

**ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ
ФАКТОРОВ СТВОЛОВОСТИ НА АССИМЕТРИЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ
КЛЕТКИ И РЕГУЛЯЦИЮ АПОПТОЗА.**

Орлова Е.В.

*Институт биологии развития им.Н.К.Кольцова РАН,
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26;*

e-mail: eaglson@mail.ru

Структурные особенности таких факторов стволовости как Numb, Prospero и Pten – одни из определяющих процесса ассиметричного деления стволовой клетки. При взаимодействии Numb с FADD, а Pros с DNA апоптоз ингибируется в пусковой точке, а затем происходит открепление фактора от клеточной мембраны. Эти изменения в их структуре, а также ориентация митотического веретена, влияют на поляризацию стволовой клетки, на тип взаимодействия стволовой клетки с нишей.

Ключевые слова: клетки, апоптоз, белковые факторы, ассиметричное деление

**THE ROLE OF STRUCTURE-TO-FUNCTION PARTICULARITIES OF CELL FATE
DETERMINANTS IN MITOTIC SPINDLES ORIENTATION AND FORMATION OF
NICHE COMPLEX.**

Orlova E.V.

*Koltzov Institute of developmental Biology RAS,
Vavilova St., 26, Moscow , 119334, Russia;*

The influence of some structure particularities of cell fate determinants like Numb, Prospero and Pten lay the foundation of the way of asymmetric cell division. Also the disturbance in their structure was followed by the mitotic spindles orientation and polarization of the cell. This fact entails the specific formation of niche complex and thus controls the process of asymmetric cell division.

Keywords: cells, apoptosis, albuminous factors, asymmetric division

Одна из важных особенностей стволовых клеток - их ассиметричное деление, поддерживающее пул этих клеток. Результатом такого деления является образование двух дочерних клеток: одна клетка остается стволовой, а другая становится на путь дифференцировки. Ассиметричное деление клеток обеспечивается несколькими механизмами, в том числе, специальными

белковыми факторами стволовости, специфическими для клеток разных тканей и органов (Knoblich, 2001). Это факторы Numb, Prospero, Pten и другие.

Фактор стволовости **Numb** обнаружен в сателлитных клетках мышц (Carmena, 1998), центральной и периферической нервной системе (Shen, 2002). Этот белок может присутствовать в клетке как в мембраносвязанном состоянии, так и в свободной форме в цитоплазме благодаря своей своеобразной доменной структуре (Dho, 2006). Этот фактор стволовости способен к специфическим белок-белковым и белок-фосфолипидным взаимодействиям (Knoblich, 1997).

Numb состоит из двух основных доменов: фосфотирозин-связывающего (РТВ) и SH2- домена (Src homology 2).

Модулярные домены SH2-домен и фосфотирозин-связывающий (РТВ) домен фактора Numb, найдены в многофункциональных молекулах с разнообразными биохимическими свойствами, включая ферменты, факторы транскрипции и цитоскелетные белки (Pawson, 1995; Pawson, 1997), могут встраиваться независимо в строго определенный сайт связывания. Изолированные домены часто присоединяются к белкам, которые содержат специфический короткий аминокислотный мотив, состоящий из консервативно связанного элемента, необходимого для распознавания специфическим доменом и боковыми аминокислотными остатками, отвечающими за специфичность связывания. Так SH2-домены связывают пептиды, содержащие в области связывания фосфотирозин (pTyr) остаток, в то время как добавочная специфичность определяется боковыми цепями, специфичных к C-терминальному pTyr (Songyang, 1993).

В противоположность этому РТВ- домены, проявляют специфичность к N-терминальным остаткам (Li, 1996).

Фосфотирозин-связывающий (РТВ) домен включен в формирование множественных белковых комплексов как *in vivo* так и *in vitro* и распознает пептиды, различающиеся по первичной и вторичной структуре (Pawson, 1995),

участвуя, таким образом, в регуляции ассиметричного клеточного деления (Zwahlen, 2000).

Как же в действительности Numb РТВ-домен способен связывать такие различные массивы пептидов? Рассмотрим это на примере комплекса Numb РТВ-домена с Nak-пептидом, который является физиологическим лигандом Numb. Zwahlen с соавторами (Zwahlen et al., 2000) был сделан РСА и ЯМР и получен а трехмерная структура этого комплекса.

Структура Numb РТВ домена - это β -сандвич, состоящий из 2 антипараллельных (ортогональных) β -слоев и накрытых сверху С-терминальной α -спиралью ($\alpha 3$) с одной стороны (рис.1,2).

