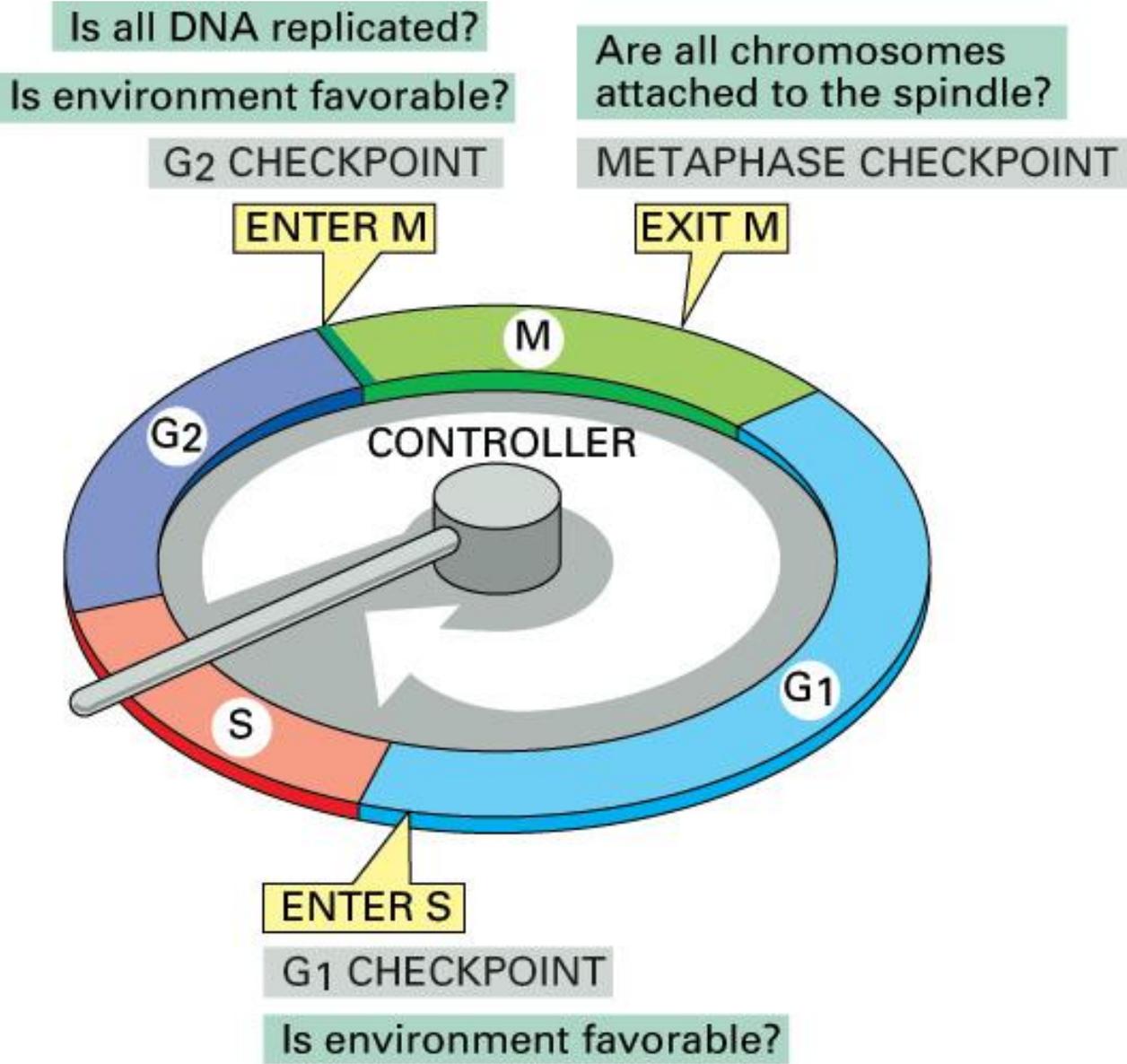


РЕПЛИКАЦИЯ.

ЭУКАРИОТЫ

2



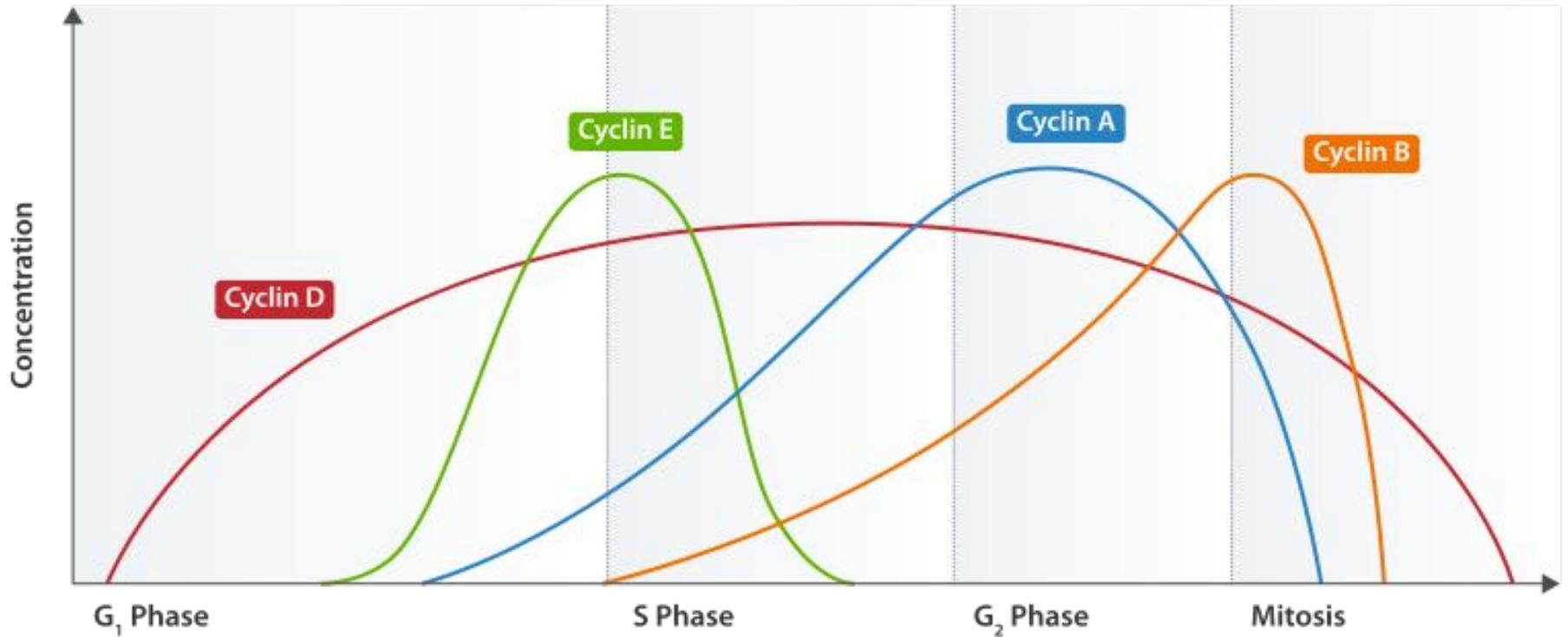
cdc-гены, cell division control

Реакции обратимого фосфорирования:

- киназы, активируемые циклинами:
 - 2 субъединицы – CDK – каталитическая субъединица
 - циклин – активирующая субъединица
- циклины
- фосфатазы

- протеолиз
- убиквитинилирование (polyUb и monoUb) – протеолиз и изменение белок-белковых взаимодействий,
соответственно

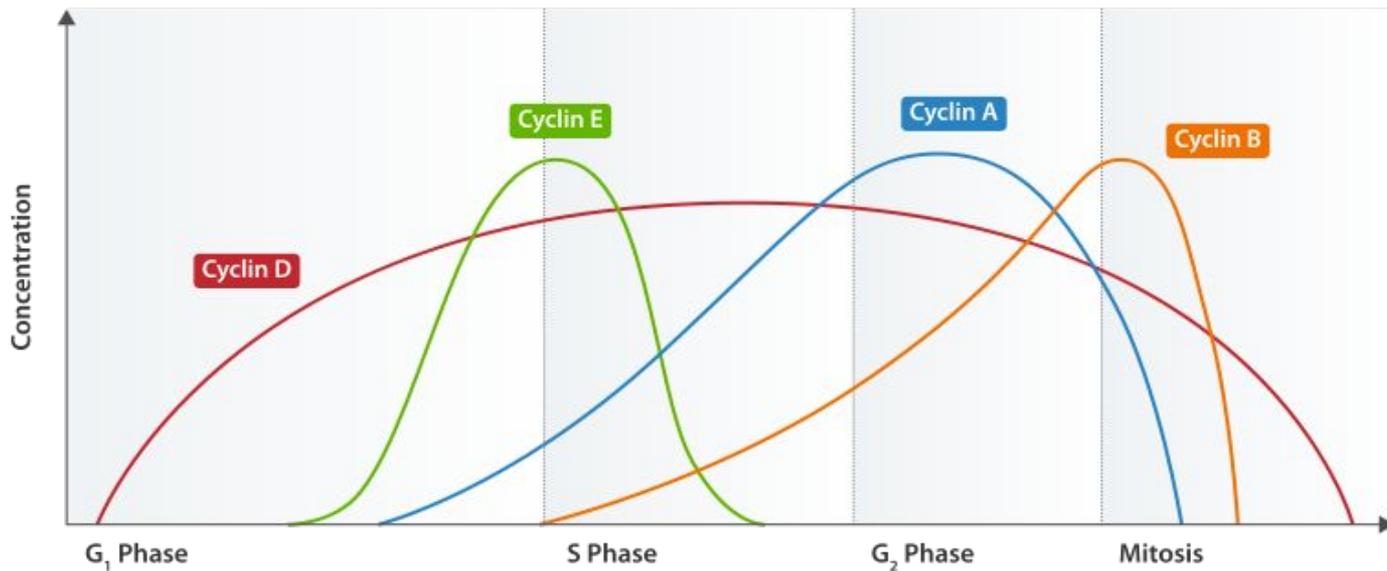
Концентрация циклинов по стадиям клеточного цикла



КОНТРОЛЬ

ЛЬ

Phase	Cyclin	CDK
G0	C	Cdk3
G1	D, E	Cdk4, Cdk2, Cdk6
S	A, E	Cdk2
G2	A	Cdk2, Cdk1
M	B	Cdk1



