

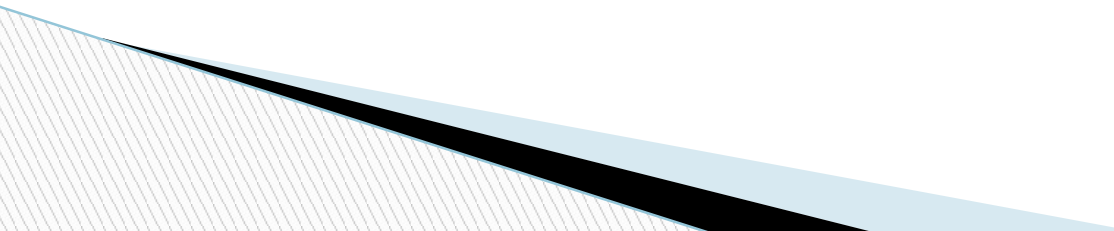
Клеточный цикл и деление клетки



2 периода жизни клетки

- Интерфаза – фаза жизни между делениями клетки и М-фаза – фаза митоза

Фаза митоза

- Компактизация (конденсация) хромосом
 - Формирование веретена и выравнивание хромосом в плоскости экватора клетки
 - Расхождение сестринских хроматид к полюсам клетки
 - Образование борозды деления
 - Окончательное разделение клетки на 2 дочерних
- 

Фазы нормального клеточного цикла

- ▣ А. фаза М – митотический цикл, который длится обычно 30-60 минут, М-фаза завершается разделением клетки на 2 дочерних
- ▣ Б. фаза G1 (Gap1) – это интервал между окончанием М-фазы и началом репликации ДНК, продолжается около 12 часов

Фазы нормального клеточного цикла

- ▣ В. Фаза S или синтетическая фаза – период подготовки к митозу, во время которого происходит синтез и репликация ДНК
- ▣ Г.Фаза G2 (Gар2) – период подготовки клетки к митозу, в течение которого осуществляется контроль полноты репликации ДНК; период роста и окончательного формирования содержимого клетки перед входением в фазу М

Поступательный характер клеточного цикла

- Когда клетки вступают в G1, последовательность молекулярных процессов «обучает» клетку для того, чтобы приступить к вхождению в S-фазу. Если эти биохимические процессы не происходят, клетка не переходит к репликации ДНК и остается в фазе G1

Поступательный характер клеточного цикла

- Если осуществление клеточного цикла в фазе G1 замедляется, клетка может экспрессировать белки, которые используются не для клеточного деления. Фаза G1 удлиняется. Затянувшаяся фаза G1 называется фазой G0
- Например, высокодифференцированные нейроны или кардиомиоциты находятся в фазе G0, что означает, что цикл деления в них приостановлен и не возобновляется

Поступательный характер клеточного цикла

- Клетки костного мозга и слизистой ЖКТ почти непрерывно делятся и редко входят в фазу G0
- Биохимические процессы клеточного цикла одинаковы у всех эукариотических клеток; многие молекулы, участвующие в клеточном делении, можно изучать на низших организмах (дрожжи, нематоды, шпорцевая лягушка, морские ежи)

Процесс созревания половых клеток

- Во время мейоза количество хромосом уменьшается в два раза с помощью 2 мейотических делений
- На 1 этапе яйцеклетки задерживаются в G2 фазе (первое мейотическое деление) и остаются в этом задержанном состоянии
- Прогестерон стимулирует яйцеклетки, которые остановились в G2-фазе, для вступления во 2-е деление мейоза

Процесс созревания половых клеток

- В результате 2-ого мейотического деления появляются дочерние клетки 2 типов: 1-я дочерняя клетка – полярное тельце, которое исчезает; 2-я клетка – ооцит – содержит половинный набор хромосом
- Ооциты вновь вступают в М-фазу и задерживаются в ней
- При оплодотворении яйцеклетки сперматозоидом хромосомный набор (количество ДНК) удваивается и регулирует все последующие процессы деления клеток

Факторы, стимулирующие созревание клеток

- Фактор стимуляции митоза (MPF) – этот фактор стимулирует клетки, находящиеся в фазе G₂, к вступлению в митоз. Прогестерон стимулирует синтез MPF и направляет клетки в фазе G₂ в митоз
- В клетках синтезируются белки циклины в течение всего клеточного цикла, которые разрушаются в начале анафазы