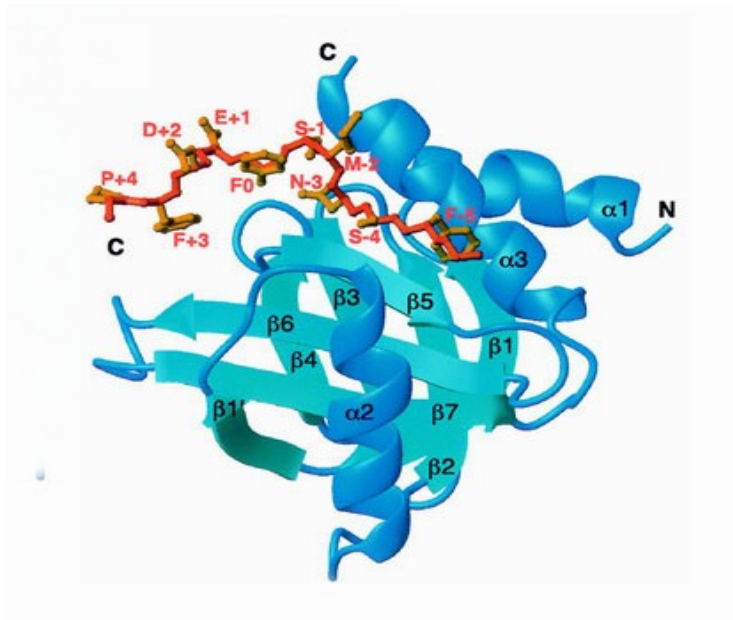


Рис.1.Схематическое устройство области связывания. Белок показан голубым, а пептид – оранжевым. Боковые цепи Nak пептида помечены. Картинка была получена с использованием программного пакета MOLMOL (Koradi et al., 1996).

Установлено, что это является условием для наличия у белка с подобным структурным образованием для участия в мембранных взаимодействиях и передачи сигнала (рис.2.).

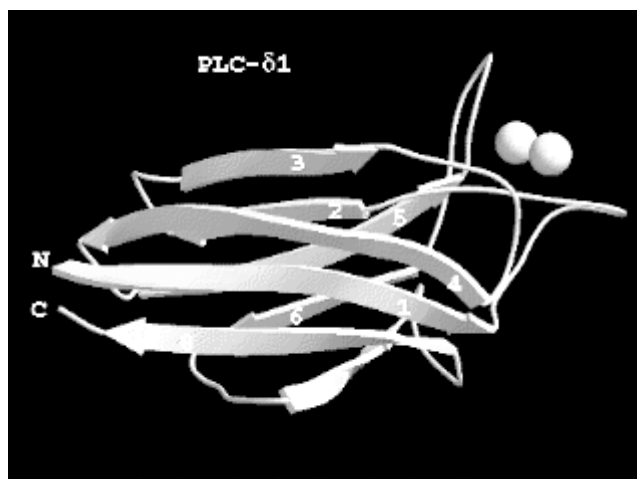


Рис.2. Типичный C2-домен на примере фосфоинозитид- специфическая фосфолипаза Cδ1 (PLCδ1).

