

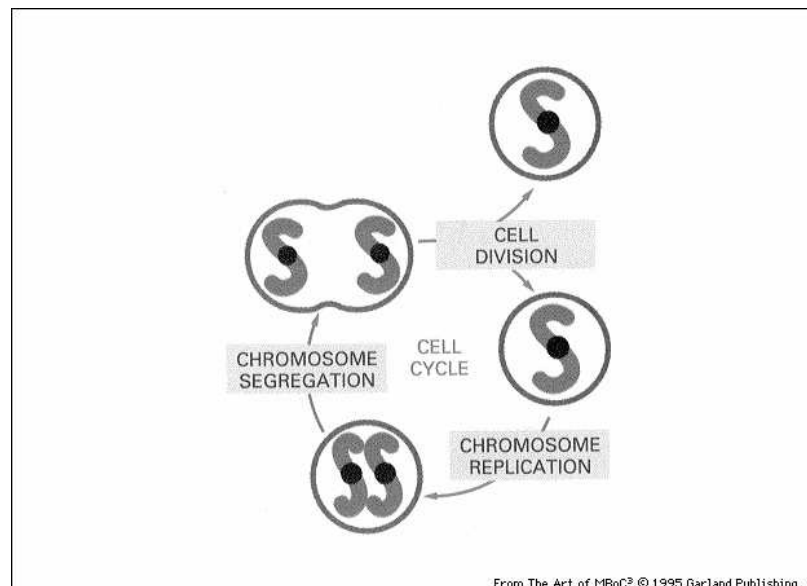
Buněčný cyklus

„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)

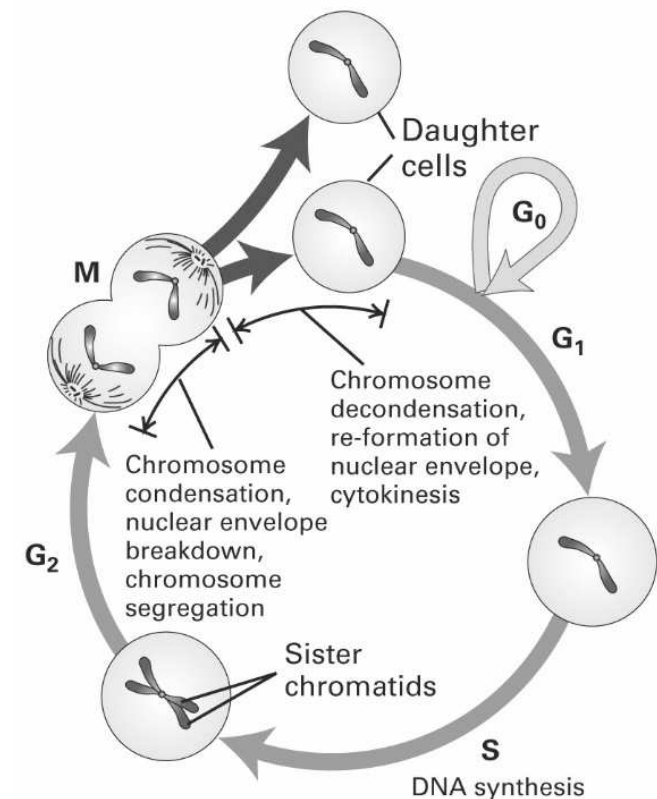
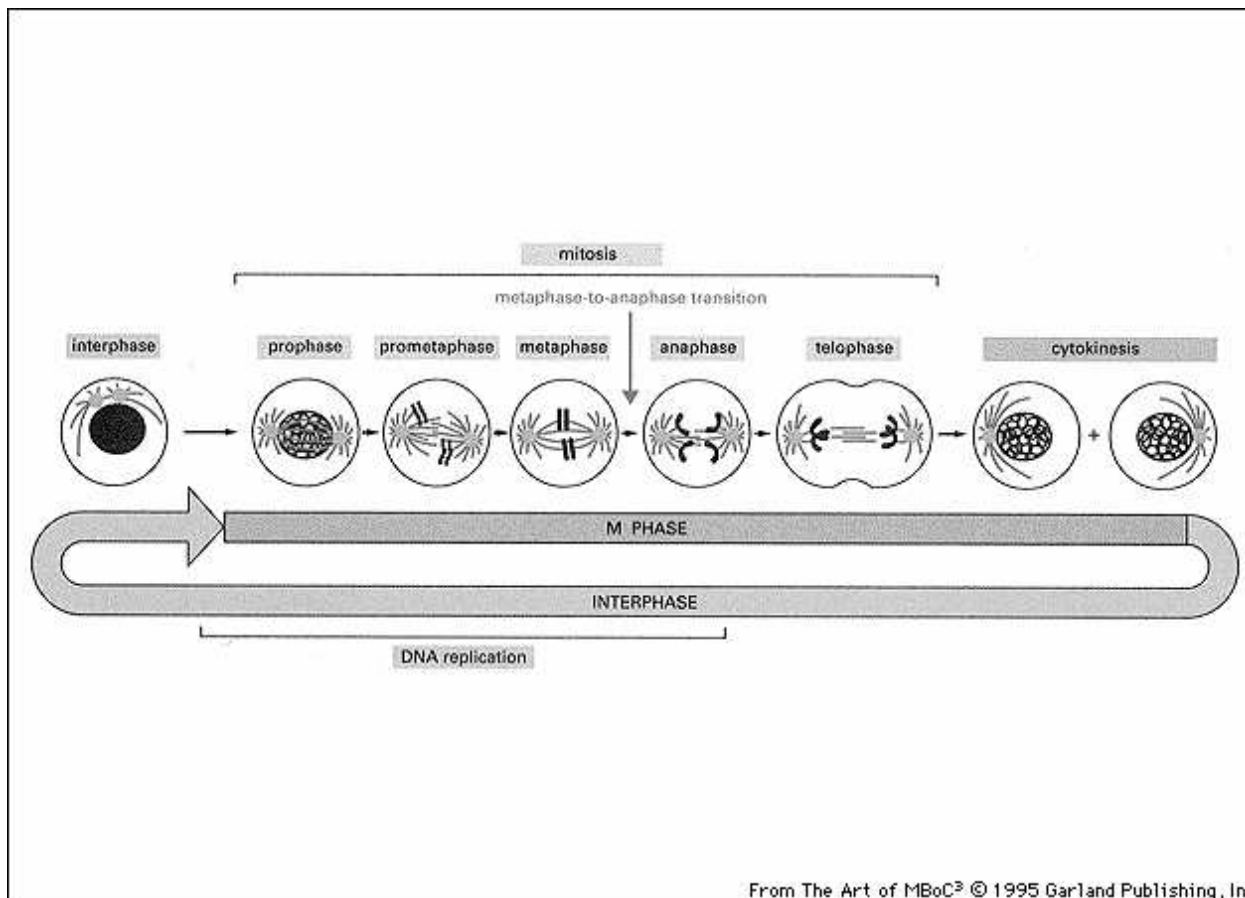
Buněčný cyklus

- cyklus buněčných procesů začínajících „zrozením“ buňky buněčným dělením a končících tvorbou dceřinné buňky nebo smrtí
- uspořádání životních procesů buňky do logického sledu tak, aby mohlo dojít k duplikaci chromozomů a rozdělení buňky
- podmínka tvorby vícebuněčných struktur
- rychlost buněčného cyklu určuje rychlost proliferace podle vnitřních potřeb a vnějších stimulů (poruchy kontroly cyklu: riziko rakoviny)
- řízení replikace a segregace chromozomů je obdobné ve všech eukaryotických buňkách

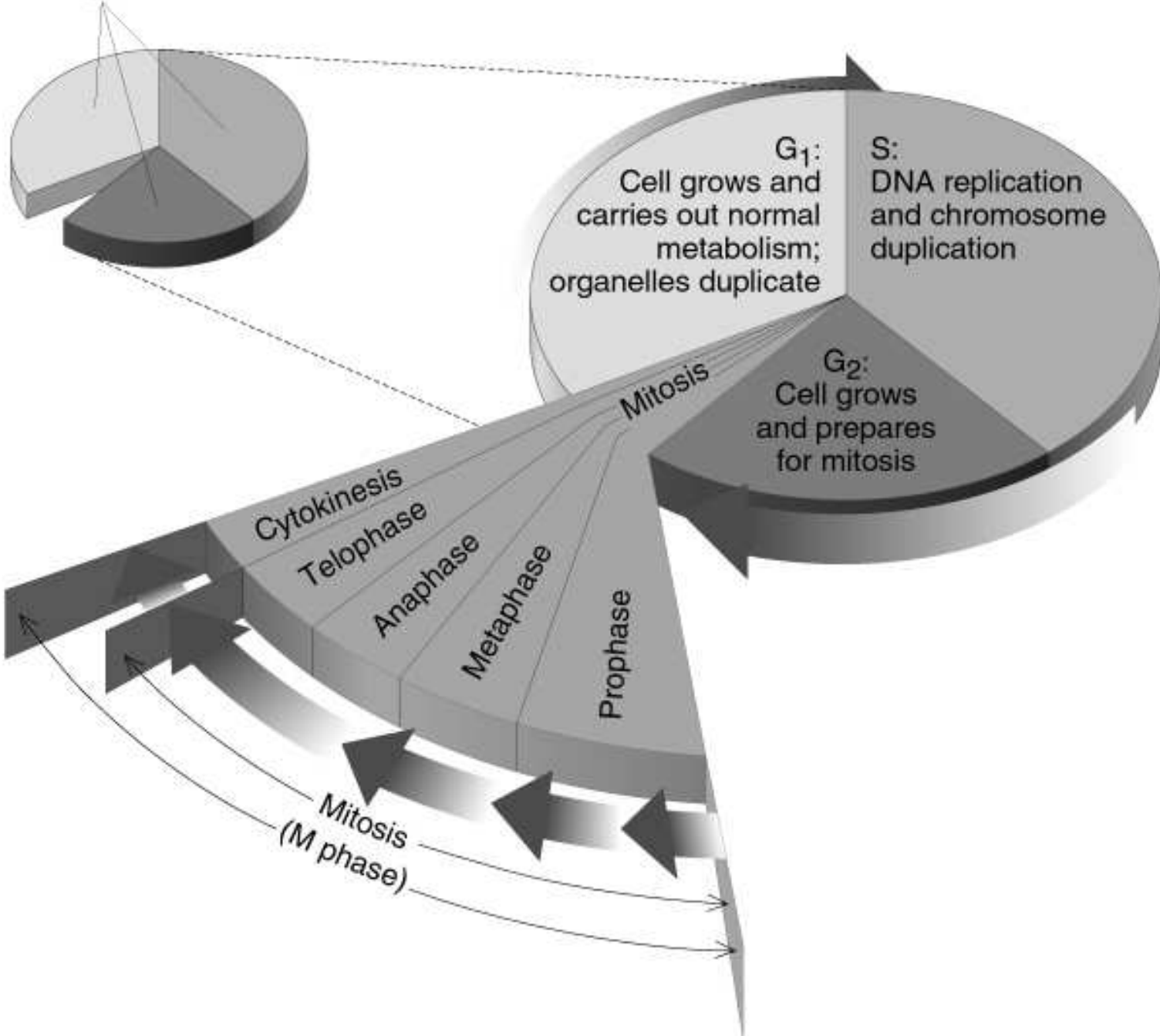


Periodické proměny buněk byly nejdříve zaznamenány světelnou mikroskopií

- mitóza (rozdělení chromozomů)
- cytokineze (rozdělení cytoplazmy)
- interfáze (dekondenzované chromozomy)

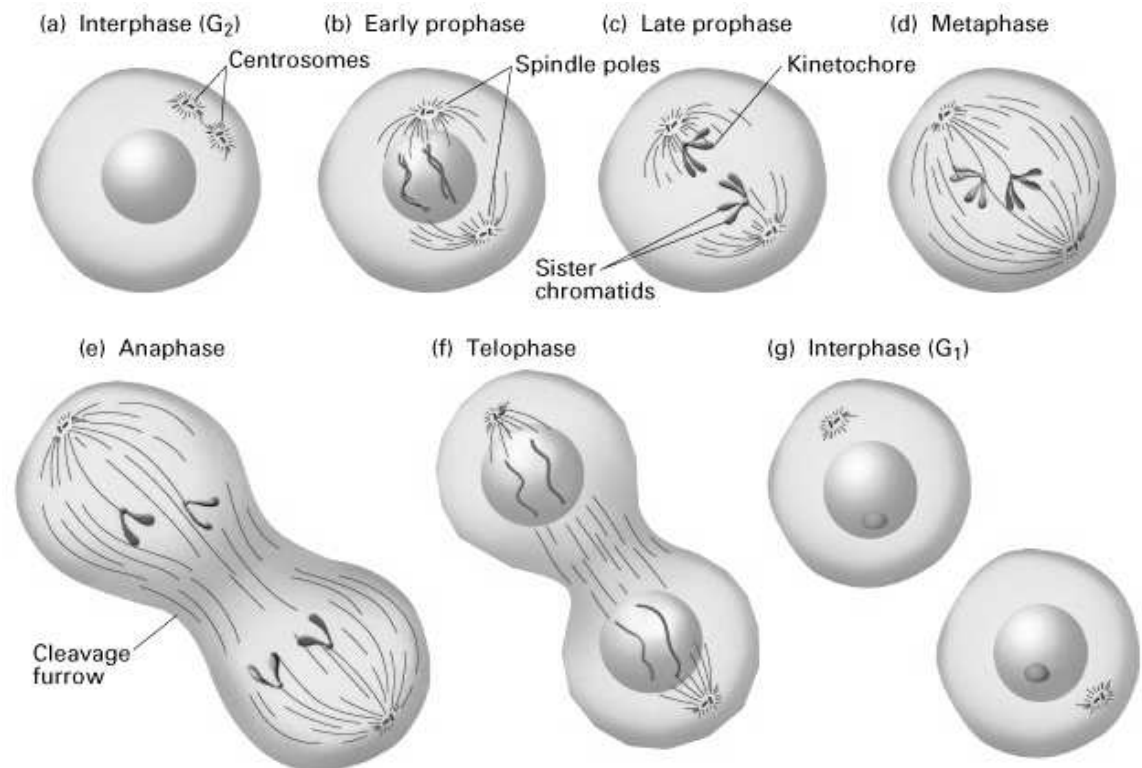


Interphase

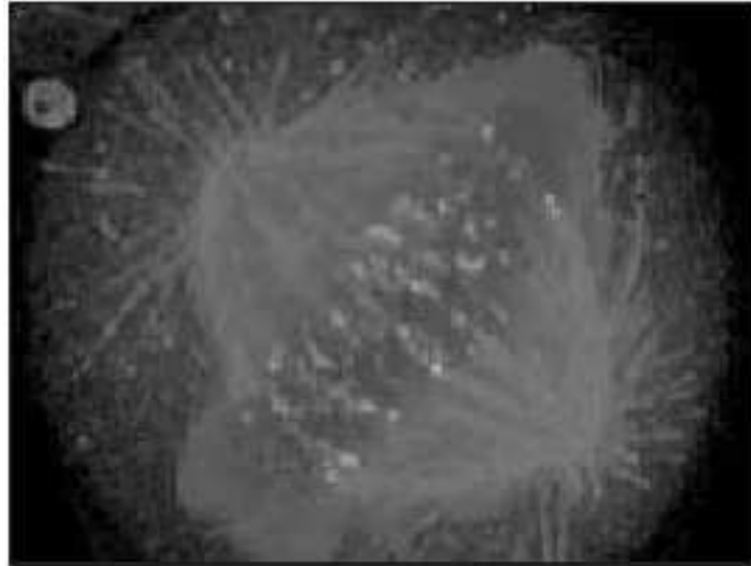


Fáze M (mitóza + cytokineze)

- buňka je zaměřena na funkce související s buněčným dělením
- metabolická aktivita slabá
- rozpad jaderné membrány (do ER)
- tvorba mitotického vřeténka
- kondenzace chromozomů
- sestavení kinetochorů
- separace chromatid
- rozpad vřeténka,
- dekonenzace chromozomů
- obnovení jaderné membrány (spojení s ER zůstává)



Mitóza

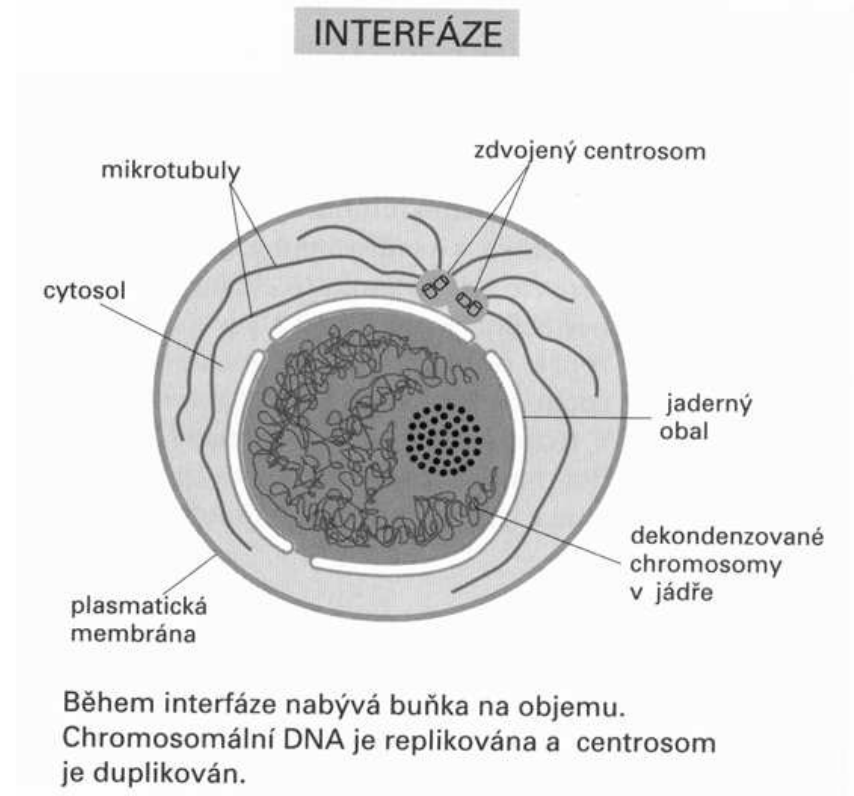


Mitóza v lidské buňce pozorovaná fluorescenční mikroskopií.

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

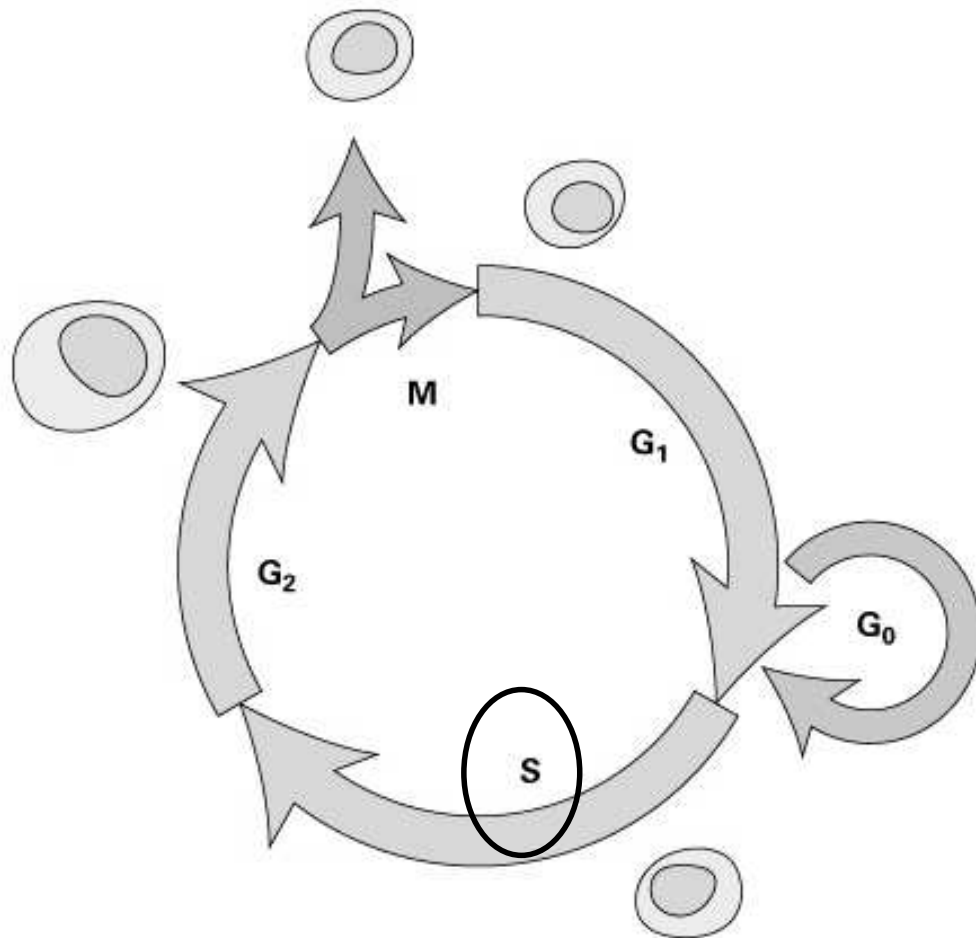
Interfáze

- tvoří většinu cyklu: hodiny, dny, týdny nebo delší období podle buněčného typu
- růst buňky
- výrazná metabolická aktivita
- rozdělena do fáze G_1 ("first gap"), S ("synthesis"), G_2 ("second gap")
- jaderná membrána je spojena s ER



S fáze

- část interfáze, při které dochází k replikaci DNA

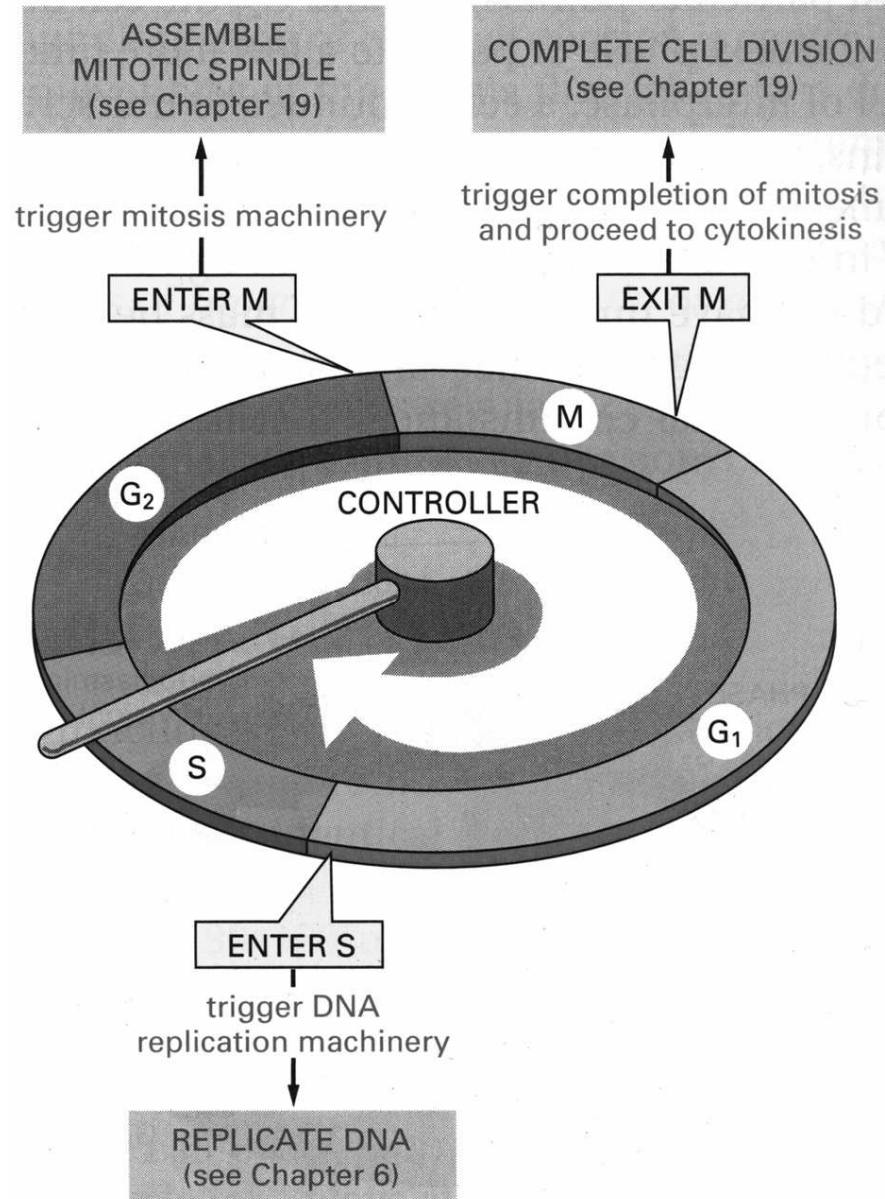


ve fázi G_2 má proto buňka dvojnásobný obsah DNA ve srovnání s buňkou ve fázi G_1

Fáze G1 a G2

- části interfáze, při kterých buňka monitoruje vnitřní a vnější prostředí a zjišťuje tak, zda je situace vhodná pro zahájení S fáze nebo mitózy

Zásadní buněčné procesy probíhají v přísné návaznosti



Časové odlišnosti buněčného cyklu

Existují

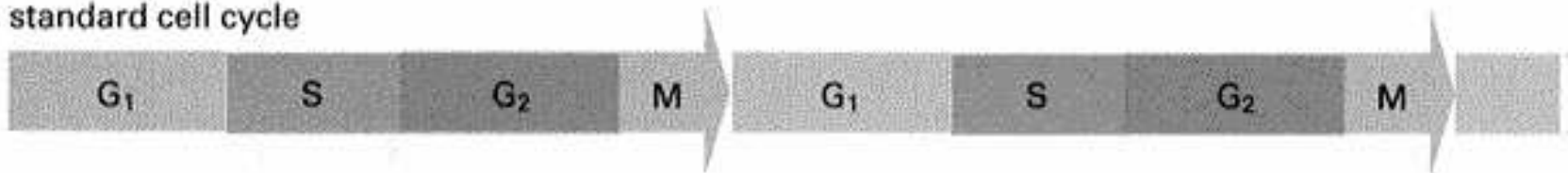
- buňky s výraznou strukturní a funkční specializací, které nemají schopnost dělení (nervové buňky, svalové buňky, červené krvinky)
- buňky, které se normálně nedělí, ale za určitých okolností se dělit mohou (jaterní buňky, lymfocyty)
- buňky, které se přirozeně dělí velmi rychle (epiteliální buňky,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