Белки - циклины

- Наиболее изучен циклин В, увеличение и снижение концентрации которого точно совпадает с процессами клеточного цикла

Строение циклина В

- Циклин В включает 2 субъединицы
- 1. киназный домен, способный к фосфорилированию специфических веществ в клетках
- 2. регуляторная субъединица, синтез которой то усиливается, то ослабевает в течение клеточного цикла

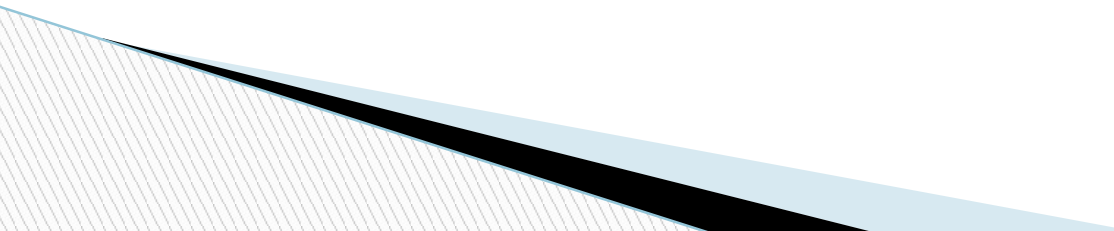
Эффекты циклина В

- Синтез циклина В начинается в фазе G1, достигает максимального уровня в конце ранней профазы и резко прекращается в начале анафазы
- Когда концентрация регуляторной субъединицы достаточно возрастает, активируется киназный домен

Эффекты циклина В

- Киназа циклина В фосфорилирует специфические белки, изменяя таким образом их функции и приводя к компактизации хроматина, разрушению ядерной оболочки и сборке веретена

MPF – активатор клеточного цикла

- MPF запускает биохимические процессы, в результате которых экспрессируются белки, участвующие в определенных этапах цикла
 - Высокая концентрация MPF приводит к конденсации хромосом, разрушению ядерной оболочки, сборке веретена
 - Низкая концентрация MPF приводит к сегрегации хромосом, деконденсации хромосом, восстановлению ядерной оболочки, репликации ДНК, удвоению центросом
- 

Разрушение циклина В

- Циклины содержат специфическую последовательность из 8-10 аминокислот, называемую блоком разрушения
- Когда белок, содержащий такой участок, должен разрушиться, с аминокислотами блока разрушения связывается 2-ой белок – распознающий белок

Разрушение циклина В

- После этого 3-й белок, убиквитинлигаза, присоединяет к остаткам лизина, расположенным вблизи участка блока разрушения, несколько копий небольшого белка (76 аминокислотных остатков), называемого убиквитином
- Сам убиквитин присоединяет еще несколько остатков убиквитина

Разрушение циклина В

- Белок с прикрепленными остатками убиквитина направляется к большому РНК-белковому комплексу, называемому протеосомой, в котором находятся протеазы
- В этом комплексе происходит разрушение исходного регуляторного белка

Каскад разрушения циклина В

- Предполагается, что белок, распознающий блок разрушения, активируется путем фосфорилирования
- Во время накопления MPF (циклина В) фосфатаза переводит распознающий белок в неактивное состояние
- Когда концентрация циклина В достигает максимума, MPF фосфорилирует распознающий белок, быстрее, чем фосфатаза удаляет фосфат

Каскад разрушения циклина В

- В результате распознающий белок связывается с блоком разрушения циклина В, приводя таким образом к его разрушению
- Эта модель частично объясняет увеличение и падение концентрации MPF во время клеточного цикла

Участие MPF в процессах митоза

- Вхождение в митоз представляет собой последовательность фосфорилирования специфических белков циклином В (MPF-киназой)
- Белковая структура, которая стабилизирует липидный бислой внутренней мембраны ядерной оболочки, называется ядерной ламиной (ламин А, В, С), ламини образуют димеры, которые полимеризуются и образуют сетеподобную структуру на внутренней поверхности ядерной мембраны

