

Г. Л. Снизур^{1,2}, С. С. Сурин^{1,2}, Д. А. Кавалерова¹

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ,

¹ кафедра биологии;

² ГБУ Волгоградский медицинский научный центр, лаборатория патоморфологии

РОЛЬ ЦИКЛИНЗАВИСИМЫХ КИНАЗ 2, 4, 6 В ПРОЦЕССЕ РЕПАРАЦИИ ИНСУЛОЦИТОВ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *

УДК 57.083.34

Циклинзависимые киназы (CDK) представляют собой семейство протеин серин/треонинкиназ, активность которых зависит от взаимодействия с некаталитической регуляторной субъединицей, называемой циклином. CDK играют важную роль в механизмах клеточного цикла, отвечающих за координацию роста клеток, репликацию ДНК и митоз, что делает их необходимыми для обеспечения пролиферации [22]. В статье приводится обзор современных сведений о роли циклинзависимых киназ в процессах регенерации инсулоцитов островков лангерганса поджелудочной железы.

Ключевые слова: циклинзависимые киназы, пролиферация, инсулоциты.

G. L. Snigur, S. S. Surin, D. A. Kavalerova

ROLE OF CYCLIN-DEPENDENT KINASES 2,4,6 IN THE PROCESS OF REPAIR OF INSULOCYTES OF THE ISLANDS OF LANGERHANS OF THE PANCREATIC GLAND

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are a family of protein serine / threonine kinases whose activity depends on interaction with a non-catalytic regulatory subunit called cyclin. CDKs play an important role in cell cycle mechanisms responsible for coordinating cell growth, DNA replication, and mitosis which makes them necessary for proliferation [22]. This article reviews current information on the role of cyclin-dependent kinases in the repair of b-cells pancreatic islet of langerhans.

Key words: cyclin-dependent kinases, proliferation, insulocytes.

Сахарный диабет 1-го и 2-го типа является результатом недостаточного производства инсулина клетками панкреатических островков. Одним из стратегических направлений лечения диабета является разработка новых лекарственных средств, которые способны увеличивать количество β -клеток поджелудочной железы, а также стимулировать продукцию инсулина. Инсулоциты поджелудочной железы долго рассматривались как окончательно дифференцированные и необладающие тотипотентностью. Появляются данные, свидетельствующие о том, что они могут регенерировать [10]. Восстановление β -клеток может быть индуцировано различными путями, поэтому активно изучаются основы контроля клеточного цикла инсулоцитов. Имеющиеся данные указывают, что β -клетки у взрослых млекопитающих обычно возникают путем самовоспроизведе-

ния, а также благодаря регенерации из стволовых клеток [10].

Предположение об отсутствии восстановления β -клеток основано на крайне медленной регенерации, которую практически невозможно отследить. Клетки взрослых мышей и крыс регенерируют со скоростью 0,07–3 % в сутки [8, 18]. Явление пролиферации инсулоцитов человека не столь хорошо изучено, однако есть данные, указывающие на то, что 0,04–1 % ядер β -клеток Homo Sapiens окрашиваются маркером пролиферативной активности Ki-67 [3, 28].

Клеточный цикл состоит из нескольких фаз, в том числе S-фазы (фаза синтеза ДНК) и M-фазы (митотическая фаза). Во время S-фазы генетический материал реплицируется, а затем разделяется на две идентичные дочерние клетки после митотической M-фазы и цитокинеза. S- и M-фазы

* Работа выполнена при поддержке финансирования научно-исследовательских работ из средств ВолгГМУ на конкурсной основе, приказ об утверждении результатов конкурса на финансирование № 130-КО от 06 февраля 2020 г.

разделены двумя промежуточными фазами (G1 и G2), которые определяют готовность клеток к переходу в S- или M-фазу. Генетические и биохимические исследования показали, что деление клеток у эукариот контролируется циклинзависимыми киназами (CDK). Циклинзависимые киназы контролируют динамику клеточного цикла и являются основными регуляторами пролиферации эукариотических клеток [5, 7, 19, 34].

Также CDK имеют важное значение в регуляции транскрипции, эпигенезе, метаболизме и в развитии стволовых клеток [6, 16, 25, 27]. Активные CDK содержат субъединицу протеинкиназы, каталитическая активность которой зависит от ассоциации с регуляторной субъединицей циклина. Таким образом, клеточный цикл регулируется комплексами димерной киназы циклин-CDK, где CDK является субъединицей каталитической киназы, а циклин является активирующей субъединицей [24].

