

УДК 576.3:575.1:577.2

МИТОТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

© 2014 г. Л.В. Высоцкая

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия, e-mail: vysot@fen.nsu.ru

Поступила в редакцию 30 сентября 2013 г. Принята к публикации 1 февраля 2014 г.

ВВЕДЕНИЕ

С тех пор как появилось знаменитое утверждение Рудольфа Вирхова: «*Omnis cellula e cellula*» прошло уже более 150 лет. Мы много знаем о механизмах клеточного деления, но остается еще немало вопросов, требующих дальнейшего изучения. В настоящей статье будут кратко рассмотрены процессы клеточного цикла, включающие митоз, т. е. митотического цикла.

Объектами изучения митотического цикла являются самые разные организмы, прежде всего те, генетика которых хорошо изучена: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Schyzosaccharomyces pombe*, плесневый гриб *Aspergillus nidulans*, плодовая мушка *Drosophila melanogaster*. Многие важные данные получены в экспериментах с оплодотворенными ооцитами морского ежа *Arbacia punctulata* и лягушки

Xenopus laevis, а также на клетках млекопитающих *in vitro*. В последнее время активно используют мышей, у которых выключены те или иные гены. Данные, полученные на разных модельных системах, дополняют друг друга и демонстрируют, несмотря на некоторые различия, существенное сходство основных процессов митотического цикла и высокую гомологию многих участвующих в них белков.

СТАДИИ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Митотический цикл – цепь событий, которые происходят в клетках, размножающихся путем митоза.

Хотя события митотического цикла плавно перетекают одно в другое, тем не менее принято выделять различные стадии, которые морфологически или биохимически четко разграничены. Разделение на интерфазу и собственно деление возникло еще в XIX в., когда световая микроскопия была единственным методом изучения клеток, и связано с изменением состояния хроматина: если в интерфазе в ядре видна сплошная масса хроматина, то с началом митоза появляются видимые в световой микроскоп нитевидные хромосомы (отсюда и название этого типа деления: греч. *mitos* – нить). Появление в 1960-х годах методов автордиографии и цитофотометрии позволило обнаружить, что удвоение хромосом занимает только часть интерфазы – период от начала синтеза ДНК до его окончания называли синтетическим – S, а интервалы, отделяющие его от деления, – G₁ и G₂ (англ. *gap* – промежуток).

Митотический цикл принято изображать схемой, представленной на рис. 1, в которой

Митотический цикл – это цепь многочисленных процессов, которые последовательно сменяют друг друга и приводят клетку к митозу, в результате которого из одной материнской клетки получаются две дочерние, содержащие идентичный генетический материал. Все процессы митотического цикла скоординированы благодаря сложной многокомпонентной системе регуляции, осуществляющей включение/выключение очередных процессов. Эта система предусматривает остановку клетки в ее продвижении по митотическому циклу, если имеются повреждения ДНК или не завершены ключевые процессы. В системе регуляции заложена способность вызвать клеточную гибель в случае, если нарушения не исправляются.

буквой «М» обозначена стадия клеточного деления.

Длительность митотического цикла регулярно делящихся клеток обычно составляет около 24 часов. G_1 -период – самый продолжительный, на него может приходиться половина времени всего митотического цикла. S- и G_2 -периоды имеют примерно равную продолжительность. Митоз у животных с большим содержанием ДНК в геноме продолжается несколько часов, у млекопитающих – 1–1,5 часа. В раннем эмбриогенезе митотические циклы значительно более короткие и отличаются по относительной продолжительности различных периодов.

Если ДНК синтезируется только в S-периоде, то синтез РНК происходит в течение всей интерфазы, синтез белка – в течение всего митотического цикла, хотя во время деления его интенсивность составляет не более 25 % от уровня интерфазы (рис. 2). Понятно, что в разное время митотического цикла спектр синтезируемых РНК и белков должен различаться, что и наблюдается в действительности. Так, синтез гистонов идет только в S-периоде, белков конденсации хроматина – в G_2 -периоде и т. п.

Деление клетки состоит из деления ядра (митоз, или кариокинез) и разделения цитоплазмы (цитокинез, или цитотомия). Иногда термин «митоз» используется для обозначения деления клетки в целом и тогда в него включают стадию

цитокинеза. Митоз не всегда сопровождается цитокинезом, например при делении ядер в синцитиальной бластодерме насекомых.

Митоз – деление ядра (клетки), при котором каждое из дочерних ядер получает генетическую информацию, идентичную генетической информации материнской клетки.

Выделение отдельных стадий митоза в основном связано с их морфологическими характеристиками. *Профаза* – это конденсация хромосом и преобразование ядерной оболочки. Исчезновение ядерной оболочки знаменует переход к стадии *прометафазы*, во время которой хромосомы соединяются с микротрубочками веретена деления и после сложных движений выстраиваются в экваториальной плоскости клетки (этот процесс называют конгрессией хромосом). В *метафазе*, когда центромерные районы хромосом уже находятся в плоскости, равноудаленной от обоих полюсов, идет проверка правильности прикрепления кинетохоров. Разделение хроматид в центромерном районе означает переход к *анафазе*, во время которой происходит расхождение хромосом к полюсам. Наконец, в *телофазе*, которая начинается после образования ядерной оболочки, идет деконденсация хроматина, и ядро готовится к возобновлению транскрипции. Цитокинез обычно происходит во время телофазы.

