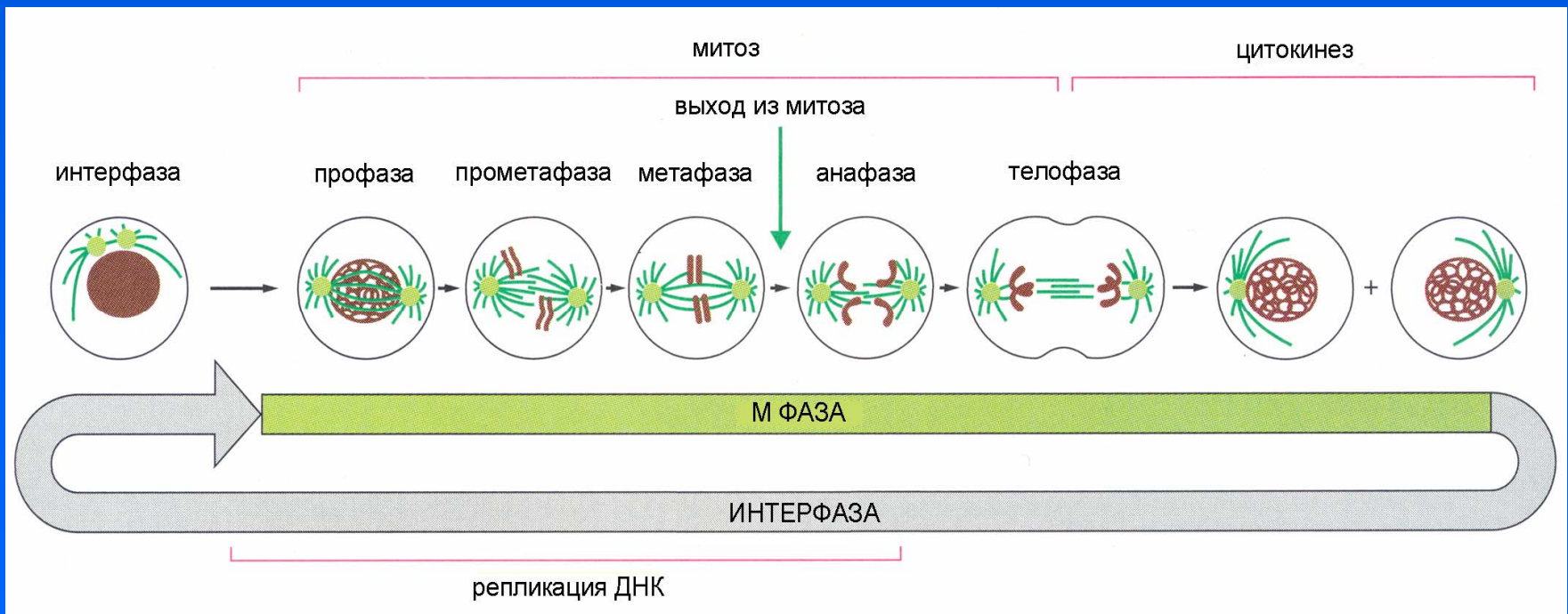


Лекция 14

Клеточный цикл

Апоптоз

Клеточный цикл



Фазы клеточного цикла

Клеточный цикл: митоз и интерфаза.

Интерфаза: общая продолжительность (в соматических клетках млекопитающих) – около суток.

Интерфаза подразделяется на периоды G_1 , S (синтез ДНК) и G_2 – опыты с импульсным мечением ДНК (Говард и Пелк).

G_1 (пресинтетический) – наиболее вариабельный период.

S-период – 6-8 часов.

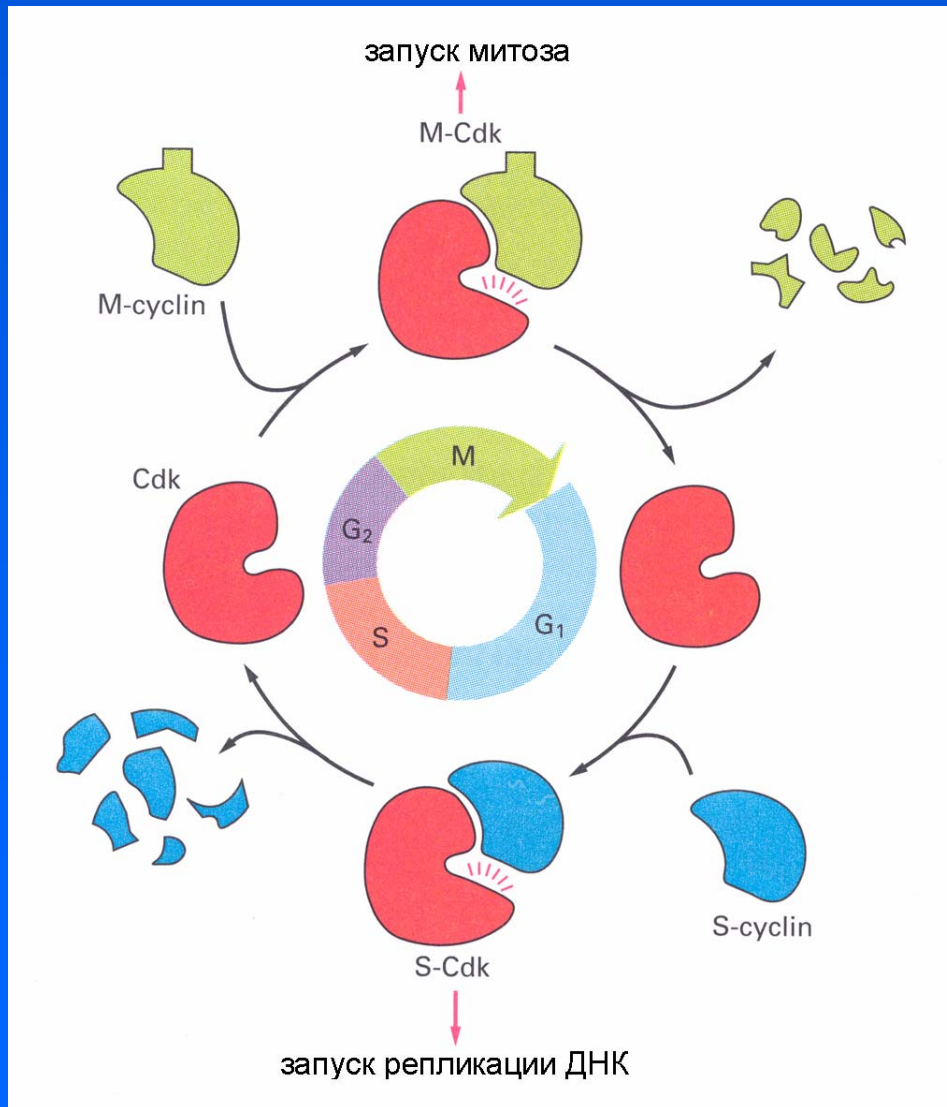
G_2 (постсинтетический период) – от 3 до 6 часов.