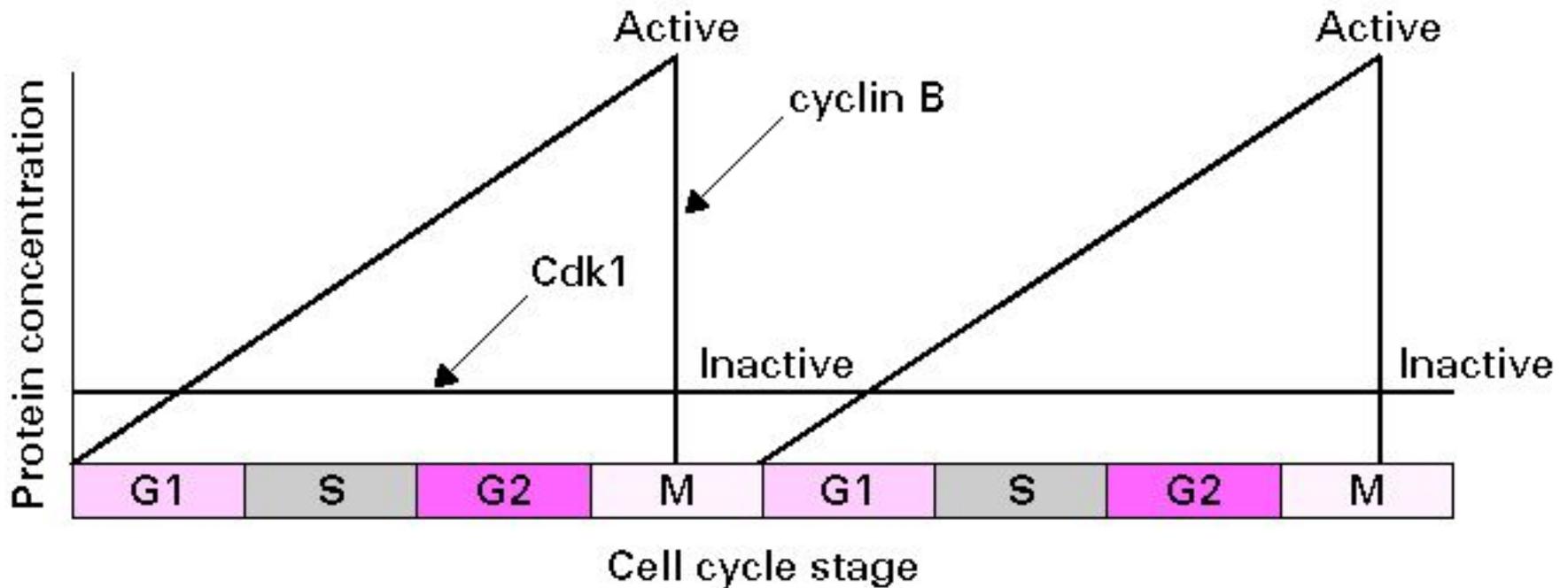
KOHTPO

CDK	Cyclin partner	Function	Deletion Phenotype in Mice
Cdk1	Cyclin B	M phase	None
Cdk2	Cyclin E	G1/S transition	Reduced size, imparted neural progenitor cell proliferation. Viable, but both males & females sterile.
Cdk2	Cyclin A	S phase, G2 phase	
Cdk3	Cyclin C	G1 phase ?	No defects. Viable, fertile.
Cdk4	Cyclin D	G1 phase	Reduced size, insulin deficient diabetes. Viable, but both male & female infertile.

Ключевые переключения под действием комплексов

циклин-циклинзависимая киназа

Cdk1, как и другие киназы, регулирующие клеточный цикл, экспрессируется постоянно, тогда как уровень экспрессии циклинов изменяется в зависимости от фазы клеточного цикла



Ключевые переключения под действием комплексов *циклин-циклинзависимая киназа*

Фосфорилирование целевых белков “включает или выключает”
процесс

G1a - R (restriction point) - G1b – **CycD/Cdc4, CycD/Cdc6**

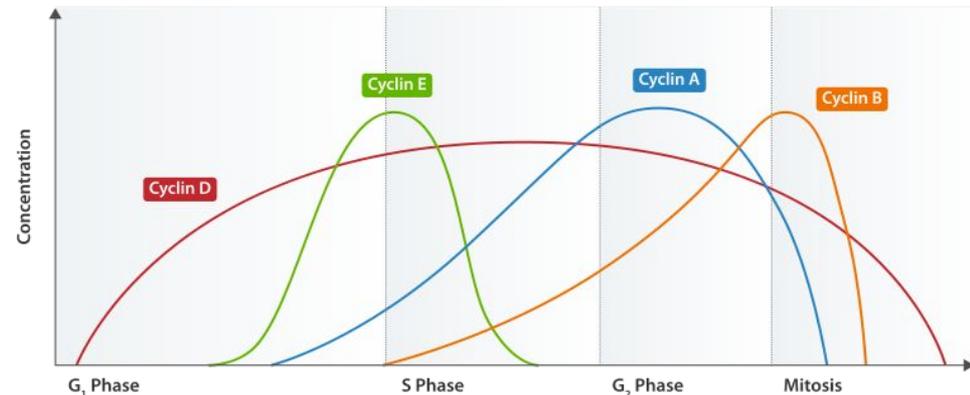
G1/S-checkpoint – CycE/Cdc2 (CycE/Cdk1)

S-фаза (включая внутренний checkpoint) – **CycA/Cdk2**

G2- и M-фазы – CycB3/Cdk1, CycB3/Cdk2

G2/M-checkpoint – CycA/Cdk1

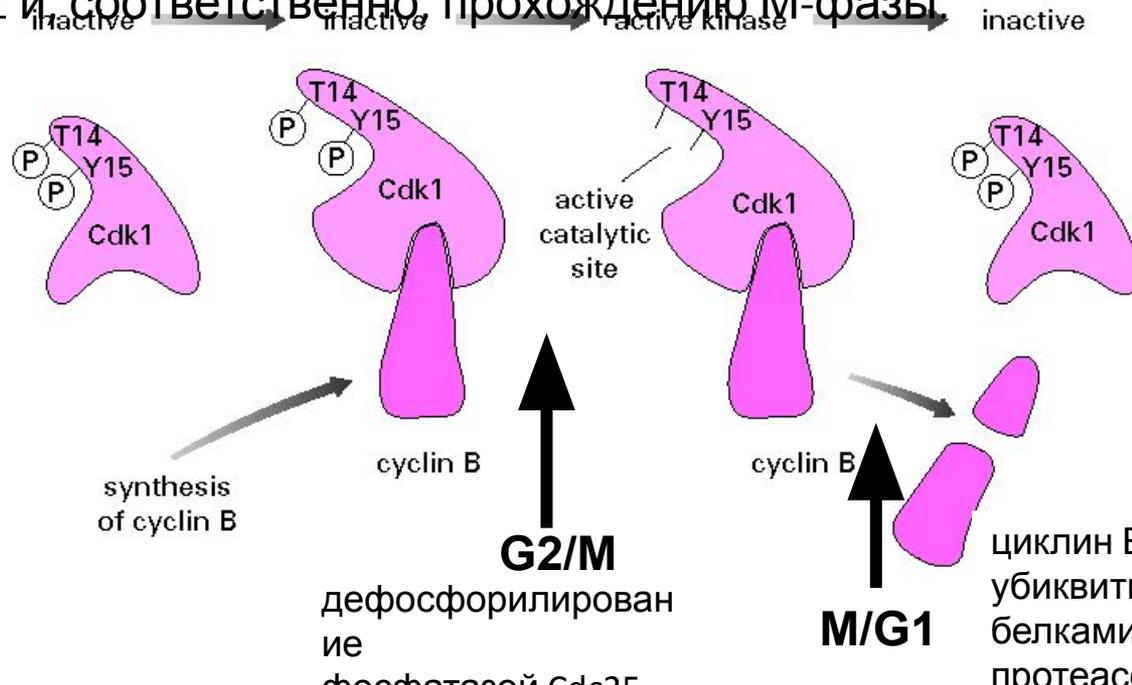
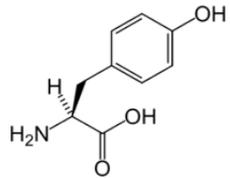
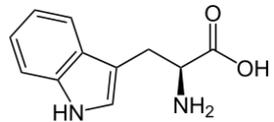
M-фаза – CycB/Cdk1



