

ОСНОВНЫЕ СОБЫТИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, ИХ РЕГУЛЯЦИЯ И ОРГАНИЗАЦИЯ

© 2004 г. Л. В. Омелянчук, С. А. Трунова, Л. И. Лебедева, С. А. Федорова

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск 630090;
факс: (3832)33-12-78; e-mail:ome@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 26.11.2002 г.
Окончательный вариант получен 28.08.03

В обзоре суммированы результаты изучения молекулярно-генетических механизмов контроля клеточного цикла на различных эукариотических моделях. Рассмотрены основные феномены клеточного цикла: 1) точки контроля и их роль в поддержании целостности ДНК и точности митоза; 2) модель клеточного осциллятора; 3) роль циклинов во временной регуляции деления клетки и координации событий митоза. Проведено подробное рассмотрение основных классов регуляторных белков, участвующих в цикле.

1. ВВЕДЕНИЕ

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 предметом многих исследований на протяжении последних двух столетий. Этот процесс был открыт в конце 70-х годов XIX в. одновременно Страсбургером на клетках растений [2] и Флеммингом на клетках животных [3]. 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 полюсов 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” [4].

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) [1]. 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) [5].

Систематическое изучение молекулярно-генетических основ клеточного цикла началось с середины 70-х годов XX в. 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 *Schizosaccharomyces pombe* и *Saccharomyces cerevisiae*. Так как ключевые белки клеточного цикла эволюционно консервативны, то результаты, полученные на

Таблица 1. Поведение ядер после попарного слияния клеток, находившихся в фазах G1, S, G2, M

	G1	S	G2	M
G1		X	Z	M
S			Y	M
G2				M
M				

Примечание. Символ М означает доминирование митоза над другими фазами; X, Y и Z – случаи более сложного поведения.

дрожжах (с некоторыми ограничениями), существенны для всех эукариот.

Цель настоящей работы – описание генов и их продуктов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла у эукариот, и молекулярных механизмов реализации основных феноменов клеточного цикла. Детально регуляция цикла изучена на посттрансляционном уровне, регуляция на транскрипционном уровне подробно исследована пока только для перехода G1–S и S-стадии, что и отражено в нашем обзоре. При этом мы практически оставили вне рамок настоящего обзора роль сигналов индукции и ингибирования пролиферации, получаемых клеткой извне, и внутриклеточные мишени действия этих сигналов, поскольку это отдельный и во многом более сложный вопрос. В связи с этим в настоящем обзоре не рассмотрены вопросы о программах пролиферации и морфогенеза, роли границ компартментов в регуляции пролиферации и регенерации тканей, молекулярной природе онкогенов и тумор-супрессоров. Механизмы регуляции собственно митоза высших эукариот: конденсации хромосом, формирования кинетохора, построения и функционирования митотического аппарата будут рассмотрены в следующем обзоре.

2. КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И ГЕТЕРОКАРИОНЫ

Разработка методики синхронизации клеточных делений и слияния протопластов, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, позволила открыть явление доминирования стадий клеточного цикла [6]. При слиянии делившейся клетки с клеткой, находившейся на любой стадии интерфазы у млекопитающих (G1, S, или G2), интерфазное ядро переходило в митоз (стадию М) (табл. 1). Для объяснения этого феномена было высказано предположение о существовании особого активного фактора, способного индуцировать митоз на любой стадии клеточного цикла. Действительно, такой фактор впоследствии был обнаружен (см. раздел 3). Более сложным было поведение ядер в клетке Х, получившейся в результате слияния клеток, находившихся на стади-

ях S и G1. После такого слияния S-фазное ядро продолжало клеточный цикл и затем останавливалось в точке перехода G2–М, а в ядре, находившемся в G1 фазе, начинался синтез ДНК. Далее это ядро проходило стадии S и G2 и оба ядра одновременно вступали в стадию М. Такое поведение клеток объяснимо, если предположить, что существуют особые точки клеточного цикла, на которых осуществляется контроль завершенности процессов подготовки к митозу (см. раздел 9). Клетки, в которых к моменту слияния одно из ядер не закончило стадию G2, останавливаются в точке G2–М до момента, когда в обоих ядрах закончится подготовка к митозу. Переход разрешается, если оба ядра готовы перейти на следующую стадию одновременно. Механизм, лежащий в основе такого поведения, рассмотрен в разделе “Точки контроля клеточного цикла”.

Рассматриваемое поведение клеток, помимо торможения в особых точках, имеет еще один существенный аспект. Тот факт, что в одном из ядер имела место репликация ДНК, свидетельствует о наличии фактора (факторов) репликации ДНК в цитоплазме гетерокариона. Возникает вопрос – почему этот фактор не активирует повторную репликацию ДНК в ядре, которое уже претерпело один цикл репликации ДНК до слияния и в момент слияния находилось в стадии G2? Какие условия являются необходимыми для репликации ДНК? Механизм блокирования ре-репликации рассмотрен в разделе “Контроль репликации ДНК”.

В клетке Y, получившейся в результате слияния клеток на стадиях G2 и S, ядро, находившееся в фазе G2, останавливалось в точке перехода G2–М, ожидая, пока второе, S-фазное ядро закончит репликацию ДНК и достигнет этой стадии. Далее оба ядра одновременно переходили в митоз. Таким образом, оба феномена: “точка контроля” и блокирование ре-репликации – наблюдаются и в этом случае. При слиянии клеток, находившихся на стадиях G1 и G2, ядро G1 реплицировалось нормально, а ядро G2 “ожидало” в переходе G2–М окончания репликации ДНК первого ядра.

3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ MPF

В норме мейоз в ооцитах лягушки протекает следующим образом: гормон прогестерон активирует переход ранних ооцитов в мейоз 1. Дальнейшие мейотические события завершаются блокированием клеточного цикла в метафазе мейоза 2. После оплодотворения это блокирование снимается, происходят кариогамия (слияние материнского и отцовского пронуклеусов) и затем зиготические деления. Были выполнены эксперименты по микроинъекционному переносу цитоплазмы ооцитов, естественным путем блокированных в метафазе мейоза 2, в ранние ооциты, еще не прошедшие индукцию прогестероном [1]. Оказалось,

Таблица 2. Классификация *cdc*-мутаций *Sch. pombe* по стадии проявления в клеточном цикле [16] и биохимическая функция продуктов соответствующих генов

Фаза клеточного цикла	<i>cdc</i> -мутации <i>Sch. pombe</i>
G1–S	<i>cdc2</i> (протеинкиназный партнер циклина), <i>cdc10</i>
S	<i>cdc17</i> (ДНК-лигаза), <i>cdc18</i> , <i>cdc19</i> (разрешающий фактор репликации), <i>cdc20</i> (ДНК-полимераза ϵ , субъединица A), <i>cdc21</i> (гомологичный белок человека – компонент разрешающего фактора МСМ4), <i>cdc22</i> (большая субъединица рибонуклеотидредуктазы), <i>cdc23</i> , <i>cdc24</i>
G2	<i>cdc6</i>
G2–M	<i>cdc1</i> (ДНК полимеразы δ , субъединица 3), <i>cdc2</i> , <i>cdc13</i> (G2–М циклин), <i>cdc25</i> , <i>cdc27</i> (ДНК-полимераза δ , субъединица 2), <i>cdc28</i> (предполагаемая АТФ-зависимая РНК-геликаза)
Цитокинез	<i>cdc3</i> (профилин), <i>cdc4</i> (легкая цепь миозина), <i>cdc7</i> (серин-треонин протеинкиназа), <i>cdc8</i> (тропомиозин), <i>cdc11</i> , <i>cdc12</i> (белок, взаимодействующий с профилином), <i>cdc14</i> , <i>cdc15</i> (белок, ассоциированный с кольцом актина), <i>cdc16</i>

что в результате рассматриваемой микроинъекции ооциты преодолевали стадии мейоза вплоть до метафазы мейоза 2 без действия прогестерона. Эти результаты были интерпретированы как свидетельство существования фактора созревания ооцитов, названного MPF (maturation promoting factor), который доминантным образом вызывает вступление ооцитов в мейоз [7]. Анализ изменения активности MPF с течением времени также показал, что пик активности всегда приходится на начало митоза [8].

Методика клеточных экстрактов, разработанная для ооцитов морского ежа и лягушки, дала возможность выделить чистый белок, обладающий функциями MPF [9]. Мажорную часть MPF составляет белковый комплекс из двух субъединиц – 32 и 45 кДа. Компонент 32 кДа узнавался антителами к консервативной части уже известного к тому времени Cdc2 *Sch. pombe*. Второй компонент был позднее идентифицирован как *cyclin B1* [10]. К настоящему времени известен целый класс белков, названных циклинами, которые периодически синтезируются и распадаются в клеточном цикле [11].

4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ CDC-ГЕНОВ У ДРОЖЖЕЙ

Базой для современного развития клеточной биологии является формальный генетический подход, реализованный на дрожжах [12]. В целом успех этого направления был основан на удобстве генетического объекта (наличие гаплоидных штаммов у дрожжей позволяет проводить отбор среди примерно 10^6 индивидуумов, тогда как для других эукариот этот параметр существенно ниже и составляет 10^4). Отсутствие хорошо видимых хромосом у этих объектов не мешало проведению исследований, так как генетический анализ проводили, оценивая размер клеток (раз-

мер почки у *S. cerevisiae* и размер дочерней клетки у *Sch. pombe*). Были выявлены две группы температурочувствительных мутаций: мутации, тормозящие клеточный цикл на той стадии развития, на которой применяется тепловая обработка (т.е. на любой стадии); и мутации, тормозящие клеточный цикл только на определенной его стадии. Ясно, что первый класс состоит из мутаций генов “домашнего хозяйства”. Вторая группа – стадиоспецифические мутации, названные *cdc*-мутациями (*cell division cycle mutations*), – оказалась превосходной моделью для выяснения механизмов регуляции клеточного цикла.

