

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА ИМЕНИ МИРЗО УЛУГБЕКА

КУРСОВАЯ РАБОТА

По предмету Биофизика регуляции внутриклеточных процессов

На тему «Роль митохондрий в процессе апоптоза»

Сдала Рахматуллина Н.

Приняла доц. Левицкая Ю. В.

Ташкент - 2013

Содержание

Введение.....	3
Глава 1. Общие представления об апоптозе	6
1.1. Структура и механизмы регуляции mPTP	8
1.2. Про- и антиапоптозные факторы	11
Глава 2. Физиологическое значение апоптоза	26
Глава 3. Роль апоптоза в патологических состояниях	31
Заключение	39
Список использованной литературы	40

Программированная гибель клеток в последнее время привлекает к себе внимание многочисленных исследователей, прежде всего, по двум причинам.

Во-первых, как оказалось, она играет важную роль в морфогенетических процессах и в регуляции численности клеток на протяжении всего онтогенетического развития многоклеточного организма.

Во-вторых, обнаружено, что возникновение многих тяжелых заболеваний связано с такими нарушениями программы клеточной гибели, при которых клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей, либо гибель захватывает избыточное число клеток, что в свою очередь приводит к патологической дегенерации тканей и органов.

Феномен апоптоза – программированной клеточной гибели описан исследователями значительно позднее, чем это было сделано по отношению к некрозу.

Так *Рудольф Вирхов* еще в 1859 году описал гистологические изменения, которые происходят в гибнущих клетках. Речь при этом шла о процессе, который Вирхов назвал “дегенерацией”, “некрозом”, “умиранием клеток”, и подчеркнул, что указанные изменения характерны для необратимых изменений в тканях.

Однако вскоре после этого в 1864 году известный зоолог и теоретик эволюционного учения *Август Вейсман* впервые описал локальную гибель клеток при метаморфозе у насекомых (превращение личинки во взрослую особь). С современной точки зрения это описание соответствует эмбриональному апоптозу.

Позднее детальное описание смерти клеток, как физиологического явления, было дано в 1885 году немецким цитологом *В. Флемингом*, который описал распад клеток овариального эпителия на частицы (в последствие названные *апоптозными тельцами*), определив процесс быстрого

исчезновения образовавшихся при распаде клеток фрагментов цитоплазмы и ядра, как *хроматолизис*.

Физиологическую смерть клеток у эмбрионов в 1950 году детально описал *Л.Глусман*, назвав ее «программированной клеточной гибелью». Этот исследователь отчетливо понимал, что имеет дело с особым видом клеточной смерти, но посчитал, что данное явление присуще только эмбриогенезу и принципиально отличается от клеточной гибели, характерной для взрослого организма.

Большинство работ, связанных с описанием апоптоза опухолевых клеток, клеток иммунной системы и некоторых других тканей относятся к концу прошлого века. Сам термин «апоптоз» был впервые применен в статье трех исследователей *J.F.R.Kerr, A.H.Wyllie, A.R.Currie*, опубликовавших в журнале *British J. of Cancer* материалы о программированной гибели клеток опухоли.

Значимость апоптоза и его роль в физиологических и патологических процессах была подтверждена присуждением в 2002 году нобелевской премии трем исследователям: *Сидни Бреннеру (S.Brenner)*, *Джону Салстону (J.Sulston)* и *Роберту Хорвицу (R.Horvitz)* за циклы работ, посвященных проблеме программированной клеточной гибели. В частности, С.Бреннер еще в 60-е годы прошлого века обнаружил гены, управляющие «жизнью и смертью» клеток органов в процессе их развития. Д.Салстон впервые обнаружил и описал мутации в генах апоптоза, а Р.Хорвиц механизмы взаимосвязи между генами, вовлеченными в процесс апоптоза.



В запуске апоптоза участвуют различные органеллы (Nigg, 2002; Chen, Wang, 2002; Edinger, Thompson, 2004), но, прежде всего это плазматическая мембрана и митохондрии (Bras et al., 2005).

Морфологические преобразования в процессе апоптоза выражаются в разной степени распада внутриклеточных компонентов. Конечными этапами апоптоза является уплотнение цитоплазмы, фрагментация ядер и самих клеток с образованием апоптотических телец, в которых могут быть фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т.д. Апоптотические клетки и тельца экспонируют на поверхности сигнальные и адгезивные молекулы, которые узнаются соседними клетками или макрофагами и способствуют фагоцитозу. К таким молекулам относятся фосфатидилсерин, лизофосфолипиды, витронектин, тромбоспондин и др. Процессу фагоцитоза способствует также инактивация на поверхности умирающих клеток молекул типа CD31, необходимых для распознавания не подлежащих поглощению жизнеспособных клеток.

В данной работе будет рассмотрен механизм апоптоза при участии митохондрий.

Глава 1. Общие представления об апоптозе

Апоптоз (от греческого apo – «отделение» и ptosis – «падение») – это запрограммированный процесс уничтожения клетки, вызванный внутренними (внутриклеточными) или внешними (внеклеточными) как физиологическими, так и патологическими факторами, активирующими генетическую программу гибели клетки и ее удаление из ткани.



Рис. 1.1. Схема, иллюстрирующая морфологические изменения при апоптозе

Митохондрии – клеточные органеллы с двойной мембраной, обладают собственным геномом и способны автономно размножаться. Митохондрии обеспечивают клетки энергией в виде АТФ. Он синтезируется за счет энергии высвобождающейся при переносе электронов с атомов водорода, образовавшихся при переработке субстратов, на конечный акцептор – кислород. Белки, переносящие электроны, встроены во внутреннюю мембрану митохондрий и образуют электронтранспортную цепь. Ее конечный элемент – цитохром С-оксидаза - и передает электроны от цитохрома С на кислород .

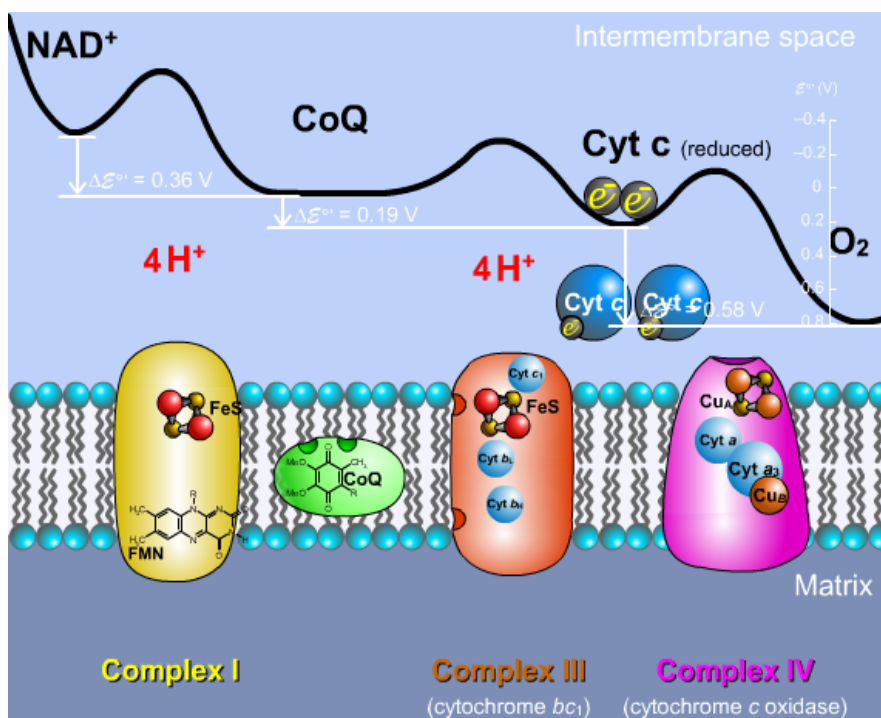


Рис. 1.2. Электронтранспортная цепь митохондрий

Органеллы, обеспечивающие жизнедеятельность клетки, обеспечивают и ее смерть. При сильном стрессовом воздействии (переохлаждении; нагревании; стимуляции образования АФК другими структурами клетки, помимо митохондрий; перекисном окислении липидов плазматической мембраны – чаще всего при облучении) в цитоплазме резко повышается концентрация ионов кальция. Если кальциевые депо клетки не справляются с его утилизацией, открывается так называемая митохондриальная пора диаметром 2,6-2,9 нм.

1.1. Структура и механизмы регуляции mPTP

Основными компонентами митохондриальной поры считаются потенциал-зависимый анионный канал VDAC1, расположенный на внешней мембране; АДФ/АТФ-антипортер (АНТ) – во внутренней мембране; циклофилинД (ЦфД) – пептидил/пропил-цис-транс-изомераза, локализованная в матриксе Мх; и бензодиазепиновый рецептор .

