

Buněčný cyklus

„When a cell arises, there must be a previous cell, just as animals can only arise from animals and plants from plants“.

(Rudolf Virchow, 1858)

Jediným způsobem jak může vzniknou nová buňka je duplikace již buňky existující

- kontinuita života od jeho vzniku

Buněčný cyklus

- jak buňky dosáhnou zdvojnásobení svého obsahu?
- jak dosáhnou přesného rozdělení svého obsahu do dvou smysluplných celků?
- jak vzájemně koordinují tyto procesy?
- uspořádání životních procesů buňky do logického sledu tak, aby mohlo dojít k duplikaci chromozomů a buněčnému dělení za vzniku přesných kopií buňky rodičovské
- podmínka tvorby vícebuněčných struktur, aktivně probíhá i v dospělých mnohobuněčných organismech (nahrazování buněk odumírajících, milióny nových buněk za vteřinu, podmínka přežití)
- principy řízení replikace a segregace chromozomů jsou obdobné ve všech buňkách

Buněčný cyklus reaguje na signály přicházející z vnějšího i vnitřního prostředí buňky

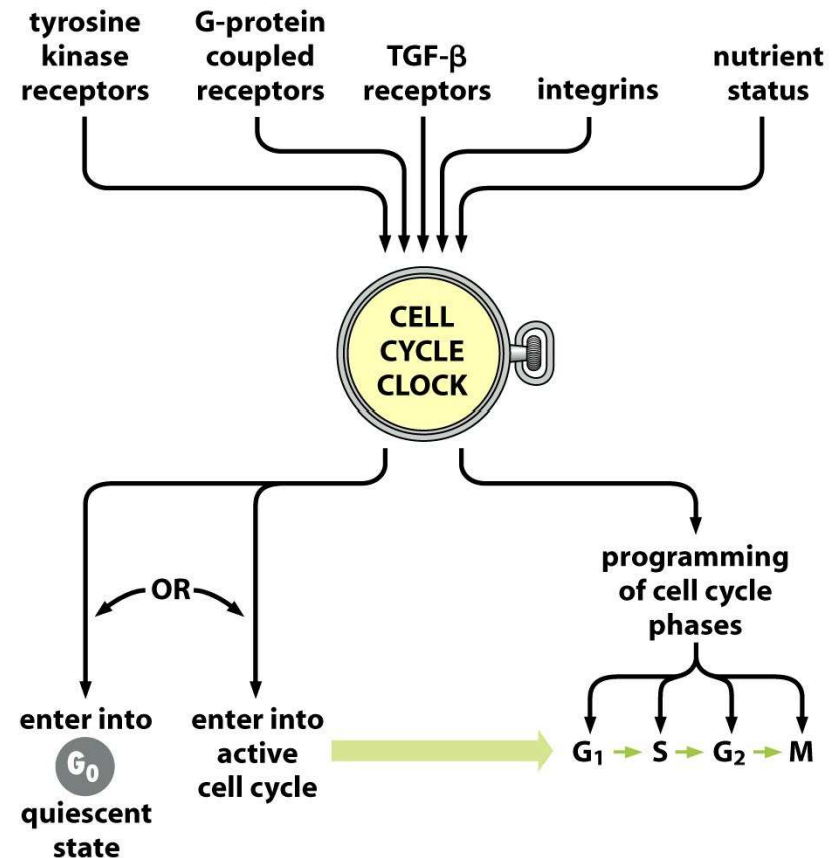
Vnější podněty:

- přítomnost signálních molekul produkovaných ostatními buňkami (koordinace)
- přítomnost živin a růstových faktorů

Vnitřní podněty:

- stupeň dokončení předchozích fází cyklu
- poškození DNA

Na základě těchto podnětů může být buněčný cyklus pozastaven.



Buněčný cyklus eukaryot

- zásadní procesy v buňce probíhají v pevně daném pořadí
- duplikace chromozomální DNA nastává ve specifické části života buňky
- následuje segregace chromozomů při buněčném dělení

- Čtyři fáze cyklu:

- M (mitóza)

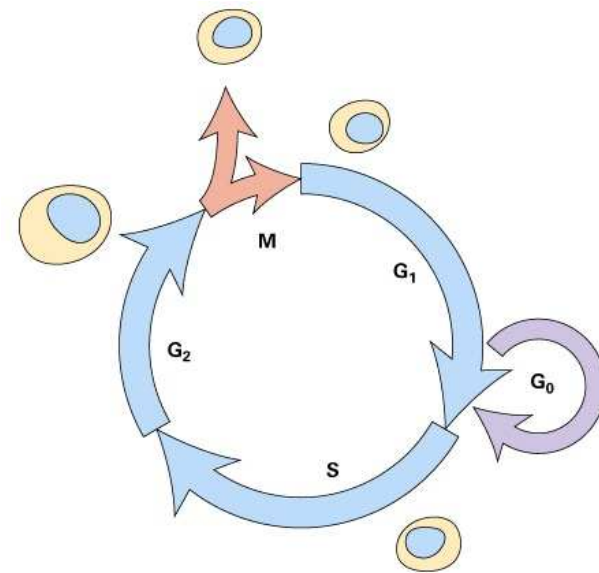
- G_1 (and G_0)

- S (replikace DNA)

- G_2

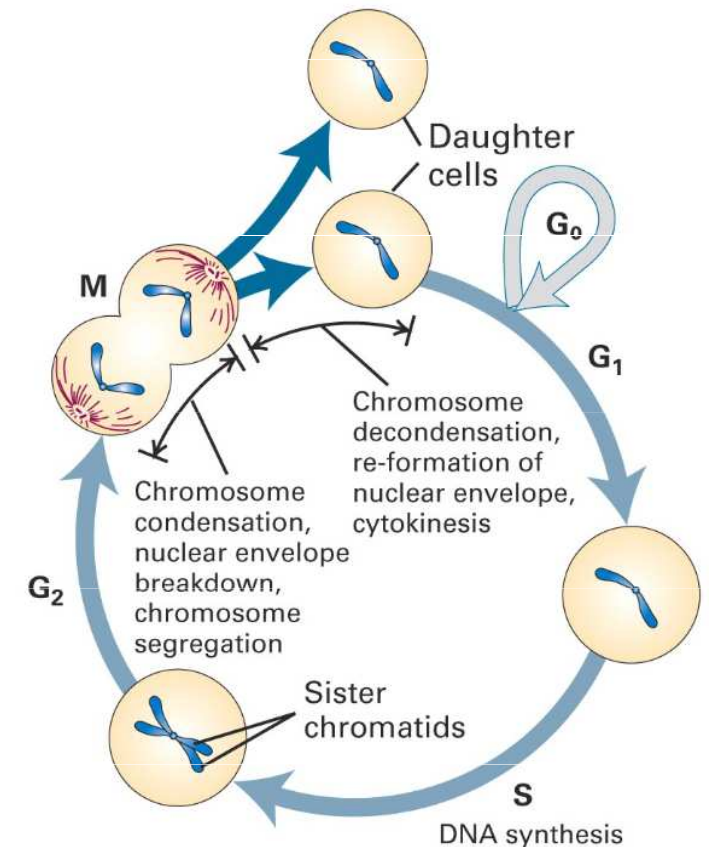
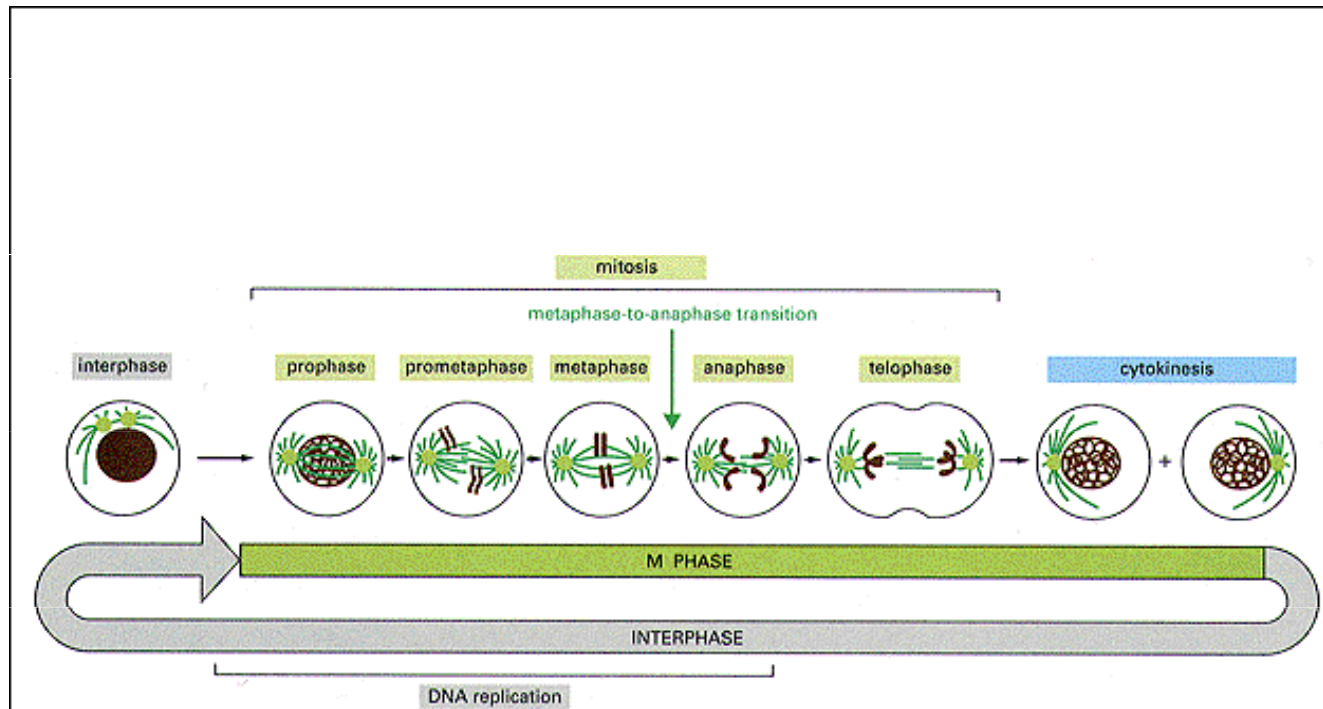


interfáze



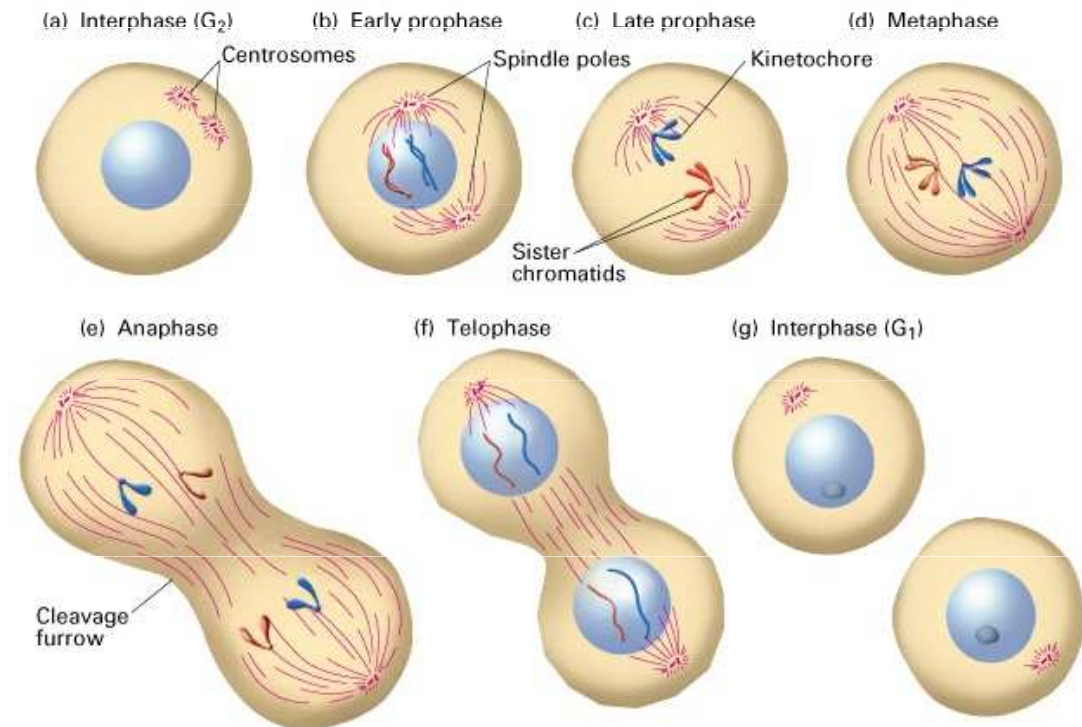
Periodické proměny buněk byly nejdříve zaznamenány světelnou mikroskopií

- mitóza (rozdělení chromozomů)
- cytokineze (rozdělení cytoplazmy)
- interfáze (období růstu buňky a replikace DNA)



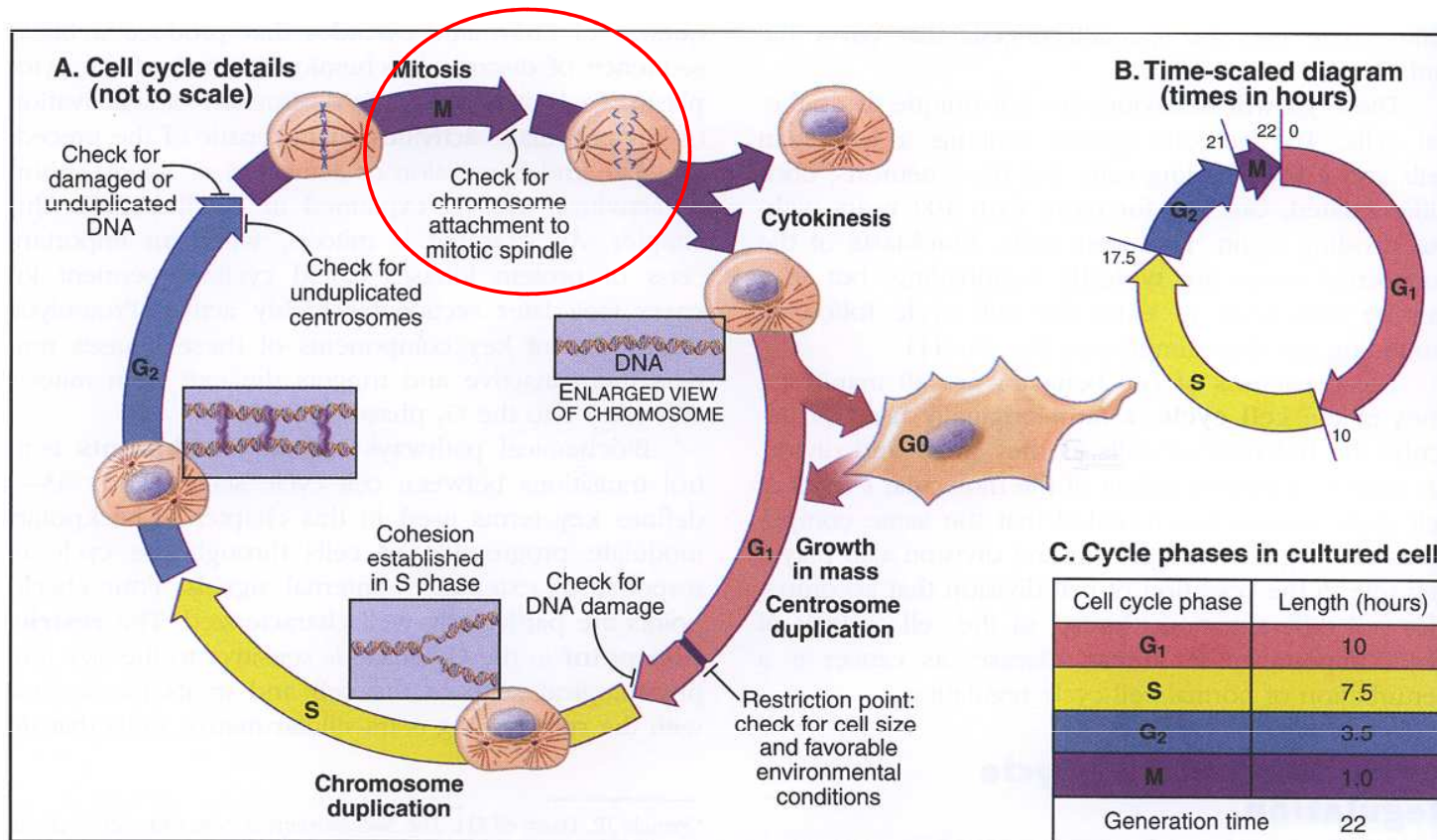
Fáze M (mitóza + cytokineze)

- buňka je zaměřena na funkce související s buněčným dělením
- metabolická aktivita slabá
- rozpad jaderné membrány (do ER)
- tvorba mitotického vřeténka
- kondenzace chromozomů do kompaktních chromatid
- sesterské chromatidy drží pohromadě („sister-chromatid cohesion“)
- sestavení kinetochorů, připojení chromatid k mitotickému vřeténku
- rozložení kohezivních molekul mezi chromatidami, separace chromatid k opačným pólům
- rozpad vřeténka,
- dekonenzace segregovaných chromozomů
- obnovení jaderné membrány (spojení s ER zůstává)

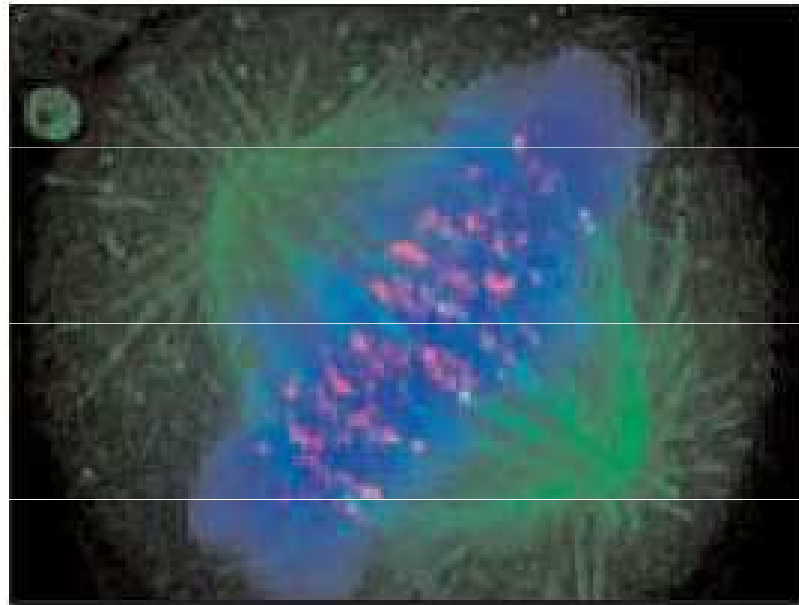


Metafázový kontrolní bod

- kontrola segregace chromozomů: oddaluje začátek separace sesterských chromatid, dokud nejsou všechny chromozomy správně napojeny na mitotické vřeténko



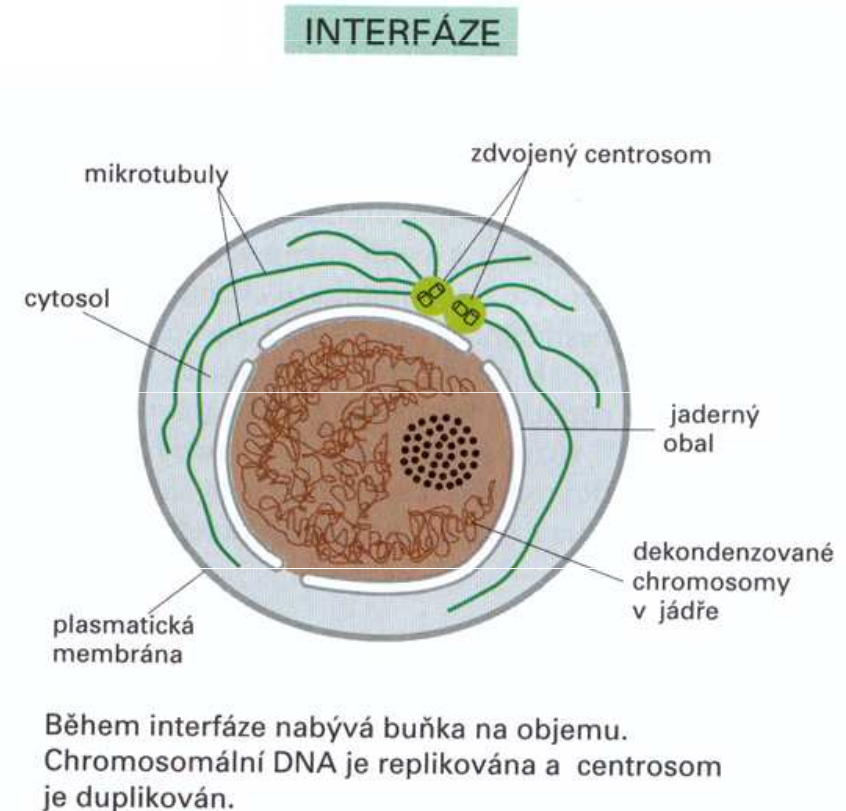
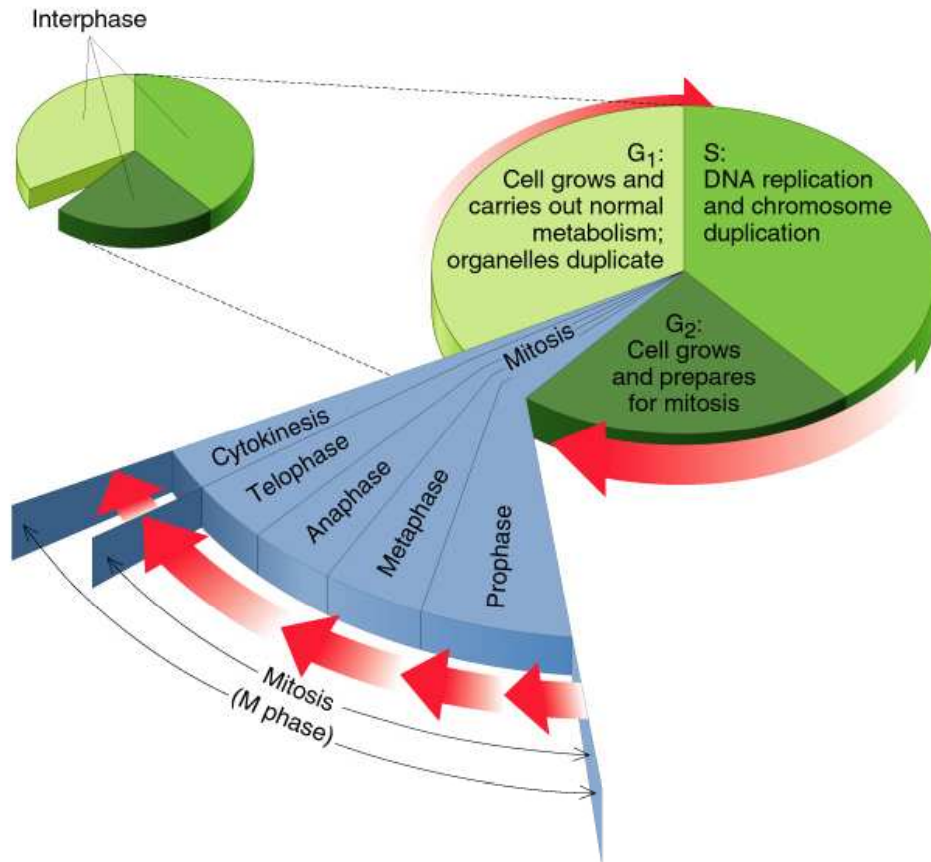
Mitóza



Mitóza v lidské buňce pozorovaná fluorescenční mikroskopií.

Mikrotubuly jsou značeny zeleně, DNA modře a kinetochory (tj. místa, kde se mikrotubuly připojují k DNA) jsou růžové.

