

Buněčný cyklus

Jan Šmarda
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU

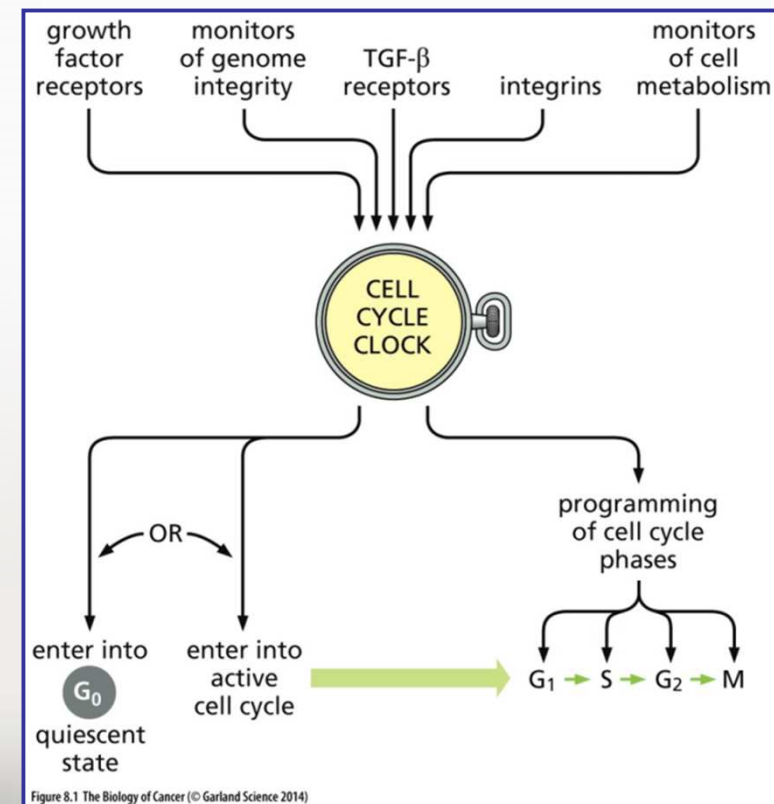
Přednáška kurzu Molekulární biologie eukaryot
10.11. 2019

Co je buněčný cyklus?

- opakovaný proces růstu a dělení buněk
- podléhá regulačním signálům **z okolí buněk**:
 - mitogenním signálům (růstovým faktorům)
 - antimitogenním signálům (např. TGF- β) - zastavují cyklus za přítomnosti mitogenních faktorů
 - signálům vedoucím buňku do **postmitotického stavu** (návrat k proliferaci nevratně znemožněn) nebo vratné klidové fáze **G0**
- podléhá signálům **z vnitřního prostředí buňky**:
 - celistvost genomu
 - metabolismus
- **mnohobuněčné organismy**: sladění s vývojem, homeostáze, průběžná obměna buněk

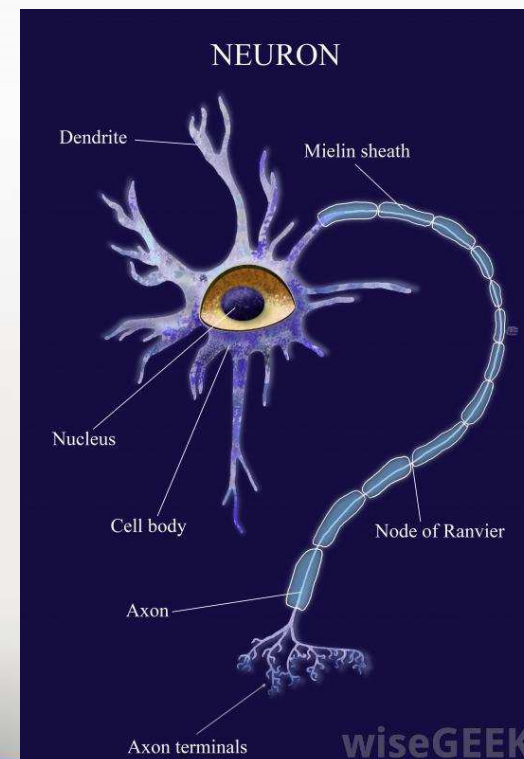
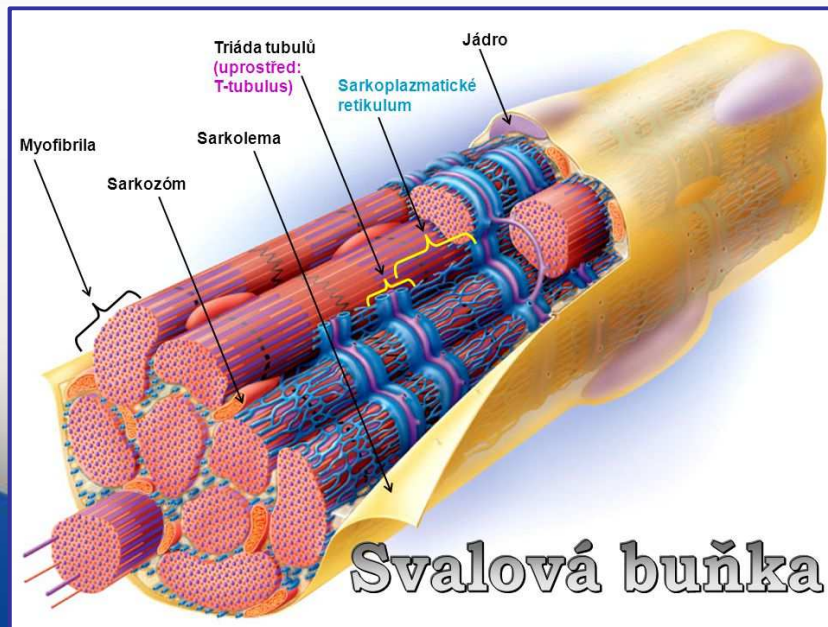
Vnímavost buněk

- vnější svět monitorován receptory
- na základě signálů buňka činí zásadní rozhodnutí:
 - proliferovat/neproliferovat
 - diferencovat/nediferencovat
 - migrovat/nemigrovat
 - žít/nežít



Buňka po svém vzniku: Co dál?

- mitóza a cytokineze dokončeny
- pokračovat dalším cyklem růstu a dělení nebo přejít do klidové fáze G0?
- rozhoduje přítomnost mitogenních/antimitogenních faktorů
- některé buňky opouštějí cyklus trvale a rezignují na další růst a dělení: stávají se **postmitotickými**



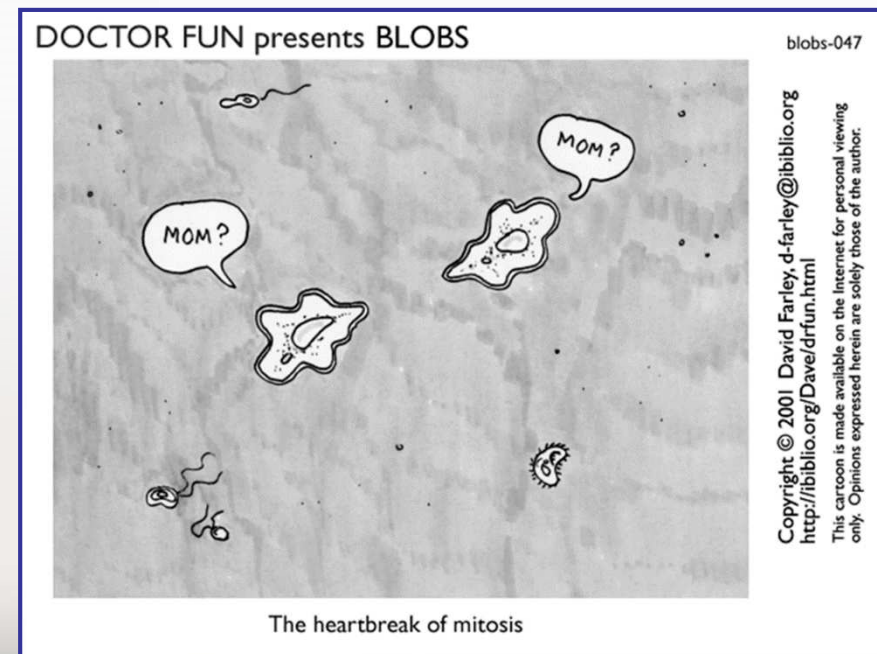
Hlavní procesy cyklu: růst a dělení

růst:

- budování nitrobuněčného obsahu
- syntéza a hromadění buněčných složek
- zvětšování objemu
- duplikace buněčného genomu

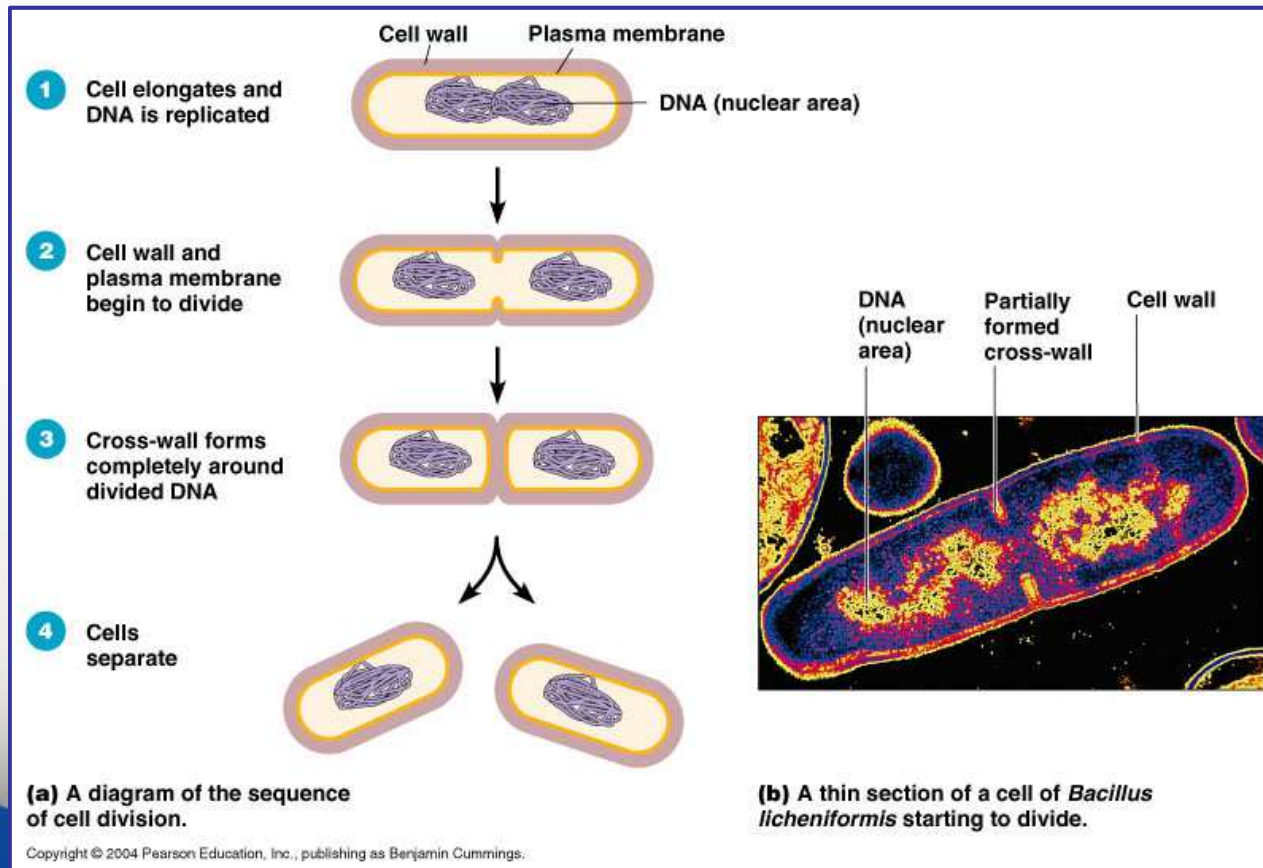
dělení:

- mitóza + cytokineze



Replikace DNA u prokaryot

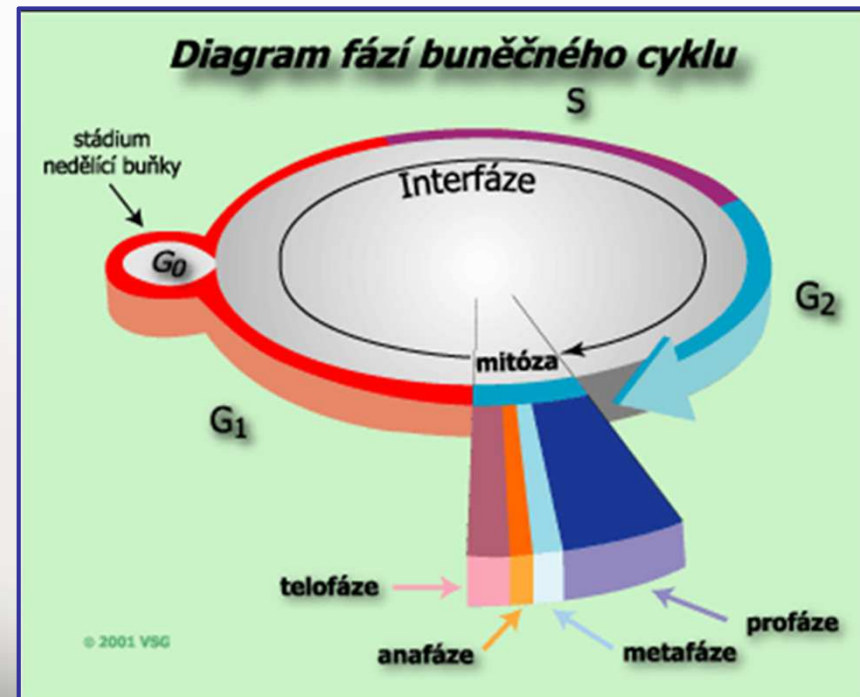
začíná okamžitě po dokončení cytokineze



Replikace DNA u eukaryot

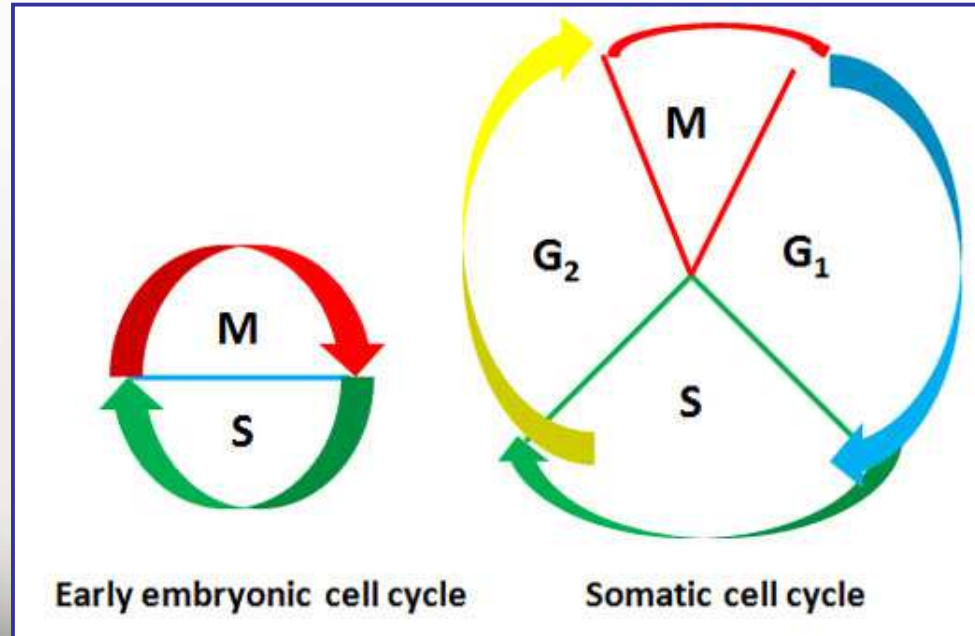
po dokončení cytokineze se okamžitě zahájí syntéza RNA a proteinů, replikace DNA se odkládá (často na 12 – 15 hodin: **fáze G1**)

- prodleva souvisí s rozhodováním o dalším osudu buňky
- pokračovat v růstu a cyklování?
- přejít do klidového stádia?
- pokud do klidového stádia, diferencovat se nebo ne?

