

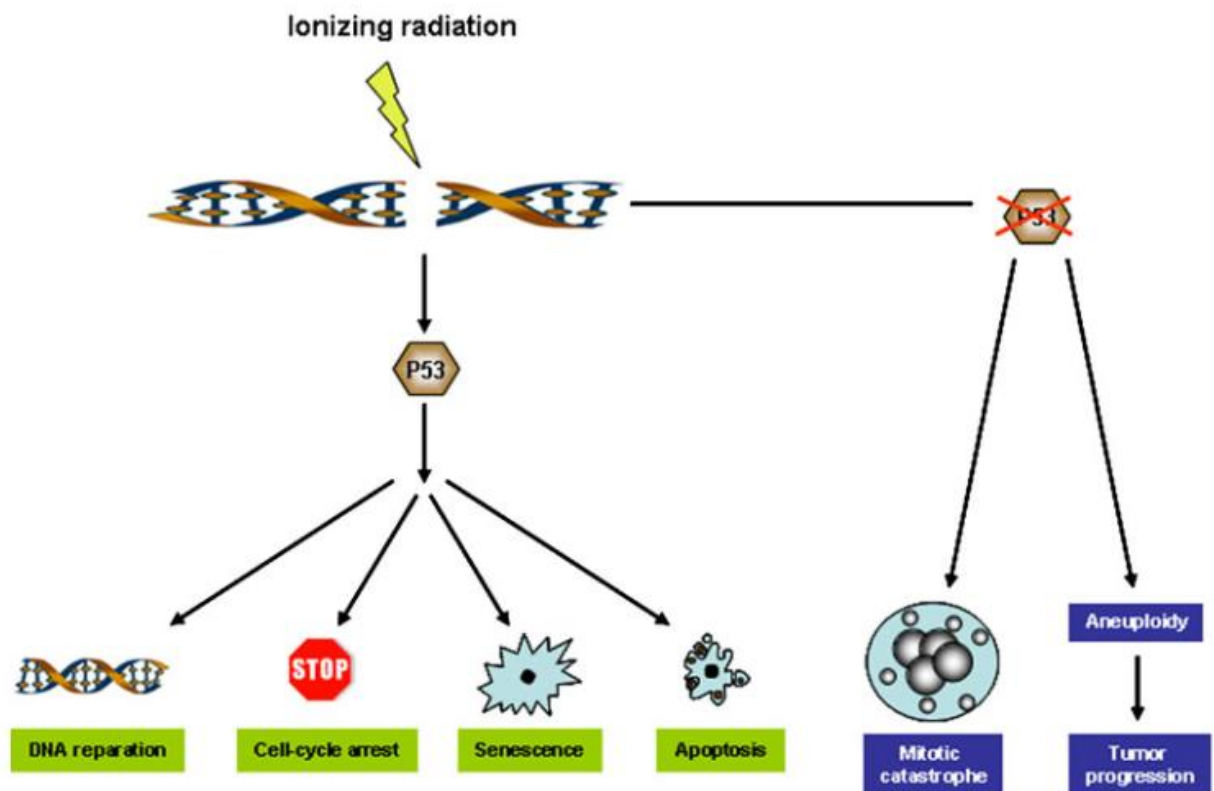
[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#01]

Реакція клітин на дію іонізуючого випромінювання

1. Типи радіаційної загибелі клітин. Етапи клітинного циклу та ключові ензими, які їх забезпечують.
2. Проліферативна загибель клітин.
3. Інтерфазна загибель клітин.
4. Радіочутливість клітин.
5. Природа радіаційної смерті клітин.

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#02]

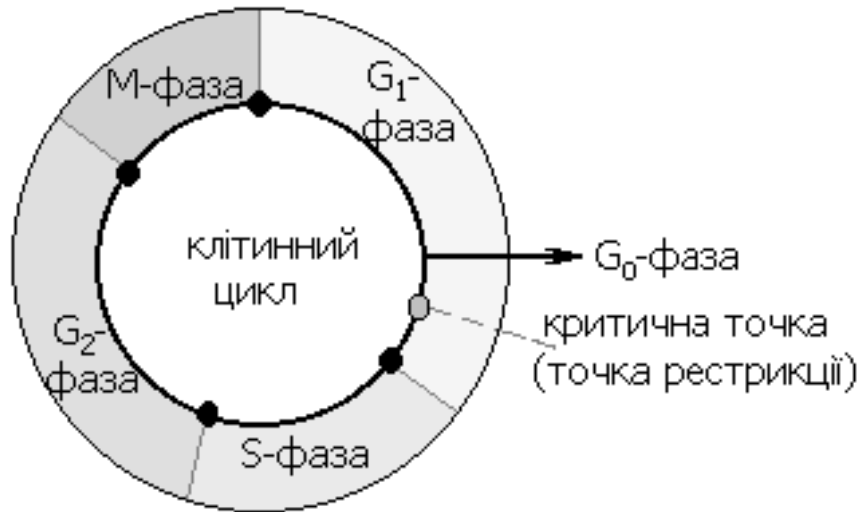
Чого очікувати при інтенсивному опроміненні клітини?



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#03]

1. Типи радіаційної загибелі клітин

Загибель клітин при опроміненні залежить від міри їх диференційованості, проліферативної активності і тривалості мітозу (правило Бергоньє-Трибондо, 1906 р.)



Фази клітинного циклу:

G1 – початкового росту (синтез мРНК, білків),

S – реплікації (подвоєння ДНК),

G2 – росту,

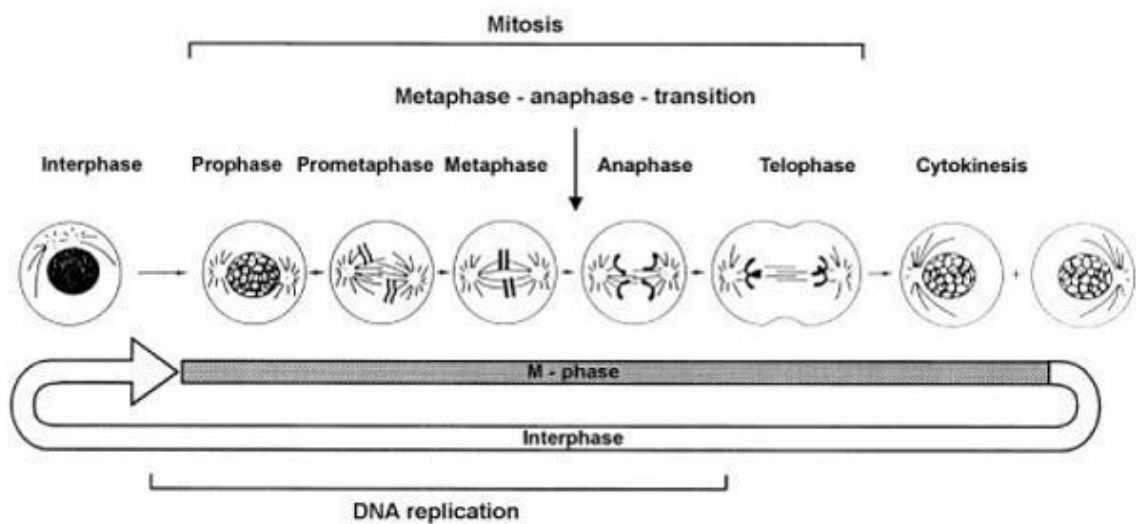
M – мітозу,

+

G0 – спокою

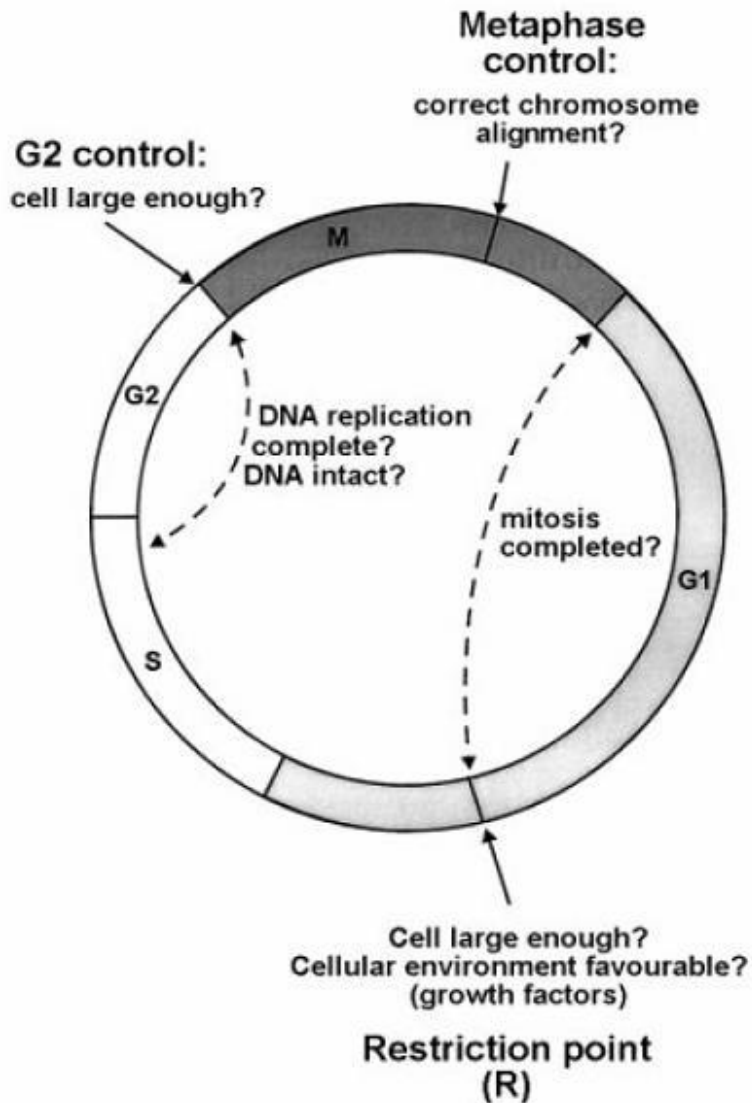
[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#04]

Клітинний цикл і фази мітозу



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#05]

