

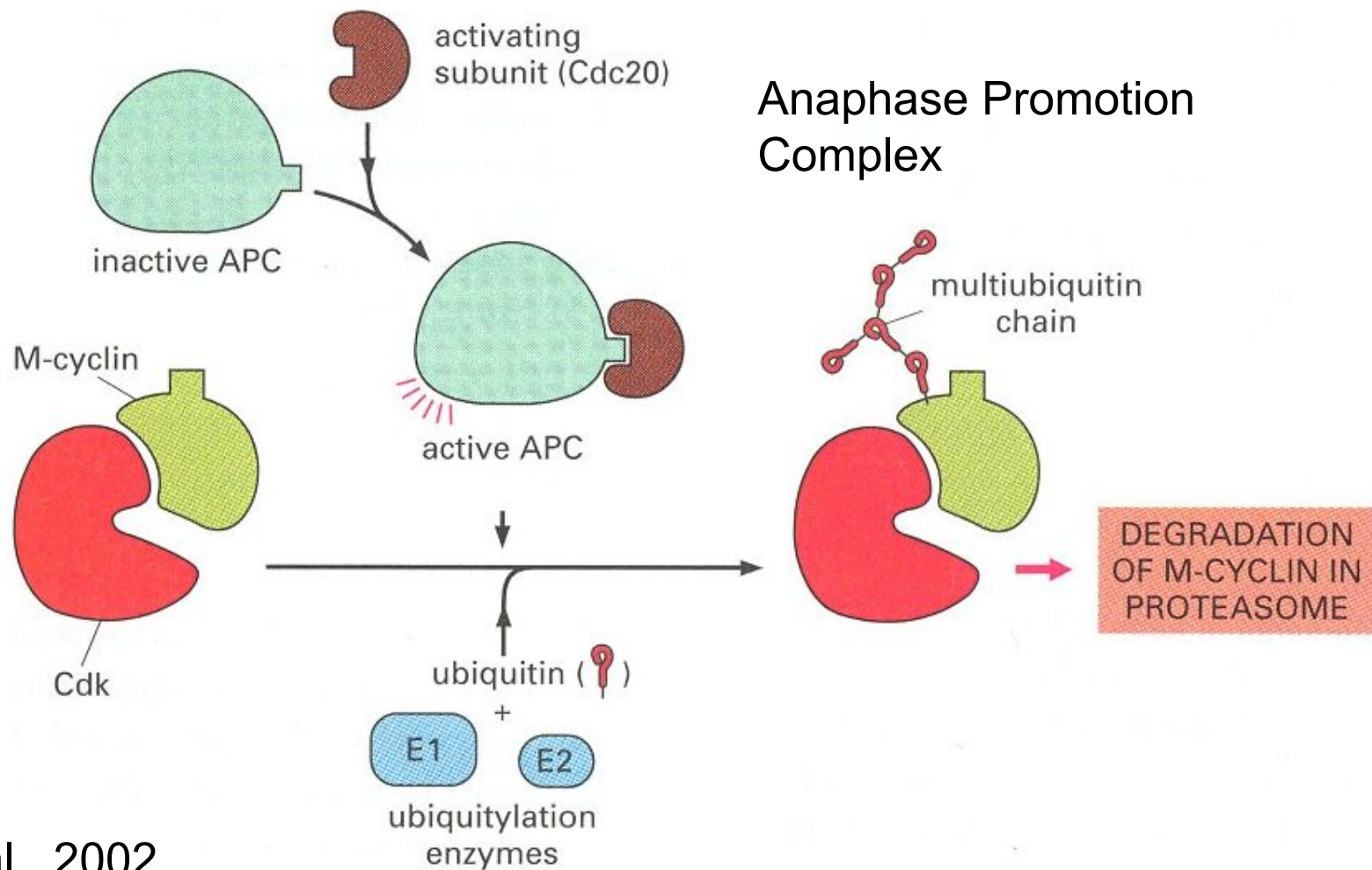
Генетика клеточного цикла

Электронно-лекционный курс
Глава 4

Протеолиз циклина под контролем APC.

Два белка, активирующих APC: Cdc 20 и Hct1

Активные формы Cdc 20, Hct1, неактивная Cdc 20, Hct1



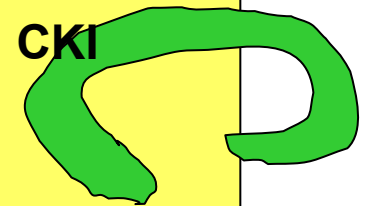
Поддержание инактивации M-Cdk после митоза

- Cdc20-APC и аналог Hct1-APC – деградация циклина.
M-Cdk активирует Cdc20-APC
M-Cdk инактивирует Hct1-APC фосфорилированием



Hct1-APC активируется в конце митоза, когда снижается к-во M-Cdk и фосфатазы отщепляют фосфат

- Sic1 – белок из группы CKI
M-Cdk инактивирует Sic1 фосфорилированием.
Sic1 активируется в конце митоза, когда снижается к-во M-Cdk

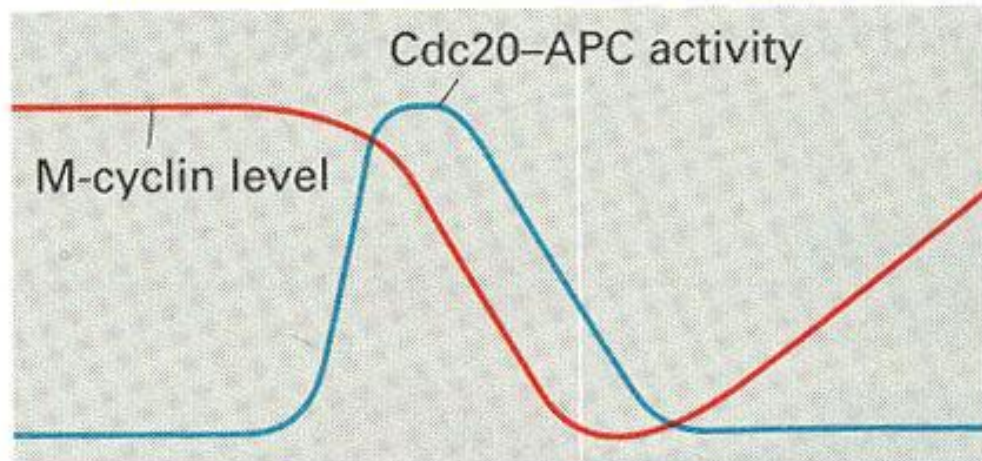


- В митозе снижается транскрипция M-циклина, до этого работала положительная обратная связь

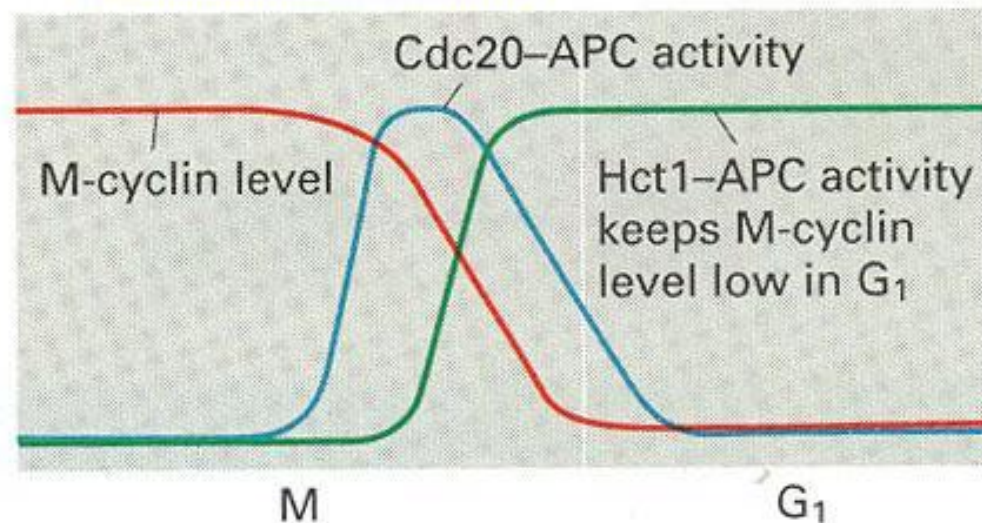
Поддержание инактивации M-Cdk после митоза

Уровень циклина снижается
за счет активности
Cdc20-APC, далее выпадение
G1 и накопление циклина

Эмбриональные клетки без G1 фазы



Клетки с G1 фазой



Уровень циклина снижается
за счет активности
Cdc20-APC, далее –
активностью Hct1-APC, Sic1

Изучение перехода G1-S у *S.cerevisia*

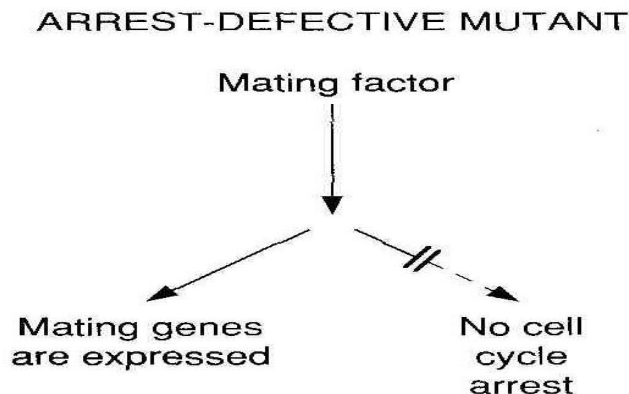
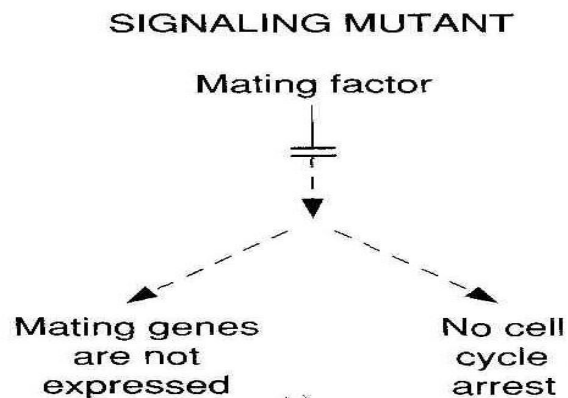
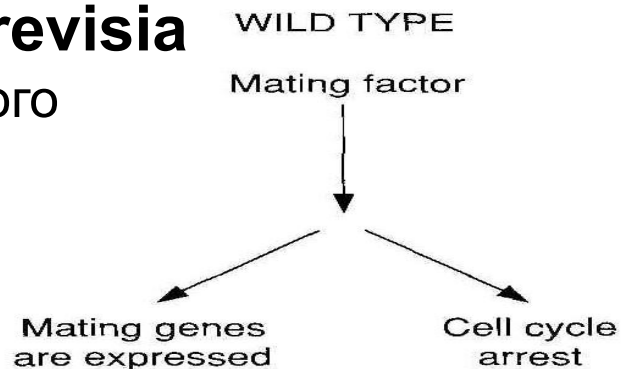
Мутации, связанные с арестом клеточного цикла, получили в реакции на α -фактор

Норма: остановка в G0,
подготовка к конъюгации

Мутации сигнального пути:
нет ареста в G0,
нет подготовки к конъюгации

Мутации ареста клеточного цикла:
нет ареста в G0,
подготовка к конъюгации

Выделили мутации по генам Cln1, Cln2, Cln3



Роль CLN3 в переходе Start

CLN3- G1-циклин, уровень транскрипции постоянен

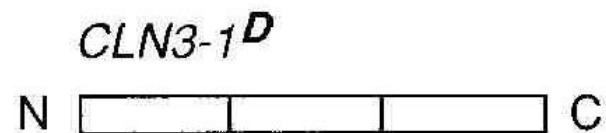
Другие циклины CLN1, 2 –G1/S – транскрипция возрастает вблизи Start – петля положительной обратной связи

Искусственное увеличение количества Cln3 – деление при меньшем размере и наоборот. Увеличение количества ДНК за счет минихромосом – задержка перехода к митозу. Размер клетки пропорционален ploидности

Стабильная форма Cln3:

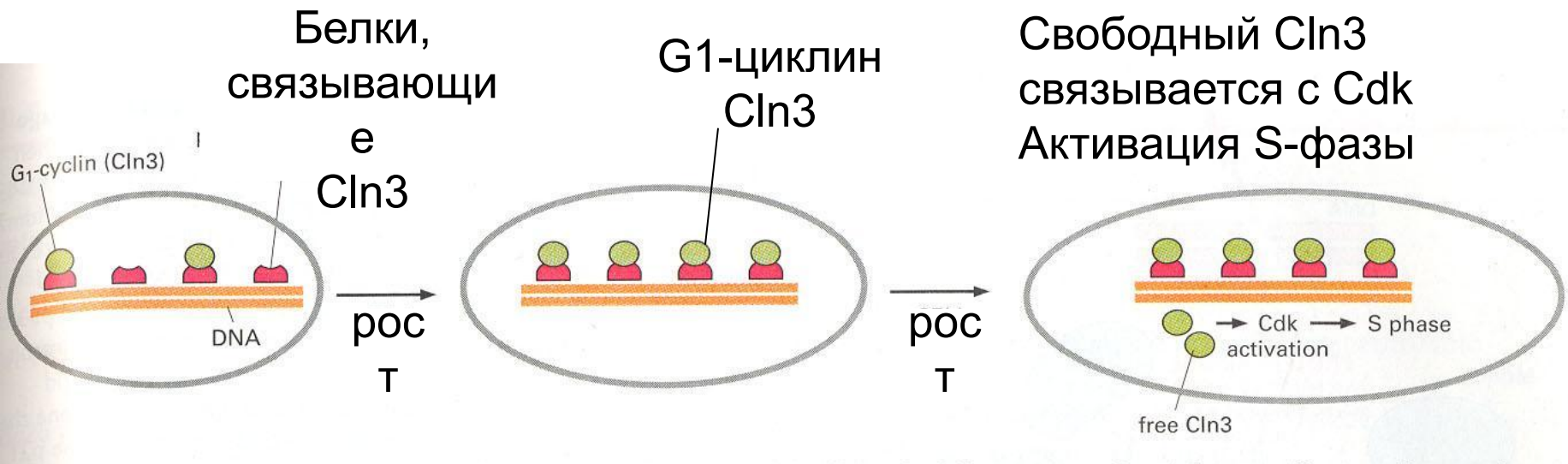
Murray A., Hunt T., 1993

Genotype	Size
Wild type	
<i>CLN3-1^D</i>	
4X <i>CLN3</i>	
Δ <i>cln3</i>	



Cyclin box

Гипотетическая модель координации роста клетки и движения по клеточному циклу у дрожжей

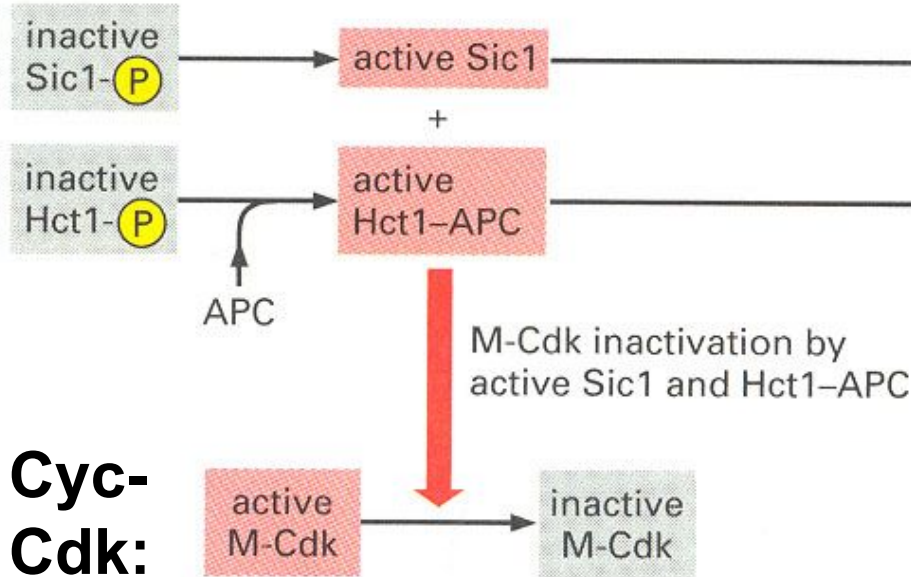


Cln3 синтезируется в G1 параллельно с ростом клетки.

Модель: количество Cln3 пропорционально количеству ДНК.

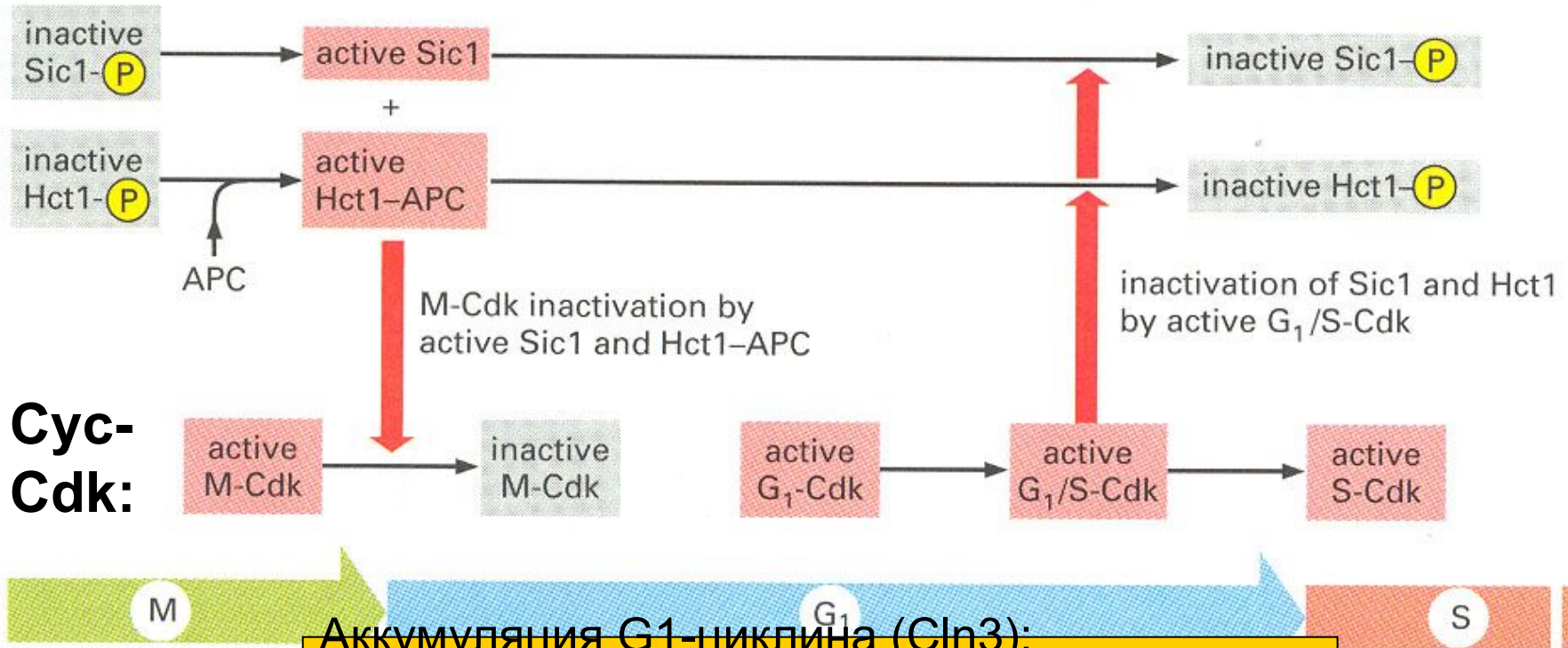
Превышение порогового уровня циклина 3 запускает активацию G1/S-Cdk и продвижение к S- фазе

Контроль прохождения G1 фазы путем изменения активности Cdk у *S.cerevisia*



Уменьшение количества активной Cdk (Cdc20-APC-обусловленный протеолиз циклина) активирует через фосфатазы Hct1-APC и белок Sic1. Инактивация M-Cdk белком Sic1, убиквитин-зависимым протеолизом, снижением транскрипции

Контроль прохождения G1 фазы путем изменения активности Cdk у *S.cerevisia*



**Сус-
Cdk:**

Аккумуляция G1-циклина (Cln3):

на него не действуют ингибиторы.