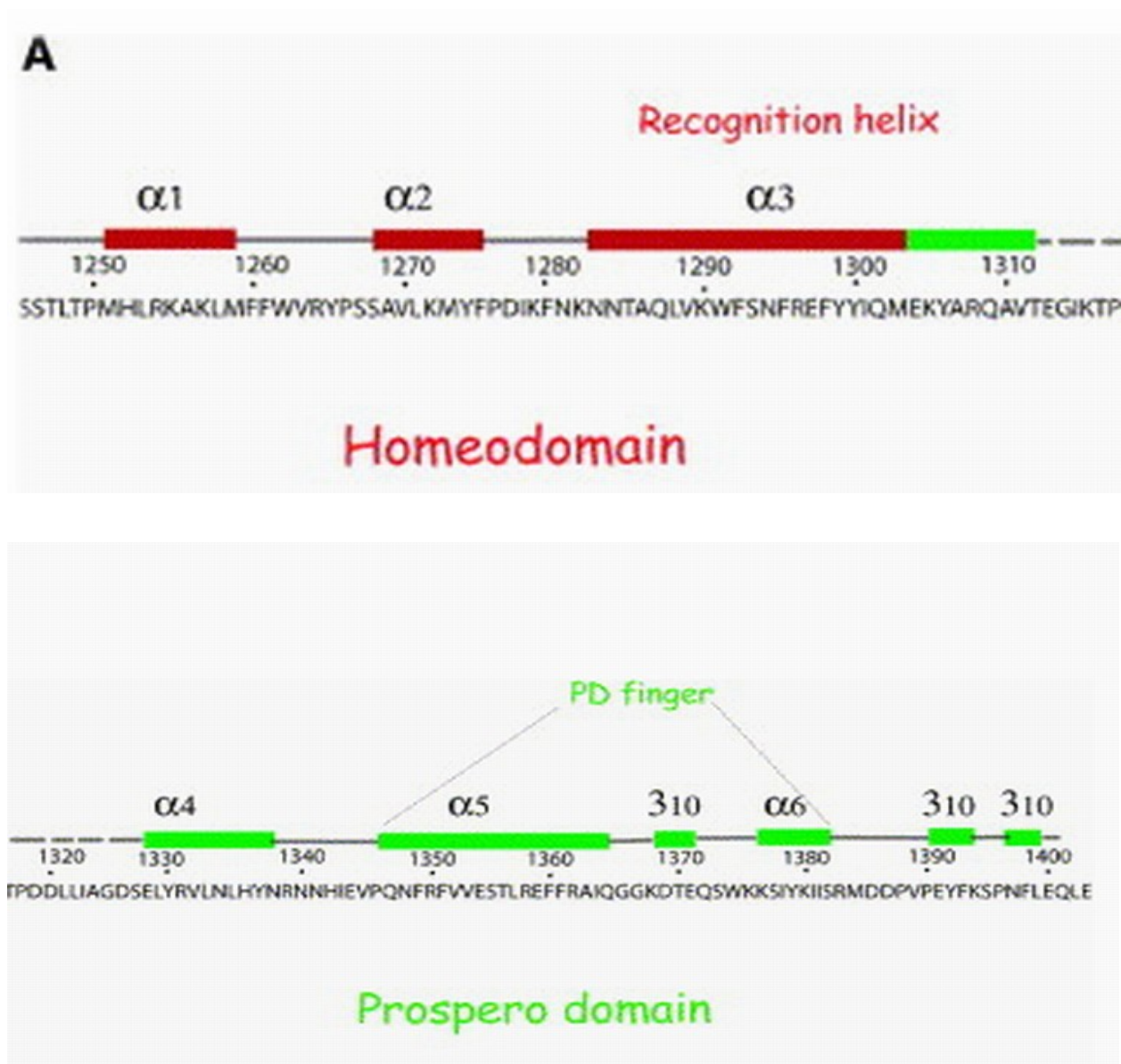
Следует отметить, что подобная структура характерна также для С-терминального C2 домена фактора стволовости Pten (рис.4).

N-терминальная α -спираль ($\alpha 1$) запакована против $\alpha 3$ под углом в $\sim 40^\circ$. Вторая спираль ($\alpha 2$) находится перпендикулярно ко второму слою β -сандвича. Данная структурная конформация участвует в процессе передачи сигнала при белок-мембранных взаимодействиях факторов стволовости Numb и Pten в процессе ассиметричного клеточного деления.

При детальном рассмотрении оказалось, что связывание происходит только из-за перераспределения поверхностного заряда при гидрофобных взаимодействиях. При этом условия связывания пептида в гидрофобной полости Numb РТВ домена включают взаимодействия "заряд-заряд", при этом размеры белковой глобулы не имеют особой важности (Kogadi et al., 1996).

Фактор стволовости **Prospero** (Pros) – мультидоменный 153.3kDa белок, имеющий дивергентный гомеодомен. (Chu-Lagraff et al., 1991; Hirata et al., 1995; Matsuzaki et al., 1992). Он как и Numb исходно является мембраносвязанным, но впоследствии он транслоцируется в цитоплазму и оттуда в ядро, где он проявляет инактивированную ранее способность связывать DNA (Kissinger et al., 1990). Эти структурные особенности Pros показаны на рис.3.

В биологическом смысле транслокация мембрана→цитоплазма→ядро, с последующей активацией именно в ядре и как следствие, проявлением способности связывать DNA, является своеобразным бинарным переключателем между сохранением стволовости стволовой клеткой или ее становлением на путь дифференцировки (Choksi et al., 2006).