Рост клетки – наиболее быстрый в G_2 периоде.

Во время митоза транскрипция подавляется на 100%, трансляция – более чем на 90%.

Выход из/вход в клеточный цикл происходит, как правило, G_1 -периоде.

Клеточный цикл – основной комплекс



Cdk – циклин-зависимая
киназа (аналог cdc2)

M-cyclin – циклин Б

S-cyclin – циклин А

Cdk стабильны, а
циклины – нет (разру-
шаются протеасомами).

Взаимодействие циклинов и циклин-зависимых киназ

Циклины не обладают каталитической активностью.

Циклин-зависимые киназы неактивны без комплекса с циклинами.

Активация комплексов киназа-циклин носит нелинейный характер, что обеспечивает гиперчувствительность к сигналам.

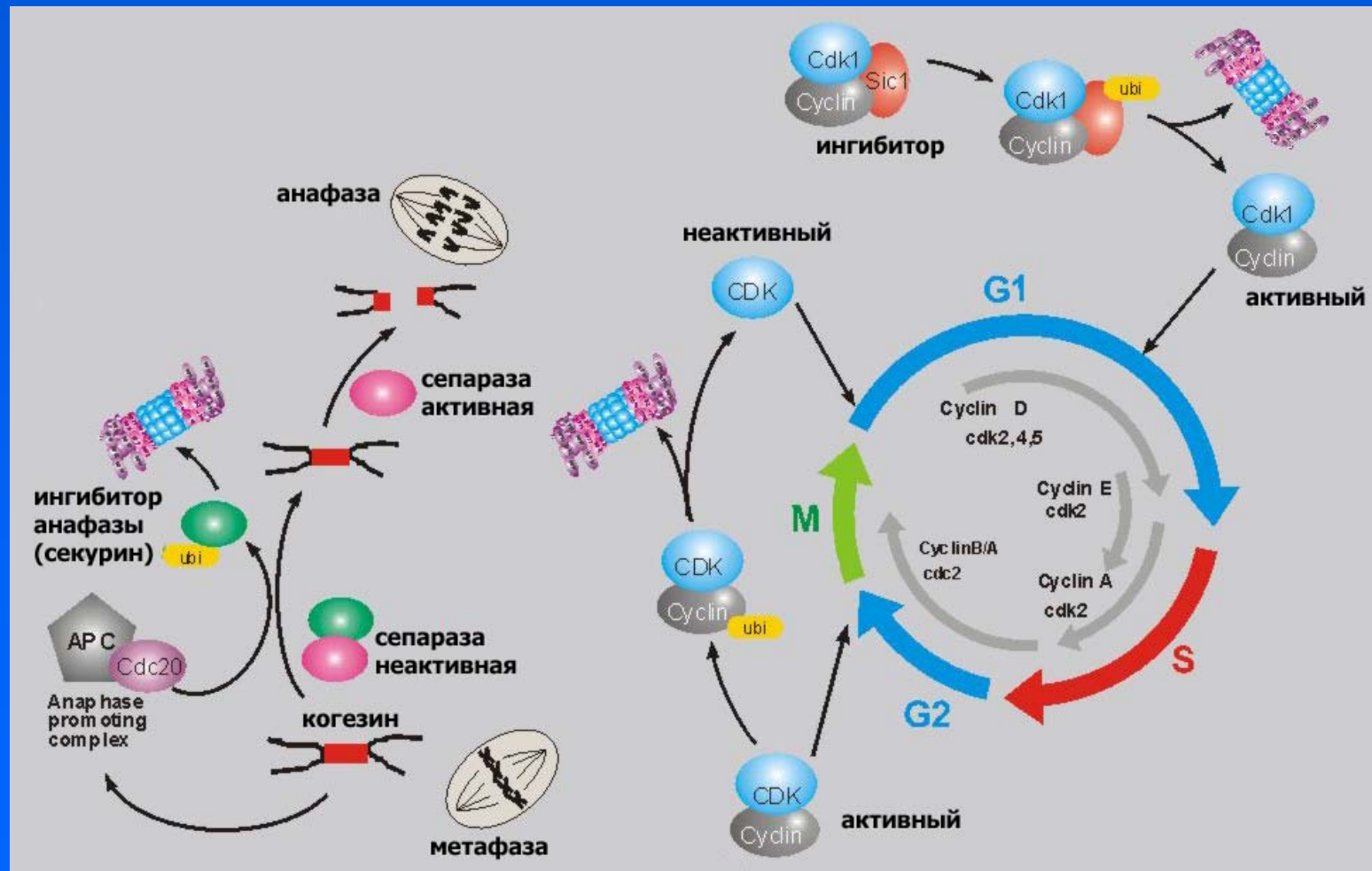
Последовательность работы основных циклинов:

В ответ на пролиферативный стимул синтезируется циклин Д. Он связывается со специальной киназой, и запускает синтез транскрипционных факторов, которые обеспечивают синтез циклина Е, циклина А и ферментов для синтеза ДНК.

