



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

Лекція № 5

Тема: Генетичний контроль мітозу та мейозу

План:

1. Регуляторні білки здійснення мітозу
2. Генетичний контроль мітозу
3. Система генів, що контролює здійснення мейозу
4. Цитогенетика В-хромосом

1. Регуляторні білки здійснення мітозу

Генетичний контроль мітозу — це процес, який забезпечує точне розподілення генетичного матеріалу між дочірніми клітинами під час клітинного поділу. Ключові регулятори цього процесу включають циклін-залежні кінази (CDKs) та їхні регуляторні партнери цикліни. Вони контролюють різні фази мітозу: від ініціації до завершення поділу.

На початку мітозу CDKs активуються і запускають конденсацію хромосом. У подальших фазах відбувається формування та розпад веретена поділу, розподіл хромосом до полюсів клітини, та формування нових ядерних оболонок. Генетичний контроль мітозу забезпечує коректний розподіл хромосом і запобігає генетичним аномаліям.

Цикліни — це ключові регуляторні білки, які контролюють діяльність циклін-залежних кіназ (CDKs) і, відповідно, управління клітинним циклом. Цикліни забезпечують точне переключення між різними фазами клітинного циклу. Ось як вони працюють:

1. **Синтез і деградація:** Цикліни синтезуються в певні моменти клітинного циклу і потім швидко деградують. Це контрольований процес, що дозволяє регулювати активність CDKs тільки в потрібний час.
2. **Формаційні комплекси з CDKs:** Цикліни зв'язуються з CDKs, формуючи активні комплекси. Ці комплекси здатні фосфорилувати специфічні субстрати, що необхідно для просування клітинного циклу.
3. **Контроль клітинного циклу:** Різні типи циклінів відповідають за різні етапи клітинного циклу:
 - G1-цикліни контролюють перехід від G1-фази до S-фази.
 - S-цикліни залучені в ініціацію синтезу ДНК в S-фазі.
 - G2/М-цикліни керують переходом від G2-фази до мітозу.
 - М-цикліни забезпечують правильний перебіг мітозу.
4. **Регуляція і зворотній зв'язок:** Активність циклінів контролюється системами зворотного зв'язку. Наприклад, активація одного комплексу CDK/циклін може призвести до активності інших генів і білків, які впливають на деградацію циклінів або активацію наступного цикліну.



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

5. **Деградація:** Після виконання своєї ролі, цикліни розщеплюються протеасомами, що запобігає їх повторному використанню в неправильний час.

Цей чітко синхронізований процес забезпечує точне управління клітинним циклом і правильний поділ клітин.

Циклін-залежні кінази (CDKs) є важливими регуляторними білками, які контролюють різні етапи клітинного циклу. Вони активуються при взаємодії з циклінами, що є регуляторними білками, і відіграють ключову роль у координуванні подій, що відбуваються під час клітинного поділу.

Основні етапи роботи циклін-залежних кіназ:

1. **Активация:** Цикліни зв'язуються з CDKs, що призводить до їх активації. Це необхідний перший крок для подальшої роботи кінази.
2. **Фосфорилування субстратів:** Активовані CDKs фосфорилують різні субстрати, що є ключовими білками, що беруть участь у клітинному циклі. Це фосфорилування викликає зміни в структурі субстратів, що впливає на їхню функцію.
3. **Регуляція клітинного циклу:** Циклін-залежні кінази контролюють різні етапи клітинного циклу, такі як G1, S, G2 та M фази. Вони забезпечують правильний хід поділу клітини, забезпечуючи, щоб кожен етап відбувався в потрібний час.
4. **Деактивация:** Після завершення своєї ролі в клітинному циклі, CDKs деактивуються. Це може відбуватися через деградацію циклінів або фосфорилування CDKs іншими ферментами.

Циклін-залежні кінази є важливими для правильного функціонування клітин і можуть бути відповідальні за розвиток різних захворювань, якщо їх робота порушується.