Точки контролю коректності проходження клітинного циклу



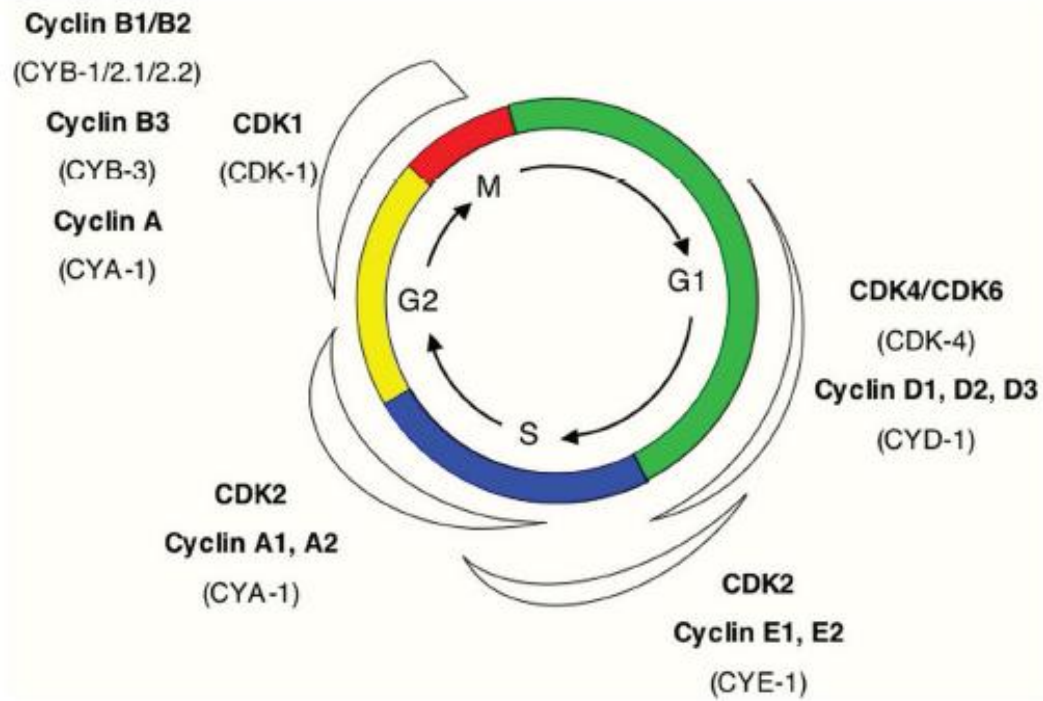
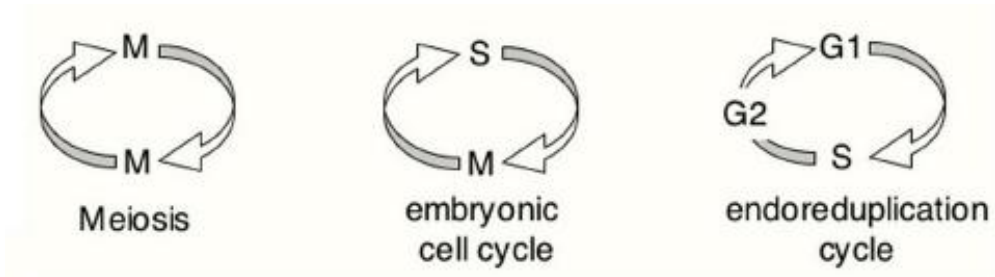
1. Точка переходу G_2/M
2. Точка переходу метафаза/анафаза
3. Точка рестрикції (перехід G_1/S)

- Внутрішні механізми контролю

- 1) реєстрація повного завершення реплікації ДНК протягом S-фази,
- 2) контроль входження в S-фазу тільки за умови наступного мітозу
- 3) контроль досягнення достатнього розміру клітини для початку наступного поділу
- 4) контроль за репаруванням пошкоджень ДНК (клітина або повністю відновлює ДНК, або переходить в стан спокою і ініціює апоптоз)

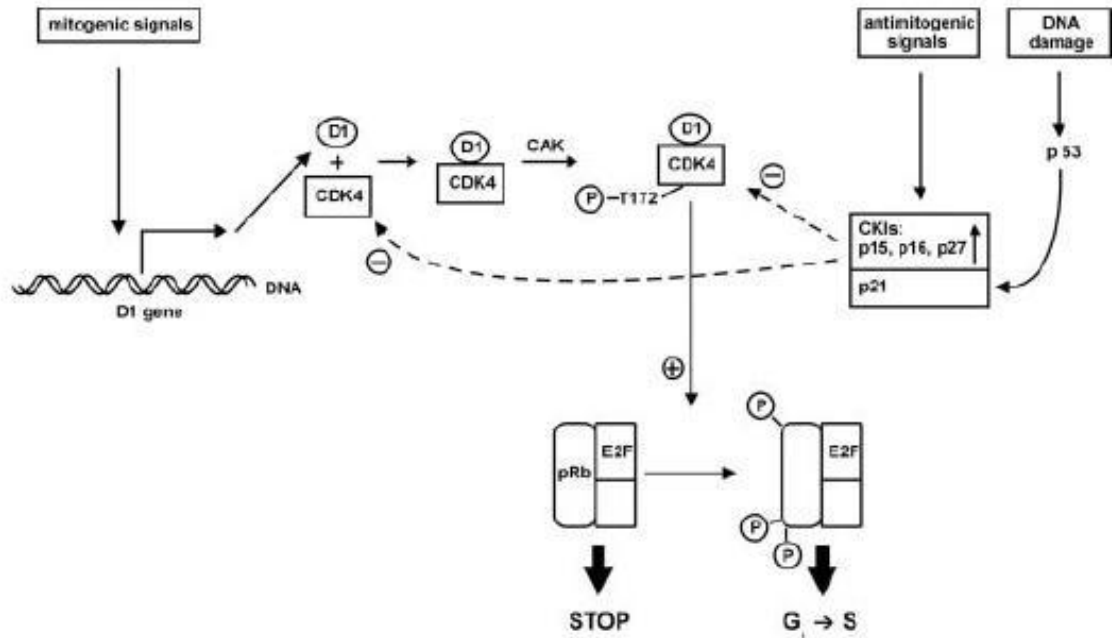
[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#06]

Фази клітинного циклу регулюються специфічними гетеродимерними ферментами – циклін-залежними протеїнкіназами:



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#07]

Індукція переходу клітини через точку рестрикції:



Цикліни типу D: D1, D2, D3

D1-тип – універсальний для всіх клітин – інтегратор зовнішніх мітотичних впливів, переводить клітину в стан мітозу (через точку R)

Головна функція – фосфорилує білок pRb (білок ретинобластоми)

Циклін E: експресія кодуючого гену активується E2F; також активує pRb

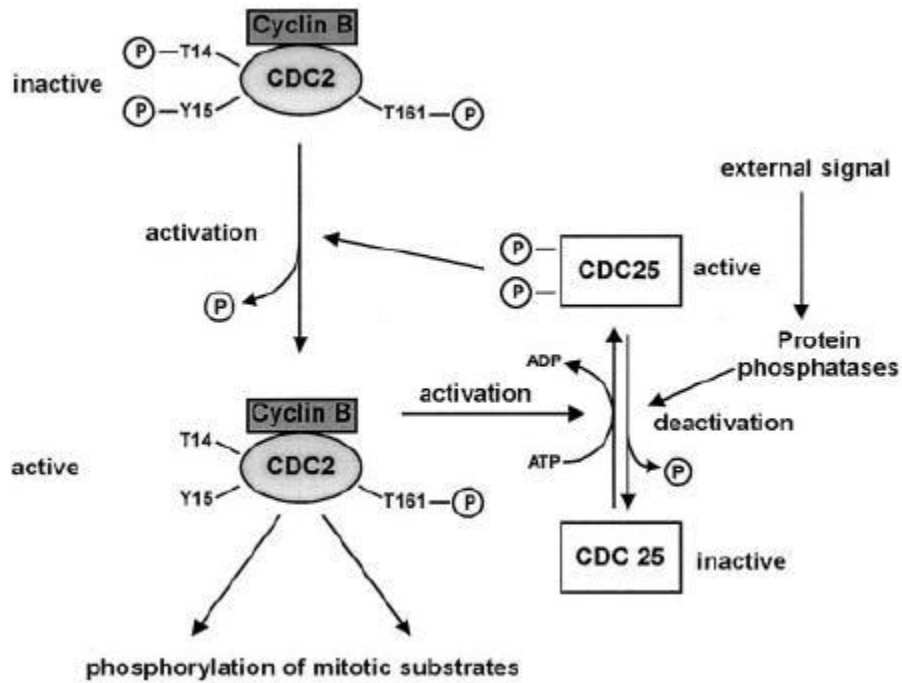
[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#08]

CDC25 phosphatase: функціонування і регуляція

Фосфатаза CDC25 – фермент, що дефосфорилує треонінові і тирозинові залишки CDC2 (15-й і 14-й), переводячи CDC2 в активний стан

CDC25 активується фосфорилуванням (по Ser/Thr залишкам) своєю ж мішенню – активним комплексом CDC2-циклінВ – *позитивний зворотній зв'язок*

інактивація – дефосфорилуванням фосфатазами PP1 і PP2A

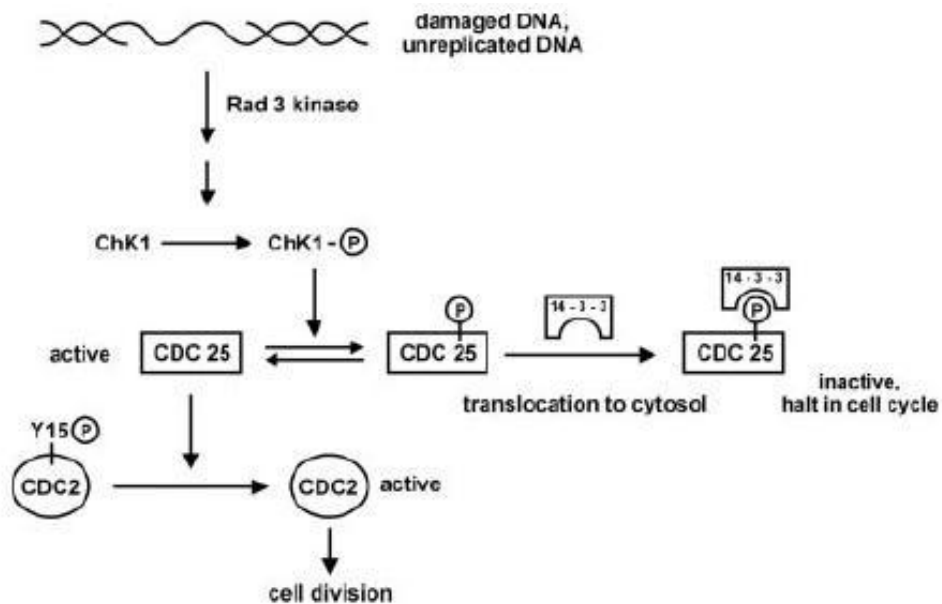


[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#09]

Точки контролю пошкодження ДНК

У випадку виявлення пошкоджень клітина:

1. зупиняє цикл в G1, S, G2 фазах;
2. уповільнює реплікацію ДНК;
3. збільшує транскрипцію генів репарації;
4. індукує апоптоз



Виявлення пошкоджень ДНК здійснюють специфічні кінази – з **надродини РІЗ-кіназ**.

Пошкодження реєструє протеїнкіназа **Rad3**, вона фосфорилує, активуючи, наступну кіназу, потім кіназа активує **кіназу Chk1**. **Chk1** фосфорилує (Ser 33, 192, 359) **CDC25**. Фосфорильовані залишки серину – сайти зв'язування комплексу **білків 14-3-3**.