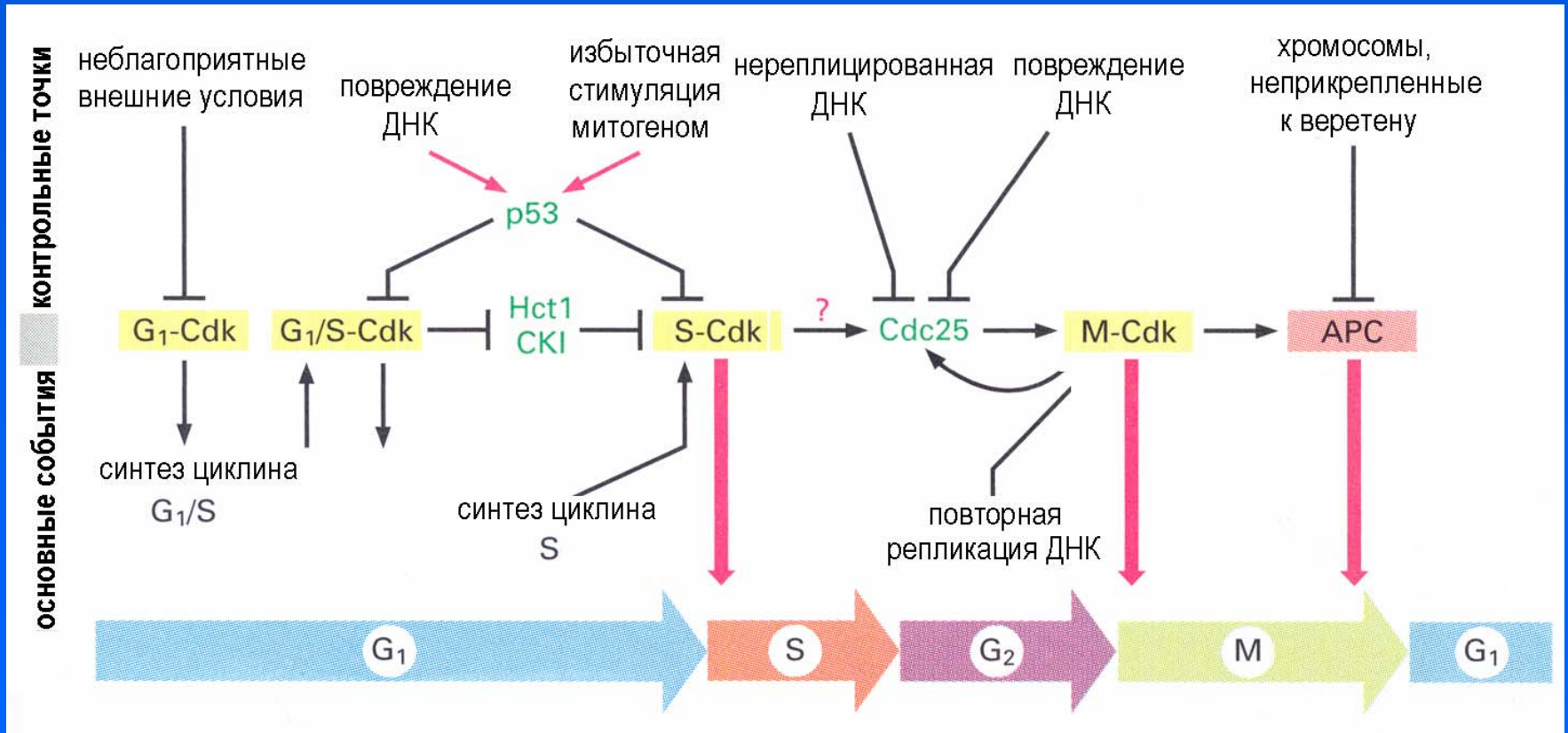
Циклин Е связывается с киназой и запускает S-фазу.

Циклин Б связывается с киназой и запускает профазу. Выход из митоза происходит при разрушении комплекса циклина Б с киназой.