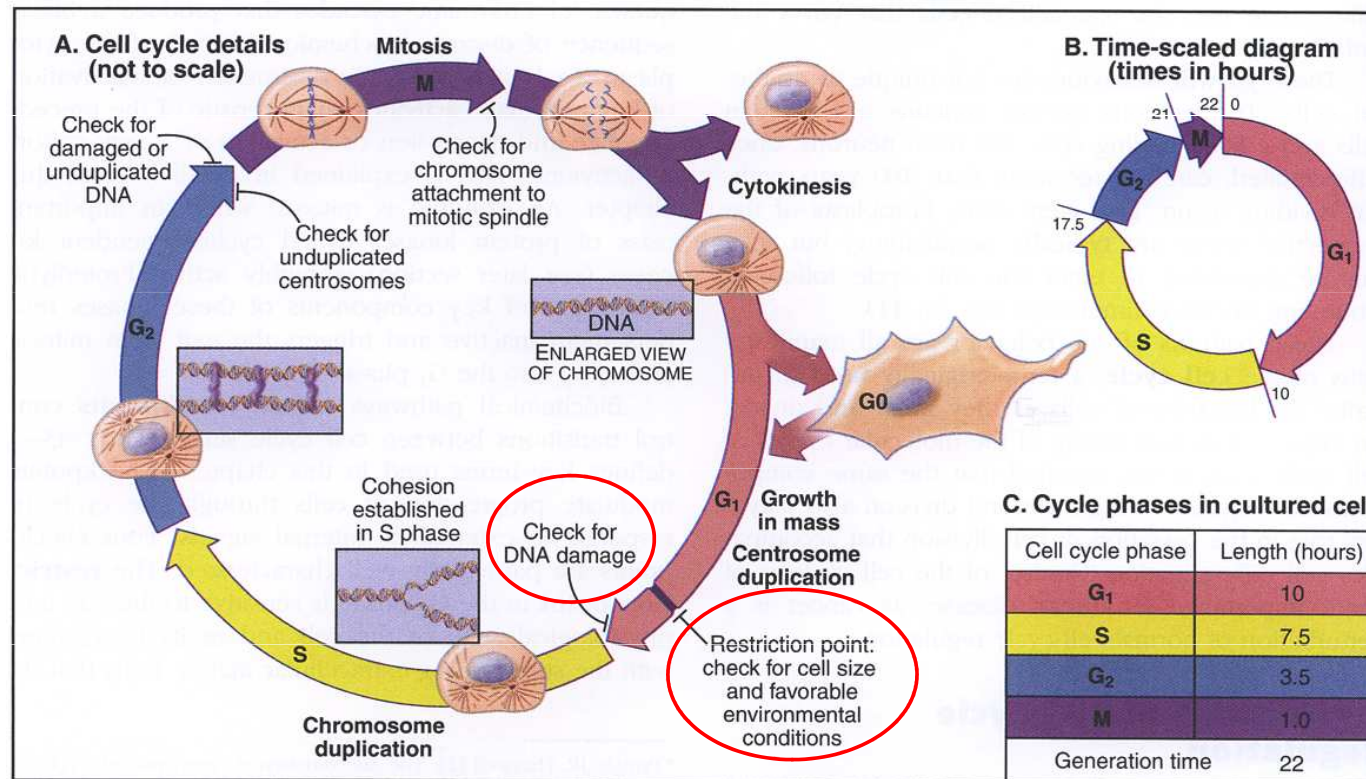
Interfáze



- tvoří většinu cyklu: hodiny, dny, týdny nebo delší období podle buněčného typu
- růst buňky
- výrazná metabolická aktivita
- rozdělena do fáze G₁ ("first gap"), S ("synthesis"), G₂ ("second gap")
- jaderná membrána je spojena s ER

Fáze G1

- nejdelší a nejvariabilnější fáze cyklu
- poskytuje čas pro biosyntetické procesy, sestavování organel a pro monitorování vnějších a vnitřních podmínek před zahájení S fáze
- dostatek živin a růstových faktorů: růst buňky, vysoká metabolická aktivita
- nedostatek živin nebo anti-proliferační signál: zpomalení postupu fází G1 nebo opuštění cyklu do fáze G0, ve kterém může setrvat dny, týdny, měsíce...
- postup fází G1 je řízen dvěma kontrolními body: **bodem restrikce** a **kontrolním bodem sledujícím stav DNA** (oba body bývají defektní u nádorových buněk)

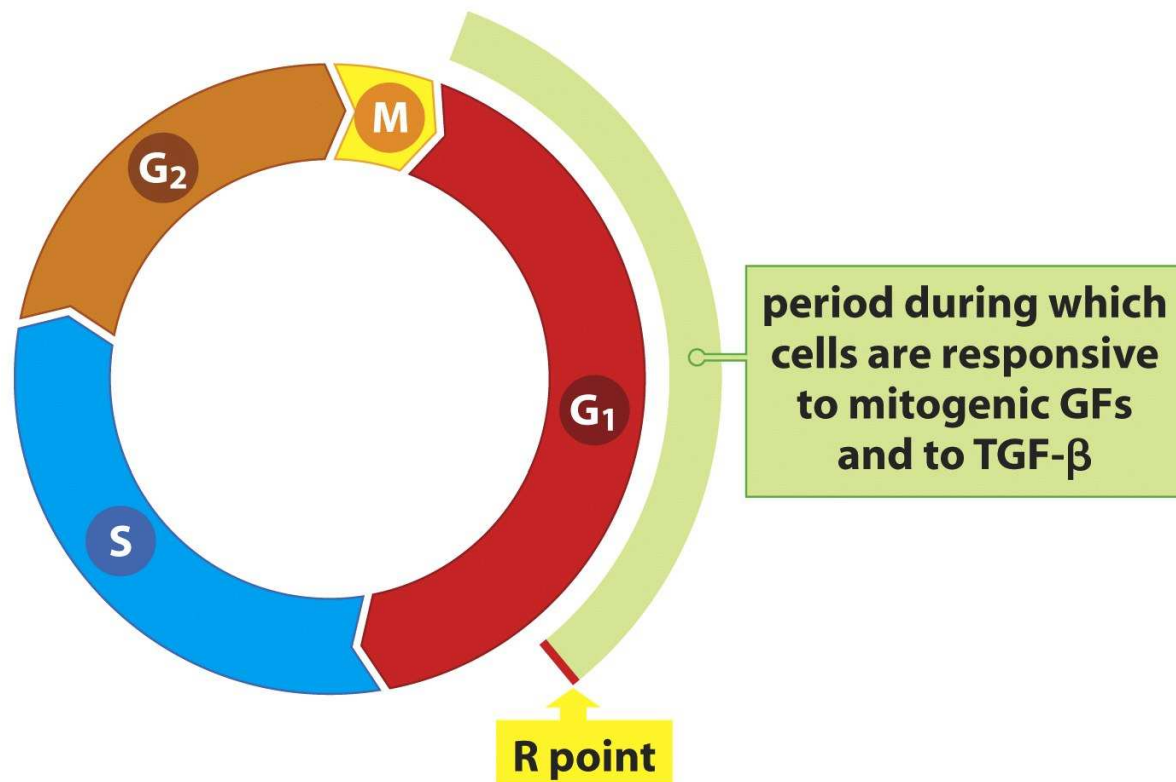


Bod restrikce (START)

- bod cyklu, kterým buňka monitoruje svou velikost, fyziologický stav a interakce s okolím
 - savci: bod restrikce („restriction point“)
 - kvasinky: START
- lokalizován v pozdní fázi *G1*
- jsou-li podmínky vhodné, živin a růstových faktorů je dostatek, buňky přejdou bodem restrikce do fáze *S*
- replikace DNA pokračuje, i když po překonání bodu restrikce jsou růstové faktory odstraněny
- vnějšími faktory další průchod cyklem neovlivní (mohou jej pozastavit jen faktory vnitřní, např. poškození DNA)
- buňky, které nezískají adekvátní signály pro průchod cyklem, bod restrikce nepřekročí: zůstanou v *G1* (resp. *G0*) nebo odumřou apoptózou

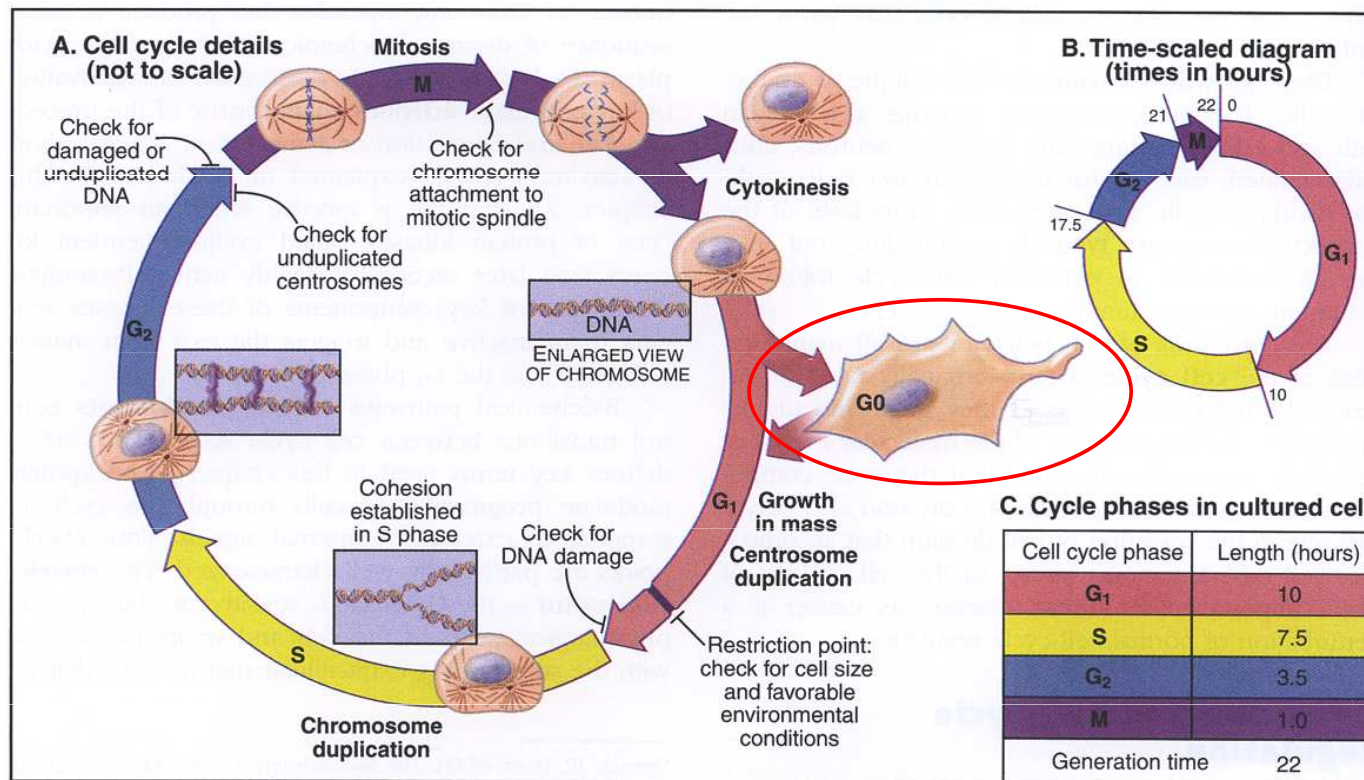
Fáze G1

- buňka je schopna reagovat na **mimobuněčné signály**: **mitogenní a anti-mitogenní růstové faktory** (citlivost končí bodem restrikce)
- buňka se rozhoduje, zda bude v cyklu pokračovat nebo jej opustí a vstoupí do fáze G0
- stejnému signálu jsou vstaveny sousedící buňky - koordinace v rámci tkáně



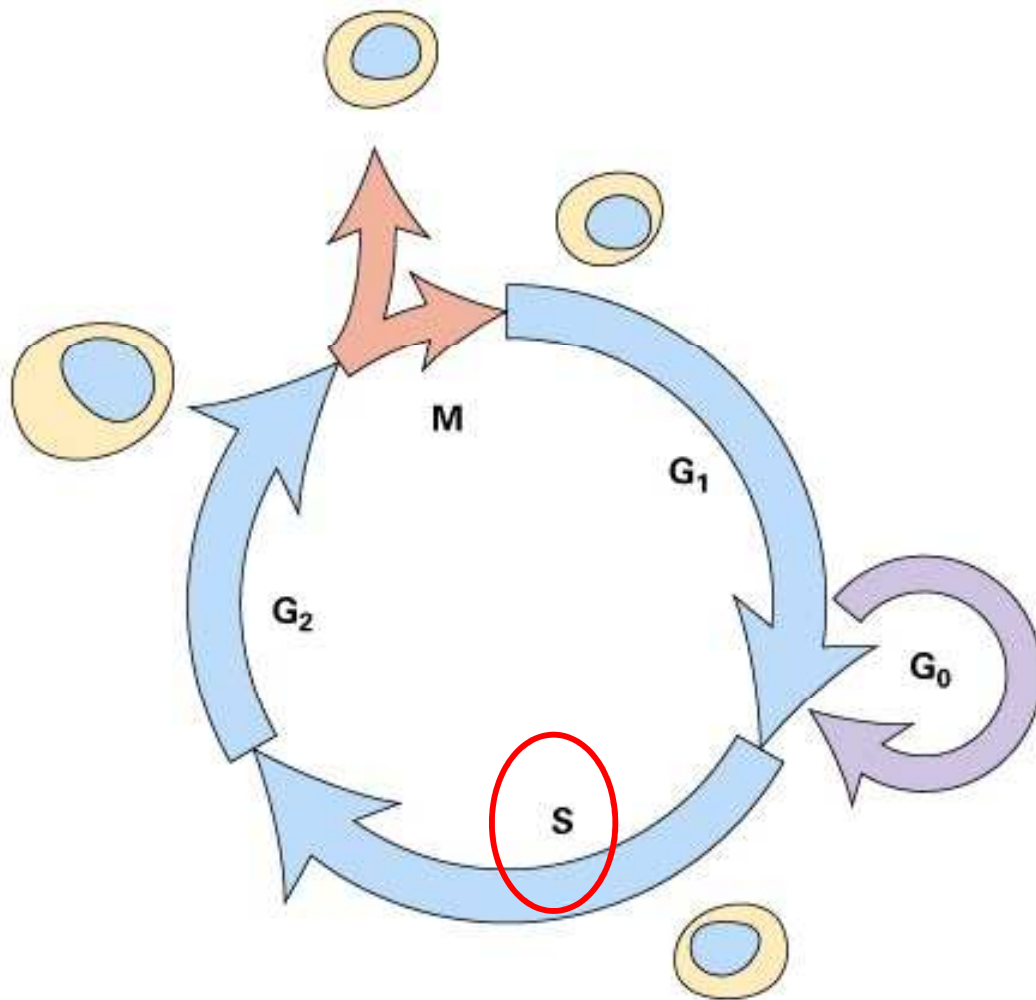
Fáze G0

- fáze, ve které se nachází většina buněk mnohobuněčných organismů: jsou diferencované a specializované k výkonu určité funkce, nedělí se
- není to klidová fáze: aktivní proteosyntéza, sekrece, pohyblivost
- možnost opětného vstupu do buněčného cyklu po přijetí určitého signálu



Fáze S

- část interfáze, při které dochází k replikaci DNA



ve fázi G_2 má proto buňka dvojnásobný obsah DNA ve srovnání s buňkou ve fázi G_1

Fáze S

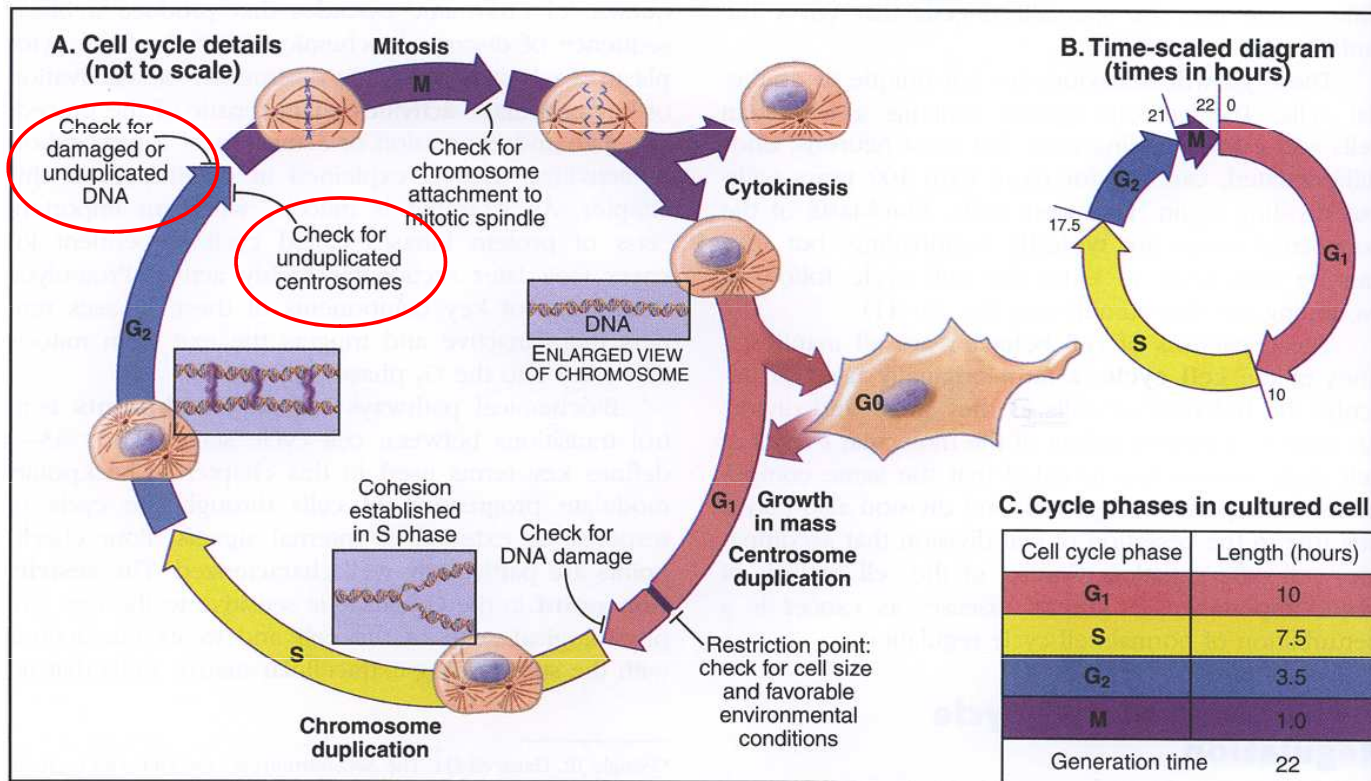
- k iniciaci replikace dochází na místech **ori**- problém koordinace:
 - nutnost zajištění úplné replikace každého chromozomu
 - nesmí dojít k opakované iniciaci ze stejného **ori** v rámci jednoho replikačního cyklu
- výsledkem fáze S jsou molekuly DNA v každém z párů duplikovaných chromozomů, které pohromadě drží speciální proteinové vazby

Princip kontroly fáze S:

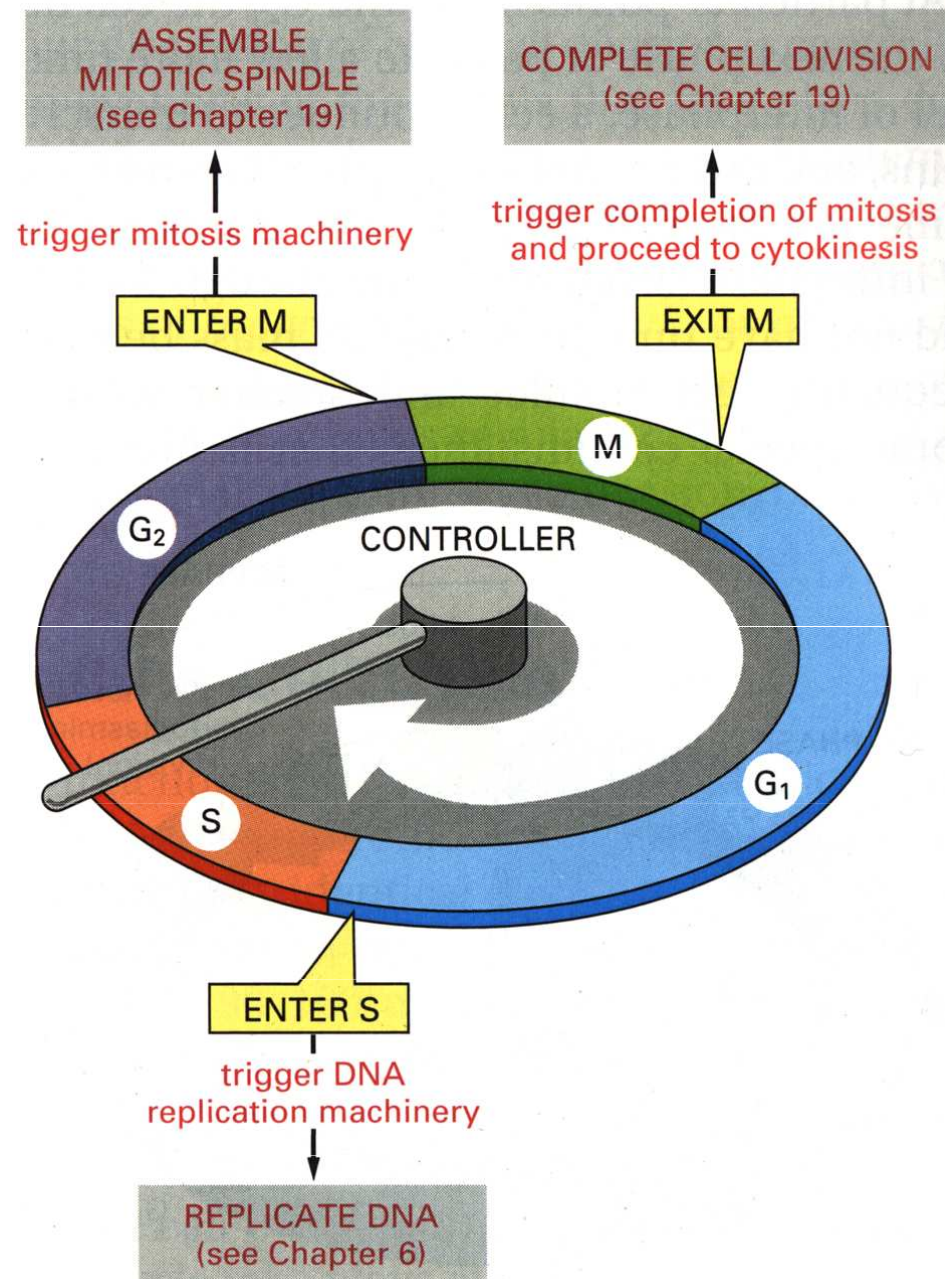
- Během fáze G1 se chromozomy modifikují navázáním proteinu **RLF** („replication licensing factor“) do oblasti **ori**, což představuje signál, že replikace dané oblasti chromozomu může proběhnout (pre-replikační komplex). Během replikace RLF místo **ori** opouští a může se na něj znovu navázat až po dokončení fáze M.