Одна из моделей мегاپоры (РТР)

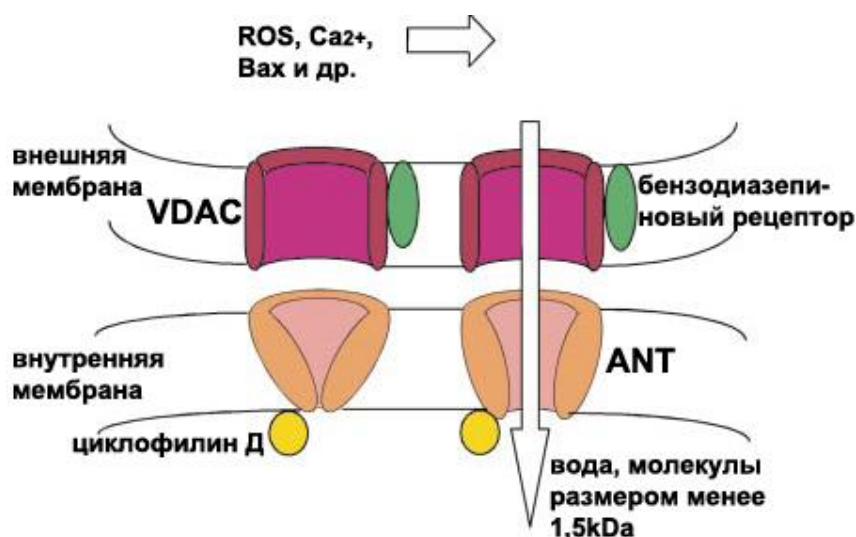


Рис. 1.3. Модель mPTP

VDAC1 функционирует не только как шлагбаум для молекул в месте входа и выхода молекул из межмембранного пространства, но также является функциональной анкерной точкой для молекул, которые взаимодействуют с митохондриями. Более того, VDAC1 играет важную роль в координации коммуникаций между митохондриями и клеткой. Немаловажный аспект такого управления является вовлечение во временное образование комплексов с другими белками. Об этом свидетельствует тот факт, что проницаемость VDAC, и, следовательно, проницаемость внешней мембраны митохондрий регулируется за счет ассоциированных белков.

Соответственно, VDAC имеет связывающие сайты для глицеролкиназ, гексокиназ и креатинкиназ. Когда креатинкиназа связывается с VDAC1, аффинность VDAC для гексокиназы и Вах падает. Кроме того, CRaf киназы также негативно регулируют VDAC1 и способствуют клеточной выживаемости за счет препятствования высвобождению цитохрома с путем прямого взаимодействия с каналом. VDAC также образует комплексы с различными другими белками, такими как АНТ, периферическим бензодиазепиновым рецептором, тубулином, с белками семейства Bcl-2 и другими про- и анти-апоптотическими белками, что делает его ключевым белком в апоптозе.

Кроме того, обнаружено, что VDAC имеет связывающие сайты для двухвалентных катионов. Так, La^{3+} и Tb^{3+} индуцируют закрытие канала, и RuRed и Ru360, известные своим специфическим взаимодействием с некоторыми Ca^{2+} -связывающими белками, индуцируют закрытие канала и стабилизируют его в этом состоянии. Ингибиторный эффект RuRed предотвращается в присутствии CaCl_2 , но возобновляется после связывания кальция ЭГТА, что свидетельствует о наличии Ca^{2+} -связывающего сайта VDAC.

АНТ - аденин-нуклеотидный транслокатор, структурный компонент mPTP, расположен во внутренней мембране митохондрий, и функционирует как воротная пора. Известно, что открытие mPTP крайне чувствительно к лигандам АНТ. Среди числа нуклеотидов, только субстраты АНТ (АДФ, dАДФ, АТФ) взаимодействуют с mPTP. От характера транспортирующихся субстратов зависит положение АДФ/АТФ-связывающего сайта, либо обращенного в матрикс (m-положение), либо в межмембранное пространство (с-положение). Ингибирование АНТ происходит при связывании лиганда в m-положении (бонгкреат), если же лиганд (атрактилат, пиридоксил фосфат) связывается в с-положении происходит его активация. Высокий уровень Ca^{2+} способен деформировать конформационное с-

положение АНТ, преобразуя селективный антипортер в неселективную пору, что свидетельствует о необходимости конформационного с- положения в образовании mPTP. Деформация АДФ/АТФ-связывающего сайта имеет обратимый характер и зависит от концентрации $[Ca^{2+}]_{мит}$.

ЦфД (Циклофилин Д) – относится к семейству циклофилинов и является митохондриальной изоформой фермента пептидил/пропил-цис-транс-изомеразы, активность которого ингибируется после связывания ЦсА (циклоспорином А), путем рецептор-лигандного взаимодействия. ЦсА не является истинным блокатором mPTP. Ингибиторный эффект ЦсА описывается как десенситизация, т.е. нечувствительность mPTP к открытию после нагрузки Ca^{2+} и неорганического фосфата (Pi), даже в случае превышения уровня Ca^{2+} и Pi вдвое. Механизм, посредством которого ЦфД модулирует mPTP заключается в следующем, при связывании ЦсА с ЦфД открывается ингибиторный Pi -сайт, который является фактическим десенситизирующим агентом для mPTP. Pi-ингибирование является унифицированной особенностью mPT во всех организмах, и является составляющей как ЦсА-чувствительного, так и ЦсА-нечувствительного набухания митохондрий.

Открытие поры приводит к выходу в цитозоль проапоптозных факторов, среди которых цитохром С.

1.2. Про- и антиапоптозные факторы

Цитохром С

Цитохром С – белок с молекулярной массой 15 кДа, синтезируется как апо-цитохром С и поступает в митохондрию, где связывается с внутренней поверхностью мембраны. Затем он выходит в цитоплазму через каналы, которые для него открывают белки семейства Bcl-2 (Bax, Bad, Bak и др.). Цитохром С необходим для образования апоптосомы, где и происходит активация каспазы-9, которая затем активирует каспазу-3. Апоптосомный комплекс с помощью Smac и еще одного фактора (Omi/HtrA2) активирует прокаспазу-9, та, став каспазой-9, превращает два других профермента в каспазы-3 и -7; а они уже расщепляют структурные белки, приводя к появлению биохимических и морфологических признаков апоптоза. В числе первых можно назвать, в частности, переход фосфатидилсерина в наружный мембранный слой и фрагментацию ДНК. Из вторых признаков наиболее характерны “отшелушивание” клетки от матрикса, сморщивание мембраны, сжатие ядра и формирование пузырьков с клеточным содержимым – апоптозных телец.

Цитохром С электростатически и гидрофобно связан с внутренней мембраной митохондрий через фосфолипиды, преимущественно через кардиолипин. Электростатически взаимодействуют между собой положительно заряженные остатки аминокислоты лизина в цитохроме и отрицательно заряженные фосфатные группы в кардиолипине. За счет гидрофобного взаимодействия между углеродной цепью этого фосфолипида и гидрофобными участками молекулы цитохрома еще более укрепляется связь фермента с митохондриальной мембраной, что обеспечивает даже его частичное погружение в ее слой.

Следовательно, для выхода цитохрома С в цитоплазму одного лишь нарушения целостности митохондриальной мембраны недостаточно. Электростатически связанный цитохром С может оторваться от

кардиолипина, если изменяется ионная сила, плотность поверхностного заряда или рН, а связанный гидрофобно - за счет окислительной модификации митохондриальных липидов. Последнюю реакцию как раз и вызывают активные формы кислорода, которые неизбежно образуются при любых сильных воздействиях (стрессах), а открывание поры усиливает этот процесс.

Однако цитохром С не всегда нужен для запрограммированной смерти. Апоптоз в сердечной ткани, например, вообще протекает без этого фермента, он так и не выходит из межмембранного пространства.

Под действием избытка ионов кальция митохондрия разбухает, через пору из нее выходит цитохром С и два белка - AIF и Smac. Первый белок индуцирует апоптоз, а второй активирует некоторые прокаспазы.

Цитохром С может высвобождаться в ответ на повышение концентрации ионов Ca^{2+} , которое вызывает открывание поры. Но выход фермента “на свободу” может и не зависеть от этих ионов, тогда процесс контролируют белки семейства Bcl-2 (B-cell leukaemia-2 - лейкемия В-клеток-2). Именно они регулируют апоптоз на уровне митохондрий. Одни из белков этого большого семейства (Bcl-2, а также Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Al и Boo) предотвращают апоптоз; другие (Bax, Bad, Bok, Bcl-xS, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk, и Mtd) способствуют самоубийству. Вот один пример работы белков этого семейства регуляторов. Цитозольный белок Bid расщепляется каспазой-8, активируемой через “рецепторы смерти”, и лизосомными протеазами катепсинами, чей выход из лизосом стимулирует эта же каспаза. Образовавшийся активный белок - усеченный Bid (truncated Bid - t-Bid) - изменяет конформацию другого проапоптозного белка, Bax, после чего тот встраивается во внешнюю мембрану митохондрий, где формирует комплекс с порином. Вместе они выстилают канал, по которому из межмембранного пространства выходят цитохром с и проапоптозные белки. Но если в дело

вмешивается Bcl-2, действующий как антиоксидант, выход цитохрома блокируется.

