

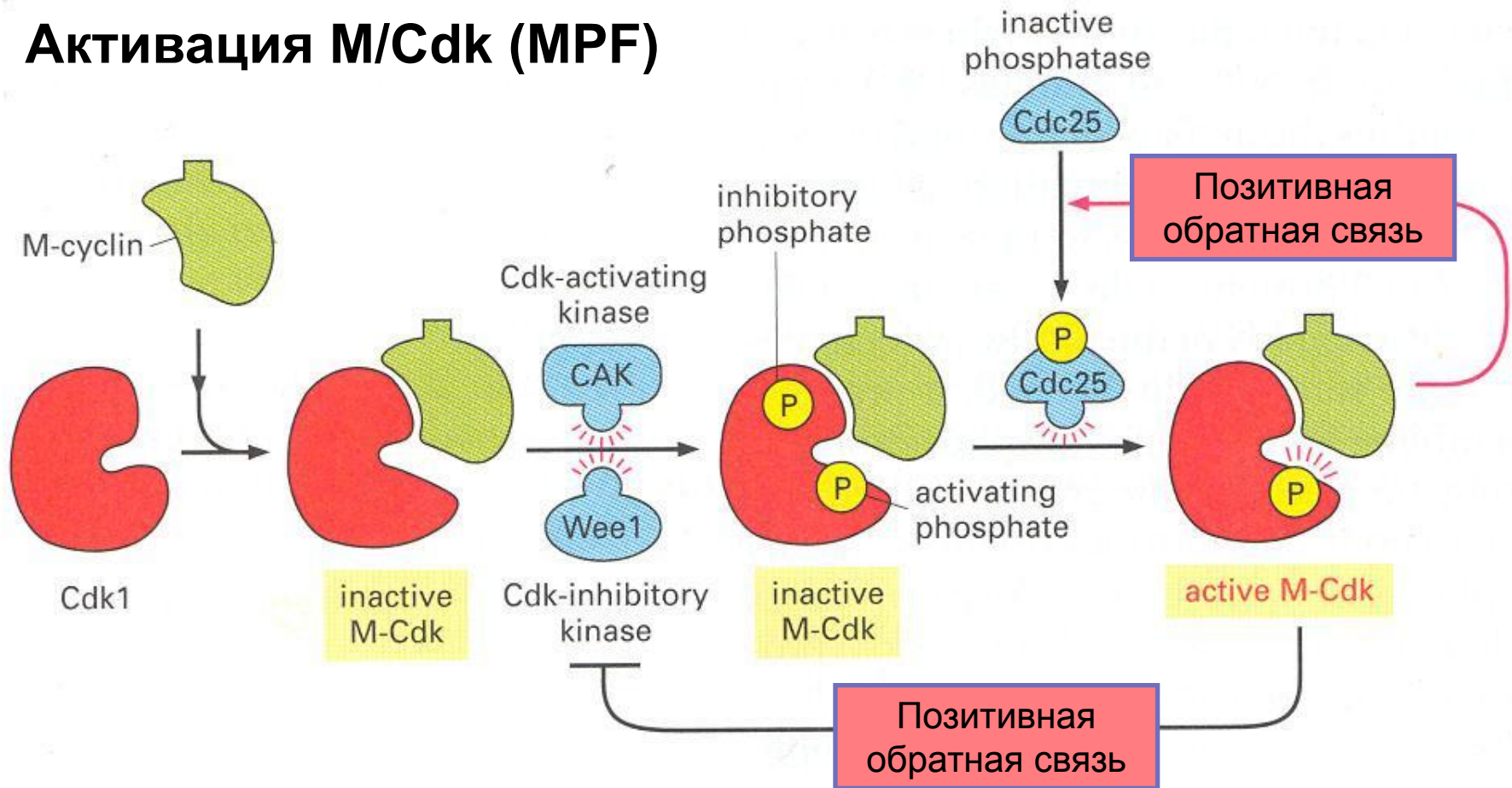


Генетика клеточного цикла

Электронно-лекционный курс
Глава 3

Подготовка к делению клетки

Активация M/Cdk (MPF)



Взрывообразное увеличение концентрации активного MPF

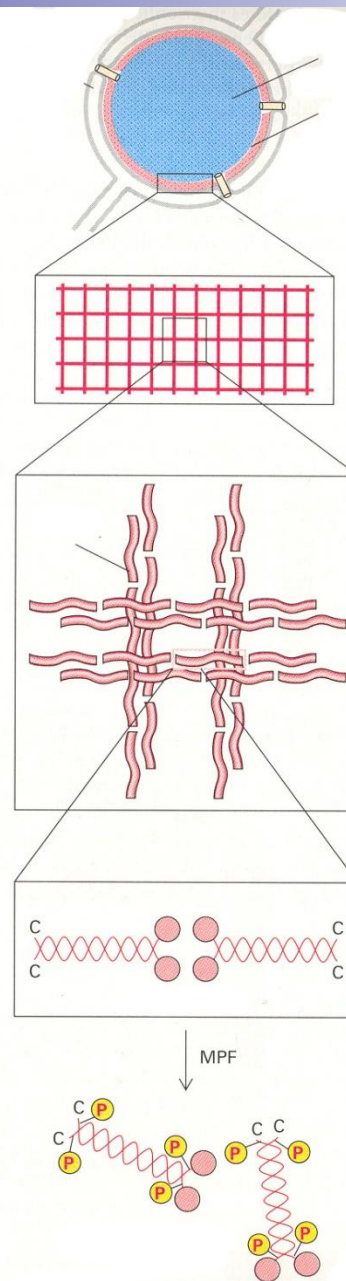
Трансформация ядра в клеточном цикле

Разборка ламины в профазе

Филаменты ламины

Тетрамер ламин

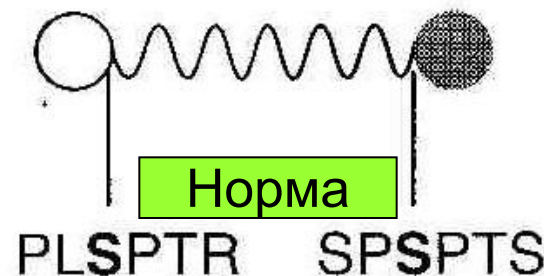
Фосфорилированные
димеры ламин



Фосфорилирование белков ламины и распад ядерной оболочки

Мутантный ген ламина человека введен в клетки китайского хомячка. Замена аминокислоты в сайте фосфорилирования приводит к нарушению разборки ламины в митозе

Сайты фосфорилирования MPF мономеров ламины



Серин, серин
P P

Фенотип
Разборка ламины

аланин, серин P
P
треонин, аланин

Замедление разборки

Замедление разборки

аланин, аланин

Нет разборки

Мутантные варианты

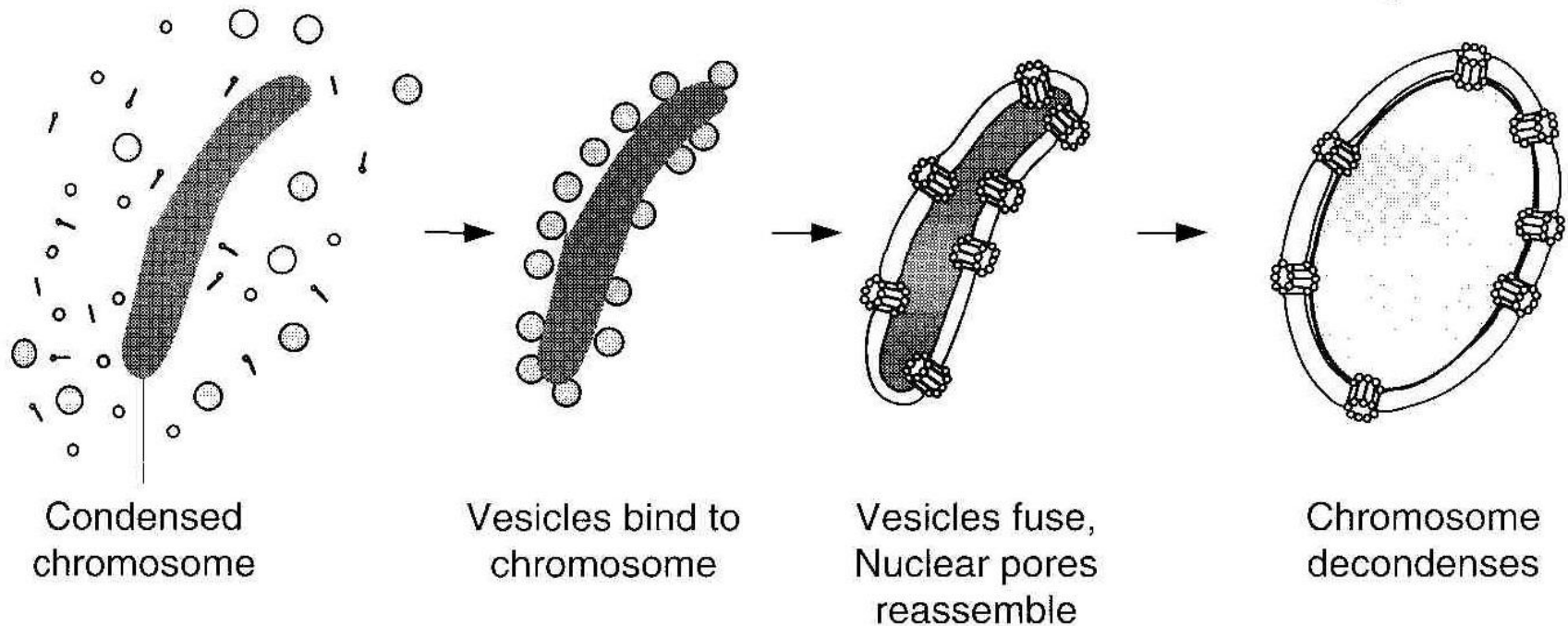
PLAPTR SPSPTS

PLTPTR SPAPTS

PLAPTR SPAPTS

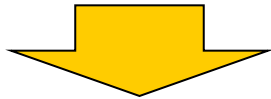
Восстановление интерфазного ядра в анафазе-телофазе.

Активность киназ снижается. Дефосфорилирование ламинов и их самосборка. Восстановление ядерной оболочки и поровых комплексов вокруг хроматина. Транспорт в ядро белков с NLS.



Изучение стабильности микротрубочек в бесклеточной системе яиц лягушки:

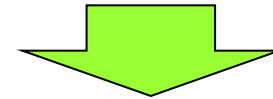
Центросомы
Флуоресцентный тубулин
Экстракт интерфаз



Микротрубочек немного, они длинные

Время полужизни микротрубочки 5 мин

Центросомы
Флуоресцентный тубулин
Экстракт метафаз



Микротрубочек много, они короткие

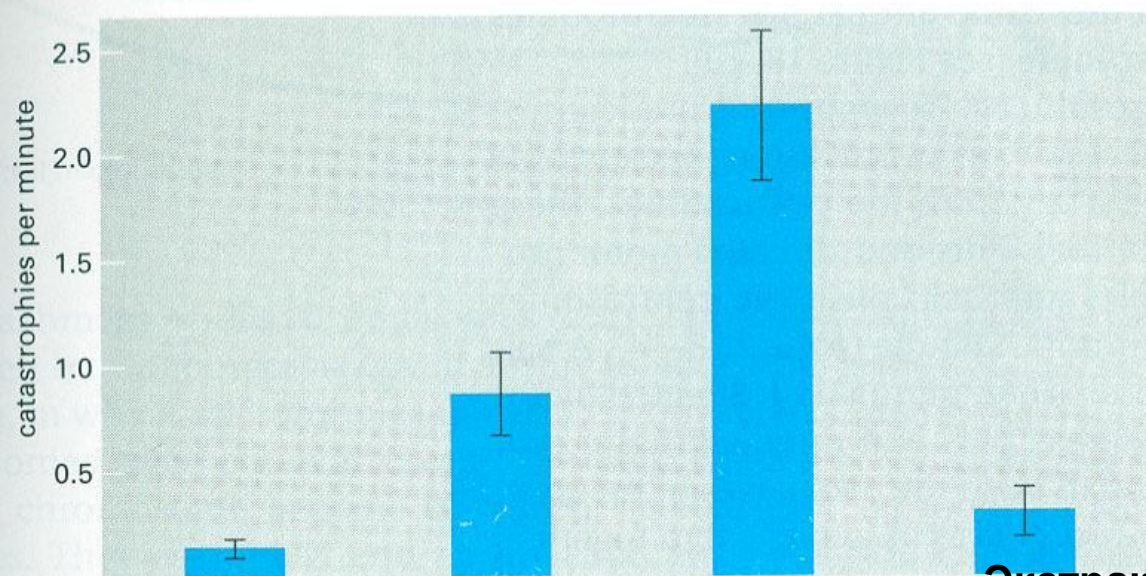
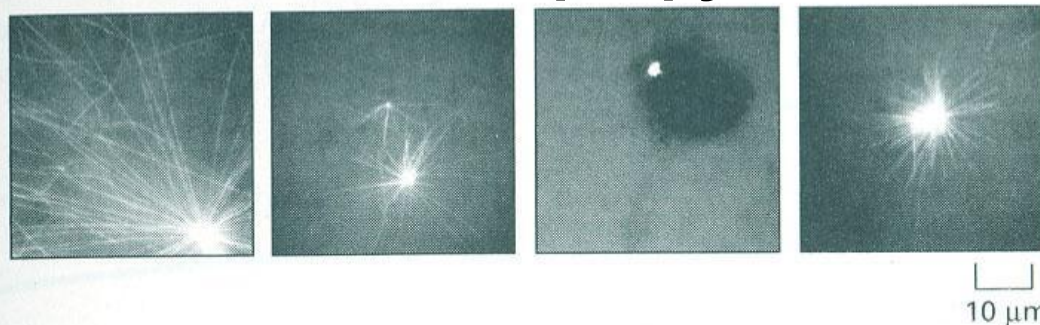
Время полужизни микротрубочки 15 сек

Увеличение частоты катастроф

М-Cdk фосфорилирует микротрубочковые моторы и MAP (белки, ассоциированные с микротрубочками)

- Белки MAP – XMAP215- стабилизируют + конец
 - Белки катастрофины из семейства кинезин-подобных белков дестабилизируют + конец, расщепляют на протофиламенты
- Баланс активностей приводит к динамической нестабильности мт

