

# Buněčný cyklus. Mitóza a cytokineze.

Aleš Hampl  
Biologický ústav LF MU

Zygota



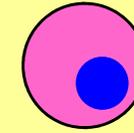
Mnohobuněčné  
embryo



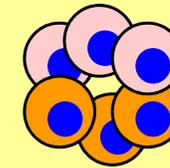
Dynamický  
mnohobuněčný  
organismus

MNOŽENÍ BUNĚK

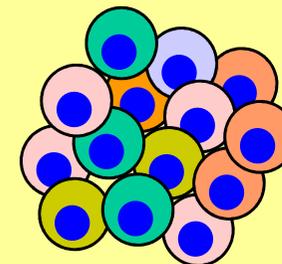
DIFERENCIACE BUNĚK



Dělení buněk  
&  
Specializace buněk



Dělení buněk  
&  
Specializace buněk



Zygota



Mnohobuněčné  
embryo



Dynamický  
mnohobuněčný  
organismus

STABILNÍ GENOM



Genomická ekvivalence

(= stejné množství DNA a stejná  
nukleotidová sekvence ve všech  
buňkách organismu - klonování)



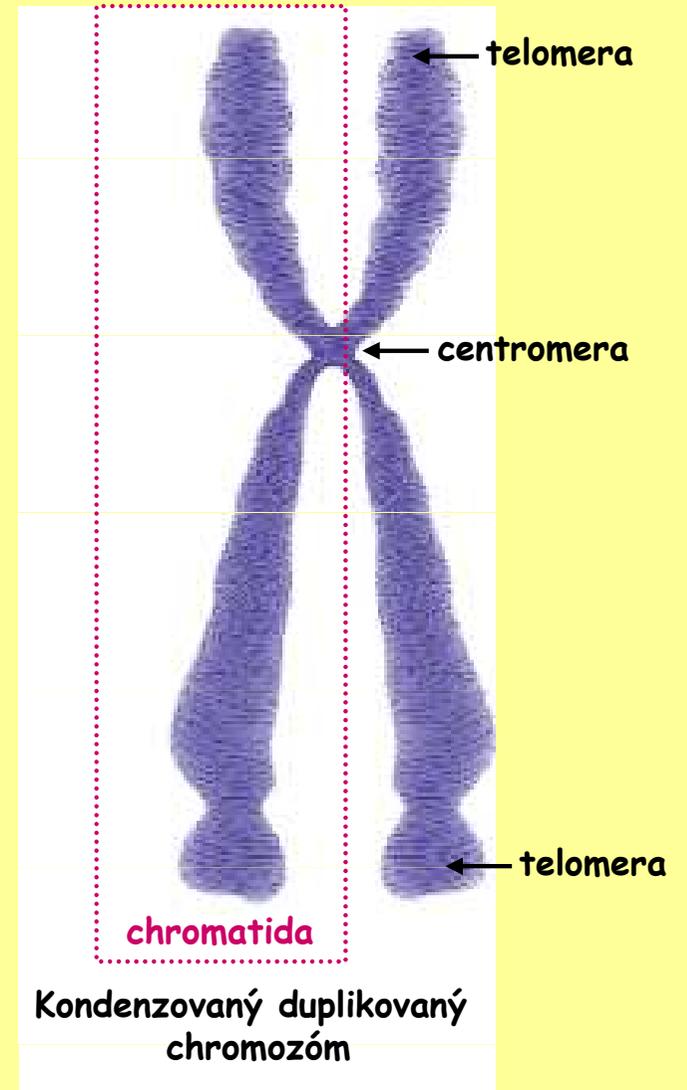
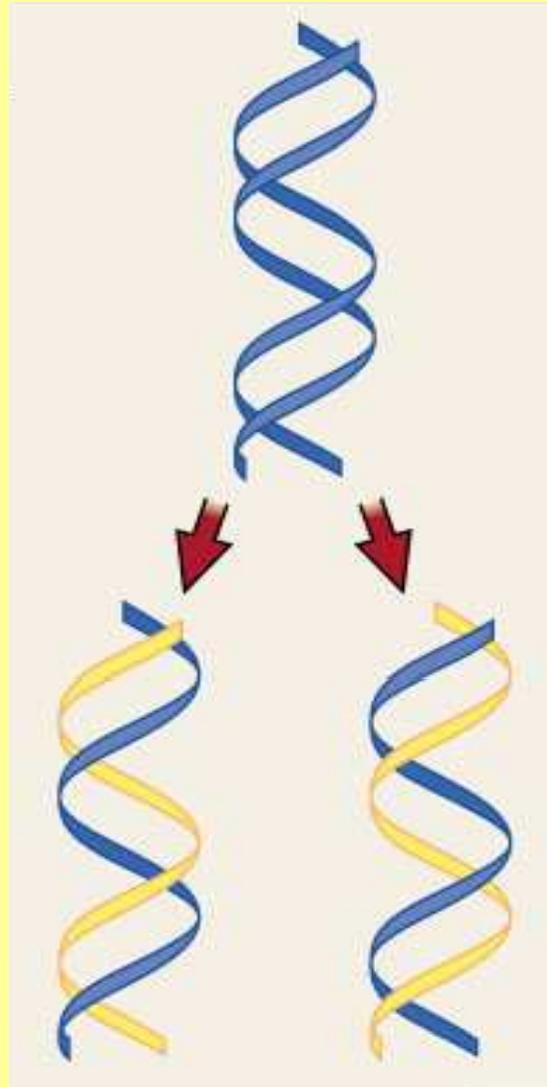
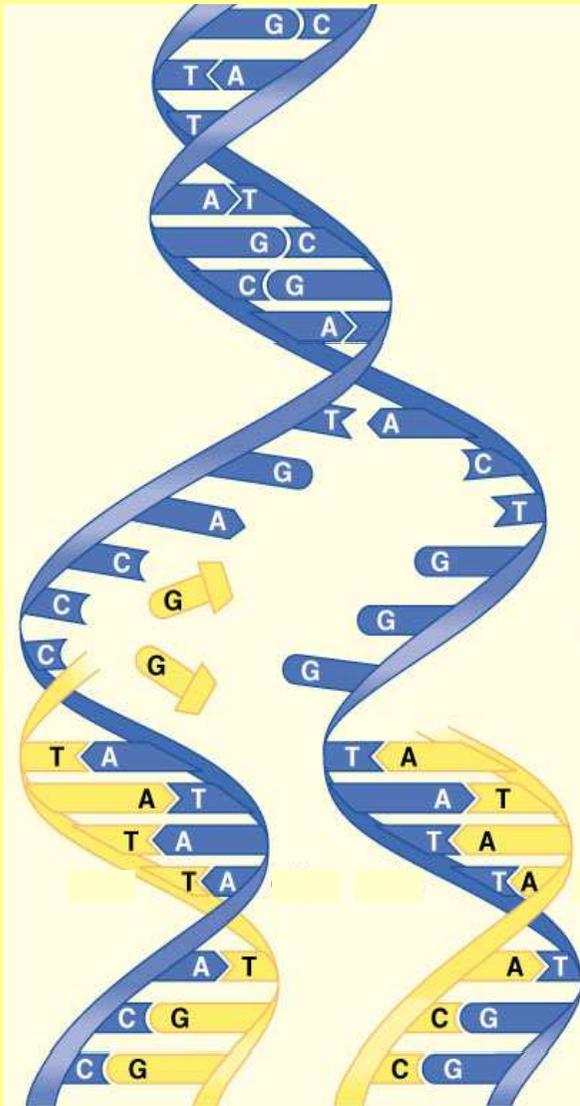
VARIABILNÍ  
TRANSKRIPČNÍ



