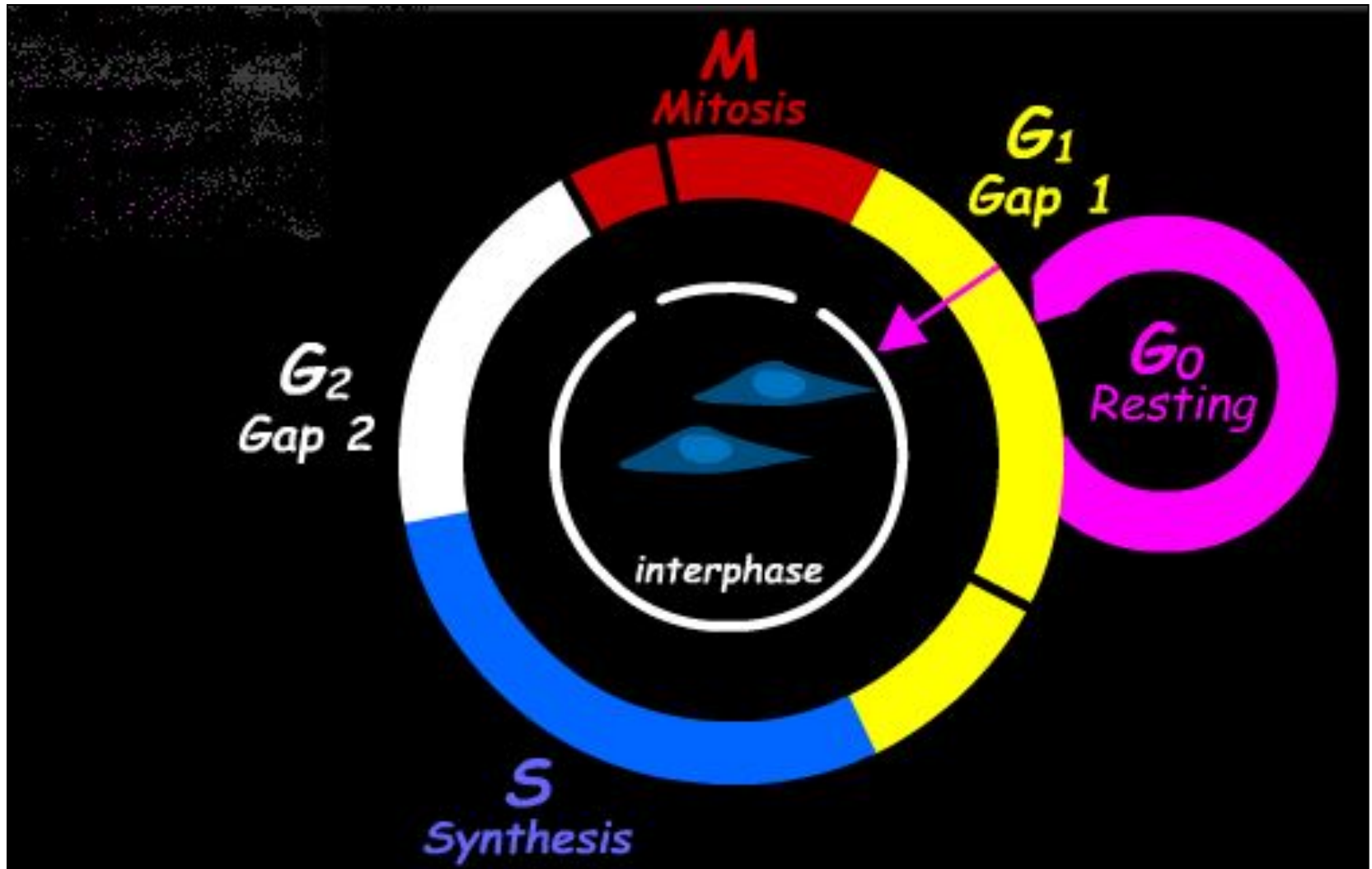


# **VI Регуляция клеточного деления**

## **1. Циклины и циклин- зависимые киназы**

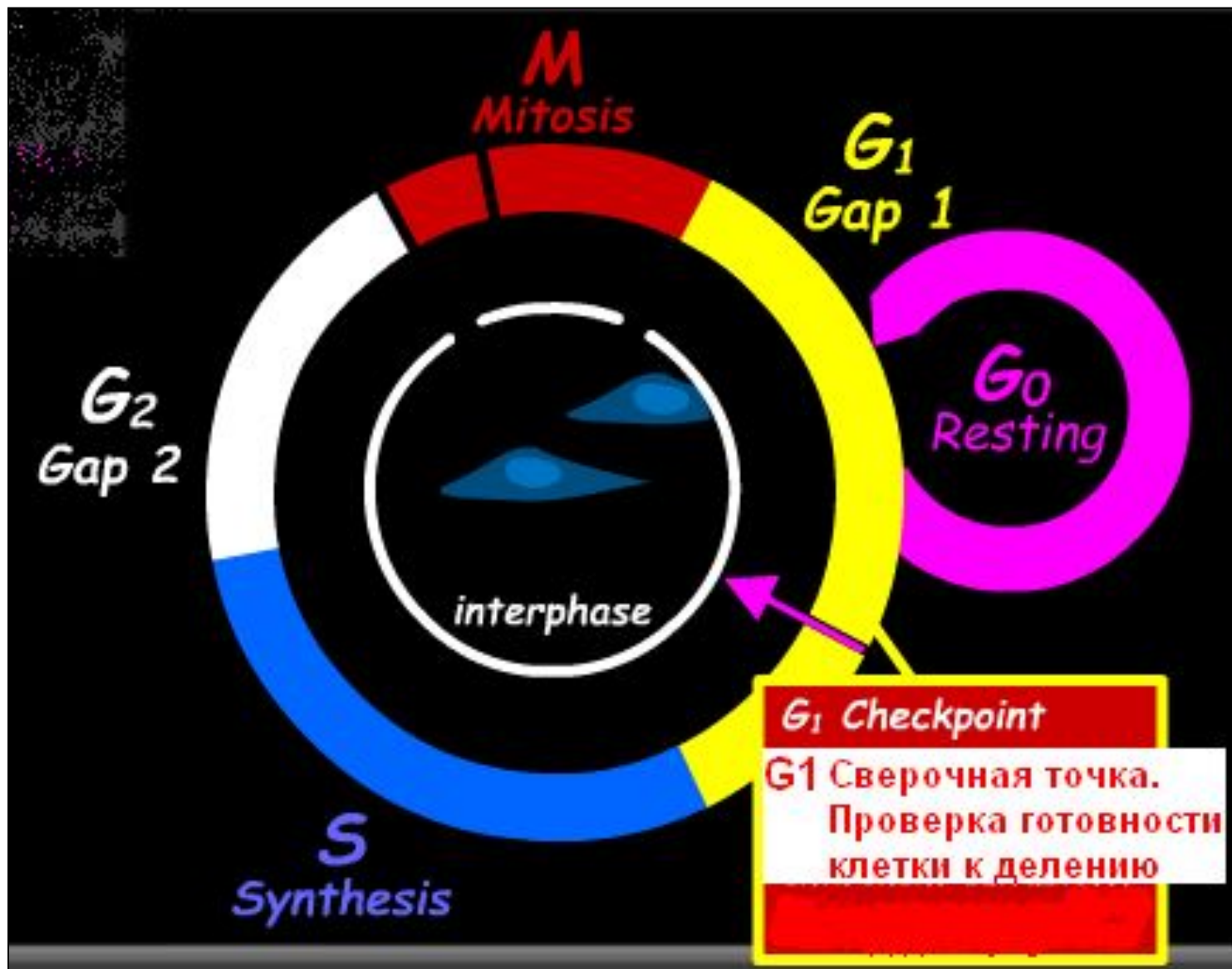
# Клеточный цикл



# Определение фаз КЦ

- Период между двумя делениями называется интерфазой. В клетках млекопитающих интерфаза длится от 12 до 24 часов. В это время в клетке постоянно синтезируется РНК, белки. Клетка увеличивается в размерах. Интерфаза делится на 4 периода: Gap (интервал) 0 (G0), Gap 1 (G1), S (synthesis) phase, Gap 2 (G2).
- **G1** фаза – период высокой метаболической активности и роста клетки между митозом и репликацией ДНК.
- **S** фаза – период синтеза (репликации ДНК). Количество ядерной ДНК увеличивается в два раза от  $2n$  до  $4n$ .
- **G2** фаза – период подготовки к митозу. Продолжается клеточный рост и синтез необходимых белков
- **M** фаза – деление клетки на две дочерние с уменьшением в них количества ДНК от  $4n$  до  $2n$ .

# Сверочные точки КЦ

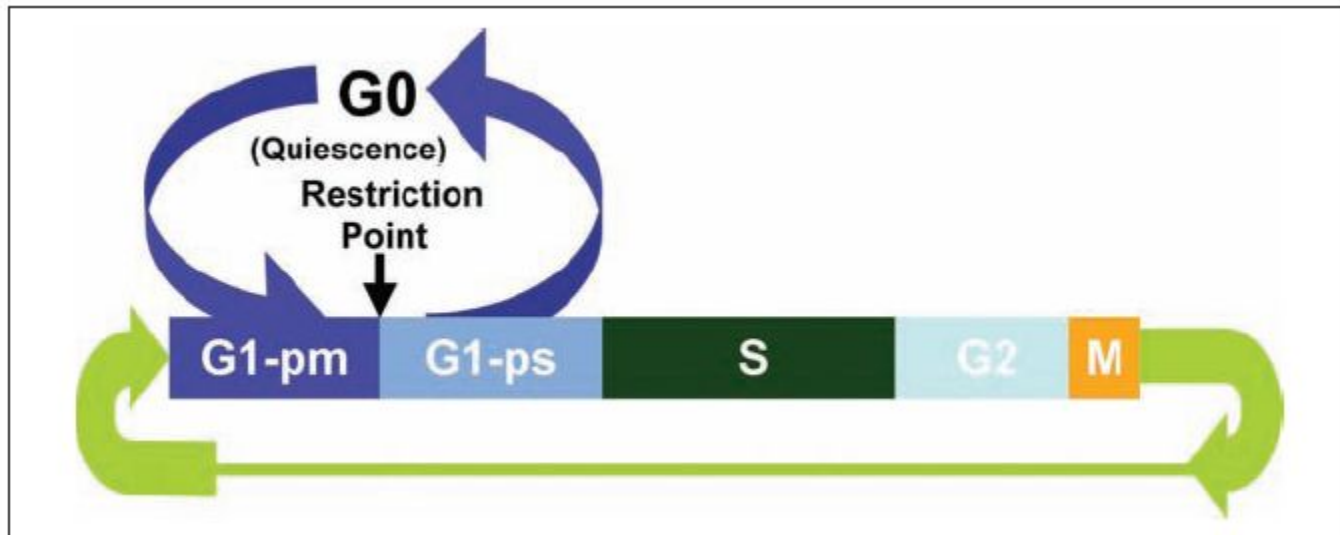


# G1-сверочная точка

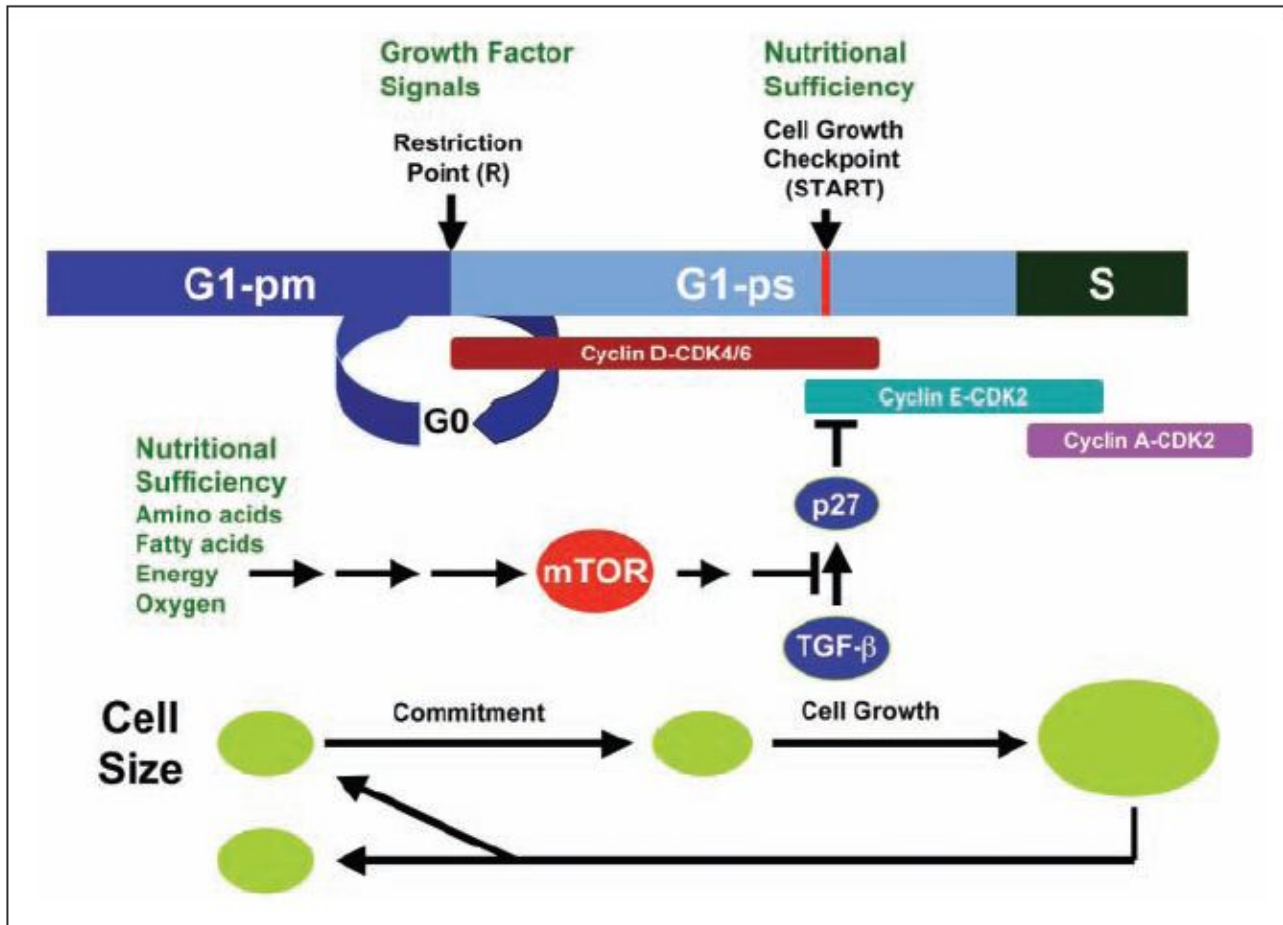
- Проверка повреждения ДНК
- Роль белка p53

# G1 сверхточные точки

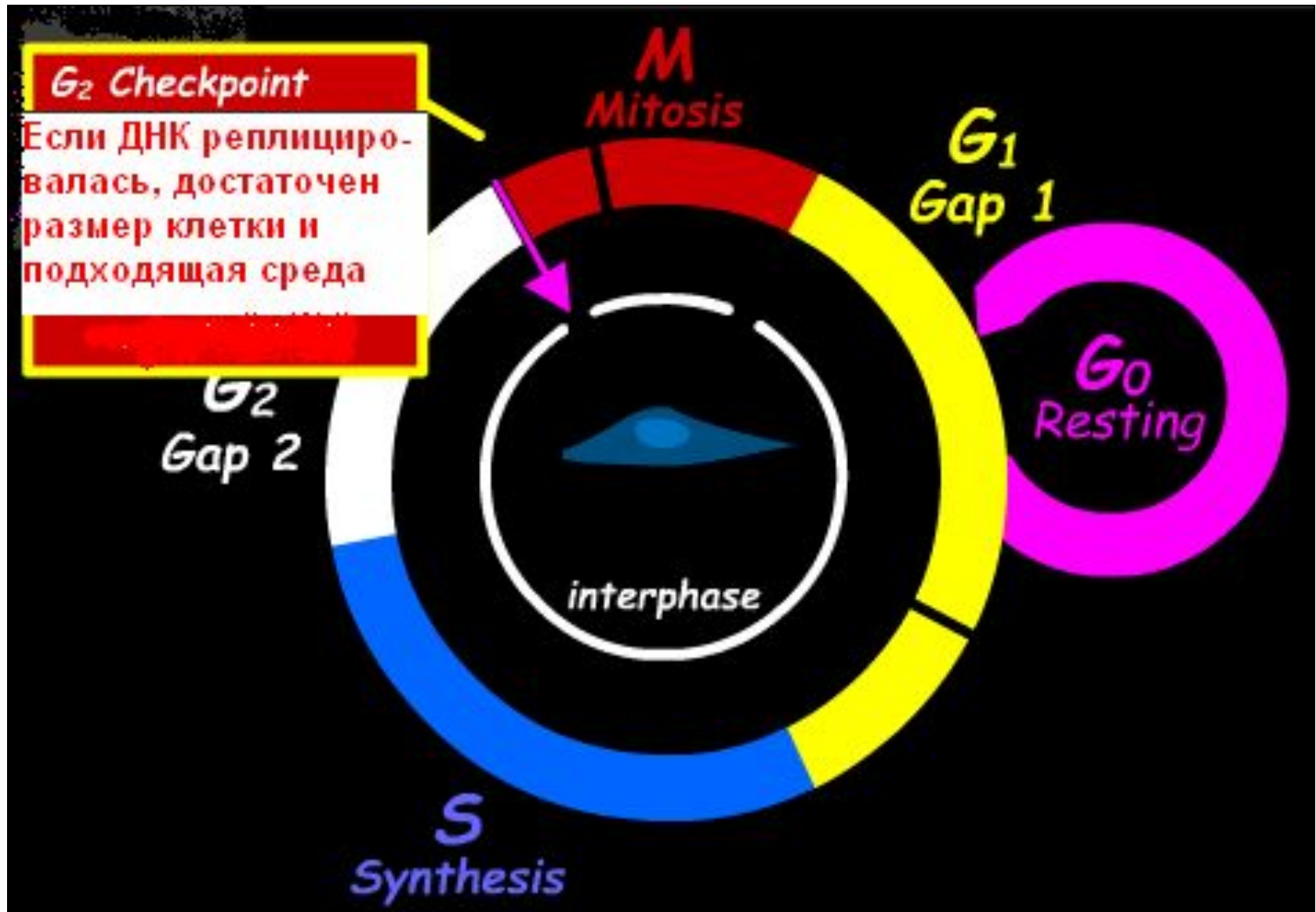
G1-postmitotic, G1-ps для G1-pre-S



# G1 сверхточные точки



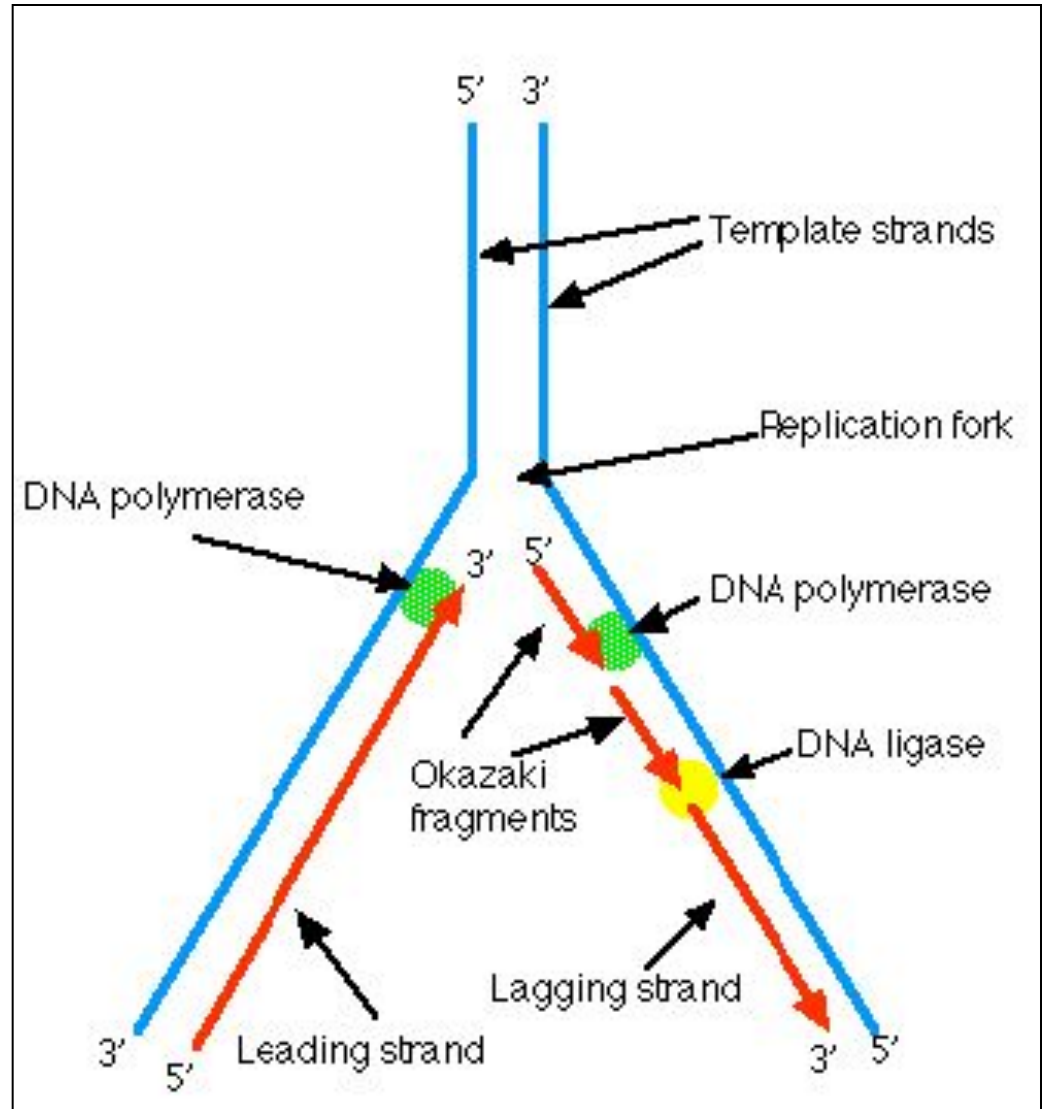
# Сверочные точки КЦ



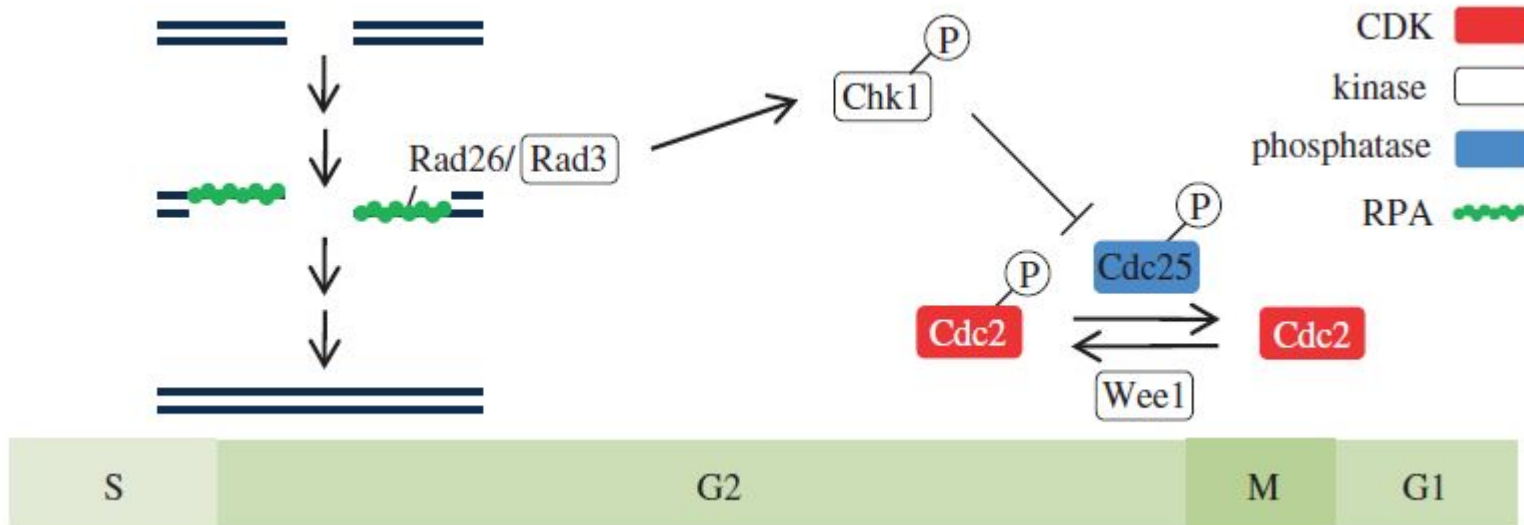


# Проверка завершенности S-фазы

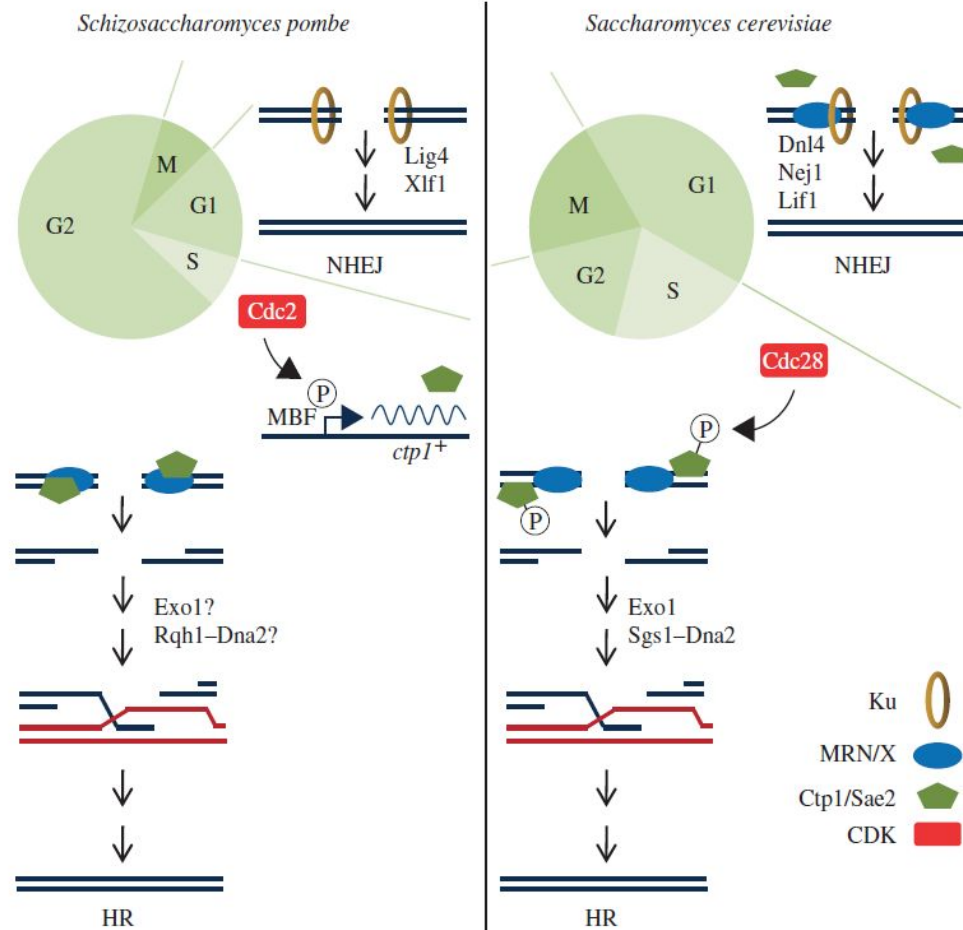
Клетка мониторится на присутствие фрагментов Оказаки



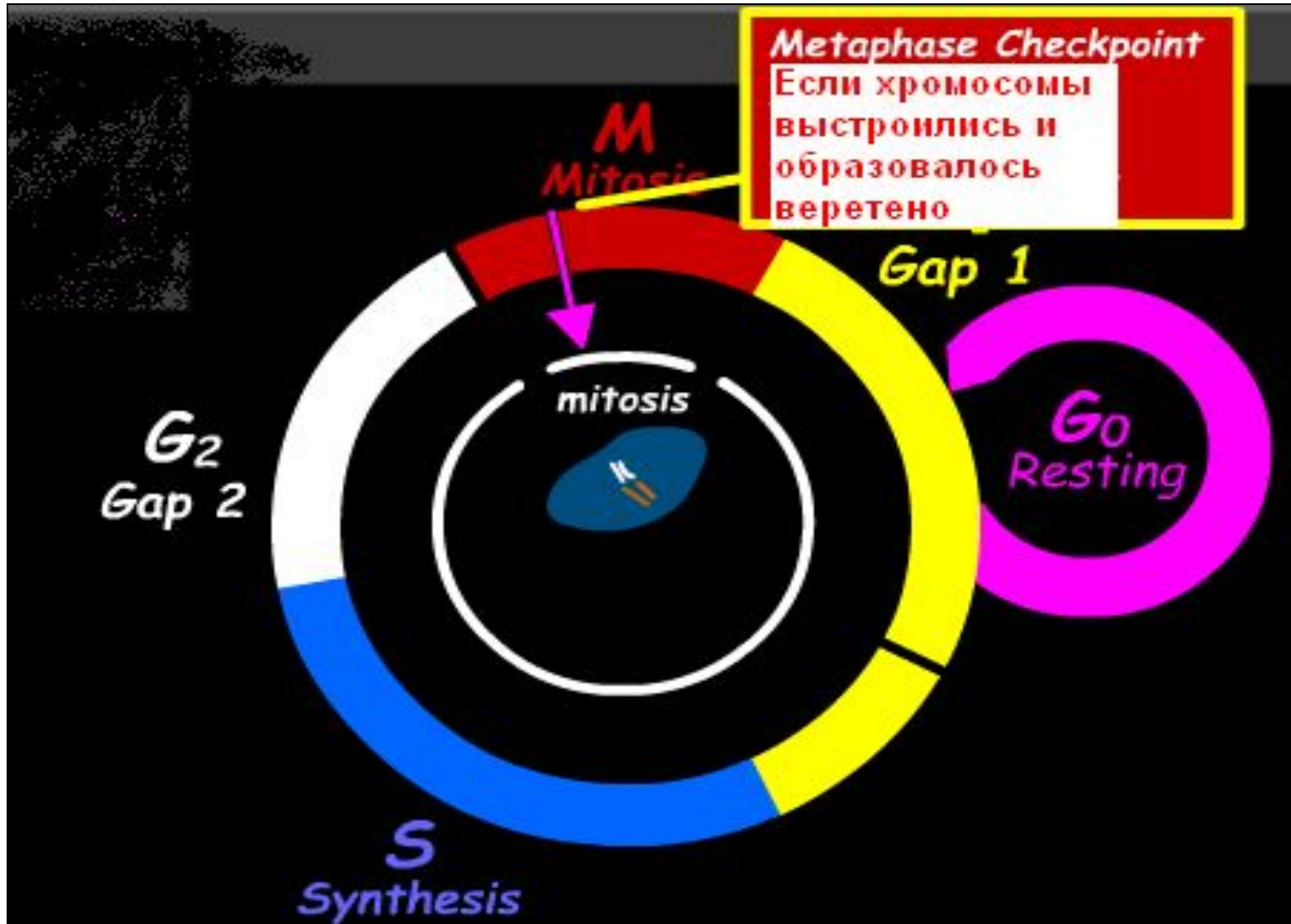
# Проверка повреждений ДНК (на примере дрожжей)-1



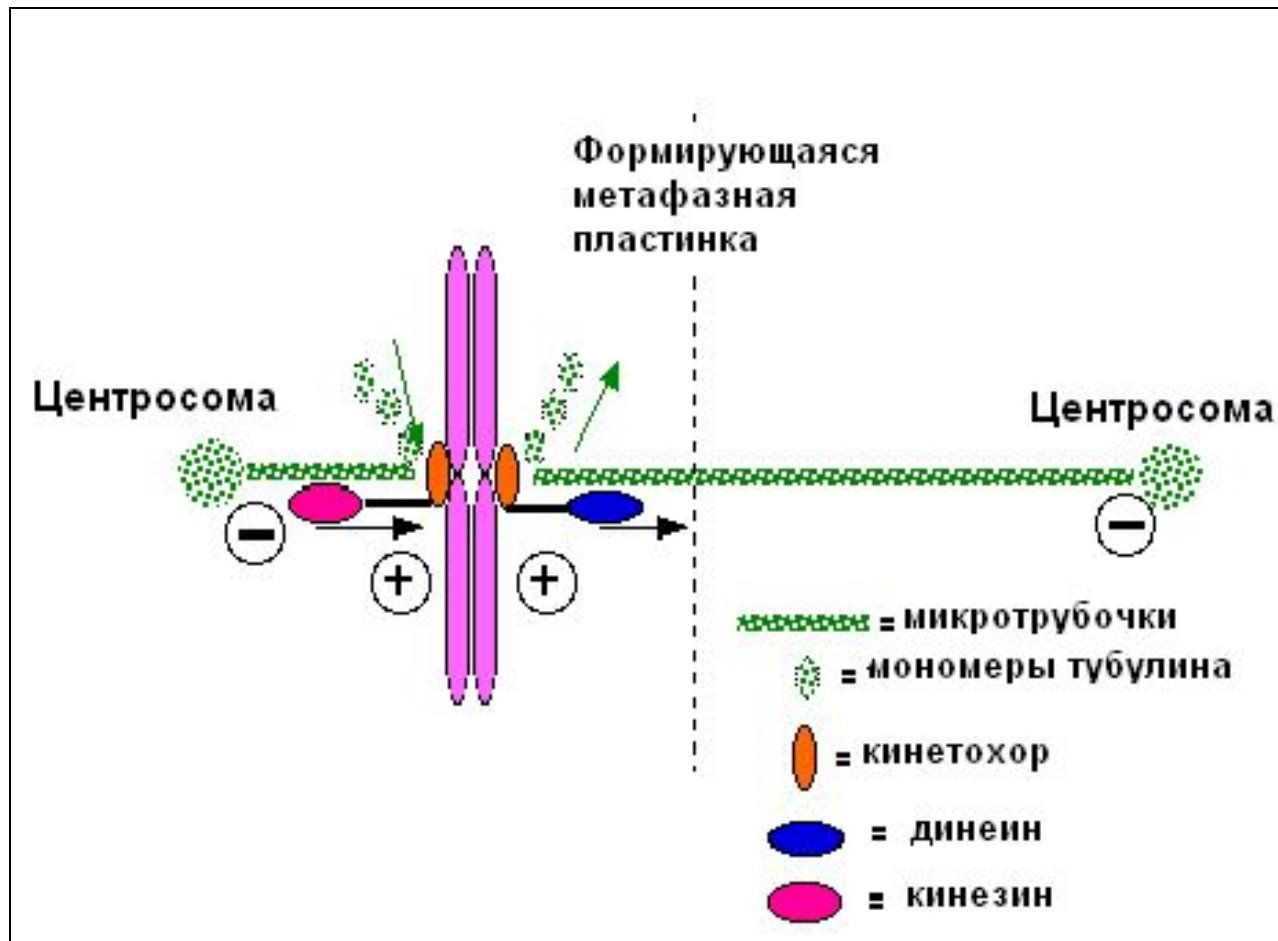
# Проверка повреждений ДНК (на примере дрожжей)-2



# Сверочные точки КЦ

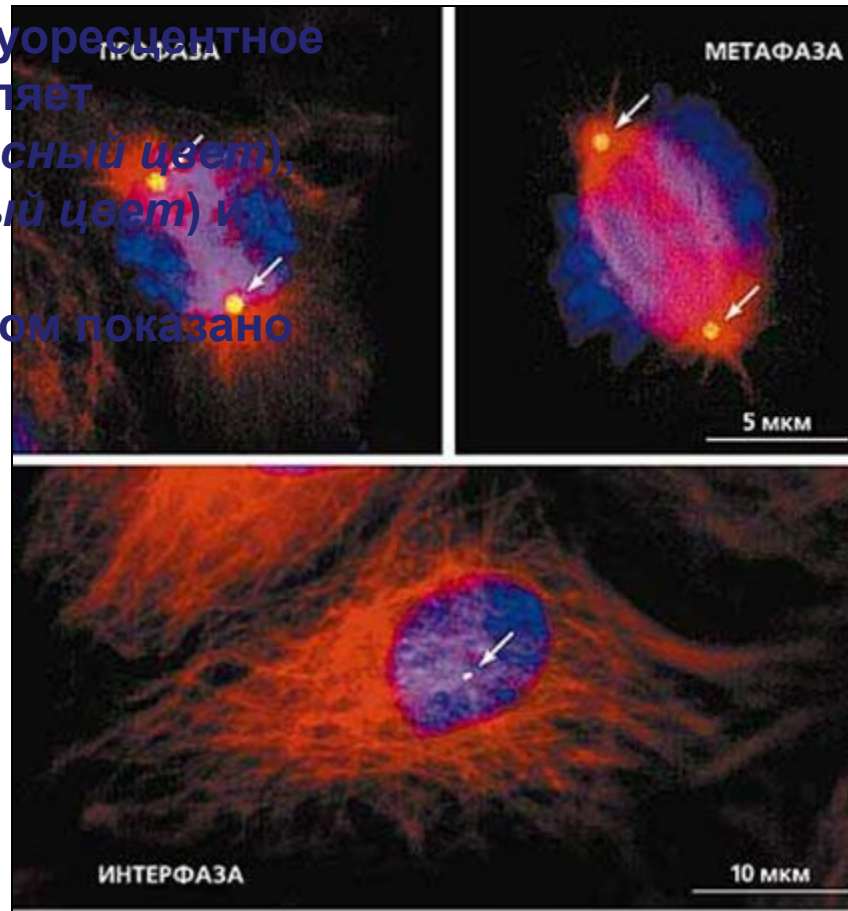


# Проверка веретена Формирование центросомы

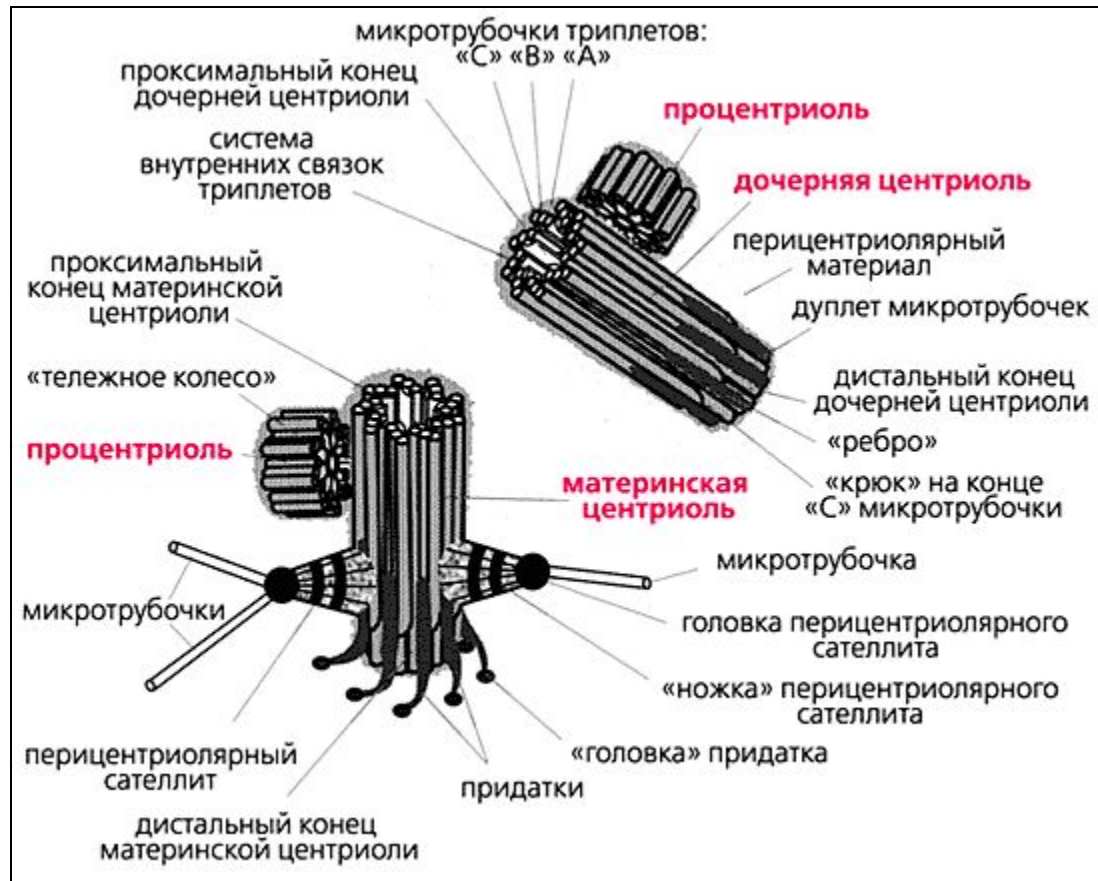


# Центросома и система микротрубочек в профазной, метафазной и интерфазной клетках

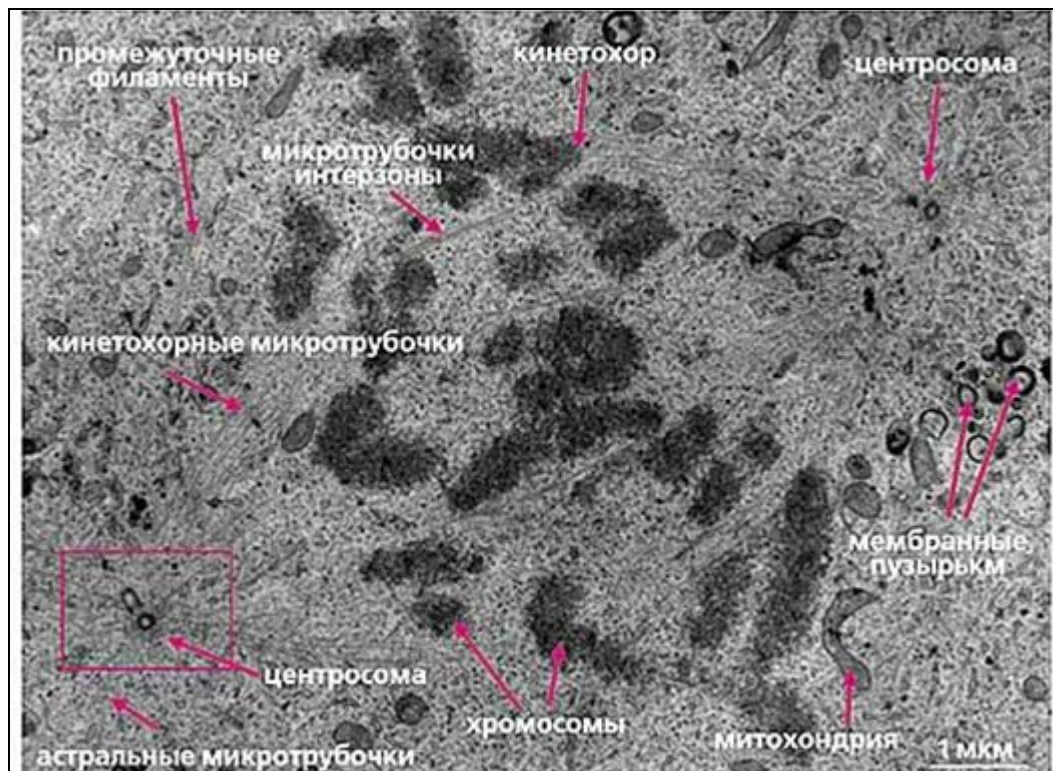
Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание выявляет микротрубочки (красный цвет), центросому (зеленый цвет) и ДНК (синий цвет). Положение центросом показано стрелками.