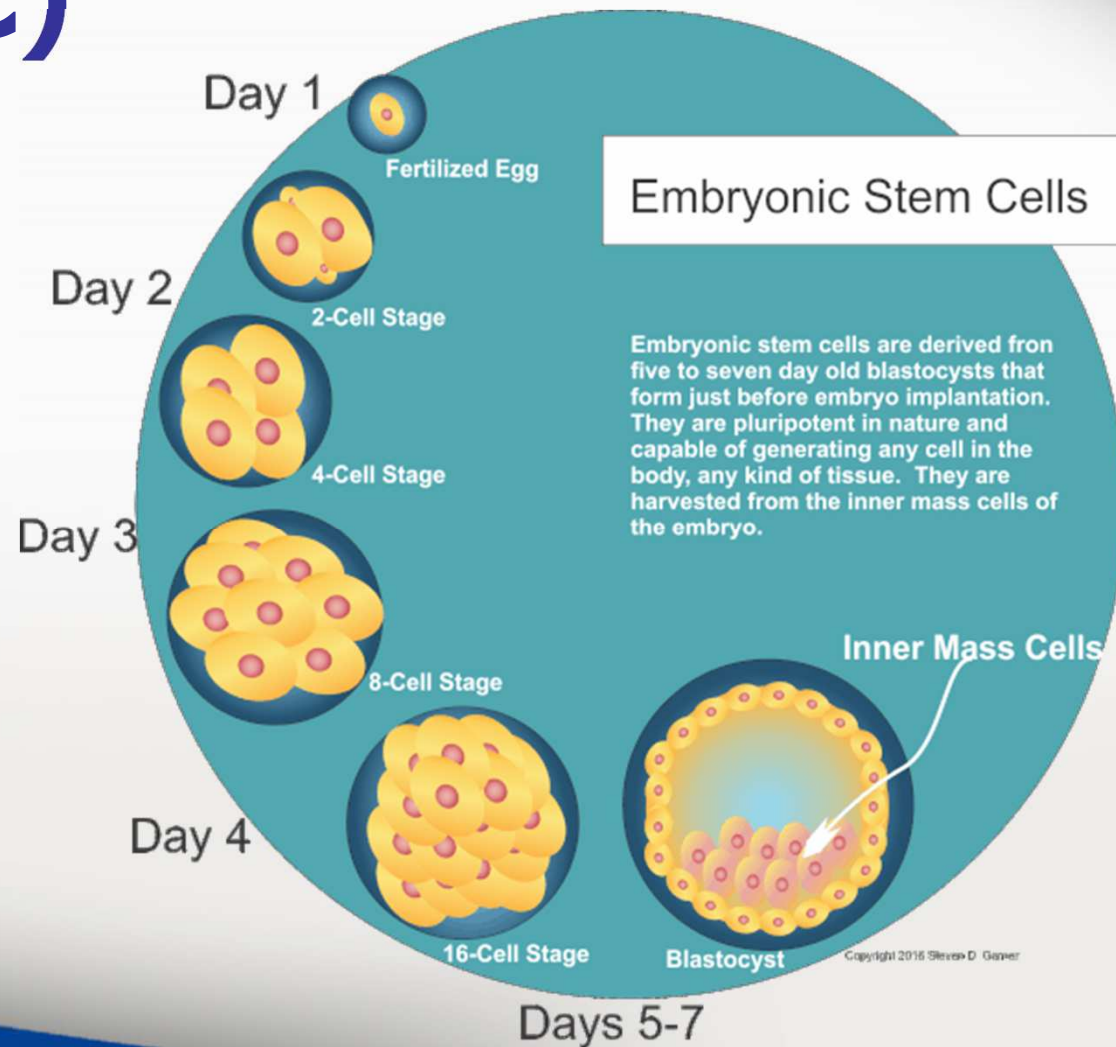


Časová náročnost S fáze

- u savčích buněk v kultuře obvykle 6 – 8 hodin
- u různých buněčných typů probíhá různě rychle
- nejrychleji u embryonálních buněk a lymfocytů, kde celý cyklus netrvá déle než 5 hodin
- u člověka je třeba replikovat $6,4 \times 10^9$ párů bází na diploidní genom



Embryonální kmenové buňky (ESC)

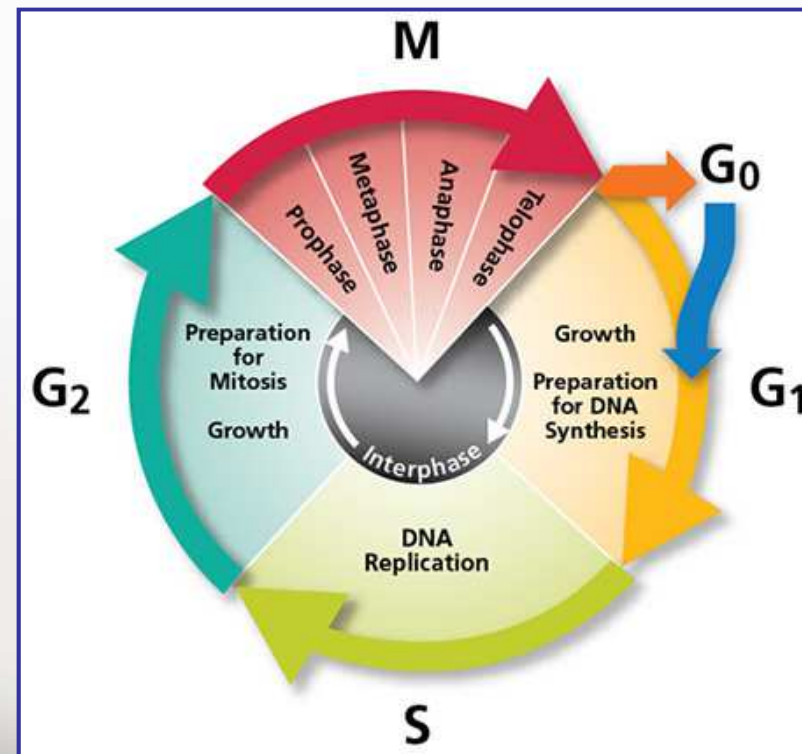


Buněčný cyklus u ESC

- vypnuta kontrola ze strany pRb i p53
- nejsou potřebné mitogenní signály z vnějšku, ale buňky si vystačí s nitrobuněčnými signály (např. Ras je konstitutivně aktivní)
- reminiscence jednobuněčných organismů, které rostou autonomně - nezávisle na buňkách sousedních
- po injekci do dospělých organismů mohou indukovat tvorbu benigních nádorů (teratomů) = jediný případ, kdy tvorbu nádoru dokážou vyvolat buňky divokého typu (nemutované)

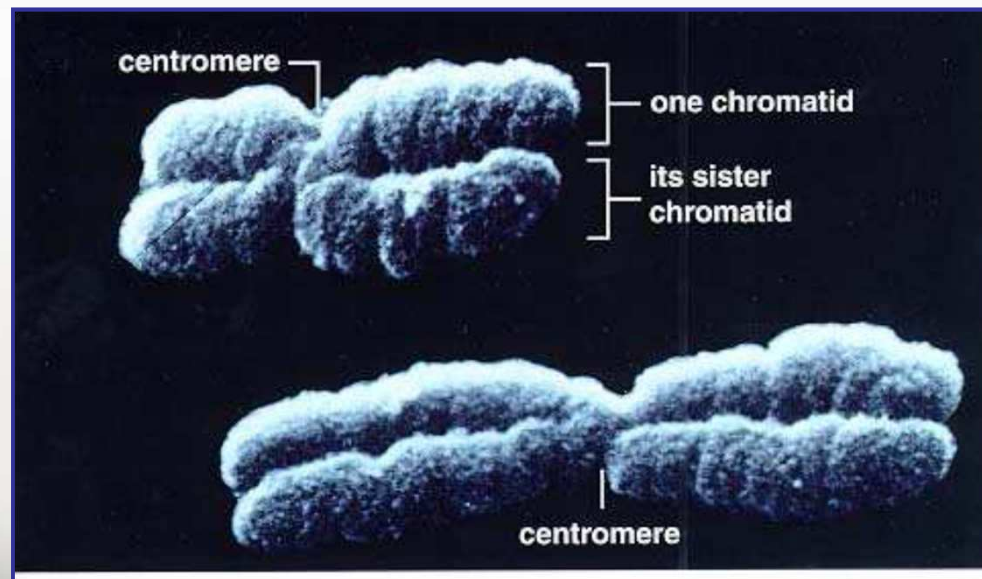
Fáze G2

- příprava na vstup do M fáze a buněčné dělení
- časové nároky u savčích buněk: 3 – 5 hodin



M-fáze

- k dispozici chromozomy s duplikovanou DNA: sesterské chromatidy k sobě v jádře přiléhají
- přesné rozdělení chromatid
- genetická výbava dceřiné buňky závisí na přesnosti replikace DNA buňky mateřské v S-fázi a přesnosti segregace duplikovaných chromozomů v M-fázi



Co když to nefunguje?

- striktní požadavky na přesnost cyklu v evoluci vedly k vytvoření kontrolních mechanismů
- monitoruje se každý krok
- následná fáze může nastat jen po řádném dokončení fáze předchozí
- dokončená fáze cyklu nemůže být zopakována jinak než opakováním celého cyklu
- v případě problémů regulační mechanismy dokážou cyklus pozastavit až do jejich vyřešení

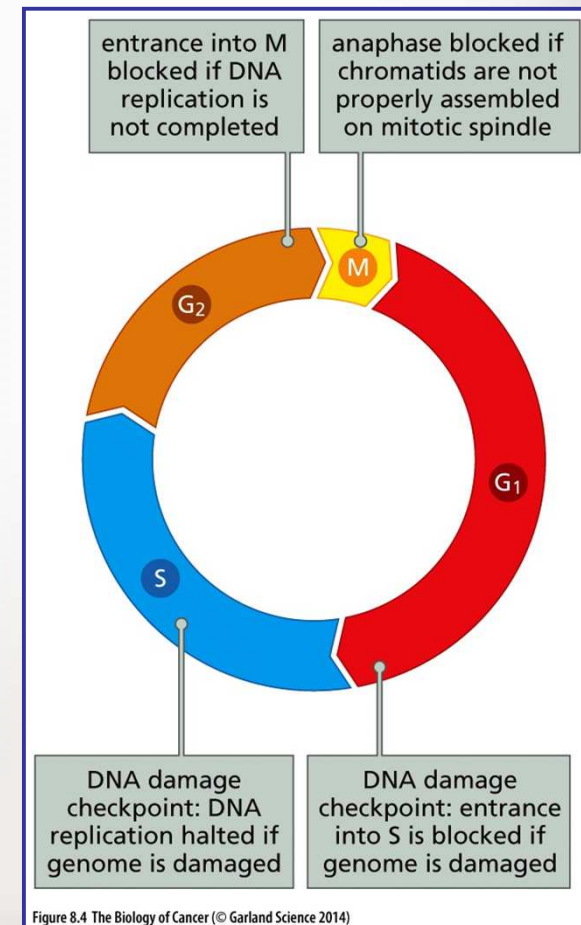
Kontrolní body („checkpoints“)

- na přechodech fází
- zajišťují „kontrolu kvality“ cyklu

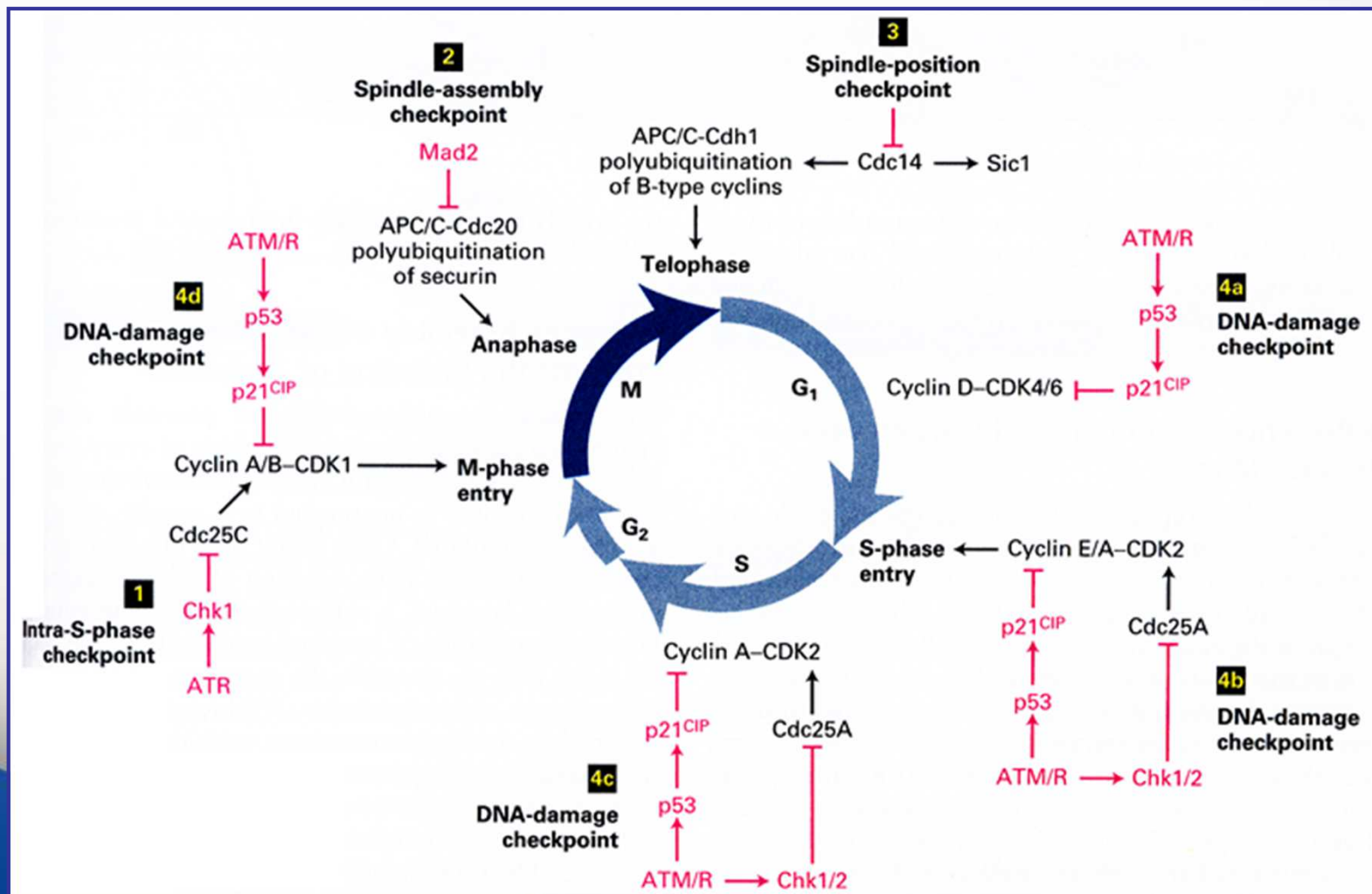


Kontrolní body („checkpoints“)

- poškození DNA/chybná replikace: zpomalení nebo zastavení cyklu ve fázi G1/S/G2
- buňka nevstupuje do fáze S s poškozenou DNA
- buňka nevstupuje do fáze M před dokončením replikace DNA nebo s poškozenou DNA
- buňka nemůže vstoupit do anafáze, dokud nejsou všechny chromozomy řádně sestaveny a připojeny k mitotickému vřeténku
- tutéž fázi nelze opakovat 2x v rámci téhož cyklu



Kontrolní body („checkpoints“)



Ztráta kontrolního bodu?

- chaos
- např. ztráta proteinu Rad17, který je součástí kontrolního bodu bránícího opakované replikaci DNA: endoreplikace chromozomální DNA, zvýšení stupně ploidie

Normální lidský karyotyp

Lidský karyotyp bez Rad17

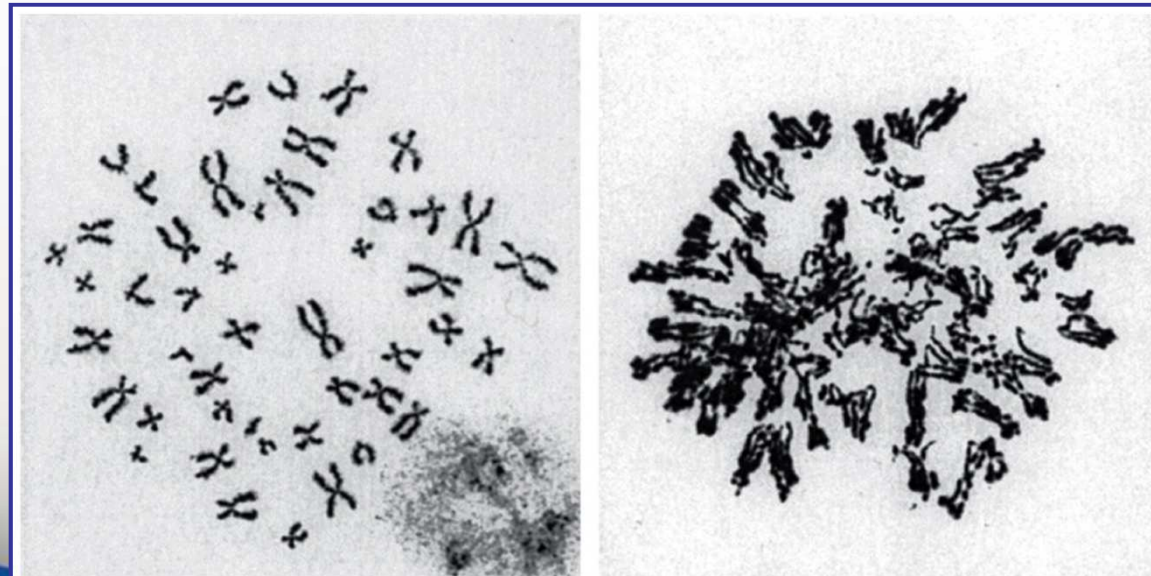


Figure 8.5a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Růst nebo být v klidu?

- odráží nutnost koordinace se sousedními buňkami při výstavbě tkání (s výjimkou embryonálních buněk)
- 10^{14} tělních buněk nemůže dostat právo autonomního rozhodování o vlastním dělení
- buňka vyhodnocuje pro- a protirůstové signály ve svém okolí během specifického okna fáze G1: od začátku G1 do času 1 – 2 hodiny před začátkem fáze S
- **v bodě restrikce** musí být učiněno finální rozhodnutí

Odebrání séra během 80-90% G1:
- přechod do klidového stavu

Odebrání séra během posledních 10-20% G1:
- přechod do fáze S, G2 a M

Totéž platí pro antimitogeny

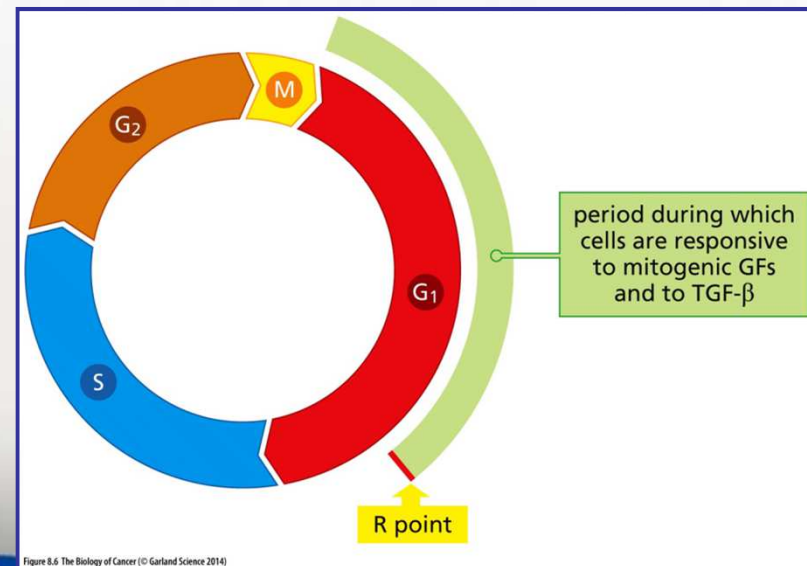
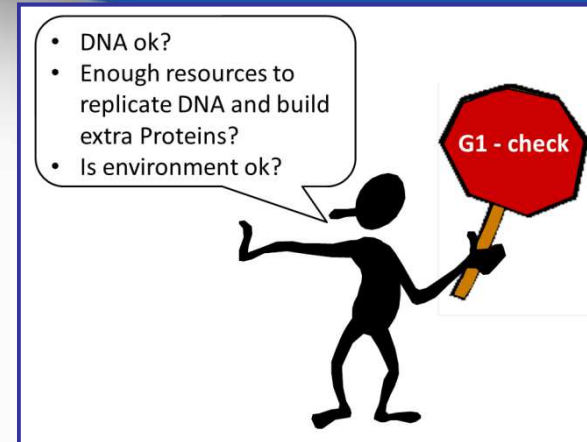


