Спецкурс "Информационная Биология"

Лекция 15-ая «Экспериментальное изучение и моделирование клеточного цикла»

Лектор - **д.б.н. Омелянчук Л.В.**

Рис.1 Клеточное деление относится к числу основополагающих биологических явлений - обеспечивает репродукцию биологических систем, как важнейшее условие их существования. Различают прямое деление клеток (амитоз) и непрямое (митоз). При прямом делении, относительно редком и мало изученном, генетический материал распределяется между дочерними клетками, по-видимому, не всегда равномерно. Преимущественно распространено непрямое (митотическое) деление, биологическое значение которого состоит в том, что дочерние клетки получают тождественные наборы хромосом, идентичные материнскому набору, обеспечивая тождество наследственных потенций в клеточных поколениях. Именно митотическое деление клеток является основным предметом исследований на протяжении последних двух столетий. Этот процесс был открыт в конце 70-х годов XIX века одновременно Страсбургером на клетках растений и Флеммингом на клетках животных. Флемминг назвал его митозом (от греческого слова *mitos* - нить), что означает деление, при котором в ядре образуются нитевидные структуры - хромосомы. По результатам наблюдений на личинках саламандры Флемминг описал несколько последовательных состояний ядра при делении клеток. На современном языке сущность этих состояний сводится к постепенной конденсации хромосом, их продольному расщеплению на две половины, формированию нитей веретена со звездой (астрой) в каждом из двух полюсов, расхождению половин хромосом к полюсам и делению клеток. Он также впервые сформулировал одно из исходных положений современной теории клеточного цикла - представление о циклических повторениях меняющихся состояний ядра в ряде последовательных клеточных делений: "При образовании нового ядра происходит повторение начальных фаз деления в обратном порядке".

По современным представлениям, клеточный цикл есть периодически повторяющаяся последовательная смена фаз G1, S, G2 и M, на протяжении которых происходит сначала удвоение генетического материала (S-фаза), а затем деление его на два идентичных дочерних набора (стадия M). Детали клеточного цикла варьируют среди разных организмов, но для всех эукариот характерны четыре особенности соматического клеточного цикла: рост клетки, репликация ДНК, митоз (деление ядра) и деление клетки (цитотомия, цитокинез). Главными событиями цикла являются репликация ДНК и сегрегация дуплицированного набора материнских хромосом на два идентичных дочерних набора. Это высокоточные процессы, их ошибки приводят к врожденным аномалиям и заболеваниям, получившим название болезней клеточного цикла, к числу которых относится рак (канцерогенез).

Систематическое изучение молекулярно-генетических основ клеточного цикла началось с середины 70-х годов XX века на дрожжевых, растительных и животных объектах, чему в значительной мере способствовало применение новых генетических, биохимических и цитологических методов. В силу особенностей биологии дрожжей, развитие исследований на этом объекте проходило быстрее, поэтому современные знания о клеточном цикле существенным образом базируются на сведениях, полученных на *S. pombe* и *S. cerevisiae*. Так как ключевые белки клеточного цикла эволюционно консервативны, то результаты, полученные на дрожжах, (с некоторыми ограничениями) существенны для всех эукариот.

Рис.2. С точки зрения цитолога, изучающего видимые в световом микроскопе изменения клетки, клеточный цикл разделяется на фазы, изображенные на рисунке. В метафазе (верхний рисунок) хромосомы видны как крестики - это две хроматиды (две идентичные копии хромосомы, возникшие в результате репликации родительской хромосомы),

скрепленные в области прицентромерного гетерохроматина. Хромосомы располагаются на веретене - особой фибриллярной структуре, специально предназначенной для последующей сегрегации хромосом. Веретено имеет полюсы, определяемые положением центросом (особые структуры, к которым прикрепляются фибриллы веретена). Сегрегация хромосом (разделение на две одинаковые группы) начинается в анафазе. Белковые фибриллы, прикрепленные к центромерам хромосом "растаскивают" гомологичные хроматиды к разным полюсам. Анафаза переходит в телофазу. На этой стадии разделенные группы хромосом деконденсируются и разделяются новой клеточной стенкой, которая формируется на месте средней зоны веретена. За телофазой следует интерфаза - стадия, на которой клетка не претерпевает существенных морфологических изменений. Однако, именно на этой стадии происходит рост размера клетки и репликация хромосом. Таким образом, в этой стадии в клетке последовательно проходят стадии G1, S, G2. В конце G2 фазы центросомы скользят по ядерной оболочке к противоположным полюсам ядра, а хромосомы начинают конденсироваться. Эта стадия называется профазой. Стадия, на которой хромосомы почти полностью конденсированы, а веретено частично собрано, называется прометафазой. В делении соматических клеток стадии Профаза, метафаза, анафаза и телофаза в совокупности называют М-фазой клеточного цикла (от слова митоз).

