

РЕГУЛЯТОРИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ *ARABIDOPSIS THALIANA* (*BRASSICACEAE*) ЗА УМОВ КЛІНОСТАТУВАННЯ. ЦИКЛІН-ЗАЛЕЖНІ КІНАЗИ

К л ю ч о в і с л о в а: клітинний цикл, циклін-залежні кінази, регуляція клітинного циклу, цикліни, експресія генів

Циклін-залежні кінази (ЦЗК) — це клітинні машини, які запускають події клітинного циклу і є своєрідним годинником цих подій. Окрім того, вони виконують функцію інформаційних процесорів, що інтегрують зовнішні та внутрішні сигнали для тонкої координації подій клітинного циклу. Оскільки основними регуляторами клітинного циклу еукаріот є цикліни (рис. 1) і ЦЗК, припускається суттєва зміна саме їхнього рівня в клітинах за умов мікрогравітації та дії інших фізичних факторів [2]. Тому для дослідження були обрані гени δ-циклінів (належать до класу Д-циклінів), які дуже важливі для проходження клітиною пресинтетичної фази клітинного циклу і відповідають за вихід клітини зі стану спокою та перехід до фази синтезу ДНК (S), а також ЦЗК2, що активується цим класом циклінів й утворює активний ЦЗК-цикліновий комплекс. Вивчення ЦЗК необхідне для розуміння фундаментальних механізмів контролю клітинного циклу.

Загальна характеристика ЦЗК: класифікація, функції та механізм дії

Кожна циклін-залежна кіназа є каталітичною субодиницею холоферментного комплексу. Активуючись присутністю другої активуючої субодиниці — цикліну, вона перетворюється на головні регулято-

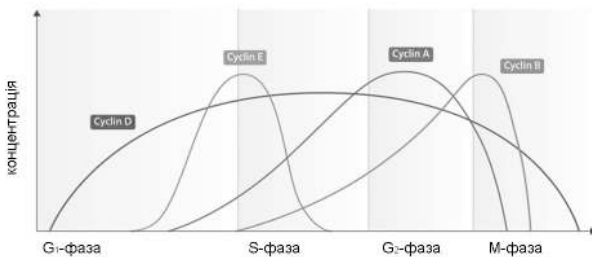


Рис. 1. Експресія циклінів протягом клітинного циклу

Fig. 1. Cyclins expression during the cell cycle

© О.А. АРТЕМЕНКО, 2014

ри, які впливають на зміну фаз клітинного циклу. Активація кожної ЦЗК відбувається після її взаємодії зі специфічним цикліном, а утворення ЦЗК-циклінового комплексу стає можливим по досягненні цикліном критичної концентрації. Комплекс, що утворився, має тригерний механізм дії та ініціює активацію наступного циклін-кіназного комплексу. У відповідь на зменшення внутрішньоклітинної концентрації конкретного цикліну відбувається зворотна інактивація відповідної ЦЗК. Деякі циклін-залежні кінази активуються більш як одним цикліном. У цьому випадку група циклінів немовби передає протеїнкінази одна одній, підтримуючи їх в активованому стані доволі тривалий час. Такі хвилі активації ЦЗК виникають протягом G1- і S- фаз клітинного циклу (рис. 2).

Ідентифіковано вісім індивідуальних ЦЗК (ЦЗК1-ЦЗК8), частина яких безпосередньо не бере участі в регуляції клітинного циклу (табл. 1). Для по-

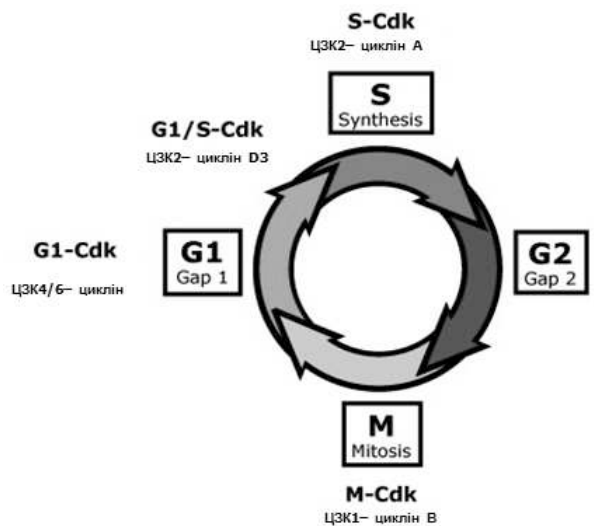


Рис. 2. Схематичне утворення ЦЗК-циклінових комплексів відповідно до фаз клітинного циклу