В групі з комплексом 14-3-3, CDC25 транслокується з ядра в цитоплазму.

Клітинний цикл зупиняється.

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#10]

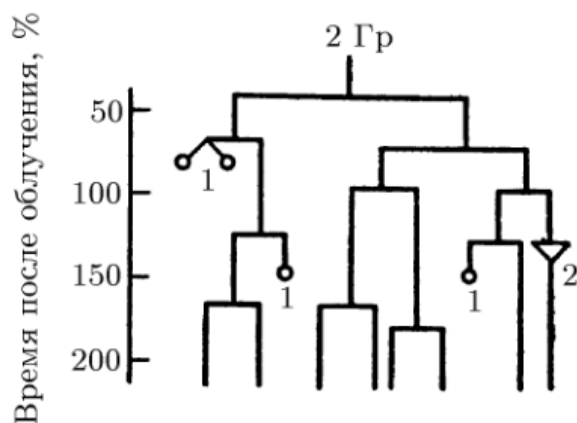
Типи радіаційної загибелі клітин залежать від їх проліферативної активності і стадії клітинного циклу:

Репродуктивна загибель (мітотична загибель, відстрочена загибель)

- (характерна для клітин, які в нормі активно проліферують, або штучно стимульовані до активної проліферації)

Інтерфазна загибель

- (характерна для диференційованих клітин, які знаходяться в інтерфазі)



Результаты наблюдения за потомками клетки линии L, облученной в дозе 0,2 Гр во время поздней S-фазы: 1 — погибшие клетки; 2 — гигантская клетка

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#11]

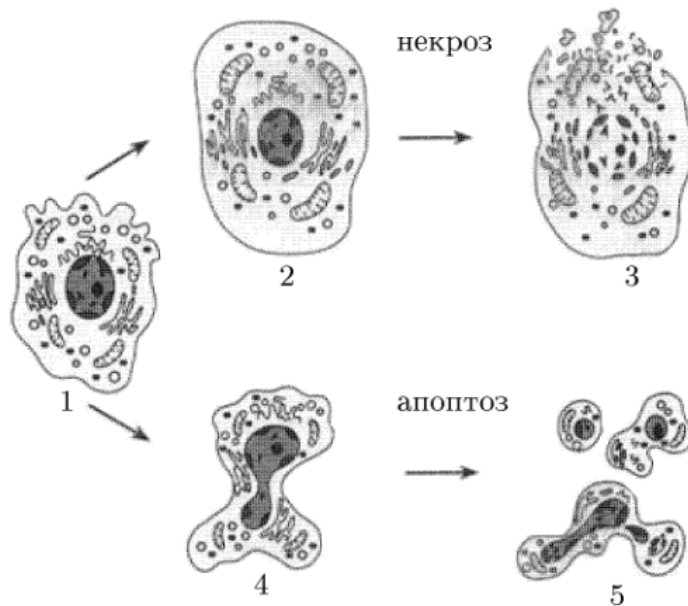
Типи програмованої загибелі клітин

// Аутофагічна загибель, Апоптоз, Програмований некроз, Апоптоз одноядерних клітин, Мітотична загибель, Апоптоз підчас мітозу, Апоптоз поліплоїдних клітин.



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#12]

Апоптоз і некроз – обидва характерні для проліферативної та інтерфазної загибелі клітин



Изменение структуры клеток животных при некрозе и апоптозе. 1 — нормальная клетка. 2, 3 — некротические изменения: 2 — набухание клетки, 3 — некротическая дезинтеграция. 4, 5 — апоптозные изменения: 4 — сморщивание клетки с образованием пузырьчатых выростов, 5 — фрагментация клетки с образованием апоптозных везикул

Ознака:	апоптоз	
Поширеність	Поодинокі клітини	Група клітин
Індукція	Активується фізіологічними або патологічними стимулами	Різні індукційні джерела пошкодження
Біохімічні зміни	Переміщення фосфатидилсерину в поверхневий шар ПМ, енергозалежна фрагментація ДНК ендогенними ендонуклеазами, Лізосоми інтактні	Порушення іонного балансу, звільняються іони кальцію
Розпад ДНК	Конденсація ДНК всередині ядра з розщепленням на фрагменти	Дифузний розпад, некротизація
Цілісність ПМ	Збережена	Зруйнована
Морфологія	Зморщування клітин і фрагментація	Набухання клітин
Запалення	Немає	Зазвичай є
Вилучення загиблих клітин	Поглинання (фагоцитоз) сусідніми клітинами	Поглинання макрофагами, нейтрофілами

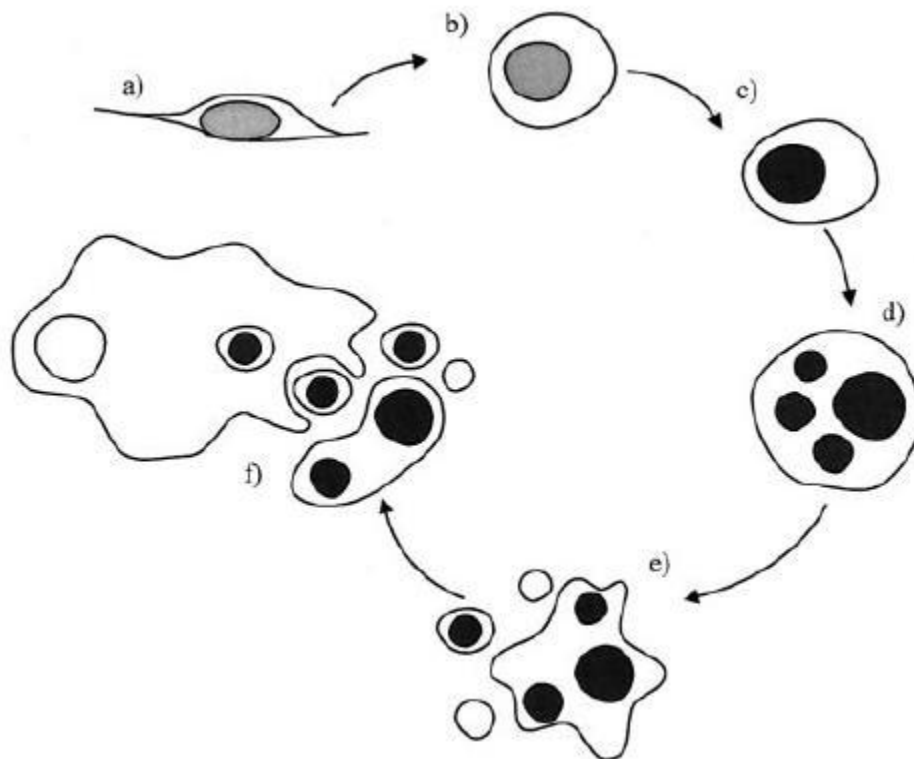
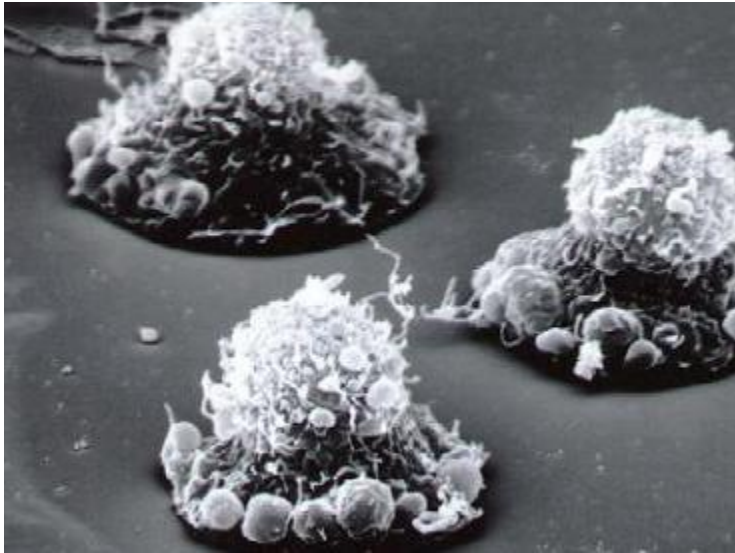
Морфологічні ознаки апоптозу

- А) - Рецепція сигналу клітиною, прикріпленою до субстрату,
- В) - Зміна клітиною форми на округлу,
- С) - Конденсація ДНК в ядрі,

D) - ДНК фрагментуються, ядро розпадається на хроматинові тільця,

E) - Клітина розпадається на везикули (**апоптичні тільця**), оточені мембраною,

F) - Клітина фагоцитується сусідніми клітинами



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#15]

Фази апоптозу

- Індукторна фаза (прийняття рішення): відбувається формування і проведення апоптотичного сигналу



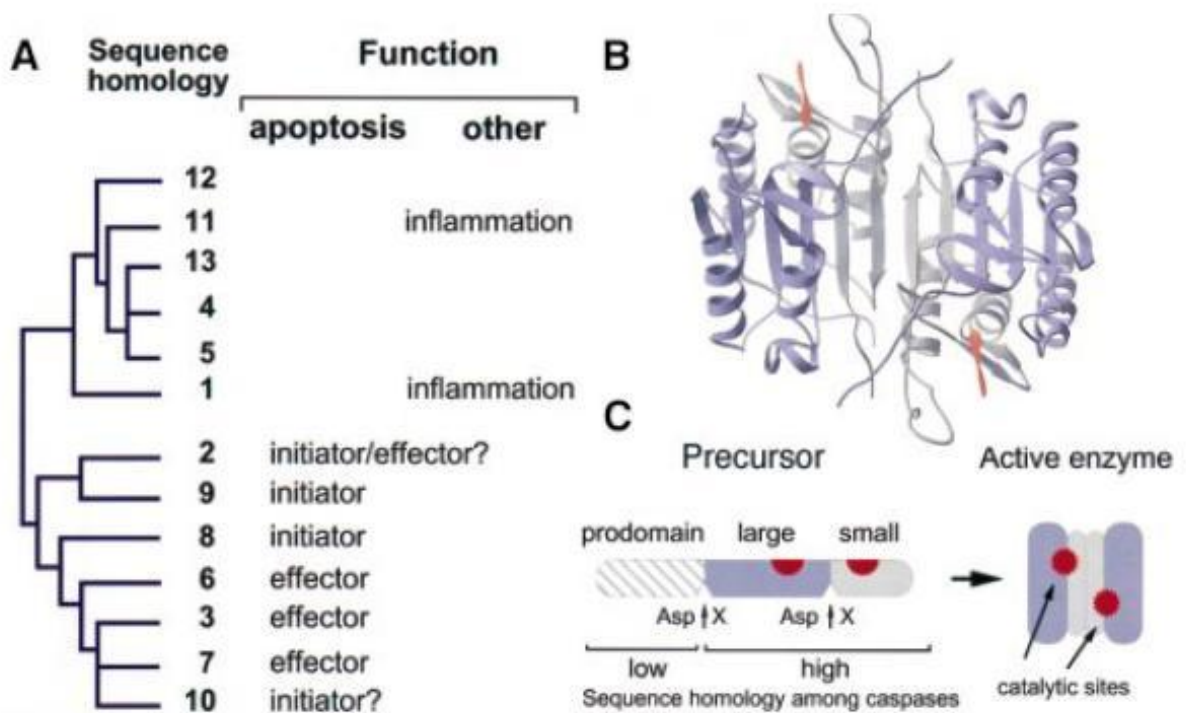
- Ефекторна фаза: відбувається демонтаж клітинних структур