Рис3. Белковые факторы, отвечающие за переход в фазу М, первоначально были идентифицированы на основе экспериментов по слиянию клеток. Как видно из рисунка, слияние клетки, находящейся в любой стадии клеточного цикла, с клеткой находящейся в М фазе, приводит к вхождению ядра первой клетки в М фазу. Это означает, что в клетке находящейся в М фазе существует цитоплазматический фактор способный активировать М фазу. Позднее этот фактор был вторично обнаружен в экспериментах по переносу цитоплазмы между ооцитами лягушки, находящимися на различных стадиях развития, и был назван "фактором созревания" MPF (maturation promoting factor).

Рис.4. Дальнейшее изучение MPF показало, что этот белковый комплекс детерминирует все события М-фазы. На рисунке показано, что распад ядерной мембраны, конденсация хромосом, сборка веретена, цитокинез регулируются MPF. Действующим компонентом MPF является его протеин-киназная активность. Субстратом MPF являются регуляторные белки. Так, например функциональные SMC субъединицы конденсинов (белки, осуществляющие конденсацию хромосом) сами по себе не являются субстратами MPF. Однако их активность регулируется MPF через особые регуляторные субъединицы SMC комплексов.

Рис.5. Клеточный цикл с формальной точки зрения - система биохимических реакций. Поэтому его описывают с помощью уравнений химической кинетики. На рисунке представлен пример составления уравнений для бимолекулярной реакции $A+B \rightarrow C$.

Рис.6. На рисунке представлена схема биохимических реакций соответствующая, так называемому, "клеточному осциллятору", детерминирующему переход $G2 \rightarrow M$. Главным элементом схемы является комплекс MPF, состоящий из двух субъединиц - регуляторной *cyclin B* и каталитической *cdc2*. Последняя не только способна осуществлять фосфорилирование субстратов, но и сама имеет сайты фосфорилирования Y и T. Субъединица *cdc2* активна только тогда, когда она находится в комплексе с *cyclin B*, T сайт фосфорилирован, а Y сайт - нет. *Cyclin B* периодически нарабатывается и распадается в клеточном цикле. В рассматриваемой биохимической схеме имеются положительная и отрицательная обратные связи: активная форма MPF способна катализировать переход неактивной формы MPF в активную при помощи индукции активности фосфатазы *cdc25*. Эта петля положительной обратной связи обеспечивает автокаталитический переход клеток в М фазу. Отрицательная обратная связь состоит в том, что активная форма MPF индуцирует деградацию *cyclin B*. Поскольку временной параметр этой реакции больше, чем для положительной обратной связи - она срабатывает позднее. На рисунке приведены также

примеры того, как ведет себя рассматриваемая модель при мутационном нарушении структуры некоторых белков участвующих в рассматриваемых реакциях. (Murray A., Hunt T. The cell cycle an introduction // New York, Oxford. Oxford University Press. 1993. 251 P.)

Рис.7. На рисунке представлен жизненный цикл дрожжей *S. Cerevisiae*. Существенным элементом жизненного цикла является стадия конъюгации. На этой стадии гаплоидные клетки (т.е. клетки несущие по одной копии каждой хромосомы) сливаются, образуя диплоидную клетку. Для того чтобы прошел процесс конъюгации (конъюгация может происходить между клетками разных половых типов; принадлежность к половому типу определяется одним геном MAT, имеющим два аллельных состояния а и а.) необходимо чтобы сливающиеся клетки были остановлены в точке G1-S перехода. Остановка достигается с помощью а фактора, выделяемого в среду клетками полового типа а. а фактор рецептируется клетками типа а, которые в ответ на останавливаются в точке G1-S перехода. Поскольку оказалось возможным синтезировать а фактор химическим путем, возникла возможность селектировать клетки нечувствительные к этому фактору. Это дало возможность провести генетическую диссекцию перехода G1-S. (Murray A., Hunt T. The cell cycle an introduction // New York, Oxford. Oxford University Press. 1993. 251 P.)