Figure 8.6 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

G1 fáze



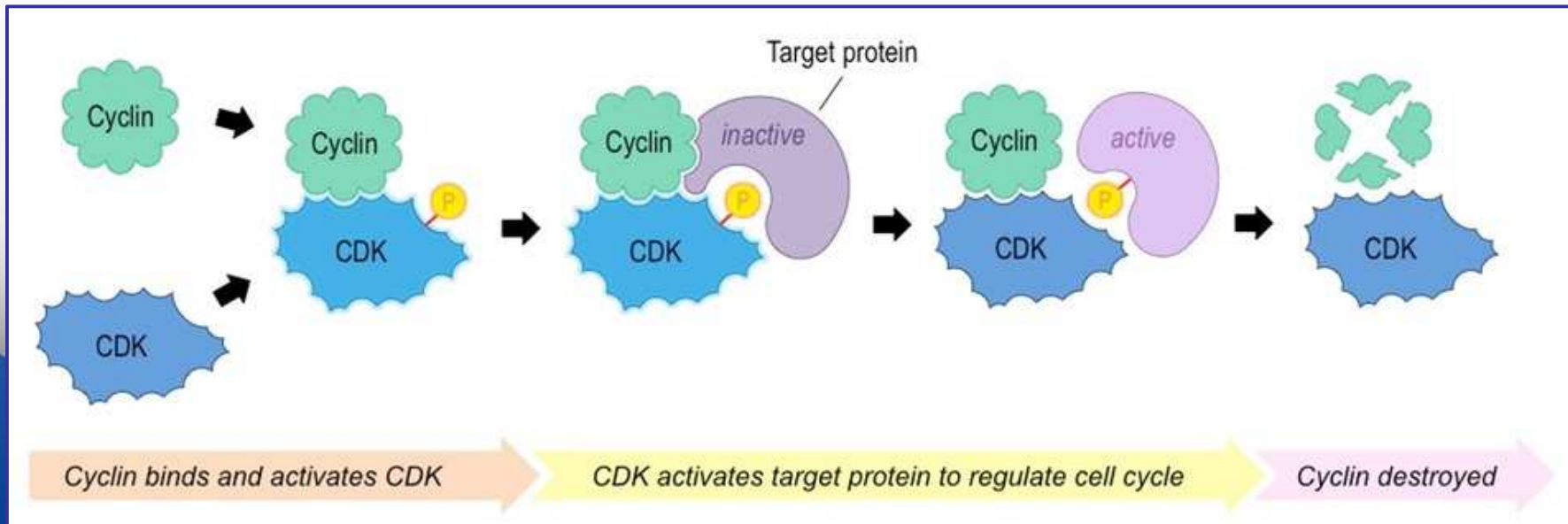
- nejvíce variabilní
- buňka citlivá na **vnitřní i vnější podněty**
- rozhodnutí o cyklování učiněné před bodem restrikce se respektuje i ve zbývajících fázích cyklu, i kdyby mezitím došlo ke změně vnější situace
- fáze S, G2 a M probíhají podle pevného jízdního řádu, který se podstatně nemění ani u buněk nádorových, nereaguje na vnější podněty (na vnitřní ano)
- bod restrikce je tak kritickým rozhodovacím okamžikem, zda má buňka růst nebo ne
- deregulace bodu restrikce: rakovina

Kontrola připojení buňky k matrix

- bez řádného přichycení buňky se cyklus zastavuje nebo nastává programovaná buněčná smrt – **anoikis** („bez domova“)
- nádorové buňky tento kontrolní bod téměř vždy ztrácejí
- některé onkoproteiny (Src/Ras) dokážou obelstít buňku, takže dostává falešné signály, že je přichycená (mechanismus neznámý)

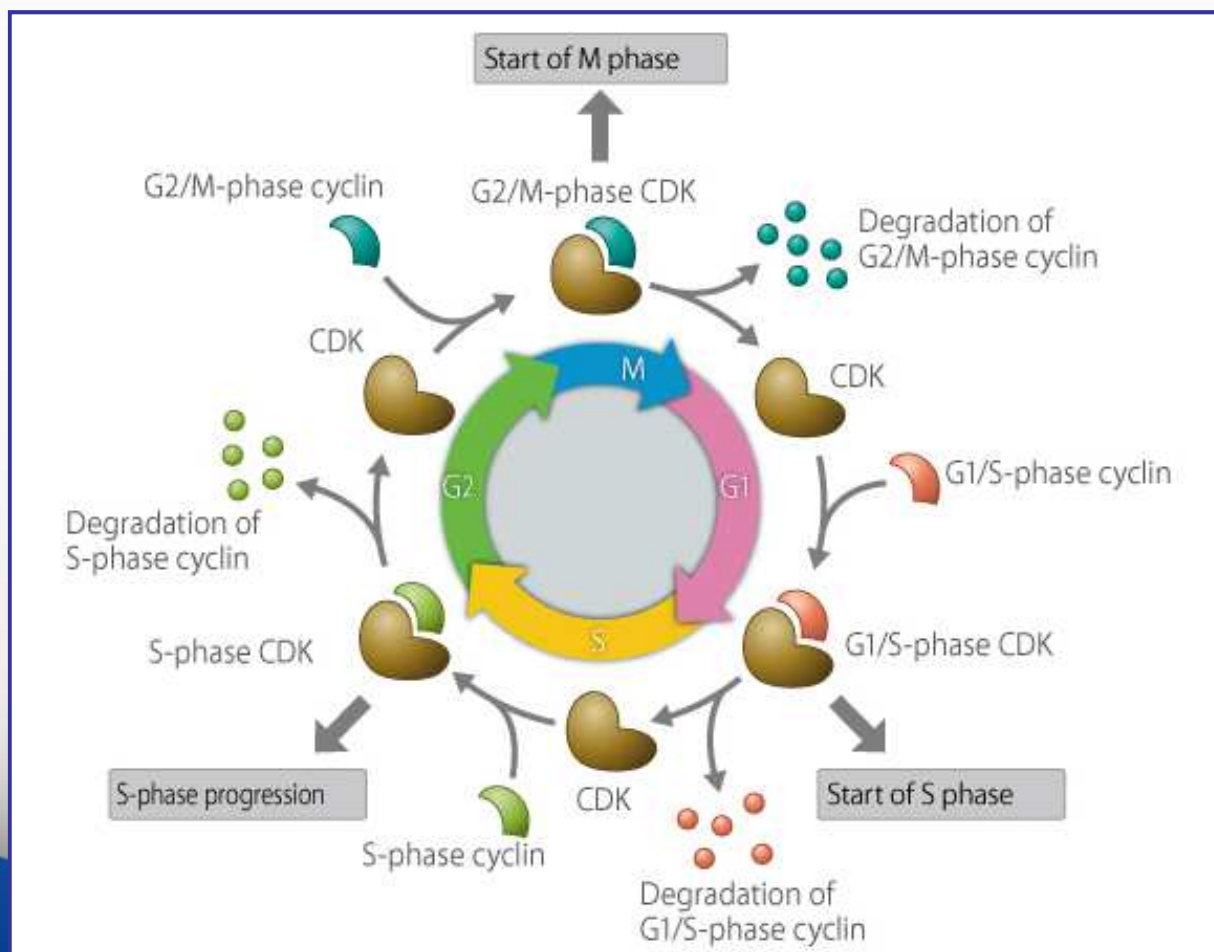
Kinázy buněčného cyklu: CDK

- **cyklin-dependentní kinázy**: nikdy nefungují samostatně
- plně závislé na cyklinech
- CDK ve spojení s cykliny zodpovídají za fosforylaci substrátů zajišťujících funkce jednotlivých fází cyklu
- ukončení aktivity komplexu cyklin/CDK ukončuje příslušnou fázi



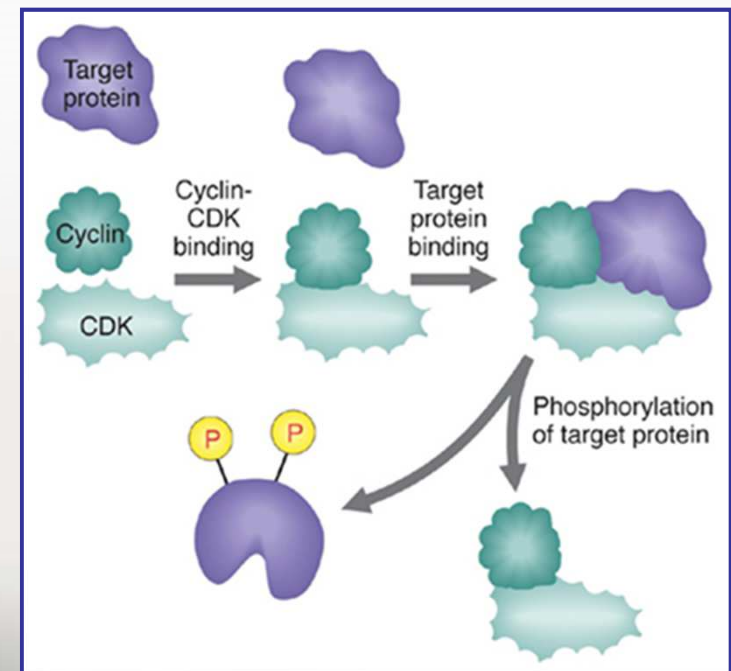
CDK

fosforylují desítky až stovky molekul zodpovědných za chod cyklu



Co jsou CDK?

- katalytická složka heterodimerních serinových/treoninových kináz
- regulační složkou jsou cykliny - členové proteinové rodiny s typickou doménou cca 100 AK, která je nutná pro vazbu a aktivaci CDK
- účinná regulace: vazbou cyklinu A se zvýší enzymová aktivita CDK2 400000x
- cykliny rozhodují o aktivitě CDK a specifitě substrátů



CDK: motor buněčného cyklu

- **fáze G1** (do bodu R): řízena kinázami **CDK4** a **CDK6** spojenými s jedním z **cyklinů D1, D2** a **D3**
- pozdní G1 po bodu R a vstup do S: **cykliny E1** a **E2** s kinázou **CDK2**
- **fáze S**: **cykliny A1/A2** nahrazují v komplexu s **CDK2** **cykliny E**
- **pozdní S**: **cykliny A** změní partnera – místo **CDK2** se vážou na **CDC2/Cdk1**
- **fáze G2** a **M**: nahrazení cyklinů A na **CDC2/Cdk1** **cykliny B (B1** a **B2)**
- pro případný vstup do **G0** je potřeba komplex **cyklinu C** a **CDK3**

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**	Cln5, 6	Cdk1
M-Cdk	cyclin B	Cdk1	Cln1, 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.

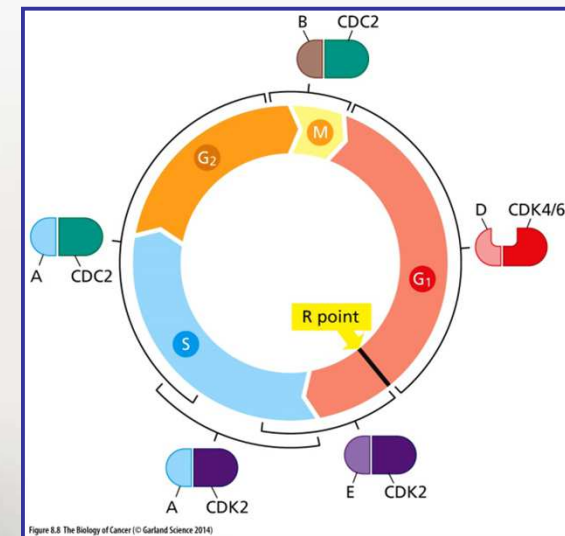
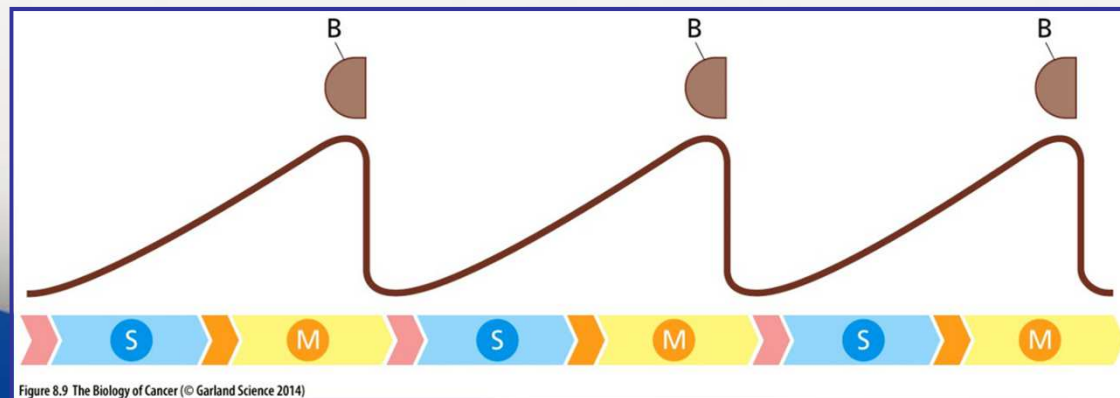


Figure 8.8 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Regulace komplexů cyklin-CDK

- zajišťuje buňce možnost zásahu do každé části cyklu
- hlavní regulační prvek: dostupnost a hladina cyklinů (výrazná fluktuace)
- hladina CDK se mění jen minimálně
- první experimenty prováděné na raných embryích žab a mořské ježovky:
 - hladina cyklinu B silně stoupá před začátkem M-fáze, čímž je umožněna tvorba komplexů cyklinů B a CDC2
 - na konci M fáze hladina cyklinů B prudce klesá v důsledku jejich řízeného rozkladu
 - u raných embryí se tak děje u všech buněk současně, hladiny cyklinových proteinů synchronně stoupá a klesá – podklad pro jejich název



Kolísání cyklinů

- v závislosti na fázi cyklu
- hladina cyklinu E je nízká po většinu G1, prudce stoupá po průchodu bodem R a rychle klesá po zahájení S
- hladina cyklinu A se zvyšuje v S fázi
- likvidace cyklinů po dokončení jejich mise je následkem polyubikvitinace a proteazomové degradace
- rozklad cyklinů zajišťuje jednosměrnost cyklu

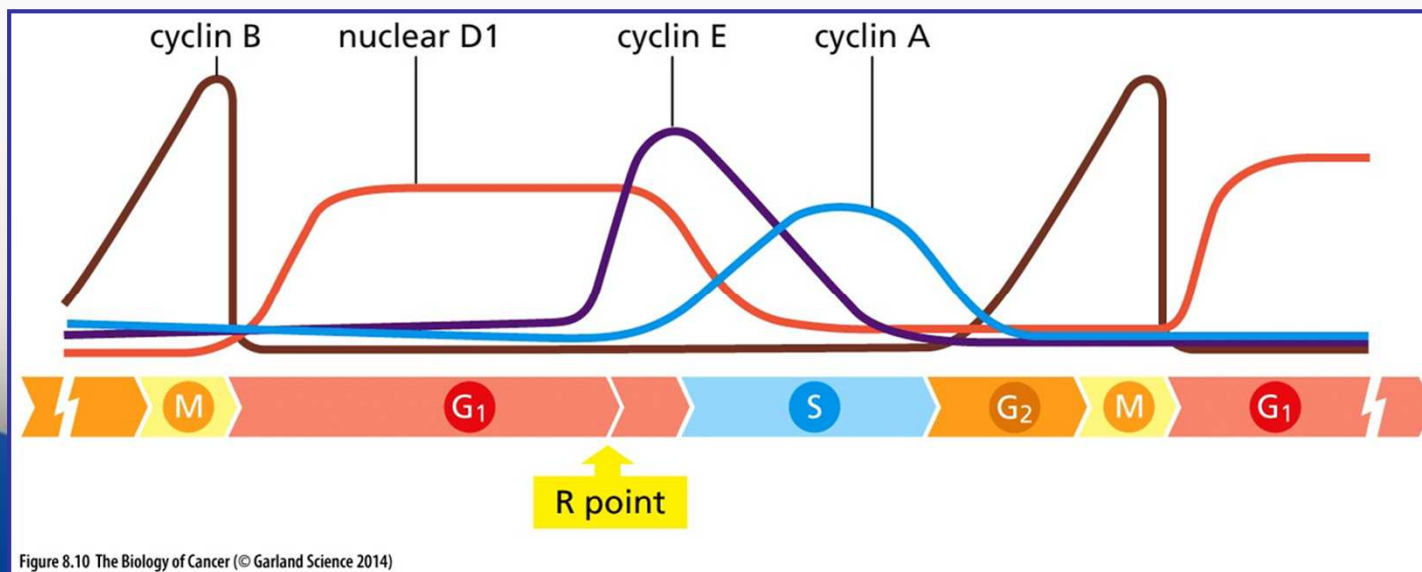


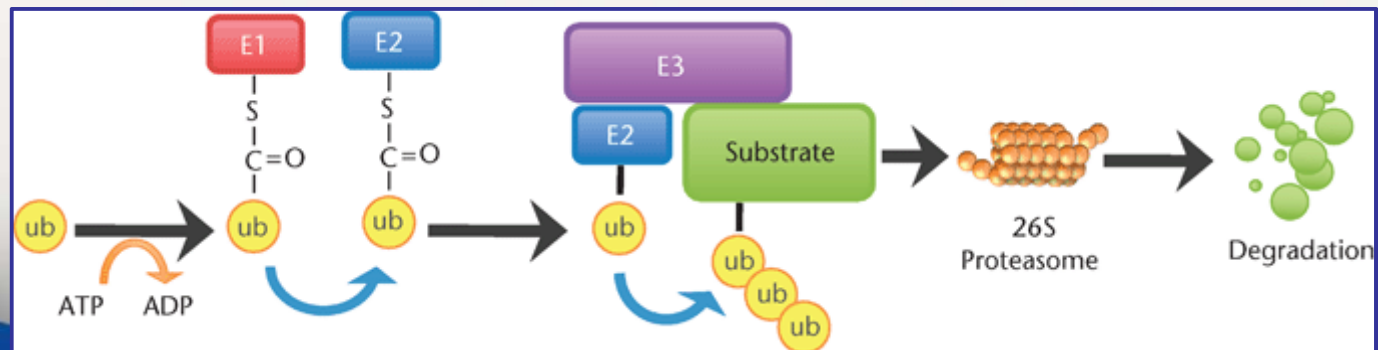
Figure 8.10 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

