастом, и положительно – с максимальным потреблением кислорода, но не с индексом массы тела и относительным содержанием жира женщин.

3.3. Длина теломер и активность теломеразы у стайеров

Изучение лейкоцитов стайеров выявило высокую активность теломеразы и повышенную экспрессию белков, стабилизирующих теломеры, а также понижение экспрессии ингибиторов клеточного цикла по сравнению с нетренированными лицами (Werner et al., 2009). Кроме того, длительные аэробные тренировки стайеров ассоциировались со снижением эрозии теломер по сравнению к спортсменами (Werner et al., 2009).

В недавней работе Østhus и соавт. (2012) изучали взаимосвязь между длинами теломер и аэробными возможностями у стайеров и физически активных лиц разных возрастных групп (всего 20 человек; 22-27 лет и 66-77 лет). Пожилые стайеры имели более длинные теломеры, чем их ровесники, никогда не занимавшиеся спортом. Теломеры молодых стайеров ничем не отличались от теломер спортсменов-ровесников. В целом, длины теломер положительно коррелировали с МПК как у стайеров ($r=0.78$, $p=0.02$), так и лиц контрольной группы ($r=0.58$, $p=0.09$). Авторы заключили, что тренировки на выносливость способствуют сохранению длин теломер к пожилому возрасту.

Вместе с тем, в работе Mathur и соавторов (2013) не было обнаружено различий в длине теломер между марафонцами ($n=17$) и лицами контрольной группы ($n=15$) того же возраста. Кроме того, авторам не удалось найти взаимосвязи длины теломер с уровнем максимального потребления кислорода в этих группах.

В мышцах бедра 18 стайеров (42 ± 7 лет) и 19 человек (39 ± 10 лет), ведущих малоподвижный образ жизни, изучали длины теломер на предмет выявления различий (Rae et al. 2010). Предполагалось, что длительные многолетние тренировки (в среднем общий пробег для каждого спортсмена составил около 50 000 км) могут привести к укорочению теломер. Тем не менее, средние минимальные длины теломер не отличались между выборками. Однако, в группе стайеров была обнаружена отрицательная корреляция между минимальной длиной теломер и стажем занятий (в годах и часах тренировок). Таким образом, длительное использование мышц приводит к их постоянной регенерации за счет использования пролиферативного потенциала сателлитных клеток, что сказывается на постепенном укорочении теломер.

При миопатическом синдроме усталости спортсменов средняя длина теломер в мышцах бедра спортсменов ($n=13$; преимущественно стайеры) была меньше, чем у спортсменов с отсутствием клинических признаков усталости ($n=13$; все стайеры) (Collins et al., 2003). При этом у 3 спортсменов первой группы наблюдались экстремально короткие теломеры, что может объясняться повышенной частотой регенерации мышц у интенсивно тренирующихся спортсменов (Collins et al., 2003).

Laue и коллеги (2012) установили, что белки шелтеринового комплекса и другие белки, регулирующие длину теломер по-разному экспрессируются в скелетных мышцах и мононуклеарных клетках крови тренированных стайеров ($n = 8$, средний возраст - 44 года) в ответ на серию марафонских забегов (7 марафонских забегов в течение 7 дней). Через 22-24 часа после последнего забега экспрессия генов ферментов, репарирующих ДНК (Ku70 и Ku80) возросла как в скелетных мышцах, так и в периферических мононуклеарных клетках крови. Кроме того, в клетках крови было обнаружено увеличение экспрессии генов, кодирующих белки

шелтеринового комплекса (TRF1, TRF2 и Pot-1). Вместе с тем, такие нагрузки не повлияли на длину теломер спортсменов.

В работе LaRocca и соавт. (2010) изучали взаимосвязь длины теломер лейкоцитов с возрастом, аэробными возможностями и уровнем физической активности в зависимости от возраста ($n = 57$). Длина теломер лейкоцитов в группе пожилых индивидов (7059 ± 141 пар оснований) была короче, чем у молодых (8407 ± 218 пар оснований) нетренированных людей. Пожилые стайеры имели примерно на 900 п.о. длиннее теломеры, чем их нетренированные ровесники, но длины теломер почти не отличались между стайерами разных возрастных групп. Кроме того, в целом по общей выборке длина теломер положительно коррелировала с уровнем максимального потребления кислорода (LaRocca et al. 2010).

3.4. Длина теломер и активность теломеразы у спортсменов, специализирующихся в силовых видах спорта.