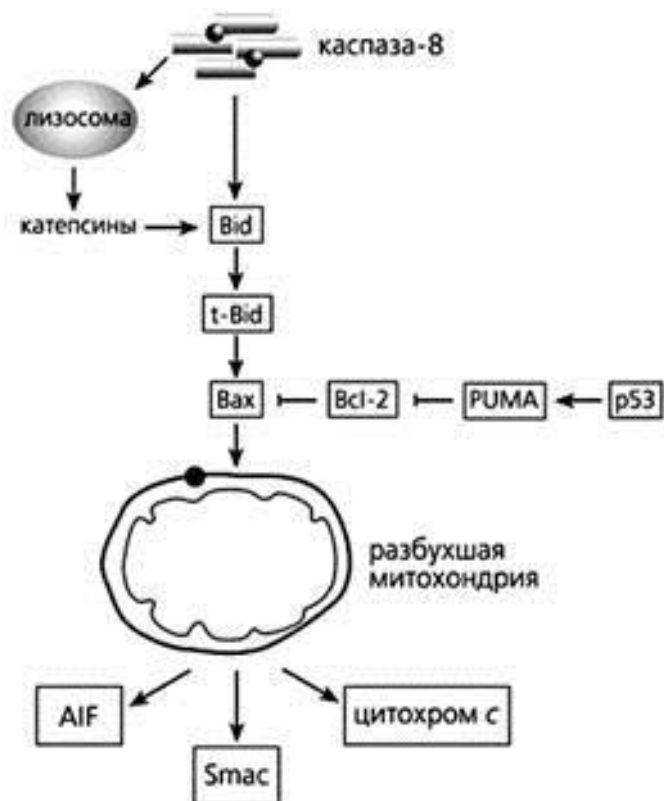


Рис. 1.4. Фрагмент схемы апоптоза, протекающего под контролем белков семейства Bcl-2, а также с участием p53

Некоторые белки, связывающие ионы кальция, например ALG-2, кодируемый одноименным геном (APOptosis-linked gene-2), тоже принимают участие в запрограммированной смерти. Так, взаимодействием ALG-2 и белка Alix (ALG-interacting protein X, известный и как AIP1) осуществляется регуляция апоптоза. Часть сложной молекулы ALG-2 представляет собой еще один апоптозный белок кальпоин.

Кальпоины специфически расщепляют белки, содержащие области, называемые PAST-мотивами и богатые остатками четырех аминокислот - пролина (P), аспарагиновой кислоты (A), серина (S) и треонина (T). (Среди этих белков - фермент ДНК-лигаза, у которого такой мотив находится в N-концевой области.) Кроме того, кальпоины освобождают каспазы от

связанных с ними ингибиторов апоптозных белков (inhibitors of APOptosis proteins, IAPs).

Впервые обнаруженные у вирусов, гомологи IAP позже были найдены у всех эукариот, от дрожжей до млекопитающих. У последних открыто восемь представителей этого семейства ингибиторов, и каждый имеет от одного до трех 70-аминокислотных участков, называемых BIR-доменами (baculoviruses inhibitor of APOptosis repeat domains - повторяющиеся домены бакуловирусного ингибитора апоптоза). Кодированный X-хромосомой IAP (XIAP) и клеточные ингибиторы апоптозных белков (cellular inhibitors of APOptosis protein; cIAP1, 2) содержат по три N-концевых BIR-домена и C-концевой RING-домен, кодируемый геном ring (really interesting new gene - действительно интересный новый ген). Эти белки ингибируют каспазы-3, -7, -9: BIR-домены целенаправленно связываются с ними, блокируя их активные центры; RING-домен обеспечивает деградацию каспаз, пришивая к ним “черную метку” - 76-аминокислотный белок убиквитин. Присоединившие его белки подвергаются расщеплению протеасомой.

Есть и другой эндогенный ингибитор каспаз - FLIP (FLICE-inhibitory protein). Он взаимодействует с пособниками суицида - сигнальными комплексами, блокируя активацию прокаспазы-8 и передачу проапоптотического сигнала от “рецепторов смерти”.

Как все ингибиторы протеаз, XIAP, cIAP1 и cIAP2 сами подвержены отрицательной регуляции. В частности, митохондриальный полипептид Smac/DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI - белок с низкой pI, прямо связывающий IAP), выходя из митохондрий в цитозоль, связывается с ингибиторами XIAP, cIAP1 и cIAP2 и мешает им взаимодействовать с каспазами. Но XIAP, cIAP1 и 2 способны противостоять ингибирующему действию Smac/DIABLO, присоединяя к нему убиквитин - сигнал для деградации. Одна из изоформ Smac/DIABLO, Smac3, сама стимулирует

присоединение убиквитина к XIAP. В высоких концентрациях каспазы-3 и -7 могут расщеплять XIAP и без посредников.

Smac/Diablo и Omi/HtrA2 - белки ингибирующие белки семейства IAP



Рис. 1.5. Схема Smac/Diablo Omi/HtrA2

Семейство каспаз

Эффекторное плечо апоптозного пути представлено семейством внутриклеточных протеаз, называемых каспазами. Они присутствуют во всех клетках, где расщепляют белки в местах расположения аспарагиновых оснований. К настоящему времени у человека идентифицировано 14 каспаз, которые по своим функциональным особенностям делятся на активаторы цитокинов (1, 4, 5, 13), инициаторные (8 и 10) и эффекторные (3, 6, 7). Аспаза 9 служит медиатором митохондриального пути апоптозного сигналинга. Каспазы находятся в клетках в неактивном состоянии (прокаспазы). Активация каспаз происходит путем их протеолитического расщепления в местах расположения аспарагиновых состояний.

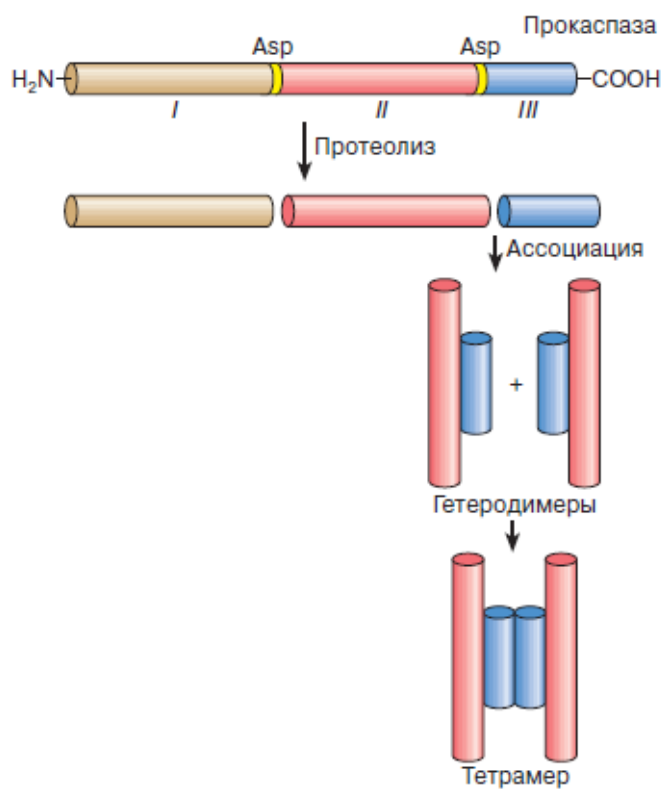
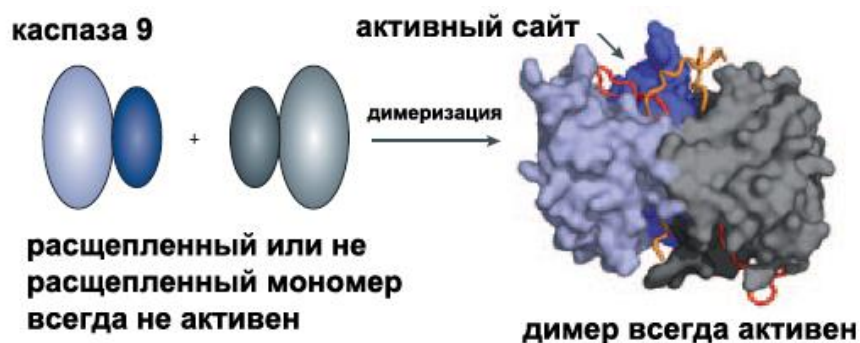


Рис. 1.6. Активация прокаспаз путем протеолитического расщепления на субъединицы и их последующей ассоциации: I – продомен, II – промежуточный домен, III – С-концевой домен, предшественник малой субъединицы каспаз

Активация инициаторных каспаз (8, 9 и 2)



Stefan J. Riedl and Guy S. Salvesen; 2007

Рис. 1.7. Активация инициаторных каспаз

После выхода в цитозоль цитохром С связывается с адаптерной молекулой Араф-1, активирующей прокаспазу -9. Данный комплекс называется апоптосомой. Каспаза-9 в свою очередь активирует каспазы-3 и -7, что приводит к фрагментации ДНК и апоптозу.



