

Molekulární biologie pro informatiky - 9

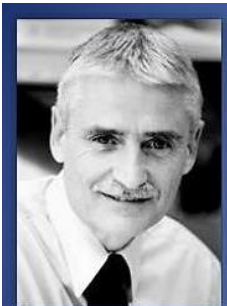
Regulace buněčného cyklu

Historie objevů buněčného cyklu



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

Rudolph Virchow, 1858



Leland H. Hartwell

V roce 2001 udělena Nobelova cena za fyziologii nebo lékařství za objevy v oblasti buněčného cyklu.

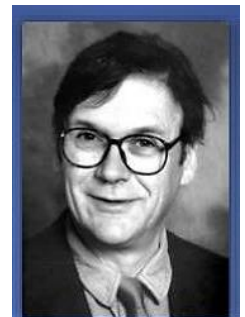
Leland Hartwell objevil specifické geny, které řídí buněčný cyklus
zavedl pojem kontrolní body buněčného cyklu



Sir Paul M. Nurse

Paul Nurse identifikoval cyklin-depenentní kinázy
prokázal jejich evoluční konzervativnost

Timothy Hunt objevil cykliny
prokázal jejich degradaci během buněčného cyklu



Tim Hunt

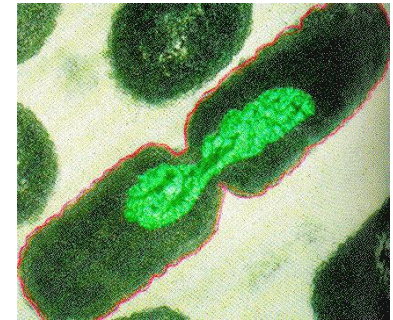
Dělení buněk

Všechny buňky pochází z již existující buňky.

Množení buněk probíhá prostřednictvím buněčného dělení.

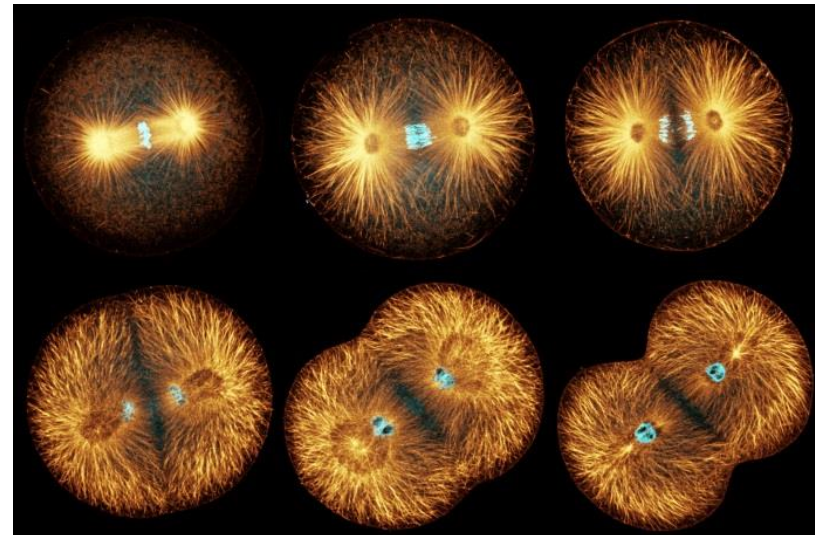
Prokaryota

- příčné dělení buněk
- tvorba nové buněčné stěny mezi kopiemi bakteriálního chromozomu



Eukaryota

- na začátku vývoje mnohobuněčného organismu je jediná buňka
- dělení buněk nezbytné pro
 - růst organismu
 - náhradu poškozených a starých buněk
 - šíření genetické informace: mitóza, meióza
- před vlastním rozdělením se buňka musí zvětšit, zduplikovat chromozomy a zajistit jejich přesné rozdělení do dceřiných buněk
- koordinace těchto procesů probíhá v rámci buněčného cyklu
- dělení buněk je přísně řízeno, aby se zachovala jednota mnohobuněčného organismu
- ztráta kontroly dělení vede k abnormálnímu vývoji a může být příčinou nádorů

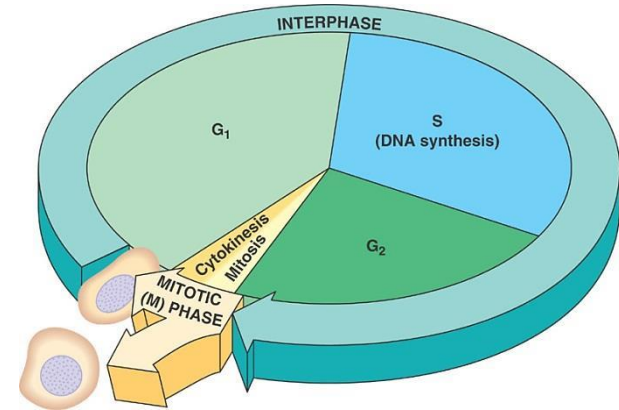


Buněčný cyklus

- cyklus životních procesů buňky, které začínají jejím zrozením a končí tvorbou dceřiných buněk
- přesná návaznost buněčných procesů, dvě odlišné fáze:

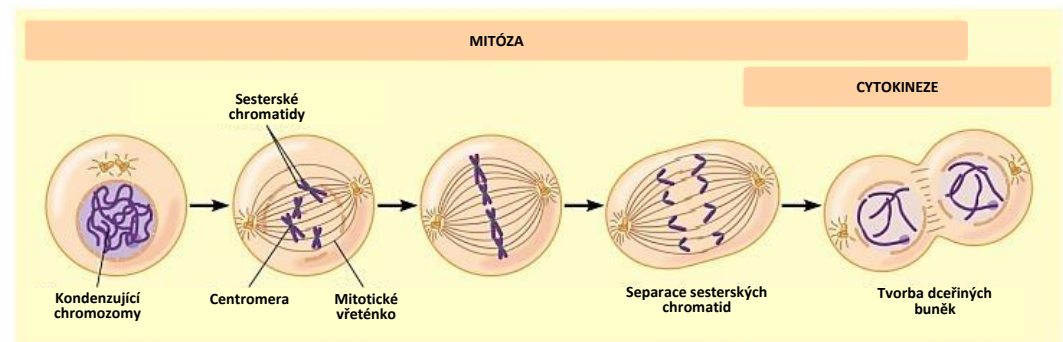
Interfáze

- růst buňky, duplikace organel, zvýšený metabolismus
 - G1** první růstová fáze, aktivní syntéza RNA a proteinů
buňka hromadí energii a připravuje se na syntézu DNA
(replikační proteiny, histony)
 - S** syntéza DNA, duplikace chromozomů
 - G2** druhá růstová fáze, pokračuje syntéza RNA a proteinů
růst buňky a příprava na M fázi (mitotické vřeténko)



M fáze

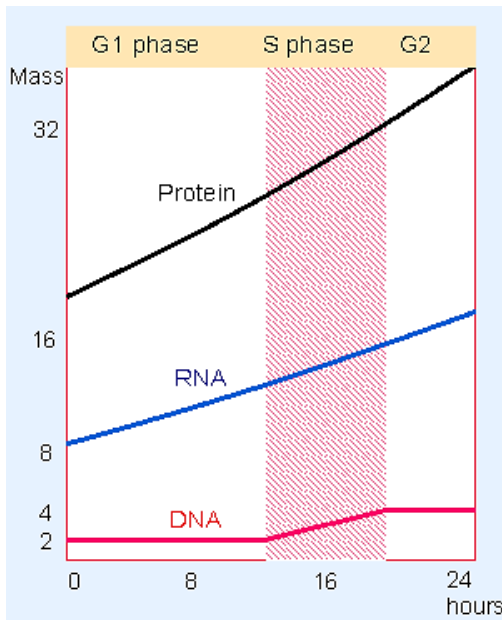
- mitóza (rozdělení jádra) a cytokineze (rozdělení buňky)
- kondenzace chromatinu
- rozpad jaderné membrány
- tvorba vřeténka a kinetochorů
- separace chromatid
- rozpad vřeténka
- dekonenzace chromatinu
- tvorba membrány, rozdělení buňky



Buněčný cyklus

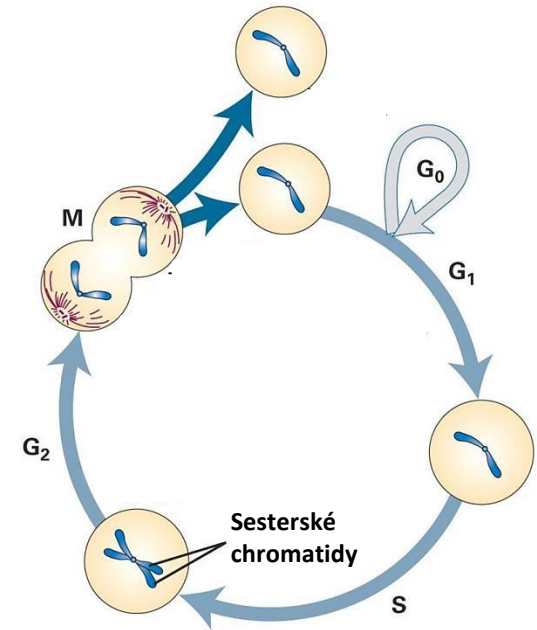
Syntéza DNA během buněčného cyklu

- veškerá struktura a funkce buňky jsou kódovány DNA
- při dělení musí každá buňka získat kompletní genetickou informaci
- DNA se replikuje před vlastním rozdělením buňky
- dochází k duplikaci chromozomů
- buňka v G₂ fázi má 2x vyšší obsah DNA než v G₁ fázi
- vzniklé kopie chromozomů jsou spojeny v oblasti centromery, tvoří sesterské chromatidy, které se při dělení jádra oddělují



Syntéza proteinů a RNA během buněčného cyklu

- stále stejně rychlá během interfáze
- v M fázi klesá syntéza proteinů a zastavuje se syntéza RNA
- všechny proteiny se tvoří během interfáze průběžně
- výjimkou jsou histony, které se tvoří pouze v G₁ a S fázi
- po dokončení replikace jsou histonové mRNA degradovány



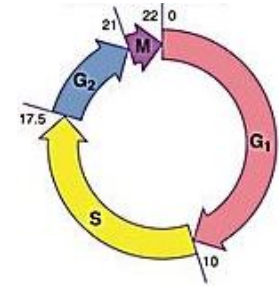
Buněčný cyklus

Časové nároky buněčného cyklu

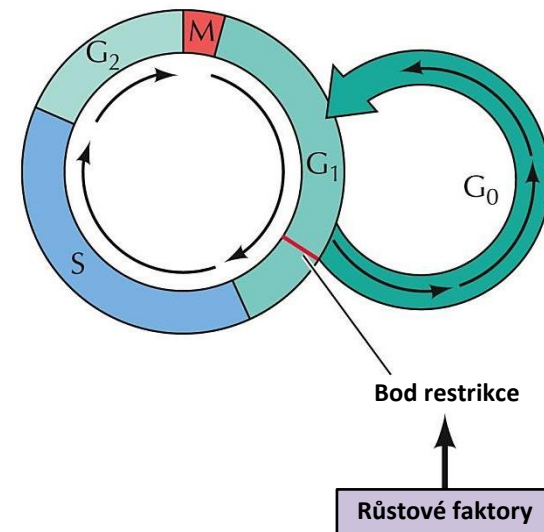
- rychlost buněčného cyklu je určena vnitřními a vnějšími stimuly
- buňky s výraznou specializací bez schopnosti se dělit (neurony, svalové buňky, červené krvinky)
- buňky, které se dělí jen za určitých podmínek (jaterní buňky, lymfocyty)
- rychle se dělící buňky (epiteliální, krevní kmenové buňky)
- většinu doby zabírá interfáze, podle typu buňky může trvat hodiny, dny, týdny, měsíce, roky
- kvasinky 1,5 - 3 hod, střevní epitel 12 hod, savčí fibroblasty v kultuře 20 hod, savčí játra cca 1 rok
- proliferující lidská buňka má cca 22 hodinový cyklus
- buňka, která se přestane dělit, vstupuje do klidové fáze G₀
- variabilita dána délkou G₁ fáze

Bod restrikce

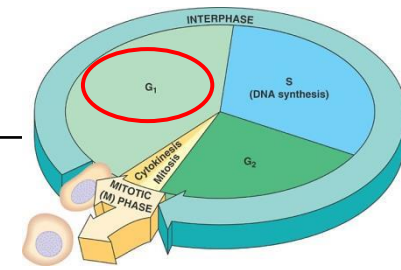
- v pozdní G₁ fázi
- na přechod z fáze G₁ do S je potřeba mimobuněčný signál (růstový faktor, mitogen)
- bez tohoto signálu buňka cyklus opustí a vstoupí do G₀



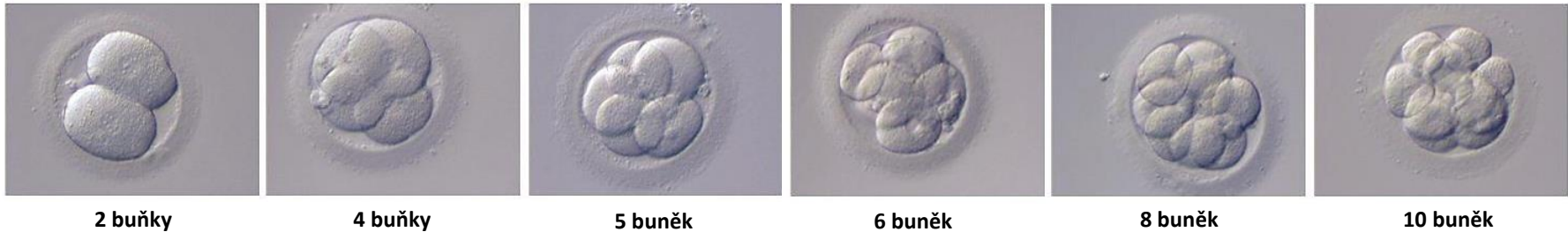
Cell cycle phase	Length (hours)
G ₁	10
S	7.5
G ₂	3.5
M	1.0
Generation time	22



G1 fáze

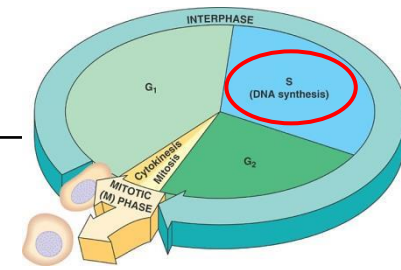


- první růstová fáze po rozdělení buňky, navazuje na cytokinezi
- buňka potřebuje dosáhnout původní velikosti buňky mateřské
- u raných embryí chybí fáze G1 a G2, buňka se dělí a zmenšuje

