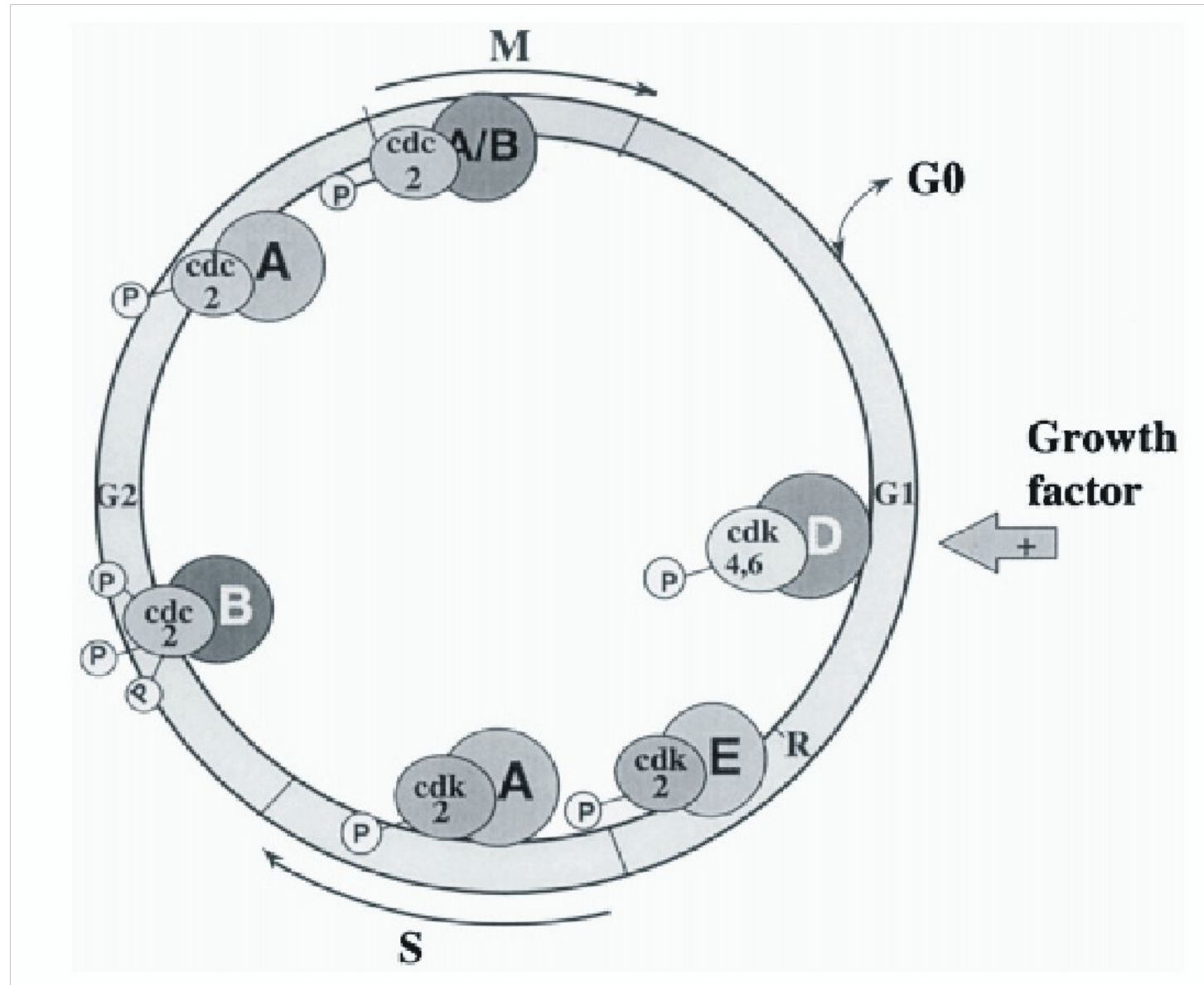
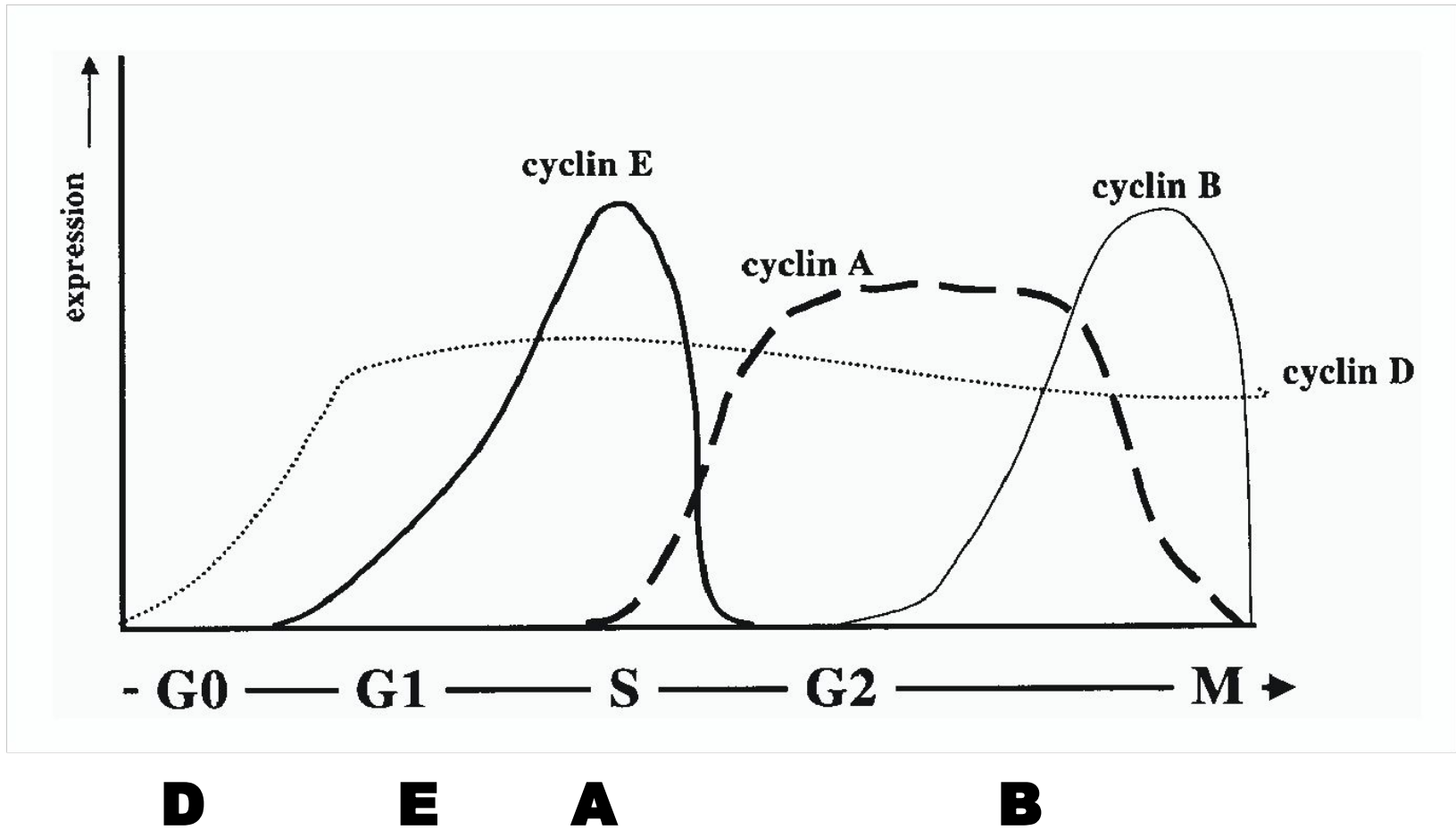


Cell cycle control

Cell cycle

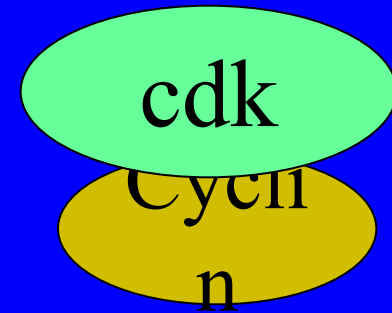


Cyclin expression



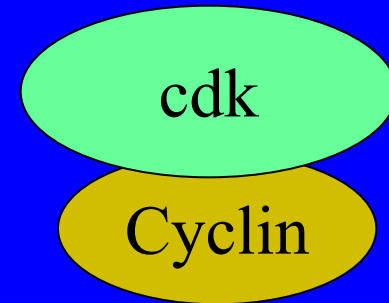
cdk regulation

- 1) The presence of the cyclin
- 2) Activating threonine phosphorylation in the kinase domain by CyH/cdk7
- 2) Inhibitory tyrosine phosphorylation on N-terminus by wee1 (dephosphorylation by cdc25 A, B, C)
- 4) The presence of the cdk inhibitors
- 5) Nuclear *vs.* cytoplasmic location



cdk regulation

1) The presence of the cyclin



a) Transcriptional regulation

AP-1, Ets-fam., LEF- β -catenin, STAT3, NF κ B, CREB for CyD

E2F, myc (indirect?) for CyE

E2F, CREB for CyA

b) Proteasomal degradation

GSK3 β for CyD. SCF complex.

