

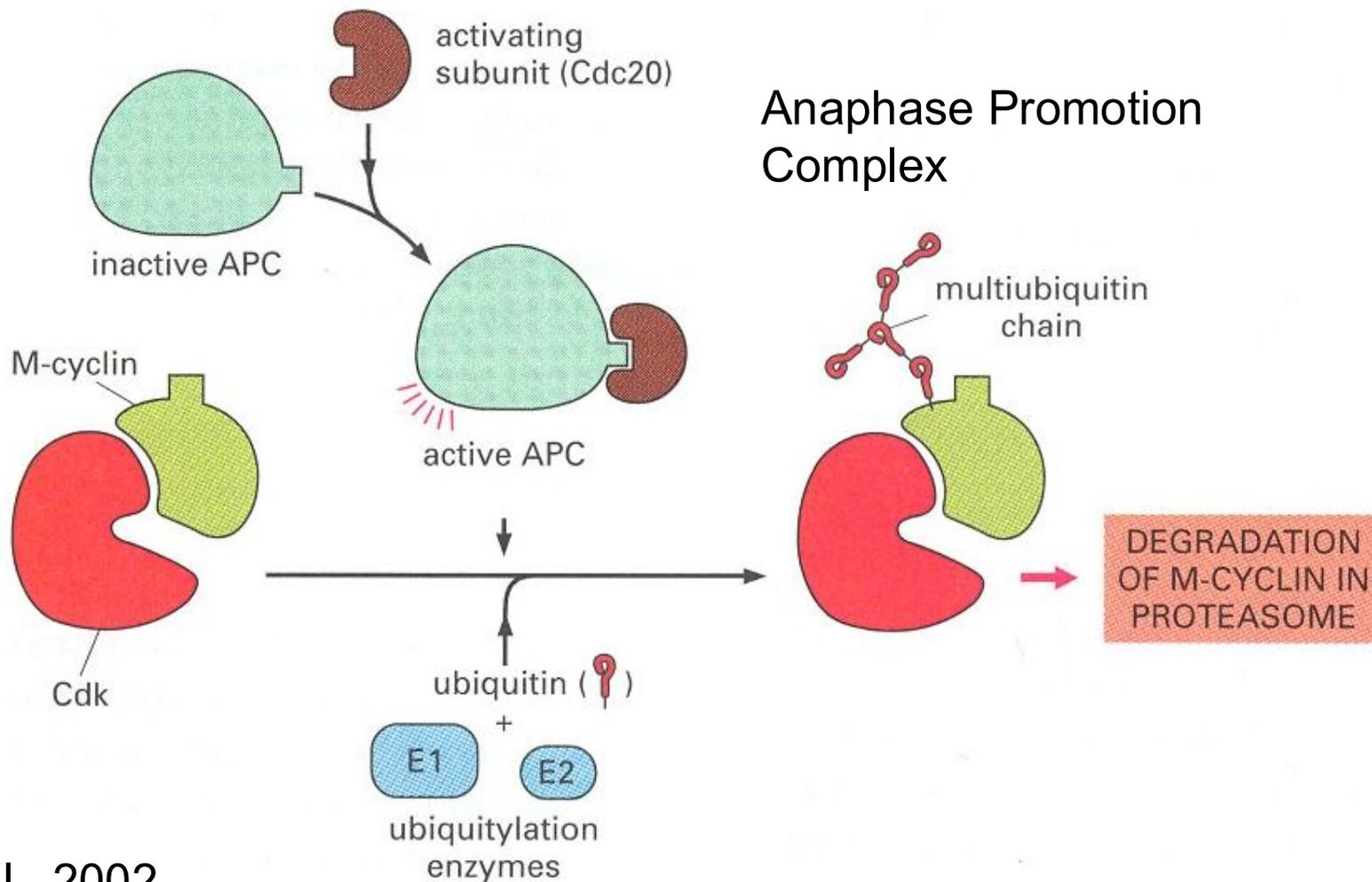
Генетика клеточного цикла

Электронно-лекционный курс
Глава 4

Протеолиз циклина под контролем APC.

Два белка, активирующие APC: Cdc 20 и Hct1

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



Поддержание инактивации M-Cdk после митоза

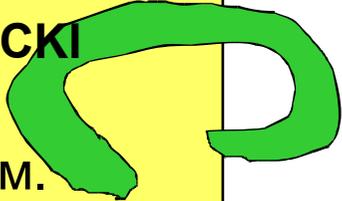
- Cdc20-APC и аналог Hct1-APC – деградация циклина.
M-Cdk активирует Cdc20-APC
M-Cdk инактивирует Hct1-APC фосфорилированием



CycB

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



CKI

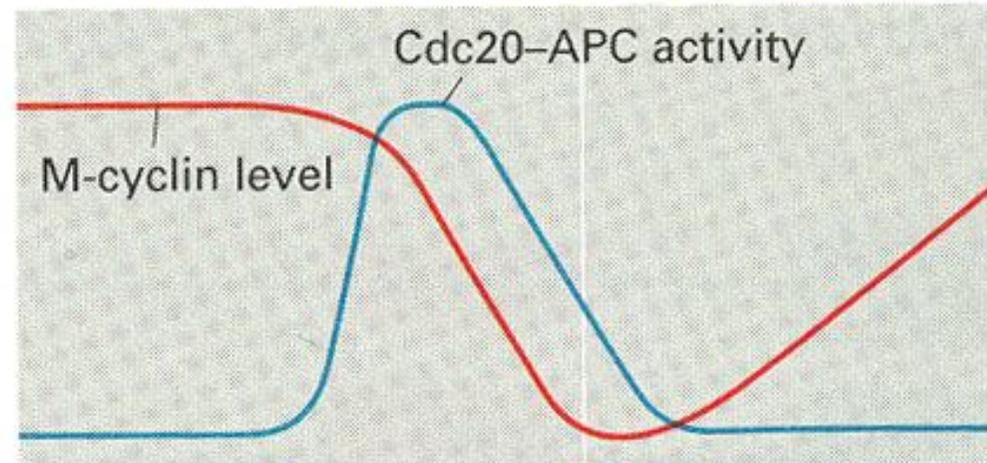
- В конце митоза снижается транскрипция M-циклина, до этого работала положительная обратная связь

Поддержание инактивации M-Cdk после митоза

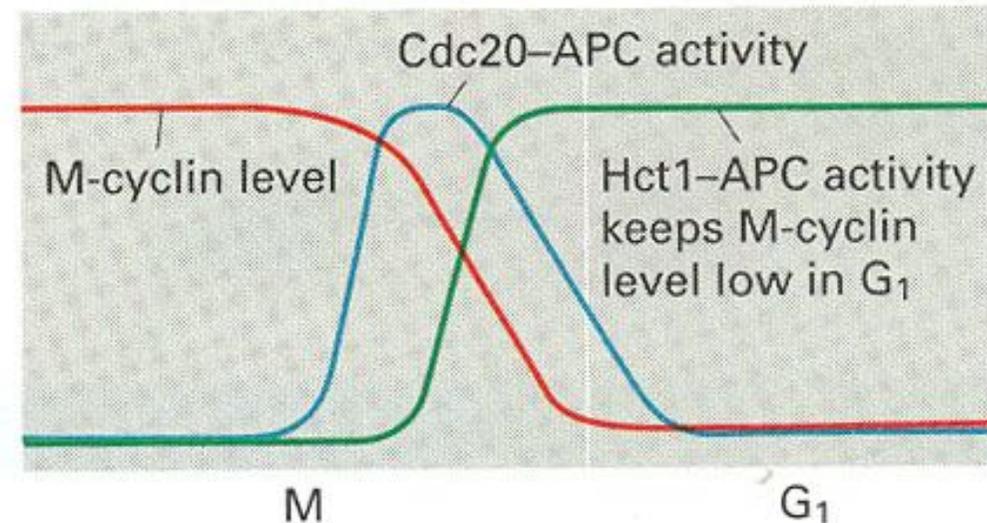
Уровень циклина снижается за счет активности Cdc20-APC, далее выпадение G1 и накопление циклина

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

Эмбриональные клетки без G1 фазы



Клетки с G1 фазой



Изучение перехода G1-S у *S.cerevisia*

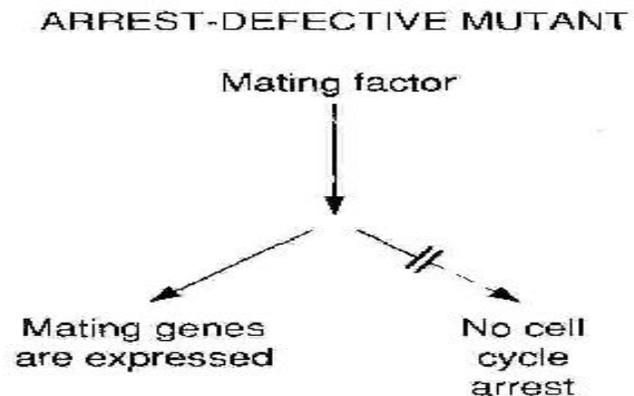
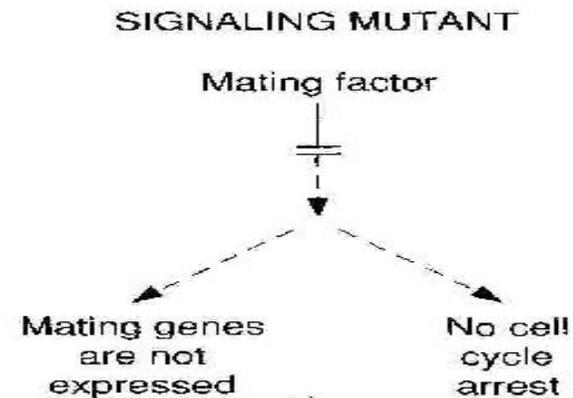
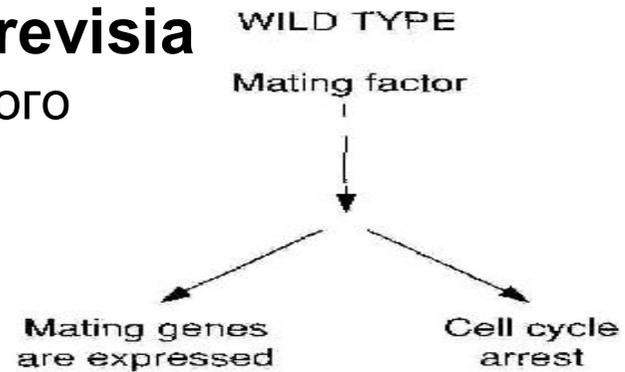
Мутации, связанные с арестом клеточного цикла, получили в реакции на α -фактор

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

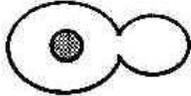
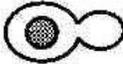
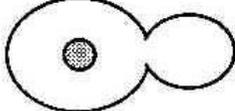
CLN3- G1-циклин, уровень транскрипции постоянен

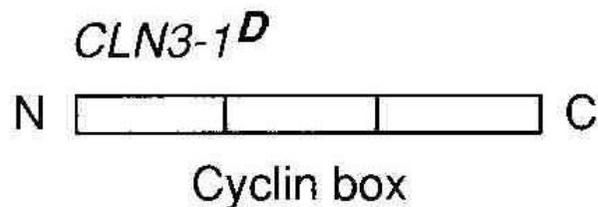
Другие циклины CLN1, 2 –G1/S – транскрипция возрастает вблизи Start – петля положительной обратной связи

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

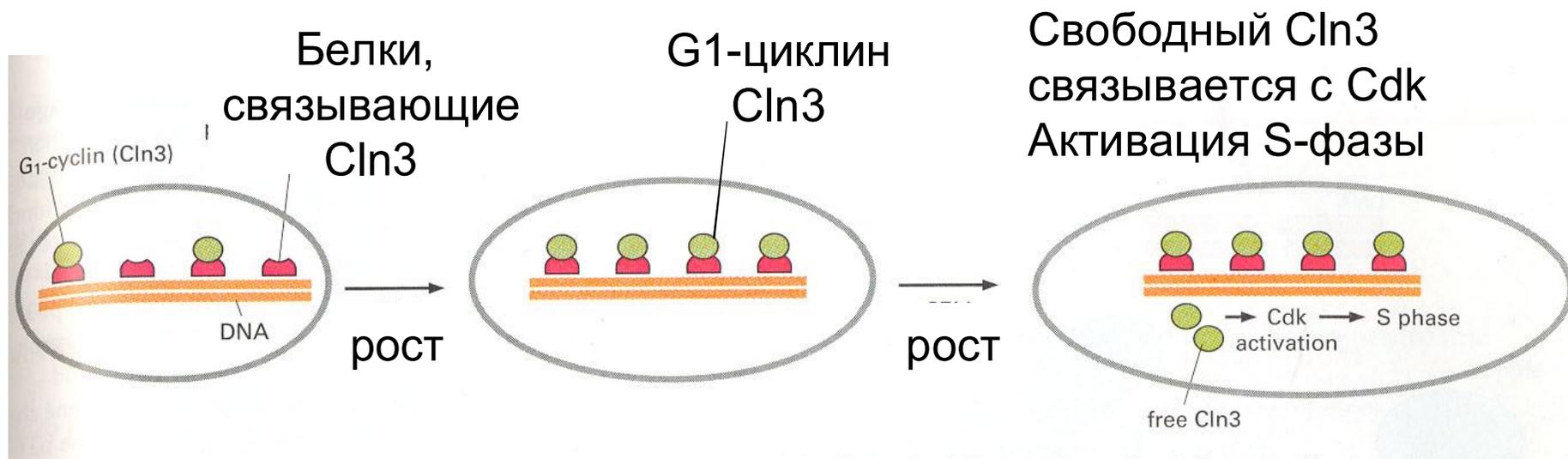
Стабильная форма Cln3:

Murray A., Hunt T., 1993

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



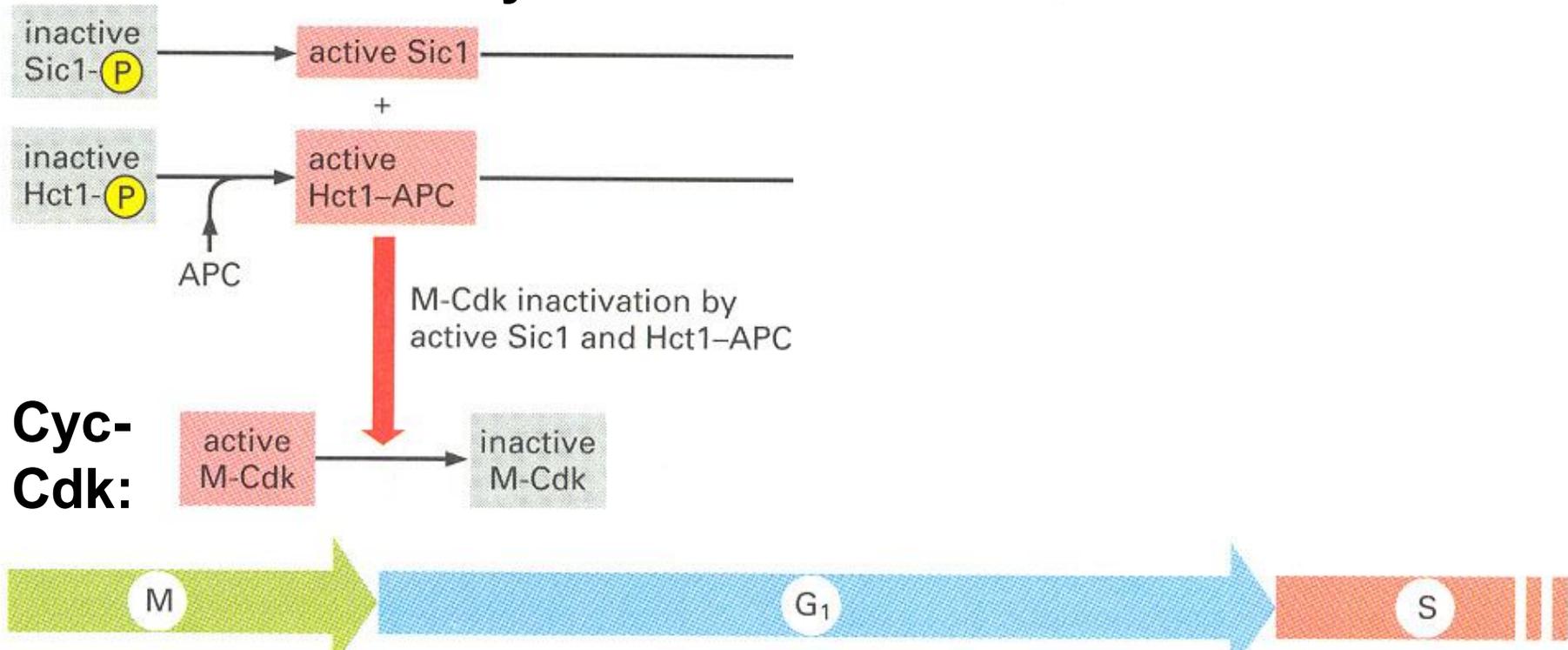
Гипотетическая модель координации роста клетки и движения по клеточному циклу у дрожжей



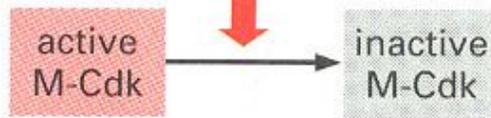
Cln3 синтезируется в G1 параллельно с ростом клетки.

