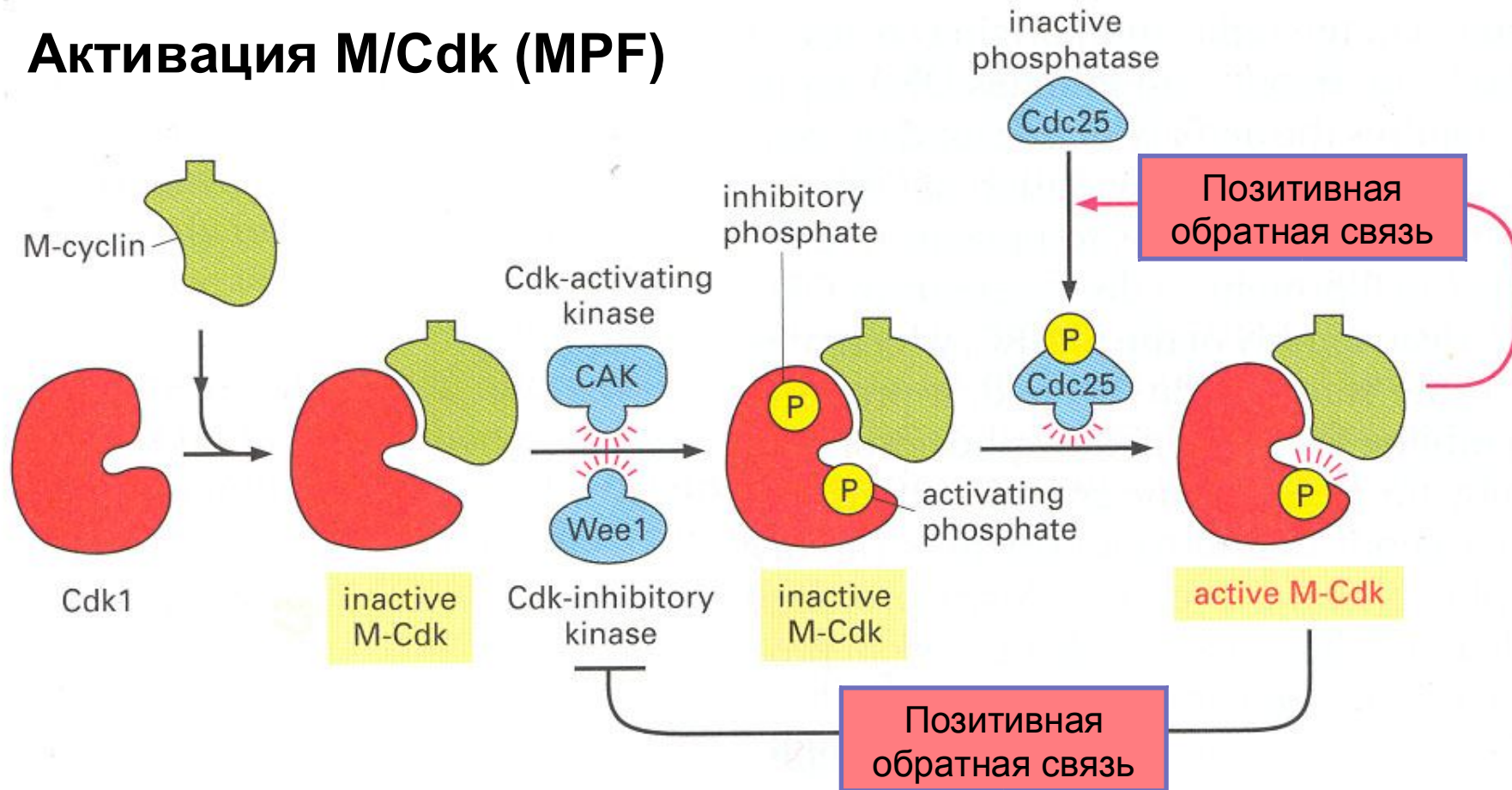


Генетика клеточного цикла

Электронно-лекционный курс
Глава 3

Подготовка к делению клетки

Активация M/Cdk (MPF)



Взрывообразное увеличение концентрации активного MPF

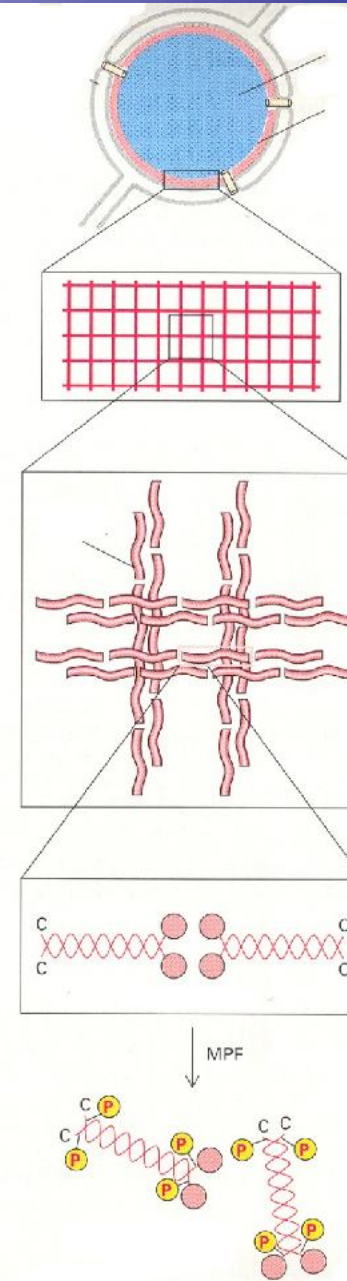
Трансформация ядра в клеточном цикле

Разборка ламины в профазе

Филаменты ламины

Тетрамер ламин

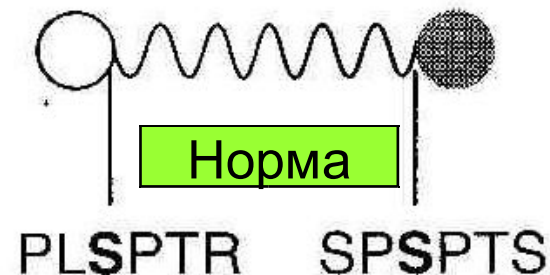
Фосфорилированные
димеры ламин

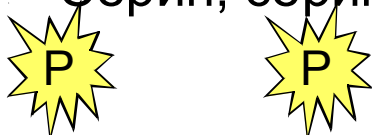


Фосфорилирование белков ламины

Мутантный ген ламина человека введен в клетки китайского хомячка. Замена аминокислоты в сайте фосфорилирования приводит к нарушению разборки ламины в митозе

Сайты фосфорилирования MPF мономеров ламины



Серин, серин


Фенотип


Разборка ламины

аланин, серин


Замедление разборки

Мутантные варианты

PLAPTR SPSPTS

треонин, аланин


Замедление разборки

PLTPTR SPAPTS

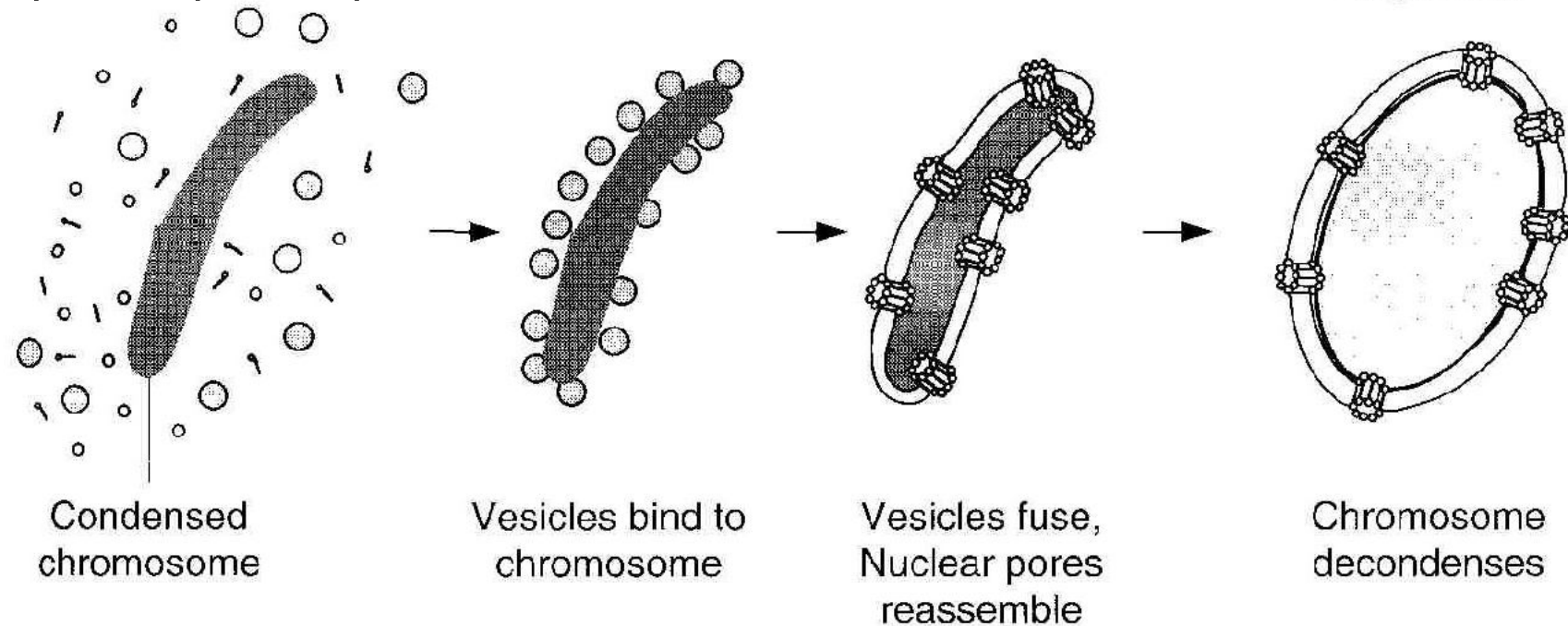
аланин, аланин

Нет разборки

PLAPTR SPAPTS

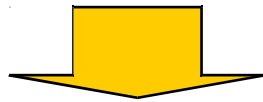
Восстановление интерфазного ядра в анафазе-телофазе.

Активность киназ снижается. Дефосфорилирование ламинов и их самосборка. Восстановление ядерной оболочки и поровых комплексов вокруг хроматина. Транспорт в ядро белков с NLS.



Изучение стабильности микротрубочек в бесклеточной системе яиц лягушки:

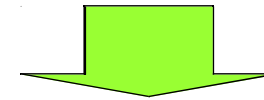
Центросомы
Флуоресцентный тубулин
Экстракт интерфаз



Микротрубочек немного, они длинные

Время полужизни микротрубочки 5 мин

Центросомы
Флуоресцентный тубулин
Экстракт метафаз



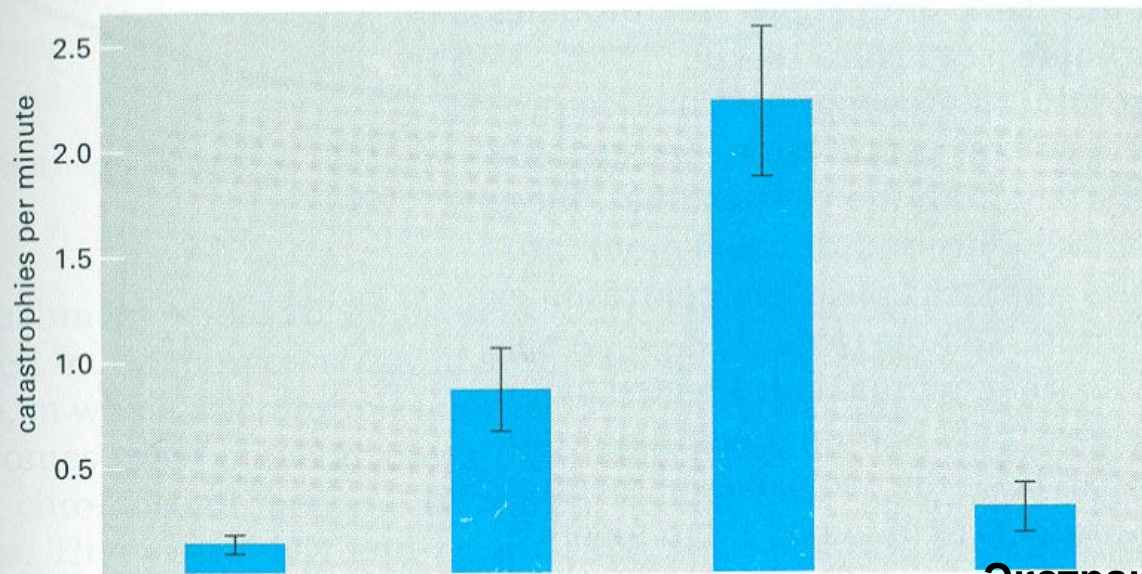
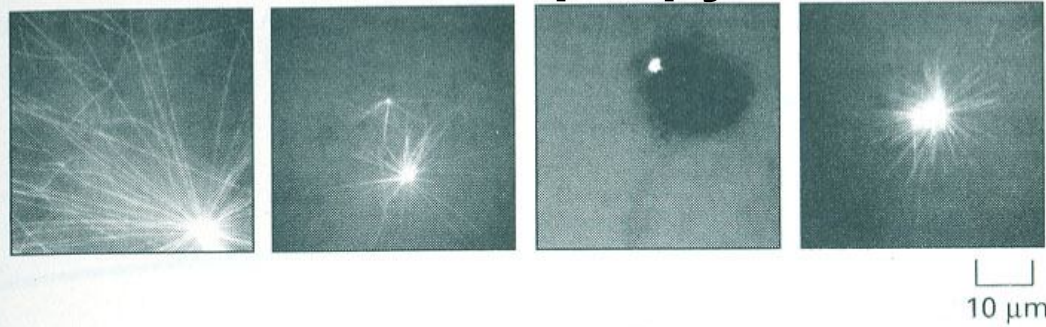
Микротрубочек много, они короткие

Время полужизни микротрубочки 15 сек

M-Cdk фосфорилирует микротрубочковые моторы и MAP (белки, ассоциированные с микротрубочками)

- Белки MAP – XMAP215- стабилизируют + конец
 - Белки катастрофины из семейства кинезин-подобных белков дестабилизируют + конец, расщепляют на протофиламенты
- Баланс активностей приводит к динамической нестабильности мт