APC for CyB in metaphase checkpoint

c) Translation and mRNA stability

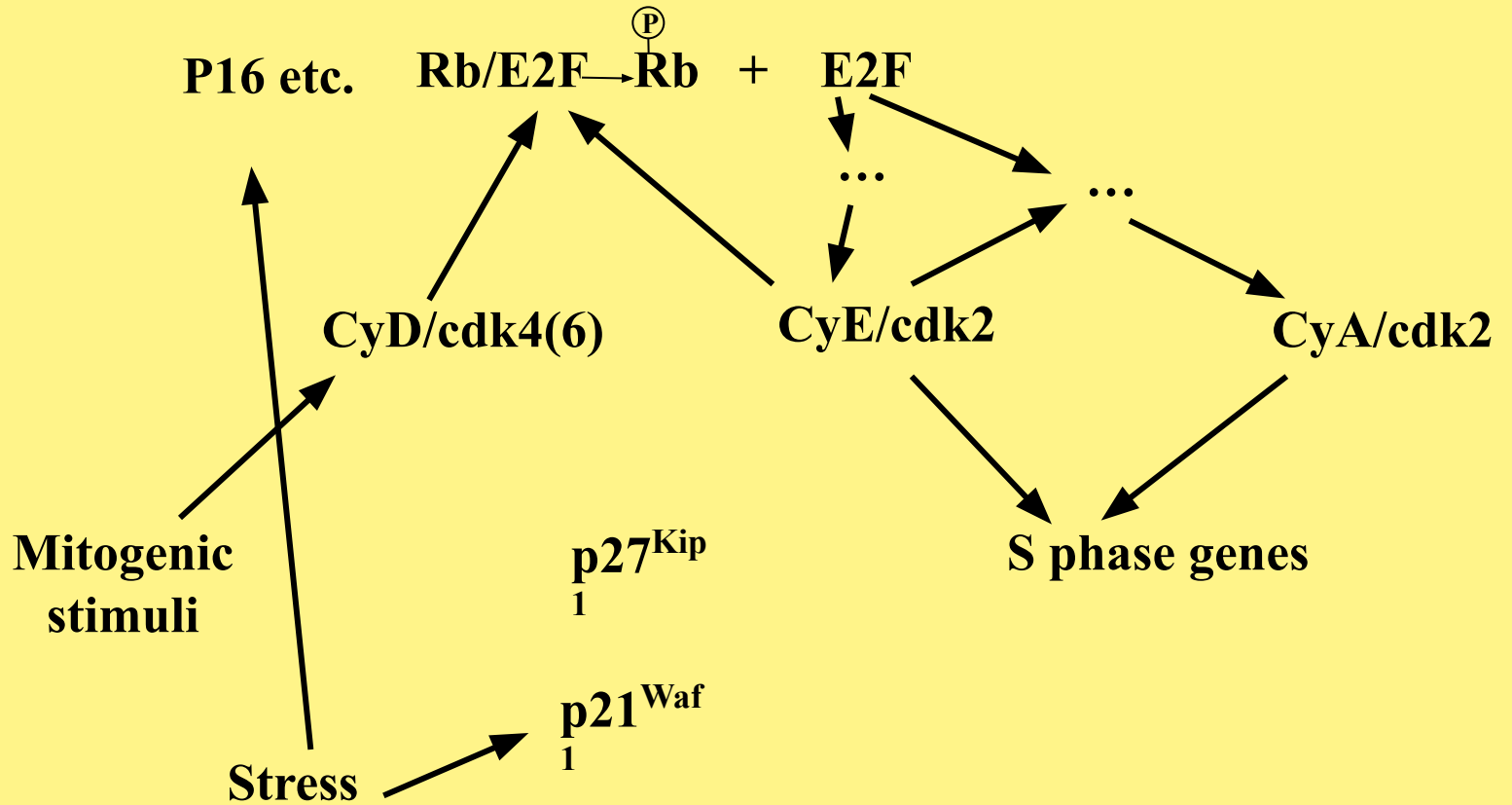
CyD

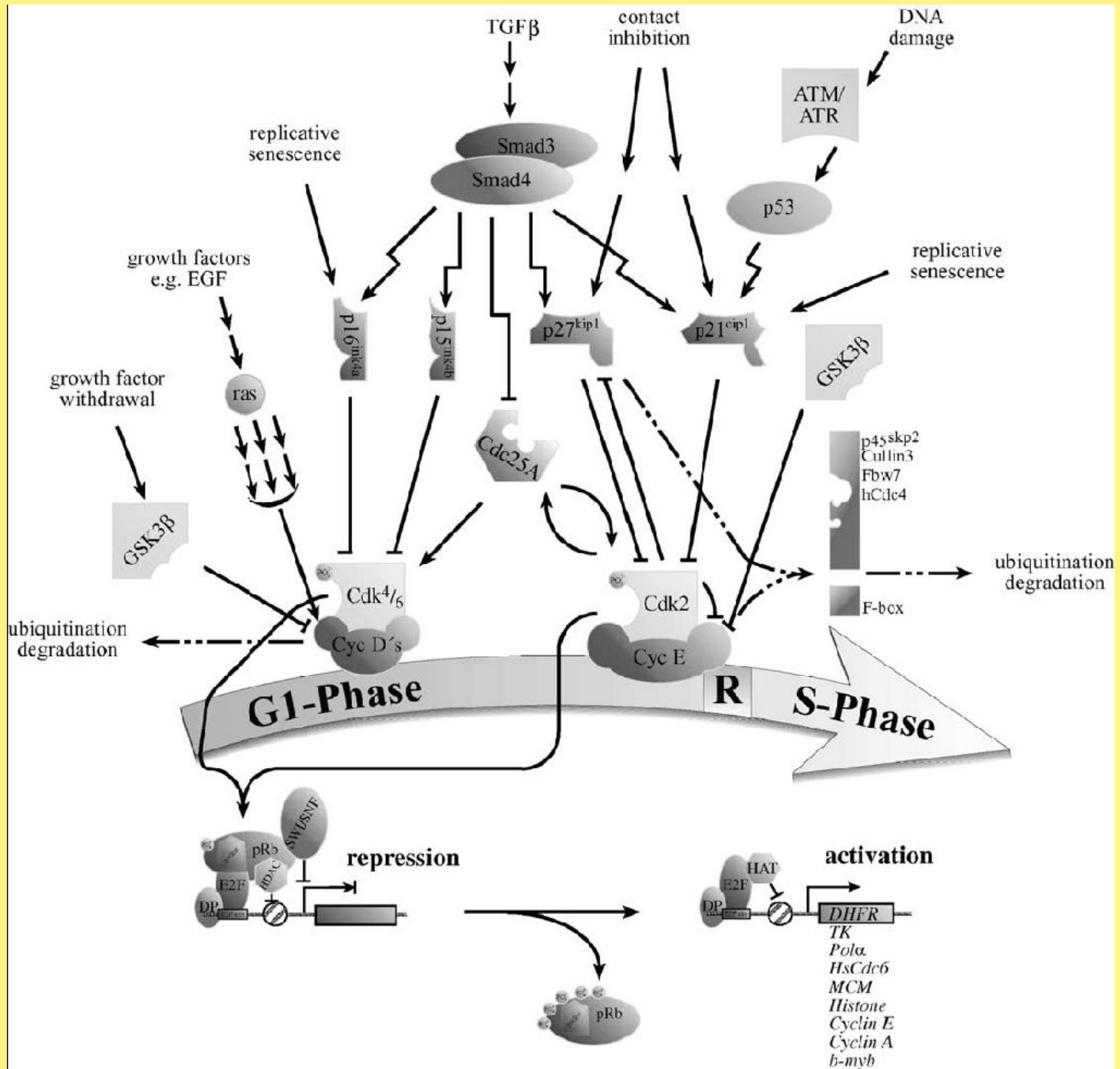
cdk inhibitors

1) Ink4 family (p15, p16, p18, p19)

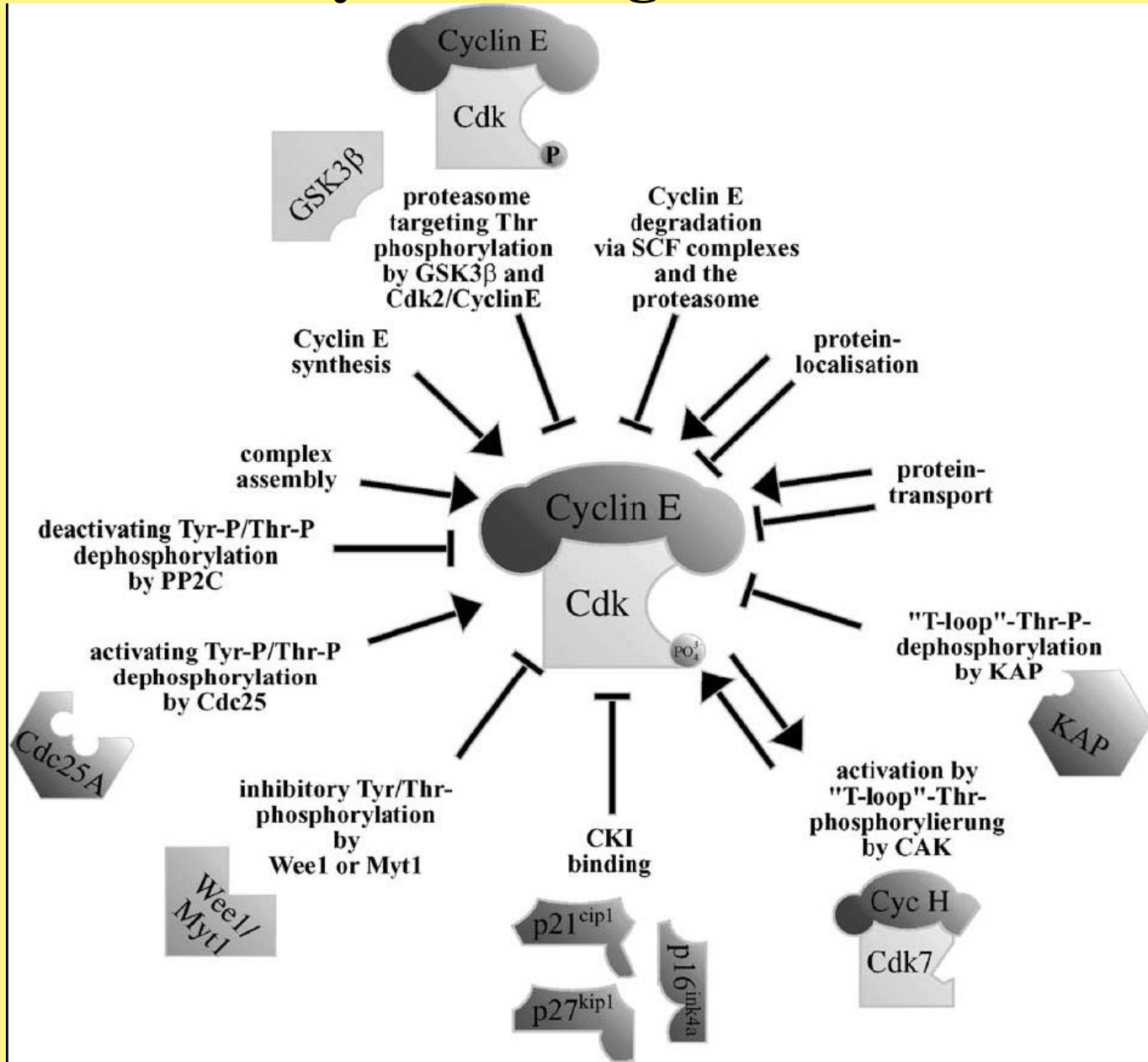
2) KIP/CIP family (p21^{waf1/CIP}, p27^{Kip1},
p57^{Kip2})