Длительность отдельных стадий митоза варьирует в разных клетках и у разных видов, но в среднем профаза и телофаза равны по продолжительности и занимают 2/3 времени,

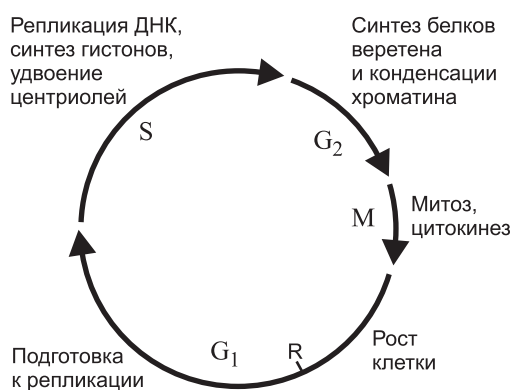


Рис. 1. Схематичное изображение клеточного цикла с кратким указанием основных событий, происходящих на разных стадиях.

R – точка рестрикции – время появления в плазматической мембране рецептора, способного воспринять сигнал, разрешающий деление.

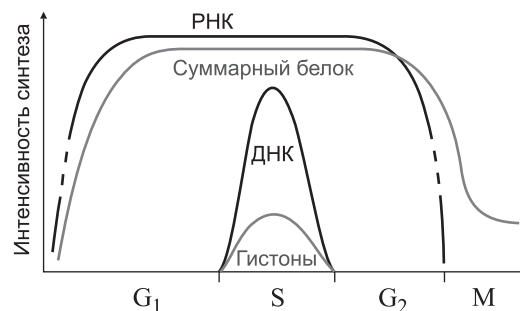


Рис. 2. Интенсивность репликации, транскрипции и трансляции на протяжении митотического цикла.

Если интенсивность синтеза РНК и ДНК измерять количеством встроенных нуклеотидов, то кривую синтеза РНК надо провести в 10–15 раз выше.

Конгрессия – сложные движения, которые выполняет митотическая хромосома от момента прикрепления к кинетохорным микротрубочкам до достижения экваториальной плоскости веретена.

оставшуюся 1/3 примерно пополам делят прометафаза и анафаза. Продолжительность метафазы составляет секунды.

Во время митоза клетка подвергается сложным морфологическим преобразованиям: меняется конденсация хроматина; перестраиваются клеточные компартменты и цитоскелет; формируются новые структуры (кинетохор на хромосомах и веретено деления); происходит движение хромосом; исчезает и вновь возникает ядерная оболочка. За всеми этими преобразованиями стоят молекулярные процессы, которые мы сейчас кратко рассмотрим.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ КЛЕТОК В МИТОЗЕ И ИХ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ

Конденсация хромосом

Нитевидные хромосомы, появление которых знаменует начало профазы, состоят из двух хроматид, находящихся на четвертом уровне упаковки (рис. 3).

Сестринские хроматиды связаны друг с другом комплексами белков, называемых *когезинами*. Основой этих комплексов являются белки семейства SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*), в частности SMC1 и SMC3. Кроме того, в когезиновый комплекс входят белки Scc1 и Scc3 (рис. 4). Считается, что связывание (когезия) сестринских хроматид происходит во время S-периода непосредственно в репликационной вилке, когда ДНК сестринских хроматид сближена. Когезины располагаются по длине хромосом на расстоянии не менее десятка т.п.н. друг от друга, связываясь преимущественно с АТ-богатыми районами ДНК. Существует две модели соединения хроматид. Одна предполагает, что когезиновый комплекс образует кольцо диаметром около 40 нм, которое может размыкаться при разъединении хроматид, другая объясняет связь хроматид поперечными когезиновыми сшивками.

В течение всей профазы происходит дальнейшая конденсация хромосом. Эта конденсация сопровождается фосфорилированием гистонов H1 и H3, появлением в хроматине

Когезия сестринских хроматид – соединение сестринских хроматид, обеспечиваемое белками комплекса когезин.

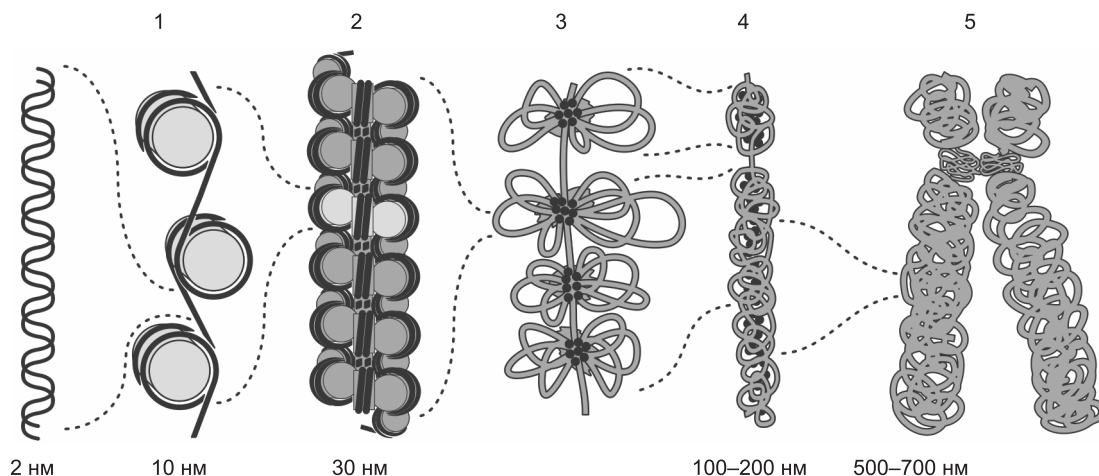


Рис. 3. Уровни упаковки хроматина.

Конденсация с 4-го до 5-го уровня происходит во время профазы.

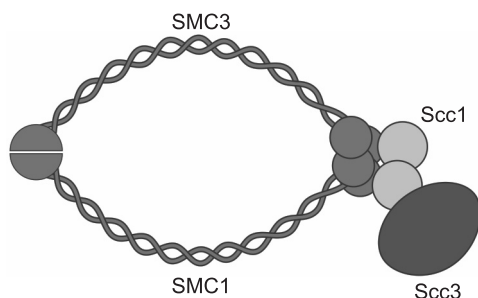


Рис. 4. Строение комплексов когезин.