Fig. 2. Schematic forming of CDK-cyclins complexes according to cell cycle phases

Таблиця 1. Класифікація та функції деяких ЦЗК еукаріот

Вид	Назва	Синонім	Розмір (амінокислотні залишки)	Функція
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cdk1	Cdc28	298	Усі стадії клітинного циклу
<i>Saccharomyces pombe</i>	Cdk1	Cdc2	297	Усі стадії клітинного циклу
<i>Drosophila melanogaster</i>	Cdk1	Cdc2	297	М
	Cdk2	Cdc2c	314	G1/S, S, можливо, М
	Cdk4	Cdk4/6	317	G1, забезпечує ріст
<i>Xenopus laevis</i>	Cdk1	Cdc2	301	М
	Cdk2		297	S, можливо, G1/S
<i>Homo sapiens</i>	Cdk1	Cdc2	297	М
	Cdk2		298	G1/S, S, можливо, М
	Cdk4		303	G1
	Cdk6		326	G1

ліпептидних ланцюгів усіх ЦЗК характерна висока (до 75 %) структурна гомологія. Специфічність їхнього функціонування забезпечує унікальні сайти зв'язування відповідних активуючих циклінів.

Прийнята в літературі нумерація ЦЗК (Cdk — в англійському варіанті) визначена послідовно за їхнім відкриттям:

ЦЗК1 — асоціюється з циклінами А та В і бере участь у переході G2-M.

ЦЗК2 — може зв'язуватися з циклінами А, Е, D2 і D3 (але не D1) [14] та є однією з основних кіназ, які регулюють перехід G1-S і проходження S-фази.

ЦЗК3 — експресується в більшості клітин на незначному рівні, її функція поки що не визначена, хоча припускається, що вона, подібно до ЦЗК2, бере участь у переході G1-S [15].

ЦЗК5 — дані про її роль і циклінів, що з нею взаємодіють, суперечливі.

ЦЗК4 та ЦЗК6 — беруть участь у регуляції переходу G1-S. Вони є основними каталітичними партнерами циклінів D-типу, утворюють з ними функціональні комплекси, що володіють субстратною специфічністю для білка Rb (ретинобластоми) [7, 10, 14].

Каталітична активність ЦЗК забезпечується високоспецифічними сайтами зв'язування, що дає змогу двом субстратам правильно розташуватися стосовно один одного і здійснити перенесення

фосфату АТФ на кисень ОН групи білка-субстрату. Члени сімейства ЦЗК складаються приблизно з 300 залишків амінокислот. Зв'язування з цикліном збільшує кіназну активність ЦЗК і, крім того, визначає їхню локалізацію та субстратну специфічність. Рівень експресії кожного з циклінів, і меншою мірою — ЦЗК, спрямовано змінюється у певні фази клітинного циклу. Так, вихід клітини зі стадії спокою і перехід до фази G1 визначається утворенням комплексів циклінів D (D1-D3) із ЦЗК4 або ЦЗК6 (залежно від типу клітин). Перехід з G1 у S пов'язаний із формуванням комплексів цикліну Е (або цикліну D3 у рослин) з ЦЗК 2 і т.д. Перехід до мітозу, наприклад, зумовлений утворенням комплексів ЦЗК1 (інша і найпоширеніша назва — Cdc2) з цикліном В (рис. 3).

