

# **Генетика клеточного цикла**

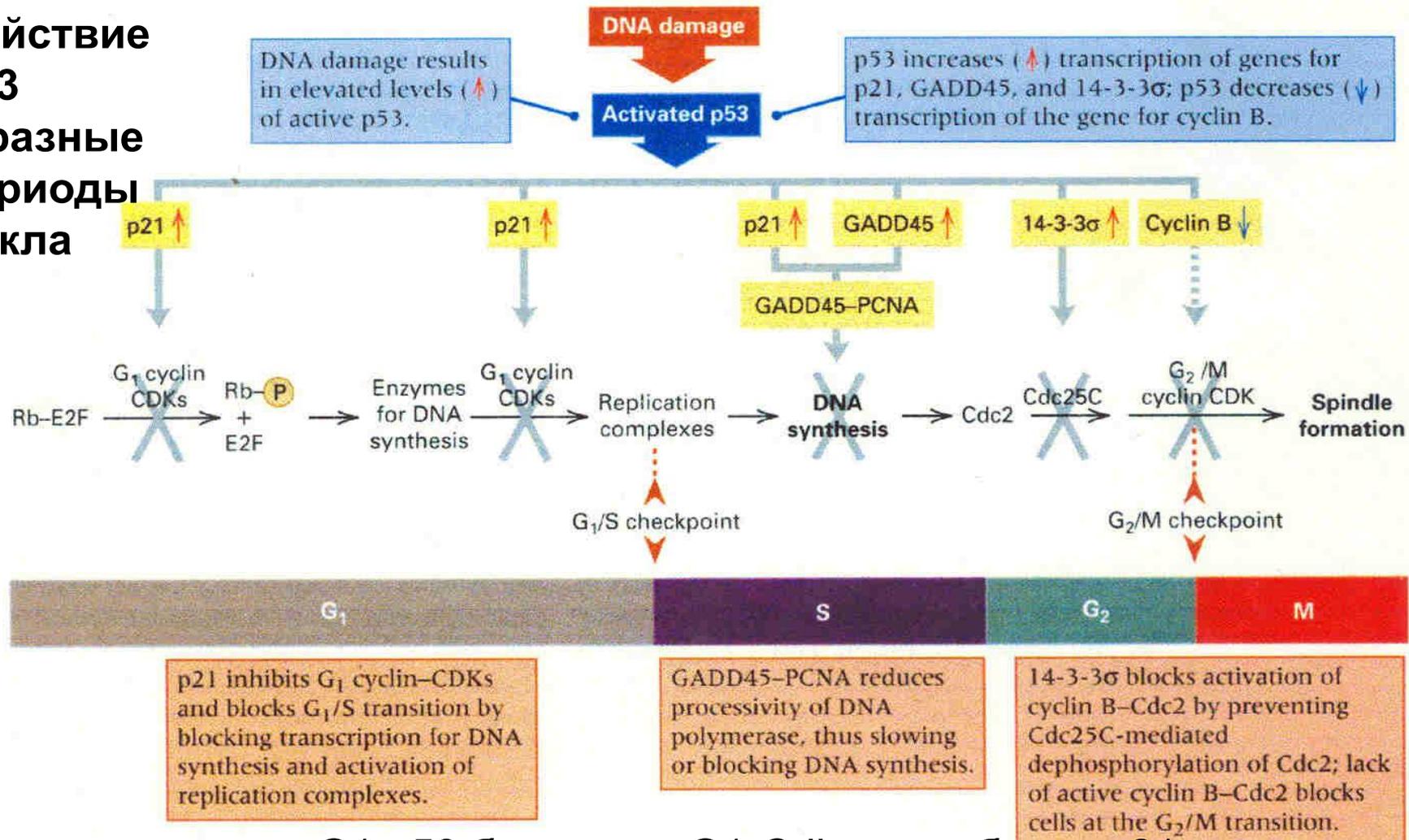
Электронно-лекционный курс

Глава 5

# **Надклеточный контроль клеточного деления, роста и апоптоза**

# Growth Arrest DNA Damage (Gadd) 45

## Действие p53 в разные периоды цикла



В точке контроля G1 p53 блокирует G1-Cdk через белок p21

В точке контроля G2/M p53 блокирует циклин B/Cdk через инактивацию фосфатазы Cdc25

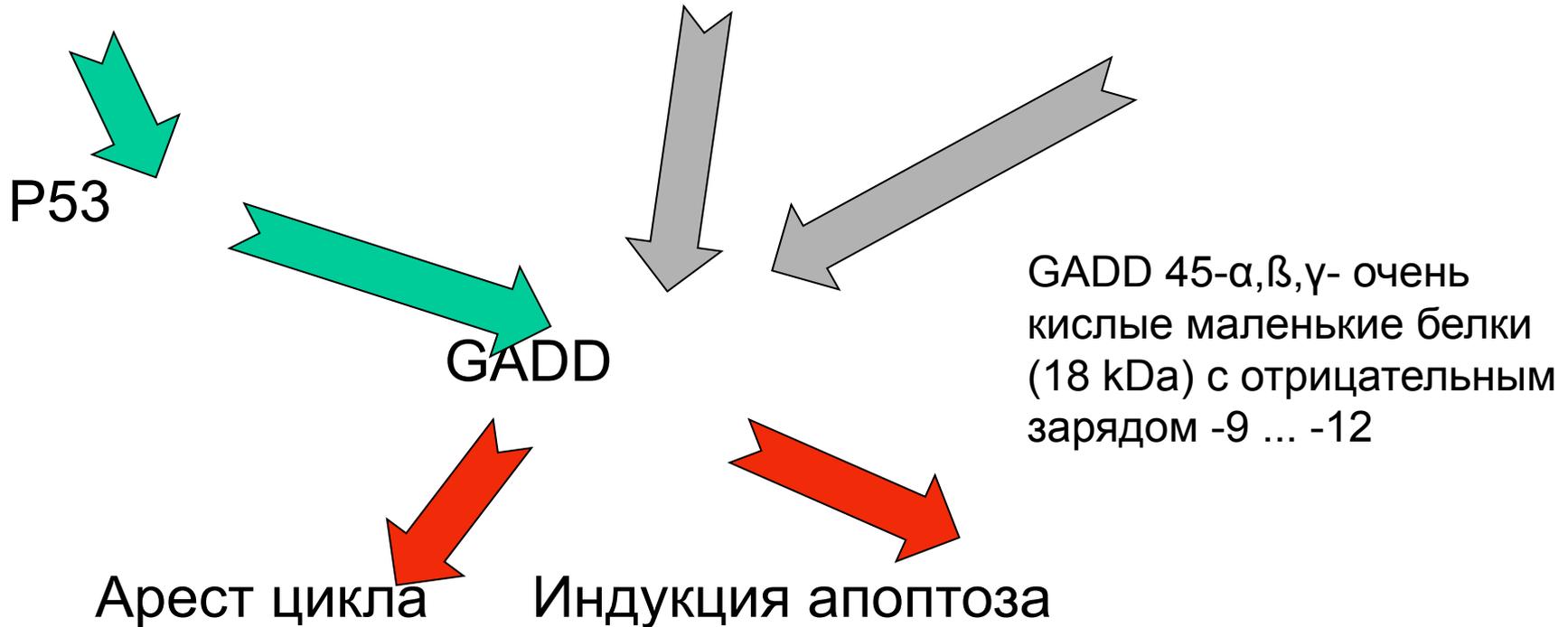
Сенсоры стресса Growth Arrest DNA Damage (GADD 45) у млекопитающих

# Белки GADD в ответе клетки на генотоксический стресс

IR ионизирующая UV  
радиация

(MMS)

метилметан сульфонат



TGFβ- индуцированный апоптоз

cdc2 (связывается и ингибирует)

MEKK (связывается и активирует JNK каскад )

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) прикрепляет ДНК-полимеразу δ к матрице (GADD связывается и модулирует работу ДНК-полимеразы )

# 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

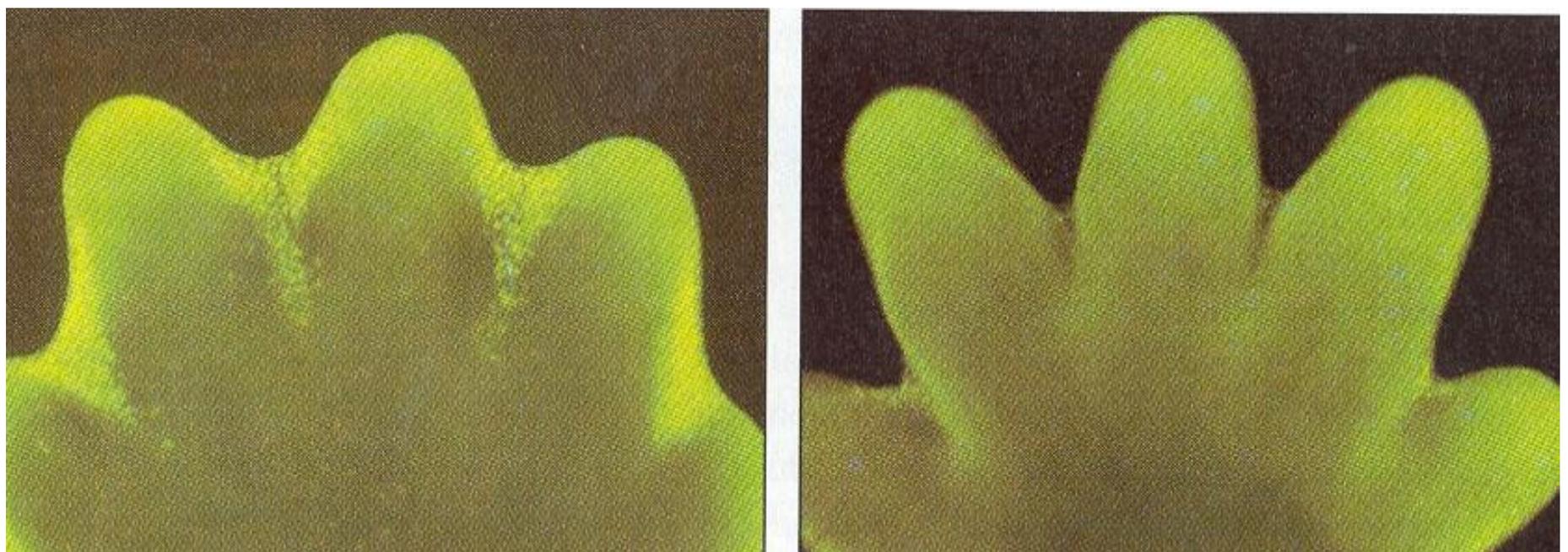
# Надклеточный контроль клеточного деления, роста и апоптоза

1. Для поддержания жизни нормальных клеток высших организмов необходимы различные специфические ростовые факторы.
2. Клетка может взаимодействовать с несколькими факторами роста; один и тот же фактор роста может влиять на разные типы клеток.
3. Реакция на ростовой фактор специфична для каждого типа клеток.

# Апоптоз – программируемая гибель клеток

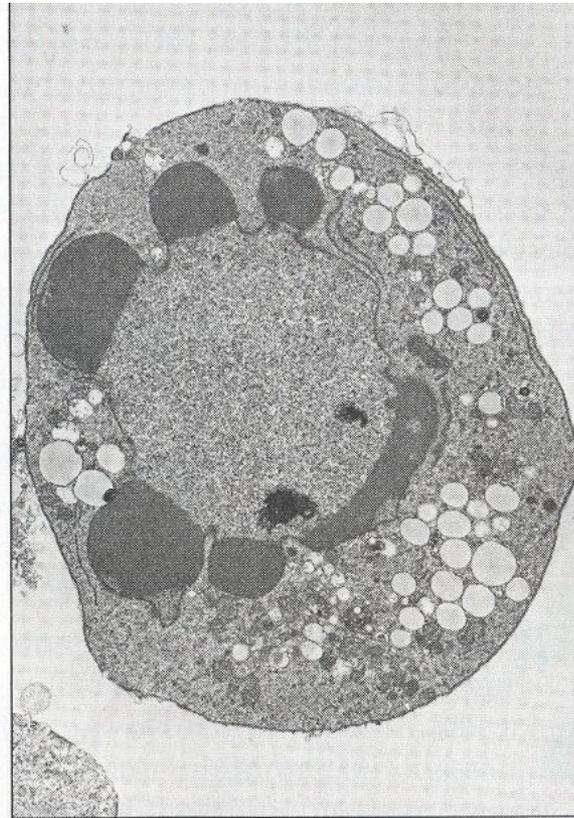
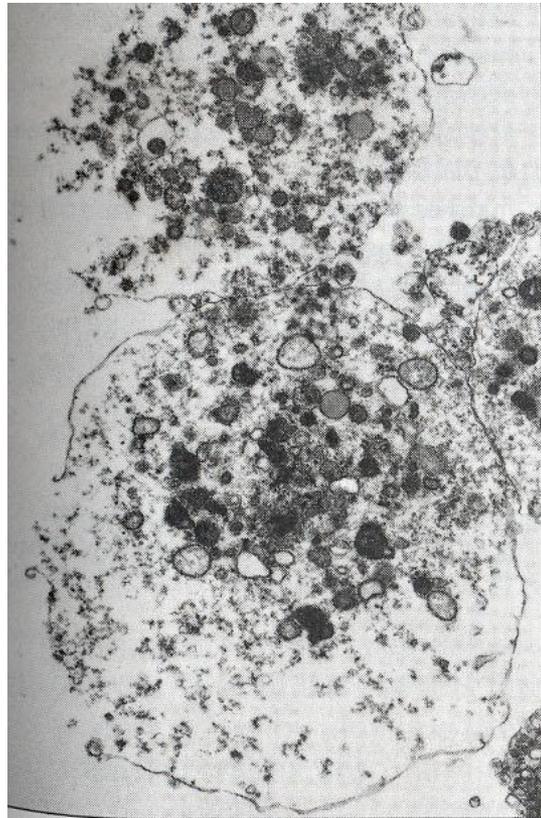
Апоптоз происходит:

- 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



(B)

10  $\mu$ m



(C)

engulfed dead cell

phagocytic cell

Некроз клетки в  
клеточной  
культуре

Гибель клетки  
апоптозом в  
клеточной культуре

Фагоцитоз клетки,  
гибущей  
апоптозом



**Апоптоз в трофоцитах бабочки**



**Апоптоз в трофоцитах  
перепончатокрылого**

# Апоптоз в сперматоцитах жука, вероятно, вызванный активацией точки контроля



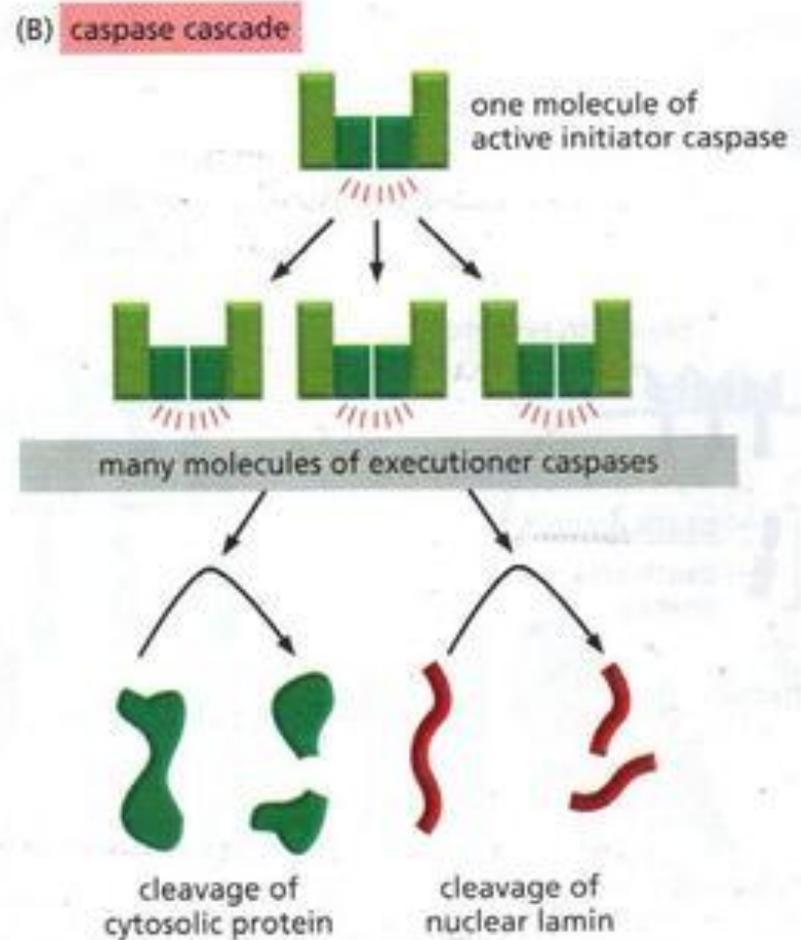
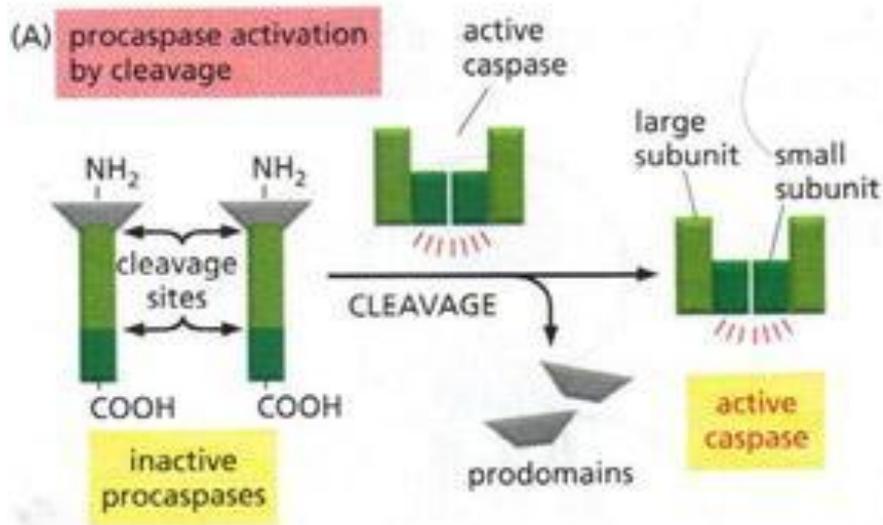
# **Апоптоз,**