многих новых белков и, в первую очередь, белков комплекса *конденсин* (рис. 5). В него также входят белки семейства SMC: SMC2, SMC4 и ряд дополнительных белков. Конденсин соединяется с хроматином в течение профазы и упаковывает его до состояния метафазной хромосомы. Эксперименты *in vitro* показывают, что в месте связывания конденсина с кольцевой ДНК образуются два витка спирали, при этом в свободной части молекулы возникает компенсаторная суперспирализация. Не исключено, что подобный механизм работает и при взаимодействии конденсина с профазным хроматином. Одновременно с конденсацией происходит постепенное высвобождение когезина из хромосомных плеч, так что к концу профазы его остается не более 5 % от того количества, которое было при вступлении клетки в митоз. Есть предположение, что конденсин конкурирует с когезином за места прикрепления и поэтому вытесняет его. Во всяком случае, иммунофлюоресцентное мечение выявляет конденсин в остовах метафазных хромосом.

Таким образом, каждая из сестринских хроматид конденсирует свои плечи независимо от другой, а их связь к концу профазы сохраняется только в области центромеры. Деконденсация хроматина происходит в телофазе после образования ядерной оболочки. Конденсин исчезает из хроматина, хромосома «разрыхляется», но объем, занимаемый ею, увеличивается незначительно.

Конденсин – комплекс белков, обеспечивающий конденсацию хроматина во время профазы митоза.

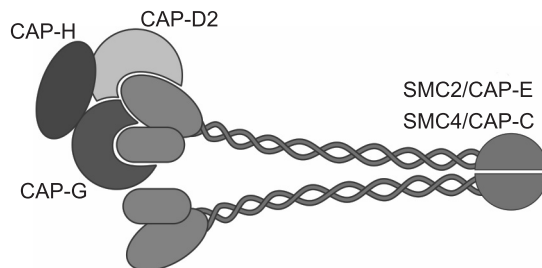


Рис. 5. Строение комплексов конденсин.

Ядрышко

Синтез рРНК, как и других РНК, прекращается к началу митоза, однако ядрышко сохраняется в течение всей профазы. Оно становится меньше по сравнению с интерфазным, уплотняется, его ультраструктура меняется: практически исчезает фибриллярная часть. В профазных преобразованиях ядрышка участвуют белки комплекса конденсин, которые появляются в районе ядрышкового организатора (ЯО) на границе G1/М стадий. С исчезновением ядерной оболочки ядрышко начинает распадаться. Часть белков ядрышка остается в области ЯО, и это позволяет обнаруживать функционирующие ЯО в метафазных хромосомах в виде аргентофильного материала в области вторичной перетяжки. Остальные компоненты распределяются по поверхности хромосом в виде мелких вкраплений, и хромосомы доставляют этих «пассажиров» в область формирования дочерних ядер.

В телофазе по мере разрыхления хроматина белки ядрышка объединяются и формируют мелкие ядрышки, число которых обычно совпадает с числом активных ЯО. С началом G₁-периода начинается синтез рРНК, объем ядрышек увеличивается, они сливаются друг с другом, поэтому в интерфазных ядрах наблюдают меньше ядрышек, чем хромосом с вторичными перетяжками.

Ядерная оболочка

У высших эукариот сегрегация хромосом в митозе происходит после исчезновения ядерной оболочки. В интерфазе у животных ядерная оболочка представлена внутренней и наружной мембраной, ядерными поровыми комплексами

(ЯПК), встроенными в участки, где наружная мембрана перетекает во внутреннюю. Внутреннюю мембрану ядерной оболочки подстилает белковая сеть (плотная пластинка, или ламина). У растений под внутренней мембраной также находятся структурные белки, выполняющие похожие функции, но они пока не изучены так подробно, как у животных.

Исчезновение ядерной оболочки – это сложный многоступенчатый процесс, во время которого все компоненты оболочки распадаются на мелкие фрагменты.

Поровые комплексы, представляющие собой сложные белковые комплексы, разбираются первыми. Уже в профазе сначала исчезают периферические структуры ЯПК, затем его центральная часть – транспортер, после этого в ядерной оболочке остается пустое отверстие. Затем исчезает плотная пластинка и мембрана распадается на мелкие пузырьки. Основой плотной пластинки являются ламины – белки, принадлежащие к одному из типов белков промежуточных филаментов (ПФ). Так же, как все белки, ПФ в дефосфорилированном состоянии обладают способностью к самосборке, цитоплазматические белки ПФ формируют длинные 10–12 нм нити, а ламины – плотную сеть. Фосфорилирование белков ПФ приводит к деполимеризации этих структур.

Ламины подразделяют на два типа: А и В. Ламины В-типа заякорены во внутренней мембране с помощью фарнезильной группировки, и эта связь устанавливается после их поступления в ядро и становится постоянной. Таким образом, в митозе, когда ядерная оболочка распадается на отдельные мелкие пузырьки, В-ламинаы остаются связанными с ними, в то время как ламины А-типа распределяются в цитозоле.

Следует отметить, что в цитоплазме в это время также происходят изменения, в частности происходит фрагментация протяженных мембранных структур, таких как аппарат Гольджи и эндоплазматическая сеть (ЭПС), на мелкие пузырьки.