В работе Kadi и соавт. (2008) изучали длины теломер у 7 пауэрлифтеров (стаж занятий 8 ± 3 лет) и в контрольной группе ($n=7$; без стажа занятий силовыми упражнениями). У спортсменов была обнаружена тенденция к увеличению длины теломер ($P = 0.07$) по сравнению с контролем. Примечательно, что результаты в приседании ($r = -0.86$; $P = 0.01$) и становой тяге ($r = -0.88$; $P = 0.01$) силовых троеборцев отрицательно коррелировали с минимальной длиной теломер. Иными словами, чем короче была длина теломер, тем более высокие спортивные результаты показывали спортсмены.

4. Методы анализа длины теломер

После выделения ДНК определяется ее концентрация, выравнивается для всей серии образцов и определяется длина теломер. Из существующих различных методов тестирования длины теломер, как подходящий для потокового анализа можно предложить вариант с оценкой количества теломерных повторов с помощью ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) (Cawthon R.M., 2002). Этот метод несколько менее точен по сравнению с анализом TRF (технология иммуноблотинга), но менее трудоемок и менее требователен к количеству материала. Анализ проводится на геномной ДНК.

В ходе анализа методом Real-time PCR оценивается количество ДНК с теломерной последовательностью в геноме. Параллельно проводится Real-time PCR к однокопийному участку геномной ДНК. Отношение количеств теломерной и однокопийной матриц пропорционально длине теломер.

Одновременно с одними реактивами за исключением праймеров готовятся стоковые смеси 1,5x (1x смесь: буфер для ПЦР 1x (Fermentas 10x PCR Hotstart buf +KCl), MgCl₂ 2 mM, dNTP 0.2 mM, 0.35 пмоль/мкл каждого праймера, 0,05 ед/мкл полимеразы Maxima (Fermentas), Sybr Green I 0.2x). Для теломерного ПЦР используется пара праймеров Tel1 ggtttttgagggtgagggtgagggtgagggtgagggt и Tel2 tcccgaactatccctatccctatccctatccctatcccta. Для контрольного ПЦР используется пара праймеров 36B4u cagcaagtgggaaggtgtaatcc и 36B4d cccattctatcatcaacgggtaca. Смеси аликвотуются в 384-луночные планшеты по 6 или 12 мкл и к ним приливается 4 или 8 мкл раствора анализируемой геномной ДНК с концентрацией 3-5 нг/мкл и 5 мкл минерального масла. Образцы смешиваются, центрифугируются и амплифицируются в CFX384. Схема амплификации для теломерного ПЦР 95С 5 минут, затем 35 циклов 95С 20 сек, 54С 2 мин. Схема амплификации для контрольного ПЦР 95С 5 минут, затем 35 циклов 95С 20 сек, 58С 1 мин.

При проведении Real-time PCR оценивается количество (определяется пороговый цикл после которого идет рост сигнала на амплификаторе) элемента ДНК, встречающегося в геноме один раз (s) и оценивается общее количество теломерных повторов (определяется пороговый цикл после которого идет рост сигнала на амплификаторе) в геноме (t). Оба эксперимента проводятся в максимально близких условиях (за исключением праймеров одинаковые смеси ПЦР, сравниваемые образцы занимают одну ячейку амплификатора, смешивание образцов на автостанции по одной и той же программе). Для каждого образца делается три повторности теломерной реакции и три повторности контрольной реакции. Вычисляется разница пороговых циклов для теломерного и контрольного ПЦР и вычисляется относительное количество теломерных повторов в геноме (T/S) по формуле $T/S=2^{(t-s)}$. Значение T/S по данным литературы пропорционально длине теломер в образце (при этом зависимость может не быть строго линейной).

Система определения длины теломер проверялась на наборе клеточных линий основанных на линии HEK суперэкспрессирующих различные компоненты теломеразы: в линии суперэкспрессирующей теломеразную РНК hTR $T/S \sim 30$, то есть не меняется, поскольку hTR не является лимитирующим фактором теломеразной активности, в линии суперэкспрессирующей теломеразную обратную транскриптазу hTERT $T/S \sim 100$, а в линии суперэкспрессирующей оба компонента $T/S > 200$). В качестве реперной точки в исследовании используется клеточная линия HEK (значение T/S 30) и ДНК из лейкоцитов со станции переливания крови (значение T/S 50).

