



# **ГЕННЫЕ СЕТИ**

## **Пути передачи сигнала в генной сети апоптоза**

*Ирина Лембитовна Степаненко, к.б.н.*



# Апоптоз, или программируемая клеточная смерть

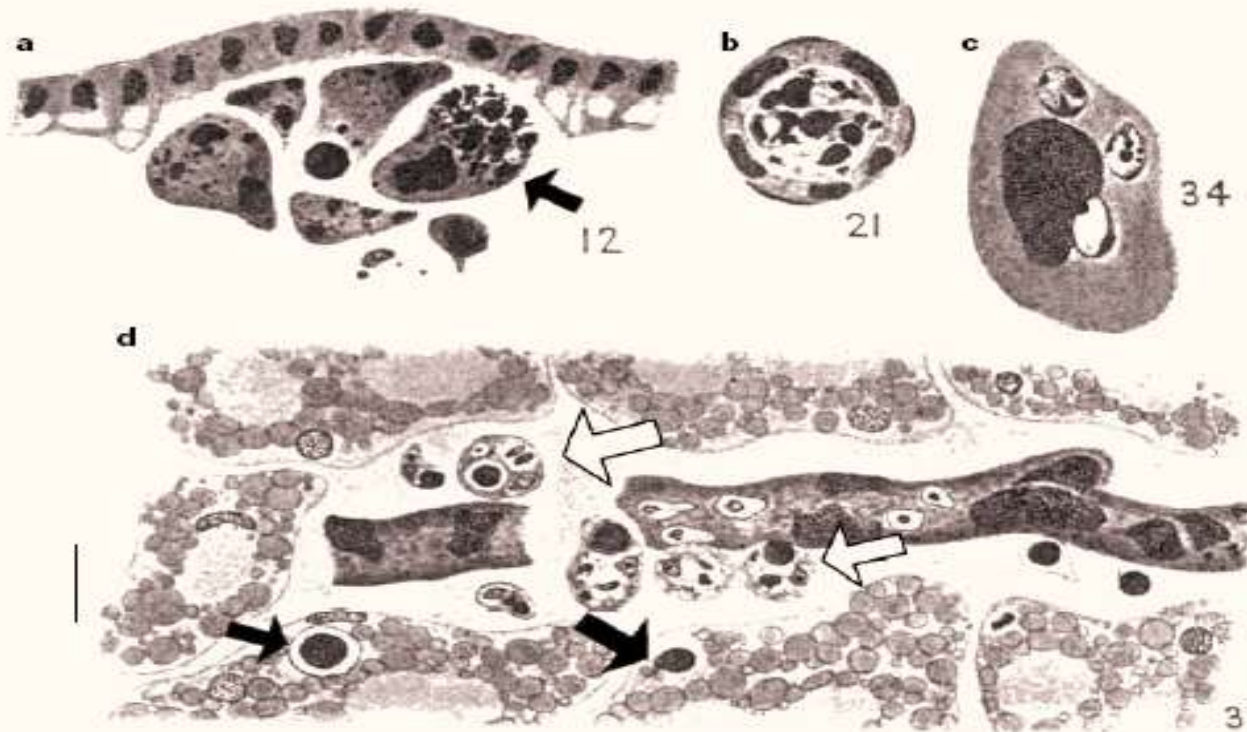


Figure 2 | Apoptotic and other types of cell death in a metamorphosing weevil. a | Gland cell disrupting, with a leukocyte (arrowhead) present. b | Regenerating Malpighian tubule with degenerate cells in lumen. c | Degenerating oenocyte. d | Degenerating salivary gland, with both leukocytes and surrounding fat participating in the phagocytosis of the gland. The white arrows show leukocytes, and the black arrows show phagocytic vacuoles. Adapted from REF. 5.

- одна из разновидностей процесса физиологической или генетически регулируемой клеточной смерти, обладающая узнаваемыми морфологическими признаками



Апоптоз - фундаментальный процесс физиологического разрушения клеток в составе целого организма, необходимый для его нормального функционирования.

Апоптоз происходит в процессе развития тканей и органов в эмбриогенезе, необходим для поддержания гомеостаза клеток, удаления опухолевых клеток и клеток, инфицированных вирусами.



## *Апоптоз, или программируемая клеточная смерть*

Морфологически характеризуется уменьшением объема цитоплазмы, конденсацией ядра и выпячиванием плазматической мембраны. Эти первоначальные изменения сопровождаются фрагментацией ядерного содержимого и последовательной инкапсуляцией этих фрагментов в связанные с мембранами "апоптотические тела", которые быстро и незаметно фагоцитируются соседние клетки.

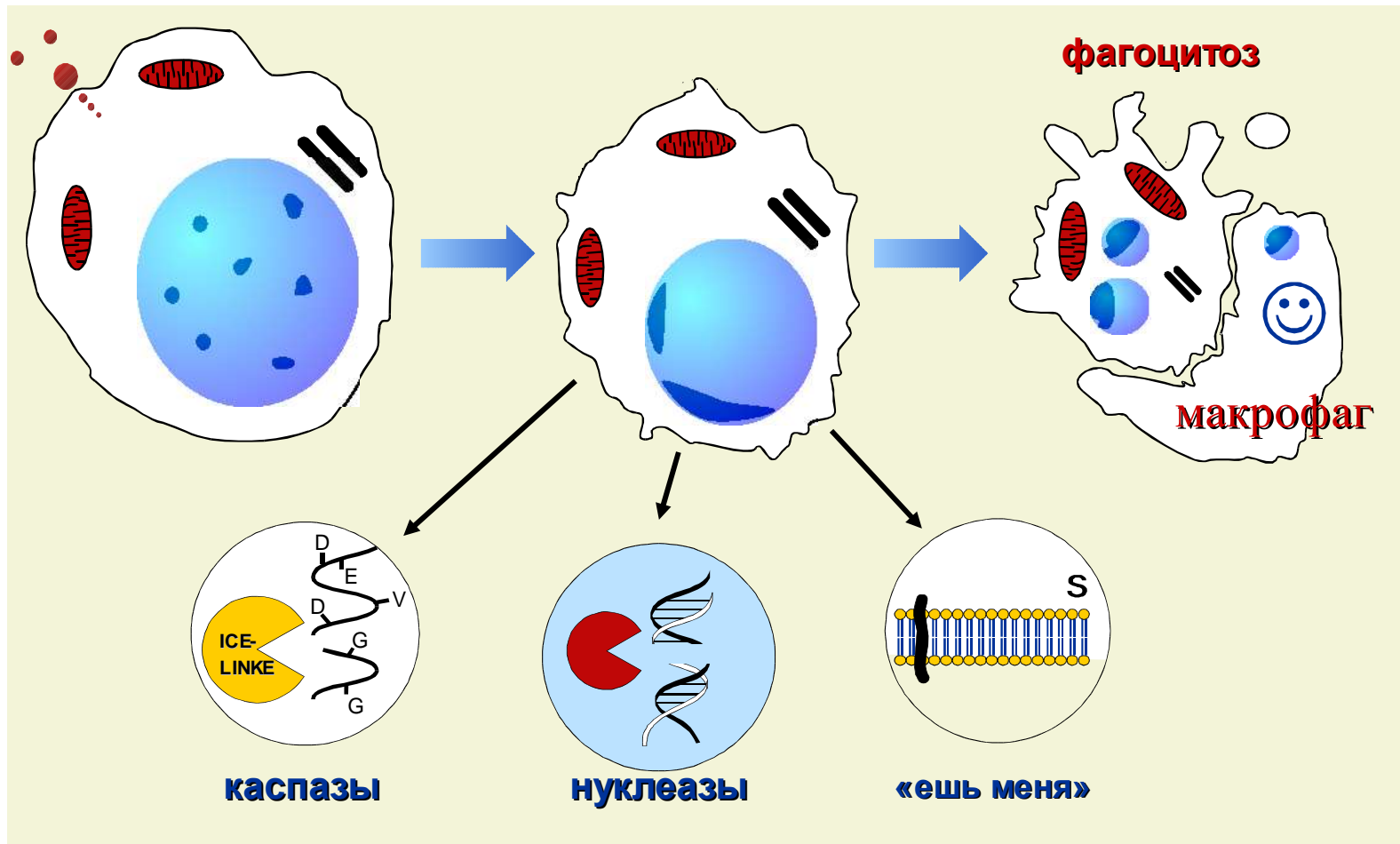
Биохимически клетки, подвергающиеся апоптозу, характеризуются снижением митохондриального трансмембранного потенциала, понижением рН, продукцией активных форм кислорода, экспозицией фосфатидилосериновых остатков в двуслойных мембранах (сигнал «ешь меня»), избирательным протеолизом ряда клеточных белков и быстрой деградацией ядерной ДНК до фрагментов, длина которых соответствует межнуклеосомным промежуткам (180 - 200 п.н.)

Деградация ДНК происходит в два этапа: сперва появляются крупные фрагменты (300 и 50 т.п.н.). Как следствие, на электрофореграммах ДНК из таких клеток видна так называемая "ДНК лестница"



# Схема механизма апоптоза

**Сигнал**





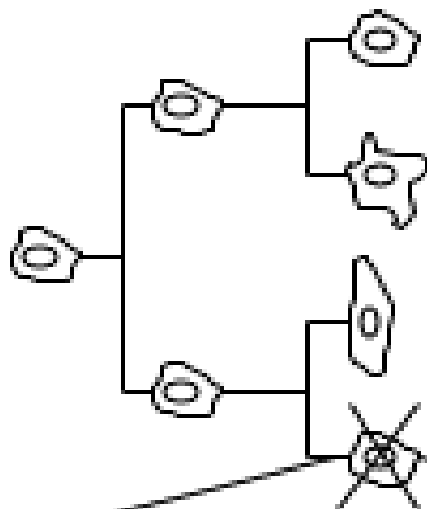
# Фазы апоптоза



- 1) получение клеткой внешнего сигнала через поверхностные рецепторы, взаимодействующие с определенными лигандами, или под действием лекарственного препарата, токсина, ионизирующего или ультрафиолетового облучения и т.д.
- 2) распознавание клеткой полученного сигнала или измененного метаболического состояния и дальнейшая передача сигнала к системе эффекторных белков, отвечающих за реализацию гибели клетки.
- 3) эффекторная фаза включает в себя активацию каспаз, высококонсервативного семейства протеаз, функцией которых служит расщепление так называемых "субстратов смерти". Вместе с каспазами активируются их позитивные и негативные регуляторы.
- 4) постмортальная фаза, или фаза деструкции, в ходе которой хроматин клетки конденсируется и ДНК подвергается деградации, погибшие клетки опознаются и фагоцитируются другими клетками.