Циклинзависимые киназы фосфорилируют субстраты, главным образом, белки семейства ретинобластомы (RB), на специфических серин/треониновых сайтах фосфорилирования, что приводит к высвобождению транскрипционных факторов, которые модулируют экспрессию промоторов гена-мишени, что стимулирует ход клеточного цикла [30].

Пролиферация является основным компонентом для поддержания β -клеточной массы у взрослых мышей. Предполагается, что ингибиторы CDK могут также играть роль в угнетении пролиферации β -клеток [14, 33]. Ген CDKN2A, который кодирует ингибитор циклинзависимых киназ p16Ink4a, визуализируется во всех геномных исследованиях сахарного диабета [4]. Экспрессия белка p16Ink4a увеличивается в старых островках и сильно коррелирует с зависимым от возраста снижением уровня пролиферации и регенерации β -клеток [13]. Протеин p16Ink4a ингибирует активность нескольких CDK, включая CDK4, CDK6 и косвенно CDK2 [11]. Белок p16Ink4a способен регулировать пролиферацию, дифференцировку и старение клеток с помощью множественных сигнальных путей.

Комплексы CDK2/циклин E необходимы для пролиферации, так как они фосфорилируют белок ретинобластомы и стимулируют клетки посредством перехода из G1 в S-фазу клеточного цикла. Также CDK2 связывается с циклином A, который сам по себе важен для пролиферации клеток [6].

Самые ранние последствия делеции CDK2 включают нарушение функции β -клеток, а не снижение массы. С возрастом или в условиях чрезмерного питания потеря CDK2 снижает

пролиферацию β -клеток и уменьшает их массу, что приводит к сахарному диабету [30].

CDK2 преимущественно экспрессируется в эндокринной части поджелудочной железы без видимой экспрессии в экзокринной ее части. Большая часть CDK2 экспрессируется в β -клетках и лишь небольшая часть в α -клетках. У мышей со специфической делецией CDK2 в поджелудочной железе развивается сахарный диабет, главным образом из-за дефектов секреции инсулина, стимулированной глюкозой, что приводит к прогрессирующему дефициту пролиферации β -клеток, уменьшению их массы, кроме того, возникают дефекты внутриклеточного метаболизма и нарушения структуры митохондрий [30].

Первые последствия делеции CDK2 проявляются в виде нарушения функций β -клеток, а не снижения клеточной массы. С возрастом или в условиях чрезмерного питания снижение уровня CDK2 приводило к уменьшению пролиферации β -клеток и снижению клеточной массы, что приводило к диабету, однако недостаток CDK2 не влияет на раннее развитие поджелудочной железы. Мыши с делецией CDK2 рождаются нормальными по размеру и массе по сравнению с контрольными однопометными, идентичными по возрасту и полу особями.

CDK2 отвечает за связывание и фосфорилирование фактора транскрипции FOXO1 по остатку Ser256 при глюкозозависимом пути активации синтеза инсулина. Индуцированное глюкозой фосфорилирование FOXO1-Ser256 является одним из механизмов активации PI3K [29]. Фактор транскрипции FOXO1 регулирует пролиферацию β -клеток путем индукции ключевых транскрипционных факторов β -клеток NeuroD и MafA [30]. Таким образом, CDK2 служит важным связующим звеном, связывающим дисфункцию β -клеток с прогрессирующим уменьшением их количества при диабете [30, 12].

Активация пути фосфоинозитид-3-киназы (PI3K)/Akt-киназы (serine threonine kinase Akt) является ключевым регулятором клеточной массы. Гиперэкспрессия Akt-киназы в клетках поджелудочной железы приводит к заметному увеличению размера и клеточной массы β -клеток за счет их пролиферации. Пролиферация β -клеток при гиперэкспрессии Akt-киназы была связана с повышенными уровнями циклина D1, циклина D2 и p21 и активностью CDK4. Предполагается, что Akt-киназа индуцирует пролиферацию клеток зависимым от CDK4 путем регуляции уровней циклина D1, циклина D2 и p21 [31]. Делеция одного аллеля CDK4 значительно снижает уровень пролиферации β -клеток, приводит к потере β -клеток поджелудочной железы и нарушению

регуляции уровня глюкозы в крови у грызунов, что в конечном итоге приводит к диабету [2, 31]. Также у мышей с делецией CDK4 наблюдается снижение массы тела и органов, однако при стимулировании экспрессии эндогенного CDK4 в ϵ -клетках и в гипофизе мышей запускается пролиферация. Тем не менее эти мыши остаются небольшими по размеру, такой фенотип является следствием уменьшения числа клеток, а не уменьшения их размера [14, 33].