Влияние белков MAP и катастрофина на стабильность микротрубочек

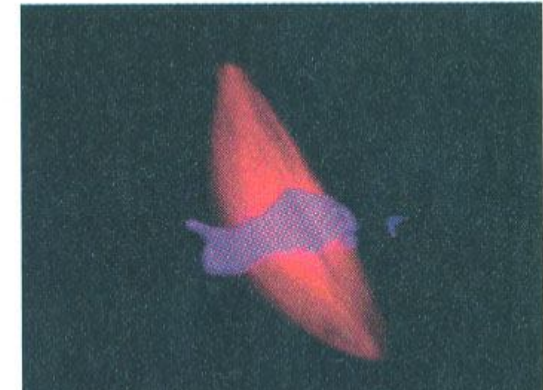


Экстракт интерфазы

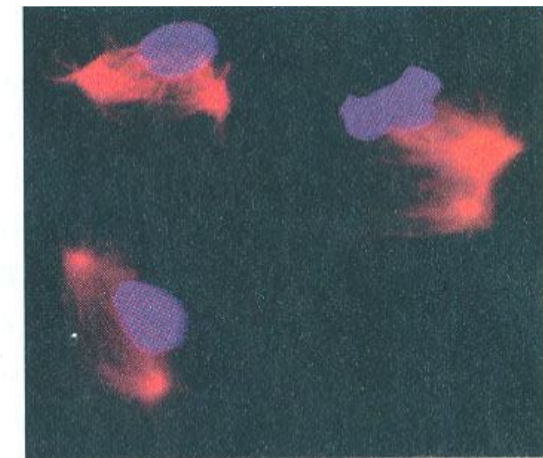
Экстракт метафазы

Экстракт метафазы, удален ХМАР215

Экстракт метафазы, удален ХМАР215, инактивирован катастрофин

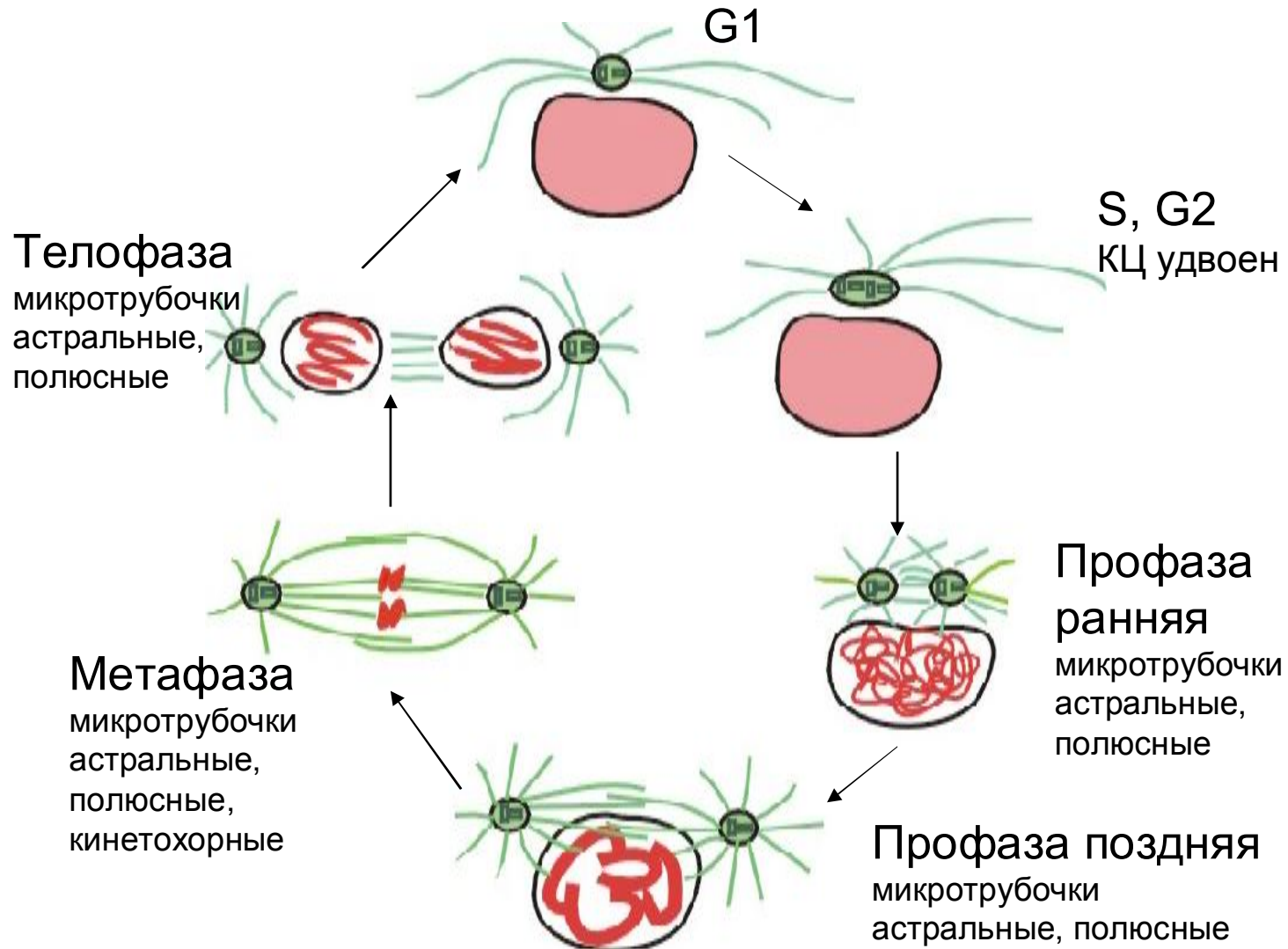


Митоз в нормальном экстракте



(B) Митоз в экстракте, удален ХМАР215

Динамика тубулинового скелета в клеточном цикле



Дупликация centrosомы запускается Cdk2/cyclin E в переходе G1-S

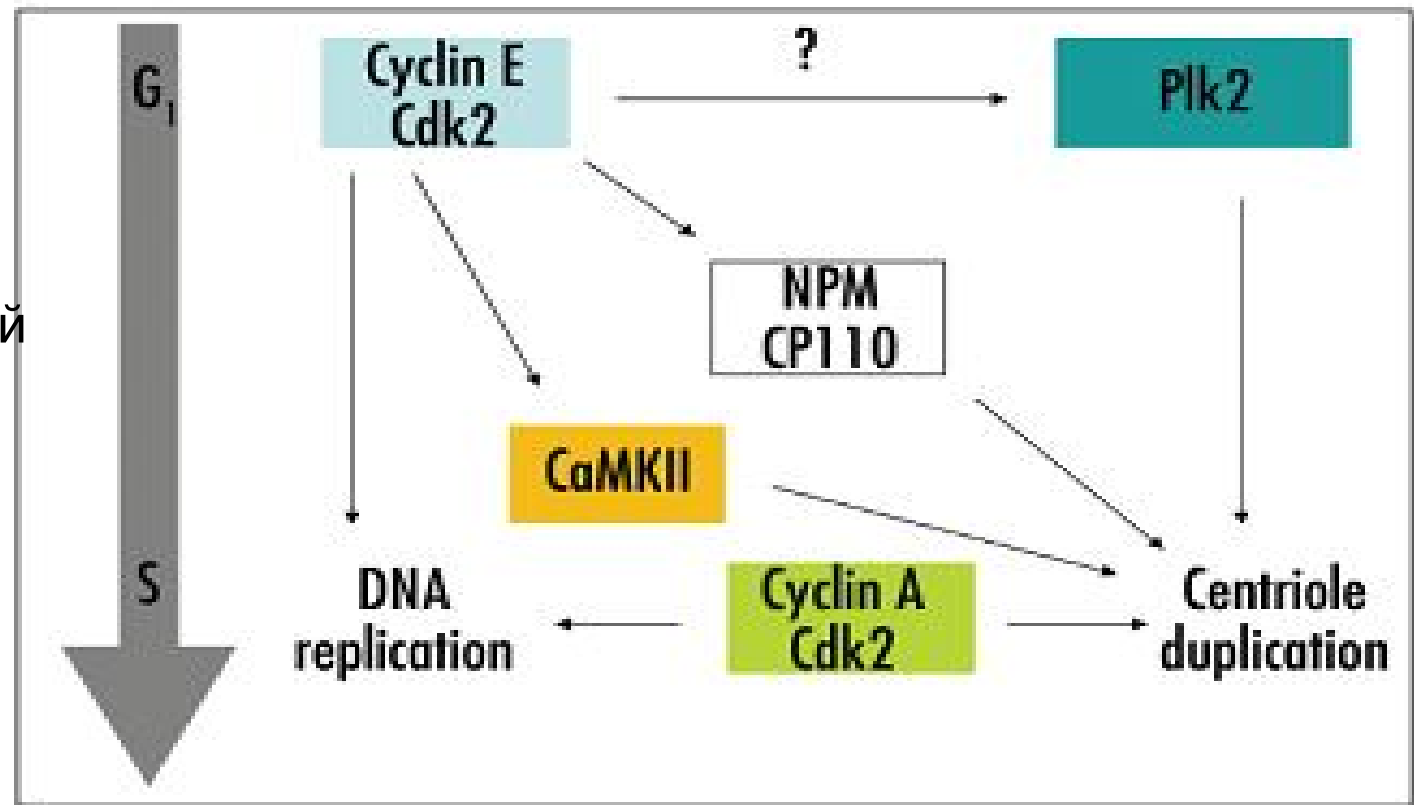
Далее, в S, репликация контролируется Cdk2/cyclin A

Polo-like-kinases найдены у многих видов. Пик активности Plk2 в переходе G1-S

Plk1 участвует в привлечении γ -тубулина в centrosомы во время их созревания – для нуклеации микротрубочек из centrosом