## **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
- Разрушение ламины.
- Разрезание белка, инактивирующего эндонуклеазу.
- 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, фосфатидилсерин появляется на внешнем мембранном слое, фосфатидилсерин появляется на внешнем мембранном слое,

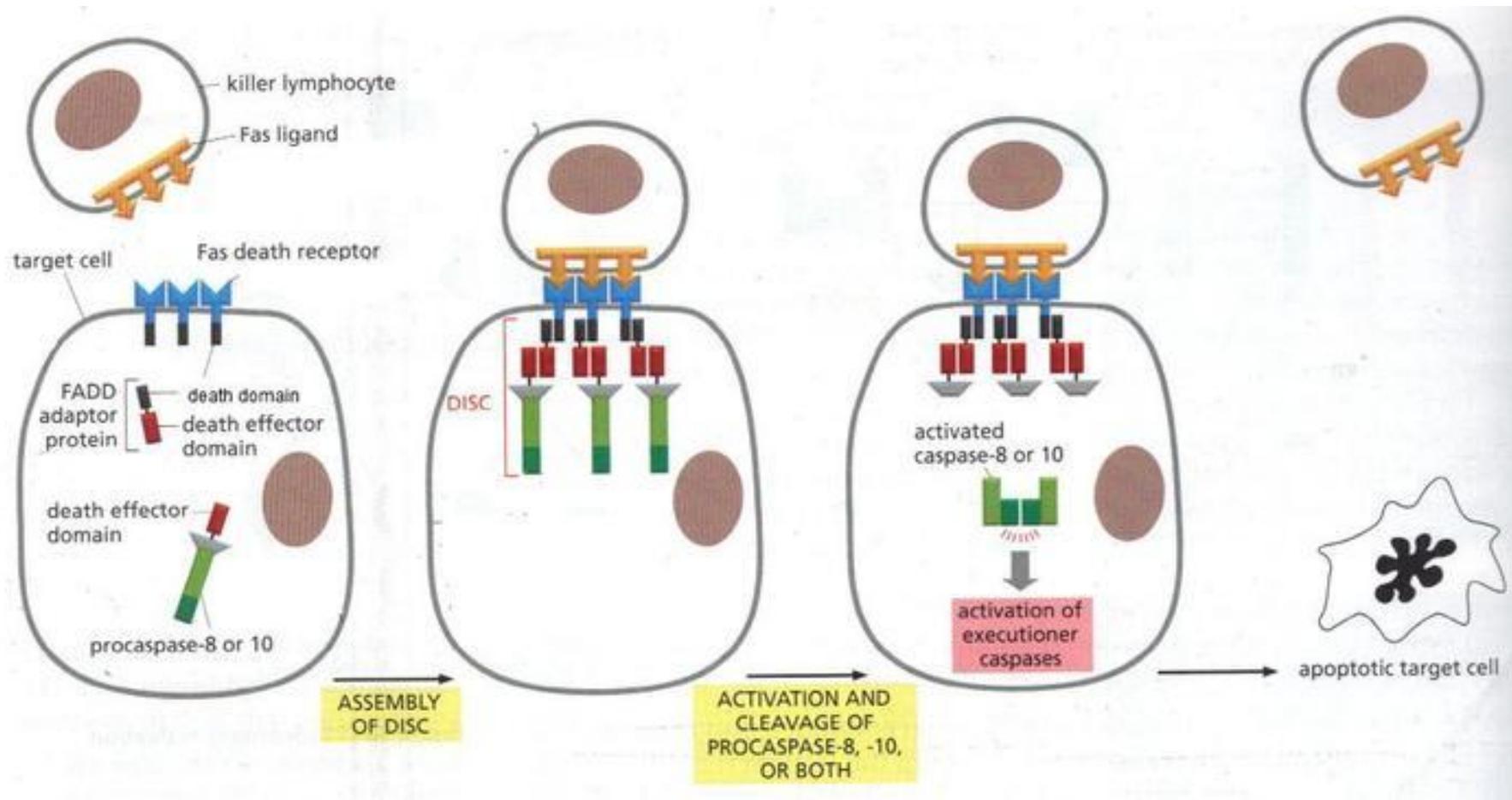


Каспазы - протеазы, имеющие цистеин в активном сайте и разрезающие белки-мишени по аспарагиновой кислоте – caspases

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

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

# Активация апоптоза с внешней стороны через Fas-путь

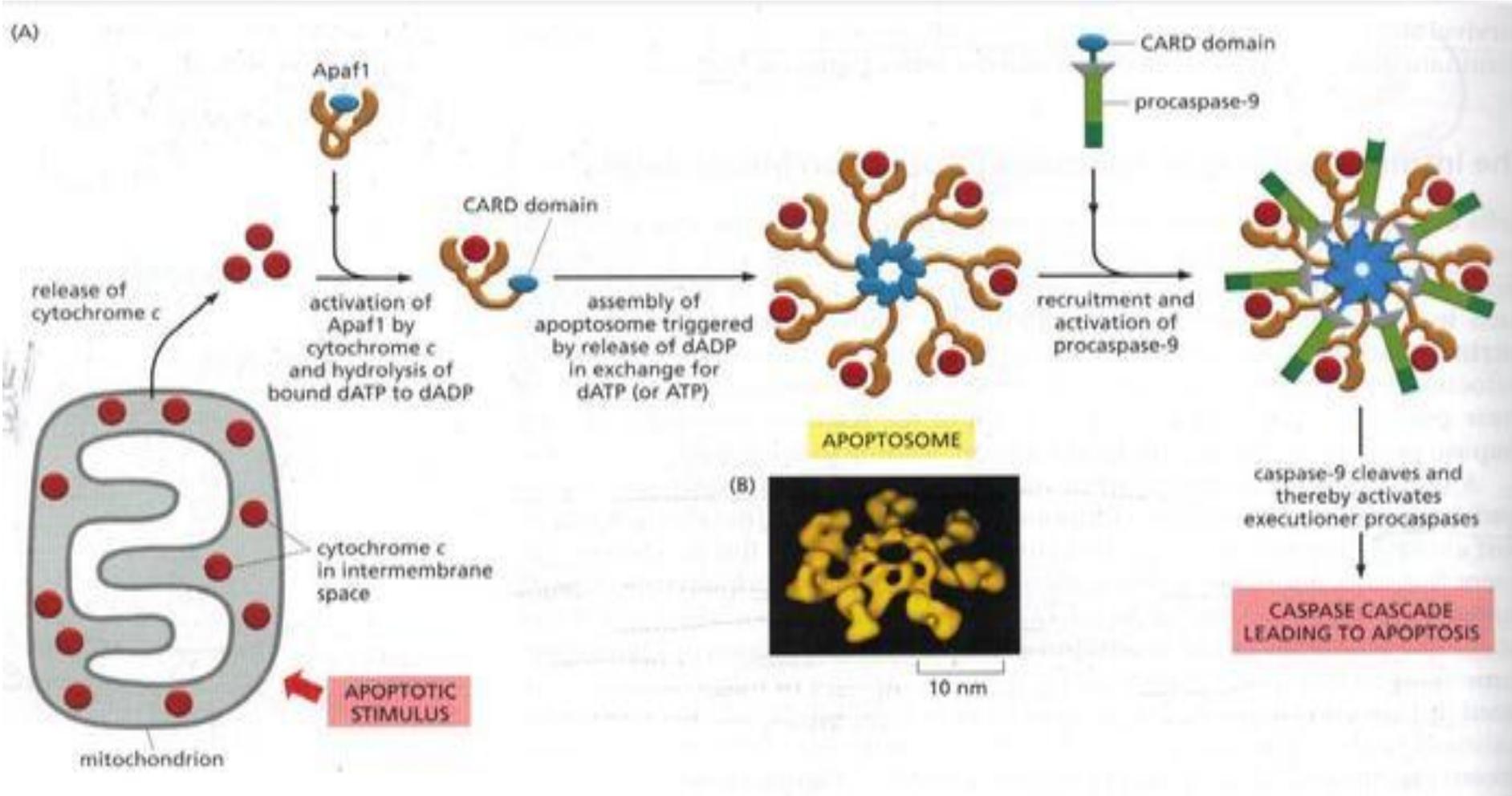


Fas-путь.

Лимфоцит-киллер активирует death –рецепторы на поверхности клетки: Fas кластеризуются, к ним присоединяются адапторные белки и прокаспазы. Взаимная активация и каскад.

Некоторые стрессированные или поврежденные клетки убивают себя сами, продуцируя и Fas-лиганд, и Fas-рецептор.

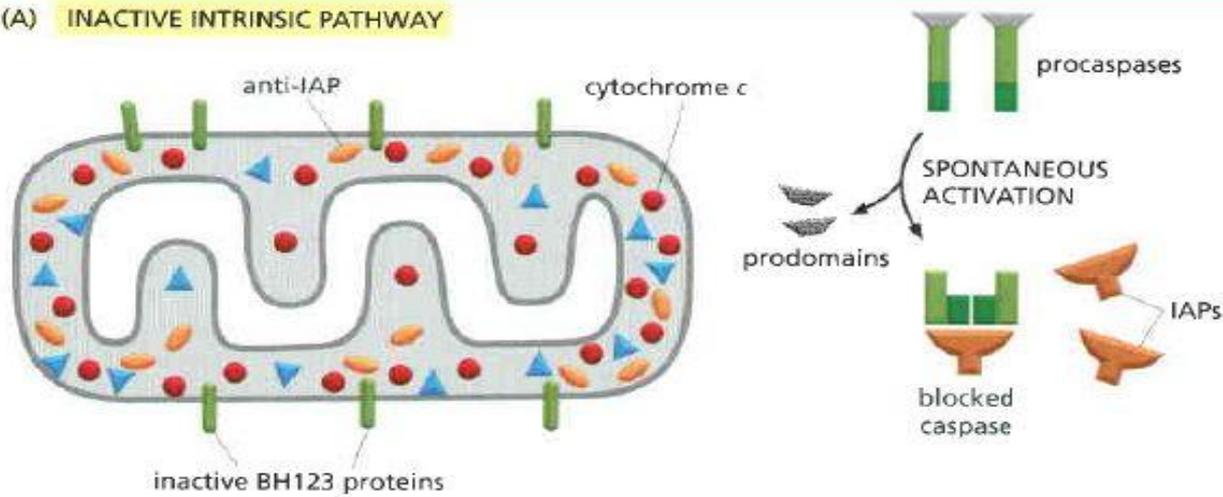
# Активация апоптоза изнутри клетки



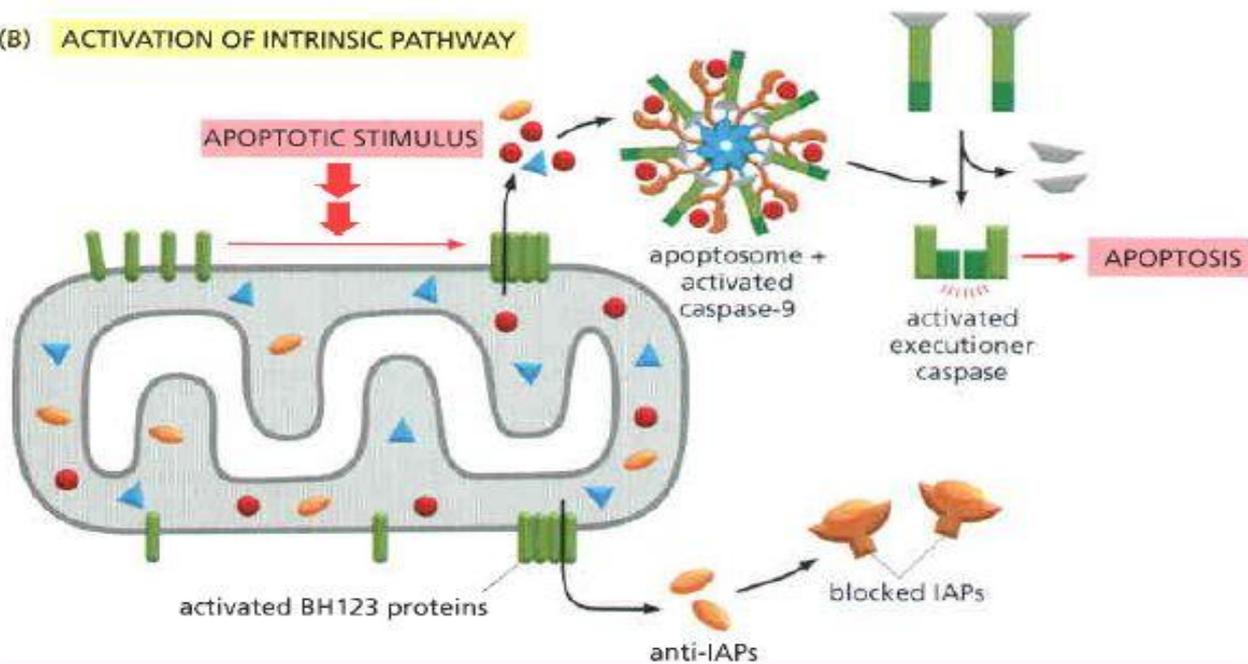
Апоптосома (700 кДа):

# Активация апоптоза изнутри клетки

(A) INACTIVE INTRINSIC PATHWAY



(B) ACTIVATION OF INTRINSIC PATHWAY



Один из путей:  
митохондрии  
индуцируются  
к выбросу цитохрома с  
в цитозоль.  
Цитохром с  
присоединяется  
к адапторному  
протеину *Araf-1*.  
Белки Вах и Вак вызывают  
выброс белка  
межмембранного  
пространства  
митохондрий за счет  
пермеабилзации внешней  
мембраны

## 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- $\beta$  – трансформирующий фактор роста – одни клетки стимулирует, другие ингибирует

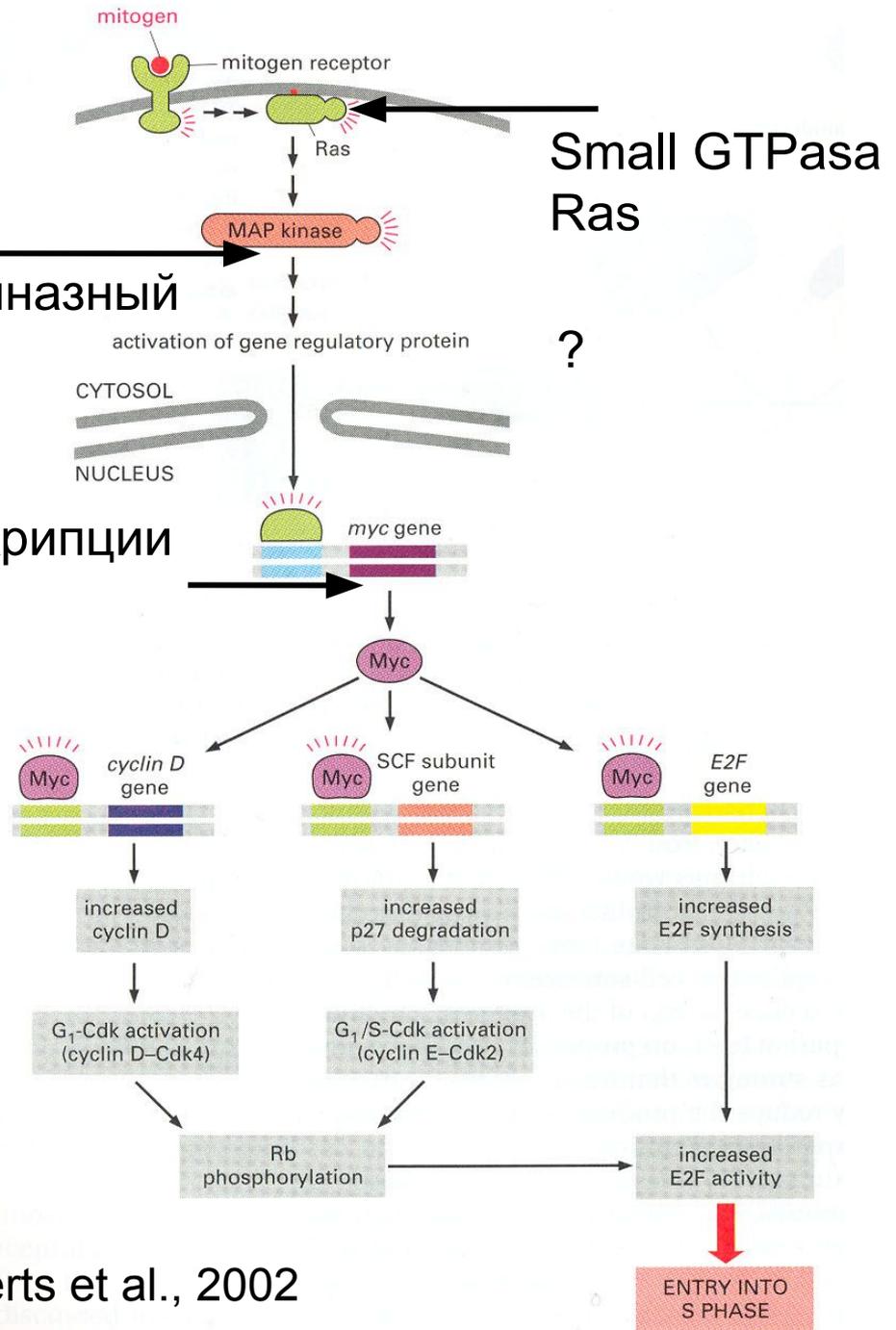
# Один из путей стимуляции клеточных делений митогеном