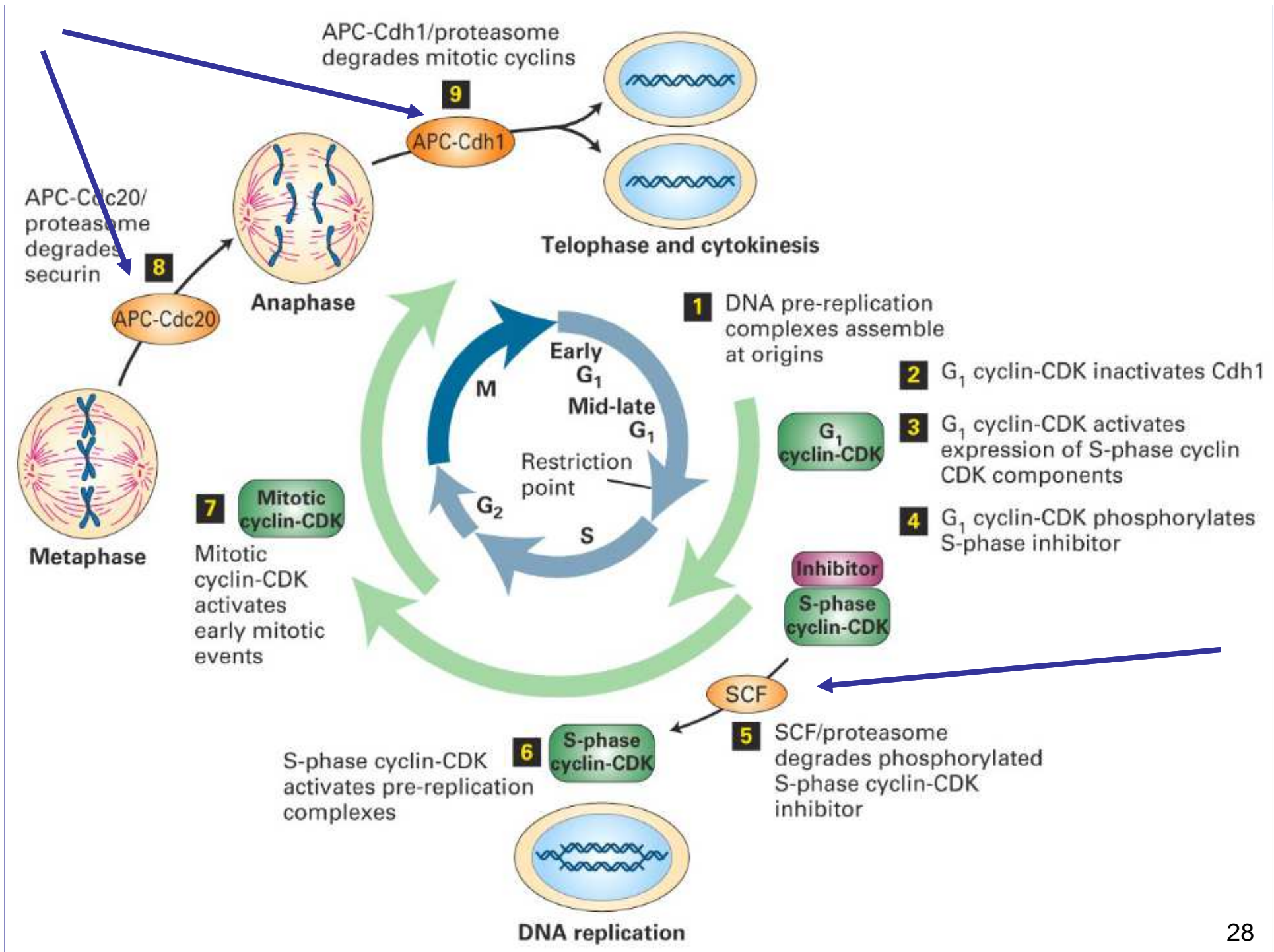
Degradační systémy

- vedle CDK dalšími řídicími elementy cyklu
- zajišťují řízený rozklad specifických proteinů cyklu
- následkem je nevratný posun fází

ubikvitin ligázy související s buněčným cyklem:

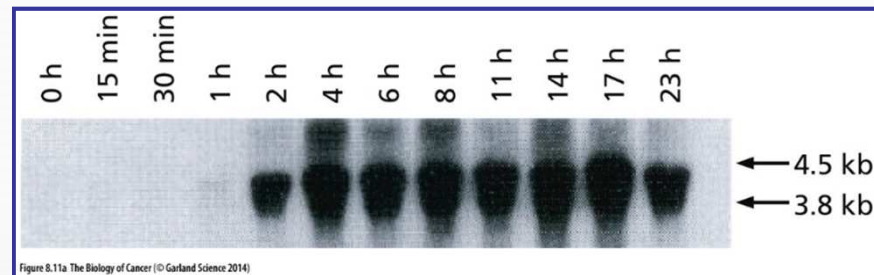
- **SCF**
- „**anaphase promoting complex**“ = **cyklozom (APC/C)**
- specificky značí proteiny polyubikvitinovou značkou, která je předurčí k proteazomové likvidaci





Cyklování cyklinů D

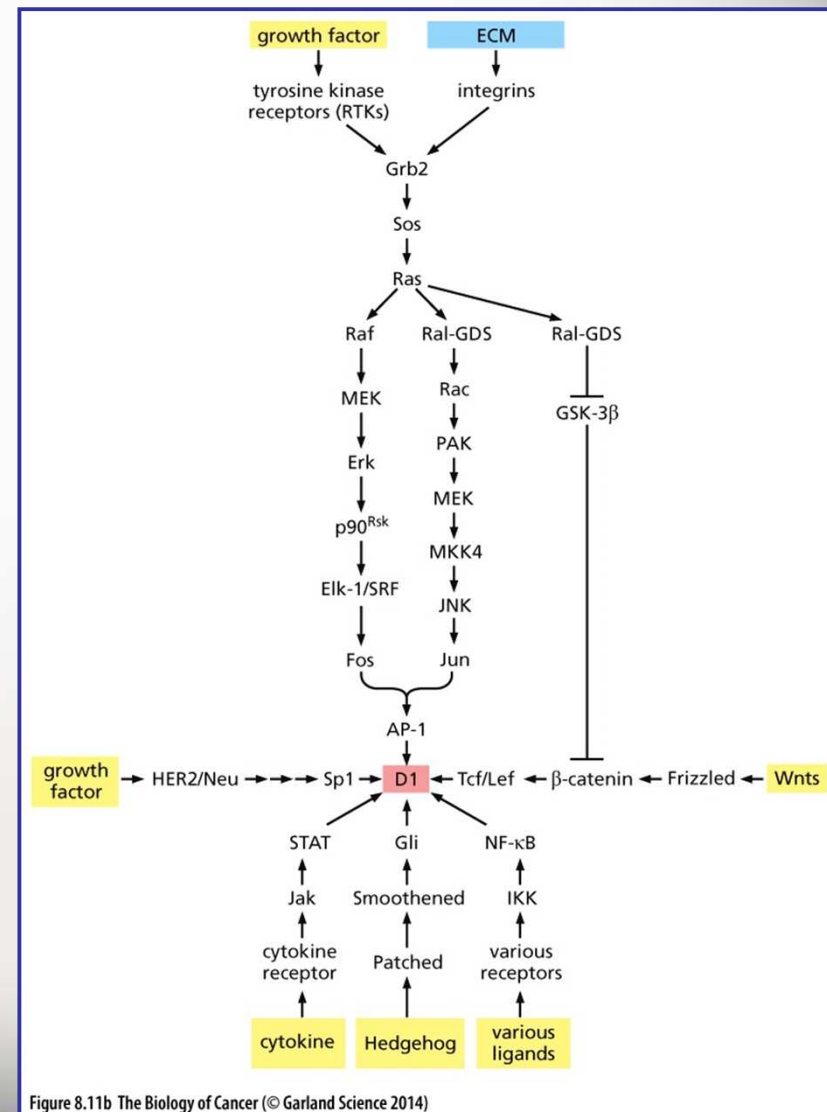
- zřetelné odlišnosti od jiných cyklinů
- hladina cyklinů D se v průběhu cyklu nemění v pravidelném rytmu, ale v závislosti na mimobuněčných signálech, především mitogenních růstových faktorech



- mitogen CSF-1 (colony-stimulating factor 1) indukuje rychlý nárůst hladiny mRNA pro cyklin D1 u makrofágů (northern blotting, sonda specifická pro cyklin D1)
- odstranění CSF-1 vede k rychlému poklesu hladiny cyklinu D (poločas rozpadu = 30 minut)

Exprese genů pro cykliny D

- pod kontrolou signálních kaskád
- cyklin D průběžně informuje aparát cyklu o stavu okolí buňky



Proč tři varianty cyklinu D?

- cykliny D1, D2, D3 mají obdobnou funkci
- enzymatická aktivita a substrátová specifita komplexu s CDK nezávisí na typu cyklinu D
- promotor každého z cyklinů D má specifické sekvence, které zajišťují citlivost pro jiné signální dráhy řízené jinými receptory

Table 8.1 Induction of D-type cyclin expression by extracellular signals

Source of signal	Signaling intermediaries	Type of cyclin
RANK receptor	NF- κ B pathway	D1
Prolactin receptor	Jak/STAT	D1
Estrogen receptor	AP-1 TF (?)	D1
Focal adhesion kinase		D1
HER2/Neu receptor	E2F and Sp1 TFs	D1
Wnts-Frizzled receptor	β -catenin and Tcf/Lef TFs	D1
Bcr/Abl		D2
FSH receptor	cyclic AMP	D2
Various mitogens	Myc	D2
Interleukin-4, 7 receptor		D2
Interleukin-5 receptor	STAT3/5	D3
Mitogens	E2A TF	D3

Abbreviations: RANK, receptor activator of NF- κ B; FSH, follicle-stimulating hormone.

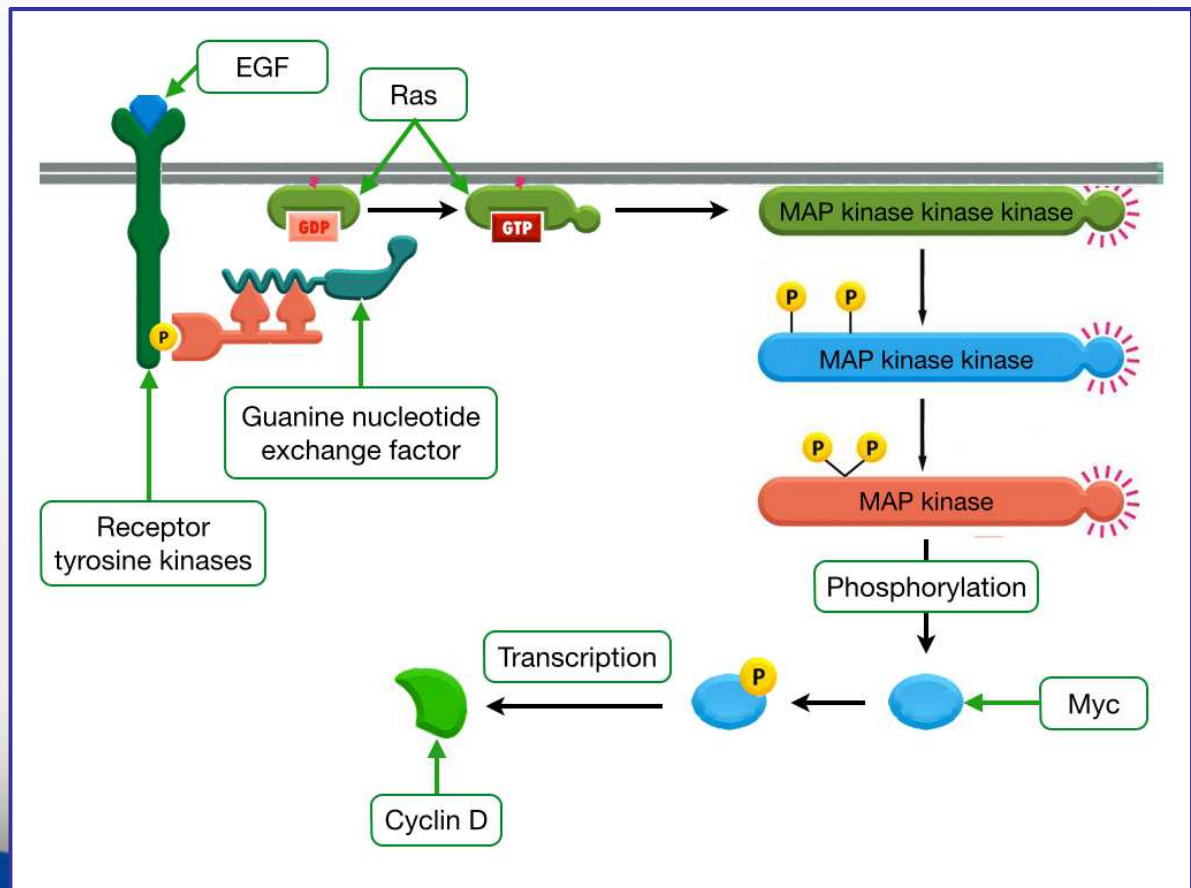
Table 8.1 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Cyklin D a funkce nesouvisející s buněčným cyklem

- spojuje se s **estrogenovým receptorem** a **transkripčním faktorem C/EBP β**
- vazba s ER aktivuje tento receptor podobně jako estrogenový ligand (mitogenní účinek, běžná overexprese cyklinu D1 u ER-pozitivní rakoviny prsu)
- vazba s C/EBP β aktivuje tento transkripční faktor a ten pak ovlivňuje diferenciační procesy
- v lidském genomu bylo chromatinovou precipitací nalezeno nejméně 700 míst s navázaným cyklinem D1, většinou spojených s promotory, (pravděpodobně existují další, dosud neznámé funkce cyklinu D1)

Vnější řízení buněčného cyklu

- komplexy cyklinu D a CDK4/6 zajišťují procesy fáze G1 od jejího začátku až po bod R – po tuto dobu je buňka citlivá k mimobuněčným signálům
- aktivace cyklinu D mitogeny je pod kontrolou signální dráhy MAPK



Vnitřní řízení buněčného cyklu

- po přechodu bodu R se buňka dostává do autonomního modu, přechází na vnitřní řízení
- následující cykly jsou pod kontrolou endogenních signálů
- průběh následujících fází cyklu je tak předvídatelný
- cykly dané fáze vypínají expresi cyklinů fáze předchozí

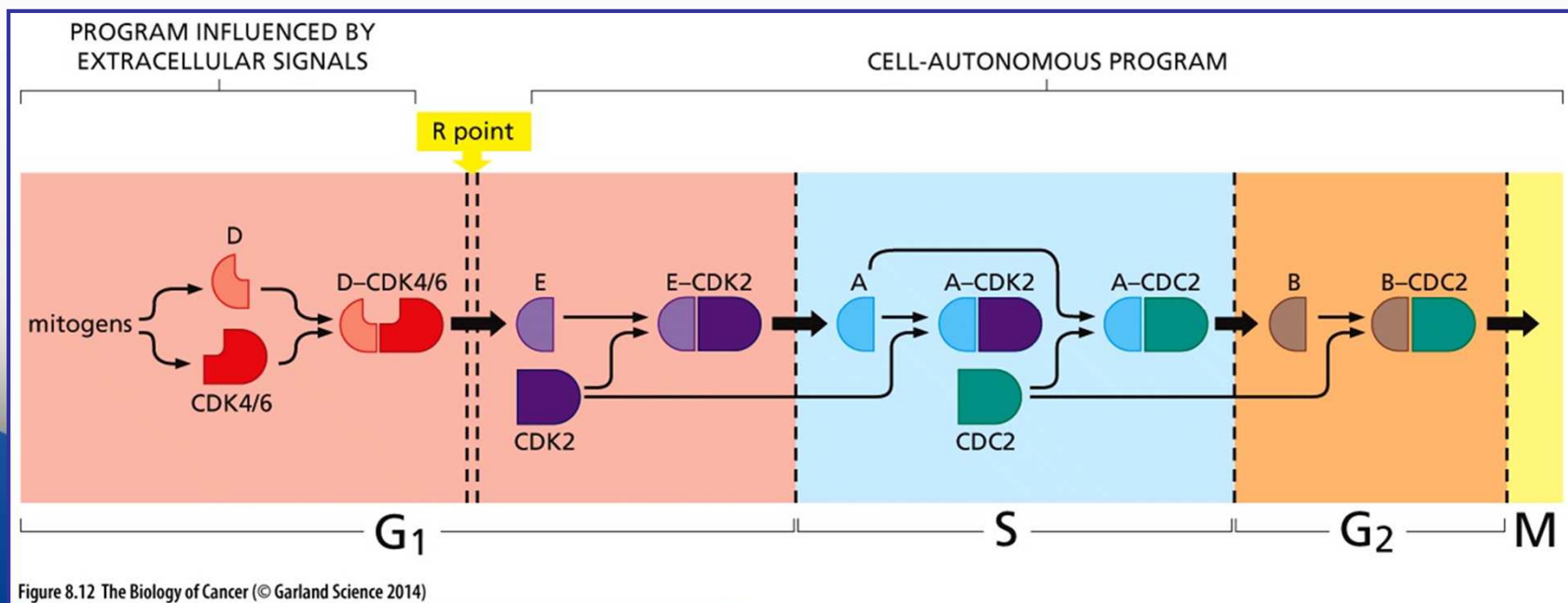
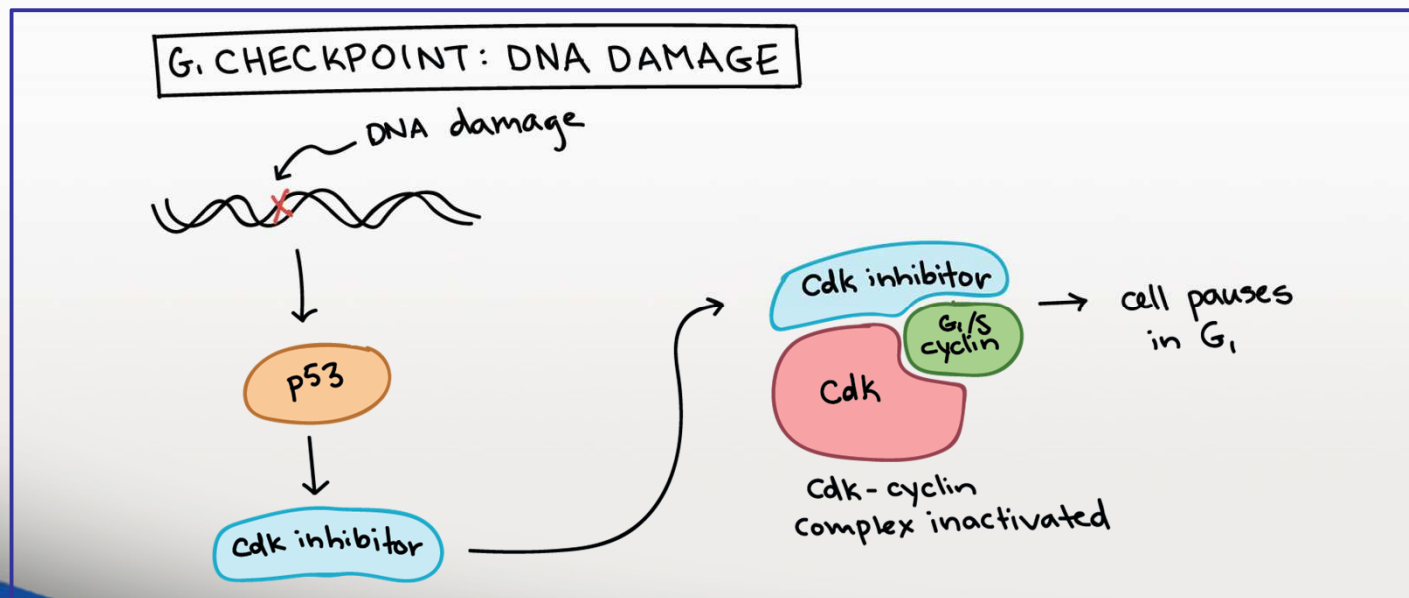