Сборка ядерной оболочки начинается со слияния пузырьков и их прикрепления к хроматину. В этом процессе активную роль играют ламины. Их дефосфорилирование приводит к тому, что ламины А- и В-типа объединяются вокруг хроматина, формируя плотную плас-

тинку и сближая мембранные везикулы. Между близко расположенными пузырьками сразу же начинают собираться поровые комплексы. Так что, когда ядерная оболочка замыкается, ЯПК способны сразу начать работу. В формировании новой ядерной оболочки принимают участие не только пузырьки из мембран «бывшего» ядра, но и пузырьки из ЭПС.

В цитоплазме в течение телофазы также в результате дефосфорилирования ряда белков восстанавливаются цистерны ЭПС и аппарата Гольджи.

Кинетохоры

За прикрепление хромосом к микротрубочкам ответственны *кинетохоры*, которые образуются в районе центромеры. Центромерная ДНК отличается от теломерной ДНК большим межвидовым разнообразием. В ней часто обнаруживают повторы АТ-богатых некодирующих последовательностей, содержащих палиндромы. В отличие от теломерной, центромерная ДНК характеризуется разнообразием нуклеотидного состава не только у разных видов, но и у хромосом в пределах одного кариотипа. Только у *S. cerevisiae* центромеры всех хромосом близки по размерам и имеют сходный нуклеотидный состав ДНК. У других изученных видов центромерные ДНК разных хромосом набора могут значительно различаться. У человека центромеры содержат α -сателлитные ДНК последовательности длиной 171 п.н., объединенные в более крупные блоки, число которых варьирует от хромосомы к хромосоме. Предполагают, что главным для функционирования центромеры является не конкретный нуклеотидный состав ДНК, а та пространственная структура, которая позволяет присоединяться к ней уникальным «центромерным» белкам. Прежде всего, это центромерный вариант гистона H3, который у позвоночных называется CENP-A, CENP-C. Эти белки присутствуют в хроматине центромерного района в течение всего клеточного цикла и, очевидно, служат основой для присоединения других белков, формирующих кинетохоры. У позвоночных таких белков не менее 50, и в ходе клеточного цикла их набор в кинетохоре меняется. В частности, во время профазы–метафазы в кинетохоре находят кинезин-подобный белок

Кинезин-подобные белки – моторные белки, умеющие перемещаться вдоль микротрубочек обычно в направлении плюс-концов.

Кинетохоры – скопление специфических белков над центромерой. Хромосома образует два кинетохора, по одному на каждой хроматиде и ориентированные в противоположные стороны.

Кинетохорная микротрубочка – микротрубочка, минус-конец которой находится в центросоме, а плюс-конец взаимодействует с кинетохором хромосом.

CENP-E и комплекс белков Augora B, который в начале анафазы оказывается на микротрубочках, располагающихся в экваториальной области клетки.

Кинетохор начинает формироваться уже в профазе как сферическое скопление белков над центромерой. Хромосома образует два кинетохора, по одному на каждой хроматиде, ориентированных в противоположные стороны. После исчезновения ядерной оболочки и присоединения дополнительных белков кинетохор уплощается и в нем становятся отчетливо видны несколько слоев. Внутренний слой, или пластинка, содержит CENP-A и CENP-C. Наружная пластинка содержит различные моторные белки, способные двигаться по микротрубочкам. От наружной пластинки отходит сеть тонких фибрилл, которую принято называть *короной*. В ее состав также входят моторные белки, в том числе цитоплазматический динеин. Все части кинетохора взаимодействуют с хроматином, и кроме упомянутых в них находят много вспомогательных белков, одни из них стабилизируют микротрубочки, другие служат для их взаимодействия с хроматином и другими структурами.

Микротрубочки

Микротрубочки составляют основу митотического аппарата — веретено деления (ахроматиновое веретено), но у растений и у животных многие детали его формирования различаются. Это связано, прежде всего, с тем, что у животных на протяжении всего клеточного цикла существует органелла *центросома*. Перед

вступлением клетки в деление она удваивается, и дочерние центросомы формируют два полюса веретена. У растений два полюса веретена создаются только во время деления клетки, их структура и способ формирования иные.

Центросома в интерфазе животной клетки — это плотное белковое скопление диаметром около 1 мкм, в центре которого перпендикулярно друг к другу расположены две центриоли. Вокруг центриолей концентрируются белки, в том числе комплексы, в которые входит γ -тубулин. Именно эти комплексы (их называют *γ -тубулиновые кольцевые комплексы*) служат «затравкой» для образования микротрубочек. Микротрубочки в интерфазной клетке расположены так, что их минус-концы собраны в центросоме, а плюс-концы находятся на периферии клетки.

Микротрубочки являются динамичными структурами, т. е. они обладают способностью удлиняться или укорачиваться. Если минус-конец микротрубочки находится в матриксе центросомы, то изменение ее длины происходит только за счет плюс-конца; в случае, когда минус-конец высвобождается из матрикса центросомы, он также может укорачиваться. При необходимости клетка «умеет» стабилизировать концы микротрубочек.

В S-периоде две центриоли в центросоме немного отходят друг от друга, и перпендикулярно каждой из них начинают расти две новые центриоли. Накануне вступления в митоз в клетке находятся две пары центриолей, т. е. по сути, — две центросомы, но до начала митоза они функционируют как единая структура.

Вступление в митоз сопровождается полной разборкой интерфазных микротрубочек и появлением «самостоятельности» у двух существующих центросом. Каждая из них на-

Центросома — плотное скопление разнообразных белков, среди которых находятся γ -тубулиновые кольцевые комплексы, в центре которого перпендикулярно друг другу расположены две центриоли.

γ -тубулиновые кольцевые комплексы — расположенные в центросоме комплексы белков, в которые входит γ -тубулин. Являются началом образования микротрубочек.