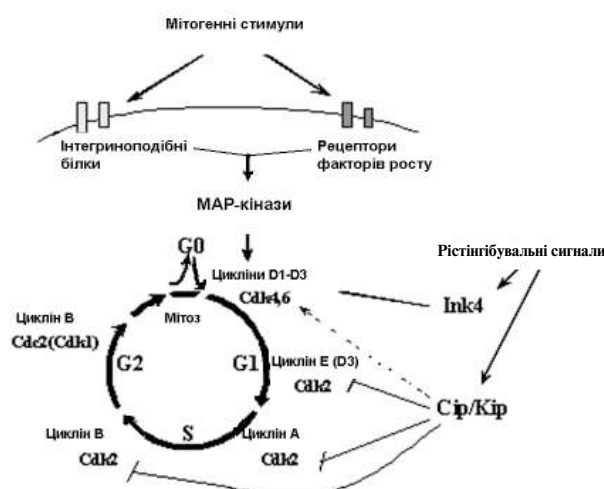


Рис. 3. Загальні принципи регуляції клітинного циклу в клітині. Вхід до циклу та пересування по ньому зумовлені послідовною активацією різних циклін-залежних кіназ (Cdk). Підвищення їхньої активності ініціюється сигналами від рецепторів факторів росту та інтегриноподібних білків, які спричинюють складний каскад подій. Вони зумовлюють активацію групи МАР-кіназ — ключових регуляторів Cdk (МАР-кіназа — Mitogen-activated protein kinase), що, активуючись внутрішньоклітинними стимулами, відповідають на позаклітинні стимули (мітогени) і регулюють багато клітинних процесів (експресію генів, поділ, диференціювання й апоптоз). Центральну роль у негативній регуляції поділу клітин відіграють інгібітори циклін-залежних кіназ (ЦКІ) — білки сімейств Ink4 та Cip/Kip [3, 8]

Fig. 3. Basic principles of cell cycle regulation. Entrance to and advance on the cycle caused consecutive activation of different cyclin-dependent kinases (Cdk). The increase of their activity initiated signals from growth factors and integrin-like proteins, which start complicated events that lead to MAP-kinase activation (MAP-kinase — Mitogen-activated protein kinase — activated by intracellular stimulus respond to extracellular stimulants (mitogens) after intracellular activation and many cell processes (genes expression, division, differentiation and apoptosis) regulation). The central role in negative regulation of cell division has cyclin-dependent kinases inhibitors (CKI) — protein family Ink4 and Cip/Kip [3, 8]

Таблиця 2. Класифікація та функції інгібіторів комплексу циклін-ЦЗК (ЦКІ)

Вид	Назва	Синоніми	Гомологи	Функції
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sic1		Rum1	Інгібує S- та M-Cdk, пригнічує активність Cdk в G1
	Far1		нет	інгібує G1/S—Cdk у відповідь на феромони
<i>Saccharomyces pombe</i>	Rum1		Sic1	Інгібує S— та M—Cdk, пригнічує активність Cdk в G1
<i>Drosophila melanogaster</i>	Roughex/Rux		нет	Інгібує S— та M—Cdk, пригнічує активність Cdk у G1
	Dacapo/Dap		Cip/Kip	Інгібує G1/S—Cdk, пригнічує активність Cdk в G1
<i>Xenopus laevis</i>	Xic1	Kix1	Cip/Kip	Інгібує G1/S— та S—Cdk
<i>Homo sapiens</i>	p21	Cip1/Waf1	Cip/Kip	Інгібує G1/S— та S—Cdk, активує циклін D—Cdk4
	p27	Kip1	Cip/Kip i	Інгібує G1/S— та S—Cdk, активує циклін D—Cdk4
	p57	Kip2	Cip/Kip	Інгібує G1/S— та S—Cdk, активує циклін D—Cdk4
	p15 ^{INK4b}	-	INK4	Інгібує Cdk4, Cdk6
	p16 ^{INK4a}	-	INK4	Інгібує Cdk4, Cdk6
	p18 ^{INK4c}	-	INK4	Інгібує Cdk4, Cdk6
	p19 ^{INK4d}	-	INK4	Інгібує Cdk4, Cdk6

Роль ЦЗК у регуляції клітинного циклу

ЦКІ — це білок, який блокує активність циклін-залежної кінази окремо або в комплексі з цикліном. Зазвичай активація ЦКІ спостерігається у фазі G1 клітинного циклу і може відбуватися у відповідь на пошкодження ДНК або спричинюватися позаклітинними інгібувальними сигналами [6].

Більшість еукаріотичних організмів мають інгібіторів циклін-залежних кіназ (табл. 2). У тваринних клітинах виділяють два сімейства ЦКІ — Cip/Kip та INK4. До інгібіторів сімейства Cip/Kip належать білки p21, p27 і p57, які блокують циклін-залежну кіназу в комплексі з цикліном (рис. 4). Інгібітори сімейства INK4 (білки p15, p16, p18 та p19) блокують окремі циклін-залежні кінази ЦЗК4 і ЦЗК6 [6, 4, 13].