Регуляція експресії генів Cdk:

Комплекси G1-періоду (циклін D–Cdk4,6 та циклін E–Cdk2), окрім інших різноманітних впливів, запускають транскрипцію гену Cdk1.

Регуляція активності Cdk

1. Зв'язування активаторної субодиниці – цикліну.
2. Зв'язування інгібіторної субодиниці. Інгібіторами Cdk є білки двох родин – INK4 (p15, p16) та KIP1 (p21, p27, p57), які перешкоджають активації Cdk.

3. Фосфорилування/дефосфорилування Cdk специфічними кіназами/фосфатазами, що призводить до їх активації чи інгібування.

Регуляція синтезу та розпаду активаторів та інгібіторів Cdk:

1. **Синтез циклінів:** кінцевою мішенню дії мітогенних факторів часто є ген цикліну D.

2. **Розпад циклінів:** убіквітинзалежний протеоліз.

Циклін B–Cdk1 (MPF) фосфорилує певні білки і стимулює вхід клітини в мітоз, але для завершення мітозу рівень MPF має зменшитись. Це забезпечується наступним чином: під час метафази мітозу MPF фосфорилує, окрім інших білків, фактор **APC (anaphase-promoting complex)** – убіквітинлігазу, специфічну до MPF. APC швидко приєднує молекули убіквітину до цикліну B, який після цього швидко руйнується в протеосомі.



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

3. **Синтез інгібіторів Cdk**: в деяких регуляторних шляхах білки родини **Smad** стимулюють синтез **p15**, **p21** та інших інгібіторів, в результаті чого поділи припиняються.

Сигнальні шляхи, пов'язані з Cdk:

1. Переважна більшість сигнальних шляхів, що регулюють проліферацію клітин, спрямована на комплекси G1-періоду (циклін D–Cdk4,6 та, в меншій мірі, циклін E – Cdk2).

2. Зовнішній стимул (мітоген) призводить до активації **тирозинкінази**, асоційованої з рецептором.

3. Наступною ланкою є каскад **МАРК**, фосфорилування певних **транскрипційних факторів** (Elk, Ets, ATF2, Tcf тощо) та активація ними **генів ранньої відповіді** (FOS, JUN).

4. Fos і Jun – транскрипційні фактори, що активують **гени пізньої відповіді**, і серед них – гени цикліну D, Cdk4, Cdk6.

Результат впливу мітогенів:

1. Підвищення вмісту в клітині цикліну D та Cdk4, Cdk6.

2. Зниження вмісту інгібіторів Cdk.

3. Дефосфорилування і підвищення активності Cdk4, Cdk6, а також Cdk2.

4. Все це забезпечує накопичення в клітині активних комплексів циклін D–Cdk4,6. Вони починають готувати клітину до поділу.

Дія антимітогенів:

1. **TNF α** через сигнальні шляхи сфінгозину та РКС **інгібує каскад МАРК**, в результаті чого в клітині знижується кількість активних комплексів циклін D–Cdk4,6 і поділи припиняються. Водночас через інші сигнальні шляхи TNF α **ініціює апоптоз**.

2. **TGF β** -рецептор фосфорилує і активує **Smad2 та Smad3**, після чого вони приєднують **Smad4** і дифундують в ядро, щоб активувати експресію генів **інгібіторів Cdk** (p15, p21). Накопичення цих інгібіторів призводить до зупинки проліферації.

Контактне гальмування проліферації:

1. При контакті з навколишніми клітинами проліферація припиняється.

2. Сигнал про міжклітинний контакт надходить від адгезивних білків **кадгеринів**. При взаємодії з іншою клітиною кадгерин набуває здатності зв'язувати білок **β -катенін**. У вільній формі β -катенін утворює активний комплекс із транскрипційним фактором **Tcf4**, який мігрує в ядро і в кінцевому результаті стимулює експресію генів **цикліну D та білка Мус** (останній активує експресію фосфатази, яка дефосфорилує і активує Cdk4).