Рис.8. Гены и белки, отвечающие за переход G1-S, а также биохимическая схема их взаимодействия изображены на рисунке. Как и в случае клеточного осциллятора, основной компонент - комплексы циклин (в данном случае Cln1,2,3) и протеин-киназа (в данном случае cdc28 S/pombe; Это гомолог cdc2 *S.cerevisiae*). Активные комплексы способны индуцировать транскрипцию циклинов Cln1 и Cln2 посредством активации транскрипционного фактора Swi4/6, что создает петлю положительной обратной связи и автокаталитический переход. (Murray A., Hunt T. The cell cycle an introduction // New York, Oxford. Oxford University Press. 1993. 251 P.)

Рис.9. Переход G1-S у высших эукариот устроен аналогично. В качестве циклинов выступают cyclin E и cyclin D. Роль транскрипционного фактора индуцирующего экспрессию циклинов выполняет E2F и его антагонист Rb, а роль протеин-киназного партнера выполняется белком Cdk2.

Рис.10. Моделирование поведения схемы, изображенной на предыдущем рисунке, показало, что в такой системе при некотором соотношении параметров наблюдаются осцилляции концентрации циклина (см. E). На фазовой диаграмме В эти осцилляции соответствуют переходам между различными ветвями решений рассматриваемой системы дифференциальных уравнений.

Рис.11. При введении в биохимическую схему цепочек реакций последовательного фосфорилирования, изображенных на рисунке, участок фазовой диаграммы, соответствующий режиму осцилляций изменяет свое положение и ширину.

Рис.12. Изменение фазовых диаграмм при введении цепочек реакций последовательного фосфорилирования белков, участвующих в регуляции перехода G1-S.

Рис.13, 14 Модель перехода G1-S у животных, выполненная сотрудниками института Кель А. Кель О. Дейнеко А.

Рис.15, 16. Точка контроля клеточного цикла G2->М и М->А. Объясним общепринятые термины, которые используются ниже при обсуждении рассматриваемого вопроса. Точки контроля клеточного цикла (checkpoint) - это системы передачи внутриклеточных сигналов, с помощью которых клетка контролирует завершение одних событий цикла и готовность

инициировать следующие. Различают сигналы (checkpoints) о повреждениях ДНК, репликации ДНК, целостности митотического аппарата. Контрольные точки, или петли обратной связи, определяют те стадии клеточного цикла, на которых осуществляется задержка прохождения по циклу в ответ на нарушение. Условно принято называть эти стадии цикла также точками контроля переходов G1-S, G2-M и M-A. Точка рестрикции (restriction point, R-point) - это стадия клеточного цикла, на которой клетка чувствительна к действию ростовых факторов. Заметим, что термин "точка рестрикции" не совпадает по значению с термином "точка контроля", а означает отдельное явление. Известная точка рестрикции находится в поздней G1 фазе, но не совпадает с точкой контроля G1-S. Если пытаться найти у дрожжей точку клеточного цикла, аналогичную точке R у млекопитающих, то это точка СТАРТ, где принимается решение о входе в S фазу.

Торможение клеток в точке G2-M возникает не только в ответ на мутагены, но также и в ответ на другие стимулы. Условные мутации *S. Pombe* в генах, кодирующих белки, которые участвуют в репликации ДНК (ДНК лигаза - *cdc17*, субъединица ДНК полимеразы гамма - *pol3*, PCNA - *pcn1*), при рестриктивной температуре задерживают клетки в переходе G2-M; к аналогичным последствиям приводит действие гидроксимочевины (ингибитора синтеза ДНК).

Блокирование клеточного цикла под действием рассмотренных факторов преодолевается в клетках *S. pombe*, мутантных по гену *rad1* (продукт гена - белок, вовлеченный в репарацию ДНК). Фенотипы мутаций генов *rad3* (продукт гена - ДНК геликаза), *rad1*, *rad17*, *hus1* и *hus2* аналогичны фенотипу *rad9*. Особенность мутаций генов *rad21* (белок участвует в репарации двунитевых разрывов) и *rad 24* состоит в том, что клетки преодолевают точку контроля в ответ на повреждения ДНК, а не в ответ на недореплицированную ДНК. Таким образом, петля обратной связи имеет дифференциальную чувствительность к различным типам агентов, нарушающих деление клетки. В норме группа генов *rad S.pombe*: *rad3*, *rad9*, *rad17*, *hus1*, а также *cdc18*, *cdt1*, *cut5*, *rum1*, - контролирует целостность ДНК в точке G1-S.