Влияние белков MAP и катастрофина на стабильность микротрубочек

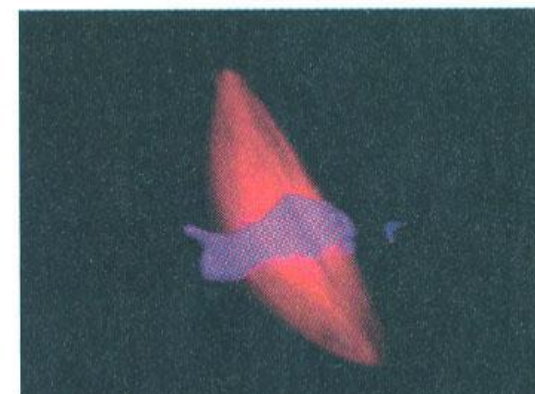


Экстракт
интерфазы

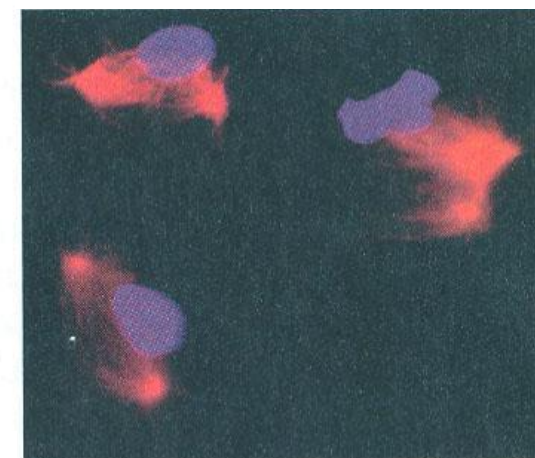
Экстракт
метафазы

Экстракт
метафазы,
удален
ХМАР215

Экстракт
метафазы,
удален
ХМАР215,
инактивирован
катастрофин

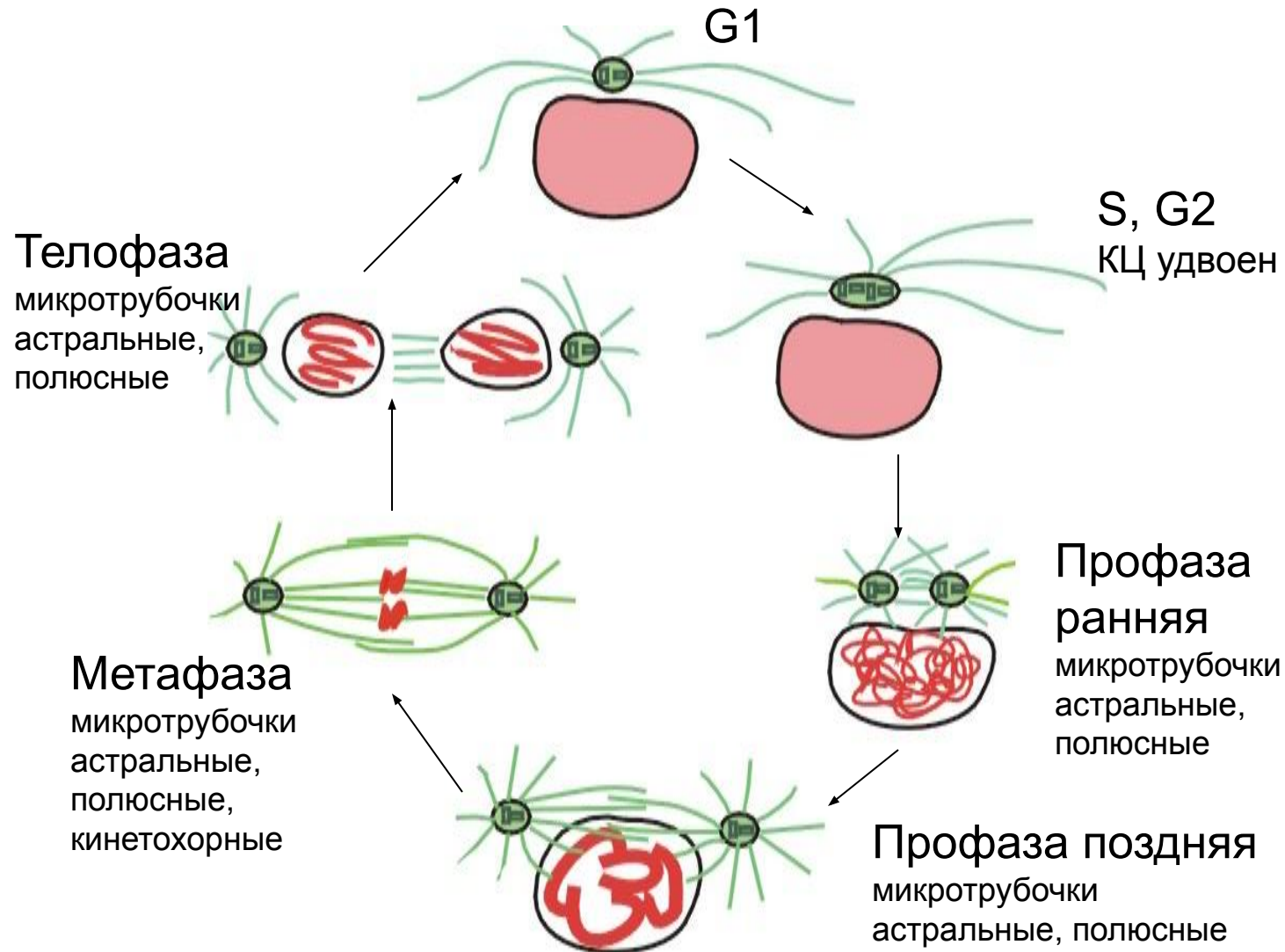


Митоз в нормальном
экстракте



(B) Митоз в
экстракте,
удален
ХМАР215

Динамика тубулинового скелета в клеточном цикле

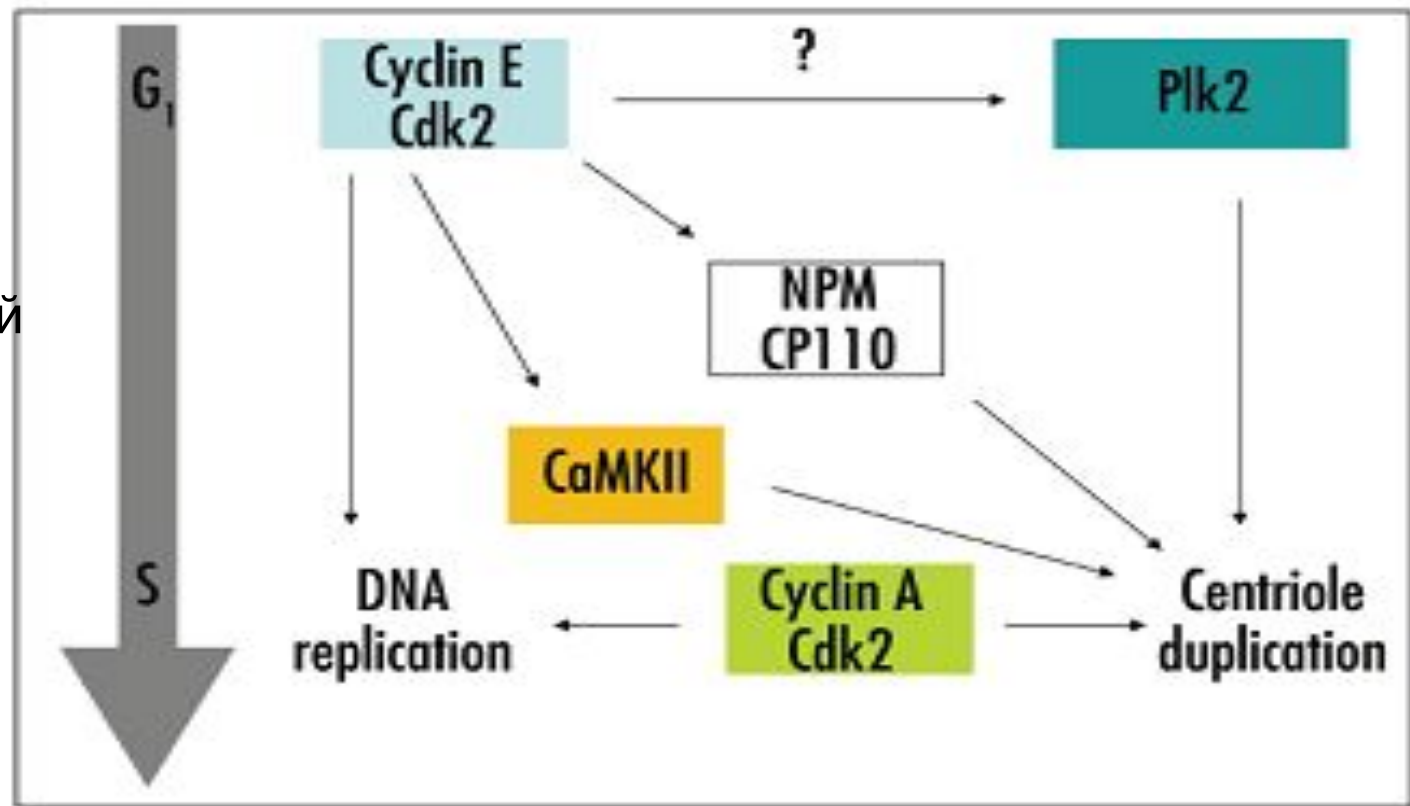


Дупликация centrosомы запускается Cdk2/cyclin E в переходе G1-S
Далее, в S, репликация контролируется Cdk2/cyclin A

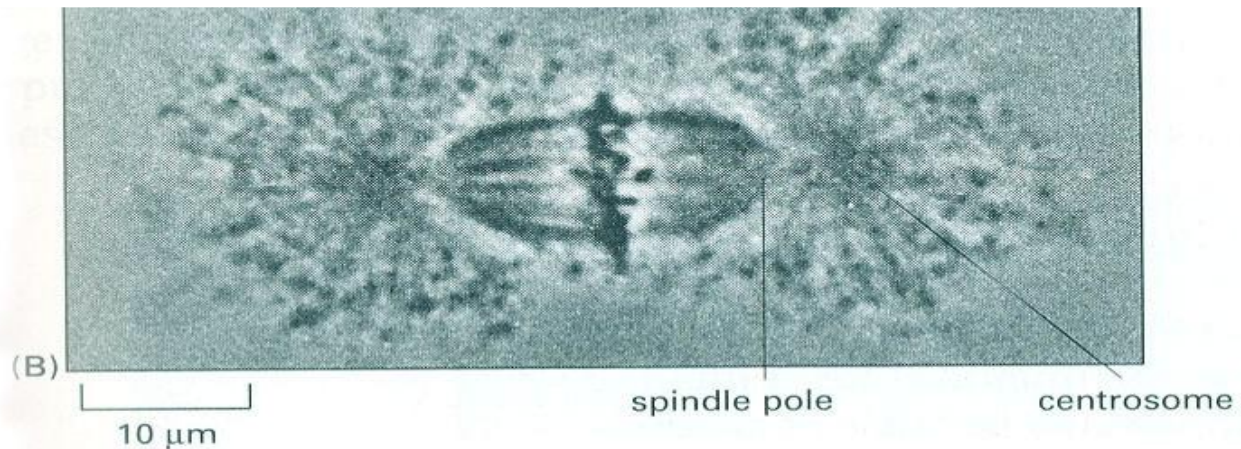
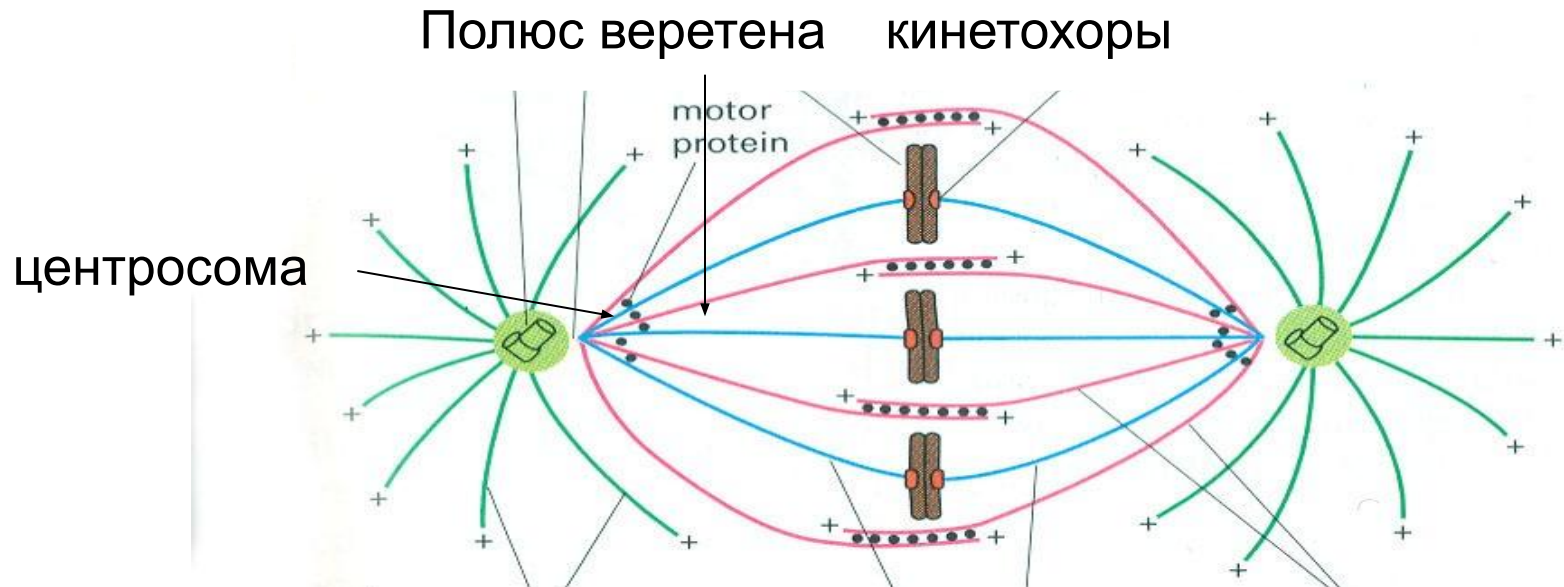
Polo-like-kinases найдены у многих видов. Пик активности Plk2 в переходе G1-S

Plk1 участвует в привлечении γ -тубулина в centrosомы во время их созревания – для нуклеации микротрубочек из centrosом

NPM, CP110 –
белки centrosом
CaMKII-
кальмодулиновый
комплекс



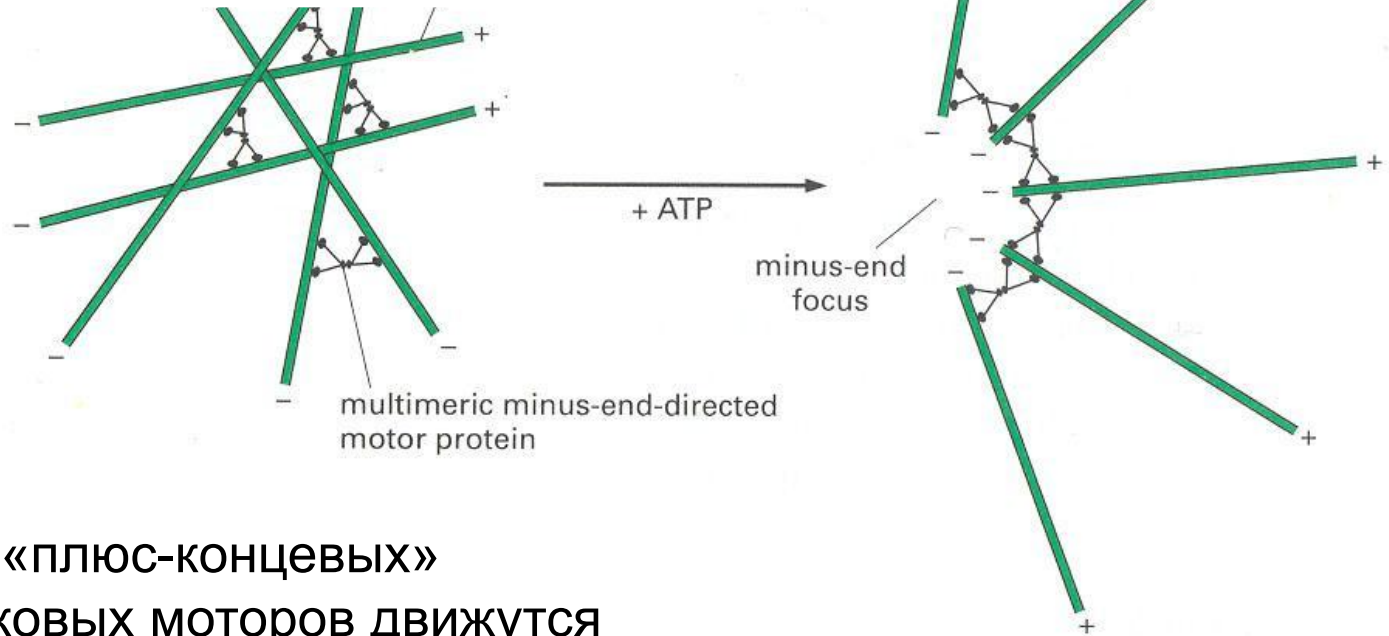
Микротрубочки, образующие веретено деления



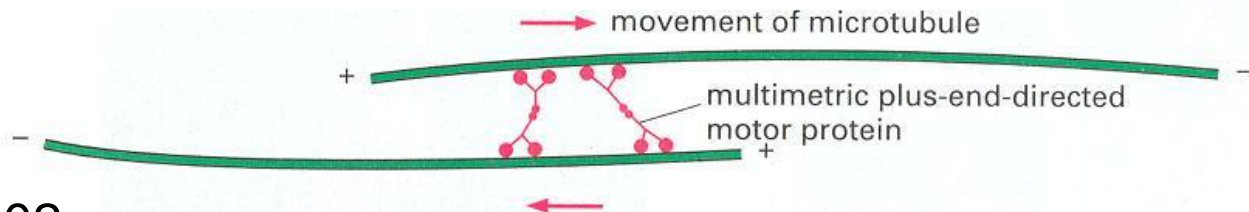
Alberts et al.,
2002

Самосборка веретена

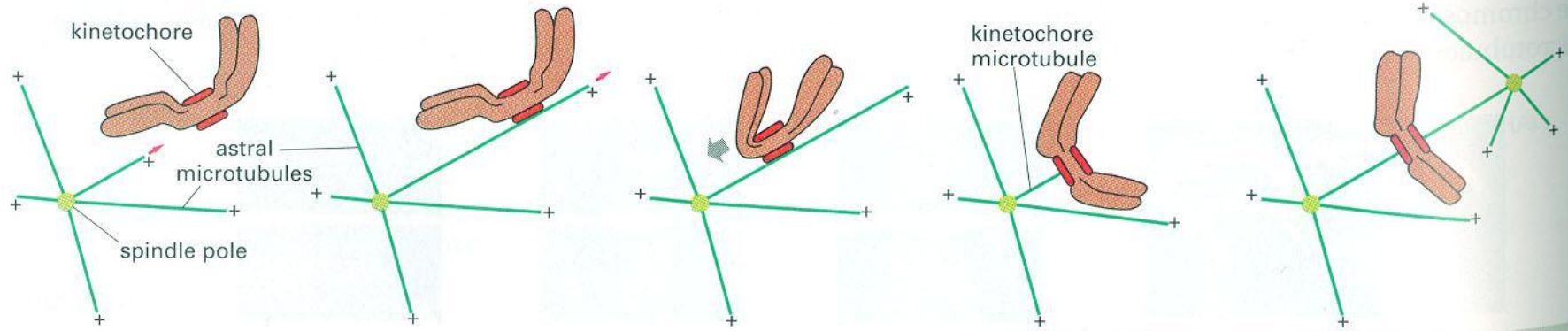
Мультимеры «минус-концевых»
микротрубочковых моторов сбегаются
к «-» концам, образуя «-» концевые фокусы



Мультимеры «плюс-концевых»
микротрубочковых моторов движутся
к «+» концам по встречным микротрубочкам,
раздвигая полюса