# Упрощенная схема строения centrosомы в интерфазных клетках млекопитающих в середине S-фазы клеточного цикла



# Ультраструктура centrosомы в митотической клетке млекопитающих

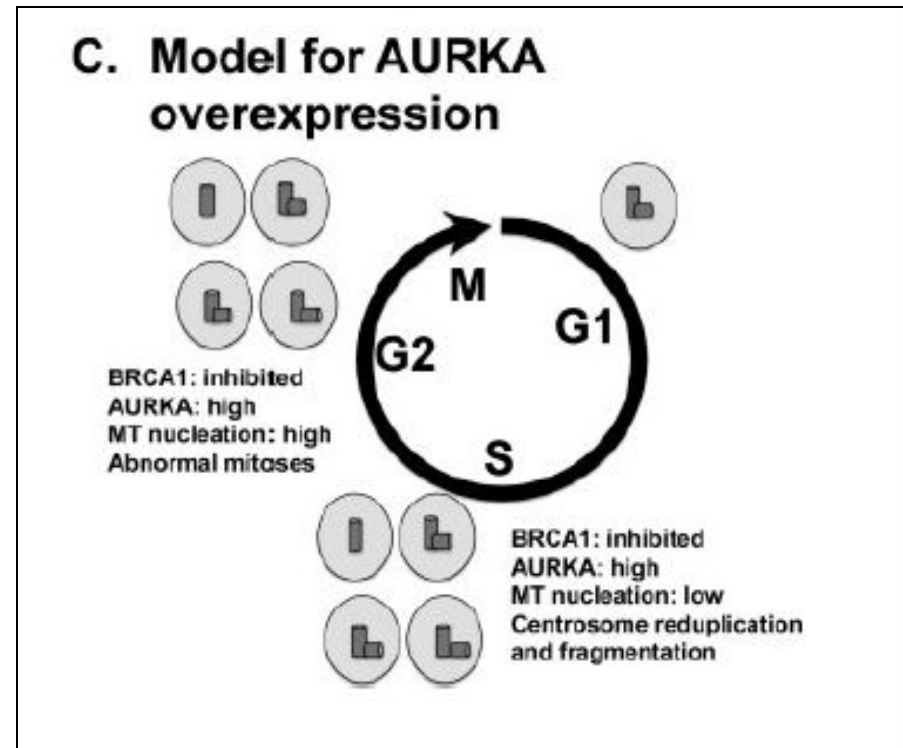
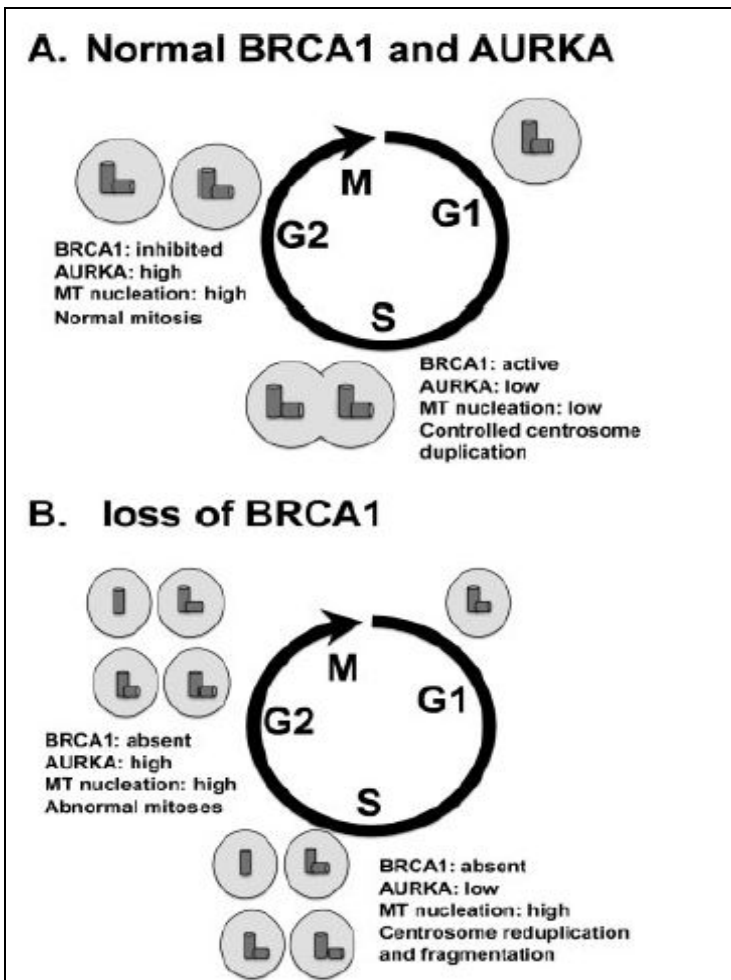




# Роль BRCA1 в формировании центросомы

- BRCA1 - обладает убиквитин-зависимой лигазной активностью. Контролирует локализацию гамма-тубулина в центросоме
- Активен в комплексе с белком BRCA1 associated ring domain (BARD1)
- AURKA фосфорилирует BRCA1, вызывая ингибирование убиквитин-зависимой лигазной активности BRCA1.

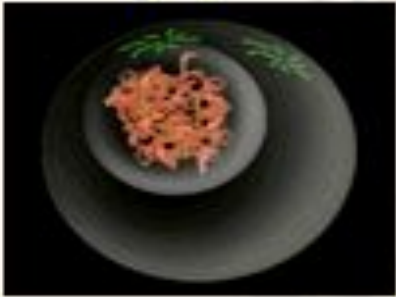
# Регуляция центросом BRCA1-зависимой убиквитиновой лигазой и Aurora A киназой



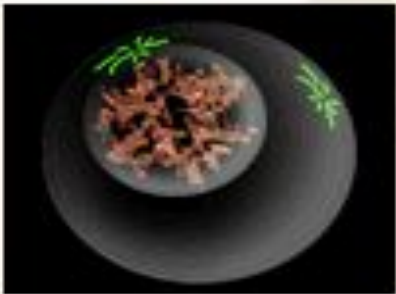
Результат потери функции BRCA1 и переекспрессии AURKA (60% РМЖ) – амплификация центросомы

# Фазы митоза

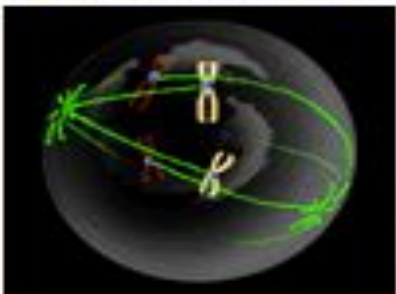
Интерфаза



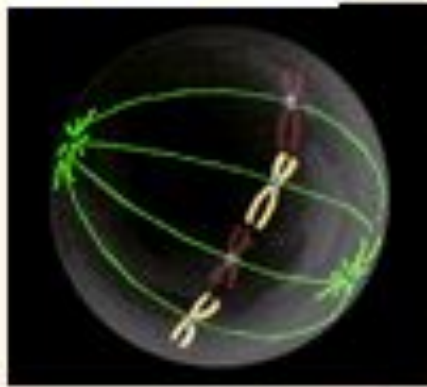
Профаза



Прометафаза



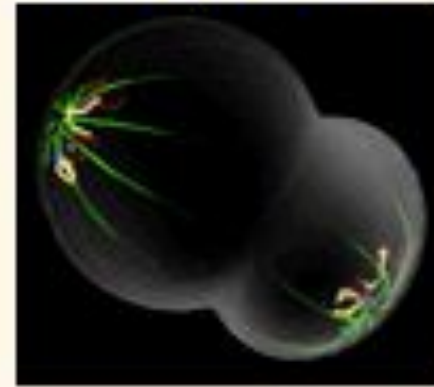
Метафаза



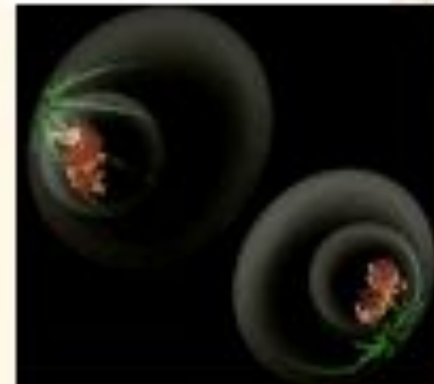
Анафаза



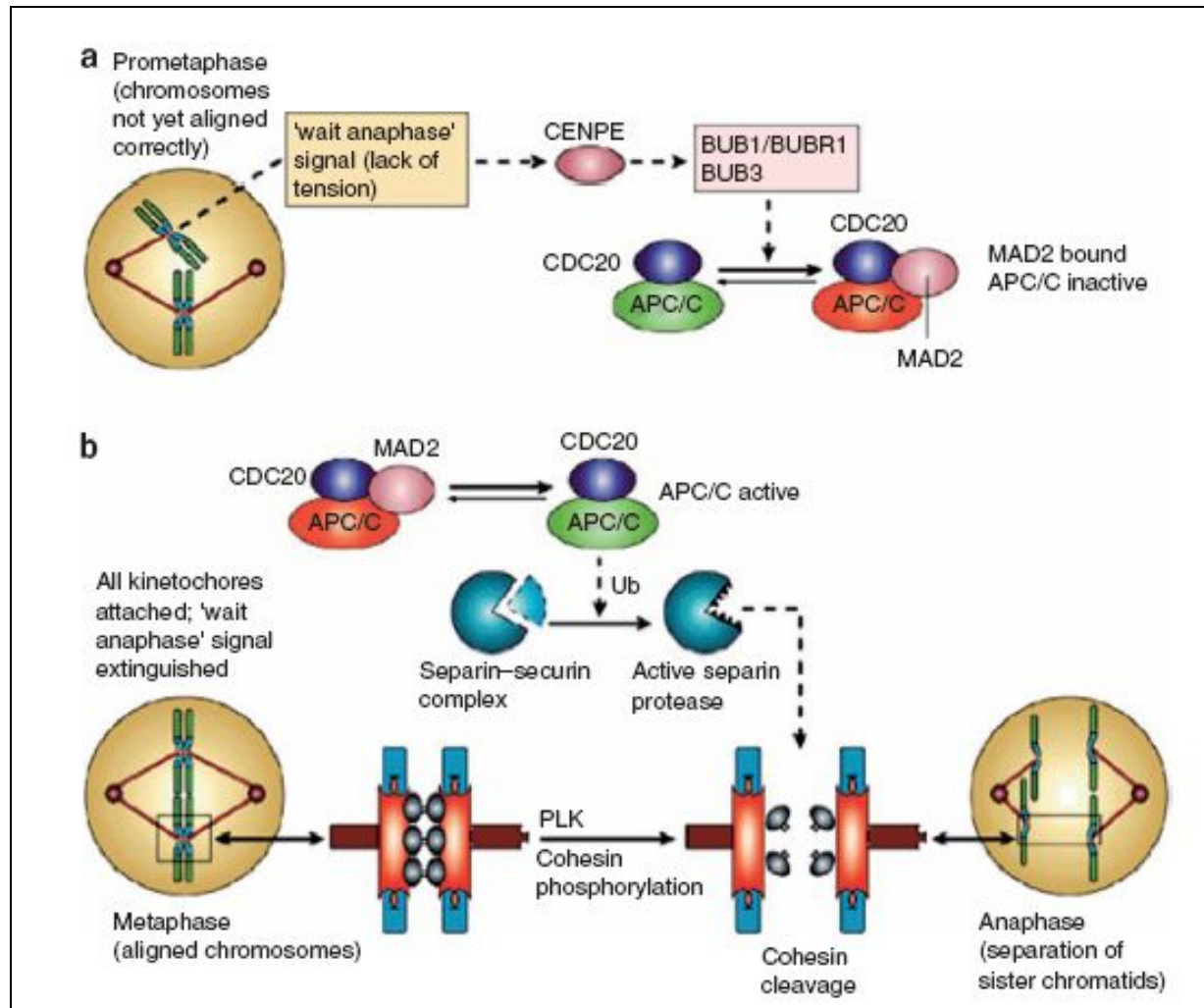
Телофаза



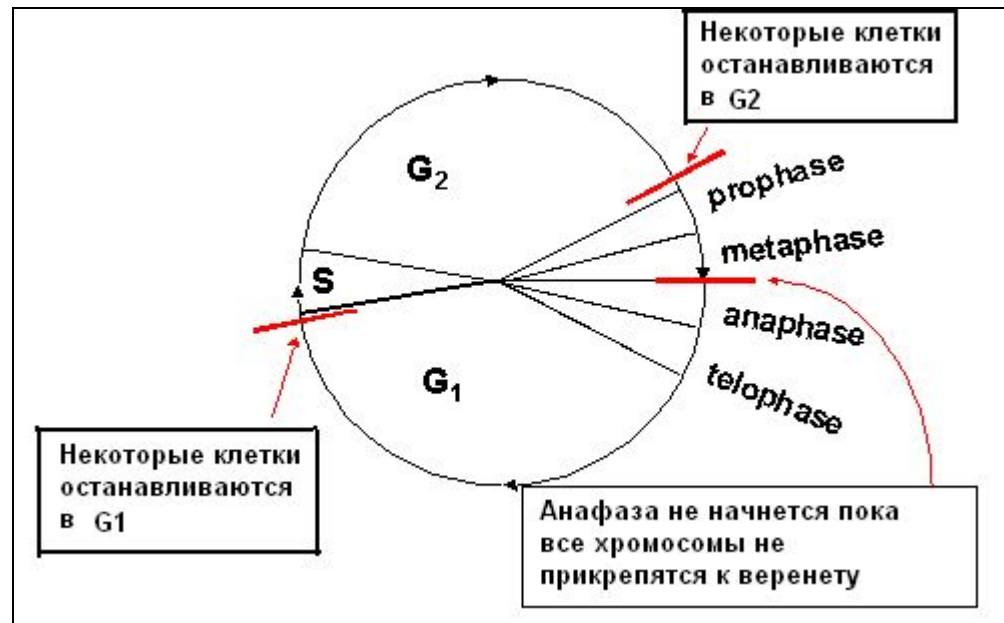
Цитокинез



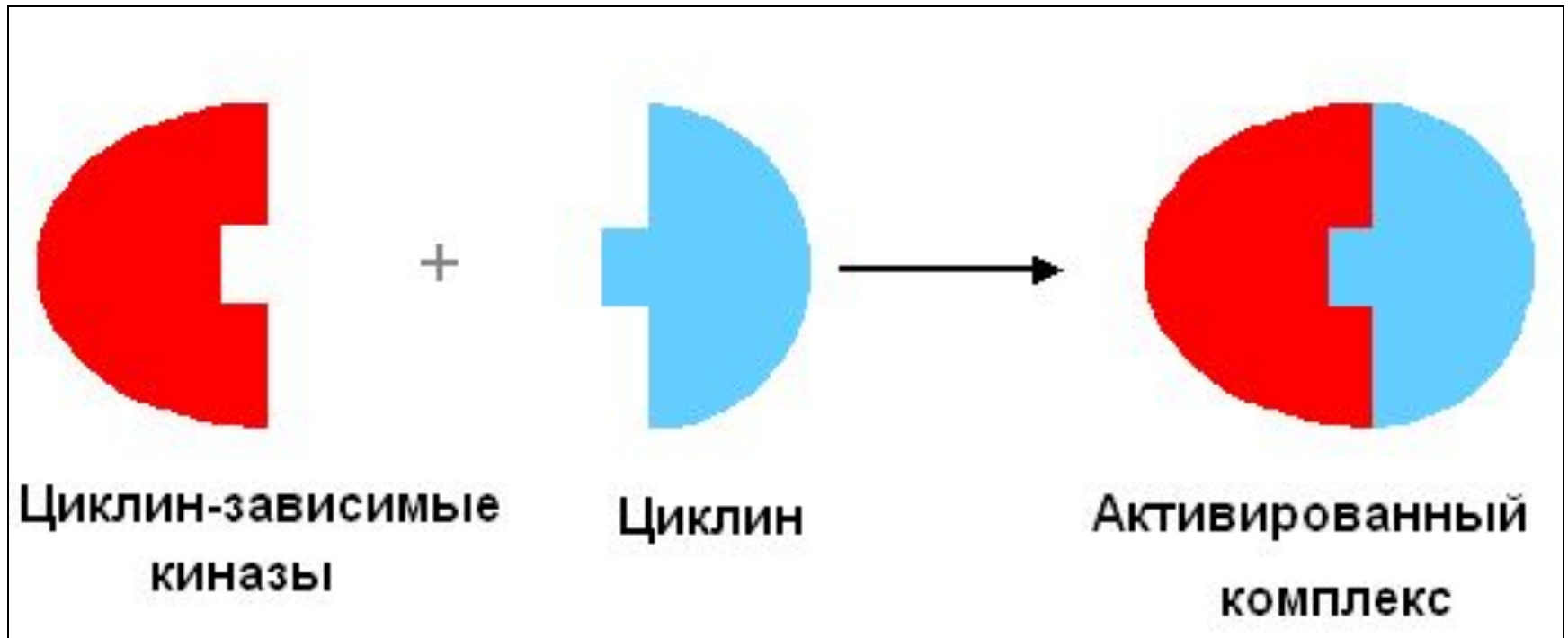
# Разделение сестринских хроматид



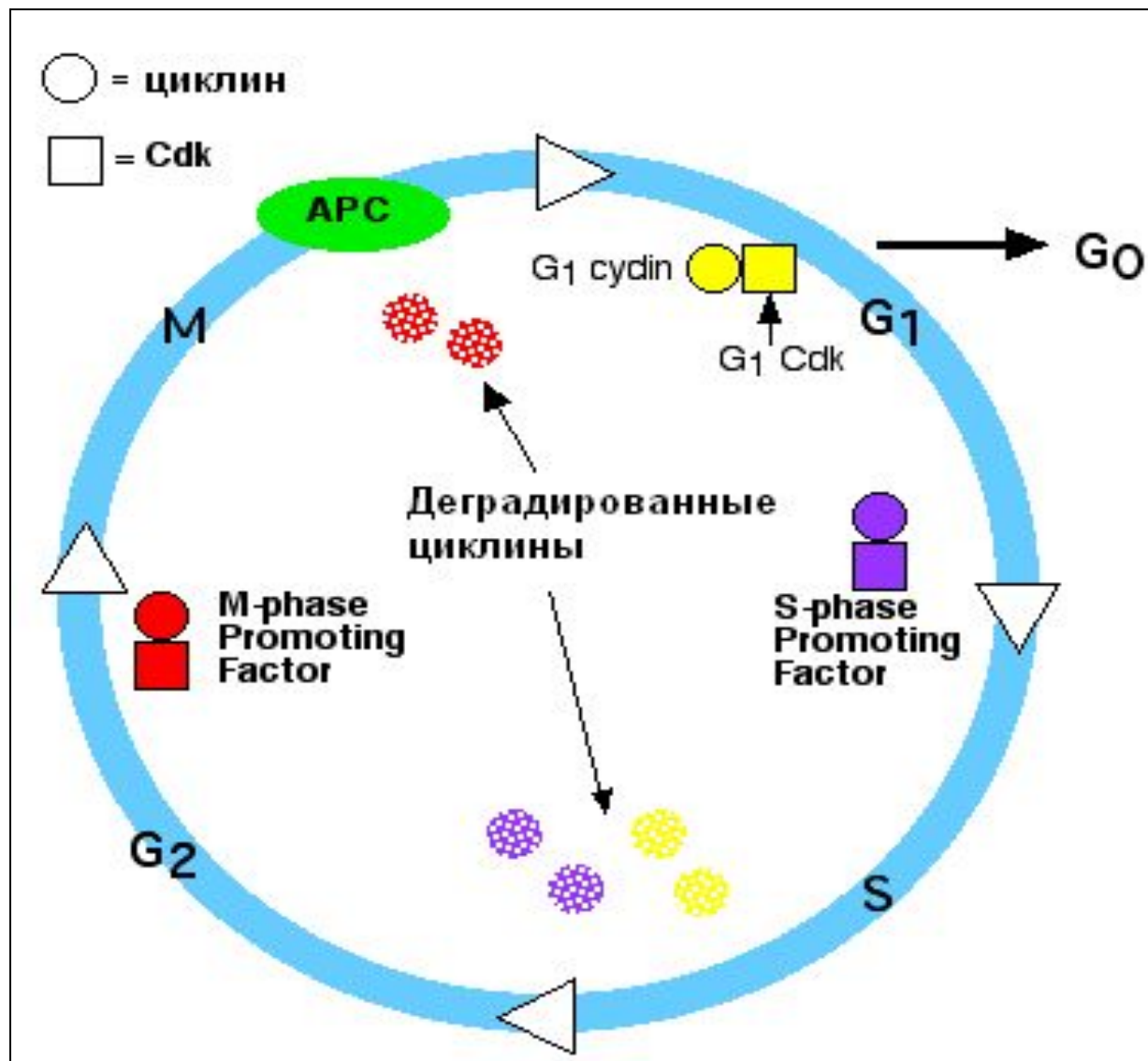
# Варианты КЦ



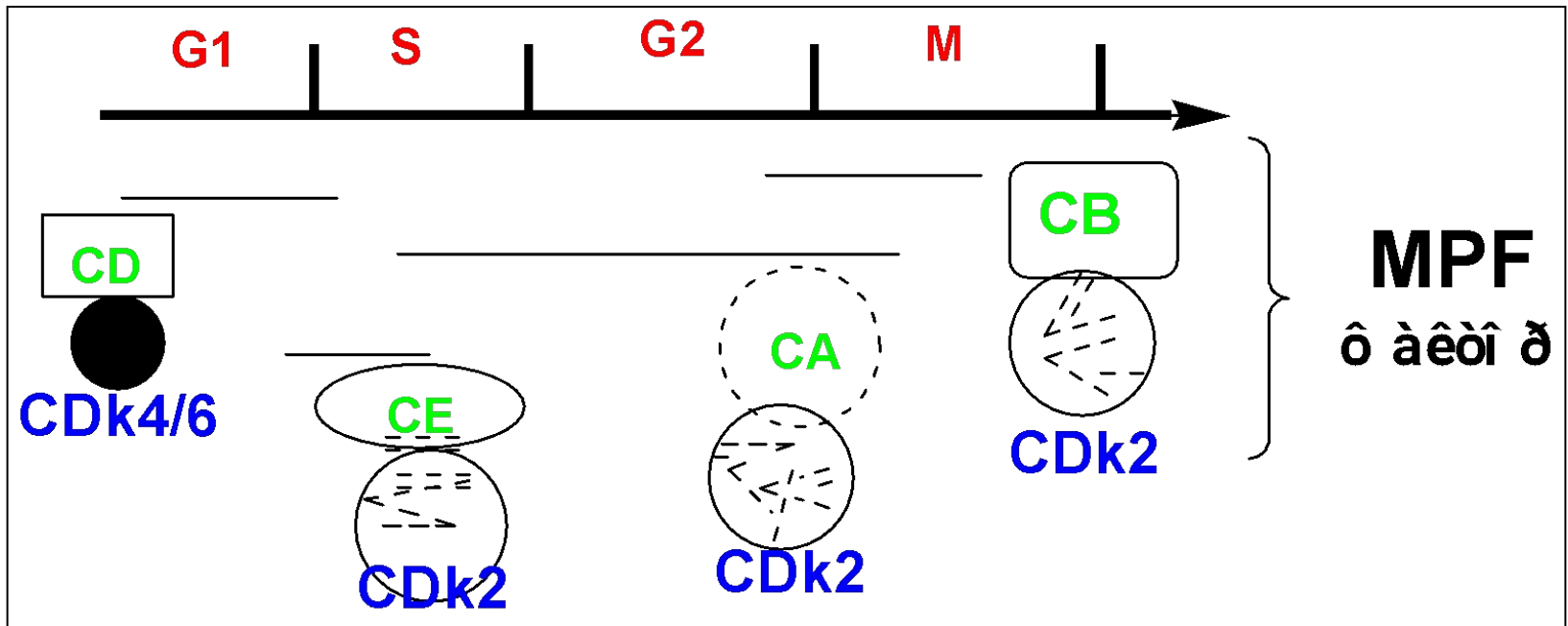
# Циклины и их киназы



# Циклины в КЦ

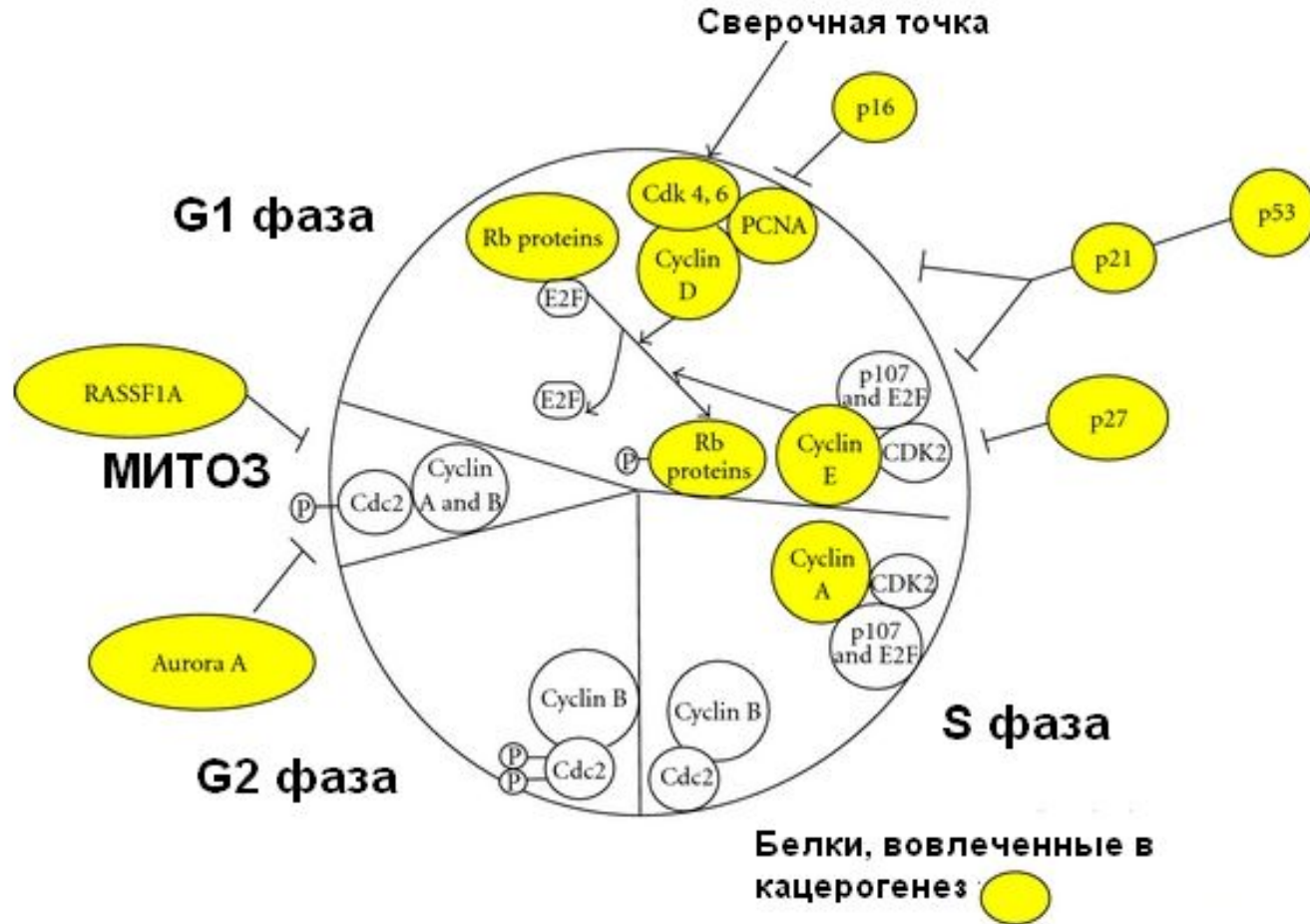


# Циклины и их киназы в КЦ

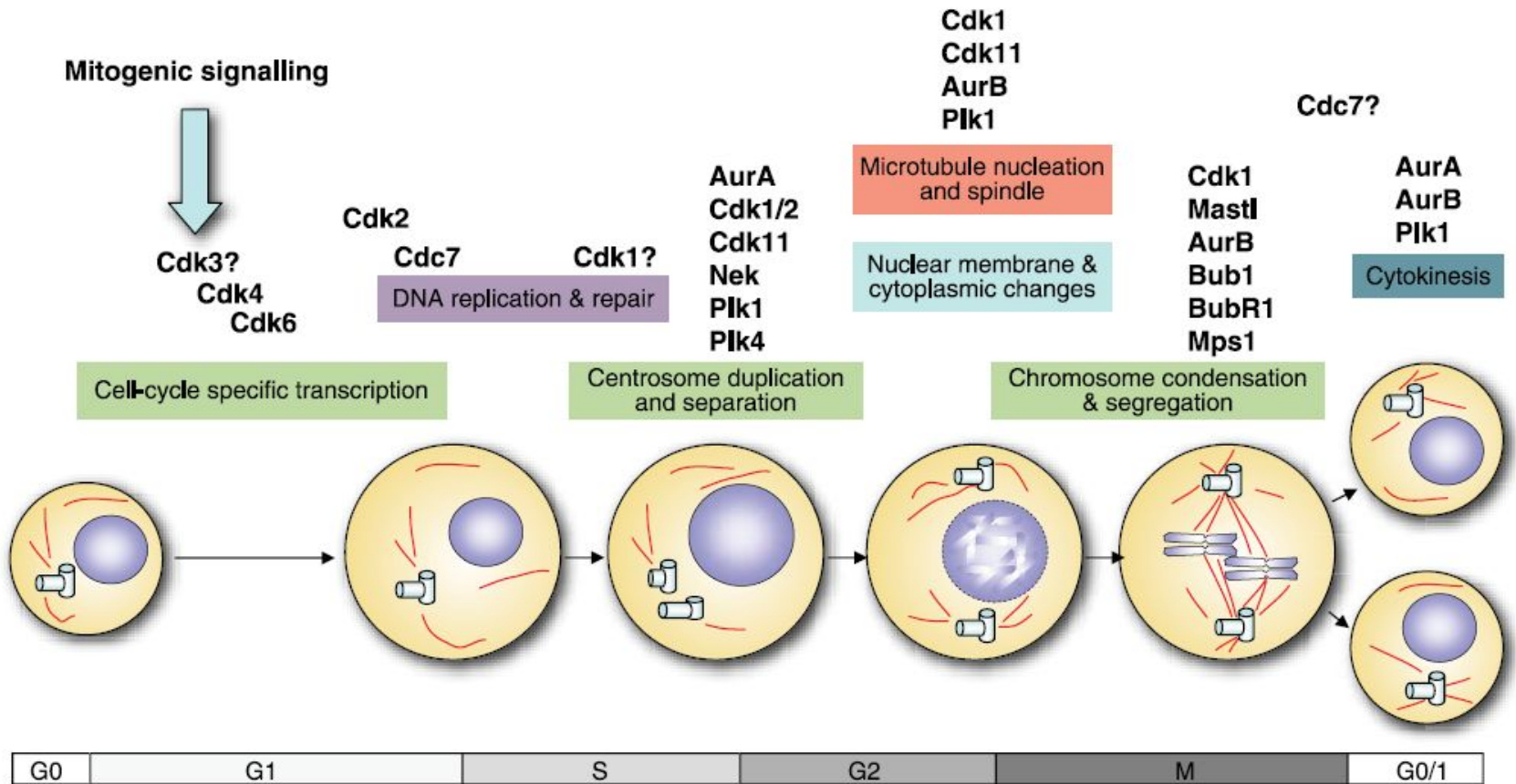




# Циклины в КЦ



# Киназы в регуляции КЦ



# Циклины и их киназы в КЦ

Циклины	Циклин-зависимые киназы (CDK)	Фаза КЦ
D <sub>1-4</sub>	2,4 (PSK-j3),6	G <sub>1</sub>
C	8 (K35)	G <sub>1</sub>
E <sub>1-2</sub>	2,4,5,6	G <sub>1</sub> /S
G <sub>1-2</sub>	ГAK (G-ассоциированная киназа)	G <sub>1</sub> /S
A <sub>1-2</sub>	1,2,3	S
A <sub>1-2</sub>	1,2,3	G <sub>2</sub> /M
F		G <sub>2</sub> /M
B <sub>1-3</sub>		M

# CDk, циклины и их субстраты-1

Обозначение	Функция	Регуляторный партнер	СУБСТРАТЫ
Cdk1	Mitosis (DNA replication and DNA damage, DNA repair)	<i>Cyclin-dependent kinases</i> Cylins A, B (D and E)	Actopaxin, adenomatous polyposis coli, Aki1 Amphiphysin 1, Anaphase Promoting Complex, Ase1, BARD1, Bcl-2, caldesmon, caspase-2, caspase-9, Cdc7, Cdc20, Cdc25A, Cdc25 C, Cdh1, Cdk7, C/EBPβ, CK II, CtlP, dynein, dystrophin, EF-1, Eg5, EGFR, ERK-3, FANCG, Fos, FoxM1B, FoxO1, GBF-1, GFAP, GM130, GRASP65, histone H1, hHR6A, HMG-I(Y), IFAP300, KRC, lamins A, B, and C, lamin B receptor, Lats1, MAP1B, MAP4, Map205, Marcks, MCM2, MCM4, MKLP1, Myb, Nedd1, NBP60, neurofilament H, NF-I, Nir2, NO38, nuclear pore complex, nucleolin, Nucks, numatrin, Orc1, p18, p47, p53, p54NRB, PAP, PHF8, plectin, PP1-I2, pRb, R2, Rab4, Rap1GAP, Raptor, RCC1, Rllalpha, RunX2, S6K1, Sam68, Securin, Separase, SIRT1, Ski, survivin, mSTI1, Tau, TMAP(CKAP2), vimentin, Vsp34, thymidine kinase, 53BP1
Cdk2	G <sub>1</sub> /S transition, DNA damage, DNA repair	Cyclins E and A (also D), PCAF	ATRIP, BARD1, B-Myb, BRCA1, CBP/p300, Cdc6, Cdc7, Cdk7, Cdt1, C/EBPβ, DP1, hHR6A, HIRA, Ku70, Marcks, MCM2, MCM4, MyoD, NPAT, nucleophosmin (B23), p107, p21Cip1, p27Kip1, p53, pRb, R2,

