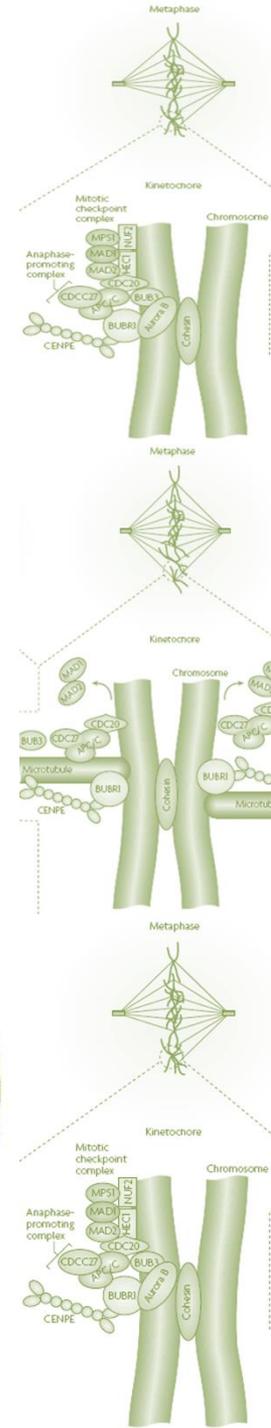
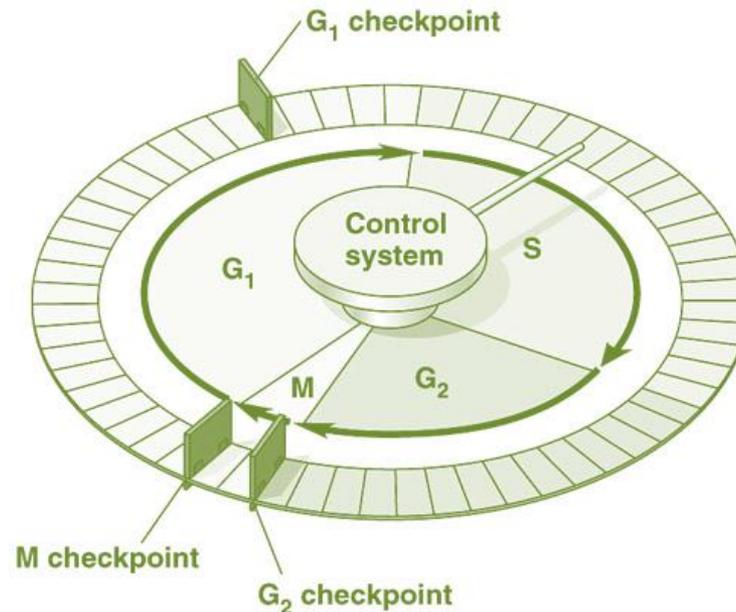
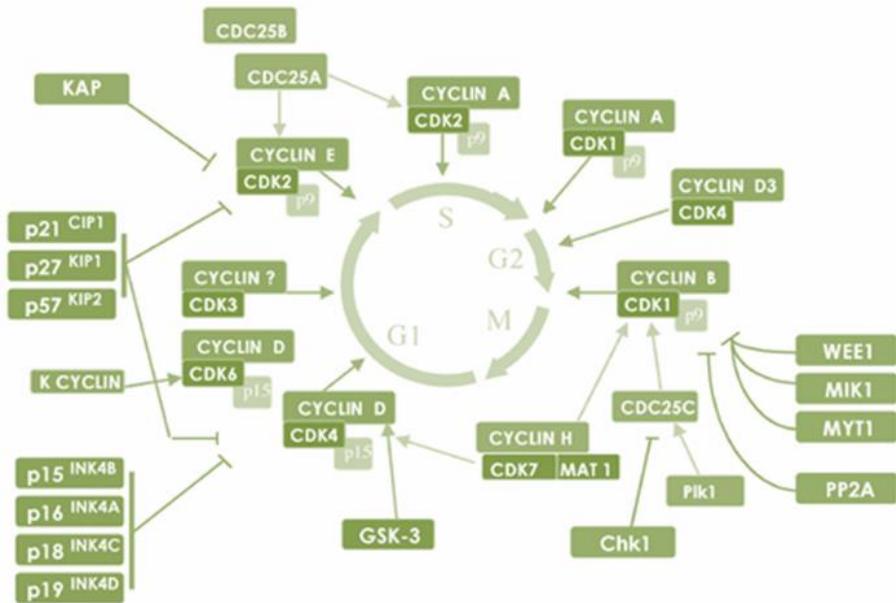


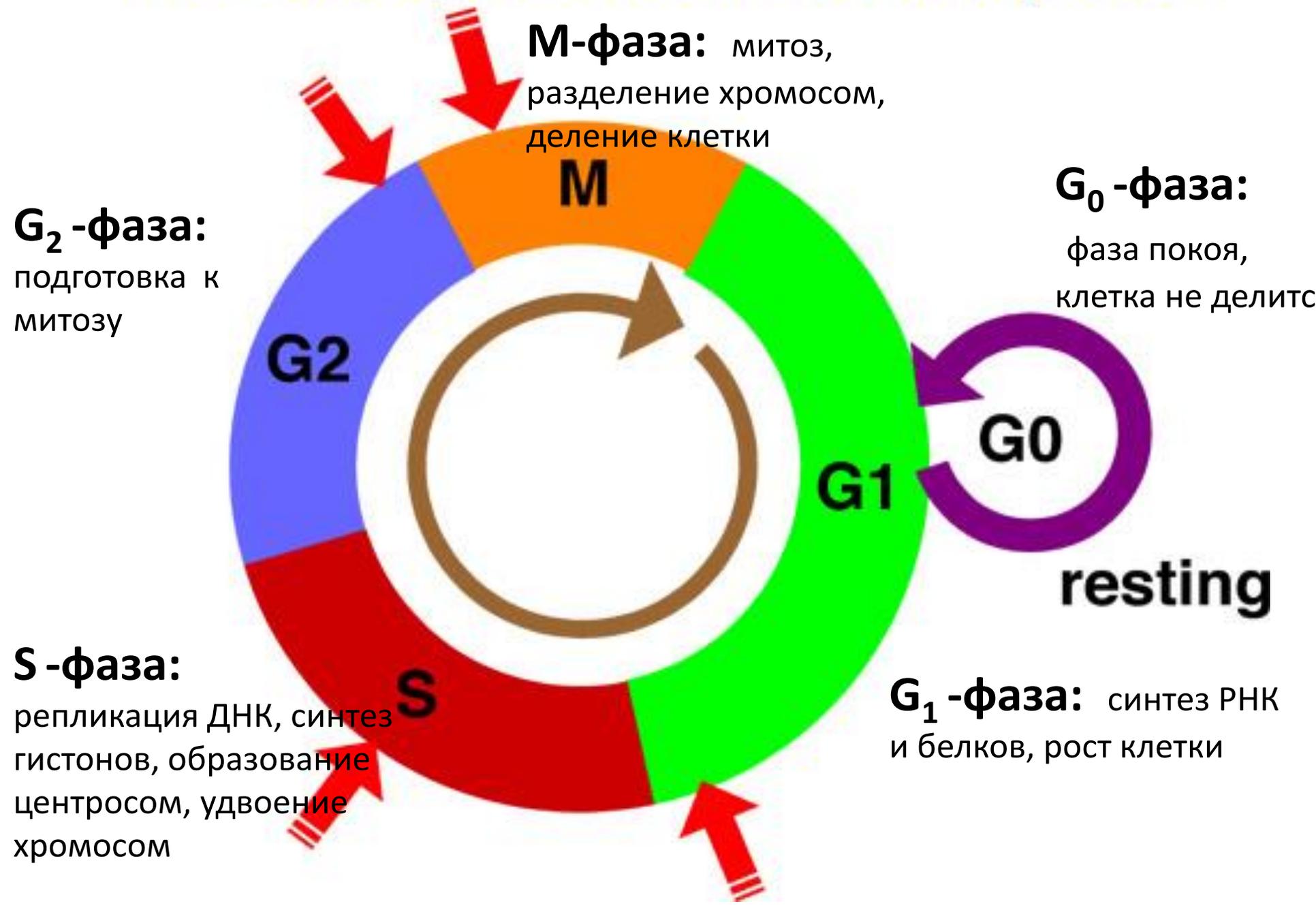
Фёдорова Светлана
среда, 6 марта, 16 часов

Checkpoints for Dummies:

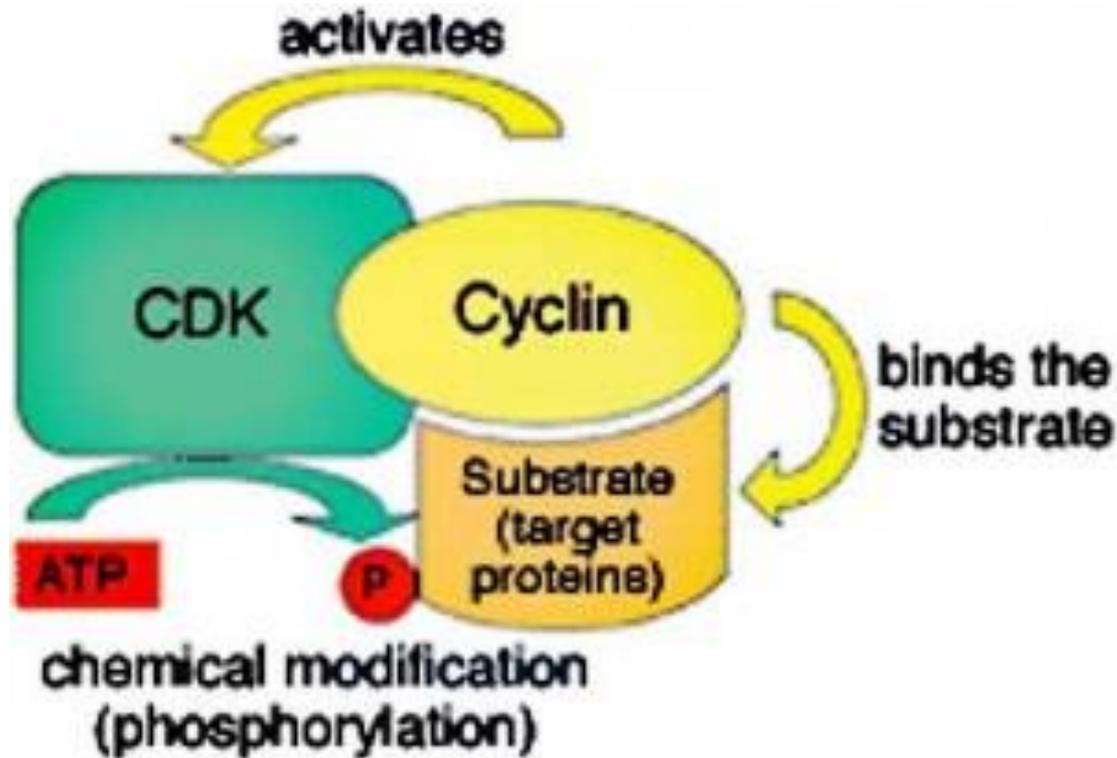
ВВЕДЕНИЕ В ЧЕКПОЙНТОВЕДЕНИЕ



The Cell Cycle and the Checkpoints



Комплексы CDK/Сус- основные регуляторы клеточного цикла



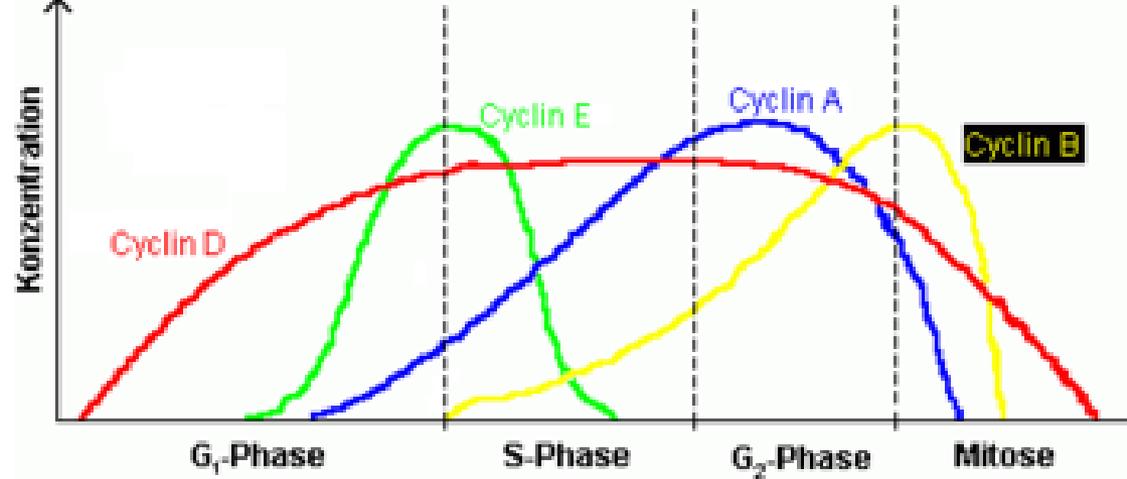
Циклин-зависимые киназы CDK

каталитическая субъединица комплекса CDK/Сус, серин-треониновая киназа

- У дрожжей *S.cerevisiae* и *S.pombe* все события клеточного цикла контролируются одной **Cdk1** (синонимы *cdc28* и *cdc2*, соответственно)
- У многоклеточных организмов события контролируются **Cdk1** и **Cdk2**. Также у высших эукариот имеются *Cdk4* и *Cdk6* которые регулируют клеточный цикл в ответ на внеклеточные сигналы.
- В животных клетках имеются, по крайней мере, 13 различных **Cdk**: **Cdk1,2,4,6** напрямую участвуют в регуляции клеточного цикла, остальные фосфорилируют другие *Cdk* и называются *Cdk*-активирующие киназы (**САК**).

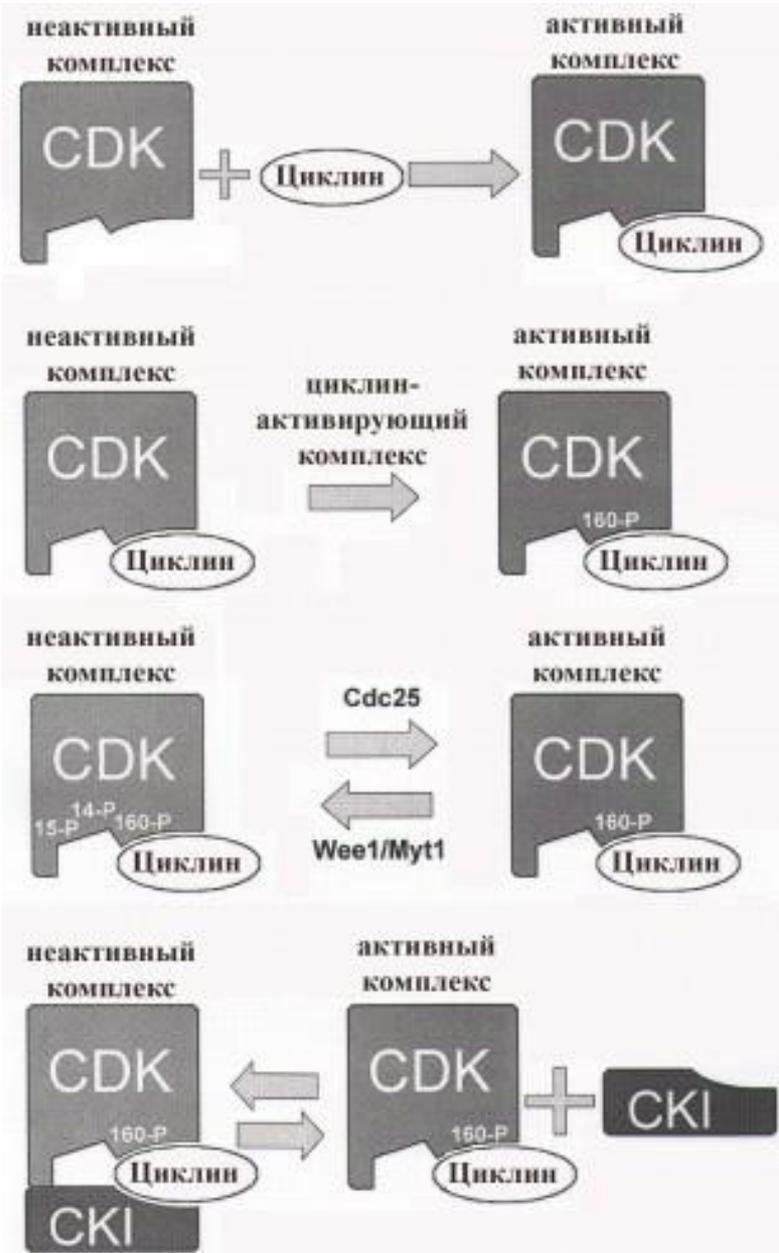
Циклины

регуляторная субъединица
комплекса CDK/Cyc



- **4 класса:**
- **G₁ циклины** (Cln3 у *S. cerevisiae* и CysD у позвоночных) помогает координировать клеточный рост с входом в новый клеточный цикл. Они необычны, так как их концентрация не меняется от фазы клеточного цикла, а меняется в ответ на внешние регуляторные сигналы роста
- **G₁/S циклины** (Cln1 и Cln2 у *S. cerevisiae*, CysE у позвоночных) достигает максимальной концентрации в поздней G₁-фазе и падает в S-фазе. Запуск репликации ДНК, выключая различные системы подавляющие S-phase Cdk в G₁-фазе; старт дубликации центросом у позвоночных, образование веретенного тела у дрожжей.
- **S циклины** (Clb5, Clb6 у *S. cerevisiae* и CysA у позвоночных), стимулируют репликацию ДНК. Уровень S циклина остается высоким в течении всей S, G₂-фаз и начала митоза, где помогает началу митозу в некоторых клетках.
- **M-циклины** (Clb1,2,3 и 4 у *S. cerevisiae* и CysB у позвоночных). Их концентрация увеличивается, когда клетка переходит к митозу и достигает максимума в метафазе. Фосфорилирование специфических белков приводит к компактизации х-м, разрушению ядерной оболочки и сборке веретена. Их разрушение в анафазе приводит к выходу из митоза и цитокинезу.

Пути регуляции комплекса CDK/Сус



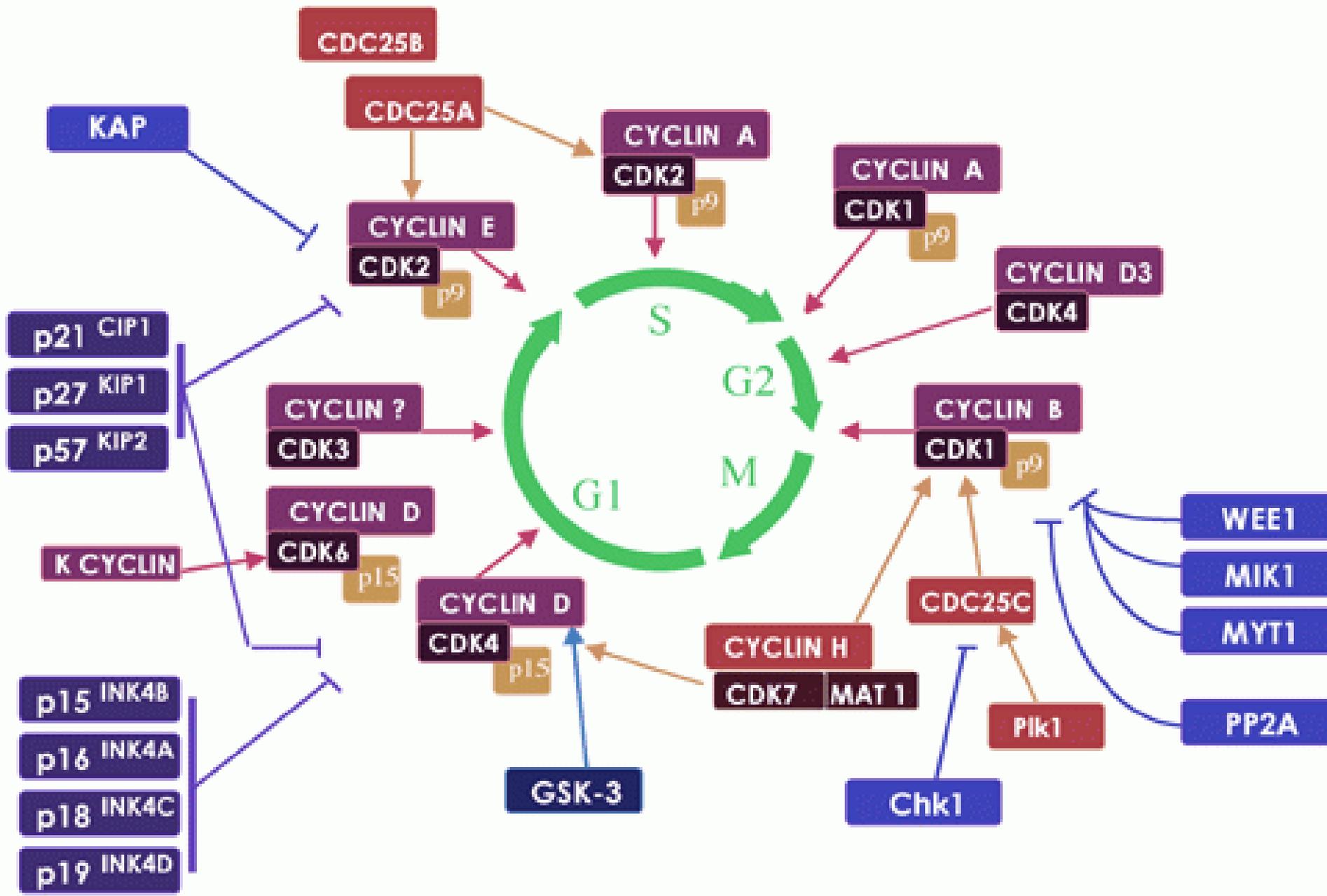
1) связывание с соответствующим циклином.

