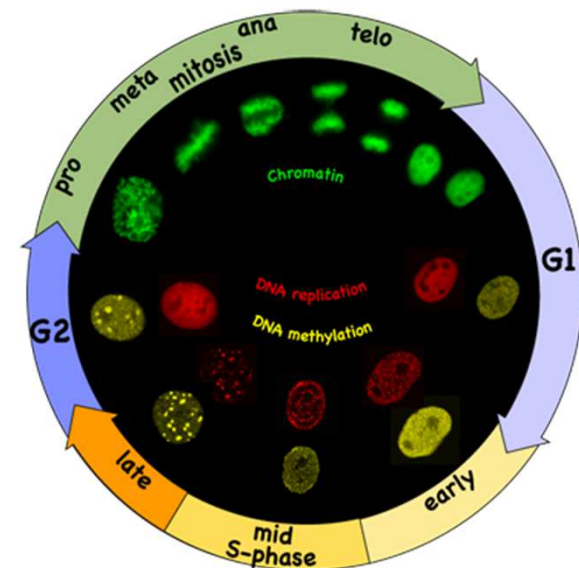


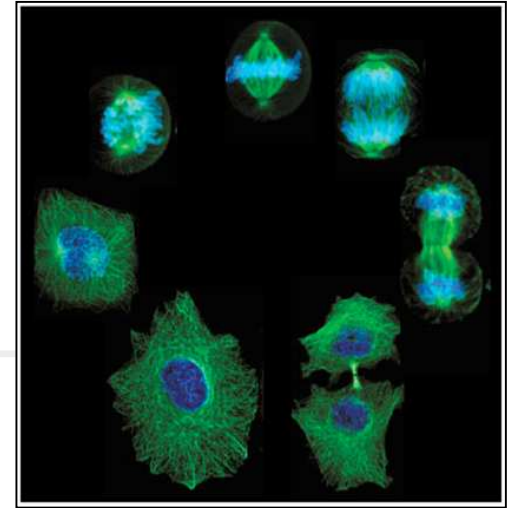
Buněčný cyklus a cílený rozklad proteinů

Jan Šmarda

Ústav experimentální biologie PŘF MU



Co je buněčný cyklus?



- uspořádaný sled makromolekulárních procesů, při kterých buňka zdvojí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě buňky dceřiné, přičemž každá z nich ponese stejné chromozomy
- hlavní cíl: reprodukce genetického materiálu pro příští generaci



Vysoké nároky na přesnost

- bezchybná replikace
- správné řazení fází
- přesná segregace chromozomů

Nežádoucí rizika:

- mitóza před replikací: ztráta genetické informace nejméně u jedné buňky
- dvojnásobná replikace části chromozomu před mitózou: zvýšení počtu kopií genů

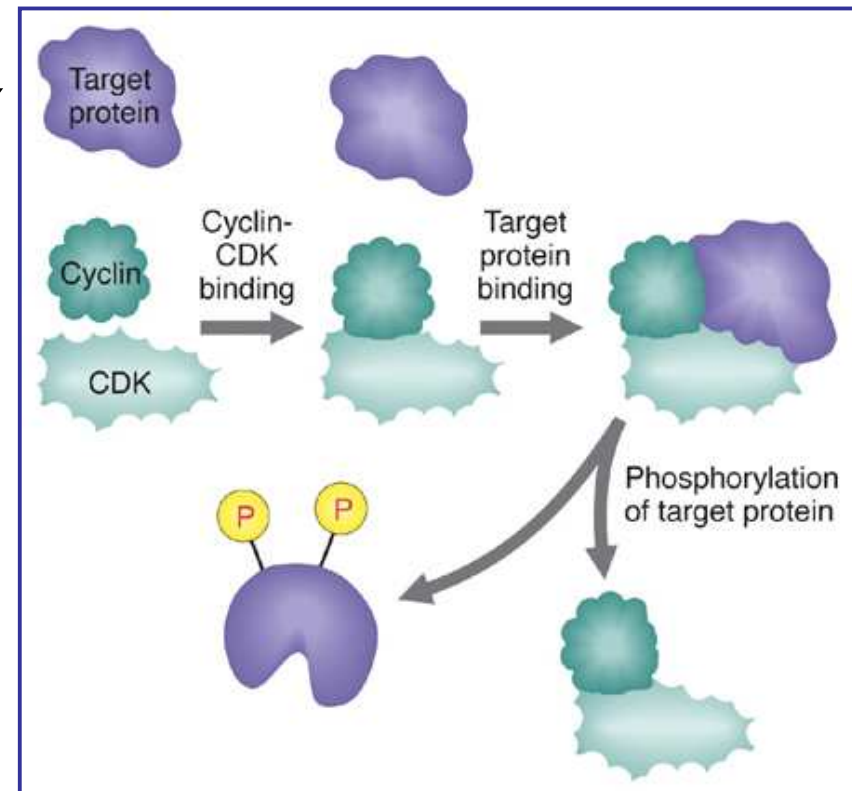


Řídící elementy cyklu

- kinázy skupiny CDK
- specifické degradační systémy

Kinázy CDK

- heterodimerní proteinkinázy s regulační složkou (**cyklinem**) a katalytickou složkou (**cyklin-dependentní kinázou, CDK**)
- na řízení cyklu se podílejí fosforylací klíčových regulátorů



Degradační systémy

- pro řízený rozklad specifických proteinů cyklu, následkem je nevratný posun fází cyklu v jednom směru

Ubikvitin ligázy:

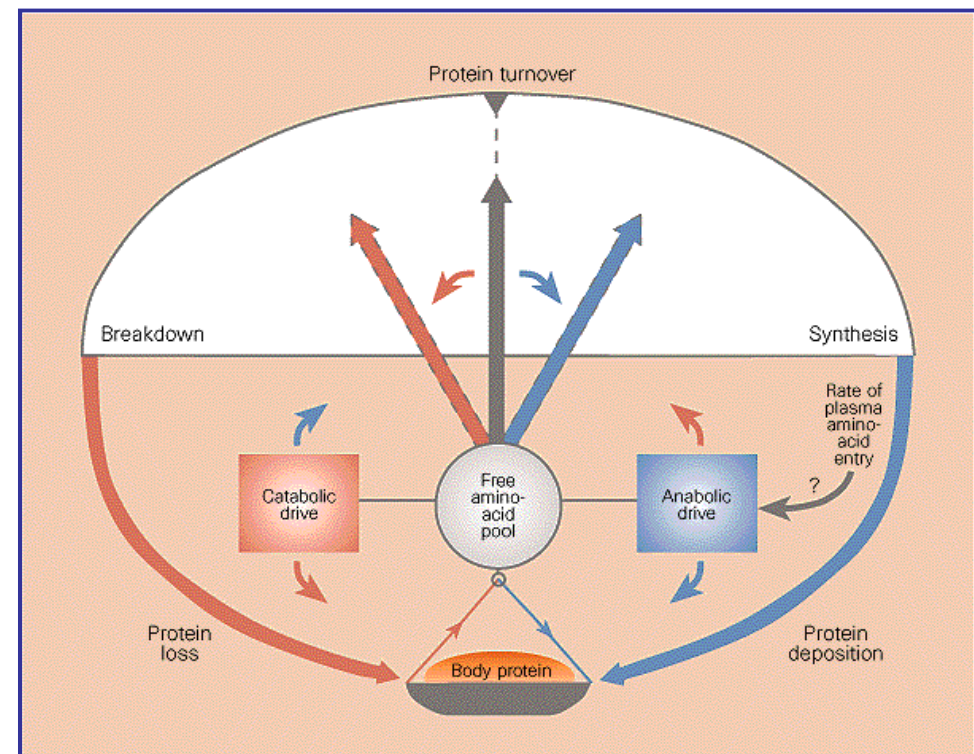
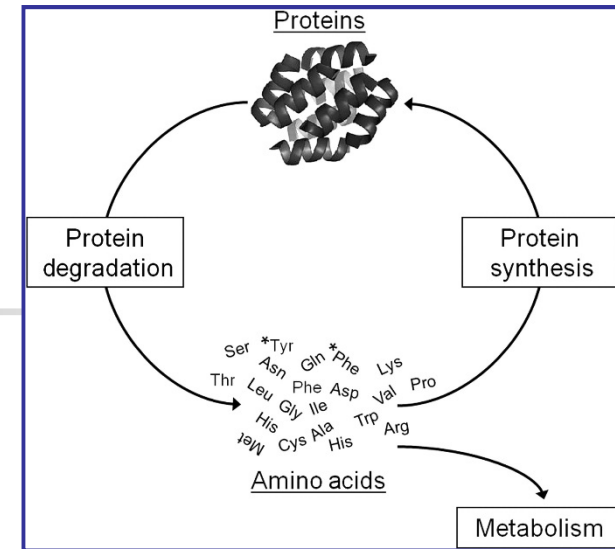
- SCF
- „anaphase promoting complex“ = cyklozom (APC/C)



Zajistí specifické označení proteinů polyubikvitinovou značkou, která je předurčí k proteazomové likvidaci

Proč rozkládat proteiny?

- buňky mohou v organismu žít různě dlouhou dobu (dny – roky), ale jejich složky jsou průběžně nahrazovány
- „turnover“ - rovnováha mezi syntézou a degradací proteinů
- vychýlení k proteosyntéze – anabolismus – výstavba tkání
- vychýlení k degradaci – katabolismus – ztráta tkání
- při stárnutí se „turnover“ prodlužuje - zvýšení hladiny poškozených proteinů
- příčinu nebo následek stárnutí organismu?





Konstitutivní turnover

- udržovací funkce – pravidelné nahrazování starších molekul novými
- přesné vyvážení syntetických a rozkladných procesů v buňce
- vyjadřuje se jako **poločas rozkladu**, tj. doba, během které se rozloží polovina molekul daného typu
- poločas závisí na velikosti molekuly, náboji, termostabilitě, flexibilitě, hydrofobicitě, způsobu složení a způsobu uspořádání (jde-li o vícepodjednotkový protein)
- poločas rozkladu proteinů se pohybuje od hodin do dnů



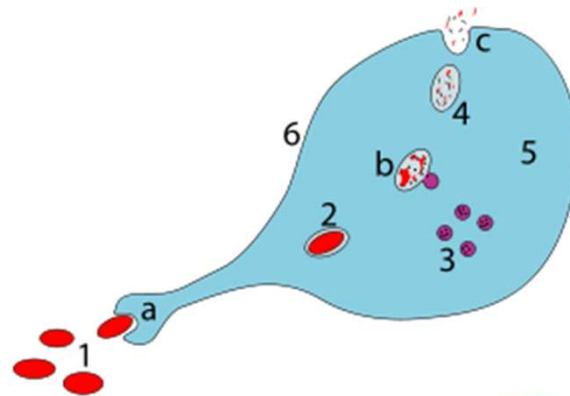
Regulovaný turnover

- rychlý rozklad specifických cílových molekul, např. v přenosech signálů, regulaci buněčného cyklu nebo při diferenciaci a vývoji

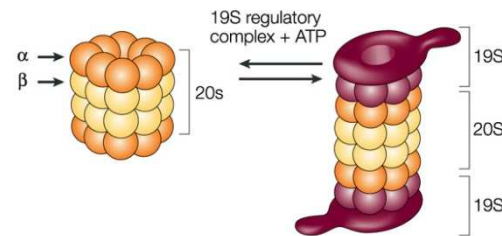
Kde probíhá proteolýza?