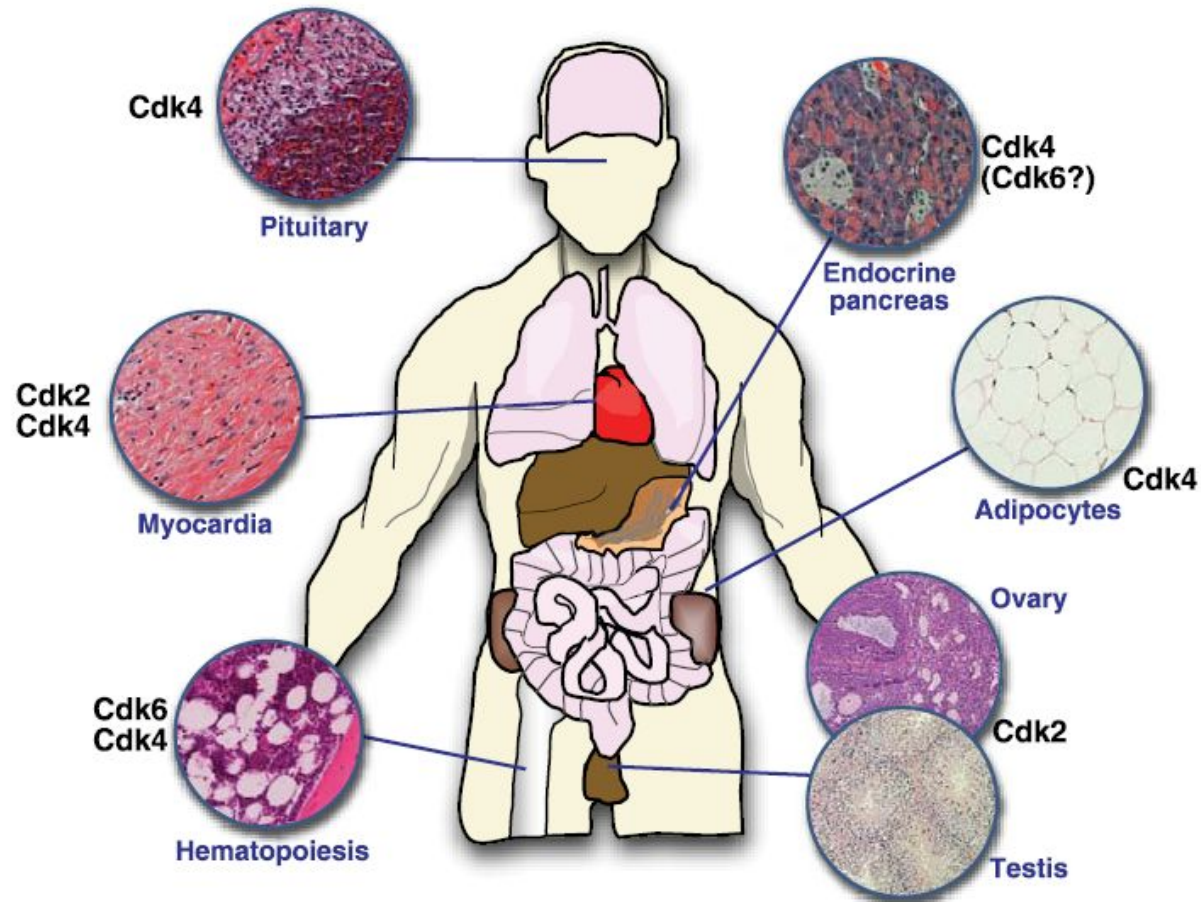
# CDk, циклины и их субстраты-2

Cdk3		Not clear	Cyclins E, A, and C, Cables	Cables 1, c-Jun
Cdk4	PSK-J3	G <sub>1</sub> /S progression	D-type cyclins	Cdt1, Marcks, p107, p130, pRb, Smad3
Cdk5	TPKII	Neuron biology, senescence	p35, p39, cyclins D, E, and I	AATYK1, Amphiphysin 1, Ape1, $\beta$ 2-Syntrophin, Cdh1, Disabled1, Doublecortin, eNOS, Munc18a, Nude, p53, PSD-95, Sds3, Stat3, Synapsin 1, tyrosine hydroxylase, Vsp34
Cdk6	PLSTIRE	G <sub>1</sub> /S progression	D-type cyclins	p107, p130, pRb
Cdk7	CAK, MO15, STK1	Cdk-activating kinase, transcription	Cyclin H	Cdk1, 2, 4, 5, 6, RNA pol II COOH-terminal domain
Cdk11	CDC2L2, CDC2L3	Transcription, splicing, centriole biology and cytokinesis	Cyclin D3, L1, L2	eIF3, Pak1, RanBPM
<i>Aurora kinases</i>				
AurkA	Ark1, Btak, Stk15, Stk6, Stk7	Centrosome and spindle function	Ajuba, Arpc1b, PAK1, Tpx2	Arpc1b, BRCA1, CENP-A, CPEB, Eg5, Histone H3, LATS2, Ndel1, N-Myc, p53, TACC

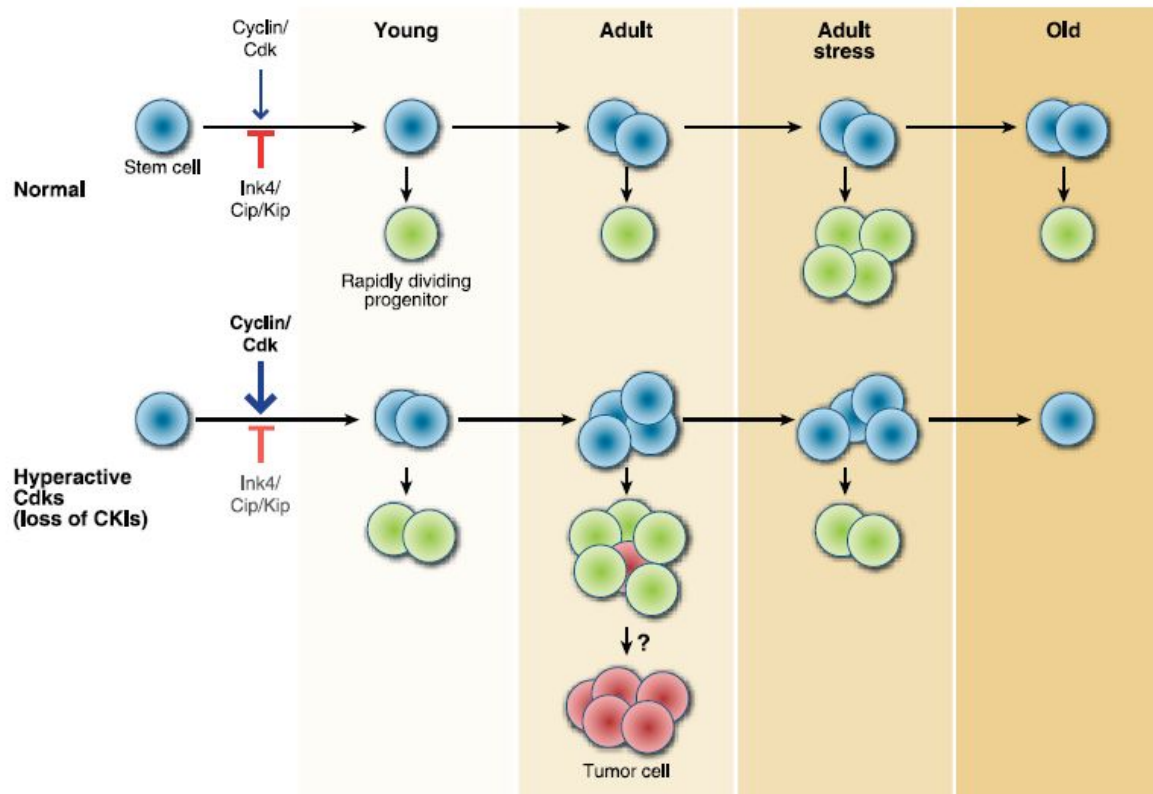
# CDk, ЦИКЛИНЫ И ИХ СУБСТРАТЫ-3

AurkB	Aik2, AIM-1, Ark2, Stk12, Stk5	Chromosomal passenger complex (CPC) kinase; Chromosome attachment and cytokinesis	INCENP, Borealin, Survivin	Borealin, CENP-A, Hec1, Histone H3, MCAK, MYBBP1A
AurkC	Ark3, Stk13	CPC kinase, meiosis	INCENP, Borealin, Survivin?	Borealin, CENP-A
<i>Polo-like kinases</i>				
Plk1		Centrosome biology and mitosis	Substrates need to be primed by Cdks	$\alpha$ -Synuclein, $\beta$ -catenin, FoxM1B, Nedd1, NudC, 53BP1
Plk2	Snk	G <sub>1</sub> /S progression?, neuron function	Substrates need to be primed by Cdks	SPAR, $\alpha$ -synuclein
Plk3		G <sub>1</sub> /S progression, neuron function		Vrk1, $\alpha$ -synuclein
Plk4	Sak	Centriole biology		
Plk5	AC104852, LOC126520	Neurite growth		No substrates identified
<i>Checkpoint kinases</i>				
Bub1		Spindle assembly checkpoint		Cdc20, Mad1, Bub3
BubR1	Bub1b	Spindle assembly checkpoint	CENP-E	
Mps1	Ttk	Spindle assembly checkpoint		p53, BLM, Dam1
<i>Replication kinases</i>				
Cdc7		DNA replication	ASK, Dbf4, Drf1	Mcm2, Mcm4, Mcm6
<i>NIMA-related kinases</i>				
Nek2				c-Nap1, rootletin, PP1, Nlp, centrobin, HMGGA2
Nek6		Mitosis	Activated by Nek9	Eg5 S1033
Nek7		Mitosis	Activated by Nek9	No substrates identified
Nek9		Mitosis		Nek6, Nek7
<i>Phosphatase-inhibiting kinases</i>				
Mastl	Greatwall, FLJ14813, Thc2	Inhibition of PP2A, mitosis	Activated by Cyclin B/Cdk1	No substrates identified

# Активность CDk в тканях человека



# Модель контроля G1 в стволовых клетках

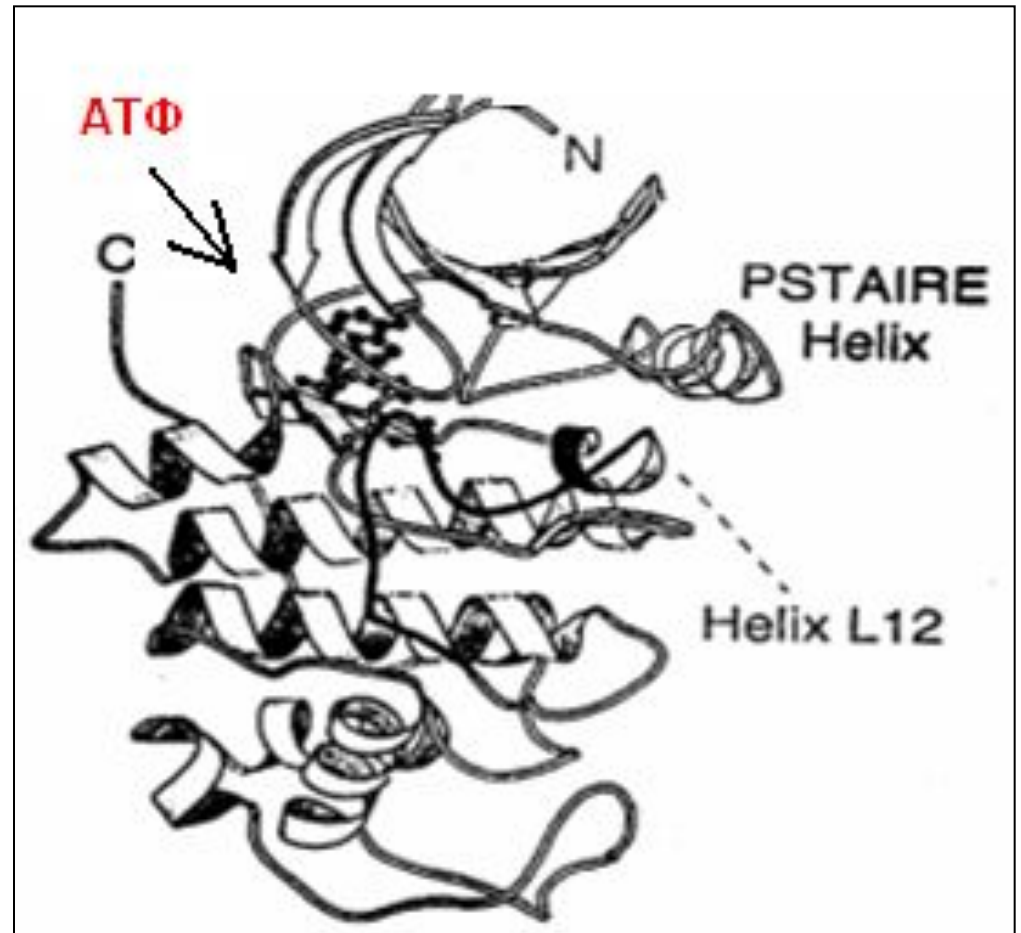


**FIGURE 3** Adult stem/progenitor cell function and its control by G1 kinases. In normal tissues, stem cell self-renewal is tightly controlled to ensure proper tissue homeostasis and regeneration throughout life. Upon hyperactivation of G1 Cdk (e.g., Cdk2, Cdk4, or Cdk6) mediated by cyclin overexpression or loss of the corresponding inhibitors (Ink4 or Cip/Kip families), proliferation of stem cells is increased possibly cooperating with tumor formation. In addition, this increased proliferation may lead to stem cell exhaustion and inefficient responses to stress or ageing. This model is mostly generated from evidence obtained from

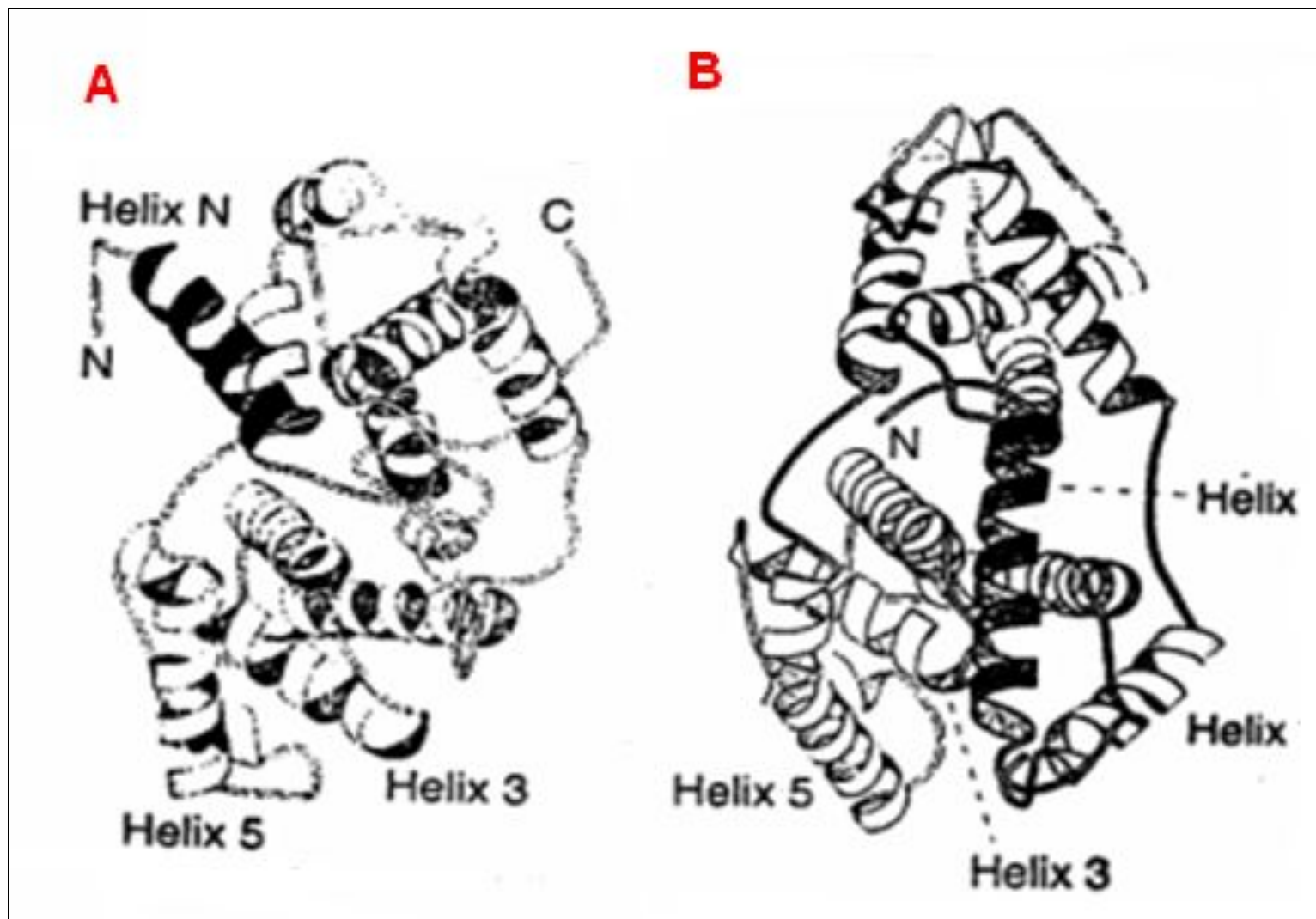


# Структура CDk2 человека, связанной с АТФ

Небольшая N-терминальная доля содержит В-полоску и PSTAIRE спираль. Показан большой С-конец. Активный центр взаимодействует с АТФ. Т-петля (146-170 ам.о.) выделена. Мономерный белок неактивен, так как Т-петля препятствует взаимодействию с субстратом.

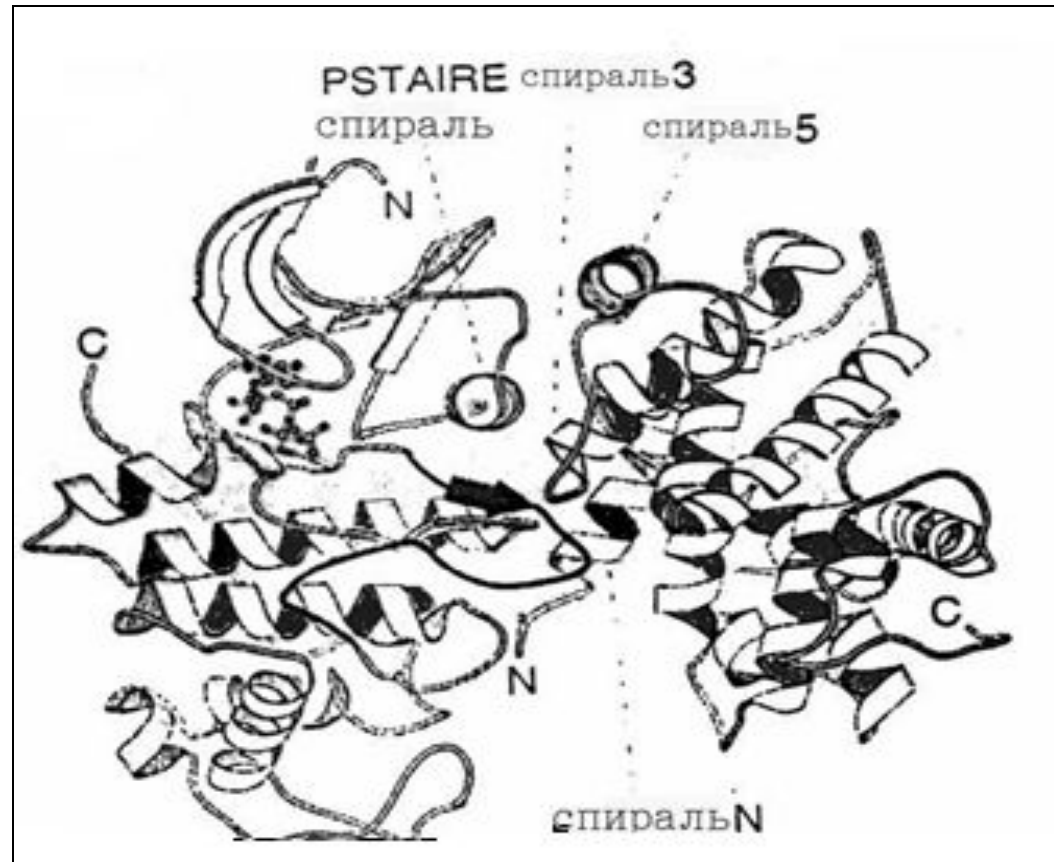


# Структура циклина А(а) и Н(в) человека

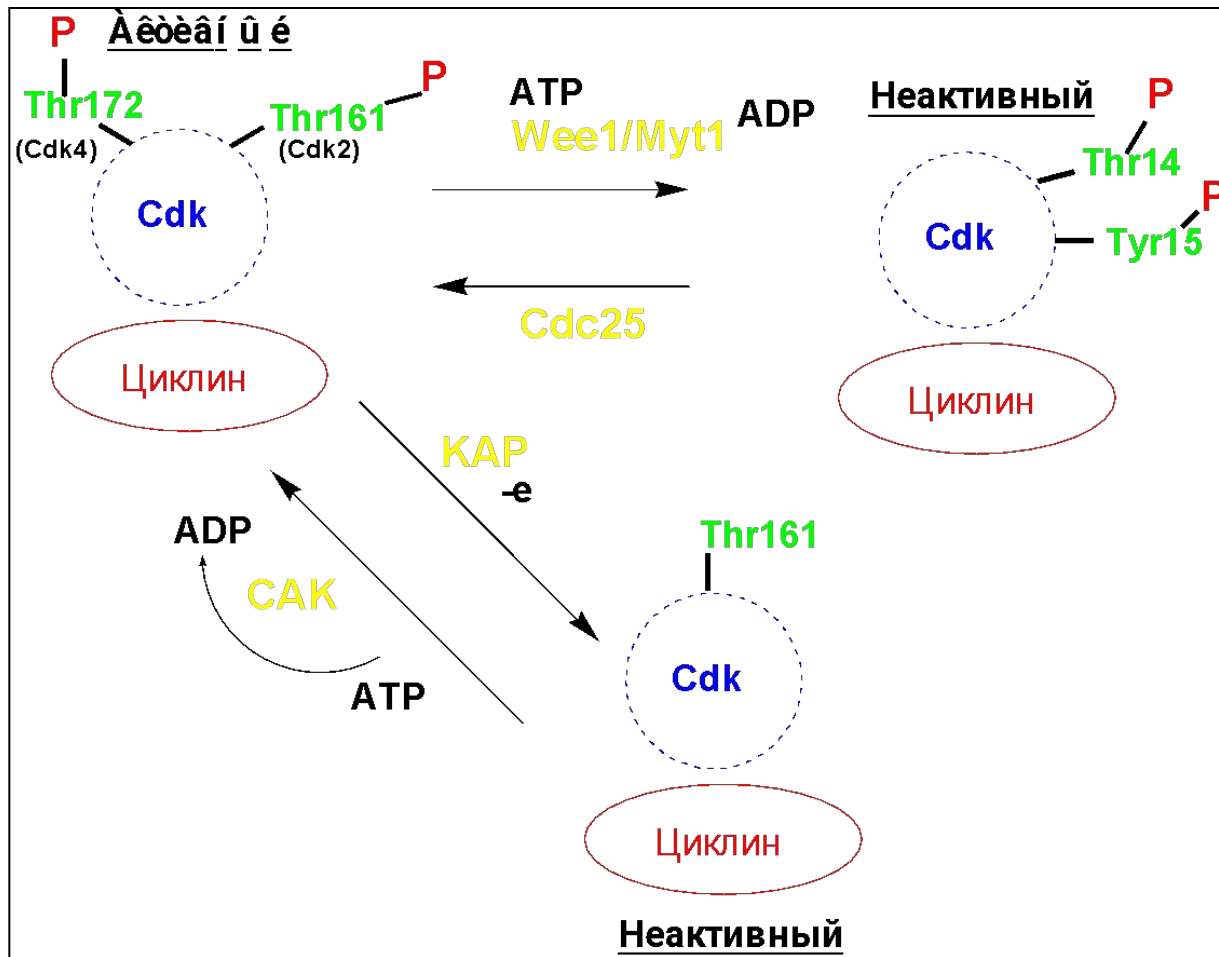


# Структура Cdk2-циклин A1-АТР комплекса человека

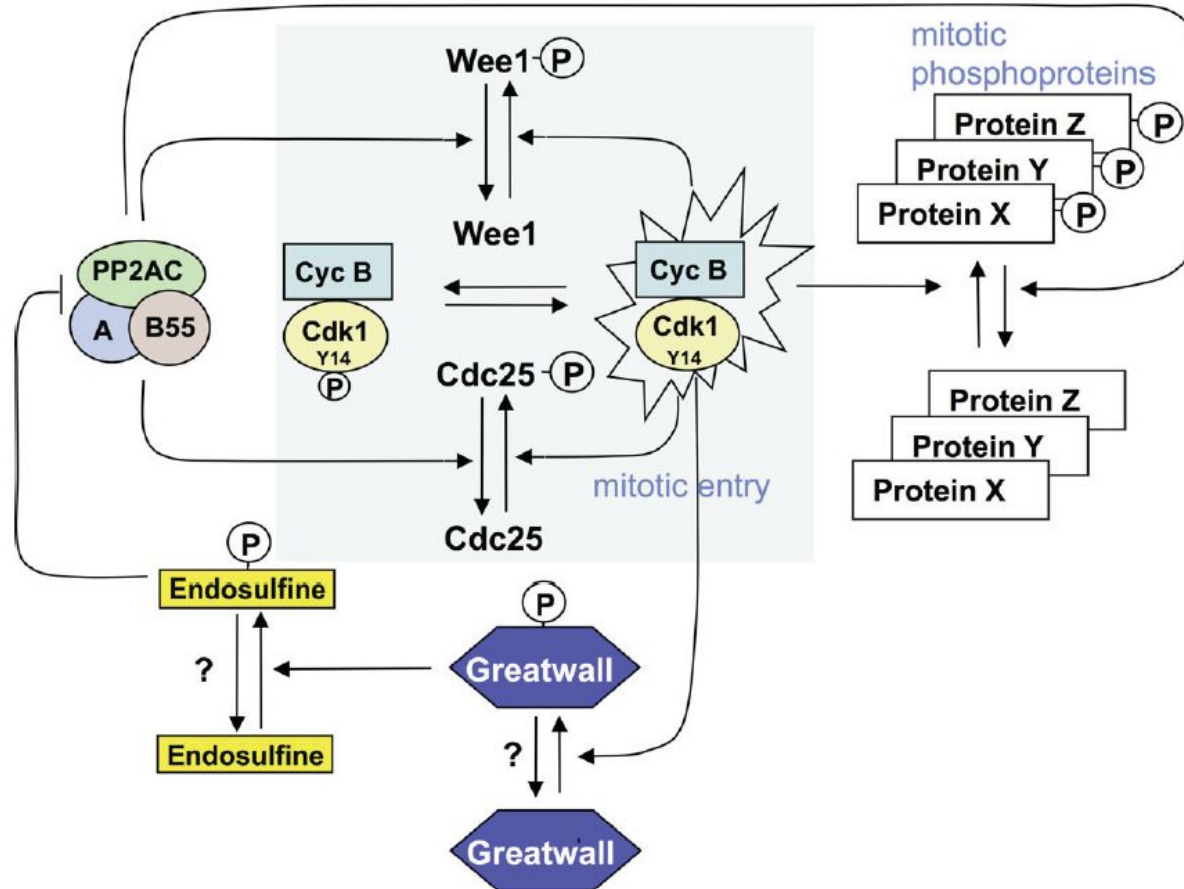
Cdk2 расположена слева. Циклин А – справа. Т-петля обозначена черной стрелкой. Связывание Cdk2 и циклина А включает взаимодействие между спиралью PSTAIRE Cdk-2 и спиралью 3 и 5 циклина А, а также между спиралью N циклина А и С-терминальной областью Cdk2. Связывание циклина вызывает значительные конформационные изменения в Cdk2. Спираль 1.12 Т-петли расположена в  $\beta$ -цепи, позволяя спирали PSTAIRE двигаться вовнутрь, чтобы корректировать расположение участка цепей, участвующих в ориентировке фосфата АТФ. Т-петля является уплощенной относительно ее позиции в мономере.



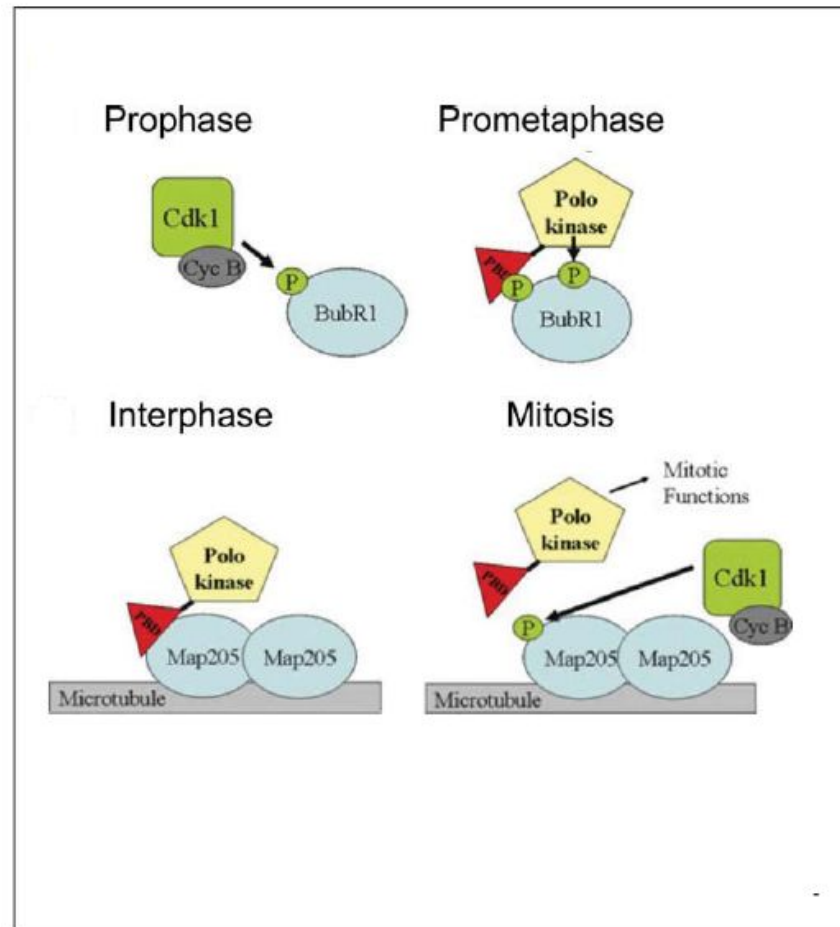
# Регуляция Cdk активности фосфорилированием



# Регуляция митоза



# Polo-киназа в регуляции МИТОЗА



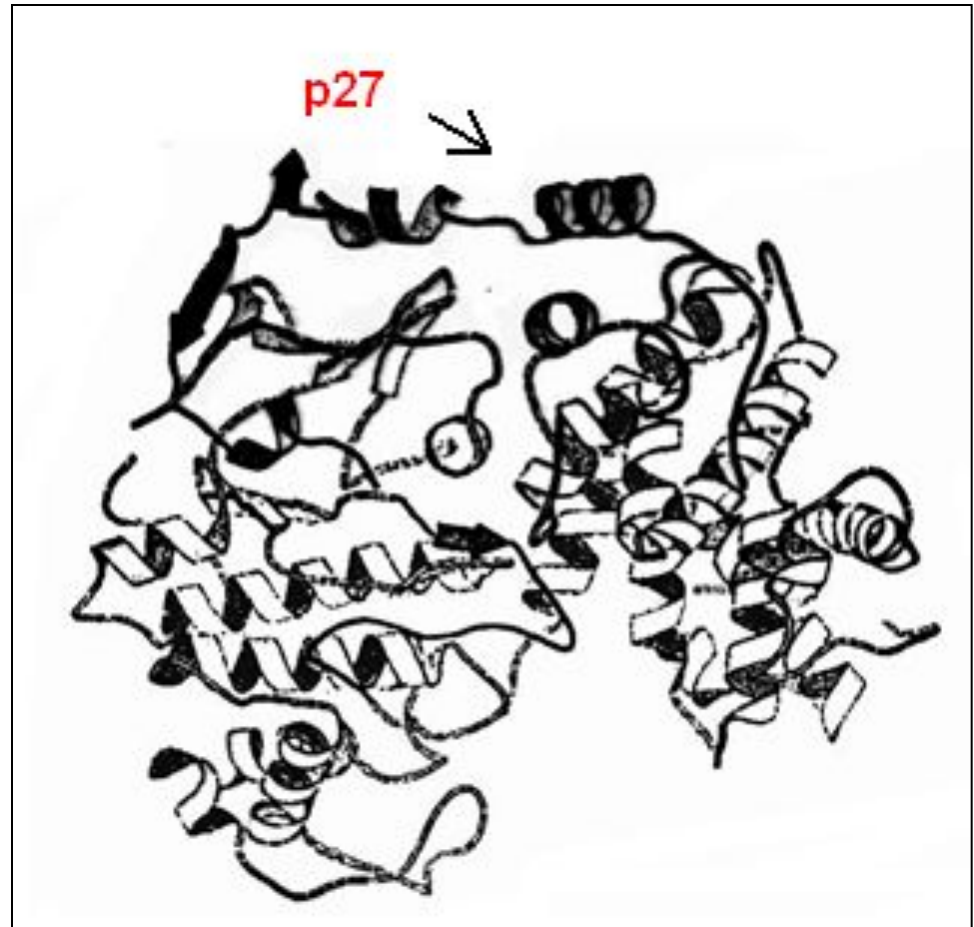
# Ингибиторы Cdk

2 Семейства CKI:

- Cip/Kip (Cdk ингибиторные белки) p21, p27, p57 – ингибируют Cdk2 и Cdk4/6 (G<sub>1</sub>/S контроль)
- INK4 (ингибиторы киназ) p15, p16, p18 и p19 (узкоспецифичны для Cdk4/6)

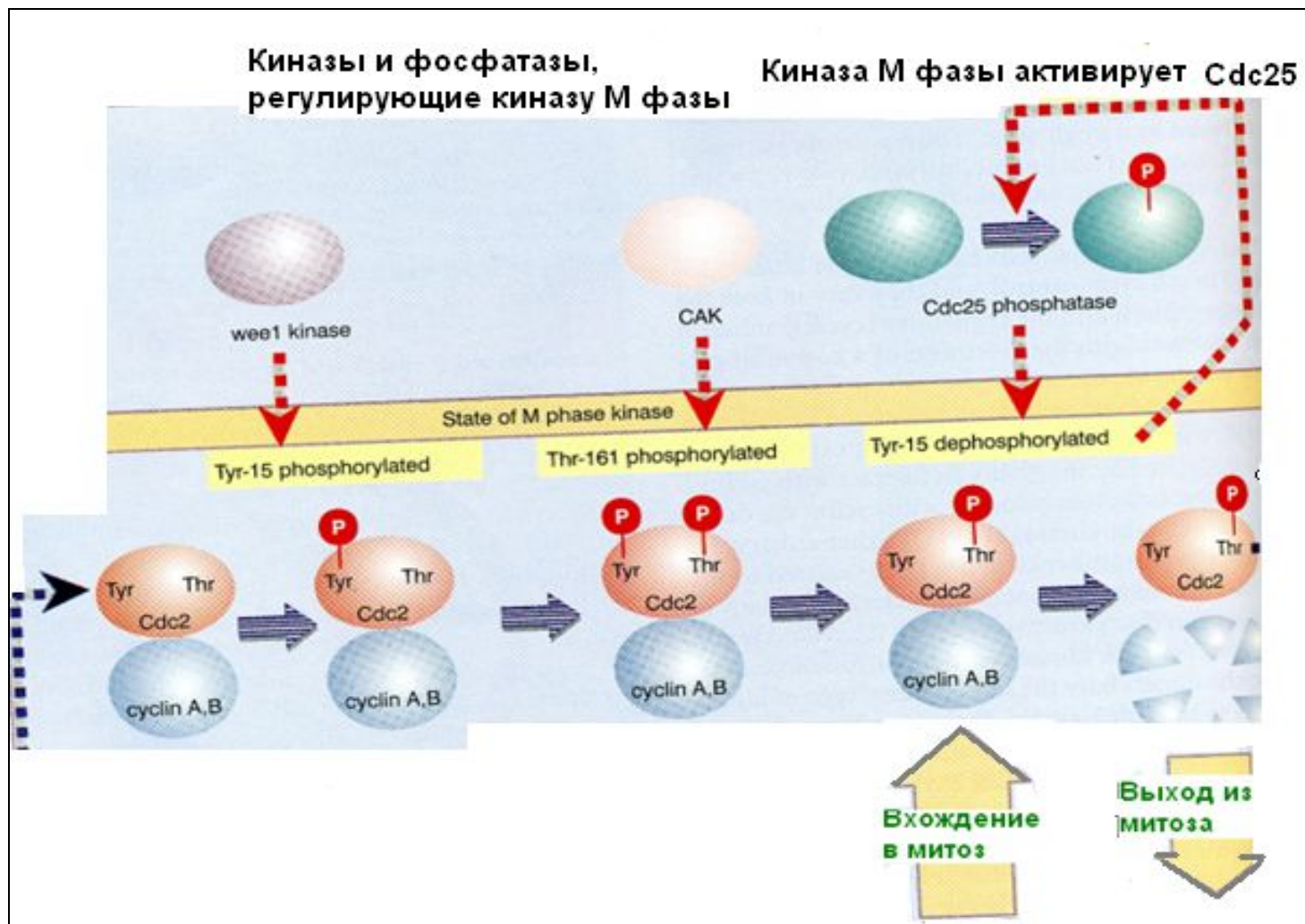
# Структура связи комплекса Cdk2-циклин A1 с усеченным пептидом p27

Пептид p27 (затемнен) протянут через вершину комплекса, причем N-конец связан с циклином A1, а C-концевая область на некотором протяжении взаимодействует с субъединицей Cdk2, разрывая  $\beta$ -складку малой доли и внедряя малую спираль в АТФ-связывающий сайт. Cdk2 в этом комплексе фосфорилирована киназой САК по Thr161 T-петли. Представленная структура иллюстрирует эффект фосфорилирования, что приводит к дальнейшему сплющиванию T-петли относительно ее позиции в нефосфорилированном комплексе.