Figure 8.12 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

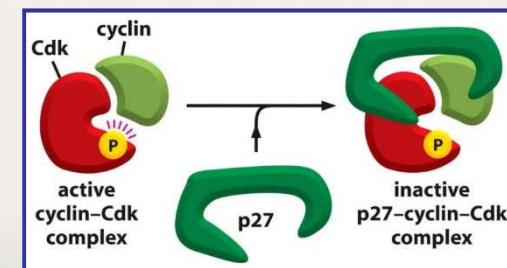
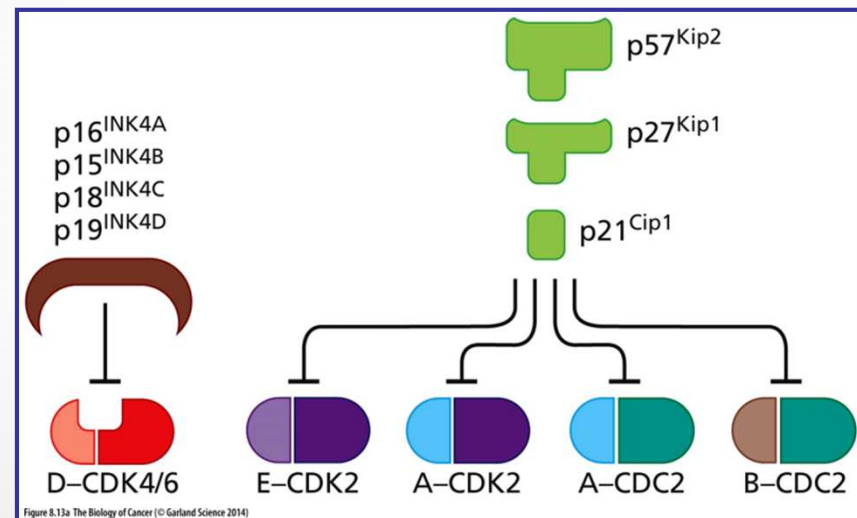
Další roviny řízení cyklu

- inhibitory CDK (**CKI**)
- antagonizují působení cyklinů tím, že se vážou na komplexy cyklinů a CDK a tím je inaktivují



Dvě rodiny inhibitorů CDK

- rodina **INK4** (inhibitors of CDK4)
 - p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C, p19INK4D
 - specificky vážou komplexy CDK4/CDK6 s cyklinem D
 - neúčinkují na CDC2 a CDK2
- rodina **Cip/Kip**
 - p21Cip1, p27Kip1 a p57Kip2
 - inhibice různých typů komplexů cyklin/CDK
 - ovlivňují i procesy transkripce, apoptózy, diferenciace, buněčné migrace, organizace cytoskeletu



TGF β aktivuje p15INK4B

- antimitogenní faktor TGF β reguluje buněčný cyklus prostřednictvím inhibitorů CDK
- významně zvyšuje expresi p15INK4B a mírně rovněž p21Cip1
- p15INK4B blokuje tvorbu nových komplexů cyklin D-CDK4/6 a inhibuje aktivitu komplexů již sestavených
- buňka nemůže projít fází G1 a dosáhnout bodu R
- TGF β prostřednictvím p21Cip1 dokáže blokovat funkci i ostatních komplexů cyklin/CDK

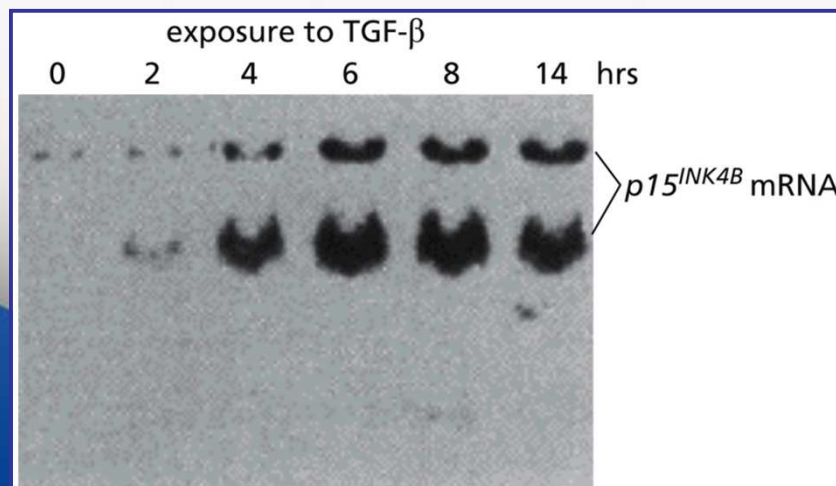


Figure 8.14b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

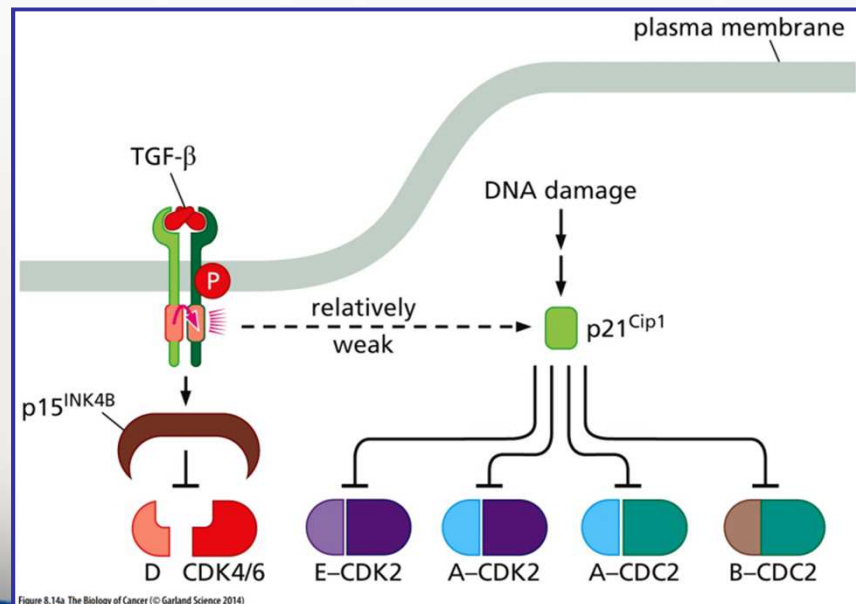
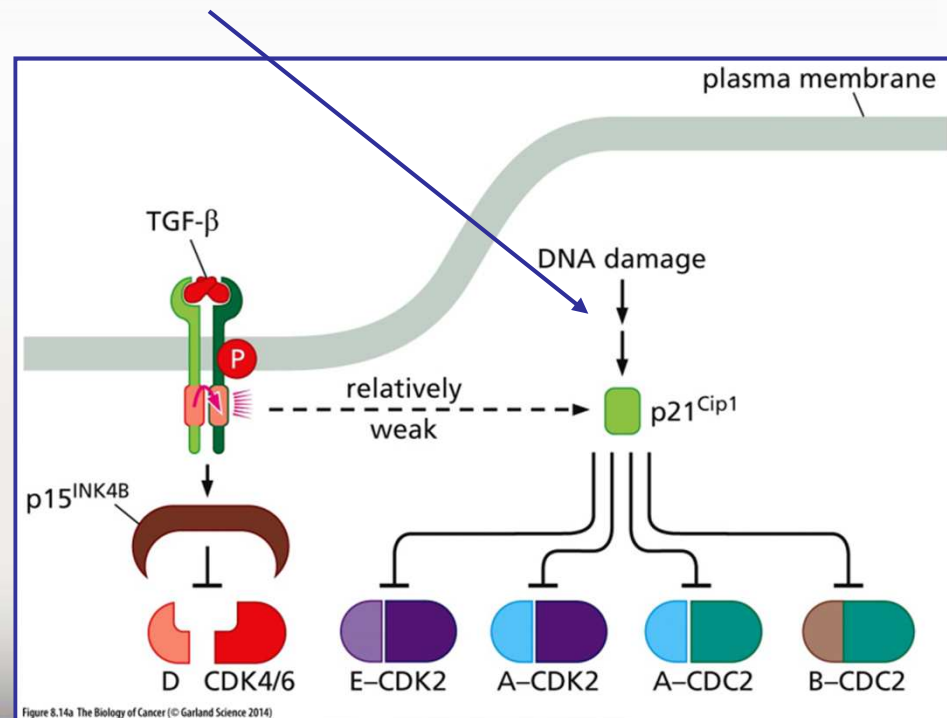


Figure 8.14a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

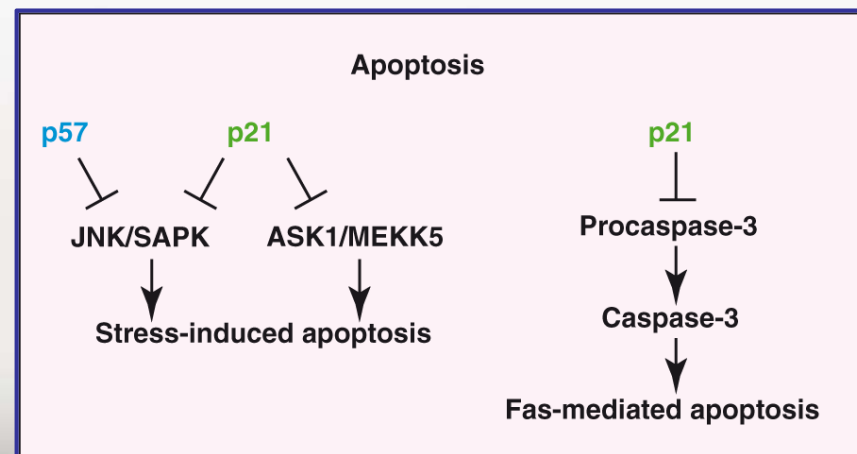
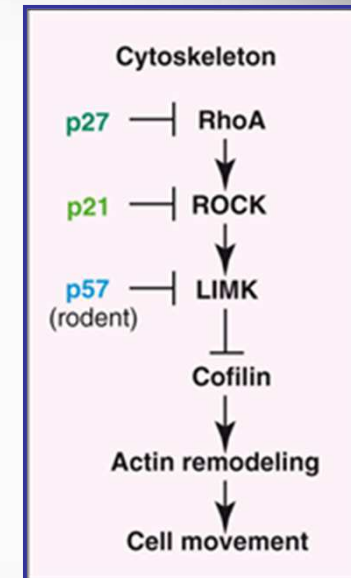
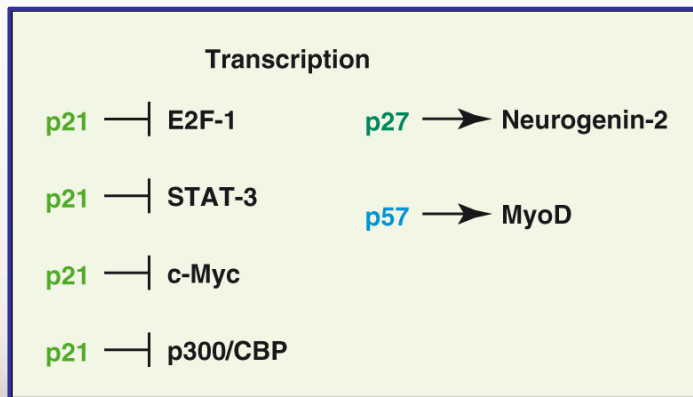
Poškození DNA aktivuje p21Cip1

- p21Cip1 dokáže blokovat funkci různých komplexů cyklin/CDK
- cyklus se zastaví v různých fázích dokud není DNA opravena
- gen p21Cip1 je pod kontrolou p53



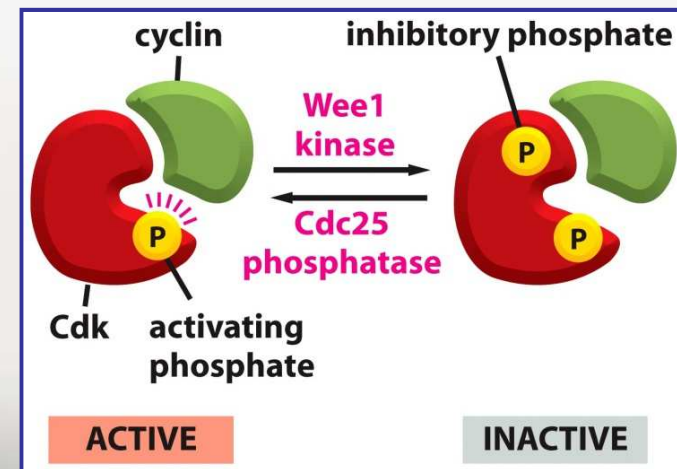
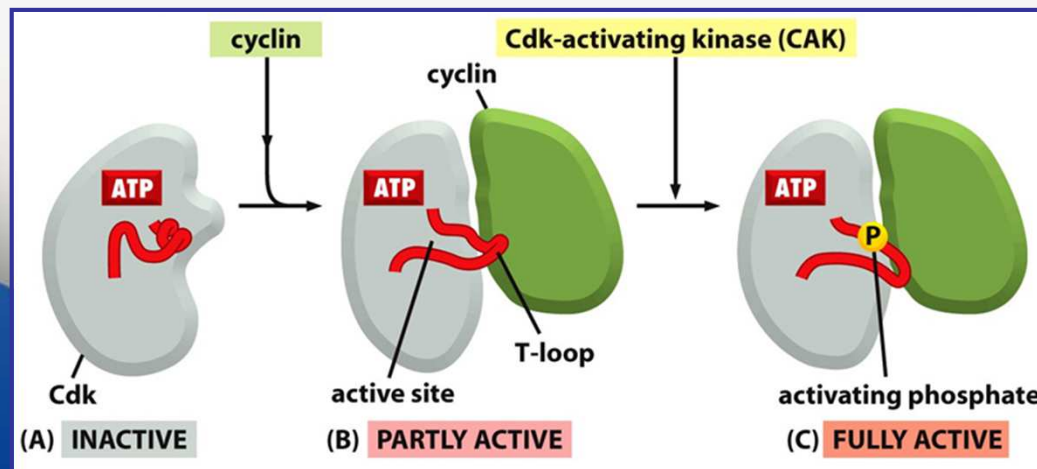
Proteiny Cip/Kip mají další funkce

- nezávislé na CDK
- regulují transkripci vazbou na transkripční faktory
- blokují apoptózu
- regulují dynamiku aktinového cytoskeletu



Fosforylace CDK

- další regulační úroveň při řízení buněčného cyklu
- podmínkou aktivity CDK je fosforylace určitých aminokyselin a defosforylace jiných aminokyselin v blízkosti aktivního místa
- aktivační fosforylace kinázou **CAK** (CDK-activating kinase)
- inhibiční fosforylace katalyzována kinázou **Wee 1**
- CAK je komplex cyklin-CDK, který fosforyluje T-smyčku CDK a tím ji stimuluje k opuštění katalytického místa
- odstranění inhibičního fosfátu fosfatázou **CDC25**

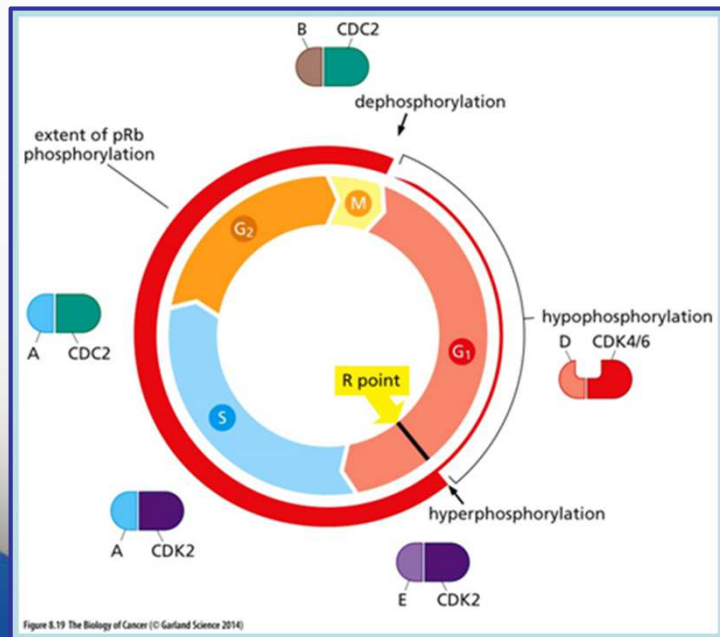


Fosforylace Rb při přechodu bodu restrikce

- nádorový supresor **Rb** zastavuje cyklus
- defektní nebo chybí u retinoblastomů, sarkomů, malobuněčných karcinomů a dalších nádorů
- Rb je v průběhu buněčného cyklu fosforylován
- nefosforylován v G0
- slabě fosforylován (hypofosforylován) na malém počtu serinových a treoninových zbytků po vstupu do G1
- silně fosforylován (hyperfosforylován) na mnohem větším počtu serinových a treoninových zbytků s přechodem bodu restrikce
- po zbytek cyklu pRb zůstává v hyperfosforylovaném stavu
- po ukončení mitózy se fosfátové skupiny odstraní proteinovou fosfatázou typu I (PP1)