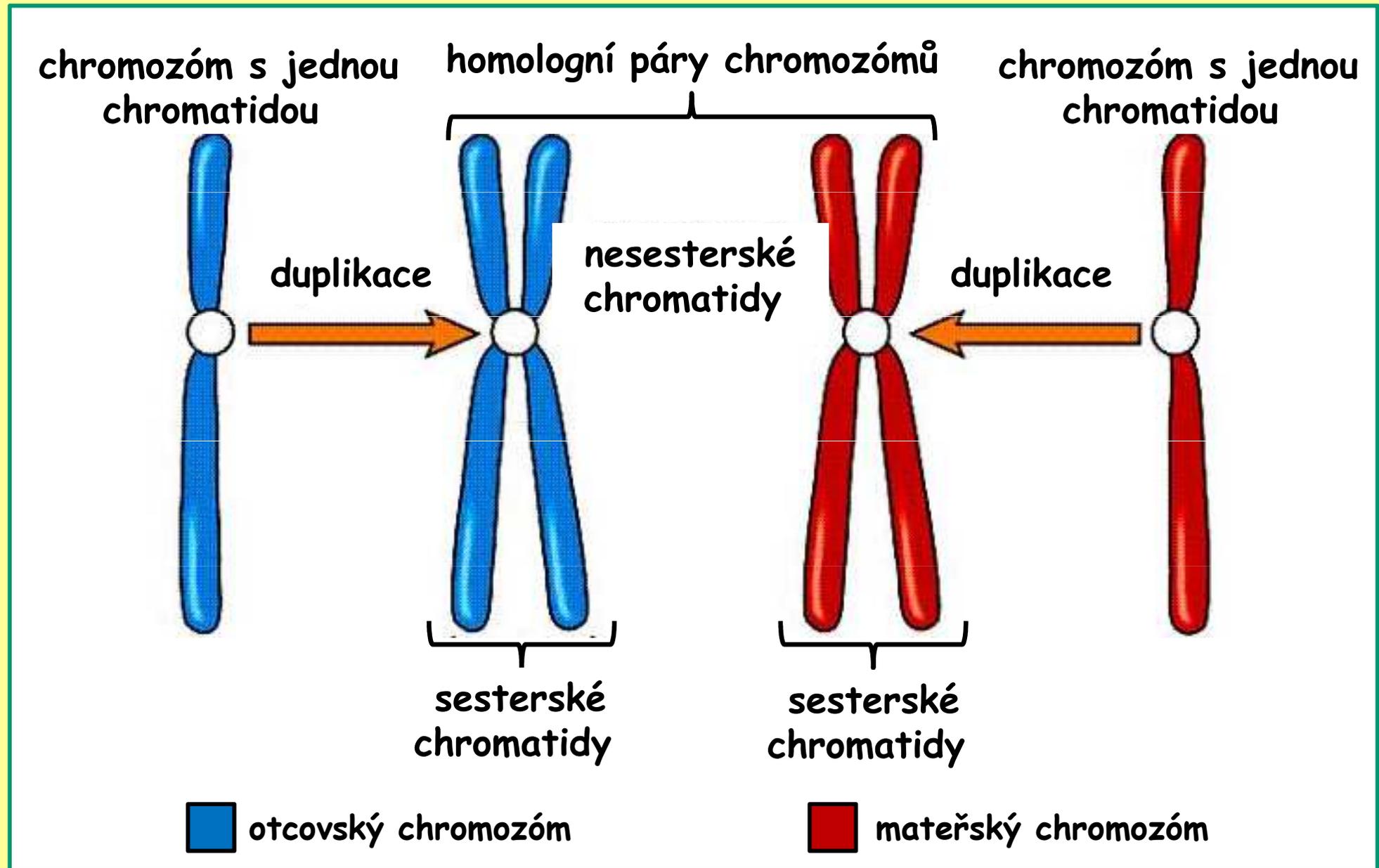
Regulátory transkripce

# STABILNÍ (NEMĚNNÝ) GENOM

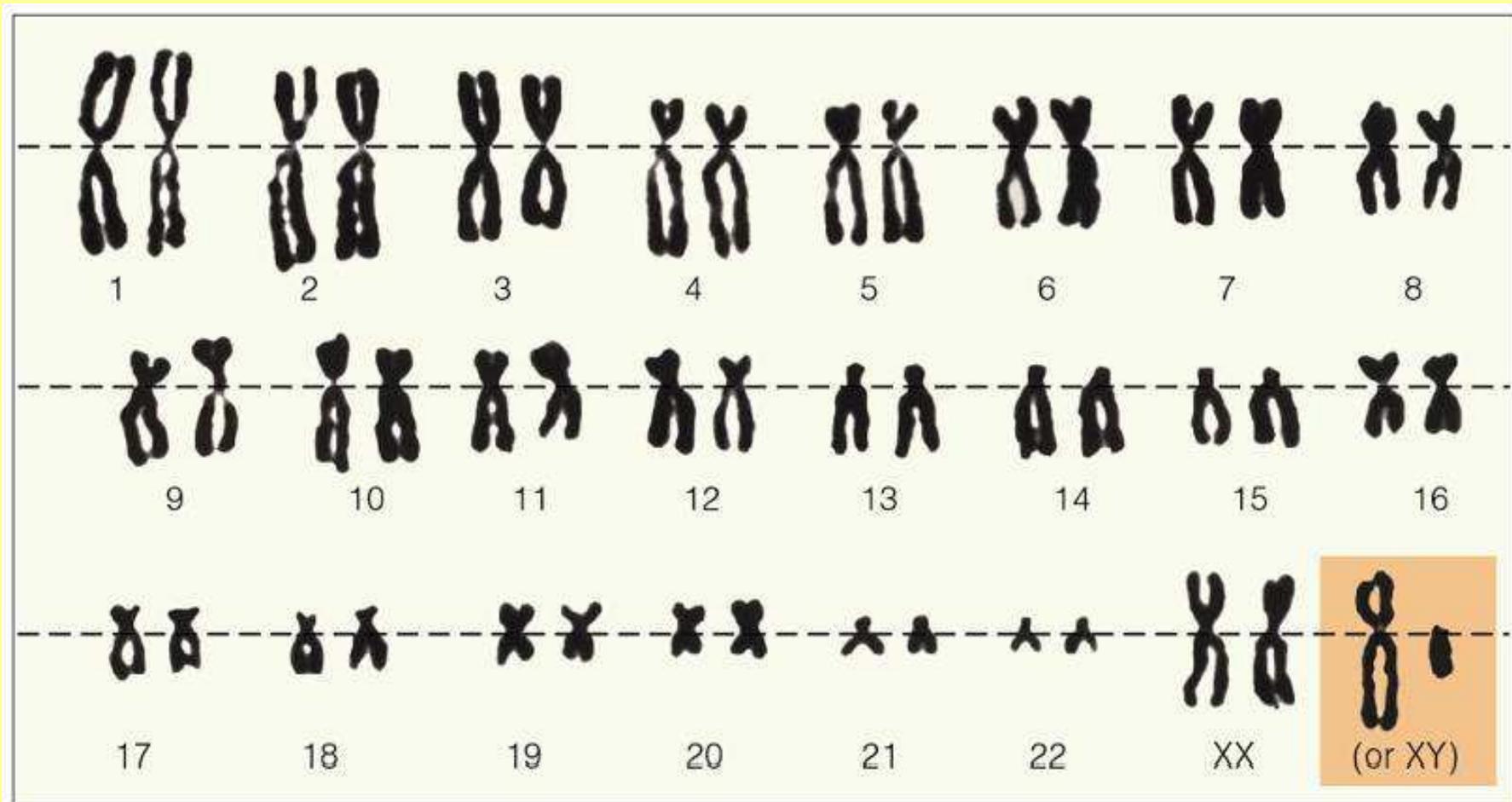
Udržuje se prostřednictvím semikonzervativní duplikace DNA