Рис.1.8. Активация каспаз митохондриями

Активация каспазы-9 происходит при её связывании с Аraf-1 в присутствии цитохрома С и dАТР. Активированная каспаза-9, в свою очередь, расщепляет и активирует каспазу-3; таким образом, каспаза-9 является одной из наиболее ранних проетаз апоптотического каскада, запускаемого цитохромом С и dАТР.

Каспаза-9 преимущественно находится в митохондриях, и для её внутриклеточного перераспределения и активации очень важно разрушение внешней митохондриальной мембраны, происходящее на ранних этапах апоптоза. Кроме каспазы-3, более поздние ферменты, каспазы-6 и -7 тоже являются мишенями для каспазы-9.

В процессе активации каспаза-9 образует димеры. Цитохром С/ Аraf-1/каспаза-9 образуют апоптосому, усиливая каспазный каскад. Активации каспазы-9 каспазой-3 значительно повышает активность апоптосомы.

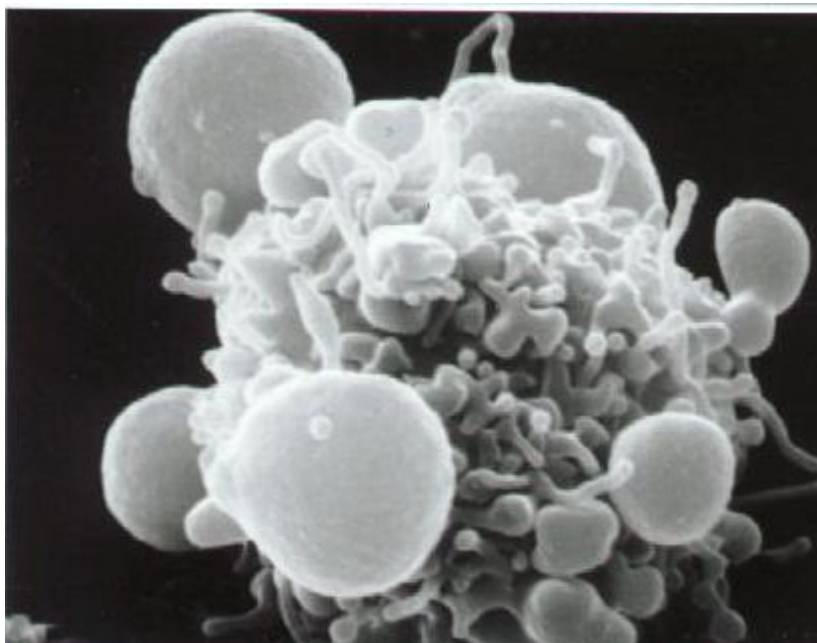
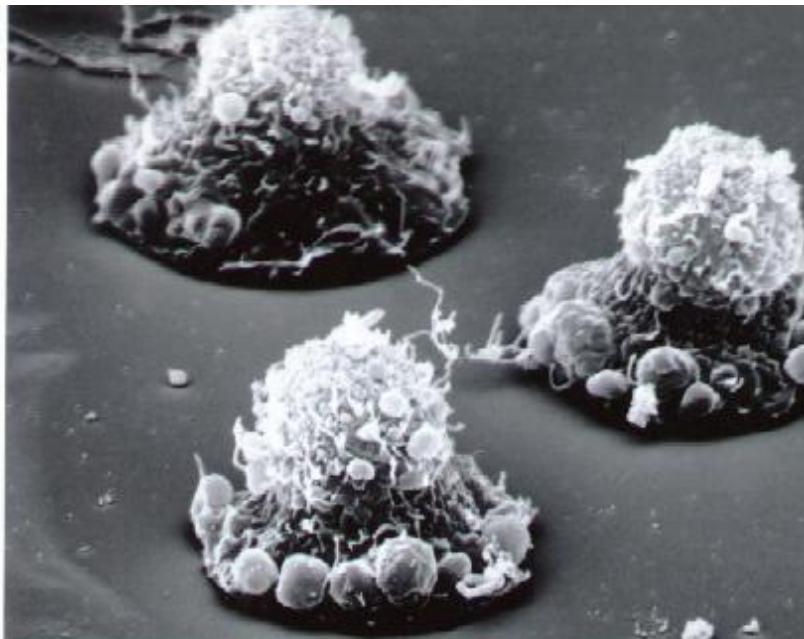


Рис. 1.9. Сканирующая электронная микроскопия

Образование апоптотических телец

В запуске апоптоза, вызванного повреждениями ДНК, активацией онкогенов и гипоксией, принимает участие белок -53 (p-53), взаимодействуя с Вах, стимулируя «рецепторы смерти» и апоптозные гены. p-53 активирует модулятор суицида PUMA (p-53 upregulated modulator of APOptosis), который затем связывает Bcl-2 и выводит из строя этот препятствующий апоптозу белок. Тем самым выход цитохрома С уже ничем не сдерживается.

p-53 – наиболее часто мутирующий ген, связанный с опухолевым ростом у человека. Мутации и потери аллелей в гене p-53, расположенном на хромосоме 17p, – наиболее распространенные повреждения, идентифицируемые в опухолевых клетках человека. p-53 является стресс-зависимым белком: в ответ на повреждение ДНК он тормозит смену фаз клеточного цикла или индуцирует апоптоз. Оказалось, что p-53, первоначально описанный как онкоген, способен супрессировать пролиферацию генетически дефектных клеток. В дальнейшем было установлено, что таким образом интактный p-53 поддерживает нормальный фенотип клеток организма. p-53 супрессирует развитие опухоли, стимулируя апоптоз. Гомологичный Bcl-2 Bax также регулируется белком p-53; известно, что Bax ускоряет апоптоз. Показано, что действие p-53 на апоптоз связано с APO-1/Fas клеточной поверхности. Активность p-53 регулируется фосфорилированием специфических протеинкиназ. В результате всех этих процессов активируется аутопротеолиз. Кроме контроля пролиферации, p-53 участвует в процессах старения клетки. На сегодняшний день известно более чем 500 мутаций гена p-53. Эти мутации были найдены в различных типах трансформированных клеток системы крови и в солидных опухолях. Спектр мутаций различен для раковых образований толстого кишечника, легкого, пищевода, молочной железы, мозга, печени, кожи и гемопоэтической ткани.

Белки теплового шока (HSP)

HSP оказывают антиапоптотическое действие, подобно белку Bcl-2. В настоящее время в литературе постулируется три основных пути влияния малых HSP на процессы апоптоза. Во-первых, sHsp могут влиять на функционирование и передачу сигнала от рецептора Fas/Apo-1 внутрь клетки, во-вторых, они могут тем или иным способом влиять на выход цитохрома C из митохондрий и, наконец, в-третьих, эти белки могут влиять на формирование апоптосом и активацию каскада каспаз.