Časové nároky buněčného cyklu

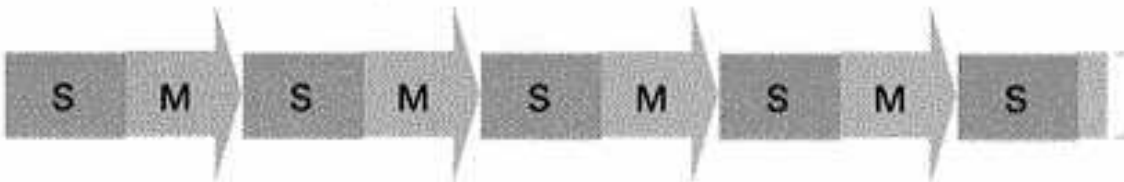
velmi variabilní, podle typu tkáně

- 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.)

standard cell cycle

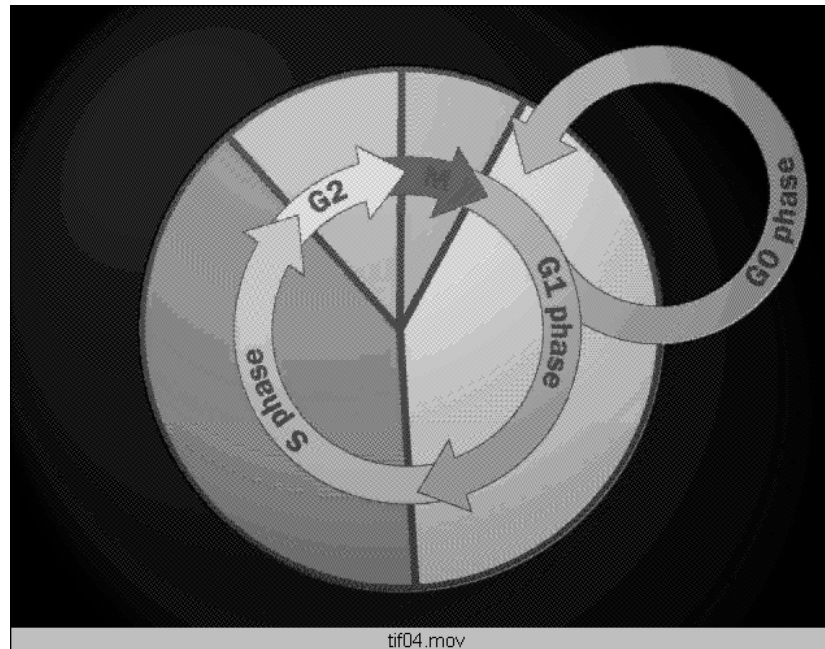


early embryonic cell cycle



Variabilita fází buněčného cyklu

- nejvíce variabilní je fáze G_1
- většina buněk, které se přestanou dělit zůstává ve fázi G_0 (speciální klidová část G_1)
- buňka obvykle musí registrovat určitý signál, aby mohla postoupit z G_1 do S , pak obvykle postupuje i do mitózy



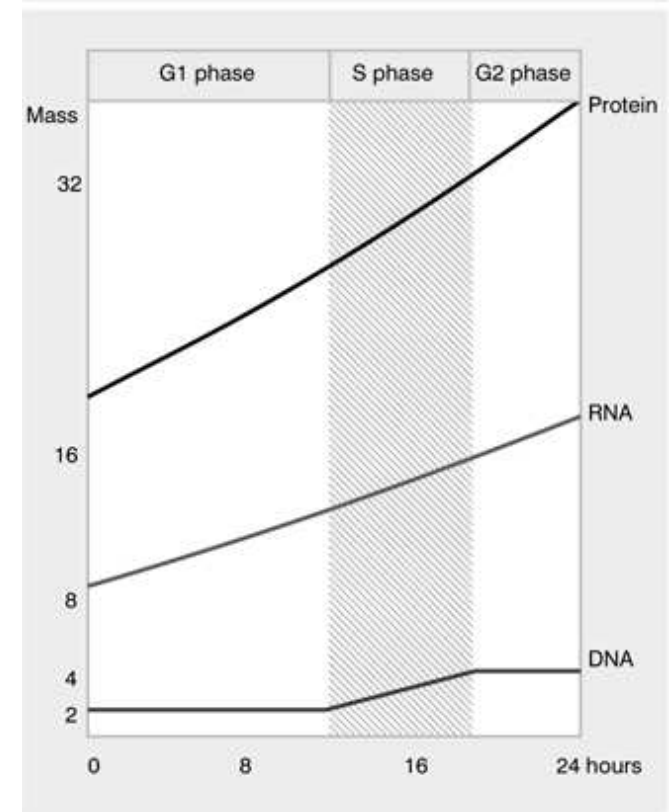
Fáze G_1

- buňka je schopna reagovat na **mimobuněčné signály**
- buňka se rozhoduje, zda bude v cyklu pokračovat nebo jej opustí a vstoupí do klidového stavu G_0
- rozhodnutí o zahájení replikace DNA se projeví přechodem tzv. bodu restrikce v pozdní fázi G_1
- pro přechod bodu restrikce je nutná přítomnost **růstových faktorů** (další fáze cyklu mohou probíhat za jejich nepřítomnosti)
- **anti-proliferační faktory** (rapamycin, cytokiny - $TGF\beta$) zastavují proliferaci pouze těch buněk, které se nacházejí v G_1 , ale ještě nedosáhly bodu restrikce

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.



Syntéza histonů je spojena se syntézou DNA

- inhibice syntézy DNA zastavuje syntézu histonů
- po dokončení replikace jsou histonové mRNA selektivně degradovány

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)

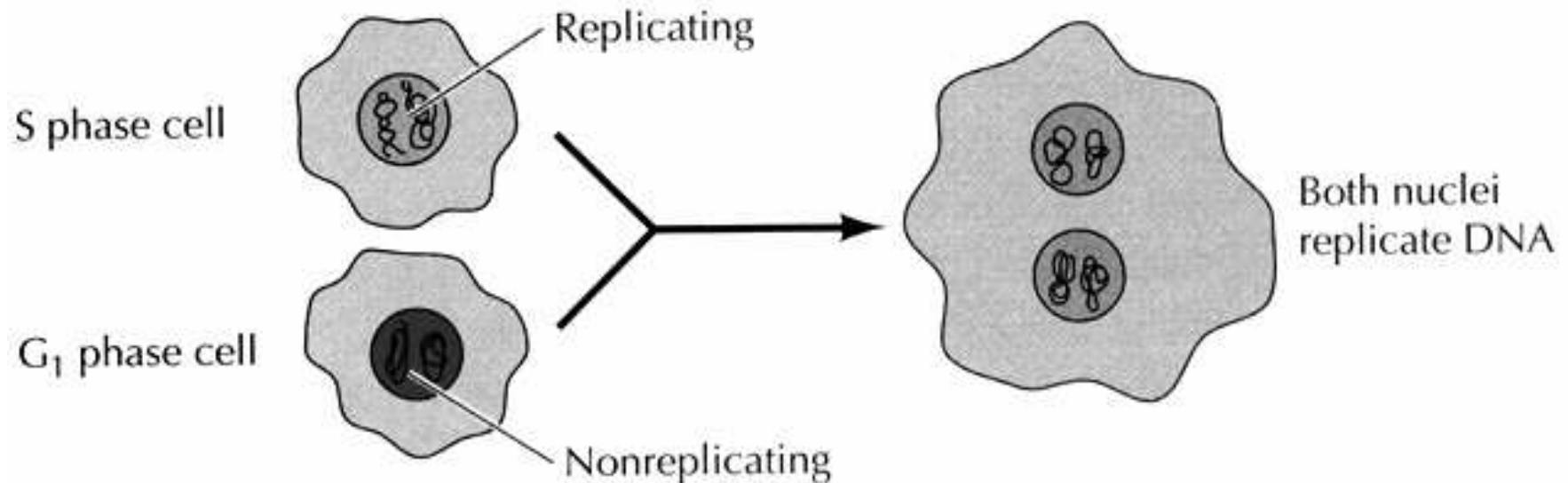
Principy řízení cyklu

- 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

Potu Rao a Robert Johnson, 1970

- klasický experimentální přístup k analýze buněčného cyklu založený na fúzi buněk v různých fázích cyklu

Fúze buňky ve fázi G_1 s buňkou ve fázi S:

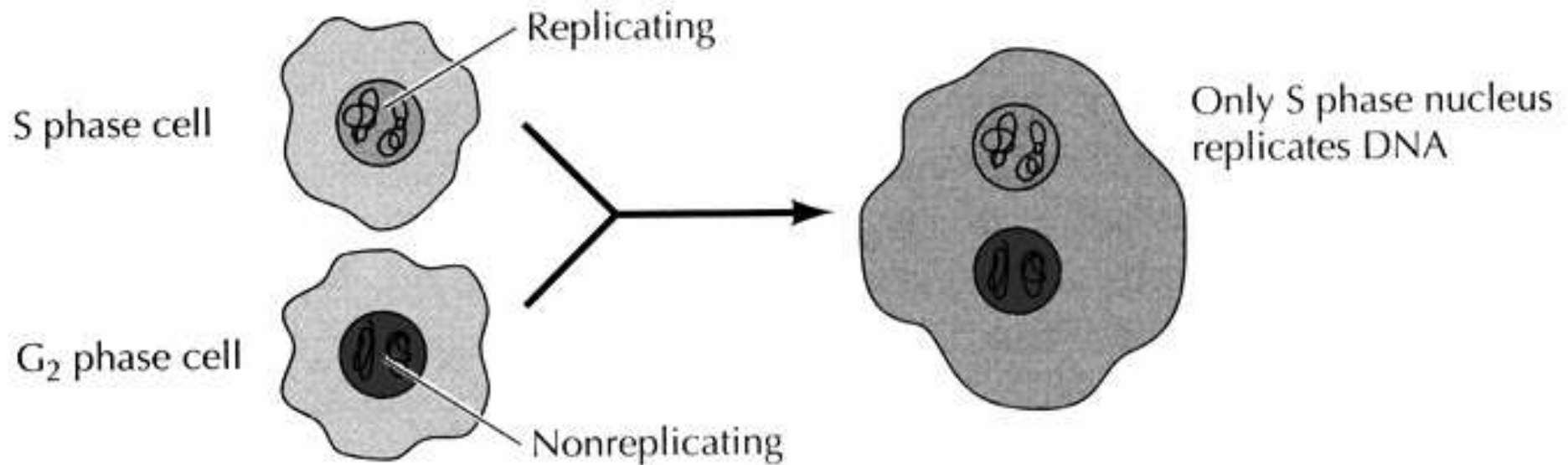


V jádře buňky ve fázi G_1 je okamžitě zahájena replikace DNA.

Závěr:

Cytoplazma buňky v S fázi obsahuje faktory, které indukují syntézu DNA v jádře buňky ve fázi G_1 .

Fúze buňky ve fázi G_2 s buňkou ve fázi S

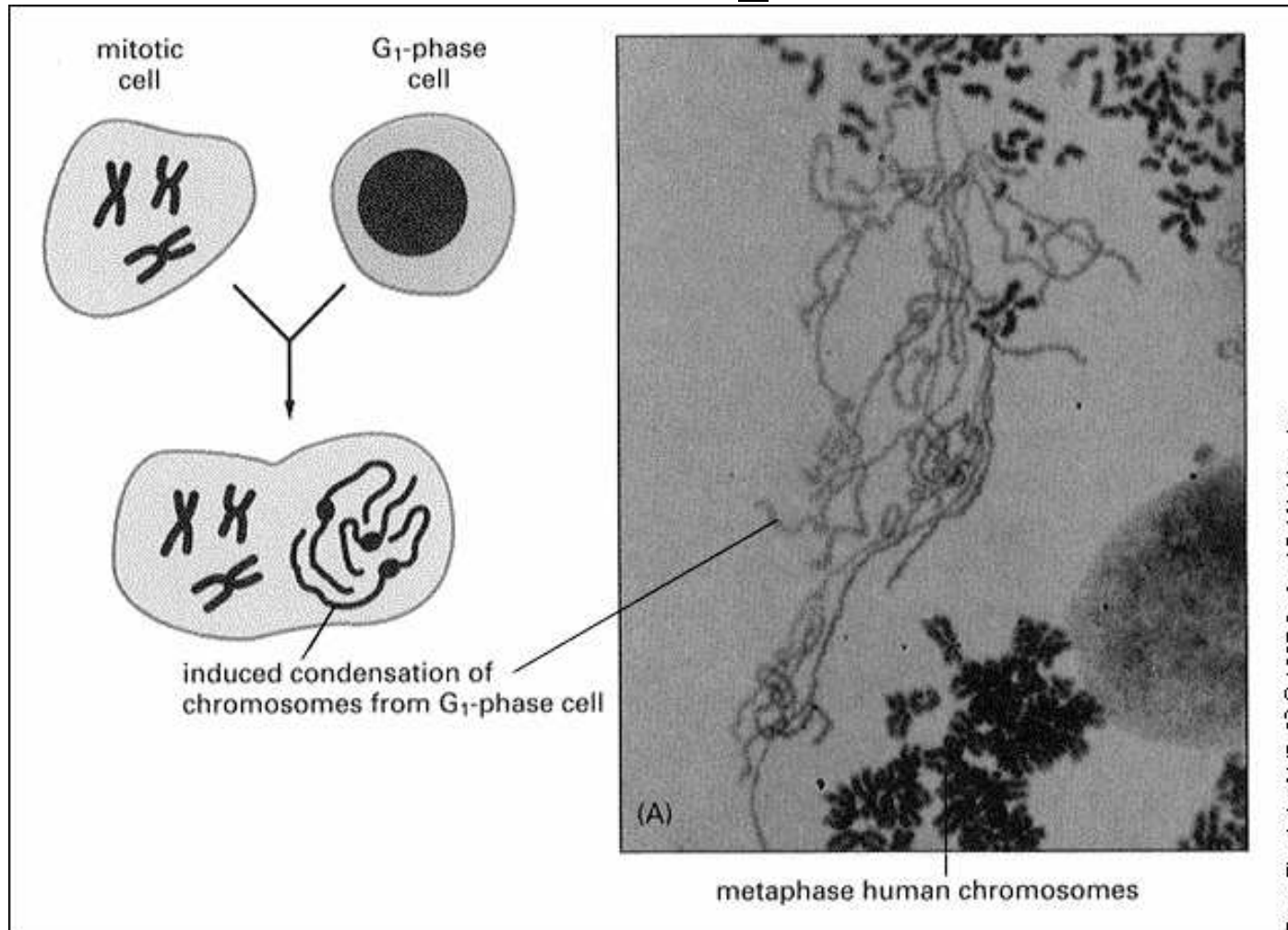


Jádro buňky ve fázi G_2 nevstupuje do další fáze S, i když je přítomno v cytoplasmě buňky ve fázi S

Závěr:

Opětná syntéza DNA v jádře buňky ve fázi G_2 vystaveném S fázové cytoplasmě nenastává. Zablokování opakované replikace je odstraněno mitózou.

Fúze buňky ve fázi M s buňkou ve fázi G_1 , S nebo G_2 :

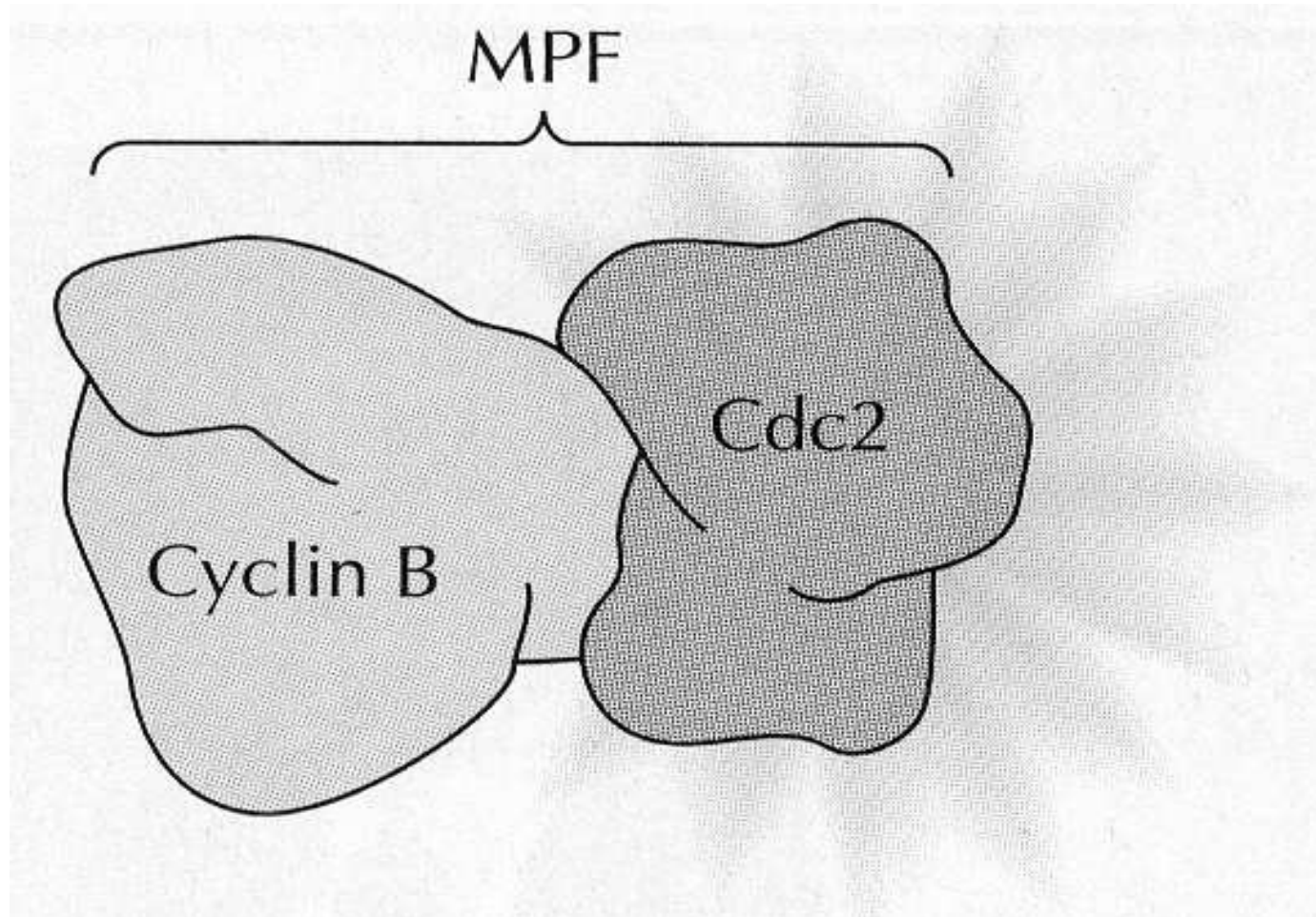


v interfázové buňce je zahájena mitóza.

Závěr:

Existuje cytoplazmatický faktor indukující M fázi, ke kterému je jádro citlivé po celý buněčný cyklus (MPF - „mitosis promoting factor“).

MPF je komplex kinázy a cyklinu



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

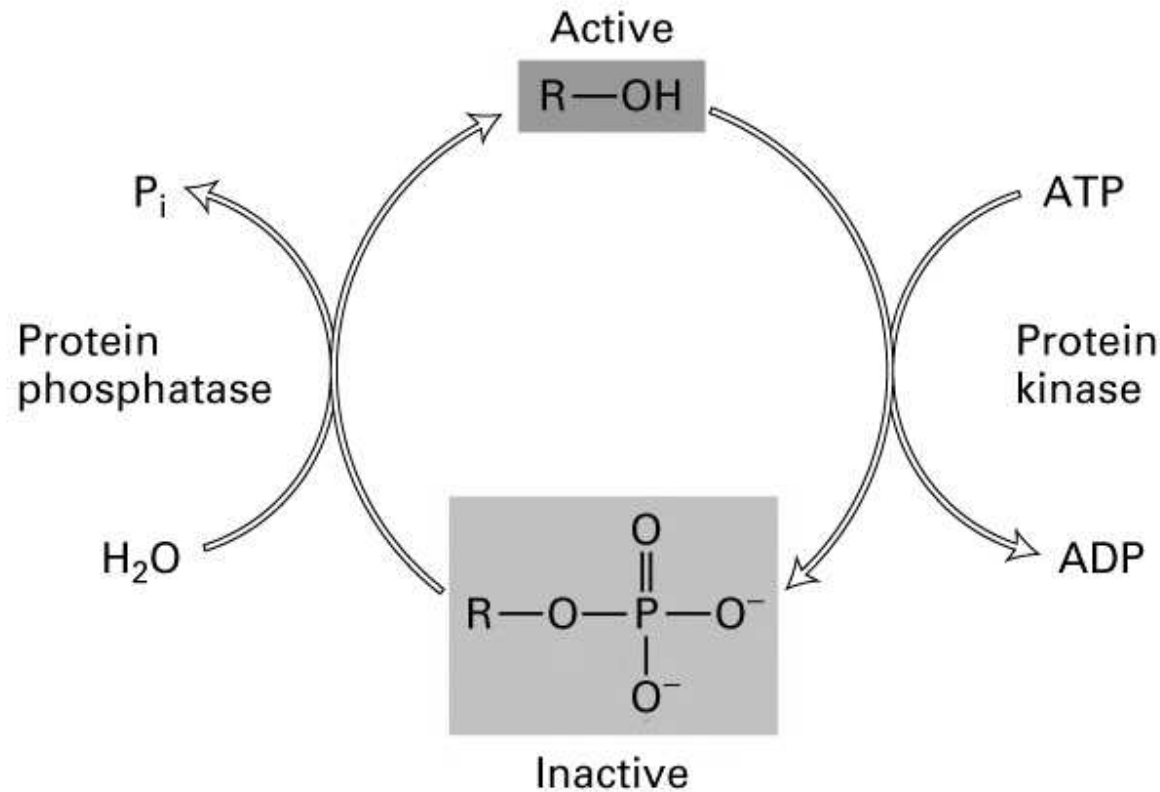
III. Kontrolní body buněčného cyklu

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

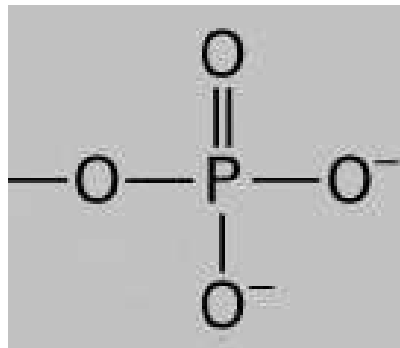
- Fosfátové skupiny jsou připojeny protein kinázami
- Fosfátové skupiny jsou odstraněny fosfatázami



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 vyvolají změny ve 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. Bod restrikce/START

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

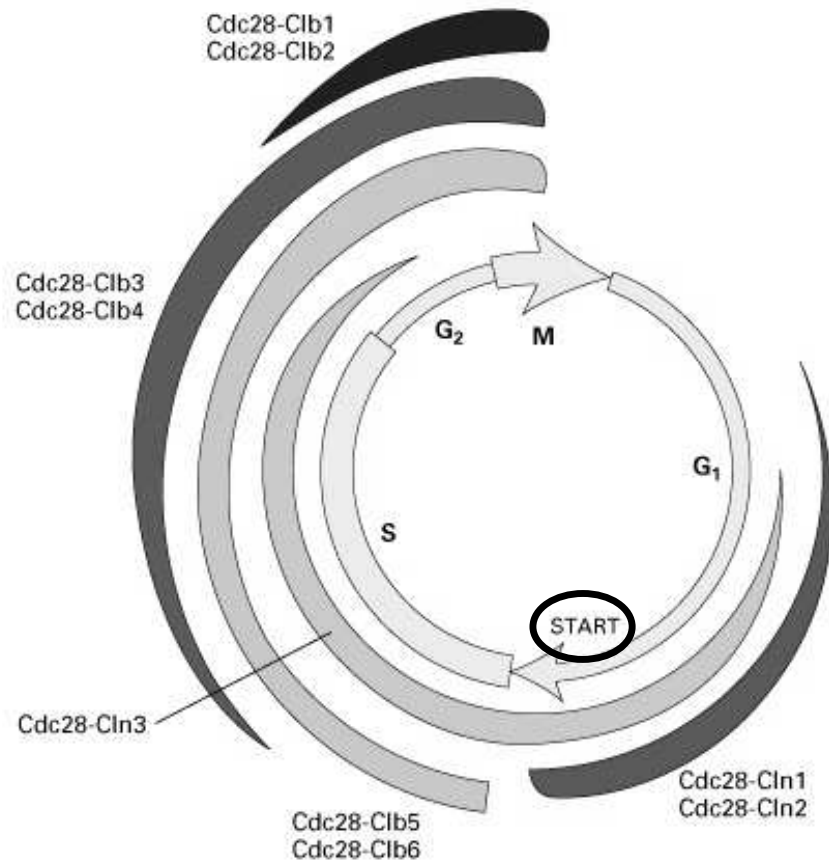
C. APC („anaphase-promoting complex“)