2) Регулирование активности комплекса за счет обратимого фосфорилирования белковым комплексом САК (CDK активирующим комплексом), состоящего из циклина H, CDK7 и Mat1.

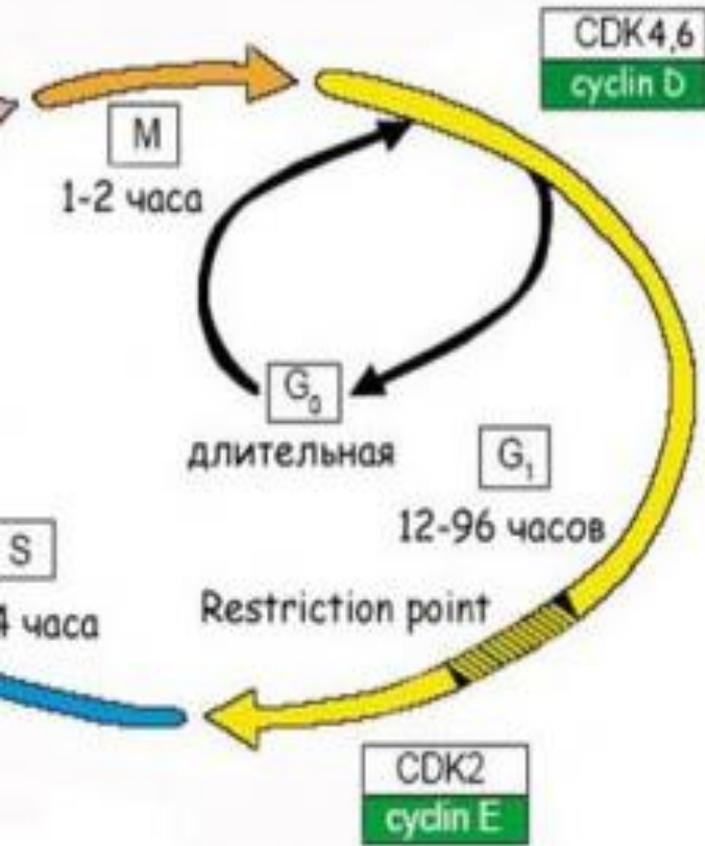
3) Ингибирующее фосфорилирование специфических сайтов CDK группой киназ, включая Wee1 киназу, и дефосфорилируются фосфатазами Cdc25. Активность этих ферментов (Wee1 и Cdc25) существенно варьирует в ответ на разные внутриклеточные события, такие как повреждения ДНК.

4) ингибирование вследствие связывания с ингибиторами CDK (CKI). Ингибиторы CDK состоят из двух групп белков INK4 и CIP/KIP.

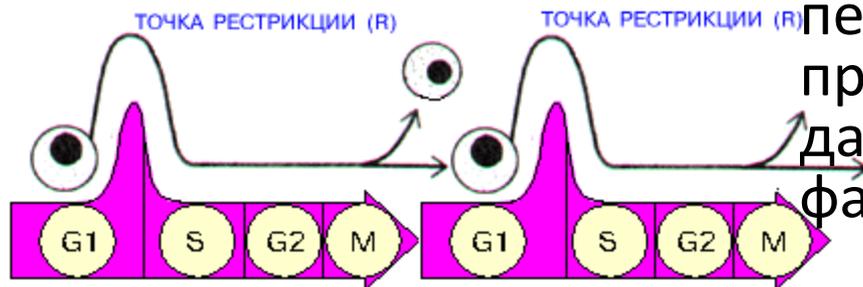
• Регуляция клеточного цикла осуществляется:



G1-фаза. Точка рестрикции (START)



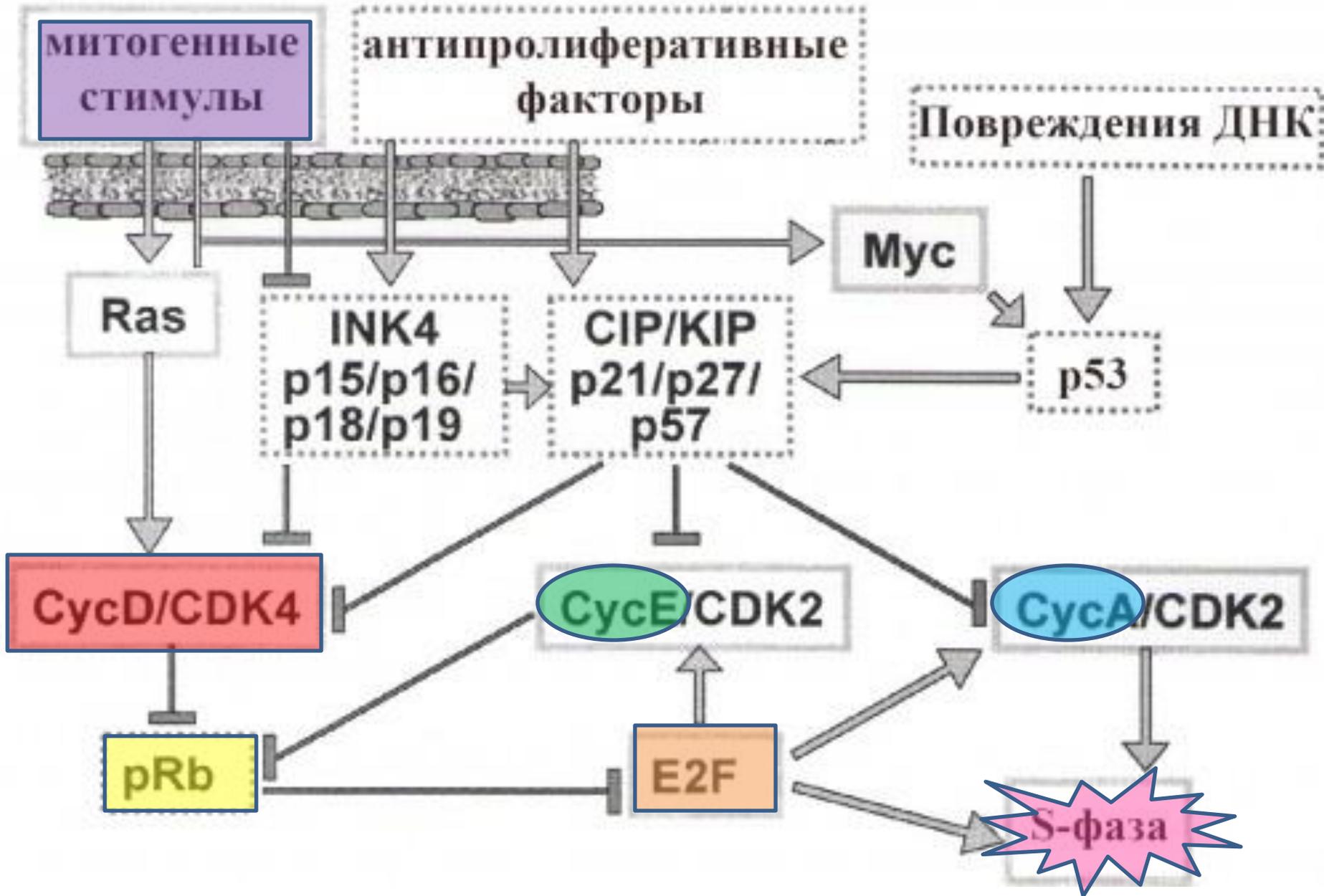
- В начале G1-периода клетка чувствительна к внешним ростовым факторам (митогенам), этот этап называется постмитотическим **G1^p**.
- **Эти белки** обеспечивают достижение клеткой определенного порога (точки **R - рестрикции** или ограничения, или перехода, у млекопитающих - **START**), после которой клетка становится невосприимчивой к внешним сигналам вплоть до завершения всего цикла деления.
- После прохождения точки R клетка переходит в **пресинтетический этап G1^{ps}**. Клетки, перешедшие в G1^{ps} период, продолжают нормальное прохождение всего клеточного цикла даже при отсутствии ростовых факторов.



Фаза G0 клеточного цикла - фаза пролиферативного покоя

- Если клетка не достигает точки R, она выходит из пролиферативного цикла и вступает в **период репродуктивного покоя (G0)** для того, чтобы (в зависимости от причин остановки):
- (1) дифференцироваться и выполнять свои специфической функции,
- (2) выжить в условиях недостаточности питательных веществ или факторов роста,
- (3) осуществить репарацию поврежденной ДНК.
- Клетки одних тканей при соответствующей стимуляции вновь способны возвращаться из периода (G0) в клеточный цикл, других - утрачивают эту способность по мере дифференцировки
- клетки в G0-фазе содержат ингибиторы пролиферации , препятствующие вступлению в S-фазу. Это означает, что клетка должна осуществлять специальную программу для выхода из G0, которая **индуцируется только факторами роста.**

Регуляция G1 фазы



Переход G1/S регулируется комплексом CysE/CDK2

Существуют две разнонаправленные системы регуляции G1/S - перехода: положительная и отрицательная .

Система положительно регулирующая вход в S-фазу, включает гетеродимер E2F-1/DP-1 и активирующие его циклин-киназные комплексы .