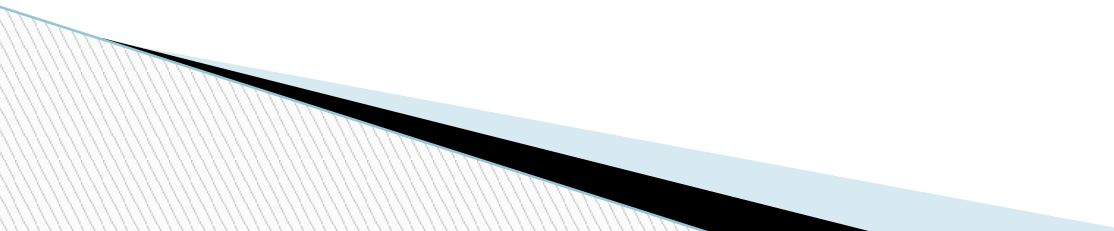
Участие MPF в процессах митоза

- В ранней профазе MPF фосфорилирует сериновые и треониновые остатки ламинов и вызывает их деполимеризацию, приводящую к разрушению ядра
- MPF фосфорилирует гистон H1 и другие белки каркаса хромосом, что приводит к их компактизации
- Вместе с другими киназами MPF также участвует в фосфорилировании, которое блокирует везикулярный транспорт и вызывает разрушение ЭПС и комплекса Гольджи

Участие MPF в процессах митоза

- Цитокинез блокируется в раннем митозе благодаря тому, что MPF фосфорилирует участок легкой цепи миозина, ингибирующий ее АТФ-азную активность и связывание с активными филаментами
- С наступлением анафазы MPF (циклин В) разрушается, ингибирование фосфатаз прекращается и белки дефосфорилируются; это аннулирует многие эффекты MPF

Участие MPF в процессах митоза

- Итак, комплекс MPF содержит каталитическую киназную субъединицу и регуляторную циклиновую субъединицу.
 - Эти субъединицы являются основными молекулами, запускающими процессы митоза
 - При их удалении клетка возвращается в состояние интерфазы
- 

Регуляция клеточного цикла

- В клетках млекопитающих существует семейство циклинзависимых киназ (Cdk), которые пронумерованы с 1 по 5 в порядке их открытия
- Когда клетки под действием факторов роста выходят из фазы G₀, первым начинает синтезироваться Cdk2-циклин D. Циклин D распознает вещества, регулирующие ферменты синтеза белков, необходимых для образования пулов репликации ДНК

Регуляция клеточного цикла

- Пока факторы роста стимулируют клетку, Cdk2-циклин D находится в активном состоянии
- мРНК и белки циклина D нестабильны, и при снижении концентрации факторов роста Cdk2-циклин D разрушается
- Сразу после появления Cdk2-циклин D выявляются еще 2 белка: Cdk4-циклин D и Cdk5-циклин D

Регуляция клеточного цикла

- ▣ Cdk2-циклин E появляется в фазе G1 и достигает максимальной концентрации на границе фаз G1 и S, после чего его концентрация резко снижается
- ▣ Cdk2-циклин A начинает синтезироваться в промежутке между фазами G1 и S и присутствует в высокой концентрации на протяжении всей фазы репликации ДНК (S-фазы)

Регуляция клеточного цикла

- В конце G2-фазы начинается образование комплекса Cdk2-циклина В. Концентрация этого комплекса увеличивается на границе G2 и М фаз, затем резко снижается вследствие полного разрушения
- Такое разнообразие киназ и циклинов обеспечивает правильную экспрессию генов, отвечающих за репликацию клетки

Регуляция клеточного цикла

- Большинство генов, регулируемых Cdk2-циклинами, делятся на 2 категории:
- Гены быстрого ответа (кодируют факторы транскрипции, которые участвуют в регуляции других генов)
- Гены замедленного ответа (продукты генов замедленного ответа участвуют в метаболических процессах, включая экспрессию субъединиц циклина

Регуляторные точки фаз клеточного цикла

- ▣ А. регуляторная точка фазы G1 – если в фазе G1 обнаруживается повреждение ДНК, белок p53 выступает в роли фактора транскрипции и вызывает задержку клеток в G1.
- ▣ Клетка задерживается в фазе G1, поврежденные нуклеотиды восстанавливаются ферментами репарации