Количество Cln3 отслеживается по его концентрации, превышение порогового уровня запускает активацию G1-Cdk и продвижение к S-фазе

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

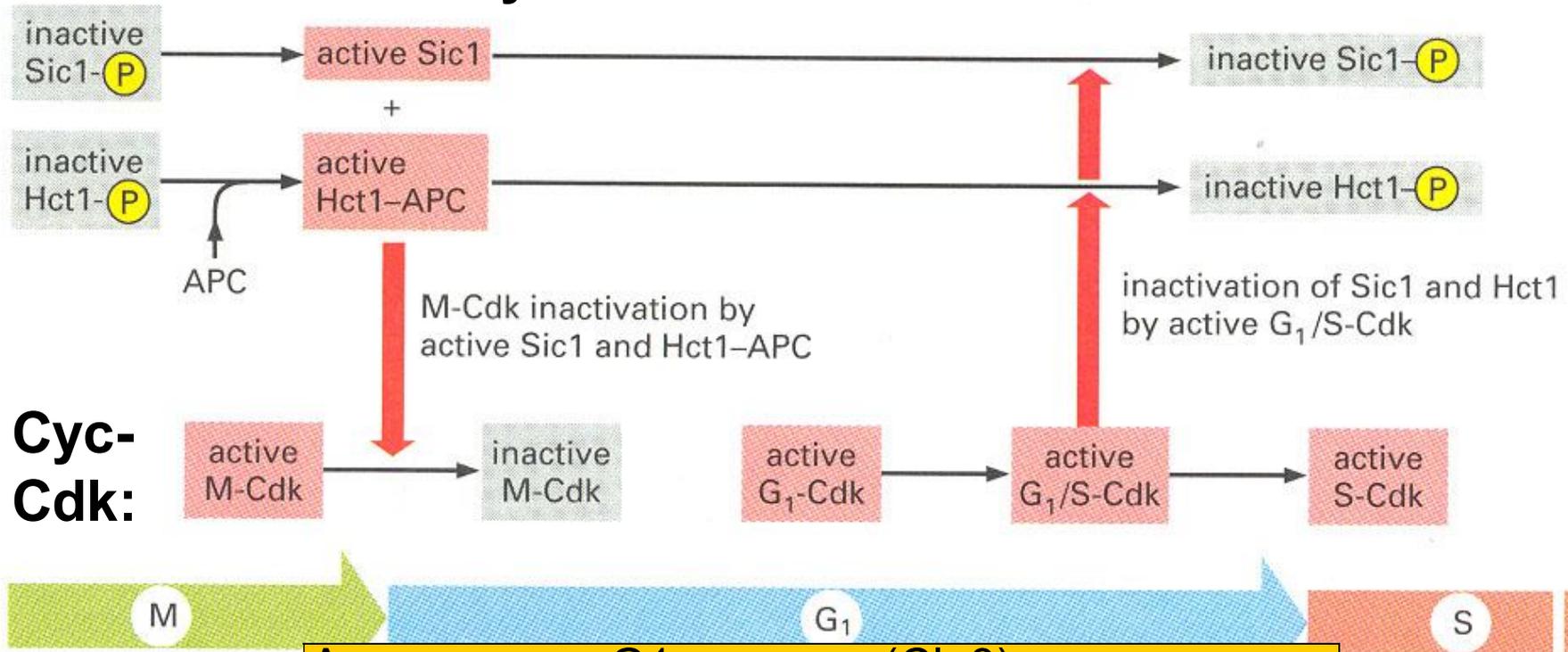


**Сус-
Cdk:**



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*

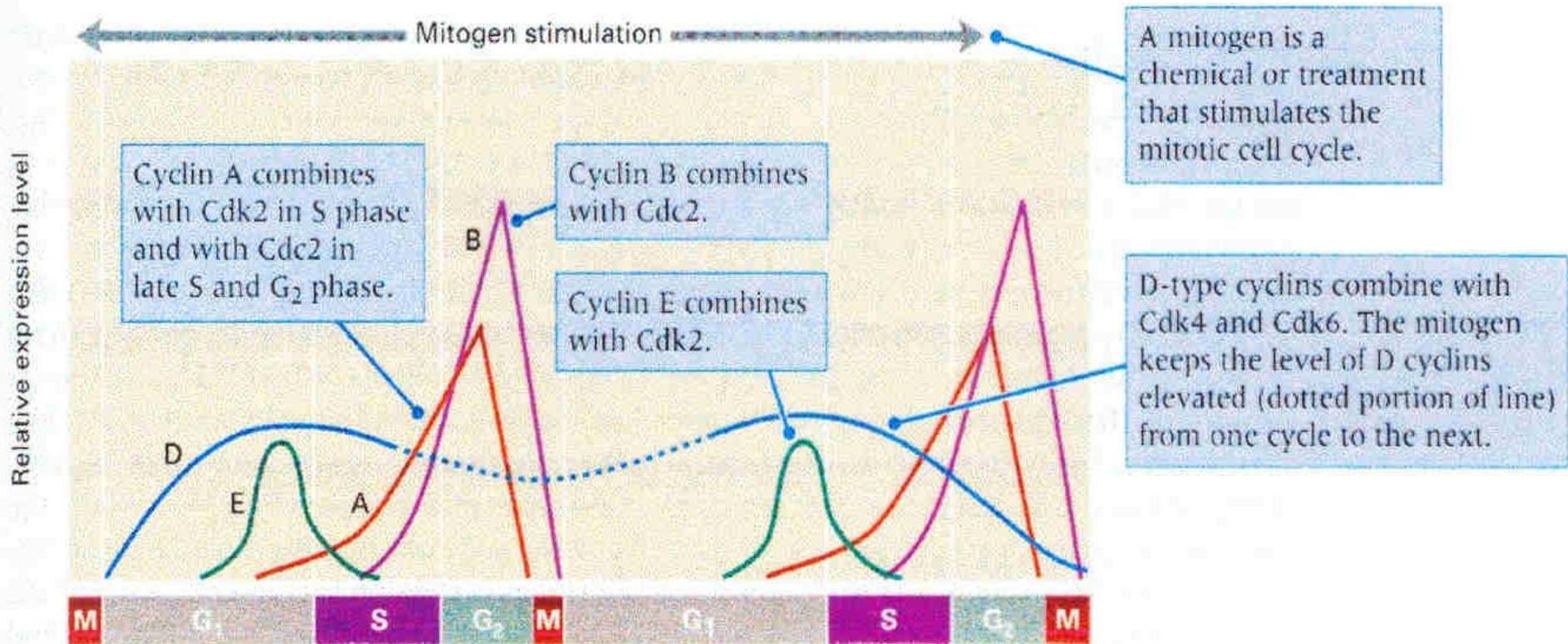


**Сус-
Cdk:**

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 перейдёт к репликации.

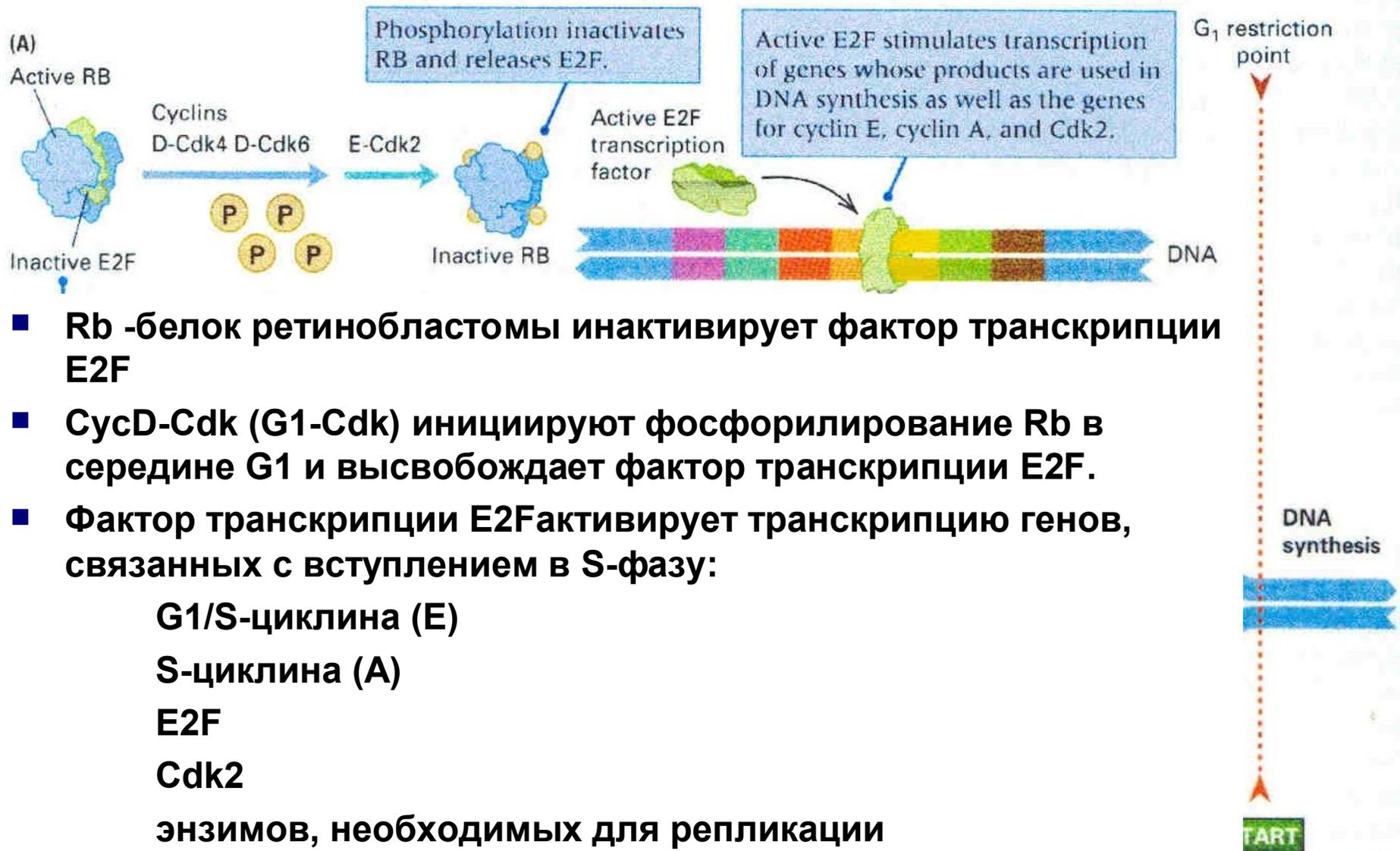
Циклины:

D - G₁

E – G₁ /S переход

A – S, G₂

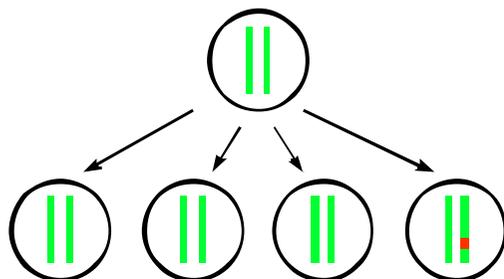
B – G₂, M



- 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

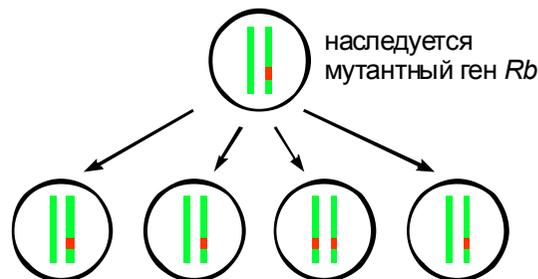
а) Нормальный здоровый индивид



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

Результат: опухоль не образуется

б) Наследственная ретинобластома

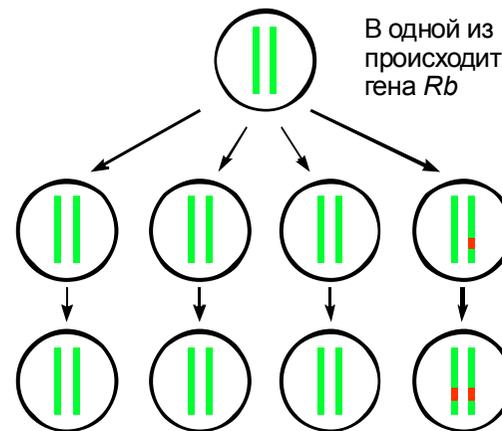


наследуется мутантный ген *Rb*
 В клетке, гетерозиготной по аллелям *Rb*, происходит еще одна мутация *Rb*

Ускоренная клеточная пролиферация приводит к образованию ретинобластомы

Результат: у большинства индивидуумов с наследуемой мутацией образуется опухоль

в) Ненаследственная ретинобластома

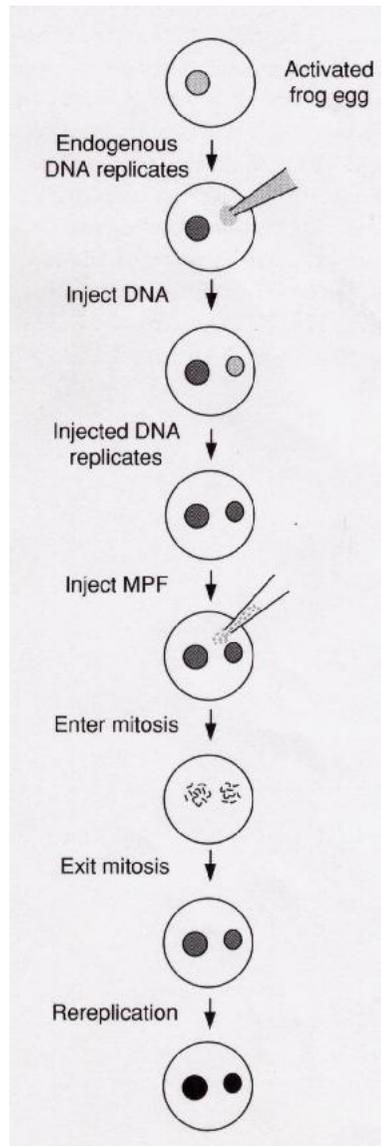


В одной из клеток происходит мутация гена *Rb*

В потомстве этой клетки иногда мутирует второй ген *Rb*

Ускоренная клеточная пролиферация приводит к образованию ретинобластомы

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



Условия репликации

Оплодотворенное яйцо лягушки остановлено в интерфазе с помощью ингибитора синтеза белка. Ядро в этом случае реплицируется только один раз.