Каспази (Caspases) – цистеїнові протеази: вони використовують залишок Cys в якості донора електронів і розщеплюють субстрат після залишку Asp

(Caspases – від Cys та Asp)

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#16]

Класифікація каспаз, їх структура і активація



A – класифікація каспаз,

B – структура каспази-3,

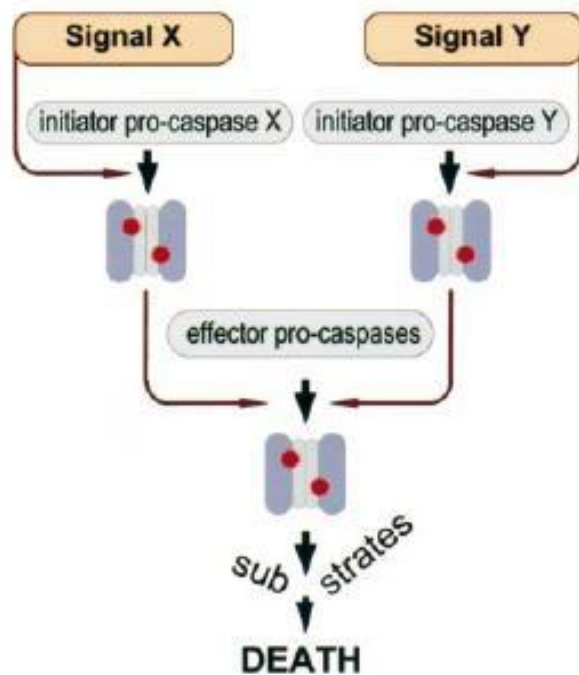
C – схема структури прокаспази і активна форма - тетрамер

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#17]

Каспази: ініціаторні і ефекторні

- **Ініціаторні (initiator caspase) 8 & 9**, сприймають проапоптотичний сигнал і ініціюють активацію каспазного каскаду
- **Ефекторні (effector caspase) 3, 6 & 7**, активуються ініціаторними каспазами через каскадний механізм; вони здійснюють апоптоз, розщеплюючи важливі клітинні білки

Caspase cascade



Сигнал X – рецептор-активований апоптоз,

Сигнал Y – апоптоз, тригером якого є цитотоксичний стрес

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#18]

Сигнальні шляхи апоптозу: 2 типи

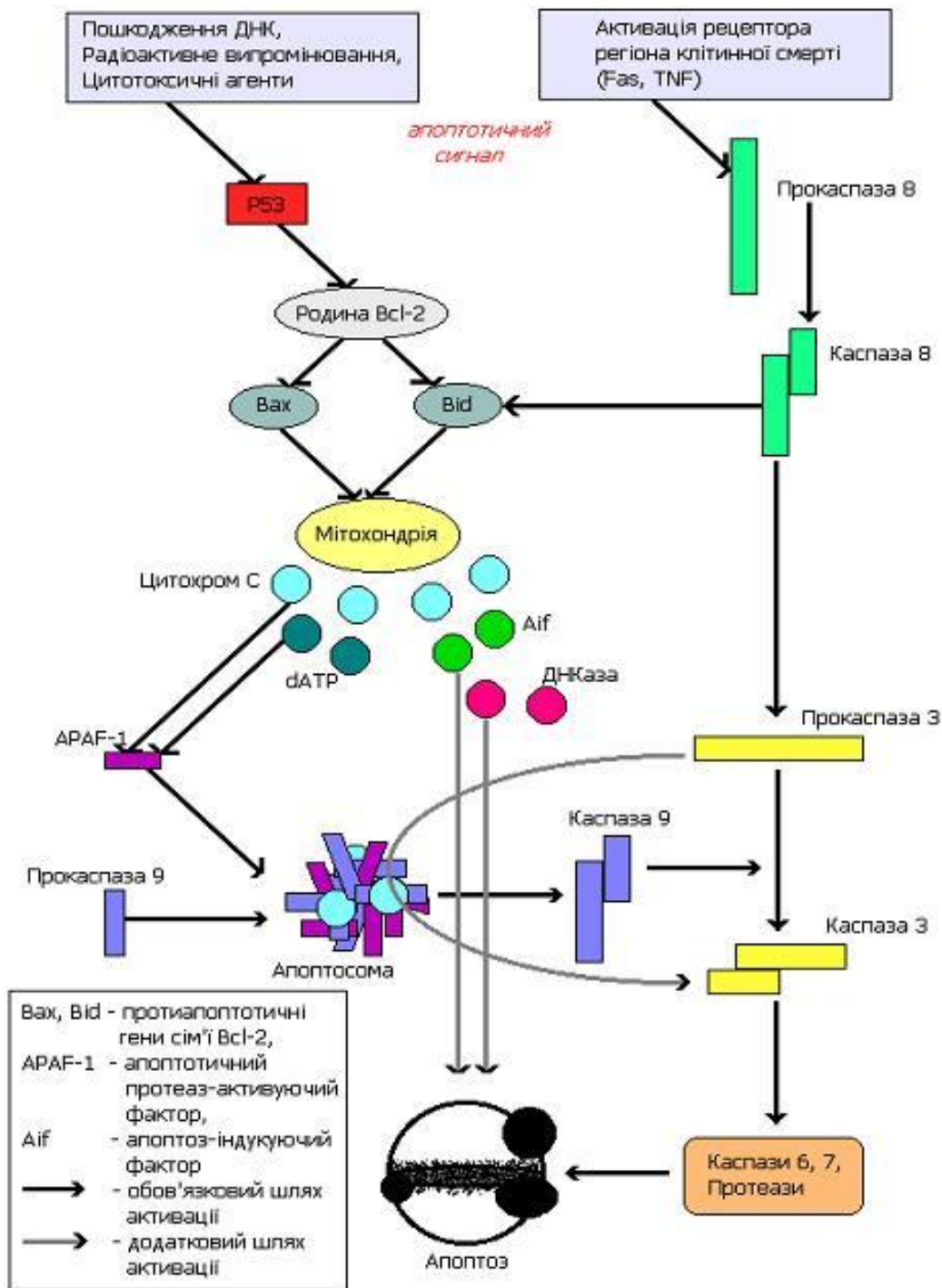
1: пошкодження ДНК, випромінювання, дія глюкокортикоїдів, припинення цитокинової регуляції, вкорочення теломерів до критичного рівня, стресовий стан клітини

Активація каспази 9

2: проапоптотичні сигнали, які передаються від рецепторів “регіону клітинної смерті” (Fas-R, TNF-R)

Активація каспази 8

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#19]



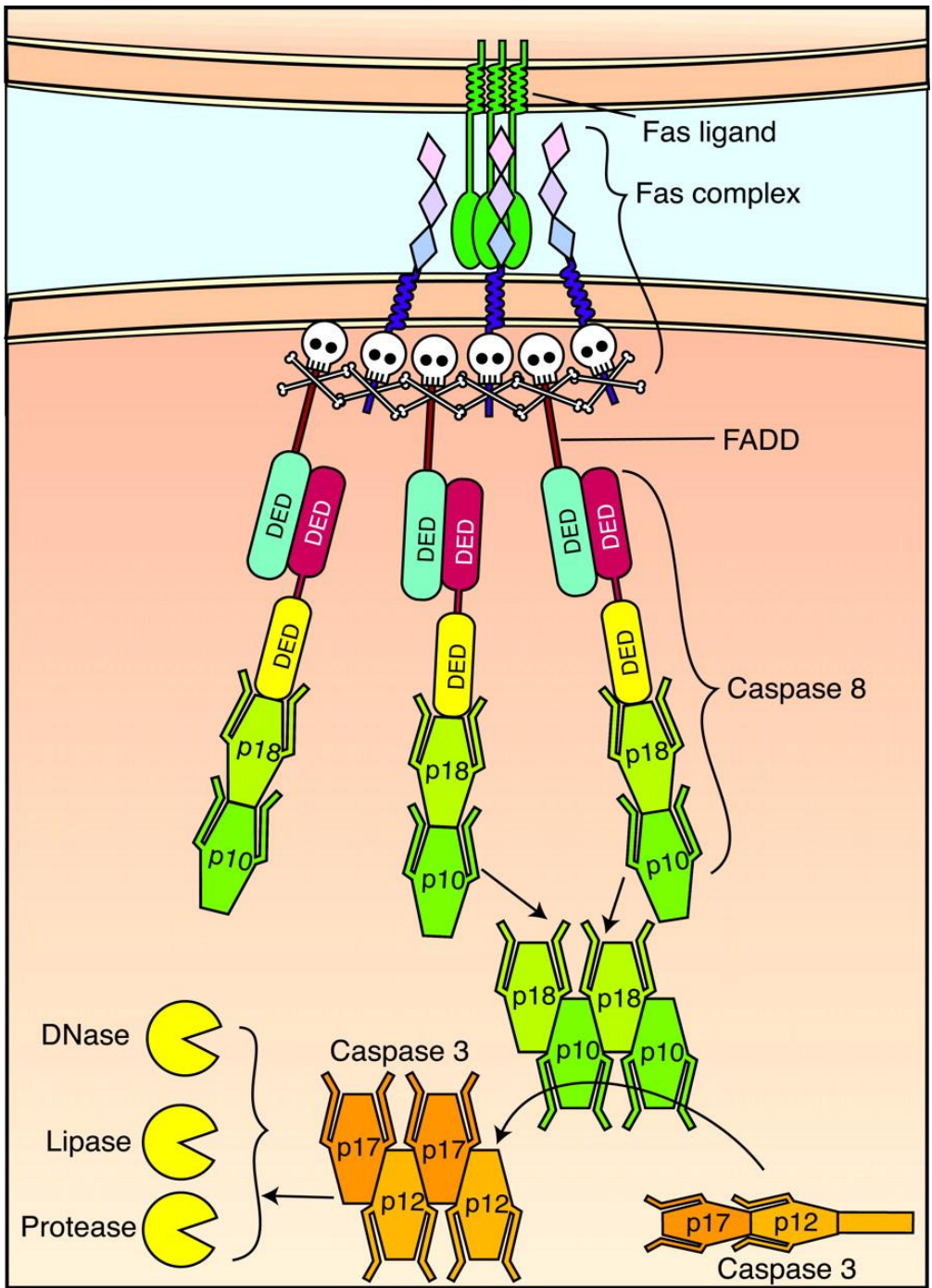
[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#20]