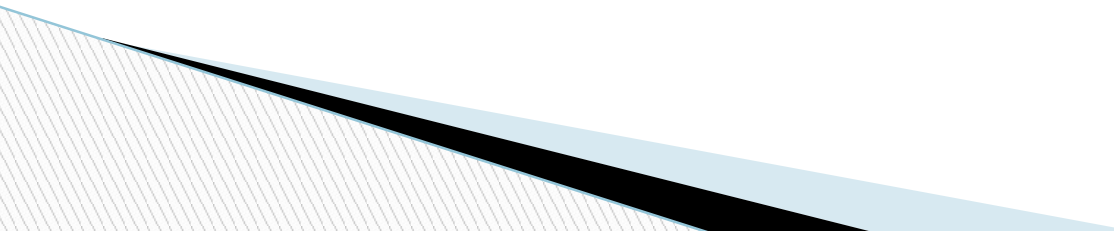
Регуляторные точки фаз клеточного цикла

- ▣ Задержка в фазе G 1 предотвращает копирование поврежденных оснований и тормозит мутацию ДНК. Нестабильный p53 обычно быстро разрушается. Однако когда в клетке появляется аномальная ДНК, белок p53 стабилизируется и присоединяется к этой ДНК
- ▣ При отщеплении белка p53 от ДНК его концентрация снижается; ингибитор Cdk отделяется, и Cdk начинает экспрессироваться
- ▣ В клетках опухолей оба аллеля p53 неактивны

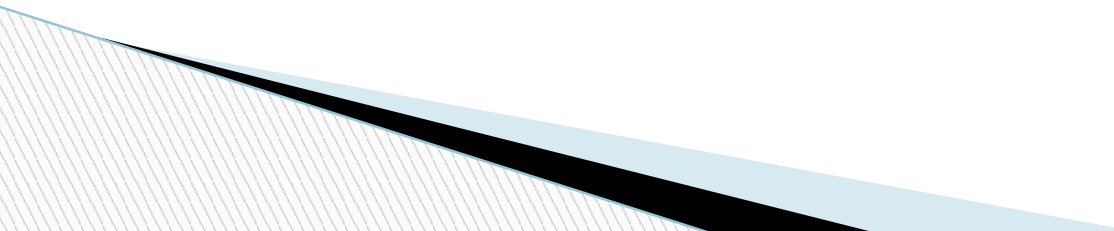
Регуляторные точки фаз клеточного цикла

- Б. регуляторная точка S – фазы функционирует в фазе S, когда реплицируется ДНК. Если произошли ошибки в репликации, и они были пропущены репаративными ферментами, клетка не может выйти из S – фазы
- В. Регуляторная точка G₂ – фазы – нереплицированная ДНК блокирует переход клетки от G-фазы к M-фазе

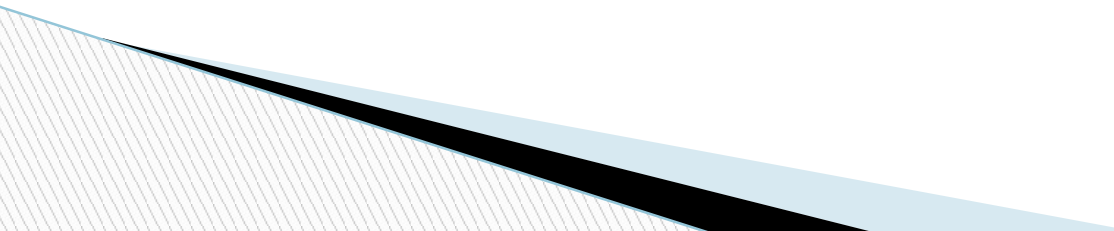
Типы повреждения ДНК

- 1. изменение одного основания –
 - Депуринизация
 - Замена цитозина на урацил
 - Замена аденина на гипоксантин
 - Алкилирование оснований
 - Вставка или делеция нуклеотида
 - Встраивание аналогичного основания
- 

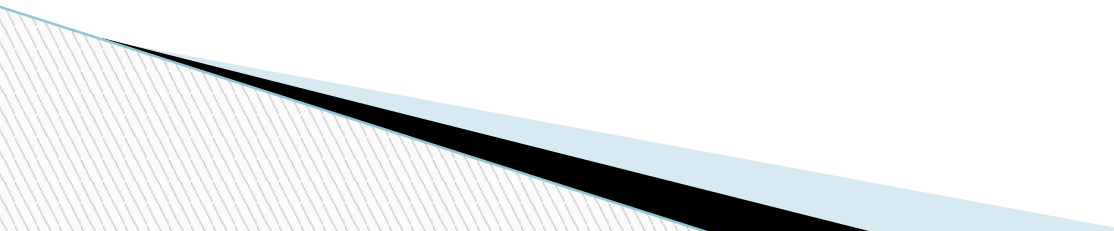
Типы повреждения ДНК

- 2. изменение двух оснований
 - Индуцируемое УФ образование димеров тимина
 - Поперечная связь с бифункциональным алкилирующим агентом
 - 3. разрушение цепи
 - Ионизирующее излучение
 - Радиоактивное разрушение элементов остова
- 

