THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.112 doi: https://doi.org/10.15407/ubj95.06.112

ВІДКРИТТЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ І ГЕНЕТИЧНИХ МЕХАНІЗМІВ РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ: НОБЕЛІВСЬКІ ЛАУРЕАТИ 2001 РОКУ ЛІЛАНД ХАРТВЕЛЛ, ТІМОТІ ХАНТ І ПОЛЬ НЕРС

О. П. МАТИШЕВСЬКА✉, *В. М. ДАНИЛОВА*, *М. В. ГРИГОР'ЄВА*, *С. В. КОМІСАРЕНКО*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
✉*e-mail: matysh@yahoo.com*

Отримано: 27 жовтня 2023; **Виправлено:** 28 листопада 2023; **Затверджено:** 01 грудня 2023

Нобелівською премією у 2001 році було нагороджено Ліланда Хартвелла, Пола Нерса і Тімоті Ханта за їхні відкриття молекулярних і генетичних механізмів клітинного циклу. В огляді проаналізовано особливості використаних вченими об'єктів, широкий спектр методів, застосованих для дослідження від звичайної світлової мікроскопії до технології рекомбінантної ДНК і комплементаційного тесту та викладено історію здійснених відкриттів. Завдяки роботам цих вчених склалося сучасне уявлення щодо існування контрольних точок клітинного циклу, комплексів, утворених цикліном і кіназами (cyclindependent kinases), що функціонують на різних фазах клітинного циклу, а також про механізм періодичної деградації цикліну та універсальність циклінового механізму клітинного ділення в усіх живих організмах.

Ключові слова: клітинний цикл, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, cdc мутанти, cdc2/cdc28, протеїнкіназа cdk, циклін, комплекс cdk/циклін.

Дослідження клітинного циклу сповнене випадковостей. Хартвелл хотів досліджувати клітинний ріст і не збирався ідентифікувати регуляторів хромосомного циклу, Пол Нерс виявив дуже важливих маленьких мутантів на неправильному кінці градієнта, а Тім Хант віднайшов циклін, шукаючи щось зовсім інше. Проте усі троє дослідників знали достатньо про об'єкти своїх досліджень, щоб усвідомити важливість того, на що вони натрапили. Як зазначав Пастер, доля прихильна лише до підготовленого розуму.

Кім Несміт, британський біохімік і молекулярний біолог

Нобелівська премія з Фізіології або медицини 2001 року була присуджена трьом вченим – Ліланду Хартвелл, серу Тіму Ханту та серу Полу Нерсу «За їхні відкриття ключових регуляторів клітинного циклу».

У резюме прес-релізу Нобелівської Асамблеї Каролінського Інституту за 8 жовтня 2001 року було опубліковано дослівно таке: «Всі організми складаються з клітин, що розмножуються завдяки поділенню клітин. Дорослий організм людини має приблизно 100 000 мільярдів клітин, які походять з однієї клітини – заплідненої яйцеклітини. У дорослих також є величезна кількість клітин, що постійно діляться, щоб замістити ті, що помирають. Перед поділом клітина має збільшитися у розмірі, подвоїти свої хромосоми та розділити їх для точного розподілу між двома дочірніми клітинами. Такі різні процеси координуються у клітинному циклі. Нобелівські лауреати з Фізіології або

Медицини цього року зробили основоположні відкриття щодо контролю клітинного циклу. Вони ідентифікували ключові молекули, що регулюють клітинний цикл у всіх евкаріотичних організмах, включно із дріжджами, рослинами, тваринами та людиною. Ці фундаментальні відкриття мають величезне значення для всіх аспектів росту клітин. Дефекти у клітинному циклі можуть призводити до хромосомних змін, які спостерігаються у злоякісних клітинах, що у майбутньому може відкрити нові можливості для лікування злоякісного росту».

У нашій статті ми спробуємо більш детально розповісти про зміст та значення досліджень лауреатів 2001 року.

Наприкінці XIX ст. німецький біолог і засновник цитогенетики Вальтер Флеммінг, досліджуючи за допомогою світлової мікроскопії поділ клітин, визначив послідовність конденсації і руху хромосом під час мітозу. Однак єдиною морфологічною зміною, яку спостерігали поза мітозом, було лише збільшення розміру клітини. Інтерфаза залишалася «чорним ящиком» і вважалася однією фазою, доки не було виявлено, що синтез ДНК потребує досить короткого періоду часу. З часом серію подій, що спонукають клітину до поділу та утворення двох нових дочірніх клітин було встановлено і названо клітинним циклом, або циклом поділу клітини. Нагадаємо, що типовий клітинний цикл евкаріот складається з чотирьох фаз – G1 (інтенсивний синтез протеїнів та ріст клітини), S (реплікація ДНК), G2 (підготовка до поділу, перевірка реплікації ДНК), які разом складають інтерфазу та M фази. M фаза включає мітоз, під час якого ділиться ядро та цитокінез, під час якого ділиться цитоплазма з утворенням двох клітин.

Після того, як чотири основні фази клітинного циклу було ідентифіковано, фокус досліджень змістився на дослідження механізмів переходу від однієї фази до наступної. Головним завданням було виявлення невідомих факторів, що регулюють і контролюють послідовність проходження клітинного циклу. На початку переважала думка про вирішальну роль ядра у проходженні клітинного циклу, тому основним методичним підходом до з'ясування цього була трансплантація клітинних ядер. Визнаним досягненням стали результати експериментів, здійснених у 1970-х роках зоологом Йошіо Масуї на ооцитах жаби *Xenopus laevis*. Вчений вперше застосував метод мікроін'єкції та експериментально продемонстрував, що декілька нанолітрів цитоплазми, взятої із заблокованих у метафазі ооцитів та введених у G2 ооцити, спричиняють швидкий перехід клітин з G2 у метафазу [1].

Оскільки вступ ооцитів до метафази мейозу називають дозріванням ооцитів, цитоплазматичний фактор отримав назву фактора, що сприяє дозріванню (Maturation promoting factor, MPF). Цей фактор було очищено лише у 1988 р., проте з'ясування його комплексної будови та особливостей функціонування, як і загальних закономірностей контролю над проходженням клітинного циклу було б неможливим без відкриттів, зроблених у 60-90-х роках минулого сторіччя Ліландом Хартвеллом, Полом Нерсом та Тімоті Хантом.

На сьогодні зрозуміло, що протікання клітинного циклу контролюється не одним фактором, а декількома механізмами, кожен із яких контролює перехід лише до певної фази клітинного циклу. На молекулярному рівні такими механізмами є комплекси, утворені протеїном цикліном та кіназами, названими cdk (cyclin dependent kinase). Ці комплекси діють так: циклін синтезується, а потім зв'язується з cdk, утворюючи активний комплекс cdk/циклін, який фосфорилює певні субстрати, що запускають перший перехід у клітинному циклі. Після цього циклін розщеплюється, що призводить до інактивації кінази. Потім синтезується інший циклін і утворюється інший активний комплекс cdk/циклін, який фосфорилює інші субстрати, що запускають наступний перехід. Кожна утворена пара cdk/cyclin діє на різні субстрати, що призводить до активації різних сигнальних шляхів, які і контролюють фази клітинного циклу.

Історія відкриттів Л. Хартвелла, П. Нерса та Т. Ханта, зроблених на шляху до ідентифікації цих ключових механізмів регуляції клітинного циклу є цікавою і дещо нетиповою. Дослідження вчених грунтувались на досягненнях у таких галузях, як зоологія, клітинна біологія, генетика, біохімія, використанні порівняно простих об'єктів – ооцитів жаби, клітин дріжджів, ооцитів морських безхребетних та на застосуванні найрізноманітніших методів – від звичайної світлової мікроскопії до технології

рекомбінатної ДНК та комплементаційного тесту.

