

# ПУЩИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЕСТЕСТВЕННО- НАУЧНЫЙ ИНСТИТУТ

Учебный центр Биофизики и биомедицины  
на базе Института теоретической и экспериментальной  
биофизики Российской академии наук

## Апоптоз, некроз, аутофагия Методы определения апоптоза

Выполнила: Колесник В.В.  
Преподаватель: доц., к.б.н., Поцелуева М.

# План лекции

- 1) Общие понятия о клеточной гибели
- 2) Апоптоз
  - a. Типы и активация каспаз
  - b. Пути запуска апоптоза
  - c. Внешний и внутренний путь
- 3) Некроз
- 4) Аутофагия
- 5) Методы определения

# Клеточная гибель

Уменьшение размеров, уплотнение хроматина

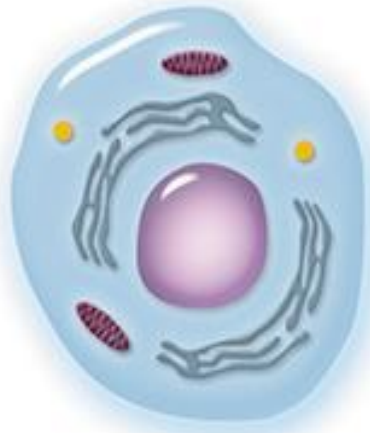
Формирование апоптотических телец

Апоптоз

Некроз

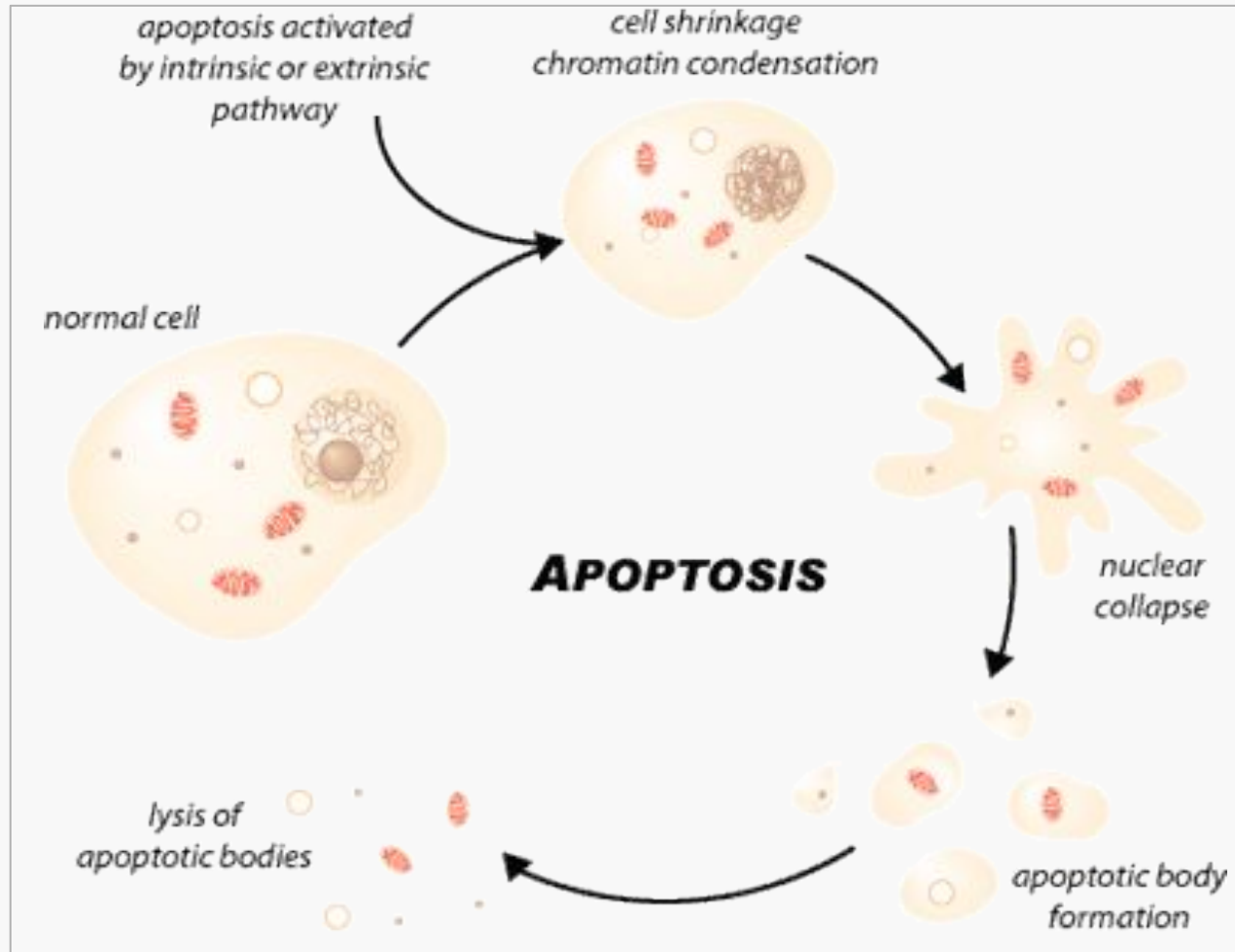
Разрыв клеточной мембраны

Нормальная клетка



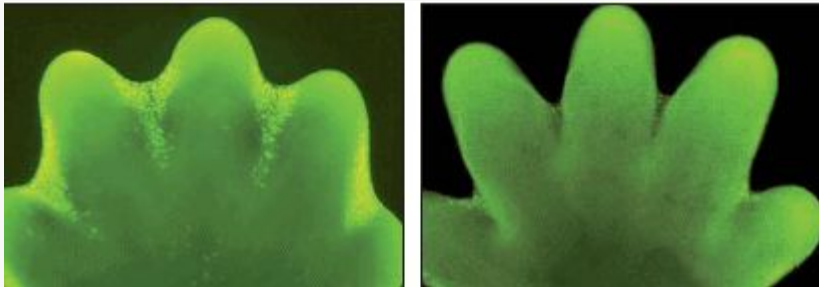
# АПОПТОЗ

Апоптоз - запрограммированная гибель клетки в ответ на внешние или внутренние сигналы.