- neregulovaná proteolýza by znamenala riziko poškození buňky
- soustředěna do specifických buněčných kompartmentů:

- lysozomů



- proteazomů



Nature Reviews | Cancer

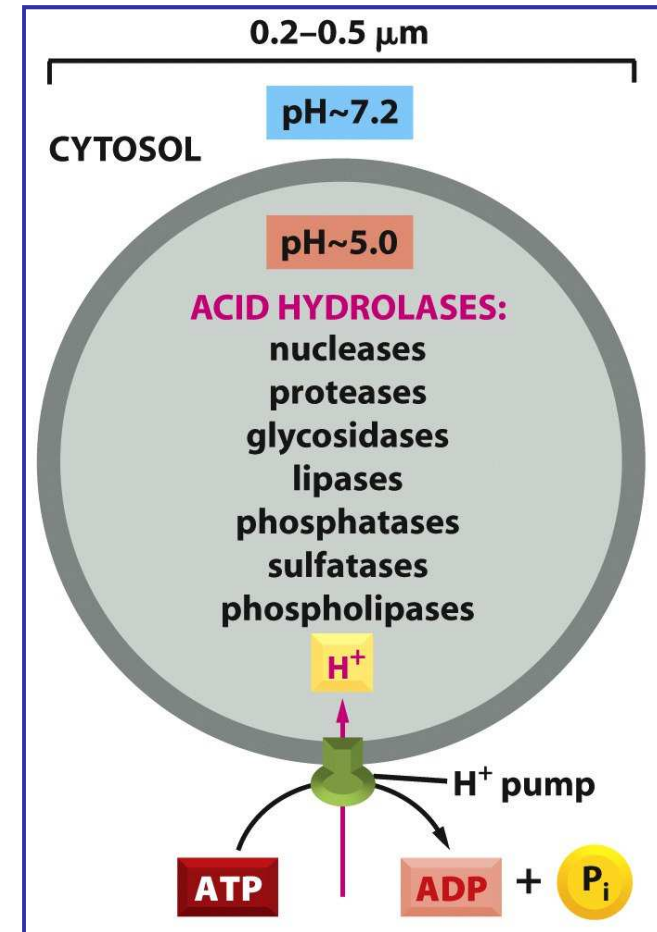
Lysozomy

- membránou ohraničené organely s rozkladnými enzymy
- hlavní organely štěpení buněčných složek



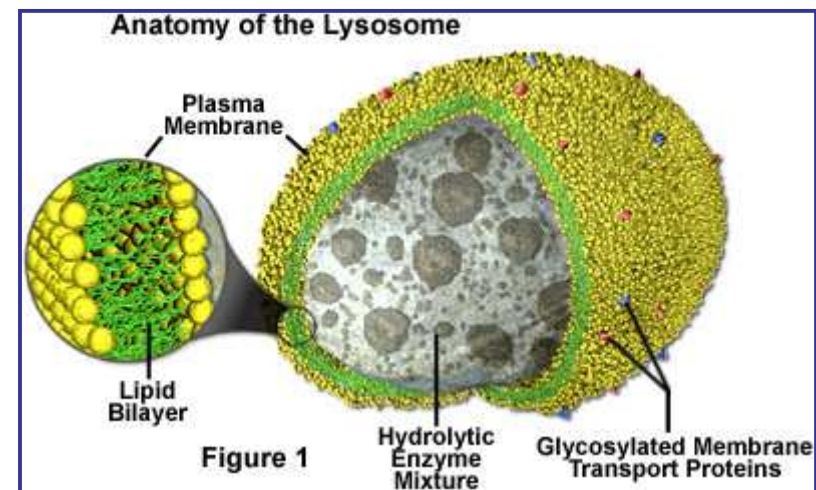
Lysozomy

- enzymová výbava: směs cca 40 **kyselých hydroláz**
- lysozomy poskytují **nízké pH**, při kterém jsou kyselé hydrolázy optimálně aktivní
- podmínkou aktivity hydroláz je jejich štěpení – syntetizují se jako **neaktivní prekurzory** o vyšší molekulové hmotnosti; aktivující štěpení probíhá až v lysozomech



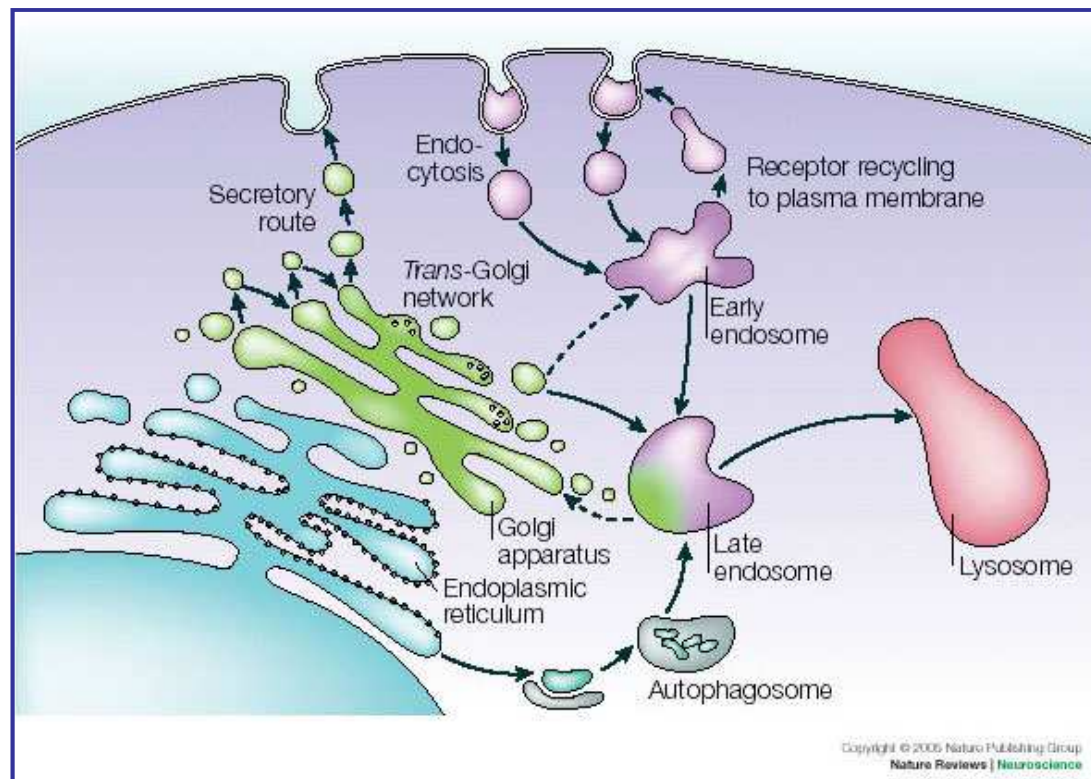
Proteolýza v lysozomech

- **nízké pH** (4-5) je nezbytné pro účinnou degradaci: podmínka aktivity enzymů, pomoc při denaturaci substrátů
- kyselé pH se udržuje **protonovými pumpami**
- **hydrolyzou ATP** se uvolňuje energie, která se využije pro transport H^+
- proteiny lysozomální membrány jsou vysoce **glykosylované**, což zvyšuje jejich odolnost k lysozomálním proteázám
- produkty rozkladu (aminokyseliny, cukry, nukleotidy) se s pomocí transportních proteinů dostávají z lysozomů do cytozolu a mohou se podílet na biosyntetických procesech nebo být vyloučeny ven z buňky



Transport substrátů a enzymů do lysozomů

- pomocí váčků (vezikulů) z vnějšího i nitrobuňčného prostoru
- enzymy jsou syntetizovány v ribozomech hrubého ER a do lysozomů se přenášejí přes Golgiho aparát



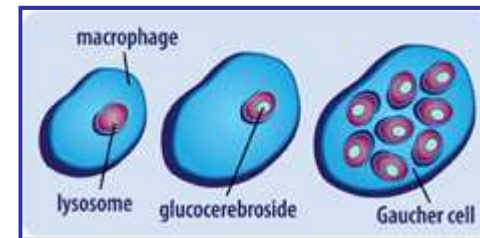


Lysozomy jsou heterogenní

- velikost a tvar značně rozmanité (ostatní orgány uniformní)
- důsledek rozmanitosti rozkládaných substrátů
 - pozůstatky různých mimobuněčných i nitrobuněčných struktur
 - fagocytované mikroorganismy
 - trávení molekul potravy
- po rozložení většiny dodaného materiálu obsahují pouze nedegradovatelné zbytky, které se vyloučí exocytózou
- je známo více než 30 různých genetických **chorob člověka**, které jsou důsledkem mutací v genech lysozomálních enzymů:
nerozložený materiál se v lysozomech hromadí

Gaucherova nemoc

Gaucherova (čti gošérova) nemoc



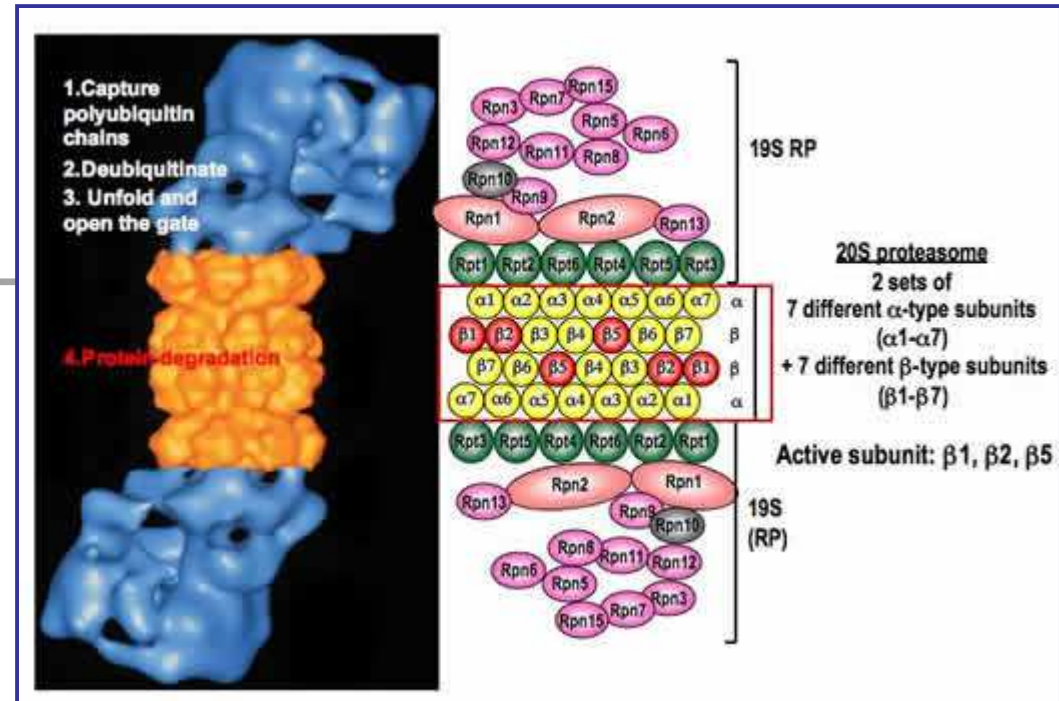
- je dědičně vázané onemocnění, které způsobuje ukládání tukových látek (především glukocerebrosidu) v lidských orgánech (slezina, játra, plíce, kosti, někdy mozek), čímž se zhoršuje jejich fungování
- příčinou je **deficit gluko-cerebrozidázy**, nedegradovaný materiál se v lysozomech hromadí – zvětšování tkání
- léčba: substituční enzymová terapie



Philippe Gaucher
(1854-1918)

Proteazom

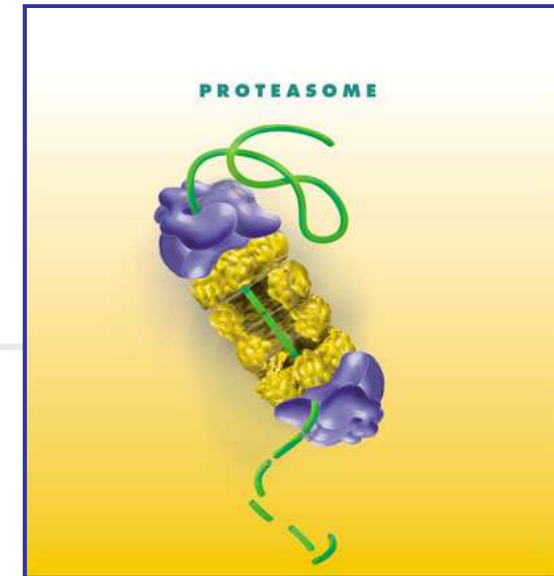
- druhý hlavní buněčný kompartment proteolýzy
- představuje až 1% všech buněčných proteinů



- tvar válce, uvnitř dochází ke štěpení proteinů na malé peptidy
- poklopy ovlivňují přístupnost válce pro substráty
- substráty jsou abnormální a špatně složené proteiny + normální proteiny označené k likvidaci

Proteazomy

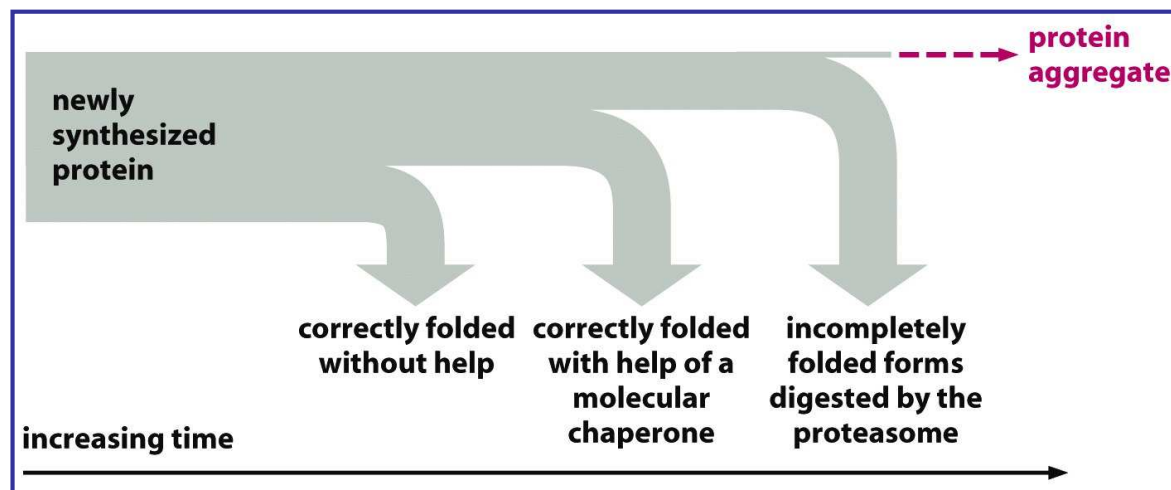
- přítomny v jádře i cytozolu
- sestaveny z mnoha proteinových podjednotek
- regulační systémy ovládají otevření „poklopů“ a umožňují tak vstup pouze vybraným molekulám
- podmínkou přenosu molekul do proteazomu je jejich modifikace připojením malého polypeptidu – ubikvitinu – k lyzinovým zbytkům
- nutná energie ATP