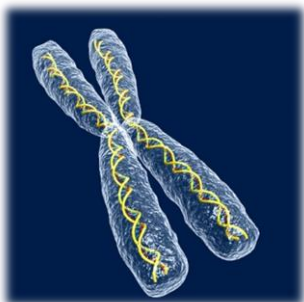
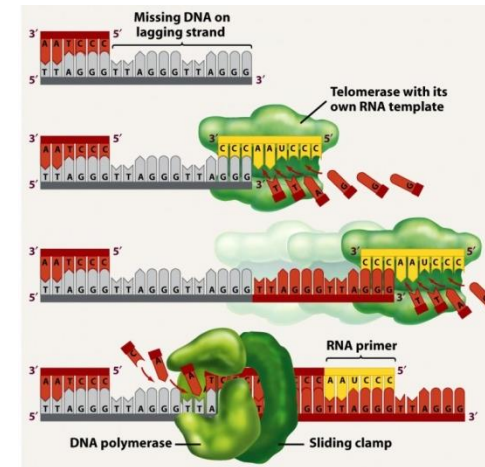
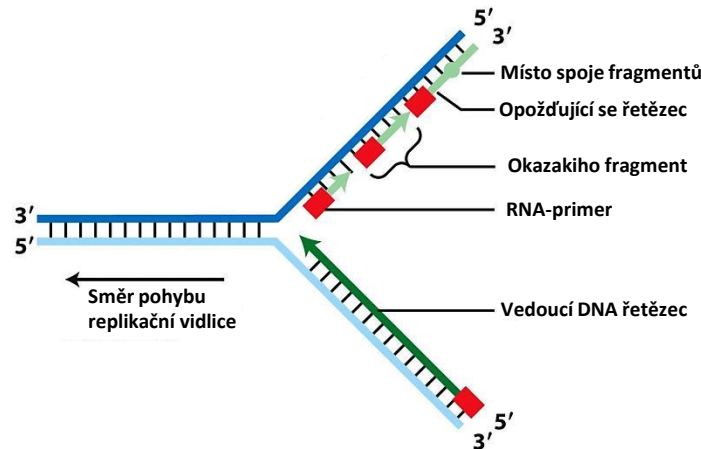
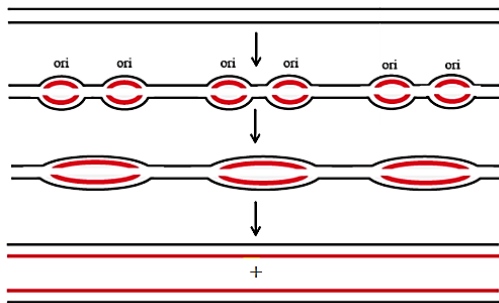


- tvorba cytoplazmy a nových organel, syntéza RNA a strukturních i regulačních proteinů
- příprava buňky na S fázi - syntéza replikačních proteinů a histonů
- běžná metabolická aktivita
- délka závisí na typu buňky, dostupnosti živin a růstových faktorů, přítomnosti inhibitorů proliferace
- v optimálních podmínkách 9 - 11 hod
- genetický materiál ve formě dekonenzovaného chromatinu, 2n molekul DNA (46 u lidí)
- bod restrikce citlivý na vnější faktory, 1. kontrolní bod buněčného cyklu
- na konci fáze se buňka rozhoduje, jak bude pokračovat
 - i) vstup do G₀ fáze: klidová fáze, buňka se nedělí
absence růstových faktorů, senescence, diferencované buňky
 - ii) vstup do S fáze: po překonání bodu restrikce, buňka navazuje dalším buněčným dělením

S fáze

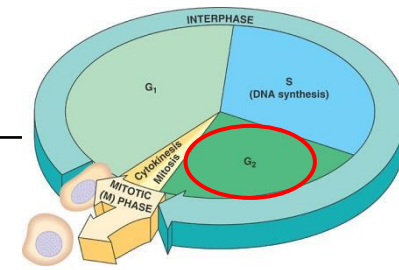


- semikonzervativní replikace DNA
- v rámci replikonů založeny v místech ori obousměrné replikační vidlice
- replikační proteiny - iniciační proteiny, helikázy, polymerázy, RNázy, ligázy, telomeráza
- syntéza DNA vyžaduje templátový DNA řetězec a RNA primer
- vedoucí řetězec tvořen kontinuálně, opoždující se řetězec přes Okazakiho fragmenty
- replikace konců lineárních chromozomů zajištěna telomerázou



- správnost replikace zajištěna přesností a proofreadingovou aktivitou DNA polymerázy, opravou chybného párování bází
- zdvojení genetického materiálu, chromozomy složené ze sesterských chromatid

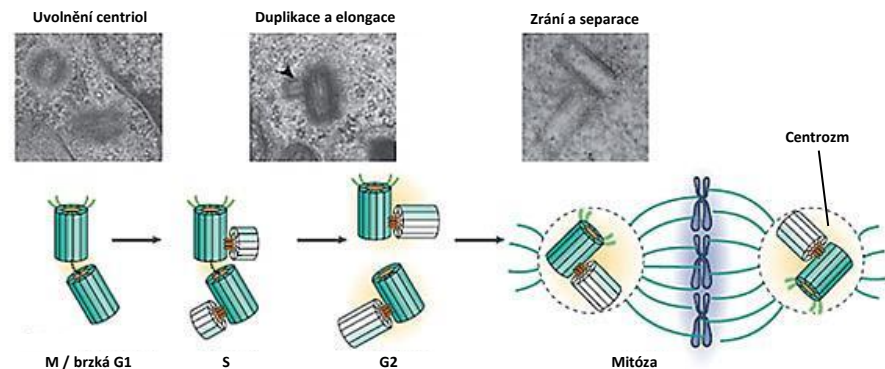
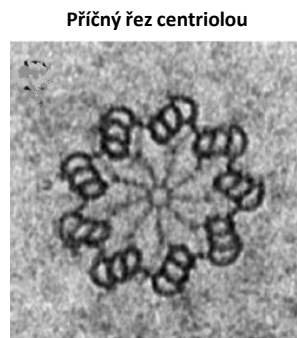
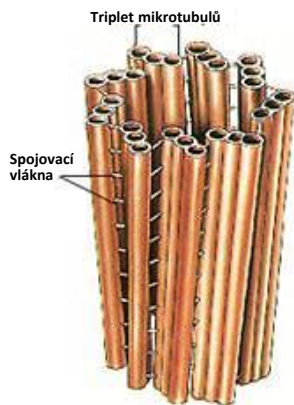
G2 fáze



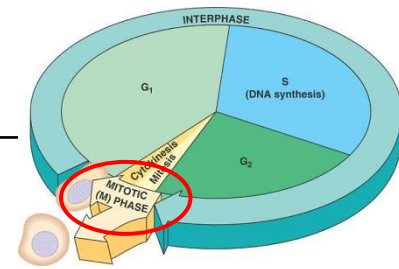
- druhá růstová fáze, premitotická fáze
- syntéza proteinů a tvorba organel, soustavná příprava na M fázi
- syntéza proteinů mitotického vřeténka, duplikace centriolů
- zreplikovaný genetický materiál, 2 x 2n molekul DNA, dvě sesterské chromatidy v chromozomu
- dekondenzovaný chromatin
- 2. kontrolní bod buněčného cyklu, kontrola celistvosti DNA a správnosti replikace

Centriola

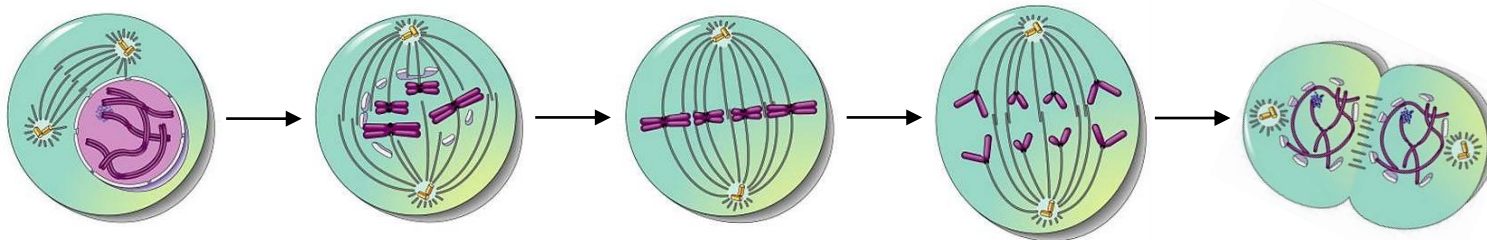
- párová organela eukaryotické buňky, není v buňkách rostlin a hub
- schopná samostatného dělení
- devět trojic mikrotubulů kolem centrální dutiny
- dvě spojené vzájemně kolmo orientované v M a G₁ fázi
- duplikace v S a G₂ fázi, ve vzniklém páru vždy jedna centriola původní a jedna nová
- spolu se svým okolím tvoří centrosom, který organizuje mitotické vřeténko



M fáze

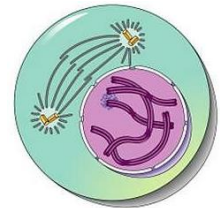
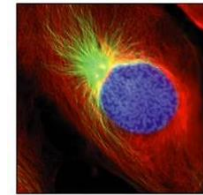


- zahrnuje dělení jádra (mitóza, karyokineze) a cytoplazmy (cytokineze)
- na základě změn v morfologii a chování chromozomů mitóza rozdělena do 5 fází



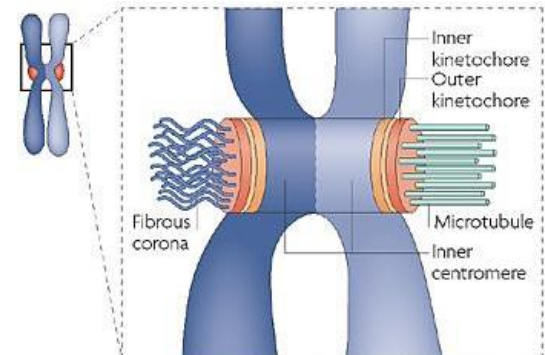
1) Profáze

- kondenzace chromozomů do podoby viditelné světelným mikroskopem
- sesterské chromatidy spojené v oblasti centromery
- posun centrozomů na opačné strany buňky
- v centrozomech zahájena tvorba mitotického vřeténka



2) Prometafáze (pozdní profáze)

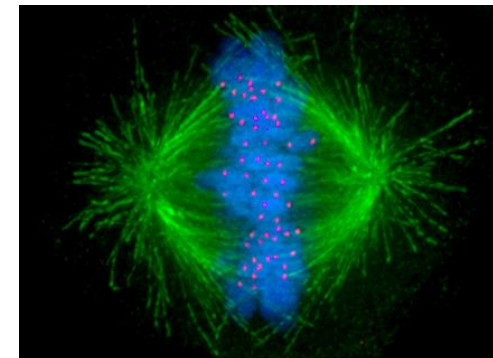
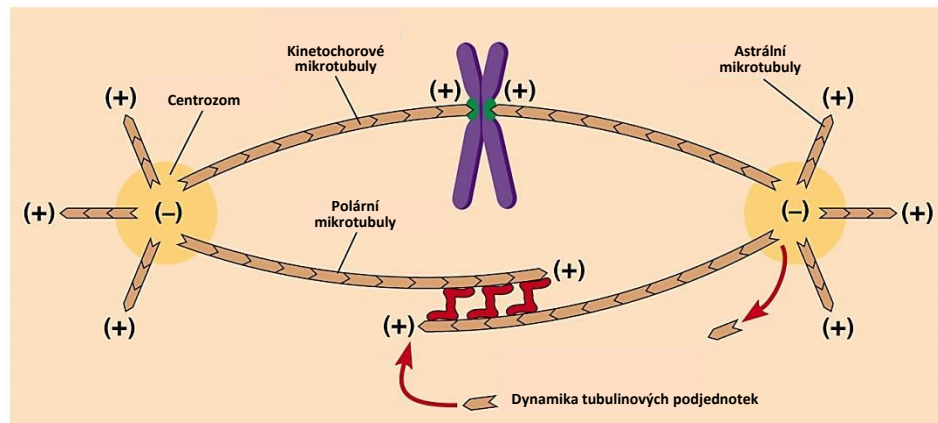
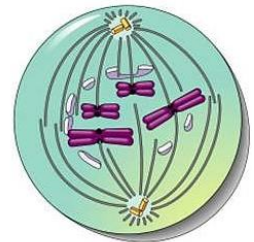
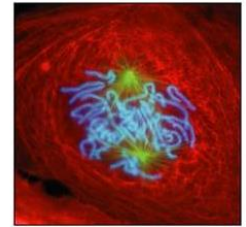
- tvorba kinetochorů na chromozomech
 - velký proteinový komplex v oblasti centromery
 - umožňuje vazbu chromozomů na mikrotubuly vřeténka
 - vnitřní vrstva rozpoznává a váže centromerovou DNA
 - prostřední vrstva spojuje vnější a vnitřní vrstvu
 - vnější vrstva se váže k (+) koncům mikrotubulů, obsahuje motorové proteiny, vychází z ní vláknitá korona



M fáze

2) Prometafáze (pozdí profáze)

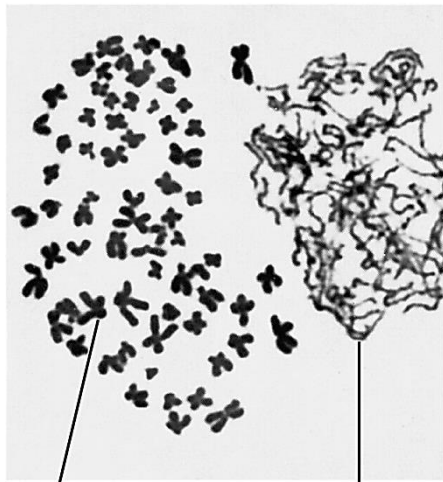
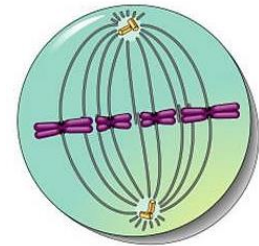
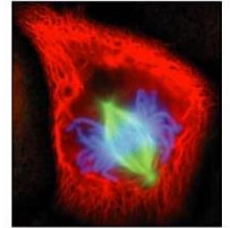
- rozpad jaderné membrány a jadérka
- ustálení pozice centrozomů na opačných stranách buňky
- pohyb chromozómů do středu buňky
- tvorba mitotického vřeténka
 - polarita tubulinu: (-) konec v centrozomu, (+) konec roste na opačném konci
 - dynamická struktura, zkracování a prodlužování (de)polymerací tubulinu
 - po rozpadu jaderné membrány (+) konce vřeténka kontaktují kinetochory
 - kinetochorové mikrotubuly: připojeny ke kinetochorům
 - polární mikrotubuly: připojeny k tubulům z opačného pólu vřeténka
 - astrální mikrotubuly: připojeny k proteinům plazmatické membrány



