

Генетика клеточного цикла

Электронно-лекционный курс

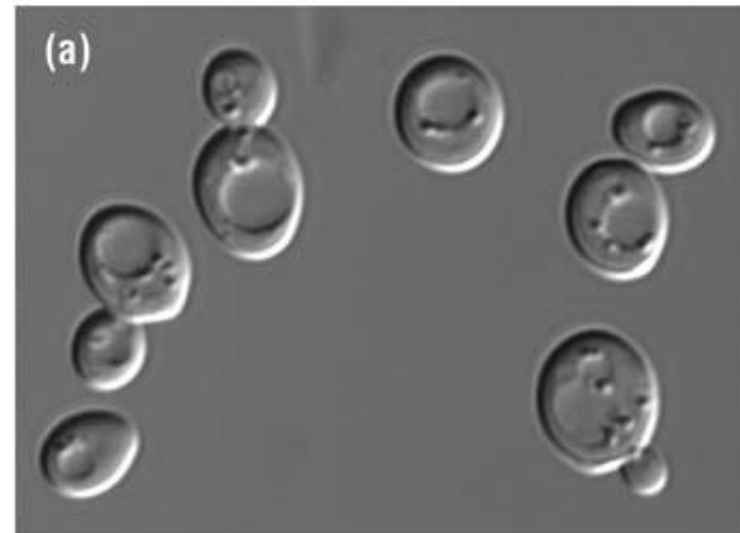
Глава 2

Дрожжи, *cdc*-мутации

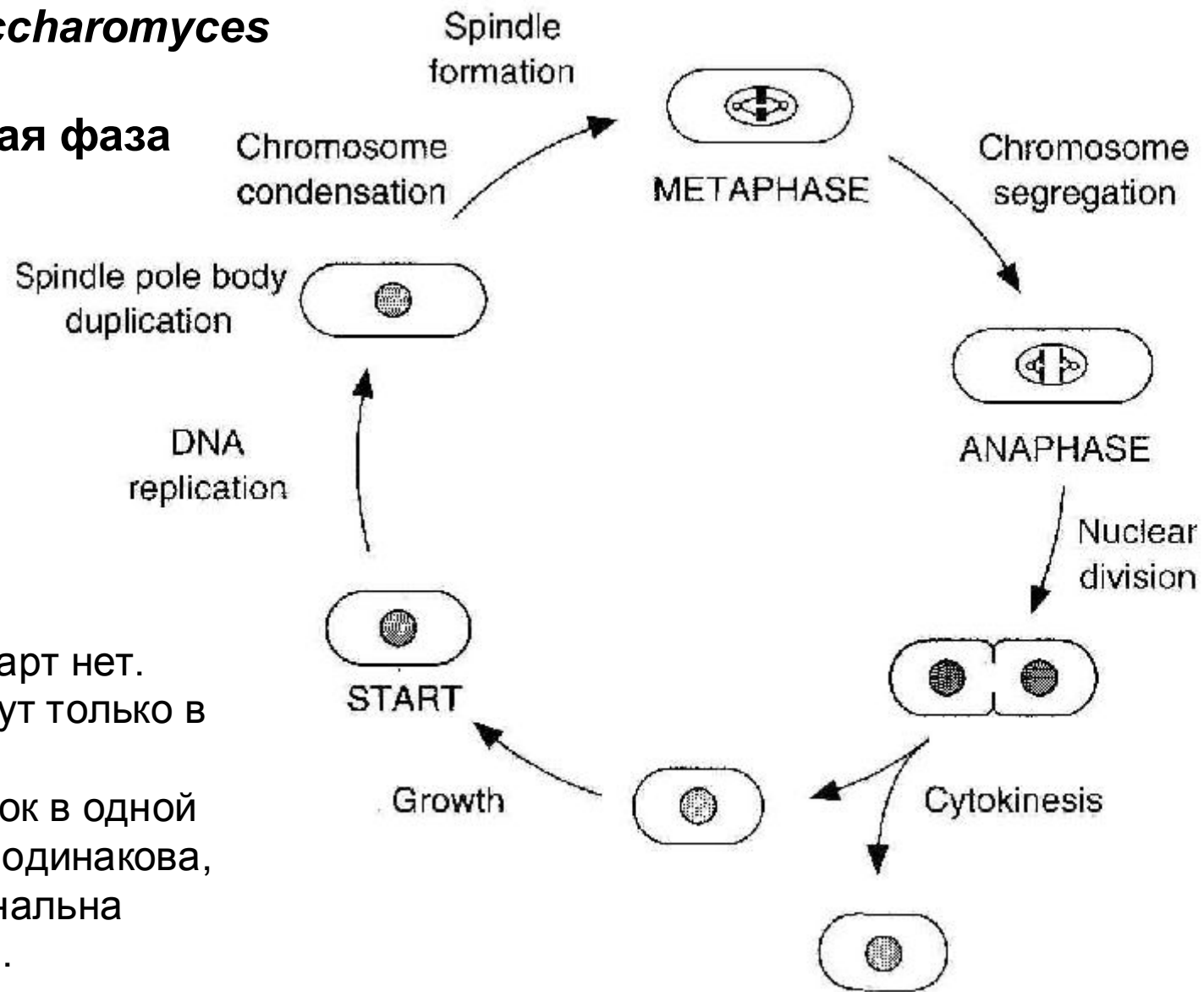
Saccharomyces cerevisiae (a),
пекарские дрожжи