Динамика присоединения хромосомы к полюсам



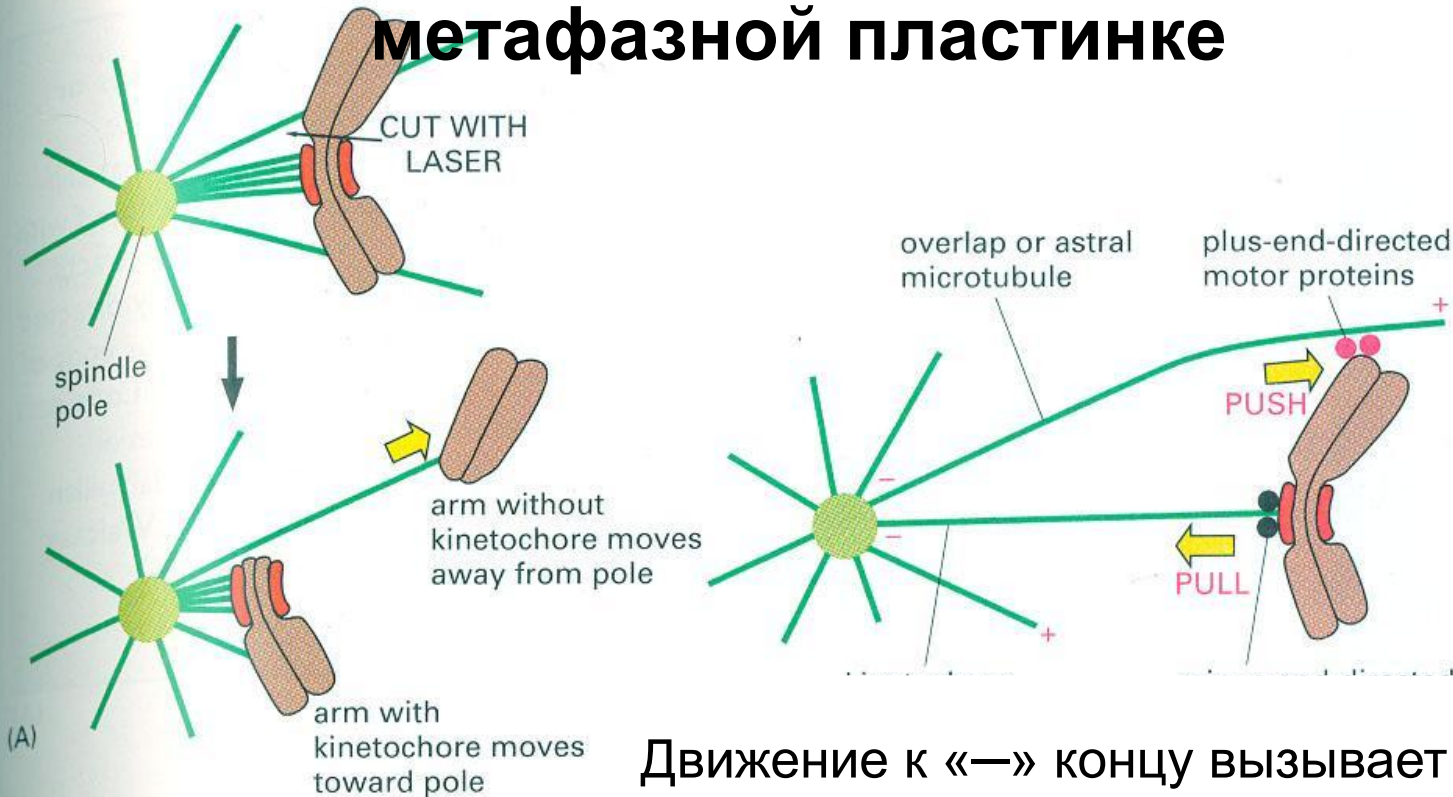
Астральные микротрубочки.
Латеральное прикрепление кинетохора
к микротрубочке, скольжение

Астральные и полюсные трубочки
находятся в состоянии динамической
нестабильности, кинетохор
стабилизирует кинетохорные трубочки

Кинетохор прикрепляется
к «+» концу микротрубочки,
кинетохор другой хроматиды
ловит микротрубочку с
противоположного полюса.
Кинетохорные микротрубочки

У полюсных и кинетохорных мт
явление полярного течения:
Сколько прибыло на «+» конце,
убыло на «-»

Хромосомы позвоночных осциллируют в метафазной пластинке

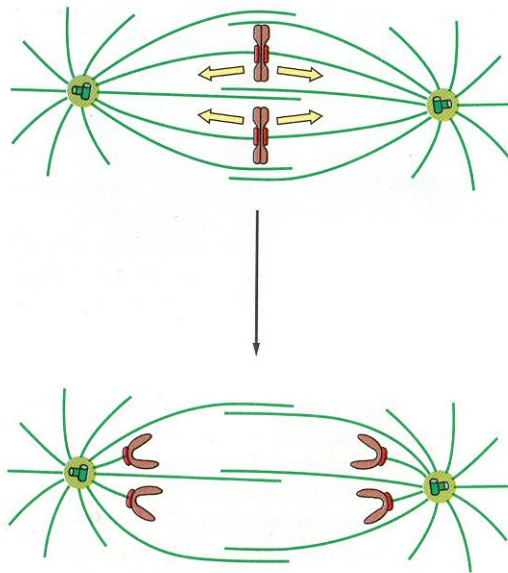


Движение к «—» концу вызывает кинетохор
Движение к «+» концу - астральная мт
выталкивающая сила —микротрубочковые
моторы, локализованные на плечах
хромосом

Механизм расхождения хромосом в анафазе

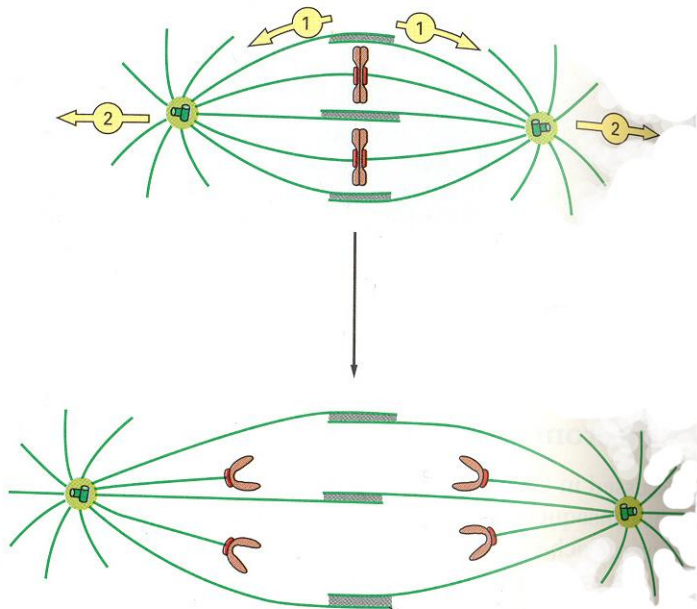
Совмещение двух процессов:

Анафаза А



Укорочение кинетохорных микротрубочек

Анафаза В



1. Удлинение и расталкивание полюсных микротрубочек
2. Астральные мт тянут полюса к клеточной поверхности

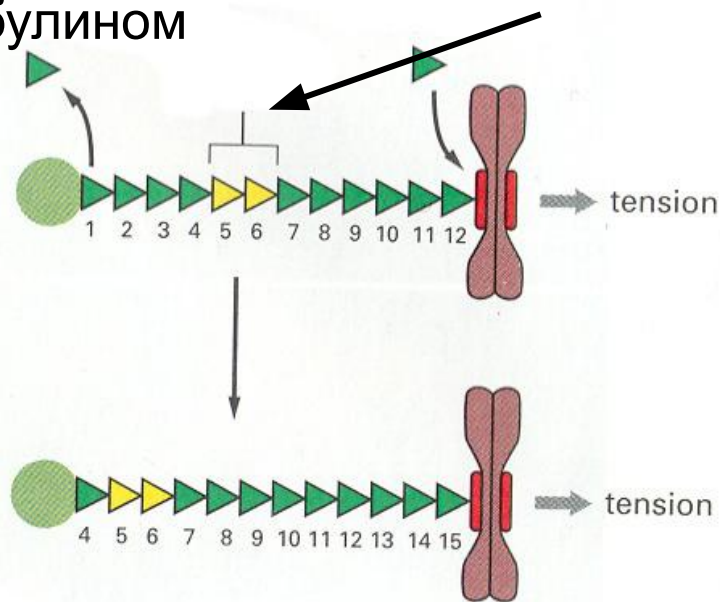
Кинетохорные микротрубочки в метафазе -анафазе

Флуоресцеин
ковалентно
связан с
тубулином

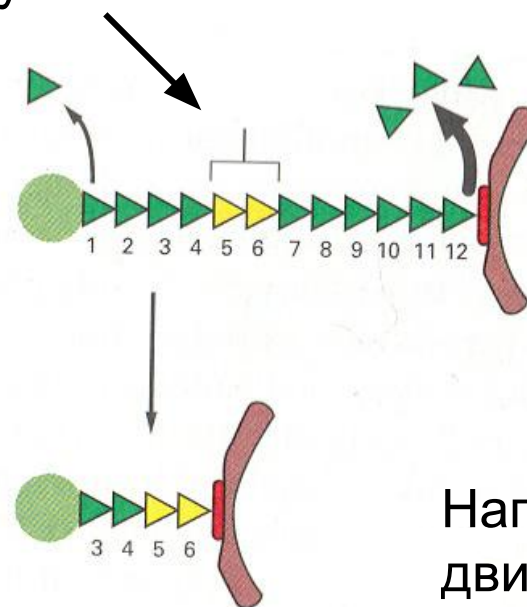
Метафаза

Анафаза

UF меченые тубулины

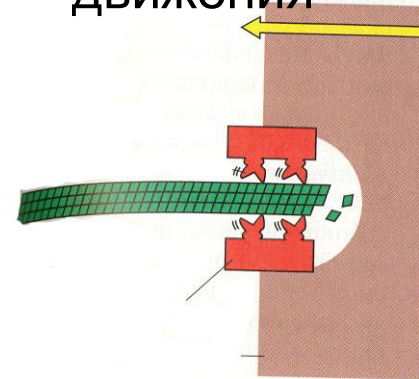


0.75 мкм/мин



Разрушение «+» конца
микротрубочек белками
кинетохора

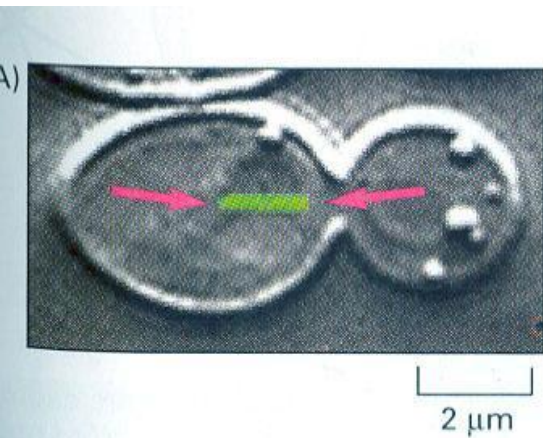
Направление
движения



кинетохор

Баланс активности микротрубочковых моторов «+» и «—» направлений

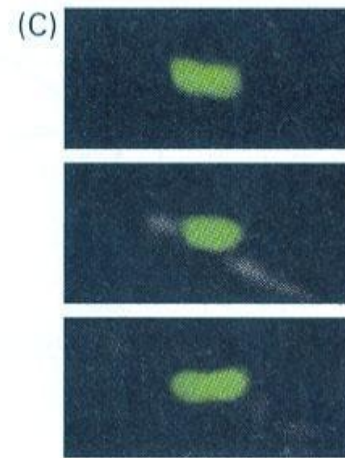
У позвоночных 7 семейств кинезин-подобных белков в митотическом веретене, у *S.cerevisia* - 5



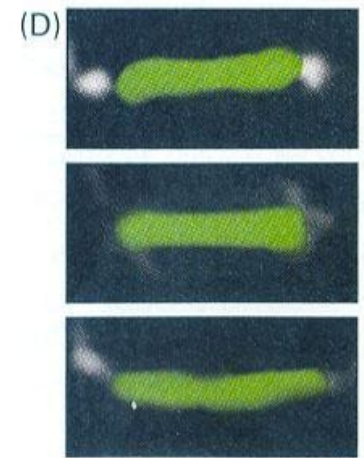
Веретено у
S.cerevisia, окраска
на тубулин



Норма



Оверэкспрессия
Kar3p «—»
концевого
MT мотора



Оверэкспрессия
Cin8p
«+» концевого
MT мотора

Центромера и кинетохор

Центромера- участок хромосомы, имеющий возможность прикрепляться к микротрубочкам. У высших организмов формируется сложная структура- кинетохор.

Генетический скрининг проводили на клетках дрожжей, изучалась стабильность передачи минихромосомы в клеточных поколениях.

chl – chromosome loss,

msm- minichromosome maintenance,

stf - chromosome transmission fidelity,

ndc – nonedisjunction

cin – chromosome instability

dis – defective in sister chromatid disjoining

mis - minichromosome instability

Наиболее простая центромера у *S. cerevisiae*.

Какая минимальная последовательность
обеспечивает передачу минихромосомы?

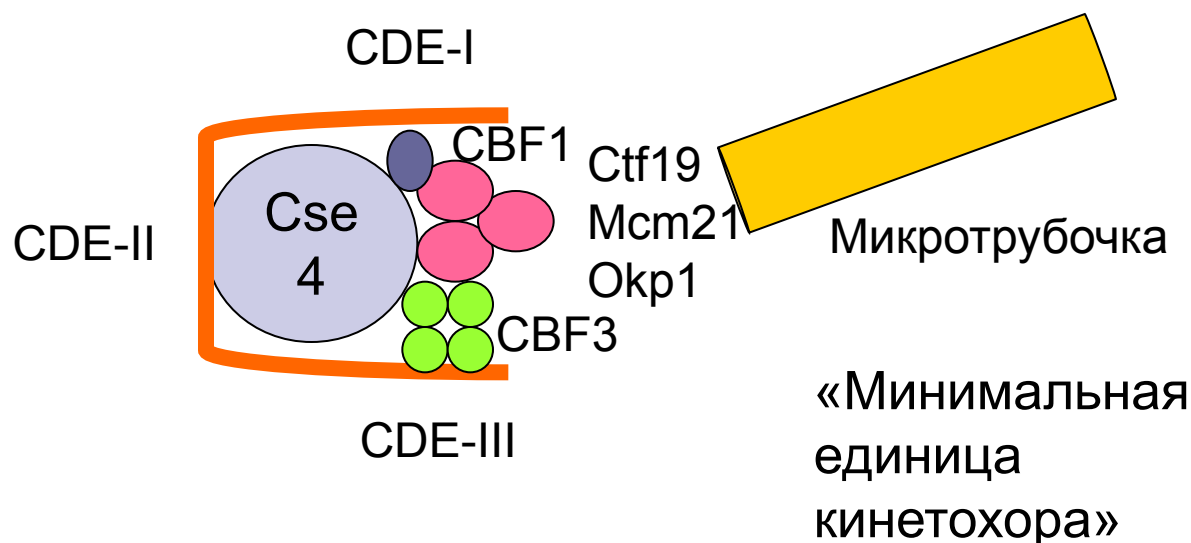
Последовательности CEN:

CDE-I (cell cycle-dependent element) –
консервативная, 9 пн, слева;

CDE-II – А-Т-богатая, 80-90 пн;

CDE-III – высококонсервативная, 11 пн, справа.

Cse4- похож на
гистон H3. Его
аналог
CENP-A есть у
высших
эукариот

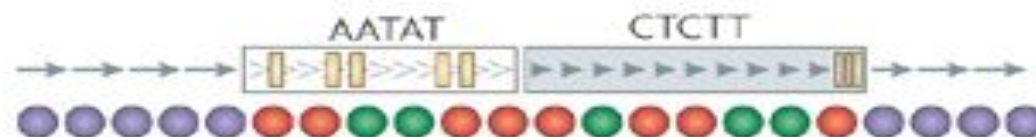


b

Human/mouse

Length of
CENP-A domain

500–1500 kb

Drosophila

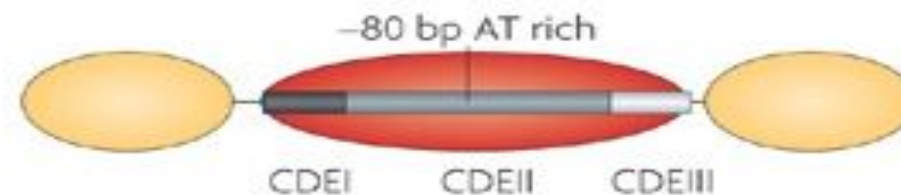
200–500 kb

S. pombe

10 kb

C. albicans

3–4.5 kb

S. cerevisiae

0.125 kb

● CENP-A nucleosomes

● H3K4me2 nucleosomes (and H2AZ in mice)

● H3K9me2/3 nucleosomes

● H3 nucleosomes

Структура хроматина центромерного домена

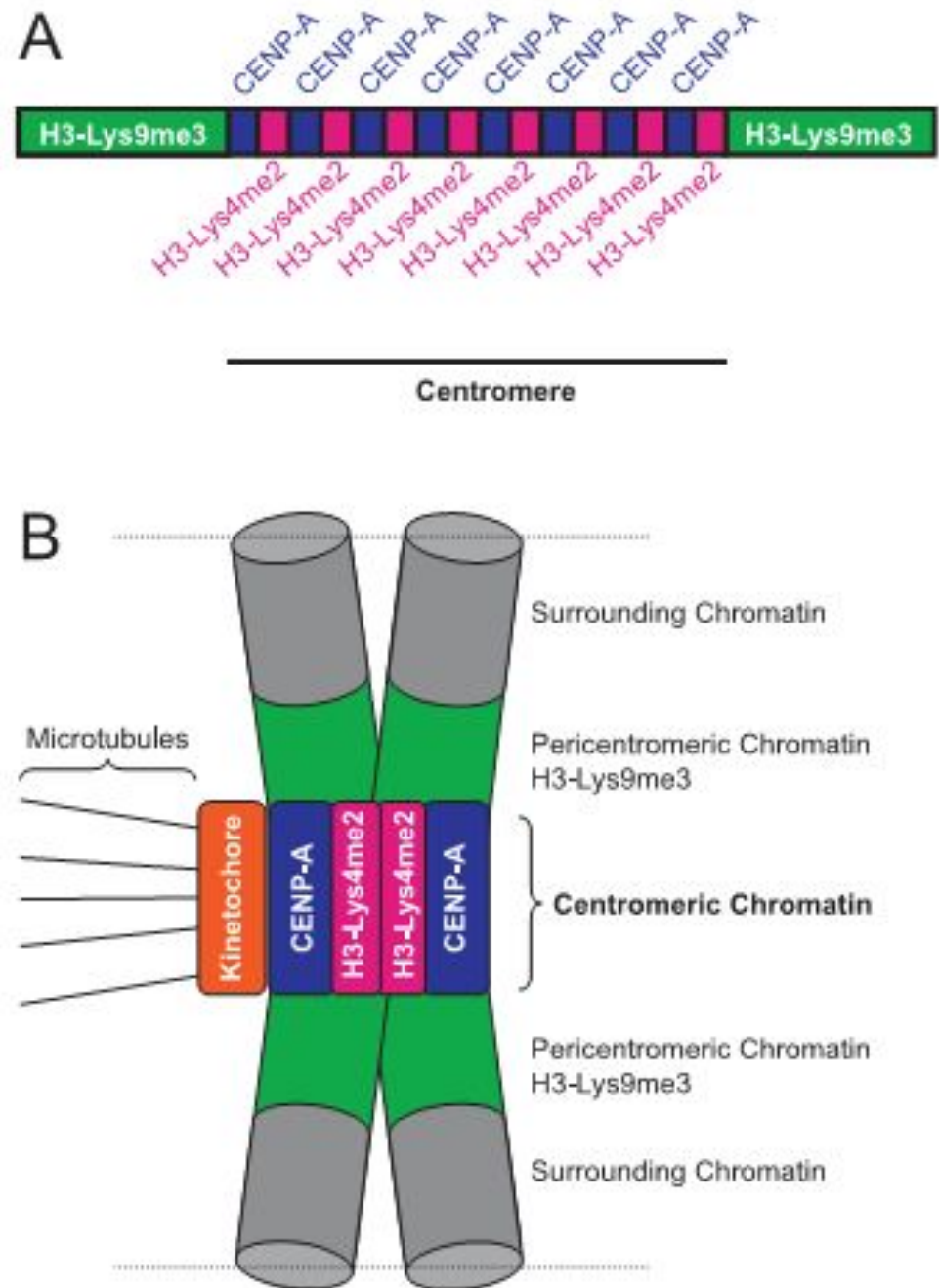
А - Растянутая хроматида в районе центромеры