Клеточный цикл – общая схема



Клеточный цикл – общая схема ингибирования



Контрольные точки клеточного цикла

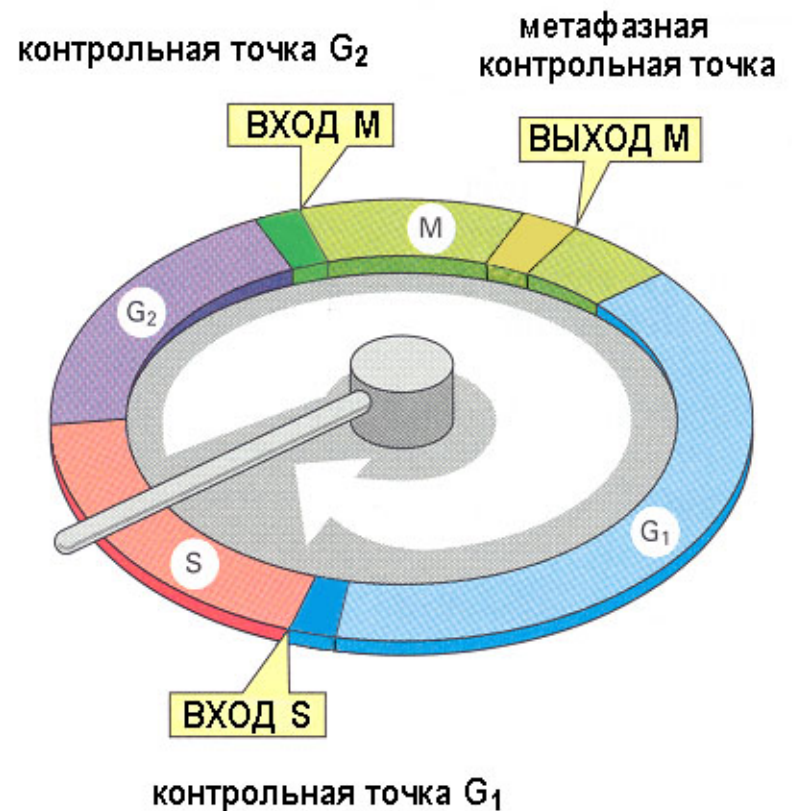
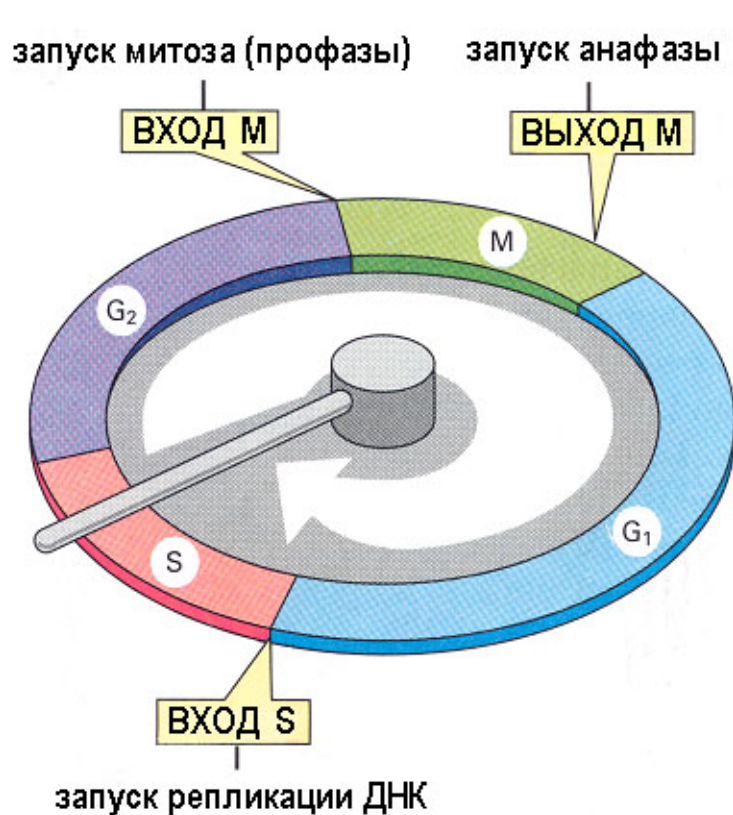
Контрольная точка – этап клеточного цикла, непрохождение которого индуцирует программу, альтернативную пролиферации.

G1/S – проверка повреждений в ДНК (зависит от p53) и разрешение на начало синтеза ДНК. При непрохождении, как правило, запускается репарация ДНК.

G2/M – проверка повреждений в ДНК (зависит от p53) – вход в митоз. При непрохождении, как правило, запускается апоптоз.

Метафаза/анафаза – проверка биполярного прикрепления хромосом. Специальный комплекс (APC – anaphase promoting complex) разрешает завершение митоза и восстановление интерфазного ядра. Короткая задержка в метафазе обратима. При длительной задержке запускается апоптоз.

Клеточный цикл – контрольные точки



Регуляция синтеза ДНК

Положительный контроль репликации: лицензирование.

Узнающий комплекс (origin recognition complex) ДНК-полимеразы дополняется лицензирующими факторами и белками MCM (mini chromosome maintenance proteins).

Узнающий комплекс садится на определенные последовательности ДНК – ori (origin). У прокариот – одна последовательность на хромосому, у эукариот – много.

В процессе репликации белки MCM отделяются от ДНК и лицензирующие факторы разрушаются (убиквитинизация).

Отрицательный контроль репликации: геминин. Он препятствует сборке MCM на новосинтезированной ДНК.

Геминин отсутствует в G1, накапливается начиная с S-фазы и разрушается в митозе.

Регуляция клеточного цикла

Обеспечивается полнота репликации ДНК и единственность цикла ее удвоения.

Вход в клеточный цикл и выход из него регулируются внешними сигналами. Исключение – стволовые клетки и клетки на ранних делениях развития (дробление).

Любые нарушения синтеза ДНК означают остановку клеточного цикла – обратимую (репарация) или необратимую (переход в апоптоз).

Нарушения регуляции клеточного цикла являются причиной возникновения раковых опухолей.

Подходы к изучению клеточного цикла

Синхронизация клеток: накопление на границе G1-S фаз (гидроксимочевина и др.), или накопление в митозе (стряхивание).

Гибридизация клеток на разных стадиях клеточного цикла:

G1/S – начинается синтез ДНК.

S/G2 – синтез ДНК в G2 ядрах не идет.

S (G2)/профаза – преждевременная конденсация хромосом.

Ингибиторы прохождения клеточного цикла: белки, инактивирующие комплексы циклинов с киназами (например, ген ретинобластомы – Rb1).

Некоторые ключевые регуляторы клеточного цикла

Белок p53. Имеет центры связывания с ДНК. Двоякая роль: торможение клеточного цикла и индукция апоптоза.

Mdm2 – негативный регулятор p53.