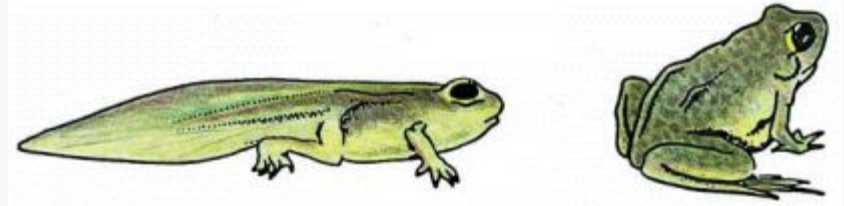


# Функции апоптоза

- Элиминация клеток в процессе эмбриогенеза
- Уничтожение структуры, которая «не нужна»
- Регуляция количества клеток
- Контроль: уничтожение нездоровых, оказавшихся не на своем месте, нефункциональных или опасных клеток
- **Баланс между клеточной смертью и пролиферацией**



овреждениями



# Ферменты апоптоза

**Каспазы** (caspase) - ферменты расщепляющие белки по остаткам аспартата. Они содержат цистеиновые остатки на своих активных центрах. Синтезируются в виде неактивных прокаспаз.

Типы:

- Активаторы цитокинов (1, 4, 5)
- Инициаторы апоптоза (2, 8, 9, 10)
- Эффекторы апоптоза (3, 6, 7)

Функции:

- Расщепление основных структурных белков
- Активация нуклеаз
- Инактивация клеточных структур

# Активация каспазы

## Прокаспаза



Продомен

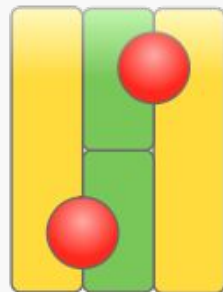
Протеолиз

Большая и малая  
субъединицы

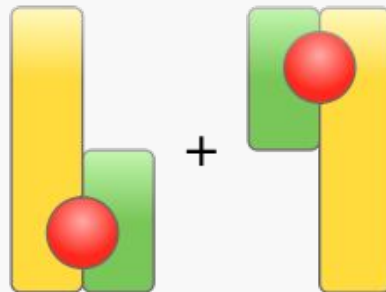


Ассоциация

## Каспаза



Тетрамер



Гетеродимеры

В составе прокаспаз выделяют 3 домена:

- регуляторный N-концевой домен (продомен)
- большая субъединица
- малая субъединица

Активация путём протеолиза

# Пути запуска апоптоза



## Внешний

- Через death-рецепторы на поверхности клетки
- Активация прокаспаз
- Каспазный каскад



## Внутренний

- Участвуют митохондрии
- Сборка апоптосомы
- Активация прокаспаз
- Каспазный каскад



# Внешний путь активации апоптоза

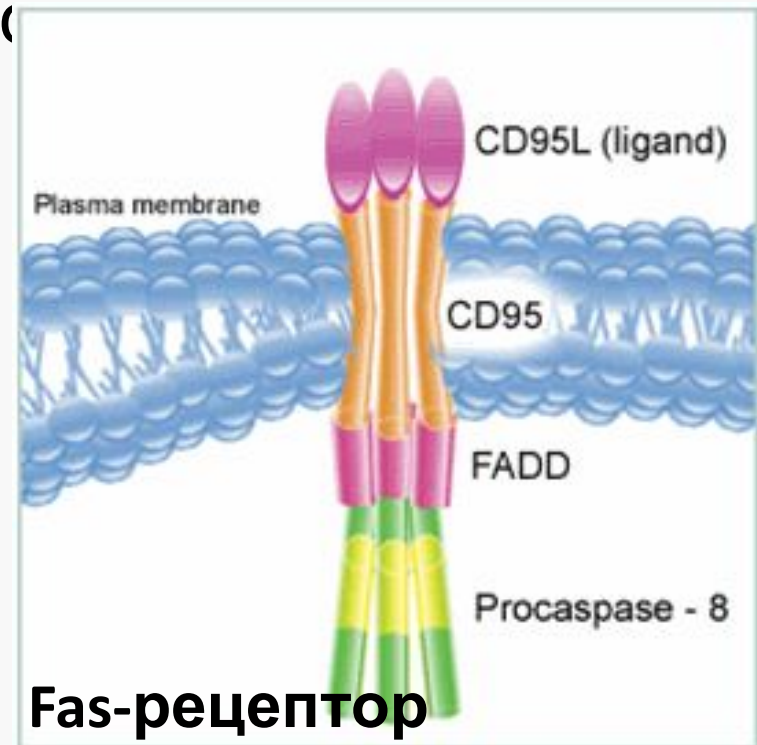
Принимают участие:

- Death-рецепторы (*рецепторы смерти*)
- Инициаторные прокаспазы -8, -10
- DISC-комплекс (*death-inducting signaling complex* - сигнальный комплекс, индуцирующий смерть)
- Эффекторные прокаспазы