III. Kontrolní body buněčného cyklu

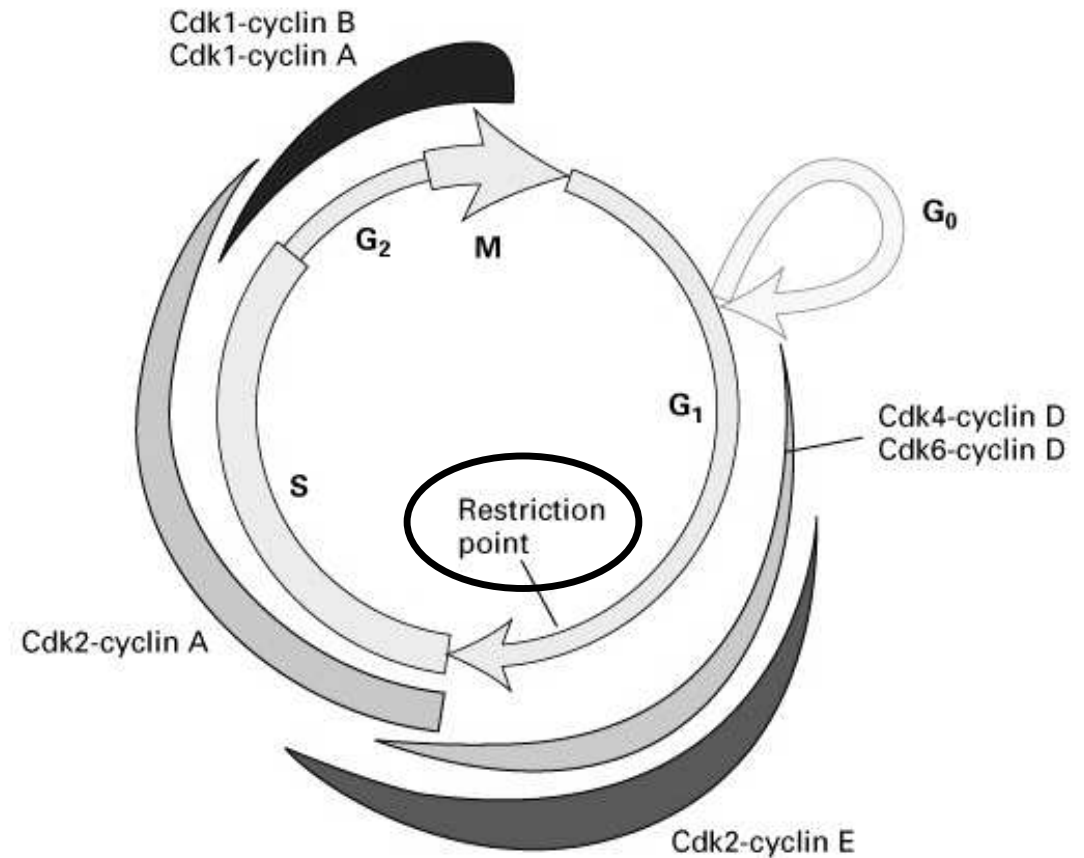
Bod restrikce (START)

- Bod cyklu, který buňky nevratně předurčuje pro dokončení buněčného cyklu
 - savci: bod restrikce („restriction point“)
 - kvasinky: START
- Lokalizován v pozdní fázi G1
- Po překonání bodu restrikce buněčný cyklus pokračuje bez ovlivnění vnějšími faktory (mohou jej pozastavit jen faktory vnitřní, např. poškození DNA)

Bod restrikce/START je v pozdní fázi G_1



Kvasinky



Savci

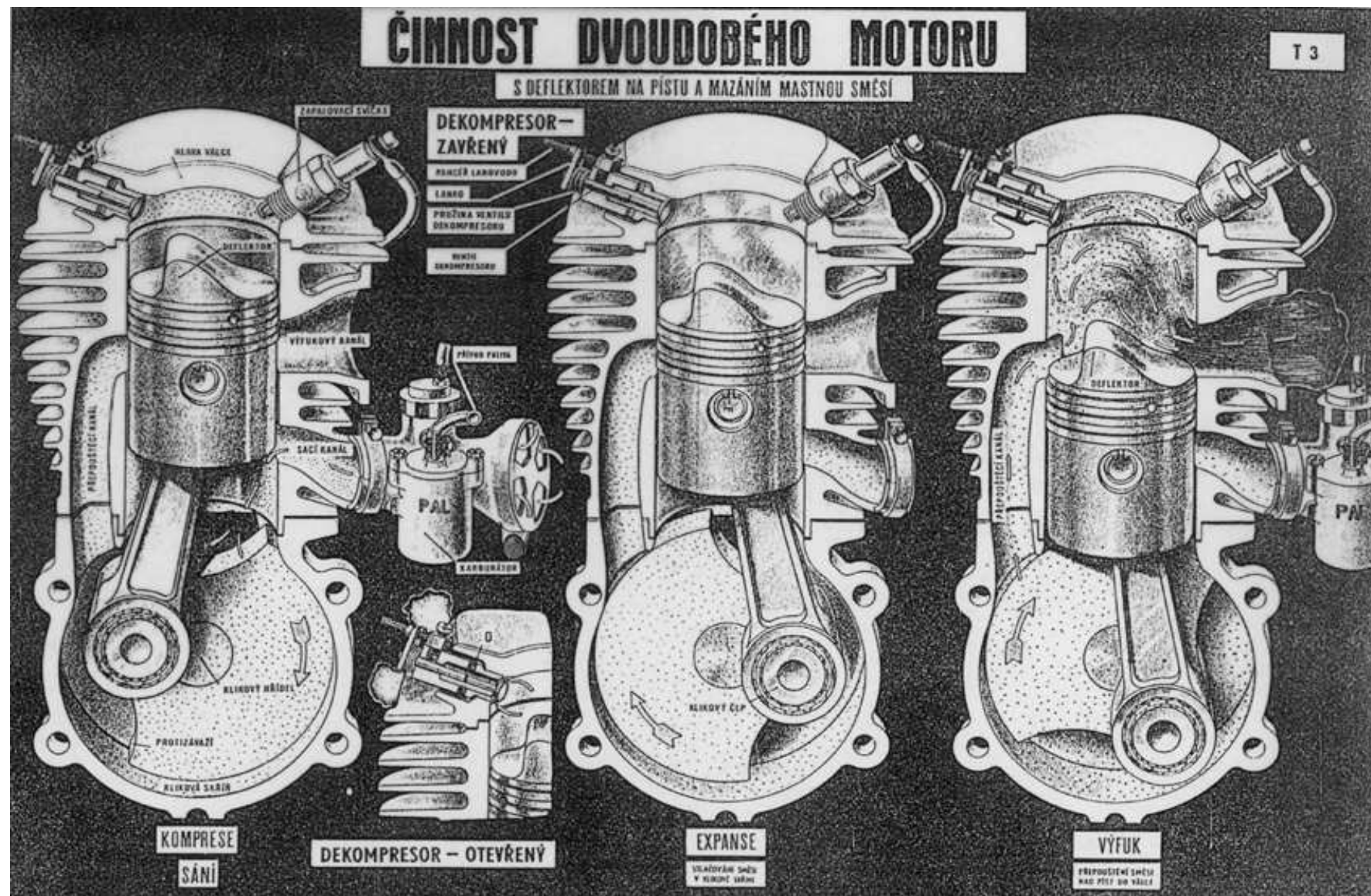
To divide or not to divide: that is the question

- 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

Princip buněčného cyklu

- průběh každou fází buněčného cyklu zajišťuje soubor specifických proteinů, jejichž aktivita je závislá na stupni fosforylace
- tuto fosforylaci zajišťují protein kinázy aktivované cykliny specifickými pro danou fázi cyklu

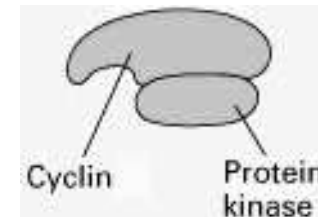
Motor buněčného cyklu má složku výkonnou a řídicí podobně jako motor spalovací



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

Heterodimerní protein kinázy složené ze dvou různých podjednotek, které zajišťují fosforylaci proteinů řídících buněčný cyklus

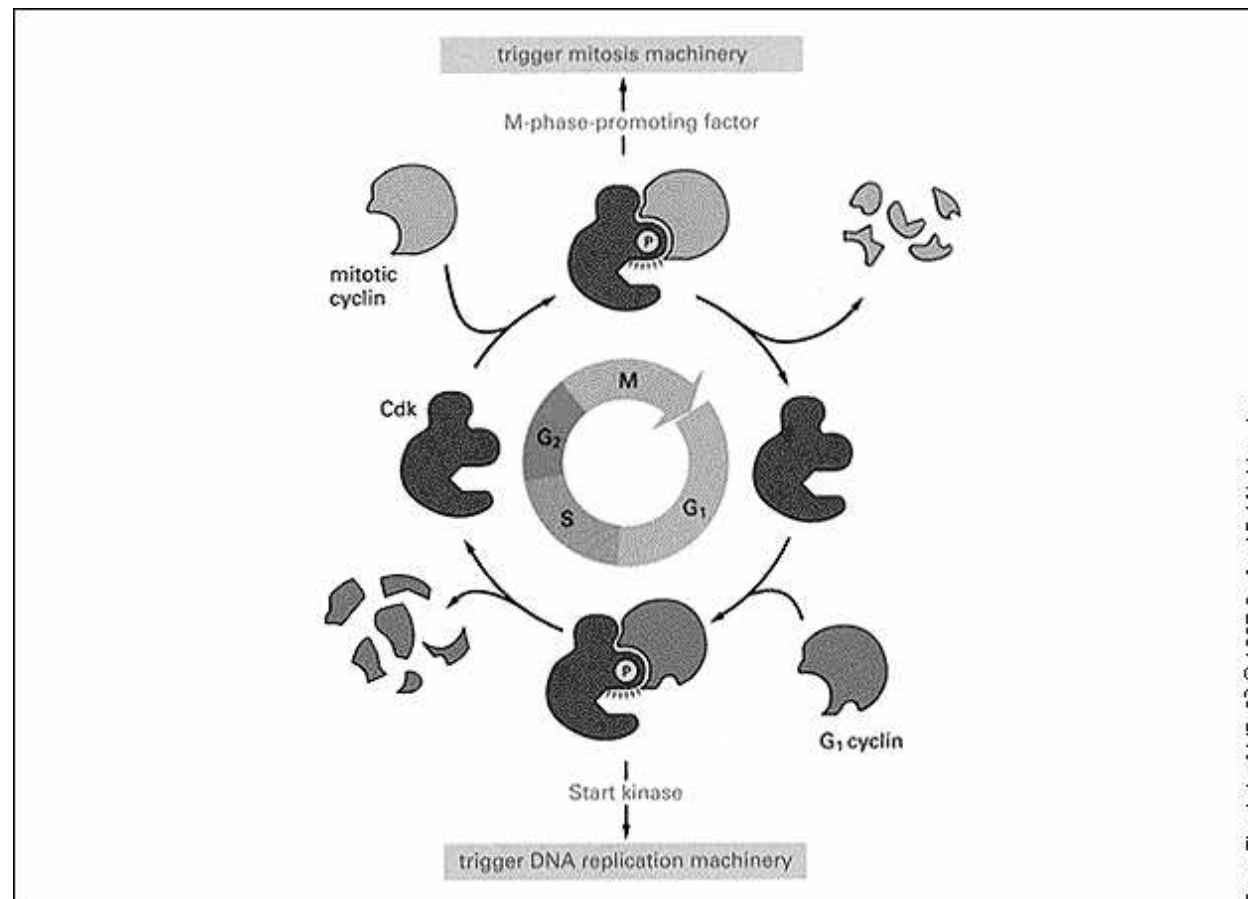
- regulační podjednotka: cyklin
- katalytická podjednotka: Cdk



Pro každou fázi cyklu existují odlišné komplexy Cdk

Aktivita Cdk je určována cykliny, které podléhají řízené degradaci

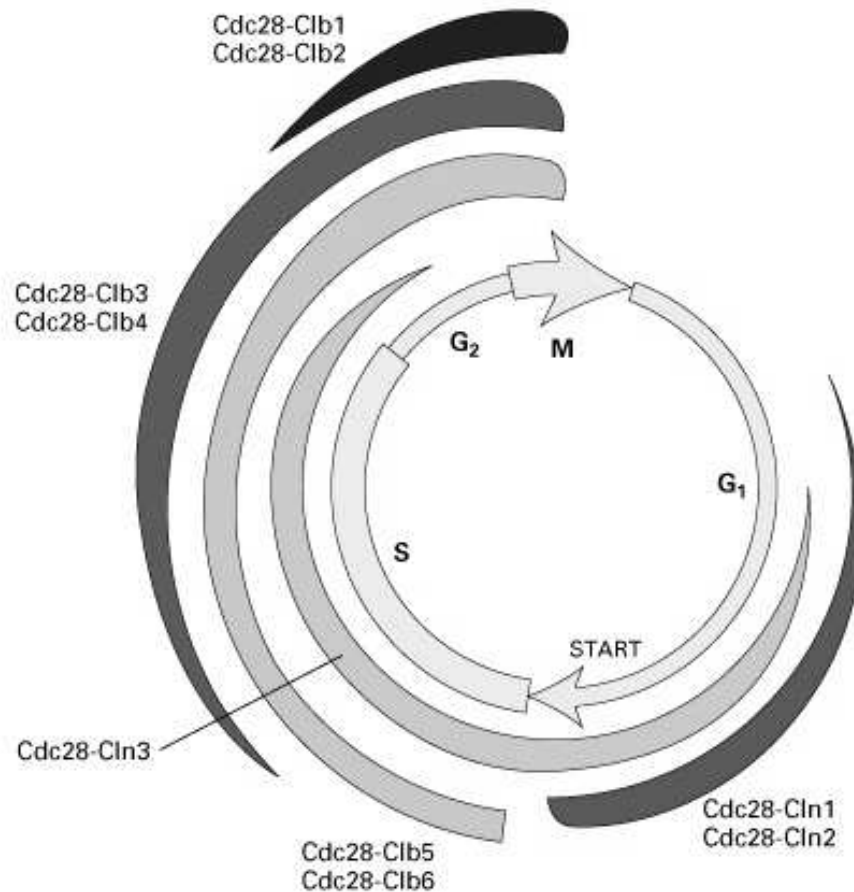
- cykliny jsou označeny ubikvitinem, což je předurčuje k rozkladu proteazomem
- nepřítomnost cyklinu inaktivuje Cdk



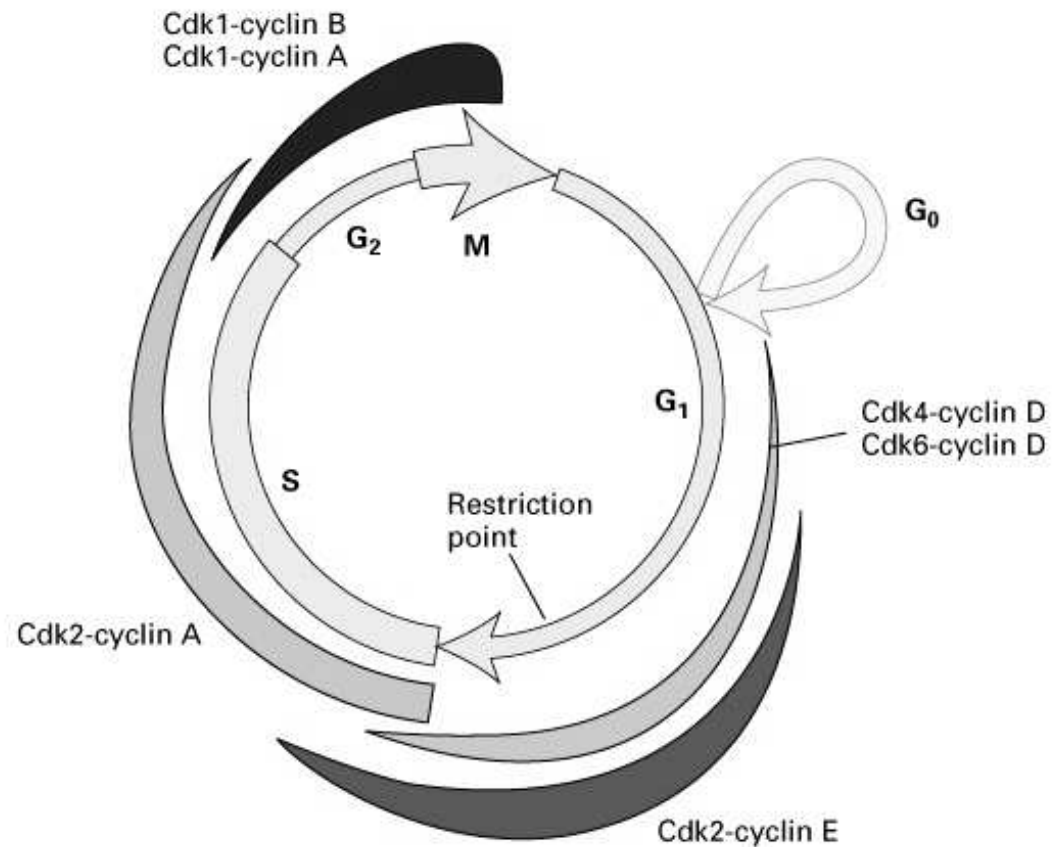
Cykliny

- regulační podjednotky komplexů Cdk-cyklin
- zapínají kinázovou (fosforylační) aktivitu Cdk
- jejich hladina během cyklu pravidelně kolísá
- ve specifických okamžicích cyklu podléhají degradaci proteolýzou

Hladina cyklinů v buňce pravidelně kolísá



Buňky kvasinek



Buňky savců

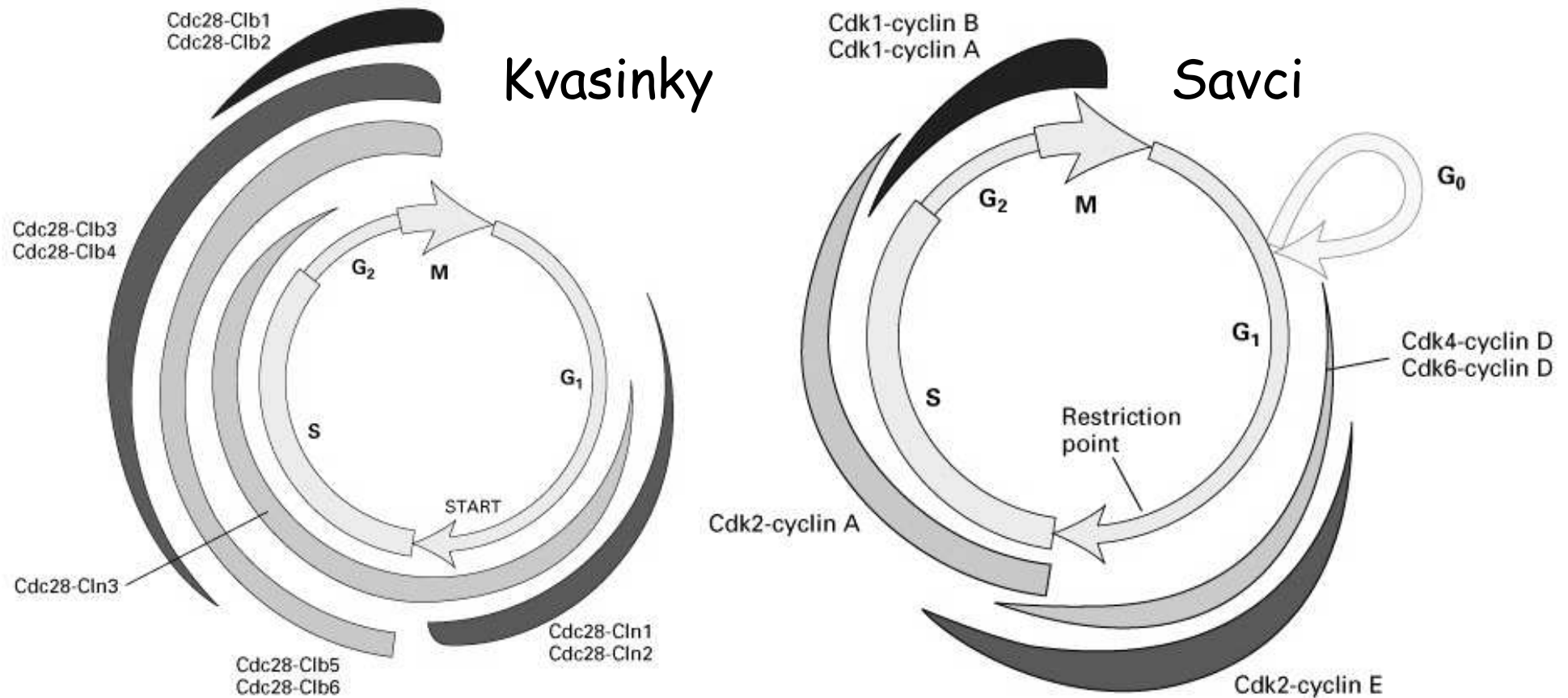
Cyklin-dependentní kinázy Cdk

- 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

Komplexy Cdk a jednotlivé fáze cyklu

- Tři typy:
 - komplexy Cdk fáze G1
 - komplexy Cdk fáze S
 - mitotické komplexy Cdk (MPF)
- Specifita fází cyklu je určena typem cyklinu a v některých buňkách také typem Cdk

Typy cyklinů a Cdk

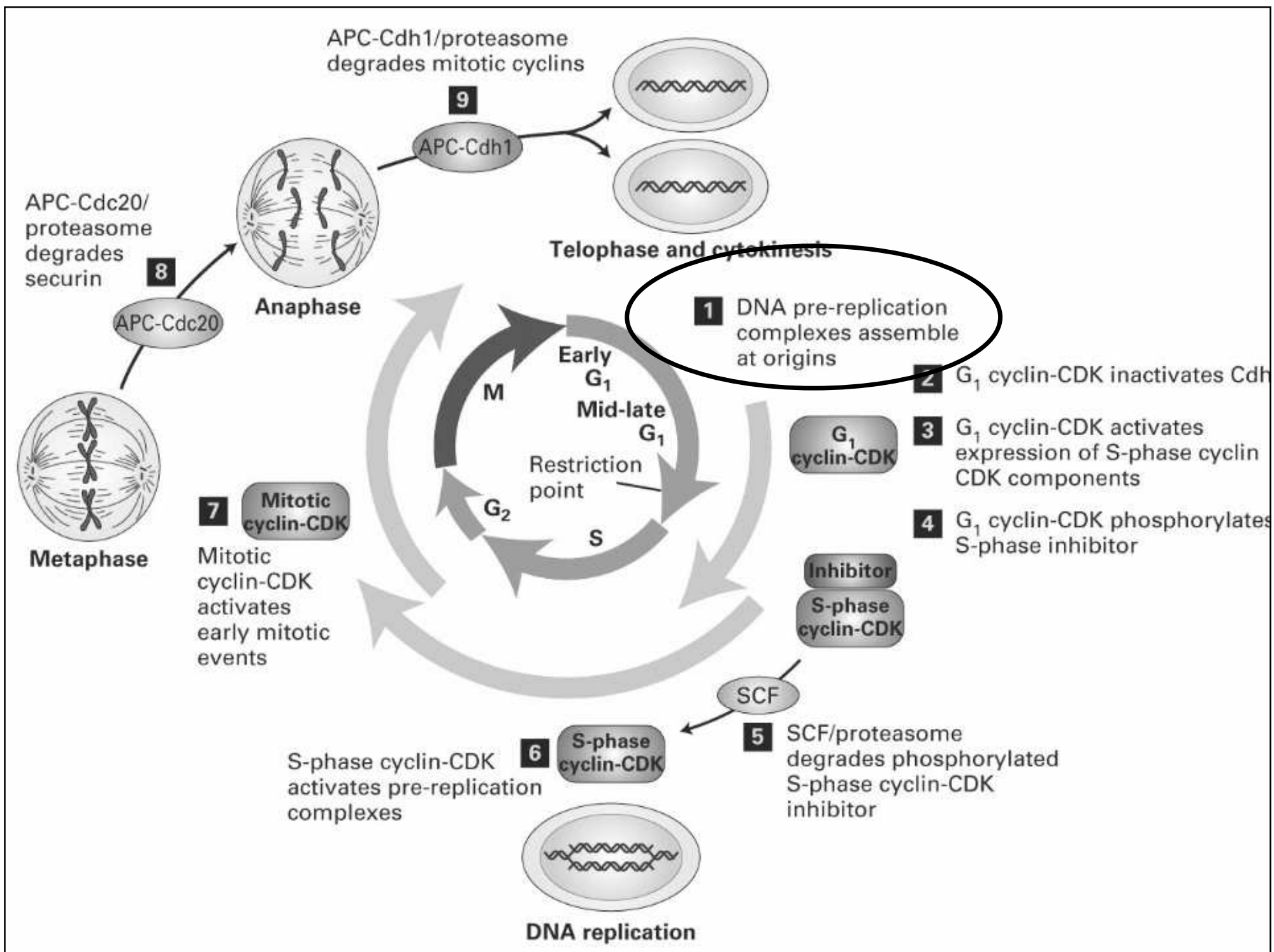


Kvasinky: 9 cyklinů a 1 Cdk

Savci: 4 rodiny cyklinů a 4 Cdk

Komplexy Cdk rané fáze G1: Cdk4/Cdk6 a cyklin D

- aktivovány jako první po přijetí signálu pro replikaci
- připravují buňku pro S-fázi
- fosforylují (a tím aktivují) transkripční faktory, které zajišťují transkripci genů kódujících enzymy nutné pro replikaci DNA a genů kódujících S-fázové cykliny a Cdk
- dochází k defosforylaci proteinů pre-replikačních komplexů fosfatázou (fosforylaci zajistily S-fázové komplexy cyklinů a Cdk v předchozí S-fázi). Důsledkem je sestavení nových pre-replikačních komplexů v místech ori.