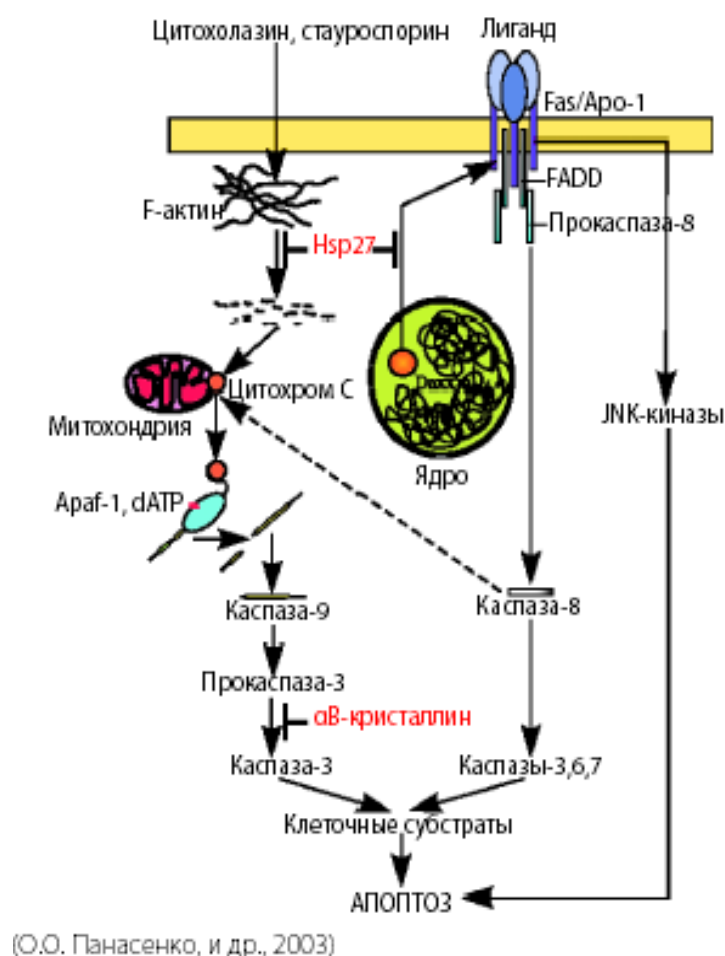


Рис. 1.10. Схема возможного участия малых белков теплового шока в процессах апоптоза

Семейство Bcl-2

Белки семейства Bcl-2 играют центральную роль в выборе между жизнью и смертью клетки. Bcl-2 гомолог белка CED-9 у *Caenorhabditis elegans*, первоначально был открыт как протоонкоген, обнаруженный в результате хромосомной транслокации t(14;18) в случае В-клеточной лимфомы. У Bcl-2 первого была обнаружена способность предотвращать апоптоз, индуцированный отсутствием интерлейкина-3 в культуре В-лимфоцитов человека.

С тех пор были обнаружены многочисленные гомологи Bcl-2. Это семейство структурно сходных белков включает более двух десятков членов, в том числе продукты протоонкогенов Bcl-2 и Bcl-x, обладающие способностью блокировать апоптоз, и опухолевый супрессор Bax, наоборот, индуцирующий апоптоз. Семейство Bcl-2 белков можно разделить на три основные группы:

1. Антиапоптогенные молекулы, такие как Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1(Bfl-1) и

Bcl-2. Все они обладают противоапоптозной активностью и имеют четыре группы гомологичных последовательностей BH1, BH2, BH3 и BH4 домены, хотя у некоторых из них BH4 домен отсутствует.

2. Проапоптогенные молекулы Bax, Bak, Bad, Mtd(Bok) и Diva имеют гомологичные последовательности BH1, BH2 и BH3, а BH4 домен у них отсутствует.

3. Проапоптогенные белки, содержащие только BH3 домен: Bik, Bid, Bim, Hrk(DP5), Blk и Bnip3, Bnip3L.

Было показано, что BH1-3 домены играют важную роль в формировании гетеро- и гомо-димеров между проапоптогенными и антиапоптогенными членами семейства, и клеточные уровни этих димеров могут сыграть определяющую роль в судьбе клетки. Гетеродимеризация происходит посредством взаимодействия BH3 домена проапоптогенного белка с гидрофобным комплексом, образованным BH1, BH2 и BH3 доменами антиапоптогенных белков. Важно то, что домены BH1 и BH2, BH3 домен необходим и достаточен для проапоптогенной активности. Белок Bcl-2 один может связывать, по крайней мере, пять членов семейства, и эта его функция может быть, кроме того, дополнена возможностью посттрансляционной модификации с помощью фосфорилирования. Близкий ген, bcl-x, кодирует два белка, различающихся сплайсингом РНК, Bcl-xL и

Bcl-xS. Также как Bcl-2, белок Bcl-xL ингибирует апоптоз, в то время как белок Bcl-xS оказывает негативный эффект на функцию Bcl-2 и Bcl-xL. Повышенная экспрессия генов этих белков может приводить к устойчивости к большинству вызывающим апоптоз стимулам, так как к этим белкам сходится множество путей апоптоза.

Большинство антиапоптогенных членов семейства Bcl-2 содержат на С-концевом участке гидрофобную последовательность, которая необходима для связывания с внутриклеточными мембранами. Таким образом, проапоптогенные и антиапоптогенные члены семейства Bcl-2, в отсутствие сигналов смерти, локализованы в различных внутриклеточных компартментах. Антиапоптогенные молекулы представляют собой мембранные белки, которые находятся в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и в ядерной мембране. Проапоптогенные молекулы семейства Bcl-2 в основном локализованы в цитозоле или связаны с цитоскелетом.

Механизм, с помощью которого белки семейства Bcl-2 регулируют митохондриально-зависимый апоптоз, остается спорным. Недавно было установлено, что VDAC (Voltage-dependent anion channel) является одним из функциональных мишеней этих белков. Белки семейства Bcl-2, такие как Bax, Bak, Bcl-2 и Bcl-XL могут взаимодействовать с двумя компонентами PT (permeability transition) пор, с VDAC, локализованным на наружной митохондриальной мембране, и с ANT (adenine nucleotide translocator), на внутренней мембране. Bcl-2 и Bcl-XL закрывают VDAC-каналы, через которые осуществляется выброс цитохрома C и/или AIF. Bax и Bak, находящиеся в норме в определенных компартментах цитоплазмы, при апоптогенных сигналах перемещаются в митохондриальные мембраны, где они, взаимодействуя с интегральным белком наружной митохондриальной мембраны VDAC, стимулируют открытие канала. Кроме того, Bax образует гетеромерные комплексы с белками Bcl-2, Bcl-x, что, возможно, открывает закрытые до этого каналы.

Таким образом, баланс между про- и антиапоптогенными членами семейства Bcl-2 играет решающую роль в судьбе клетки.

Возможные механизмы обеспечения проницаемости внешней мембраны Bax/Bak и Bax/tBid

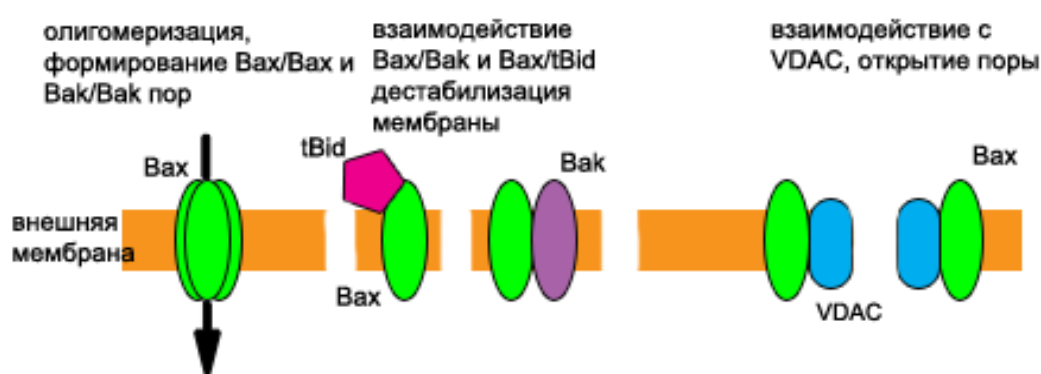


Рис. 1.11. Механизмы обеспечения проницаемости внешней мембраны Bax/Bak и Bax/tBid

Bcl-2 кодируется протоонкогеном и является внутриклеточным мембраносвязанным белком, блокирующим апоптоз. Этот белок экспрессируется на ряде гемопоэтических клеток, на малигнизированном и несвязанном с опухолью эпителии. Ген Bcl-2 выполняет уникальную среди онкогенов млекопитающих функцию в качестве негативного регулятора апоптоза. Впервые это было обнаружено при изучении хромосомных транслокаций, типичных для лимфом. Кроме того, Bcl-2 связан со стволовыми клетками, коммитирующими дифференцировку и морфогенез. Уменьшение концентрации Bcl-2 приводит клетки к апоптозу. С другой стороны, сверхэкспрессия Bcl-2 защищает клетки от

смерти, но это не приводит к бессмертию нормальной клетки и не является причиной опухолевой трансформации таких клеток. Гетерогенность экспрессии Bcl-2 в опухолях предполагает разные пути регуляции гена. К тому же, экспрессия белка, ассоциированная с предраковыми поражениями, возможно, связана с ранней стадией образования опухоли.

Белок Bcl-2 также связан с наличием резистентности опухоли к терапии. Кроме того, прогностическое значение экспрессии Bcl-2 показано для нескольких видов опухолей, таких как неходжкинские лимфомы, сквамозная клеточная карцинома, карцинома молочной железы и желчного пузыря, тимомы. Нарушение регуляции экспрессии Bcl-2 наблюдается у пациентов с множественной миеломой и острым миелолейкозом. Bcl-2 был предложен в качестве полезного маркера для оценки адекватности терапии IL-2, у пациентов со СПИД.