# Внешний путь активации апоптоза

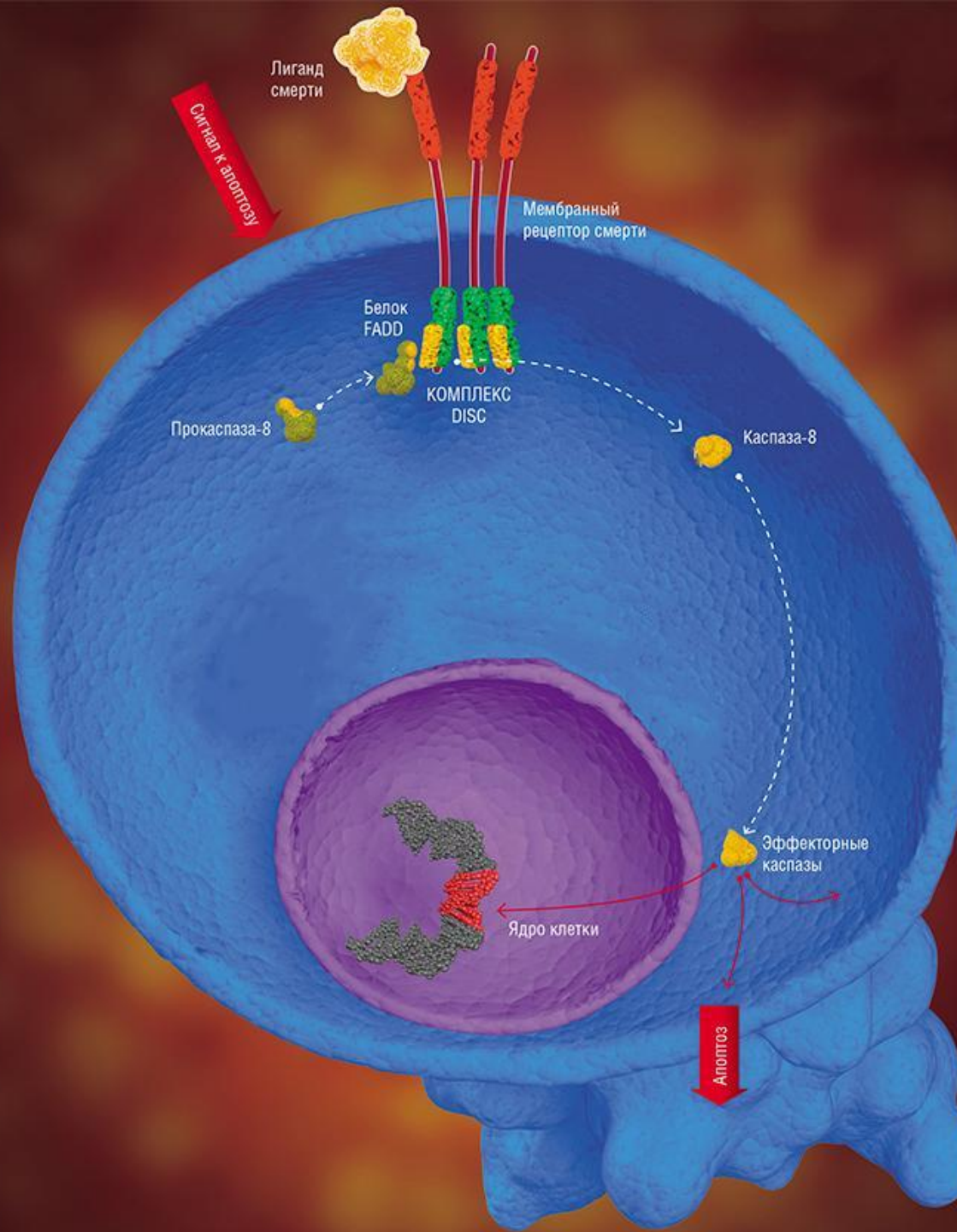
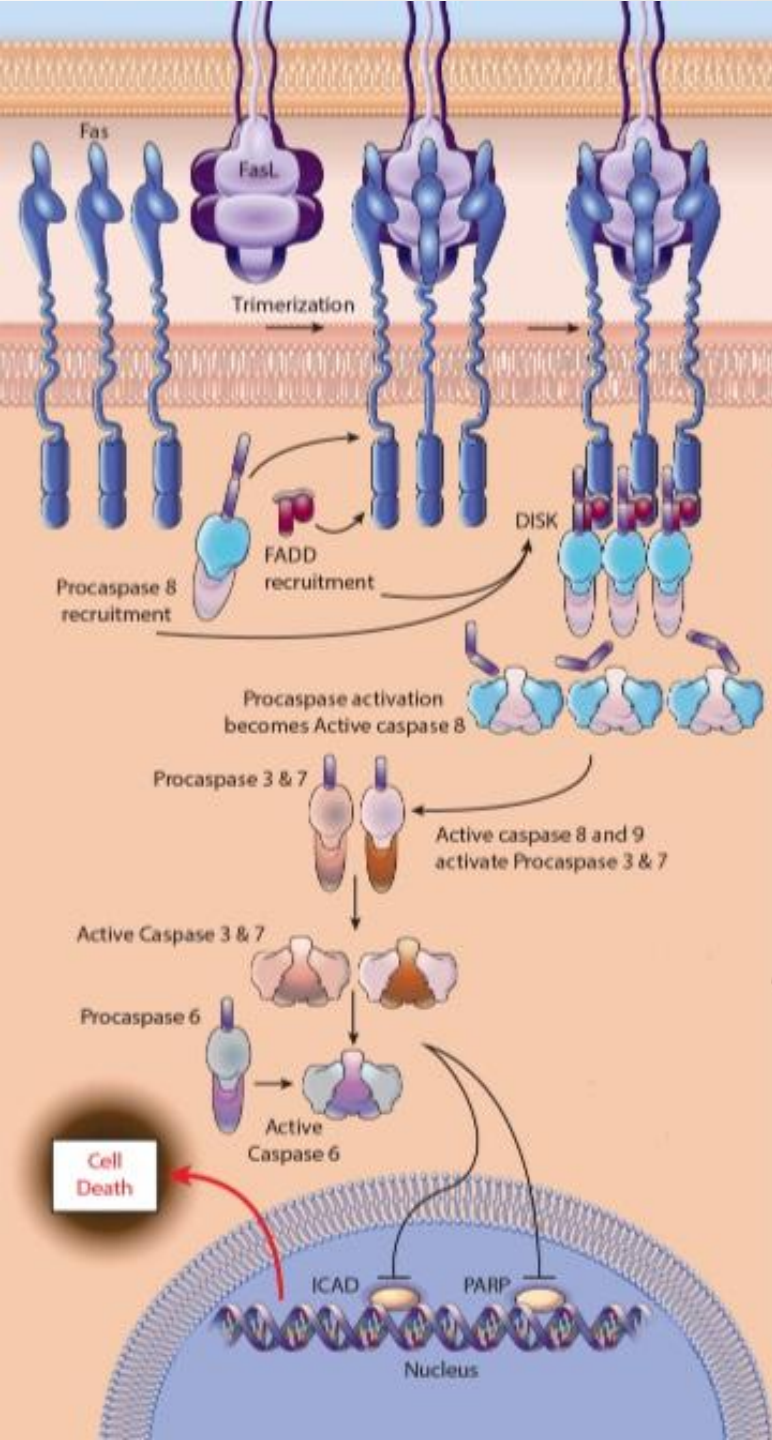
Death-рецепторы (*рецепторы смерти*) – трансмембранные белки, имеют домен для связывания сигнальных белков и «домен смерти», запускающий апоптоз.

Принадлежат к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (*TNF*).



# Внешний путь активации апоптоза

- 1) Fas-лиганд (на поверхности  $T_H_C$ ) связывается с Fas-рецептором на поверхности клетки-мишени
- 2) Активация Fas-рецептора и его внутриклеточный домен начинает связывать адаптерные белки.
- 3) Адаптерные белки связывают прокаспазы -8 и/или -10
- 4) Образуется DISC-комплекс, активирует инициаторные прокаспазы, которые затем активируют эффекторные прокаспазы
- 5) Индукция апоптоза



# Ингибирование внешнего пути

Многие клетки вырабатывают белки-ингибиторы препятствующие передаче сигнала смерти:

- Рецепторы-приманки – имеют лиганд-связывающий домен, но не имеют домена смерти => лиганд связывается, но апоптоз не запускается
- Белок FLIP – подобен инициаторной прокаспазе, но не имеет протеолитического домена => связывается с DISC-комплексом, ингибируя дальнейший путь апоптоза

