

Генетика клеточного цикла

Электронно-лекционный курс

Глава 5

Надклеточный контроль клеточного деления, роста и апоптоза

Надклеточный контроль клеточного деления, роста и апоптоза

Размер организма и органа зависит от числа клеток и их массы. Число клеток определяется их рождением и гибелью

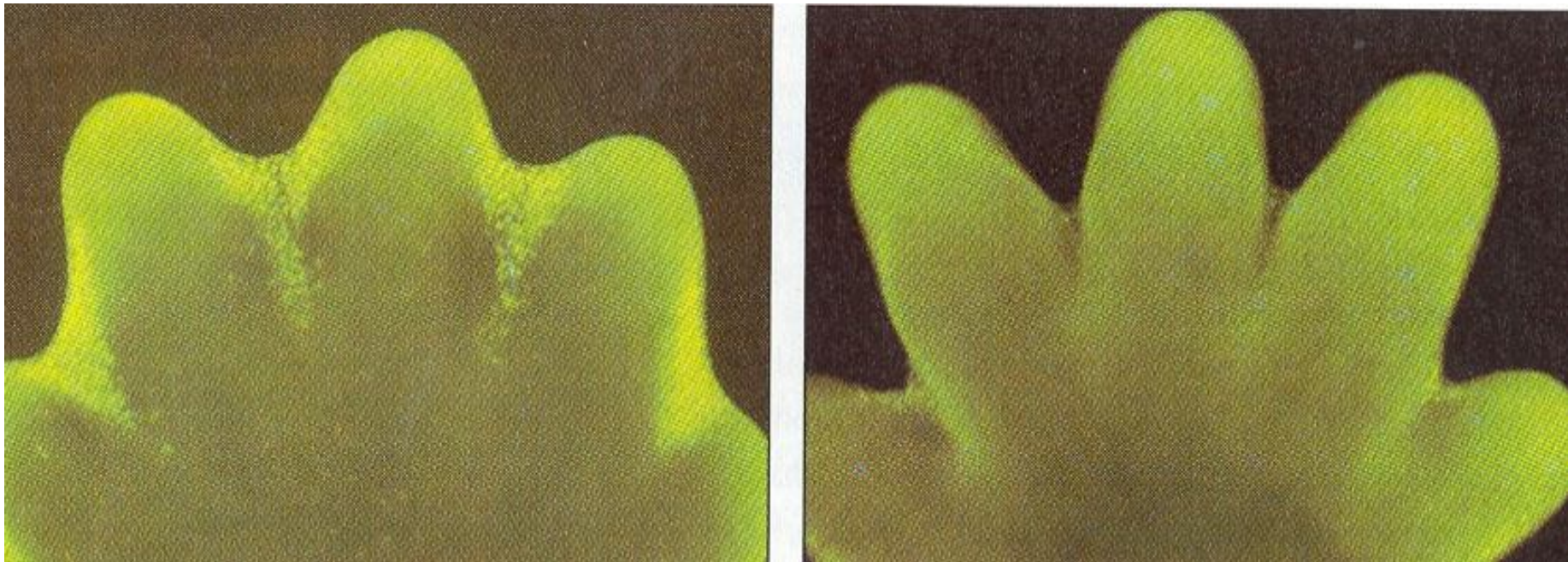
Экстраклеточные сигналы, регулирующие эти процессы, часто называют «факторы роста» в широком смысле. Для точного выражения следует различать:

1. Митогены – стимулируют клеточные деления, снимая внутриклеточный блок с продвижения по циклу.
2. Ростовые факторы – стимулируют увеличение массы клетки, вызывая синтез макромолекул и ингибируя их деградацию
3. Факторы выживания – супрессируют апоптоз

Апоптоз – программируемая гибель клеток

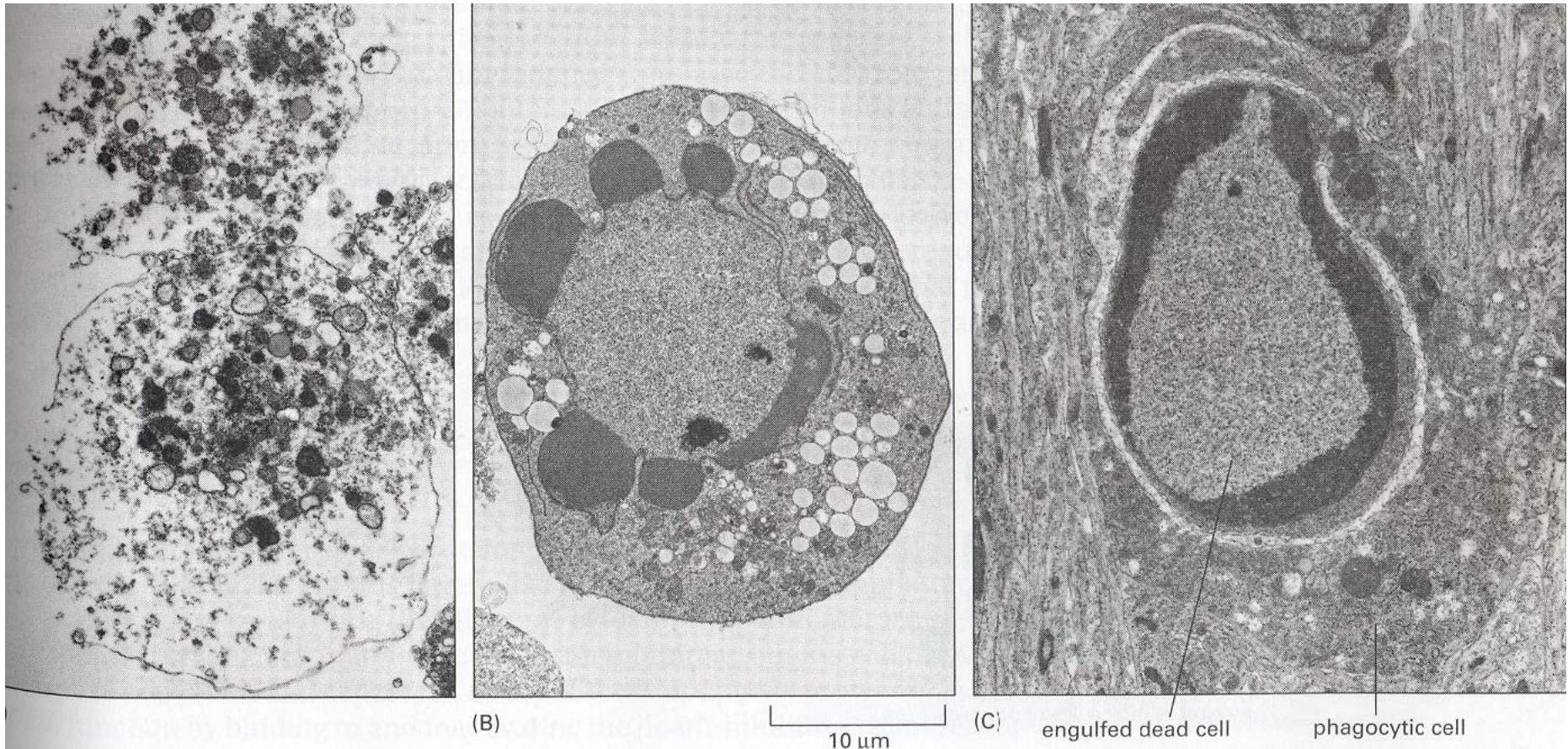
Апоптоз происходит:

- Эмбриогенез и дифференцировка
- Физиологическое обновление клеток
- Атрофия, вызванная действием факторов некроза опухолей
- Вирусные заболевания (СПИД)
- Нейродегенеративные заболевания (б. Альцгеймера, б. Гатчинсона)



Лапа эмбриона мыши с интервалом в сутки, окраска на апоптоз

Варианты гибели клеток



Некроз клетки в
клеточной
культуре

Гибель клетки
апоптозом в
клеточной культуре

Апоптоз клетки в
развивающейся
ткани

Апоптоз, морфологические изменения:

- Конденсация хроматина, фрагментация и разрушение ядра.
- Цитоскелет сжимается.
- Клеточная мембрана вспухает.
- Клетки фрагментируются, образуются «апоптозные тела».

Молекулярные изменения:

- Возрастает концентрация Ca^{2+}
- Активируются протеазы-каспазы
- ДНК режется на фрагменты
- Клеточная поверхность меняется- теряется сиаловая кислота на гликопротеинах и гликолипидах-, что вызывает быстрый фагоцитоз клетки макрофагами или соседями
- На мембране появляются рецепторы витронектина, притягивающие макрофаги

Каспазы - протеазы, имеющие цистеин в активном сайте и разрезающие белки-мишени по аспарагиновой кислоте – caspases

- Разрушение ламины. Разрезание белка, инактивирующего эндонуклеазу – разрезание ДНК.

Каспазы синтезируются в виде прокаспаз, хранятся в клетке долгое время.

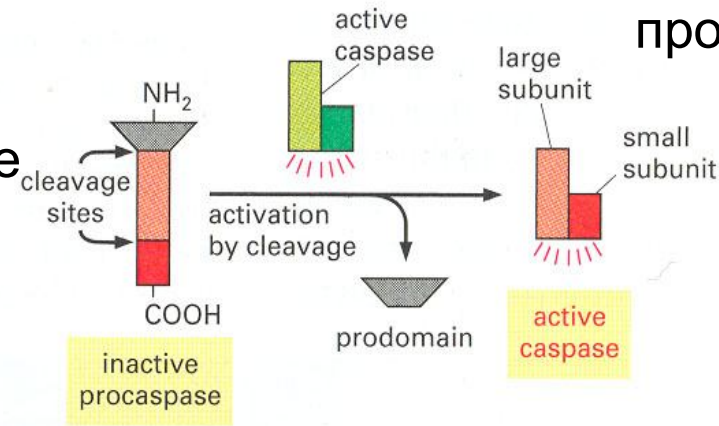
Активируются другими каспазами разрезанием по аспарагиновой кислоте. Амплификация протеолитического каскада.

Апoptосома (700 кДа):

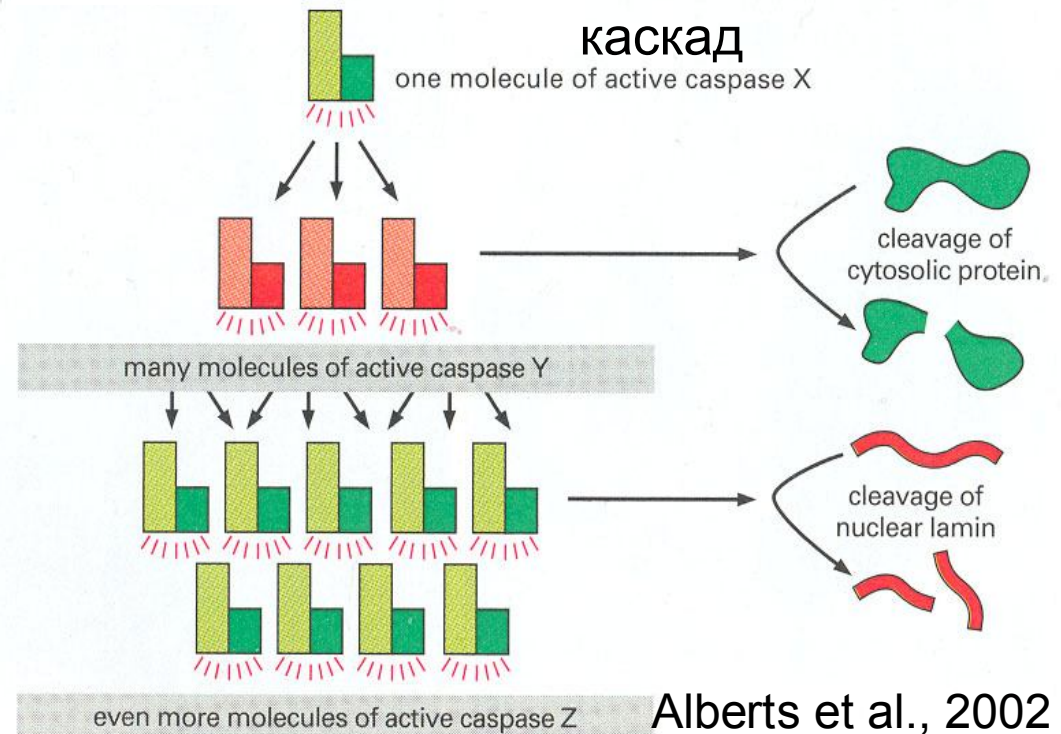
Адапторный белок – собирает инициаторные прокаспазы в комплекс или агрегат. Они взаимно активируют друг друга

Далее каспазы эффекторные

Активация прокаспазы



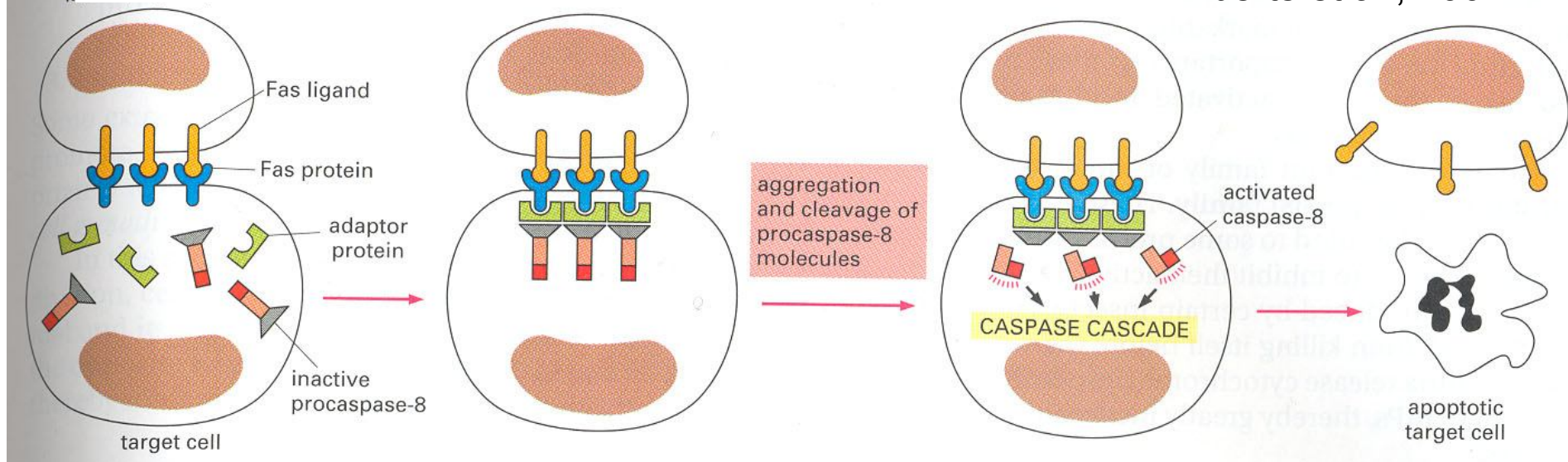
Каспазный каскад



Alberts et al., 2002

Активация апоптоза с внешней стороны

Alberts et al., 2002



- Fas-путь. Активация апоптоза с внешней стороны Ca^{++} независимый Лимфоцит-киллер активирует death –рецепторы на поверхности клетки: белок Лиганд Fas присоединяется к Fas-рецептору Fas кластеризуются, к ним присоединяются адапторные белки и прокаспазы-8. Взаимная активация и каскад. Некоторые стрессированные или поврежденные клетки убивают себя сами, продуцируя и Fas-лиганд, и Fas-рецептор.
- Липидный путь – через Fas и сфингомиелиназу (сем. Фосфолипаз C). Сфингомиелин – церамид + фосфорилхолин. Повреждение K^{+} каналов