Schizosaccharomyces pombe (b),
африканские пивные дрожжи

From **The Cell Cycle: Principles of Control**
by David O Morgan



Клеточный цикл
Schizosaccharomyces
***pombe*,**
гаплоидная фаза

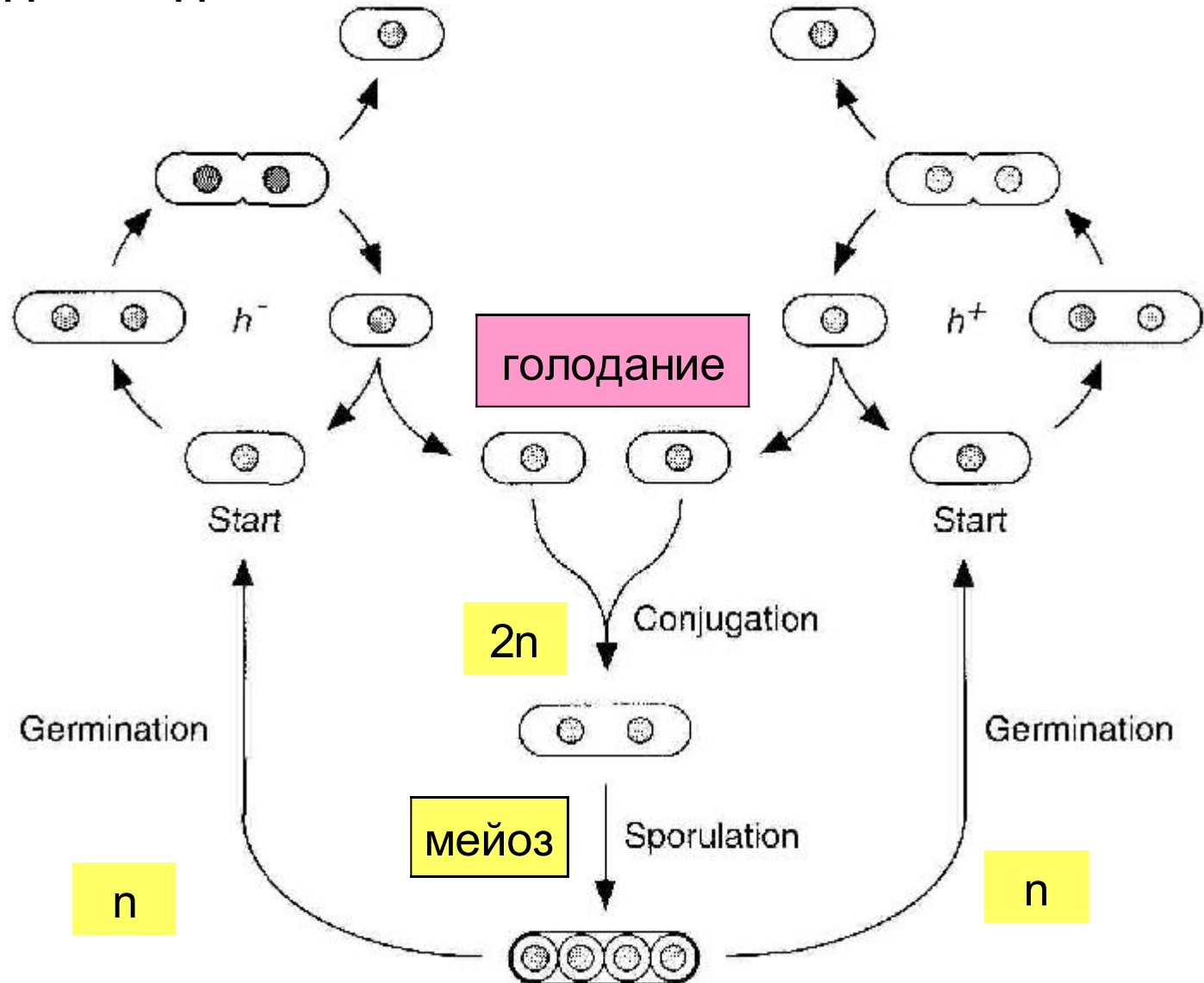


Маркера Старт нет.
 Клетки растут только в длину.
 •Длина клеток в одной фазе цикла одинакова,
 •пропорциональна фазе цикла..

Жизненный цикл *Sch. pombe*, гаплоидная и диплоидная фазы

Живут в гаплоидной фазе. Конъюгация только в бедной среде, сразу мейоз.

Репликация начинается сразу после деления. Чувствительная к повреждениям ДНК стадия минимальна.



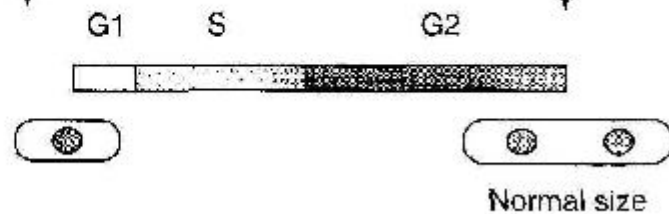
Murray A., Hunt T., 1993

Условная мутация wee1

Пороговый размер для Старта

Пороговый размер для митоза

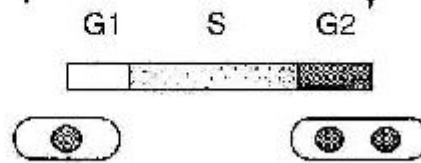
постоянно 25°



Нормальный размер клеток

Мутация wee1 снижает пороговый размер клетки для перехода в митоз

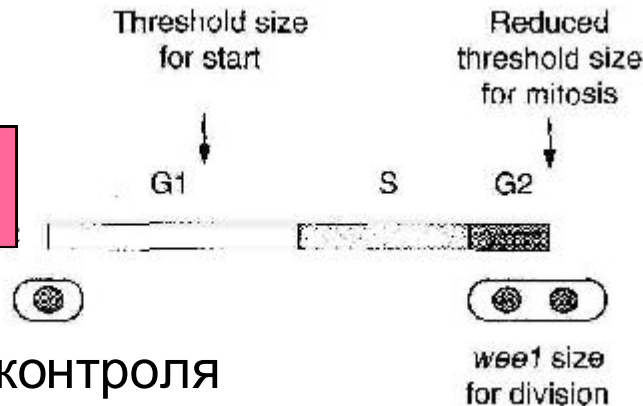
сдвиг 25° - 35°



Мелкие клетки, укороченный цикл

Есть еще точка контроля для входа в Start

постоянно 35°



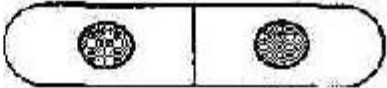
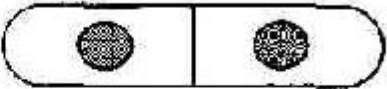

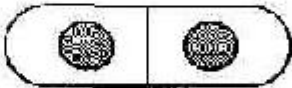

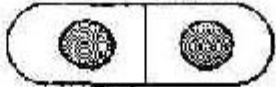
Длительность цикла нормальная, клетки мелкие

Wee1 - часть точки контроля

Взаимодействие мутаций у дрожжей *Sch. pombe*



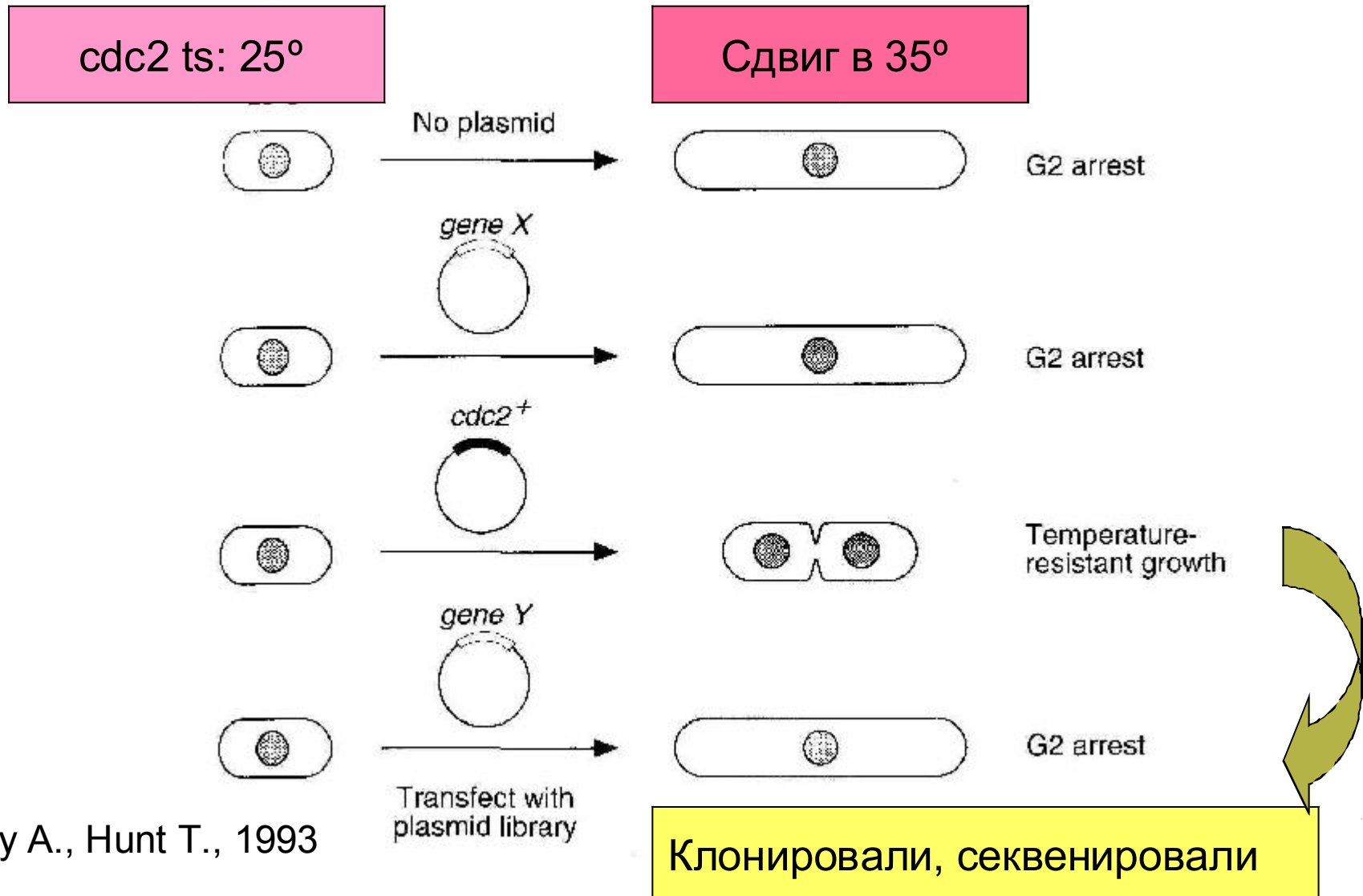
Циклы в зависимости от дозы генов.