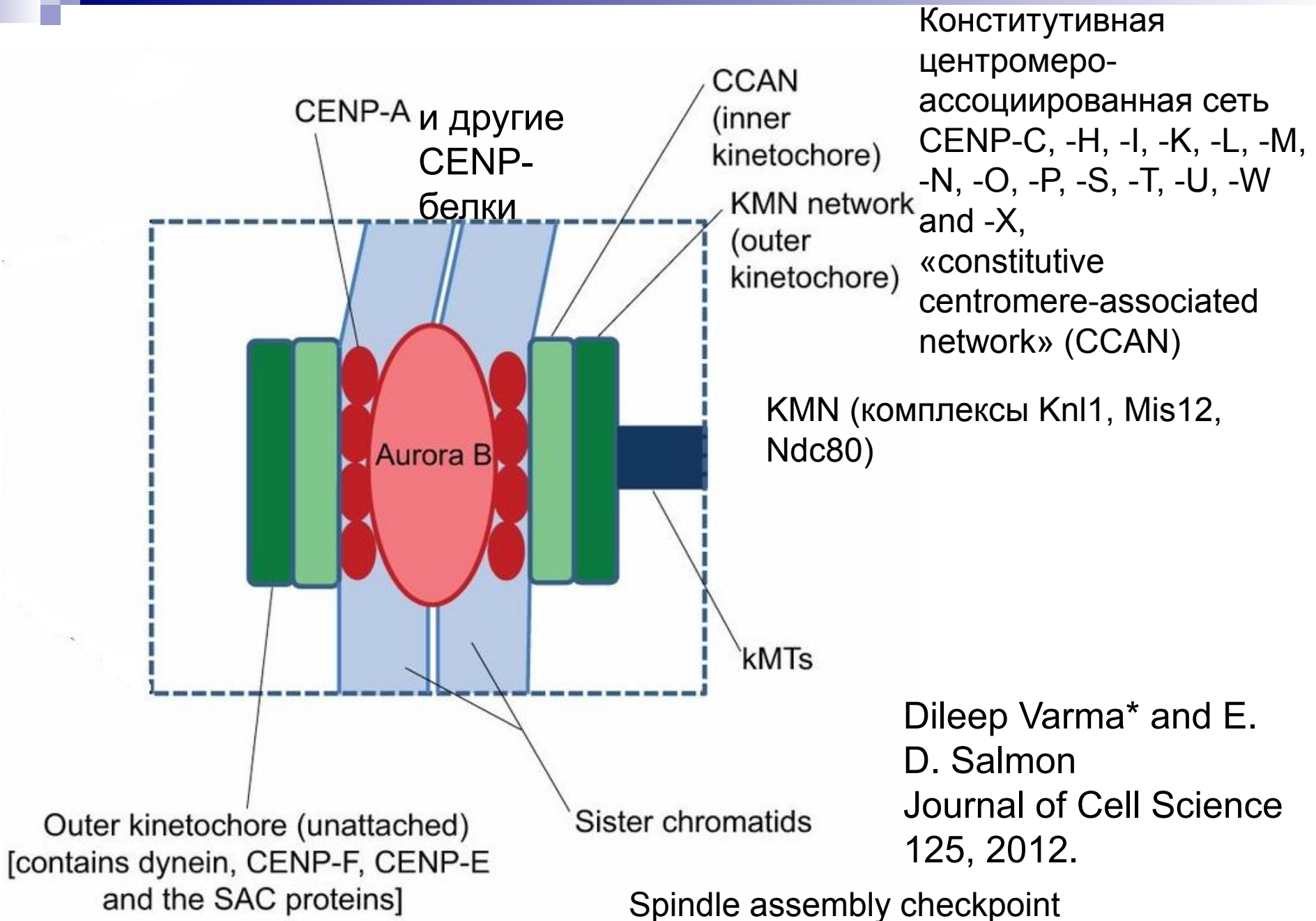
CENP-A – аналог гистона H3:

57% гомологии с С-конца, с N-конца большие отличия

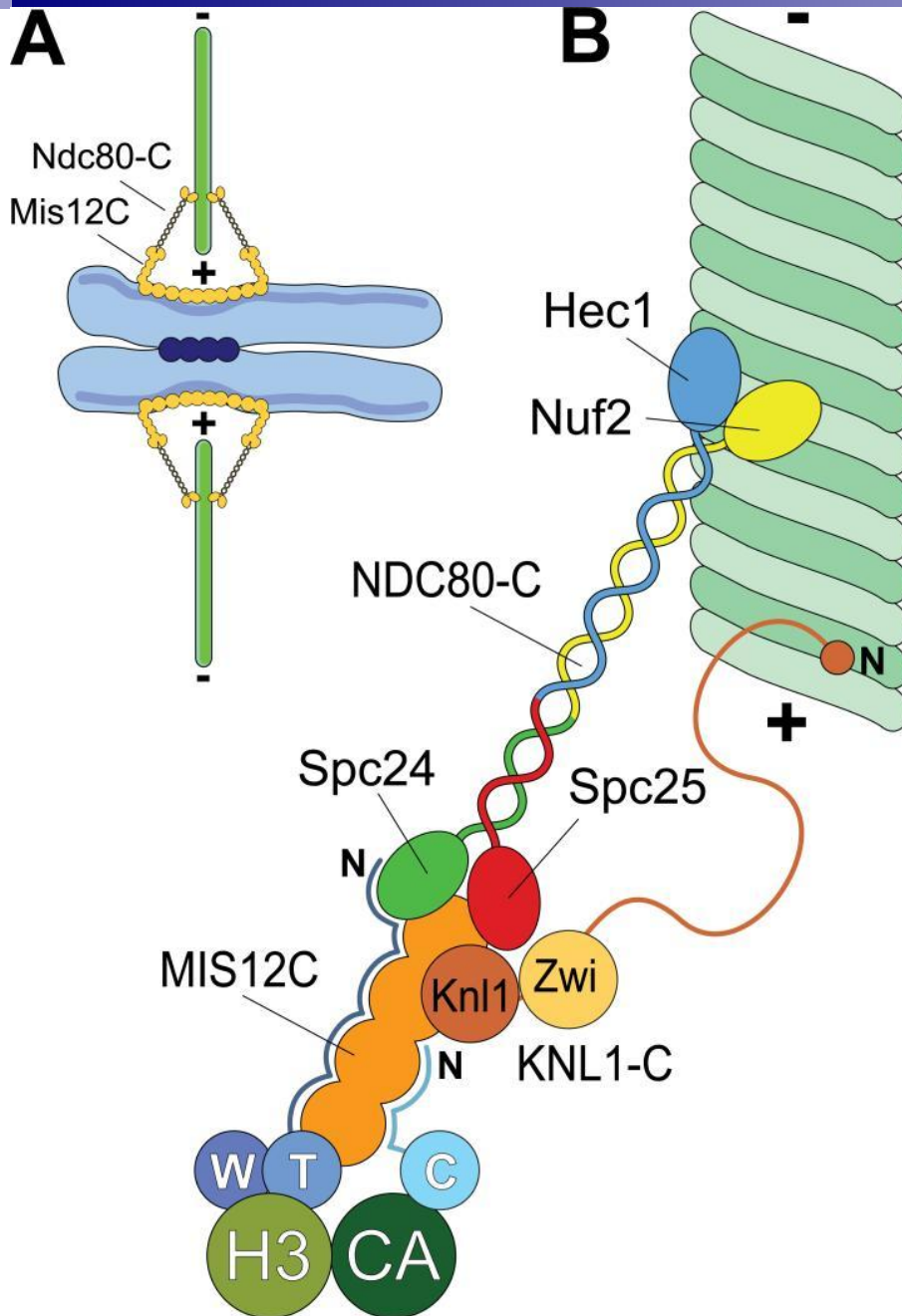
В – Центромерный район метафазной хромосомы

CENP белков описано около 20





Dileep Varma* and E. D. Salmon
Journal of Cell Science
125, 2012.



KMN (комплексы Knl1, Mis12, Ndc80)

[Curr Opin Cell Biol.](#) 2012
Feb;24(1):48-56.

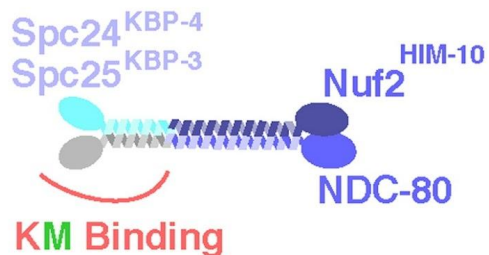
**Structural organization of
the
kinetochore-microtubule
interface**

E

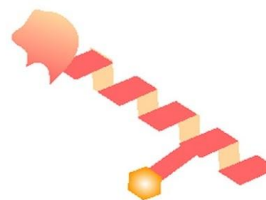
MIS-12 Complex



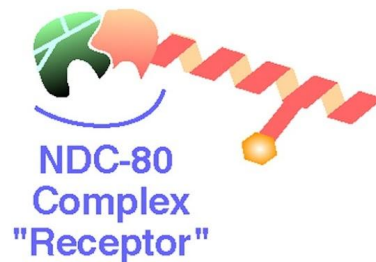
NDC-80 Complex



KNL-1



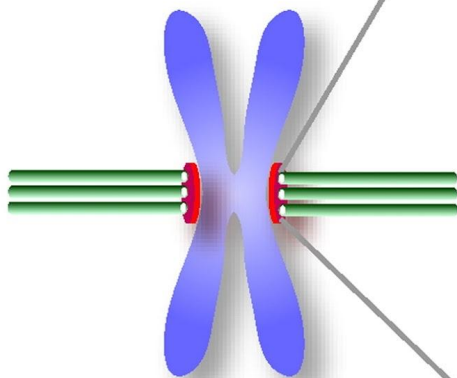
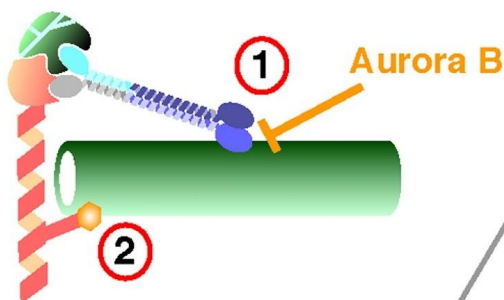
KNL-1 / MIS-12 Complex



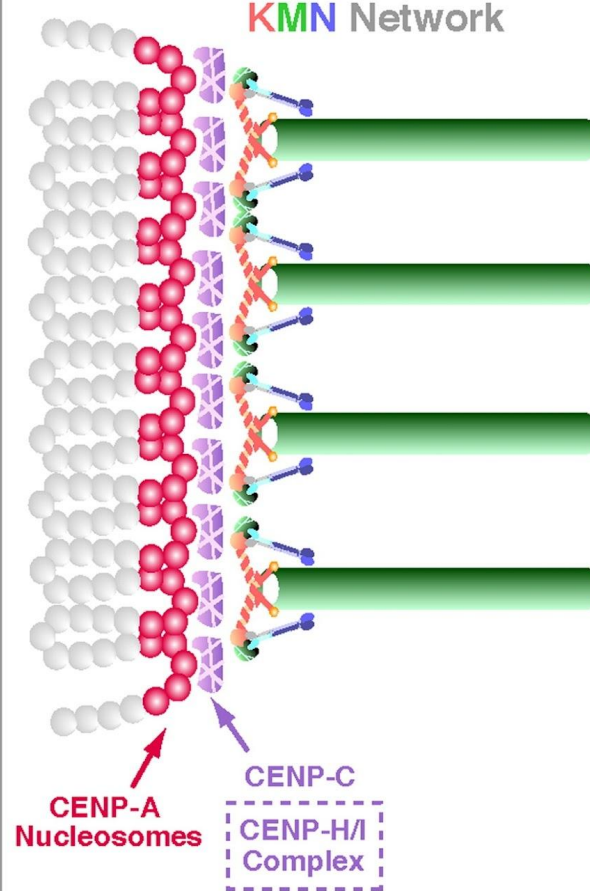
F

Модель
взаимодействия
корового
кинетохора с
микротрубочкой
(C.elegance)

KMN Network



KMN Network

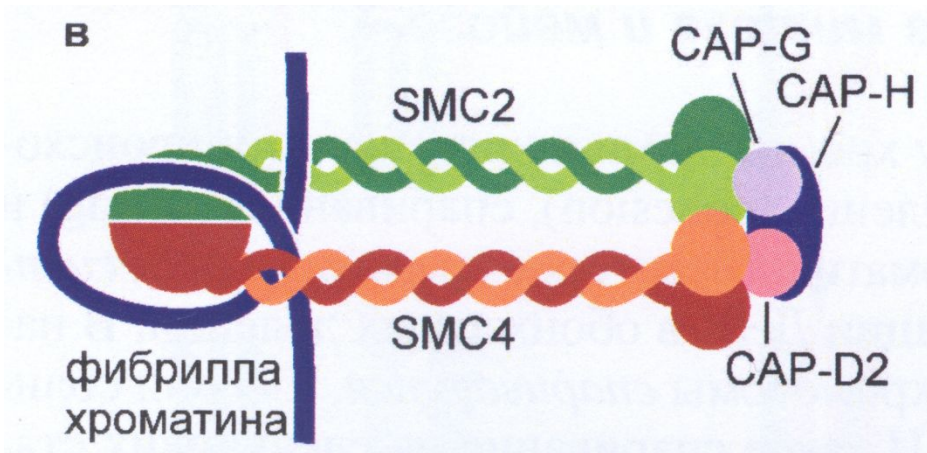


Cheeseman
et al., 2006

SMC-белки в клеточном цикле (structural maintenance of chromosome)

Конденсин впервые описали у *Xenopus*. Он вызывал конденсацию хромосом в бесклеточном экстракте лягушачьих яиц. АТФ-аза.

Конденсин-1 консервативен (дрожжи- человек). Скорее всего, общий предок всех эукариот имел оба конденсина (1 и 2).



Конденсины
фосфорилируются
киназами:

Cdk1, aurora B, polo

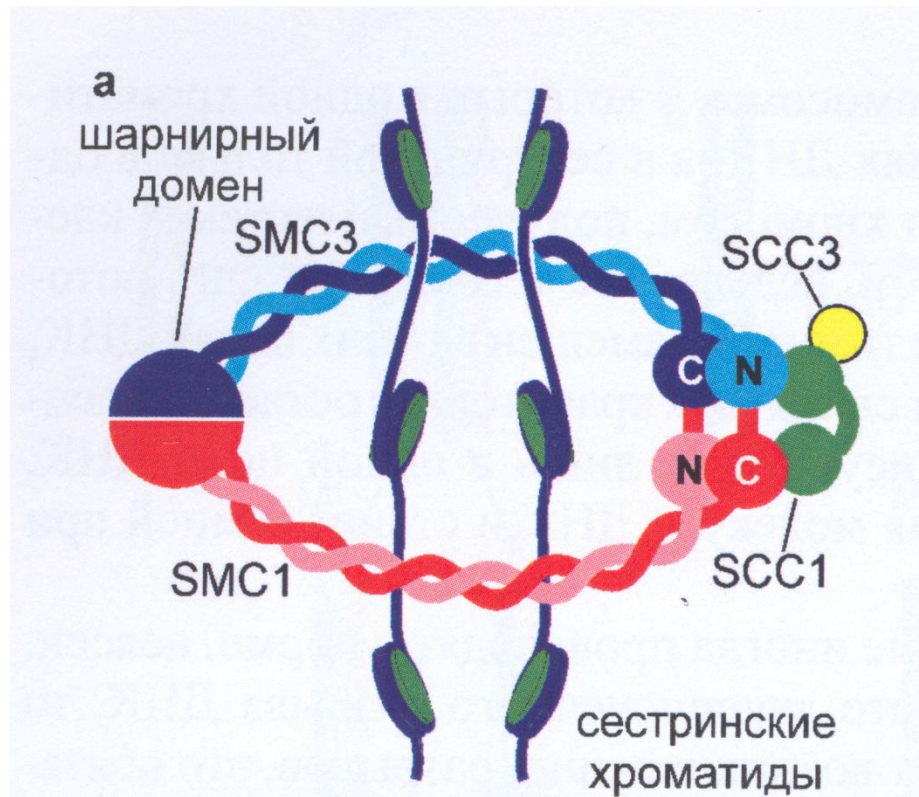
Димер конденсина.