G1-Cdk (Cln3-Cdk) запускает транскрипцию

G1/S-циклинов (Cln1,2). Активность

G1/S-Cdk

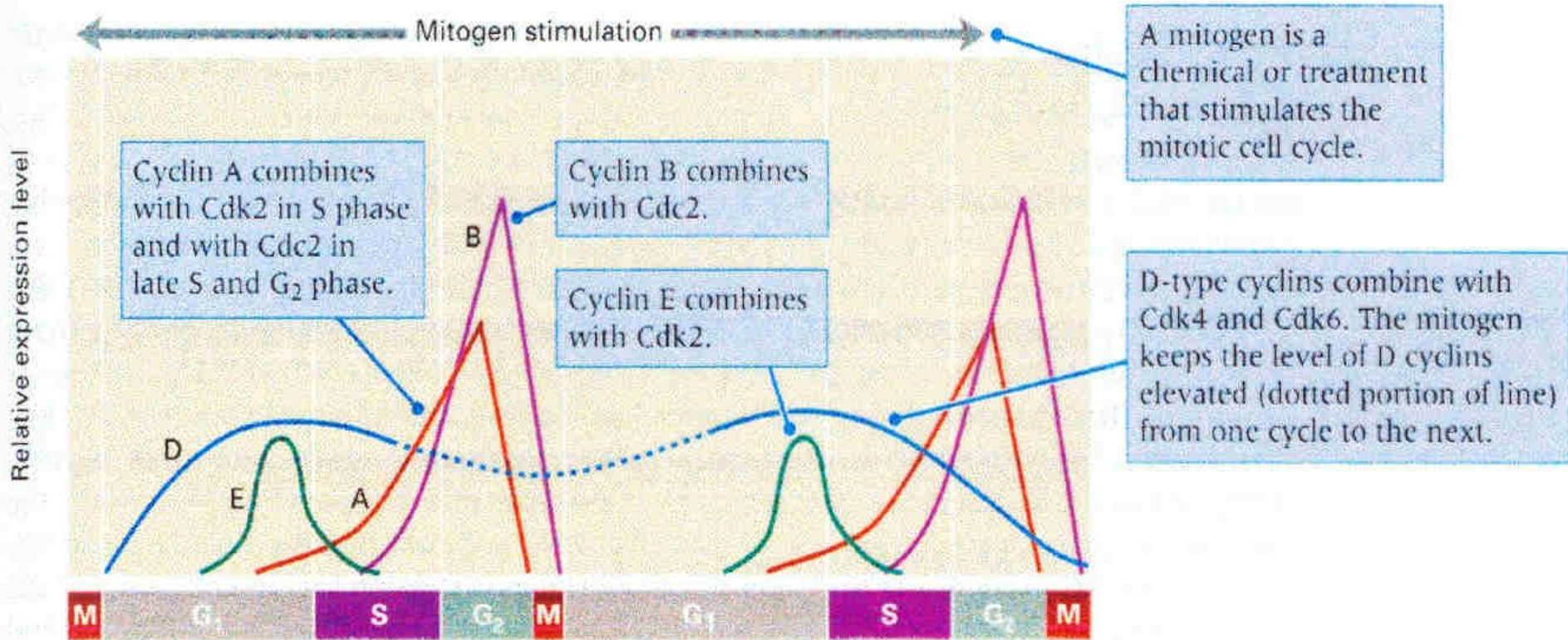
инактивирует (фосфорилирует)

ингибиторы, инициирует транскрипцию

S-циклинов

Активная
форма
S-Cdk
запускает
S-фазу

Многоклеточные организмы. Флуктуации уровней циклинов в клеточном цикле. Экспрессия циклина D (G1 -циклина) в ответ на митоз-стимулирующие агенты (митогены)

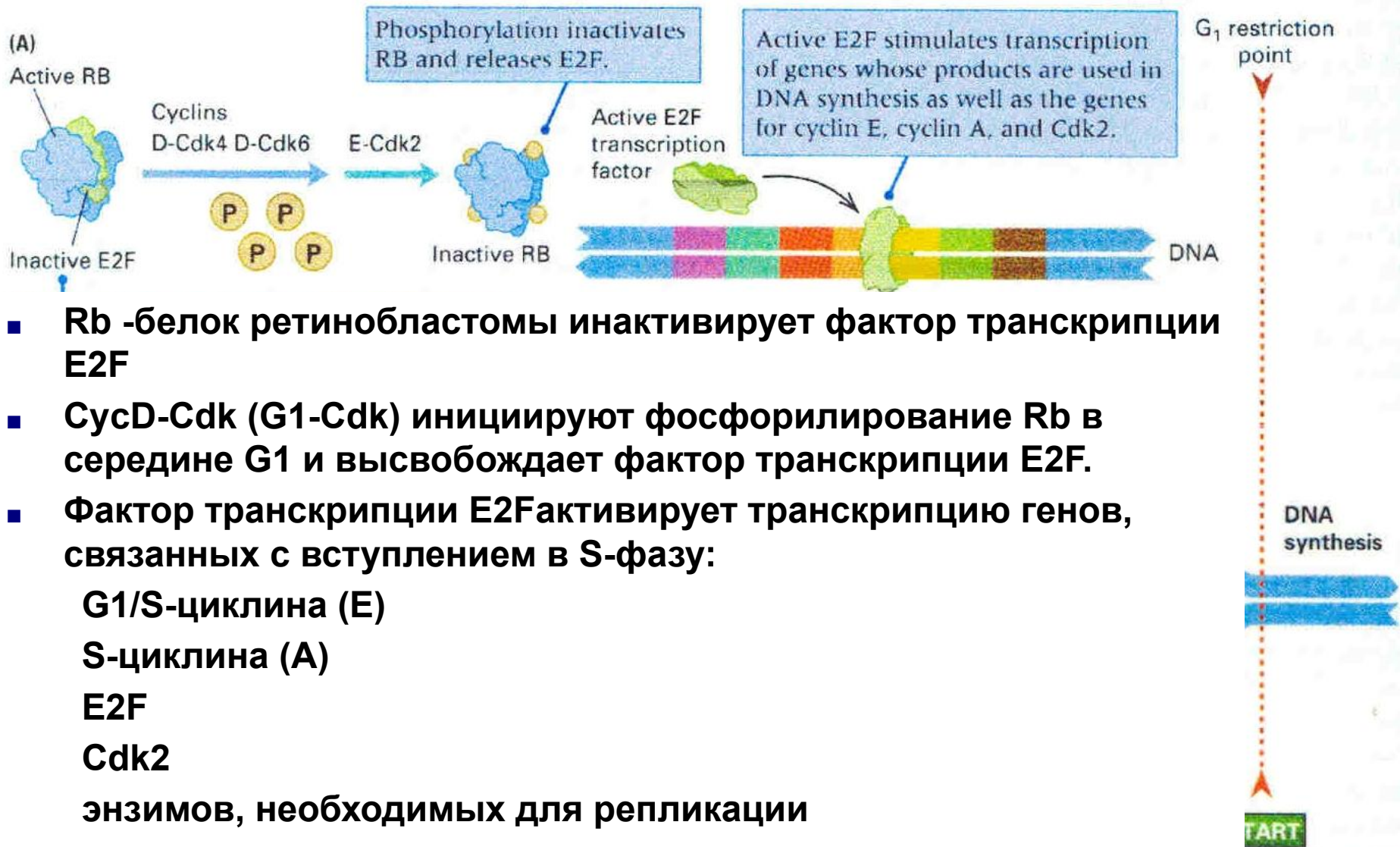


Для клетки многоклеточного организма существует R – точка рестрикции – аналог точки Старт. В ней клетка выходит в G₀ и ждет сигнала извне – ростового фактора – после чего перейдет к репликации.

Циклины:

- D - G₁
- E – G₁ /S переход
- A – S, G₂
- B – G₂, M

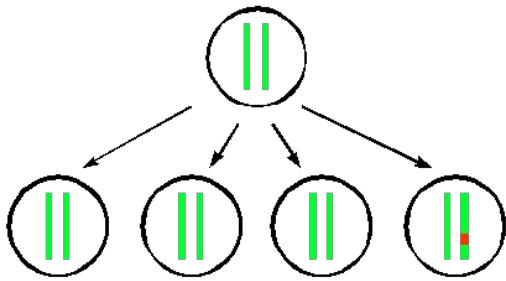
Роль Rb белка в контроле перехода G1-S у многоклеточных



- Rb -белок ретинобластомы инактивирует фактор транскрипции E2F
- СуcD-Cdk (G1-Cdk) инициируют фосфорилирование Rb в середине G1 и высвобождает фактор транскрипции E2F.
- Фактор транскрипции E2F активирует транскрипцию генов, связанных с вступлением в S-фазу:
 - G1/S-циклина (E)
 - S-циклина (A)
 - E2F
 - Cdk2
 - энзимов, необходимых для репликации

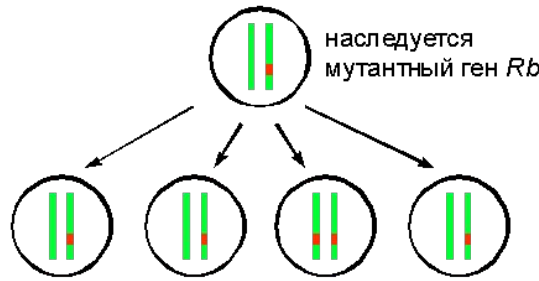
Схема мутирования гена *Rb* и образования наследственной и ненаследственной форм ретинобластомы у человека

а) Нормальный здоровый индивид



В одной из клеток спонтанно инактивируется один из нормальных аллелей гена *Rb*

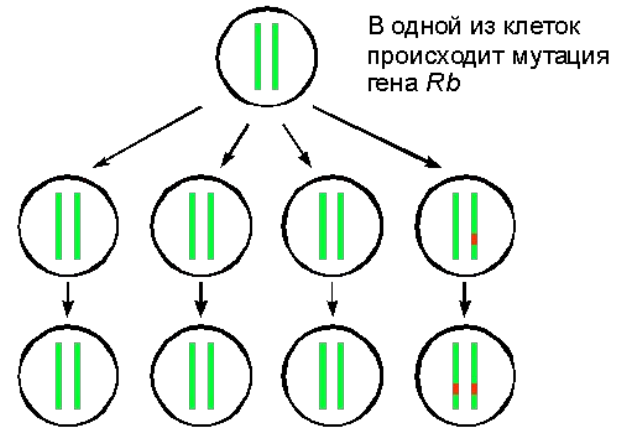
б) Наследственная ретинобластома



В клетке, гетерозиготной по аллелям *Rb*, происходит еще одна мутация *Rb*

Ускоренная клеточная пролиферация приводит к образованию ретинобластомы

в) Ненаследственная ретинобластома



В потомстве этой клетки иногда мутирует второй ген *Rb*

Ускоренная клеточная пролиферация приводит к образованию ретинобластомы

Белок *Rb* – опухолюсупрессор, супрессор опухолей.

Мутации с потерей функции

Результат: опухоль не образуется

Результат: у большинства индивидуумов с наследуемой мутацией образуется опухоль

Результат: только у одного индивидуума из 3000 нормальных людей формируется опухоль

Инициация репликации ДНК у *S.cerevisiae*

Основные участники

ORC-origin recognition complex

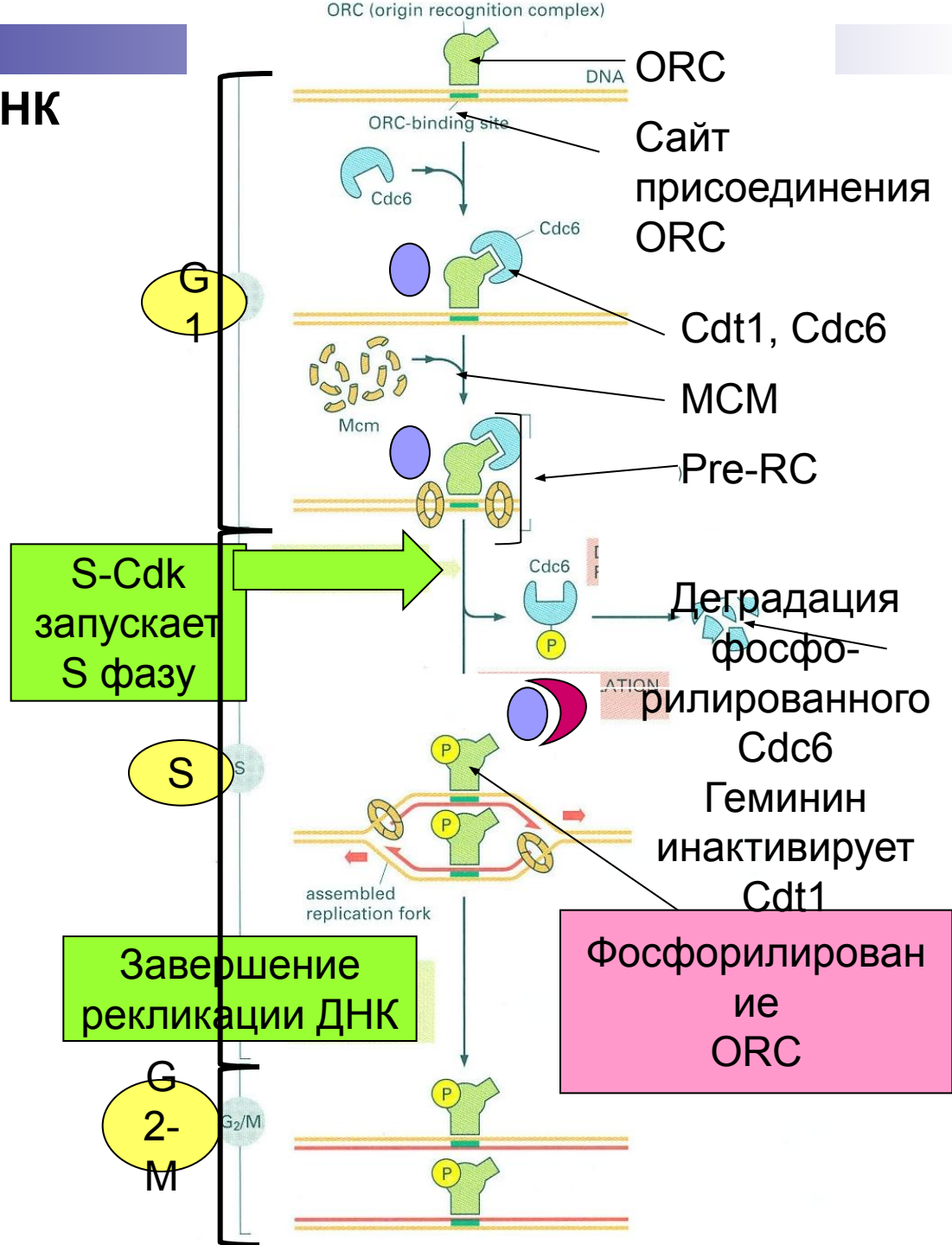
(6 белков: *orc1-orc6*)-прикреплен к *ori* в течение всего цикла

Cdc6- регуляторный белок, прикрепляется к ORC в начале G1 (фактор, вводящий геликазу)

Cdt1/Double-parked- нужен для введения геликазы

Mcm 2-7-белки – регуляторные близкородственные белки, часть пререпликативного комплекса pre-RC (гексамерная ДНК-геликаза)

S-Cdk циклин S-зависимая киназа



Компоненты организации репликации

ORC комплекс из 6 белков

Cdc7 CDK

Cdc6- нестабилен у дрожжей ($T_{1/2}=5$ мин), появляется в G1

Cdt1

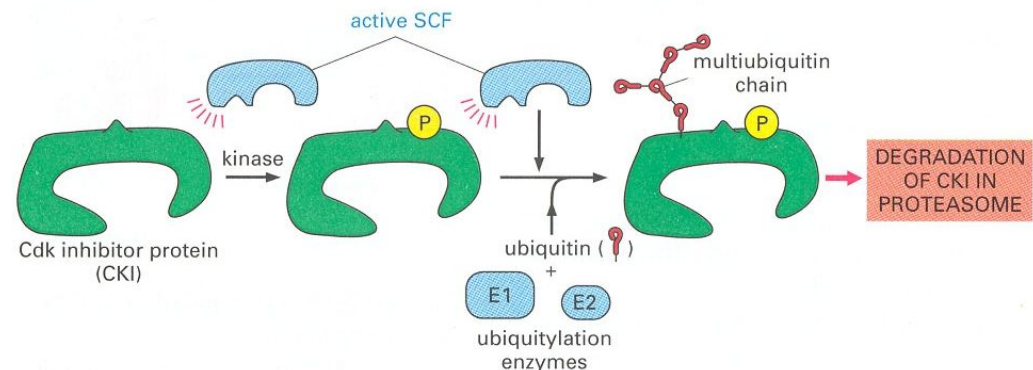
MCM (мутанты, не способные к репликации)

Geminin у многоклеточных разрушаются в метафазе под воздействием APC

Cyclin

Мутанты в системе протеолиза белков (лицензирующего фактора), накапливается избыточная ДНК (повторно реплицируется)

(A) control of proteolysis by SCF



Предотвращение повторной репликации

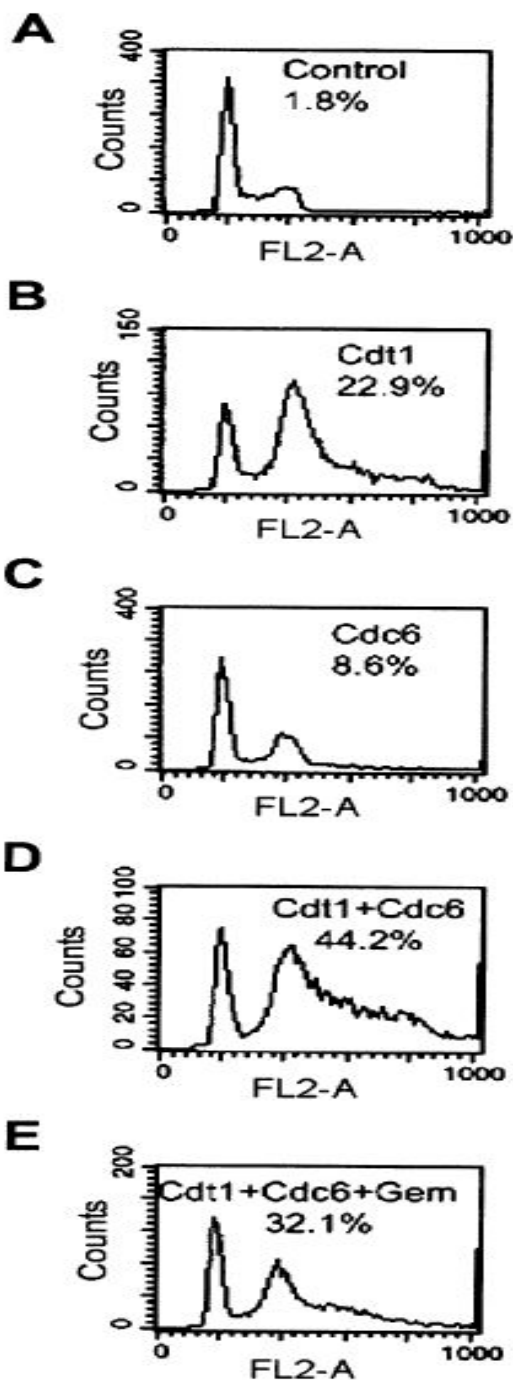
S-Cdk:

- запускает репликацию ДНК
- фосфорилирует **Cdc6**, он отделяется от ORC- предотвращение репликации с этого *ori*. Фосфорилированный Cdc6 узнается комплексом SCF, убиквитинизируется.
- фосфорилирует **Mcm**-белки , это вызывает их экспорт из ядра – гарантия того, что комплекс **Mcm** больше не соберется
- -фосфорилирует **Cdt1**

Geminin у многоклеточных накапливается в S, G2, M

Связывается - инактивирует **Cdt1** и препятствует повторной сборке пререпликативного комплекса -лицензированию репликации