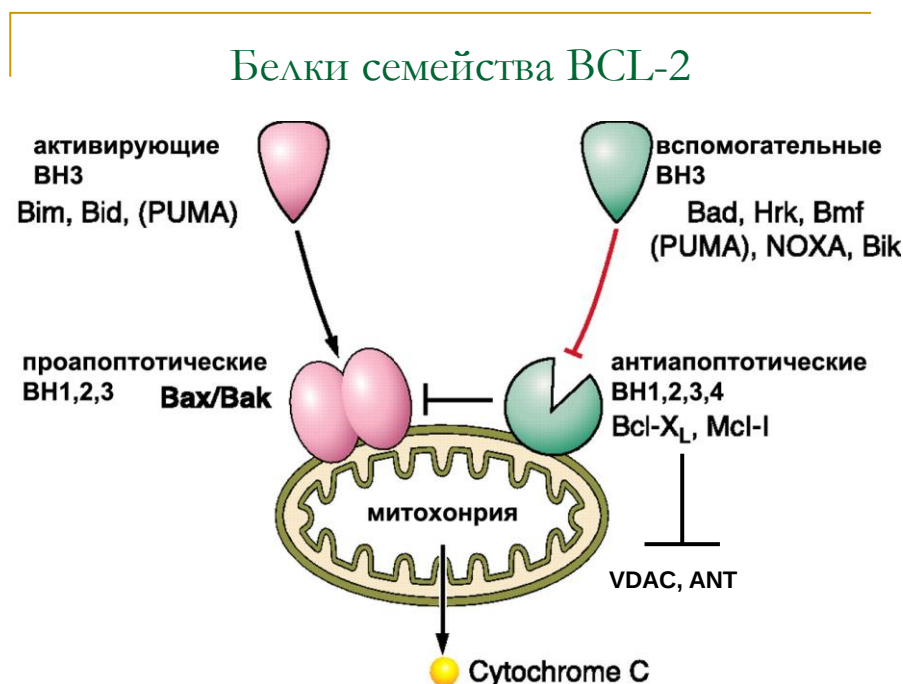


Рис. 1.12. Белки семейства Bcl-2

Глава 2. Физиологическое значение апоптоза

Во время нормального развития организма апоптоз возникает в клетках при формировании формы или структуры органа. Например при образовании конечности мыши некоторые клетки подвергаются апоптозу и образуются пальцы.

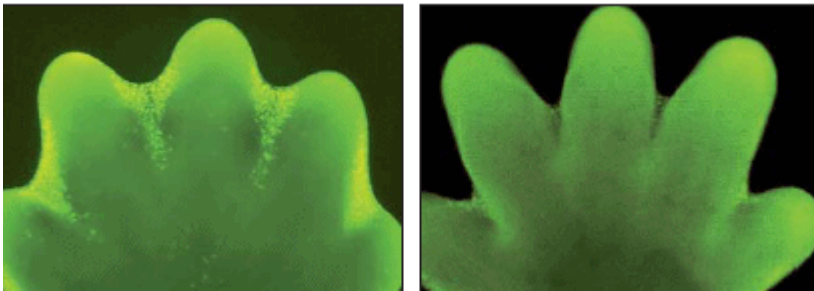


Рис. 2.1. Апоптоз во время нормального развития конечности мыши. Клетки подвергшиеся апоптозу (слева) мечены желтым. Та же конечность (справа) через один день.

Интересно, что некоторые птицы, такие как утка, имеют перепонки между пальцами, тогда как у других птиц, таких как курица, перепонки нет. В раннем эмбриогенезе и курицы и утки имеют перепонки между пальцами. Специфический белок BMP4 образуется в клетках между пальцами, запуская клеточную смерть этих клеток. Другой белок BMP (gremlin) образуется вокруг пальцев у обеих птиц и только у уток образуется также и в клетках перепонки, предотвращая запуск апоптоза в них.

Если добавлять белок gremlin в перепонку эмбрионов курицы, то она не подвергается апоптозу и сохраняется.



Рис. 2.2. Слева лапка курицы после добавления в перепонку белка *Gremlin* (перепонка сохранилась), справа контрольный эксперимент без добавления белка (перепонка подверглась апоптозу).

Другим примером апоптоза в нормальном развитии является метаморфоз головастика лягушки. Под воздействием тиреоидного гормона при метаморфозе головастика лягушки, запускается апоптоз и хвост головастика исчезает.

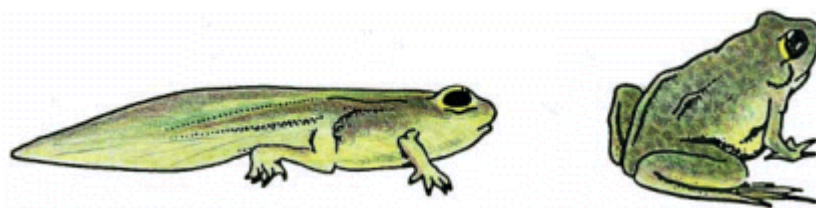


Рис. 2.3. Морфогенез лягушки

Апоптоз принимает участие в следующих физиологических и патологических процессах:

1. Запрограммированном разрушении клеток во время эмбриогенеза (включая имплантацию, органогенез).
2. Гормон – зависимой инволюции органов у взрослых, например, отторжение эндометрия во время менструального цикла, атрезии фолликулов в яичниках в менопаузе и регрессия молочной железы после прекращения лактации.
3. Удаление некоторых клеток при пролиферации клеточной популяции.

4. Гибели отдельных клеток в опухолях, в основном при ее регрессии, но также и в активно растущей опухоли.
5. Гибели клеток иммунной системы, как В-, так и Т-лимфоцитов, после истощения запасов цитокинов, а также гибели аутореактивных Т-клеток при развитии в тимусе.
6. Патологической атрофии гормон-зависимых органов, например атрофии предстательной железы после кастрации и истощении лимфоцитов в тимусе при терапии глюкокортикоидами.
7. Патологической атрофии паренхиматозных органов после обтурации выводных протоков, что наблюдается в поджелудочной и слюнных железах, почках.
8. Гибели клеток, вызванных действием цитотоксических Т-клеток, например, при отторжении трансплантата и болезни «трансплантат против хозяина».
9. Повреждении клеток при некоторых вирусных заболеваниях, например, при вирусном гепатите, когда фрагменты апоптотических клеток обнаруживаются в печени, как тельца Каунсильмана.
10. Гибели клеток при действии различных повреждающих факторов, которые способны вызвать некроз, но действующих в небольших дозах, например, при действии высокой температуры, ионизирующего излучения, противоопухолевых препаратов.

При развитии **эмбриона** различают три категории автономного апоптоза: морфогенетический, гистогенетический и филогенетический.

Морфогенетический апоптоз участвует в разрушении различных тканевых зачатков. Примерами являются:

- разрушение клеток в межпальцевых промежутках;
- гибель клеток приводит к разрушению избыточного эпителия. При слиянии небных отростков, когда формируется твердое небо.

- гибель клеток в дорсальной части нервной трубки во время смыкания, что необходимо для достижения единства эпителия двух сторон нервной трубки и связанной с ними мезодермы.

Нарушение морфогенетического апоптоза в этих трех локализациях приводит к развитию синдактилии, расщеплению твердого неба и spina bifida соответственно.

Гистогенетический апоптоз наблюдается при дифференцировке тканей и органов, что наблюдается, например, При гормональнозависимой дифференцировке половых органов из тканевых зачатков. Так, у мужчин клетками Сертоли в яичках плода синтезируется гормон, который вызывает регрессию протоков Мюллера (из которых у женщин формируются маточные трубы, матка и верхняя часть влагалища) путем апоптоза.

Филогенетический апоптоз участвует в удалении рудиментарных структур у эмбриона, например, пронефроса.

Эмбриональный апоптоз

В процессе развития эмбриона апоптоз может играть как положительную, так и отрицательную роль. Пусковыми факторами апоптоза эмбриональных клеток в большинстве случаев является дефицит апоптозподавляющих факторов в межклеточной среде, недостаток факторов роста, или неспособность эмбриональных клеток воспринимать воздействие этих факторов, а также лишение эмбриональных клеток субстрата адгезии (Рис. 2.4.). Апоптоз нервных клеток может индуцироваться и в том случае, если они не образуют или утрачивают синаптические связи со своими соседями. Кстати, последний механизм действует не только в эмбриональной нервной системе, но и во взрослом организме.