- Fas – рецептор относится к семейству рецепторов Фактора некроза опухолей (РФНО). Рецептор экспрессируется в лимфобластах, тимоцитах, активированных Т и В лимфоцитах, фибробластах, кератиноцитах, гепатоцитах, нейронах и астроцитах. Есть укороченная растворимая форма. Мутации в гене ассоциированы с лимфопролиферативными (4-28% в опухолях) и аутоиммунными заболеваниями.
- Fas – лиганд относится к семейству Фактора некроза опухолей (ФНО), мембранная или растворимая форма, экспрессируется на активированных Т лимфоцитах, клетках Сертоли

Активация апоптоза изнутри клетки

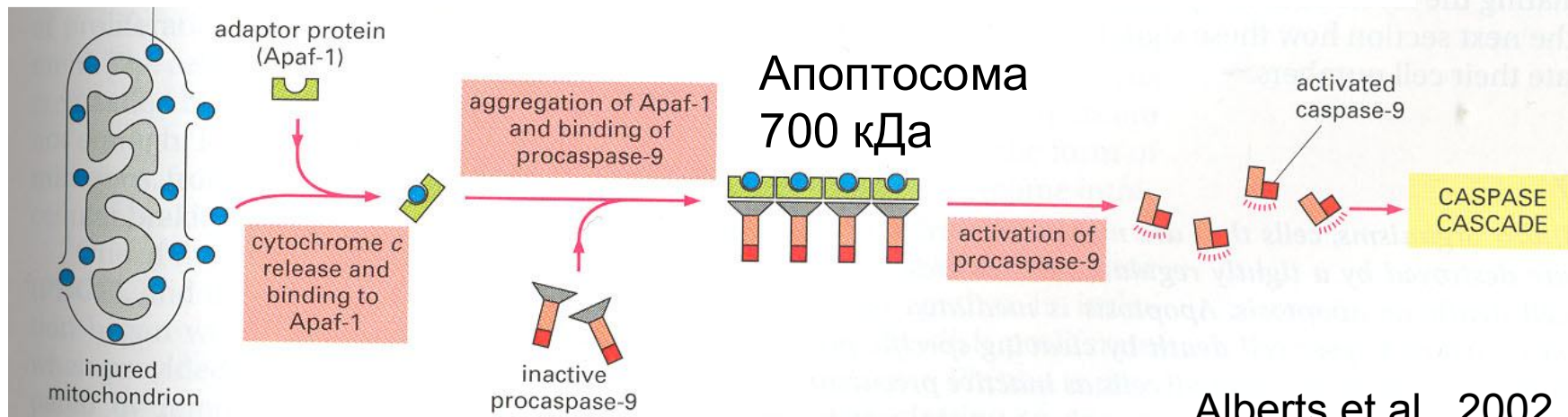
- Один из путей: митохондрии индуцируются к выбросу цитохрома с в цитозоль.

Цитохром с присоединяется к адапторному протеину *Apaf-1* (коровый скэффолд-белок).

- Митоптоз – каспазозависимый процесс элиминации митохондрий.

Белки Вах и Вак вызывают выброс белка межмембранного пространства митохондрий за счет пермеабелизации внешней мембраны, стимулируется фрагментация митохондрий и гибель клетки без активации каспаз

Цитохром с выходит из межмембранного пространства



Alberts et al., 2002

Регуляторы апоптоза

Белки семейства Bcl-2 (*B-cell lymphoma*) – внутриклеточные регуляторы активации прокаспаз:

- *Bcl-2* и *Bcl-XL* ингибируют апоптоз, блокируя выброс цитохрома с. Связаны с мембраной митохондрий, блокируют проапоптотический комплекс (прокаспазы, адаптер Араf3, флавопротеин AIF -apopt. inducing factor, цитохром с)
- Другие белки Bcl-2, наоборот, ускоряют активацию прокаспаз,
- *Bid* активирует *Bax* и *Bak*
- *Bax*, *Bak* дестабилизируют мембрану митохондрий, стимулируют выброс цитохрома с,
- *Bad* присоединяется и активирует белки, ингибирующие смерть

Ингибиторы апоптоза (IAP):

- присоединяются к прокаспазам, предотвращая их активацию;
- Соединяются с каспазами, ингибируя их активность
- Survivin – участник комплекса белков- пассажиров

Митогены (более 50 белков)

Фактор роста тромбоцитов PDGF –platelet-derived growth factor

Клетки фибробластов в культуре делились с добавлением сыворотки крови и не делились в плазме.

Плазма – забирают жидкую часть крови без образования сгустка.

Сыворотка – то же после образования сгустка.

Клетки делились при добавлении экстракта фибробластов

В организме тромбоциты стимулируют деление клеток при заживлении ран.

EGF –epidermal growth factor

PDGF (фибробласты, гладкие мышечные, нейроглиальные) и EGF – широкого спектра действия

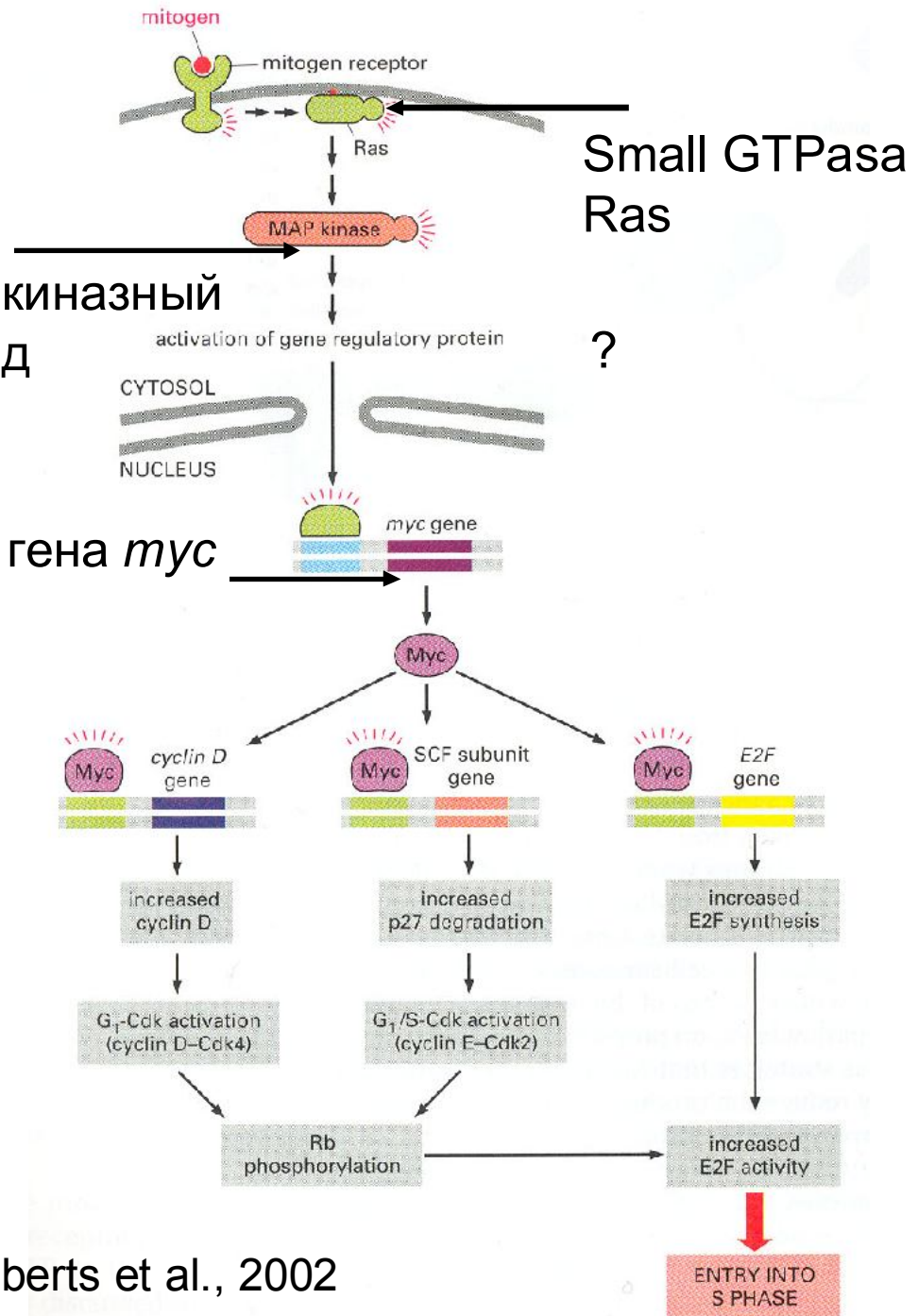
Эритропоэтин – только для эритроцитов

TGF- β – трансформирующий фактор роста – одни клетки стимулирует, другие ингибирует

Один из путей стимуляции клеточных делений митогеном

MAP-киназный каскад

Активация гена *myc*

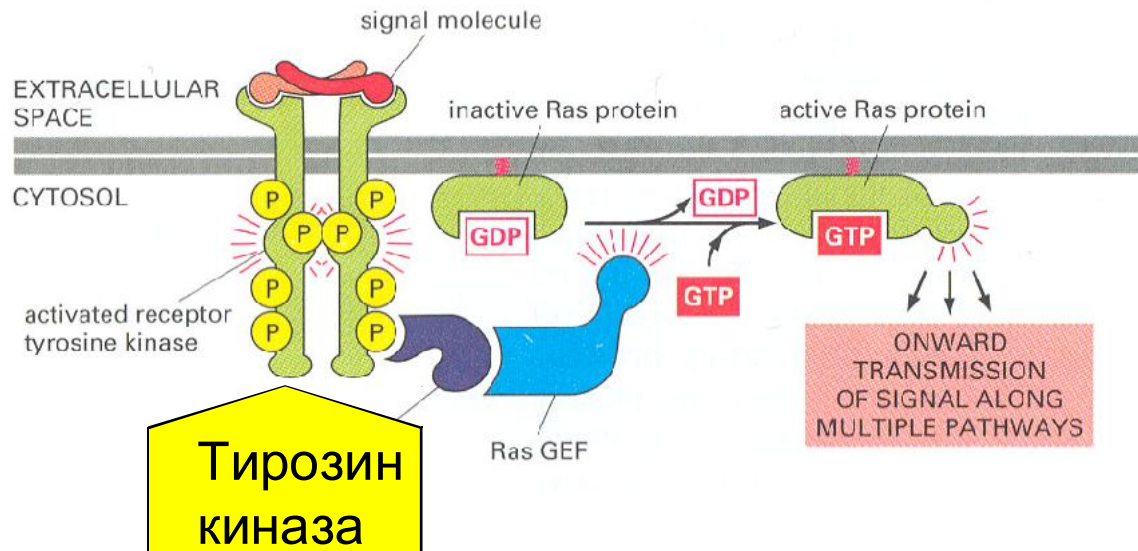


Многие компоненты внутриклеточных сигнальных путей оказываются онкогенами

Гиперактивный *Ras*- продукт мутантного гена *ras* часто вызывает рак (30%)

Мутация 1 ак в *Ras* – перманентная активность, постоянная стимуляция сигнального пути

Alberts et al., 2002



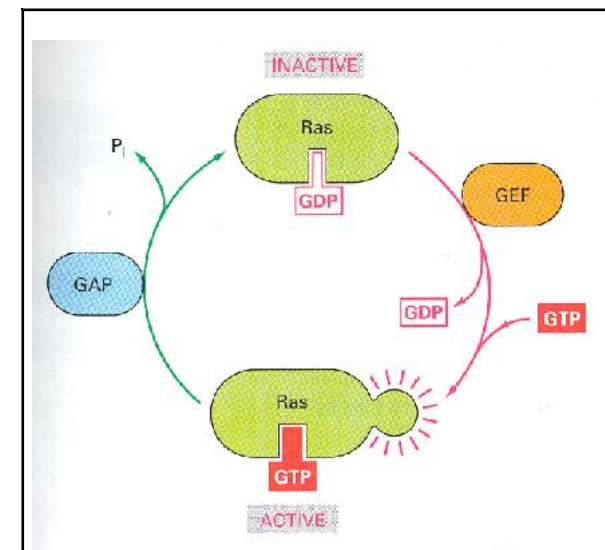
Ras- мономерная GTF-аза, имеет пренильную группу.

Ras-GEF- guanine nucleotide exchange factors

Протоонкогены – гены, в норме стимулирующие деление клетка. Мутация с приобретением функции (доминантная) превращает его в онкоген.

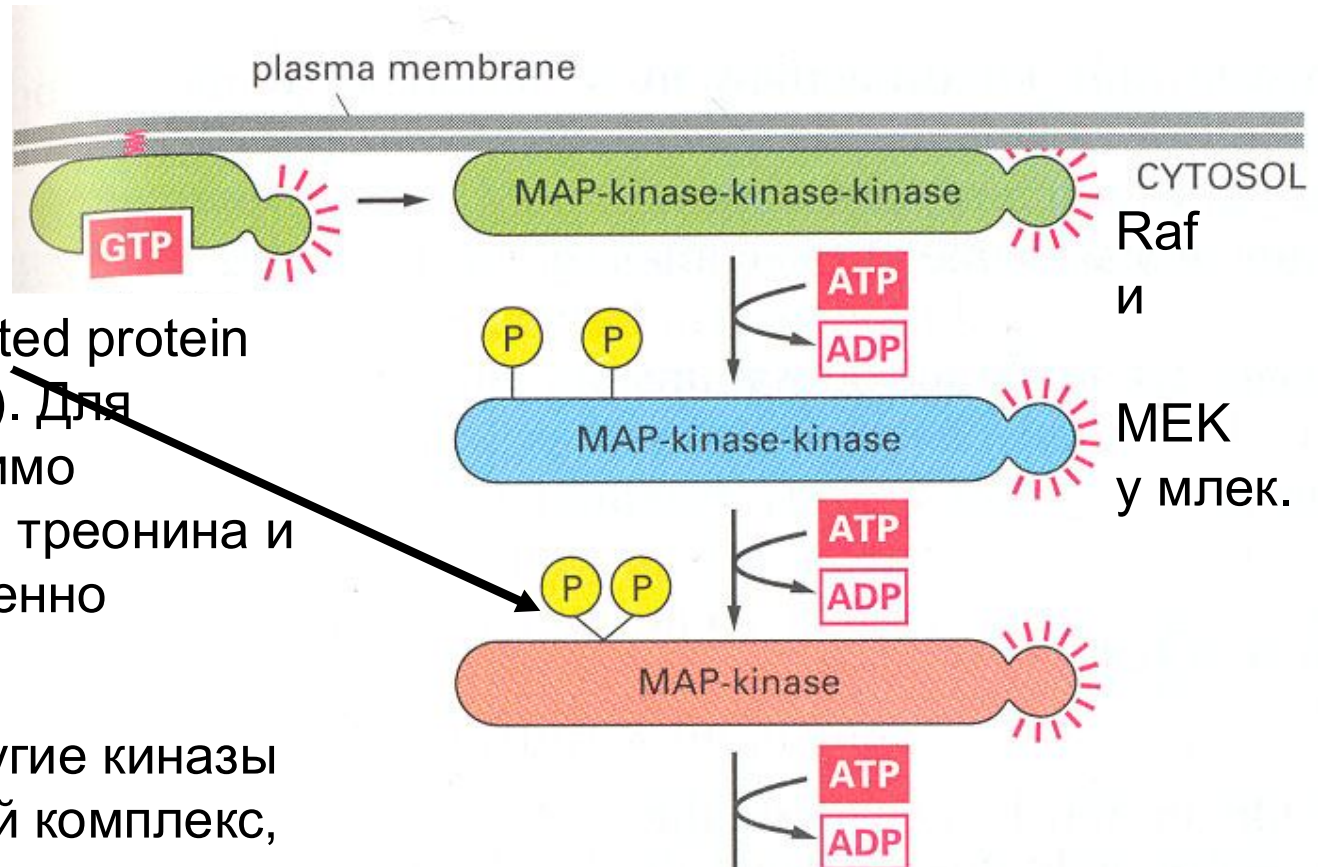
Туморсупрессоры – гены, в норме подавляющие клеточные деления. Функция утрачивается в результате мутациях в обоих генах (рецессивные).