M fáze

3) Metafáze

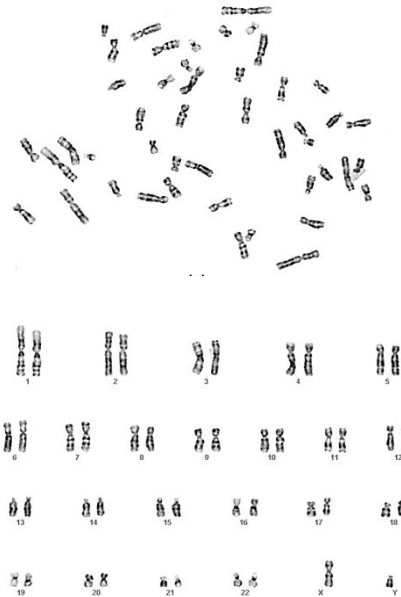
- dokončena kondenzace chromozomů
- chromozomy taženy / tlačeny kinetochorovými mikrotubuly
- seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině mezi póly vřeténka (metafázní destička)
- sesterské chromatidy každého chromozomu připojeny k opačným pólům vřeténka
- sestavení karyotypu z buněk zastavených v metafázi (kolchicin)



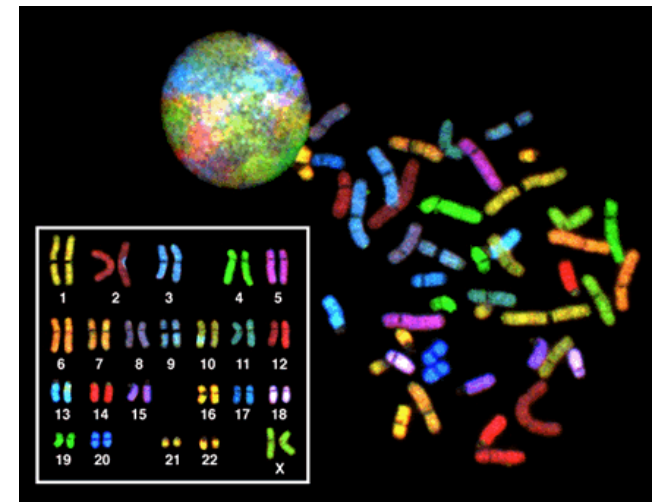
Metafázní chromozomy

G1 chromozomy

Klasický karyogram



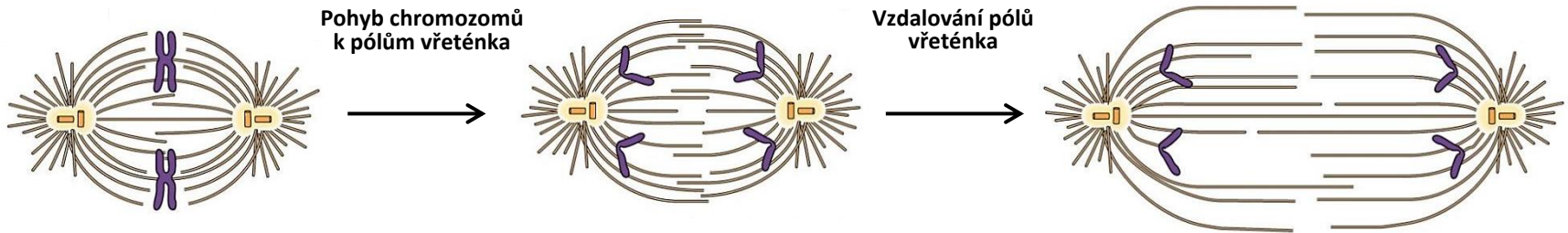
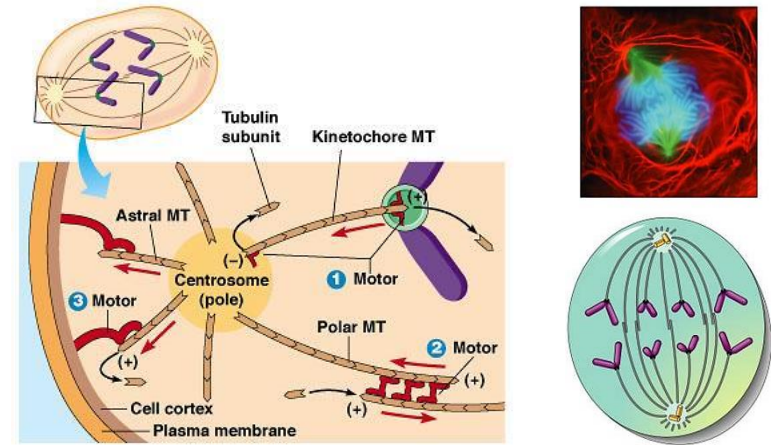
Spektrální karyogram



M fáze

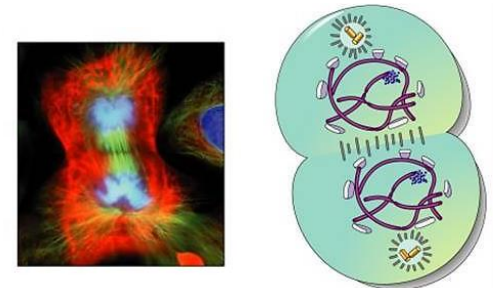
4) Anafáze

- rozdělení centromer, separace sesterských chromatid
- pohyb chromatid k pólům vřeténka
 - zkracování kinetochorových mikrotubulů
 - vzdalování pólů vřeténka
 - účast motorových proteinů
- u každého pólu vřeténka shromážděna stejná sada genetické informace, základ dceřiných buněk

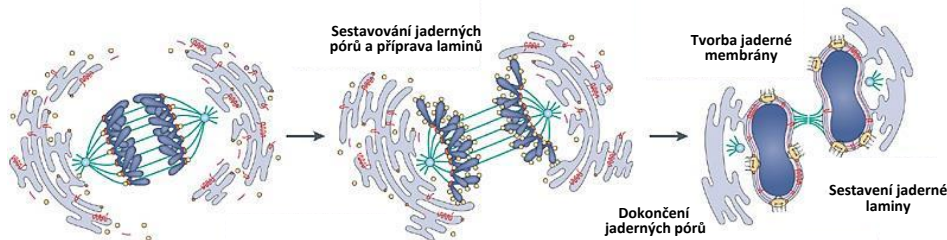
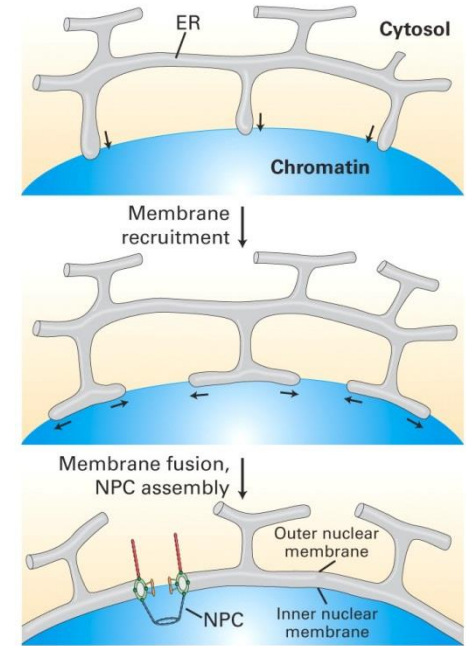
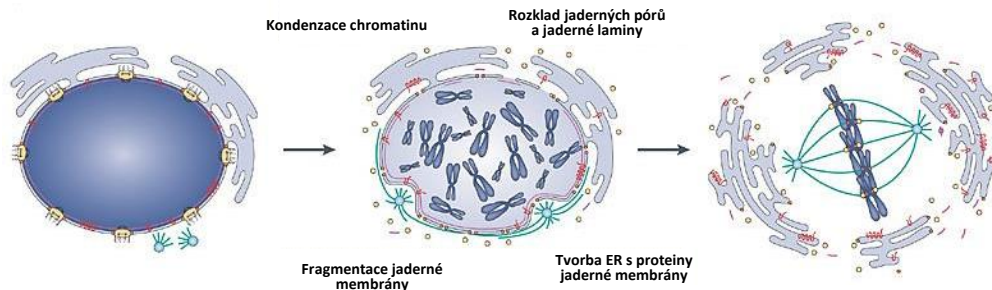
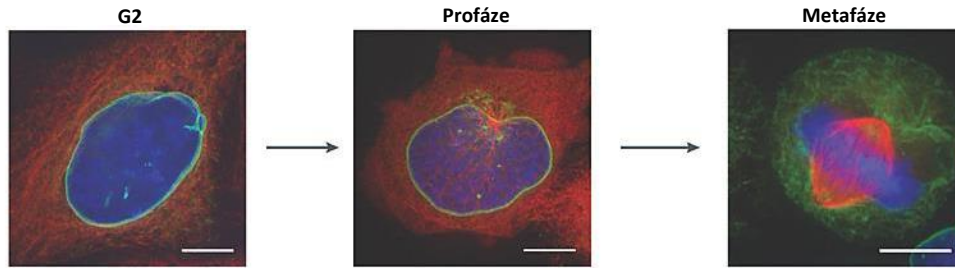


5) Telofáze

- pokračuje prodlužování polárních mikrotubulů, příprava na cytokinezi
- chromozomy, které dorazily k pólům vřeténka, začínají dekondenzovat
- rozpad kinetochorů, rozpad mitotického vřeténka, tvorba jadérka
- obnova jaderné membrány kolem sady sesterských chromatid



Jaderná membrána během M fáze



Cytokineze

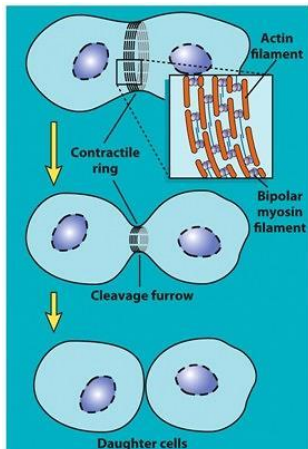
- rozdělení cytoplazmy po rozdělení chromozomů k opačným pólům vřeténka
- ukončuje buněčné dělení, vznik dvou identických dceřiných buněk, menších než buňka mateřská
- nemusí po mitóze vždy následovat, replikace a dělení jádra bez cytokineze (endocykly)
např. brzká vývojová stádia *D. melanogaster*

Živočišná buňka

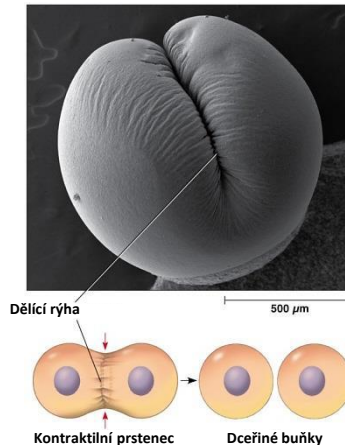
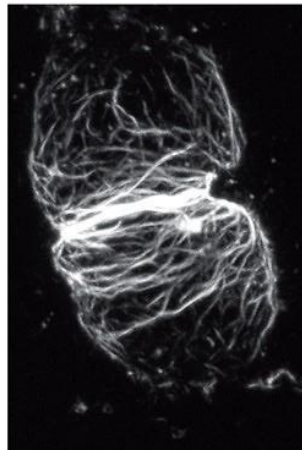
- kontraktilní prstenec z aktinových filament
- stahování prstence v přítomnosti myozinu a ATP tvoří dělicí rýhu

Rostlinná buňka

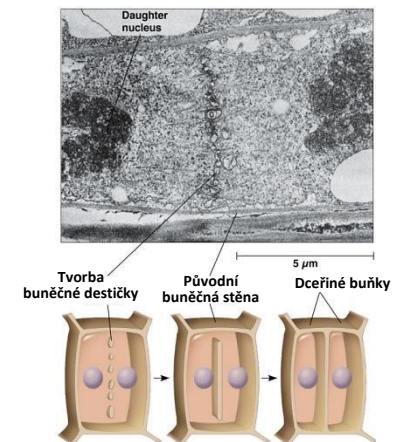
- buněčná destička mezi dceřinými buňkami
- tvorba destičky z materiálu dopraveného z GA (polysacharidy, glykoproteiny)



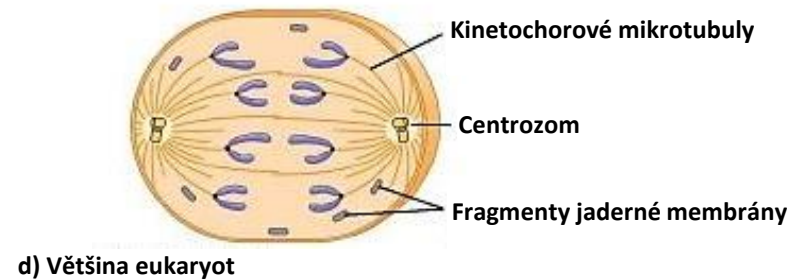
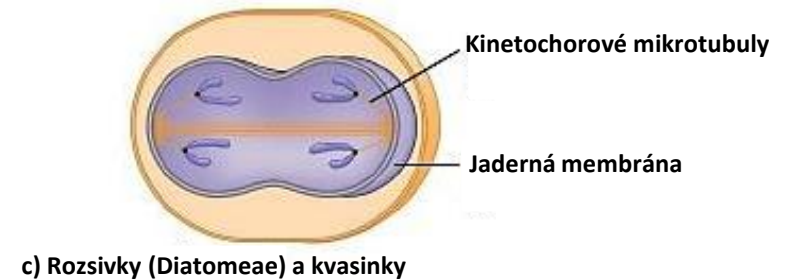
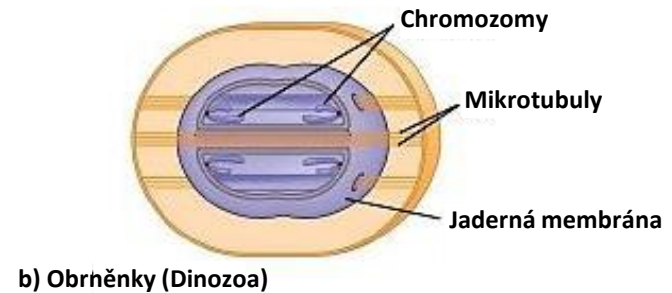
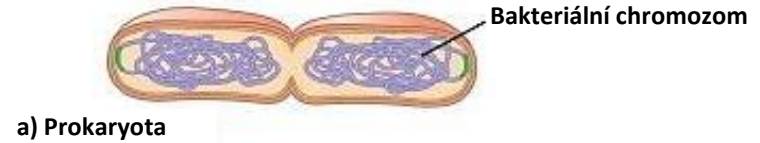
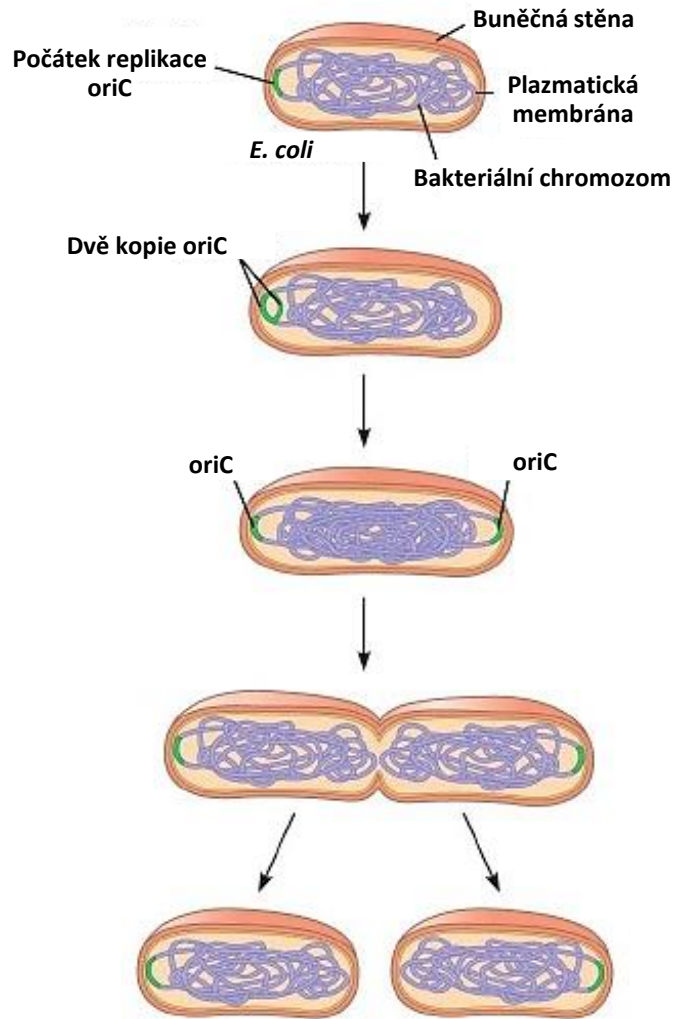
Živočišná buňka