Fáze G2

- je fází, ve které buňky provádějí kontrolu DNA a připravují se na mitózu
- v případě, že je nalezena nereplikovaná nebo poškozená DNA, nebo nedošlo k duplikaci centrozomu (**kontrolní body v G2**), dochází ke spuštění protein kinázové kaskády, která znemožní zahájení mitózy
- poškození těchto kontrolních bodů může přispět k vzniku rakoviny



Zásadní buněčné procesy probíhají v přísné návaznosti



Časové odlišnosti buněčného cyklu

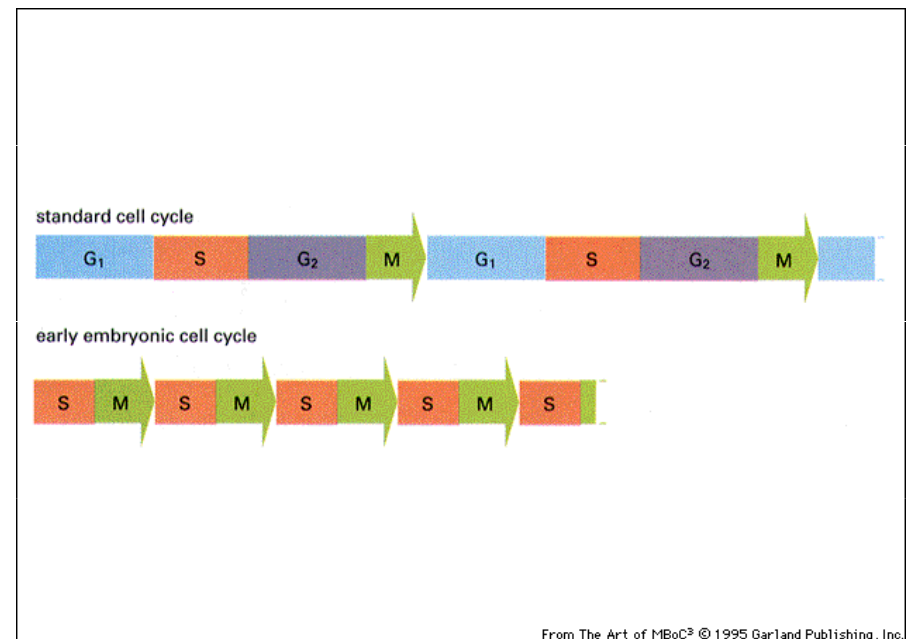
Existují

- buňky s výraznou strukturní a funkční specializací, které nemají schopnost dělení (nervové buňky, svalové buňky, červené krvinky)
- buňky, které se normálně nedělí, ale za určitých okolností se dělit mohou (jaterní buňky, lymfocyty)
- buňky, které se přirozeně dělí velmi rychle (epiteliální buňky, krevní kmenové buňky)

Časové nároky buněčného cyklu

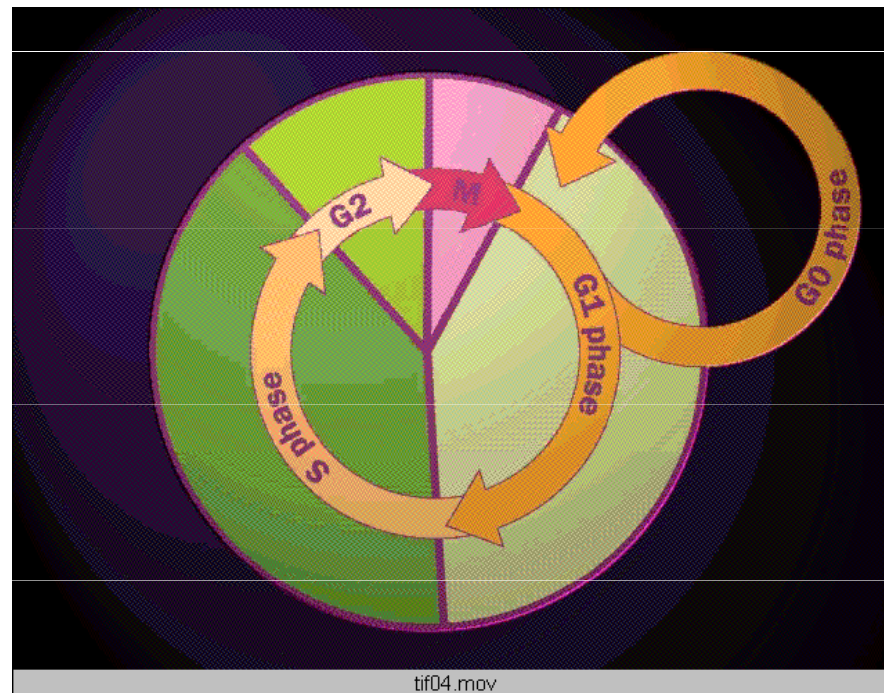
velmi variabilní, podle typu tkáně

- méně než 30 minut u některých embryí (obojživelníci)
- kvasinky 1,5 - 3 hod.
- buňky střevního epitelu 12 hod.
- savčí fibroblasty v kultuře 20 hod.
- savčí játra cca 1 rok
- typická rychle rostoucí lidská buňka má 24. hod. cyklus (G₁/11 hod., S/8 hod., G₂/4 hod., M/1 hod.)



Variabilita fází buněčného cyklu

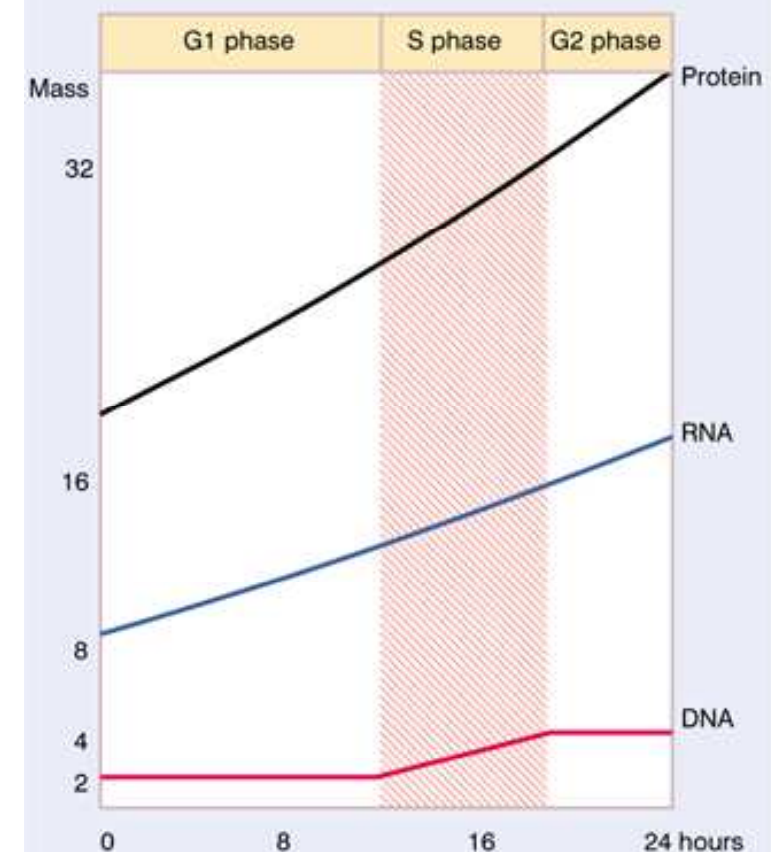
- nejvíce variabilní je fáze G_1
- většina buněk, které se přestanou dělit zůstává ve fázi G_0



Syntéza makromolekul během buněčného cyklu

- během interfáze je syntéza RNA a proteinů relativně konstantní
- během mitózy klesá syntéza proteinů a zastavuje se syntéza RNA
- všechny druhy proteinů s výjimkou histonů se tvoří průběžně během interfáze
- histony se tvoří výlučně ve fázi S

Figure 27.2 Synthesis of RNA and proteins occurs continuously, but DNA synthesis occurs only in the discrete period of S phase. The units of mass are arbitrary.



Buněčný cyklus a kvasinky

Výhody kvasinkového modelu:

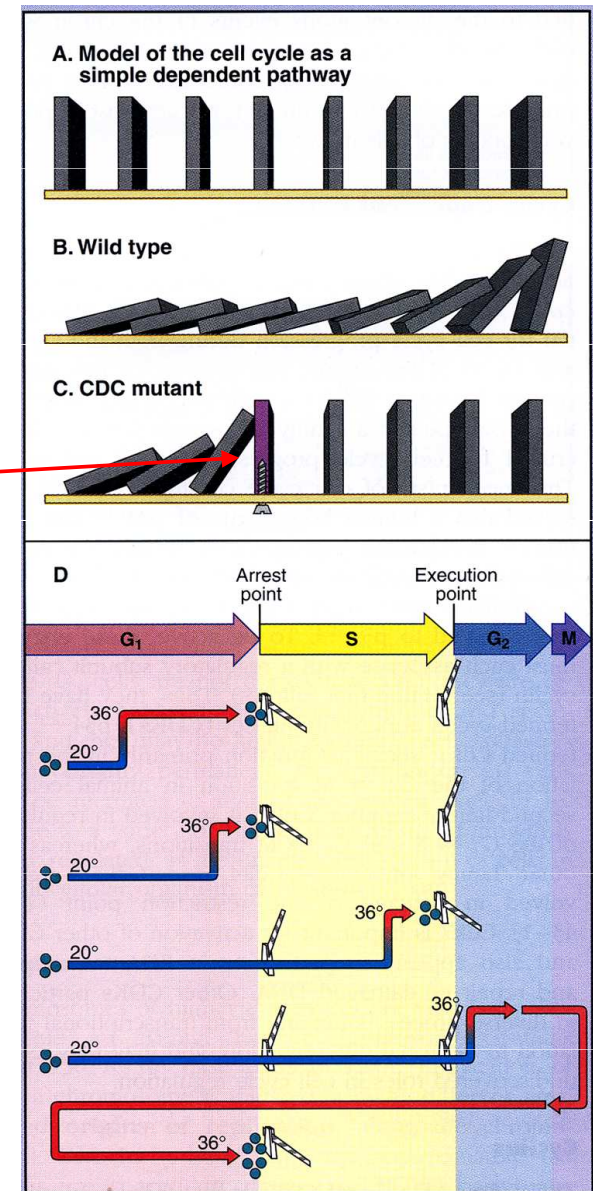
- dostupnost údajů o sekvenci (usnadnění charakterizace nových genových produktů)
- haploidní status, možnost přenosu cizorodé DNA, začlenění této DNA do chromozomu homologní rekombinací (usnadnění genetických analýz)
- snadná kultivace, vysoká rychlost cyklu
- možnost jednoduchého vyhodnocení fáze buněčného cyklu mikroskopickou analýzou morfologie buněk:
 - u pučících kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) nepřítomnost pupene - značí fázi **G1**, přítomnost pupene menšího než u rodičovské buňky - značí fázi **S**, přítomnost pupene podobné velikosti jako u rodičovské buňky - značí fázi **G2**
 - u štěpících se kvasinek (*Schizosaccharomyces pombe*) lze na fázi cyklu usuzovat z délky buněk

Buněčný cyklus je sled navazujících fází

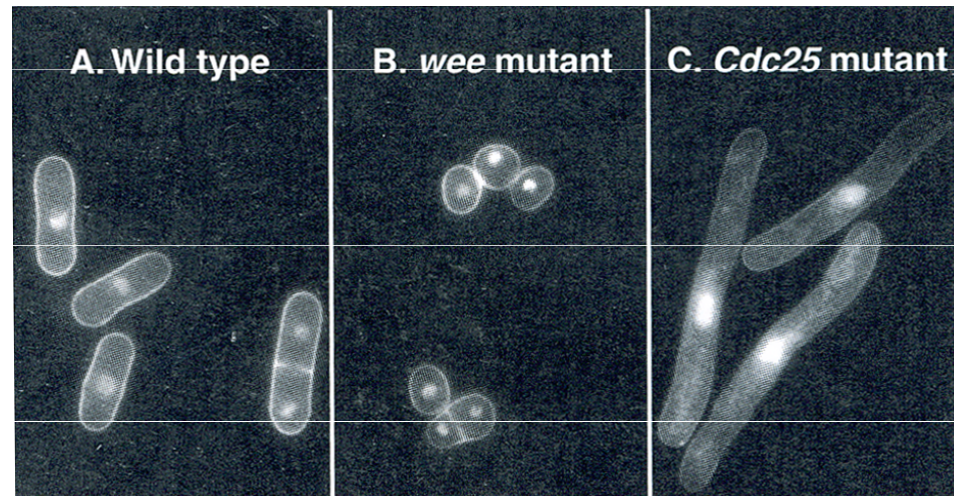
Ze studia cyklu u kvasinek vyplynulo, že nová fáze cyklu může nastat až po dokončení fáze předchozí - dominový efekt

Mutace v genech nutných pro průchod danou fází cyklu (*cdc*) se projeví synchronizací celé populace kvasinkových buněk - jejich cyklus se zastaví ve stejné fázi

Geny *cdc* jsou esenciální, proto kvasinky defektní v *cdc* nejsou životaschopné - připraveny podmíněčně letální mutanti



Mutace v genech *cdc* se projeví uniformním fenotypem všech mutantů



A: *S. pombe* divokého typu

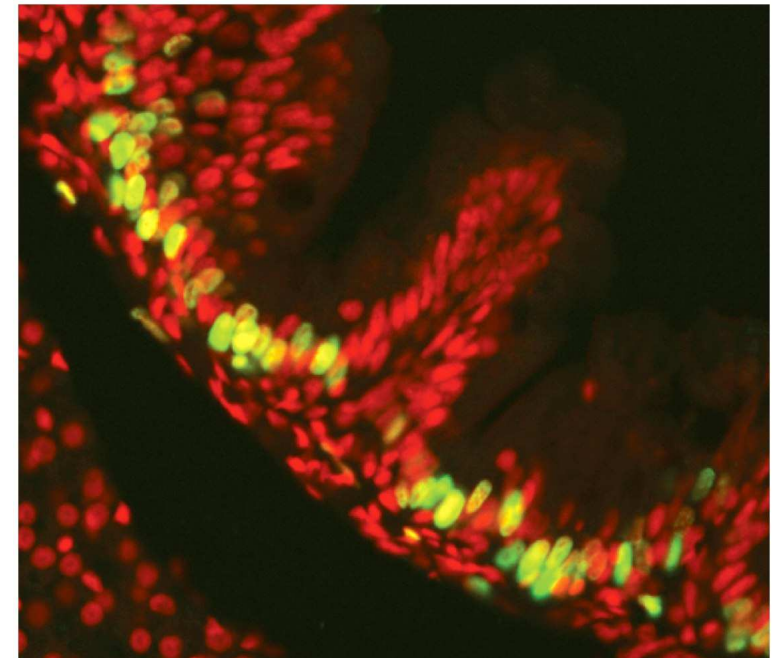
B: *S. pombe* s mutací v genu *wee1*, která urychluje vstup do mitózy

C: *S. pombe* s mutací v genu *cdc25*, která znemožňuje vstup do mitózy

Přístupy k analýze buněčného cyklu

Mikroskopie:

- sledování cytokineze
- sledování mitózy:
 - zviditelnění kondenzovaných chromozomů např. fluorescenčními barvivy, která se vážou na DNA
 - zviditelnění mitotického vřeténka prostřednictvím specifických protilátek
- sledování S-fáze:
 - zviditelnění inkorporace značeného tymidinového analogu (BrdU) do DNA prostřednictvím anti-BrdU protilátek



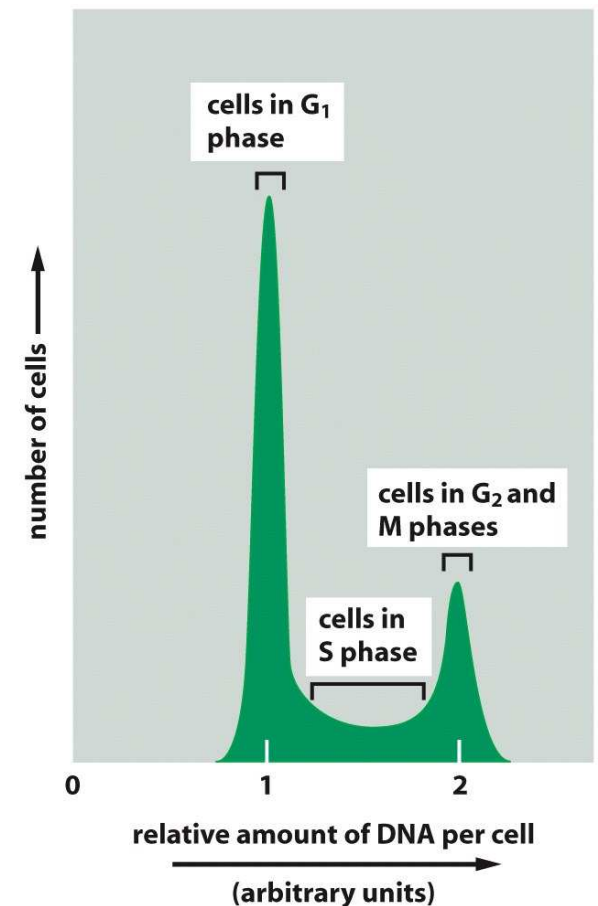
Přístupy k analýze buněčného cyklu

Průtoková cytometrie

- sledování obsahu DNA jednotlivých buněk v buněčných populacích

V nesynchronizované populaci proliferujících buněk bývá 30-40% buněk ve fázi S, které lze odečíst po krátkém označení buněk BrdU jako *tzv. labelling index*: naznačuje trvání S fáze

Velikost frakce buněk v mitóze udává *mitotický index*, na základě kterého lze odhadnout dobu trvání M fáze.



Řízení buněčného cyklu

Otázky:

Jaký mechanismus řídí střídání syntézy DNA, mitózy a cytokineze?

Existuje oddělený řídicí systém nebo se procesy syntézy DNA, mitózy a cytokineze nějak řídí navzájem samy?

Po mnoho let záhada.

Koncem 80. let 20 stol. identifikovány klíčové proteiny řídicího systému proteiny CDK a cykliny

Řízení buněčného cyklu

Proč?

- reakce na velikost buněk a mimobuněčné signály (živiny, růstové faktory, stresové faktory, poškození DNA)
- koordinace návaznosti fází (M fáze nesmí začít před dokončením replikace, replikace DNA se nesmí opakovat dokud buňka neprojde M fází)

Principy řízení cyklu

- poškozená DNA se nesmí replikovat
- mitóza nesmí začít před dokončením replikace
- poškozená DNA nesmí být předána do dceřinných buněk
- chybně spárované chromozomy nesmí dokončit mitózu

Principy regulace buněčného cyklu

I. Posttranslační modifikace

- fosforylace

- proteolýza

II. Řízení buněčného cyklu

III. Kontrolní body buněčného cyklu

Principy regulace buněčného cyklu

I. Posttranslační modifikace

- fosforylace

- proteolýza

II. Řízení buněčného cyklu

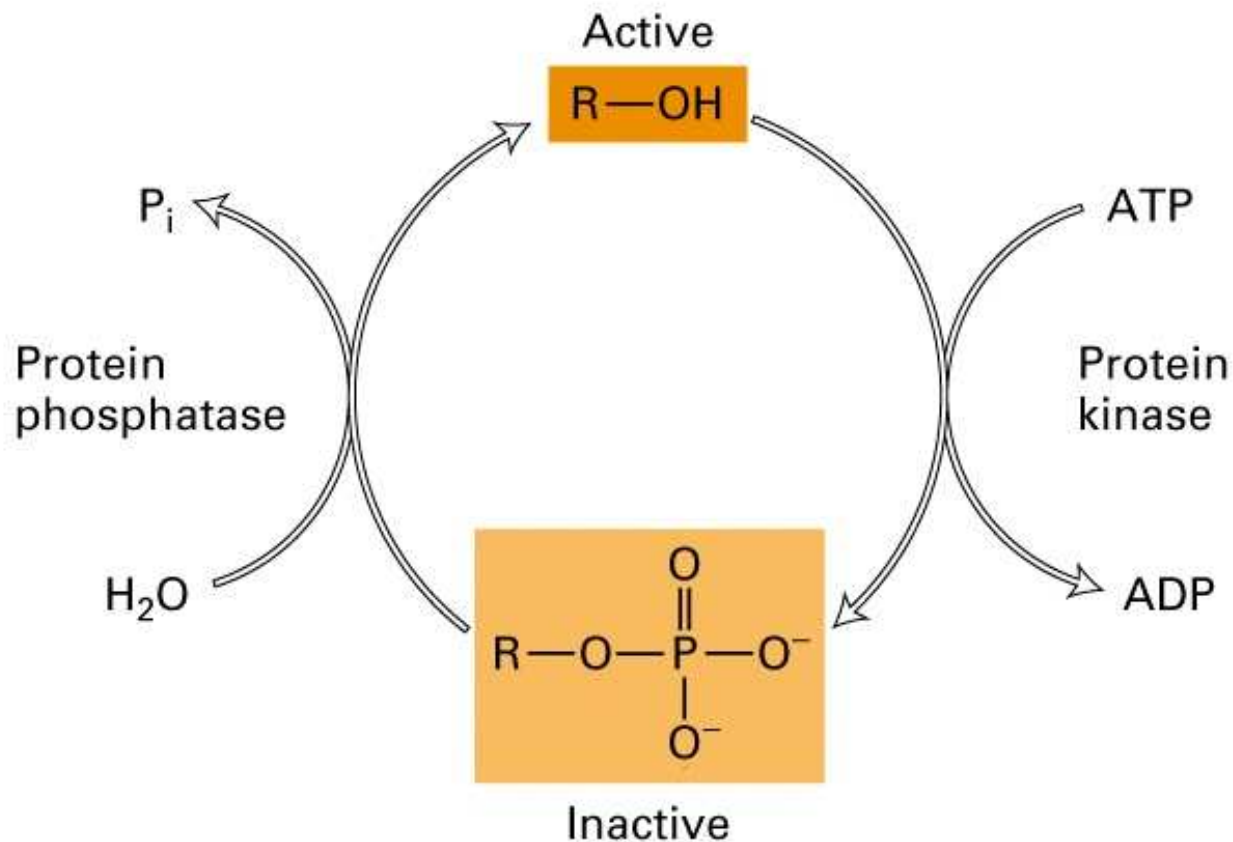
III. Kontrolní body buněčného cyklu

Přehled chemických modifikací

- kovalentní vazba chemické skupiny k aminokyselině proteinu
- typy modifikací:
 - acetylace (obvykle na 1. aminokyselině)
 - **fosforylace (obvykle spojena s regulacemi)**
 - lipidace (připojení k membráně)
 - glykosylace (obvykle vně buňky)

Modifikace proteinů fosforylací

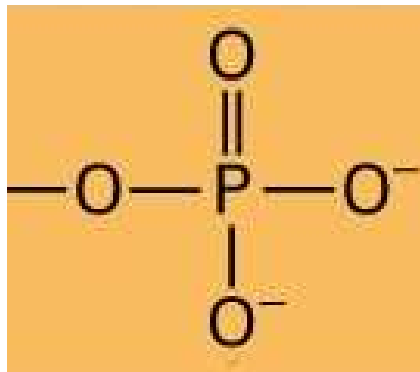
- fosfátové skupiny jsou připojeny protein kinázami
- fosfátové skupiny jsou odstraněny fosfatázami



Fosforylace často mění strukturu a funkci proteinů

Proč je fosforylace tak běžným mechanismem regulujícím aktivitu proteinů?