Следует ожидать, что в регуляции активности точек контроля задействованы три группы генов, кодирующих: 1) белки-сенсоры, которые контролируют завершение событий клеточного цикла, 2) сигналы, посылаемые этими сенсорами, и 3) эффекторы - ответные элементы, которые принимают сигналы и осуществляют задержку движения клеток по циклу. Известные функции генов и их продуктов, участвующих в регуляции точек контроля, хорошо "проецируются" на эту схему. Так, к сенсорам повреждений можно отнести белки, кодируемые генами *rad1* и *rad9* - репарация и связывание с повреждениями ДНК соответственно, а также продукт гена *cdc18* - фактор репликации. К сенсорам относятся продукты гена *rad17*, кодирующего 3'-5' экзонуклеазу, и гена *rad24*, предполагаемого гена экзонуклеазы, гомологичного фактору репликации ДНК человека. В то же время продукт гена *rad3* - протеин-киназу естественно считать передатчиком сигнала, возникающего при активации точки контроля. Передатчиками являются продукты гена *mec1*, кодирующего инозитол-фосфатидил-инозитол киназу (гомолог человеческой FRP1 протеин-киназы), гена *tec2*, кодирующего треонин-тирозин протеин-киназу, серин-треонин киназа Chk1 (Rad53). Одним из эффекторов в остановке клеточного осциллятора является Cdc2 - каталитический компонент циклиновых киназ.

Активация и передача сигнала об остановке клетки в точке контроля не является простым процессом каскадной активации, т.к. в этом процессе имеются внутренние петли обратной связи. Так, в ответ на повреждения ДНК белок Mec1 фосфорилирует сенсоры повреждений Rad9 и Dcd1 [41]. Взаимодействие белков точек контроля достаточно сложно: например, Mec1, фосфорилированный с помощью Rad9, связывается с Rad53. Фосфорилирование же самого Rad53 зависит не только от Rad9 и Mec1, но также и от белков группы Rad17, Rad24, Dcd1, Mec3 (группа Rad24), - независимой от Rad9 ветви сенсоров повреждений ДНК. В фосфорилирование Dcd1 вовлечены Mec1 и белки группы Rad24, но не Rad9. По-видимому,

смысл этой сложной регуляции состоит в амплификации сигнала, блокирующего клеточный осциллятор только при соблюдении определенных условий.

Для жизнедеятельности клетки необходимы не только точная репликация и целостность хроматина (проверяемая в точках контроля G1-S и G2-M), но также и правильная сегрегация хромосом. Целям последнего служит точка контроля M-A, проверяющая правильность сборки веретена и правильность прикрепления хромосом к веретену. Сегрегация хромосом у всех эукариот задерживается под действием агентов, нарушающих формирование веретена (например, при помощи колхицина). Изучение генетического контроля этого процесса началось с получения у дрожжей *S.cerevisiae* условных мутаций *Mad*, *Bub* и *Mps1*. Мутация *Mad* (*mitotic arrest deficient*) проявляется на фоне действия бенонила, мутации *Bub* (*budding uninhibited by benzimidazole*) и *Mps1* отменяют задержку клеток в митозе, вызываемую в норме под действием веществ, нарушающих полимеризацию микротрубочек. Протеинкиназа *Mps1* рассматривается как первое звено передачи сигнала на блокирование перехода метафаза-анафаза. Кроме этого, она вовлечена в дубликацию полярных телец веретена (аналогов центросом высших эукариот). Изучение фенотипов двойных мутантов позволило идентифицировать наличие разветвления цепи сигнала, идущего от *Mps1*, на *Mad2*-ветвь (*Bub1*, *Bub3*, *Mad1*, *Mad2*, *Mad3*) [45-46] и *Bub2*-ветвь (представлена одним геном). Исследование поведения минихромосом у *S.cerevisiae* показало, что присутствие минихромосом, содержащих копию кинетохора, вызывает временную задержку наступления анафазы. В то же время, у мутантов по генам группы *mad* такой задержки не происходит. Это свидетельствует о том, что клетка "проверяет" число и/или состояние кинетохоров перед вступлением в анафазу. По молекулярной функции *Bub1* принадлежит к классу протеинкиназ. Функция *Bub2* неизвестна, и очевидных гомологий не удается найти. Также неизвестна функция белка *Bub3*, однако в этом случае удается найти гомологию с трансмембранным белком A72.5 мыши, богатым WD40-повторами (функция WD повторов связана с убиквитинизацией белков). Продукт гена *Mad1* гомологичен немышечному дельта-миозину (тяжелая цепь) крысы. *Mad3* гомологичен протеинкиназе мыши. *Mad2* - это протеин изопренил-трансфераза, которая контролирует связывание белков с мембранами и прикрепление кинетохоров к микротрубочкам веретена.

