

Мембраны митохондрий и апоптоз

Некроз и апоптоз

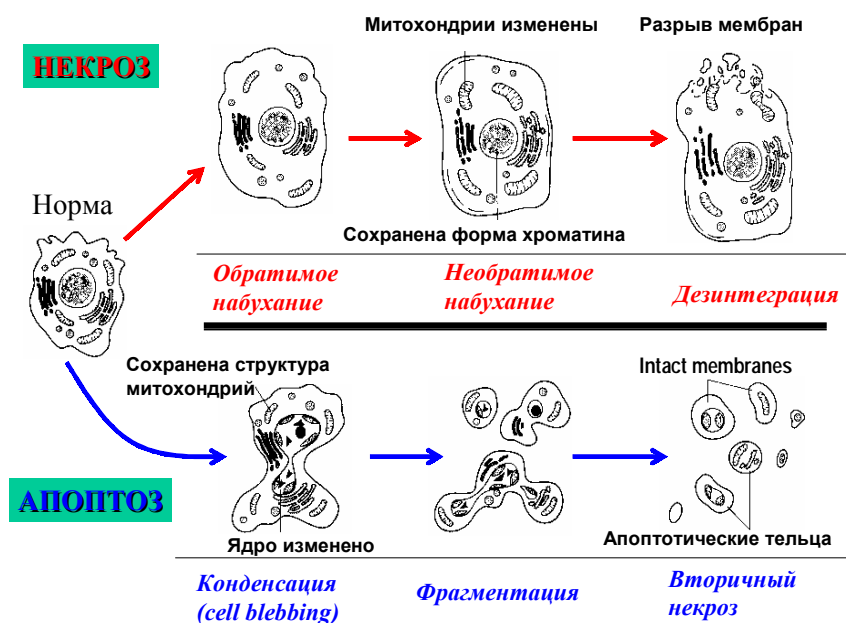
При остром недостатке кислорода, как говорилось в предыдущих лекциях, гибель клетки связана с нарушением энергообеспечения. После достаточно длительного «энергетического голода» клетка становится нежизнеспособной из-за повреждения митохондрий. Смерть клетки происходит в данном случае достаточно быстро. Этот тип клеточной смерти называется «некрозом».

Очевидным условием некроза является повреждение большей части митохондрий в клетке, так что оставшиеся целыми митохондрии уже не в состоянии восполнять энергетические потребности клетки в целом.

Существует, однако, и иной путь смерти клетки, который может иметь место не только в патологии, но и в норме, когда организм сталкивается с необходимостью удалить клетки определенного типа. В этом случае включается целый каскад реакций, специально предназначенных для того, чтобы убить и разрушить клетку. Такая «запрограммированная смерть» клеток была названа апоптозом.

Морфологические признаки апоптоза

Существуют определенные морфологические различия между клетками, оказавшимися в состоянии некроза, и ступившими в апоптоз. Они показаны на рис. 1.



Эти различия сводятся к следующему:

Митохондрии при некрозе набухают и разрушаются, при апоптозе большинство митохондрий мало изменено по сравнению с нормой.

Ядра при некрозе мало изменены, при апоптозе они сначала сжимаются (конденсируются), а потом фрагментируются.

Рисунок 1. Морфологические различия клеток при некрозе и апоптозе

Клетка при некрозе набухает, а затем может произойти разрыв цитоплазматической мембраны. При апоптозе клетка сжимается, на ее поверхности образуются «бородавки» (blebbing), а на поздних стадиях клетка фрагментируется (см. рис. 1).

Биохимические показатели апоптоза

Непосредственной причиной разрушения клеточных структур при апоптозе служит активация гидролитических ферментов, в основном протеиназ и эндонуклеаз, а также инактивация репарирующих ферментативных систем. По этой причине активация эндонуклеаз и фрагментация ДНК были первыми и сохранившими свое значение показателями апоптоза в тех или иных клетках. Характерным признаком апоптоза служит также появление в клетке специфических сериновых протеиназ, называемых каспазами. Очень важную роль играет также появление на поверхности клеток фосфатидилсерина, который в норме находится на внутренней поверхности липидного бислоя цитоплазматической мембраны. Все эти изменения используются для обнаружения апоптоза. Существует множество других показателей, на которых мы останавливаться не будем.