NPM, CP110 –
белки centrosом

CaMKII-
кальмодулиновый
комплекс

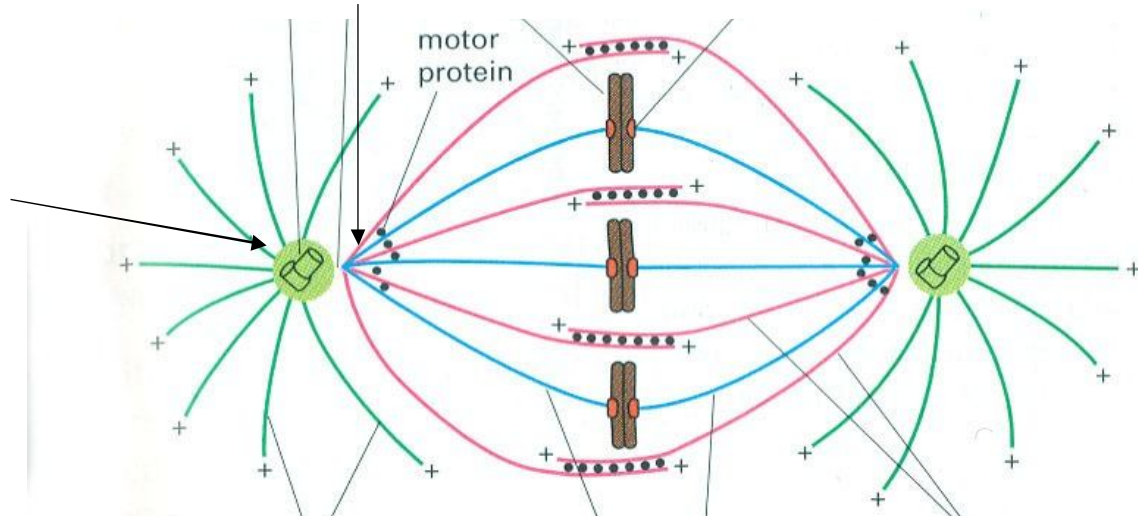


I.Hoffman, 2004

Микротрубочки, образующие веретено

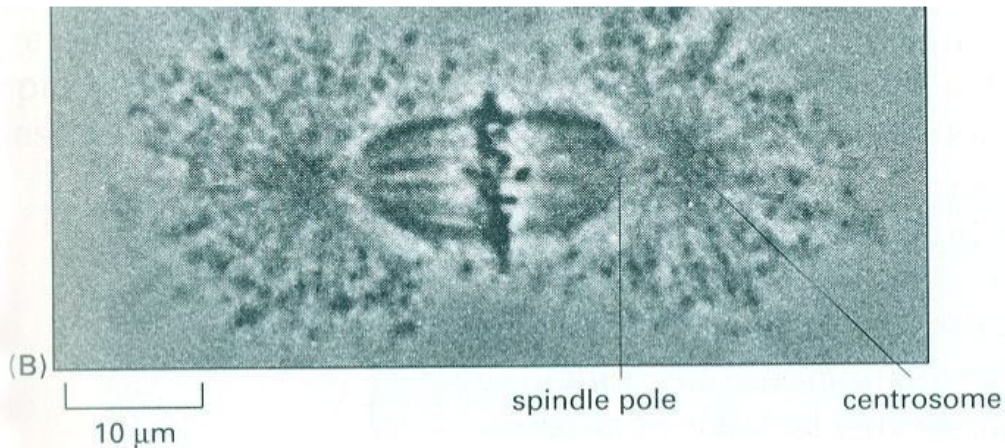
Полус веретена кинетохоры

центросома



Микротрубочки

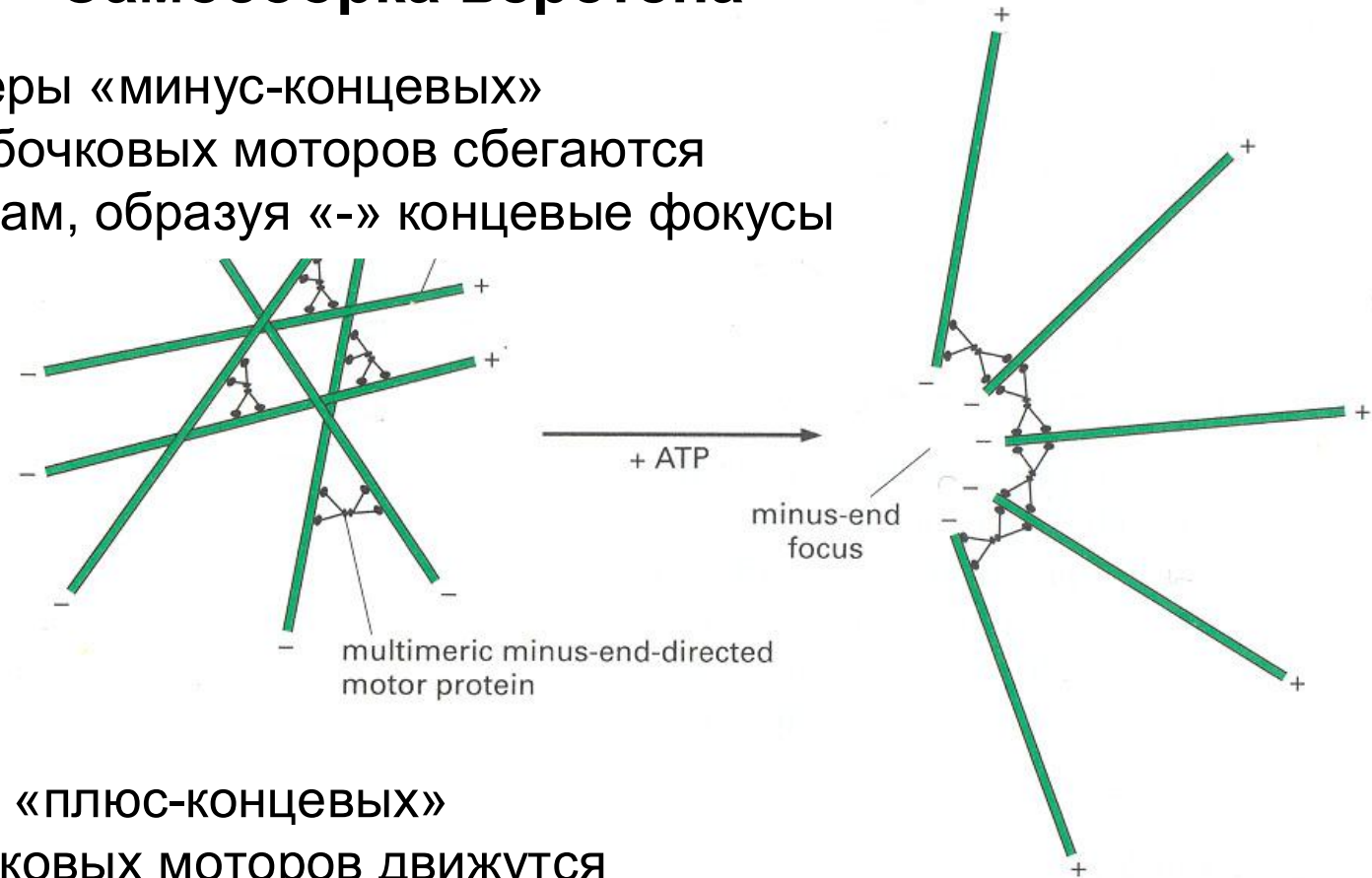
Астральные кинетохорные полюсные



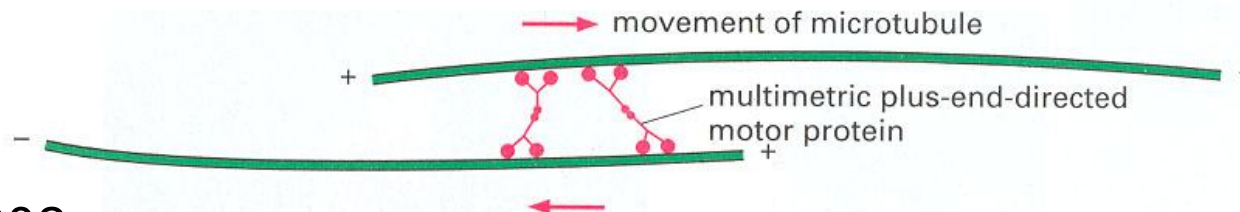
Alberts et al.,
2002

Самосборка веретена

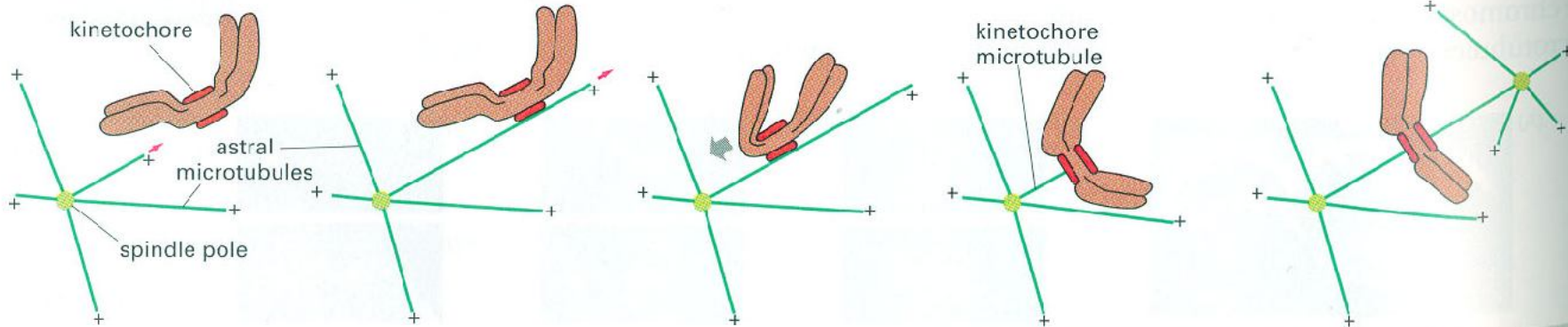
Мультимеры «минус-концевых»
микротрубочковых моторов сбегают
к «-» концам, образуя «-» концевые фокусы



Мультимеры «плюс-концевых»
микротрубочковых моторов движутся
к «+» концам по встречным микротрубочкам,
раздвигая полюса



Динамика присоединения хромосомы к полюсам



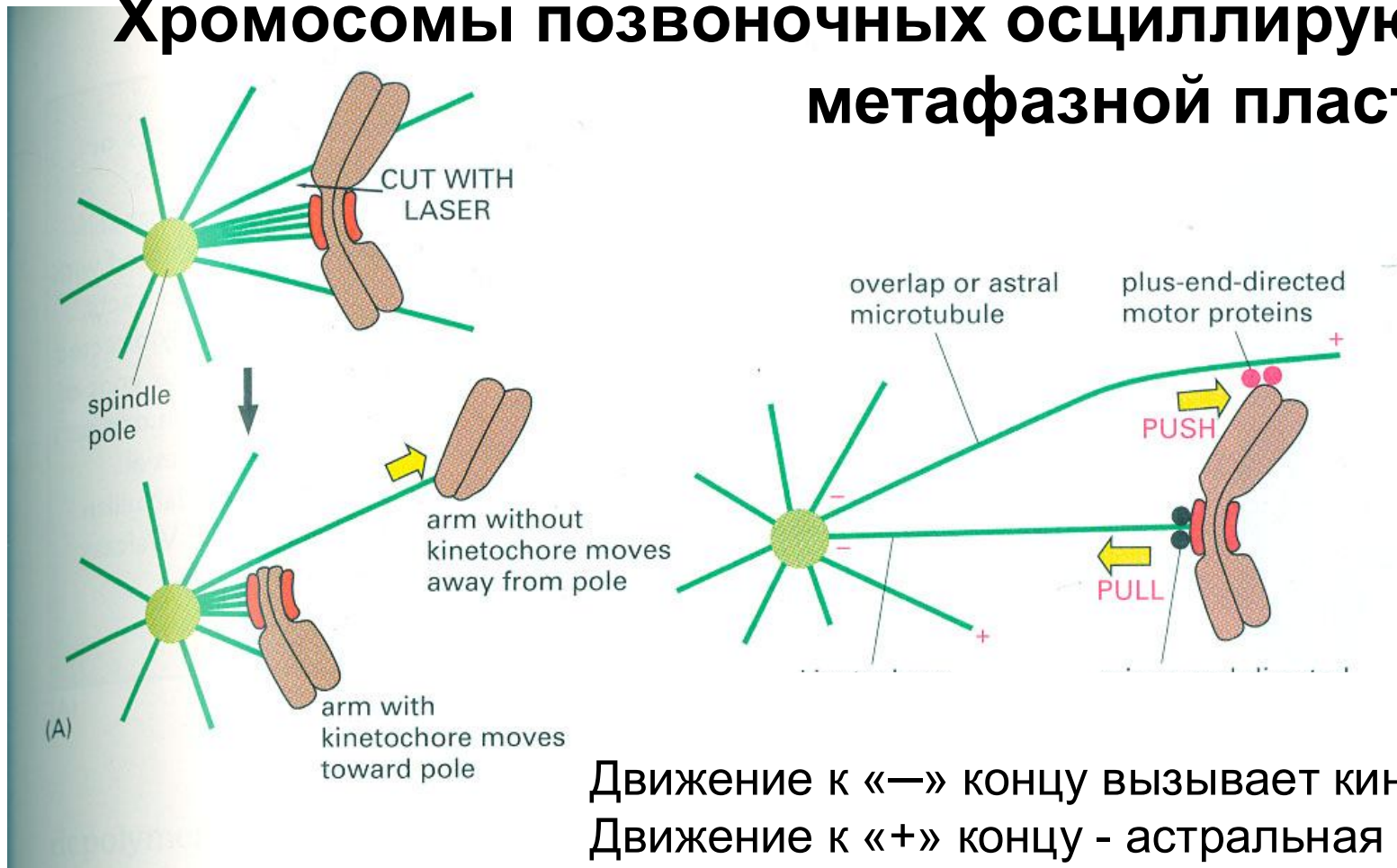
Астральные микротрубочки.
Латеральное прикрепление кинетохора
к микротрубочке, скольжение

Астральные и полюсные трубочки
находятся в состоянии динамической
нестабильности, кинетохор
стабилизирует кинетохорные трубочки

Кинетохор прикрепляется
к «+» концу микротрубочки,
кинетохор другой хроматиды
ловит микротрубочку с
противоположного полюса.
Кинетохорные микротрубочки

У полюсных и кинетохорных
явление полярного течения:
Сколько прибыло на «+» конце,
убыло на «-»

Хромосомы позвоночных осциллируют в метафазной пластинке

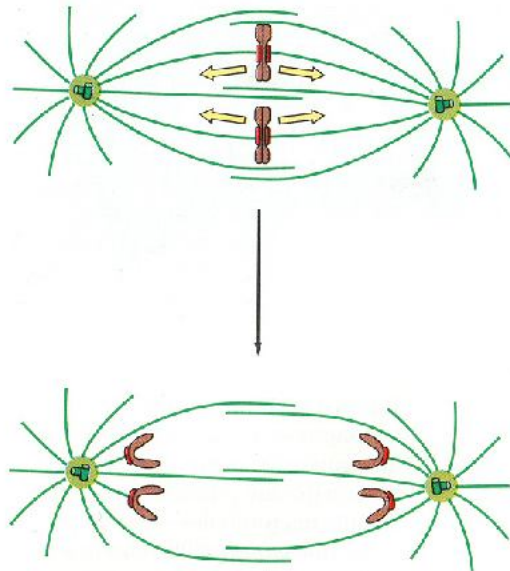


Движение к «—» концу вызывает кинетохор
Движение к «+» концу - астральная мт
выталкивающая сила –микротрубочковые
моторы, локализованные на плечах хромосом

Механизм расхождения хромосом в анафазе

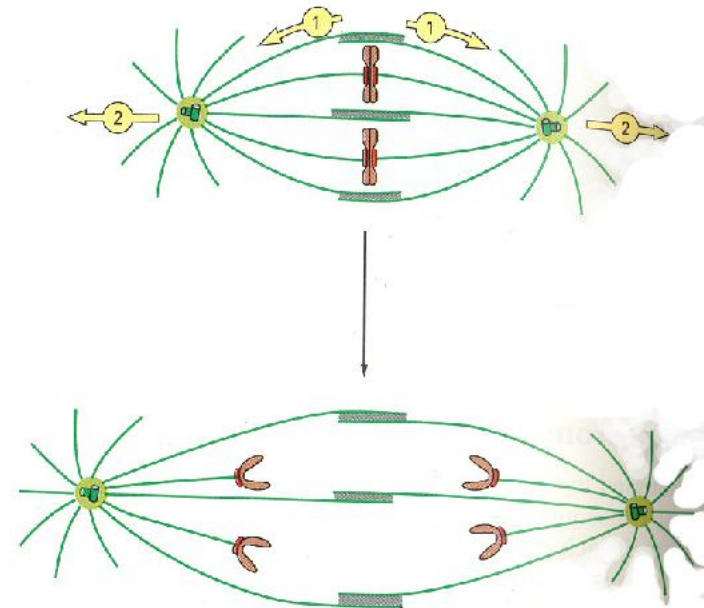
Совмещение двух процессов:

Анафаза А



Укорочение кинетохорных микротрубочек

Анафаза В



1. Удлинение и расталкивание полюсных микротрубочек
2. Астральные мт тянут полюса к клеточной поверхности

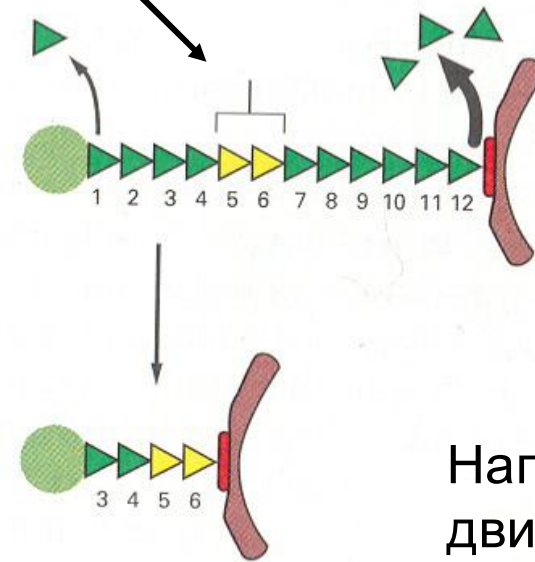
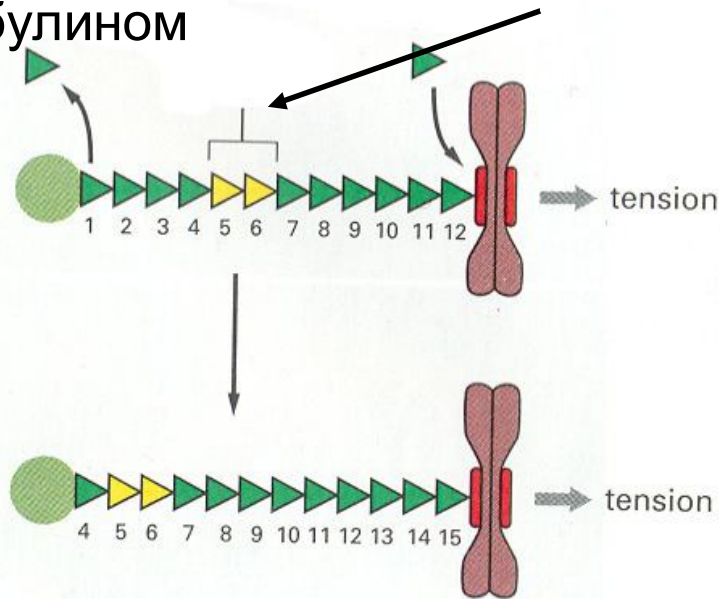
Кинетохорные микротрубочки в метафазе -анафазе

Флуоресцеин
ковалентно
связан с
тубулином

Метафаза

Анафаза

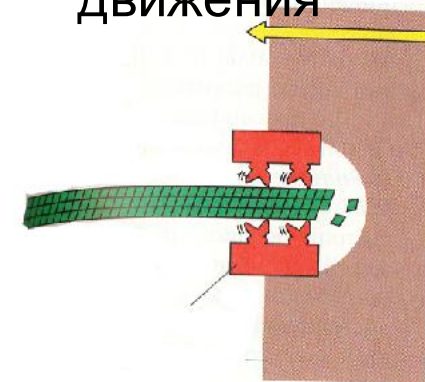
UF меченые тубулины



0.75 мкм/мин

Разрушение «+» конца
микротрубочек белками
кинетохора

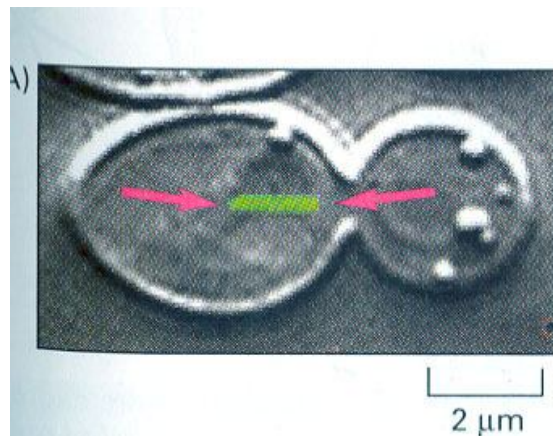
Направление
движения



кинетохор

Баланс активности микротрубочковых моторов «+» и «-» направлений

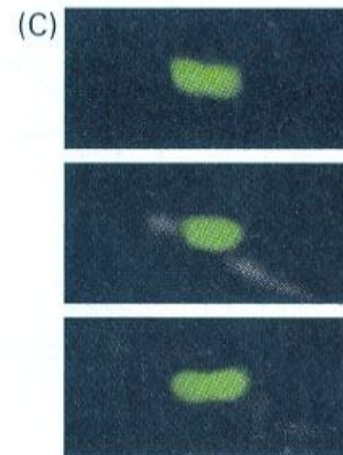
У позвоночных 7 семейств кинезин-подобных белков в митотическом веретене, у *S.cerevisia* - 5