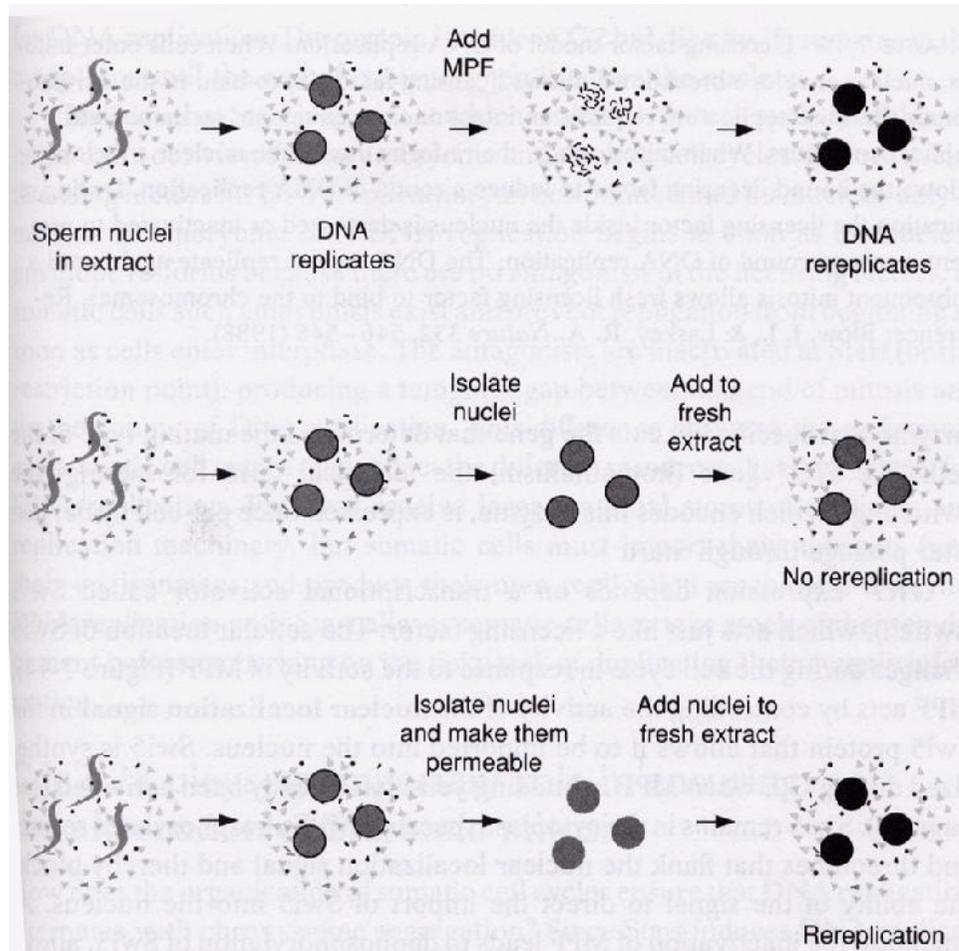
Если инъецировать чужеродную ДНК, то она образует псевдо-ядро, способное реплицироваться один раз.

Добавление MPF вызывает митоз в ядре и псевдо-митотические фигуры в псевдо-ядре.

После этого ядро реплицируется один раз.

Вывод: для репликации необходимо пройти митоз.

Условия репликации



Ядра спермиев в экстрактах яиц лягушки.

Ядра спермиев реплицируются в экстракте однократно. Если добавить MPF, то ядра реплицируются еще раз. Перенос ядер на новый экстракт не приводит к повторению репликации, поэтому дело не в экстракте.

Если ядра выделить, обработать детергентом и поместить на свежий экстракт, то как и в случае MPF, репликация повторяется. Детергент разрушает оболочку ядра.

Вывод:

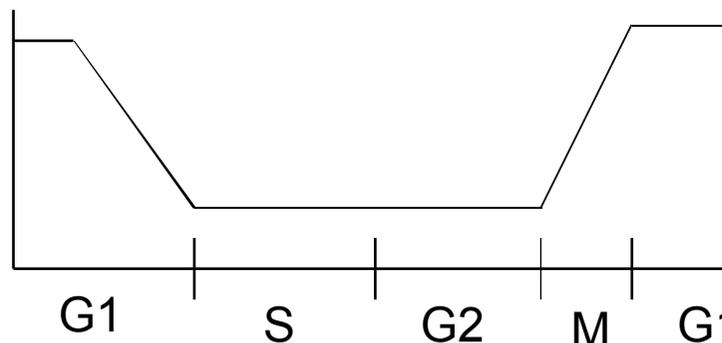
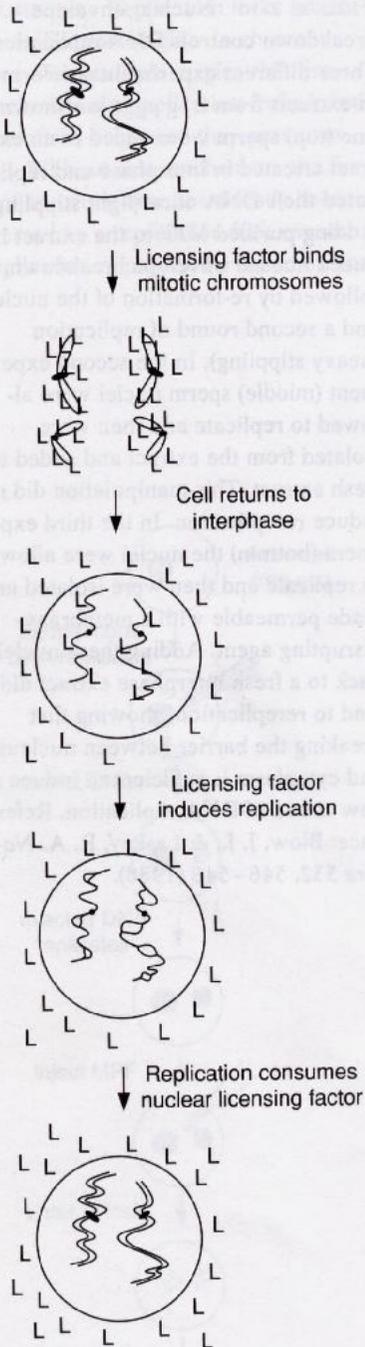
для того, чтобы прошла репликация, надо разрушить оболочку ядра.

Модель лицензионного фактора

Антитела на лицензионный фактор связывались с лицензированным хроматином, но не связывались с нелицензированным.

Оказалось, что они специфичны к белку, гомологичному к Mcm-3 *S. cerevisiae*.

Mcm – minichromosome maintenance protein. Этот белок вовлечен в передачу минихромосом в поколениях.



Активность L-фактора регулируется циклин-зависимыми киназами.

Murray A., Hunt T., 1993

Инициация репликации ДНК у *S.cerevisiae*

Основные участники

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

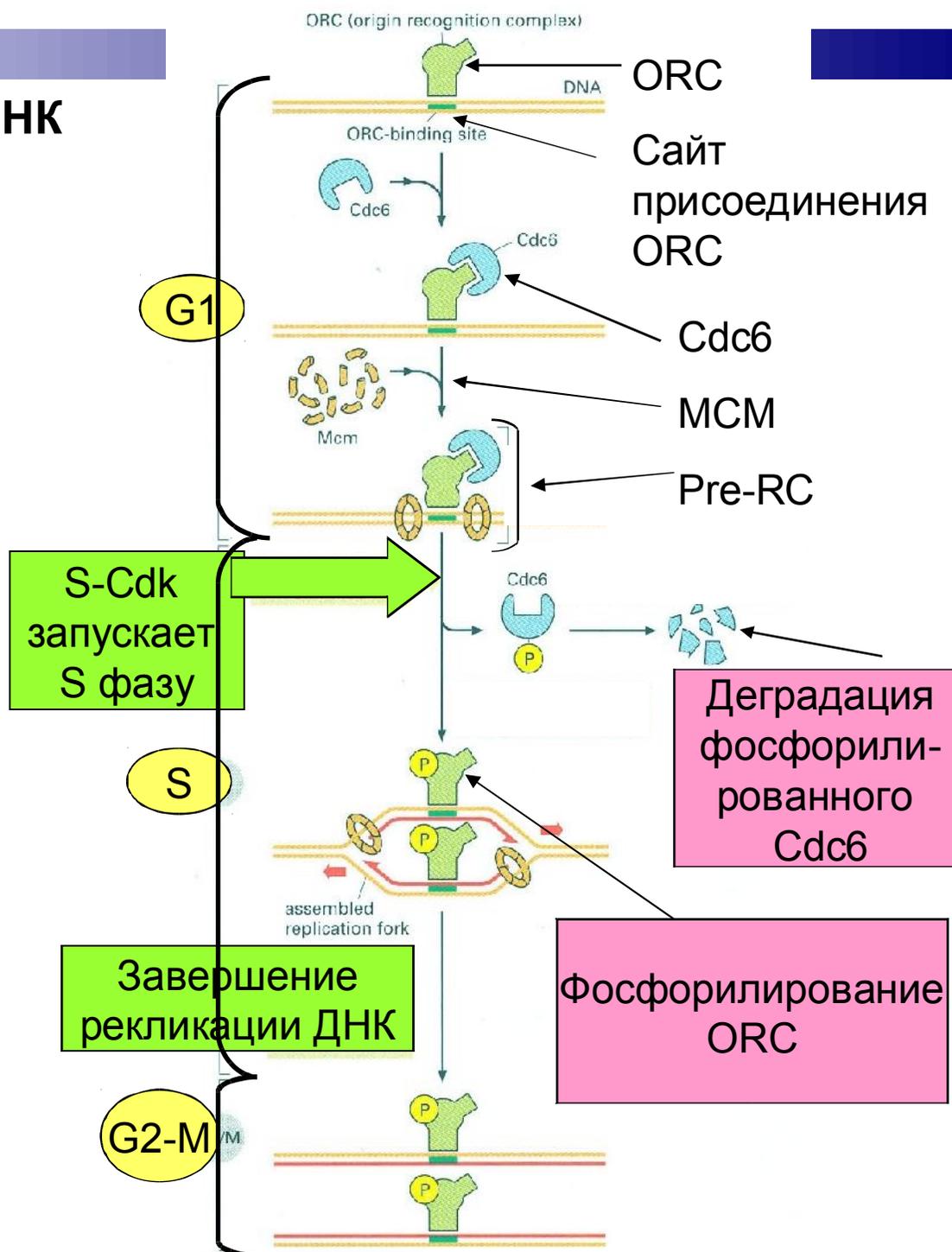
Cdc6- регуляторный белок, прикрепляется к ORC в начале G1 (фактор, вводящий геликазу)

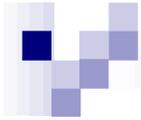
Cdt1/Double-parked- нужен для введения геликазы

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

S-Cdk циклин S-зависимая киназа

Alberts et al., 2002



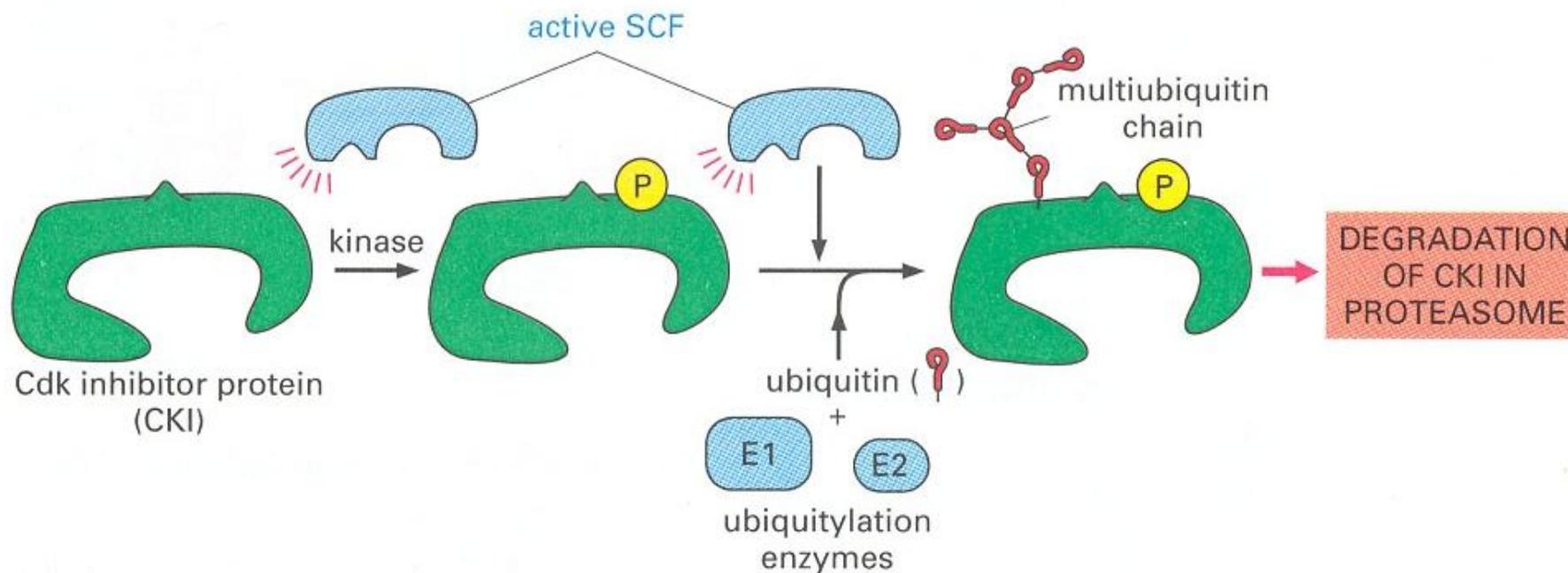


Компоненты пререпликативного комплекса

- ORC
 - Cdc6
 - Cdt1
 - MCM
 - Geminin у многоклеточных
 - Cyclin
- Cdc7 CDK
- разрушаются в метафазе
-

Протеолиз, опосредованный комплексом SCF, на примере белка CKI

Активность SCF постоянна в течение всего цикла





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

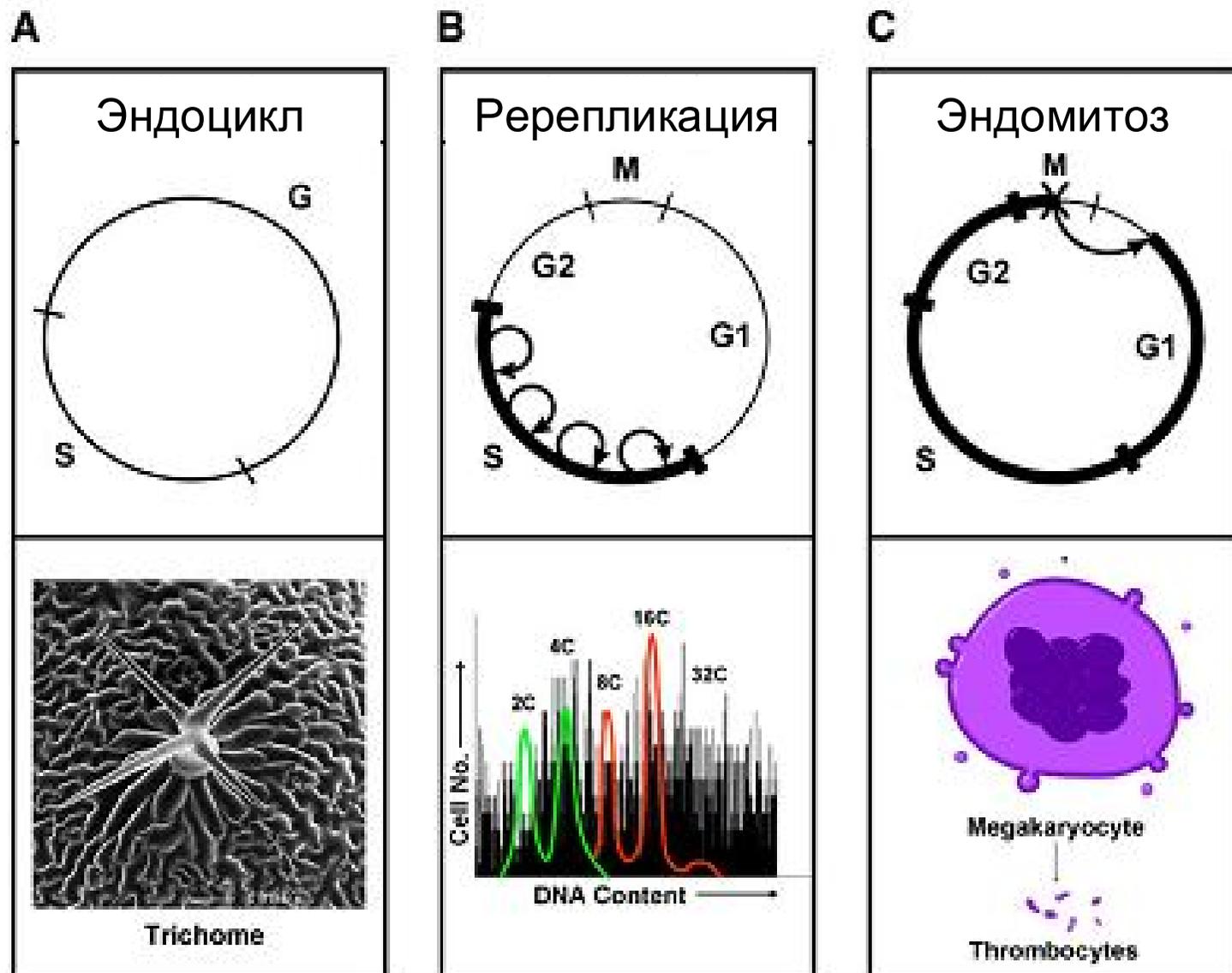
Связывается с **Cdt1** и препятствует повторной сборке

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

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

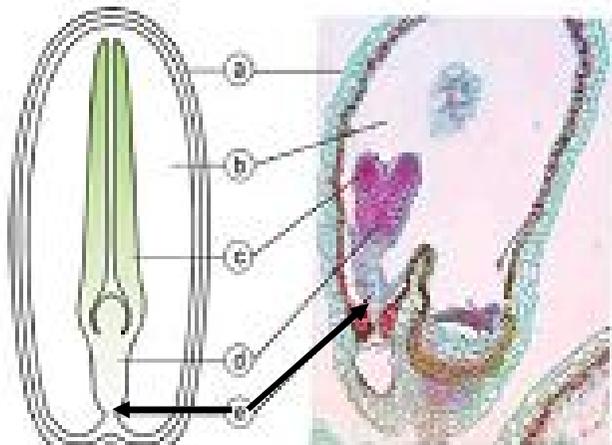
Формы эндополиплоидии



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

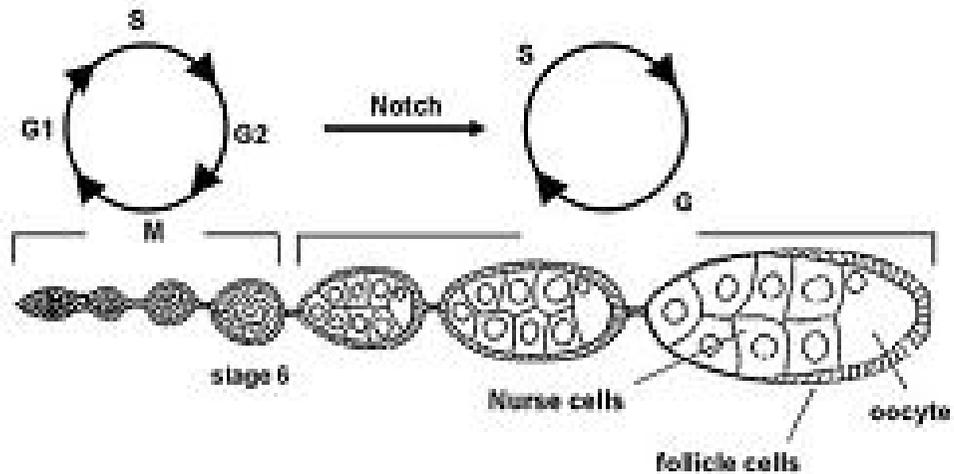
Примеры тканей, имеющих эндоцикл

A Plant embryo

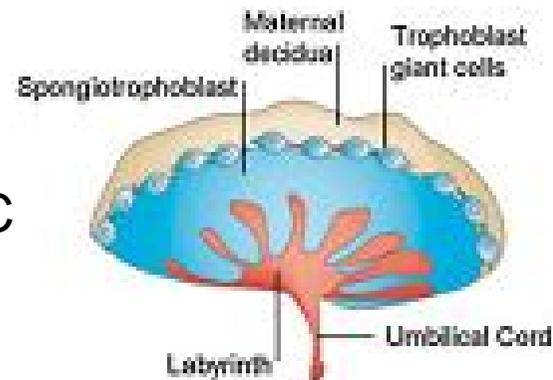


Суспенсор-подвесок

B *Drosophila* ovariole

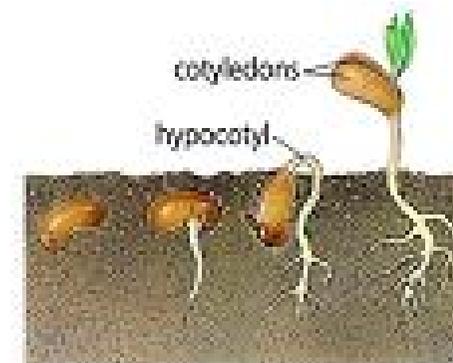


C Trophoblast giant cells mediate implantation



До 1000С

D Hypocotyl

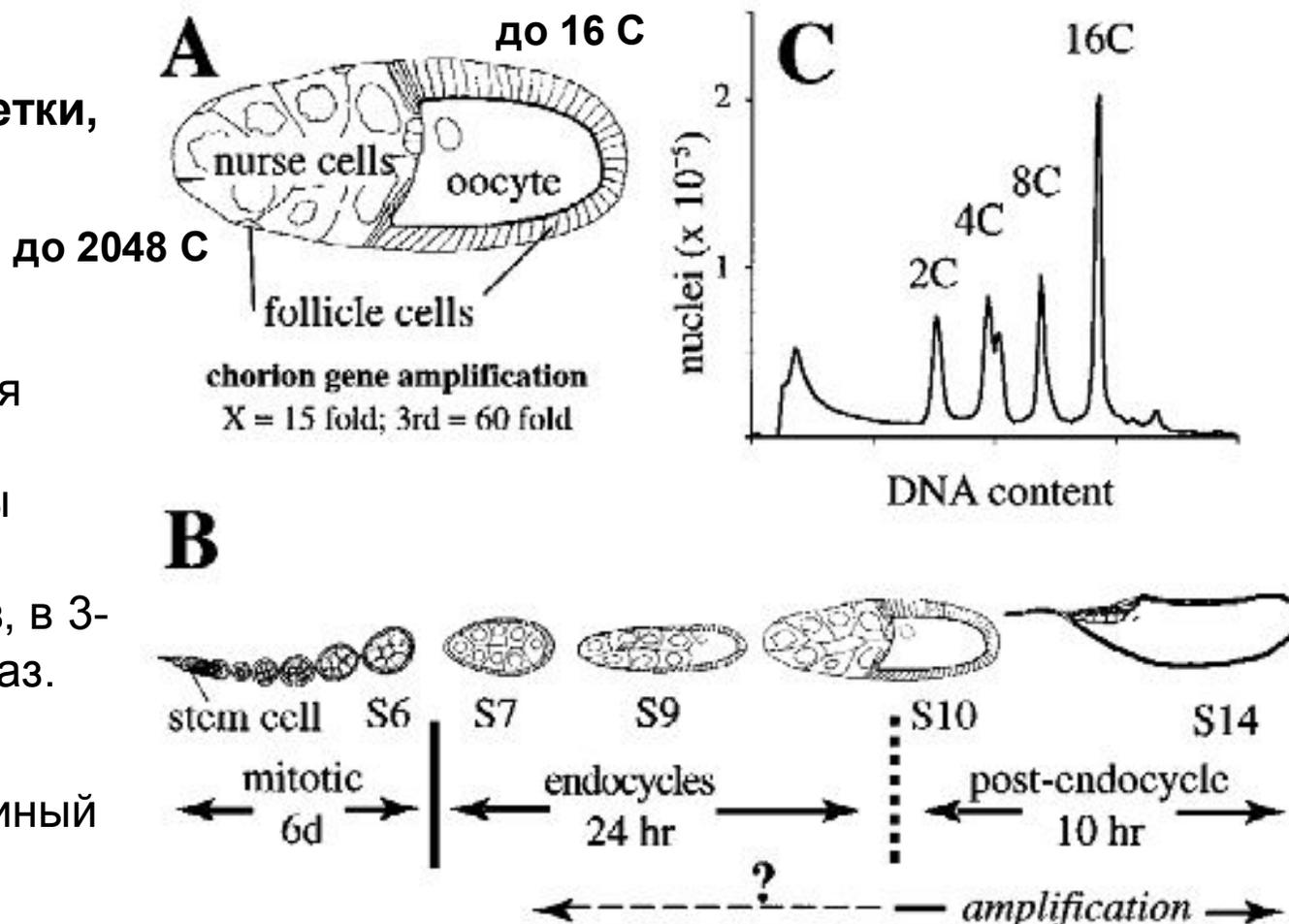


**Фолликулярные клетки,
о окружающие ооцит:**

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.

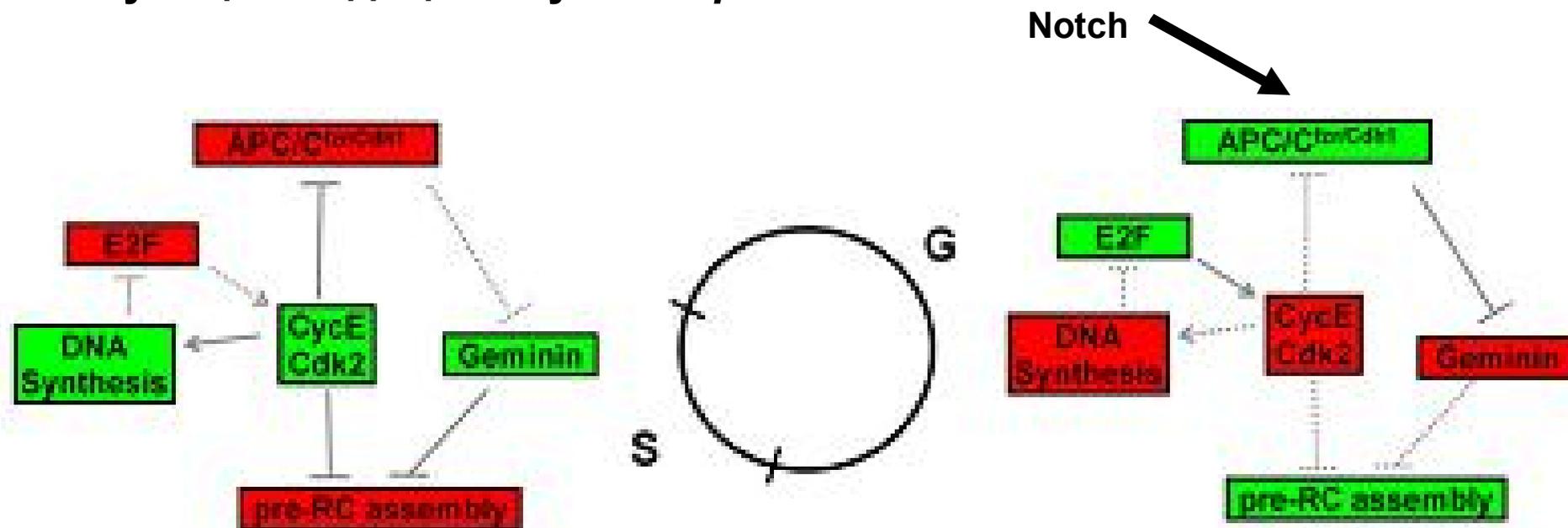
Для амплификации
требуется дрозофилиный
гомолог белка ORC2