Rostlinná buňka



Evoluce mitózy



Meióza

Nepohlavní rozmnožování

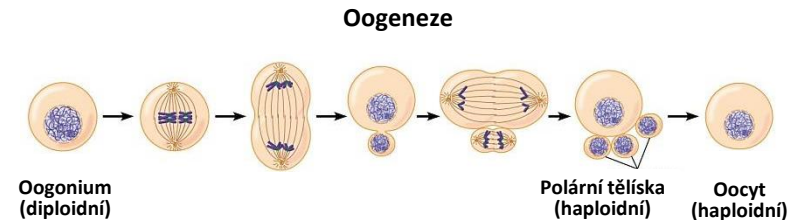
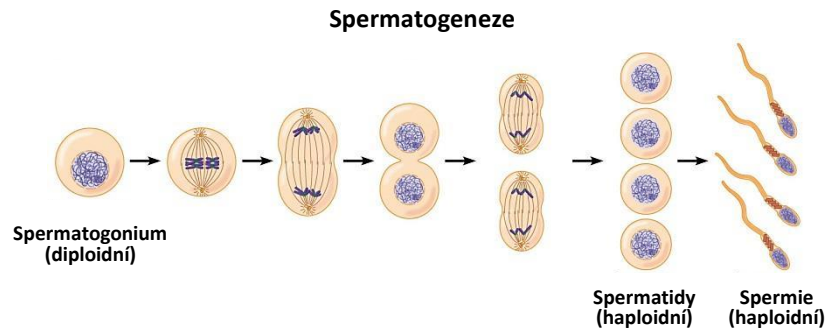
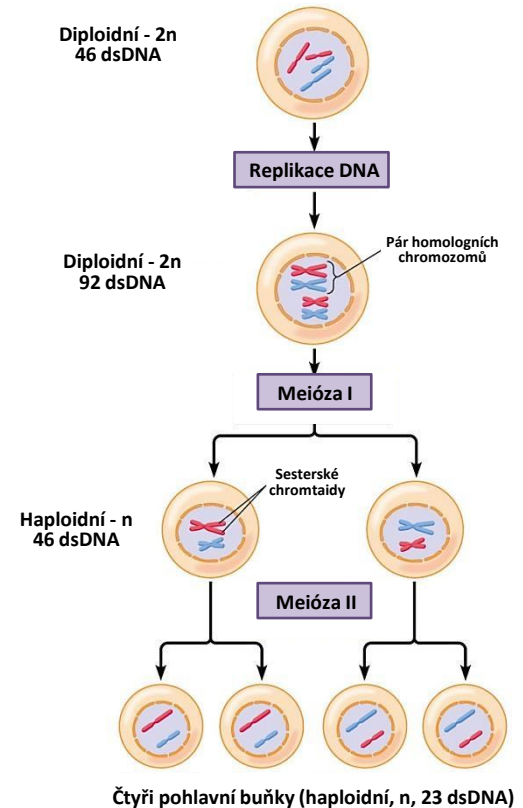
- jedna buňka se dělí a vznikají dvě nové, identické dceřiné buňky
- např. mitóza, binární dělení

Pohlavní rozmnožování

- spojení dvou buněk za vzniku nové buňky (zygota), která je odlišná od těch původních

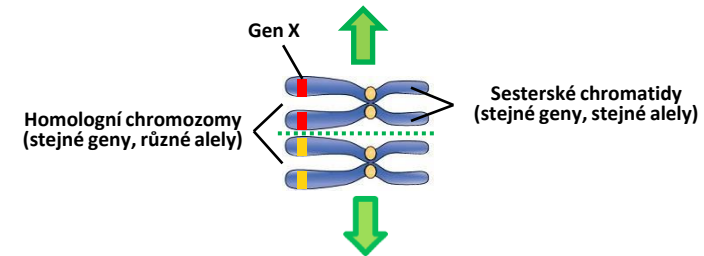
Meióza

- redukční dělení
- probíhá v zárodečných buňkách, vznikají gamety (vajíčka, spermie)
- interfáze s replikací chromozómů, dvě meiotická dělení
- původní buňka je diploidní ($2n$), vznik čtyř dceřiných buněk, které jsou haploidní (n)
- redukuje počet chromozómů na polovinu, oplodněním se obnovuje diploidní stav



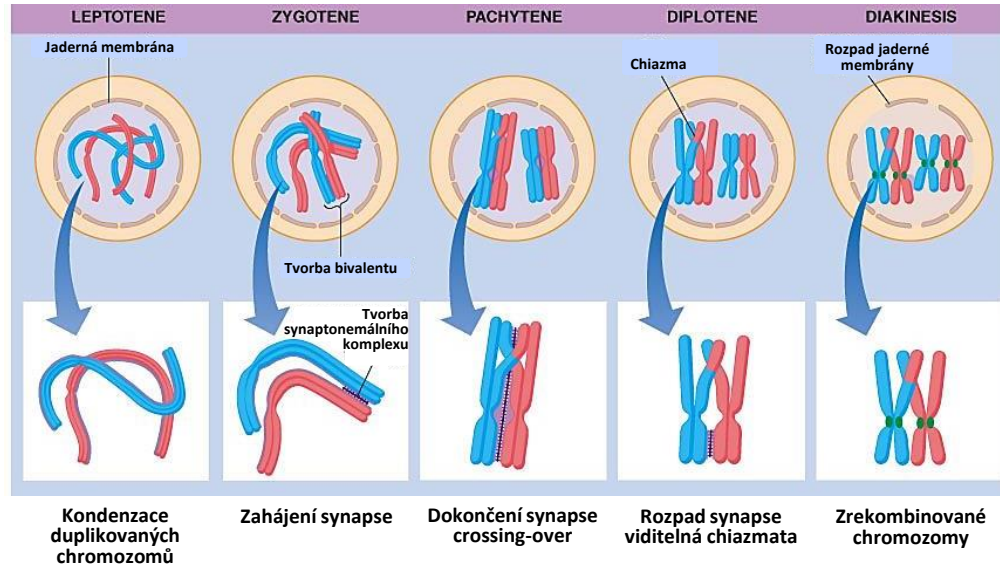
Meióza I - redukční dělení

- separace homologních chromozomů s různými alelami genu
- neobvyklý typ buněčného dělení, při kterém se tvoří haploidní buňky s chromozomy ze dvou sesterských chromatid



Profáze I

- párování homologních chromozomů, tvorba bivalentů (2 chromozomy), tetrad (4 chromatidy)
- mezi homologními chromozomy spojenými synapsí probíhá crossing-over (homologní rekombinace)
 - vzájemné překřížení homologních chromozomů v tetradách
 - výměna částí chromozomů, zajišťuje genetickou rekombinaci u potomků
- kondenzace chromozomů, tvorba dělicího vřeténka, rozpad jaderné membrány
- skládá se z pěti fází



Meióza I - redukční dělení

Metafáze I

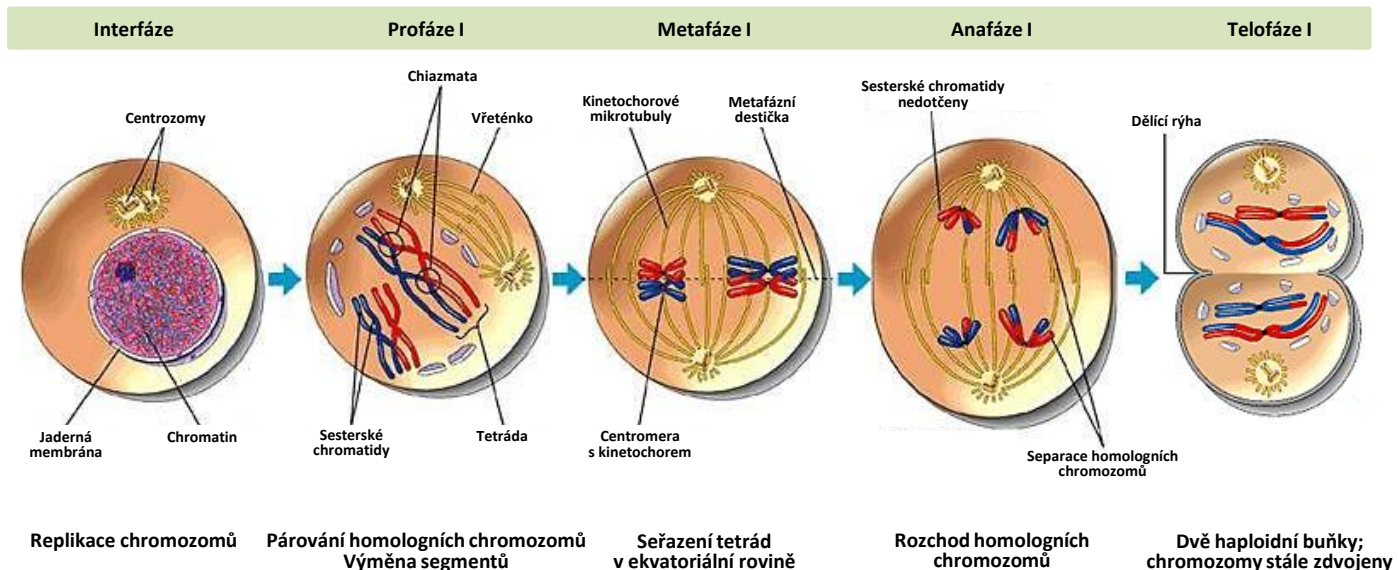
- seřazení párů homologních chromozomů v ekvatoriální rovině

Anafáze I

- separace homologních chromozomů a jejich pohyb k pólům dělicího vřeténka
- sesterské chromatidy zůstávají spojeny v oblasti centromer

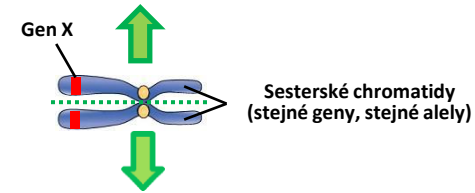
Telofáze I

- rozpad dělicího vřeténka, obnova jaderné membrány
- cytokineze dělí buňku na dvě



Meióza II - separační dělení

- po meióze I v buňce přítomen jen jeden homolog z každého chromozomu
- při meióze II dochází k separaci sesterských chromatid, které obsahují stejnou genetickou informaci, do vznikajících gamet



Profáze II

rozpad jaderné membrány, tvorba dělicího vřeténka

Metafáze II

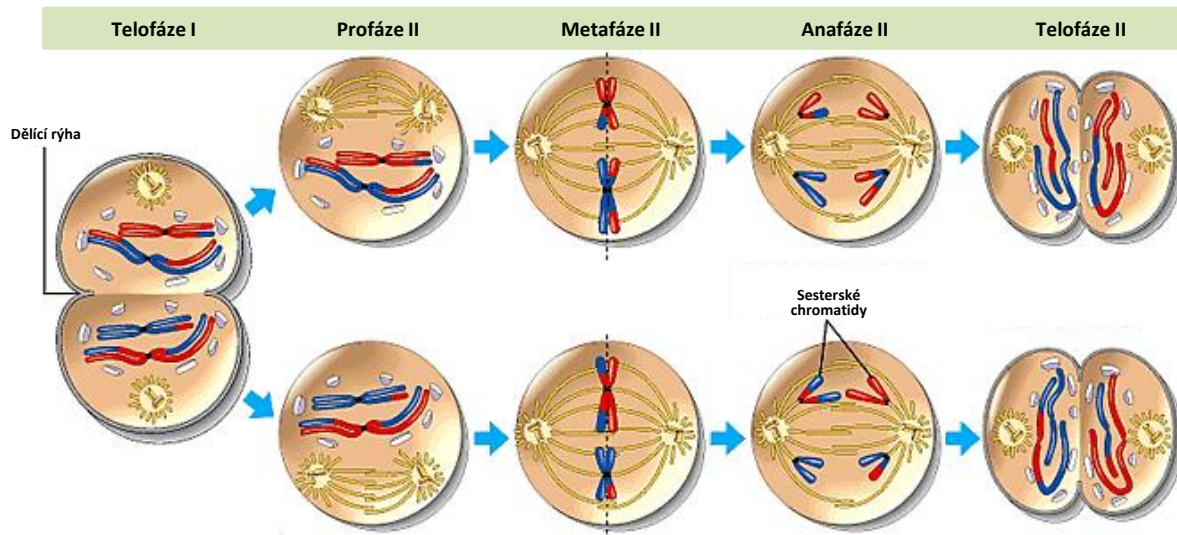
seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině

Anafáze II

separace sesterských chromatid a jejich pohyb k opačným pólům vřeténka

Telofáze II

rozpad dělicího vřeténka, obnova jaderné membrány, cytokineze



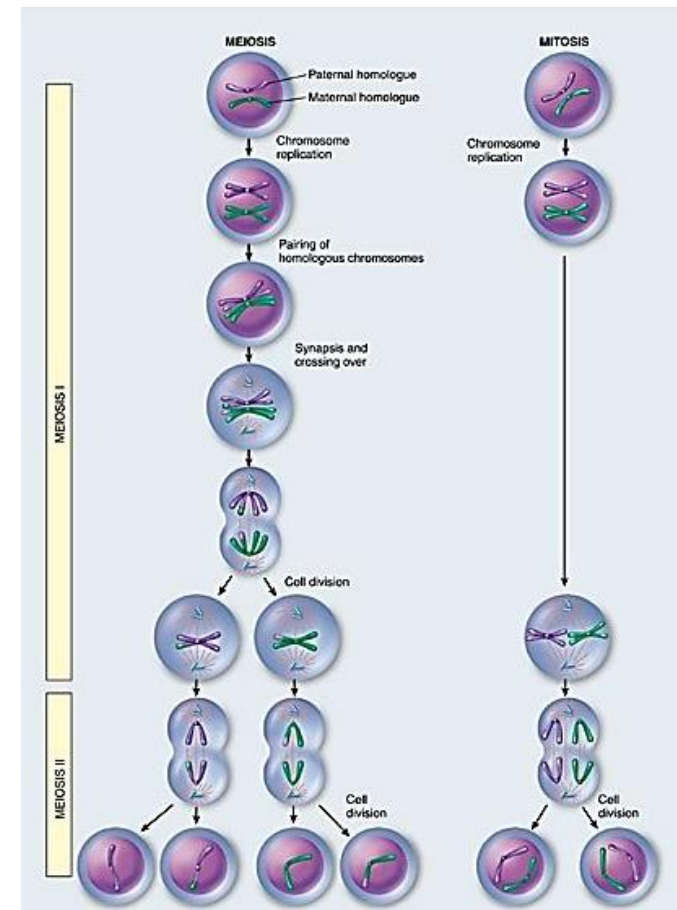
Dvě haploidní buňky;
chromozomy stále zdvojeny

Během meiózy II dochází ke konečné separaci sesterských chromatid.
Vznikají čtyři haploidní dceřiné buňky, které obsahují jednu kopii každého chromozomu.

