

Клеточный цикл и его регуляция

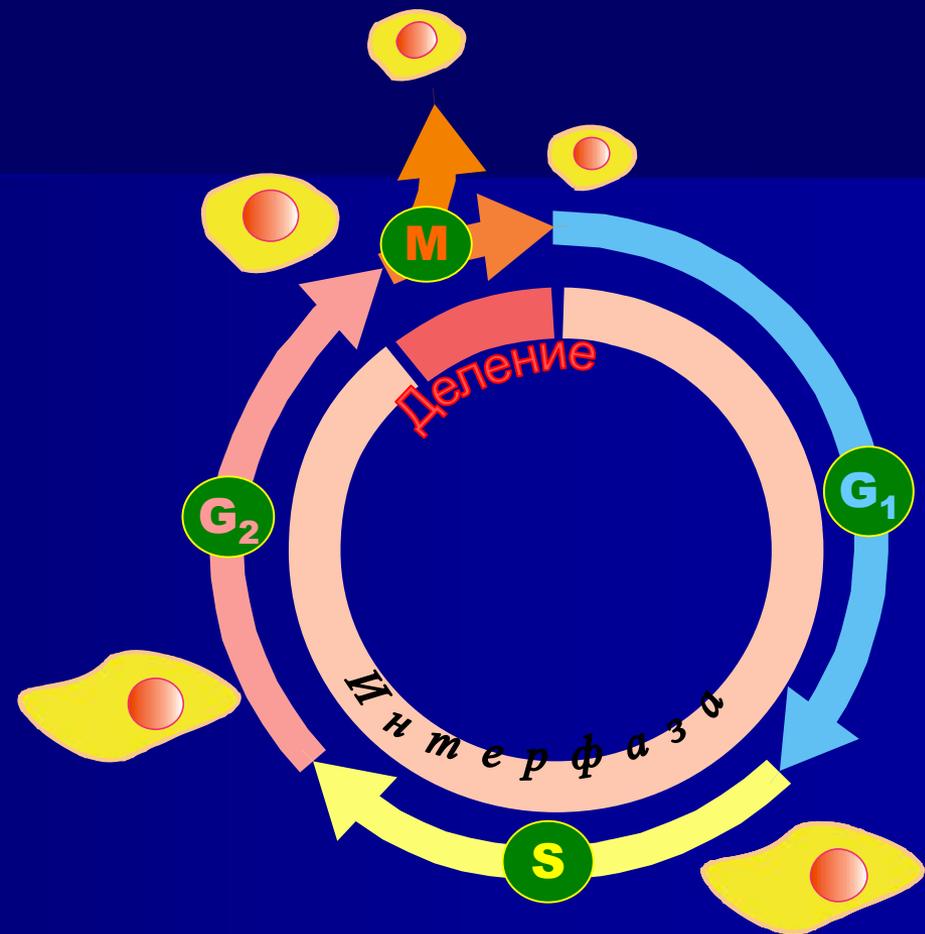
Клеточный цикл

Клеточный цикл - жизненный цикл клетки от деления до следующего деления или смерти.

Клеточный цикл включает **митотическое деление** и **интерфазу** - промежуток между делениями.

Точная регуляция клеточного цикла является основой нормального развития и существования многоклеточного организма.

- Клетка не сможет разделить до тех пор пока не произойдет:
 - удвоения ее генома (ДНК) в **S** (синтетической) фазе клеточного цикла;
 - компактной упаковки и разделения удвоенного генома в ходе митоза (**M** фазы).
- **Период между M и S фазами называется G_1** (от англ. *gap* – промежуток) - **пресинтетический**, а **между S и M - G_2** - **постсинтетический**.



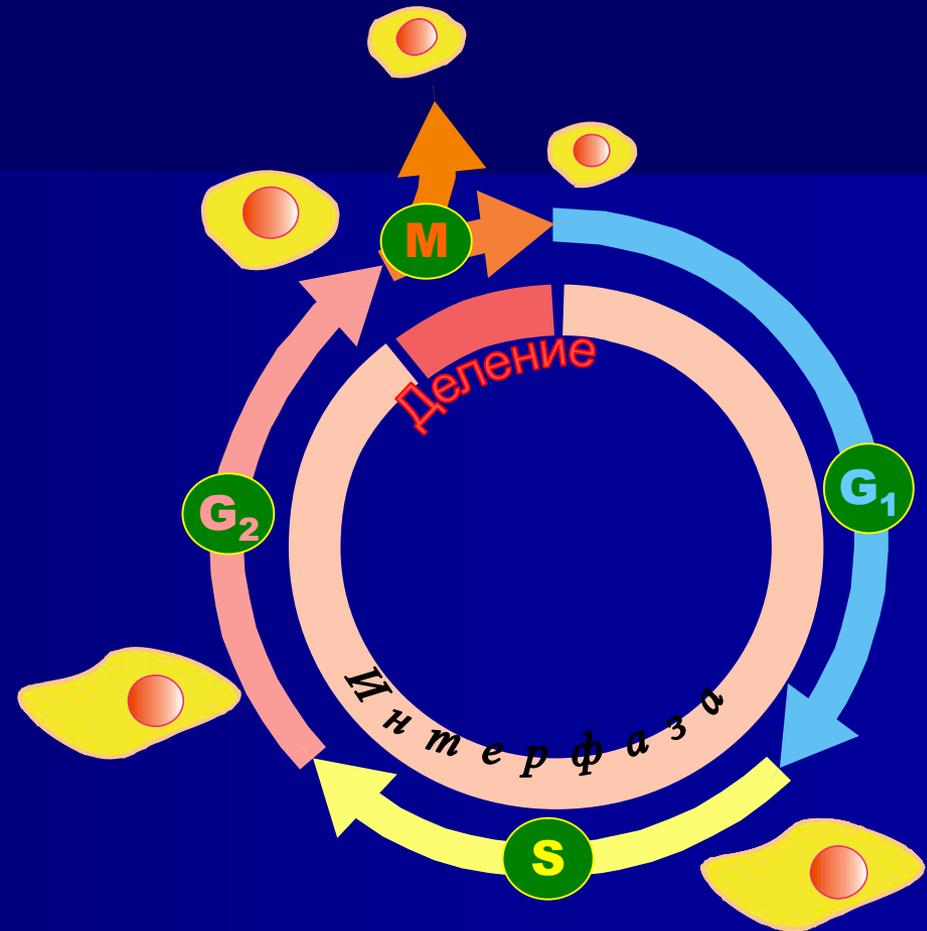
В фазе G_1 происходит рост клетки и подготовка хромосом для репликации;

В **S-фазе** – синтез (репликация) ДНК и центриолей;

В фазе G_2 – подготовка к делению;

В фазе **M** – компактизация ДНК и ее точное деление на 2 части.

Когда клетка находится в любой стадии клеточного цикла за исключением митоза, то она находится в стадии интерфазы.



Фазы клеточного цикла

M-фаза

Митоз; Разделение хромосом;
Деление клетки

G₂-фаза

Подготовка к
митозу

S-фаза

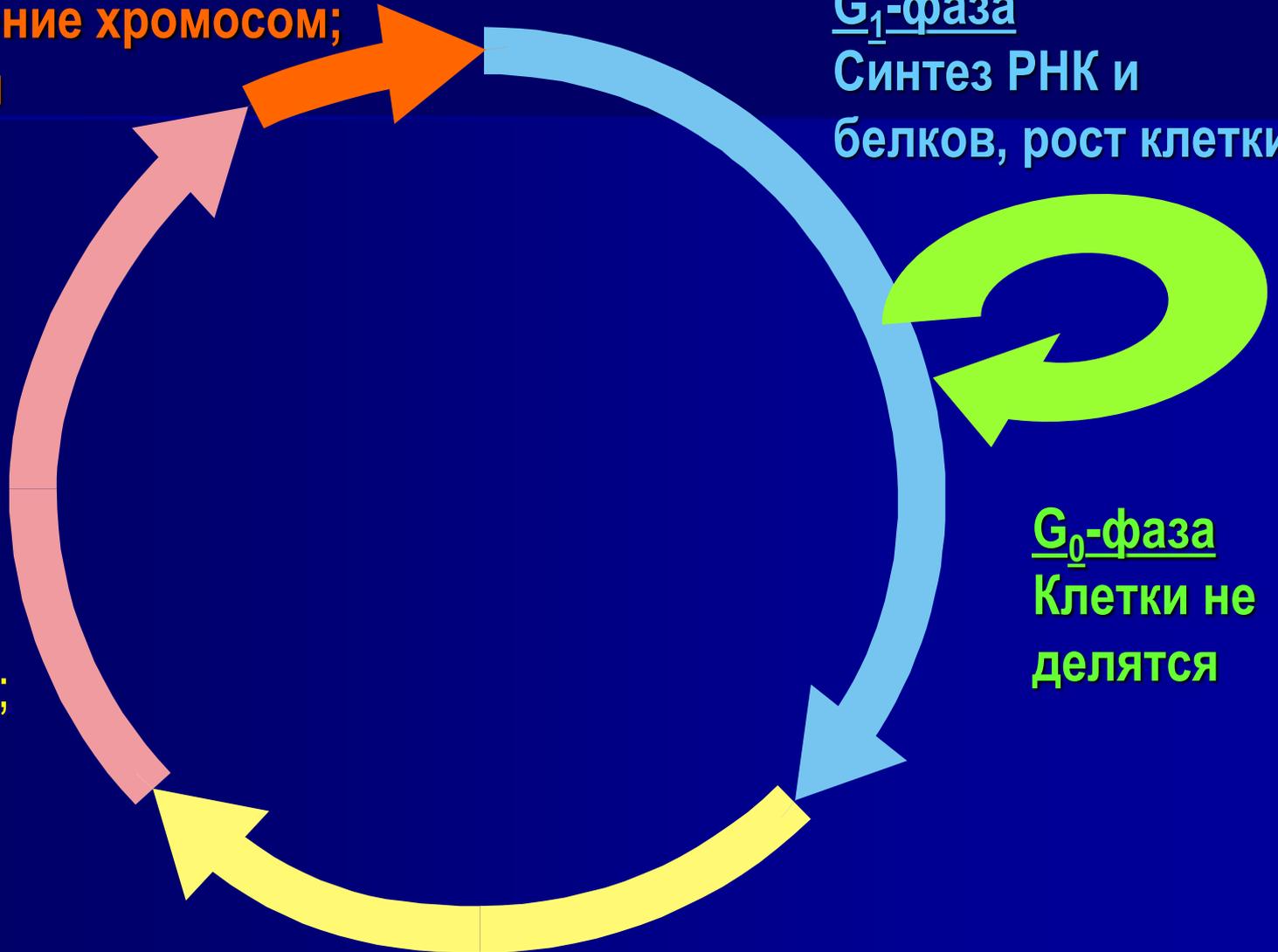
Репликация
ДНК;
Синтез гистонов;
Образование
центросомы;
Удвоение
хромосом

G₁-фаза

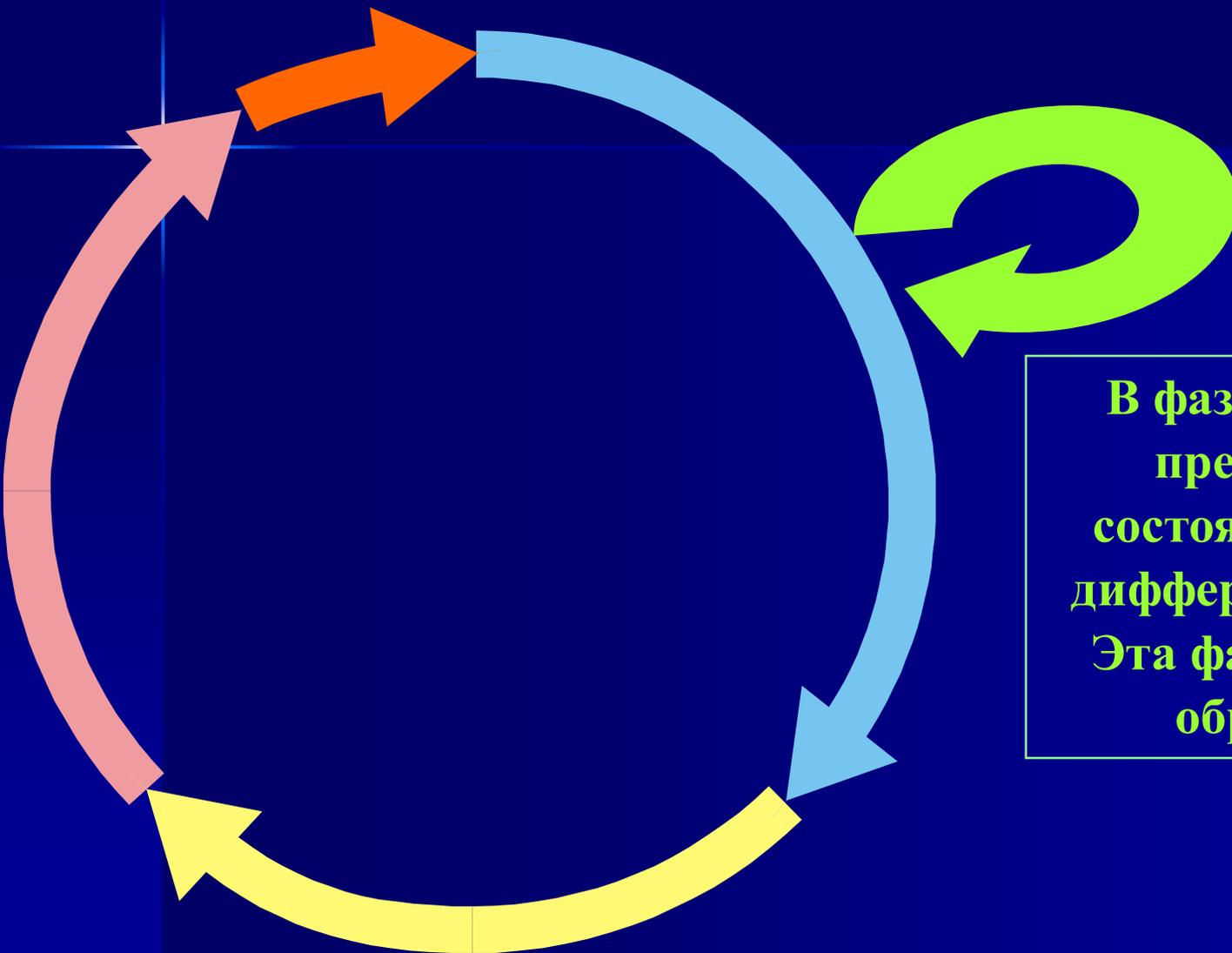
Синтез РНК и
белков, рост клетки

G₀-фаза

Клетки не
делятся



Фаза G_0



Продолжительность клеточного цикла

Клетки человека в культуре :

$G_1 = 8 - 12$ ч. (высокий уровень синтеза РНК и белков)

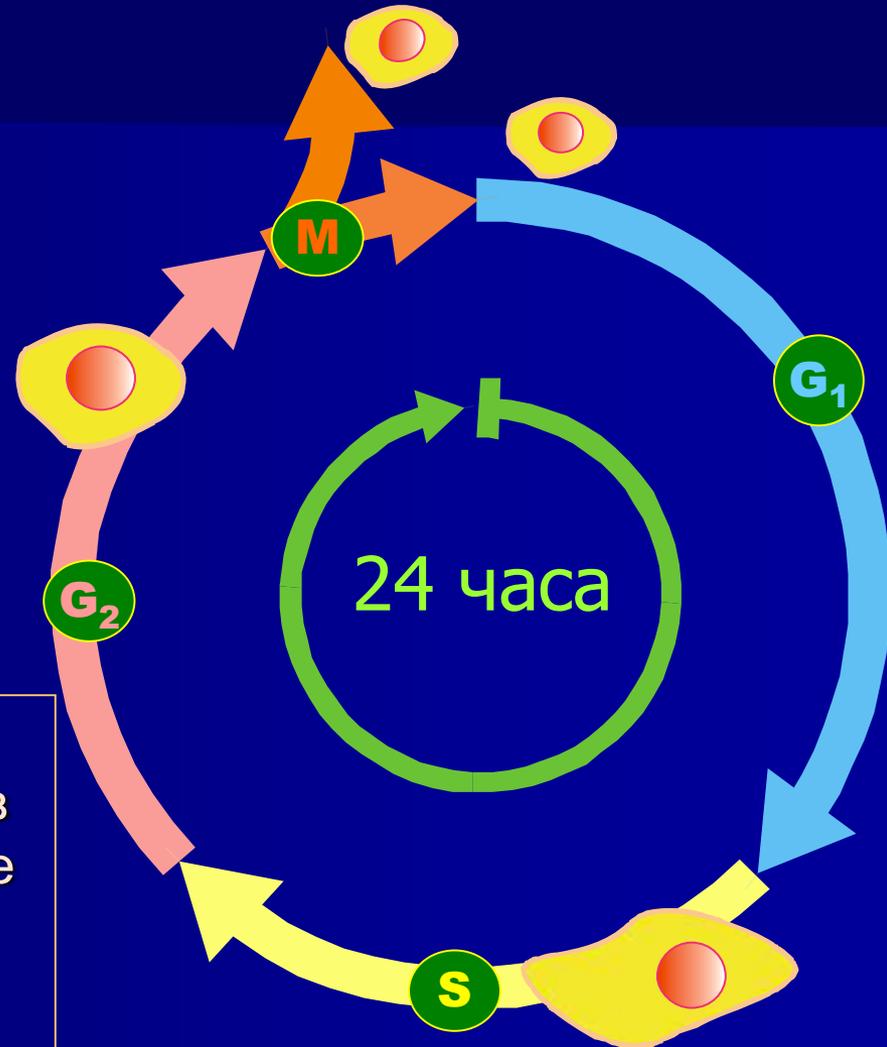
$S = 6 - 8$ ч. (синтез ДНК)

$G_2 = 2 - 4$ ч. (уменьшенный синтез белков)

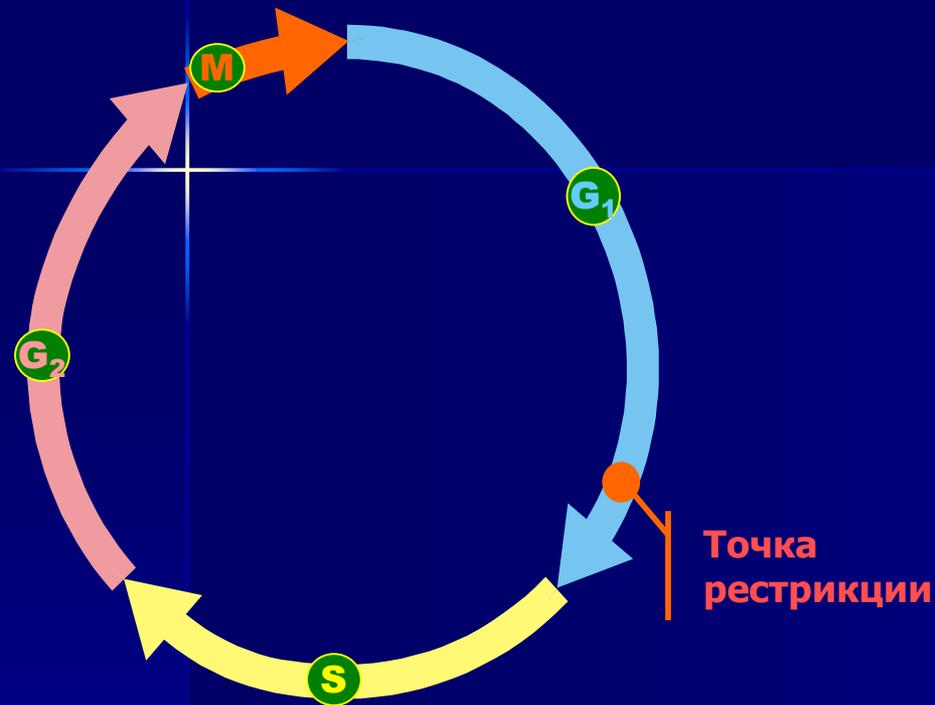
$M = 1$ ч. (синтез РНК отсутствует)

В среднем продолжительность клеточного цикла составляет **24 ч.**

Различия в длительности клеточного цикла между тканями определяются в основном длиной фазы G_1 . Некоторые клетки делятся очень медленно, оставаясь в G_1 -фазе многие дни или даже годы.



Точка рестрикции



По окончании G₁ клетки переключаются на автономную программу регуляции. Все физиологические задержки и остановки цикла происходят в фазе G₁. Только повреждение какой либо клеточной структуры может остановить цикл в других фазах. Критическим пунктом клеточного цикла является **точка рестрикции** в конце фазы G₁. Именно здесь клетка "принимает решение" переходить в фазу S или углубиться в состояние покоя. Клетки, израсходовавшие свой пролиферативный потенциал, останавливаются в G₁ из-за утраты способности переходить точку рестрикции.

M-фаза подразделяется на шесть стадий

Интерфаза



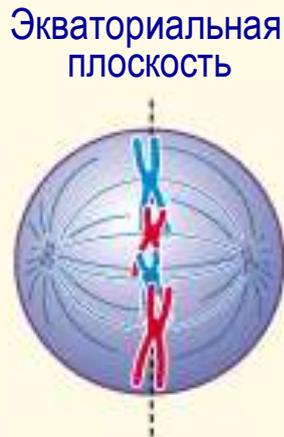
Профаза



Прометафаза



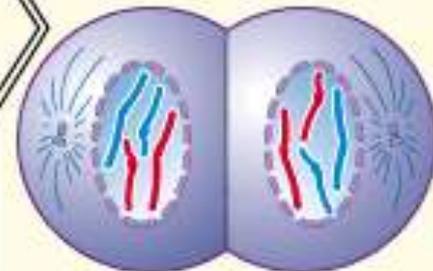
Метафаза

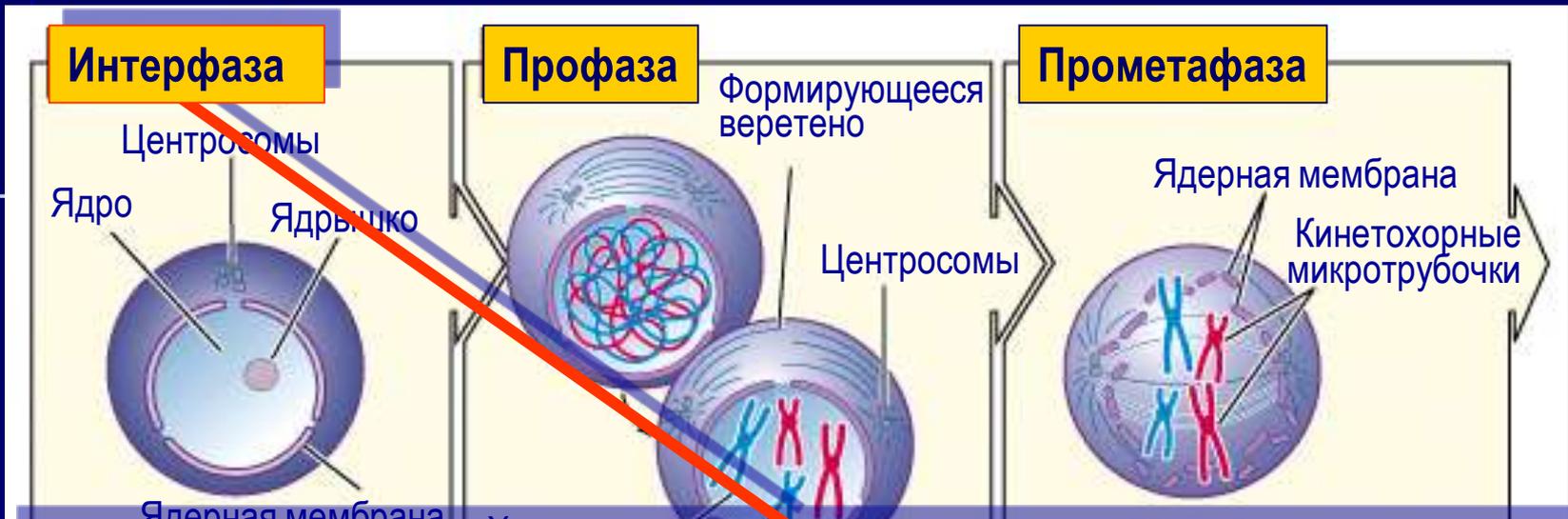


Анафаза



Телофаза





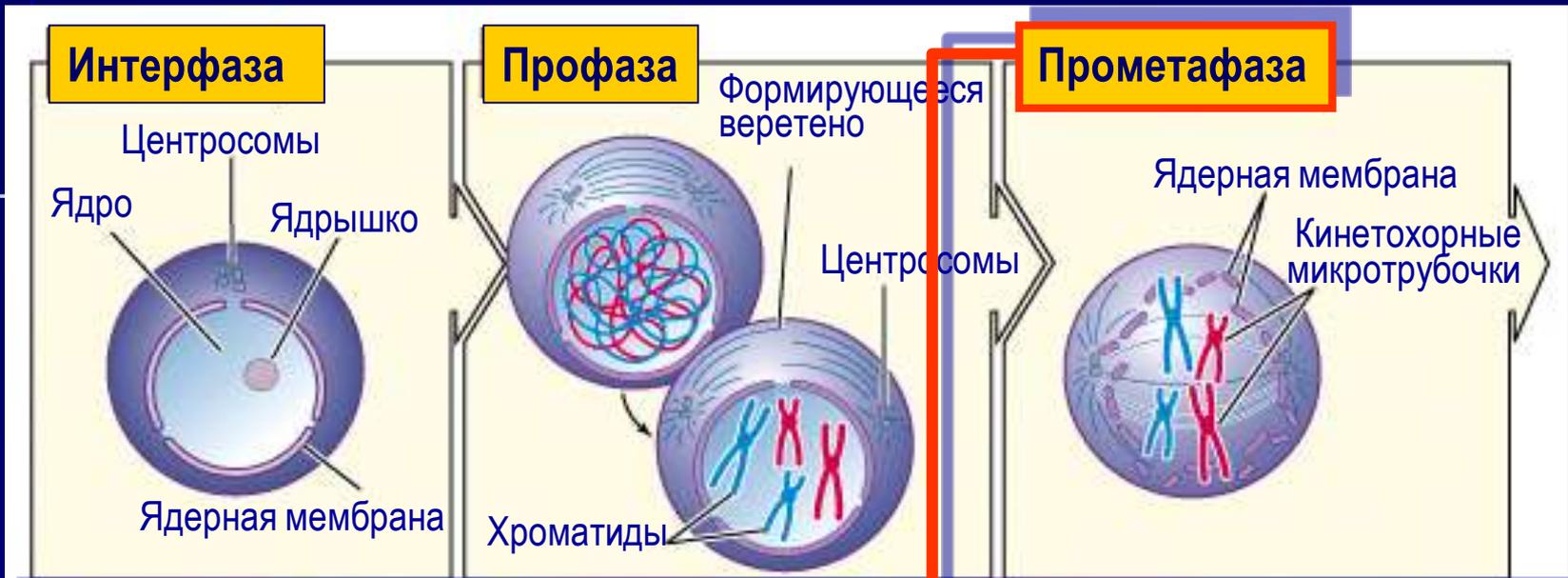
Период, во время которого происходят сложные приготовления к митозу (G1-S-G2)

Стадии митоза



Хроматин конденсируется в отчетливо видимые **хромосомы**. Каждая хромосома состоит из двух сестринских **хроматид**. В конце профазы цитоплазматические микротрубочки, составляющие часть интерфазного цитоскелета, распадаются и начинается образование **веретена** - главного компонента митотического аппарата. Сборка веретена происходит вначале вне ядра.