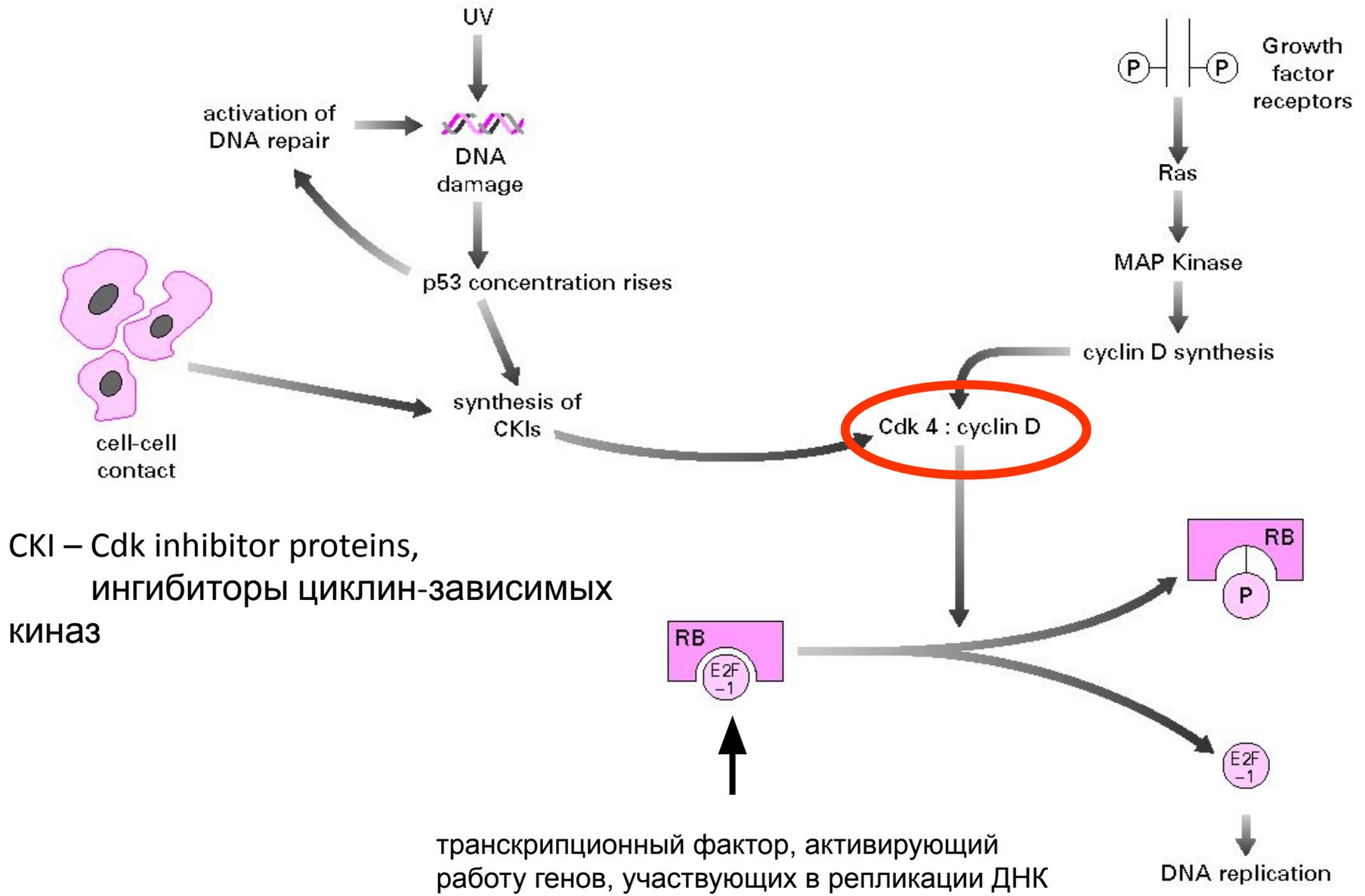
Cdk1 регулирует переход M/G1

Активность самой Cdk1 регулируется на двух уровнях:

- (1) присоединение циклина В, что приводит к стимуляции активности Cdk1;
- (2) фосфорилирование по треонину 14 и тирозину 15 киназой Wee1, что приводит к инактивации Cdk1 (стерически препятствует связыванию АТФ с активным центром);
- (3) дефосфорилирование - процесс обратный фосфорилированию, катализируется фосфатазами, cdc25, что приводит к восстановлению активности Cdk1 и, соответственно, прохождению М-фазы.



стадия R, restriction point



CKI – Cdk inhibitor proteins,
ингибиторы циклин-зависимых
киназ

транскрипционный фактор, активирующий
работу генов, участвующих в репликации ДНК

контроль начала S-фазы

Cdk 2 - циклин E

Cdk 4
Cdk 6 | циклин D

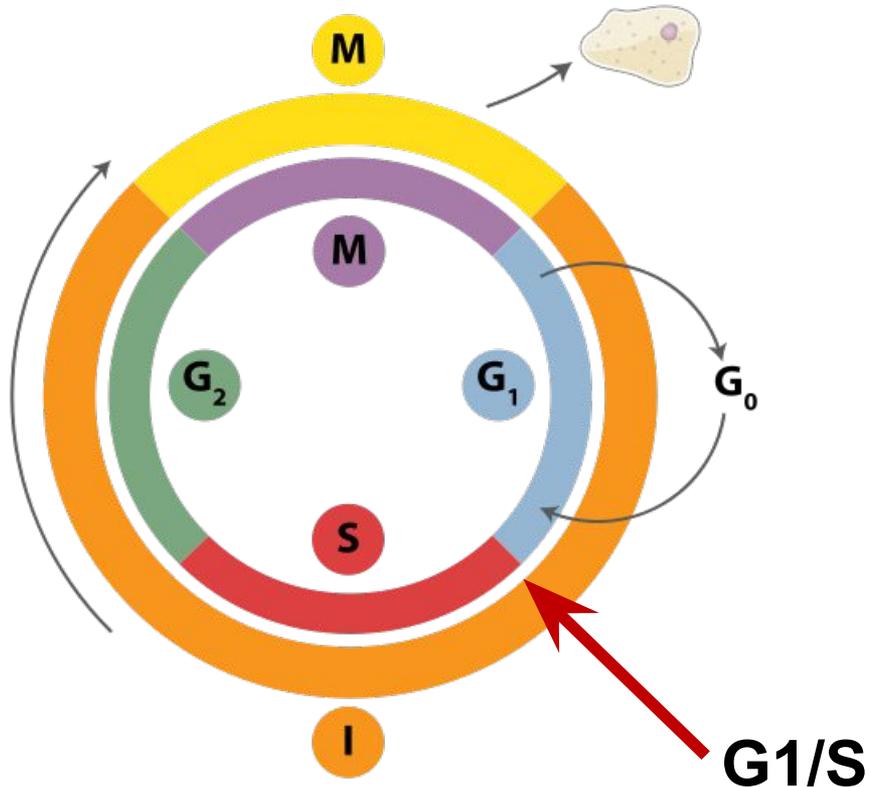
Cdk 4 активирует работу транскрипционного фактора E2F-1, включающего гены, работа которых необходима для репликации ДНК

Cdk 4 инактивирует белок Rb, который является ингибитором E2F-1

Cdk 2,4 и 6 являются сенсорами различных сигналов. Частью сенсорной системы являются ингибиторы Cdk (CKI).

КОНТРОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

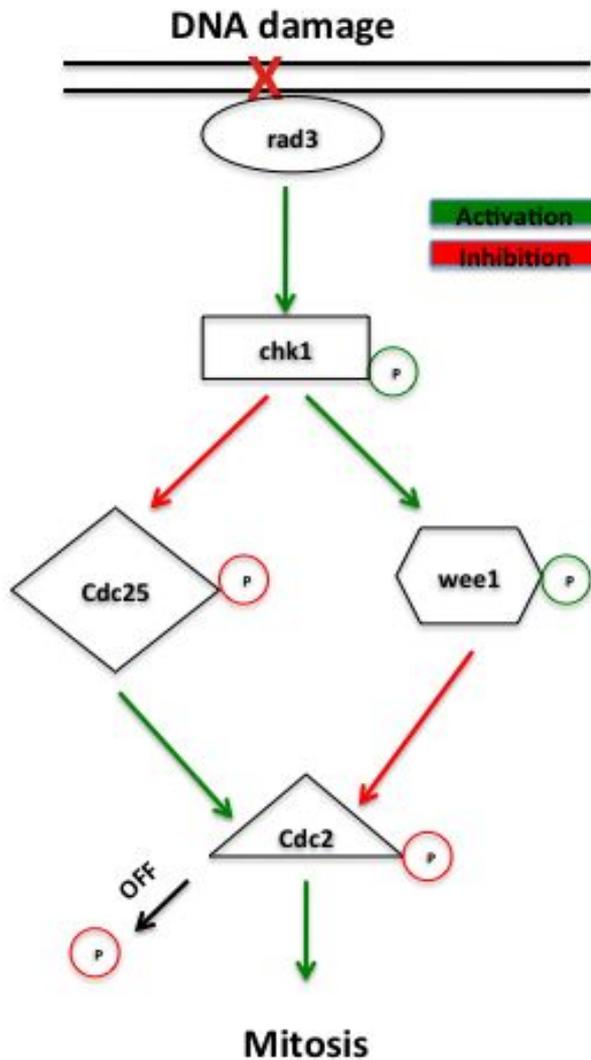
ЦИКЛИНЫ + ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫЕ КИНАЗЫ, Cdks



ATR, ataxia telangiectasia and Rad3-related protein,
кратковременная остановка

ATM, ataxia telangiectasia mutated,
полная задержка или апоптоз

Checkpoint G2/M - исправление повреждений ДНК



Cdc2 = Cdk1 (cell division cycle protein 2 homolog or Cyclin-dependent kinase 1) – серин/треониновая протеинкиназа, отвечающая за продвижение в М-фазе клеточного цикла (составная часть МРС)

Rad3 = ATM/ATR – киназы, активирующиеся в ответ на повреждения ДНК

Wee1 – киназа, инактивирующая CDK1

Cdc25 – фосфатаза, снимающая ингибирование CDK1

chk1 - серин/треониновая протеинкиназа, активация которой приводит к аресту клеточного цикла и активации репарации ДНК

1. Повреждения ДНК активируют киназы rad3 (ATM/ATR).

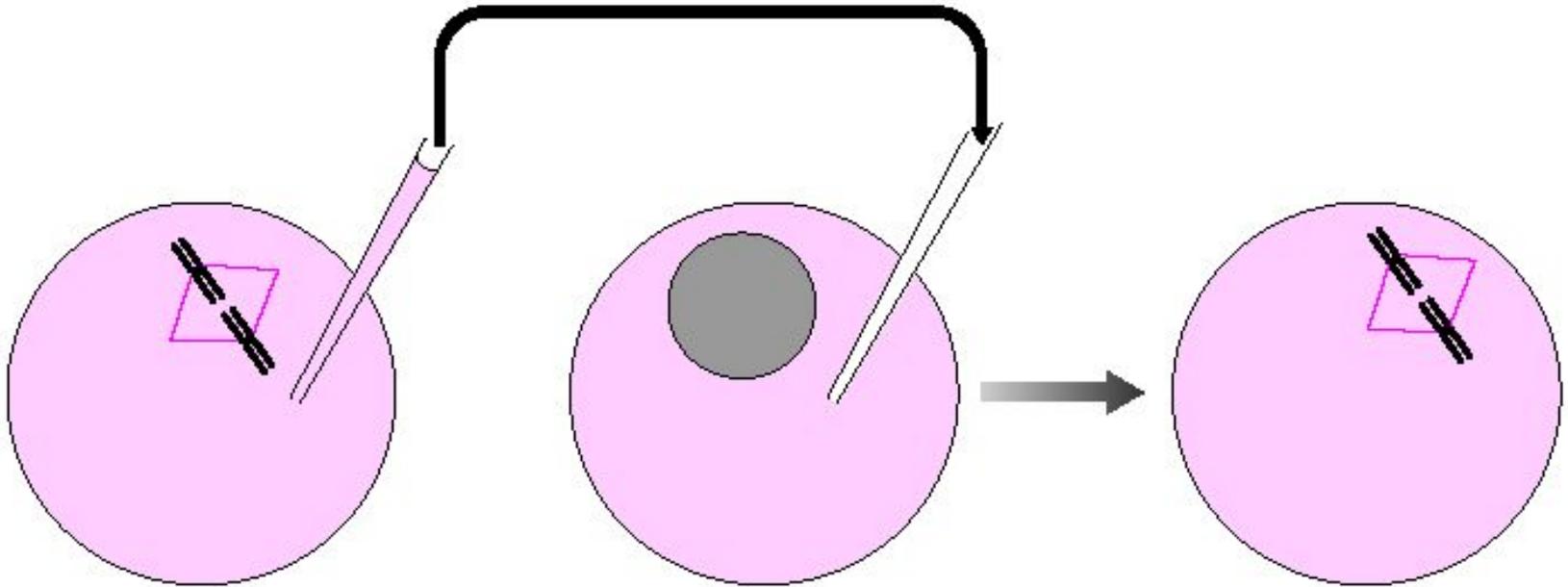
2. Киназы rad3 (ATR/ATM) фосфорилируют киназу chk1, значительно стимулируя ее активность.