Meióza

- výsledkem meiózy jsou čtyři haploidní buňky s jednou kopií každého chromozomu
 - crossing-overem vznikají různé kombinace alel různých genů v rámci chromozomu
 - meióza je základem pro pohlavní rozmnožování, závisí na přítomnosti homologních chromozomů
 - potomstvo vzniklé pohlavním rozmnožováním je geneticky odlišné od svých rodičů i sourozenců
- pohlavní rozmnožování je zdrojem genetické rozmanitosti, která pochází z:
- nezávislý výběr chromozomů: nezávislá orientace chromozomových párových během meiózy I
 - náhodné oplodnění: náhodné oplození vajíčka spermii za vzniku zygoty
 - crossing-over: nové kombinace alel v rámci chromozomu

	Mitóza	Meióza
Replikace DNA	Během interfáze, před mitózou	Během interfáze, před meiózou, pouze jednou
Počet dělení	1	2
Synapse homologních chromozomů	Neprobíhá	Probíhá spolu s crossing-overem mezi nesesterskými chromatidami během profáze I.
Počet dceřiných buněk a jejich genetický obsah	Dvě diploidní (2n) dceřiné buňky, geneticky identické s rodiči.	Čtyři haploidní (n) dceřiné buňky, obsahují polovinu počtu chromozomů rodičovské buňky, geneticky odlišné od rodičů i mezi sebou.
Úloha v lidském těle	Produkce buněk pro růst a opravu organismu.	Produkce gamet které zajišťují genetickou rozmanitost při sexuálním rozmnožování.

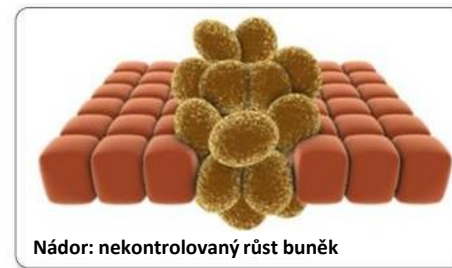
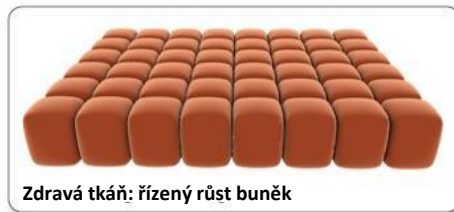


Řízení buněčného cyklu

- rozhodnutím se, zda se budou dělit, reagují buňky na svoji velikost a extracelulární signály (přítomnost živin, růstových faktorů, stresových faktorů, poškození DNA)
- kvasinky se rozhodují hlavně podle velikosti buňky a dostupnosti živin
- u savců převládá vliv růstových faktorů a mitogenů

Principy řízení buněčného cyklu

- mitóza neproběhne před koncem replikace DNA, replikace DNA neproběhne bez rozdělení buňky
- poškozená DNA se nesmí replikovat a předat do dceřiných buněk
- chybně spárované chromozomy nesmí dokončit mitózu
- deregulace buněčného cyklu může vést ke vzniku nádorových onemocnění



i) **posttranslační modifikace proteinů**, které se účastní jednotlivých fází buněčného cyklu

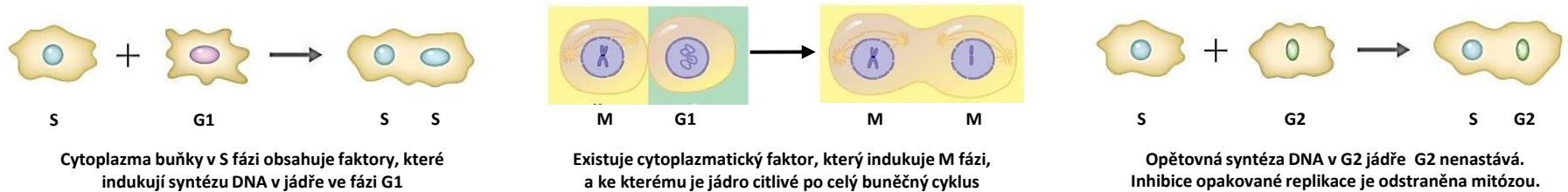
- fosforylace: významná změna struktury a funkce proteinů, reverzibilní
proteinkinázy patří mezi hlavní regulátory buněčného cyklu
- proteolýza: nepotřebné proteiny označeny ubikvitinem a degradovány v proteozomu, ireverzibilní

ii) **kontrolní body buněčného cyklu**

Řízení buněčného cyklu - historie

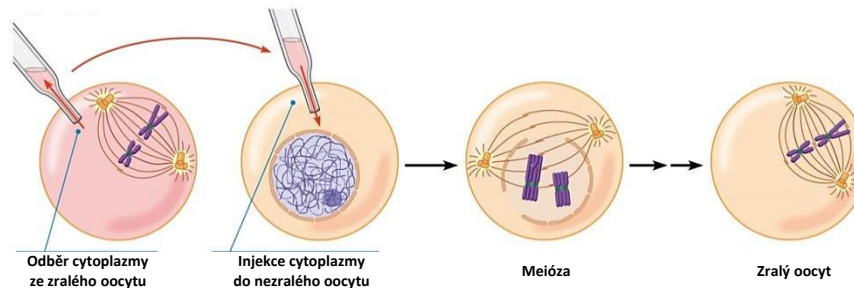
Potu Rao, Robert Johnson (1970)

- analýza buněčného cyklu pomocí experimentů s fúzí buněk v různých fázích cyklu
- vznik buňky se dvěma jádry - heterokaryon
- buněčný cyklus řízen specifickými chemickými signály obsaženými v cytoplasmě
- řízení buněčného cyklu probíhá ve dvou místech - G1/S přechod, G2/M přechod



Yoshio Masui, Clement Markert (1971)

- identifikace faktoru MPF (mitosis-promoting factor), dimer složený z proteinkinázy (CDK) a cyklinu
- MPF je vysoce konzervativní, indukuje u všech eukaryotických buněk mitózu
- *Xenopus laevis* - oblíbený modelový organismus kvůli velkým oocytům

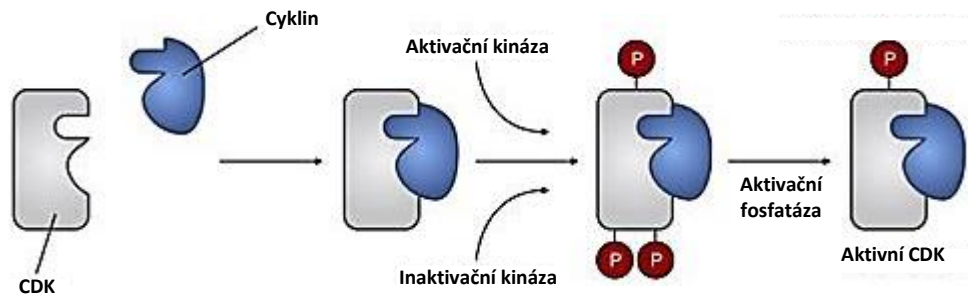


Faktory zajišťující řízení buněčného cyklu

Cyklin-dependentní-proteinkinázy (Cdk)

- klíčové enzymy regulující přechod mezi fázemi BC, přestup buněk z G0 do G1
- různé fáze BC spouští tím, že fosforylují specifické cílové proteiny
- jejich aktivita je přísně regulována
 - i) katalytická aktivita pouze v komplexu s cyklinem
 - ii) Tyr fosforylační místa - aktivační, inhibiční
 - fosforylace specifickými kinázami, defosforylace fosfatázami
 - iii) inhibitory
- u kvasinek 1 enzym, u člověka 5 enzymů

G1	CDK4, CDK2, CDK6
S	CDK2
G2	CDK2, CDK1
M	CDK1



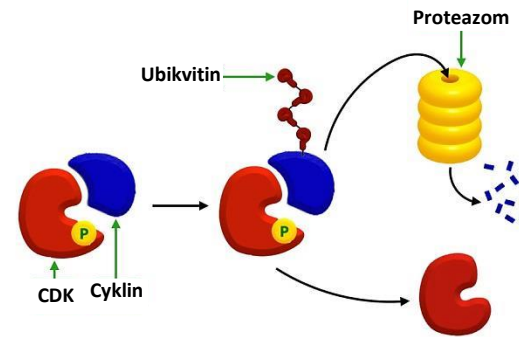
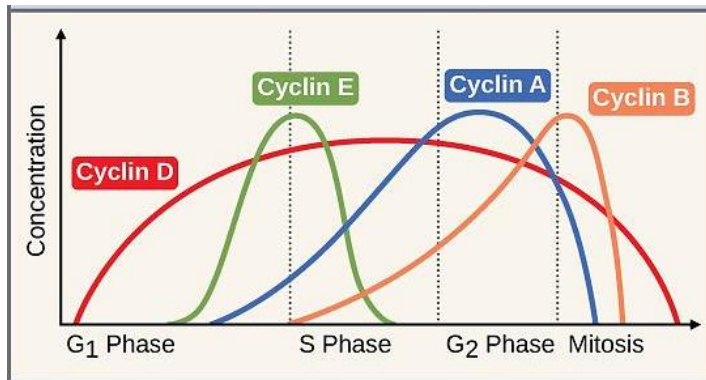
Inhibitory CDK (CKI)

- negativní regulátory průchodu BC, dvě rodiny (INK, CIP)
- váží se na CDK a tlumí jejich aktivitu, zodpovědné za zástavu BC v G1
- např. p21 se aktivně syntetizuje při poškození DNA, váže se na CDK a přerušuje průběh BC

Faktory zajišťující řízení buněčného cyklu

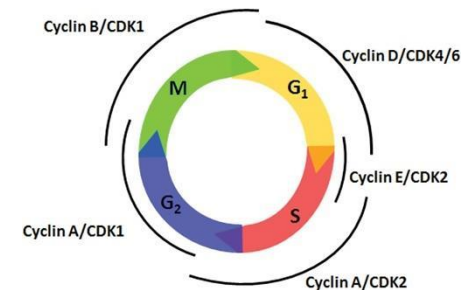
Cykliny

- proteiny tvořící komplexy s Cdk, aktivují Cdk a určují jejich substrátovou specifitu
- regulují průchod jednotlivými fázemi BC
- jejich koncentrace kolísá během fází BC - specifická syntéza / ubikvitinace a proteolýza



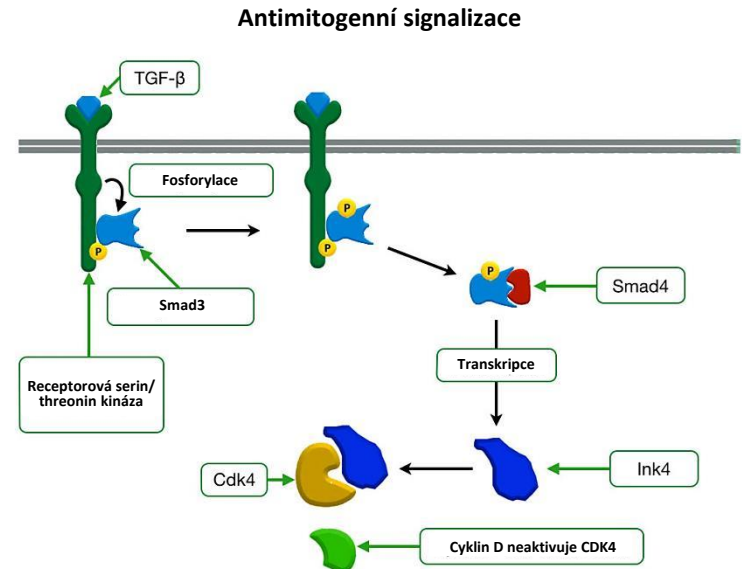
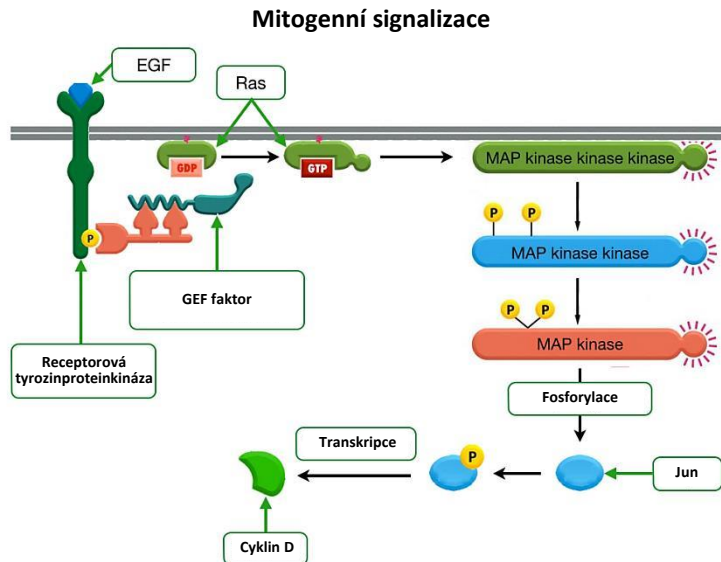
- u kvasinek 9 typů
- u člověka 4 rodiny, které jsou aktivní v různých fázích BC

Fáze BC	Cyklin	CDK	Funkce
G1	D, E	CDK4, CDK6, CDK2	Umožňují překonat bod restrikce v pozdní G1
S	A, E	CDK2	Umožňují zahájit replikaci DNA
G2	A	CDK2, CDK1	Navádějí buňku k M fázi
M	B	CDK1	Podporují mitotické děje