5. Методы определения теломеразной активности

В 1961 г. Хейфлик и Мурхиад показали, что культура соматических клеток имеет ограниченный период жизни (предел Хейфлика). В 1973 г. Оловников предположил, что возможное число делений клетки определяется укорачиванием концов хромосом - теломер, играющих роль «клеточных часов». Теломеры защищают геном клетки от деградации, участвуют в мейотическом спаривании хромосом и регуляции транскрипции генов прителомерной области. В клетках, способных размножаться бесконечно (бессмертных), существует механизм, компенсирующий укорачивание теломер.

В 1985 г. Блекберн и Грейдер открыли теломеразу - фермент, удлиняющий одну из цепей теломеры. Теломераза представляет собой РНК-белковый комплекс, основные компоненты которого - РНК-матрица для синтеза теломер (TERC), выполняющая также структурную функцию, и обратная транскриптаза (TERT). Теломеразный комплекс (теломераза) связывается с теломерой или олигонуклеотидом, последовательность которого может не совпадать с теломерной последовательностью (теломеримитирующий олигонуклеотид), и синтезирует короткий фрагмент ДНК (GTTAGG у млекопитающих). Затем теломераза передвигается на конец теломеры (транслокация) и вновь синтезирует фрагмент ДНК (рис. 4).

Активность теломеразы пропорциональна общему количеству синтезированной ею ДНК, а процессивность пропорциональна длине синтезированных фрагментов. Теломеразная активность служит маркером про-лиферативной активности клеток. Компоненты теломеразы могут выполнять функции, не зависящие от сборки активного комплекса. Например, hTERT (TERT человека) независимо от присутствия hTERC (TERC человека) может работать как РНК-зависимая РНК-полимераза.

Повышение экспрессии hTERC не всегда совпадает с появлением теломеразной активности.

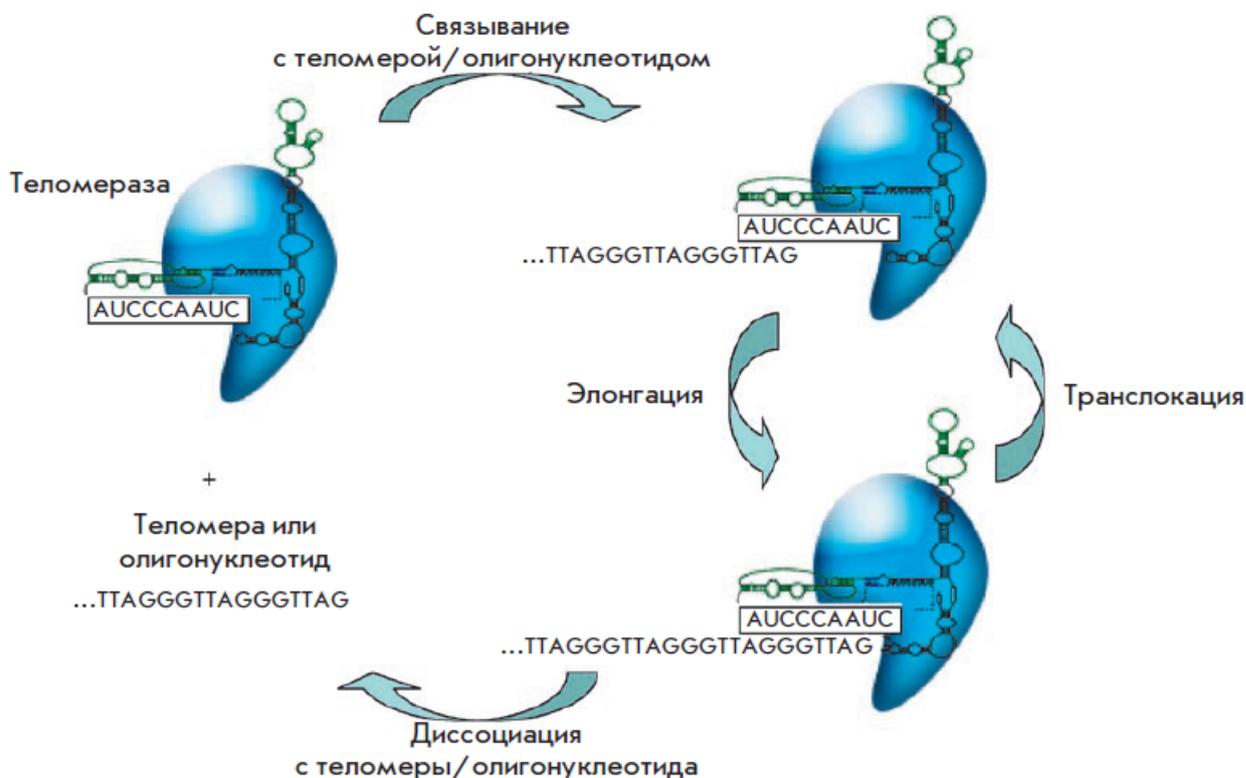


Рис. 4. Общая схема работы теломеразного комплекса.