Зупинимось коротко на особливостях деяких використаних цими вченими експериментальних підходів. Для генетичних досліджень, як зручний об'єкт, було обрано клітини дріжджів, максимальна кількість генів у яких не перевищує 5-7 тисяч. Об'єктом досліджень Хартвелла стали клітини пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Це сферичної форми клітини діаметром 4-8 мкм, їхній поділ починається з утворення бруньки, розмір якої упродовж клітинного циклу збільшується, доки не досягне розміру материнської клітини, після чого дочірня клітина відокремлюється. Об'єктом досліджень Нерса були дріжджі *Schizosaccharomyces pombe* – паличкоподібні клітини довжиною 5-8 мкм, що упродовж клітинного циклу ростуть у довжину, доки не відбудеться їх симетричний поділ посередині з утворенням двох дочірніх клітин однакового розміру.

Дріжджі виявились особливо корисними для ізоляції чутливих до температури мутантів та для ідентифікації генів, відповідальних за прогресування клітинного циклу. Вченими було застосовано метод мутацій (conditional mutations), що виявляються за температури 37°C, названою обмежувальною. Якщо за дозвільної температури (23°C) мутантний фенотип не виявлявся, то за обмежувальної температури мутантний протеїн втрачав активність і клітина зупинялась у певній фазі клітинного циклу, що відбивалось на її морфологічно зміненому фенотипі. Хартвелл назвав такі клітини cdc (cell division cycle) мутантами. Для ідентифікації гена, відповідального за правильне проходження фази клітинного циклу мутантні клітини трансформували з використанням плазмідної геномної бібліотеки з клітин дикого типу та культивували за обмежувальної температури. Та незначна кількість клітин, які поглинули плазміду, що містила cdc ген дикого типу зазнавали генетичної комплементації, відновлювали нормальний фенотип, здатність до реплікації та до утворення колоній за обмежувальної температури. Плазмідна ДНК, виділена з такої колонії, містила *cdc* ген дикого типу, що дозволяло шляхом секвенування ідентифікувати відповідний cdc протеїн.

Якщо генетики змогли ідентифікувати фактори, необхідні для протікання клітинного циклу ізолював мутанти, то біохіміки ідентифікували ці фактори застосував їх очищення та електрофорез. Так, Тімоті Хант використав як модельну систему екстракт яєць морського їжака і виявив на електрофореграмах протеїн, названий цикліном.

Проаналізуємо детальніше творчий шлях кожного з трьох Нобелівських лауреатів.

Ліленд Хартвелл (р.н. 1939)

Ліленд Хартвелл (*Leland Hartwell*) народився 30 жовтня 1939 року у Лос-Анджелесі (Каліфорнія, США), у сім'ї Ернеста Хартвелла, виробника вивісок, та Марджорі Хартвелл (пізніше Ніколс). Допомагаючи батькові у магазині Ліланд розпитував, як працює неонова вивіска, бо хотів розуміти принцип її дії, проте не отримував відповіді, адже ніхто з сімї ніколи не вчився у коледжі. Ця природна цікавість не означала, що Ліланд був добрим учнем. Він із задоволенням колекціонував жуків, ящірок, павуків та змій, проте у віці від 13 до 17 років був більше «захоплений спортом, дівчатами та автомобілями» [2].

На той час Ліленд залишився лише з матір'ю, яка підпрацьовувала секретарем та офіціанткою. Коли юнак вирішив продовжити навчання у старшій школі, мати підтримала його і змінила квартиру на ближчу до цієї школи. Це було вдалим рішенням, тому що тут юнакові пощастило з вчителями, які визнали та розвинули його талант у природничих науках та математиці. Він успішно засвоїв курси з хімії, фізики та математики у коледжі Глендейла, сподіваючись стати інженером. Натхненний своїм професором-консультантом, він подав заяву і у 1958 році був прийнятий до престижного Каліфорнійського технологічного інституту за спеціальністю фізика. Це був ще один серйоз-

ний прорив у біографії майбутнього дослідника. Відзначимо, що на той час минуло лише 5 років після відкриття структури ДНК [3] і весь інститутський курс лекцій з біології було присвячено ДНК, РНК і протеїнам.

Тому можна зрозуміти, чому захоплення Леланда фізикою змінилось на захоплення біологією. Він зацікавився літературою з генетики фагів та регуляції генів і відвідував вечірні заняття з біохімії та генетики у лабораторії інституту. По закінченні навчання у 1961 р. Хартвелл вступив до аспірантури Масачусетського технологічного інституту і у 1964 р. отримав докторський ступінь у галузі бактеріальної біохімічної генетики.

На той час Франсуа Жакоб и Жак Моно опублікували свою видатну роботу про lac оперон [4]. Хартвелл дійшов висновку, що регуляцію генів вже достатньо добре вивчено.

Він вирішив зайнятися чимось менш дослідженим, зокрема, контролюванням росту та проліферації ракових клітин і для своєї постдокторської роботи обрав лабораторію майбутнього лауреата Нобелівської премії (1975 р.) Ренато Дульбекко в Інституті біологічних досліджень Солка у Каліфорнії, де досліджували взаємодію онкогенних вірусів із ДНК клітин тварин. Той факт, що навіть у пластикових чашках Петрі ракові клітини росли, тоді, як нормальні клітини ні, особливо вразив дослідника і він повністю заглибився у цю проблему. Після півторарічної роботи постдоком, засвоївши методи культивування клітин та гібридизації ДНК, що знадобилось йому у подальшому, Хартвелл покинув лабораторію, скориставшись пропозицією зайняти посаду доцента у новому Каліфорнійському університеті в Ірвіні, що давало можливість розпочати незалежну наукову кар'єру. У 1965 р. Хартвелл започаткував тут власну лабораторію і спочатку мав намір досліджувати проліферацію ракових клітин. Він навіть зумів отримати для цього грант Національного інституту охорони здоров'я та замовив необхідне обладнання. Проте, чекаючи на його доставку, вчений засумнівався у перспективі фундаментальных відкриттів за використання клітин ссавців і вирішив скористатися для генетичного аналізу клітинного росту простішою моделлю евкаріотичної клітини, а саме, клітинами пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. У різні часи дріжджі звинувачували в тому, що вони не є справжніми евкаріотами, проте було продемонстровано, що дріжджі мають евкаріотичний клітинний цикл із періодами G1, S, G2 і M (1), у них наявне внутрішньоядерне веретено поділу, а те, що вони ростуть як окремі клітини давало перевагу для вивчення їхнього поділу.

Хартвелл почав із виділення великої колекції чутливих до температури клітин дріжджів *S. cerevisiae*, що зазнали мутацій після попередньої обробки нітрозогуанідином. Вирощена за дозвільної температури (23°C) асинхронна популяція таких клітин за обмежувальної температури (36°C) ставала синхронно затриманою на певному етапі клітинного ділення. Хоча більшість мутантів мали нічим непримітні фенотипи, серед них було виявлено незвичну популяцію клітин із фенотипом, який свідчив про дефекти у просуванні через цикл. Однак на той час не було способу розпізнавати таких мутантів серед безлічі дефектних за іншими важливими клітинними процесами.

Прорив трапився у 1968 р., коли Лі Хартвелл разом із одним зі своїх випускників Браяном Рідом (Brian Reid) переїхав із Ірвіна до Вашингтонського університету, де став викладачем на факультеті генетики. Тут для аналізу клітинного циклу *S. cerevisiae* було використано мікроскопію сповільненої зйомки. Через послідовні проміжки часу після перенесення мутантів у середовище з температурою 36°C робили їх покадрові знімки за допомогою фотомікроскопа, який утримували у кімнаті при 36°C. Упродовж цілого літа 1969 р. Рід та Хартвелл проводили досить обтяжливі експерименти, адже дослідники були змушені здійснювати скринінг, сидячи і пітніючи перед мікроскопом у теплій кімнаті. Результат був того вартий – вивчаючи покадрові зображення, вчені раптово усвідомили, що проходження клітинного циклу *S. cerevisiae* можна оцінювати за розміром бруньки – клітини без бруньки знаходяться у G1, з маленькою брунькою – у S, а з великою – у G2 фазі (рис. 1) [5].