3. Киназа chk1 фосфорилирует киназу wee1, увеличивая ее стабильность, а также фосфорилирует фосфатазу cdc25, ингибируя ее и препятствуя попаданию cdc25 в ядро.

4. Происходит сильный сдвиг в сторону фосфорилирования Cdk1 (Cdc2) в отсутствие дефосфорилирования. Киназа CDK1 и, соответственно, фактор МРС инактивированы – клетка тормозится в фазе G2 до тех пор, пока повреждения ДНК не будут исправлены.

контроль М- фазы

Перенос цитоплазмы из митотической клетки в интерфазную стимулирует
вхождение интерфазной клетки в митоз

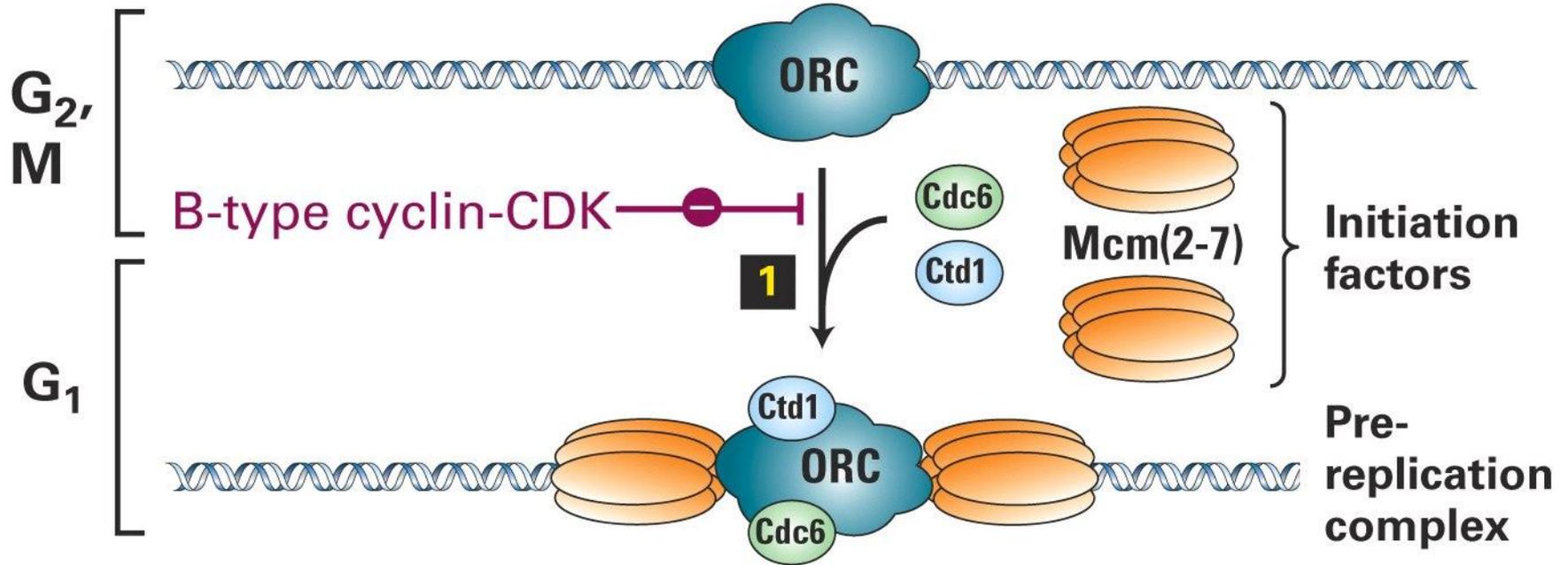


MPF - Mitotic Promoting Factor

MPF = Cdk1 + Cyclin B

Активная Cdk1 фосфорилирует комплекс мишеней, участвующих в начале митоза (белки хромосом, ядерной оболочки, ядрышка, центросом и т.д.)

Фосфорилирование при сборке реплисомы

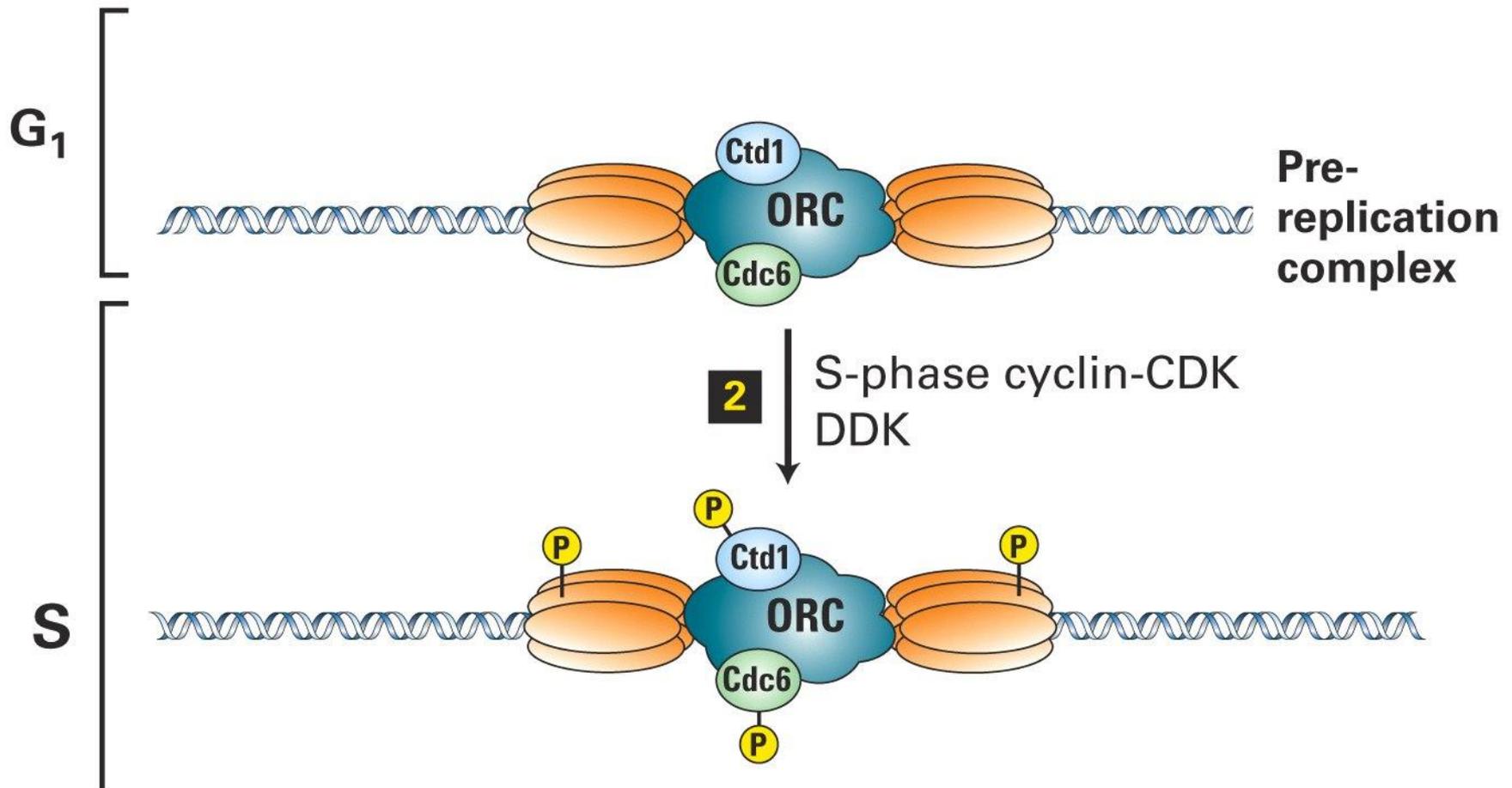


В поздней M и ранней G₁ фазах Cdc6 отвечает за загрузку неактивной геликазы MCM(2-7) в pre-RC. При этом загрузка АТФ-зависима и возможна только в присутствии Ctd1, формирующего промежуточные комплексы с Mcm2-7.

Лицензированный ориджин – участок ДНК, на котором собран комплекс ORC-cdc6-cdt1-2*Msm(2-7).

Активность Cdc6 регулируется через Cdk более высокого порядка.