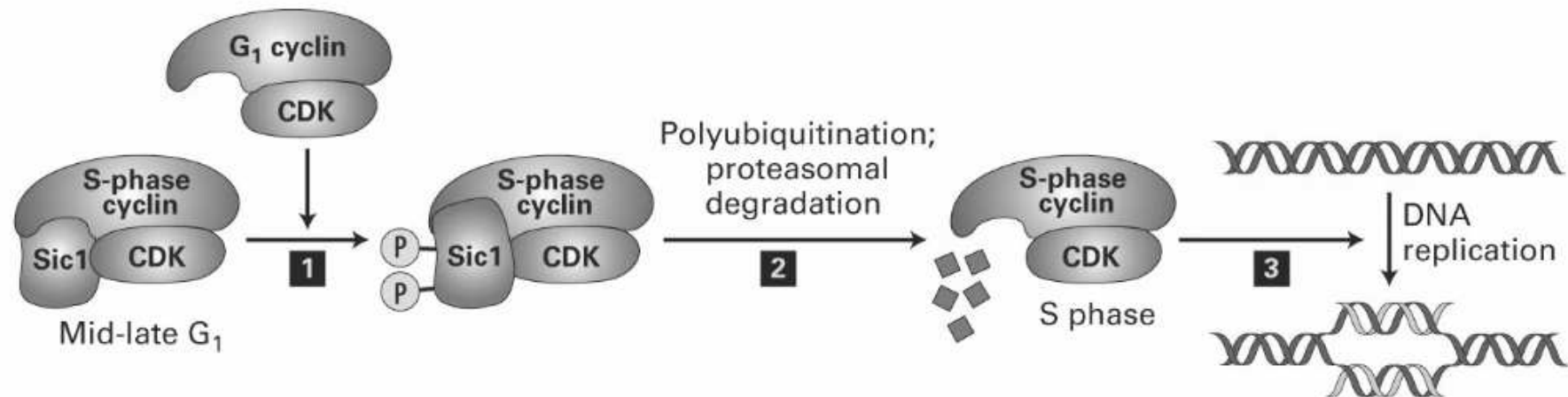


Komplexy Cdk přechodu fází G1/S: Cdk2 a cyklin E

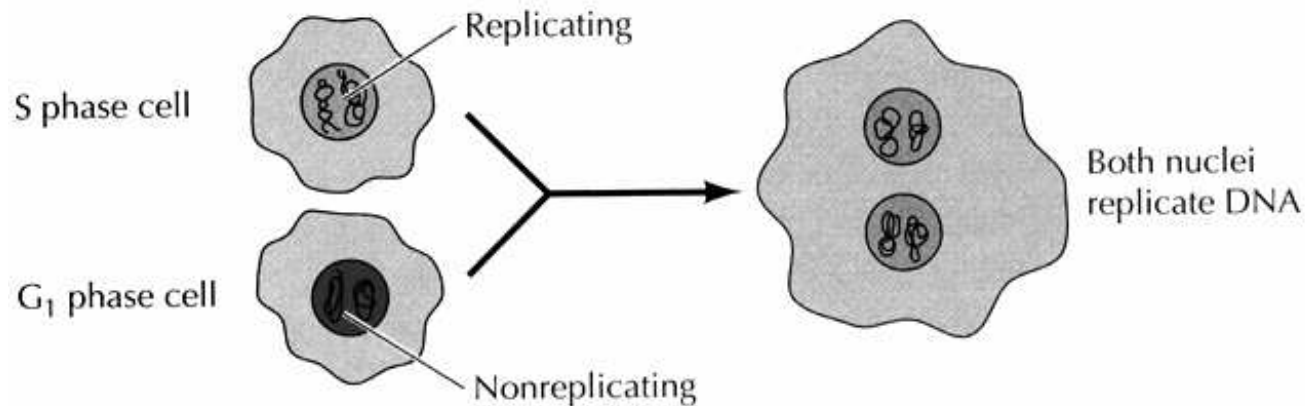
- dále připravují buňku pro S-fázi
- v pozdní fázi G1 způsobují degradaci inhibitoru komplexu Cdk fáze S (fosforylace a následná ubikvitinace inhibitoru S-fáze ubikvitin ligázou **SCF**): rozložení inhibitoru S-fáze proteazomem - výsledkem je aktivace S-fázového komplexu Cdk
- fosforylují transkripční faktory, které zajišťují transkripci genů kódujících enzymy nutné pro replikaci DNA

Kontrola přechodu *G1/S* u kvasinek

- S-fázové komplexy cyklin/CDK se hromadí ve fázi *G1*, ale jsou inhibovány inhibítozem S-fáze **Sic1** (zabránění iniciace S-fáze dokud na ni není buňka zcela připravena)
- v pozdní fázi *G1* fosforylují *G1*-fázové komplexy cyklin/CDK inhibitor Sic1: tím je rozeznán ubikvitin ligázou SCF a označen polyubikvitinací pro likvidaci v proteazomu
- S-fázové komplexy cyklin/CDK jsou odstraněním inhibitoru aktivovány



Proč cytoplazma buňky v S-fázi indukuje replikaci DNA jádra ve fázi G_1 ?

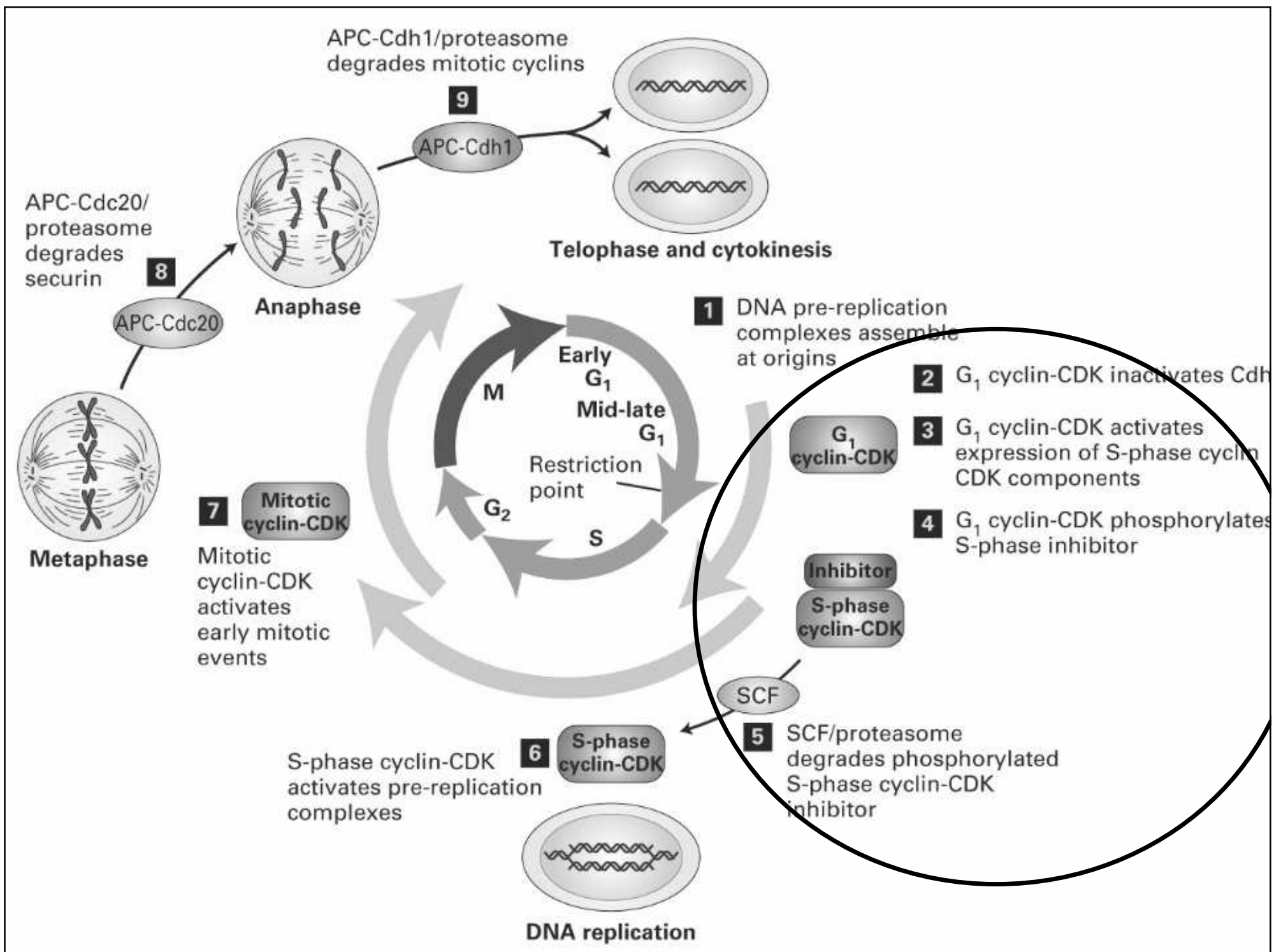


Buňka v aktivní S-fázi obsahuje komplexy Cdk2/cyklin E a Cdk2/cyklin A:

- fosforylace a následná degradace inhibitoru S fáze v hybridních
- fosforylace/aktivace transkripčních faktorů zajišťujících expresi genů, kódujících enzymy nutné pro replikaci DNA
- již pre-formované transkripční faktory vytvořené buňkou v S-fázi napomáhají replikaci DNA jádra ve fázi G_1

Během fáze *G1* začíná stoupat hladina mitotického cyklinu B

- jedním ze substrátů *G1*-fázových komplexů cyklin/CDK je protein **Cdh1** („APC-specificity factor“)
- Cdh1 zprostředkovává interakci cyklinu B s APC („anaphase-promoting complex“) a napomáhá jeho degradaci proteazomem
- Cdh1 je aktivní pouze v pozdní anafázi, kdy je zajištěno, že segregující chromozomy se dostatečně rozestoupily do dělicích se buněk
- fosforylace Cdh1 během *G1* fáze inhibuje spojení s APC a znemožňuje tak likvidaci mitotického cyklinu B: hladina cyklinu během interfáze B průběžně stoupá



Komplexy Cdk fáze S: Cdk2 a cyklin A

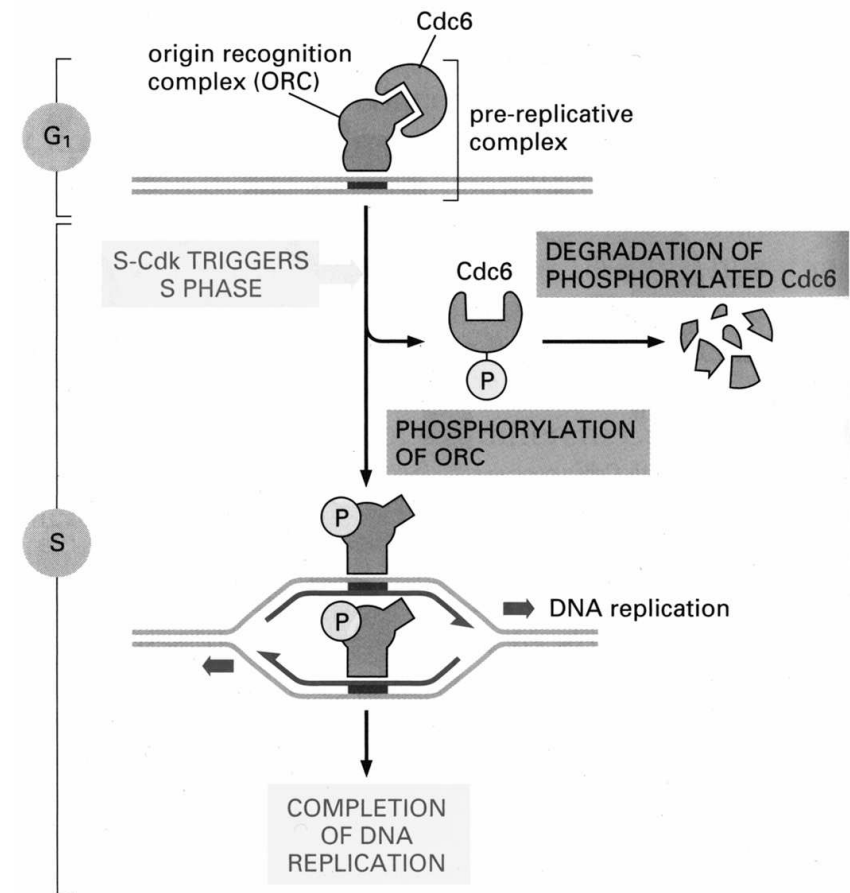
- zajišťují iniciaci replikace DNA a zabraňují nežádoucí opakované replikaci v rámci jednoho cyklu
- fosforylují regulační místa proteinů, tvořících pre-replikační komplex s DNA: (1) aktivace replikace, (2) inhibice tvorby nových pre-replikačních komplexů
- výsledkem je vznik dvou sesterských chromatid každého chromozomu spojených molekulami kohezinu
- replikace musí být maximálně přesná:
 - riziko přenosu mutací do další generace
 - riziko amplifikací

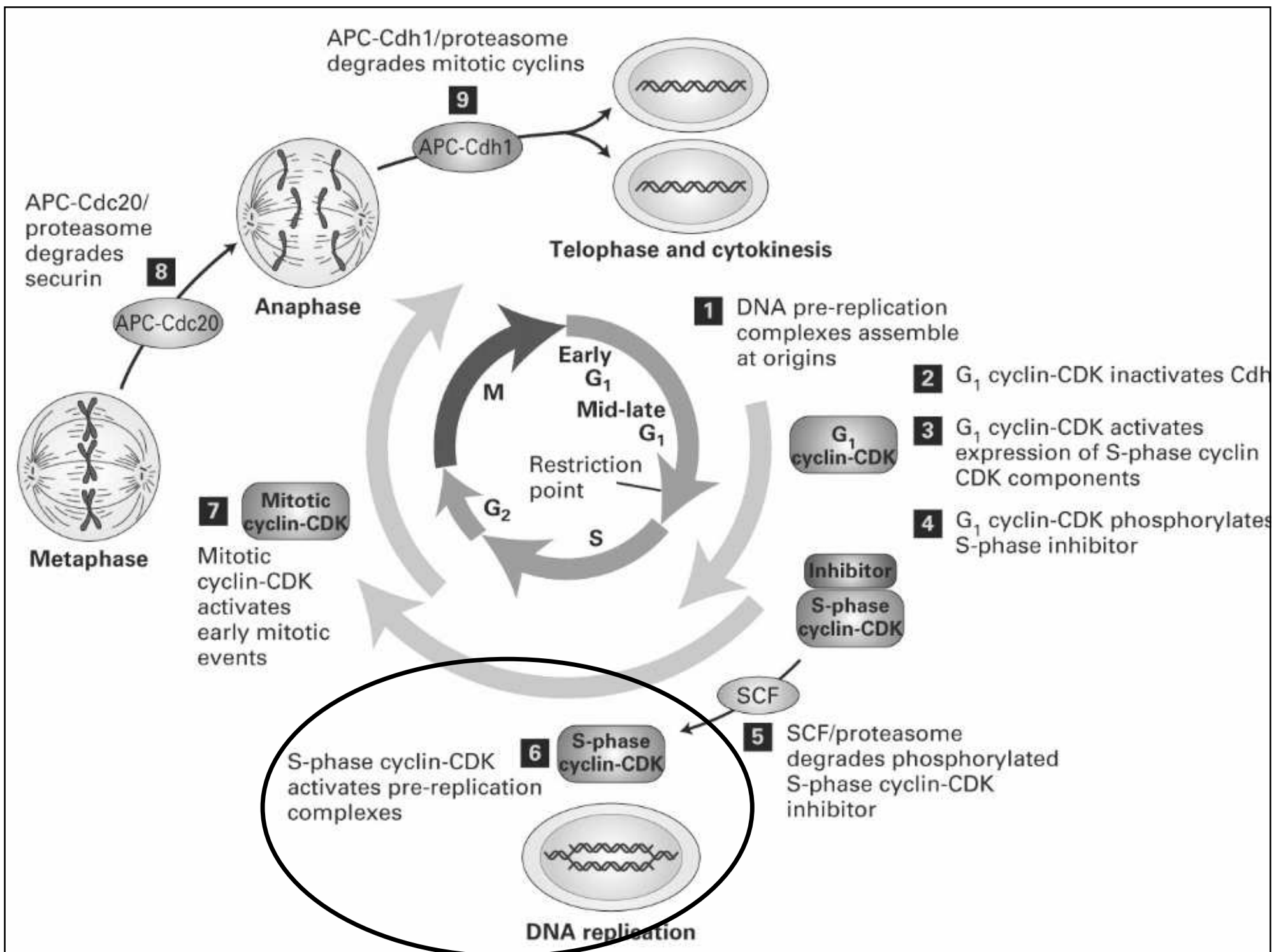
Zajištění iniciace a zabránění opakování replikace v rámci jednoho cyklu

- na místa ori DNA se stabilně váže komplex proteinů **ORC** („origin recognition complex“) - slouží jako místo vazby regulačních proteinů, např. **Cdc6**
- hladina **Cdc6** je nízká v průběhu cyklu, přechodně se zvyšuje v rané fázi **G1**
- vazba **Cdc6** na **ORC** v **G1** umožňuje vazbu dalších proteinů za vzniku **pre-replikačního komplexu**

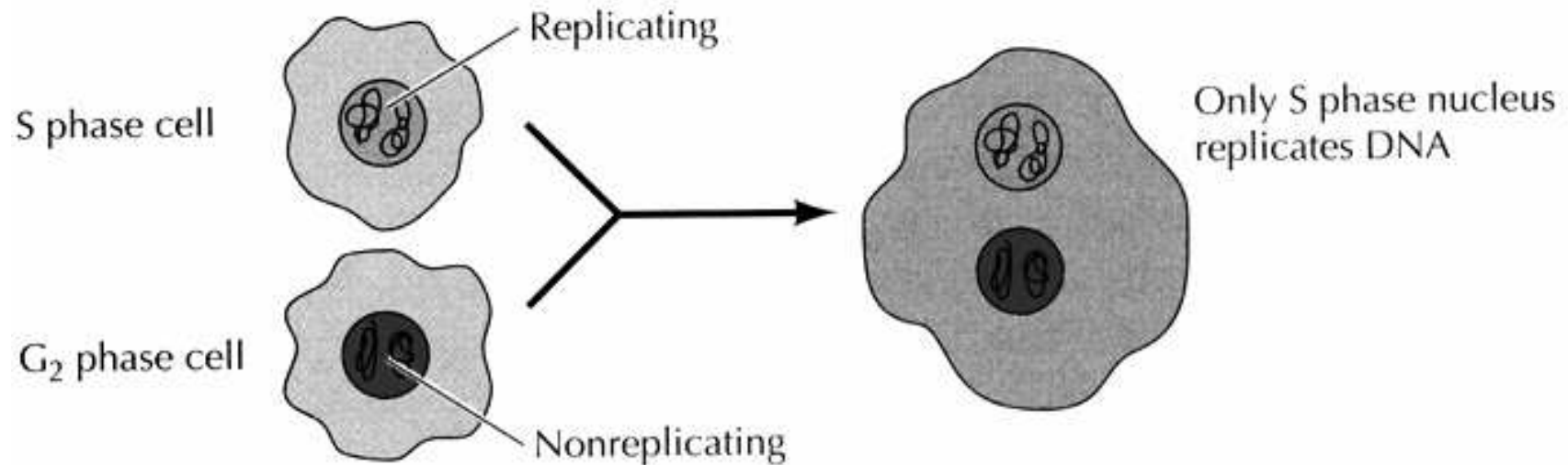
Iniciace replikace: přítomnost pre-replikačního komplexu a S-fázových komplexů cyklin-Cdk

Zabránění opětné replikace: fosforylace **Cdc6** působením S-fázových komplexů cyklin/Cdk vedoucí k oddělení z komplexu a následnému rozkladu **Cdc6** (znemožnění tvorby nových pre-replikačních komplexů)





Proč jádro ve fázi G₂ není indukováno k další replikaci cytoplazmou buňky ve fázi S?



Opětná replikace DNA v jádře G₂ není možná v důsledku absence pre-replikačních komplexů (S-fázové komplexy cyklin/Cdk okamžitě fosforylují protein Cdc6, který je následně rychle rozložen)

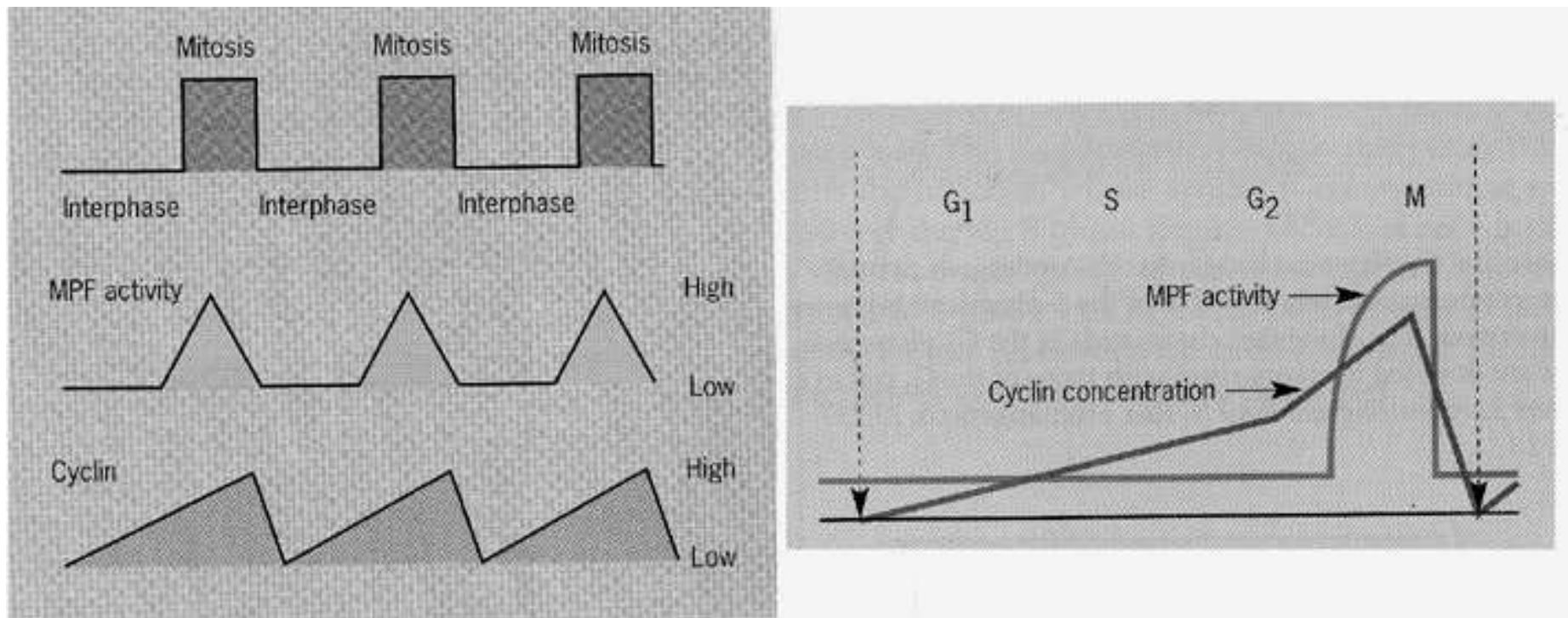
Buňka ve fázi G₂ může pokračovat k mitóze za předpokladu, že je v ní dostatečná hladina mitotických komplexů cyklin B/CDK
-to však není případ S-fázové buňky, proto jádro buňky z fáze G₂ zůstává v hybridních buňkách „pasivní“

Komplexy Cdk fází G2/M: Cdk1 a cykliny A/B

- syntetizovány průběžně během interfáze
- aktivita blokována inhibičními fosforylacemi dokud není potvrzeno dokončení replikace DNA
- po přijetí aktivačního signálu: defosforylace v inhibičních místech umožní aktivaci kinázové aktivity: fosforylace řady proteinů, které zodpovídají za:
 - kondenzaci chromozomů
 - rozpad jaderné membrány
 - tvorbu mitotického vřeténka
 - seřazení kondenzovaných chromozomů v rovině

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 G₂)

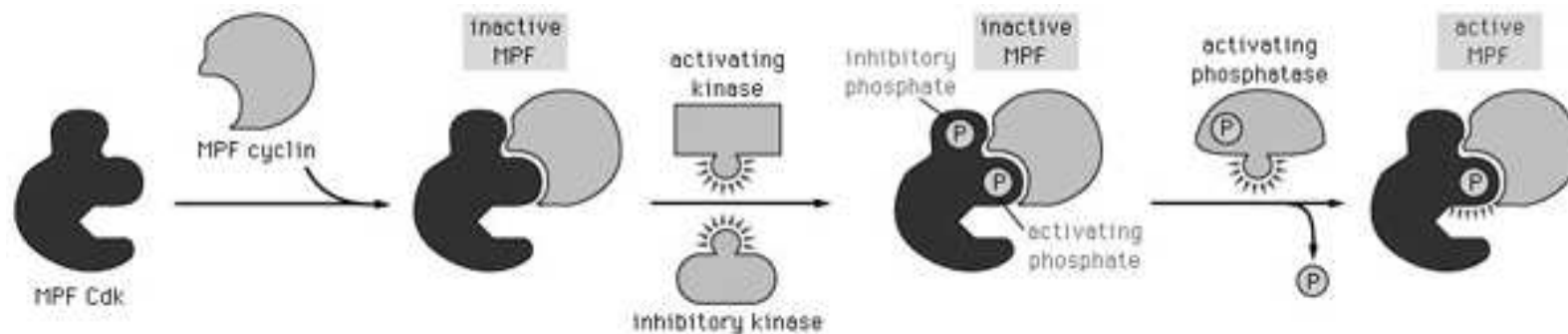


Přítomnost cyklinu B není jedinou podmínkou aktivace MPF

Koncentrace cyklinu B se zvyšuje rovnoměrně během cyklu, 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.