Белки CIP/KIP, которые являются ингибиторами комплекса циклин E/CDK2, также связываются с комплексом циклин D/CDK4/6, и это приводит к дальнейшей активации CDK2 путем изолирования CIP/KIP от их мишени. Следовательно, комплекс циклин D/CDK4/6 представляет собой ключевой ферментный комплекс, который регулирует переход от фазы G1 к фазе S. Также p27kip является основным ингибитором клеточного цикла в клетках, так как он накапливается в ядрах клеток мышей с ожирением, ингибируя пролиферацию ϵ -клеток [32].

При инфицировании островков лангерганса человека лентивирусным вектором, содержащим ДНК CDKR24C (ген, кодирующий белок CDK4), также наблюдалась более высокая скорость пролиферации. Аденовирусы, экспрессирующие CDK4 и циклин D1 в островках лангерганса крысы и человека, также приводят к усилению пролиферации ϵ -клеток и фосфорилированию белка ретинобластомы [9]. Исследования трансгенных мышей, со сверхэкспрессией CDK4, выявили заметное увеличение пролиферации ϵ -клеток, и у мышей не было признаков злокачественных новообразований островков поджелудочной железы в течение 18-месячного периода исследования [26]. Это указывает на то, что регуляция клеточного цикла является ключевым процессом в регенерации инсулоцитов, и CDK4 играет ведущую роль в пролиферации ϵ -клеток мышей. Таким образом, CDK4 млекопитающих не только участвует в контроле пролиферации определенных типов клеток, но может играть более широкую роль в гомеостатической регуляции клеточной массы в органах. Данные, полученные из экспериментов на клеточных культурах, указывают на то, что циклинзависимая киназа 4 (CDK4) играет ведущую роль в качестве сигнальной молекулы в ранней стадии G1, регулируя переход от интерфазы к митозу. Активность CDK4 связана с циклинами D1, D2 и D3, синтез которых регулируется митогенными сигнальными путями [14, 33]. Индуцированная экспрессия циклина D1 в клетках поджелудочной железы мышей приводит к выраженной гиперплазии островков лангерганса.

Циклин D1 может индуцировать пролиферацию ϵ -клеток *in vivo* без образования рака, несмотря на эту выраженную гиперплазию клеток, гипогликемия не наблюдается. Проллиферация, вызванная циклином D1, увеличивает число ϵ -клеток, но не изменяет способность ϵ -клетки реагировать на изменения уровня глюкозы в крови [33]. Комплексы CDK4-циклин D фосфорилируют и частично инактивируют белки ретинобластомы (pRb), p107 и p130, тем самым активируя транскрипционные факторы E2F/DP, модулирующие экспрессию генов, необходимых для запуска клеточного цикла. E2F-чувствительные гены одноименного фактора транскрипции запускают экспрессию циклинов E- и A-типа, которые связывают и активируют CDK2-киназу, фермент, который, как считается, необходим для прохождения через S-фазу [14, 33].

Циклинзависимые киназы D-типа CDK4 и CDK6, экспрессия которых модулируется стимулирующими рост сигналами, функционируют в ранней и средней фазе G1. За ними следует активация CDK2 в комплексе с циклином E в конце G1 фазы. Комплексы CDK2/циклин A функционируют в S-фазе, тогда как комплексы CDK2/циклин B и A способствуют переходу G2/M. CDK2 необходим для завершения профазы митоза, делеция CDK2 влияет на время S-фазы [23].

CDK6, функциональный аналог CDK4, также может образовывать комплексы с D-циклинами, но существует явное полное отсутствие или только минимальная экспрессия CDK 6 в мышечных островках.

Избыточная экспрессия CDK6 в сочетании с циклином D1 заметно увеличивает репликацию ϵ -клеток взрослых людей *in vivo*. Сверхэкспрессия CDK6 в сочетании с циклин D3 также индуцирует репликацию ϵ -клеток [21].