Стимуляция митогеном сигнального пути Ras



Alberts et al., 2002

Стимуляция митогеном сигнального пути Ras



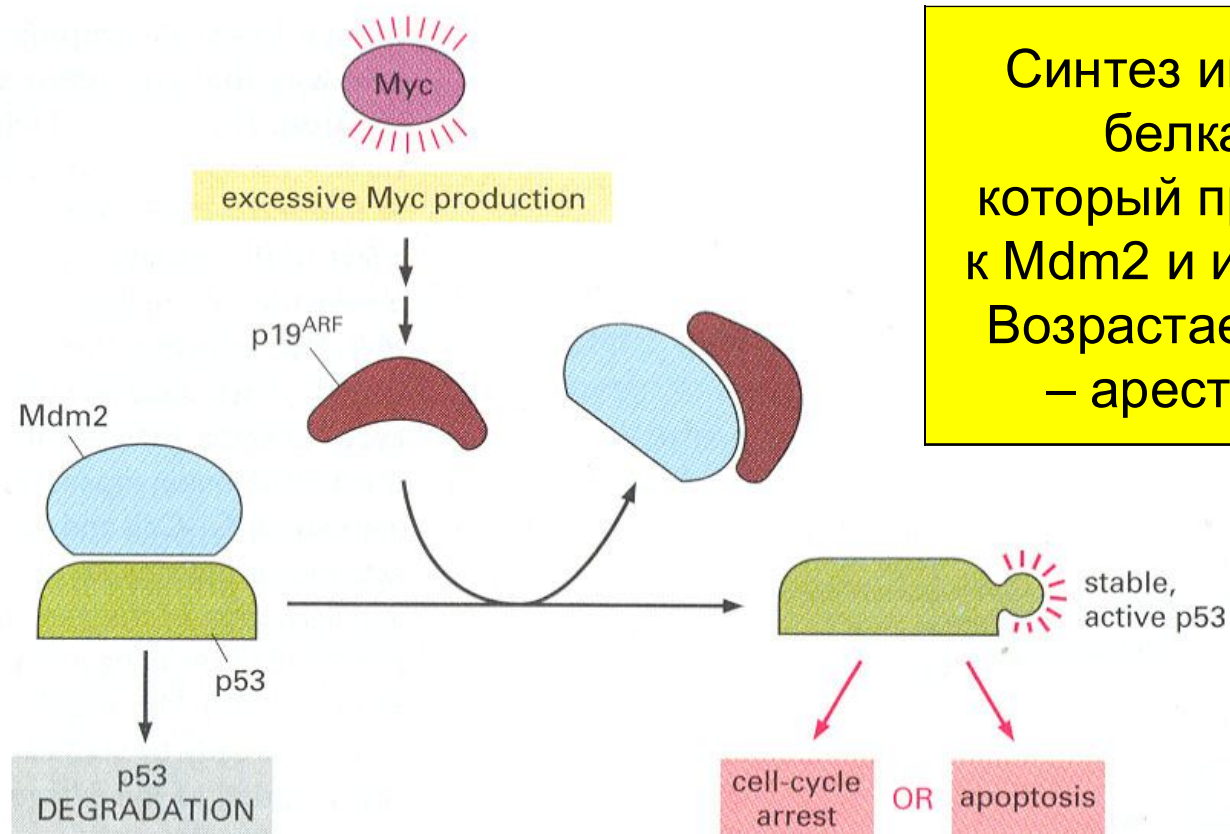
MAP- mitogen-activated protein kinase (MAP-киназа). Для активации необходимо фосфорилирование треонина и тирозина одновременно

Входит в ядро и фосфорилирует другие киназы и гено-регуляторный комплекс, активируя транскрипцию «непосредственно ранних генов» через минуты после сигнала – это *тус-ген*

Повышенная стимуляция митогенного пути индуцирует арест клеточного цикла или апоптоз

В большинстве нормальных клеток гиперактивация Ras и Myc приводит к активации точки контроля. Нормальная клетка в состоянии различить аномальную стимуляцию.

Alberts et al., 2002



Синтез ингибиторного белка p19ARF, который присоединяется к Mdm2 и ингибирует его. Возрастает уровень p53 – арест или апоптоз

В раковых клетках эта система часто инактивируется мутациями в компонентах точки контроля

Другие способы регуляции митогенной активности

- Белок SKI p27 прогрессивно нарастает в клетках, которые делятся определенное число раз, прежде чем войдут в перманентный арест при терминальной дифференцировке.

У мышей, дефицитных по p27, общее число клеток увеличено

- Репликативное старение клеток, связанное с теломерами. У фибробластов через 25-50 делений с митогенами в среде наступает арест. Активация пути p53 в ответ на повреждения теломер.

- У грызунов теломераза активна. Контроль над делениями осуществляется механизмом p19ARF. Мутации в нем могут приводить к «бессмертию» культуры клеток

Факторы роста

У одноклеточных для роста необходимо только питание. У многоклеточных – ростовой фактор.

Увеличение скорости синтеза макромолекул и снижение скорости деградации

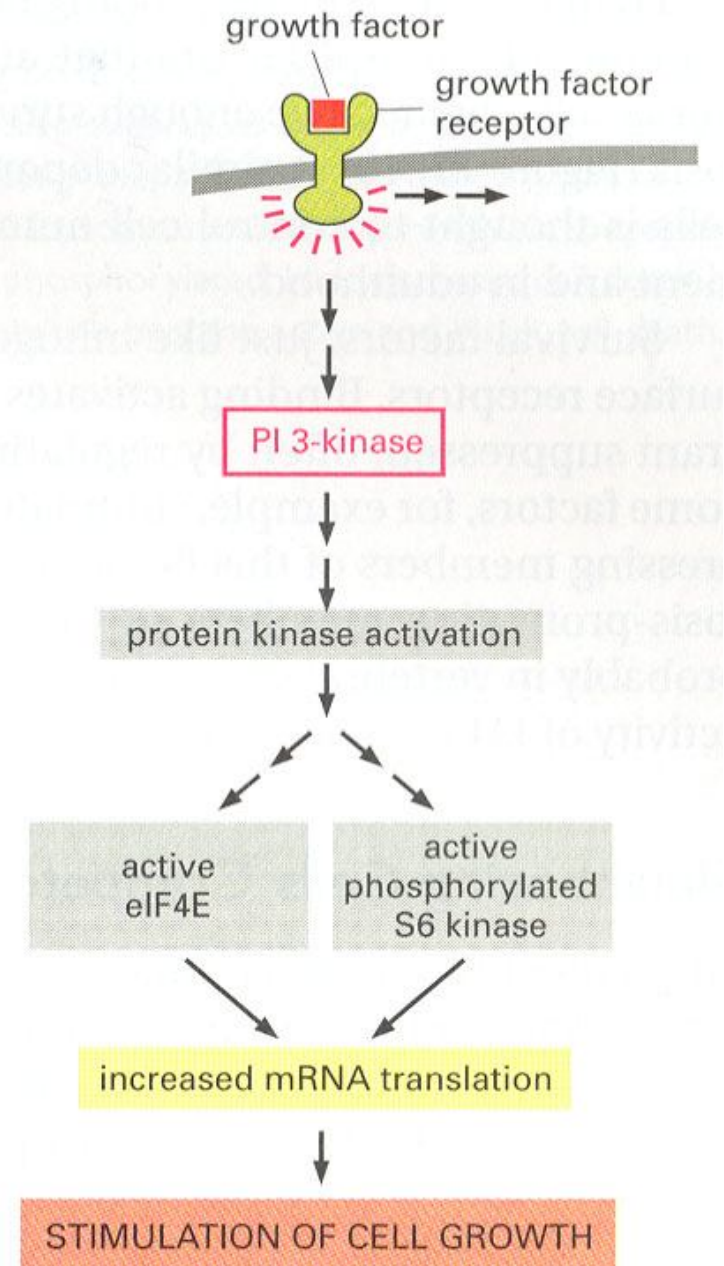
Путь PI 3- фосфатидинозитол-3-киназы

S6 киназа фосфорилирует белок S6 рибосом – трансляция набора мРНК, кодирующего рибосомные компоненты

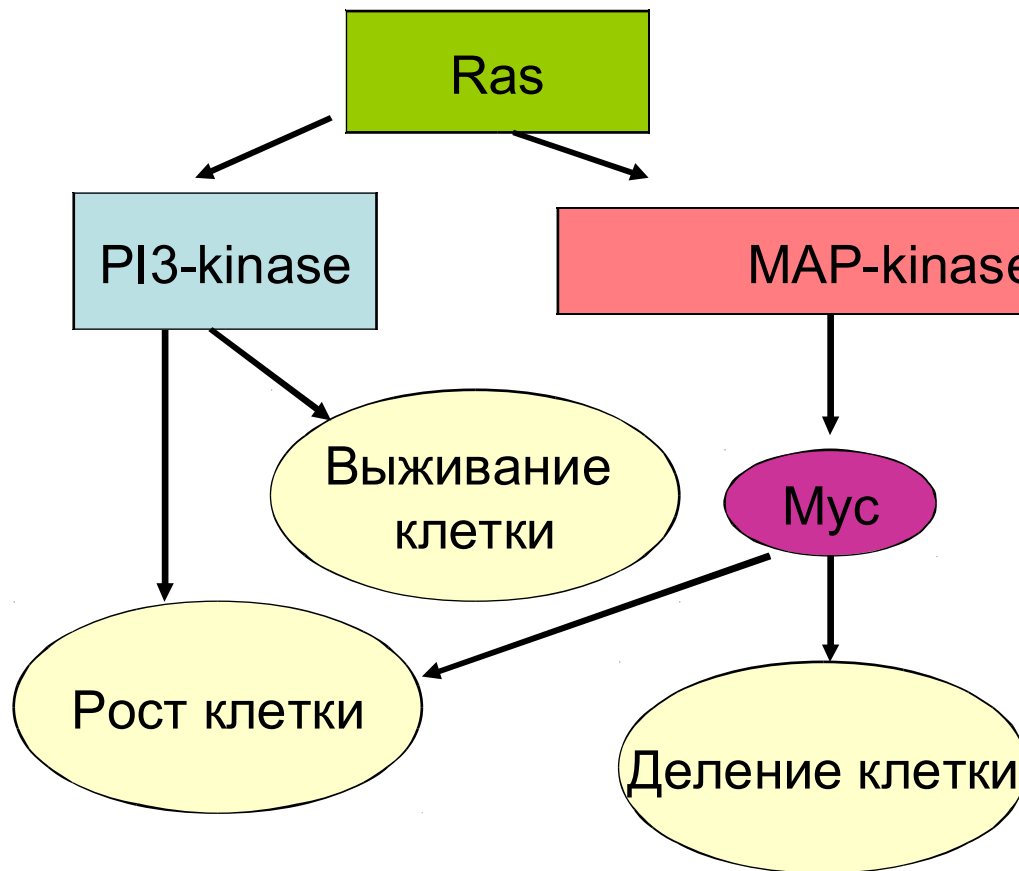
Мутация в гене S6 киназы у дрозофилы: мухи мелкие, клетки мелкие, число нормальное

Активация трансляции фактором инициации трансляции eIF4E

Увеличение продукции регуляторного белка Мус. Он увеличивает транскрипцию белков, вовлеченных в клеточный метаболизм и синтез макромолекул



Внеклеточные сигнальные белки могут действовать как ростовой фактор, фактор выживания и митоген одновременно: PDGF – фактор роста тромбоцитов



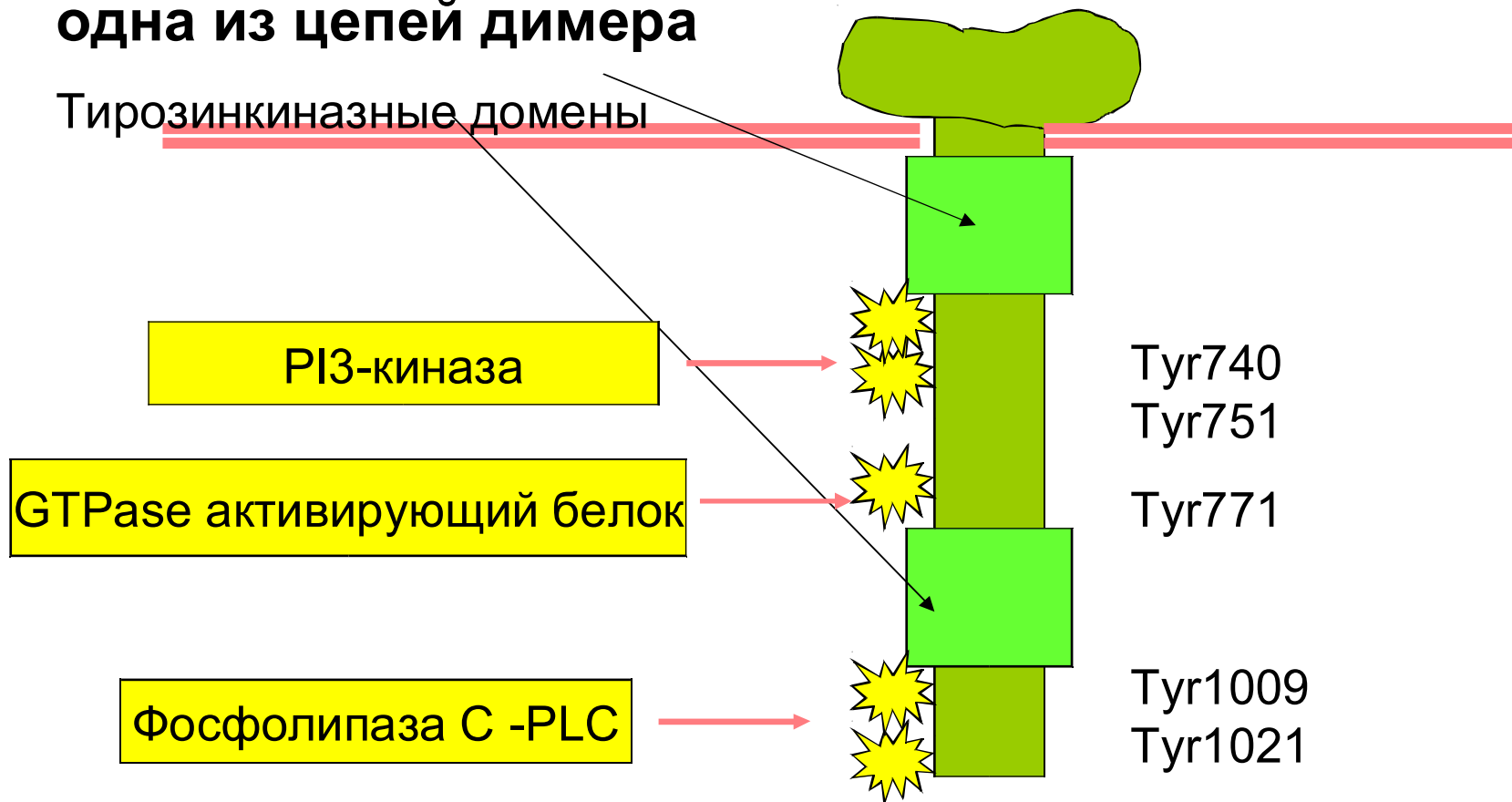
Связь роста и пролиферации гарантирована

В некоторых клетках рост и пролиферация контролируются независимо (эмбриогенез). Симпатический нейрон исключен из цикла, но растет пропорционально количеству NGF (nerve grows factor), который выделяет клетка-мишень