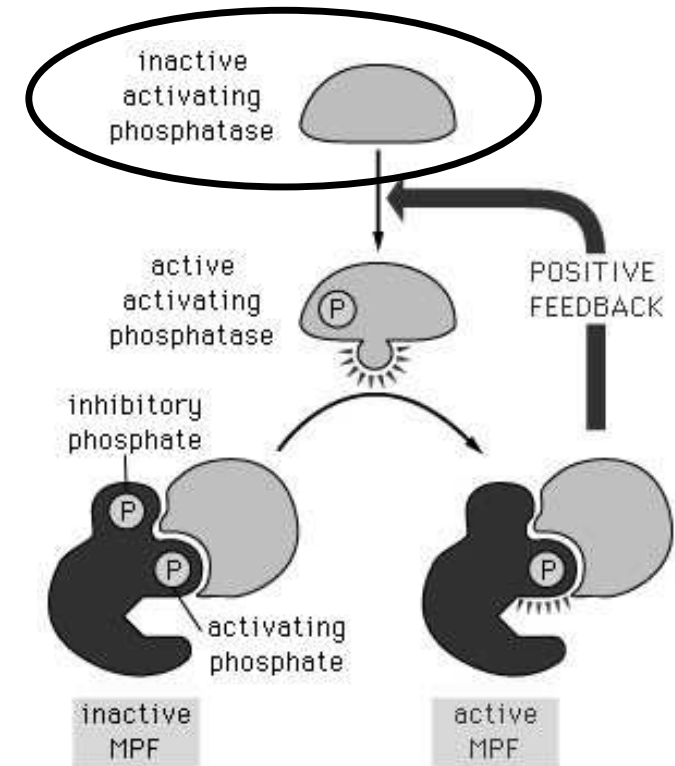


Pozitivní zpětná vazba: aktivovaný MPF aktivuje další komplexy MPF

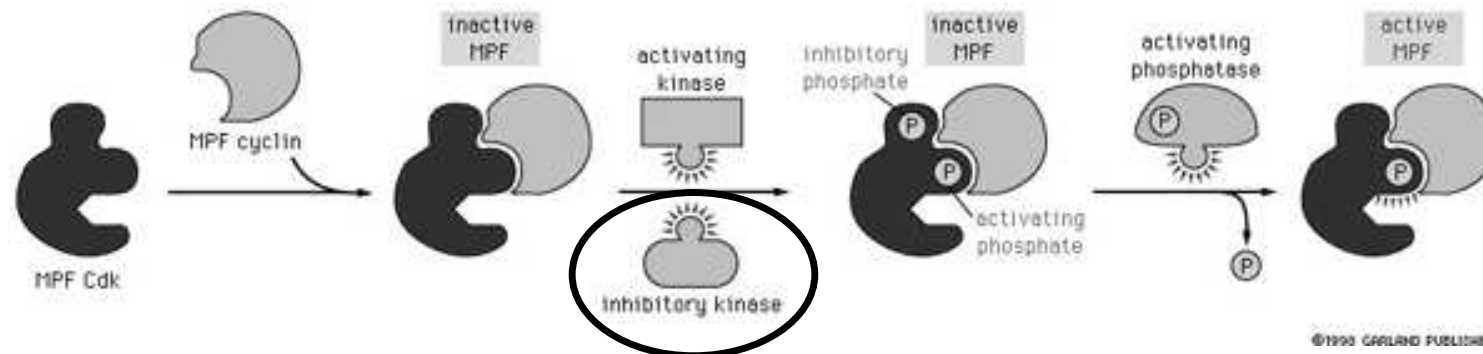
Substrátem MPF je

- **aktivační fosfatáza**, která odstraňuje inhibiční fosfátové skupiny a tak aktivuje další molekuly MPF
- **inhibiční kináza**, která se fosforylací inaktivuje: posílení aktivace MPF

Oba faktory přispívají k dramatickému zvýšení aktivity MPF v krátkém okamžiku: iniciace M-fáze



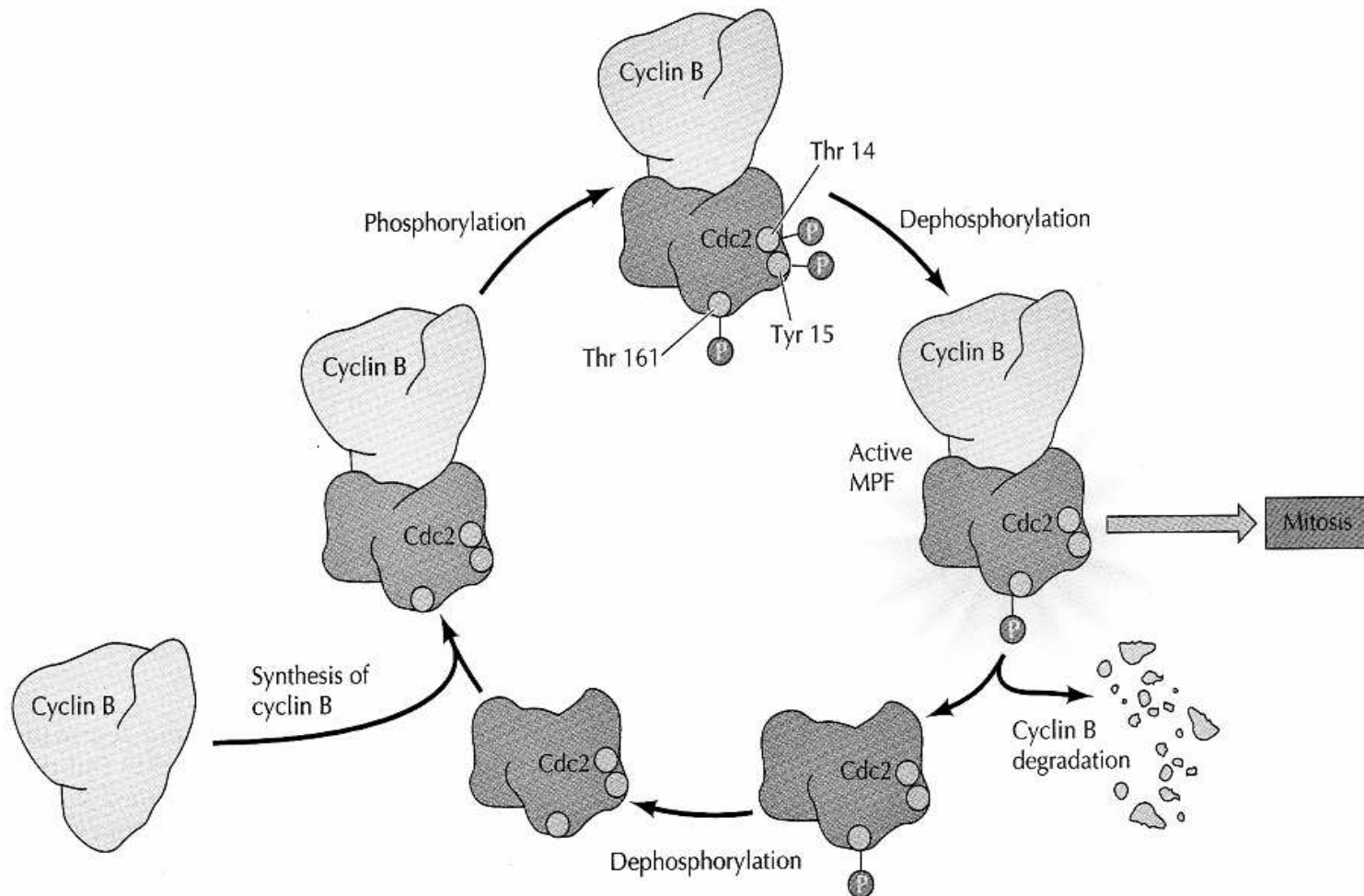
©1998 GARLAND PUBLISHING



©1998 GARLAND PUBLISHING

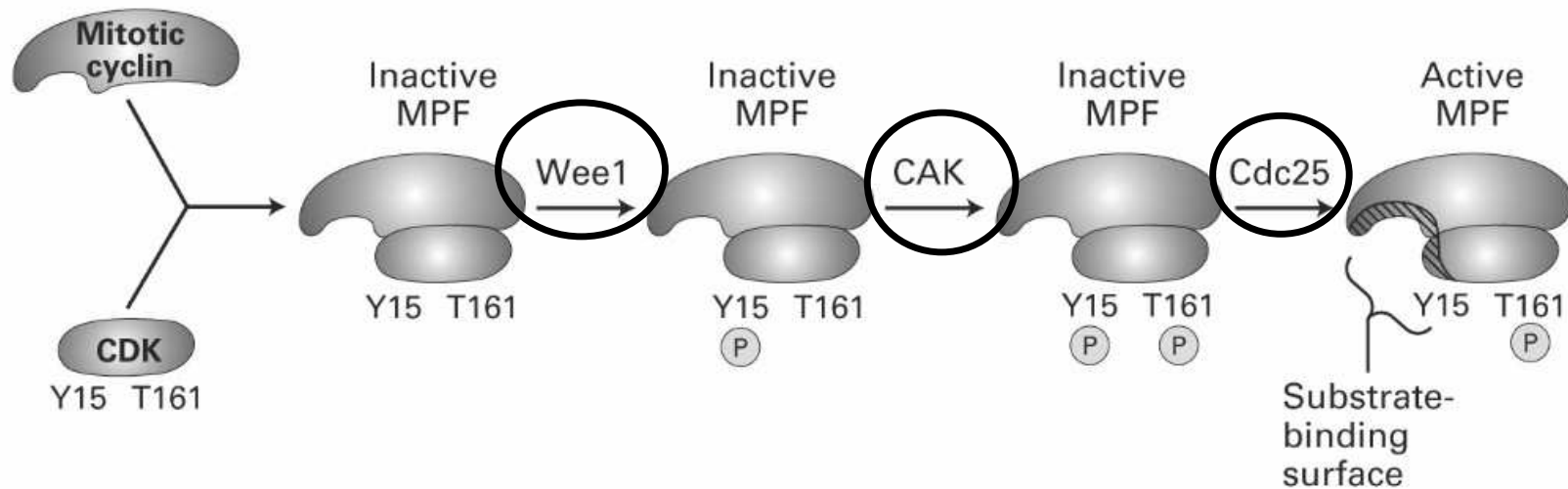
Podmínky aktivity MPF u kvasinek *S. cerevisiae*

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

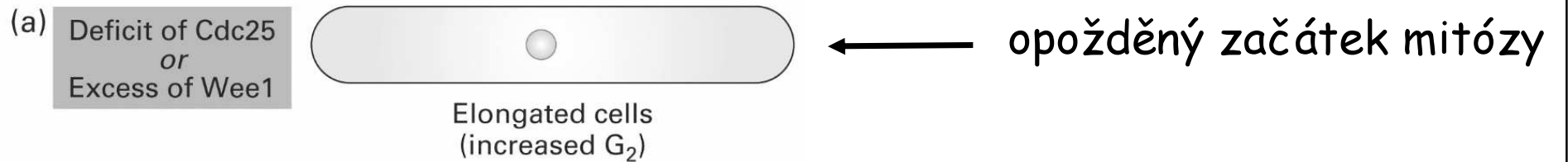


Regulace aktivity MPF u kvasinek *S. pombe*

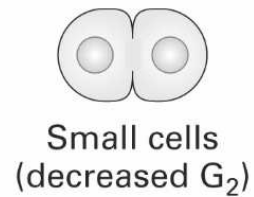
- MPF je tvořen cyklinem Cdc13 a kinázou Cdc2
- kináza Wee1 fosforyluje tyrozin 15 Cdc2 (inhibiční efekt)
- kináza CAK fosforyluje treonin 161 Cdc2 (aktivační efekt)
- za přítomnosti zbytků 15 a 161 ve fosforylovaném stavu je MPF inaktivní
- odstranění fosfátu z tyrozinu 15 fosfatázou Cdc25 se MPF aktivuje



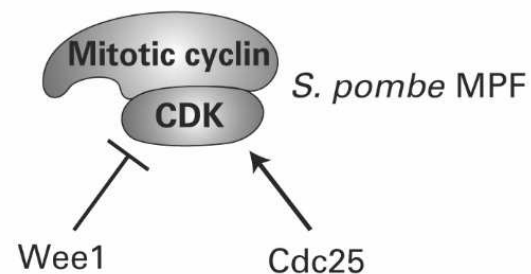
Kontrola velikosti buněk u kvasinek



Deficit of Wee1
or
Excess of Cdc25

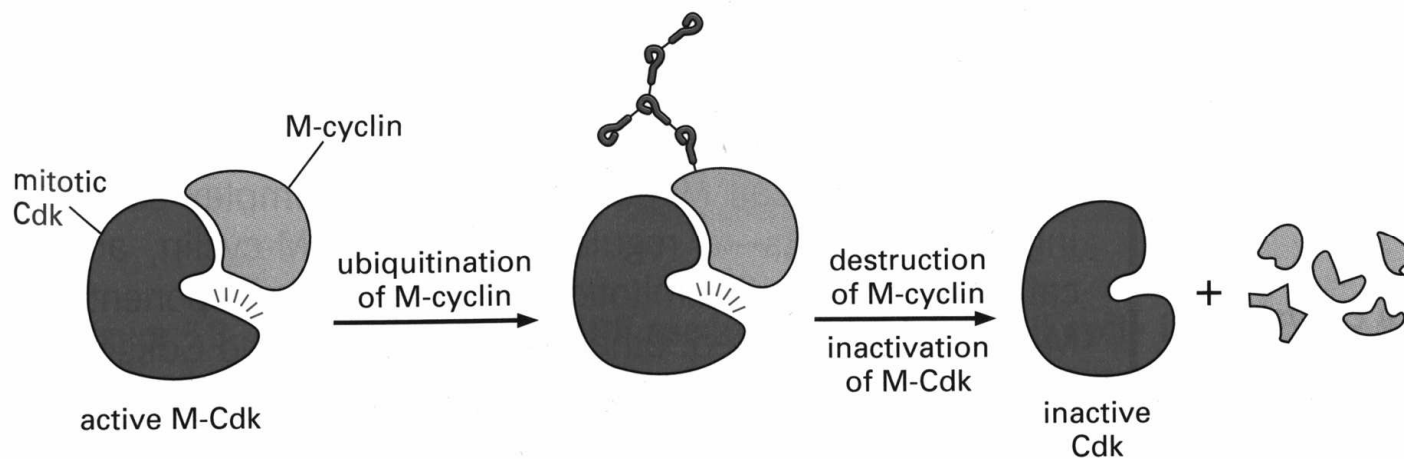


(b)



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



Kontrola ubikvitinace cyklinu B: APC („anaphase-promoting complex“)

- APC slouží jako **ubikvitin ligáza**: připojuje ubikvitin k cyklinu B a dalším proteinům řídících mitózu a tím je předurčuje k degradaci proteazomem
- aktivita APC kolísá v průběhu cyklu: zapíná se v pozdní mitóze mitotickým komplexem Cdk (MPF)
- substrátem je např.

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

- ubikvitinace a rozklad sekurinu uvolňuje chromatidy pro segregaci
- ubikvitinace sekurinu je inhibována až do okamžiku připojení kinetochorů všech chromozomů k mikrotubulům vřeténka

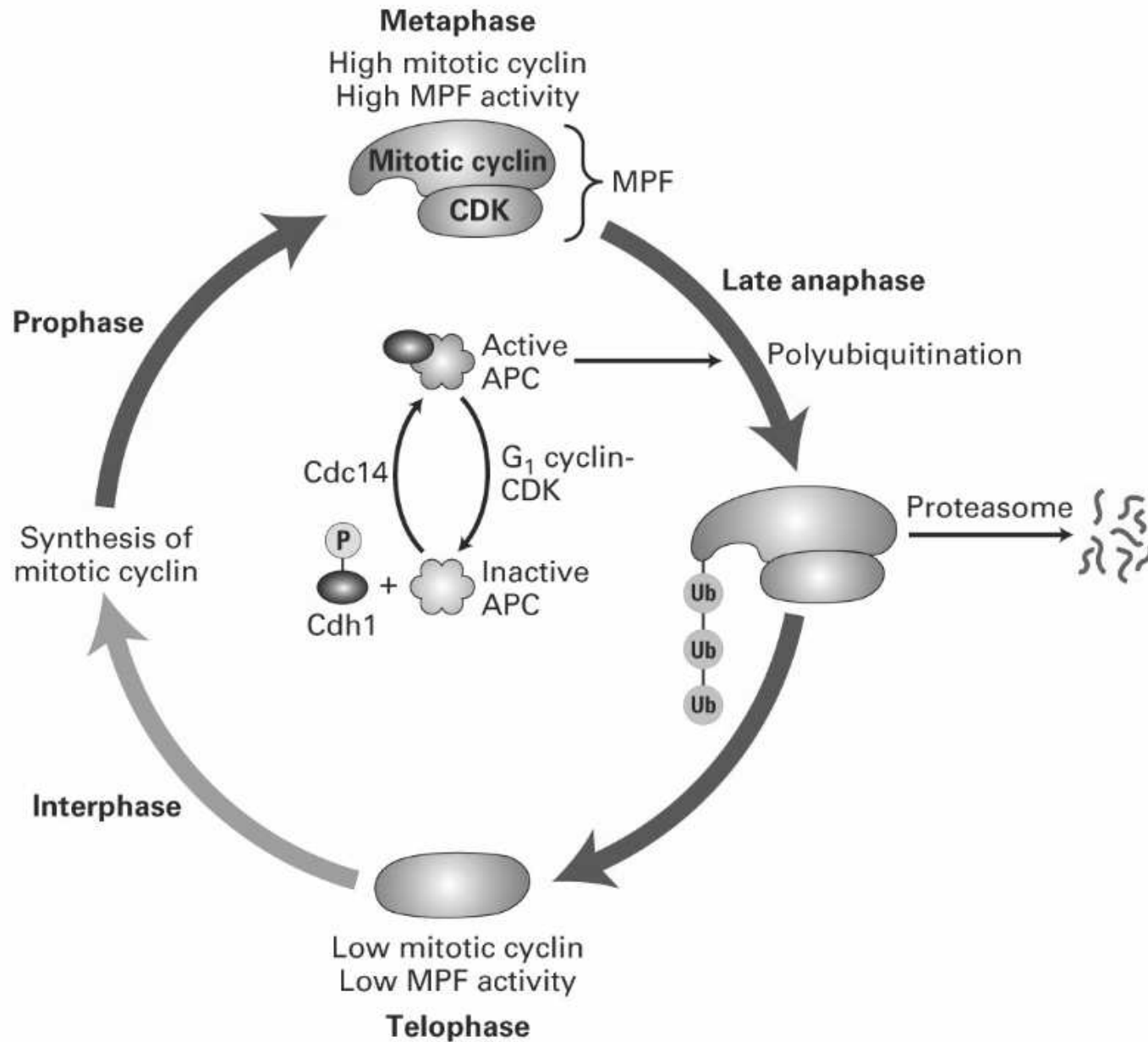
Cyklin B: regulátor mitotického komplexu Cdk (MPF)

- 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

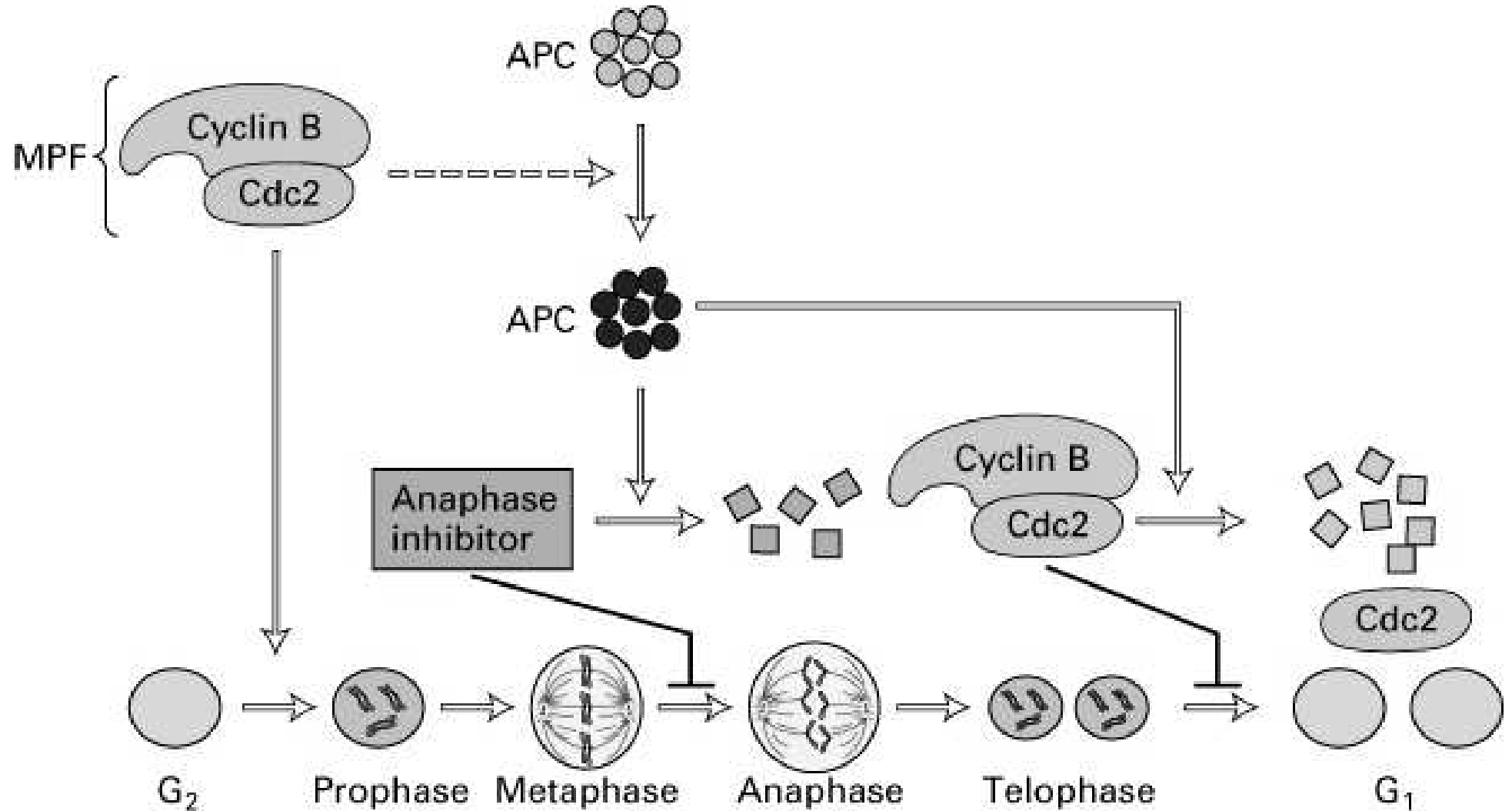
Regulace aktivity MPF

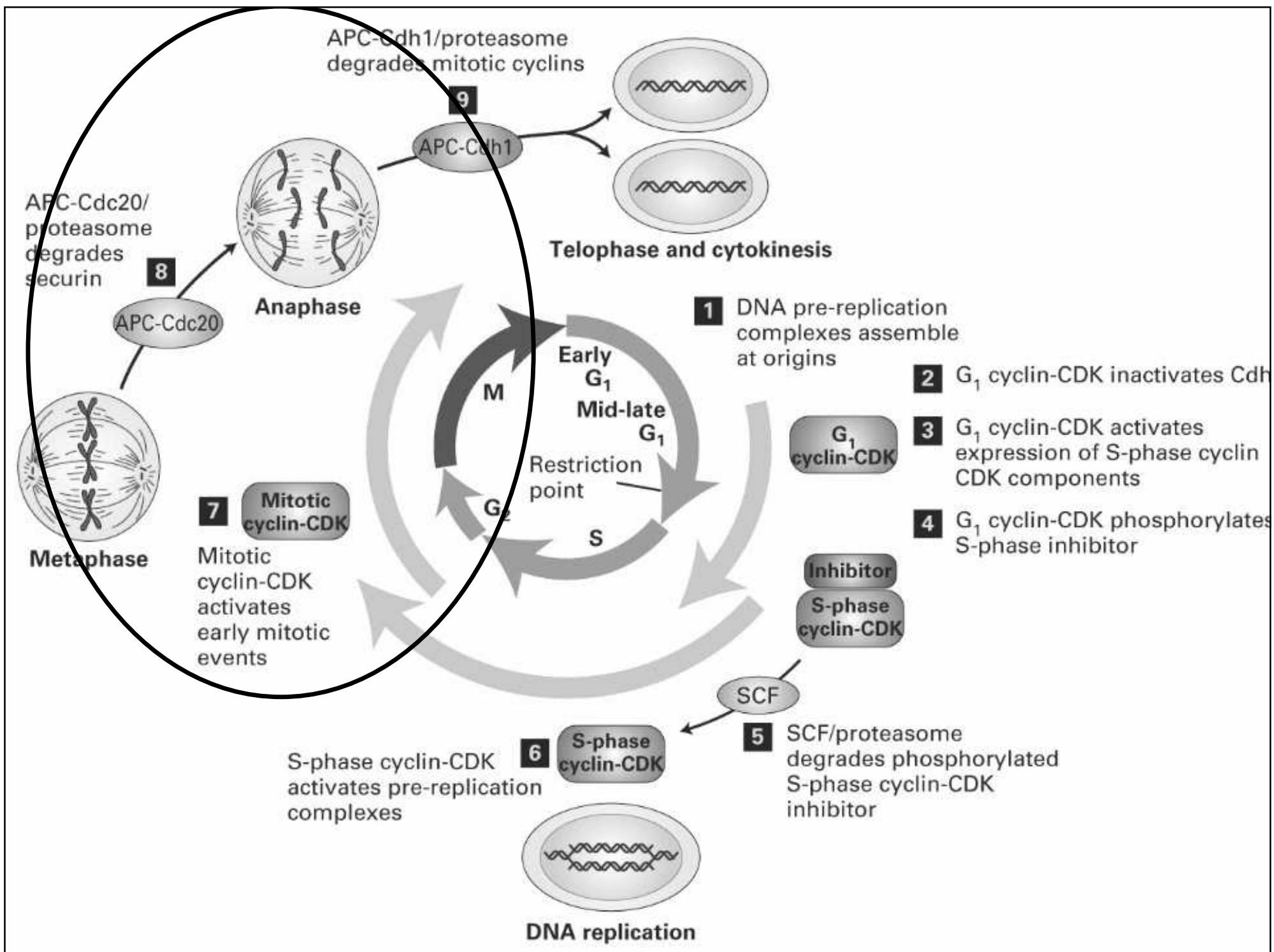
- APC může zajistit ubikvitinaci M-fázových cyklinů pouze během pozdní anafáze v důsledku vazby **Cdh1** („APC-specificity factor“)
- Cdh1 může vázat APC pouze v defosforylovaném stavu
- aktivační defosforylaci Cdh1 katalyzuje fosfatáza **Cdc14** v pozdní anafázi
- inaktivační fosforylaci katalyzují 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