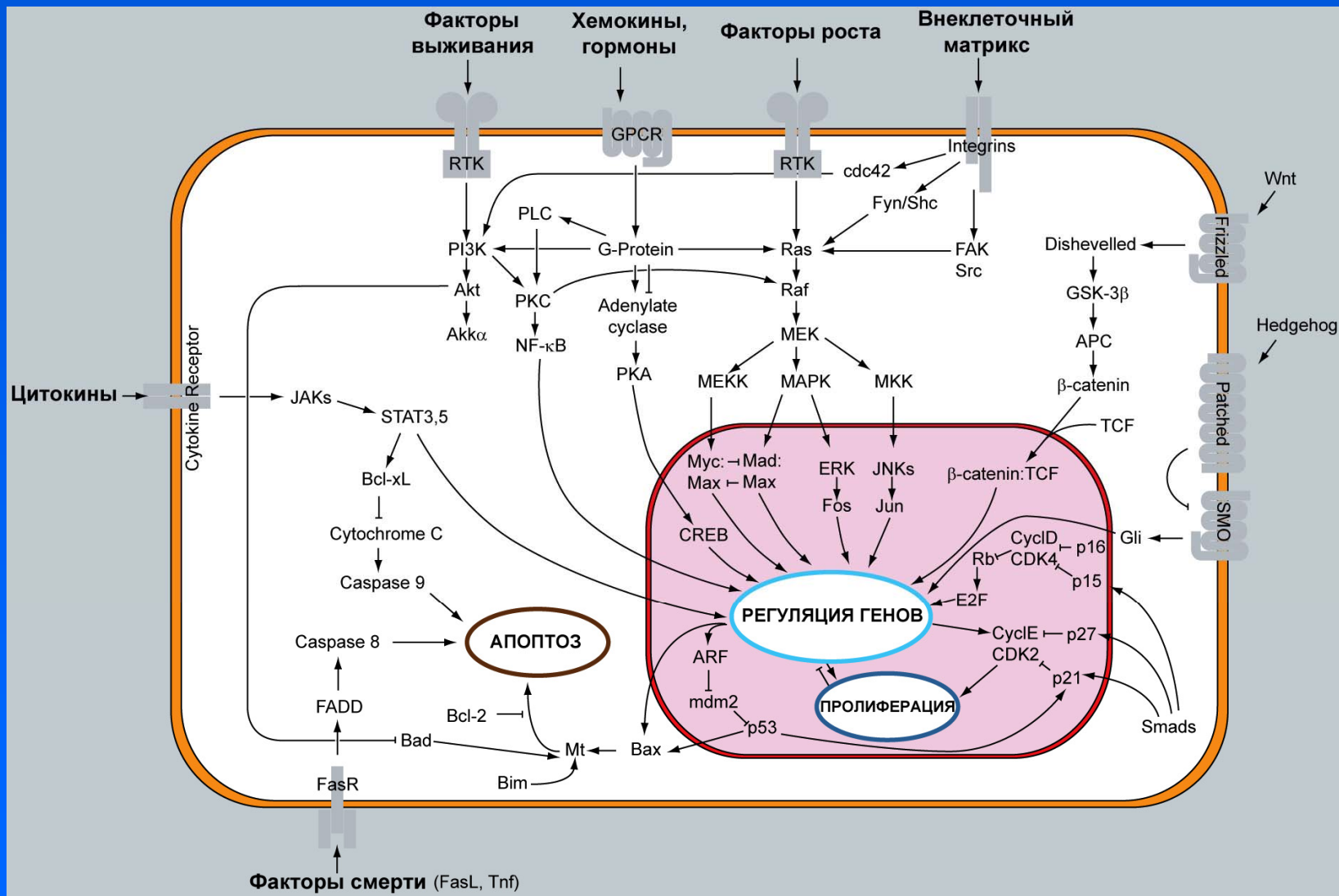
USP7 – позитивный регулятор p53.

Белок гена ретинобластомы – Rb1. Работает в гипофосфорилированном состоянии (G1). В начале S-фазы гиперфосфорилируется и инактивируется. Неактивен в дефосфорилированном (ранний G1) и гиперфосфорилированном (S, G2, M) состояниях.

p21 – циклин-зависимый ингибитор киназ (комплексы циклин Е-киназа 2 и циклин Д – киназа 4). Активируется посредством p53 и тормозит прохождение S-фазы.

p27 – ингибитор клеточного цикла, блокирует его на стадии G1. Регулируется внешними факторами.

Регуляция клеточной пролиферации и гибели



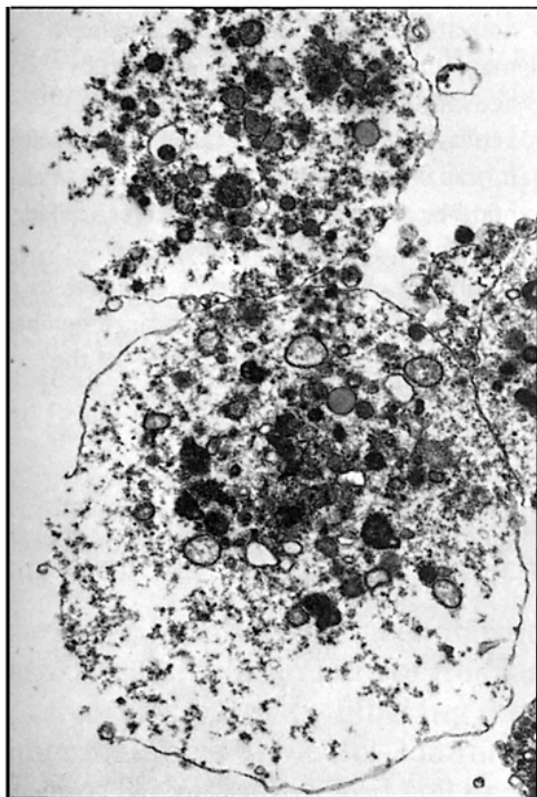
**Апоптоз —
программируемая
гибель клеток**