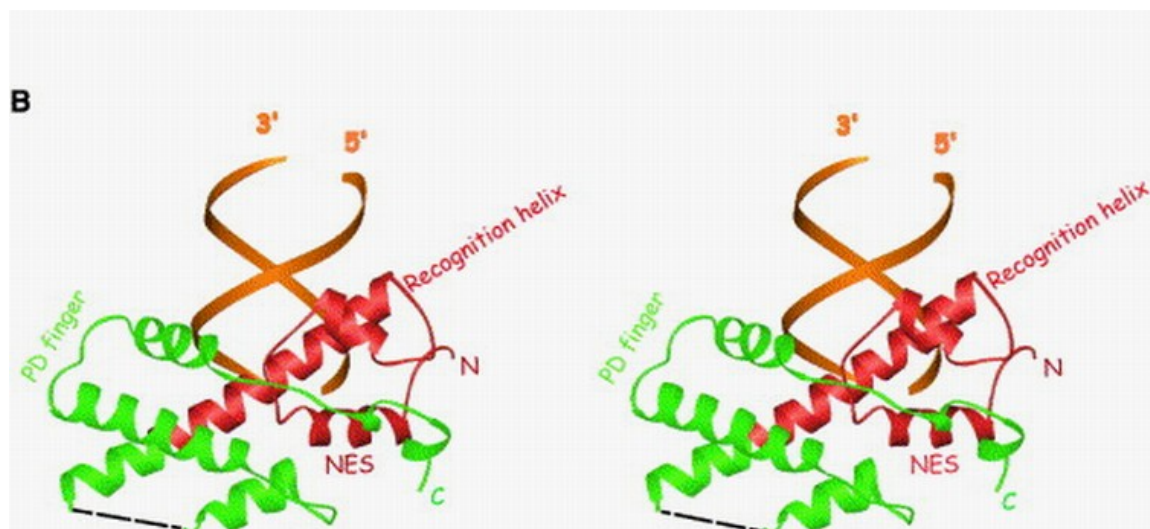


Рис 3. (А) Аминокислотная последовательность и вторичная структура HPD домена у Prospero. Участок гомеодомена (HD) показан красным, Prospero домен (PD) -зеленым. (В) Стереорезервирование комплекса Pros и DNA. DNA показана оранжевым.

Белок **Pten** является фосфатазой, которая может работать как с полипептидными, так и с фосфоинозитидными субстратами (Lee et al., 1999).

Pten имеет C2 домен, ответственный за связывание с фосфолипидами мембраны *in vitro* и фосфатазный домен (рис. 4).

C-терминальный домен фактора стволовости Pten регулирует Ca^{2+} -зависимым образом мембранные взаимодействия с некоторыми сигнальными белками, такими как фосфоинозитид- специфическая фосфолипаза $CD1$ (PLC $\delta 1$), фосфоинозитид 3-киназа (PI3K) и протеин киназа C (PKC) (Rizo et al., 1998).

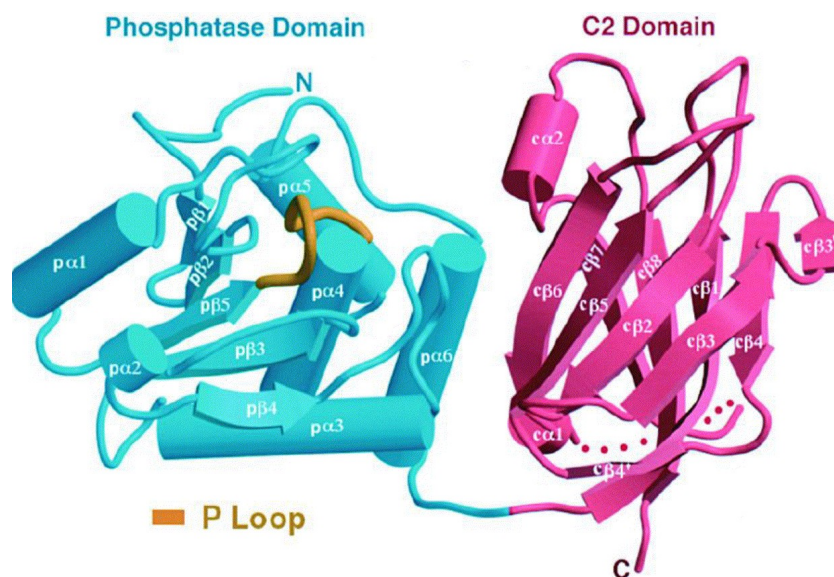


Рис.4. Структура Pten: N-терминальный фосфатазный домен и C-терминальный C2 домен.

