Роль каспаз в перестройках межклеточных контактов эндотелиальных клеток, вызванных субтоксическими концентрациями TNF-α

Гринева Александра Сергеевна

Научные руководители:

Галкин Иван Ильич, научный сотрудник института физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ

Специализированный учебно-научный центр (факультет) — школа-интернат имени А.Н. Колмогорова Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Москва – 2016

Введение.

Эндотелий кровеносных сосудов выполняет ряд важных функций, одна из которых – регуляция проницаемости сосудов.

Проницаемость капилляров обеспечивает обмен жидкостью и макромолекулами между кровью и тканями, а также иммунный ответ. Нарушение регуляции проницаемости может привести к развитию отеков, различных тяжелых сердечно-сосудистых заболеваний, полиорганной недостаточности.

Изучение регуляции проницаемости представляет из себя очень важную задачу, её решение поспособствует разработке новых лекарственных препаратов, направленных на предупреждение и лечение большого количества сердечно-сосудистых заболеваний.

Целью данной работы является исследования роли каспаз в перестройках межклеточных контактов клеток эндотелия.

Для этого необходим проанализировать опубликованные литературные данные, связанные с неапоптотическими функциями каспаз, освоить методы работы с клеточными культурами млекопитающих и провести эксперимент. Исследовать действие ингибиторов каспаз на распределение белков межклеточных контактов в условиях стимуляции их низкими концентрациями TNFα. Отдельно будет исследована роль каспазы-3 в данном процессе.

Литературный обзор.

Апоптоз – наиболее распространенная форма запрограммированной клеточной смерти, происходящая в ответ на внешний или внутренний сигнал. Впервые термин «апоптоз» (от греч. apoptosis – листопад) был предложен Дж.Ф.Керром в 1972 году для обозначения программируемой гибели гепатоцитов (клеток печени).

Программируемая гибель клеток играет очень важную роль в развитии и правильном целостном функционировании организма. Апоптоз выполняет ряд функций, таких как: формирование органов при эмбриогенезе (например, развитие конечностей у высших позвоночных), ликвидация ненужных органов во время эмбриогенеза (например, формирование половой системы человека), контроль числа клеток организма (например, автоматическая гибель нейронов в ходе формирования нервной системы), уничтожение вредных и дефектных клеток (например, ликвидация клеток-мишеней Т-киллерами; предотвращение аутоиммунных реакций путем уничтожения «неправильных» лимфоцитов). Таким образом, различные нарушения в регуляции апоптоза могут привести к развитию

раковых опухолей, аутоиммунных заболеваний, распространению в организме вирусных и бактериальных инфекций.

Механизм гибели клетки путем апоптоза существенно отличается от процесса незапрограммированной клеточной смерти – некроза (рис.1). При апоптозе не происходит набухания и разрыва клетки и ее органелл, вызывающего воспалительную реакцию. Напротив, клетка отделяется от остальных клеток, теряет контакты с ними. В самой клетке конденсируются цитоплазма и хроматин, молекулы ДНК разрезаются на фрагменты, по длине соответствующие или кратные нуклеосомам; клетка фрагментируется на особые апоптотические тельца, не вызывающие воспаления, которые интенсивно поглощаются макрофагами. Все эти процессы идут с затратой АТФ.