Коли Хартвелл придбав повітродувку та коробку з оргскла, у якій підтримували температуру 36°C і у якій і розмістили мікроскоп, то аналіз мутантів значно прискорився. Упродовж декількох місяців було ідентифіковано більше ста мутантів із ймовірними дефектами клітинного поділу. Хартвелл назвав такі клітини

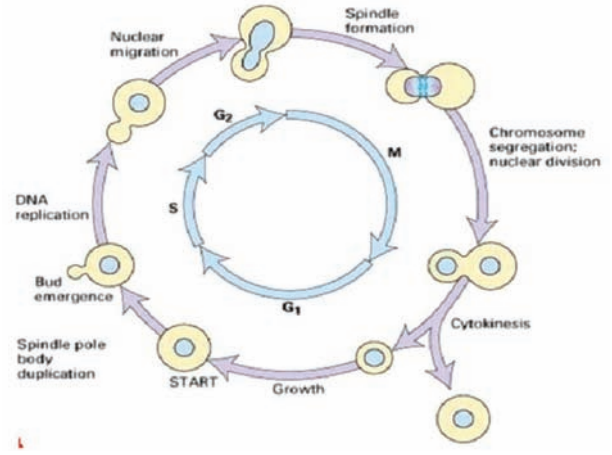


Рис. 1. Діаграма мітотичного життєвого циклу Saccharomyces cerevisiae та його фаз [5]

cdc (*cell division cycle*)-мутантами, тобто мутантами циклу поділу клітин [6].

Щоб переконатись, що віднайдені мутанти клітинного ділення дійсно були мутантами клітинного циклу, дослідники засвоїли метод Гімзе для фарбування ядер та оцінили стан ядерного циклу. Виявилось, що мутанти, які затримувалися з однаковою морфологією клітин, затримувалися і з однаковою морфологією ядер. Так, клітини з мутацією *cdc-8* зупинялись на етапі конденсації хромосом та їх розходження до протилежних полюсів (рис. 2, *Б*), а клітини з мутацією *cdc-10* – на етапі переходу від поділу ядра до цитокінезу (рис. 2, *В*) [7].

Особливу увагу Хартвелла привернув мутант *cdc28*. Це був єдиний мутант, що не зазнавав ні брунькування, ні подвоєння ДНК, ні поділу ядра чи цитокінезу. Вчений припустив, що *cdc28* кодує протеїн, необхідний для проходження G1 фази клітинного циклу, тобто для його початку, і що цей протеїн є ключовим регулятором клітинного циклу [8]. Контрольований cdc28 протеїном перехід від G1 до S фази Хартвелл назвав «Стартом» (рис. 1).

Той факт, що припущення Хартвелла було правильним і що багато які з відкритих ним *cdc* генів дійсно кодують регуляторів клітинного циклу, було експериментально доведено пізніше біохімічними дослідженнями інших вчених. Так, Стів Рід, який приєднався до команди Хартвелла як постдок та зосередився на детальному дослідженні *cdc28*, здійснив клонування гена *cdc28* і у 1984 р. показав, що кодований ним протеїн є протеїнкіназою, відомою на сьогодні як cdk1 (*cyclin dependent kinase 1*) [9].

Остаточне уявлення щодо поєднання cdc28 *S. cerevisiae*, cdc2 *S. pombe* та MPF стало можливим завдяки дослідженням Пола Нерса та Тімоті Ханта.

Хартвелл натомість зосередився не на функції ідентифікованих ним *cdc* генів, а на проблемі точності дотримання клітинного циклу. Звідки, запитав він, клітини знають, що вони не повинні зазнавати мітозу, коли їхні хромосоми пошкоджені? Чи може чутливість до радіації деяких відомих *rad*-мутантів дріжджів бути пов'язана не з дефектною репарацією ДНК, а з неспроможністю таких мутантів зупинити клітинний цикл під час опромінення?

В експериметальному дослідженні Хартвелл та Вейнер виявили, що у разі мутації гена *rad9* опромінені клітини зазнавали ділення, натомість клітини дикого типу зупинялися у G2 або M фазі. Вчені постулювали, що протеїн rad9 блокує механізм просування опромінених

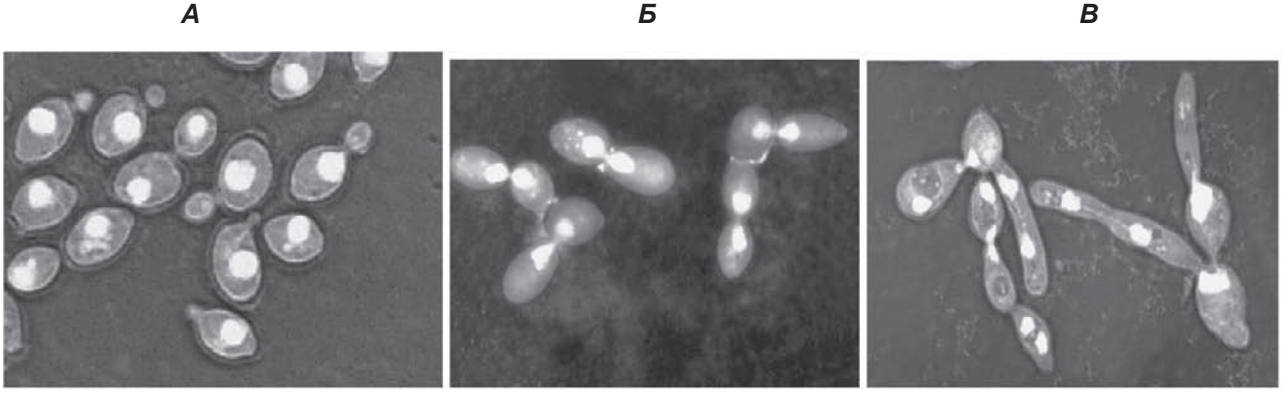


*Рис. 2. Нормальні дріжджеві клітини Saccharomyces cerevisae та cdc мутанти через декілька годин після інкубації за обмежувальної температури. (**А**) дикий тип (**Б**) cdc8, (**В**) cdc10 [7]*

клітин через мітоз. Стаття, опублікована ними за цими результатами [10] мала важливе значення, оскільки демонструвала, що певні гени, які самі по собі не є визначальними для протікання клітинного циклу, забезпечують його зупинку у разі пошкодження ДНК. Окрім того, представлені результати свідчили, що таку ж роль у людському організмі відіграє протеїн p53.

Ще одним важливим здобутком Хартвелла є запропонована ним концепція щодо існування механізмів моніторингу, названих «контрольними точками» (*checkpoints*), які постійно контролюють проходження фаз клітинного циклу. Лише у разі завершення однієї фази відповідний контрольний механізм дезактивується, тим самим дозволяючи перехід до іншої фази клітинного циклу [11].

Слід зазначити, що вчений шукав відповіді на поставлені питання ще до того, як можна було відповісти на них безпосередньо вимірюванням рівнів cdk1-циклiну. Як показав подальший молекулярний аналіз, в опромінених клітинах дріжджів і ссавців із пошкодженими хромосомами не активується комплекс cdk1-циклін B і клітини блокують M-фазу, щоб забезпечити репарацію ДНК.

Результати досліджень Хартвелла сприяли становленню сучасних уявлень про існування чотирьох основних контрольних точок клітинного циклу. На сьогодні загальновідомо, що контрольна точка G1/S (або START у дріжджів) необхідна для накопичення поживних речовин та факторів росту. Пропускна точка G2 контролює цілісність ДНК і дозволяє перейти до мітозу лише тим клітинам, які мають непошкоджену ДНК. Ще двома пунктами пропуску є точки контролю мітозу та цитокінезу (рис. 3).