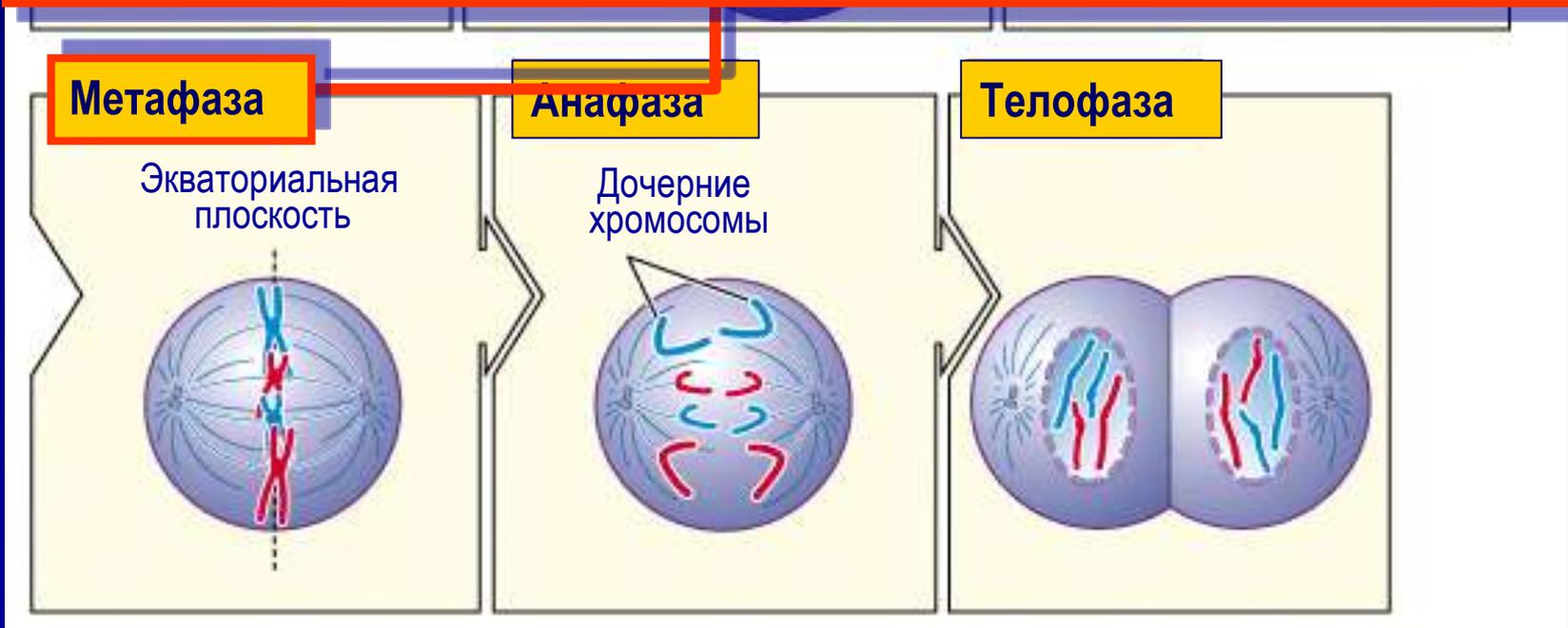
Стадии митоза



Начинается с быстрого распада ядерной оболочки. На каждой центромере образуются **кинетохоры**, которые прикрепляются к **кинетохорным микротрубочкам**.
Остальные микротрубочки веретена называются **полюсными**, а лежащие вне веретена - **астральными**.
Кинетохорные микротрубочки тянут хроматиды в разные стороны, что приводит к интенсивному движению хромосом.

Стадии митоза

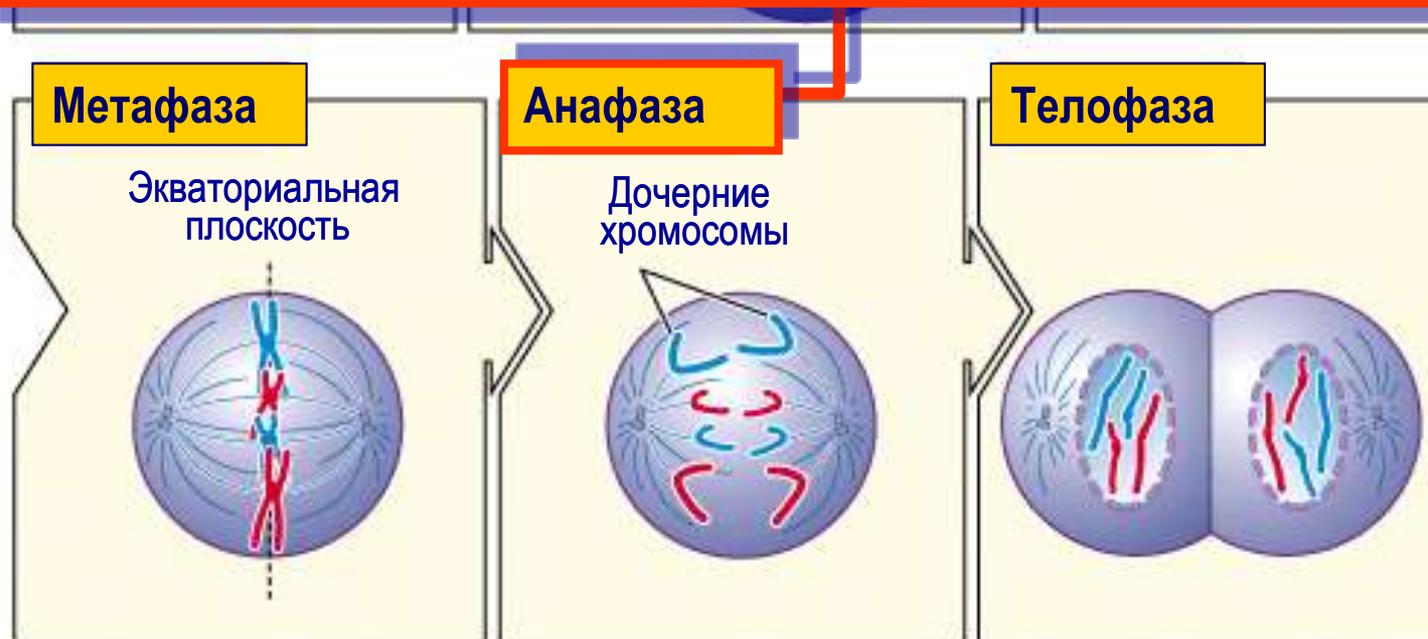
Кинетохорные микротрубочки приводят каждую хромосому в **экваториальную плоскость** на полпути между полюсами веретена. Хромосомы образуют здесь метафазную пластинку, в которой они удерживаются натяжением кинетохонных микротрубочек, отходящих от них к противоположным полюсам веретена.



Стадии митоза

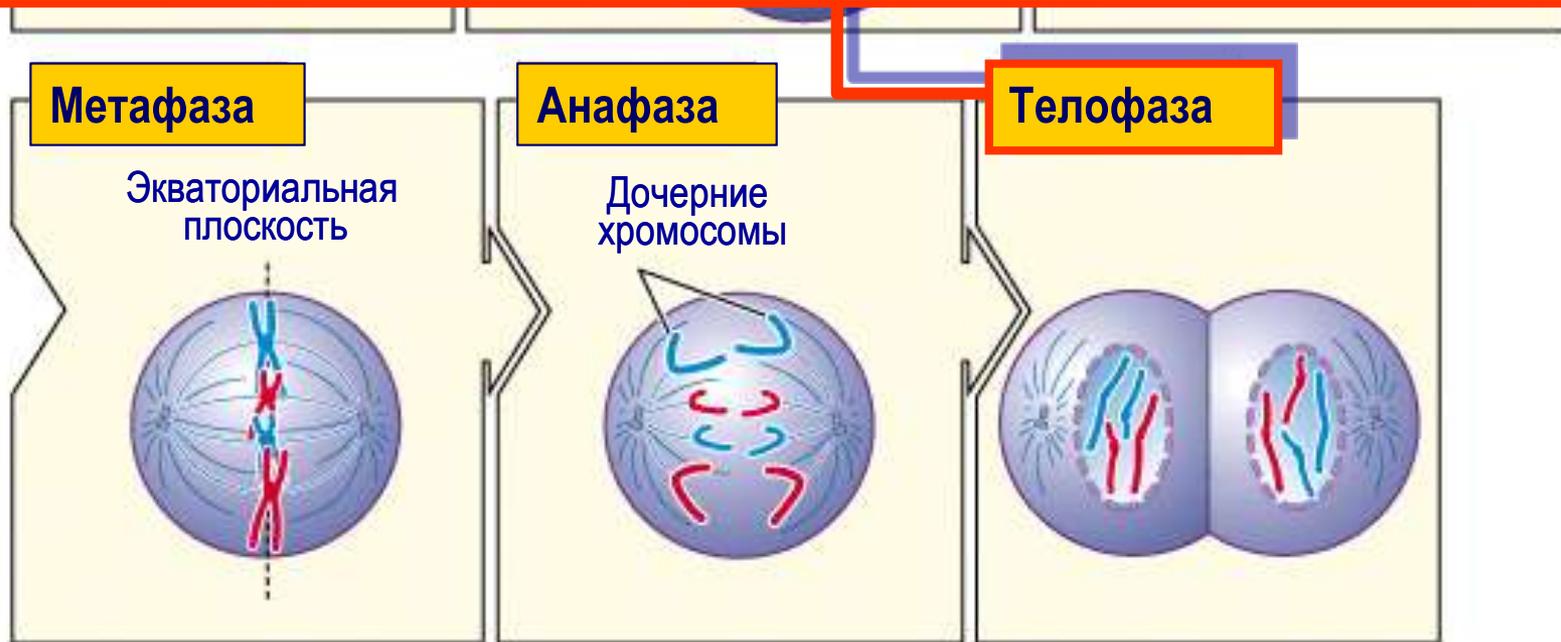
Знаменуется внезапным разделением парных кинетохоров каждой хромосомы, после чего две хроматиды начинают медленно расходиться к противоположным полюсам.

- **Анафаза А** – кинетохорные микротрубочки укорачиваются, хромосомы приближаются к полюсам.
- **Анафаза В** – происходит удлинение полярных микротрубочек и полюсы веретена еще дальше отодвигаются друг от друга.

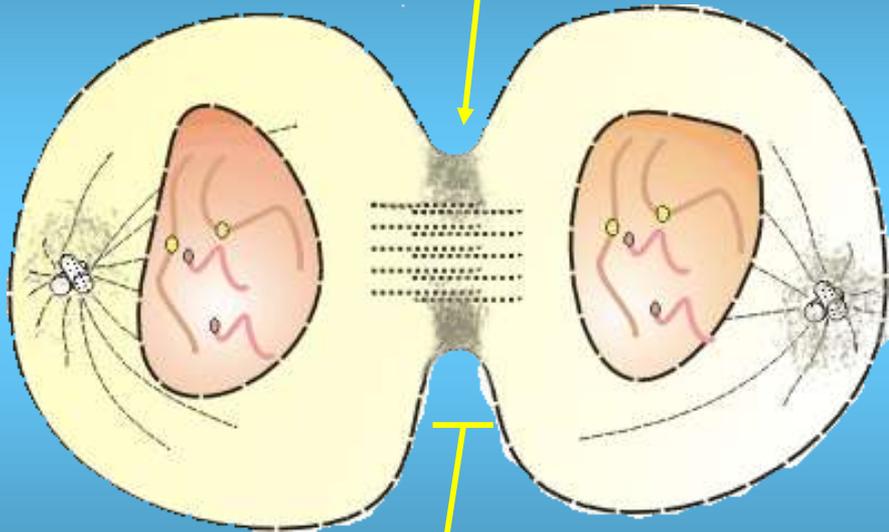


Стадии митоза

(от греч. telos – конец) разделившиеся дочерние хроматиды подходят к полюсам и кинетохорные микротрубочки исчезают. Полярные микротрубочки продолжают удлиняться. Вокруг каждой группы дочерних хроматид образуется новая ядерная оболочка. Хроматин деконденсируется, появляются ядрышки.

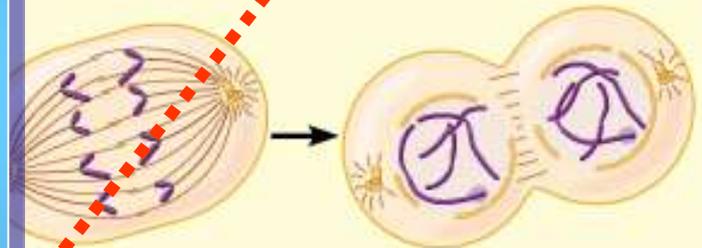


Сократимое кольцо,
образующее борозду деления



Остаточное
тельце

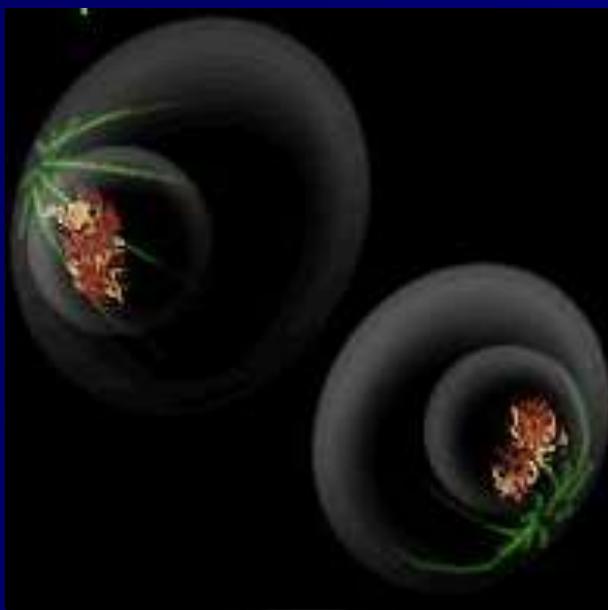
ЦИТОКИНЕЗ



Разделение
сестринских
хроматид

Формирование
дочерних клеток

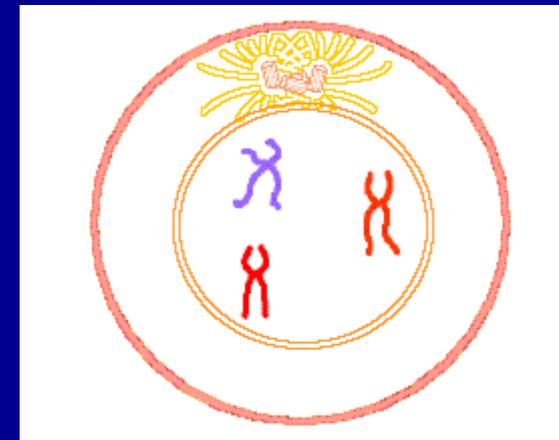
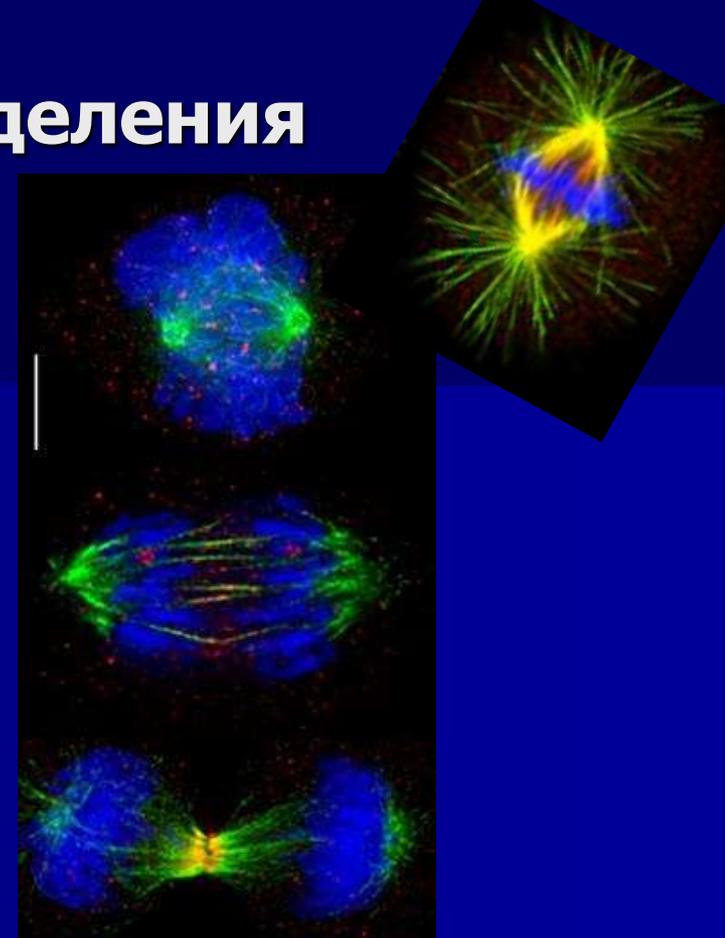
Процесс разделения цитоплазмы. Обычно начинается где-то в анафазе. Мембрана в экваториальной области начинает втягиваться внутрь по направлению оси веретена. Образуется борозда деления, которая постепенно углубляется, пока не дойдет до остатков веретена, расположенного между ядрами. Этот мостик (остаточное тельце - область перекрывания микротрубочек) может некоторое время сохраняться, а затем исчезает, что ведет к полному разделению дочерних клеток.



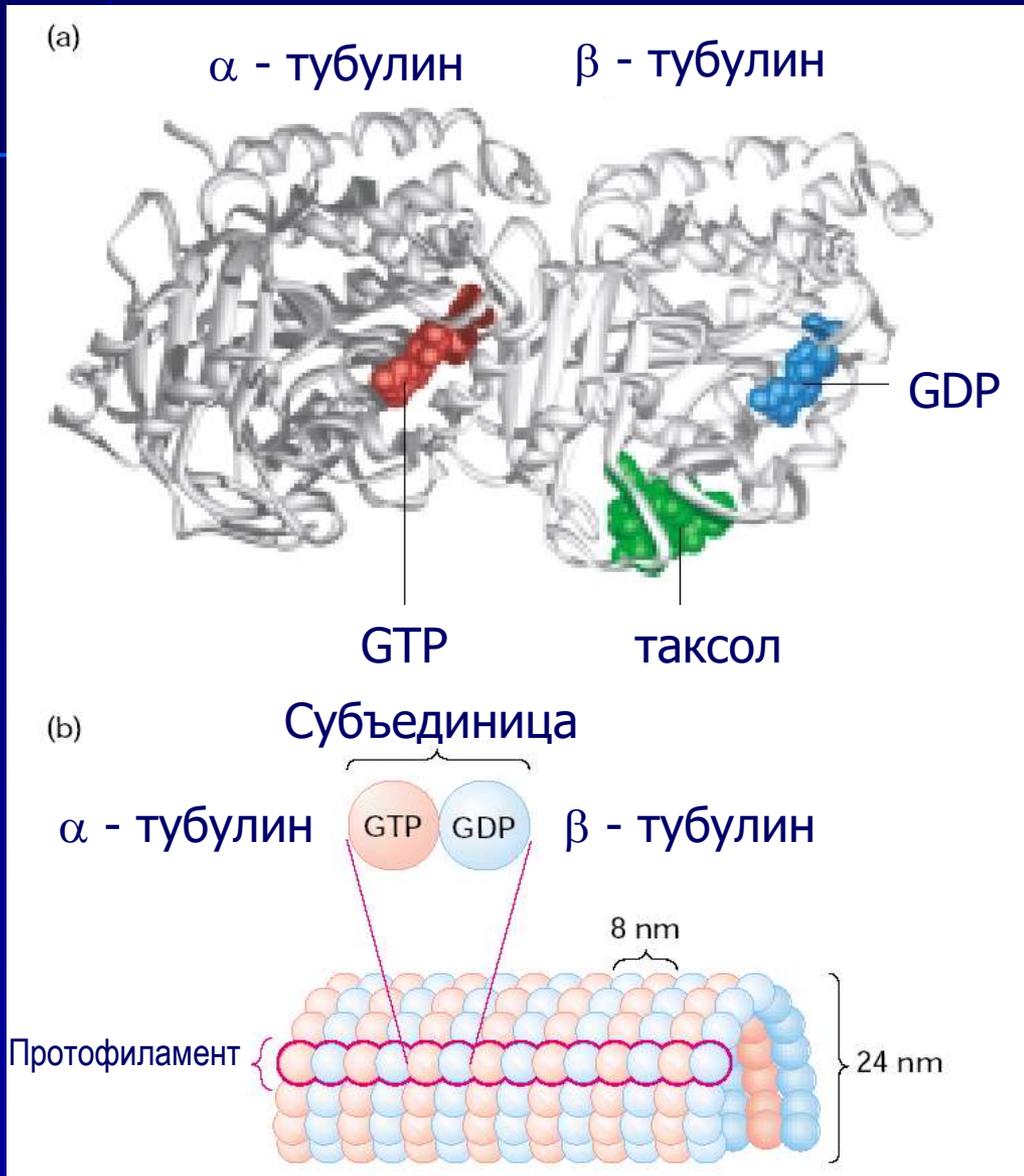
Телофаза

Моторика клеточного деления

- В ходе клеточного деления хроматиды сегрегируют по **биполярному веретену**. В начале каждой М-фазы интерфазный цитоплазматический комплекс микротрубочек постепенно исчезает и собирается биполярное веретено.
- Имеются важные особенности веретена деления, общие для всех типов клеток эукариот. Это должны быть два поля веретена, от которых отходят динамические МТ однородной полярности (с минус-концами на полюсах и плюс-концами на экваторе веретена). Хромосомы должны захватываться и стабилизироваться плюс-концами микротрубочек через кинетохор и переноситься в метафазную пластинку. Это общий план, позволяющий хромосомам в дальнейшем сегрегировать в результате переноса к полюсам в ходе анафазы.

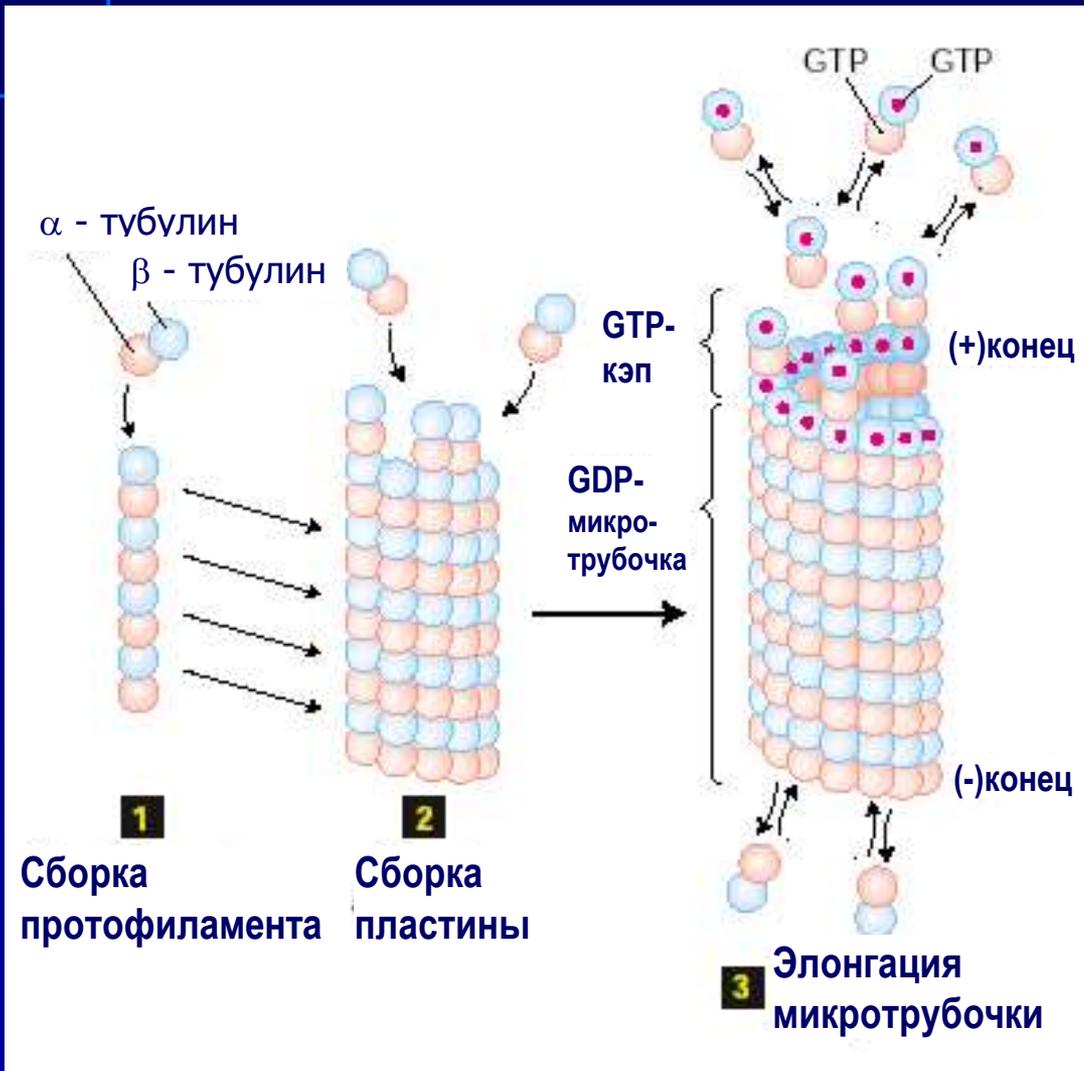


Микротрубочки веретена



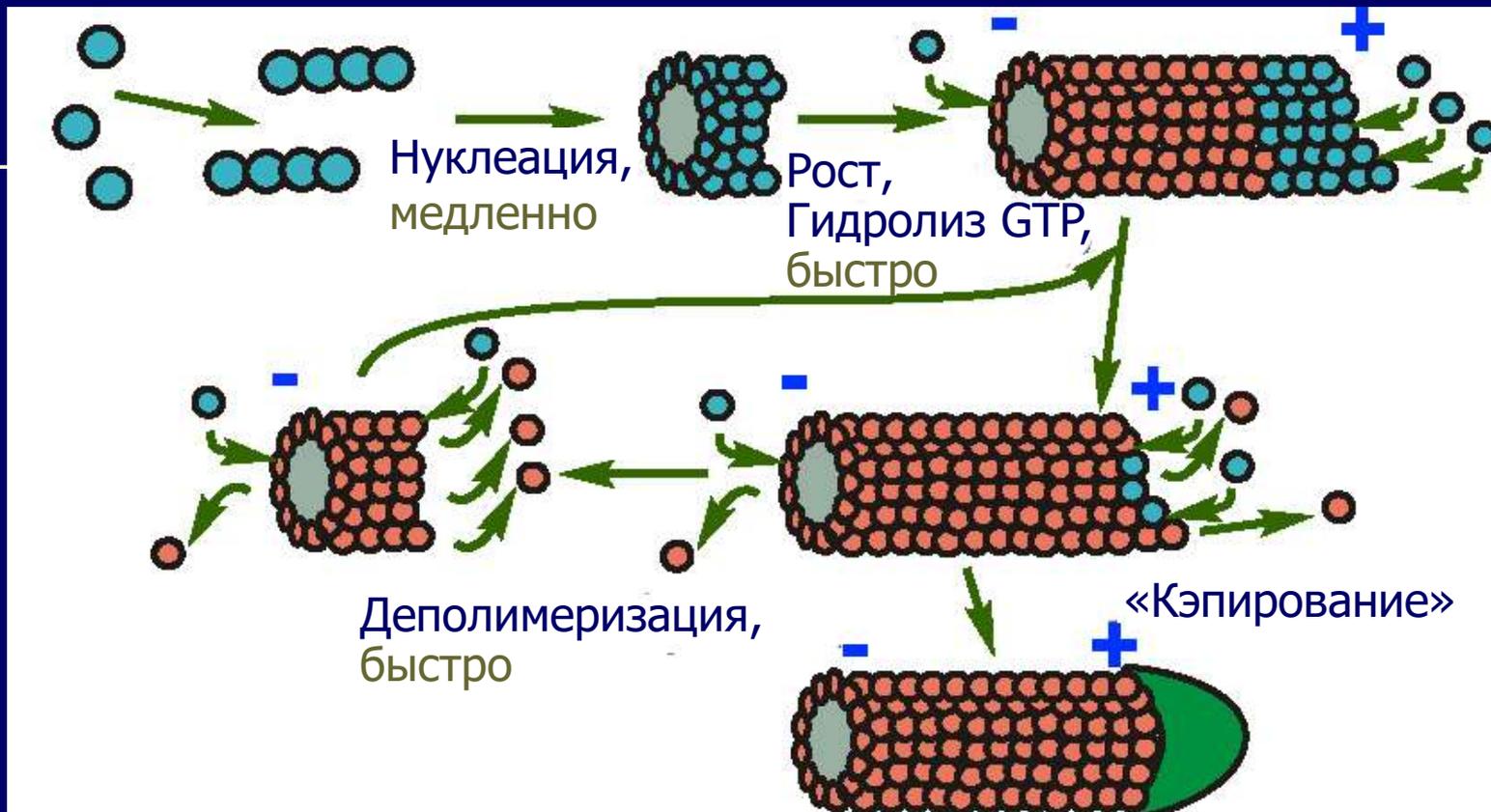
Микротрубочки (МТ), ответственные за движение хромосом в ходе клеточного деления, представляют собой полые цилиндры, образованные молекулами тубулина. Гетеродимерный филогенетически высоко консервативный белок тубулин, состоящий из двух субъединиц, обладает способностью связывать две молекулы гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ).