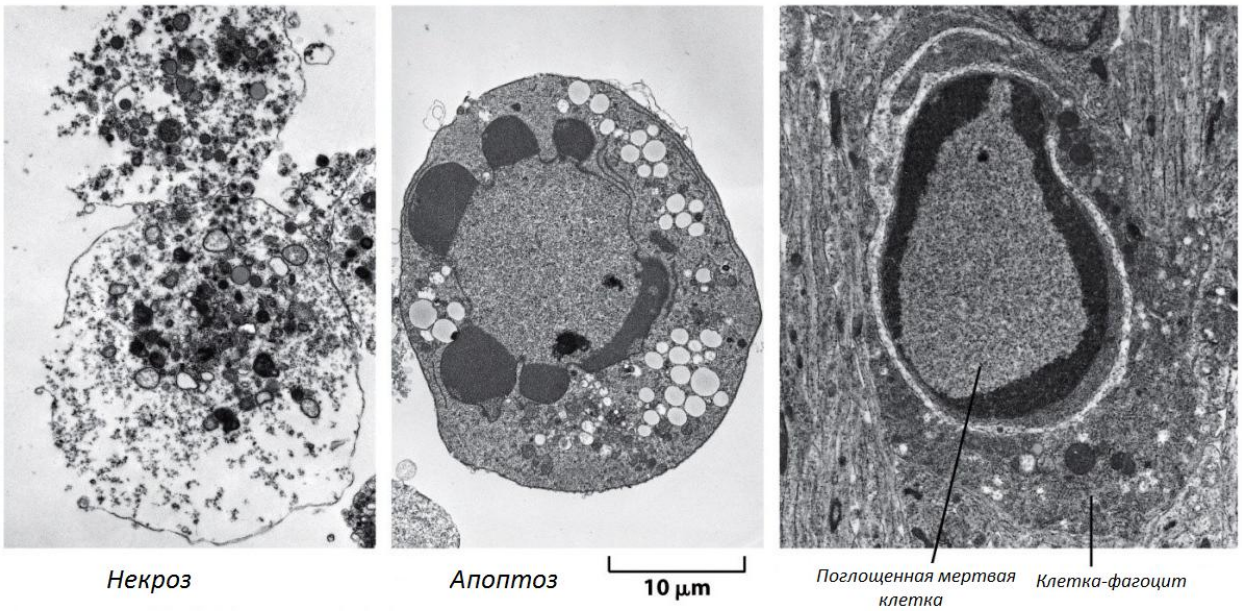

Рис. 1 Различия гибели клетки, взято из [1].

Запуск процесса апоптоза включает в себя большое количество регуляторных ступеней и множество сигнальных факторов. Молекулярный каскад может быть запущен как и внутри самой клетки, так и благодаря внешнему сигналу. Запуск внешнего пути апоптоза происходит при связывании проапоптотических рецепторов («рецепторов смерти») с соответствующими внеклеточными лигандами, в качестве которых наиболее часто выступают фактор некроза опухоли (TNF-α), Fas-L. В качестве примера внешней активации рассмотрим механизм действия белка Fas. После связывания белка с Fas-L его конформация меняется: происходит тримеризация рецепторов в плазматической мембране. Благодаря этим изменениям цитоплазматический домен рецептора DD (death domain) может взаимодействовать с молекулой адапторного белка FADD (Fas-death associated domain protein), который

имеет в своей структуре «эффекторные домены смерти» (death effector domain). После активации FADD с этими доменами связывается прокаспаза-8. Данный белковый ансамбль получил название DISC (death inducing signaling complex). В случае, когда стимулом к индукции апоптоза служит взаимодействие TNFR (рецептор TNF-α) с TNF-α, образуется аналогичный белковый комплекс DISC, но адапторным белком является не FADD, а TRADD (TNFR- associated death domain protein) и, помимо прокаспазы-8, в сборке комплекса может принимать участие прокаспаза-10.

Каспазы – это особое семейство протеаз, они являются ключевым звеном молекулярного апоптотического каскада. Каспазы обладают уникальной способностью расщеплять целевые субстраты. Каспазы – это сигнальные протеазы, предназначенные для специфического гидролиза белков, но не для их деградации, осуществляемые ими разрывы приводят к преобразованию исходной структуры, но не к разрушению.

Первоначально в клетке каспазы синтезируются в виде зимогенов (функционально неактивных предшественников), их обычно называют прокаспазами. Если рассматривать, начиная с N`-конца, то каждая прокаспаза состоит из продомена, большой и малой субъединицы. В процессе активации каспазы, происходит протеолиз между большой и малой субъединицами, продомен часто (но не всегда) подвергается протеолитическому отщеплению. Активная каспаза представляет собой тетрамер, состоящий из двух больших и двух малых субъединиц (рис.2).