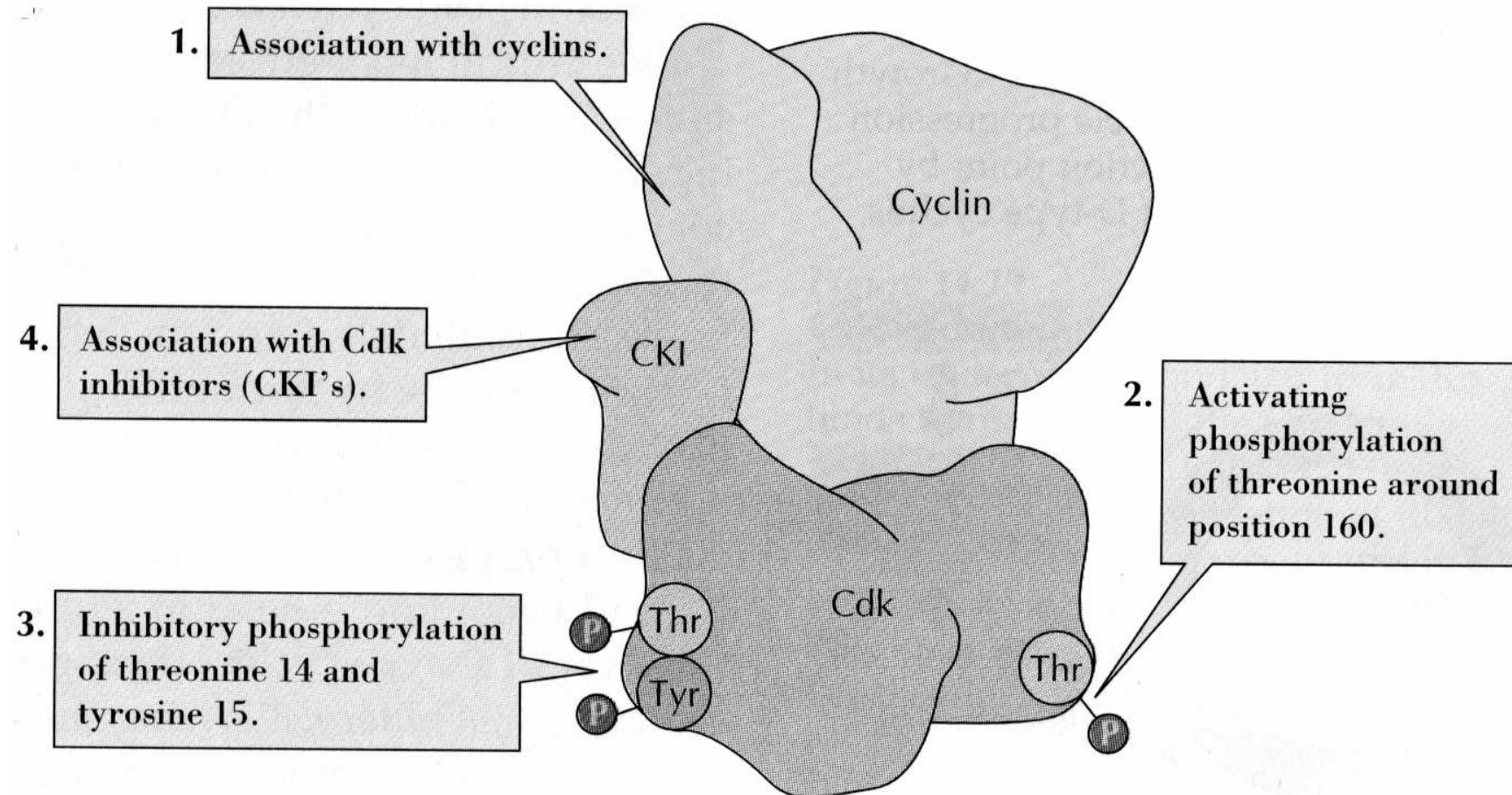


Regulate APC





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

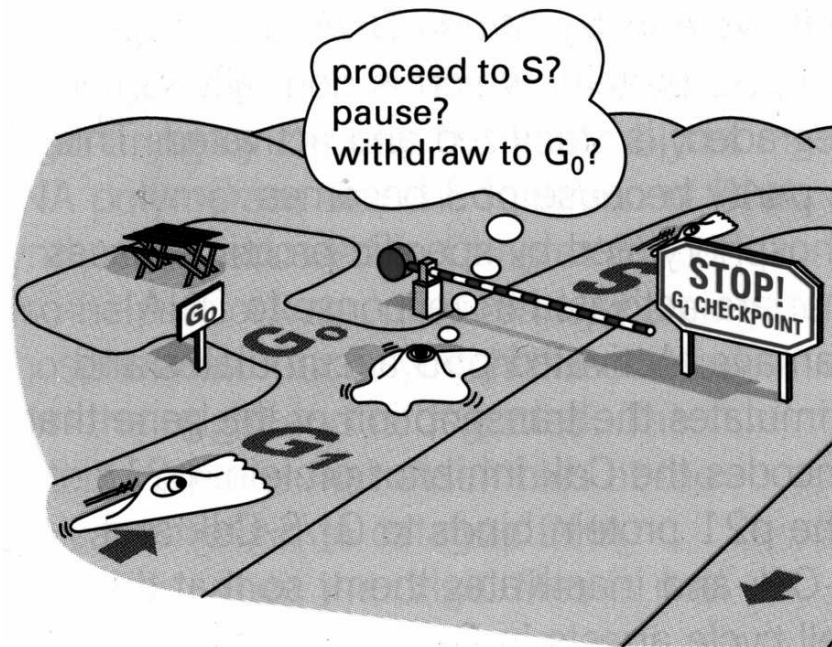
3. Aktivace Cdk defosforylací

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

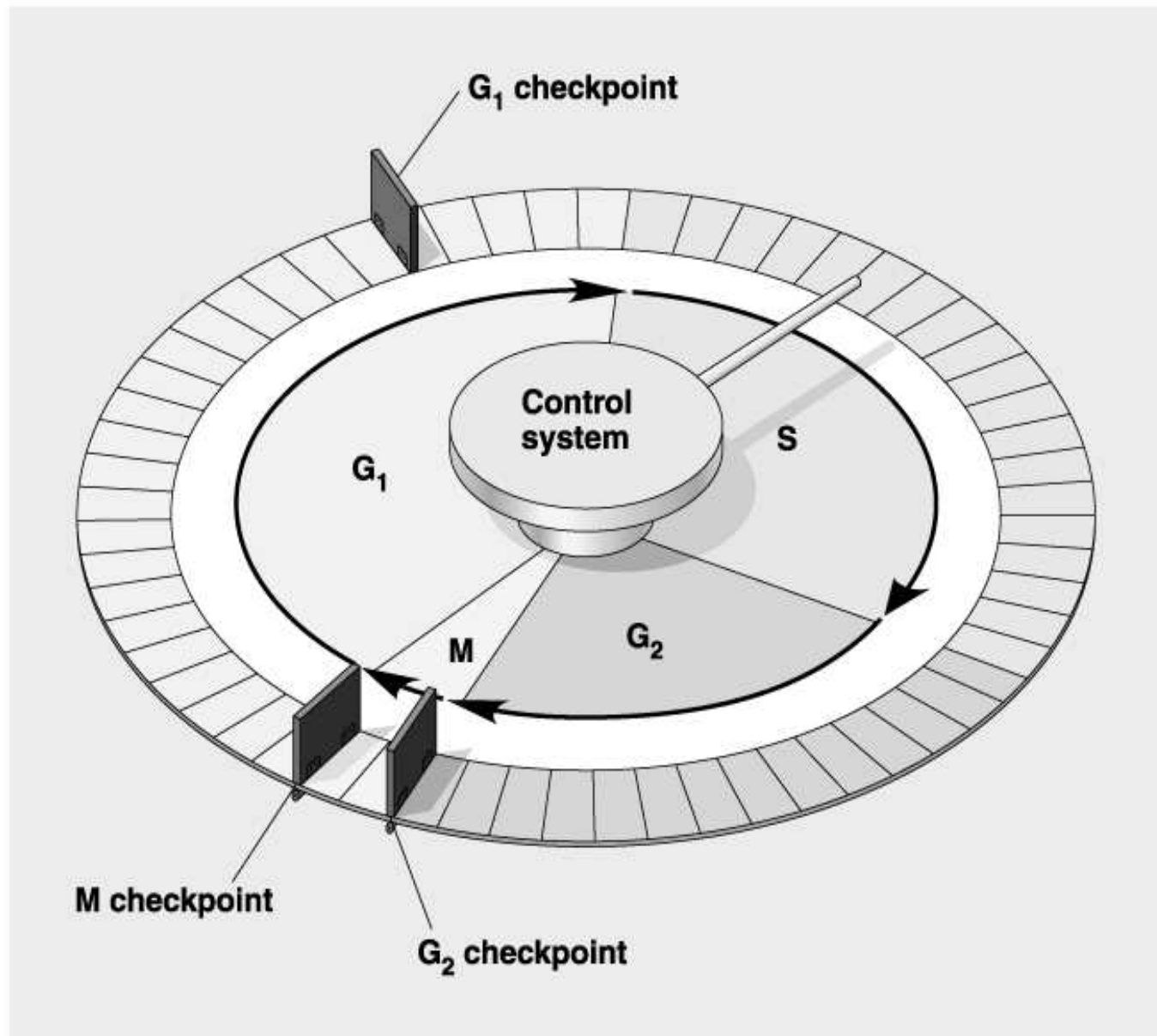
4. Regulace Cdk vazbou inhibitorů

- 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)

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



- Podstata mechanismu zajišťující správný chod buněčného cyklu
- Po překonání bodu restrikce buňka pokračuje v cyklu pokud nezaznamená např. poškození nebo neúplnou replikaci DNA, nedostatečné sestavení mitotického aparátu, apod.
- Pozastavení cyklu může nastat v jednom ze tří kontrolních bodů



Kontrolní body - molekulární brzdy cyklu

Kontrolní bod G1

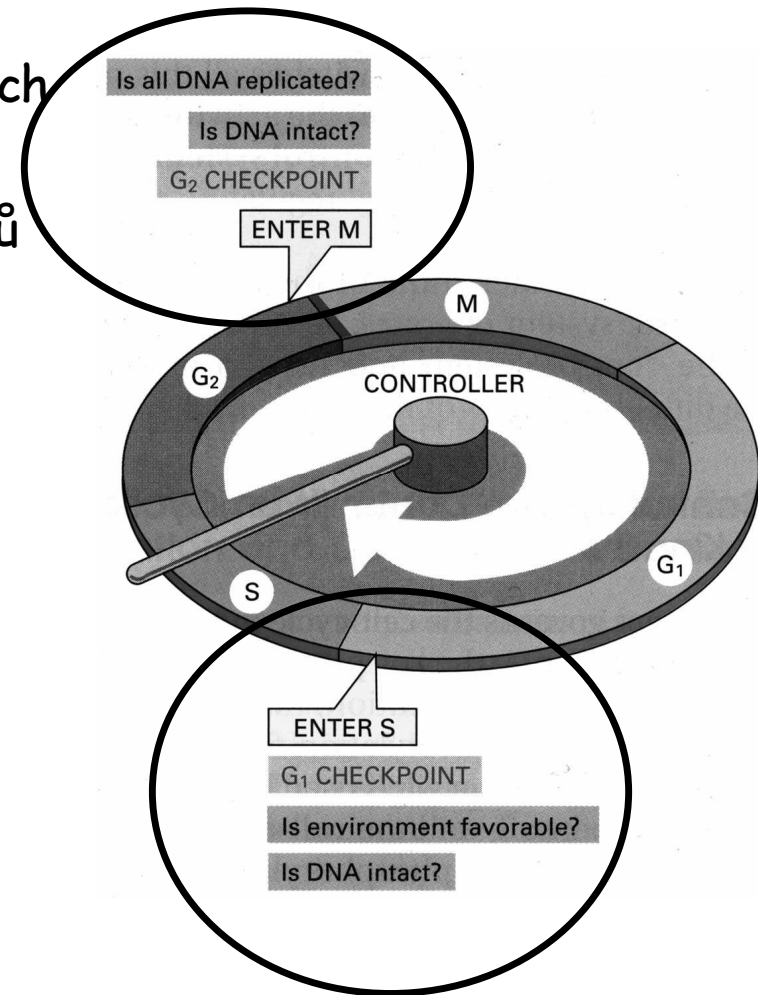
Průchod závisí na vnějších i vnitřních faktorech

- dostupnosti živin
- přítomnosti specifických růstových faktorů (mitogenů)
- celistvosti DNA

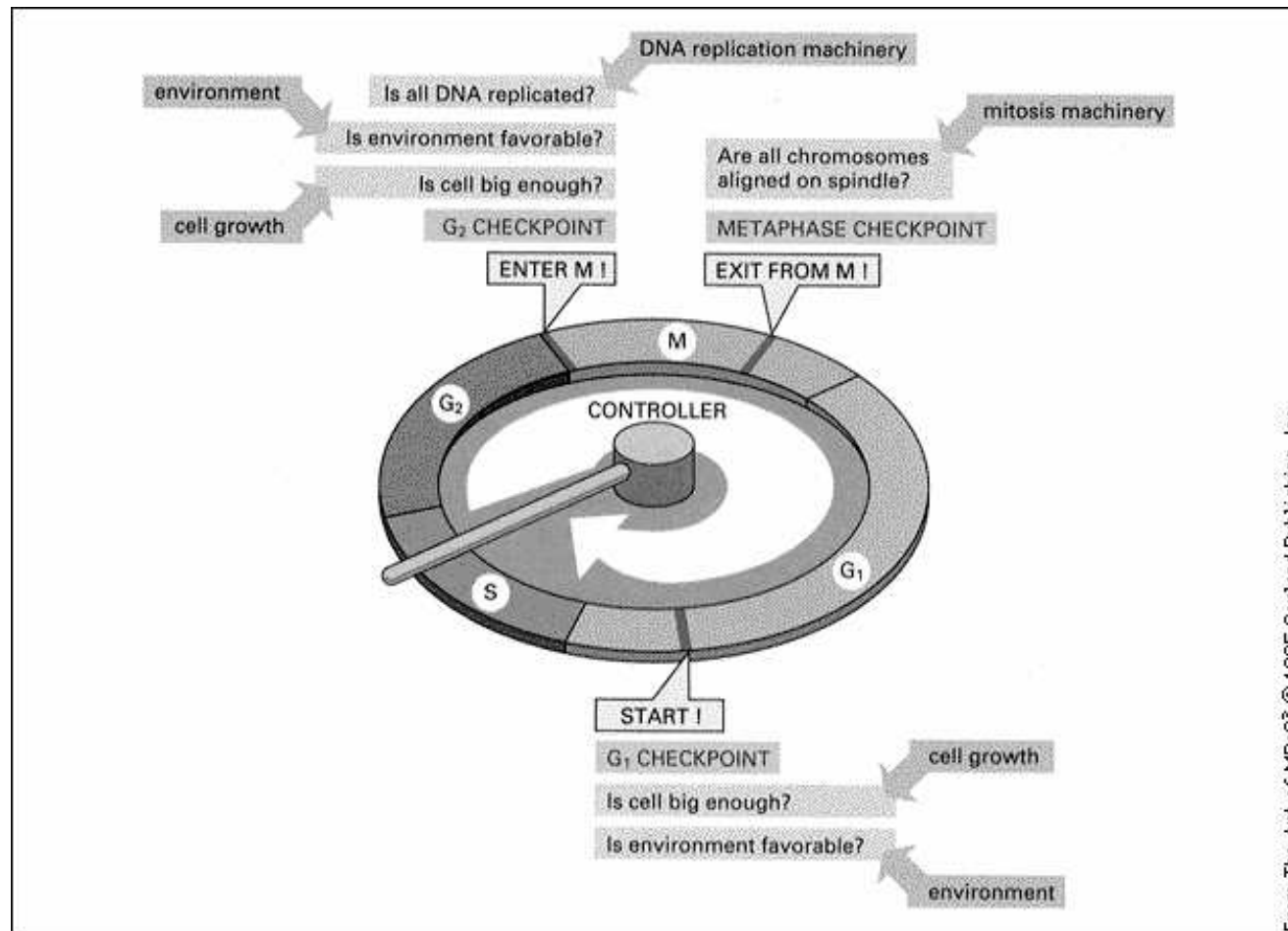
Kontrolní bod G2

Průchod závisí pouze na vnitřních faktorech

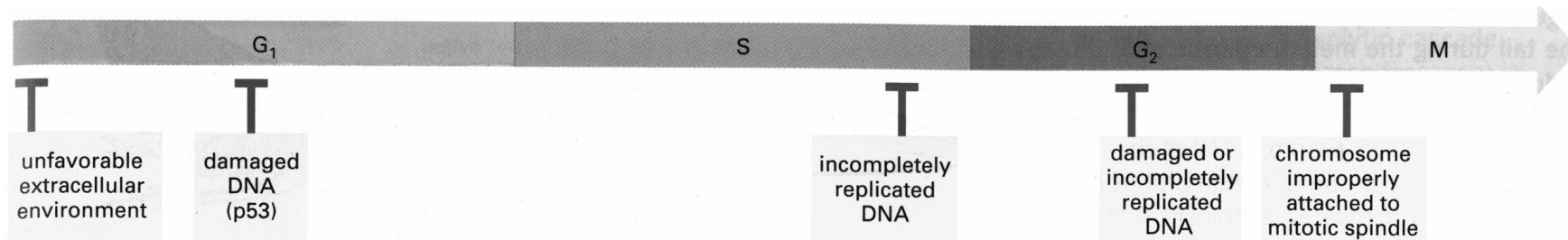
- celistvosti DNA
- dokončení replikace DNA



Existují další kontrolní body buněčného cyklu



From The Art of MBoC³ © 1995 Garland Publishing, Inc.



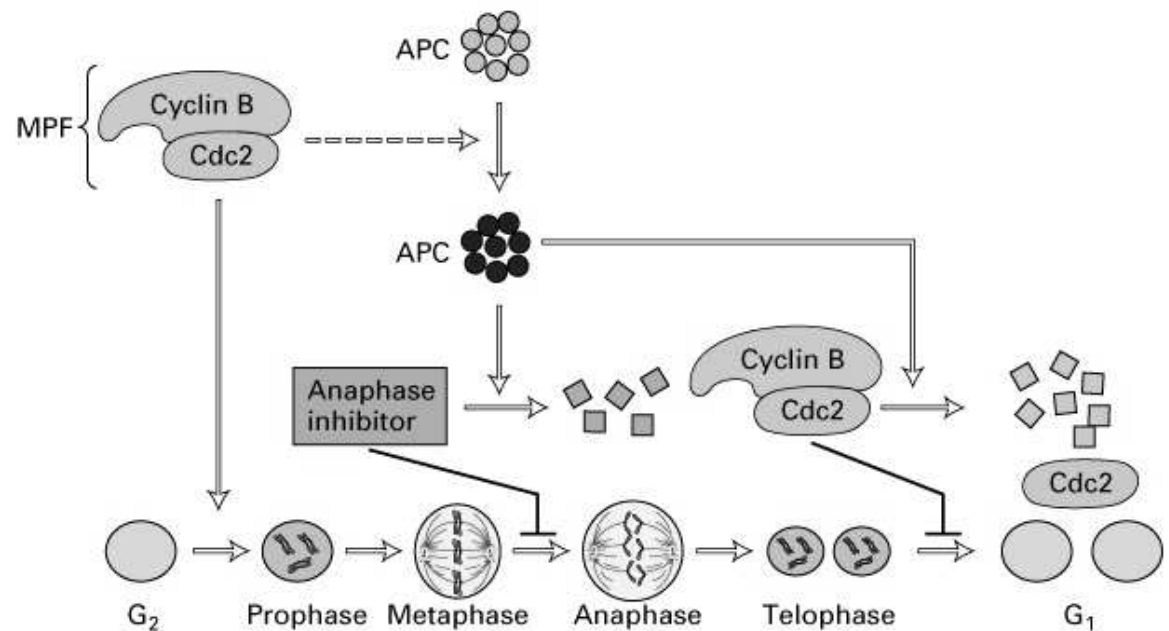
Mechanismus řídicí buněčný cyklus vnímá vnitřní i vnější buněčné podněty

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

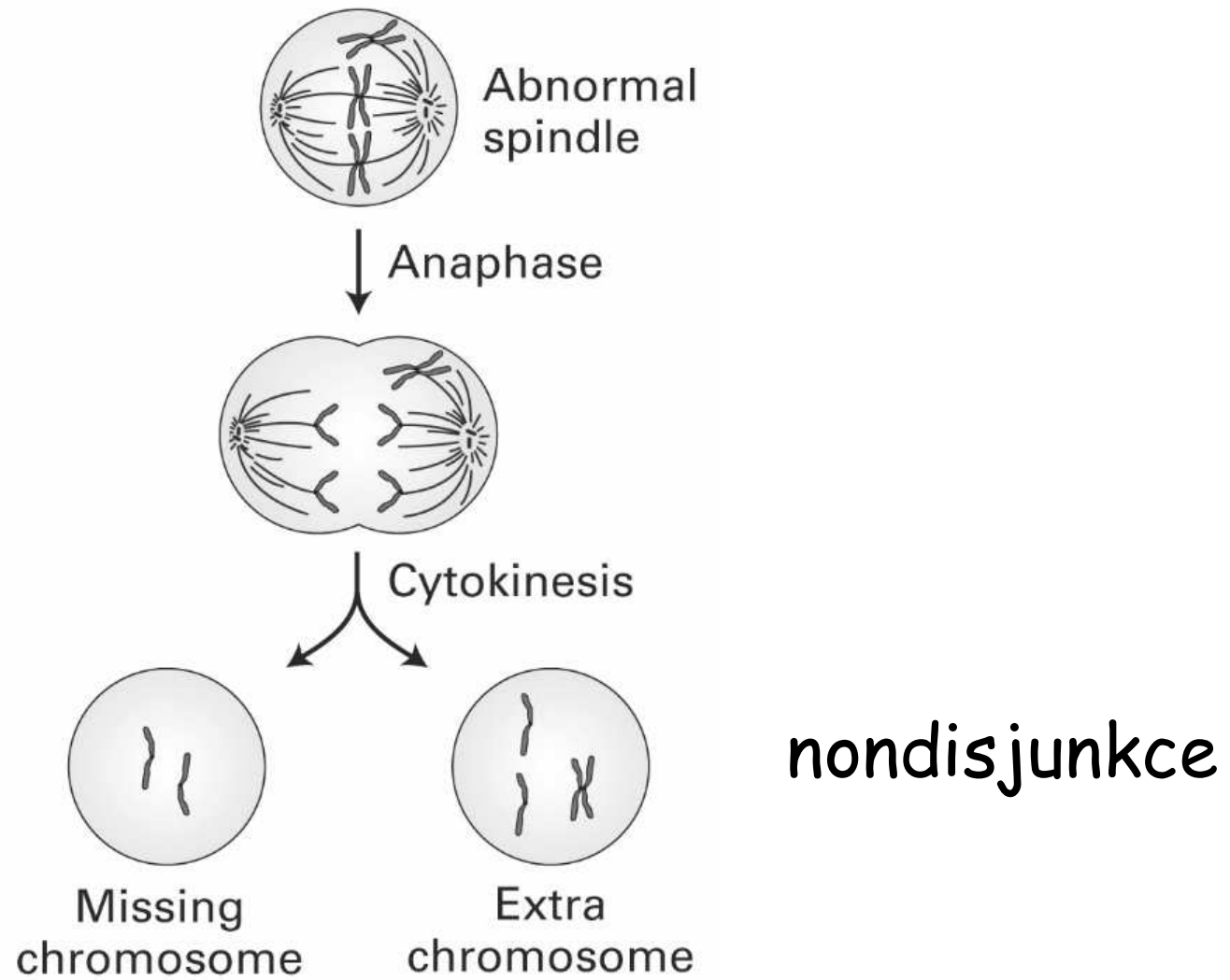
Kinetochory poskytují kontrolnímu bodu ve fázi M informaci o stavu interakcí mezi chromozomy a vřeténkem. Tento kontrolní bod musí získat „potvrzení“ o připojení všech chromozomů k mikrotubulům vřeténka, aby umožnil pokračování cyklu do anafáze.