В табл. 2 приведены сведения о некоторых *cdc*-мутациях, идентифицированных у *Sch. pombe*. У *S. cerevisiae* мутации по фазам действия распадаются на аналогичные группы. Представленность мутаций с различными фазами действия отражает относительную генетическую “сложность” рассматриваемых процессов. Некоторые гены контролируют несколько фаз клеточного цикла – например, ген *cdc2* участвует в контроле входа в S-фазу и перехода G2–М. Фенотипически мутация гена *cdc2* проявляется в S-фазе или переходе G2–М в зависимости от того, осуществлялся ли сдвиг температуры до перехода G1–S или после него [13, 14].

Ген, соответствующий мутации *cdc2 Sch. pombe*, кодирует продукт длиной 297 аминокислот (34 кДа), имеющий функцию серин-треонинкиназы p34^{cdc2}, и имеет 63% гомологии по последовательности ДНК с геном *cdc28 S. cerevisiae* [15]. Позднее с помощью трансфекции была показана функциональная заменяемость генов *cdc2 Sch. pombe* и *cdc28 S. cerevisiae*. Изучение активности белка *cdc2* с помощью гистона H1 как субстрата фосфорилирования показало, что эта активность имеет пик в точке G2–М перехода (рис. 1) и зависит не только от взаимодействия этого белка с другими, но и от степени фосфорилирования этого белка са-

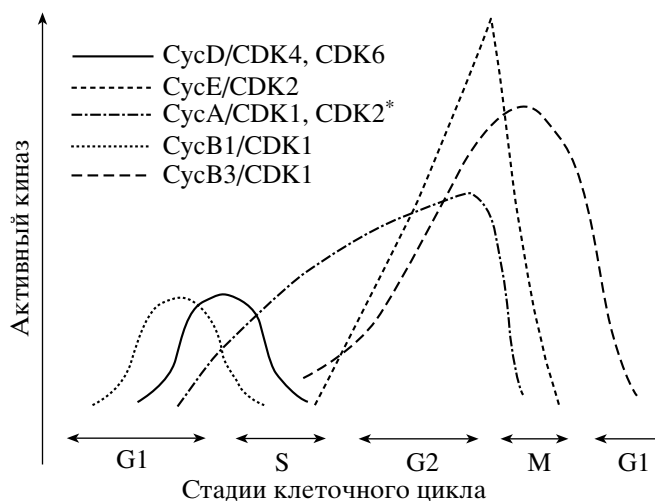


Рис. 1. Схема, отражающая дифференциальную активность комплексов циклин/циклин зависимая киназа (cyclin/cdk). *Cyc A функционирует в комплексе с киназой Cdk2 в G1-S-фазах клеточного цикла и с Cdk1 – в G2-M-фазах.

мого по себе [16]. Субстратами этого фосфорилирования являются Tyr15 (Y-сайт) и Thr167 (T-сайт). По результатам исследования фенотипа аллелей гена *cdc2* и локализации соответствующих за-

мен в первичной структуре полипептида (табл. 3) оказалось, что многие мутации, нарушающие консервативные аминокислотные консенсусы, прилежащие к этим двум сайтам, кластеризуются вокруг этих сайтов [17–19]. Анализ фенотипов клеток, содержащих эти мутационные варианты генов, позволил установить, что активной является только та форма MPF, у которой T сайт фосфорилирован, а Y-сайт – нет (рис. 2) [20].

Клонирование гена *cdc13⁺ Sch. pombe* показало, что его продукт длиной 482 аминокислоты имеет значительную гомологию с уже известными циклинами группы В [21, 22]. Делеционные аллели *cdc13* вызывают блокирование клеток в периоде G2 с неконденсированными хромосомами и неактивной киназой *cdc2* [22]. Учитывая биохимическое взаимодействие между продуктами генов *cdc2* и *cdc13* [20], естественно считать, что эти продукты совместно функционируют в переходе G2–М, регулируя вхождение клеток в митоз. При этом сверхпродукция Cdc13 не вызывает нарушений клеточного деления. Это означает, что регуляция активности комплекса происходит не на уровне транскрипции, а на уровне пост-трансляционных модификаций белков [21, 22].

Температурочувствительные аллели гена *cdc25* блокируют клетки в переходе G2–М, остав-

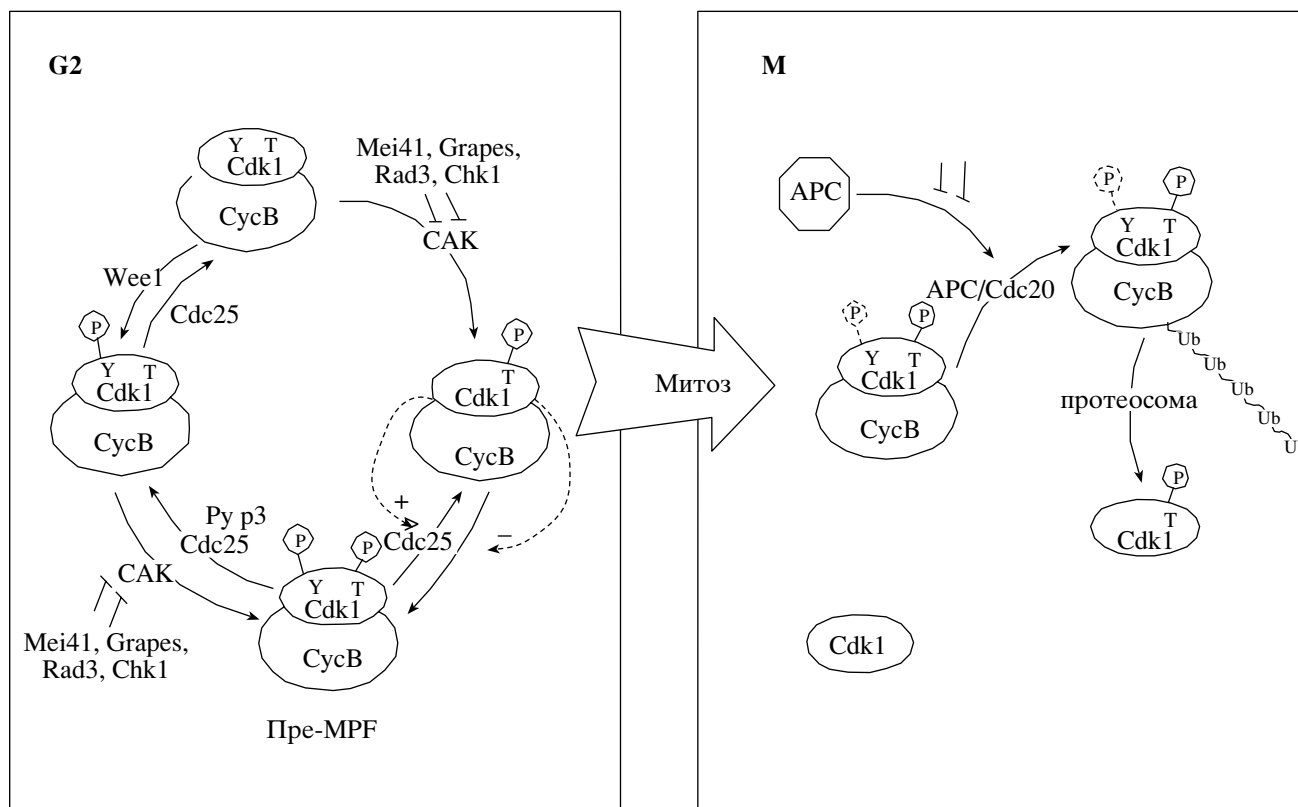


Рис. 2. Функции Cdk1 (Cdc2): переход G2–М. Пояснения см. в тексте. MPF – maturation promotion factor; APC – anaphase promoting complex; CAK – Cdk-activating kinases. Пояснения см. в тексте.

Таблица 3. Структурно-функциональная характеристика аллелей гена *cdc2 Sch. pombe*

Функция	Стадия температурного сдвига	Название аллеля гена <i>cdc2 Sch. pombe</i>
Температурочувствительное блокирование	(G1–S) + (G2–M) Только G2–M	<i>M35(T), 17/22(T), 45(T), M26/M55(T), 33, 47, 48, M63, 56/130(Y)</i> <i>18</i>
Холодочувствительное блокирование	(G1–S) + (G2–M) Только G2–M	<i>59, r4</i> <i>A20, B14, D21, E8(T), E9</i>
Дефект мейоза		<i>M35(T)</i> <i>N22(Y)</i>
Деление при малом размере почки		<i>1w/2w(T), 3w, 4w, 56/130(Y)</i>

Примечание. Приведены названия аллелей, вызывающих блокирование клеточного цикла. В скобках после названия аллеля указана близость рассматриваемой аминокислотной замены к одному из двух сайтов фосфорилирования продукта Cdc2 (Y или T).

ля белок Cdc2 фосфорилированным по Y сайту и неактивным. В течение 10 мин после возвращения клеток к перmissive температуре происходит активация этого белка. Сверхпродукция же белка Cdc25 приводит ко входу в митоз [23]. Этот набор свойств позволил считать фосфатазу Cdc25 активатором киназы Cdc2. Функция Cdc25 состоит в дефосфорилировании Y сайта *cdc2* и тем самым стимулировании перехода MPF в активную форму [24].

Делеционные аллельные варианты гена *wee1* вызывают вхождение клеток в митоз при размере почки меньше, чем у дикого типа *S. cerevisiae* (преждевременное вхождение в митоз). При сверхпродукции этого белка, наоборот, наблюдается увеличение “критического” размера почки клетки [25]. Таким образом, свойства *wee1* противоположны свойствам *cdc25*. Продукт гена *wee1* – это 877 аминокислотный полипептид, имеющий гомологию с C-концом протеинкиназ [25]. Роль Wee1 киназы в фосфорилировании Y сайта Cdc2 и ингибировании активности этой киназы была показана для ее эволюционных гомологов у высших эукариот [26].