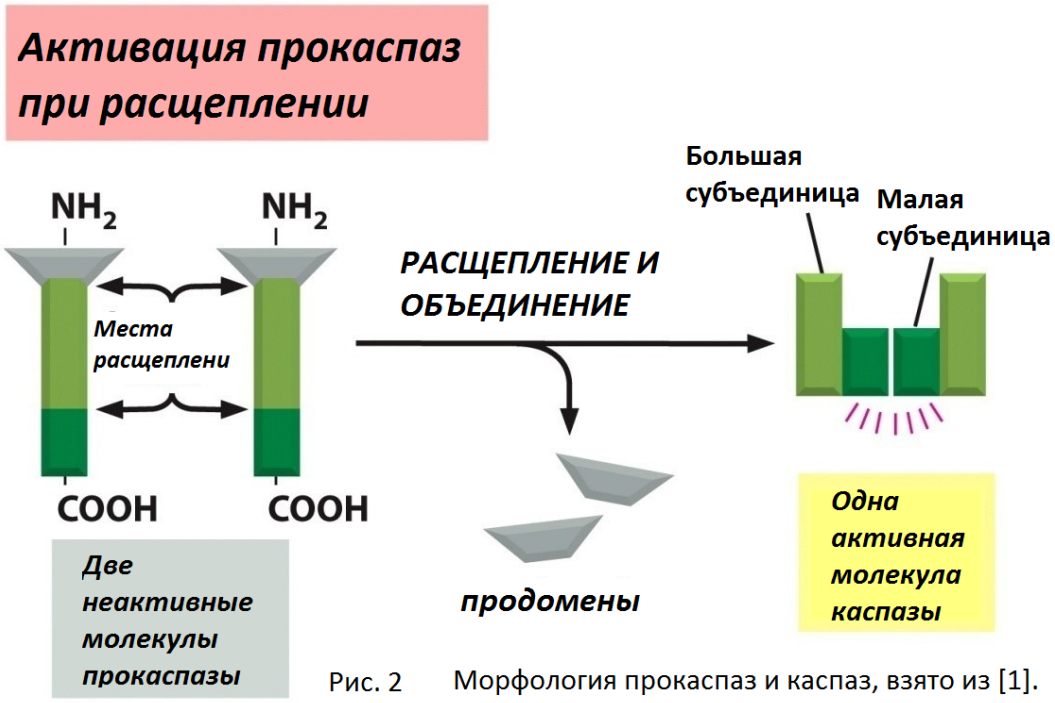

Рис. 2 Морфология прокаспаз и каспаз, взято из [1].

Каспазы, принимающие участие в апоптозе, принято подразделять на две группы: инициаторные и эффекторные. Эффекторные каспазы (-3,-6,-7) содержат короткий продомен, их функцией является расщепление клеточных структур. Их активация происходит под действием инициаторных каспаз (-2,-8,-9,-10), которые содержат длинный продомен. С помощью продомена инициаторные каспазы воспринимают апоптотический сигнал, которй может быть передан им двумя различными путями.

Внешний (или прямой) путь был рассмотрен выше. Но также существует внутренний (или митохондриальный) путь апоптотического сигнала. Ключевой участник внутреннего пути индукции апоптоза является цитохром с, элемент электронной транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. Выход цитохрома с в цитозоль обеспечивает его взаимодействие с адапторной молекулой Apaf1 (apoptotic protease activating factor 1). Происходящие при этом конформационные изменения приводят к сборке семилучевого комплекса, называемого «апоптосомой» (рис.3). Апоптосома является неким аналогом комплекса DISC, ее функция заключается в активации инициаторной прокапазы-9, которая влечет за собой каскад протеолитических реакций, приводящих к гибели клетки.