Он состоит из 8 слоев анти-параллельных β -сандвичей, и подобен похожей структурной композиции из анти-параллельных β -сандвичей для РТВ-домена фактора стволовости Numb. Положительный заряд на фосфатазном домене Pten (рис.5.) должен компенсироваться отрицательным зарядом на субстрате, поэтому Pten имеет большую степень сродства к сильнокислым субстратам (Myers et al., 1997).

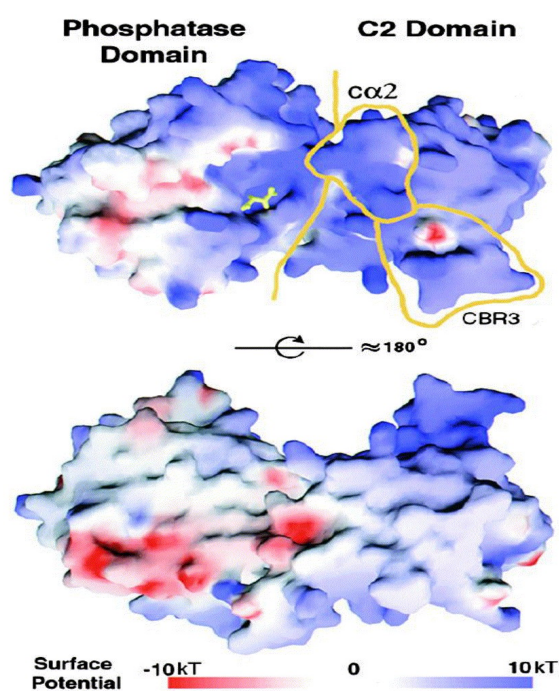


Рис.5. Поверхностное распределение заряда на Pten.

Вышеописанные структурные особенности факторов стволовости могут влиять на участие в ассиметричное клеточное деление. Рассмотрим гипотетический механизм этого процесса.

Следует отметить, что уменьшение полярности стволовых клеток ведет к нарушению локализации факторов стволовости в дочерних клетках (Varmark et al., 2007).

Можно предположить, что общая особенность факторов стволовости, т.е. механизм последующей локализации только в одной из дочерних клеток, состоит в том, что, вероятно, при переходе фазы G_0 в G_1 способность их выхода из мембрано-связанного состояния, по-видимому, зависит от способности фактора стволовости Numb связываться РТВ-доменом с FADD (рис.6 А, Б) – Fas-ассоциированным белком, содержащим “домен смерти” (Fas-associated protein with death domain) (Eberstadt et al., 1998), который присоединяясь к прокаспазе-8, включает цепь апоптотических стимулов (Riedl et al., 2004). В свою очередь фактор стволовости Pros нарушает процесс фрагментации DNA, имеющий место при апоптозе. В результате происходит ингибирование как Fas-, так и Вах- индуцированного апоптоза, а факторы стволовости открепляются от мембраны. Этим, вероятно, объясняется “бессмертие” стволовых клеток.

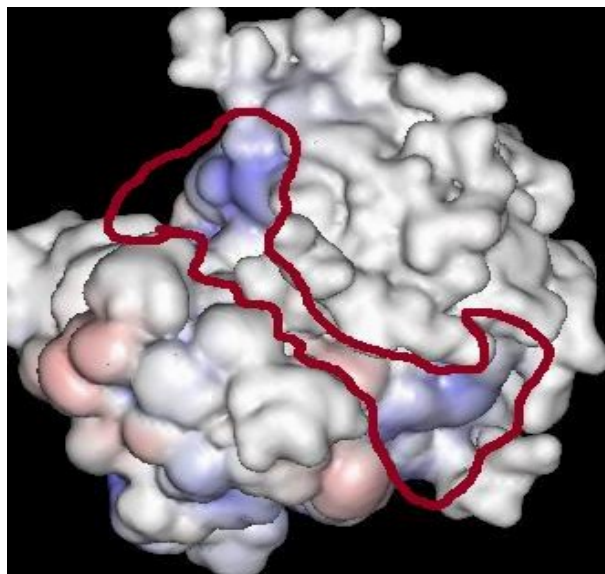
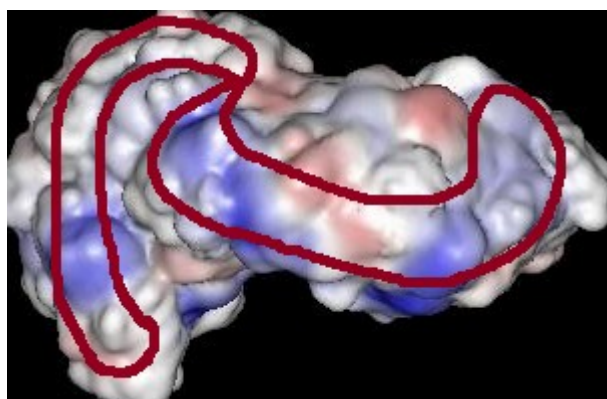


Рис. 6 А. РТВ-домен фактора стволовости Numb с предполагаемой областью связывания FADD (обозначено красным).