● Wild type		Нормальный размер
● 5 x <i>cdc2</i> ⁺		Нормальный размер
● 5 x <i>cdc13</i> ⁺		Нормальный размер
● Δ <i>wee1</i>		Делятся, не успев вырасти
● 3 x <i>wee1</i> ⁺		Задержка деления
● 5 x <i>cdc25</i> ⁺		Делятся, не успев вырасти

Активность белков в зависимости от количества генов

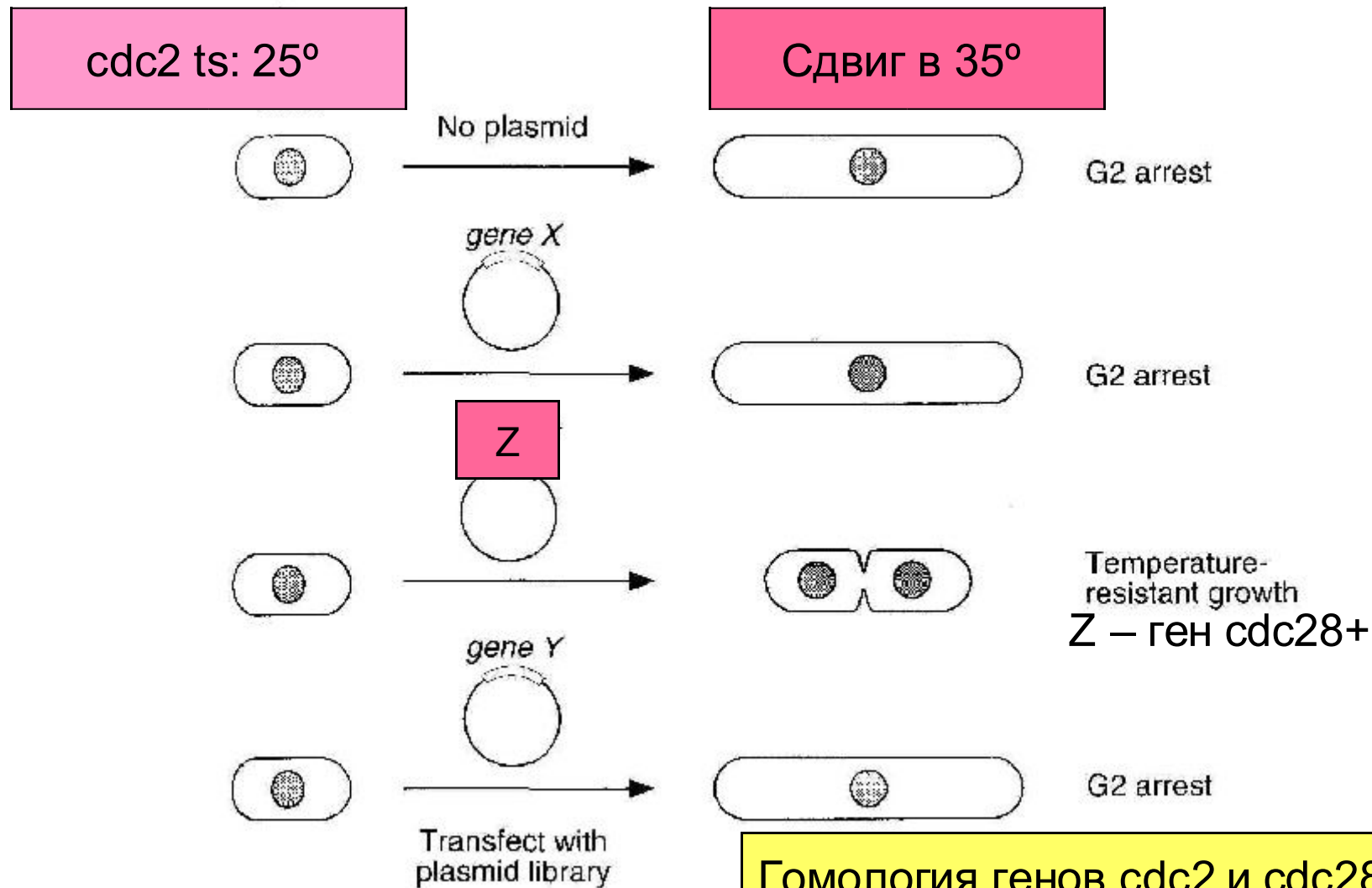
- Cdc2-главный индуктор митоза
 - Wee1 – ингибирует Cdc2
 - Cdc25 – активирует Cdc2
- } регуляторы

Выделение гена *cdc2+*. Схема эксперимента по трансфекции мутантов *cdc2* плазмидами с фрагментами ДНК дрожжей *Sch. pombe*



Murray A., Hunt T., 1993

Схема эксперимента по трансфекции мутантов *cdc2* *Sch. pombe* плазмидами с фрагментами ДНК *S. cerevisiae*



Murray A., Hunt T., 1993

Клонировали и секвенировали гены -аналоги cdc2 (Sch. Pombe) и cdc28 (S. cerevisia) - 60 % гомологии. Игрют ключевую роль в регуляции цикла. Продукт гена – полипептид длиной 297 ак (34 кДа). Протеинкиназа: **Серин-треонинкиназа p34 cdc2**

Аналогичным способом получили ген cdc2+ человека в культуре cdc2 ts при рестриктивной температуре.

Таким же способом получили и клонировали гены cdc13+, cdc25+, wee1+. cdc13+ - продукт длиной 482 ак оказался гомологичен уже известным **циклинам группы В.**

cdc25+ - **фосфатаза**
wee1+ - **протеинкиназа**

К 1988 г:

- генетики показали, что цикл регулируется Cdc2/Cdc28 у всех видов,
- биохимики и физиологи – что MPF универсален для митоза и мейоза,
- какова роль циклина?