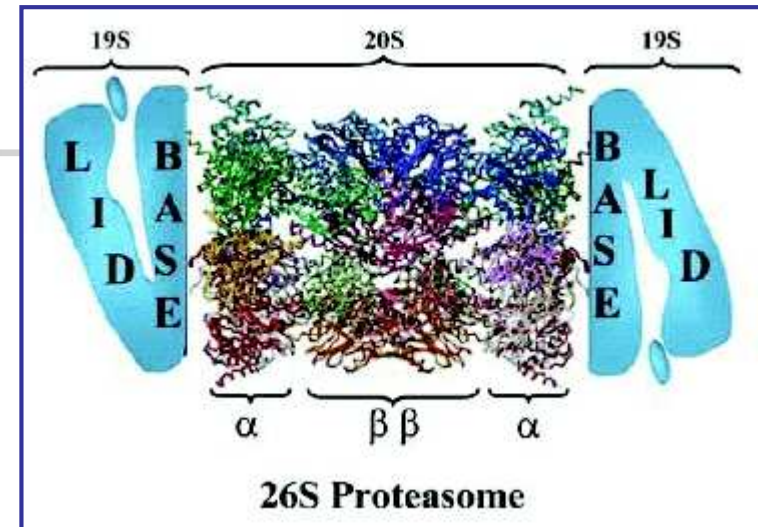
Proteazom

a kontrola kvality proteosyntézy

- proteosyntéza většinou produkuje řádně složené proteiny
- neúplně složené proteiny jsou zacíleny **chaperony** díky obnaženým hydrofobním sekvencím a buňka se snaží zajistit, aby dosáhly správné konformace
- nesložené proteiny se likvidují v proteazomu
- nesprávná funkce proteazomu: proteiny s obnaženými hydrofobními úseky agregují a narušují funkce tkání



Proteazom 26S



- ATP-dependentní komplex proteáz
- katalyzuje rozvolnění a proteolytický rozklad svých substrátů
- složen z katalytického komplexu 20S, který je obklopen dvěma regulačními komplexy 19S

Struktura proteazomu

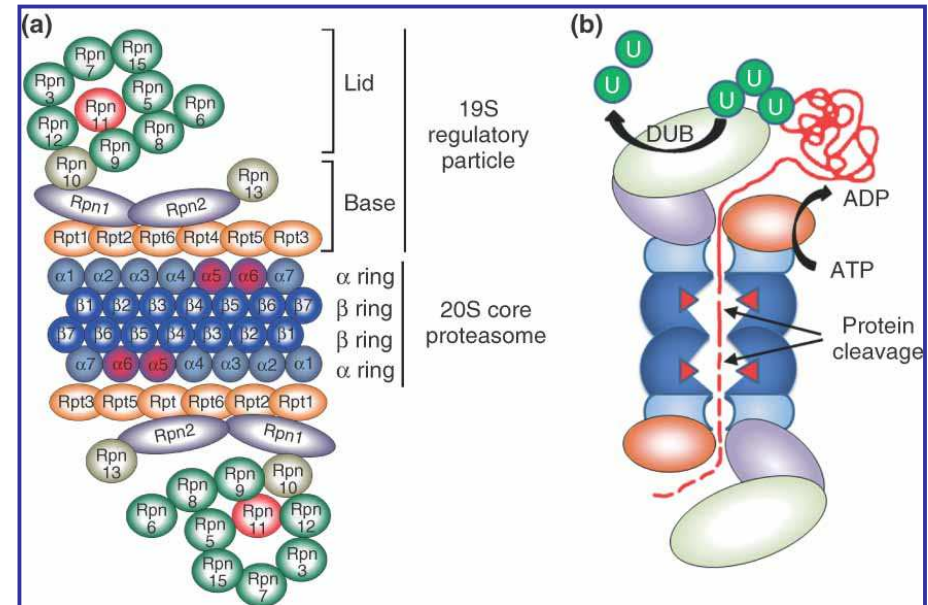
Podjednotka 20S (jádro):

- válec složený ze čtyř kruhů (2x α , 2x β)

- vnitřní komora přístupná pouze otvory na obou koncích

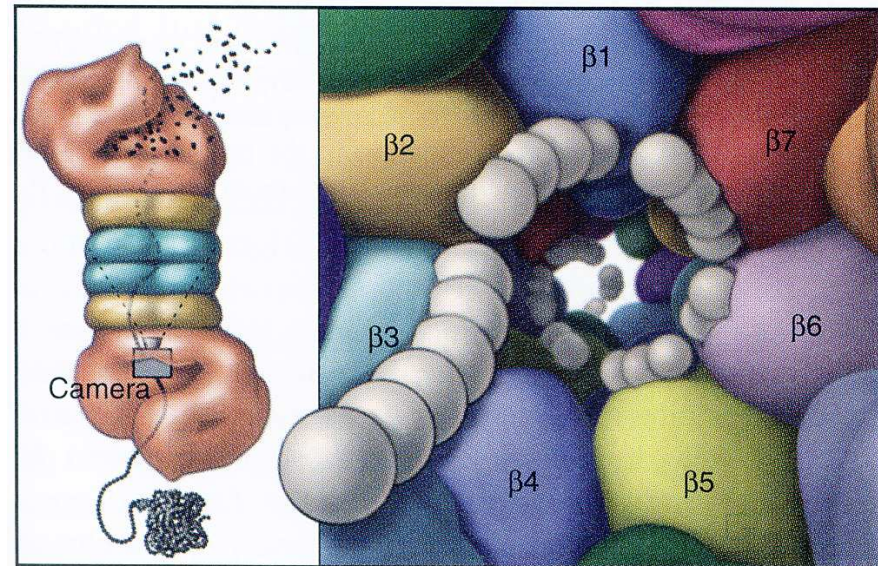
- aktivní místa pro proteolýzu soustředěna v podjednotkách β

- β 1 štěpí kyselé zbytky (caspase-like activity)
- β 2 štěpí zásadité zbytky (trypsin-like activity)
- β 5 štěpí hydrofobní zbytky (chymotrypsin-like activity)



Jádro proteazomu (20S)

- podjednotky α nemají katalytickou aktivitu, účastní se translokace substrátu do proteolytické komory
- vlastní hydrolýza molekul substrátu na malé peptidy je zajišťovaná podjednotkami β a nevyžaduje ATP
- ATP je potřeba pro rozvinutí proteinů, aby se do úzkého prostoru válce mohly dopravit



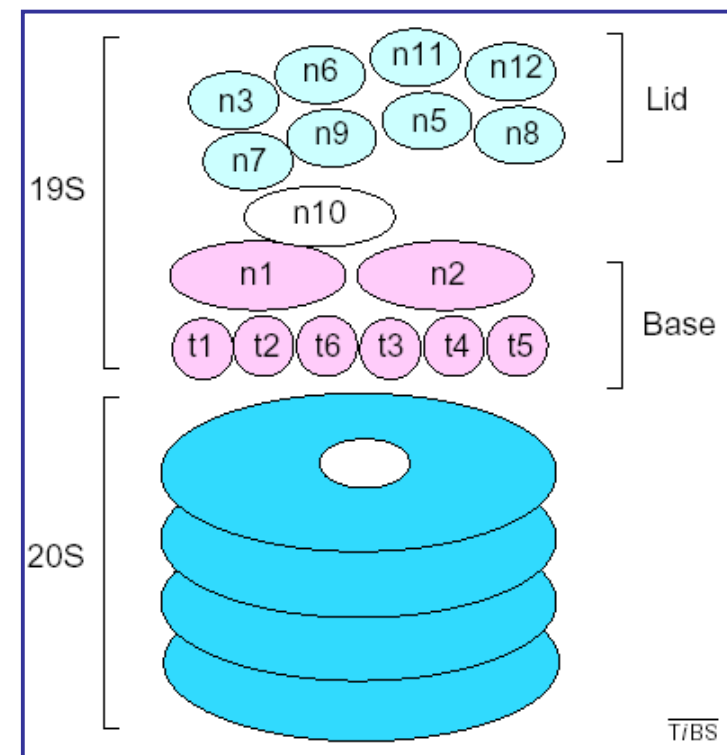
Struktura proteazomu: podjednotka 19S

obsahuje víko („lid“) a základnu („base“)

regulační funkce: rozeznávají a rozplétají substrátové proteiny

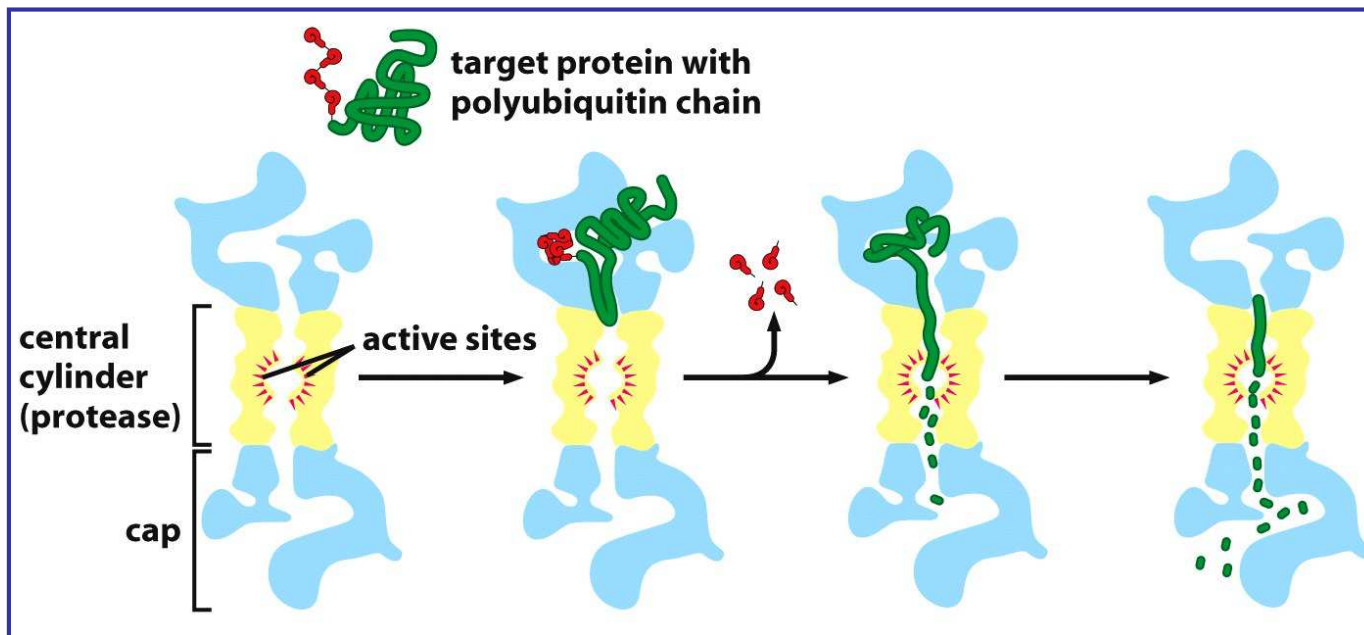
Složeny z 15-20 jednotek:

- jednotky n1-n12 bez ATPázové aktivity tvoří poklop: rozeznávají ubiquitinem označené proteiny a odstraňují ubiquitinové značky pro recyklaci
- ATPázy t1-t6 tvoří základnu: zajišťují rozplétání proteinů a jejich transport do podjednotky 20S



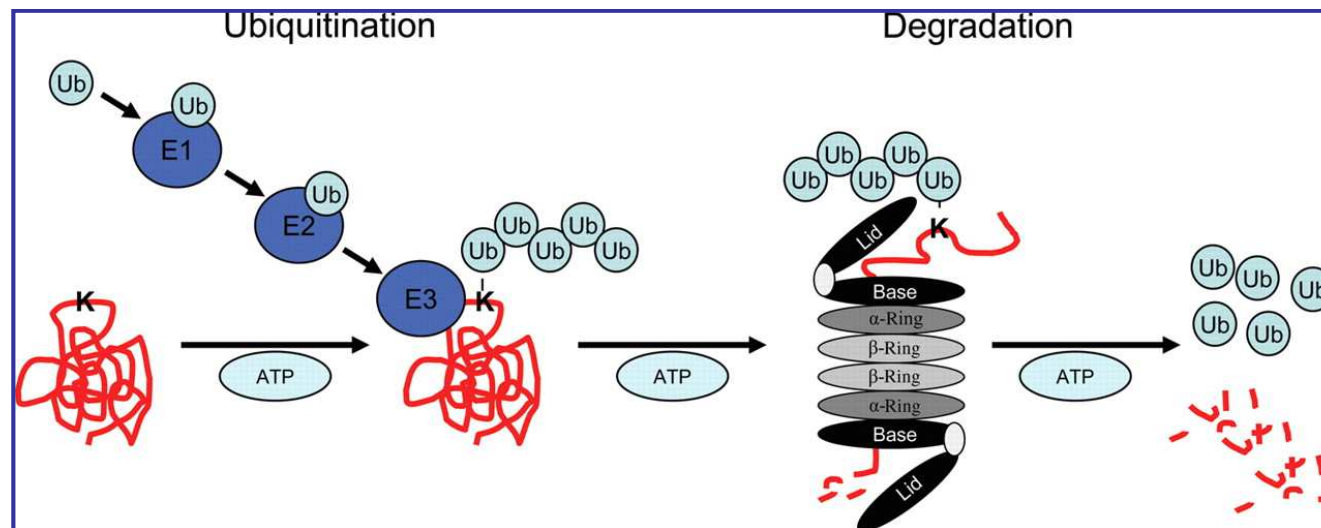
Postupný rozklad proteinů v proteazomu

- víko proteazomu rozeznává příslušný substrát
- substrát se rozplétá a za spotřeby ATP se translokuje do válce; v rané fázi se odštěpuje ubikvitin pro recyklaci
- hydrolýza je důkladná: na malé peptidy