- je reverzibilní
- velké negativní náboje fosfátové skupiny mohou způsobit významné změny ve struktuře proteinů, které ovlivní jejich funkci



Proteinové kinázy

- katalyzují vazbu fosfátových skupin k proteinům (tzv. fosforylaci)
- fosfátové skupiny přenášejí z ATP (za vzniku ADP)
- řídí aktivitu mnoha buněčných proteinů
- proteiny mohou být fosforylovány na mnoha místech
- hlavní regulátory buněčného cyklu a buněčných signalizací

Rozklad proteinů

- nepotřebné proteiny se rozkládají proteázami (proteolýzou) na aminokyseliny
- často se využívá proteáz soustředěných do proteazomu
- regulace buněčného cyklu zahrnuje proteolýzu regulačních proteinů, což zajišťuje ireverzibilitu jednotlivých fází

Principy regulace buněčného cyklu

I. Posttranslační modifikace

- fosforylace
- proteolýza

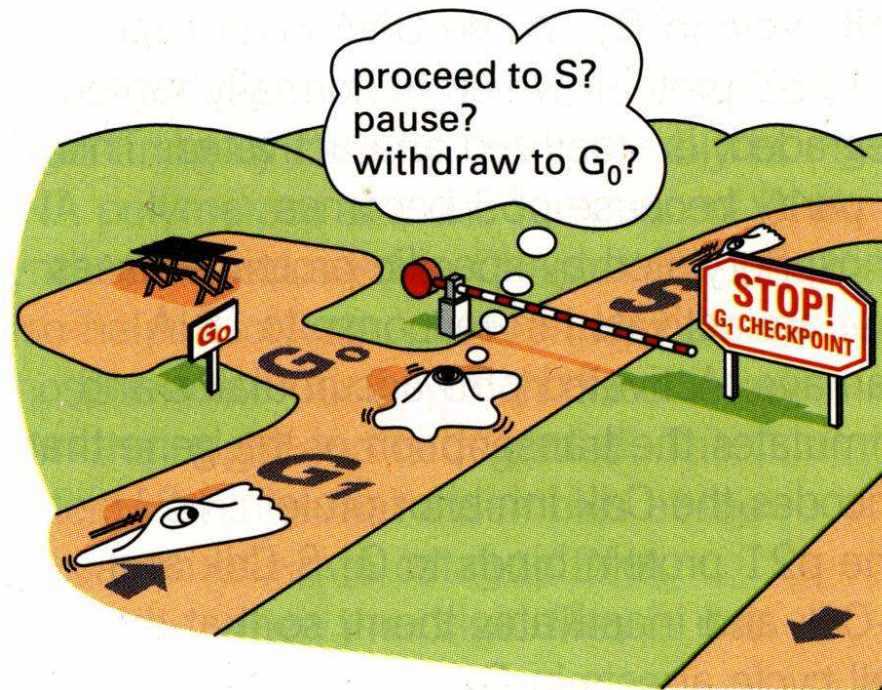
II. Řízení buněčného cyklu

A. Kontrolní body cyklu

B. Komplexy Cdk („cyclin-dependent kinase“)

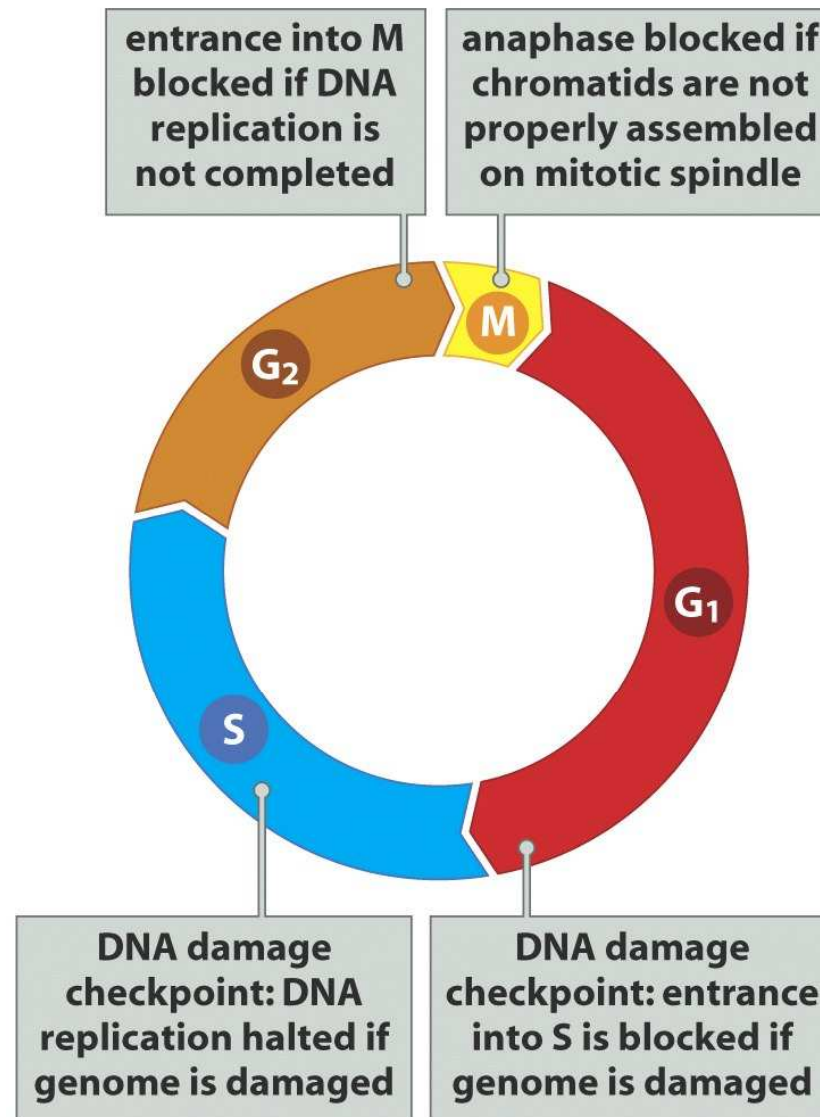
C. APC („anaphase-promoting complex“)

Kontrolní body buněčného cyklu („cell-cycle checkpoints“)

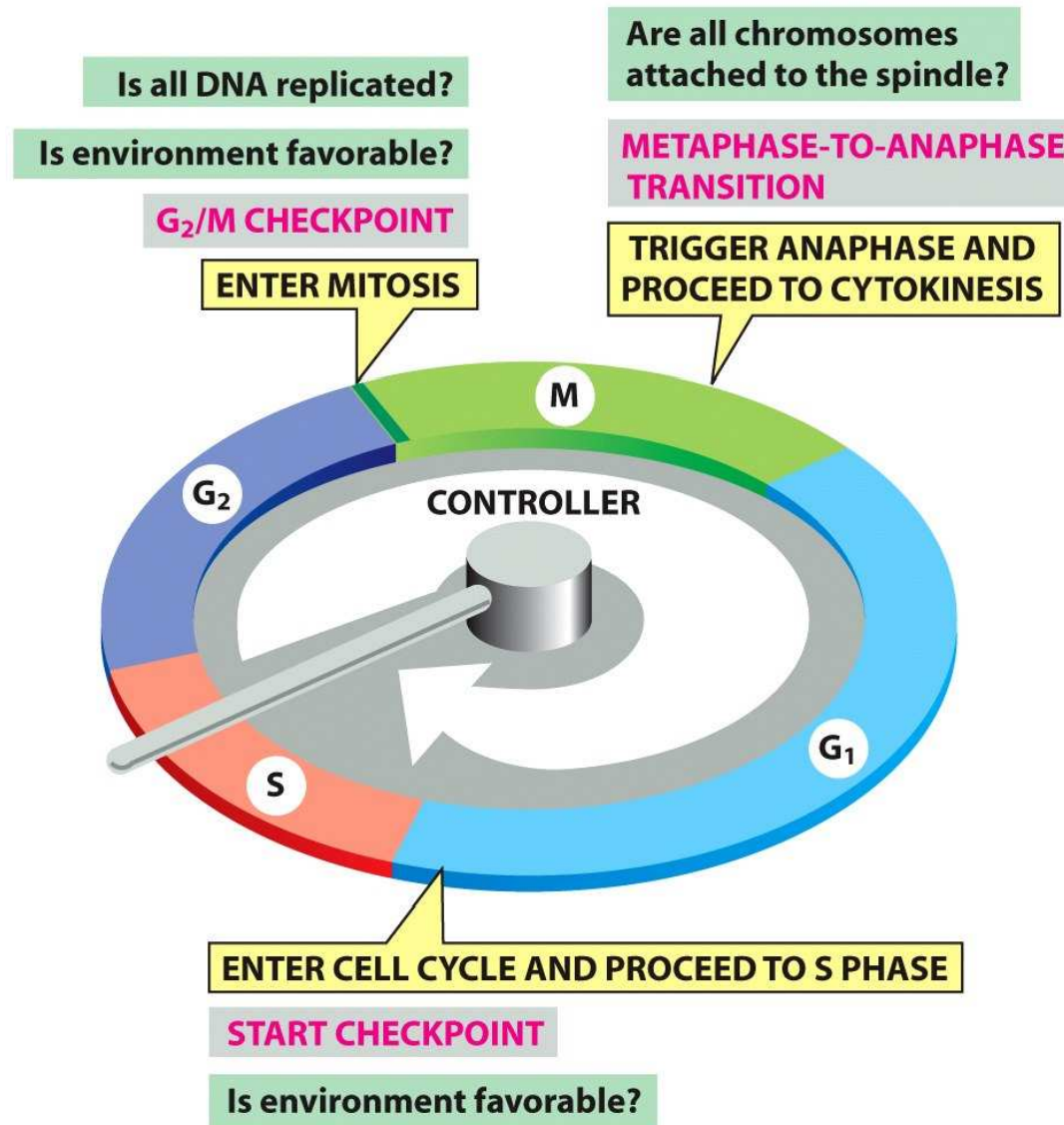


- sensory sledují klíčové děje buněčného cyklu a poskytují řídicímu systému zpětnou vazbu
- je-li zaznamenána chyba, řídicí systém prodlouží danou fází cyklu (pozastaví jej v některém z kontrolních bodů, aby chyba mohla být opravena)

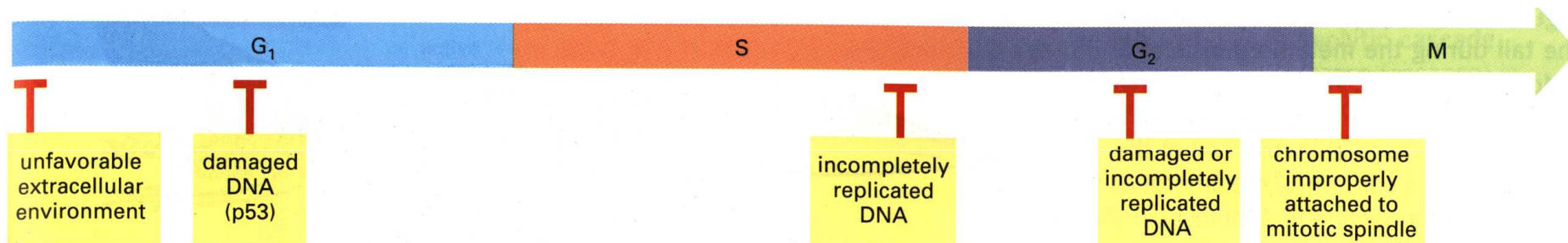
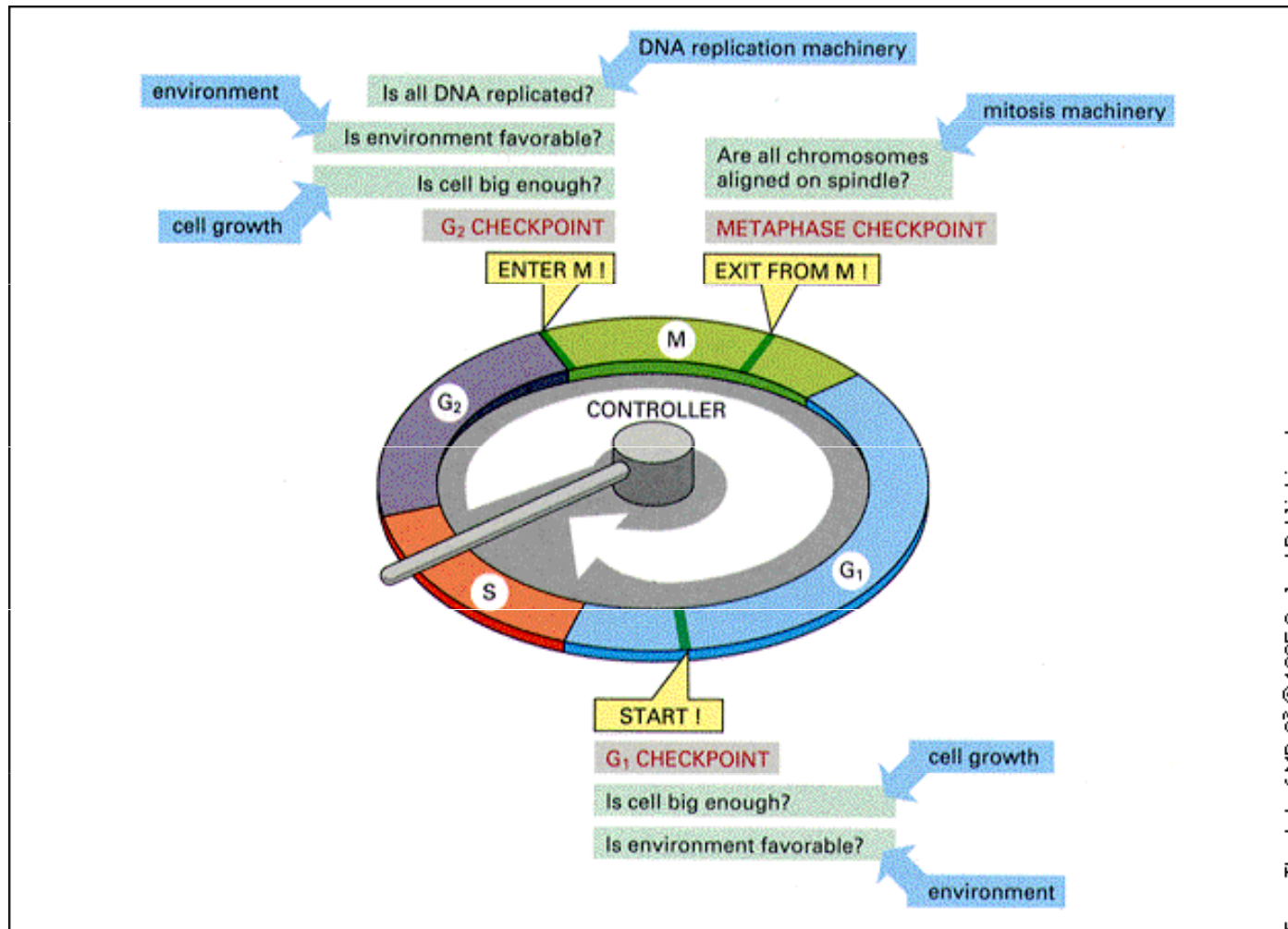
Čtyři hlavní kontrolní body cyklu



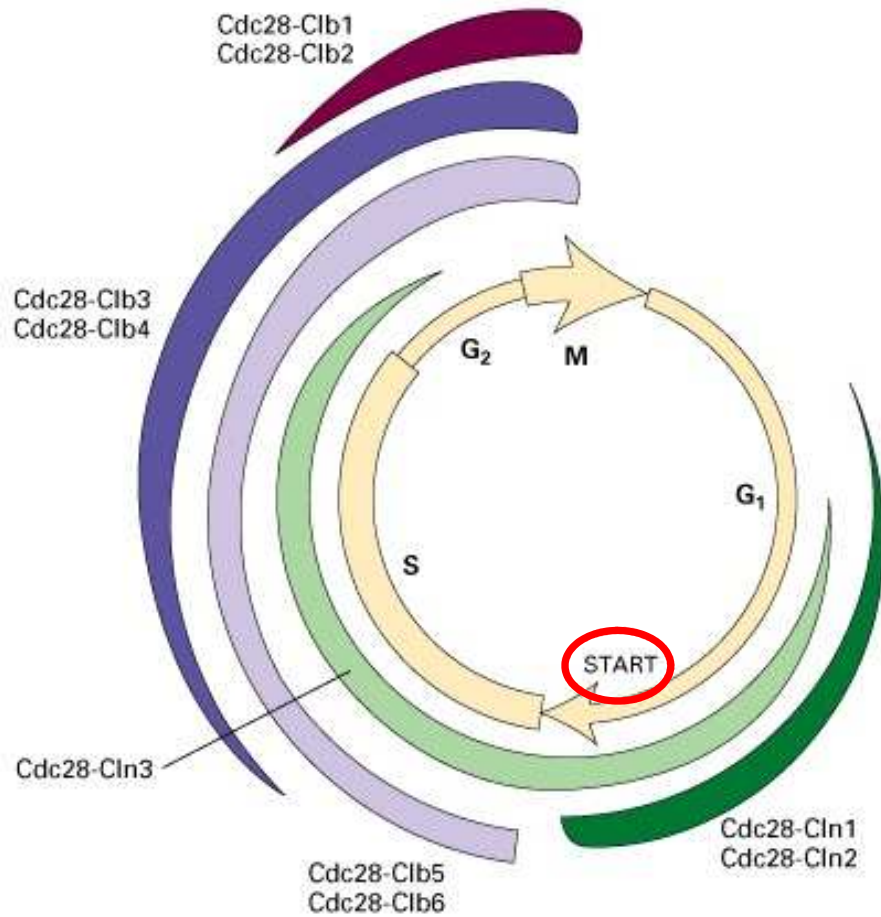
Kontrolní body - molekulární brzdy cyklu



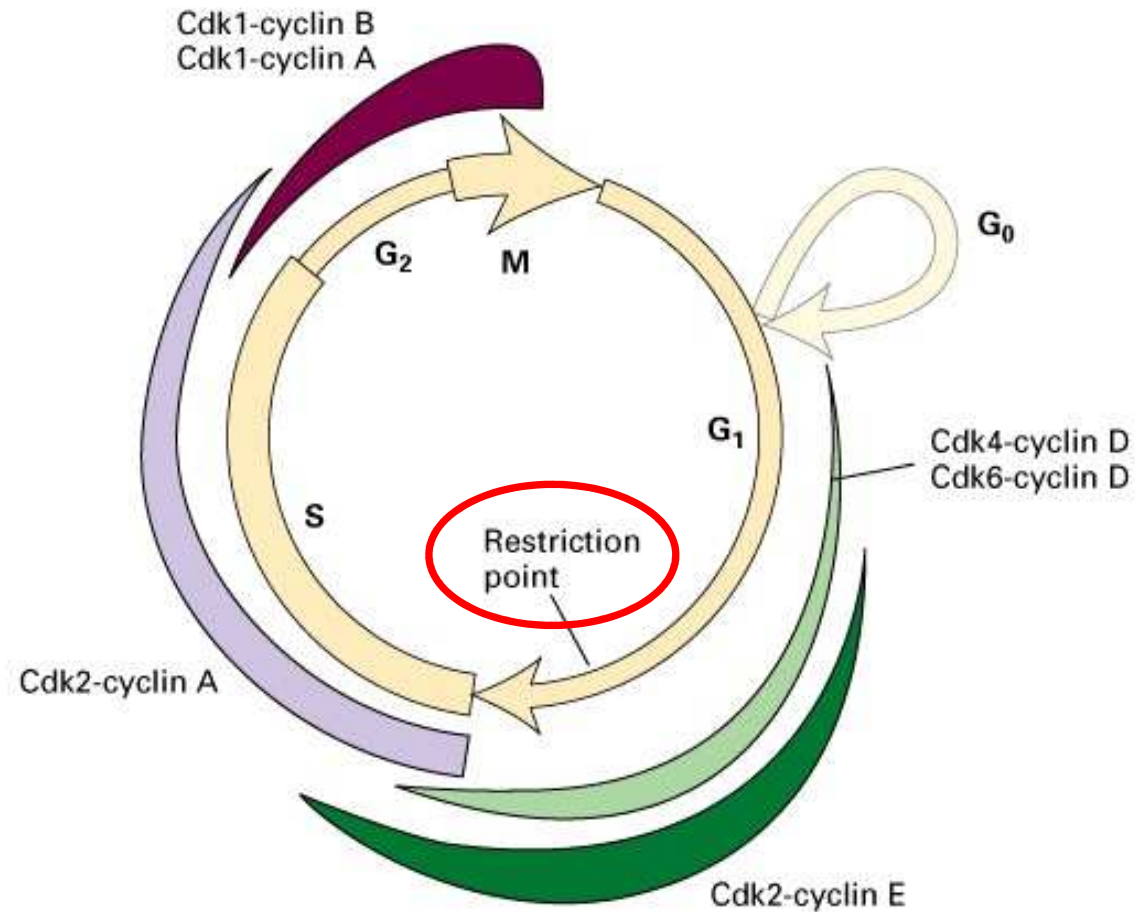
Existují další kontrolní body buněčného cyklu



Bod restrikce/START je v pozdní fázi G_1



Kvasinky



Savci

Sledování celistvosti DNA

- buňky s poškozenou nebo částečně replikovanou DNA zastavují svůj postup cyklem **v pozdní fázi G1 nebo G2**
- porucha je před obnovením cyklování buď odstraněna nebo buňka odumírá apoptózou

Metafázový kontrolní bod

- kontroluje sestavení mitotického vřeténka
- oddaluje okamžik separace chromatid, dokud nejsou všechny chromozomy řádně připojeny k vřeténku

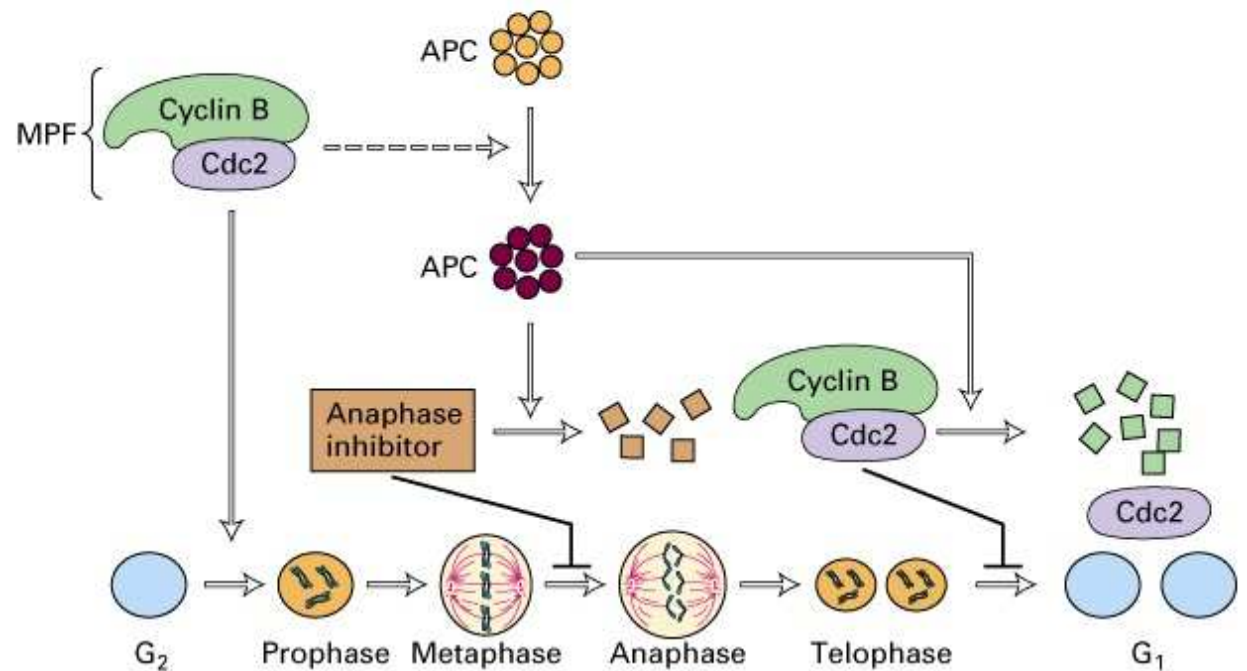
Mechanismus řídicí buněčný cyklus vnímá vnitřní i vnější buněčné podněty

Vnitřní podněty: průběžné monitorování stavu DNA a stav připojení chromozomů k dělicímu vřeténku v M-fázi

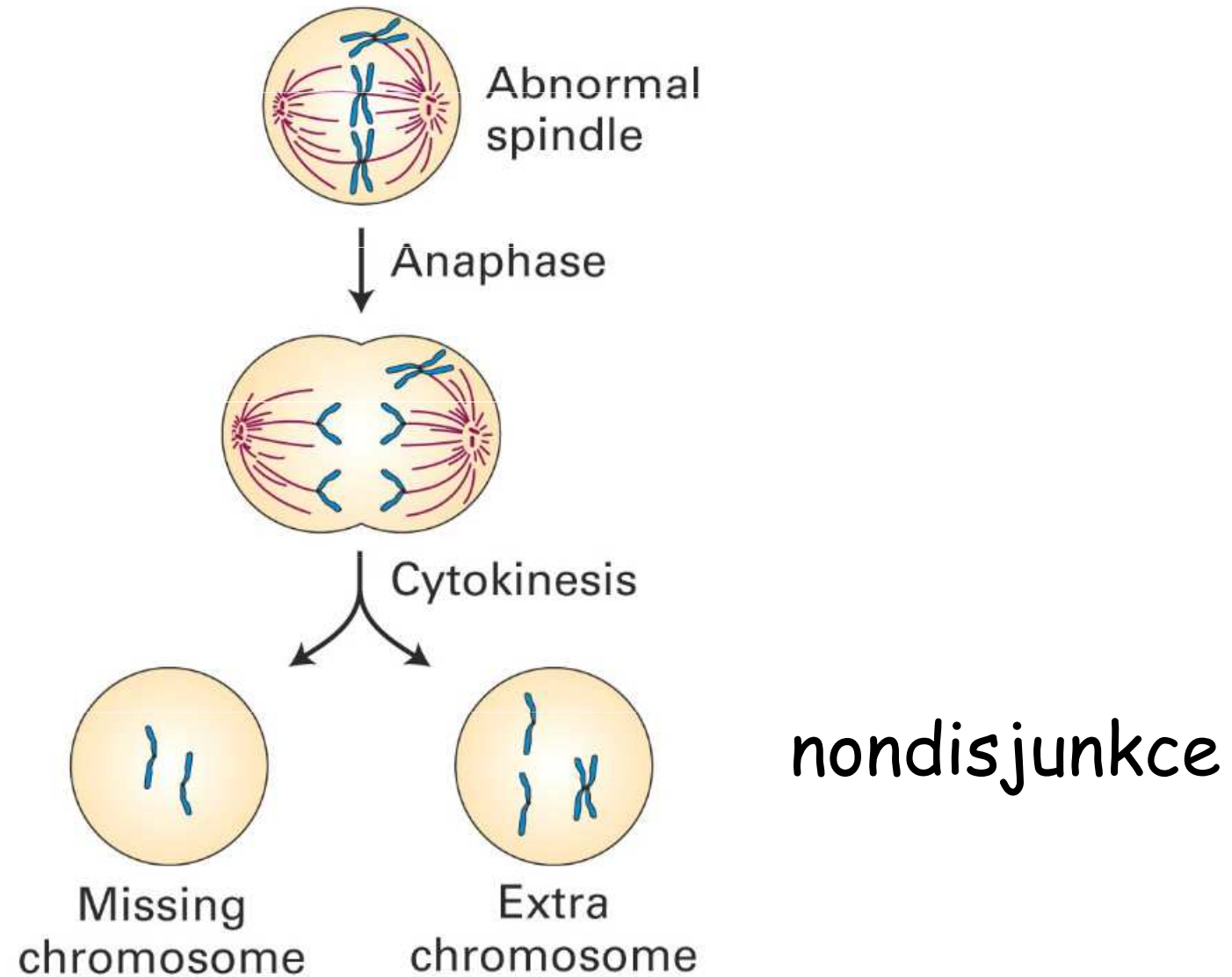
Kinetochory poskytují kontrolnímu bodu ve fázi M informaci o stavu interakcí mezi chromozomy a vřeténkem. Tento kontrolní bod požaduje „potvrzení“ o připojení všech chromozomů k mikrotubulům vřeténka, aby umožnil pokračování cyklu do anafáze.