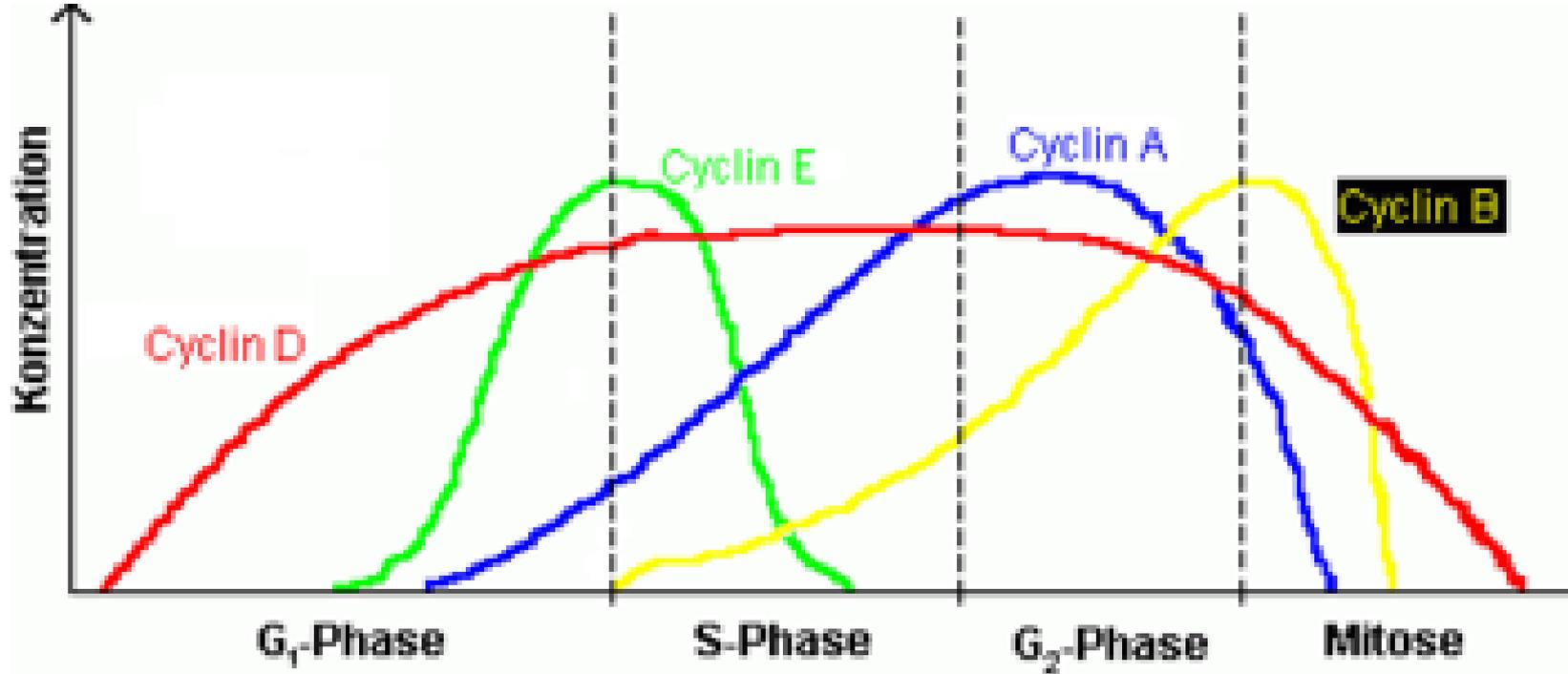
Другая система тормозит вход в S-фазу. Она представлена опухолевыми супрессорами p53 и pRB , которые подавляют активность гетеродимеров E2F-1/DP-1.

Нормальная пролиферация клеток зависит от точного баланса между этими системами . Соотношение между этими системами может изменяться, приводя к изменению скорости пролиферации клеток.

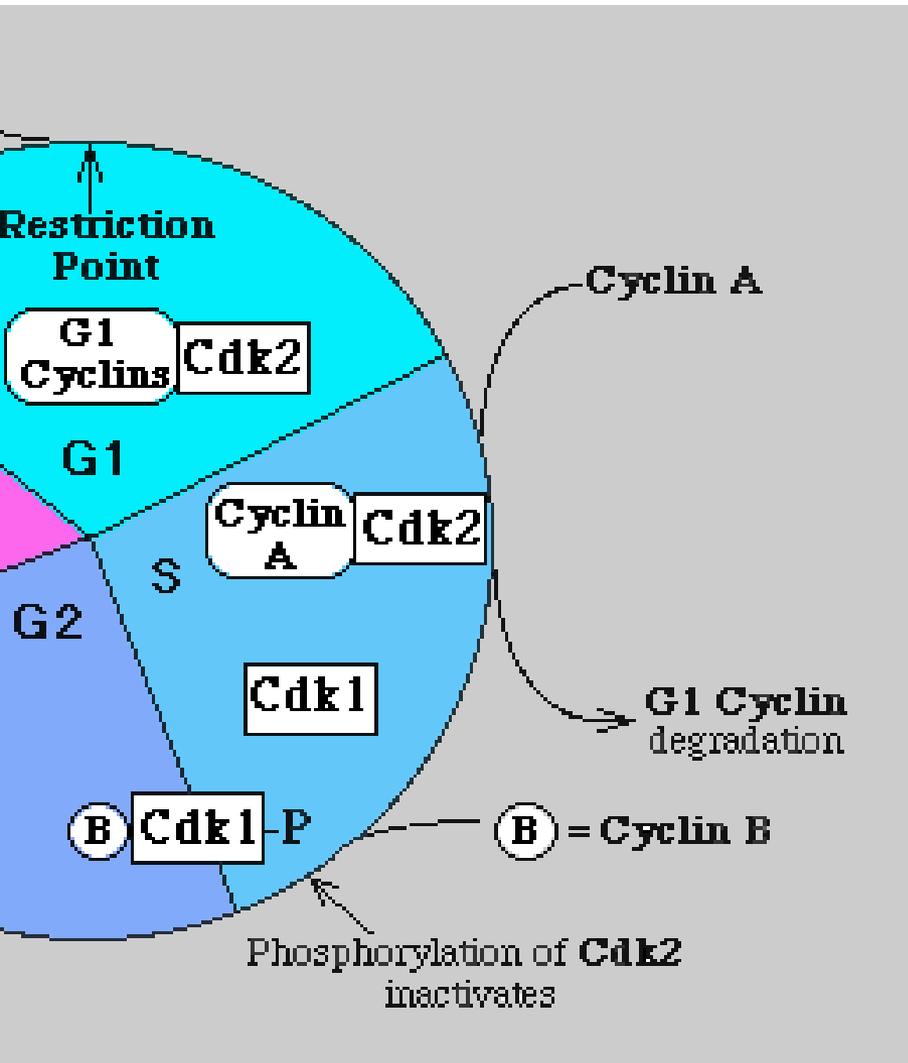
S фаза

Синтетический (S-) период характеризуется удвоением содержания (репликацией) ДНК и синтезом белков, в частности, гистонов, которые поступают в ядро из цитоплазмы и обеспечивают нуклеосомную упаковку вновь синтезированной ДНК. В результате происходит удвоение числа хромосом. Одновременно удваивается число центриолей. S-период длится у большинства клеток 8-12 часов.

- После вступления клетки в S-фазу происходит быстрая деградация циклина E и активация CDK2 циклином A. Циклин E начинает синтезироваться в конце фазы G1 и его взаимодействие с CDK2 является необходимым условием для вступления клетки в S-фазу и продолжения синтеза ДНК. Этот комплекс активирует синтез ДНК через фосфорилирование белков в областях начала репликации.