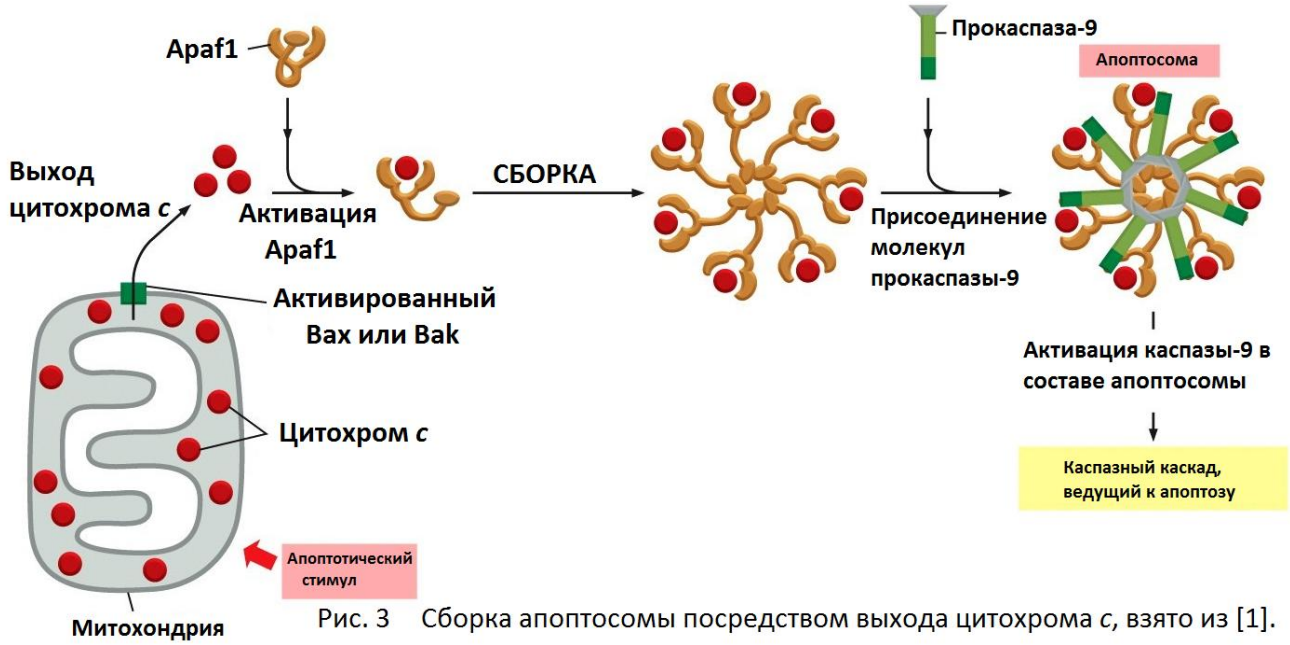

Рис. 3 Сборка апоптосомы посредством выхода цитохрома *c*, взято из [1].

В обычных условиях цитохром с локализуется в межмембранном пространстве на внутренней мембране митохондрии. Его выход в цитозоль обусловлен проницаемостью наружной мембраны митохондрии, которая находится под контролем белков семейства Bcl-2. Представителей этого семейства делят на две категории: про-апоптотические и анти-апоптотические белки.

В ответ на апоптотический стимул цитозольные про-апоптотические белки Bax, Bid, Bad способны перемещаться к наружней мембране митохондрии, на которой локализуются белки анти-апоптотичекого действия, ответственные за поддержание ее целостности. После полученного апоптотического сигнала белок Bax (в некоторых клетках Bak) самоолигомеризуется и формирует в наружней мембране митохондрии функциональный гомодимер, необходимый для высвобождения цитохрома с.

Есть и другие пути возникновения проницаемости внешней мембраны митохондрии. Например, возможное формирование гигантской митохондриальной поры. Ее открытие приводит к потере мембранного потенциала, в матрикс начинает поступать жидкость, митохондрия набухает, и внешняя мембрана лопается, высвобождая белки межмембранного пространства, в том числе цитохром с [1-3].

В ходе исследований было выявлено, что, помимо апоптотических функций, некоторые каспазы обладают также неапоптотическими свойствами. Например, каспаза-3 принимает участие в регуляции нейропластичности (способности нейронов изменять свою функцию и структуру под действие изменений внешней или внутренней среды). Таким образом, каспаза-3 участвует в формировании памяти, в процессе обучения, в изменении активности головного мозга во время спячки и т.д. Но в то же время каспаза-3 обладает апоптотическими функциями. Считается, что ее функции зависят от субстрата, с которым взаимодействует каспаза [4].