3. При міжклітинній взаємодії β -катенін зв'язується з кадгерином, і поділи припиняються.

2. Генетичний контроль мітозу.

Однією з найважливіших функцій, яку виконують у клітинах хромосоми є сегрегаційна функція, яка контролюється складними генетичними системами та забезпечує регулярний, упорядкований



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

розподіл, сегрегацію генетичного матеріалу при мітотичному поділі, а також при мейозі і гаметогенезі.

Клітинний поділ, істотні моменти якого – розходження до полюсів хроматид від кожної хромосоми (каріокінез) та формування перетинки, що розділяє материнську клітину на дві дочірні (цитокінез), є одним із етапів (зазвичай нетривалим) клітинного циклу – періоду від одного поділу клітини до наступного поділу у дочірніх клітинах. У цьому циклі після завершення попереднього поділу настає інтерфаза, в якій особливо важливим є період підготовки до наступного поділу, коли здійснюється реплікація хромосом (S-період). Пресинтетичний період інтерфази називають періодом G_1 , а постсинтетичний – періодом G_2 . Слідом за G_2 настає профаза, а потім сам мітоз (M) – каріокінез і цитокінез.

За рівнем оновлення клітин всі тканини організму поділяються на три групи:

1. стабільні клітинні популяції – складаються із клітин з повною втратою здатності до поділу (нейрони, кардіоміоцити). Число клітин у такій популяції стабілізується на початку їх диференціювання; у міру старіння організму воно знижується внаслідок природного зменшення клітин;

2. зростаючі клітинні популяції – здатні не тільки до оновлення, але також і до зростання, збільшення маси тканини за рахунок наростання числа клітин та їх поліплоїдизації. Їх клітини виконують спеціалізовані функції, але зберігають здатність при стимуляції знову вступати в цикл для того, щоб відновити свою нормальну чисельність. Описані популяції клітин утворюють нирки, печінку, підшлункову і щитовидну залози;

3. оновлюємі клітинні популяції – характеризуються постійним оновленням клітин; спад кількості диференційованих, що виконують спеціалізовані функції, і нездатні до поділу клітин внаслідок їх загибелі, врівноважуються утворенням нових внаслідок поділу малодиференційованих камбіальних клітин і їх подальшого диференціювання. До таких популяцій відносять епітелій кишки, епідерміс, а також клітини кісткового мозку і крові.

Регуляція клітинного циклу у різних тканинах організму здійснюється збалансованою складною системою механізмів, стимулюючих або інгібуючих клітинний розподіл. Система регуляції клітинного циклу отримує два види інформації: про дію на клітину різних зовнішніх факторів, що сприяють активації або гальмуванню її поділу. Вона обробляє і інтегрує цю інформацію у вигляді визначальних сигналів, чи буде клітина вступати у мітотичний цикл або диференціюватися і перебувати у періоді репродуктивного спокою (G_0);

І другий тип інформації – про інтактність геному, при пошкодженні геному цикл зупиняється і включається система репарації ДНК. Тим самим знижується ймовірність небажаної реплікації пошкодженої ДНК. Численні сигнали, що регулюють діяльність клітини, замикаються на ген p53, який блокує проходження клітинного циклу до усунення виниклого ушкодження. Якщо це пошкодження занадто серйозне, p53 (у сукупності з іншими регуляторами) запускає програму апоптозу – запрограмованої загибелі клітини.

Виявлення та збереження у генетичних організмах мутацій, які блокують будь-які з етапів мітозу, можливо лише у тому випадку, якщо це



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

мутація з умовним проявом, бо інакше ці мутації визначали б неможливість клітинного поділу, тобто нежиттєздатність гомозиготної зиготи, за такими мутантним алелями. Можливості отримання мутацій з умовним проявом найчастіше використовується при роботі з мікроорганізмами, у тому числі з нижчими еукаріотичними організмами – грибами, водоростями, найпростішими.