Ліленд Хартвелл працював у Вашингтонському університеті з 1968 до 1996 року. Після цього він приєднався до Дослідницького центру раку Фреда Хатчинсона у Сіетлі, (штат Вашингтон, США) для роботи на посаді президента і директора. На службу директор Центру незмінно приїжджав велосипедом, нерідко у супроводі дружини, яка працювала тут фотографом. Вчений доклав багато зусиль для інтеграції міждисциплінарних фундаментальних, прикладних і клінічних досліджень раку. У 1998 р. за фундаментальні дослідження в галузі медицини Хартвелл удостоївся премії імені Альберта Ласкера, яка серед фахівців вважається своєрідною рекомендацією на Нобелівську. Половину призової суми вчений пожертвував місцевій школі, вчителі якої займаються з дітьми, які перебувають на лікуванні у Центрі, другу половину – активістам, які опікуються родичами пацієнтів.

Натепер загальновизнано, що своїми дослідженнями з використанням дріжджів *S. cerevisiae* Ліленд Хартвелл започаткував новий напрям – **генетику клітинного циклу**. Цей напрям був успішно підтриманий та продовжений генетичними дослідженнями «другого покоління» з використанням дріжджів *S. pombe*, яке продемонструвало, як можна відрізнити ключові регуляторні гени клітинного циклу від тих, що кодують звичайні ензими.

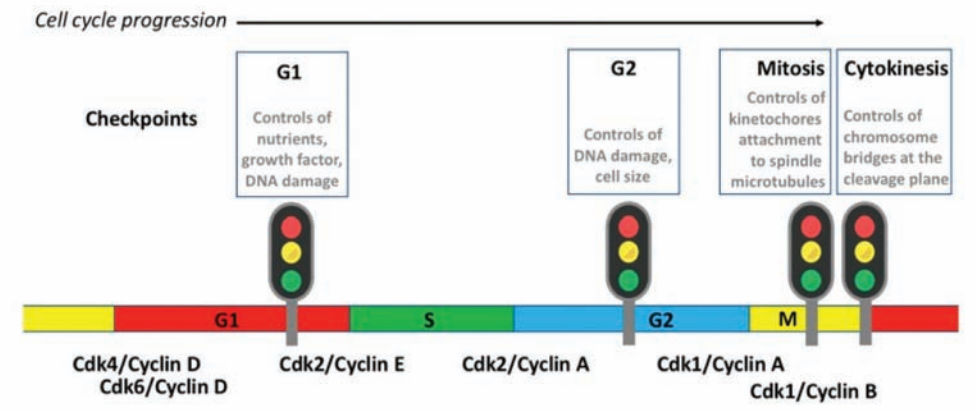


Рис. 3. Основні елементи регулювання клітинного циклу: контрольні точки, cdks та цикліни [12]

Сер Пол Нерс (р.н. 1949)

Сер Пол Нерс (*Paul M. Nurse*) – британський біохімік і молекулярний біолог, народився 25 січня 1949 року у Лондоні і зростав у сім'ї, де батько працював механіком, а мати займалась вихованням дітей. Пол закінчив державну середню школу – гімназію округу Харроу для хлопчиків. З усіх предметів, окрім французької мови, його оцінки були достатньо високими для того, щоб вступити до університету. А от іспит із французької він провалював шість разів і так не спромігся його скласти. Тому юнак влаштувався на роботу техніком у лабораторію місцевої пивоварні. Тут він намагався швидко закінчити щоденну роботу, щоб мати достатньо часу для дослідницьких проектів. Лише завдяки випадковій зустрічі Пола з одним із професорів генетики Бірмінгемського університету, який оцінив його творчий потенціал, юнака було зараховано на факультет біології. Під час навчання в університеті Пол зацікавився проблемами біології розвитку, тому для роботи над докторською дисертацією обрав лабораторію Університету Східної Англії (UEA) у Норфолку, де вивчали метаболізм амінокислот під час клітинного циклу дріжджеподібних грибів. У 1973 р. Пол отримав ступінь PhD з клітинної біології і біохімії.

Нерса дуже цікавила проблема контролювання клітинного циклу, проте було незрозумілим, як саме можна досліджувати ці процеси. Відповідь прийшла, коли він ознайомився зі статтями Лі Хартвелла, опублікованими на початку 1970-х років і присвяченими виділенню та аналізу термочутливих мутантів пекарських дріжджів, затриманих у певних точках клітинного циклу [13].

Натхненний результатами Хартвелла, Пол Нерс вирішив дослідити регуляцію клітинного циклу такими самими методами, використовуючи як модельну систему дріжджі *Schizosaccharomyces pombe*. Для цього він розпочав роботу як постдок в університеті Единбурга у лабораторії Мердока Мітчисона, який був британським авторитетом у царині клітинного циклу дріжджів, проте не був генетиком. Упродовж 1973–1979 рр. Нерс зміг налагодити у лабораторії генетичний аналіз клітинного циклу *S. pombe*. Він зосередився на пошуку генів, у разі мутації яких клітини виглядали б під мікроскопом як незвично подовжені, тому що затримувались до вступу у мітоз, ділились дуже повільно і продовжували рости за обмежувальної температури. Невідомо, чим би закінчився такий пошук, якби не ще одна з випадковостей, які відігравали ключову роль у біографії вченого. Виділяючи на верхній частині градієнта сахарози подовжені мутанти клітин, він несподівано натрапив на щасливу знахідку – мутантний штам із абсолютно протилежним фенотипом, а саме маленькі за розміром клітини, які мало хто б помітив, тому що вони розташувались у нижній частині градієнта (не через малий розмір клітин, а тому, що дефект поділу спричиняв злипання дочірніх клітин) (рис. 4). При переході від 25° до 35° ці клітини ділились вдвічі швидше за нормальні [12, 14].

Окрилений такою знахідкою, Пол поспішив поділитись своїм результатом із колегами, які, натомість, дуже скептично його оцінили, стверджуючи, що наявність таких клітин є результатом контамінації клітинної популяції. Проте Нерсу вдалося довести, що виявлені ним клітини насправді є мутантними малими дріжджевими клітинами, які так швидко проходять стадію мітозу, що не встигають досягти нормального розміру. Оскільки на той час Нерс працював у Единбурзі, він назвав такі клітини мутантами «wee», що шотландською означає «маленькі» (рис. 4). Це був перший приклад мутанта, що демонстрував очевидний дефект у регуляції клітинного циклу. Пол Нерс зрозумів важливість свого відкриття і, на відміну від Хартвелла, відразу поставив за мету з'ясувати молекулярний механізм виявленого порушення.

На початку слід було ізолювати більшу кількість мутантів wee, але їх скринінг був надзвичайно трудомістким. Нерс не витримував більше п'яти годин за мікроскопом і щотижня міг ідентифікути лише одного-двох мутантів.