CDK-6 и циклин D1 *in vitro* приводили к заметной активации фосфорилирования белка ретинобластомы и запуску процессов пролиферации без индукции гибели клеток. Сверхэкспрессия CDK-6 значительно стимулирует пролиферацию человеческих ϵ -клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, не вызывая их гибель или потерю функции. С функциональной точки зрения сверхэкспрессия CDK-6 в сочетании с циклином D1 приводит к уникально устойчивой пролиферации. CDK-6 в сочетании с циклином D1 может вызывать еще большую стимуляцию регенерации ϵ -клеток, в некоторых случаях, повышая ее в 40 раз. В отличие от сверхэкспрессии CDK-4, которая сама по себе не способна значительно фосфорилировать pRb, ни активировать деление ϵ -клеток, сверхэкспрессия CDK-6 способна

достичь обоих этих результатов, предположительно, в сочетании с эндогенными циклинами D-типа [20].

Генетические и биохимические исследования, проведенные за последние три десятилетия, предоставили существенную информацию о молекулярных механизмах прогрессирования клеточного цикла и показали, что циклинзависимые киназы являются основными регуляторами этого фундаментального процесса. CDK фосфорилируют многочисленные субстраты, чтобы управлять такими процессами, как репликация ДНК, митоз и цитокинез [24].

Для успешной терапии при сахарном диабете необходимо применение фармакологических субстанций, способствующих повышенной экспрессии циклинзависимых киназ в β -клетках поджелудочной железы, что позволит активизировать процесс их пролиферации и более полно раскрыть потенциал применяемой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Александрова, А. К.** Современные представления о роли в клеточном цикле белков – ингибиторов циклин-зависимых киназ p16 и p27 / А. К. Александрова, В. А. Смольяникова. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 1 (156). – С. 7 – 10. – Текст : непосредственный.
2. CDK4/6 inhibition on glucose and pancreatic beta cell homeostasis in young and aged rats / A. I. Sacaan, S. Thibault, M. Hong [et al.] // *Molecular Cancer Research*. – 2017. – № 15 (11). – P. 1531 – 1541. – Direct text.
3. B-cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes / A. E. Butler, J. Janson, S. Bonner-Weir [et al.] // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52. – № 1 (102). – P. 102 – 110. – Direct text.
4. **Andrew, P. Morris.** Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes / P. Andrew // *Nature Genetics*. – Vol. 44. – № 9. – P. 981. – Direct text.
5. The emerging role of cyclin-dependent kinases (cdks) in pancreatic ductal adenocarcinoma / Balbina García-Reyes, Anna-Laura Kretz, Jan-Philipp Ruff [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – № 19 (10). – 3219 p. – Direct text.
6. Cdk2 knockout mice are viable / Cyril Berthet, Eiman Aleem, Vincenzo Coppola [et al.] // *Current Biology*. – 2003. – Vol. 13. – P. 1775 – 1785. – Direct text.
7. **David, O. Morgan.** Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors / O. David // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 1997. – № 13. – P. 261 – 291. – Direct text.
8. **Finewood, D. T.** Dynamics of β -cell mass in the growing rat pancreas. estimation with a simple mathematical model / D. T. Finewood, L. Scaglia, S. Bonner-Weir // *Perspectives in Diabetes*. – 1995. – Vol. 44. – P. 249 – 256. – Direct text.
9. Stewart. Induction of β -cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclinD1 / I. Cozar-Castellano, K. K. Takane, R. Bottino [et al.] // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53. – P. 149 – 159. – Direct text.
10. Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic β -cell / I. Cozar-Castellano, N. Fiaschi-Taesch, T. A. Bigatel [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2006. – № 27 (4). – P. 356 – 370. – Direct text.
11. The fate of pancreatic tumor cell lines following p16 overexpression depends on the modulation of CDK2 activity / J. Calbo, C. Serna, J. Garriga [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. – 2004. – № 11. – P. 1055 – 1065. – Direct text.
12. White. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic β -cell growth / J. A. Kushner [et al.] // *Molecular And Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25. – № 9. – P. 3752 – 3762. – Direct text.
13. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential / J. Kiraman Krishna-murthy, M. R. Ramsey, K. L. Ligon [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 443. – P. 453 – 457. – Direct text.
14. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic β -cell proliferation but not homeostatic cell number / J. Martin, S. L. Hunt, P. Dubus [et al.] // *Oncogene*. – 2003. – № 22. – P. 5261 – 5269. – Direct text.
15. **Heit, J. J.** Intrinsic regulators of pancreatic β -cell proliferation / J. J. Heit, S. K. Karnik, S. K. Kim // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2006. – Vol. 22. – P. 311 – 340. – Direct text.
16. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6 / M. Malumbres, R. Sotillo, D. Santamaria [et al.] // *Cell*. – 2004. – Vol. 118. – P. 493 – 504. – Direct text.
17. **Malumbres, M.** Cyclin-dependent kinases / M. Malumbres // *Genome Biology*. – 2014. – № 15 (122). – Direct text.
18. Very slow turnover of β -cells in aged adult mice / M. Teta, S. Y. Long, L. M. Wartschow [et al.] // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P. 2557 – 2567. – Direct text.
19. **Koltovaya, N. A.** Involvement of cyclin-dependent kinase CDK1/CDC28 in regulation of cell cycle / N. A. Koltovaya // *Russian Journal of Genetics*. – 2013. – Vol. 49. – № 7. – P. 691 – 706. – Direct text.
20. Survey of the human pancreatic β -cell G1/S proteome reveals a potential therapeutic role for cdk-6 and cyclinD1 in enhancing human β -cell replication and function *in vivo* / N. Fiaschi-Taesch, T. A. Bigatel, B. Sicari [et al.] // *DIABETES*. – Vol. 58. – P. 882 – 893. – Direct text.
21. Induction of human β -cell proliferation and engraftment using a single G1/S regulatory molecule, cdk6 / N. M. Fiaschi-Taesch, F. Salim, J. Kleinberger [et al.] // *DIABETES*. – Vol. 59. – P. 1926 – 1936. – Direct text.