Окрім зв'язування з циклінами, активність ЦЗК регулюється змінами фосфорилування деяких їхніх амінокислотних залишків (за таку регуляцію відповідають фосфатази Cdc25 і протеїнкінази САК,

Wee1) та зв'язуванням із ЦКІ — інгібіторами ЦЗК. ЦКІ — це група білків, яка складається з двох сімейств. Представники сімейства Cip/Kip (p21WAF1/CIP1, p27KIP1 і p57KIP2) інгібують різні комплекси ЦЗК2, що відповідають за вхід та просування S фази. Меншою мірою вони пригнічують активність комплексів циклін В/Cdc2, які відповідають за перехід до мітозу. З іншого боку, вони не інгібують, а навіть активують комплекси циклін D/ ЦЗК4(6), які оперують у ранішій G1 фазі. Члени сімейства Ink4 (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d) безпосередньо взаємодіють з ЦЗК4(6). При цьому, зв'язуючи ЦЗК4(6), що містяться в складі активних комплексів із цикліном D та білками Cip/Kip, вони витісняють білки Cip/Kip, спрямовуючи їх на зв'язування з ЦЗК2. Тому підвищення активності білків Ink4 зумовлює як пряме інгібування активності комплексів циклін D/ ЦЗК4(6), так і непряме блокування комплексів циклін E (D3 у рослин)/ ЦЗК 2 та циклін A/ ЦЗК 2 (рис. 4).

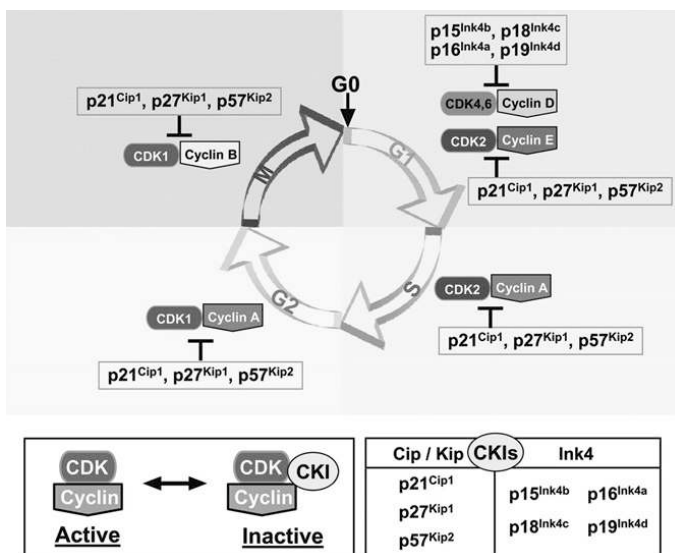


Рис. 4. Регуляція клітинного циклу еукаріот комплексами ЦЗК/циклін та ЦКІ. Активація специфічних комплексів ЦЗК/циклін забезпечує просування клітини фазами клітинного циклу. ЦКІ (Cip/Kip і Ink4 сімейства) взаємодіють та інактивують комплекси ЦЗК/циклін, блокуючи просування клітинним циклом і клітинну проліферацію [5]

Fig. 4. Cell cycle regulation by CDK/cyclin complexes and CKIs. Activation of specific CDK/cyclin complexes drives progression through these cell cycle phases. CKIs of the Cip/kip and the Ink4 families interact with and inactivate CDK/cyclin complexes, thereby blocking cell cycle progression and cell proliferation [5]

Дія більшості інгібувальних факторів заснована на активації ЦКІ сімейств Ink4 та Cip/Kip, що спричинює зупинку клітинного циклу в так званих чекпойнтах (checkpoints – точки перевірки). Залежно від типу інгібувальної дії та молекул, залучених до його розпізнавання, спостерігається зупинка клітинного циклу в G1, S, G2 фазах або мітозі [16]. При цьому затримка в G2 пов'язана як з активацією сімейства Cip/Kip, так і з підвищенням активності низки інших молекул, що інгібують функцію комплексу циклін В/Cdc2, а зупинка в мітозі — зі змінами активності молекул, які контролюють конденсацію хроматину і розділення сестринських хроматид [3, 17].