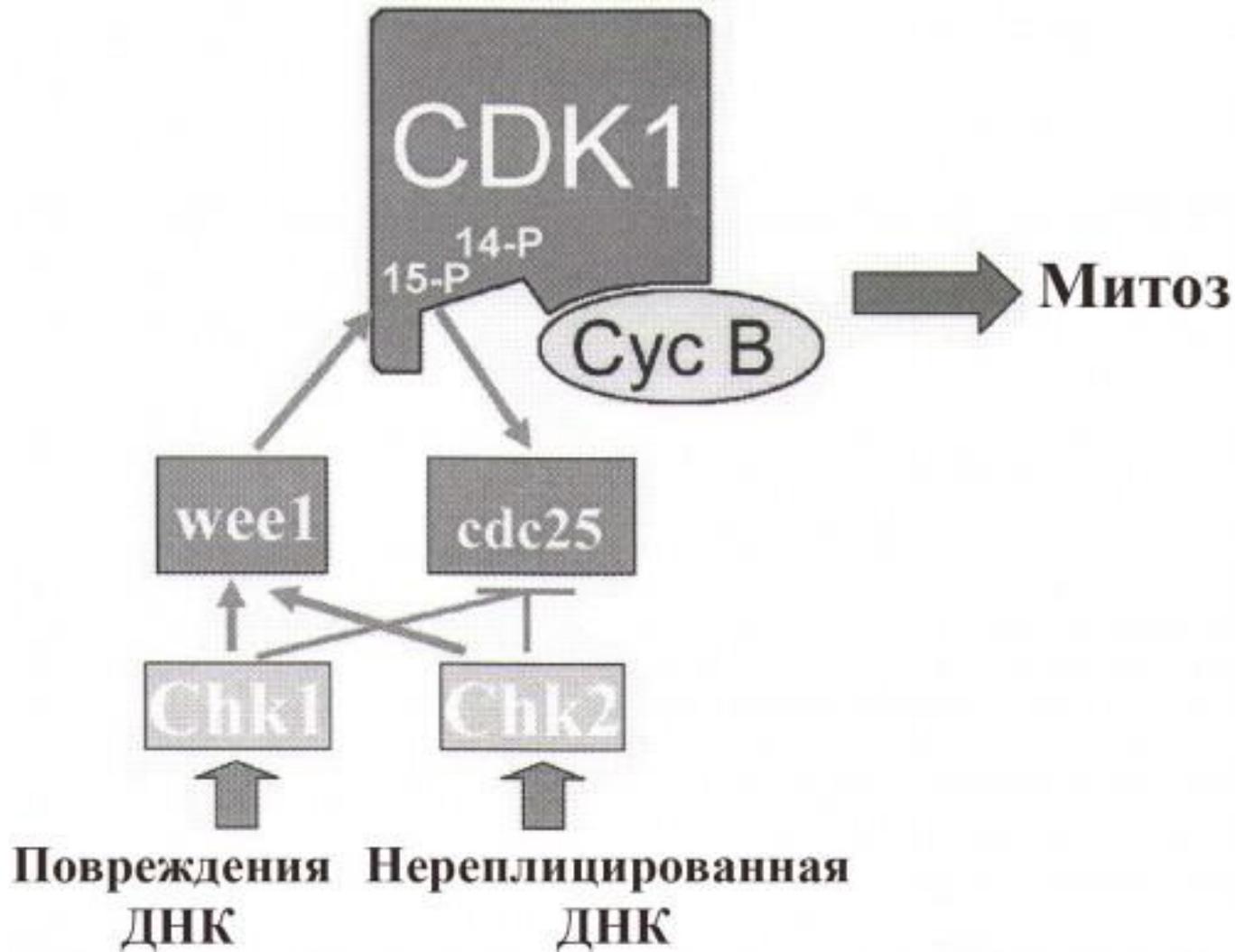


Переход S/G2 регулируется комплексом CysA/CDK1



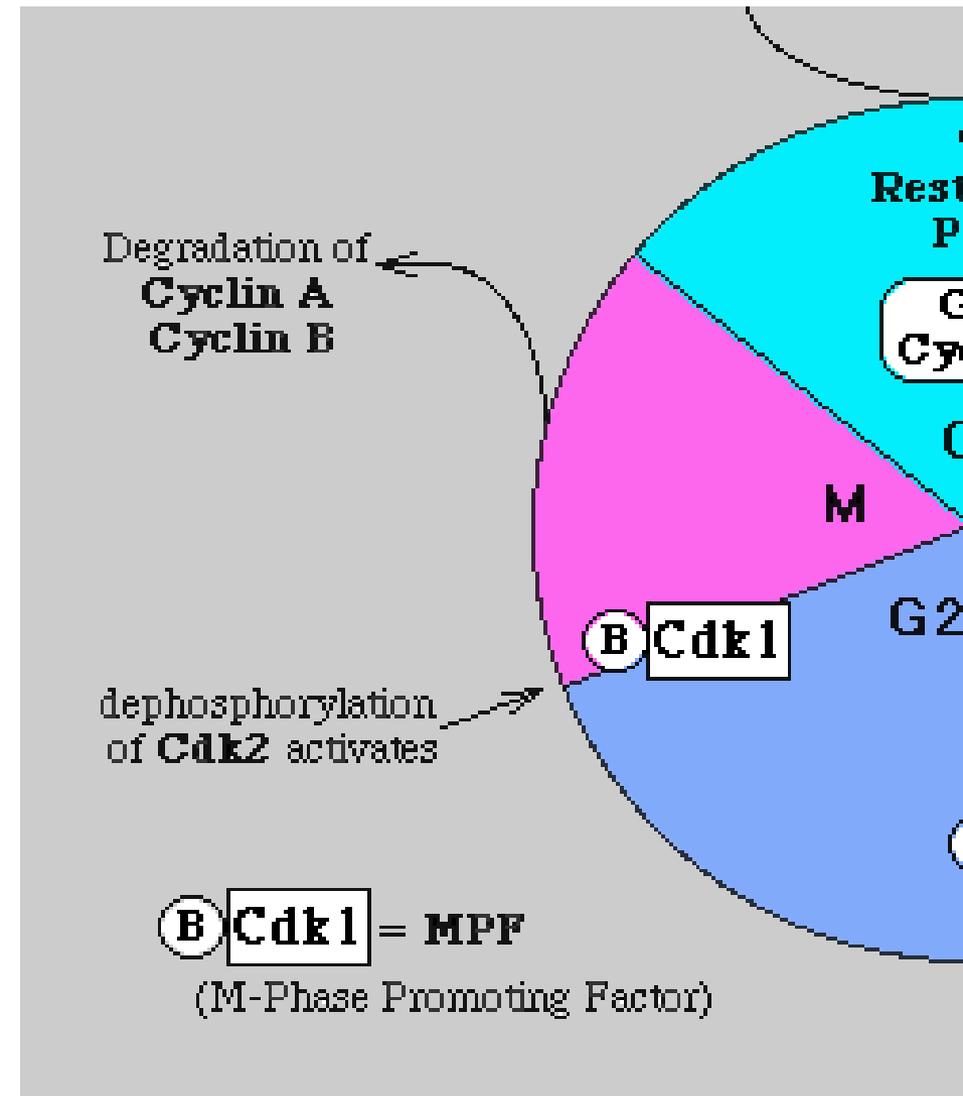
Сигналом к завершению S-фазы и переходу клетки к фазе G2 является активация **циклином А** другой киназы **CDK1** с одновременным прекращением активации CDK2. Задержка между окончанием синтеза ДНК и началом митоза (фаза G2) используется клеткой для контроля полноты и точности произошедшей репликации хромосом.

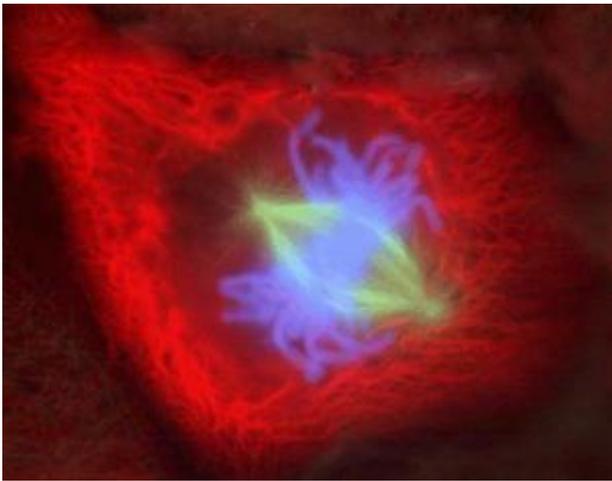
Регуляция G2 фазы



Регуляция перехода клеточного цикла от фазы G2 к фазе M

- Сигнал к началу деления клетки (митоза) исходит от фактора **MPF (M phase promoting factor)**, стимулирующего M-фазу клеточного цикла. MPF представляет собой комплекс киназы CDK1 с активирующими ее циклинами A или B.