# Нобелевская премия 2002 за работу по изучению роли апоптоза в развитии нематоды

Cell lineage (1090 cells)



The nematode  
*C. elegans*  
(959 cells)



**"Genetic regulation of organ development and programmed cell death"**

Лауреаты премии

*Sydney Brenner*

*John Sulston*

*Robert Horvitz*

Programmed cell death (131 cells)



"death genes"



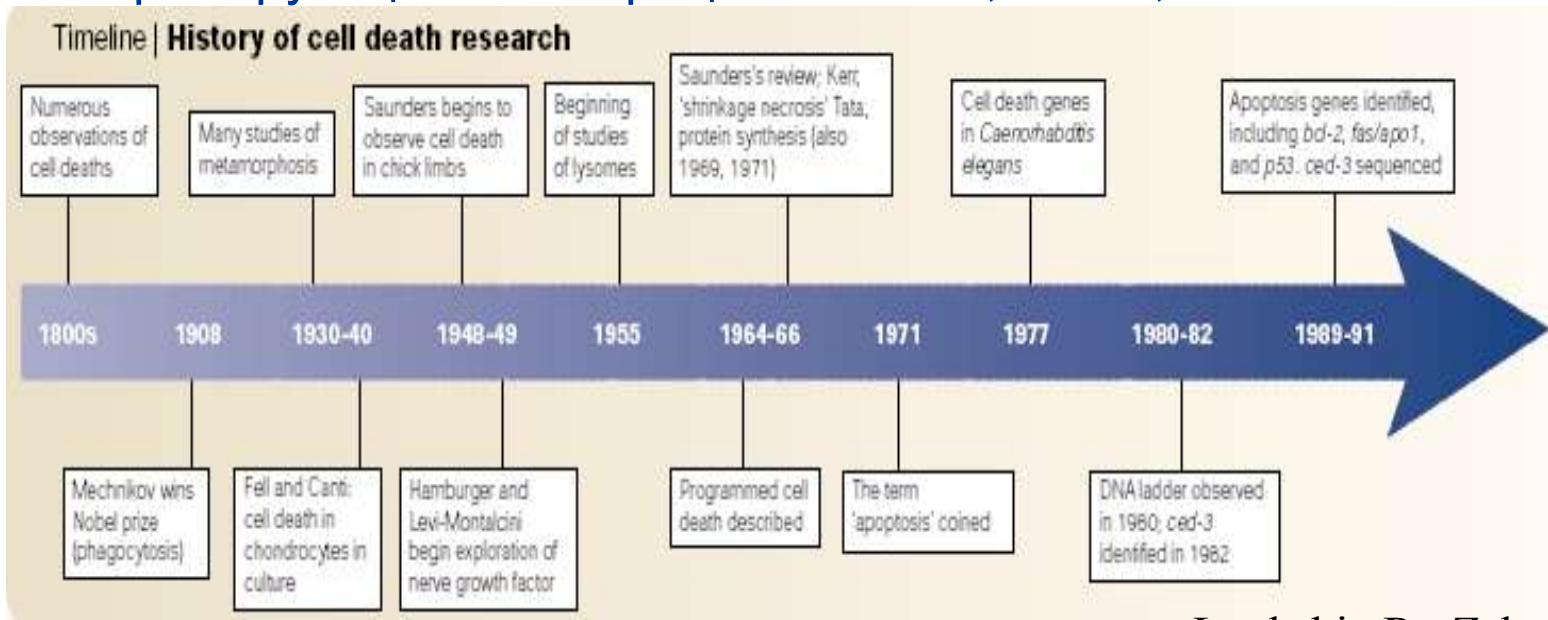
living cell

dead cell



# Апоптоз, или программируемая клеточная смерть

Первое интригующее наблюдение, что смерть клетки является неотъемлемой частью нормального развития организма было сделано еще в 1842 году, в конце 1970-х Horvitz и Sulston показали, что 131 из 1090 соматических клеток нематоды погибает в процессе развития. Выявлены гены, контролирующие этот процесс: *ced-3*, *ced-4*, *ced-9*.

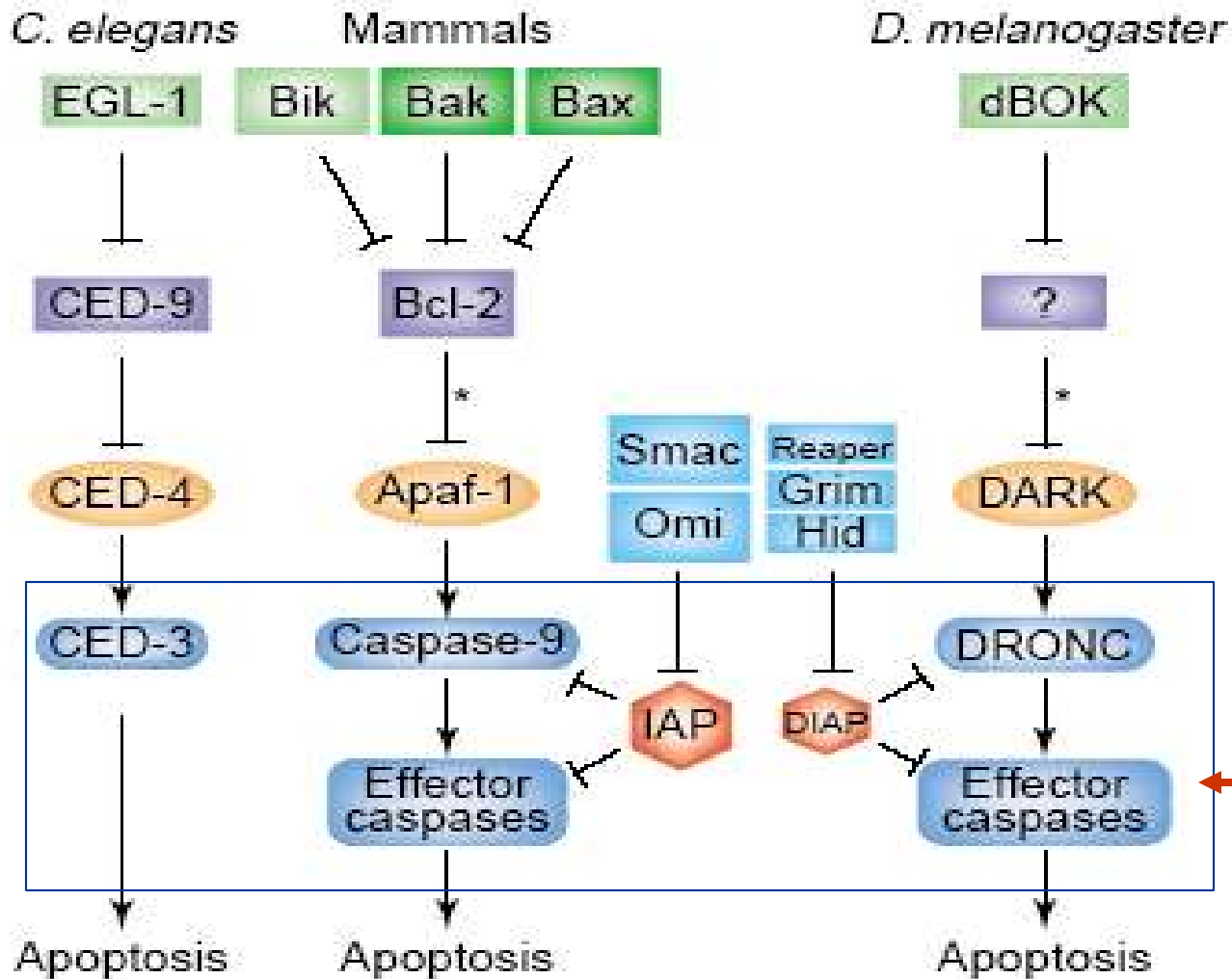


Lockshin R., Zakeri Z., 2001





## Консервативность механизма апоптоза



Апоптоз – генетически регулируемый процесс, основные механизмы которого консервативны от круглых червей до человека.

каспазы



## **Системная компьютерная биология**

В последнее десятилетие молекулярные биологи проявляют все возрастающий интерес к программируемой клеточной смерти, по морфологическим признакам определяемой как апоптоз, и получили огромное количество экспериментальных данных.

Компьютерная обработка и формализация позволит систематизировать и анализировать разнородные данные.

База генных сетей GeneNet накапливает данные о структурно-функциональной организации генной сети, регулирующей апоптоз, и доступна по адресу  
(<http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/systems/mgl/genenet>)



## *Структурно-функциональная организация генной сети апоптоза*



Особенностью генной сети апоптоза является преобладание положительных обратных связей, вызывающих усиление сигнала и переход системы к терминальному состоянию, то есть к гибели клетки.

Каскадный принцип усиления сигнала и интеграция путей передачи сигнала лежит в основе организации генной сети.



# Каскадный принцип усиления сигнала - каспазы

## Caspases (cysteine aspartate proteases)

В ходе апоптоза каспазы отвечают за расщепление определенных субстратов, играющих как структурную, так и регуляторную роль в клетке. В настоящее время у человека известно 11 каспаз. Каспазы представляют собой протеолитические ферменты, расщепляющие свои специфические субстраты по остаткам аспарагиновой кислоты.

### Иницирующие каспазы

### Выполняющие каспазы

Апоптоз, воспаление      апоптоз

Каспазы 1, 5, 11

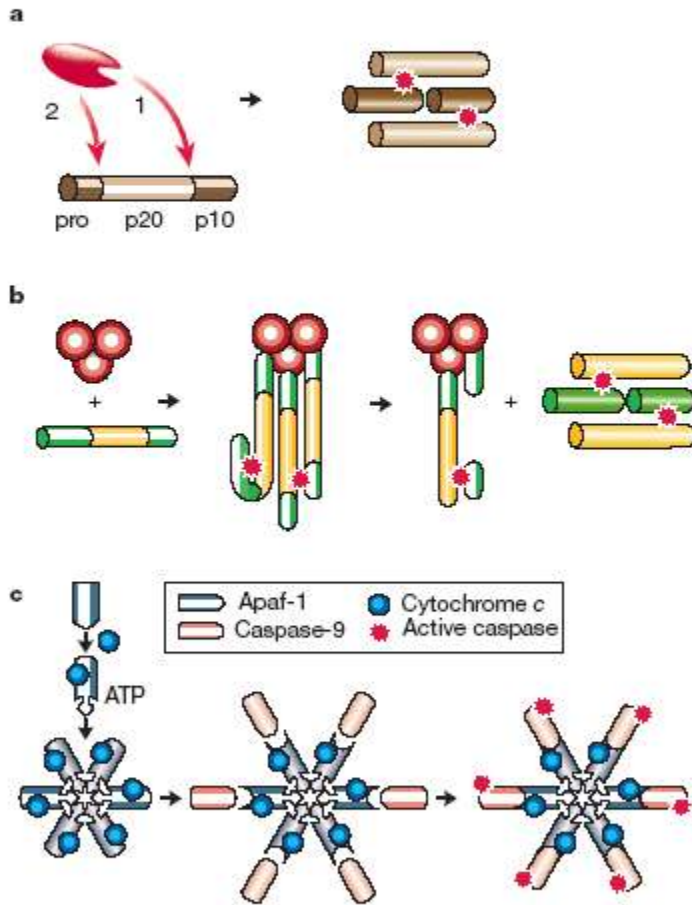
2, 8, 9, 10, 12

3, 6, 7

Активация каспаз происходит по каскадному принципу в результате протеолиза каспаз вышестоящими, иницирующими каспазами, которые содержат *death domains* и активируются в результате увеличения их локальной концентрации и белок-белковых взаимодействий с адапторными белками.