# Metabolismus chromozómů - Homologní chromozómy

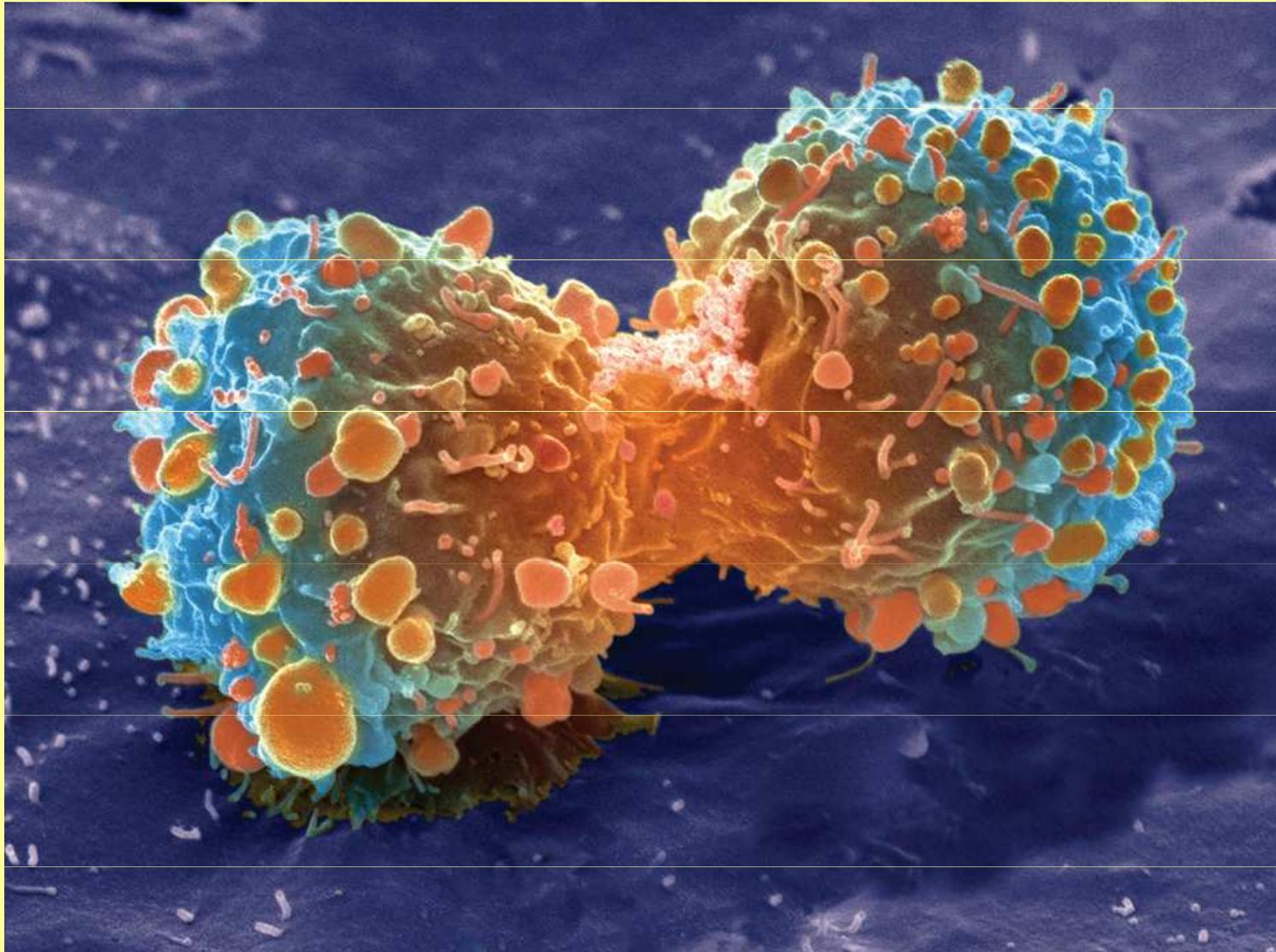


Páry homologních chromozómů (2N) organizované do podoby „KARYOTYPU“



# Základní koncept 1

MITÓZA a CYTOKINEZE produkují dvě geneticky identické buňky

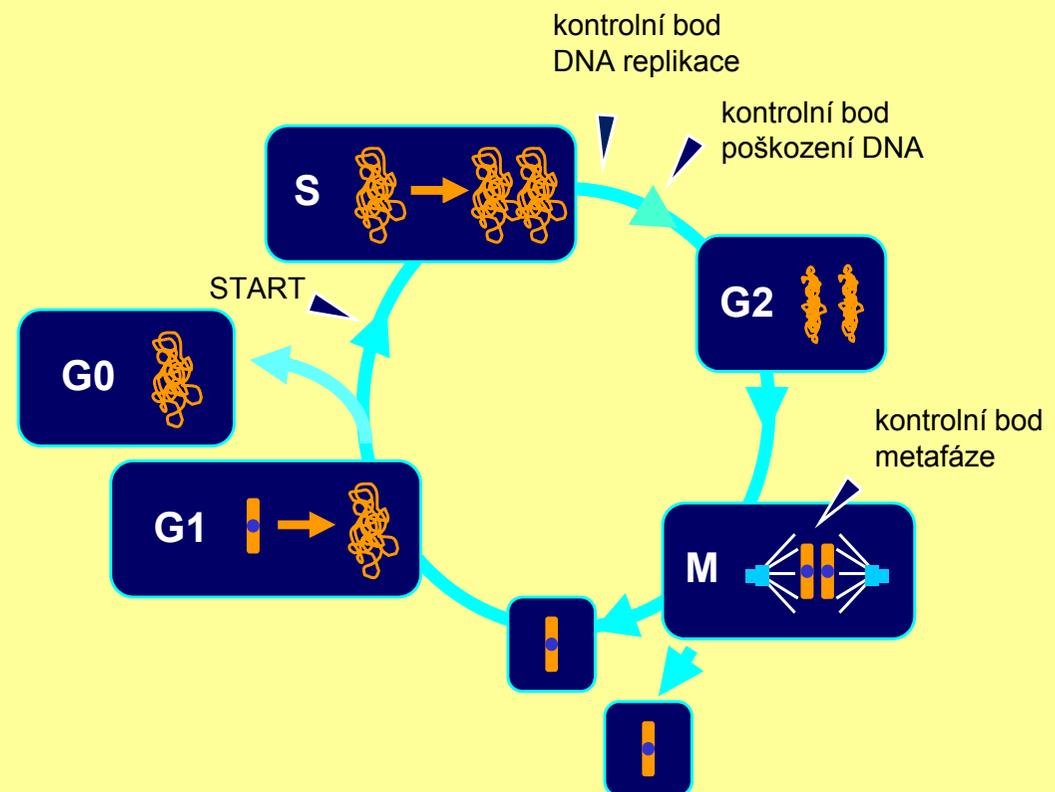


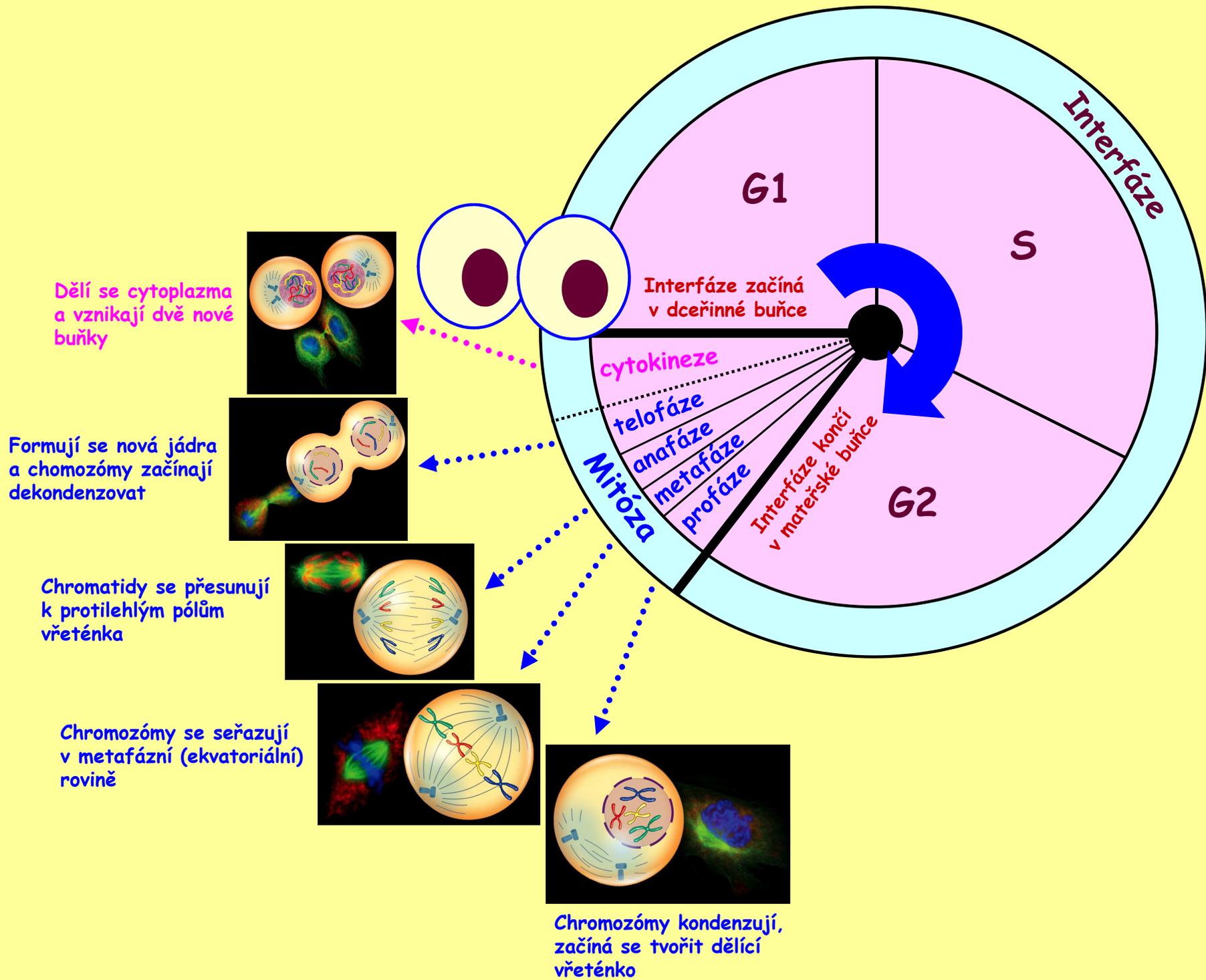
# Základní koncept 2

MITÓZA a CYTOKINEZE jsou částí buněčného cyklu

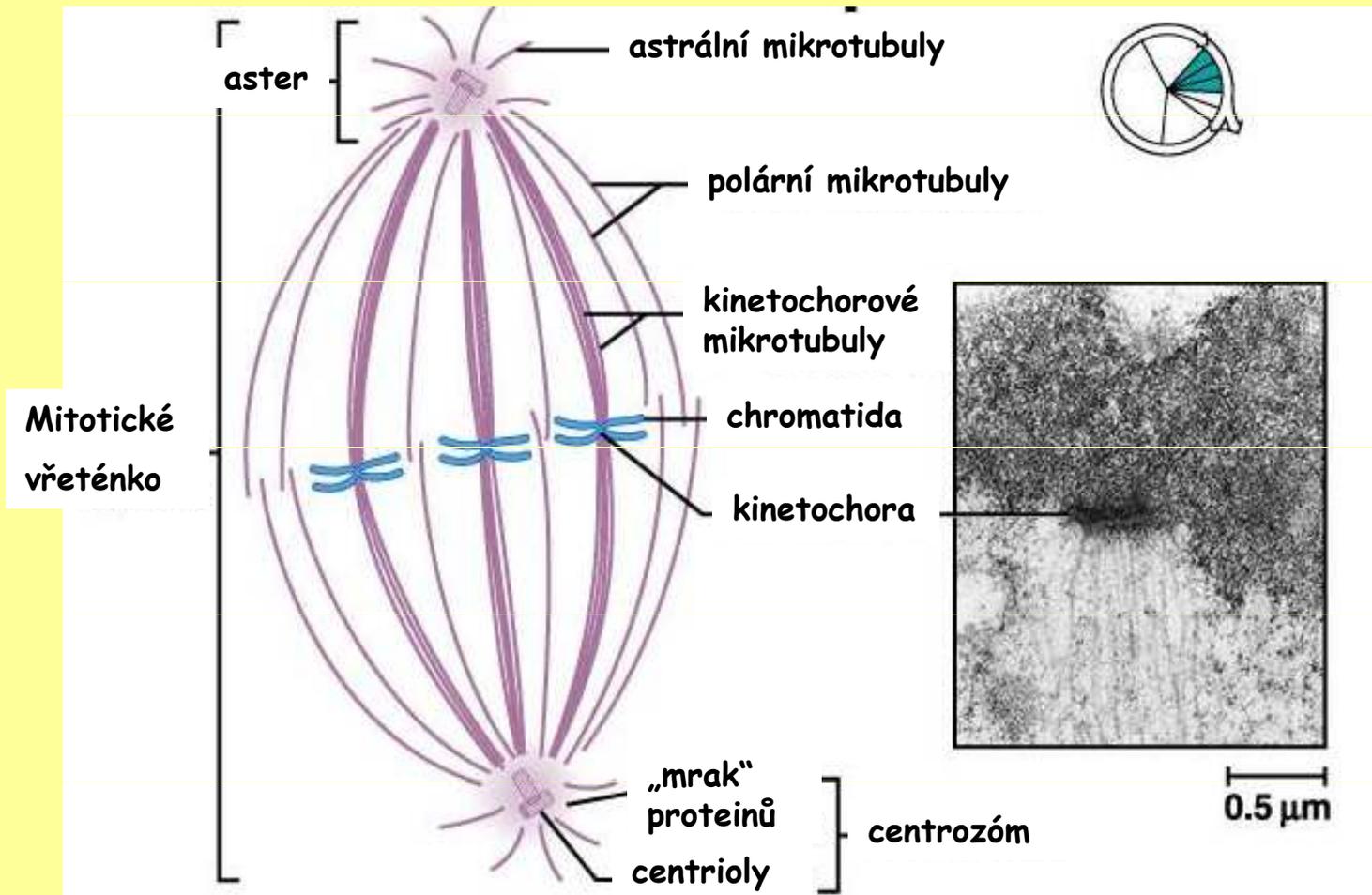
## Buněčný cyklus

- má semi-modulární charakter
- je vybaven kontrolními body
- mezi buňkami je koordinován růstovými faktory