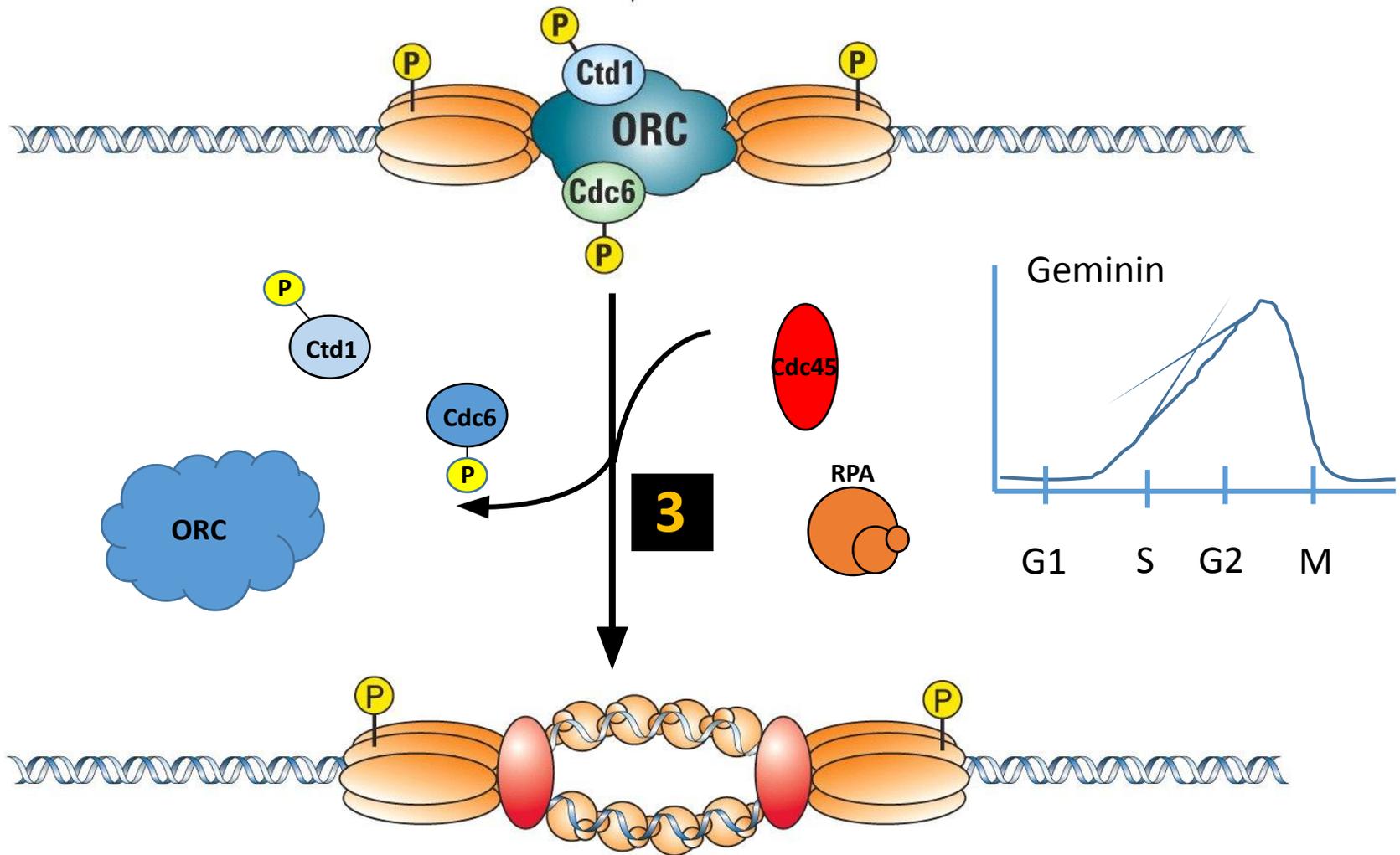
Фосфорилирование при сборке реплисомы



Привлечение Mcm зависит от киназ Cdc6 и Cdt1.

Фосфорилирование Mcm приводит к изменению конформации и привлечению комплекса Cdc7/Dbf4 (DNA binding factor 4), который фосфорилирует Mcm2 после собственной активации комплексом Cdk2/CycE в поздней G1-фазе.

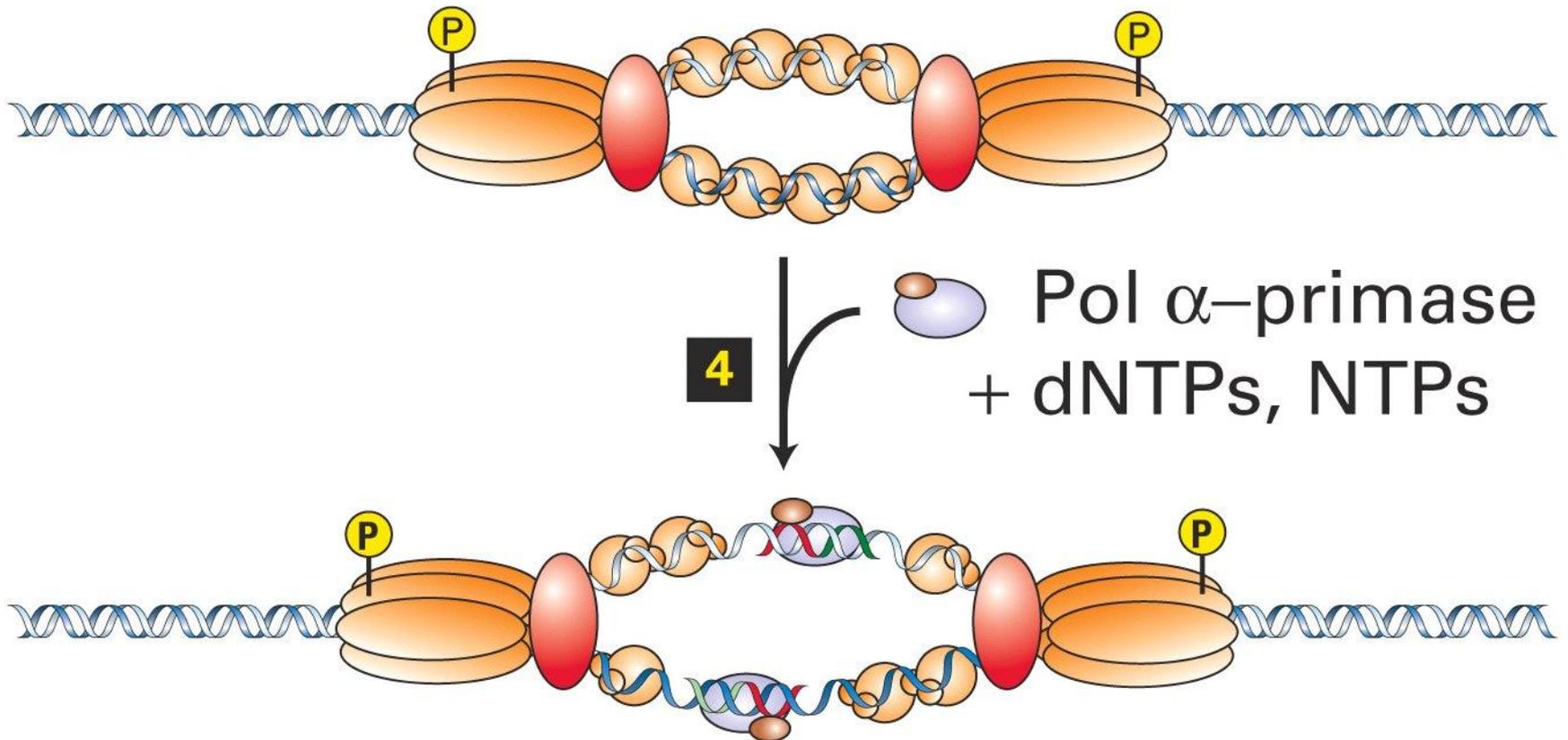
Потом Cdc7/Dbf4 фосфорилирует cdc45.

S

Mcm2-P и Cdc6-P способны связать cdc45 и RPA уже в поздней G1 или на границе G1/S-фаз. Таким образом, лицензированный pre-RC переходит в RC.

При переходе в S-фазу первым из RC-комплекса высвобождается Cdc6 и уходит в цитоплазму. Также из RC высвобождается Ctd1 (с помощью геминина) и подвергается убиквитин-зависимой протеосомной деградации. Отсутствие этих двух киназ препятствует сборке новых pre-RC до митоза.

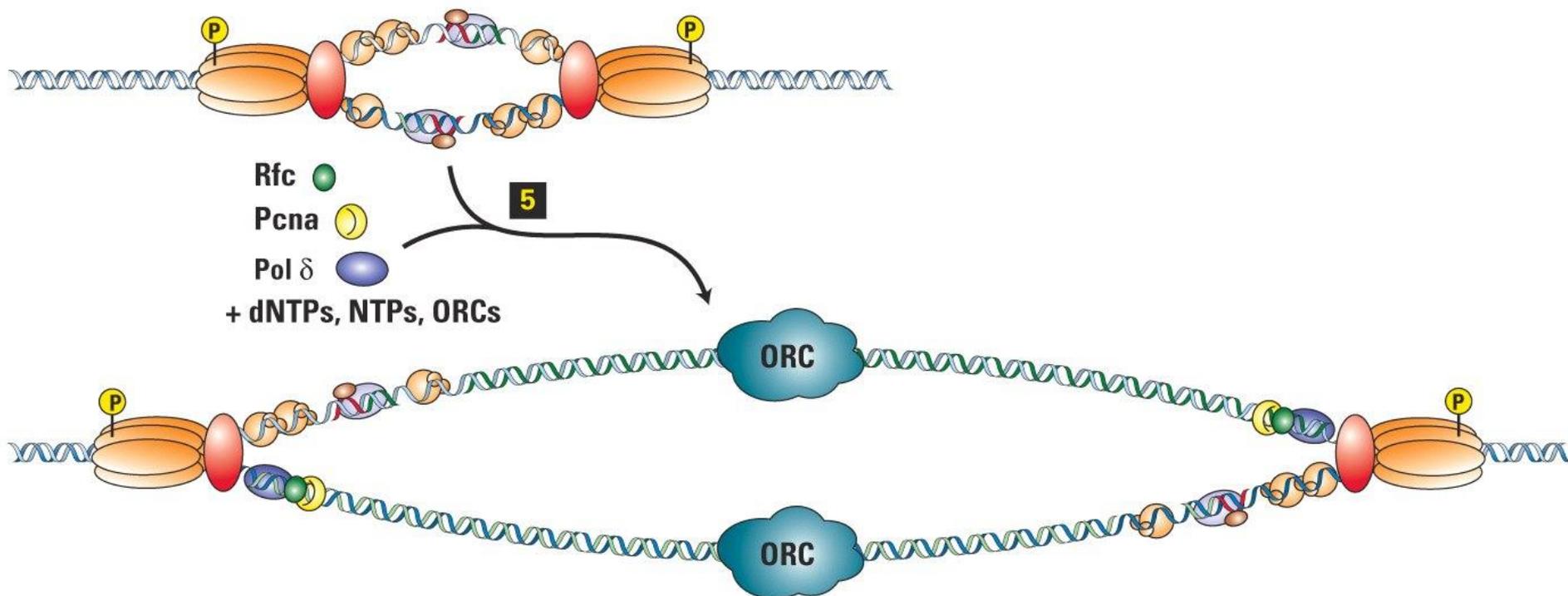
Фосфорилирование при сборке реплисомы



Pol α /prim загружается также посредством cdc45 и фосфорилирования двух больших субъединиц, опосредованное CysE/Cdk2. После загрузки Pol α /prim-комплекс формирует РНК-ДНК-праймеры - затравки репликации.