Progression through G1

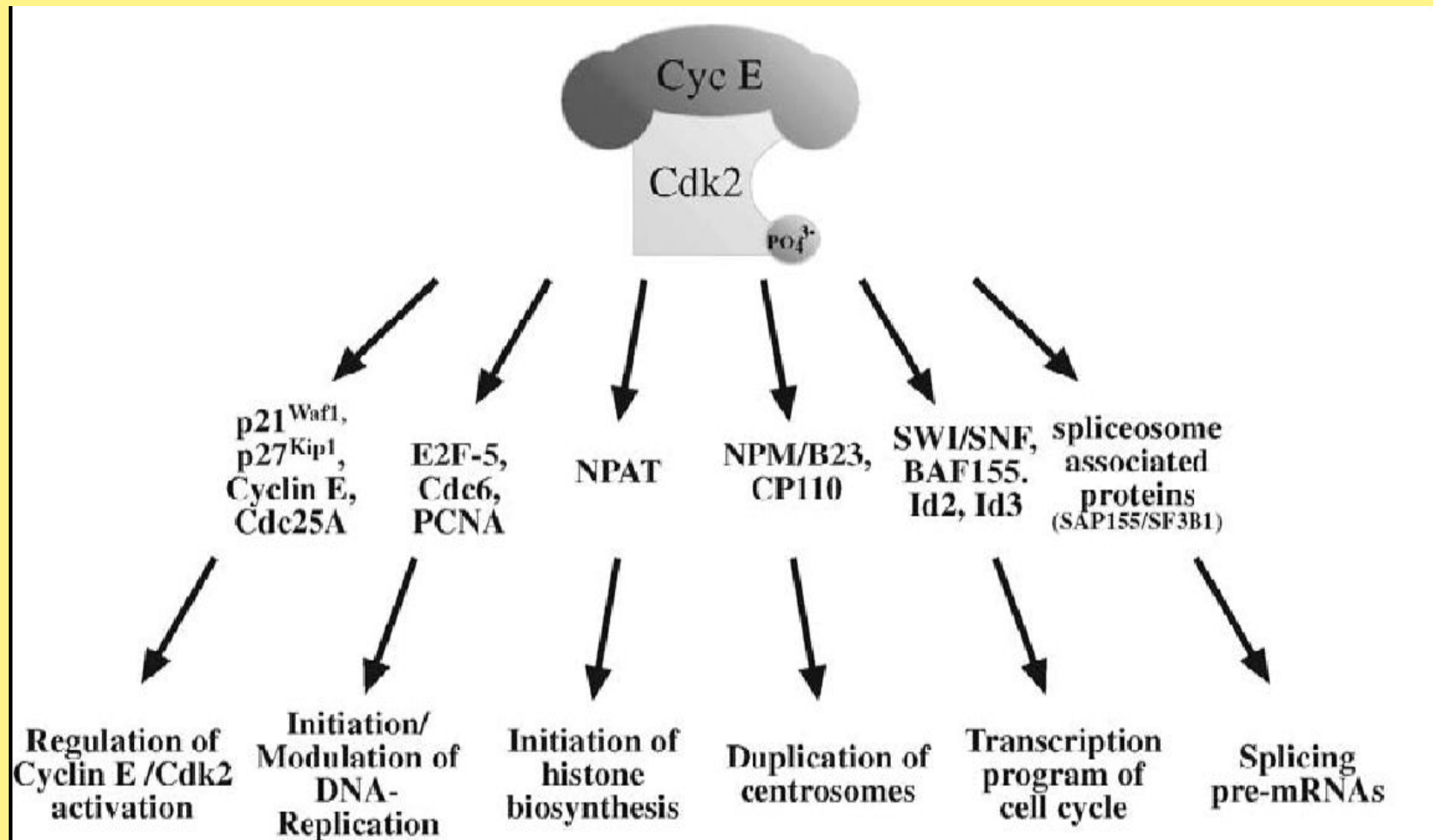




Cyclin E regulation

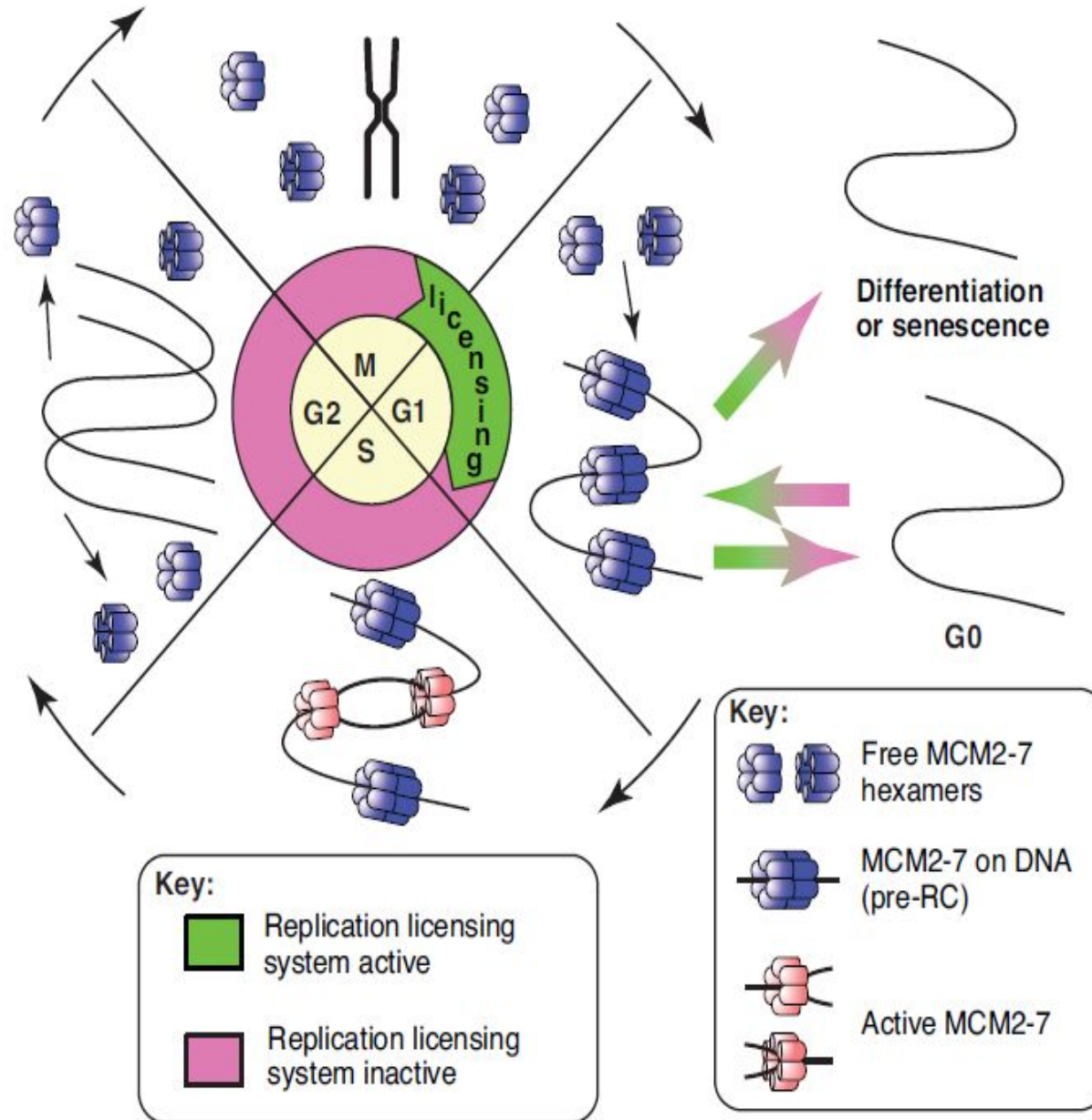


Cyclin E targets

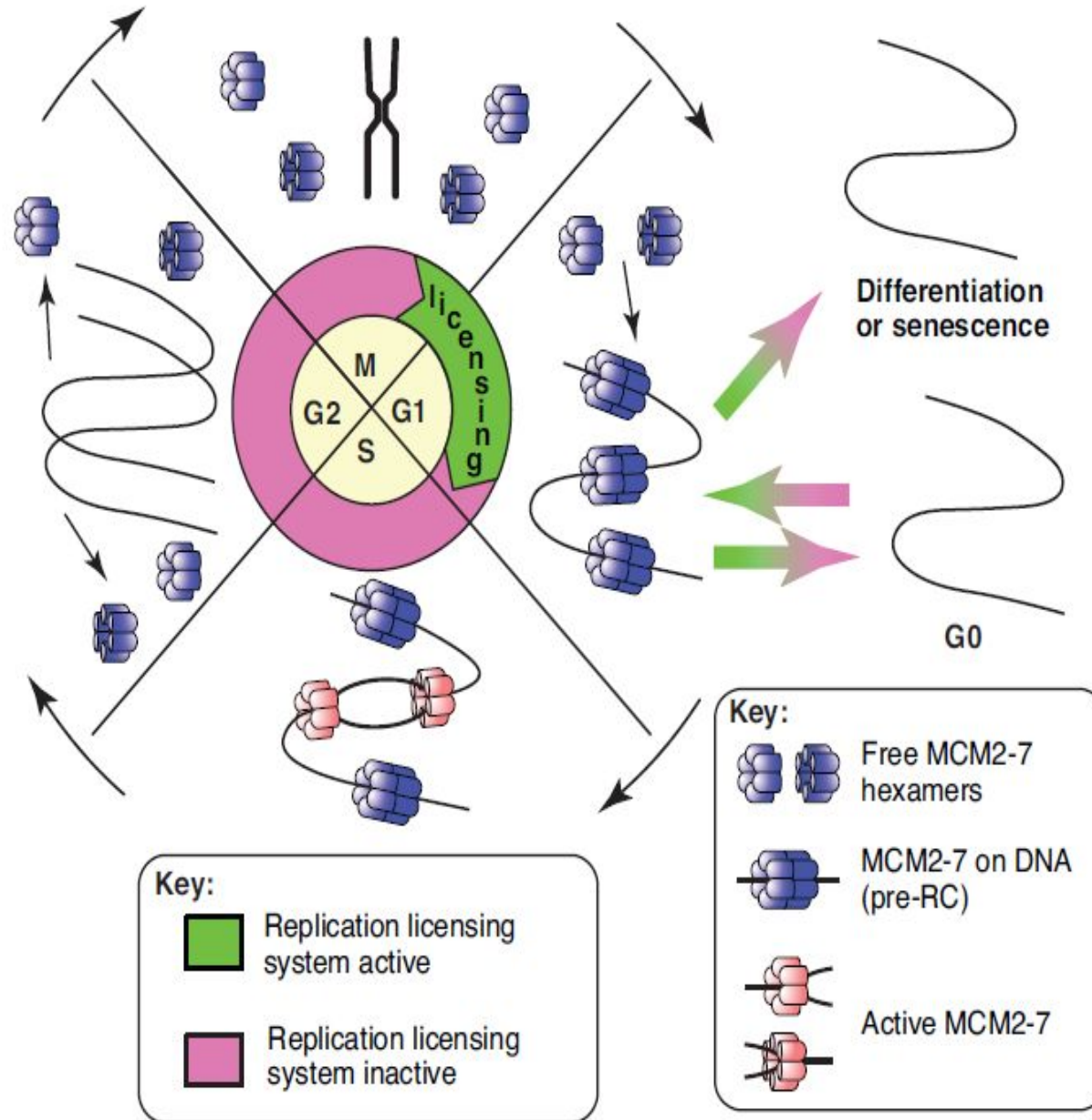


Cyclin E targets

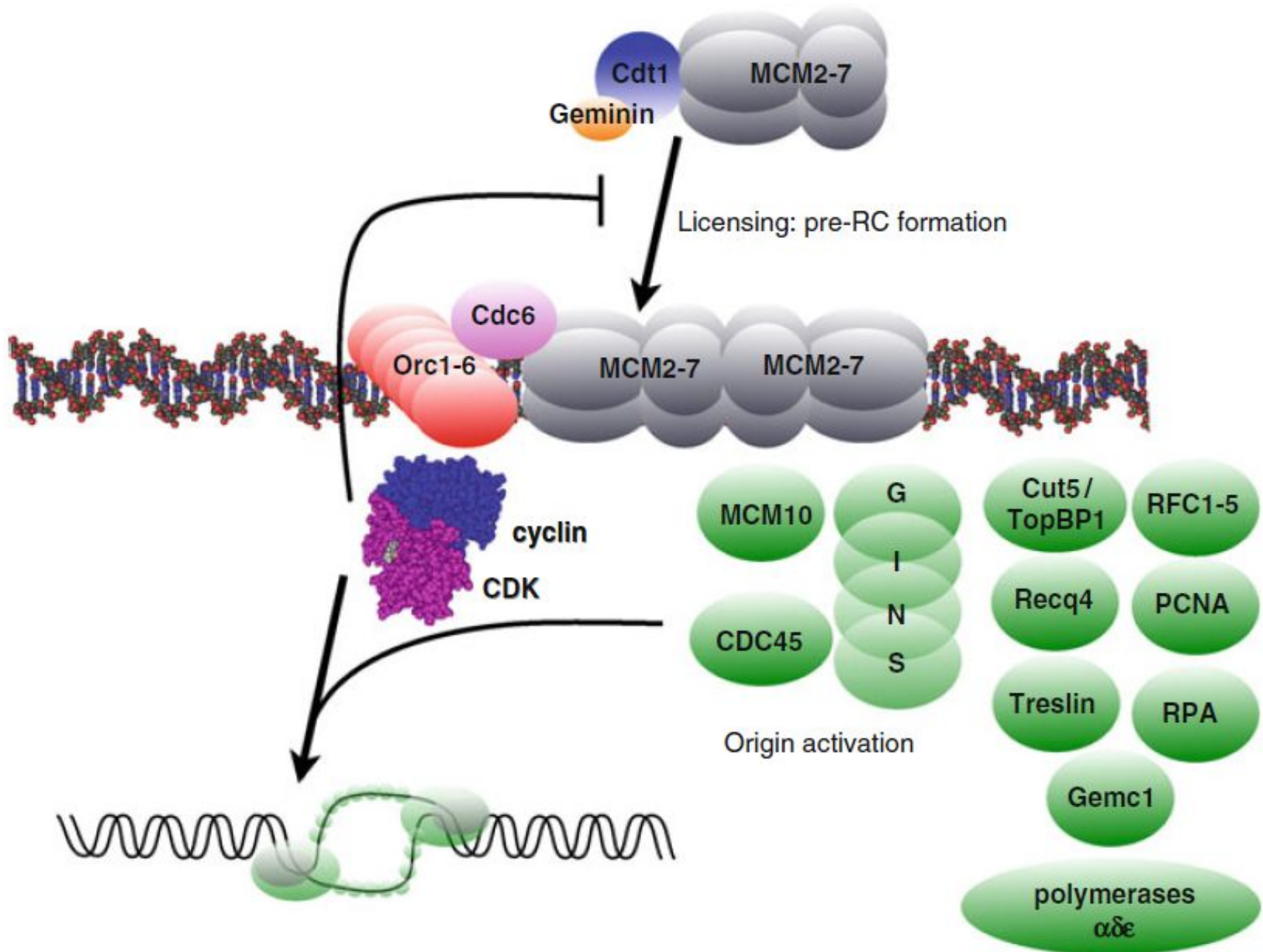
Replication licensing



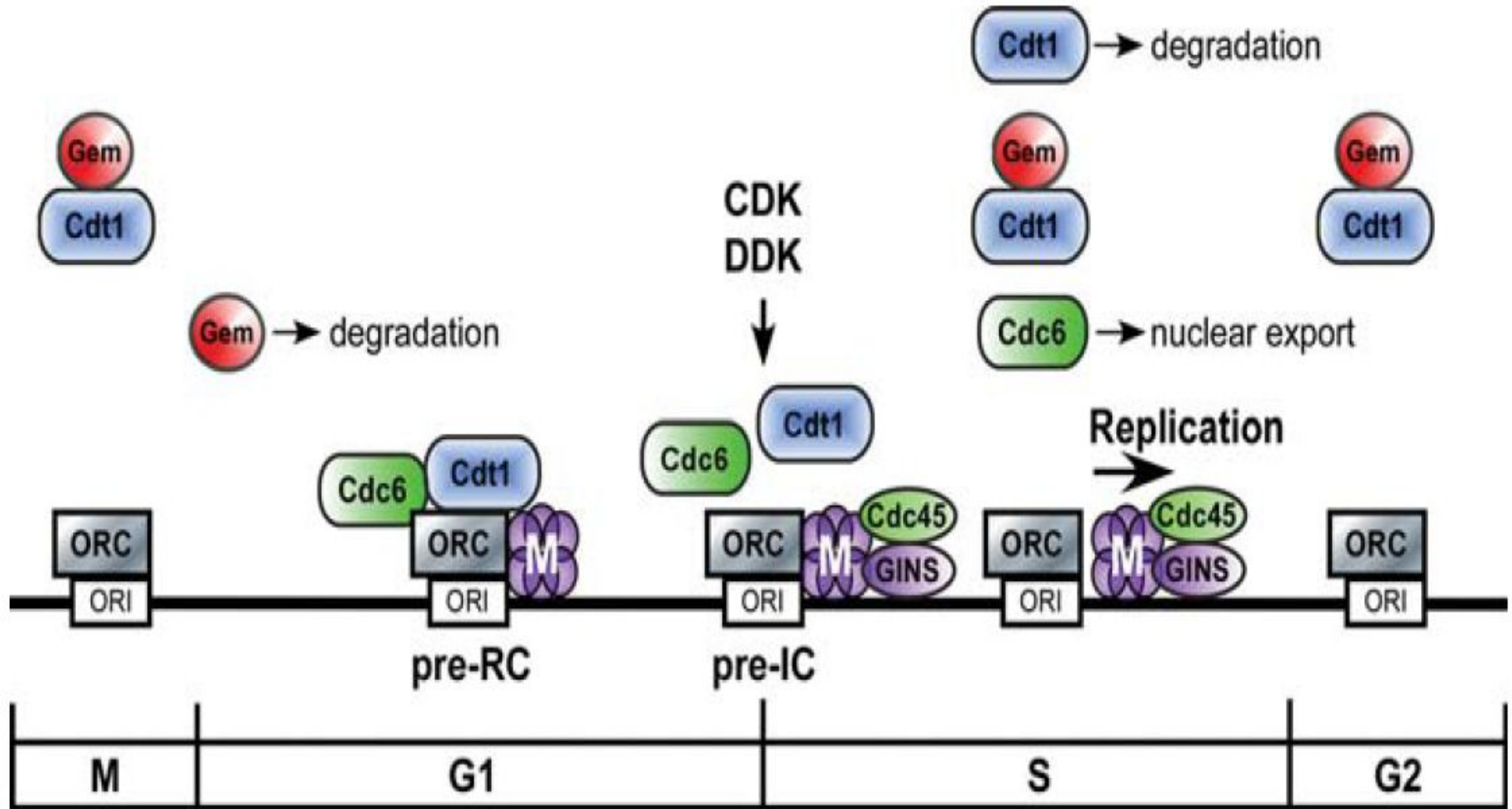
Replication licensing



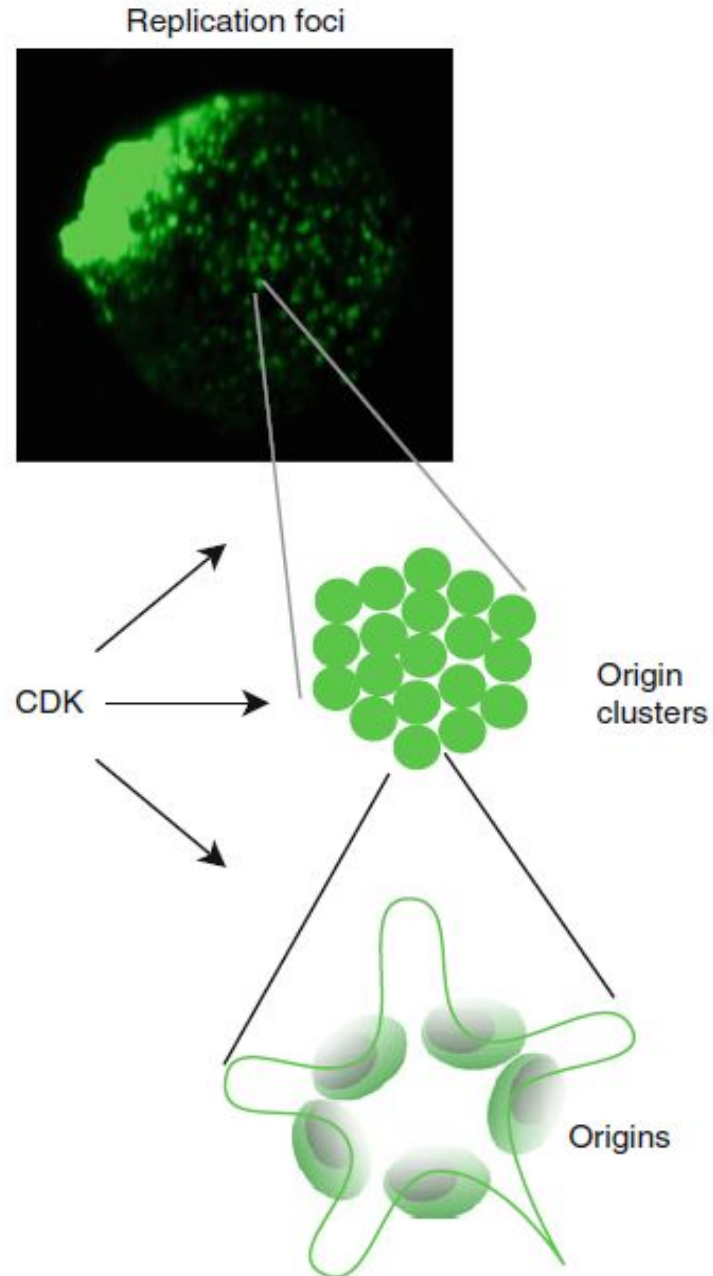
Replication initiation



Geminin and licensing regulation

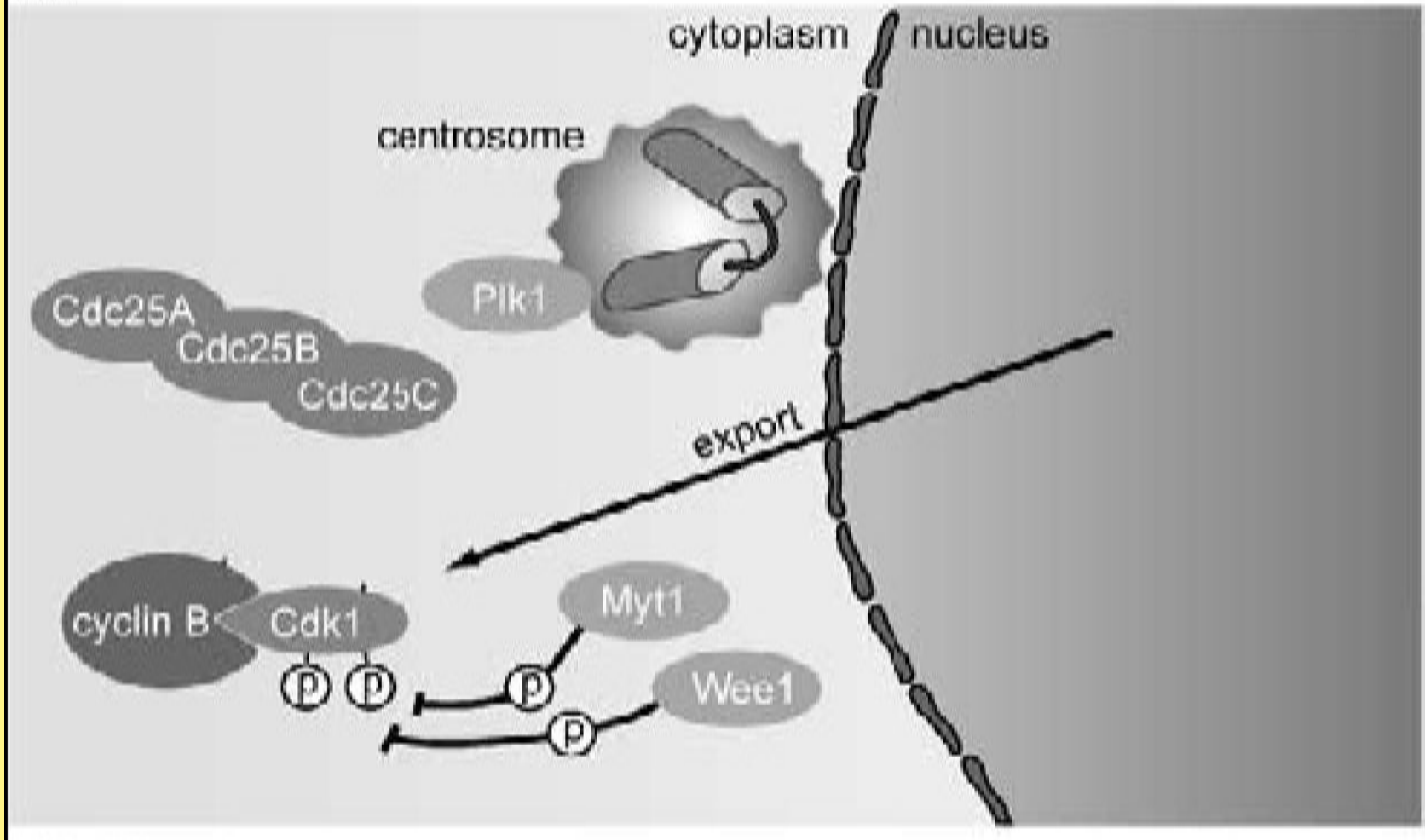


Clusters of replication

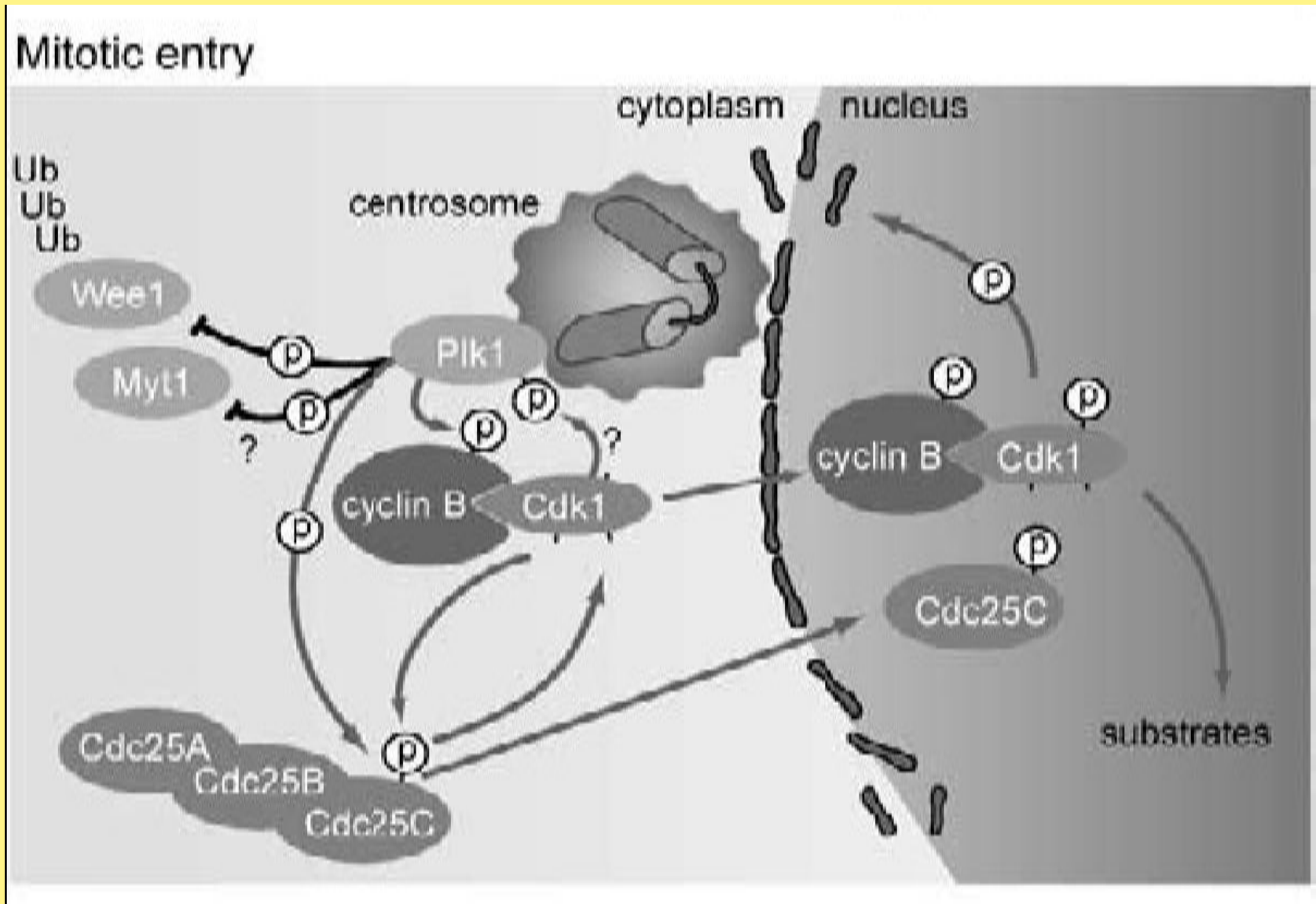


Progression through G2 to mitosis

G2

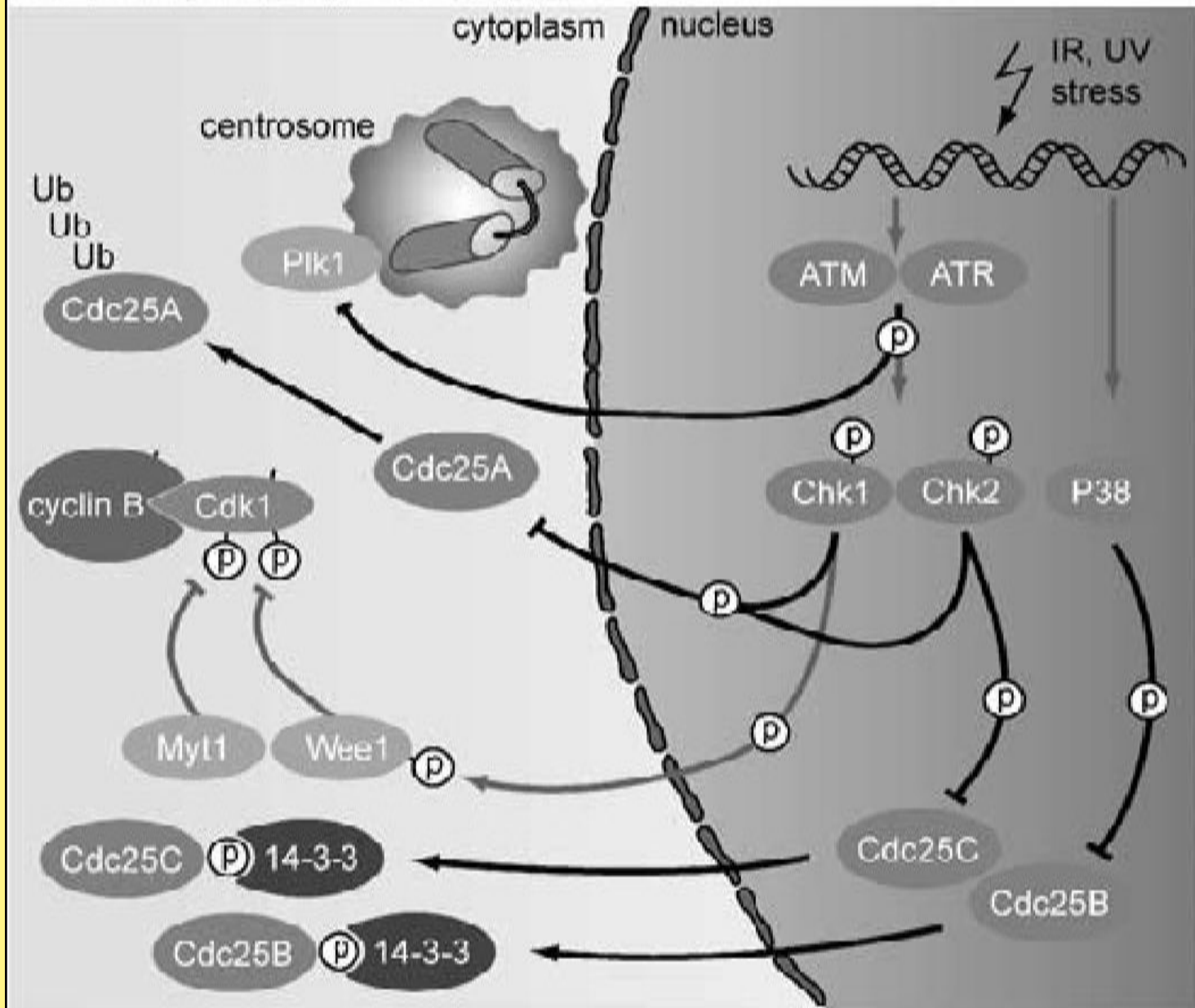


Progression through G2 to mitosis

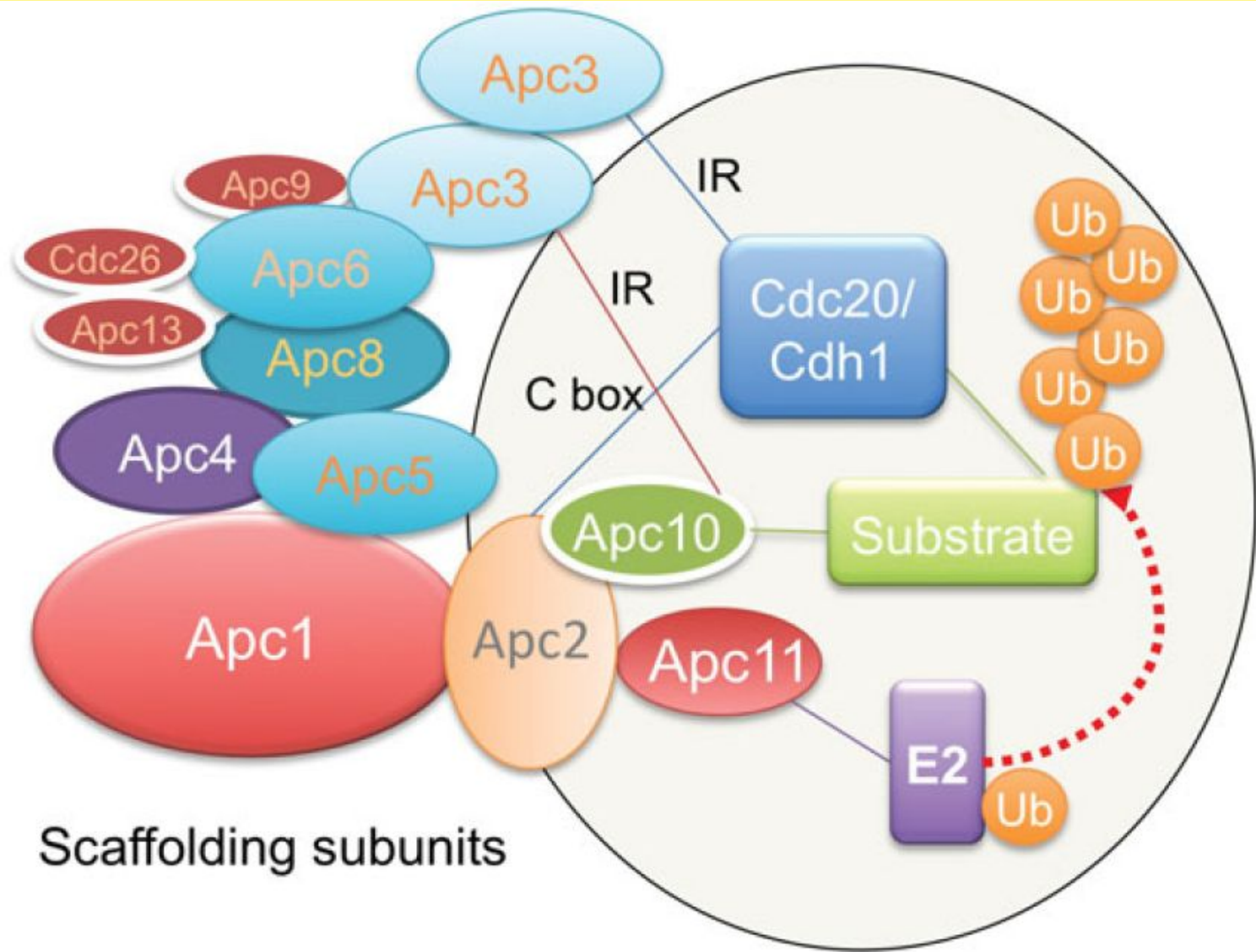


Progression through G2 to mitosis