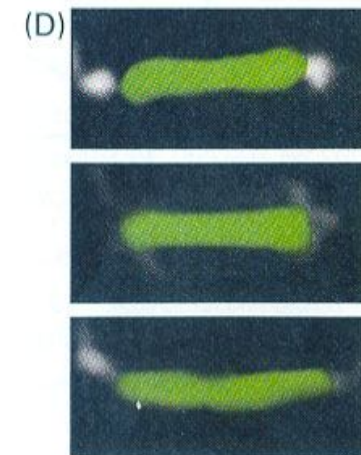
Веретено у *S.cerevisia*, окраска на тубулин



Норма



Оверэкспрессия *Kar3p* «-» концевое мт мотора



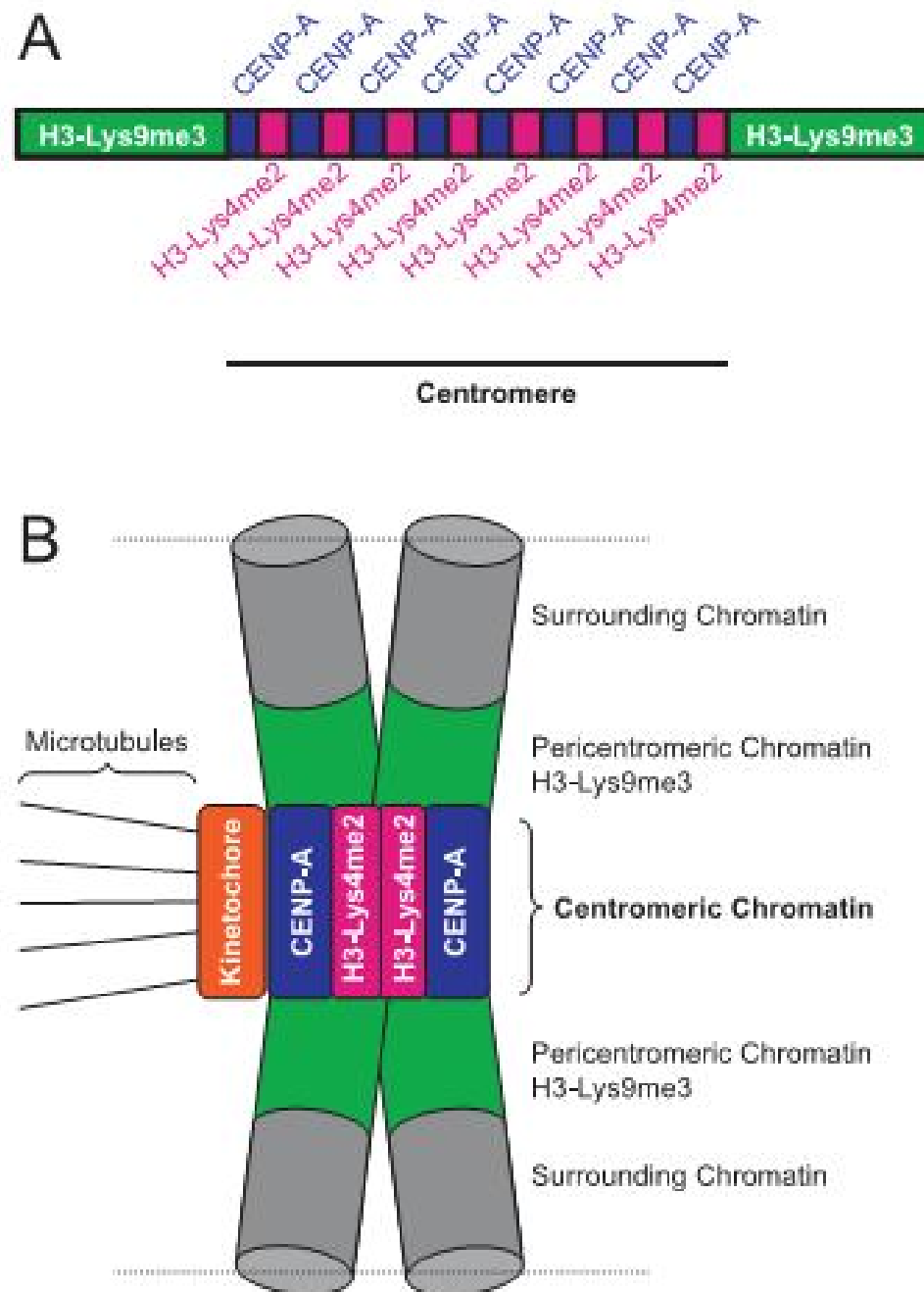
Оверэкспрессия *Cin8p* «+» концевое мт мотора

Структура центромерного домена

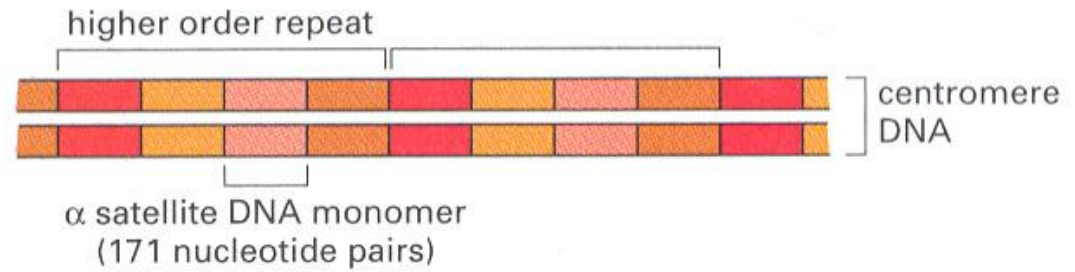
A - Растянутая хроматида в
районе центромеры

CENP-A – аналог гистона H3

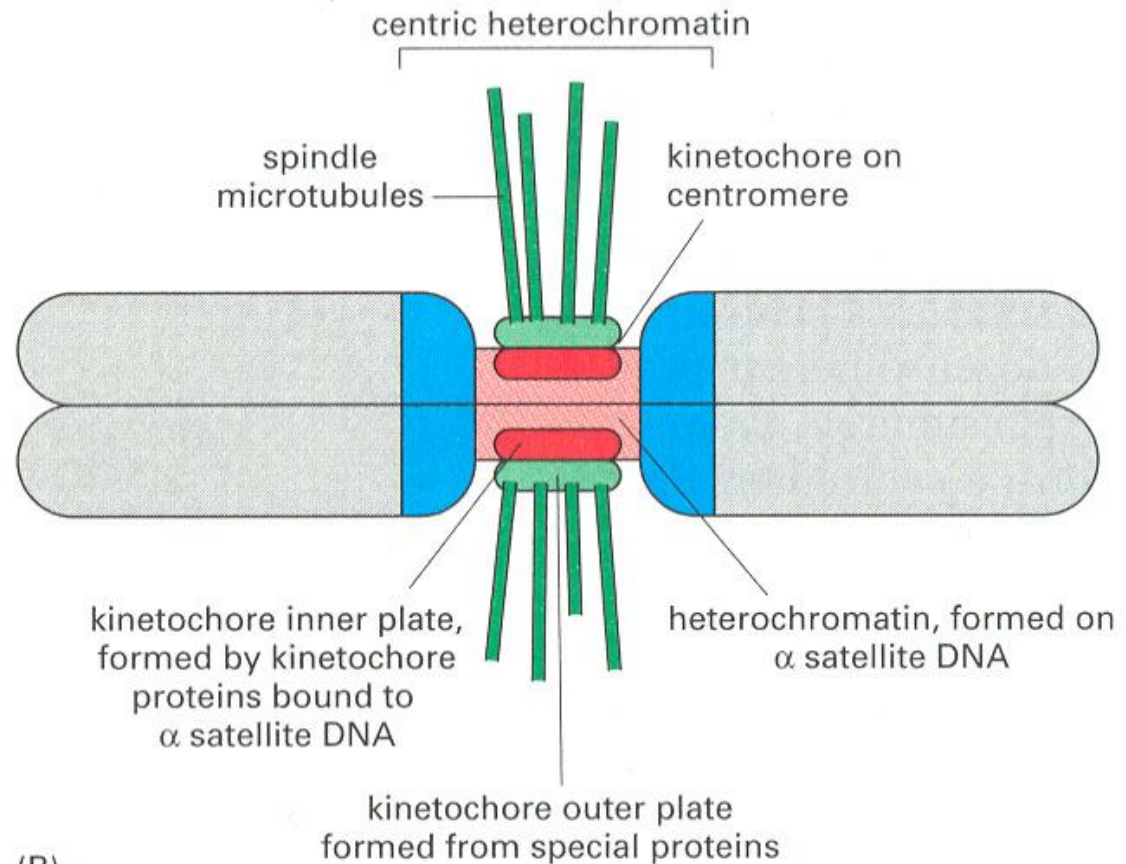
B – Центромерный район
метафазной хромосомы



Строение кинетохора



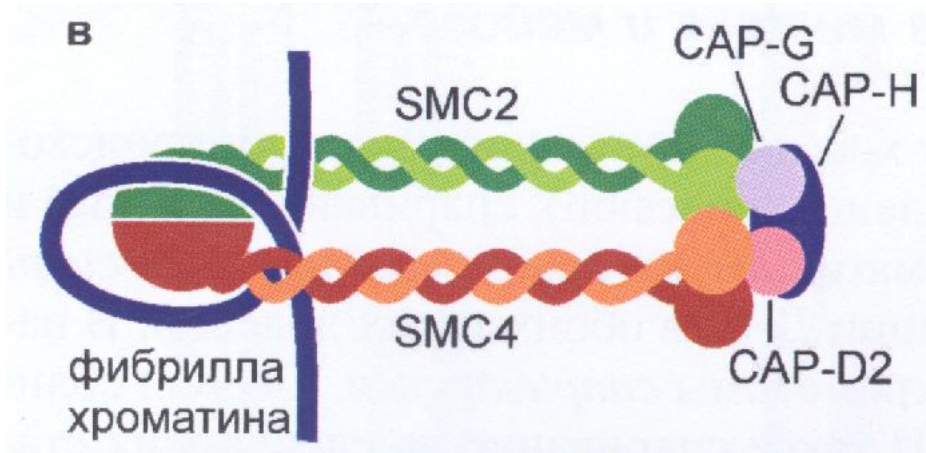
(A)



(B)

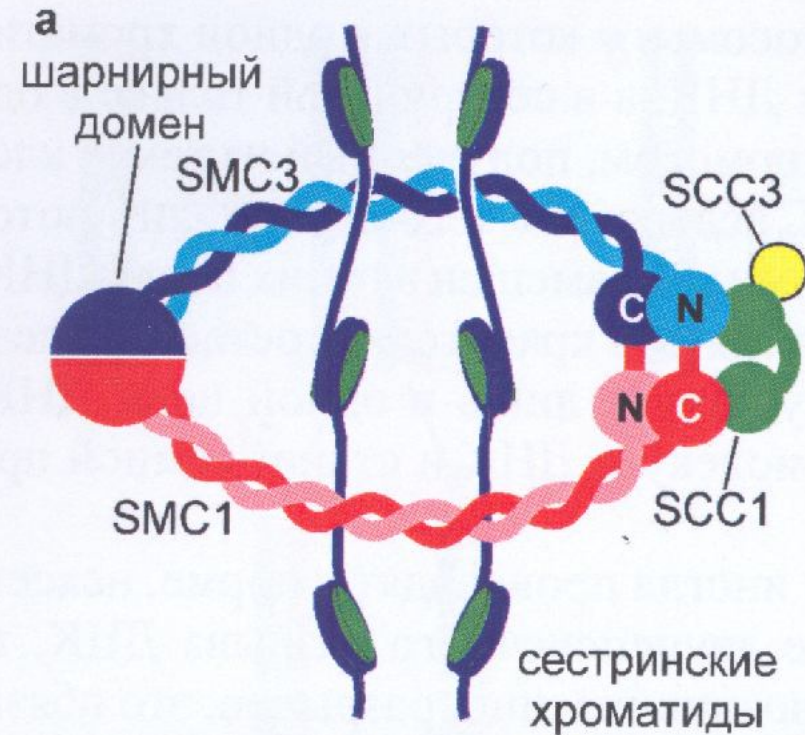
SMC-белки в клеточном цикле

M-Cdk фосфорилирует конденсины, конденсация хроматина *in vitro* (бесклеточный экстракт лягушачьих яиц)

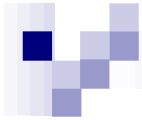


Димер конденсина.
Участие конденсинов
в конденсации хроматина

Хромосомы конденсируются и разделяются



Когезиновое
кольцо



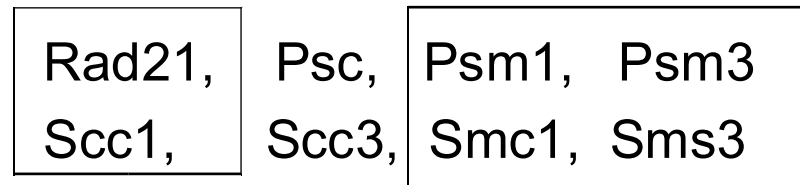
Когезины

Когезины – семейство SMC (structural maintenance of chromosome) белков

- Когезиновые кольцеобразные комплексы вводятся перед репликацией с гидролизом АТФ
- Когезия запускается белком Eco1 (Ctf7), а он связан с PCNA, кольцевым кофактором ДНК-полимеразы

Когезины дрожжей в митозе:

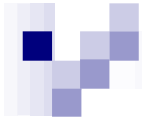
- *Sh. pombe* (fission) :
- *S. cerevisia* (budding):



Замыкает
когезиновое
кольцо

Отвечает за
локализацию
на хромосоме
(связь с Swi6
и HP-1)

Гетеродимер
охватывает ДНК



Активация M-Cdk:

Индукцирует сборку веретена

вызывает конденсацию хромосом

растворение ядерной оболочки

перестройку тубулинового цитоскелета

реорганизацию аппарата Гольджи и ЭПС

Фосфорилирование
белков этих
структур или их
регулирующих

Инактивация M-Cdk:

Те же события разворачиваются

в обратном направлении

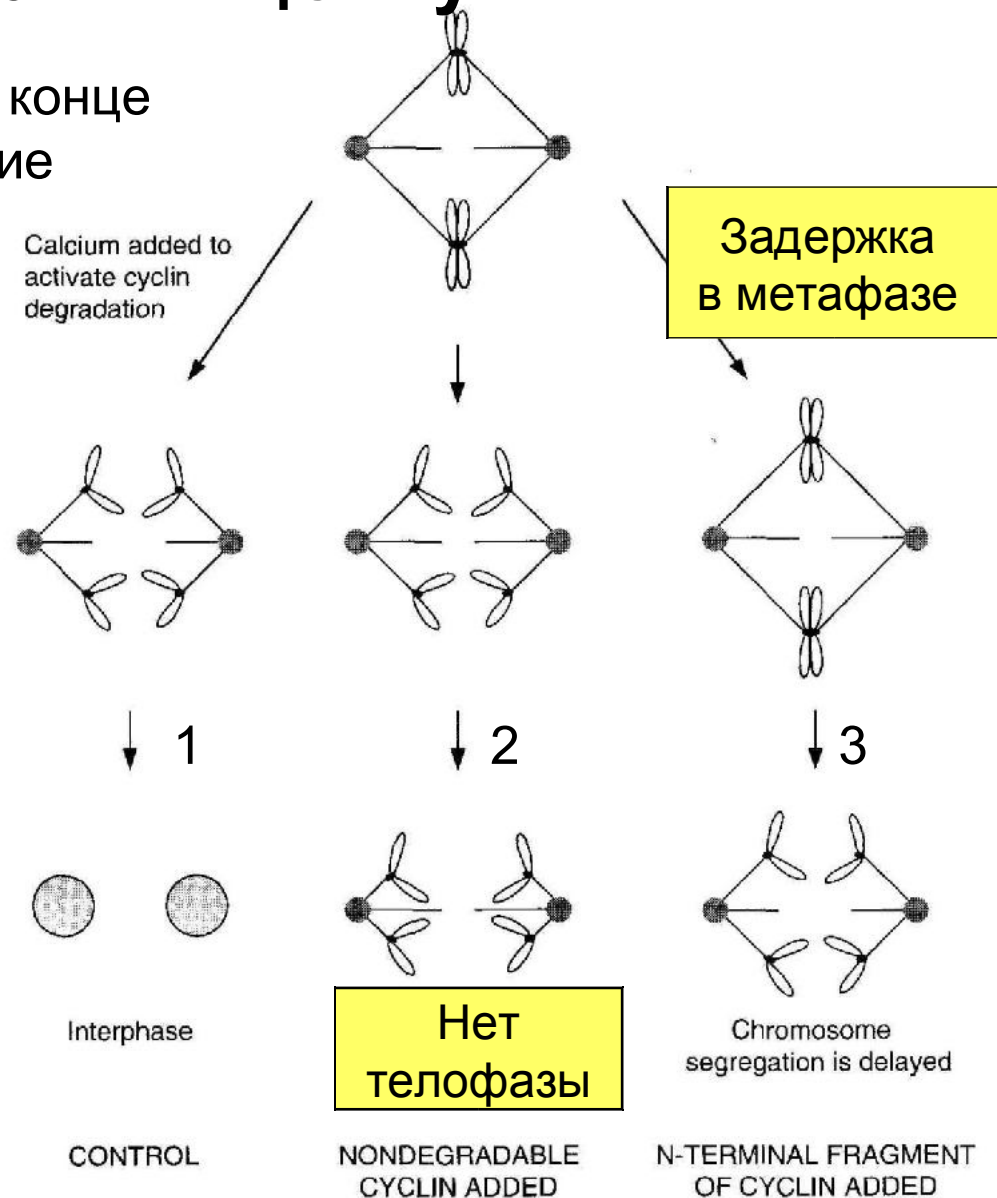
дефосфорилирование

Не понятно, что вызывает сегрегацию хромосом и цитокинез?

Бесклеточный экстракт яиц лягушки.

Концентрация циклина падает в конце митоза. Это вызывает разделение хроматид?

- 1- Добавление Ca^{2+} активирует деградацию циклина - нормальная анафаза-телофаза
- 2- Введение циклина без бокса деструкции – хроматиды сегрегируют, деконденсации нет
- 3- Введение N-концевого фрагмента циклина с боксом деструкции – задержка сегрегации, анафазы-телофаза

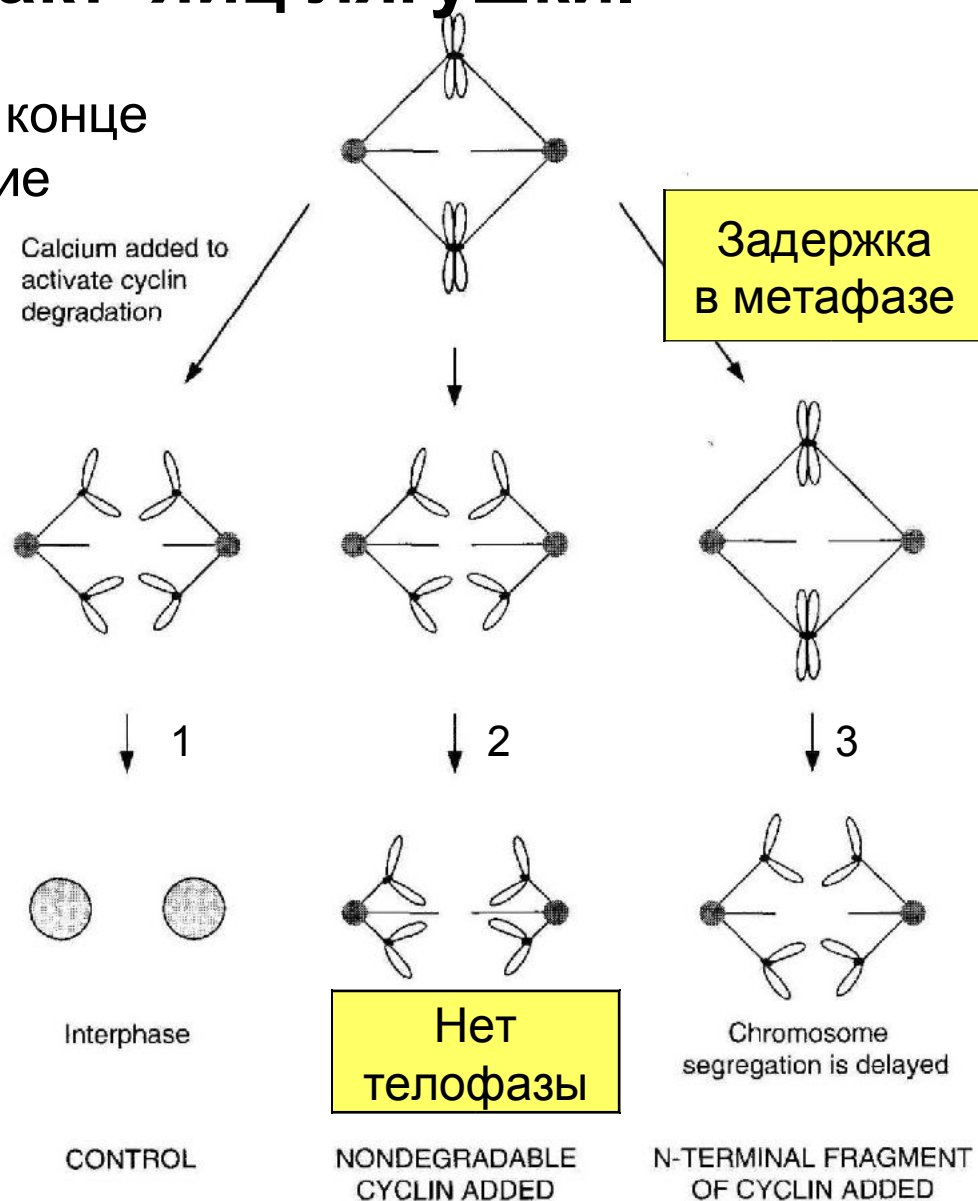


Murray A., Hunt T., 1993

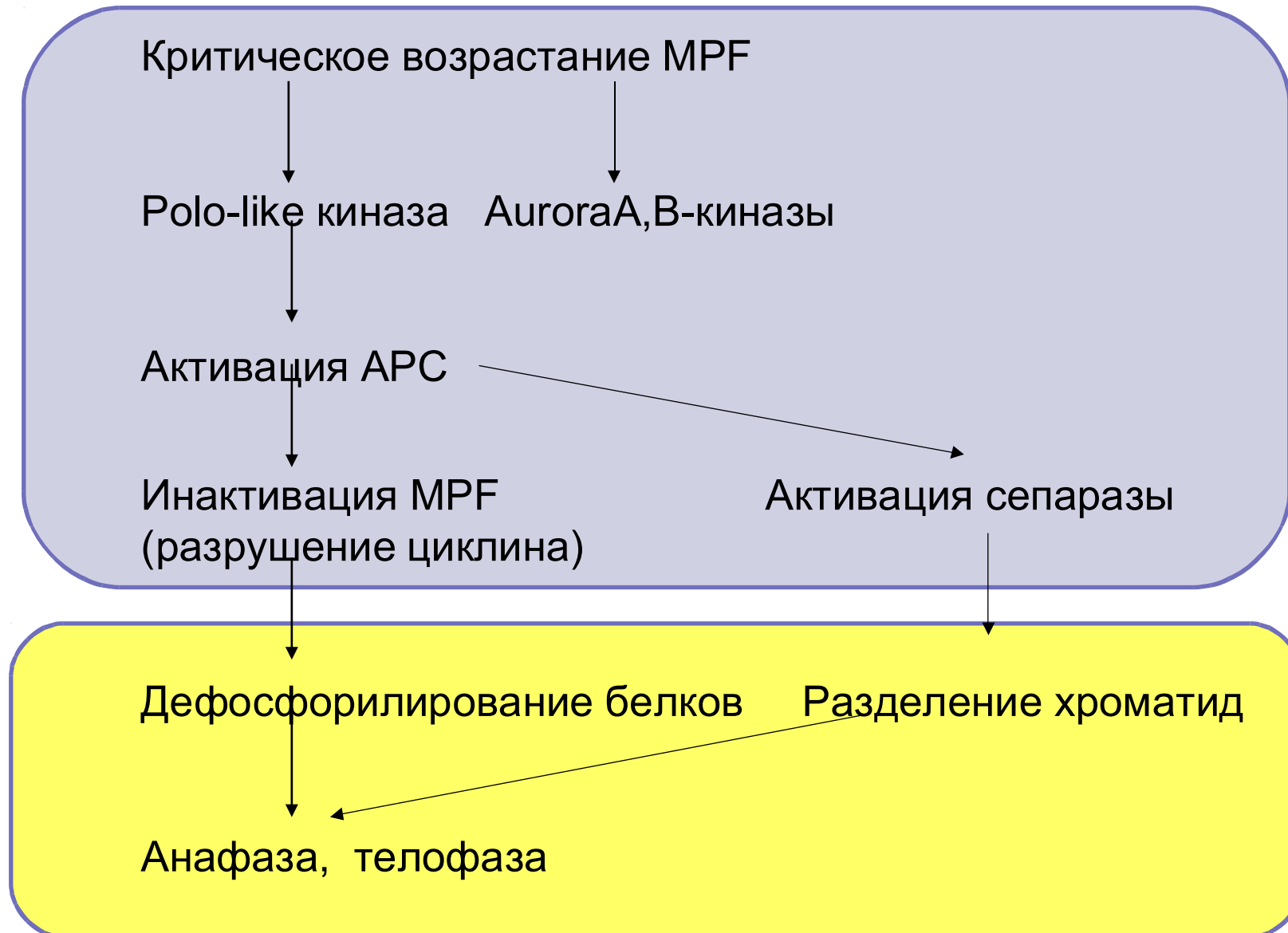
Бесклеточный экстракт яиц лягушки.

Концентрация циклина падает в конце митоза. Это вызывает разделение хроматид?

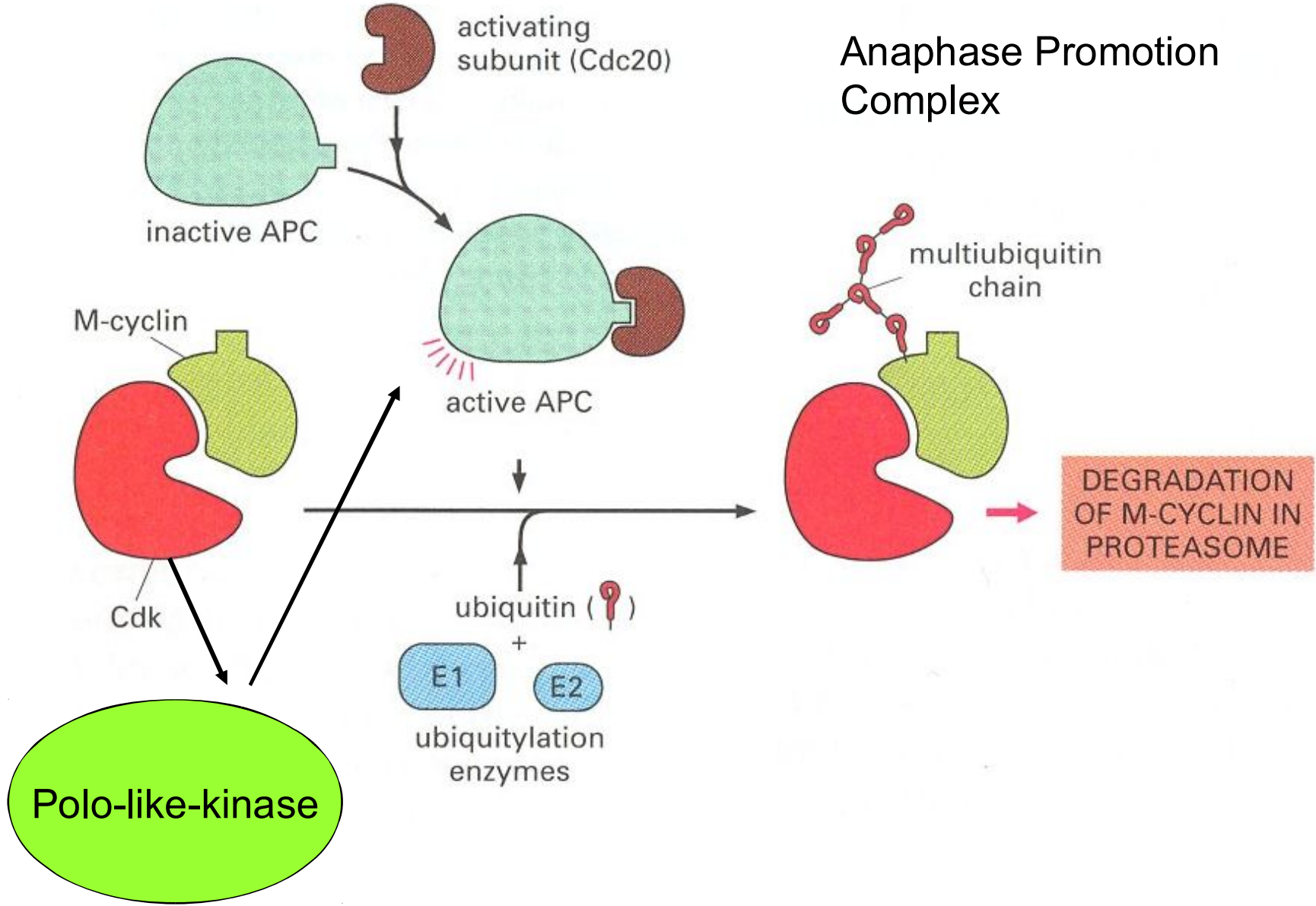
Для разделения хроматид не нужно разрушение циклина. Разрушение циклина вызывает телофазу.