MAP-киназный каскад

Активация транскрипции гена *myc*

Активация транскрипции генов, связанных с выходом из G0

Многие компоненты внутриклеточных сигнальных путей оказываются онкогенами

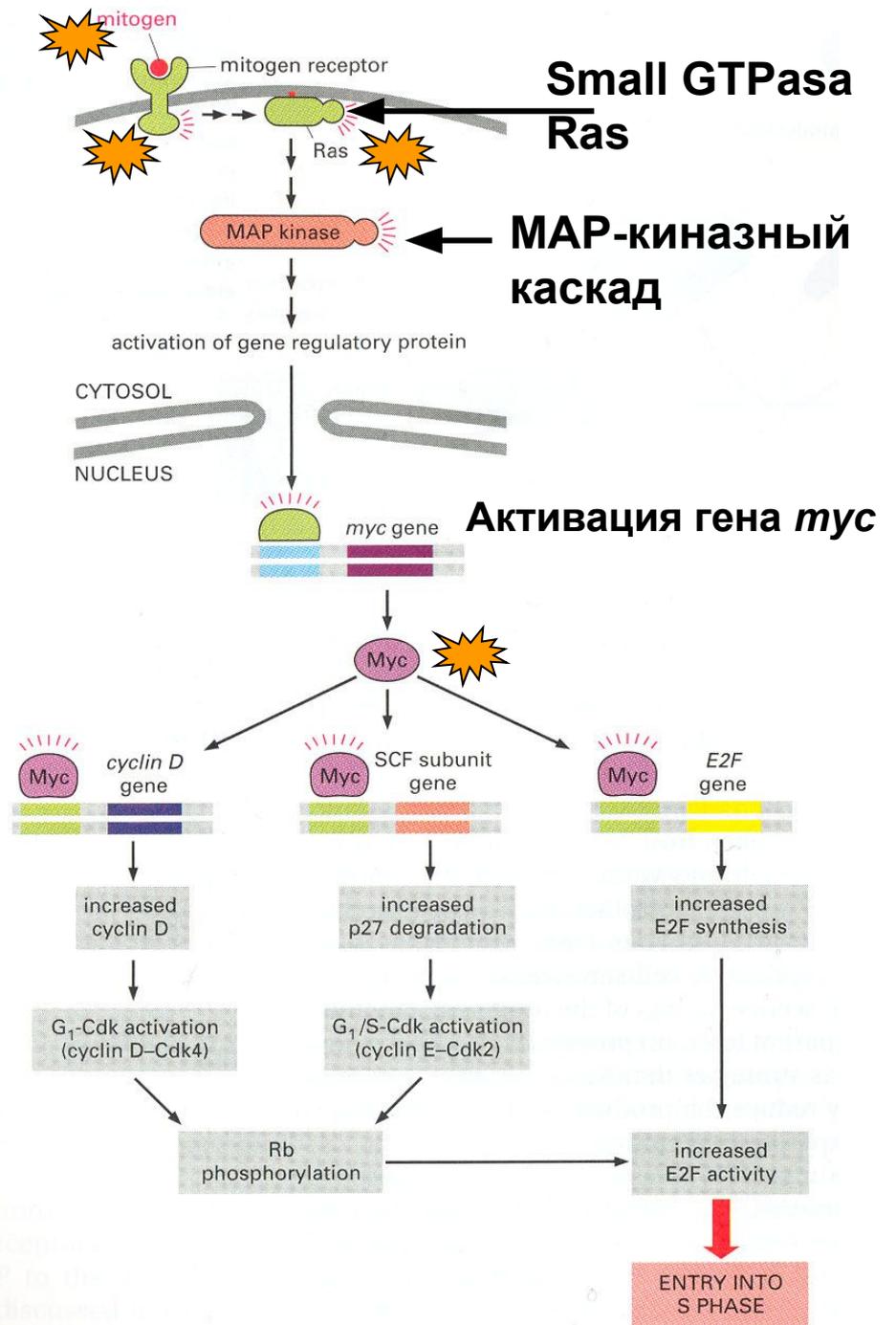


# Участники сигнального пути Ras и мус в онкогенезе

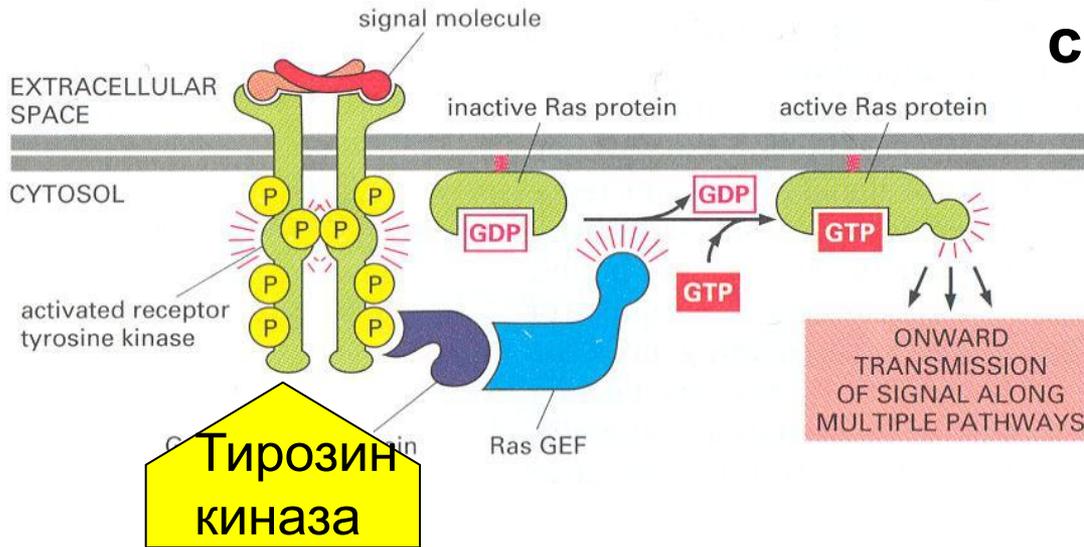
Гиперактивный Ras- продукт мутантного гена *ras* часто вызывает рак (рак толстой кишки, мочевого пузыря, поджелудочной железы, лёгкого -30% всех случаев )

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

Гиперактивация гена *мус* – мелкоклеточный рак лёгкого, рак толстой кишки, лимфома



# Стимуляция митогеном сигнального пути Ras

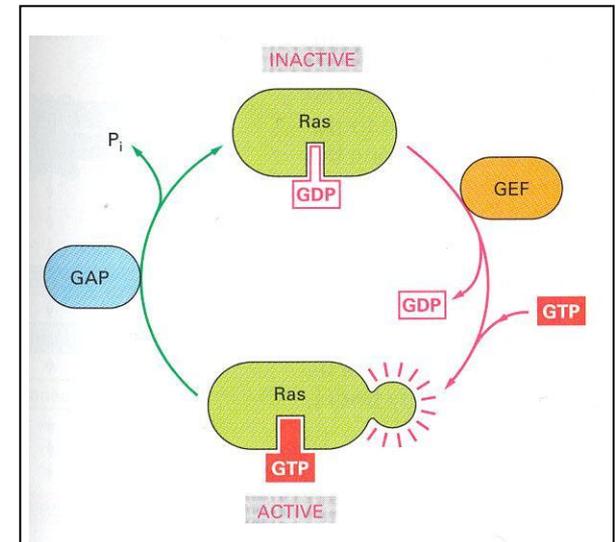


Ras- мономерная GTF-аза, имеет пренильную группу.

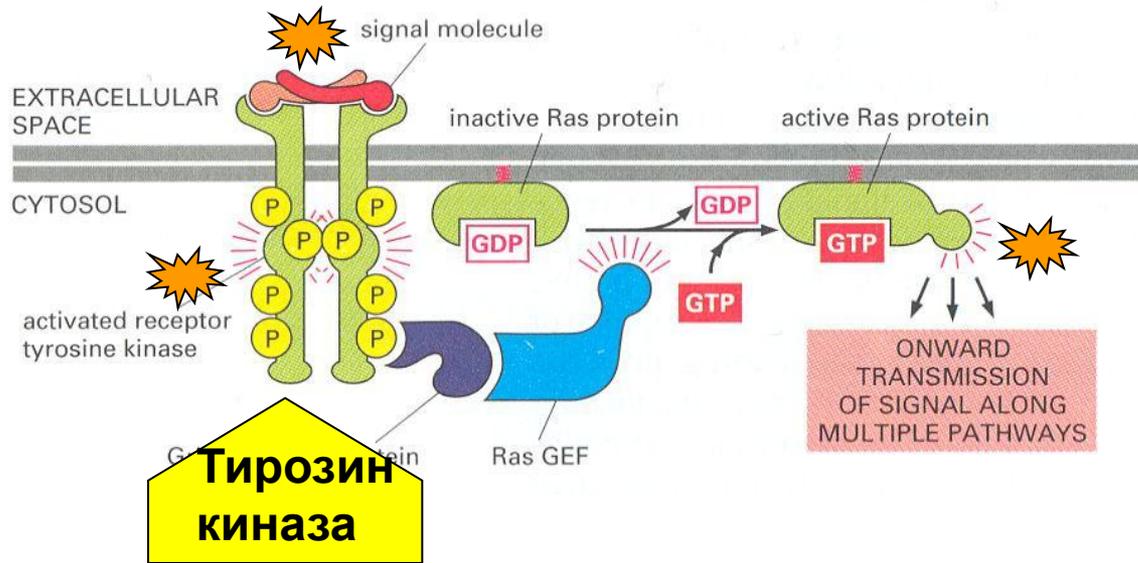
Ras-GEF- guanine nucleotide exchange factors

Протоонкогены – гены, в норме стимулирующие деление клетки. 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).



# Участники сигнального пути Ras и тус в онкогенезе



**Фактор роста тромбоцитов**  
(вирус саркомы обезьян)

**Рецептор фактора роста эпидермиса** (глиобластома, вирус эритробластога птиц)

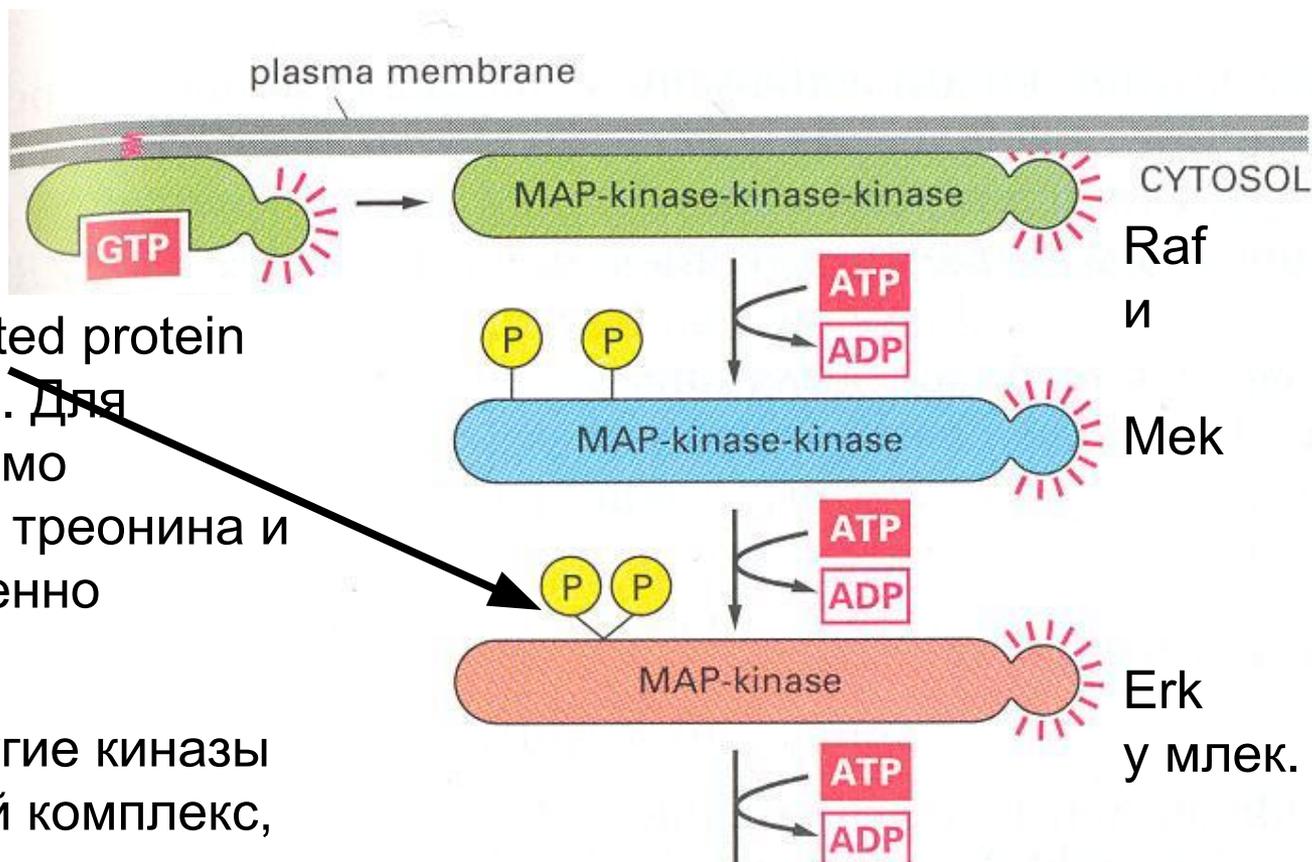
**Рецептор колониестимулирующего фактора M-CSF** (саркома кошки)

Фосфотирозины рецептора служат докинг-сайтом для различных белков, имеющих домены SH2 (src homology region-пролин-богатые), SH3, в т.ч. Src-тирозинкиназы, PTB (phosphotyrosine binding)-домены,

**Активация пути тус**

Тирозин-фосфатазы специфические для определенного класса рецепторов, обеспечивают быструю отмену сигнала

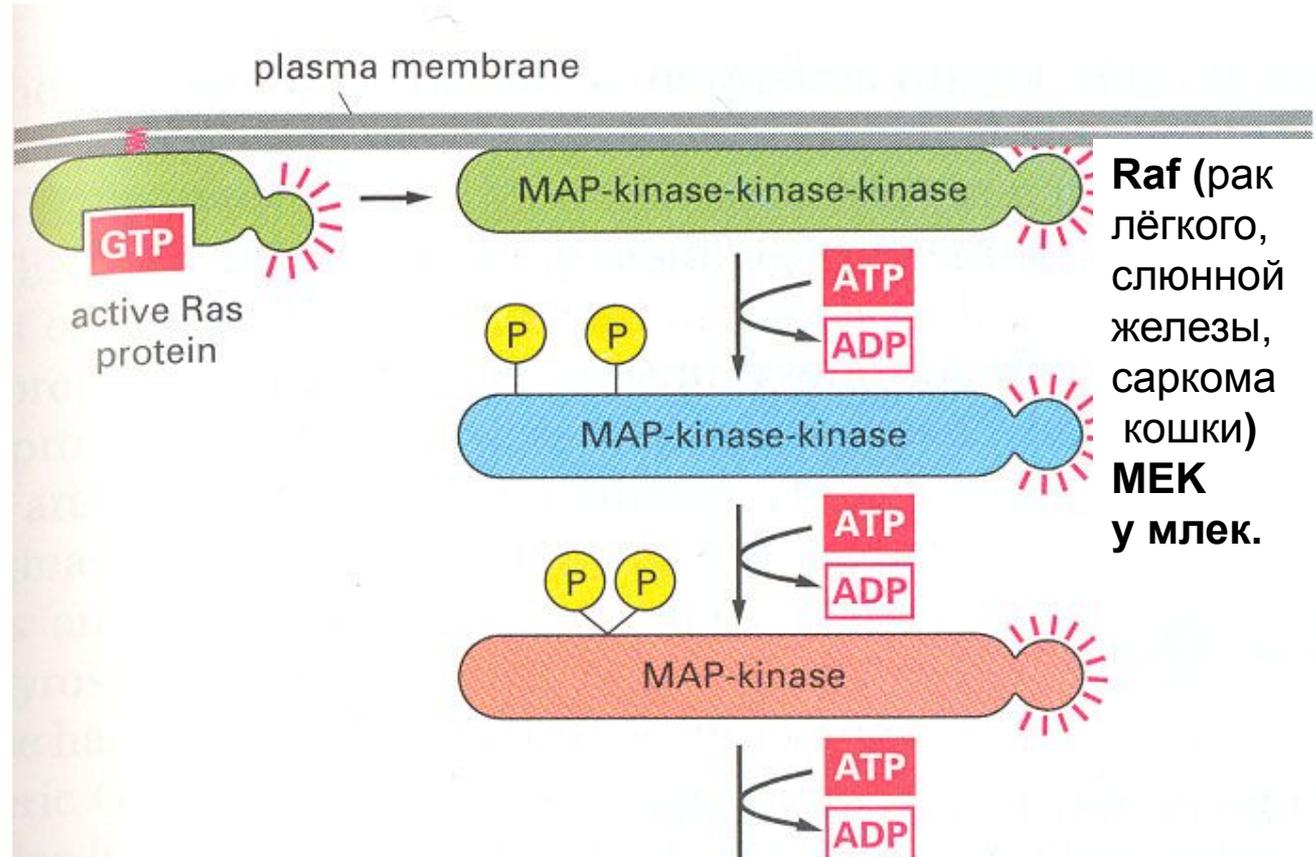
# Стимуляция митогеном сигнального пути Ras