Kinetochory, které nejsou připojeny k vřeténkům aktivují signální dráhu, která udržuje APC („anaphase promoting complex“) v inaktivním stavu - inhibice anafáze: cyklus se zastavuje.

Po připojení všech kinetochorů - APC se aktivuje, rozklad inhibitoru anafáze: cyklus pokračuje.



Nedostatečná funkce kontrolního bodu v M fázi vede k nerovnoměrné distribuci chromozómů v dceřinných buňkách



Mechanismus řídící buněčný cyklus vnímá vnitřní i vnější buněčné podněty

Vnější podněty jsou chemické a fyzikální povahy:

1. Chemické faktory:

- absence esenciálních živin zastavuje cyklus
- růstové a protirůstové faktory, pro které mají buňky povrchové receptory, ovlivňují cyklus

2. Fyzikální faktory:

- prostor („density-dependent growth“)
- povrch pro adherenci („anchorage-dependent growth“)

Poškození DNA: zastavení cyklu ve fázi G_1 a G_2

- chemické a fyzikální mutageny poškozující DNA zastavují cyklus ve fázi G_1 a G_2
- cyklus nemůže pokračovat do S nebo M fáze dokud není poškození opraveno
- zastavení buněčného cyklu (opravitelné poškození DNA) nebo programovaná buněčná smrt (rozsáhlé poškození DNA) je výsledkem aktivace nádorového supresoru p53, který zvýší hladinu inhibitoru Cdk p21

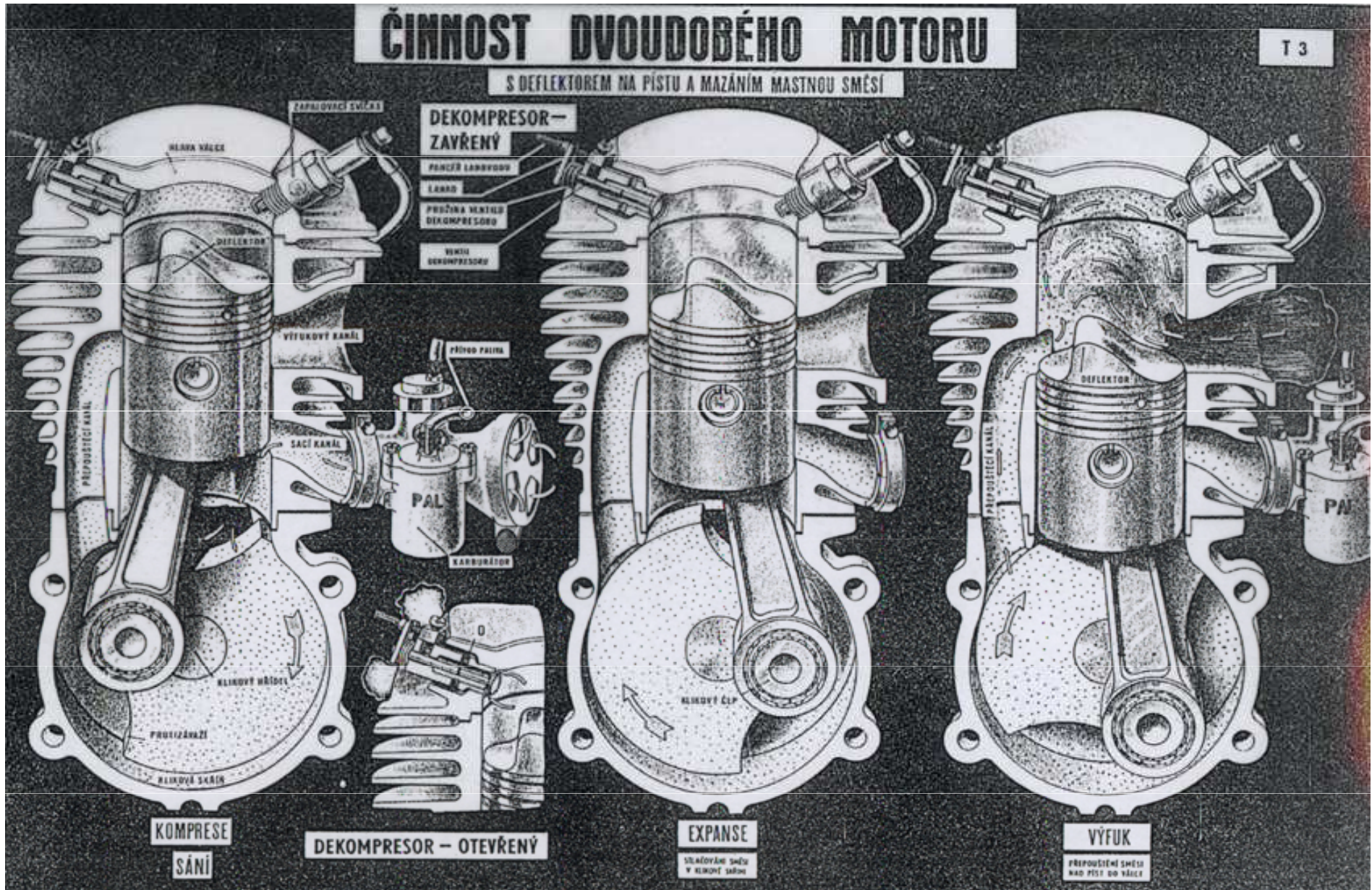
To divide or not to divide: that is the question

- buňky kvasinek se rozhodují podle své velikosti, která odráží dostupnost živin
- buňky savců se rozhodují podle přítomnosti růstových faktorů, zvaných mitogeny, které stimulují růst buněk, resp. anti-mitogeny, které růst tlumí

Biochemie buněčného cyklu

- průběh každou fází buněčného cyklu zajišťuje soubor specifických proteinů, jejichž aktivita je závislá na stupni fosforylace
- přechod mezi jednotlivými fázemi je řízen protein kinázami a fosfatázami
- klíčovými enzymy jsou protein kinázy aktivované cykliny specifickými pro danou fázi cyklu

Motor buněčného cyklu má složku výkonnou a řídicí podobně jako motor spalovací



Komplexy Cdk („cyclin-dependent kinases“) a cyklinů

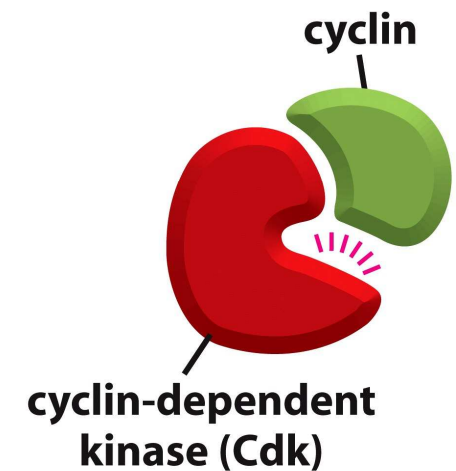
Heterodimerní protein kinázy složené ze dvou různých podjednotek, které fosforylují proteiny zajišťující buněčný cyklus

-regulační podjednotka: **cyklin**

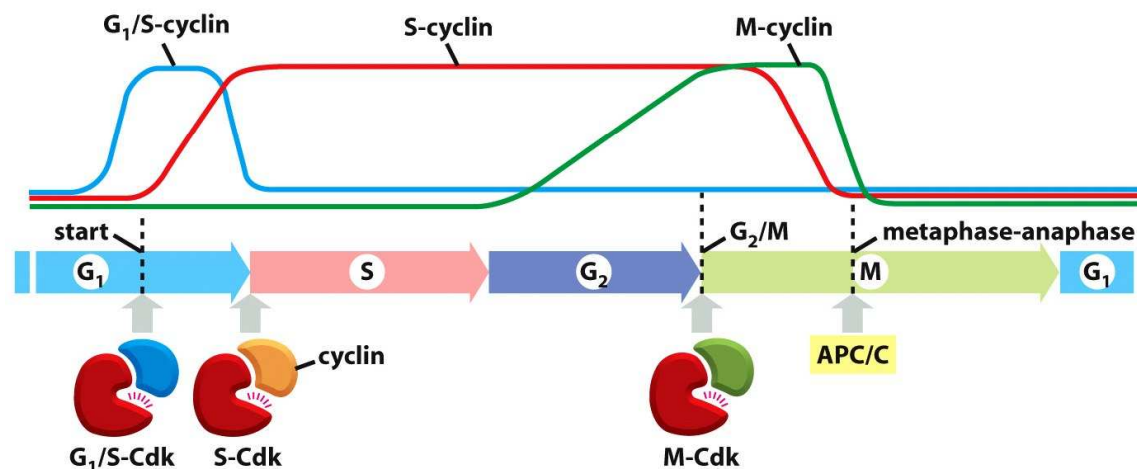
-katalytická podjednotka: **serinová/treoninová kináza Cdk**

-Cdk je aktivní jen za přítomnosti cyklinu

(**vazba cyklinu A zvyšuje enzymovou aktivitu CDK2 400.000x**)

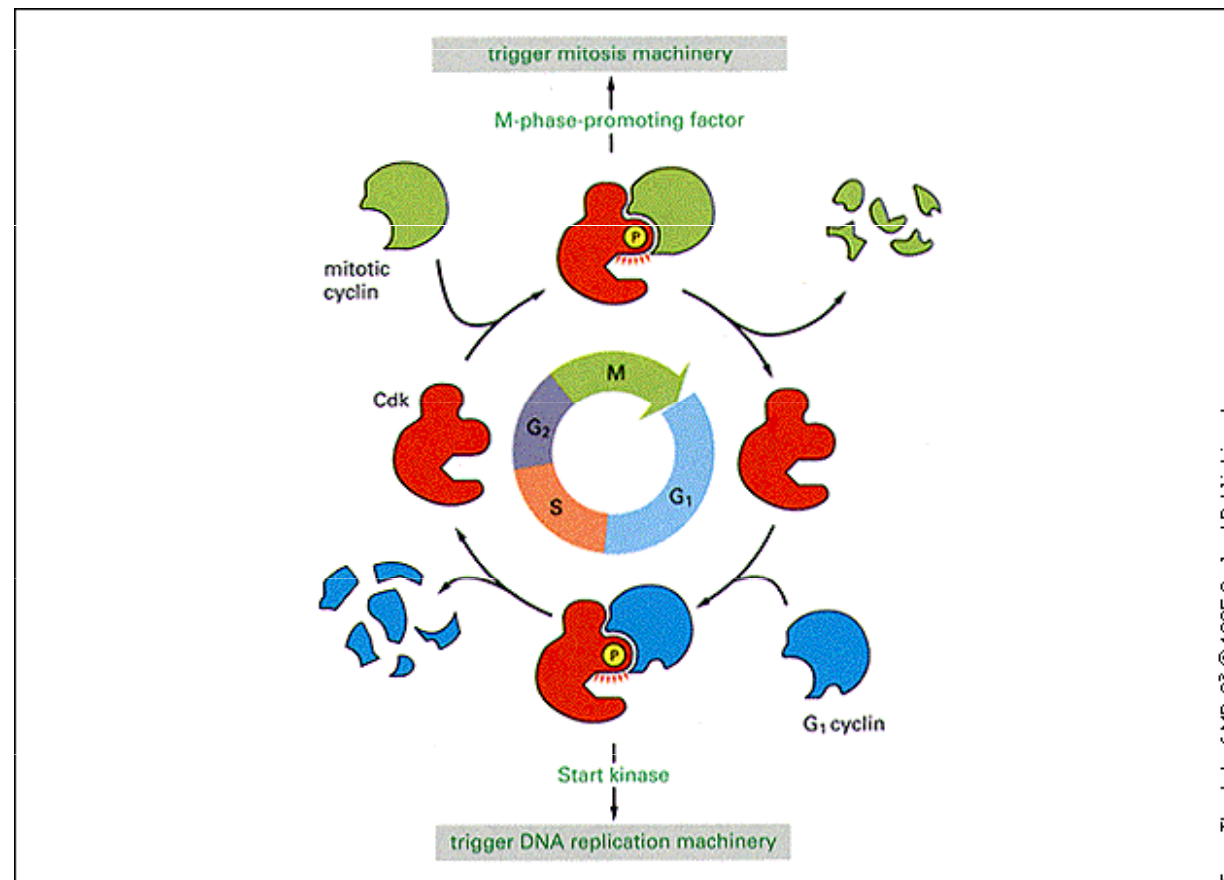


Pro každou fázi cyklu existují odlišné komplexy Cdk.



Aktivita Cdk je určována cykliny, které podléhají řízené degradaci

- cykliny jsou označeny **ubikvitinem**, což je předurčuje k rozkladu proteazomem za vzniku malých peptidů a uvolněných molekul ubikvitinu, které se mohou opět použít pro označení jiných proteinů
- nepřítomnost cyklinu inaktivuje Cdk



Cykliny

- regulační podjednotky kináz Cdk
- zapínají kinázovou (fosforylační) aktivitu Cdk
- napomáhají komplexům cyklin-Cdk rozeznávat a vázat správné substráty
- jejich hladina během cyklu pravidelně kolísá
- ve specifických okamžicích cyklu podléhají degradaci proteolýzou (výjimka - cykliny D)

Čtyři hlavní druhy cyklinů

- **Cykliny G1:** podílejí se na řízení aktivity cyklinů G1/S
- **Cykliny G1/S:** aktivují Cdk v pozdní G1, napomáhají překonání bodu restrikce, jejich hladina klesá na začátku fáze S
- **Cykliny S:** aktivují Cdk po průchodu bodem restrikce a pomáhají duplikaci chromozomů, hladina S fázových cyklinů zůstává zvýšena až do mitózy, protože tyto cykliny přispívají k řízení některých procesů rané mitózy.
- **Cykliny M:** aktivují Cdk, které stimulují vstup do mitózy po průchodu kontrolním bodem G2/M. Ve střední části fáze M jsou degradovány.

Table 17–1 The Major Cyclins and Cdks of Vertebrates and Budding Yeast

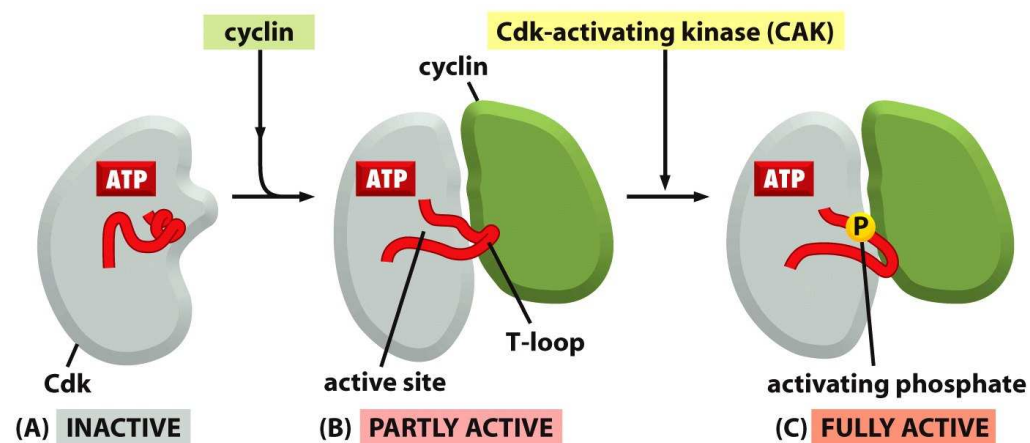
CYCLIN–CDK COMPLEX	VERTEBRATES		BUDDING YEAST	
	CYCLIN	CDK PARTNER	CYCLIN	CDK PARTNER
G ₁ -Cdk	cyclin D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G ₁ /S-Cdk	cyclin E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	cyclin A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
M-Cdk	cyclin B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

* There are three D cyclins in mammals (cyclins D1, D2, and D3).

** The original name of Cdk1 was Cdc2 in both vertebrates and fission yeast, and Cdc28 in budding yeast.

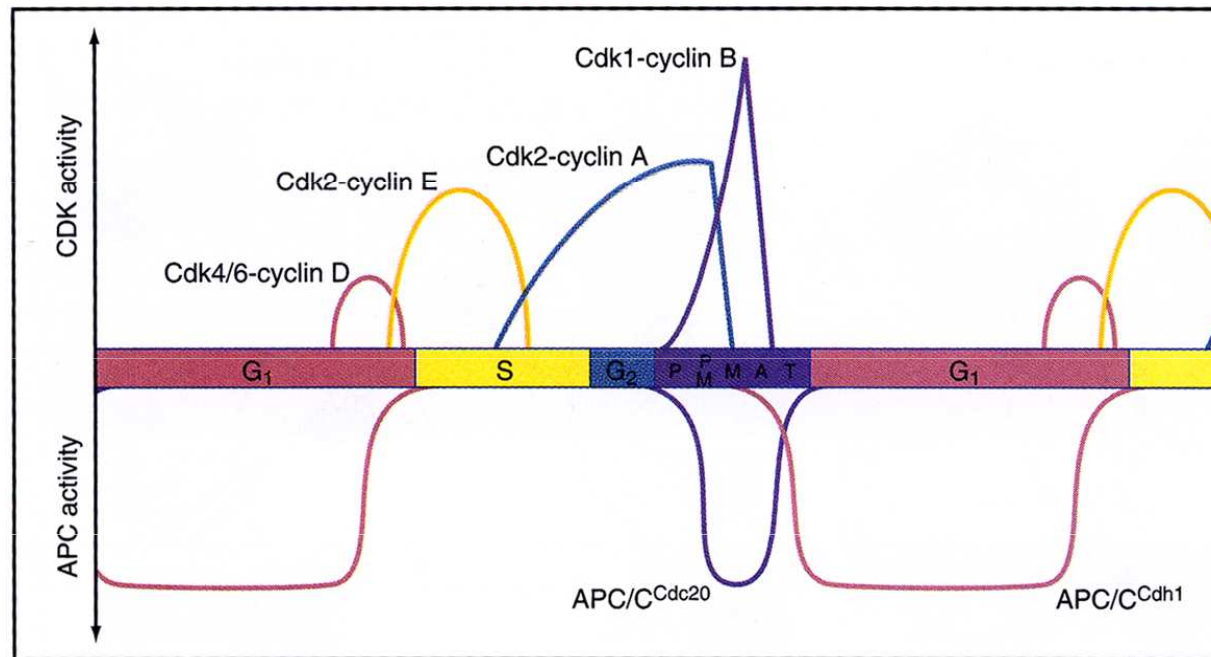
Funkce cyklinů

- cykliny nejenom aktivují Cdk, ale rovněž je navádějí k specifickým cílovým proteinům (substrátům)
- spektrum substrátů fosforylovaných stejným komplexem cyklin/Cdk se během cyklu mění tak, jak se mění přístupnost těchto substrátů
- krystalografie: 3 stavy komplexů cyklin/cdk
 - (A) inaktivní** - bez cyklinu, aktivní místo Cdk je blokováno částí proteinu zvanou T-smyčka
 - (B) částečně aktivní** - po navázání cyklinu na Cdk
 - (C) plně aktivní** - fosforylace specifického treoninu molekuly Cdk kinázou CAK (Cdk-activating kinase): zvýšení afinity pro substráty



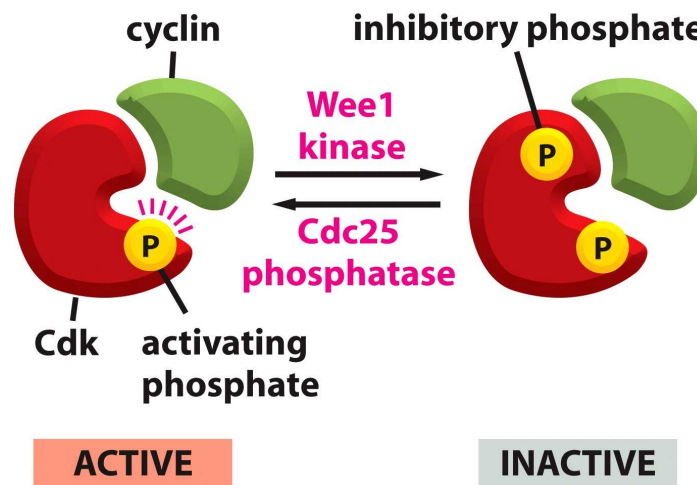
Cyklin-dependentní kinázy Cdk

- katalytické podjednotky komplexů Cdk-cyklin
- jejich aktivita se zapíná spojením s cykliny
- jejich aktivita (nikoliv koncentrace) pravidelně kolísá během cyklu
- fosforylují proteiny zodpovědné za průběh a regulaci buněčného cyklu



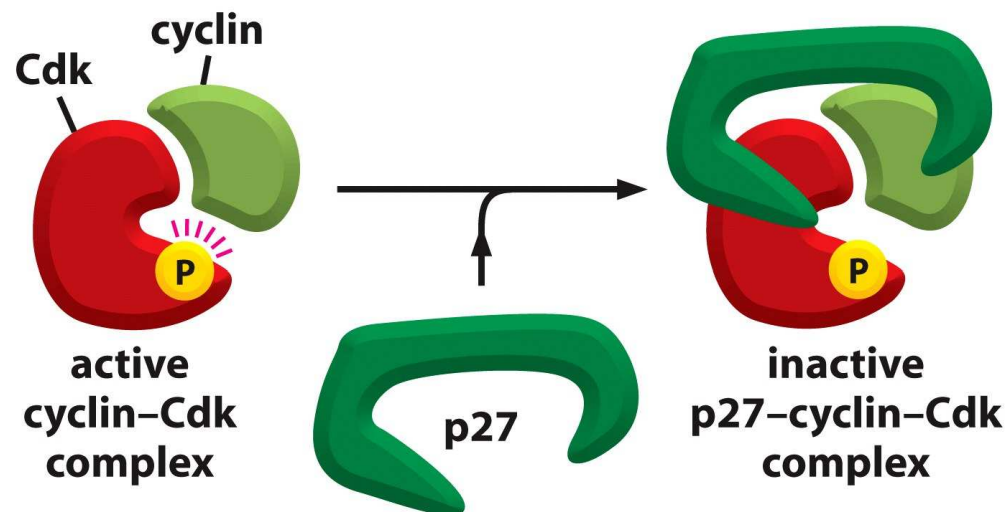
Inhibice cyklu fosforylací Cdk

- oscilace cyklinů primárně určuje aktivitu Cdk
- pomocné mechanismy přispívají jemné regulaci aktivity Cdk:
 - fosforylace dvojice aminokyselin v blízkosti aktivního místa kinázou Wee1 inhibuje aktivitu komplexu cyklin/Cdk
 - defosforylace těchto aminokyselin fosfatázou Cdc25 zvyšuje aktivitu komplexu cyklin/Cdk



Inhibice cyklu inhibičními proteiny CKI

- vážou se na komplexy cyklin/Cdk: změna struktury aktivního místa Cdk
- využívají se především při řízení aktivity komplexů cyklinů/Cdk fází G1/S a S



Řízení cyklu cyklickou proteolýzou

- likvidace cyklinů
- přechod z metafáze do anafáze

hlavním regulátorem je anaphase-promoting complex, nebo-li cyklozom (APC/C)

- ubikvitin ligáza
- katalyzuje přenos a vazbu mnoha kopií malého proteinu - ubikvitinu k specifickým cílovým proteinům
- takto označené proteiny jsou určeny k rozkladu proteazomem

Anaphase-promoting complex (APC/C)

- zajišťuje likvidaci 2 důležitých typů proteinů: sekurinu a cyklinů S a M fáze
- k aktivaci dochází uprostřed M fáze, aktivovaný stav přetrvává až do fáze G1 až do okamžiku, kdy dojde k akumulaci komplexů cyklinů G1/S a Cdk