Микротрубочки веретена



Для полимеризации тубулина необходимо присутствие ГТФ, ионов Mg^{2+} и удаление ионов Ca^{2+} . Полимеризация тубулина с образованием МТ сопровождается гидролизом ГТФ, по одной молекуле ГТФ на одну присоединенную субъединицу.

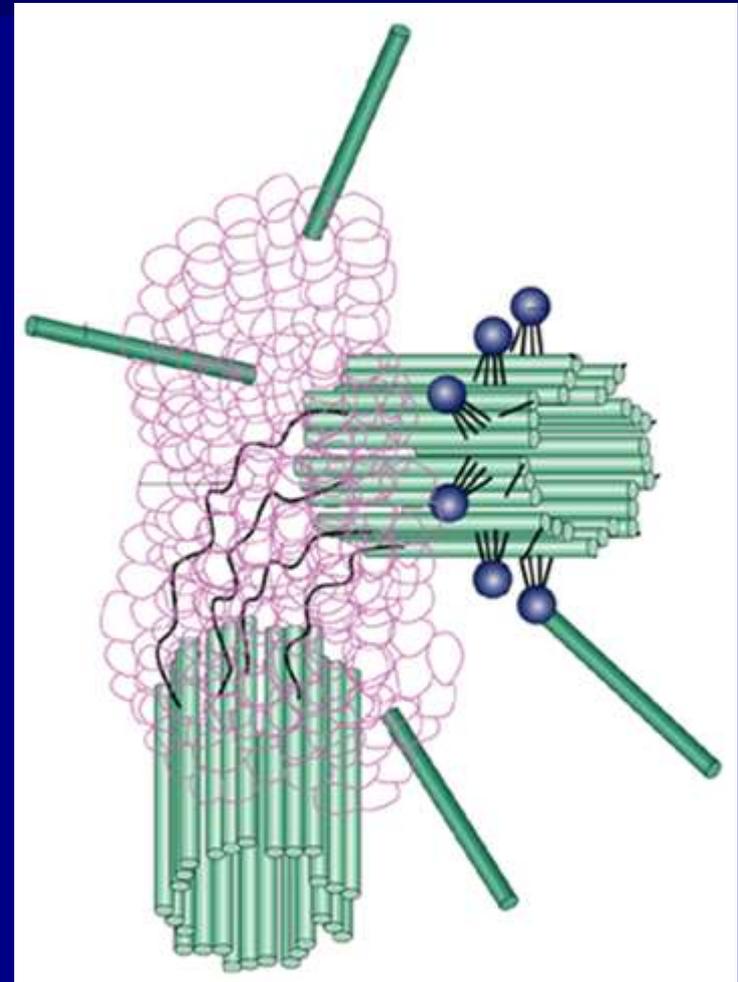
Микротрубочки веретена



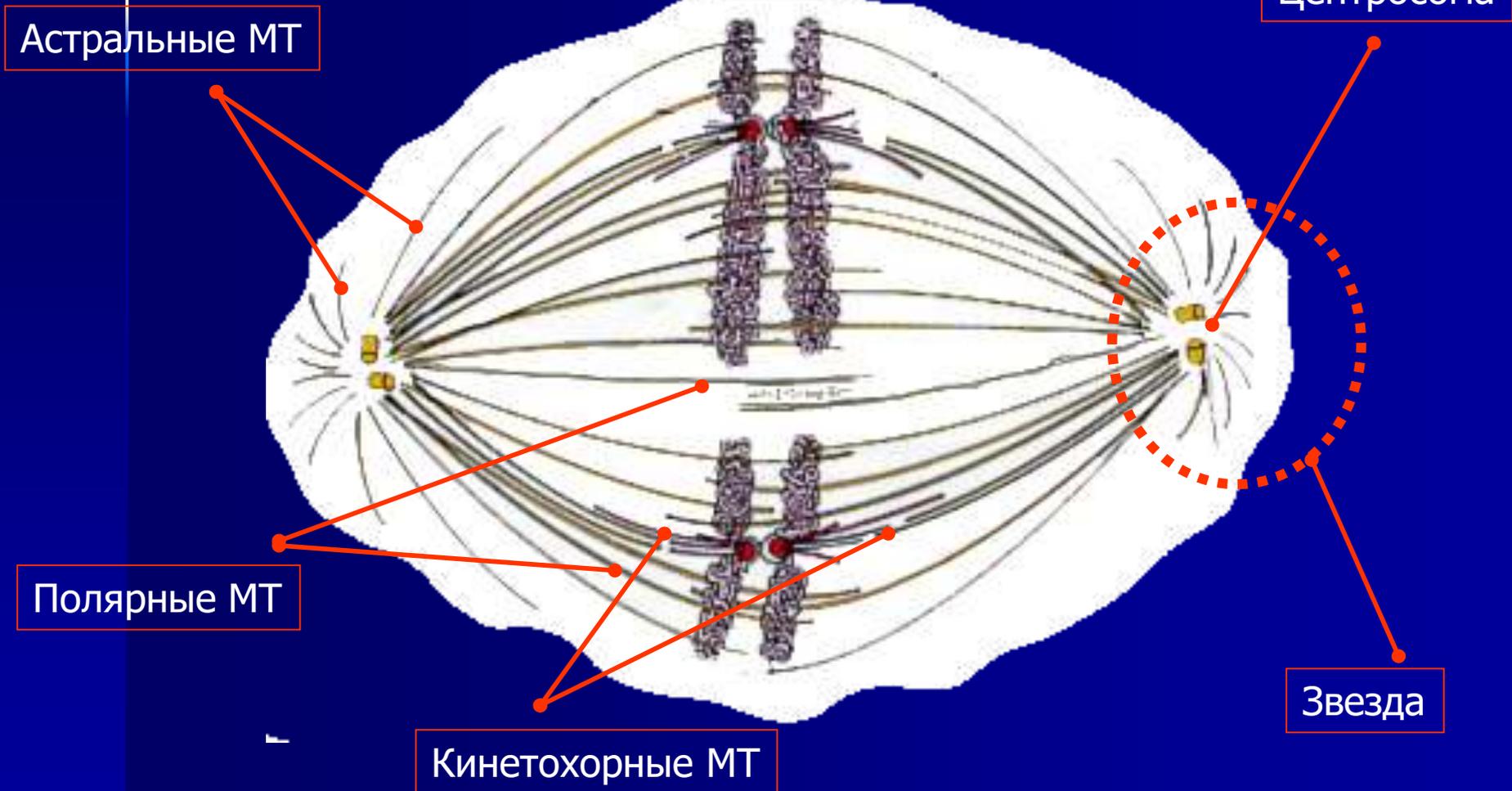
Веретено деления является динамической структурой, свойства которой зависят от полимеризации и деполимеризации составляющих ее МТ. Быстро растущие плюс-концы МТ имеют трехкратное преимущество в скорости роста по сравнению с минус-концами, что объясняется конформационными особенностями полимеризующихся структур.

Центр образования МТ

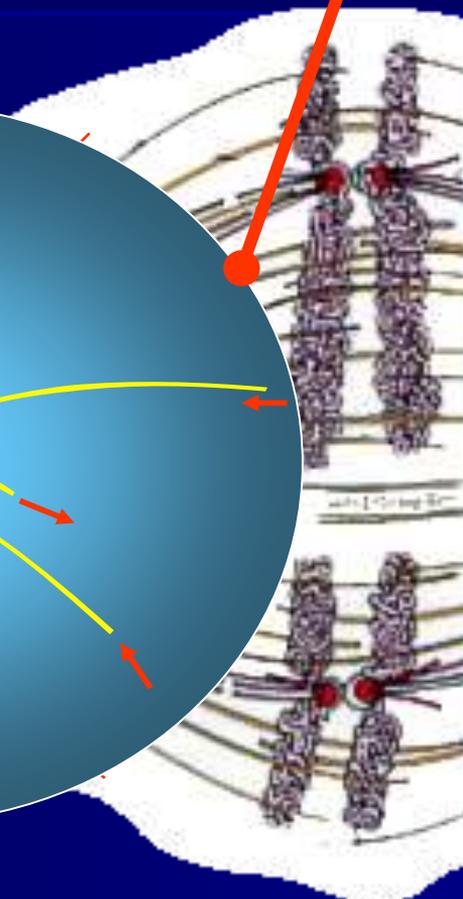
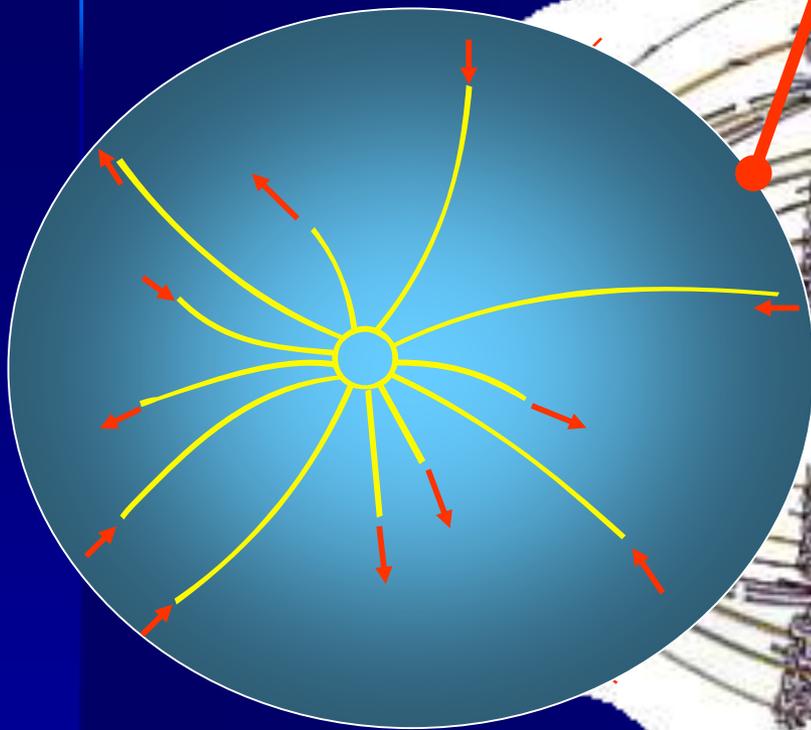
- Центром образования МТ – затравкой - является **центриоль**, на которой происходит стабилизация минус-концов и нуклеация МТ. МТ митотического веретена пребывают в состоянии необычайно быстрой сборки и разборки. Центр организации постоянно продуцирует новые МТ, которые направлены случайным образом, а их минус-концы закорены и защищены от деполимеризации. МТ, растущая из такого центра, может стать стабильной при условии, что ее плюс-конец окажется каким-либо образом закрытым («кэпированным»).



Модель двухполюсного веретена

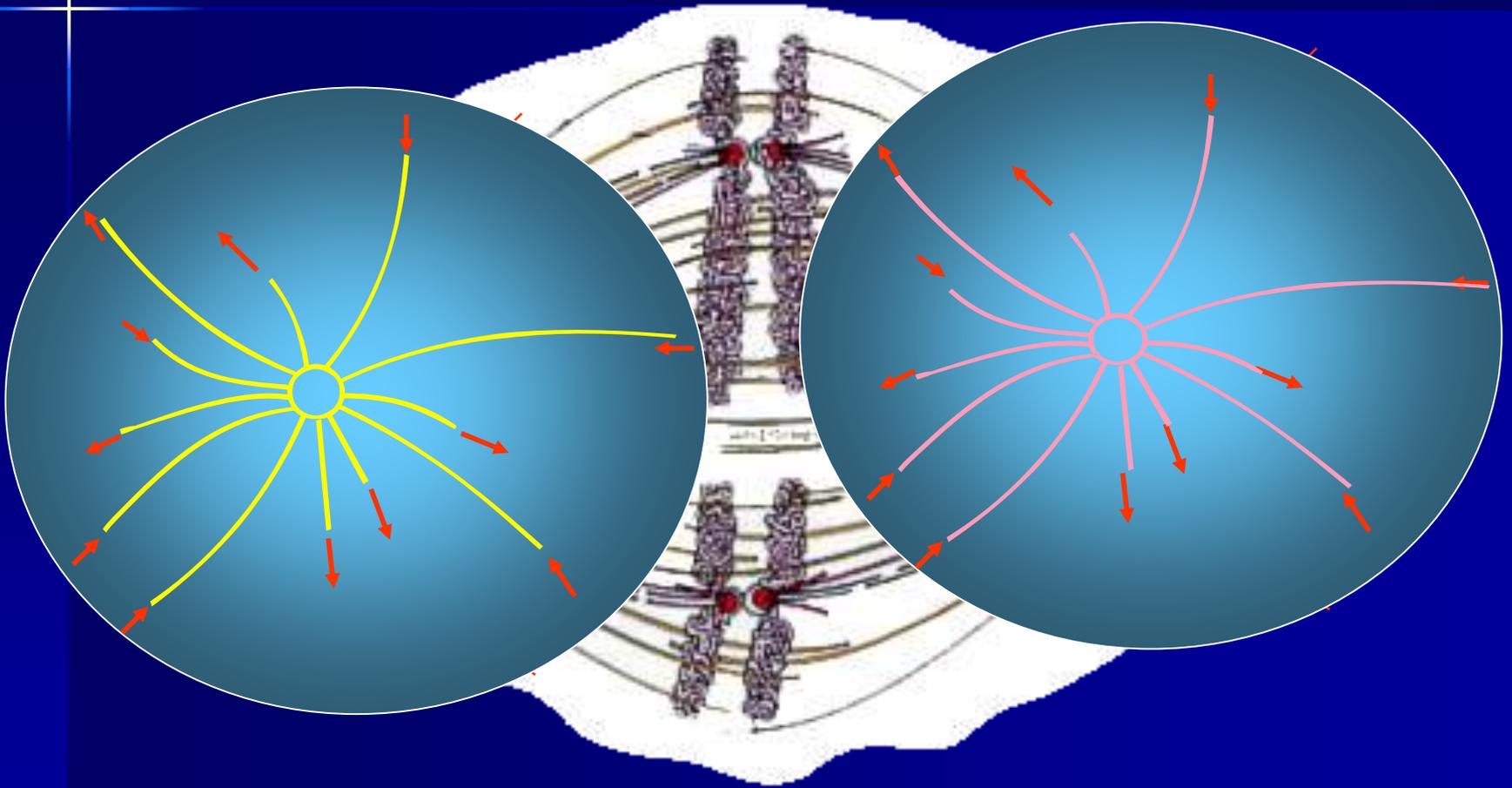


Модель двухполюсного веретена

A micrograph showing a two-pole spindle. Two centrosomes are visible as red dots at opposite poles. Microtubules are seen as thin, radiating lines connecting the poles. Chromosomes are aligned at the equatorial plate. A red line with circular markers connects the text box to the centrosomes in the micrograph.

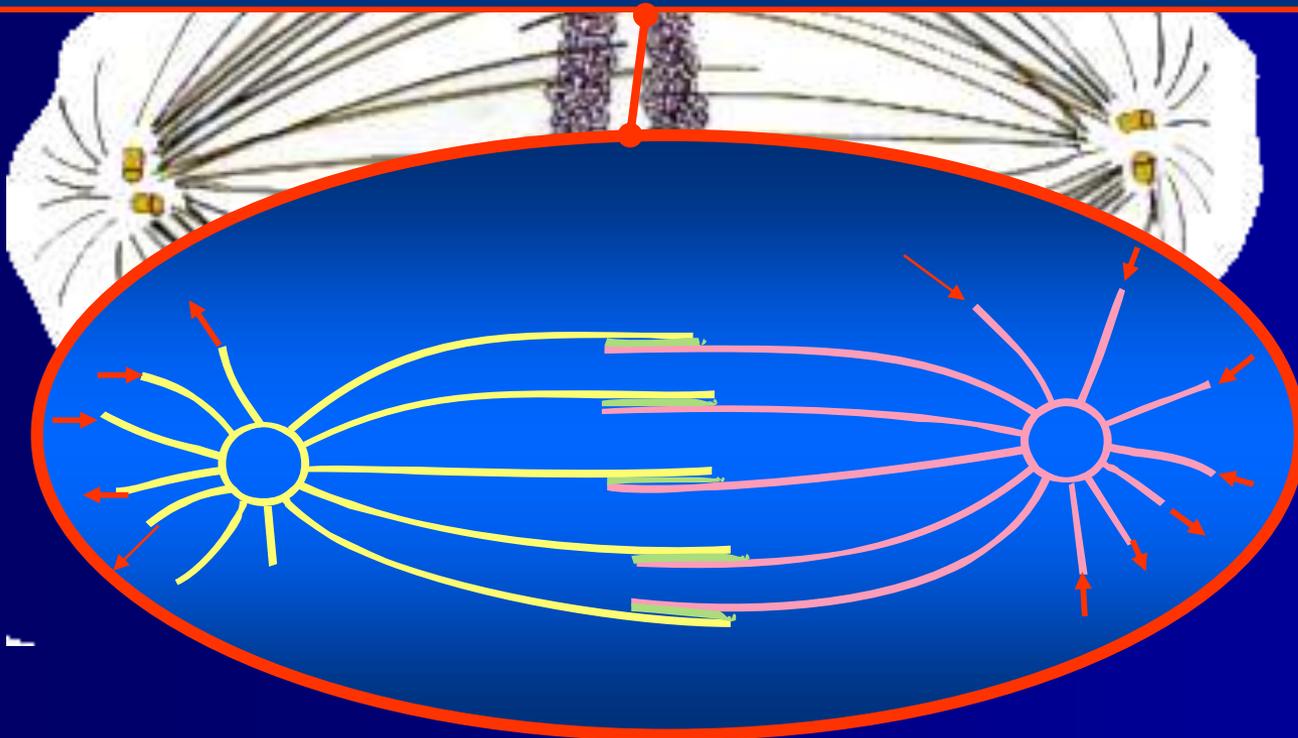
Новые МТ отрастают в случайных направлениях от двух centrosом. Их плюс-концы динамически нестабильны и резко переходят от равномерного роста к быстрому укорочению, при котором часто деполимеризуется вся МТ. Таким образом МТ, берущие начало в центре организации, могут стабилизироваться событиями, происходящими в других участках клетки.

Модель двухполюсного веретена



Модель двухполюсного веретена

Когда две МТ от противоположных центросом взаимодействуют в зоне их перекрывания, белки, связанные с МТ сшивают их друг с другом, прикрывая и стабилизируя их плюс-концы и уменьшая вероятность их деполимеризации.



Для успешного деления клетка должна реплицировать ДНК, причем только один раз.

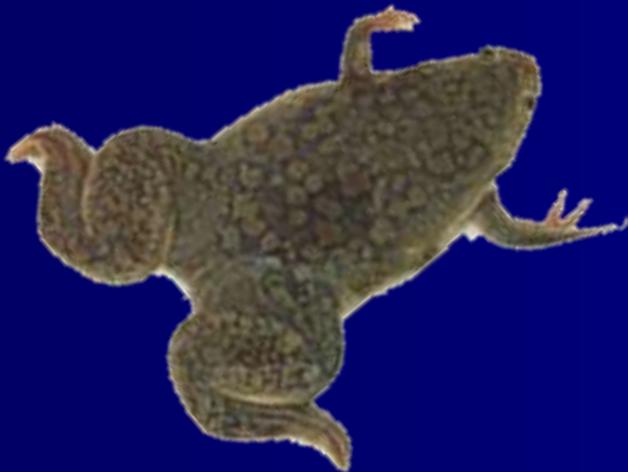
Упаковать генетическую информацию и разделить ее поровну по дочерним клеткам.

Удвоение ДНК и сегрегация хромосом разделены во времени – жизнь клетки подразделяется на стадии: подготовка к репликации (G1), синтез ДНК (S), подготовка к митозу (G2) и митоз (M).

Основная стратегия разграничения стадий клеточного цикла – построение ингибиторных барьеров, которые необходимо преодолеть для перехода в следующую фазу. Механизм стимуляции и регламентации перехода клетки к разным фазам цикла и составляет систему РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА.

История изучения клеточного цикла

- Эксперименты, проведенные в начале 1970-х показали, что яйца взрослых лягушек *Xenopus laevis* производят фактор, который будучи введенным в незрелые ооциты, находящиеся в G2 фазе, запускает в них мейоз, таким образом готовя их для оплодотворения. Фактору дали имя **maturation-promoting factor**, или **MPF**. Экстракты из многих клеток - от дрожжей до человека - имели MPF активность, но она проявлялась не на всех стадиях клеточного цикла. Экстракты из клеток в G1 и S фазе не содержали MPF. Однако когда клетка приближалась к митозу, активность появлялась, а после деления резко исчезала.



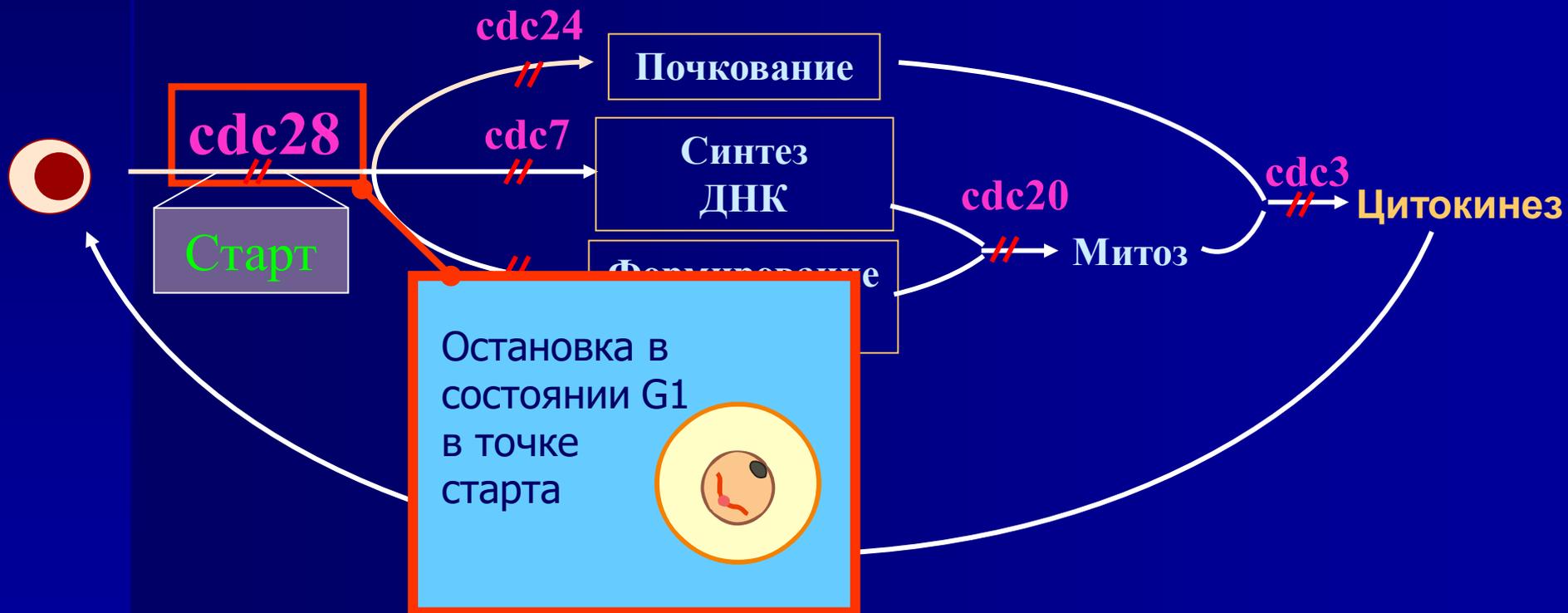
История изучения клеточного цикла

- Вторым направлением исследований была генетика дрожжей с различными мутациями, изменяющими нормальное течение клеточного цикла. Было выделено множество мутантных штаммов с нарушенным клеточным циклом.



История изучения клеточного цикла

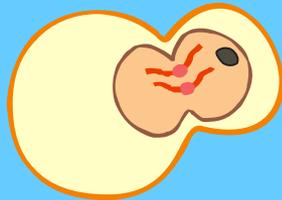
- Вторым направлением исследований была генетика дрожжей с различными мутациями, изменяющими нормальное течение клеточного цикла. Было выделено множество мутантных штаммов с нарушенным клеточным циклом.



История изучения клеточного цикла

- Вторым направлением исследований была генетика дрожжей с различными мутациями, изменяющими нормальное течение клеточного цикла. Было выделено множество мутантных клеточным циклом.

ДНК реплицирована, почка сформирована, ПТВ не удвоено



История изучения клеточного цикла

- Вторым направлением исследований была генетика дрожжей с различными мутациями, изменяющими нормальное течение клеточного цикла. Было выделено множество мутантных штаммов с нарушенным клеточным циклом.

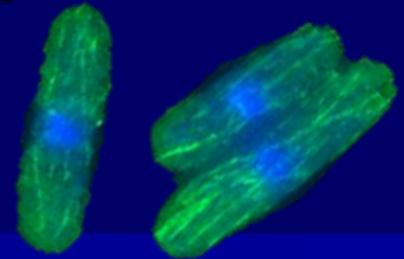


История изучения клеточного цикла

- Вторым направлением исследований была генетика дрожжей с различными мутациями, изменяющими нормальное течение клеточного цикла. Было выделено множество мутантных штаммов с нарушенным клеточным циклом.