5. МОДЕЛЬ КЛЕТОЧНОГО ОСЦИЛЛЯТОРА

После того как круг генов и их продуктов, участвующих в регуляции клеточного цикла, был установлен и были получены доказательства особой роли обратимого фосфорилирования белков в этом процессе, возник вопрос, каким образом эта система обеспечивает периодичность смен фаз клеточного цикла у дрожжей и многоклеточных. Современные представления о клеточном цикле базируются на понятии клеточного осциллятора и системы передачи внутриклеточных сигналов – checkpoints. Под клеточным осциллятором подразумевается система обратимых периодических модификаций белков в результате актов фосфорилирования / дефосфорилирования,

которые приводят к глобальной реорганизации структур клетки. Характерной особенностью клеточного осциллятора является существование пороговых значений стимулирующих сигналов, позитивной и негативной обратных связей [27]. Рассмотрим периодичность прохождения клеткой фаз цикла на примере MPF. Активация MPF происходит путем дефосфорилирования циклической компоненты фосфатазами семейства Cdc25, подавление – фосфорилированием киназами типа Wee1 (рис. 2). Механизм регулирования MPF является высококонсервативным.

В клетках человека, имеющих гомологи рассматриваемых белков, Cdc25 является субстратом фосфорилирования Cdc2 (в другой номенклатуре – Cdk1) [28], что подтвердило выдвинутую ранее идею о том, что активность MPF регулируется по типу автокатализа [29]. Активность Wee1-киназы антагонистична активности Cdc25 и заключается в координации завершения процессов репликации и репарации ДНК с контролем скорости развития данного автокаталитического процесса. Известны Pyp1 и Pyp2-фосфатазы, активирующие Wee1; кроме того, известна Nim1 киназа, ингибирующая Wee1-активность. Помимо этого активность MPF контролируется петлей отрицательной обратной связи, чтобы в нужный момент вызвать инактивацию Cdc2 и обеспечить переход клетки из метафазы в анафазу. Совокупность положительных и отрицательных обратных связей приводит к тому, что активность MPF периодически возрастает до порогового уровня, а затем снижается, представляя собой основу клеточного осциллятора перехода G2–M (рис. 2). Подобные системы регулируют и другие стадии клеточного цикла.

Инактивация гена *cyclin B* осуществляется через убиквитин-зависимый протеолиз комплексом активации анафазы (APC – anaphase promoting complex) (рис. 2). APC узнает и связывается с кон-

Таблица 4. Нарушения, вызывающие активацию сигнальных путей checkpoints

Фаза клеточного цикла, во время которой происходят повреждения	Нарушения, вызывающие активацию checkpoints	Фаза цикла, в которой клетка задерживается в ответ на повреждения
G1	Разрывы ДНК Нарушение дупликации и/или расхождения центросом	G1–S G2–M
S	Блокирование репликативной вилки	G2–M
G2	Двухцепочечные разрывы ДНК	G2–M, M–A
M	Хромосомы, не прикрепленные к веретену	M–A

сервативной последовательностью, называемой боксом деструкции циклинов (destruction box, D-box) и расположенной в N-конце циклинов. Убиквитин-лигаза из комплекса APC пришивает молекулы убиквитина к молекулам лизина вблизи D-box. Затем белки, содержащие полиубиквитиновые цепочки, распознаются протеасомой и подвергаются деградации [30]. Активность убиквитин-лигазы, выделенной из яиц морского ежа, увеличивается при добавлении белка Cdc2 [31].

Кроме того, пространственная локализация различных белков-регуляторов клеточного деления обеспечивает временной контроль событий клеточного цикла. Некоторые из этих регуляторов периодически перемещаются между компартментами внутри клетки, что имеет значение для субстратной специфичности и точного времени действия протеинкиназ и фосфатаз. Контроль внутриклеточной локализации антагонистических киназ, фосфатаз и протеаз обеспечивает существование градиента фосфорилированных и дефосфорилированных субстратов внутри одной и той же клетки. В пространственном измерении клетка координирует глобальную реорганизацию внутриклеточной структуры на входе и выходе из митоза [32]. Отметим также, что проведенное выше рассмотрение MPF как комплекса CysB/Cdc2 (в другой номенклатуре – CysB/Cdk1) является некоторым упрощением. В клетке высших эукариот имеются несколько родственных генов *cyclin B*; кроме того, комплекс CysA/Cdk1 при переходе G2–M может функционировать аналогично MPF.

6. ТОЧКИ КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Объясним общепринятые термины, которые используются ниже при обсуждении рассматриваемого вопроса. Точки контроля клеточного цикла (checkpoints) – это сигнальные системы, 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 (табл. 4). 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 перехода G1–S [33]. 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. Генетический анализ клеточного цикла у *S. cerevisiae* показал, что между прохождением точки СТАРТ и началом S-фазы имеются промежуточные этапы.

Задержка деления клетки после облучения была известна еще в классической радиобиологии [34]. Сведения о том, что для задержки важна активность определенных генов, были получены в работах по селекции условных мутаций дрожжей, приводящих к летальному митозу при действии мутагена и не влияющих на деление в отсутствие мутагена. Отметим, что проблема генетического контроля задержки митоза имеет два аспекта. С одной стороны, это генетический контроль процесса репарации, рассмотрение которого выходит за рамки настоящего обзора. С другой стороны, это вопрос о собственно генах, продукты которых задерживают деление клетки в ответ на повреждение внутриклеточных структур.

Условные мутаген-чувствительные мутации *S. cerevisiae*, приводящие к летальному митозу при облучении и действии рестриктивной температуры, по признаку морфологии погибших клеток распадаются на два класса. Мутации класса *rad52* нарушают репарацию ДНК и приводят к гибели клеток при больших размерах, превышающих размер интактных клеток. Это означает, что у таких мутантных клеток нарушен только процесс репарации, но не затронут механизм обратной связи (checkpoint), который обеспечивает задерж-

ку клеток в ответ на мутаген. Вследствие этого задерживается движение клеток по циклу, а процесс клеточного роста не тормозится, и клетки погибают при больших размерах без деления. Ко второму классу относятся мутации генов типа *rad9*, характеризующиеся наличием погибших клеток малого размера, что было объяснено нарушением системы петли обратной связи. Действительно, если поврежден механизм задержки, то клетки будут нормально двигаться по циклу, несмотря на присутствие мутагена, и будут входить в митоз при нормальных размерах, сходных с размерами необлученных интактных клеток [35].

Пути контроля репарации и репликации ДНК

Торможение клеток при переходе G2–М возникает не только в ответ на мутагены, но также и в ответ на другие стимулы. Условные мутации *Sch. pombe* в генах, кодирующих белки, которые участвуют в репликации ДНК (ДНК лигаза – *cdc17*, субъединица ДНК полимеразы γ – *pol3*, PCNA – *pcn1*), при рестриктивной температуре задерживают клетки в переходе G2–М. К аналогичным последствиям приводит действие гидроксимочевина (ингибитора синтеза ДНК).

Блокирование клеточного цикла под действием рассмотренных факторов преодолевается в клетках *Sch. pombe*, мутантных по гену *rad1* (продукт гена – белок, вовлеченный в репарацию ДНК) [36]. Фенотипы мутантных генов *rad3* (продукт гена – ДНК-геликаза), *rad1*, *rad17*, *hus1* и *hus2* аналогичны фенотипу *rad9*. Особенность мутаций генов *rad21* (белок участвует в репарации двуниевых разрывов) и *rad24* состоит в том, что клетки преодолевают точку контроля в ответ на повреждение ДНК, а не в ответ на недореплированную ДНК [37]. Таким образом, петля обратной связи имеет дифференциальную чувствительность к различным типам агентов, нарушающих деление клетки. В норме группа генов *rad Sch. pombe*: *rad3*, *rad9*, *rad17*, *hus1*, а также *cdc18*, *cdt1*, *cut5*, *rum1*, – контролирует целостность ДНК при переходе G1–S [13].

Система checkpoints функционирует по следующей схеме: белки-сенсоры контролируют завершение событий клеточного цикла и посылают соответствующие сигналы, принимаемые эффекторами – ответными элементами, которые осуществляют задержку движения клеток по циклу [38]. 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 [38, 39]. В то же время продукт гена *rad3* – протеинкиназа естественно считать передатчиком сигнала, возникающего при активации точки контроля. Передатчиками являются продукты гена *mec1*, кодирующего инозитол-фосфатидил-инозитолкиназу (гомолог человеческой FRP1 протеинкиназы), гена *mec2*, кодирующего треонин-тирозин протеин-киназу, а также серин-треонинкиназа Chk1 (Rad53) [35, 40]. Одним из эффекторов клеточного осциллятора является Cdc2 – каталитический компонент циклиновых киназ.

Активация и передача сигнала о задержке клетки в точке контроля не является простым процессом каскадной активации, так как, в этом процессе имеются внутренние петли обратной связи. Так, в ответ на повреждения ДНК белок Mec1 фосфорилирует сенсоры повреждений Rad9 и Ddc1 [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 [42]. В фосфорилирование Dcd1 вовлечены Mec1 и белки группы Rad24, но не Rad9 [41]. По-видимому, смысл этой сложной регуляции состоит в амплификации сигнала, блокирующего клеточный осциллятор только при соблюдении определенных условий. К белкам, передающим сигнал, относят и протеинкиназу Dun1. Кроме того, этот белок вовлечен в индукцию транскрипции генов репарации [43]. Таким образом, процесс активации точки контроля основан не только на специфических белок-белковых взаимодействиях, но также включает и дифференциальную активность генов.