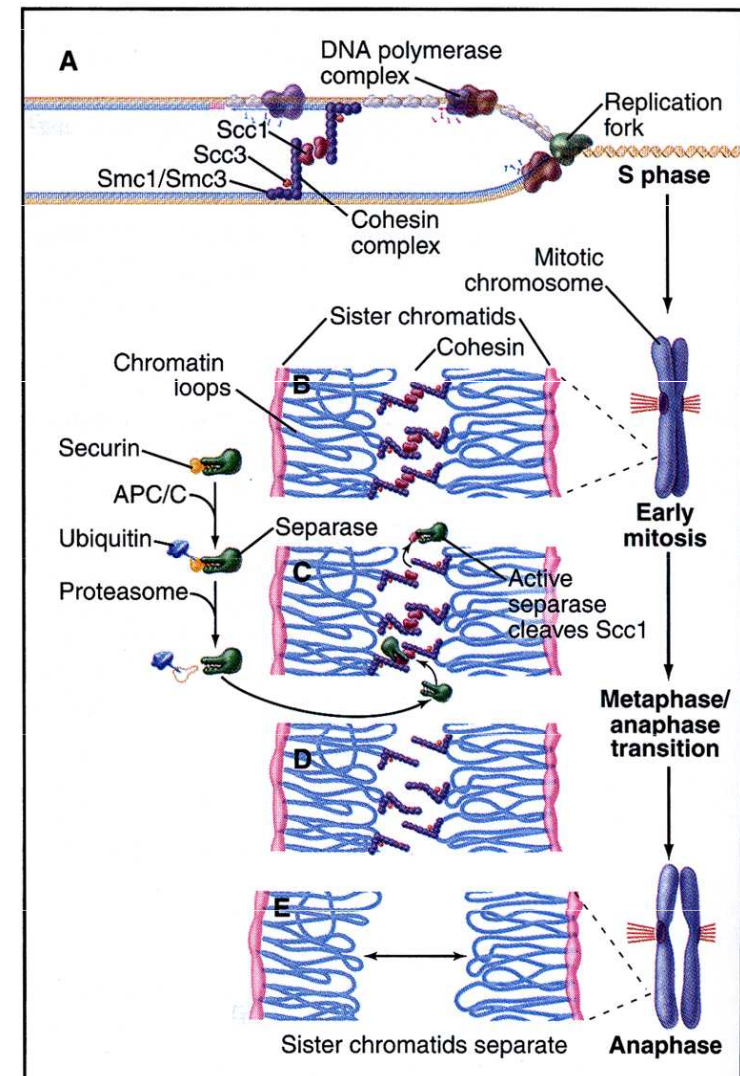
Hlavní substráty APC/C:

Inhibitor anafáze (sekurin): protein, který inhibuje předčasnou degradaci proteinů, zajišťujících spojení sesterských chromatid (např. kohezinu) v rané mitóze

- ubikvitinace a rozklad sekurinu vede k aktivaci separázy, která může štěpit kohezin a spojení chromatid je tak uvolněno - nastává segregace
- ubikvitinace sekurinu je inhibována až do okamžiku připojení kinetochorů všech chromozomů k mikrotubulům vřeténka

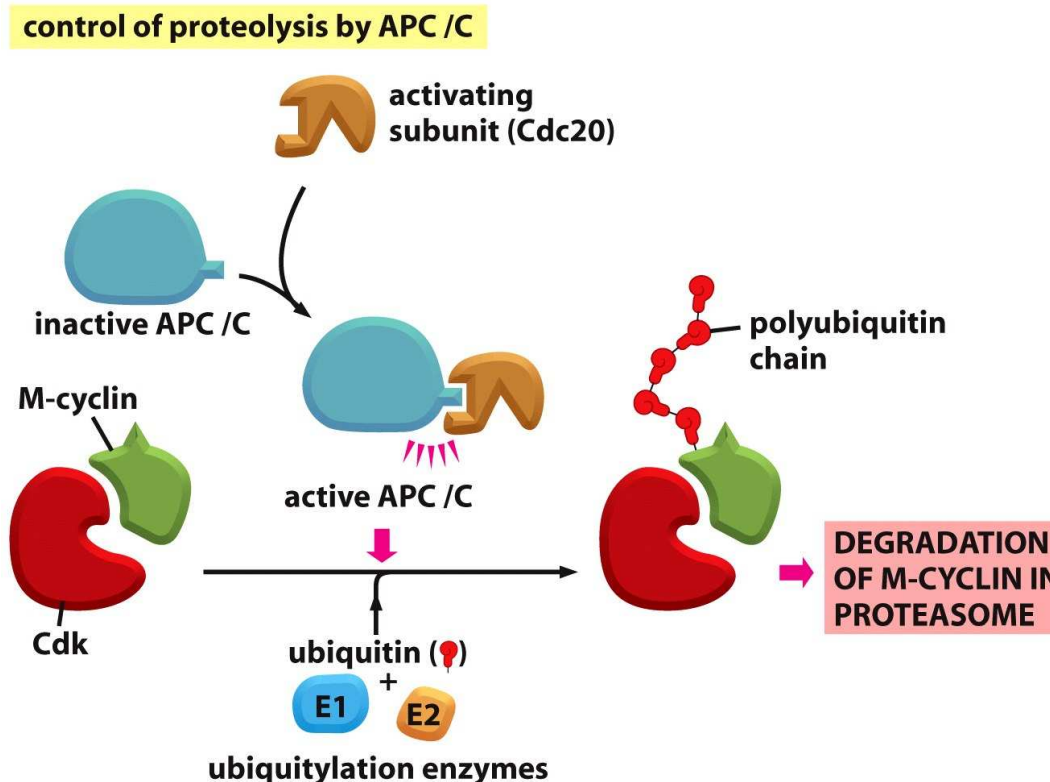
Cyklin B: regulátor mitotického komplexu Cdk (MPF)

- absence cyklinu B inaktivuje MPF a zakončuje mitózu
- absence kinázové aktivity MPF umožňuje konstitutivně aktivním fosfatázám odstranit fosfátové skupiny z proteinů, které byly fosforylovány MPF: zakončení mitózy



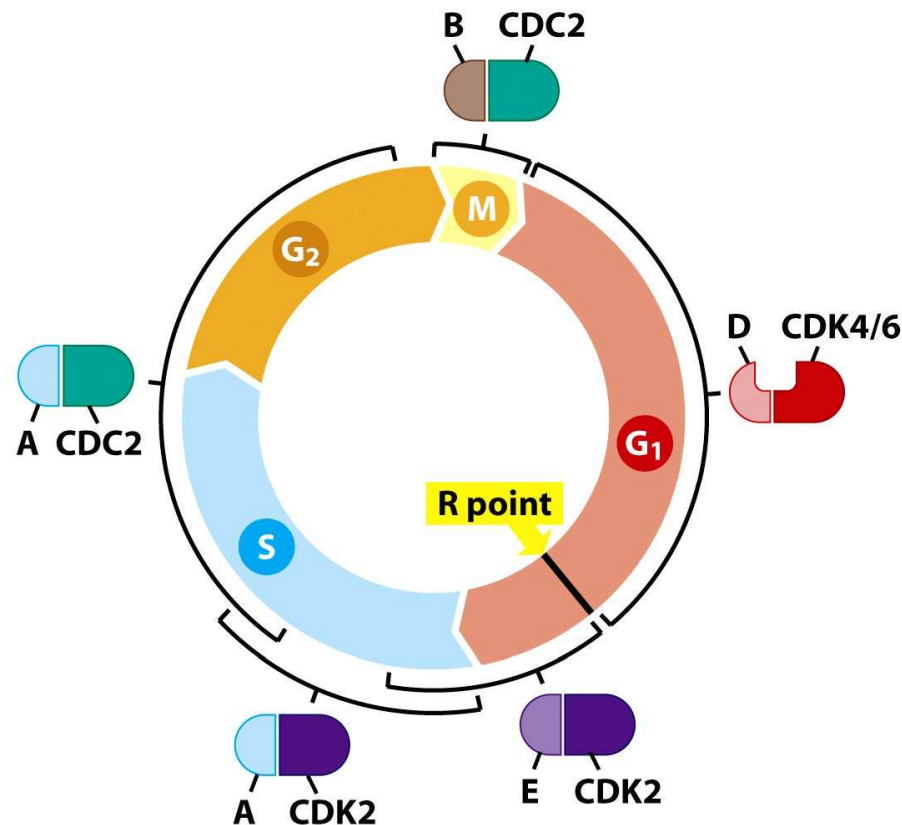
Anaphase-promoting complex (APC/C)

- APC/C se aktivuje v mitóze připojením aktivační podjednotky Cdc20 (během anafáze) nebo Cdh1 (v pozdní M a rané G1 fázi)
- tyto podjednotky se podílejí na rozeznání substrátů
- s pomocí proteinů E1 a E2 APC/C přenáší molekuly ubikvitinu na cílový protein, např. cyklin B
- následuje rozklad označeného proteinu proteazomem



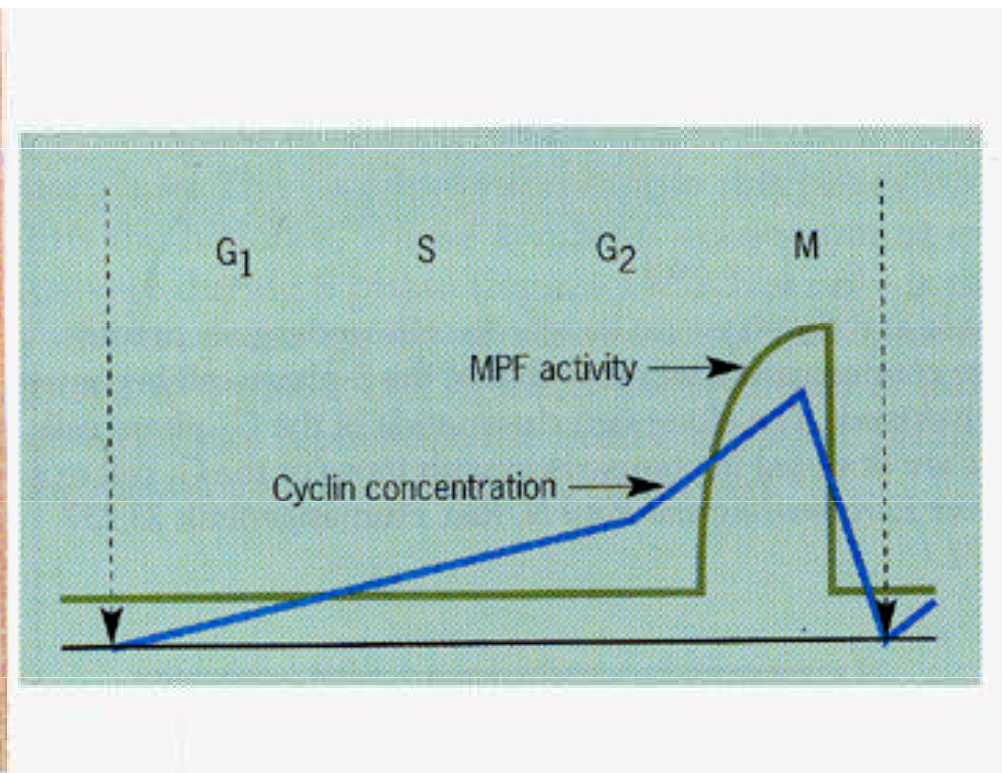
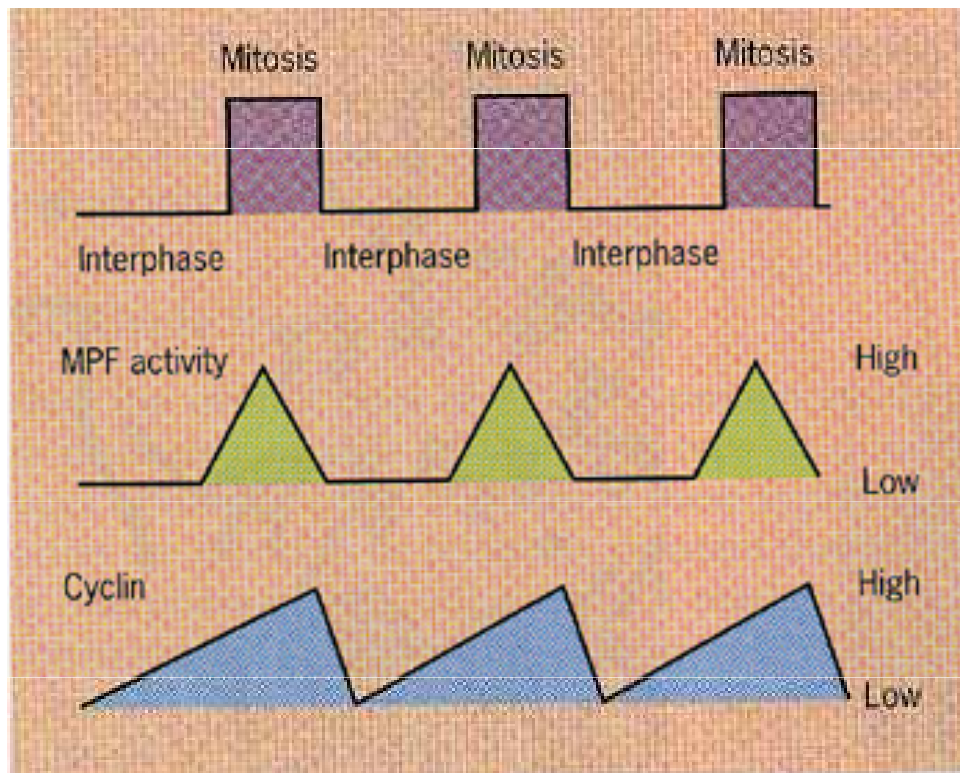
Komplexy Cdk/cyc a jednotlivé fáze cyklu

- komplexy fáze **G₁**: **Cdk4** nebo **Cdk6** a **cykliny D** (D1, D2, D3)
- komplexy přechodu fází **G₁/S**: **Cdk2** a **cykliny E** (E1, E2)
- komplexy fáze **S**: **Cdk2** a **cykliny A** (A1, A2)
- komplexy pozdní fáze **S** a fáze **G₂**: **Cdc2/Cdk1** a **cykliny A**
- **mitotické komplexy Cdk (MPF)**: **Cdc2/Cdk1** a **cykliny B** (B1, B2)



Hladina cyklinu B určuje aktivitu MPF

- vysoká hladina cyklinu B \Rightarrow vysoká aktivita MPF
- nízká hladina cyklinu B \Rightarrow nízká aktivita MPF
- syntéza cyklinu B začíná během interáze (fáze S a G_2)



Řízení mitózy: 2 fáze

1. skokové **zvýšení aktivity MPF** v kontrolním bodě G2/M: zahájení procesů rané mitózy (profáze, prometafáze, metafáze): MPF a další kinázy fosforylují proteiny zapojené do sestavování mitotického vřeténka a jeho připojení k párům sesterských chromatid
2. **aktivace APC** na rozhraní metafáze a telofáze:
 - rozložení sekurinu, čímž se uvolní proteáza štěpící kohezin a nastane separace sesterských chromatid
 - rozložení cyklinů, inaktivace Cdk, defosforylace substrátů: podmínka zahájení pozdní M fáze (dokončení anafáze, rozložení vřeténka, cytokineze)

MPF posunuje buňku do M fáze

MPF zajišťuje všechny procesy, které se odehrávají v rané mitóze:

- indukce sestavení dělicího vřeténka
- indukuje kondenzaci chromozomů
- zodpovídá za rozložení jaderné membrány, změny aktinového cytoskeletu a Golgiho aparátu

MPF napomáhají 2 další rodiny proteinových kináz:
"Polo-like kinases" a "Aurora kinases"

Jejich aktivita závisí na MPF

Přítomnost cyklinu B není jedinou podmínkou aktivace MPF

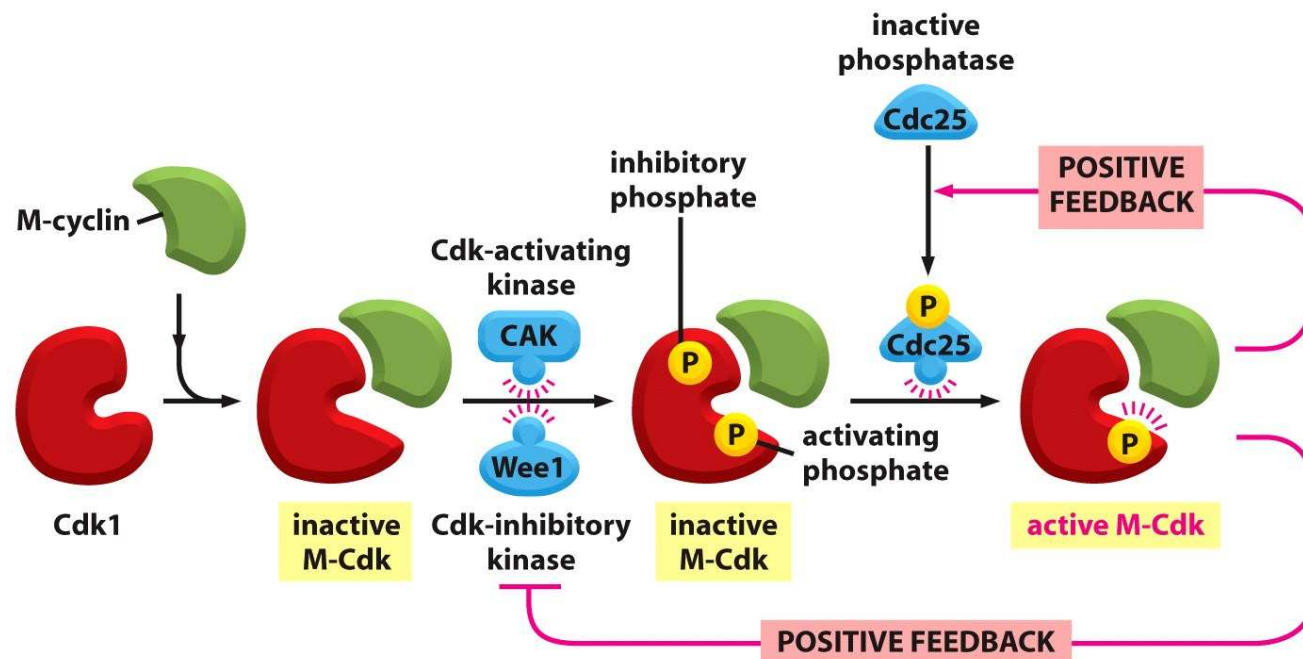
Koncentrace cyklinu B se zvyšuje rovnoměrně během G2 fáze (aktivace transkripce), ale k aktivaci MPF dochází najednou. Proč?

Maximální aktivita MPF vyžaduje **fosforylaci určitých aminokyselin specifickou kinázou a defosforylaci jiných aminokyselin specifickou fosfatázou.**

Odstranění inhibičního fosfátu fosfatázou je posledním krokem, který aktivuje MPF na konci interfáze.

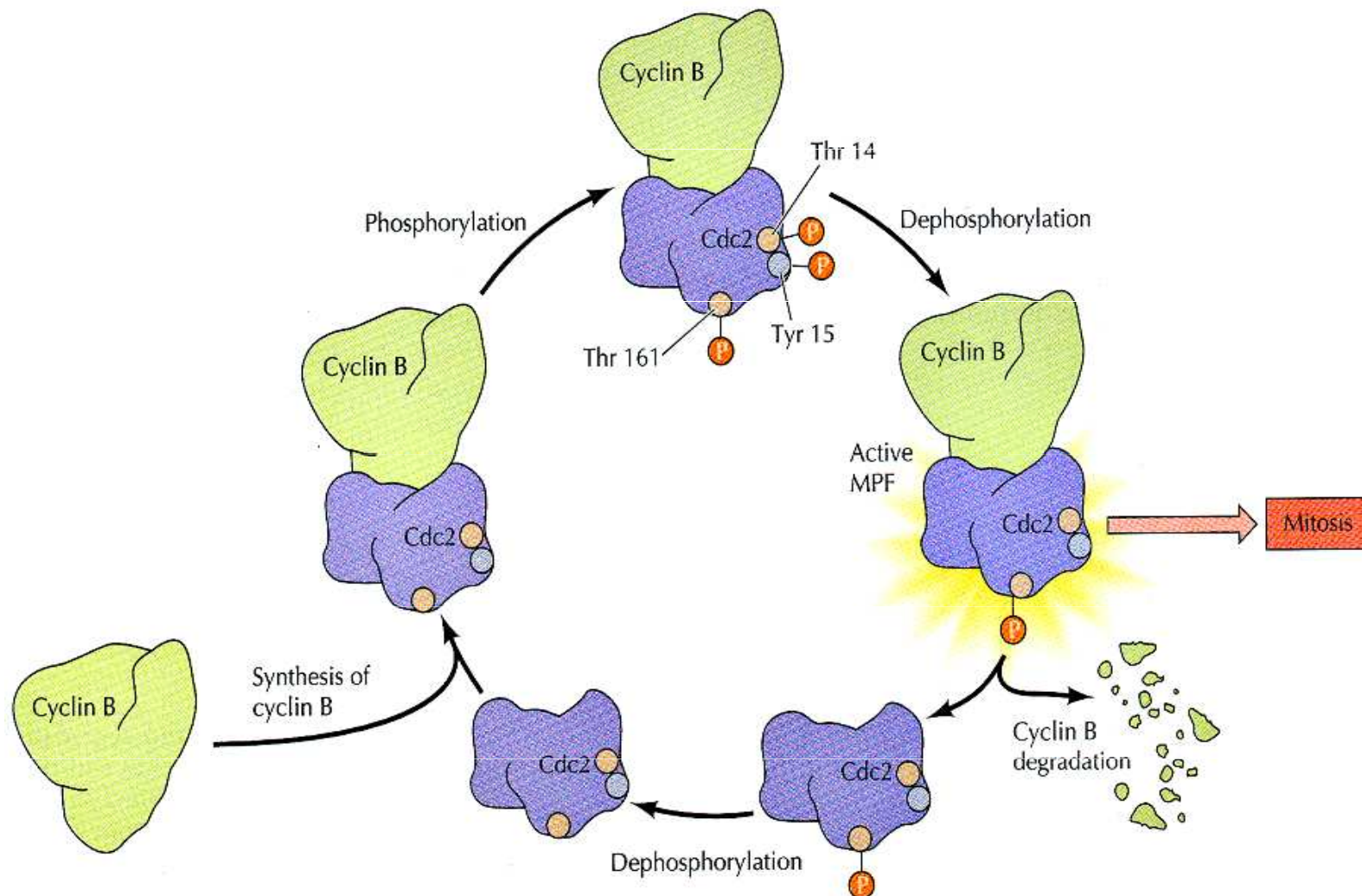
Pozitivní zpětná vazba: aktivovaný MPF aktivuje tvorbu dalších komplexů MPF

- sestavené komplexy cyklinu B s Cdk1 jsou fosforylovány kinázou CAK (aktivační efekt) a zároveň kinázou Wee1 (inhibiční efekt): komplex je inaktivní
- proto na konci G2 je v buňce k dispozici dostatek komplexů cyklinu B s Cdk, ale v inaktivním stavu
- aktivací fosfatázy Cdc25 se spustí rychlá aktivace MPF: Cdc25 odstraní inhibiční fosfát z MPF
- aktivní MPF inhibuje inhibiční kinázu Wee1 a aktivuje aktivační fosfatázu Cdc25: rychlá aktivace všech molekul MPF