Вплив кліноостатування на ЦЗК

Відомо, що клітини, які перебувають в активному фізіологічному стані й діляться, є найчутливішими до зміненої гравітації [9]. У дослідженнях з різними видами вищих рослин встановлені зміни їхньої ростової реакції в умовах реальної мікрогравітації в космічному польоті та симульованої мікрогравітації (кліноостатування, яке частково відтворює біологічні ефекти мікрогравітації). Відзначено як стимуляцію проліферативної активності, так і її зниження або відсутність помітних змін. З'ясувалося, що найчутливішими є клітини, які перебувають у пресинтетичній фазі клітинного циклу (G1) [6, 12].

Для вивчення впливу кліноостатування на активність клітинної проліферації необхідні дослідження як молекулярних механізмів регуляції клітинного циклу, так і розвитку рослин в умовах зміненої гравітації. Використання кліноостатування дає можливість визначити вплив симульованої гравітації на події в клітині протягом клітинного циклу — вихід зі стану спокою і просування G1- і S фазами циклу. Раніше ми показали, що кліноостатування гальмує перехід клітин кореневої меристеми рослин від пресинтетичної фази циклу до фази синтезу ДНК завдяки накопиченню в клітині транскриптів $\delta 3$ -цикліну, який відповідає за вступ клітини у фазу синтезу [1]. Вважається, що надекспресія гена $\delta 3$ -цикліну є відповіддю клітини на стресові умови і свідчить про вплив кліноостатування на клітинний цикл. Також відомо, що клітинний цикл регулюється активністю ЦЗК-циклінового комплексу, який контролює перехід з однієї фази циклу до іншої. Транскрипційна ак-

тивність генів циклінів за умов кліноостатування вища, ніж у контролі, однак очевидна затримка переходу клітин до фази синтезу ДНК, найімовірніше, зумовлена неактивним станом ЦЗК-циклінового комплексу [7, 11].

Об'єктом нашого дослідження були трансгенні рослини *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. (*Brassicaceae*) ЦЗК G1::GFP та циклін D1::GFP за умов кліноостатування і в контролі на ранніх етапах росту (2—5 діб). У результаті експерименту на дводобових проростках *A. thaliana*, за допомогою конфокальної мікроскопії, показано, що експресія цикліну D1 в умовах кліноостатування вища, ніж у контролі (рис. 5). У контролі рівень транскриптів був невеликим і в основному локалізований у зоні меристеми кореня. У разі кліноостатування кількість транскриптів виявилася більшою і розташовувалися вони не тільки в меристемі, а й у перичиклі зони розтягу. Ці дані підтверджують результати, отримані раніше про надекспресію генів цикліну D в умовах кліноостатування методами ЗТ-ПЛР та гібридизації *in situ* [1].

Експресія ЦЗК G1::GFP за кліноостатування також вища порівняно з контролем. У контролі транскрипти розташовані поодинокі в клітинах зони розтягу і їхня флуоресценція була надмірною. За умов кліноостатування розташування транскриптів і їхня флуоресценція рівномірні в зонах меристеми та розтягу. За отриманими даними можна припустити, що оскільки експресія ЦЗК в умовах кліноостатування вища, а активність комплексу циклін-ЦЗК нижча, то відбувається активація ЦКІ. Ним може бути білок p57 — негативний регулятор проліферації клітин, який інгібуює деякі комплекси G1 циклін/ЦЗК, або білок p21 — інгібітор у G1/S переході клітинного циклу. Для глибшого вивчення цього питання та з'ясування причини інгібування необхідні подальші дослідження.

Таким чином, оскільки активність цикліну D може контролюватися дією як ендогенних, так і екзогенних факторів, кліноостатування може бути одним із тих чинників, що впливають на експресію білків, які регулюють клітинний цикл. Ці дані можна використати як модель для подальшого дослідження ЦЗК-циклінового комплексу та ЦКІ у вивченні молекулярних механізмів регуляції росту та проліферації.