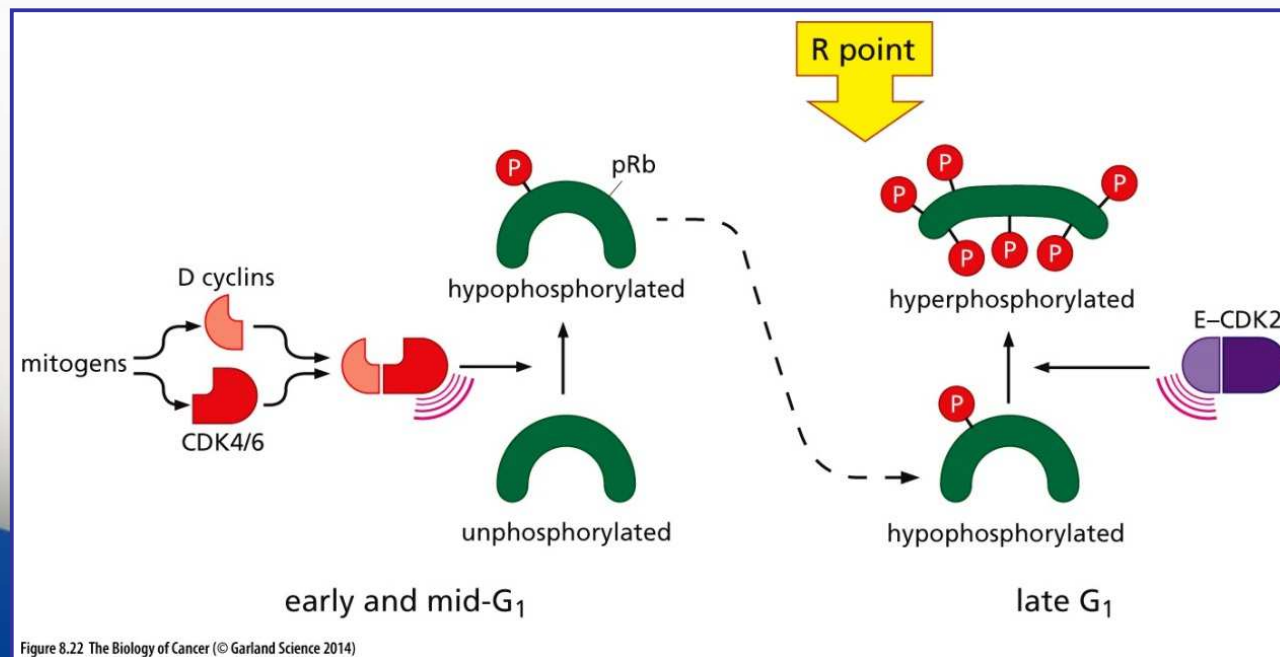
Rb: hlídač bodu restrikce

- v průběhu rané až střední fáze G1 působí jako inhibitor buněčného cyklu
- hyperfosforylace jej inaktivuje, takže ztrácí svou inhibiční funkci, což umožňuje průchod bodem restrikce



Co rozhoduje o fosforylaci Rb?

- v rané až střední fázi G1 hypofosforylaci pRb zajišťuje CDK4/6-cyklin D
- v pozdní fázi G1 hyperfosforylaci zajišťuje CDK2-cyklin E – inaktivace Rb
- ztráta mitogenů v G1 před dosažením bodu R znamená pokles cyklinu D, Rb ztrácí fosfátové skupiny a mění se na protein, který není dobrým substrátem pro fosforylaci komplexu CDK2-cyklin E



Rb po přechodu bodem restrikce

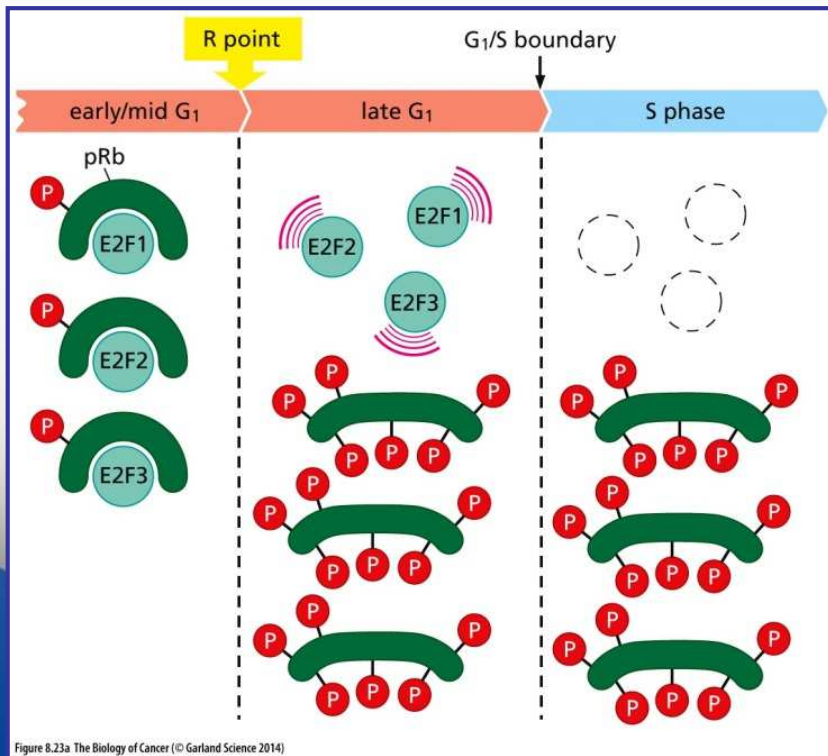
- úroveň hyperfosforylace a funkční inaktivace Rb po přechodu R neklesá, ale ještě se posiluje pomocí komplexů CDK s cykliny E, A a B
- žádný z nich již není citlivý na mimobuněčné signály: cyklus pokračuje v pevně stanoveném rytmu S - G2 – M
- defosforylace pRb po ukončení mitózy proteinovou fosfatázou typu I (PP1)

Ztráta Rb? Problémy...

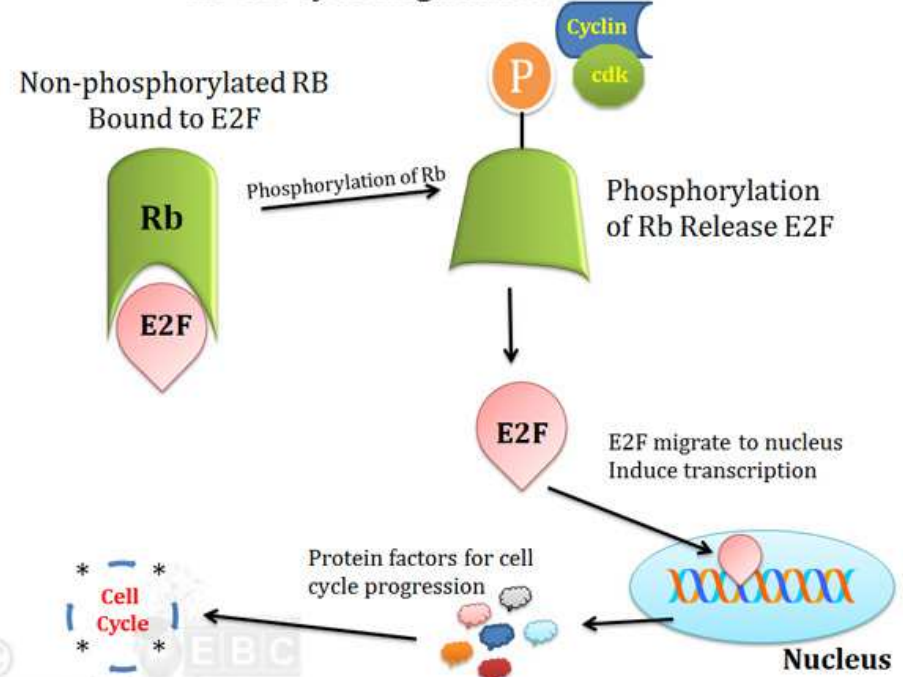
- mutace v genu *Rb*, metylace jeho promotoru, působení onkoproteinů: ztráta funkce „ovladače závory“ bodu R (zůstává otevřená)
- bez dozoru Rb buňky přecházejí z G1 do S bez náležité kontroly
- deregulace Rb je velice rozšířená u nádorových buněk (možná k ní dochází úplně ve všech...)

Rb a E2F

- transkripční faktor E2F rozhoduje o transkripci genů nutných pro S fázi a další pokračování cyklu
- nefosforylovaný/hypofosforylovaný Rb váže E2F
- hyperfosforylovaný pRb uvolňuje E2F



Mechanism of Action of Rb (Retinoblastoma) Protein in Cell Cycle Regulation



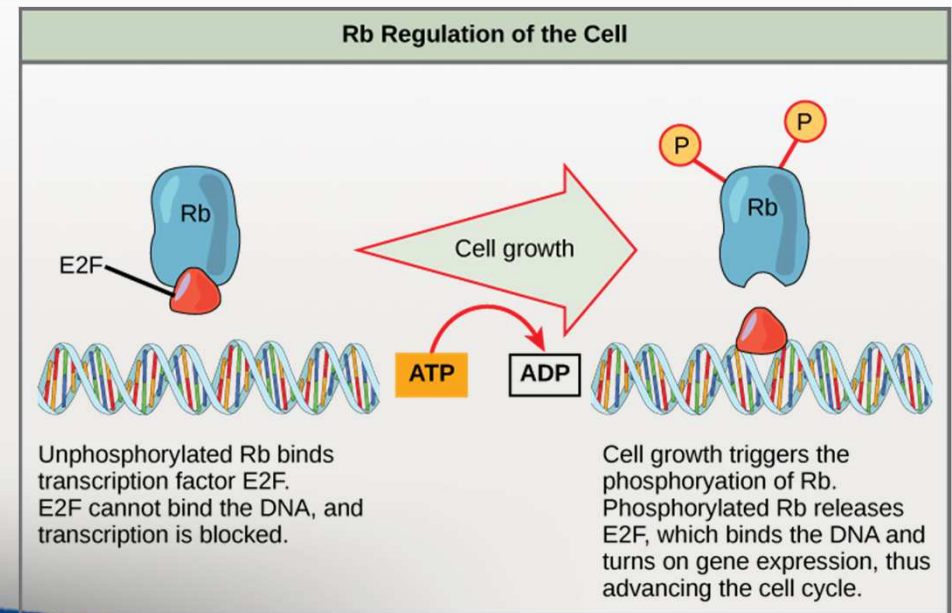
Rb a E2F

raná fáze G1: proteiny E2F jsou spojeny s Rb

- E2F nemůže fungovat jako transkripční faktor, cílové geny E2F se neexprimují, S fáze nenastává

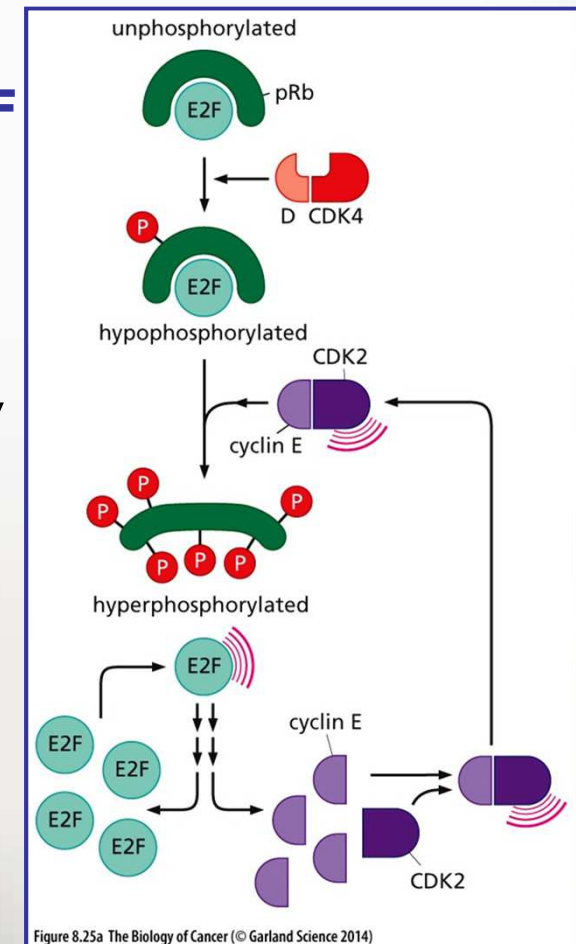
pozdní fáze G1: hyperfosforylace Rb, E2F se uvolňuje

- E2F zajistí transkripci svých cílových genů, cyklus jde do S fáze
- po přechodu do S fáze se proteiny E2F rychle inaktivují nebo degradují (fungují jen v úzkém časovém rozmezí na začátku fáze S)



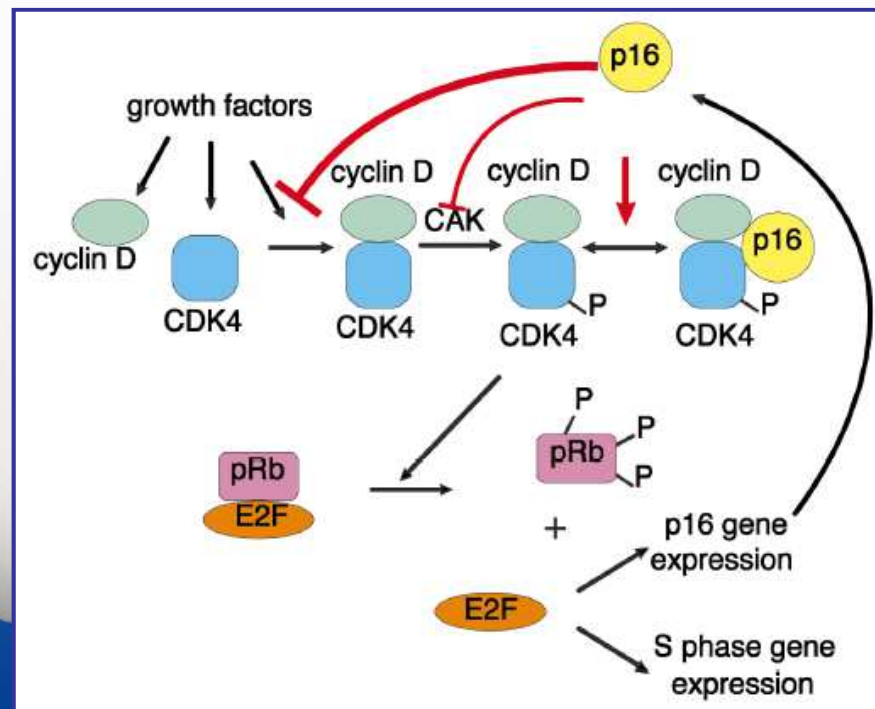
Cílové geny E2F

- cca 500 genů má ve svých promotorech vazebná místa pro E2F
- nezbytné pro vstup do S fáze: kódují např. proteiny, které katalyzují syntézu deoxyribonukleotidů (dihydrofolát syntáza, thymidin kináza) nebo jsou přímo zapojené do replikace DNA
- cílovými jsou rovněž geny kódující **cyklin E** a **E2F** pro pozitivní zpětnou vazbu:
 - po přechodu bodu R rychle stoupá hladina cyklinu E a E2F
 - cyklin E je zodpovědný za hyperfosforylaci Rb, čímž se tvoří ještě více E2F a cyklinu E...
 - E2F je transkripční faktor, který posiluje svou vlastní expresi



Cílové geny E2F

- gen kódující inhibitor **p16INK4**
- negativní zpětná vazba
- p16 se váže ke komplexu CDK4-cyklin D a inhibuje jej
- inhibice aktivační kinázy CAK
- inhibice sestavování komplexů CDK4-cyklin D



Manuel Serrano

Ukončení aktivity E2F

- E2F je aktivátorem transkripce jen krátce
- se zahájením fáze S dochází k aktivaci cyklinu A, který se spojí s CDK2 a fosforyluje E2F
- následkem je ztráta transkripčně aktivační schopnosti E2F, ubikvitinace a proteazomový rozklad

E2F je mocný induktor S fáze

mikroinjekce proteinu E2F do vyhladovělých buněk ve fázi G0
postačuje k indukci fáze S

Fáze M

zajištěna komplexy **cyklinu B** a **CDC2**, které fosforylují stovky proteinů:

- proteiny asociované s chromatinem, které stimulují kondenzaci chromozomů (např. kondenzin)
- proteiny jaderné membrány a pórů, které zajišťují stažení jaderné membrány do ER
- proteiny asociované s mikrotubuly, které remodelují cytoskelet do mitotického aparátu
- kinetochorové proteiny, které zajišťují sestavení kinetochorů a jejich připojení k mikrotubulům vřeténka
- kinázy, které asistují při dalších procesech mitózy

Fáze M

Pro regulaci jsou zásadní dva procesy:

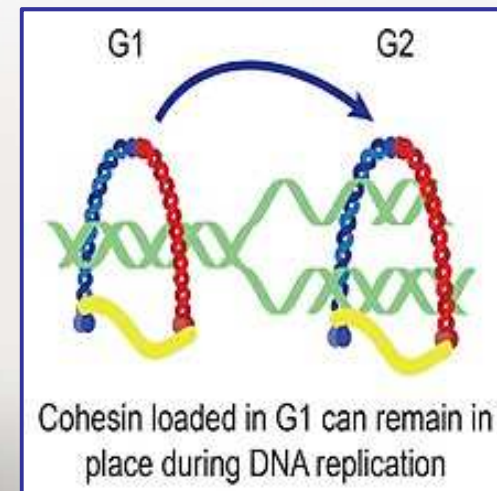
- prudké zvýšení aktivity komplexu **cyklinu B-CDC2** v kontrolním bodě G2/M, které vede k iniciaci procesů rané mitózy
- působení **ubikvitin ligázy APC/C**: inaktivace komplexů cyklinu B-CDC2 a likvidace dalších klíčových M-fázových molekul (např. sekurinu), které vedou k dokončení mitózy

Příprava chromozomů k segregaci

- na konci S-fáze se každý replikovaný chromozom skládá z páru identických chromatid slepených k sobě
- spojení sesterských chromatid zajišťuje kohezin
- to usnadňuje pozdější mitózu – poruchy v mezichromatidové kohezi vedou k vážným poruchám segregace chromozomů

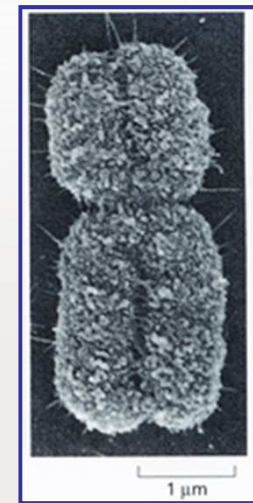
Kohezin

- komplex proteinů, který je v průběhu replikace umístěn v mnoha místech po celé délce každé chromatidy