Značení proteinů pro proteazomovou likvidaci

- regulačním prvkem je vstup do válce proteazomu
- substráty, kterým má být povolen vstup do proteozomu se opatří specifickou značkou (protein-tagging) – **ubikvitinem**
- ubikvitin se k cílovém proteinu připojuje kovalentní vazbou pomocí specifických enzymů





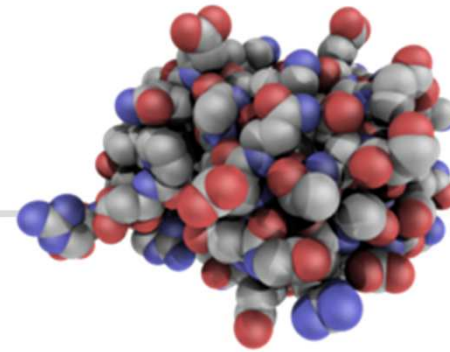
Významné cíle proteazomové degradace

- regulátory buněčného cyklu a růstu
- složky buněčných signálních kaskád
- transkripční faktory
- enzymy zapojené do metabolických reakcí
- varianty proteinů vytvořené v důsledku mutace nebo defektní proteosyntézy
- antigeny hlavního histokompatibilitního komplexu třídy I

vyřazení funkce proteazomu je pro buňky letální



Ubikvitin

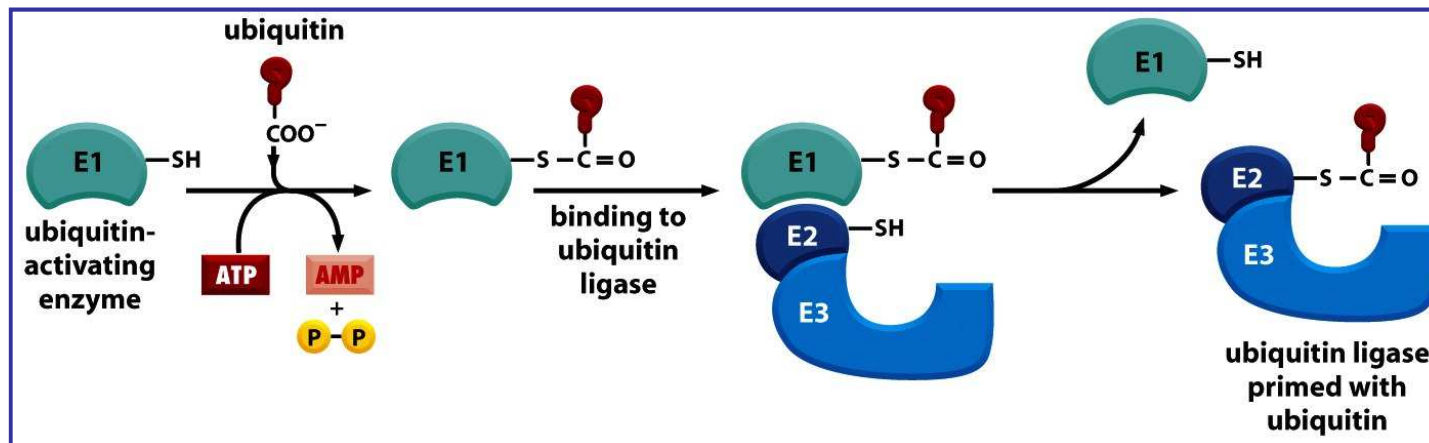


- protein o nízké molekulové hmotnosti (76 AK)
- kompaktní globulární struktura
- evoluční konzervativnost
- vyskytuje se ve všech tkáních všech eukaryotických organismů
- v buňce se vyskytuje jako volná molekula nebo kovalentně připojená k jiným proteinům
- váže se k aminoskupině lyzinu cílového proteinu
- vazbou dalších molekul ubikvitinu vzniká polyubikvitinový řetězec, který je vstupenkou do proteazomu

Značení molekul ubikvitinem

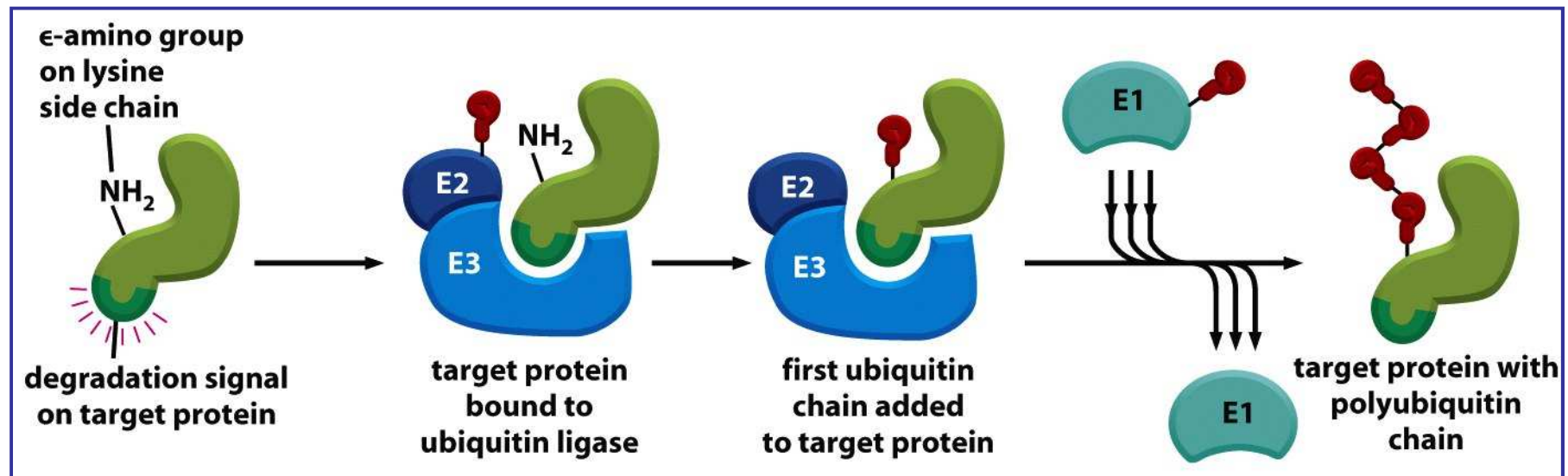
aktivace ubikvitinu

- katalyzovaná ubikvitin-aktivujícím enzymem E1
- reakce je závislá na ATP
- výsledkem je ubikvitin připojený svým C-koncem k proteinu E1
- následně se ubikvitin přenáší z E1 na ubikvitin-konjugující enzym E2
- enzym E2 funguje v komplexu s enzymem E3; tento komplex se označuje jako **ubikvitin-ligáza**



Značení molekul ubikvitinem

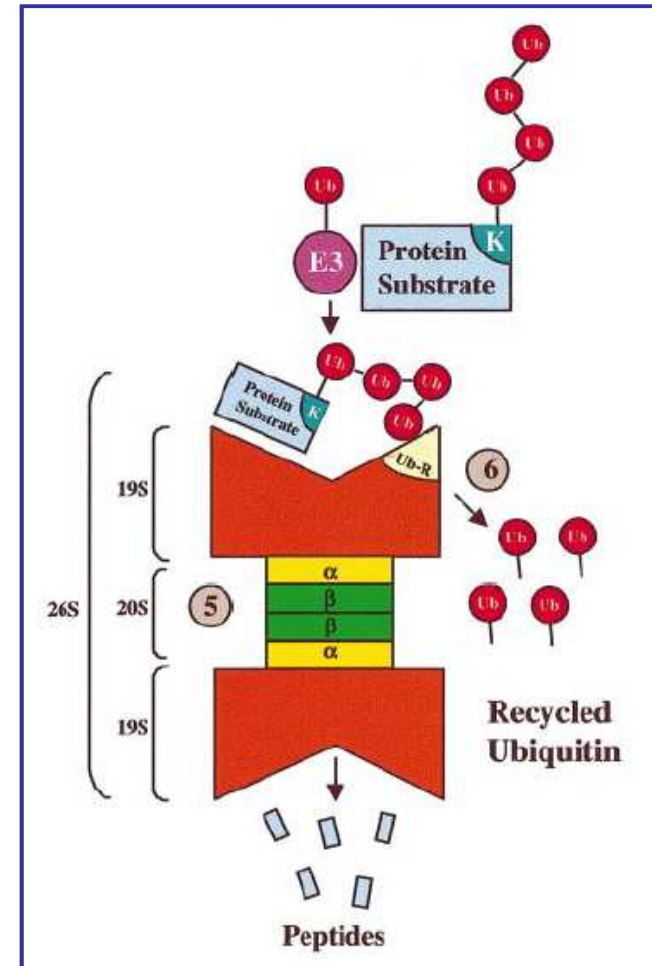
- u savců existují stovky ubikvitin-ligáz, které rozeznávají degradační signály (tzv. degrony) na cílových proteinech prostřednictvím části E3 - **rozeznání substrátu**
- **ubikvitin-ligázy zajišťují** vznik polyubikvitinových řetězců připojených k lysinu cílového proteinu



Proteiny s navázaným Ub podléhají degradaci v proteazomu

Průběh:

- vazba substrátu označeného poly-Ub k Ub-receptorové podjednotce **proteazomu**
- odštěpení Ub prostřednictvím **izopeptidáz** vázaných na poklop
- rozvinutí a translokace substrátu do válce proteazomu
- degradace substrátu na malé peptidy



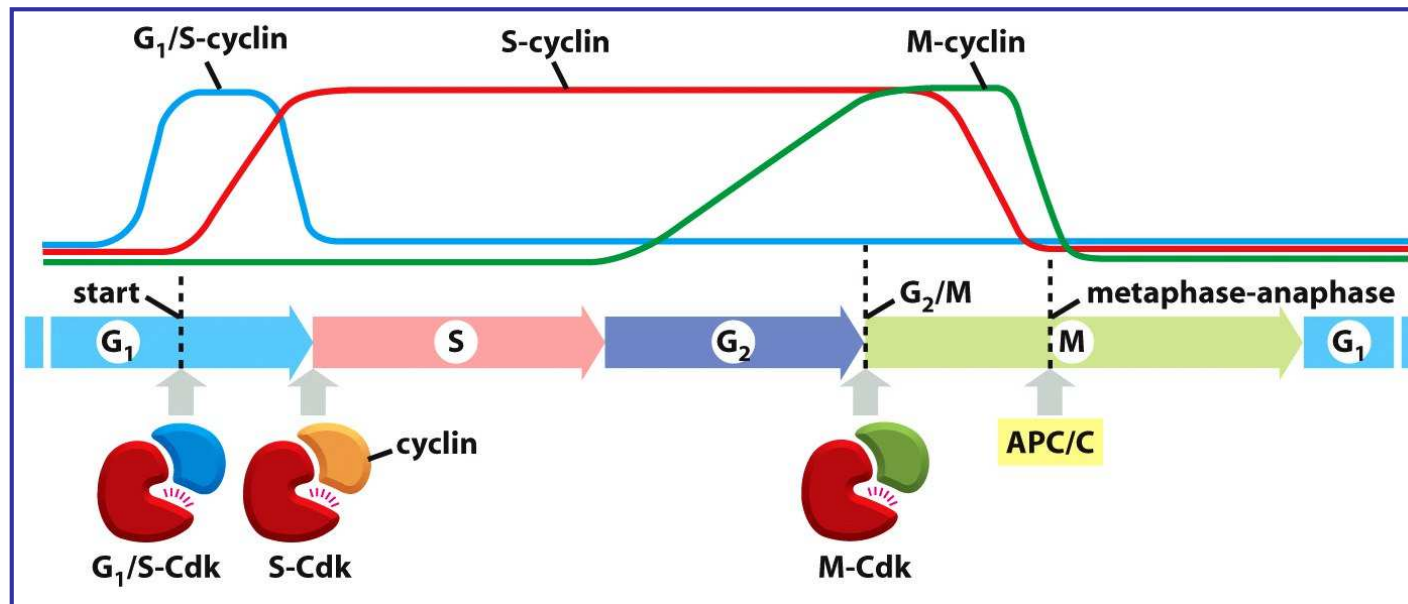


Řízená destrukce proteinů - příklady

- likvidace **špatně složených** nebo jinak abnormálních proteinů
- likvidace **normálních proteinů**, jejichž poločas rozpadu je z nějakého důvodu potřeba zkrátit (např. v souvislosti se změnou stavu buňky, buněčným cyklem, apod.)
- existují proteiny s přirozeně krátkým poločasem rozpadu, jiné se rychle rozkládají jen podmíněčně, jinak jsou stabilní
- např. cykliny se v určité fázi buněčného cyklu rychle rozkládají

Aktivita komplexů cyklin-CDK

- koncentrace cyklinů kolísá v průběhu cyklu
- koncentrace CDK je stabilnější, ale jejich aktivita je bez cyklinu nulová
- cykliny spolurozhodují o výběru substrátu pro fosforylaci kinázou CDK



Cykliny a fáze cyklu

- **Cyklin fáze G1: cyklin D**
- **Cyklin fáze G1/S: cyklin E**
- **Cyklin fáze S/G2: cyklin A**
- **Cyklin fáze M: cyklin B**

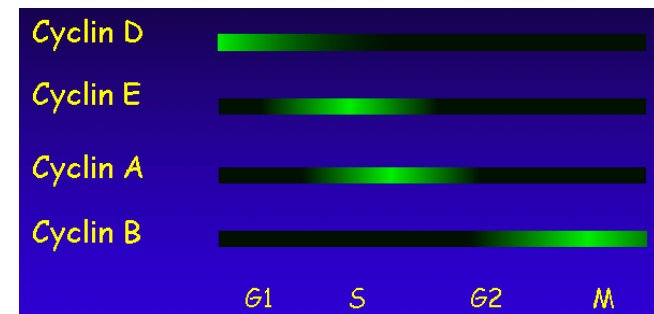


Table 17–1 The Major Cyclins and Cdks of Vertebrates and Budding Yeast

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).