Типы повреждения ДНК

- 4. поперечные связи
 - Между основаниями одной нити или двух параллельных нитей
 - Между ДНК и белковыми молекулами (например, гистонами)
- 

Белки, ингибирующие комплексы Cdk2-циклин

- Существует 2 основных семейства ингибиторов:
 - Семейство p21
 - Семейство p15 и p16
- 

Белки, ингибирующие комплексы Cdk-циклин

- Семейство p21 включает 3 белка, кодируемых разными генами: p21, p27, p57
- Эти белки содержат гомологичные N-концевые участки, взаимодействующие с комплексами Cdk-циклин
- P21 – это, во-первых, Cdk-связывающий белок, который активируется в стареющих клетках, и, во-вторых, продукт гена, индуцируемого опухолевым супрессором p53

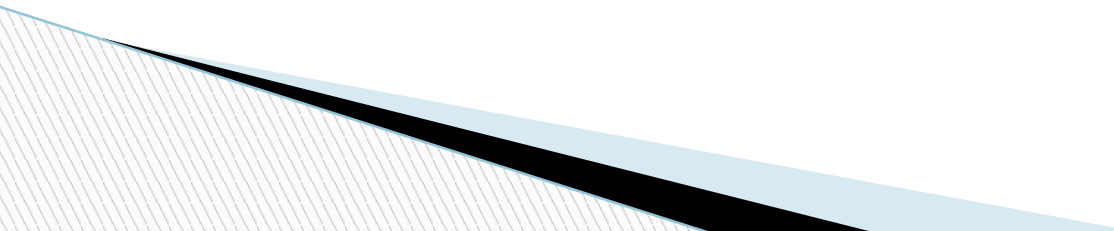
Белки, ингибирующие комплексы Cdk-циклин

- ▣ p21 ингибирует множество различных комплексов Cdk-циклин, блокируя их взаимодействие с субстратом (экспрессия p21 регулируется с помощью p23)
- ▣ P27 опосредует контактное подавление клеточного роста, которое вызывает выход клеток из клеточного цикла (когда достигнута критическая плотность клеточной популяции, клетки перестают делиться), межклеточные контакты стимулируют экспрессию p27

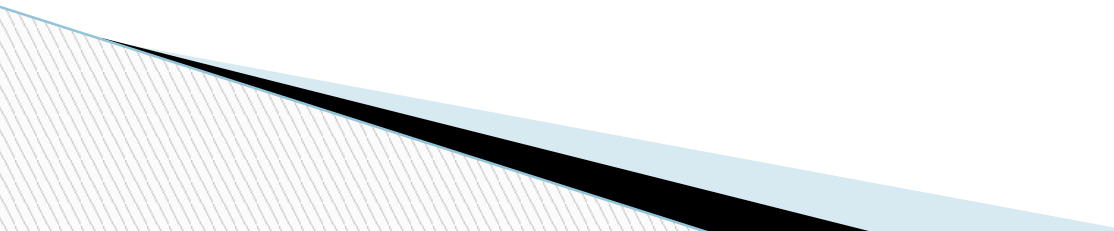
Семейство ингибиторов p15 и p16

- P15 и p16 являются медиаторами задержки пролиферации, вызванной антиростовыми факторами (например, трансформирующий фактор роста- TGF- β)
- P15 и p16 взаимодействуют с Cdk4 и Cdk6, эти ингибиторы могут нарушать связывание с циклинами D (нарушение экспрессии p15 часто наблюдается при меланоме)

Факторы роста

- ▣ Тромбоцитарный фактор роста
 - ▣ Эпидермальный фактор роста
 - ▣ Фактор роста фибробластов
 - ▣ Фактор роста нервов
 - ▣ Эритропоэтин
 - ▣ М
 - ▣ ИЛ-2, ИЛ-3 и пр.
- 