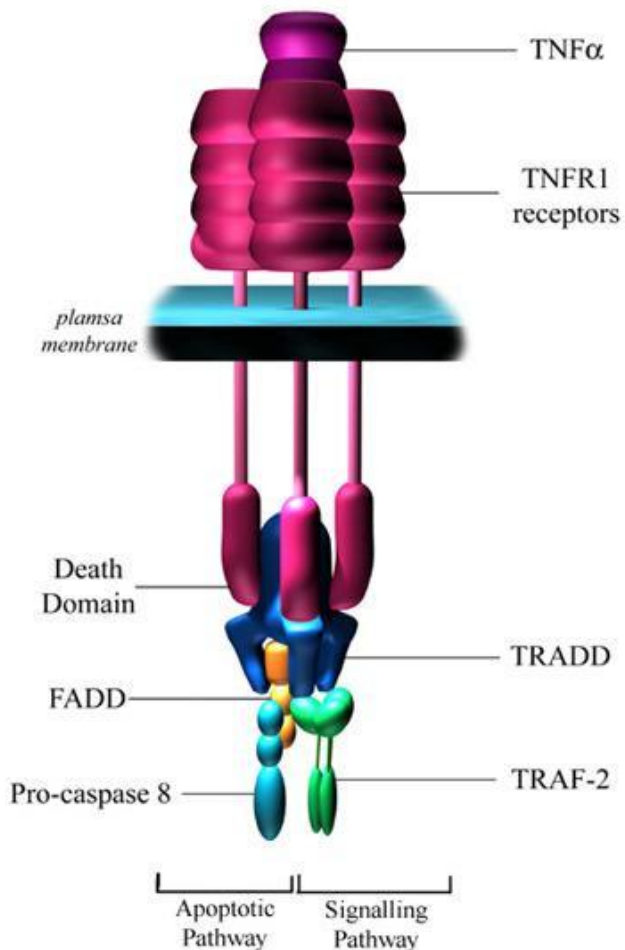
Кофактори
 каспази 9):

активації

апоптозу

(шлях





Кофактори апоптозу, опосередкованого через рецептори типу Fas-R:

FADD (Fas-associated death domain) – домени смерті, асоційовані з цитоплазматичною частиною Fas-R)

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#21]

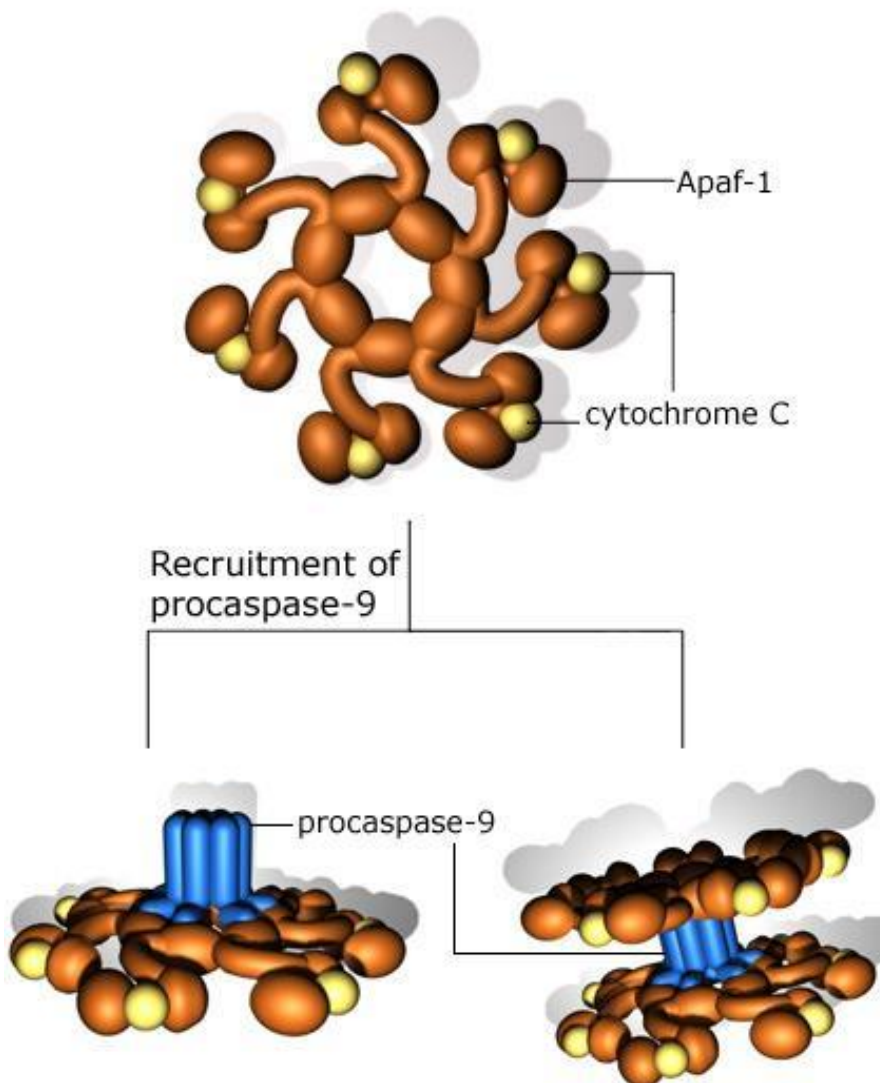
Кофактори активації апоптозу (шлях каспази 9):

Кофактори апоптозу Araf1 & Cytochrome C:

Araf1 (apoptosis protease activating factor-1) за допомогою CARD-фрагмента контактує з ініціаторними каспазами (1, 2, 4, 5 і 9).

У комплексі з АТФ і цитохромом С утворює апоптосому (комплекс, в якому активуються індукторні каспази)

First stage of apoptosome formation



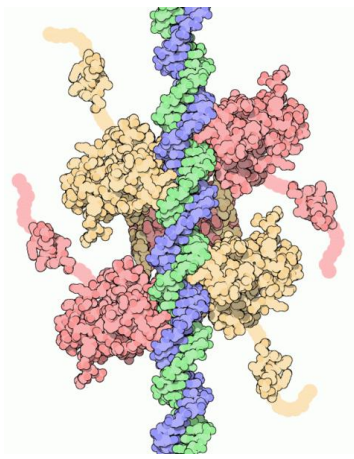
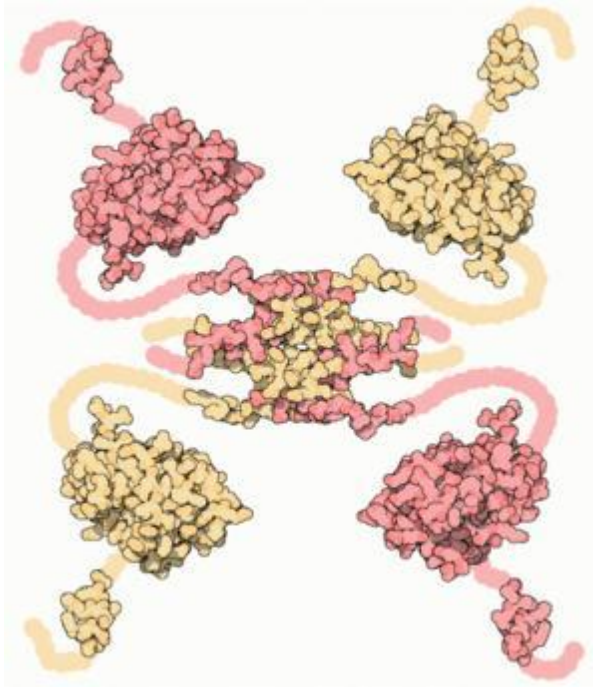
[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#22]

Сигнальні шляхи активації каспази 9:
p53 – *guardian of the genome* — хранитель геному

- Сенсор пошкодження ДНК – ген **p53** (розміщений в короткому плечі 17 хромосоми)
- Білок **p53**: 393 ааз, M = 53 кДа, діє як транскрипційний фактор
- Неактивний p53 міститься в цитоплазмі, активований – в ядрі
- Спричиняє 2 головні ефекти:

1) зупиняє клітинний цикл в G1/S (через p21);

2) активує апоптоз



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#23]

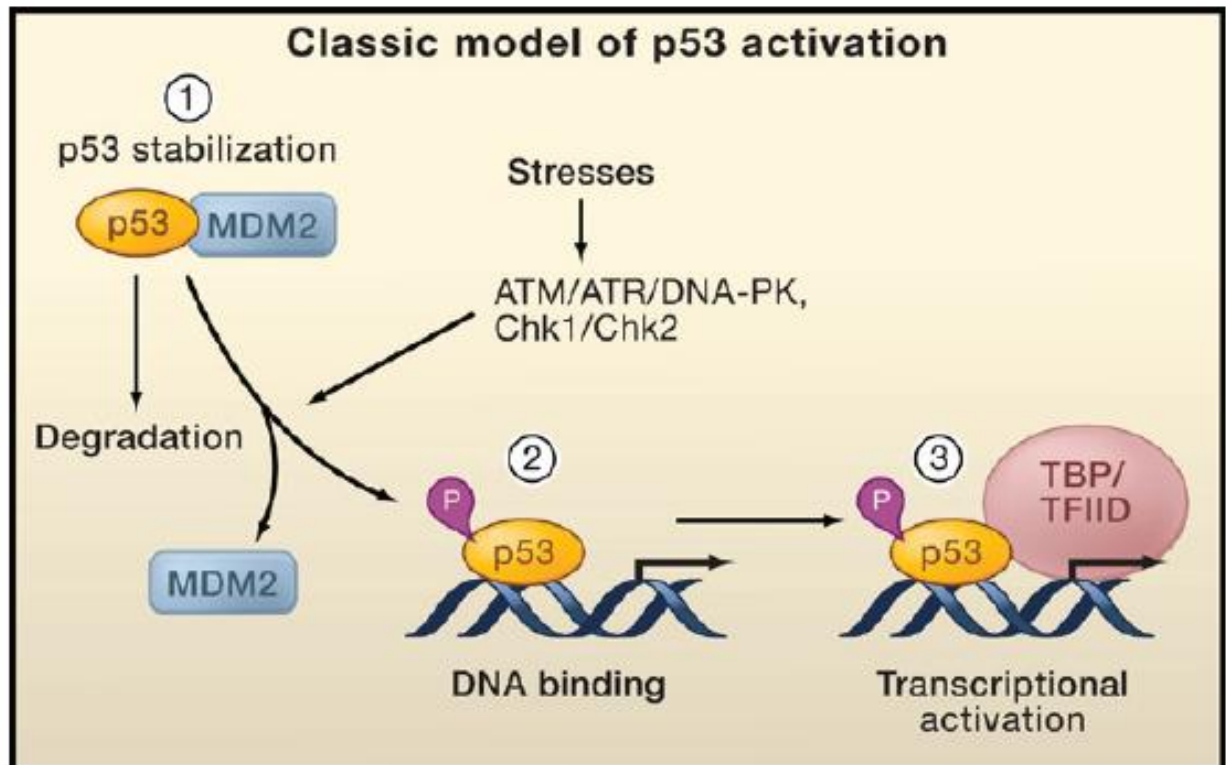


Figure 2. Classical Model of p53 Activation

The classical model for p53 activation generally consists of three sequential activating steps: (1) stress-induced stabilization mediated by phosphorylation (P), (2) DNA binding, and (3) recruitment of the general transcriptional machinery. During normal homeostasis, p53 is degraded after Mdm2-mediated ubiquitination (left), while stress signal-induced p53 phosphorylation by ATM, ATR, and other kinases stabilizes p53 and promotes DNA binding. DNA-bound p53 then recruits the transcriptional machinery to activate transcription of p53 target genes.