Это детали одной машины?

Это параллельные пути регуляции процесса?

Из 1 литра лягушачьих яиц выделили 1 мкг MPF:

- антитела на циклин выявили субъединицу 46 кДа.
- антитела на Cdc2 выявили субъединицу 34 кДа.

Выявили киназную активность – по фосфорилированию гистона H1

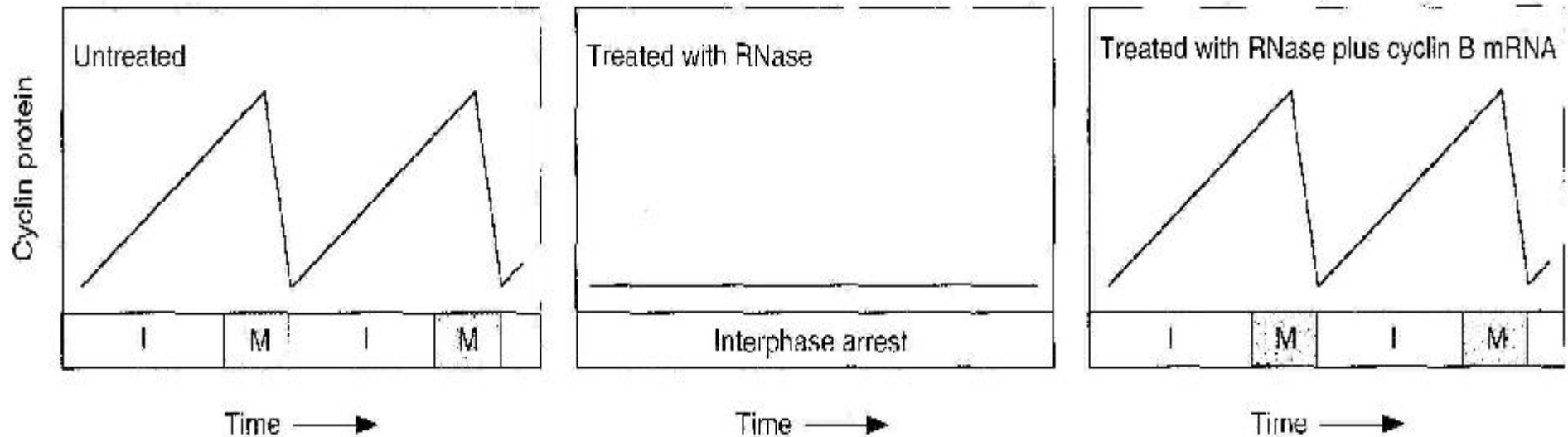
Свойства MPF изучали в бесклеточной системе

Получение бесклеточного экстракта

- Яйца лягушки стимулируют электрошоком, имитируя оплодотворение. В цитоплазме повышается содержание Ca^{2+} , завершается M2
- Яйца центрифугируют, цитоплазму отделяют от желтка и липидов
- Добавляют спермии и АТФ
- Ядра спермиев набухают и проходят циклы репликации- митоза за 40-60 мин

В бесклеточной системе происходит репликация ДНК, сборка веретена, расхождение сестринских хроматид, анафазное движение

Ген Циклина морского ежа клонировали в *E.coli*, получили мРНК, мРНК циклина добавили в экстракт цитоплазмы лягушки. Наблюдали митозы



Взаимозаменяемость циклинов эволюционно удаленных видов

Добавили дезоксиолигонуклеотид, комплементарный мРНК циклина, в экстракт цитоплазмы лягушки. РНК-аза не разрезает гибрид ДНК-РНК, остановка в интерфазе

Именно циклин, а не другой белок, отвечает за наступление митоза

Проверка гипотезы:

для инактивации MPF нужна деградация циклина.

Отсутствие деградации должно остановить цикл в митозе.

Мутантная форма циклина: в белке отсутствует концевой фрагмент из 90 ак. Добавили в бесклеточный экстракт, деления остановились

За деградацию циклина отвечает концевой фрагмент

**Проверка гипотезы:
для входа в митоз
необходимы**

посттрансляционные события

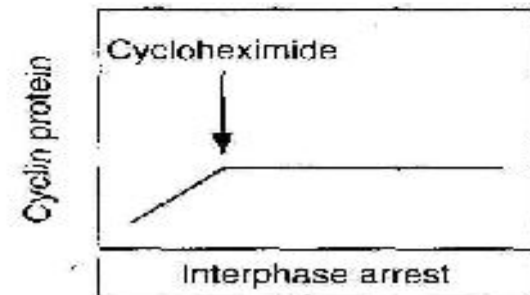
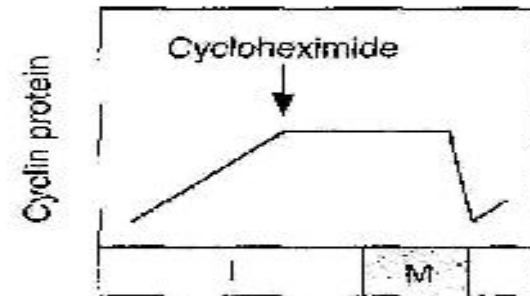
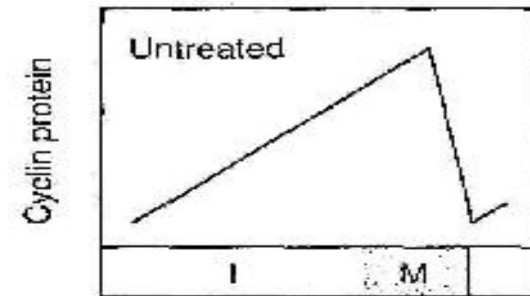
Добавляли ингибитор белкового синтеза –

Циклогексимид - противоречивые данные:

- в начале интерфазы – интерфазный арест
- Во второй половине интерфазы – митоз проходил