На фіксованих клітинах нервових гангліїв личинок *D. melanogaster* вивчено вплив мутації гена клітинного циклу *ff3* на сегрегацію хромосом. Для цього порівнювали розподілення клітин за розміром діаметра інтерфазного ядра і відстані між сестринськими наборами хроматид у анафазі та телофазі. У контрольній лінії дикого типу *Lausenne* розподілення клітин по відстані між сестринськими хроматидами у анафазі виявилось схожим з розподілом клітин за розміром ядра, середня відстань між хроматидами, що розійшлися в анафазі (I_{cp}) збіглася із середнім діаметром інтерфазних ядер (d_{cp}) і склала 8,3 мкм; перехід клітин у телофазу відбувався при розбіжності хроматид на відстань 10 мкм і більше. У мутантній лінії *ff3* порівняно з контрольною лінією *Lausenne* змінювалося розподілення клітин за розміром ядра в інтерфазі і відстані між сестринськими наборами хроматид у анафазі, при цьому середній діаметр ядра і середня відстань між хроматидами збільшилися однаково до 9,3 мкм. Специфічною особливістю мітозу у мутантній лінії *ff3* було передчасний початок телофазної реорганізації хроматину. Внаслідок цього мали місце клітини з аномально коротким – меншим діаметром інтерфазних ядер та відстанню між сестринськими наборами хроматид у телофазі.

Умовний характер появи мутацій дозволяв зберігати мутантів у пермісивних умовах, здійснювати генетичний аналіз, отримувати генотипи, що поєднують по кілька мутантних генів. При цьому якщо у подвійного мутанта, що поєднує мутації з різним фенотиповим проявом, при певних умовах виявляються характеристики тільки однієї з мутацій, то робиться висновок про те, що ці мутації блокують послідовні етапи ланцюга подій і при цьому мутація, що виявляється у подвійного мутанта, блокує більш ранній етап. Цей факт приймається як свідчення того, що у клітинному циклі мутантної лінії *ff3* контролює подію I_{cp} , здійснювану незалежно від подій, які контролюються іншими чотирма генами.

Сукупність фактів, отриманих при вивченні взаємодії мутацій різних генів, дозволила дослідникам зробити ряд висновків про те, які етапи у клітинному циклі можуть контролювати ті або інші гени.

Поки виділено групу генів, функції яких необхідні для здійснення певних етапів клітинного циклу. Це дозволяє сподіватися на те, що надалі можна буде або поділити кожен з описуваних етапів на ланцюг послідовних подій, або виявити взаємодію якихось компонентів єдиної системи, що забезпечує проходження даного етапу клітинного циклу.

3. Система генів, що контролює здійснення мейозу.

Генетичний контроль мейозу забезпечує точне розділення генетичного матеріалу, що дозволяє утворювати статеві клітини (гамет) з половинним набором хромосом. Ось як це працює:



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

1. **Ініціація мейозу:** Початок мейозу контролюється специфічними генами, які активують сигнальні шляхи для переходу клітини з мітотичного циклу до мейозу.
2. **Синапсис і кросинговер:** На початку мейозу (під час профазі I) відбувається синапсис — з'єднання гомологічних хромосом. Гени контролюють ферменти, що забезпечують рекомбінацію ДНК (кросинговер), обмін генетичними сегментами між гомологічними хромосомами. Це забезпечує генетичне різноманіття.
3. **Сегрегація хромосом:** Генетичний контроль регулює правильне розподілення гомологічних хромосом під час анафази I і розподілення сестринських хроматид під час анафази II. Механізми перевірки (checkpoint) гарантують, що клітини не переходять до наступного етапу, доки не буде завершено правильний розподіл хромосом.
4. **Циклін-залежні кінази (CDKs)** та цикліни грають ключову роль у регуляції мейозу, як і в мітозі. Вони контролюють прогресію клітин через фази мейозу та забезпечують правильний перебіг поділу.
5. **Генетична стабільність:** Гени, що відповідають за репарацію ДНК, активуються для усунення будь-яких пошкоджень ДНК, що виникають під час рекомбінації та розподілу хромосом, забезпечуючи стабільність геному.