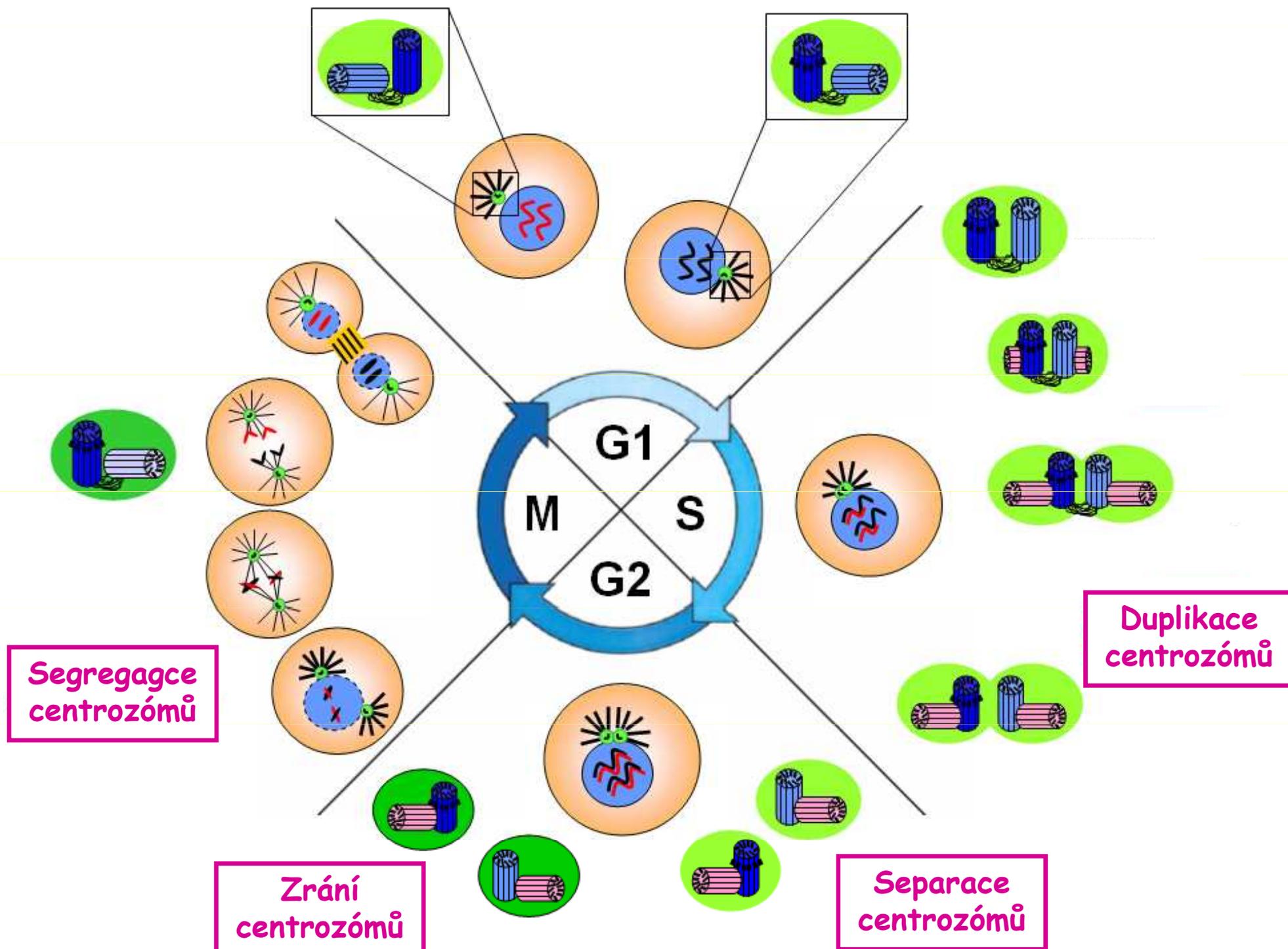




# Mitotické vřeténko



# Metabolismus centrozómů - Semikonzervativní duplikace



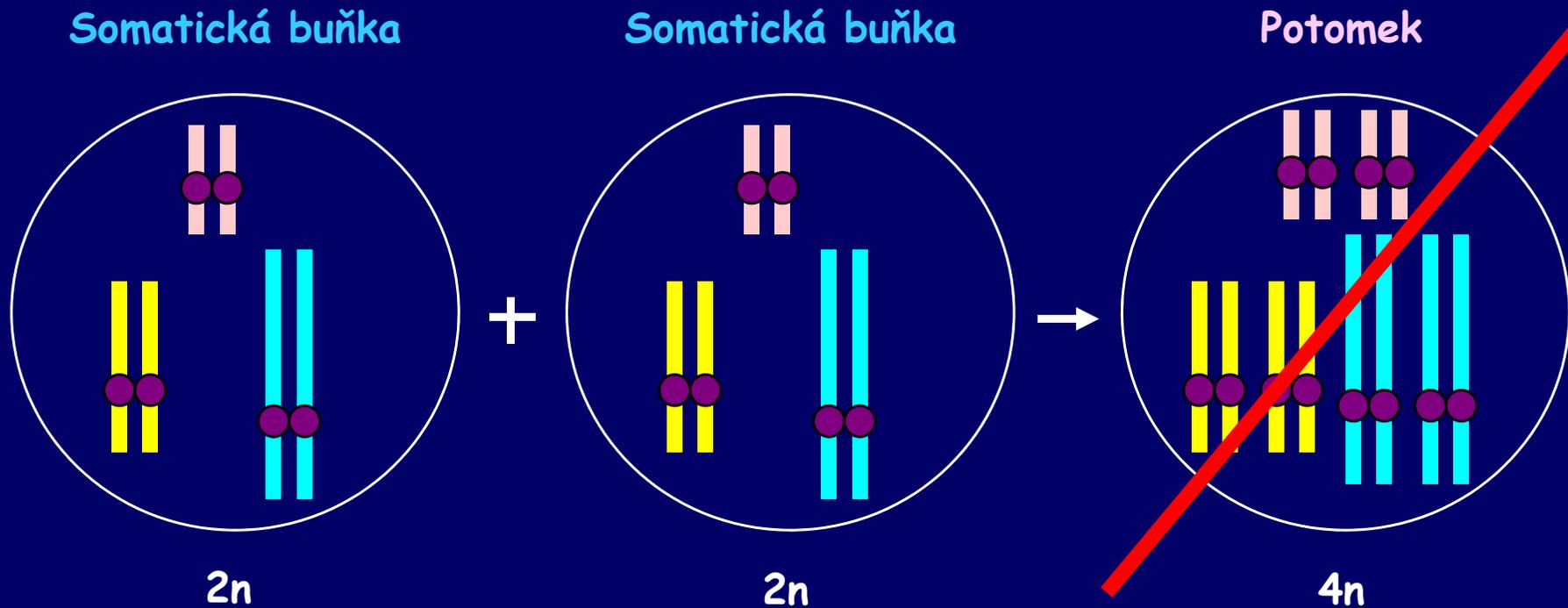
# MEIÓZA

Buněčné dělení, které umožňuje realizaci genetických procesů klíčových pro vývoj pohlavních buněk (gametogenezu)

Tyto genetické procesy zahrnují:

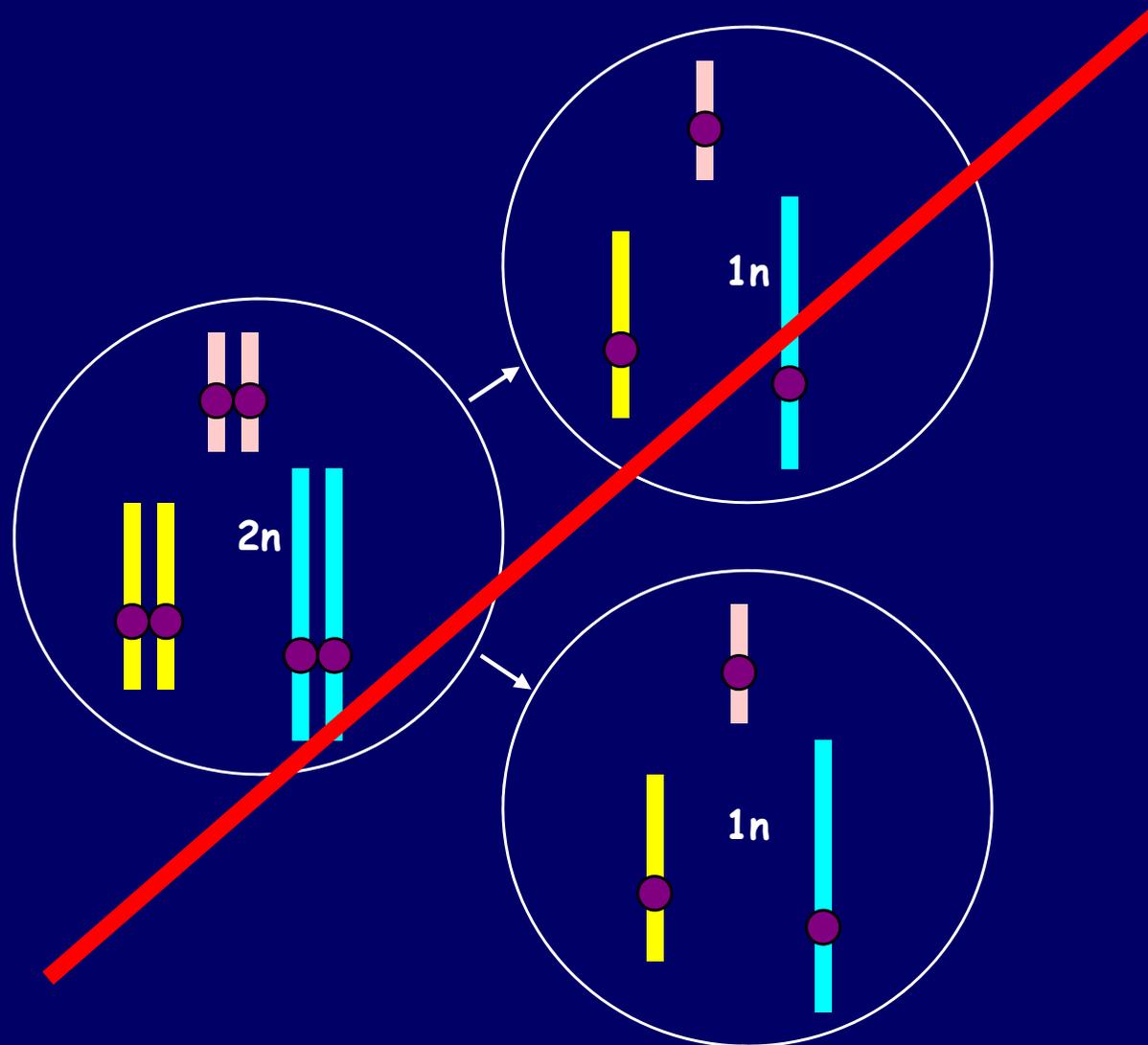
- Redukci počtu chromozomů
- Nezávislou segregaci chromozomů
- „Crossing over“