Культура нейральных предшественников:
EGF- подъем MAP-активности через 5 мин и быстрое снижение, деления
NGF- MAP-активность высока часами,
Остановка пролиферации, дифференцировка

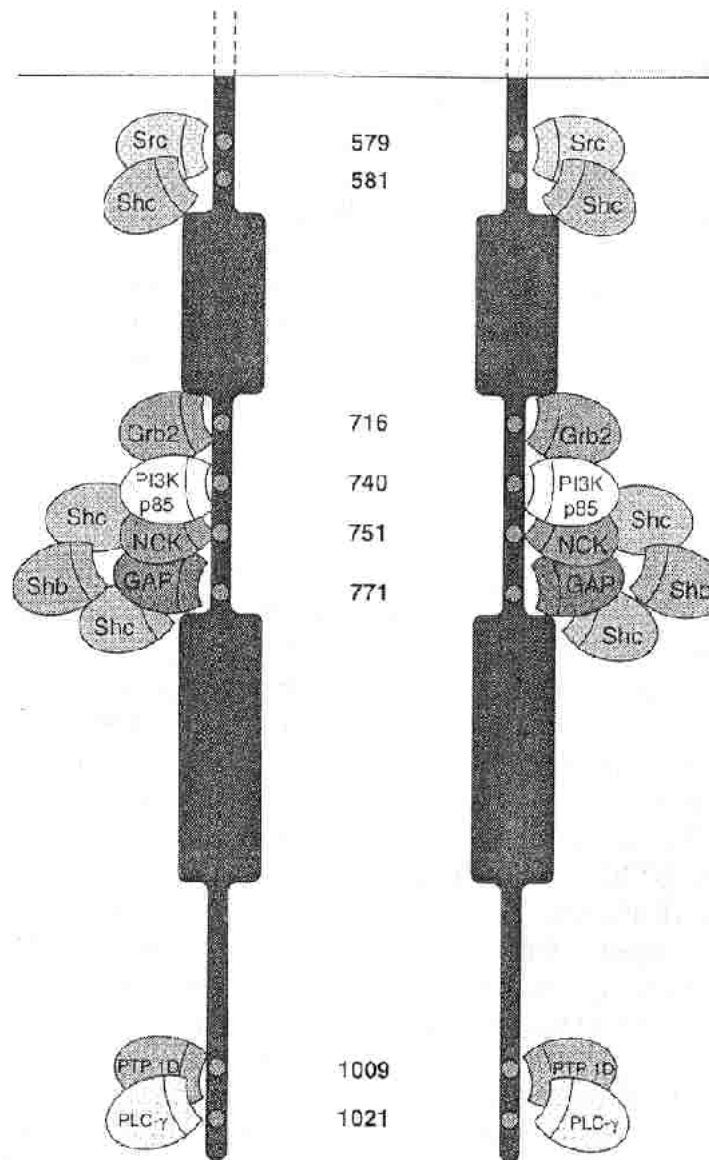
Рецептор PDGR – фактора роста тромбоцитов, одна из цепей димера

Тирозинкиназные домены



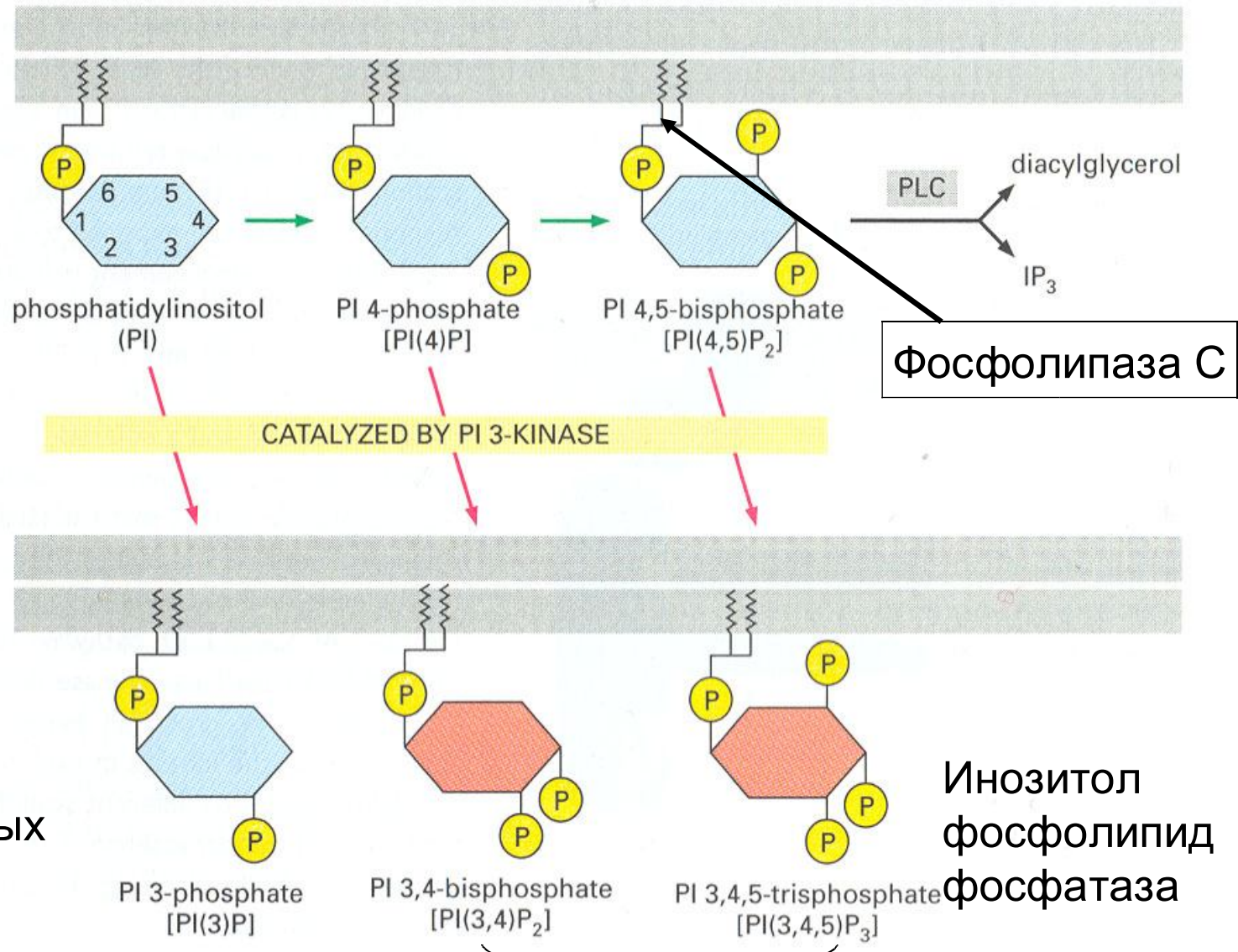
Фосфотирозины служат докинг-сайтом для различных белков, имеющих домены SH2 (src homology region), SH3

Многообразие
белков,
связывающихся с
фосфотирозинами.
Докинг-сайты для
белков, имеющих
домены SH2 (src
homology region), SH3



Возможные превращения PI 3 под действием PI 3-киназы

Alberts et al., 2002

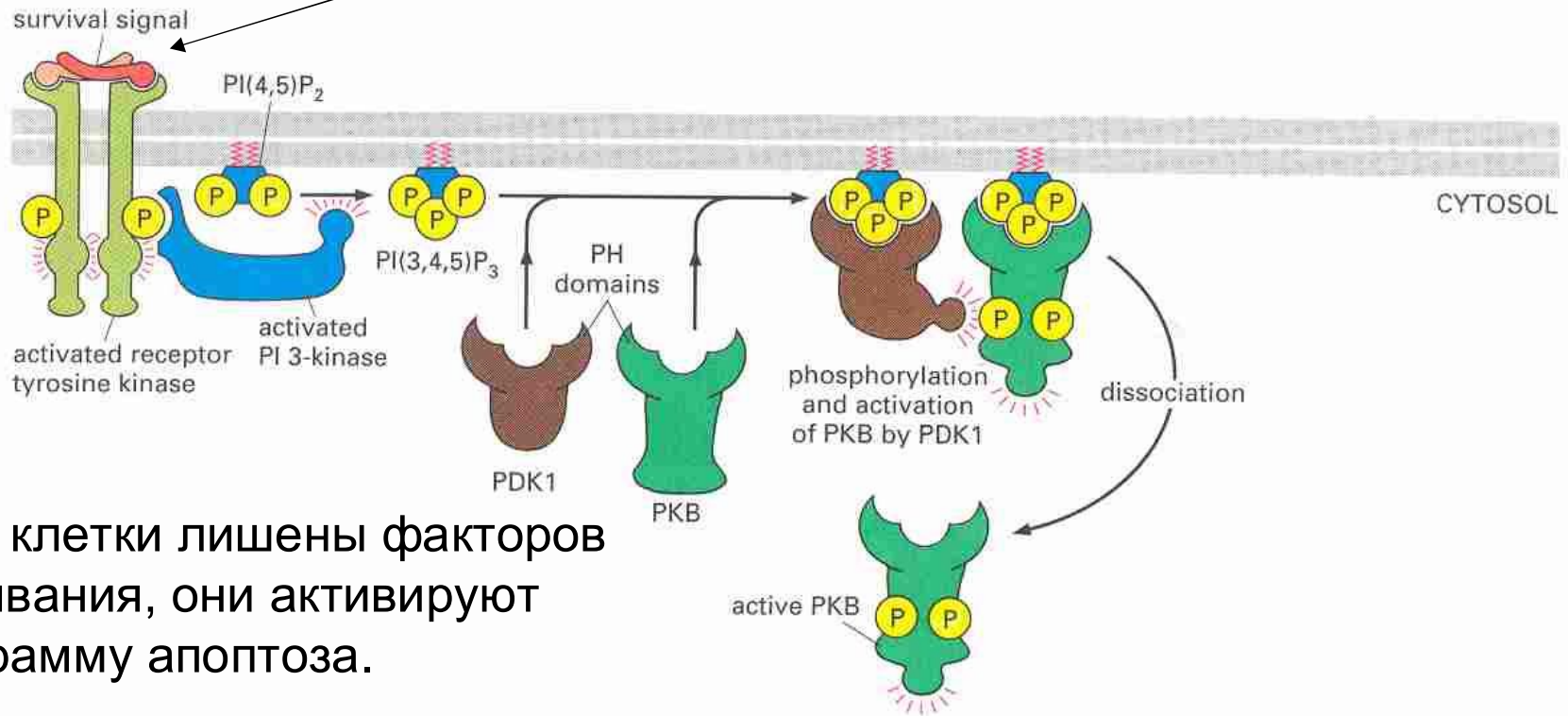


Создание докинг-сайтов для внутриклеточных сигнальных белков

Инозитол фосфолипид фосфатаза

Факторы выживания

Внеклеточные факторы, супрессирующие апоптоз



Если клетки лишены факторов выживания, они активируют программу апоптоза.

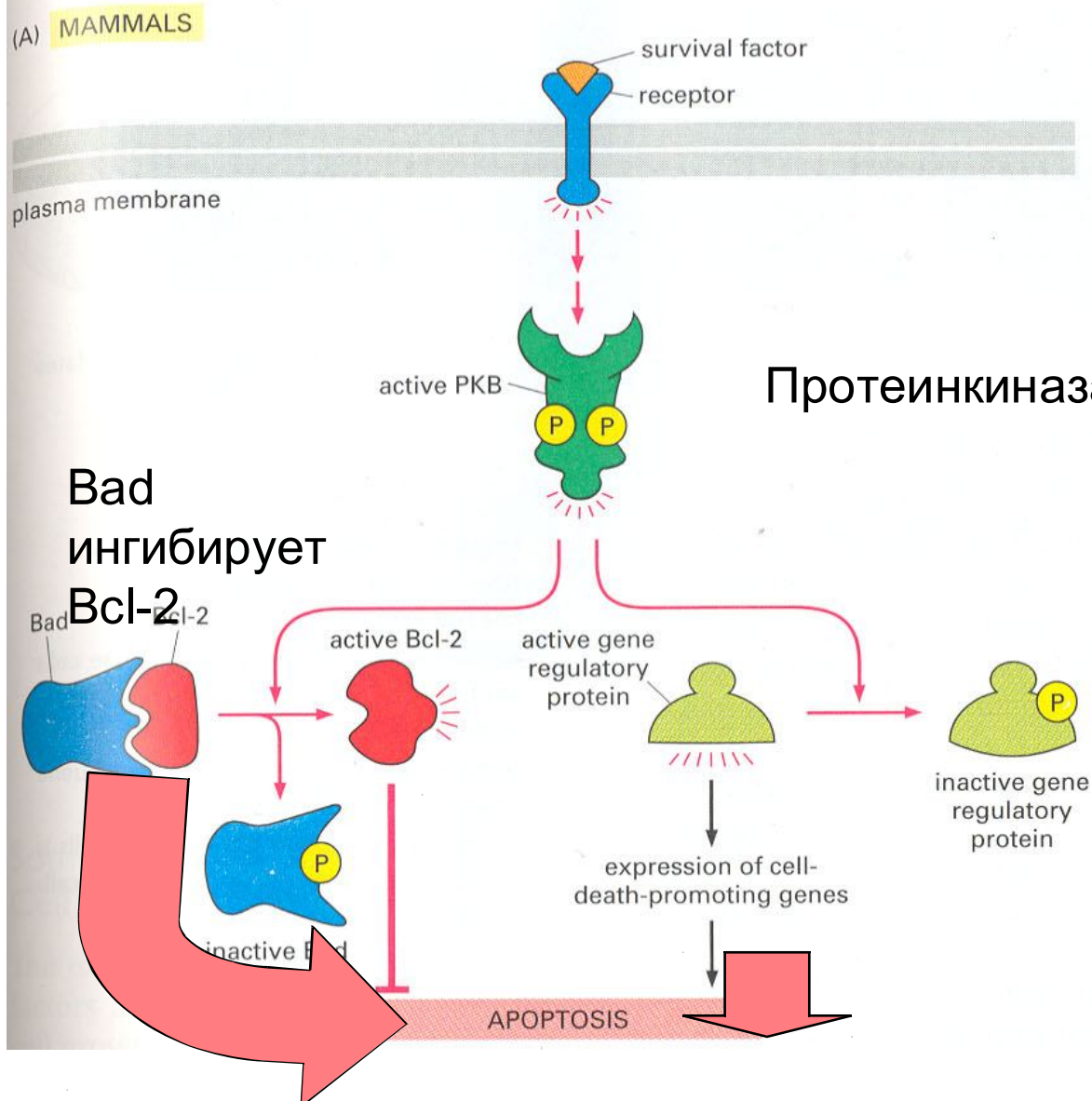
Нервные клетки образуются в избытке и конкурируют за фактор, выделяемый мишенями

PDK1 - PI-dependent kinase

PKB-протеинкиназа В уходит в цитоплазму, фосфорилирует многие белки

Alberts et al., 2002

Фактор выживания супрессирует апоптоз у млекопитающих



Bad
ингибирует
Bcl-2

Протеинкиназа В

(B)

Рецептор фактора выживания активирует протеинкиназы, в т.ч. PKB.