Апоптоз и некроз: сравнение

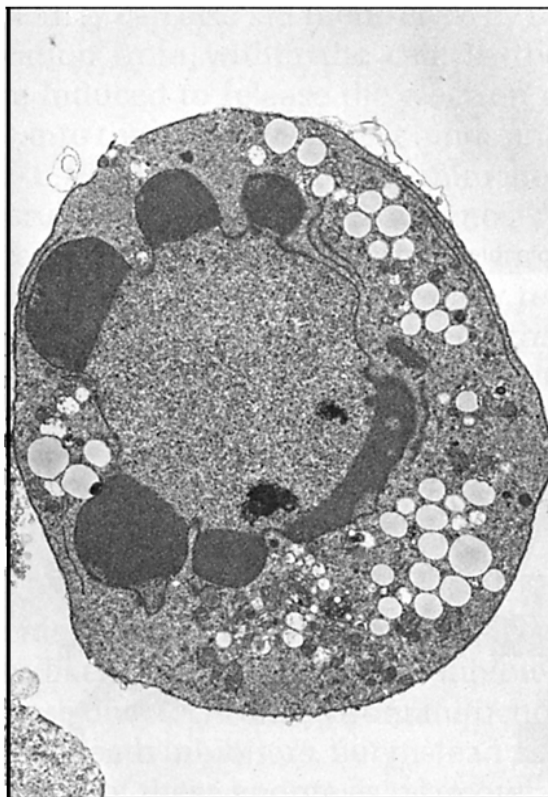
Гибель поврежденной клетки: набухание органелл, потеря целостности мембраны. На уровне ткани – индукция воспаления.

Апоптоз: съеживание клетки и “вскипание” поверхности; фрагментация ДНК и частичный протеолиз цитоплазматических белков. Конечные стадии: фрагментация клетки и ее фагоцитоз. Процесс происходит в отсутствие воспаления.

Некроз и апоптоз - ЭМ

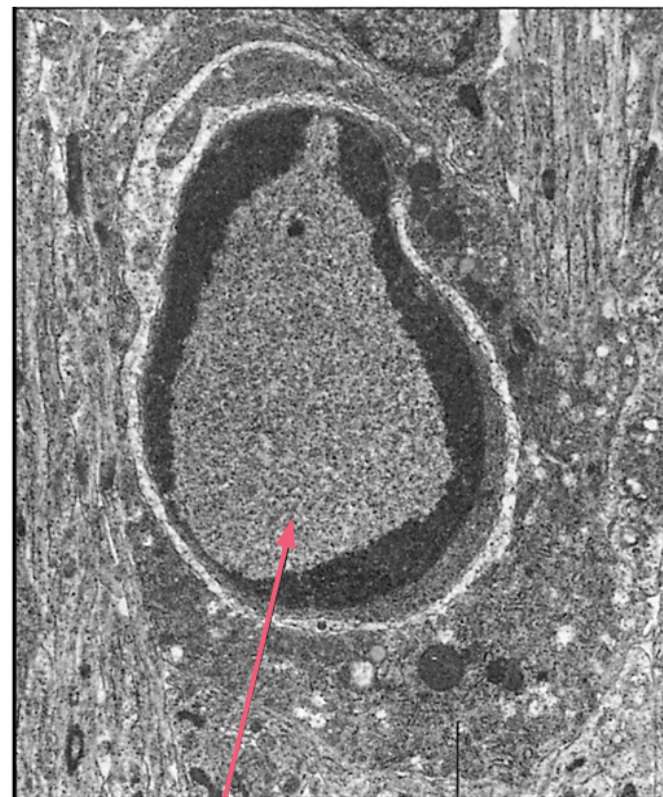


некроз



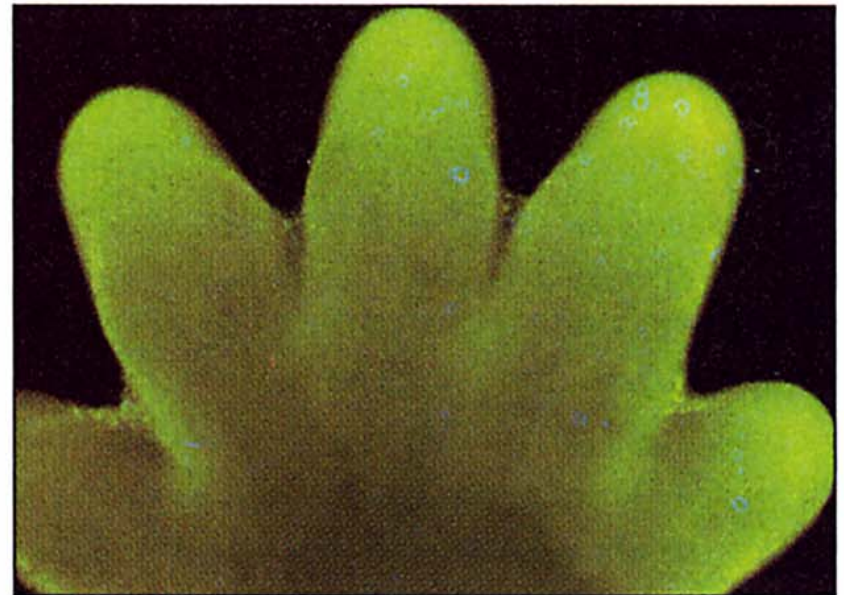
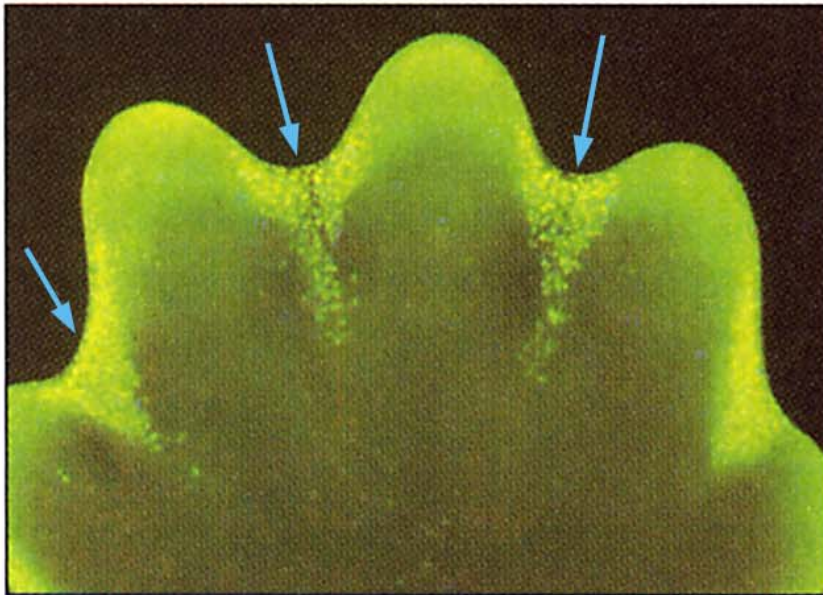
апоптоз