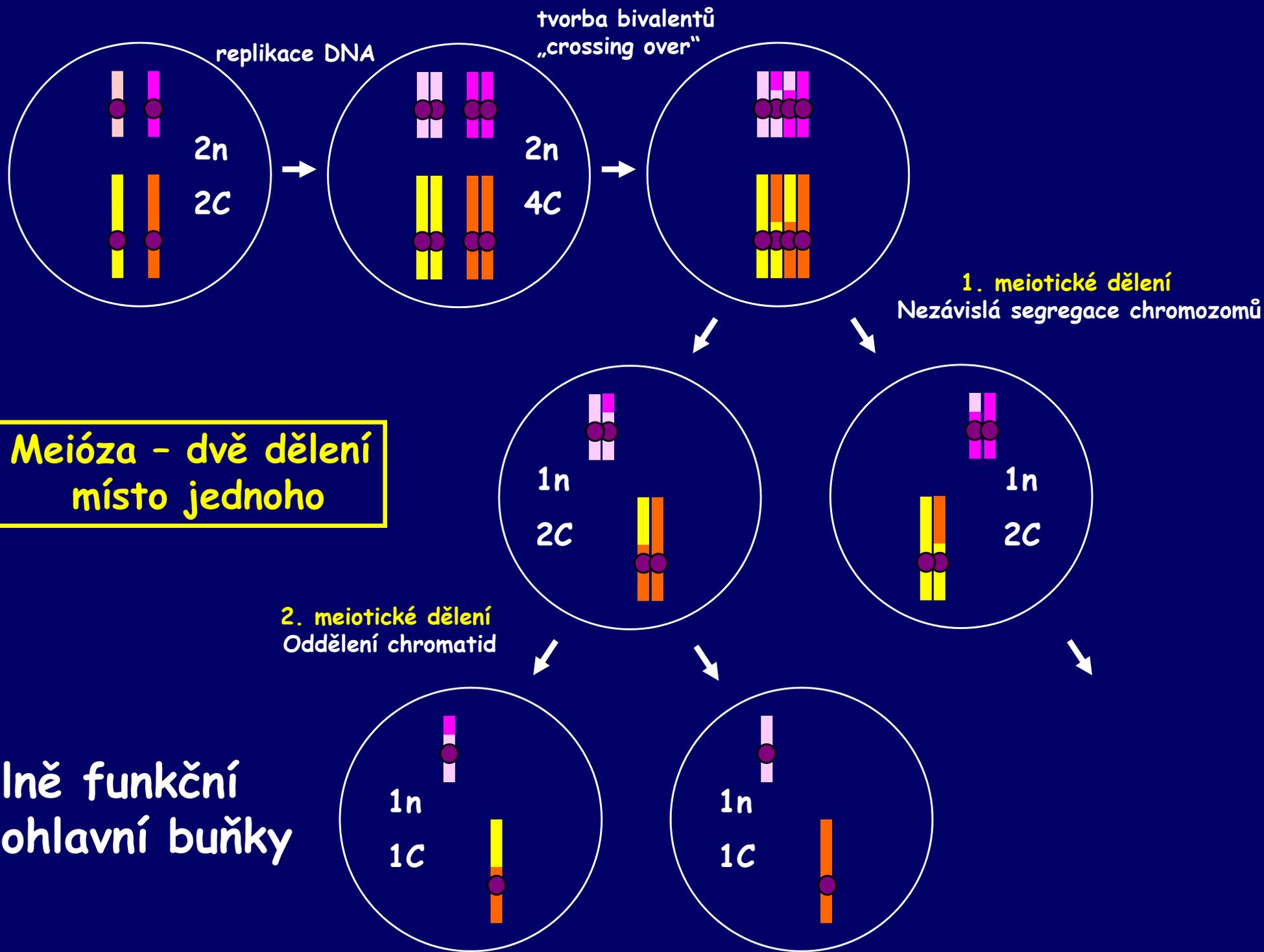
# Redukce počtu chromozomů Proč?



Gamety musí mít haploidní počet chromozomů ( $n$ ), aby splynutí gamet nevedlo u potomků ke znásobení počtu chromozomů nad diploidní počet ( $2n$ ).

Principiálně by se redukce počtu chromozómů mohla snadno odehrát v jednom kroku vynecháním replikace DNA s následnou separací homologních chromozómů při jednom dělení buňky.





**Meióza - dvě dělení místo jednoho**

**Plně funkční pohlavní buňky**

- Nezávislá segregace chromozomů
- „Crossing over“
- Fertilizace

jsou zdrojem genetické diverzity, která je základem adaptace živých organismů

# Nahlédnutí do nepříliš dlouhé historie studia buněčného cyklu

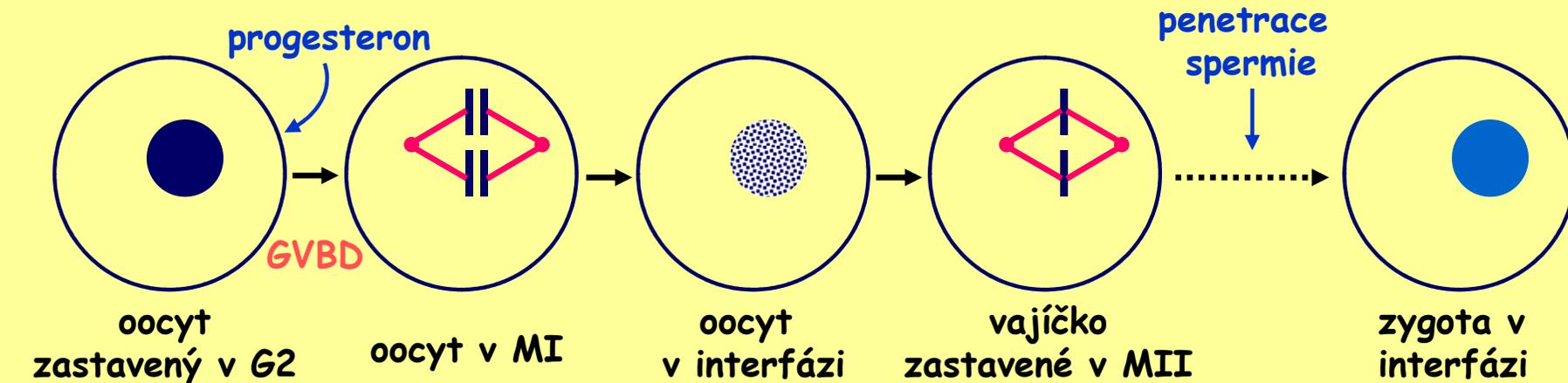
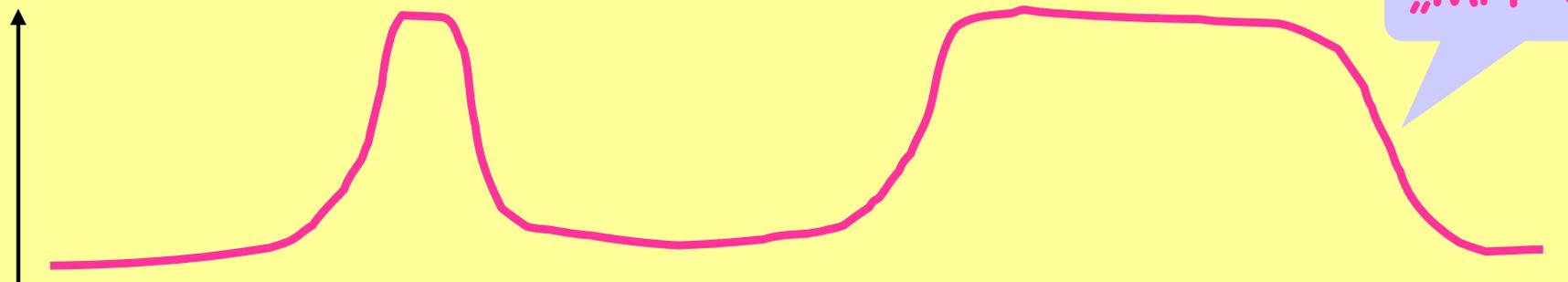
(~3 dekády)

80-tá léta minulého století = počátky studia buněčného cyklu

1971 - první popis cytoplazmatické aktivity zvané „MPF“ v meioticky zrajících oocytech žáby

(Masui and Markert, J. Exp. Zool.)

aktivita MPF



Existence MPF není omezena pouze na zrající oocyty, ale MPF se vyskytuje v mnoha různých buněčných typech:

1978 - buňky rýhujícího se embrya (Wassermann and Smith, J. Cell Biol.)

1979 - kultivované savčí buňky (Sunkara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA)

1982 - kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Weintraub et al., CR Acad. Sci. Paris)

&

Vlastnosti MPF jsou shodné u všech analyzovaných buněčných typů :

- aktivita MPF je časově korelována s M fází buněčného cyklu
- MPF indukuje vstup do M fáze
- pokles MPF activity je spojen s reformováním jádra, dekonenzací chromozomů a syntézou DNA



Všechna eukaryota používají ke koordinaci progresu svého buněčného cyklu (= svého buněčného dělení) stejný „princip“

## Důležité poznatky získané studiem kvasinek:

1980, 1981 - byla ukázána klíčová role produktu genu *cdc2* genu v kontrole progresu buněčného cyklu u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*

(Nurse and Thuriax, *Genetics*; Nurse and Bisset, *Nature*)

Když jsou mutanti v *cdc2* genu, kteří jsou citliví k teplotě, inkubováni při nepermissivní teplotě, zastavují svůj cyklus v G1 před S fází nebo v G2 před mitózou.

Gen *cdc2* kvasinky *S. pombe* má svůj homolog *CDC28* u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

1985 - 1990 = „zlatá léta“ výzkumu buněčného cyklu

Kvasinky byly první:

1985, 1986 - bylo ukázáno, že *CDC28* gen kvasinky *S. cerevisiae* a *cdc2* gen kvasinky *S. pombe* kódují protein kinázu, která může být regulována fosforylací

(Reed et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Simanis and Nurse, Cell)

- oba geny *cdc2* a *CDC28* kódují 34/36 kD fosfoprotein s kinázovou aktivitou (62% aminokyselinová identita)
- hladina p34/p36 proteinu je u proliferujících buněk konstantní
- u buněk, které přestanou proliferovat a zastaví svůj cyklus v G1 fázi, je p34/p36 defosforylován a nemá kinázovou aktivitu

## Obratlovci je mají také:

1987 - funkční komplementací mutace *S. pombe cdc2* byl identifikován lidský homolog kvasinkového genu *cdc2*  
(Lee and Nurse, Nature)

1987 - v lidských buňkách byl identifikován p34 protein, který je homologní s p34<sup>cdc2</sup> proteinem kvasinky *S. pombe* and p36<sup>CDC28</sup> proteinem kvasinky *S. cerevisiae*  
(Draetta et al., Cell)

Lidský p34 protein byl imunoprecipitován z HeLa buněk označených [<sup>35</sup>S]methioninem s použitím monoklonální protilátky reagující s p34<sup>cdc2</sup> a p34<sup>CDC28</sup>.