G2-M DNA Damage Checkpoint



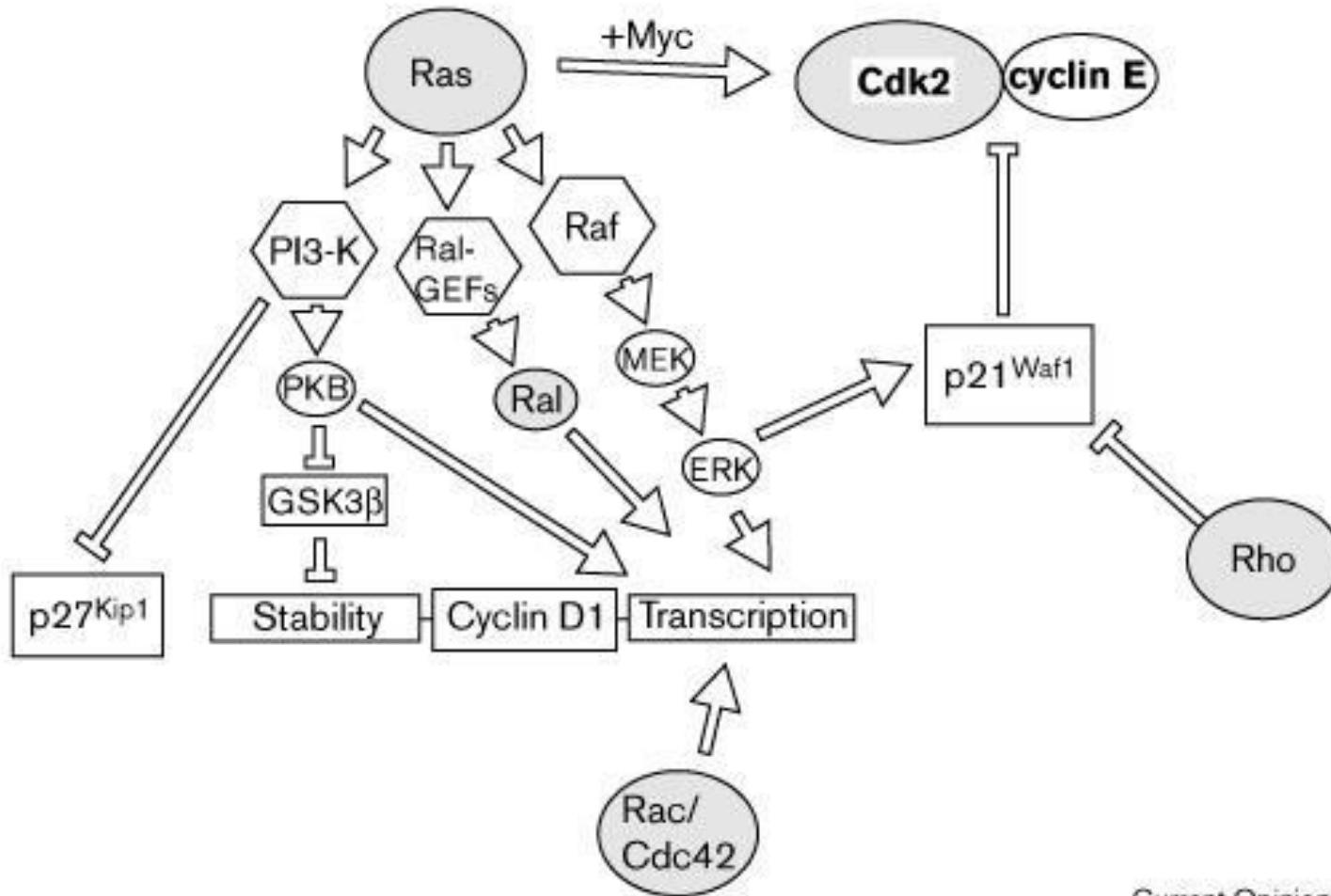
APC/C



Catalytic and substrate-binding module

Integration of signaling pathways in cell cycle control

Ras connection to cell cycle



Proliferative stimuli

Serum

Growth factors, some cytokines

Some GPCR ligands (especially LPA)

Cell-matrix adhesion

Steroid hormones

Proliferative pathways

GF receptors

Non-receptor tyrosine kinases

Ras

ERK, sometimes

JNK, SRF, AP-1 (c-jun, c-fos) transcription factors

PI-3 kinase

Moderate ROS

PKC (various isoforms), often Ca

PKA (not always)

Integrins

Actin membrane targeting and polymerisation stimulators

Rho family GTPases

c-myc, E2F

β -catenin, STAT3, STAT5

Anti-proliferative stimuli

Proliferative signals (serum, GF, adhesion etc) withdrawal