## Механизм активации каспаз



Hengartner M.O., 2000

Каспазы синтезируются в виде неактивных одноцепочечных предшественников (проферментов), которые присутствуют в цитоплазме.

Связывание лиганда с рецептором и адапторными белками приводит к увеличению локальной концентрации прокаспаз и активации каспазы 8 и 10.

Каспаза 9 активируется связываясь с регуляторными субединицами Apaf-1 и цитохомом с, образуя комплекс, называемый апоптосомой.

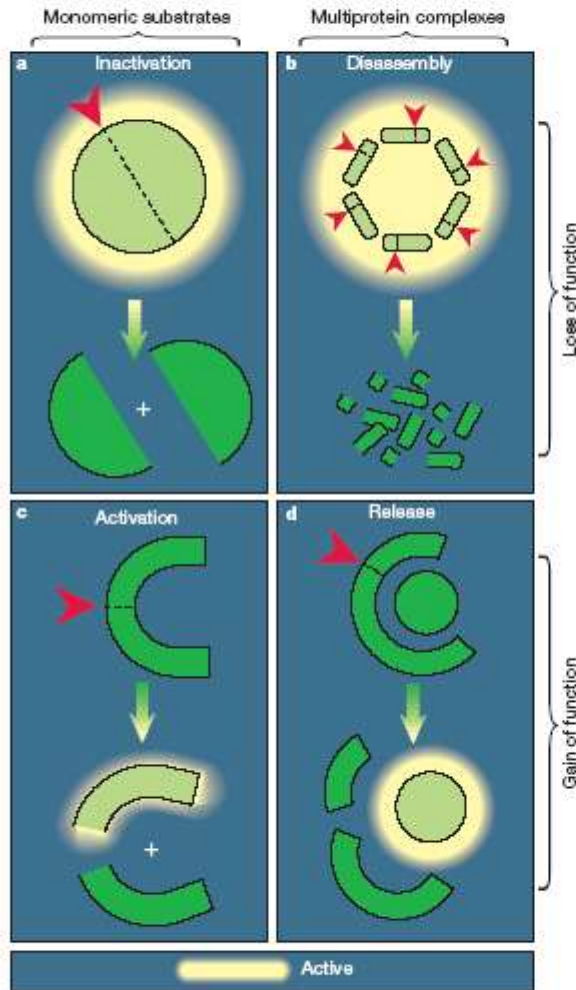
Другие каспазы активируются иницирующими каспазами, амплифицируя и интегрируя проапоптотный сигнал.



## Субстраты каспаз

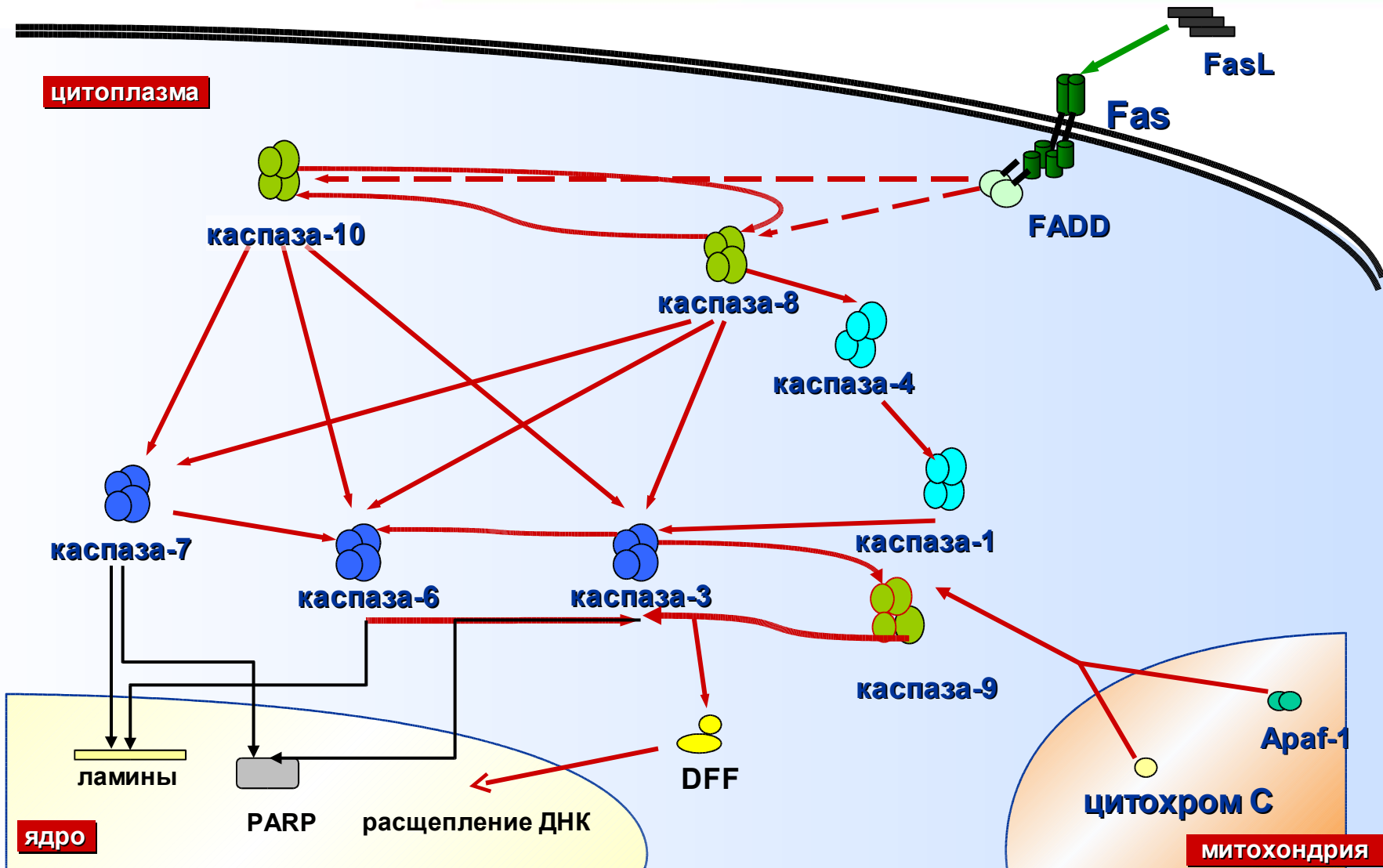
Активированные иницирующие каспазы 8, 9, 10 and 12 расщепляют и активируют выполняющие каспазы 3, 6 и 7, которые в свою очередь расщепляют «субстраты смерти» и вызывают апоптоз.

Каспазы 3, 6, 7 иницируют либо активацию белков с проапоптозной функцией, либо инактивацию белков, необходимые для поддержания структурной целостности клетки и ее выживания. Каспазы играют важную роль в фрагментации ДНК посредством активации CAD (caspase-activated deoxyribonuclease). В норме CAD локализована в цитоплазме и связана со своим ингибитором (ICAD/DFF-45), маскирующим ее пептид ядерной локализации и подавляющим эндонуклеазную активность. При апоптозе ICAD/DFF-45 инактивируется, приводя к активации CAD, транслокации ее в ядро и последующей фрагментации ДНК.



Hengartner M.O., 2000

# Каспазный каскад в генной сети апоптоза





## *Интеграция путей активации апоптоза*



В клетках млекопитающих существуют два основных пути каспаз-зависимого апоптоза: внешний, рецепторный, через цитоплазматическую мембрану и внутренний, митохондриальный путь, которые конвергируют, активируя каспазу 3.

Далее включаются различные подпрограммы разрушения клетки.

Интегратором этих двух путей является Bid, который расщепляется каспазой 8, транслоцируется в митохондрию и усиливает выход из митохондрии цитохрома c.

Интеграция путей передачи сигнала происходит при p53-индуцируемом апоптозе, вызываемом различными факторами стресса.