Участие конденсинов
в конденсации хроматина

Хромосомы конденсируются и разделяются

SMC-белки в клеточном цикле

Когезины – семейство SMC



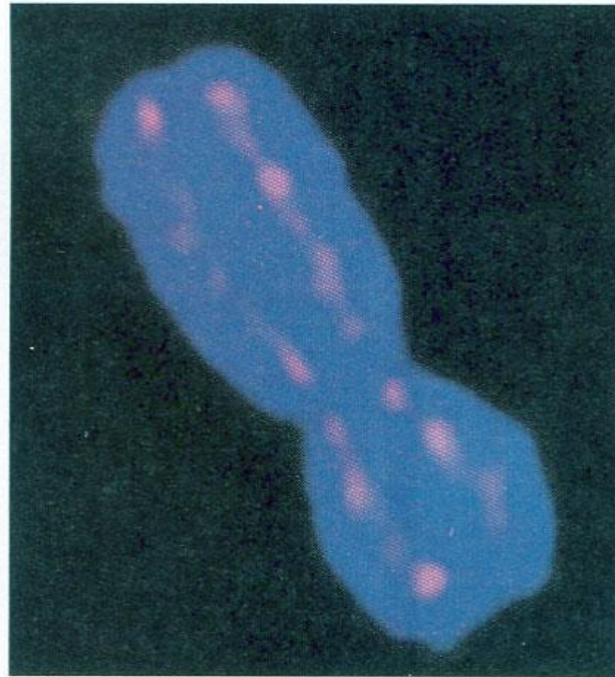
- Когезиновые кольцеобразные комплексы вводятся перед репликацией с гидролизом АТФ
- Когезия запускается белком Esc1 (Ctf7), а он связан с PCNA, кольцевым кофактором ДНК-полимеразы

Когезиновое
кольцо

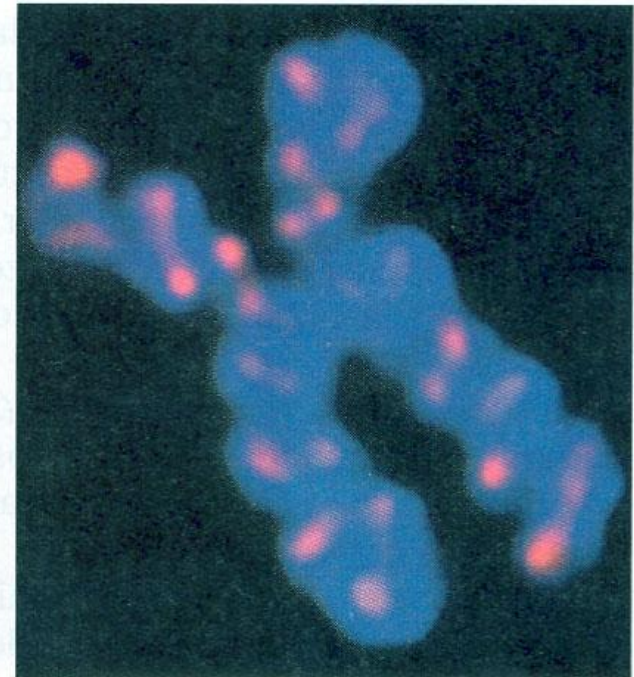
Коряков, Жимулев, 2009

Хромосомы человека, окраска антителами на конденсины (красный), ДНК окрашена DAPI (голубой)

Типичная
митотическая
хромосома



(A)



(B)

1 μm

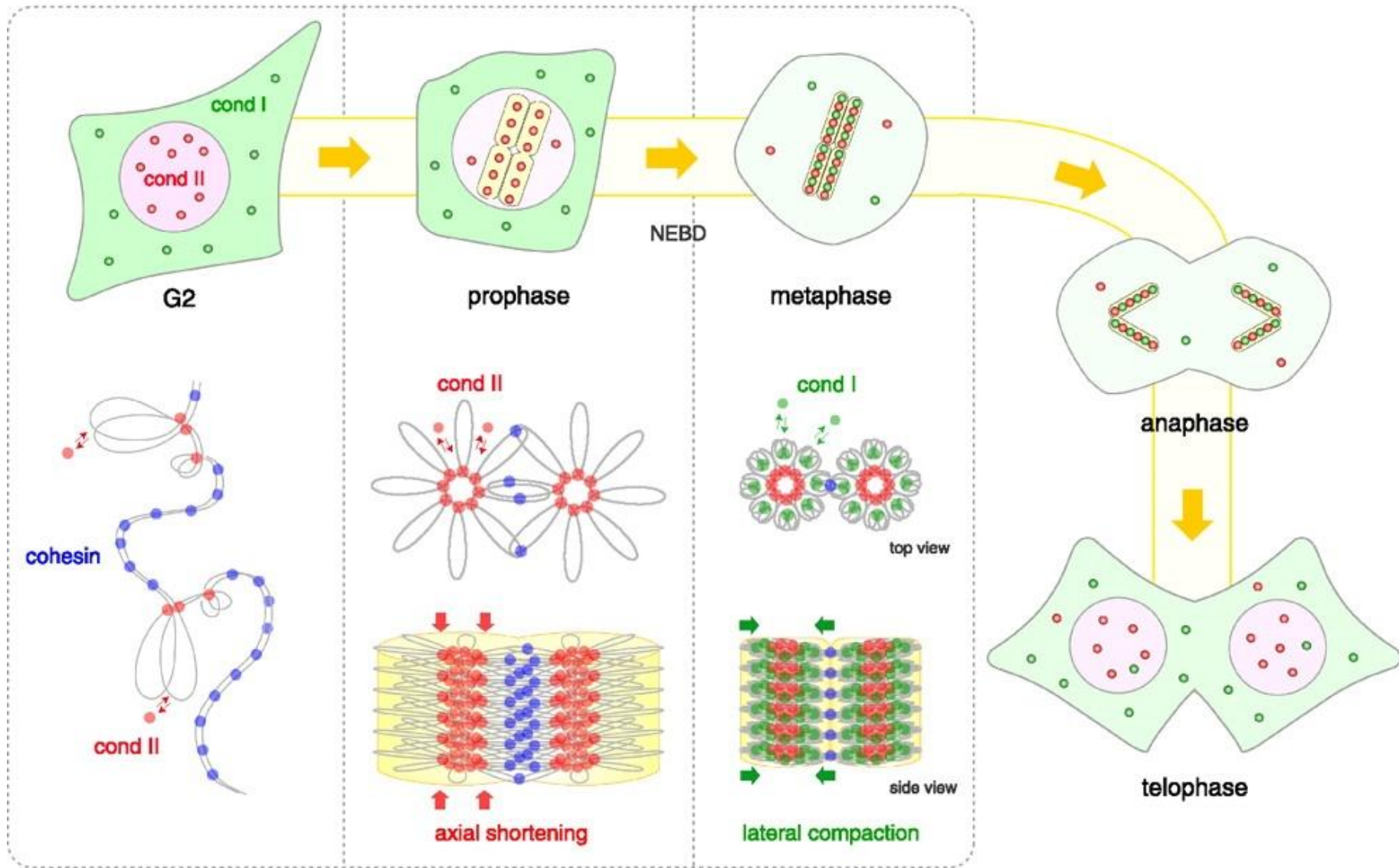
Хромосома в метафазном аресте (колхицин).

При этом конденсин 1 разрушается каспазо-зависимым механизмом

Когезины и конденсины в клеточном цикле

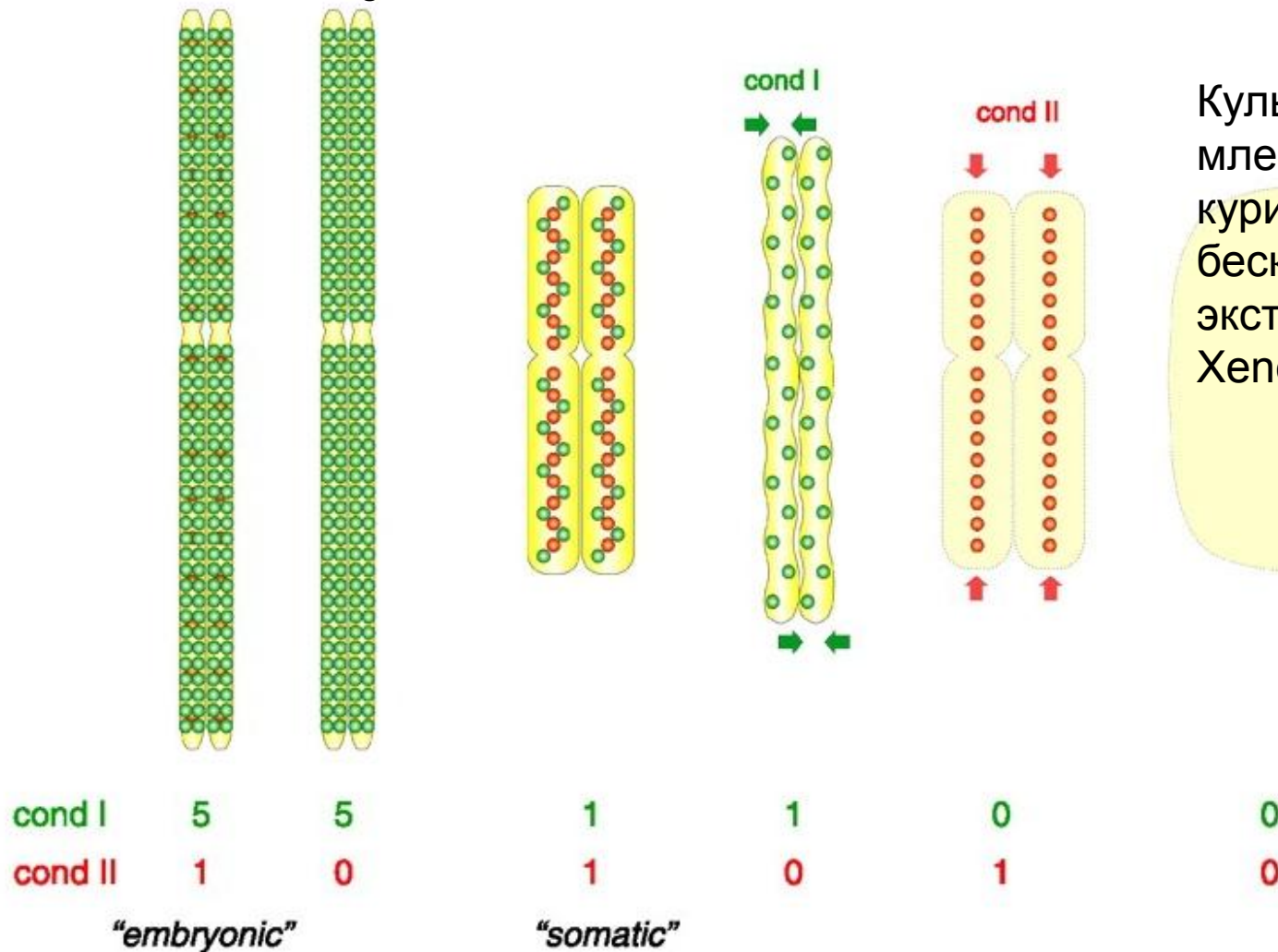
Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions.

T.Hirano, 2012



Когезины и конденсины в клеточном цикле. Морфология хроматина в зависимости от соотношения конденсинов 1 и 2

B Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. T.Hirano, 2012



Активация M-Cdk:

Индукцирует сборку веретена

вызывает конденсацию хромосом

растворение ядерной оболочки

перестройку тубулинового цитоскелета

реорганизацию аппарата Гольджи и ЭПС

Фосфорилирование
белков этих
структур или их
регулирующих

Инактивация M-Cdk:

Те же события разворачиваются

в обратном направлении

дефосфорилирование

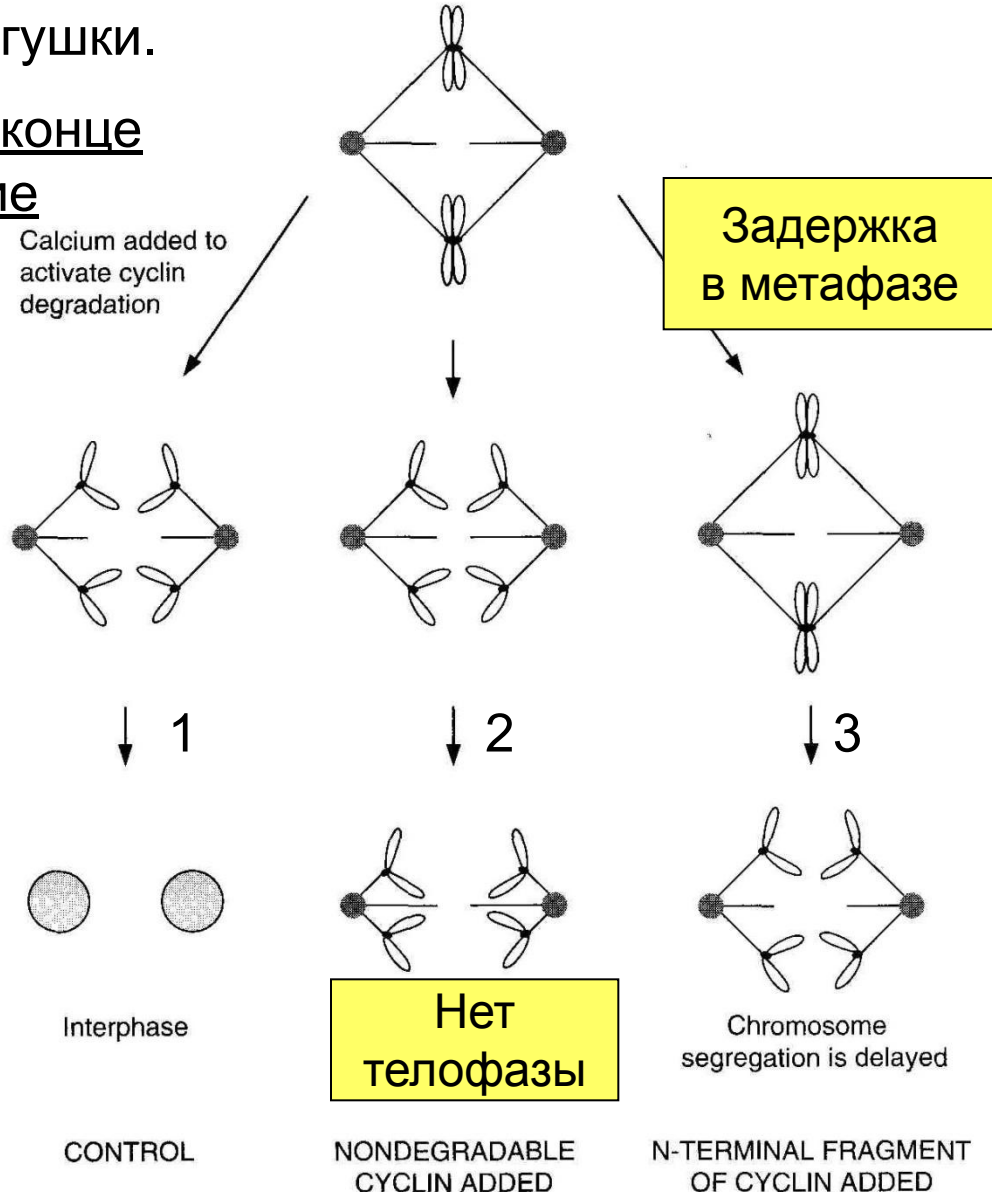
Не понятно, что вызывает сегрегацию хромосом и цитокинез?

Роль циклина в анафазе

Бесклеточный экстракт яиц лягушки.

Концентрация циклина падает в конце митоза. Это вызывает разделение хроматид?

- 1- Добавление Ca^{2+} активирует деградацию циклина - нормальная анафаза-телофаза
- 2- Введение циклина без бокса деструкции – хроматиды сегрегируют, деконденсации нет
- 3- Введение N-концевого фрагмента циклина с боксом деструкции – задержка сегрегации, анафазы-телофазы

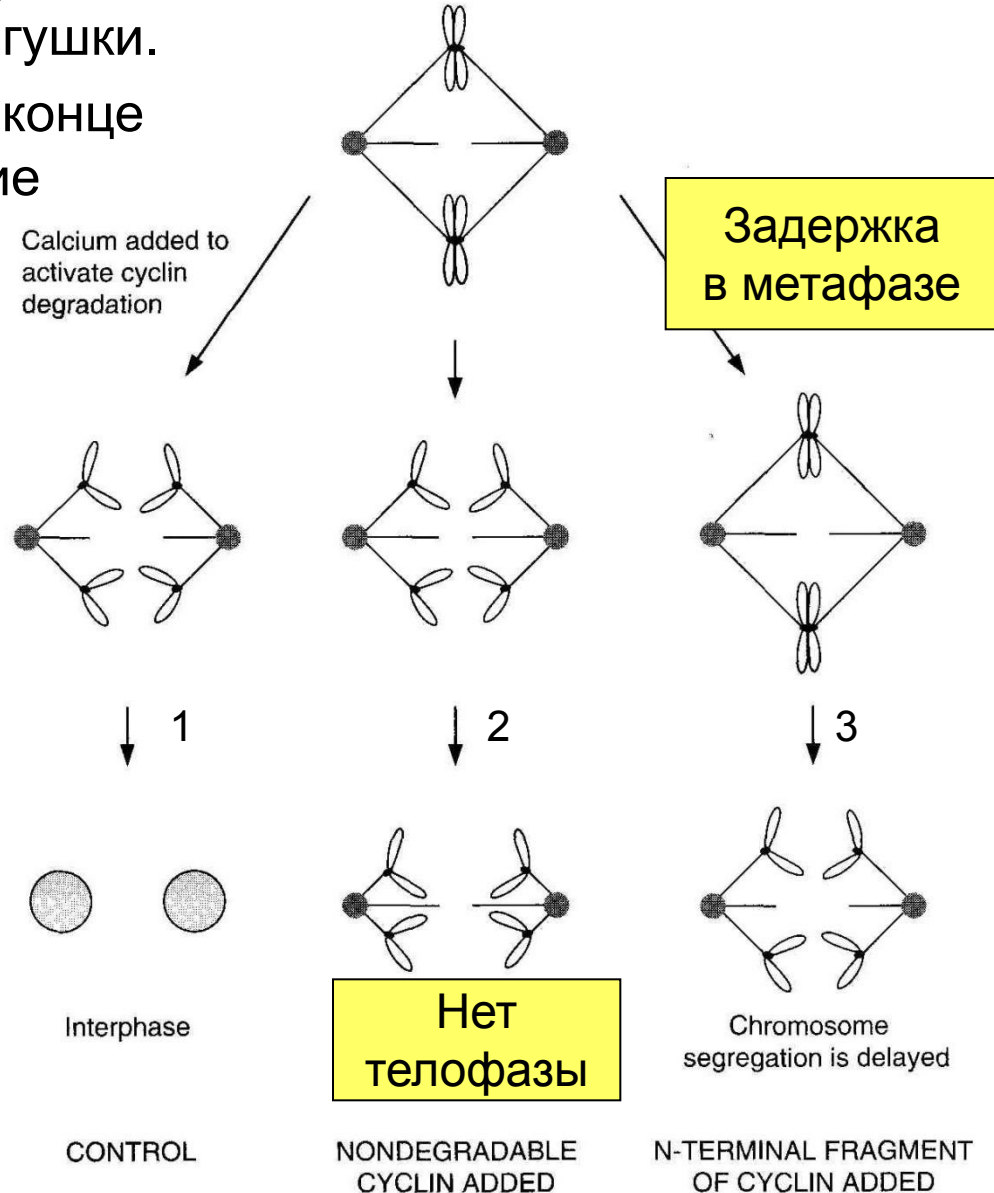


Роль циклина в анафазе

Бесклеточный экстракт яиц лягушки.