чинает продуцировать микротрубочки и делает их в большем количестве и с более высокой скоростью, чем в интерфазе. Нестабильность митотических микротрубочек выражена гораздо сильнее, чем в интерфазе, т. е. они не только быстро возникают, но и быстро деполимеризуются, а на их месте возникают новые. Эти микротрубочки гораздо короче интерфазных, они растут из centrosом в разные стороны, их называют *астральными* микротрубочками. Микротрубочки, растущие от двух centrosом навстречу друг другу, захватываются моторными белками, которые начинают двигаться сразу по двум противоположно направленным микротрубочкам в направлении к их плюс-концам. С этого момента такие астральные микротрубочки превращаются в *межполюсные*. Они продолжают расти, при этом область их перекрывания остается постоянной, и в результате centrosомы отодвигаются друг от друга до тех пор, пока не окажутся на противоположных сторонах ядра.

У тех организмов, у которых ядерная оболочка разрушается задолго до образования двух полюсов, кроме моторных белков,двигающихся по антипараллельным микротрубочкам, работают моторные белки, связывающие астральные микротрубочки с плазматической мембраной. Они дополнительно тянут полюса в разные стороны.

После того как исчезает ядерная оболочка, астральные микротрубочки, быстро растущие в произвольном направлении и быстро деполимеризующиеся, как бы «зондируют» пространство бывшего ядра. Если такая микротрубочка захватывается цитоплазматическим динеином, который входит в состав короны кинетохора, то она стабилизируется и превращается в кинетохорную микротрубочку. После этого не важно, захвачена ли микротрубочка за плюс-конец или за боковую поверхность, цитоплазматический динеин, а следовательно, кинетохор, а за ним и хромосома начинают двигаться к ее минус-концу, т. е. к одному из полюсов. Так как при этом движении хромосома поворачивается этим кинетохором к полюсу, то с ней могут взаимодействовать другие микротрубочки, растущие от этого полюса, и раньше или позже кинетохор сестринской хроматиды захватит микротрубочки от противоположного полюса.

Астральные микротрубочки – микротрубочки, растущие в митозе во все стороны от centrosом.

Взаимодействие с белками кинетохора стабилизирует микротрубочки, причем установлено, что нить микротрубочки, соединившаяся с кинетохором не под прямым углом (что бывает, когда микротрубочки от одного полюса соединяются с кинетохорами разных хроматид или, наоборот, один кинетохор соединяется с микротрубочками от разных полюсов), оказывается нестабильной. Другими словами, кинетохор «умеет» оценивать степень натяжения кинетохорных нитей. В результате происходит «исправление» ошибок прикрепления. Таким образом, существует система, обеспечивающая правильное прикрепление хромосом к микротрубочкам веретена.

После того как кинетохоры правильно прикрепилась к полюсам, идет выравнивание хромосом в экваториальной плоскости клетки (конгрессия). Этот процесс зависит от способности кинетохорных микротрубочек к удлинению и укорачиванию. Короткие микротрубочки наращивают свою длину на плюс-конце, длинные укорачивают ее и с плюс- и с минус-концов. В этих процессах важную роль играет способность микротрубочек реагировать на силу натяжения, которая меняется, поскольку хромосомы находятся под действием противоположно направленных сил. Кинезин-подобные белки тянут их за кинетохор к полюсу, растущие астральные микротрубочки «отталкивают» их от полюса. Кроме того, существуют еще моторные белки, которые соединяются с плечами хромосом и, двигаясь по некинетохорным нитям, помогают перемещать хромосому к середине веретена. Результатом является такое положение хромосом, при котором силы, тянущие их к разным полюсам, были бы равны, т. е. на равном расстоянии от обоих полюсов.

Расхождение сестринских хроматид в анафазе происходит после исчезновения их связи в центромерном районе. Оно обеспечивается укорочением кинетохорных нитей, по которым движется к минус-концу динеин-подобный белок, «подъедающий» их плюс-конец, с од-

ной стороны, и в результате деполимеризации этих микротрубочек на минус-конце, с другой. Движение хромосом к полюсам (А-анафаза) – не единственная возможность «развести» хроматиды на значительное расстояние для успешного их попадания в разные ядра. Существует еще движение полюсов в сторону друг от друга (В-анафаза). Оно обеспечивается удлинением перекрывающихся межполюсных микротрубочек с активным участием астральных микротрубочек, которые своими плюс-концами взаимодействуют с динеинами, закрепленными на плазматической мембране за полюсами.

Особенности митоза растительных клеток, в первую очередь, связаны с отсутствием в них постоянно функционирующей centrosомы как центра, в котором собраны минус-концы всех микротрубочек. В интерфазной клетке растений большая часть микротрубочек расположена в кортикальном слое, меньшая часть отходит от ядра в направлении к периферии клетки. Есть основание считать, что минус-концы этих микротрубочек расположены рядом с поверхностью ядра или непосредственно на ней. Об этом свидетельствует выявление вблизи поверхности ядра γ -тубулина. Перед вступлением клеток в митоз кортикальные микротрубочки собираются в плотное кольцо. В этом процессе принимают участие и микрофиламенты. Радиальные микротрубочки, деполимеризованные в той или иной степени, располагаются вокруг ядра. Вначале профазы препрофазное кольцо микротрубочек деполимеризуется. В метафазном веретене микротрубочки ориентированы своими минус-концами к периферии клетки, т. е. за время профазы они меняют свою ориентацию

Препрофазное кольцо – структура, образующаяся в растительной клетке накануне митоза собирающимися в плоское кольцо кортикальными микротрубочками при участии микрофиламентов. Отмечает место, где пройдет граница между дочерними клетками.