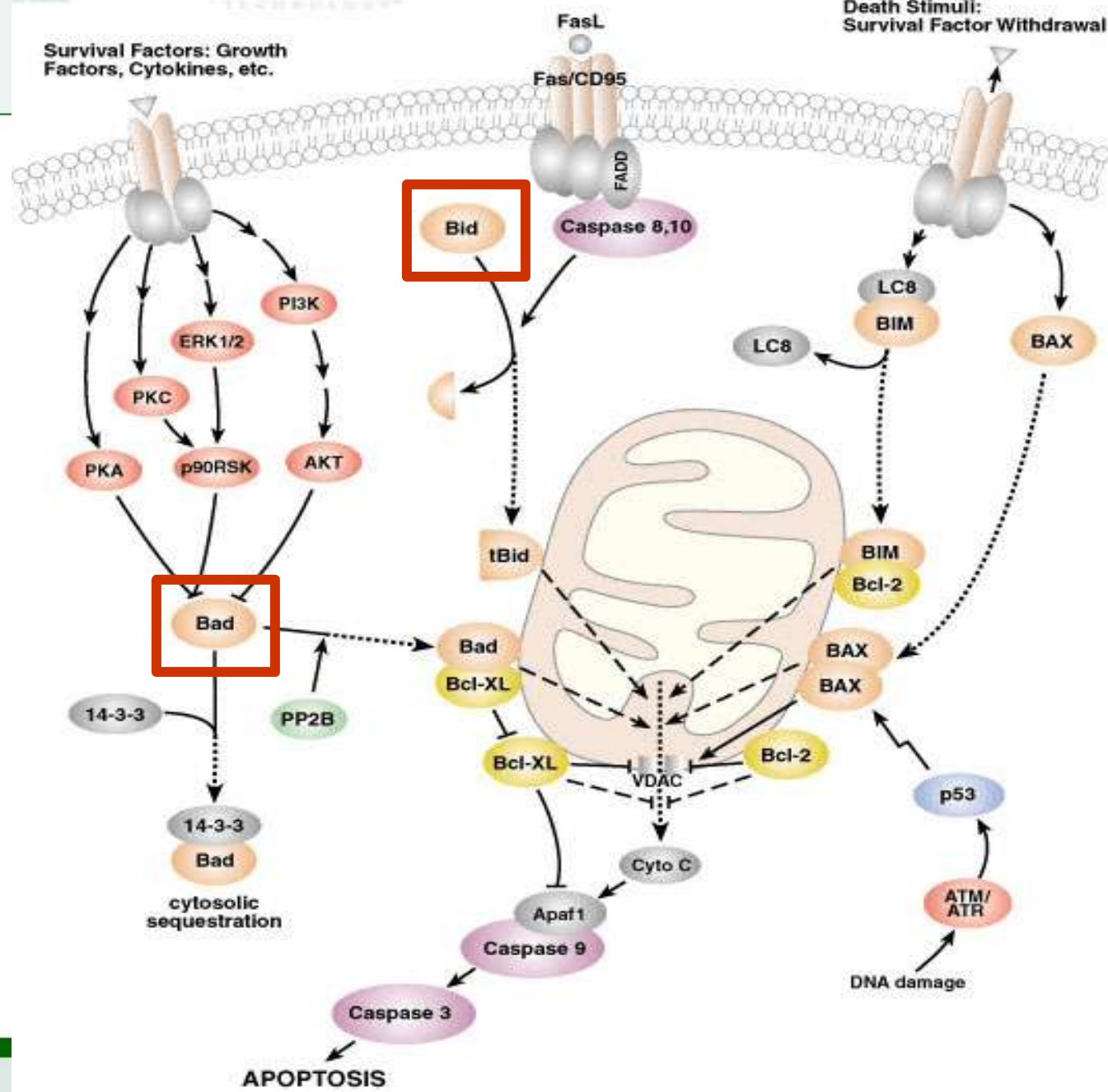
# Cell Signaling

## Mitochondrial Control of Apoptosis



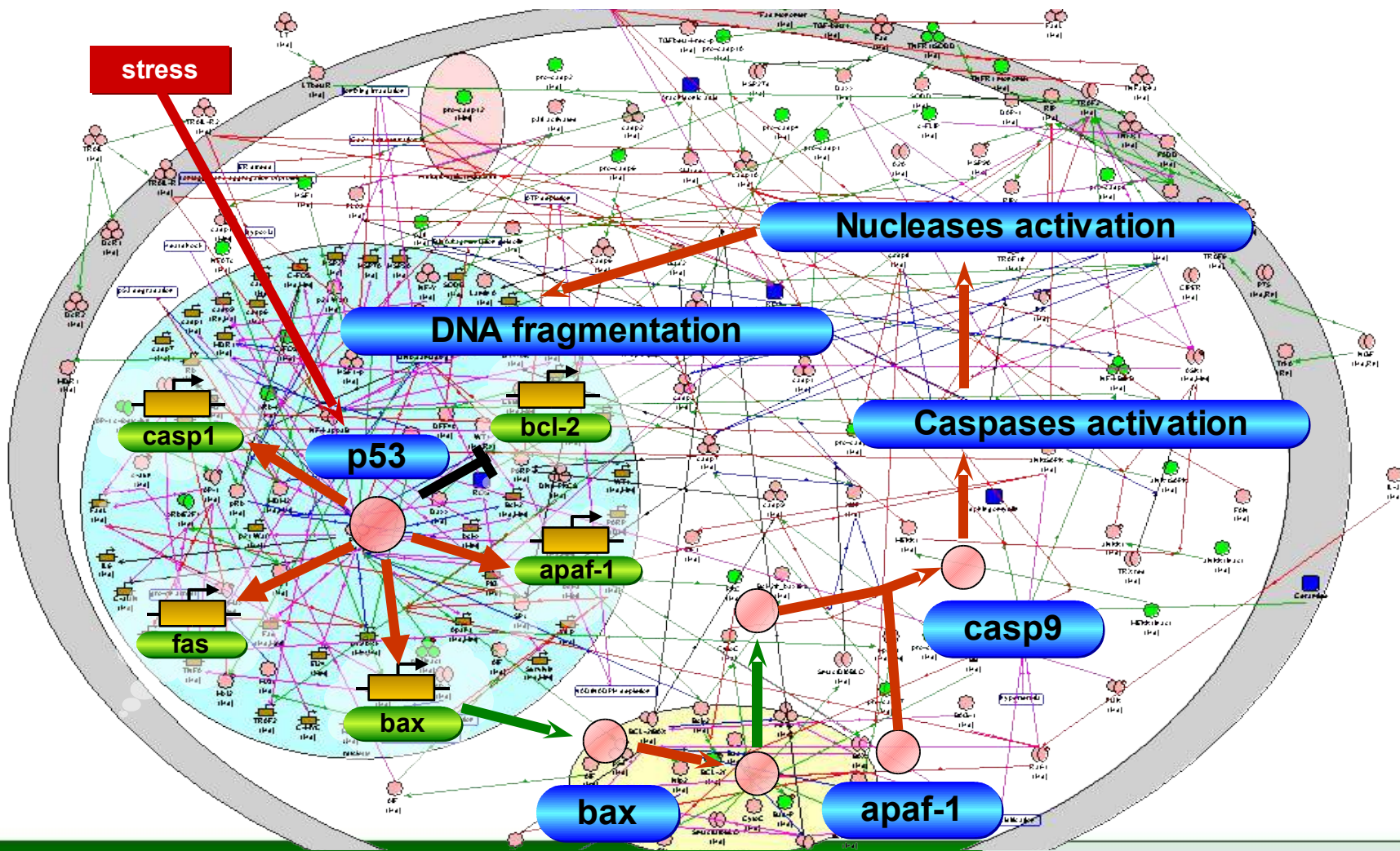
Survival Factors: Growth Factors, Cytokines, etc.

Death Stimuli: Survival Factor Withdrawal



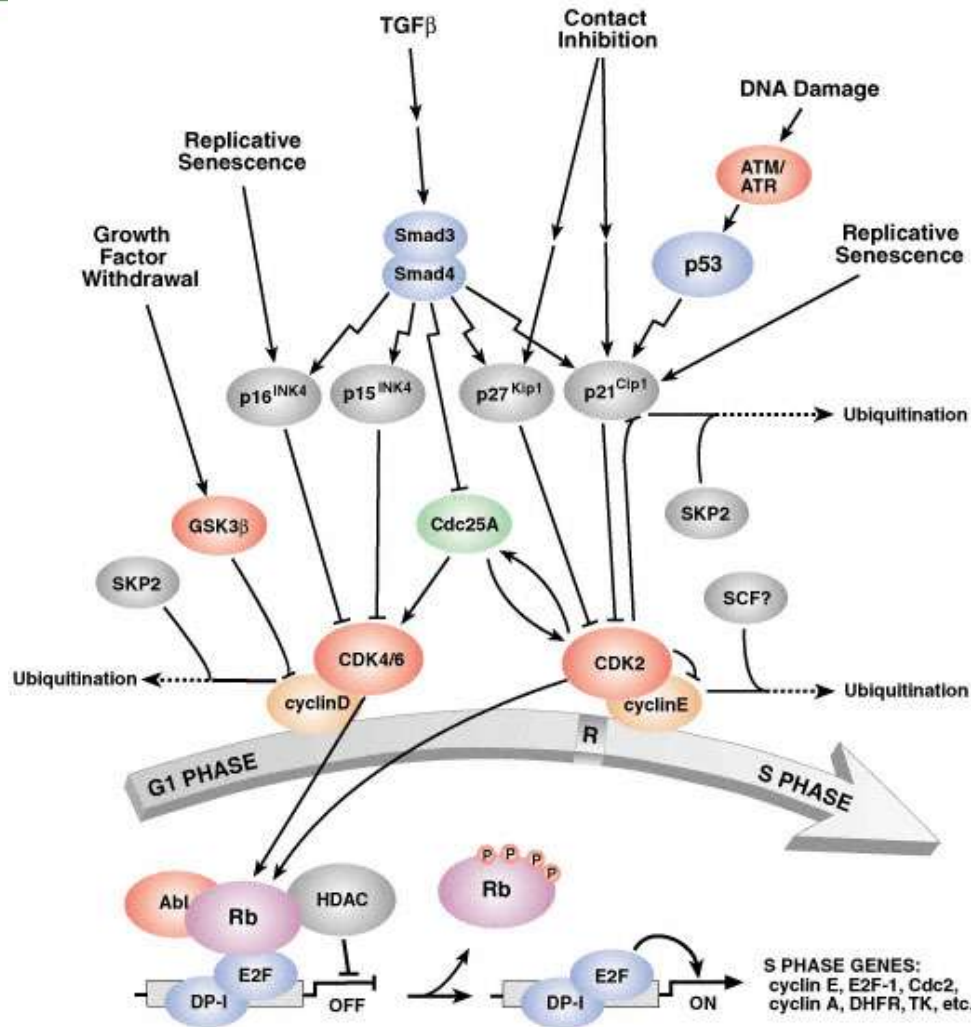


# Генная сеть апоптоза в базе данных GeneNet





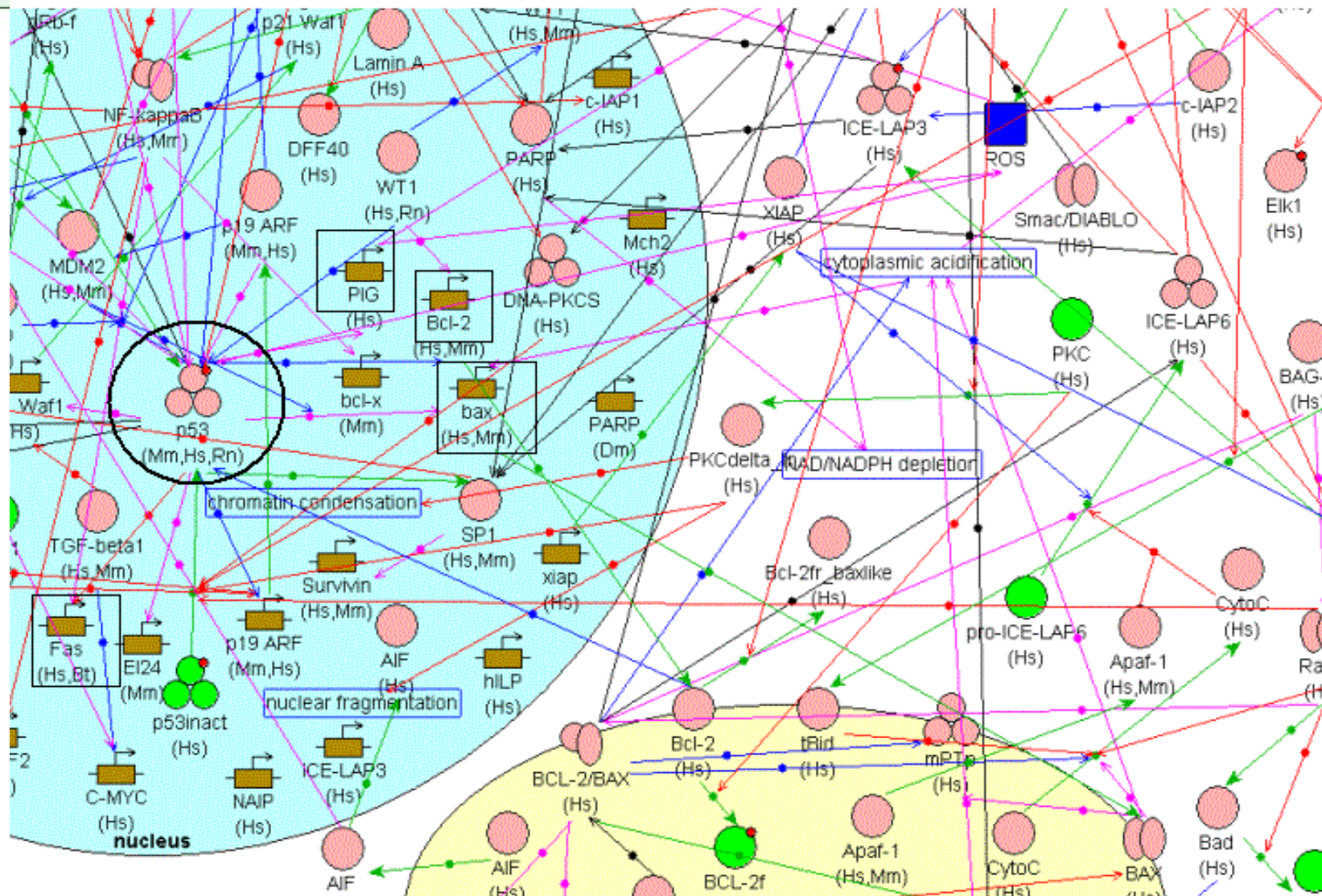
### G1/S Checkpoint



Белок опухолевого супрессора p53 широко известен благодаря своей роли "молекулярного стража генома" и участию в регуляции клеточного цикла. Высокий уровень нормального белка p53 вызывает временную задержку или даже арест клеточного цикла в двух его критических точках. Первая задержка на границе G1 и S фаз обеспечивает при этом возможность репарации ДНК перед репликацией. Если же повреждения значительны, p53 индуцирует экспрессию генов «машины смерти»