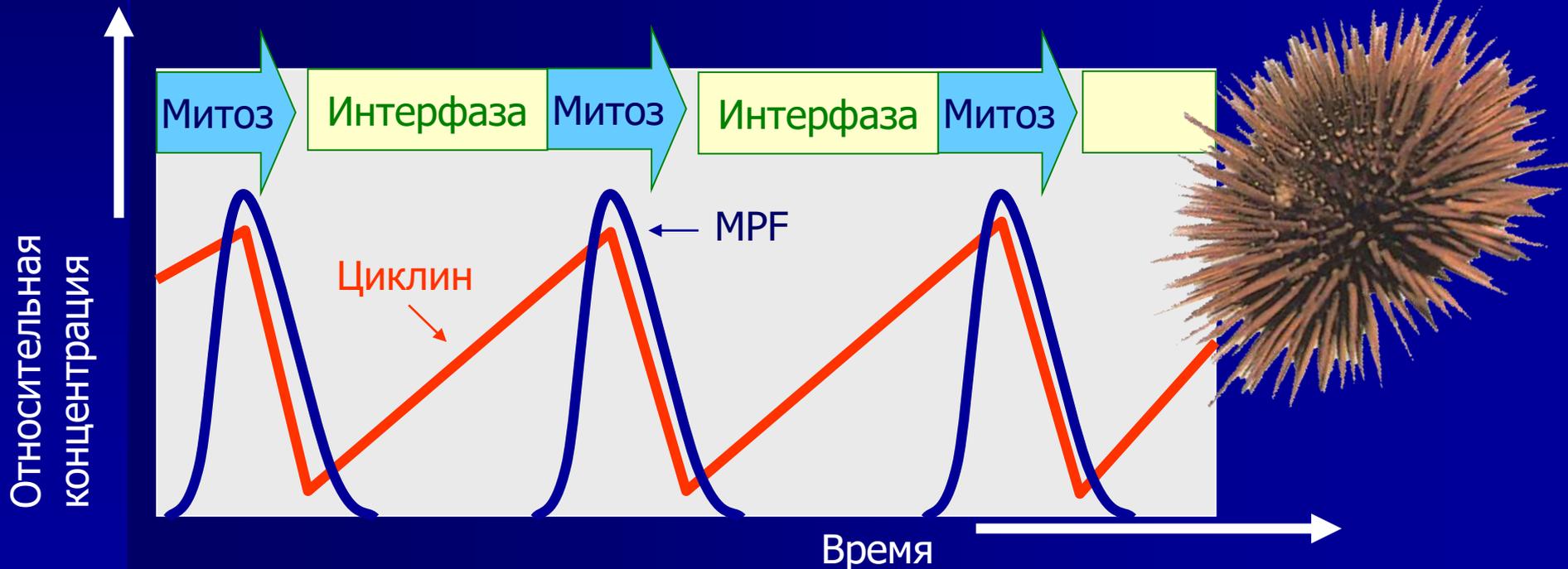
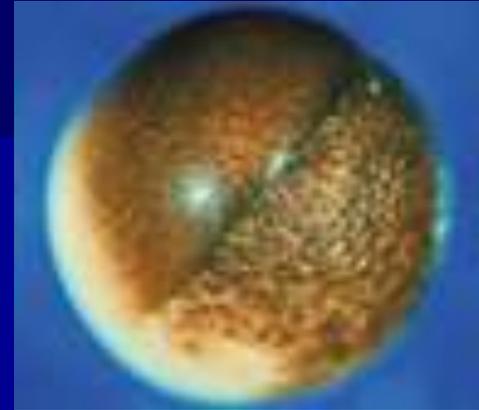
История изучения клеточного цикла



- Одна из мутаций, **cdc2 (cell division cycle)**, была обнаружена в начале 1980-х **Paul Nurse**. Продукт гена **cdc2** играет важную роль в работе молекулярного аппарата клеточного цикла. Теперь известно, что это протеин киназа с молекулярным весом 34000д. Очень близкая к ней протеинкиназа, являющаяся продуктом гена **CDC28**, с аналогичной функцией была обнаружена **Lee Hartwell** у почкующихся дрожжей *S. cerevisiae*. Эти киназы обозначаются вместе как **p34**. В дальнейшем они и их гомологи, выделенные из других организмов были названы **Cdk (Cyclin dependent kinase)**, то есть **ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫМИ КИНАЗАМИ**.

История изучения клеточного цикла

□ В 1983 году Tim Hunt изучал контроль белкового синтеза в яйцах морского ежа и обнаружил, что через 10 минут после оплодотворения появился новый белок. Белок появлялся и исчезал с каждым клеточным делением, из-за чего его назвали циклином. Подъемы и спады уровня циклина были согласованы с концентрацией MPF.



История изучения клеточного цикла

Выделение и очищение MPF было очень долгим процессом. В 1988 году было обнаружено, что MPF состоит из двух белков с молекулярными массами 34000 и 45000д. Анализ первого белка с помощью антител к р34 дрожжей показали, что это одинаковые белки. Дальнейшая работа показала, что второй компонент MPF - циклин.

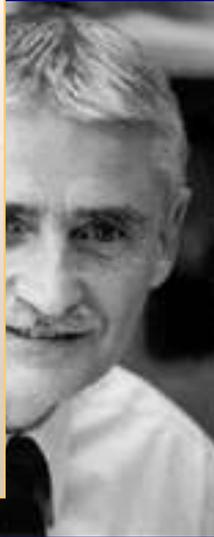
В 2001 году **Paul Nurse**, **Tim Hunt** и **Lee Hartwell** за свои революционные исследования регуляции клеточного цикла получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.



Paul Nurse



Tim Hunt



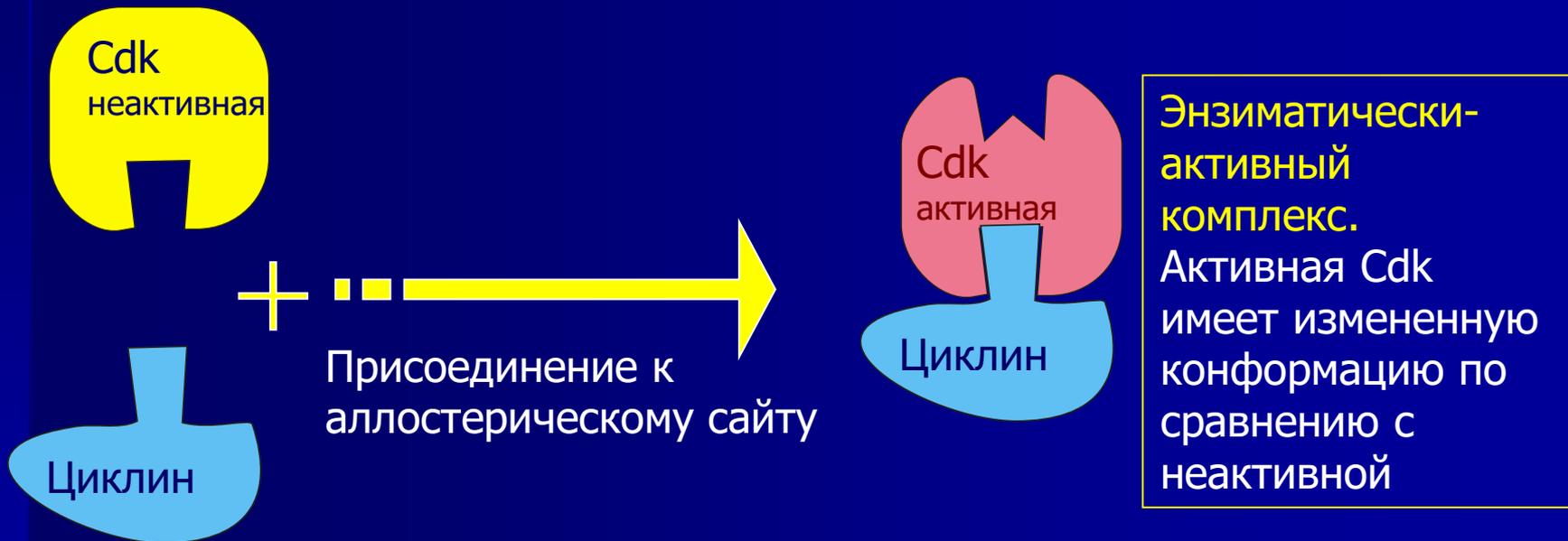
Leland Hartwell

Циклины и циклин-зависимые киназы

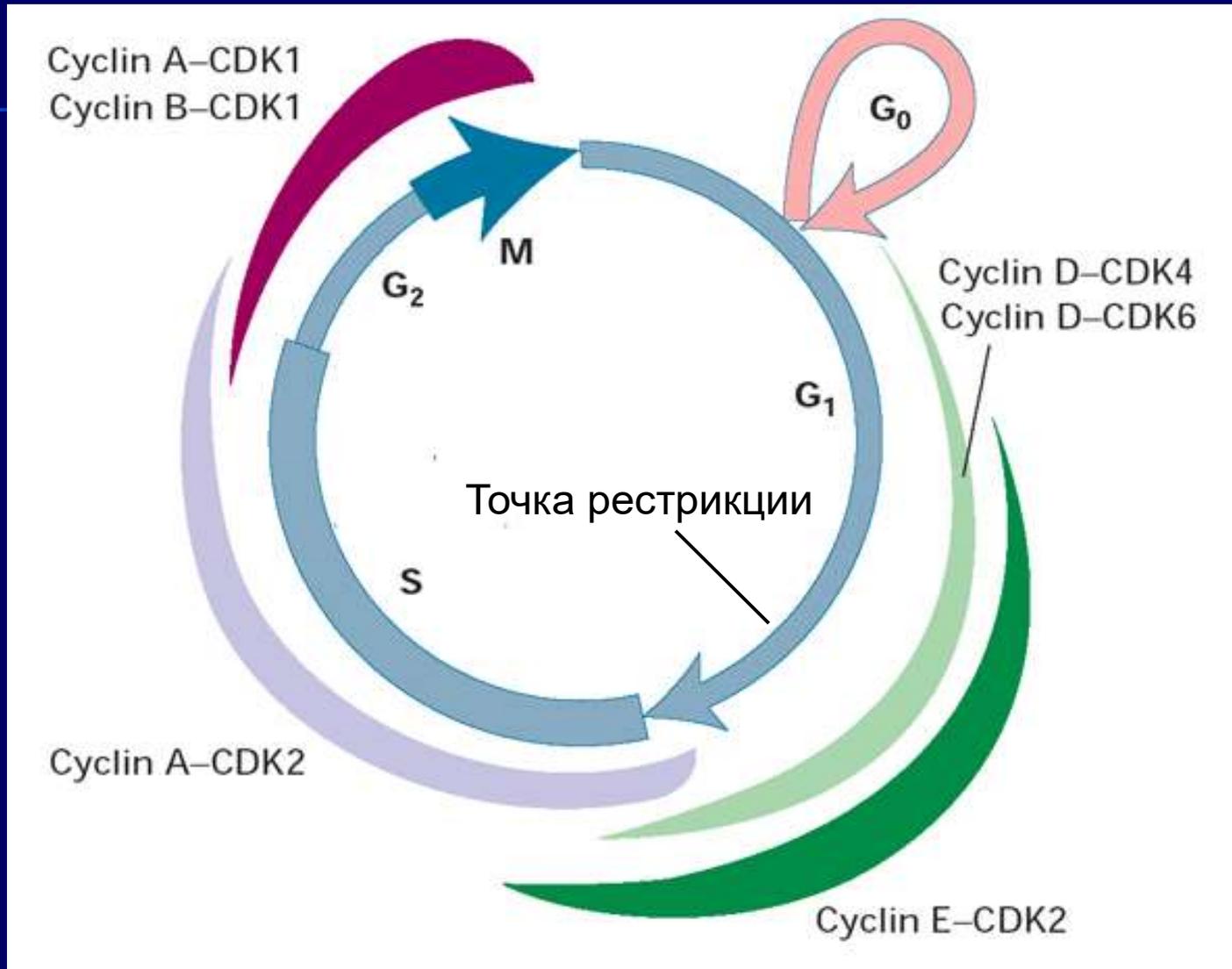
- **Циклин зависимые киназы (Cdk)** - это клеточные машины, которые запускают события клеточного цикла и являются своеобразными часами этих событий. Кроме того, они выполняют функцию информационных процессоров, которые интегрируют внеклеточные и внутриклеточные сигналы для тонкой координации событий клеточного цикла. Изучение Cdk необходимо для понимания фундаментальных механизмов контроля клеточного цикла.

Регуляция активности Cdk

- **Циклин зависимые киназы (Cdk)** – это семейство АТФ-зависимых протеинкиназ, схожих между собой по структуре и функции. Главная структурная особенность – наличие определенных препятствий, не позволяющих Cdk связывать субстраты в активном центре без активаторной субъединицы – **циклина**.
- В гетеродимерной (состоящей из 2 разных субъединиц) протеинкиназе циклин является **регуляторной субъединицей**, а Cdk (циклин-зависимая киназа) – **каталитической субъединицей**.



Активность **Циклин-Cdk** комплексов клеток млекопитающих в ходе клеточного цикла культивируемых G_0 -клеток, стимулированных к делению ростовыми факторами

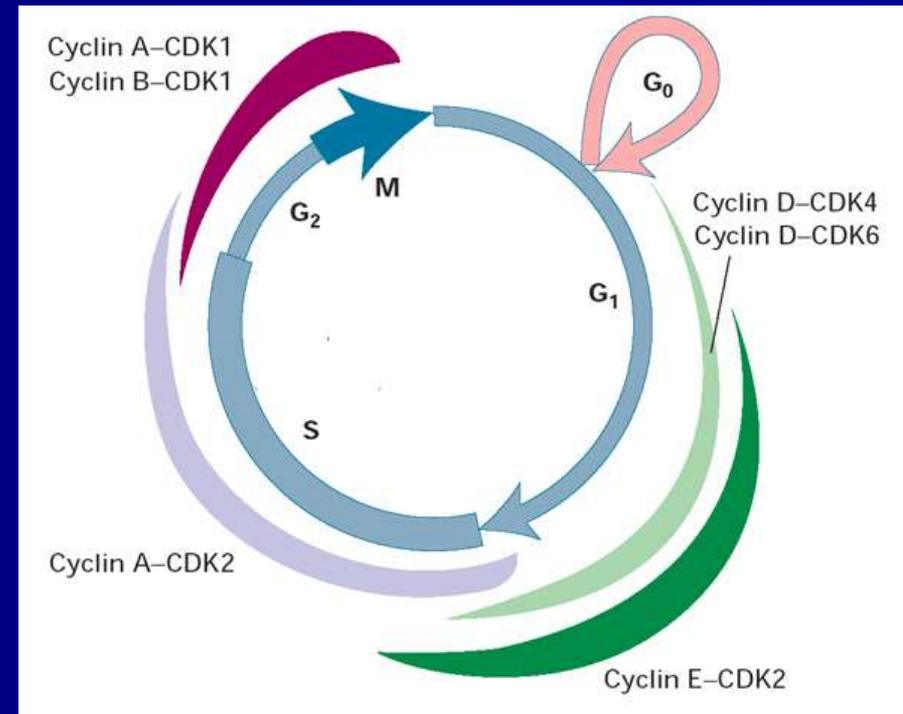


Способы регуляции содержания и активности Cdk

1. Регуляция синтеза самих Cdk.

- Не все Cdk одновременно присутствуют в клетке на разных стадиях ее цикла. Важным моментом является активация гена той или иной Cdk.

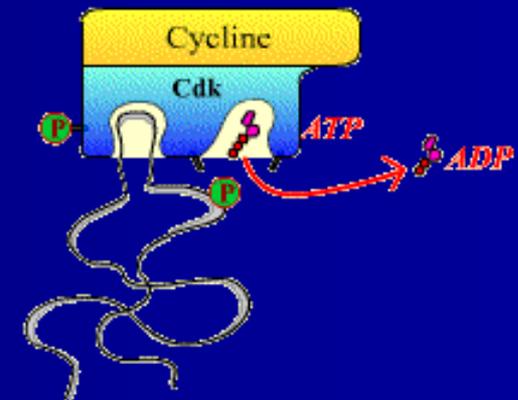
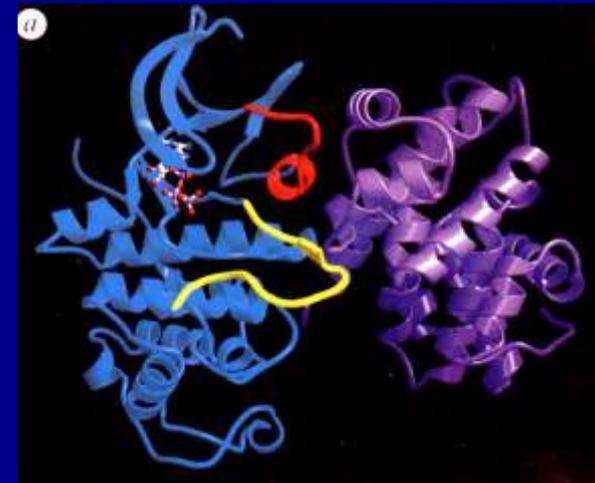
Например, комплексы G1 периода (Циклин D-Cdk4/6 и циклин E-Cdk2) запускают транскрипцию гена киназы Cdk1, которая необходима для образования комплексов G2 и M.



Способы регуляции содержания и активности Cdk

2. Регуляция активности Cdk.

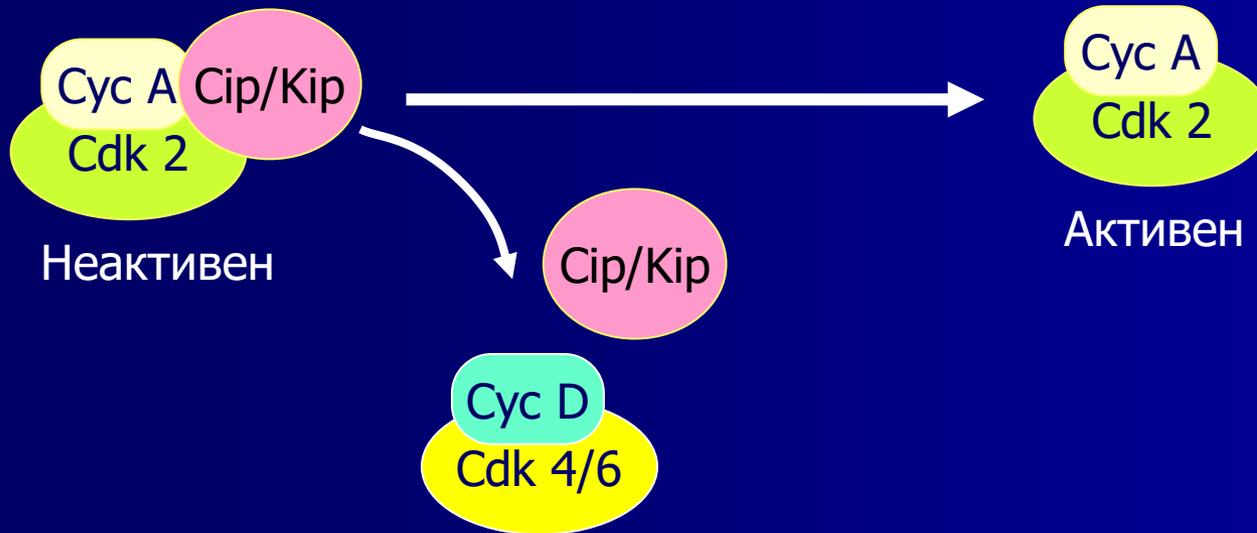
- Первичный механизм активации - связывание с субъединицей циклина.
- Активирующее фосфорилирование Cdk. Связывание циклина A с Cdk2 увеличивает киназную активность последней на несколько порядков. Это объясняется конформационными изменениями Cdk. Фосфорилирование Cdk необходимо лишь для улучшения связывания с белковым субстратом.



Способы регуляции содержания и активности Cdk

2. Регуляция активности Cdk.

- Связывание с ингибиторной субъединицей

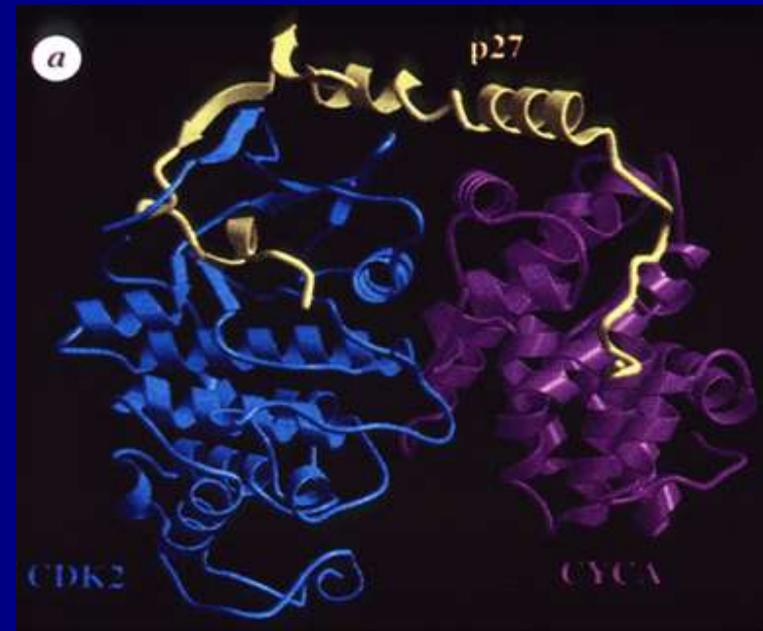


Способы регуляции содержания и активности Cdk

2. Регуляция активности Cdk.

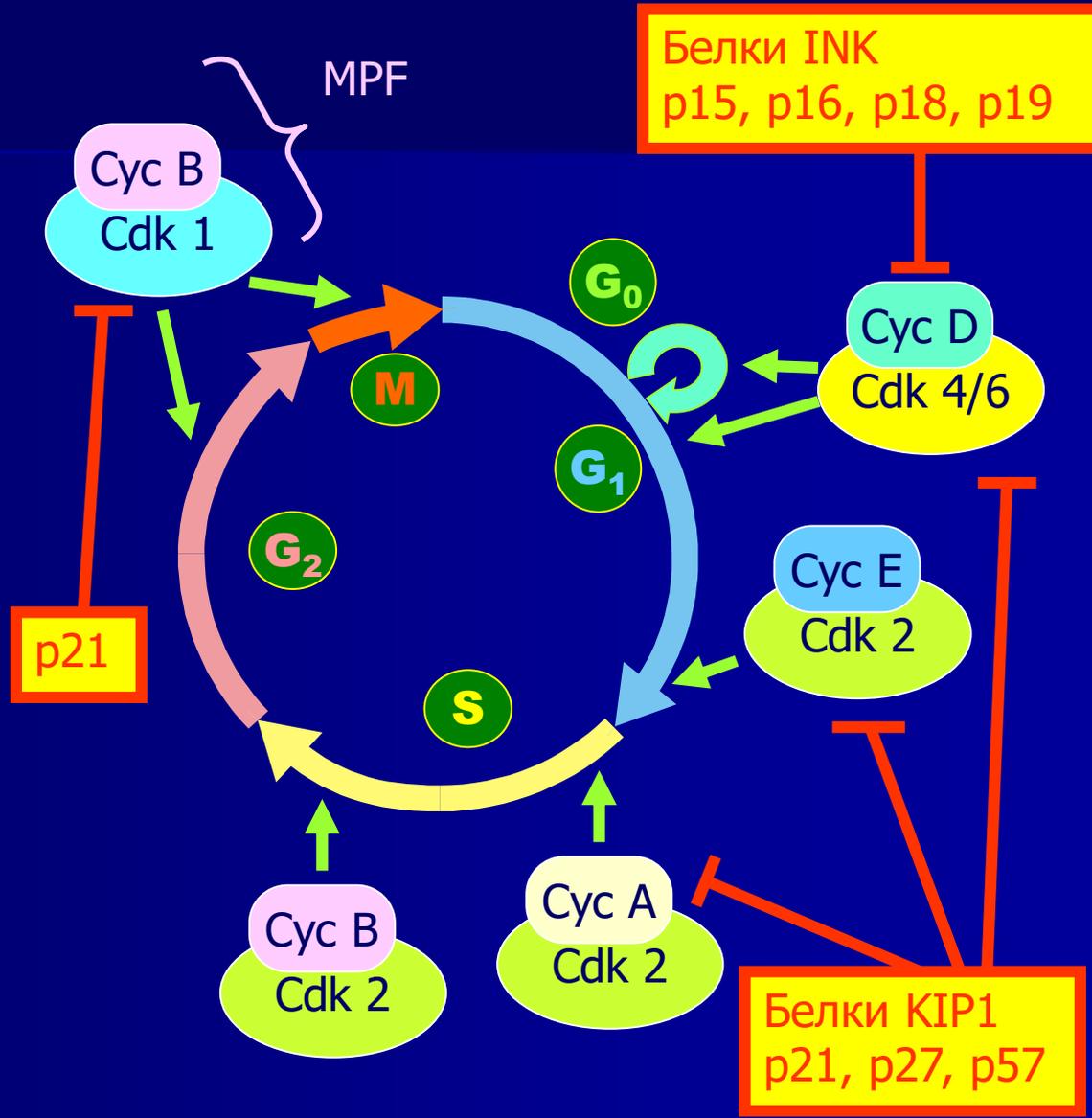
- Связывание с ингибиторной субъединицей

Существует два основных семейства **CKI (cyclin kinase inhibitor)** белков, осуществляющих ингибирование Cdk. Представители первого семейства **Cip/Kip (CDK inhibitory protein)** - **p21, p27 и p57**, ингибируют Cdk2 и Cdk4/6 циклиновые комплексы, осуществляя G1 и G1/S контроль. Представители второго семейства **INK4 (inhibitor of kinase 4)** - **p15, p16, p18 и p19**, узкоспецифичны для Cdk4/6-цД комплексов и осуществляют аналогичные функции.



Ингибирование активности Cdk

Как следует из функциональных особенностей СКІ, их активация происходит, когда дальнейшее продолжение клеточного цикла нежелательно. Например, лишение клеток питательных веществ приводит к увеличению уровня **p27**, а внеклеточный ингибитор роста TGF- вызывает увеличение уровня **p15**. Повреждения ДНК активирует транскрипцию **p21** под действием белка p53. Белок **p21** способен ингибировать белок PCNA, принимающий участие в репликации ДНК. Таким образом, осуществляется остановка клетки в сверочной точке G1 фазы, что позволяет клетке репарировать повреждения ДНК.



Способы регуляции содержания и активности Cdk

2. Регуляция активности Cdk.

- **Ингибирующее фосфорилирование** вносит вклад в отсчет времени митоза. До митоза комплекс циклин B-Cdk1 инактивирован фосфорилированием по треонину-14 и тирозину-15. Фосфорилирование остатков у позвоночных осуществляется Myt1 и Wee1 соответственно. К концу G2 резкое дефосфорилирование этих двух остатков активирует Cdk1 и запускает митоз. Дефосфорилирование осуществляется фосфатазами семейства Cdc25.

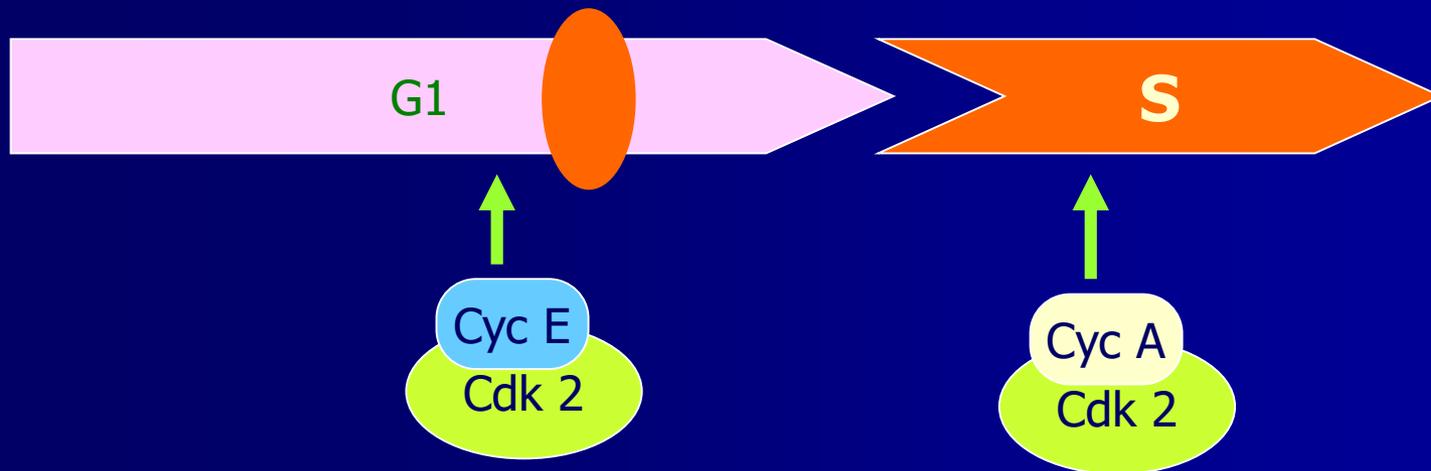


Регуляция циклинов

Регуляция циклинов осуществляется на двух уровнях.