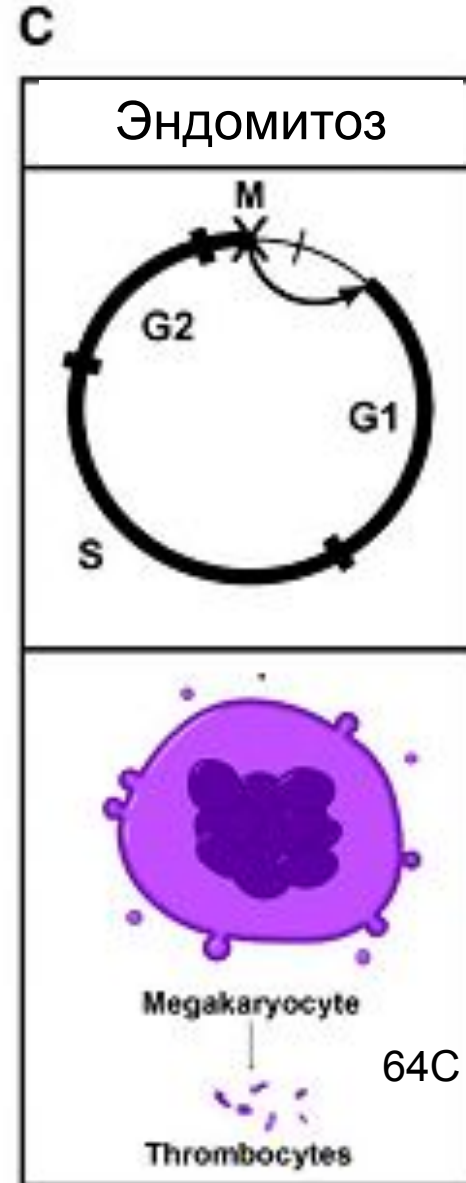
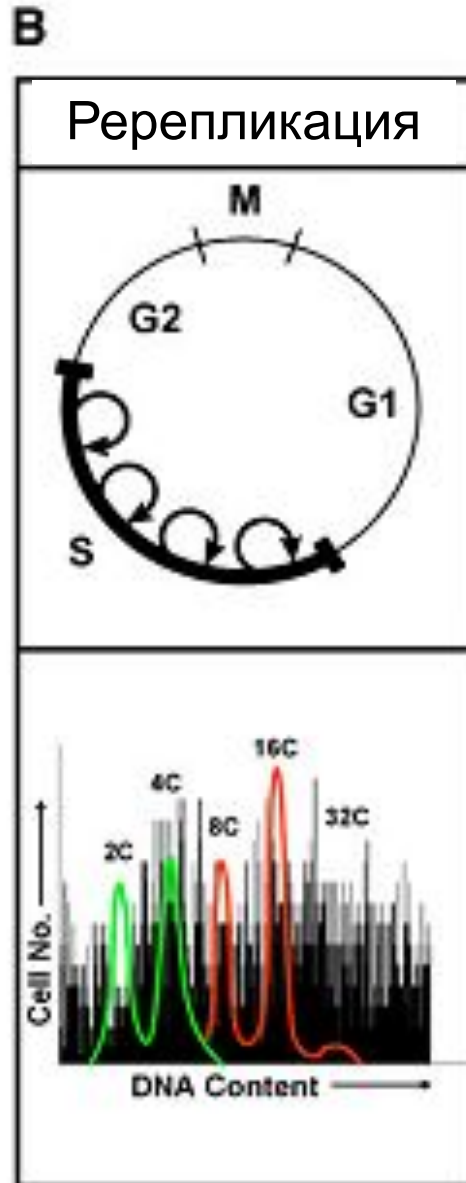
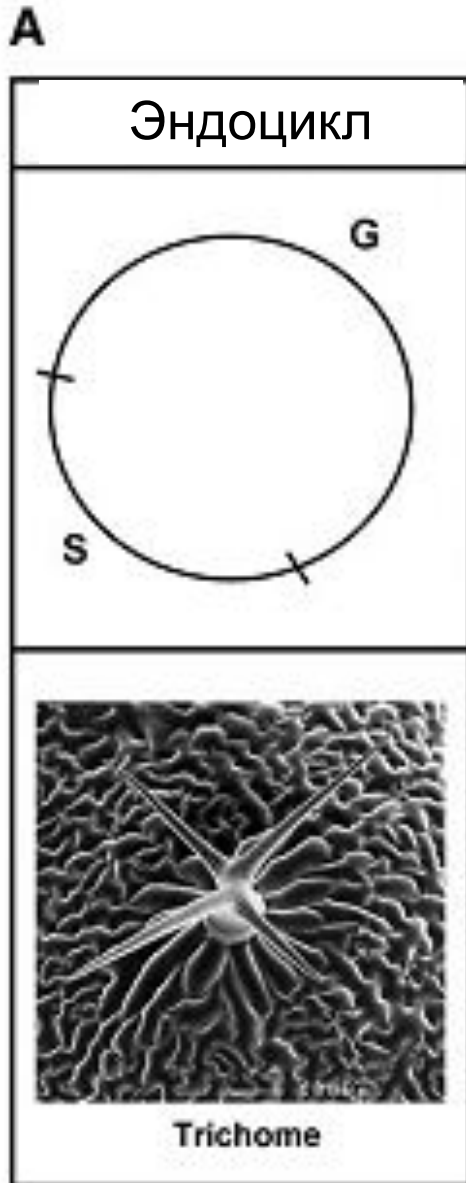
- RESET: в конце митоза активность всех **Cdk** падает до нуля.
- Cdc6** и **Mcm**-белки и **Cdt1** дефосфорилируются,.
- Геминин** и все **циклины E, A и B** разрушаются с помощью **APC**.
- pre-ORC может собираться снова



Overexpression of Cdt1 and Cdc6 Shows the Appearance of Cells with Greater than 4n DNA Content
(A–E) FACS analyses of H1299 cells infected with adenoviruses expressing indicated proteins. Left panels: histograms of cells stained with propidium iodide for DNA content. y axis, cell count; x axis, propidium iodide fluorescence.

**Molecular Cell, Vol. 11, 997–1008, April, 2003,
 Copyright © 2003 by Cell Press
 A p53-Dependent Checkpoint
 Pathway Prevents Rereplication**

Формы эндополиплоидии

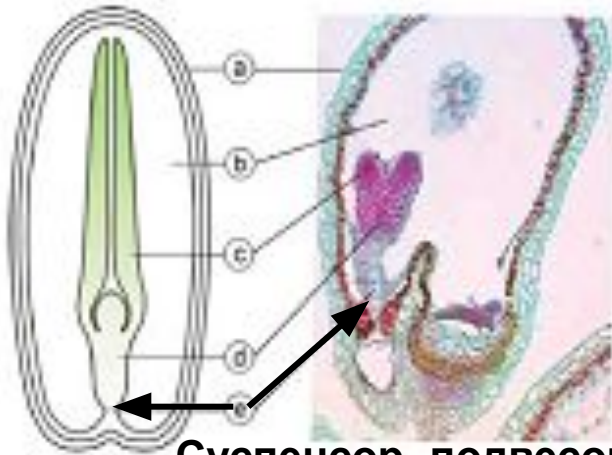


Маркер митоза- фосфо Н3 Достигают метафазы, но нет цитокинеза

H.O.Lee, J.M.Davidson & R.J.Duronio, 2009

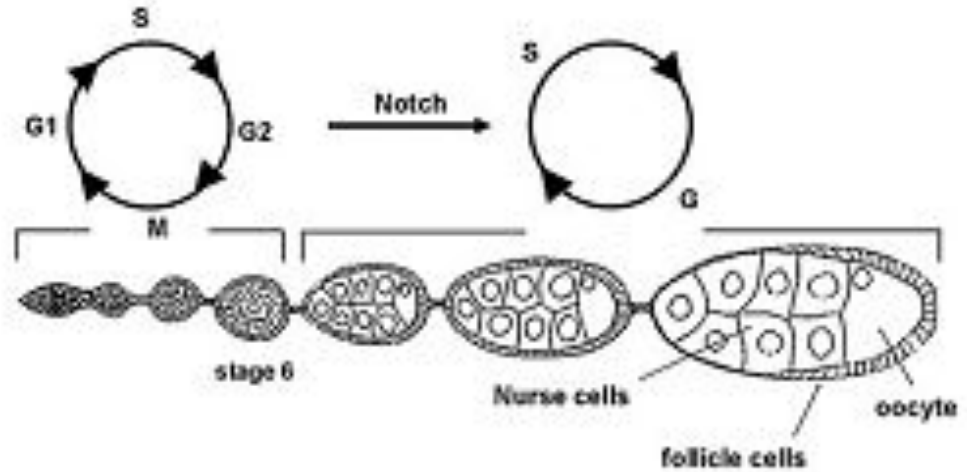
Примеры тканей, имеющих эндоцикл

A Plant embryo

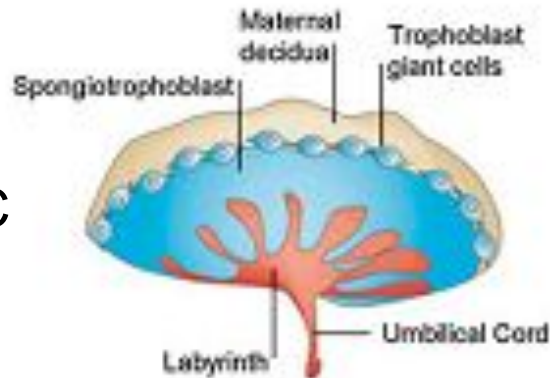


Суспенсор- подвесок

B *Drosophila* ovariole

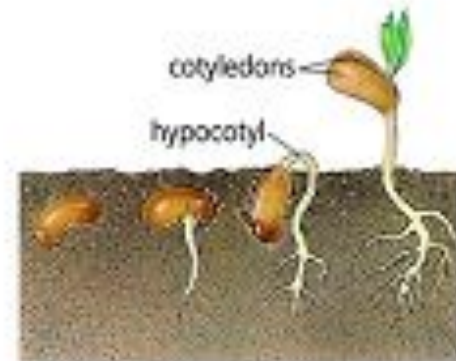


C Trophoblast giant cells mediate implantation



До 1000С

D Hypocotyl

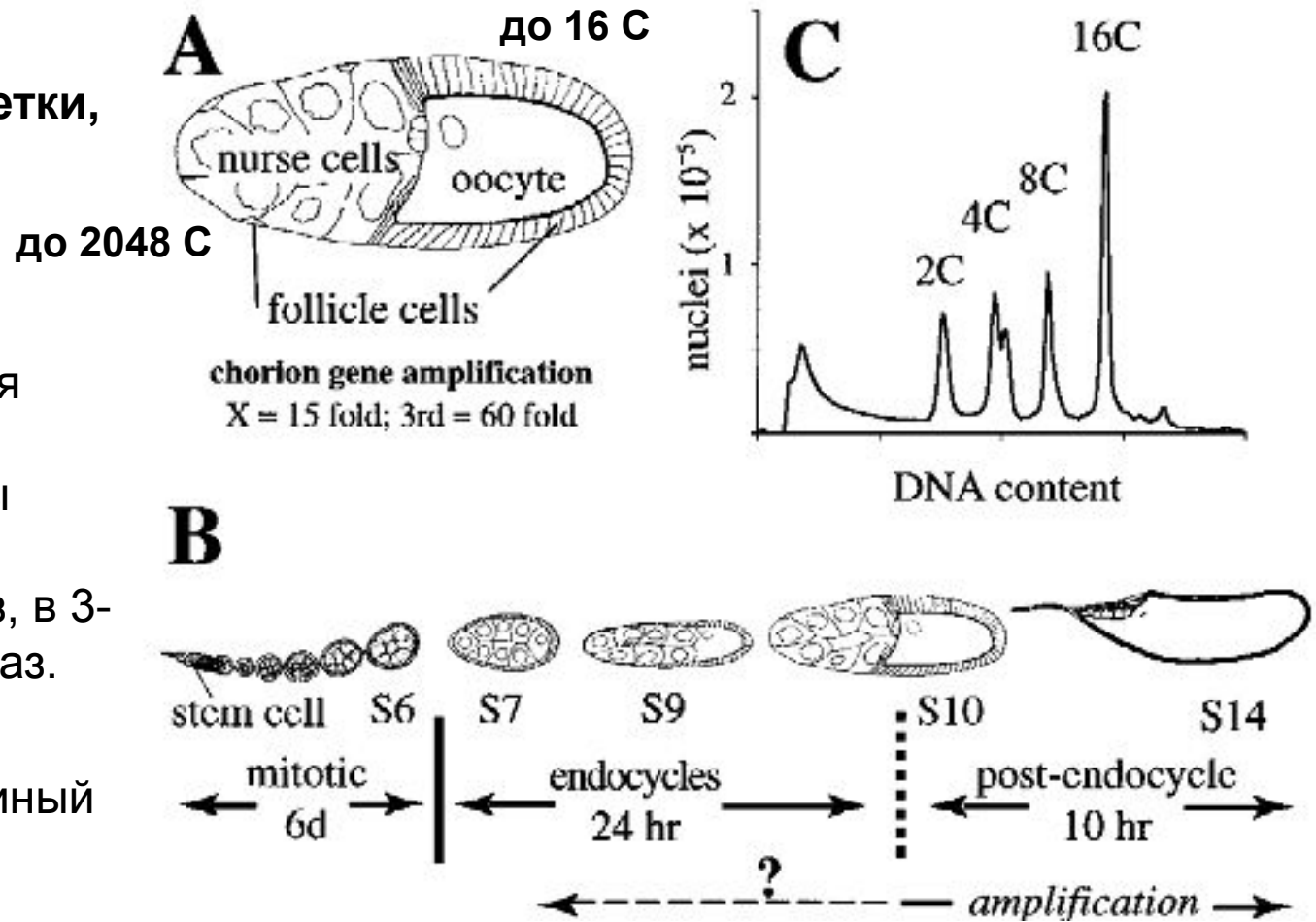


**Фолликулярные клетки,
о окружающие ооцит:**

МИТОЗЫ,
эндоциклы,
амплификация.

Полипloidизируются
(до 16 C), потом
амплифицируют гены
белков хориона: в X-
хромосоме – в 15 раз, в 3-
й хромосоме – в 60 раз.

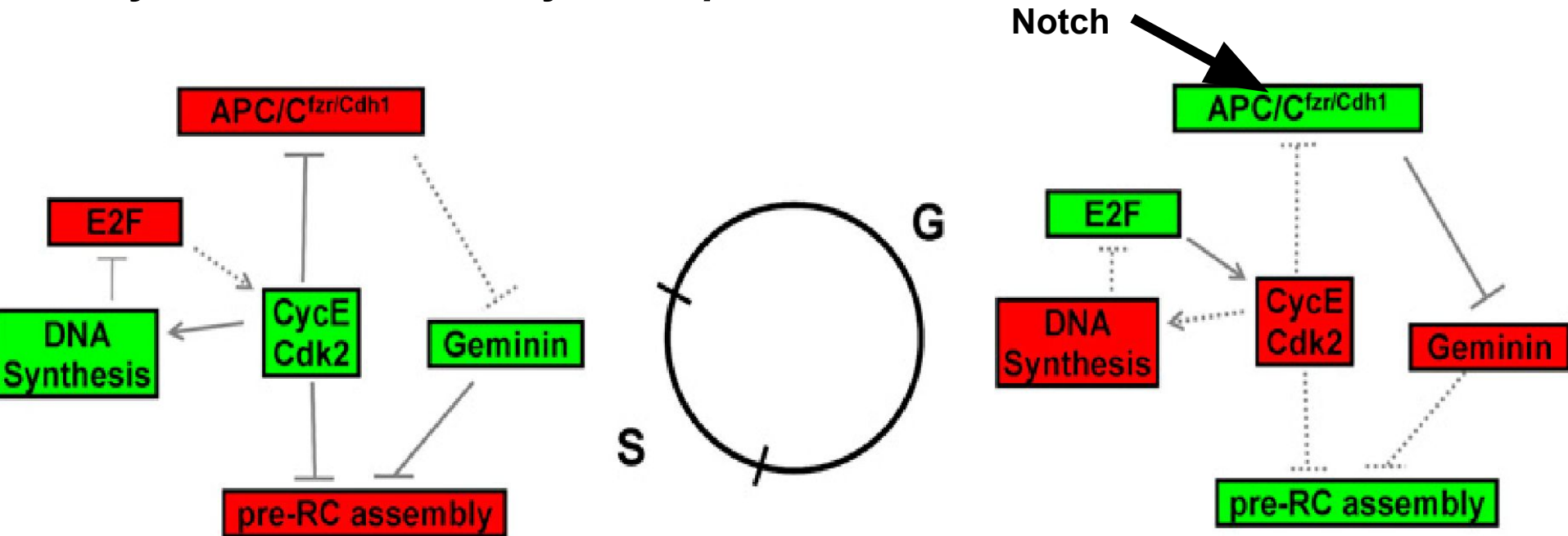
Для амплификации
требуется дрозофилиный
гомолог белка ORC2



B.R.Calvi, M.A.Lilly & A.C.Spradling, 1998

H.O.Lee, J.M.Davidson & R.J.Duronio, 2009

Регуляция эндоцикла у *Drosophila*



Зеленым цветом отмечены активные компоненты, красным - репрессированные

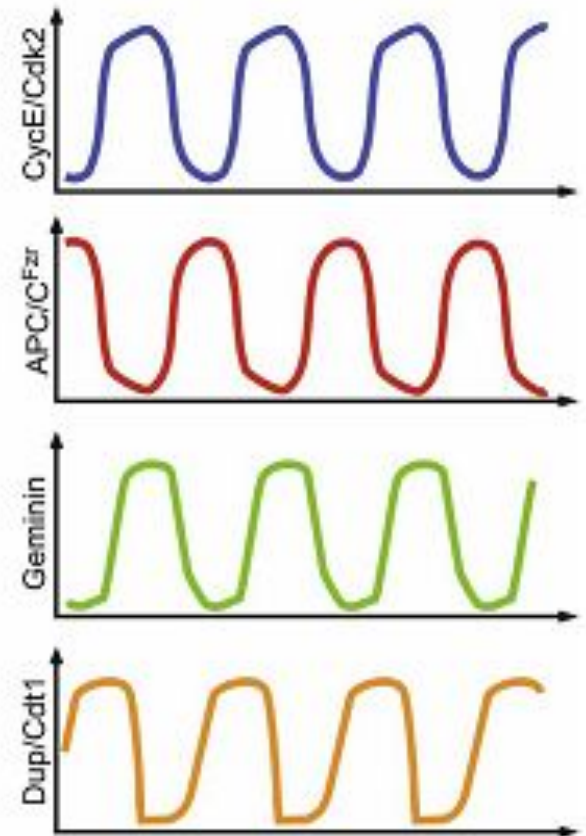
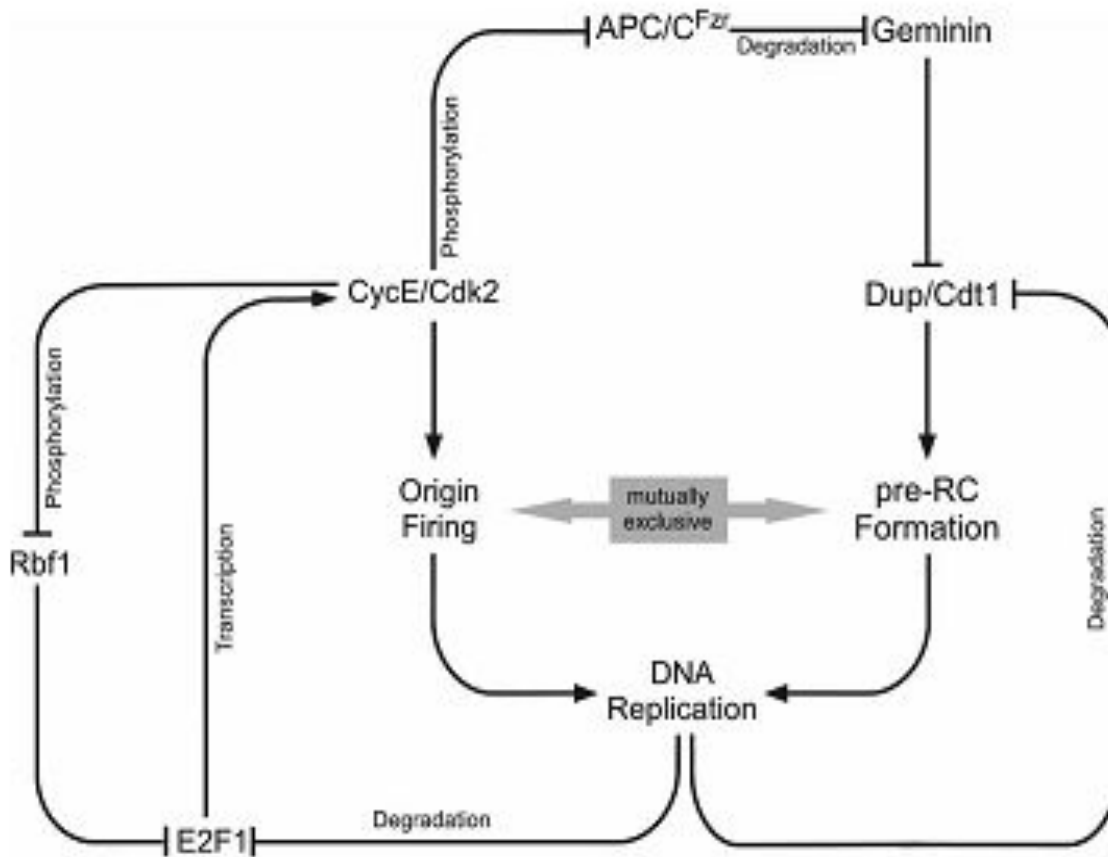
Белки, активирующие APC: fizzy (**fzy/Cdc20**) – в метафазе, fizzy-related (**fzr/Cdh1**) – в анафазе и далее в G1