Подобные механизмы ингибирования помогают предотвратить спонтанный запуск апоптоза по внешнему пути

# Внутренний путь активации апоптоза

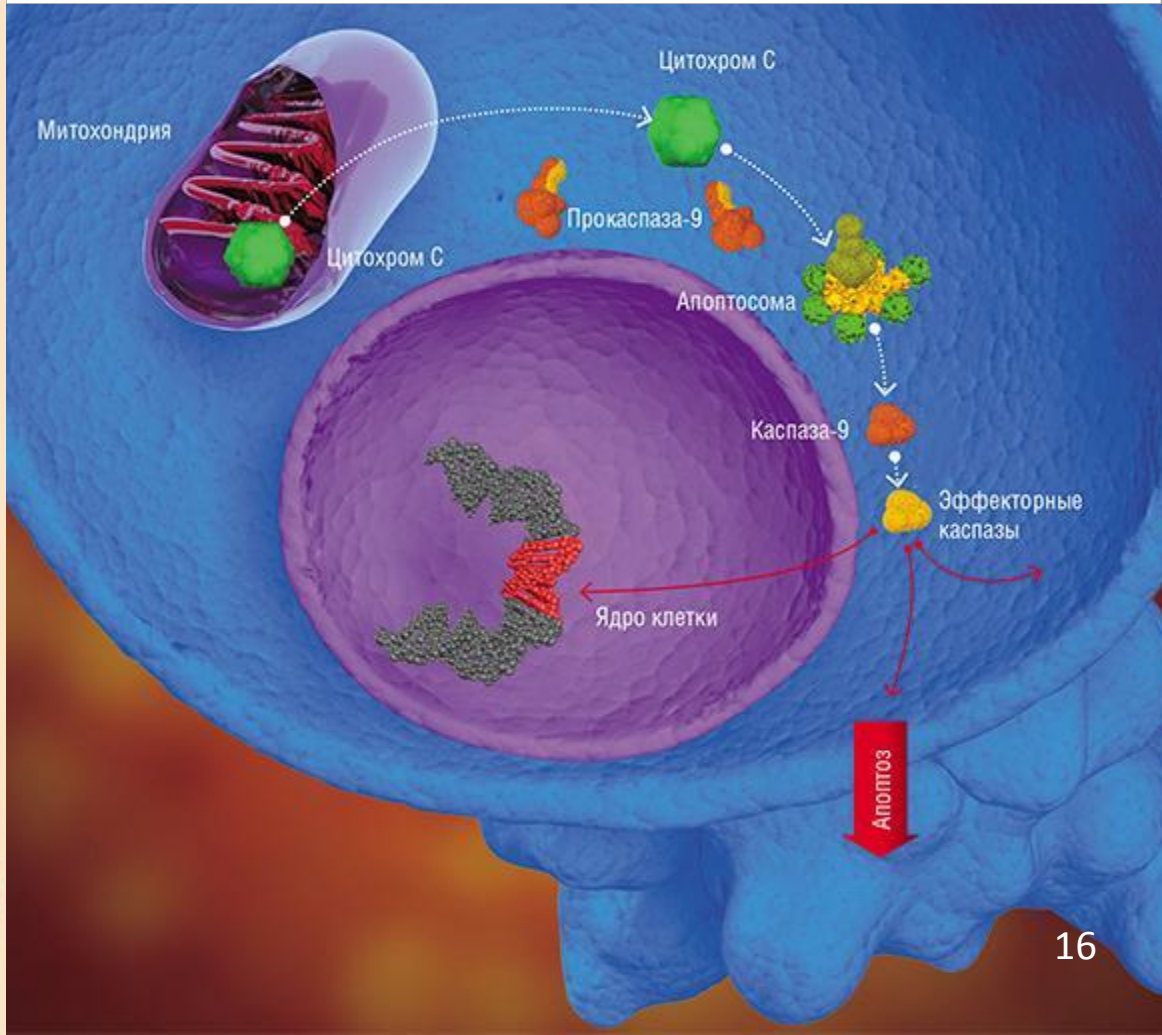
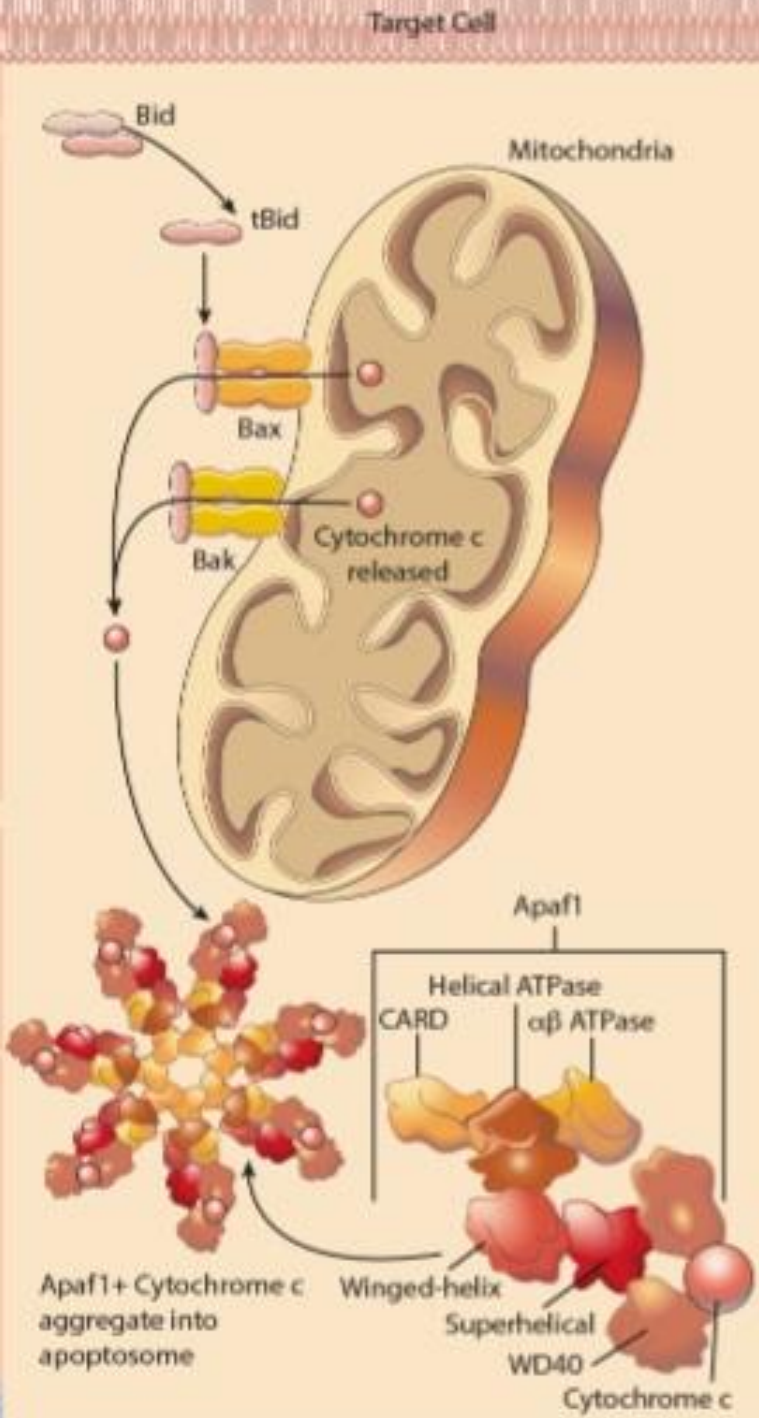
Принимают участие:

- Митохондриальные белки (цитохром c, Bcl2, BAX-only)
- ARAF1 (*apoptotic protease activating factor-1* – апоптотический фактор активации протеаз)
- P53 (белок супрессор опухоли, активируется при повреждении ДНК)
- Каспазы -3,-7,-9
- Апоптосома

# Внутренний путь активации апоптоза

- 1) Запуск программы апоптоза в ответ на стрессовое воздействие (повреждение ДНК, недостаток кислорода)
- 2) Выход митохондриальных белков из межмембранного пространства в цитоплазму (цитохром с)
- 3) Цитохром-с связывается с адаптерным белком АРАF1, образуя апоптосому
- 4) Апоптосома активирует прокаспазу-9
- 5) Прокаспазы-9 активируют эффекторные прокаспазы
- 6) Индукция апоптоза

# Внутренний путь активации апоптоза





# Внутренний путь активации апоптоза

**Bcl2** – семейство белков, регулируют внутренний путь активации апоптоза.



**Антиапоптотические  
(Bcl2, Bcl-XL)**

Ингибируют апоптоз,  
препятствуют выходу  
митохондриальных белков



**Проапоптотические**

**BH123**

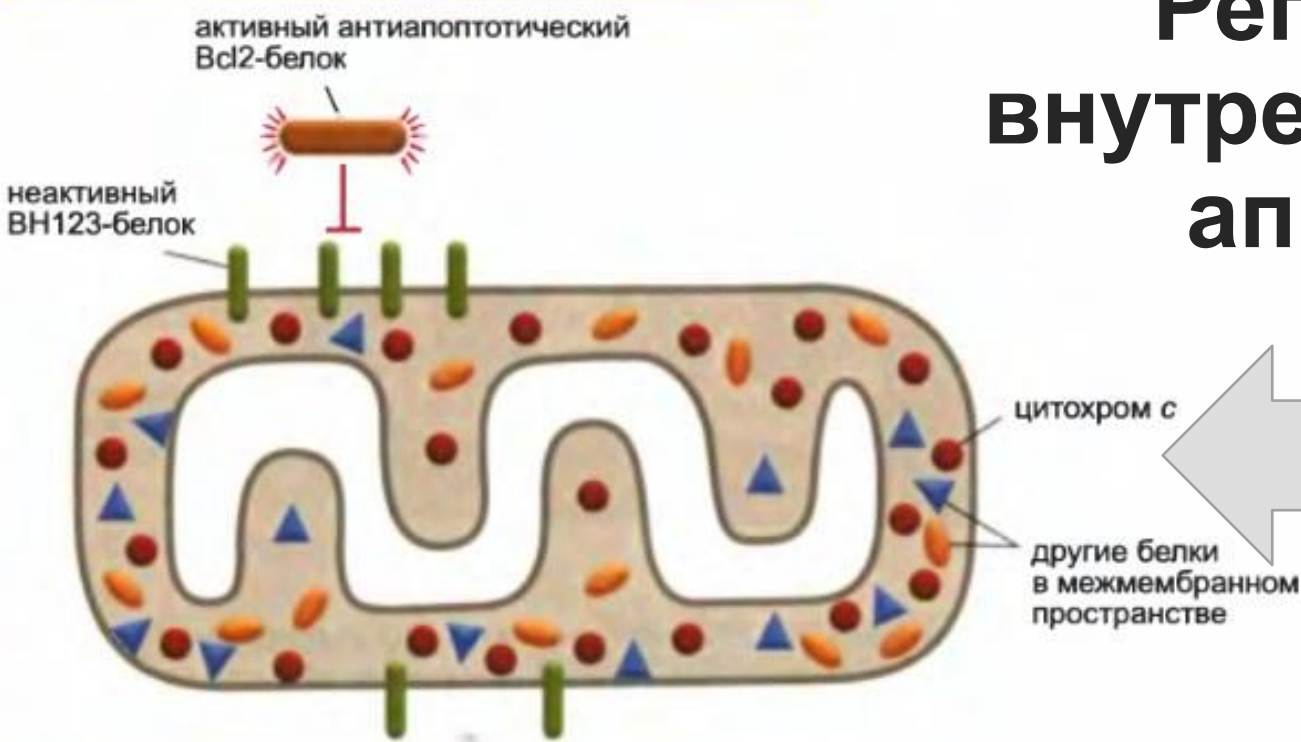
Образуют канал для  
высвобождения  
белков