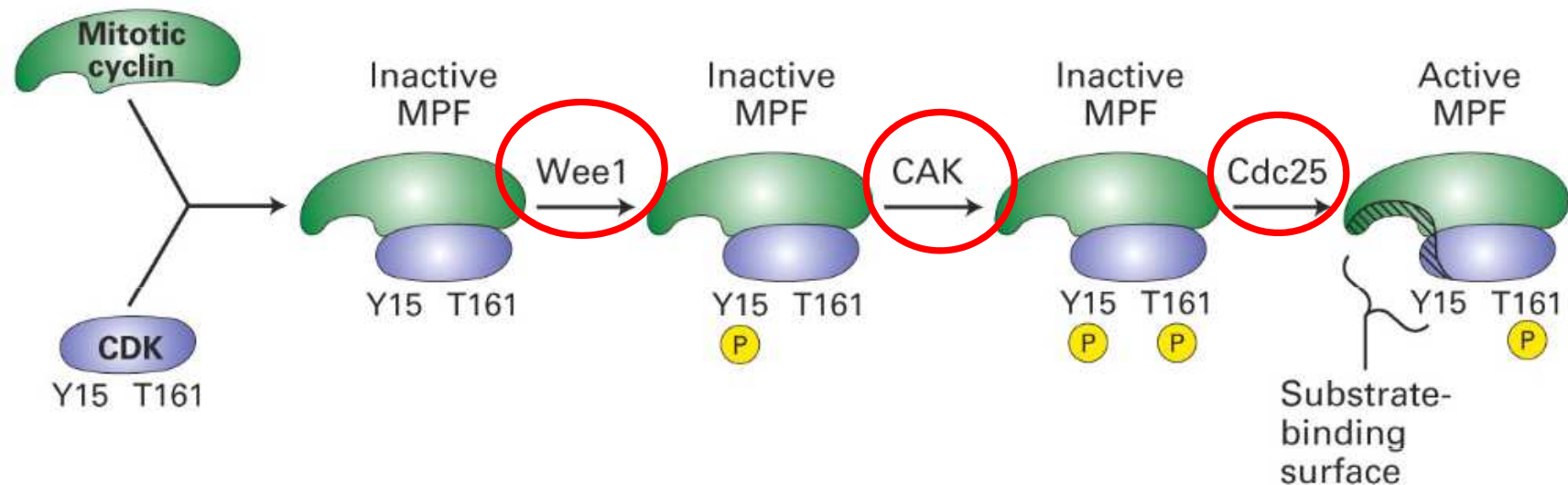
Podmínky aktivity MPF u kvasinek *S. cerevisiae*

- fosforylace Thr-161 proteinu Cdc2 (kinázou CAK)
- defosforylace Thr-14 a Tyr-15 proteinu Cdc2 (fosfatázou Cdc25)

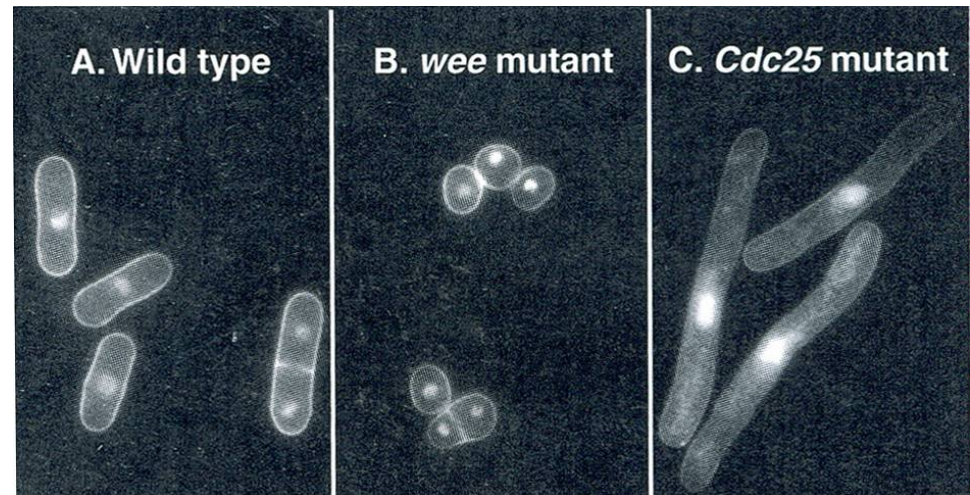
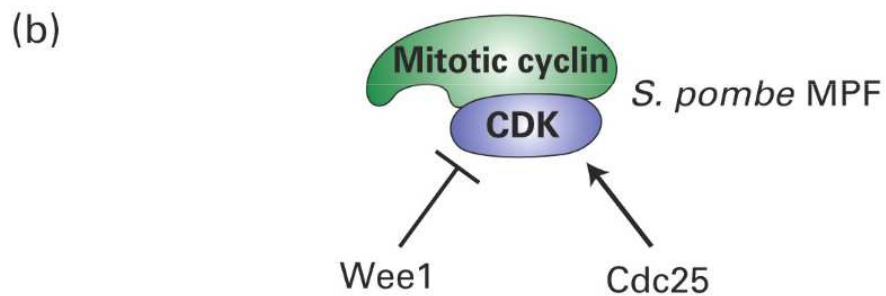
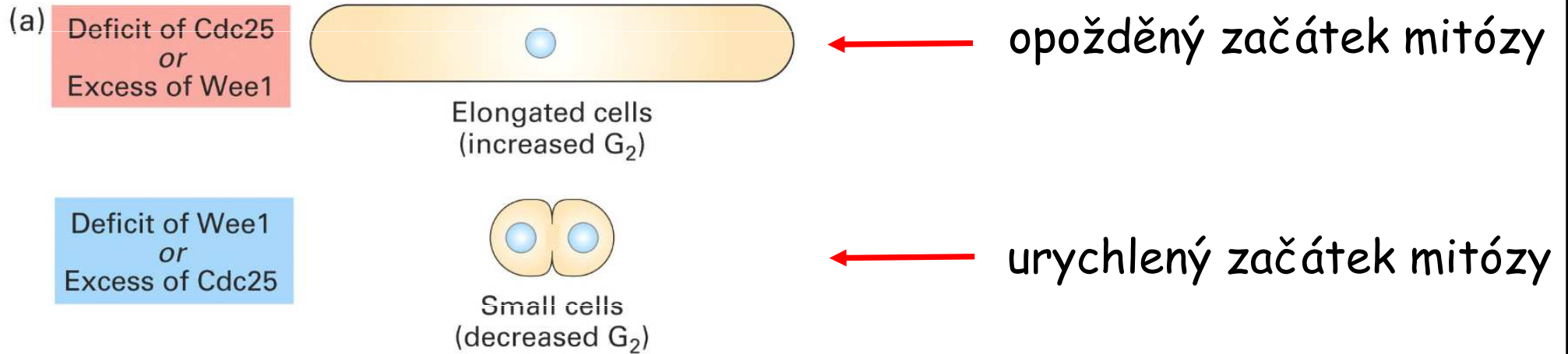


Regulace aktivity MPF u kvasinek *S. pombe*

- MPF je tvořen cyklinem Cdc13 a kinázou Cdc2
- kináza Wee1 fosforyluje tyrozin 15 Cdc2 (inhibiční efekt)
- kináza CAK fosforyluje treonin 161 Cdc2 (aktivační efekt)
- za přítomnosti zbytků 15 a 161 ve fosforylovaném stavu je MPF inaktivní
- odstranění fosfátu z tyrozinu 15 fosfatázou Cdc25 se MPF aktivuje

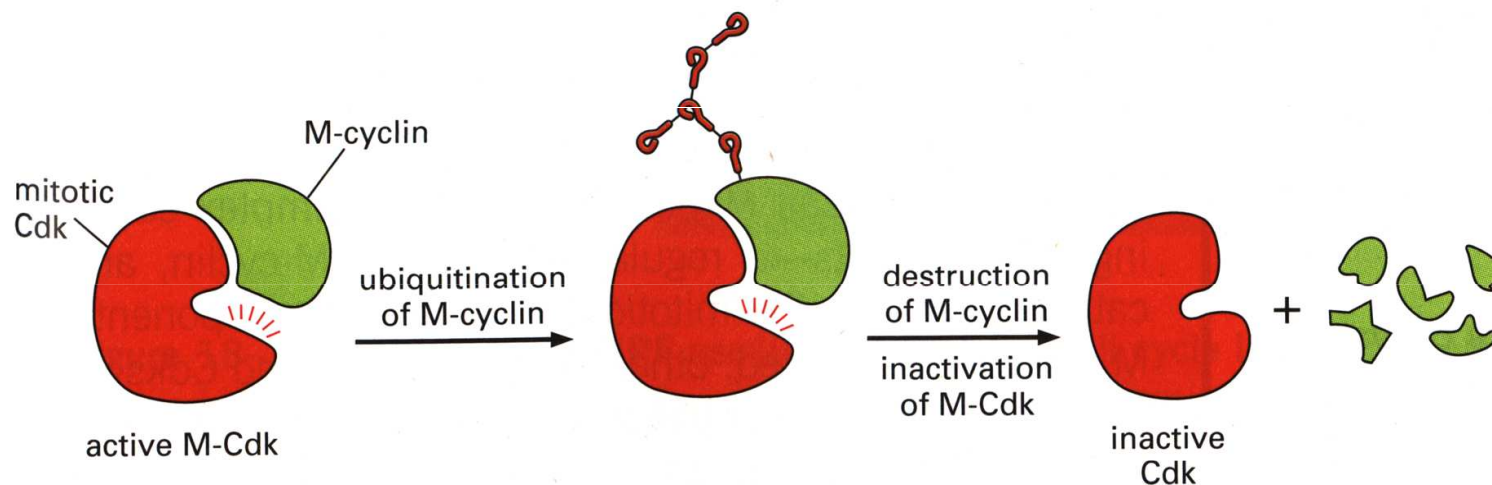


Kontrola velikosti buněk u kvasinek



Zakončení mitózy je důsledkem náhlého poklesu hladiny cyklinu B

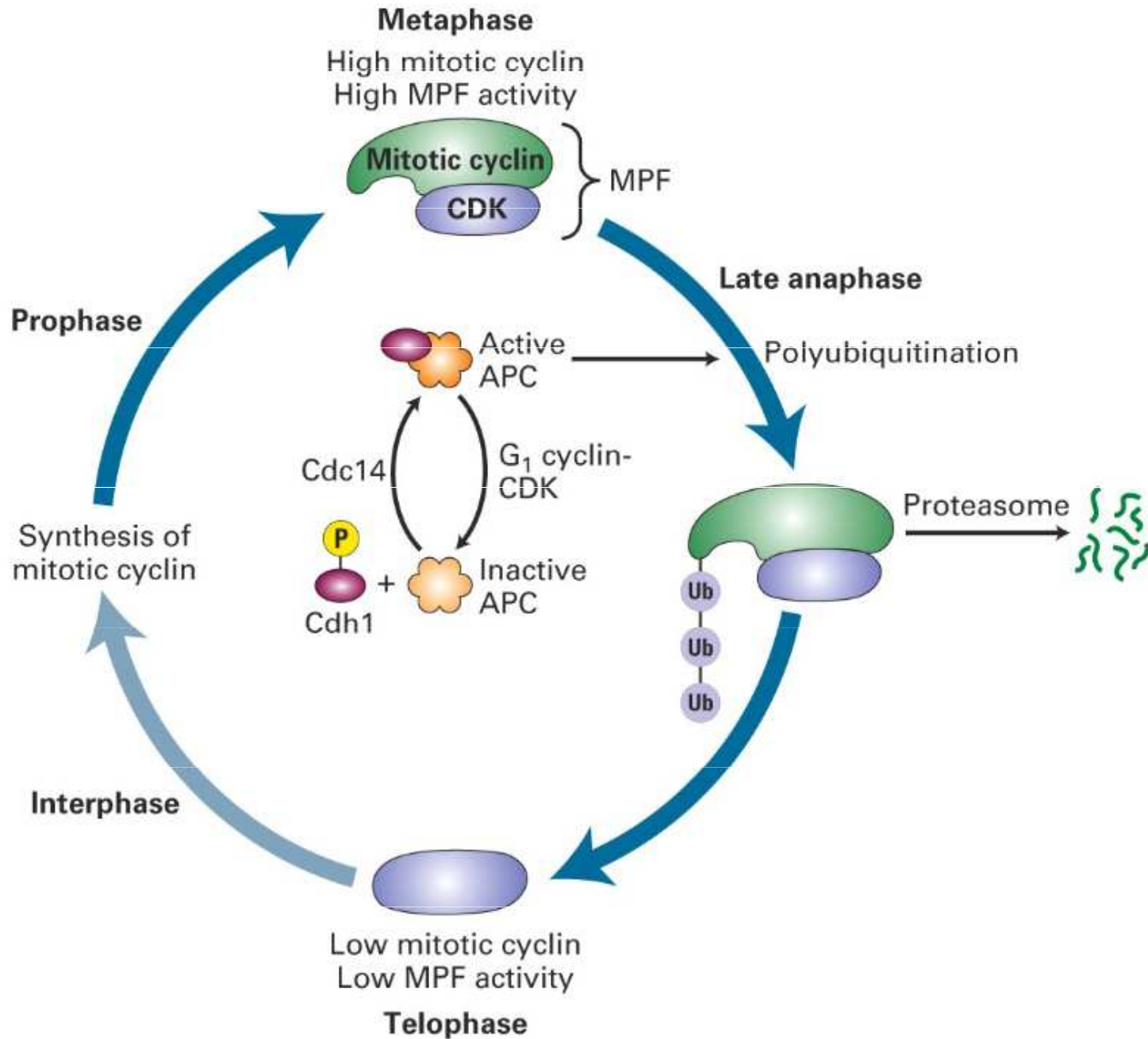
- koncem mitózy se k cyklinu B kovalentně váže řada molekul ubikvitinu
- přítomnost ubikvitinu označuje protein pro degradaci v proteazomu



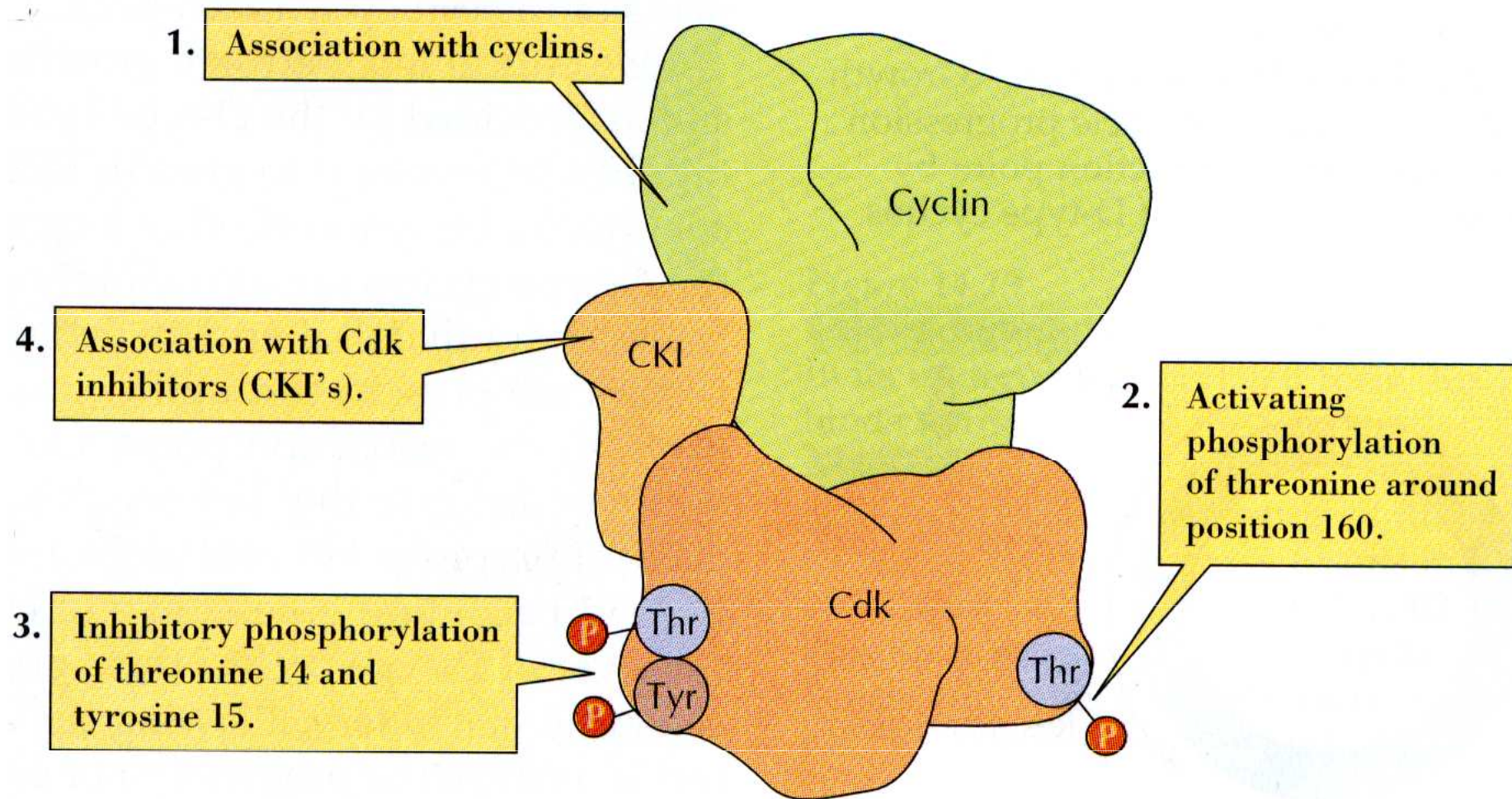
Regulace aktivity MPF

- APC může zajistit ubikvitinaci M-fázového cyklinu B pouze během pozdní anafáze v důsledku vazby **Cdh1** („APC-specificity factor“)
- Cdh1 může vázat APC pouze v defosforylovaném stavu
- aktivační defosforylaci Cdh1 katalyzuje fosfatáza **Cdc14** v pozdní anafázi
- inaktivační fosforylaci katalyzují G1-fázové komplexy Cyklin/Cdk
- k defosforylaci Cdh1 dochází až po přijetí signálu, že segregující chromatidy dosáhly v dělicích se buňkách správné pozice

Regulate activity MPF



Čtyři úrovně regulací cyklin- dependentních kináz



1. Regulace Cdk interakcí s Cykliny

určující je míra syntézy a degradace cyklinů

2. Regulace Cdk fosforylací

- k fosforylaci dochází na konzervativním zbytku treoninu 161- fosforylaci katalyzuje **kináza CAK** („cyclin-activating kinase“)
- CAK je složena z Cdk7 a cyklinu H

3. Aktivace Cdk defosforylací

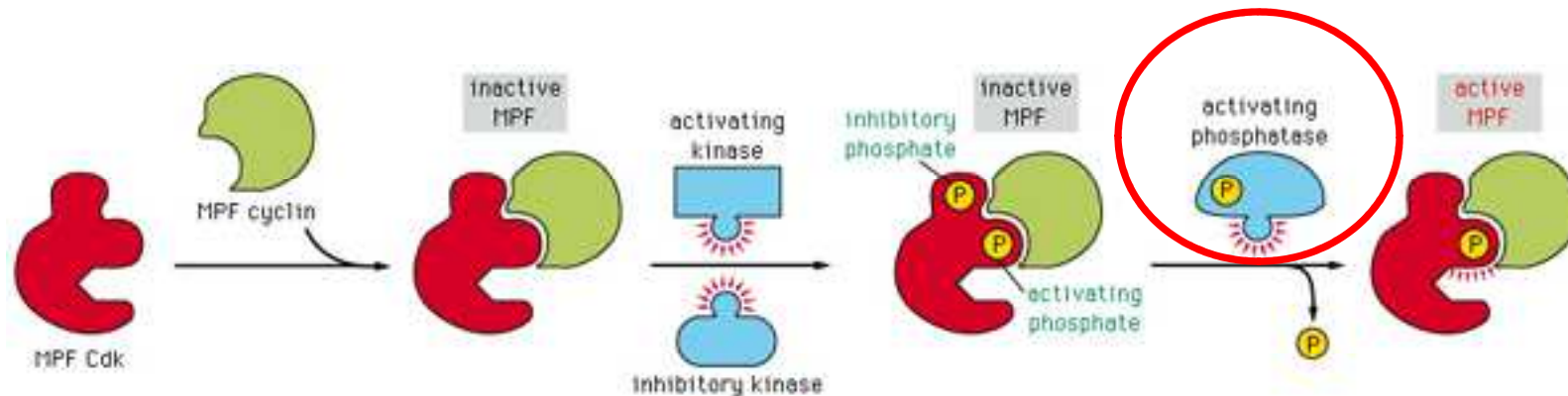
- fosforylace Thr 14 a Tyr 15 (zajištěná kinázami Wee1 a Myt1) inaktivuje Cdk 2
- defosforylací zajišťují fosfatázy rodiny Cdc25

4. Regulace Cdk vazbou inhibitorů

- inhibitory komplexů Cdk/Cyc se označují CKI („Cdk inhibitors“)
- některé CKI se vážou na různé komplexy Cdk/Cyc (např. p21)
- některé CKI se vážou pouze na specifické komplexy Cdk/Cyc a tak selektivně blokují průběh určitou fází cyklu (např. p16: vazba na Cdk4/CycD a Cdk6/CycD)

Checkpoint kinase-1 (CHK1)

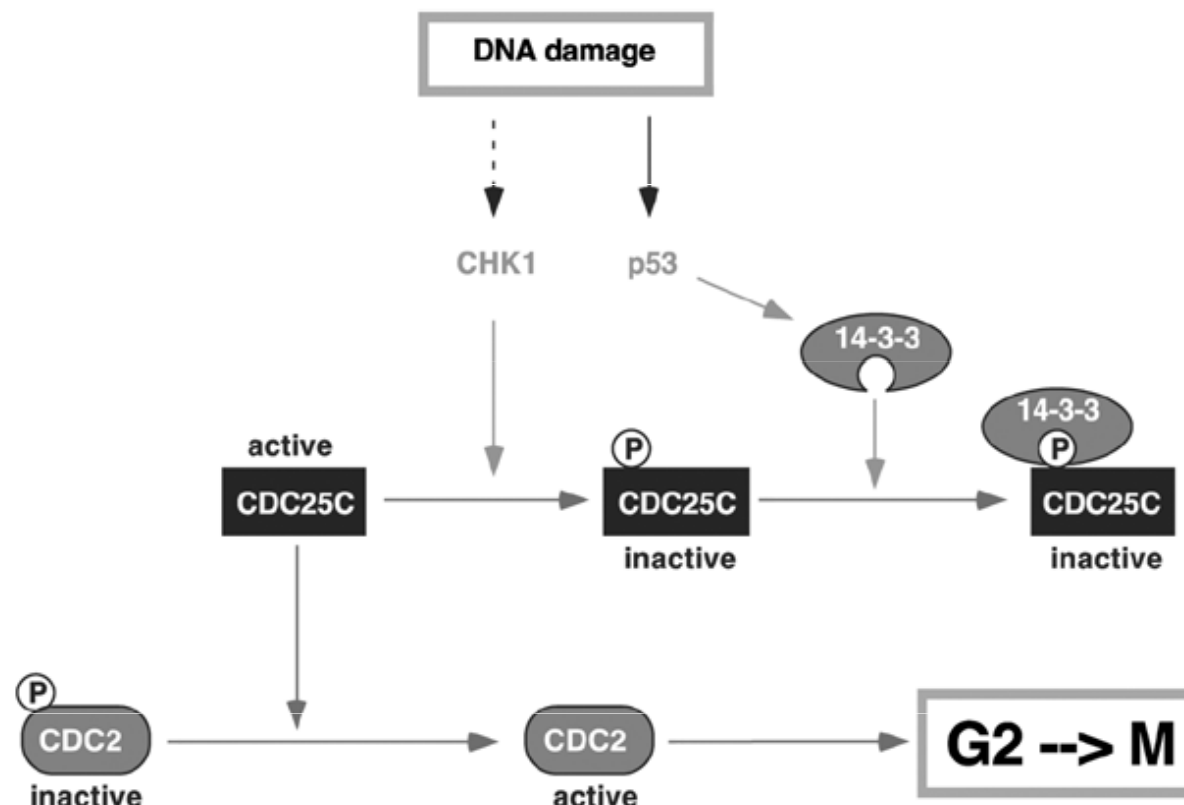
- Systém je aktivován poškozením DNA ve fázi G_2
- CHK1 fosforyluje aktivující fosfatázu Cdc25 a zajišťuje tak její inaktivaci: komplex cyklin B-Cdk zůstává ve fosforylovaném, tj. inaktivním stavu - znemožněna iniciace mitózy (možnost reparace DNA)



Checkpoint kinase-1 (CHK1)

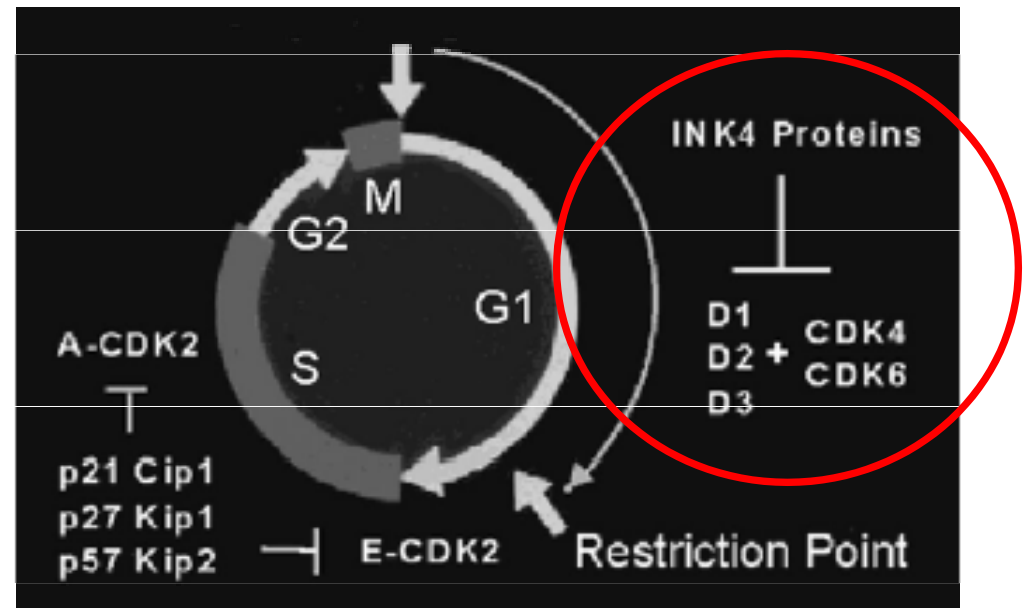
Mechanismus:

- CHK1 fosforyluje aktivující fosfatázu Cdc25, zajišťuje tak její spojení s 14-3-3 a inaktivaci: komplex cyklin B-Cdk zůstává ve fosforylovaném, tj. inaktivním stavu.