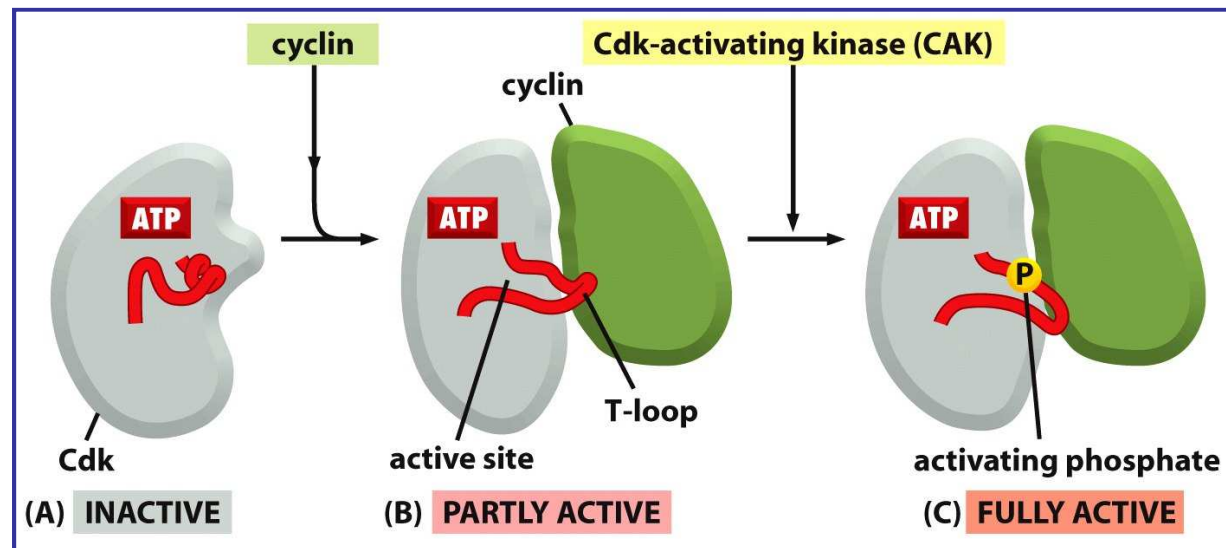
** The original name of Cdk1 was Cdc2 in both vertebrates and fission yeast, and Cdc28 in budding yeast.

Tři funkční stavy Cdk

A) inaktivní - bez cyklinu, aktivní místo Cdk je blokováno částí proteinu zvanou T-smyčka

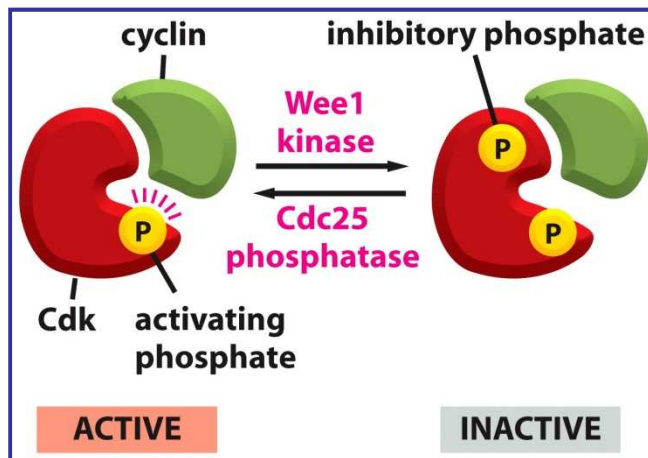
(B) částečně aktivní - po navázání cyklinu opouští T-smyčka aktivní místo Cdk a částečně jej tak aktivuje

(C) plně aktivní - fosforylace treoninu T smyčky Cdk kinázou CAK (Cdk-activating kinase): konformační změna, zvýšení afinity pro příslušné substráty



Regulace aktivity Cdk: fosforylace

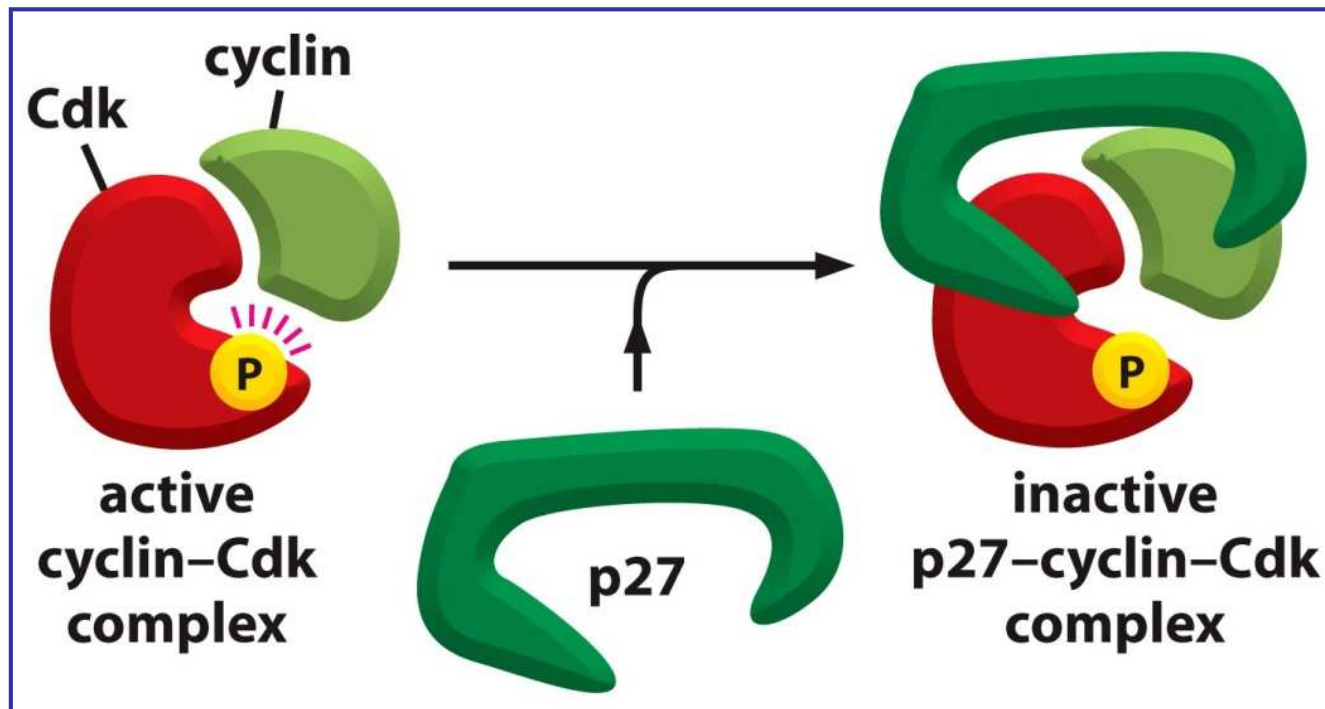
- vazba cyklinů primárně určuje aktivitu Cdk
- pomocné mechanismy přispívají jemné regulaci aktivity Cdk:
 - fosforylace dvojice aminokyselin v blízkosti aktivního místa **kinázou Wee1** inhibuje aktivitu komplexu cyklin/Cdk
 - defosforylace těchto aminokyselin **fosfatázou Cdc25** zvyšuje aktivitu komplexu cyklin/Cdk
 - další aktivační fosfát přidává **CAK** na T smyčku



Kináza Wee1 – inhibuje komplexy cyklin Cdk
Fosfatáza Cdc25 – aktivuje komplexy cyklin-Cdk

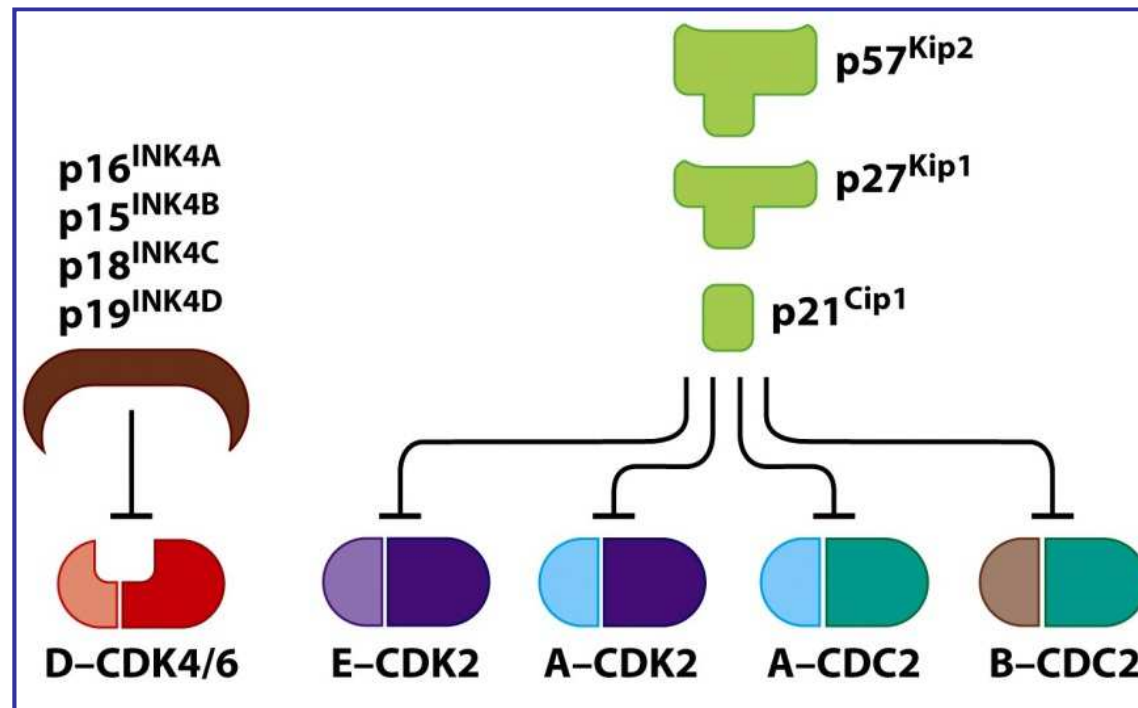
Regulace aktivity Cdk: inhibiční proteiny CKI

- vážou se na komplexy cyklin/Cdk a inhibují je v důsledku změny konformace aktivního místa Cdk



Inhibitory CDK: rodina Cip/Kip

- tři členové u savců: p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}
- p21 se indukuje při poškození DNA pomocí proteinu p53, pozastavuje cyklus ve fázích G1 a G2