Концентрация циклина падает в конце митоза. Это вызывает разделение хроматид?

Для разделения хроматид не нужно разрушение циклина. Разрушение циклина вызывает телофазу.



Переход Метафаза-Анафаза

Критическое возрастание MPF

Polo-like киназа

Aurora A, B-киназы

Активация APC

Инактивация MPF
(разрушение циклина)

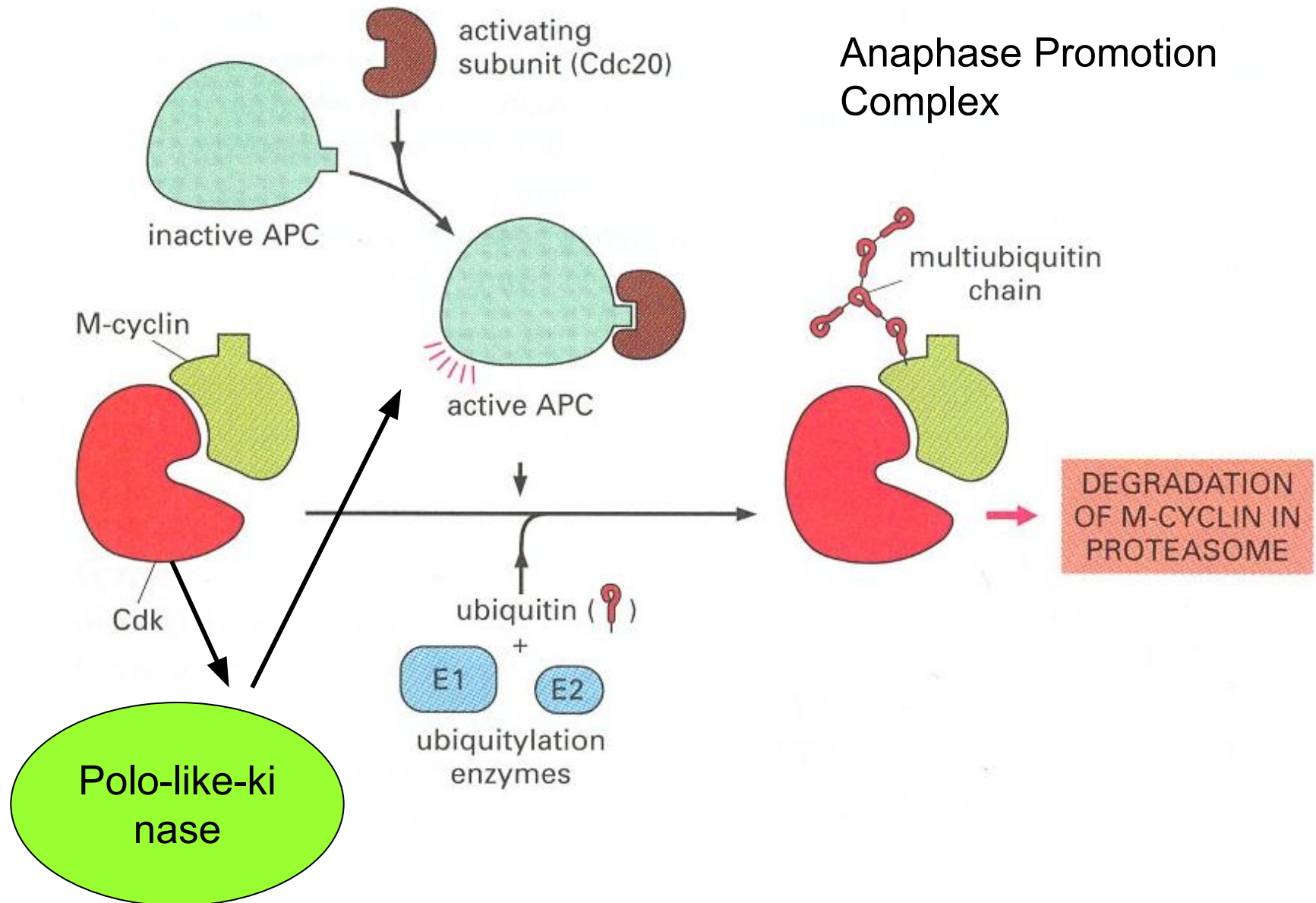
Активация сепаразы

Дефосфорилирование белков

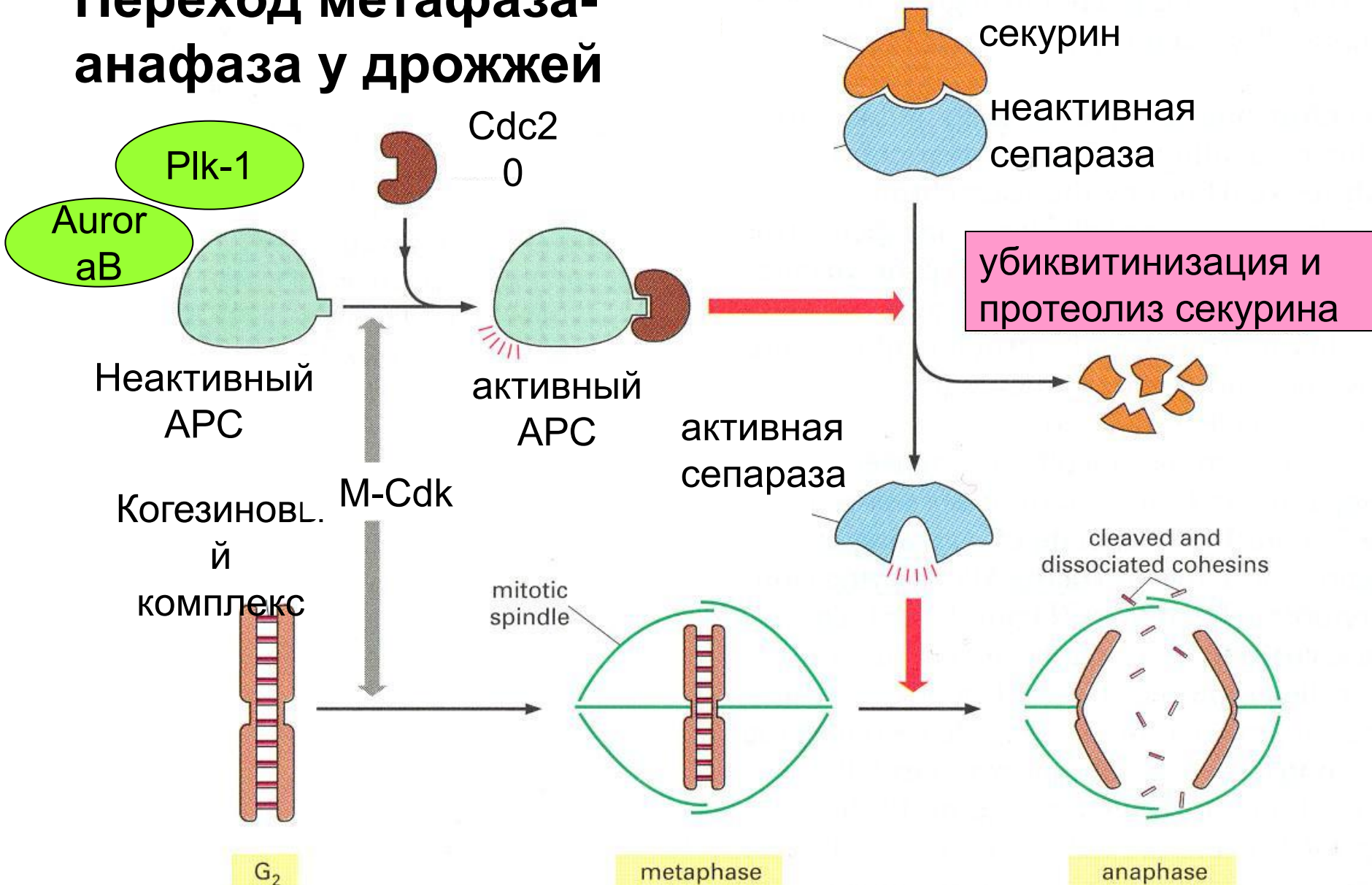
Разделение хроматид

Анафаза, телофаза

Протеолиз циклина под контролем APC



Переход метафаза-анафаза у дрожжей





Переход метафаза- анафаза у дрожжей

Основные участники:

- APC - anaphase promotion complex – при добавлении субъединиц E1 и E2 служит убиквитин лигазой
- Cdc20 - белок, активирующий APC
- Сепараза – протеаза, разрезающая один из когезинов (Rad21, Scc1)
- Секурин- белок, инактивирующий протеазу
- Polo-like – киназа 1 – активирует APC (Plk-1)

Разделение сестринских хроматид в митозе

Дрожжи:

Сепараза разрезает когезины по всей длине хромосом в переходе М-А

Позвоночные (человек, HeLa):

1. Профаза-прометафаза:

- Polo-подобная киназа и Aurora- киназа фосфорилируют и удаляют когезины по плечам хромосом в течение профазы. Обособление сестринских хроматид
- Белок шугошин препятствует отделению когезинов в центромерном районе (присоединяет фосфатазу).
- Количество конденсинов нарастает

2. Переход М-А:

Сепараза разрезает когезины в центромерном районе

CPC- chromosomal passenger complex

Aurora киназа В - каталитическая субъединица CPC

Survivin
Borealin
INCENP
TD-60
CSC-1

регуляторный кор комплекса –
регулирует активность Aurora
киназы В

Aurora серин-треонин киназа- у дрожжей (А), у дрозоды (А и В), у человека (А, В, С).

Aurora киназа-В фосфорилирует:

Н3-гистон,

CENP-A, кинетохоро-специфичный вариант гистона Н3

INCENP- внутренний центромерный белок (между хроматидами)

Миозина II регуляторную лёгкую цепь

Топоизомеразу II α

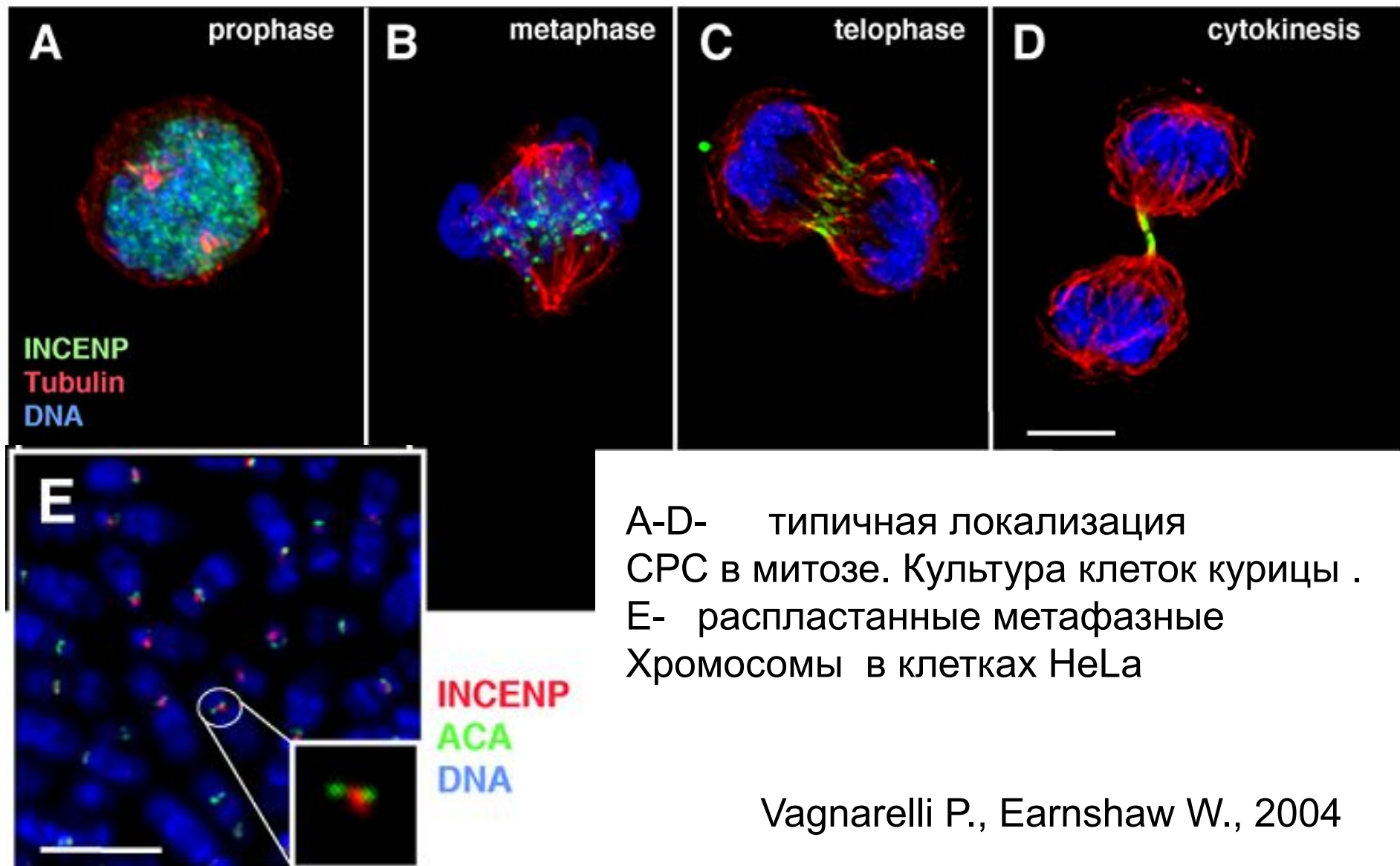
Виментин

Десмин

МСАК (митотический центромерно-ассоциированный кинезин)

Survivin

CPC- chromosomal passenger complex



Vagnarelli P., Earnshaw W., 2004

CPC- chromosomal passenger complex

CPC, хромосомные пассажиры: белки, локализованные в специфических районах:

- в G2 – внутриядерно,
- в профазе митоза – вдоль конденсирующихся хромосом,
- в метафазе – в центромерных районах хромосом,
- в анафазе – в центральном веретене,
- в телофазе- в остаточном тельце веретена

Комплекс работает в митозе и мейозе, контролирует:

- Хромосомную модификацию (фосфорилирование гистона H3)
- Хромосомную конгрессию (построение)
- Прикрепление кинетохоров к микротрубочкам, коррекция
- Формирование стабильного биполярного веретена
- Участвует в митотической точке контроля

CPC- chromosomal passenger complex

Survivin – член семейства IAP (Inhibitor of Apoptosis). RNAi в клетках HeLa вызывает нарушение построения хромосом, стойкую активацию точки контроля целостности веретена

Фосфорилируется Cdk1/СycB (MPF)

- В составе CPC вовлечён в сегрегацию сестринских хроматид – за это отвечает домен BIR (бакуловирусный IAP повтор).
- Участвует в точке контроля прикрепления хроматид к веретену - mitotic spindle assembly checkpoint (MSAC)
- Одна из причин лекарственной устойчивости рака

Borealin - регулятор клеточного цикла. Связан с Сурвивином.

- инактивируется в ответ на p53/Rb-сигналы,
- активируется в раковых клетках

RNAi в клетках вызывает трансформацию биполярного веретена и нормальной метафазной пластинки в мультиполярное веретено в анафазе.

TD-60 –белок телофазного диска - GEF (guanine-nucleotide exchange factor), он индуцирует GTP -азу Ran, прикрепляется к микротрубочкам.