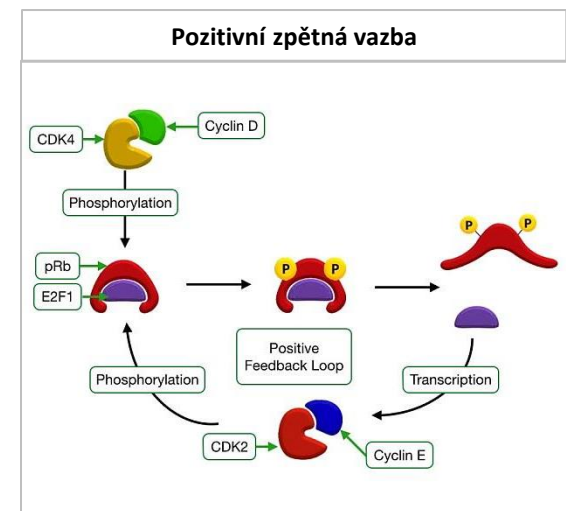
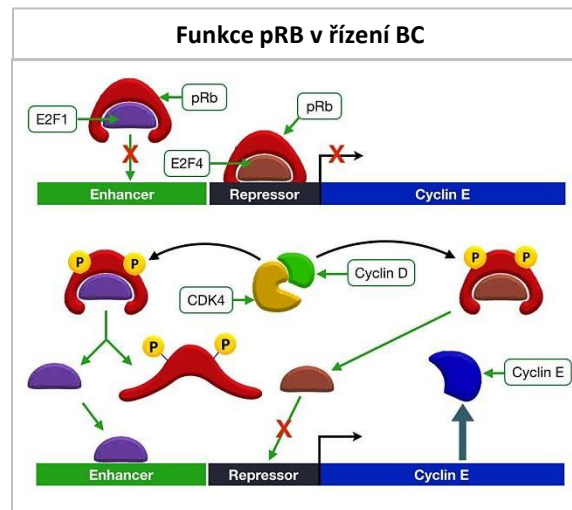
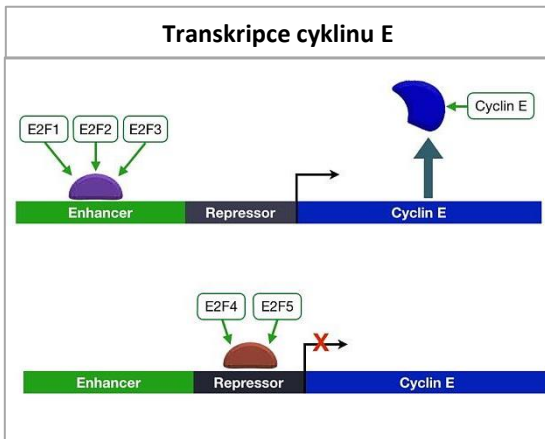
Řízení buněčného cyklu - raná G1

- **cyklin D - CDK4/6**
- tři formy cyklinu D (D1, D2, D3) s tkáňově specifickou expresí, tvoří komplex s CDK4 nebo CDK6
- cyklin D působí jako senzor mitogenních signálů a připravuje buňku pro S-fázi
- aktivace transkripčních faktorů, které zajišťují expresi replikačních proteinů a cyklinu E
- defosforylace složek pre-iniciačních komplexů, sestavení nových komplexů v místech ori
- odpověď na mitogenní signály
př. EGF - EGFR - GEF faktor - Ras protein - dráha MAP kináz - transkripční faktory - exprese cyklinu D
- inhibice antimitogenními signály
př. TGFβ - TGFβR - transkripční faktor Smad3, Smad4 - exprese CDK inhibitoru



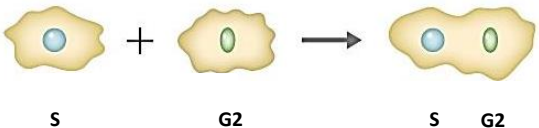
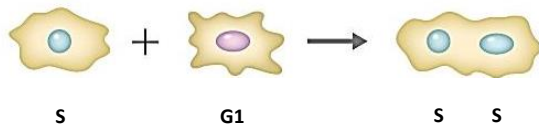
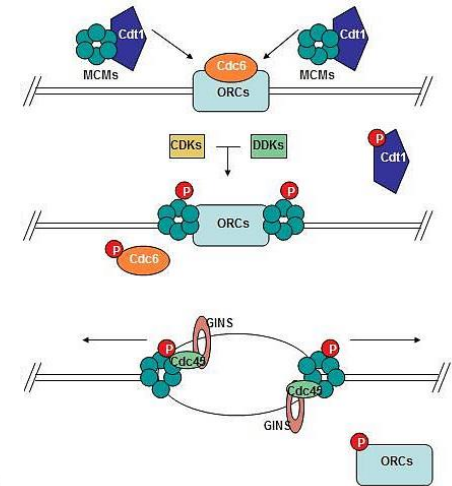
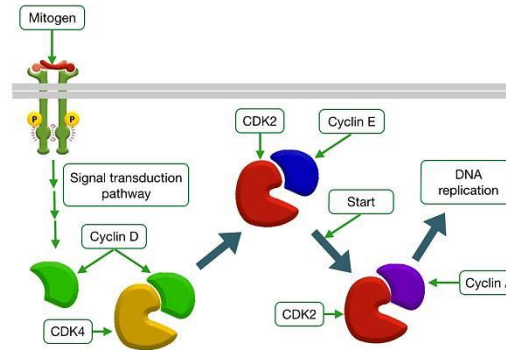
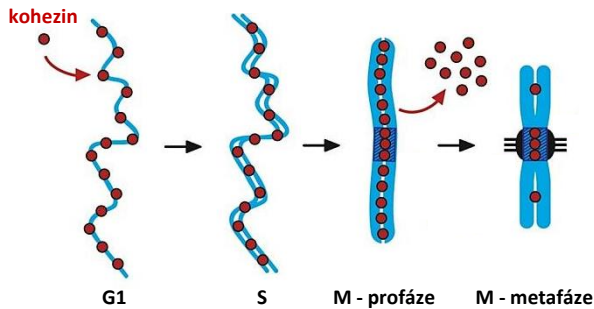
Řízení buněčného cyklu - přechod G1/S

- **cyklin D - CDK4/6, cyklin E - CDK2**
- dále připravují buňku pro S-fázi
- transkripce cyklinu E řízena sadou transkripčních faktorů E2F (aktivátory 1-3, inhibitory 4-5)
- Rb protein (pRb) aktivní v nefosforylované formě, inhibován fosforylací
- v G0 a G1 inhibuje pRB svojí vazbou aktivační E2F a aktivuje inhibiční E2F, potlačuje expresi cyklinu E
- po fosforylaci komplexem cyklin D - CDK4/6 se pRb uvolňuje a E2F spouští expresi cyklinu E, cyklinu A a replikačních proteinů
- pozitivní zpětná vazba - cyklin E tvoří komplex s CDK2 a dokončuje fosforylaci pRb, v tuto chvíli je průchod buněčným cyklem nezávislý na přítomnosti mitogenů
- po zahájení S fáze je cyklin E degradován a CDK2 tvoří komplex s cyklinem A



Řízení buněčného cyklu - S fáze

- **cyklin A - CDK2**
- fosforylace složek pre-iniciačního komplexu
 - iniciaci replikace DNA (aktivace komplexu MCM)
 - blok opakované replikace v rámci jednoho BC (uvolnění cdc6)
- výsledkem S fáze je vznik dvou sesterských chromatid každého chromozomu spojených molekulami kohezinu



Cytoplazma buňky v S fázi obsahuje aktivní komplexy cyklin E - CDK2 a cyklin A - CDK2, které zajistí fosforylaci pRB, expresi replikačních proteinů a iniciaci replikace DNA. Již není třeba mitogenní signál.

V jádře G2 buňky neproběhne opakovaná S fáze v důsledku absence pre-iniciačních komplexů.

Řízení buněčného cyklu - přechod G2/M

MPF (mitosis-promoting factor) = cyklin B - CDK1

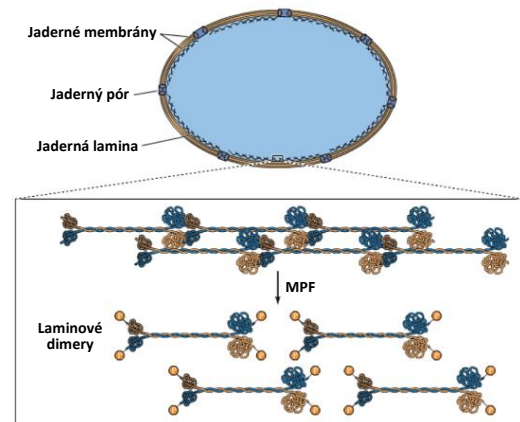
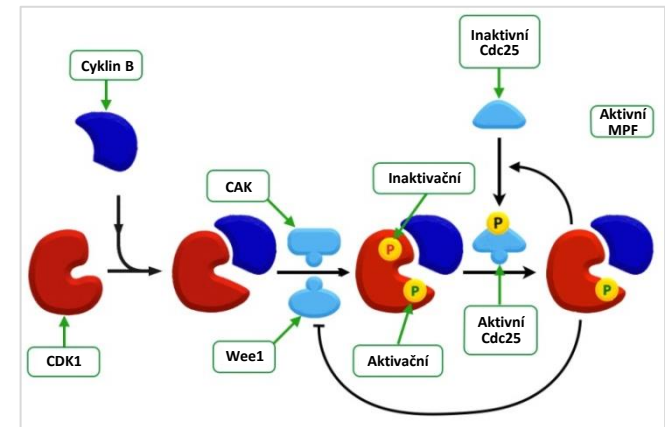
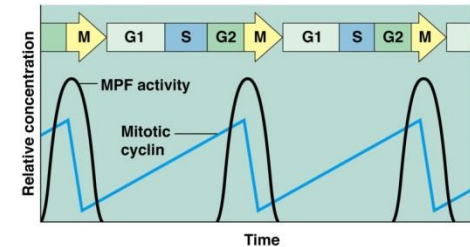
- koncentrace cyklinu B roste průběžně během celé interfáze
- CDK1 - inhibiční fosforylace kinázou Wee1
odstraněna fosfatázou Cdc25
- aktivační fosforylace kinázou CAK
- nárůst aktivity MPF je skokový, při maximální hladině cyklinu B a po odstranění inhibiční fosforylace
- pozitivní zpětná vazba - aktivovaný MPF aktivuje Cdc25 a inhibuje Wee1

MPF fosforyluje cílové proteiny zapojené v brzké fázi mitózy

- kondenzace chromatinu - aktivace kondenzinů
- rozpad jaderné membrány - depolymerace laminů, fosforylace jaderných pórů a proteinů vnitřní membrány
- tvorba mitotického vřeténka - aktivace centrozomů a proteinů asociujících s mikrotubuly

Kontrola velikosti buněk u kvasinek

- nízká aktivita Cdc25 a vysoká aktivita Wee1 - opožděná mitóza, delší G2, zvětšení buněk
- vysoká aktivita Cdc25 a nízká aktivita Wee1 - urychlená mitóza, kratší G2, zmenšení buněk



Řízení buněčného cyklu - M fáze

APC, anaphase-promoting complex

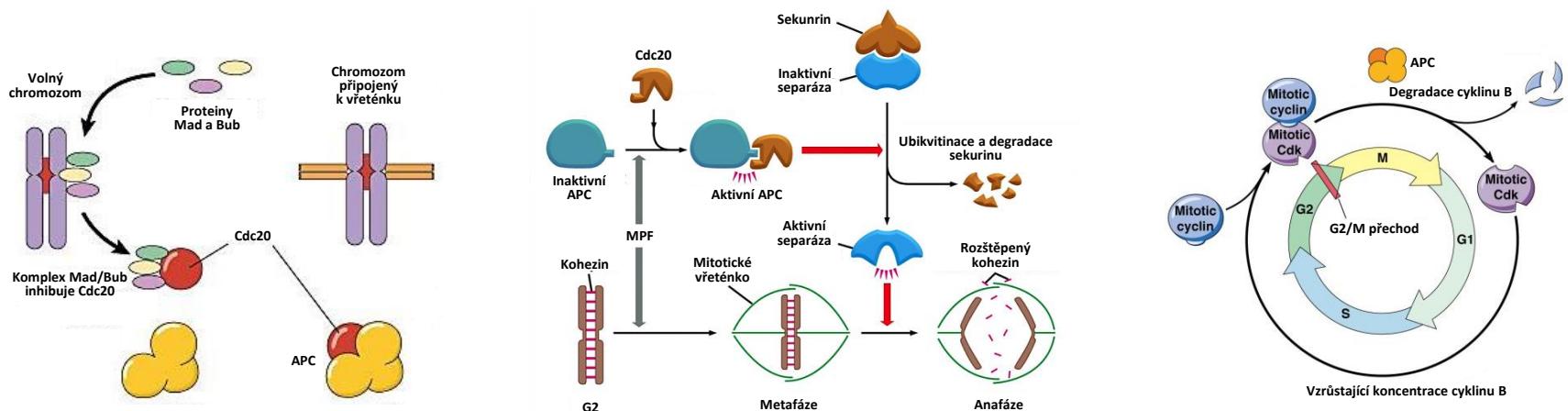
- ubikvitin ligáza připojující ubikvitin k proteinům, které řídící mitózu, a tím je předurčuje k degradaci
- aktivita během BC kolísá, aktivován v pozdní mitóze působením MPF
- funguje jen po připojení proteinu Cdc20, ten je blokován proteiny Mad a Bub, které ho uvolňují až po správném připojení kinetochorů všech chromozomů k mikrotubulům vřeténka
- substrátem jsou např.

i) sekurin

- jeho rozklad uvolňuje separázu, která degraduje proteiny spojující sesterské chromatidy

ii) cyklin B

- náhlý pokles jeho hladiny inaktivuje MPF
- absence MPF umožňuje konstitutivně aktivním fosfatázám odstranit fosfátové skupiny z proteinů, které byly fosforylovány MPF, zakončení mitózy, vstup do nové G1



Inhibitory CDK (CKI)

Rodina INK4 (Inhibitors of Kinase 4)

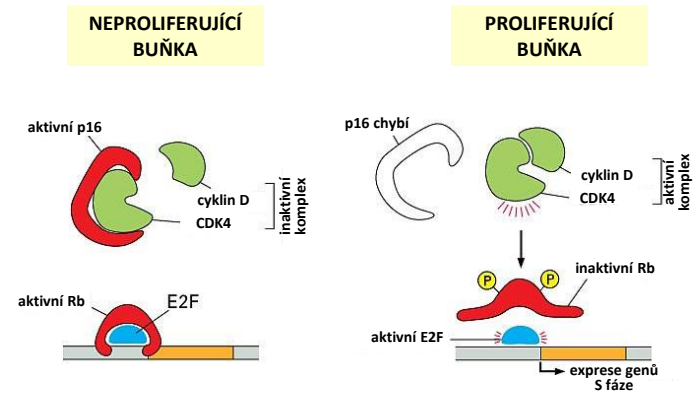
- p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}
- inhibují sestavování komplexů a kinázovou aktivitu cyklin D - CDK4/6, zástava v G1
- exprese p16 stimulována inhibitory růstu (např. TGFβ) a proteiny E2F (negativní zpětná vazba)