Cell-cell adhesion

TGF β (not always)

Some cytokines (interferons), sometimes GFs

DNA damage, telomere shortening

Hyperosmolarity, UV, pro- or antioxidants, heat shock

Some GPCR ligands

Inhibitors of DNA or dNTP synthesis

Tubulin-reactive drugs

Oncogene activation (not always)

Tyrosine kinase inhibitors

Anti-proliferative pathways

p53

High and prolonged Ras or ERK

STAT1, STAT2

Smad2, 3, 4

GSK3 β

PKA (sometimes), PKC δ

JNK, p38

Telomere shortening

Bcl-2

Cell cycle dependent p53 induction

E2F-1



p19^{AR}
F

mdm2

p53

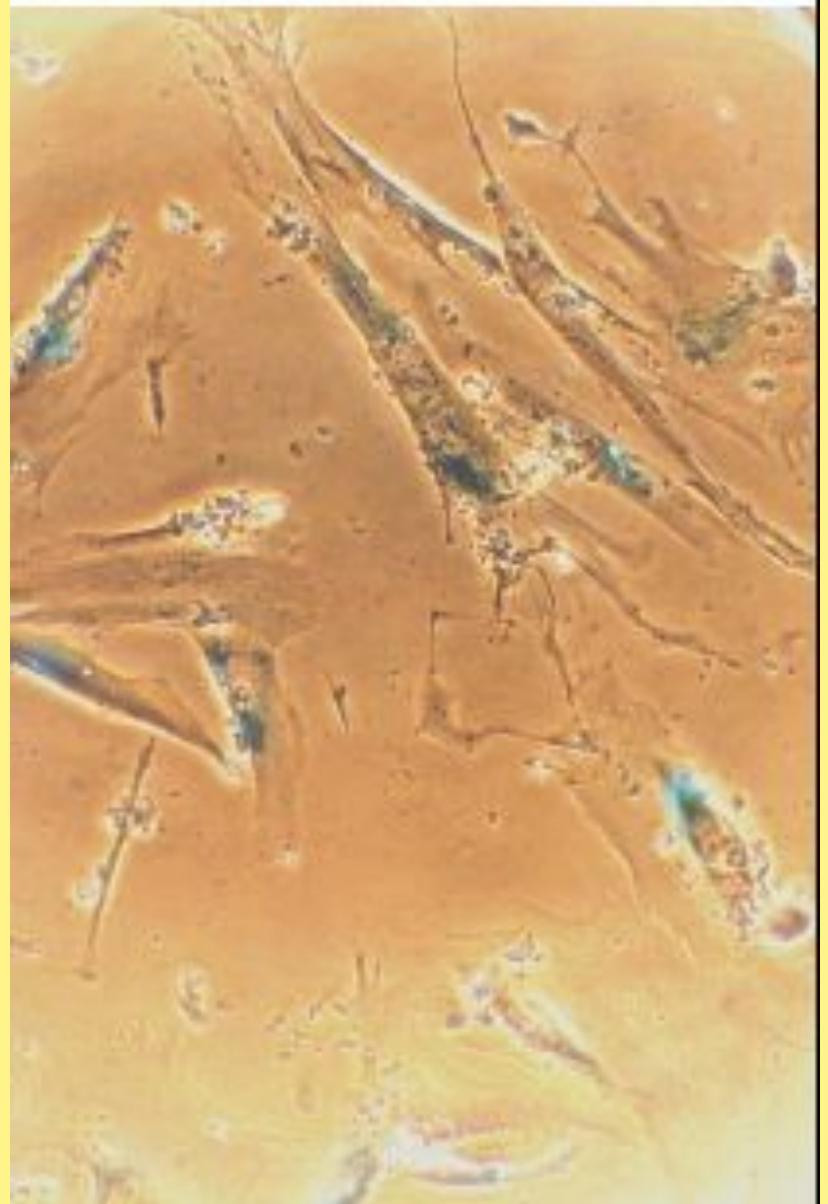
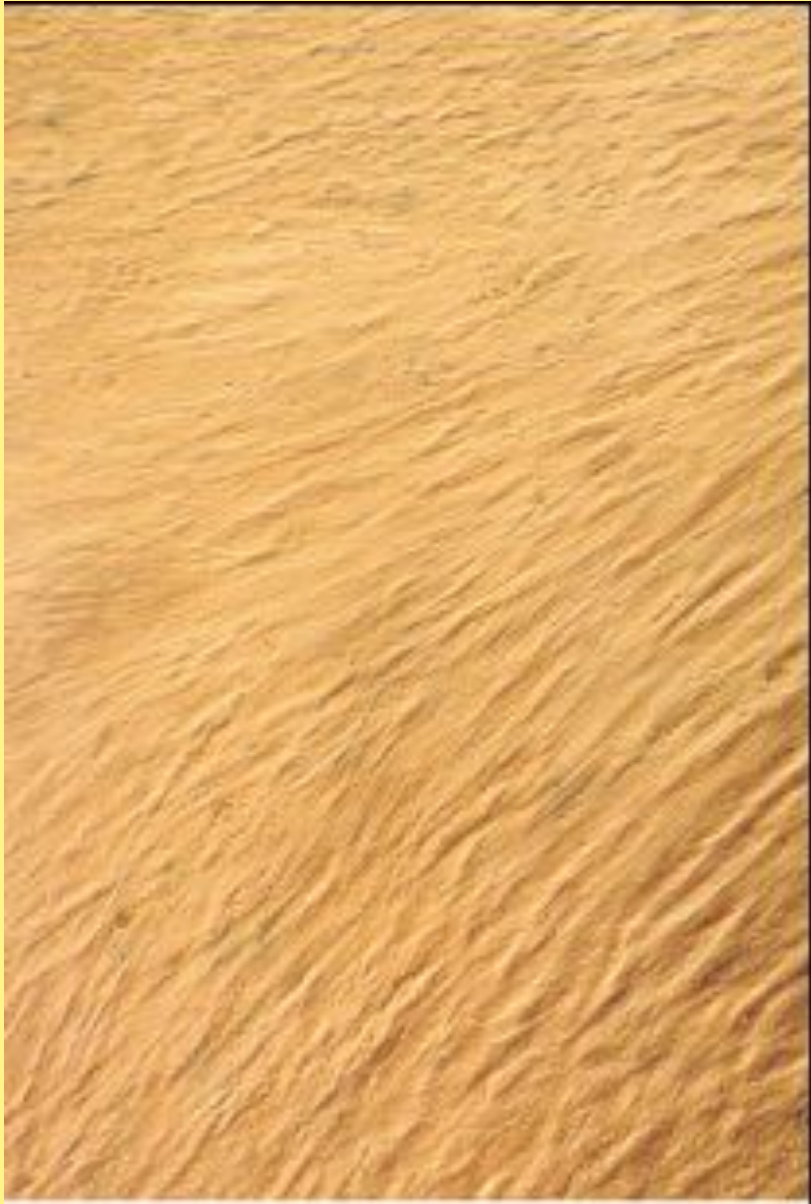


p21^{wa}
f

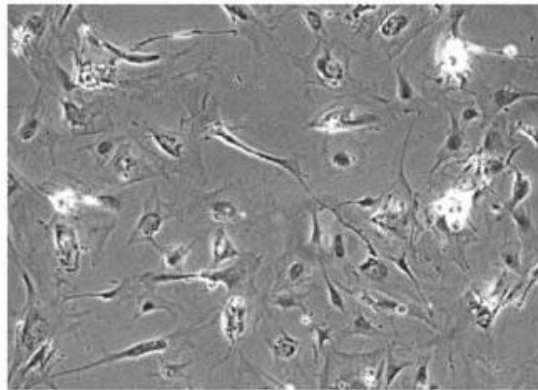
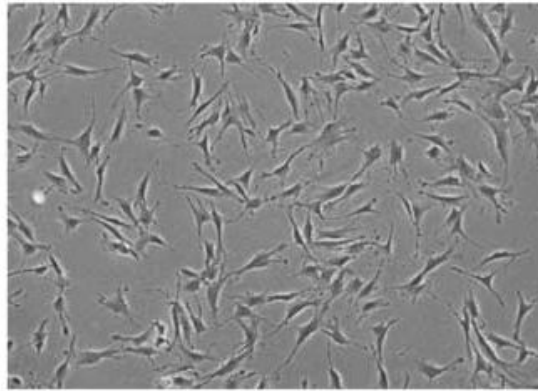
Cy/cdk