Рис. 2.4. Схема осуществления эмбрионального апоптоза

Глава 3. Роль апоптоза в патологических состояниях

Патологический процесс определяется как «закономерная последовательность явлений, включающая защитно-приспособительные реакции и нарушения жизнедеятельности в разных сочетаниях, развивающаяся под действием патогенного фактора» (Н.И.Лосев). Следовательно, разнообразие болезней сводится к конечному числу взаимодействующих патологических процессов. Патологический процесс — частное по отношению к болезни понятие, хотя некоторые процессы присутствуют при многих нозологических формах. Патологический процесс может быть локализован, затрагивать часть организма, болезнь же всегда относится к целостному организму. Принято считать, что патологические процессы — сложные мозаичные элементы болезней, состоящие из неразрывно связанных общими механизмами элементарных защитно-компенсаторных и повреждающих реакций. В связи с этим необходимо отметить, что апоптоз регулируется комплексом биохимических, молекулярных и генетических факторов, большинство из которых полностью не изучено.

В конечном счете, ПГК является результатом баланса про- и противоапоптозных факторов.

Как усиление, так и ослабление апоптоза может играть едва ли не решающую роль в развитии многих патологических процессов. *Ослабление апоптоза* так же может способствовать развитию патологических процессов. Прежде всего, это положение хорошо демонстрирует явление ослабления апоптоза при онкологических заболеваниях. Наиболее активными, стремительно развивающимися являются злокачественные опухоли, при развитии которых в силу их особенностей апоптоз опухолевых клеток угнетен. При развитии опухоли происходит как бы соревнование двух процессов: развитие апоптоза и размножение клеток опухоли. Если степень апоптоза малегнизированных клеток высока, их клон не образуется и

опухоль не развивается. Если же темпы размножения опухолевых клеток обгоняют апоптоз, в организме возникает злокачественное новообразование. Повышенная продукция в клетках иммунной системы факторов, тормозящих апоптоз, а также образование внеклеточных факторов, блокирующих апоптоз (например, появление растворимых рецепторов некоторых цитокинов, способных индуцировать апоптоз) может приводить к развитию ряда аутоиммунных процессов, вплоть до проявления системной аутоиммунной патологии (например, системной красной волчанки). При СКВ обнаружена повышенная предрасположенность к апоптозу лимфоцитов и усиление экспрессии Fas-L гранулоцитами.

Ненормальное усиление апоптоза в процессе развития плода может приводить к эффекту «минус ткань», что весьма часто не совместимо с жизнью и заканчивается внутриутробной гибелью плода. Повышенный апоптоз кардиомиоцитов при болезни Дауна способен привести к развитию кардиомиопатии.

Многие виды патологии системы крови так же объясняются повышением уровня апоптоза кроветворных клеток-предшественниц. В результате возникают такие заболевания как тяжелые комбинированные иммунодефициты, апластические анемии, панцитопении. Чаще всего эта патология является следствием недостаточной выработки так называемых «факторов выживания», например, интерлейкина 7 (ИЛ-7), который является цитокином, тормозящим апоптоз стволовых и других клеток-предшественников.

Усиление апоптоза Т-хелперов при СПИДе является основным патогенетическим механизмом этого иммунодефицита. С другой стороны, усиление апоптоза клеток, инфицированных вирусами или поврежденных микробными токсинами, играет положительную роль, прерывая прогрессирование вирусных и микробных инфекций.

Наиболее выраженные формы нарушений, при которых в процесс апоптоза тотально вовлекаются клетки любых типов, наблюдаются при беременности.

Они обычно несовместимы с развитием плода и приводят к внутриутробной гибели. Известны также более ограниченные нарушения такого типа, которые проявляются как дефекты развития с формированием «минус-ткани». Другим примером могут служить некоторые врожденные поражения сердца. Во II триместре развития плода в сердце происходит перестройка тканевых структур, в которой важная роль принадлежит апоптозу. Эти процессы нарушаются при синдроме Дауна, что влечет за собой формирование миопатии. Другой пример, относящийся к патологии сердца, — аритмогенная кардиопатия правого желудочка, при которой в значительной степени вследствие усиленного апоптоза кардиомиоцитов происходит их замещение жировой тканью.

Другим примером болезней, связанных с усилением апоптоза, являются заболевания нервной системы, вызываемые атрофией ее определенных участков. Как правило, атрофия является следствием индукции апоптоза соответствующих клеток в неположенное время или в чрезмерно выраженном масштабе. К таким заболеваниям относятся боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, спинальная мышечная атрофия и другие заболевания нервной системы. Идентифицирован «ген болезни Альцгеймера», продукт которого оказался транскрипционным фактором ALG-2. При этом заболевании идентифицированы факторы, накопление которых способствует развитию апоптоза нервных клеток, — пептид A β , α -амилоид и др.

Примеры заболеваний. Злокачественные опухоли и апоптоз. При изучении проблем канцерогенеза было отмечено, что одним из наиболее эффективных методов борьбы организма с малегнизацией клеток является их апоптоз. Если иммунные механизмы борьбы с клетками злокачественных опухолей включаются только тогда, когда в организме уже появились ненормальные клетки-мутанты, то апоптозный механизм реагирует на возможность малегнизации клетки уже в тот момент, когда обнаруживается

первичное повреждение ДНК. В этом случае предпосылкой к активации механизмов апоптоза является отсутствие эффекта от деятельности репарационных систем, пытавшихся «залечить» повреждение ДНК. Нерепарированное повреждение ДНК благодаря пока еще мало изученным механизмам обеспечивает включение и активацию гена опухолевого супрессора p53. Повышенная же выработка белка p53 вызывает к жизни ряд последовательных событий:

- активацию гена p21 и выработку белка p21, блокирующего митотический цикл на уровне G1 и G2;
- блокирование антиапоптозных факторов (в частности, белка Bcl-2 и некоторых других);
- запуск митохондриального механизма апоптоза;
- повышенный синтез «рецепторов смерти» клетки;
- завершение апоптоза благодаря активации каскада «казнящих каспаз».

Так развиваются события в том случае, если развитие апоптоза опережает интенсивность пролиферации малегнизированных клеток. Однако, если антиапоптозные механизмы сохраняют жизнь клетки-мутанта, если она успевает дать начало клону своих потомков, опухоль стремительно растет со всеми печальными последствиями этого процесса.

Следует отметить, что со временем увеличивается доля патологических процессов, основывающихся на усилении апоптоза, которое вызвано действием внешних апоптогенных факторов. Первое место среди них занимает ионизирующая радиация. В связи с тем, что она индуцирует апоптоз преимущественно лимфоидных клеток, эта сторона ее действия проявляется в иммунной недостаточности, хотя вызываемые облучением нарушения кроветворения, по крайней мере, частично, обусловлены индукцией апоптоза клеток-предшественников. Аналогичным эффектом обладают многие химиотерапевтические препараты, используемые при лечении опухолей, а также гормоны, прежде всего глюкокортикоиды, широко применяемые при лечении различных заболеваний. Источником

апоптогенных факторов является также внешняя среда. Нормальное окружение человека практически не является источником воздействий, вызывающих апоптоз, однако такие факторы могут накапливаться во внешней среде при формировании экологического неблагополучия.

Апоптоз Т-хелперов при СПИДе . Цитопатогенное действие вируса СПИДа на иммунocyты CD4 (Т-хелперы) реализуется несколькими путями.

Во-первых, от действия ВИЧ погибают CD4 клетки, инфицированные этим вирусом. Следует отметить, что их число относительно не велико, так как один из вирусных белков – белок Nef способен тормозить апоптоз.

Во-вторых, при контакте ВИЧ с рецепторным аппаратом зрелых, неинфицированных этим вирусом клеток CD4 в них запускается механизм апоптоза. Кроме того, апоптоз активируется и в гемопоэтических предшественниках клеток CD4 – клетках CD34, что резко снижает образование новых Т-хелперов.