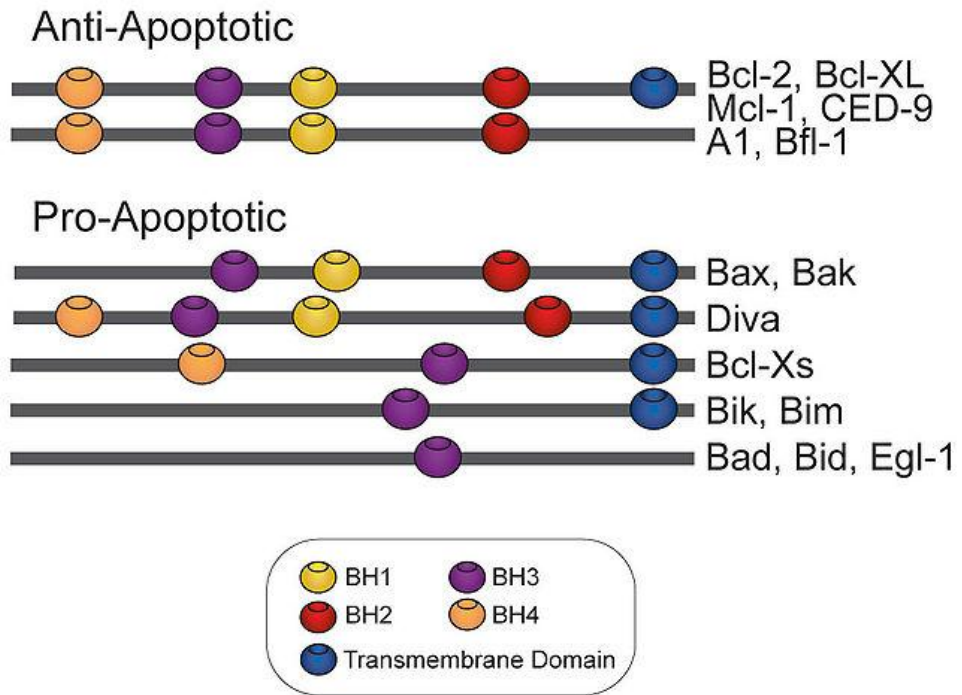
Figure 2. Classical Model of p53 Activation

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#24]

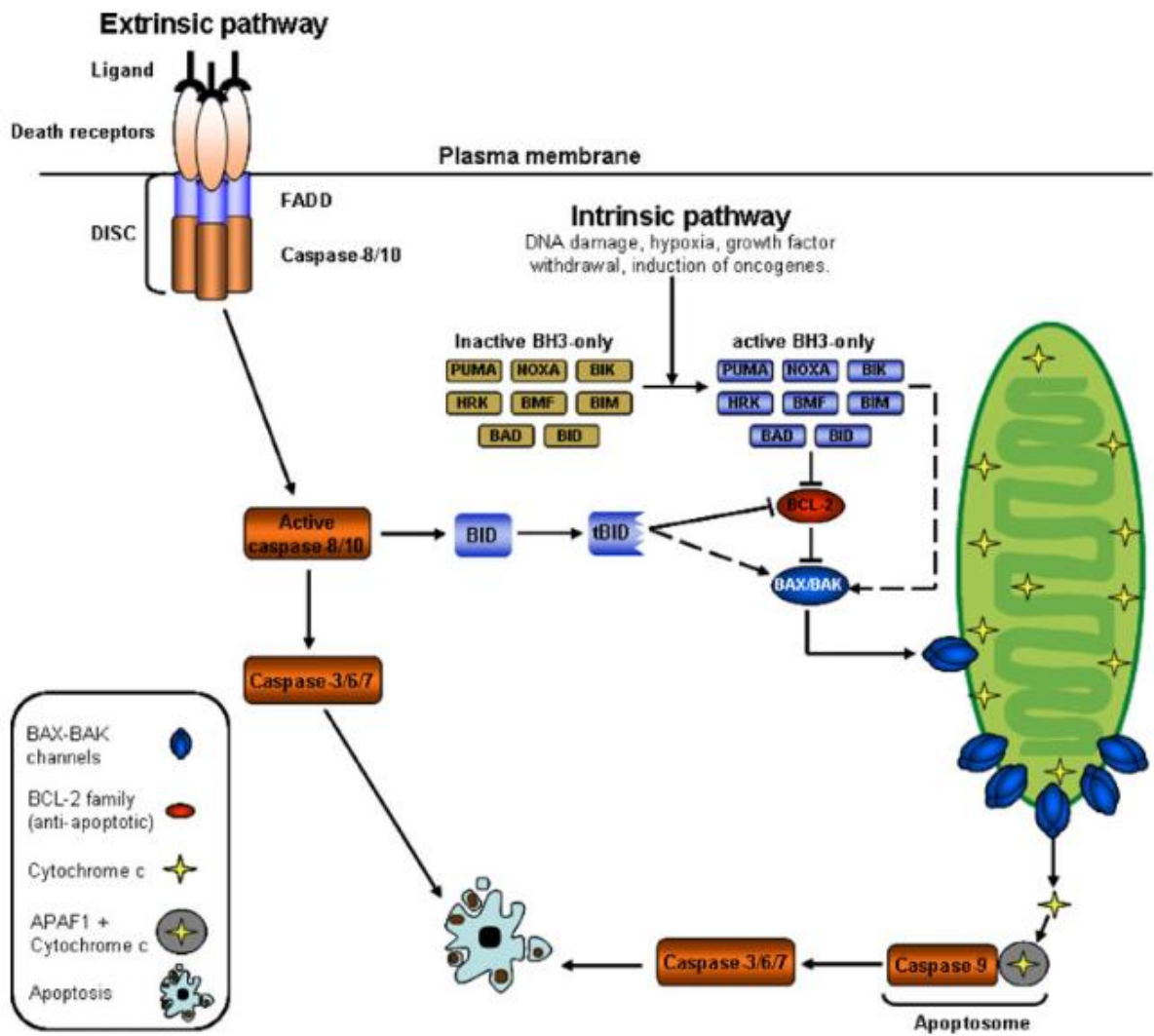
Білки родини Bcl-2:

- Це родина білків (близько 16 білків), які приймають участь в регуляції апоптозу – **“мітохондріальну”** ланку (активують або інгібують).
- Гени родини локалізовані у 18 хромосомі
- Всі представники містять від 1 до 4 повторів амінокислотної послідовності (BH motif – Bcl-2 homolog), якої відомо 4 типи (BH1 – BH4)

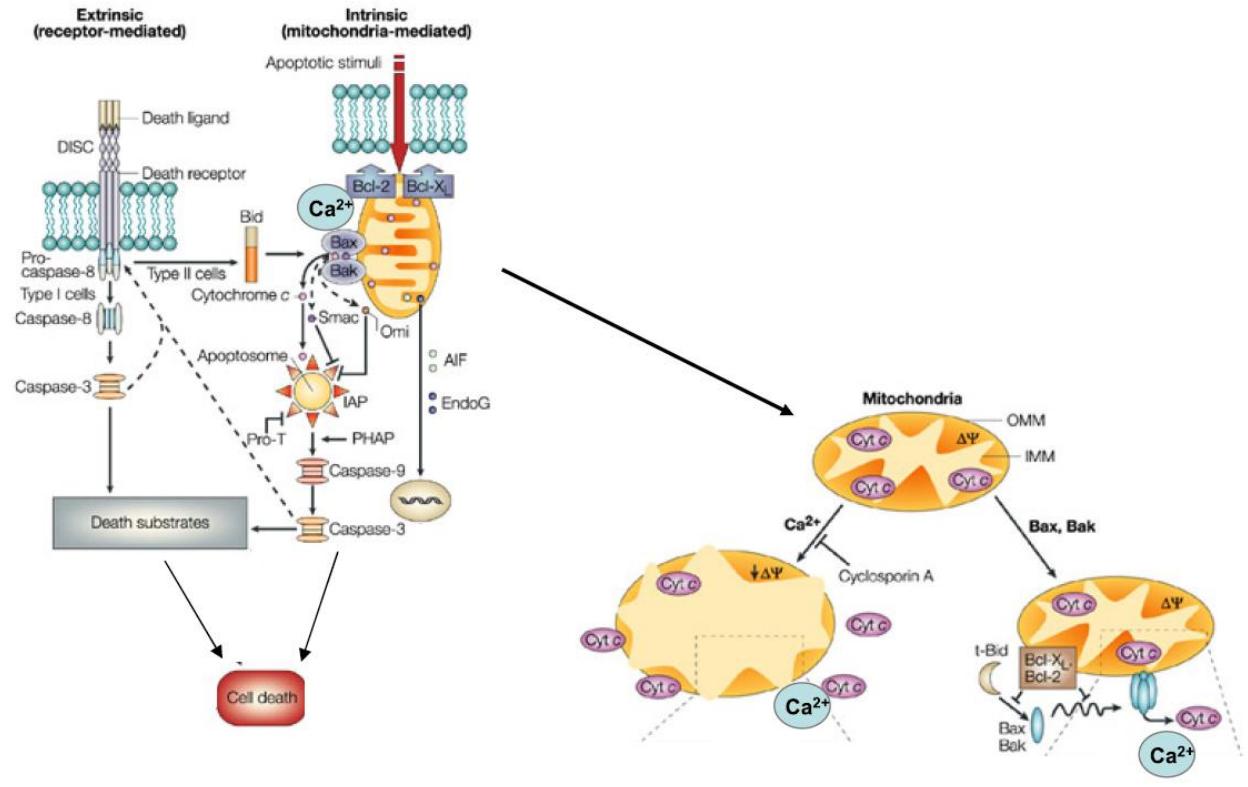
Bcl-2 Family



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#25]



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#26]