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*

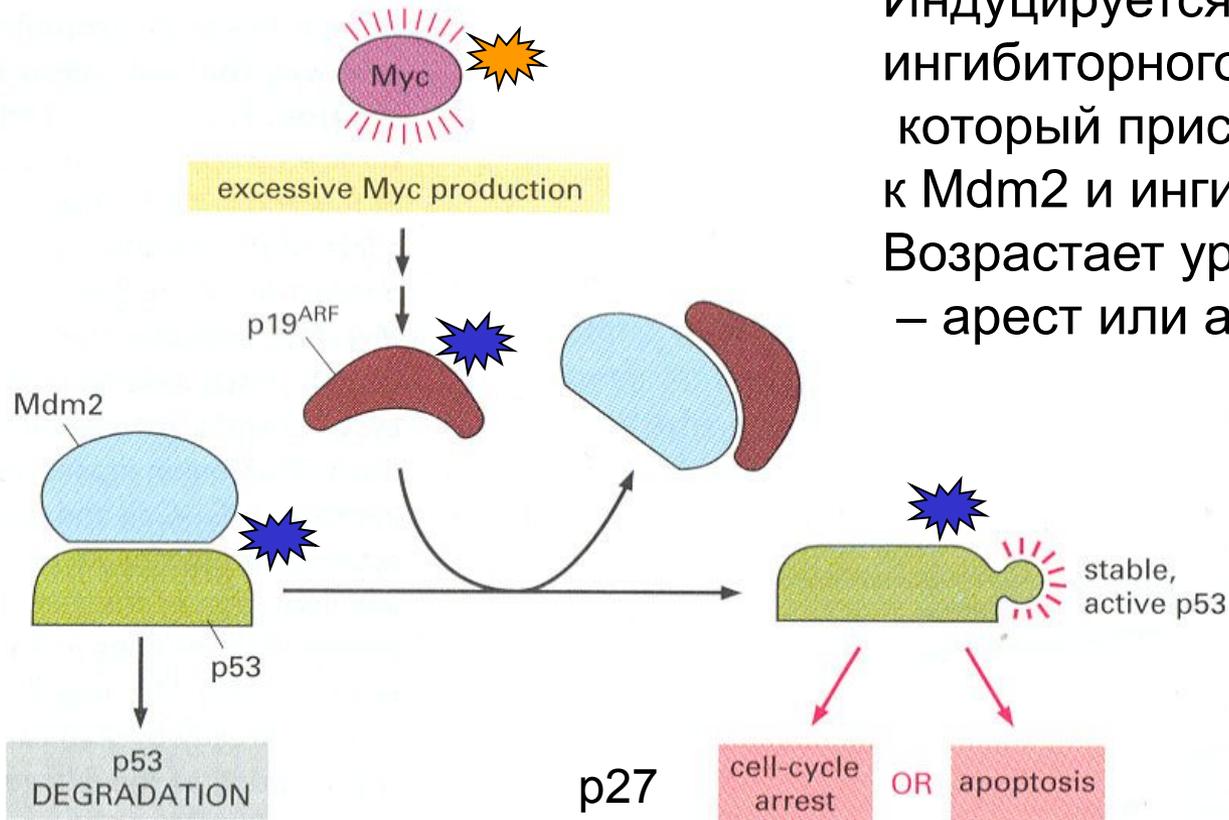
# Участники сигнального пути Ras и тус в онкогенезе



Гиперактивация гена *тус* – мелкоклеточный рак лёгкого, рак толстой кишки, лимфома

# 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.



Индукцируется 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

Репликативное старение клеток, связанное с теломерами. У фибробластов через 25-50 делений в среде с митогенами наступает арест клеточного цикла. 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
- Количество белка 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

# Факторы роста

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

Увеличение скорости синтеза макромолекул и снижение скорости деградации

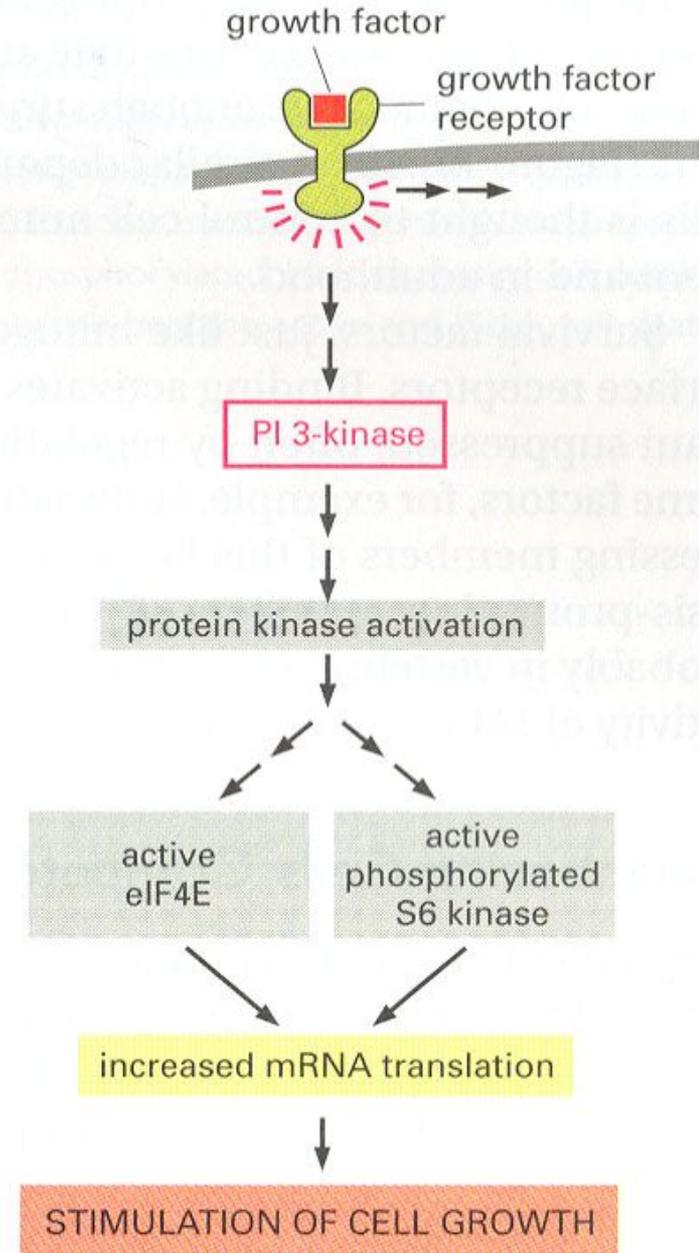
Путь PI 3- фосфатидинозитол-3-киназы.

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

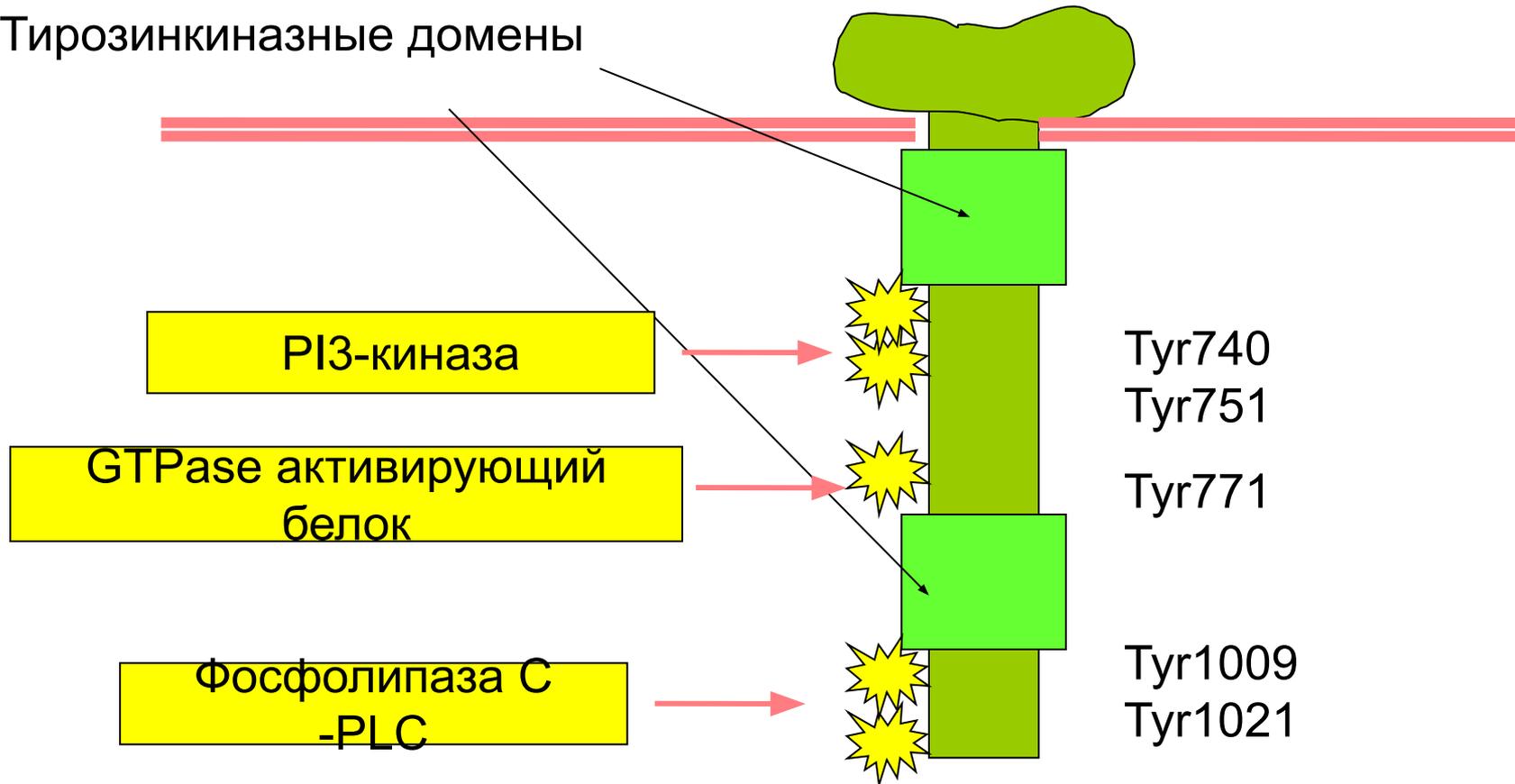
Активация трансляции фактором инициации трансляции eIF4E

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



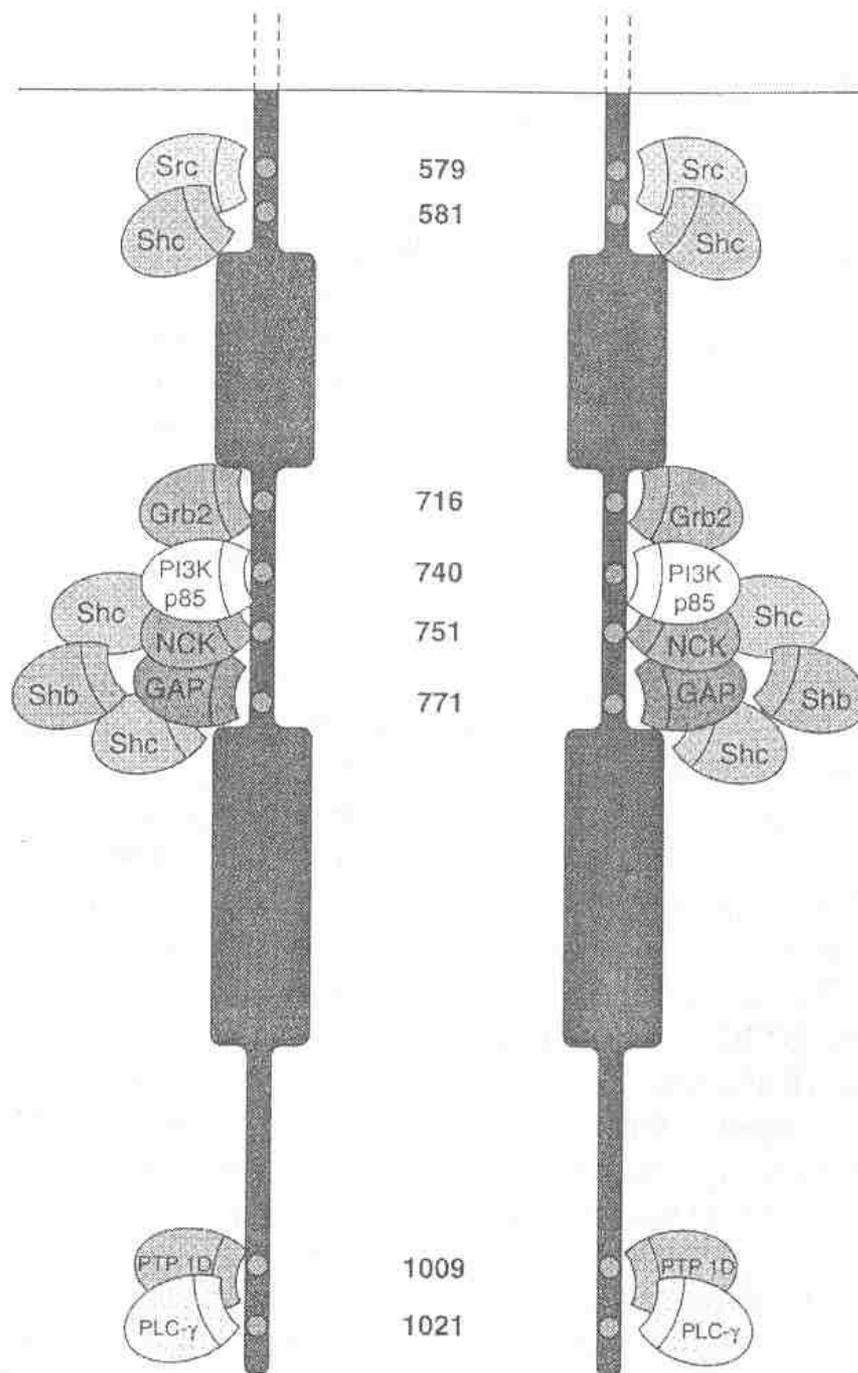
# Рецептор PDGR – фактора роста тромбоцитов, одна из цепей димера

Тирозинкиназные домены

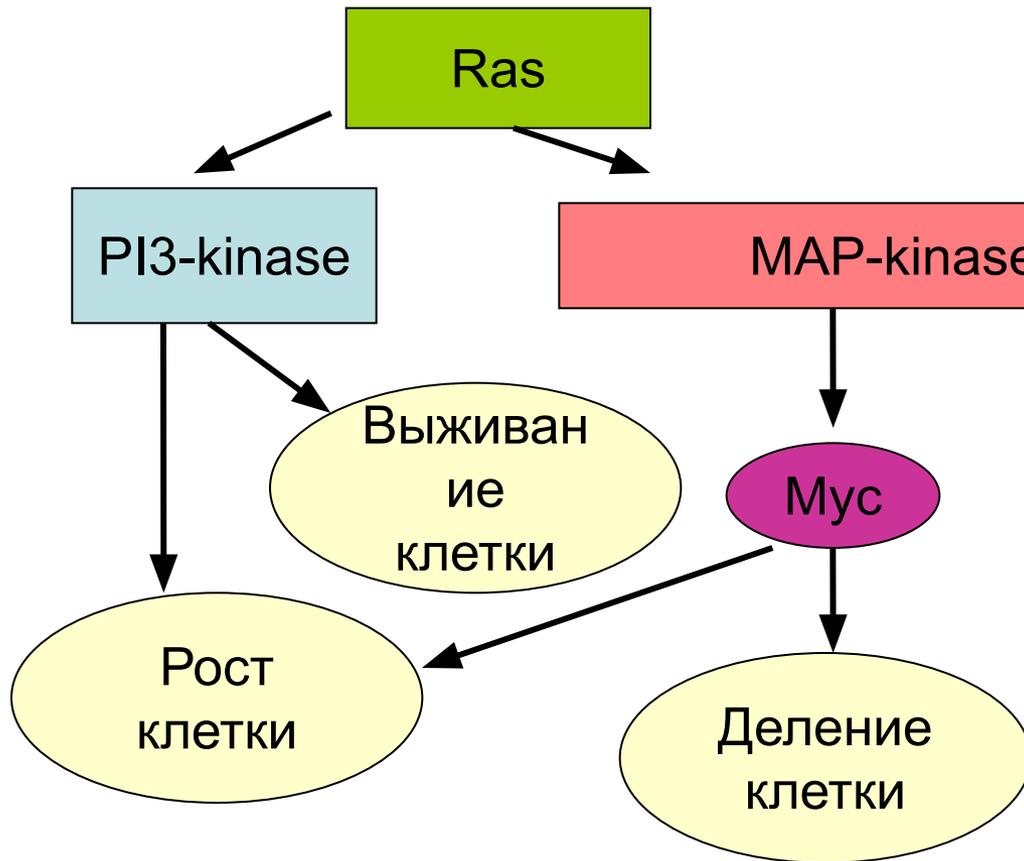


Фосфотирозины служат докинг-сайтом для различных белков, имеющих домены SH2 (src homology region), SH3