hTERC ингибирует протеинкиназу ATR, мишенями которой являются известный супрессор опухолевого роста p53 и протеинкиназа контрольных точек CHK1, входящая в систему проведения сигналов от поврежденной ДНК. Снижение уровня hTERC приводит к остановке клеточного цикла в фазах G1 и G2 в результате активации белка p53 и протеинкиназы CHK1, но механизм этого остается неизвестным. Активность теломеразы не выявляется в подавляющем большинстве нормальных клеток человека, но присутствует в репродуктивных органах и эмбриональных тканях.

Методы с амплификацией синтезированной теломеразой днк (TRAP)

Среди методов определения активности теломеразы наиболее распространен TRAP (протокол амплификации теломерных повторов), позволяющий, благодаря некоторым модификациям, проводить полуколичественный и количественный анализ. Существуют модификации, при которых повышается скорость анализа, радиоактивная метка заменяется немечеными соединениями, снижается количество побочных продуктов и т.д., например, методы сцинтилляционного анализа сближения, гибридизационной защиты, транскрипционной амплификации, экстракции магнитными шариками.

Некоторые модификации дают возможность определять активность теломеразы даже в одной клетке. Протокол амплификации теломерных повторов можно разбить на три основных этапа: удлинение праймера, амплификация синтезированной теломеразой ДНК и детекция. На стадии удлинения теломерные повторы добавляются теломеразой, присутствующей в клеточном экстракте, к теломеримитирующему олигонуклеотиду (TS, см. табл. 1).

Таблица 1. Некоторые олигонуклеотиды, используемые в различных модификациях TRAP

Олиго-нуклеотид	Нуклеотидная последовательность
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
CX	5'-(CCCTTA) ₃ CCCTAA-3'
ACX	5'-GCGCGG(CTTACC) ₃ CTAACC-3'
RP	5'-TAGAGCACAGCCTGTCCGTG-3'
RPC3	5'-TAGAGCACAGCCTGTCCGTG(CTAACC) ₃ -3'
TSG4	5'-GGG ATTGGG ATTGGG ATTGGGTT- 3'

После этого проводят ПЦР-амплификацию синтезированной теломеразой ДНК с использованием специфических праймеров (теломеримитирующего и обратного). На этом этапе в синтезированную теломеразой ДНК могут включаться различные метки: радиоактивная, флуоресцентная, аффинная. Затем следует детекция (в оригинальном методе с электро-форетическим разделением продуктов ПЦР и фотографированием).

Исходный метод TRAP не свободен от ряда недостатков. При амплификации продуктов ПЦР первоначально применяли олигонуклеотид СХ, имевший комплементарное перекрытие в несколько олигонуклеотидов с ТS. Это приводило к образованию димеров праймеров и продуктов, возникающих из-за взаимодействия между праймерами. Даже при использовании оптимального праймера АСХ с некомплементарным ТS-концом при анализе концентрированных экстрактов опухолевых тканей может появляться фоновый сигнал. Другая проблема состоит в том, что если использовать обратные праймеры, полностью соответствующие теломерным повторам, то праймеры отжигаются в ходе ПЦР не по краям матрицы (в силу периодичности теломер) и появляются ложные сигналы.

Эту проблему решают, добавляя на края праймера дополнительные некомплементарные теломерам участки (табл. 1) с 5'-концевым нетеломерным «довеском» из 6 нуклеотидов. Может использоваться комбинация нескольких праймеров, используемых в качестве обратных, для уменьшения неспецифических сигналов (подробнее о двухпраймерной системе далее, праймеры RP и RPC3 приведены в табл. 1).