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:

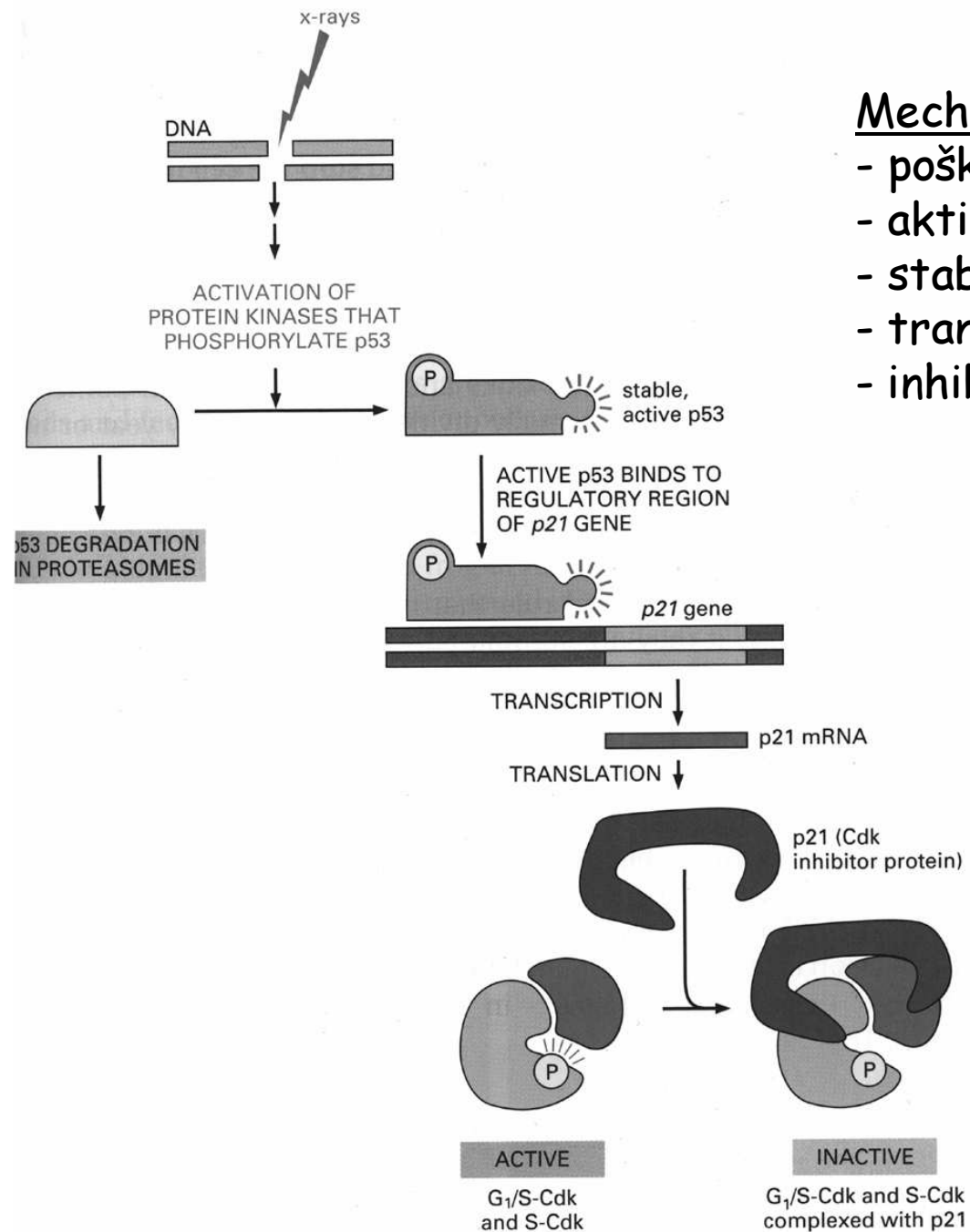
- absence esenciálních živin zastavuje cyklus
- absence růstových faktorů, pro které mají buňky povrchové receptory, zastavuje cyklus

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
- pozastavení buněčného cyklu (opravitelné poškození DNA) nebo programovaná buněčná smrt (rozsáhlé poškození DNA) je výsledkem aktivace nádorového supresoru p53, který zvýší hladinu inhibitoru Cdk

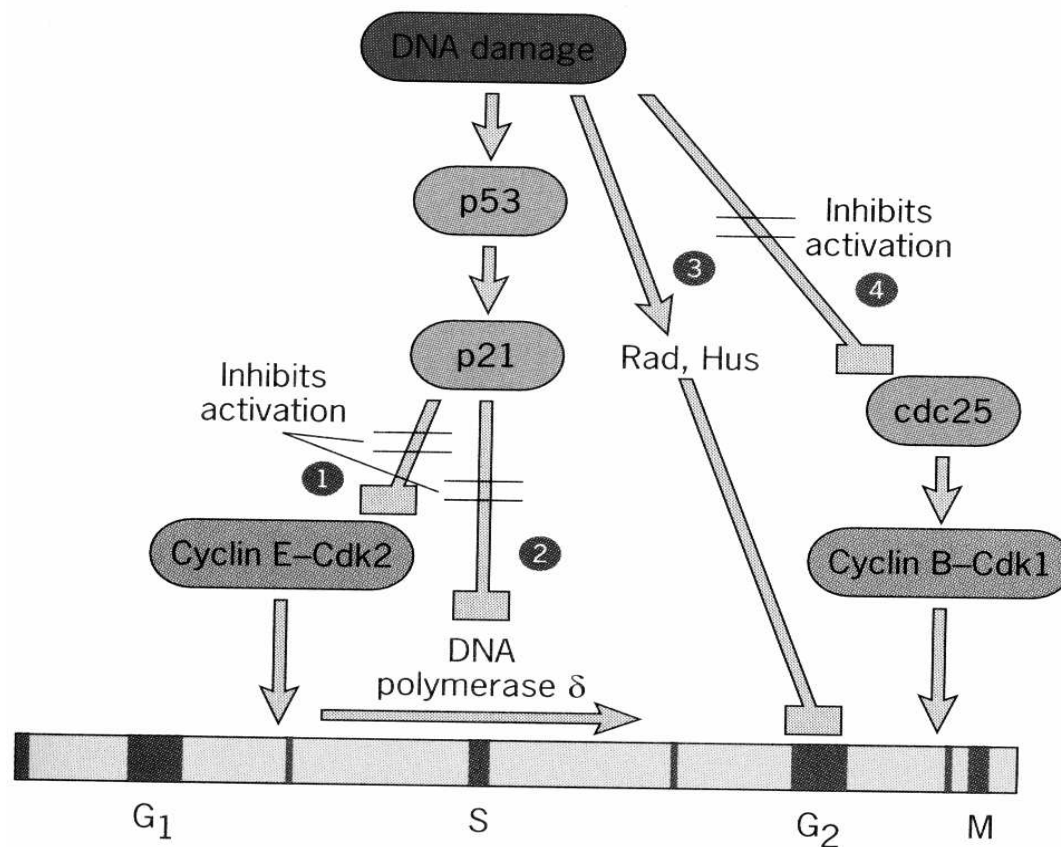


Mechanismus:

- poškození DNA
- aktivace kináz fosforylujících p53
- stabilizace p53
- transaktivace p21 proteinem p53
- inhibice Cdk S-fáze proteinem p21

p53 je významný regulátor buněčného cyklu

- poškození DNA (nebo jiný stresový faktor) stabilizuje p53
- p53 indukuje expresi genů, které buď zastaví buněčný cyklus (p21/CIP) nebo indukují apoptózu (*bax*)



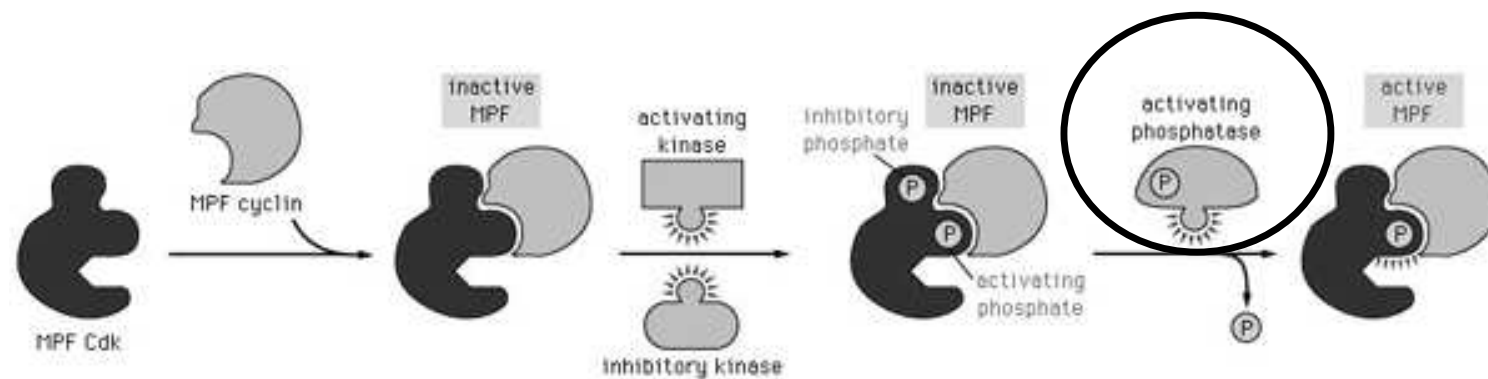
Absence funkčního p53

- 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.

Checkpoint kinase-1 (CHK1)

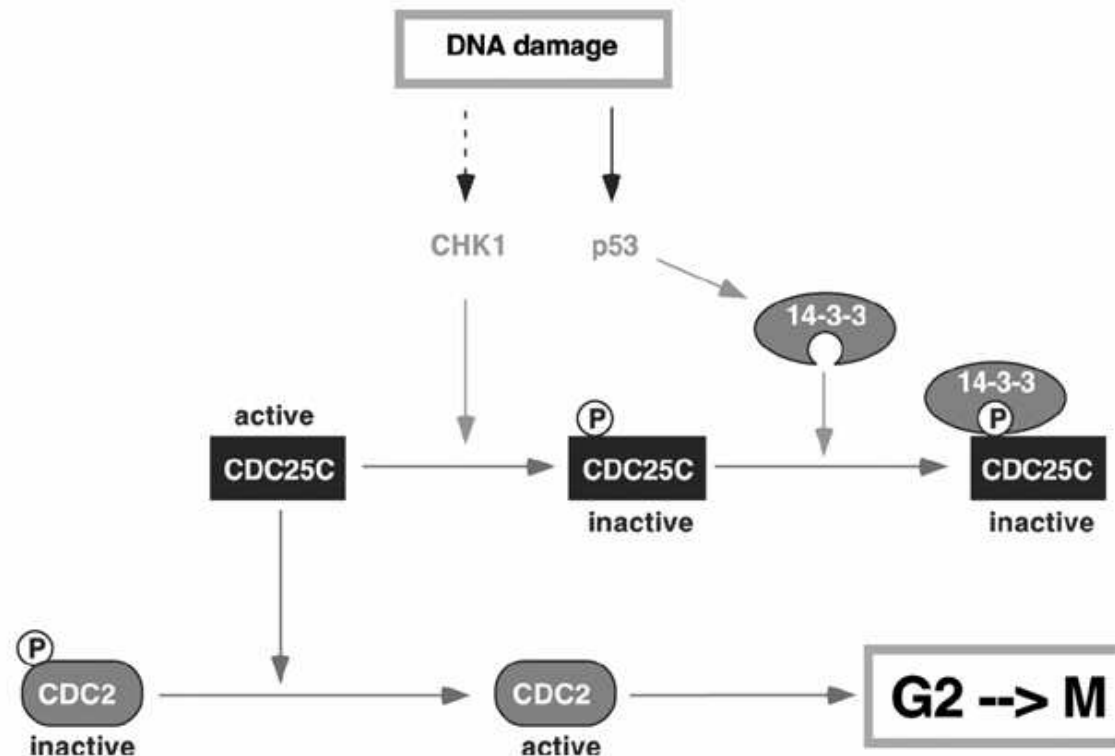
- Systém je aktivován poškozením DNA ve fázi G_2
- CHK1 fosforyluje aktivující fosfatázu Cdc25 a zajišťuje tak její inaktivaci: komplex cyklin B-Cdk zůstává ve fosforylovaném, tj. inaktivním stavu - znemožněna iniciace mitózy (možnost reparace DNA)



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.



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

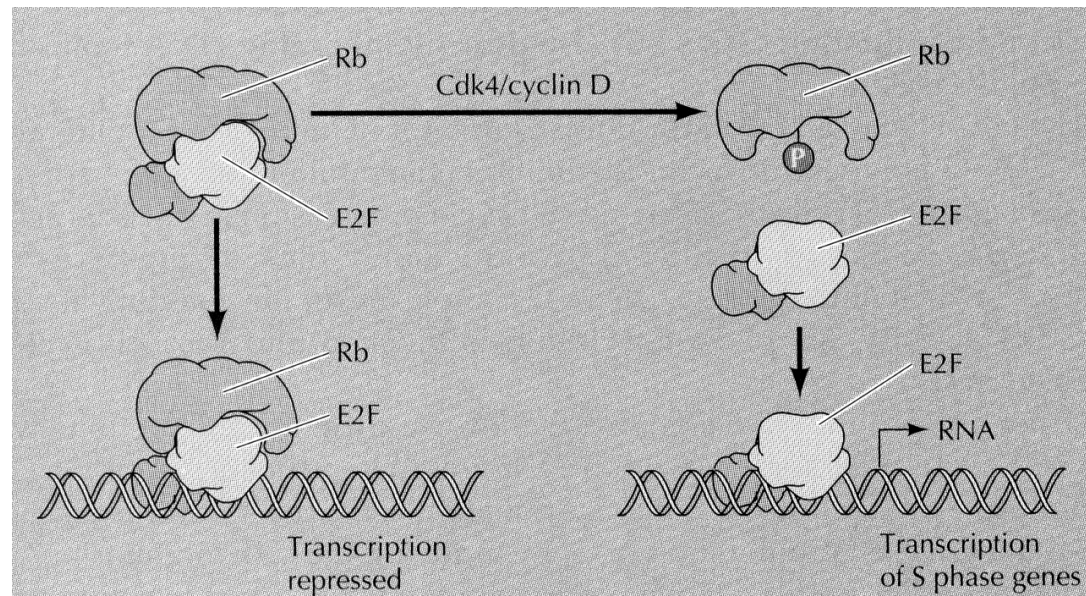
Typickou brzdou buněčného cyklu je **protein Rb** („retinoblastoma protein“)

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
- váže se na určité regulační proteiny, které za jeho přítomnosti nemohou aktivovat transkripci genů nutných pro proliferaci buněk

Mitogeny uvolňují brzdící účinek Rb

- Aktivují signální dráhy, které vedou k tvorbě aktivních komplexů cyklinů a Cdk pro fáze *G1* a *G1/S*.
- Tyto kinázy fosforylují protein Rb
- Fosforylovaný Rb mění konformaci a uvolňuje regulační proteiny, které pak mohou aktivovat expresi genů nutných pro buněčnou proliferaci



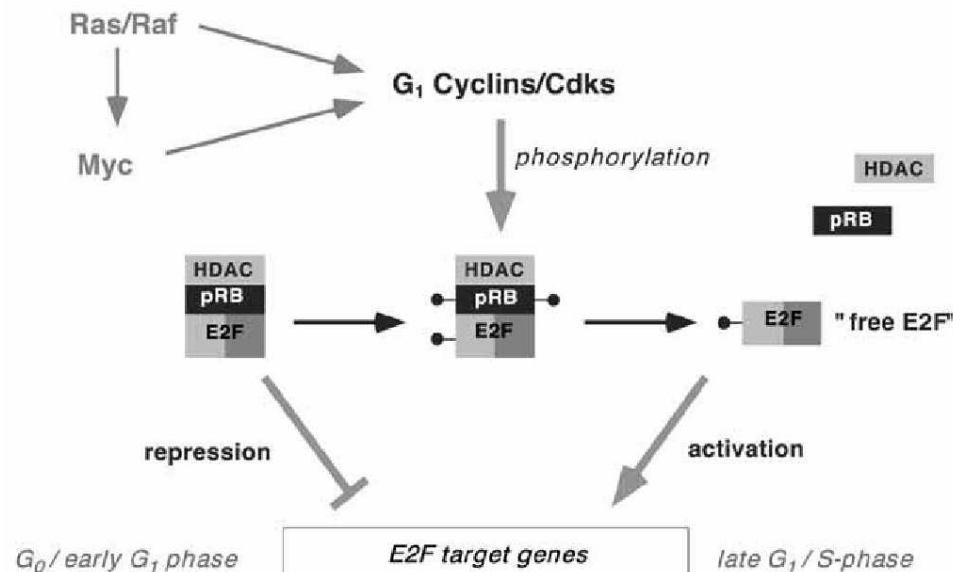
Průchod bodem restrikce (G_1/S): klíčová úloha proteinu Rb

raná až střední fáze G_1 :

- Rb tvoří komplex s transkripčním faktorem E2F a histonovou deacetylázou (HDAC)
- aktivní represe transkripce cílových genů E2F

střední až pozdní fáze G_1 :

- cyklin D/CDK4/6 a cyklin E/CDK2 fosforylují komplex E2F-Rb-HDAC
- rozpad komplexu E2F-Rb-HDAC
- „volný“ faktor E2F aktivuje expresi svých cílových genů

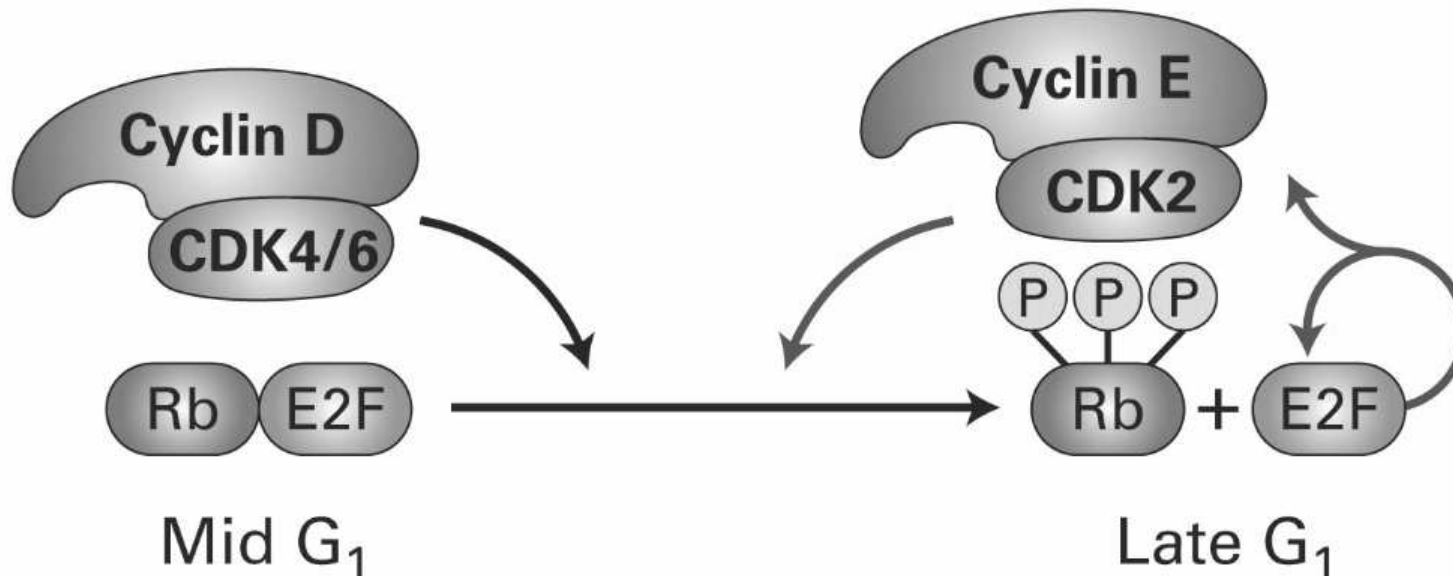


Regulace aktivity E2F: pozitivní zpětná vazba

Buňky ve fázi G₀:
Rb blokuje aktivitu E2F

Stimulace buněk mitogeny:

- indukce exprese CDK4,CDK6, cyklinů D a E2F
- fosforylace Rb komplexu cyklinů D a Cdk4/6
- uvolněný E2F indukuje transkripci genů kódujících cyklin E, CDK2 a E2F
- komplexy cyklin E-CDK2 dále fosforylují Rb



**Buněčný cyklus je podmíněn souhrou
řady molekul**

Stimulace buněčného cyklu mitogenními signály

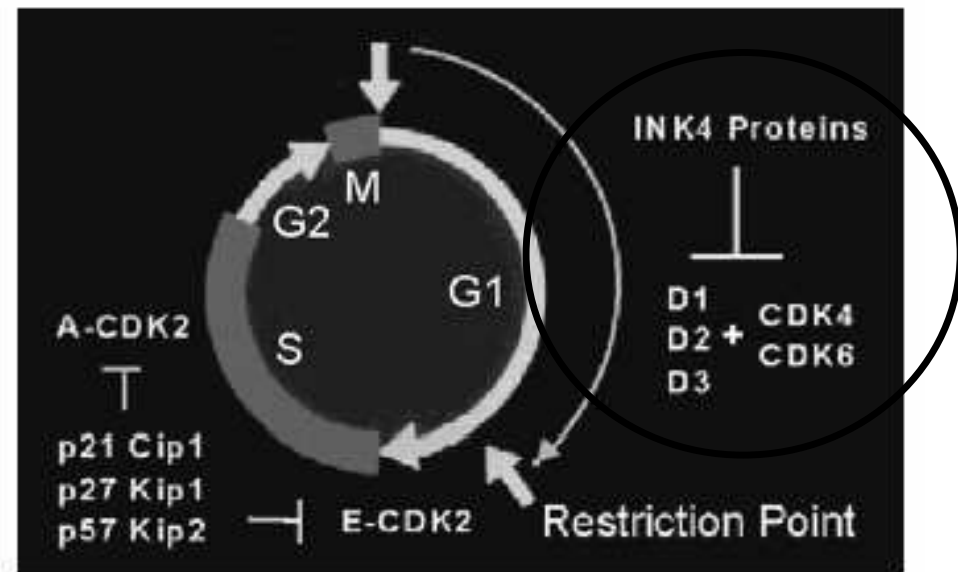
- jako senzory růstových faktorů se uplatňují cykliny D
- 3 formy cyklinu D: D1, D2, D3 (tkáňově specifická exprese)
- cykliny D reagují na přítomnost transkripčních faktorů (NF κ B, c-Myc, AP-1) i mitogenních signálů (kaskáda MAP)
- cykliny D tvoří komplexy s Cdk4 nebo Cdk6 - translokace do jádra - fosforylace kinázou CAK
- komplex Cdk4/cycD fosforyluje pRb - eliminace jeho protirůstové funkce: uvolnění E2F z Rb/HDAC - vazba E2F na transkripční faktory - vstup do fáze S

Stimulace buněčného cyklu mitogenními signály

- E2F indukuje také expresi genů kódujících cyklin E a cyklin A
- cyklin E tvoří komplex s CDK2 a spolupracuje s komplexem CDK4/6-cyklin D na dokončení fosforylace Rb
- změna v zajištění fosforylace Rb z původně mitogen-dependentních komplexů CDK4/6-cyklin D na mitogen-independentní komplexy CDK2-cyklin E částečně vysvětluje, proč je po překonání bodu restrikce další průběh cyklu nezávislý na přítomnosti růstových faktorů
- po zahájení fáze S je cyklin E degradován a CDK2 tvoří komplexy s cykliny A

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

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



Společné znaky:

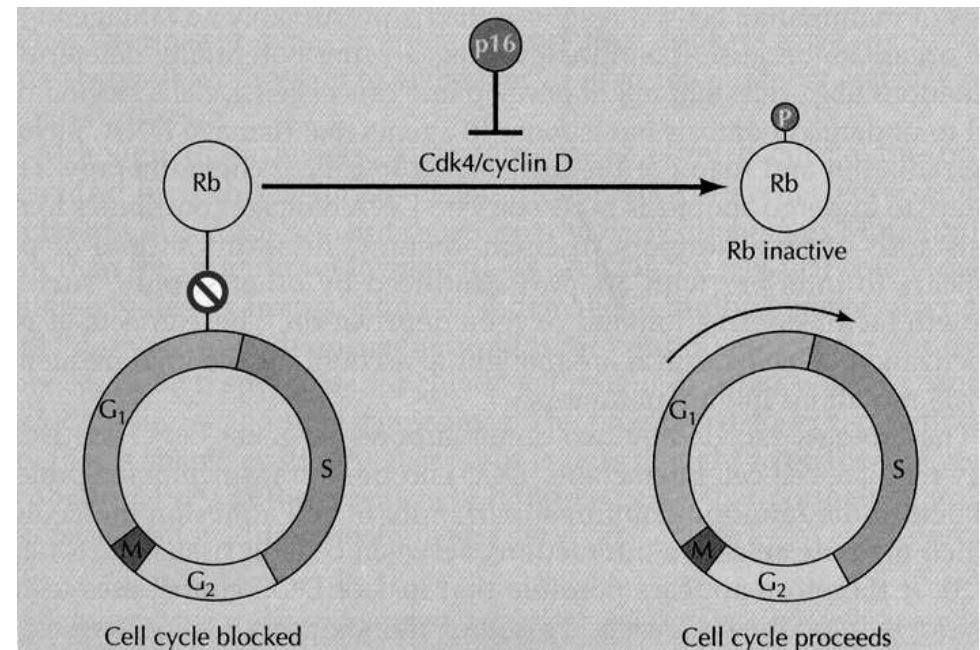
- inhibice fosforylace Rb kinázami CDK4 nebo CDK6
- negativní regulace buněčného cyklu („brzda“)

p16^{INK4A} (=p16)

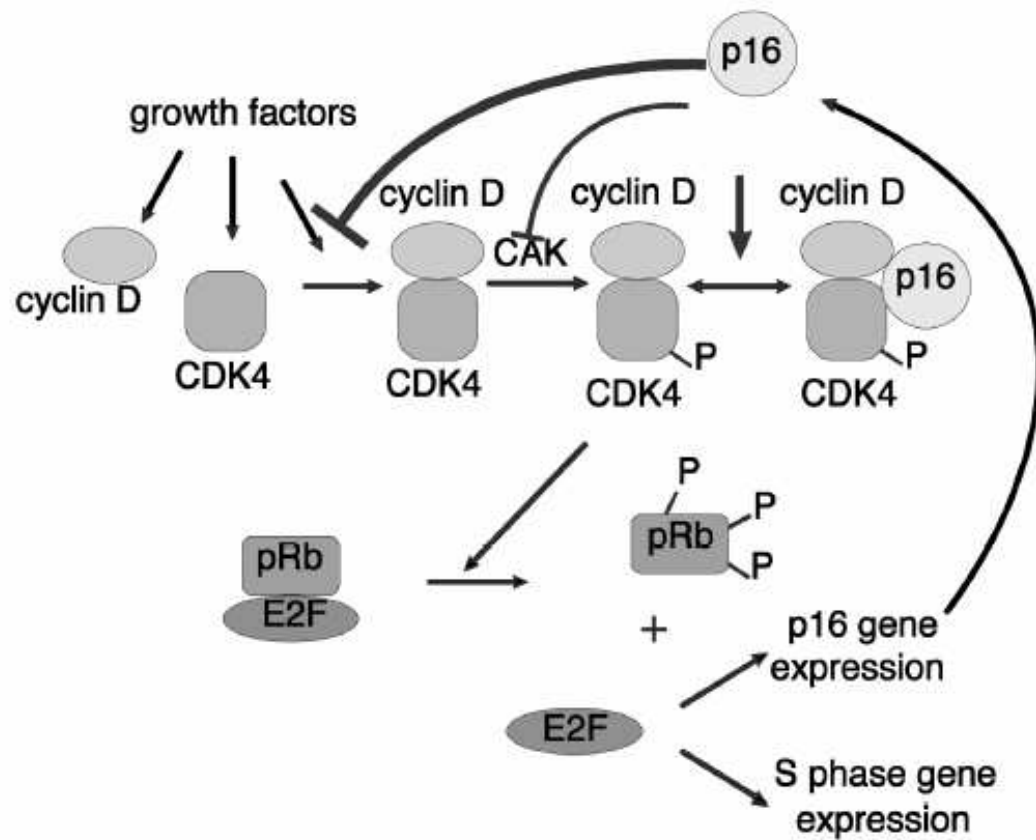
- schopnost vazby ke komplexu CDK4-cyklin D a inhibice kinázové aktivity CDK4
- inhibice fosforylace CDK4 kinázou CAK
- inhibice sestavování komplexů CDK4-cyklin D
- inhibitory růstu (např. TGFβ) stimulují transkripci p16