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

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

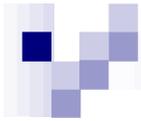
Регуляция эндоцикла у *Drosophila*



Зеленым цветом отмечены активные компоненты, красным - репрессированные

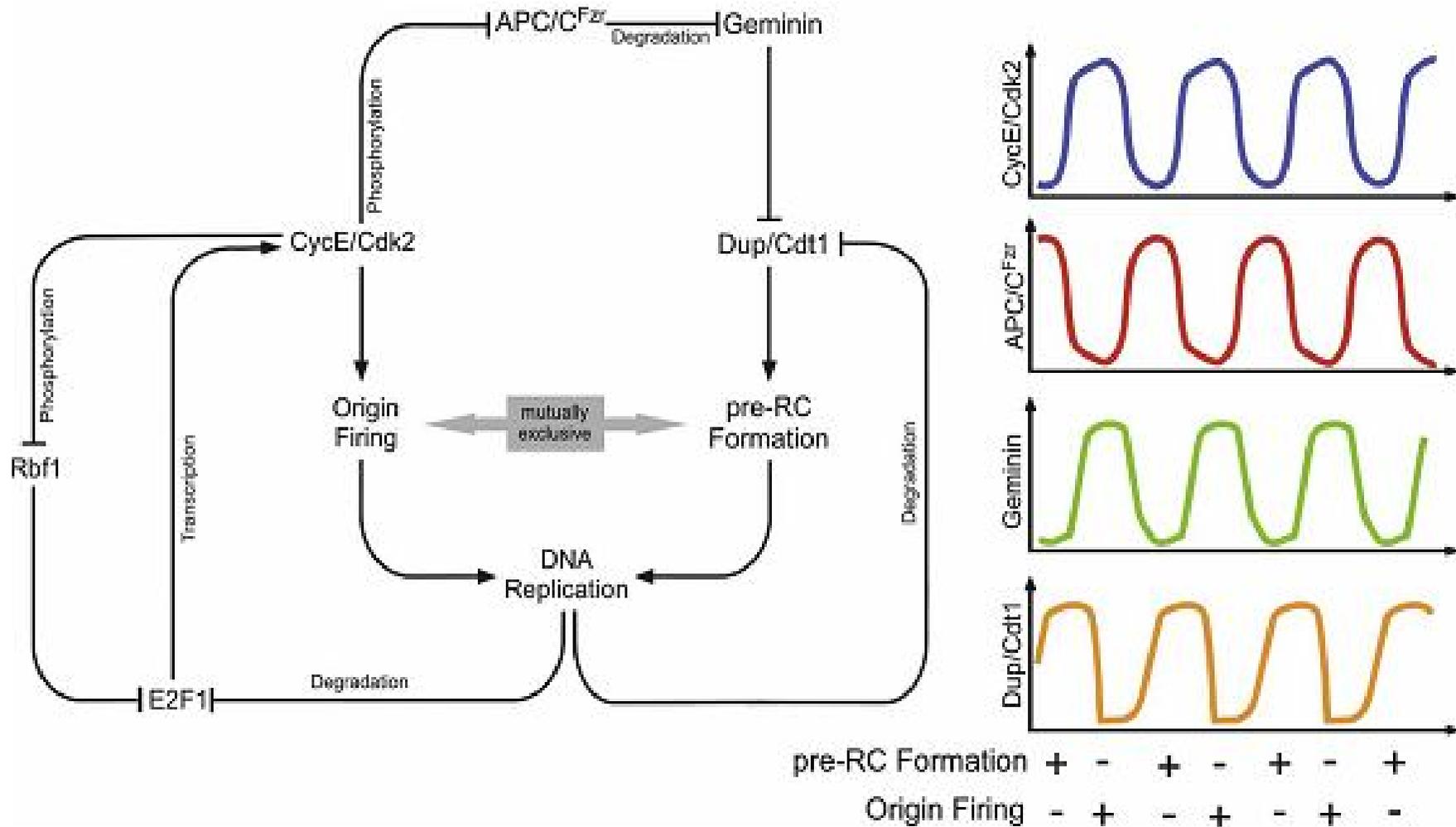
Белки, активирующие APC: fizzy (**fzy/Cdc20**) – в метафазе, fizzy-related (**fzr/Cdh1**) – в анафазе и далее в G1

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



Эндорепликация

Циркуляция СусЕ/Cdk2 и активного АРС, циклинов А и В нет



S.Y.Park & M.Asano,
2008

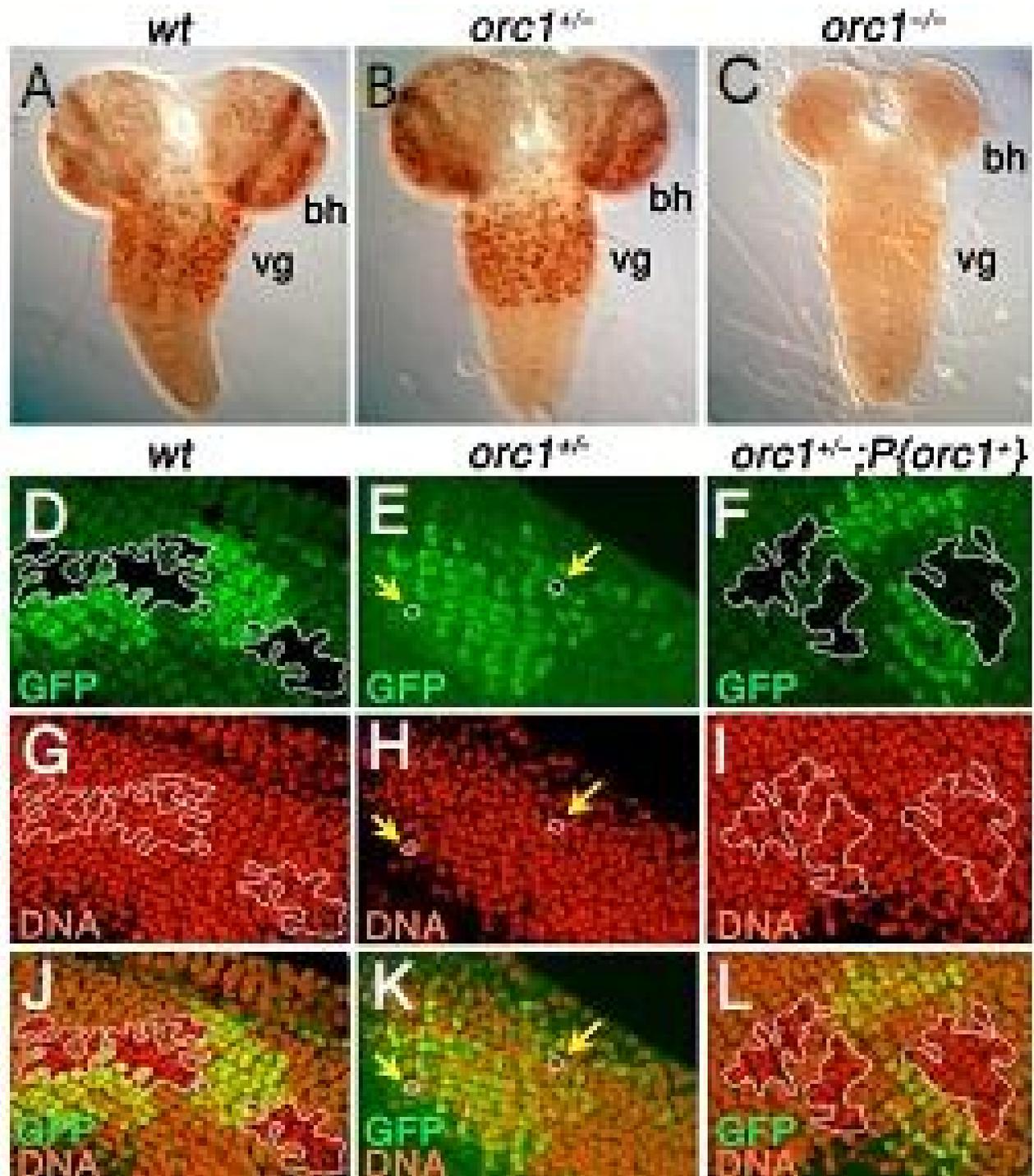
Orc1 необходим для
пролиферации.

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

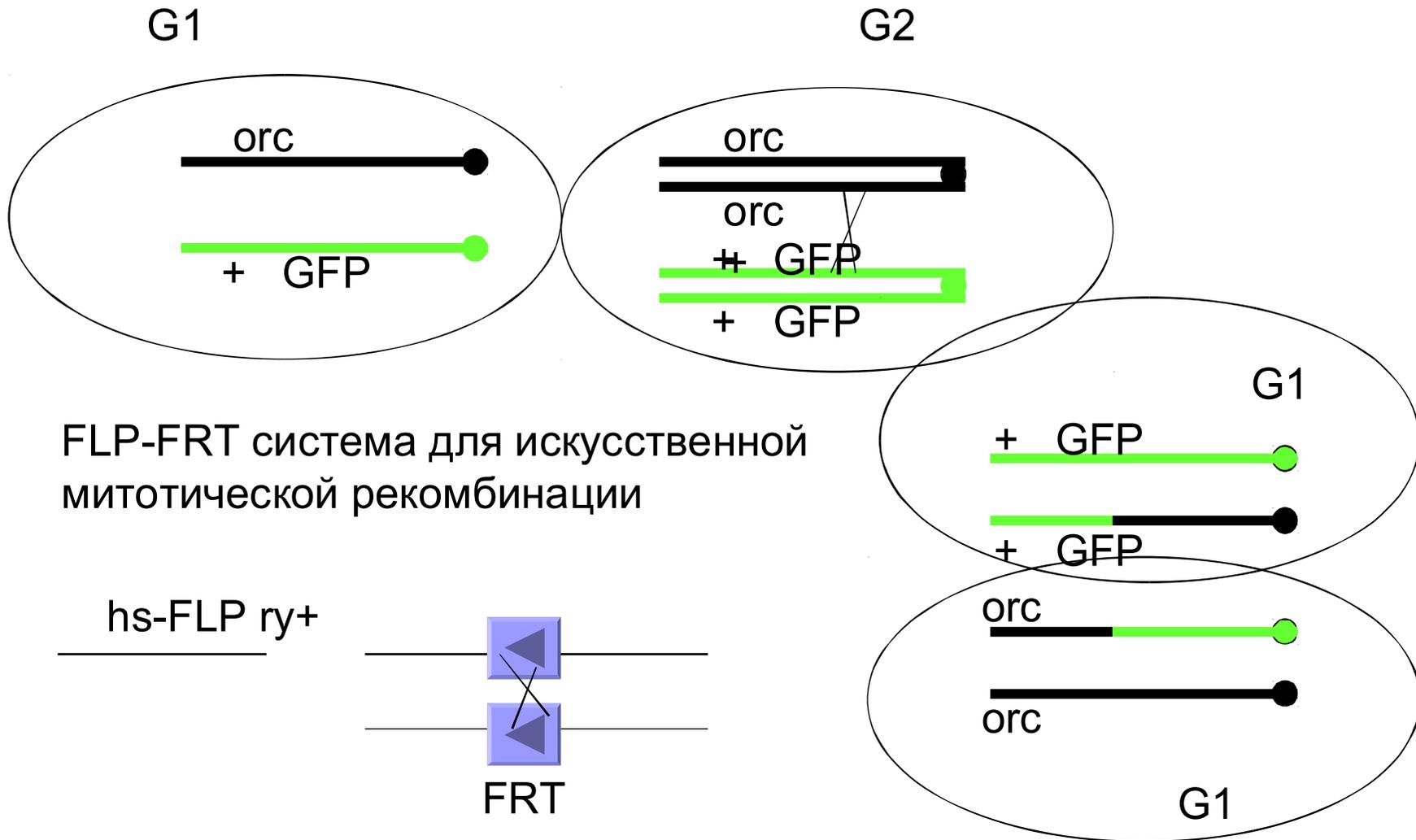
wt- дикий тип

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 (stage 11) generated in WT (A-C) and *orc1*^{+/-} heterozygous (D-F) flies.

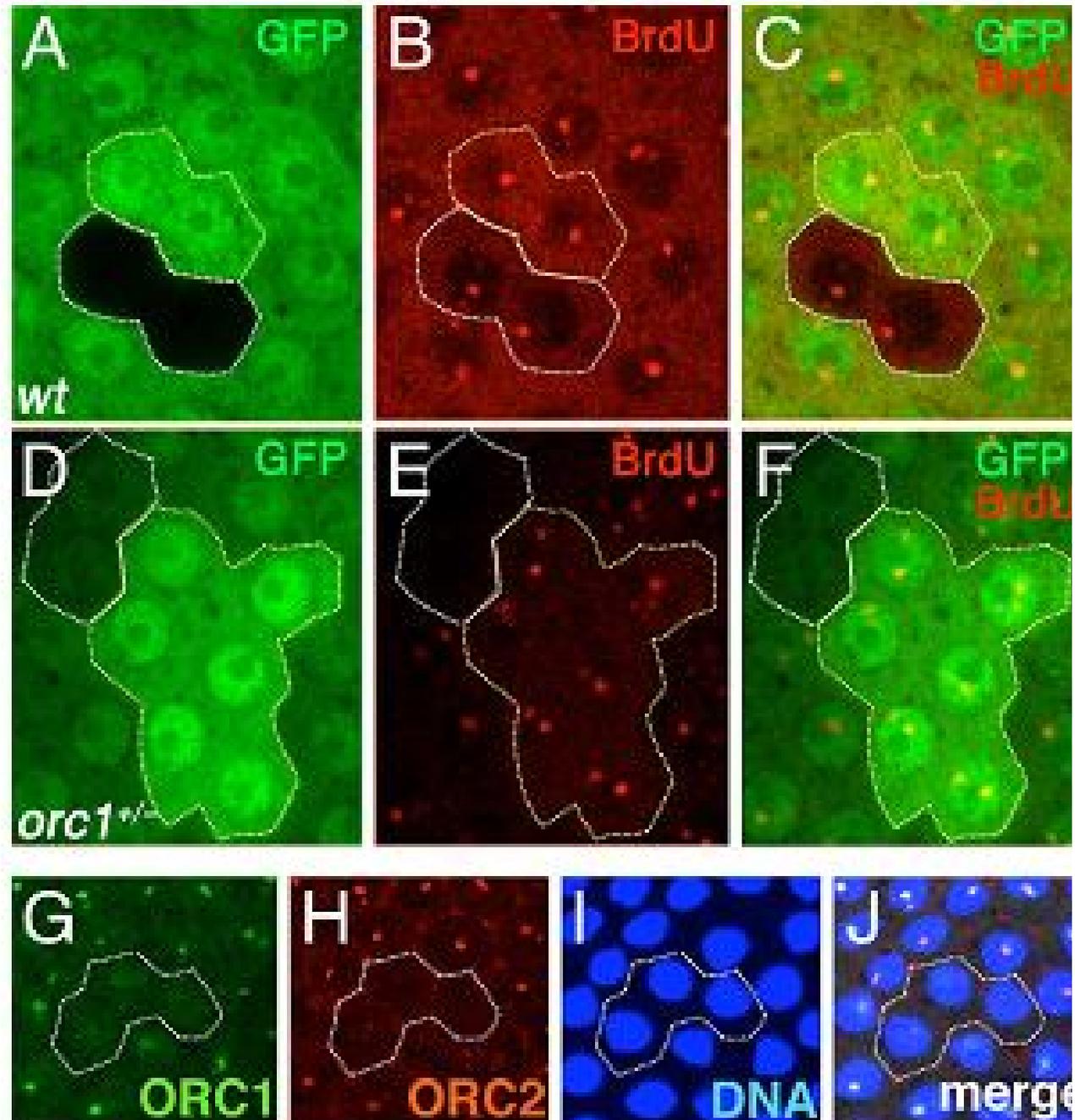
GFP (-/-) or GFP (+/+) clones are outlined.