22. **Noble, M. E. M.** Cyclin-dependent kinases / M. E. M. Noble, J. A. Endicott // *Encyclopedia of Genetics*. – 2001. – P. 500 – 506. – Direct text.
23. **Kaldis, P.** The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals / P. Kaldis // *CMLS, Cellular and Molecular Life Science*. – 1999. – № 55. – 284 – 296. – Direct text.
24. **Suryadinata, R.** Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates / R. Suryadinata, M. Sadowski, B. Sarcevic // *Bioscience Reports*. – 2010. – Vol. 30 (4). – P. 243 – 255. – Direct text.
25. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia / S. G. Rane, P. Dubus, R. V. Mettus [et al.] // *Nature Genetics*. – 1999. – Vol. 22 (1). – P. 44 – 52. – Direct text.
26. In vivo proliferation of differentiated pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependent kinase 4 / S. Hino, T. Yamaoka, Y. Yamashita [et al.] // *Diabetologia*. – 2004. – № 47. – P. 1819 – 1830. – Direct text.
27. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice / S. Ortega, I. Prieto, J. Odajima, [et al.] // *Nature Genetics*. – 2003. – Vol. 35. – № 1. – Direct text.
28. β -Cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy / S. A. Kassem, I. Ariel, P. S. Thornton [et al.] // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49. – P. 1325 – 1333. – Direct text.
29. **Martinez, S. C.** Glucose regulates foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet β -cell / S. C. Martinez, C. Cras-Meneur, E. Bernal-Mizrachi, M. Alan Permutt // *Diabetes*. – Vol. 55. – P. 1581 – 1591. – Direct text.
30. Loss of cyclin-dependent kinase 2 in the pancreas links primary β -cell dysfunction to progressive depletion of β -cell mass and diabetes / S. Y. Kim, Ji-Hyeon Lee, M. J. Merrins [et al.] // *The Journal Of Biological Chemistry*. – 2017. – Vol. 292. – № 9. – P. 3841 – 3853. – Direct text.
31. Akt induces β -cell proliferation by regulating cyclinD1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity / S. Fatrai, L. Elghazi, N. Balcazar [et al.] // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 318 – 325. – Direct text.
32. Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice / T. Uchida, T. Nakamura, N. Hashimoto [et al.] // *Nature Medicine*. – Vol. 11. – № 2. – P. 175 – 182. – Direct text.
33. Overexpression of cyclinD1 in pancreatic β -cells in vivo results in islet hyperplasia without hypoglycemia / X. Zhang, J. P. Gaspard, Y. Mizukami [et al.] // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 54. – P. 712 – 719. – Direct text.
34. **Lee, Y. C.** Regulation of beta cell replication / Y. C. Lee, J. Hoiriis Nielsen // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2008. – № 297. – P. 18. – Direct text.