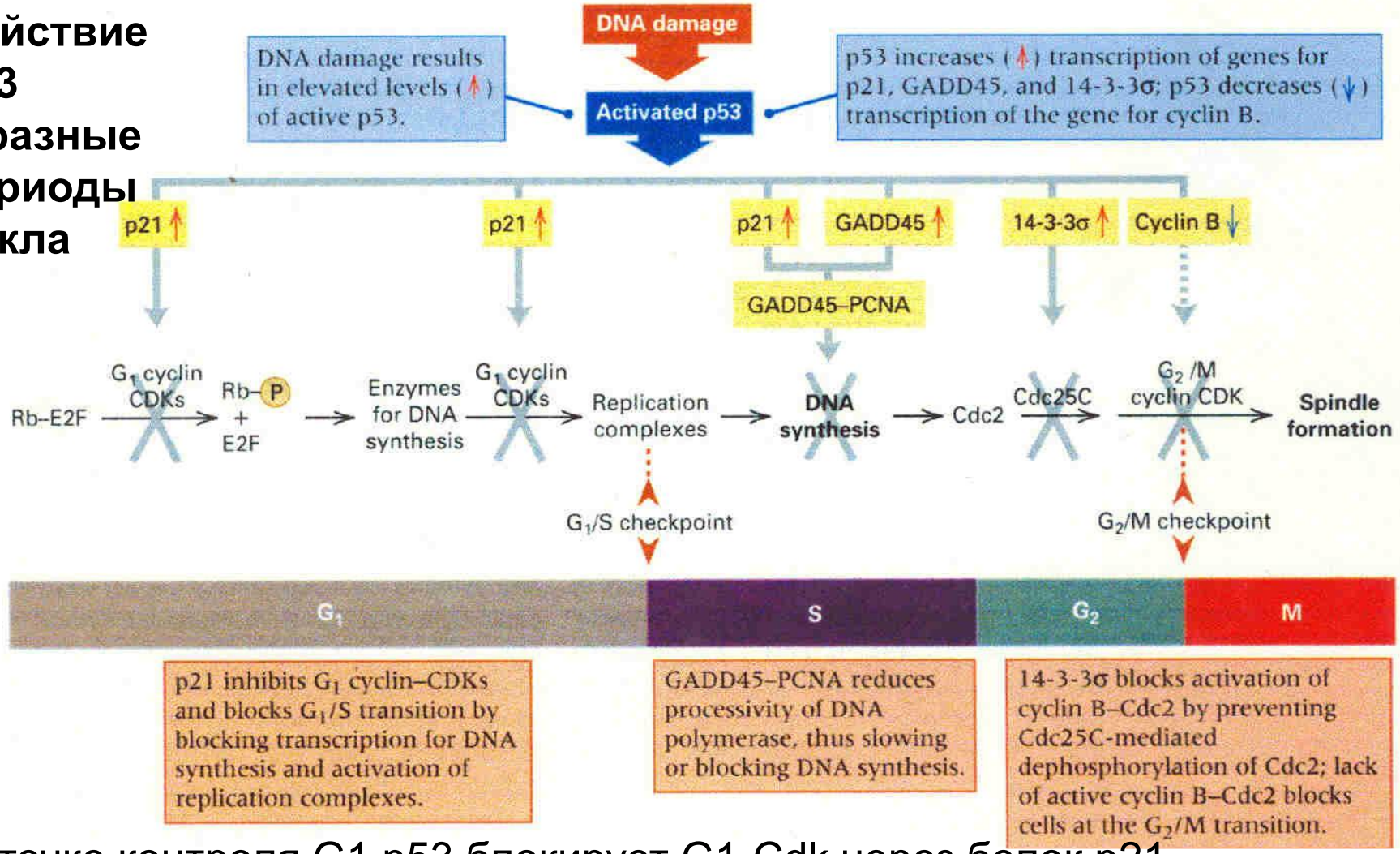
Генетика клеточного цикла

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

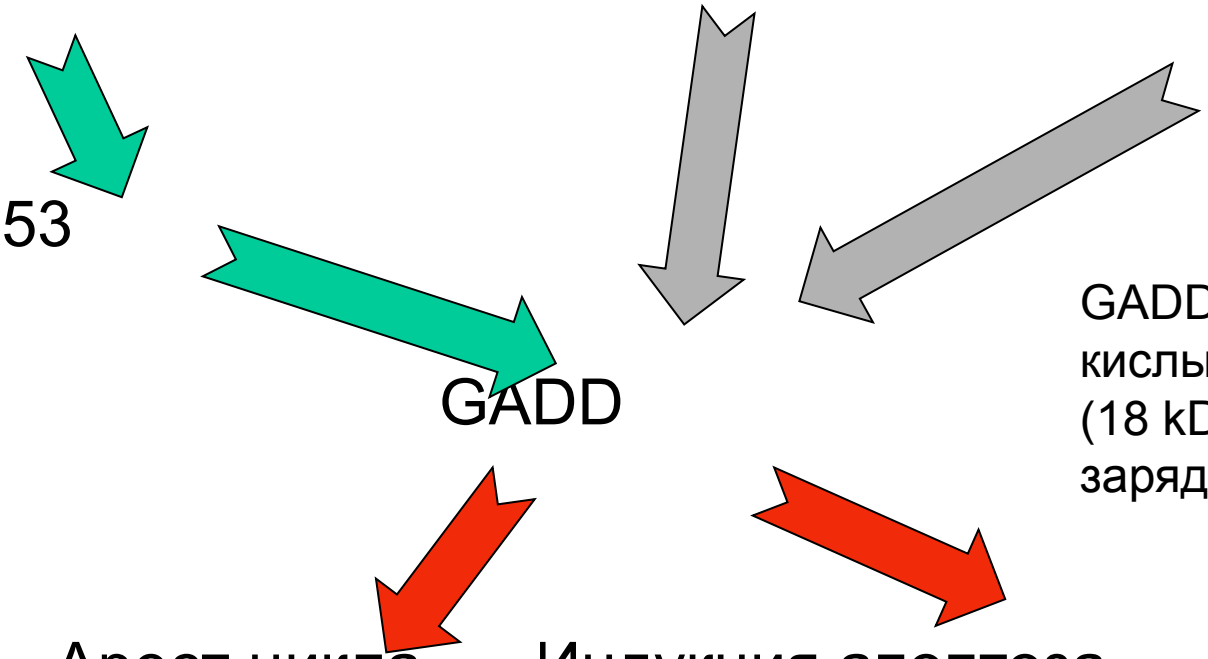
Сенсоры стресса Growth Arrest DNA Damage (GADD 45) у млекопитающих

Белки GADD в ответе клетки на генотоксический стресс

IR ионизирующая радиация

UV

(MMS) метилметан сульфонат



GADD 45-α,ß,γ- очень кислые маленькие белки (18 kDa) с отрицательным зарядом -9 ... -12

Арест цикла

Индукция апоптоза

TGFß- 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:

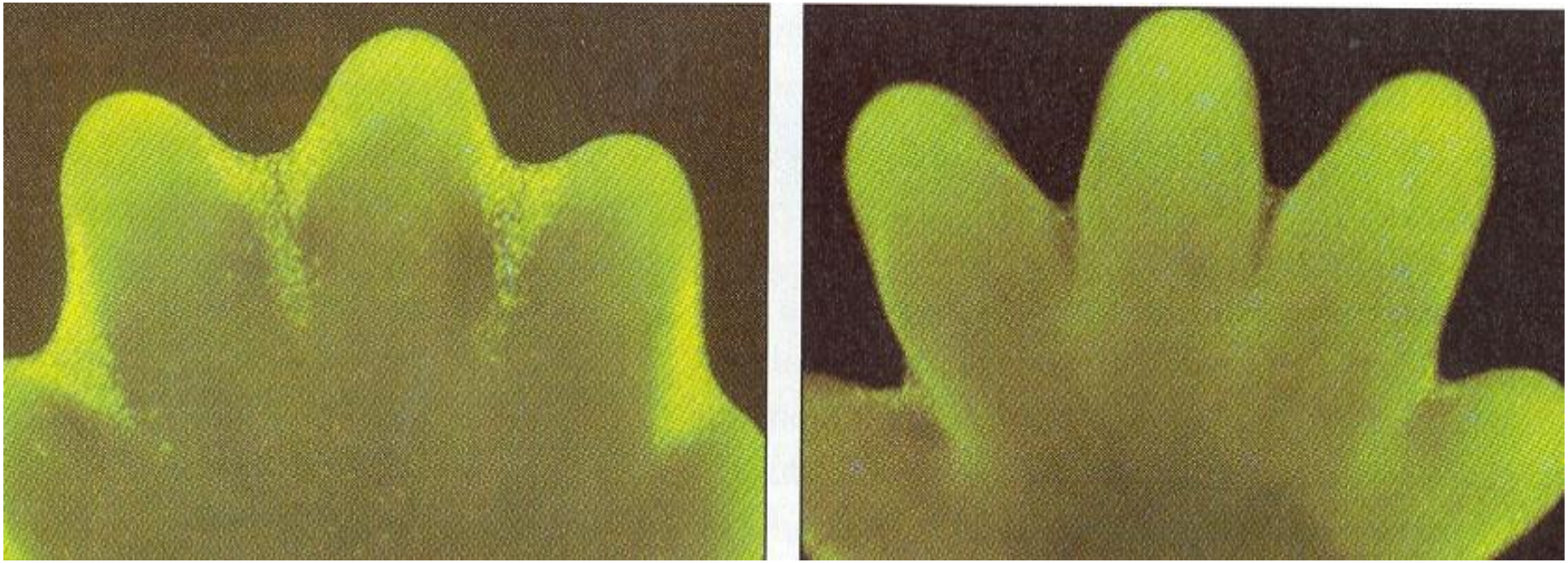
-Эмбриогенез и дифференцировка

-Физиологическое обновление клеток

-Атрофия, вызванная действием факторов некроза опухолей

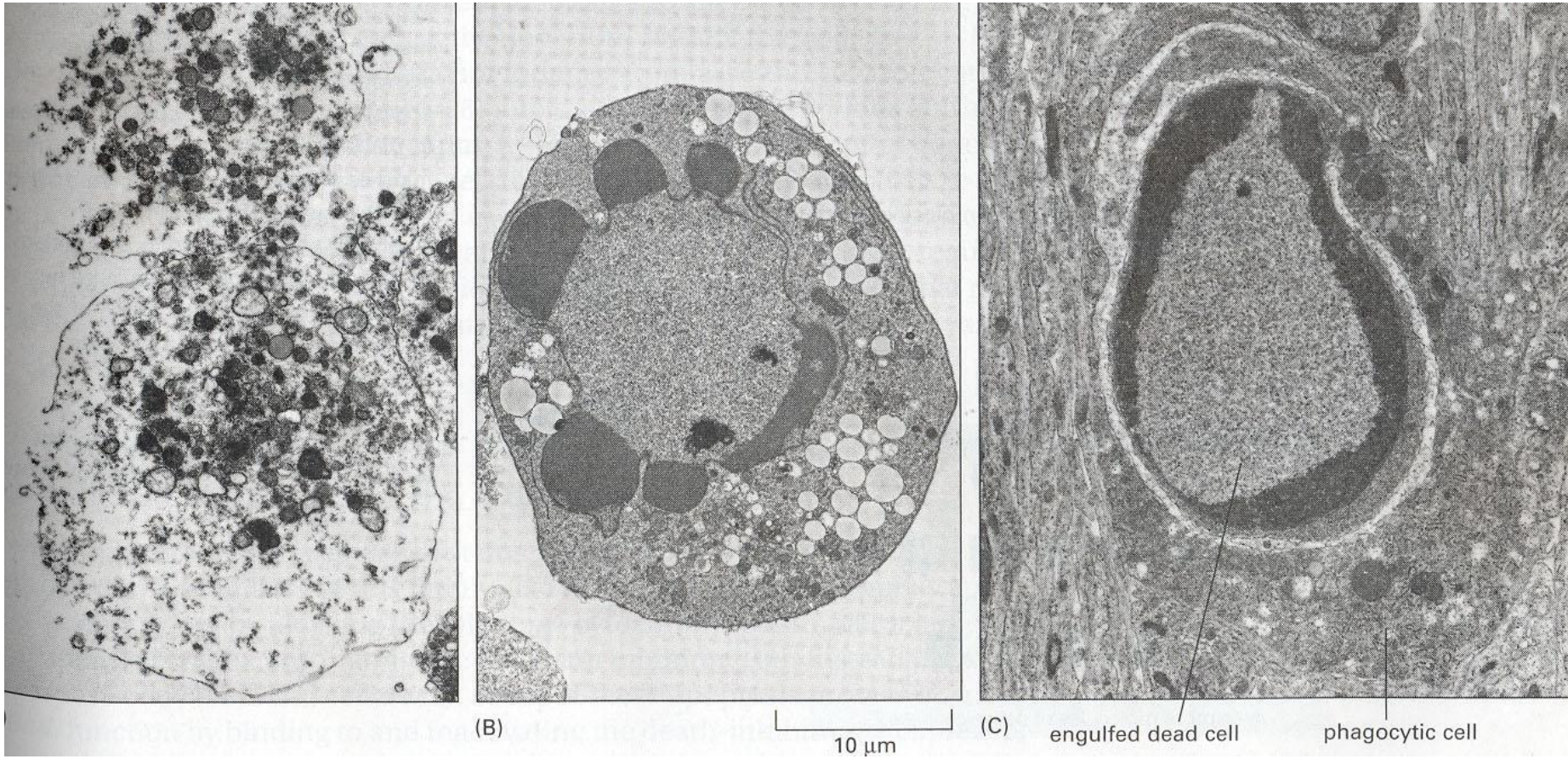
-Вирусные заболевания (СПИД)

-Нейродегенеративные заболевания (б. Альцгеймера, б. Гатчинсона)



Лапа эмбриона мыши с интервалом в сутки, окраска на апоптоз

Варианты гибели клеток



Некроз клетки в клеточной культуре

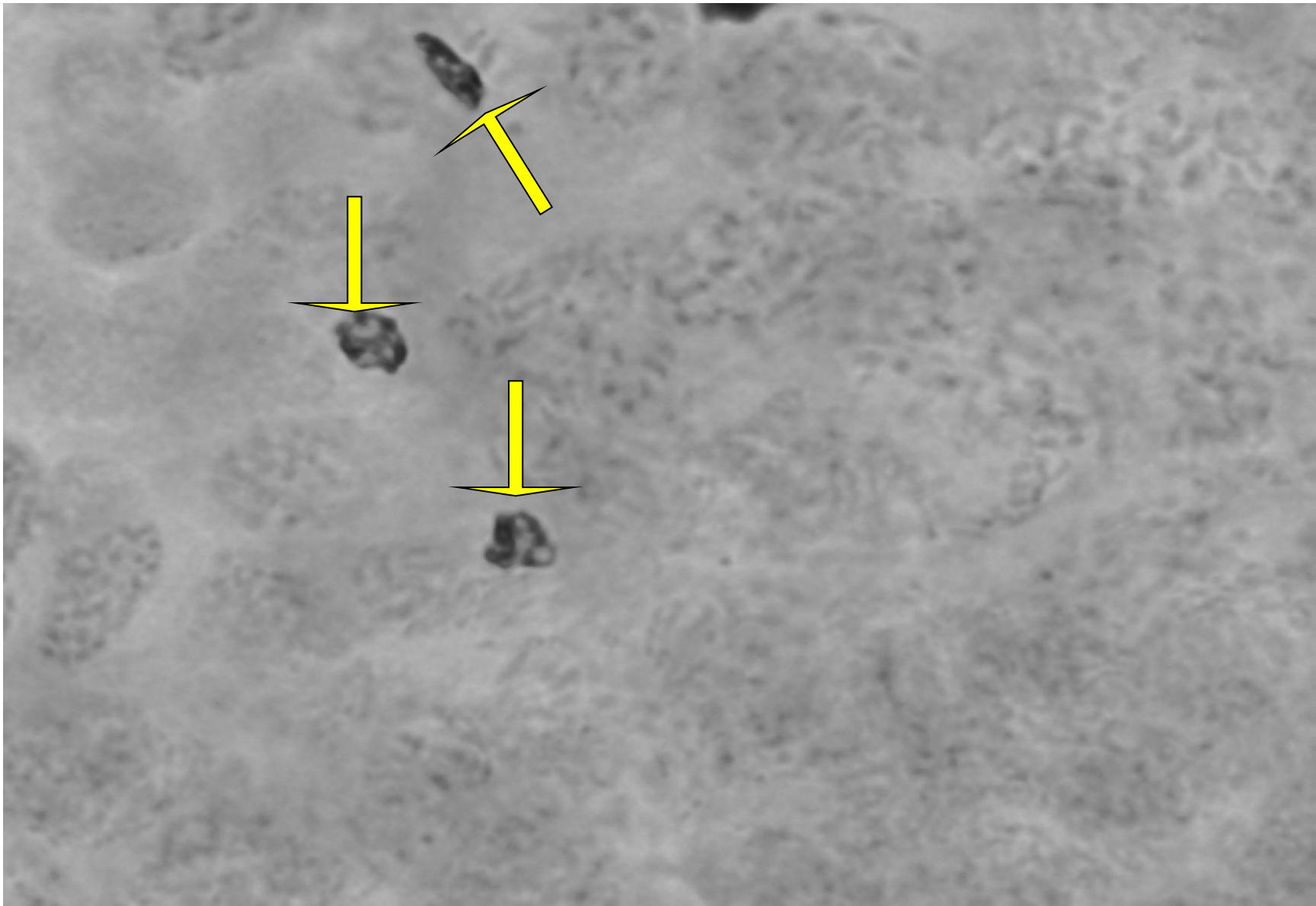
Гибель клетки апоптозом в клеточной культуре