## Začíná se objevovat vztah mezi $p34^{cdc2}$ and MPF:

**1988 - MPF izolovaný** (afinitní chromatografií s použitím  $p13^{suc1}$ ) z oocytů žáby sestává ze dvou hlavních komponent, proteinů o molekulových hmotnostech 34 kD a 42 kD; 34 kD protein je nejspíše homologem  $p34^{cdc2}$

(Dunphy et al., Cell, July 29)

**1988 - MFP izolovaný** z oocytů žáby obsahuje 32 kD protein, který je rozeznán protilátkou proti  $p34^{cdc2}$ ; 32 kD protein je asociován s 42 kD proteinem, s nímž tvoří komplex vykazující kinázovou

(Gautier et al., Cell, July 29)

**1988 - histon H1 kinázová (H1K) aktivita**, která je specifická pro M fázi, koeluuje při její izolaci s 34 kD proteinem, který je rozeznán protilátkou proti  $p34^{cdc2}$ ; MPF and H1K jsou nespíš stejnou entitou

(Arion et al., Cell)

## Biochemie proteinu p34 naznačuje jeho úlohu v regulaci buněčného cyklu:

**1988 - lidský protein p34 (HeLa buňky) podléhá v závislosti na buněčném cyklu změnám ve fosforylaci a v uspořádání partnerů**

(Draetta and Beach, Cell)

- u buněk v G1 fázi je protein p34 defosforylován, není asociován s proteinem p62 a nemá kinázovou aktivitu
- všechny tyto parametry jsou revertovány u buněk v G2/M fázi
- u buněk zastavených v M fázi působením nokodazolu se akumuluje aktivní komplex p34/p62

## Cyklin vstupuje do hry:

1983 - poprvé popsán jako protein, který podléhá opakované destrukci u rýhujících se vajíček mořské ježovky

(Evans et al., Cell)



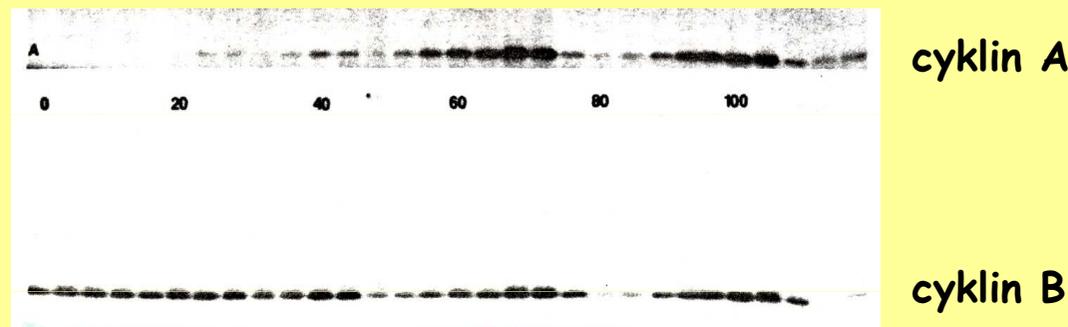
1989 - syntéza cyklinu je nezbytná pro vstup do M fáze u oocytů žáby

(Minshull, Blow, and Hunt; Cell)

1989 - destrukce cyklinu je nezbytná pro výstup z mitózy u časných embryí žáby

(Murray, Solomon, and Kirschner; Nature)

### Příklad: fluktuace cyklinů A a B v časném embryu škeble



minuty po fertilizaci

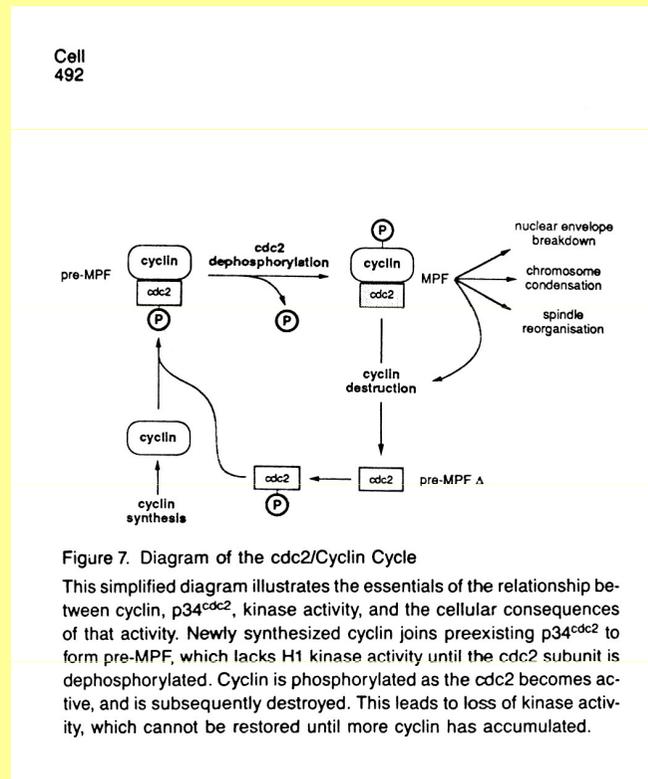
Westendorf et al., J. Cell Biol., 1989

## „Kruh se uzavírá“:

### 1990 – cykliny B1 and B2 jsou komponenty MPF oocytů žáby

(Gautier et al., Cell)

- imunoprecipitáty cyklinů B1 a B2 vykazují H1K aktivitu, která je charakteristická pro MPF
- exogenně přidané cykliny B1 a B2 jsou oba substráty této kinázové aktivity
- kinázová aktivita asociovaná s cykliny B1 a B2 osciluje s kinetikou, která je stejná jako kinetika aktivity p34 kinázy



U vyšších eukaryot není situace tak jednoduchá:

PARADIGMA  
„buněčný cyklus jako cyklus *cdc2*“

SE ZDÁL

atraktivní pro jeho jednoduchost

ALE

další studie celou problematiku zkomplikovaly

↓  
NEJPRVE

**1991 - komplementací mutace *CDC28* u kvasinky *S. cerevisiae* byla nalezena nová lidská p34 protein kináza (CDK2 - cell division kinase)**

(Elledge, Spottswood, EMBO J.)

CDK2 má 66% aminokyselinovou sekvenční identitu s CDC2Hs, která byla identifikována Lee and Nurse (1987) komplementací *cdc2* mutace u *S. pombe*

## Současný stav (slovy)

Enormní komplexnost molekulární mašinerie, která reguluje buněčný cyklus, díky:

- Velkému počtu existujících kináz příbuzných p34<sup>cdc2</sup> (označovaných CDK - cyclin dependent kinases)
- Velkému počtu existujících cyklinů
- Skutečnosti, že různé cykliny interagují s různými CDK a *vice versa*
- Existenci dalších molekul, které interagují s komplexy cyklin/CDK

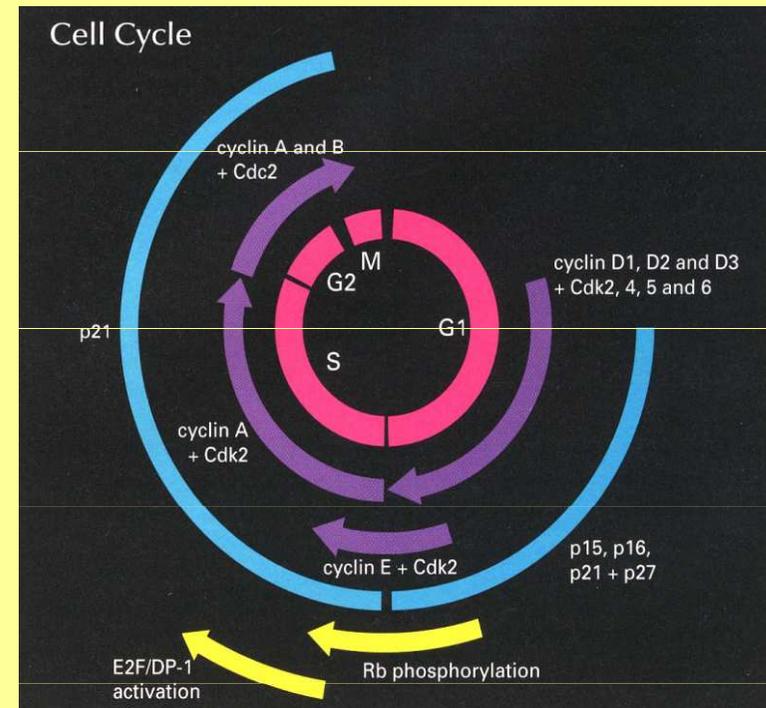
## Současný stav (graficky: zjednodušeno)

### Cdks and Related Proteins

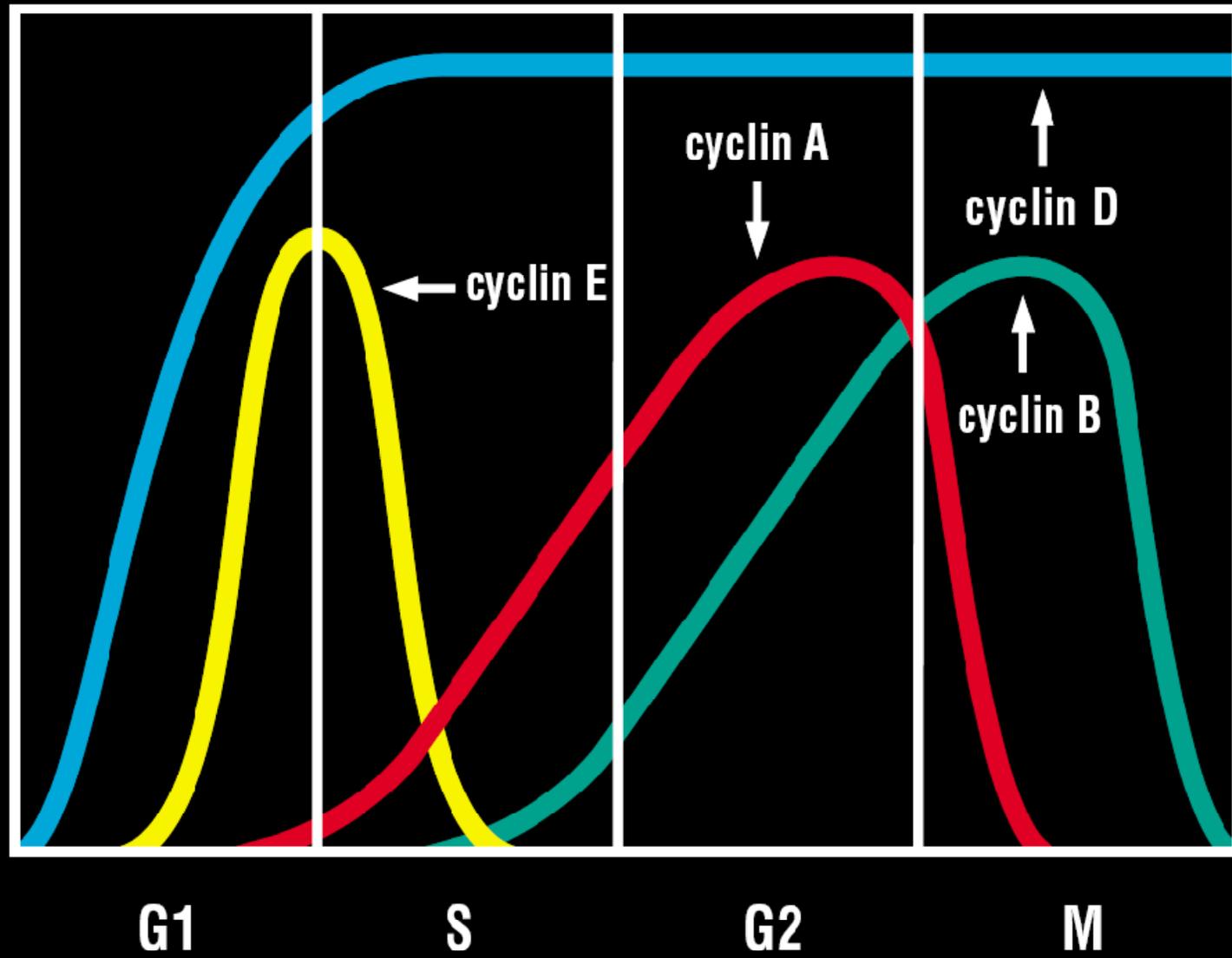
kinase	PSTAIRE motif	regulatory subunits	putative substrates
Cdc2 p34	PSTAIRE	cyclin A & B	Rb, NF, histone H1
Cdk2	PSTAIRE	cyclin A, E & D	Rb, p27
Cdk3	PSTAIRE	cyclin E	E2F-1/DP-1
Cdk4	PV/ISTVRE	cyclin D1, D2, & D3	Rb
Cdk5	PISSLRE	p35	NF, Tau
Cdk6	PLSTIRE	cyclin D1, D2, & D3	Rb
Cdk7	NRTALRE	cyclin H	Cdc2, Cdk4/6
Cdk8	SACRE	cyclin C	RNA Pol II
Cdk9	PITALRE	cyclin T	Rb, MBP