Пути контроля митотического аппарата

Для жизнедеятельности клетки необходимы не только точная репликация и целостность хроматина (проверяемая в точках контроля G1–S и G2–М), 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 беномила, мутации *Bub* (*budding uninhibited by benzimidazole*) и *Mps1* отменяют задержку клеток в митозе, вызывае-

мую в норме под действием веществ, нарушающих полимеризацию микротрубочек [44]. Протеинкиназа Mps1 рассматривается как первое звено передачи сигнала для блокирования перехода метафаза–анафаза. Кроме этого, она вовлечена в дупликацию полярных телец веретена (аналогов centrosom 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) [47]. 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 [1]. По молекулярной функции Bub1 принадлежит к классу протеинкиназ. Функция Bub2 неизвестна и очевидных гомологий не удастся найти. Также неизвестна функция белка Bub3, однако в этом случае удастся найти гомологию с трансмембранным белком A72.5 мыши, богатым WD40-повторами (функция WD повторов связана с убиквитинизацией белков). Продукт гена Mad1 гомологичен немышечному δ -миозину (тяжелая цепь) крысы. Mad3 гомологичен протеинкиназе мыши. Mad2 – это протеин изопренилтрансфераза, которая контролирует связывание белков с мембранами и прикрепление кинетохоров к микротрубочкам веретена [48].

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 [49]. Эксперименты по сверхэкспрессии Cdc20 показали, что мишенью Cdc20 являются не митотические циклины, а сепарин Pds1 [50]. Клетки, содержащие белковые замены в области деструкционного бокса белка Pds1, не могут входить в анафазу [51], 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.

Известны 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 [40]. 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 [52].

Рассматриваемые эффекторы используются и точкой контроля G2–М при повреждении ДНК. Это происходит в результате цепи последовательных реакций фосфорилирования Mec1, Chk1, Pds1. Данные эффекторы функционируют также в составе системы, контролирующей завершенность синтеза ДНК. Сенсорами в этой системе являются Pol2 (ДНК полимеразы), Rfc5 (фактор репликации) и белки Dpb11, Drc1 [53, 54]. Дефекты репликации ДНК узнаются сенсорами, в результате чего фосфорилируется передатчик сигнала Mec1. Дальнейшие события аналогичны описанным в предыдущем пункте.

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 [48]. Помимо этого Mad2 располагается на centrosomax, вдоль микротрубочек веретена и в цитоплазме [48]. Гомолог Mad1 человека связан с кинетохорами в интерфазе и с centrosomax в митозе [55], гомолог Bub1 мыши связан с кинетохорами в митозе [56].

Адаптация точек контроля

Активация точки контроля приводит либо к временной задержке цикла (до ликвидации ошибки), либо к необратимой задержке, т.е. гибели клеток (апоптозу), осуществляемой с помощью каспаз [57]. В отдельных случаях задержка в цикле может быть с течением времени преодолена без полной репарации повреждений. Это явление получило название адаптации точки контроля. Поскольку были идентифицированы мутации, нарушающие процесс адаптации [58], можно утверждать, что адаптация – это генетически контролируемый процесс. Известен ингибитор апоптоза IAP (впервые найденный у вирусов, которые способны ингибировать апоптоз клеток хозяина, синоним – *survivin*). IAP экспрессируется в фазах G2 и М клеток человека и в норме связан с вер-

теном. При нарушении веретена с помощью цитостатиков этот белок изменяет свою локализацию и связывается с хромосомами.

Точки контроля являются стадиоспецифическим (и, по-видимому, тканеспецифическим) феноменом. Действительно, эксперименты с экстрактами из яиц лягушки показали, что в раннем развитии яйца (при концентрации ядер около 100 на яйцо) ингибитор синтеза ДНК – афидиколин – не задерживает деление ядер. Однако при концентрации 500 ядер на яйцо под действием рассматриваемого агента деление ядер останавливается [59]. Сходные наблюдения существуют и на дрозофиле [60].

7. ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Рассмотренные выше исследования на дрожжах, культуре клеток и ооцитах играли на определенном этапе доминирующую роль в изучении клеточного цикла эукариот. У многоклеточных организмов, в отличие от одноклеточных, появляются сигналы развития, что приводит к формированию различных тканей и определяет различную кинетику циклов. Принципиальная схема регуляции цикла изменилась незначительно, но набор генов и кодируемых ими белков, регулирующих смену фаз цикла, у высших эукариот существенно расширился. Более детально изучен класс модуляторов активности циклин-зависимых киназ: циклинактивирующие киназы, ингибиторы киназ, активирующие и ингибирующие фосфатазы, факторы, направляющие специфический протеолиз белков клеточного цикла. Выявлены функции таких высококонсервативных регуляторов стадии G1 и перехода G1–S как CysD, CysE, Rb и E2F/DP, которые не имеют ортологов у дрожжей [61]. Схема, отражающая дифференциальную активность комплексов циклин/циклин зависимая киназа (cyclin/cdk), приведена на рис. 1.

Рассмотрим структуру и особенности функционирования основных белков-регуляторов клеточного цикла высших эукариот.

Циклин-зависимые киназы (CDKs) изолированы из многих эукариотических организмов, степень их гомологии варьирует от 58 до 97% [27]. Функции киназ – фосфорилирование белков, участвующих в основных событиях клеточного цикла.

Определение субстрат-специфичности каждой CDK является трудноразрешимой задачей, поскольку многие киназы (MAPs, Cys/CDKs) фосфорилируют белки по гомологичным консенсусам [27]. Потенциальными субстратами для Cdk1 в митозе являются белки цитоскелета (lamins, vimentin, caldesmon, MAP-p220), протеинкиназы (p60^{src}, p85^{gag-mos}), ДНК-связывающие белки (histoneH1, HMG I, Y, P1, nucleolin) и другие белки (APP, rab1,

4, cyclinB, cdc25B, Cdc25C, Far1, Cdc20, FZR) [62]. В фазах G1–S циклин-зависимые киназы фосфорилируют так называемые “rocket”-белки (pRb, p107, p103), факторы транскрипции (E2Fs, Sp), субъединицы комплекса деградации белков и ряд других белков (estrogen receptor α , ID1, ID2, B-Myb) [63]. Для формирования киназного комплекса необходим белок Suc1 (Sks1), первоначально отнесенный к классу ингибиторов циклин-зависимых киназ. Важную роль в узнавании субстратов играют циклины и Suc1 [64].

Циклины могут быть условно разделены по структуре и фазам действия на два подсемейства: циклины G1 (группы C, D, E, J) и митотические циклины G2-M (группы B, A). Все циклины имеют общий гомологичный район – “cyclin box”, ответственный за связывание с киназой. G1 циклины являются короткоживущими белками, они быстро разрушаются, их уровень определяется в большой степени скоростью транскрипции мРНК [65]. По сравнению с митотическими циклинами, G1 циклины имеют более длинную C-концевую последовательность после “cyclin box”, содержащую PEST-последовательность, наличие которой коррелирует с коротким временем жизни белков.

Митотические CysA, CysB стабильны в интерфазе и быстро разрушаются в митозе убиквитин-опосредованным протеолизом [30]. Циклины семейства A в комплексе с Cdk2 регулируют прохождение стадий G1–S, необходимы для репликации ДНК, а переход G2–M регулирует комплекс CysA/Cdk1 [65]. Уровень и активность циклинов в клетке определяются их транскрипцией, протеолизом и действием специфических ингибиторов [66]. Предполагалось, что все митотические циклины дрозофилы деградируют по идентичной схеме, что определяется присутствием “destruction box”, но оказалось, что деградация CysA в значительной степени определяется также длинным N-концевым районом [67].

Неясным остается феномен нацеливания различных циклинов и киназ для образования определенных Cys/Cdk комплексов. С одной стороны, различные циклины связываются с одной и той же киназой: например, CysA, CysB1, CysB2, CysB4 – с каталитической субъединицей Cdk1 и, напротив, один циклин – с разными киназами, например CysA – с Cdk1 и Cdk2 (рис. 1), CysB3 цыпленка связывается с Cdk2, что предполагает его роль в регуляции S-фазы [68]. CysB3 дрозофилы соосаждается только с Cdk1 [69]. Возможно, наличие множества различных комплексов Cys/Cdk может служить клетке маркером, по которому она определяет прохождение фаз цикла.

CDK-активирующие киназы (CAK) были идентифицированы по гомологии первичной последовательности к CDKs и своей способности активировать комплексы Cys/Cdks. CAK найдены в раз-

личных эукариотических организмах, включая человека, лягушку, дрозофилу, дрожжи. САК фосфорилирует специфичный консервативный остаток Thr161 (или Hu-Thr170), который находится в районе Т-петли и становится доступным действию САК после связывания с циклином. Одна из киназ семейства САК получила название Cdk7, ее циклиновый компонент – CysH. Третья субъединица комплекса CysH/Cdk7 – белок p34 или MAT1, относящийся к семейству RING-белков и играющий, по-видимому, стабилизирующую роль фактора сборки этого комплекса. Другая функция САК состоит в фосфорилировании карбоксильного (CTD) конца РНК-полимеразы II (RNAPII). Показано участие САК в TFIIH транскрипционном комплексе, связывающемся с RNAPII. Таким образом, САК может обеспечивать связь между транскрипцией и контролем клеточного цикла [70].