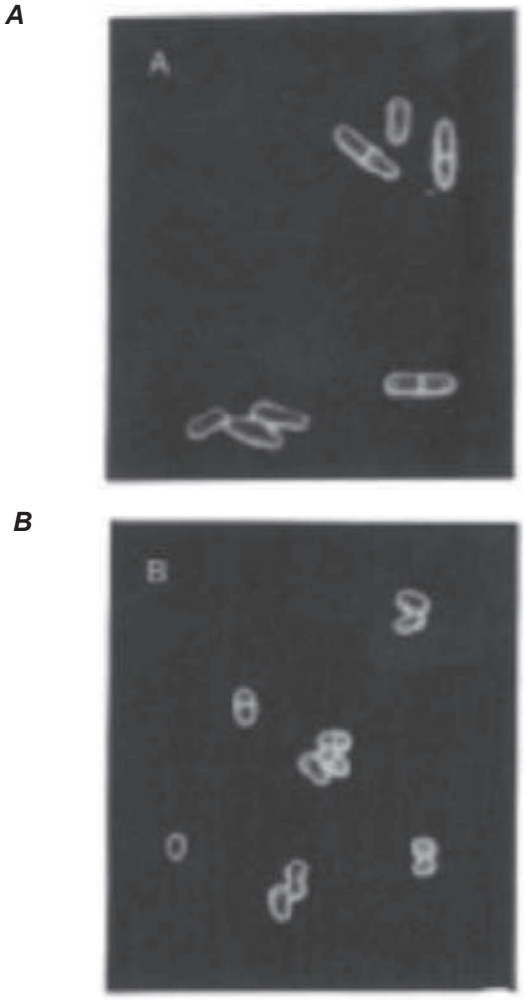


*Рис. 4. Дріжджові клітини Schizosaccharomyces pombe нормального розміру (**A**) і крихітні мутанти (**B**) [14]*

Він планував ідентифікувати 50 таких мутантів, на що знадобилося більше року. Усі віднайдені мутації були рецесивними і згідно даних генетичного картування виявлялись у локусі єдиного гена *wee1*. Нерс разом із колегою П'єром Тюріо (*Pierre Thuriaux*) показали, що у нормальних дріжджових клітинах продукт гена *wee1* є інгібітором вступу у мітоз і, що втрата його функції і є причиною набуття мутантного фенотипу з пришвидшеним протіканням клітинного циклу [15]. Отже, Пол ідентифікував свого першого мутанта *wee* і розпочав пошук нових, але другий ген *wee* був гнітюче невловимим.

Культуральну чашку з черговим, 48-им із 50-ти мутантів Нерс аналізував у лабораторії Единбурзького університету ввечері у дощову п'ятницю. Ось як він згадував про це: «*...чашка була страшенно забруднена ниткоподібним грибом і оскільки вже було пізно і я був втомлений, я викинув її у сміттєвий бак. Я поїхав додому на велосипеді, випив чаю, а потім відчув себе винним і повернувся на велосипеді близько дев'ятої години. А оскільки це були 1970-ті роки, сміттєвий бак до того часу ще не був спорожнений. Вона ще була у смітнику, я її дістав*» [16]. Виявилося, що це і був єдиний мутант з домінантною мутацією у локусі іншого гена, названого *wee2-1*.

На той час у клітинах *S. pombe* вже було ідентифіковано гени циклу клітинного поділу *cdc* і Тюріо припустив, що *wee2-1* може бути алеллю посилення функції одного з них. Методом структурного картування геному він довів, що *wee2-1* дійсно є алельною формою гена *cdc2* [17]. До цього моменту *cdc2* був не більш цікавим, ніж будь-який інший ген клітинного циклу. Після експерименту Тюріо стало зрозуміло, що цей ген має кодувати ключовий регулятор мітозу. На відміну від *wee1*, який пригнічував мітоз, *cdc2* був необхідний для його активації. Ці дані свідчили, що *wee2-1* і *cdc2* разом задіяні у регуляторній мережі, що контролює проходження мітозу.

Подальші експерименти показали, що *cdc2* необхідний не лише для регуляції швидкості проходження мітозу, але й для початку S-фази. Це було несподівано, тому що біохімічні процеси S-фази та мітозу дуже різні, але, здавалось, контролювались одним і тим же геном. З того часу ген *cdc2* не тільки став основним і улюбленим об'єктом Пола Нерса, а ще й зробив його відомим.

Генетичні експерименти поки що нічим не допомагали у з'ясуванні молекулярної ролі *cdc2* у контролюванні клітинного циклу. Це можна було встановити лише шляхом клонування гена *cdc2* дріжджів *S. pombe*, а для цього треба було розробити процедуру трансформації ДНК, тобто введення бібліотеки генів *cdc* генів дикого типу у клітини термочутливого мутантного фенотипу cdc^{ts} з тим, щоб встановити чи відбудеться комплементація і відновлення нормального фенотипу і який з генів за це відповідатиме.

Оволодіння цими методами стало першочерговою задачею Пола Нерса. Для цього у 1979 р. він створив власну лабораторію в університеті графства Сассекс, неподалік Брайтона. Тут методом комплементації ген *cdc2* був

клонований і виявилось, що він повністю усуває дефекти мутанта cdc2^{ts} як у G1/S, так і у G2/M фазах. Вченого відразу зацікавило – якщо cdc2 є «мотором» клітинного циклу, то чи присутній він у дріжджах інших видів?

Щоб це з'ясувати команда Нерса здійснила трансформацію cdc2^{ts} мутанта дріжджів *S.pombe* бібліотекою генів пекарських дріжджів *S. cerevisiae* і таки виявила фрагмент ДНК, який усував дефекти мутанта у клітинному циклі. Яким же було здивування дослідників, коли цей фрагмент виявився відкритим Хартвелом геном *cdc28*! [18].

Отже, ген *cdc2*/*cdc28* необхідний як для ініціації реплікації ДНК, так і для мітозу в дріжджах обох видів, що свідчило про подібність контролювання клітинного циклу у досить віддалено споріднених клітинах дріжджів. Тоді Нерс поставив дуже сміливе запитання – якщо цей механізм зберігається у дріжджів, чи присутній він в усіх евкаріотичних клітинах і у клітинах людини, зокрема? Коли у 1984 р. вчений приєднався до Імперського фонду дослідження раку ICRF (Imperial Cancer Research Fund) у Лондоні, то почав шукати відповідь на це питання. «*Було кілька брів піднято щодо того, що саме дослідник дріжджів робить у дослідницькому центрі раку*», – згадує Пол. Дріжджі і люди розійшлися в ході еволюції приблизно на 1,5 мільярда років, тому переважала думка, що такий складний процес, як розмноження, не може бути однаковим у простих дріжджах та у клітинах людини. Всупереч переконанню своїх колег і своєму власному здоровому глузду, Нерс та постдок у його лабораторії Мелані Лі впровадили повний каталог людських генів у дріжджі з дефектним геном *cdc2*. «*Це був експеримент, який відверто не мав права спрацювати*» – відзначав Нерс. Але сталося диво – шляхом комплементації дослідники таки віднайшли ген, що повністю замінював дефектний дріжджовий *cdc2* [19]. Отже, людський ген міг чудово працювати в дріжджах!

До цього часу клітинний цикл тваринних клітин і дріжджів досліджували окремо один від одного і мало хто був готовий до того, щоб повністю усвідомити ступінь збереження клітинних механізмів в усіх живих істотах. Ідентифікація Нерсом людського ортолога *cdc2* змінила це назавжди. Приблизно в цей же час аналогічні відкриття щодо консерватизму евкаріотичних механізмів були зроблені в галузі клітинної біології та біології розвитку. Згадаймо хоча б дослідження Нобелівського лауреата Роберта Корнберга, який використав дріжджеву модель для з'ясування молекулярних основ транскрипції у евкаріотів [20].

Між тим, детальна молекулярна характеристика гена *cdc2* у лабораторії Нерса продовжувалась. Як саме ген *cdc2*/*cdc28* проявляє свою активність? Насамперед проти *cdc2p* було вироблено антитіла і той факт, що утворені у екстракті *S. pombe* імунопреципітати мали протеїнкіназну активність свідчив, що ген кодує протеїнкіназу. Протеїнкіназна активність *cdc2* змінювалась упродовж клітинного циклу і досягала максимального рівня на початку мітозу [21]. Ці результати цілком узгоджувались з отриманими раніше у лабораторії Стіва Ріда даними про те, що ген *cdc28* дріжджів *S. cerevisiae* також кодував протеїнкіназу [9]. Ген *cdc2*/*cdc28* став відомий як ген циклін-залежної протеїнкінази cdk1.