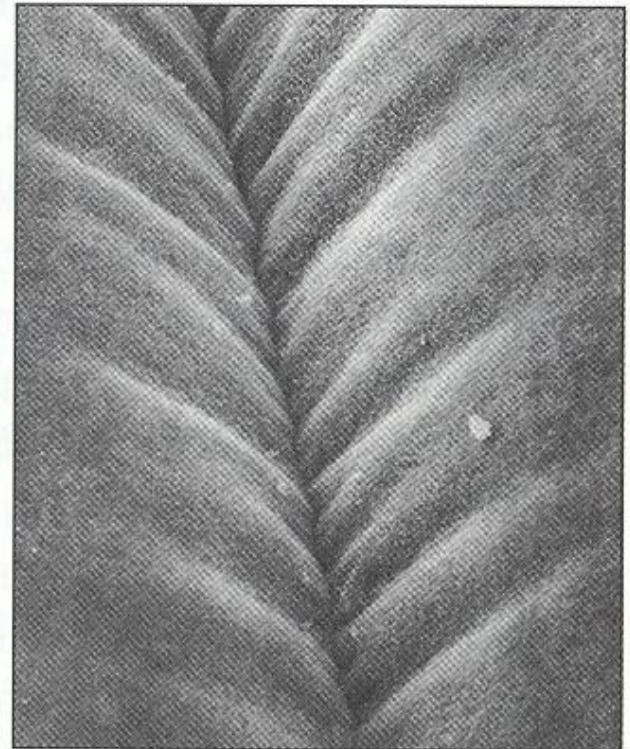
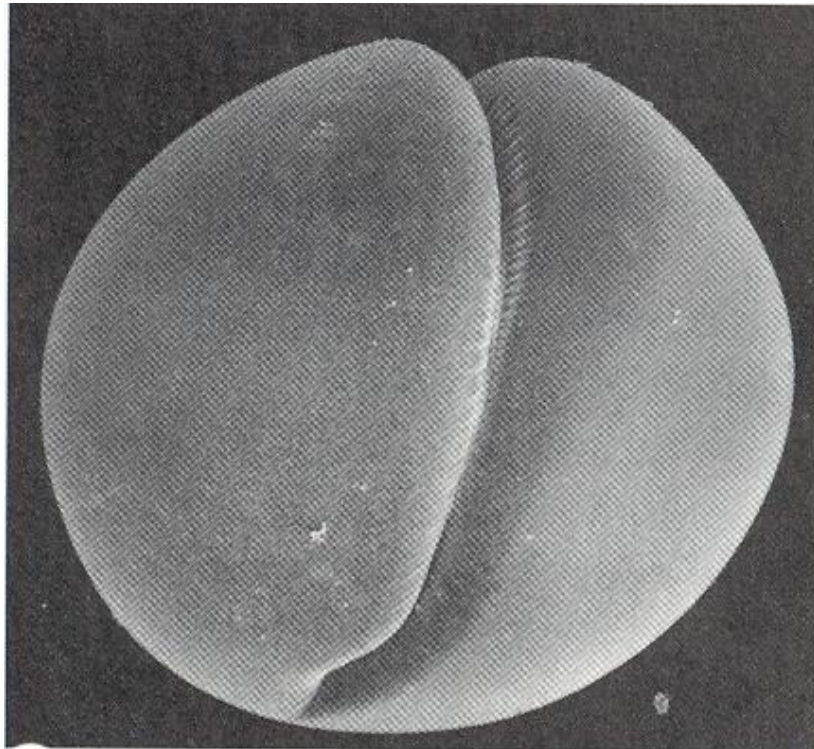
Цитокинез

Должен происходить в нужное время в нужном месте

Сократительное кольцо образуется под мембраной, его плоскость перпендикулярна веретену

Активированные , но неоплодотворенные яйца лягушки: нет centrosомы – нет веретена – нет цитокинеза

Сдвиг веретена сдвигает сократительное кольцо. Сокращение началось – веретено можно удалить – цитокинез продолжится.



Цитокинез

Активная форма MPF фосфорилирует легкую цепь миозина

АТФ-азная активность миозина ингибируется, кольцо сокращаться не может

Фосфатазы отщепляют фосфат – сокращение кольца

Интерфаз

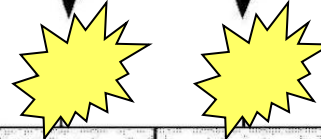
а

Myosin light chain



MPF

Myosin light chain kinase



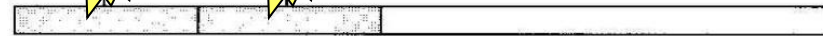
Метафаз

а

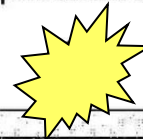
Inhibitory site

Activating site

P

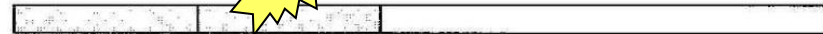


MPF turns off,
phosphatase acts



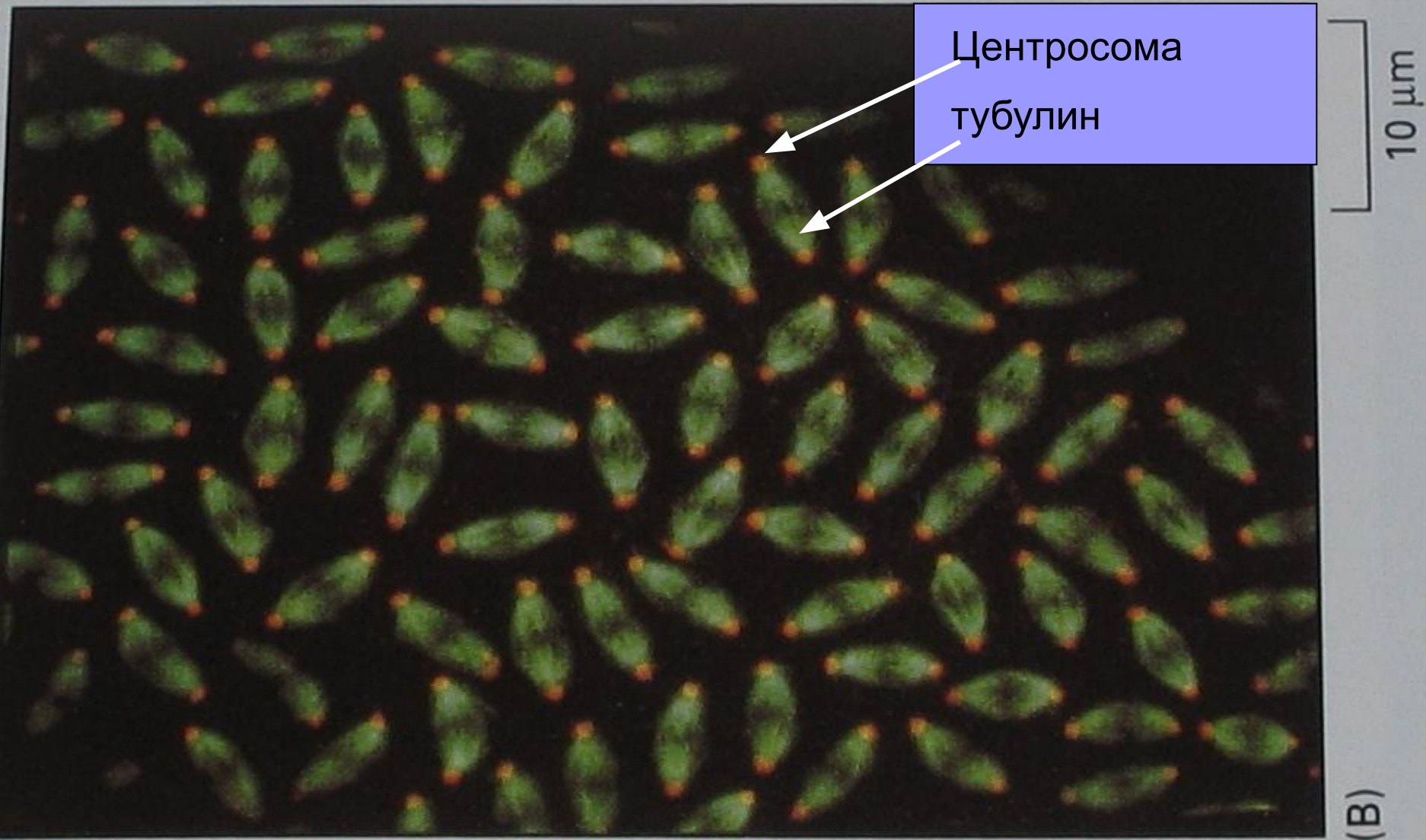
Цитокине

Active myosin induces cytokinesis



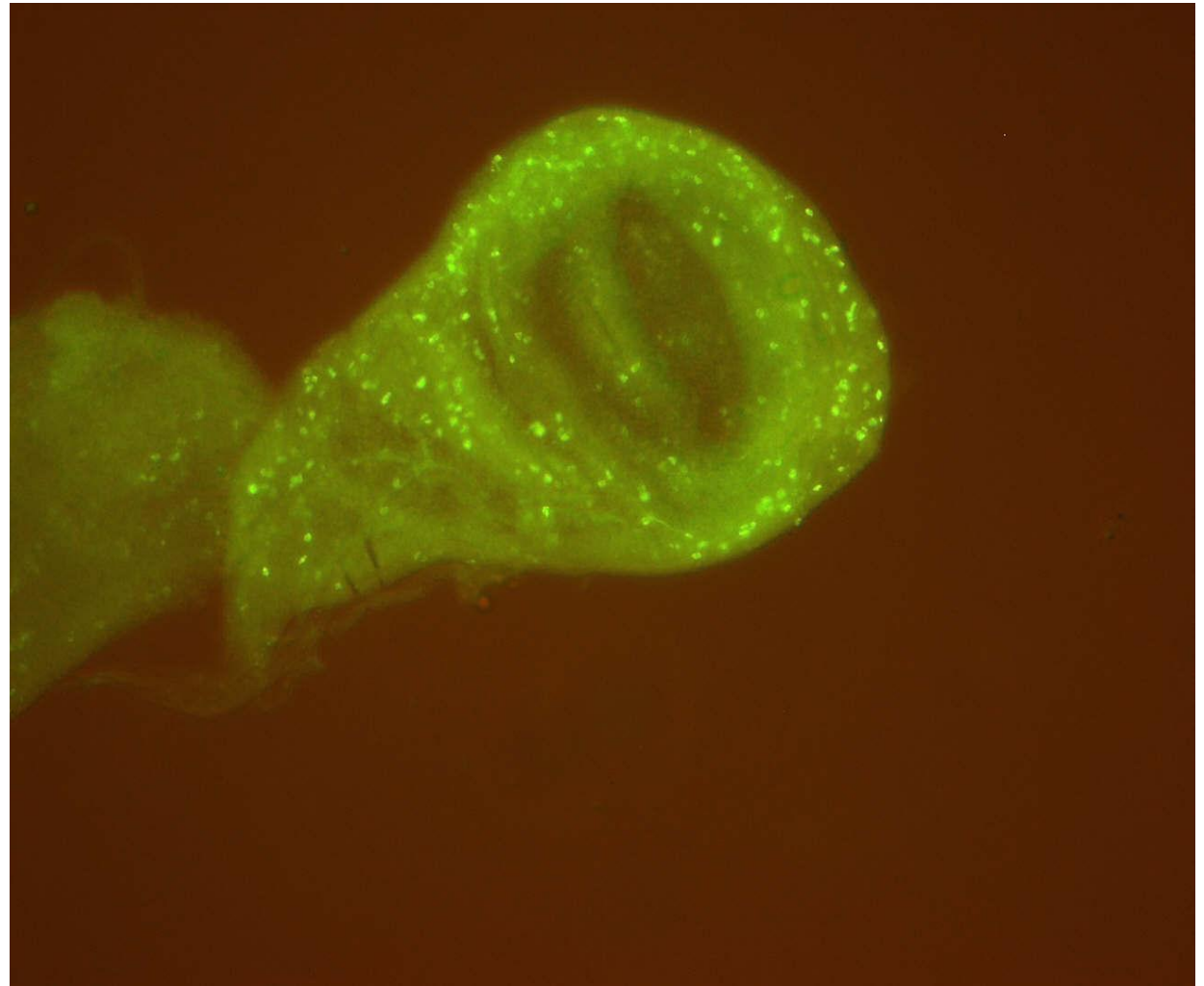
3

Дробление у дрозофилы. Синхронные митозы в синцитиальной бластодерме



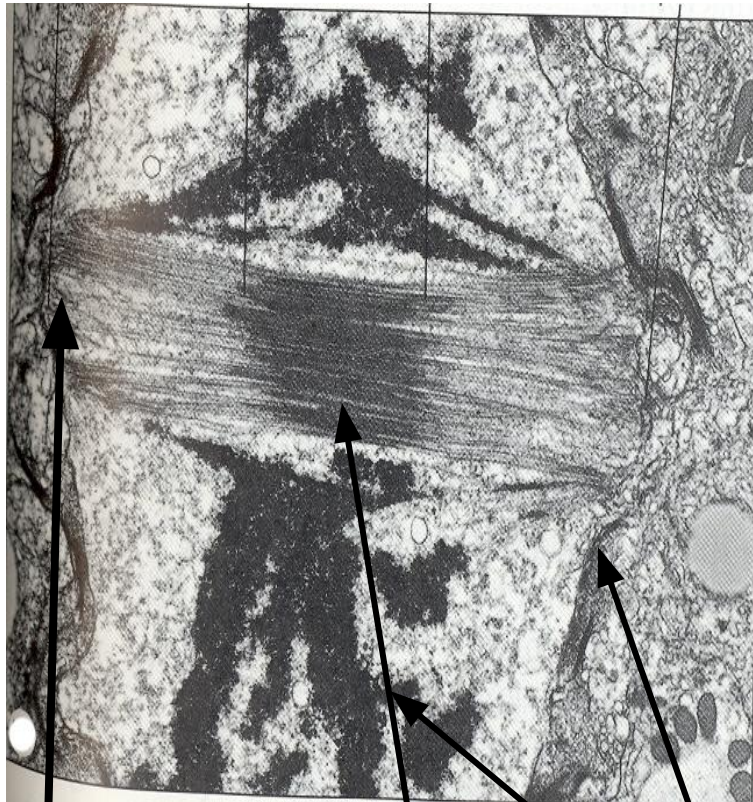
Митозы в имагинальном диске дрософилы

Антитела на
фосфорили-
рованный
гистон H3 –
Маркер митоза

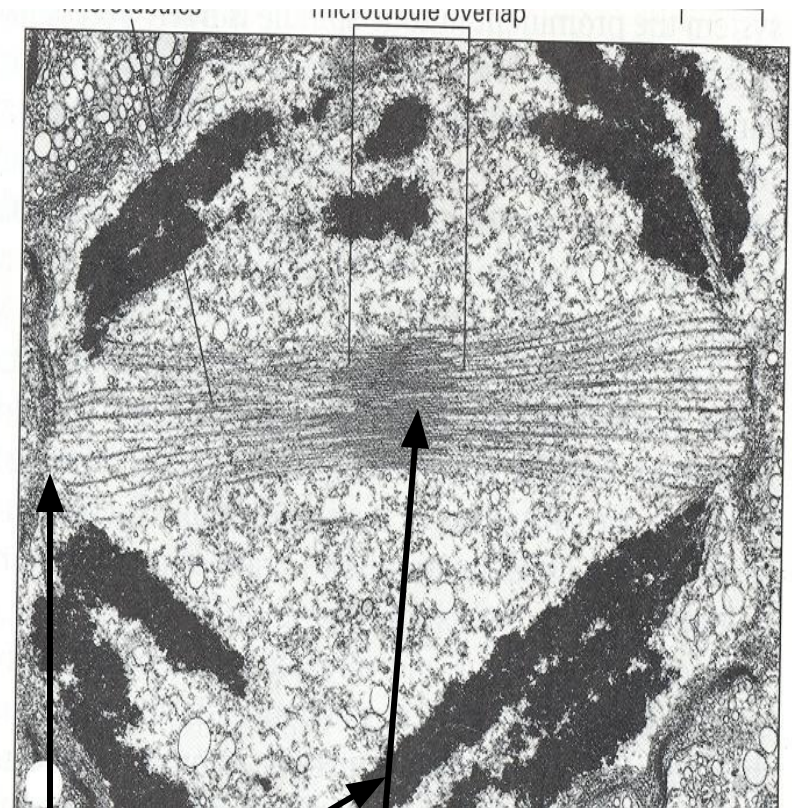


Закрытый митоз у дрожжей

Метафаза



Анафаза



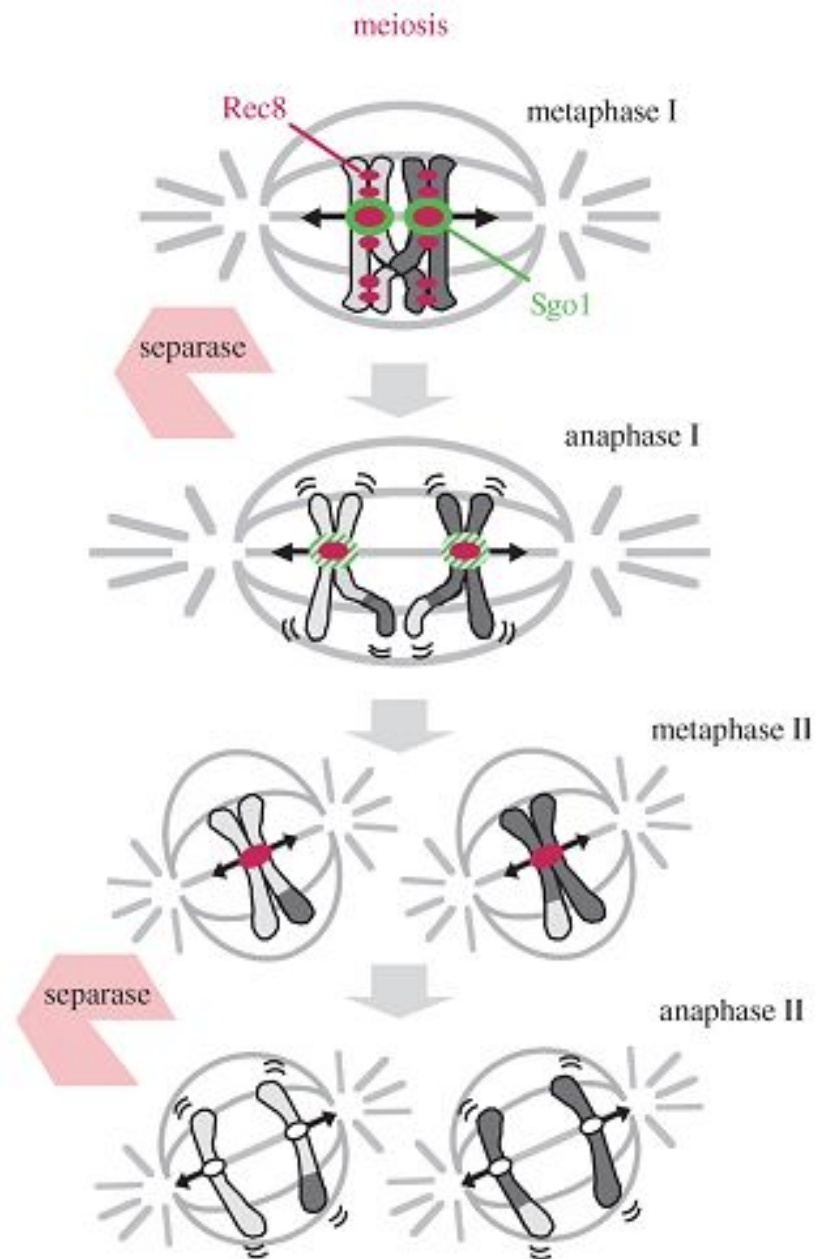
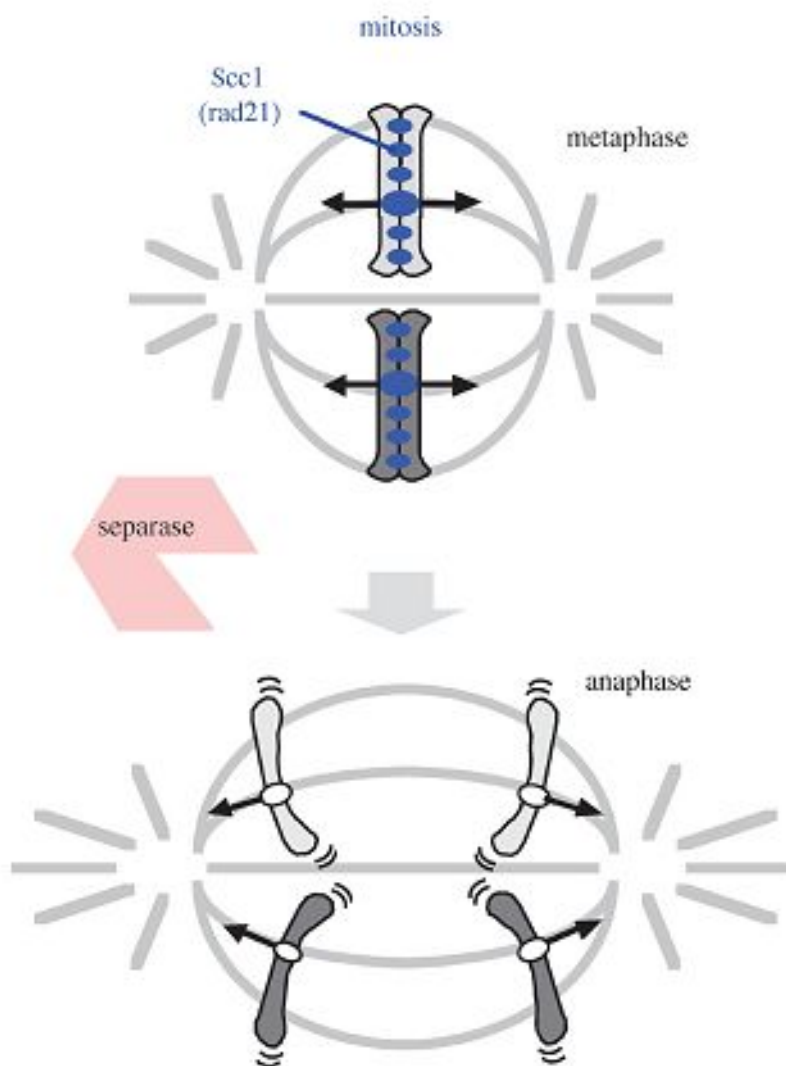
Полярное
тело