Фосфатазы типа PP1 и PP2A вовлечены во многие аспекты клеточного метаболизма, в том числе в контроль клеточного цикла, хотя их точная роль остается неясной. Возможно, специфичные функции этих белков в клеточном цикле обеспечиваются регуляторными субъединицами. Фосфатазы типа PP1 эволюционно консервативны, гомология между соответствующими ферментами дрожжей и млекопитающих составляет 70–80% [13]. Мутации по одной из фосфатаз типа PP1, гену *Sch. pombe dis2*, приводят к нерасхождению хромосом. Регуляторная субъединица *sds22 Sch. pombe* взаимодействует с двумя фосфатазами типа PP1 (как с *dis2*, так и *sds21*), изменяя их субстратоспецифичность [71].

PP2A является негативным регулятором входа в митоз, ингибитором Cdc25 активности. Идентичность структуры белков PP1 и PP2A дрожжей *Sch. pombe* составляет 80% [13]. Гомология каталитических субъединиц фосфатаз у дрозофилы и человека составляет 95%, регуляторных субъединиц – 70–79% [72]. PP2A дрозофилы состоит из одной каталитической и двух регуляторных (65 и 55 кДа) субъединиц. Анализ мутаций по гену, кодирующему субъединицу 55 кДа, показал, что фермент, содержащий этот белок, играет важную роль в детерминации судьбы клетки [13] и регуляции клеточного цикла [73]. Регуляторные субъединицы PR55 обеспечивают субстратоспецифичность фосфатаз, во многих случаях являющихся антагонистами по своему действию Cys/Cdks.

Митоз-индуцирующие фосфатазы – это гомологи дрожжевого фермента Cdc25, способные активировать циклин-зависимые киназы, дефосфорилируя их. Они являются ключевыми инициаторами митоза эукариотических клеток, антагонистами киназ семейства Wee1. У дрозофилы известны два гомолога – String, Twine, у человека три – Cdc25C, Cdc25B, Cdc25C [74, 75]. Все фосфатазы

Cdc25 содержат каталитический домен в С-концевой половине молекулы и регуляторный домен в N-концевой части. Активность фермента контролируется изменениями в регуляторной области, мотивами для фосфорилирования Cdks и CaMРP [74]. Дрожжевая фосфатаза Cdc25 позитивно контролирует клеточный уровень САМР в точке СТАРТ фазы G1, запускает клеточное деление и активирует переход G2–М. Cdc25A человека действует как основная внутриядерная фосфатаза в интерфазе, нейтрализует активность ингибирующих киназ семейства Wee1 по отношению к CysA/Cdk2, CysE/Cdk2, CysD/Cdk4 и, возможно, ядерной фракции CysB/Cdk2 [75]. Начало митоза у позвоночных контролируется генами *Cdc25B*, *Cdc25C*. Ген *string* дрозофилы транскрибируется на стадии G1, а продукт гена действует во время перехода G2–М [76], фосфатаза дрозофилы, активирующая циклины группы G1, неизвестна. Инактивация Cdc25, вероятно, контролируется направленным убиквитин-опосредованным протеолизом [77].

Ингибиторы циклиновых киназ (CDI) впервые были изолированы в 1993 г. по их способности ингибировать активность CDKs и напрямую взаимодействовать с данными комплексами и/или отдельными компонентами [65]. CDI – это небольшие белки (20–27 кДа), по гомологии структуры и функций условно подразделяющиеся на классы p21 (CIP/KIP) и p15 (INK). Функции CDI состоят в координации детерминации судьбы клетки и фазы клеточного цикла. CDI останавливают клетки в фазах G1, G2 или в начале S-фазы, в М-фазе через направленное ингибирование определенных Cys/Cdk комплексов и регуляцию внутриклеточной локализации.

Белок p21 связывается с Cdk2 комплексами CysA, CysD1, CysE и слабее – с Cdk1, Cdk3 [78]. Промотор гена *p21* содержит сайт связывания для белка p53 и может обеспечивать ингибирование клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК по схеме: повреждение ДНК → индукция p53 → → наработка белка p21 → ингибирование циклинов. Близкий по структуре белок p27^{KIP1} имеет наибольшее сродство к Cdk4 [65]. Два небольших белка p16^{INK4} и p15^{INK4B} специфически ингибируют Cdk4, Cdk6, оба белка имеют четыре “ankyrin” домена [79]. p16^{INK4} связывается с Cdk4 и антагонизирует CysD1 из комплекса *in vitro*, что может объяснить отсутствие CysD1, p21, PCNA в комплексе с Cdk4 в трансформированных клетках. Белки p21 и p16 не взаимодействуют с циклин-активирующими киназами (САК), но оба предотвращают взаимодействие САК с Cys/Cdks комплексами, изменяя пространственное расположение функционально-значимых аминокислот [70].

CDI выполняют свою роль в регуляции дифференцировки: мутации по генам *p21* и *p27^{kip1}* мы-

ши в эмбриогенезе приводят к потере многими клетками способности дифференцироваться [80].

К ингибиторам киназ относят и быстро эволюционирующий ген *D. melanogaster* – *Rux* [81], который частично определяет активность CysA/Cdk2 на стадиях G1, S и влияет на активность CysA/Cdk1, CysB/Cdk1 во время митоза [82]. По ряду функциональных особенностей *Rux* близок к семейству ингибиторов Cip/Kip [81]. Отметим, что пока это единственный известный ингибитор митотических циклиновых киназ.

8. КОНТРОЛЬ ВХОДА В S-ФАЗУ У ДРОЖЖЕЙ

Ген *cdc2 Sch. pombe* играет существенную роль в контроле переходов G2–M и G1–S (табл. 2, 3). Мутантные аллели *cdc2* влияют на координацию роста и деления. Мутации в гомологичном гене *cdc28 S. cerevisiae* блокируют клетки в точке перехода G1–S, их действие аналогично действию феромонов при спаривании [16, 83]. Более того, было показано, что клетки, на которые действовали феромонами, блокируются в состоянии с низкой активностью Cdc28-киназы [84].

Особенности биологии размножения дрожжей сыграли важную роль в генетическом анализе контроля входа в S-фазу. Для того чтобы произошла успешная конъюгация гаплоидных клеток, принадлежащих к различным половым типам (α и a), необходимо, чтобы эти клетки были синхронизированы на определенной стадии клеточного цикла. У *S. cerevisiae* это достигается следующим образом: клетка типа α останавливается в точке G1–S и выделяет в среду половой фактор α , клетка типа a рецептирует этот сигнал и также останавливается в точке G1–S перехода, затем происходит образование единой диплоидной клетки. После того, как удалось осуществить химический синтез фактора α , возникла возможность селективировать мутации, нечувствительные к этому фактору, т.е. выделить такие линии, клетки типа a которых не останавливаются в точке G1–S в ответ на действие полового фактора. Так были изолированы доминантные мутации гена *CLN3 S. cerevisiae*. Изучение первичной структуры белка, кодируемого этим геном, показало наличие циклинового бокса недалеко от N конца полипептида [85]. В другом эксперименте [86] были идентифицированы два других гена – *CLN1* и *CLN2*, периодически транскрибирующихся в клеточном цикле [87]. Было установлено, что оба эти гена содержат консенсус в регуляторной зоне, связывание с которым транскрипционного фактора Swi4 отвечает за экспрессию в фазе G1 [88]. Оказалось, что экспрессия генов *CLN1*, *CLN2* и фосфорилирование транскрипционного фактора Swi4 под действием комплекса Cdc28/CLN образуют положительную петлю обратной связи, в результате акти-

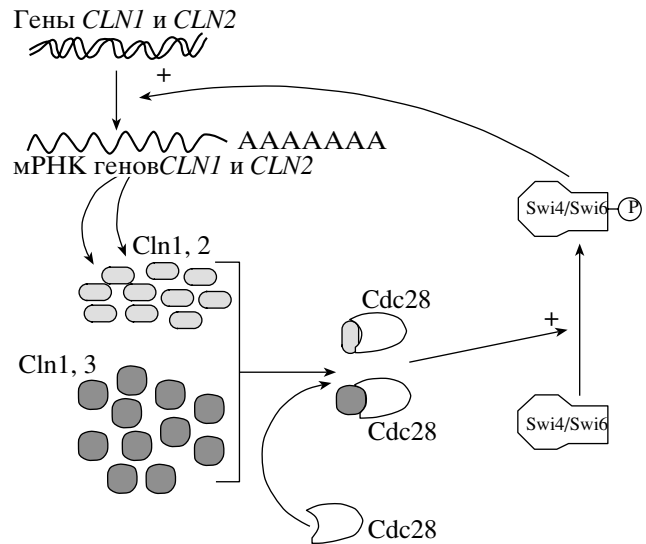


Рис. 3. Положительная петля обратной связи активации транскрипции генов *CLN1* и *CLN2*, регулирующая переход G1–S в клетках *S. cerevisiae*.

вации которой клетка вступает в S-фазу [89, 90]. Устройство этой петли изображено на рис. 3. Экспрессия генов *CLN1* и *CLN2* усиливается автокаталитически, поскольку продукты этих генов, связываясь с протеинкиназой Cdc28, фосфорилируют транскрипционный комплекс Swi4/Swi6, который, в свою очередь, снова усиливает транскрипцию рассматриваемых циклинов. В отличие от петли обратной связи, регулирующей входение в митоз, данная петля содержит транскрипционный уровень регуляции цикла.

9. ПЕРЕХОД G1–S У ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

В зависимости от характера внешних сигналов, клетки выбирают различные программы развития: пролиферацию, апоптоз или дифференцировку. Терминальная дифференцировка клеток Metazoa происходит чаще всего в фазе G1 и означает выход в фазу G0 (Рис. 4). У дрожжей контрольная точка в фазе G1, в которой совокупность условий внешней среды (питание, радиация и т.д.) и внутриклеточных условий определяет, может ли клетка заканчивать G1-фазу и готовиться к S-периоду, называется СТАРТ-позицией [64, 91]. В клетках млекопитающих перед точкой СТАРТ расположена точка R (restriction point) [92], в которой клетки чувствительны к факторам роста и гормональным стимулам.