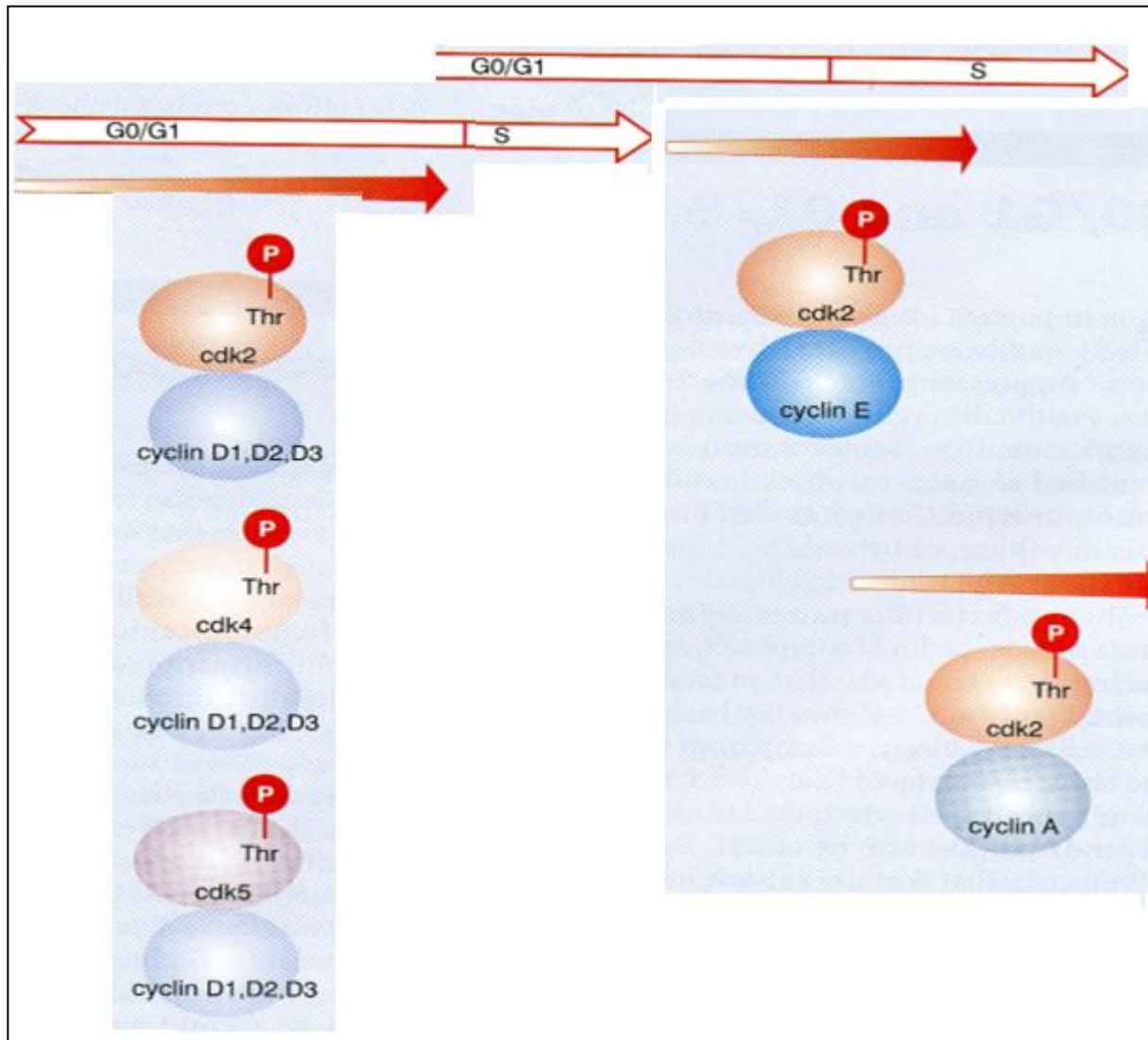




# Контроль митоза киназой М фазы



# Cdk-комплексы в G1 и S фазы



# Регуляция циклинов

- - Транскрипция (E2F стимулирует ЦА и Е в S фазе) или ЦD RAS-RAF-МАР киназный каскад или сАМР.
- - Деградация протеолизом

# Структура протеосомы

## Коровая частица (CP)

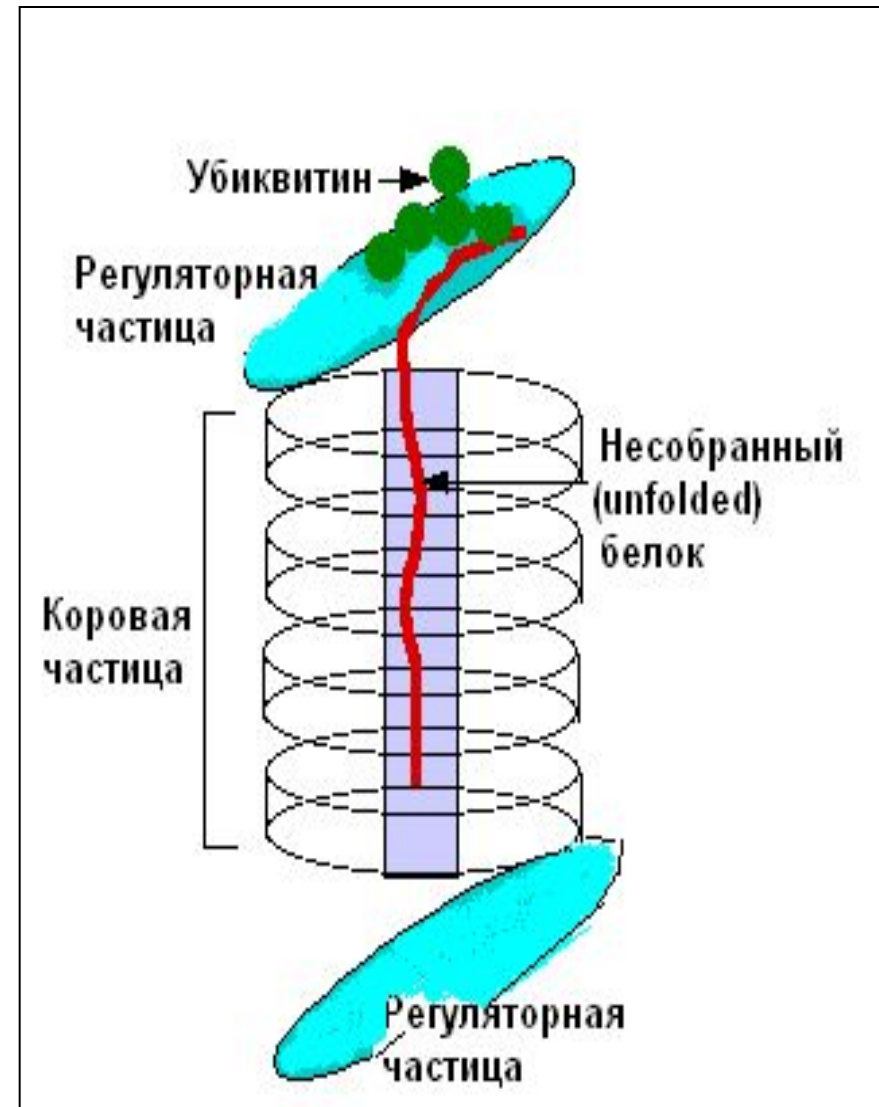
- CP состоит из 2 копий 14 различных белков.
- Они объединены в группу из 7, образующих кольцо.
- 4 кольца складываются друг с другом

## Регуляторная частица (RP)

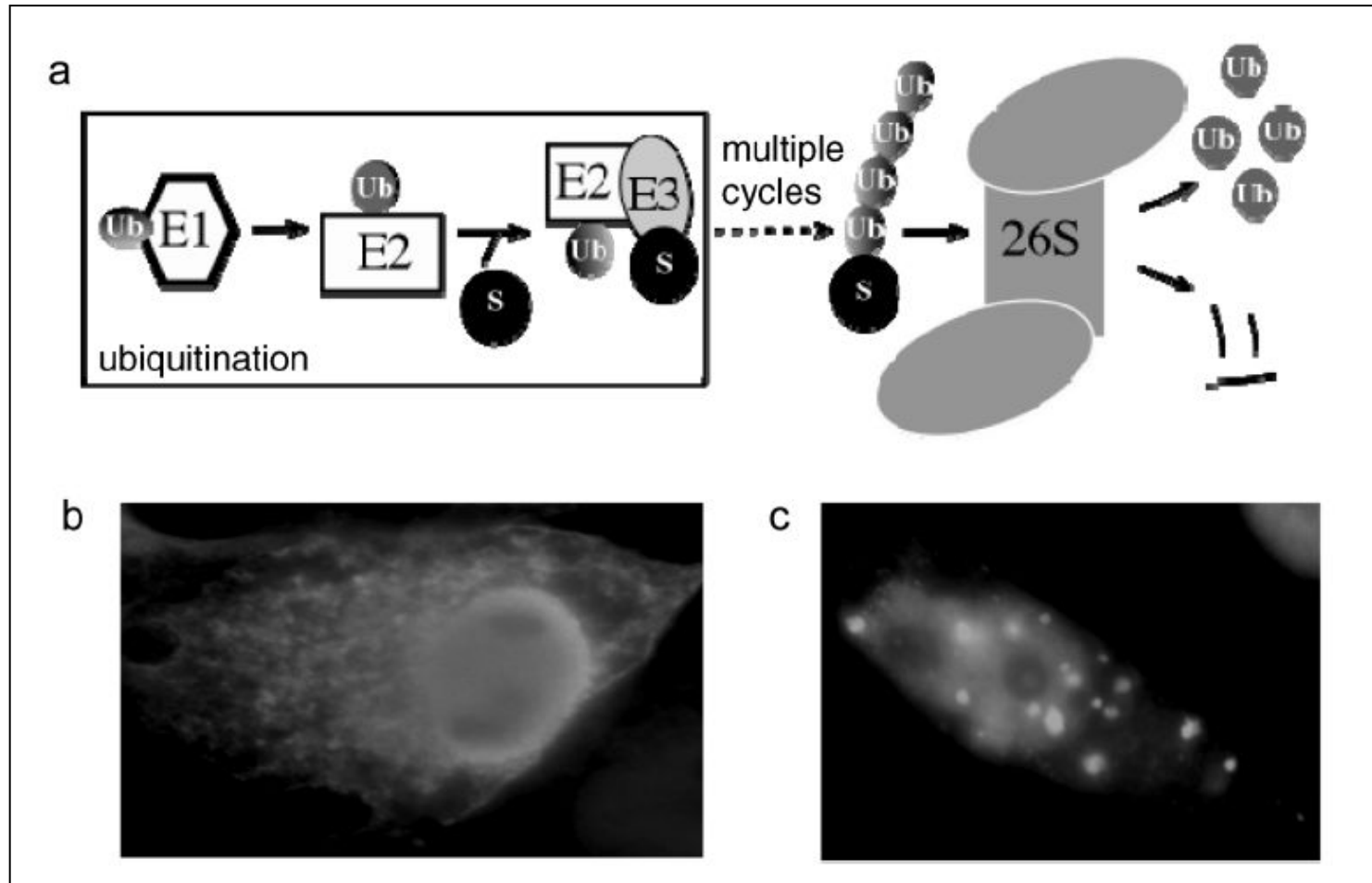
- Есть 2 идентичные RP на каждом конце коровой частицы.
- Каждая состоит из 14 различных белков.
- 6 из них - ATPases.
- Некоторые субъединицы содержат сайты, распознаваемые убиквитином

## Убиквитин

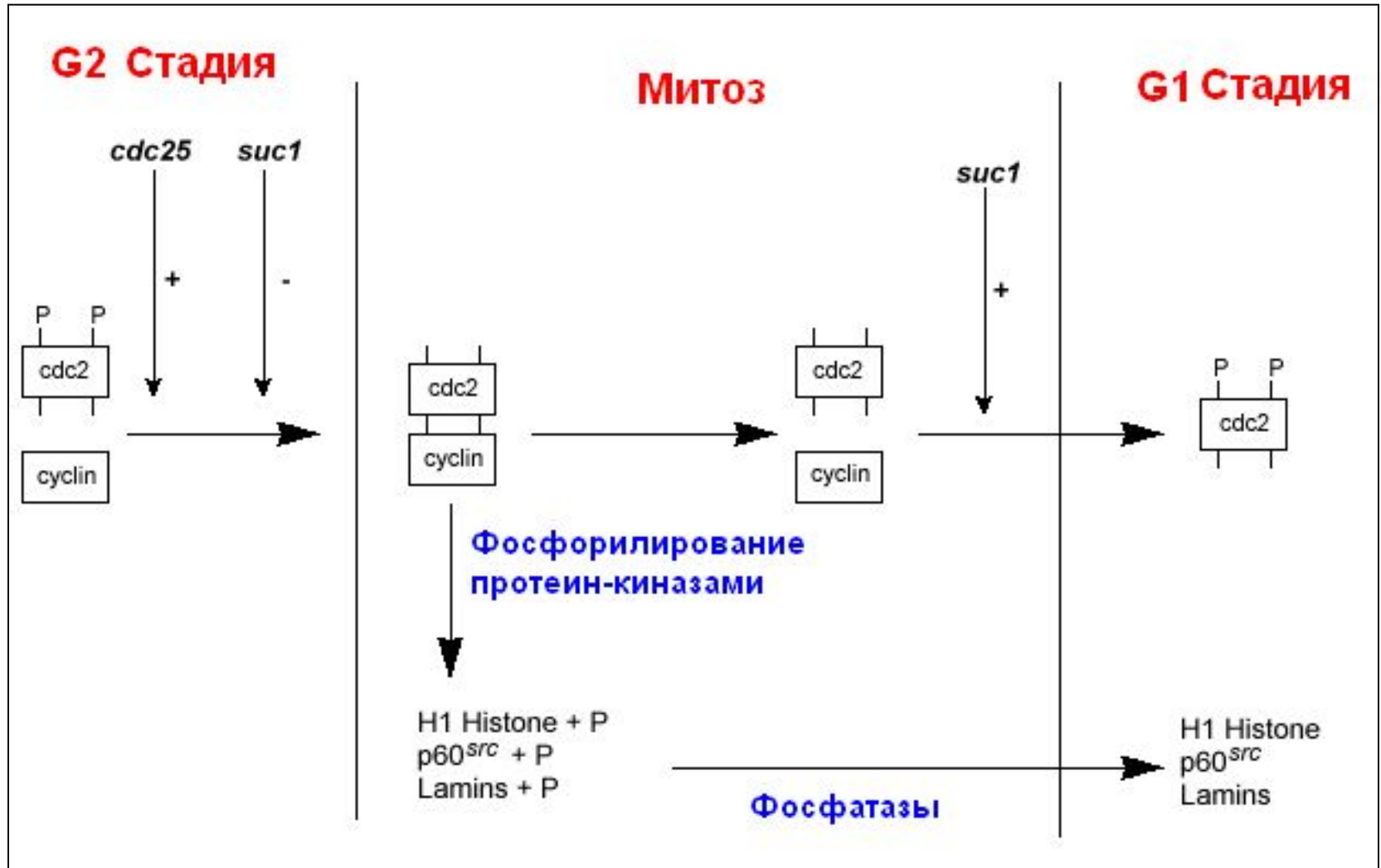
- Небольшой белок (76 аминокислоты)
- Высококонсервативный
- Используется для разрушения белков-мишеней



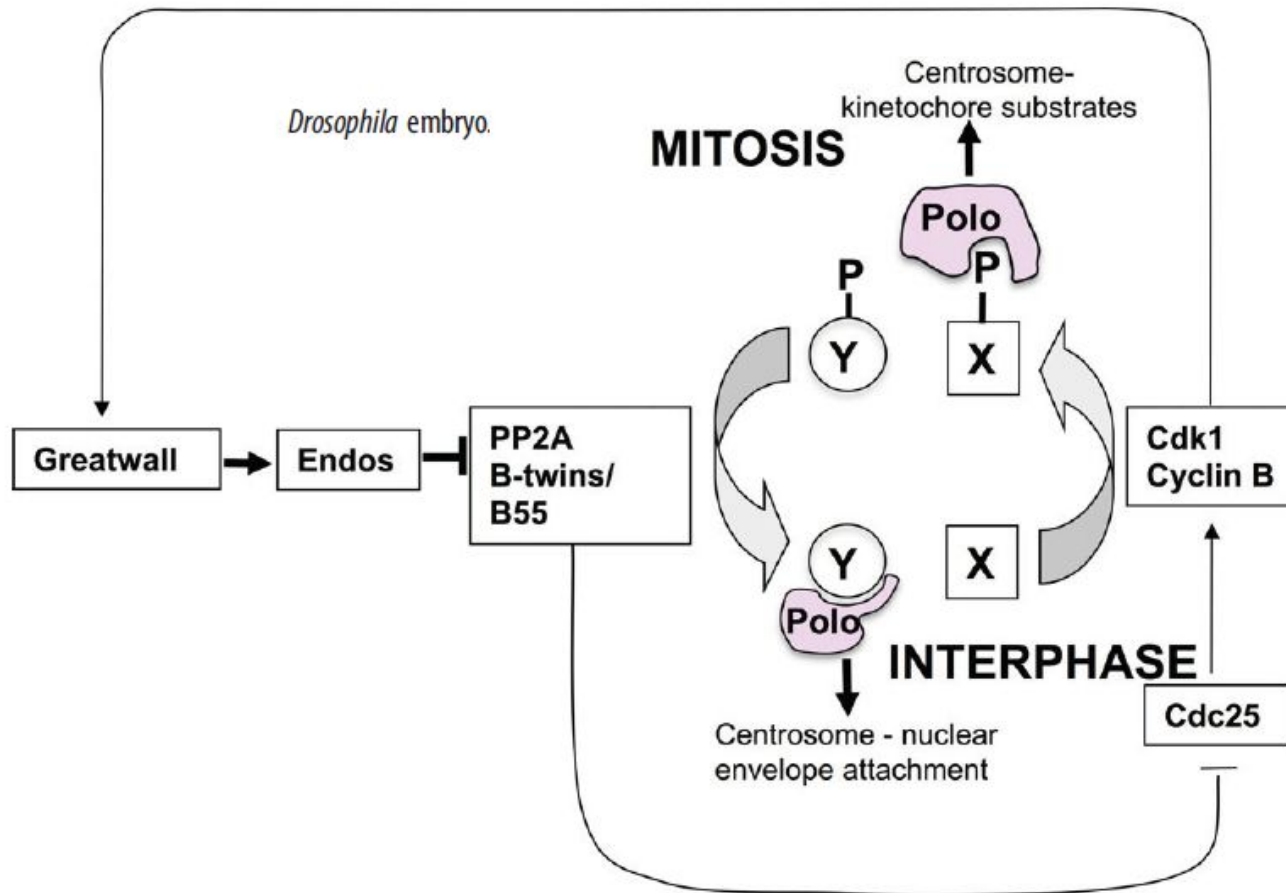
# УБИКВИТИНАЦИЯ



# Выход из деления-1



# Выход из деления-2

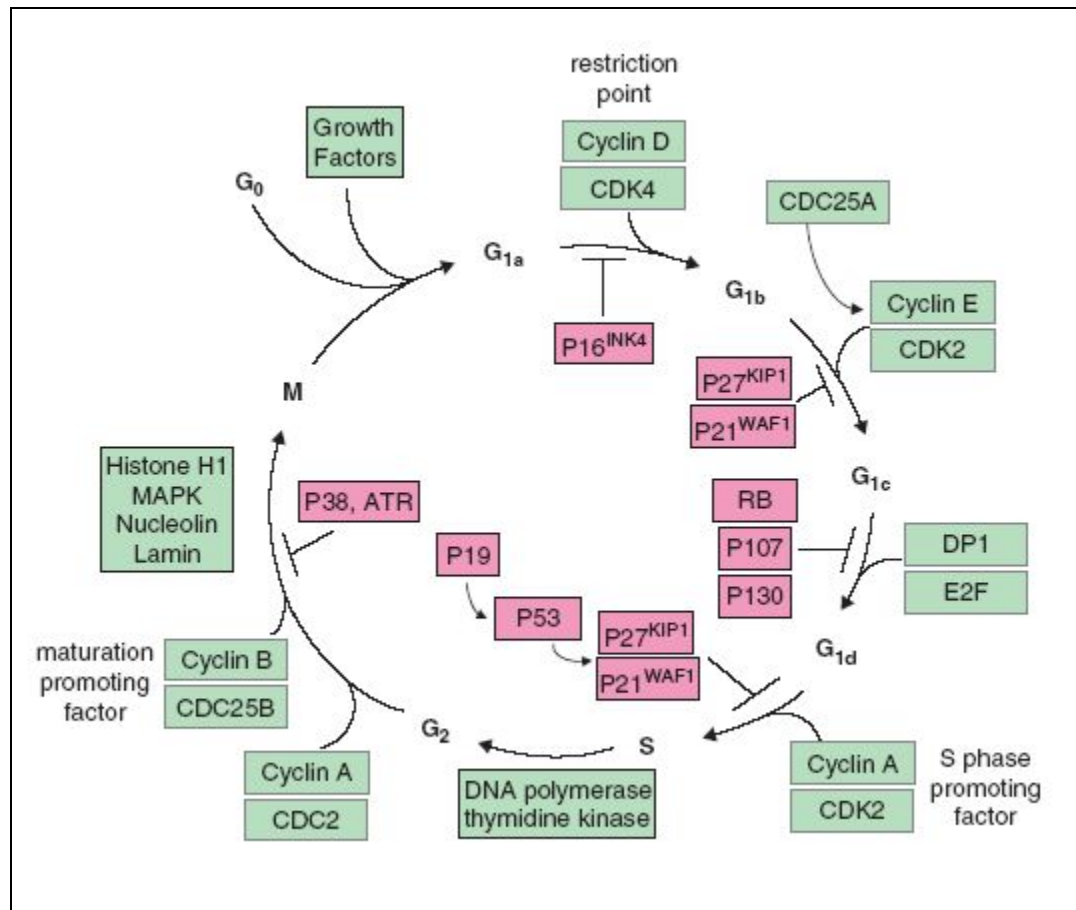


# Деструкция митотических циклинов

- Циклосома APC (anaphase promoting complex) – метафаза-анафаза (Cdc20) и выход из митоза (Hct1).
- Субстрат для APC-Cdc20 – белки секурин и сепарин, удерживающие сестринские хроматиды. Для
- APC-Hct1 осуществляет убиквитирование ЦВ.
- APC инактивируется G<sub>1</sub> циклинами



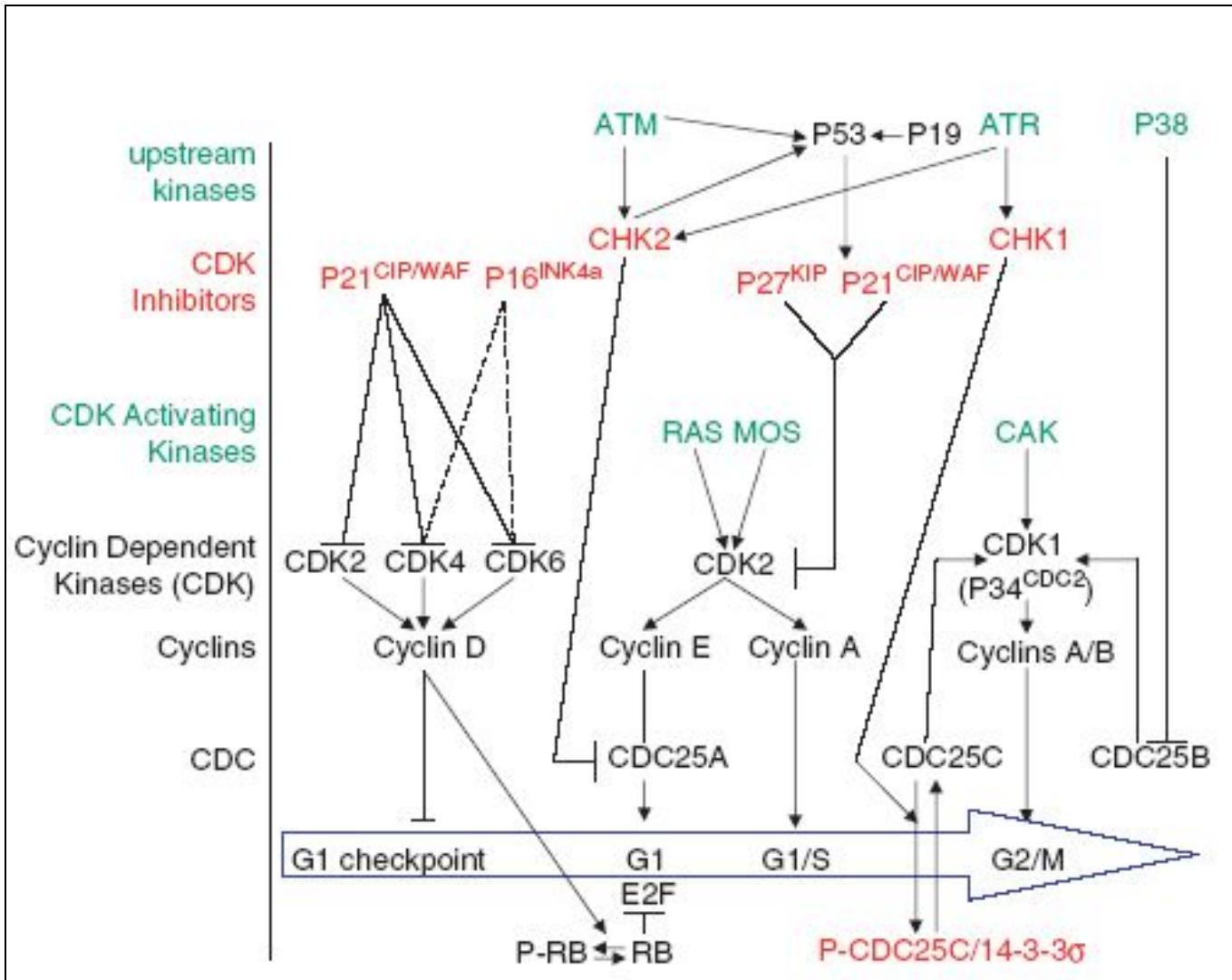
# Регуляция циклинов в КЦ



## Нобелевская премия по физиологии и медицине за 2001 г.

- Присуждена американцу Леланду Хартвеллу и англичанам Тимоти Ханту и Полу Нерсу. Этой награды ученые удостоились за значительные достижения в области исследований клеточного цикла. В заявлении Нобелевского комитета говорится, что эти открытия *“будут применяться при диагностике опухолей и в конце концов приведут к разработке новых способов борьбы с раком”*.

# Сверочные точки в КЦ



# Киназы КЦ в развитии рака-1

Ген	Хромосома	Генетическое повреждение	Болезнь
<i>Cyclin-dependent kinases</i>			
<i>CDK2</i>	12.q13.2	P45L	Glioblastoma
<i>CDK3</i>	17q25.1	S106N	Glioma
<i>CDK4</i>	12q14.1	R24C, R24H, N41S	Melanoma
		Amplification	Several neoplasias
<i>CDK6</i>	7q21.2	P199L and fs	Melanoma and brain tumors
		translocation	Hematopoietic disorders
<i>CDK8</i>	13q12.13	R424C; D189N	Intestine and lung tumors
<i>CDK19 (Cdc2L6)</i>	6q21	Inversion	Microcephaly
		G175S, A395V	Melanoma and brain tumors
<i>Aurora kinases</i>			
<i>AURKA</i>	20q13.2	Amplification	Multiple neoplasias
		S155R, S398L, V174M, and ns	Intestine, skin, and lung tumors
<i>AURKB</i>	17p13.1	V57M, E274Q	Lung and brain tumors
<i>AURKC</i>	19q13.43	c.144delC	Sterility
		G18E, E114Q, H210Q	Lung tumors
<i>Polo-like kinases</i>			
<i>PLK1</i>	16p12.2	Several point mutations	Carcinoma cell lines
		R12L	Lung tumor
<i>PLK2</i>	5q11.2	Hypermethylation	Hematopoietic, liver tumors
		G92S, S14T, and fs	Lung and ovary tumors
<i>PLK3</i>	1p34.1	Hypermethylation	Liver tumors
<i>PLK4</i>	4q28.2	LOH, hypermethylation	Hepatocellular carcinoma
<i>PLK5</i>	8q12.3	Hypermethylation	Glioblastoma

# Киназы КЦ в развитии рака-2

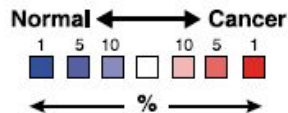
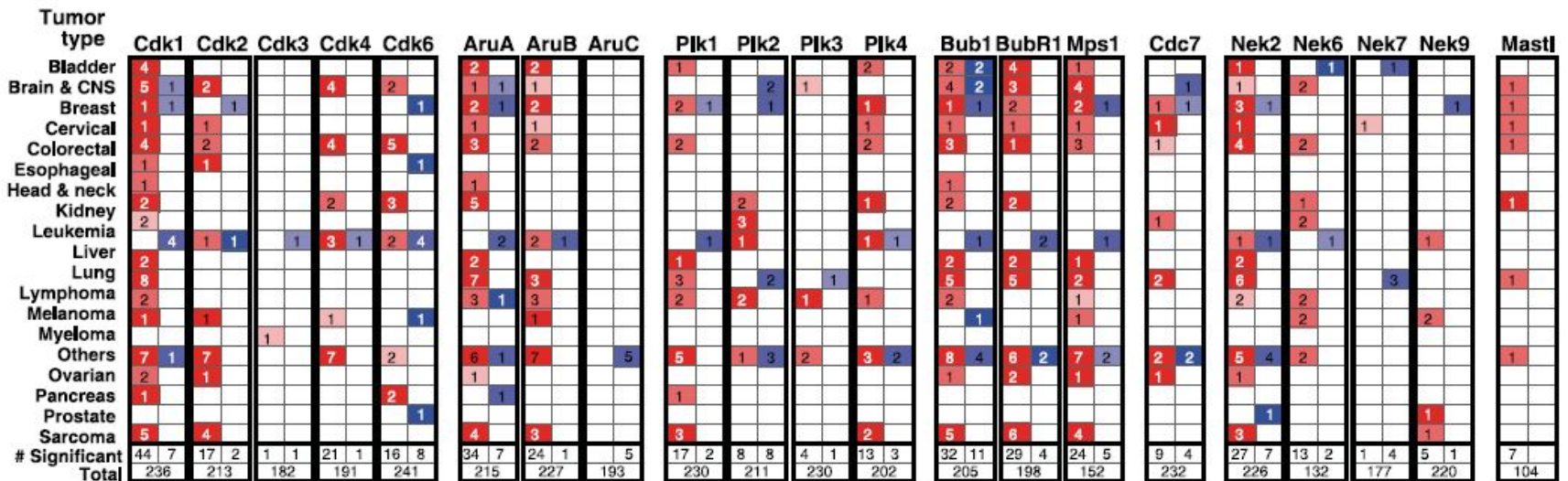
<i>PLK3</i>	1p34.1	Hypermethylation	Liver tumors
<i>PLK4</i>	4q28.2	LOH, hypermethylation	Hepatocellular carcinoma
<i>PLK5</i>	8q12.3	Hypermethylation	Glioblastoma
<i>Checkpoint kinases</i>			
<i>BUB1</i>	2q13	Several point mutations and hypermethylation	Several tumor types (colorectal, lung, thyroid, T cell leukemia)
<i>BUB1B</i> (BubR1)	15q15.1	Point mutations	Mosaic variegated aneuploidy and premature chromatid separation syndromes
<i>TTK</i> (Mps1)	6q14.1	Hypermethylation fs mutations in A9 and A7 repeats	Colon carcinoma Gastric, pancreas, ovary and colorectal tumors
<i>Replication kinases</i>			
<i>CDC7</i>	1p22.2	G119E and fs	Spontaneous mutations in stomach, intestine and brain tumors
<i>Nima-related kinases</i>			
<i>NEK6</i>	9q33.3	I99S	Spontaneous mutations in kidney tumors
<i>NEK7</i>	1q31.3	I275M and ns	Spontaneous mutations in lung and ovary tumors

# Киназы КЦ в развитии рака-3

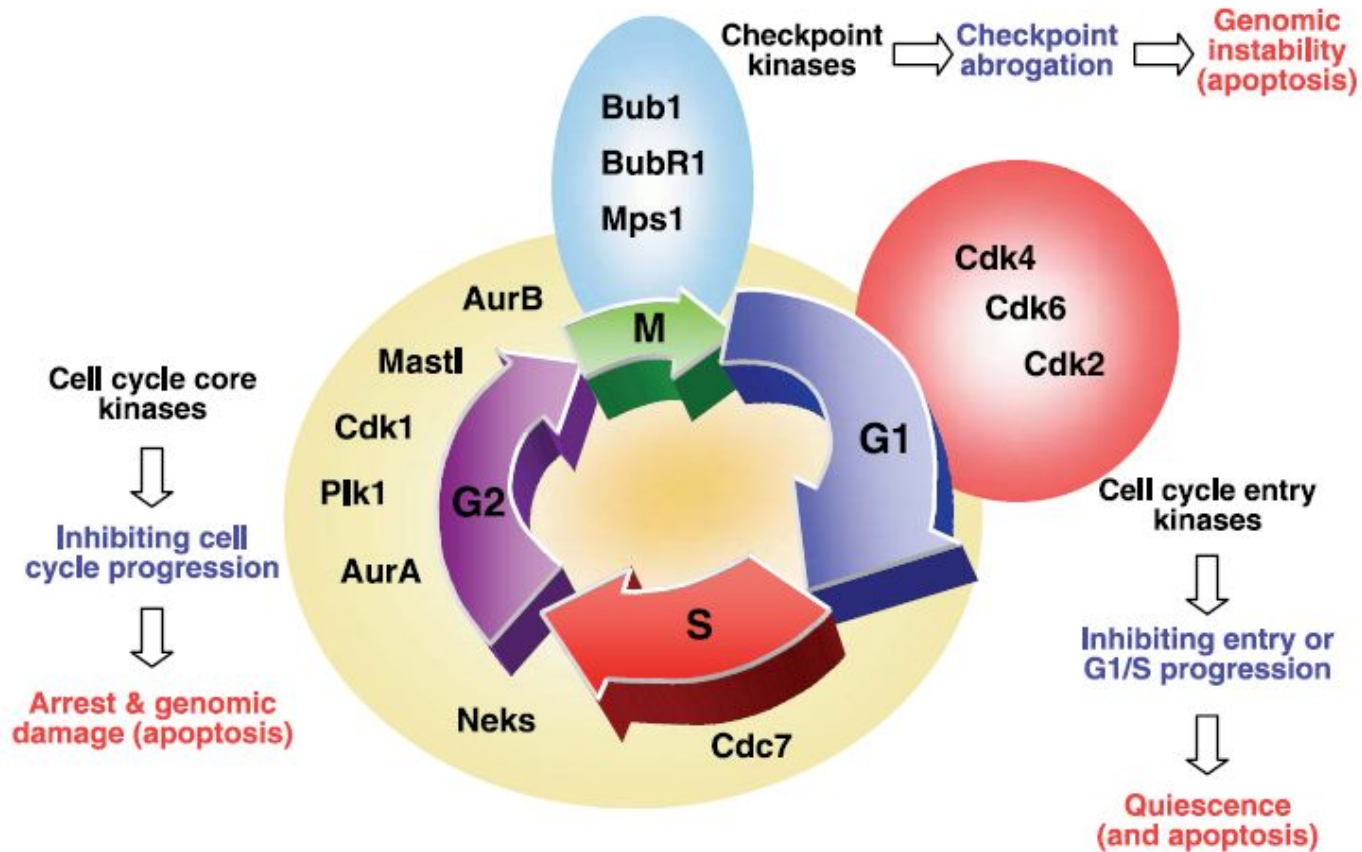
---

<i>NEK8</i>	17q11.2	L621F, R282Q and fs,	Spontaneous mutations in ovary, skin and stomach tumors
<i>NEK9</i>	14q24.3	P870S and fs	Spontaneous mutations in lung and ovary tumors
<i>Phosphatase-inhibiting kinases</i>			
<i>MASTL</i>	10q12.1	CHECK D854N and fs	Thrombocytopenia; Spontaneous mutations in stomach and lung tumors

# Экспрессия киназ КЦ в опухолях человека



# Киназы КЦ в терапии рака





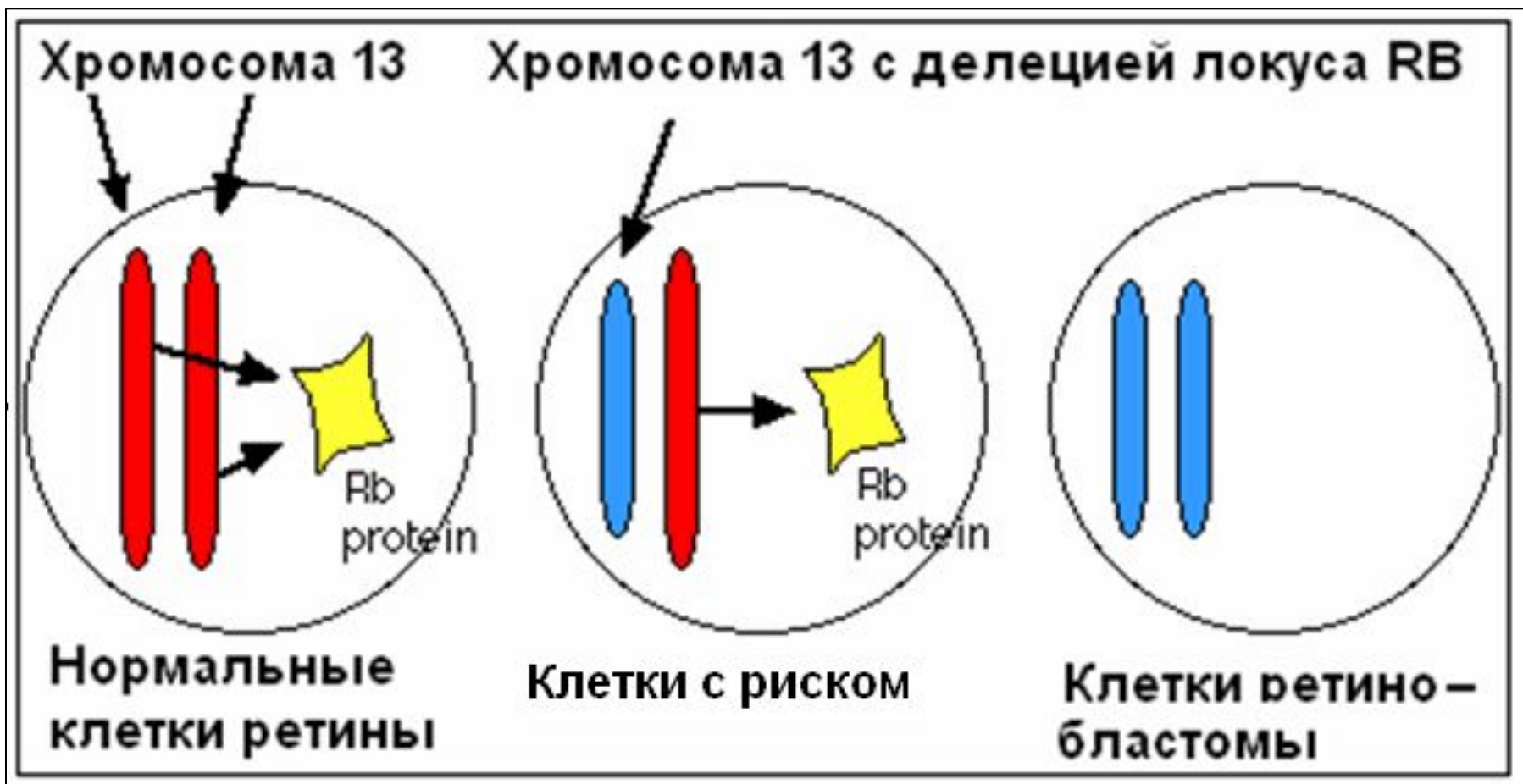
## 2. Раковые супрессорные гены или онкосупрессоры

- RB
- p53 (TP53)