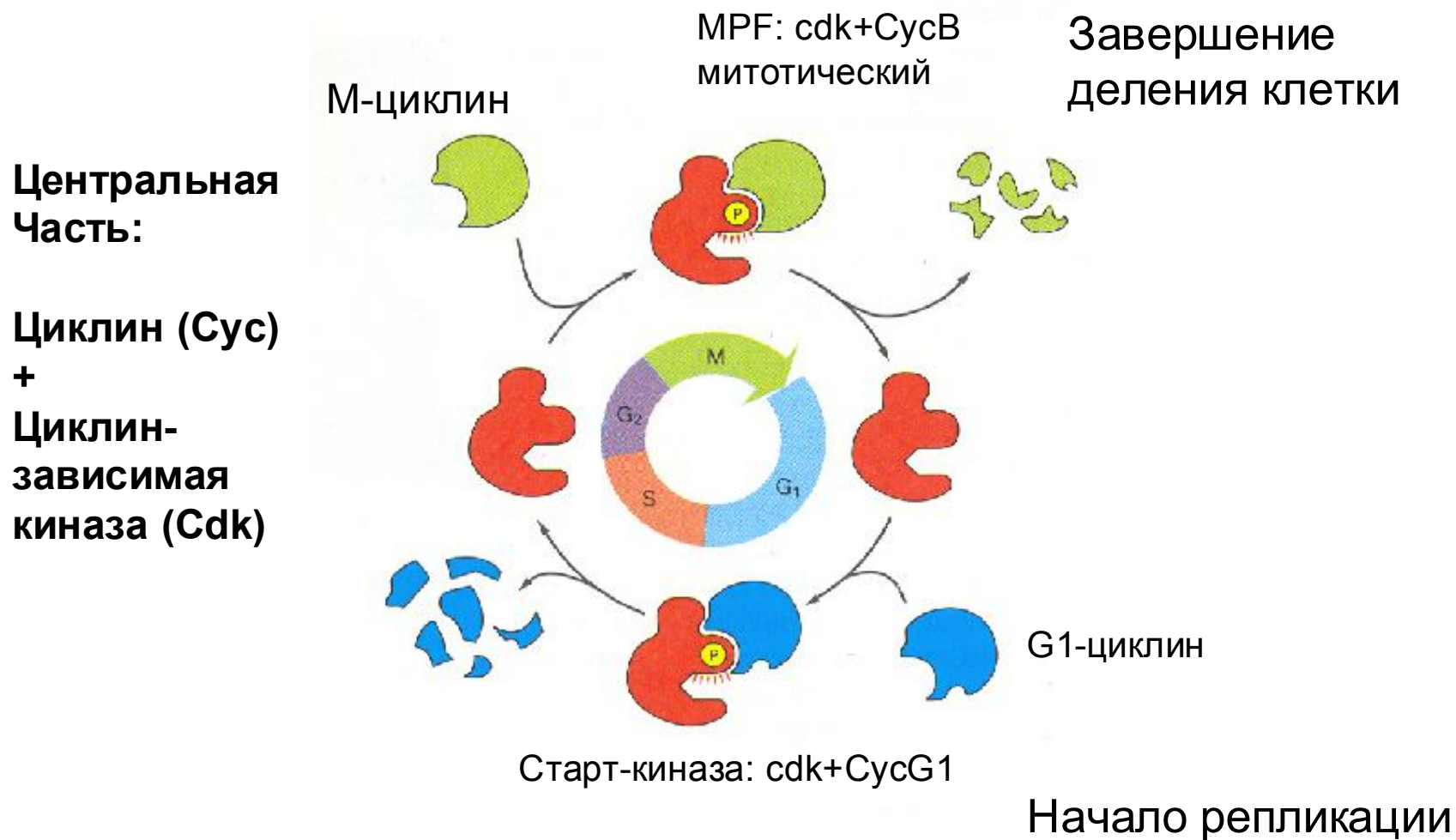
Необходимо пороговое количество циклина, которое способно завершить митоз.

Митоз активируется не количеством циклина, а появлением его посттрансляционных модификаций



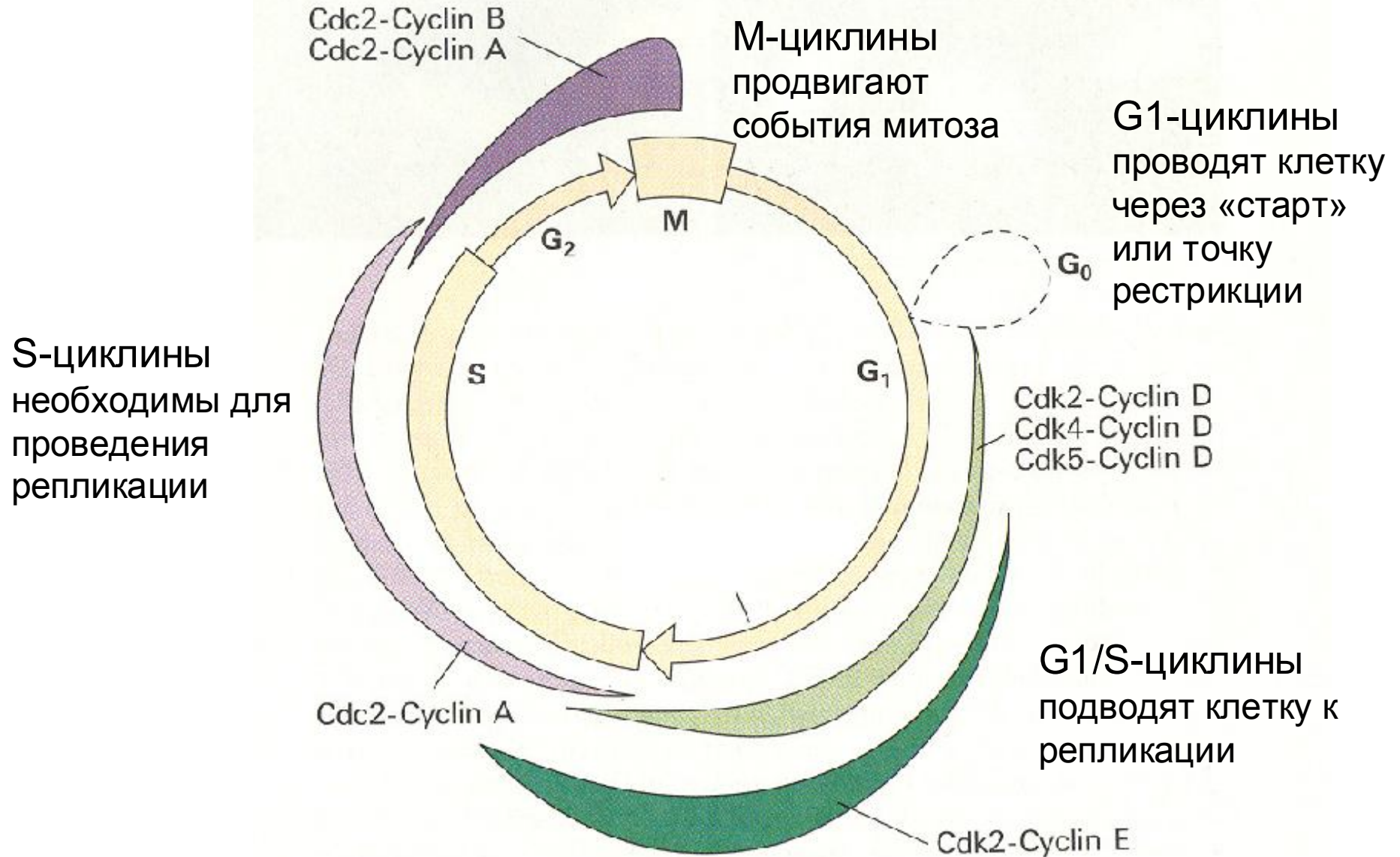
Регуляция клеточного цикла у дрожжей

общая схема активации и разрушения



Alberts et al., 2002

Циклины и Cdk высших эукариот



Основные циклины и циклин зависимые киназы позвоночных и *S.cerevisia*

CYCLIN-CDK COMPLEX	VERTEBRATES		BUDDING YEAST	
	CYCLIN	CDK PARTNER	CYCLIN	CDK PARTNER
G ₁ -Cdk	cyclin D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G ₁ /S-Cdk	cyclin E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	cyclin A	Cdk2	Clb5, 6	Cdk1 Cdc28
M-Cdk	cyclin B	Cdk1**	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

* There are three D cyclins in mammals (cyclins D1, D2, and D3).