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



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



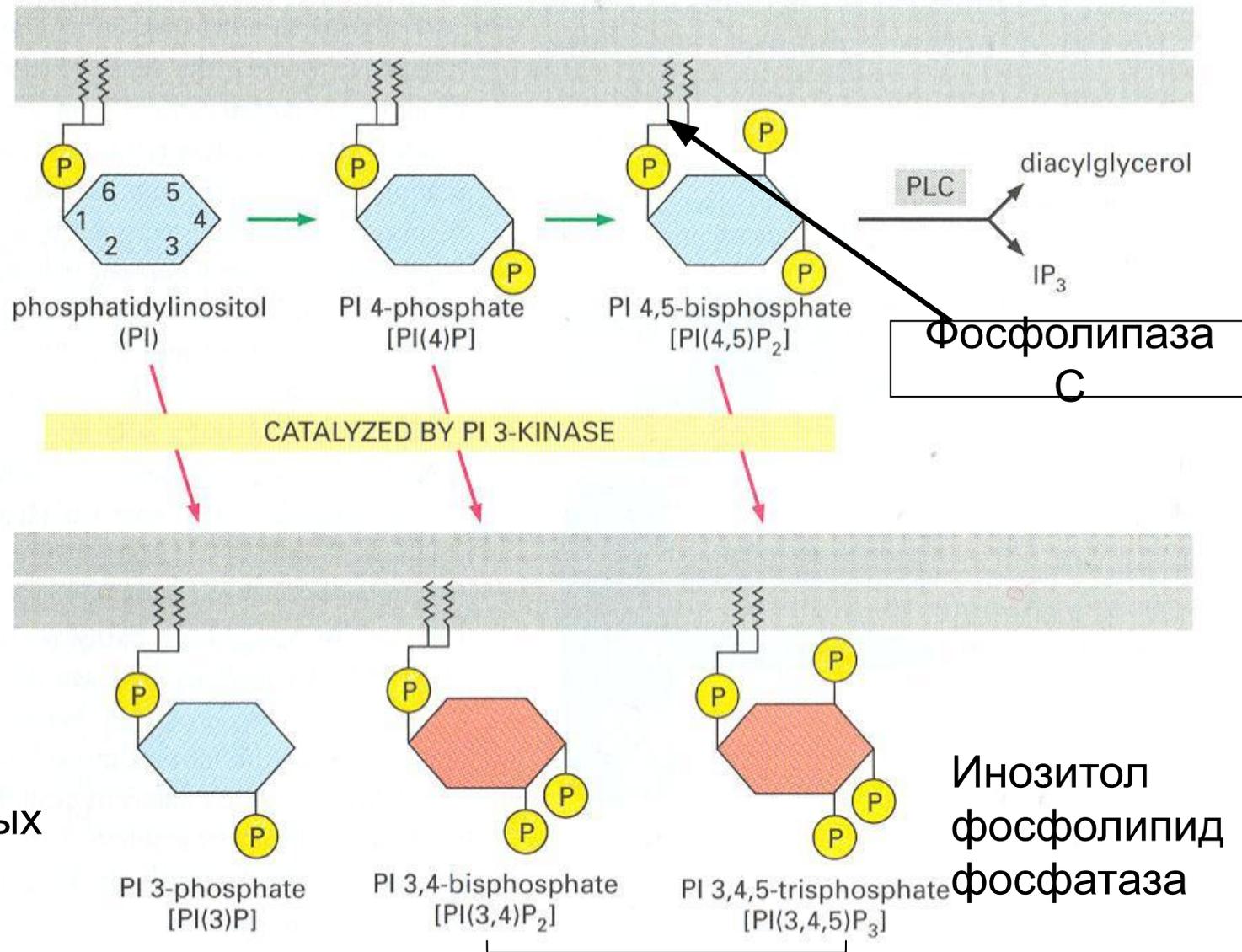
Связь роста и пролиферации гарантирована

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

# Возможные превращения PI 3 под действием PI 3-киназы

Alberts et al., 2002

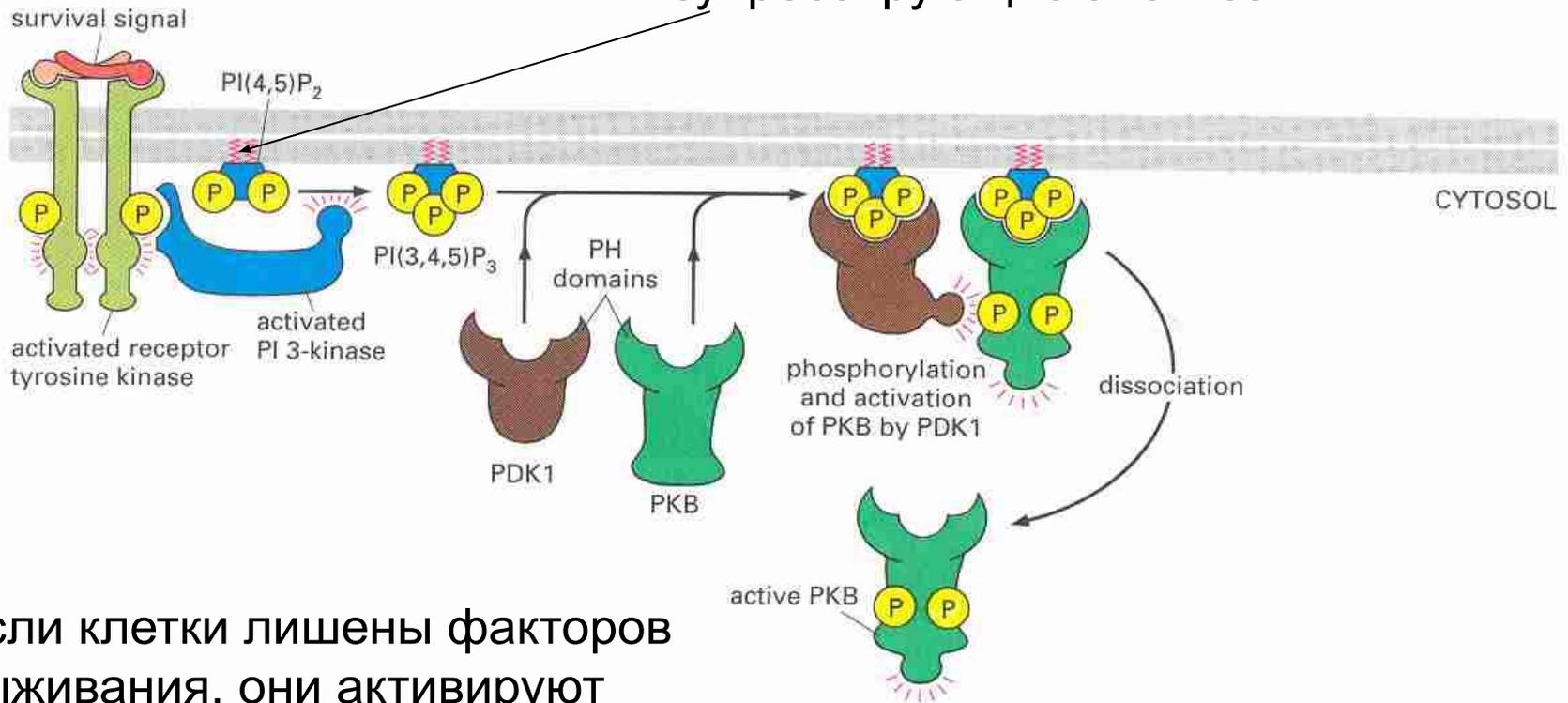


Создание докинг-сайтов для внутриклеточных сигнальных белков

Инозит фосфолипид фосфатаза

# Факторы выживания

Внеклеточные факторы, супрессирующие апоптоз



Если клетки лишены факторов выживания, они активируют программу апоптоза.

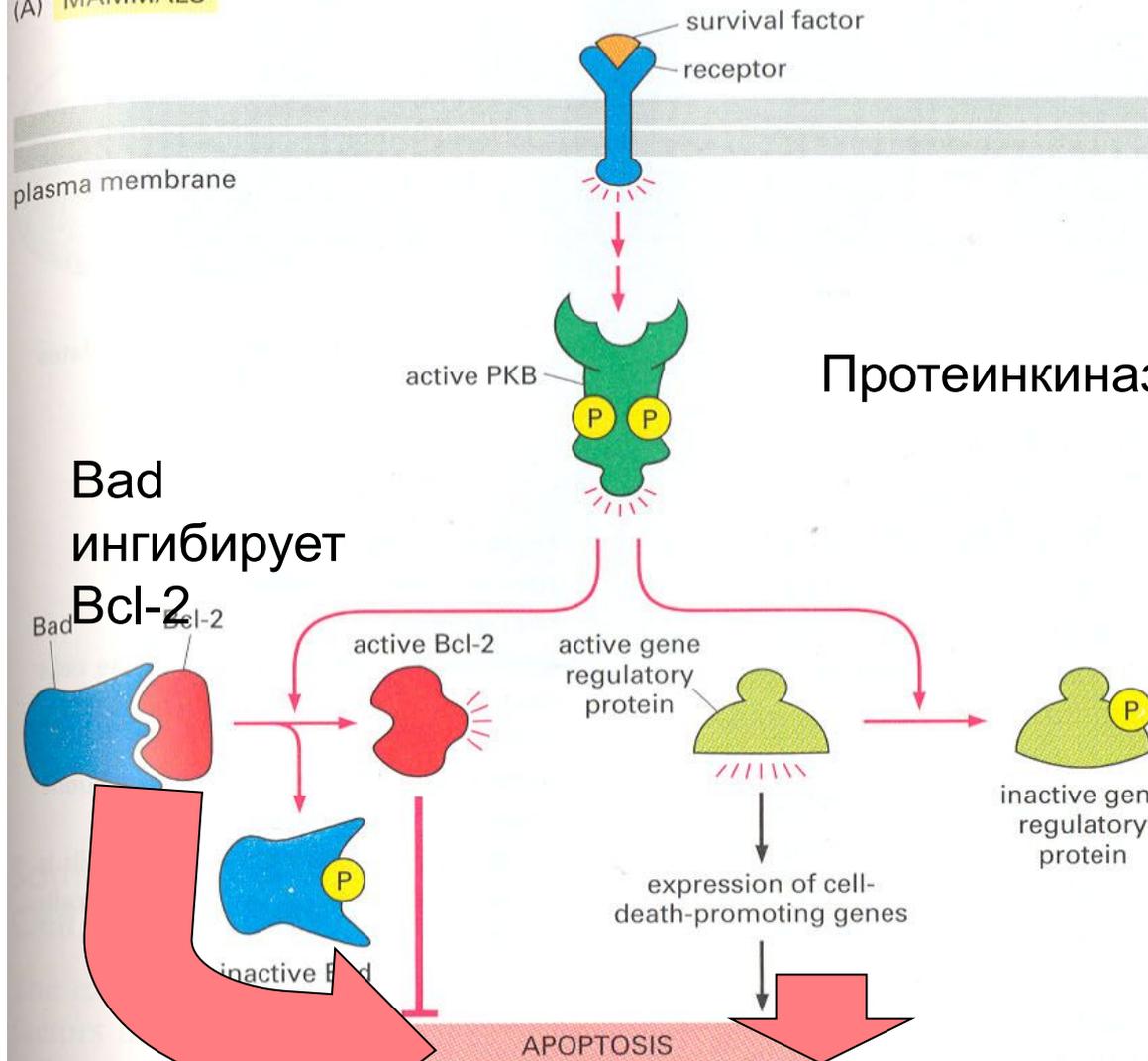
Нервные клетки образуются в избытке и конкурируют за фактор, выделяемый мишенями

PDK1 - PI-dependent kinase

PKB-протеинкиназа В уходит в цитоплазму, фосфорилирует многие белки, ингибирует апоптоз (повышенный уровень во многих опухолях)

# Фактор выживания супрессирует апоптоз у млекопитающих

(A) MAMMALS



Bad ингибирует Bcl-2

Протеинкиназа В

(B)

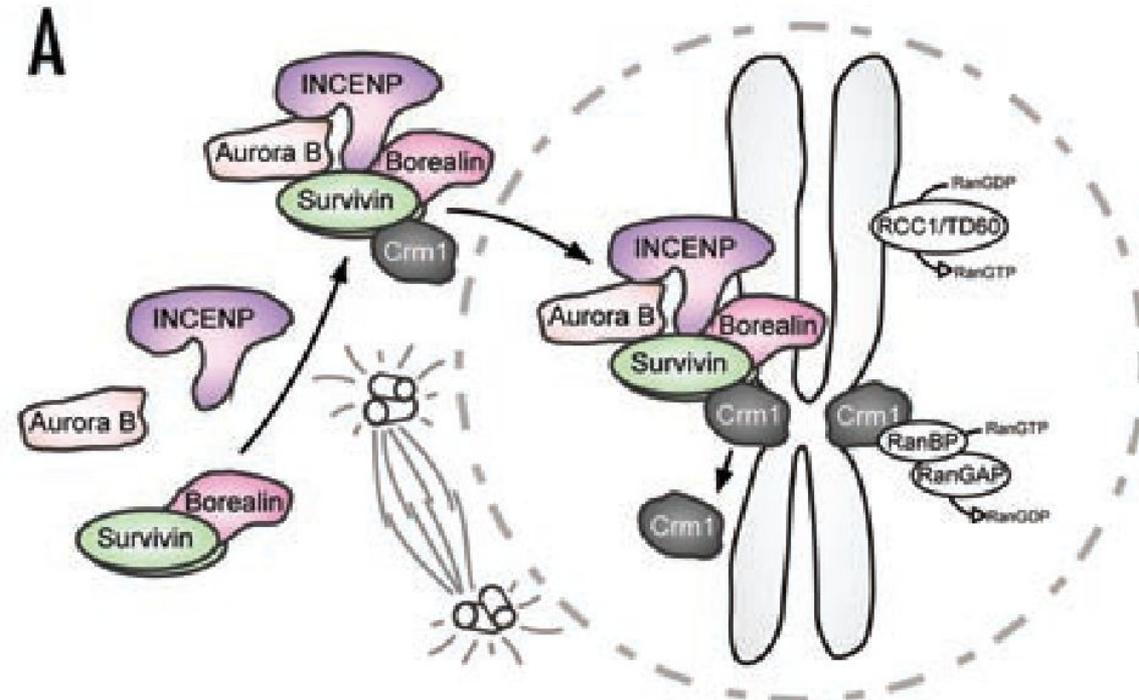
Рецептор фактора выживания активирует протеинкиназы, в т.ч. PKB.

PKB:

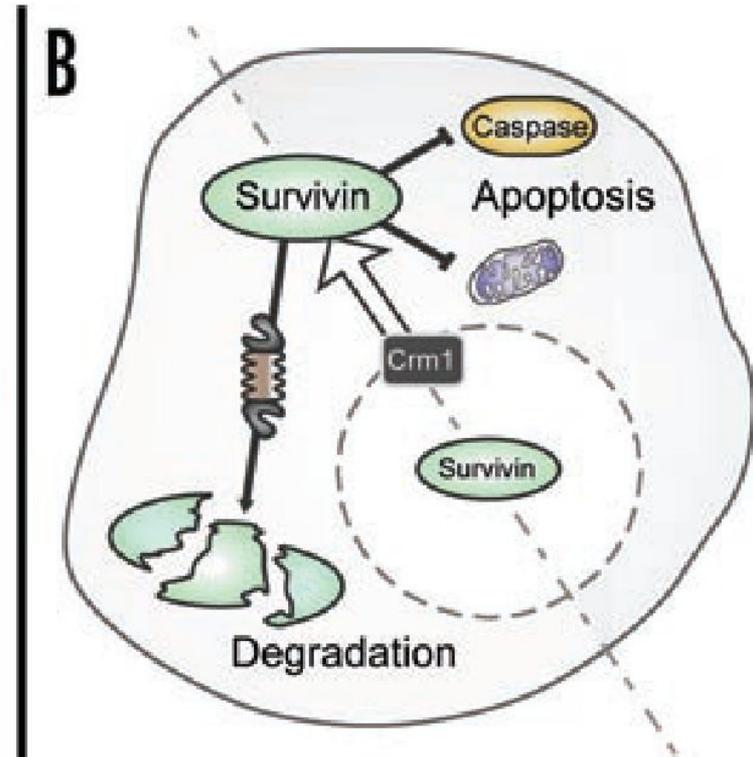
1. Активирует ингибитор апоптоза Bcl-2.
2. Ингибирует гены, вызывающие апоптоз

# Survivin в апоптозе

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



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



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

Содержит бакуловирусный IAP повтор, ингибирует эффекторные каспазы. Высокоактивен в опухолевых и фетальных клетках, отсутствует в терминально дифференцированных

# 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**

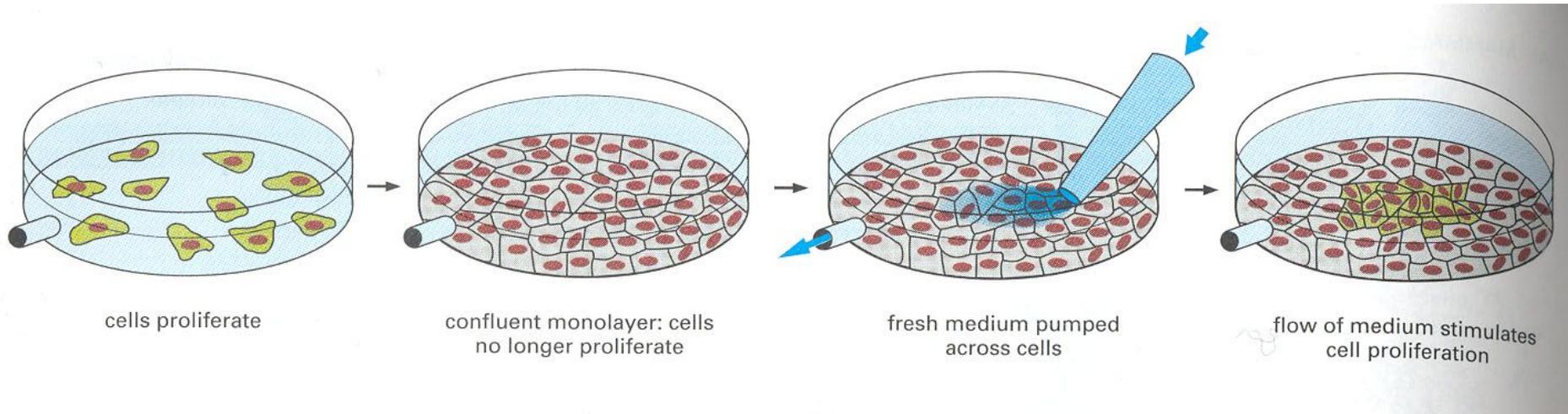
У долгожителей (старше 100 лет) и их детей чаще встречались мутации рецептора к инсулиноподобному фактору роста-1. У носителей мутаций был нарушен процесс связывания клеток с ИФР-1, повышение уровня ИФР-1 в крови на 37%

Каскад **IGFR-1** влияет на продолжительность жизни

# Конкуренция клеток за сигнальные белки

Клетки в культуре. Явление контактного ингибирования

Контактное ингибирование клеточных делений = зависимое от плотности



Пролиферация

Монослой, нет  
пролиферации

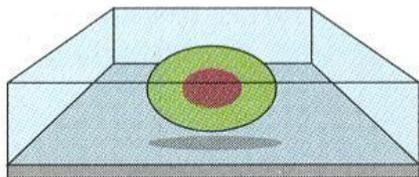
Постоянно  
добавляется  
свежая среда

Пролиферация в  
потоке  
возобновляется

Плотность определяется доступностью экстраклеточных факторов

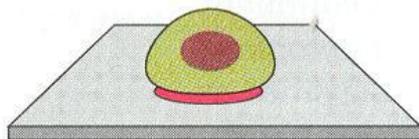
# Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