Notch индуцирует транскрипцию **fzr/Cdh1**, репрессирует экспрессию **string/cdc25**, **p21/p27**-ингибитора S-Cdk

Drosophila Cki Дасаро инактивирует S-Cdk

Эндопликация

Циркуляция CysE/Cdk2 и активного APC, циклинов А и В нет



pre-RC Formation	+	-	+	-	+	-	+
Origin Firing	-	+	-	+	-	+	-

S.Y.Park & M.Asano,
2008

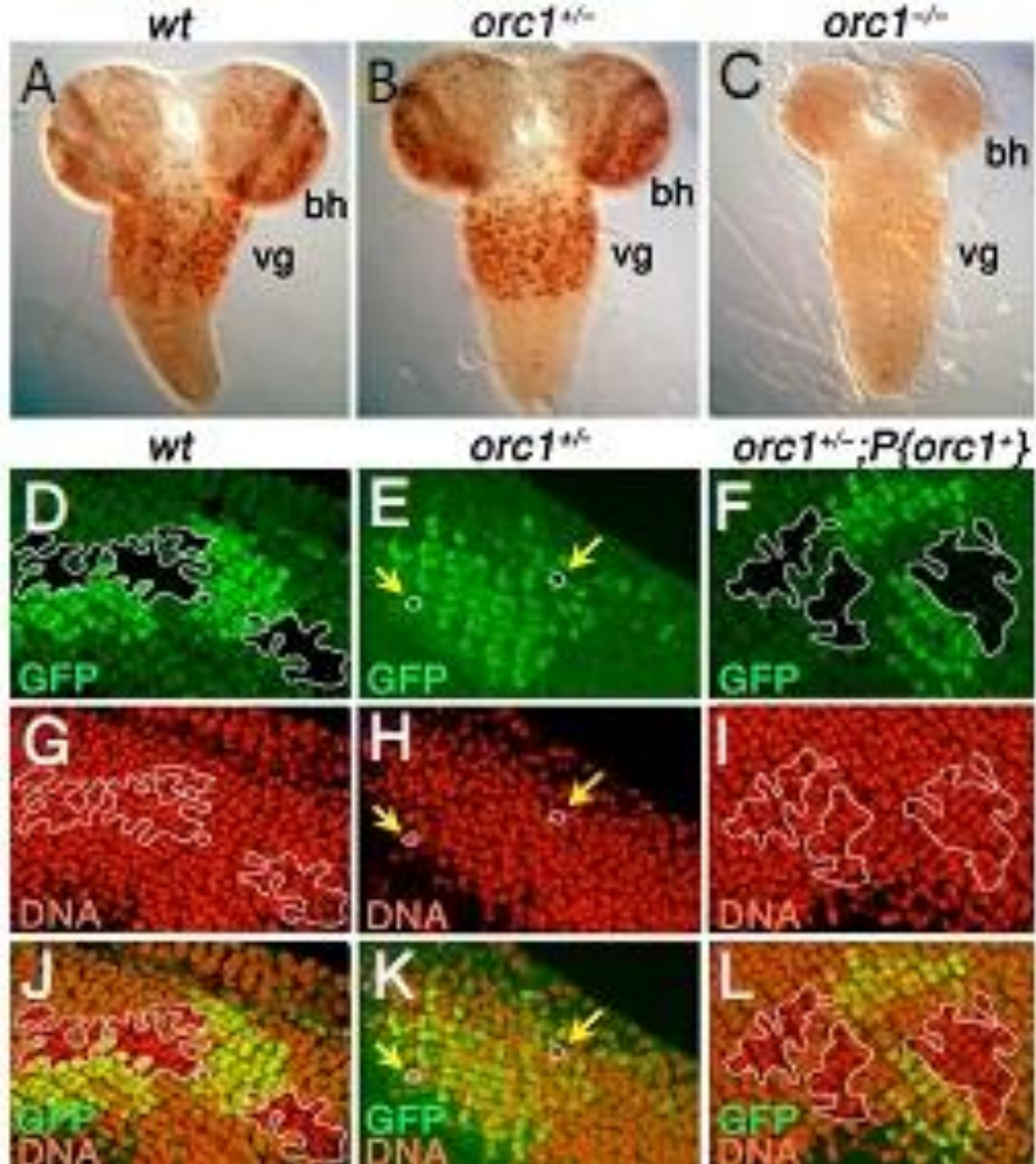
Orc1 необходим для
пролиферации.

A,B,C- включение BdU
в нервные ганглии
личинок,

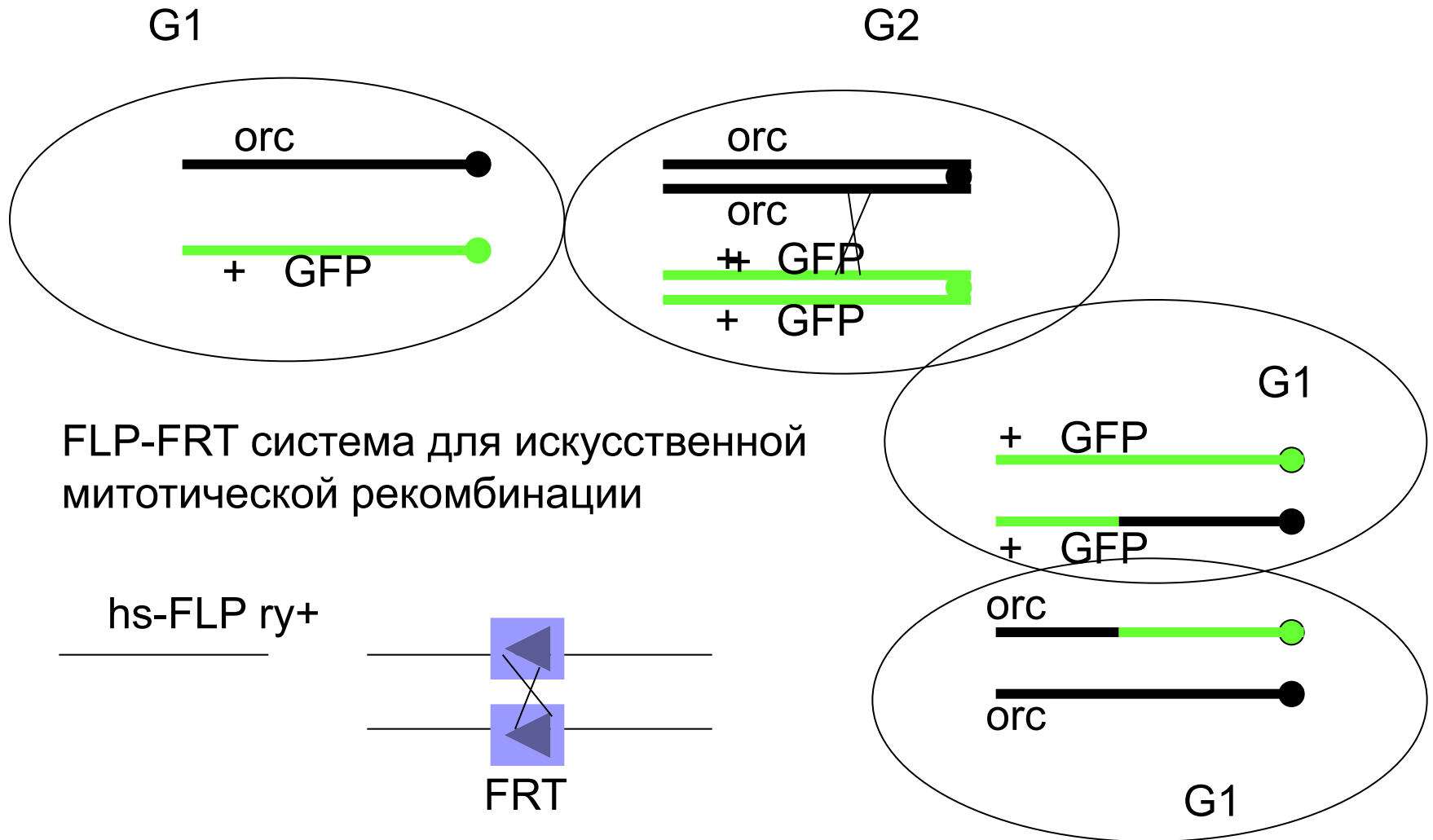
wt- дикий тип

D,E,F – FRT-
индуцированные
клоны в глазо-
антеннальном диске
GFP/+

G,H,I - включение BdU
в те же клоны



Явление соматического кроссинговера используют для тестирования мутаций





Orc1 необходим для амплификации

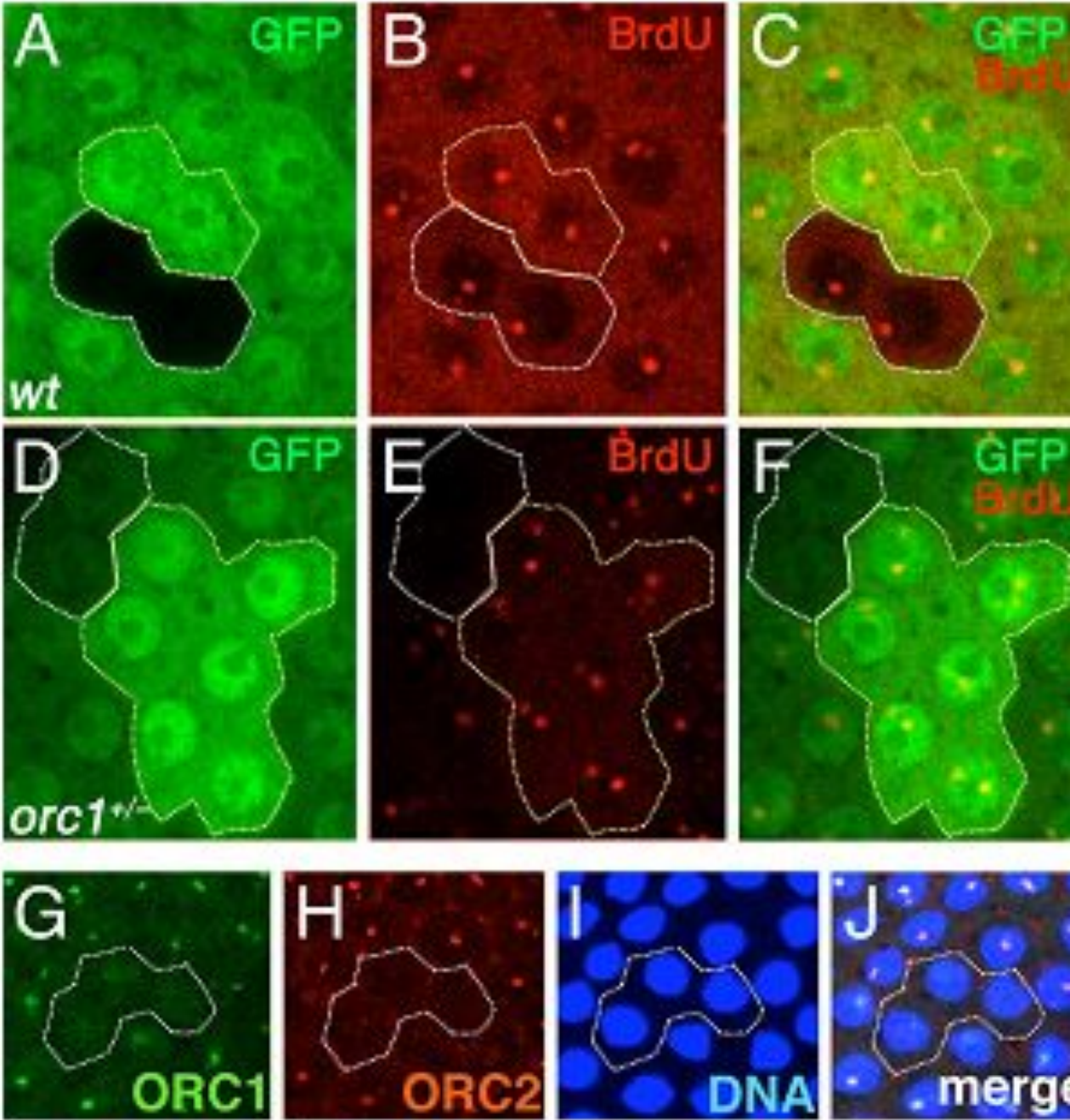
(A-F) Two-cell *orc1*^{-/-} somatic clones of ovarian follicle cells (stage11) generated in WT (A-C) and *orc1*^{+/-} heterozygous (D-F) flies.

GFP (-/-) or GFP (+/+) clones are outlined.

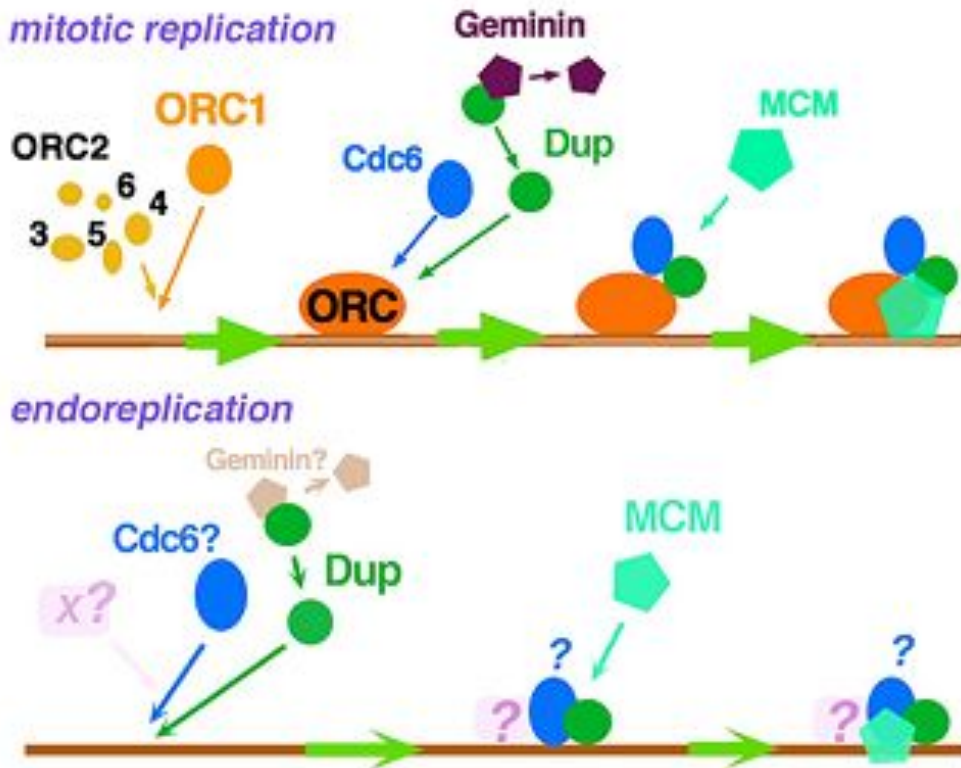
DNA synthesis occurs only at the specific amplification loci at this stage of oogenesis.

(G-J) Histochemical analyses of ORC1(G), ORC2(H), and DNA(I). A 3-cell/ somatic clone was generated in an *orc1*^{+/-} heterozygote. Note that ORC2 also

fails to localize to the amplification loci in *orc1*^{-/-} cells.