Negativní zpětná vazba:

- uvolnění E2F způsobuje aktivaci exprese p16

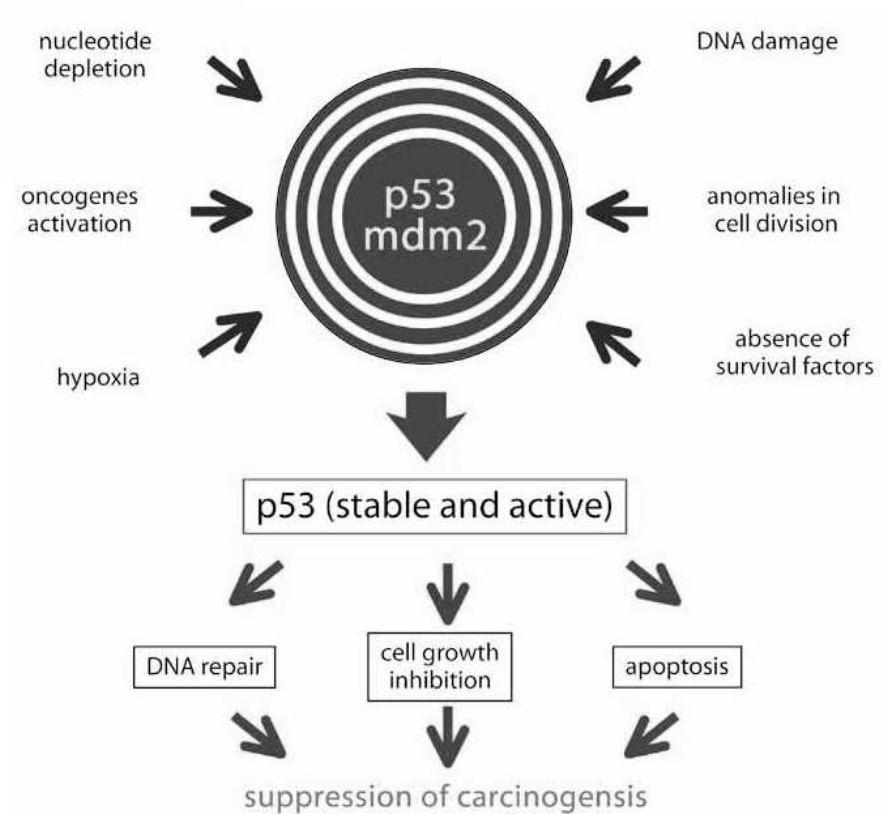
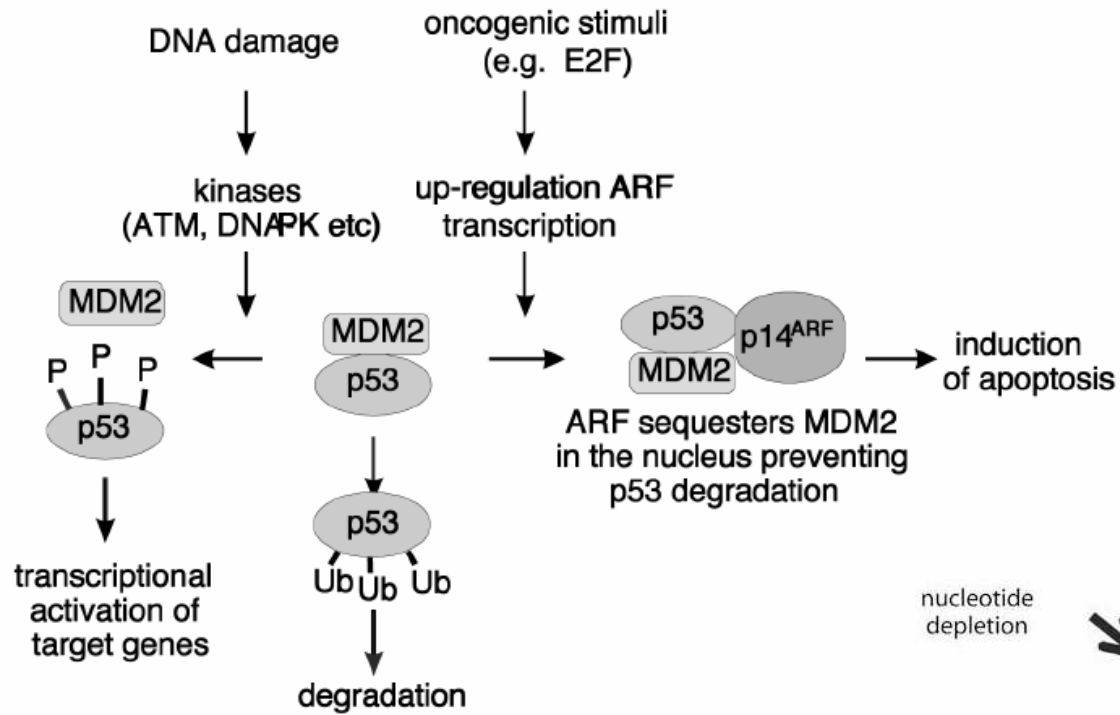


Účinky proteinu p16



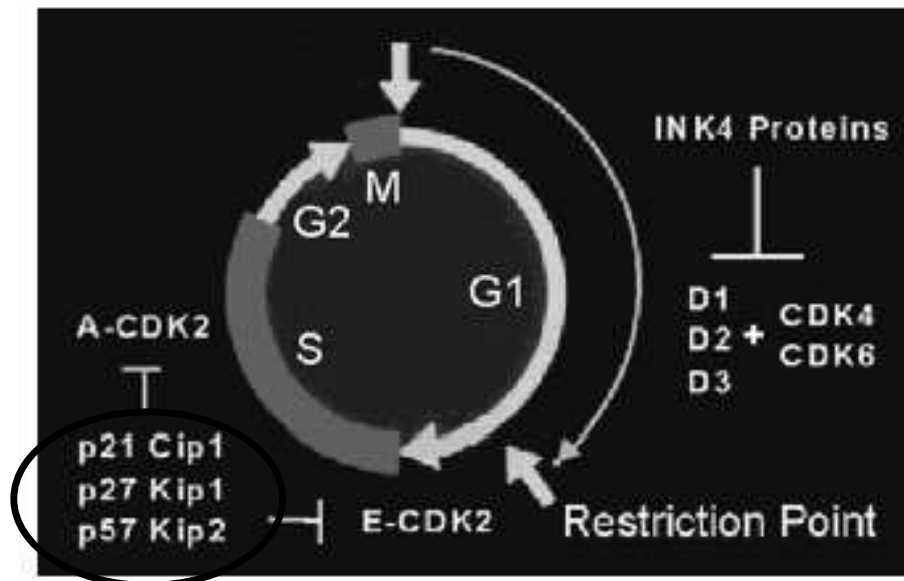
Protein ARF („alternative reading frame product“)

- zapojen do stimulace apoptózy např. v buňkách infikovaných viry
- součást signální dráhy řízené p53
- p53 aktivuje expresi *mdm2*
- MDM2 zjišťuje export p53 z jádra k cytoplazmatickému proteazomu (rozklad p53)
- ARF se váže k MDM2 a imobilizuje tak komplex MDM2/p53 v jádře (zablokování přirozené degradace p53)



Inhibitory CDK: rodina Cip/Kip

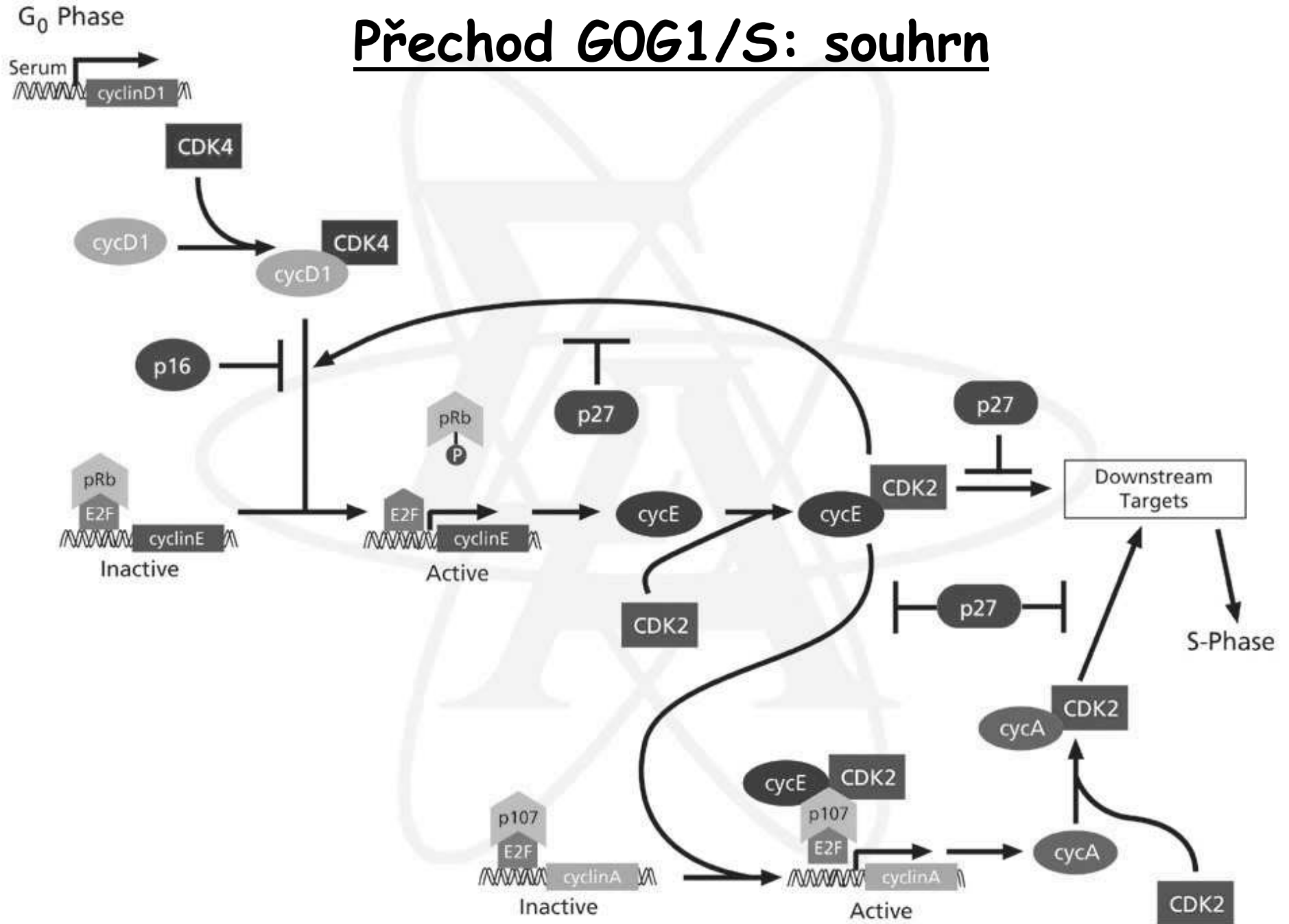
- p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}
- inhibice CDK2 v komplexech s cykliny E a A



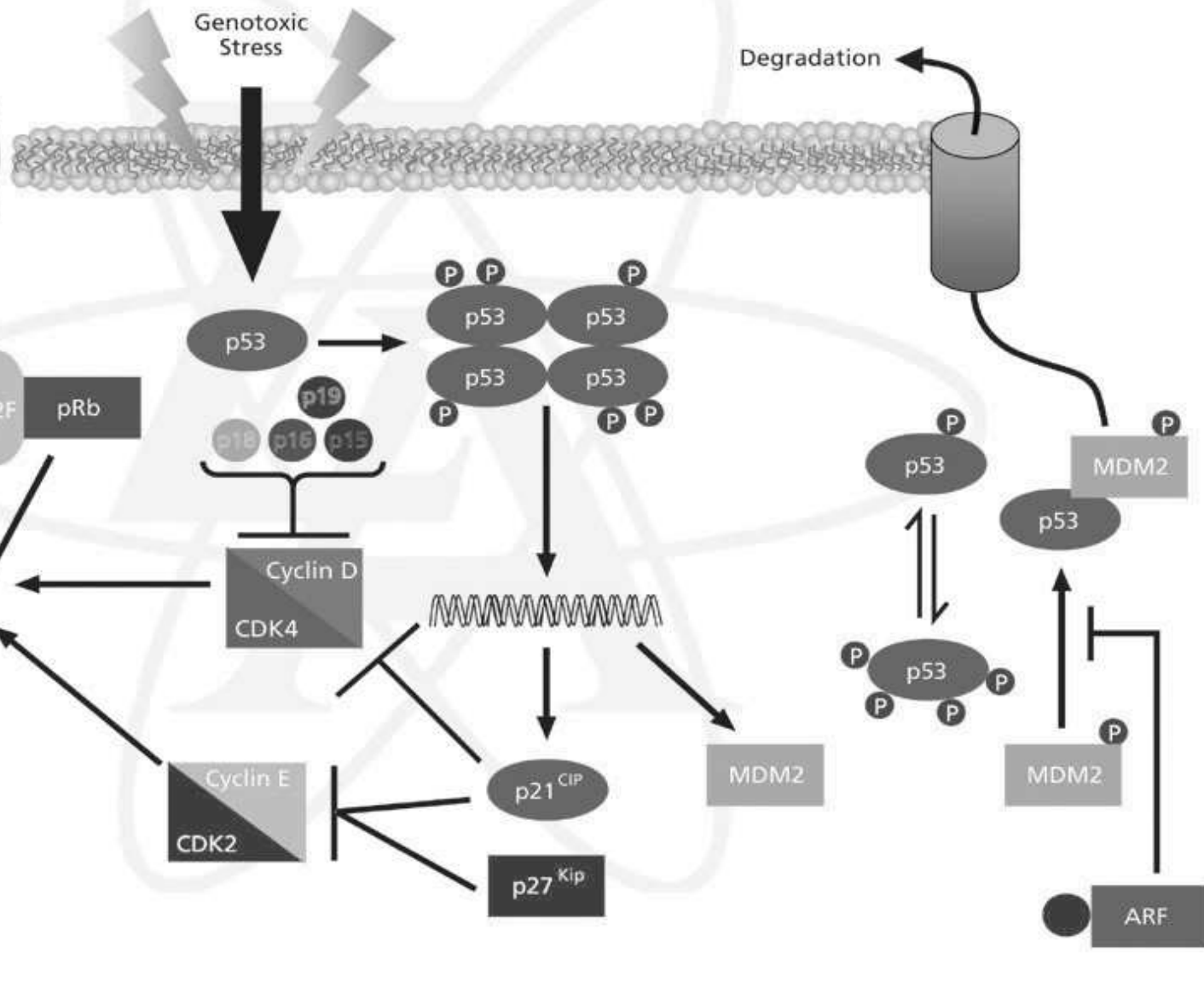
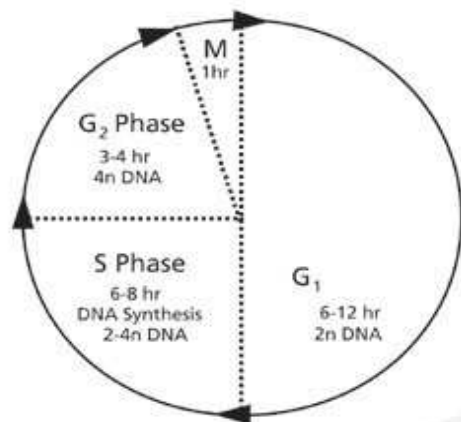
Univerzální inhibitor CDK: p21

- cílový gen proteinu p53 (přímá aktivace transkripce)
- váže a inhibuje komplexy:
 - cyklin E-CDK2
 - cyklin D-CDK4/6
 - cyklin A-CDK2
 - cyklin B-CDK1

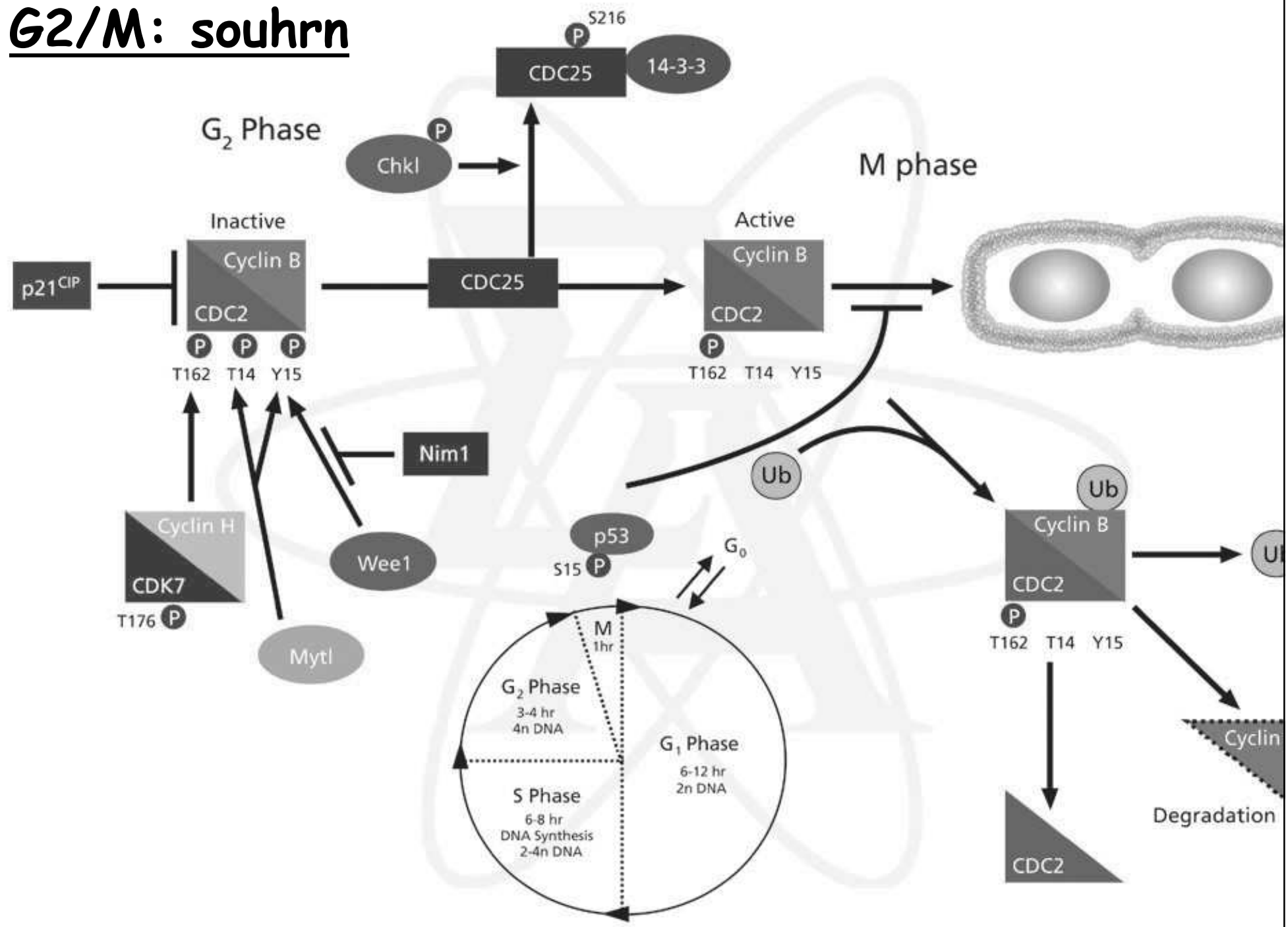
Přechod G₀/S: souhrn

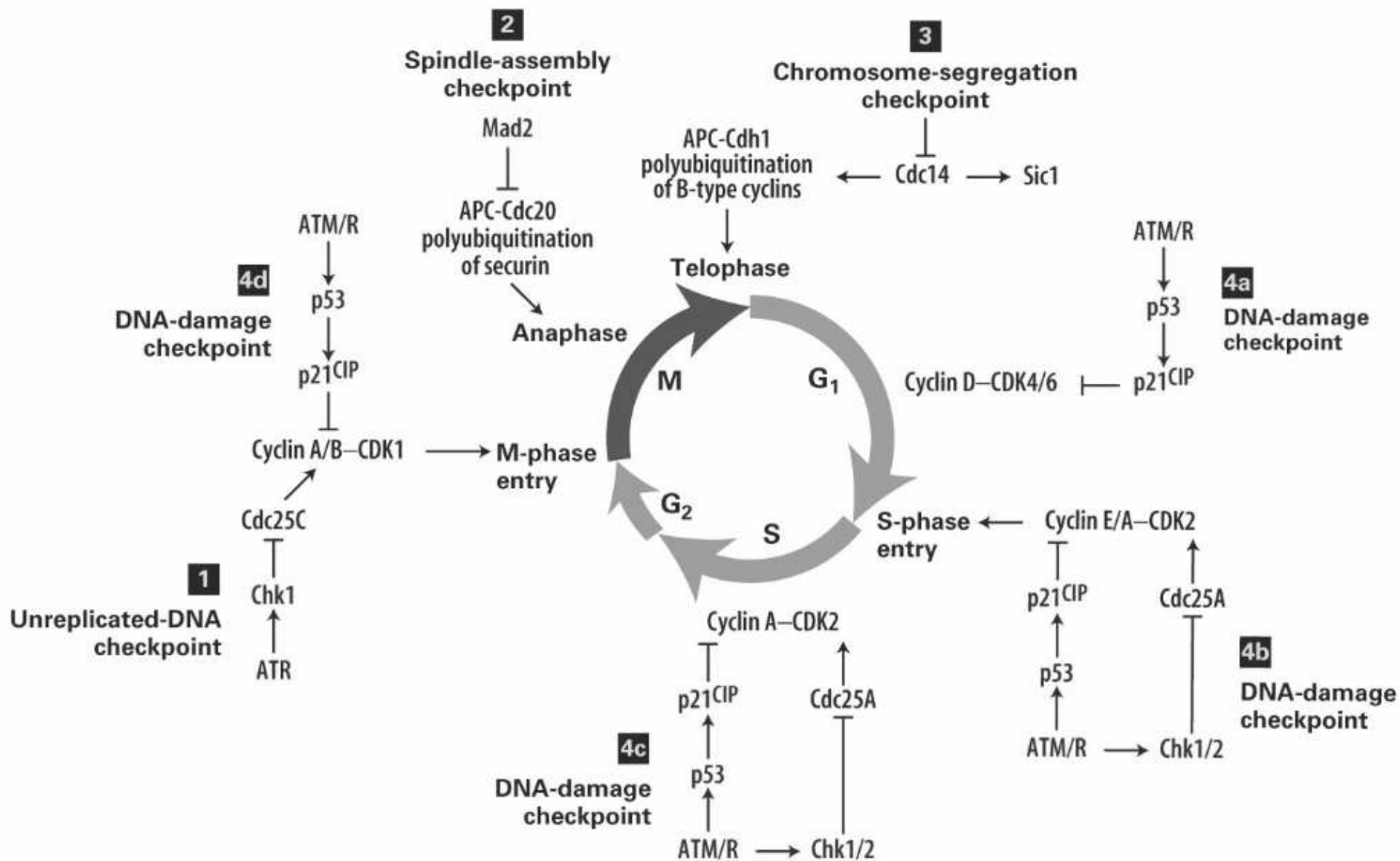


Přechod G1/S a p53



G2/M: souhrn





2001 Nobel Prize in Medicine: CELL CYCLE!!

Paul Nurse

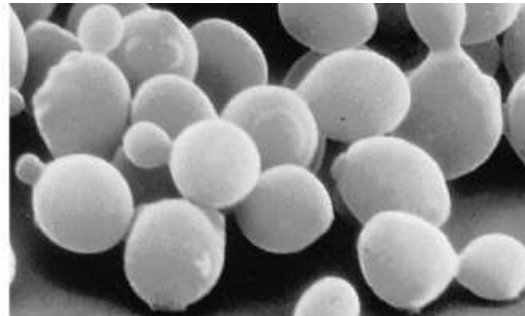
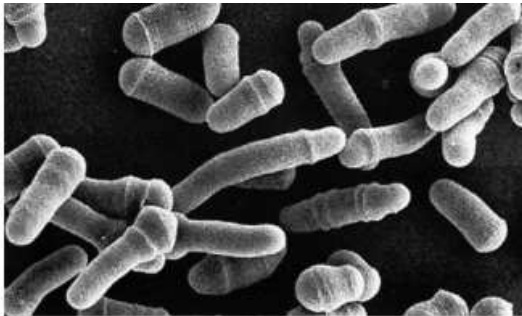
Lee Hartwell

Tim Hunt

QuickTime™ and a
Photo - JPEG decompressor
are needed to see this picture.

QuickTime™ and a
Photo - JPEG decompressor
are needed to see this picture.

QuickTime™ and a
Photo - JPEG decompressor
are needed to see this picture.



QuickTime™ and a
Photo - JPEG decompressor
are needed to see this picture.

Yeast:

Identified genes that regulate the cell cycle and showed that humans also have them.

Sea urchin:

Identified cyclin proteins in sea urchin eggs

Newly synthesized proteins labeled with ^{35}S -methionine:

