

Регулация на еукариотния клетъчен цикъл. Програмирана клетъчна смърт

Клетъчният цикъл е поредица от координирани явления. Клетката достига до определен размер – дели се и така се осъществява приемствеността между клетките (според Вирхоф). Периодът от време, през който една клетка синтезира ДНК (S-фаза), натрупва и биосинтезира белтъци (за изравняване на съотношението ДНК / белтък) и включването на сигнални механизми, определящи деленето (M-фаза) обхваща един клетъчен цикъл.

Има две междинни фази:  $G_1$  и  $G_2$ , които не са застъпени във всички клетки. Някои клетки, които са крайно диференцирани, не се делят – те се намират във фаза G

0  
.

Клетъчен цикъл при Proc и Euc

Proc клетка представлява цял организъм, ето защо има разлика в процесите. Euc клетки са части, влизащи в състава на тъкани и органи. Жизненият цикъл на Proc е по-малък от 90 min. Просто устроените Euc (*Saccharomyces*) също имат кратък жизнен цикъл - ~ 90 min. При човек една клетка се дели за ~ 24 h. Вътрешното разпределение на фазите е следното:

1. M-фаза – (30 min – 1 h).
2.  $G_1$  ~ (9 h).
3. S ~ (10 h).
4.  $G_2$  ~ (4,5 h).

Контролът на Euc клетъчен цикъл е многоетапен процес. Ето защо се използват модели за неговия анализ:

1. *Saccharomyces* – *Schizosaccharomyces pombe* и *S cerevisiae*. Техният геном е малък

(Sacch / човешки геном ~ 1%); Дрождите съществуват дълго време в хоплоидно състояние и пъпкуват в тази форма – всеки ген е представен в едно копие и при селекция на мутанти, лесно се вижда дали има промяната в гена, защото тя има фенотипна проява, която се отразява върху клетъчния цикъл. Гените, които се манипулират по някакъв механизъм и чието повлияване води до дефекти в клетъчния цикъл, се нарича cdc (cell division cycle) гени.

С този модел е доказано, че температурно-чувствителните мутации имат отношение към клетъчния цикъл: при висока температура клетките не се делят, а при ниска – се делят. Температура, при която клетките се делят, се нар. пермисивна, а тази, при която не се делят – рестриктивна температура (при нея Sacch спират да пъпкуват).

2. Xenopus (туй е жаба :-)) – при тях по-добре личат БХ промени в клетъчния цикъл — неоплодените яйца нарастват много, т.к. се синтезират много белтъци, но при оплождане има увеличен синтез на ДНК в сравнение с този на белтъците. Процесът на делене протича много бързо, защото не се чака да се синтезират белтъци. За 7 h делене на оплодените клетки, се получават  $2^{12}$  клетки. Този модел позволява морфологично наблюдение.

3. Клетъчни култури – за определяне на фазата се използват: 1) -радиоактивни предшественици – например тимидин, белязан с  $^3\text{H}$  – открива се с авторадиография – изследва се скоростта на внасяне и делене на клетката; 2) предшественик с Br – dU – спецична база, срещу която може да се получат Ab – използва се за определяне за колко време преминава клетката през клетъчния цикъл.

4. Неопластично трансформирани животински култури – делят се много дълго време, но такава делене е патология, а не е нормален клетъчен цикъл. Това е модел, който визуализира БХ механизми на процесите, които се ползват за клетъчно делене. При нетрансформирани животински култури животът е ограничен (не са безсмъртни), дори и в присъствие на цитокини и левцини (защото всяка една клетка съществува винаги под въздействие на вътреклетъчни и извънклетъчни сигнали).

## Компоненти на контролната система на клетъчния цикъл

1. Всеки един цикъл трябва да има “часовник” – за колко време за една клетка минава

периодът на клетъчния цикъл.

2. Тези явления трябва винаги да са еднопосочни ( $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow G_0$ ).

3. Контрол за защита при аварии (дефекти, промени) – механизми, които да се противопоставят на тези промени.

4. Механизъм за адаптивност на клетката, съобразно екстрацелуларни и интрацелуларни сигнали.

В еволюцията се е утвърдила консервативност в начина на делене – именно в местата за проверка, наречени check points, в които се проверява, дали състоянието на клетката съответства на фазата, в която се намира, и какво трябва да се промени, за да върви клетката еднопосочно.

Важни check points (между две фази или малко преди самия преход) за еднопосочността и синхронът са проверките дали двете дъщерни клетки покриват всички изисквания и дали има време за поправки, допълнителни реакции и т.н.

За да започне клетката да се дели (в S фаза), да започне репликацията, трябва до края на  $G_1$ -фазата да се знае, дали са подходящи условията за процесите. На края на  $G_1$  е check point 1, който проверява наличните dNTP, ензими, белтъци – тогава чак репликацията може да започне.

Преминава се през S фаза, но за да може репликация  $\rightarrow$  ТРК  $\rightarrow$  ТРЛ да вървят еднопосочно, в началото на  $G_2$  фазата, преди митоза, се намира check point 2 – проверка дали ДНК е удвоена, достатъчно ли е съотношението ДНК / RNA, белтъци и т.н.

Check point 3 е преди  $G_1$  фазата – тук се проверява дали двете клетки са еднакви,

разпределението на хромозомите, хроматиди, хистонови и нехистонови белтъци и дали двете дъщерни клетки са подготвени.

Най-често сигналите, които действат в контролните пунктове са вътреклетъчни негативни сигнали – не се позволява преминаване от една в друга фаза, без да са се извършели всички необходими явления.

Циклините са най-важните регулатори на КЦ. След като е изпълнил каталитичната си функция, циклинът се подлага на разграждане чрез Ubq-ране, а с Ubq са свързани лигази и този комплекс осъществява протеолитична атака върху циклина и каталитичната му активност се инхибира. В повечето Euc има 4 класа циклини:

1. Клас 1 – характерни за  $G_1$  фазата и част от S фазата – в края на  $G_1$  се свързва с циклин-зависимата протеинкиназа и се подготвя процеса на репликация.
2. Клас 2 – за S фазата – за началото на репликацията.

Тези два класа свързват един тип протеинкинази cdk.

3. Клас 3 – M-циклини – характерни за фазата на делене.
4. Клас 4 – за  $G_2$  фазата (късна фаза на растеж).

В по-просто устроените клетки (Sacch) има по-малко циклини (1 – 2 кинази, работещи с 1 – 2 циклина). Функционалната активност на циклините е активиране на протеинкиназата и насочването и към съответния субстрат.

Контролът на клетъчния цикъл става с циклин-зависими протеинкинази (cdk), които се

активират циклично – осъществява се фосфолиране с циклична зависимост (в определен етап от цикъла). Те са хетеродимери – циклинът и протеинкиназата отделно са неактивни. Циклинът е характерен за точно определена фаза – синтезира се и се свързва с протеинкиназата и в тази форма има фосфорилираща активност. Променя се конформацията на ензима – свързва се с АТР и се активира център с протеинкиназна активност. Пространствената организация на протеинкиназата (cdk) е такава, че има закрит АЦ, а при поява на циклин, се образува Т - луп (много голям конформационен преход), осъществява се фосфорилиране (по-малка промяна в конформацията) и така вече може да се свърже със съответния циклин.

Циклините не само активират cdk, но и насочват cdk към съответния субстрат. Субстратите се свързват с комплекса циклин-киназа. Някои субстрати могат да са чувствителни в определен момент от цикъла, а в друг момент – по-малко чувствителни.

Активността на cdk се изразява във фосфорилиране на субстрати, което ги активира.

1. Ефекторните, инхибиращи фактори, които увеличават или намаляват активността на cdk. Участват два белтъка: 1. протеинкиназа Wee 1 и 2. фосфотаза cdc 25 (cell division cycle). При висока експресия на Wee 1, последният осъществява фосфорилиране по втори Tyr-остатък на активната cdk. Така има две фосфорилирани места, което инхибира активността му (двата Tyr-остатък са близо един до друг). За да се прекрати отрицателния контрол, става дефосфорилиране на втория Tyr-остатък на ензима с участие на cdc 25. Така се увеличава на активността на cdk.

2. Взаимодействие на cdk с киназен инхибитор;

3. Ограничена протеолиза – трябва да се хидролизира циклина от АЦ на cdk като тук участва ензим - убиквитин лигаза (Ubq – лигаза).

В клетките има SCF комплекс, който е постоянно активиран. Този комплекс въздейства върху инхибиторен белтък, който се фосфорилира от киназа. Така инхибиторът е прицелен за SCF комплекса. Заедно с E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> комплекса, Ubq-лигазата закача Ubq към прицелен субстрат, който може да е циклин. По този начин на регулация SCF белтъкът предизвиква Ubq-ра не по време на M фазата.

Друг начин за контрол на протеолизата е с участие на APC белтък, който е в неактивна форма. Активира се като се свърже с Cdc 20 и се образува активиран комплекс. В края на М фазата се образува именно този комплекс и той също осъществява Ubq на субстрат.

Този контрол се осъществява с налични в клетката белтъчни комплекси, но контролът може да става и с промени в експресията на гени. При интензивна ТРК на циклините, има и повече протеинкинази.

### Вътреклетъчен контрол

1. S-фаза – повече се знае за контрола при еднократна репликация. Комплексът S фазов циклин и съответната cdk иницира еднократно процеса на репликация. В началото на репликацията върху OriC (Proc) се образува origin recognition complex ORC – комплекс, свързан с OriC. Това е start сигнал за репликацията. След това свързване с Ori, нивото на един Cdc 6 белтъка се увеличава, и cdc 6 се свързва с комплекса на oriC. Това е сигнал за взаимодействие с Mcm белтъци (много копия). Вече свързани, те определят навлизането на клетката в S фазата, циклинът на S фазата се свързва с cdk, cdk фосфорилира cdc6 – той се инактивира и деградира, което позволява репликацията да започне. Свързаната cdk-циклин пречи на повторна инициация (реасемблиране) на репликационния комплекс.