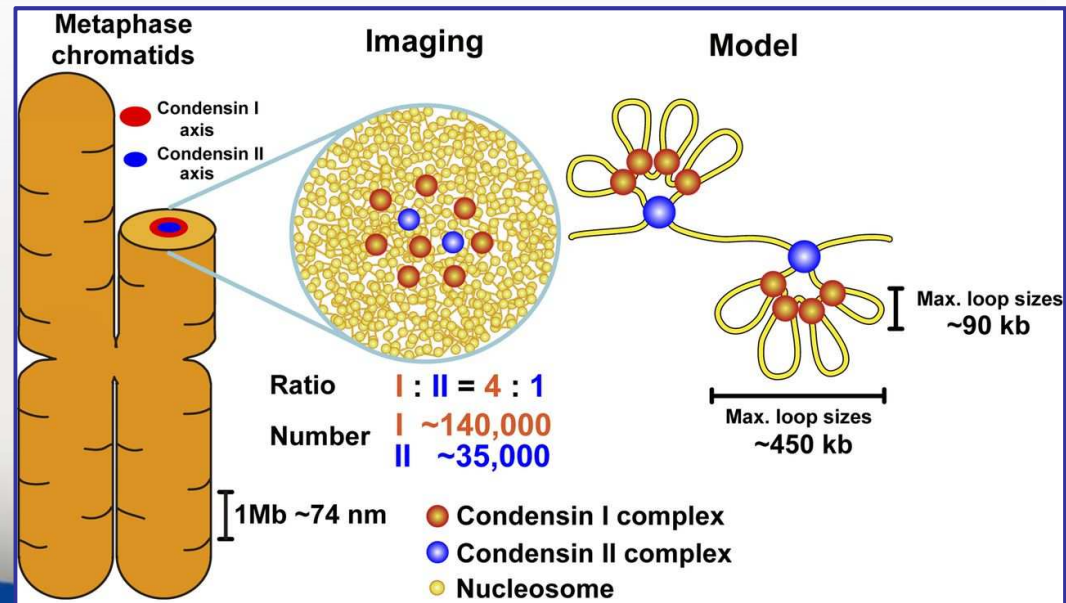
Kondenzace chromatid

- replikovaná DNA po skončení fáze S má podobu dlouhých vláken, jejichž oddělení by znamenalo riziko poškození
- buňka postupně reorganizuje chromatidy do kompaktnějších struktur, které mohou být snadněji odděleny
- na konci metafáze mají chromatidy podobu tyčinkovitých struktur, které jsou pevně spojeny v oblasti centromery



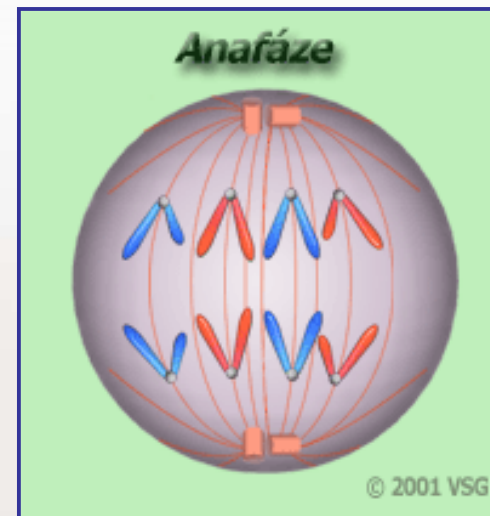
Kondenzace chromatid

- kondenzace i rozdělení chromatid se účastní **kondenzin**
- proteinový komplex složený z 5 podjednotek
- strukturní podoba s kohezinem
- kondenzin tvoří kruhové struktury, které využívají energie ATP pro skládání DNA do kompaktnější podoby
- fosforylace kondenzinu komplexem cyklin B-CDC2 stimuluje jeho schopnost navíjet DNA



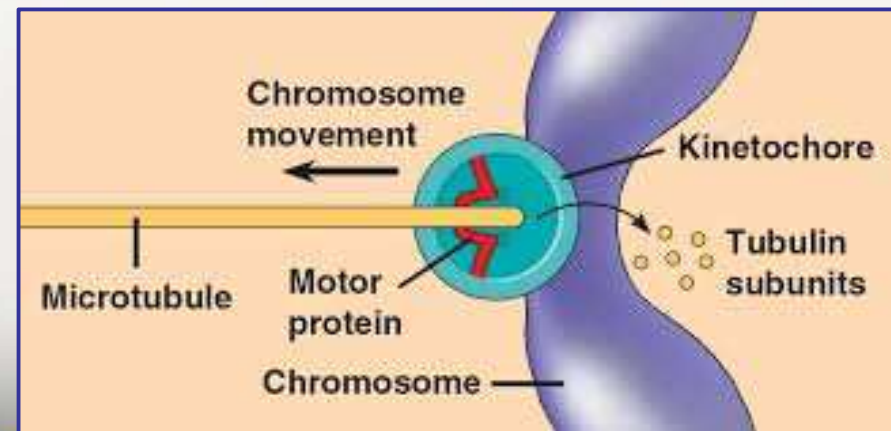
Mitotické vřeténko

- řada mikrotubulů zajišťujících rozdělení sesterských chromatid a segregaci sad chromozomů v anafázi
- sestavení vřeténka stimuluje komplex cyklinu B a CDC2



Připojení chromatid k vřeténku: kinetochory

- kinetochory: proteinové struktury v heterochromatinové oblasti centromery
- konce mikrotubulů se napojují na kinetochory ve speciálních dotykových místech
- spojení s kinetochory nebrání přidávání nebo odstraňování tubulinových jednotek, které vedou ke změně velikosti vřeténka



Kinázy „Polo-like“ a Aurora

Podíl na zajištění rané mitózy

Kináza Plk

- sestavení mitotického vřeténka

Kináza Aurora A

- řídí sestavení a stabilitu vřeténka

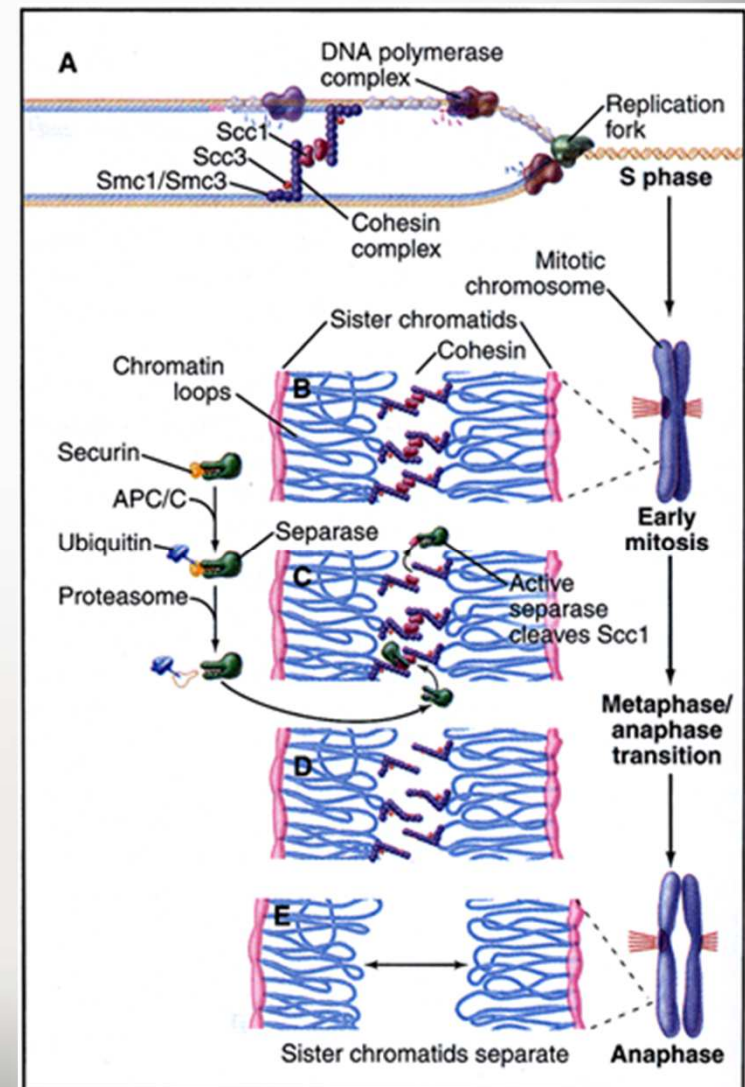
Kináza Aurora B

- řídí připojení sesterských chromatid k vřeténku



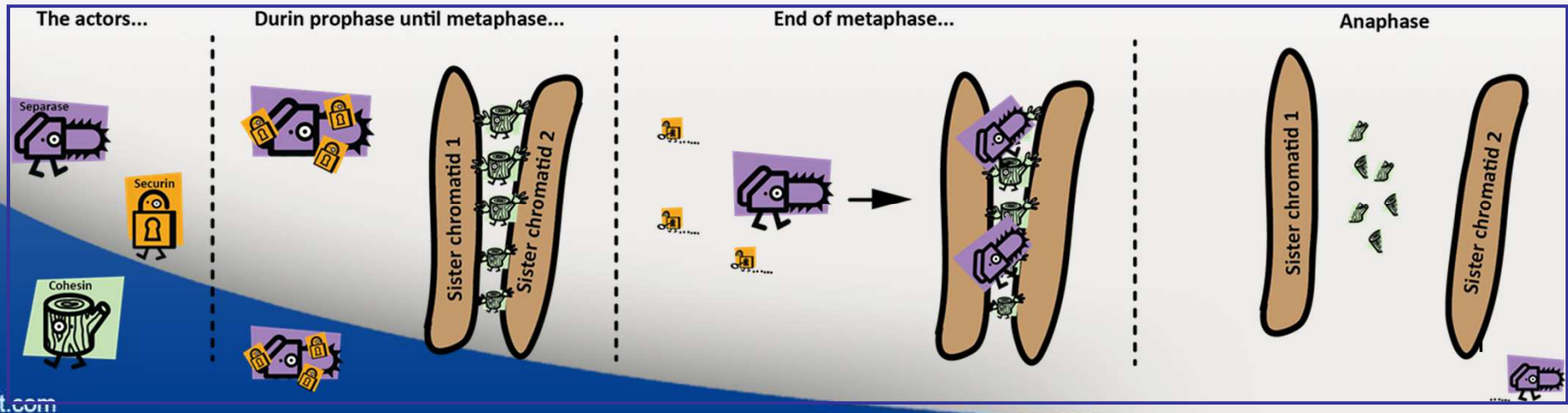
Anaphase-promoting complex (APC/C)

- ubikvitin ligáza řídící mitózu
- inhibitor anafáze (**sekurin**) inhibuje předčasnou degradaci proteinů, zajišťujících spojení sesterských chromatid (např. kohezinu) v rané mitóze
- ubikvitinace a rozklad sekurinu vede k aktivaci **separázy**, která štěpí kohezinu a rozpojuje tak chromatidy
- ubikvitinace sekurinu je inhibována až do okamžiku připojení kinetochorů všech chromozomů k mikrotubulům vřeténka



APC/C zajišťuje likvidaci sekurinu

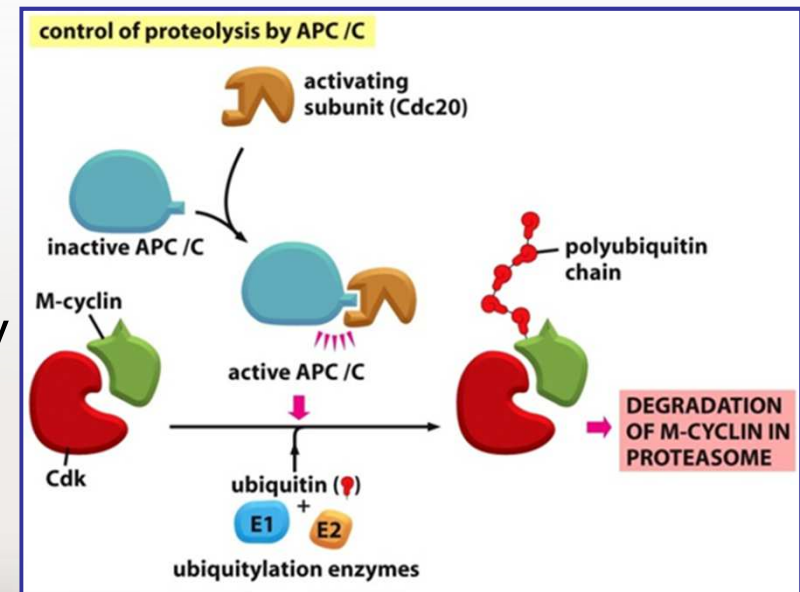
- metafáze: sesterské chromatidy spojené kohezinem připraveny k segregaci
- sekurin dosud inhibuje separázu: kohezin se neštěpí
- všechny kinetochory připojeny k vřeténku: ubikvitin ligáza APC/C s adaptérovým proteinem Cdc20 zajistí polyubikvitinaci sekurinu (tím předurčen k degradaci)
- konec metafáze: rozklad sekurinu, aktivace separázy, štěpení kohezinu
- následkem je oddělení chromatid a začátek anafáze



APC/C

zajišťuje i likvidaci cyklinu B

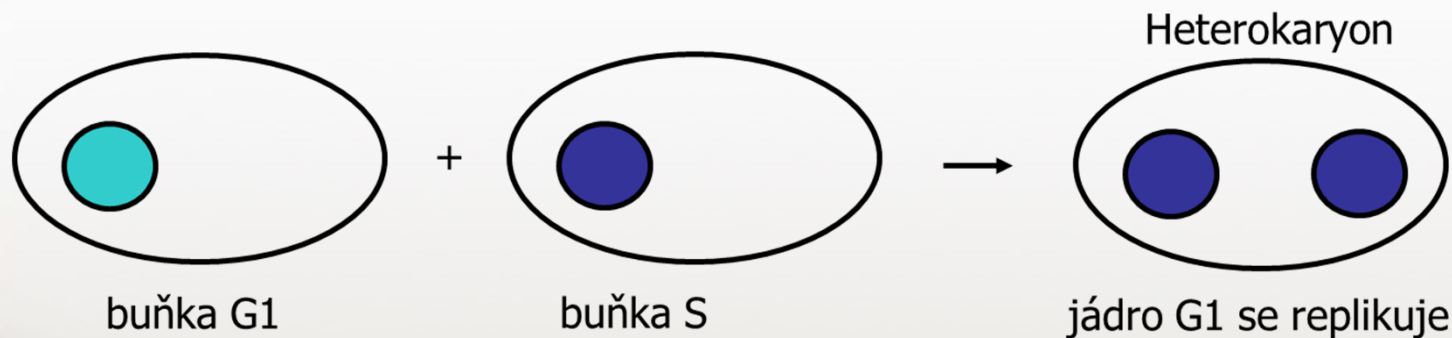
- jakmile jsou kinetochory připojeny k vláknům vřeténka, zruší se inhibice faktoru Cdc20, který funguje jako aktivátor APC/C
- APC/C se aktivuje připojením Cdc20 během anafáze
- Cdc20 se podílí na rozeznání substrátů APC/C
- APC/C katalyzuje připojení ubikvitinu na cílový protein, např. cyklin B
- cyklin B se rozkládá
- absence cyklinu B inaktivuje CDC2
- absence kinázové aktivity CDC2 umožňuje konstitutivně aktivním fosfatázám odstranit fosfáty z proteinů fosforylovaných CDC2: zakončení mitózy



Historie výzkumu buněčného cyklu

Johnson a Rao, 1970

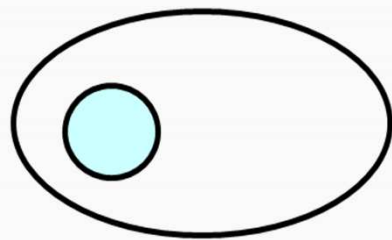
- spojení buněk v různých fázích cyklu fúzí: **G1 + S**
- sledován průběh replikace DNA inkorporací značeného tymidinu
- značka se objevila v DNA buňky fáze G1 i S: buňka ve fázi G1 po fúzi okamžitě zahájila replikaci