S.Y.Park & M.Asano,
2008



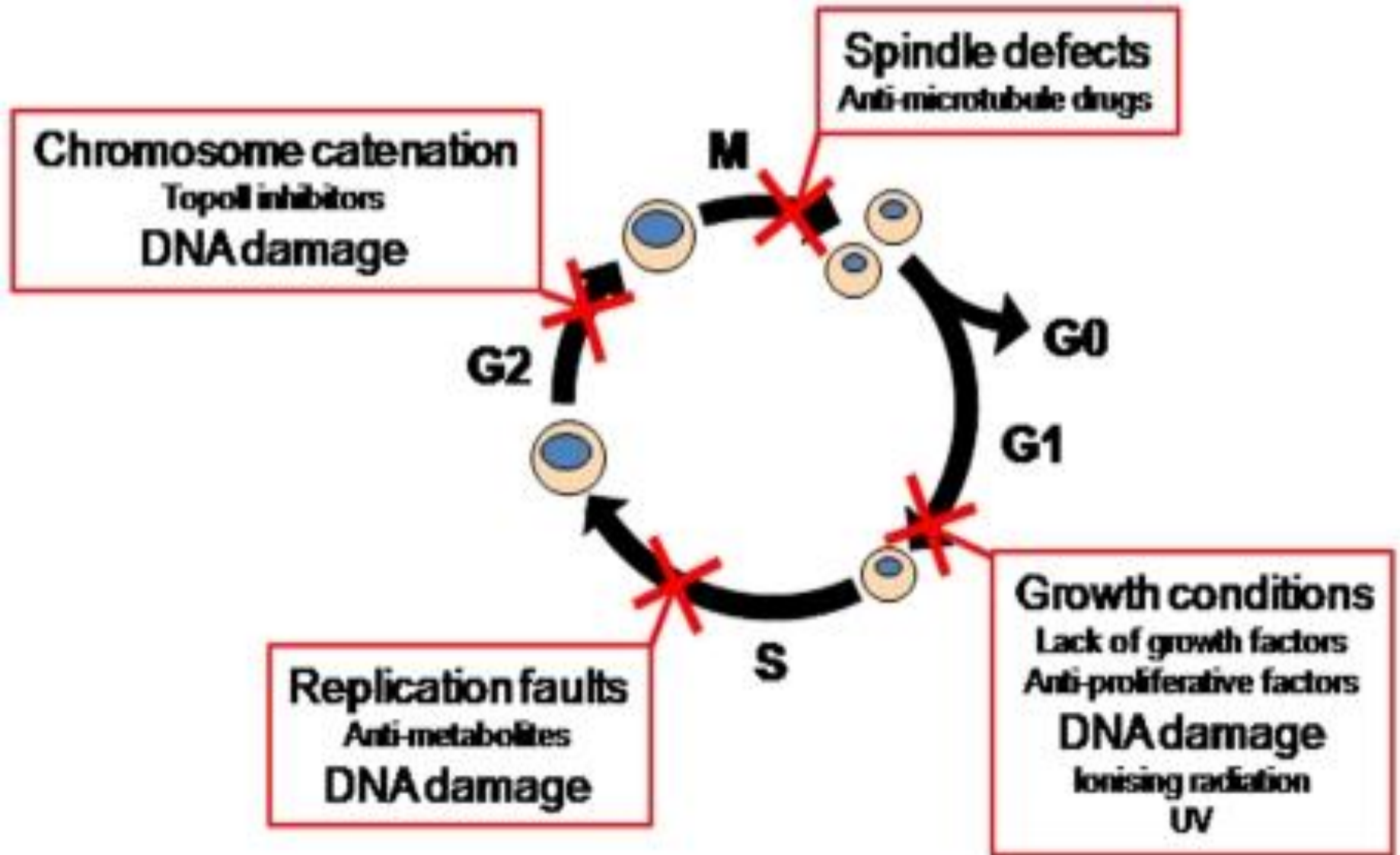
Для эндорепликации не нужны белки *orc1, 2*, вероятно, существуют другие, которые их заменяют в эндоциклах. У арабидопсиса два близких белка для митоза и эндорепликации *orc1a* и *orc1b*

Для пролиферации клеток и амплификации генов хориона белки *orc1, 2* необходимы

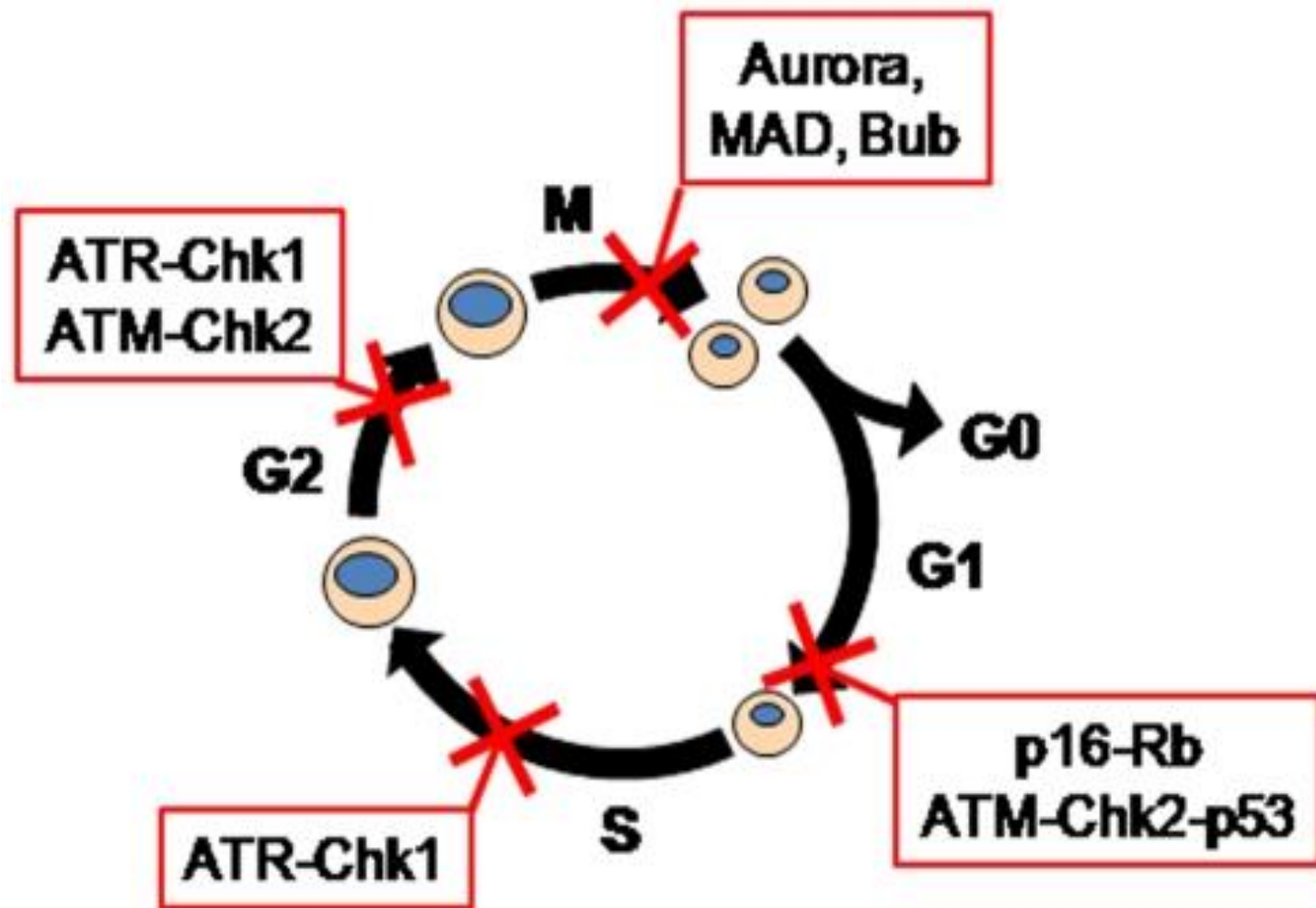
Точки контроля клеточного цикла



Что вызывает активацию точек контроля ?



Какие структуры работают в точках контроля ?



Изучение точек контроля у дрожжей:

Получение условных мутагенчувствительных мутаций

- Обработка слабой дозой радиации (мутации *rad*)
- веществами, блокирующими репликацию (гидроксимочевина) (мутации *hus*)
- веществами, блокирующими сборку веретена деления (мутации *mad* - mitotic arrest deficient, мутации *bub* - budding uninhibited by benzimidazole)

Селекция мутантов с неправильной реакцией на обработку (не останавливали клеточный цикл)

Обычная структура точки контроля

Сенсор

Передача сигнала

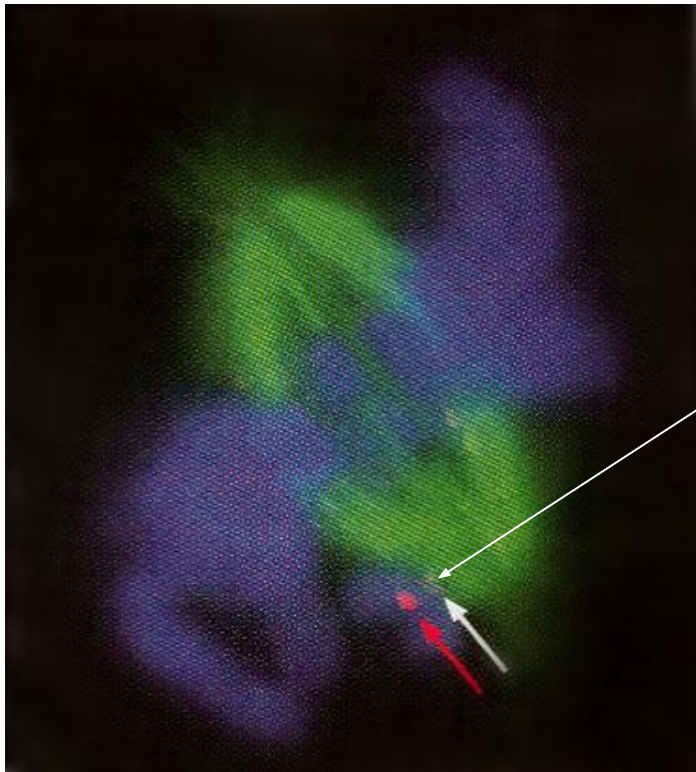
Эффекторная часть

- Остановка клеточного цикла
- Исправление повреждения
- Апоптоз у многоклеточных

Точка контроля: переход М-А

Обработка колхицином, винбластином останавливает клетку в метафазе на часы.

Хромосомы должны быть прикреплены к веретену: распознаются неприкрепленные кинетохоры и кинетохоры со слабым натяжением (прикреплены к одному полюсу)



К неприкрепленному кинетохору присоединяется белок **Mad2** - ингибируется Cdc20-APC и деструкция секурина

Mad2 - α -субъединица изопренил-трансферазы,

Точки контроля клеточного цикла. Переход М-А

- дефект веретена
- дефект полюсов (в т.ч. нереплицированная centrosoma)
- дефект кинетохоров

К неприкрепленному кинетохору присоединяется белок Mad2, ингибирует Cdc20-APC

Мутации:

mad- metaphase arrest deficient,

bub – budding uninhibited Benzimidazole

Кинетохорный белок **Bub1** (киназа):

запускает сборку компонентов кинетохора (**BubR1, CENP-F**),

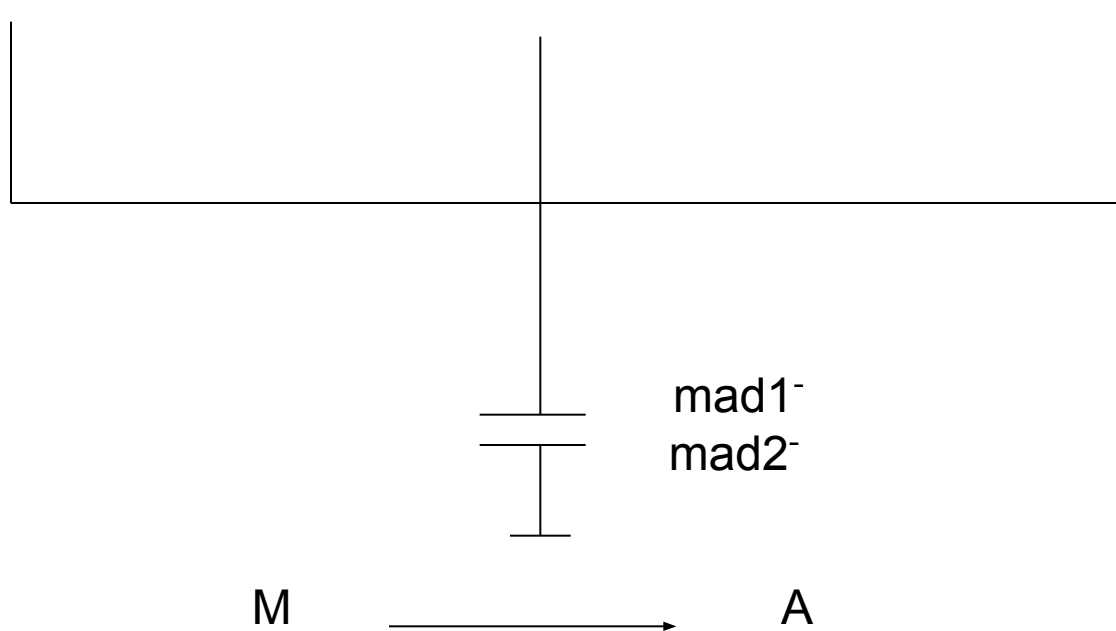
Контролирует правильное формирование кинетохора.

Структура точки контроля M-A у *S.cerevisiae*

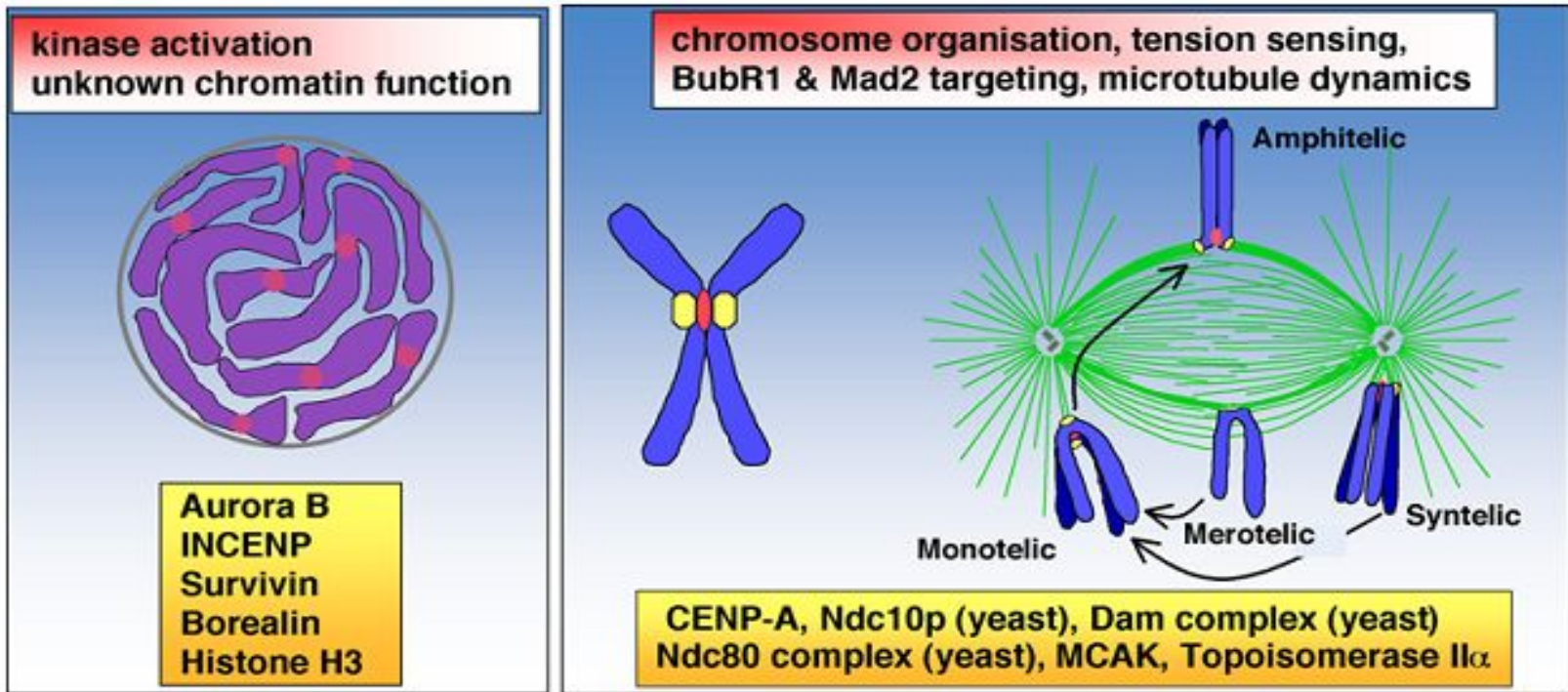
Дефект
микротрубочек

Дефект Spindle pole
bodies (аналогов
центросом)

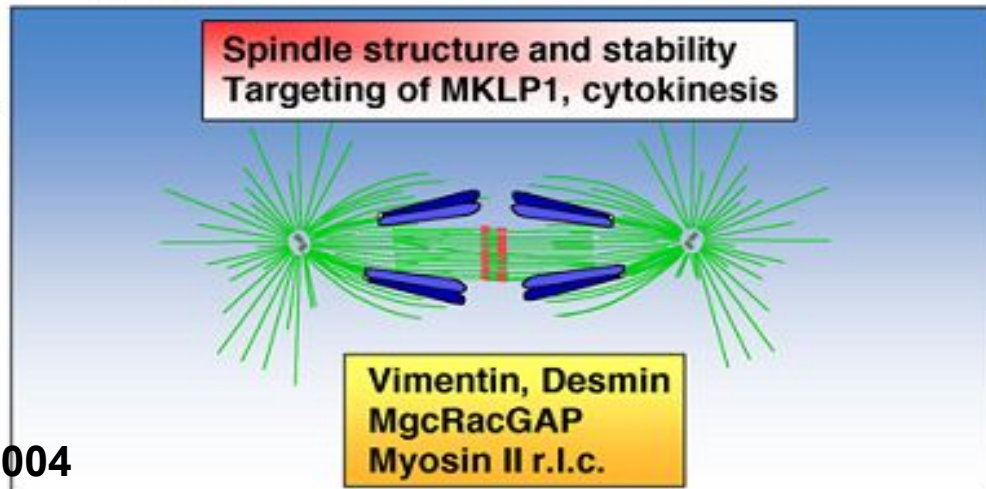
Дефект
кинетохоров



Участие белков CPC- chromosomal passenger complex в точке контроля M-A

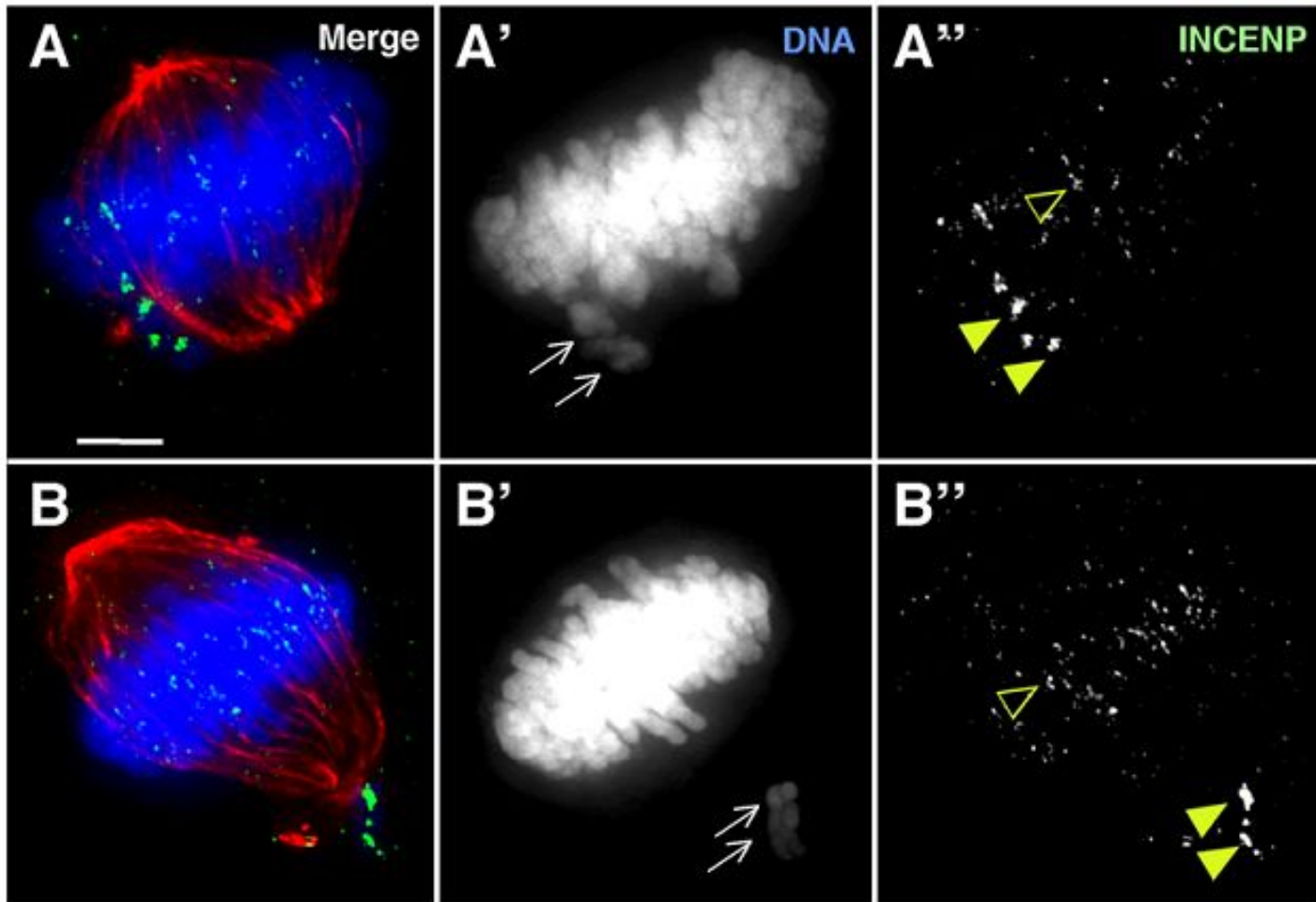


- Chromosomal passengers
- Nuclear lamina
- Microtubules
- Chromosomes
- Kinetochores