10 μm



фагоцитирующая клетка

Апоптоз при развитии конечности



1 mm

Особенности апоптоза

1. Долгое время сохраняется высокий уровень выработки АТФ.
2. Процесс протекает медленно и занимает многие часы (возможно – более суток).
3. Процесс состоит из нескольких «модулей», которые могут использоваться клеткой и при индукции некроза.
4. Основное отличие некроза – быстрое нарушение энергетики клетки и вследствие этого – осмотические изменения.

Индукция апоптоза

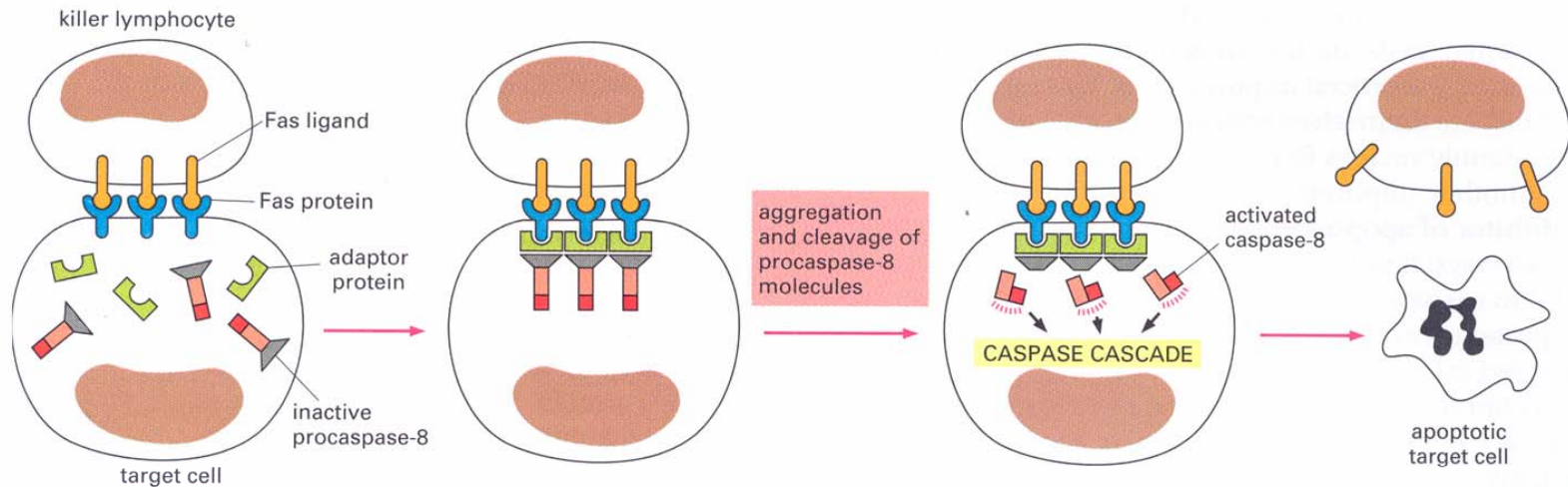
Внешний путь – Fas и TNF-рецептор (фактор некроза опухоли). Связываются с Fas-лигандом (на поверхности другой клетки) и TNF соответственно.

Внутренний путь – активация каспаз через повреждение комплекса Bcl-2-Apaf1 (1-й фактор активации ферментов апоптоза).

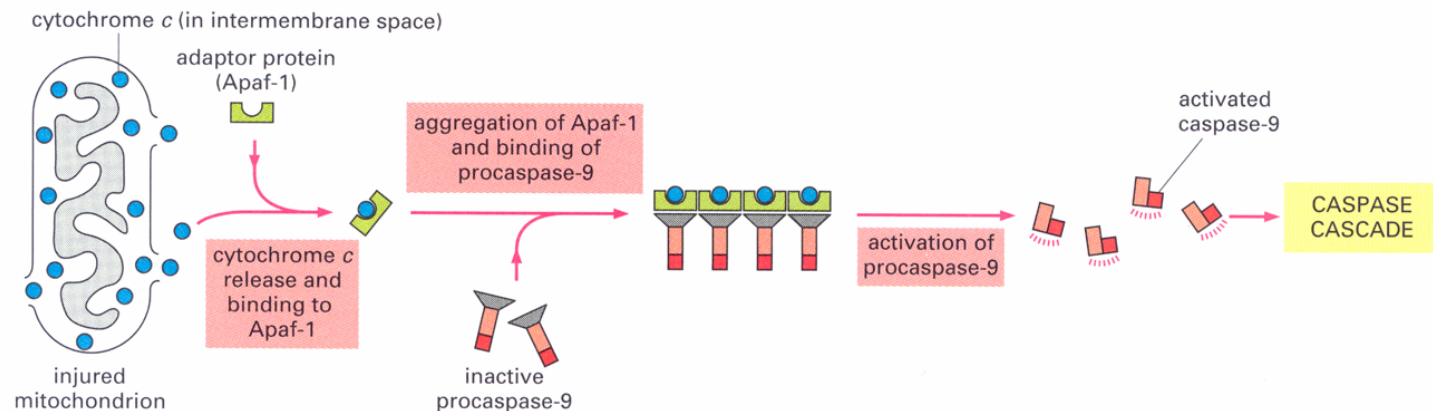
Второй внутренний путь – через активные формы кислорода (повреждение митохондрий).