- транскрипция генов
- деградация белка

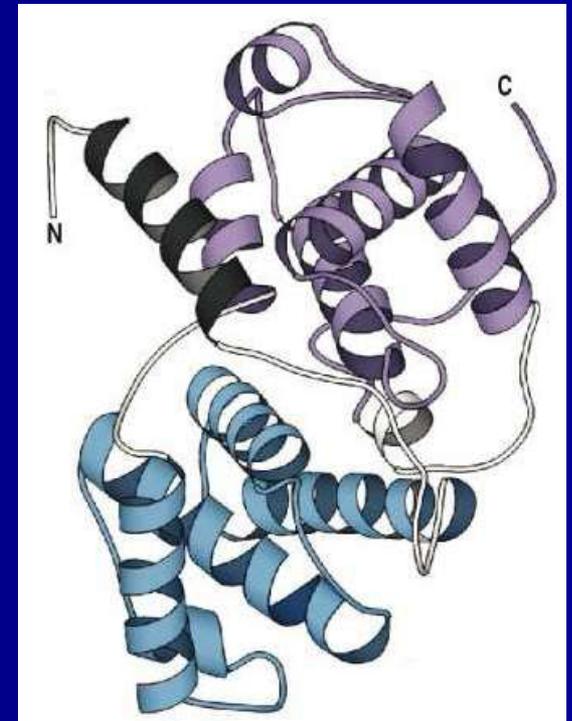
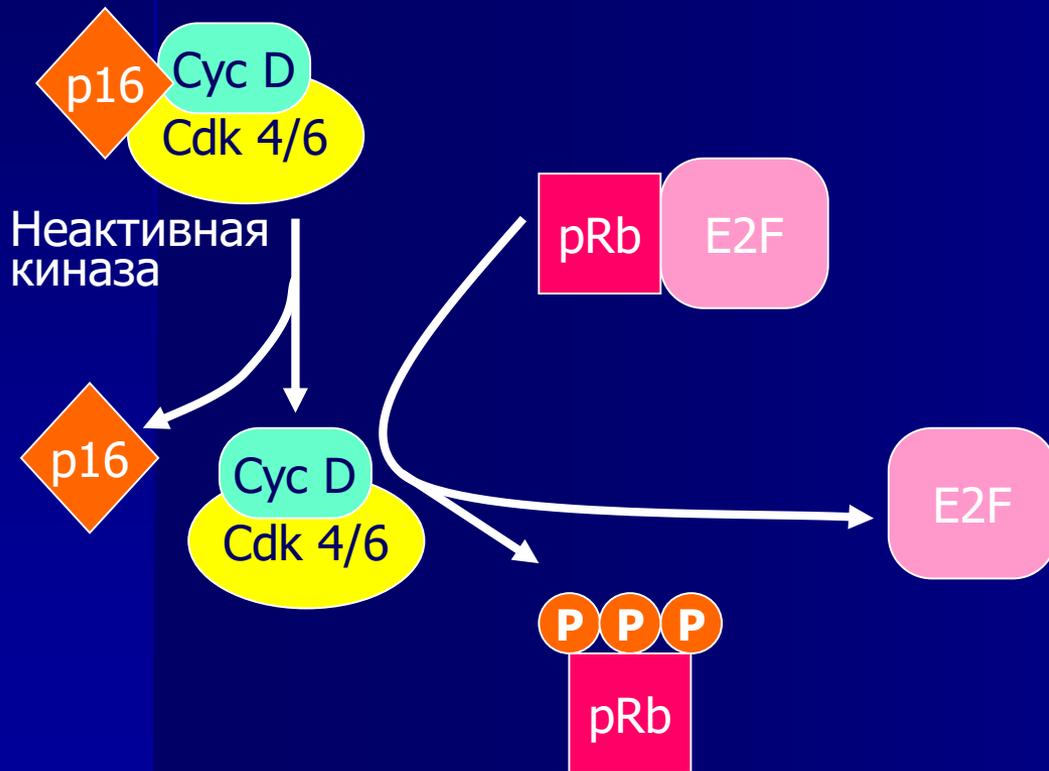
Регуляция транскрипции генов циклинов у высших эукариот изучена на примере перехода **ограничительной точки клеточного цикла**. Центральную роль в этом переходе играет **E2F** - фактор транскрипции некоторых генов, необходимых для синтеза ДНК в S фазе. Он стимулирует также транскрипцию генов **циклина A**, **циклина E** и своего собственного гена.



Регуляция ЦИКЛИНОВ

- Транскрипция генов

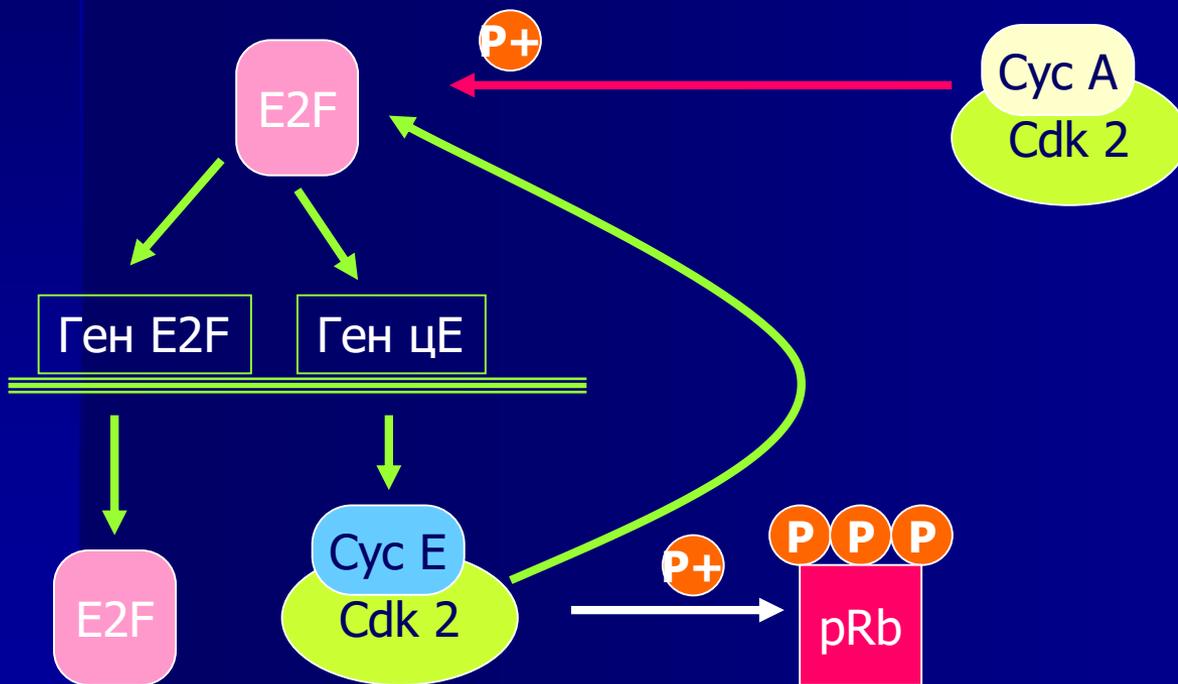
В неделящихся клетках и клетках G1 фазы белок **pRb** находится в нефосфорилированном состоянии. Белок pRb ингибирует E2F, связываясь с ним. Факторы роста стимулируют транскрипцию циклина D. Происходит накопление комплексов циклин D-Cdk4, которые начинают фосфорилировать Rb, что приводит к его диссоциации от E2F.



Регуляция циклинов

- Транскрипция генов

Освободившийся E2F стимулирует транскрипцию своего гена и гена **циклина E**. Образующийся вследствие этого комплекс Cdk2-цE, еще активнее фосфорилирует pRb. Таким образом, сеть эффектов через петлю положительной обратной связи приводит к быстрому возрастанию E2F зависимой транскрипции и переходу клетки в начало S фазы. Вскоре после этого в клетке появляются комплексы Cdk2-цA, которые фосфорилируют E2F, уменьшая его способность связываться с ДНК.

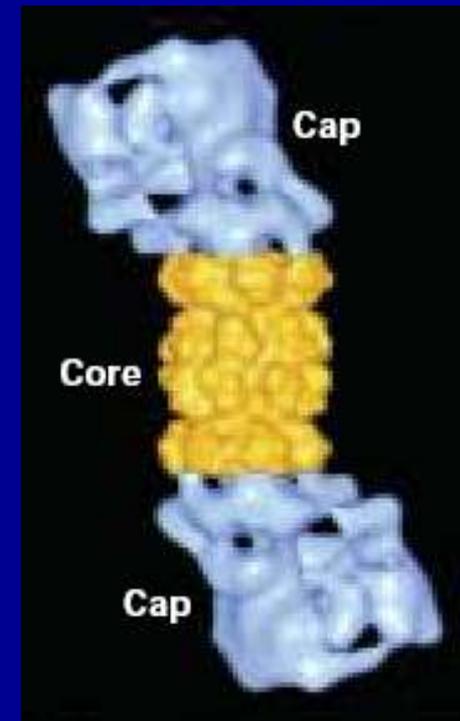


Регуляция циклинов

- Разрушение протеолизом

Таким образом контролируется, например, выход из митоза. Деструкция митотических циклинов необходима для начала телофазы и подготовки к следующему циклу. Распад короткоживущих белков является **убиквитин-зависимым**. **Убиквитин (Ub)** – небольшой белок (76 ам), который связывается с белками, тем самым «метит» их для разрушения в протеосомах.

Протеосомы - это нелизосомальные мультикаталитические **протеиназы**, обнаруженные у эукариот, широко распространенные в цитоплазме. Большая часть цитозольного протеолиза осуществляется именно протеосомами. Протеосома состоит из 14 субъединиц, представляющих собой различные протеазы. Они образуют бочкообразную структуру с активными центрами внутри. Большие протеазные комплексы по крайней мере из десяти различных полипептидов образуют дно и крышку такой бочки. Их роль, видимо, заключается в транспорте убиквитинированных белков в центр бочки.



Регуляция **ЦИКЛИНОВ** - разрушение протеолизом

Для присоединения Ub к белку-мишени требуются три фермента.

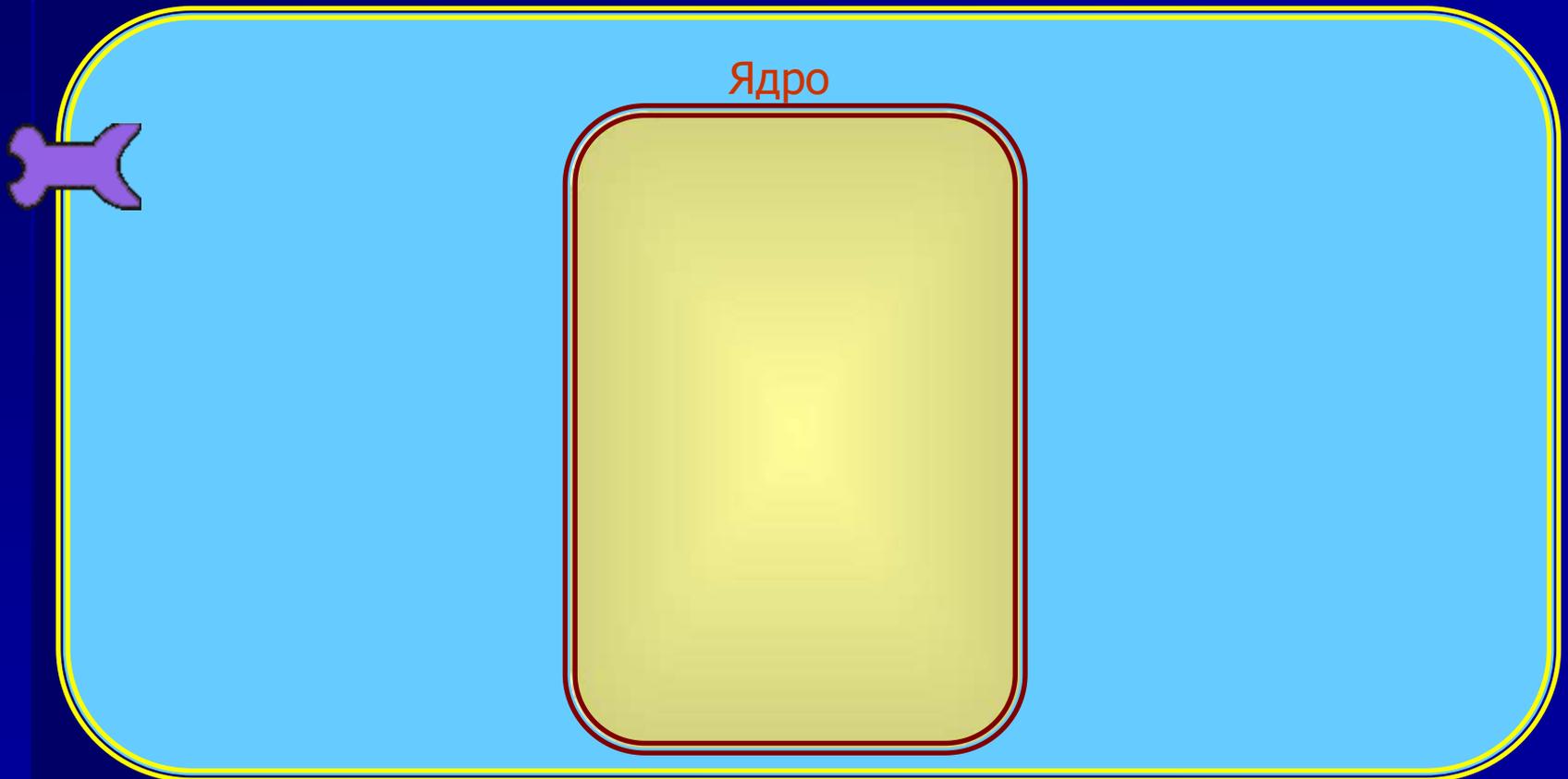
- **Убиквитин-активирующий фермент (E1)**
- Формирует по С-концу Ub тиоэфирную СВЯЗЬ
- **Убиквитин-конъюгирующий фермент (E2)**
- принимает Ub на себя.
- **Убиквитин-лигаза (E3)**
- переносит Ub с E2 на белок.
- **E2 и E3** представлены различными формами, специфичными в отношении тех или иных белков
- **Помеченные цепочками Ub белки быстро разрушаются в протеосомах**



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие МИТОГЕНОВ

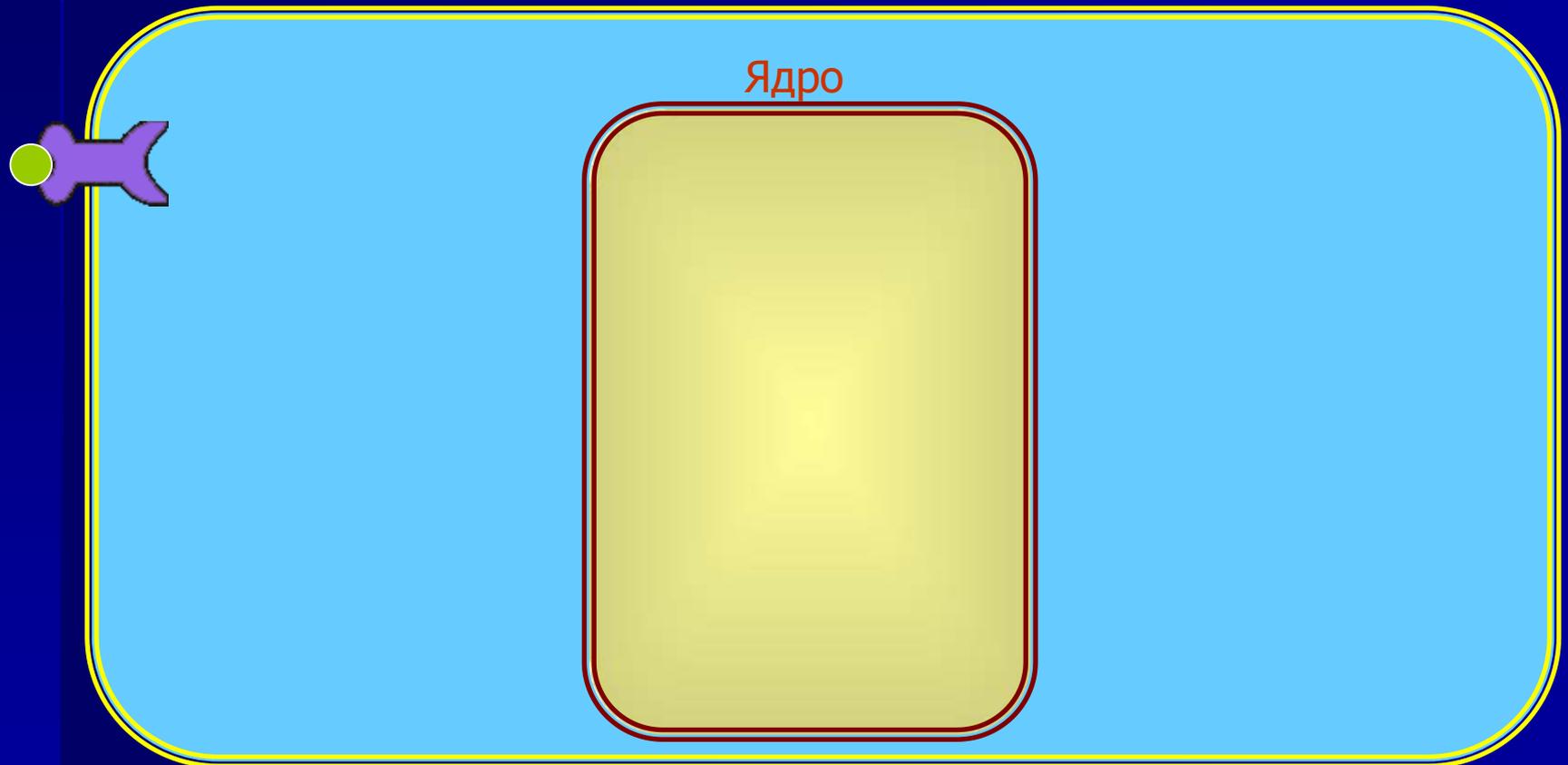
Практически все сигнальные пути, регулирующие пролиферацию клеток, направлены на комплексы G1 периода – в основном Cdk4/6-цD и, в меньшей степени, Cdk2-цE. Именно данные комплексы запускают очередной процесс деления клетки.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие митогенов

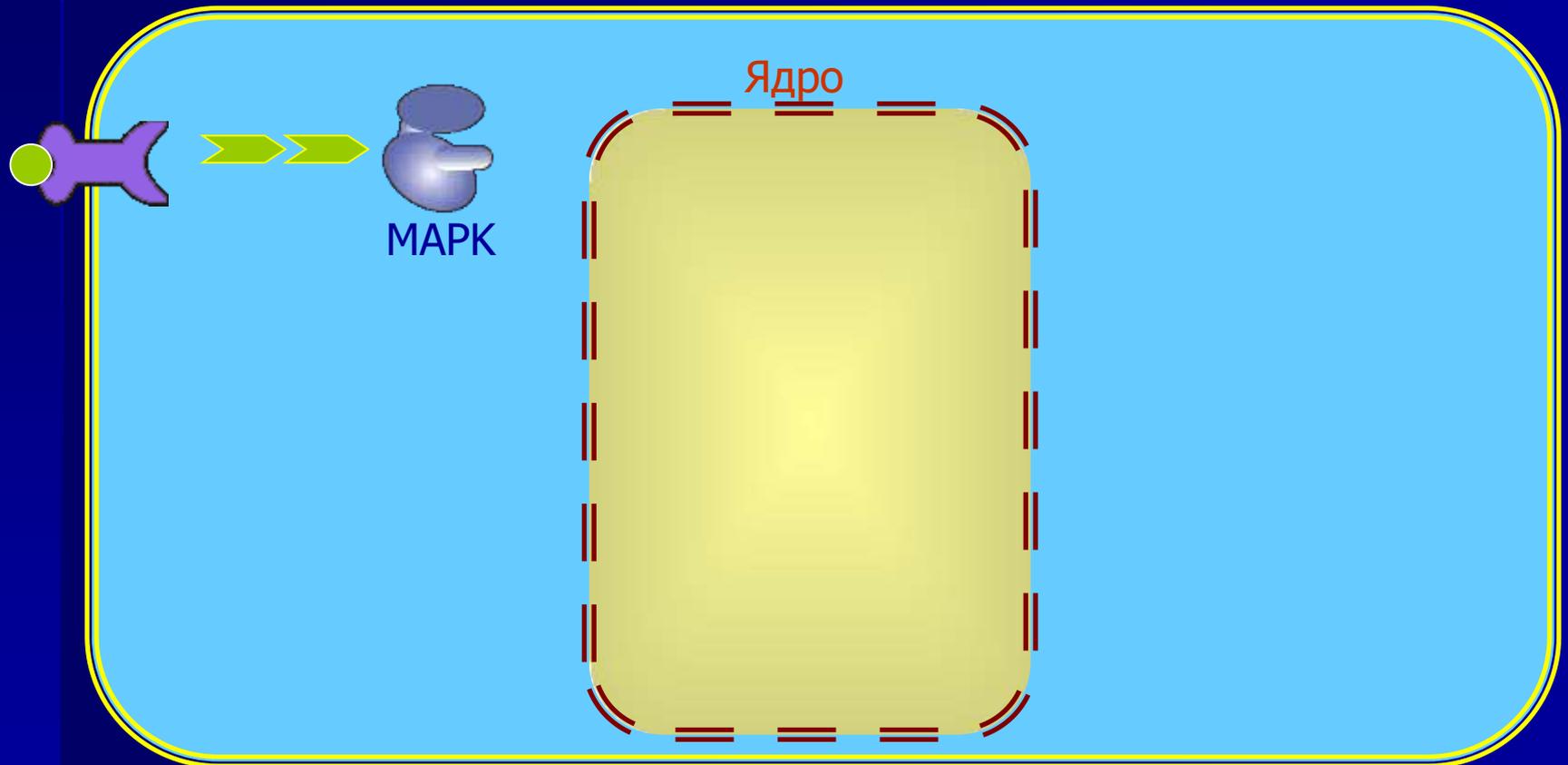
1. Внешний сигнал ростового фактора приводит к активации киназы, связанной с рецептором



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие митогенов

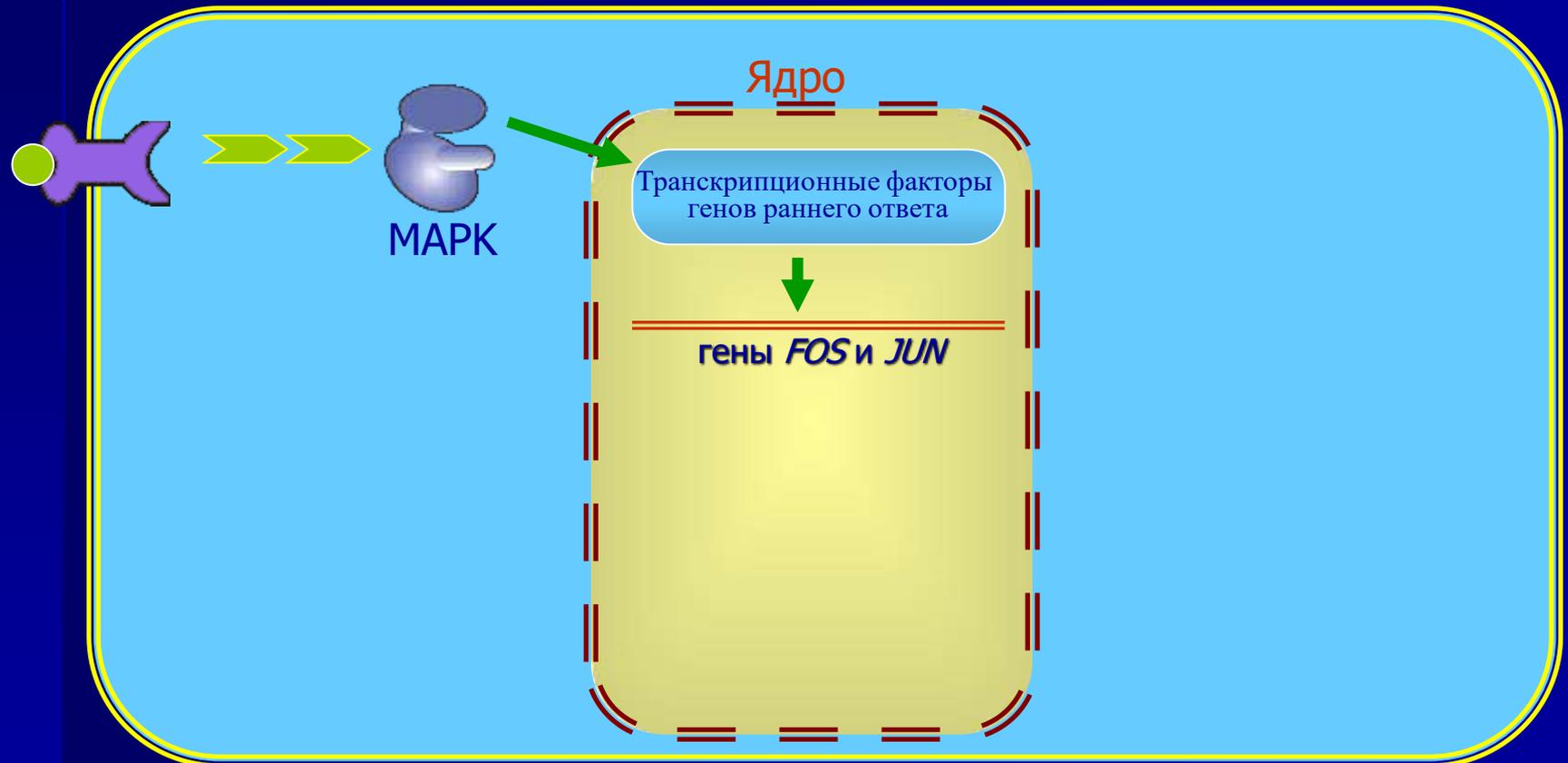
2. Это ведет (через те или иные посредники) к запуску каскадов митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК)



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие МИТОГЕНОВ

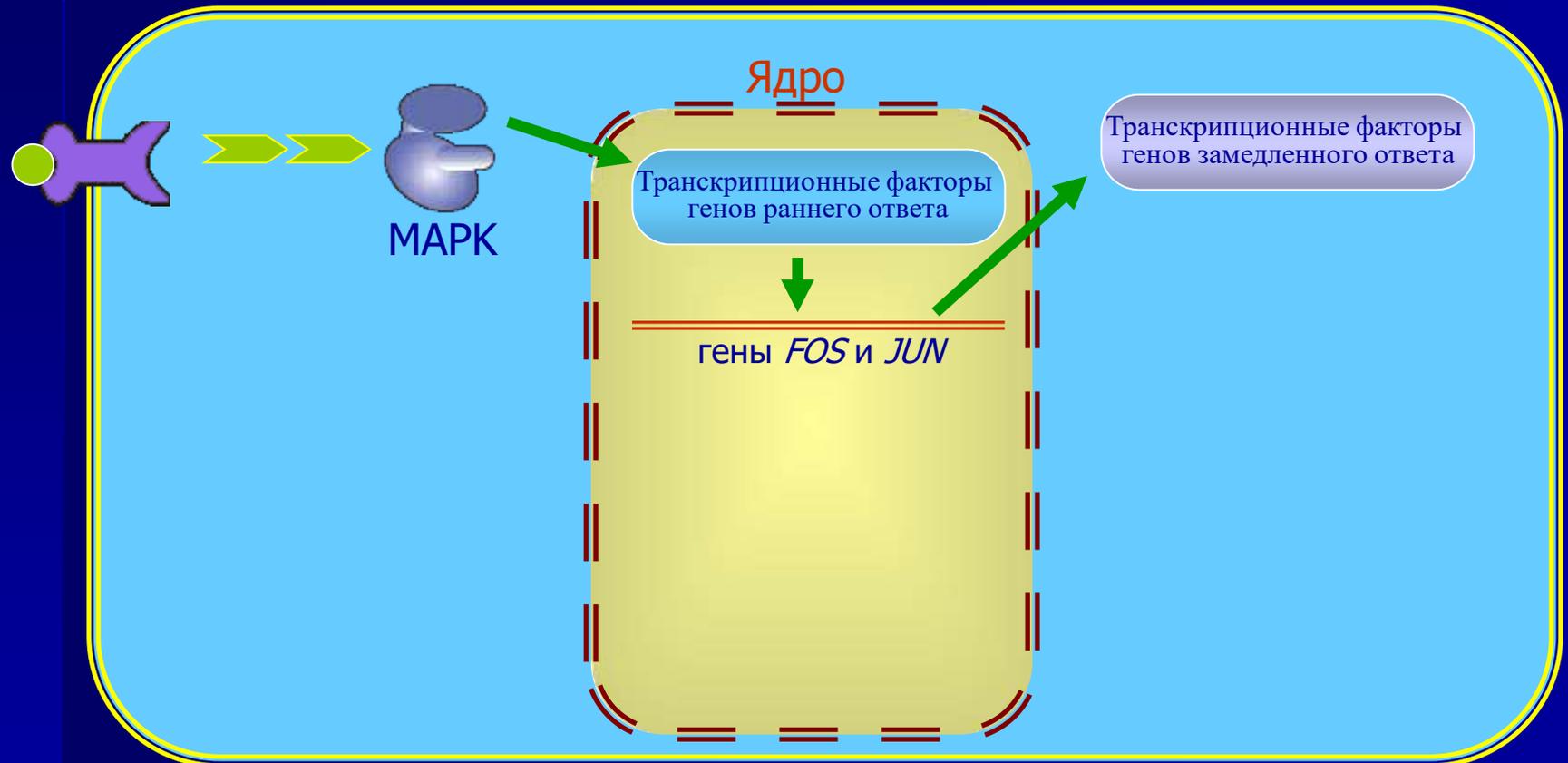
3. Конечные ферменты MAPK фосфорилируют ряд транскрипционных факторов, активирующих гены раннего ответа (*FOS* и *JUN*)