Б. Структура FADD состоит из двух ортогонально расположенных серпов (обозначено красным)

Следует отметить, что функциональная взаимосвязь контроля апоптоза ассиметричным клеточным делением была также показана в работе Hatzold с соавторами (Hatzold et al., 2008).

Следующим этапом после вышеописанных белок-белковых взаимодействий является процесс ориентации митотического веретена.

С одной стороны, стимулом “моторной активности” (Erin K. McCarthy et al., 2006) митотического веретена, вероятно, являются структурно-пространственные перестройки факторов стволовости, а именно

рядконформационных переходов: фактор стволовости↔клеточная мембрана и фактор стволовости↔субстрат.

С другой стороны, ориентация митотического веретена, по-видимому, находится в соответствии с изменением суммарного дипольного момента ($\delta\Delta$) при удвоении центриолей. При удвоении крепление материнской и дочерней центриолей в centrosome происходит зигзагообразно (ступенчато) (O'Connell et al., 2000) (рис.7).

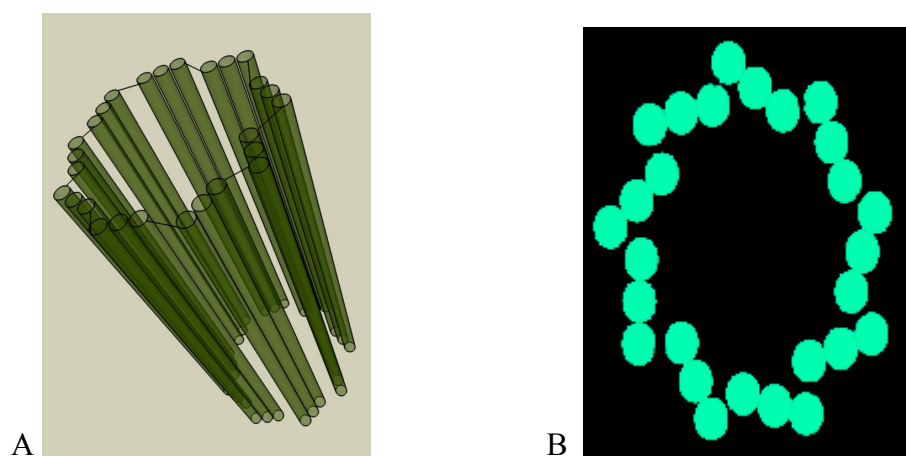


Рис. 7. Центриолей (А) и ее поперечный срез (В) с 9 триплетами микротрубочек.

Так как крепление последующей центриоли к предыдущей происходит с разных концов (рис.7В), то при этом вполне вероятно изменение суммарного дипольного момента. Вклад в процесс изменения дипольного момента может вносить также моторный белок динеин, который преобразует химическую энергию гидролиза АТФ в механическую работу (O'Connell et al., 2000) и, в свою очередь, вносит вклад в поляризацию клетки вдоль большого диаметра и является одним из основных факторов, определяющих финальную направленность митотического веретена. Следует отметить, что это удвоение начинается во время перехода фазы G_1 в S-фазу митотического цикла и завершается в точке начала митоза (Feldman J. L., et al., 2008).

Далее ортогональная или горизонтальная ориентация митотического веретена ведет к взаимно-однозначному взаимодействию якорного типа с клетками ниши (Yukiko et al., 2005).

Такой комплекс (стволовая клетка + ниша) (рис.8) может быть определяющим в поляризации стволовых клеток, и следующим этапом будет определение проекции дипольного момента по-отношению к большому диаметру стволовой клетки (Xie, 2000; Song et al., 2002; Kiger et al. 2001; Tulina et al., 2001; Jones et al., 2004).