Фагоцитоз клетки, гибнущей апоптозом

Апоптоз в трофоцитах
бабочки

Апоптоз в трофоцитах
перепончатокрылого

Апоптоз в сперматоцитах жука, вероятно, вызванный активацией точки контроля

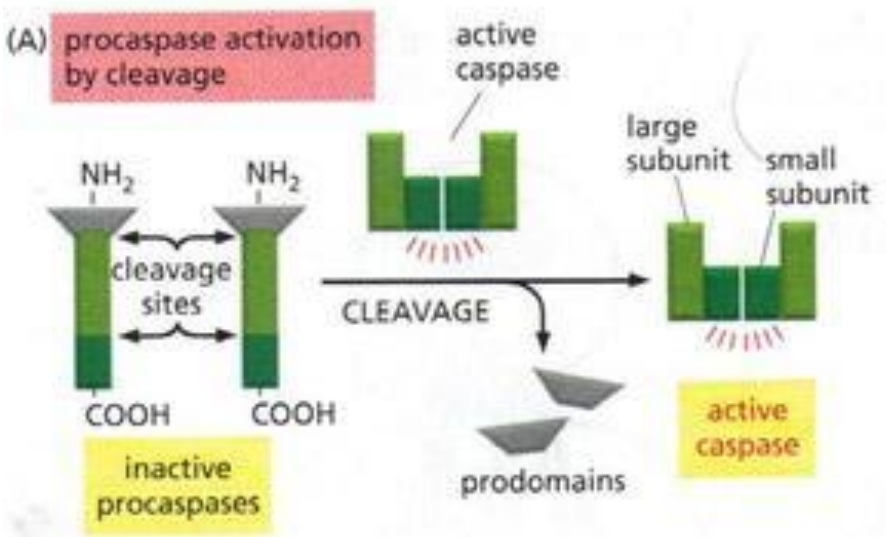


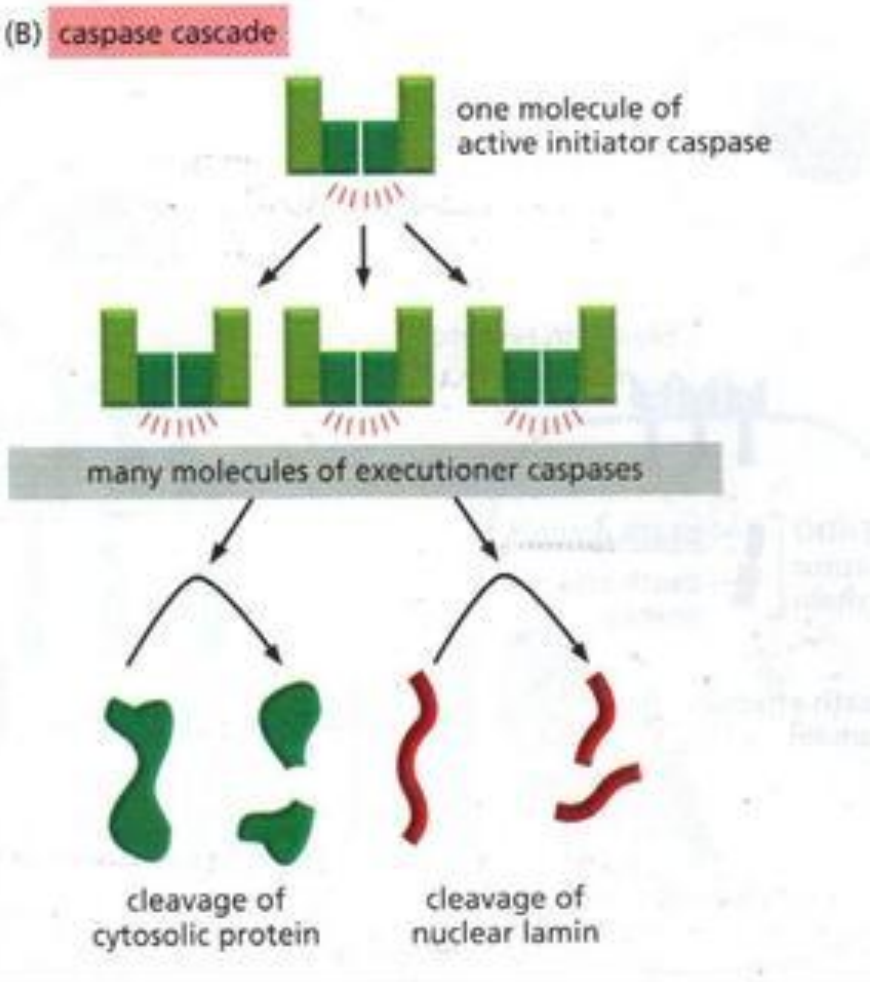
Апоптоз,
морфологические изменения:

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

Молекулярные изменения:

- Возрастает концентрация Ca2+
- 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,



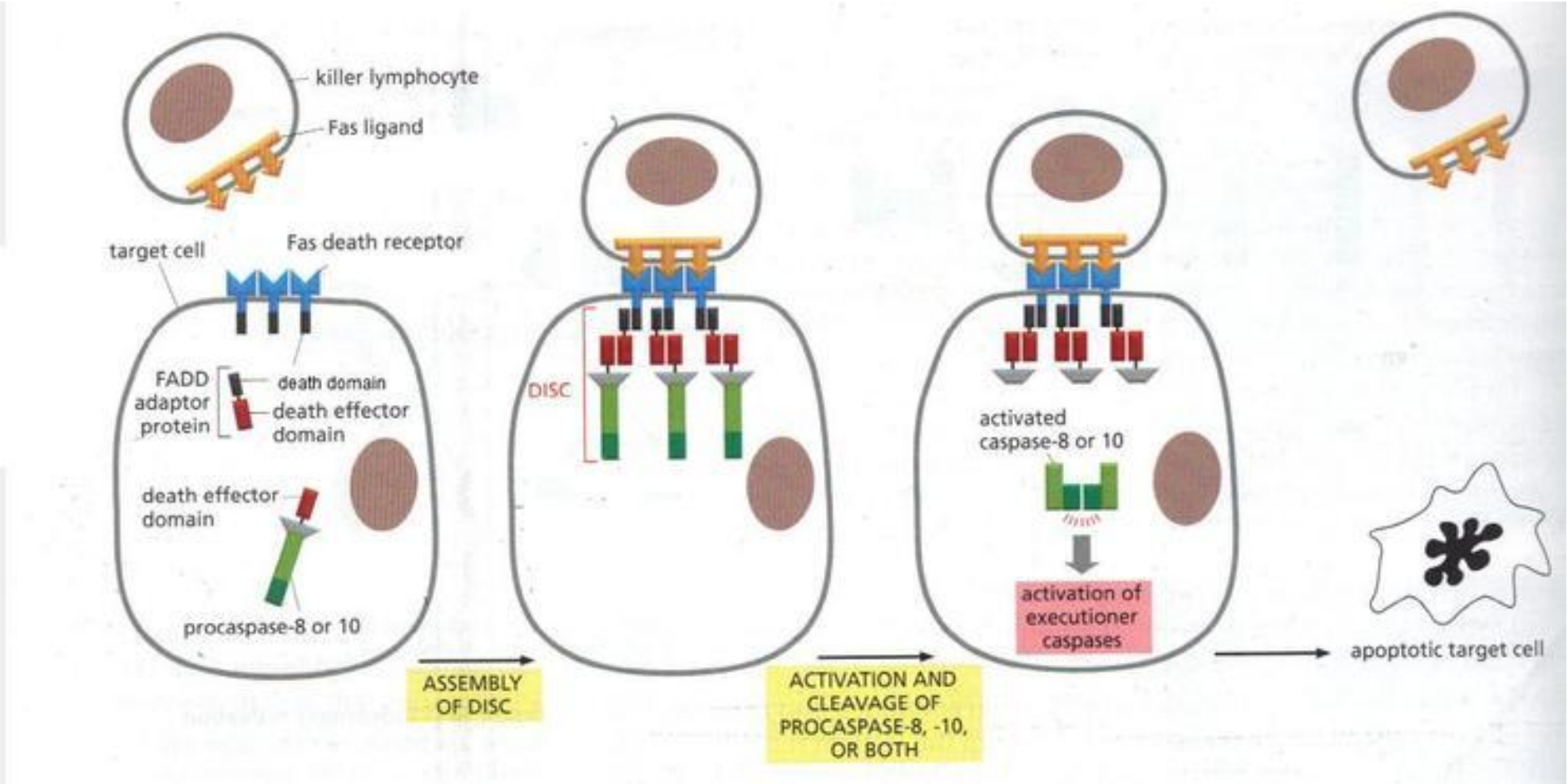


Каспазы - протеазы, имеющие цистеин в активном сайте
и разрезающие белки-мишени по аспарагиновой кислоте – caspases

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

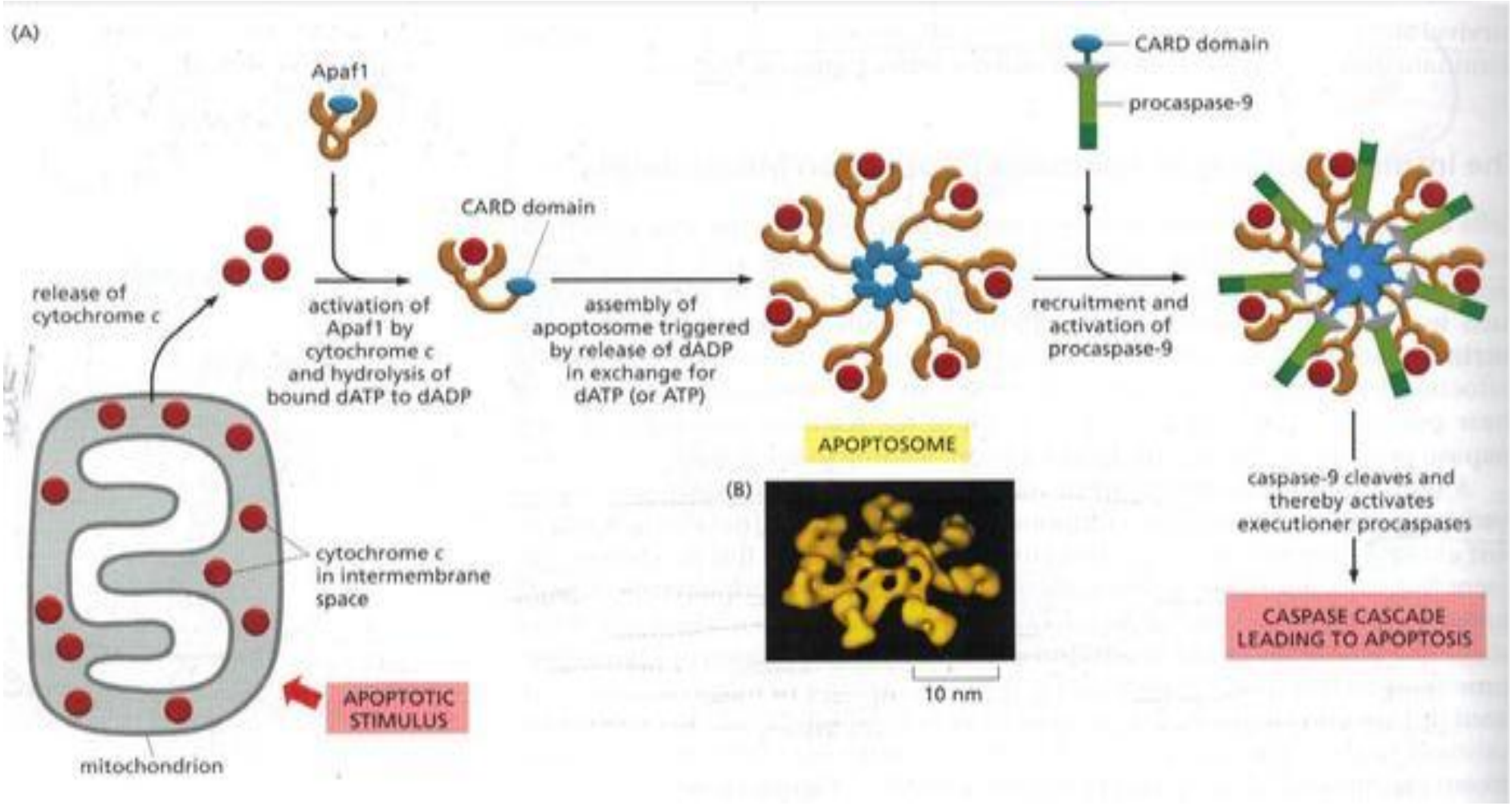
Активируются другими каспазами разрезанием по аспарагиновой кислоте. Амплификация протеолитического каскада.

Активация апоптоза с внешней стороны через Fas-путь



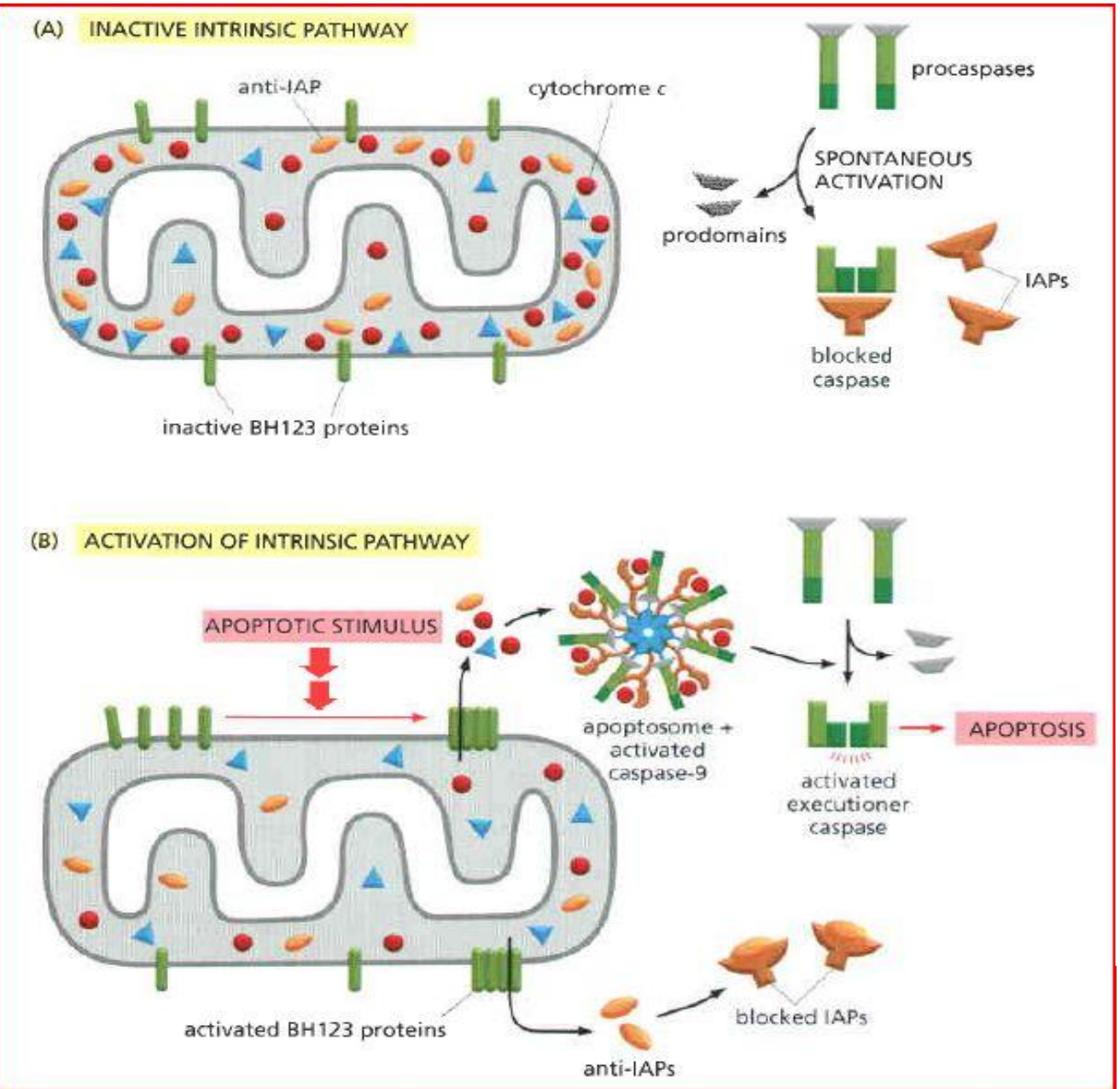
Fas-путь.
Лимфоцит-киллер активирует death –рецепторы на поверхности клетки: Fas кластеризуются, к ним присоединяются адапторные белки и прокаспазы. Взаимная активация и каскад.
Некоторые стрессированные или поврежденные клетки убивают себя сами, продуцируя и Fas-лиганд, и Fas-рецептор.

Активация апоптоза изнутри клетки



Апоптосома (700 кДа):

Активация апоптоза изнутри клетки



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

Митогены (более 50 белков)

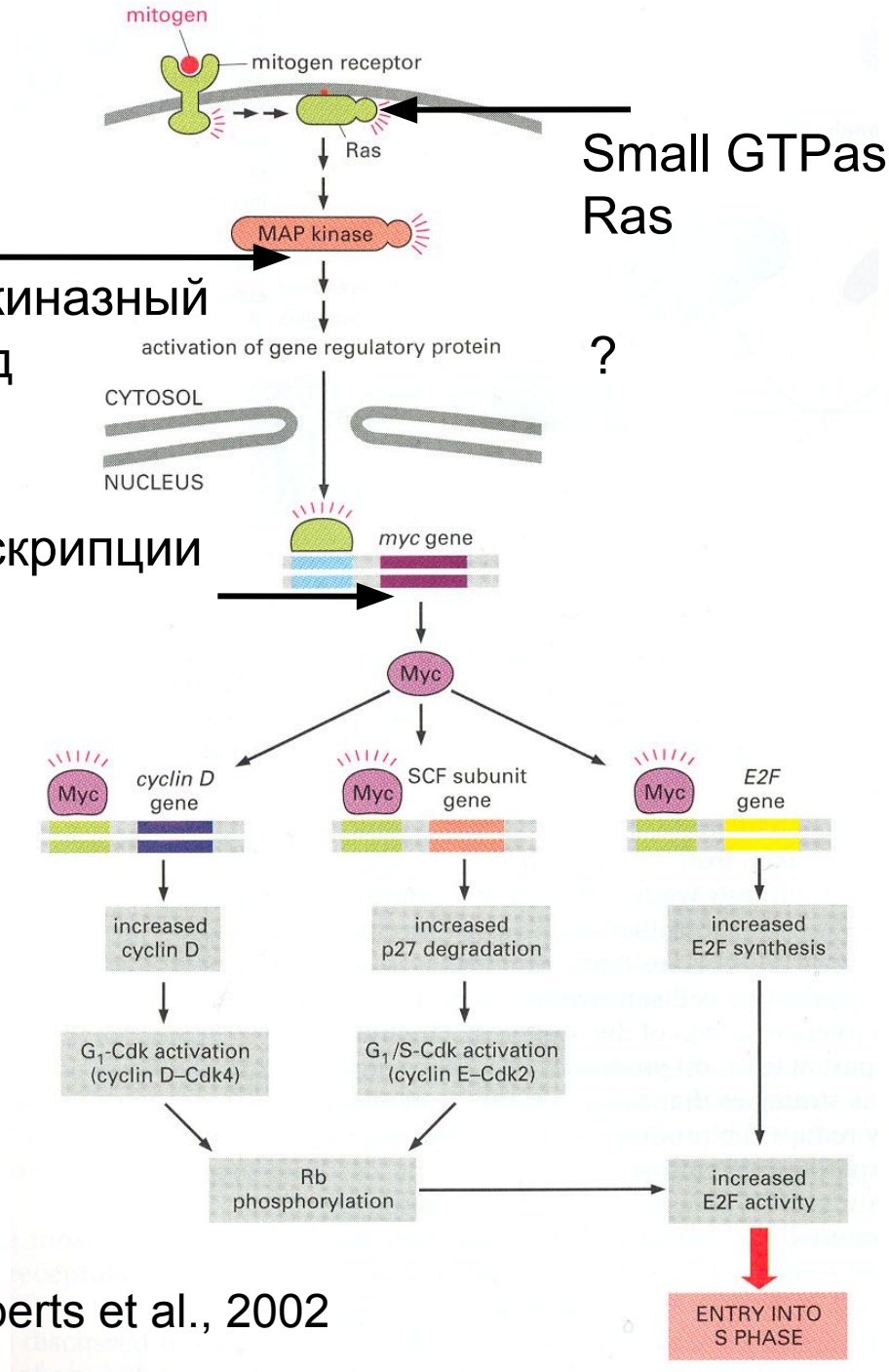
Фактор роста тромбоцитов PDGF –platelet-derived grows factor
Клетки фибробластов в культуре делились с добавлением сыворотки крови и не делились в плазме.
Плазма – забирают жидкую часть крови без образования сгустка.
Сыворотка – то же после образования сгустка.
Клетки делились при добавлении экстракта 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



Small GTPasa Ras

MAP-киназный каскад

?