Всі ці механізми гарантують правильний і точний розподіл генетичного матеріалу, що є критичним для утворення здорових гамет і наступного покоління.

Генетичними дослідженнями встановлено, біля 32 генів, які контролюють процеси, що забезпечують нормальний мейоз.

Існування специфічної системи генів, які контролюють мейоз і не зачіпають мітоз підкреслює виявлення у багатьох видів рослин, мікроорганізмів та деяких тварин численних мутацій, які значно впливають на будь-який етап мейозу і при цьому не знижують їх життєздатність та зростання за допомогою мітотичних поділів.

Навіть генетичний контроль цитокінезу у мейозі у дріжджів виявився специфічним, оскільки гени, мутації яких блокують цитокінез у мітозі, не впливали на мейоз.

Отже, мейоз контролюється особливою системою генів, які детермінують різноманітні етапи саме цього поділу. Крім того, дослідження мейотичних мутацій (скорочено званих мей- мутаціями) у *D. melanogaster* показує, що генетичний контроль мейозу здійснюється по-різному в ово- і сперматогенезі, оскільки більшість вивчених мей-мутацій у самців не виявляється.

При дослідженні мей-мутацій з'ясовується, що багато з них характеризується цілим спектром аномалій мейозу порівняно з диким типом. Значна частина цього плейотропного ефекту буває наслідком першого, найбільш раннього порушення у ланцюзі подій, що відбуваються у мейозі.

Таким чином, вивчення мей-мутацій дозволило обгрунтовано висунути припущення про те, що генетично контролюється не тільки загальний рівень рекомбінаційного процесу у хромосомах, але і властива виду неоднорідність ймовірних обмінів у різних ділянках хромосом. Мутації деяких генів змінюють саме характер цієї неоднорідності.



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

Підвищення частоти нерозходження хромосом викликається мутаційними змінами, які призводять до передчасного розщеплення центромірів сестринських хроматид або до порушення апарату веретена та до аномалій у центромірних ділянках хромосом і дефектам у їх взаємодії з апаратом веретена.

Разом з тим слід зазначити, що підвищення частоти нерозходження хромосом властиво багатьом мей-мутаціям, що призводить до різкого пригнічення кросинговеру. У таких мутантів пари гомологічних хромосом, у яких не відбувся кросинговер, після пахітенної стадії профазі виявляються не пов'язаними хіазмами і тому представлені унівалентами. Припускають, що у таких умовах проявляється здатність до попарних асоціацій хромосом, включаючи і негомологічні – розподільна кон'югація.

Таким чином, мейоз дійсно являє собою унікальну подію у життєвому циклі організму, а функції, які могли б бути спільними у мітозі і мейозі, контролюються у мейозі особливими генними системами.

Тобто, порівняно з регуляцією мейозу в одногеномних диплоїдних видів організмів з поліплоїдними каріомами, які включають кілька гомологічних або кілька різних, але споріднених геномів, несуть додаткові системи генів, що знижують частоту утворення мультивалентів або повністю їх виключають.

4. Цитогенетика В-хромосом

Генетично збалансовані системи являють собою каріоми еукаріотичних організмів, що включають подвійний набір хромосом одного або декількох геномів. Нестача однієї з хромосом будь-якої пари (моносомія) або надлишок – зайва хромосома будь-якого типу (трисомія), залежно від того, за якою хромосомою даний каріотип незбалансований змінює цілий комплекс ознак і часто проявляється у фенотипі.

Є, однак, особливий клас хромосом, найбільш характерна і несподівана властивість яких – необов'язковість їх присутності. Зазвичай невелика кількість таких хромосом у каріотипі помітної дії на фенотипі не має. Цих хромосом може зовсім не бути, і організми також не змінюють свої ознаки. Таким чином, цей клас хромосом найкраще характеризував би термін «необов'язкові». Однак така назва для них не прийнятна, а використовуються інші терміни: зверхчисленні (*supernumerary*), додаткові (*accessory*). Іноді їх називають екстрахромосомами. Л. Рандольф для позначення цих хромосом запропонував одне з найбільш вдалих назв – В-хромосоми, назвавши при цьому хромосоми, складові каріому організму, А-хромосомами.