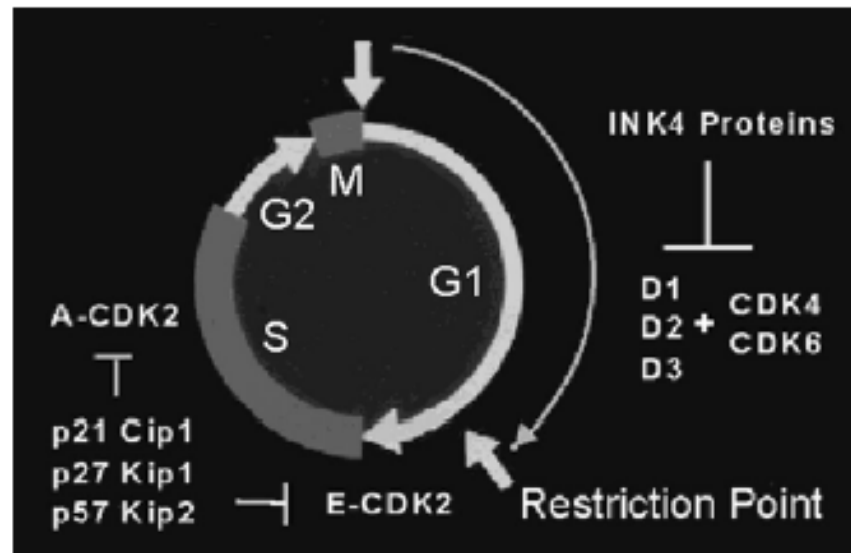


Inhibitory CDK: rodina INK4

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

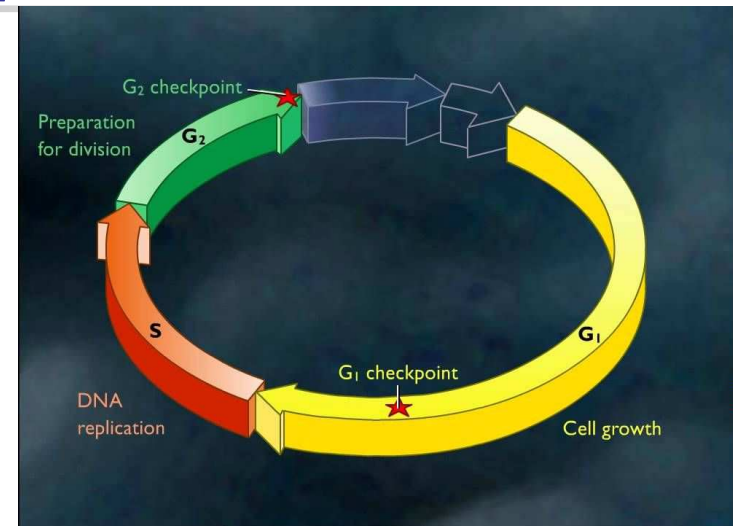
Společné znaky:

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



Kontrolní body cyklu- molekulární brzdy

- Kontrolují :
 - iniciaci fáze S
 - iniciaci mitózy
 - rozdělení dceřiných chromozomů v anafázi
 - začátek telofáze a cytokineze
 - celistvost DNA
- zajišťují, aby hlavní události cyklu probíhaly v pevně daném pořadí
- sensory sledují klíčové děje cyklu a poskytují řídicímu systému zpětnou vazbu
- je-li zaznamenána chyba, řídicí systém prodlouží danou fází, aby chyba mohla být opravena
- zajišťují extrémní přesnost buněčného dělení (příjem správného počtu řádně replikovaných chromozomů dceřinou buňkou)



Checkpoints in the Cell Cycle

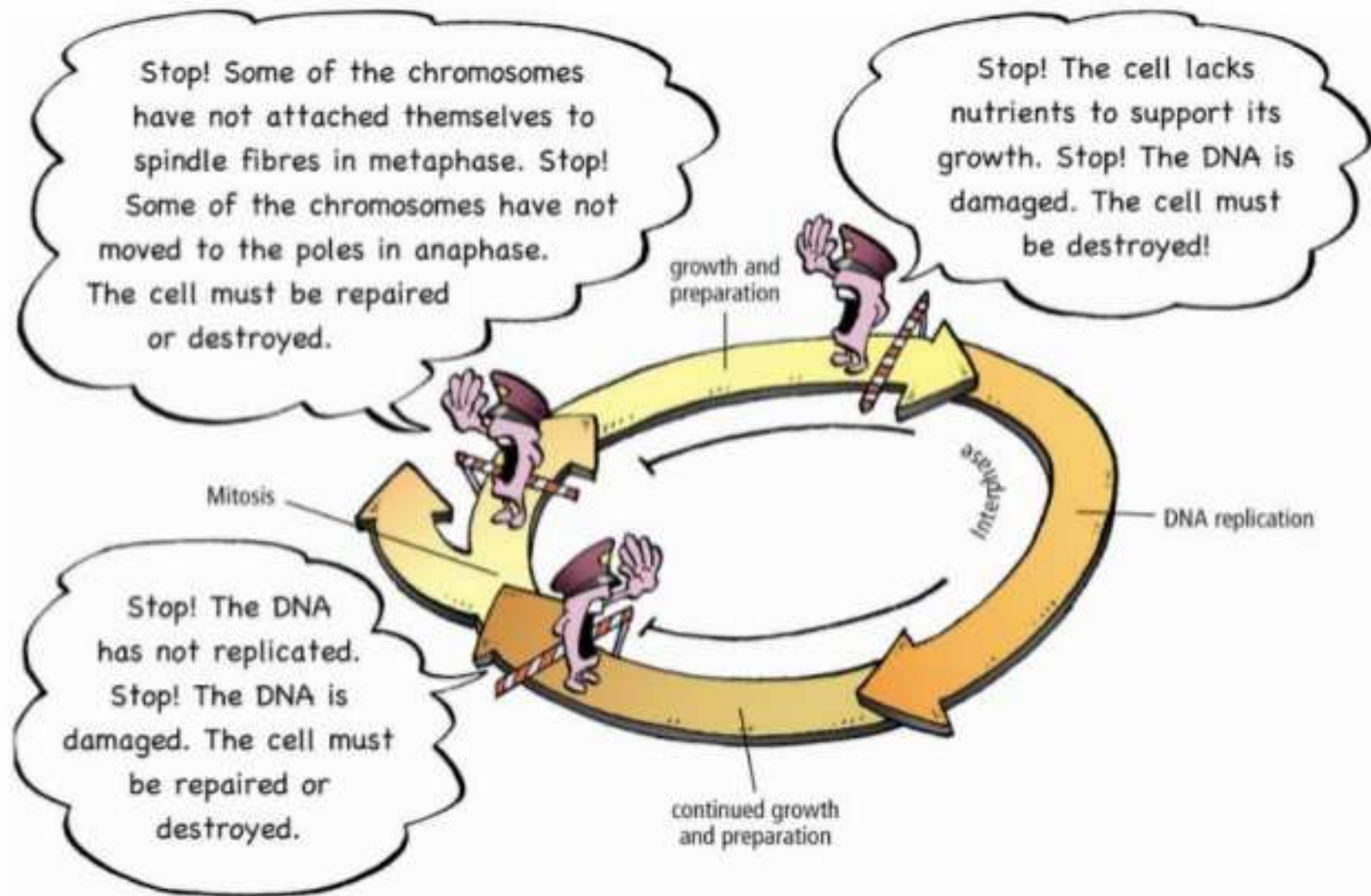


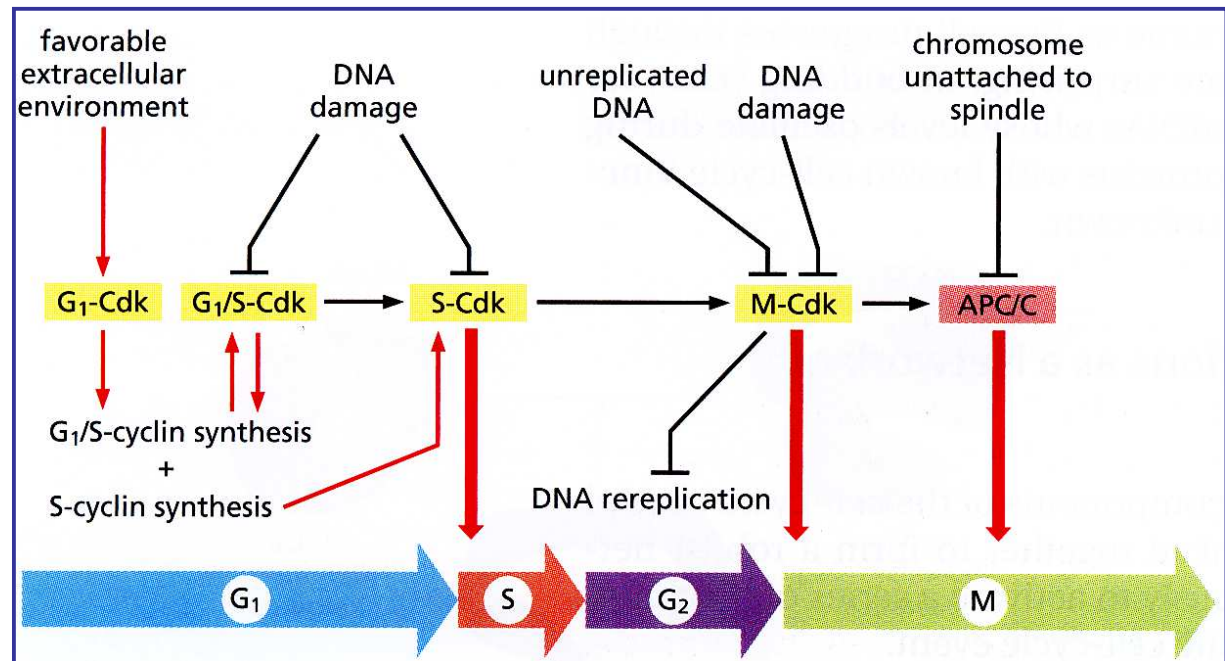
Figure 5.11 Checkpoints in the cell cycle

Princip fungování kontrolních bodů

- kontrolují aktivity komplexů cyklin-CDK a ubikvitinligáz SCF a APC/C

různé mechanismy:

- regulace syntézy a degradace cyklinů
- fosforylace CDK v inhibičních a aktivačních místech
- regulace syntézy a stability inhibitorů CDK



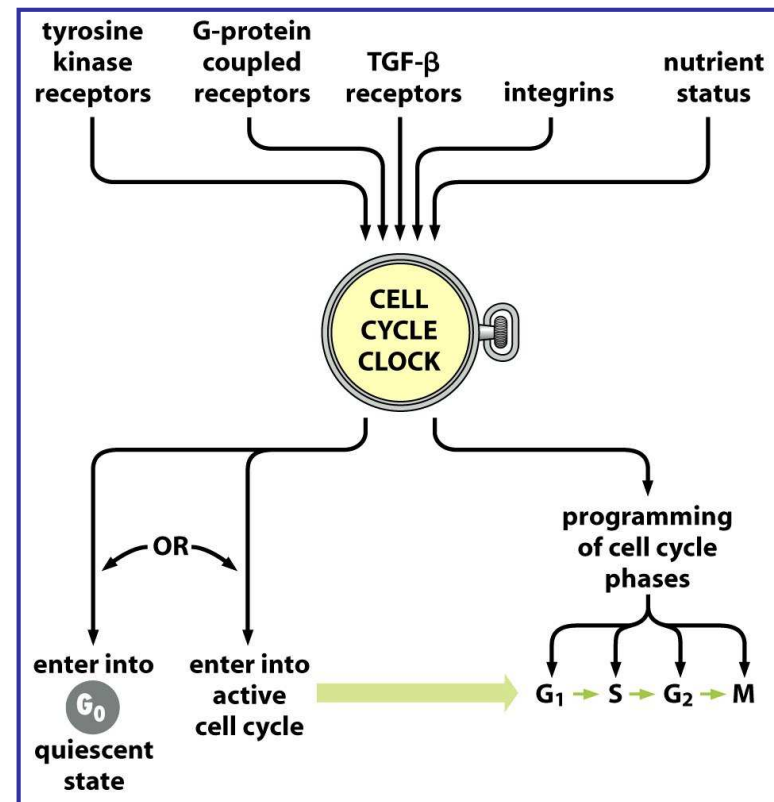
Buněčný cyklus reaguje na signály z vnějšího i vnitřního prostředí

Vnější podněty:

- signální molekuly
- živiny a růstové faktory

Vnitřní podněty:

- stupeň dokončení předchozích fází
- poškození DNA

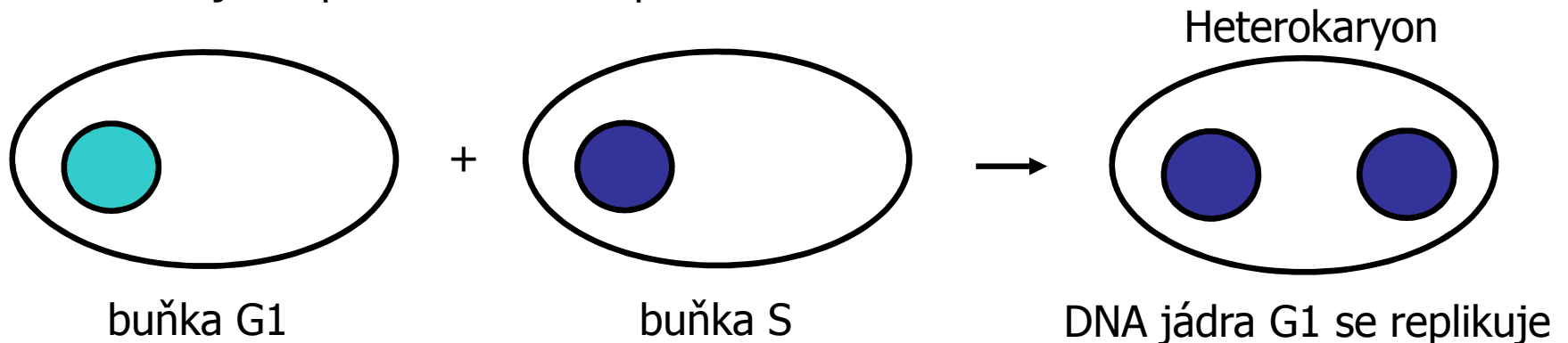


Na základě těchto podnětů může být buněčný cyklus pozastaven.