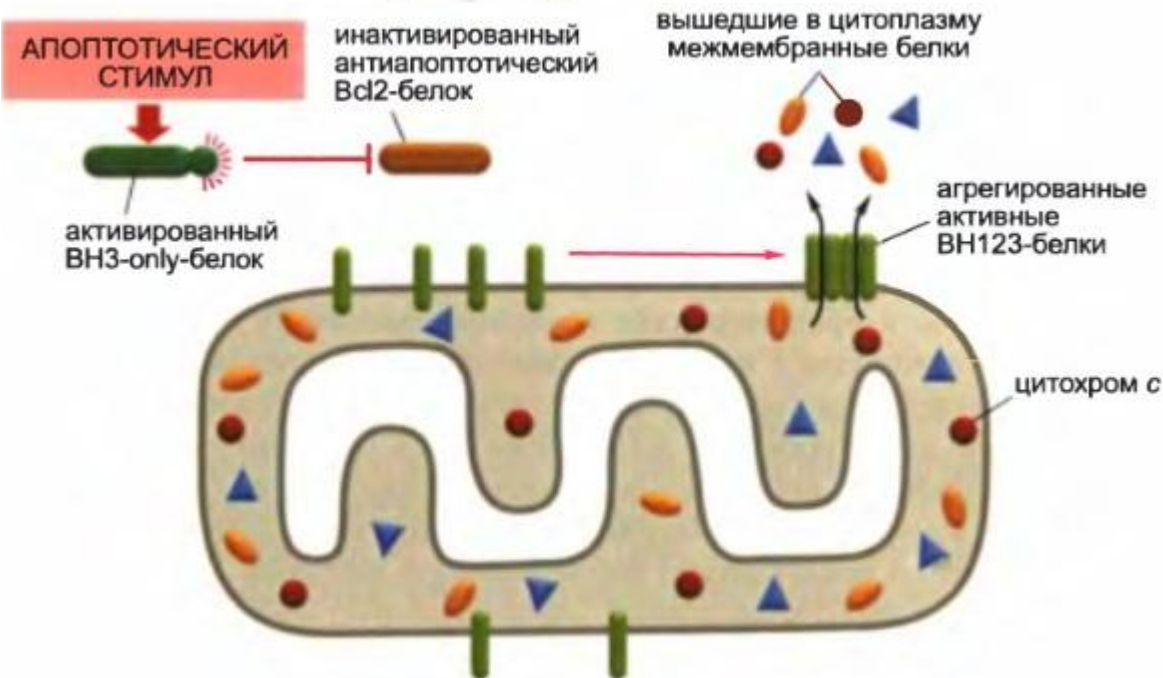
**BH3-only**

Инактивируют  
антиапоптотич  
еские белки

# Регуляция внутреннего пути апоптоза



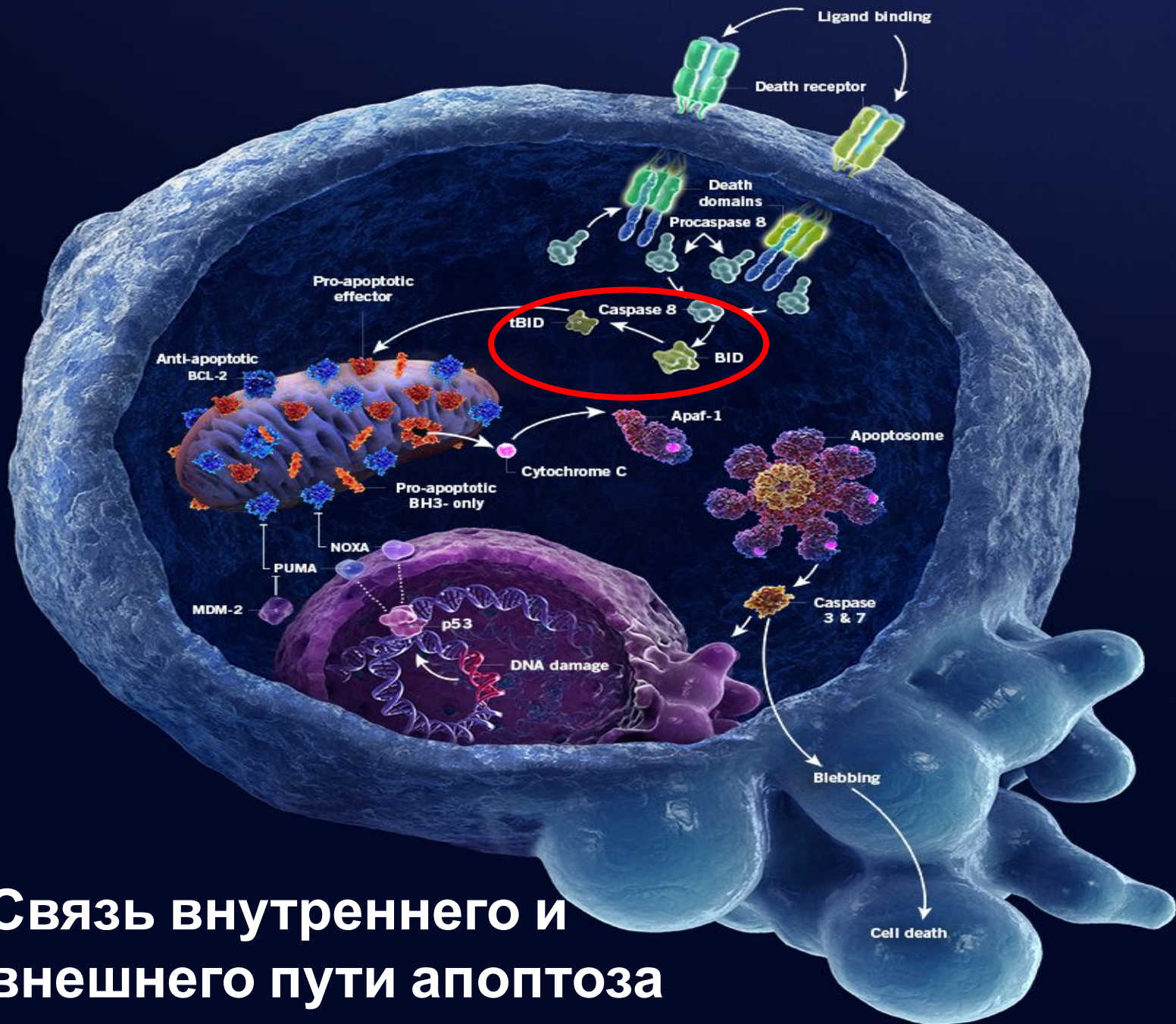
В отсутствие апоптотического стимула Bcl2 связываются с BH123 белками и ингибируют их



При поступлении сигнала к апоптозу BH3-only связываются с Bcl2, блокируя их способность ингибировать BH123. BH123 агрегируются на внешней мембране и создают канал для выхода белков в цитоплазму.

# Связь внутреннего и внешнего пути апоптоза

- Внешний путь может требовать запуска внутреннего пути для усиления каспазного сигнала.
- Участвует белок BID (входит в семейство BH3-only).
- Каспаза-8 разрезает BID, он перемещается к митохондриии, ингибирует антиапоптотические белки, запускает высвобождение цитохрома c.



# Связь внутреннего и внешнего пути апоптоза

# Некроз

Некроз - вид клеточной гибели, при котором клетки погибают в результате какого-либо экзо- или эндогенного повреждения.

- Некротические клетки набухают и разрываются, выплескивая свое содержимое на соседние клетки, вызывая воспалительную реакцию.