практически на 180° . Механизм поворота еще не установлен, но возможно, что укорочение микротрубочек его облегчает. Как только исчезает ядерная оболочка, микротрубочки быстро полимеризуются, некоторые из них своими плюс-концами соединяются с кинетохорами хромосом, одновременно другие перекрываются плюс-концами друг с другом. Так возникают кинетохорные и межполюсные микротрубочки. Таким образом, их плюс-концы располагаются в области бывшего ядра, а минус-концы вначале направлены в разные стороны, затем выравниваются параллельно друг другу и, наконец, благодаря моторным белкам, которые перемещаются к минус-концам, собираются вместе, формируя полюса. Подобный процесс образования веретена без участия centrosомы описан для некоторых клеток животных, у которых отсутствуют centrosомы, его также наблюдали в условиях *in vitro*. По сравнению с животными клетками полюса в клетках растений более «рыхлые», в них практически отсутствуют астральные микротрубочки, соединяющие полюс с кортикальным слоем цитоплазмы и, возможно, плазматической мембраной.

Цитокинез

Механизмы цитокинеза животных и растительных клеток принципиально различны. Животные клетки делятся за счет сокращения актин-миозинового кольца, которое тесно связано с периферией клетки и формирует клеточную перетяжку в плоскости, перпендикулярной веретену деления. Активными участниками цитокинеза являются микротрубочки остаточного тельца, которые являются остатками перекрывающихся межполюсных микротрубочек.

Плазматическая мембрана дочерних растительных клеток и разделяющая их клеточная пластинка строятся из пузырьков, образующих-

А-анафаза – стадия, во время которой происходит укорочение кинетохорных микротрубочек и перемещение хромосом из экваториальной плоскости веретена к полюсам.

В-анафаза – стадия, во время которой полюса отодвигаются друг от друга за счет удлинения перекрывающихся межполюсных микротрубочек и движения плюс-концов астральных микротрубочек относительно плазматической мембраны в разные стороны от проекции centrosомы на плазматическую мембрану.

Остаточное тельце – пучок микротрубочек, который формируется в анафазе между расходящимися к полюсам хромосомами. Образуется на основе межполюсных микротрубочек веретена.

ся в аппарате Гольджи, начиная с центра клетки. Пузырьки направляются к месту формирования клеточной пластинки по микротрубочкам *фрагмопласта*. В начале цитокинеза фрагмопласт представляет собой пучок микротрубочек, расположенных между дочерними ядрами и перекрывающихся своими плюс-концами. По мере формирования клеточной пластинки центральные микротрубочки деполимеризуются и фрагмопласт принимает форму цилиндра. Интересно, что образование клеточной пластинки начинается перпендикулярно плоскости веретена, но если митотическое веретено формировалось в клетке не перпендикулярно плоскости препрофазного кольца, то в конце цитокинеза клеточная пластинка поворачивается и сливается со стенками материнской клетки в том месте, где располагалось препрофазное кольцо. То есть на плазматической мембране или в кортикальном слое цитоплазмы остаются какие-то метки, которые определяют место слияния. Определение плоскости деления цитоплазмы клеток у животных происходит в анафазе–телофазе, а у растений еще накануне митоза, в G_2 -периоде.

РЕГУЛЯЦИЯ И КОНТРОЛЬ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Множество событий, из которых складывается цикл деления клетки, хорошо скоординированы благодаря существованию сложной

Фрагмопласт – структура, сформированная в растительной клетке микротрубочками между образовавшимися в телофазе ядрами. Эти микротрубочки необходимы для транспорта мембранных пузырьков, поставляющих материал для строительства плазматической мембраны дочерних клеток и клеточной пластинки.

системы регуляции и контроля. Прежде всего, регулируется вступление клетки в деление. У одноклеточных организмов на частоту клеточных делений влияние оказывают внешние факторы, например, при недостатке питательных веществ клетки делятся реже и могут вообще прекратить размножение. У дрожжей такой клеточный ответ основан на чувствительности аденилатциклазы к уменьшению концентрации питательных веществ во внешней среде и снижению активности. В результате уменьшается концентрация цАМФ – внутриклеточного активатора протеинкиназы, которая фосфорилирует белок, приводящий клетки в состояние готовности к делению.

У многоклеточных организмов вступление в деление определяют не только благоприятные для клетки внешние условия, но и специальные сигнальные молекулы – ростовые факторы, или *митогены*, которые связываются с рецепторами на поверхности клеток-мишеней и запускают механизм митотического цикла. В отсутствие таких факторов клетки, находящиеся в G_1 -периоде, могут выйти из цикла и перейти в состояние покоя (стадия G_0). Это состояние может быть обратимым, и клетки могут, получив сигнал к делению, начать пролиферацию, могут дифференцироваться и потерять способность к делению, а могут вступить в апоптоз.

Взаимодействие ростового фактора с рецептором включает внутриклеточную систему регуляции пролиферации, которая основана на активации или инактивации белков путем процессов их фосфорилирования/дефосфорилирования, осуществляемых протеинкиназами/протеинфосфатазами.

Основными регуляторами митотического цикла являются CDK – циклин-зависимые киназы. Их активность проявляется только в комплексе с *циклинами*, концентрация которых меняется в ходе митотического цикла: разные циклины начинают синтезироваться в различ-

Митогены, ростовые факторы – внеклеточные сигнальные молекулы, стимулирующие клетки к делению, известно более 50. Обычно являются небольшими пептидами. Часто обладают широкой специфичностью.

Дефосфорилирование – процесс удаления фосфатных групп протеинфосфатазами.

Протеинкиназы – ферменты, фосфорилирующие белки, т. е. присоединяющие к аминокислотным остаткам тирозина, треонина или серина фосфатные группы. В результате фосфорилирования белок активируется или ингибируется.

Протеинфосфатазы – ферменты, дефосфорилирующие белки, в результате чего они активируются или инактивируются.