### Major Cyclin-Cdk Cell Cycle Complexes

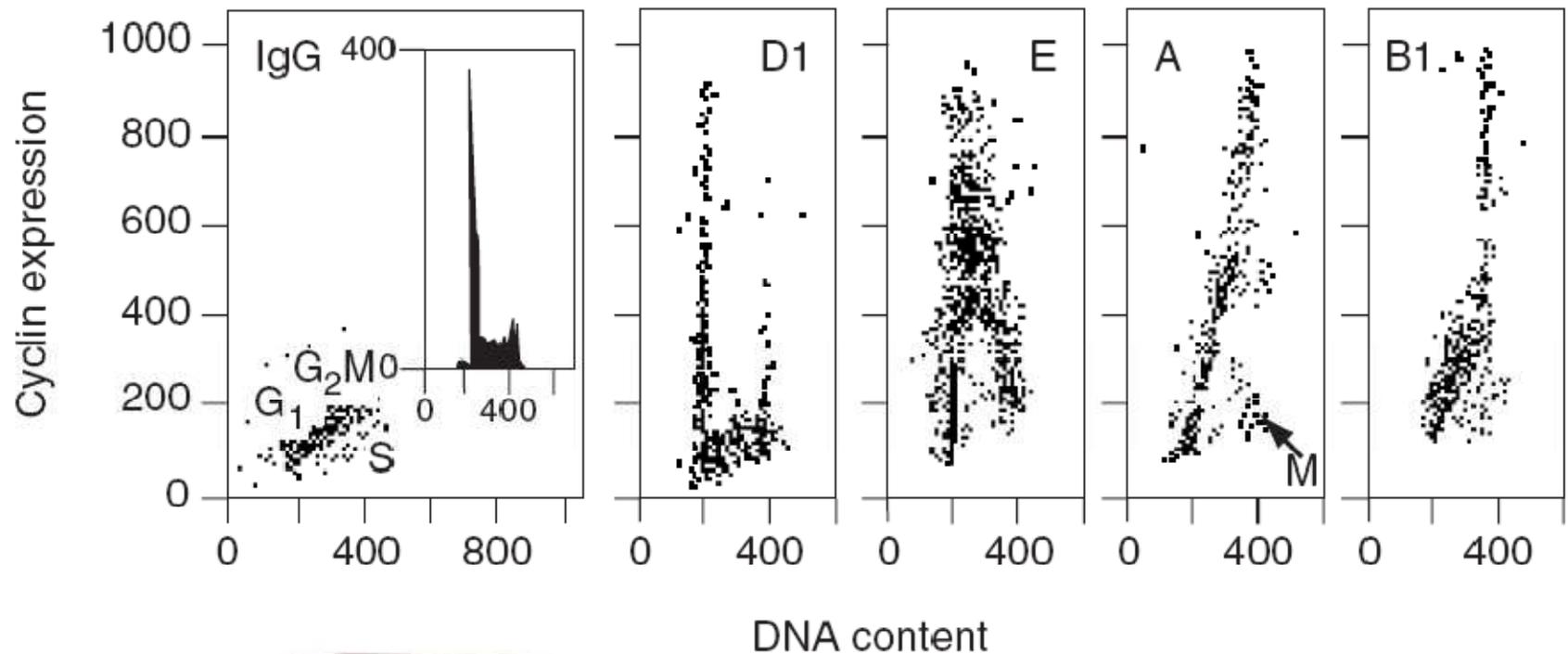
cell cycle stage	cyclin-Cdk complexes	inhibitors						
		p15	p16	p18	p19	p21	p27	p57
G1	cyclin D-Cdk4/6	+	+	+	+	+	+/-	+/-
G1/S	cyclin E-Cdk2	-	-	-	-	+	+	+
S	cyclin A-Cdk2	-	-	-	-	+	-	+
G2/M	cyclin B-Cdk2	-	-	-	-	+	-	-



Periodicita exprese cyklinů



# Detekce intracelulárních proteinů v kombinaci s detekcí DNA průtokovou cytometrií



Current Protocols in Cytometry

# Významné fenomény

A cesty k poznání jejich základů vztahujících se k regulaci průběhu buněčného cyklu

Phenomen:

Nekontrolovaná hyperproliferace

Omezená proliferace

Phenotyp:

Proliferativní choroby (rakovina, psoriáza, revmatická artritida, ...)

Neschopnost náhrady/obnovy poškozených buněk/tkání

Profit:

Nalezení biomarkerů  
Design léčiv

Indukce proliferace „kmenových buněk“

Pochopení molekulárních mechanismů regulujících buněčný cyklus je přeměňováno do disignu „chytrých“ diagnostických a terapeutických strategií.

## Jednoduchá logika pohledu na regulátory buněčného cyklu:

Regulátory buněčného cyklu:

Pozitivní

Negativní

Zástupci:

CDK, cykliny

Inhibitory CDK

V hyperproliferujících buňkách:

Zvýšená množství  
& Aktivovány

Snížená množství  
& Inaktivovány

V neproliferujících buňkách:

Snížená množství  
& Inaktivovány

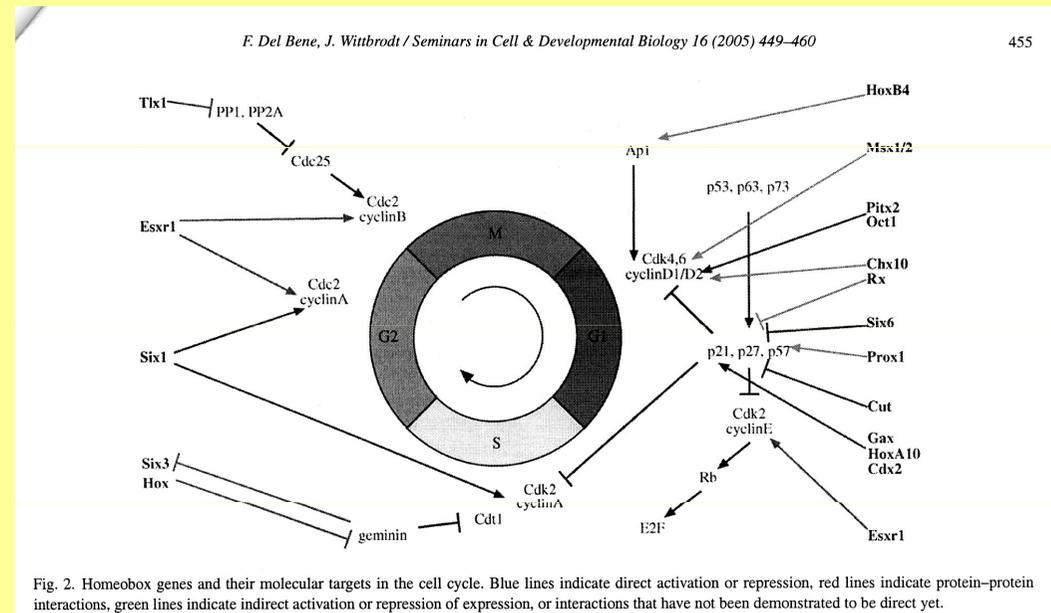
Zvýšená množství  
& Aktivovány

## Možné příčiny abnormální funkce regulátorů buněčného cyklu:

### Abnormality regulátoru samotného

- Mutace v kódující sekvenci
- Mutace v regulační sekvenci (elementu)
- Epigenetická změna v kódující sekvenci
- Epigenetická změna v regulační sekvenci (elementu)
- Abnormální posttranslační modifikace
- Jiné

### Deregulace dráhy nadřazené regulátoru buněčného cyklu



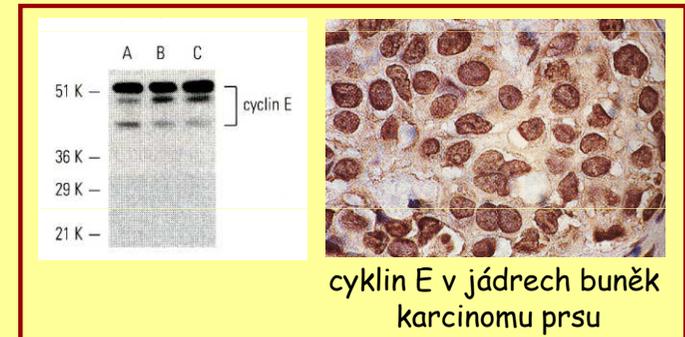
Příklad komplexnosti drah nadřazených  
regulátorům buněčného cyklu

# Jak lze analyzovat abnormality regulátorů buněčného cyklu?

(srovnání normálních a abnormálních buněk)

## Na úrovni struktury genu:

- **Analýza sekvence** (sekvenování, RFLP, ...)