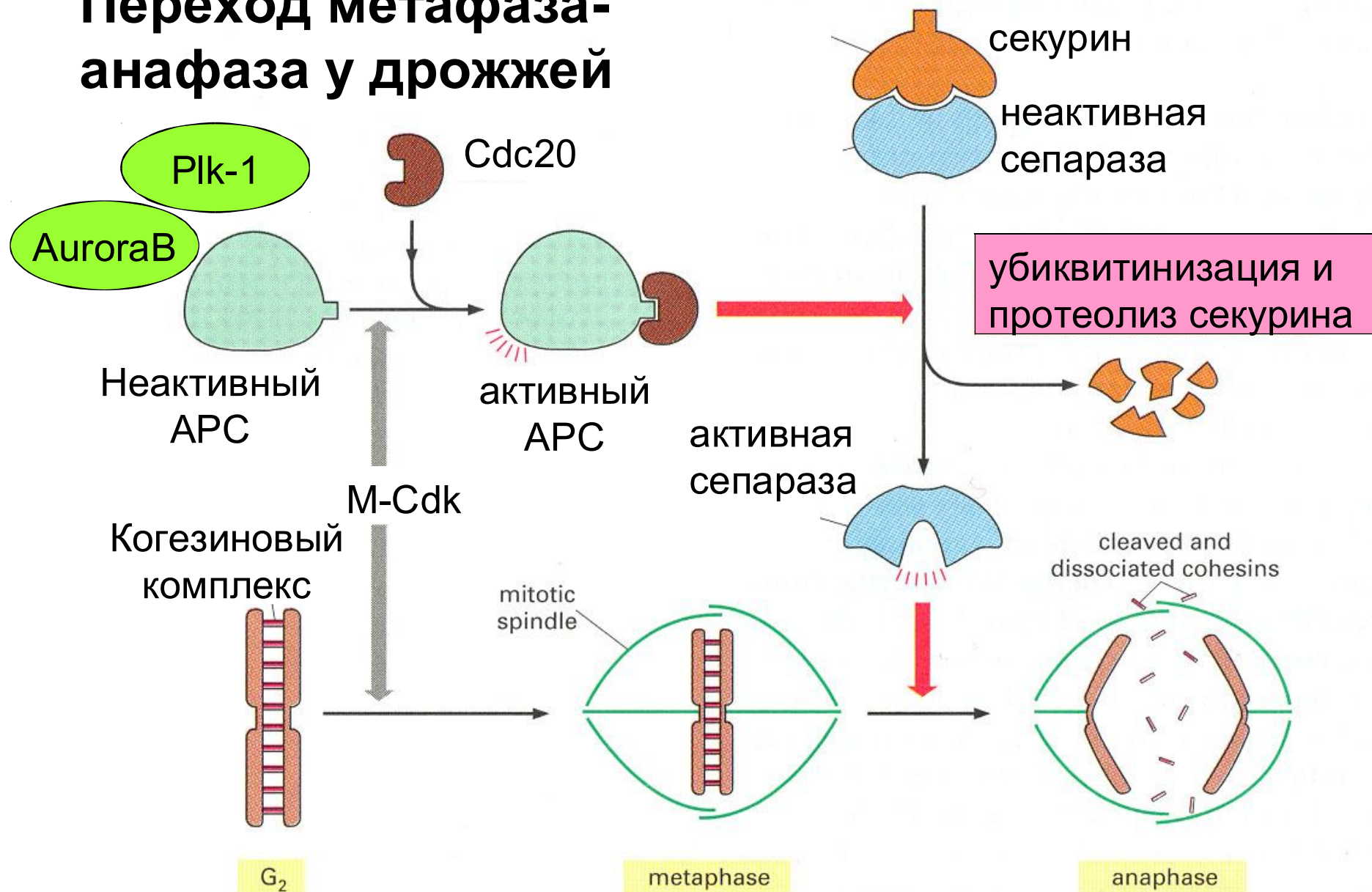
Переход Метафаза-Анафаза




Протеолиз циклина под контролем APC



Переход метафаза-анафаза у дрожжей





Переход метафаза- анафаза у дрожжей

Основные участники:

- APC - anaphase promotion complex – при добавлении субъединиц E1 и E2 служит убиквитин лигазой
- Cdc20 - белок, активирующий APC
- Сепараза – протеаза, разрезающая один из когезинов (Rad21, Scc1)
- Секурин- белок, инактивирующий протеазу
- Polo-like – киназа 1 – активирует APC (Plk-1)



Разделение сестринских хроматид в митозе

Дрожжи:

Сепараза разрезает когезины по всей длине хромосом в переходе М-А

Позвоночные (человек, HeLa):

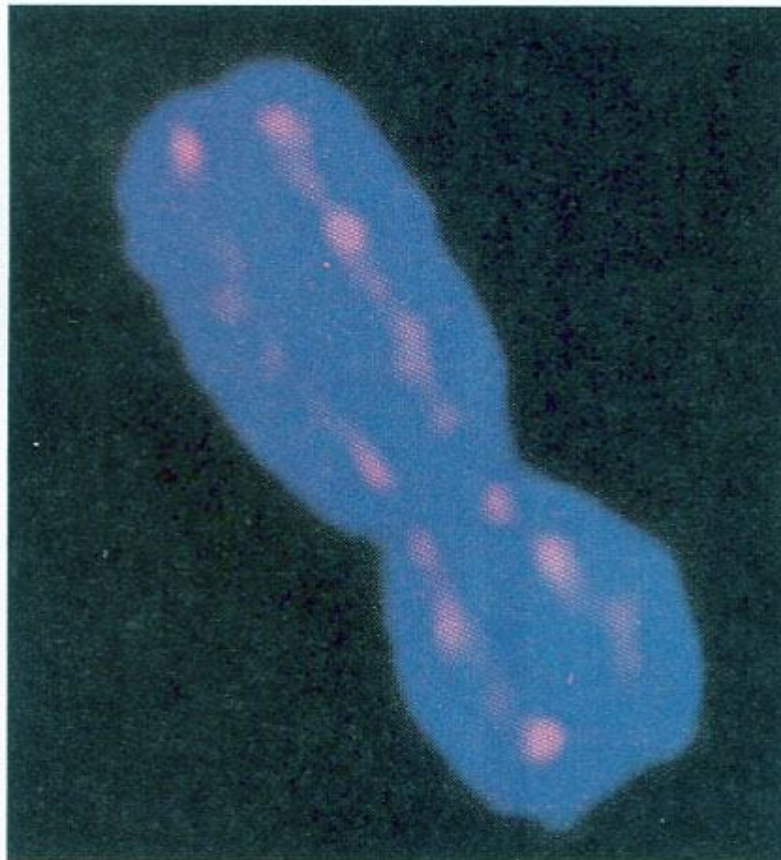
1. Профаза-прометафаза:

- Polo-подобная киназа и Auroга- киназа фосфорилируют и удаляют когезины по плечам хромосом в течение профазы.
- Белок шугошин препятствует отделению когезинов в центромерном районе (присоединяет фосфатазу).
- Количество конденсинов нарастает

2. Переход М-А:

Сепараза разрезает когезины в центромерном районе

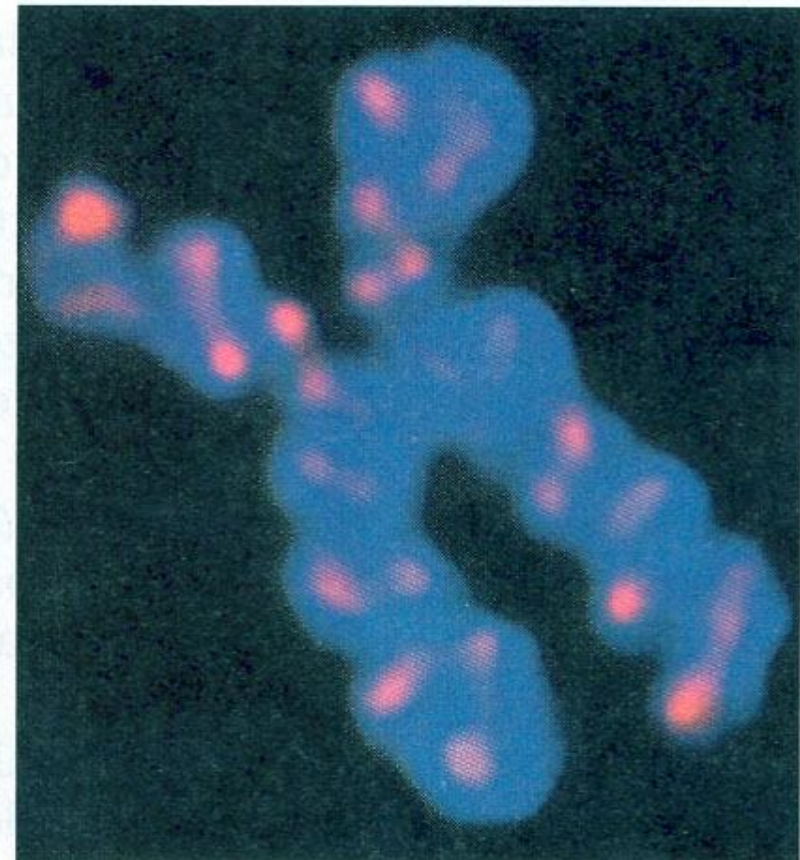
Хромосомы человека, окраска антителами на конденсины (красный), ДНК окрашена DAPI (голубой)



(A)

Типичная митотическая хромосома

Alberts et al., 2002



(B)

Метафазная хромосома, 1 μm
метафазный арест
(колхицин)

Цитокинез

Должен происходить в нужное время в нужном месте

Сократительное кольцо образуется под мембраной, его плоскость перпендикулярна веретену

Активированные, но неоплодотворенные яйца лягушки: нет centrosомы – нет веретена – нет цитокинеза

Сдвиг веретена сдвигает сократительное кольцо. Сокращение началось – веретено можно удалить – цитокинез продолжится.

Активная форма MPF фосфорилирует легкую цепь миозина

АТФ-азная активность миозина ингибируется, кольцо сокращаться не может

Фосфатазы отщепляют фосфат – сокращение кольца

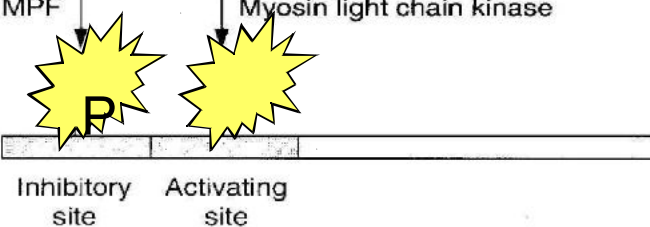
Интерфаза

Myosin light chain



MPF ↓ Myosin light chain kinase

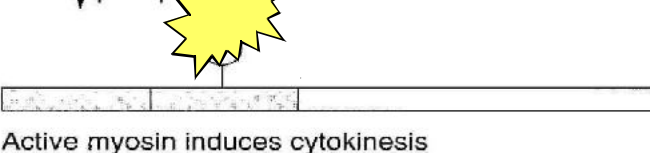
Метафаза



Inhibitory site Activating site

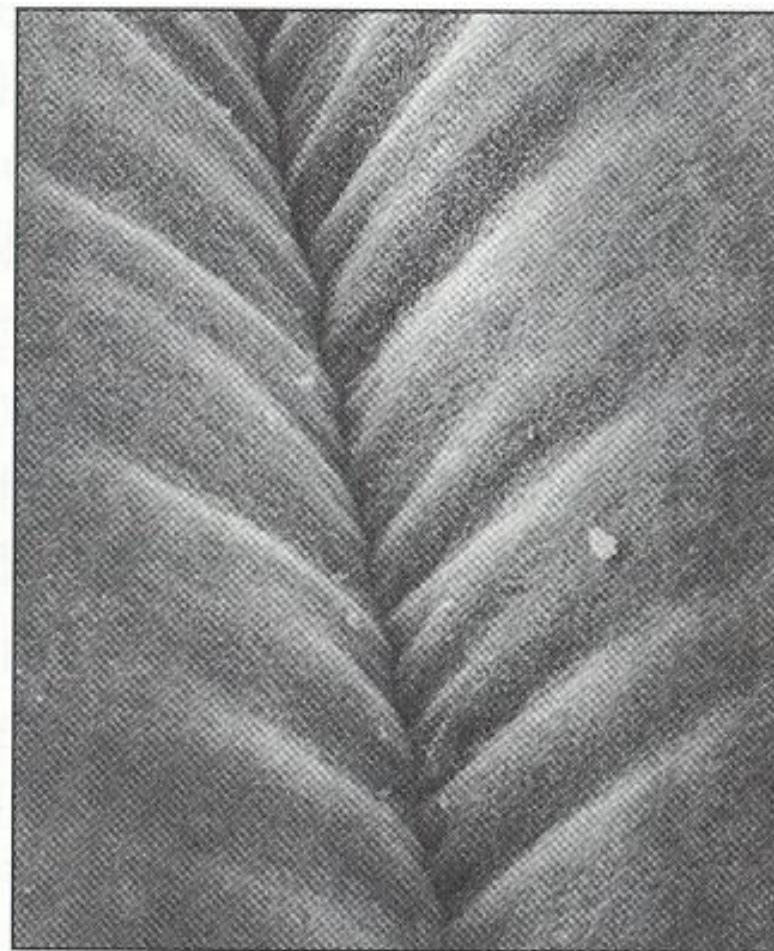
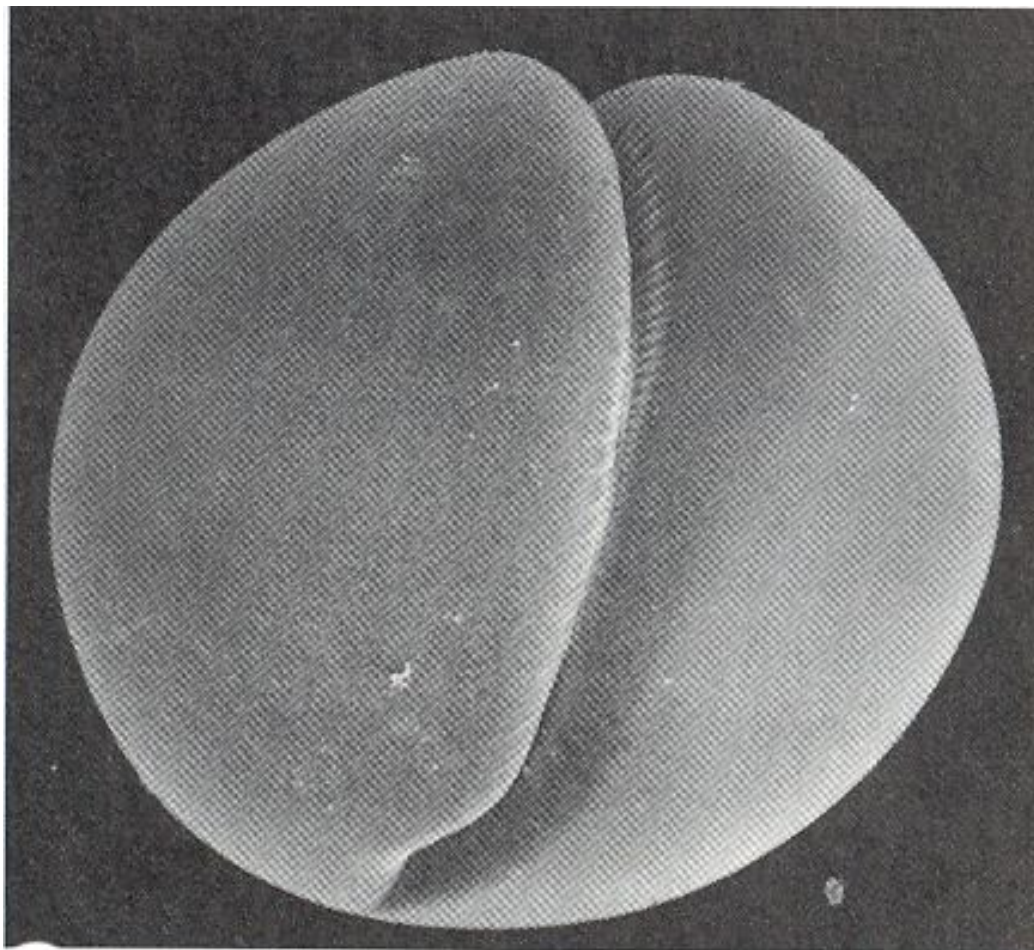
Цитокинез