Активация транскрипции гена *myc*

Активация транскрипции генов, связанных с выходом из G0

Многие компоненты внутриклеточных сигнальных путей оказываются онкогенами

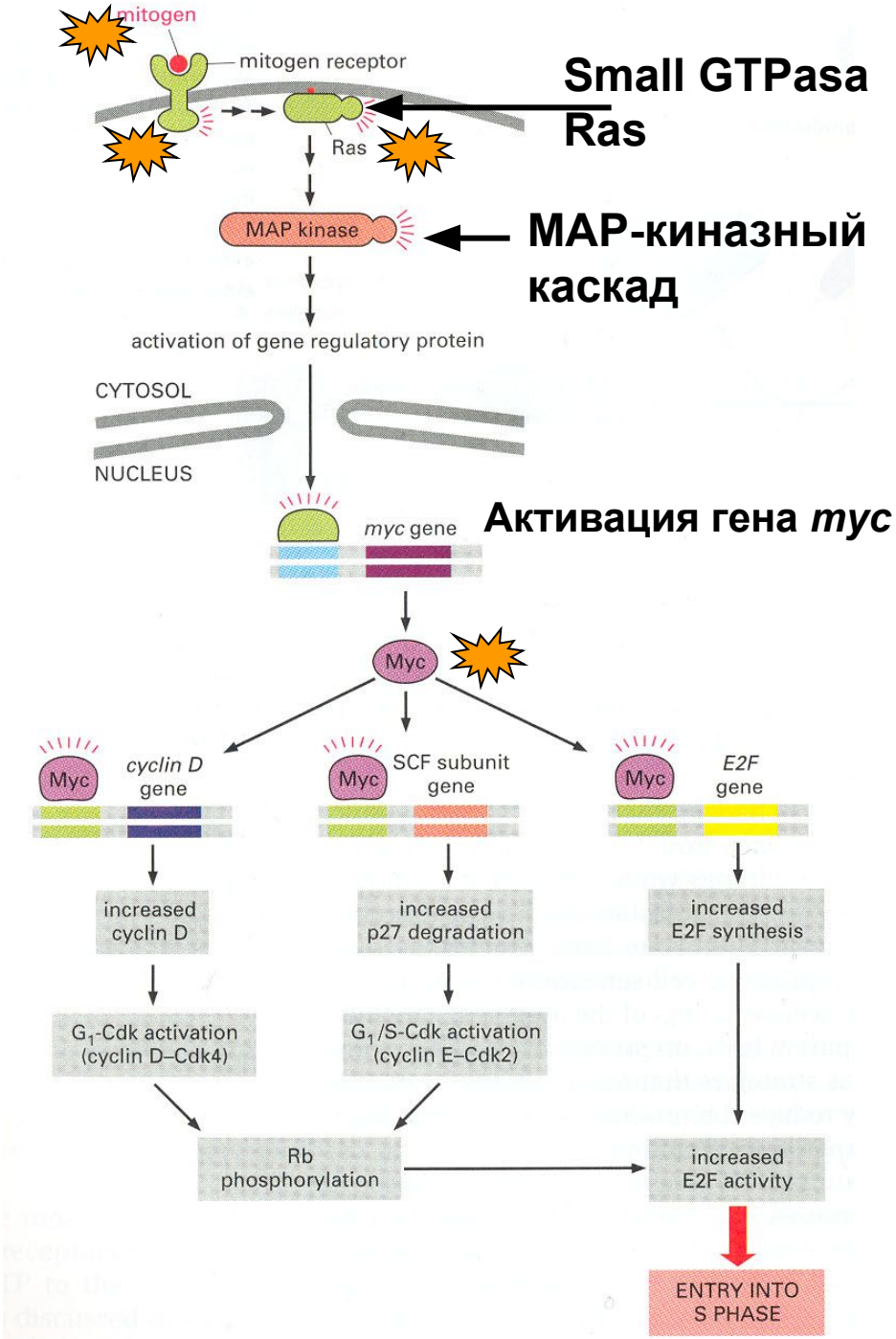
Alberts et al., 2002

Участники сигнального пути Ras и myc в онкогенезе

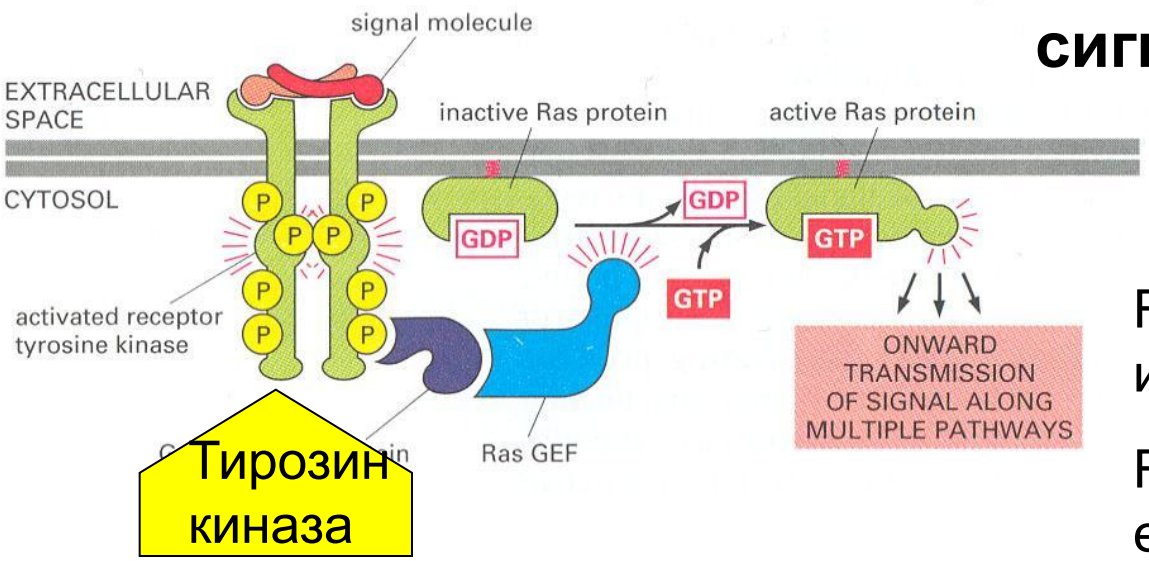
Гиперактивный Ras- продукт мутантного гена *ras* часто вызывает рак (рак толстой кишки, мочевого пузыря, поджелудочной железы, лёгкого -30% всех случаев)

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

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



Стимуляция митогеном сигнального пути Ras

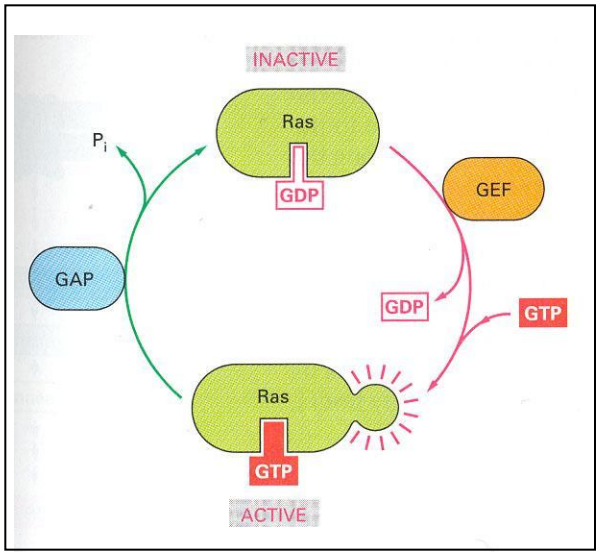


Ras- мономерная GTF-аза, имеет пренильную группу.

Ras-GEF- guanine nucleotide exchange factors

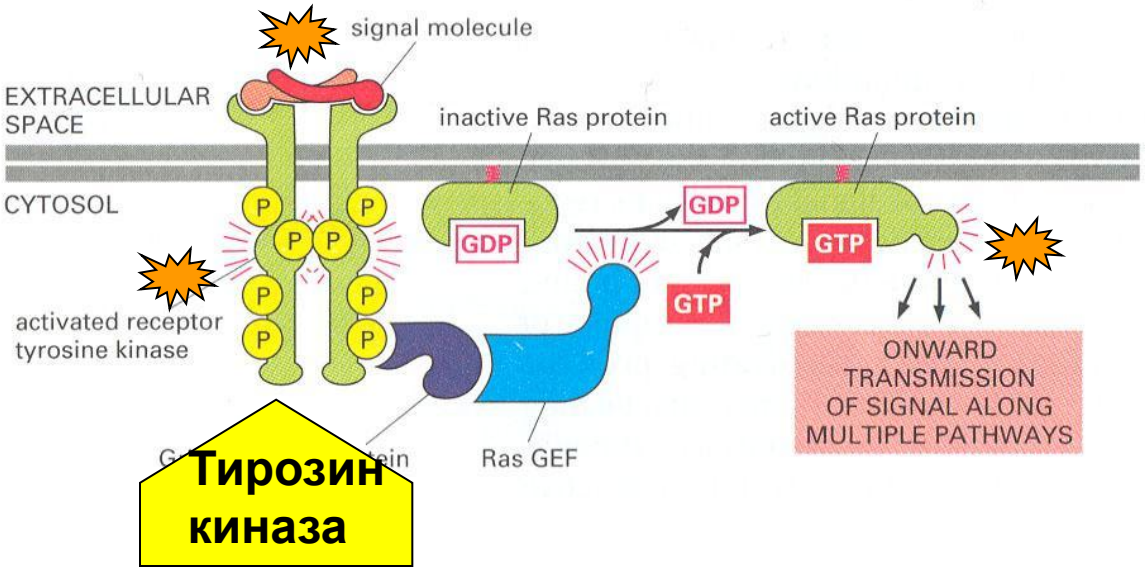
Протоонкогены – гены, в норме стимулирующие деление клетка. Мутация с приобретением функции (доминантная) превращает его в онкоген.

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



Alberts et al., 2002

Участники сигнального пути Ras и myc в онкогенезе



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

Рецептор фактора роста эпидермиса (глиобластома, вирус эритробластоза птиц)

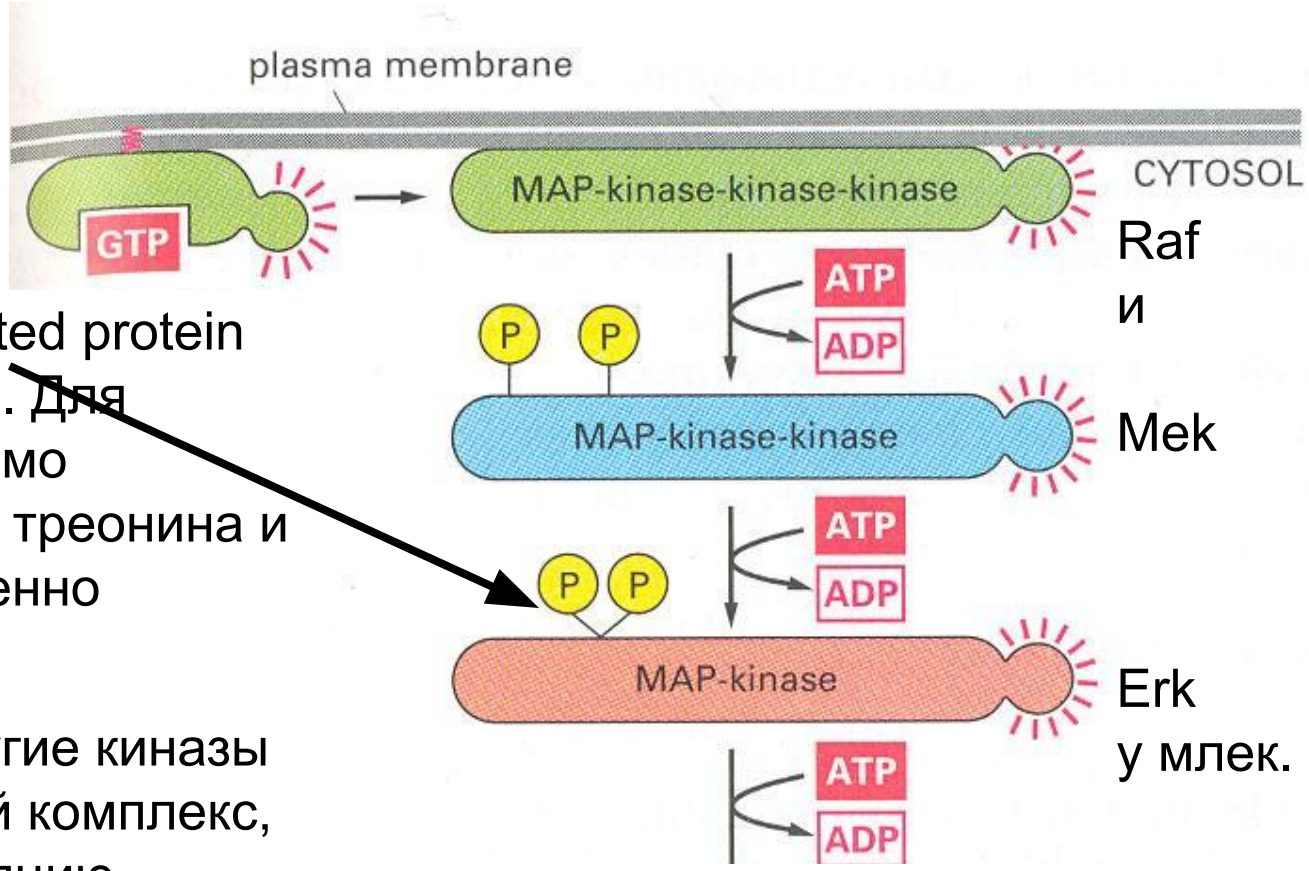
Рецептор колониестимулирующего фактора M-CSF (саркома кошки)

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 *myc*

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

Стимуляция митогеном сигнального пути Ras

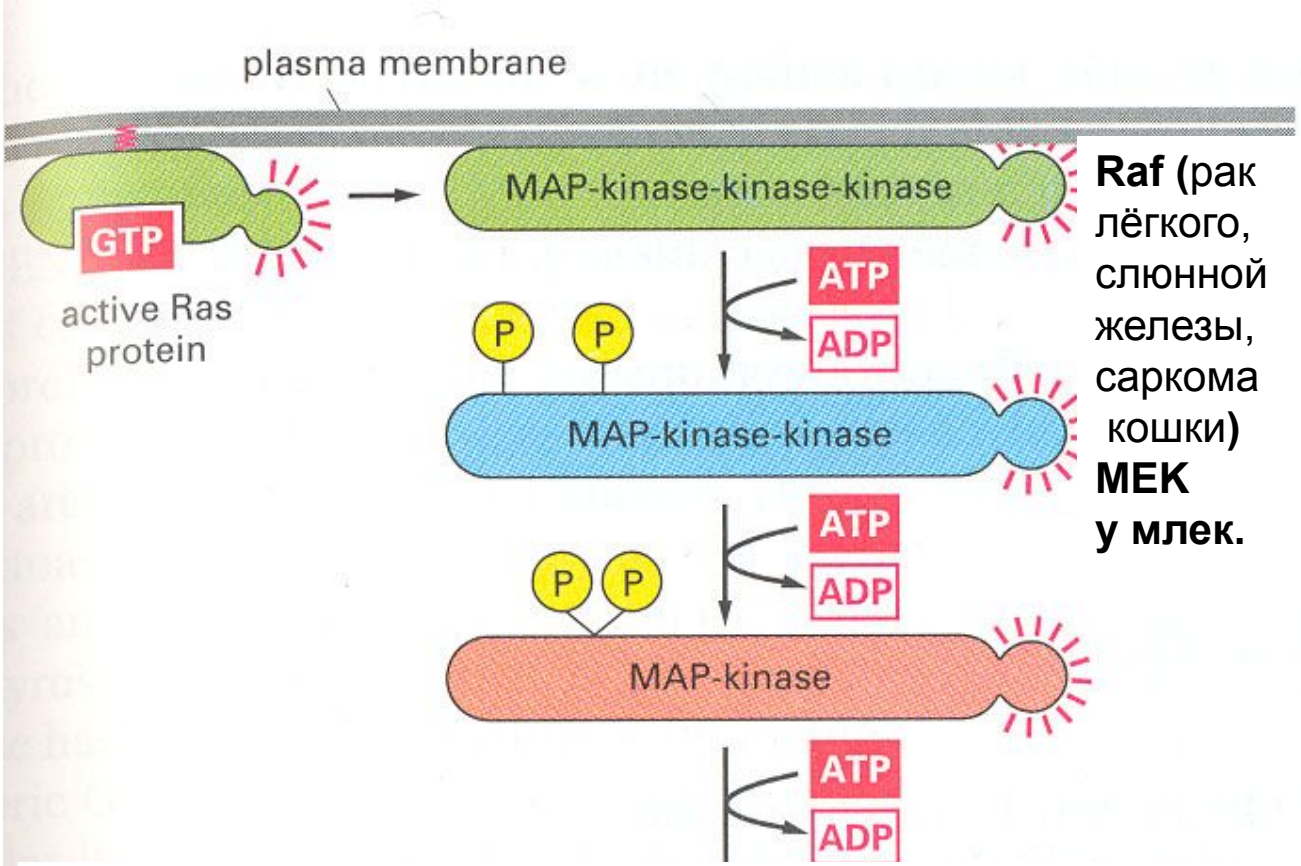


MAP- mitogen-activated protein kinase (MAP-киназа). Для активации необходимо фосфорилирование треонина и тирозина одновременно