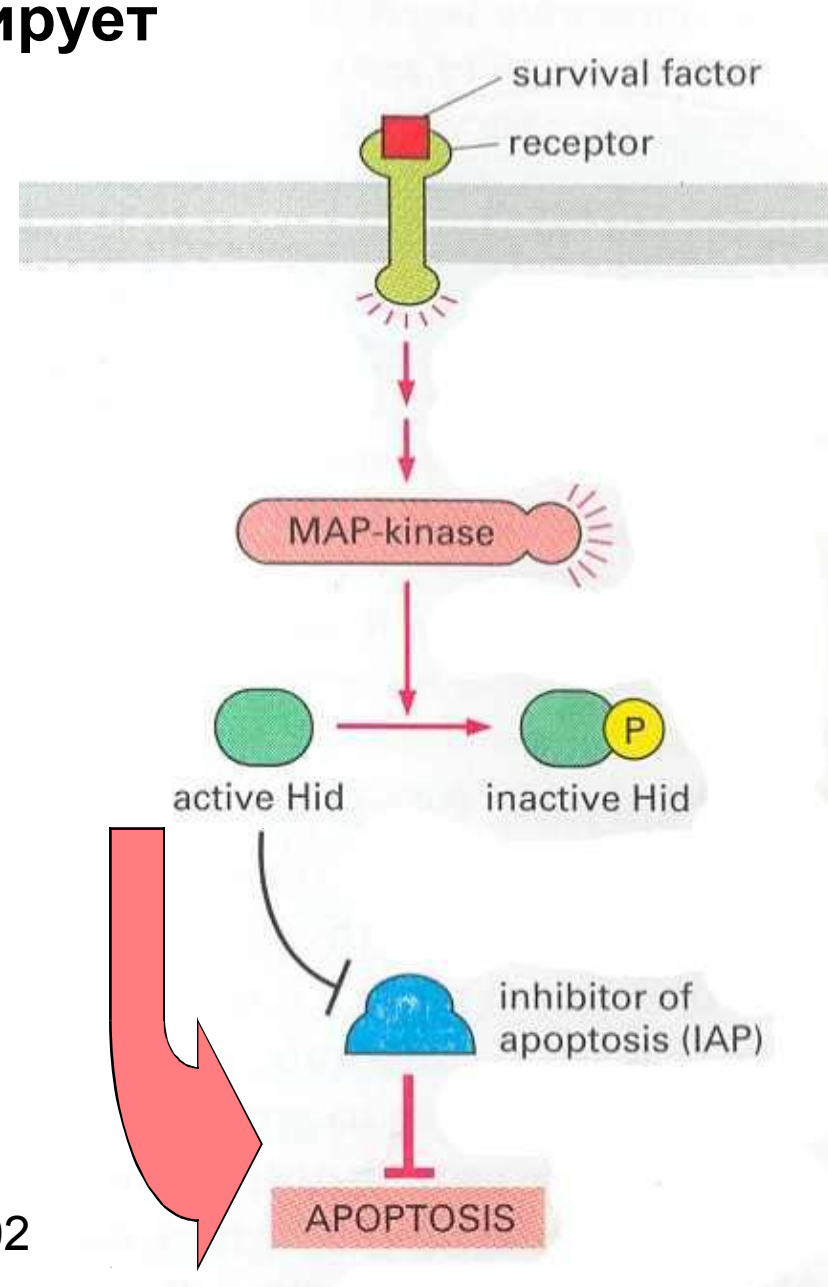
PKB:

1. Активирует ингибитор апоптоза Bcl-2.
2. Ингибирует гены, вызывающие апоптоз

Фактор выживания супрессирует апоптоз у дрозофилы

У дрозофилы

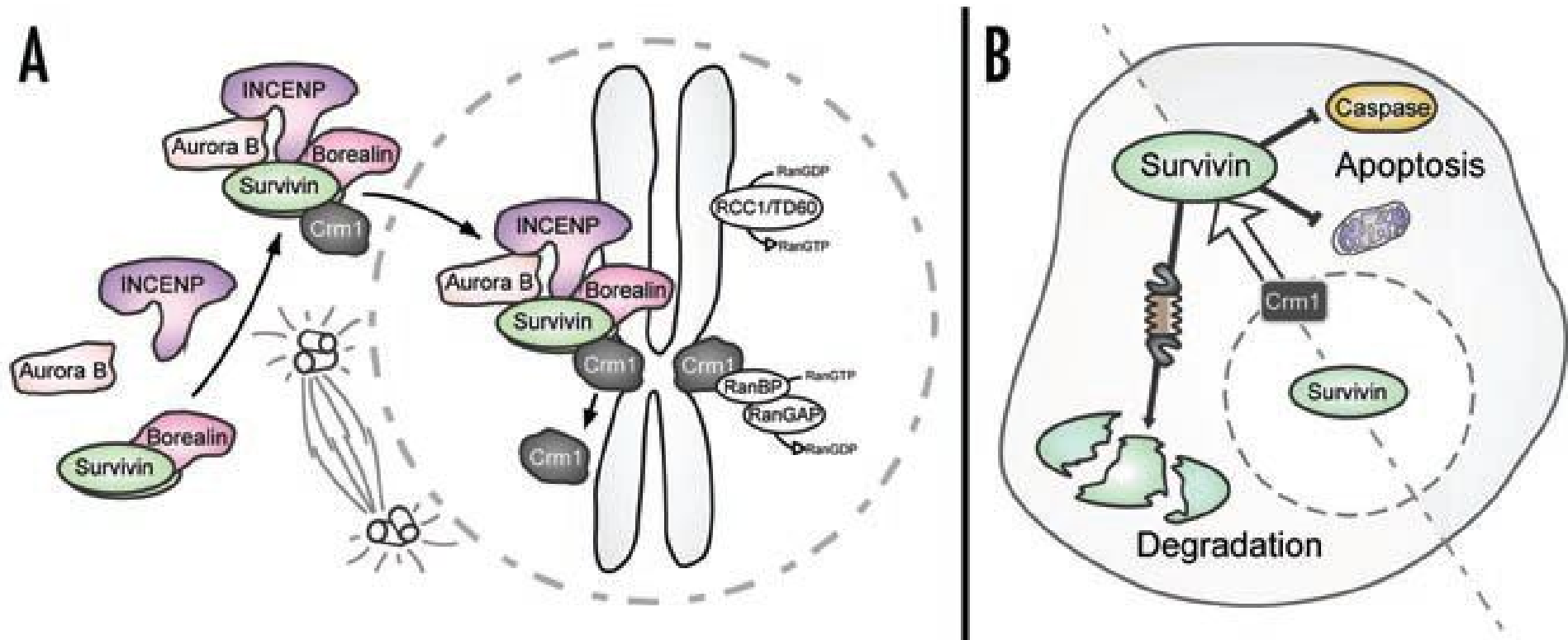
Стимуляция ингибитора апоптоза IAP:



Alberts et al., 2002

Survivin в апоптозе

S.K. Knauer, W. Mann, R.H. Stauber, 2007



A. Survivin в составе комплекса белков пассажиров необходим для правильного расхождения хромосом

B. Экспорт Survivin из ядра ингибирует апоптоз. При химиотерапии раковых опухолей концентрация Survivin в ядрах раковых клеток является благоприятным для пациента признаком

Некоторые сигнальные белки, действующие через тирозин-киназные рецепторы

Лиганд	Рецептор	Некоторые ответы
EGF- фактор роста эпидермиса	EGF-рецептор	стимулирует пролиферацию различных типов клеток
IGF-1, IGF-2 – инсулиноподобный фактор роста	IGF- рецептор-1	стимулирует рост и выживание клеток
NGF – фактор роста нервов	TrkA	стимулирует рост и выживание некоторых нейронов
PDGF – фактор роста тромбоцитов	PDGF-рецептор	стимулирует выживание, рост и пролиферацию различных типов клеток
M-CSF- фактор стимуляции колоний макрофагов	M-CSF -рецептор	стимулирует пролиферацию и дифференцировку моноцитов/ макрофагов
FGF-1... 24 – фактор роста фибробластов	FGF -рецепторы	стимулирует пролиферацию различных типов клеток, ингибирует дифференциацию некоторых клеток- предшественниц, индуцирует сигналы к развитию
VEGF- фактор роста эндотелия	VEGF- рецептор	стимулирует ангиогенез

Инсулиноподобный фактор роста IGF-1

Собаки крупных пород имели аллель гена IGF-1, ассоциированный с большей экспрессией, собаки мелких пород – слабоэкспрессирующийся аллель.

У человека в промоторе гена обнаружен вариабельный участок, состоящий из CA-повторов, число которых может варьировать от 10 до 24 (в среднем их 19). Данные говорят о корреляции числа CA-повторов с уровнем экспрессии гена. В одинаковой степени как малое, так и большое число этих повторов ассоциируется со снижением циркуляции IGF-1. Носители 19 CA-повторов (их также называют носителями аллеля 192) в процессе тренировок развивают силу в большей степени, чем носители других аллелей.

Рецептор инсулиноподобного фактора роста IGFR-1

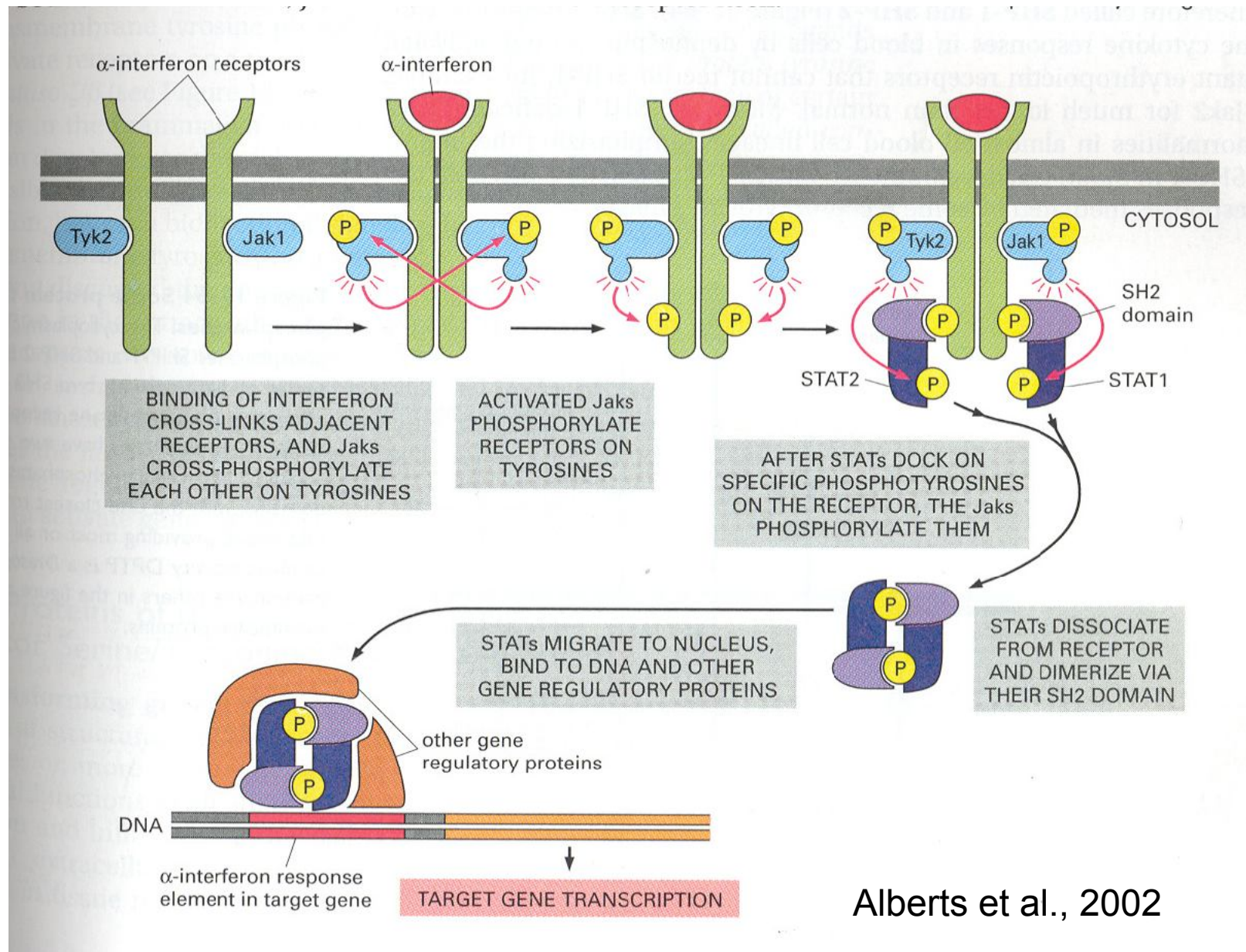
У долгожителей (старше 100 лет) и их детей чаще встречались мутации рецептора к инсулиноподобному фактору роста-1. У носителей мутаций был нарушен процесс связывания клеток с ИФР-1, повышение уровня ИФР-1 в крови на 37%

- **Цитокиновые рецепторы**

Jak-STAT – сигнальный путь:

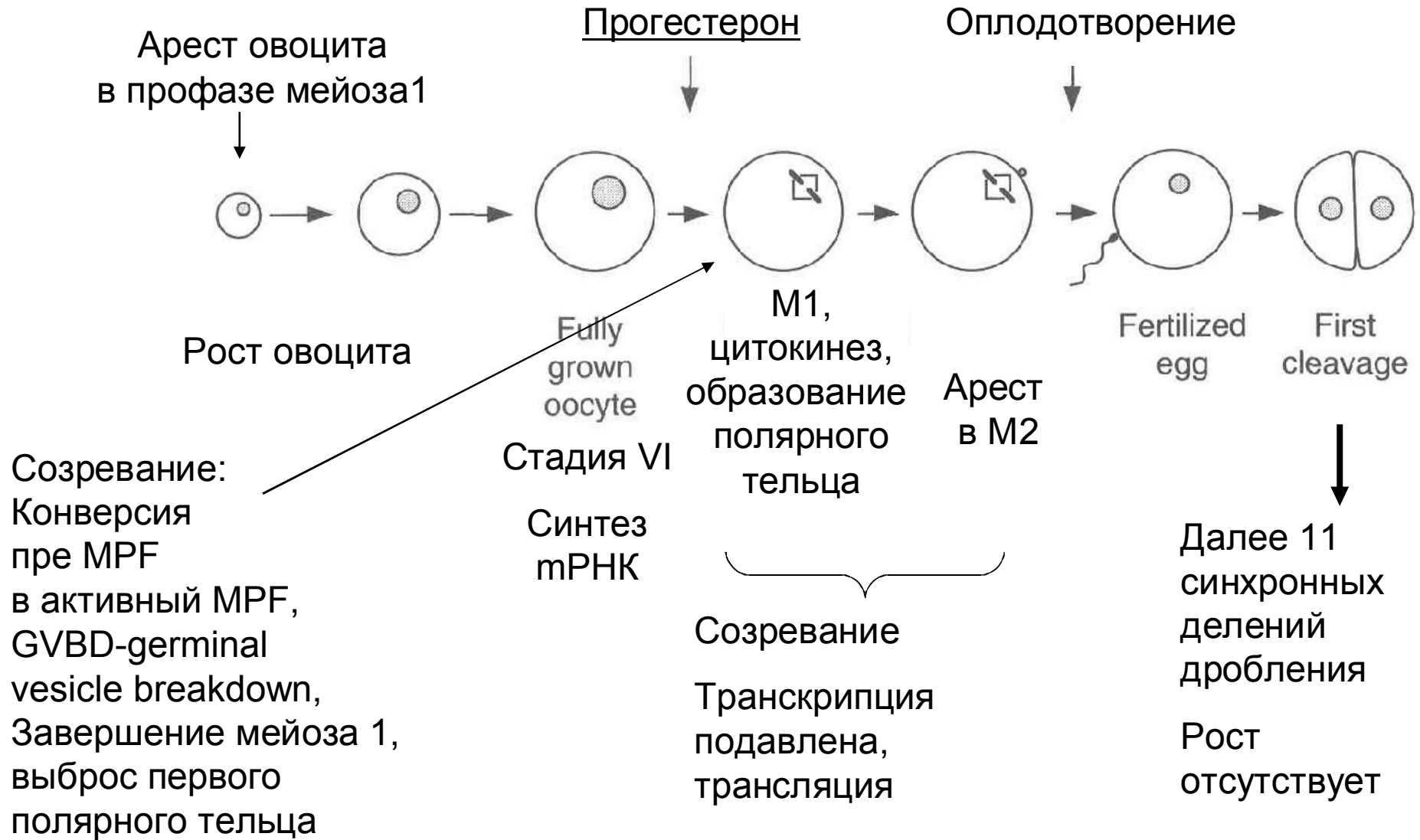
- Интерфероновый рецептор
- Janus-киназы – цитоплазматические тирозин-киназы
- STAT – signal transducers and activators of transcription
- Лиганды:
 - интерфероны α и γ : активация макрофагов, увеличение устойчивости к вирусной инфекции,
 - Эритропоэтин : выживание, пролиферация и дифференцировка эритроидного ряда,