В смесь TRAP для оценки влияния стабилизирующих квадруплексы ингибиторов может добавляться олигонуклеотид TSG4 (табл. 1), который не требует синтеза теломеразой нескольких повторов до начала действия ингибитора. Более подробно преимущества и недостатки различных олигонуклеотидов, используемых в TRAP, рассмотрены в работе.

Кроме того, если использовать ПЦР для амплификации сигнала, то на результат определения теломеразной активности могут влиять ингибиторы ПЦР, содержащиеся в образце. Первоначально в методе TRAP продукты ПЦР выявляли в полиакриламидном геле (ПААГ) по радиоактивной метке, которую вводили с помощью радиоактивно меченного праймера или встраивали в ДНК в ходе реакции.

Метод позволяет качественно оценивать активность и процессивность теломеразы в экстрактах клеток и тканей, но, как уже сказано, нуждается в радиоактивных препаратах. ПЦР второй стадии TRAP позволяет получить достаточно ДНК для окрашивания в геле, например бромидом этидия (достаточно сильный мутаген, чувствительность невысокая), нитритом серебра (чувствительность, как при использовании радиоактивной метки, но метод более трудоемкий и сравнительно дорогой), Sybr Green и его аналогами (чувствительность, как при использовании радиоактивной метки, а мутагенность гораздо ниже, чем у бромида этидия, хотя он также является интеркалирующим красителем). Возможно также и флуоресцентное мечение олигонуклеотидов, используемых в TRAP.

Очистка синтезированной теломеразой ДНК и эффективность TRAP

Получить экстракты опухолевых клеток или клеточных линий и определить в них теломеразную активность достаточно просто, тогда как ткани состоят из нескольких типов клеток и могут содержать вещества, влияющие на количественную и даже качественную оценку теломеразной активности. Поэтому возможны ложноположительные или ложноотрицательные результаты, которые могут повлиять на правильность диагноза и прогноз заболевания.

Определение теломеразной активности могут затруднять и особенности биопсийных образцов: большие объемы жидкости (кровь и т.д.) или присутствие многочисленных нормальных клеток. В этих случаях возможна

экстракция синтезированной теломеразой ДНК при помощи модифицированных магнитных шариков. При этой процедуре ингибиторы ПЦР удаляются или сильно разбавляются. Метод TRAP с такой экстракцией состоит из трех основных этапов: удлинение субстратимитирующего олигонуклеотида теломеразой, выделение синтезированной теломеразой ДНК с помощью модифицированных магнитных шариков, амплификация.

На этапе экстракции синтезированную теломеразой ДНК гибридизуют с С-богатым биотинилированным праймером (СССТАА)₂ и выделяют ее из реакционной смеси с помощью покрытых стреп-тавидином магнитных шариков. Затем синтезированную теломеразой ДНК высвобождают из комплекса с помощью нагревания и проводят ПЦР. Эта модификация имеет на порядок меньшую чувствительность к ингибиторам ПЦР по сравнению со стандартным TRAP и несколько большую эффективность при анализе тканевых и других комплексных образцов.

Вместо биотинилированного праймера и магнитных шариков можно использовать экстракцию фенолом и хлороформом, хотя при этом хуже удаляются примеси, хорошо растворимые в воде, а не в органических растворителях.

В работе по определению теломеразной активности может быть использован метод детекции теломеразной активности, разработанный на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (Донцова О.А. и соавторы). Данный метод адаптирован под различные типы клеток, и основан на получении клеточного экстракта с сохранением активности теломеразы и реакции удлинения теломерного субстрата с окрашиванием продуктов реакции флуоресцентным красителем Sybr Green. Преимущества метода позволяют заменить окрашивание на основе радиоавтографии, общепринятое ранее, на более безопасную

детекцию и использовать в качестве биологического материала малоинвазивный материал: лимфоцитарную фракцию периферической крови.

Данная методика определения теломеразной активности основана на работе (Kim, N.W., et al 1994) с некоторыми модификациями. Анализ проводится на чисто выделенной моноцитарной фракции клеток крови (примесь эритроцитов мешает анализу), 100000 клеток на анализ.

Клетки моноцитов лизируются буфером с мягким детергентом, отделяется экстракт. Для этого клетки, полученные из моноцитарного кольца на градиенте плотности Ficoll и промытые буфером PBS ресуспендировали в лизирующем буфере (10 mM Tris-HCl или 10mM HEPES-KOH, pH 7.5, 1.0 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM β-меркаптоэтанол, 5% глицерин, 0.5% CHAPS, 0.1 mM PMSF), 1 мл на 0,1-10 млн клеток, в зависимости от необходимой концентрации. Инкубируют 30 минут во льду. Центрифугируют 10 минут при 4°C на 15000 об/мин и отбирали надосадочный раствор. Экстракт делят на аликвоты и замораживают в жидком азоте.