Důkaz existence regulátorů cyklu: fúze savčích buněk

(Johnson a Rao, 1970)

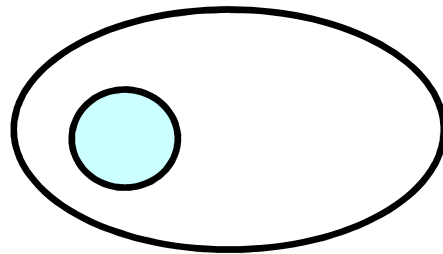
- spojení buněk v různých fázích cyklu: G1 + S
- sledován průběh replikace DNA inkorporací značeného tymidinu
- značka se objevila v DNA buňky fáze G1 i S: buňka ve fázi G1 zahájila replikaci okamžitě po fúzi



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

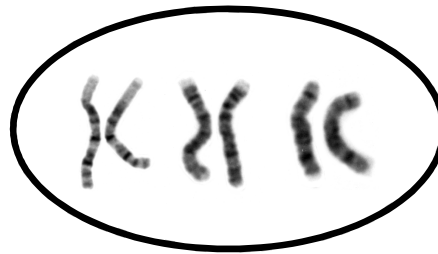
Důkaz existence regulátorů cyklu: fúze savčích buněk

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



buňka G1, G2 nebo S

+

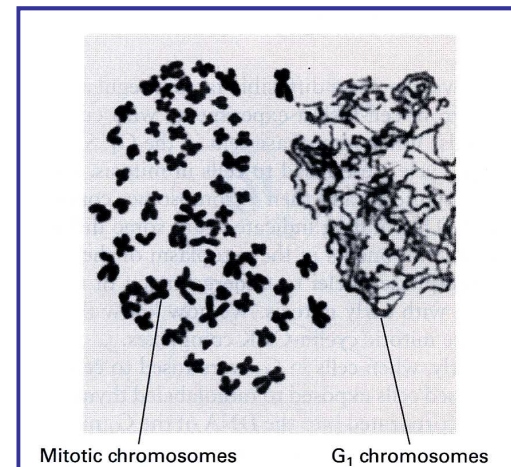


buňka M

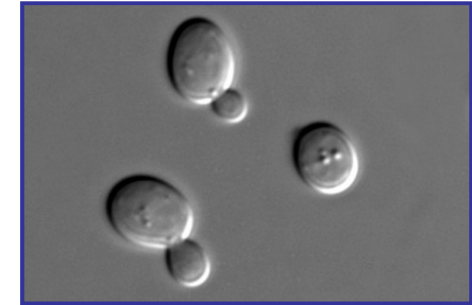


retrakce jaderné membrány,
chromozomy kondenzují

Závěr: v M-fázové buňce existuje faktor, který indukuje mitózu



Výzkum buněčného cyklu u kvasinek



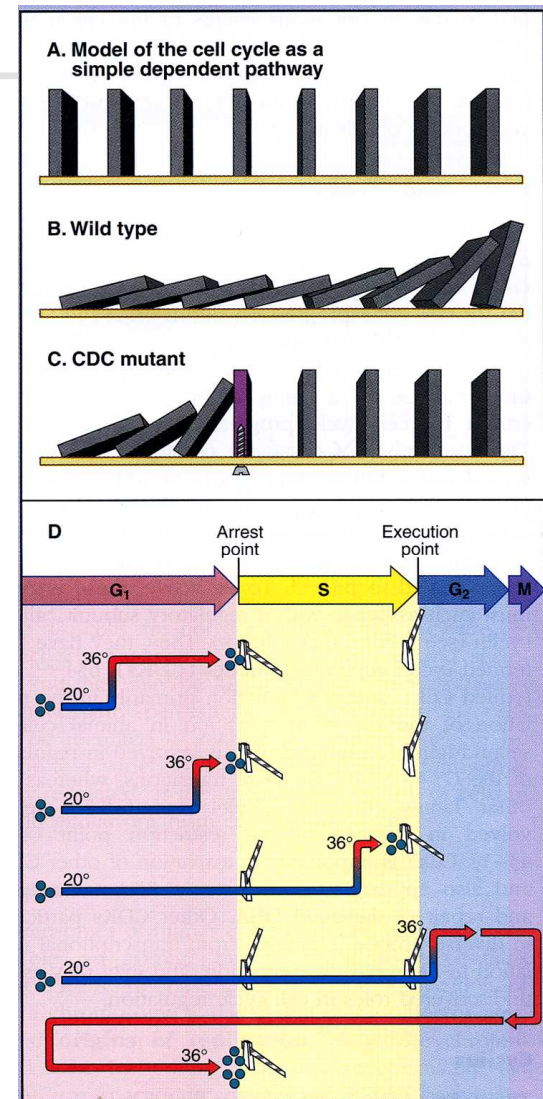
Výhody kvasinkového modelu

- dostupnost údajů o **sekvenci genomu**
- **haploidní status** - usnadnění genetických analýz
- **snadná kultivace**, vysoká rychlost cyklu
- **snadné vizuální vyhodnocení fáze buněčného cyklu** mikroskopickou analýzou morfologie buněk:
 - u pučících kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) nepřítomnost pupene – značí fázi **G1**, přítomnost pupene menšího než u rodičovské buňky – značí fázi **S**, přítomnost pupene podobné velikosti jako u rodičovské buňky – značí fázi **G2**
 - u štěpících se kvasinek (*Schizosaccharomyces pombe*) lze na fázi cyklu usuzovat z délky buněk

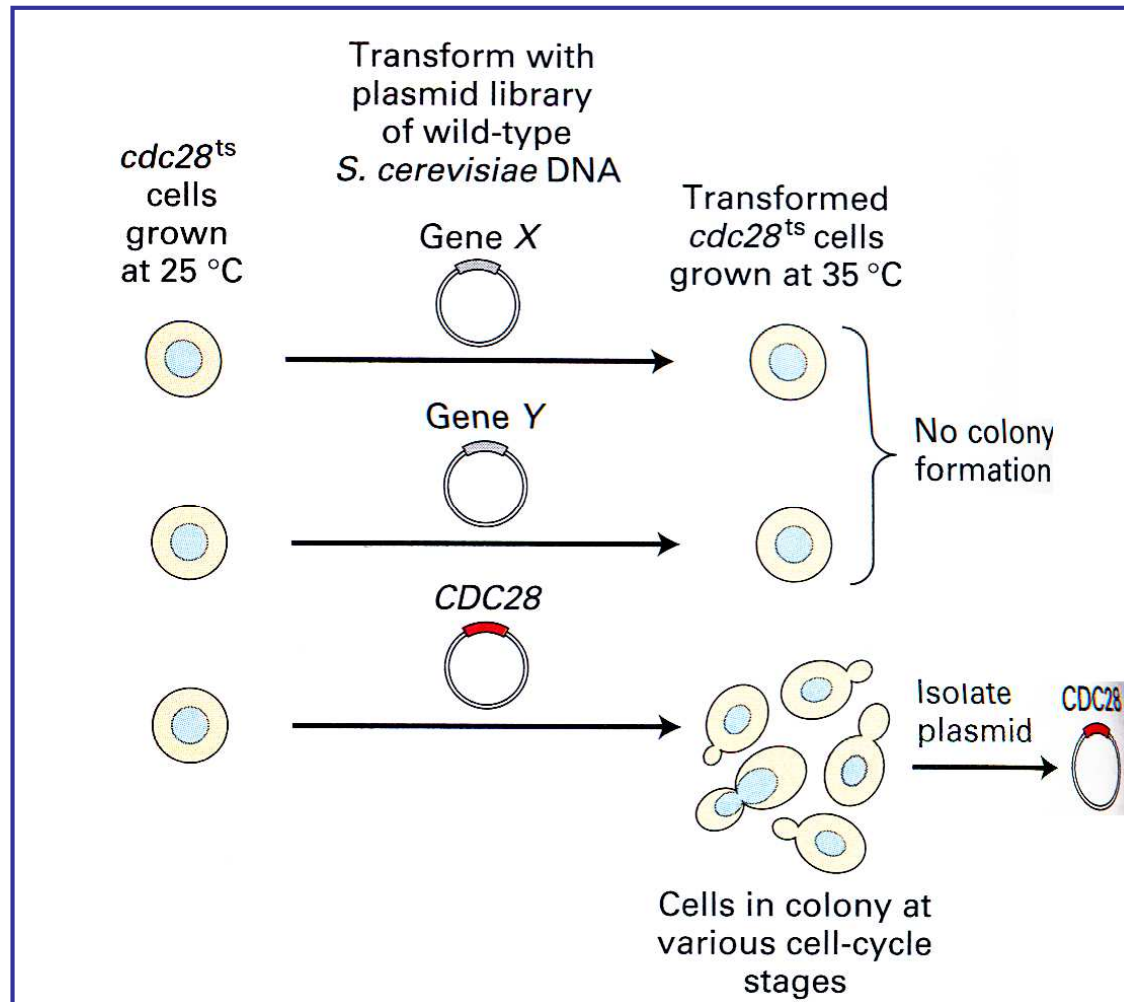
Kvasinky: buněčný cyklus je sled navazujících fází

- 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

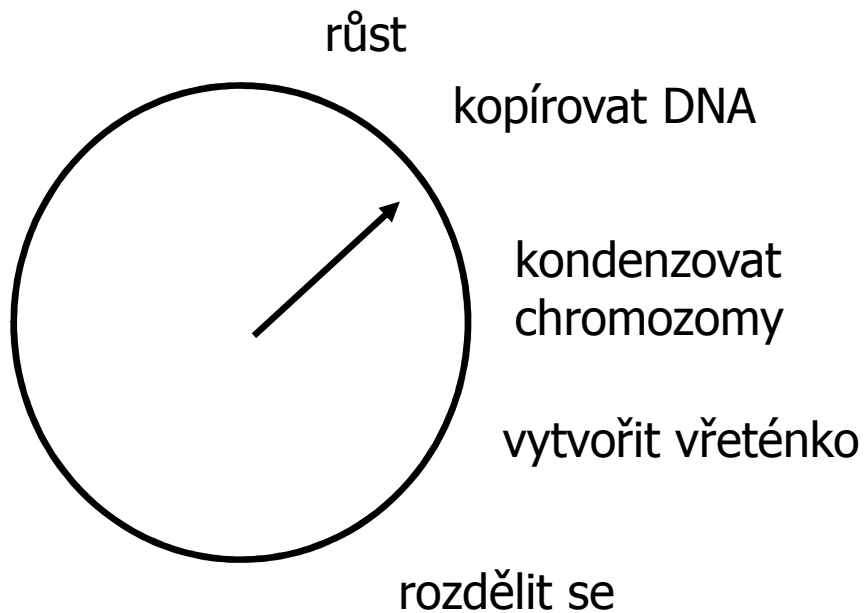
Geny *cdc* jsou esenciální, proto kvasinky defektní v *cdc* nejsou životaschopné – připraveny podmíněčně letální mutanti



Identifikace genů řídících cyklus



Buněčný cyklus krok za krokem



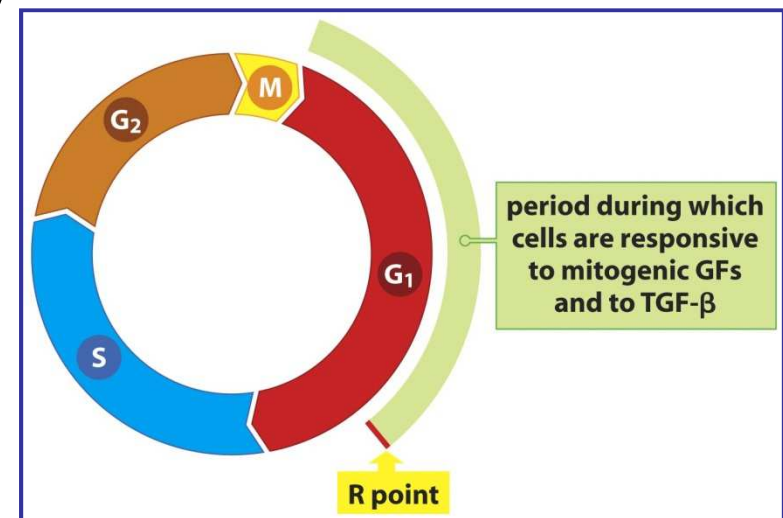


Fáze G1

- nejdelší a nejvariabilnější
- biosyntetické procesy, sestavování organel
- monitorování vnějších a vnitřních podmínek před zahájením S-fáze
- dostatek živin a růstových faktorů: růst buňky, vysoká metabolická aktivita
- nedostatek živin nebo anti-proliferační signál: zpomalení postupu fází G1 nebo opuštění cyklu do fáze G0
- na konci kontrolní **bod restrikce/Start**

Fáze G1

- buňka schopna reagovat na **mimobuněčné signály: mitogenní a anti-mitogenní (TGF- β) růstové faktory**
- růstové faktory přítomny a protirůstové nepřítomny: překonání bodu restrikce do další fáze
- S-fáze probíhá i za nepřítomnosti růstových faktorů
- stejnému signálu jsou vystaveny sousedící buňky – koordinace