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

Alberts et al., 2002

Участники сигнального пути Ras и myc в онкогенезе

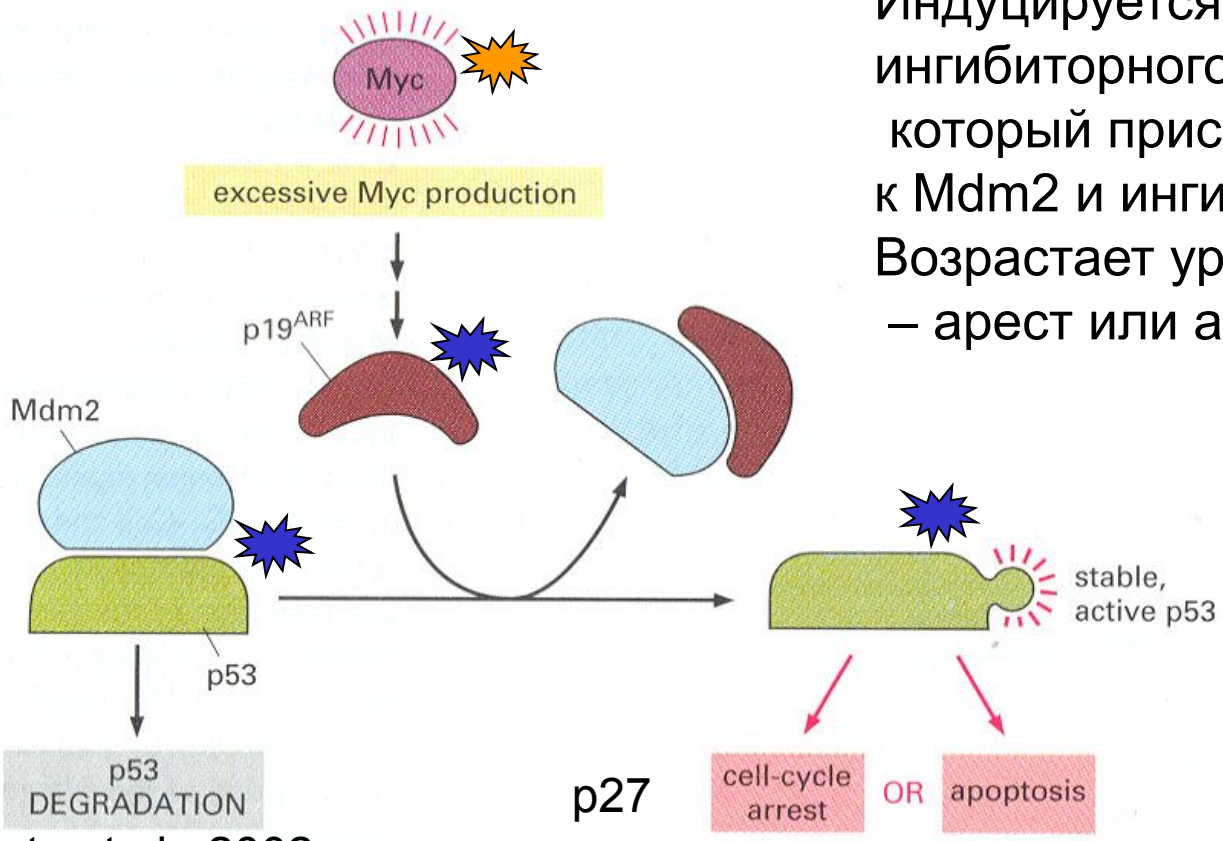


Raf (рак лёгкого, слюнной железы, саркома кошки) **MEK у млек.**

Гиперактивация гена *myc* – 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.



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

p27

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

Alberts et al., 2002

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 CKI 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

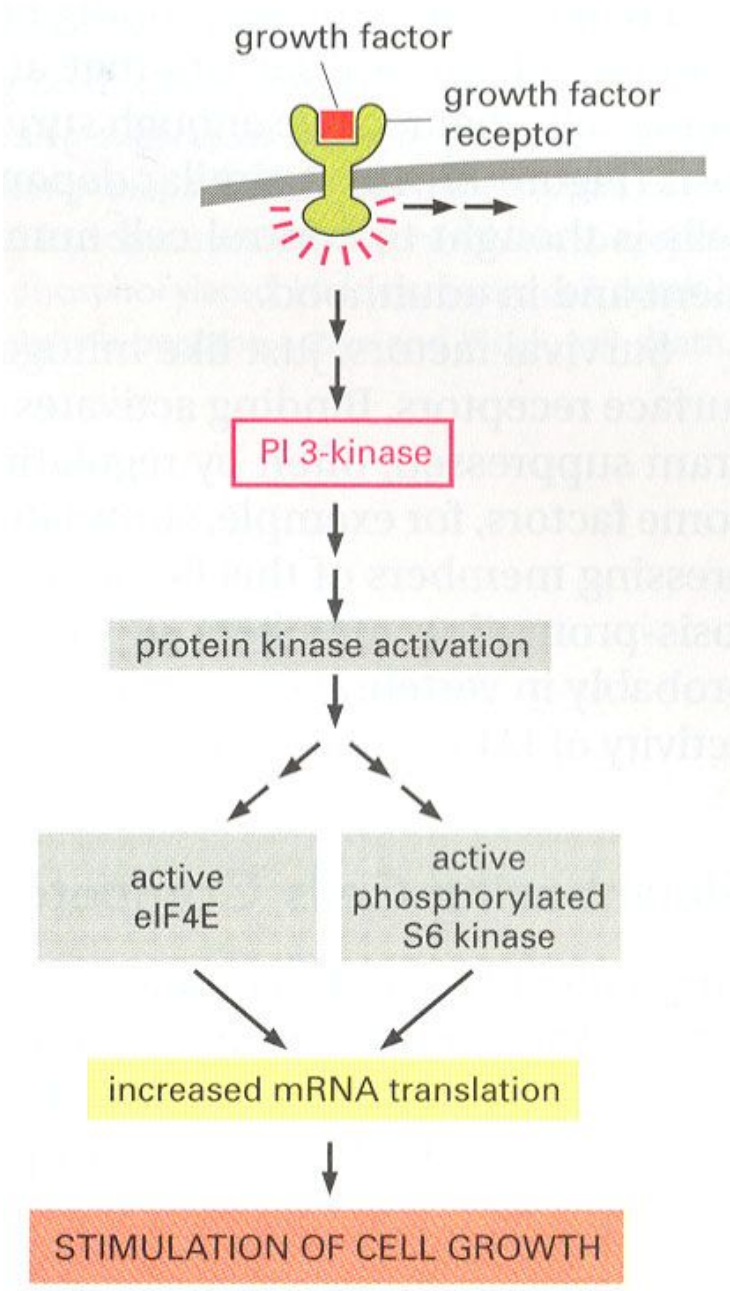
Путь PI 3- фосфатидилинозитол-3-киназы.

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

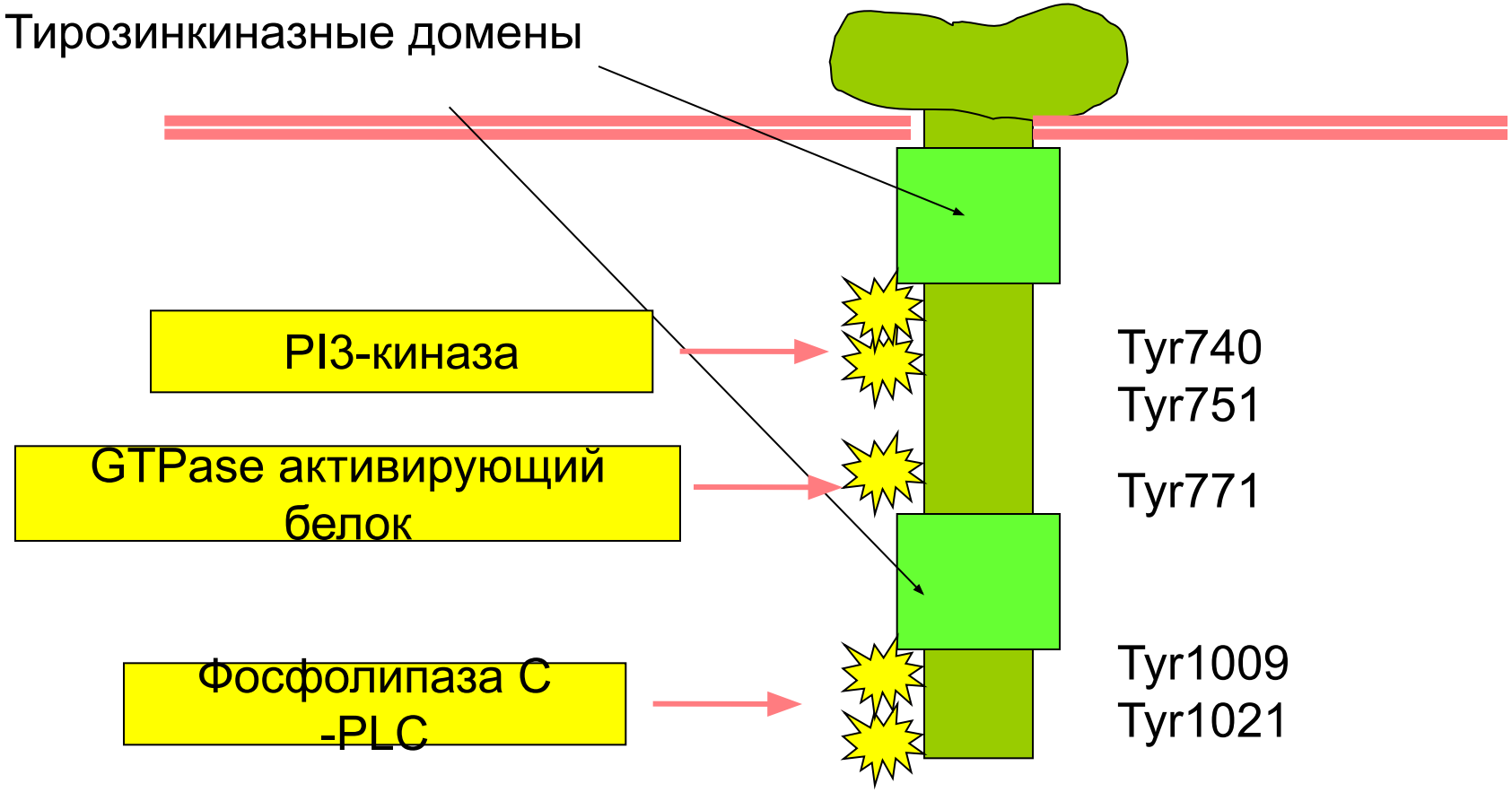
Мутация в гене S6 киназы у дрозофилы: мухи мелкие, клетки мелкие, число нормальное

Активация трансляции фактором инициации трансляции eIF4E

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

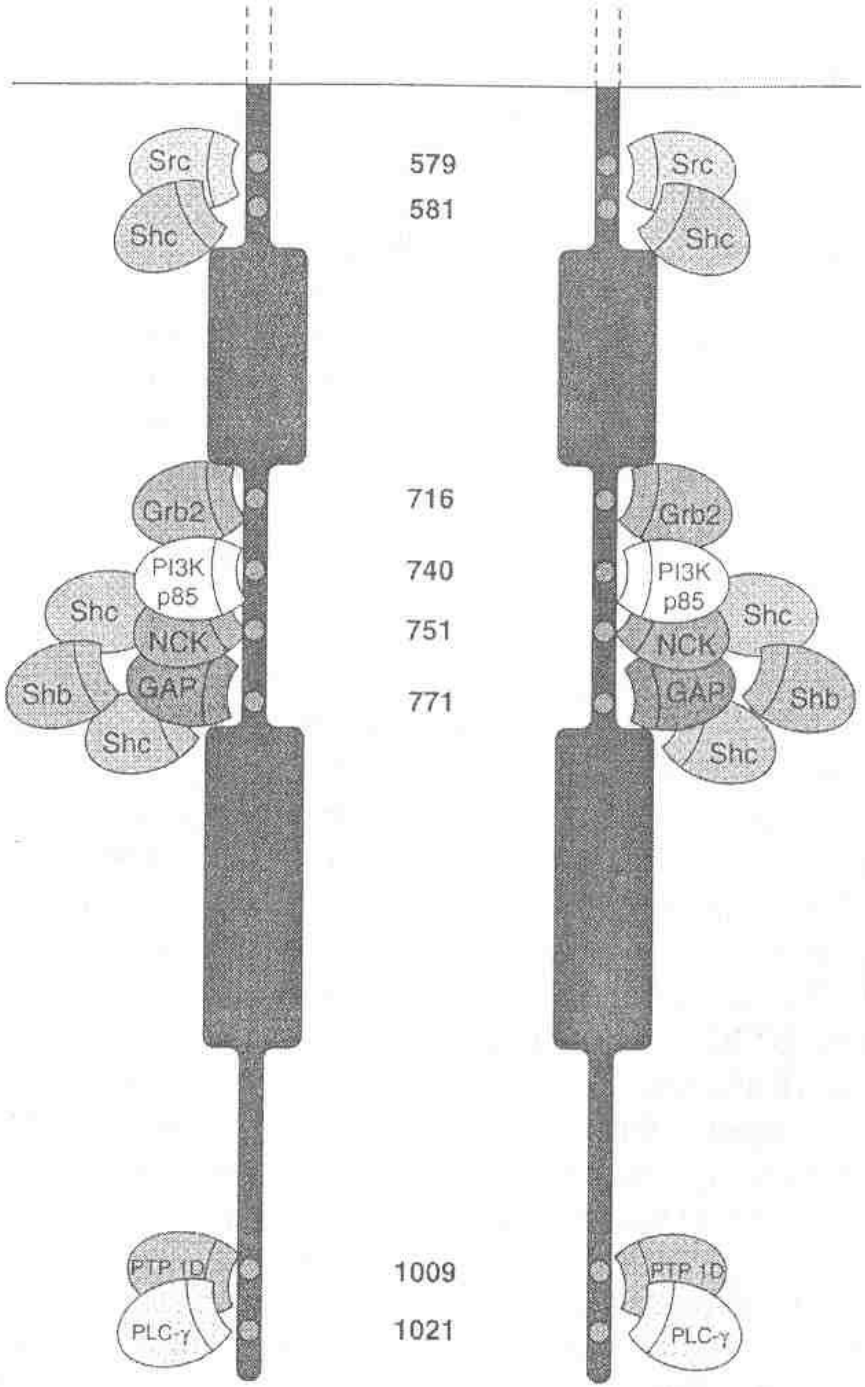


Рецептор PDGR – фактора роста тромбоцитов, одна из цепей димера

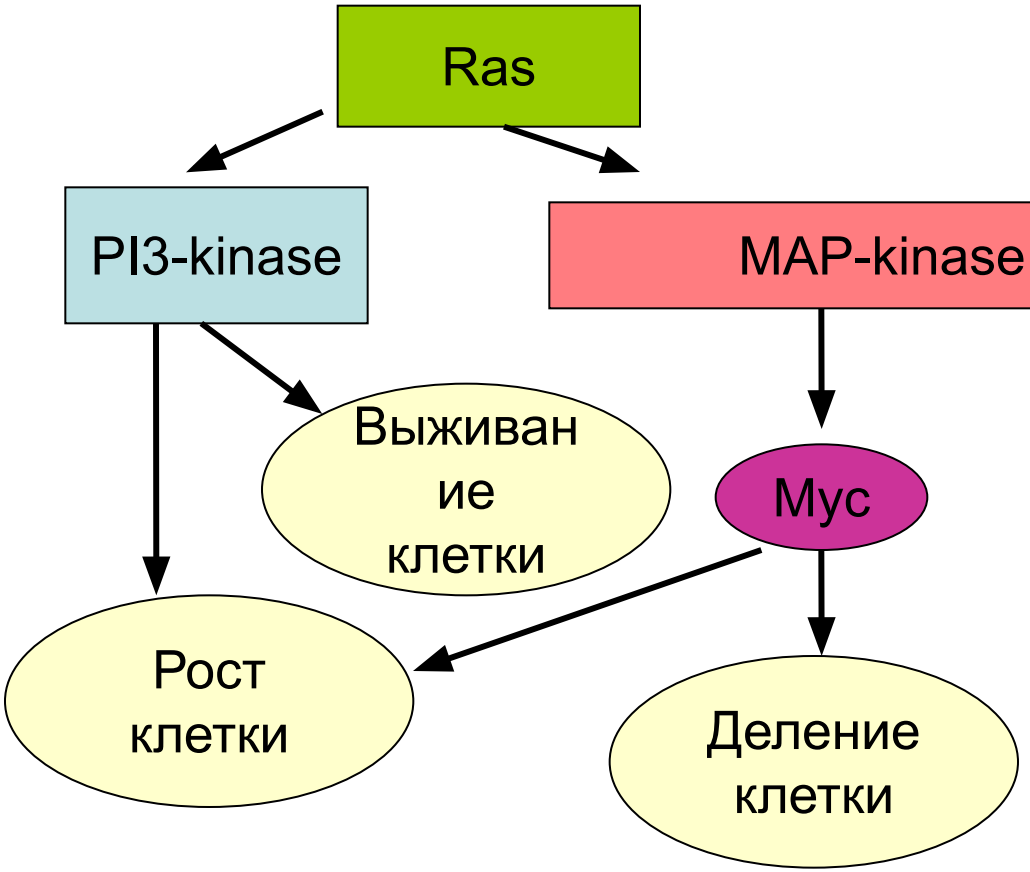


Фосфотирозины служат докинг-сайтом для различных белков, имеющих домены SH2 (src homology region), SH3