В процессе гибели эндотелиальных клеток путем апоптоза наблюдается разрушение межклеточных контактов, что ведет к нарушению проницаемости сосудов. Эндотелий кровеносных сосудов выполняет важные функции: обеспечивает кровоснабжение тканей, развитие иммунной системы и иммунный ответ, обмен жидкостью и макромолекулами между кровеным руслом и тканями. Все эти функции обеспечиваются регуляцией проницаемости слоя эндотелиальных клеток. Нарушение регуляции ведет к серьезным нарушениям в работе организма, к возникновению тяжелых сердечно-сосудистых заболеваний. Избыточная проницаемость вызывает появление отеков в близлежащих тканях или воспалительных процессов из-за проникновения в ткань компонентов крови, которые в норме содержатся только в кровяном русле.

Проницаемость регулируется путем изменения состояния межклеточных контактов эндотелиальных клеток. Для увеличения проницаемости необходимо разрушить межклеточные контакты, то есть расщепить белки, образующие контакты. Такие процессы происходят на первых стадиях апоптоза (клетка отделяется от

соседних), расщепление происходит благодаря деятельности каспаз. Однако в начальных стадиях процесса увеличения проницаемости сосудов апоптоз не наблюдается. Это происходит благодаря наличию у каспаз, в частности, у каспазы-3, функций, не связанных напрямую с регуляцией апоптоза [5].

Материалы и методы.

В ходе эксперимента клетки культуры сосудистого эндотелия человека EA.hy926 выращивали на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, при температуре 37ºC и содержании CO_2 5%. Для эксперимента клетки в количестве 100 тысяч высаживали в лунки 6-луночного планшета, в которые предварительно были помещены покровные стёкла. Клетки растили в течение 4 дней до образования ими монослоя. По достижении клетками состояния монослоя им меняли среду на обеднённую (содержащую 0,2% сыворотки) и оставляли на ночь. На следующий день к клеткам добавляли ингибитор каспаз ZVAD (5 мкМ) или ингибитор каспазы-3 DEVD (5 мкМ), а через 15 минут после добавления ингибиторов – человеческий TNF-α (10 нг/мл). На следующий день клетки фиксировали 2% параформальдегидом (10 минут, 37°C), а затем пермеабилизовали 0,2% раствором TritonX-100 (5 минут при комнатной температуре). Реакцию с антителами против целевого белка VE-кадгерина проводили 12-15 часов при +4°C во влажной камере. Реакцию с антителами против мышиных антител (антител к VE-кадгерину), мечеными флуорофорами Oregon Green 488, проводили 60 минут при комнатной температуре. Изображения получали на флюоресцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss), оборудованном камерой AxioCAM HRM.

Результаты и выводы.

Графические результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 4 ниже. На фотографии Б видны изменения в межклеточных контактах, вызванные инкубацией с TNF-α. В отличие от ровных межклеточных границ контрольной группы наблюдаются некоторые расхождения между клетками. Эти нарушения межклеточных контактов характерны для действия TNF-α и активируемых им каспаз.