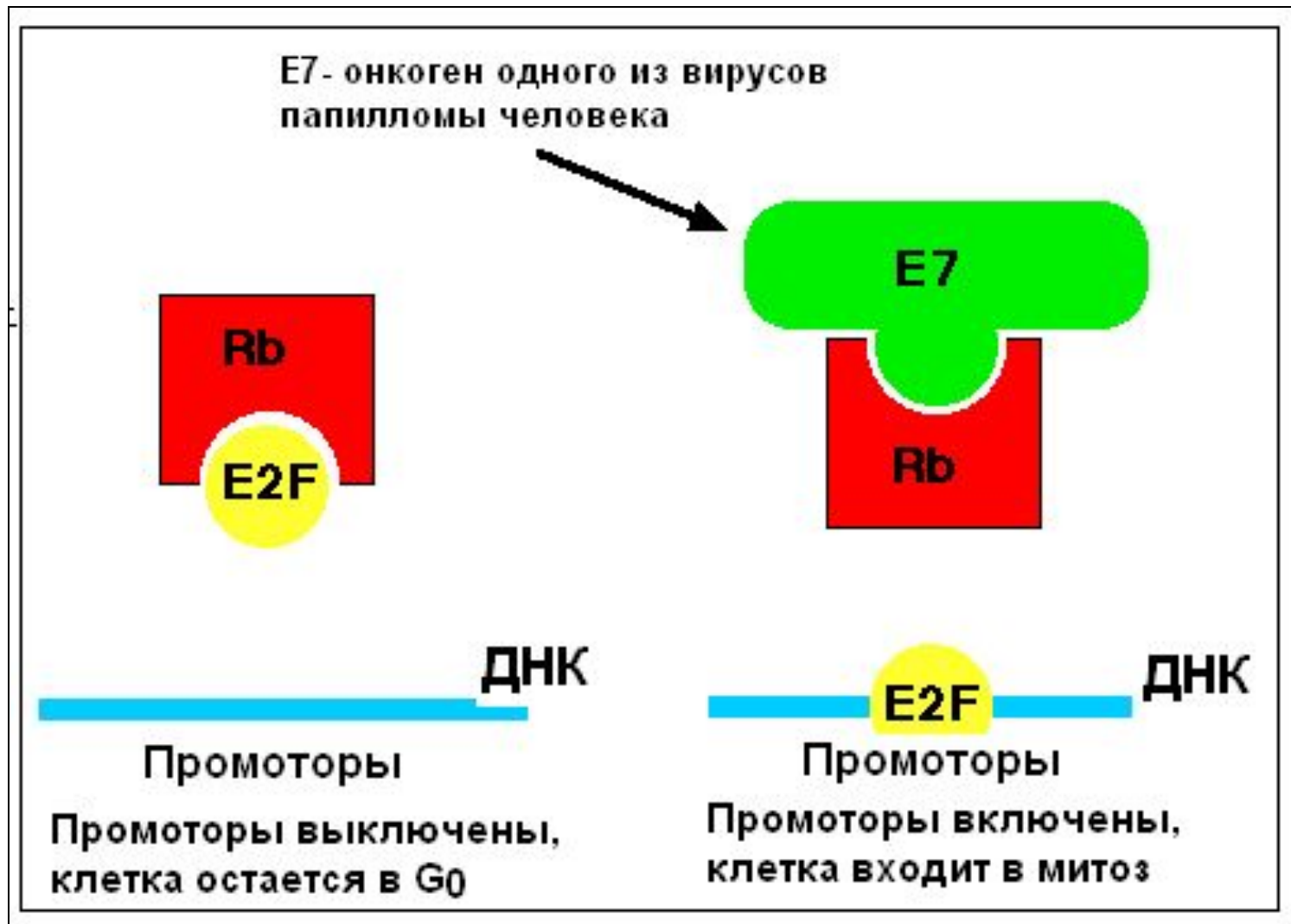
Развитие рака происходит из-за потери функции РСГ

- RB Белок

# Развитие ретинобластомы (q14 делеция в 13-й хромосоме)



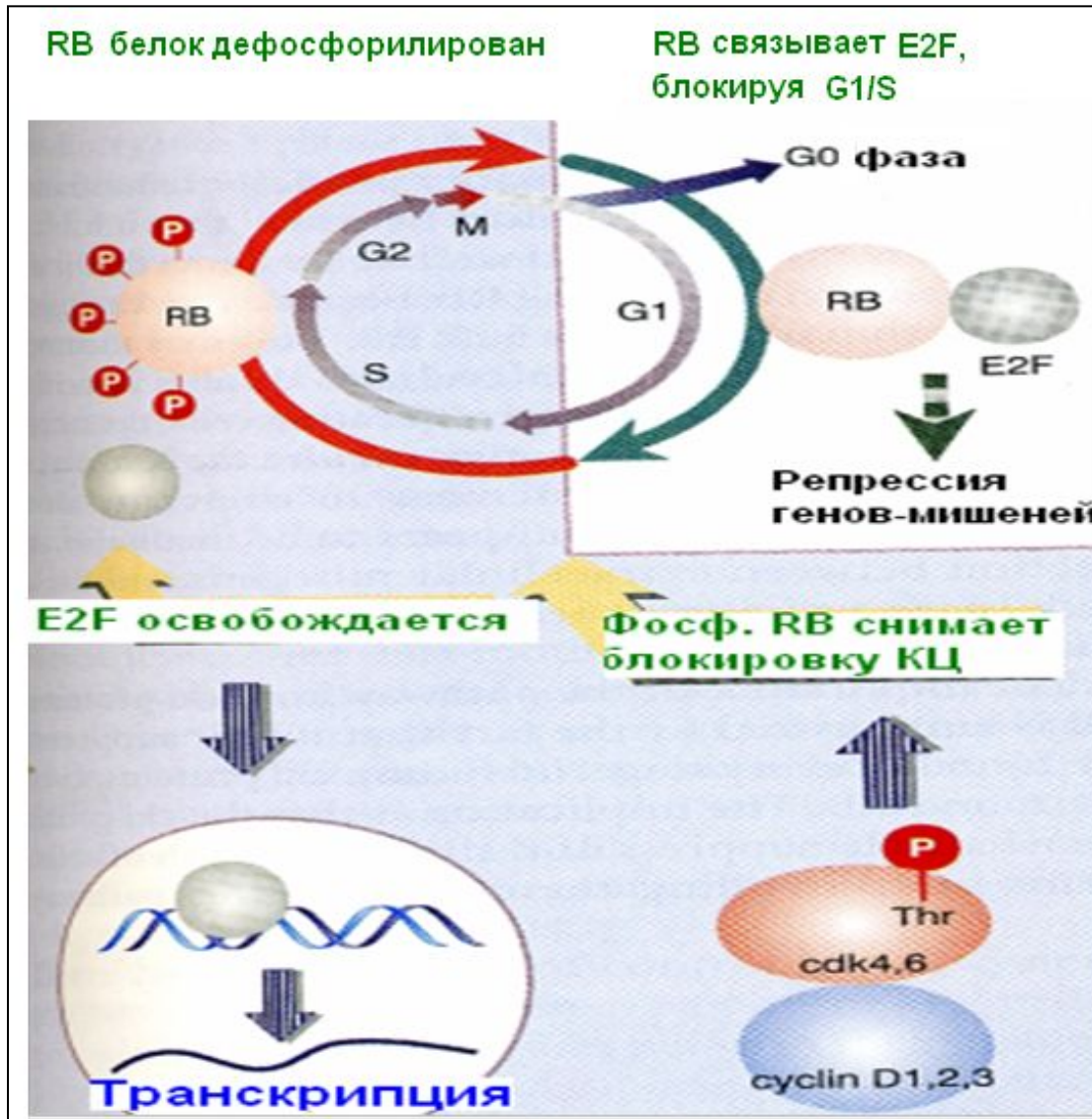
# Роль вирусных онкогенов



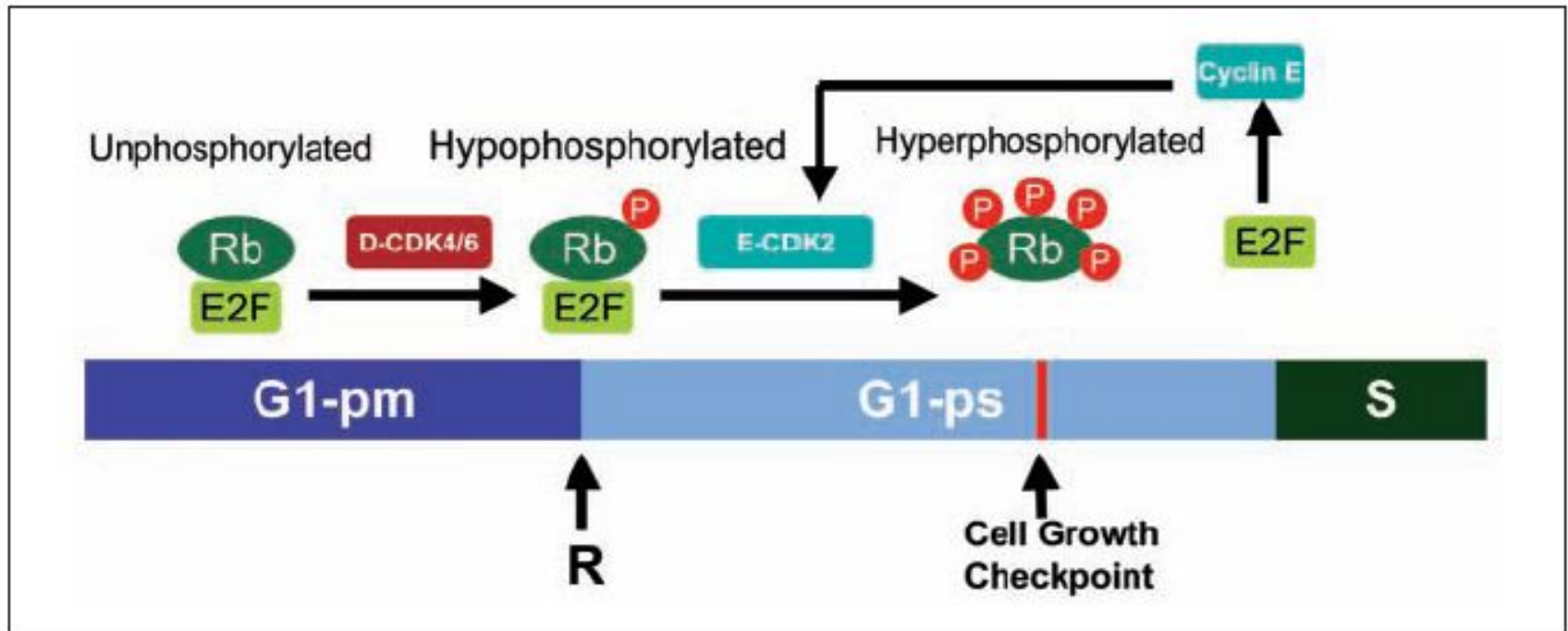
# Комплекс RB с вирусным белком



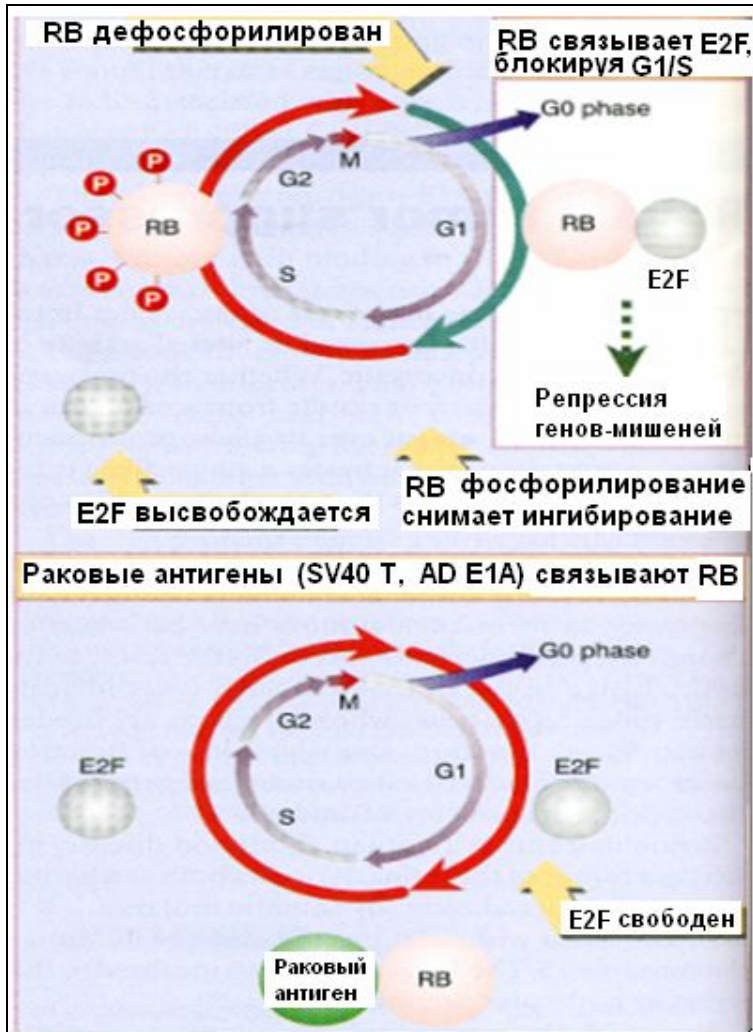
# RB белок в регуляции КЦ



# Rb белок в регуляции КЦ



# Фосфорилирование RB контролируется в КЦ

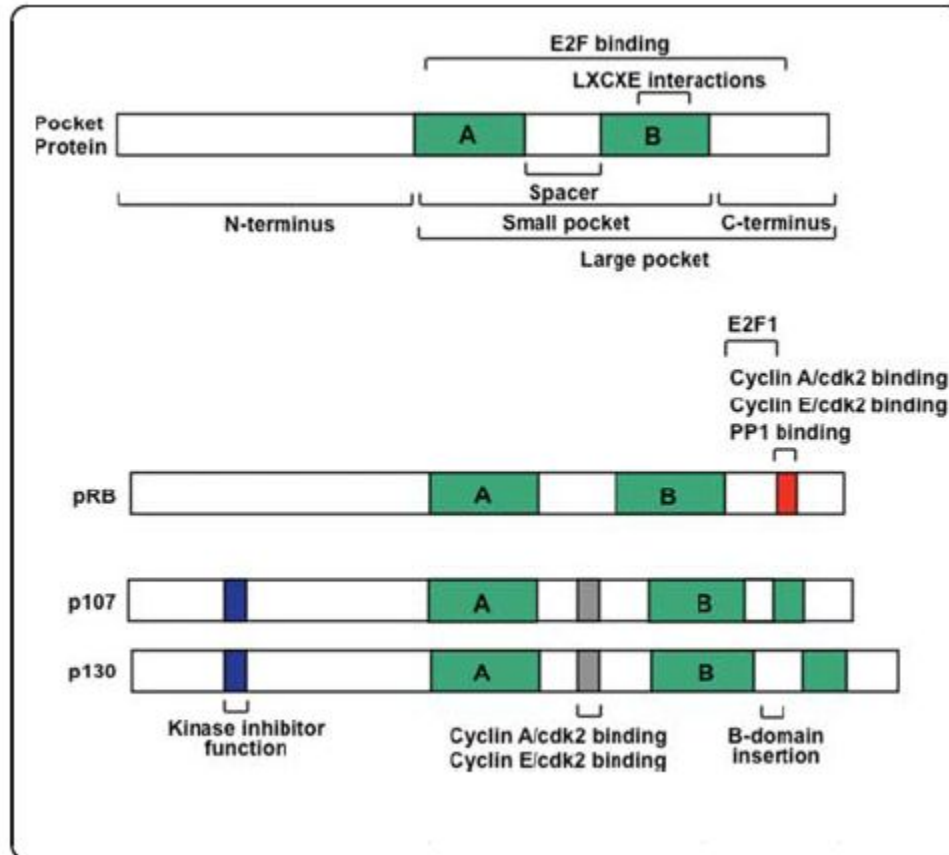


Блокирование КЦ прекращается, когда RB фосфорилируется (в норме) или когда это секвестрируется опухолевым онкогеном (в раковых опухолях)

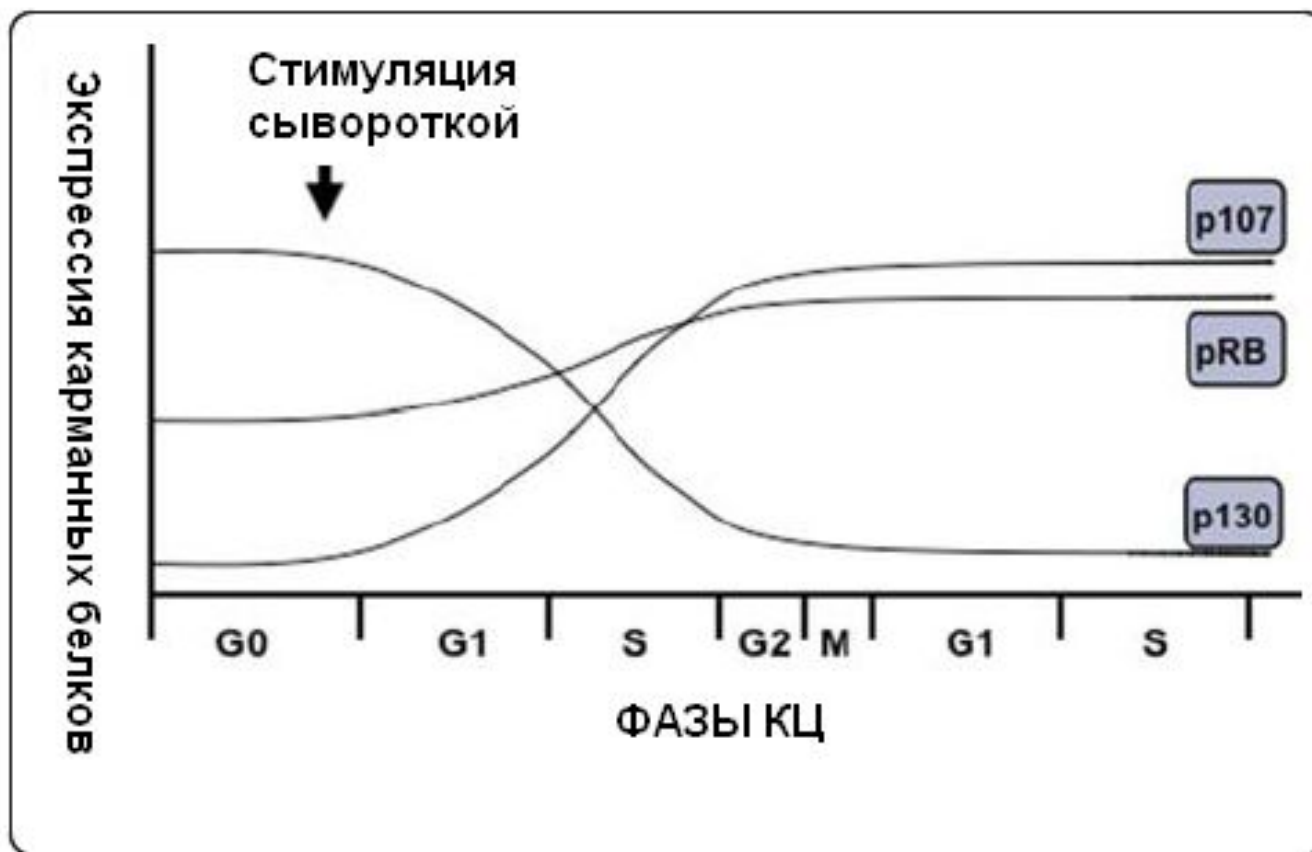




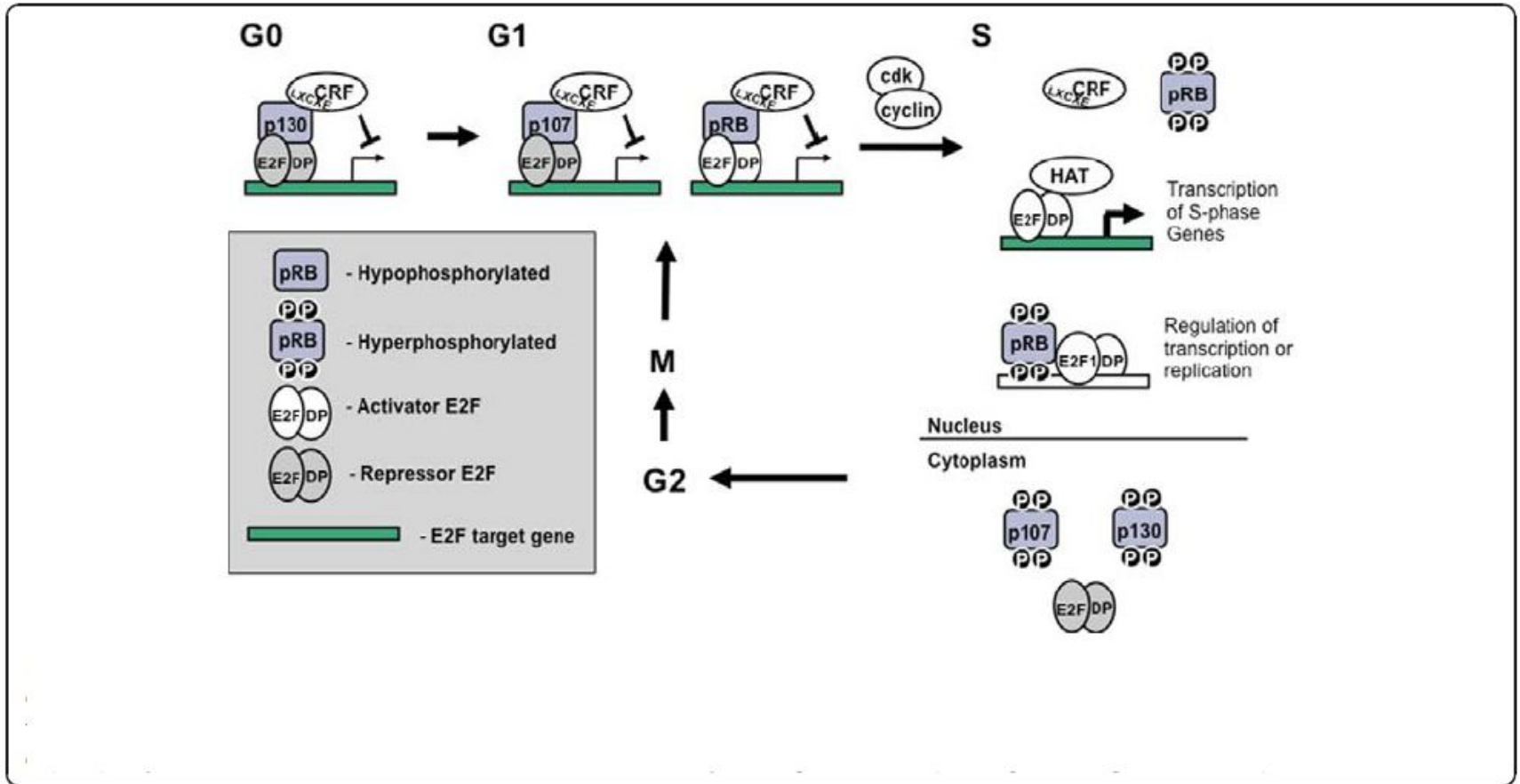
# Семейство RB белков



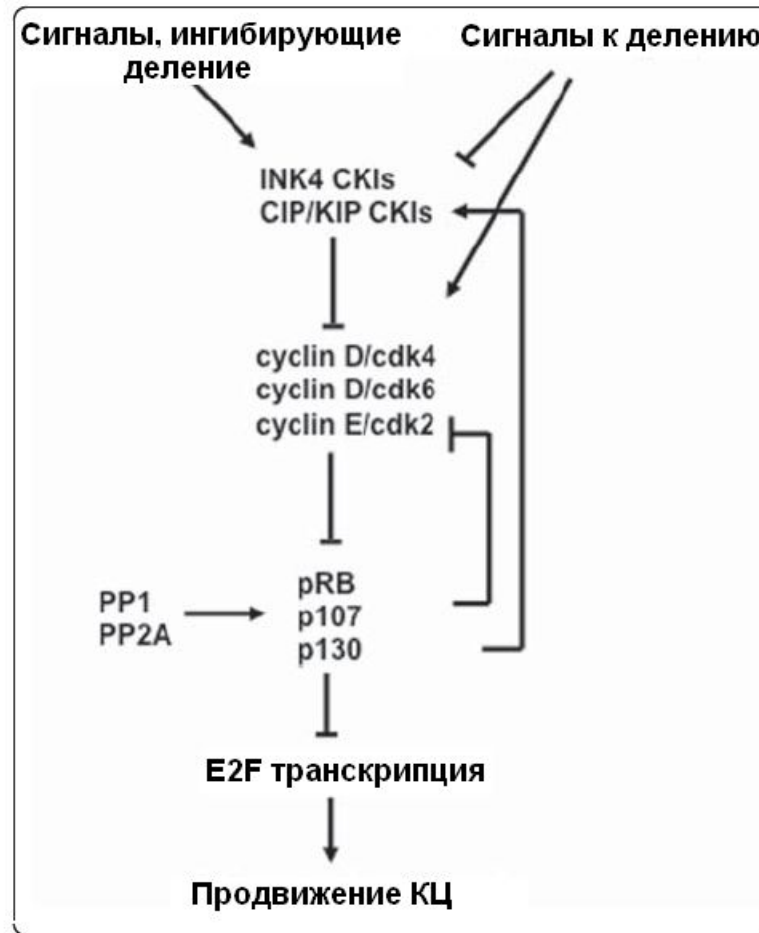
# RB белки в клеточном цикле



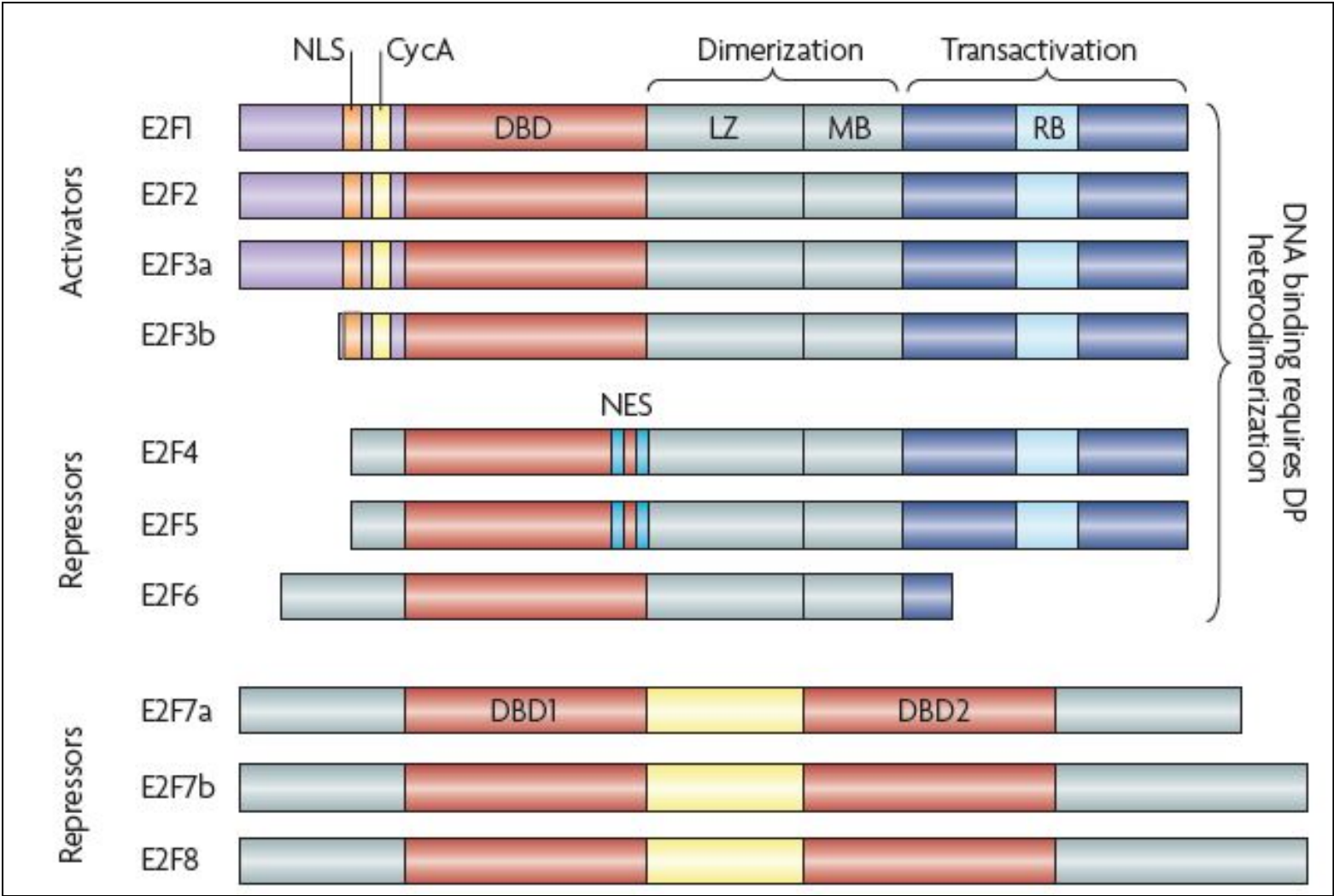
# Модель регуляции КЦ карманными белками



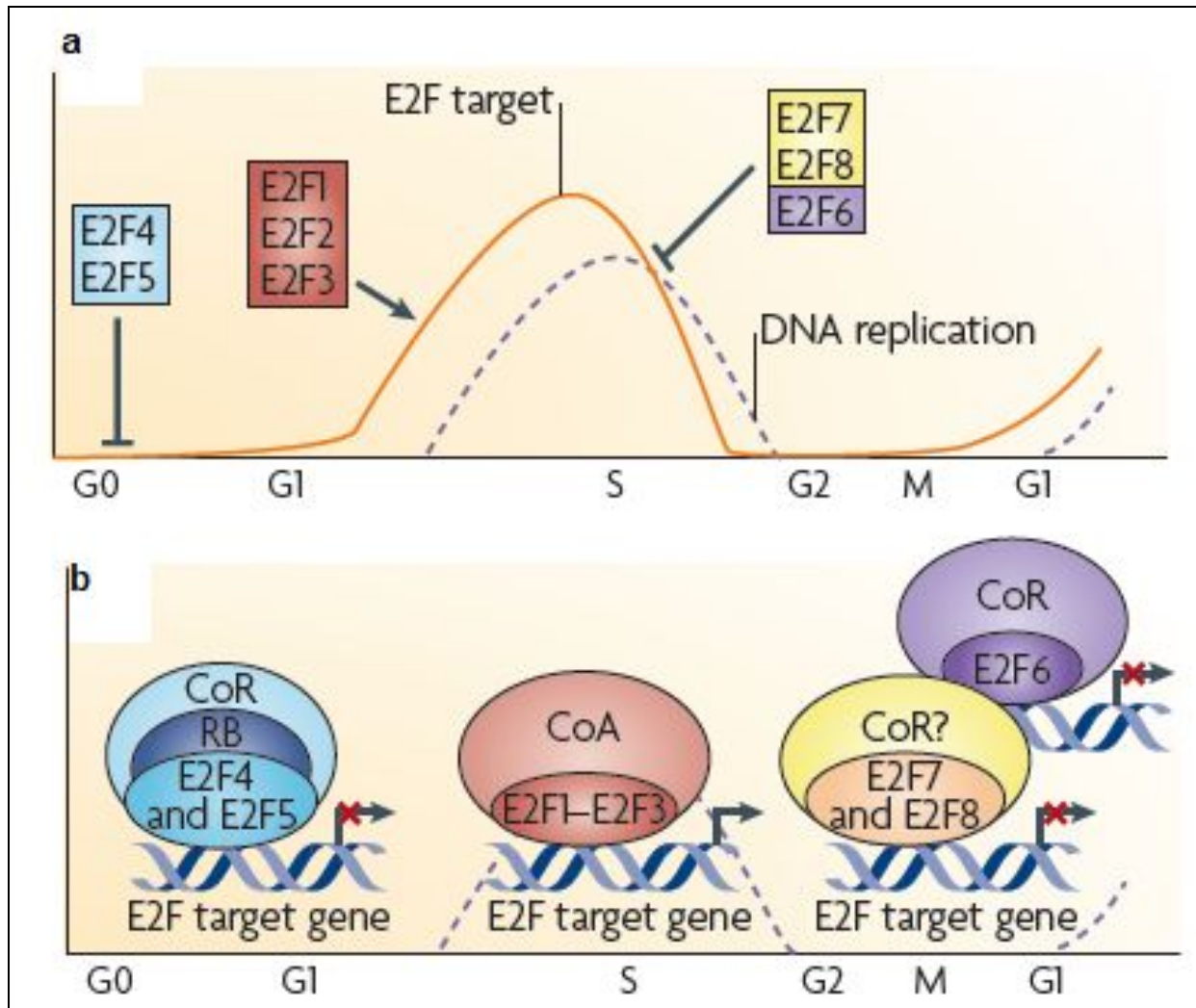
# Взаимодействие регуляторных белков в G<sub>1</sub>-фазе



# Семейство E2F млекопитающих



# Экспрессия E2Fs во время КЦ

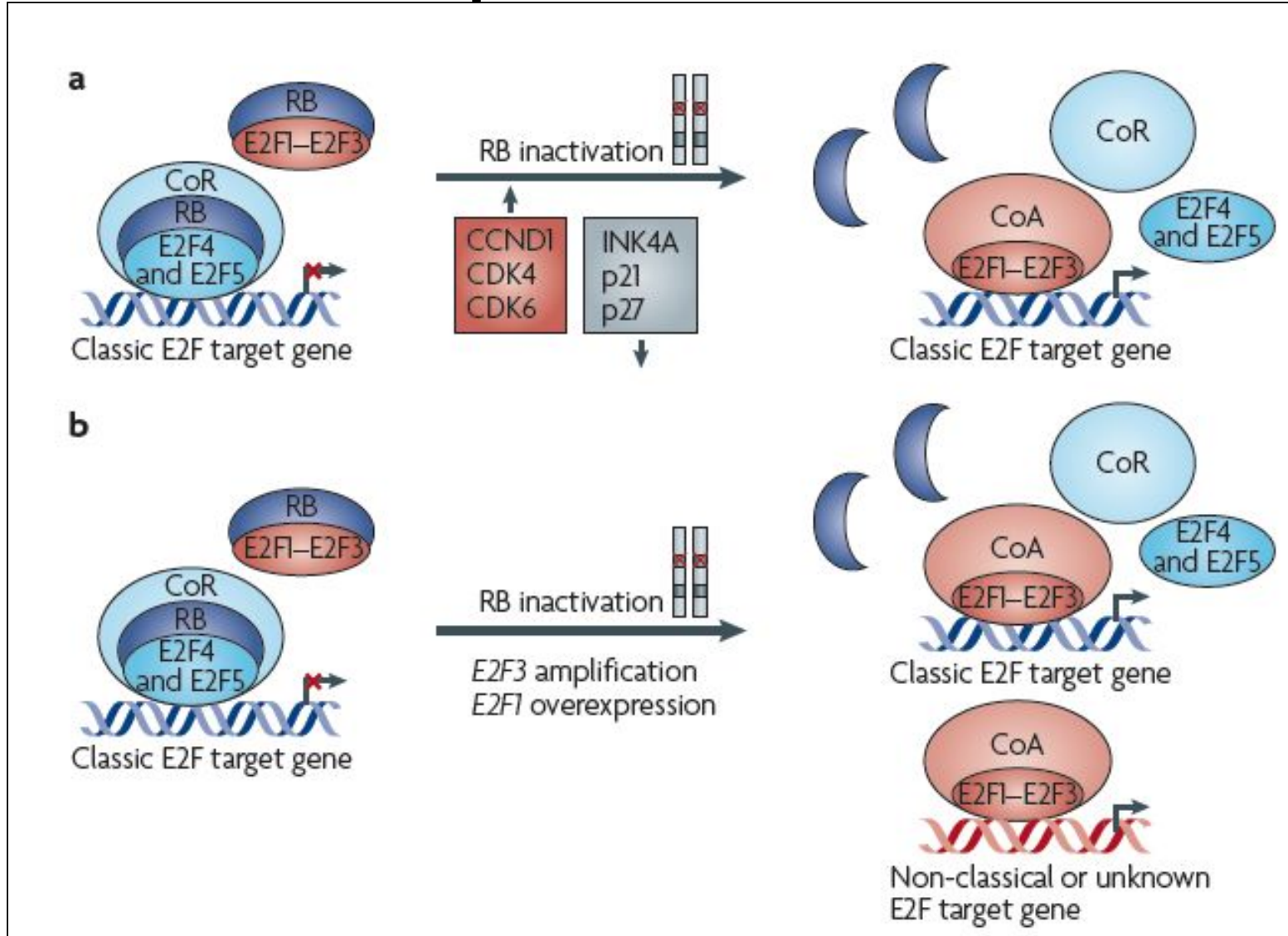


# E2Fs и рак

Gene (chromosome)	Genetic alteration	Human cancer	Notes
<i>E2F1</i> (20q11.2)	Amplification	HCC <sup>96-98</sup> , oesophageal SCC <sup>175</sup> , NSCLC <sup>176</sup> and cervical cancer <sup>177-179</sup>	None
	Increased expression	NSCLC <sup>111,135,179,180</sup> , SCLC <sup>112,181</sup> , glioblastoma <sup>109</sup> , oesophageal SCC <sup>181,182</sup> , HCC <sup>183,184</sup> , pancreatic ductal carcinoma <sup>185</sup> , and GI stromal <sup>186</sup> , breast <sup>187</sup> and ovarian cancer <sup>130,131,188</sup>	None
	Decreased expression	Gastric adenocarcinoma <sup>189</sup> , oral SCC <sup>190</sup> , and colon <sup>191</sup> and bladder cancer <sup>192</sup>	None
<i>E2F2</i> (1p36)	Amplification	SCLC <sup>193</sup> , alveolar rhabdomyosarcoma <sup>194</sup> and osteosarcoma <sup>195</sup>	Detection of 1p32–1p36 amplicon in SCLC
	Deletion	Neuroblastoma <sup>196</sup> , pheochromocytoma <sup>197</sup> and breast cancer <sup>198</sup>	None
	Increased expression	Ovarian cancer <sup>130,131</sup>	None
<i>E2F3</i> (6p22)	Amplification	Retinoblastoma <sup>105,106,133</sup> , uveal melanoma <sup>199</sup> , and breast <sup>200,201</sup> and bladder cancer <sup>103,104</sup>	Detection of 6p21.2 amplicon in breast cancer; complete <i>RB1</i> inactivation through LOH in retinoblastoma
	Increased expression	NSCLC <sup>111</sup> , SCLC <sup>111</sup> , and bladder <sup>103,104</sup> , breast <sup>118</sup> , ovarian <sup>188</sup> and prostate cancer <sup>202</sup>	Decreased <i>RB1</i> expression in breast cancer
<i>E2F4</i> (16q21–q22)	Amplification	Bladder cancer <sup>101</sup>	CGH analysis carried out on 12 transitional cell carcinoma lines
	Deletion	HCC <sup>203</sup> and breast cancer <sup>117,204,205</sup>	None
	Increased expression	Breast <sup>117</sup> and colon cancer <sup>206</sup>	None
	Mutation (AGC repeat)	GI cancer <sup>207-209</sup>	Expanded or reduced polyserine stretch and LOH frequently observed