Розшифровка дослідниками з лабораторії Нерса послідовності wee1 показала належність і цього протеїну до протеїнкіназ, що свідчило про його можливість безпосередньо фосфорилювати і, у такий спосіб, пригнічувати протеїнкіназну активність *cdc2*, тобто функціонувати як негативний регулятор мітозу.

Отримані групою Нерса результати про участь *cdc2* у регуляції клітинного циклу наштовхували на думку, що *cdc2* може бути пов'язаним із відкритим Йошіо Масуї фактором сприяння дозріванню (Maturation promoting factor, MPF) ооцитів [1]. Здійснена у 1988 році біохіміками-послідовниками Масуї очистка MPF з екстракту ооцитів жаби *Xenopus laevis* показала, що цей фактор складається з двох протеїнів із молекулярною масою 34 та 45 кДа [22].

У співробітництві вченими з інших лабораторій Нерсу вдалося експериментально довести зв'язок між MPF та cdc2. Так, із застосуванням антитіл, отриманих проти cdc2 та їх перехресної реакції з очищеним MPF було продемонстровано, що антитіло реагує з 34кДа протеїном у складі MPF [23]. Отже, протеїнкіназа cdc2 (cdk1) виявилася складовим компонентом MPF.

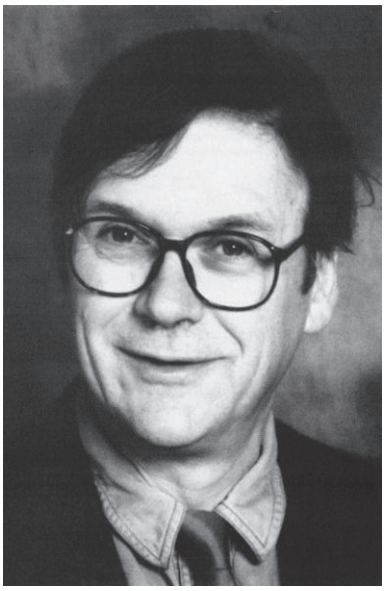
Після цього постало логічне запитання: а що ж це за інший протеїн у складі MPF?

Щоб відповісти на це запитання ми нижче проаналізуємо наукові досягнення третього з нагороджених Нобелівською премією лауреатів – **Тіма Ханта**. А поки що відзначимо, що Пол Нерс, пропрацювавши з 1988 року професором біохімії та завідувачем кафедри мікробіології університету Оксфорду, повернувся у 1993 році до Імперського фонду дослідження раку, де зайняв посаду наукового директора. Свою діяльність у ICRF вчений присвятив, зокрема, об'єднанню благодійної Компанії з дослідження раку та Імперського фонду дослідження раку, який став носити назву Організації з дослідження раку Об'єднаного Королівства (Cancer Research UK). У 2002 р. Пол Нерс став головним виконавчим директором цієї організації. З 2003 до 2011 р. вчений виконував обов'язки президента Рокфеллерівського університету Нью-Йорка, де продовжив дослідження клітинного циклу дріжджів.

Непередбачені і випадково виявлені факти мали місце не лише у науковій діяльності Пола Нерса, а й у його особистій біографії. Так, декілька років потому, як вчений став президентом Рокфелерівського університету Нью Йорка, він подав заявку на отримання грін-карти, але вона була відхилена через недостатність даних у свідоцтві про народження. У біографічному додатку до Нобелівської лекції Пол описав, що він відчув, коли з нового розширеного свідоцтва дізнався, що чоловік і жінка, яких він вважав своїми батьками, насправді були його бабусею та дідусем, а його біологічною матір'ю була молода жінка, яку він вважав своєю сестрою [24]. Втім, вчений сприйняв цей факт із властивими йому мудрістю та іронією, зауваживши, що походження з робітничого класу сприяло його здатності взаємодіяти з людьми з усіх верств суспільства. «*Я непоганий генетик, і моя досить проста сім'я змогла утримувати мою власну генетичну таємницю понад півстоліття*» – констатував вчений.

У період з 2010 до 2015 рр. Пол Нерс був президентом Лондонського Королівського Товариства. У 2011 році він став головним виконавчим директором та керівником лабораторії клітинного циклу у Британському центрі медичних досліджень та інновацій (нині Інститут Френсіса Кріка). З 2017 р. вчений є ректором університету у Брістолі (Англія).

Вчений нагороджений орденом Почесного легіону від Франції та орденом Висхідного сонця від Японії. У 1999 році Королева Єлизавета посвятила Пола Нерса у лицарі.



Сер Річард Тімоті Хант (р.н. 1943)

Сер Річард Тімоті Хант (*Richard Timothy Hunt*) – британський біохімік і молекулярний фізіолог. Народився 19 лютого 1943 р. у містечку Нестон графства Чешир (Англія) у сім'ї викладача палеонтології Річарда Вільяма Ханта та дочки торговця деревиною Кіт Роуленд. У 1945 році батько був призначений хранителем західних рукописів у Бодліанській бібліотеці університету Оксфорду і сім'я переїхала до цього міста. Під час навчання у школі Коледжу Магдалини в Оксфорді, де наукові премії тепер носять його ім'я, Тім Хант особливо зацікавився хімією і зоологією. У 1961 р. він вступив до Клер-коледжу у Кембріджі для вивчення природничих наук та з наміром стати біохіміком.

По закінченні навчання у 1964 р. Тім відразу почав працювати на кафедрі біохімії цього університету. Його цікавили питання контролю трансляції мРНК, і, зокрема, регуляції синтезу гемоглобіну. Для проведення присвячених цим питанням досліджень він виїхав до Нью-Йорка, де упродовж чотирьох місяців працював у лабораторії Медичного коледжу Альберта Эйнштейна. Свою докторську дисертацію, яку захистив у 1968 р. у Кембріджському університеті, Хант присвятив синтезу гемоглобіну в ізольованих ретикулоцитах (незрілих еритроци-

тах) кроля і з того часу почав цінувати переваги простих модельних систем.

Після отримання докторського ступеня Хант продовжив дослідження синтезу гемоглобіну і водночас почав пошук нових моделей для вивчення контролю трансляції мРНК. Те, що деякі дослідники порівнювали синтез гемоглобіну в еритроцитах із синтезом протеїнів в ооцитах морського їжака підштовхнуло Ханта до вивчення біології розвитку та ембріології.

Для цього він скористався можливістю провести літо у Морській біологічній лабораторії (MBL) Вудс-Хоулу (Масачусетс, США) – міжнародному науково-дослідницькому та освітньому центрі у галузі біології та навколишнього середовища. Ця лабораторія надає притулок для гуру мітозу та інших вчених, які відвідують знамениті літні курси підвищення кваліфікації. Тут можна було досліджувати синтез протеїнів, важливих для ембріогенезу безхребетних, таких як молюски (*Spisula solidissima*) і морські їжаки (*Arbacia punctulata*). Ці організми були історичним фаворитом у Вудс-Хоулі, тому що подорож до сусідніх рифів та рибальських доків забезпечувала легкодоступне джерело їх постачання. Яйцеклітини та сперма легко виробляються цими істотами у лабораторних умовах (потрібно лише трохи відфільтрованої морської води), а клітини ембріонів через їх прозорість добре підходять для мікроскопічного аналізу. Тут у Вудс-Хоулі регуляцію розвитку молюсків вивчала американська дослідниця Джоан Рудерман, до якої і приєднався Тім Хант. Він був вражений тим, як швидко яйцеклітини діляться, і почав більше думати про поділ клітин.