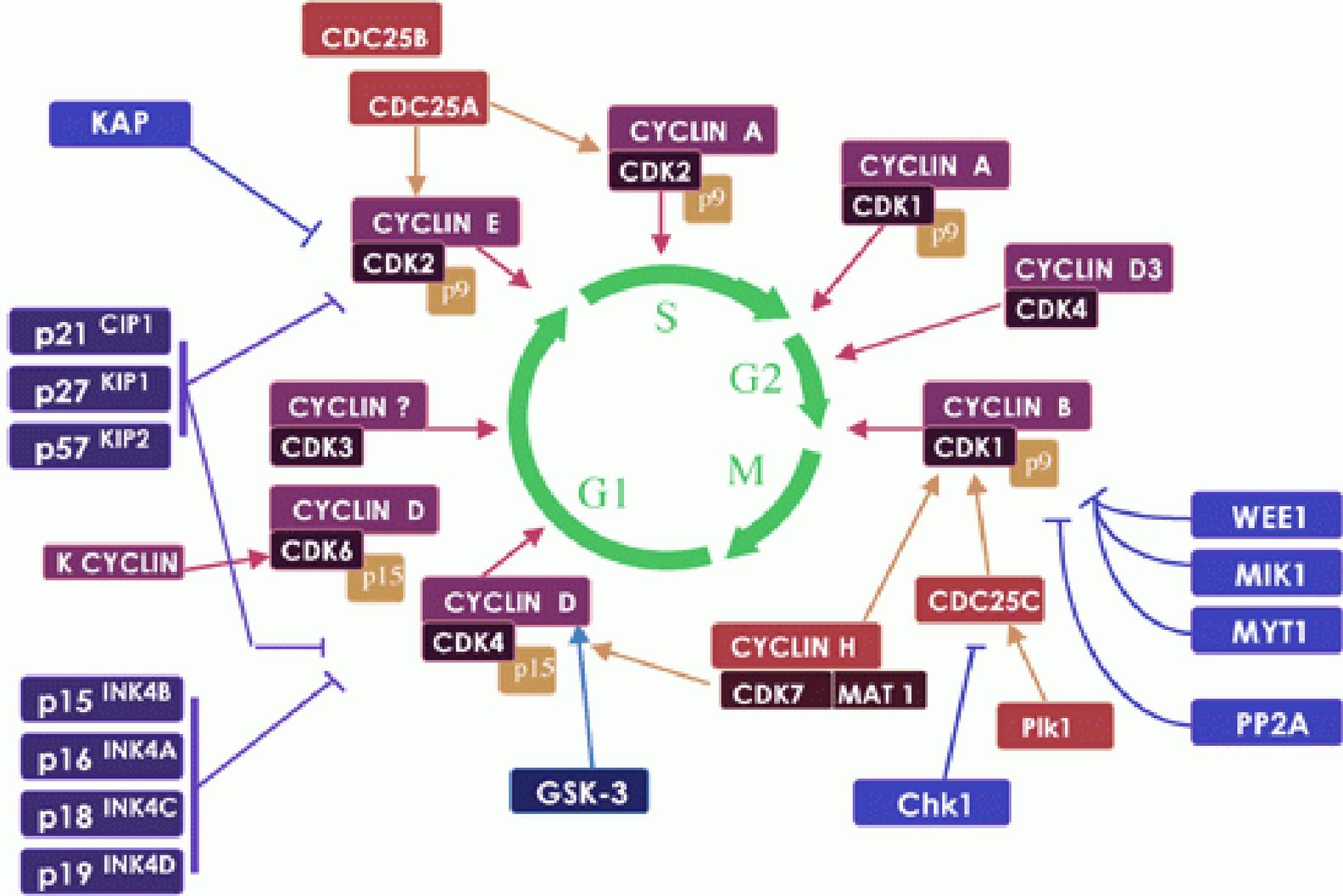


МИТОЗ

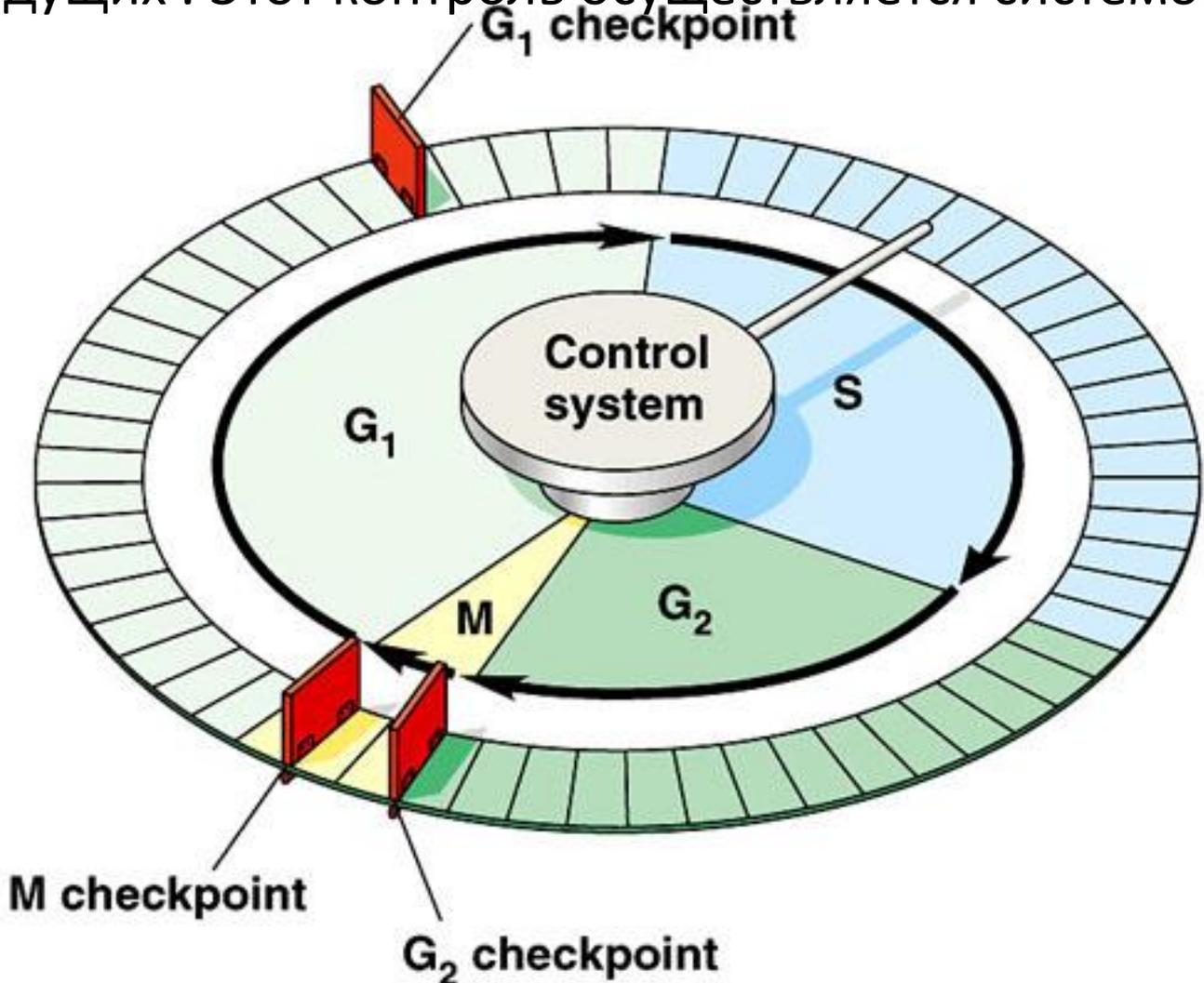
Регуляция митоза



- регуляция переходов из разных фаз клеточного цикла осуществляется:
- G1/S - комплексом *CycE/CDK2*
- S/G2 - комплексом *CycA/CDK1*
- G2/M - комплексом *CycB/CDK1*

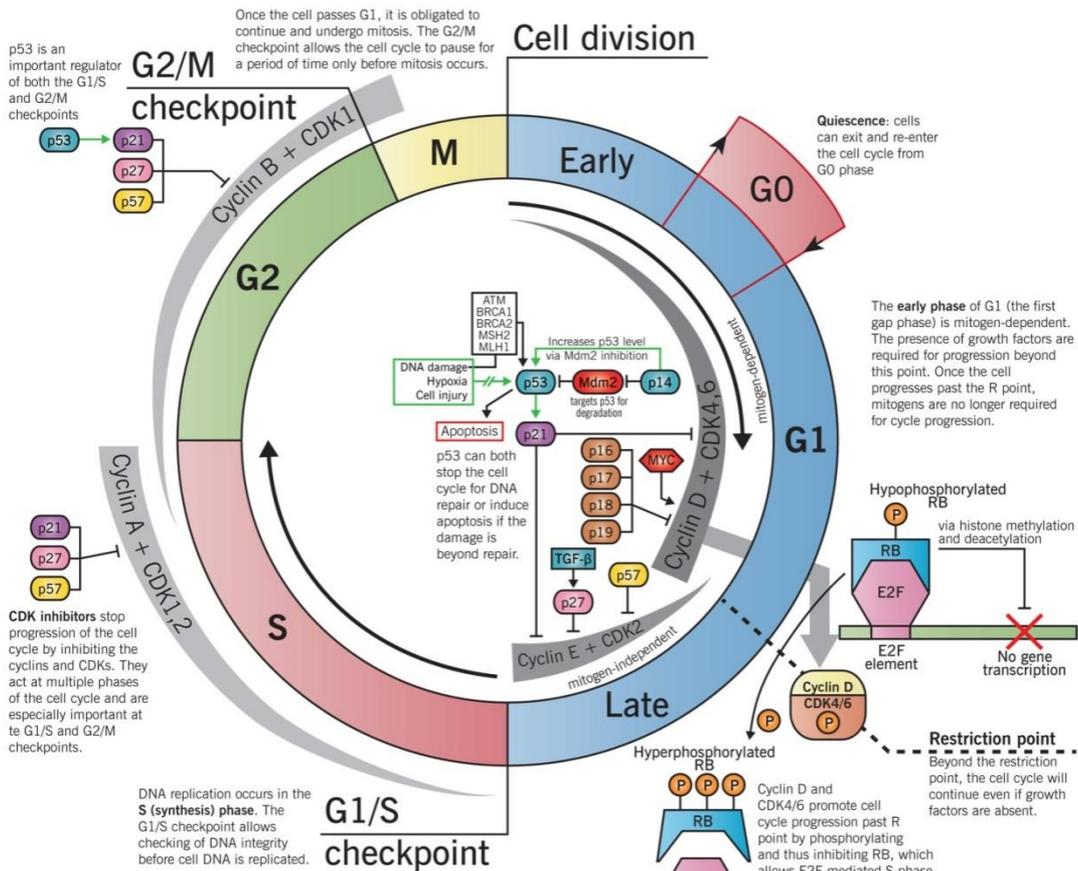


прохождение клетки через каждую фазу жестко контролируется – последующие стадии не начинаются без полного завершения предыдущих . Этот контроль осуществляется системой **checkpoints**



The cell cycle and implications for cancer genetics

The cyclins and CDKs promote cell cycle progression, while the CDK inhibitors stop it. The balance between the two groups of molecules determines whether the cell proliferates or is quiescent.



RB
 autosomal dominant inheritance

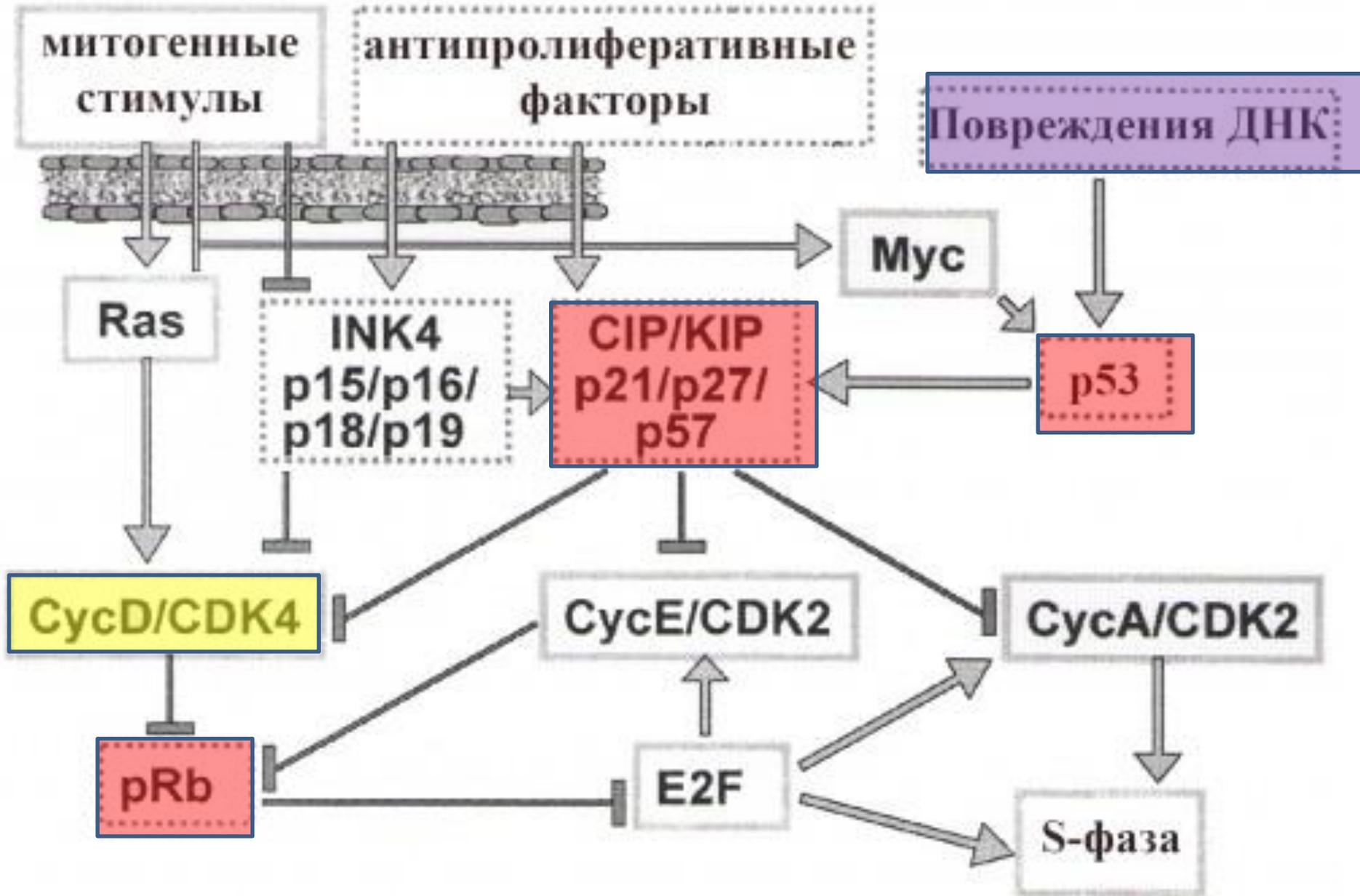
Germline mutations of *RB1* gene causes **retinoblastoma**, an embryonic cancer of the retina. Since RB inhibits cell cycle progression, it is protective against uncontrolled cell proliferation and thus is a **tumour suppressor (ts)**. According to the **Knudson two-hit hypothesis** for recessive ts genes, both alleles of the *RB1* gene must be lost for cancer to develop. In the **hereditary form**, one allele of the *RB1* gene is mutated or deleted in the germ cells. The other allele is lost via a somatic mutation later on. The hereditary form features bilateral, multifocal retinal involvement and typically manifests early, before the age of 1. **Sporadic retinoblastoma** is more common, and is often unilateral and unifocal in origin. The age of onset is usually later, between the ages of 1 and 2.