Белок-белковые взаимодействия в точке контроля метафаза-анафаза также не являются простой цепью передачи сигнала. Так, *Mad1* и *Mad2* формируют комплекс, причем *Mad1* фосфорилируется белком *Mps1* с большей эффективностью именно тогда, когда *Mad1* находится в комплексе. У *S.cerevisiae* мишенью связывания *Mad2* является комплекс активации анафазы (APC), точнее, его компонент *Cdc20*. Это связывание приводит к ингибированию активности APC (комплекс промотирования анафазы). Эксперименты по сверхэкспрессии *Cdc20* показали, что мишенью *Cdc20* являются не митотические циклины, а сепарин *Pds1*. Клетки, содержащие белковые замены в области деструкционного бокса белка *Pds1*, не могут входить в анафазу, поскольку имеют высокую активность MPF. Это означает, что отсутствие распада *Pds1* блокирует как разделение хроматид, так и инактивацию MPF. Таким образом, *Mad2*-путь предотвращает элонгацию веретена и потерю когезии сестринских хроматид, т.е. опосредует ингибирование входа в митоз, в то время как *Bub2*-путь ингибирует протеолиз митотических циклинов и предотвращает выход из митоза.

Известно два типа эффекторов (исполнителей) перехода из метафазы в анафазу, - это белок *Pds1* (сепарин), отвечающий за спаренность хроматид (для перехода из метафазы в анафазу необходима его инактивация), и рассмотренный выше фактор MPF, деструкция которого необходима для прохождения анафазы, телофазы и цитокинеза. Инактивация *Pds1* происходит в результате его фосфорилирования белком *Chk1*, который, в свою очередь, является субстратом фосфорилирования *Mec1*. Протеолиз циклинов, осуществляемый комплексом APC, является необходимым элементом завершения митоза в норме. Активация же метафазной точки контроля ингибирует активность APC (в отношении циклинов) с помощью изменения активности компонентов *Hct1* и *Chd1* этого комплекса.

Внутриклеточная локализация белков, вовлеченных в функционирование метафазной точки контроля, связана в основном с кинетохорами. У позвоночных белок Mad2 селективно связан с неприкрепленными к веретену кинетохорами и исчезает из кинетохоров после их прикрепления к веретену. Помимо этого, Mad2 располагается на центросомах, вдоль микротрубочек веретена и в цитоплазме. Гомолог Mad1 человека связан с кинетохорами в интерфазе и с центросомами в митозе, гомолог Bub1 мыши связан с кинетохорами в митозе.

Рис.17. Почему хромосомы в клеточном цикле реплицируются только один раз? Ответ был получен в эксперименте, изображенном на рисунке. Если ядра клеток помещены на экстракт яиц морского ежа, относительно которого известно, что он содержит все необходимые компоненты для репликации ядер, то репликации не происходит. Однако, если ядра обработать активной МРФ, либо разрушить ядерную мембрану с помощью детергента, то происходит однократная репликация ядер. Из этого был сделан вывод о существовании лицензионного фактора (см. след. рисунок).

Рис.18. Согласно модели лицензионного фактора, перед входом клетки в митоз лицензионный фактор сосредоточен в цитоплазме. После разрушения ядерной оболочки, наступающей вследствие активности МРФ, лицензионный фактор проникает в ядро и связывается с началами репликации хромосом, разрешая (давая лицензию) на однократную репликацию. В результате этого хромосомы в S фазе проходят репликацию, а лицензионный фактор теряет свою активность. Для наступления следующей репликации необходимо новое поступление лицензионного фактора из цитоплазмы.

Рис. 19. Клеточный цикл регулируется не только внутриклеточными, но также и внешними факторами. Наиболее простой случай такой регуляции это синхронизация клеточных циклов при помощи полового фактора у дрожжей. На рисунке представлена схема событий передачи сигнала. α -Фактор, связываясь со своим рецептором, расположенным на клеточной мембране, индуцирует изменение конформации рецептора. В результате этого происходит распад так называемого малого G белка на $\alpha+\beta,\gamma$ субъединицы. Одновременно происходит обмен GDP на GTP на α субъединице. Это событие порождает сигнал, останавливающий клеточный цикл.

Рис.20. Регуляция клеточного цикла посредством малых G белков также имеется и у высших эукариот. На рисунке приведена схема, показывающая цепочку событий, в соответствии с которой факторы роста и состояние внеклеточного матрикса детерминируют пролиферацию. Подобно тому, как это имеет место для α -фактора дрожжей, внеклеточные стимулы активируют малые G белки (Ras и Rho). В результате этого активируется MAPK или SIP/KIP сигнальные пути соответственно. Это приводит к изменению активности G1 фазных циклинов и преодолению G1-S контроля.