CysA/Cdk2 ингибирует инициацию в G2.

Фосфорилирование при сборке реплисомы



После синтеза РНК-ДНК-праймеров с праймированной структурой связывается Rfc, который в свою очередь в АТФ-зависимой манере загружает на праймер-матричный дуплекс PCNA.

На следующем этапе происходит ассоциация репликативных ДНК-полимераз дельта и эпсилон и формирование репликативных вилок.

Формирование реплисомы закончено.

Репликация ДНК у высших эукариот

После того, как синтез ДНК закончен, *ori* вновь АТФ-зависимо заполняются комплексом ORC на протяжении частично G2 и M-G1-фаз. Таким образом, обеспечивается выбор *ori* для следующего раунда репликации.

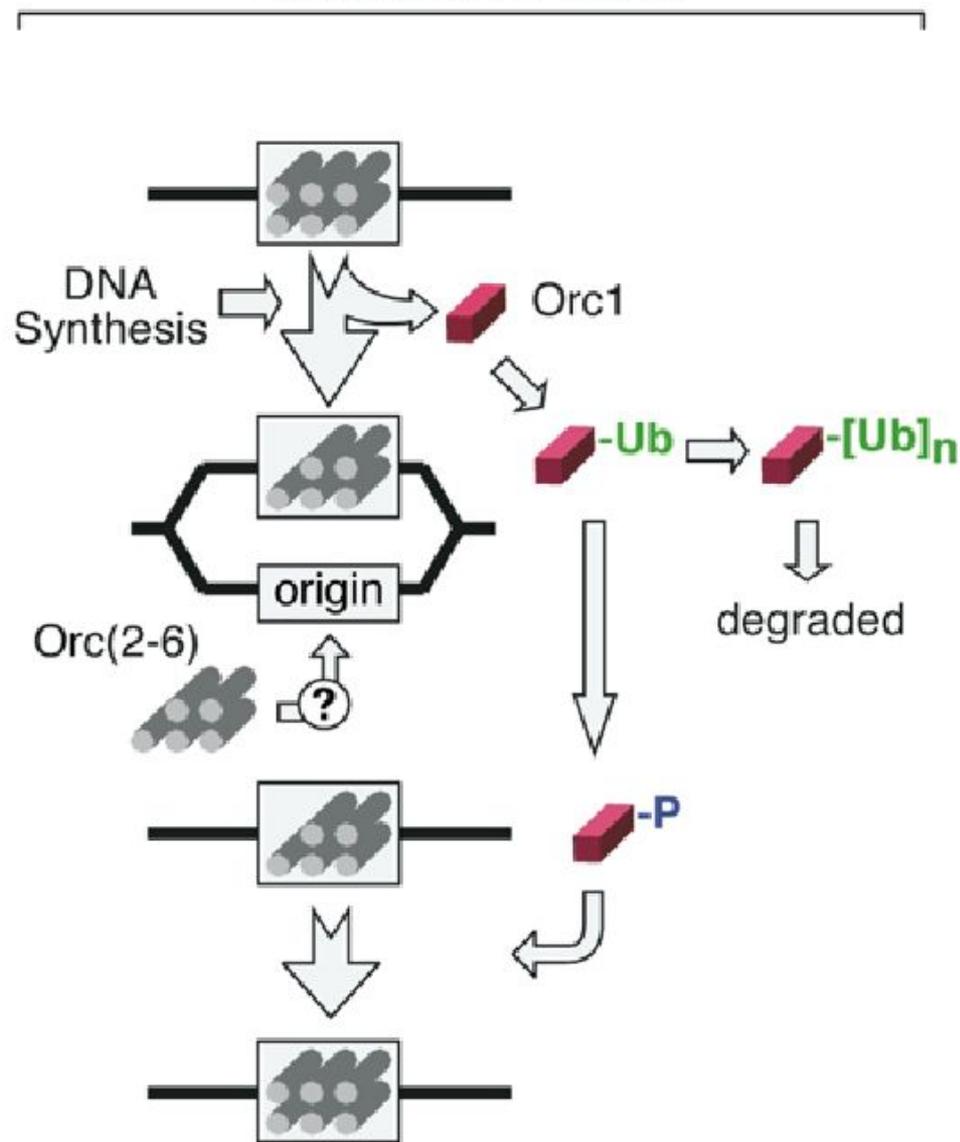
Повторная сборка pre-RC-комплексов в этих местах в рамках текущего цикла невозможна. Почему?

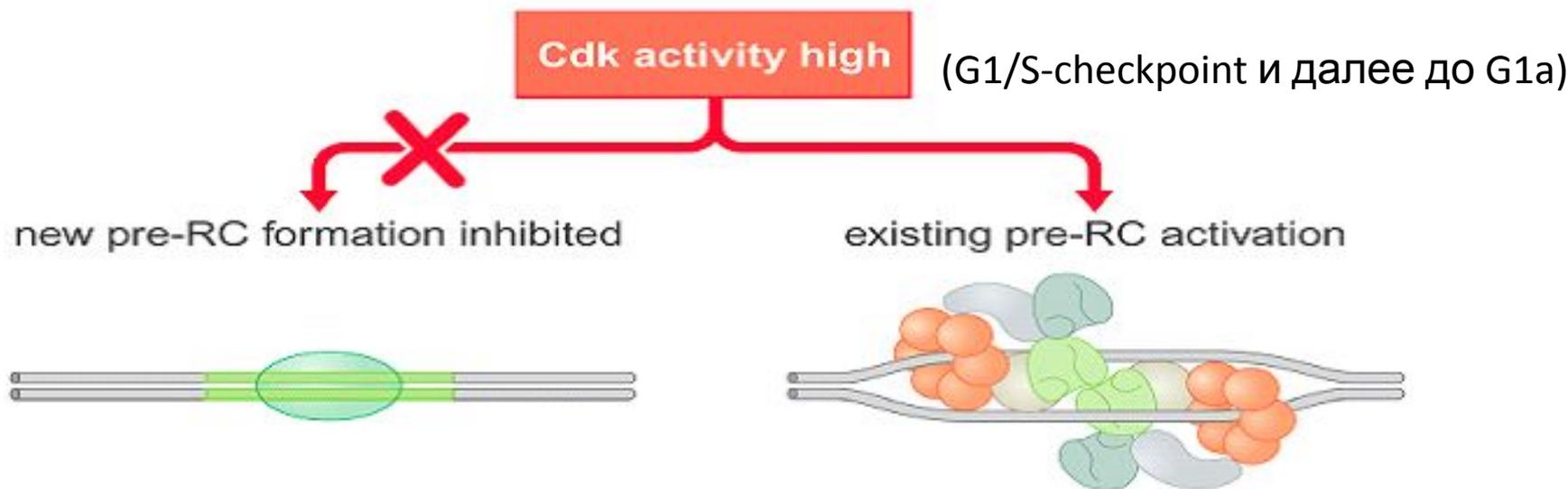
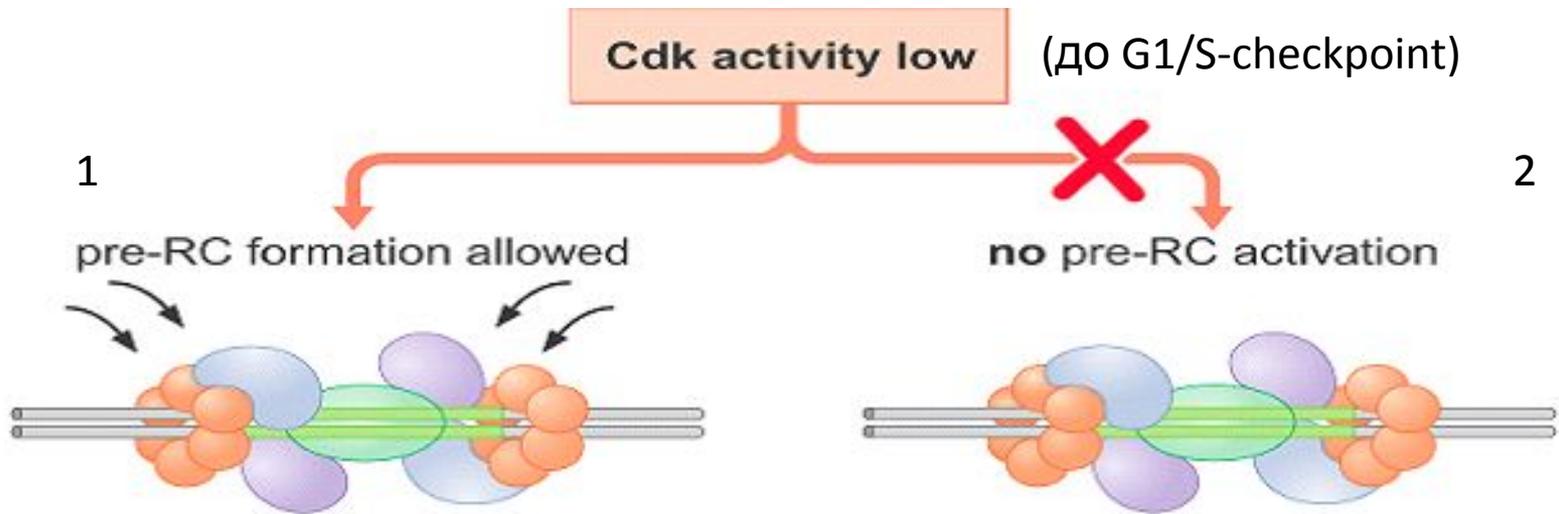
На этих стадиях клеточного цикла не хватает факторов *cdc6*, *ctd1*. Загрузка геликазы MCM2-7 на *ori* невозможна, *ori* "не лицензирован".

Еще один **путь запрета повторной сборки** репликативных комплексов – убиквитинилирование отдельной субъединицы *Orc1*, при которой невозможно формирование продуктивного комплекса ORC в *ori*, а также полиубиквитинилирование *Orc1*, ведущее к его протеолитической деградации на указанных стадиях клеточного цикла.