Роль цитохрома *c* в запуске каскада реакций, ведущих к апоптозу

В последние годы стала очевидной центральная роль цитохрома *c* в развитии апоптоза (см., в частности, обзоры) {Skulachev, 1996 #546; Skulachev, 1998 #479; Cai, 1998 #408}. Участие цитохрома *c* было документировано во множестве исследований. Так, например, было показано, что микроинъекция цитохрома *c* в клетки разных типов вызывает апоптоз {Zhivotovsky, 1998 #501}.

Действие цитохрома *c* основано на том, что он активирует, в присутствии определенных кофакторов, каскад реакций, осуществляемых каспазами. Так было показано, что в цитозольных экстрактах клеток HeLa (не подверженных апоптозу) цитохром *c* вместе с dATP (в микромолярных количествах) либо с ATP (в миллимолярных количествах) активирует каспазу 3 с последующей дефрагментацией ядерной ДНК {Liu, 1996 #455} (см. рис. 2).



Рисунок 2. Участие цитохрома *c* в апоптозе

1-2 – выход цитохрома из межмембранного пространства при разрыве внешней мембраны или образовании в ней больших пор.

3-4 – цитохром образует комплекс с белком Араф-1 и dATP с образованием апоптосомы.

5 – под действием апоптосомы прокаспаса 9 превращается в каспазу 9 – активный протеолитический фермент

6 – 8 запускается каскад реакций, ведущих к апоптозу.

Механизм активации каспаз цитохромом *c* детально изучен в ряде работ (см. обзор) {Cai, 1998 #408}. Прежде всего, было показано, что не имеет значения, находится ли цитохром в окисленном или же в восстановленном состоянии. {Hampton, 1998 #429} Более того, способностью активировать каспазы и апоптоз обладали медь и цинк-замещенные производные цитохрома, вообще не способные к окислению. {Kluck, 1997 #441} Это говорит о том, что активным началом является не гем, а апобелок цитохрома. Дальнейшие исследования проводились на изолированных участниках процесса {Zou, 1997 #503; Li, 1997 #454}, в частности, был очищен апоптозный фактор активации протеаз (Араф-1). По-видимому, активация включает в себя две стадии: связывание ATP или dATP на Араф-1, а затем прикрепление к этому белку цитохрома *c*. Это приводит к изменению конформации молекулы Араф-1, и обнажению, к которому затем присоединяется прокаспаса-9. В результате этого эта протеаза переходит в активную форму. Затем каспаза-9 расщепляет прокаспазу-3, превращая ее в активную протеазу, каспазу-3, а та, в свою очередь, активирует каспазу-6, затем последовательно активируются фактор фрагментации ДНК

(DFF) {Liu, 1997 #456}, поли- (ADP-рибозо) полимераза (PARP) и другие ферменты, действие которых приводит ко всем проявлениям апоптоза (рис. 2).

Механизмы выхода цитохрома с из митохондрий

Выход цитохрома с из митохондрий может происходить в результате, по меньшей мере, двух различных процессов. {Skulachev, 2000 #555} Один из них связан с увеличением объема (набуханием) матрикса митохондрий и разрывом наружной мембраны под действием давления со стороны внутренней мембраны, площадь которой значительно больше, чем площадь мембраны наружной. Вторая причина выхода цитохрома – образование больших пор во внешней мембране.

Как уже говорилось ранее, причина набухания митохондрий – увеличение ионной проницаемости внутренней мембраны. Одна из причин этого – гидролиз фосфолипидов эндогенной фосфолипазой А₂. Вторая причина набухания – перекисидация липидов мембран, которая приводит к окислению тиоловых групп белков и набуханию митохондрий (см. {Putvinsky, 1977 #520} и обзор [{Vladimirov, 1980 #524}]). Это «перекисное» набухание (p-swelling) {Olenev, 1976 #393} вызвано увеличением проницаемости внутренних мембран как для катионов, так и для анионов, что приводит к входу воды в матрикс вследствие осмотического давления белков матрикса. Согласно современным представлениям, образование неселективных каналов во внутренней мембране (НСК) обусловлено окислением тиоловых групп ААА, {Kowaltowski, 2001 #700}.

Образование пор во внешней мембране, не связанное с набуханием матрикса, обусловлено в основном белком Вах, принадлежащим к семейству белков Bcl {Strasser, 2000 #645; Desagher, 2000 #688} (рис. 3). Возможность образования пор в наружной мембране олигомерами белка Вах основана на опытах с протеолипосомами, в которых был показан выход цитохрома с из протеолипосом, состоящих из Вах и фосфолипида. {Antonsson, 1997 #693} Антиапоптотический белок того же семейства Bcl-2 тормозил этот процесс.