** The original name of Cdk1 was Cdc2 in both vertebrates and fission yeast, and Cdc28 in budding yeast.

Sch.pombe:

Cdc13

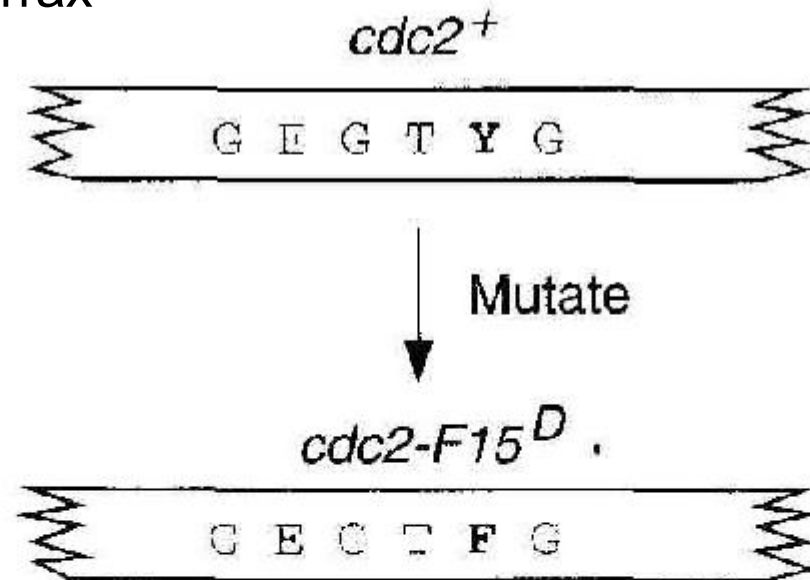
Cdc2

Установление сайтов фосфорилирования

Синтез аллельных вариантов гена *cdc2* с аминокислотными заменами в сайтах фосфорилирования

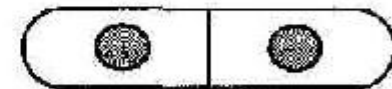
Синтезировали мутантный ген *cdc2*, где тирозин15 заменена на фенилаланин (то же, но без OH)

Заместили нормальный ген мутантным

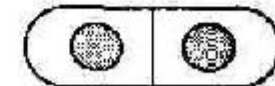


Фосфорилирование сайта Tyr15 ингибирует Cdc2
С этим сайтом работают wee1-киназа и cdc25-фосфатаза

Wild type



cdc2-F15^D



Murray A., Hunt T., 1993

Активность Cdk регулируется различными способами:

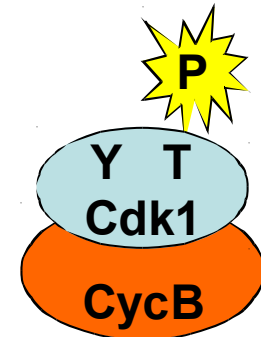
- Циклинами (их появлением и разрушением убиквитин-зависимым протеолизом)
«грубая регуляция»



- Фосфорилированием комплекса Cyclin-Cdk, а именно, Cdk- по 2-м позициям:

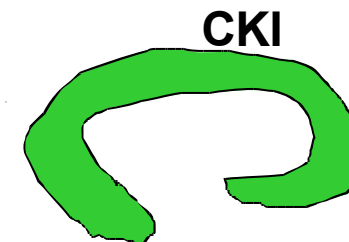
Thr161 -(Т-сайт) –САК –Cdk активирующей киназой,
Tyr15 (Y-сайт) - фосфорилирование киназой Wee1 и
отщепление фосфата фосфатазой cdc25 –

«тонкая регуляция»



Активный MPF

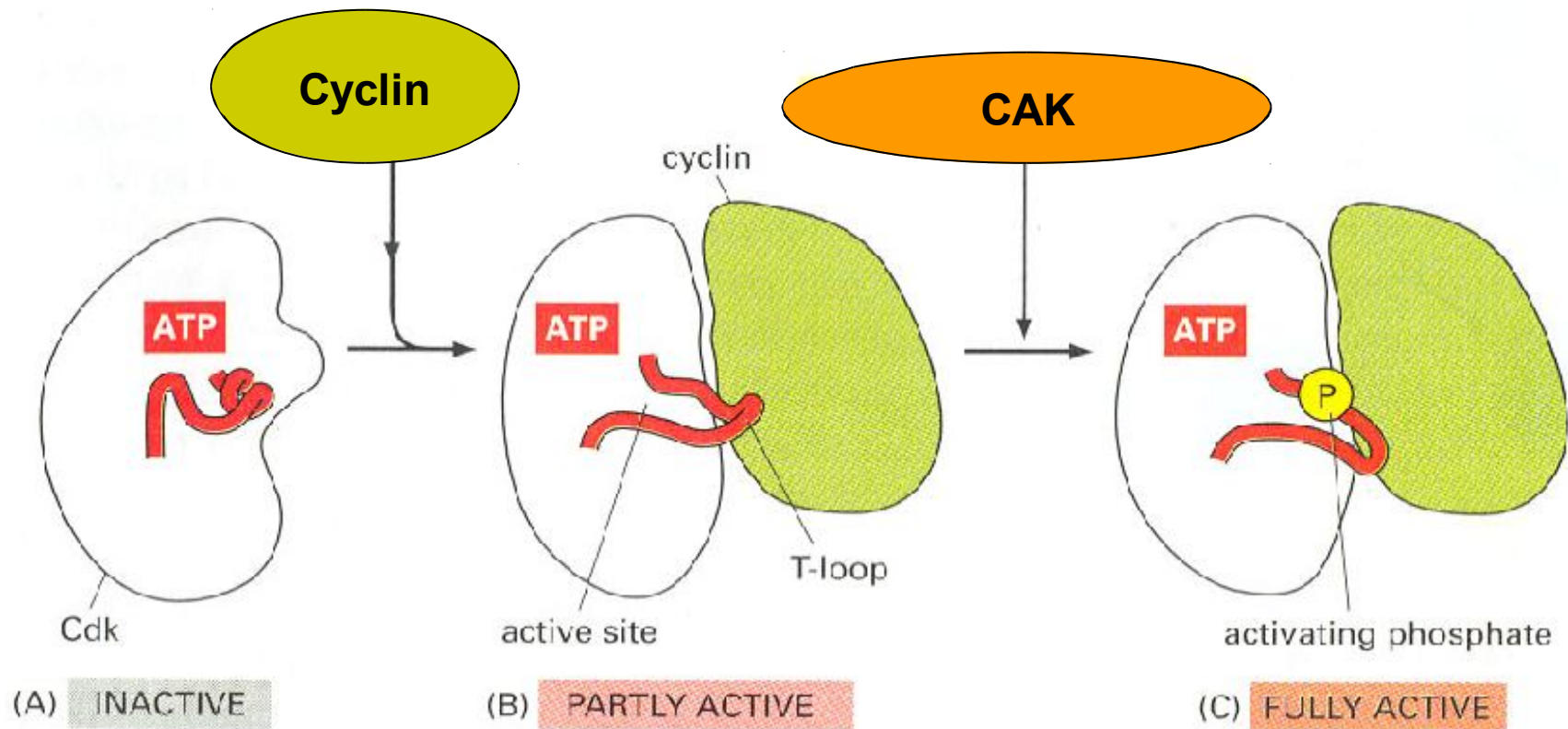
- Cdk-ингибирующими белками CKI – связывается с комплексом Cyc-Cdk, нарушая активный сайт
Быстрое выключение комплекса Cyc-Cdk