Цитокиновые рецепторы: Jak-STAT – сигнальный путь



Alberts et al., 2002

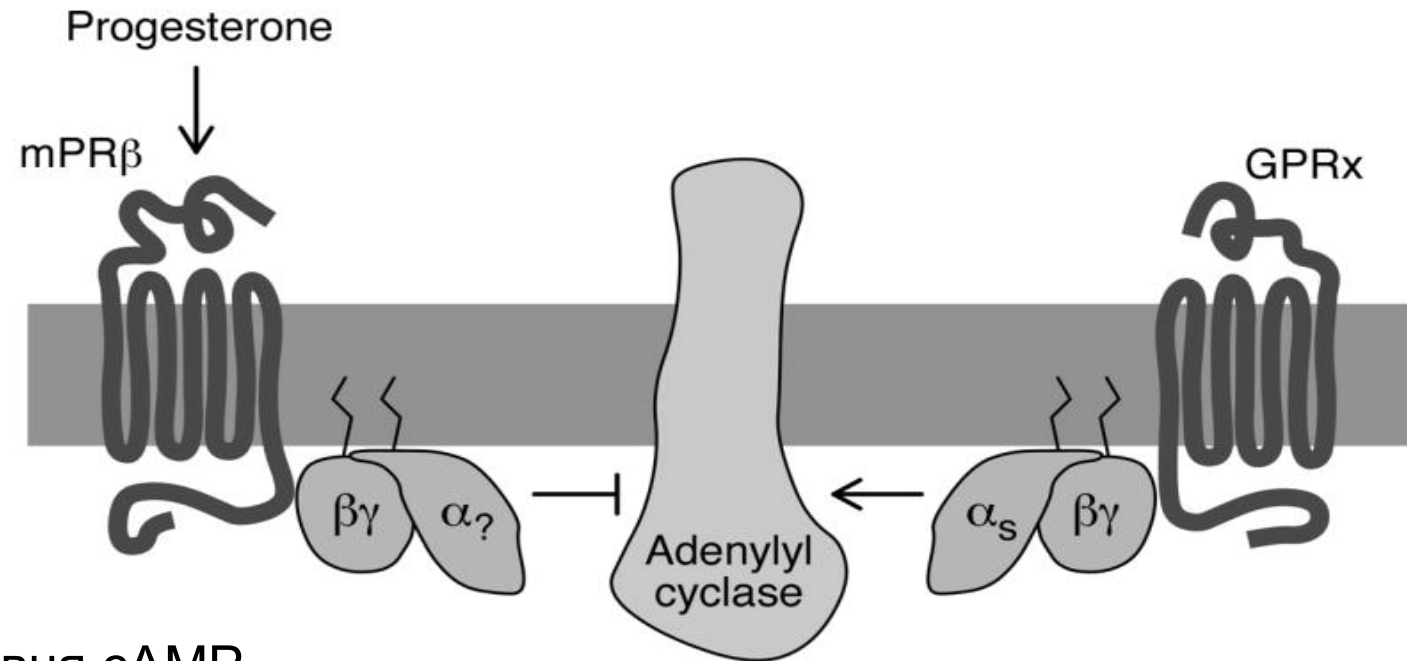
Овогенез, мейоз и оплодотворение у лягушки



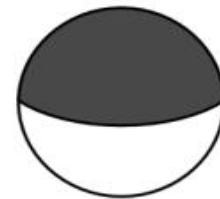
Созревание ооцита

- Созревание ооцита запускается прогестероном. Он действует через неклассический рецептор на плазматической мембране и вызывает уменьшение уровня cAMP.
- Неклассический прогестероновый рецептор имеет негеномный эффект на созревание ооцита.
- В процессе участвуют G-protein coupled receptors (7 раз пронзают мембрану) и вызывает уменьшение уровня cAMP.

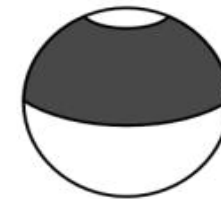
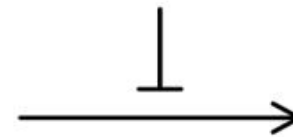
- Роль GPRx (G-protein coupled receptors) в поддержании мейотического ареста



Уменьшение уровня cAMP
запускает созревание ооцита.
Проходит первое деление, арест в M II.



G2 arrest



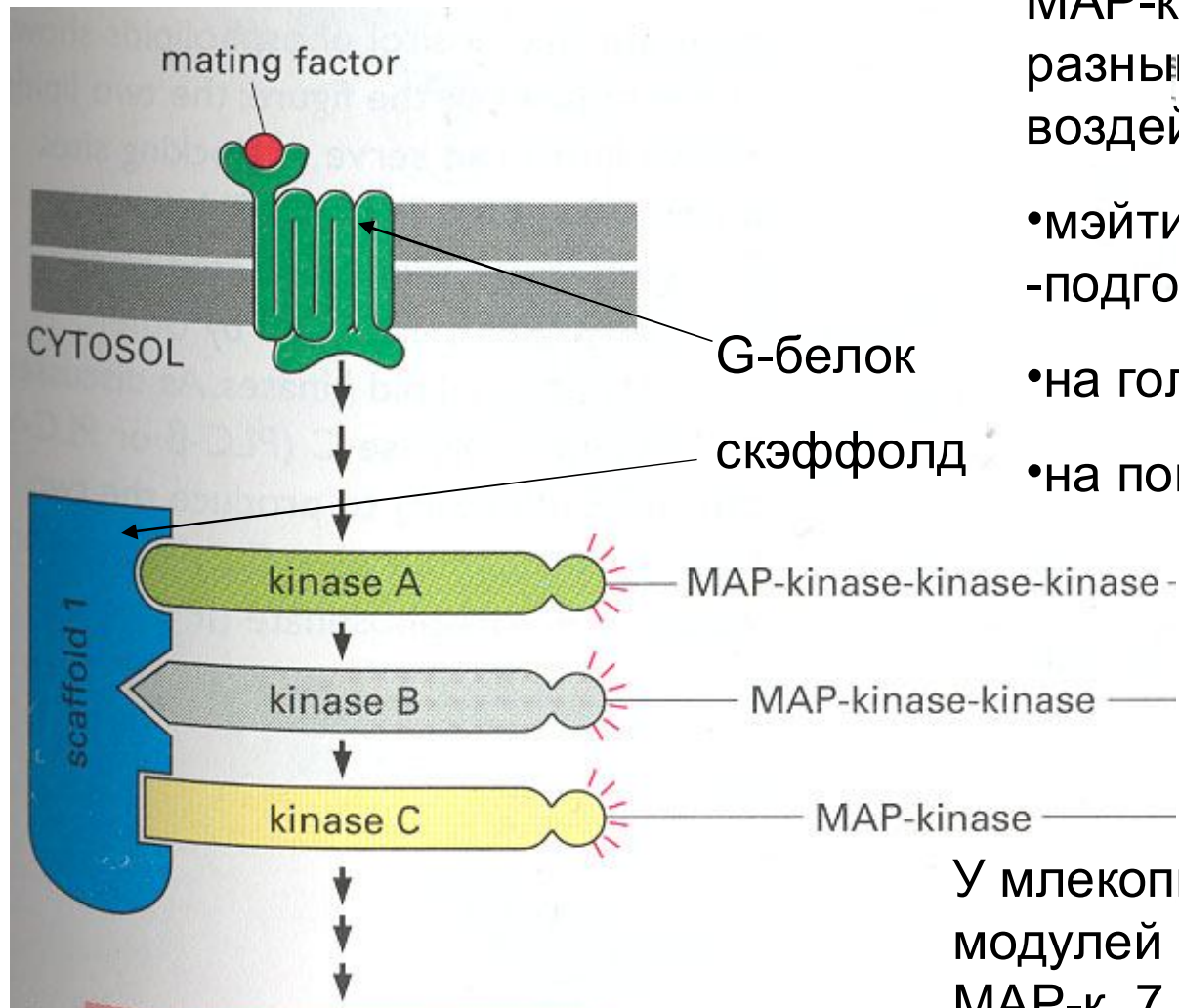
M_{II} arrest

Ríos-Cardona D et al., 2008

Созревание ооцита

- Прогестероновая стимуляция трансляции:
 - прогестерон-индуцируемый путь передачи сигнала;
 - амплификацию сигнала;
 - полиаденилирование цитоплазматических мРНК и трансляция (~100 А).
- Трансляция мРНК серин-треонин киназы Mos (уровень регулируется добавлением poly-A хвоста во время созревания) - MAPKKK
- MAPK- киназа
- MAPK
- Превращение запасов пре-MPF в MPF

MAP –киназный путь у дрожжей



MAP-киназы активируют разный ответ на разные воздействия:

- мэйтинг-фактором - подготовка к конъюгации,
- на голодание,
- на повышение осмолярности

У млекопитающих 5 параллельных модулей MAP-киназ. 1 модуль: 12 MAP-к, 7 MAPкк, 7 MAPккк

Обеспечение точности и локальности сигнала

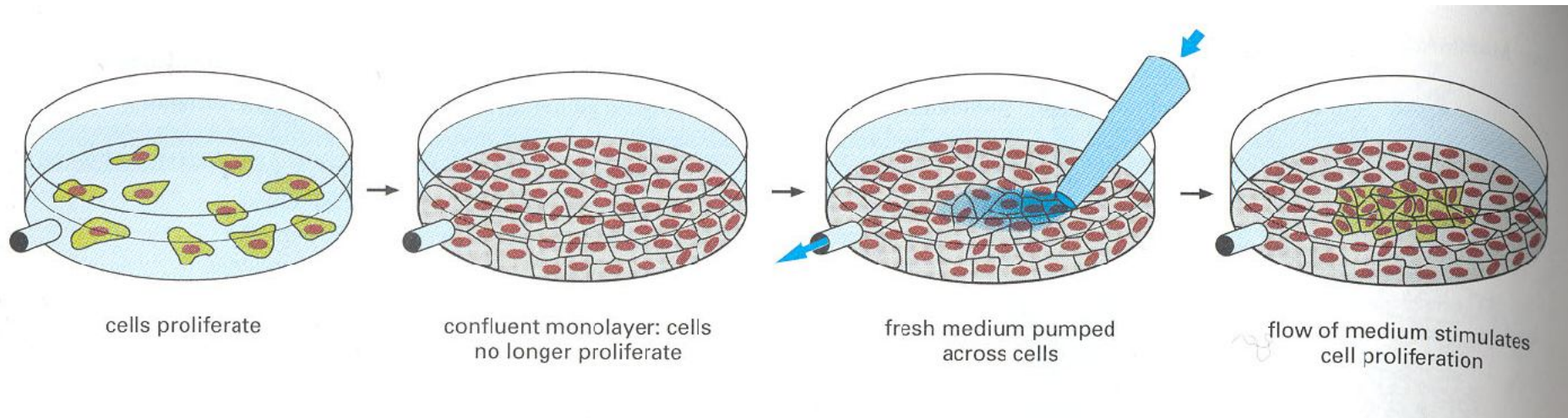
(A) MATING RESPONSE

Alberts et al., 2002

Конкуренция клеток за сигнальные белки

Клетки в культуре. Явление контактного ингибирования

Контактное ингибирование клеточных делений = зависимое от плотности



Пролиферация

Монослой, нет пролиферации

Постоянно добавляется свежая среда

Пролиферация в потоке возобновляется

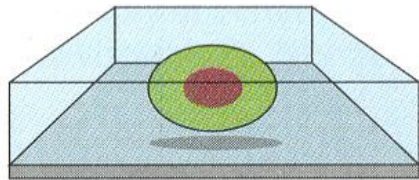
Плотность определяется доступностью экстраклеточных факторов

Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

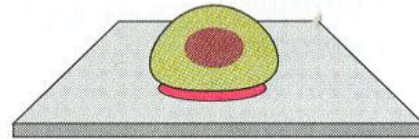
Суспензия

Слабая адгезия

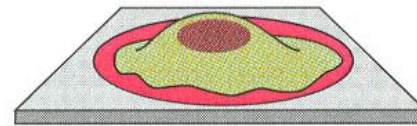
Хорошая адгезия



8%



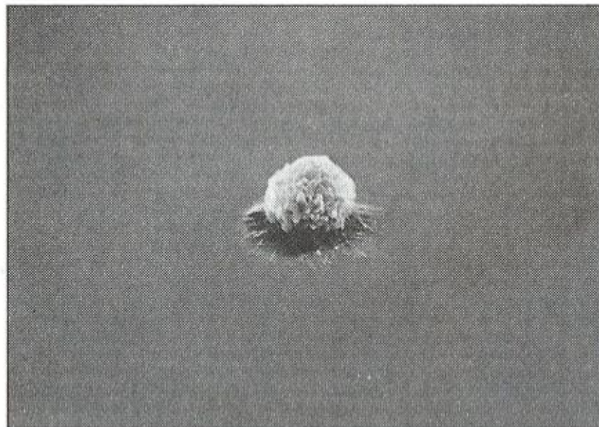
30%



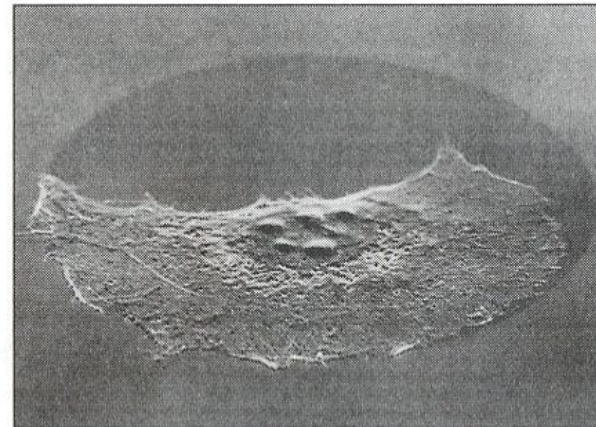
90%

(A)

Возможность вступления в S фазу



(B)



(C)

50 μ m

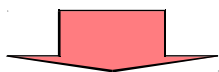
В среду добавили
НЗ-тимидин, через
1-2 дня
зафиксировали и
авторадиографи-
ровали

Alberts et al., 2002

Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

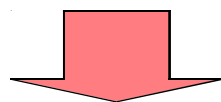
Фибробласты растут на субстрате, покрытом фибронектином (внеклеточный матрикс).

Фокальная адгезия – места контактов: актин – интегрин - фибронектин. В местах кластеризации интегринов - фокальный контакт - активация тирозин киназы FAK (фокальной адгезии), прикрепление к цитоплазматическим хвостам интегринов, кроссфосфорилирование друг друга.



Сайты SH, присоединение киназы Src.