Inhibitory CDK: rodina INK4 ("inhibitor of CDK4")

- p16^{INK4A}
- p15^{INK4B}
- p18^{INK4C}
- p19^{INK4D}



Společné znaky:

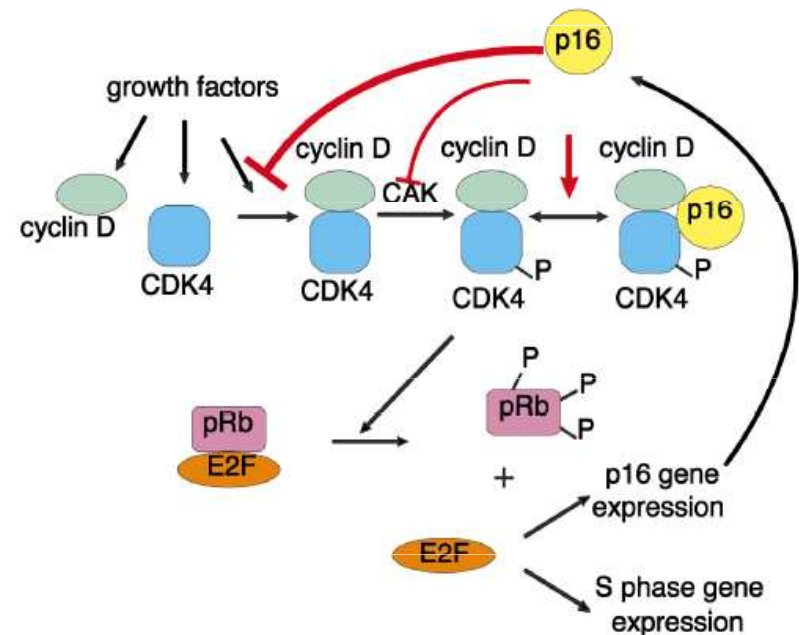
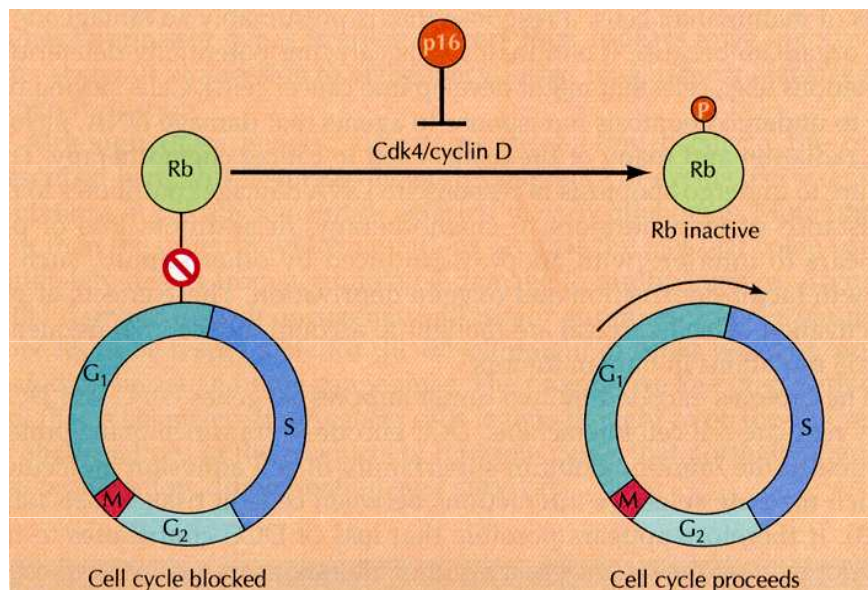
- inhibice tvorby komplexů cyklinů D a CDK4/CDK6 a inaktivace již vytvořených komplexů
- zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 (před bodem restrikce)

p16^{INK4A} (=p16)

- schopnost vazby ke komplexu CDK4-cyklin D a inhibice kinázové aktivity CDK4
- inhibice fosforylace CDK4 kinázou CAK
- inhibice sestavování komplexů CDK4-cyklin D

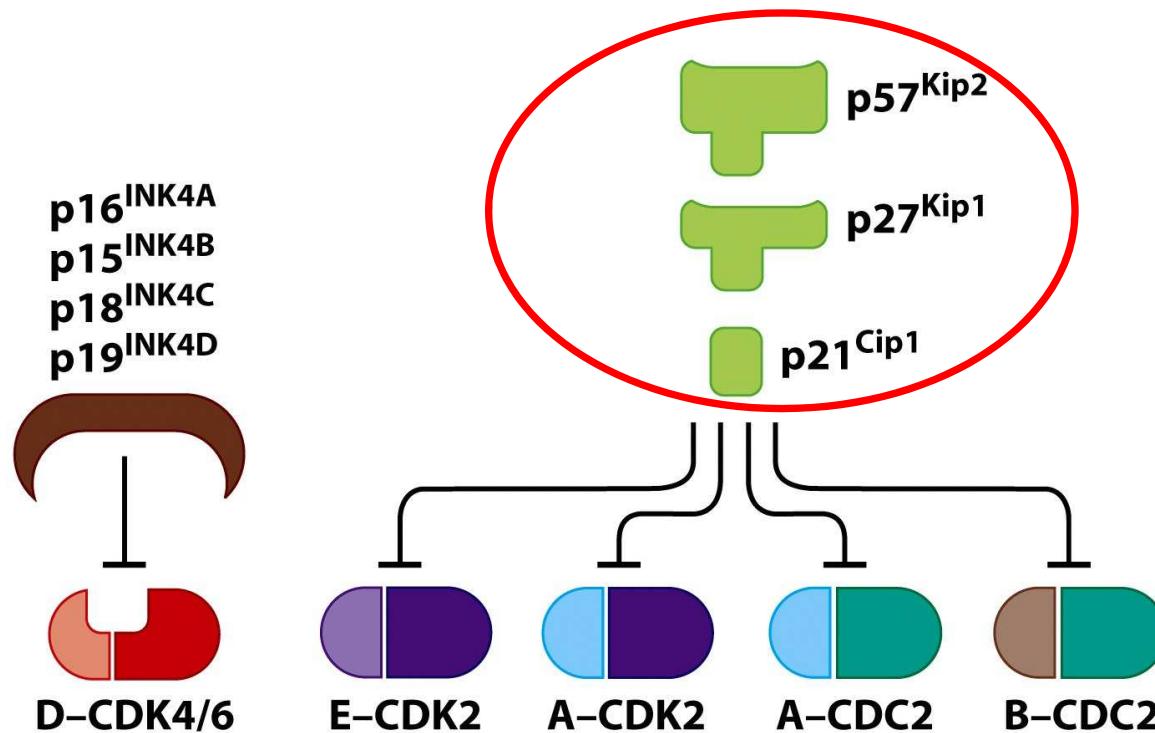
Negativní zpětná vazba:

- uvolnění E2F způsobuje aktivaci exprese p16



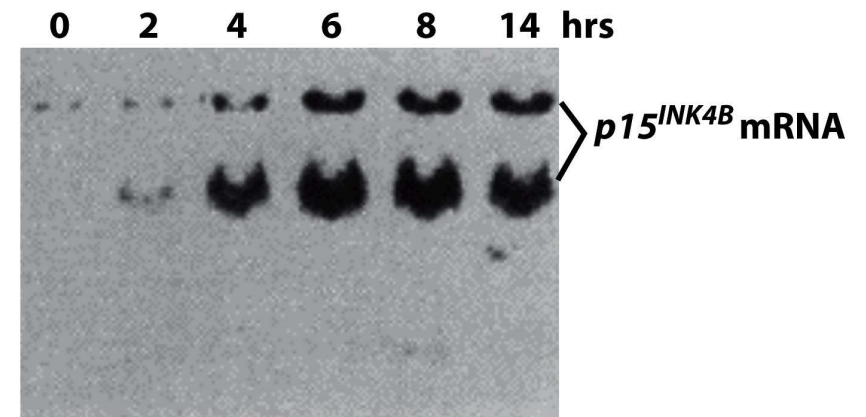
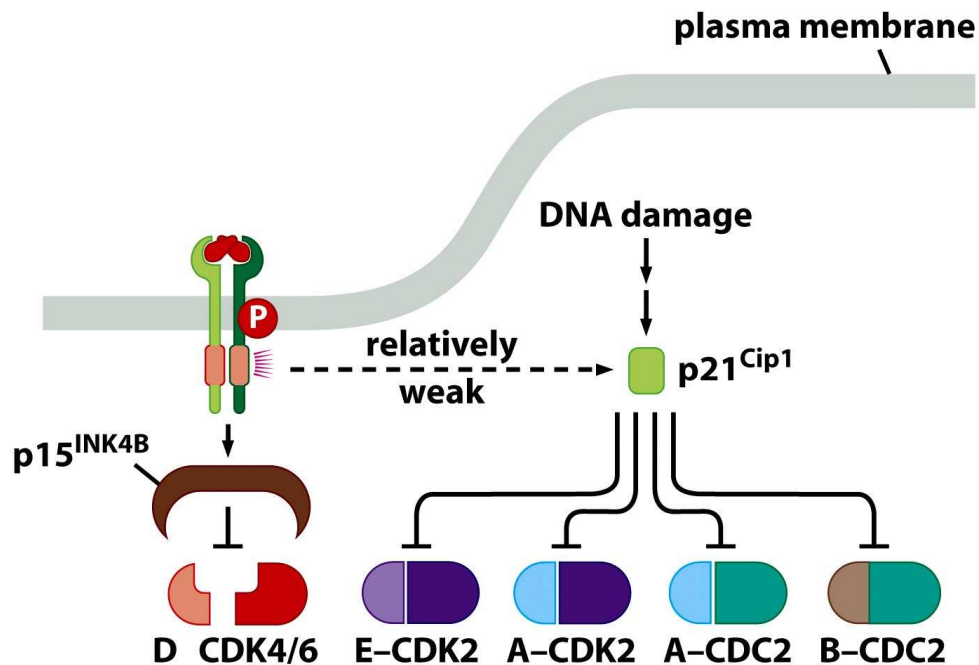
Inhibitory CDK: rodina Cip/Kip

- p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}
- inhibice CDK2 a CDC2 v komplexech s cykliny E, A, B



Kontrola buněčného cyklu TGF- β využívá inhibitorů CDK

- TGF- β silně indukuje expresi p15^{INK4B} a slabě také p21^{Cip1}
- důsledkem je zastavení proliferace



Kontrola integrity DNA: role p53

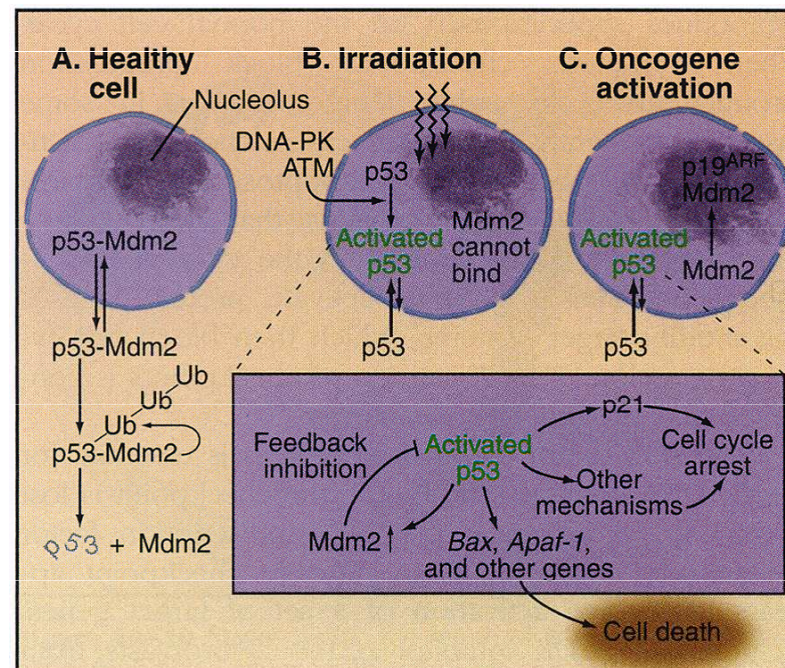
Obecný princip: poškození DNA - senzorické proteiny „hlásí“ problém specifickým proteinovým kinázám - ty fosforylují své substráty a zastaví cyklus

p53 - nádorový supresor, zásadní pro kontrolní bod G1

- transkripční faktor, řídí expresi řady genů, např. **p21^{Cip1}** (inhibitor CDK), **mdm2** (ubikvitin ligáza E3), **bax**, **CD95**, **Apaf-1** (všechny související s indukcí apoptózy)

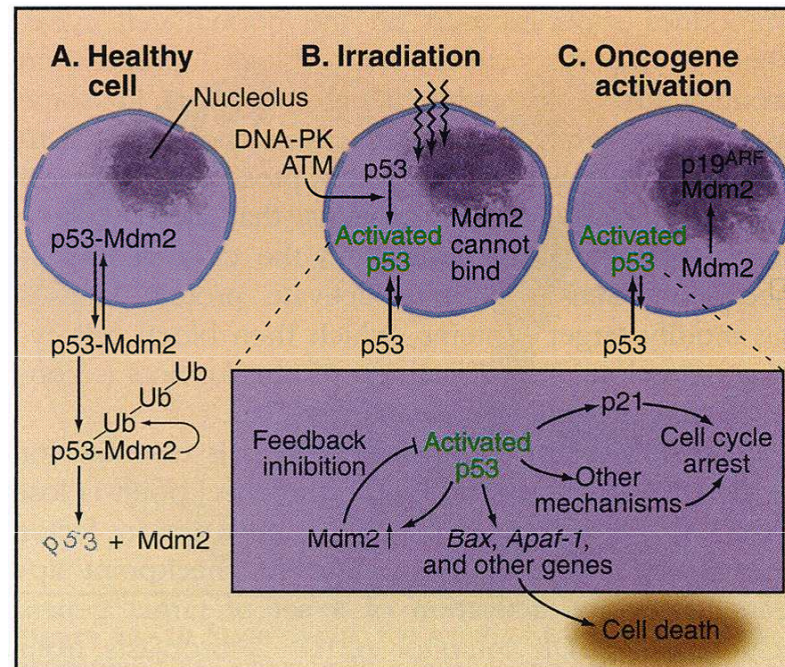
p53 ve zdravých buňkách

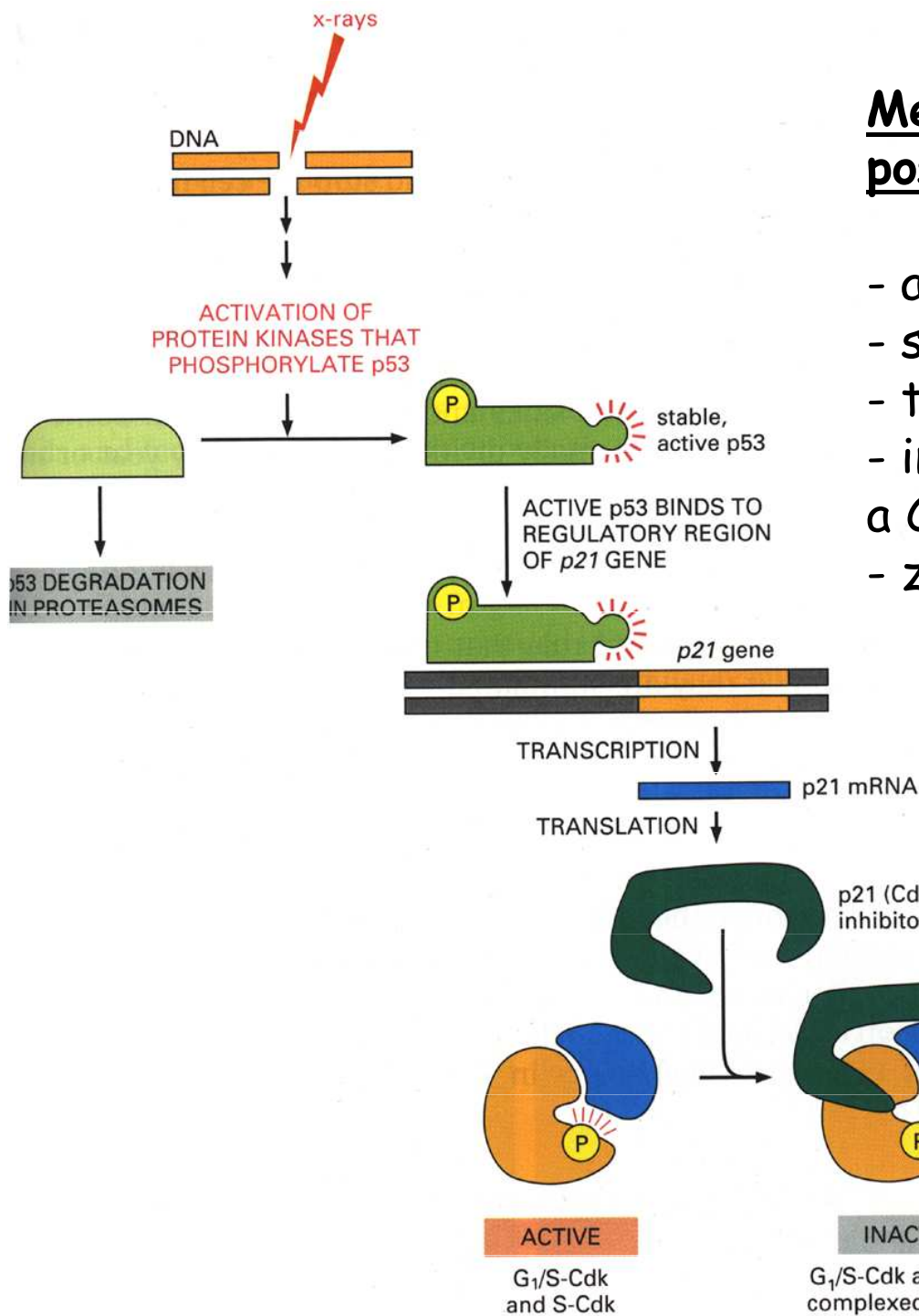
- protein p53 je ve větších množstvích pro buňky toxický: proto je ve zdravých buňkách hladina p53 nízká
- nízkou hladinu p53 zprostředkovává protein Mdm2: ubikvitin ligáza E3
- p53 aktivuje expresi *mdm2*, protein Mdm2 modifikuje protein p53 ubikvitinací a zajišťuje tak jeho degradaci proteazomem



p53 v buňkách s poškozenou DNA

- Poškození DNA vede k aktivaci kináz ATM a DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), které p53 fosforylují
- DNA-PK fosforyluje rovněž Mdm2, což znemožní jeho vazbu k p53
- p53 se rychle stabilizuje a může aktivovat expresi svých cílových genů, včetně p21^{Cip1}



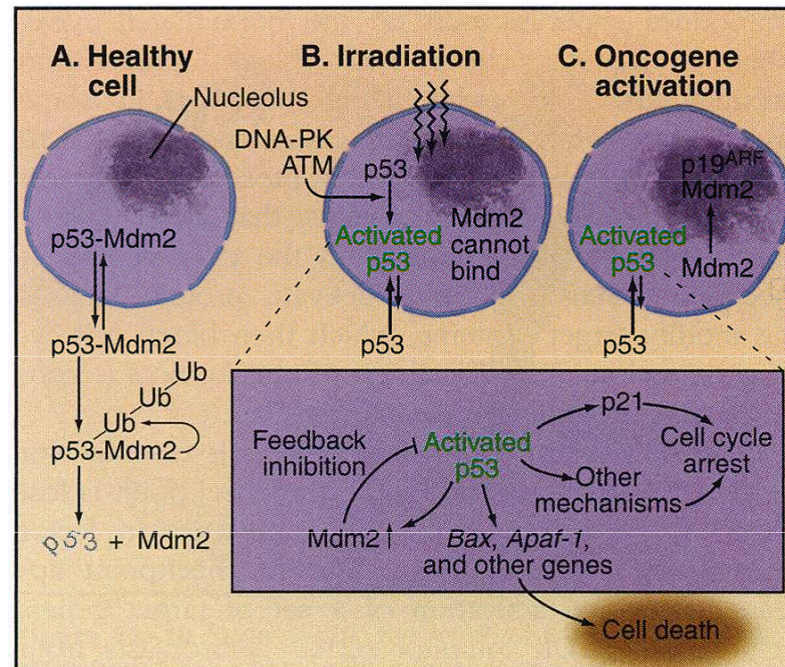


Mechanismus účinku p53 v buňkách s poškozenou DNA:

- aktivace kináz fosforylujících p53
- stabilizace p53
- transaktivace genu $p21^{Cip1}$ proteinem p53
- inhibice aktivity Cdk2-E, Cdk2-A, Cdc2-A a Cdc2
- zastavení cyklu

p53 se podílí na ochraně buňky před vznikem rakoviny

- porucha cyklu z důvodu přítomnosti onkogenu vede k expresi nádorového supresoru p19^{ARF}
- p19^{ARF} vyvazuje Mdm2 v jadérku
- volný p53 se hromadí v jádře, kde aktivuje expresi svých cílových genů zapojených do indukce programované buněčné smrti



Absence funkčního p53

- nemožnost pozastavení buněčného cyklu
- replikace neopravené DNA
- hromadění mutací
- riziko vzniku rakoviny

Mutace v genu p53 se objevují ve více než 50% lidských zhoubných nádorů.

Živočišné buňky vyžadují mimobuněčné signály pro dělení, růst a přežití

Signální molekuly jsou produkovány jinými buňkami téhož organismu.

Klasifikace do tří hlavních skupin:

1. **Mitogeny** - stimulují buněčné dělení tím, že překonávají přirozené brzdící mechanismy buněčného cyklu
2. **Růstové faktory** - stimulují růst buněk vedoucí k navýšení buněčné hmoty tím, že indukují syntézu a inhibují degradaci proteinů a jiných makromolekul
3. **Faktory pro přežívání** („survival factors“) - zvyšují životaschopnost buněk supresí programované buněčné smrti

Mitogeny stimulují buněčné dělení

- vážou se na povrchové receptory a aktivují je
- aktivované receptory stimulují různé buněčné signální dráhy, které zajistí zvýšenou proliferaci tím, že uvolní nitrobuněčné molekulární „brzdy“, které blokují přechod z fáze G1 do fáze S

Typickou brzdou buněčného cyklu je **protein Rb** („retinoblastoma protein“)

Protein Rb

- původně nalezen při studiu dětského očního nádoru - retinoblastomu: u postižených dětí protein Rb chybí nebo je defektní
- objevuje se ve vysoké míře v jádrech zdravých buněk všech obratlovců
- spolu s rodinou transkripčních faktorů E2F řídí kontrolní bod restrikce
- **interakce E2F a Rb** s promotory řady cílových genů nutných pro proliferaci vypíná jejich expresi: **cyklus se v bodu restrikce zastaví**
- **fosforylace Rb** vyvolá jeho disociaci od E2F, což aktivuje expresi příslušných proliferačních genů: **průchod bodem restrikce obnoven**

Mitogeny uvolňují brzdící účinek Rb

- mitogeny aktivují signální dráhy, které vedou k tvorbě aktivních komplexů cyklinu D a Cdk 4 ve fázi G1
- komplex Cdk4/cyklin D fosoryluje protein Rb
- fosorylovaný Rb mění konformaci a uvolňuje E2F, který pak může aktivovat expresi genů nutných pro buněčnou proliferaci