ORC цикл, исключающий возможность повторной инициации до прохождения

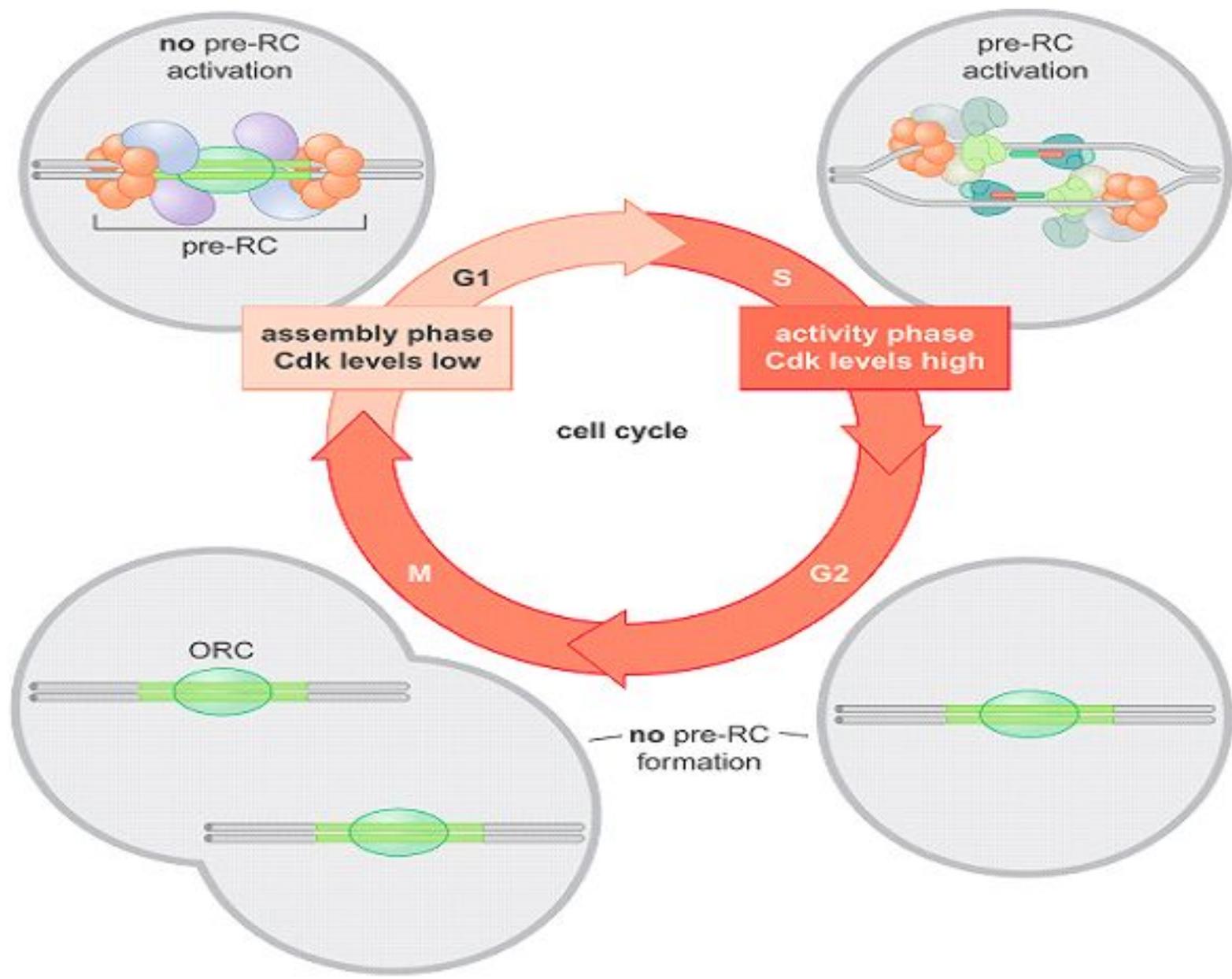
Mammalian Cells





Фосфорилирование компонентов ORC :

1. препятствует формированию новых pre-RC;
2. активирует-запускает ориджин.



Начало клеточного цикла – restriction point (R) –

- решается вопрос о дальнейшем продвижении по G1-фазе (достаточно ли питания, есть ли внешний сигнал - факторы роста)

G1b-фаза - транскрипция, трансляция необходимых макромолекул

- окончательное лицензирование ориджинов репликации

G1/S-checkpoint – индукция инициации синтеза ДНК

- решается вопрос о готовности к синтезу ДНК

S-фаза – DNA damage/replication stall checkpoint -

- синтез ДНК, удвоение хромосом

G2-фаза – конденсация хроматина, подготовка к митозу

G2/M-checkpoint – решается вопрос о готовности к делению

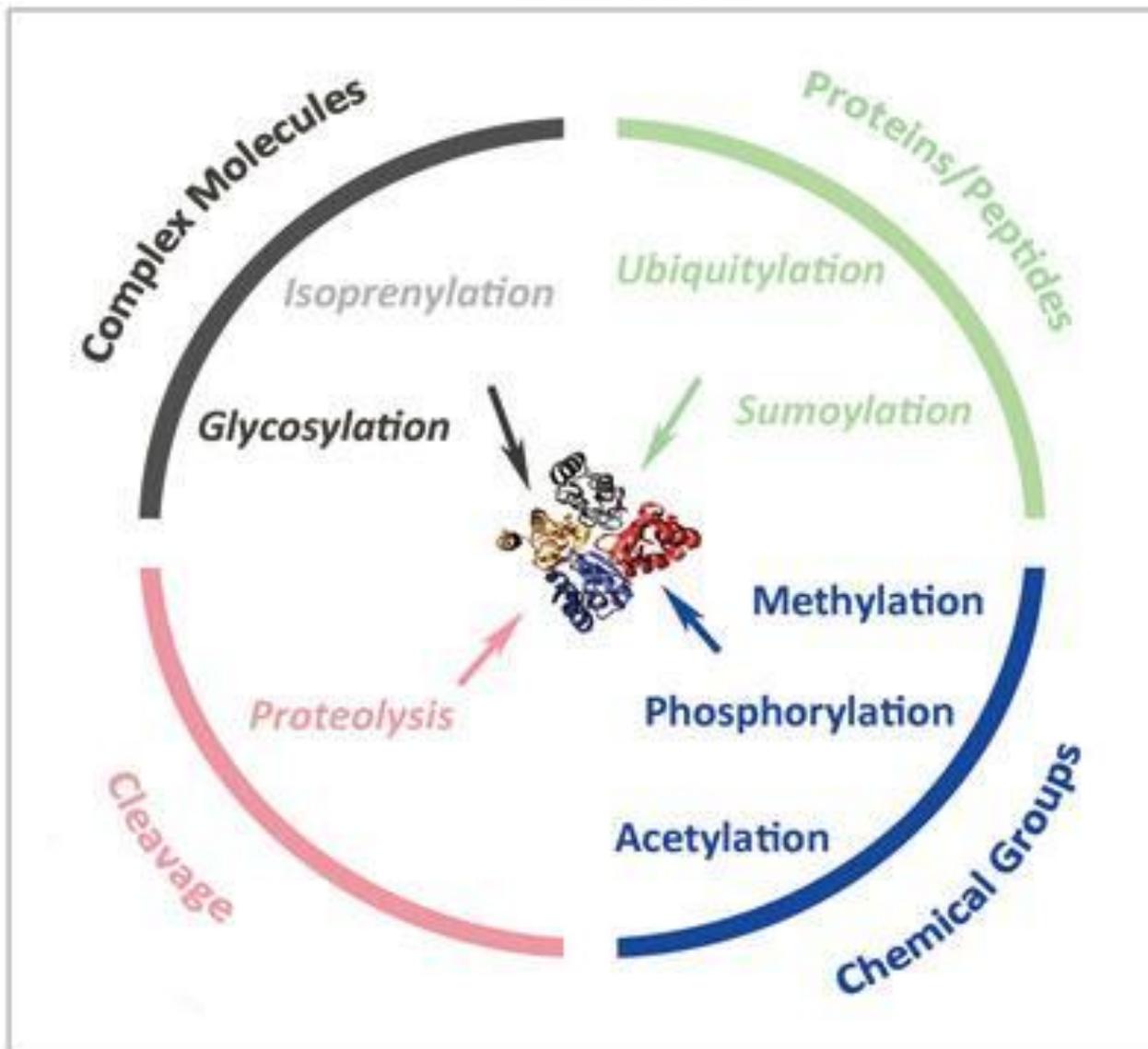
- (полностью ли реплицирована ДНК, отсутствуют ли повреждения ДНК)

M-фаза (митоз) – разделение хромосом, цитокинез, деление клетки

- (практически полное отсутствие матричного биосинтеза)

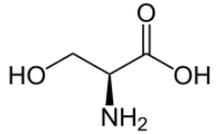
M-checkpoint – проверяется крепление хромосом на веретене деления

ОСНОВНЫЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ



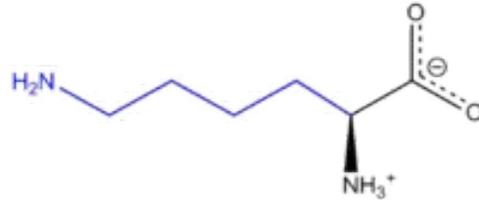
ОСНОВНЫЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

OH



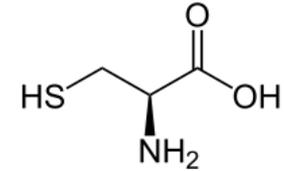
ser

NH₂



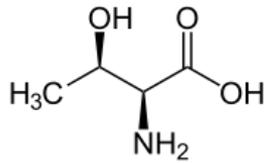
lys

SH

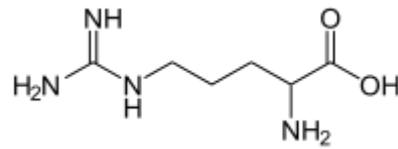


cys

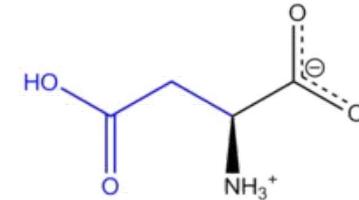
COOH



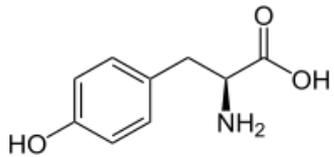
thr



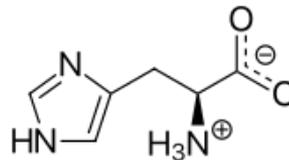
arg



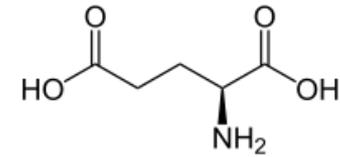
asp



tyr



his



glu

ОСНОВНЫЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Частота

встречаемости

299749
319997

Total Characterized
Total Processed

108222	Phosphorylation
104966	N-linked glycosylation
33291	Acetylation
10295	Methylation
6069	Palmitoylation
5548	Amidation
4808	Citrullination
4104	O-linked glycosylation
3842	Sulfation
3259	Hydroxylation
2983	Ubiquitylation
2062	S-diacylglycerol cysteine
1616	Pyrrolidone Carboxylic Acid
1508	Myristoylation
1344	Sumoylation
1257	Gamma-Carboxyglutamic Acid
1098	Geranyl-geranylation
1012	GPI anchoring
477	S-nitrosylation
440	Deamidation
384	Farnesylation
325	ADP-ribosylation
305	Nitration
259	C-linked glycosylation
186	FAD
182	Formylation
87	Bromination
20068	Others

ОСНОВНЫЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

- небольшие химические группы:
фосфорилирование, гликозилирование, S-нитрозилирование, метилирование, N-ацетилирование;
- липиды:
пальмитилирование - присоединение 16-звенной ацильной цепи к остаткам цистеина через тиоэфирную связь,
myristoylation является ковалентным и необратимым присоединением 14-звенной жирной кислоты к N-концевым остаткам Gly эукариотических или вирусных белков;



- небольшие белки:
убиквитинилирование, сумоилирование.

ОСНОВНЫЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Функции:

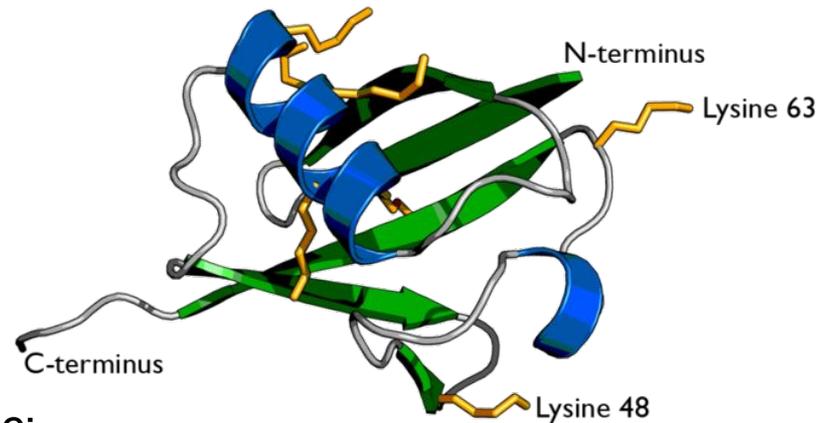
- связывание протеасомой и деградация белков;
- изменение клеточной локализации;
- контроль функций других белков;
- контроль клеточных процессов;

Убиквитин

76 ао, 8.5 кДа

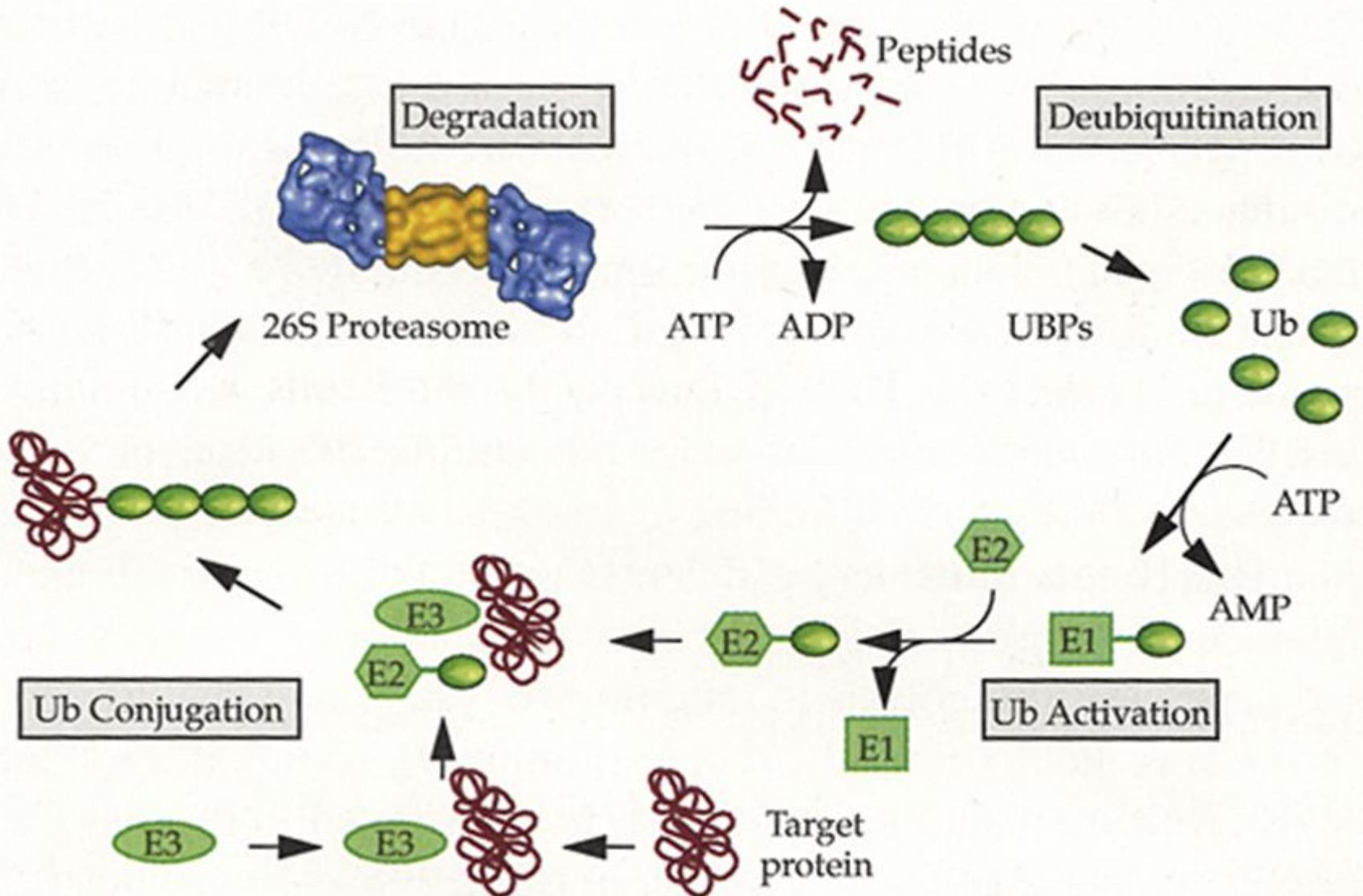
Процессы:

- деление клеточного цикла;
- транскрипция и репликация;
- биогенез органелл, в том числе рибосом;
- дифференцировка и созревание клеток;
- передача клеточного сигнала, ответ на стресс;
- моделирование рецепторов на клеточной поверхности;
- морфогенез нервной системы;
- дегенерация нервных и мышечных волокон;
- продукция антигенов;
- иммунный ответ;
- генерация иммунного ответа при вирусной инфекции;
- апоптоз.



ОСНОВНЫЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ

УБИКВИТИН



E3 ligase	Targeted protein or pathway	Ubiquitin chain type	Disease
FANCL ³⁹	FANCD2, FANCI	monoUb	Fanconi anemia
DDB2 (refs. 42,43)	Chromatin	monoUb	Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome
Cbl family ¹²	RTKs	monoUb	Cancer
Nedd4 (refs. 77,79)	PTEN, α -synuclein	monoUb, Lys63, polyUb	Cowden syndrome, Parkinson's disease
Rabex-5 (ref. 25)	Ras	monoUb	Cancer
MDM2 (ref. 9)	p53	Lys48	Cancer
SCF ¹⁰	Cyclin-CDK, p27, p21	Lys48	Genomic instability
APC/C ¹⁰	Cyclin-CDK	Lys48	Genomic instability
SOCS1/3 (refs. 118,119)	IRS2	Lys48	Metabolic syndrome
MG53 (ref. 121)	IR, IRS1	Lys48	Metabolic syndrome
FbwB (ref. 120)	IRS1	Lys48	Metabolic syndrome
Atrogin1 (refs. 104,105)	MyoD	Lys48	Muscle wasting
Murf1 (refs. 103-105)	Thick filaments	Lys48	Muscle wasting
Trim32 (ref. 110)	Thin filaments	Lys48	Muscle wasting
pVHL ¹⁵	HIF	Lys48	Von Hippel Lindau
IAPs ³²⁻³⁴	NIK	Lys48	Multiple myeloma

E3 ligase	Targeted protein or pathway	Ubiquitin chain type	Disease
Rnf168 (ref. 44)	Histones	Lys63, polyUb	Cancer, RIDDLE syndrome
TRAF6 (refs. 95,99)	TRAF6, NEMO, huntingtin	Lys63, polyUb	Inflammatory disease, Huntington's disease
Itch, IAPs ⁷²	RIP2	Lys63, polyUb	X-linked lymphoproliferative disease, Crohn's disease
Parkin ^{82,85}	Mitochondrial outer membrane proteins	Lys63, polyUb	Parkinson's disease
CHIP, Parkin ⁸²	Huntingtin, β -amyloid, tau	Lys63, polyUb	Huntington's disease, Alzheimer's disease
c-IAP1 (ref. 147)	RIP1	Atypical polyUb	Inflammatory disease
BRCA1 (ref. 40)	BRCA1	Atypical polyUb	Breast and ovarian cancer
LUBAC ^{68,69,161}	NEMO	Linear polyUb	Autoinflammation, muscular amylopectinosis, bacterial infections

ОСНОВНЫЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

SUMO

Small Ubiquitin-like Modifier

~100 ао, 12 кДа

Функции:

- транспорт белков (цитоплазма-ядро);
- регуляция транскрипции;
- апоптоз;
- стабильность белков;
- прогресс клеточного цикла;
- ответ на стресс;
- НЕ используется для деградации белков;

Заболевания:

- наследственные кардиомиопатии;
- болезнь Альцгеймера;
- болезнь Паркинсона;
- болезнь Хантингтона;
- рак;
- спиноцеребральная атаксия 1;
- амиотропный латеральный склероз;