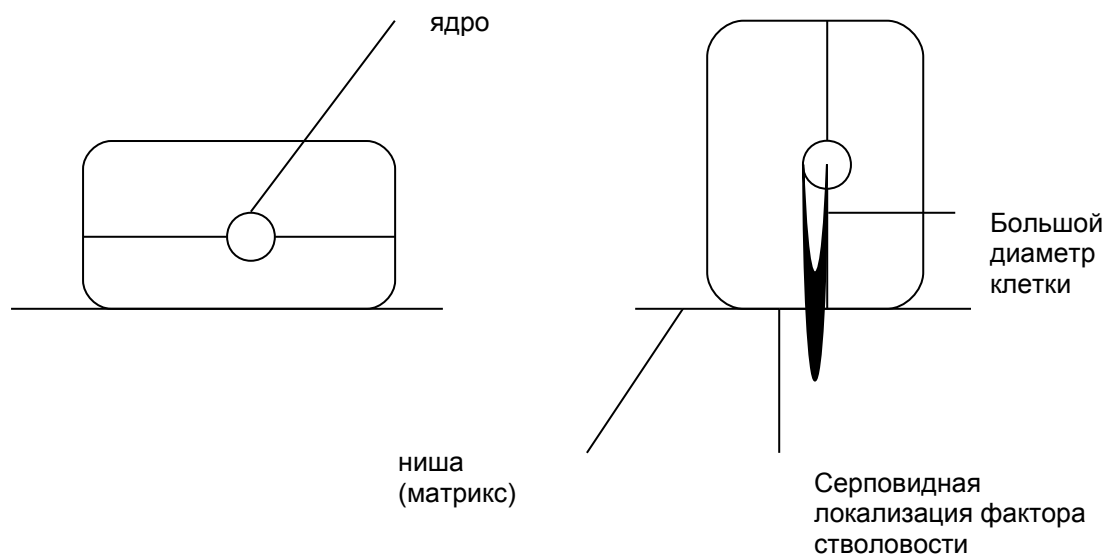


Рис. 8. Схематическое представление процесса встраивания стволовой клетки в образование ниши.

Когда веретено ортогонально к оси большого диаметра клетки, локальная проекция дипольного момента равна нулю, а магнитный момент равен 1. При этом энтропия системы имеет локальный минимум, и эта ситуация является более энергетически выгодной для изменения мембранного потенциала Нернста. Эти изменения впоследствии приводят к вертикальному делению и последующему образованию неэквивалентных дочерних клеток. При этом апикальные клетки имеют зону пролиферации, а нижние содержат исходный фактор стволовости в том же полюсе дочерней клетки, что и у материнской (Cayouette et al., 2001).

Таким образом, проведенный структурно-функциональный анализ факторов стволовости Numb, Prospero и Pten, а также ряда причин, влияющих на ориентацию митотического веретена, связанного со степенью поляризации стволовой клетки позволяет более детально понять взаимосвязь между различными клеточными механизмами, их структурно-функциональными особенностями и степень их влияния на ассиметричное деление.

Автор выражает сердечную признательность директору Института Биологии Развития РАН д.б.н. профессору Озернюку Николаю Дмитриевичу за помощь и поддержку в некоторых цитологических аспектах данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Carmena A., Oei B.M., Menon D., Jimenez F., Chia W. Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. // *Genes & Dev.*, 1998, v.12,p. 304-315.

Cayouette M., Whitmore A. V., Glen J., and Raff M. Asymmetric Segregation of Numb in Retinal Development and the Influence of the Pigmented Epithelium. // *The Journal of Neuroscience*, 2001, v.21, N15, p.5643–5651.

[Choksi SP](#), [Southall TD](#), [Bossing T](#), [Edoff K](#), [de Wit E](#), [Fischer BE](#), [van Steensel B](#), [Micklem G](#), [Brand AH](#). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. // [Dev Cell](#). 2006,v.11, N6, p.775-89.

Chu-Lagraff Q., Wright D.M., McNeil L.K. and Doe C.Q. The prospero gene encodes a divergent homeodomain protein that controls neural identity in *Drosophila*, // *Development* 1991, v. 2 (Suppl.), p. 79–85.

Dho D .V, Trejo J., Siderovski D. P., and McGlade C. J. Dynamic Regulation of Mammalian Numb by G Protein-coupled Receptors and Protein Kinase C Activation: Structural Determinants of Numb Association with the Cortical Membrane. // *Molecular Biology of the Cell*, 2006, v. 17, p.4142–4155.

Eberstadt M., Huang B., Chen Z., Meadows R. P., Ng S.-C., Zheng L., Lenardo M. J. and Fesik S. W. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. // *Nature*, 1998, v.392, p.941-945.

Erin K. McCarthy and Bob Goldstein. Asymmetric Spindle Positioning. // *Curr Opin Cell Biol.*, 2006, v.18, p. 79-85.