p53
 autosomal dominant inheritance

Germline mutations of *p53* gene causes **Li-Fraumeni syndrome**, in which multiple cancers develop at a relatively young age (<45). Breast cancer, osteosarcoma, leukemia, lymphoma, and adrenocortical carcinomas are the most common cancers found in Li-Fraumeni syndrome. Similar to retinoblastoma, the **two-hit hypothesis** applies to Li-Fraumeni syndrome as well. One allele of *p53* is lost in the germline and the second allele is lost somatically. The risk of cancer is dominantly inherited. *p53* is called the "guardian of the genome." It is lost in almost every type of cancer because its loss confers a significant survival advantage, leading to rapid, unchecked proliferation and evasion of apoptosis.

Oncogenes	Tumour suppressors
<i>The lack of inhibition or gain of function of which will lead to cancer.</i>	<i>The increased inhibition or loss of function of which will lead to cancer.</i>
Cyclins	RB
Cyclin-dependent kinases (CDKs)	p53
E2F	p21, p27, p57 (CIP/KIP/WAF)
MYC	p14/ARF
Mdm2	p16/INK4a, p17, p18, p19
	TGF-β receptor
	BRCA1, BRCA2
	ATM

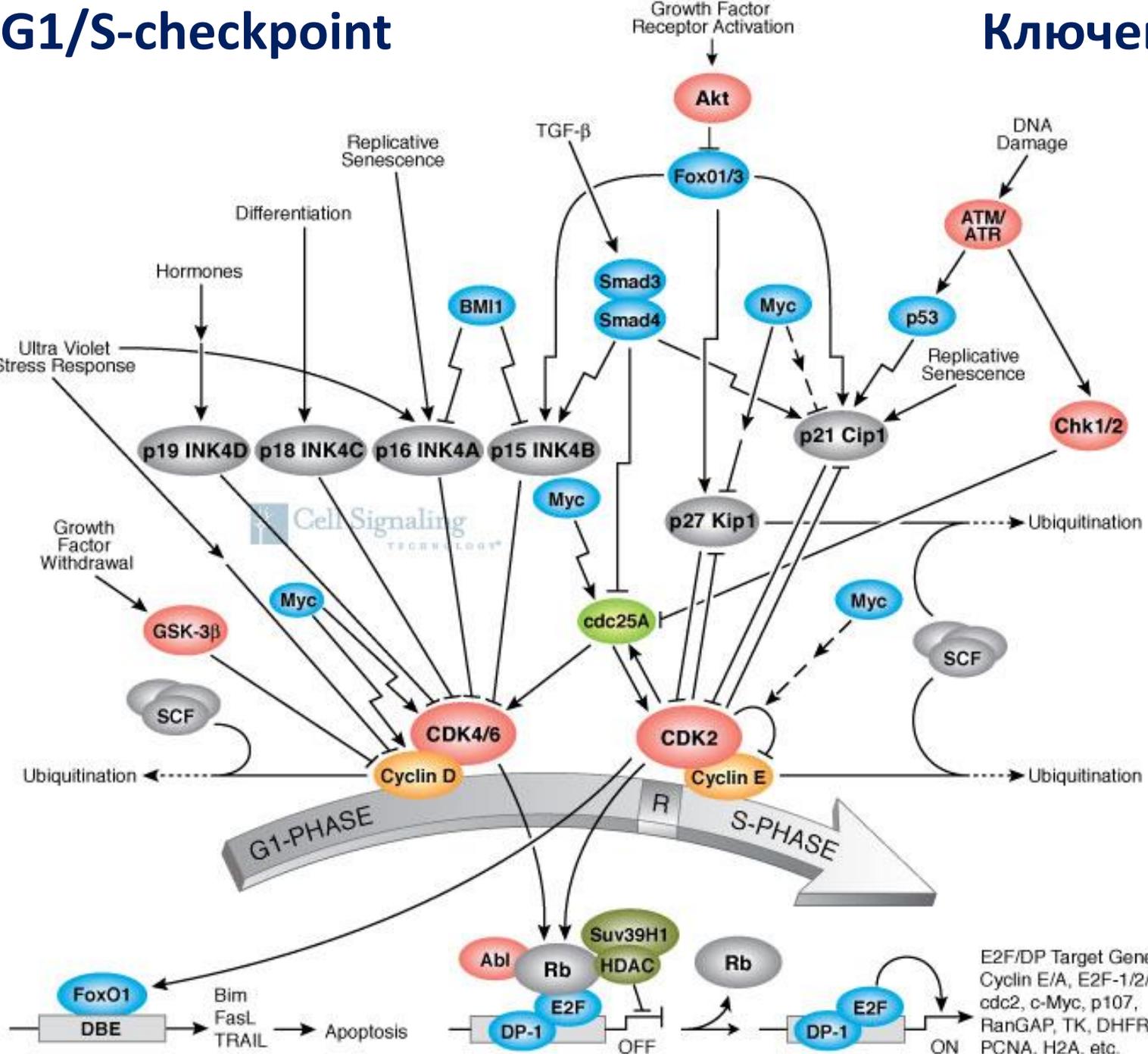
чекпоинт целостности ДНК: G1/S



G1/S-checkpoint

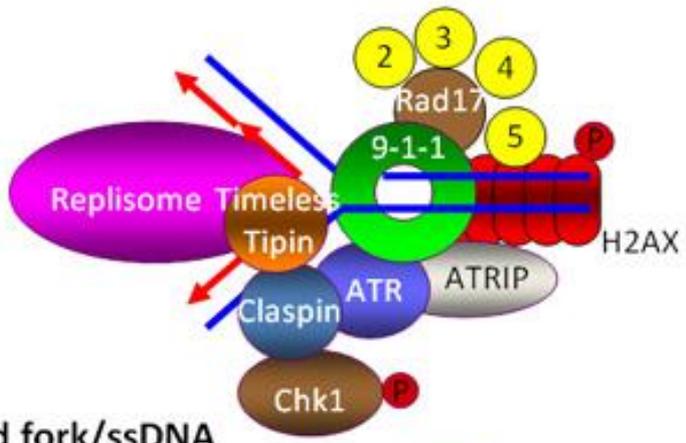
Ключевые белки:

P53
Cdc25a

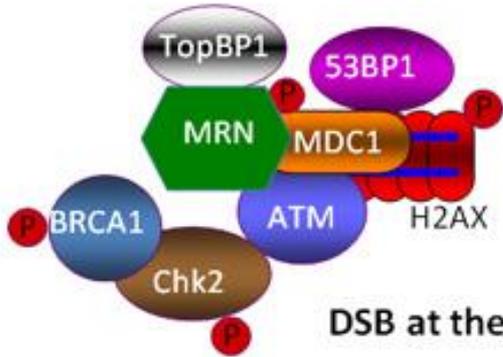


E2F/DP Target Genes:
Cyclin E/A, E2F-1/2/3,
cdc2, c-Myc, p107,
RanGAP, TK, DHFR,
PCNA, H2A, etc.