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



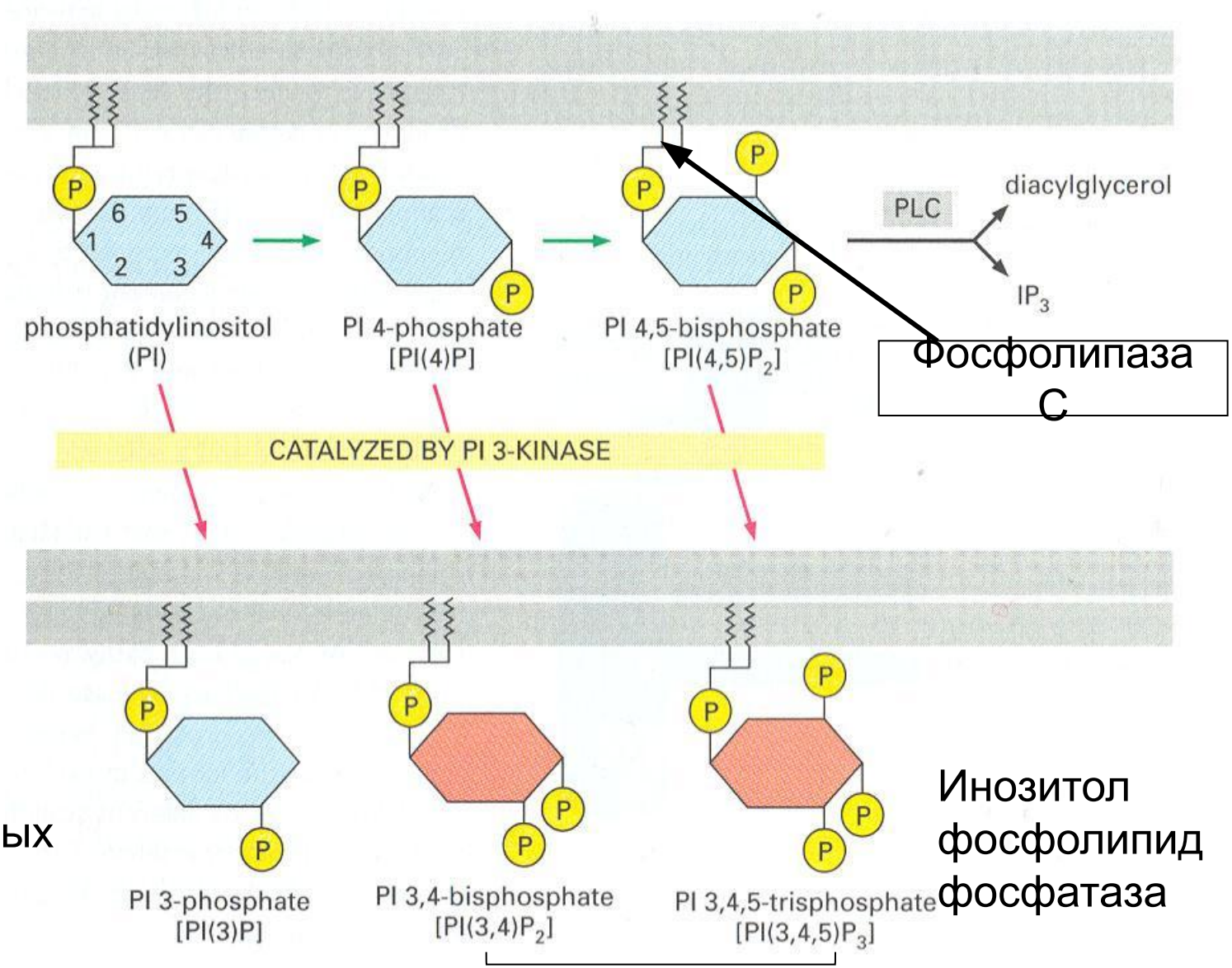
Связь роста и пролиферации гарантирована

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

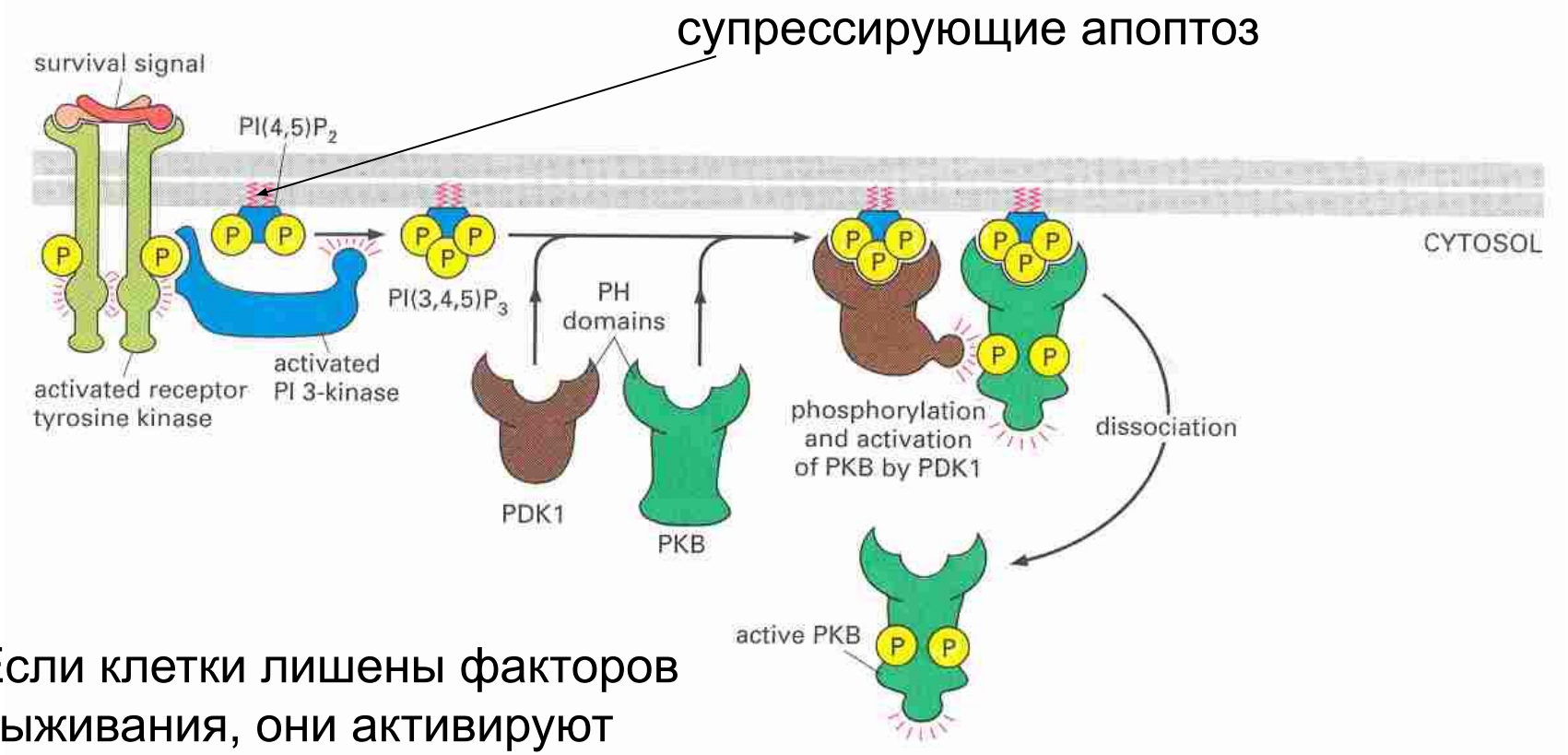


Создание докинг-сайтов для внутриклеточных сигнальных белков

Инозитол фосфолипид фосфатаза

Факторы выживания

Внеклеточные факторы, супрессирующие апоптоз



Если клетки лишены факторов выживания, они активируют программу апоптоза.

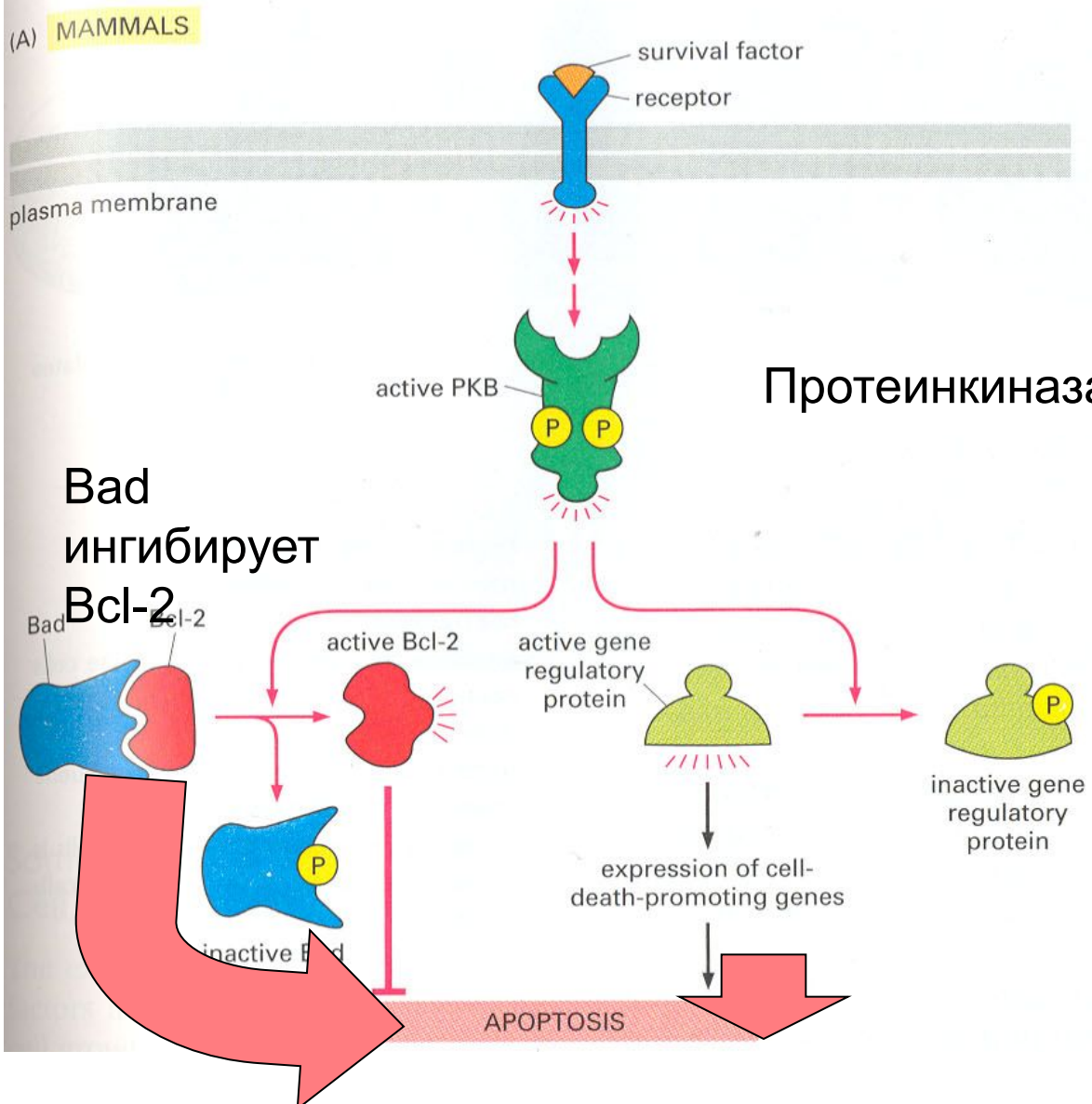
Нервные клетки образуются в избытке и конкурируют за фактор, выделяемый мишенями

PDK1 - PI-dependent kinase

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

Alberts et al., 2002

Фактор выживания супрессирует апоптоз у млекопитающих



(B)

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

Протеинкиназа B

Bad ингибирует Bcl-2

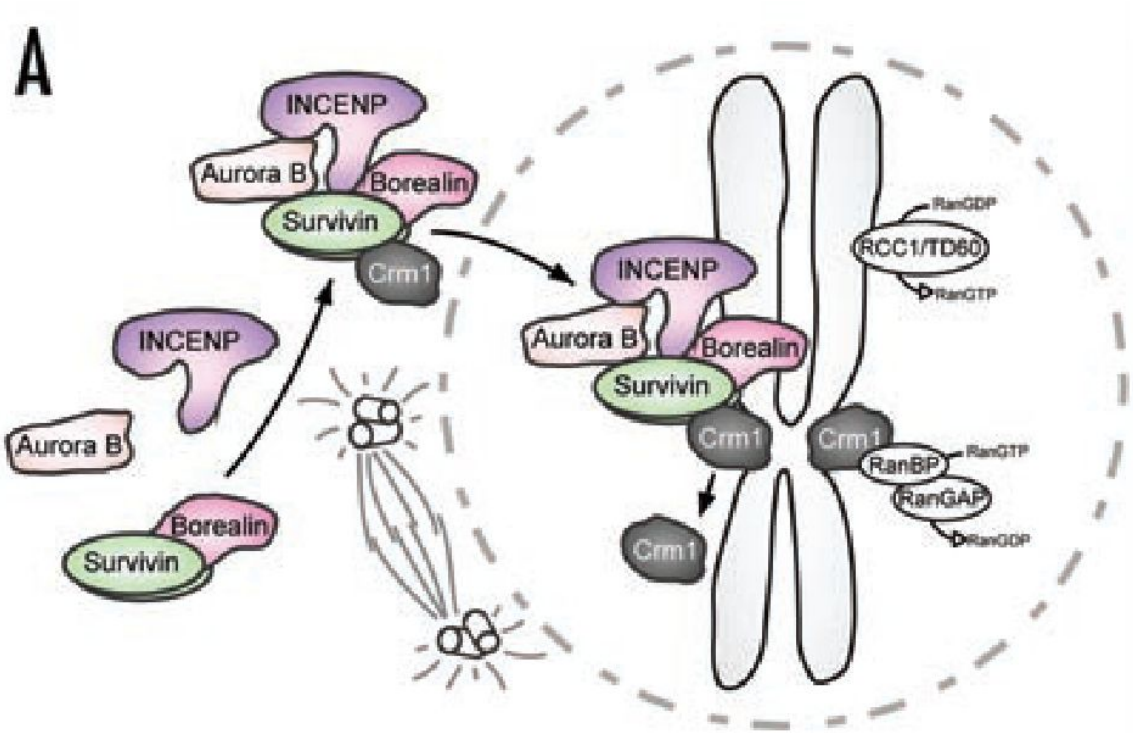
PKB:

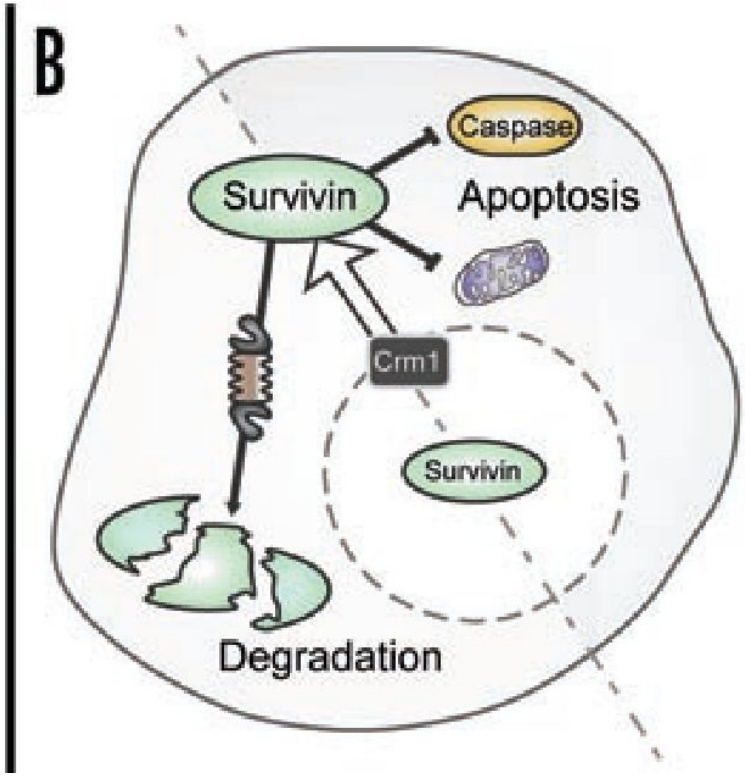
1. Активирует ингибитор апоптоза Bcl-2.

2. Ингибирует гены, вызывающие апоптоз

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

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

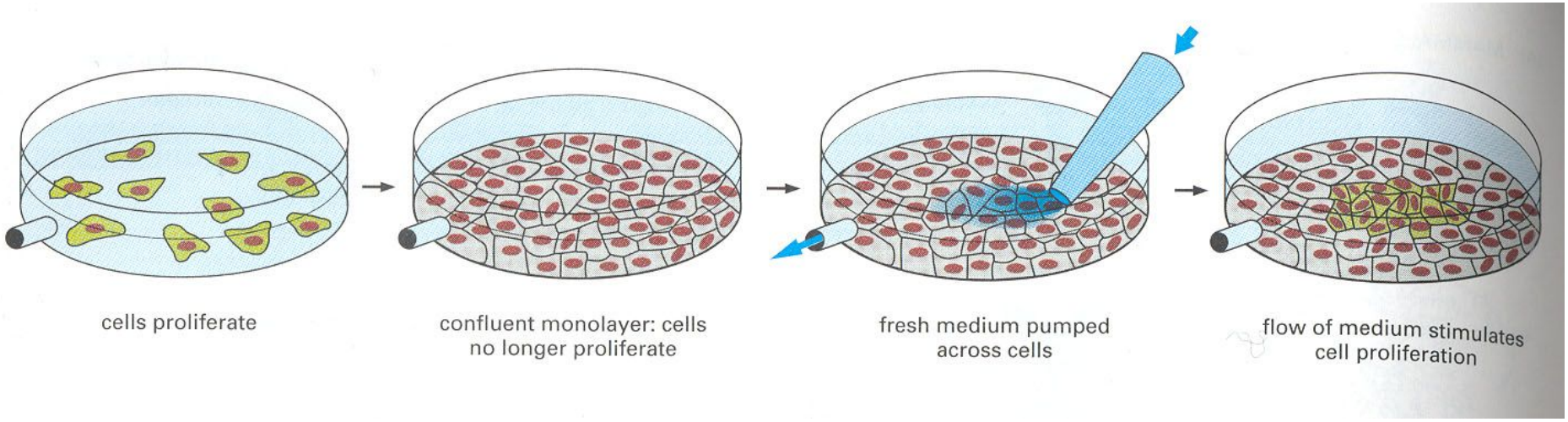
У долгожителей (старше 100 лет) и их детей чаще встречались мутации рецептора к инсулиноподобному фактору роста-1. У носителей мутаций был нарушен процесс связывания клеток с ИФР-1, повышение уровня ИФР-1 в крови на 37%