контроль

кліностакування

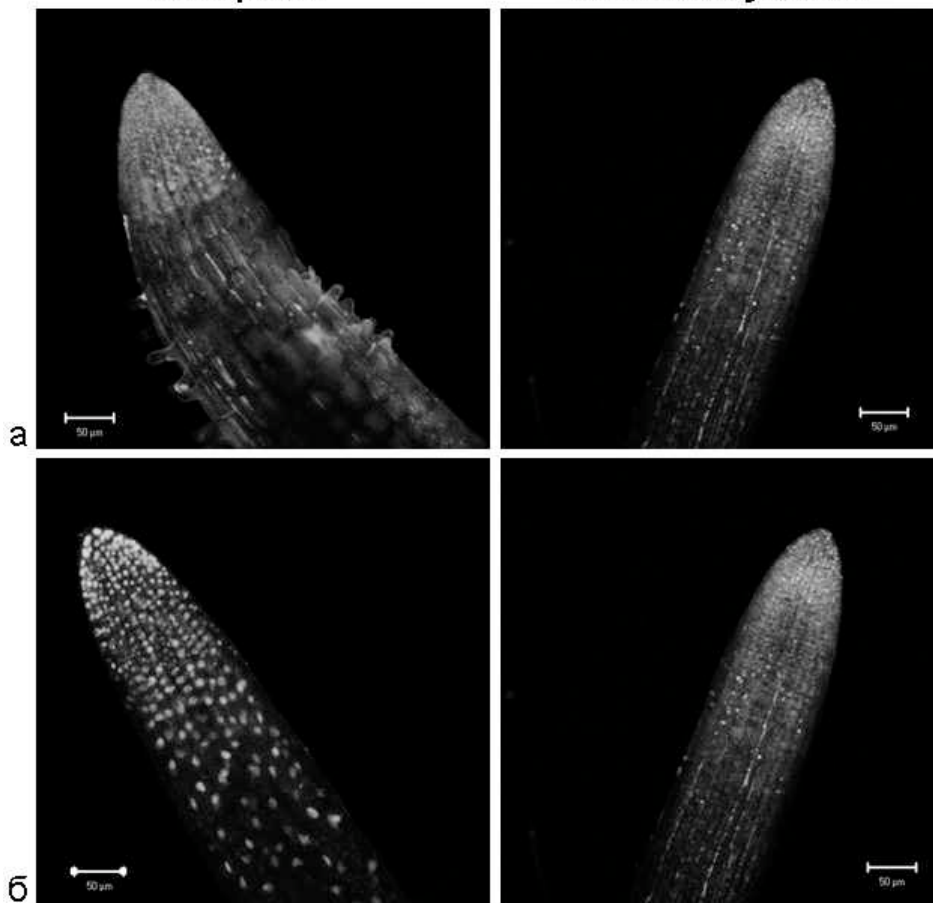


Рис. 5. Експресія цикліну D (а) та CDK D1 (б) у дводобових проростків *Arabidopsis thaliana*

Fig. 5. Cyclin D expression (a) and CDK D1 (b) in two-day germinated seedlings of *Arabidopsis thaliana*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Артеменко О.А. Експресія генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів в кореневій меристемі *Pisum sativum* L. за умов кліностакування // Цитологія та генетика. — 2006. — **40**, № 2. — С. 36—41.
2. Артеменко О.А. Сучасні уявлення про регуляцію клітинного циклу у рослин // Укр. ботан. журн. — 2001. — **58**, № 4. — С. 415—421.
3. Копнин Б.П. Основные свойства неопластической клетки и базовые механизмы их возникновения // Практическая онкология. — 2002. — **3**, № 4. — С. 229—235.
4. Andrietta M. H., Eloy N.B., Hemerly A.S., Ferreira P C.G. Identification of sugarcane cDNAs encoding components of the cell cycle machinery // Genet. Mol. Biol. — 200—**24**. — P. 1—4.
5. Fuster J.J., Fernandez P., Gonzalez-Navarro H., Silvestre C., Abu Nabah Y. N., Andres V. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies // Cardiovasc. Res. — 2010. — **86**. — P. 254—265.
6. Gaudin V., Lunness P.A., Fobert P.R., Towers M., Riou-Khamlichi C., Murray J.A., Coen E., Doonan J.H. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene // Plant Physiol. — 2000. — **122**. — P. 1137—1148.
7. Healy J.M., Menges M., Doonan J.H., Murray J.A. The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**. — P. 7041—7047.
8. Knepper C., Savory E. A., Day B. Arabidopsis NDR1 is an integrin-like protein with a role in fluid loss and plasma membrane-cell wall adhesion // Plant Physiol. — 2011. — **156**(1). — P. 286—300.
9. Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol. — 1997. — **17**— P. 1—78.
10. Mews M., Moore R. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division // Protoplasma. — 2001. — **216**(3—4). — P. 119—142.
11. Morgan D.O. The cell cycle: principles of control. — New science press. ISBN 978-0-9539181-2-6, 2007. — 297 p.
12. Oakenfull E.A., Riou-Khamlichi C., Murray J.A.H. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression // Phil. Trans. Royal Soc. Lond. — 2002. — **357**. — P. 749—760.
13. Shah M.A., Schwartz G.K. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy // Clin. Cancer Res. — 2001. — **7**. — P. 2168—2181.