Активированные поверхностные рецепторы запускают киназный каскад или цепь последовательных реакций фосфорилирования/дефосфорилирования: фактор роста связывается с рецептором и активирует рецепторную тирозинкиназу (MEM/MKK), которая активирует MAPKK, а этот

тинобластомы (pRb), который является мишенью многих сигналов, контролирующих рост (рис. 4). В гипофосфорилированном состоянии pRb и ассоциированные с ним в комплекс белки p107, p130 связывают транскрипционные факторы семейства E2F (рис. 4). Активные комплексы – CysD/Cdk4 и CysE/Cdk2 фосфорилируют белки семейства Rb, включая p107 и p130, что обеспечивает освобождение и активацию факторов транскрипции, в том числе и E2Fs/DP [94, 95]. Циклины группы D фосфорилируют pRb первыми, около контрольной точки R. Белки E2F функционируют в комплексе с белками DP, гетеродимеры E2F/DP регулируют программу транскрипции многих генов клеточного цикла при переходе G1–S у млекопитающих и дрозофилы [96]. Пять генов *E2F* и два гена *DP* млекопитающих выполняют перекрывающиеся функции, у дрозофилы известно пока по одному гену *dE2F* и *dDP*, функции которых существенны для регуляции перехода G1–S. Белки E2F–1, E2F–2, E2F–3 взаимодействуют с pRb, в то время как E2F–4 связывается с p107, p130 [97]. Гиперфосфорилированная форма pRb присутствует в момент перехода от фазы G1 к S, тогда как E2F/p107 имеет другой паттерн появления в клеточном цикле. В поздней фазе G1 функционируют ДНК-связанные комплексы E2F/p107/CysE/Cdk2, а в S-фазе действует транскрипционный комплекс E2F-4/CysA/p107/Cdk2 [97].

Эффект, который оказывают CysA и CysE на ассоциированный с ними E2F, не очевиден. На данный момент известно, что E2F наиболее активен в свободном состоянии, но комплексы Cys/Cdk могут модулировать, а не ингибировать полностью активность E2F. Другое значение связывания состоит в том, что комплексы Cys/Cdk связываются через E2F с ДНК и могут фосфорилировать соседние ДНК-ассоциированные белки [65]. Например, фосфорилирование фактора транскрипции Sp1 человека комплексом CysA/CDK усиливает его активность в 3–4 раза [63]. И наоборот, связывание комплексов Cys/Cdk с E2F-факторами может регулировать внутриклеточную локализацию факторов транскрипции семейства E2F [32].

В настоящее время основная роль комплекса CysE/Cdk2 в клеточном цикле многоклеточных организмов рассматривается как регуляция перехода G1–S и инициация транскрипции, в то время как для продолжения транскрипции и прохождения S-фазы требуется комплекс CysA/Cdk2. Однако фосфорилирование Rb зависит от CysD, CysE и от CysA, что предполагает отдельную функцию CysA в регуляции перехода G1–S [63]. В отличие от дублируемых функций циклинов групп A и D, роль CysE уникальна. Субстраты для CysC/Cdk в S-фазе остаются спорными; возможные кандидаты – это белки RF-A, Cdc6, необходимые для репликации ДНК [32, 98], и транскрипционные факторы. Для инициации S-фазы млекопитающих имеет

значение фосфатаза Hu-Cdc25A – гомолог крайне важного регулятора митоза Hu-Cdc25B, DmCdc25^{string} [61, 99].

В результате интенсивного изучения закономерностей прохождения клеткой стадий G1–S выявлены многие гены и функции кодируемых ими продуктов, тем не менее не решены принципиально важные вопросы о механизмах положительной и отрицательной обратных связей, например, неизвестны киназы и фосфатазы, непосредственно контролирующие активность CysE/Cdk2, CysA/Cdk2. Обратная положительная и отрицательная связи на стадии G1–S, вероятно, частично реализуются через CysE (см. раздел 6 “Точки контроля клеточного цикла”), хотя положительная связь через факторы E2Fs действует не во всех случаях [100]. Отрицательная связь через автофосфорилирование CysE и деградацию комплексом SCF выявлена относительно недавно [101]. Точное время и амплитуда экспрессии циклинов G1 важны для нормального протекания клеточного цикла. Трансформации ведут к увеличению уровня циклинов G1, что достигается многими разнообразными способами, например нарушением функций pRb, CDI, Cdc25, увеличением экспрессии генов, усиленной деградацией ингибиторов, повышенной стабильностью циклинов.

10. КОНТРОЛЬ РЕПЛИКАЦИИ ДНК

Биохимические процессы, происходящие при репликации ДНК, в настоящее время хорошо изучены [102]. Представляет интерес вопрос о том, как достигается точное и однократное удвоение таких макроструктур, какими являются хромосомы эукариот? Активированная “машина” синтеза ДНК каким-то образом выбирает именно то ядро, которое содержит набор нереплицированных хромосом, которые перед делением должны реплицироваться, но оставляет ядро с уже реплицированными хромосомами. Даже чужеродная ДНК, помещенная в экстракт яиц лягушки, способна образовать окруженные ядерной оболочкой хроматин-подобные структуры и реплицироваться [102, 103]. Сведения о том, что репликация ДНК зависит от внутриклеточных структур, были получены вначале в экспериментах по микроинъекциям MPF в яйца лягушки, деление ядер в которых было остановлено ингибитором синтеза белка [104]. Такие инъекции вызывали вступление ядер в митоз и последующую репликацию ДНК. Одно из вероятных объяснений феномена предполагало разрушение ядерной оболочки, благодаря чему некий фактор, контролирующий синтез ДНК, садится на хромосомы.

Если в экстракт из яиц лягушки, заблокированный на стадии интерфазы с помощью ингибитора синтеза белка циклогексимида, добавить ядра спермиев, то происходит однократная репли-

кация ядер. Если эти ядра перенести на свежий экстракт, то дополнительной репликации все равно не происходит. Но если рассматриваемые ядра подвергнуть обработке детергентом, который разрушает оболочку ядра, то ДНК реплицируется еще раз [105]. Эти результаты позволили предположить существование особого “разрешающего фактора”, который способен, связываясь с хромосомами (предположительно с районами начал репликации), разрешать (давать лицензию) репликацию. Чтобы понять, почему он обладает лишь однократным действием, необходимо предположить существование еще одного фактора – SPF (S-phase promoting factor), цитоплазматическая активность которого вырабатывает сигнал, инициирующий репликацию на сайтах связывания лицензирующего фактора с ДНК [106, 107]. Такая двухфазная модель получила экспериментальные подтверждения при изучении ДНК футпринтов начал репликации дрожжей, которые, как оказалось, могут находиться в “пререпликативном” и “пострепликативном” состоянии [107].

Установлено, что активность разрешающего фактора может быть ингибирована с помощью протеинкиназного ингибитора 6-диметиламинопурина (6-DMAP), что позволило обнаружить периодичность активности фактора в клеточном цикле [108]. Компоненты разрешающего фактора удалось идентифицировать [109], ими оказались белки, гомологичные дрожжевым белкам “поддержания минихромосом” MCM (minichromosome maintenance). Помимо белков MCM для корректного функционирования разрешающего фактора необходимы белки, определяющие хромосомную локализацию MCM. Среди разрешающих факторов выявлены специфические белки убиквитинизирующей системы.

11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ТОЧКИ КОНТРОЛЯ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ ОПУХОЛЕЙ

Известно, что возникновение многих опухолей человека коррелирует с возникновением мутаций в гене *p53* [110]. В прямых экспериментах было показано, что мутации в гене *p53* инактивируют точку контроля клеточного цикла G1–S [111]. Аналогичные данные известны для синдрома атаксии–телеангиэктазии [112]. Секвенирование гена *bub1* в двух случаях колоректального рака показало наличие мутаций по рассматриваемому гену, вовлеченному в работу точки контроля перехода G1–S. Функциональные исследования подтвердили наличие причинно-следственной связи между возникновением некоторых типов опухолей и инактивацией точек контроля [113]. В целом для опухолевых клеток более характерна инактивация G1–S точки контроля, чем инактивация G2–M точки.

Клетки, содержащие мутации по генам точек контроля (например, клетки, мутантные по гену *rad9 S. cerevisiae*) значительно менее устойчивы к действию радиации, чем нормальные клетки. Таким образом, мутации, нарушающие точку контроля, выступают в качестве радиационных сенситизаторов, вследствие чего увеличивается гибель клеток. Применение радио- и химиотерапии именно на опухолях, вызванных мутациями, инактивирующими точку (точки) контроля клеточного цикла, может быть более эффективным по сравнению с другими типами опухолей, поскольку в этом случае клетки опухоли естественным образом отличаются от нормальных соседних клеток большей радиочувствительностью.

Однако не все случаи возникновения опухолей связаны с изменениями в функционировании точек контроля. Так, у дрозофилы белковые продукты многих генов опухоле-супрессоров локализованы в области межклеточных контактов. Это означает, что в ряде случаев опухолевая трансформация клеток связана с дефектами межклеточных коммуникаций – изменением системы передачи сигнала на задержку пролиферации. Ответ клеток таких опухолей на облучение и цитостатики будет не отличим от ответа обычных клеток.

Для опухолей очагового характера применяется терапия, при которой используется сфокусированное на опухоли облучение. После локального облучения опухолевые клетки частично (см. про адаптацию точек контроля) подвергаются апоптозу. Известно, что в регуляции эффективности апоптоза принимают участие различные факторы. Активность иммунной системы непосредственным образом связана с программой клеточной гибели (важным этапом апоптоза у *C. elegans* является распознавание апоптирующей клетки клетками иммунной системы). Поэтому можно ожидать, что для рассматриваемого случая эффективной будет комбинация радио-, химио- и иммунотерапии, либо радио-, химиотерапии и стимуляции естественной противоопухолевой защиты с помощью цитокинов.