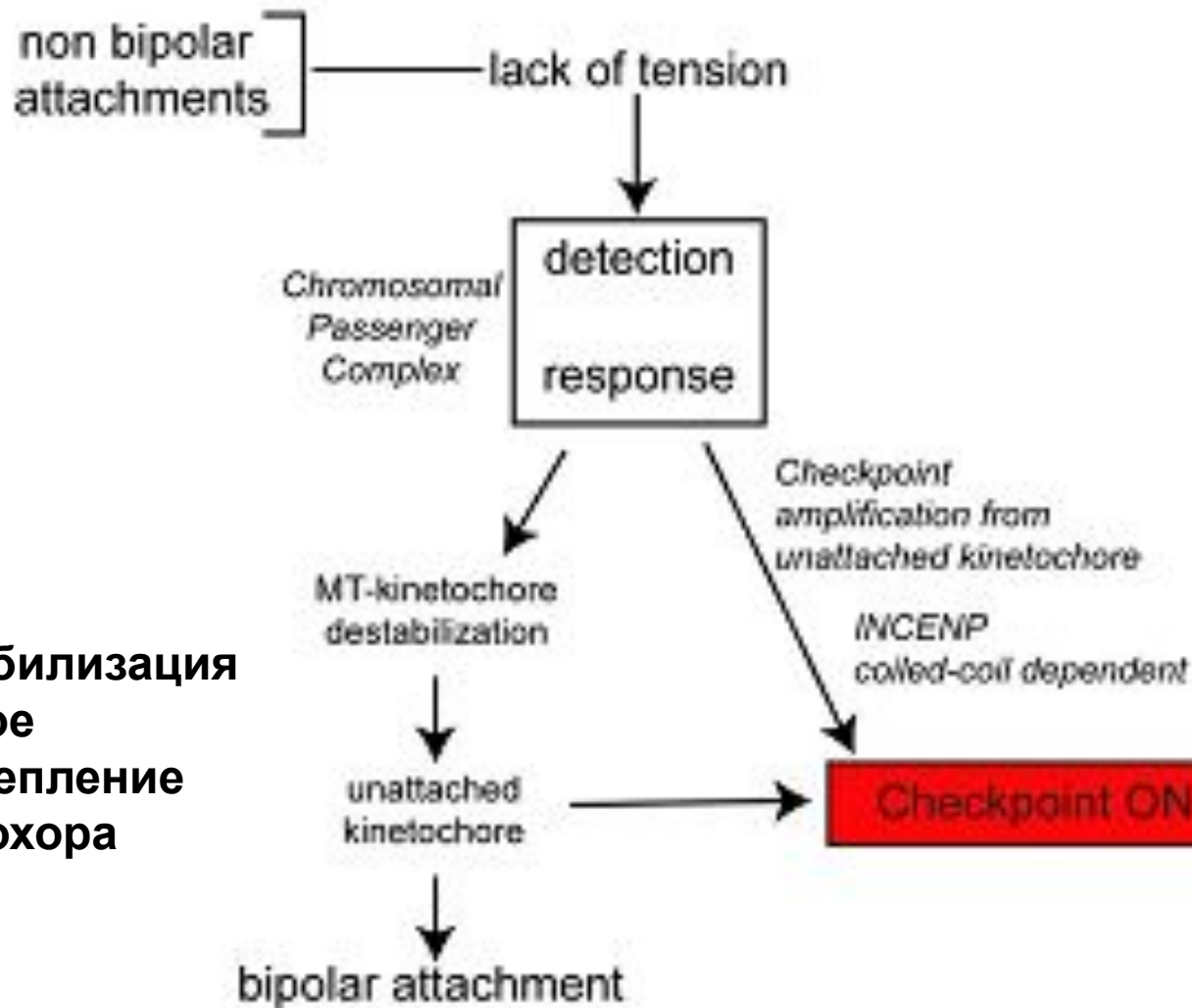
Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK)

CPC- chromosomal passenger complex



INCENP в клетках He LA. Метафазы с нарушением построения хромосом. Яркий сигнал на центромерах (стрелки)

Роль CPC в точке контроля веретена



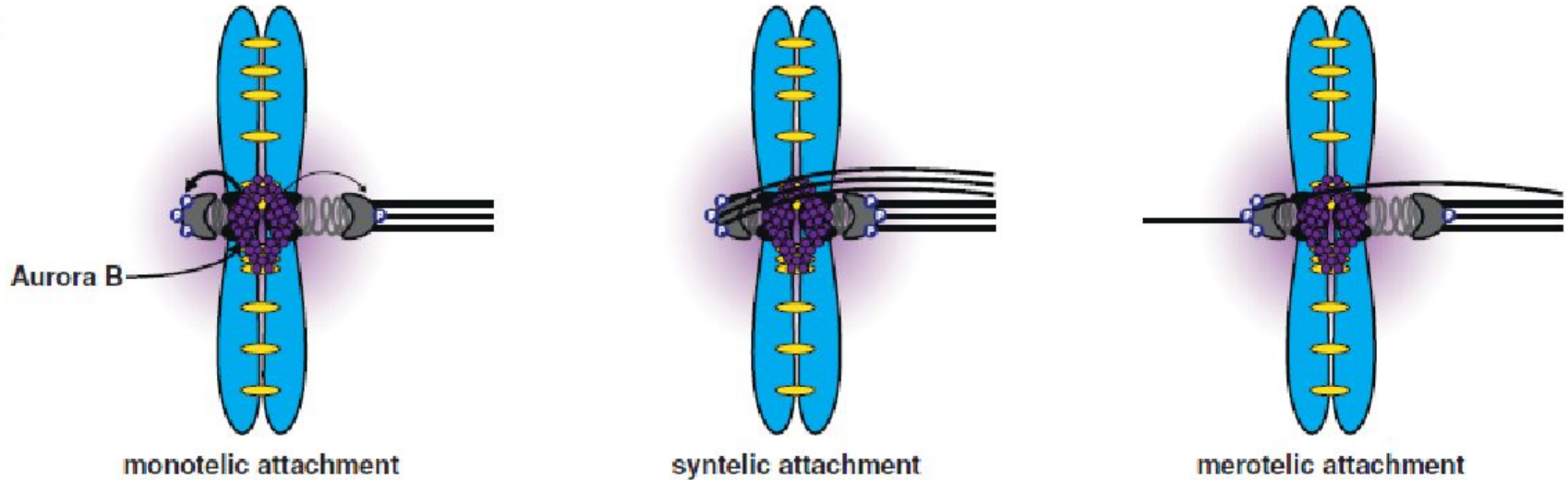
Дестабилизация
и новое
прикрепление
кинетохора

Сигнализация о
нарушении,
остановка
деления

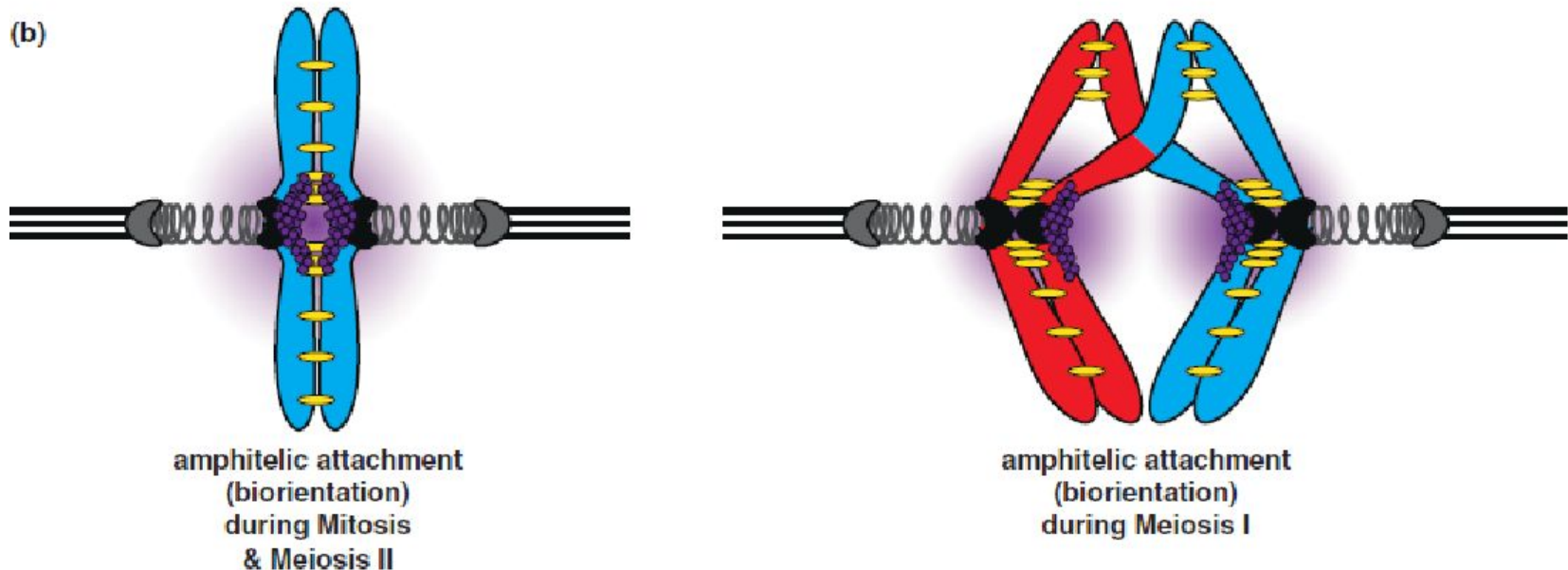
Meiosis I: when chromosomes undergo extreme makeover

Matthew P Miller^{1,2,3}, Angelika Amon^{1,2} and Elçin Ünal^{1,2}

(a)



(b)



Meiosis I: when chromosomes undergo extreme makeover

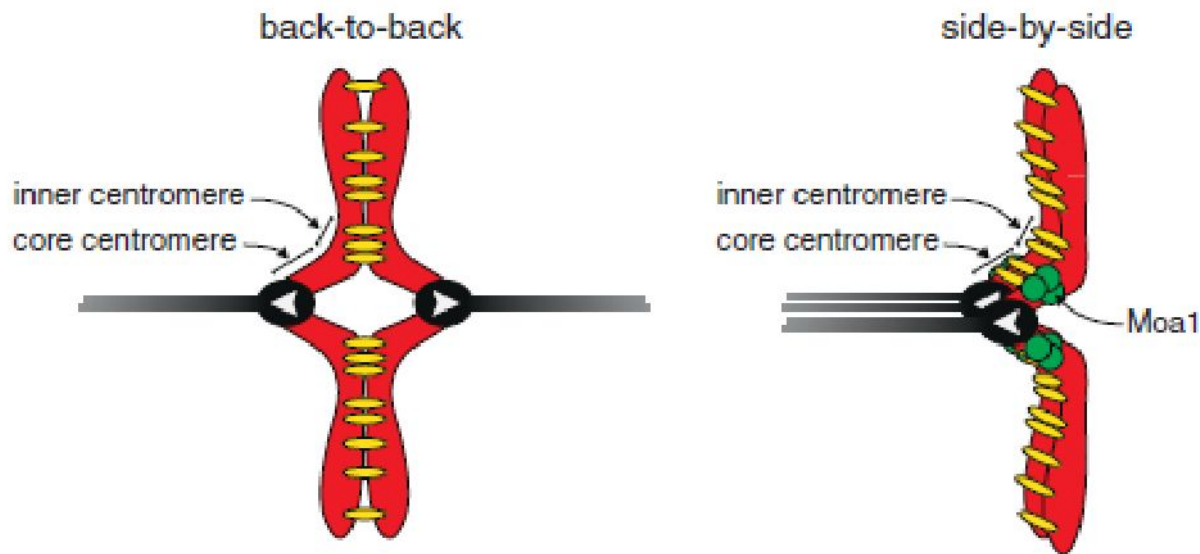
Matthew P Miller^{1,2,3}, Angelika Amon^{1,2} and Elçin Ünal^{1,2}

Aurora B selectively destabilizes microtubule attachments that fail to generate tension. **(a)** The pulling forces exerted by spindle microtubules attached to the kinetochore are resisted by linkages between sister chromatids, mediated by the cohesin complex (yellow). This results in tension across the kinetochores of sister chromatids. Microtubule attachments that fail to generate tension are selectively destabilized by the kinase Aurora B, which is concentrated at the inner centromere (purple circles). Phosphorylation of outer kinetochore components by Aurora B severs microtubule attachments. Thus, nontension generating attachments are destabilized due to outer kinetochore substrates being in close proximity to Aurora B. Monotelic attachment (left) is the state when only one of the two sister kinetochores is attached to kinetochore microtubules. Syntelic attachment (middle) is a condition in which both sister kinetochores become attached to microtubules from the same pole. Merotelic attachment (right) is when a single kinetochore becomes attached to microtubules from both spindle poles. Purple gradient represents Aurora B phosphorylation gradient. P represents Aurora B-dependent phosphorylation of outer kinetochore components. **(b)** Tension promotes stable microtubule-kinetochore interactions through spatial separation of Aurora B from kinetochore substrates. Correct amphitelic (bioriented) attachments result in stable microtubule-kinetochore interactions by positioning/pulling the kinetochore substrates away from Aurora B. Biorientation is promoted by Aurora B in both mitosis and meiosis. In mitosis and meiosis II (left), tension occurs across the kinetochores of sister chromatids, while in meiosis I (right), tension occurs across the kinetochores of homologous chromosomes.

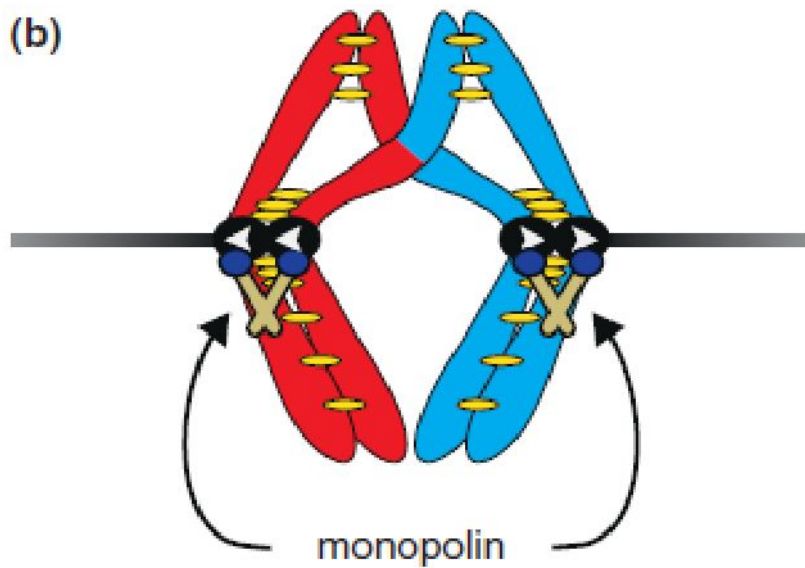
Current Opinion in Cell Biology 2013, **25**:687–696

(a)

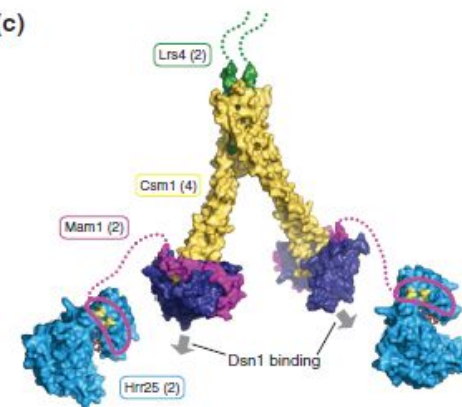
Kinetochores geometry



(b)

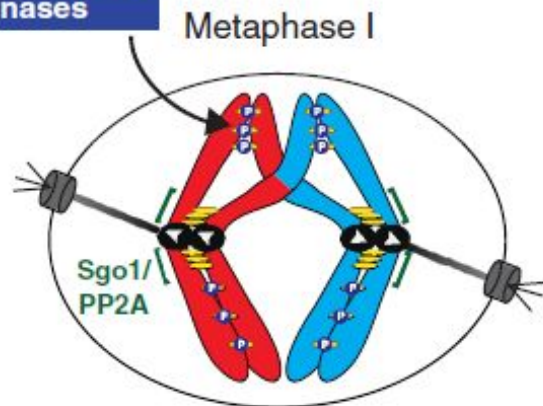


(c)

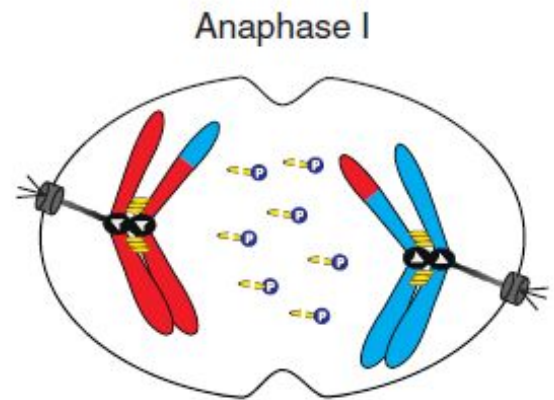
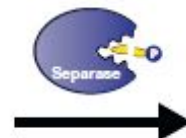


(a)

Polo, CK1, DDK
kinases

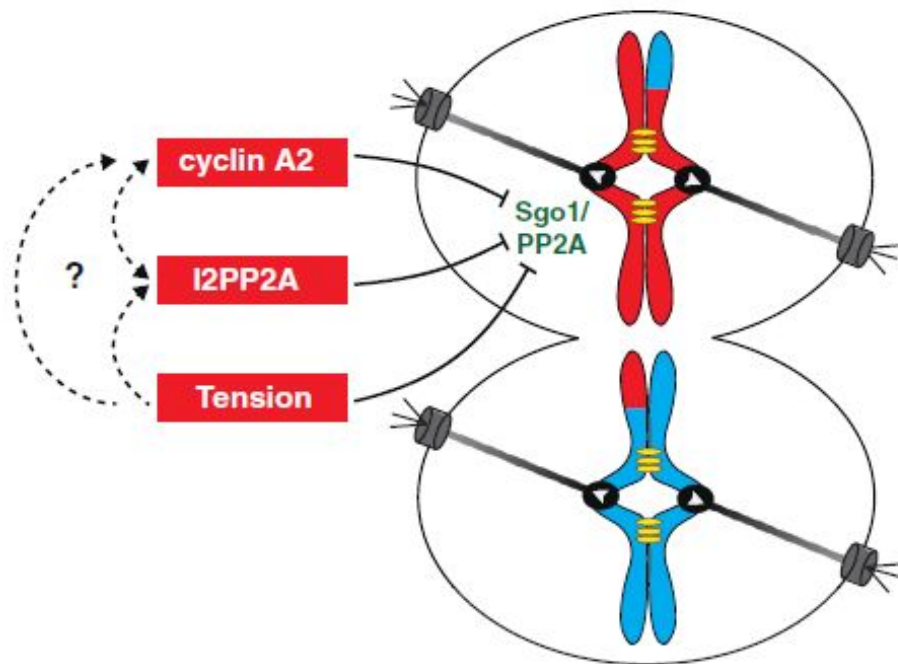


Rec8-containing cohesin (○)

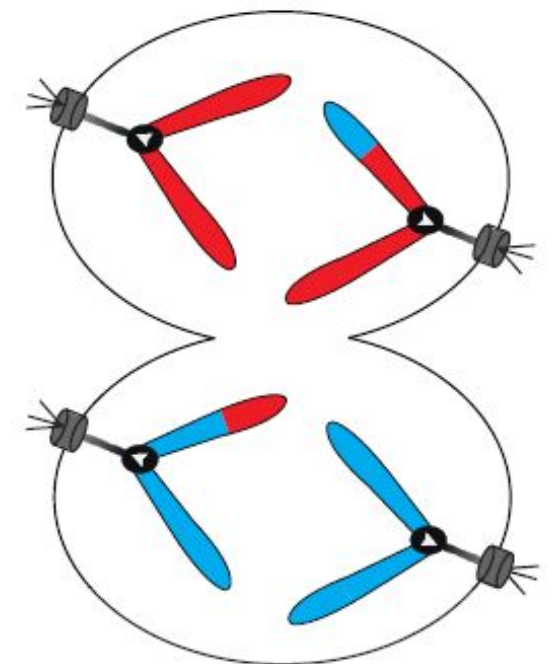


(b)

Metaphase II



Anaphase II



CPC- chromosomal passenger complex

Survivin – член семейства IAP (Inhibitor of Apoptosis)

- Присоединяет CPC к кинетохору, вовлечён в сегрегацию сестринских хроматид.
- Участвует в точке контроля прикрепления хроматид к веретену - mitotic spindle assembly checkpoint (MSAC) , которая регулирует переход от метафазы к анафазе
- После деления выходит из ядра и ингибирует апоптоз (имеет домен BIR - бакуловирусный IAP повтор). Одна из причин лекарственной устойчивости рака. Повышается в опухолевых клетках, особенно в устойчивых к терапии.