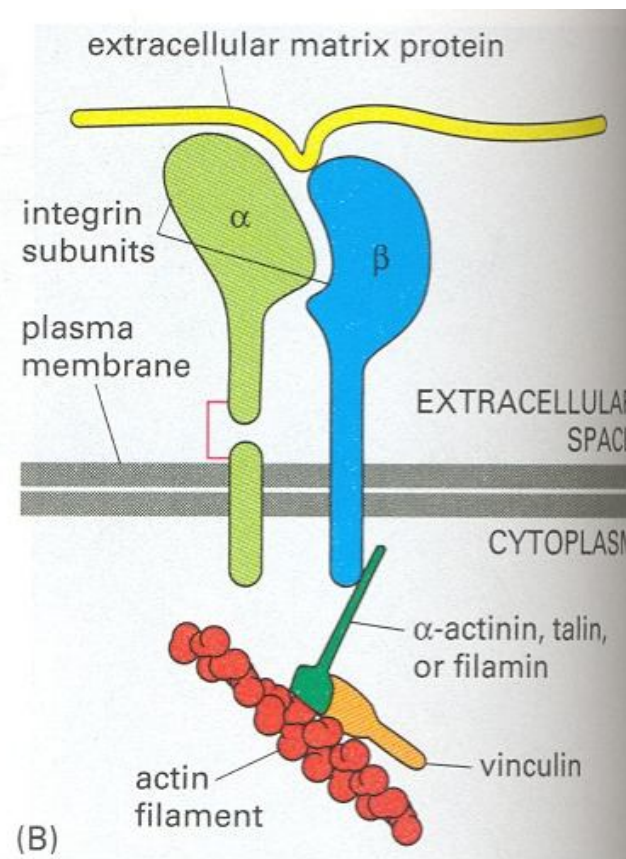
Две киназы продуцируют сигналы о прикрепленн



Выживание, рост, деление и перемещение.

FAK-focal adhesion kinase – активирует внутриклеточный сигнал, разрешающий выживание, рост и деление клетки.

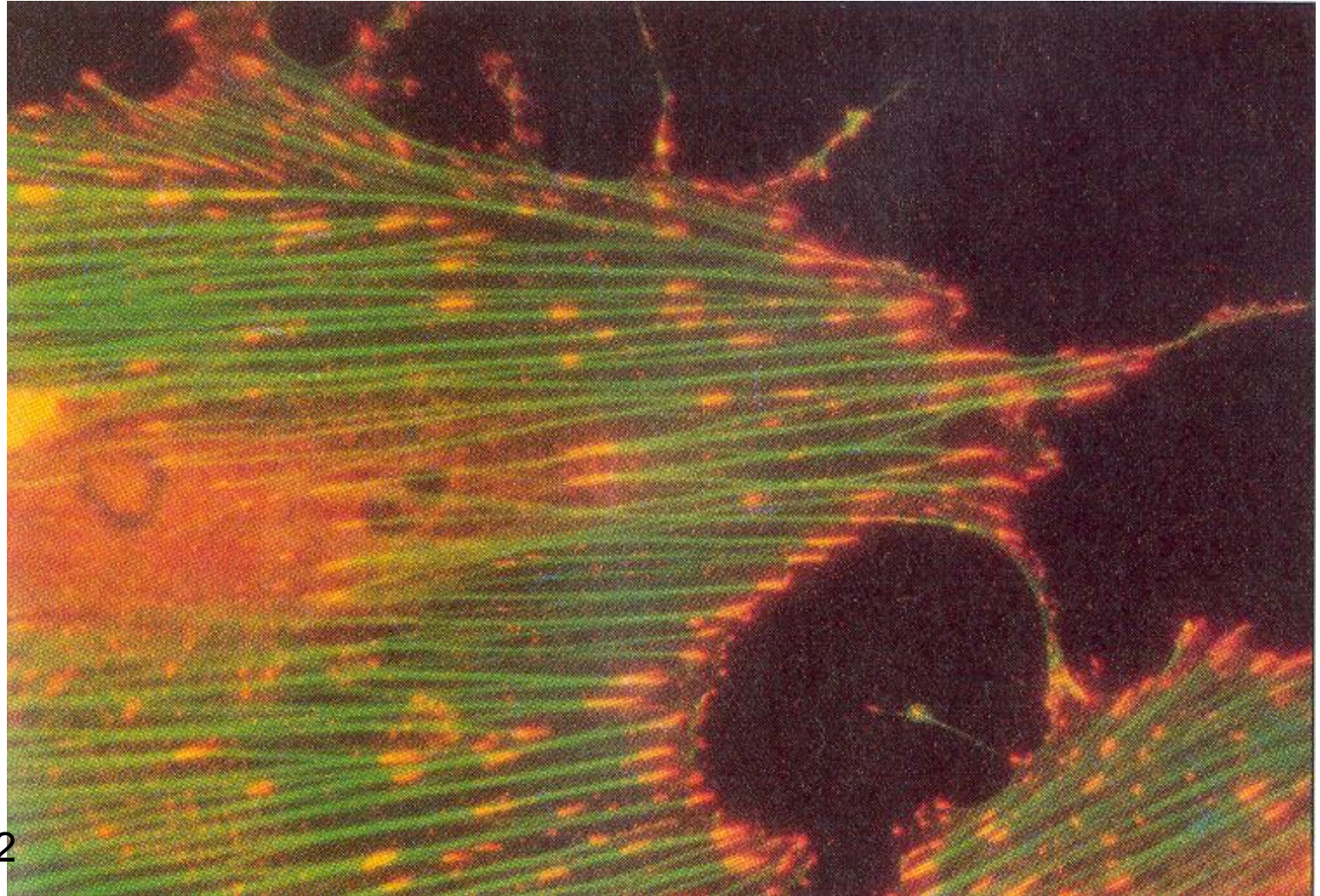
Мыши, дефицитные по FAK, погибают в раннем развитии



Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

Флуоресцентная окраска: Зеленый- актин, красный- белки, содержащие фосфотирозин, оранжевый – точки перекрывания двух компонентов

Метод FRET



Alberts et al., 2002

Внеклеточные сигналы, ингибирующие рост

TGF- β – большое семейство родственных белков. Растворимые димеры, действуют как гормоны или локальные медиаторы.

Суперсемейство: TGF- β , активины и BMP

TGF- β ингибирует пролиферацию нескольких типов клеток, блокируя клеточный цикл в G1 или стимулируя апоптоз.

Градуирующие морфогены в эмбриогенезе

Рецепторы TGF- β - серин-треонин киназы.

Активируется путь Smads. Изменения в транскрипции генов, регулирующих клеточные деления, дифференцировку, образование внеклеточного матрикса и смерть.

BMP- bone morphogenetic protein из семейства TGF- β . Помогает включить апоптоз в тканях между развивающимися пальцами, в молочной железе

Myostatin (то же семейство) – ингибирует пролиферацию миобластов.

Внеклеточные сигналы, ингибирующие рост

Белки семейства TGF β (Трансформирующий фактор роста β)

Действуют как гормоны или локальные медиаторы

Представитель суперсемейства родственных полипептидов, участвующих в клеточной дифференцировке и эмбриогенезе (Dpp(dros)=BMP4(mam)). Формирование костей, хрящей, развитие половых органов.

Выполняют функции факторов роста и подавляют рост.

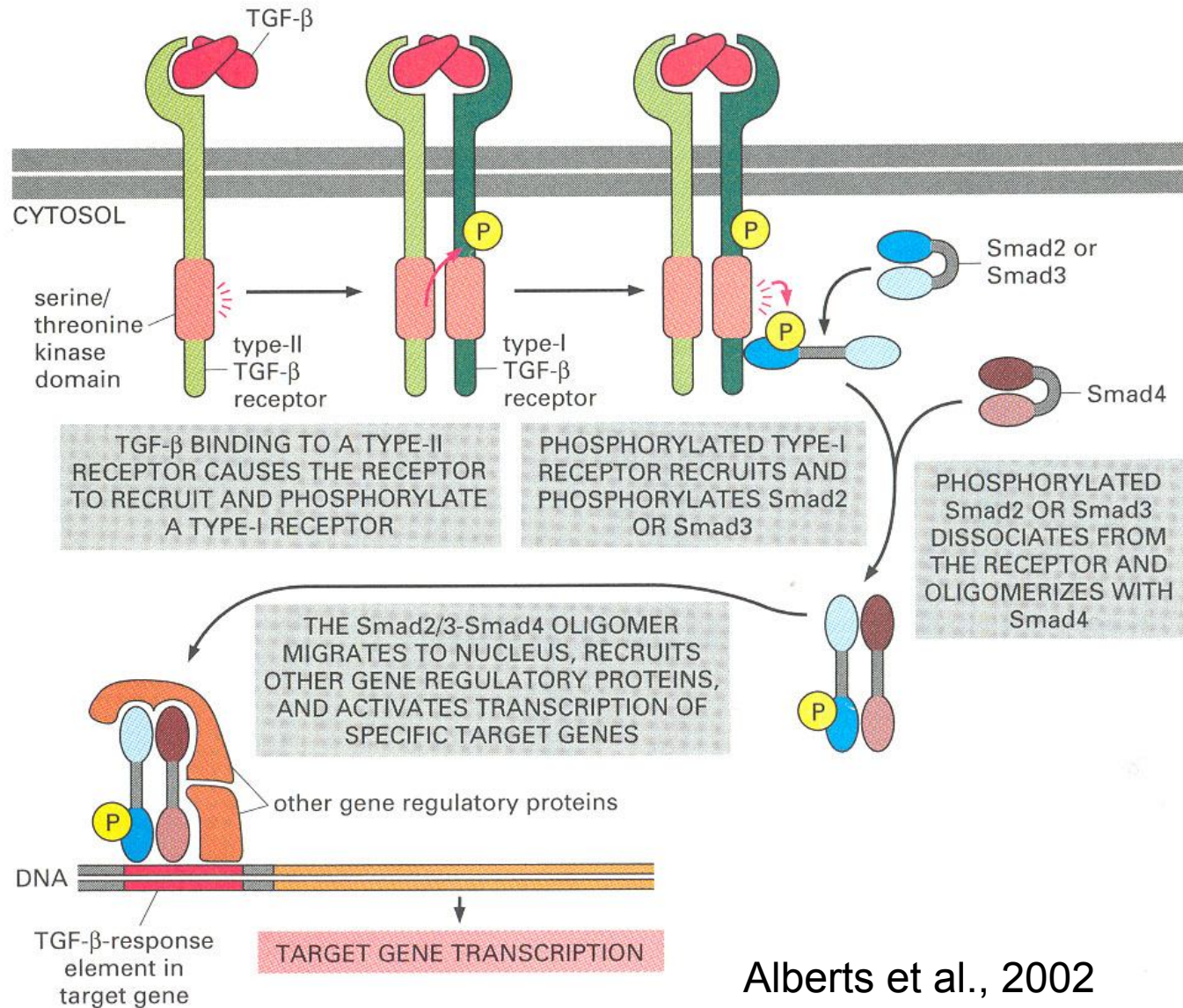
Чаще противодействуют митогенам, вызывая задержку клеточного цикла и развитие морфологических структур эмбриона. Стимулирует:

- синтез белков внеклеточного матрикса (коллагены 1, 4, фибронектин)
 - остеогенную активность
 - рост симпатических нейронов
 - дифференцировку клеток гладкой мускулатуры
 - Хемотаксический фактор для моноцитов, фибробластов, астроцитов.
 - Подавляет пролиферацию и функцию Т и В-лимфоцитов, эндотелиальных и эпителиальных клеток.
 - Вызывает апоптоз (перепонка между пальцами, молочная железа)
 - Секретируется определенными бластомерами, вызывая гаструляцию
- Гомодимеры, масса 25 кДа. Секретируются в виде предшественника и активируются протеолизом

Путь TGF-β - Smad

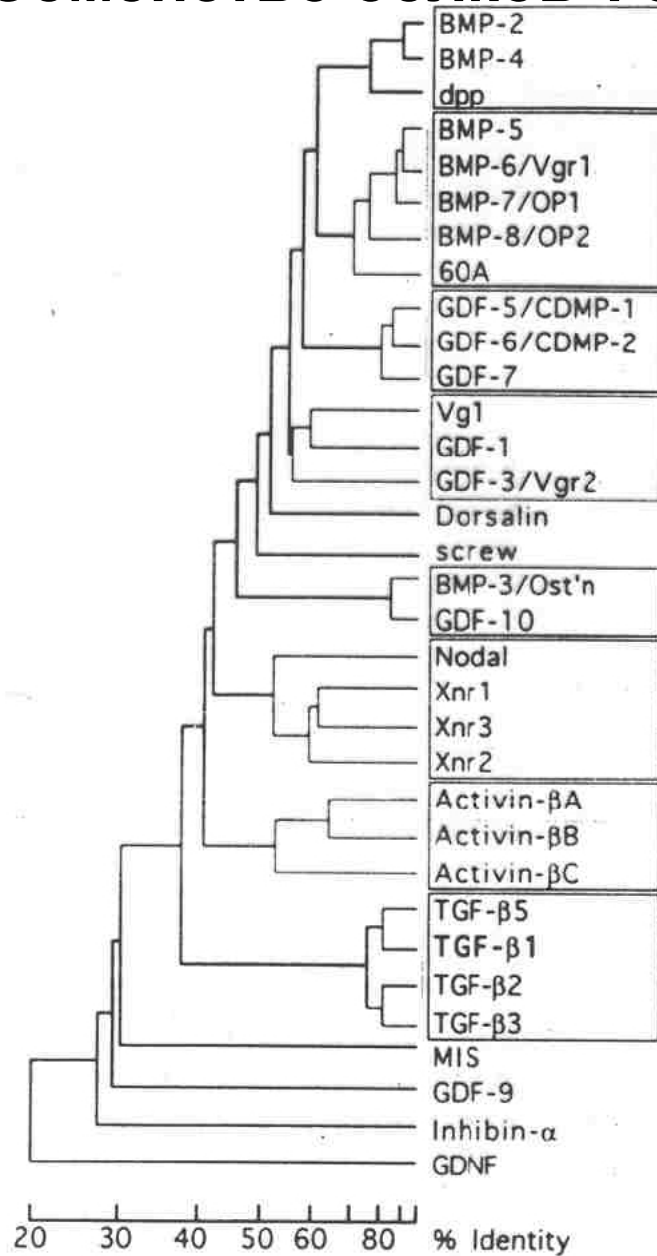
Рецепторы TGF-β - серин-треонин киназы.