Суспензия



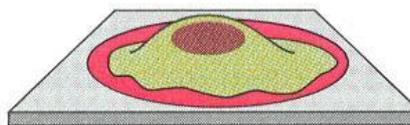
8%

Слабая адгезия



30%

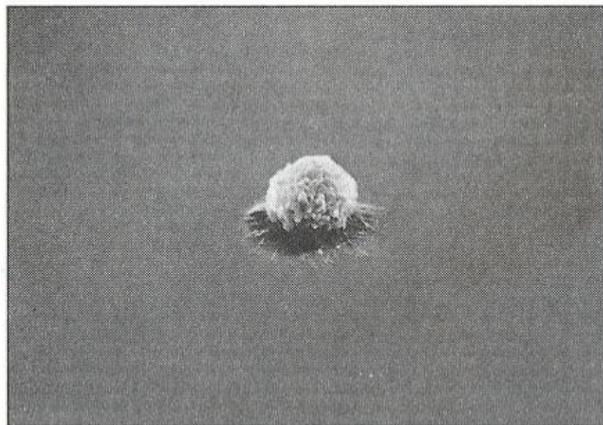
Хорошая адгезия



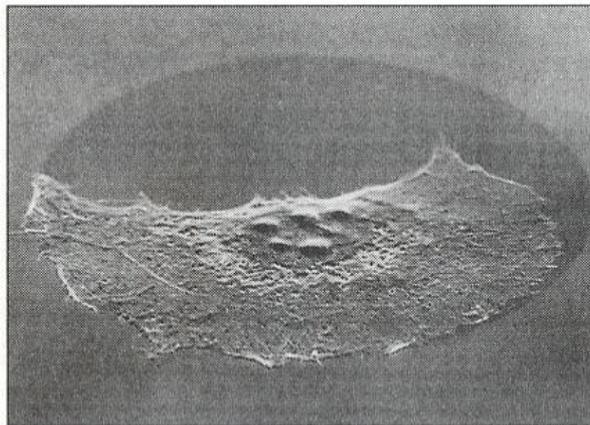
90%

(A)

Возможность вступления в S фазу



(B)



(C)

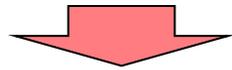
50  $\mu\text{m}$

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

## Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

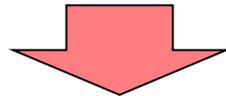
Фибробласты растут на субстрате, покрытом фибронектином (внеклеточный матрикс).

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.

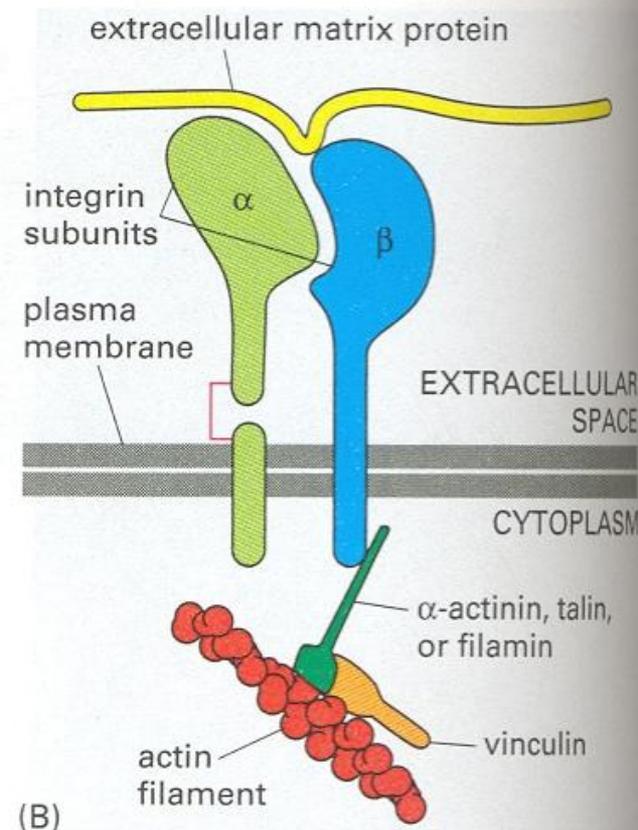
Две киназы продуцируют сигналы о прикреплении



Выживание, рост, деление и перемещение.

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

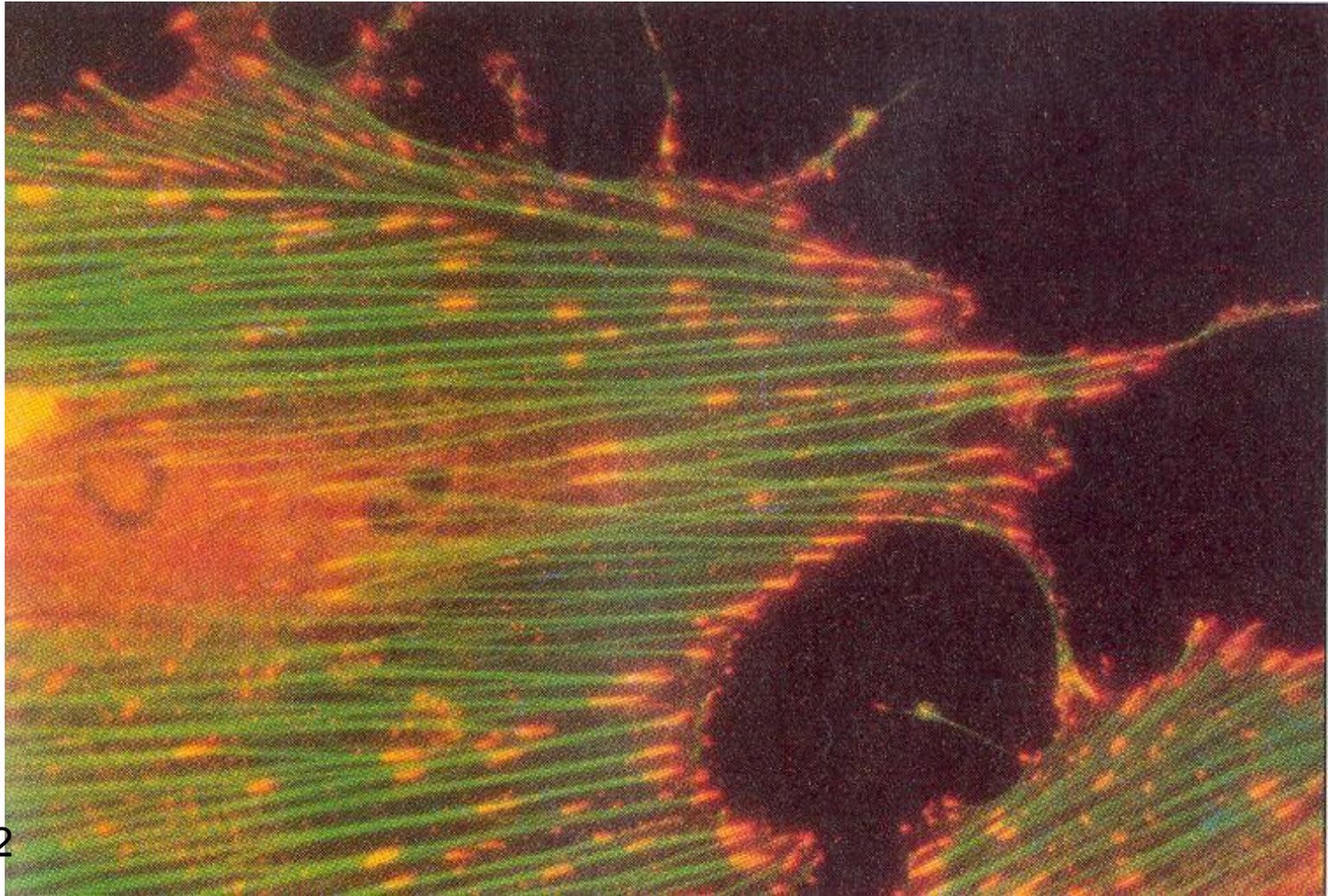
Мыши, дефицитные по FAK, погибают в раннем развитии



# Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

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

Метод FRET



# Цитокиновые рецепторы

Jak-STAT – сигнальный путь:

Интерфероновый рецептор

Janus-киназы – цитоплазматические тирозин-киназы

STAT – signal transducers and activators of transcription

Лиганды:

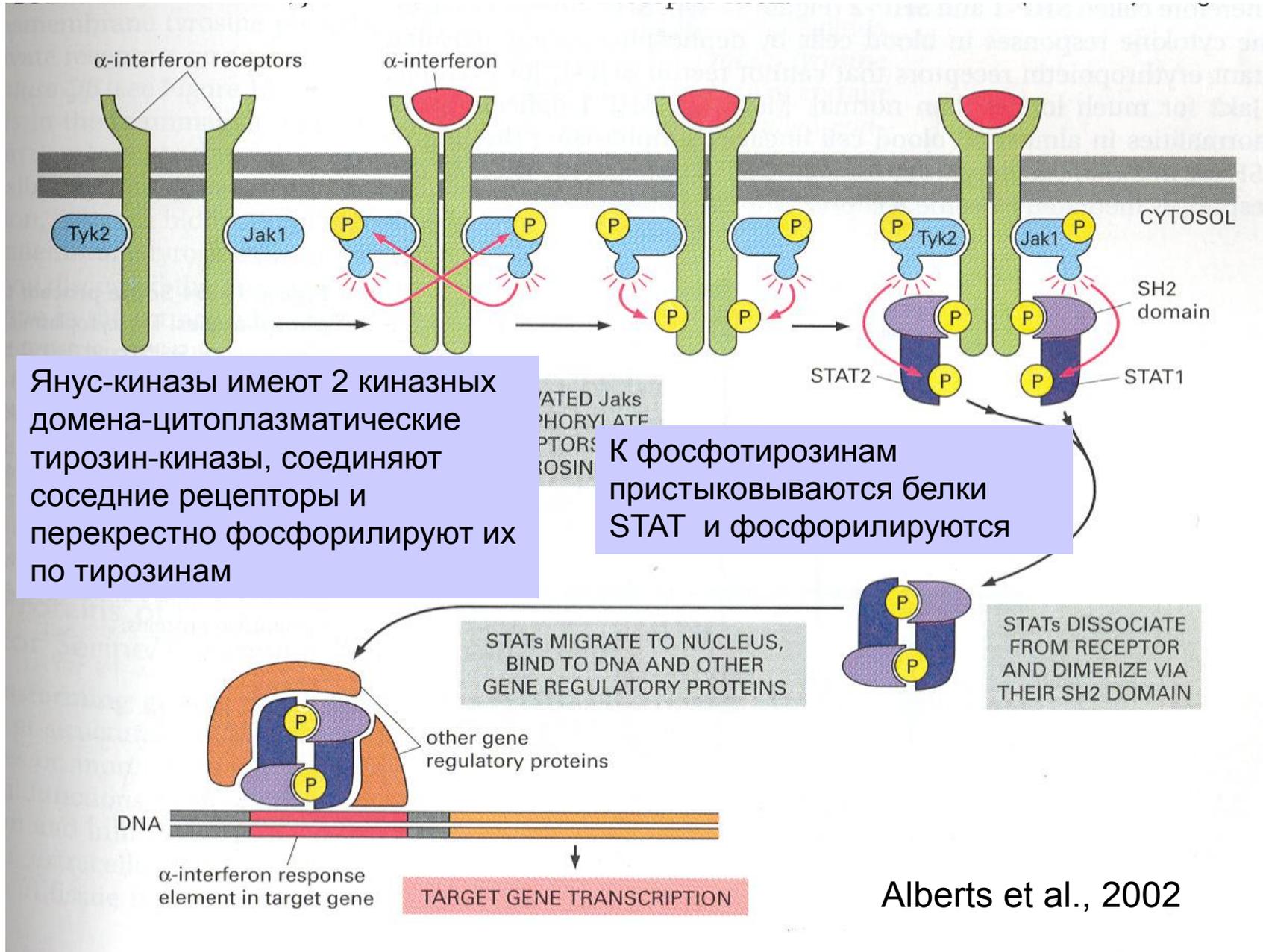
интерфероны  $\alpha$  и  $\gamma$  (активация макрофагов, увеличение устойчивости к вирусной инфекции),

Эритропоэтин (выживание, пролиферация и дифференцировка эритроидного ряда),

гормон роста,

пролактин

# Цитокиновые рецепторы: Jak-STAT – сигнальный путь



Янус-киназы имеют 2 киназных домена-цитоплазматические тирозин-киназы, соединяют соседние рецепторы и перекрестно фосфорилируют их по тирозинам

ACTIVATED JakS PHOSPHORYLATE RECEPTORS TYROSIN

К фосфотирозинам пристыковываются белки STAT и фосфорилируются

STATs MIGRATE TO NUCLEUS, BIND TO DNA AND OTHER GENE REGULATORY PROTEINS

STATs DISSOCIATE FROM RECEPTOR AND DIMERIZE VIA THEIR SH2 DOMAIN

# **Внеклеточные сигналы, ингибирующие рост**

TGF- $\beta$  – большое семейство родственных белков. Растворимые димеры, действуют как гормоны или локальные медиаторы, градуирующие морфогены.

Суперсемейство: TGF- $\beta$ , активины и BMP

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

Градуирующие морфогены в эмбриогенезе

## **Рецепторы TGF- $\beta$ - серин-треонин киназы.**

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

BMP- bone morphogenetic protein из семейства TGF- $\beta$ . 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 $\beta$ (Трансформирующий фактор роста $\beta$ )**

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.

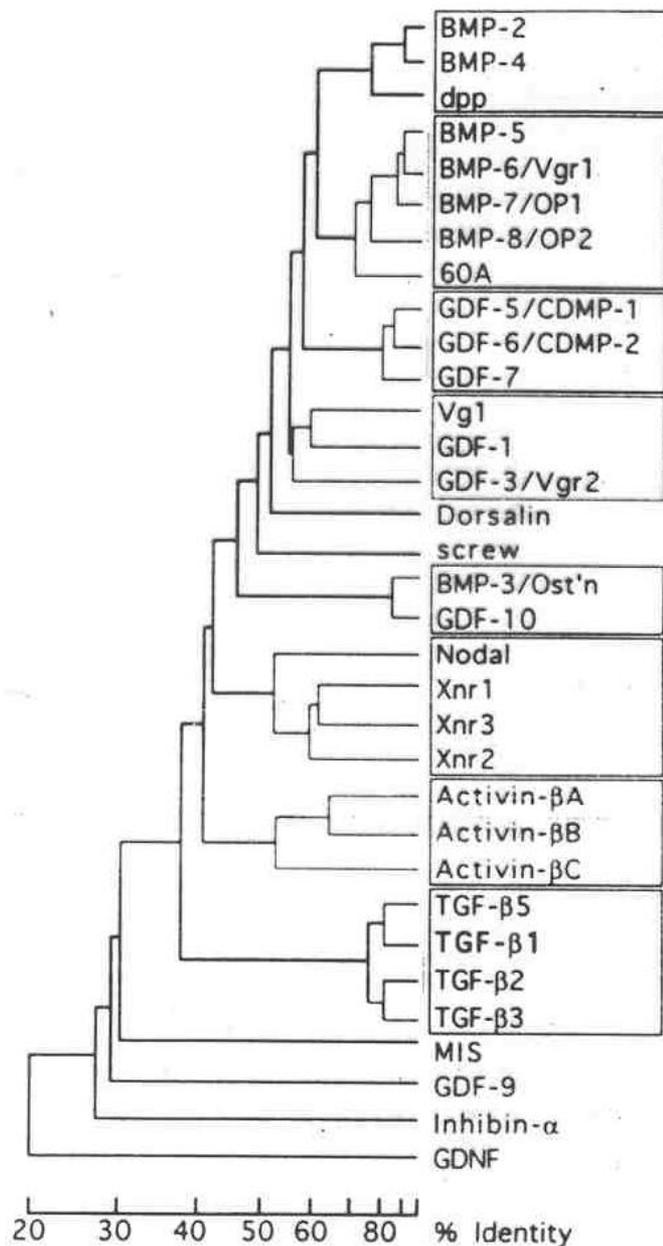
Выполняют функции факторов роста и подавляют рост.