MPF turns off phosphatase



Active myosin induces cytokinesis

Цитокинез в яйце лягушки- борозда дробления





CPC- chromosomal passenger complex

CPC, хромосомные пассажиры: белки, локализованные в специфических районах:

- в G2 – внутриядерно,
- в профазе митоза – вдоль конденсирующихся хромосом,
- в метафазе – в центромерных районах хромосом,
- в анафазе – в центральном веретене,
- в телофазе- в остаточном тельце веретена

Комплекс работает в митозе и мейозе, контролирует:

- Хромосомную модификацию (фосфорилирование гистона H3)
- Хромосомную конгрессию (построение)
- Прикрепление кинетохоров к микротрубочкам, коррекция
- Формирование стабильного биполярного веретена
- Участвует в митотической точке контроля



CPC- chromosomal passenger complex

Aurora киназа В - каталитическая субъединица CPC

Survivin
Borealin
INCENP
TD-60
CSC-1

регуляторный кор комплекса –
регулирует активность Aurora
киназы В

Aurora серин-треонин киназа- у дрожжей (А), у дрозофилы (А и В), у человека (А, В, С).

Aurora киназа-В фосфорилирует:

Н3-гистон,

СENP-А, кинетохоро-специфичный вариант гистона Н3

INCENP

Миозина II регуляторную лёгкую цепь

Топоизомеразу II α

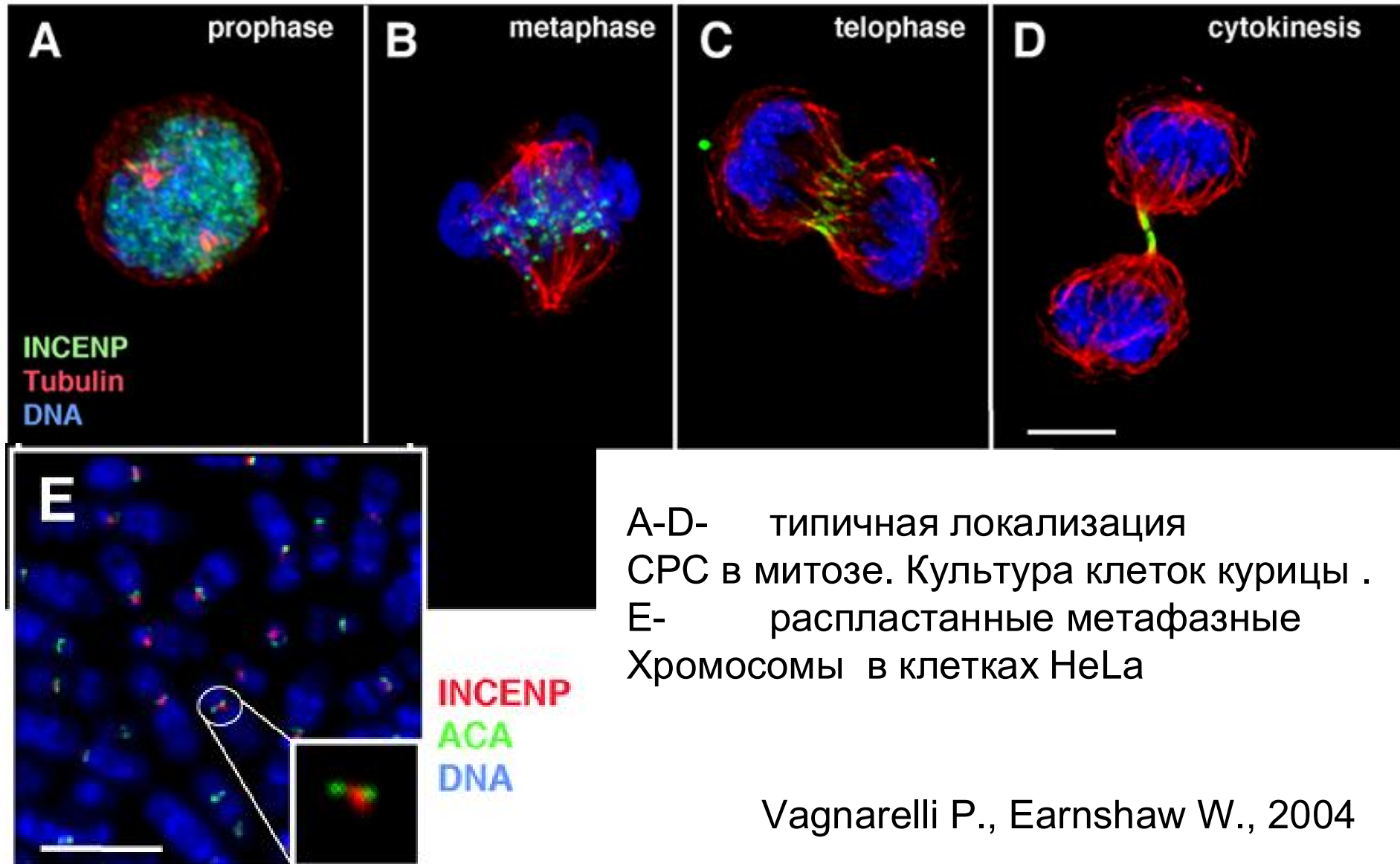
Виментин

Десмин

МСАК (митотический центромерно-ассоциированный кинезин)

Survivin

CPC- chromosomal passenger complex



A-D- типичная локализация CPC в митозе. Культура клеток курицы .
E- распластанные метафазные Хромосомы в клетках HeLa

Vagnarelli P., Earnshaw W., 2004



CPC- chromosomal passenger complex

Survivin – член семейства IAP (Inhibitor of Apoptosis). RNAi в клетках HeLa вызывает нарушение построения хромосом, стойкую активацию точки контроля целостности веретена

Фосфорилируется Cdk1/CycB (MPF)

- В составе CPC вовлечён в сегрегацию сестринских хроматид – за это отвечает домен BIR (бакуловирусный IAP повтор).
- Участвует в точке контроля прикрепления хроматид к веретену - mitotic spindle assembly checkpoint (MSAC)
- Одна из причин лекарственной устойчивости рака

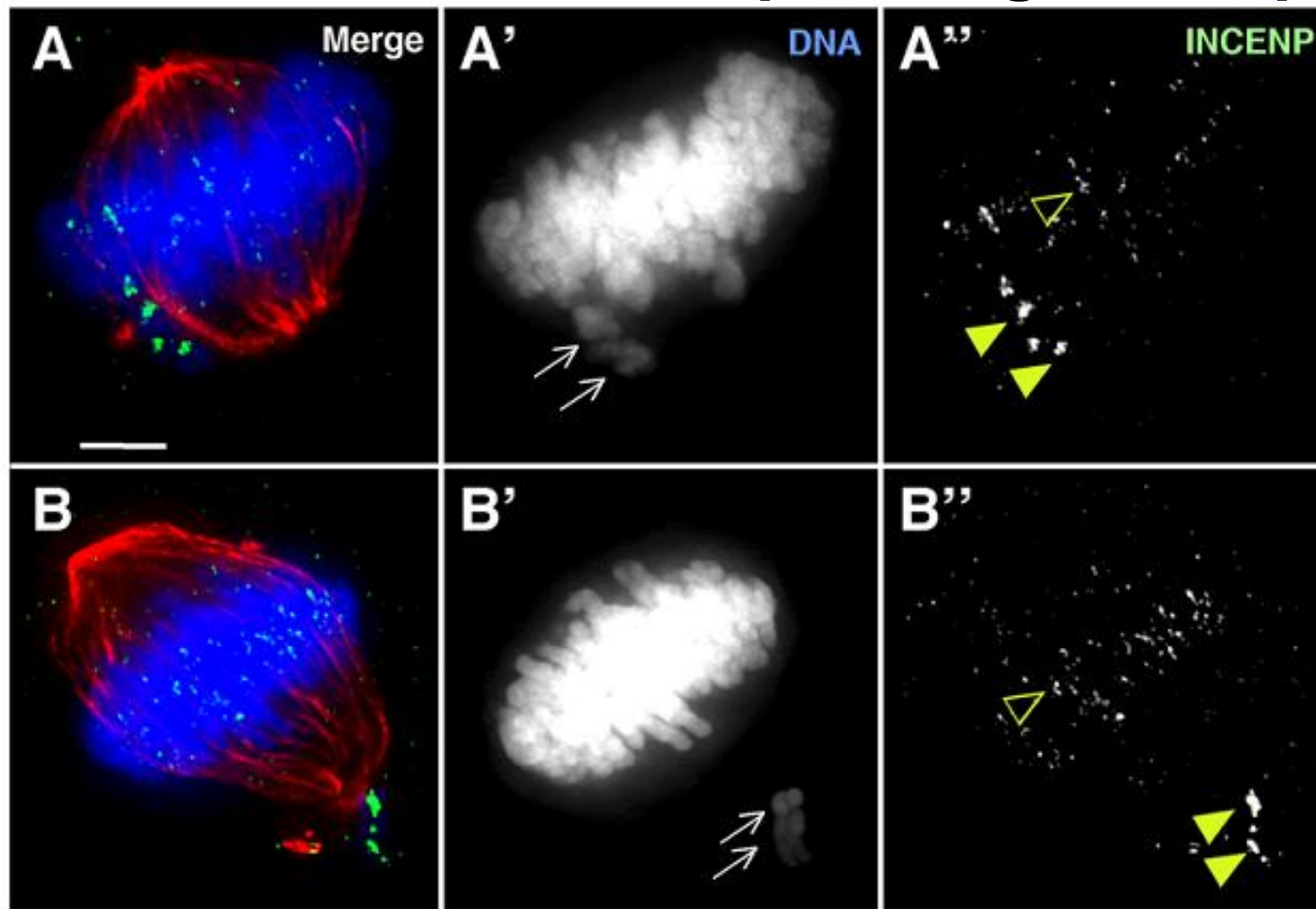
Borealin - регулятор клеточного цикла. Связан с Сурвивином.

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

RNAi в клетках вызывает трансформацию биполярного веретена и нормальной метафазной пластинки в мультиполярное веретено в анафазе.

TD-60 –белок телофазного диска - GEF (guanine-nucleotide exchange factor), он индуцирует GTP -азу Ran.

CPC- chromosomal passenger complex



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

Vagnarelli P., Earnshaw W., 2004

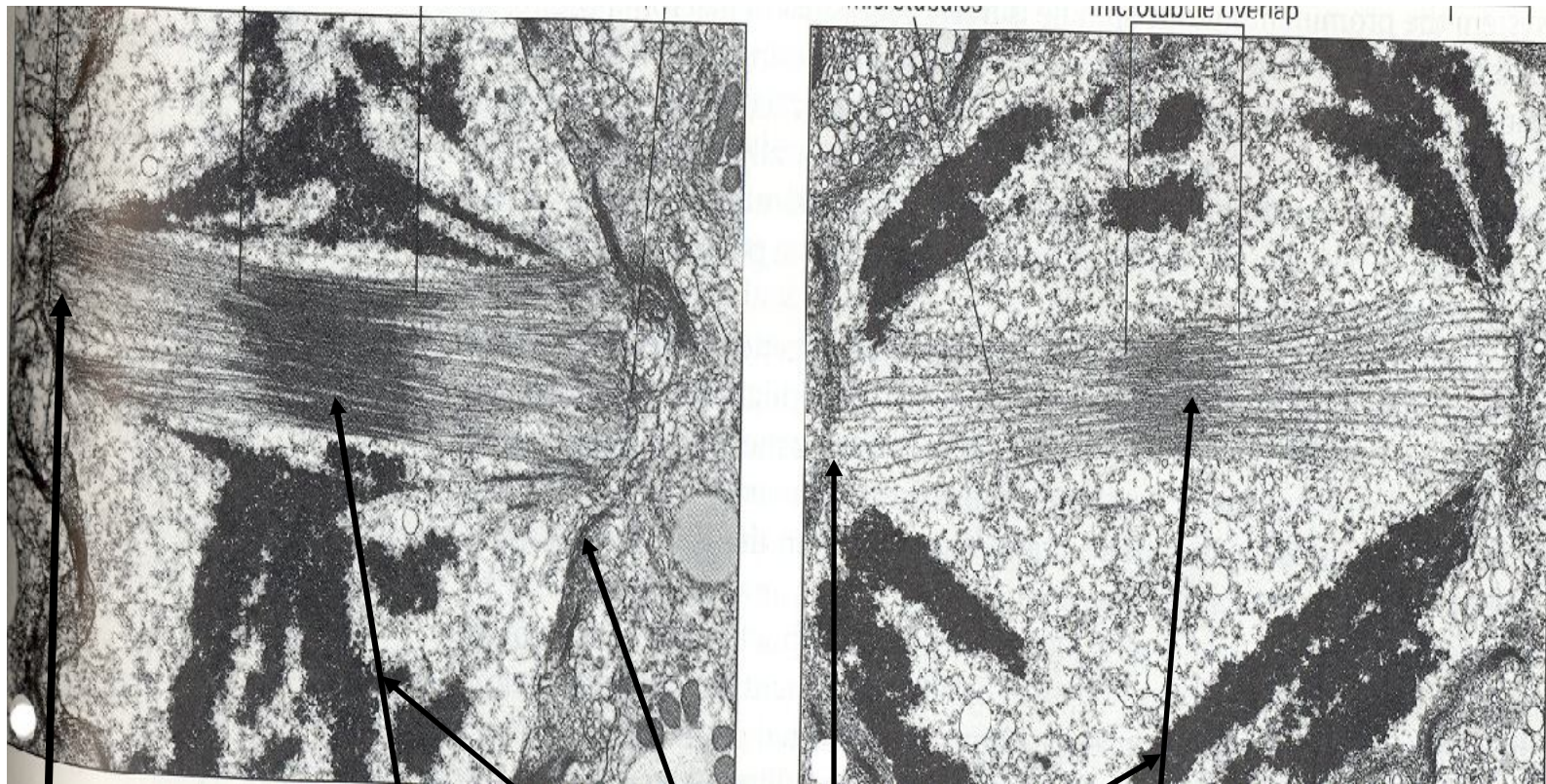
Дробление у дрозофилы. Синхронные митозы в синцитиальной бластодерме