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

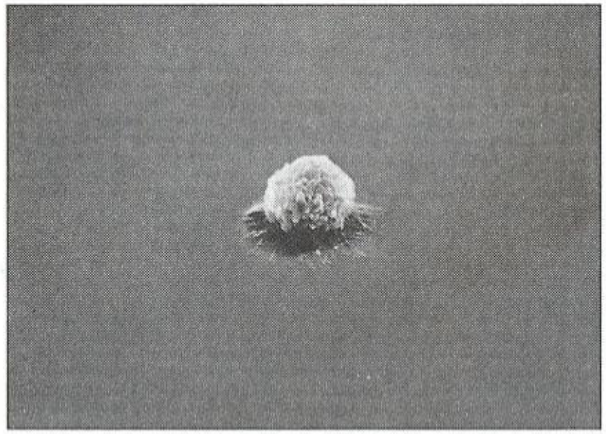
Alberts et al., 2002

Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

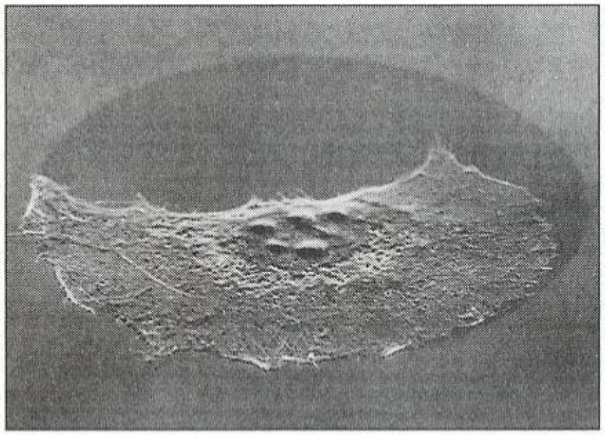
Суспензия | Слабая адгезия | Хорошая адгезия

8% | 30% | 90%

(A) Возможность вступления в S фазу



(B)



(C) 50 μm

В среду добавили H3-тимидин, через 1-2 дня зафиксировали и авторадиографировали

Alberts et al., 2002

Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

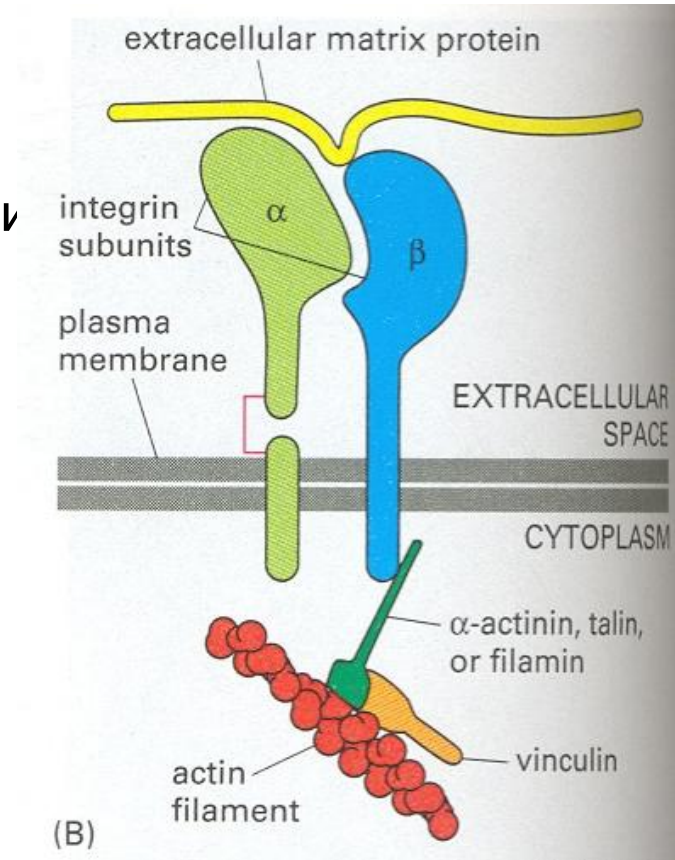
Фибробласты растут на субстрате, покрытом фибронектином (внеклеточный матрикс).
Фокальная адгезия – места контактов: актин – интегрин - фибронектин. В местах кластеризации интегринов - фокальный контакт - активация тирозин киназы FAK (фокальной адгезии), прикрепление к цитоплазматическим хвостам интегринов,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

Сайты SH, присоединение киназы Src.

Две киназы продуцируют сигналы о прикреплени

Выживание, рост, деление и перемещение.

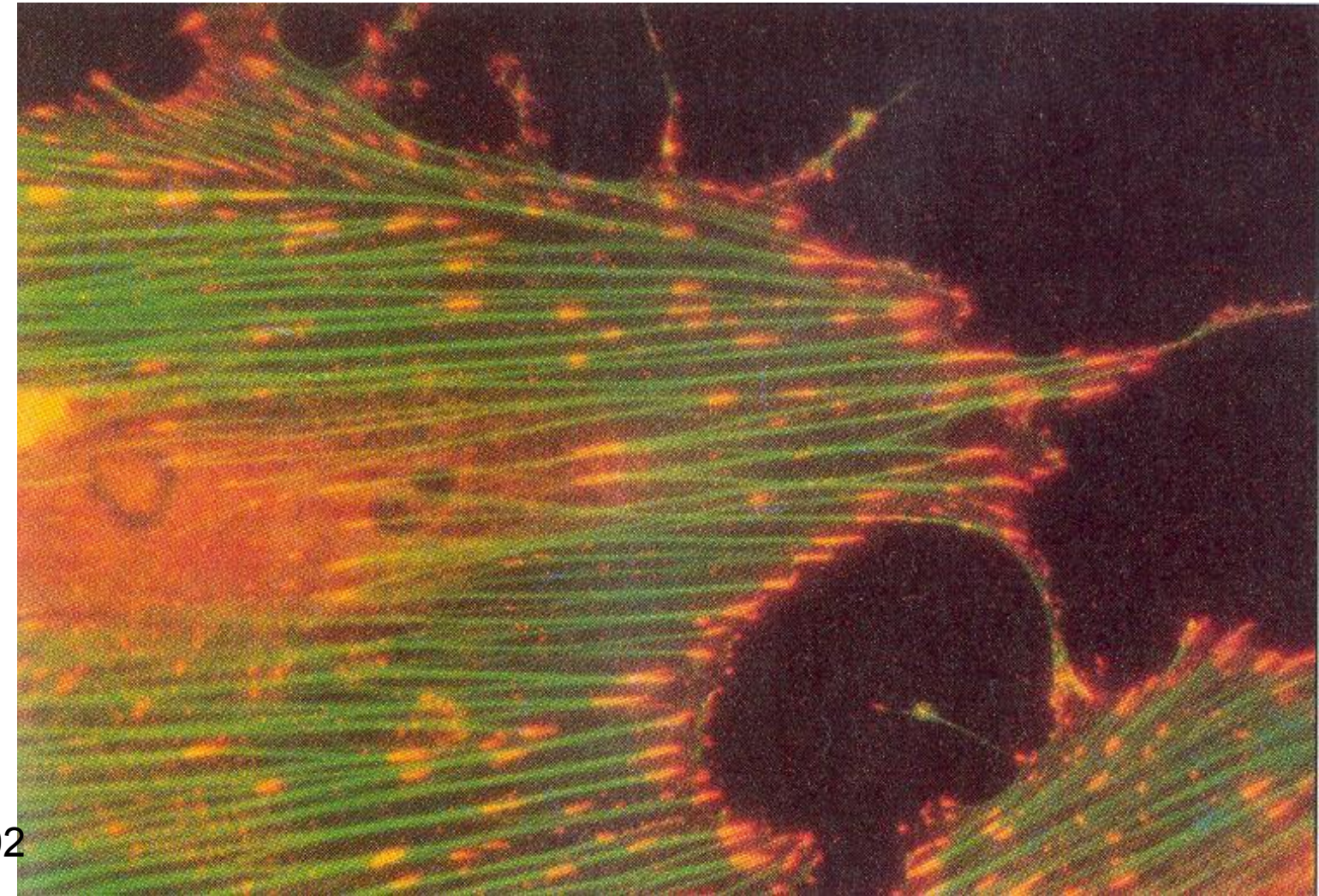
FAK-focal adhesion kinase – активирует внутриклеточный сигнал, разрешающий выживание, рост и деление клетки.
Мыши, дефицитные по FAK, погибают в раннем развитии



Способность к делению зависит от формы и прикрепления клеток

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

Метод FRET



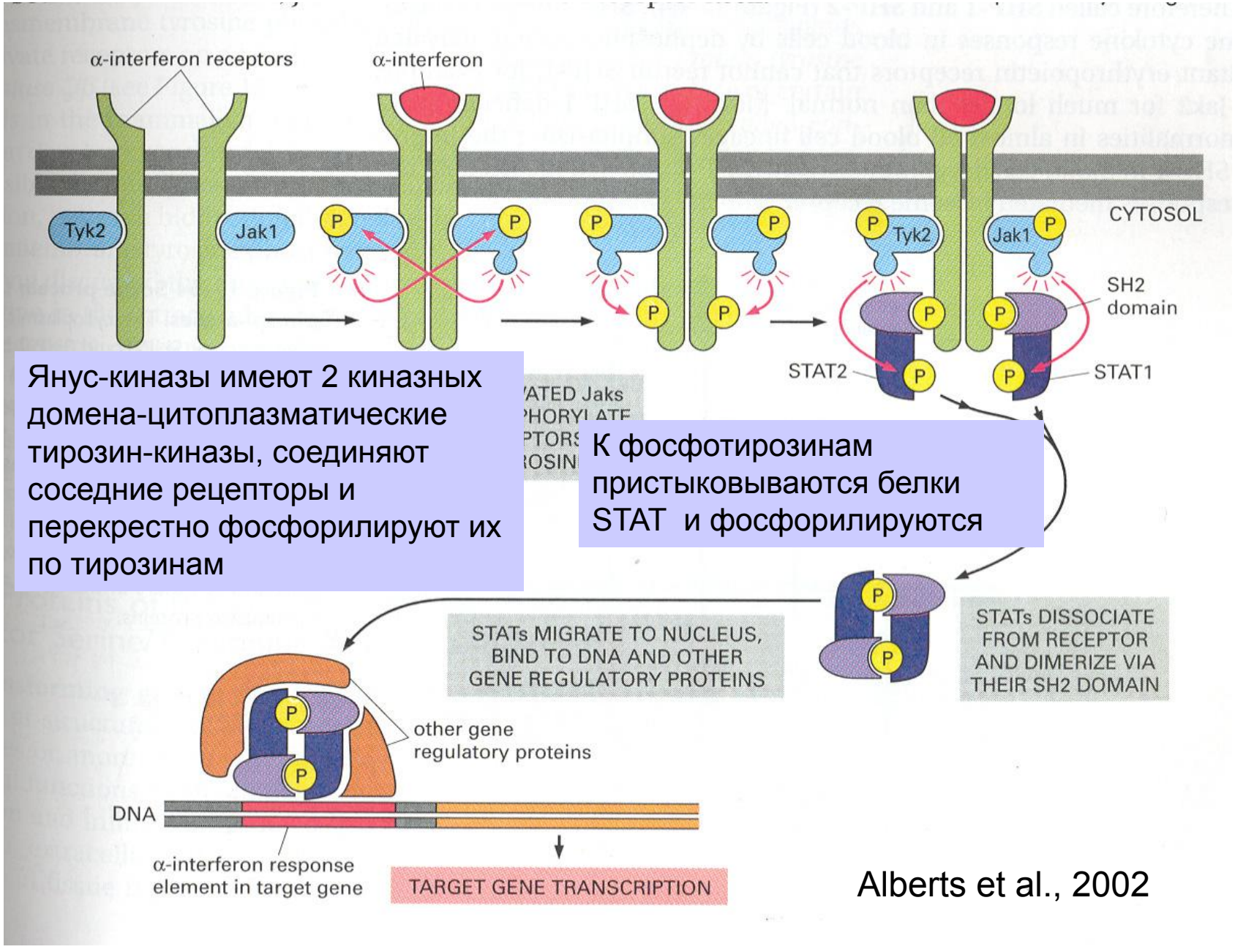
Alberts et al., 2002

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),
  - 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

К фосфотирозинам пристыковываются белки STAT и фосфорилируются

Alberts et al., 2002

Внеклеточные сигналы, ингибирующие рост

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

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, дифференцировка, 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.

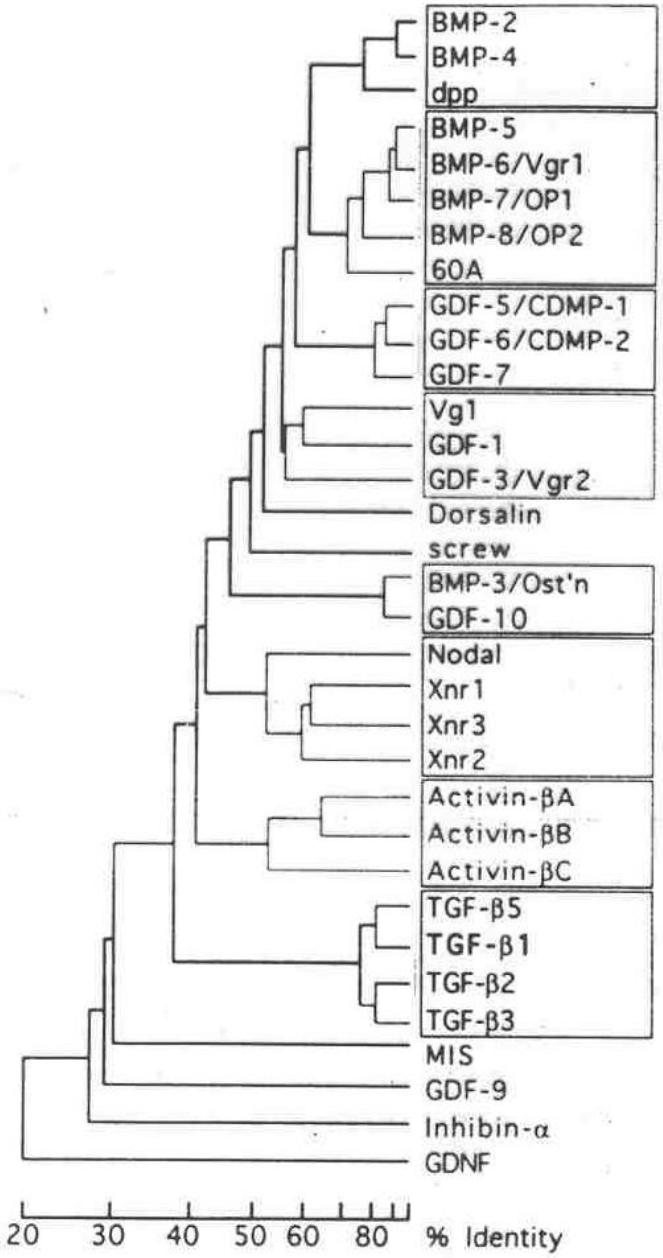
Выполняют функции факторов роста и подавляют рост.

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

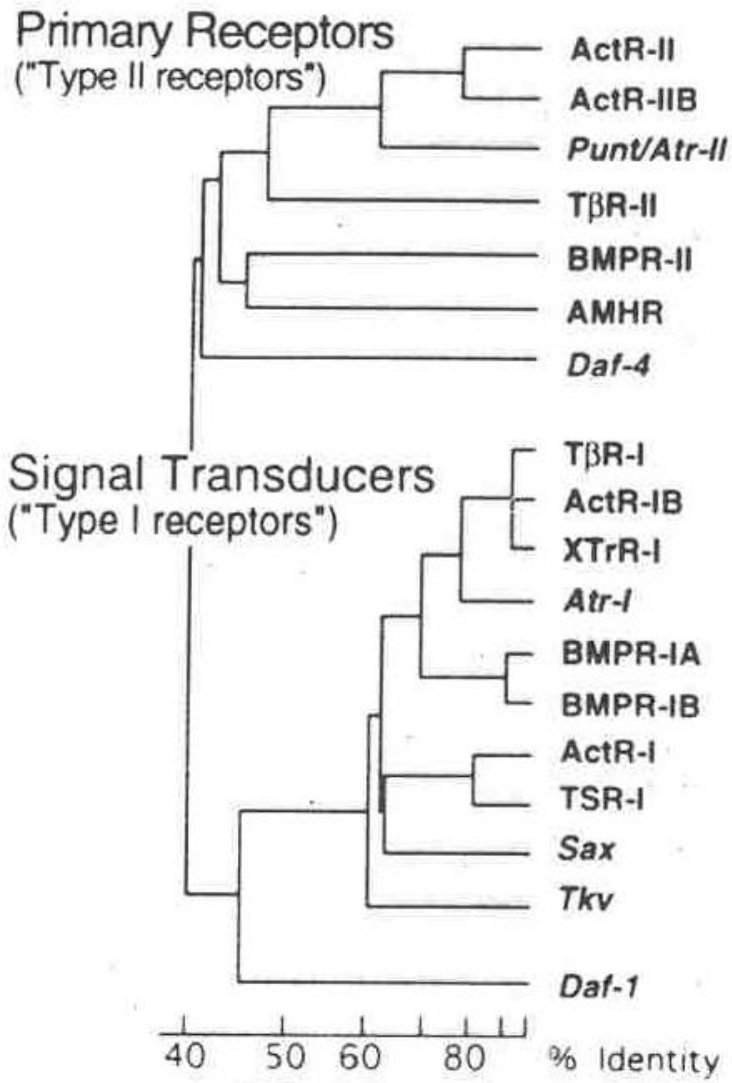
Семейство белков TGF-β:



Рецепторы TGF-β :

Тип II

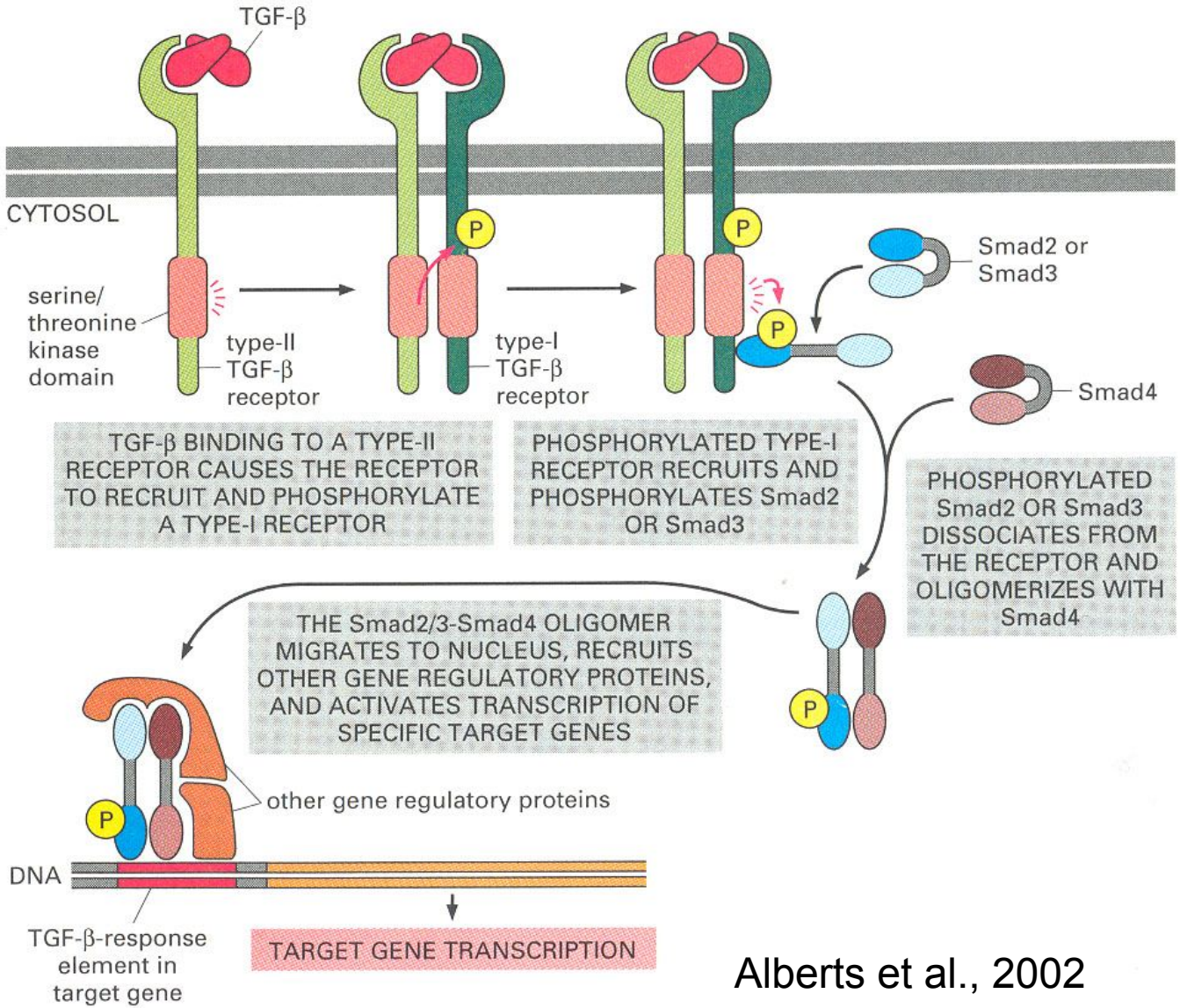
Тип I



Путь TGF-β - Smad

Рецепторы TGF-β - серин-треонин киназы.