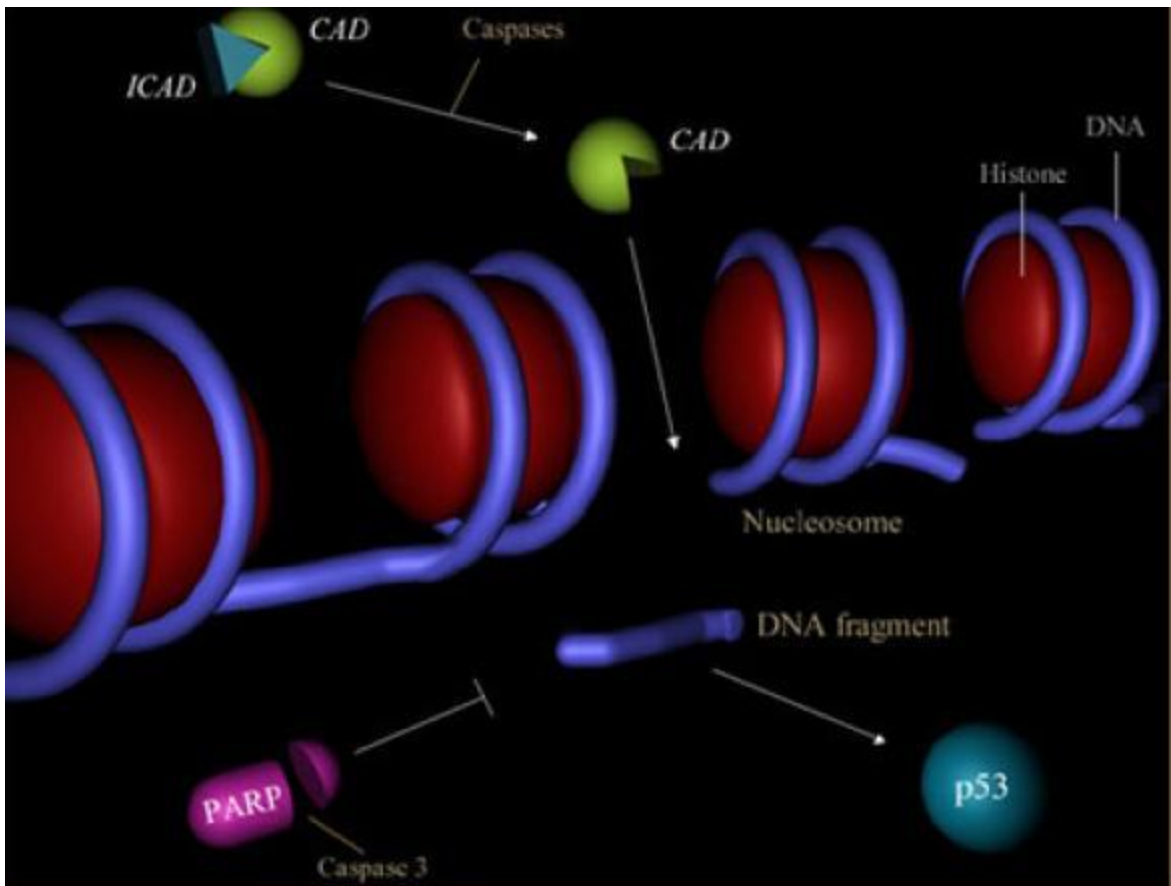
[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#27]

Деградація ДНК

CAD – caspase activated DNAase (фермент-ДНКаза)

ICAD – inhibitor CAD (інгібітор ДНКази)

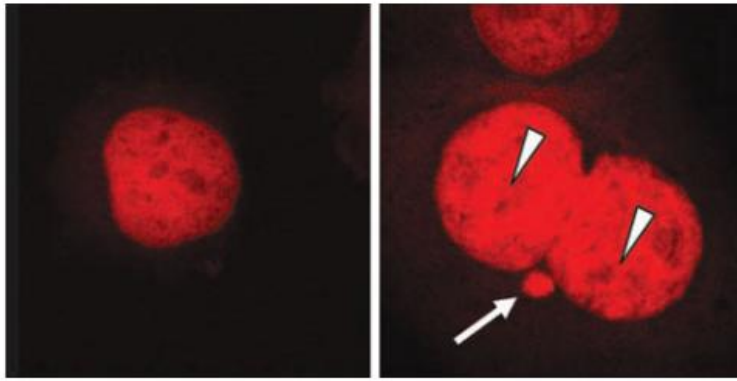
PARP – poly (ADP-ribose) polymerase (репаруючий білок)



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#28]

Мітотична катастрофа

- **Мітотична катастрофа** (підтип 1)
– реалізація апоптичної програми
власне в процесі мітозу;
при цьому сегрегація хромосом
не спостерігається, і клітина
блокується в одній з фаз мітозу (зазвичай, в прометафазі і метафазі).
- Переважно реалізується за мітохондріальним шляхом (за активації ініціаторної каспази 9).
- **Мітотична катастрофа** (підтип 2) – постмітотична загибель поліплоїдних клітин – реалізація апоптичної програми після завершення аномального мітозу коли не відбувається розділення хромосом і утворення дочірніх клітин, в стадії G1.
- При цьому окремі ядра такої гігантської клітини переважно залишаються анеуплоїдними.

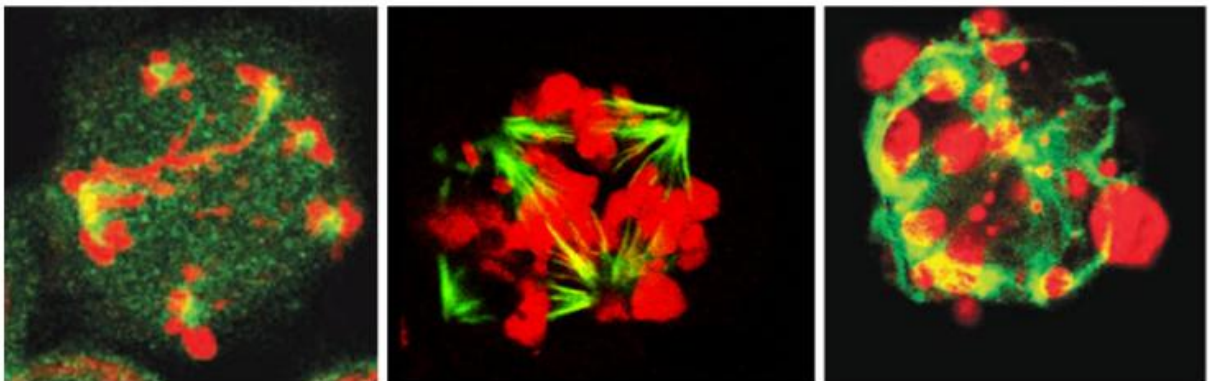


Mitotic catastrophe following irradiation [72]. Control cells normally contain a single round nucleus (*to the left*). Irradiated cells display increased frequencies of multiple nuclei (*arrowheads*) and micronuclei (*arrow; to the right*)

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#29]

Мітотична катастрофа

- Причини МК: пошкодження ДНК (контролю мітозу), порушення веретена поділу (формування багатопольного веретена поділу).
- При порушенні процесів апоптозу (перевірка в точці рестрикції) **поліплоїдних** (зокрема, тетраплоїдних) клітин, вони здатні надалі здійснювати клітинний цикл і мітоз.



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#30]

Аутофагійна загибель клітин

- **Аутофагія** – це деградація органел і цитоплазматичного матеріалу, яка здійснюється за участі внутрішньоклітинних мембранних структур. При цьому de novo формуються спеціалізовані структури – **аутофагосоми** – двомембранні структури з частинами внутрішньоклітинного вмісту.
- Коли аутофагосоми зливаються з лізосомами (**аутофаголізосоми**), відбувається розщеплення їх вмісту.
- Аутофагія запускається, зокрема, пошкодженням органел (мітохондрій, пероксисом тощо)

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#31]

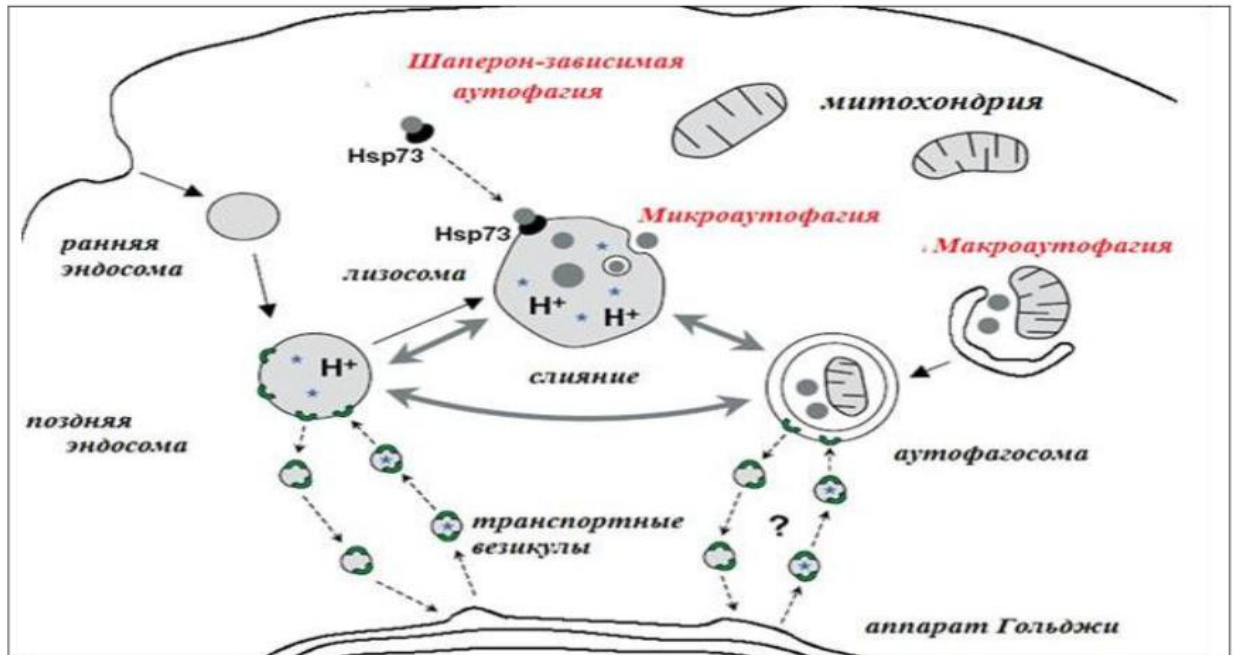
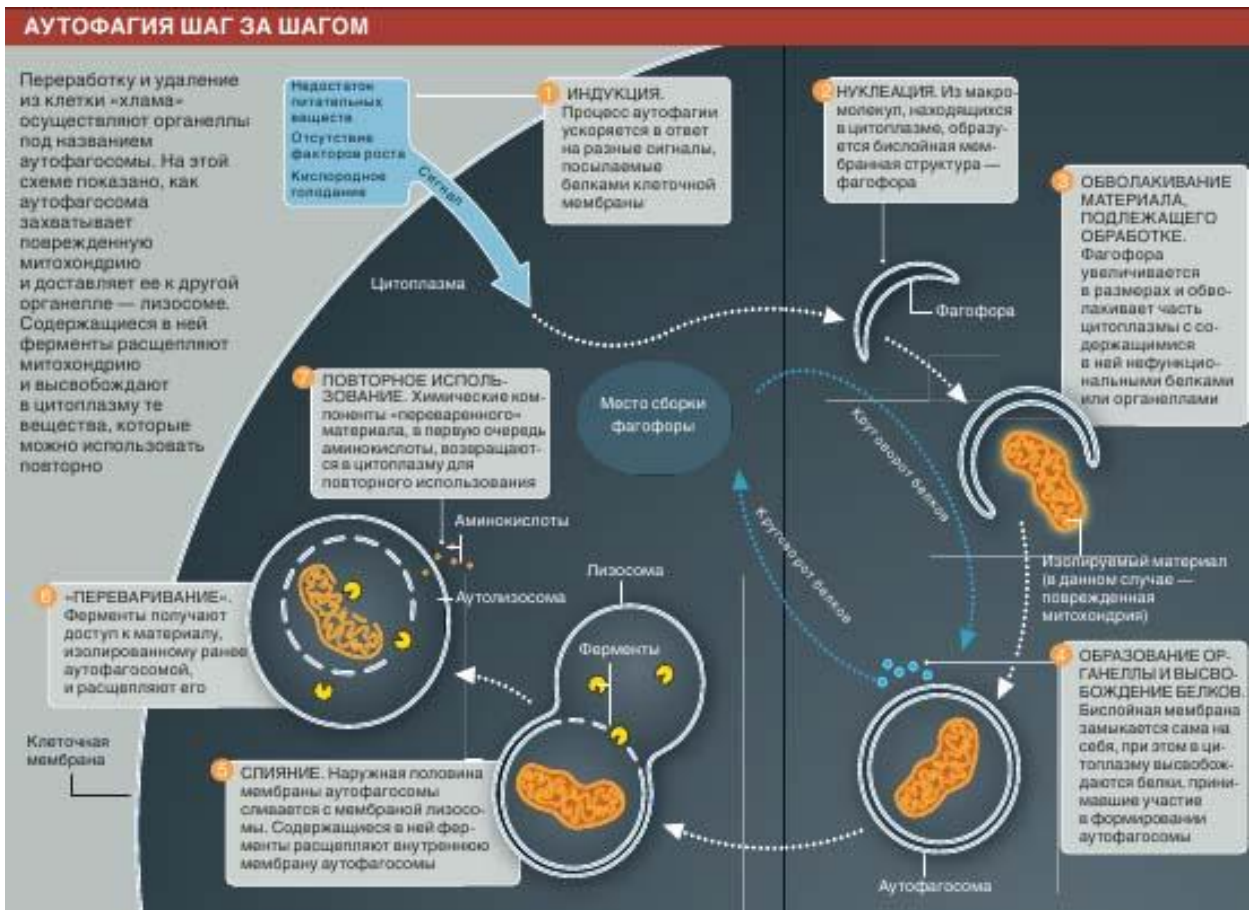