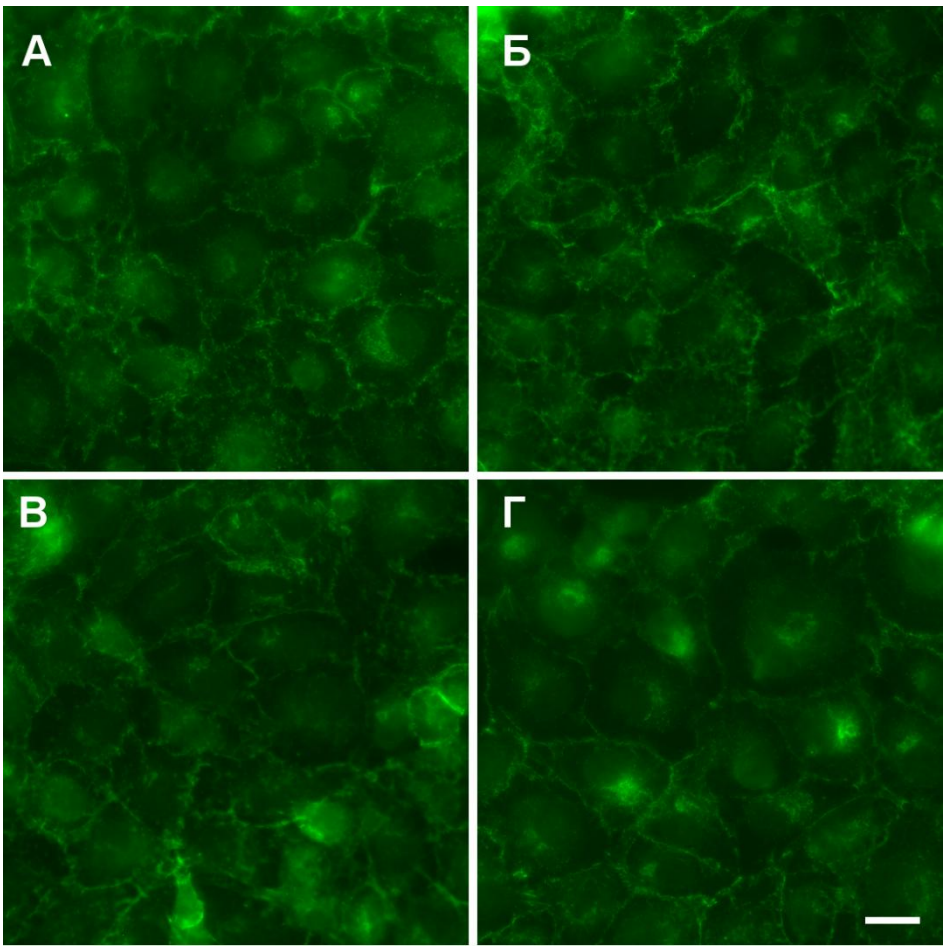

Рис. 4. Распределение VE-кадгерина в межклеточных контактах клеток эндотелия. (А): контрольные клетки; (Б): клетки, подвергнутые инкубации cTNF-α (10 нг/мл; 24 часа); (В): клетки, подвергнутые инкубации с TNF-α (10 нг/мл; 24 часа) и ингибитором каспаз ZVAD (5 мкМ; 24 часа); (Г): клетки, подвергнутые инкубации с TNF-α (10 нг/мл; 24 часа) и ингибитором каспазы-3 DEVD (5 мкМ; 24 часа). Маркер 15 мкм.

На снимках В и Г подобных изменений на границах клеток не наблюдается. Структура межклеточных контактов соответствуют контрольным клеткам, а значит перераспределения белков не происходит. Из этого можно сделать вывод, что каспазы имеют прямое отношение к перестройке контактов в культуре клеток эндотелия. Ингибирование действия каспаз влияет на перераспределение белков межклеточных контактов, никаких изменений в их расположении не наблюдается. А отдельная обработка клеток ингибитором каспазы-3 дает тот же результат, что и угнетение всех каспаз одновременно. Это подтверждает гипотезу о наибольшем вкладе в изменения контактов между эндотелиальными клетками именно каспазы-3. Вдобавок к своим основным – апоптотическим – функциям, она обладает неапоптотическими функциями, обеспечивающими полноценное функционирование организма через связь кровеносного русла и окружающих его тканей. Полученные

данные могут иметь важное значение при поиске новых мишеней для действующих веществ лекарственных препаратов, предназначенных для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, отеков.

Ссылки.

1. Б. Альбертс и др. Основы молекулярной биологии клетки. М.: Бином, 2015.

2. A. Gewies. ApoReview. Introduction to Apoptosis. 2003.

3. V. Gogvadze et al. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Chemico-biological interactions. 2006. 163(1), p. 4-14.

4. M. D'Amelio et al. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. Cell Death & Differentiation. 2010. 17(7), p. 1104-1114.

5. Sawant et al. The role of intrinsic apoptotic signaling in hemorrhagic shock-induced microvascular endothelial cell barrier dysfunction. J Cardiovasc Transl Res. 2014. 7(8), p.711-8.