Стратегия наиболее быстрой передачи сигнала в ядро

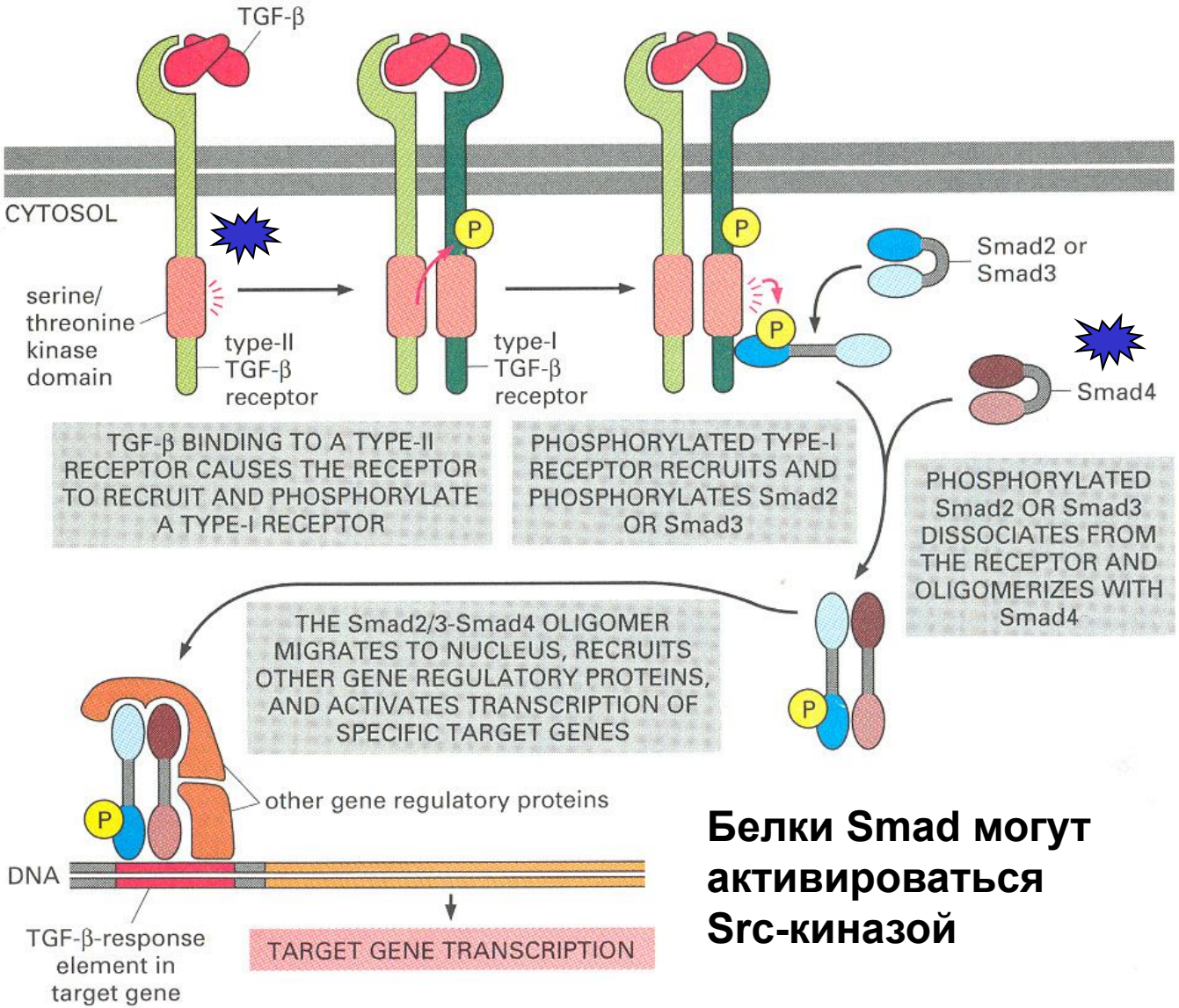


Alberts et al., 2002

Участники пути TGF-β – Smad в онкогенезе

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.



Туморсупрессор Рецептор TGF-β II (30% при раке прямой кишки)

Туморсупрессор Smad4 (рак поджелудочной и др.)

Белки Smad могут активироваться Src-киназой

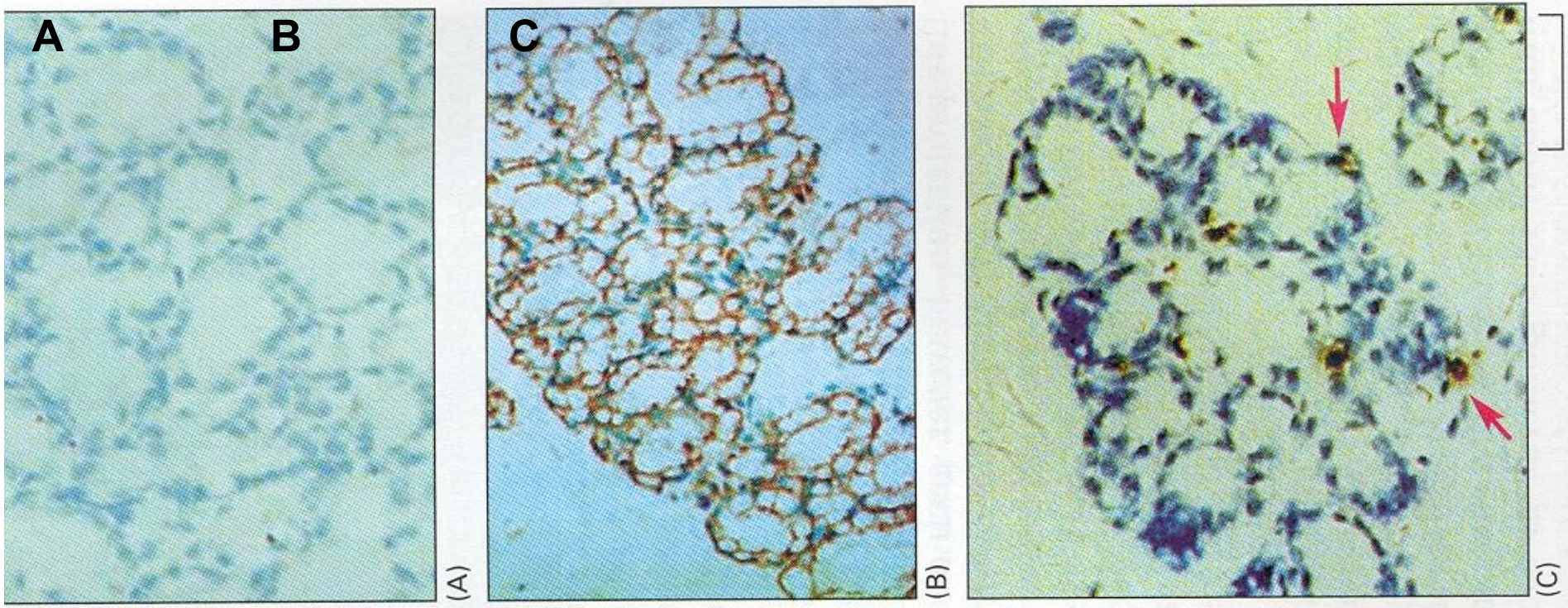
Семейство TGFβ: BMP- bone morphogenetic protein

Молочная железа мыши:

A- железа в при нормальном высасывании;

B – Через 9 часов после прекращения высасывания, экспрессия TGFβ3;

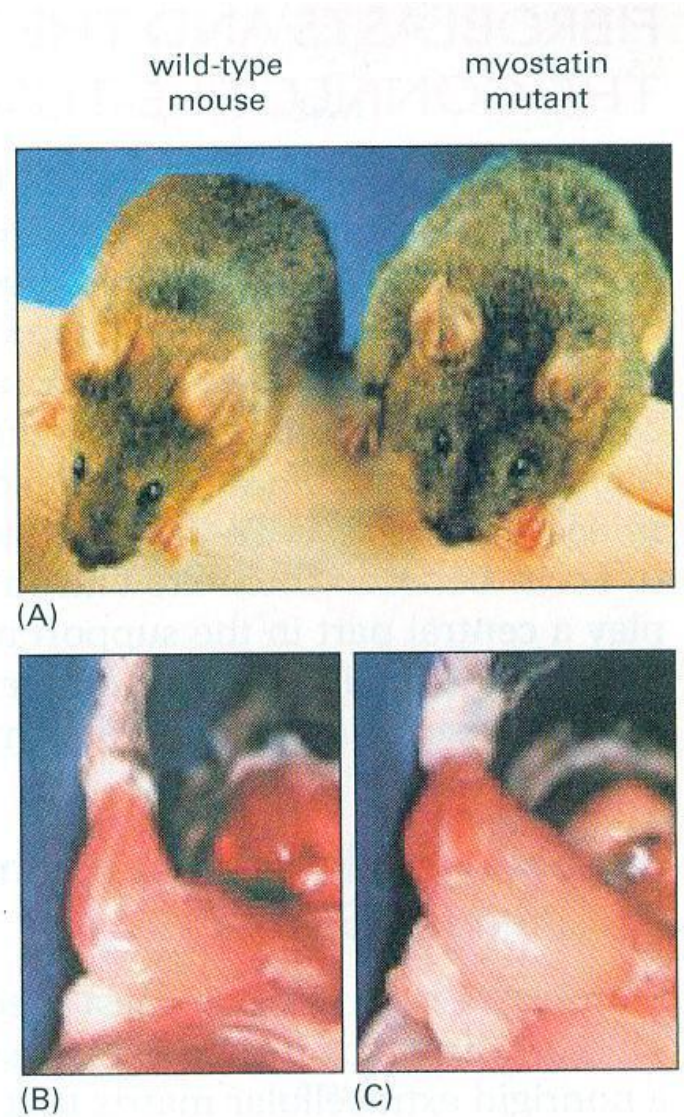
C – Через 3 суток после прекращения высасывания, начало апоптоза



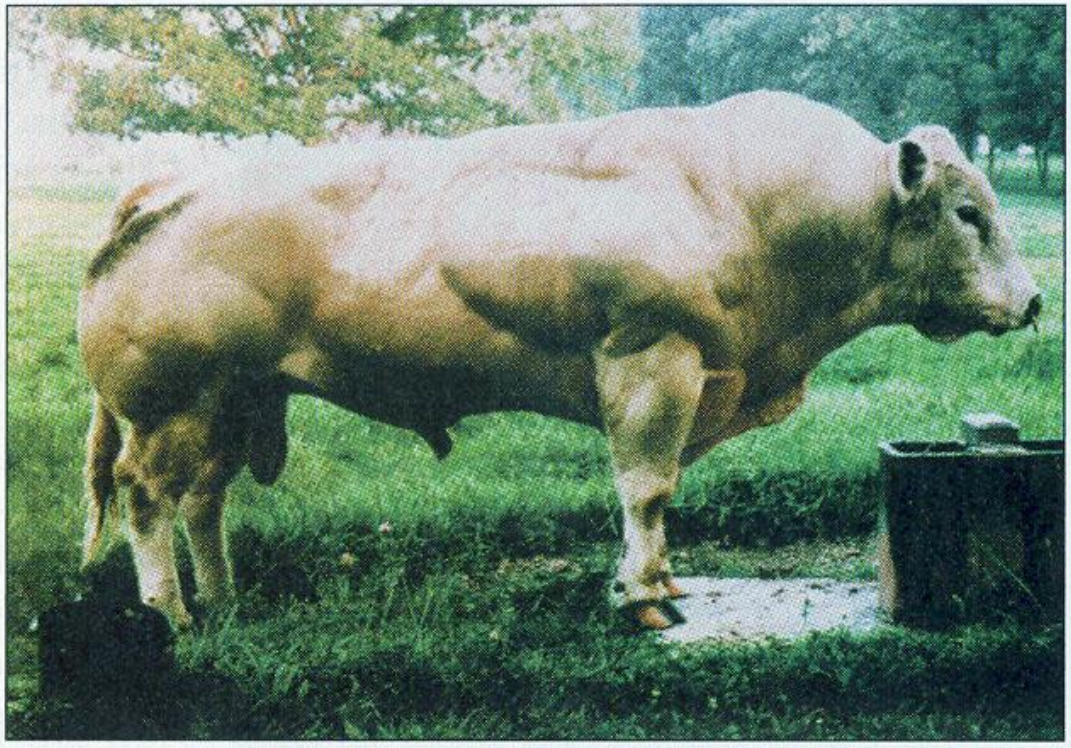
Alberts et al., 2002

Семейство белков TGF-β

Myostatin– ингибирует пролиферацию миобластов.