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

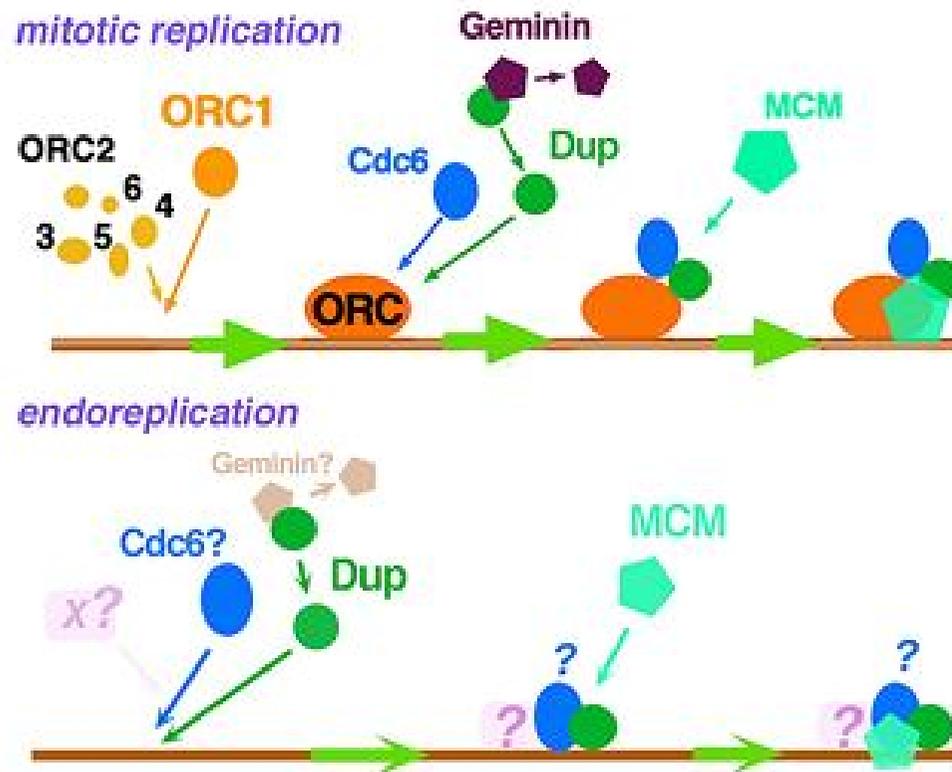
(G-J) Histochemical analyses of ORC1(G), ORC2(H), and DNA(I). A 3-cell/ somatic clone was generated in an *orc1*^{+/-} heterozygote. Note that

ORC2 also fails to localize to the amplification loci in *orc1*^{-/-} cells.

S.Y.Park & M.Asano,
2008



S.Y.Park & M.Asano,
2008

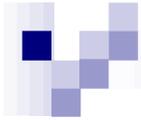


Для эндорепликации не нужны белки *orc1, 2*, вероятно, существуют другие, которые их заменяют в эндоциклах. У арабидопсиса два близких белка для митоза и эндорепликации *orc1a* и *orc1b*

Для амплификации генов хориона белки *orc1, 2* необходимы

Точки контроля клеточного цикла





- Изучение точек контроля у дрожжей:
- Получение условных мутагенчувствительных мутаций
- Обработка радиацией (мутации *rad*)
- веществами, блокирующими репликацию (гидроксимочевина) (мутации *hus*)
- веществами, блокирующими сборку веретена деления (мутации *mad* - mitotic arrest deficient, мутации *bub* - budding uninhibited by benzimidazole)

Точки контроля клеточного цикла

Сенсор



Передача сигнала



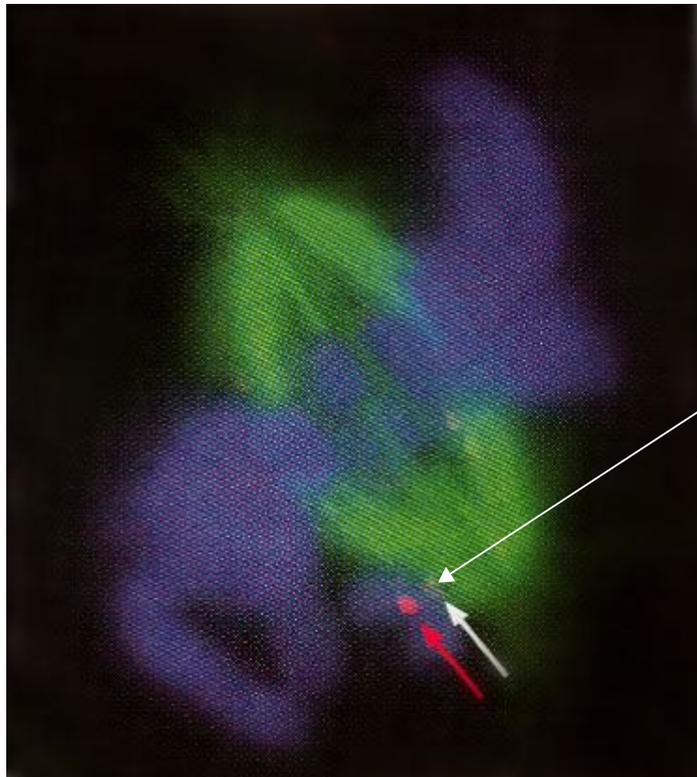
Эффекторная часть

- 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, ингибируется Cdc20-APC

Мутации:

mad- metaphase arrest deficient,

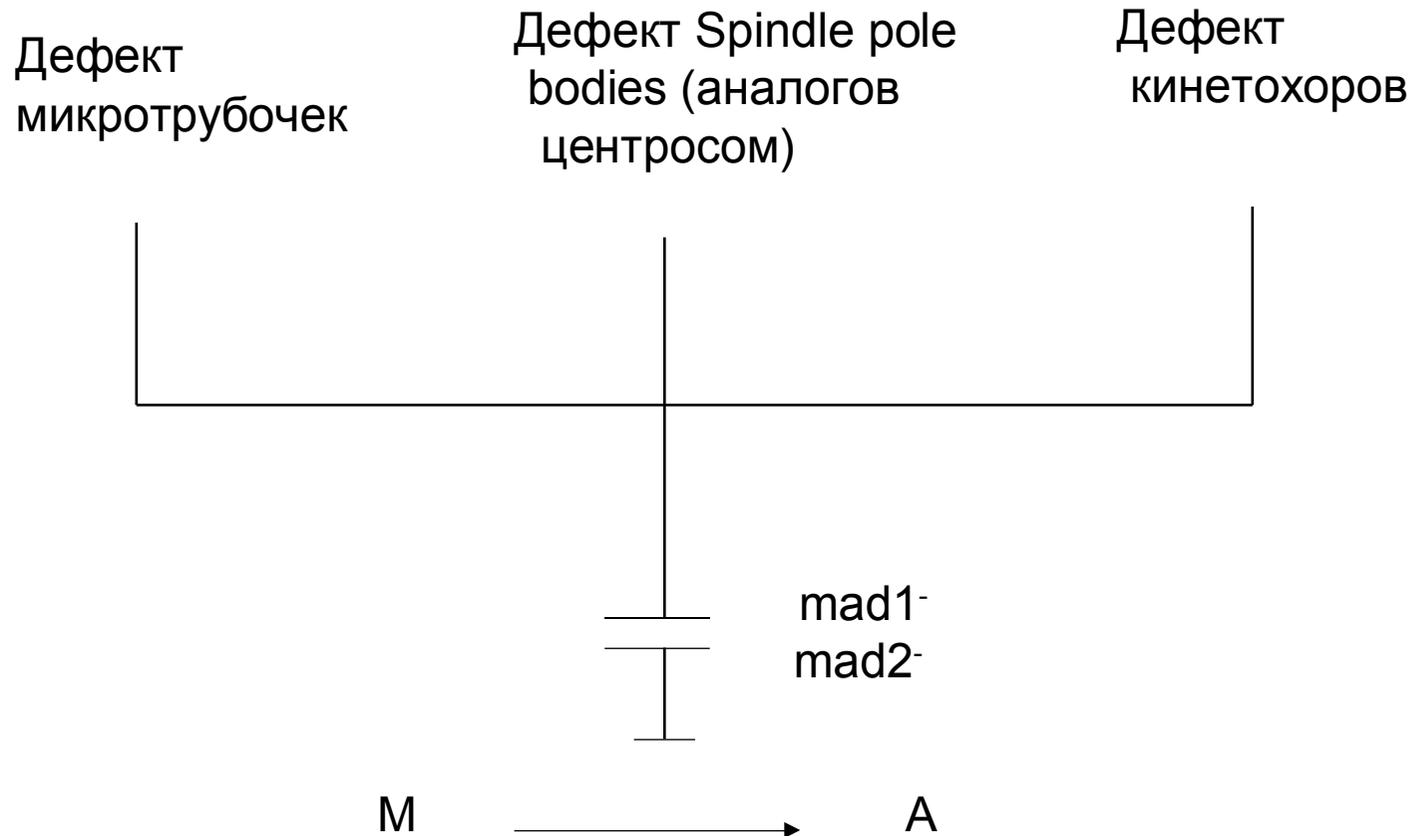
bub – budding uninhibited Benzimidazole

Кинетохорный белок **Bub1** (киназа):

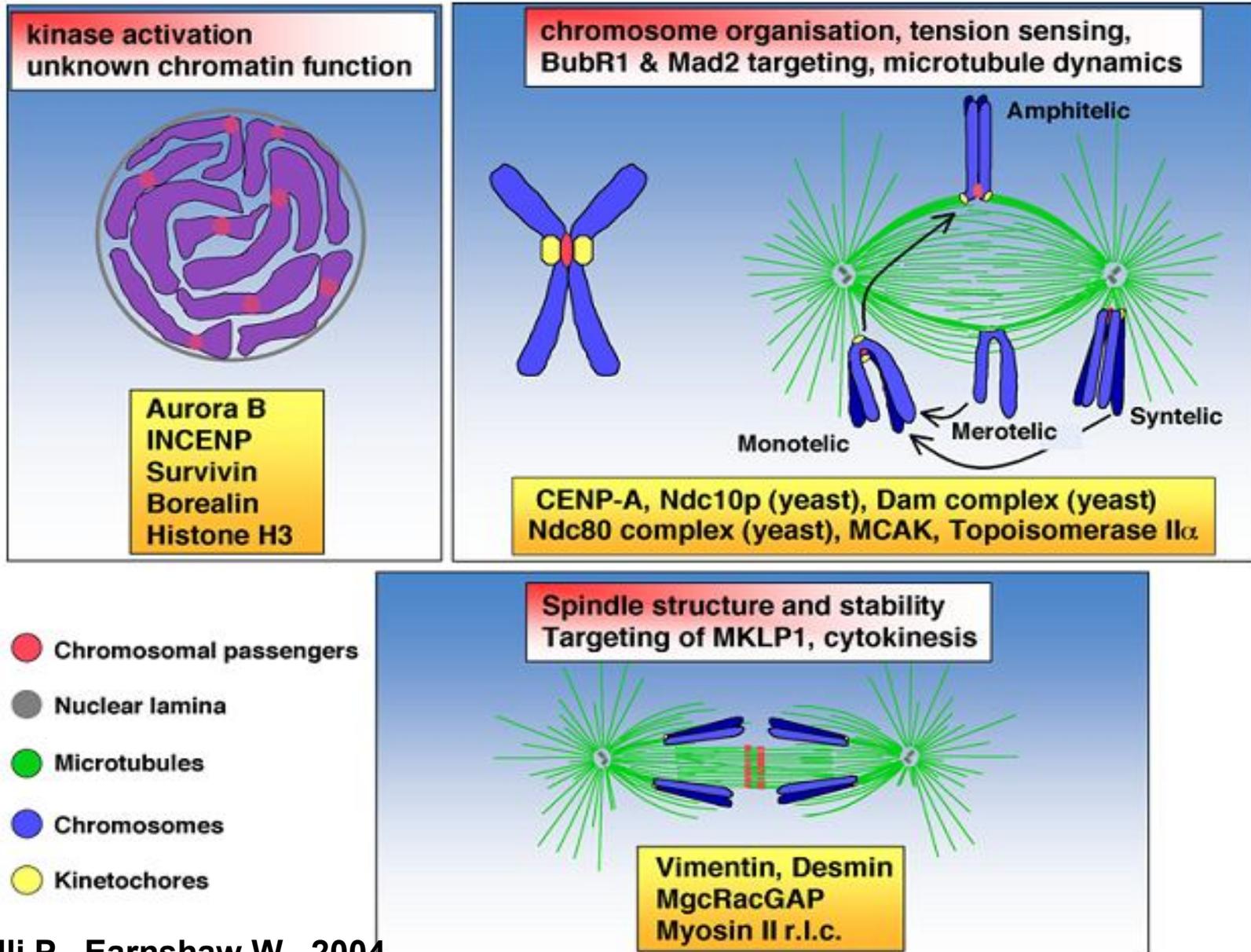
запускает сборку компонентов кинетохора (BubR1, CENP-F),

Контролирует правильное формирование кинетохора.

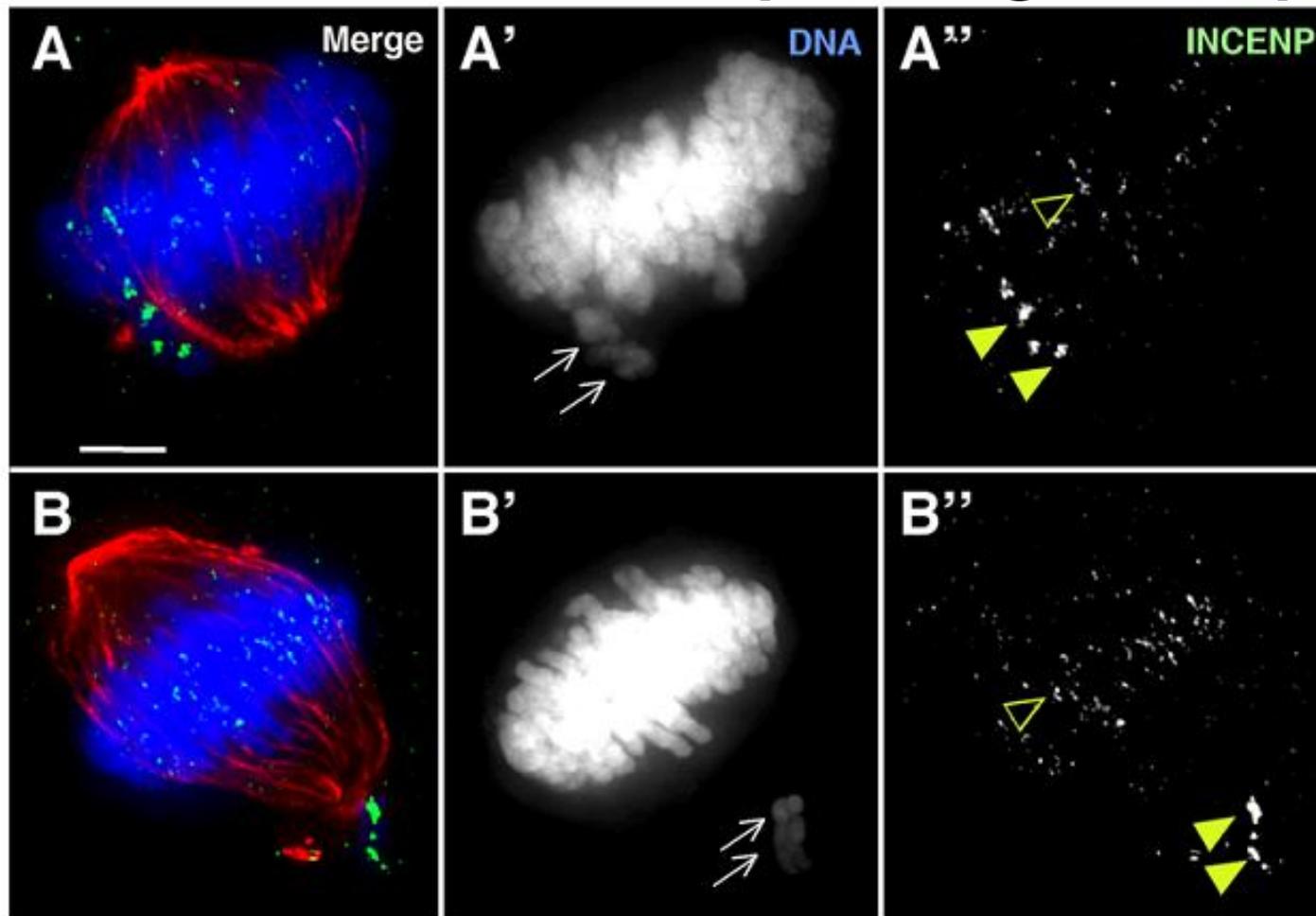
Структура точки контроля M-A у *S.cerevisiae*