14. Sherr C.J., Roberts J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression // *Genes Dev.* — 1999. — 13(12). — P. 1501—1512.
15. Van den Heuvel S., Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control // *Science.* — 1994. — 262. — P. 2050—2054.
16. Lipavska H., Maskova P., Vojvodova P. Regulatory dephosphorylation of CDK at G2/M in plants: yeast mitotic phosphatase cdc25 induces cytokinin-like effects in transgenic tobacco morphogenesis // *Ann. Bot.* — 2011. — 107. — P. 1071— 086.
17. Schnittger A., Schobinger U., Stierhof Y.D., Hulskamp M. Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis* trichomes // *Curr. Biol.* — 2012. — 12. — P. 415—420.

Рекомендує до друку
І.В. Косаківська

Надійшла 23.07.2014 р.

О.А. Артеменко

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины,
г. Киев

РЕГУЛЯТОРЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA* (BRASSICACEAE) В УСЛОВИЯХ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ. ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫЕ КИНАЗЫ

Основными регуляторами клеточного цикла растений, как и всех эукариот, являются циклины и циклин-зависимые киназы (ЦЗК), которые образуют активный комплекс, запускающий каскад реакций для прохождения клеткой клеточного цикла. В статье обобщены и собраны данные о классификации и свойствах этих белков и их роли в регуляции клеточного цикла растений на примере *Arabidopsis thaliana* (L) Heunh. Особое внимание уделено генам d-циклинов (относятся к классу D-циклинов), которые очень важны при прохождении клеткой пресинтетической фазы клеточного цикла, отвечают за выход клетки из состояния покоя и переход в фазу синтеза ДНК (S) и могут регулироваться

действием экзогенных факторов; а также ЦЗК 2, которая связывается с этим классом циклинов и образует активный ЦЗК-циклиновый комплекс. Каждый циклин синтезируется и деградирует в клетке в определенные периоды времени и уровень их экспрессии колеблется на протяжении клеточного цикла [2], тогда как ЦЗК присутствуют в клетке постоянно. Поэтому изучение ЦЗК необходимо для понимания фундаментальных механизмов контроля клеточного цикла.

К л ю ч е в ы е с л о в а: клеточный цикл, циклин-зависимые киназы, регуляция клеточного цикла, циклины, экспрессия генов.

О.А. Artemenko

M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine

CELL CYCLE REGULATORS IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (BRASSICACEAE) TRANSGENIC PLANTS UNDER CLINOROTATION. CYCLIN-DEPENDING KINASES

The main cell cycle regulators in plants, as in all eukaryotes, are cyclin and cyclin-dependent kinases (CDK). They form active complex to initiate a cascade of reactions during cell cycle progression. In this article the generalized data about classification, properties of these proteins and their role in cell cycle regulation in the model plant *Arabidopsis thaliana* (L) Heunh. are presented. The following issues are emphasized: d-cyclins genes (from D-class of cyclins), very important for cell progression across pre-synthetic phase of the cell cycle, which are responsible for cell transition from quiescence stage in DNA-synthesis phase (S) and can be regulated by exogenic factors; and CDK2, which combines this class of cyclins to form an active CDK-cyclin complex. Each cyclin is synthesized and degrades in the cell for a specific period of the cycle and their expression fluctuates during the whole cell cycle [2], whereas CDKs is permanently present in the cell. Therefore, the study of CDK is necessary for understanding the fundamental cell cycle control mechanisms.

K e y w o r d s: cell cycle, cyclin-dependent kinase, cell cycle regulation, cyclin, gene expression.