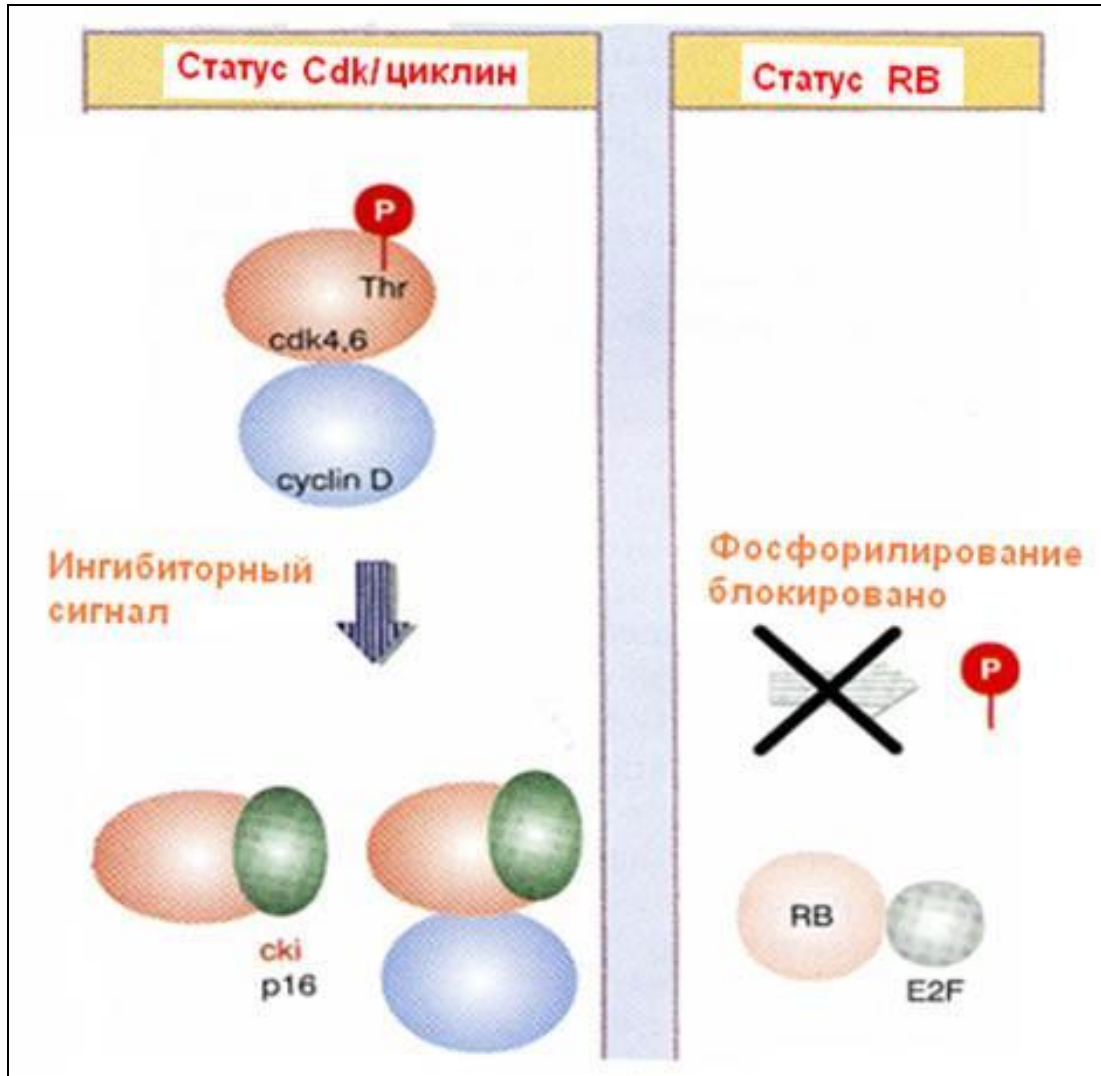


# Парадигма взаимодействия E2F-RB в раковых клетках



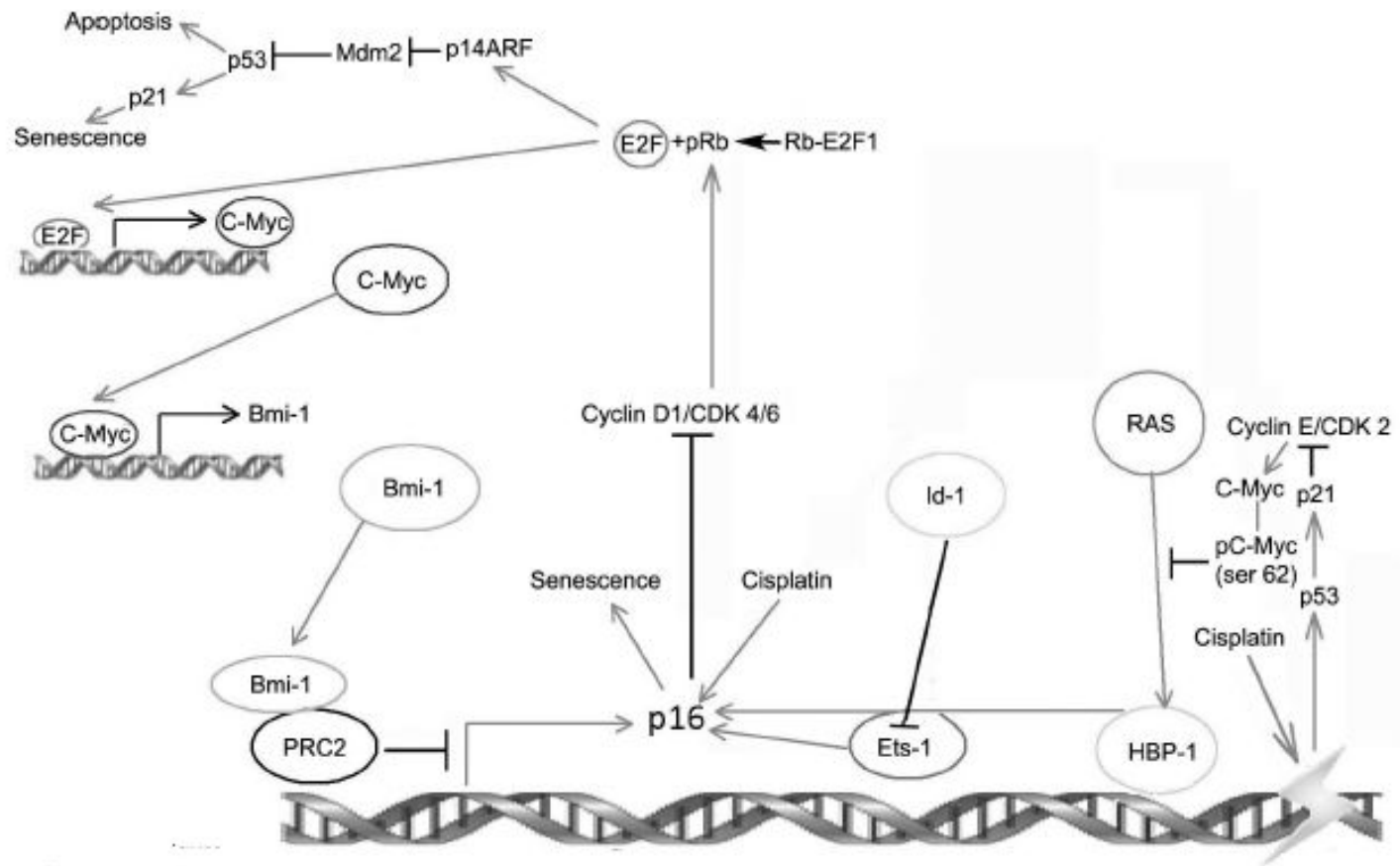
- В ядре непролиферирующих клеток остается RB гипофосфорилированным и формирует белковый комплекс E2F-RB, т.о. ингибируются гены, регулирующие вход в S1-фазу. Гипофосфорилированный RB также напрямую связывает и ингибирует активаторы E2F (E2F1-E2F3). RB инактивирован во многих типах рака, часто из-за мутации гена, локализованного на длинном плече хромосомы 13 (13q14.3) или из-за нарушения компонентов E2F-RB пути. Например, CCND1 переэкспрессируется или амплифицируется в раковых клетках, в итоге, нарушается функция E2F из-за активации CDK4 и CDK6 и RB гиперфосфорилируется. CDK4 и CDK6 часто переэкспрессируются, мутируют или амплифицируются в раковых клетках. Во многих раковых клетках ингибированы INK4A, p21, p27, в норме антагонисты фосфорилирования RB.
- Диссоциация гиперфосфорилированного RB из комплекса с RB ведет к неконтролируемому накоплению E2F, (E2F1 и E2F3).

# p16 в регуляции КЦ

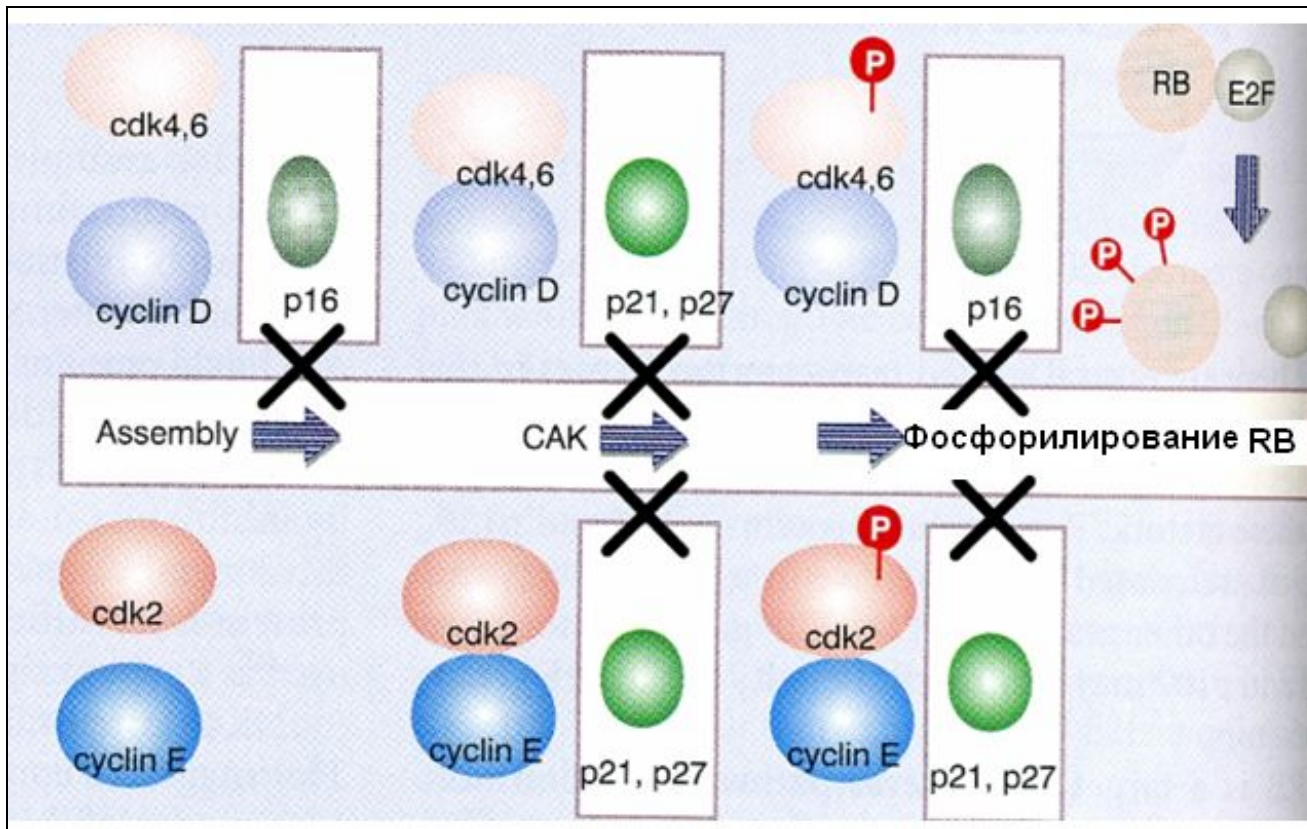


p16 связывается с cdk4 и cdk6 и к димеру cdk4,6. Ингибируя активность cdk-циклин D, p16 предотвращает фосфорилирование RB и держит E2F в неактивной форме, что делает его неспособным инициировать S фазу.

# R16 и старение



# p21 и p27 в регуляции КЦ



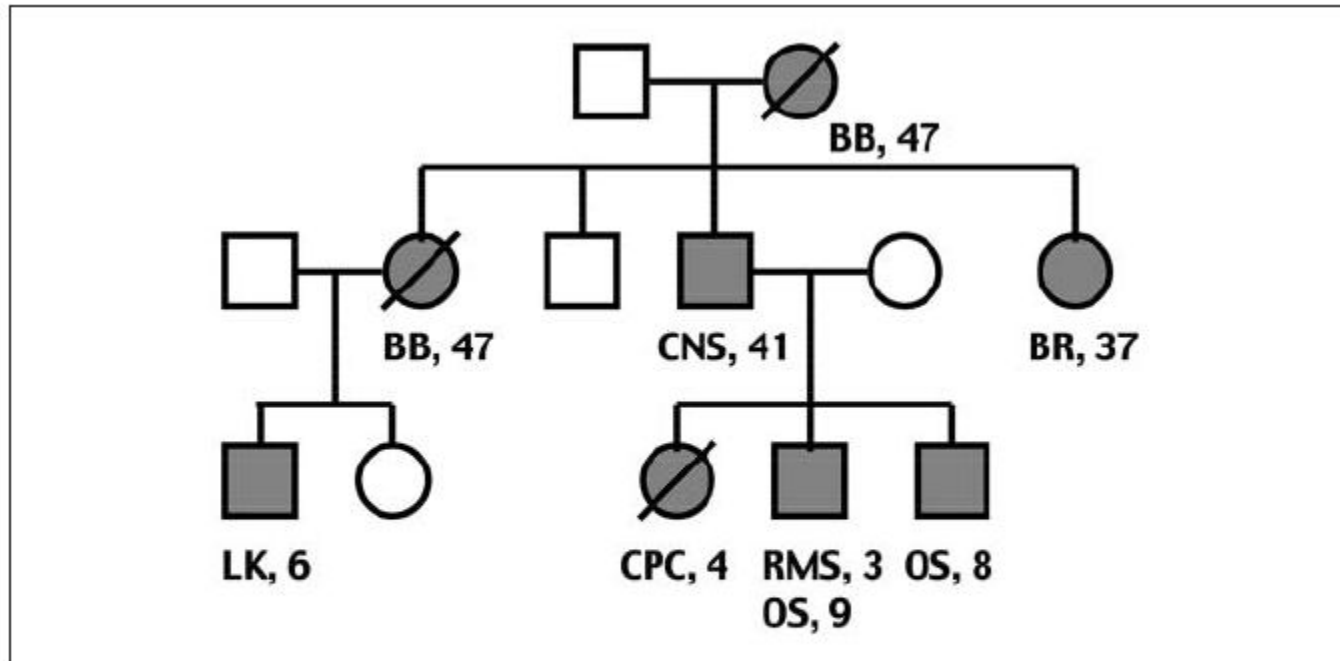
p21 и p27 ингибируют сборку и активность комплексов cdk с циклинами D и E. Они также ингибируют КЦ вне зависимости от RB. p16 ингибирует сборку и активность cdk4,6-циклин D

**Белок p53 – ключевой  
онкосупрессор. Роль в  
онкологии**

# Структура и функции p53

- - ДНК-связывающий белок (впервые описан в 1979 г.)
- - Фактор транскрипции (активация, супрессия генов)
- Страж генома
- Локализация: 17 хромосома
- Размер - 20kb (11 экзонов)
- Белок p53 – олигомерный ФТ (393 о.ак), организован в 5 структурных и функциональных районов

# Родословная семьи с синдромом Li-Fraumeni (1969)



BB-билатеральный РМЖ; CNS-рак головного мозга; BR-унилатеральный РМЖ; LK-лейкемия; CPC-карцинома хориоидного сплетения; RMS-рабдомиосаркома; OS-остеосаркома

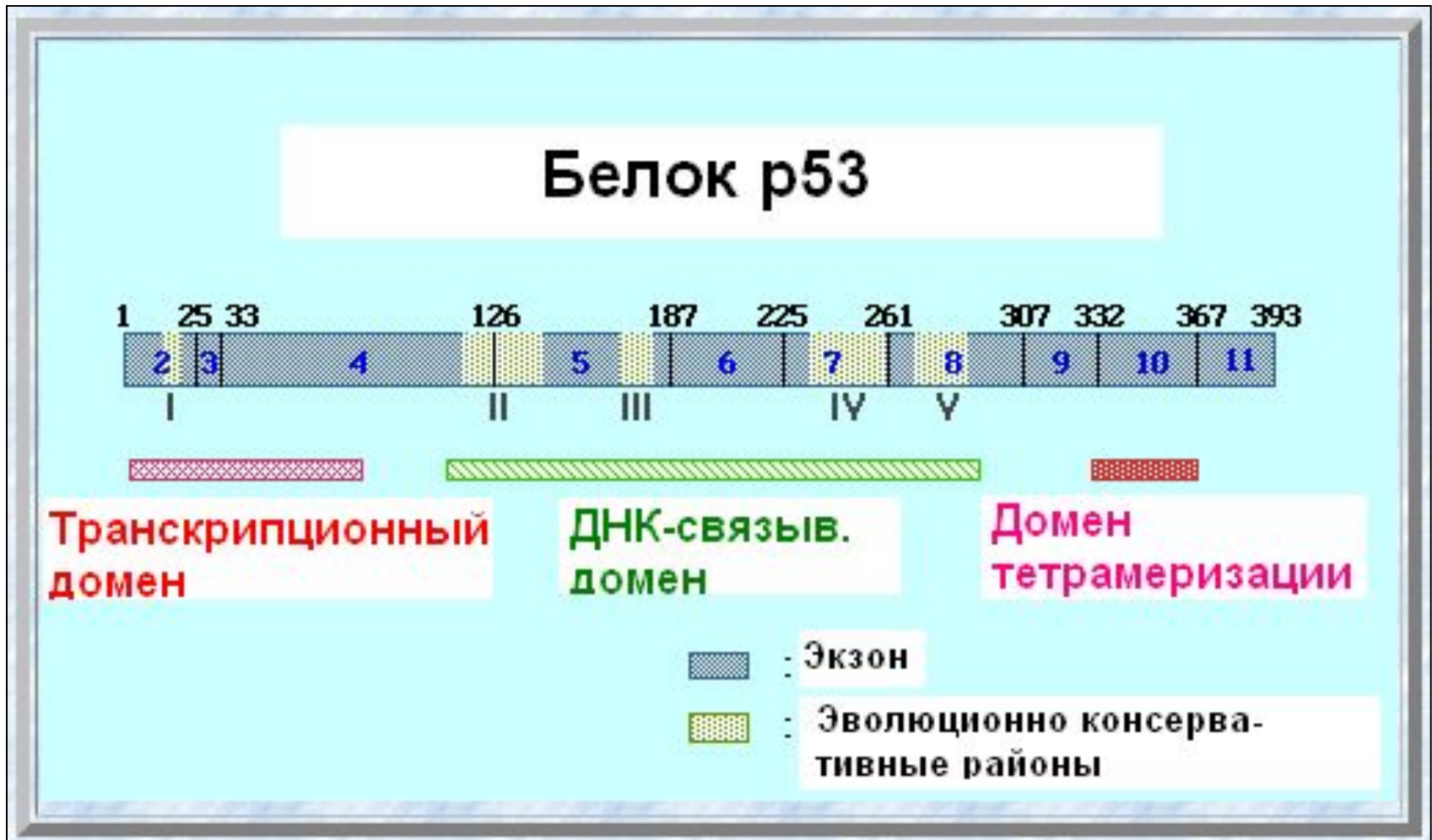
Частота: 1:5,000 человек



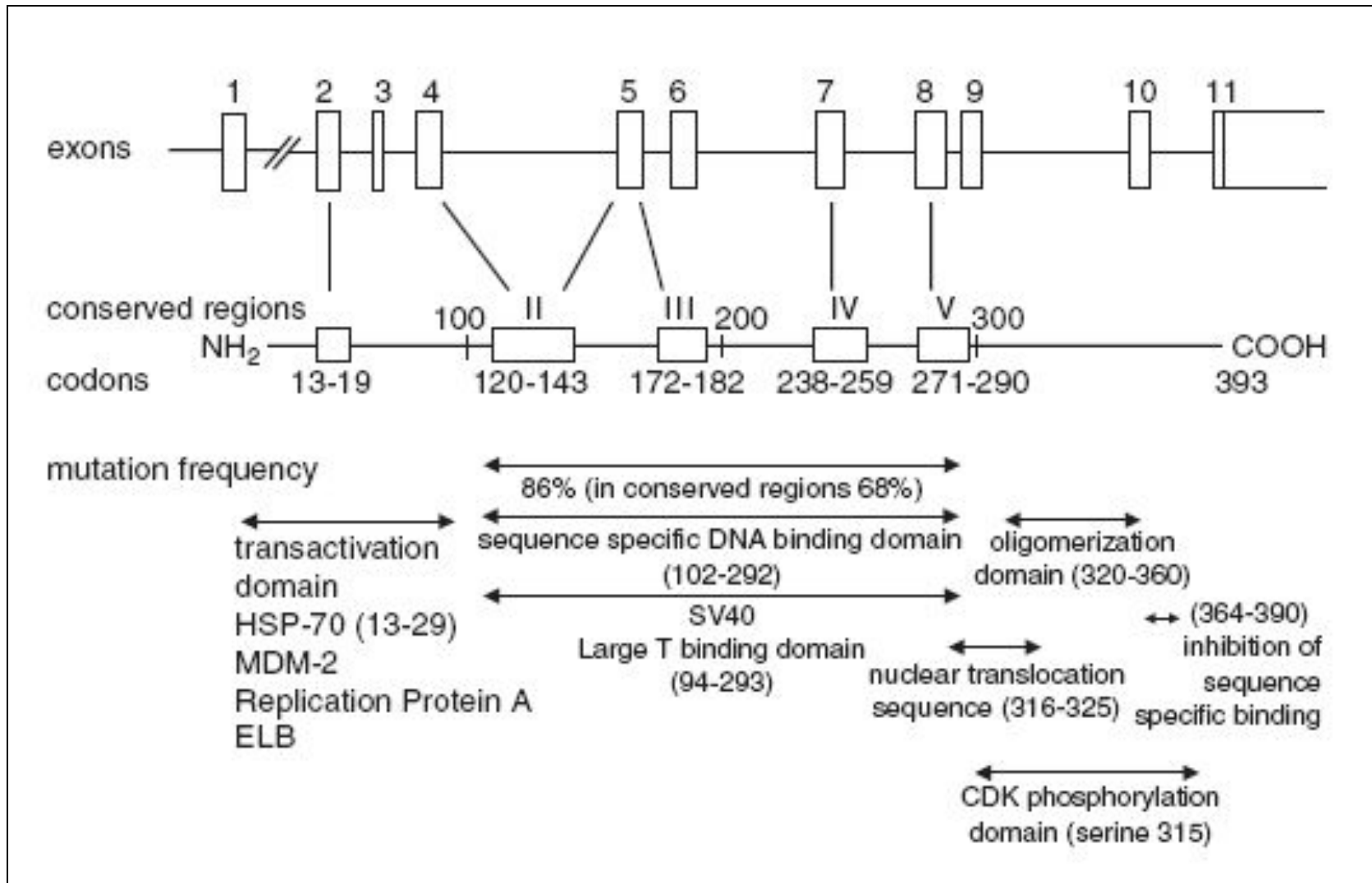
# Последовательности, узнаваемые p53

PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy

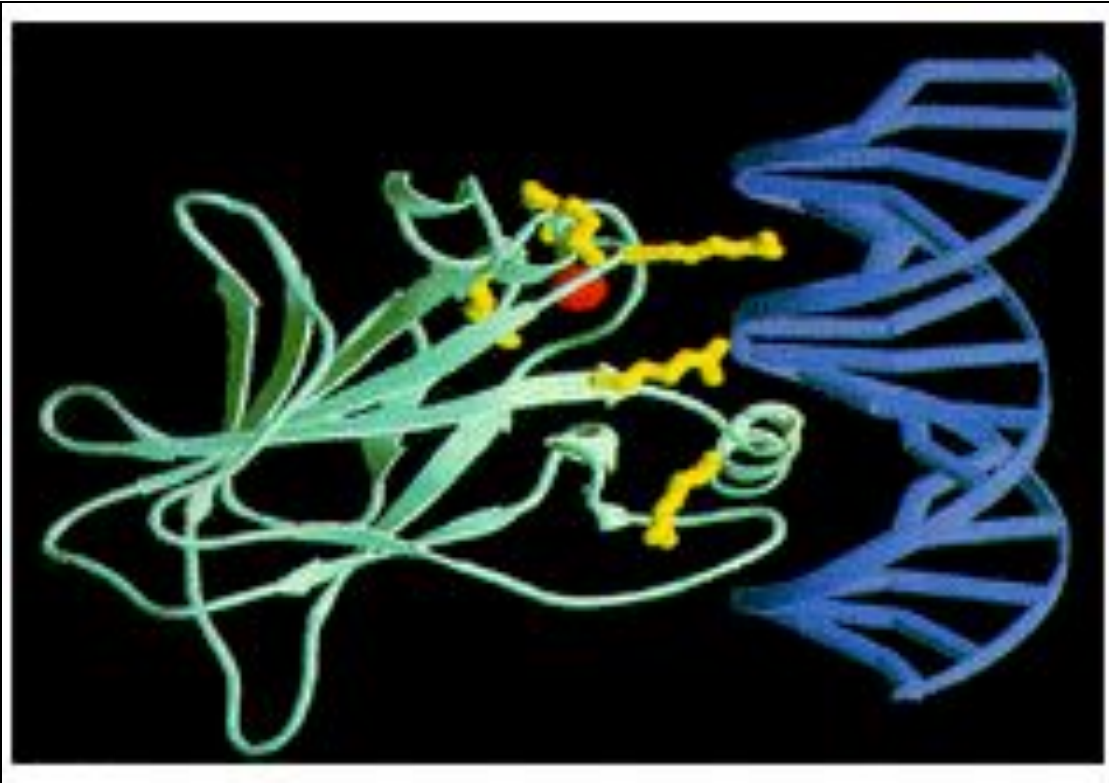
# Доменная структура p53 белка



# Доменная структура р53 белка

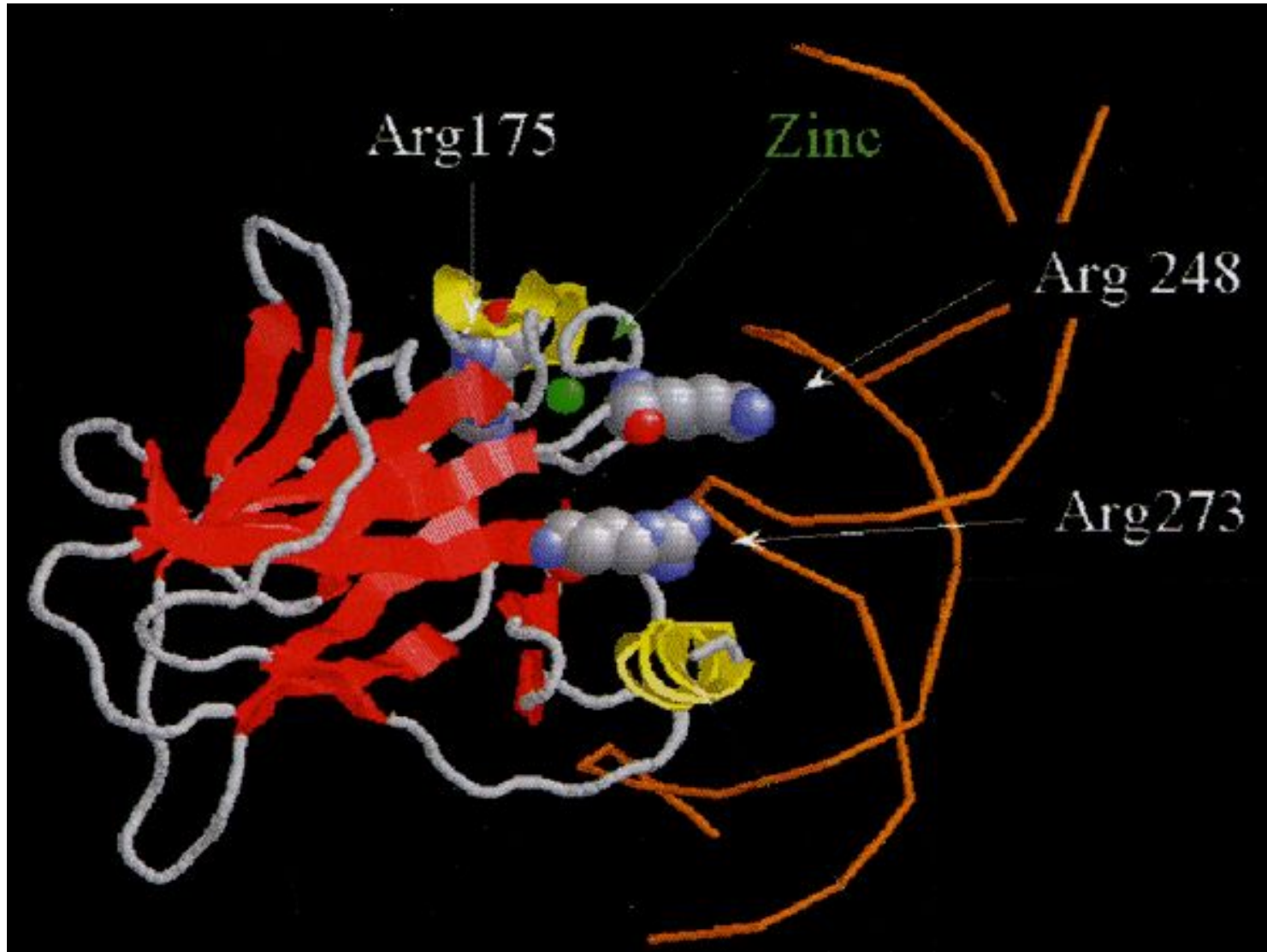


# Структура корового домена p53

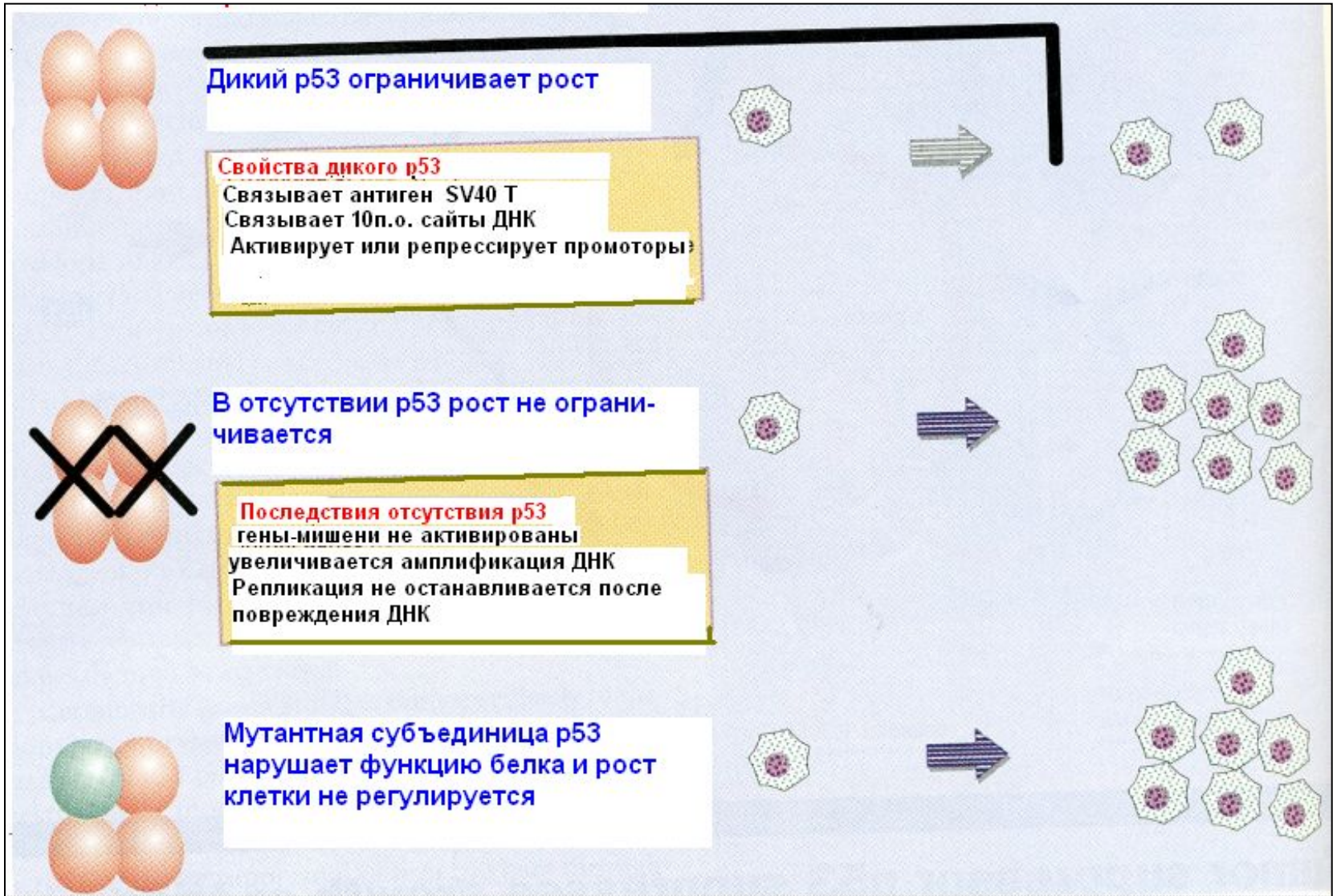


Коровый домен p53 (светло-зеленый) связывается с ДНК (синий). 6 наиболее частых мутаций показаны желтым. Все эти а.о. нужны для связывания с ДНК

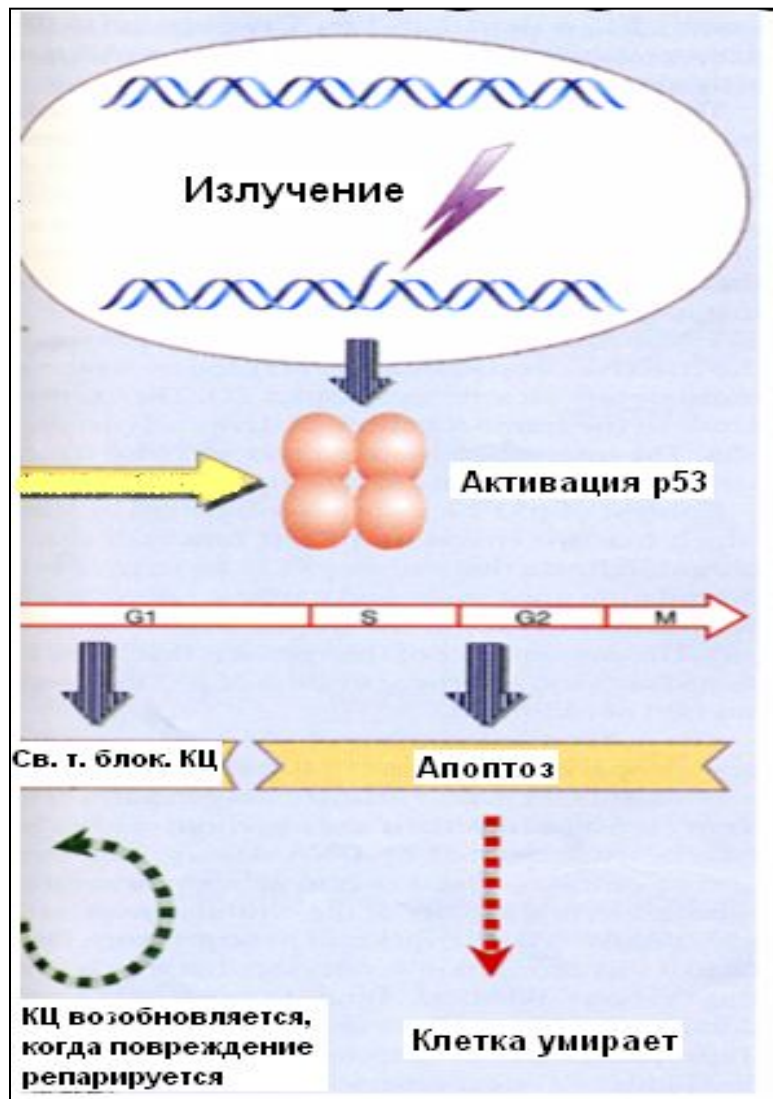
# 3D структура p53



# p53 регулирует рост

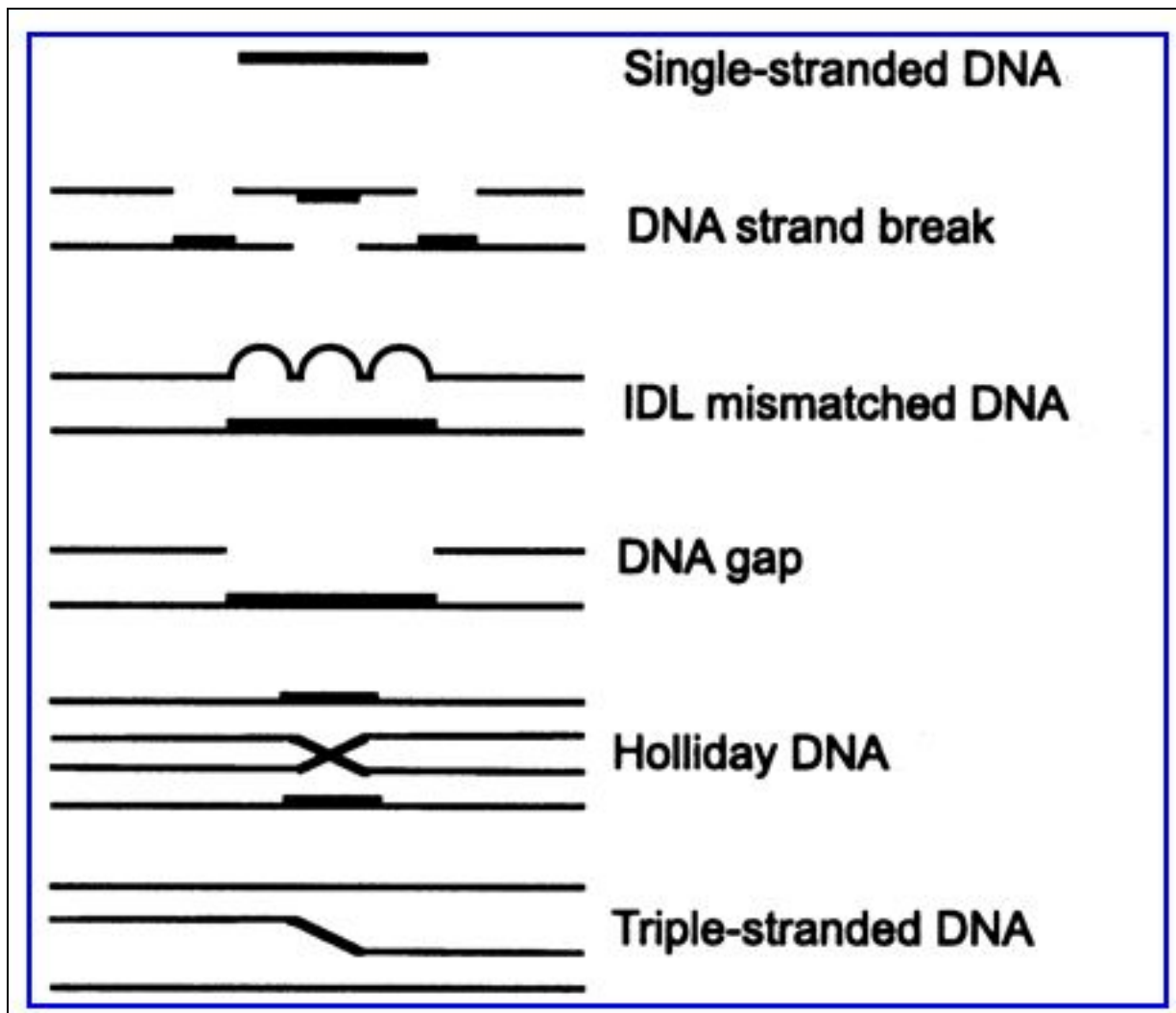


# p53 отвечает на повреждение ДНК



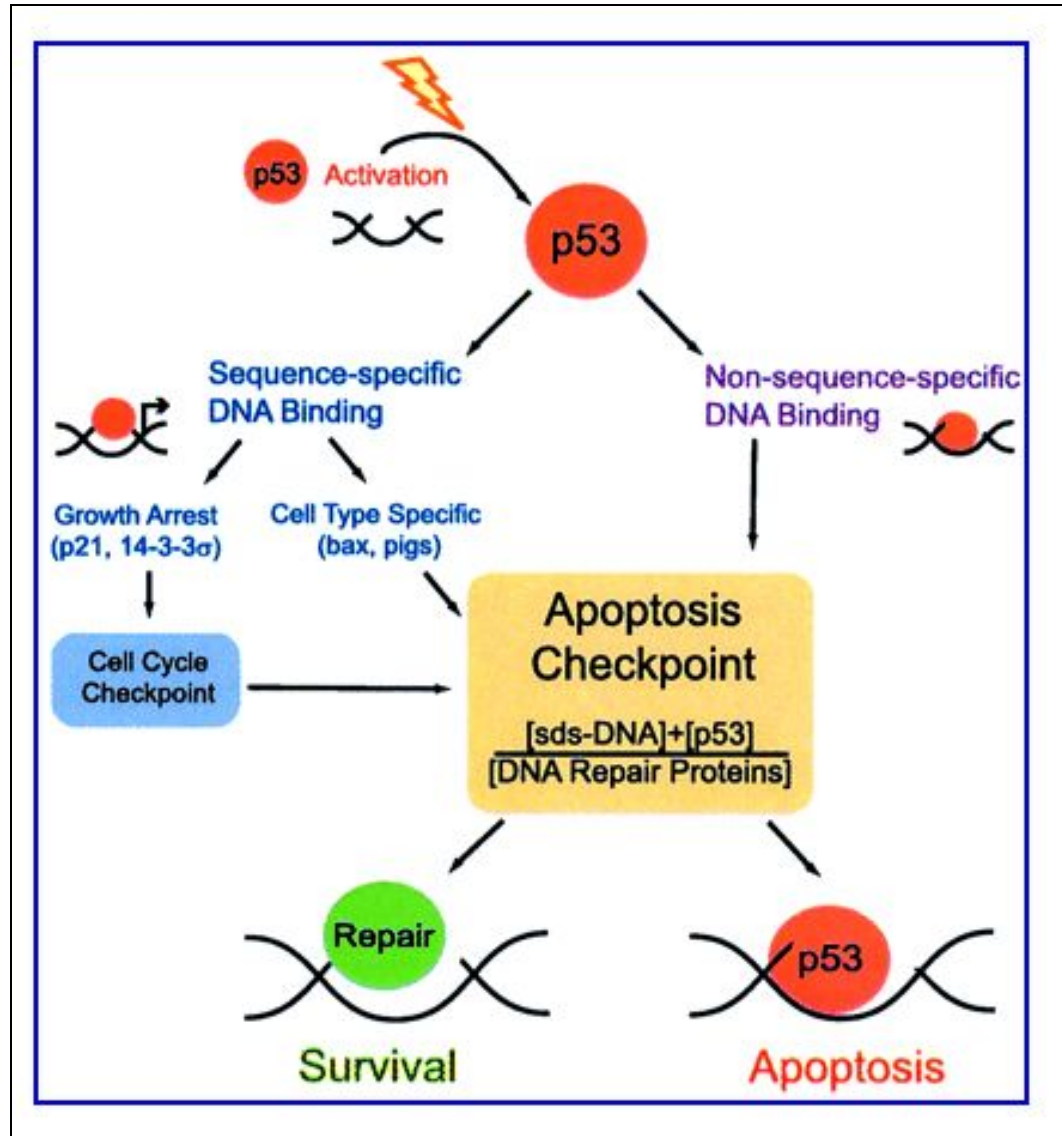
Повреждение ДНК активирует p53. Результат зависит от стадии КЦ. На ранних стадиях p53 активирует сверхточную точку, что тормозит процесс до тех пор, пока повреждение будет репарировано. Если поздно, p53 запускает апоптоз.