Rodina CIP (CDK Inhibitory Proteins)

- p21^{Cip1} (cílový gen proteinu p53), p27^{Kip1}, p57^{Kip2}
- váží a inhibují cyklin D - CDK4/6, cyklin E - CDK2, cyklin A - CDK2, cyklin B - CDK1

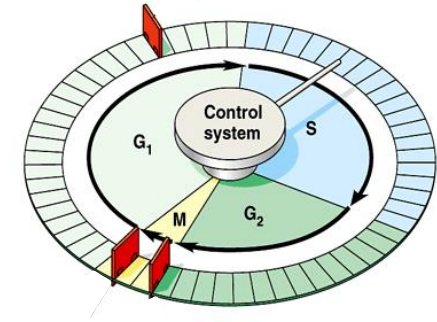
Farmakologické inhibitory CDK

- CDK řídí buněčný cyklus, expresi genů, diferenciaci, apoptózu, procesy v nervovém systému
- deregulace CDK u různých chorob, farmakologické inhibitory blokují ATP vazebné místo CDK
- zkoumán selektivní účinek těchto inhibitorů a jejich možné využití pro léčebné účely
 - nádory, neurodegenerativní choroby (Alzheimerova choroba, ALS, mrtvice)
 - kardiovaskulární choroby (ateroskleróza, hypertrofie srdce)
 - virové infekce (HCMV, HIV, HSV, HPV)
 - parazitická protozoa (malárie, spavá nemoc)



Kontrolní body buněčného cyklu

- vnímají vnější i vnitřní podněty a zajišťují správný chod BC
- kontrola dokončení předchozí fáze a splnění podmínek pro fázi následující



Kontrolní bod G1 - bod restrikce

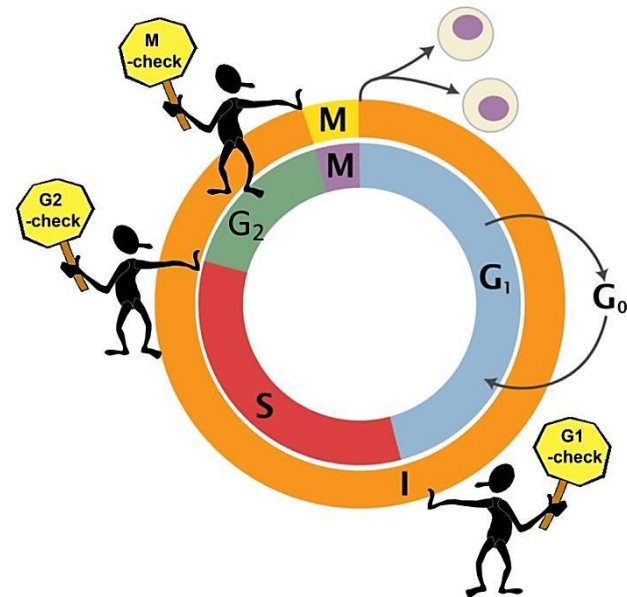
- vliv vnějších faktorů - přítomnost živin, mitogenů, antiproliferačních faktorů
- po překonání bodu restrikce mohou BC zastavit už jen vnitřní faktory
- celistvost DNA
- velikost buňky (kvasinky)

Kontrolní bod G2

- dokončení replikace DNA
- celistvost DNA
- velikost buňky (kvasinky)

Kontrolní bod M

- přechod metafáze-anafáze
- správné připojení chromozomů k mitotickému vřeténku



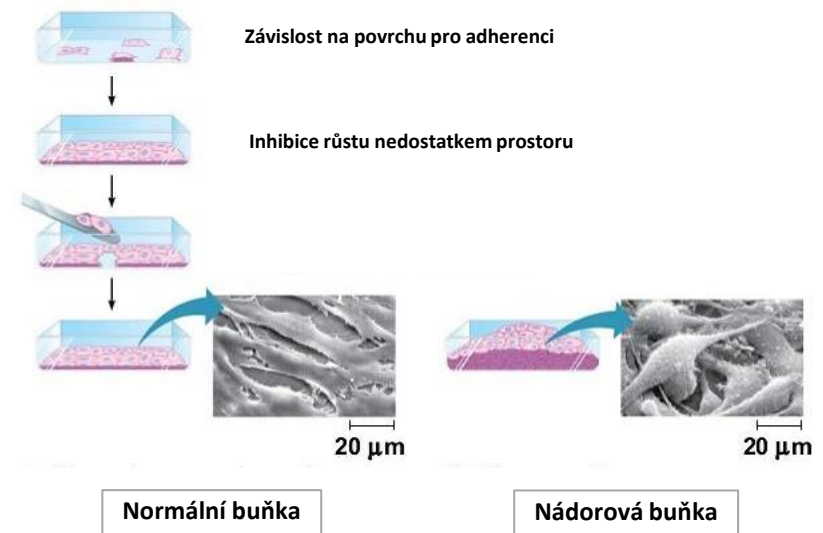
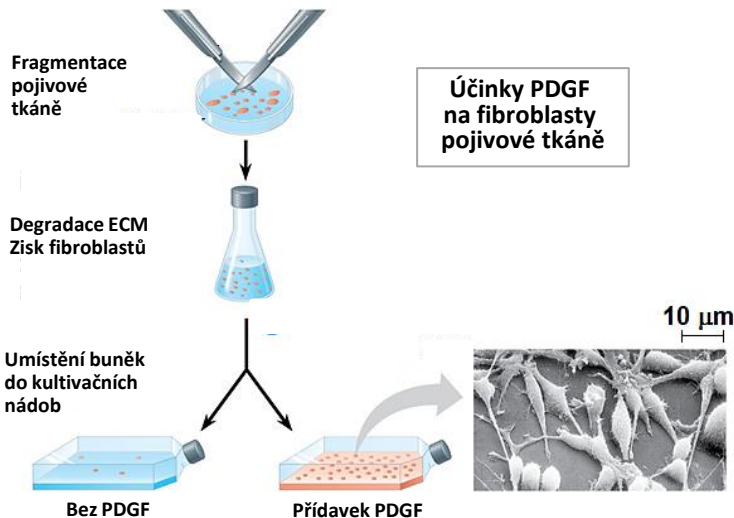
Kontrolní body buněčného cyklu

Vnější podněty - chemické

- živočišné buňky potřebují kromě esenciálních živin mimobuněčné signály pro růst, dělení a přežití
- signální molekuly produkované jinými buňkami téhož organismu:
 - i) mitogeny - stimulují dělení buněk, překonávají přirozené brzdící mechanismy G1/S (např. pRb)
 - ii) růstové faktory - stimulují navýšení hmoty a růst buněk, indukují syntézu makromolekul
 - např. PDGF: tvorba v krevních destičkách, podpora hojení ran
 - iii) faktory pro přežívání - potlačují programovanou buněčnou smrt

Vnější podněty - fyzikální

- pro růst a proliferaci vyžaduje buňka prostor a povrch pro adhezenci



Kontrolní body buněčného cyklu

Vnitřní podněty

- celistvost DNA, připojení chromozomů k dělicímu vřeténku

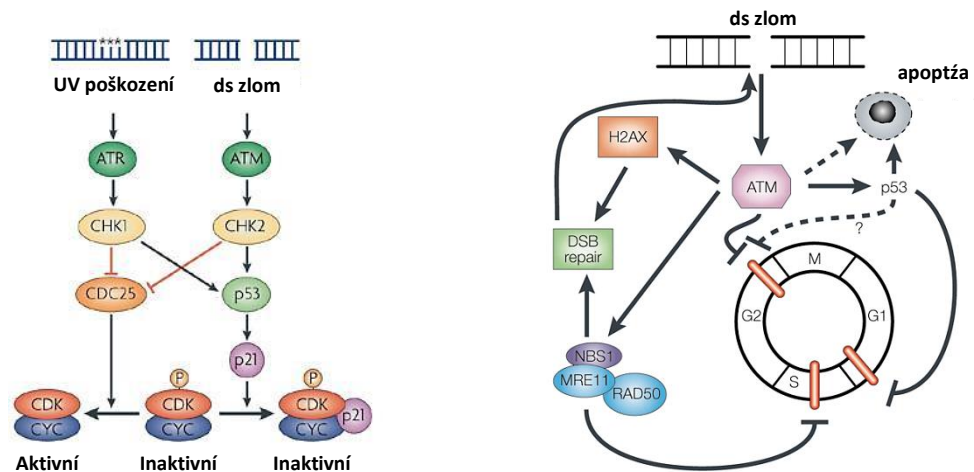
Poškození DNA

- vlivem fyzikálních a chemických mutagenů
- opravitelné poškození - zastavení BC do doby opravení DNA
- rozsáhlé poškození - programovaná buněčná smrt
- zástava v BC v G1 (inaktivace CDK2) nebo G2 (inaktivace CDK1)
- klíčová úloha nádorových supresorů

ATM, ATR - rozpoznání poškozené DNA (UV fotoprodukty, dsDNA zlomy), aktivace CHK1, CHK2

CHK1, CHK2 - aktivace p53, inhibice Cdc25

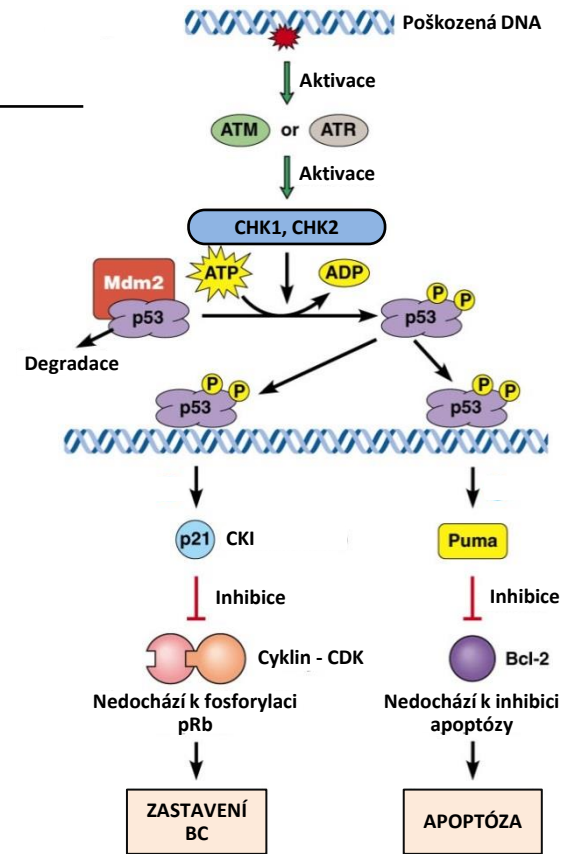
p53 - zvýšení hladin CKI



Kontrolní body buněčného cyklu

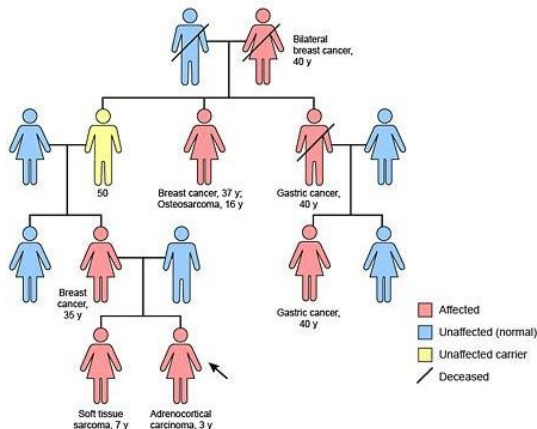
p53

- významný regulátor BC, působí jako nádorový supresor
- za normálních podmínek nízká hladina, průběžná degradace
 - Mdm2 zajišťuje transport p53 z jádra k proteazomu
 - zpětná vazba: p53 spouští expresi Mdm2
- stabilizován ve stresových situacích, především při poškození DNA
- působí jako transkripční faktor, indukuje
 - zastavení BC: exprese p21/CIP
 - zastavení replikace DNA: inaktivace DNA polymerázy δ
 - zastavení mitózy: inaktivuje cdc25
 - apoptózu: exprese Bax, Puma



Deficit p53

- průchod BC s poškozenou DNA - hromadění mutací - riziko vzniku nádoru (mutace v genu p53 u většiny nádorových onemocnění)
- Li-Fraumeniho syndrom
 - dědičný syndrom způsobený inaktivační mutací p53
 - zvýšené riziko vzniku nádoru (sarkomy, nádory mozku, prsu, nadledvinek, leukemie)
 - 50 % riziko nádoru do 40 let věku, 90% do 60 let věku



Kontrolní body buněčného cyklu

Kontrolní bod dělicího vřeténka

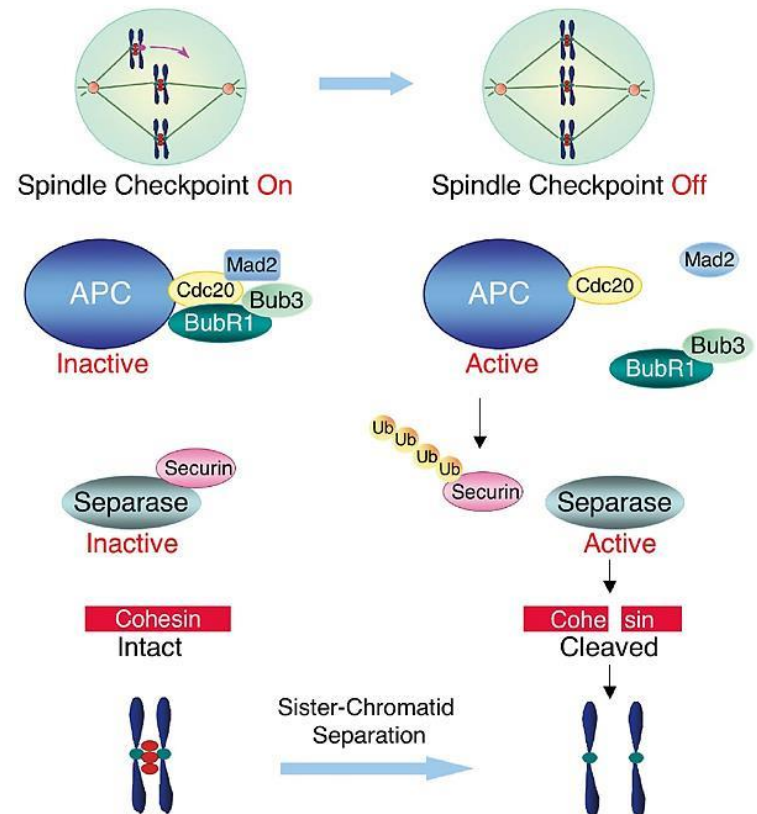
- pro vstup do anafáze musí buňka získat potvrzení o připojení všech chromozomů na kinetochorové mikrotubuly dělicího vřeténka
- poškození tohoto kontrolního mechanismu vede k poškození a nondisjunkci chromozomů