Роль фазы G0 и генетического переключения

- Большинство клеток млекопитающих находятся в особой фазе клеточного цикла G0, это удлиненная фаза G1
 - Гены, кодирующие белки, которые запускают пролиферацию клеток, находятся в «выключенном» состоянии
 - В этом положении метаболическая энергия клетки расходуется на образование специализированных белков, необходимых для осуществления дифференцировки
- 

Роль фазы G0 и генетического переключения

- В большинстве клеток гены пролиферации могут быть включены снова; в клетках сердечной мышцы и нейронах Cdk и циклины не включаются
- Гены, чьи продукты участвуют в регуляции клеточной пролиферации, называют протоонкогенами (в ходе мутаций этих генов протоонкоген становится онкогеном)

Примеры онкогенов

онкоген	Форма рака
C-raf	Рак легкого
C-kit	Рак легкого
C-myc	Лимфома
N-myc	Неробластома
K-ras	Рак толстой кишки
erbA	лимфома

Гены-онкосупрессоры

ген	Функция белка	Заболевание
p53a	ДНК-связывающий белок	Все виды рака
APC	Молекулы клеточной адгезии катенин - β	Семейный аденоматозный полипоз
NF1	G-белок нейрофибромин	Нейрофиброматоз 1

Сигнальный механизм Ras-белка

- ▣ Основным ферментом тирозинкиназного каскада является Ras-белок – небольшая (21 кДа), связанная с мембраной ГТФаза, Ras-белок играет роль «молекулярного переключателя»
- ▣ Он активирует молекулы, влияющие на клеточную пролиферацию

Сигнальный механизм Ras-белка

- ▣ Ras находится в активном состоянии, контактируя с ГТФ, и в неактивном состоянии, контактируя с ГДФ. Активация Ras обеспечивается белком SOS (фактор, обменивающий гуаниннуклеотиды, - заменяет ГДФ на ГТФ в Ras-белке; затем Ras взаимодействует со 2-ым белком GAP (белок, повышающий ГТФ-азную активность) и инактивируется

Этапы сигнального каскада, приводящего к активации Ras

- Фактор роста связывается с RPTK-рецептором
- Димеризация рецептора и самофосфорилирование рецепторных остатков тирозина
- SH2-домен Grb2-белка связывается с фосфорилированным тирозином
- Связывание вызывает конформационные изменения GRB2-белка и его SH3-участок связывается с SOS
- SOS взаимодействует с мембраносвязанным Ras-белком, превращая ГДФ в ГТФ и активируя таким образом Ras

Механизм действия MAP

- Установлено, что Ras инициирует серию реакций, в результате которых активируются другие внутриклеточные киназы, вызывающие клеточное деление
- Этот механизм называется киназным митогенактивирующим механизмом (MAP), действует во всех клетках организма (его нарушение приводит к развитию опухолей)

Каскад MAP

- Активированный Ras взаимодействует с внутриклеточной серин-треонин-киназой Raf-1 (первый компонент ферментного каскада)
- Активированный Raf-1 активирует другую киназу, которая фосфорилирует остатки тирозина, серина, треонина, MEK или MAP2K

Каскад MAP

- Далее активируются киназы, контролирующие циклины, и циклинзависимые киназы
- Ras - Raf-1 – MAP2K
- Белок MAP2K уникален в том смысле, что он может самостоятельно фосфорилировать регуляторные остатки треонина и тирозина в своем субстрате – MAP2K фосфорилирует в молекуле MMAPK тирозин-185 и треонин-183, а затем инактивируется специфической фосфатазой

Каскад MAPK

- ▣ MAPK-семейство включает 3 изоформы (MPK, Erk-1, Erk-2), которые могут активироваться в ответ на воздействие многих факторов роста и митогенов
- ▣ Активированная MAPK может фосфорилировать множество ядерных и цитоплазматических белков – это факторы транскрипции, регуляторные белки цитоскелета, компоненты пускового сигнального каскада (SOS, Raf-1, RPTK-рецепторы по принципу положительной обратной связи)

Каскад MAP

- Этот сигнальный каскад, запущенный фактором роста, является ведущим сигнальным механизмом клетки
 - Более 50 известных онкогенов кодируют белки, которые участвуют в каскадных реакциях, стимулирующих клеточное деление (белки – факторы роста, рецепторы факторов роста, факторы транскрипции)
 - В итоге, изменяется активность различных генов
- 