DNA-replication checkpoint: S-фаза



Stalled fork/ssDNA

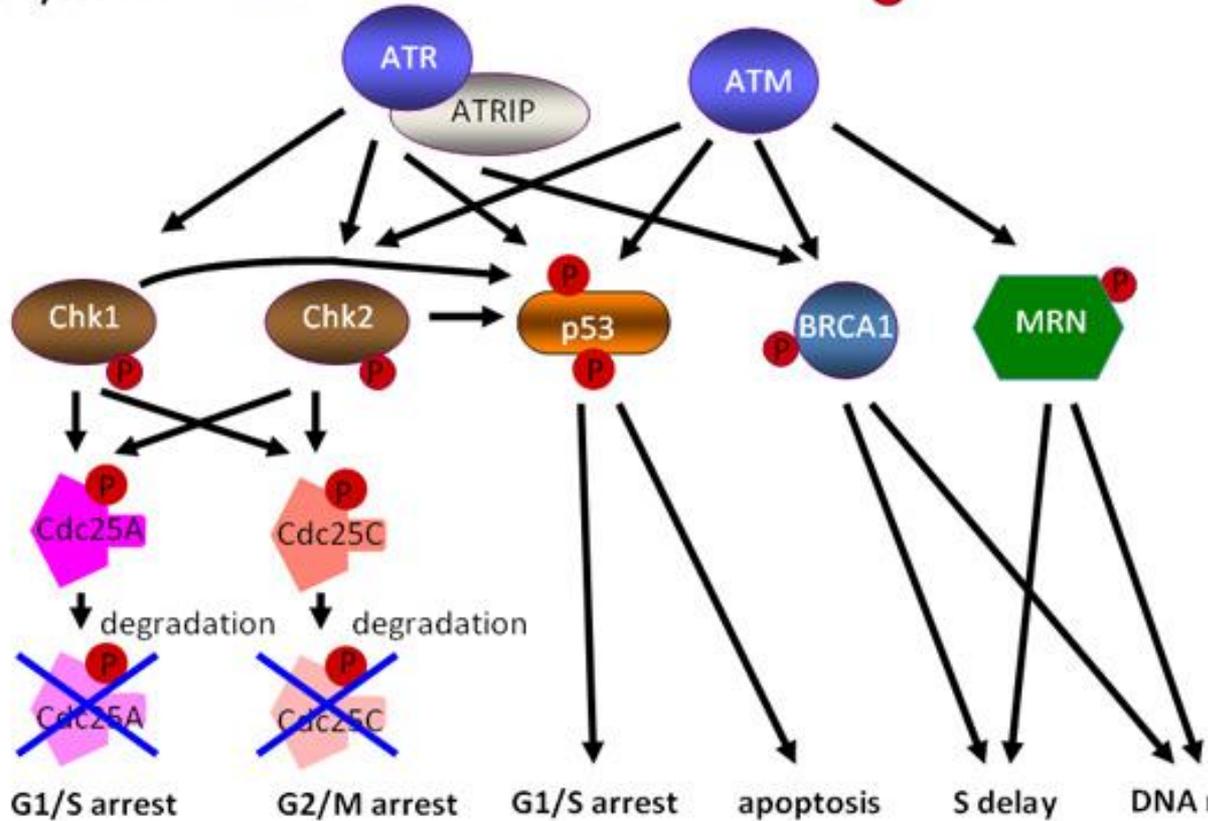


DSB at the fork

ATR=
the ataxiatelangiectasia
Rad3 related kinase

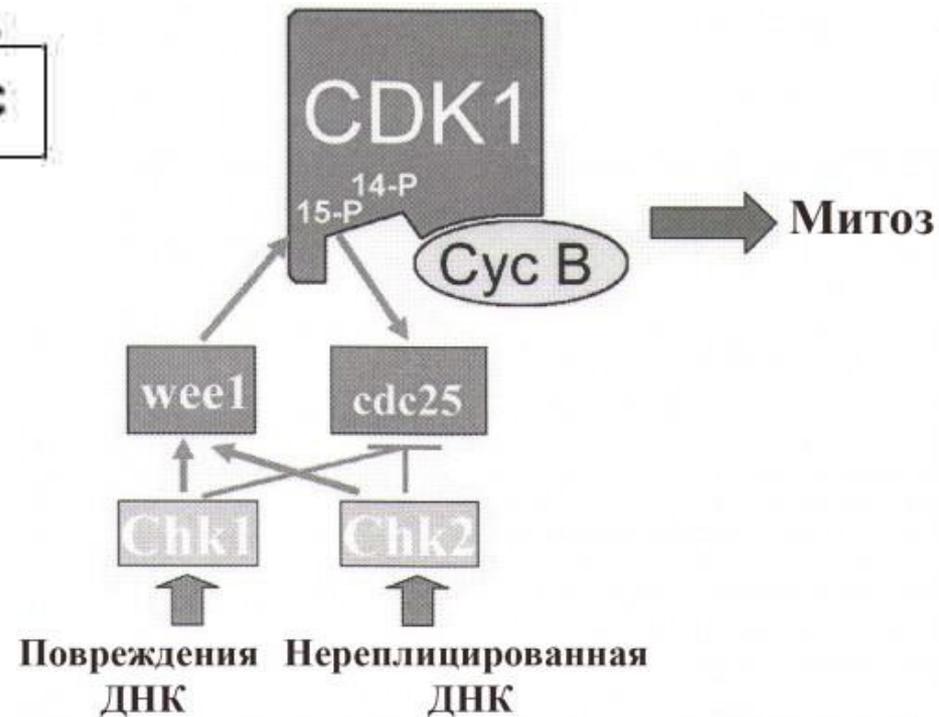
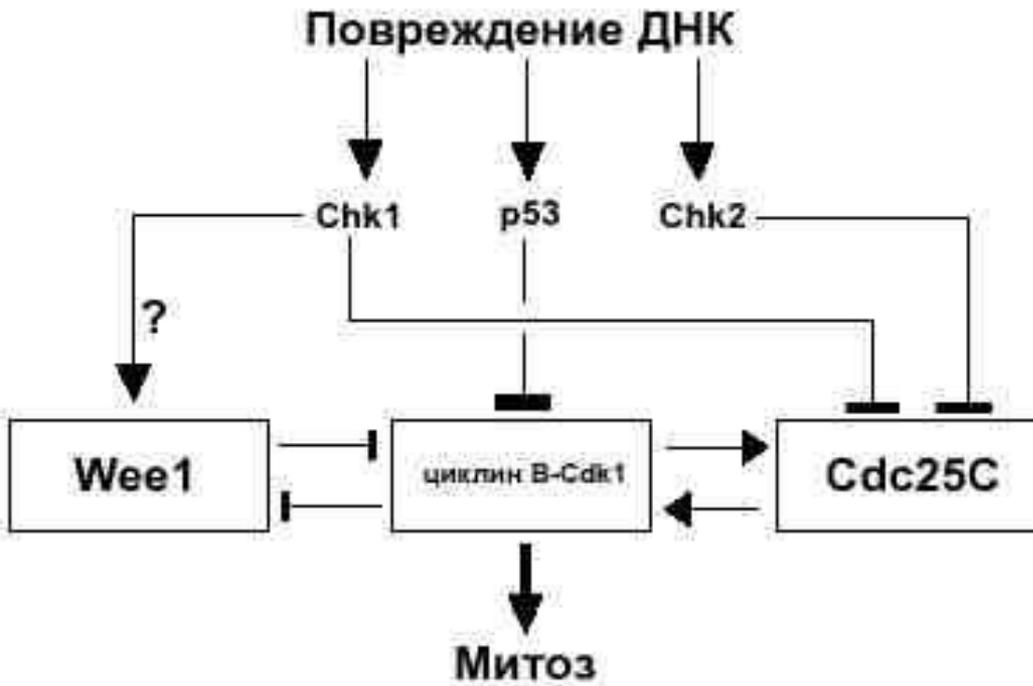
ATM=
the ataxiatelangiectasia
mutated kinase

Chk1, 2= the checkpoint
kinase 1, 2

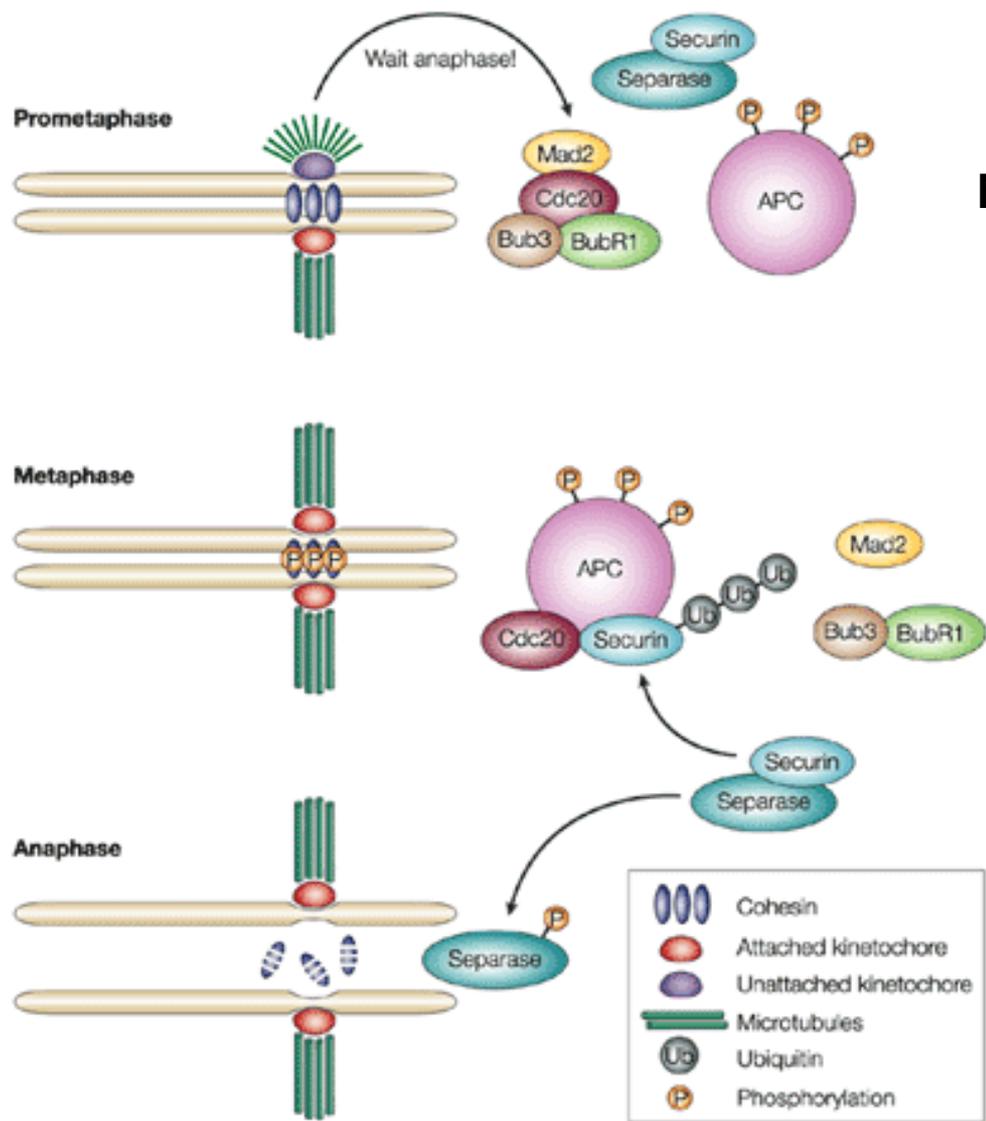


G1/S arrest G2/M arrest G1/S arrest apoptosis S delay DNA repair

Checkpoint целостности ДНК, завершенность репликации: G2/M



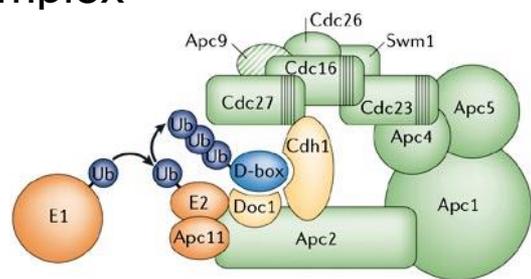
анафазный (кинетохорный) checkpoint: М-фаза



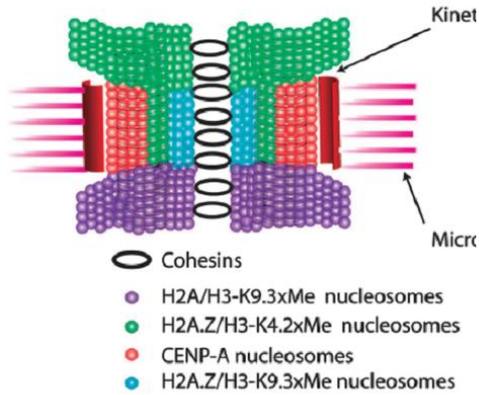
MAD – mitotic arrest deficient

BUB – budding uninhibited by benzimidazole

APC – anaphase promoting complex



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology



Greaves et al.
PNAS January 9, 2007