Стратегия наиболее быстрой передачи сигнала в ядро



Alberts et al., 2002

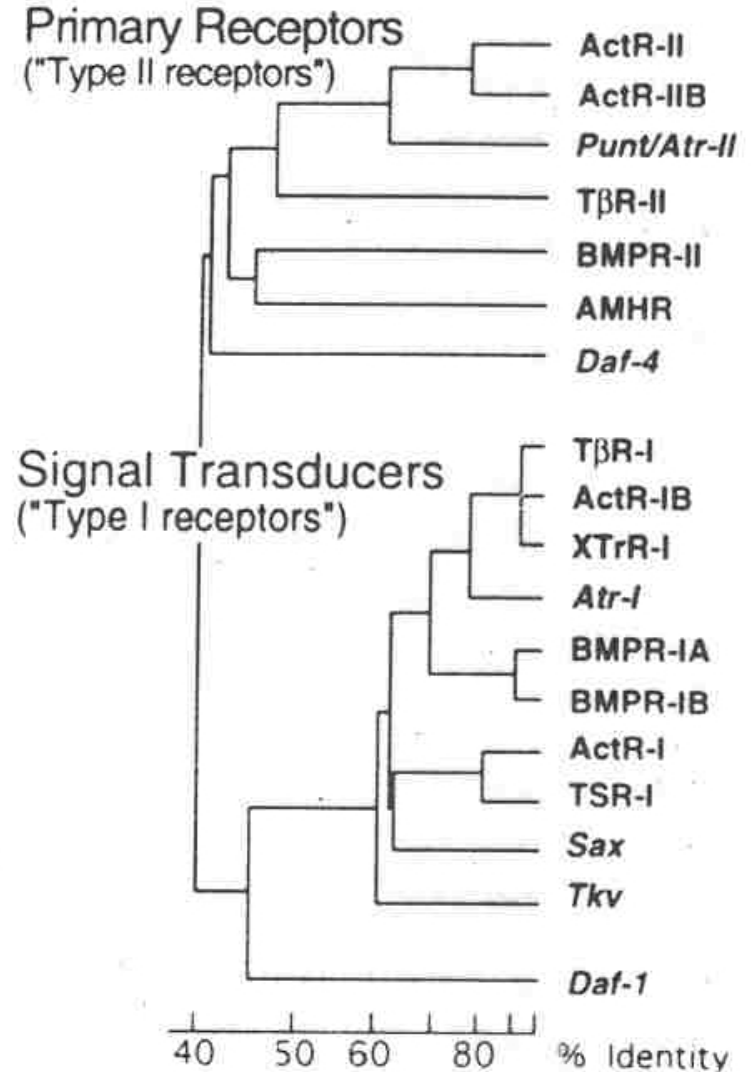
Семейство белков TGF- β :



Рецепторы:

Тип I

Тип II



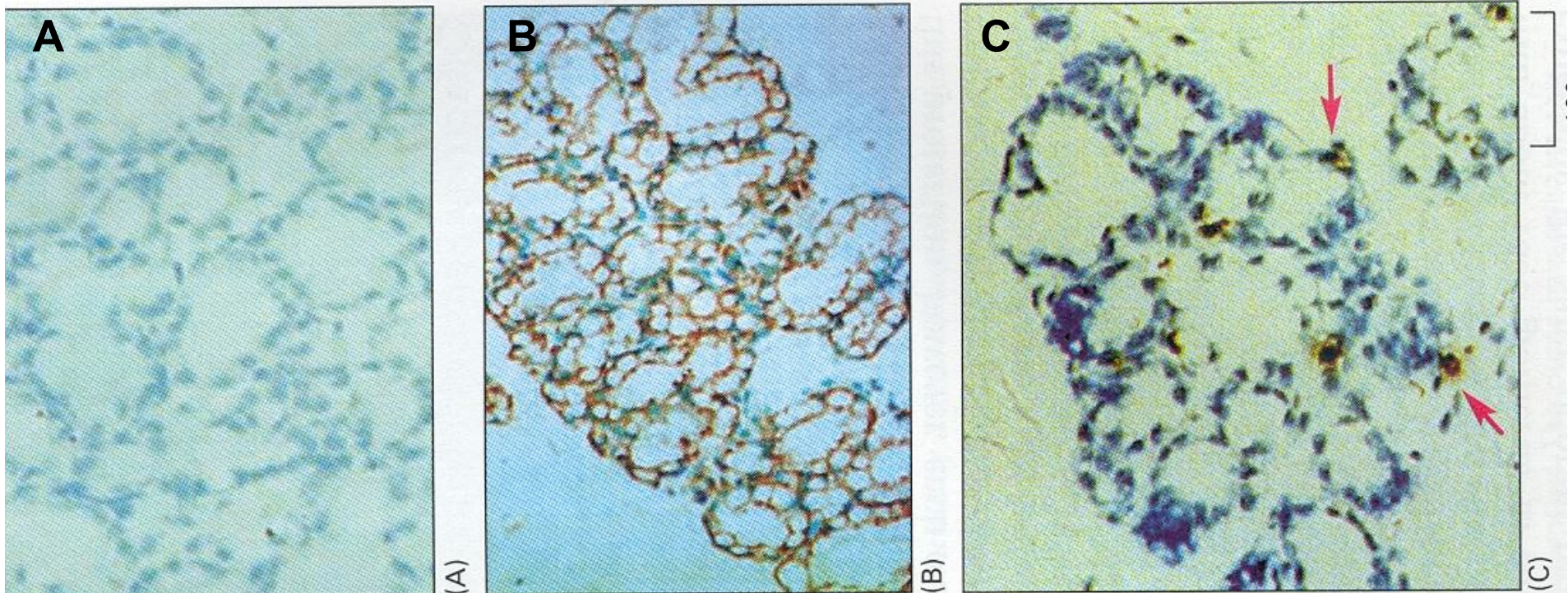
Семейство $TGF\beta$: BMP- bone morphogenetic protein

Молочная железа мыши:

А- железа в при нормальном высасывании;

В – Через 9 часов после прекращения высасывания, экспрессия $TGF\beta 3$;

С – Через 3 суток после прекращения высасывания, начало апоптоза



Alberts et al., 2002

Семейство белков TGF- β

Myostatin– ингибирует пролиферацию миобластов.

wild-type
mouse

myostatin
mutant



(A)



(B)

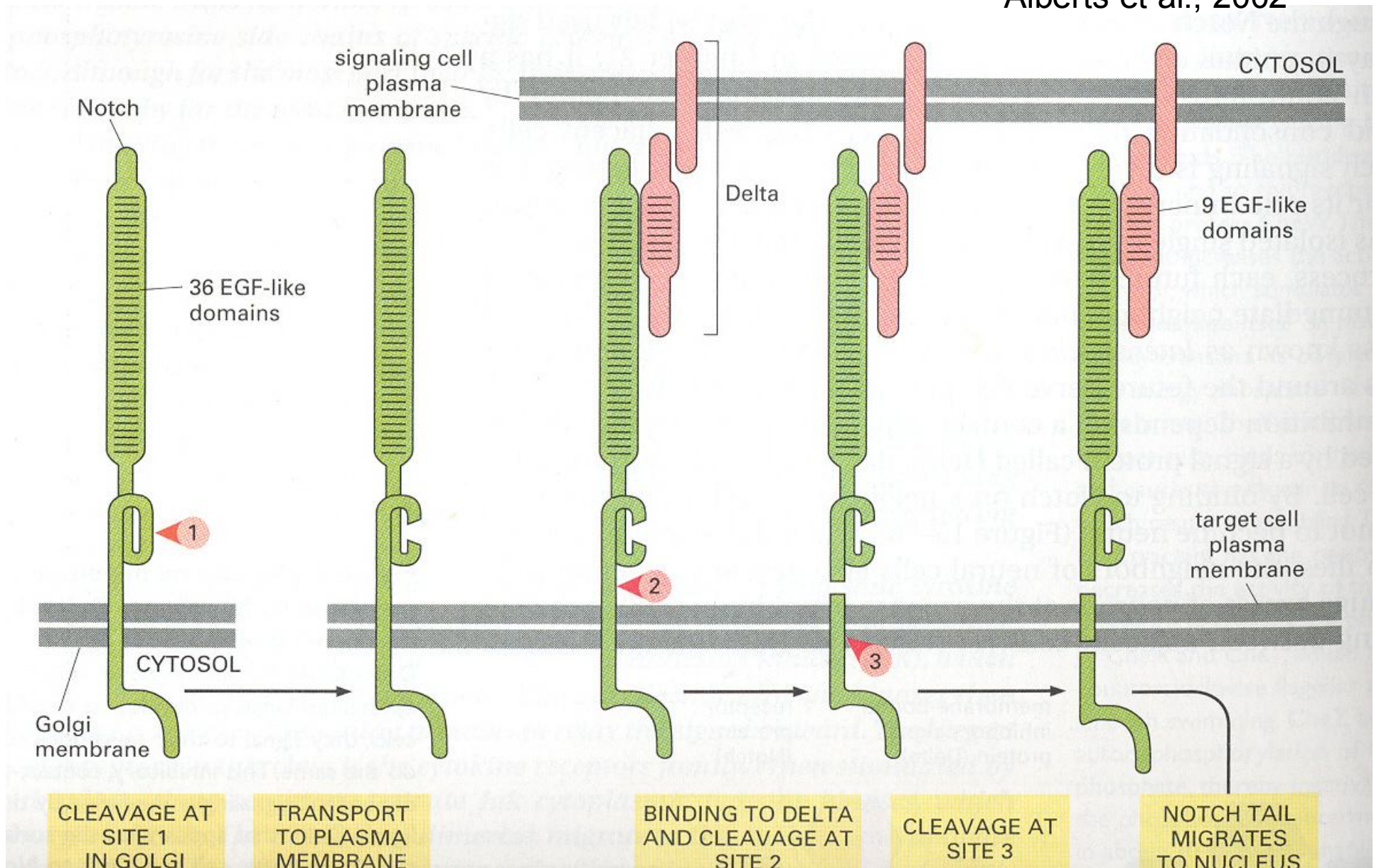
(C)

Alberts et al., 2002

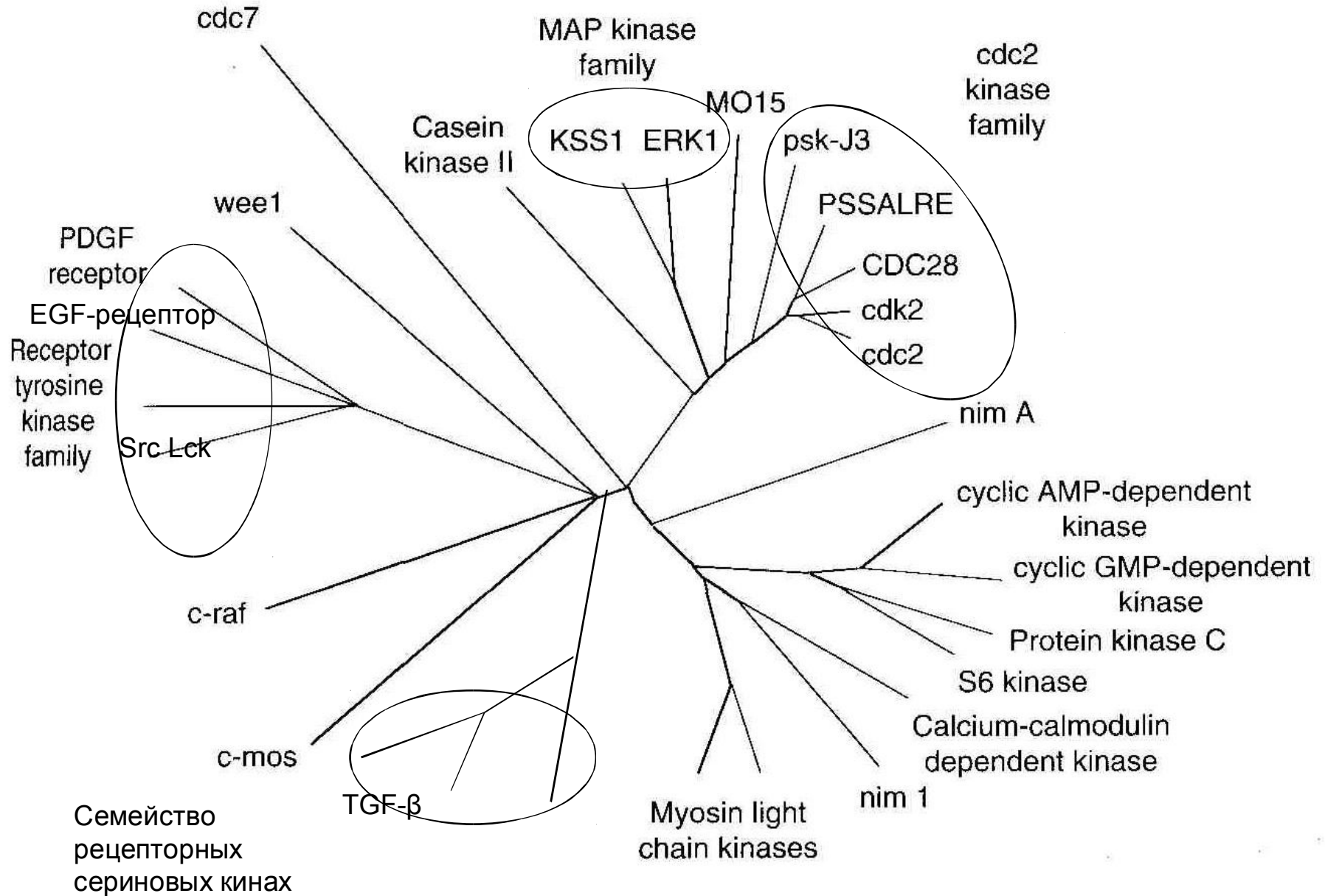


Сигнальный путь Delta – Notch – путь дифференцировки

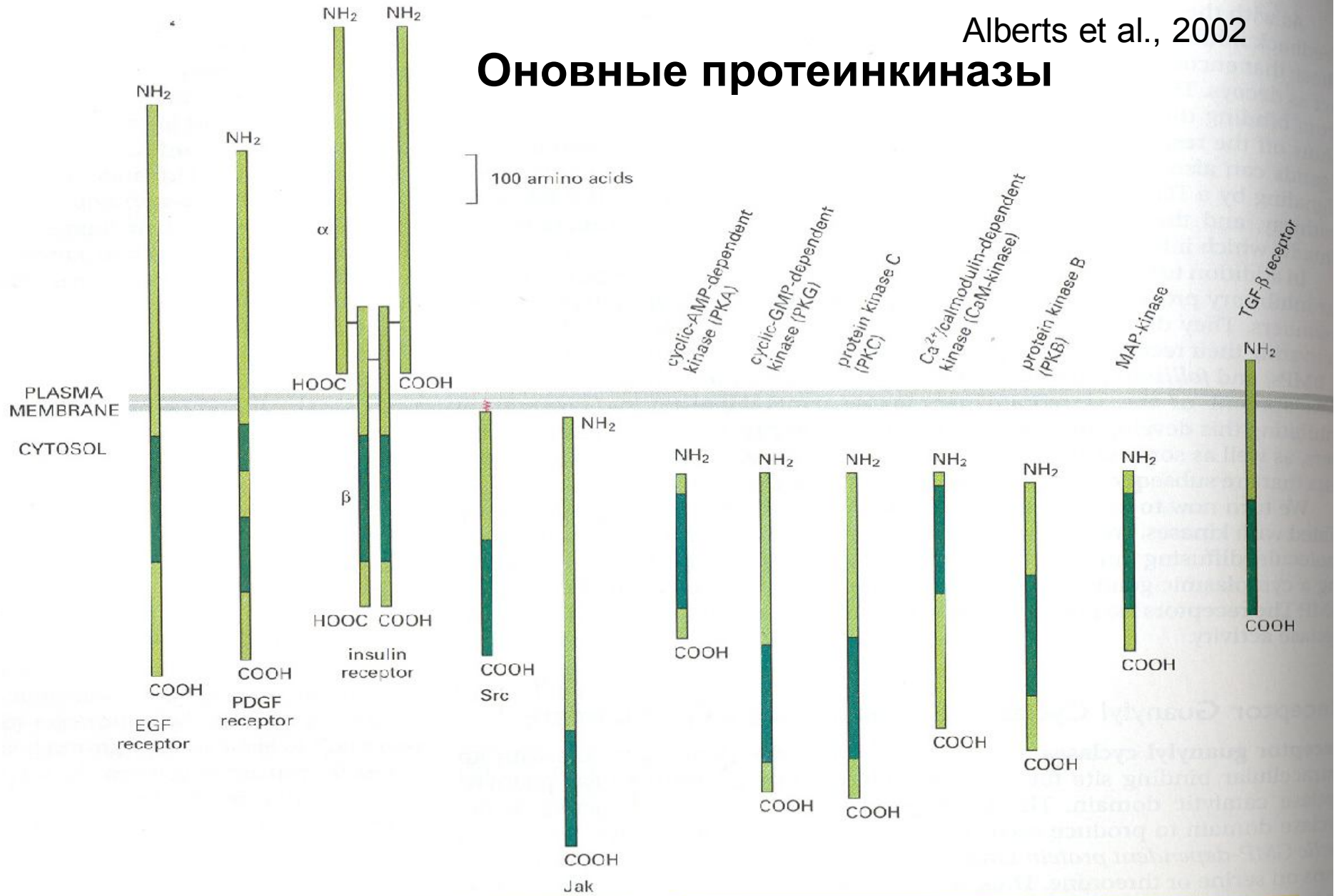
Alberts et al., 2002



Эволюционное древо некоторых протеин киназ



Основные протеинкиназы



Тирозин протеинкиназы

Серин-треонин протеинкиназы