Feldman J. L., Geimer S., Marshall W. F. [The Mother Centriole Plays an Instructive Role in Defining Cell Geometry](#). // *PLoS. Biol.*, 2008, 5(6): e149 doi:10.1371/journal.pbio.0050149.

Hatzold J., Conradt B. Control of apoptosis by asymmetric cell division. // PLoS Biol., 2008, v. 6, Issue 4, p. 0001-0014

Hirata J., Nakagoshi H., Nabeshima Y. and Matsuzaki F. Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. // Nature 1995, v.377, p. 627–630.

Jones, D. L. and Fuller, M. T. Stem cell niches. // In Handbook of Stem Cells, 2004, v. 1: Adult and Fetal Stem Cells (ed. R. Lanza), p. 59-72. San Diego, CA: Academic Press.

Kiger, A. A., Jones, D. L., Schulz, C., Rogers, M. B. and Fuller, M. T. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. // Science 2001, v.294, p.2542-2545.

Kissinger C.R., Liu B., Martin-Blanco E., Kornberg T.B. and Pabo C.O. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. // Cell, 1990, v.63, p. 579–590.

Knoblich J. A. Asymmetric cell division during animal development. // Nature Rev. Mol. Cell Biol., 2001, v.2, p. 11-20 .

Knoblich JA, Jan LY and Jan YN. The N terminus of the *Drosophila* Numb protein directs membrane association and actin-dependent asymmetric localization. // Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94, 13005–13010.

Koradi R, Billeter M and Wuthrich K. MOLMOL, a program for display and analysis of macromolecular structures. // J Mol Graph, 1996, v.14, p.51–55.

Lee J.-O., Yang H., Georgescu M.-M., Di Cristofano A., Maehama T., Shi Y. Crystal Structure of the PTEN Tumor Suppressor: Implications for Its Phosphoinositide Phosphatase Activity and Membrane Association. // Cell, 1999, v. 99, p.323–334.

Li S-C, Lai KMV, Gish GD, Parris WE, van der Geer P, Forman-Kay J and Pawson T. Characterization of the phosphotyrosine-binding domain of the *Drosophila* Shc protein. // J Biol Chem, 1996, v.271, p.31855–31862.

Matsuzaki F., Koizumi K., Hama C., Yoshioka T. and Nabeshima Y. Cloning of the *Drosophila* prospero gene and its expression in ganglion mother cells. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992, v.182, p. 1326–1332.

Myers M.P., Stolarov J.P., Eng C., Li J., Wang S.I., Wigler M.H., Parsons R and Tonks N.K. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, v. 94, p. 9052–9057.

O'Connell C. B. and Wang Yu-li. Mammalian Spindle Orientation and Position Respond to Changes in Cell Shape in a Dyneindependent Fashion. // Molecular Biology of the Cell 2000, v. 11, p.1765–1774.

Pawson T. Protein modules and signaling networks. // Nature, 1995, 373, 573–580.

Pawson T., Scott J.D. Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. // *Science*, 1997, v.278, p.2075–2080.

Riedl S. J. and Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews*. // *Molecular cell biology*, 2004, v.5, p. 897-907.

Rizo J. and Sudhof T.C. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. // *J. Biol. Chem.* 1998, v. 273, p. 15879–15882.

Shen Q., Zhong W., Nung Y., Templel S. Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. // *Development*, 2002, v. 129, p. 4843-4853.

Song X., Zhu C. H., Doan C. and Xie T. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. // *Science*, 2002, v.296, p.1855-1857.

Songyang Z et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences.// *Cell*, 1993, 72, 767–778.

Tulina N., Matunis E. Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. // *Science*, 2001, v.294, p.2546-2549.

Varmark H, Llamazares S, Rebollo E, Lange B, Reina J, Schwarz H and Gonzalez C. Asterless is a constitutive centriolar protein required to organise functional centrosomes and essential to trigger zygotic development in *Drosophila*. // *Curr Biol*, 2007, v. 17, N20, p.1735-45.

Xie, T. and Spradling, A. C. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. // *Science*, 2000, v.290, p.328-330.

Yukiko Y., Fuller M. T. and Leanne J. D. Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. // *J. of Cell Science*, 2005, v.118, p.665-672.

Zwahlen C. Li S.-C., Kay L.E., Pawson T. and Forman-Kay J.D. Multiple models of peptide recognition by the PNB domain of the cell fate determinant Numb. // *The EMBO J.*, 2000, v.19, No.7, p.1505-1515.