Borealin - регулятор клеточного цикла,

- инактивируется в ответ на p53/Rb-сигналы,
- активируется в раковых клетках

Кинетохорный белок **Bub1** (киназа):

запускает сборку компонентов кинетохора (BubR1 CENP-F), привлекает шугошин во внутренний кинетохорный район. В клетках с удаленным Bub1 CPC дестабилизирован и перемещен. Контролирует правильное формирование кинетохора.

Точка контроля клеточного цикла. G1

G1 контроль размера клетки перед Стартом
Cln3 у дрожжей

G1 контроль повреждения ДНК.
Поврежденная ДНК – активация p53 – CKI
Блок активации G1/S-Cdk, S-Cdk

Повышенная стимуляция митогеном.
Активация p53 – CKI - апоптоз
Блок активации G1/S-Cdk, S-Cdk

Точки контроля клеточного цикла у дрожжей. G2

G2 Контроль повреждения ДНК.

Поврежденная ДНК – киназы – инактивируют Cdc25

Блок активации M-Cdk

Мутации rad1, rad3, rad24, rad9 (регулятор репликации),
rad17(экзонуклеаза), hus1, hus2

G2-M или конец S. Контроль завершения репликации.

Распознаются

-нереплицированные участки

-незавершенные вилки,

Сенсоры сигнализируют в систему контроля КЦ,

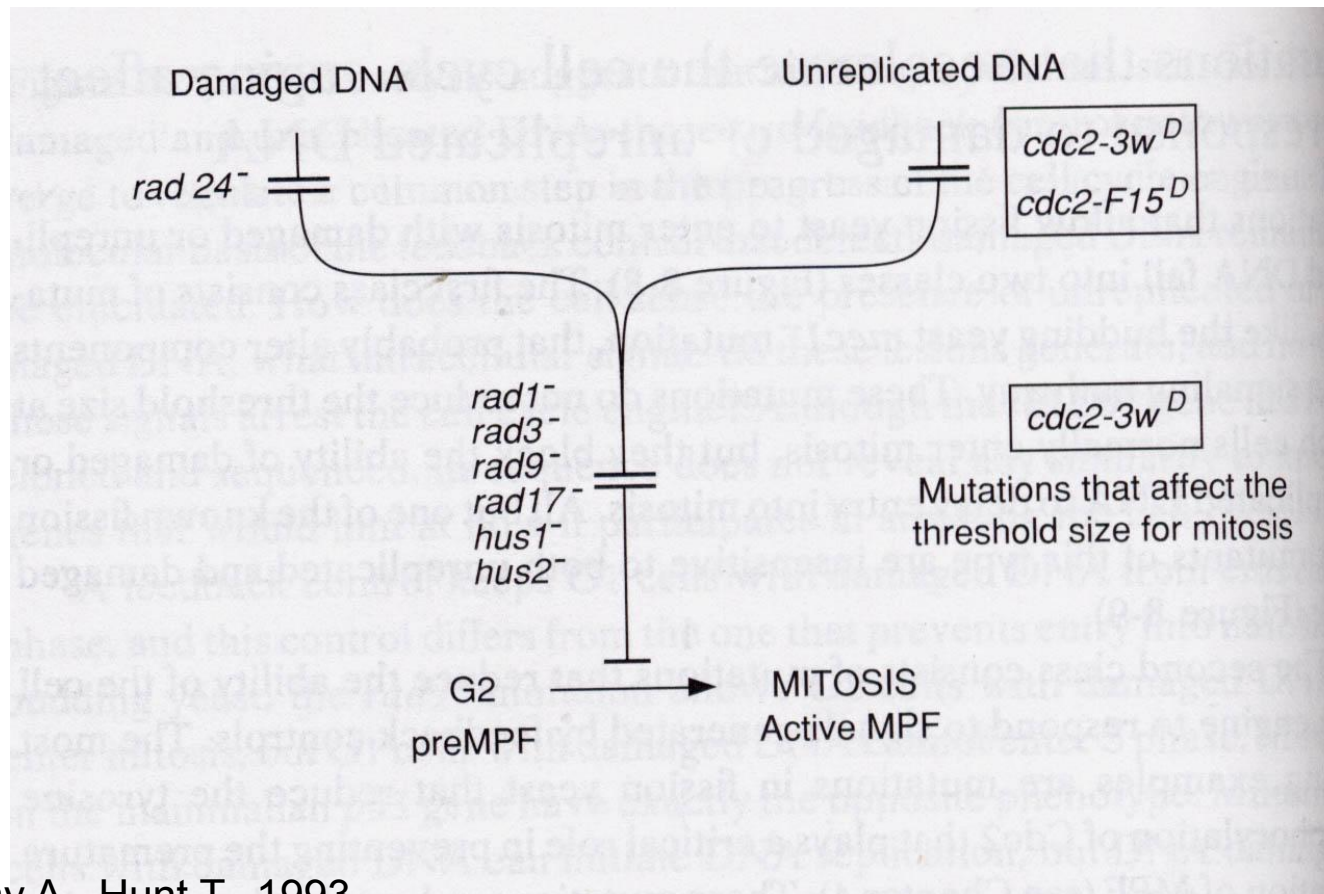
блок фосфатазы Cdc25 блокирует активацию M-Cdk.

Мутанты cdc2-3wD, cdc2-F15D, rad24 вступают в суицидальный митоз

G2 Контроль репликации центросомы.

Передача сигнала- протеинкиназы : Mec3, Rad53

Структура точки контроля G2-M



Murray A., Hunt T., 1993

Точки контроля клеточного цикла:

Повреждения ДНК

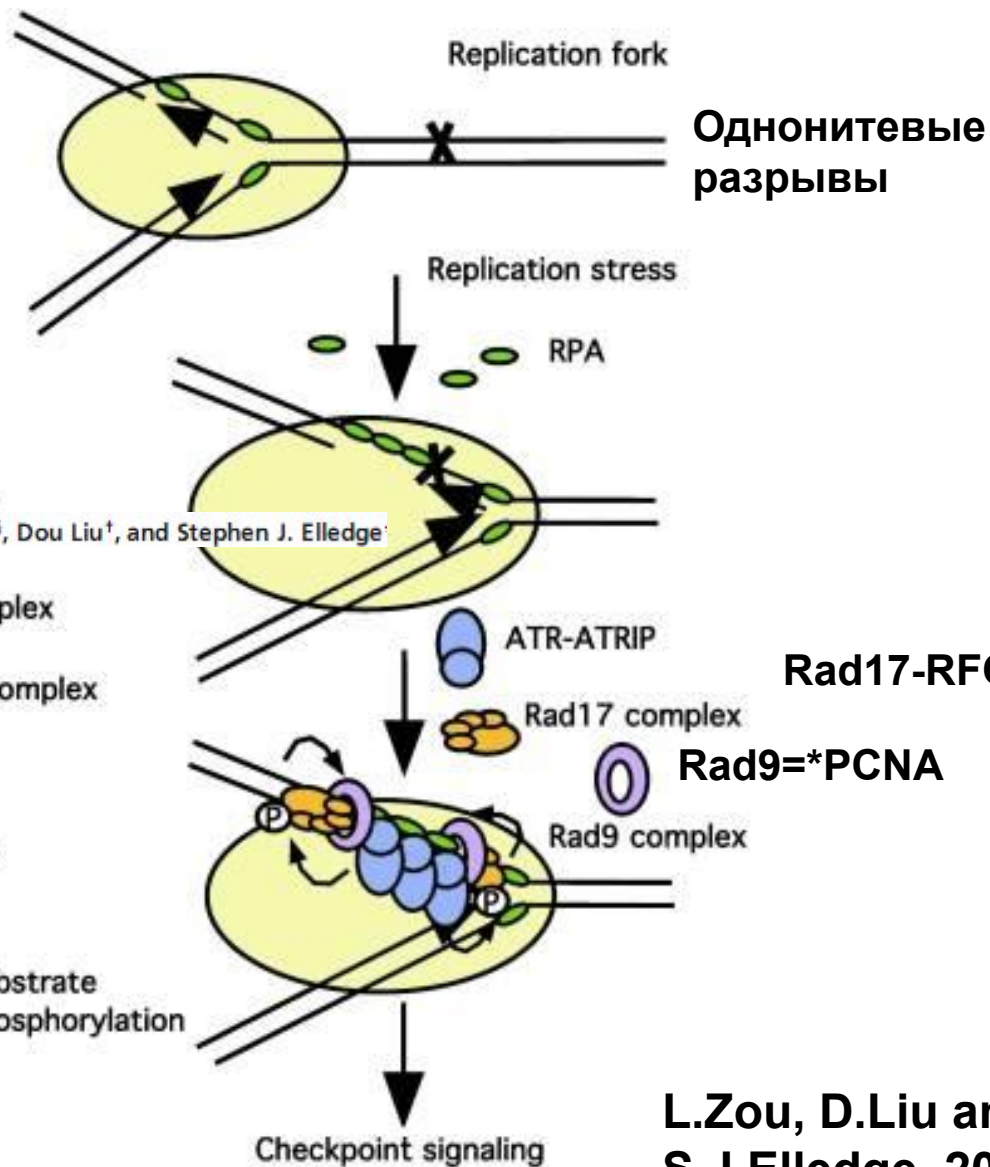
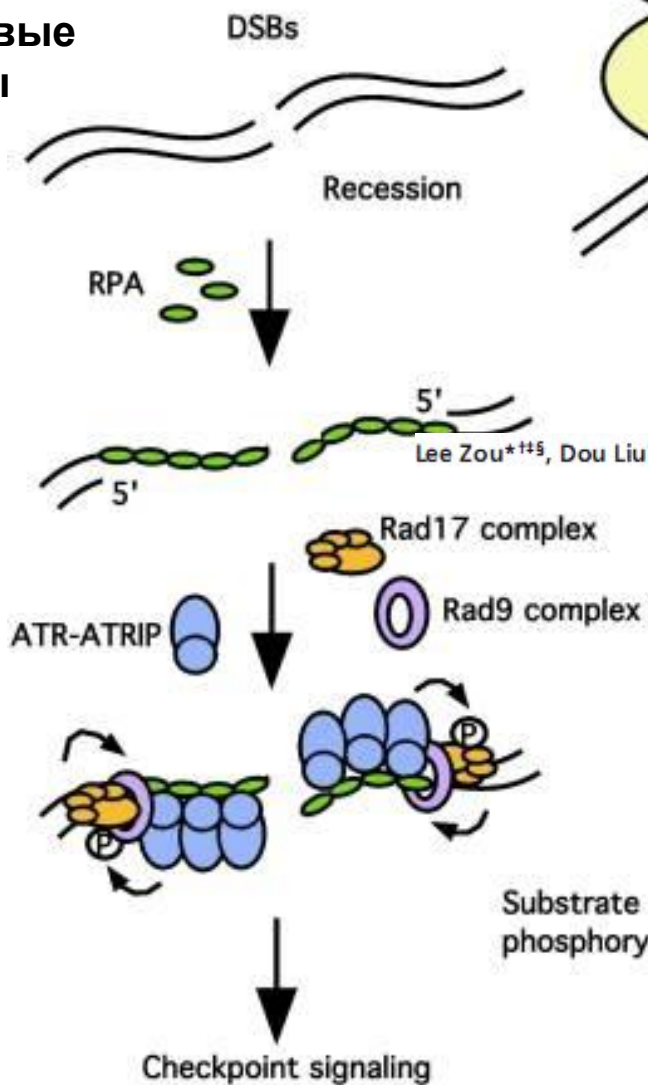
- Болезнь «атаксия телангиэктазия»- синдром Луи-Бара – дефект одной из протеинкиназ, фосфорилирующих p53 в ответ на облучение - ATM-киназа (ATM – ataxia telangiectasia mutated) (ответ на двунитевые разрывы)
- ATR – ATM and Rad3 related – ответ на многие формы повреждения ДНК (генотоксический стресс)
- киназы фосфатидилинозитол 3-подобные.

Центральные компоненты ответа на повреждения ДНК

- Белок RPA взаимодействует с одностранными разрывами ДНК (остановленные вилки репликации, двунитевые разрывы ДНК, сайты репарации эксцизионные, мисматч)
- привлекает ATR-киназу и белок ATRIP (ATR-interacting protein)
 - Rad17- подобен репликативному фактору C
 - Rad9 – кольцевой белковый комплекс, подобный PCNA
- ATM и ATR активируют серин-треонин-киназы точки контроля Chk1 и Chk2
- Chk1 и Chk2 ингибируют фосфорилированием Cdc25 фосфатазу, предотвращая вступление в митоз, фосфорилируют p53.

Сенсоры поврежденной ДНК

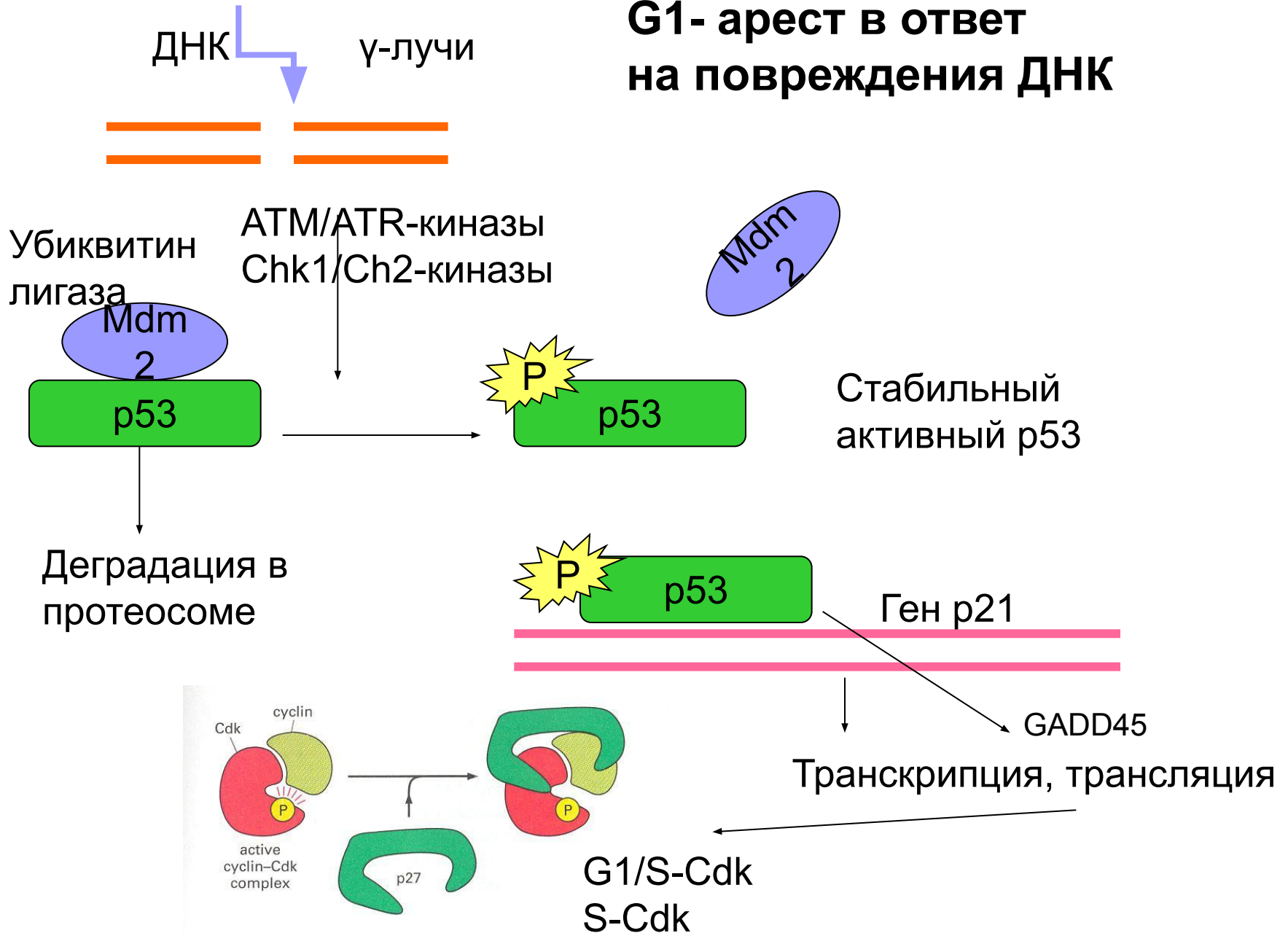
Двунитевые разрывы



Lee Zou^{††5}, Dou Liu[†], and Stephen J. Elledge

L.Zou, D.Liu and S.J.Elledge, 2003

G1-арест в ответ на повреждения ДНК



Сенсоры повреждения ДНК:

RPA –

ATR - амплификация сигнала

ATRIP

Передача сигнала:

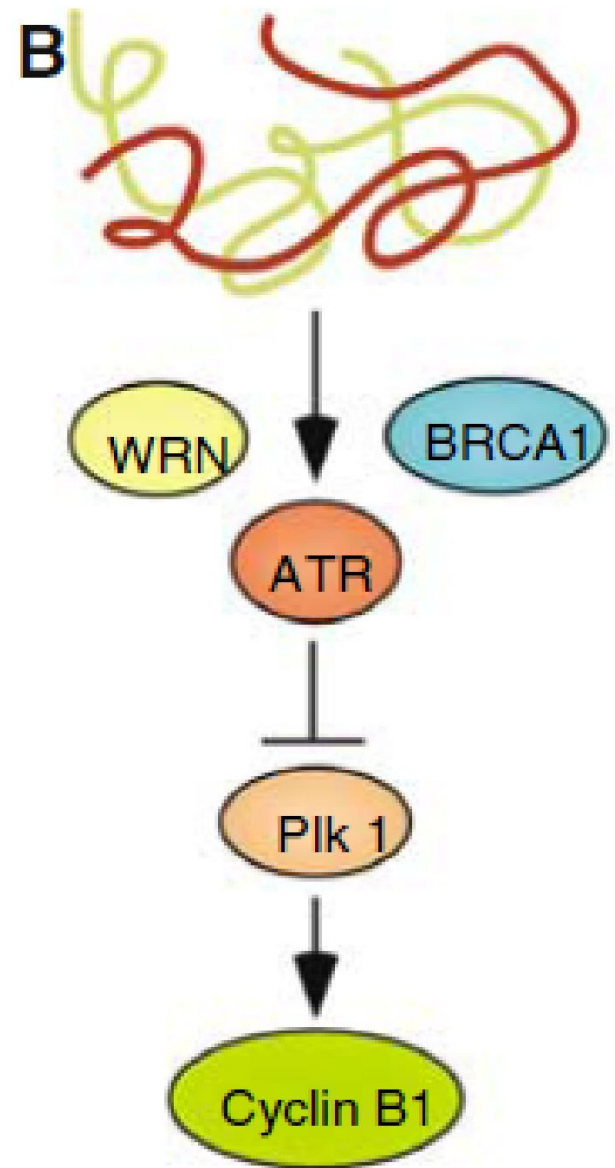
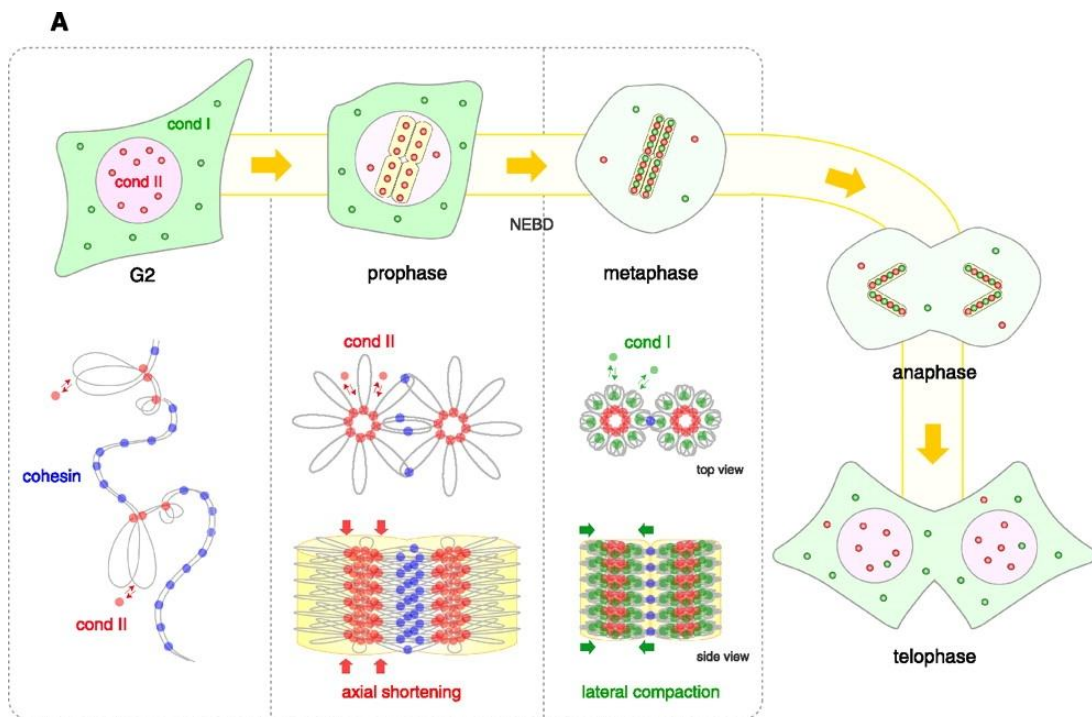
Активация Chk 1, 2 киназ