Циклины – белки, концентрация которых меняется в течение митотического цикла. Образуют комплексы с циклин-зависимыми киназами, которые являются главными переключателями процессов пролиферации.

ное время и могут подвергаться очень быстрой протеасомной деградации.

У дрожжей *S. pombe* есть единственная Cdk и один вид циклина. Предполагается, что за счет разной пороговой активности комплекса Cus-CDK регулируются переходы G_1/S и G_2/M . У *S. cerevisiae* – 9 циклинов, у человека – не менее 12. Наиболее изучены циклины, представленные на рис. 6. Циклины в основном обеспечивают субстратную, тканевую и даже внутриклеточную специфичность действия CDK. Например, некоторые циклины находятся только в ядре, другие – в центросоме и т. д. Один и тот же циклин может связываться с разными CDK и наоборот CDK могут взаимодействовать не с одним, а с двумя разными циклинами. Таким образом, создаются разные сочетания CDK-циклинов, что обеспечивает субстратную специфичность их действия и позволяет осуществлять тонкую регуляцию процессов митотического цикла.

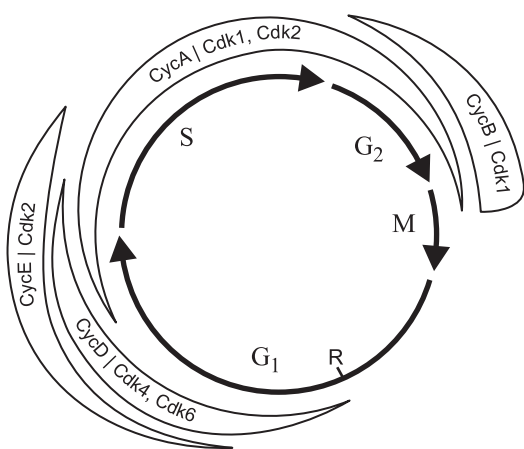


Рис. 6. Циклины и взаимодействующие с ними циклин-зависимые киназы в митотическом цикле.

Циклин D работает в G_1 -периоде и подготавливает переход в S-стадию. Его часто называют G_1 -циклином. Циклин E, или G_1/S -циклин, определяет начало синтетической стадии, его сменяет циклин A, который работает в S-периоде, поэтому иногда его называют S-циклином, но так как он же участвует в начальных событиях митоза, то его вместе с циклином B относят к митотическим (M-) циклинам.

Работа комплексов Cus-CDK дополняется существованием многочисленных «модификаторов»: активаторов и ингибиторов протеинкиназ и протеинфосфатаз, факторов, защищающих белки от деградации, с одной стороны, и факторов мобильной системы деградации «отработавших» белков, с другой, и т. д. Результатом их совместной работы является координация всех процессов, их быстрое переключение с одного на другой.

Синтез циклина D запускается после присоединения к рецептору на плазматической мембране сигнальной молекулы – фактора роста. Пока концентрация Cus D невысока, он не может присоединиться к Cdk, так как его место занято белком p16. Только когда концентрация CusD возрастает, он вытесняет p16 из Cdk. Образовавшиеся комплексы CusD-Cdk4/Cdk6 фосфорилируют белок Rb, который связывал фактор транскрипции E2F. Фосфорилированный Rb отсоединяется от E2F, и последний активирует транскрипцию ряда генов, в том числе циклина E, Cdk2, белков инициации репликации а также своего собственного. Уровень E2F повышается, а так как комплекс CusE-Cdk2 тоже фосфорилирует белок Rb и он не может связать E2F, то происходит многократное усиление транскрипции. Синтезируются белки, участвующие в репликации, и клетка преодолевает барьер G_1/S .

Подготовка к ключевому событию интерфазы – синтезу ДНК – начинается задолго до S-периода, в конце M-фазы и в G_1 -периоде,

когда в местах начала репликации собираются пререпликативные комплексы, состоящие из нескольких белков. Место сборки этих белков определяется свойствами хроматина, и в пререпликативный комплекс они встраиваются согласно строгой очередности. В последнюю очередь присоединяются белки МСМ (Mini-chromosome Maintanase). Пререпликативный комплекс может собраться только в условиях низкой активности СусА-Сdk2, так как образующие его белки при фосфорилировании теряют способность узнавать друг друга и соединяться вместе.

Пререпликативный комплекс является основой для посадки белков репликации. После их присоединения пререпликативный комплекс превращается в *реплисому* и клетка переходит из G₁- в S-период. В составе реплисомы остается МСМ, который работает в качестве геликазы. Повторно войти в состав пререпликативного комплекса и реплисомы МСМ сможет только после завершения деления. Таким образом, в митотическом цикле обеспечивается однократная репликация каждого репликона.

Если репликация завершена полностью, клетка переходит в G₂-период, в котором продолжает расти, и начинает подготовку к митозу.

Вход в митоз определяет активность комплекса СусВ-Сdk1. По мере синтеза циклин В связывается с Сdk1, но активность комплекса подавляется киназой Wee, которая фосфорилирует Сdk1 по тирозину в 15-м или треонину в 14-м положении. Для активации СусВ-Сdk1 необходимо дефосфорилирование, которое осуществляет протеинфосфатаза Сdc25. Активность этой фосфатазы, в свою очередь, контролируется киназами, отличными от CDK, называемыми Поло-киназами. Поло-киназа активирует Сdc25. Сdc25 активирует комплекс СусВ-Сdk1, который в свою очередь активирует Сdc25. В результате взрывообразно увеличивается активность комплекса СусВ-Сdk1 и клетка переключается на митотические процессы.