# Фрагмент генной сети апоптоза:

## ключевой транскрипционный фактор p53





## *Интеграция путей активации апоптоза: ключевой транскрипционный фактор p53*

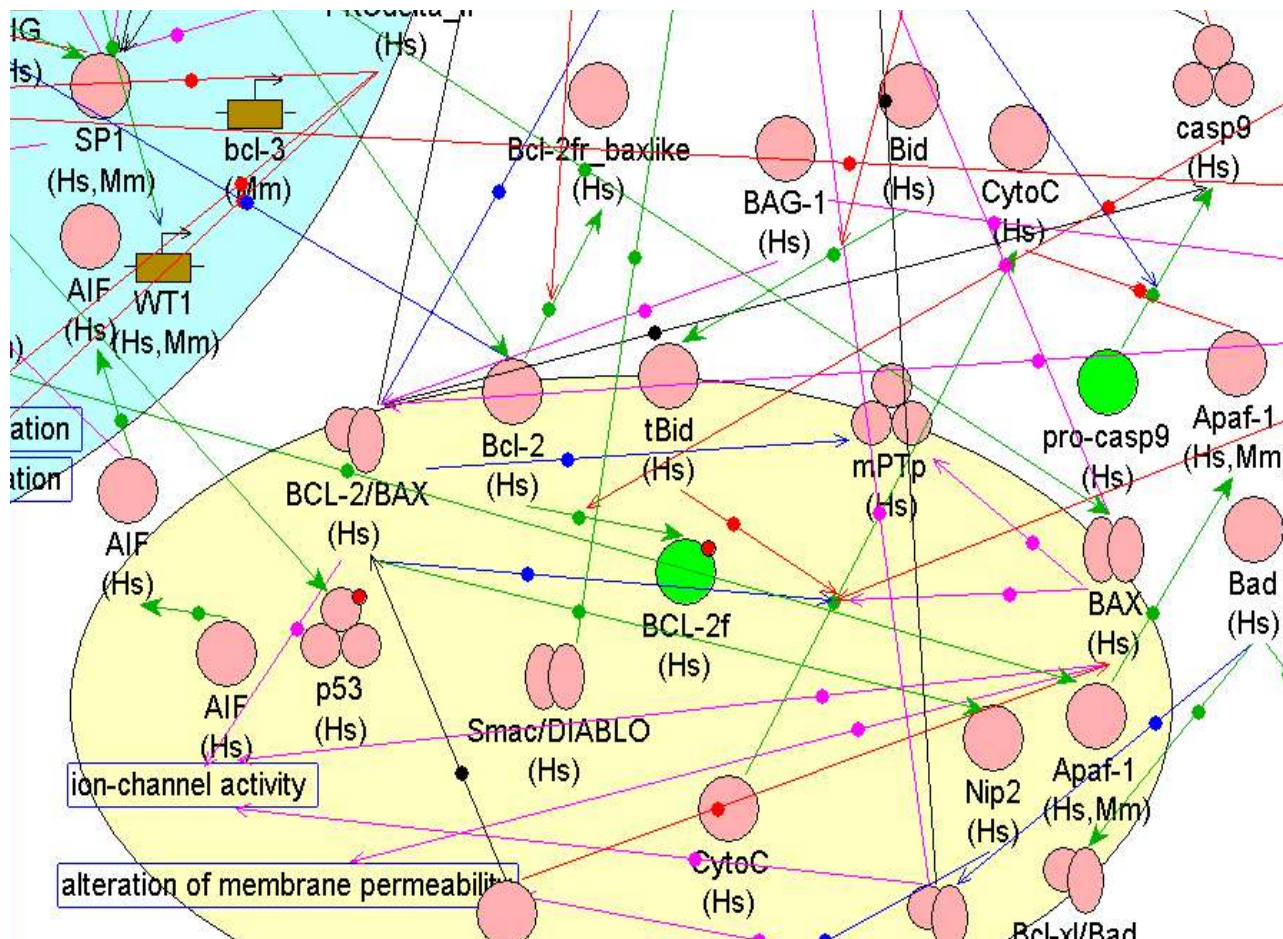
**Транскрипционный фактор p53** индуцирует гены с проапоптозной функцией *bax*, *NOXA*, *P53AIP*, *Araf-1* и *Fas/CD95* и подавляет транскрипцию антиапоптозного гена *Bcl-2*.

Белок *Bax* в форме активных гомодимеров встраивается в мембраны митохондрии и образует поры. Транслокация *Bax* к мембране митохондрии приводит к высвобождению митохондриальных факторов *Araf-1* и цитохрома *c*, которые в свою очередь активируют каспазу 9 и вызывают апоптоз.

Усиление экспрессии гена *Fas* приводит к увеличению на клеточной поверхности рецептора *Fas*, в результате чего клетка становится компетентной к *FasL*-индуцированному апоптозу через активацию каспазы 8.



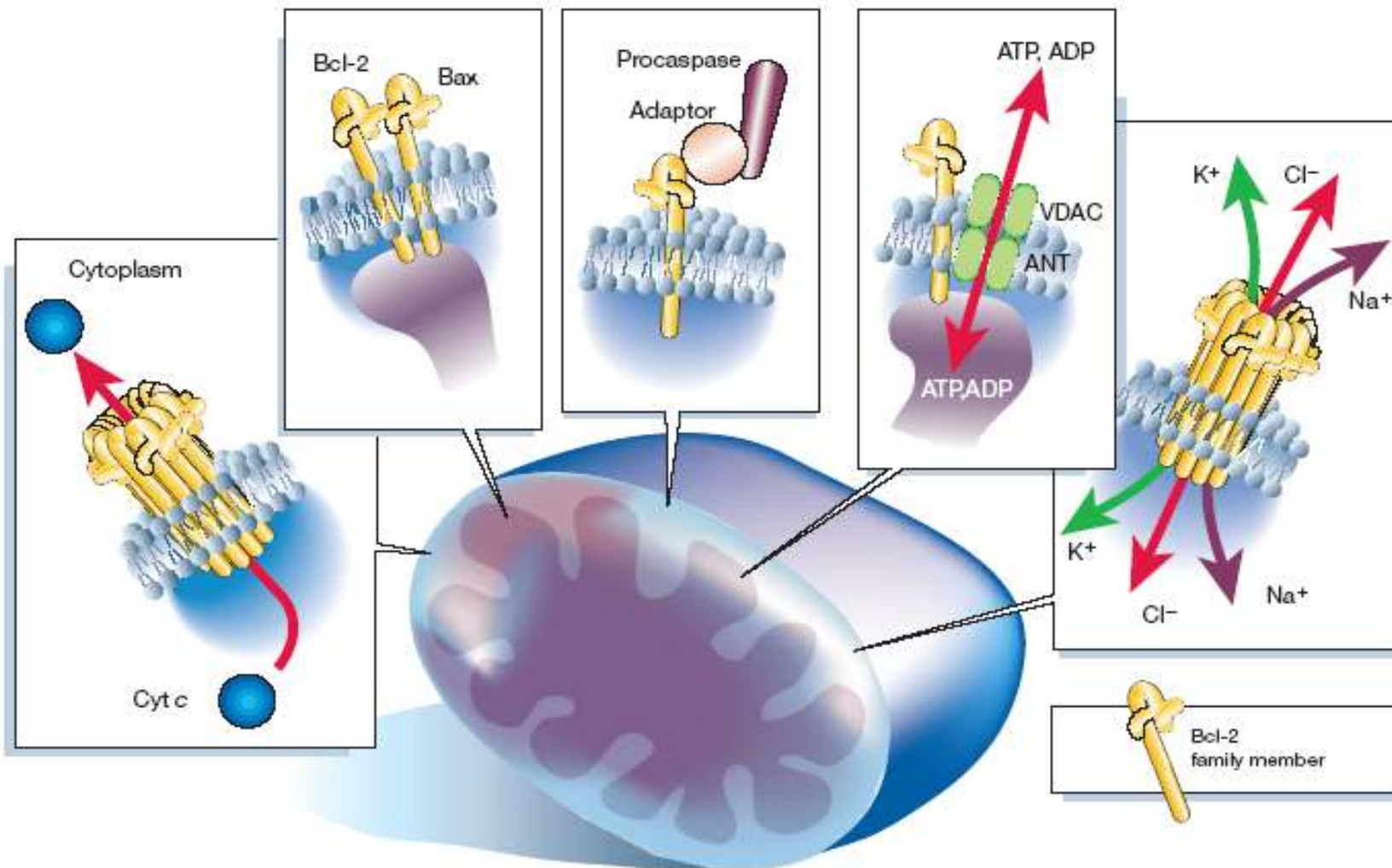
# *Bcl-2* семейство белков – медиаторы апоптоза



Активация каспаз регулируется Bcl-2 семейством белков, включающим белки, обеспечивающие выживание клетки (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1), стимулирующими клеточную смерть (Bax, Bak, Bok), и BH3-only (Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa), которые связываются с другими белками Bcl-2 семейства и либо инактивируют Bcl-2-like, либо модулируют Bax-like белки.