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

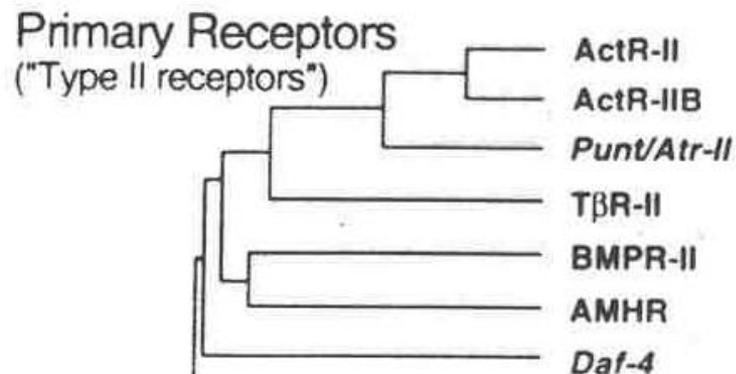
Гомодимеры, масса 25 кДа. Секретируются в виде предшественника и активируются протеолизом

# Семейство белков TGF- $\beta$ :

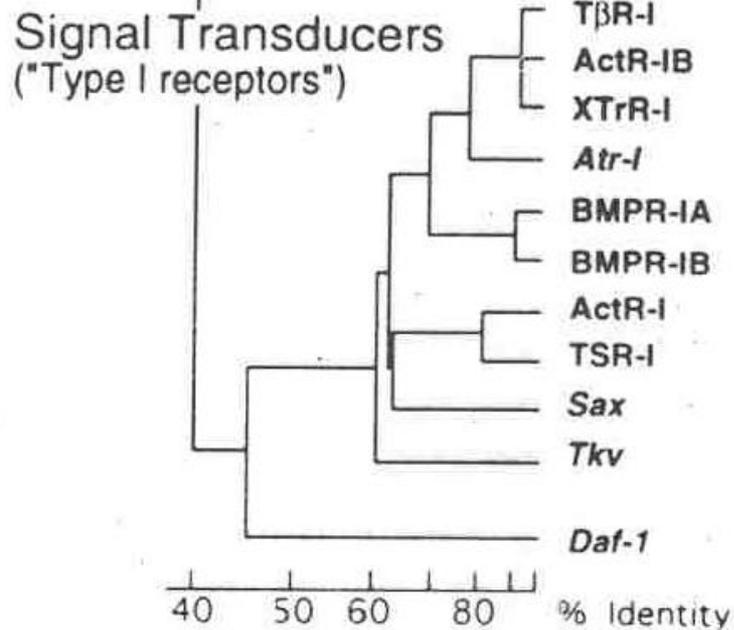


## Рецепторы TGF- $\beta$ :

Тип II



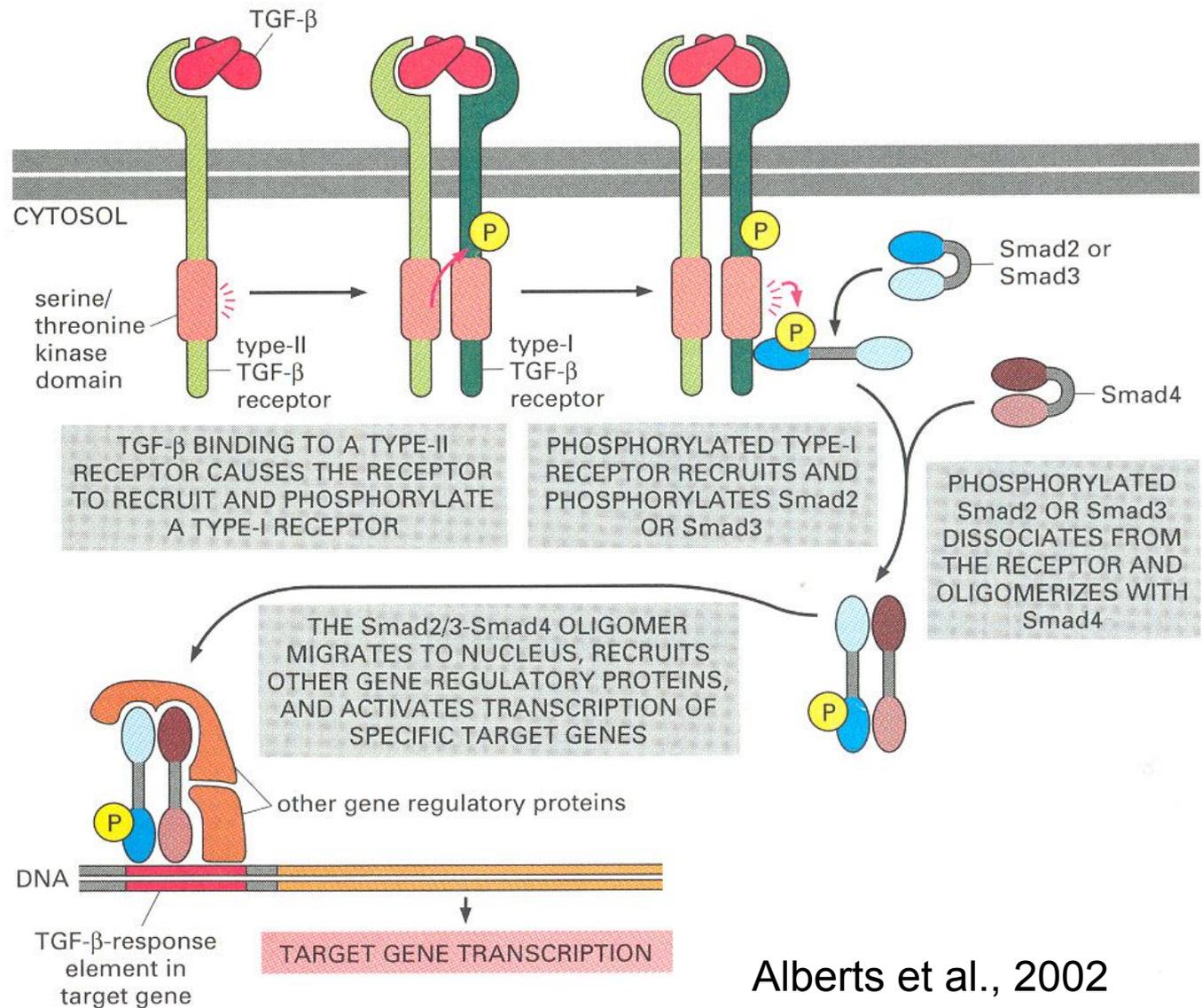
Тип I



# Путь TGF- $\beta$ - Smad

## Рецепторы TGF- $\beta$ - серин-треонин киназы.

Стратегия  
наиболее  
быстрой  
передачи  
сигнала в ядро



# Участники пути TGF- $\beta$ – Smad в онкогенезе

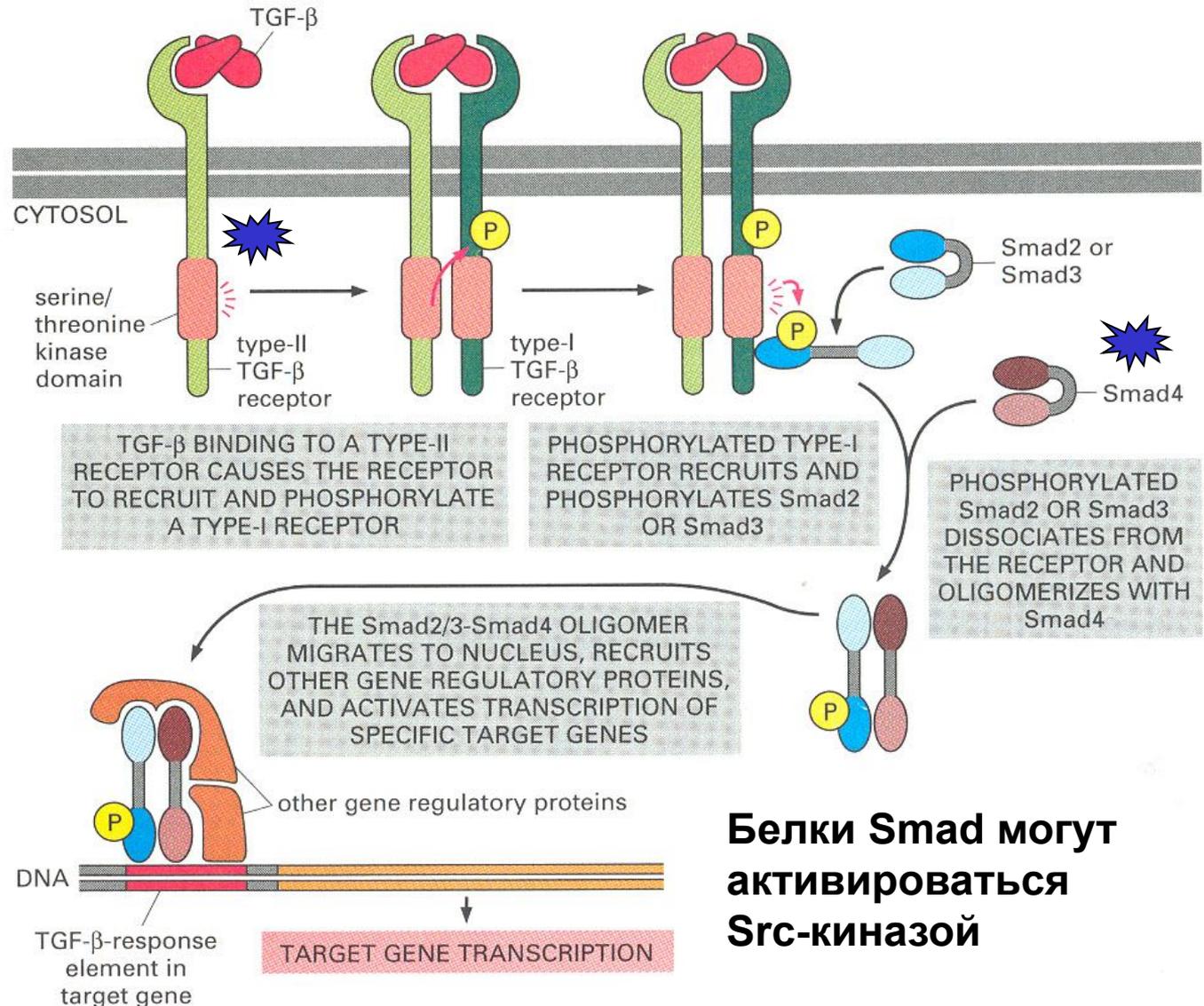
TGF- $\beta$  ингибирует пролиферацию нескольких типов клеток, блокируя клеточный цикл в G1 или стимулируя апоптоз.

Градуирующие морфогены в эмбриогенезе

Туморсупрессор  
Рецептор TGF- $\beta$  II  
(30% при раке прямой кишки)

Туморсупрессор  
Smad4 (рак поджелудочной и др.)

## Рецепторы TGF- $\beta$ - серин-треонин киназы.



**Белки Smad могут активироваться Src-киназой**

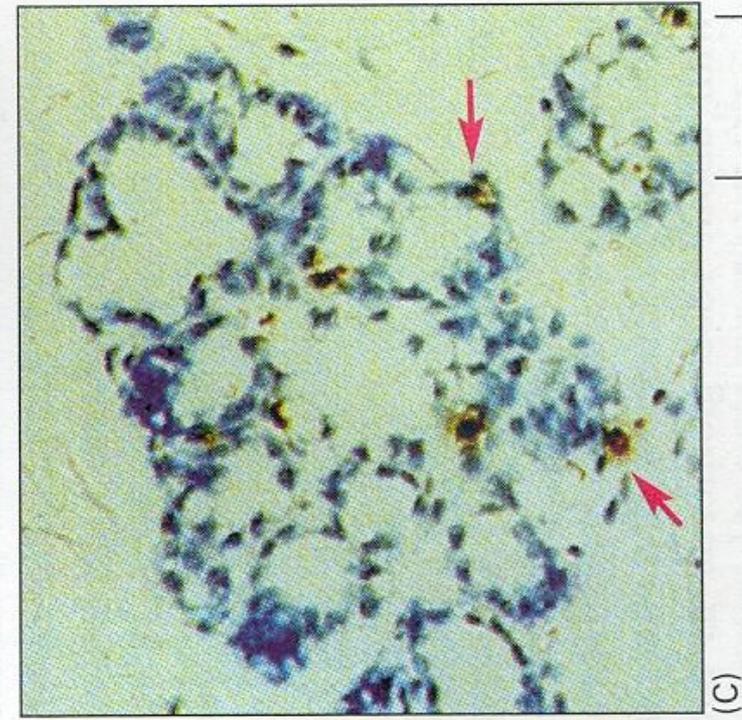
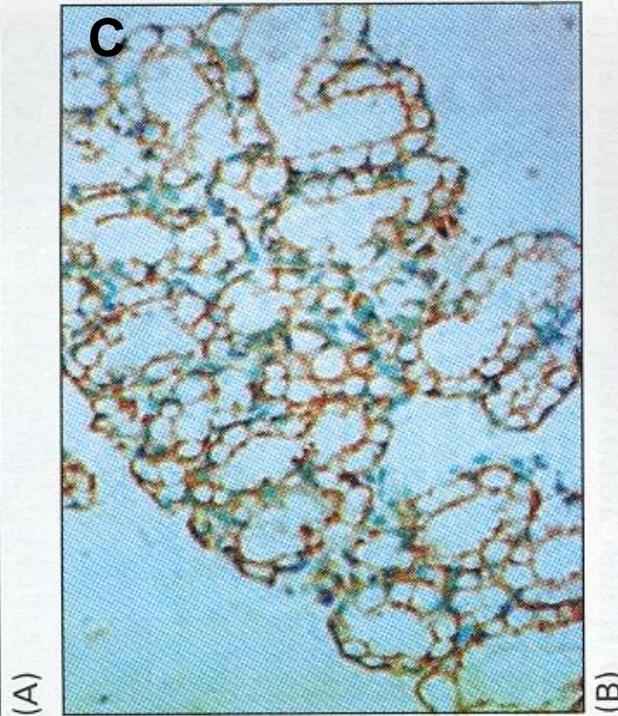
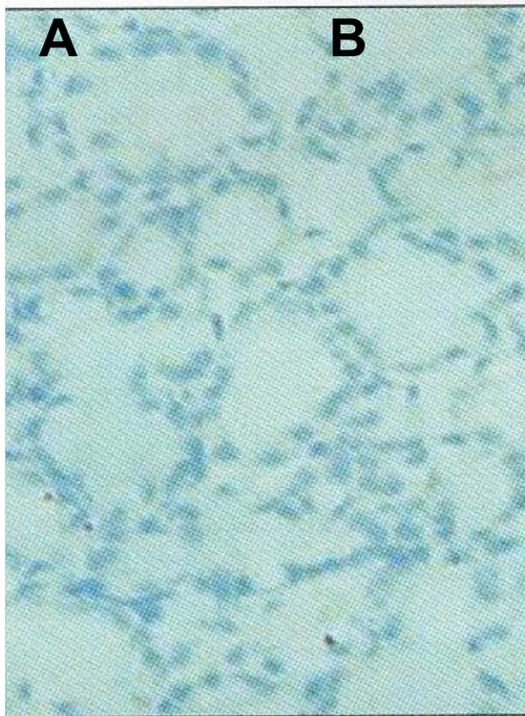
# Семейство $TGF\beta$ : BMP- bone morphogenetic protein

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



# Семейство белков TGF- $\beta$

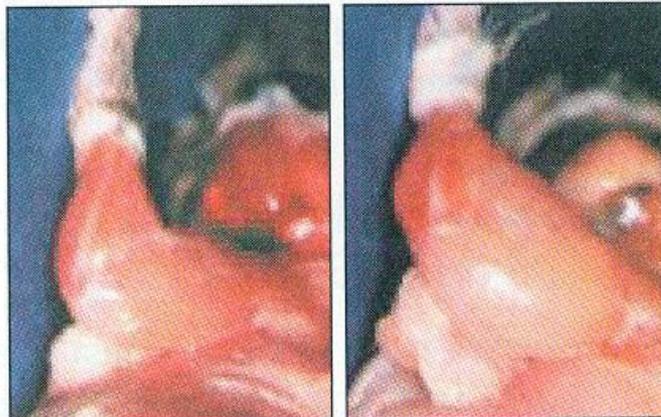
Myostatin– ингибирует пролиферацию миобластов.

wild-type  
mouse

myostatin  
mutant



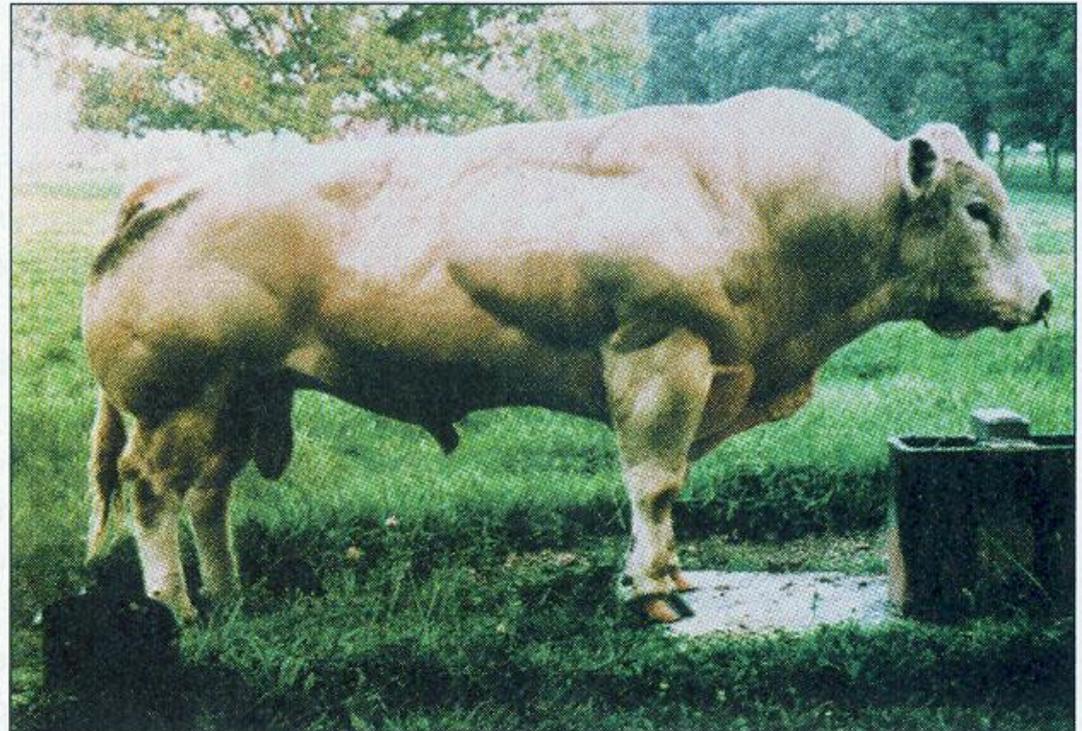
(A)



(B)