Тім став постійним відвідувачем Вудс-Хоулу, щорічно викладав тут курс фізіології і мав намір дослідити синтез протеїнів, які можуть бути важливими в ембріогенезі безхребетних. Для цього він приїздив до лабораторії з валізою, повною дрібниць, що можуть йому знадобитися – трубок, наконечників, гелевих пластин і навіть перистальтичної помпи. Влітку 1982 р. вчений вирішив детальніше дослідити синтез протеїнів після запліднення яйцеклітин морського їжака *Arbacia*. Експеримент був досить простим– до запліднених яйцеклітин додавали радіоактивно мічений [^{35}S]метіонін, мічені протеїни осаджували, розділяли відповідно до їх маси у SDS-поліакриламідному гелі, радіоактивні смуги візуалізували за допомогою фотоплівки.

Навряд чи цей експеримент був би таким історичним, якби не надзвичайна передбачливість та попередній досвід Ханта як біохіміка, для якого важлива динаміка процесу – зразки відбирали кожні 10 хв після запліднення яйцеклітин. Вчений так описував отриманий результат: «*Коли ми отримали авторадіограму SDS-геля, я помітив дуже дивну річ – мічену смугу, що зникала, на відміну від інших смуг, які, як і очікувалося, з часом ставали інтенсивнішими. Дивне зникнення протеїну відбувалося приблизно за 10 хвилин до кожного клітинного поділу, коливання тривали кілька годин після запліднення. Дуже дивно, що ніхто цього раніше не помітив, це можна було зробити будь-коли після винаходу SDS поліакриламідного гелю приблизно у 1970 році*» [25].

Того літа до досліджень Ханта приєднались відвідувачі курсу фізіології студент медик Том Еванс та Ерік Розенталь, колишній студент Джоан Рудерман. Команда Ханта ретельно проаналізувала побудований за результатами експерименту графік і виявила, що зникнення та повторна поява дивного протеїну відбуваються у певних точках клітинного циклу – він накопичувався у інтерфазі, досягав піку перед мітозом і дуже швидко зникав всередині мітозу (рис. 5) [26]. Хант назвав цей протеїн цикліном, одні стверджують через циклічну природу його

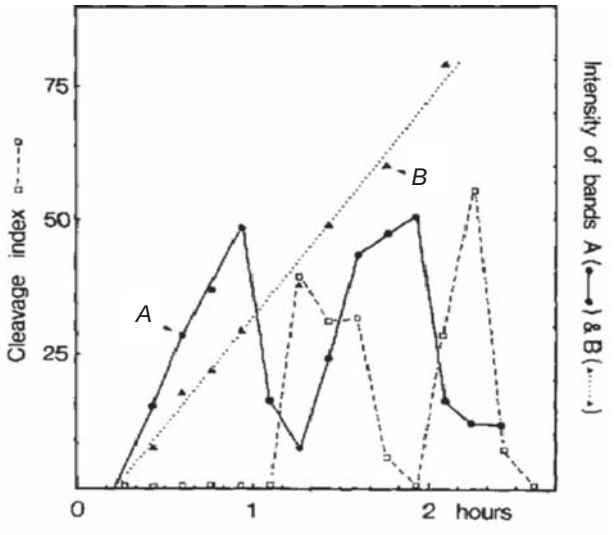


Рис. 5. Кореляція рівня циклін з циклом поділу клітини циклін А (●—●); протеїн В (▲···▲); індекс поділу (□- - -□) [26]

існування у клітині, а інші – через любов Ханта до їзди на велосипеді.

Явище зникнення протеїну було не тим, що збирався дослідити вчений, проте він відразу зрозумів його важливість. Догма того часу стверджувала, що протеїни не зникають, однак результати експерименту свідчили, що можна спеціально розщепити протеїн у цитоплазмі, тоді як усі інші будуть абсолютно стабільними.

Хант із колегами показали, що циклін синтезується з постійною швидкістю протягом усього клітинного циклу, а значить, ймовірною причиною його зникнення було протеолітичне розщеплення перед мітозом. Таку ж закономірність дослідники спостерігали і у морського їжака виду *Lytechinus,* а також у молюска *Spisula solidissima*, де вони виявили не один осцилюючий білок, а два, названі циклін А та циклін В. Безсумнівно, вони були першими, хто описав періодичну деградацію протеїну упродовж клітинного циклу як збережену особливість у морських безхребетних. На той час вони заявили, що «*важко повірити, що поведінка циклінів не пов'язана з процесами поділу клітин, але на даному етапі у нас немає прямих доказів цього*».

Хант не мав великої лабораторії і тому його можливості провести те, що на певному етапі стало б очевидним «*вбивчим експериментом*» були обмеженими. Проте він ніколи не вагався обговорювати свої ідеї з колегами і був щасливий бачити, як інші проводять експерименти, які він міг би робити сам.

Хант зазначив у своїй Нобелівській лекції, що того ж дня, коли він отримав результат щодо циклину, у нього відбулась важлива розмова зі співробітником MBL Джоном Герхартом, який на традиційній п'ятничній вечірній лекції MBL доповів про результати роботи з вивчення активності відкритого М. Масуї фактора сприяння мітозу (MPF). Виявилось, що MPF з'являється у високих концентраціях на початку клітинного циклу ооцитів жаби *Xenopus laevis*, потім зникає і знову з'являється під час мейозу, щоб зникнути в кінці клітинного циклу [27].

Ідея про те, що інактивація MPF може бути пов'язана з протеолітичним розщепленням циклину і що між цими компонентами існує залежність була дуже привабливою, адже значно випереджала свій час. Єдиним варіантом подальших досліджень було клонувати, секвенувати та експресувати циклін, щоб з'ясувати, чим він є.

У 1983–1984 рр. Джоан Рудерман розшифрувала повну послідовність цикліну А молюска, а у 1986 р. команді Ханта вдалося клонувати і секвенувати циклін В морського їжака. Порівняння двох послідовностей показало значну гомологію залишків та наявність циклінового боксу, який пізніше виявився доменом, що зв'язується з циклін-залежною кіназою cdk1, щоб активувати цей ензим.

Наступний прогрес став результатом простого експерименту, здійсненого Джоан Рудерман навесні 1986 року [28] для з'ясування того, що станеться, якщо мРНК, що кодує циклін А молюска, ввести в ооцит жаби *Xenopus*. Відповідь була не просто втішною, але й захопливою, оскільки яйцеклітини поводилися так, ніби їм ввели MPF.

Тім Хант із колегами доповнили ці результати експериментом, коли до яйцеклітин Xenopus ввели мРНК цикліну з *Xenopus*. Це також спричинило дозрівання ооцитів і навело на думку, що циклін присутній не лише у морських безхребетних, але й у хребетних.

У 1987 р. у Вудс Хоулі відбувся присвячений MPF симпозіум, на якому Джим Маллер представив результати очистки цього фактора, що доводили існування у його складі двох компонентів із молекулярними масами 32 та 45 кДа [22]. Як ми вже знаємо з досліджень Пола Нерса, протеїном із молекулярною масою 34кДа у складі MPF була протеїнкіназа cdk1 [23].

Тім Хант пообіцяв на симпозіумі, що як тільки він отримає антитіла до цикліну В, то зможе перевірити його наявність у складі MPF. У співробітництві з Маллером Ханту вдалося довести, що смуга 45 КДа в очищеному препараті MPF відповідає цикліну В [29]. Так складалось уявлення про те, що циклін є субодиницею, що регулює активність циклін-залежної протеїнкінази cdk1 у складі MPF.

Доведено, що на відміну від більшості протеїнкіназ, cdk1 повністю неактивна, доки не зв'язана циклінами, тому що за відсутності цикліну важливий каталітичний залишок глутамінової кислоти на висококонсервативній спіралі cdk1 знаходиться за межами каталітичної щілини, а доступ поліпептидних субстратів до ATP заблокований. Зв'язування цикліну знімає блокаду і спричиняє переміщення всередину

щілини залишку глутамінової кислоти, який разом із залишками лізину, аспарагінової кислоти та іоном магнію утворює координаційні зв'язки з атомами фосфату у складі АТР [30]. Саме завдяки залежності cdk1 від нестабільних циклінів клітинам вдається дуже швидко змінювати активність цих протеїнкіназ під час проходження через клітинний цикл.