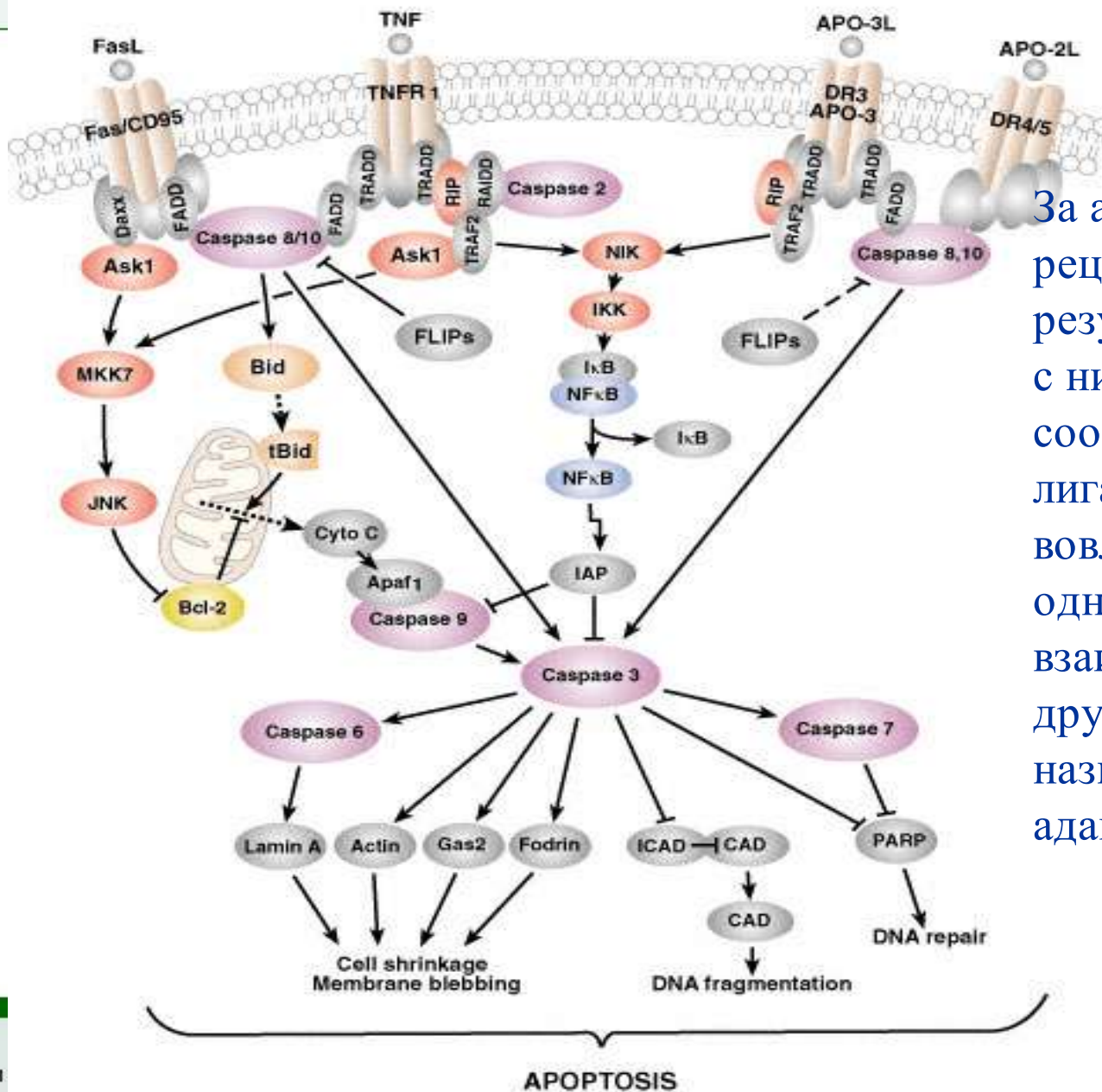


# *Bcl-2* белки формируют поры в мембране митохондрий





# Активация апоптоза: рецепторный путь



За активацией рецепторов в результате связывания с ними соответствующих лигандов следует вовлечение в процесс одного или более взаимодействующих друг с другом так называемых адапторных белков.





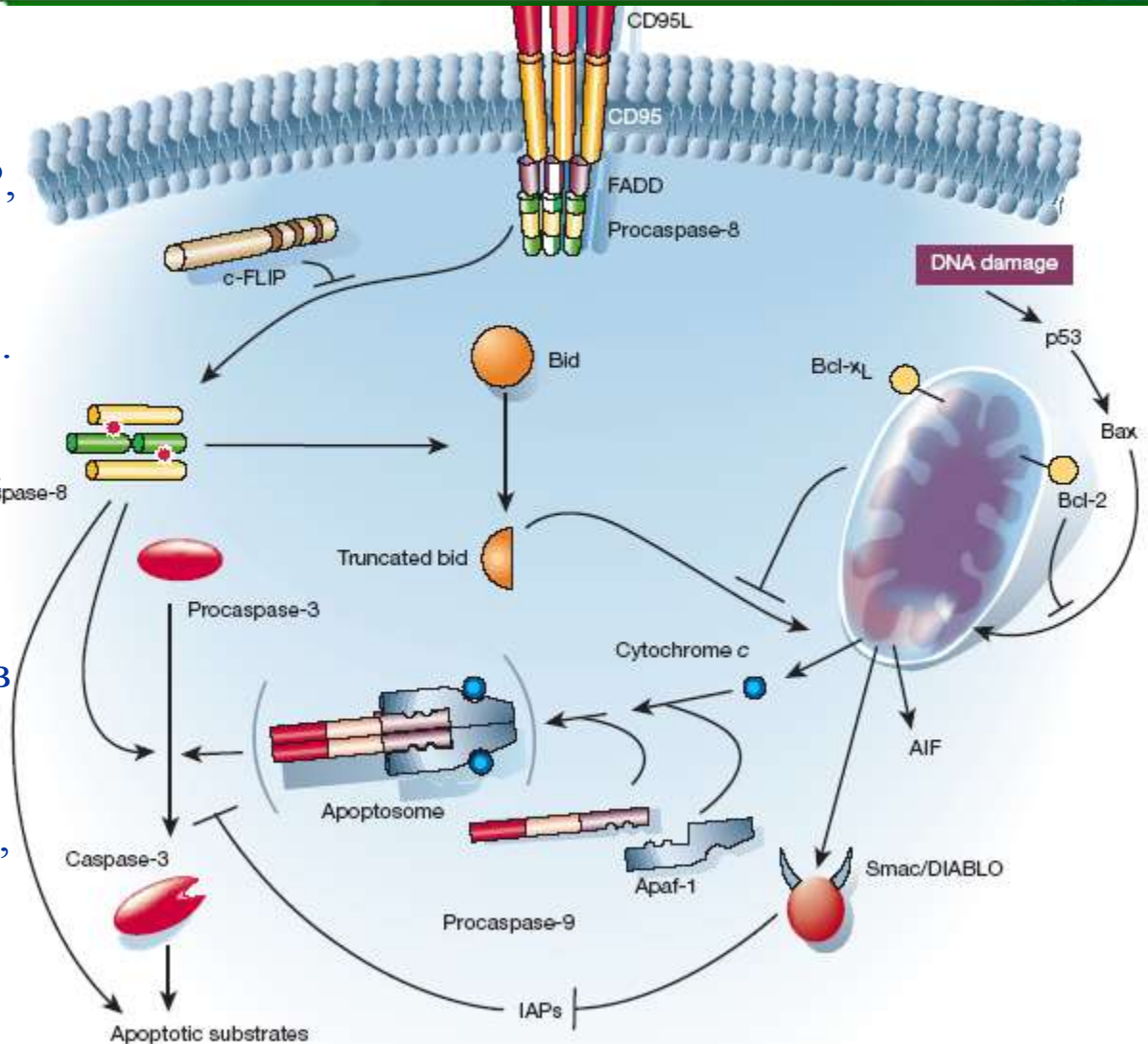
# Ингибиторы апоптоза



Включение генной сети контролируется ингибиторами апоптоза. IAP, c-IAP-1 и c-IAP-2, XIAP, survivin, связываясь, ингибируют каспазы 3, 7, 9.

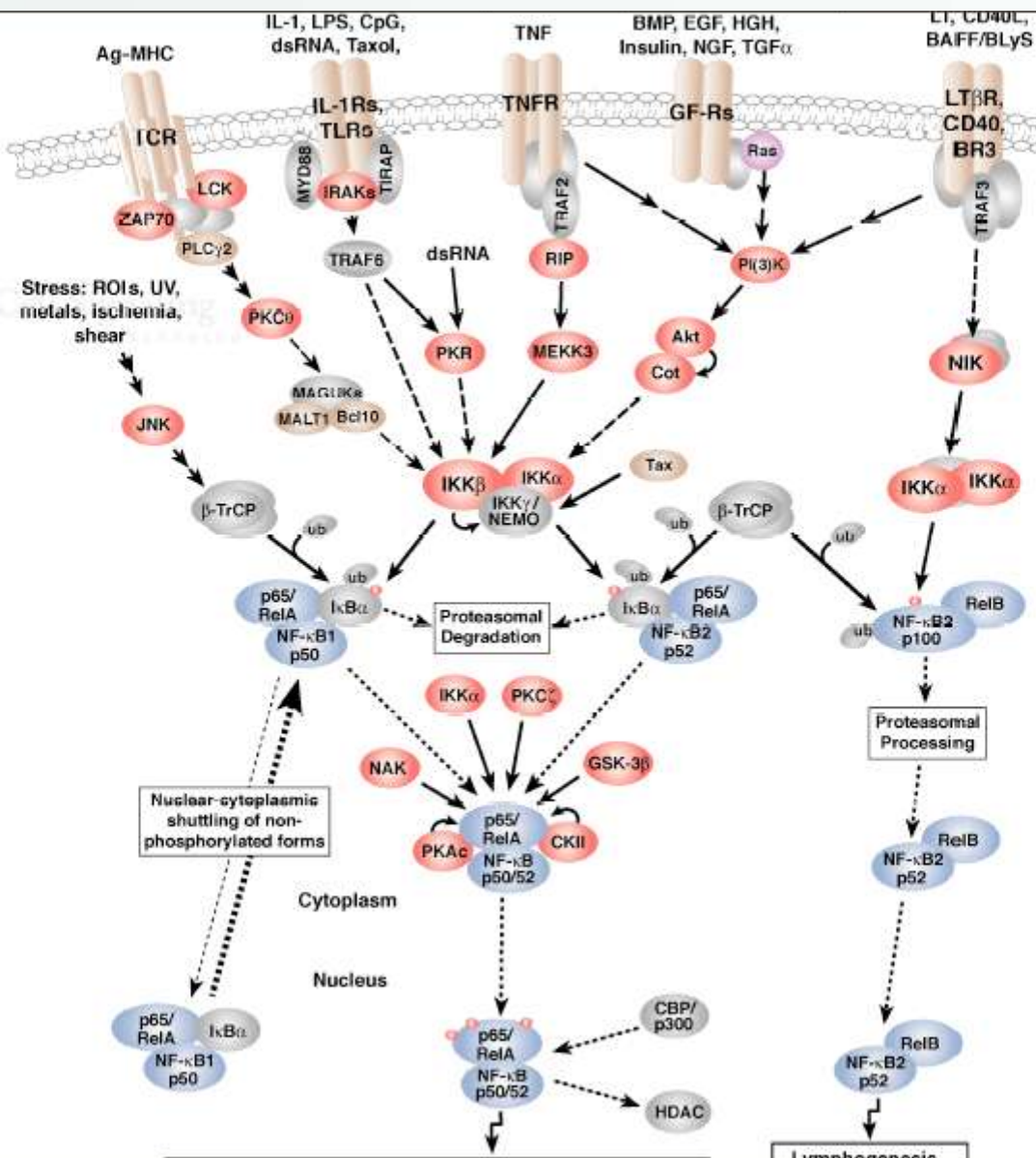
FLIP препятствует взаимодействию каспазы 8 с Fas-associated death domain адапторным белком.