Закр́тый митоз у дрожжей

Метафаза

Анафаза



Полярное
тело

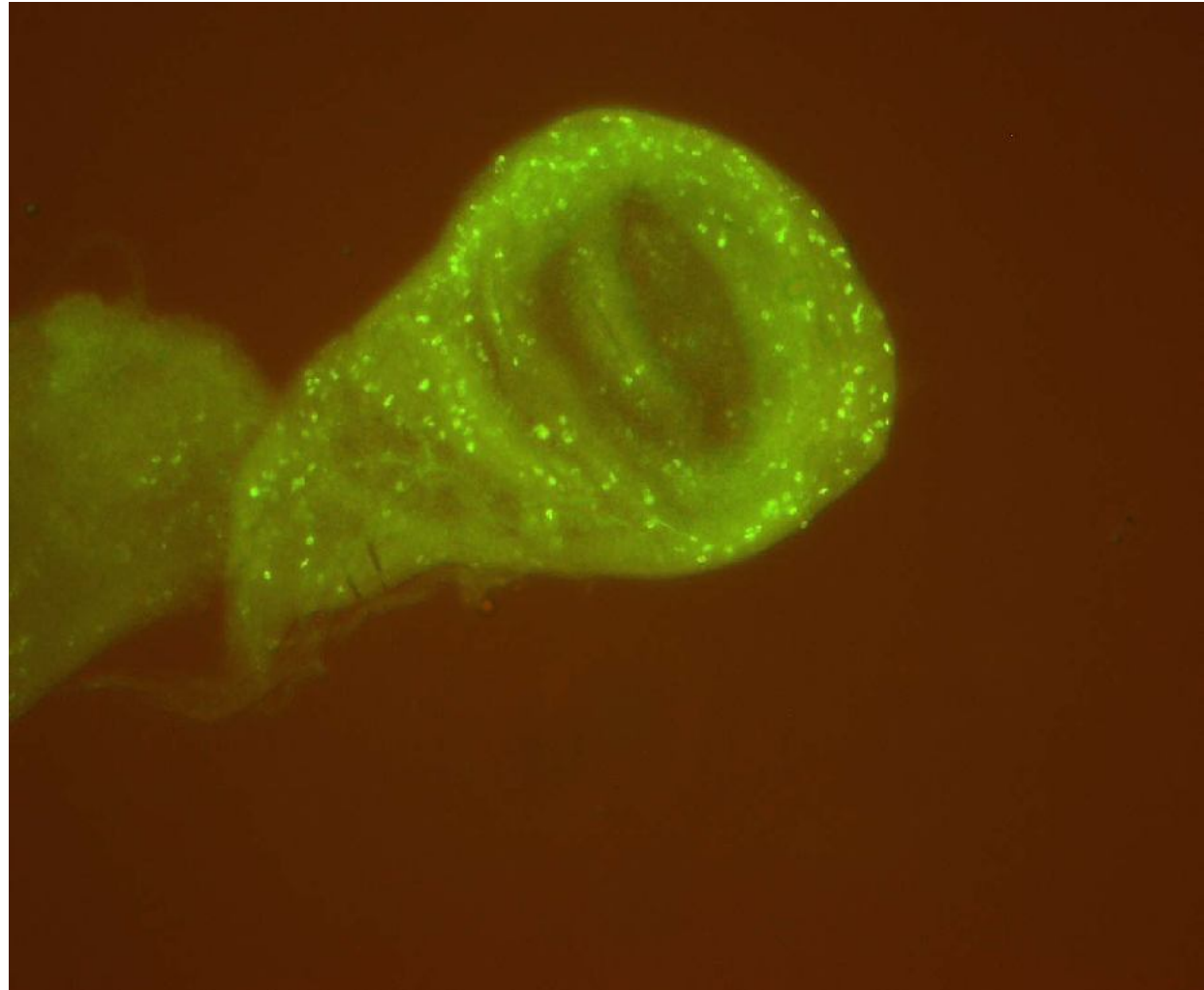
Ядерная оболочка

Хромосомы

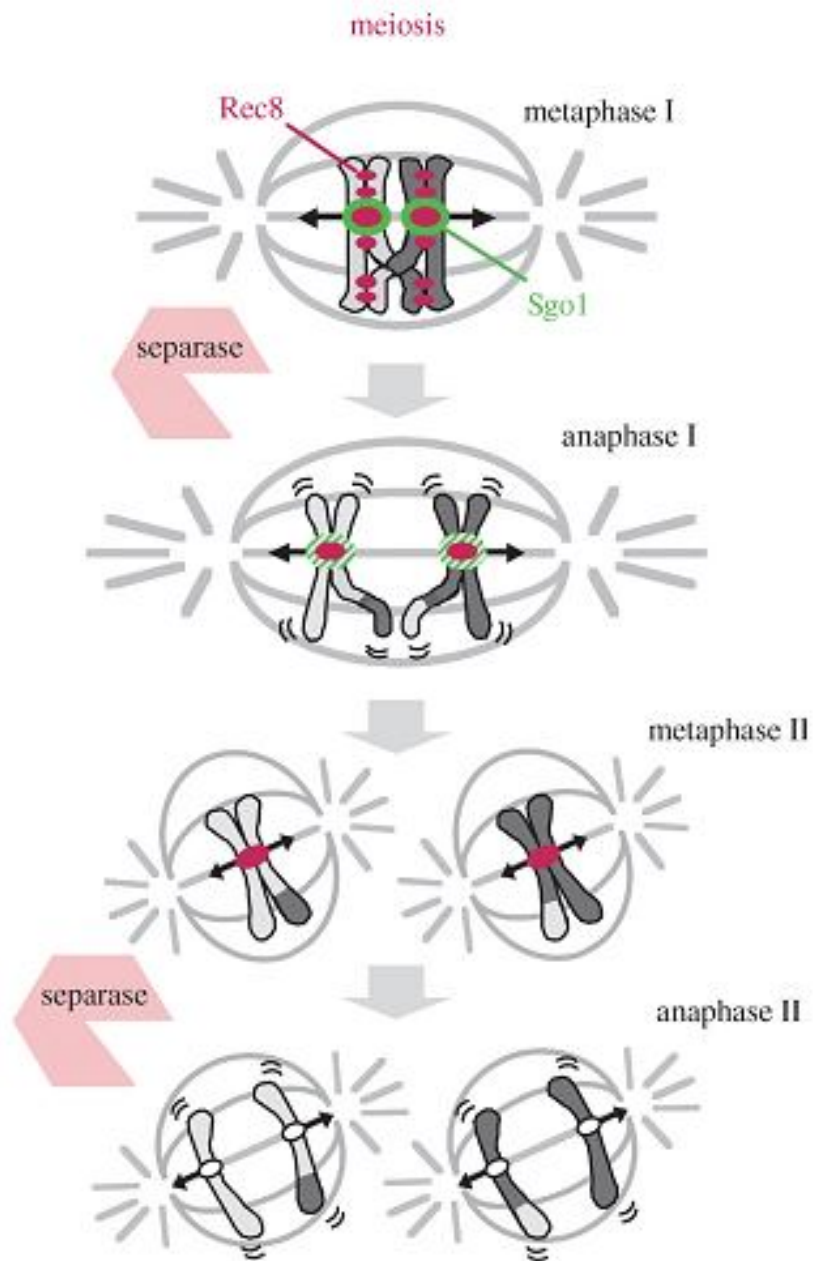
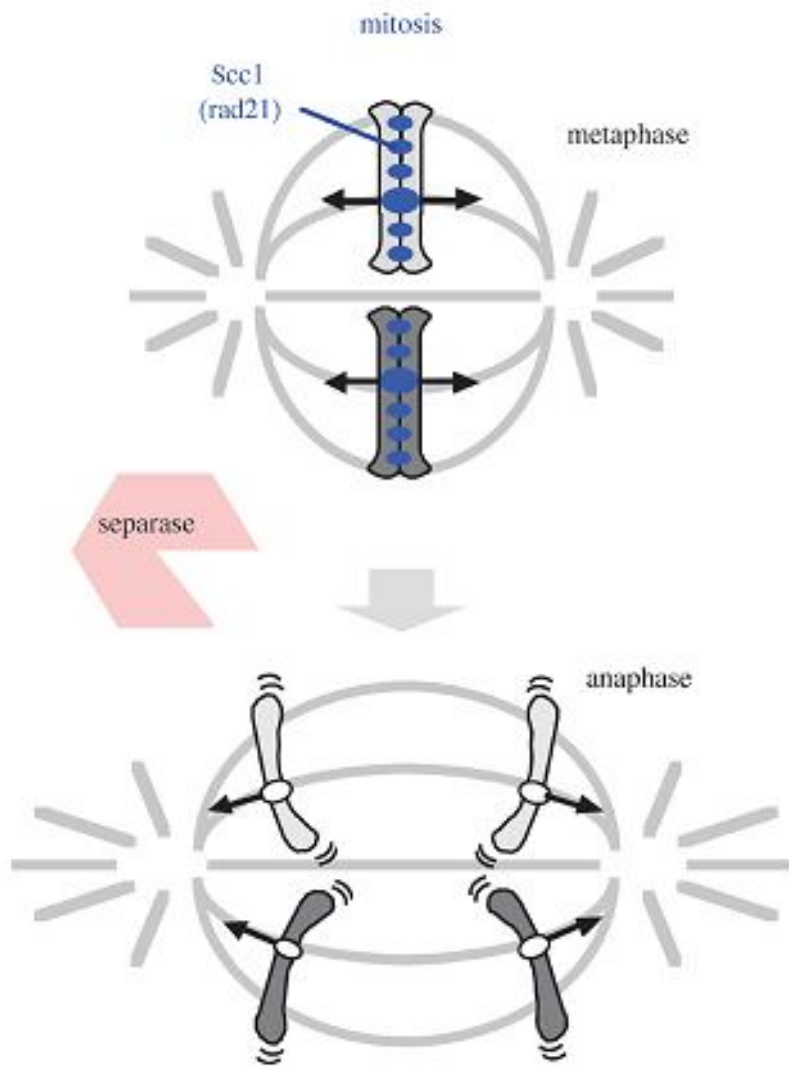
Зона перекрывания микротрубочек

Митозы в имагинальном диске дрозофилы

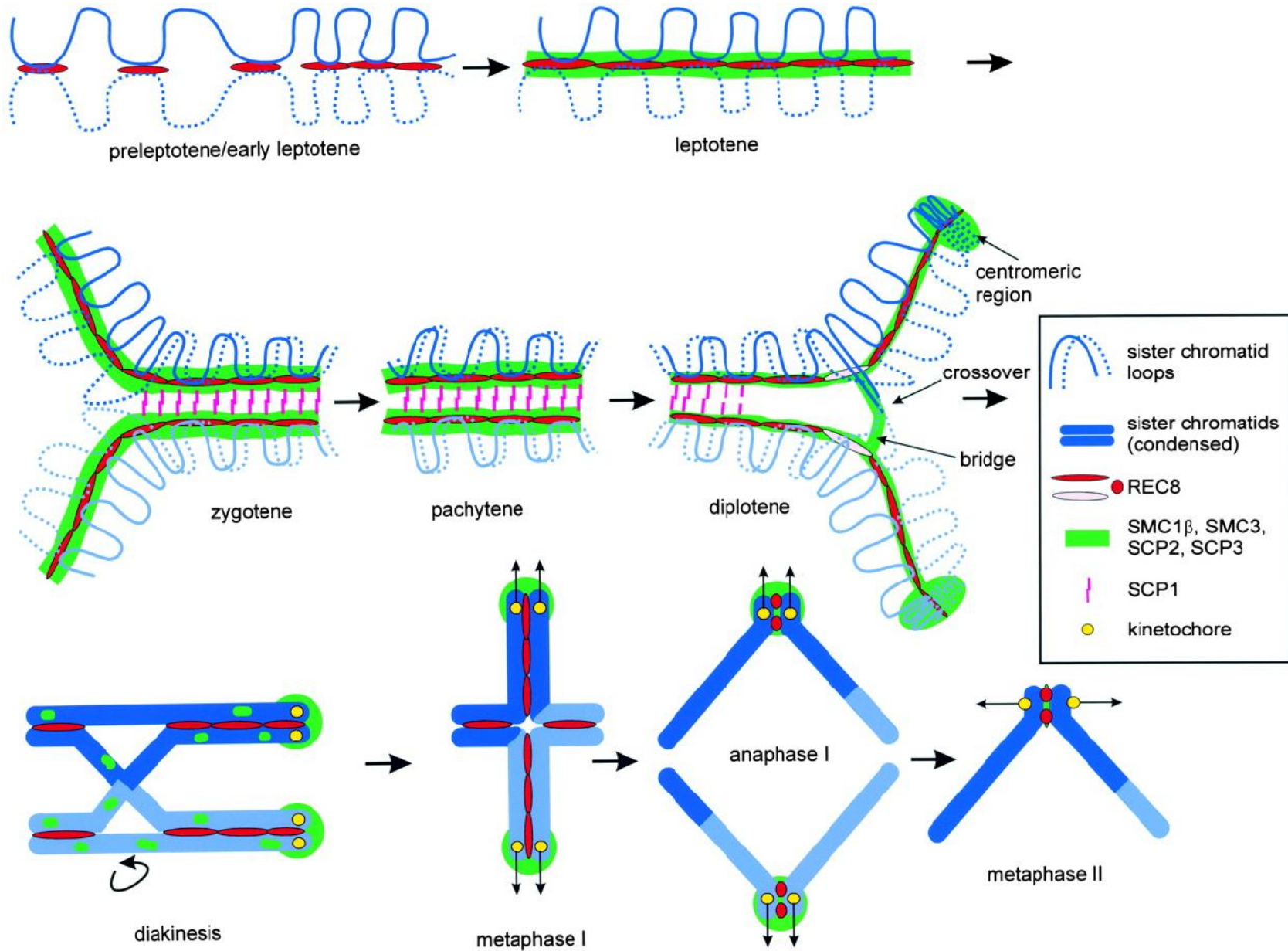
Окраска на
фосфорили-
рованный
гистон H3



Митоз и мейоз



Мейоз





Расхождение хромосом в митозе и мейозе

	Митоз	Мейоз 1	Мейоз 2
Дрожжи	Сепараза разрезает когезины по всей длине хромосом в переходе М-А	Мейотический когезин разрушается по плечам, шугошин препятствует его разрушению в центромерном районе	Мейотический когезин разрушается в центромерном районе
Позвоночные	1. Polo-подобная киназа и Аурога-киназа удаляют когезины по плечам хромосом в течение профазы. Шугошин препятствует разрушению в центромерном районе 2. Сепараза разрезает когезины в центромерном районе в переходе М-А	Возможно, хиазмы разрешаются механизмом 1	Хроматиды разделяются в центромерном районе по механизму 2

Мужской и женский мейоз