Cell senescence

Cell senescence



Cell senescence inducers



cellular senescence



telomere uncapping



DNA damage



oxidative stress



oncogene activity



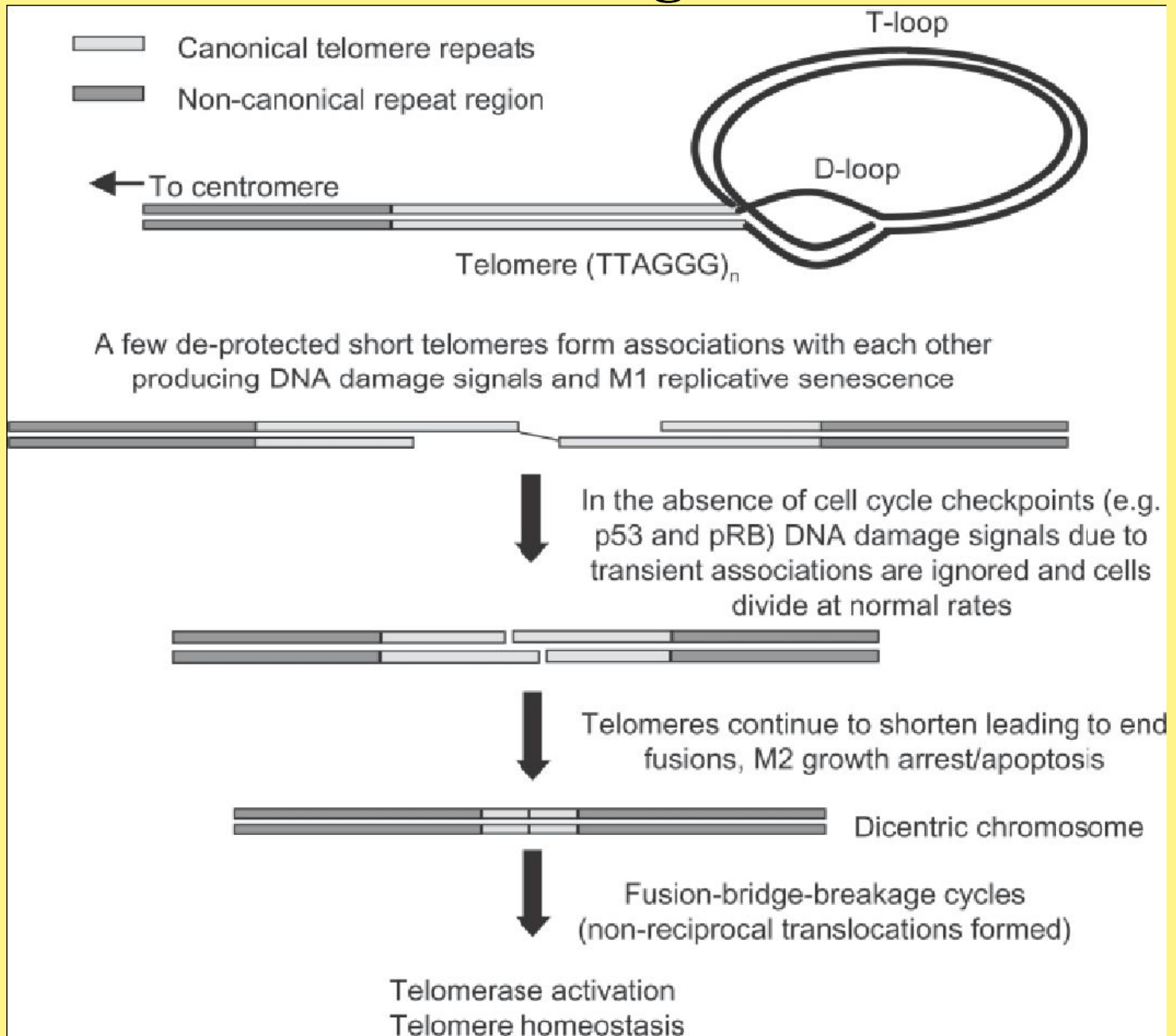
**lack of nutrients/
growth factors**



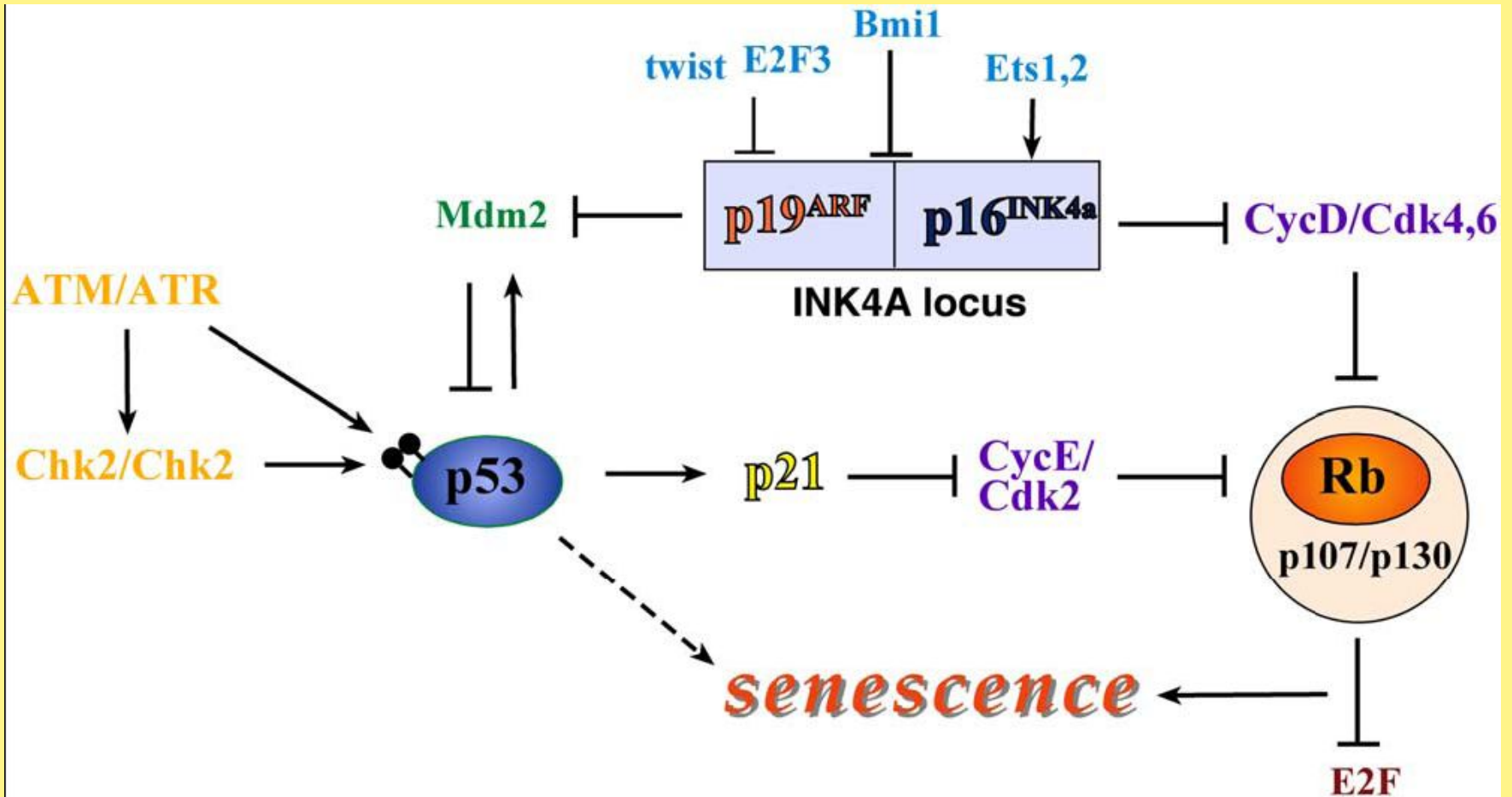
improper cell contacts

others

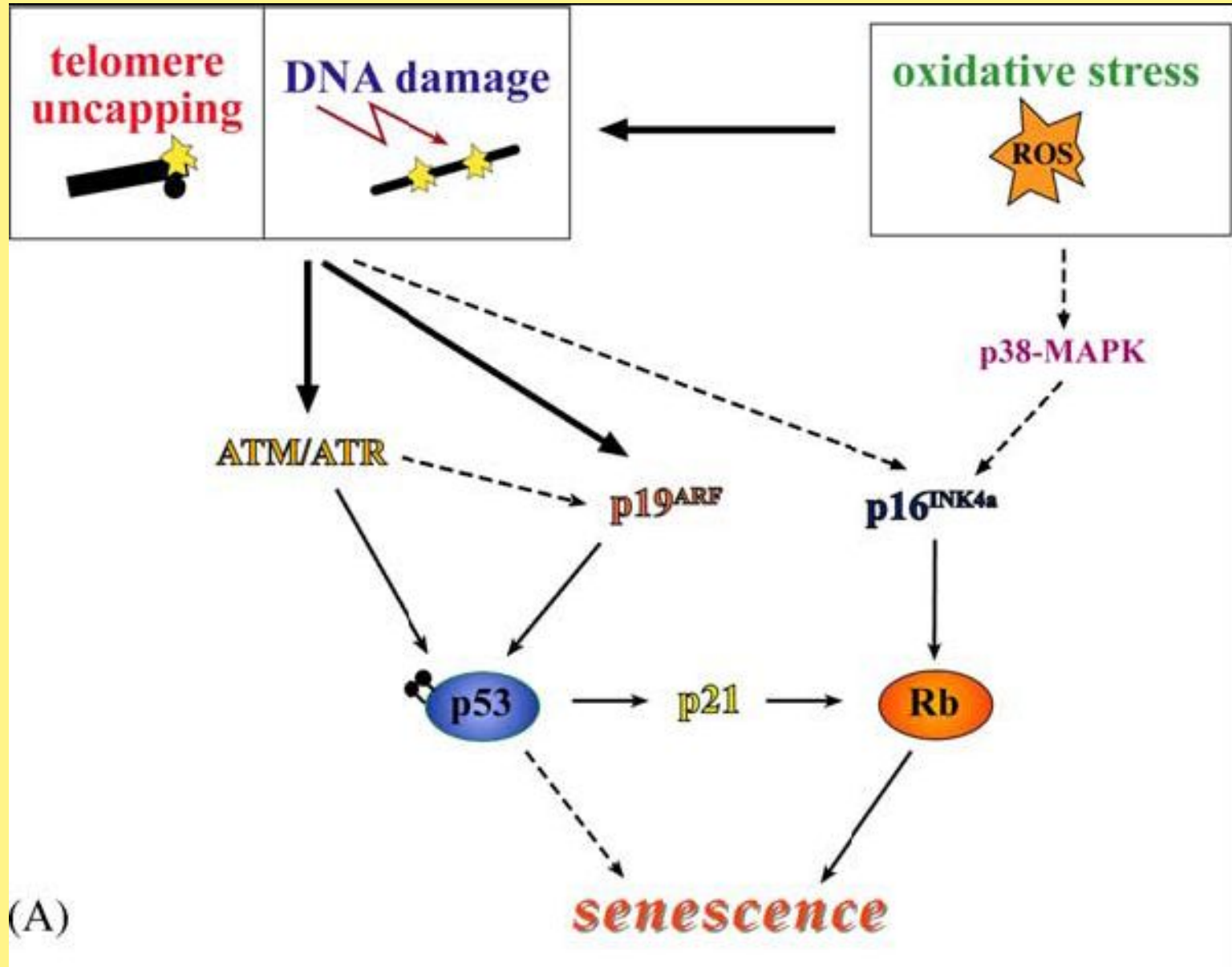
Telomere signal



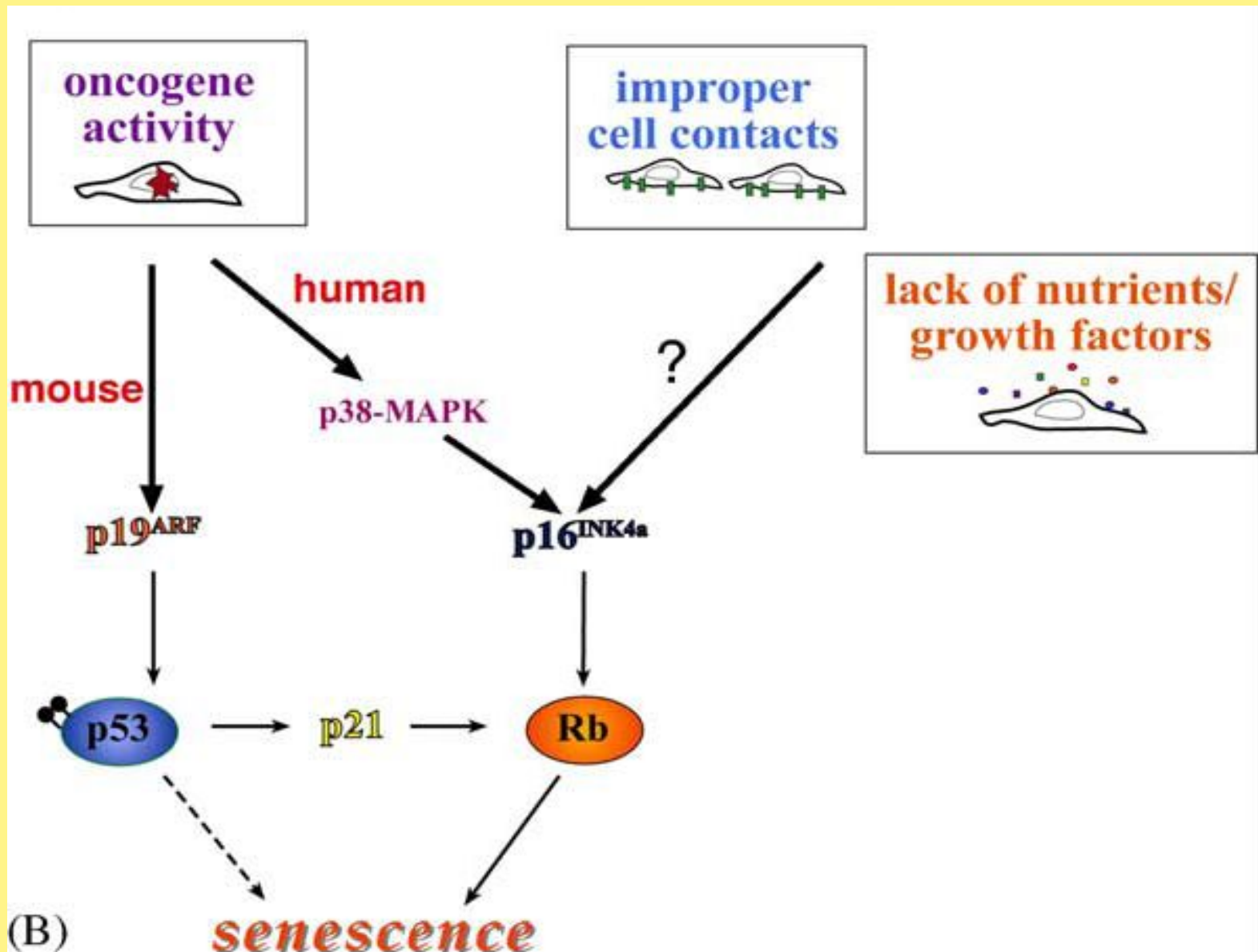
Signaling to senescence



Replicative (telomere-dependent) senescence

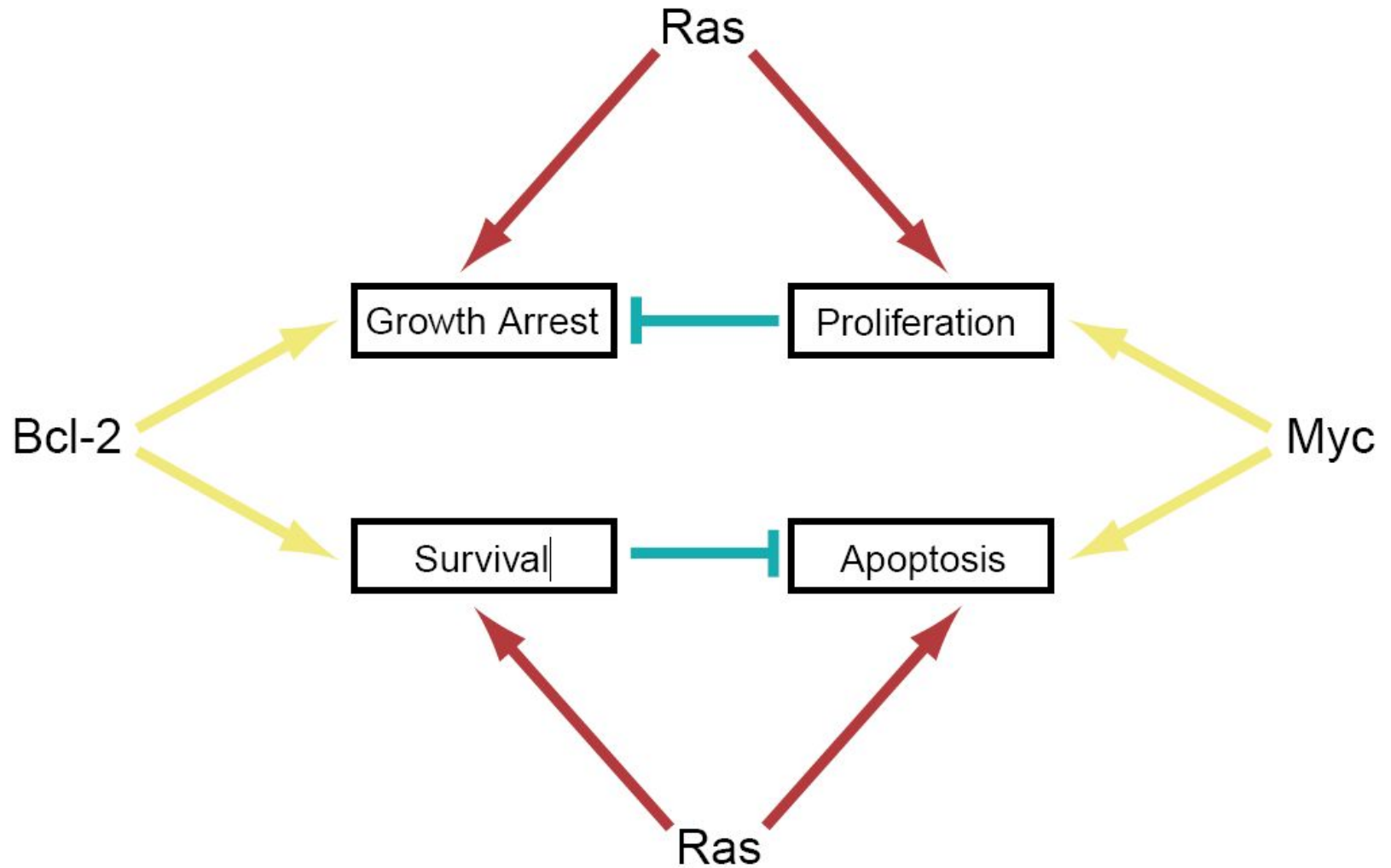


Premature (accelerated, stress- and oncogene-induced, telomere-independent)

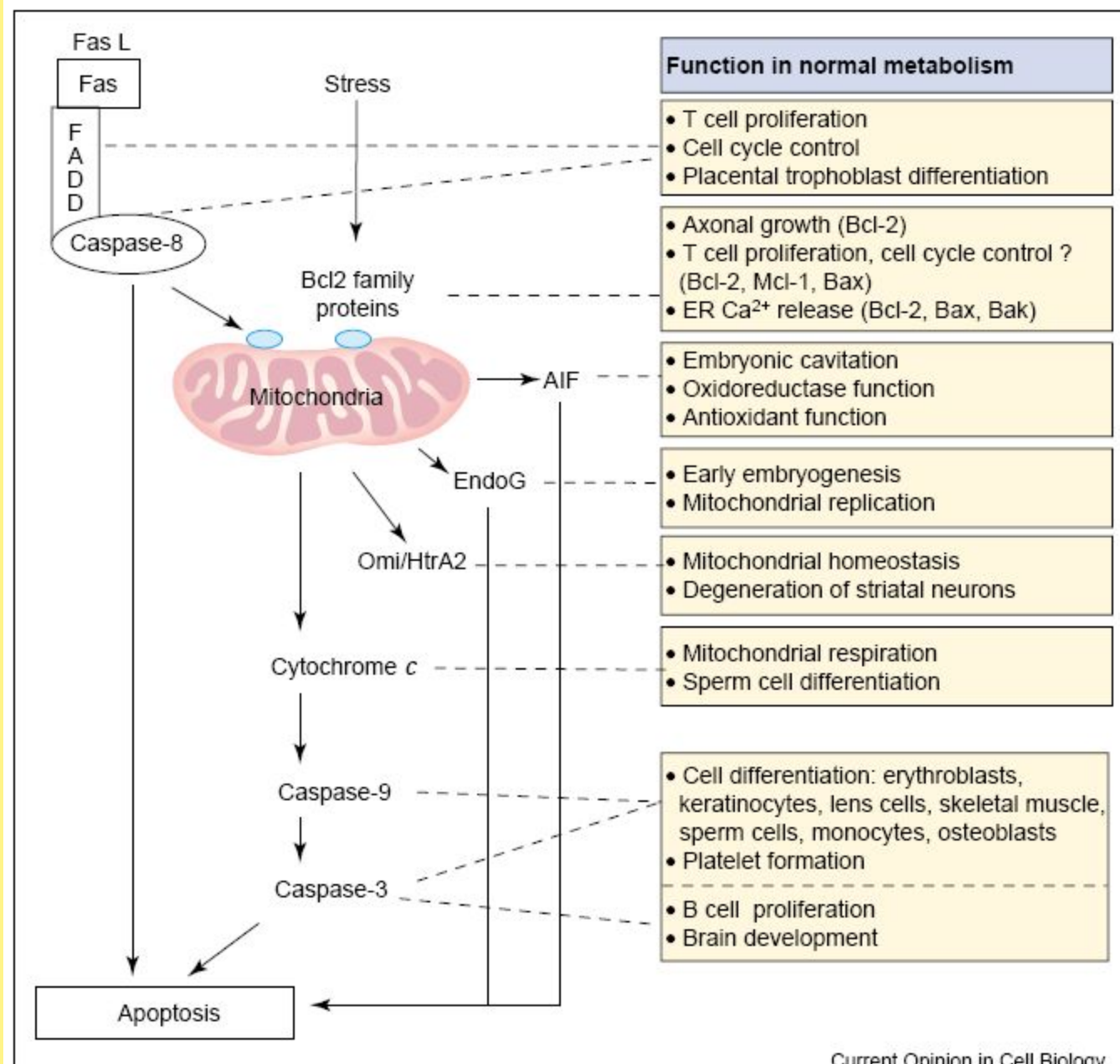


Cell cycle and apoptosis

Proliferation and apoptosis



Non-apoptotic functions of apoptotic proteins



Integration of signaling pathways in apoptosis control

Signal-regulated elements of the apoptotic machinery

Bcl-2 family (Bax, Bak, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Bad, Bid, Puma, Noxa etc.; expression, proteasome degradation, activation, processing, phosphorylation, localisation)

Death receptors (TNF α R-family) and death ligands
(expression, plasma membrane localisation, processing)

Procaspases (expression)

Caspase inhibitors (IAPs, XIAP, survivin)

MPT inducers

hsp70

Pro-apoptotic stimuli

Survival signals (serum, GF, adhesion etc) withdrawal

FasL, TRAIL, TNF α etc.

TCR, BCR

Some cytokines (interferons), sometimes GFs

DNA damage

Hyper- or hypoosmolarity, UV, pro- or antioxidants,
heat shock

Some GPCR ligands

Kinase inhibitors

Pro-apoptotic pathways

p53

p38, JNK (not always), upstream kinases (MEKK)

Crk

Ras (not always)

GSK3 β

FoxO

STAT1, STAT2

PKC δ