# Неспецифические последовательности ДНК, с которыми может связываться p53

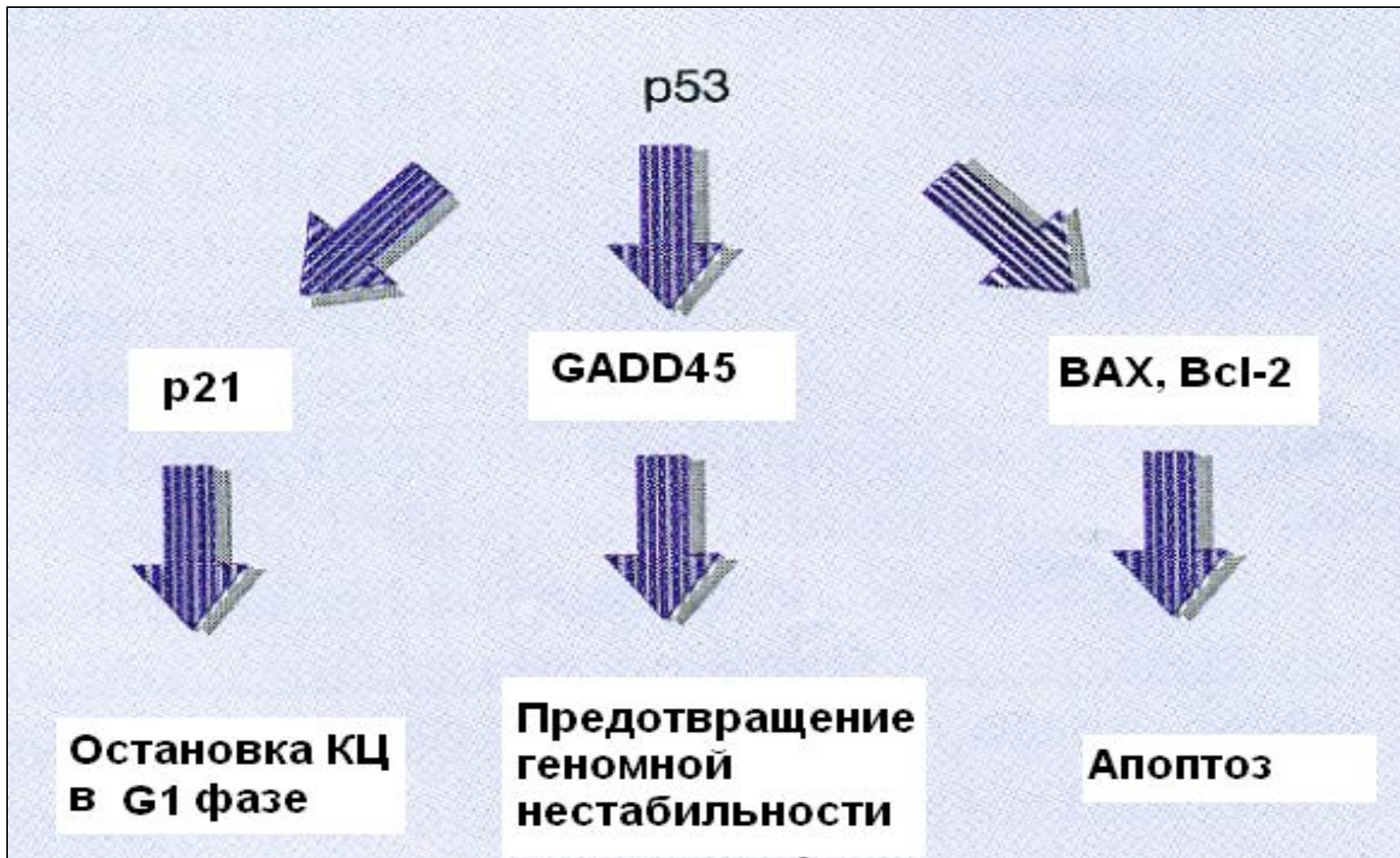




# p53 и апоптоз



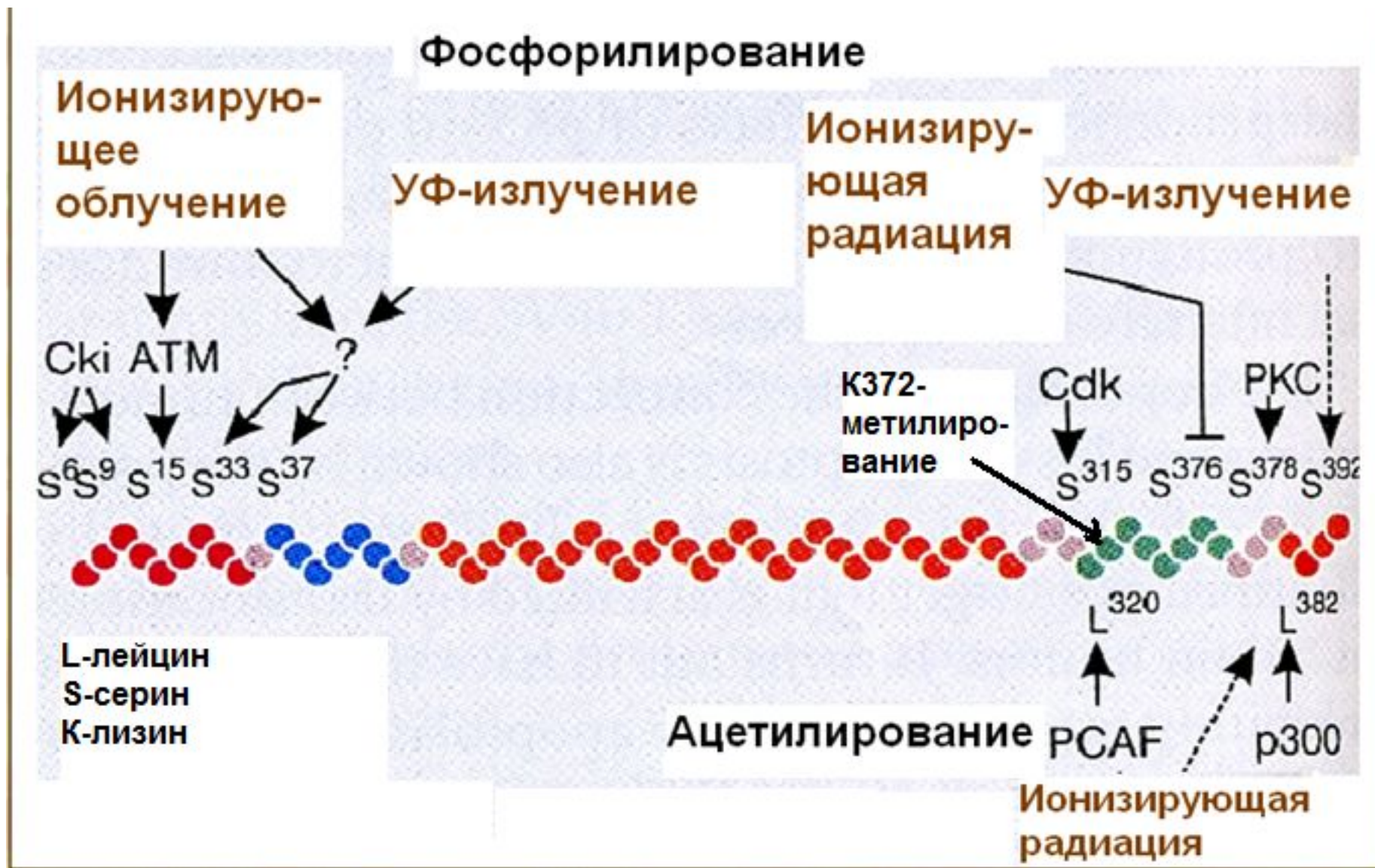
**p53 активирует несколько независимых путей.  
Активация ареста КЦ вместе с геномной  
нестабильностью – альтернатива апоптозу**



# Регуляция активности p53

- 1. В норме его экспрессия невелика и контролируется убиквитинированием и протеосомной деградацией.
- 2. Индукция в ответ на стимулы (посттранскрипционная модификация)
- 3. Деградация белка SUMO-1 + др. белки
- 4. Роль белка mdm2
- 5. Механизмы повреждения p53

**Каждый путь, который активирует p53, вызывает модификацию определенных остатков аминокислот белка**



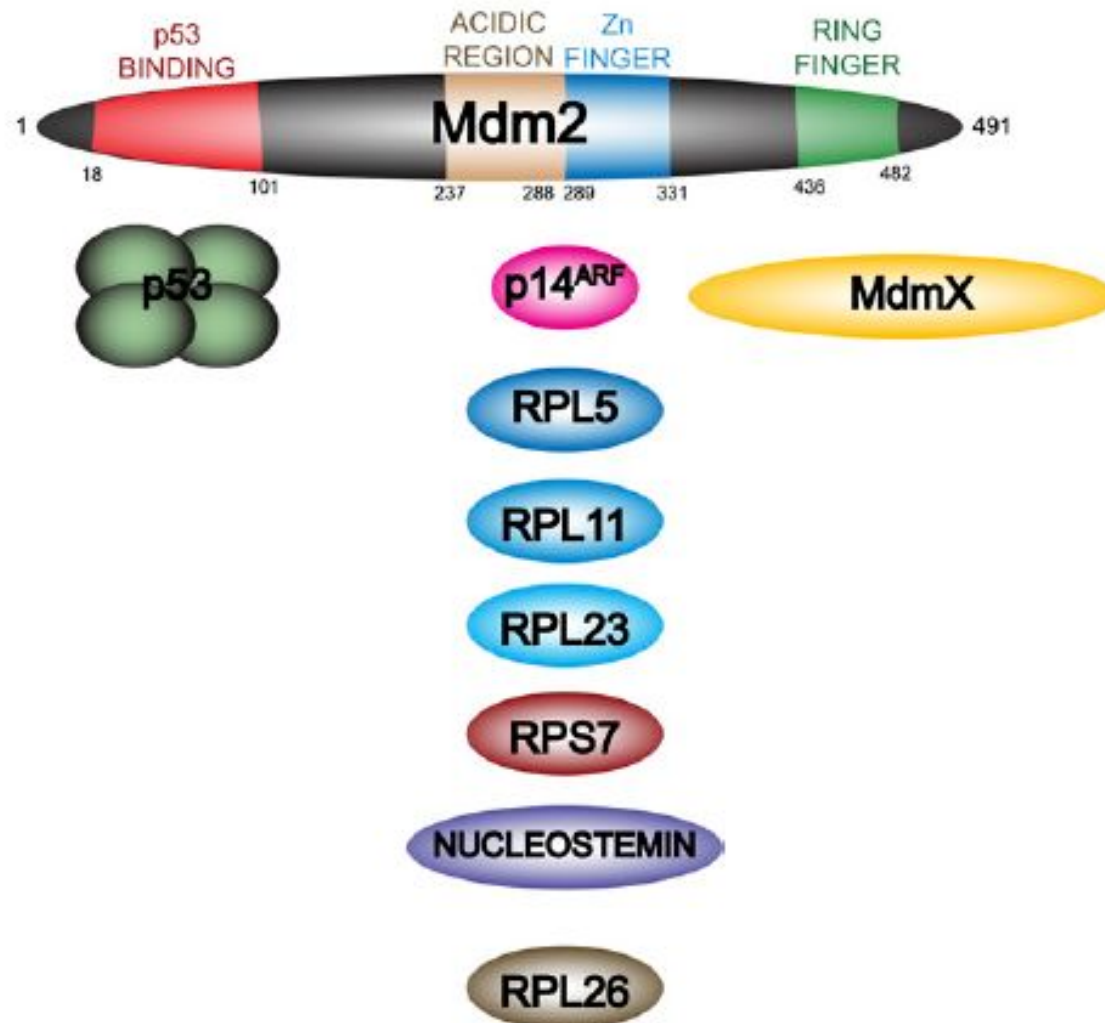
Residue of p53	Modification	Modifiers	De-modifiers
S6	P	JNK2, CK1 $\delta$ / $\epsilon$	-
S9	P	CK1 $\delta$ / $\epsilon$	-
S15	P	ATM, ATR, DNA-PK, AMPK, mTOR, RSK2, CDK5	PP1, PPM1D
T18	P	TTK, CHK2, VRK1	-
S20	P	CHK2, PIK3	-
S33	P	CDK9, CDK5, CAK/CDK7, GSK3 $\beta$ , P38K	-
S37	P	ATR, PRAK	PP1, PP2A
S46	P	CDK5, AMPK $\alpha$ , HIPK2, P38K, PKC $\delta$ , DYRK2	PP2A
T55	P	ERK2, TAF1	PP2A, B56Y
T81	P	JNK2	-
K120	Ac	TIP60	-
T155	P	CSN	-
K164	Ac	P300 (KAT3B)	-
S215	P	STK15	-
E255, E258, E259	R	PARP-1 (poly ADP-ribosylase)	-
K305	Ac	P300 (KAT3B)	-
S313, S314	P	CHK1, CHK2	-
S315	P	STK15, CDK9, CDK2	CDC14A
L320	Ac	PCAF (KAT2B)	HDAC1
S366	P	CHK2, I $\kappa$ BK2	-
K370	Me <sup>1</sup> , Me <sup>2</sup>	SMYD2 (KMT3C)	LSD1
K372	Me <sup>1</sup>	SET7/9 (KMT3)	-
K373	Ac	P300 (KAT3B)	HDAC1
S376	P	PKC, GSK3 $\beta$	-
T377	P	CHK1, CHK2	-
S378	P	PKC, CHK1, CHK2	-
K382	Ac	P300 (KAT3B)	HDAC1, SIRT1
K382	Me <sup>2</sup>	SET8 (KMT5A)	-
K386	S	SUMO-1	-
T387	P	CHK1	-
S392	P	CDK9, PKR, FACT (CK2)	PP1
K320, K321, K370, K372, K373	N8	FBXO11, MDM2	-
K120, K132, K139, K164	Ub	-	-
K291, K292	Ub	MKRN1	-
K320	Ub	E4F1	-
K351, K357	Ub	MSL2	-
K101, K370, K372, K373, K381, K382, K386	Ub	MDM2	-

P Phosphorylation; Ac Acetylation; Me<sup>1</sup> Mono-methylation; Me<sup>2</sup> Di-methylation; R Ribosylation; S Sumoylation; N8 Neddylation; Ub Ubiquitination.

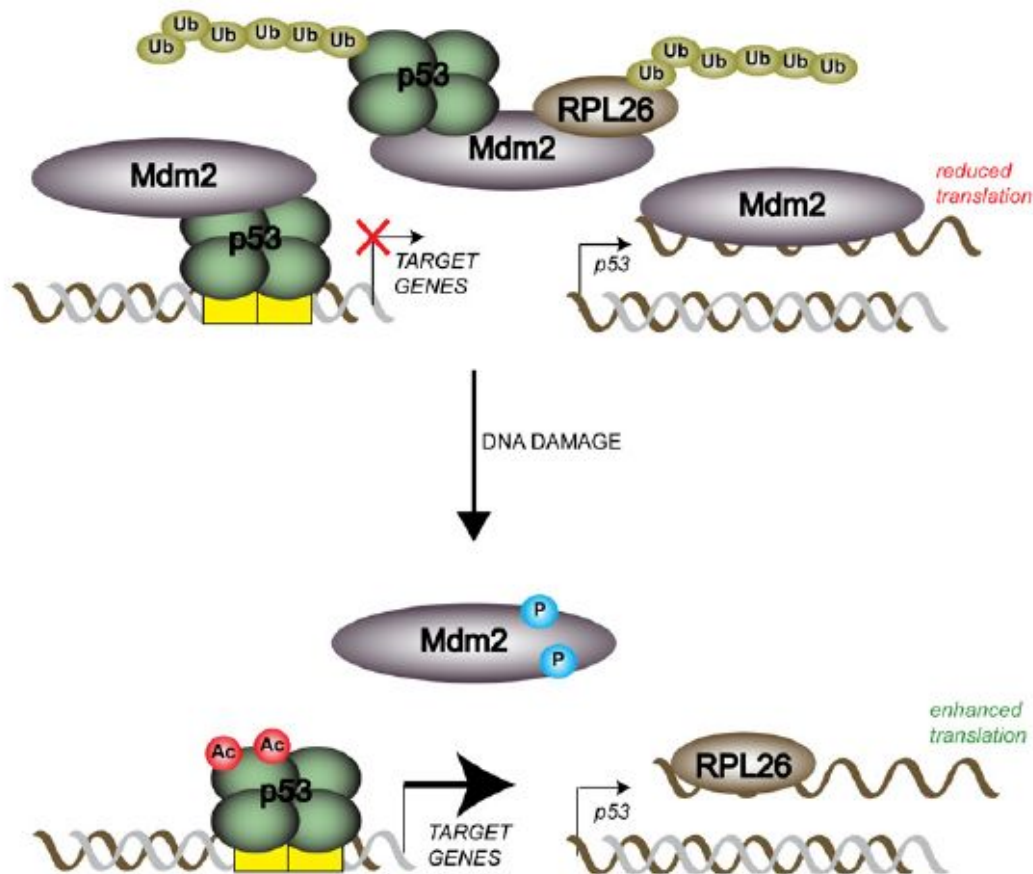
# MDM2 в регуляции p53

- 1991 г. - впервые показано его взаимодействие с p53

# Структура белка Mdm2



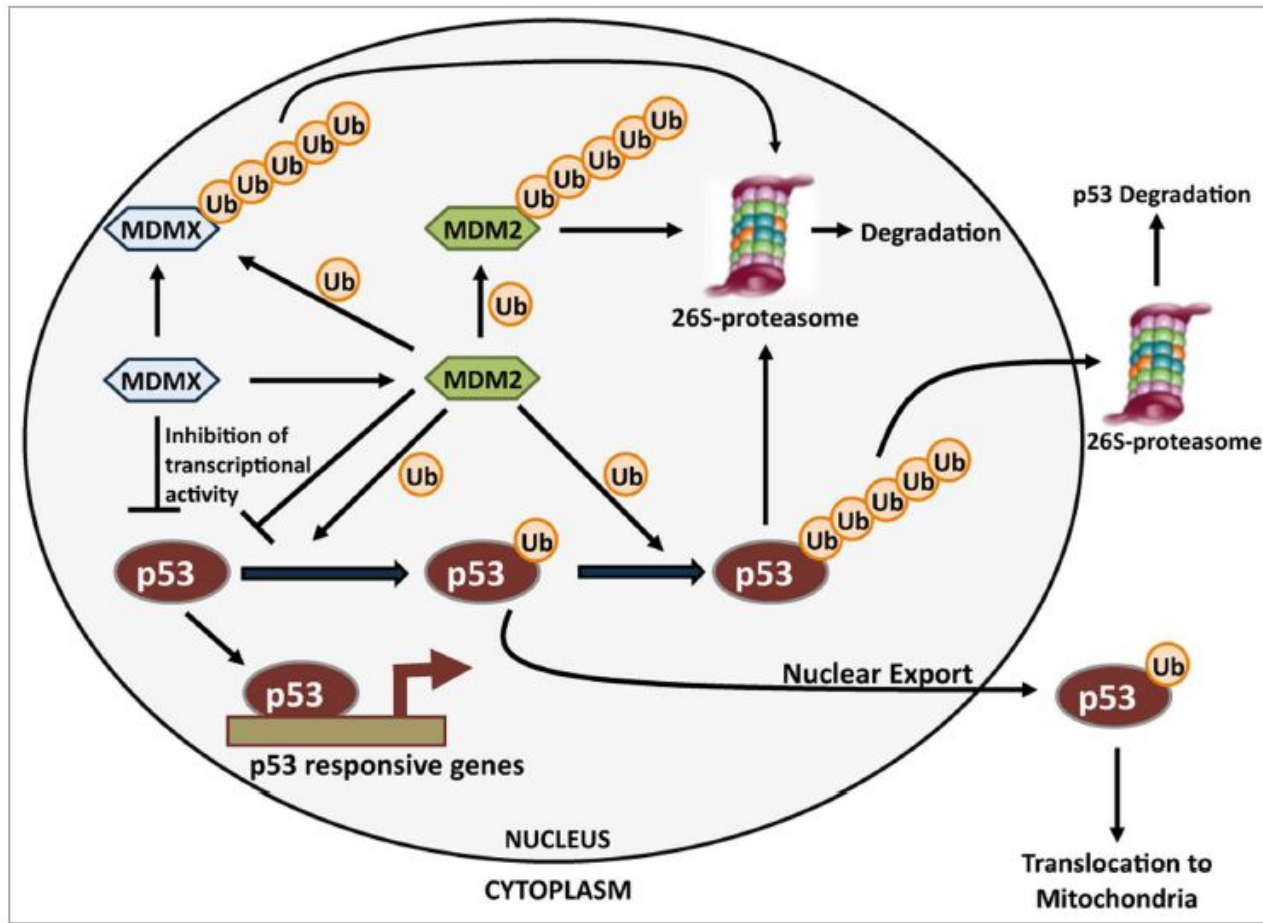
# Mdm2 регулирует p53-зависимый ответ на повреждение ДНК



Mdm2 связывается с p53, который регулирует многие гены. До повреждения ДНК Mdm2 взаимодействует с p53 и рибосомным белком RPL26, приводя к убиквитинации и протеосомной деградации. При повреждении ДНК Mdm2 и p53 модифицируется пост-транскрипционно и не могут больше взаимодействовать. Теперь p53 может регулировать экспрессию генов. Недавно показано, что Mdm2 взаимодействует с mRNA самого p53 и супрессирует трансляцию. Кроме того, белок RPL26 является также регулятором трансляции p53. При повреждении ДНК его взаимодействие с Mdm2 также прекращается, что приводит к увеличению уровня белка p53.



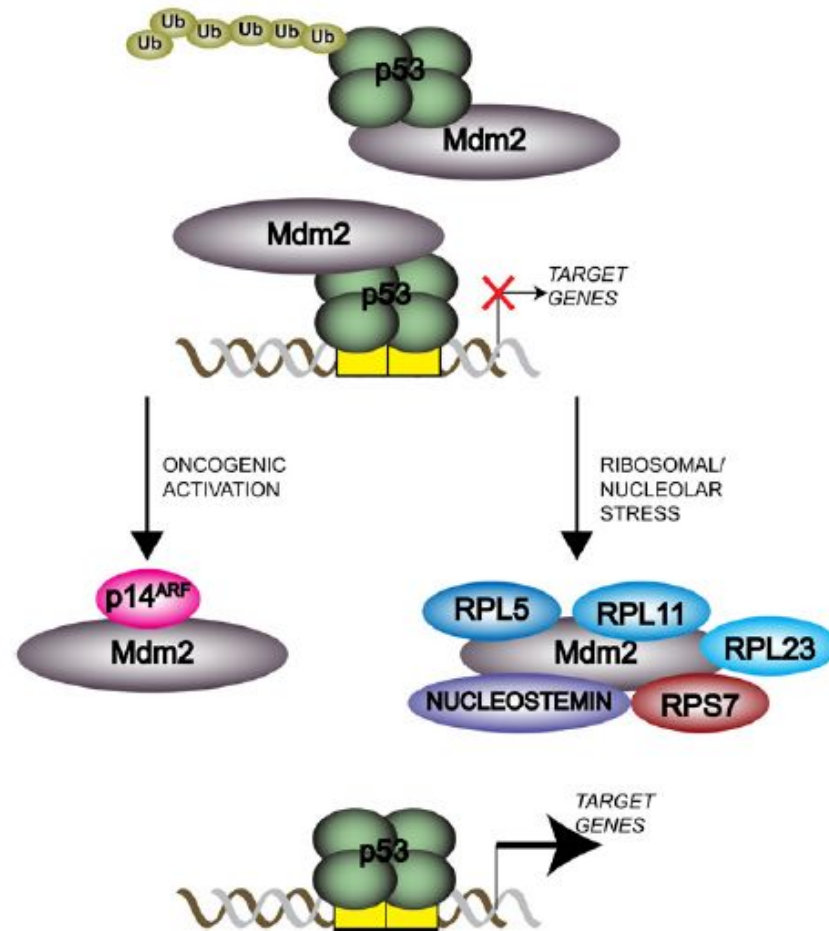
# Комплексный контроль p53



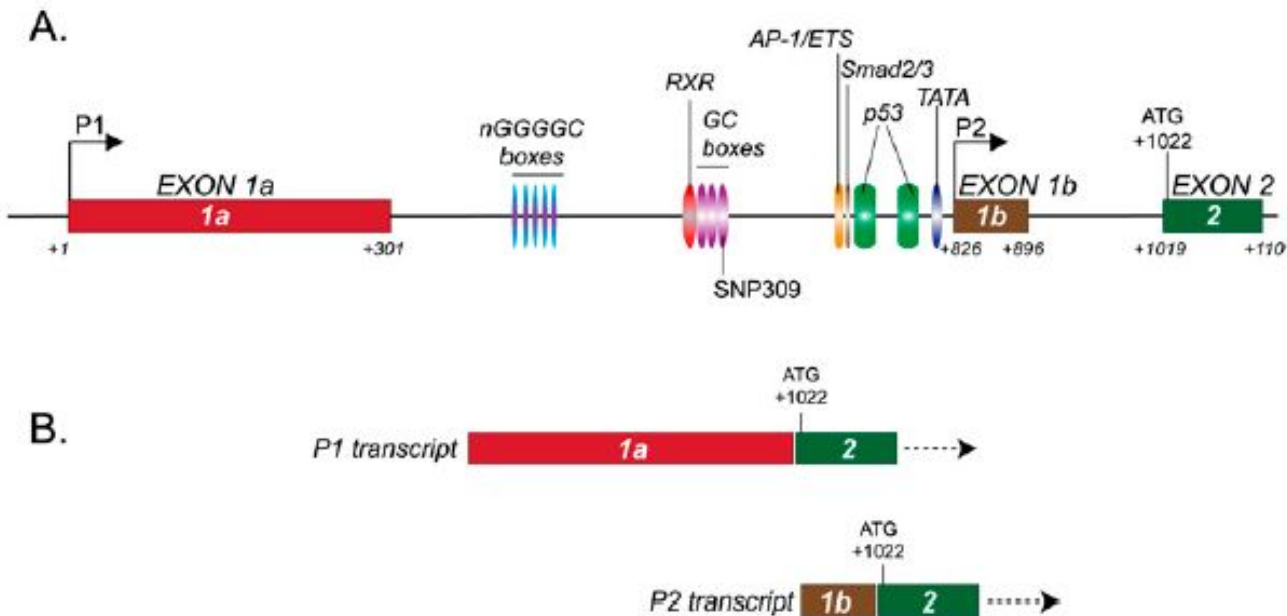
# Убиквитин-Е3-лигазы, регулирующие активность p53

Ligase	Type	p53-responsive	E2	Ub	p53-Lysine residue	p53 status	Mode
Mdm2	RING	Yes	UbcH5b	Mono/Poly	K370, K372, K373, K381, K382, K386	Degradation	Direct
Pirh2	RING	Yes	UbcH5b	Poly	-	Degradation	Direct
Cop1	RING	Yes	UbcH5b	Poly	-	Degradation	Direct
TRIM24	RING	-	UbcH8	Poly	-	Degradation	Direct
ARF-BP1	HECT	No	UbcH5c	Poly	-	Degradation	Direct
CARP1/2	RING	-	-	Poly	-	Degradation	Direct
TOPORS	RING	-	UbcH5a/c, UbcH6	Poly	-	Degradation	Direct
Synoviolin	RING	-	UbcH5c	Poly	-	Degradation	Direct
CHIP	-	-	UbcH5b	Poly	-	Degradation	Direct
JFK	RING	-	-	Poly	-	Degradation	Skp1-Cul1-Rbx1-F-box
MKRN1	RING	No	-	-	K291, K292	Degradation	Direct
E4orf6 and E1B55K	RING	-	UbcH5a	Poly	-	Degradation	ElonginB-Cul5-Rbx1
ICP0	RING	-	UbcH5a, UbcH6	Poly	-	Translocation to Nuclear Foci	Direct
MSL2	RING	-	-	Poly	K351, K357	Nuclear Export	Direct
CUL7	-	-	-	Mono/Di	-	Transcriptional inactivation	Direct
WWP1	HECT	Yes	UbcH5c	Mono/Poly	-	Nuclear Export	Direct
Ubc13	-	Repressed	Ubc13	Poly	-	Prevent Tetramerization	Direct
E4F1	-	-	-	Poly	K320	Translocation to Chromatin	Direct
BZLF1	-	-	UbcH5a/c	Poly	-	Degradation	ElonginB/c-Cul2/5-SOCS

# Активация p53 в ответ на стресс

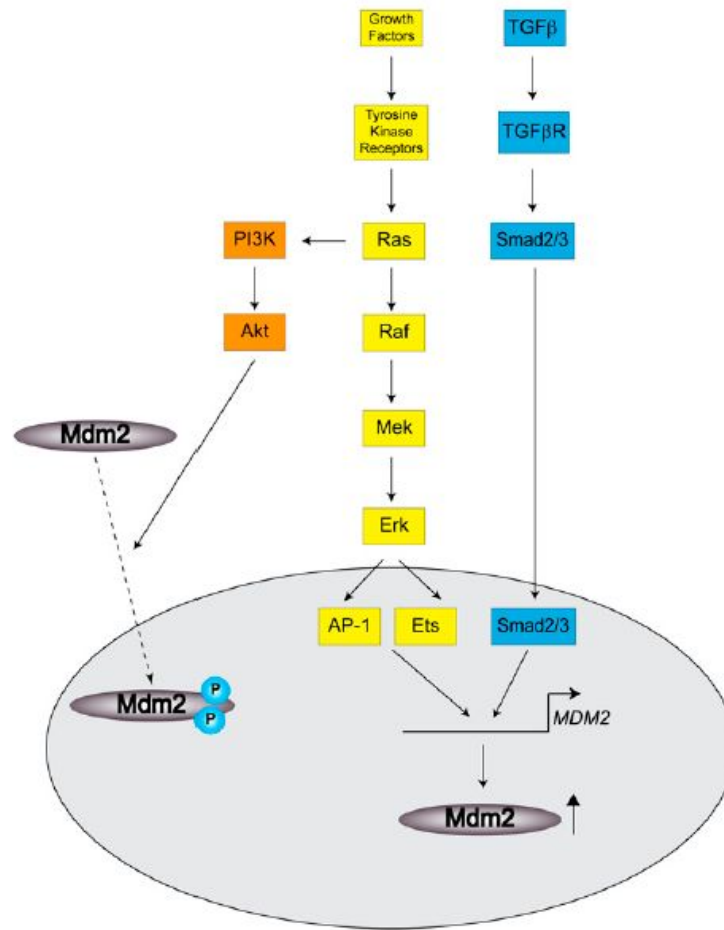


# Регуляция экспрессии гена *Mdm2*

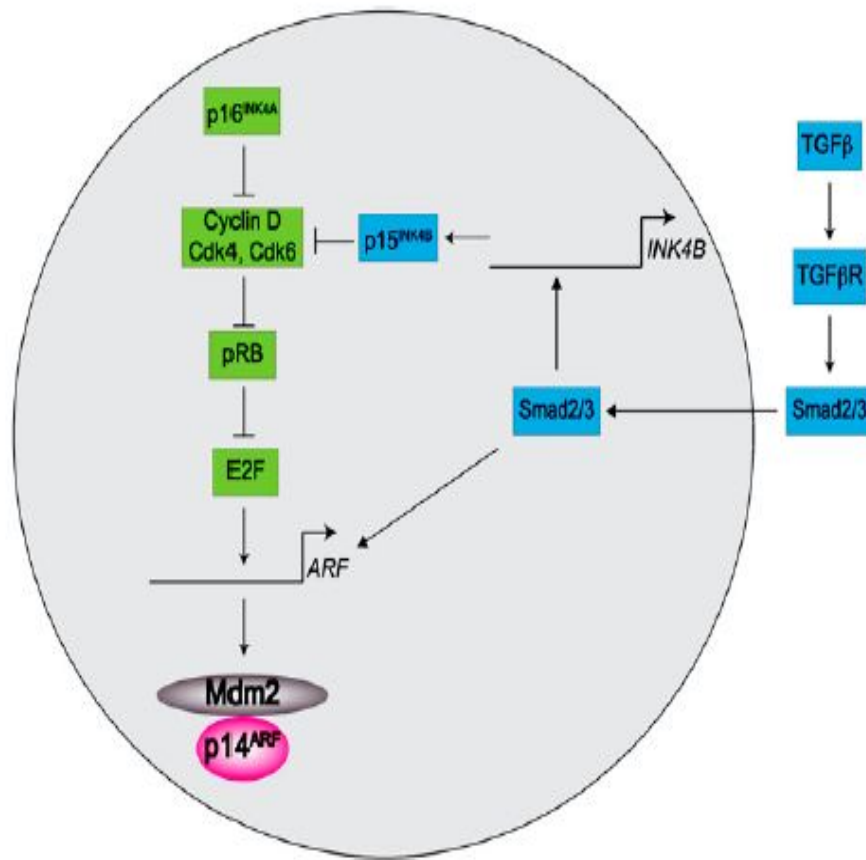


У гена *Mdm2* два промотора. P1 контролирует базальную экспрессию, P2 промотор использует стартовый сайт у первого экзона 1b. P2 – индуцибельный промотор, регулируется многими ФТ, включая RXR, AP-1, семейство Ets, Smad2, Smad3 и сам p53. Транскрипты с промоторов P1 and P2 имеют различные нетранслируемые регионы и разную длину.