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие митогенов

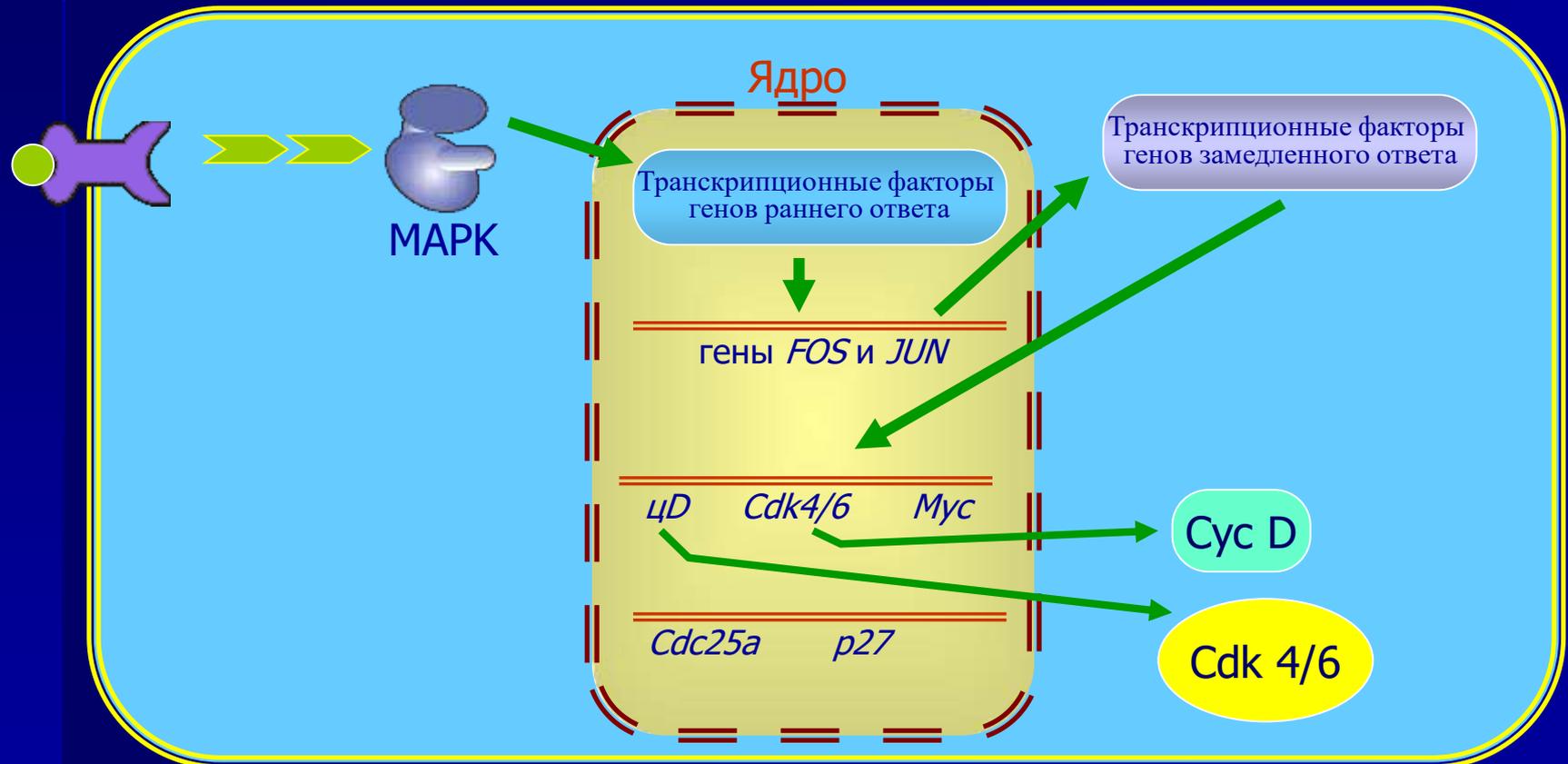
4. Продукты семейства *FOS* и *JUN* – это транскрипционные факторы, специфичные в отношении генов замедленного ответа.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие митогенов

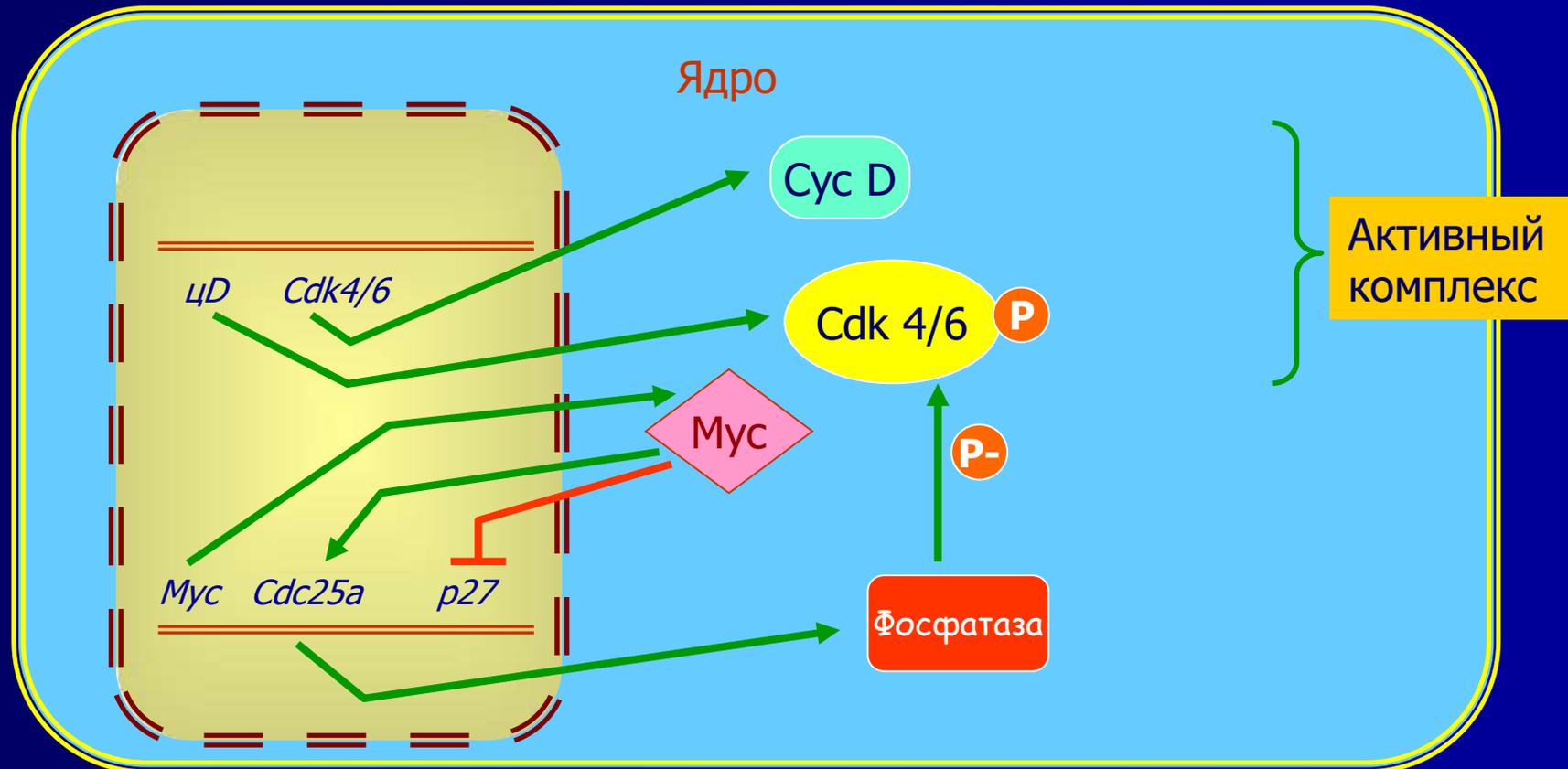
5. Гены замедленного ответа, экспрессируясь запускают клеточный цикл. Среди них гены **циклина D**, **Cdk4/6**, т.е. компоненты комплексов специфичных для первой половины G1 периода.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие МИТОГЕНОВ

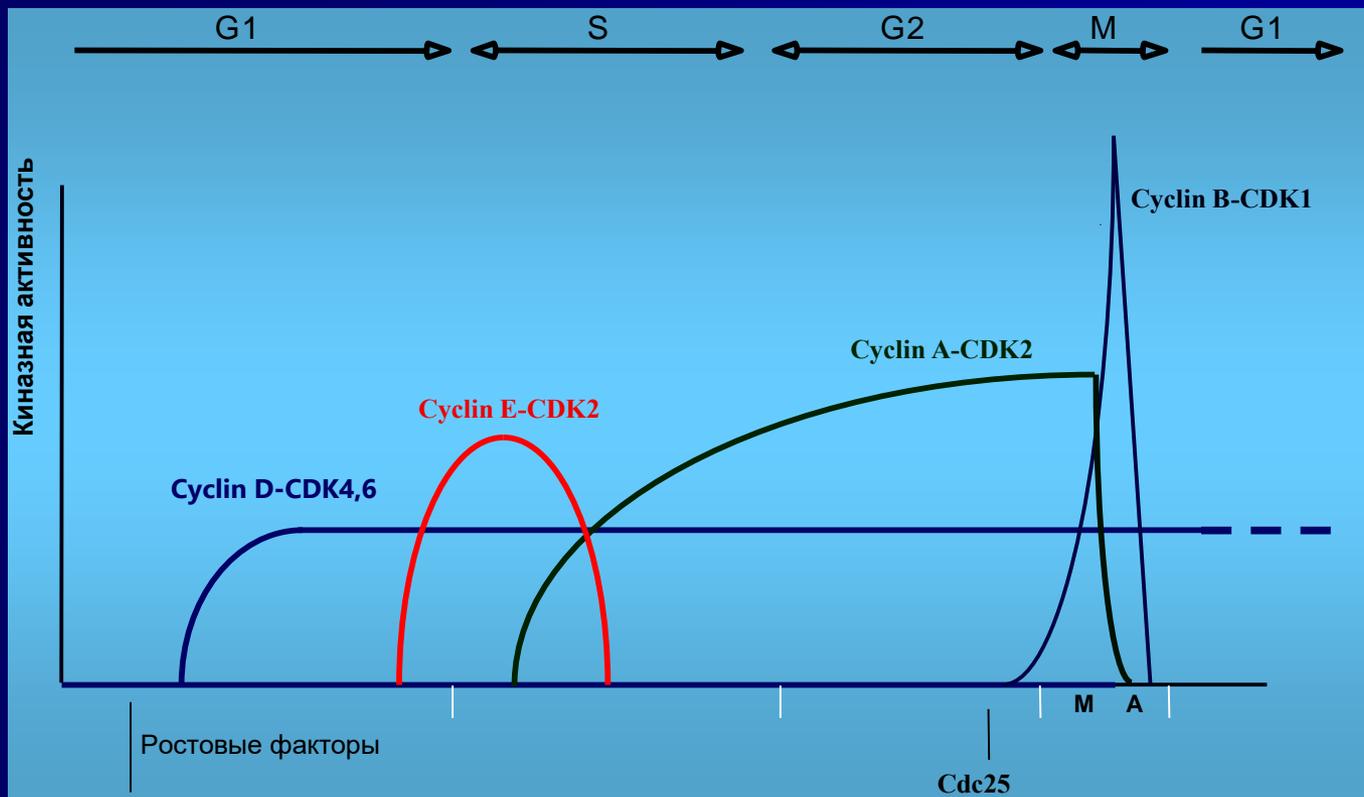
6. Кроме того синтезируется белок **Мус**. Он в свою очередь тормозит экспрессию **p27**, ингибитора целого ряда циклин-киназных комплексов, активирует ген фосфатазы **Cdc25a**, которая дефосфорилирует Cdk4 и Cdk2.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Принцип работы в клеточном цикле

- а) устранение активности комплекса предыдущей стадии,
- б) стимуляция событий «своей» стадии,
- в) образование (или активация) комплексов предыдущей стадии.

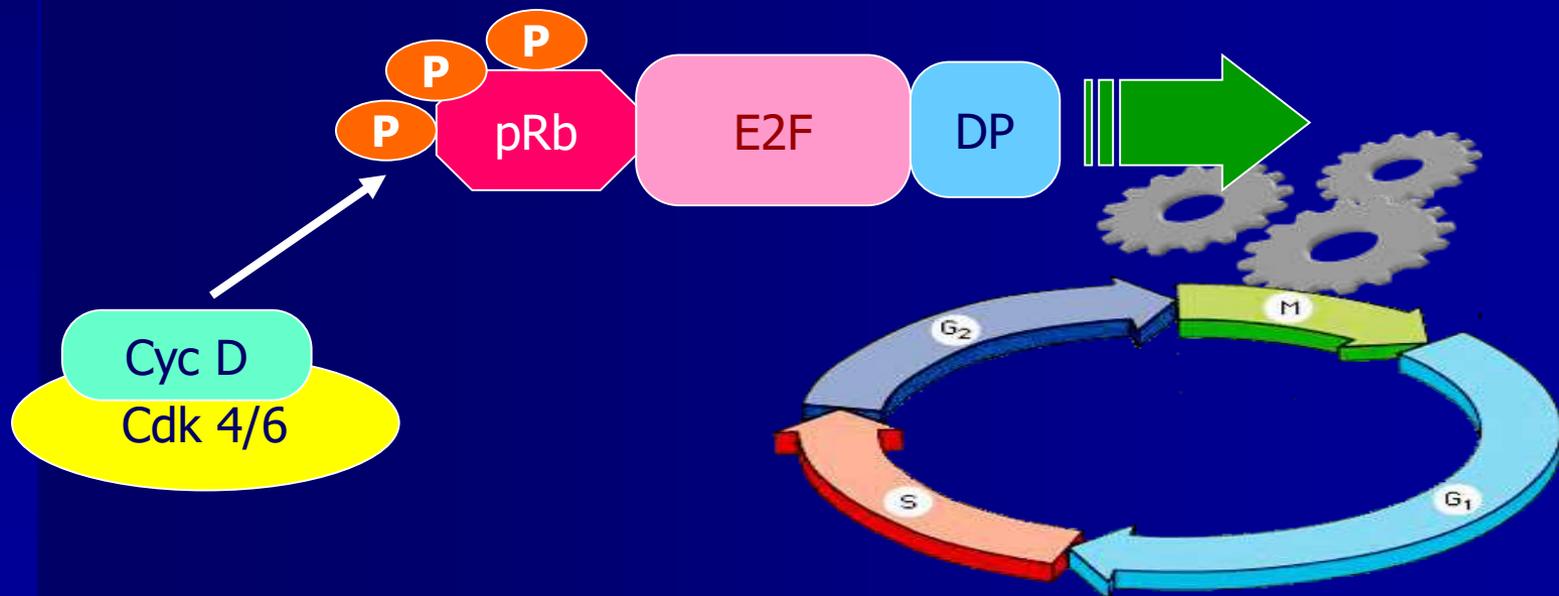


Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие комплексов G1 стадии

Активные протеинкиназные комплексы циклин D-Cdk4/6 действуют сразу на несколько субстратов.

Основной субстрат – белок pRb и подобные ему белки p105 и p130. В результате фосфорилирования pRb теряет сродство к E2F-DP, который в качестве транскрипционного фактора активирует целый ряд генов.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие комплексов G1 стадии

- образование
компонентов
комплексов
следующих
стадий цикла

- сохранение этих
компонентов на
протяжении
определенного
времени

- активацию в
нужный момент

- Образование
субстратов и
ферментов,
необходимых для
репликации ДНК

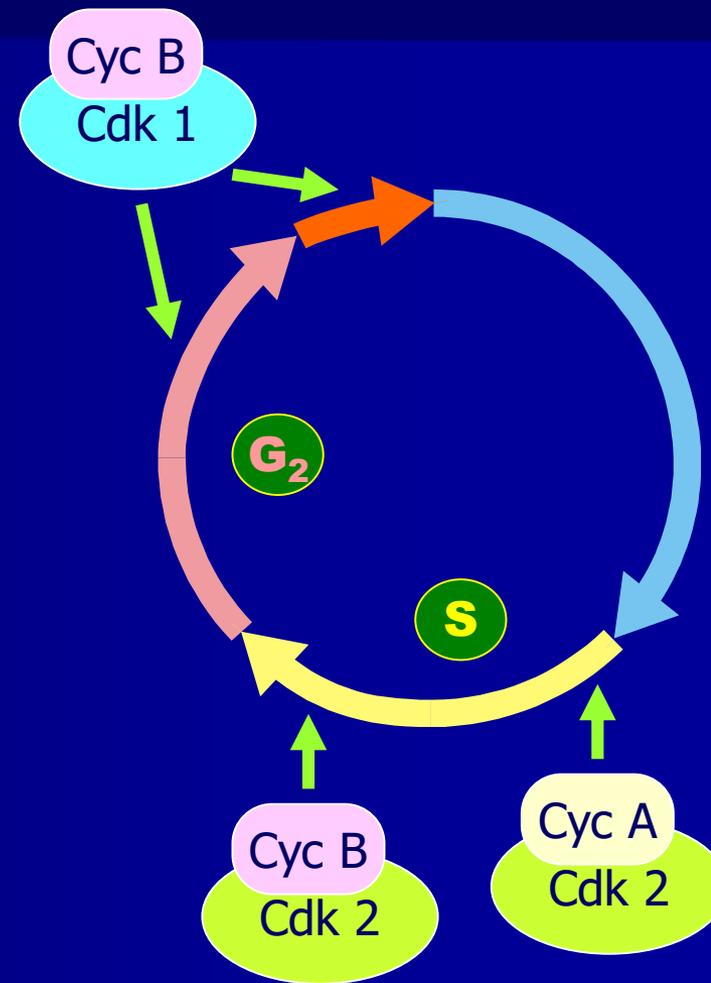
Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие комплексов S и G2 стадии

Для S-перехода характерны комплексы цА-Cdk2 и цВ-Cdk2, а для G2 - цВ-Cdk1.

Основная задача комплексов S-периода – обеспечить такое проведение репликации, чтобы каждый участок любой молекулы ДНК был реплицирован **только один раз**.

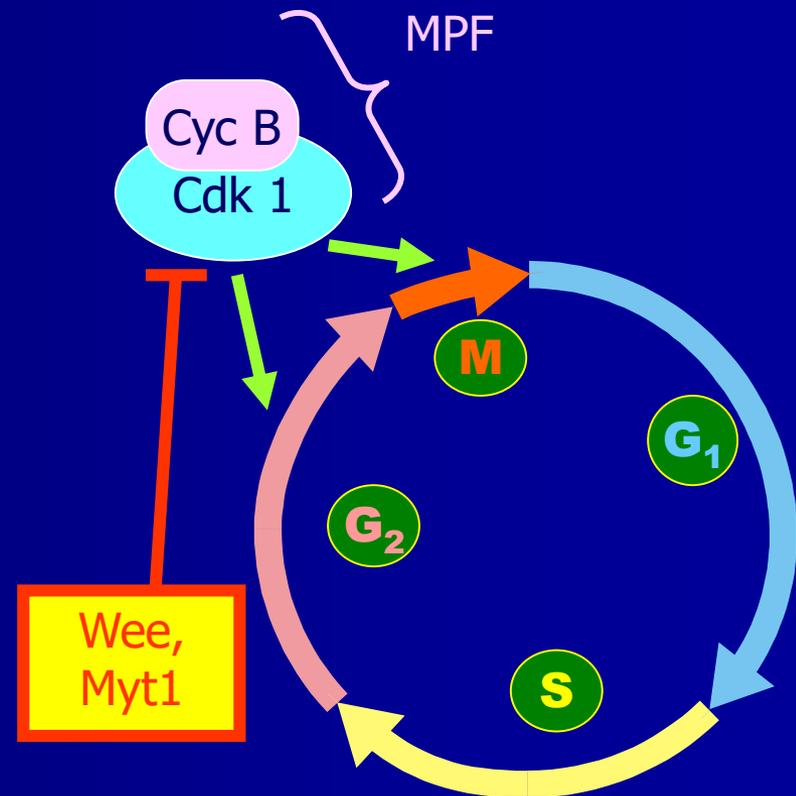
С любой точкой начала репликации за весь клеточный цикл должна связаться только одна пара репликативных комплексов.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Дополнительные события S и G2 стадий

- Образование компонентов митоз-стимулирующего фактора (MPF).
- Торможение активности этого комплекса – во избежание преждевременного начала митоза. Это осуществляется путем ингибиторного фосфорилирования.

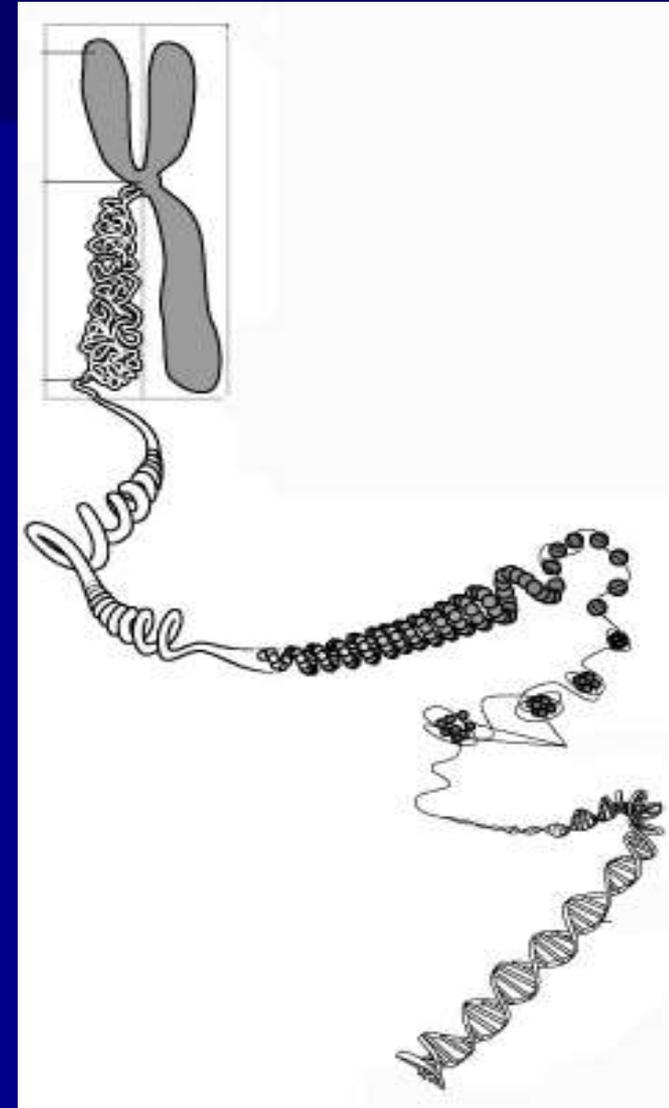
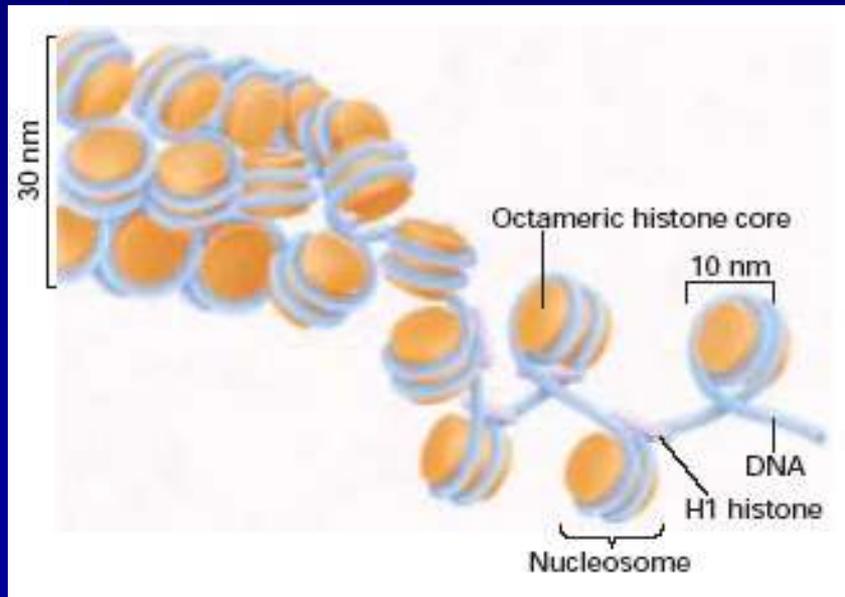


Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие митотического комплекса MRF

1. Конденсация хромосом

- MRF способен фосфорилировать гистон H1. Молекулы гистона H1 связаны с межнуклеосомными участками ДНК и участвуют в укладке нуклеосомной нити, предположительно только в фосфорилированном состоянии.