Ceramide

Anti-apoptotic stimuli

Serum

Growth factors (especially IGF-1 and insulin),
some cytokines

Cell-matrix adhesion

TNF α -family (all DD(-) receptors + some DD(+))

CD19, CD28 etc. ligands

Some GPCR ligands

Caspase inhibitors

Anti-apoptotic pathways

PI-3 kinase, Akt-PKB

NFκB (not always)

ERK (not always), Raf, JNK (sometimes);

AP-1
Ras (not always)

Most PKC isoforms

PKA

STAT3, STAT5

hsp70, hsp90, hsp27

p21^{wa}
f

Методы в исследовании передачи сигнала

Everybody lies.

House M.D.

И
артефакты

**Методы в исследовании
передачи сигнала**

Добрый совет №1

Помните, что не все статьи и опубликованные результаты достоверны.

Ориентируйтесь на цитирование и мнение ведущих специалистов.

Как доказать участие сигнальной молекулы в клеточном процессе в ответ на стимул

?



Известно, что данный стимул приводит к данному результату. Нужно выяснить, участвует ли в передаче сигнала от стимула на результат молекула-кандидат, и насколько она необходима.

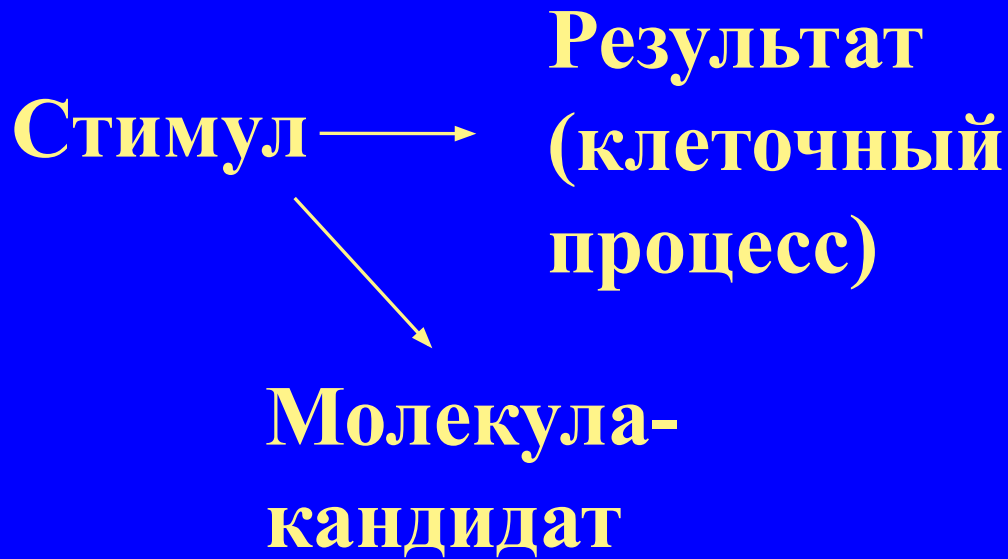
1) Сигнальная молекула **активируется** (деактивируется)/**накапливается**(уменьшается в количестве)/
меняет локализацию **в ответ на данный стимул**
(далее рассматриваем только активацию)

2) **Ингибирование активности/активации** данной молекулы
(ингибиторы самой молекулы или вышестоящих молекул,
ингибирующие антитела, siRNA/shRNA, нокаут по данному
гену) **препятствует ответу на данный стимул.**

2а) В идеале требуется провести реактивацию/обратную
трансфекцию

3) **Активация** данной молекулы (при действии другого
стимула/искусственного активатора/оверэкспрессии/
экспрессии конститутивно-активной формы) **вызывает**
требуемый ответ.