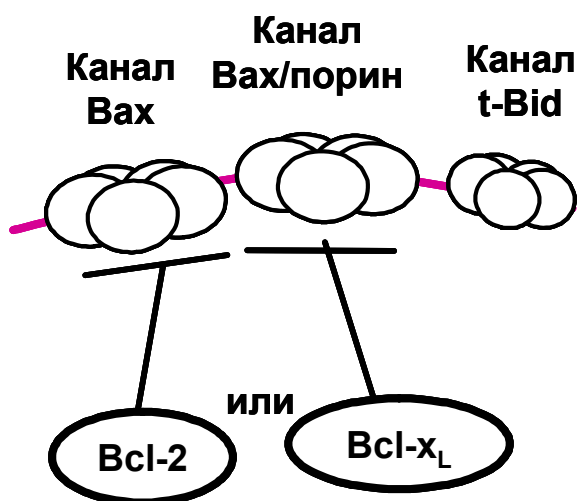


Рисунок 3. Большие каналы во внешней мембране митохондрий

Вах и t-Bid – белки цитоплазмы, способные встраиваться в наружную мембрану митохондрий. Порин, или VDAC (voltage dependent anionic channel) – белок внешней мембраны. Bcl-2 и Bcl-x_L – белки, конкурирующие с Вах и t-Bid и препятствующие образованию (открыванию) больших каналов.

Особенно эффективно выходил цитохром с из липосом в присутствии одновременно двух белков: Вах и порин, {Shimizu, 1999 #694} выход в данном случае предотвращался аналогом Bcl-2, белком Bcl-x_L. Активация Вах может быть вызвана другим проапоптотическим белком Bid. Впрочем, обрезанная форма Bid (t-Bid), возможно, способна формировать каналы независимо от Вах. Эти и другие факты легли в основу схемы на 3.

Открывание как пор внутренней мембраны митохондрий, так и пор в наружной мембране регулируется белками семейства Bcl. При этом молекулы Bcl-2 приходят изнутри, а другие (Ras, Raf, Bag-1, Grb10) – из цитоплазмы, встраиваются в наружную мембрану и могут ассоциироваться, формируя комплекс, называемый некоторыми авторами митохондриальной «сигналомой» (рис. 4), который регулирует открывание митохондриальных мегаканалов (ПВМ) {Salvioli, 2001 #610}.

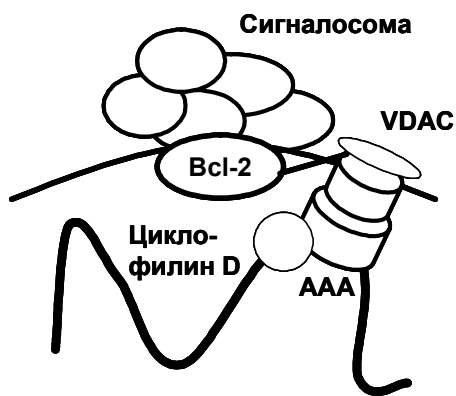


Рисунок 4. Строение сигнасомы, регулирующей открывание неселективных каналов в митохондриальных мембранах (НСК).

Циклофилин D – белок, специфически ингибируемый циклоспоринм А. AAA – АТФ-АДФ антипортер (или обменник адениннуклеотидов). Остальные сокращения см. на рис. 3

В заключение следует добавить, что публикации по механизму образования пор в мембранах митохондрий появляются почти каждый день и многое в приведенных схемах, вероятно, придется еще уточнять.

Цитохром с как «вторичный мессенджер» апоптоза

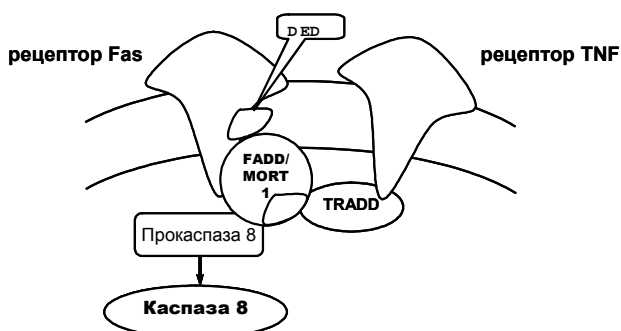


Рисунок 5. Активация каспазы 8 под действием апоптогенов. Fas – антигенный домен на поверхности иммунных комплексов, TNF – фактор некроза опухоли.