Závěr: v S-fázové buňce existuje faktor, který indukuje replikaci v buňce G1

Historie výzkumu buněčného cyklu

spojení buněk v různých fázích cyklu: **G1, G2, S + M**



buňka G1, G2 nebo S

+

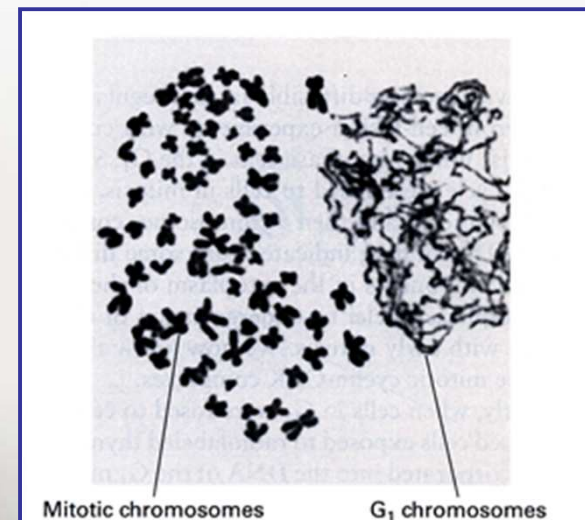


buňka M



retrakce jaderné membrány,
chromozomy kondenzují

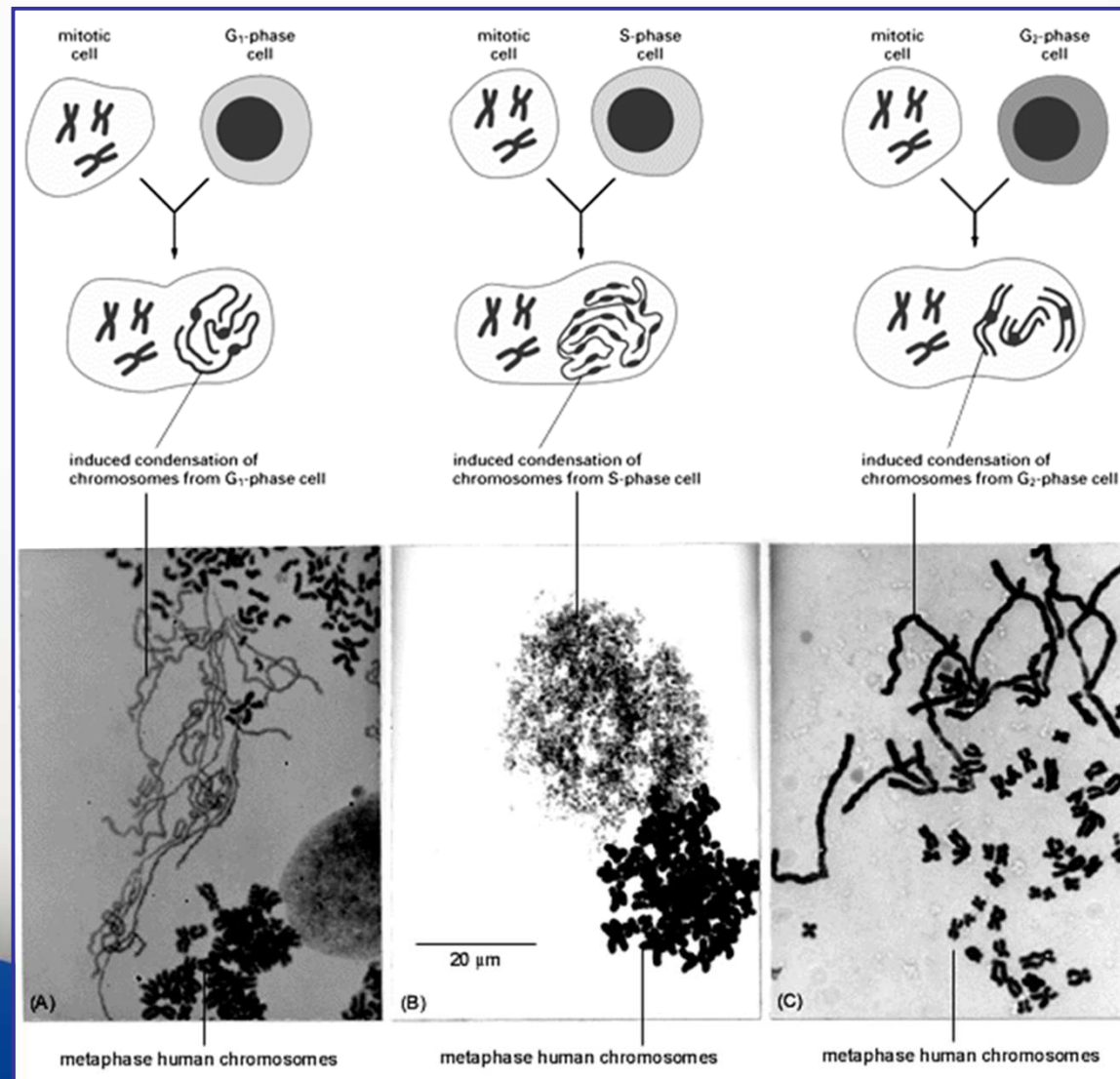
Závěr: v M-fázové buňce existuje faktor, který indukuje mitózu u všech interfázových buněk



Mitotic chromosomes

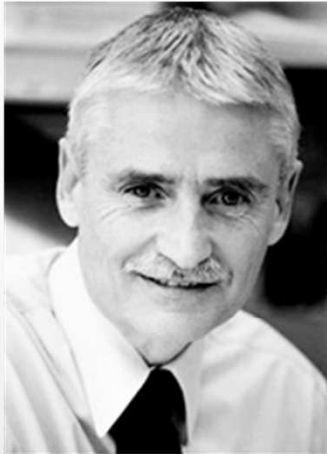
G₁ chromosomes

Historie výzkumu buněčného cyklu

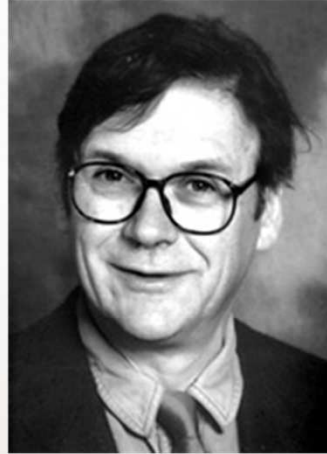


Historie výzkumu buněčného cyklu

Nobelova cena za fyziologii a medicínu 2001



Leland H. Hartwell



Tim Hunt

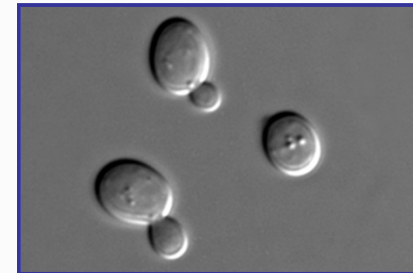


Paul Nurse

Výzkum cyklu u kvasinek

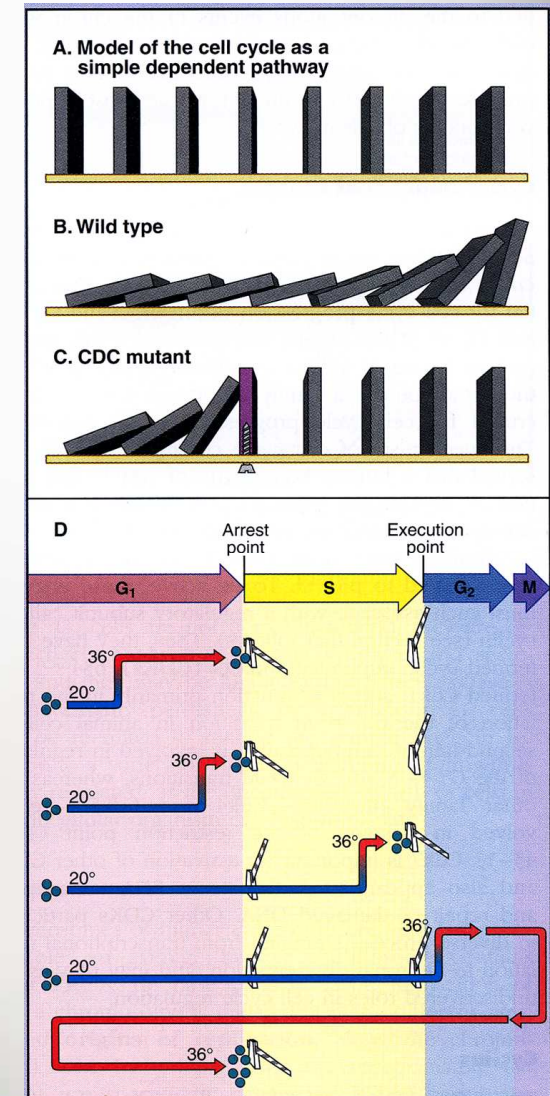
Výhody kvasinkového modelu

- znalost sekvence genomu
- haploidní status
- snadná kultivace, vysoká rychlost cyklu
- snadné vizuální vyhodnocení fáze buněčného cyklu mikroskopií:
 - u pučících kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) nepřítomnost pupene: fáze **G1**; přítomnost pupene menšího než u rodičovské buňky: fáze **S**, přítomnost pupene podobné velikosti jako u rodičovské buňky: fáze **G2**
 - u štěpících se kvasinek (*Schizosaccharomyces pombe*) lze na fázi cyklu usuzovat z délky buněk



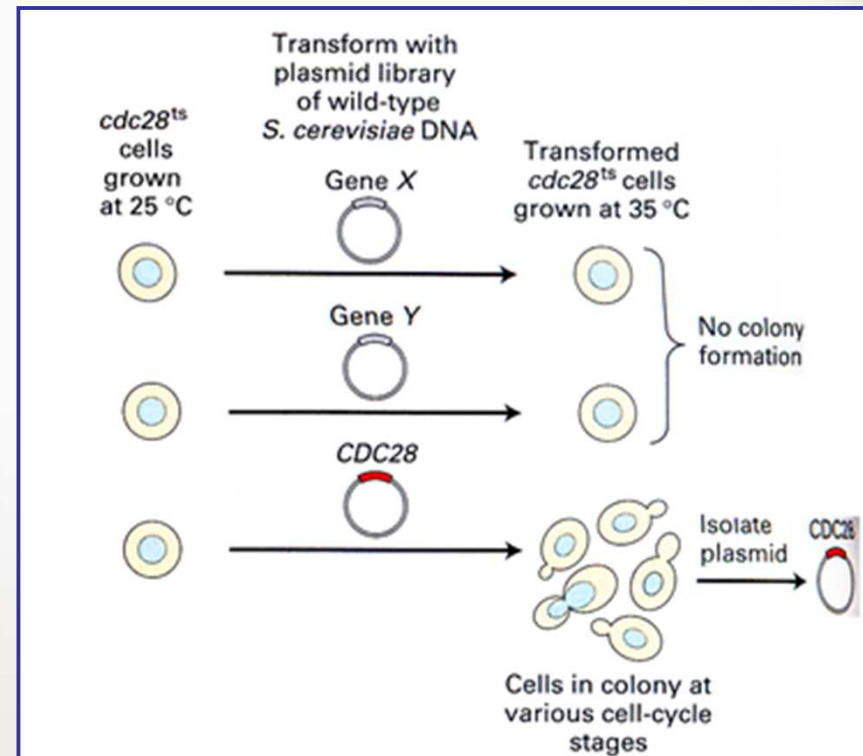
Výsledky výzkumu cyklu u kvasinek

- buněčný cyklus je sled navazujících fází
- 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



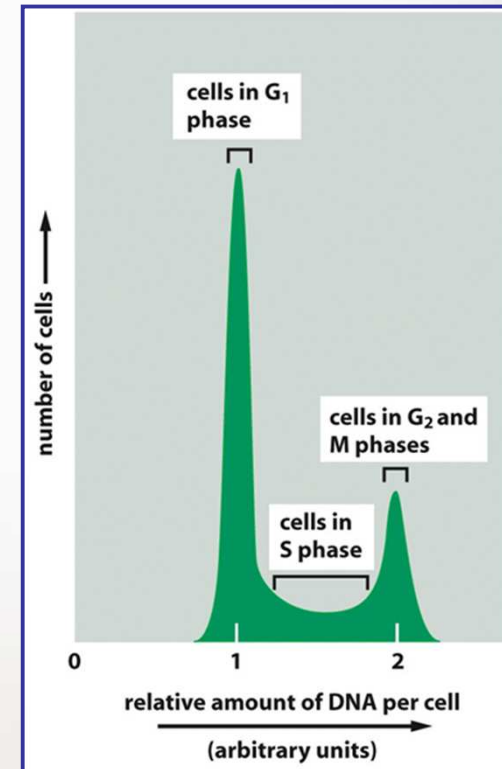
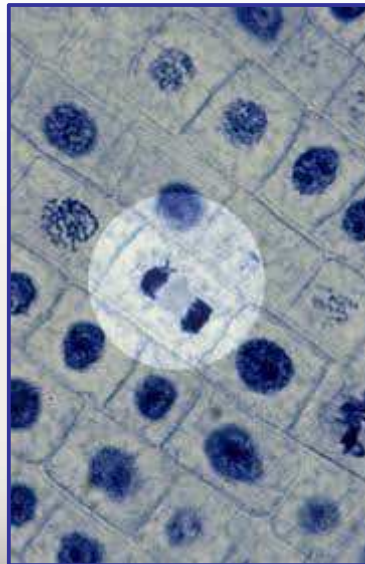
Identifikace regulátorů cyklu

- alely wt mohou být izolovány z recesivních ts mutantů *cdc* transformací haploidních mutantních buněk plazmidovou knihovnou obsahující kvasinkové geny divokého typu
- lidská cDNA komplementuje deficit funkce kvasinkového genu *cdc*



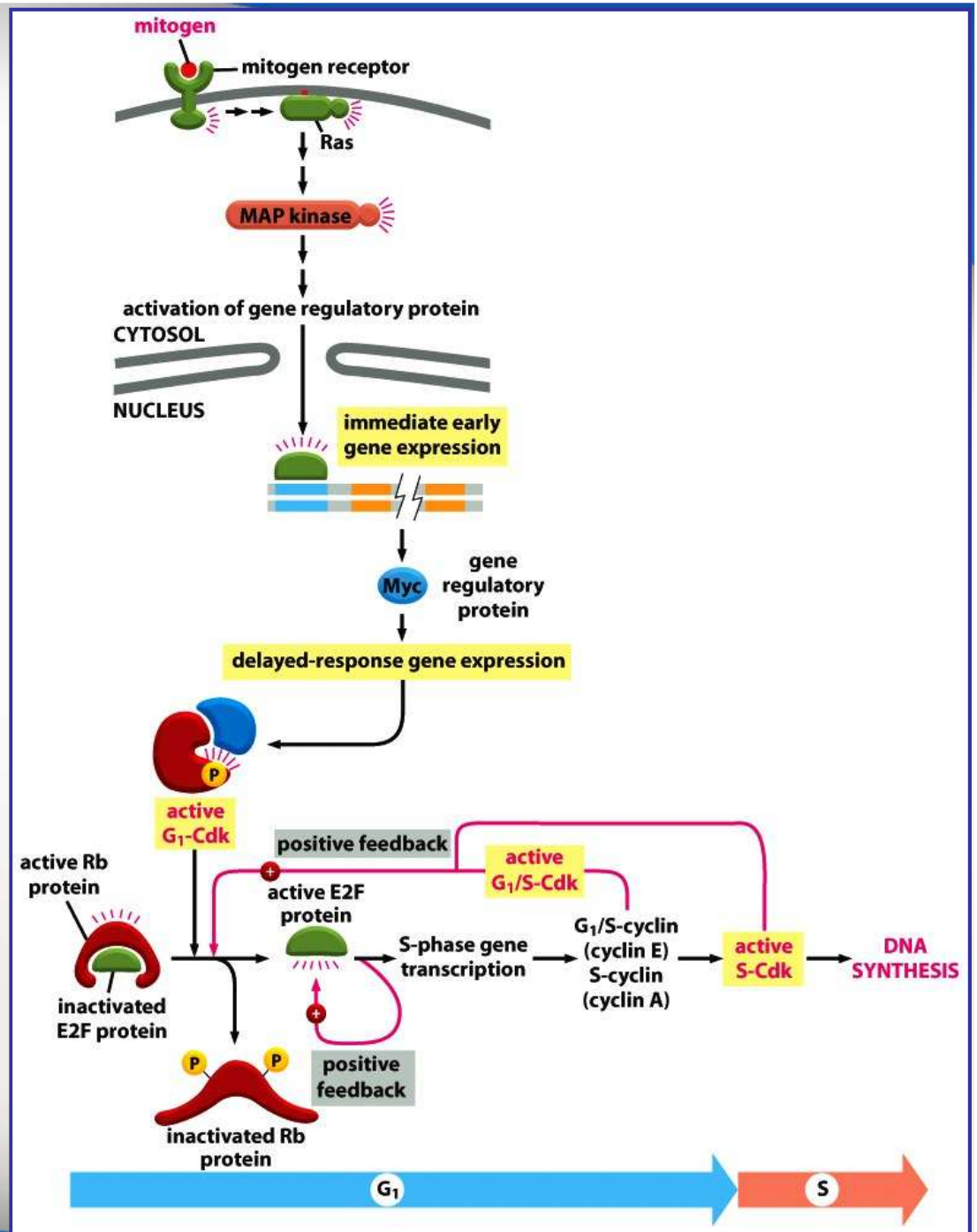
Studium cyklu

- průtoková cytometrie
- sledování inkorporace značených deoxyribonukleotidů
- mikroskopie (M-fáze)



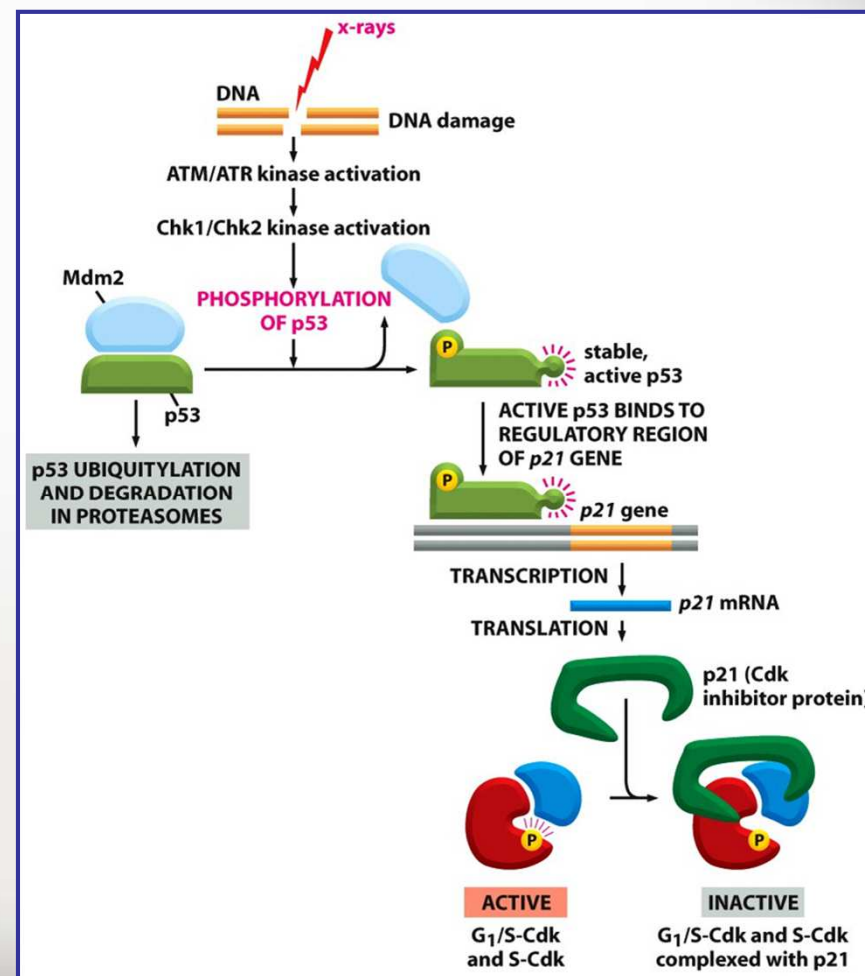
Mitogeny

- všechny signály související s regulací proliferace musí být napojeny na buněčný cyklus



Nádorový supresor p53

- p53 je nestabilní, v nepoškozených buňkách je v nízké koncentraci
- důsledek jeho interakce s ubikvitin ligázou Mdm2 (jejíž expresi zajišťuje)
- fosforylace p53 v poškozených buňkách omezuje jeho interakci s Mdm2, tím se stabilizuje
- stabilizovaný p53 aktivuje expresi p21 a zastavuje tak buněčný cyklus



Mutace p53 výrazně zvyšuje genomovou nestabilitu