3а) В идеале хорошо дополнительно заингибировать эту
активацию/накопление



Добрый совет №2

Применяйте комплексные подходы (ингибирование + анализ активации + активация).

Методы *in vitro* и *in vivo*

- Исследование молекул
- Исследование
изолированных органелл
или их лизатов
- Исследование клеток или
лизатов клеток
- Исследования на органах
и организмах

Добрый совет №3

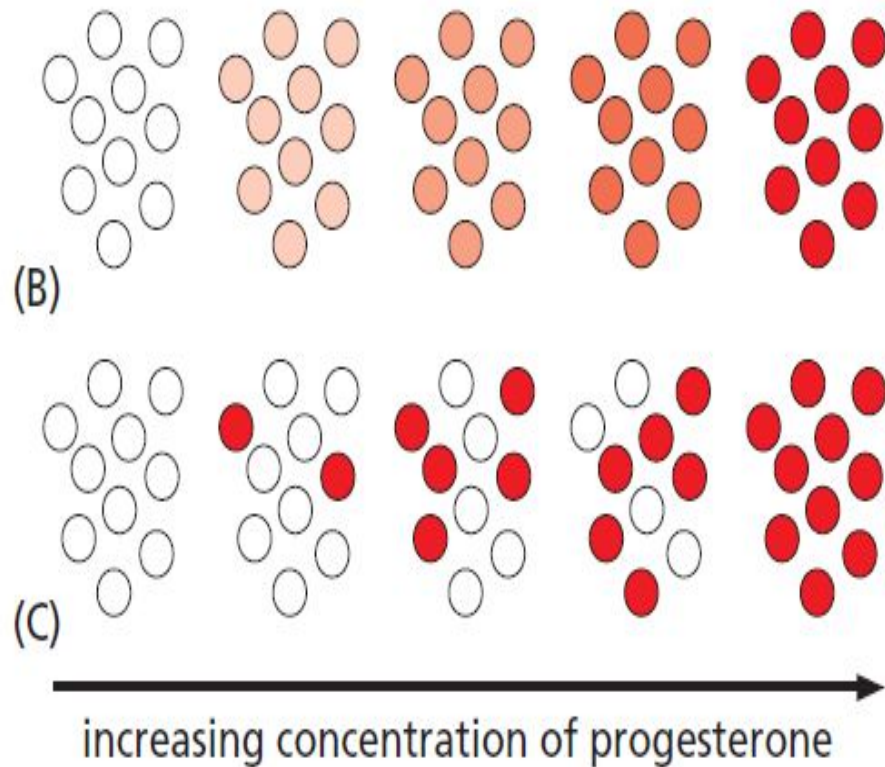
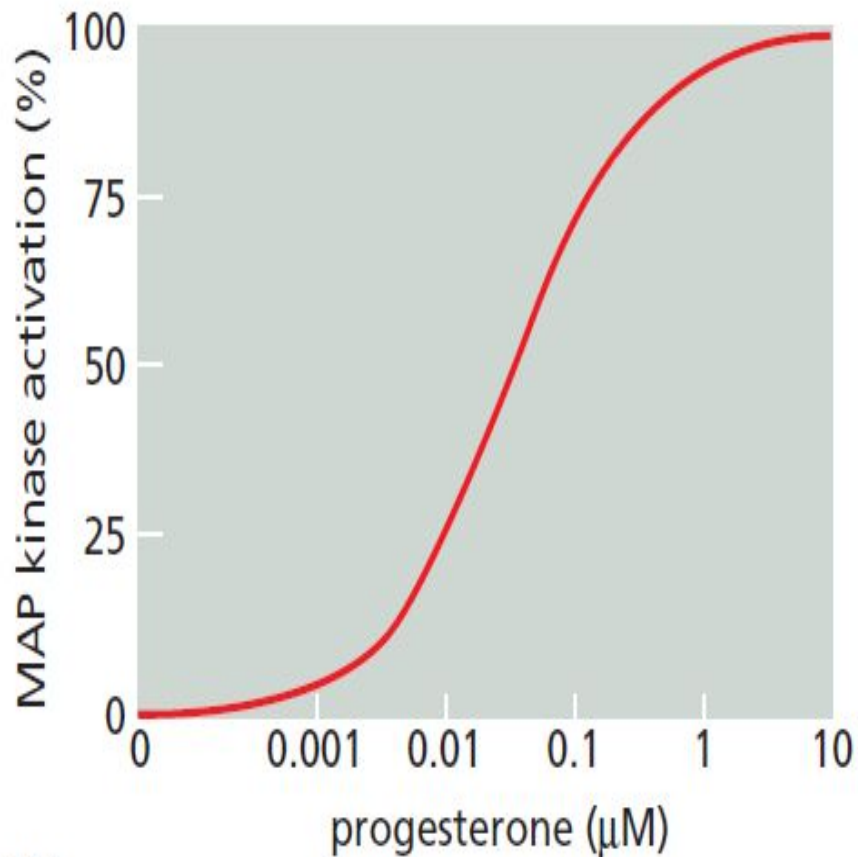
Используйте разные объекты
(например, проверяйте
результаты на других клеточных
линиях)

Для хорошей публикации
необходимы исследования на
разных уровнях

Методы интегральные или поклеточные

- Интегральные методы обычно достовернее (особенно если определяется мол. масса при иммунологических методах) и легче оцифровываются
- Поклеточные методы дают информацию о различии клеток в популяции

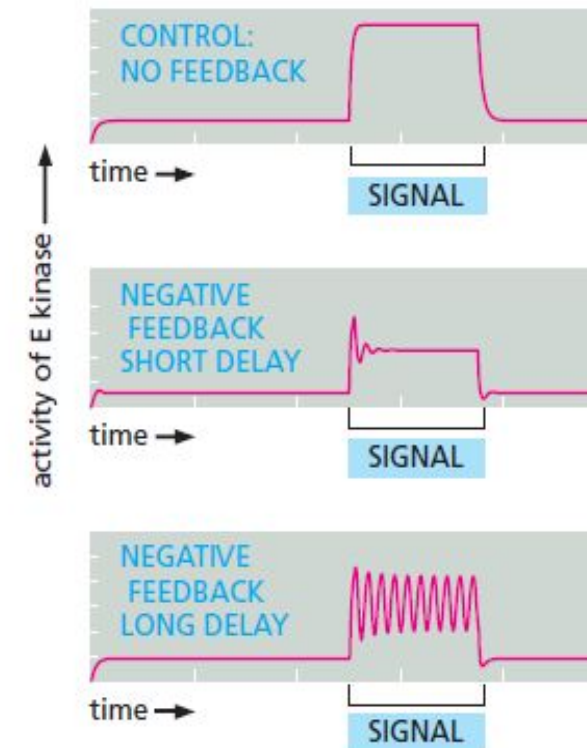
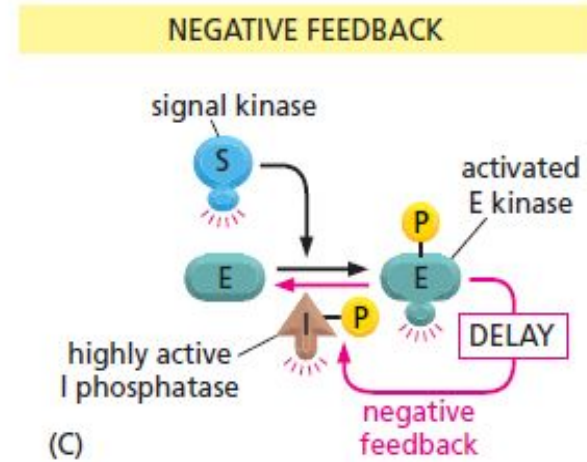
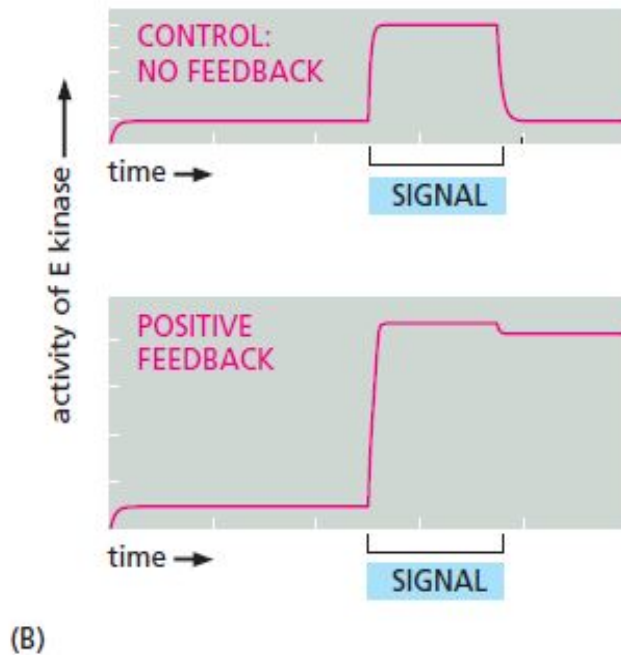
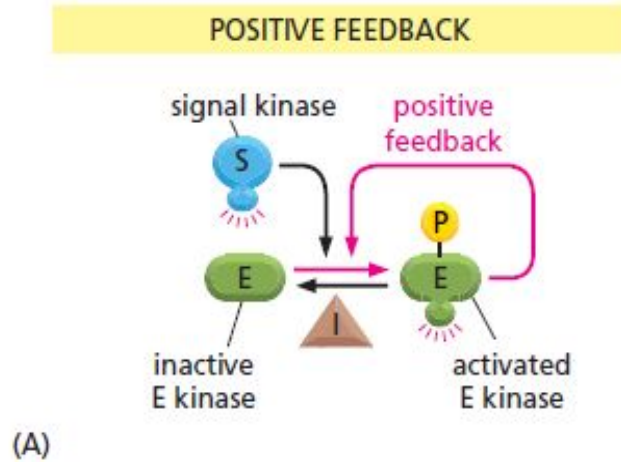
Преимущество анализа отдельных клеток



Добрый совет №4

Применяйте по клеточные
методы в дополнение к
интегральными

Обратные связи, ответ «все или ничего» и осцилляции



Добрый совет №5

Исследуйте разные временные точки (динамику ответа).

По возможности применяйте методы, позволяющие наблюдать за живой клеткой

Использование ингибиторных стратегий

- Низкомолекулярные ингибиторы (например, киназ или протеаз)
- Ингибирующие антитела
- DNA decoys (ингибирование ДНК-связывания)
- Доминантно-негативные формы (помнить, что именно ингибируется!)
- siRNA/shRNA
- Нокаутные или условно-нокаутные животные, клетки из них
- Нокауты/геномные мутации соматических клеток, включая мутации сайтов промоторов – практически не применяется

Добрый совет №6

Используйте современные специфичные ингибиторы в разумных концентрациях.

Проверяйте неродственным ингибитором или альтернативным подходом.

The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P.

Biochem J. 2007 Dec 15;408(3):297-315.

Введение белков в клетку

- Микроинъекция
- Пермеабелизация стрептолизинном и прочие методы трансфекции белка
- Временная (transient) трансфекция ДНК
- Постоянная (stable) трансфекция ДНК
- «Регулируемая» трансфекция

Добрый совет №7

Помните об артефактах,
связанных с уровнем
ингибирования или экспрессии.

Помните об ограничениях
постоянной и временной
трансфекции.

Исследование экспрессии

- RT-PCR (в том числе real time)
- ИФА или дот-блот
- Вестерн-блот
- Проточная цитометрия
- Иммунофлуоресценция

Добрый совет №8

По возможности пользуйтесь современными высокопроизводительными методами.

Используйте возможности геномики и протеомики, базы данных, массивы кДНК, антител и малых молекул, масс-спектрометрию, многолуночные платы, компьютерную обработку.

Добрый совет №9

Помните, что не все методы достоверны, а антитела, субстраты, ингибиторы специфичны.

Ориентируйтесь на современное мнение ведущих специалистов или проверяйте сами.

Исследование вторичных модификаций (фосфорилирование)

- Фосфоаминокислотный анализ, анализ содержания фосфора, анализ включения радиоактивного фосфора – почти не применяется
- Масс-спектрометрия высокого разрешения
- Методы с использованием фосфоспецифических антител
- ИФА или дот-блот
- Вестерн-блот
- Проточная цитометрия
- Иммунофлуоресценция
- Иммунопреципитация на белок и последующий иммуноблот антителами к фосфоаминокислоте

Исследование локализации

- Иммунофлуоресценция
- Меченые белки или GFP-fusion
- Субклеточное фракционирование

Исследование взаимодействия белков

- Образование комплексов *in vitro*
- Колокализация на иммунофлуоресценции (нестрога)
- FRET(FREER) меченых белков или GFP-fusion
- Ко-иммунопреципитация

Исследование активности фермента (киназы)

- In vitro киназный эссе́й (радиоактивный или нерадиоактивный)
- In gel киназный эссе́й (зимография)

Исследование транскрипционных факторов

- Локализация (Crm1 для shuttling)
- EMSA (DNA-binding)
- Иммунопреципитация хроматина (ChIP)
- FISH
- Репортерные конструкции

Добрый совет №10

Используйте адекватные
статистические методы

Гланц С. Медико-биологическая статистика.
М.: Практика, - 1998.

Добрый совет №11

Стремитесь к совместной
работе (co-laboration)

Добрый совет №12

Международные конференции — незаменимая возможность получить актуальные знания и познакомиться с полезными людьми.

Добрый совет №13

Изучайте науку планировать эксперименты (тактика)

Изучайте искусство планировать направления работы (стратегия)

Удачи!!!

In: Molecular Biology of the Cell

B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis,

M. Raff, K. Roberts, P. Walter.

5th edition. 2008

15. Cell Communication + other chapters

Signal Transduction

B. Gomperts, I. Kramer, P. Tatham

2nd edition. 2009

Biochemistry of Signal Transduction and Regulation

G. Krauss

3rd edition, Wiley, 2003

Handbook of Cell Signaling

R. Bradshaw, E. Denis

Academic Press; 2003

2nd edition 2009