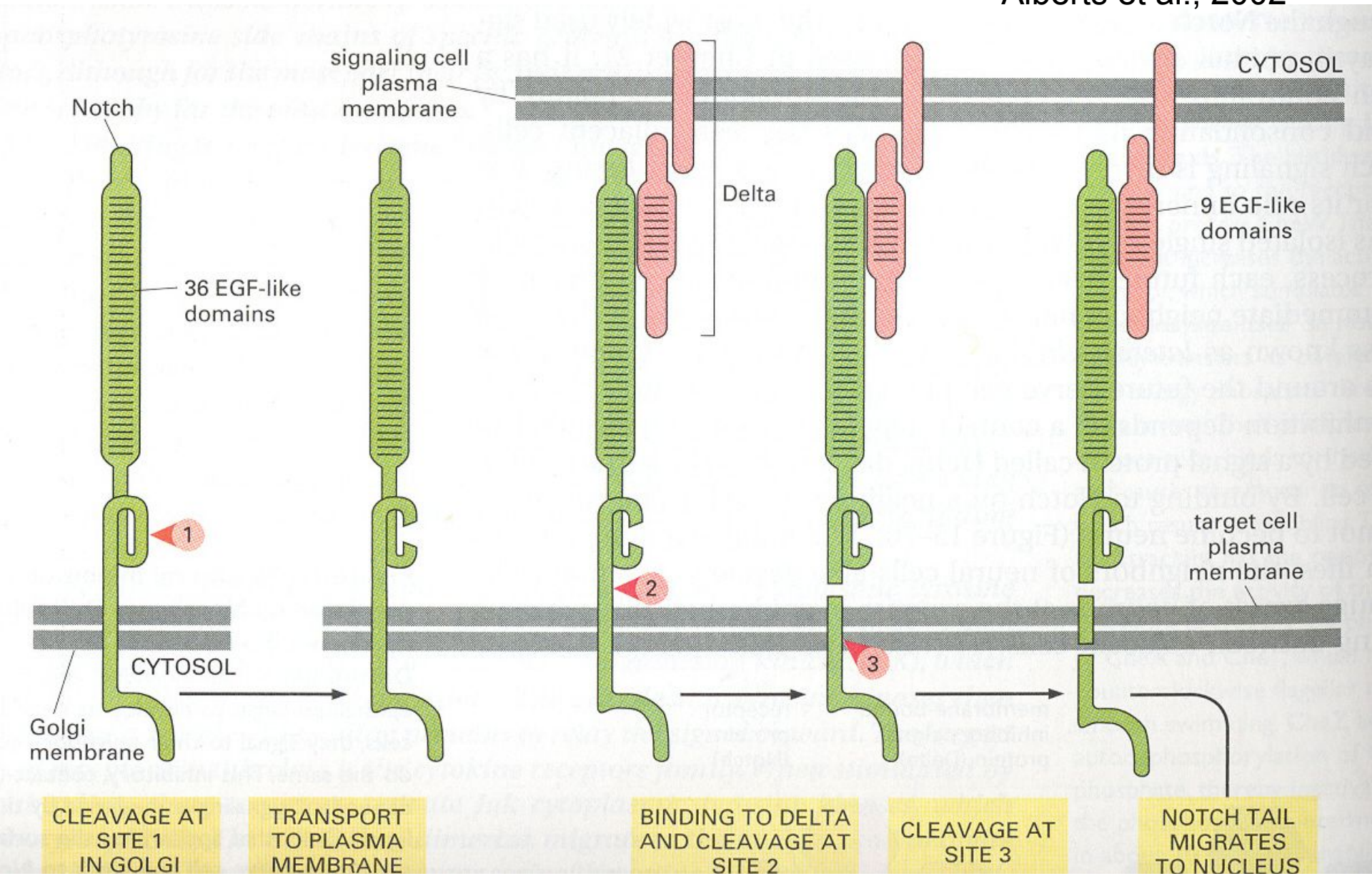


Alberts et al., 2002



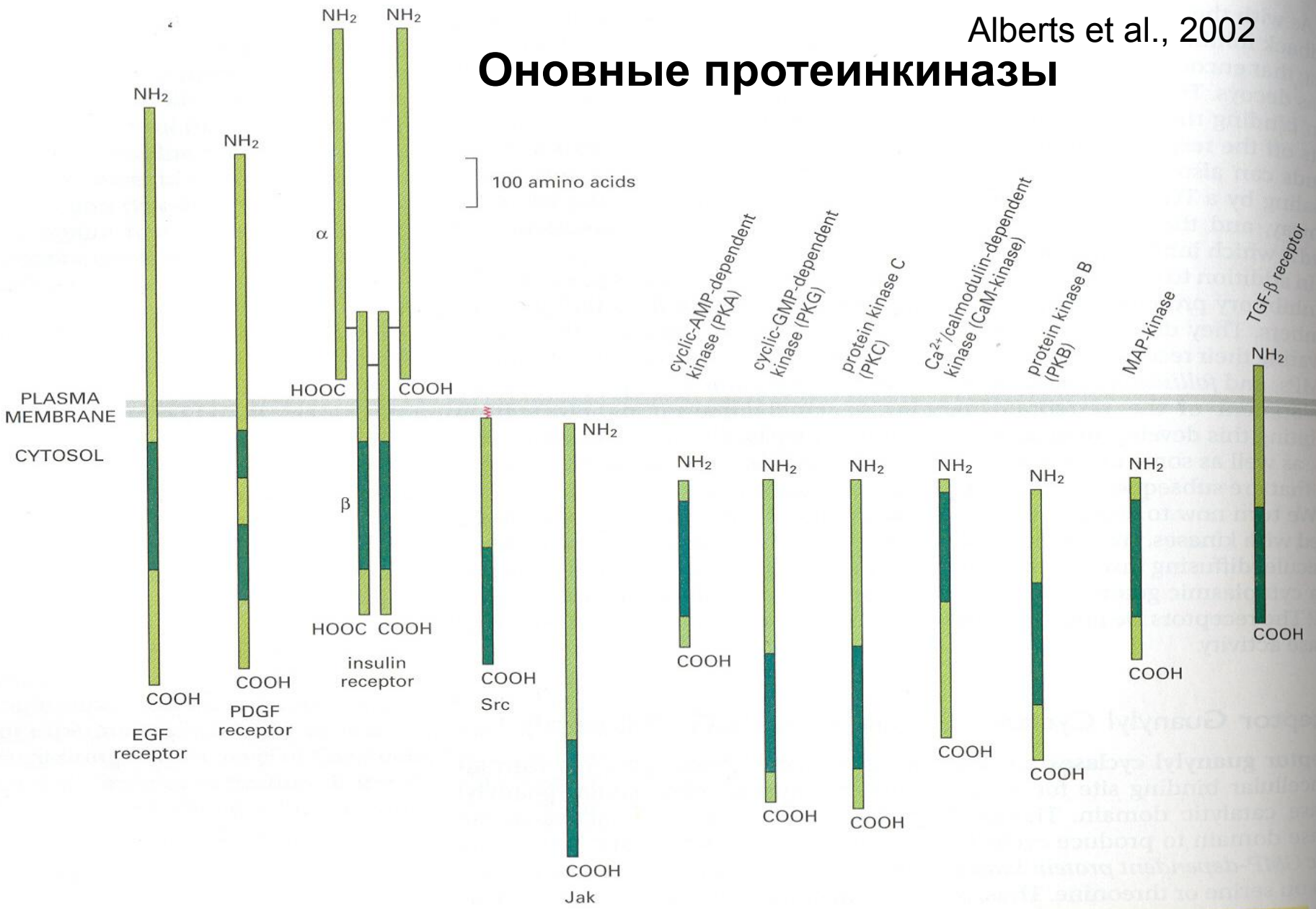
Сигнальный путь Delta – Notch – путь дифференцировки

Alberts et al., 2002



Alberts et al., 2002

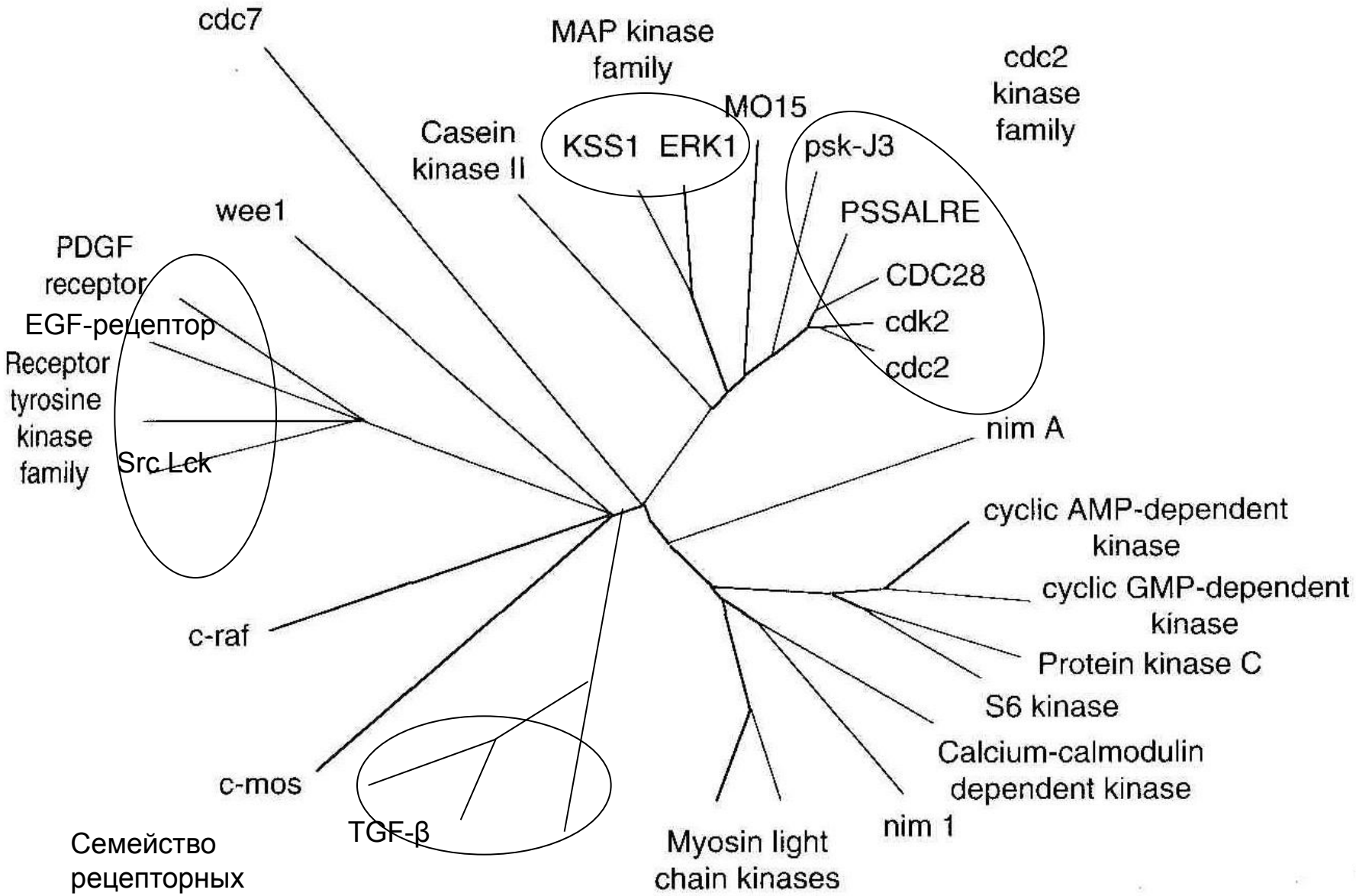
Оновные протеинкиназы



Тирозин протеинкиназы

Серин-треонин протеинкиназы

Эволюционное древо некоторых протеин киназ



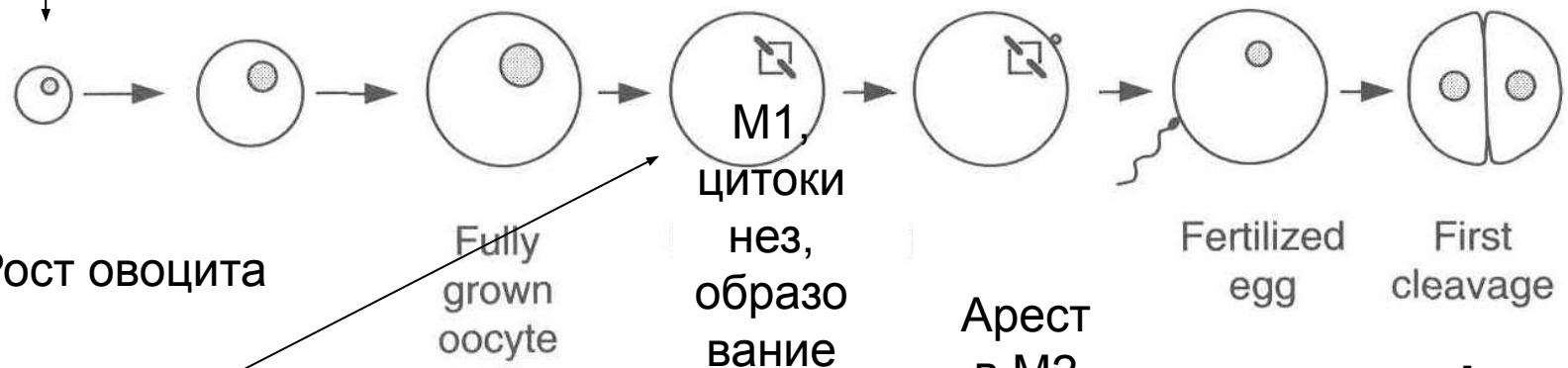
Семейство рецепторных сериновых кинах

Овогенез, мейоз и оплодотворение у лягушки

Арест овоцита в профазе мейоза1

Прогестерон

Оплодотворение



Рост овоцита

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

Стадия VI

Синтез мРНК

M1, цитокинез, образование полярного тельца

Арест в M2

Созревание

Транскрипция подавлена, трансляция

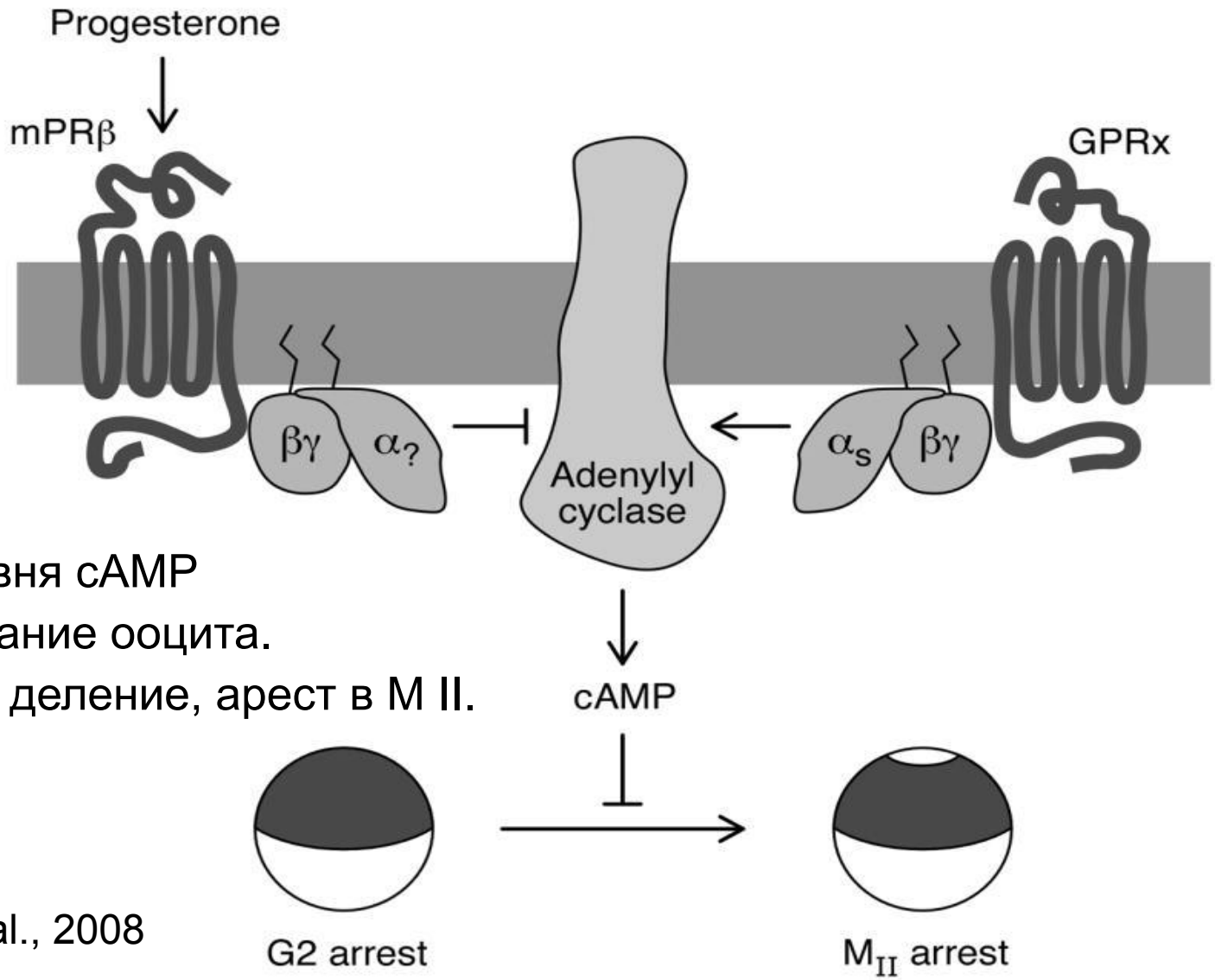
Далее 11 синхронных делений дробления

Рост отсутствует

Созревание ооцита

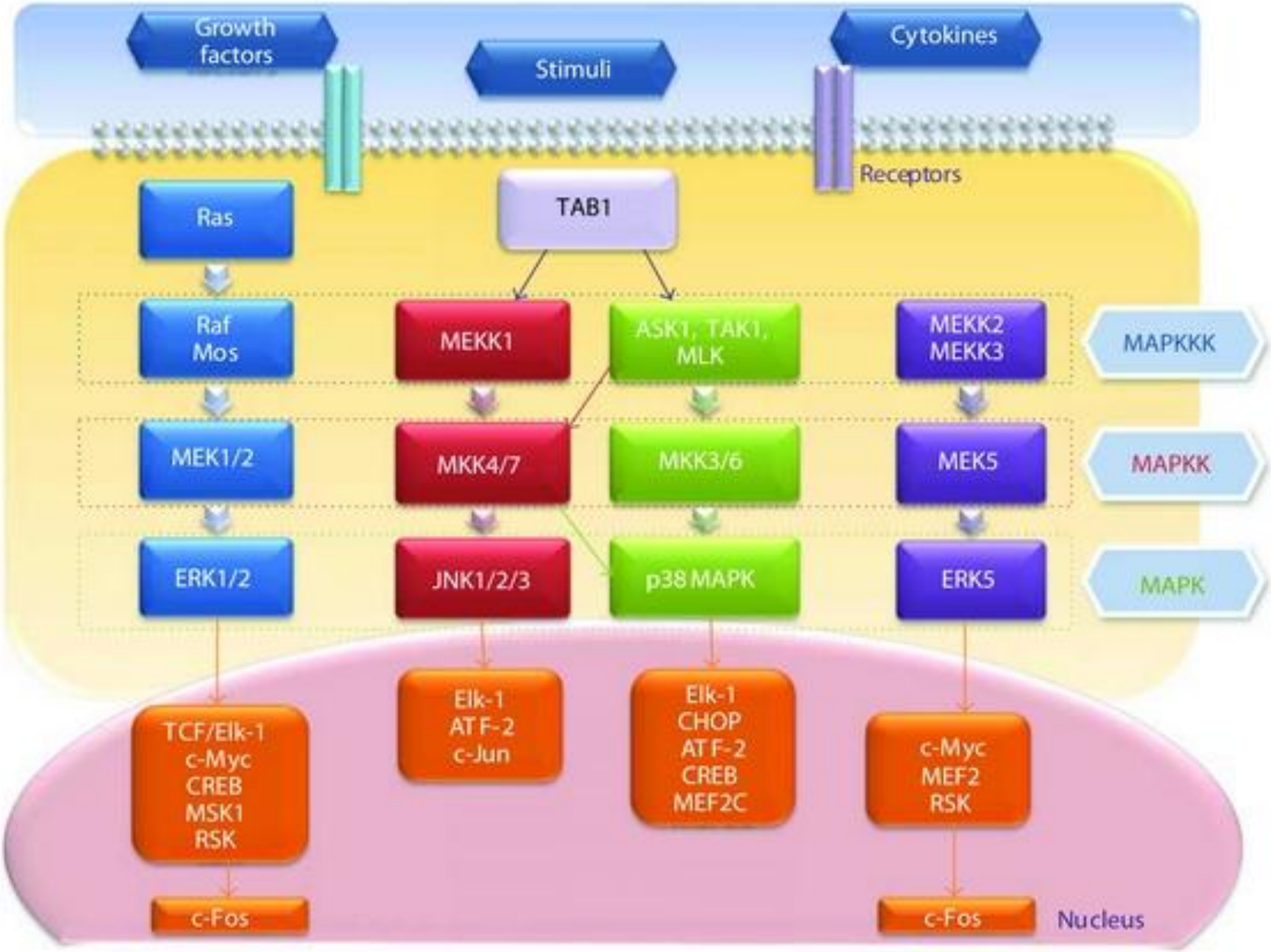
- Созревание ооцита запускается прогестероном. Он действует через неклассический рецептор на плазматической мембране и вызывает уменьшение уровня cAMP.
- Неклассический прогестероновый рецептор имеет негеномный эффект на созревание ооцита.
- В процессе участвуют G-protein coupled receptors (7 раз пронзает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

Ríos-Cardona D et al., 2008


Growth factors
Stimuli
Cytokines
Receptors
Ras
TAB1
Raf
Mos
MEKK1
ASK1, TAK1, MLK
MEKK2
MEKK3
MAPKKK
MEK1/2
MKK4/7
MKK3/6
MEK5
MAPKK
ERK1/2
JNK1/2/3
p38 MAPK
ERK5
MAPK
TCF/Elk-1
c-Myc
CREB
MSK1
RSK
Elk-1
AT F-2
c-Jun
Elk-1
CHOP
AT F-2
CREB
MEF2C
c-Myc
MEF2
RSK
c-Fos
c-Fos
Nucleus