Существенным недостатком цитостатических препаратов, используемых в настоящее время в терапии опухолей, является отсутствие у них тканеспецифичности. Эффект увеличения интенсивности апоптоза при активации точек контроля может быть использован для конструирования химерных белков, обладающих тканеспецифическим цитостатическим и активирующим апоптоз действием. Такой агент должен содержать белковый фрагмент, способный проникать в клетки (проникающие белки уже сконструированы биомедицинскими фирмами и используются для исследовательских целей, хотя эффективность проникновения пока крайне невелика – около 1%), и белковый домен, способный активировать точку

контроля (точнее, ту часть сигнальной цепи точки контроля, которая увеличивает апоптоз). Тканеспецифичность подобных пептидов может быть обеспечена доменом, ответственным за проникновение, либо можно попытаться найти тканеспецифические особенности сигнальной цепи точек контроля в различных тканях. Существенным моментом такого подхода является то, что пептид, обладающий цитостатической активностью, должен действовать в малой концентрации на фоне нормального продукта (используя генетическую терминологию, ген, кодирующий рассматриваемый химерный белок, должен также содержать доминантную мутацию, приводящую к активации точки контроля).

Приведенный нами обзор работ показывает, что в последнее время произошел существенный прогресс в понимании многих деталей процессов, происходящих в делящейся клетке. В то же время вопрос об особенностях клеточного цикла в разных тканях и в клетках опухолей требует дальнейших исследований. Предполагается, что накопление более детальных знаний в этом направлении позволит усовершенствовать существующие методы противоопухолевой терапии и таким образом реализовать идейный потенциал теории клеточного цикла в практической области. Следующим шагом в развитии фундаментальных знаний о клеточном цикле, с нашей точки зрения, будут исследования регуляции пролиферации на более высоких, чем клеточный, уровнях – на уровне ткани и организма в целом.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 02-04-49323 и МАС № 02-04-06013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray A., Hunt T. The cell cycle an introduction. N. Y.; Oxford: Oxford Univ. Press, 1993. 251 p.
2. Strasburger E. Neue Beobachtungen über Zellbildung und Zellteilung // Bot. Ztg. 1879. Bd.37. P. 265–288.
3. Flemming W. Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen // Arch. Mikr. Anat. 1879. Bd.16.
4. Flemming W. Zur Kenntniss der Zelle in ihrer Teilungs-Erscheinungen // Schriften Naturwiss. Vereins Schl.-Holsk. 1878. Bd. 3. № 1. P. 26.
5. Lees E.M., Harlow E.D. Cancer and the cell cycle // Cell cycle control / Eds Hutchison Ch., Glower D.M. Oxford; N. Y.; Toronto: Oxford Univ. Press, 1995. P. 228–263.
6. Rao P.N., Johnson R.T. Mammalian cell fusion: Studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis // Nature. 1970. V. 225. P. 159–169.
7. Masui Y., Markert C.L. Cytoplasmatic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes // J. Exp. Zool. 1971. V. 177. P. 129–145.
8. Gerhart J., Wu M., Kirschner M. Cell cycle dynamics of an M-phase specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs // J. Cell Biol. 1984. V. 98. P.1247–1255.
9. Gautier J., Norbury C., Lohka M. et al. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+* // Cell. 1988. V. 54. P. 433–439.
10. Pines J., Hunt T. Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs // EMBO J. 1987. V. 6. P.2987–2995.
11. Minshull J., Pines J., Golsteyn R. et al. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division // J. Cell Sci. Suppl. 1989. V. 12. P. 77–97.
12. Nurse P., Thuriaux P., Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Mol.Gen. Genet. 1976. V.146. № 2. P.167–178.
13. MacNeill S.T., Fantes P.A. Controlling entry into mitosis in fission yeast // Cell cycle control / Eds Hutchison Ch., Glower D.M. Oxford; N. Y., Toronto: Oxford Univ. Press, 1995. 268 p.
14. Nurse P., Bisett Y. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast // Nature. 1981. V. 292. P. 558–560.
15. Simanis V., Nurse P. The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation // Cell. 1986. V. 45. P. 261–268.
16. Booher R.N., Alfa C.E., Hyams J.S., Beach D.H. The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear location // Cell. 1989. V. 58. P. 485.
17. MacNeill S.A., Creanor J., Nurse P. Isolation characterization and molecular cloning of the fission yeast *p34^{cdc2}* protein kinase gene: identification of temperature-sensitive G2-arresting alleles // Mol. Gen. Genet. 1991. V. 229. P. 109.
18. Nurse P., Thuriaux P. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Genetics. 1980. V. 96. P. 627–635.
19. Lundgren K., Walworth N., Booher R. et al. *mkl1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2* // Cell. 1991. V. 64. P. 1115.
20. Gould K.L., Nurse P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis // Nature. 1989. V. 342. P. 39–45.
21. Richardson H., Lew D.J., Henze M. et al. Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2 // Genes Dev. 1992. V. 6. № 11. P. 2021–2304.
22. Goehl M.G., Winey M. The yeast cell cycle // Curr. Opin. Cell Biol. 1991. V. 3. № 2. P. 242–246.
23. Russell P., Nurse P. *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast // Cell. 1986. V. 45. P. 145–150.
24. Millar J.B., McGowan C.H., Lenaers G., et al. *p80^{cdc25}* mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates *cdc2* kinase in fission yeast // EMBO J. 1991. V. 10. P. 4301–4310.

25. Russell P., Nurse P. Negative regulation of mitosis by *wee1*⁺, a gene encoding a protein kinase homolog // Cell. 1987. V. 49. P. 559–568.
26. Kumagai A., Dunphy W.G. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts // Cell. 1992. V. 70. P. 139–146.
27. Basi G., Draetta G. The cdc2 kinase: structure, activation and its role at mitosis in vertebrate // Cell Cycle Control / Eds Hutchison C., Glover D. N. Y.: Oxford Univ. Press, 1995. P. 106–143.
28. Hoffmann I., Clarke P. R., Markote M.J. et al. Phosphorylation and activation of human cdc25C by cdc2-cyclinB and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis // EMBO J. 1993. V. 12. P. 53–58.
29. Wasserman W.J., Masui Y. Effects of cycloheximide on acytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes // Exp. Cell. Res. 1975. V. 91. P. 381–390.
30. Glotzler M., Murray A.W., Kirschner M.W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway // Nature. 1991. V. 349. P. 132–138.
31. Hershko A., Ganoth D., Sudakin V., Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2 // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 4940–4946.
32. Pines J. Four-dimensional control of the cell cycle // Nature Cell Biol. 1999. V. 1. P. E73–E79.
33. Planas-Silva M.D., Weinberg R.A. The restriction point and control of cell proliferation // Curr. Opin. Cell Biol. 1997. V. 9. P. 768–772.
34. Лу Д.Е. Действие радиации на живые клетки / Ред. Дубинин Н.П. М.: Госатомиздат, 1963. 284 с.
35. Weinert T.A., Kiser G.L., Harwell L.H. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair // Genes Dev. 1994. V. 8. P. 652–665.
36. Rowley R., Subramani S., Young P.G. Checkpoint controls in *Schizosaccharomyces pombe*: rad1 // EMBO J. 1992. V. 11. № 4. P. 1335–1342.
37. Al-Khodairy F., Carr A.M. DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe* // EMBO J. 1992. V. 11. № 4. P. 1343–1350.
38. Murray A.W. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls // Nature. 1992. V. 359. P. 599–604.
39. Lydall D., Weinert T. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest // Science. 1995. V. 270. P. 1488–1491.
40. Sanchez Y., Bachant J., Wang H. et al. Control of the DNA damage checkpoint by Chk1 and Rad53 protein kinases through distinct mechanisms // Science. 1999. V. 286. P. 1166–1171.
41. Paciotti V., Lucchini G., Plevani P., Longhese M. P. Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p // EMBO J. 1998. V. 17. P. 4199–4209.
42. Sanchez Y., Desany B.A., Jones W.J. et al. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways // Science. 1996. V. 271. P. 357–360.
43. Allen J.B., Zhou Z., Siede W. et al. The SAD1 / RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast // Genes Dev. 1994. V. 8. P. 2401–2415.
44. Weiss E., Winey M. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is a part of a mitotic checkpoint // J. Cell Biol. 1996. V. 132. P. 111–123.
45. Alexandru G., Zacharie W., Schleffer A., Nasmyth K. Sister chromatid separation and chromosome reduplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage // EMBO J. 1999. V. 18. P. 2707–2721.
46. Fraschini R., Formenti E., Lucchini G., Piatti S. Budding yeast Bub2 is located at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2 // J. Cell Biol. 1999. V. 145. P. 979–991.
47. Feaquet D., Fitzpatrick P.J., Johnson A.L. et al. A Bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the Dbf2p kinase in budding yeast // EMBO J. 1999. V. 18. P. 2424–2434.
48. Walters J.C., Chen R.H., Murray A.W., Salmon E.D. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension // J. Cell Biol. 1998. V. 141. P. 1181–1191.
49. Nasmyth K. Separating sister chromatids / Trends Biochem. Sci. 1999. V. 24. P. 98–104.
50. Visintin R., Prinz S., Amon A. CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis // Science. 1997. V. 278. P. 460–463.
51. Cohen-Fix O., Peters J.M., Kirschner M.W., Koshland D. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p // Genes Devel. 1996. V. 10. P. 3081–3093.
52. Elledge J.S. Mitotic arrest: Mad2 prevents sleepy from waking up the APC // Science. 1998. V. 279. P. 999–1000.
53. Sugimoto K., Shimomura T., Hashimoto K., et al. Rfc5, a small subunit of replication factor C complex, couples DNA replication and mitosis in budding yeast // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7048–7052.
54. Wang H., Elledge S.J. DRC1, DNA replication and checkpoint protein 1, functions with DPB11 to control DNA replication and the S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 3824–3829.
55. Jin D.Y., Spencer F., Jeang K.T. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein Mad1 // Cell. 1998. V. 93. P. 81–91.
56. Taylor S.S., McKeon F. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage // Cell. 1997. V. 89. P. 727–735.
57. Li F., Ambrosini G., Chu E.Y., et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving // Nature. 1998. V. 396. P. 580–584.
58. Toczyski D.P., Galgoczy D.J., Hartwell L.H. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint // Cell. 1997. V. 90. P. 1097–1106.
59. Dasso M., Newport J.W. Completion of DNA replication is monitored by a feedback system that controls the