Одним з перших В-хромосоми спостерігав Е. Вільсон у клопа *Matepodius terminalis*. Він висловив припущення про те, що ці хромосоми можуть походити від Y-хромосоми як її короткі фрагменти. Ця ідея Е. Вільсона широко використовується при обговоренні питання про походження В-хромосом. Разом з тим проти цього припущення свідчать багаточисленні факти відсутності кон'югації між В-хромосомами і хоча б з будь-якою з А-хромосом. Цього не спостерігається незважаючи на існуючу у клітині здатність до розподільної кон'югації навіть негомологічних хромосом.



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

На сьогодні В-хромосоми знайдено в усіх основних групах еукаріотів – грибів, рослин і тварин, проте вважається, що кількість видів із додатковими хромосомами є відносно невеликою. Основна складність у дослідженні В-хромосом полягає саме у тому, що їхня наявність є не обов'язковою і у більшості видів вони присутні не у кожного організму і не у всіх популяціях, і навіть не у всіх клітинах одного і того самого організму.

З В-хромосомами пов'язані дві основні проблеми – це їхнє походження і біологічне значення їхньої наявності. Стосовно походження існують три основні гіпотези: В-хромосоми можуть утворюватися із аутосом, із статевих хромосом або внаслідок міжвидової гібридизації. Щодо біологічного значення то існує декілька припущень – від поглядів на В-хромосоми, як на «геномних паразитів», до тверджень про їх адаптивну роль, особливо у не сприятливих умовах існування.

Отже, В-хромосоми не містять будь-якого специфічного генетичного матеріалу, який відрізняє одна від одної кожну з хромосом нормального геному і вони не гомологічні жодній з А- хромосом. Цей факт добре відповідає самій «необов'язковості» В- хромосом. У них немає експресуючих генів з істотними для життя організму функціями. Саме тому ні відсутність, ні наявність В- хромосом у невеликій кількості не призводить до будь-якого помітного впливу на фенотип.

Біохімічними дослідженнями не виявлено будь-яких специфічних відмінностей у будові В-хромосом порівняно з А- хромосомами. Таким чином, генетична інертність В-хромосом може бути пов'язана з особливостями їх компактизації у клітинному циклі: у багатьох організмів більша частина їх матеріалу виявляється у вигляді гетеропіктонічних щільних компактних блоків гетерохроматину на тих стадіях мітозу і мейозу, на яких основна маса матеріалу А-хромосом представлена пухкою структурою еухроматину з досить чітким хромомерним малюнком. Реплікація В-хромосом, як і гетерохроматинових ділянок А- хромосом, зрушена до кінця S-фази. Винятки з цієї закономірності вельми рідкісні. Один із прикладів – еухроматинові за морфологією В-хромосоми кларкії (*Clarkia sp.*), у яких спостерігається і кон'югація з А-хромосомами.

Таким чином від основного набору В-хромосоми відрізняються за такими параметрами:

- мають менші розміри;
- часто крапкоподібної форми;
- гірше забарвлюються у разі цитологічних досліджень;
- їхні центромери часто дефективні;
- у більшості випадків вони гетерохроматинізовані і містять переважно повторювані послідовності ДНК;
- їхня кількість не стала і є різною у різних організмів однієї популяції, а також може змінюватися від одиниці до кількох десятків у різних клітинах одного і того самого організму;
- розташовуються переважно на периферії метафазної пластинки;
- при мейозі не кон'югують із хромосомами основного набору;
- успадковуються не регулярно;



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

- показник їх трансмісії часто вищий 0,5, тобто вони здатні накопичуватися до, під час та після мейозу.