Активация циклин-зависимой киназы Cdk

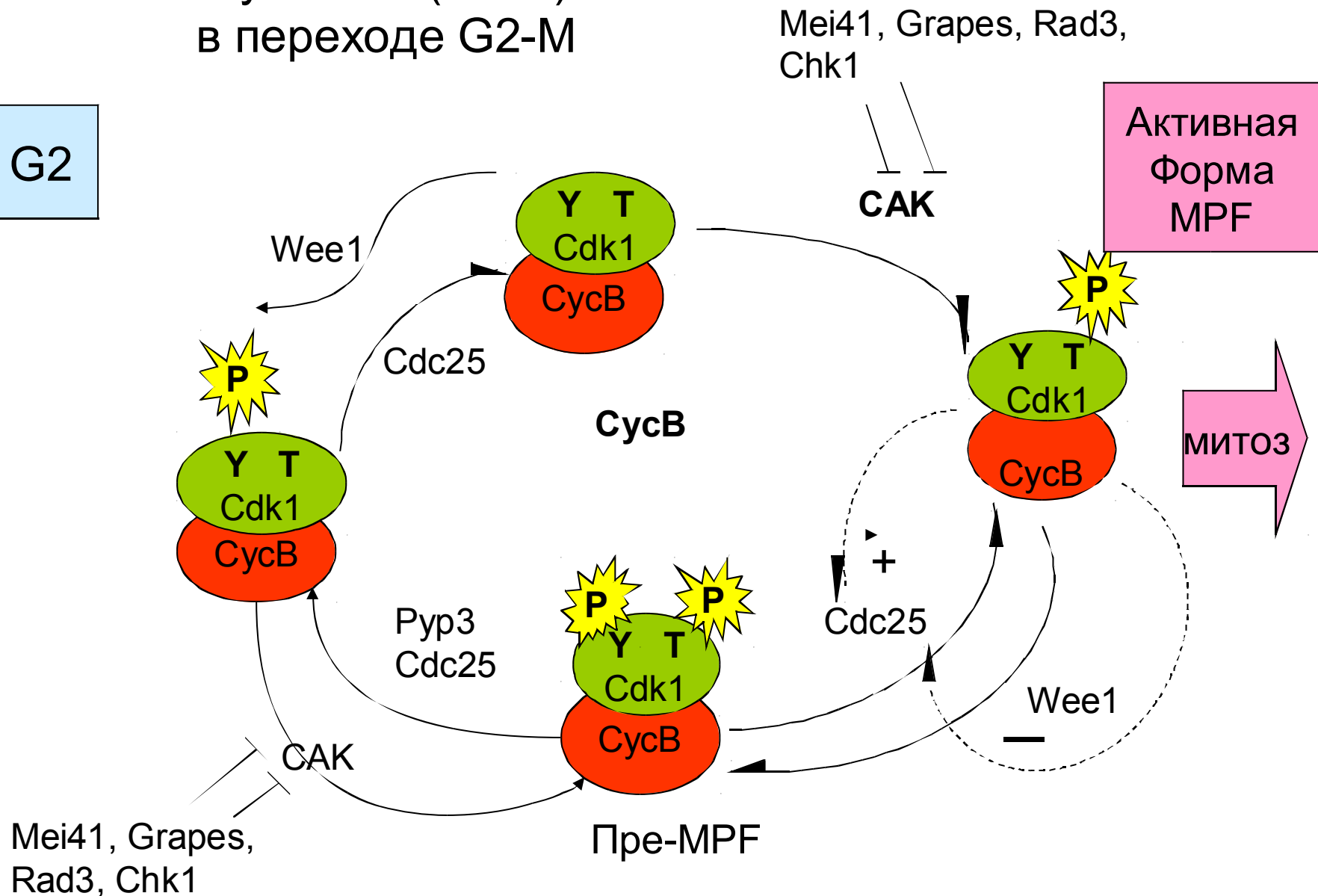
■ Присоединение циклина

■ Фосфорилирование
Cdk-активирующей киназой CAK

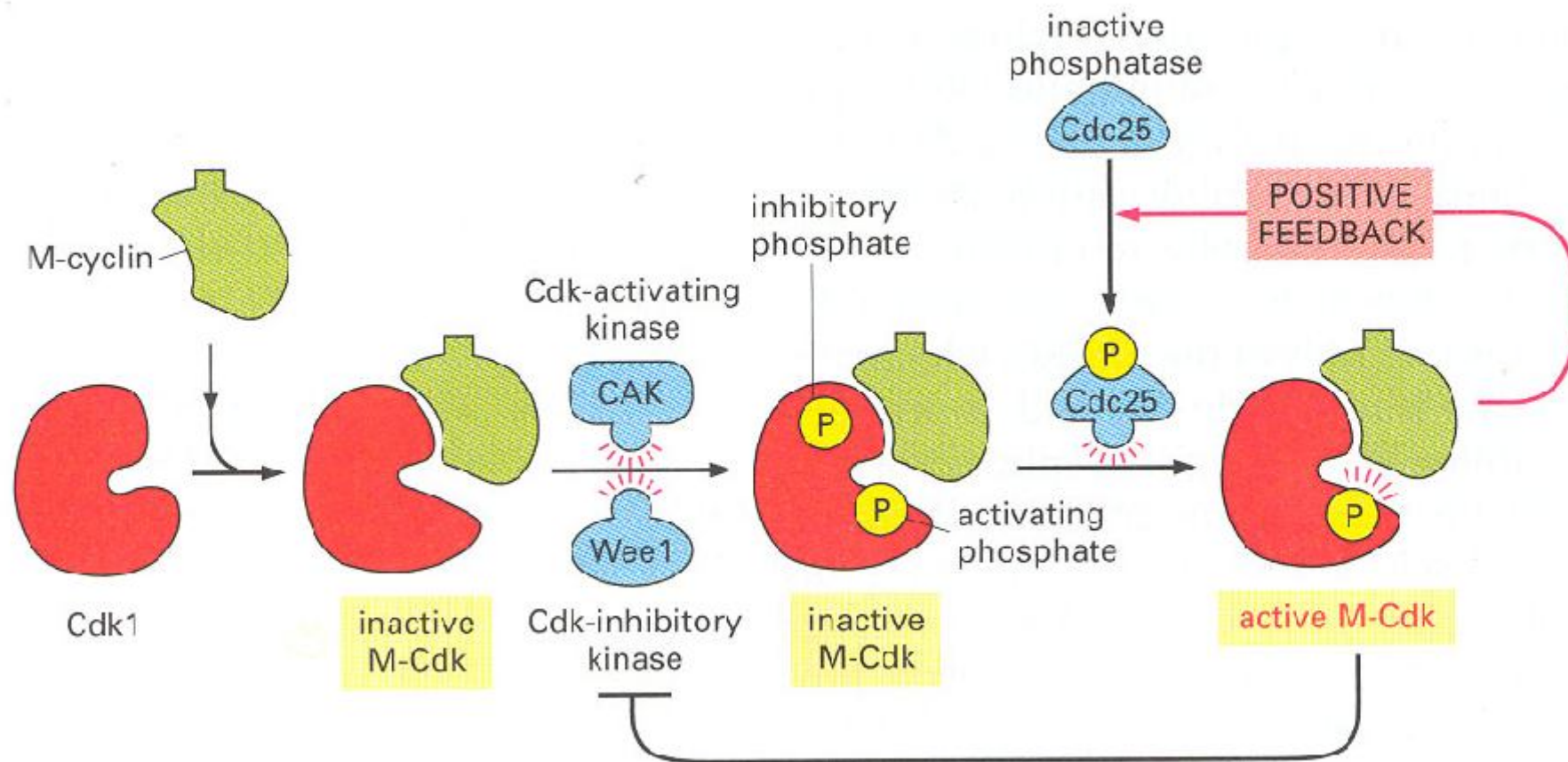


Циркуляция комплексов Cyc/Cdk1 (Cdc2) в переходе G2-M

G2