У 1990 році Тім Хант почав працювати в Імперському дослідницькому фонді раку, пізніше відомому як Організація з дослідження раку Об'єднаного Королівства (Cancer Research UK), де його робота була зосереджена на з'ясуванні того, як неконтрольоване розмноження з вимкненими гальмівними сигналами у клітинному циклі робить клітини раковими. До кінця 2010 року Хант мав власну лабораторію в Інституті Френсіса Кріка і залишається почесним керівником групи в цьому інституті.

У 2006 р. Тімоті Хант на честь дня народження був посвячений Королевою Єлизаветою у лицарі за заслуги перед наукою.

Питання про те, яким же є механізм протеолітичного розщеплення цикліну, протягом певного часу залишалось відкритим. Тім Хант відзначав, що «*більшість людей не вірили, що все може бути так просто, як створити протеїн для каталізу мітозу, а потім зруйнувати його, щоб зупинити мітоз*» [25].

У 1984 році, через рік після того, як Тім Хант виявив циклін, його зникнення і повторну появу в клітині упродовж клітинного циклу, ізраїльський вчений А. Чехановер припустив, що цикліни розщеплюються убіквітиновим шляхом [31], встановленим ним разом з А. Гершко та І. Роуз [33], за що цим трьом вченим у 2004 році було присуджено Нобелівську премію з хімії «за відкриття убіквітин-залежного шляху деградації протеїнів» [33].

У 1991 р. А. Гершко прибув до Морської біологічної лабораторії у Вудс-Хоулі і використав для дослідження механізму деградації цикліну ту саму модель ооцитів молюска *Spisula*, яку використовував Тім Хант та Джоан Рудерман у своїх оригінальних дослідженнях [32]. У 2004 році за відкриття убіквітин-залежного шляху деградації протеїнів вченим було присуджено Нобелівську премію з хімії [33].

Цикліновий механізм клітинного ділення визнаний фундаментальним для усіх живих організмів (за виключенням бактерій). Стало очевидним, що протеїнкінази cdk поєднуються з різними циклінами для контролю переходів клітинного циклу в клітинах людини. Сімейство протеїнів – учасників цього механізму значно розширилось завдяки дослідженням у багатьох лабораторіях світу [34].

На сьогоднішній день ідентифіковано приблизно 20 різних ензимів cdk з широким розмаїттям субстратів і приблизно 30 різних циклінів. Так, продемонстровано, що комплекс cdk2 з циклінами E або A (S-Cdks) запускає початок S-фази, а комплекс cdk1 з циклінами A або B (M-Cdks), запускає перехід G2/M [12] (рис. 3).

Виявлення «світлофорів» хромосомного циклу є величезним кроком у з'ясування того, як кожна наша клітина успадковує дві повні копії геному після поділу. Мутації генів, що контролюють клітинний цикл і порушення в остаточно збалансованих системах регуляції клітинного циклу можуть призвести до хромосомної нестабільності, яка розвивається в злоякісних клітинах. Без сумніву, зроблені Лілендом Хартвеллом, Тімоті Хантом та Полом Нерсом відкриття мають фундаментальне біологічне значенння, оскільки дають розуміння того, як клітини контрольовано діляться, як клітинний поділ регулюється, щоб залишатися високо відтворюваним і що може відбуватись не так у злоякісних клітинах.

DISCOVERY OF MOLECULAR AND GENETIC MECHANISMS OF CELL CYCLE REGULATION: 2001 NOBEL LAUREATES LELAND HARTWELL, TIMOTHY HUNT AND PAUL NURSE

O. P. Matyshevska✉*, V. M. Danilova, M. V. Grigorieva, S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
✉*e-mail: matysh@yahoo.com*

Leland Hartwell, Paul Nurse and Timothy Hunt in 2001 were awarded the Nobel Prize for their discovery of molecular and genetic mechanisms of the cell cycle. The review analyzes the features of the objects chosen by scientists, a wide range of methods from conventional light microscopy to recombinant DNA technology and complementation test, used for research, and covers a history of the discoveries made. Thanks to the work of these

scientists, a modern understanding of the cell cycle checkpoints, the complexes formed by cyclin and cyclin-dependent kinases at different phases of the cell cycle, as well as the mechanism of periodic cyclin degradation and the universality of the cyclin mechanism of cellular division in all living organisms was gained.

K e y w o r d s: cell cycle, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *cdc* mutants, *cdc2*/*cdc28*, cdk protein kinase, cyclin, cdk/cyclin complex.

References

1. Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of Frog oocytes. *J Exp Zool.* 1971; 177(2): 129-145.
2. Regime of access : https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2001/hartwell/biographical/
3. Regime of access : https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/speedread/
4. Regime of access : https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1965/summary/
5. Aon JC, Tecson RC, Loladze V. Saccharomyces cerevisiae morphological changes and cytokinesis arrest elicited by hypoxia during scale-up for production of therapeutic recombinant proteins. *Microb Cell Fact.* 2018; 17(1): 195.
6. Hartwell LH, Culotti J, Reid B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1970; 66(2): 352-359.
7. Regime of access : https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2001/hartwell/facts/
8. Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* 1974; 183(4120): 46-51.
9. Lörincz AT, Reed SI. Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes. *Nature.* 1984; 307(5947): 183-185.
10. Weinert TA, Hartwell LH. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 1988; 241(4863): 317-322.
11. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989; 246(4930): 629-634.
12. Uzbekov R, Prigent C. A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. *Cells*. 2022; 11(4): 704.
13. Hartwell LH. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev.* 1974; 38(2): 164-198.
14. Nurse P. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. 1975; 256(5518): 547-551.
15. Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet.* 1976; 146(2): 167-178.
16. Regime of access : https://geneticsunzipped.com/blog/2019/7/4/017-happy-100th-birthday-to-us
17. Nurse P, Thuriaux P. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 1980; 96(3): 627-637.
18. Beach D, Durkacz B, Nurse P. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature.* 1982; 300(5894): 706-709.
19. Lee MG, Nurse P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature.* 1987; 327(6117): 31-35.
20. Matyshevska OP, Danylova VM, Komisarenko SV. Studies of the molecular basis of eukaryotic transcription. Roger Kornberg the Nobel prize in Chemistry 2006. *Ukr Biochem J.* 2022; 94(4): 93-102.
21. Moreno S, Hayles J, Nurse P. Regulation of $p34^{cdc2}$ protein kinase during mitosis. *Cell.* 1989; 58(2): 361-372.
22. Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85(9): 3009-3013.
23. Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene $cdc2^{+}$. *Cell.* 1988; 54(3): 433-439.
24. Regime of access : https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2001/nurse/facts/
25. Regime of access : https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2001/hunt/biographical/
26. Evans T, Rosenthal ET, Youngbloom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal

mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 1983; 33(2): 389-396.
27. 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; 98(4): 1247-1255.
28. Swenson KI, Farrell KM, Ruderman JV. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus oocytes*. *Cell.* 1986; 47(6): 861-870.
29. Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Mallet JL. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus. Cell*. 1990; 60(3): 487-494.
30. Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* 1999; 287(5): 821-828.
31. Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell.* 1984; 37(1): 57-66.
32. Hershko A. Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999; 354(1389): 1571-1575.
33. Matyshevska OP, Grigorieva MV, Danilova VM, Komisarenko SV. Ubiquitin and its role in proteolisis: the 2004 Nobel prize in chemistry. *Ukr Biochem J.* 2022; 94(5): 84-96.
34. Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, Morgan DO, Tsai LH, Wolgemuth DJ. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(11): 1275-1276.