Некроз вызывают:

- Повреждения мембран
- Подавление активности мембранных насосов
- Изменения при недостатке кислорода

# Некроз

- Клетка набухает за счет обводнения
- В цитоплазме увеличение концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$
- Закисление цитоплазмы
- Набухание вакуолярных компонентов и разрыв их мембран
- Прекращение синтеза белков в цитозоле
- Освобождение лизосомных гидролаз и лизис клетки

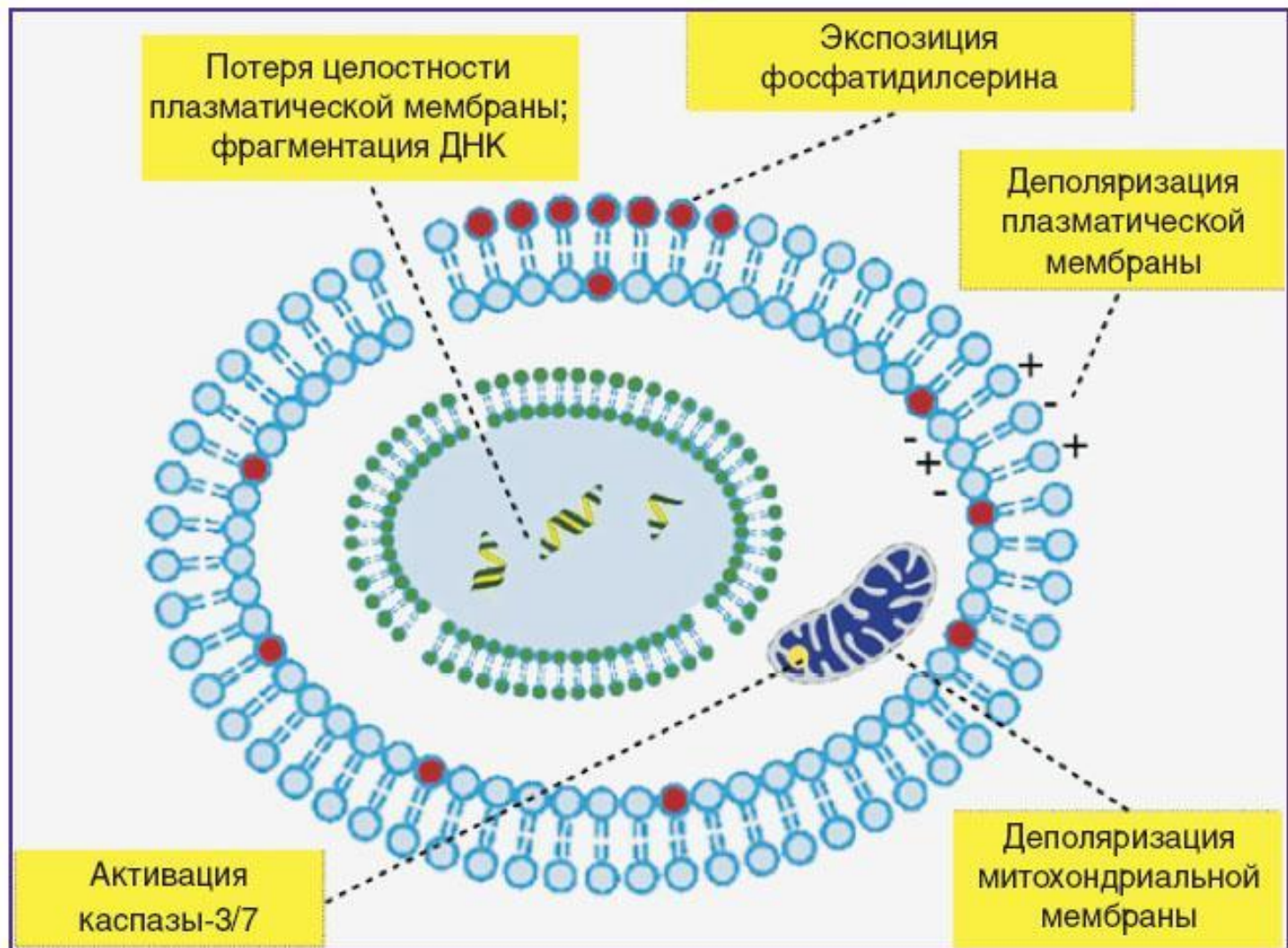
## Некроз



# Сравнительная характеристика апоптоза и некроза

Апоптоз	Некроз
Физиологический процесс	Патологический процесс
Генетически запрограммирован	Не связан с геномом клетки
Распространяется на отдельные клетки	Развивается на территории ткани\органа
Нет дистрофических изменений клеток	Предшествует дистрофия
Не сопровождается воспалением	Сопровождается воспалением
Заканчивается фагоцитозом апоптозных телец	Аутолиз погибшей ткани
Не сопровождается участием гидролаз	Развивается с помощью гидролаз
Не имеет клинических	Выраженная клиническая

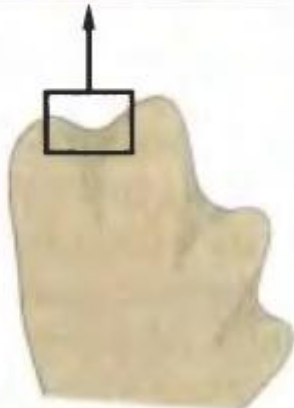
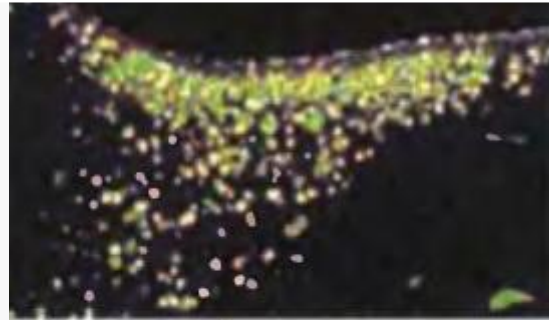
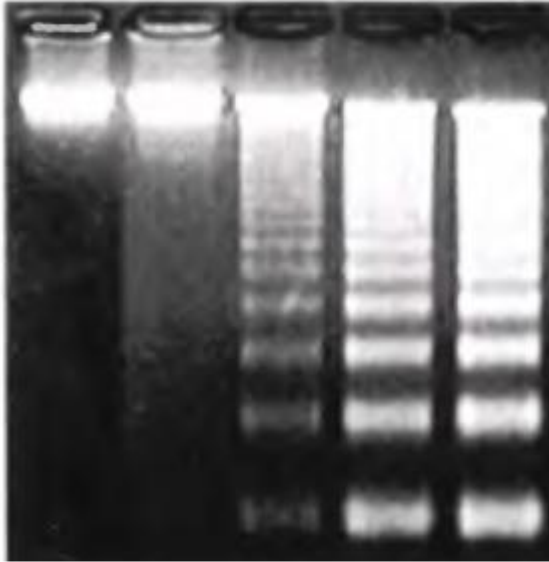
# Основные изменения в клетке при апоптозе