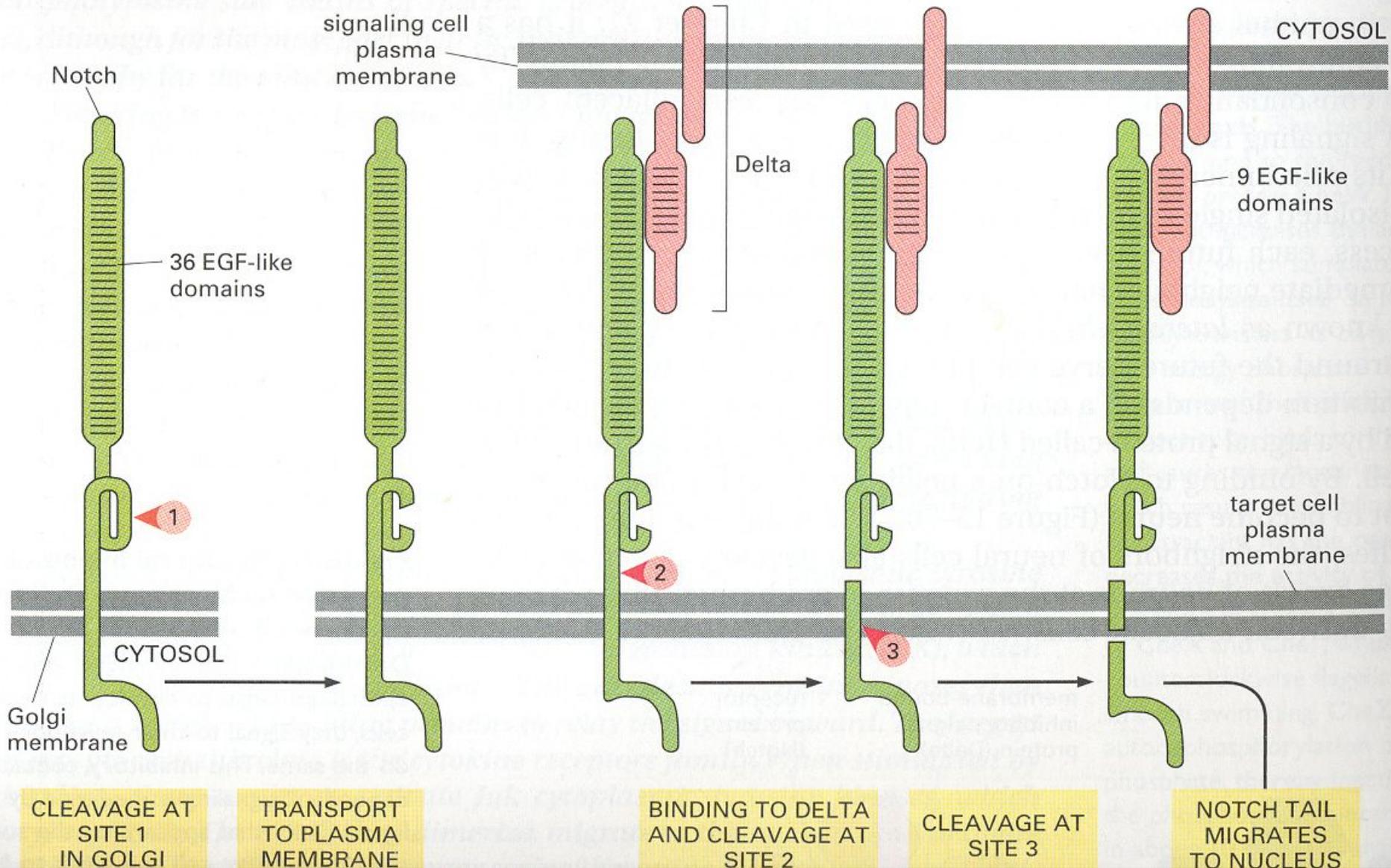
(C)

Alberts et al., 2002

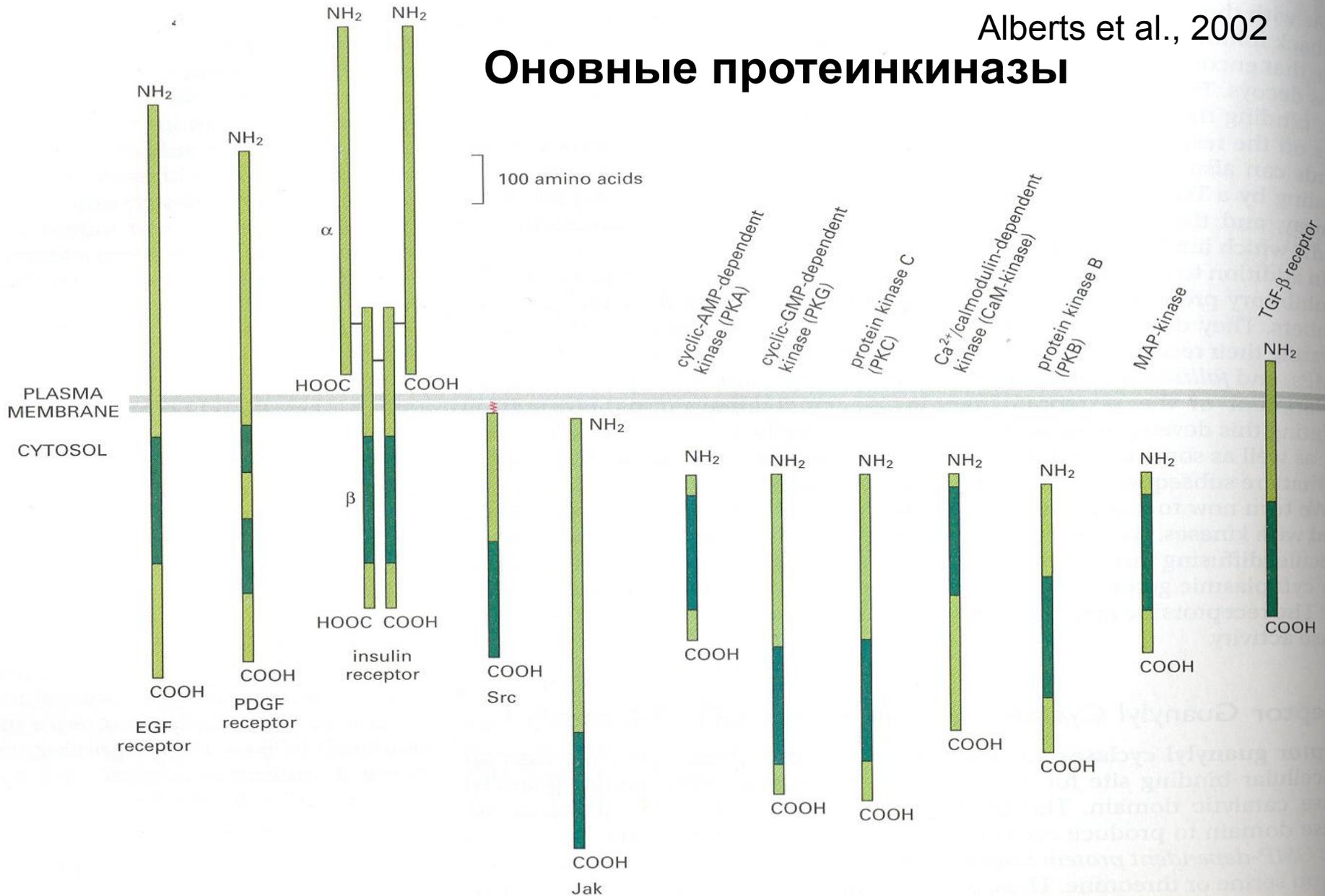


# Сигнальный путь Delta – Notch – путь дифференцировки

Alberts et al., 2002



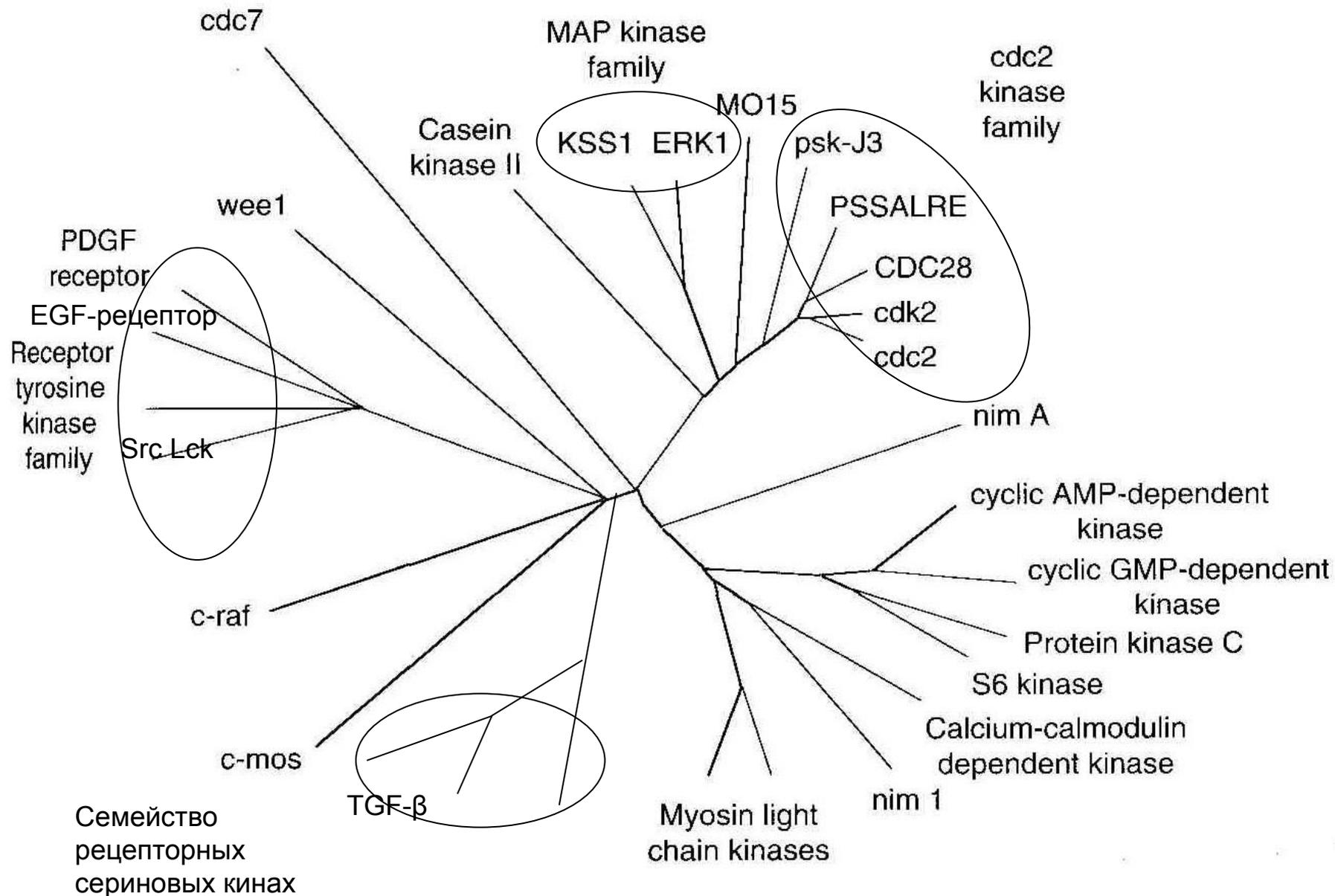
# Основные протеинкиназы



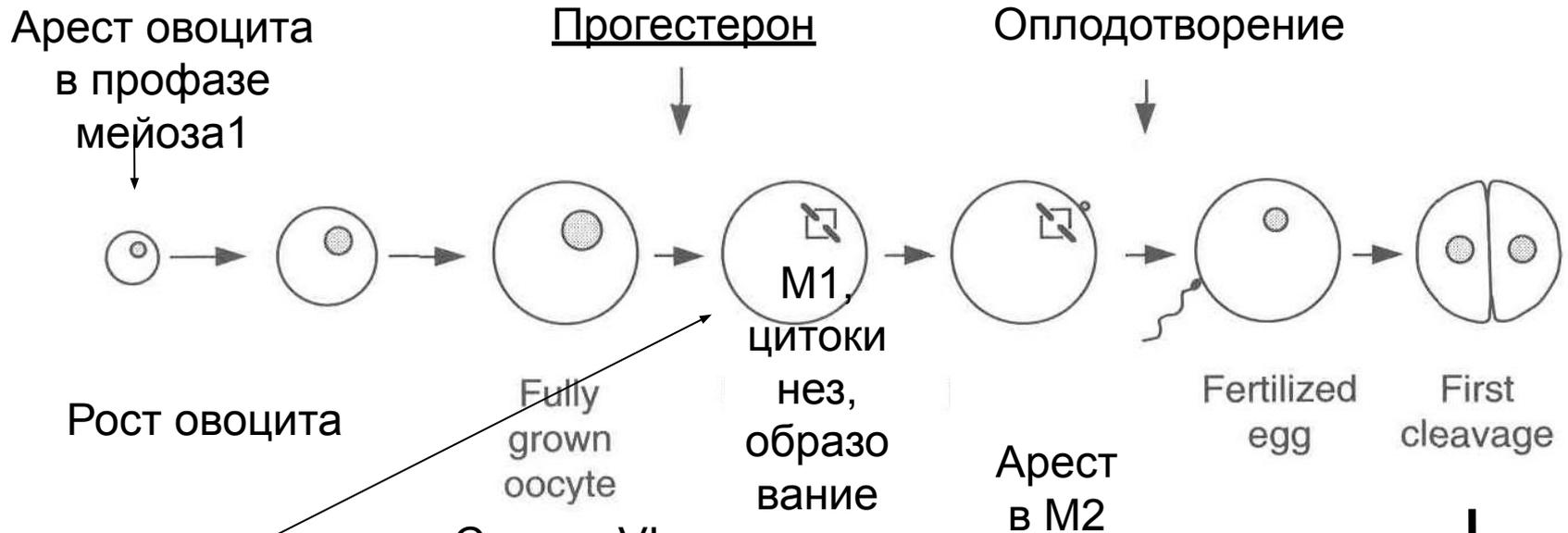
Тирозин протеинкиназы

Серин-треонин протеинкиназы

# Эволюционное древо некоторых протеин киназ



# Овогенез, мейоз и оплодотворение у лягушки



Созревание:  
 Конверсия  
 пре MPF  
 в активный MPF,  
 GVBD-germinal  
 vesicle breakdown,  
 Завершение мейоза 1,  
 выброс первого  
 полярного тельца

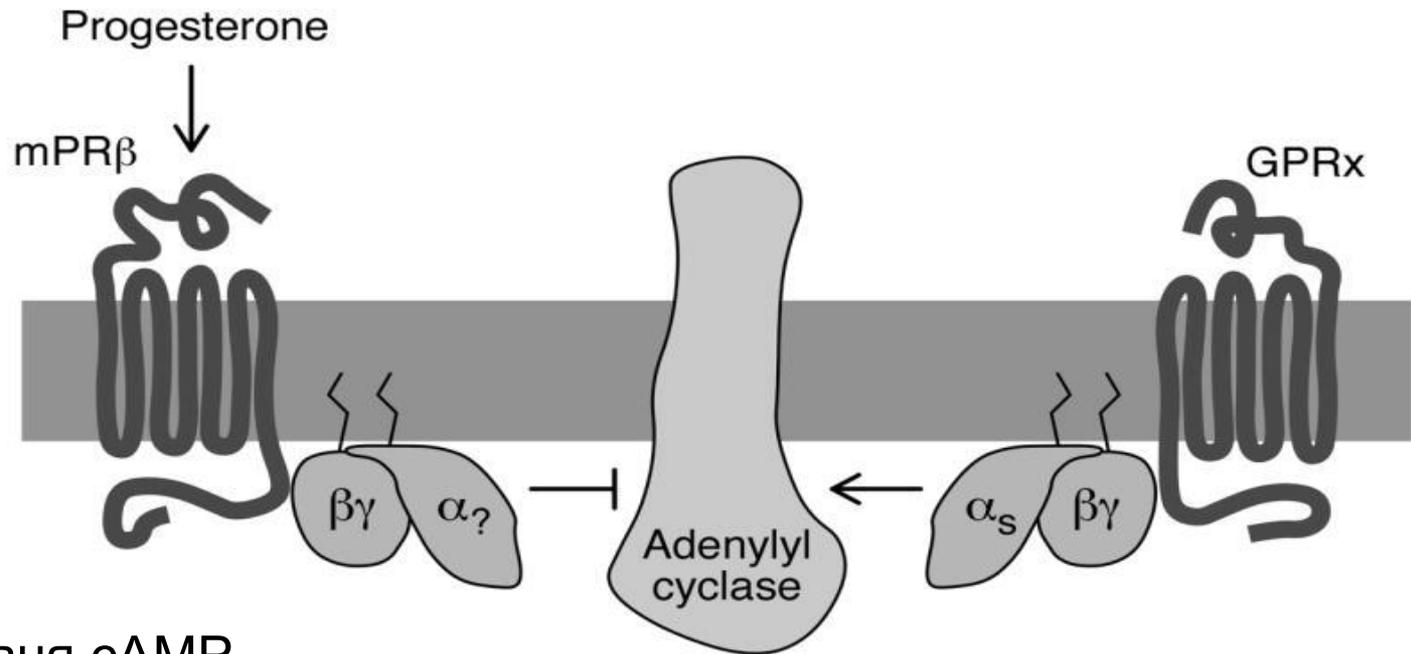
Созревание  
 Транскрипция  
 подавлена,  
 трансляция

Далее 11  
 синхронных  
 делений  
 дробления  
 Рост  
 отсутствует

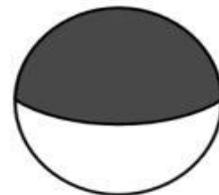
## Созревание ооцита

- 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.

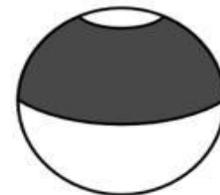
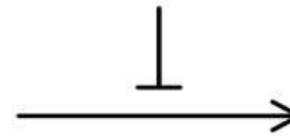
- Роль GPRx (G-protein coupled receptors) в поддержании мейотического ареста



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



G2 arrest



M<sub>II</sub> arrest