Другие пояснения даны в тексте.

Каскад реакций, запускаемых такими апоптогенами, как Fas и TNF, включает в себя активацию каспаз-8 и 1 (рис. 5). С рецептором Fas связывается белок, который получил название FADD/MORT1, {Boldin, 1995 #404} FADD {Chinnaiyan, 1995 #414}. На этом белке есть участок, называемый DED {Kischkel, 1995 #440} (death ejector domain), к которому присоединяется каспаза 8 и TRADD (TNF receptor associated protein). При связывании Fas с рецептором происходит его агрегация и связывание прокаспазы 8 с DED, ее превращение в активную каспазу 8, которая, в свою очередь атакует прокаспазы 1 и 3, превращая их в активные каспазы 1 и 3 с последующим запуском всего каскада апоптотических изменений в клетке (рис. 6).

Высвобождение цитохрома с из митохондрий может быть пусковым фактором апоптоза, но и, наоборот, следствием действия на митохондрии факторов, вызывающих апоптоз. К таким апоптогенам относится Fas. Было показано, что при действии этого апоптогена на изолированные клетки Jurkat была нарушена дыхательная цепь митохондрий вследствие выхода из них цитохрома с. {Krippner, 1996 #450} Ингибиторы каспаз предотвращали выход цитохрома. {Krippner, 1996 #450; Cai, 1998 #408} Таким же образом вторично действует выход цитохрома и при апоптозе, вызванном фактором некроза опухоли (TNF).

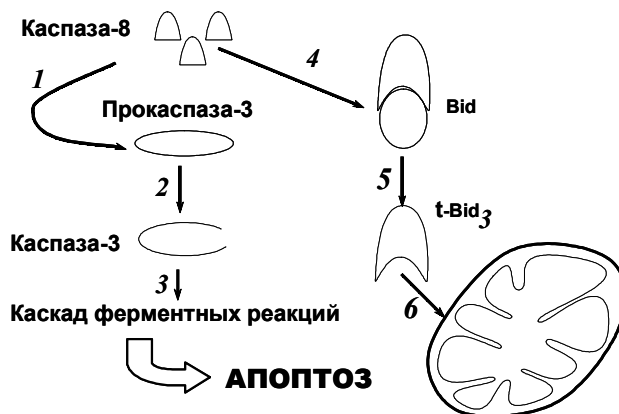


Рисунок 6. Активация апоптоза с участием каспазы 8

1–3 – Немитохондриальный путь через стадию активации каспазы 3. 4–6 – Активация выхода цитохрома с через стадию образования t-Bid₃ и формирования больших пор во внешней митохондриальной мембране (сравни рис.).

Наряду с этим, независимым от митохондрий путем (как правило, не основным) имеет место также путь, связанный с действием на мембраны митохондрий. Началом его может служить расщепление белка Bid с образованием его усеченной формы t-Bid (стрелка 5 на рисунке 6). Последний вызывает образование пор в мембранах митохондрий (стрелка 6) и выход цитохрома с (см. рис. 3 и 2). Это приводит к активации каспазы (рис. 2) и последующему развитию каскада реакций, ведущих к апоптозу.

Таким образом, выход цитохрома с может служить связующим звеном между действием апоптогенов на клетку и развитием апоптоза.

Необходимо, однако, подчеркнуть, что хотя схема на рис. 6 объясняет многие экспериментальные данные, она не может считаться исчерпывающей, т.к. не затрагивает главного: общеизвестного факта, что в развитии, а часто и в зарождении каскада реакций апоптоза ведущую роль играют *свободные радикалы* и другие *активные формы кислорода*. Этот вопрос мы рассмотрим в следующей лекции.

Вопросы для самоконтроля и экзамена

1. Морфологические признаки некроза и апоптоза.
2. Биохимические признаки апоптоза.
3. Роль цитохрома с в апоптозе. Апоптосома. Роль каспазы 9 в апоптозе.
4. Два основных механизма выхода цитохрома с из мембран. Строение больших пор во внешней мембране митохондрий. Сигналосома.
5. Роль каспазы 8 в апоптозе.
6. Каскад реакций, вызываемых фактором некроза опухоли и приводящих к апоптозу.