И, наконец, в-третьих, мембранный гликопротеин вируса gp120 способен блокировать корецепторы Т-хелперов. После этого Т-киллеры распознают Т-хелперы как чужеродные клетки и уничтожают их. В результате происходит резкое снижение числа Т-хелперов. Иначе говоря, развивается иммунодефицит

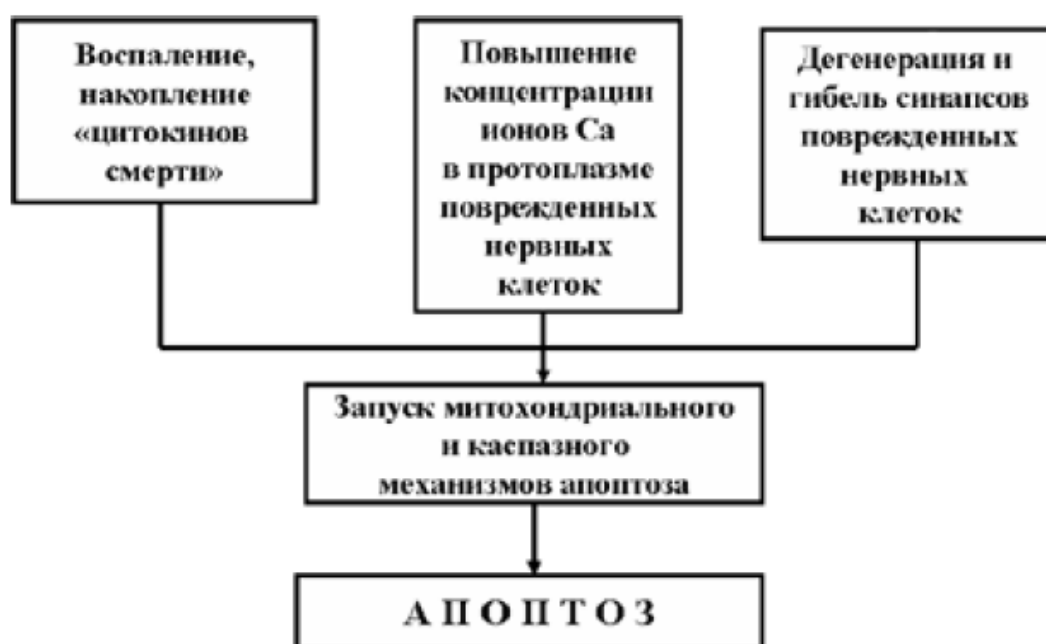
Апоптоз при нейродегенеративных заболеваниях

Явление апоптоза сопровождает развитие и ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз и другие.

Апоптоз нервных клеток при этих заболеваниях был выявлен как чисто морфологическими методами, так и в тех исследованиях, при которых в ЦНС экспериментальных животных вводились про- и антиапоптозные факторы. Как известно, при нейродегенеративных заболеваниях ЦНС происходит разрушение синаптического аппарата нейронов, а также гибель самих нервных клеток. При болезни Альцгеймера основным фактором ее

патогенеза является избыточный синтез β -амилоида и/или его недостаточное разрушение и удаление из ткани головного мозга, что приводит к образованию амилоидных сенильных бляшек, повреждающих нейроны и разрушающих межнейрональные синапсы. Такую же роль играют и нейрофибриллярные клубки, образующиеся в результате выработки аномального тау-протеина.

Повреждения нейронов, их дендритного аппарата, синапсов вызывают локальную воспалительную реакцию, в которой активное участие принимают микроглиальные структуры. При воспалении в нервной ткани накапливаются многие цитокины, в частности, ФНО α . Имеются и многие дополнительные патогенетические факторы, которые усугубляют развитие этого заболевания.



Апоптоз при нейродегенеративных заболеваниях (на примере болезни Альцгеймера)

Рис. 3.1. Схема апоптоза при нейродегенеративных заболеваниях

К таким дополнительным факторам относятся, например, нарушение обмена глюкозы в нервной ткани, энергодефицит, усиление перекисного окисления, повреждение и недостаточность антиоксидантных систем

нейронов, недостаточность ацетилхолиновой и некоторых других трансмиссивных систем головного мозга.

В конечном итоге все факторы патогенеза направлены к одной цели: разрушение межнейрональных связей и гибель нервных клеток. Именно эти нейродегенеративные изменения и реализуют клинику и исход болезни Альцгеймера. В настоящее время достоверно установлено, что основным механизмом, приводящим к гибели нейронов, является их апоптоз. Апоптоз нейронов может запускаться несколькими путями (Рис. 13).

Во-первых, повреждение нейронов за счет накопления β -амилоида и образования нейрофибриллярных клубков резко увеличивает окислительный клеточный стресс, ведет к интрацеллюлярному накоплению активных форм кислорода. Это, в свою очередь, вызывает активацию NMDA-рецепторов и открытие кальциевых каналов в мембране нейронов. Повышение уровня Ca^{2+} в протоплазме нейронов активирует прокаспазы и, далее, весь каскад «казнящих каспаз».

Во-вторых, учитывая, что часть нейронов гибнет за счет развития некробиоза и некроза, в нервной ткани развивается процесс воспаления и, как его неизменный спутник, происходит накопление провоспалительных цитокинов, в том числе – и ФНО. Контакт этих цитокинов с «рецепторами смерти» клетки запускает механизм «инструктивного апоптоза».

В-третьих, в результате развития болезни Альцгеймера происходит разрушение синапсов, и нервные клетки теряют связь друг с другом. Как мы помним, в эмбриональной нервной ткани это обстоятельство является триггером для запуска внутриклеточных механизмов апоптоза. Судя по всему, этот же механизм действителен и для нервной ткани взрослого организма.

Таковы основные сведения о роли апоптоза в развитии патологии органов и систем организма, а также о его участии в ряде физиологических процессов.

Таким образом, в основе достаточно большого числа патологических процессов лежат нарушения регуляции апоптоза. У взрослых могут регистрироваться лишь дефекты с ограниченными фенотипическими проявлениями, поскольку организмы с обширными дефектами такого рода гибнут на ранних этапах онтогенеза. Наиболее характерным проявлением недостаточности апоптоза является развитие аутоиммунных процессов и злокачественных новообразований, проявлениями усиленного апоптоза служат аплазии и дегенеративные процессы, а также некоторые уродства с дефектами тканей. Вклад апоптоза в реализацию различных форм патологии находится еще в процессе осмысления, хотя уже сейчас ясно, что в одних случаях он может быть ключевым, а в других — определяет тот патологический фон, на котором разворачиваются специфические процессы. Очевидно, что эти закономерности апоптоза в целостном организме следует учитывать при разработке стратегии и тактики лечения различных форм патологии.

Заключение

Апоптоз – это запрограммированный процесс уничтожения клетки, вызванный внутренними (внутриклеточными) или внешними (внеклеточными) как физиологическими, так и патологическими факторами, активирующими генетическую программу гибели клетки и ее удаление из ткани.

В данной курсовой работе были рассмотрены основные механизмы участия митохондрий в запуске апоптоза. Были описаны белки, активирующие и ингибирующие апоптоз.

Описан механизм индукции митохондриальной поры, а также пути её ингибирования. Изучение механизма индукции митохондриальной поры является очень актуальным, поскольку эта пора является одним из ключевых элементов в запуске апоптоза. Поиск ингибиторов митохондриальной поры является одним из перспективных направлений в фармакологии. Нужно отметить, что индукторы mPTP также являются источниками пристального внимания современных исследователей, поскольку направленная индукция mPTP может стать оружием в борьбе с онкологическими заболеваниями.

Также в данной работе была подробно рассмотрена роль апоптоза в таких патофизиологических процессах, как болезнь Альцгеймера, онкологические заболевания. Рассмотрена и положительная сторона апоптоза, участие в дифференцировке клеток, развитии эмбриона и т.д.

Живой организм является уникальной системой, сочетающей в себе противоположные возможности одного и того же процесса. От того насколько слаженно и гармонично работают эти системы - активации и ингибирования апоптоза, зависит здоровье организма.

Список использованной литературы

1. Александрова Е., Онищенко Г.Е. Доклады РАН.-2004.-Т.399
2. Bras M., Queenan B., Susiin S.A. Biochemistry.- 2005.-Т.70
3. Роль апоптоза в патогенезе заболеваний.Белушкина Н.Н.
<http://www.science-faculty.net.ru/lek/apoptosis.htm>
4. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AN. Apoptosis. The role of the endonuclease. Am J Pathol. - 1990
5. Робинсон М.В., Труфакин В.А. Апоптоз клеток иммунной системы // Успехи совр. биол. - 1991. – т.111,№ 6
7. Цыпленкова В.Г., Бескровнова Н.Н. Апоптоз // Арх. патол. – 1996. – т.58, № 5
8. Антонова Е.И.Пути программируемой клеточной гибели/ Е.И.Антонова, О.З.Мкртчян//Биология в школе.- 2011.-№ 3
9. Константинов Е.М. Роль репарации ДНК в клеточной гибели, индуцированной генотоксическим действием [Текст]:I съезд общества клеточной биологии / Е.М.Константинов, И.И.Крамаренко, Т.Д.Смирнова, С.М.Терех, В.А.Тронов // Цитология. – 2003. – Т.45. – №9.
10. Проскуряков С.Я. Некроз – активная форма программируемой клеточной гибели [Текст] / С.Я.Проскуряков // Биохимия. – 2002. – Т.67, вып. 4.
11. Самуилов В. Д. Биохимия программируемой клеточной смерти (апоптоза) у животных / СОЖ т. 7, № 10, 2001.