2. След S фаза следва М фаза с участие на М циклини (или още В циклини). Те са най-много в клетката. Регулацията може да е: 1. инхибиране на деградиране или; 2. висок ТРК на М циклини и висока концентрация на cdk за тяхното свързване. Комплексът циклин – cdk може повторно да се фосфорилира с Wee 1 или дефосфорилира от Cdc 25. Комплексът циклин - cdk (M) може да активира собствения си активатор – Cdc 25 по пътя на обратната връзка.

За да се влезе в М-фаза, трябва да се докаже завършената репликация на ДНК, иначе има отрицателен сигнал. Вече в М фаза, комплексът М-циклин – cdk има няколко функции:

1. Подготовка на хромозомите за разделяне.
2. Кондензиране на хроматина.
3. Разграждане на ядрената мембрана.

4. Поява на митотично вретено.
5. Реаранжиране на активния цитоскелет.
6. Реаранжиране на АГ и ЕПР.

Това става с участието на белтъци, активирани от този комплекс. Фосфорилирането на базалната ламинина я деполимеризира. Има и кондензинов комплекс, който кондензира ХЗ. Той се фосфорилира от М-cdk. Последният има афинитет към различни конформационни състояния на ДНК и индуцира конформационни промени в нея и преход от М-фаза в анафаза.

Разделянето на сестринските хроматиди става чрез претеолиза с участието на комплекса APC, активиран от Cdc 20 и чрез Ubq-лигазна активност. Така се регулират белтъци на митозата, например конхензиновия комплекс, поддържащ сестринските хроматиди. Белтъкът сепараза в неактивно състояние е в комплекс с белтък – секурин. След края на митозата, APC комплексът атакува секурин чрез Ubq, сепаразата се активира и атакува конхензиновия комплекс като хроматидите се разделят .

Определяне състоянието на кинетохората – ако не е правилно свързвана с нишките на делителното вретено, се наблюдава отрицателен ефект – не се образува APC - cdc 20. Тук участват няколко белтъка. Този механизъм е характерен за Euc.

Излизане от митозата – става с деградация на М-циклина.

## Контрол на клетъчен цикъл – растеж

Ако клетъчният цикъл протича бързо – клетките са малки, но с помощта на екстрацелуларни сигнали (Sacch) – например с циклин 3, достигаш до определена концентрация, се стимулира деленето. Циклин 3 може да се свърже в комплекс с ДНК или с белтък, свързан с ДНК. Ако той остане в излишък – няма място за свързване с ДНК, клетката се дели.

Програмирана клетъчна смърт (апоптоза)

Това е нормално явление, защото повредените клетки могат да се отстранят без да се увредят други клетки. Много клетки загиват през индивидуалното развитие. Апоптозата се активира чрез вътреклетъчна циклична каскада. Ензимите се нар. каспази и се синтезират в неактивна форма, нар. прокаспази, а се активират като зимогени (по протеолитичен път) като се получава голяма и малка СЕ. Това е амплифицираща се каскада – активира се първата каспаза – тя втората и т.н. Последните каспази атакуват ламинина и други белтъци, активиращи ДНК-ases. Тези ензими имат необратим ход. Прокаспазите са активират от адапторни белтъци. Като голяма и малка СЕ взаимодействат с тези белтъци може да се осъществи протеолитична атака към различни субстрати.

- цитотоксични Т-лимфоцити – върху мембраната си имат белтък – Fass L (лиганд), а прицелните за тях клетки имат Fass - R (за Fas-лиганда) – при образуването на комплекс с адапторния белтък, каспазите агрегират и се активират чрез протеолиза.

- чрез cysC - при увреждане на кетките, cysc се пропуска повече през мембраната на МТХ. Адапторният белтък в цитоплазмата образува комплекс с cysc, но се свързва и с прокаспазата, като я активира.

Чрез белтъци на апоптазата става деградиране на ДНК и на белтъци. Белтъците на апоптазата активно отстраняват клетките, но ако има дисбаланс в тяхната активност, настъпва канцерогенеза.

1. Белтък р53 – той е активатор на ТРК на гени, кодиращи белтъци, подпомагащи освобождаването на cysc от МТХ. При повреда в клетката, р53 активира ТРК на гените, което освобождава cysC и се предизвиква апоптоза.

2. BCL2 и ТАР – те са основни вътреклетъчни регулатори. При увеличаване нивото на BCL2 и другите белтъци от това семейство се инхибира апоптозата. В BCL2-семейството някои белтъци са инхибитори, а други активатори, а от баланса между тях се определя ефекта им като се повлиява нивото на cysC.

3. Инхибитори на апоптозните белтъци – открити при *vir* по насекоми. Като се инхибира апоптозата, *vir* започва развитието си в клетката. Активността им зависи от



екстрацелуларни сигнали (от околните клетки).