Рис.2. Аутофагия - процесс, посредством которого собственные компоненты клетки доставляются к лизосомам для деградации (по Terman et al., 2007)

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#32]

Етапи макроаутофагійної загибелі клітин



[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#33]

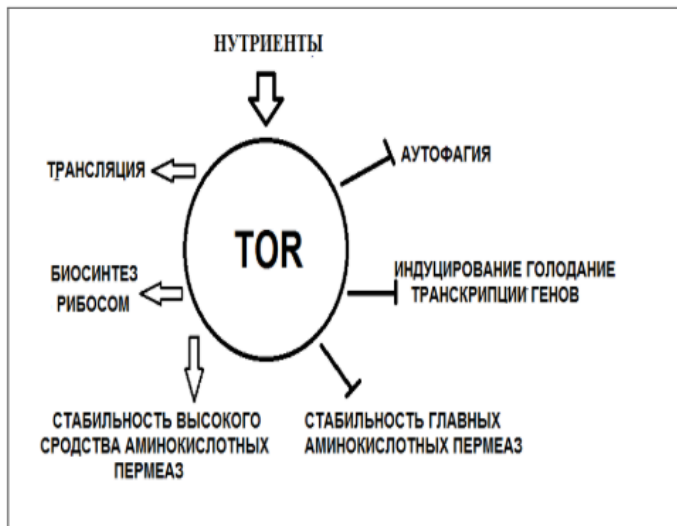


Рис.3. Белки TOR ингибируют аутофагию и вызванную голоданием транскрипцию генов и активируют такие процессы как трансляцию и биосинтез рибосом

Из статьи: (Raught B.,Gingras A., Sonenberg N. Белки-мишени рапамицина (TOR) - The target of rapamycin (TOR) proteins //Proc Natl Acad Sci.- 2001.-V.98, №13.- P.7037–7044)

Рис 3. Белки TOR ингибируют аутофагию и вызванную голоданием транскрипцию генов и активируют такие процессы как трансляцию и биосинтез рибосом.

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#34]

Програмований некроз

- Це – енергетична катастрофа клітини: фактичною причиною некрозу є зниження рівня АТФ нижче критичного значення, спричинене токсинами або фізичним руйнуванням структур клітини.
- Програмований некроз рецептор-опосередковано індукується молекулами TNF (tumor necrosis factor – фактор некрозу пухлин) або при одночасній активації апоптозу через рецептори Fas і блокуванні каспаз.

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#35]

Table 3.1 The characteristics of different types of cell death*

Type of cell death	Morphological changes			Biochemical features	Common detection methods
	Nucleus	Cell membrane	Cytoplasm		
Apoptosis	Chromatin condensation; nuclear fragmentation; DNA laddering	Blebbing	Fragmentation (formation of apoptotic bodies)	Caspase-dependent	Electron microscopy; TUNEL staining; annexin staining; caspase-activity assays; DNA-fragmentation assays; detection of increased number of cells in sub-G1/G0; detection of changes in mitochondrial membrane potential
Autophagy	Partial chromatin condensation; no DNA laddering	Blebbing	Increased number of autophagic vesicles	Caspase-independent; increased lysosomal activity	Electron microscopy; protein-degradation assays; assays for marker-protein translocation to autophagic membranes
Necrosis	Clumping and random degradation of nuclear DNA	Swelling; rupture	Increased vacuolation; organelle degeneration; mitochondrial swelling	–	Electron microscopy; nuclear staining (usually negative); detection of inflammation and damage in surrounding tissues
Senescence	Distinct heterochromatic structure (senescence-associated heterochromatic foci)	–	Flattening and increased granularity	SA- β -gal activity	Electron microscopy; SA- β -gal staining; growth-arrest assays
Mitotic catastrophe	Multiple micronuclei; nuclear fragmentation; dicentric chromosomes	–	–	Caspase-independent (at early stage) abnormal CDK1/cyclin B activation	Electron microscopy; assays for mitotic markers (MPM2); TUNEL staining

CDK1, cyclin-dependent kinase 1; SA- β -gal, senescence-associated galactose; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling.

*Adapted from Okada and Mak (2004). Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd.

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#36]

Проліферативна загибель. Інтерфазна загибель.

- Апоптоз
- Програмований некроз
- Апоптоз
- Аутофагія

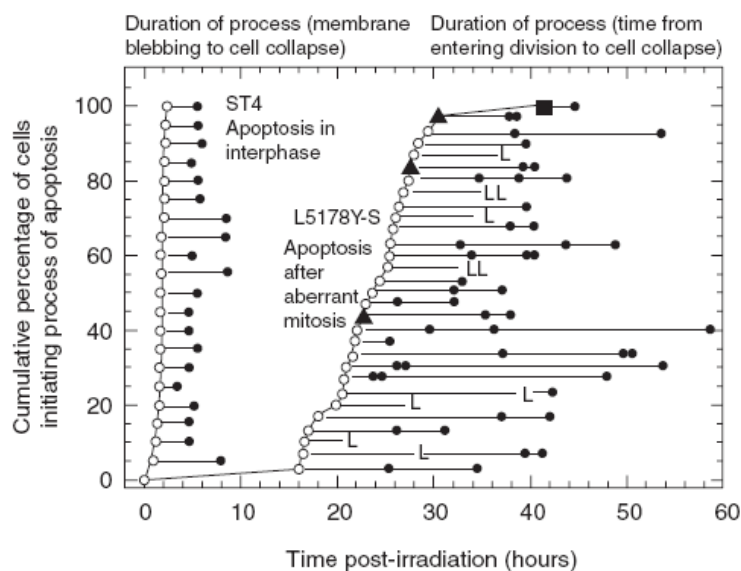


Figure 3.2 Data from Endlich *et al.* (2000) demonstrating early and late forms of cell death. The ST4 lymphoid cells die rapidly by apoptosis before mitosis. L5178Y-S cells also die by apoptosis following irradiation, but only after attempting to complete mitosis. In this case the initial DNA damage response is not sufficient to induce cell death and the cells die because of problems that occur during mitosis.

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#37]

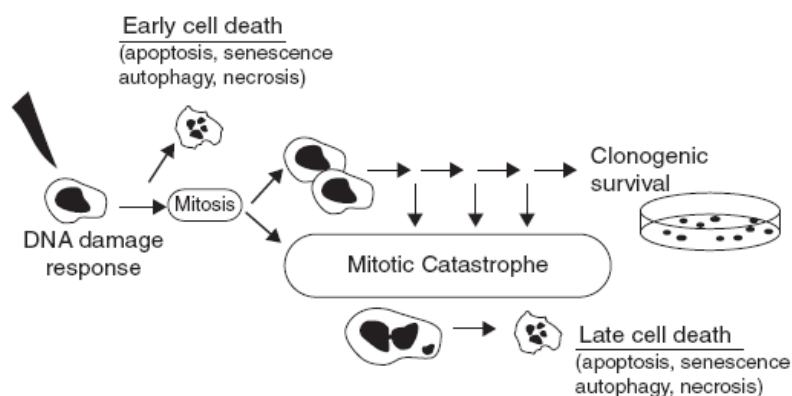


Figure 3.1 Schematic of cell death following irradiation. DNA damage induced by irradiation elicits activation of the DNA damage response (DDR – see Chapter 2), which leads to induction of cell-cycle checkpoints and DNA repair. In certain rare cells this response also induces apoptosis or other forms of cell death. However, in most cases cells die only after attempting mitosis. Remaining or improperly repaired DNA damage causes mitotic catastrophe, which subsequently leads to cell death. Mitotic catastrophe and cell death can take place after the first attempt at cell division, or after several rounds of proliferation. Consequently, this form of cell death is considered late cell death.

[sheva_medu_mag01_CHUMBALYK_L_3 RBa#38]

Модуляція радіочутливості клітин

- Актиноміцин Д, Циклогексід, Стрептовітацин А,
- Агматин, Спермідин, NaCl,
- Дихальні отрути (ціаніди, динітрофенол, йодацетат, арсенат натрію),
- Нікотинамід,

- Цистеамін,
- O₂