Ингибирование ингибиторов апоптоза происходит при высвобождении из митохондрии Smac/DIABLO, который связывается с ингибиторами XIAP, активирует каспазы



Hengartner M.O., 2000

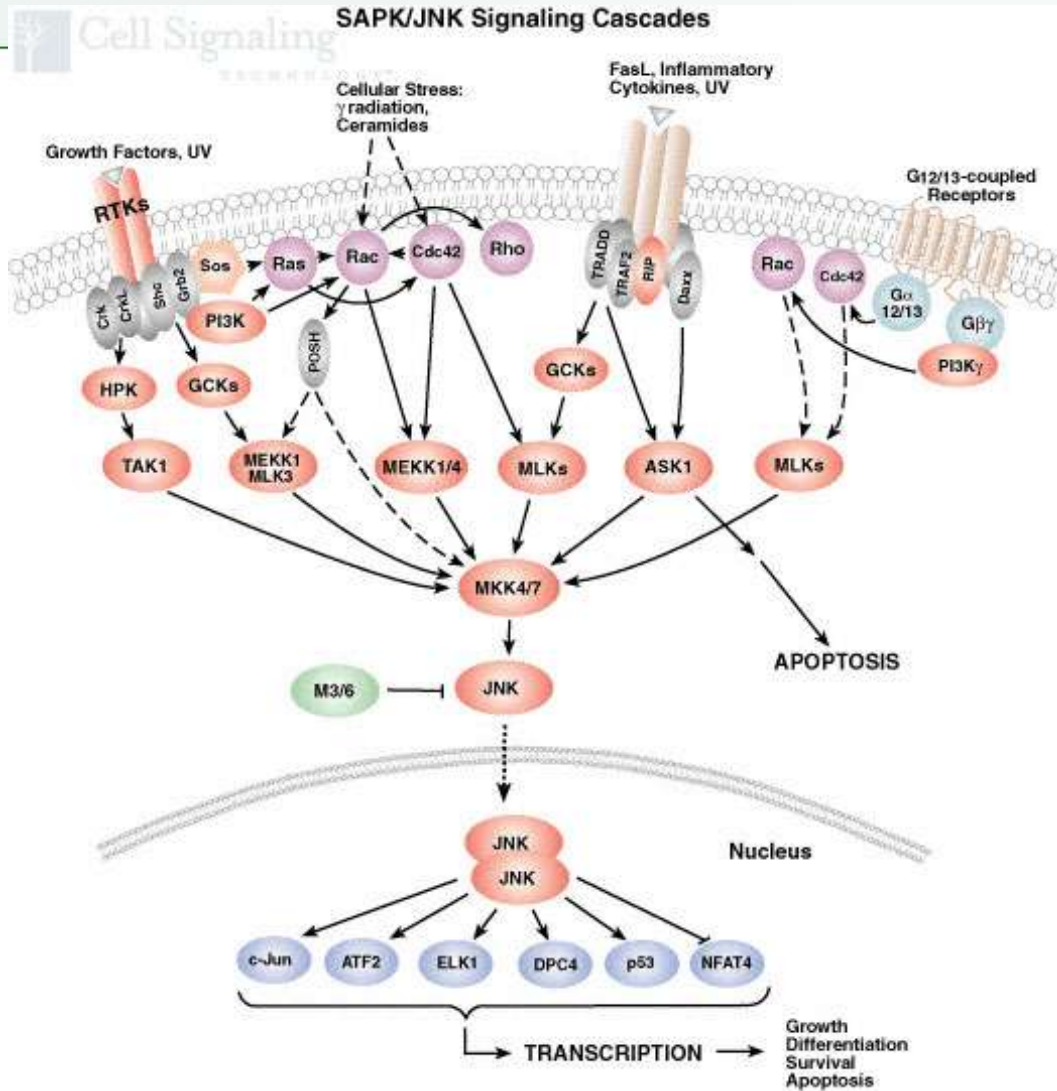
# TNF-alpha индуцирует активацию NF-карраВ



TNF $\alpha$  индуцирует два важных сигнальных пути. Один из них приводит к программируемой клеточной смерти, тогда как второй активирует транскрипционный фактор NF-карраВ, необходимый для выживания клетки. Он усиливает экспрессию генов ингибиторов апоптоза.



# Стресс-активируемые протеинкиназы



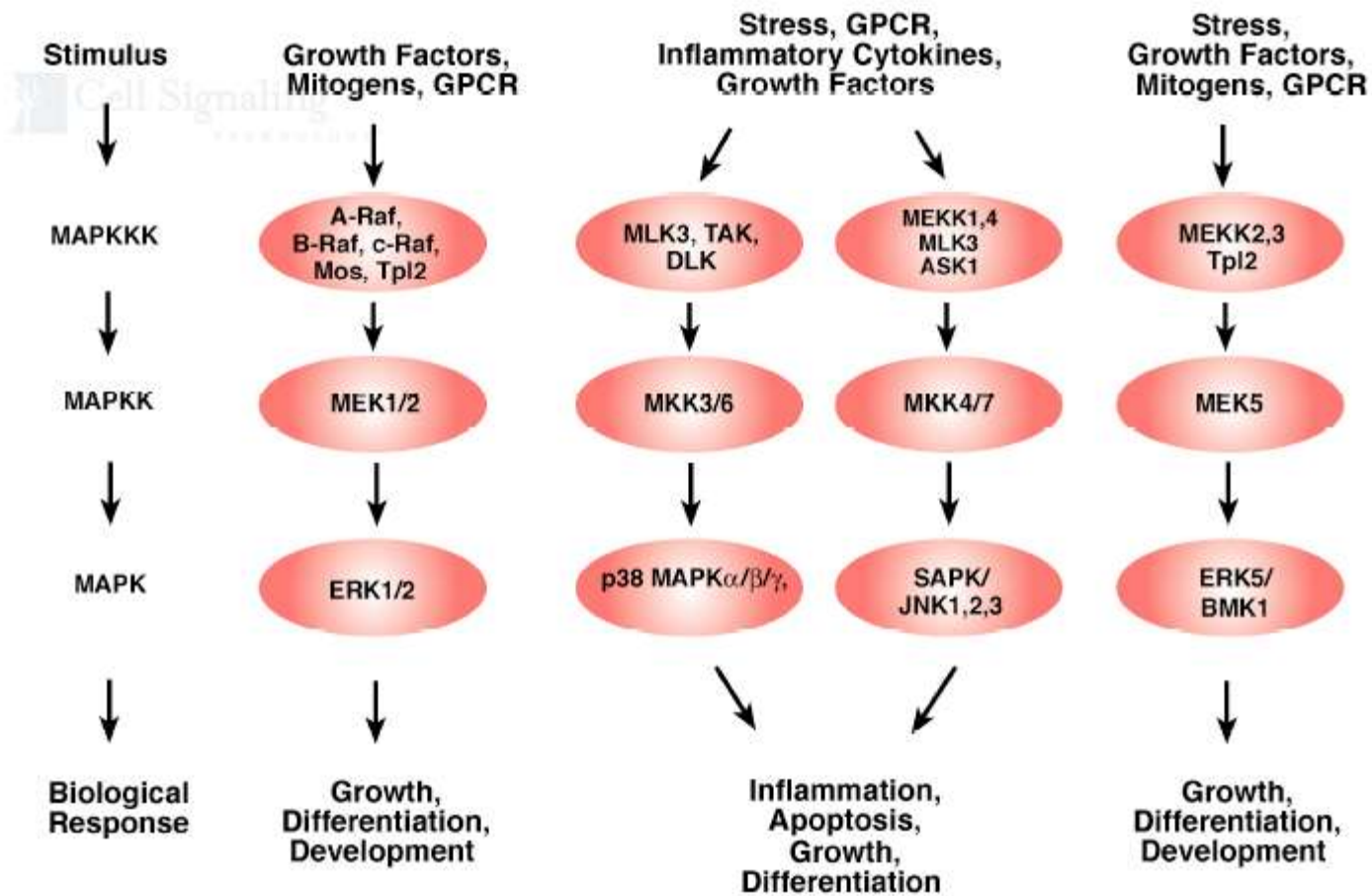
Цитокины TNF $\alpha$  и Fas, запускают активацию киназ SAPK, известных также как c-Jun N-концевые киназы (JNK). Функция JNKs заключается в фосфорилировании c-Jun, благодаря чему усиливается его транскрипционная активность. JNK-путь запускается многими другими стрессовыми стимулами, например, ультрафиолетовым и ионизирующим излучением, тепловым шоком, церамидами и окислительным стрессом. Все эти стимулы способны индуцировать апоптоз. Происходит последовательная активация киназ, что в конечном счете ведет к фосфорилированию c-Jun и других транскрипционных факторов