Время (часы)

0 1 3 6 12

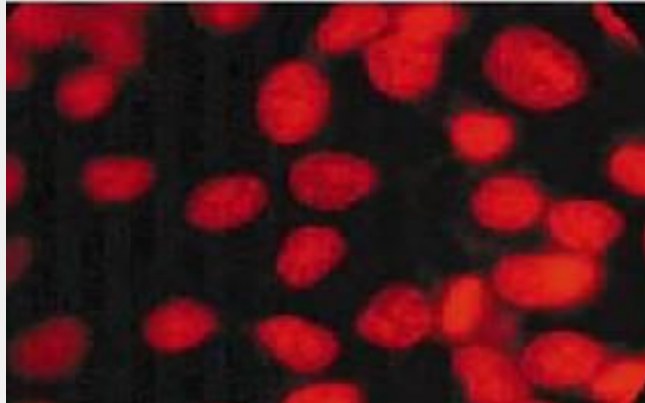


# Методы определения апоптоза

**Гель-электрофорез:** эндонуклеазы расщепляют хромосомную ДНК на фрагменты специфической длины, при анализе фрагменты ДНК выстраиваются в лестничную структуру

**TUNEL-метод:** из-за расщепления у ДНК появляется множество новых свободных концов, которые можно увидеть в апоптозных ядрах, используя меченный нуклеотид.

# Методы определения апоптоза



**Цитофлуориметрия:** Маркером является фосфатидилсерин (ФС). В апоптозных клетках ФС перескакивает на внешнюю мембрану. Его выявляют с помощью меченого белка аннексина V.

В комбинации с пропидием йодидом распознаются интактные клетки, «ранний» или «поздний» апоптоз.

**Цитометрия:** Выявление клеток готовых к апоптозу с помощью моноклональных антител.

Положительно заряженные флуоресцентные красители, которые аккумулируются в

МИТОХОНДРИЯХ

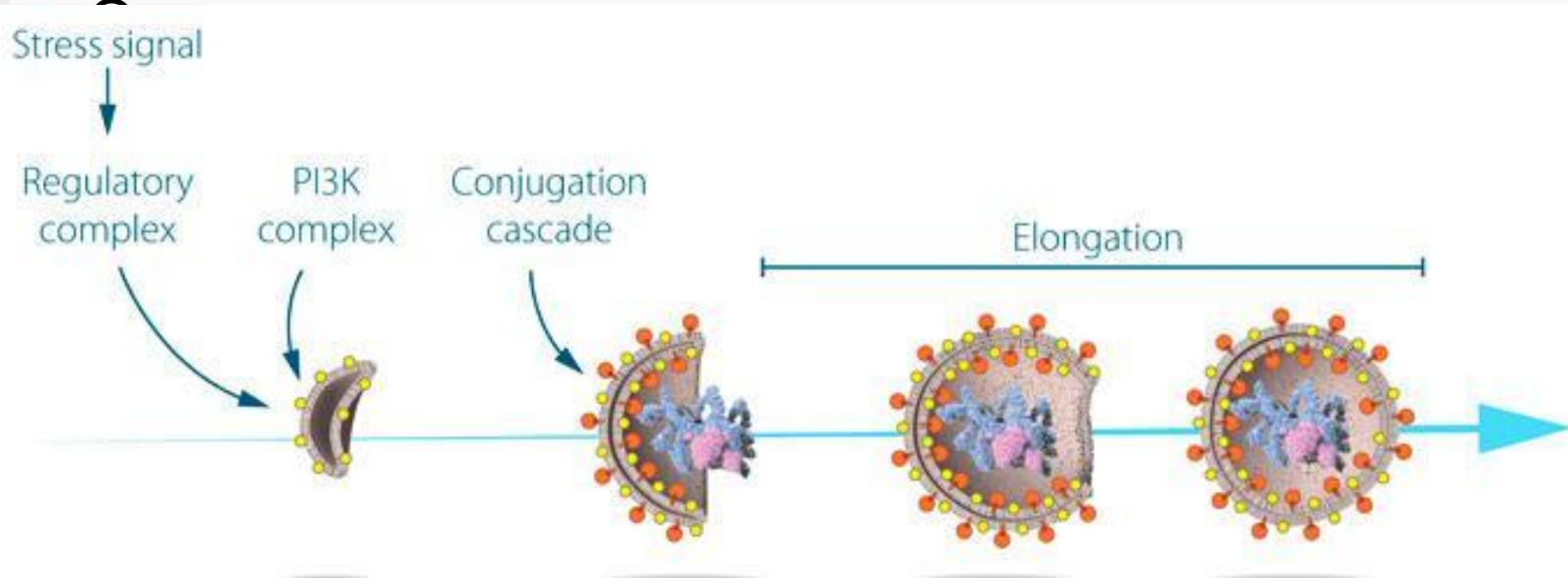
## Методы изучения апоптоза *in vitro* и *in vivo*

Изменения, возникающие при апоптозе	Методы изучения <i>in vitro</i>	Методы изучения <i>in vivo</i>
Морфологические изменения и деполяризация плазматической мембраны	Световая микроскопия Электронная микроскопия Проточная цитометрия	ПЭТ ОФЭКТ
Экспозиция фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина на поверхности цитоплазматической мембраны	Проточная цитометрия Флюоресцентная микроскопия	ПЭТ ОФЭКТ Оптический имиджинг МРТ
Активация каспаз	ИГХ ИФА Вестерн-блот Проточная цитометрия Флюоресцентный имиджинг Флюоресцентная спектроскопия FRET/FLIM-имиджинг	FRET/FLIM-имиджинг ПЭТ МРТ
Деполяризация митохондриальной мембраны	Проточная цитометрия	ПЭТ
Фрагментация ДНК	TUNEL-метод Электрофорез ИГХ ИФА Флюоресцентная микроскопия	ОФЭКТ
Биохимические маркеры апоптоза	ИГХ ИФА Вестерн-блот Флюоресцентный имиджинг FRET/FLIM-имиджинг	FRET/FLIM-имиджинг

# Аутофагия

Аутофагия — процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь её лизосом или вакуолей и подвергаются в них деградации.

В 2016 году за открытие и исследование механизмов аутофагии была вручена Нобелевская премия по физиологии и медицине японскому учёному Ёсинори



# Аутофагия

Аутофагия своего рода переработка клеточных структур. Предотвращает быстрое старение клетки.

Нарушение клеточной аутофагии у человека приводит к развитию: болезни Паркинсона, диабета II типа, раковых заболеваний.