## Na úrovni transkripce genu:

- **Množství mRNA** (Northern blot, RT-PCR, QRT-PCR, chip analýza, hybridizace *in situ*)

## Na úrovni exprese a funkce proteinu:

- **Celkové množství regulátoru** (*Western blot, imunodetekce in situ*)
- **Asociace regulátoru s jeho partnery** (imunoprecipitace)
- **Aktivita** (stanovení kinázové aktivity *in vitro*)
- **Jiné aspekty metabolismu, např. poločas života** (metabolické značení)

## Sofistikované experimentální způsoby analýzy významu/funkce regulátorů buněčného cyklu:

### Genetické modifikace

- Ektopická exprese - transgeneza
- Zvýšení exprese
- Exprese mutantních forem (např. dominantně negativní mutanti)
- Genový „knockout“ a „knockin“ homologní rekombinací
- Genový „knockdown“ s využitím siRNA strategie
- Exprese značených proteinů umožňujících jejich sledování *in vivo*
- Jiné

V buňkách kultivovaných *in vitro*

U zvířat (myš, *Drosophila*, ...)

Analýza fenotypu na všech možných úrovních

**Co jsme se dosud dozvěděli?**

**&**

**Důležité pro zapamatování:**

# U lidských malignit se vyskytují různé defekty regulátorů buněčného cyklu:

(adaptováno z: Webster, K.R., Exp. Opin. Invest. Drugs, 1998)

<u>Protein</u>	<u>Funkce</u>	<u>Defekt(y)</u>	<u>Typ nádoru</u>
p16	Inhibitor Cdk4/6	Delece	~95% T-cell ALL
		Bodová mutace	~75% Melanom
		Umlčení	~75% Karcinom pankreatu
			~52% Karcinom jícnu
			12 - 30% Karcinom plic
			~30% Gliom
			~20% Karcinom močového měchýře
			Sporadický melanom
			~95% Nádorové buněčné linie
p18	Inhibitor Cdk6	Delece	Akutní lymfoidní leukémie
		Bodová mutace	Karcinom prsu
p21	Inhibitor Cdk	Snížená exprese	Buněčné linie deficientní v p53
p27	Inhibitor Cdk	Degradace	Karcinom prsu
			Kolorektální karcinom
cdk1	Katalytická podjednotka	Zvýšená exprese	Karcinom prsu
			Karcinom prostaty
			Kolorektální karcinom
			Karcinom žaludku

<u>Protein</u>	<u>Funkce</u>	<u>Defekt(y)</u>	<u>Typ nádoru</u>
cdk2	Katalytická podjednotka	Zvýšená exprese	Kolorektální karcinom
cdk4	Katalytická podjednotka	Amplifikace	Sarkom, gliom
		Bodová mutace	Melanom
		Zvýšená exprese	Adenomatózní polypóza
Cyclin A	Aktivátor cdk1/2	Stabilizace	Karcinom jater
Cyclin B1	Aktivátor cdk1	Zvýšená exprese	88% Kolorektální karcinom
Cyclin D1	Aktivátor cdk4/6	Amplifikace	40 - 80% Karcinom prsu
		Zvýšená exprese	~70% Adenomatózní polypóza
			50% B-buněčný lymfom
			~47% Karcinom plic
			~35% Karcinomy hlavy a krku
			25 - 50% Karcinom jícnu
			~25% Karcinom močového měchýře
Cyclin E	Aktivátor cdk2	Amplifikace	~90% Kolorektální karcinom
		Zvýšená exprese	30 - 80% Karcinom prsu
			~70% Karcinom prostaty
			~18% Karcinom vaječníků
			Karcinom žaludku

- 1) Většina kanonických komplexů cyklin/cdk není nezbytná pro proliferaci buněk díky značné funkční redundanci, promiskuitě a výkonným kompenzačním mechanismům.
- 2) Konkrétní konfigurace molekul, které řídí průběh buněčného cyklu u vyšších eukaryot jsou specifické podle buněčného typu; začínají být také odhalovány nové nekanonické funkce cyklinů a Cdk.

### Cdk2 - nejmarkantnější příklad

Cdk2 a jeho aktivátory cykliny E byly dlouho považovány za nepostradatelné regulátory savčího somatického buněčného cyklu.

2003 - Deplece Cdk2 (protismyslné oligonucleotidy, siRNA) má pouze zanedbatelný vliv na proliferaci nádorových buněk kultivovaných *in vitro*.

(Tetsu and McCormick, *Cancer Cell*).

2003 - Myši deficientní v *Cdk2* genu jsou plně životaschopné; s výjimkou poruchy ve vývoji gamet nevykazují žádné známky vývojových abnormalit; tato skutečnost naznačuje, že Cdk2 není nepostradatelná pro většinu, ne-li všechny somatické buňky.

(Ortega et al., *Nat. Genet.*; Berthet et al., *Curr. Biol.*)

# Regulátory buněčného cyklu v reálném světě

**Obecná otázka:**  
Molekulární mechanismy řídící vývoj žlutého tělíska  
(potenciální cíle pro farmakologickou intervenci)



**Jedna specifická otázka:**  
Změny v množství proteinů regulujících buněčné dělení během vývoje tohoto orgánu

Použitý biologický model - **myš**; Použitá technika - **WB analýza**

## Analyzovaná stádia vývoje žlutého tělíska (1 až 6)

**1** Granulózní buňky Graafova folikulu těsně před ovulací

**2** Luteinizující buňky Graafova folikulu 72 hodin po ovulaci

**3** Buňky žlutého tělíska ve třináctém dni gravidity

**4** Buňky žlutého tělíska v šestnáctém dni gravidity

**5** Buňky žlutého tělíska v osmnáctém dni gravidity

**6** Buňky zanikajícího žlutého tělíska 2 dny po porodu

Zpracování

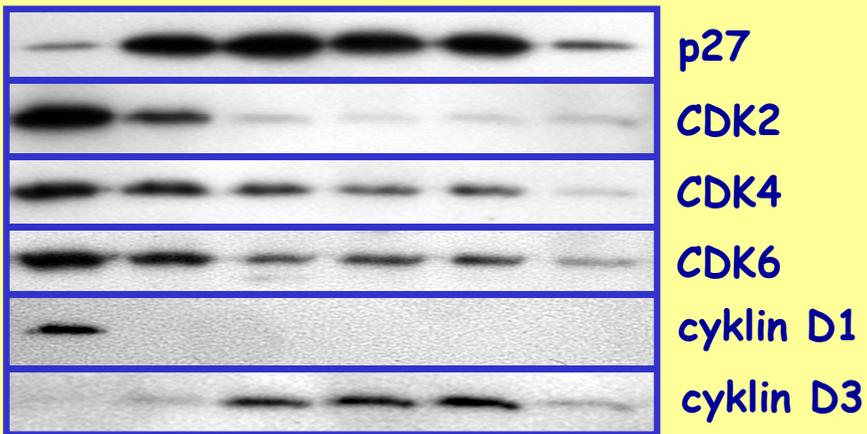
Lýza buněk - získání proteinů

Separace proteinů pomocí SDS-PAGE

WB analýza pomocí protilátek

Výsledek

Byly zjištěny změny v kvantitě šesti regulátorů buněčného dělení, k nimž dochází během vývoje žlutého tělíska u myši



Analyzované regulátory buněčného dělení

# Prognostická hodnota exprese jednotlivých regulátorů buněčného cyklu není zdaleka stanovena.

## p27 - inhibitor CDK

Je tento regulátor dobrý prediktor u nádoru močového měchýře?

Table 1. p27 immunoreactivity and its relationship to other tumor characteristics

Variable (n)	p27-low staining (55 cases) n (%)	p27-high staining (20 cases) n (%)	Statistical analyses
<b>Grade</b>			
G1 (13)	10/13 (76.9)	3/13 (23.1)	NS*
G2 (38)	28/38 (73.7)	10/38 (26.3)	
G3 (24)	17/24 (70.8)	7/24 (29.2)	
<b>Growth pattern</b>			
Papillary (61)	46/61 (75.4)	15/61 (24.6)	NS
Solid/mixed (14)	9/14 (64.3)	5/14 (35.7)	
<b>Stage</b>			
Superficial (54)	38/54 (70.4)	16/54 (29.6)	NS
Muscle-invasive (21)	17/21 (81.0)	4/21 (19.0)	
<b>PCNA index</b>			
Low (25)	17/25 (68.0)	8/25 (32.0)	NS
Moderate (28)	22/28 (78.6)	6/28 (21.4)	
High (22)	16/22 (72.7)	6/22 (27.3)	
<b>p53 immunoreactivity</b>			
Absent (44)	24/44 (54.5)	20/44 (45.5)	NS
Present (31)	16/31 (51.6)	15/31 (48.4)	
<b>Recurrence</b>			
Absent (15)	8/15 (53.3)	7/15 (46.7)	NS
Present (60)	47/60 (78.3)	13/60 (21.7)	
<b>Progression</b>			
Absent (45)	16/45 (35.6)	29/45 (64.4)	NS
Present (9)	5/9 (55.6)	4/9 (44.4)	

\*Non-significant.

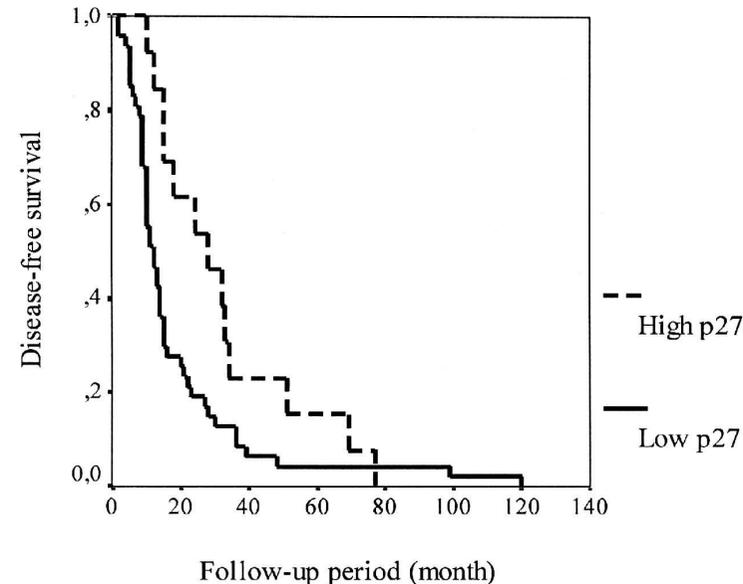


Figure 4. Disease-free survival curves based on a comparison between low and high p27 expression levels.

**p27 není dobrý prediktor výsledku léčby karcinomu močového měchýře !**

## Co zejména bychom si měli pamatovat?

- funkce molekul regulujících buněčný cyklus ještě není úplně pochopena
- některé dnes obecně přijímané koncepty regulace buněčného cyklu budou muset být revidovány
- nové nečekané otázky musí být experimentálně ověřeny

**Děkuji za pozornost**

**Otázky a komentáře na:  
ahampl@med.muni.cz**