Эффекторная часть:

Фосфорилирование Cdc25 – остановка входа в митоз

Фосфорилирование p53 – транскрипция гена белка CKI – ингибитора комплекса cdk-cyclin

- **Контроль декатенации** – проверка отсутствия зацеплений ДНК в G2 перед входом в профазу митоза
- Возможная модель сигнального пути
- WRN- Вернер-геликаза (синдром Вернера), топо-II
- Ингибиторы топо-II рассматриваются для использования при определенных формах рака



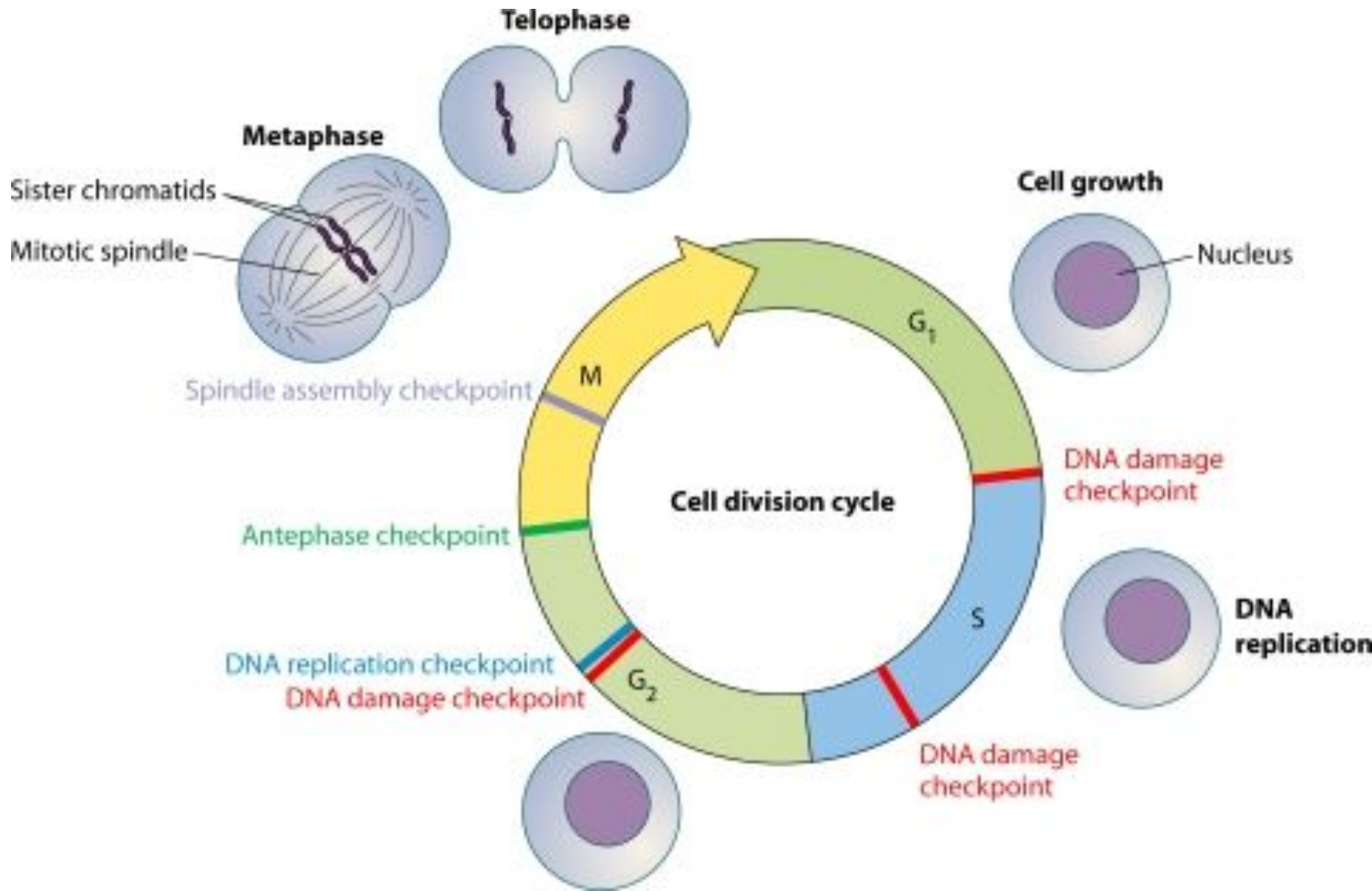
■ Antephase checkpoint.

- Точка контроля в Антефазе отлична от контроля декатенации.
- Клетки откладывают вступление в профазу митоза (конденсацию хроматина) при обработке X-лучами, микротрубочковыми ядами (колхицином), низкой температурой. Клетки, вступившие в профазу, деконденсируют свой хроматин (в нейробластах саранчи после облучения уменьшилось число клеток в профазе)
- Короткий промежуток в конце G2

Ключевой белок – CNFR – неканоническая убиквитин-лигаза. Убиквитинизирует polo-like (Plk) киназу, тем самым воздействуя на Cdk-1, откладывая вхождение в МИТОЗ.

R38 – киназа играет роль в ответе на UV-облучение, осмотический стресс

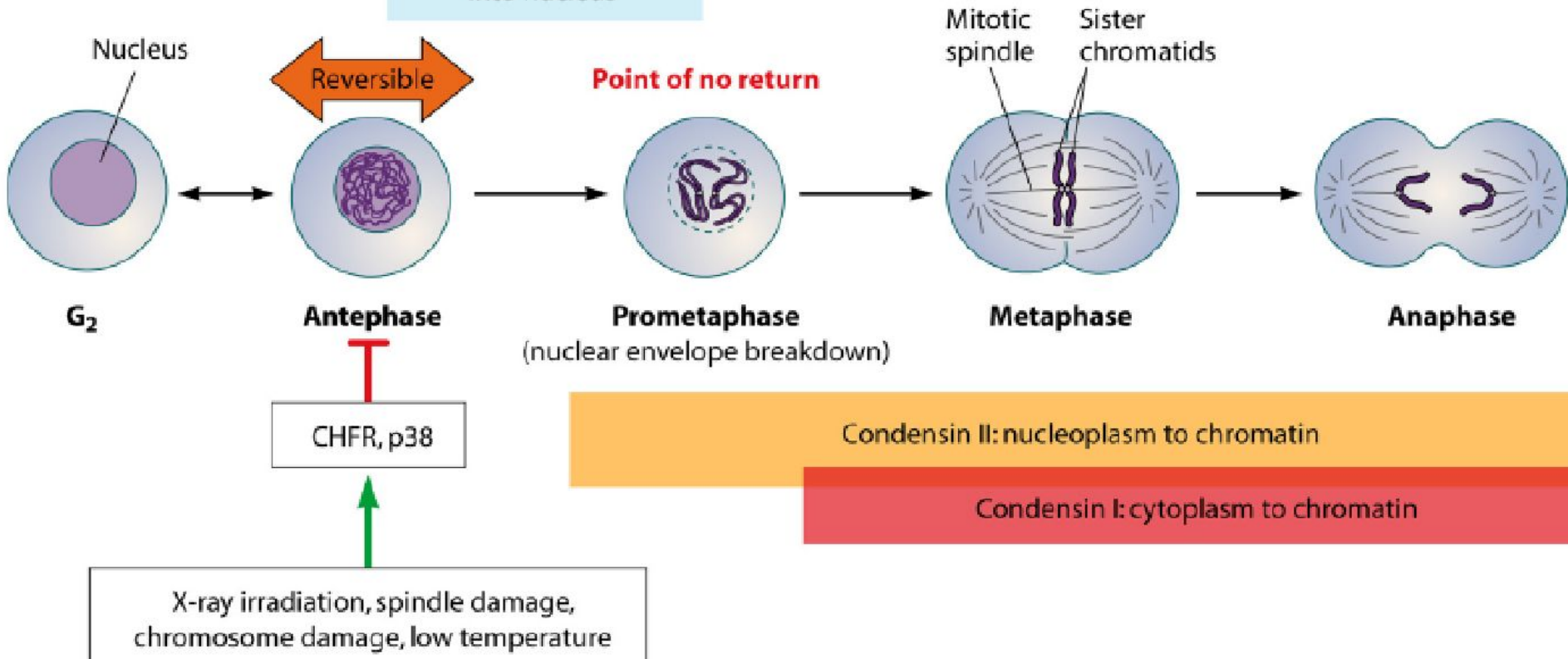
Antephase checkpoint



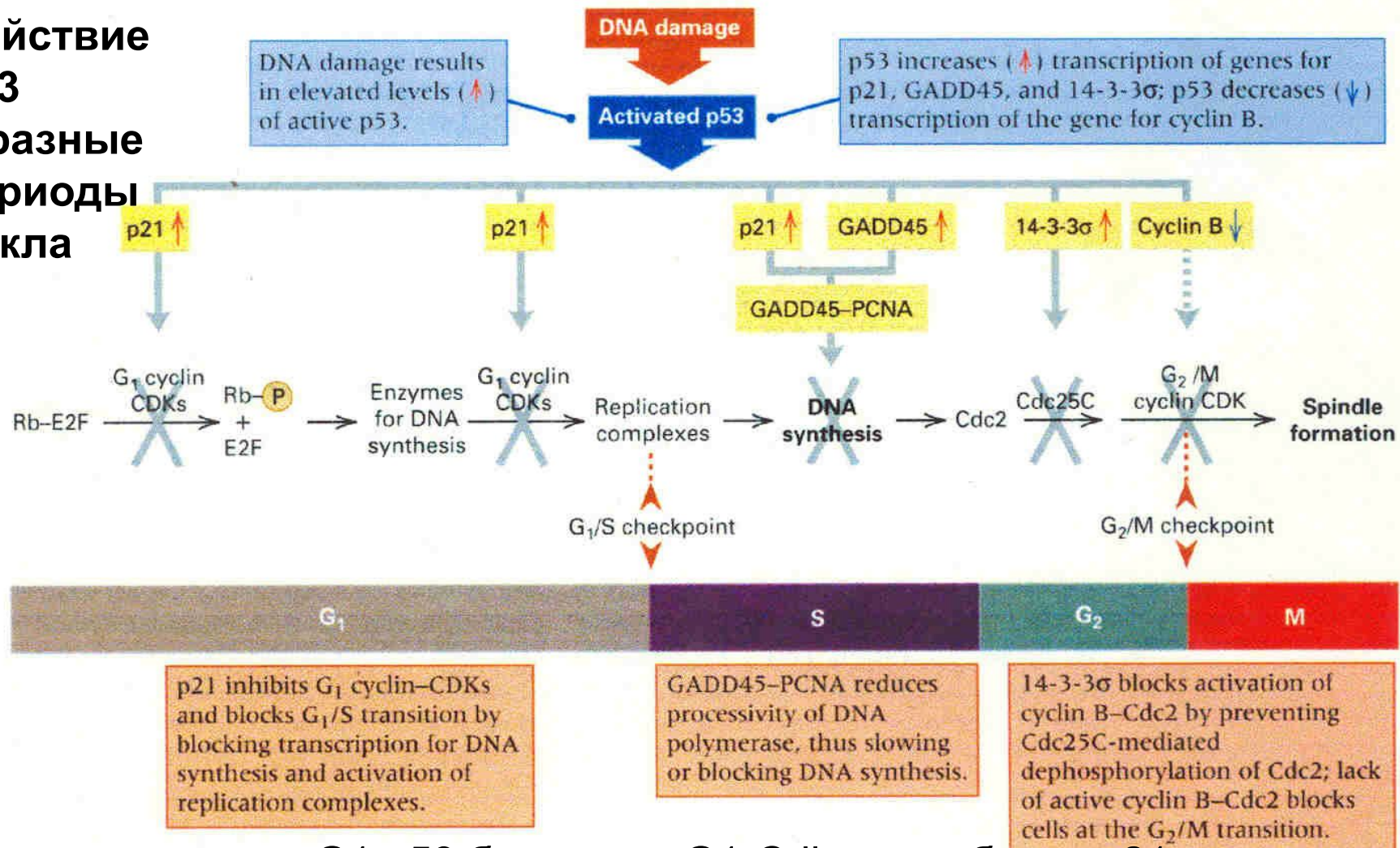
Antephase checkpoint

Cyclin A-CDK in nucleus

Entry of
Cyclin B1-CDK1
into nucleus



Действие p53 в разные периоды цикла

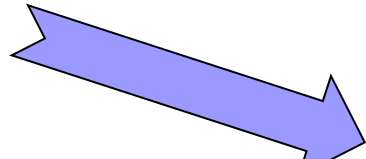


В точке контроля G1 p53 блокирует G1-Cdk через белок p21
 В точке контроля G2/M p53 блокирует циклин B/Cdk через инактивацию фосфатазы Cdc25
 Сенсоры стресса Growth Arrest DNA Damage (Gadd 45) у млекопитающих

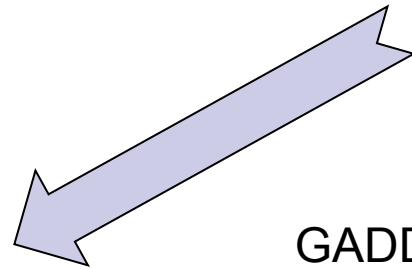
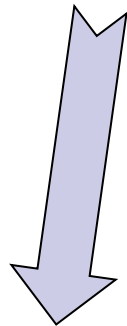
Белки GADD в ответе клетки на генотоксический стресс

- IR ионизирующая UV (MMS)
- радиация метилметан сульфонат

■ P53



GADD



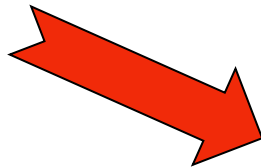
GADD 45- α , β , γ - очень кислые маленькие белки (18 kDa) с отрицательным зарядом -9 ... -12

□

□ Арест цикла



Индукция апоптоза



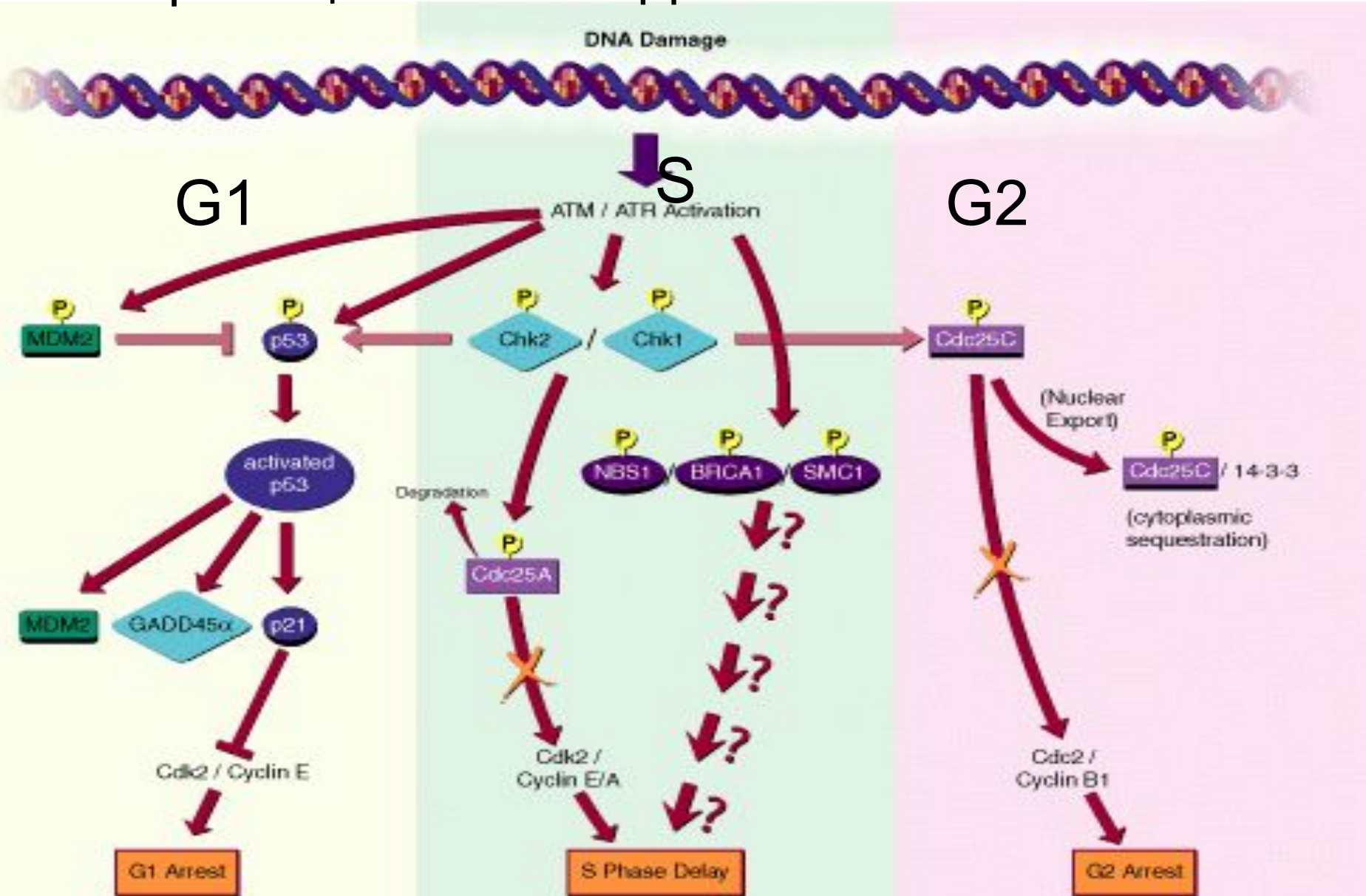
TGF β - индуцированный апоптоз

cdc2 (связывается и ингибирует)

MEKK (связывается и активирует JNK каскад)

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) прикрепляет ДНК-полимеразу δ к матрице (GADD связывается и модулирует работу ДНК-полимеразы)

Контроль целостности ДНК



Spindle checkpoint/kinetocore regulation:

BUB1, BUBR1, MAD2, STK15, CENP-A, CENP-H; AIM1; INCENP

DNA damage checkpoint (G2):

*BRCA1; ATR; ATM
CDC25A, B, and C*

DNA damage checkpoint (G1):

*ATM; CYCLIN E; CDK2
rad17, rad24, mec3*

Intra-S replication checkpoint:

BLM/WRN/RTS

Replication checkpoint:

rcf5, pol2, drc1

Replication checkpoint transducers/effectors:

*ATR, ATM, MRE11, NBS1, CHK2, CHK1;
CDC25A; KU70/KU80; LIG4*