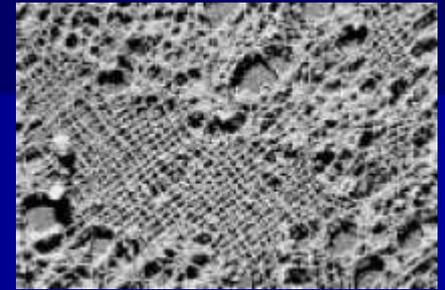


Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

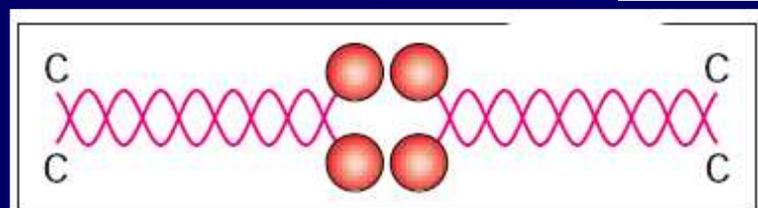
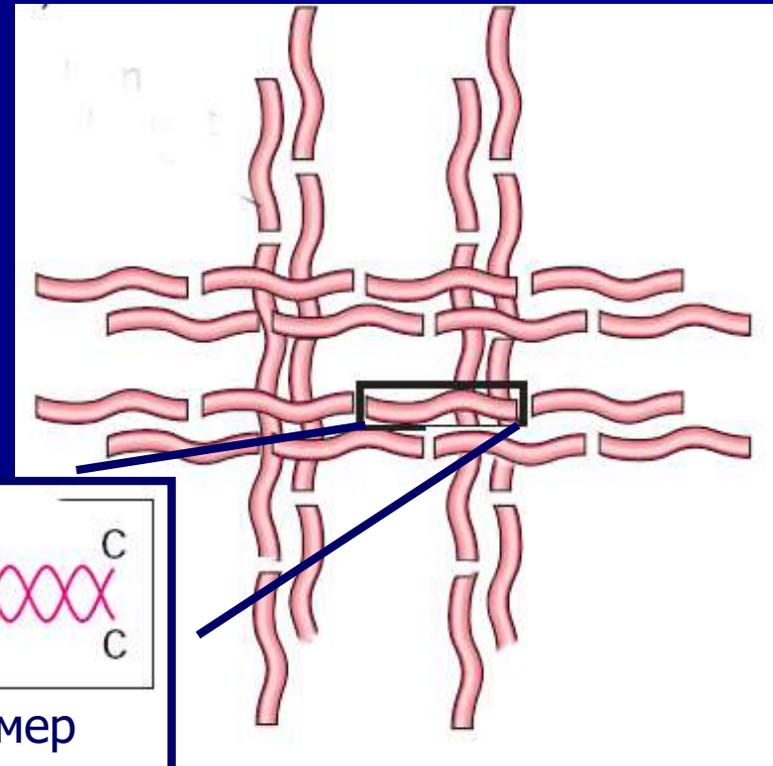
Действие митотического комплекса MPF

2. Распад ядерной оболочки

Целостность ядерной оболочки поддерживается ядерной ламиной - тонкой сетевидной пластинки, которая образована из промежуточных филаментов и прилежит к внутренней стороне ядерной мембраны, выполняя функцию опорной структуры.



Белки ламины имеют гантелеобразную форму. Полимеризация происходит путем взаимодействия глобулярных доменов.



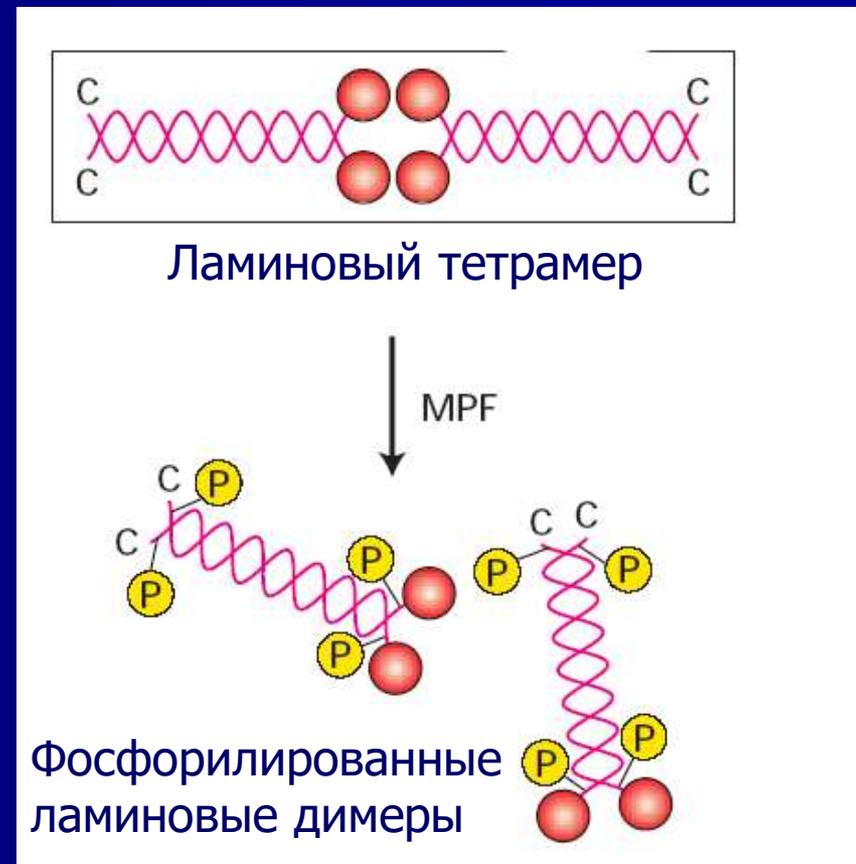
Ламиновый тетрамер

Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие митотического комплекса MPF

2. Распад ядерной оболочки

MPF катализирует фосфорилирование определенных остатков серина в области палочковидных частей филаментов. Это сказывается на конформации связывающих доменов. Это приводит, в свою очередь, к тому, что вся конструкция рассыпается. Мембрана, лишенная объединяющей конструкции, распадается на микропузырьки.



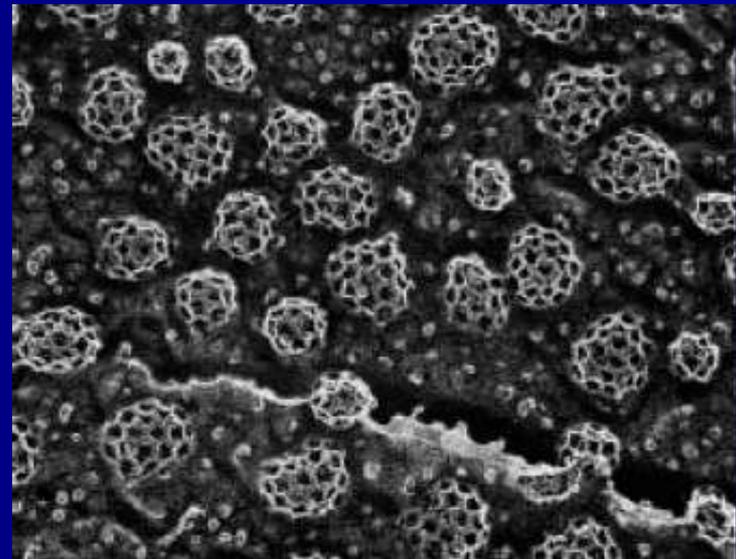
Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Действие митотического комплекса MPF

3. Распад других мембранных структур

Аналогично распаду ядерной мембраны разрушаются также мембраны **эндоплазматической сети и комплекса Гольджи**. Благодаря распаду на везикулы, сохраняется единая система цистерн и вакуолей, которая

- не мешает расхождению хромосом,
- не попадает в будущие ядра
- не препятствует разделению цитоплазмы.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

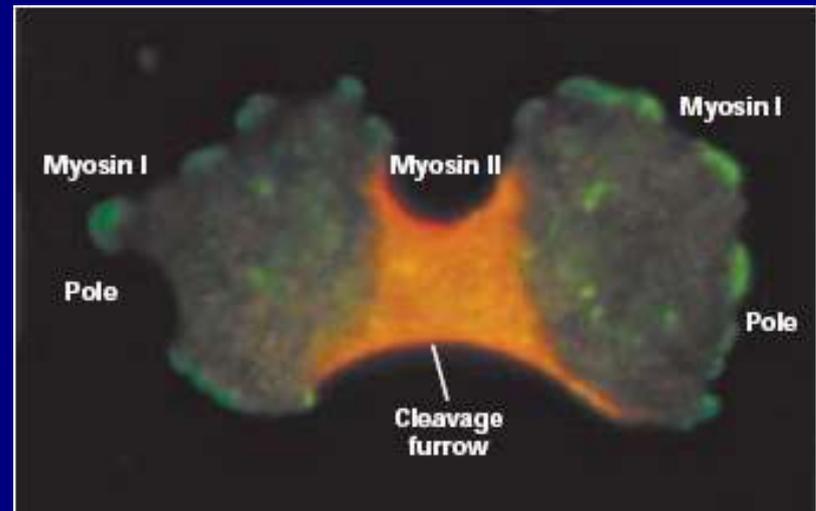
Действие митотического комплекса MPF

4. Формирование веретена деления

Катализатором полимеризации тубулина является MPF

5. Предупреждение преждевременной цитотомии

Цитотомия в телофазе происходит путем образования актино-миозинового кольца. Фактор MPF в ранней профазе фосфорилирует легкие цепи миозина, что лишает миозин способности реагировать с актином.

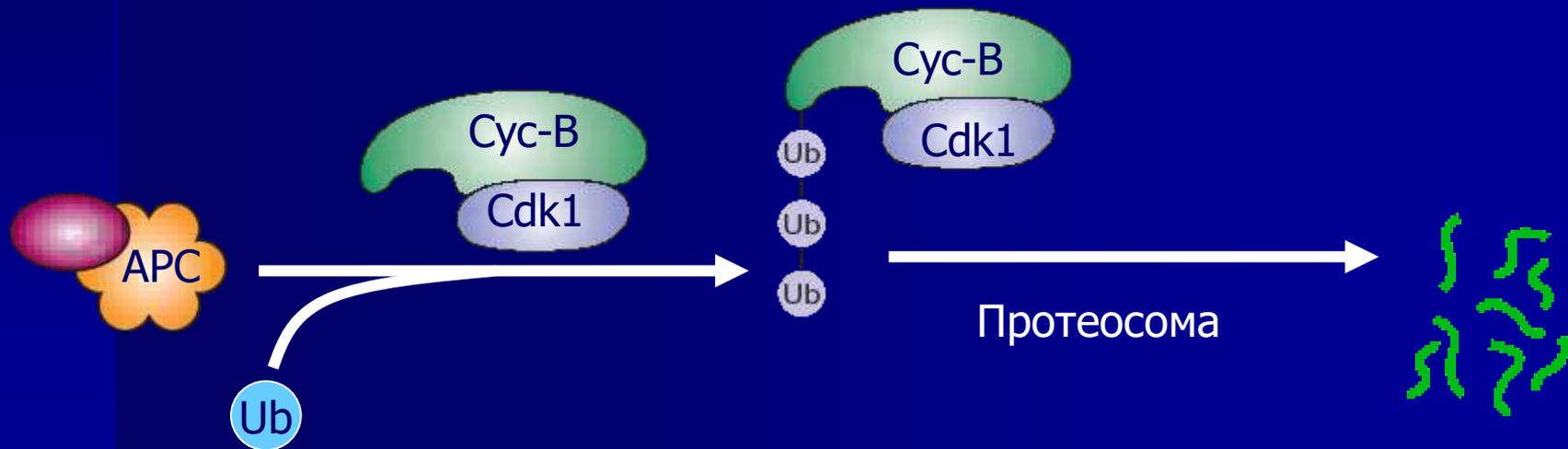


Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу, - APC

APC – является убиквитинлигазой, специфичной в отношении ряда белков, в том числе **MPF**. Помимо MPF убиквитин-лигаза APC действует на многие другие субстраты, поэтому необходима тонкая регуляция ее активности и специфичности.



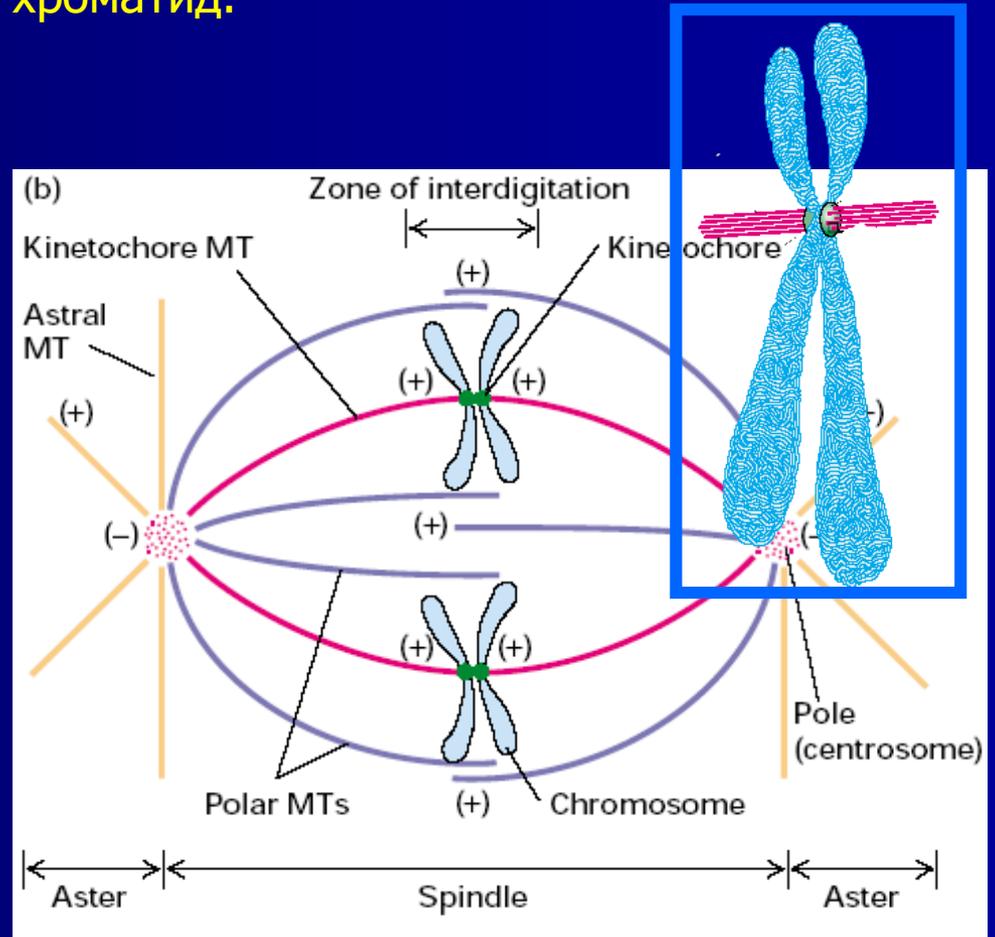
Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу - APC

1. Расхождение сестринских хроматид.

Анафаза начинается после выстраивания хромосом в экваториальной плоскости биполярного веретена и знаменуется одновременным разделением всех сестринских хроматид. Это разделение является скорее результатом потери сцепления между хроматидами, чем увеличением тянущих сил со стороны полюсов веретена.



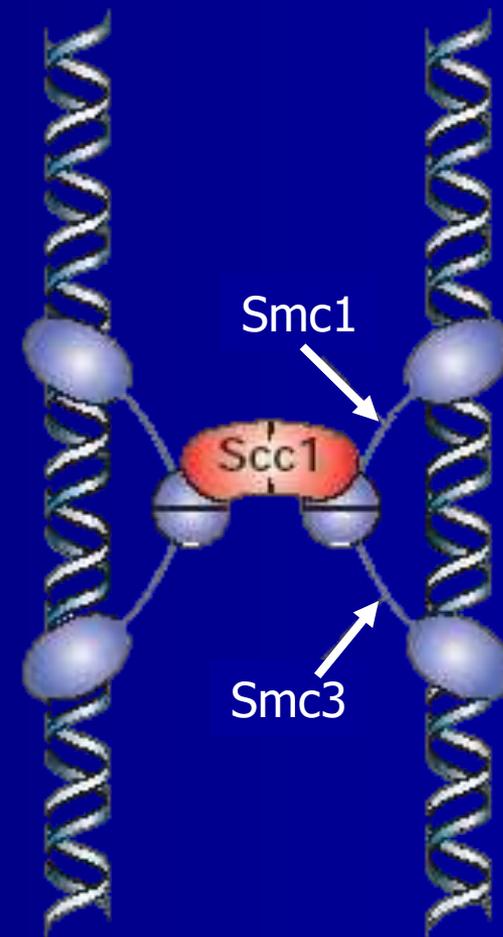
Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу - APC

1. Расхождение сестринских хроматид.

Хроматиды сцеплены между собой мультибелковыми комплексами – когезинами.



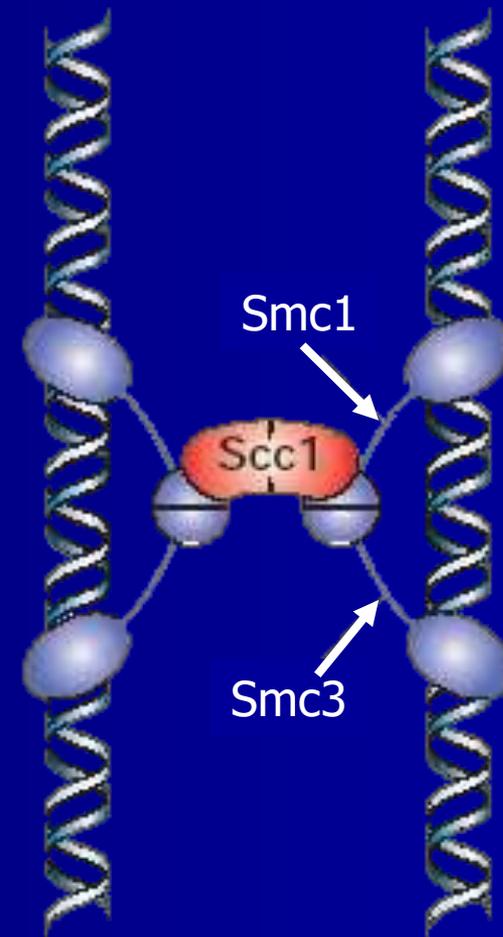
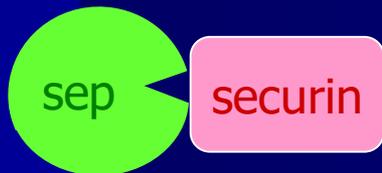
Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу - APC

1. Расхождение сестринских хроматид.

Разделение сестринских хроматид зависит от деградации ингибитора, так называемого **секурина** (securin), посредством убиквитин-зависимого протеолиза. Этот ингибитор предотвращает действие протеазы, названной сепаразой (separase).



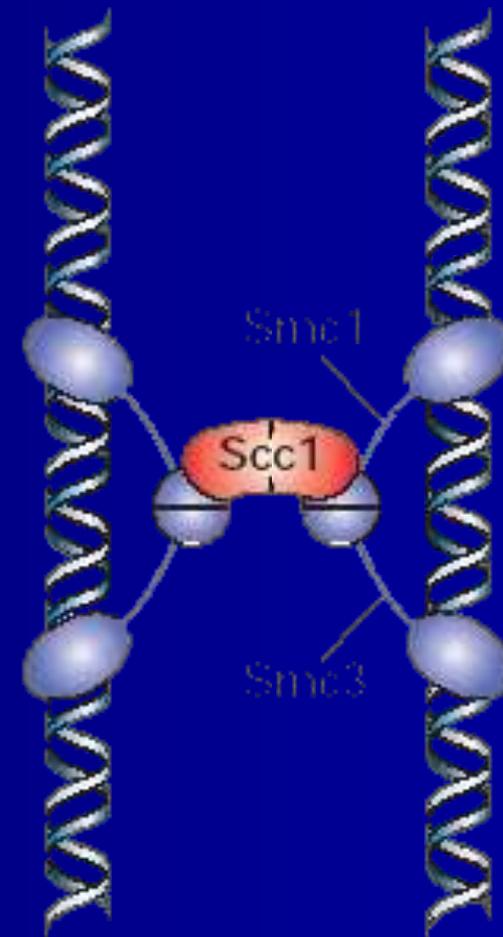
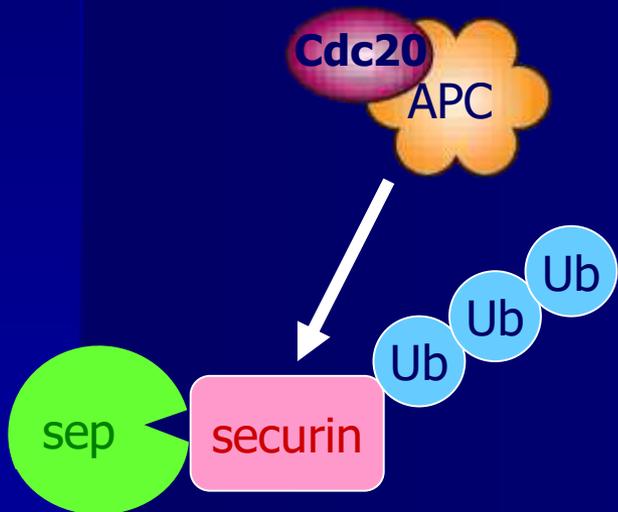
Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу - APC

1. Расхождение сестринских хроматид.

APC специфически разделяет свободная сепараза активированный Cdc20 метит сшивающий белок Scc1, что приводит к разделению securin убиквитином для уничтожения в протеосомах. сестринских хроматид.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу - APC

2. Разрушение MPF.

Пока не завершится расхождение хромосом, разрушение MPF нежелательно, так как благодаря ему поддерживается конденсированное состояние хромосом, ядерная мембрана находится в раздробленном состоянии и т.д. Поэтому в отношении MPF лигаза APC неактивна до поздней анафазы.



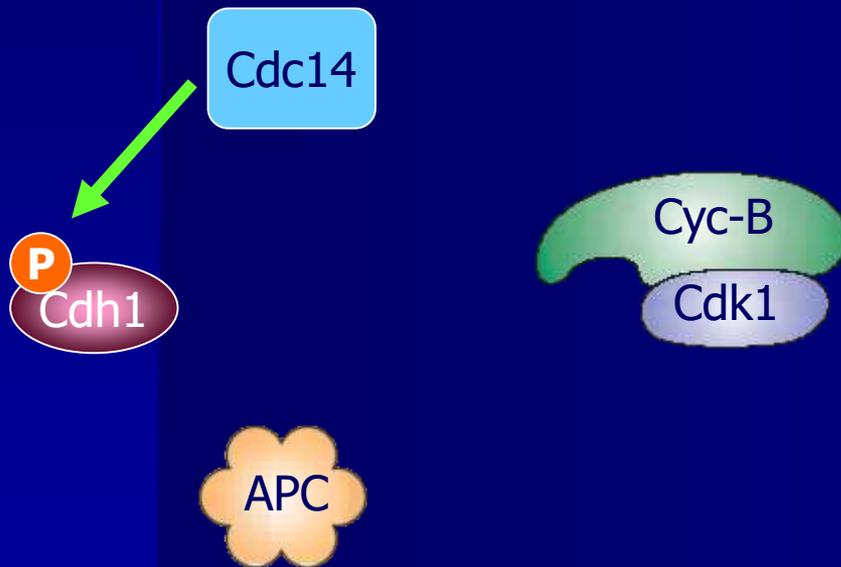
Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу - APC

2. Разрушение MPF.

Фосфорилирование Cdh1 предотвращает активацию APC. В активацию APC вовлечена киназа Cdc14, которая дефосфорилирует Cdh1, который в свою очередь связывается с APC.



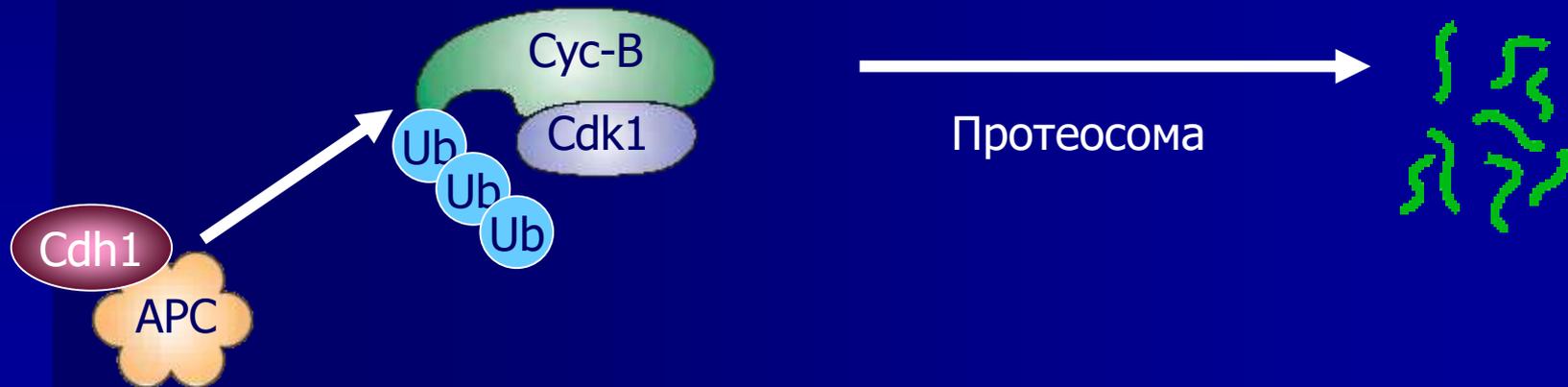
Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу - APC

2. Разрушение MPF.

Активный комплекс APC-Cdh1 действует на фактор MPF, направляя его протеолизис.



Механизм действия комплексов Циклин-Cdk

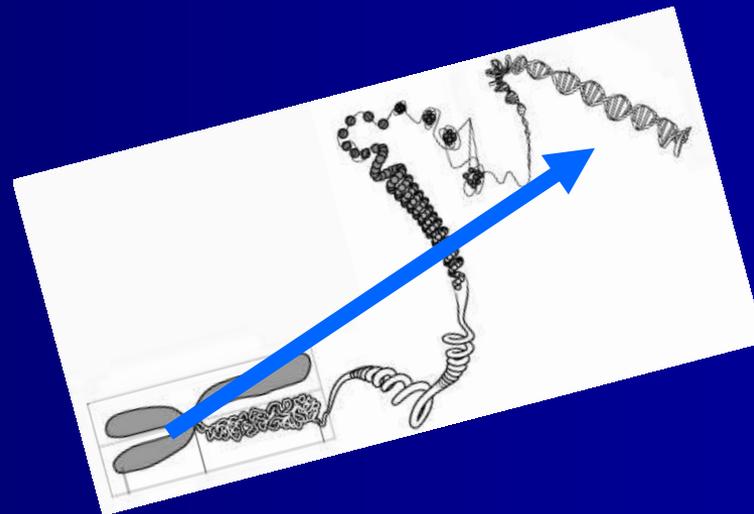
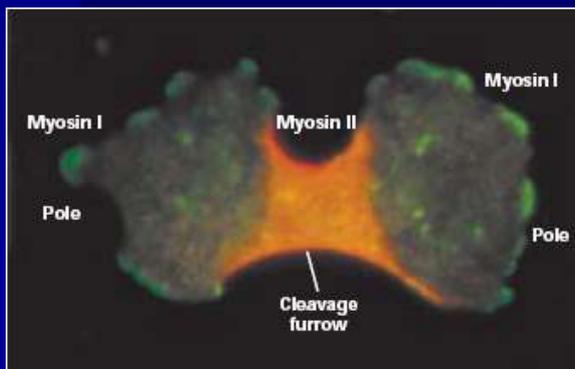
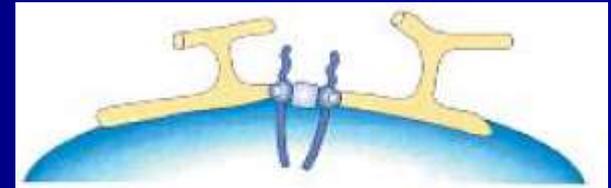
Анафаза и телофаза митоза

Действие фактора, обеспечивающего анафазу - APC

3. Эффекты разрушения MPF.

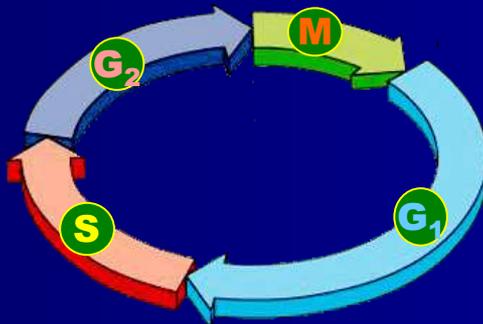
В делящейся клетке постоянно присутствуют протеинфосфатазы. После резкого снижения MPF их активность начинает преобладать. Это приводит к событиям, противоположным событиям профазы.