CPC- chromosomal passenger complex

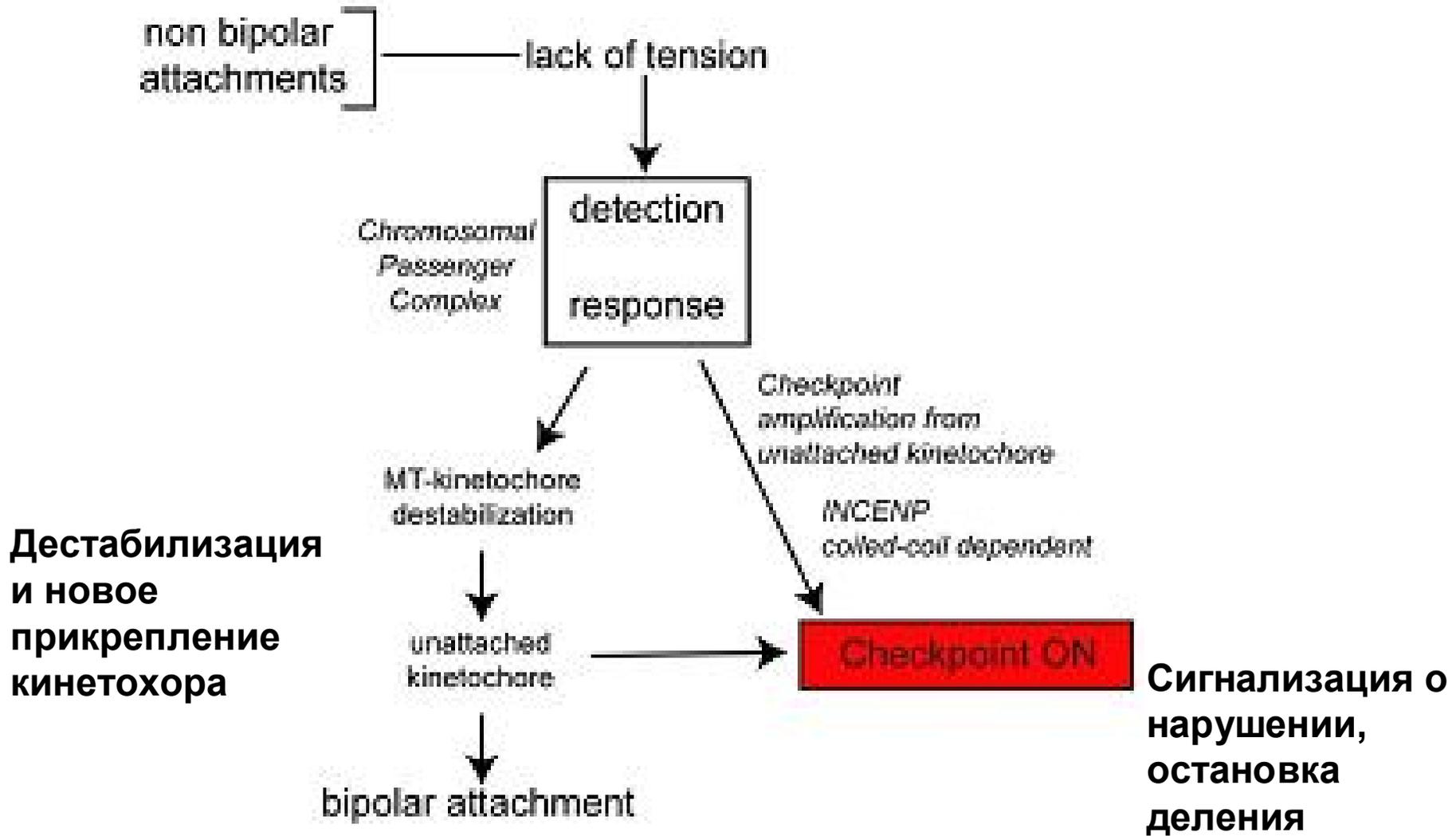


CPC- chromosomal passenger complex



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

Роль CPC в точке контроля веретена





CPC- chromosomal passenger complex

Survivin – член семейства IAP (Inhibitor of Apoptosis)

- 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) , которая регулирует переход от метафазы к анафазе
- Одна из причин лекарственной устойчивости рака

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,

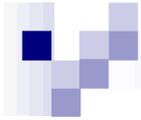
Сенсоры сигнализируют в систему контроля КЦ,

блок фосфатазы Cdc25 блокирует активацию M-Cdk.

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

G2 Контроль репликации centrosомы.

Передача сигнала- протеинкиназы : Mec3, Rad53

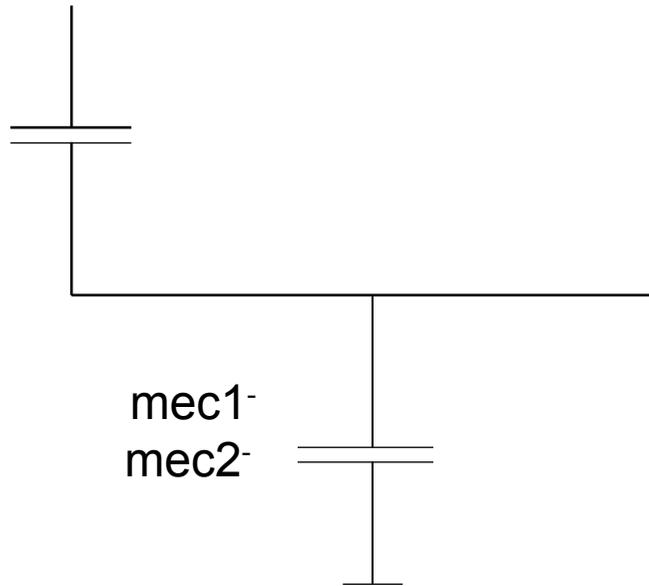


Структура точки контроля G2-M у *S.cerevisiae*

Damaged DNA

Unreplicated DNA

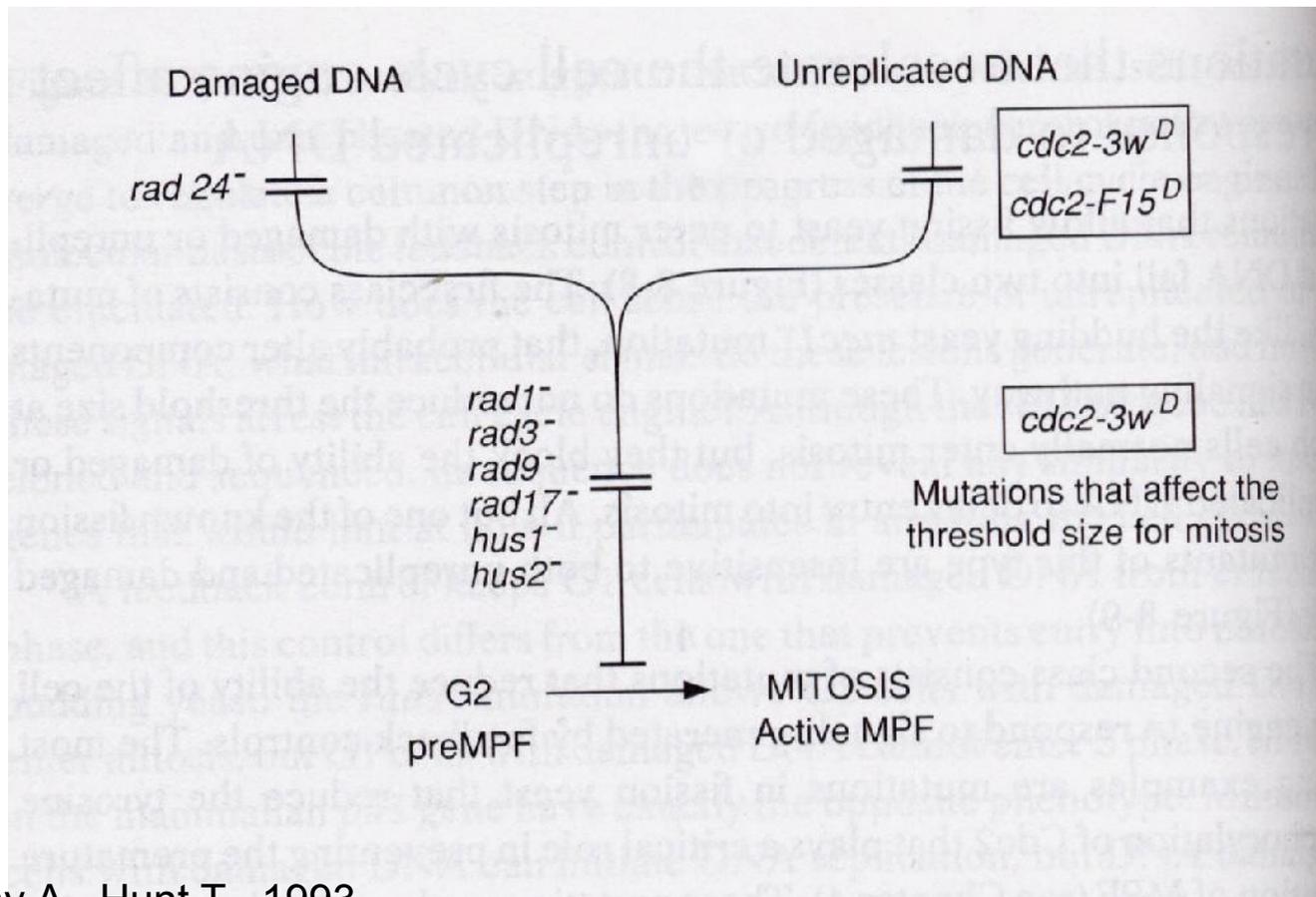
rad 9-
rad 17-
rad24-
mec 3-



mec1-
mec2-

G2 → M

Структура точки контроля G2-M



Murray A., Hunt T., 1993



Точки контроля клеточного цикла:

Повреждения ДНК

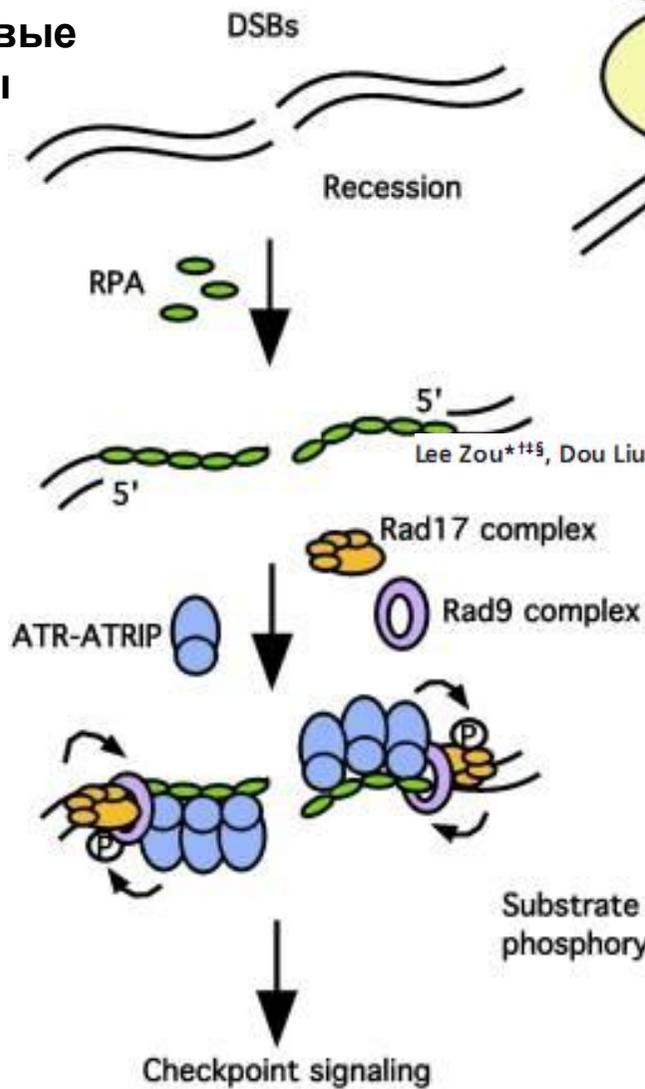
- Болезнь «атаксия телангиэктазия»- синдром Луи-Бара – дефект одной из протеинкиназ, фосфорилирующих p53 в ответ на облучение - ATM-киназа (ATM – ataxia telangiectasia mutated) (ответ на двунитевые разрывы)
- ATR – ATM and Rad3 related – ответ на многие формы повреждения ДНК (генотоксический стресс)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