АПОПТОЗ – ОСНОВНЫЕ ПУТИ

Внешняя активация



Внутренняя активация



Апоптоз – последовательность событий

Выход цитохрома С из митохондрий, продолжительная активация p53 или образование комплекса лиганда с Fas/TNF-рецептором.

Появление фосфатидилсерина на поверхности плазматической мембраны и налипание аннексина V.

Активация прокаспазы (8 или 9) и запуск каспазного каскада (активация каспазы 3 и др.).

Активация нуклеаз – деградация хроматина с расщеплением ДНК на фрагменты.

Съеживание клетки и «вскипание» поверхности.

Фрагментация клетки и ее поглощение соседями (фагоцитоз).

Каспазы

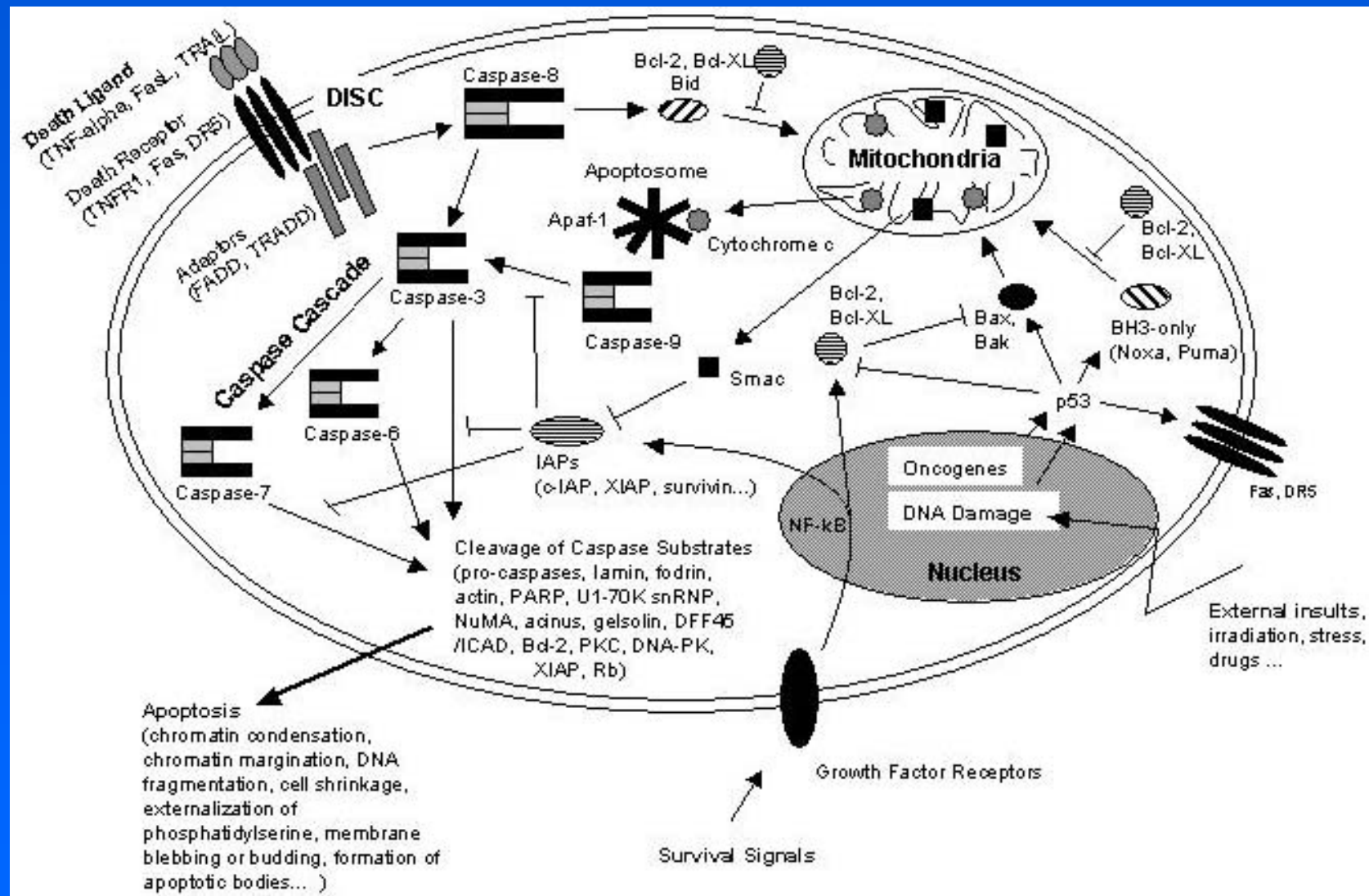
Семейство ферментов.

Синтезируются в виде прокаспаз. В нормальной клетке неактивны.

Активируются за счет фосфорилирования и отщепления фрагментов молекулы.

В активной форме расщепляют белки на крупные фрагменты по некоторым остаткам аспарагина.

Апоптоз – общая схема



Физиологическая роль апоптоза

Регуляция численности клеточных популяций в эмбриогенезе – удаление избыточных клеток.

Удаление клеток во взрослом организме без возникновения очага воспаления.

Контроль размножения клеток через сверхточные точки.

Борьба организма с вирусными инфекциями.

Апоптоз у растений

**Механизм индукции – разрушение
клеточной вакуоли.**

Причина – вирусная инфекция.

**Ферменты-исполнители – аналоги
каспаз.**