Комплекс СусА-Сdk1 продолжает работать на ранних этапах митоза, отвечая за конденсацию хроматина, формирование веретена. За разъединение сестринских хроматид отвечает одна из Поло-киназ, которая фосфорилирует белок Scc1 в когезиновых комплексах в плечах хромосом, в то время как связь сестринских

МСМ – кольцевой комплекс из 6 белков, участвует в образовании пререпликативного комплекса и в качестве геликазы работает в реплисоме.

Пререпликативный комплекс – комплекс белков, собирающийся в конце G₂-периода в местах начала репликации из поочередно соединяющихся белков, один из которых – белковый комплекс МСМ – является геликазой.

хроматид в центромерной области нарушается только при переходе метафаза/анафаза и отвечает за это СусВ-Сdk1.

Кроме Поло-киназ и CDK в митотическом цикле работают и другие протеинкиназы. Они обладают субстратной специфичностью, и нормальное прохождение клетки по митотическому циклу является результатом их слаженной совместной работы. Субстратами киназы В из семейства Аугоа, например, являются такие белки, как гистон H3, легкая цепь миозина, топоизомераза II α , кинезин, связанный с центромерным районом хромосом в митозе, виментин и десмин – белки промежуточных филаментов и др. Киназы Аугоа участвуют в конденсации хромосом и созревании кинетохора, в образовании веретена, в разделении сестринских хроматид в центромерном районе хромосом на границе метафаза/анафаза, а также в цитокинезе.

Переход метафаза/анафаза означает, по сути, выход клетки из митоза. К этому времени резко возрастает концентрация комплекса СусВ-Сdk1. Он активирует Аугоа А, В киназы и Поло-киназу, они, в свою очередь, активируют ряд белков, среди которых сложный белковый комплекс APC (Anaphase-Promoting Complex). APC узнает белки, подлежащие деградации. APC взаимодействует с белками, имеющими специальную метку – бокс деструкции, определенную последовательность из нескольких аминокислотных остатков, пришивает к ним цепочку из убиквитинов, которая, в свою очередь, является сигналом для протеасомы, разрушающей меченые белки. Результатом деятельности APC является разделение сестринских хроматид в центромерном районе, что означает наступление анафазы. В числе белков, меченных APC, находится циклин В. Он деградирует и Сdk1 прекращает работу. После этого

Протеасома – комплекс из нескольких белков, осуществляющий в цитозоле деградацию белков, помеченных либо присоединенными убиквитинами, либо специфическим фосфорилированием.

Точка рестрикции – время появления в плазматической мембране рецептора, способного воспринять сигнал, разрешающий деление.

Контрольные точки митотического цикла (checkpoints) – стадии митотического цикла, на которых клетка может останавливаться перед переходом к следующим процессам.

начинается дефосфорилирование белков под действием фосфатаз. Оно приводит к образованию ядерной оболочки, запуску цитокинеза. Клетка выходит из митоза и возвращается в интерфазное состояние.

Регуляция митотического цикла заключается не только в скоординированном включении очередных процессов, но и в контроле завершенности предыдущих процессов. На некоторых стадиях клетка может приостановить свое продвижение по клеточному циклу, если имеются нарушения каких-либо структур. Эти стадии получили название точек контроля. Клетка «останавливается»: в G_1 -периоде – в случае повреждения ДНК; в S -периоде – при неполной репликации ДНК; накануне митоза в G_2 -периоде – при нарушении целостности ДНК и на границе метафаза/анафаза – если обнаружены неприкрепившиеся к веретену кинетохоры. К таким кинетохорам прикрепляется белок, который одновременно соединяется с комплексом APC и инактивирует его. Разделение сестринских хроматид не происходит, и анафаза не наступает до тех пор, пока не установится правильное взаимодействие кинетохоров с веретеном и не активируется APC.

Контроль за движением по клеточному циклу при повреждении ДНК базируется в основном на способности ряда белков взаимодействовать с поврежденной ДНК. Например, чтобы остановить митотический цикл на границе G_1 - S , необходимо ингибировать комплекс Cdk2-CycE. Таким ингибитором является белок P21, но его в клетке нет, пока нет повреждения ДНК. Как только происходит повреждение ДНК, к местам разрывов присоединяется белок 9-1-1, который привлекает сюда киназы ATR/ATM. Они активируются и фосфорилируют киназы

Chk1 и Chk2, которые в свою очередь фосфорилируют белок P53. В норме P53 быстро деградирует, но в результате фосфорилирования он становится устойчивым и накапливается в ядре. P53 является фактором транскрипции ряда генов, в том числе гена белка P21. Этот ген транскрибируется и синтезируется белок P21, который ингибирует комплекс Cdk2-CycE. Как следствие, S -фаза не наступает.

К сожалению, в короткой статье невозможно описать все примеры взаимодействия белков в реализации процессов митотического цикла. Они многочисленны и отличаются тканевым и межвидовым разнообразием. И хотя молекулярные основы процессов пролиферации являются предметом изучения во многих научных лабораториях мира, область наших знаний остается несоизмеримо малой по сравнению с тем, что пока не известно. Тем не менее всем понятно, насколько актуальной является задача исследования организации и регуляции клеточного деления – процесса, играющего главную роль в жизни всех организмов, и человека в том числе.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Гусаченко А.М. Курс лекций «Генетика клеточного цикла» // Сайт ФЕН НГУ. <http://fen.nsu.ru/posob/gkc/gkc-1.pdf> – gkc-7.pdf
- Клетки / Под. ред. Б. Льюина, Л. Кассимериса, В.П. Лингаппы, Д. Плоппера. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. 952 с.
- Омельянчук Л.В., Федорова С.А. Основные события клеточного цикла: их регуляция и организация. Новосибирск: НГУ, 2010. 47 с.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. *et al.* Molecular Biology of the Cell. N.Y.: Garland Science, 2007. 1392 p.