Ядерная оболочка

Хромосомы

Зона перекрывания микротрубочек

Митоз и мейоз



Расхождение хромосом в митозе и мейозе

	Митоз	Мейоз 1	Мейоз 2
Дрожжи	Сепараза разрезает когезины по всей длине хромосом в переходе М-А	Мейотический когезин разрушается по плечам, шугошин препятствует его разрушению в центромерном районе	Мейотический когезин разрушается в центромерном районе
Позвоночные	1. Polo-подобная киназа и Aurora- киназа удаляют когезины по плечам хромосом в течение профазы. Шугошин препятствует разрушению в центромерном районе 2. Сепараза разрезает когезины в центромерном районе в переходе М-А	Возможно, хиазмы разрешаются механизмом 1	Хроматиды разделяются в центромерном районе по механизму 2

Когезины

Когезины – семейство SMC (structural maintenance of chromosome) белков

- Когезиновые кольцеобразные комплексы вводятся перед репликацией с гидролизом АТФ
- Когезия запускается белком Eco1 (Ctf7), а он связан с PCNA, кольцевым кофактором ДНК-полимеразы

Когезины дрожжей в митозе:

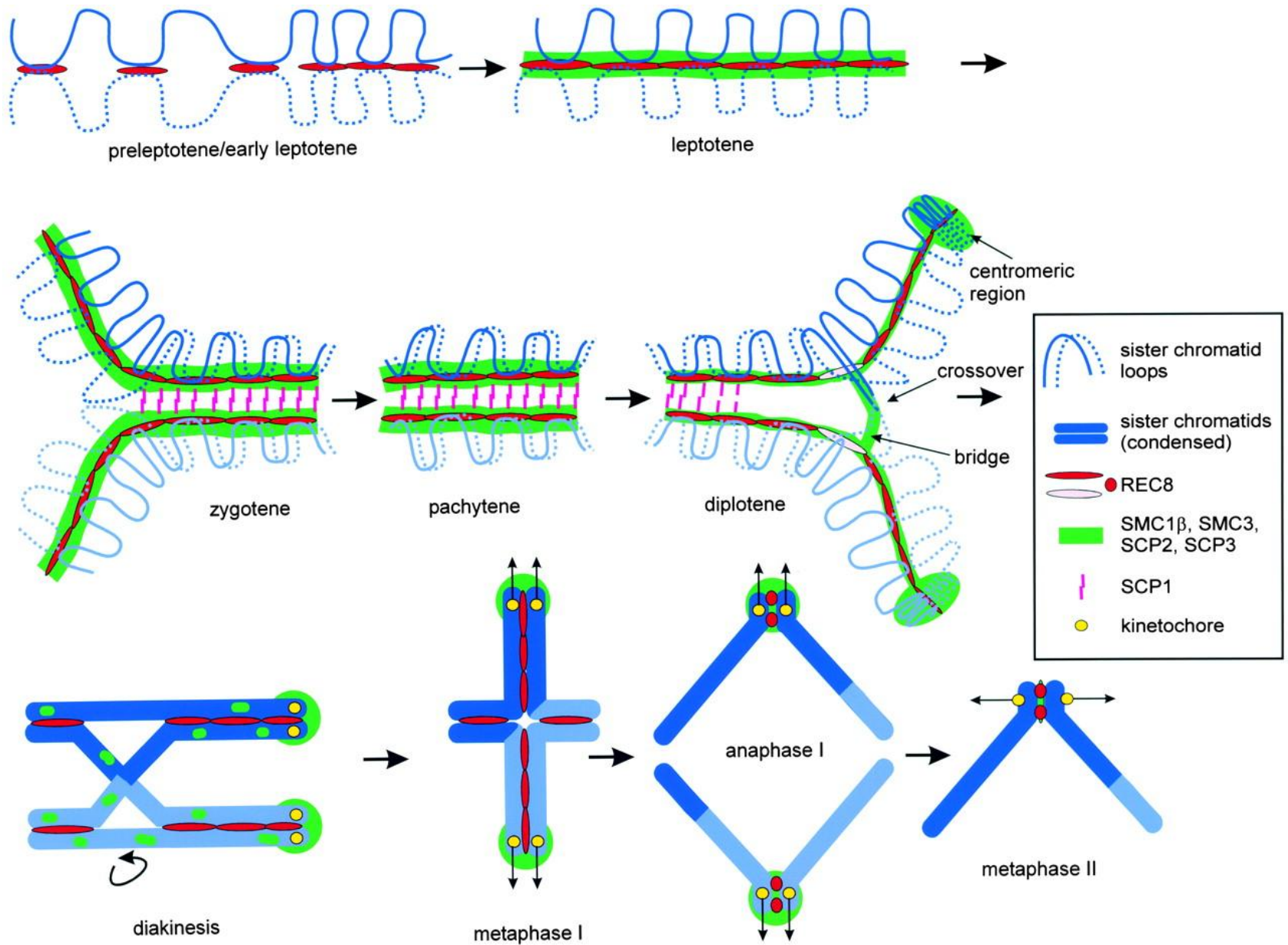
■ Sh. pombe (fission) :	Rad21,	Psc,	Psm1,	Psm3
■ S. cerevisia (budding):	Scc1,	Scc3,	Smc1,	Sms3

Замыкает
когезиновое
кольцо

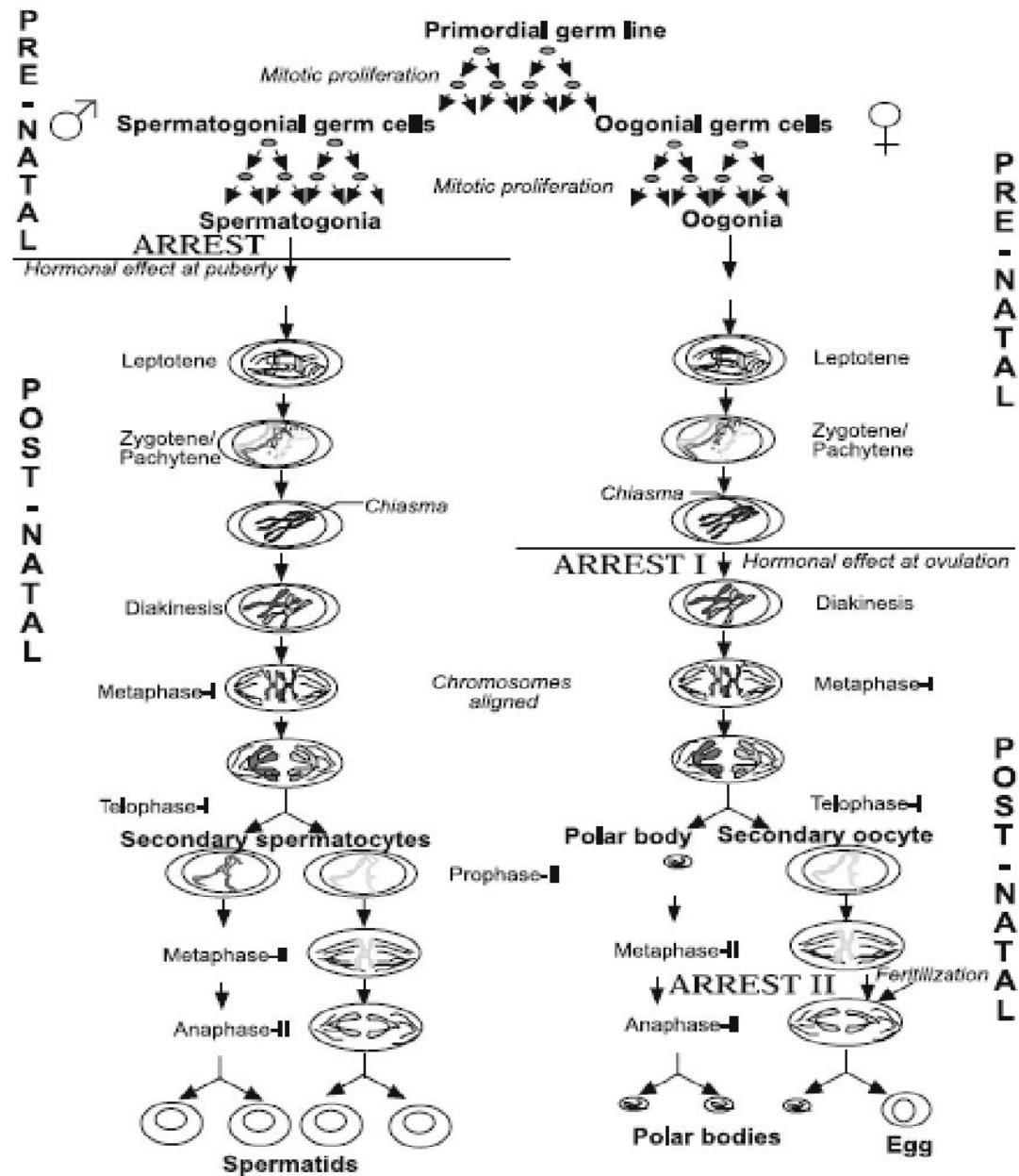
Отвечает за
локализацию
на хромосоме
(связь с Swi6 и
HP-1)

Гетеродимер
охватывает ДНК

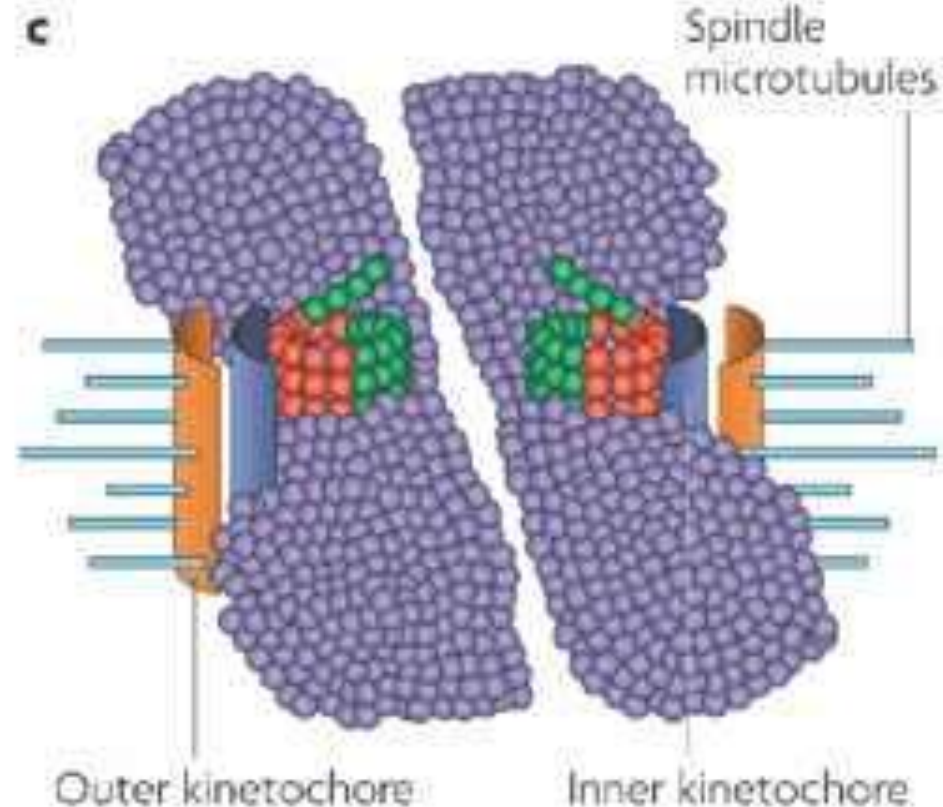
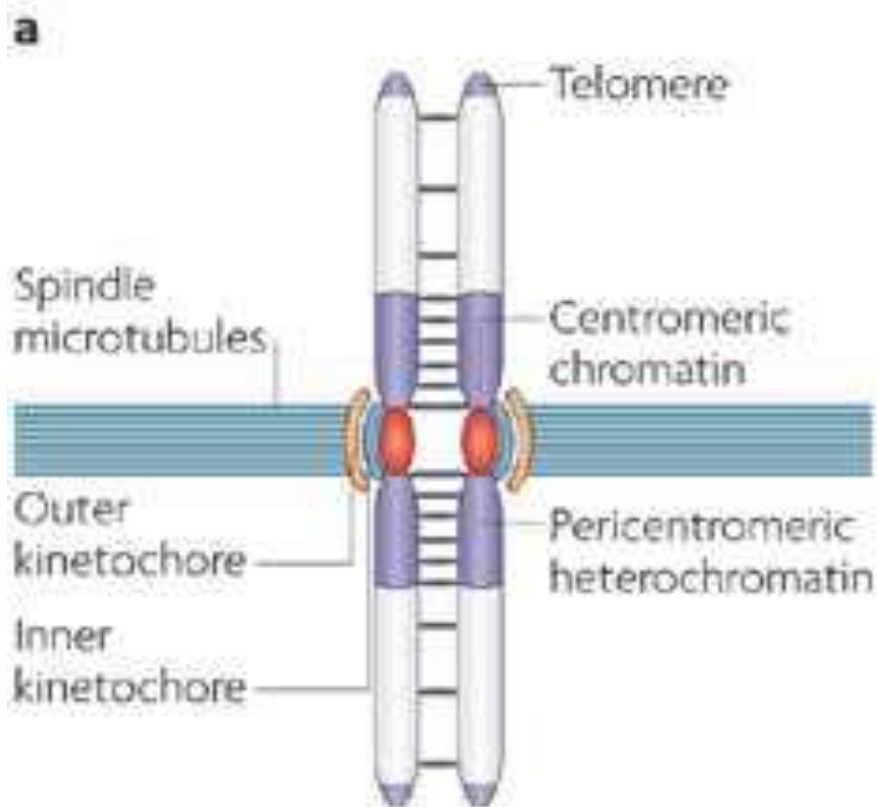
Мейоз



Мужской и женский мейоз



Центромера и кинетохор



The Conserved KMN Network Constitutes The Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore

I.M. Cheeseman, J.S. Chappie, E.M. Wilson-Kubalek and A.Desai

- (E) Models for the component parts of the KMN network. The MIS proteins (MIS-12, KBP-1, and KBP-2) directly interact with and stabilize KNL-3. The Spc24/Spc25 dimer of the NDC-80 complex is required to mediate the interaction of the NDC-80 complex with the KNL-1/MIS-12 complex. KNL-1 directly associates with the MIS-12 complex, and this association is necessary to form the kinetochore receptor for the NDC-80 complex.
- (F) Microtubule-binding activities of the KMN network. Two distinct microtubule-binding regions are present in the network—one in the NDC-80 complex head and one in KNL-1. NDC-80 complex binding to microtubules is inhibited by Aurora B phosphorylation. Connecting these components within the KMN network synergizes the net microtubule-binding activity. Schematic on the right presents a speculative view of the kinetochore-microtubule interface. The KMN network assembles on a specialized chromatin domain formed by CENP-A nucleosomes, CENP-C, and other inner kinetochore proteins to form a repeating unit allowing interactions with multiple microtubules.

У высших эукариот такие последовательности не найдены. Центромерная ДНК- повторы более 500 тпн
Участок центромерной ДНК человека

Строение кинетохора