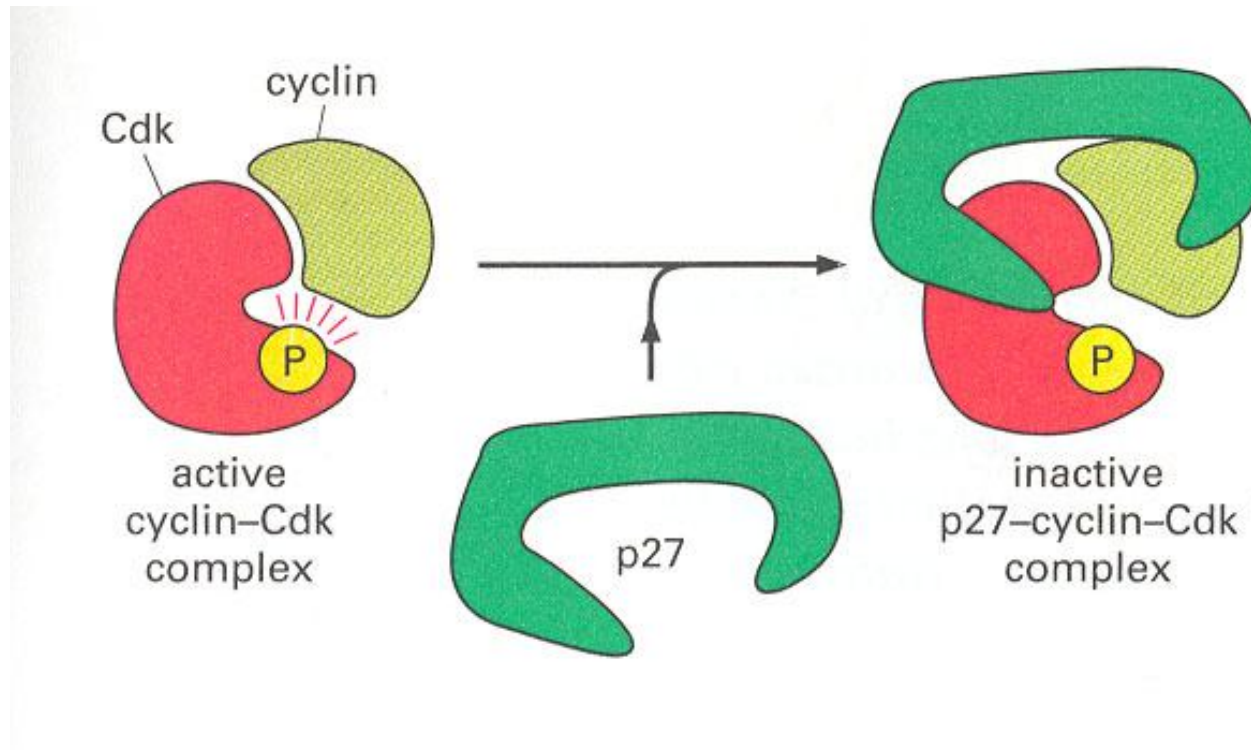


Активация M/Cdk (MPF)

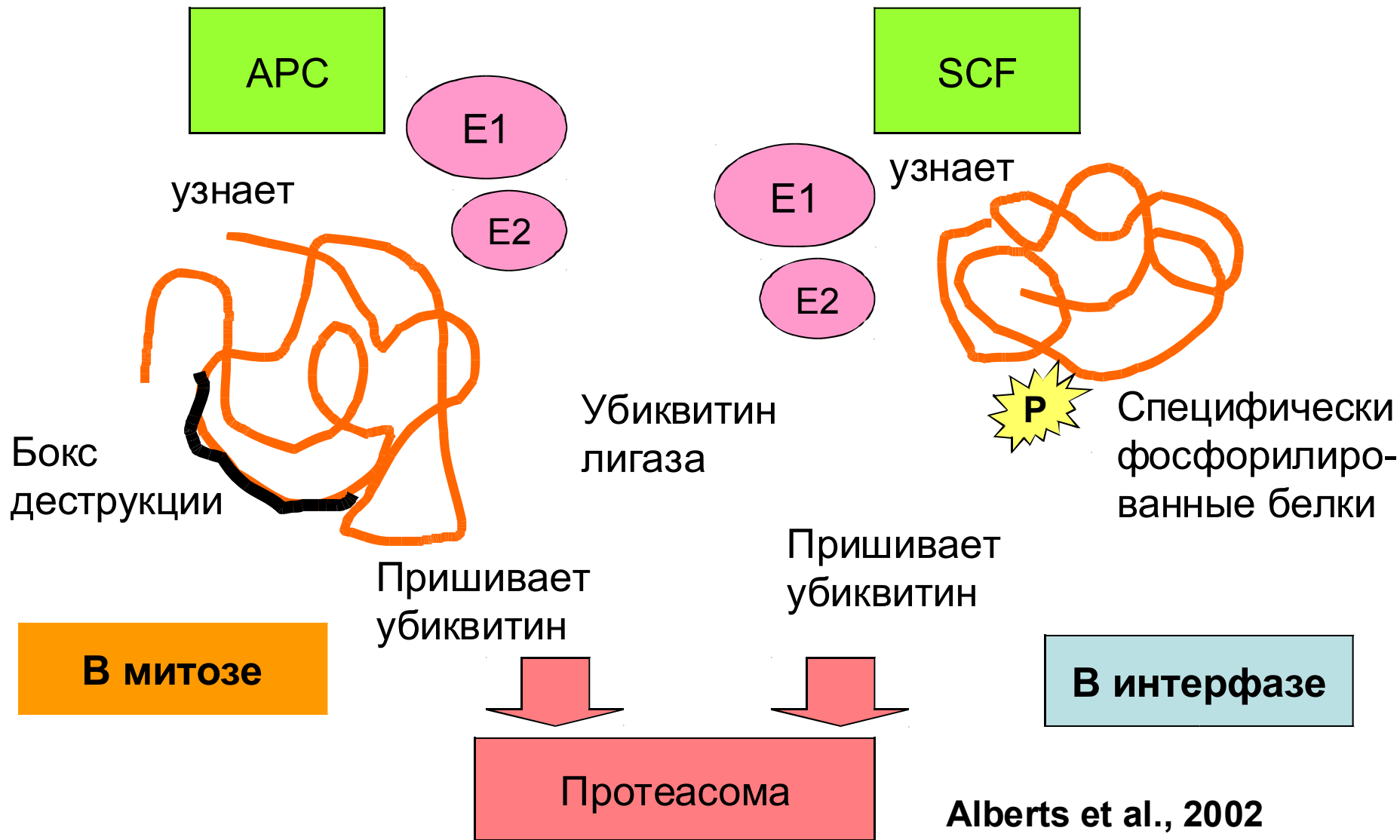


Инактивация Cdk ингибирующим белком :

Cdk-ингибирующий белок СКІ – связывается с комплексом Cus-Cdk, нарушая активный сайт



Две системы, обеспечивающие протеолиз:



26S протеасома