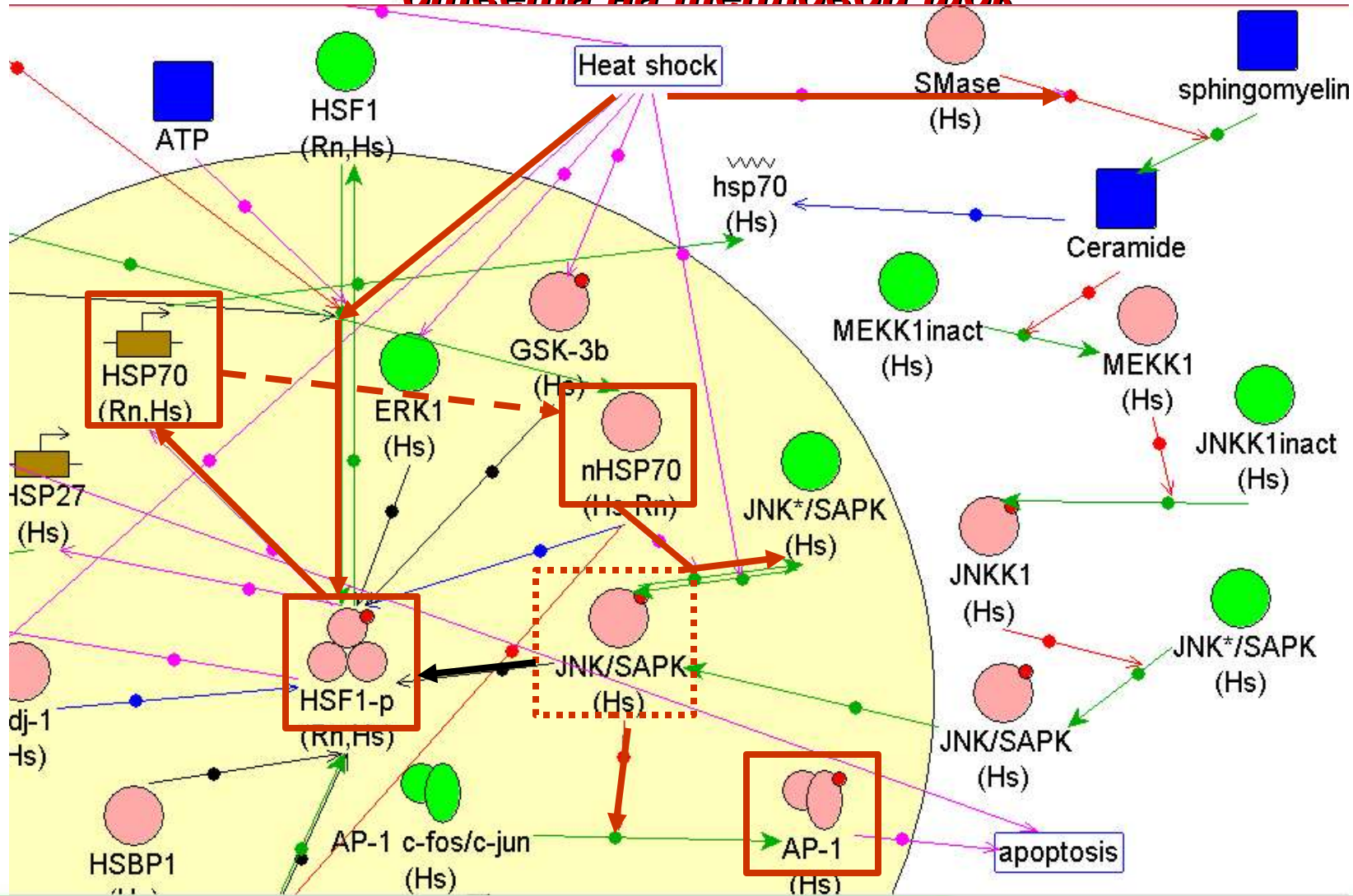
# МАРК киназный каскад



## MAPK signaling cascades



# Каскад стресс-индуцируемых киназ и интерференция генных сетей апоптоза и ответа на тепловой шок





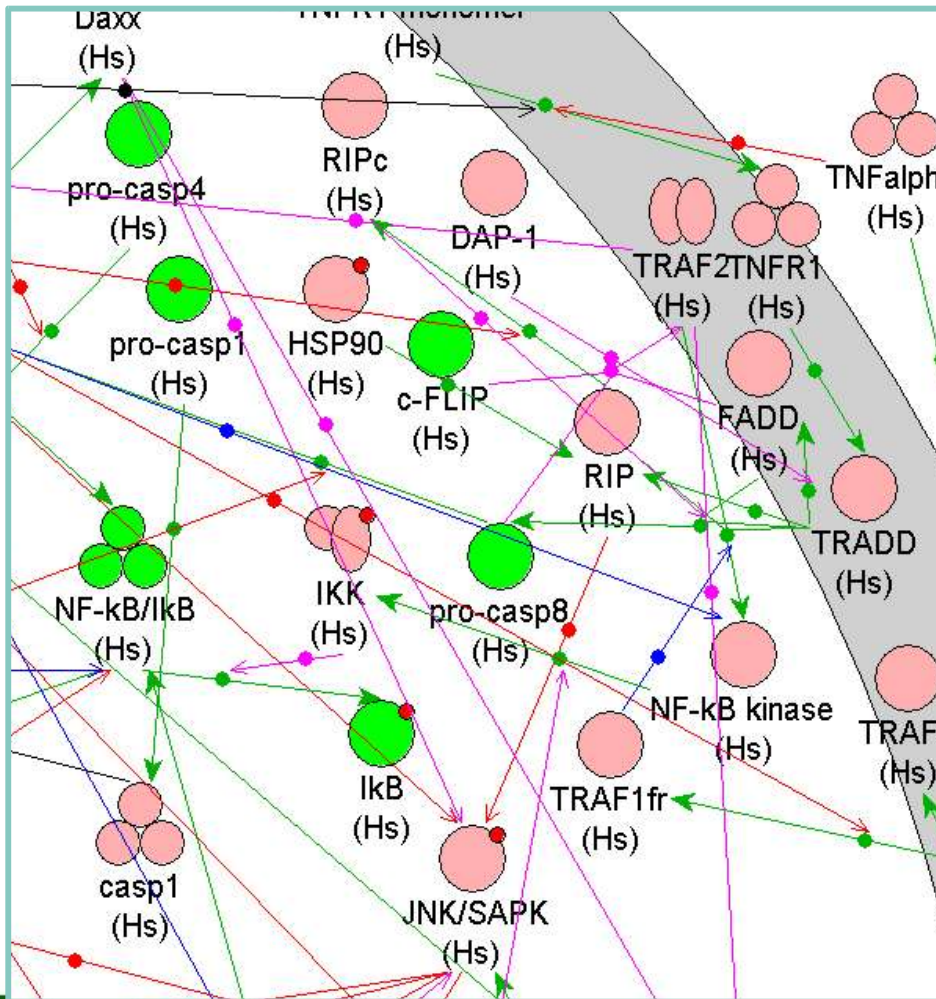
## **Системная компьютерная биология**



Накопление информации позволит понять особенности функционирования генной сети в различных типах клеток, при действии факторов, вызывающих или ингибирующих апоптоз, и выявить наиболее важные узлы генной сети, которые могут быть использованы для управления процессом.

Формализованное описание и систематизация данных в базе GeneNet позволяет провести компьютерный анализ данных и конструировать математические модели.

# Теоретический анализ генной сети



- Расчет параметров динамики функционирования генной сети
- Поиск критических элементов графа генной сети (узлов)
- Поиск подсетей в графе генной сети
- Поиск регуляторных контуров в генной сети и точек их пересечения



# Мутации генов апоптоза

## Рецепторы смерти

Tumor necrosis factor receptor 1 -- familial periodic fever syndrome

Fas (CD95) -- autoimmune lymphoproliferative syndrome type 1; malignant lymphoma; bladder cancer

## Лиганд

Fas ligand – systemic lupus erythematoses

## каспаза

Caspase 10 -- autoimmune lymphoproliferative syndrome type II

## B-cell lymphoma/leukemia (Bcl- семейство)

Bcl-10 -- non-Hodgkins lymphoma

bax – colon cancer; hematopoietic malignancies

bcl-2 -- non-Hodgkins lymphoma

## Ингибиторы апоптоза

c-IAP2 – low –grade MALT lymphoma

NAIP1 – spinal muscular atrophy

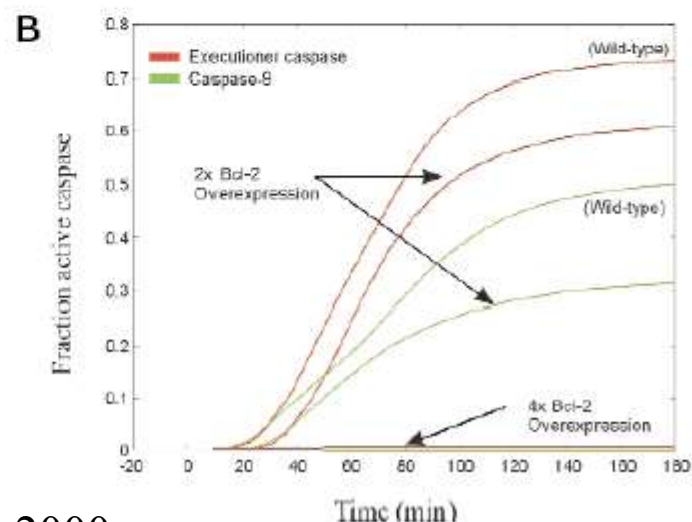
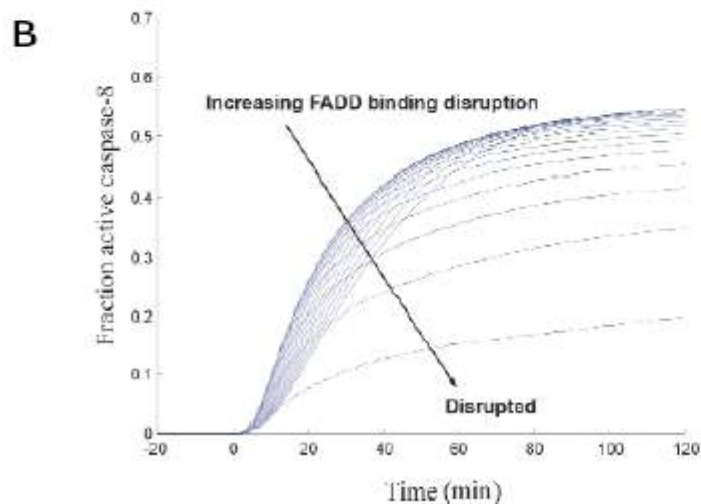
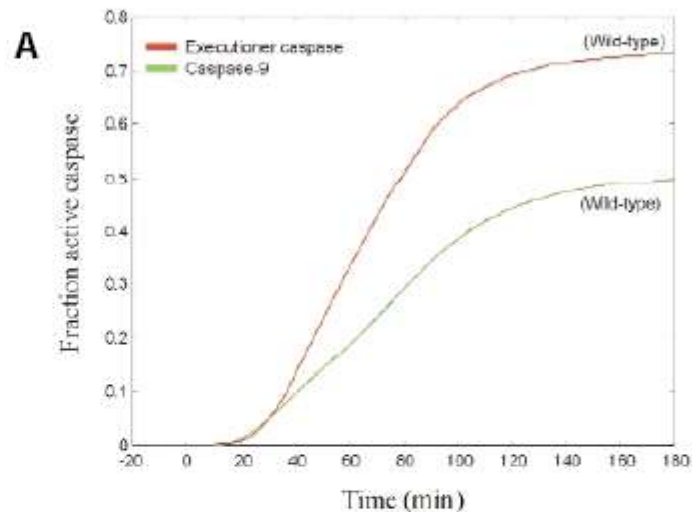
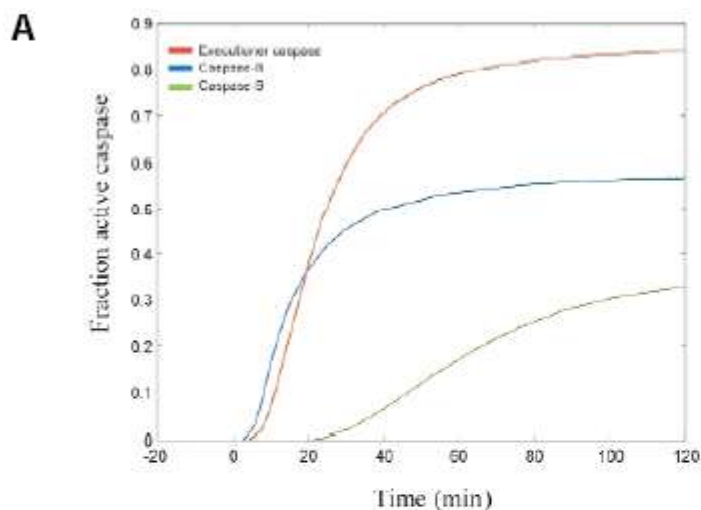
## Транскрипционный фактор

p53 -- various malignant neoplasms

Мутации в некоторых из них, действующих на различных уровнях процесса, вызывают развитие ряда болезней человека, главным образом различных видов злокачественных опухолей.



# Моделирование действия мутаций на функционирование генной сети позволит предсказывать эффективность химиотерапии и способствовать развитию новых стратегий лечения болезней



Fussenegger M. et al., 2000



**Каскадный принцип усиления сигнала и интеграция путей передачи сигнала лежит к основе организации генной сети апоптоза**