# Онкогенные пути усиливают экспрессию Mdm2

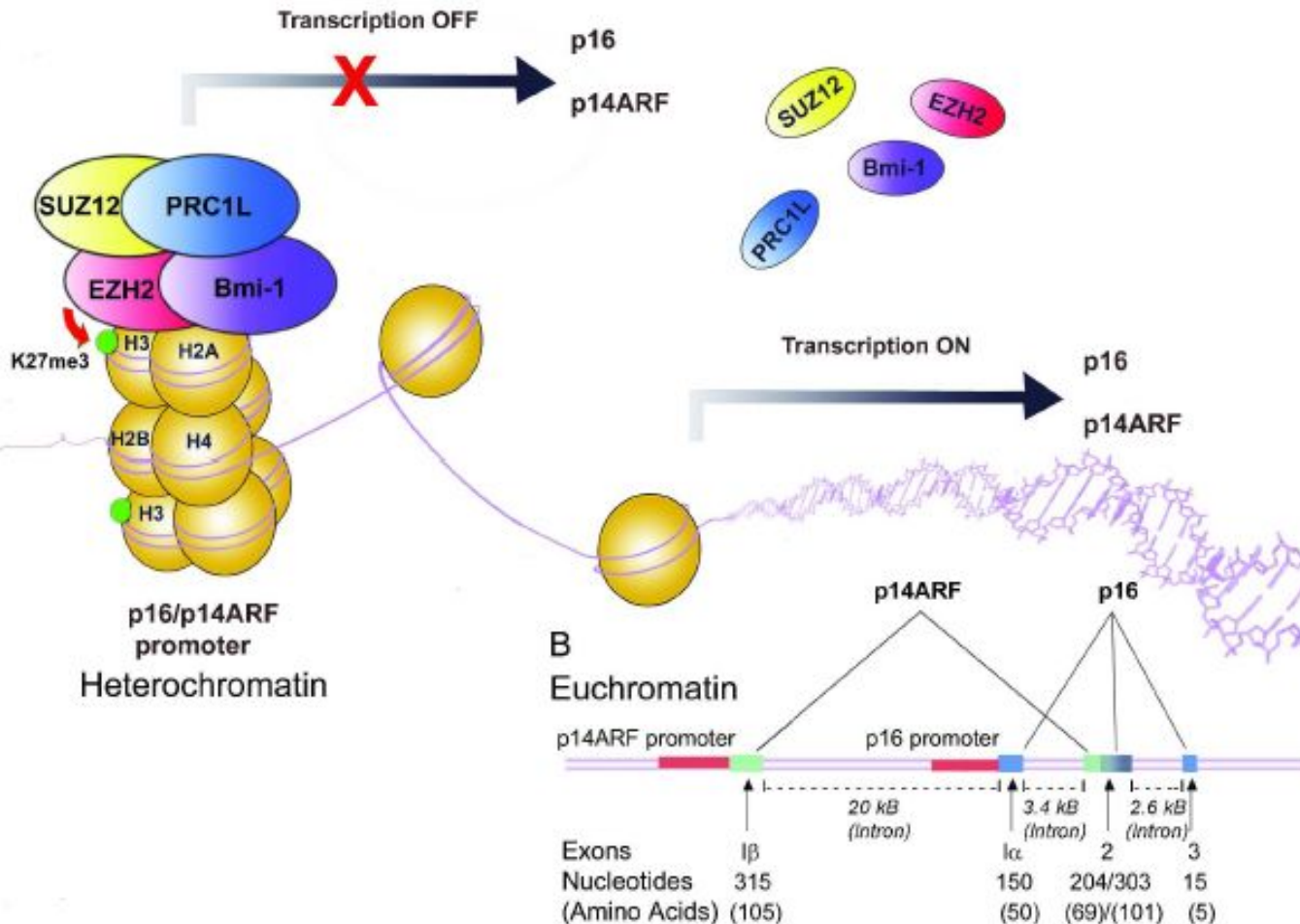


# Онкосупрессоры контролируют функцию Mdm2



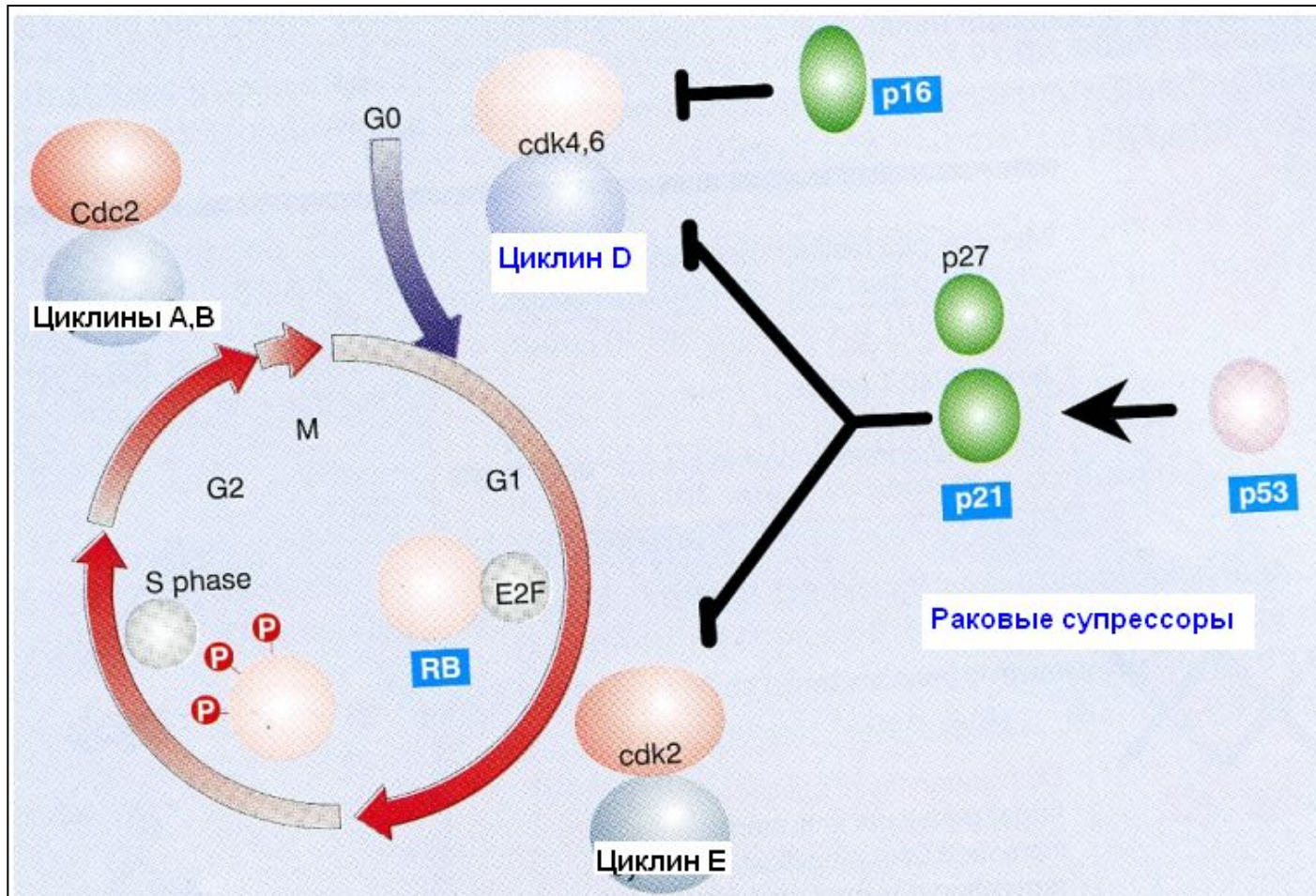
Белок p14<sup>ARF</sup> – негативный регулятор Mdm2, он транскрипционно регулируется ФТ семейства E2F. Белки RB регулируют функцию E2F. Многие компоненты этого пути являются онкогенами (Cyclin D, Cdk4, and Cdk6) или онкосупрессорами (p16<sup>INK4A</sup> и pRB). TGFβ-путь также осуществляет супрессорный эффект через p15<sup>INK4B</sup>. Путь TGFβ регулирует экспрессию p14<sup>ARF</sup> напрямую через взаимодействие белков Smad с геномным локусом ARF.

# P16 и ARF



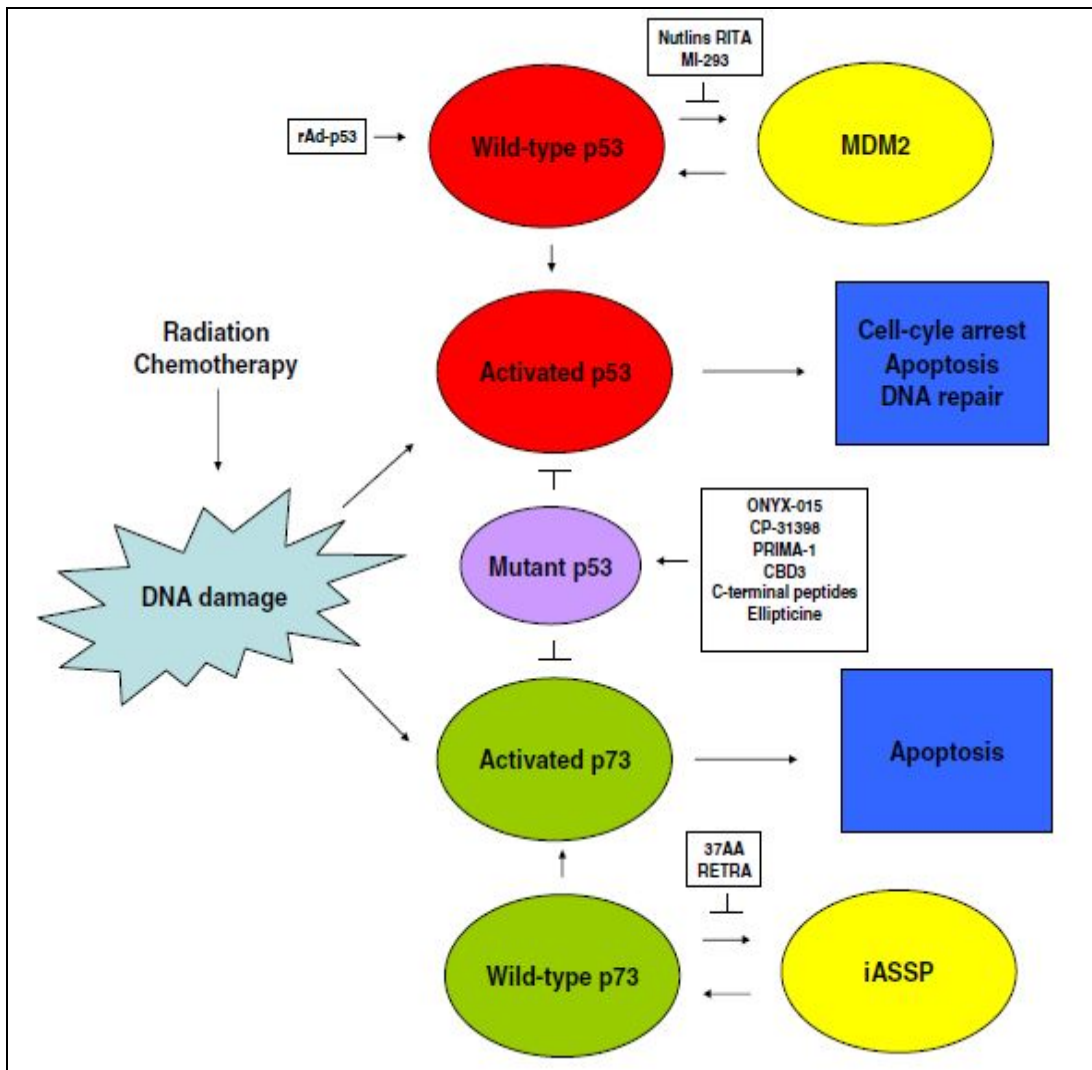
Ген p16 охватывает локус Ink4b/ARF/Ink4a на хромосоме 9p21. Две различных рамки считывания используются для транскрипции p14ARF (альтернативная рамка считывания) и p16 ген-супрессор опухолей

# РСГ осуществляют контроль КЦ



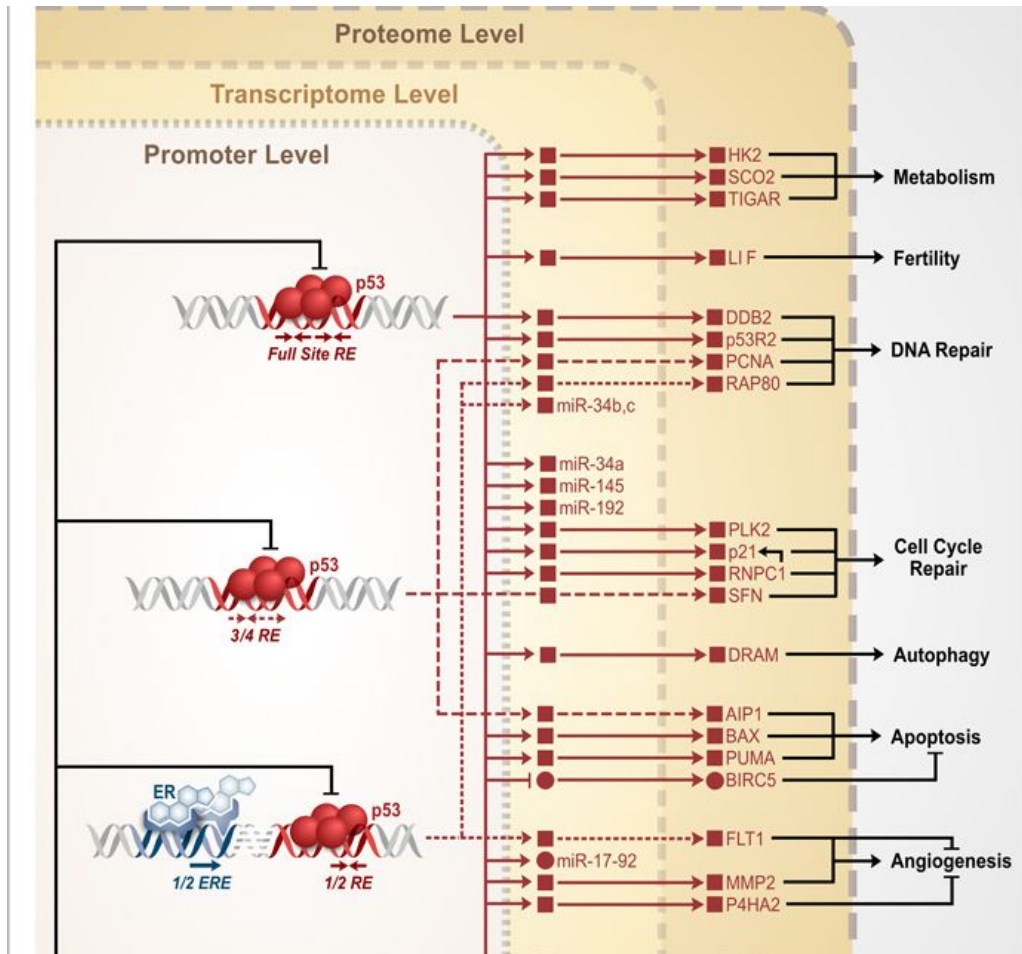


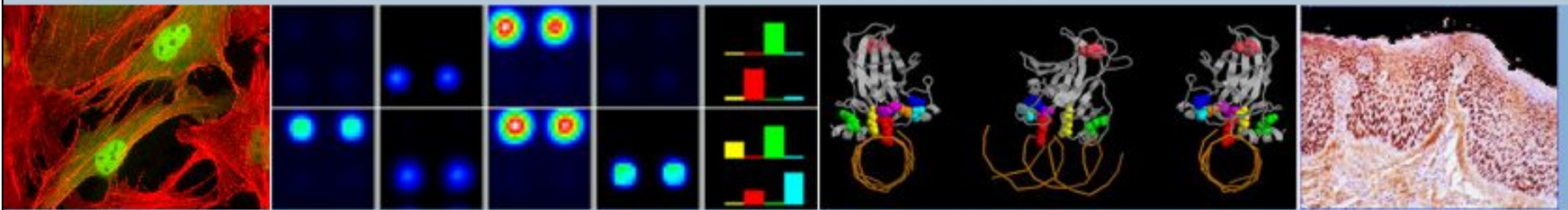
# P53 – мишень в химиотерапии



В нормальных клетках p53 тонко регулируется. MDM2 стимулирует p53 к протеосомной деградации. Повреждение ДНК приводит к фосфорилированию p53 и его диссоциации из комплекса p53-MDM2 и трансактивации downstream генов. Белок p73 принадлежит к p53 семейству и негативно контролируется iASSP. p73 также активируется химиотерапией и индуцирует апоптоз. Во многих опухолях мутантный p53 связывается и инактивирует p73. Стратегия: (1) доставить wild-type p53 к раковым клеткам (rAd-p53), (2) удалить мутантный p53 аденовирусом (ONXY-015), (3) восстановление функции дикого p53 (CP-31398, PRIMA-1, CBD3, C-terminal peptides, Ellipticine), (4) ингибирование деградации p53 (nutlins, RITA, MI-293), (5) активация других членов p53 семейства для замены функции p53.

# Гены-мишени p53





- Home
- About the Database
- Database Downloads
- Database Statistics
- Online Analysis
- User's Help
- Data Submission
- Slide-show
- References
- TP53 Resources
- Useful Links
- Disclaimer
- Contact Us

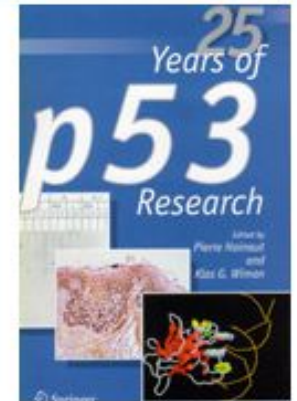
The IARC TP53 Mutation Database compiles all TP53 gene mutations identified in human cancers and cell lines that have been reported in the peer-reviewed literature since 1989.

The following datasets are available:

- .TP53 **somatic mutations** in sporadic cancers
- .TP53 **germline mutation** in familial cancers
- .Common TP53 **polymorphisms** identified in human populations
- .**Functional properties** of P53 mutant proteins
- .TP53 gene status in human **cell-lines**.

The database is meant to be a source of information on TP53 mutations for a broad range of scientists and clinicians who work in different areas:

- .**Basic research**, to study the structural and functional aspects of the p53 protein;
- .**Molecular pathology of cancer**, to understand the clinical significance of mutations identified in cancer patients;
- .**Molecular epidemiology of cancer**, to analyze the links between specific exposures and mutation patterns and to make inferences about possible causes of cancer.



[Read](#)

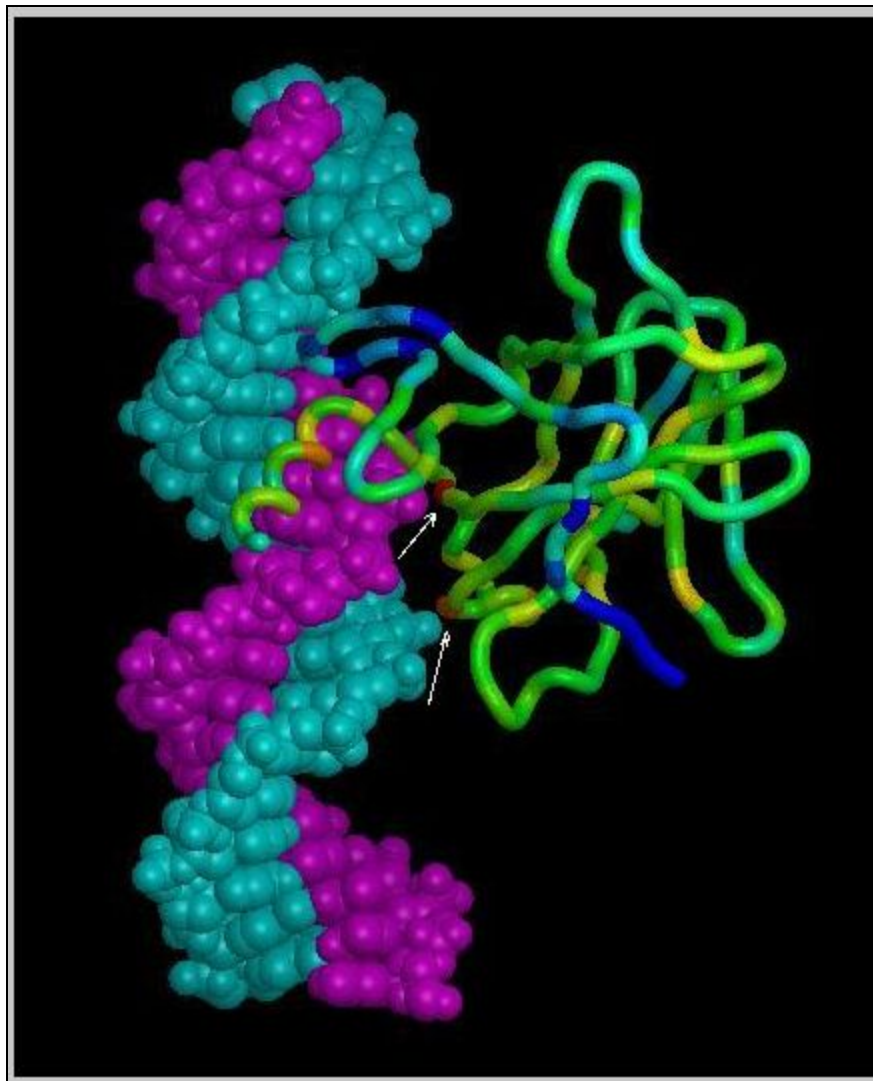
#### WHAT'S NEW?

- ▶ **be held in New York, May 20-24 2006.** [More...](#)
- ▶ 2nd International Workshop on Mutant p53, November 2005, Israel. [Report...](#)
- ▶ Latest news on p53 at [biojournals.com](http://biojournals.com).
- ▶ The online analysis system of the IARC TP53 database has been updated in **November 2005**. New search options, graphical outputs and annotations on functional activities of mutant proteins have been added. [More...](#)

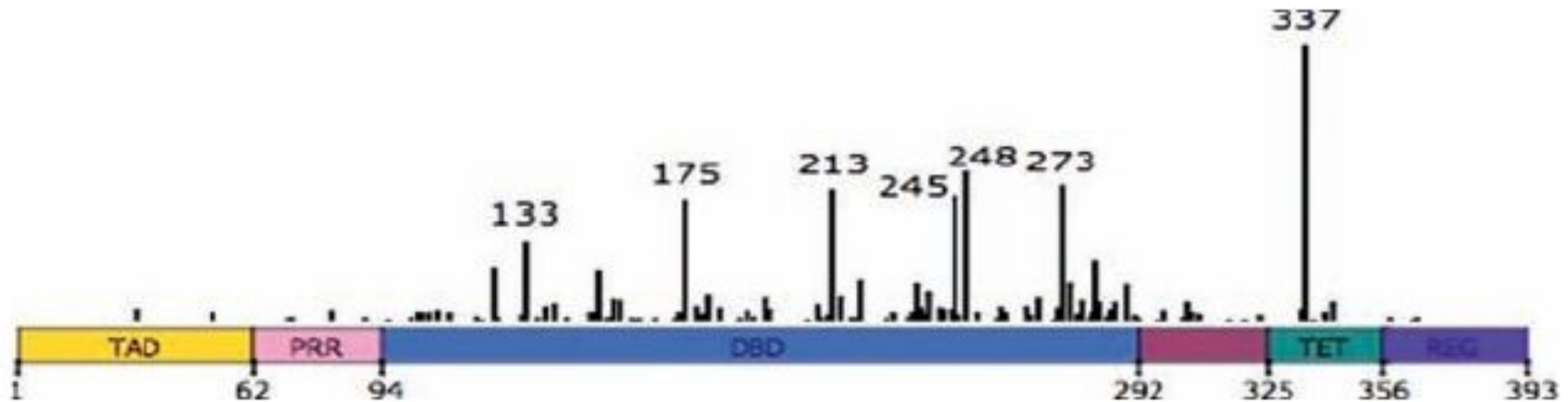


2011 г.: Согласно IARC, выявляется более, чем 26 000 соматических мутаций в (TP53 database version R14 (<http://www-p53.iarc.fr/>))

# Наиболее часто встречаемые мутации p53

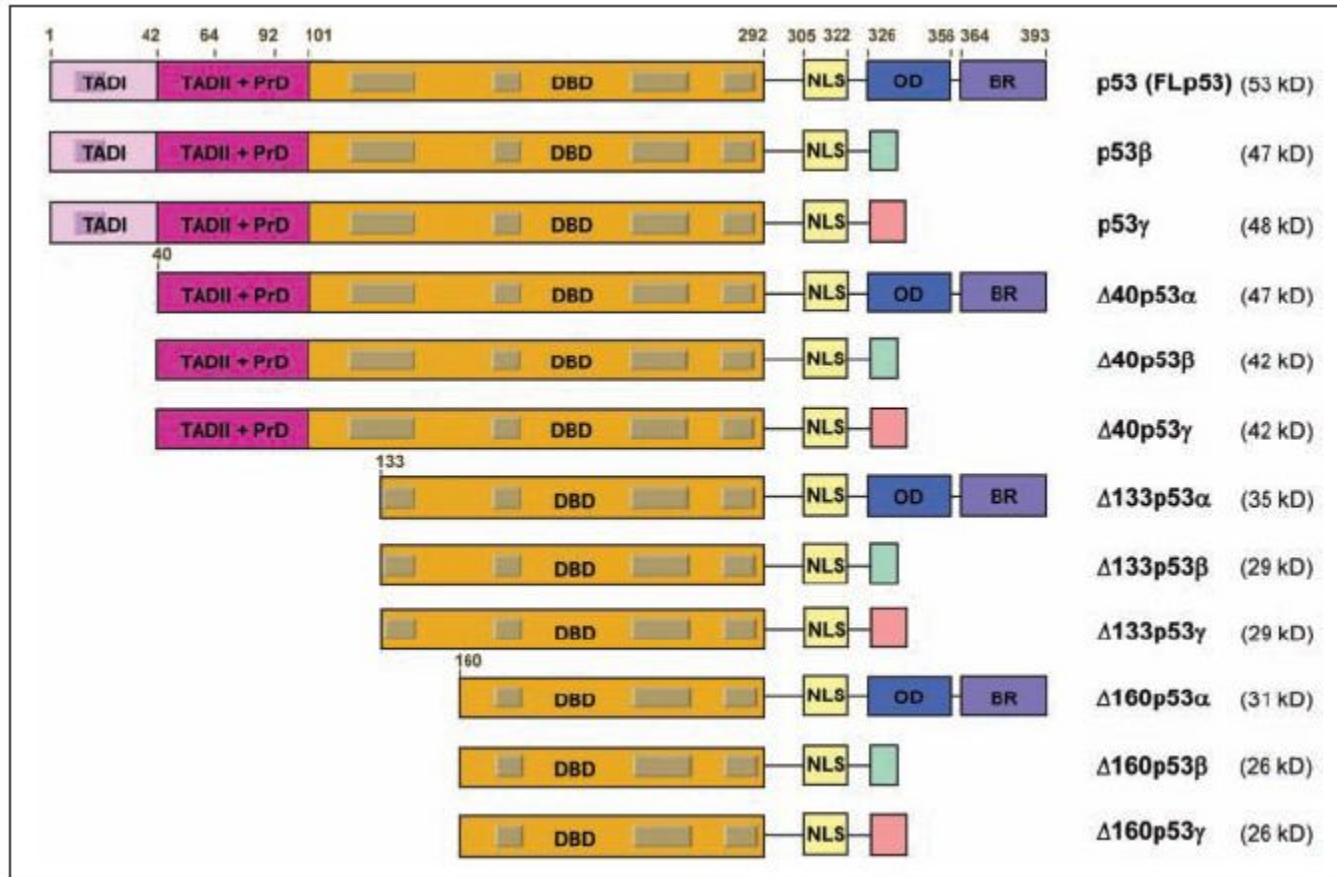


# Относительная частота герминальных мутаций в *p53*



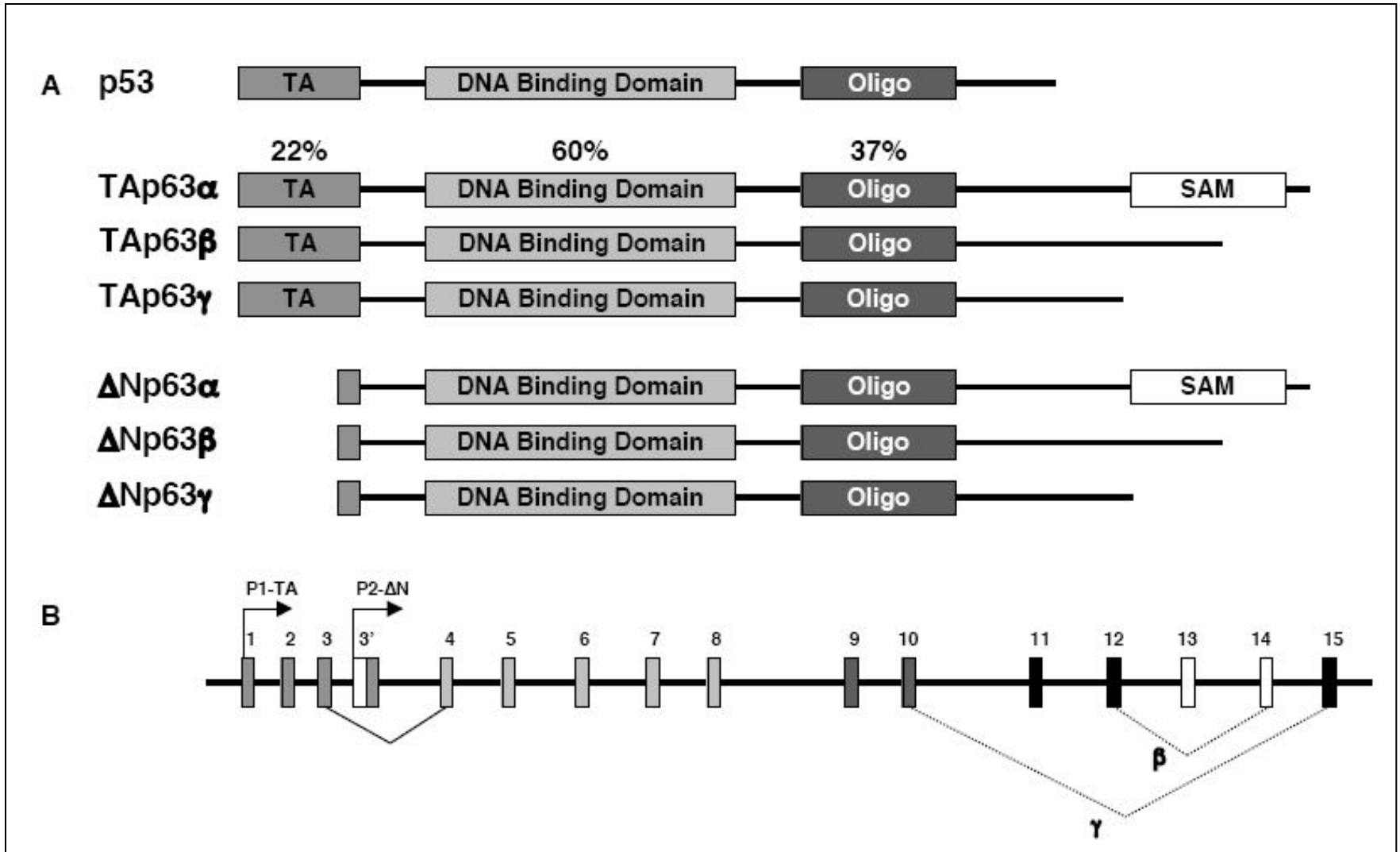
TAD-трансактиваационный домен; PRR-пролин-богатый район; DBD-ДНК-связывающий домен; TET-домен тетрамеризации; REG-регуляторный домен.

# Изоформы p53



# р63 и р53 белки

(SAM – sterile alpha motive)



# Экспрессия p63 в опухолях

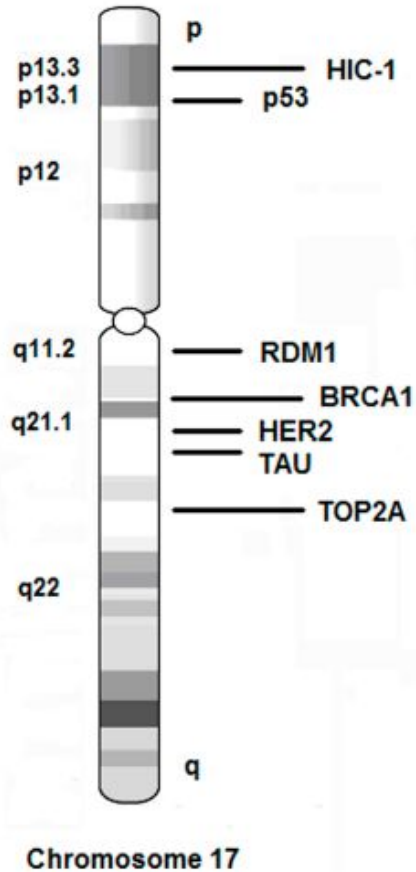
Tissue/Organ Site	Variant mRNA expressed	Comments*
Bladder	TAp63 and $\Delta$ Np63	$\Delta$ Np63 $\alpha$ protein expression
Breast	$\Delta$ Np63	Protein expression in ductal hyperplasia, carcinoma <i>in situ</i> , and sarcomatoid/metaplastic carcinomas (restricted to myoepithelial cells)
Cervix	Not determined	Protein expression in SCC <sup>a</sup>
Head and Neck	TAp63 and $\Delta$ Np63	Gene amplification and $\Delta$ Np63 $\alpha$ protein overexpression in SCC
Lung	TAp63 and $\Delta$ Np63	Gene amplification and $\Delta$ Np63 $\alpha$ protein overexpression in SCC
Prostate	$\Delta$ Np63	Protein expression in benign prostate hyperplasia, high-grade intraepithelial neoplasia, and ACBCC <sup>b</sup> (restricted to basal cells)



# Восстановление активности p53

- Введение в опухоль дикого p53 с помощью репликативно-дефектного аденовирусного вектора
- **CP-31398** – молекула на основе хиназолина, увеличивает термодинамическую стабильность мутантного p53.
- (PRIMA) – p53 reactivation and induction of massive apoptosis -1 – небольшая молекула, ковалентно связывается с тиоловыми группами мутантного p53 и восстанавливает ДНК-связывающую активность.
- **Пептид 53BP2**, который связывают С-конец p53 (остатки 490–498), или антитела, что стабилизирует p53 и увеличивает его способность связываться с ДНК and showed that it could stabilize a p53 mutant and increase its capacity to bind
- DNA
- **anti-mdm2** агенты
- Активировать апоптоз через p63 and p73

# Маркеры РМЖ на 17-хромосоме



TOP2A, TAU и RDM1 гены, отвечающие на антрациклины, таксаны или цис-платин терапию соответственно, РСГ p53, BRCA1 и HIC-1 важны в канцерогенезе МЖ

**Wei Zhang and Yingyan Yu «The Important Molecular Markers on Chromosome 17 and Their Clinical Impact in Breast Cancer»**  
*Int. J. Mol. Sci. 2011, 12, 5672-5683*

# Функции маркеров

Gene ID	Name	Location	Functions
2064	ERBB2/HER2	17q21.1	Epidermal growth factor (EGF) receptor family of receptor tyrosine kinases. Amplification and/or overexpression have been reported in numerous cancers.
7153	TOP2A	17q21-q22	DNA topoisomerase, controls and alters the topologic states of DNA during transcription. It is associated with the development of drug resistance.
201299	RDM1	17q11.2	RAD52 protein encoded by RDM1 is involved in DNA double-strand break repair and recombination event. Disruption of the RDM1 gene resulted in an increased sensitivity to the anti-cancer drug cisplatin.
7157	P53	17p13.1	P53 responds to diverse cellular stresses to regulate target genes that induce cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair. It is accumulated in a variety of transformed cells.
672	BRCA1	17q21	BRCA1 plays a role in maintaining genomic stability. It acts as a tumor suppressor. BRCA1 combines with other tumor suppressors, to form a BRCA1-associated genome surveillance complex (BASC). Mutations in this gene are responsible for approximately 40% of inherited breast cancers and more than 80% of inherited breast and ovarian cancers.
3090	HIC-1	17p13.3	Hypermethylated in cancer 1, a candidate tumor suppressor gene which undergoes allelic loss in breast and other human cancers. The human HIC-1 gene is a target gene of p53.
4137	TAU	17q21.1	Microtubule-associated protein TAU (MAPT), functions to keep cell shape, microvesicle transportation and spindle formation. Interfering spindle microtubule dynamics will cause cell cycle arrest and apoptosis. TAU detection helps to identify those patients who are most likely to benefit from taxane treatment and resistant to paclitaxel treatment.

# Примеры различных РСГ

Familial Cancer Syndrome	Tumor Suppressor Gene	Function	Chromosomal Location	Tumor Types Observed
Li-Fraumeni Syndrome <a href="#">OMIM data</a>	P53	cell cycle regulation, apoptosis	17p13.1	brain tumors, sarcomas, leukemia, breast cancer
Familial Retinoblastoma <a href="#">OMIM data</a>	RB1	cell cycle regulation	13q14.1-q14.2	retinoblastoma, osteogenic sarcoma
Wilms Tumor <a href="#">OMIM data</a>	WT1	transcriptional regulation	11p13	pediatric kidney cancer
Neurofibromatosis Type 1 <a href="#">OMIM data</a>	NF1 protein = neurofibromin 1	catalysis of RAS inactivation	17q11.2	neurofibromas, sarcomas, gliomas
Neurofibromatosis Type 2 <a href="#">OMIM data</a>	NF2 protein=merlin or neurofibromin 2	linkage of cell membrane to actin cytoskeleton	22q12.2	Schwann cell tumors, astrocytomas, meningiomas, ependymomas
Familial Adenomatous Polyposis <a href="#">OMIM data</a>	APC	signaling through adhesion molecules to nucleus	5q21-q22	colon cancer

<p>Tuberous sclerosis 2</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	<p>TSC2 protein = tuberin</p>	<p>GTPase activation of RAP1 and RAB5</p>	<p>16p13.3</p>	<p>benign growths (hamartomas) in many tissues, astrocytomas, rhabdomyosarcomas</p>
<p>Deleted in Pancreatic Carcinoma 4 Familial juvenile polyposis syndrome</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	<p>DPC4 also known as Smad4</p>	<p>regulation of TGF- <math>\beta</math>/BMP signal transduction</p>	<p>18q21.1</p>	<p>pancreatic carcinoma, colon cancer</p>
<p>Deleted in Colorectal Carcinoma</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	<p>DCC</p>	<p>transmembrane receptor involved in axonal guidance via netrins</p>	<p>18q21.3</p>	<p>colorectal cancer</p>
<p>Familial Breast Cancer</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	<p>BRCA1</p>	<p>cell cycle control, controlling protein degradation, DNA damage repair, and transcriptional regulation; interacts with Rad51 in DNA repair</p>	<p>17q21</p>	<p>breast and ovarian cancer</p>
<p>Familial Breast Cancer</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	<p>BRCA2</p>	<p>transcriptional regulation of genes involved in DNA repair and homologous recombination</p>	<p>13q12.3</p>	<p>breast and ovarian cancer</p>

<p>Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer type 1 HNPCC1</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	MSH2	DNA mismatch repair	2p22-p21	colon cancer
<p>Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer type 2 HNPCC2</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	MLH1	DNA mismatch repair	3p21.3	colon cancer
<p>Familial diffuse-type gastric cancer</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	CDH1 protein = E-cadherin	cell-cell adhesion protein	16q22.1	gastric cancer, lobular breast cancer
<p><a href="#">von Hippel-Lindau Syndrome</a></p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	VHL	regulation of transcription elongation through activation of a ubiquitin ligase complex	3p26-p25	renal cancers, hemangioblastomas, pheochromocytoma, retinal angioma
<p>Familial Melanoma</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	p16 <sup>INK4a</sup> also called CDKN2A protein=cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	cell-cycle regulation	9p21	melanoma, pancreatic cancer, others
<p>Gorlin Syndrome</p> <p><a href="#">OMIM data</a></p>	PTCH protein = patched	transmembrane receptor for sonic hedgehog (shh), involved in early development through repression of action	9q22.3	basal cell skin carcinoma

# Примеры нокаутных мышей с инактивированными РСГ или ПО

Gene	Cellular role	Spontaneous tumors/other phenotypes
APC <sup>Δ716</sup>	Cytoskeletal regulation	Intestinal tumors
p53*	DNA damage response, cell cycle control	Lymphomas, sarcomas, others
p21	Cell cycle control	No spontaneous cancers, cells defective in G <sub>1</sub> arrest after damage
NF1	Ras regulatory protein	-/- lethal, +/- develop pheochromocytomas and myelogenous leukemia
BRCA1	Unknown—possibly DNA repair, proliferation	-/- lethal, +/- no tumor phenotype
BRCA2	Unknown—possibly DNA repair	-/- lethal, +/- no tumor phenotype
ATM	Cell cycle control, DNA damage checkpoint	Lymphomas
Rb	Cell cycle control	-/- lethal, +/- develop pituitary tumors

# VHL онкосупрессор

Von Hippel-Lindau syndrome – наследственная мультисистемная болезнь, характеризующаяся ненормальным ростом кровяных сосудов.

Часто сопровождается спорадической ренальной карциномой.

Локализация – ядро и цитозоль.

Выполняет аналогичные p53 и RB функции