С полученным экстрактом проводится теломеразная полимеразная реакция. Полученные продукты амплифицируются с помощью ПЦР и детектируются либо в ходе Real-time PCR либо по ПААГ гелю.

Готовится 28 мкл смеси 1: 1x TRAP-буфер (1x TRAP-буфер: 20 mM HEPES-KOH pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 1mM EGTA, 0,1 мг/мл BSA, 0,005% v/v Tween-20), по 20 мкМ dNTP, 10 пмоль олигонуклеотида TS (aatccgctcgagcagagtt) и экстракт моноцитов или клеток контрольных клеточных линий. Реакционную смесь инкубируют 30 минут при 25°C.

На втором шаге к смеси добавляли 1,5 ед. Taq-ДНК-полимеразы (“Хеликон”), 10 пмоль олигонуклеотида ACX (gcgcggcttacccttacccttaccctaacc) и проводили ПЦР по следующей схеме: 35 с 94°C, 35 с 50°C 90 с 72°C (30 циклов, амплификатор Mastercycler (“Eppendorf”, Германия)).

При оценке по гелю 15 мкл раствора наносили в 15% полиакриламидный гель (акриламид: BIS-акриламид 1:19 10%, TBE 1x (pH

8,3, трисгидроксиметиламинометан 0,1 М, борная кислота 0,1 М, ЭДТА 2 мМ), TEMED 0,1%, персульфат аммония 0,1%). В качестве электродного буфера используют TBE 1x. Проводят электрофорез, пока ксиленцианол не пройдет 15 ± 5 см. Гель окрашивают раствором SYBR Green (10000× концентрат в DMSO фирмы Sigma-Aldrich, разведенный в 10000 раз 0,1М буфером Tris-HCl с рН 8,0). Окраску детектируют с помощью фосфоримиджера фирмы Fuji или трансиллюминатора с фильтром для детекции Sybr Green I.

При оценке активности теломеразы по ПЦР в реальном времени к смеси на втором шаге прибавляется Sybr Green I до 0.2x концентрации в финальной смеси и проводится Real-time PCR на приборе CFX-96 или CFX-384 с оценкой количества продукта пороговым методом. В качестве калибровочной кривой используется серия разведений контрольных экстрактов клеточных линий.

Работа проводится с помощью стандартного молекулярно-биологического оборудования (микроцентрифуга, термостат и др.), автоматизированной станции пипетирования (пр-во Perkin-Elmer) и 384- и 96-луночного Real-time PCR амплификатора (пр-во Biorad).

Заключение

Активность теломеразы рассматривается как потенциальный маркер физиологического резерва организма: длительность активного функционирования клетки, пролиферативного потенциала, а длину теломер – «клеточными часами», ограничивающими число возможных делений клетки. Физические нагрузки приводят к увеличению активности теломеразы и количества теломеразной обратной транскриптазы и белка TRF в миокарде, лейкоцитах и эндотелиальных клетках и к предотвращению укорочения теломер в них. При миопатическом синдроме у спортсменов, сопровождающимся усталостью, средняя длина теломер в мышцах спортсменов меньше, чем у здоровых спортсменов, при этом у некоторых индивидов наблюдались экстремально короткие теломеры, что может объясняться повышенной частотой регенерации мышц у интенсивно тренирующихся спортсменов. Было установлено, что физические нагрузки силового характера также приводят к незначительному укорочению теломер в скелетных мышцах индивидов. Одним из открытых вопросов на сегодня остается поиск биологических маркеров эффективности тренировок. Изменения теломеразной активности можно рассматривать как маркер пролиферативного потенциала, что отражается на эффективности тренировок. Другой очень важной проблемой является оценка предела, до которого можно увеличивать интенсивность нагрузок, в частности, чтобы не возникало синдрома перетренированности. С целью поиска таких показателей предлагается оценка средней длины теломер в скелетных мышцах, поскольку именно теломеры определяют резерв числа делений клеток. Таким образом, применение данных о теломеразной активности и длине теломер с целью определения физиологического резерва позволяет значительно повысить эффективность подготовки спортсменов.