i) kontrolní bod zapnut

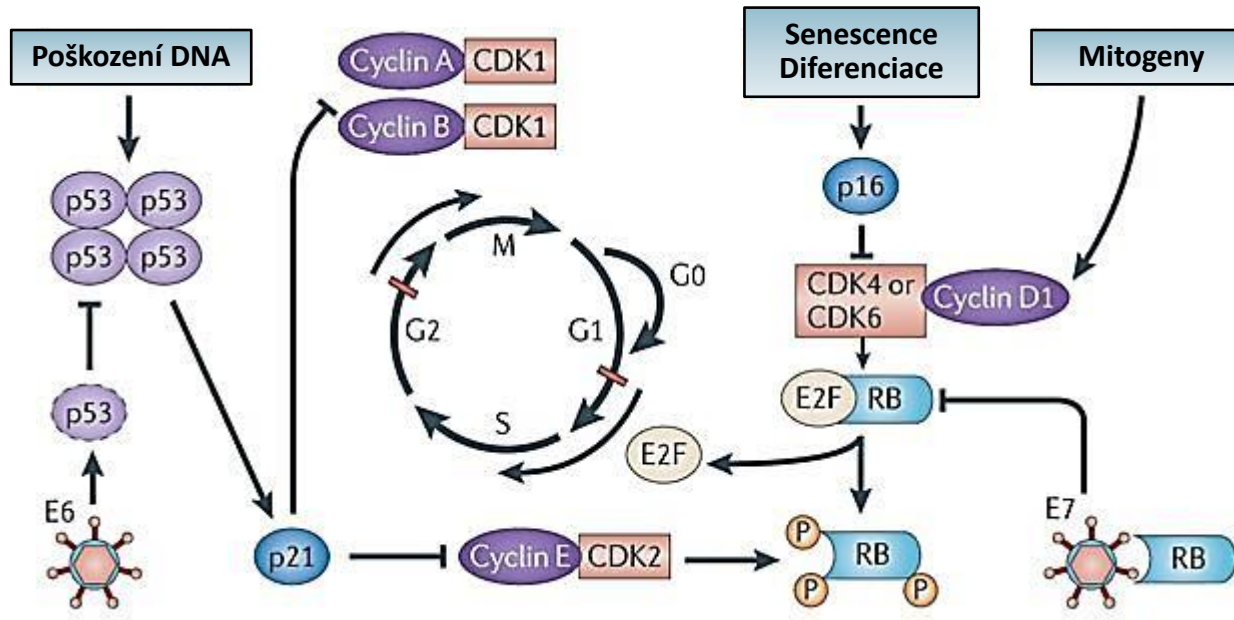
- nepřipojené kinetochory aktivují proteiny Mad a Bub
- komplex APC-Cdc20 v inaktivním stavu

ii) kontrolní bod vypnut

- vazba sesterských chromatid chromozomů na kinetochorové mikrotubuly z opačných pólů dělicího vřeténka vyvolává v chromozomech mechanické napětí
- netvoří se komplex proteinů Mad a Bub
- komplex APC-Cdc20 je aktivní a zajišťuje degradaci sekurinu



Faktory ovlivňující průchod BC

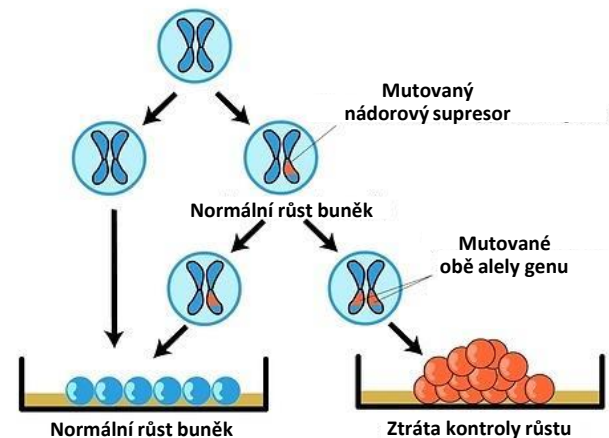
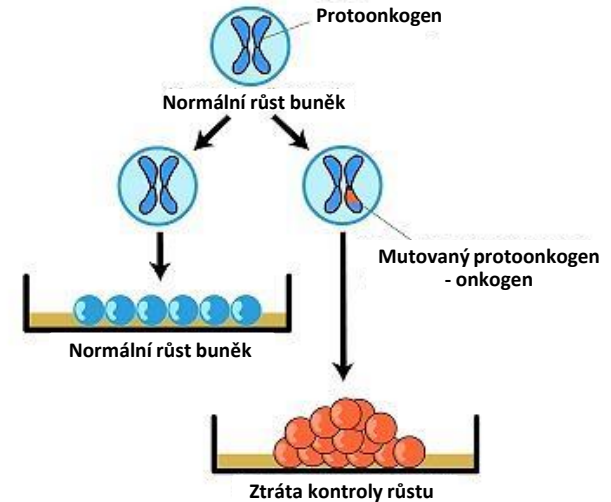


- přítomnost mitogenů - exprese cyklinu D
- přítomnost antimitogéních, diferenačních faktorů - exprese CKI
- stárnutí buňky - exprese CKI
- poškození DNA - zástava BC přes p53
- virové infekce (např. HPV, lidský papilomavirus) - inhibice p53 a pRb, proliferace buňky

Poruchy řízení buněčného cyklu

Nádorová onemocnění

- nádorové buňky nepotřebují k dělení růstové faktory
 - samy si mohou tvořit růstové faktory
 - mohou signalizovat i bez přítomnosti růstového faktoru
 - mohou mít narušené kontrolní body BC
- zvýšená proliferace buňky podpoří její transformaci do buňky nádorové
- nádor je v podstatě selhání kontroly buněčného dělení, nekontrolovatelný růst buněk
- **protoonkogeny**
 - normálně aktivují proliferaci buněk
 - při abnormální aktivaci či ztrátě jejich inhibice podporují vznik nádoru
 - př. růstové faktory, cykliny, CDK, E2F, Mdm2, Ras, Myc
- **nádorové supresory**
 - normálně potlačují dělení buněk
 - inaktivace či zvýšená inhibice podporuje vznik nádoru
 - př. pRb, p53, p21, p14, p16, TGF- β , ATM



Poruchy řízení buněčného cyklu

Početní změny chromozomů (aneuploidie)

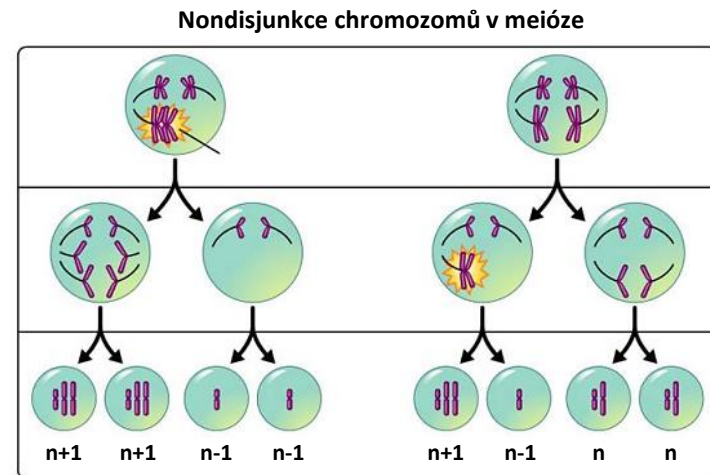
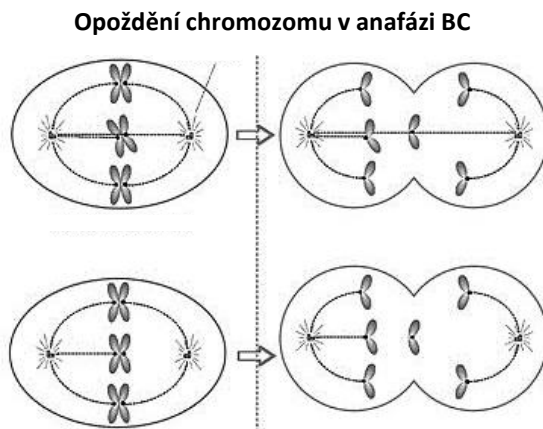
- normální karyotyp 46, XX(Y) monozomie - např. 45, X trizomie - např. 47, XY +21
- chyby v kontrolním bodu dělicího vřeténka, výsledek nondisjunkce a opoždění chromozomů

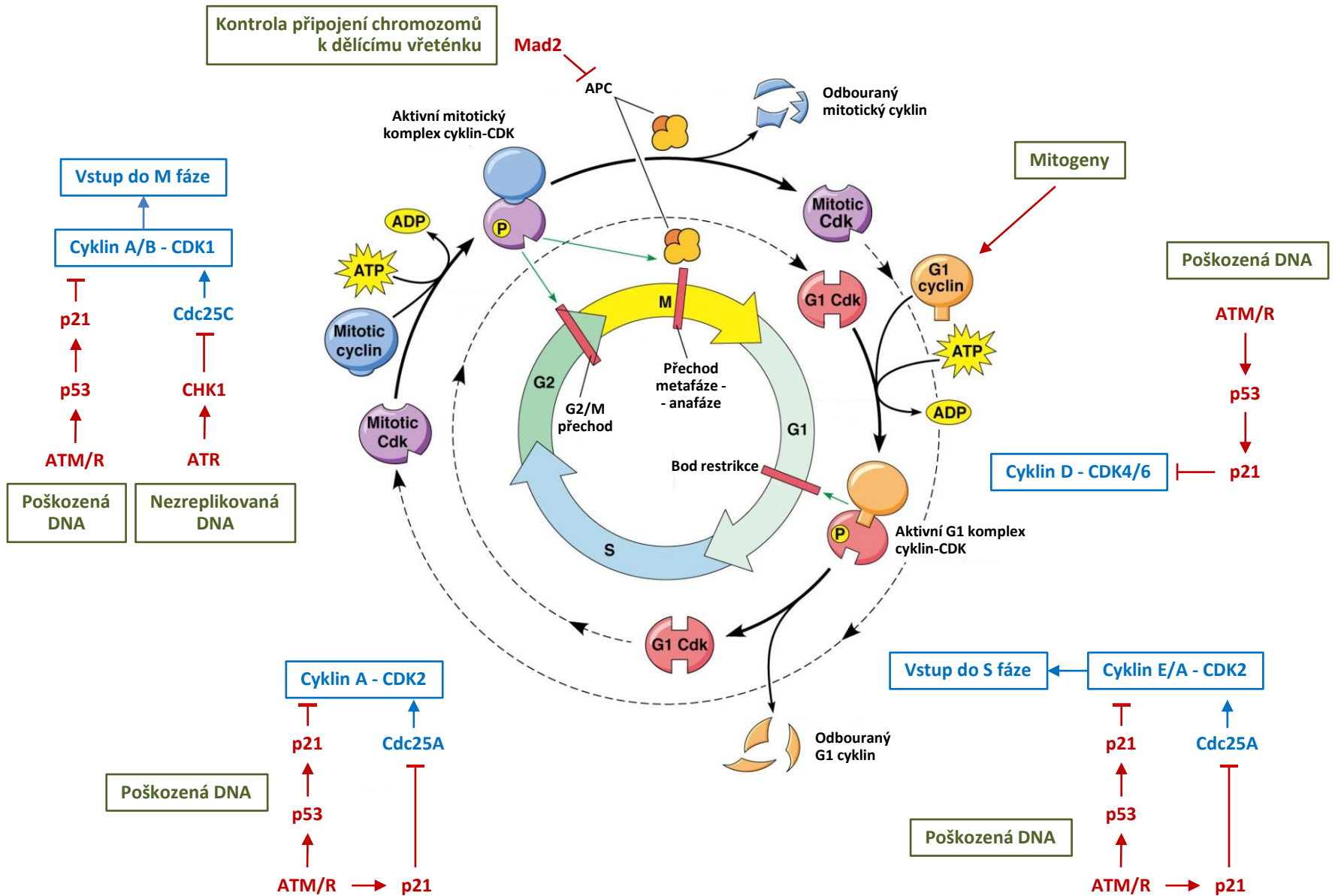
i) chyby v mitóze

- opoždění chromozomu v anafázi a jeho nezačlenění do dceřiného jádra
- vznik mozaicismu, v jednom organismu se vyskytují linie buněk s různým karyotypem

ii) chyby v meióze

- nondisjunkce - vznik nulizomické / trizomické gamety, monozomie/trizomie po oplození
 - v MI: chyba v rozdělení homologních chromozomů
 - v MII: chyba v rozdělení chromatid
- opoždění chromozomu v anafázi: vznik nulizomické gamety





Zvídavé otázky

Kolik buněk vzniká z jedné buňky, která podstoupí meiózu?

Do jakých dvou hlavních fází se rozděluje buněčný cyklus?

Jaké buňky se množí pomocí mitózy?

Jaký typ mikrotubulů je zodpovědný za vazbu chromozomů během M fáze BC?

Jak se nazývá fáze buněčného cyklu, při které se buňka fyzicky rozdělí na dvě?

Jaká struktura zastává při mitóze funkci obdobnou chiasmatům při meióze?

Vstup do jaké fáze buněčného cyklu signalizuje aktivní komplex MPF?

Ke vstupu do jaké fáze buněčného cyklu vede degradace G1 fázových cyklinů?

Rozpad jaderné membrány odpovídá začátku prometáfáze (ANO/NE)

Při mitóze jsou jádra dceřiných buněk geneticky shodné s jádrem mateřské buňky (ANO/NE)

Během mitotické profáze obsahuje každý chromozom dvě chromatidy (ANO/NE)

Homologní chromozomy se párují během mitotické profáze (ANO/NE)

Začátek anafáze je inhibován až do seřazení všech chromozomů v ekvatoriální rovině (ANO/NE)

Buňky v G0 fázi buněčného cyklu obsahují stejné množství DNA jako ve fázi G2 (ANO/NE)

Zvídavé otázky

Co je cílem ubikvitinace komplexem APC na začátku anafáze?

- a) sekurin
- b) separáza
- c) kohezin
- d) tubulin

Jaké z následujících tvrzení porovnávajících mitózu a meiózu není pravdivé?

- a) oba procesy využívají dělicí vřeténko z mikrotubulů
- b) po obou procesech následuje cytokineze
- c) oba procesy jsou pečlivě regulovány
- d) v obou procesech probíhá během profáze crossing-over
- e) oba procesy zahrnují redukci obsahu DNA v dceřiných buňkách

Jaké z následujících tvrzení o anafázi buněčného cyklu není pravdivé?

- a) zmenšuje se vzdálenost mezi kinetochory a póly dělicího vřeténka
- b) zvětšuje se vzdálenost mezi dvěma sadami dceřiných chromatid
- c) rozpadají se mikrotubuly dělicího vřeténka
- d) zvětšuje se vzdálenost mezi oběma póly dělicího vřeténky
- e) dochází k cyklin-dependentní aktivaci CDK1