- а) Восстановление ядерных оболочек
- б) Деконденсация хромосом
- в) Цитотомия (цитокинез)



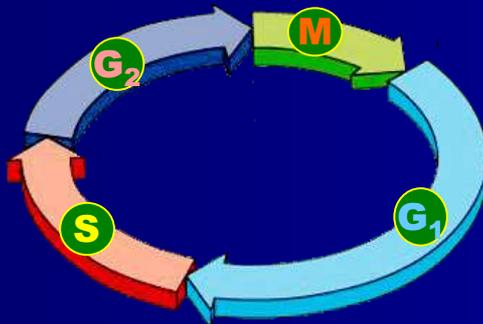
Контроль клетки за прохождением клеточного цикла

- В ходе клеточного цикла клеткой осуществляется самоконтроль собственного состояния. Этот контроль приурочен к определенным стадиям цикла. Системы, способные останавливать клеточный цикл в определенных точках в ответ на различные повреждения, получили название **сверочных точек** (от англ. **checkpoint**) клеточного цикла.



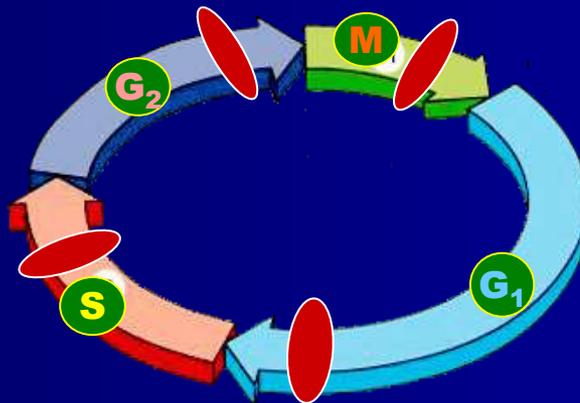
Контроль клетки за прохождением клеточного цикла

- Контролю подвергается состояние наследственного материала. В зависимости от результатов выбирается один из трех вариантов дальнейшего поведения:
 - 1 – безостановочный переход к следующей стадии цикла,
 - 2 – задержка на текущей стадии для исправления дефекта,
 - 3 – запуск механизма апоптоза, если нарушения неисправимы.



Сверочные точки (checkpoints) клеточного цикла

- В цикле существует несколько сверочных точек, прохождение которых возможно лишь в случае нормального завершения предыдущих этапов и отсутствия повреждения генома. Выделяют **по меньшей мере 4** такие точки: в периодах G₁, S и G₂, а также "точку проверки сборки веретена деления". Выделяют еще 2 критических перехода между фазами - G₁/S и G₂/M.



Сверочная точка G1

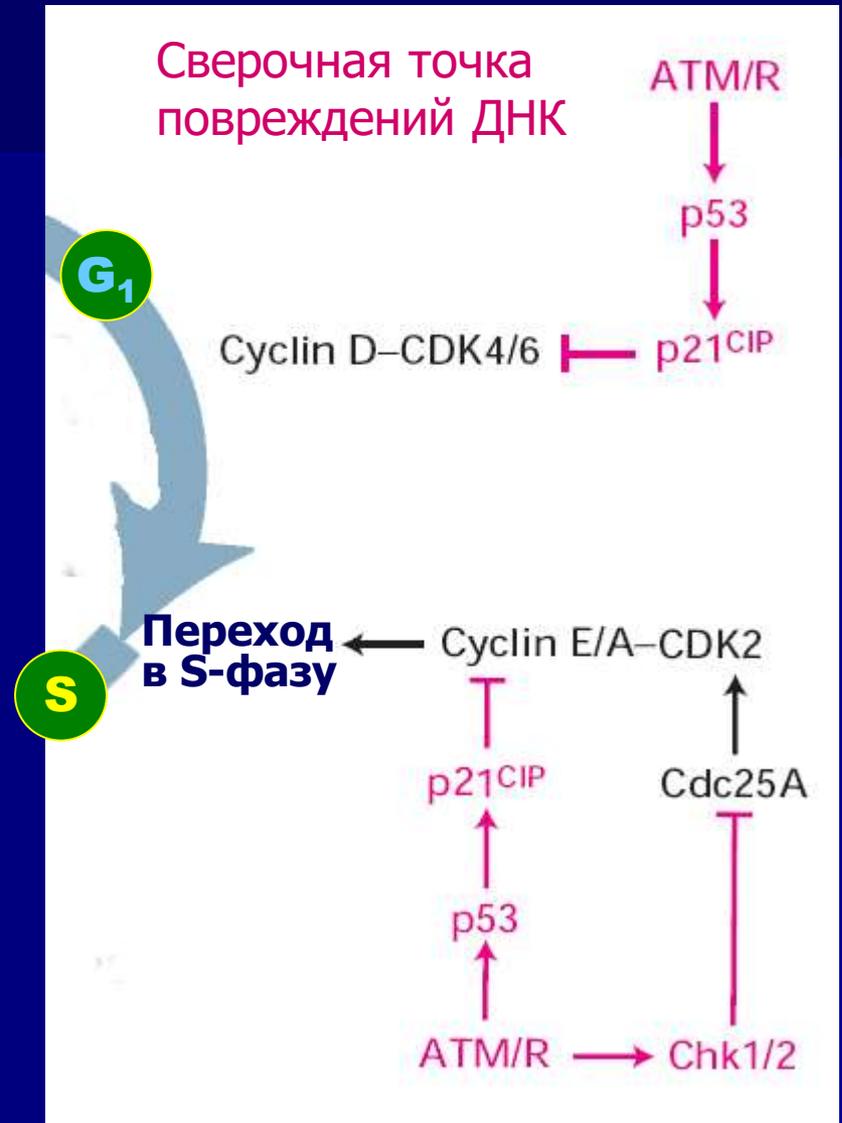
Основное требование к клетке, вступающей в S-фазу, - интактность ДНК, так как репликация поврежденной ДНК приведет к передаче генетических аномалий потомству. Поэтому клетки, подвергшиеся мутагенным воздействиям, вызывающим разрывы ДНК (УФ- и гамма-облучение, алкилирующие соединения), останавливаются в G1 и не входят в S-фазу.

Остановка в G1 наблюдается не только после ДНК-повреждающих воздействий, но и при других состояниях, в том числе приводящих к нарушениям числа хромосом - при незавершенности предыдущего клеточного цикла митозом (расхождением хромосом), при неправильной сегрегации хромосом во время митоза, приведшей к образованию микроядер, а также при разрушении микротрубочек.

Остановка в G1 может быть необратимой, как это наблюдается при гамма-облучении или обратимой, прекращающейся с окончанием действия фактора, ее вызвавшего, например, при восстановлении нормального пула нуклеотидов или при реставрации микротрубочек.

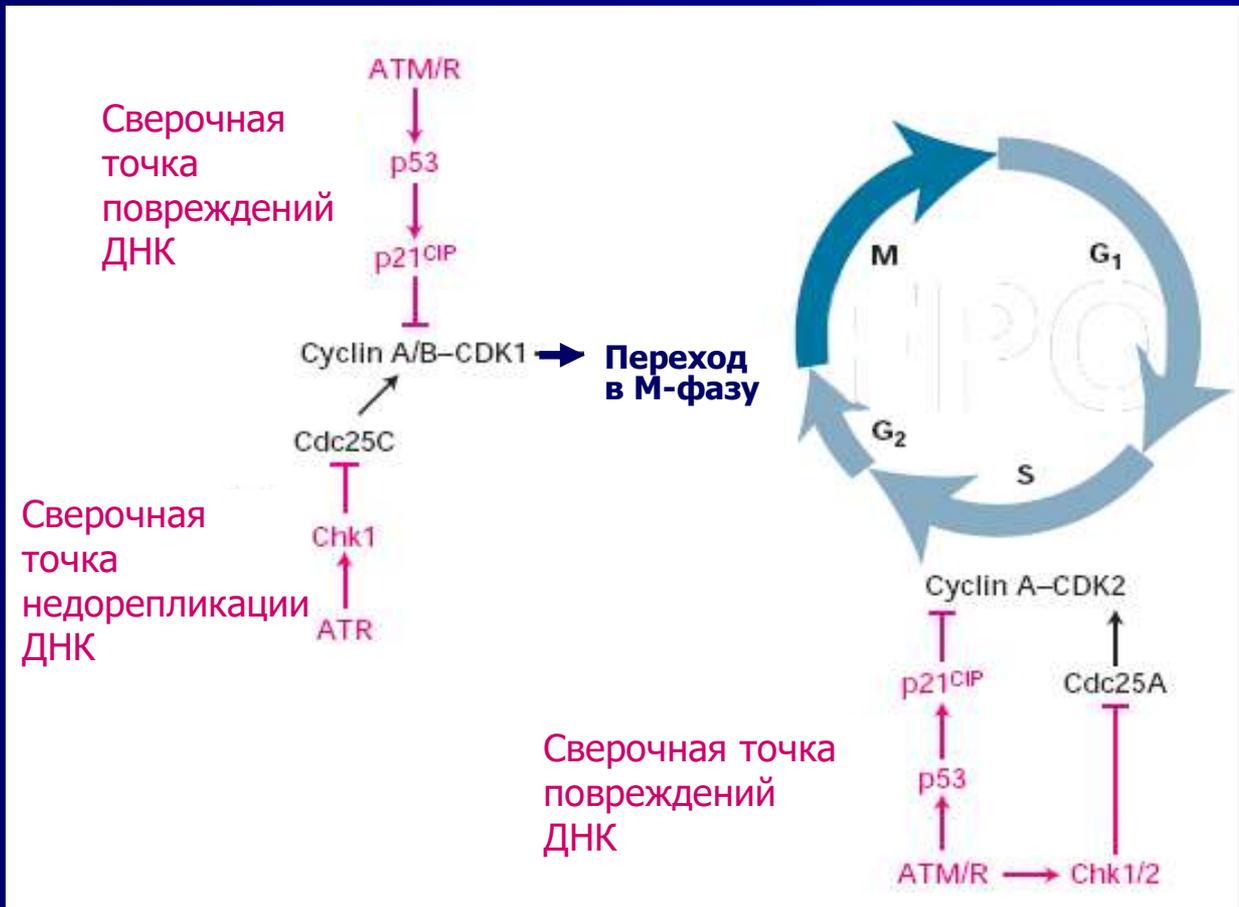
Сверочная точка G1

Белки ATM и ATR являются датчиками информации о повреждениях ДНК. Эффекторами ATM являются checkpoint-киназы Chk1/2, белок p53, BRCA1. Белок p53 активирует ингибитора всех циклин-киназных комплексов p21. Chk1/2 способен ингибировать фосфатазу Cdc25, которая играет важную роль в переходе к синтетическому периоду. Если повреждения ДНК очень велики и их исправление затягивается, то длительно сохраняющий свою активность белок p53 действует как транскрипционный фактор генов, запускающих программу апоптоза.

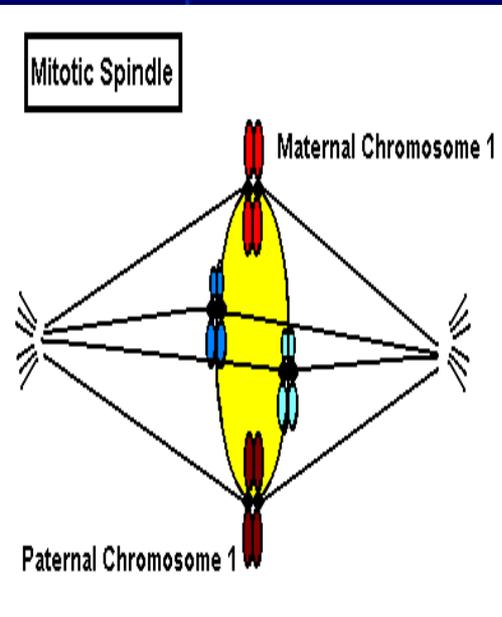


Сверочная точка S и G2

Повреждения ДНК и другие нарушения вызывают остановку в S и в G2-фазе клеточного цикла. При этом выявляются повреждения, пропущенные при прохождении предыдущих контрольных точек, либо полученные на последующих стадиях клеточного цикла. Кроме того, в G2-фазе детектируется полнота репликации ДНК и поэтому клетки, в которых ДНК недореплицирована, не входят в митоз.

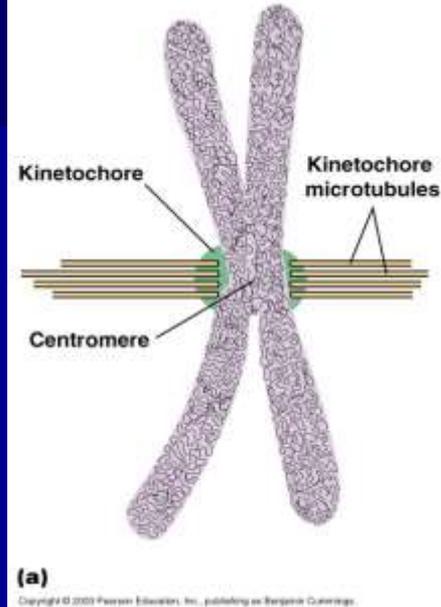


Сверочная точка сборки веретена (spindle-assembly checkpoint)



Во избежание неправильного распределения хромосом клетки задерживаются в метафазе до тех пор, пока все кинетохоры не будут прикреплены к микротрубочкам.
Определяющую роль в индукции остановки в метафазе играют изменения взаимодействий ассоциированных с кинетохорами белков - BUB1, BUBR1, MAD1 и MAD2.

Мутации этих белков впервые были обнаружены у почкующихся дрожжей (budding yeast).



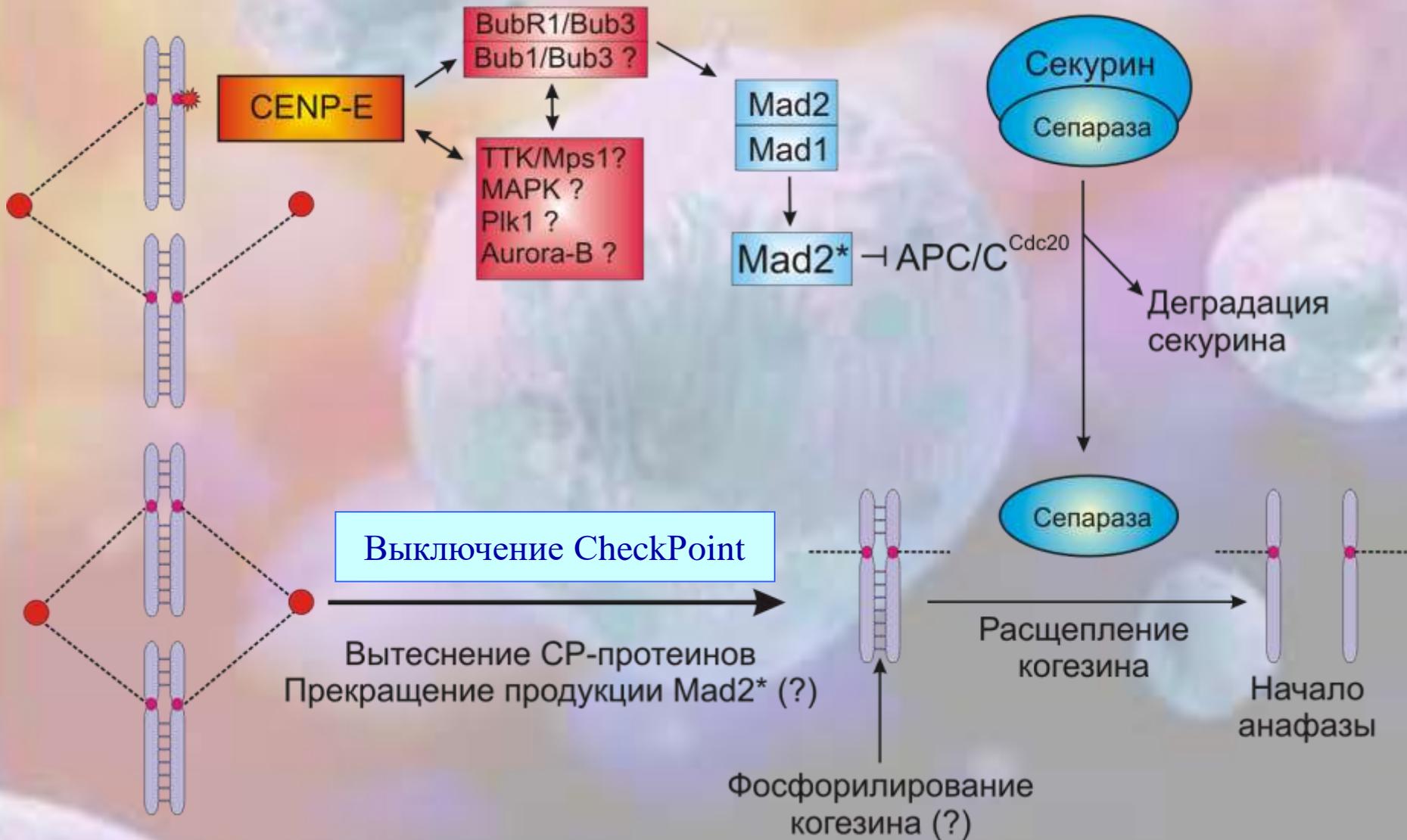
При обработке дрожжей-мутантов веществами, деполимеризующими микротрубочки, клетки теряли способность останавливаться на стадии метафазы.

У дрожжей были найдены 2 вида мутаций:

BUB - budding uninhibited by benomyl и **MAD** - mitotic arrest deficient.

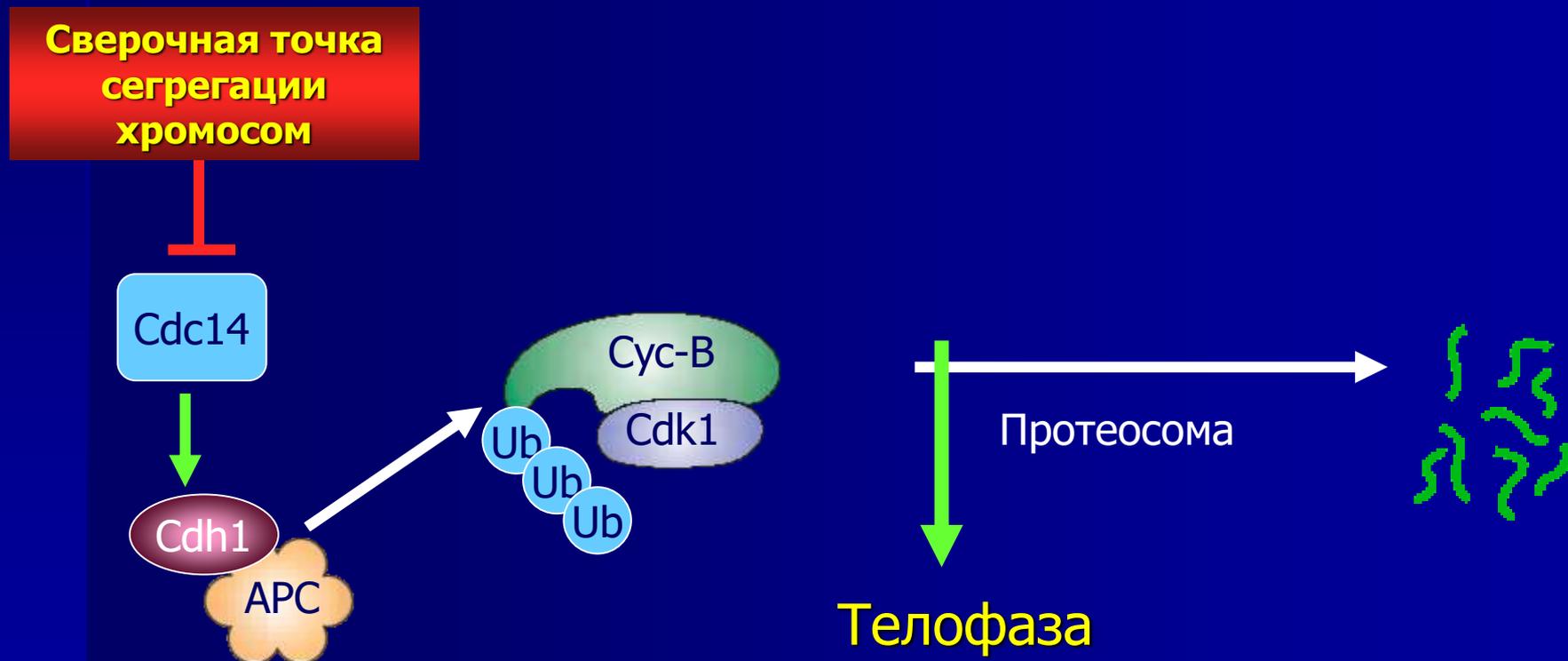
Неприкрепленные кинетохоры активируют MAD2, который ингибирует комплекс Cdc20-APC.

**Включение
CheckPoint – контрольной точки**



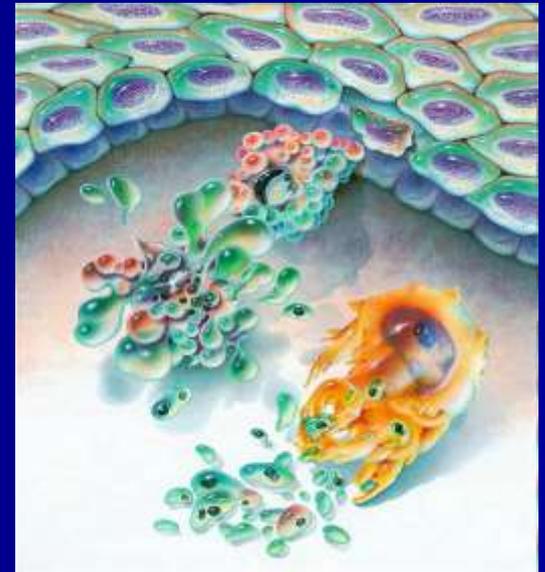
Сверочная точка сегрегации хромосом (Chromosome segregation checkpoint)

Контрольная точка сегрегации хромосом препятствует освобождению Cdc14. Таким образом протеолизис MPF не происходит. Что препятствует вхождению клетки в телофазу клеточного цикла.



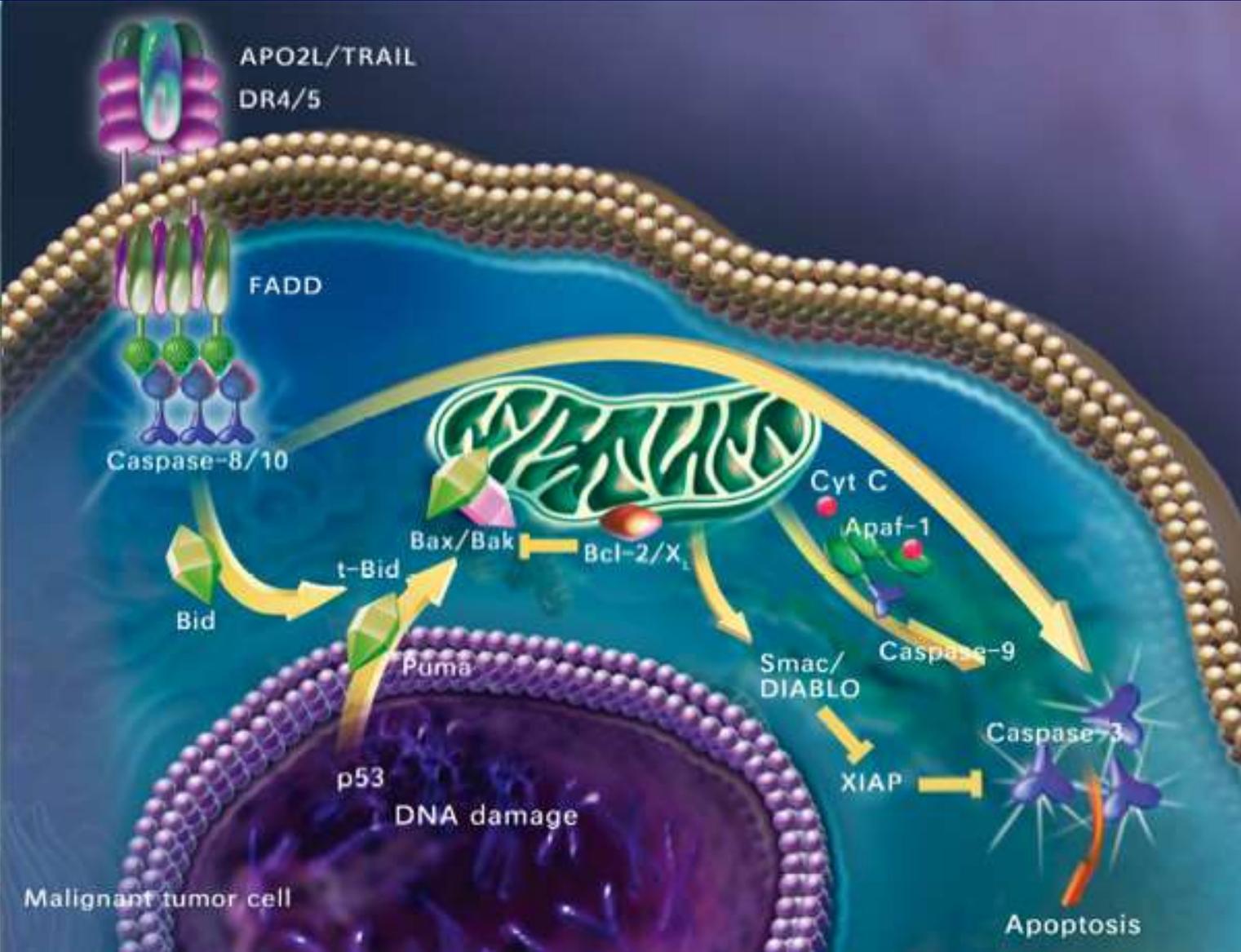
Общие представления об апоптозе

■ Апоптоз - это генетически запрограммированный путь клеточной смерти, необходимый в развитии многоклеточного организма и участвующий в поддержании тканевого гомеостаза. Этот механизм, как известно, вызывается различными сигналами: связыванием с рецепторами специфических киллерных лигандов, нехваткой факторов роста/выживания, повреждениями ДНК и разрушениями цитоскелета, гипоксией и другими неблагоприятными условиями.



Сравнительная характеристика некроза и апоптоза

Признак	Апоптоз	Некроз
Распространенность	Одиночная клетка	Группа клеток
Индукция	Активируется физиологическими/или патологическими стимулами	Различная в зависимости от повреждающего фактора
Биохимические изменения	Энергозависимая фрагментация ДНК эндогенными эндонуклеазами Лизосомы интактные	Нарушение или прекращение ионного обмена. Из лизосом высвобождаются ферменты
Распад ДНК	Внутриядерная конденсация с расщеплением на фрагменты	Диффузная локализация в некротизированной клетке
Целостность клеточной мембраны	Сохранена	Нарушена
Морфология	Сморщивание клеток и фрагментация	Набухание и лизис клеток
Воспалительный ответ	Нет	Обычно есть
Удаление погибших клеток	Поглощение (фагоцитоз) соседними клетками	Поглощение (фагоцитоз) нейтрофилами и макрофагами



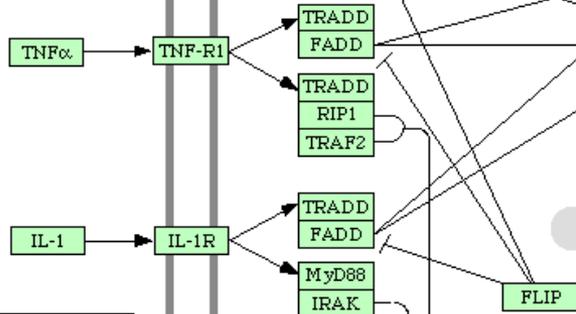
APOPTOSIS

Extrinsic Pathway

Death Ligand

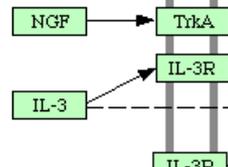


Adaptor



Cytokine-cytokine receptor interaction

Survival Factors



Ca²⁺-induced Cell Death Pathways