- initiation of mitosis *in vitro*: studies in *Xenopus* // Cell. 1990. V. 61. P. 811–823.
60. Fogarty P., Campbell S.D., Abu-Shumays R., et al. The *Drosophila grapes* gene is related to checkpoint gene *chk1/rad27* and is required for late syncytial division fidelity // Curr. Biol. 1997. V. 7. P. 418–426.
 61. Jones L., Richardson H., Saint R. Tissue-specific regulation of *cyclin E* transcription during *Drosophila* embryogenesis // Development. 2000. V. 127. P. 4619–4630.
 62. Morgan D.O. The dynamics of cyclin dependent kinase structure // Cur. Opin. in Cell Biology. 1996. V. 8. № 6. P. 767–772.
 63. Foias de Borja P., Collins N.C., Du P. et al. Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription // The EMBO J. 2001. V. 20. № 20. P. 5737–5747.
 64. Hadwiger J.A., Wittenberg C., Mendenhall M.D., Reed S.I. The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1⁺* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex // Mol. Cell Biol. 1989. V. 9. № 5. P. 2034–2041.
 65. Pines J., Hunter T. Cyclin-dependent kinases: an embarrassment of riches? Cell Cycle Control / Eds Hutchison C., Glover D. N. Y.: Oxford Univ. Press, 1995. P. 144–176.
 66. Hunt T., Luca F.C., Ruderman J.V. The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycle of the clam embryo // J. Cell Biol. 1992. V. 116. P. 707–716.
 67. Jacobs H.W., Keidel E., Lehner C.F. A complex degradation signals in Cyclin A required for G1 arrest, and a C-terminal region for mitosis // The EMBO J. 2001. V. 20. № 10. P. 2376–2386.
 68. Gallant P., Nigg E.A. Identification of novel vertebrate cyclin: Cyclin B3 shares properties with both A-type and B-type cyclins // EMBO J. 1994. V. 13. P. 595–605.
 69. Jacobs H.W., Knoblich J., Lehner C. F. *Drosophila* Cyclin B3 is required for fertility and is dispensable for mitotic like Cyclin B // Genes Dev. 1998. V. 12. № 23. P. 3741–51.
 70. Sclafani R.A. Cyclin dependent kinase activating kinases // Cur. Opin. in Cell Biology. 1996. V. 8. № 6. P. 788–794.
 71. Stone E.M., Yamano H., Kinoshita N. et al. Mitotic regulation of protein phosphatases by the fission yeast sds22 protein // Cur. Biol. 1993. V. 3. P. 13–16.
 72. Mayer-Jaekel R.E., Hemmings B.A. Role of protein phosphatase 2A in *Drosophila* development // Semin. Cancer Biol. 1995. V. 6. P. 249–256.
 73. Shiomi K., Takeichi M., Nishida Y. et al. Alternative cell fate choice induced by low-level expression of a regulator of protein phosphatase 2A in the *Drosophila* peripheral nervous system // Development. 1994. V. 120. P. 1591–1599.
 74. Wegener S., Hample W., Herrmann D., et al. Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C // Eur. J. Cell Biol. 2000. V. 79. P. 810–815.
 75. Molinari M., Mercurio C., Dominguez J., et al. Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis // EMBO Rep. 2000. V. 1. № 1. P. 71–79.
 76. Lehman D.A., Patterson B., Johnson L.A., et al. Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, string / Cdc25 // Development. 1999. V. 126. P. 1793–1803.
 77. Karlsson C., Katich S., Hagting A. et al. Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis // J. Cell Biol. 1999. V. 146. № 3. P. 573–583.
 78. Harper J.W. Cyclin Dependent Kinase Inhibitors // Checkpoints Control and Cancer / Ed. Kastan M.B. N.Y.: Cold Spring Harb. Lab. Press, 1997. P. 91–108.
 79. Serrano M., Hannon C.J., Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D / CDK4 // Nature. 1994. V. 366. P. 704–707.
 80. Myster D.L., Duronio R.J. To differentiate or not to differentiate? // Curr. Biol. 2000. V. 10. № 8. P. R302–304.
 81. Avedisov S.N., Krasnoselskaya I., Mortin M., Thomas B.J. *Roughex* mediates G(1) arrest through a physical association with *cyclin A* // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 21. P. 8220–8229.
 82. Foley E., O'Farrell P.H., Sprenger F. Rux is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) specific for mitotic cyclin-Cdk complexes // Curr. Biol. 1999. V. 9(23). P. 1392–402.
 83. Bedard D.P., Johnston G.C., Singer R.A. New mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affecting completion of the “Start” event // Curr. Genet. 1981. V. 4. P. 205.
 84. Wittenberg C., Reed S.I. Control of the yeast cell cycle is associated with assembly / disassembly of the Cdc28 protein kinase complex // Cell. 1988. V. 564. P. 1061.
 85. Cross F.R. DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell Biol. 1988. V. 8. P. 4675–4684.
 86. Hadwiger J.A., Wittenberg C., Richardson H.E., et al. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6255.
 87. Wittenberg C., Sugimoto K., Reed S.I. G1-specific cyclins of *S. cerevisiae* cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34^{CDC28} protein kinase // Cell. 1990. V. 62. P. 225–233.
 88. Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1963. С. 429.
 89. Ogas J., Andrews B.J., Hershkovitz I. Transcriptional activation of *CLN1*, *CLN2*, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1 specific transcription // Cell. 1991. V. 66. P. 1015–1022.
 90. Cross F.R., Tinkenberg A.H. A potential positive feedback loop controlling *CLN1* and *CLN2* gene expression at the start of yeast cell cycle // Cell. 1991. V. 65. P. 875–882.
 91. Hartwell L.H., Weinert T.A. Checkpoints: Control that ensure the order of cell cycle events // Science. 1989. V. 246. № 4930. P. 629–634.

92. Bartek J, Bartkova J., Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and restriction point // *Cur. Opinion in Cell Biol.* 1996. V. 8. № 6. P. 805–814.
93. Won K.A., Xiong Y., Beach D. Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 9910.
94. Datar S.A., Jacobs H.W., de la Cruz A.F., et al. The *Drosophila* CycD/cdk4 complex promotes cellular growth // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 17. P. 4543–4554.
95. Dyson N. The regulation of E2F by pRb-family proteins // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 2245–2262.
96. Duronio R.T., Bonnette P.C., O'Farrell P.H. Mutations of the *Drosophila* dDP, dE2F, and cyclin E Genes reveal distinct roles for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1–S transition // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. N.1. P. 141–151.
97. Beijersbergen R.L., Carlee L., Kerkhoven R.M., Bernards R. Regulation of retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes // *Genes Dev.* 1995. V. 9. № 11. P. 1340–1353.
98. Stepanova L., Leng X., Parker S.B., Harper J.M. Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes cdk4 // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 1491–1502.
99. Hoffmann I., Draetta G., Karsenti E. Activation of phosphatase activity of human Cc25A by a Cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 4302–43107
100. Santoni-Rugiu E., Falck J., Mailand N. et al. Involvement of myc activity in a G1/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. N. 10. P. 3497–3509.
101. Strohmaier H., Spruck C.H., Kaiser P. et al. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in breast cancer cell line // *Nature.* 2001. V. 413. P. 316–322.
102. Blow J.J., Watson J.V. Nuclei act as independent and integrated units of replication in a *Xenopus* cell-free DNA replication system // *EMBO J.* 1987. V. 6. № 7. P. 1997–2002.
103. Blow J.J., Shleeman A.M. Replication of purified DNA in *Xenopus* egg extract is dependent on nuclear assembly // *J. Cell Sci.* 1990. V. 95. P. 383–391.
104. Newport J.W., Kirschner M.W. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development // *Cell.* 1984. V. 37. P. 731–742.
105. Blow J.J., Laskey R.A. A role of the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle // *Nature.* 1988. V. 332. № 6164. P. 546–548.
106. Nishitani H., Taraviras S., Lygerou Z., Nishimoto T. The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 48. P. 44905–44911.
107. Diffley J.F., Cocker J.H., Dowell S.J., Rowley A. Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins *in vivo* // *Cell.* 1994. V. 78. P. 303–316.
108. Blow J.J. Preventing re-replication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor // *J. Cell. Biol.* 1993. V. 122. P. 993–1002.
109. Kubota Y., Mimura S., Nishimoto S., Nojima H. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of *Xenopus* DNA replication licensing factor // *Cell.* 1995. V. 81. P. 601–609.
110. Hollstein M., Vogelstein B., Harris C. p53 mutations in human cancer // *Science.* 1991. V. 253. P. 49.
111. Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer // *Cell Prolif.* 2000. V. 33. P. 261–274.
112. Kuerbitz S.L., Plunkett B.S., Walsh W.V., Kastan M.B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 7491–7495.
113. Rotman G., Shiloh Y. The ATM gene and protein: possible roles in genome surveillance, checkpoint controls and cellular defence against oxidative stress // *Cancer Surv.* 1997. V. 29. P. 285–304.