Центральные компоненты ответа на повреждения ДНК

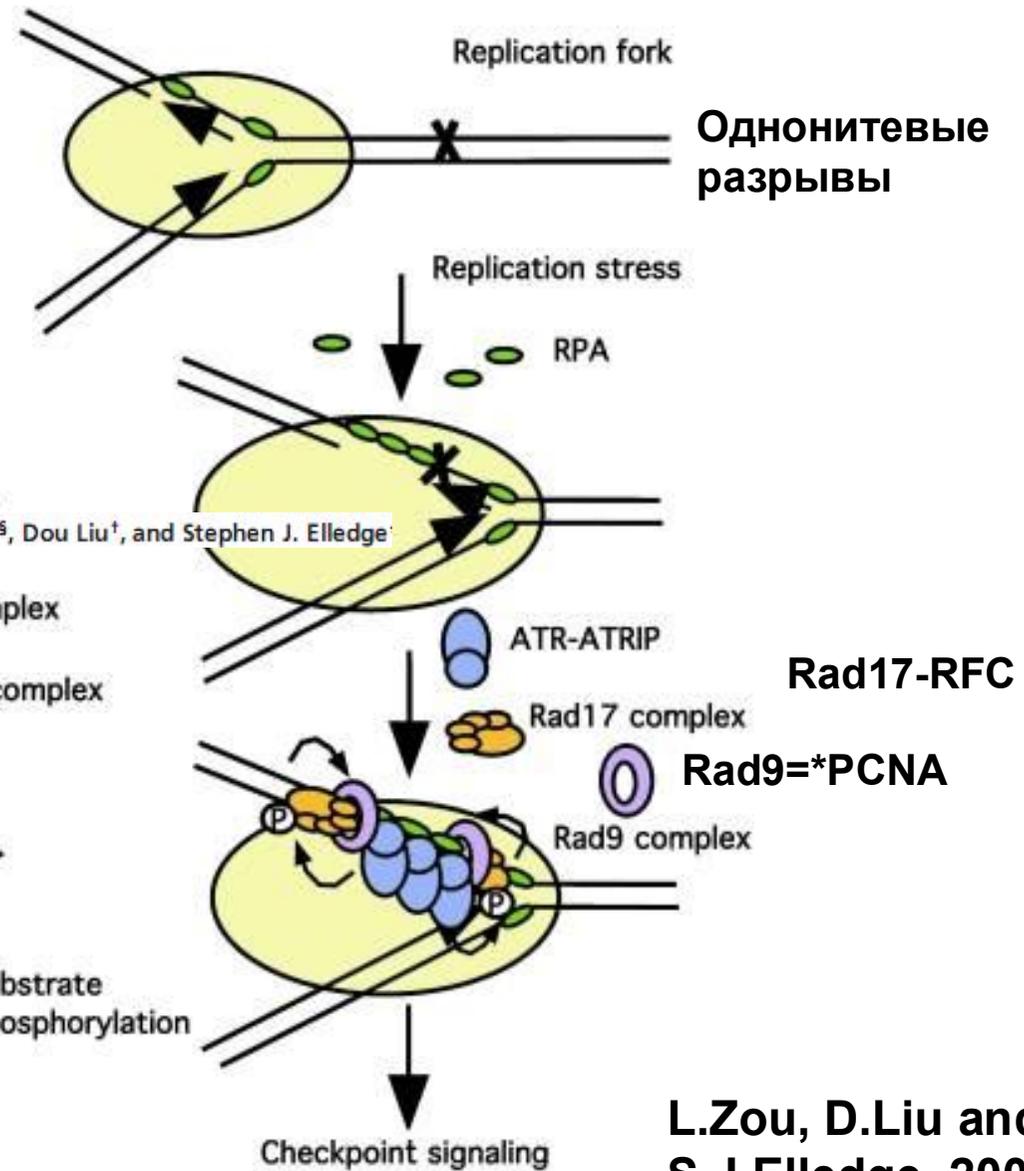
- Белок RPA взаимодействует с однонитевыми разрывами ДНК (остановленные вилки репликации, двунитевые разрывы ДНК, сайты репарации эксцизионные, мисматч)
- привлекает ATR-киназу и белок ATRIP (ATR-interacting protein)
 - Rad17- подобен репликативному фактору C
 - Rad9 – кольцевой белковый комплекс, подобный 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

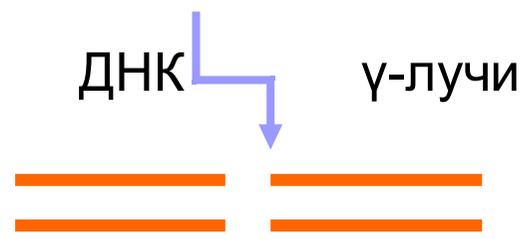
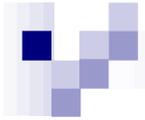


Однонитевые разрывы

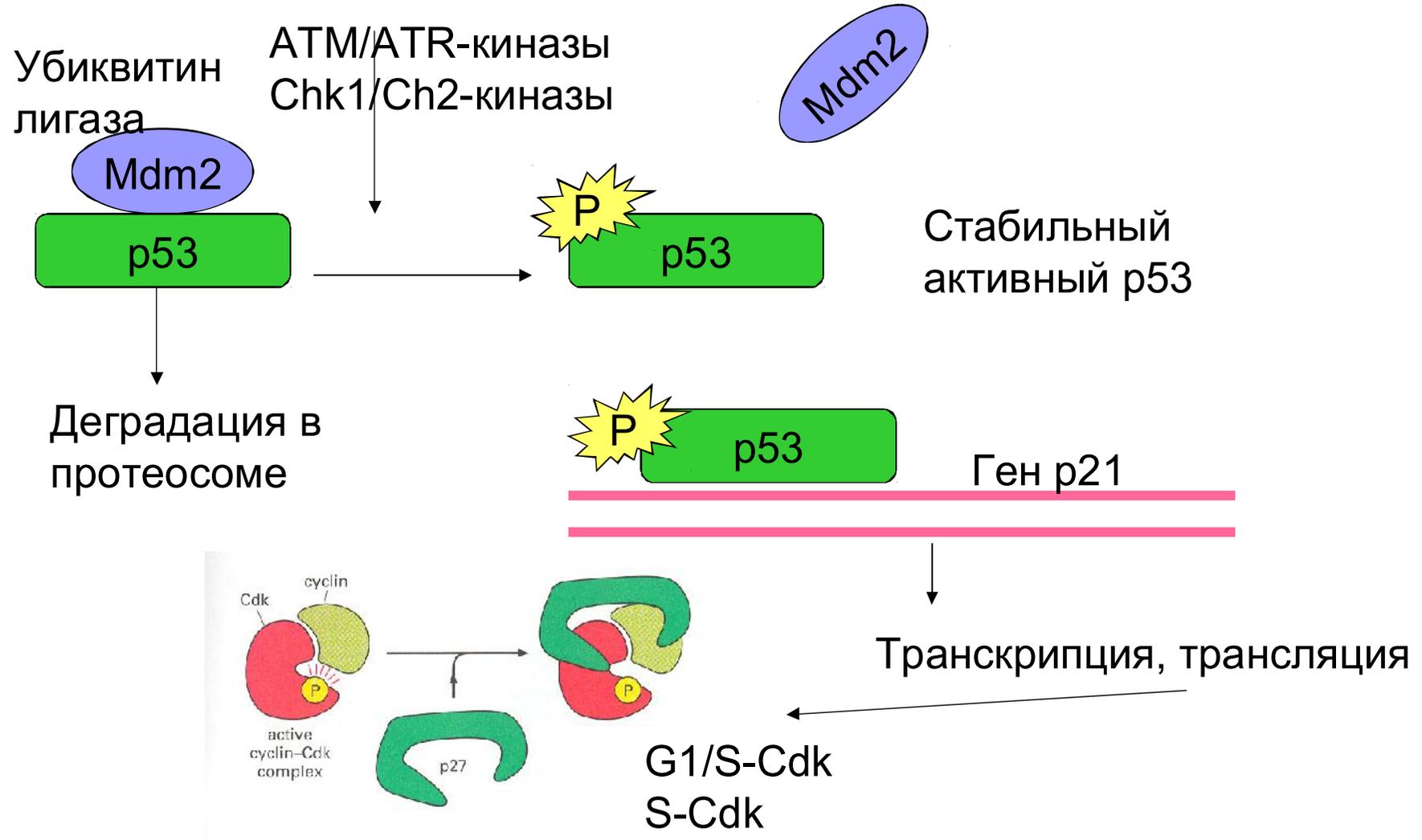


Lee Zou^{1,2,5}, Dou Liu¹, and Stephen J. Elledge

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



G1- арест в ответ на повреждения ДНК





Сенсоры повреждения ДНК:

RPA –

ATR - амплификация сигнала

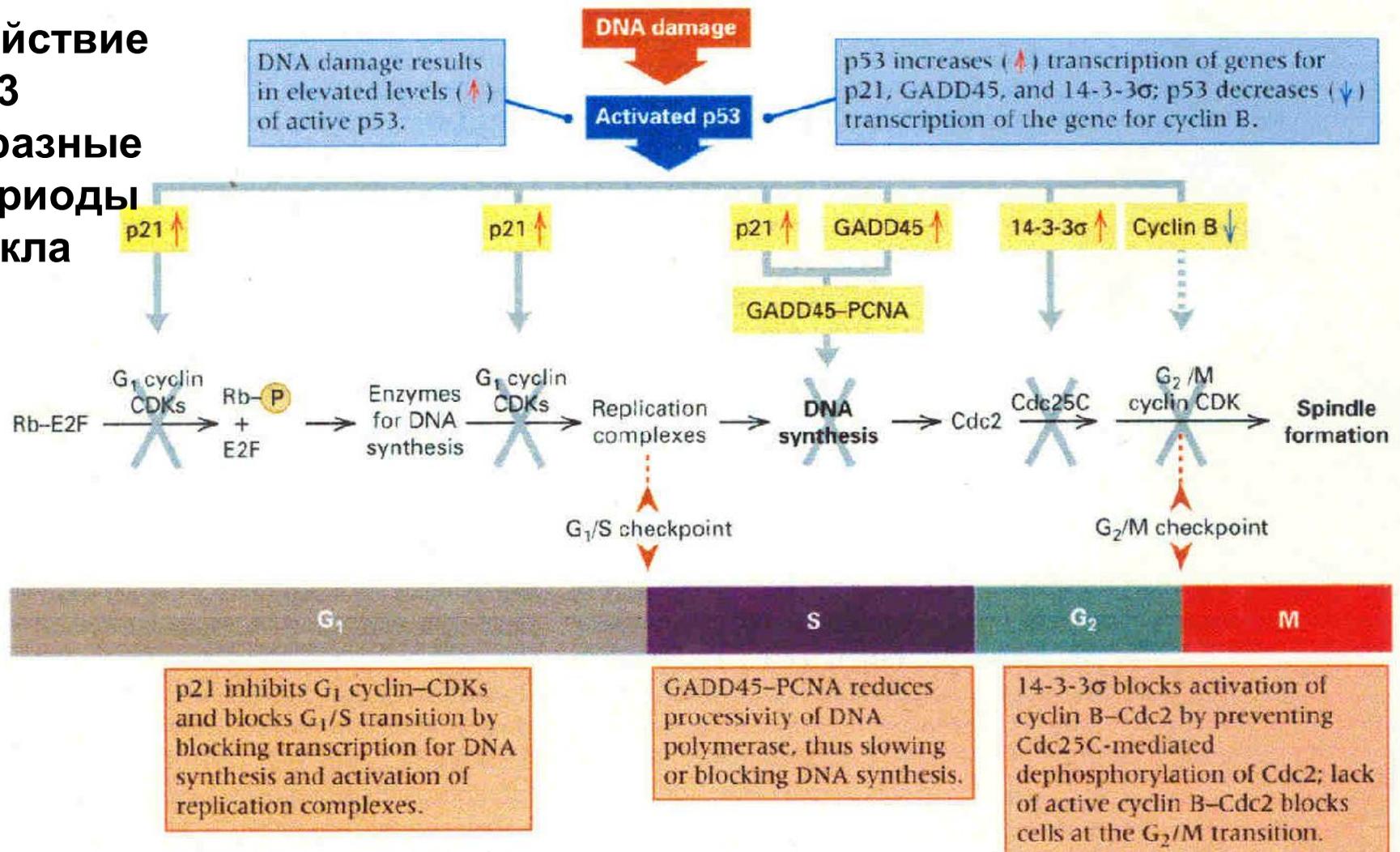
ATRIP

Активация Chk 1, 2 киназ

Фосфорилирование Cdc25 – остановка входа в митоз

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

Действие p53 в разные периоды цикла



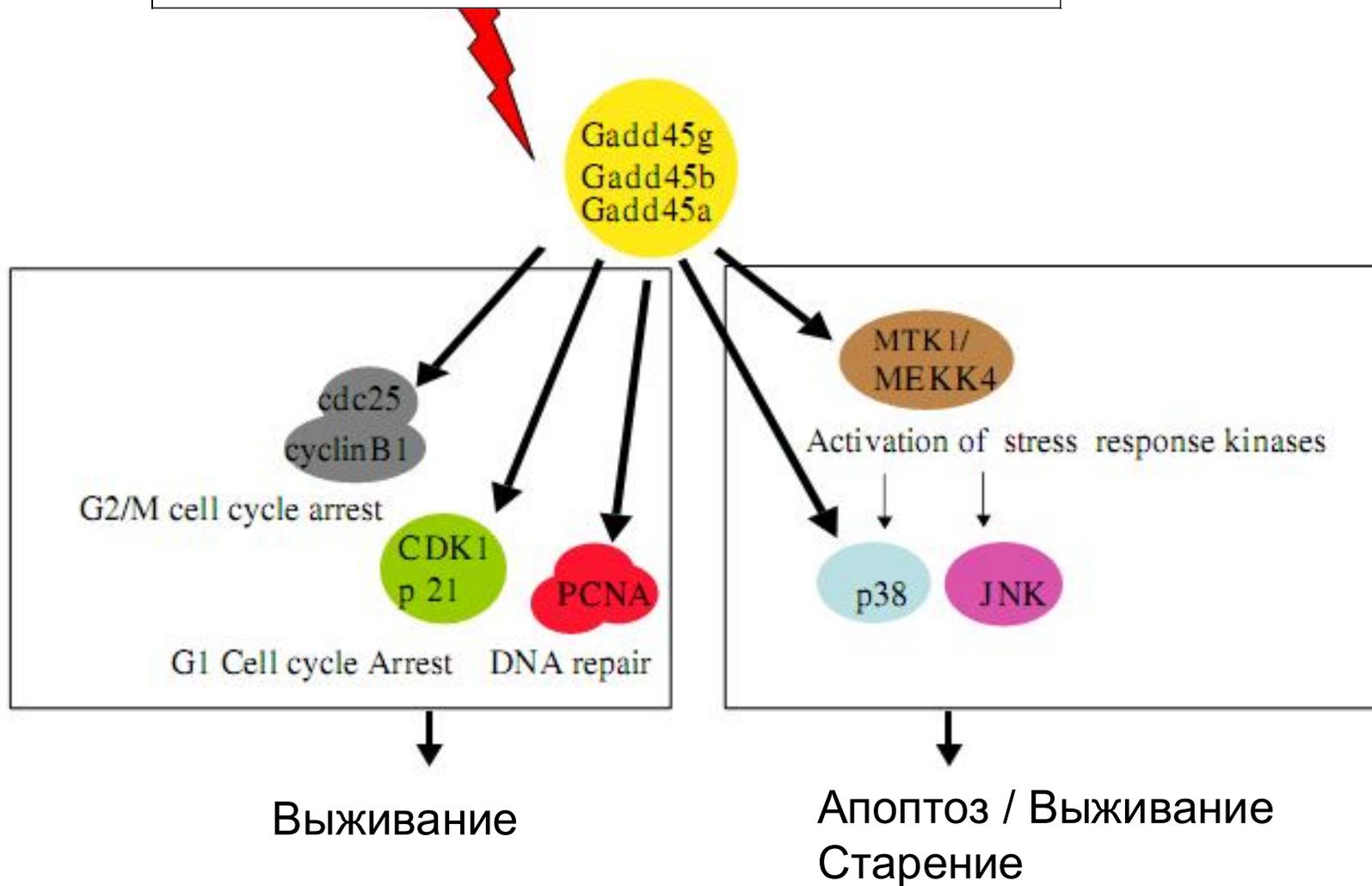
В точке контроля G1 p53 блокирует G1-Cdk через белок p21

В точке контроля G2/M p53 блокирует циклин B/Cdk через инактивацию фосфатазы Cdc25

Сенсоры стресса Growth Arrest DNA Damage (Gadd 45) у млекопитающих

Роль белков Gadd - Growth Arrest DNA Damage

Средовой или физиологический стресс



Нарушения, вызывающие остановку в точках контроля