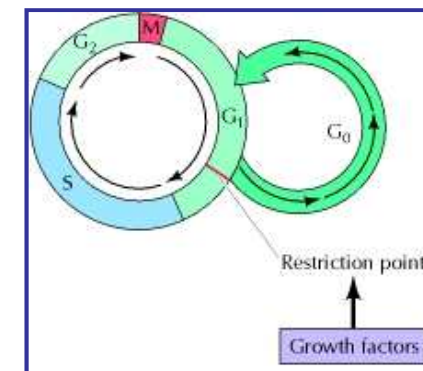
Fáze G0

- fáze, ve které se nachází většina buněk mnohobuněčných organismů: jsou diferencované a specializované k výkonu určité funkce, nedělí se
- možnost opětného vstupu do buněčného cyklu po přijetí prorůstového signálu

Neurony a buňky kosterního svalstva jsou **terminálně diferencované (fáze G0)** - exprese genů nutných pro buněčný cyklus je zcela vypnuta; opětné nastartování cyklu téměř nemožné

Jaterní buňky: udržují schopnost rychlého obnovení funkcí cyklu, např. v případě poranění

Fibroblasty a lymfocyty: přecházejí do G0 a znovu se vracejí do cyklu několikrát během svého života





Návrat do cyklu z fáze G0

- přidání růstových faktorů aktivuje transkripci genů ve dvou fázích: **geny okamžité reakce** (early-response genes) a **geny opožděné reakce** (delayed-response genes)
- transkripce raných genů se indukuje během minut (např. *jun*, *fos*, *myc*)
- exprese genů opožděné reakce závisí na produktech genů okamžité reakce (např. cyklin D)

Proteiny E2F

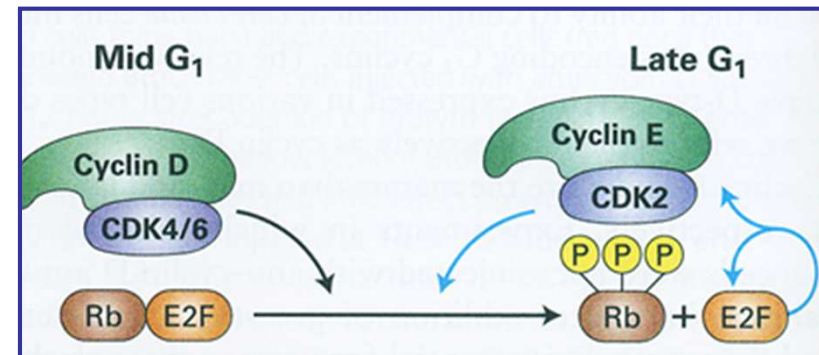
- E2F jsou transkripční faktory, které aktivují expresi genů kódujících proteiny pro replikaci DNA, cykliny pozdní fáze G₁, S a CDK fáze S

Nepřítomnost mitogenů:

- exprese genů řízených E2F je znemožněna interakcí mezi E2F a proteinem Rb

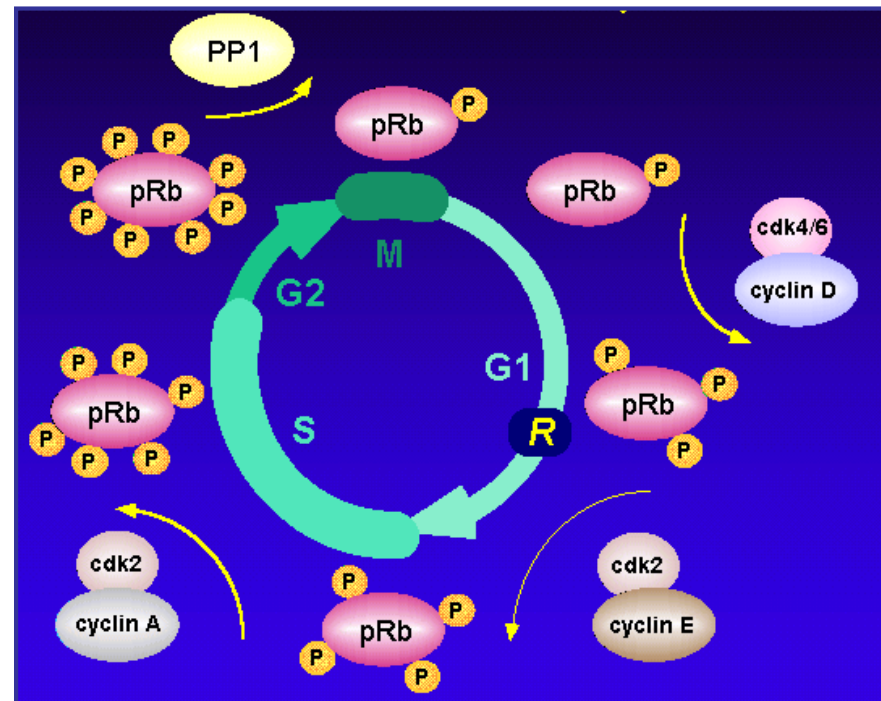
Přítomnost mitogenů:

- G₁-CDK fosforyluje Rb
- tím se uvolní vazba Rb-E2F
- E2F následně zajistí expresi cílových genů



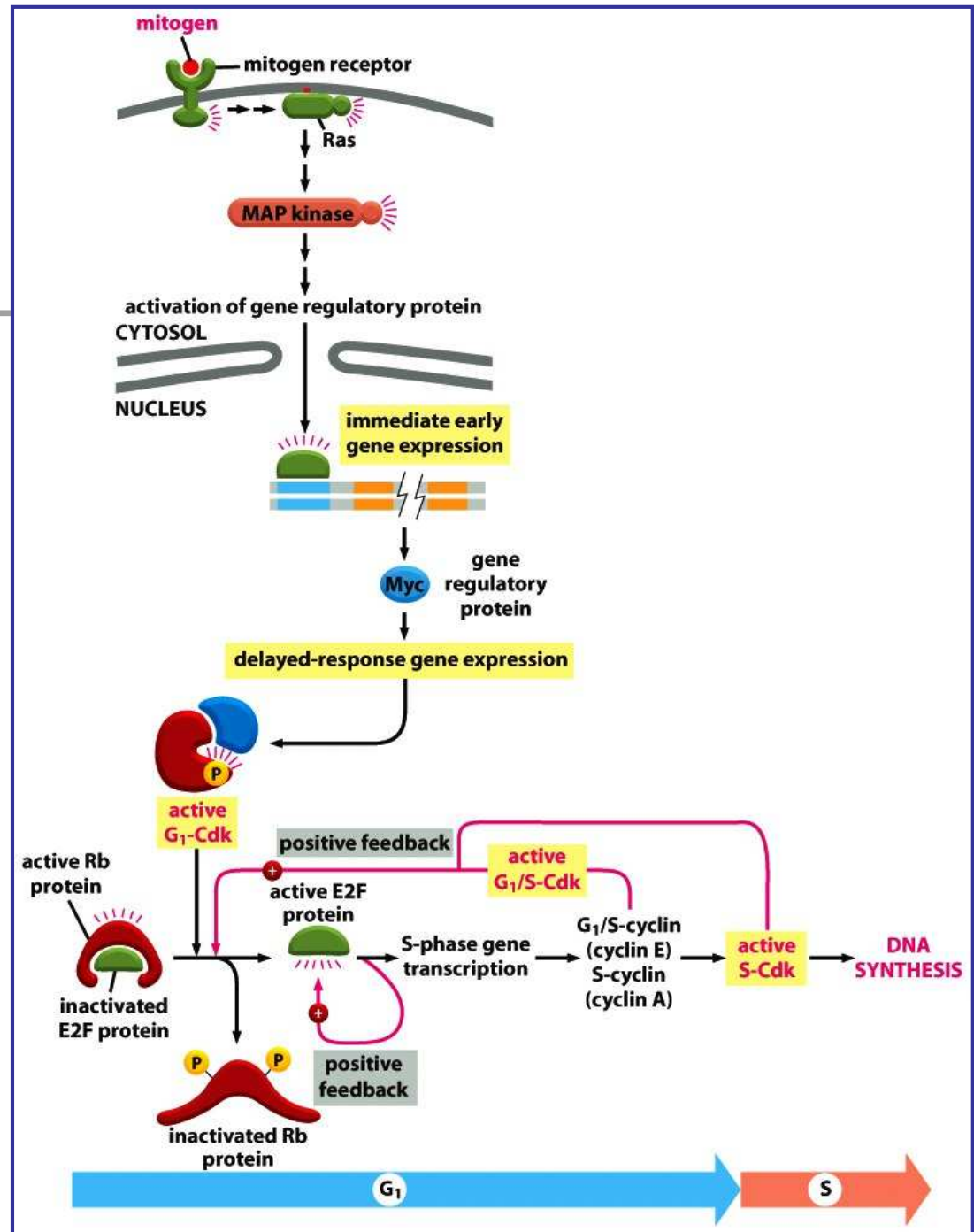
Přechod bodu restrikce: účast Rb

- Rb protein je jedním z nejdůležitějších substrátů komplexů cyklin-CDK fáze G1
- fosforylace Rb brání jeho asociaci s E2F – následkem je posun do fáze S
- fosforylace Rb se v průběhu cyklu dále zvyšuje
- fosfatázou PP1 přechází Rb zpět do hypofosforylovaného stavu ve fázi G2



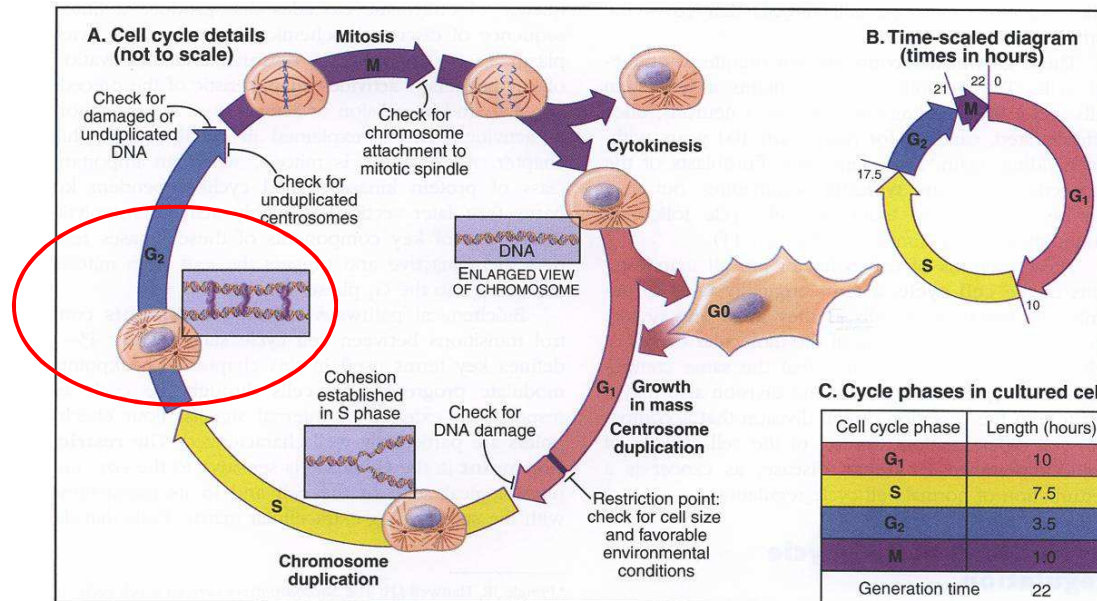
Mitogeny

- prorůstové signální molekuly, které nitrobuněčnými signálními kaskádami aktivují **geny okamžité reakce**
- produkty genů okamžité reakce aktivují **geny opožděné reakce** (např. cyklin D)
- cyklin D/CDK fosoryluje Rb
- pozitivní zpětné vazby: E2F posiluje transkripci vlastního genu; G1/S-Cdk a S-Cdk zvyšují fosorylaci Rb



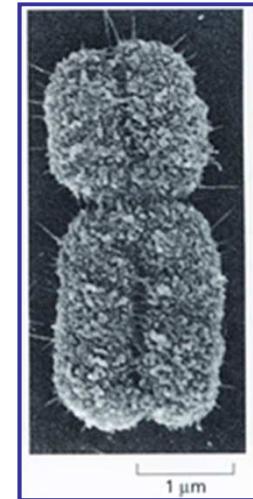
Fáze G2

- buňka má dvojnásobný obsah DNA než v G1
- sesterské dvoušroubovice drženy v komplexu **kohezinem**
- kontrola celistvosti DNA a příprava mitózy
- v případě, že je nalezena nereplikovaná nebo poškozená DNA, nebo nedošlo k duplikaci centrozomu kontrolní body znemožní zahájení mitózy



Kondenzace chromatid

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





M-Cdk

jediná kináza zajišťující všechny procesy mitózy:

- sestavení vřeténka
- připojení sesterských chromatid k opačným pólům
- kondenzaci chromozomů do tyčinkovitých struktur
- degradaci jaderné membrány
- změna uspořádání aktinových vláken, atd.



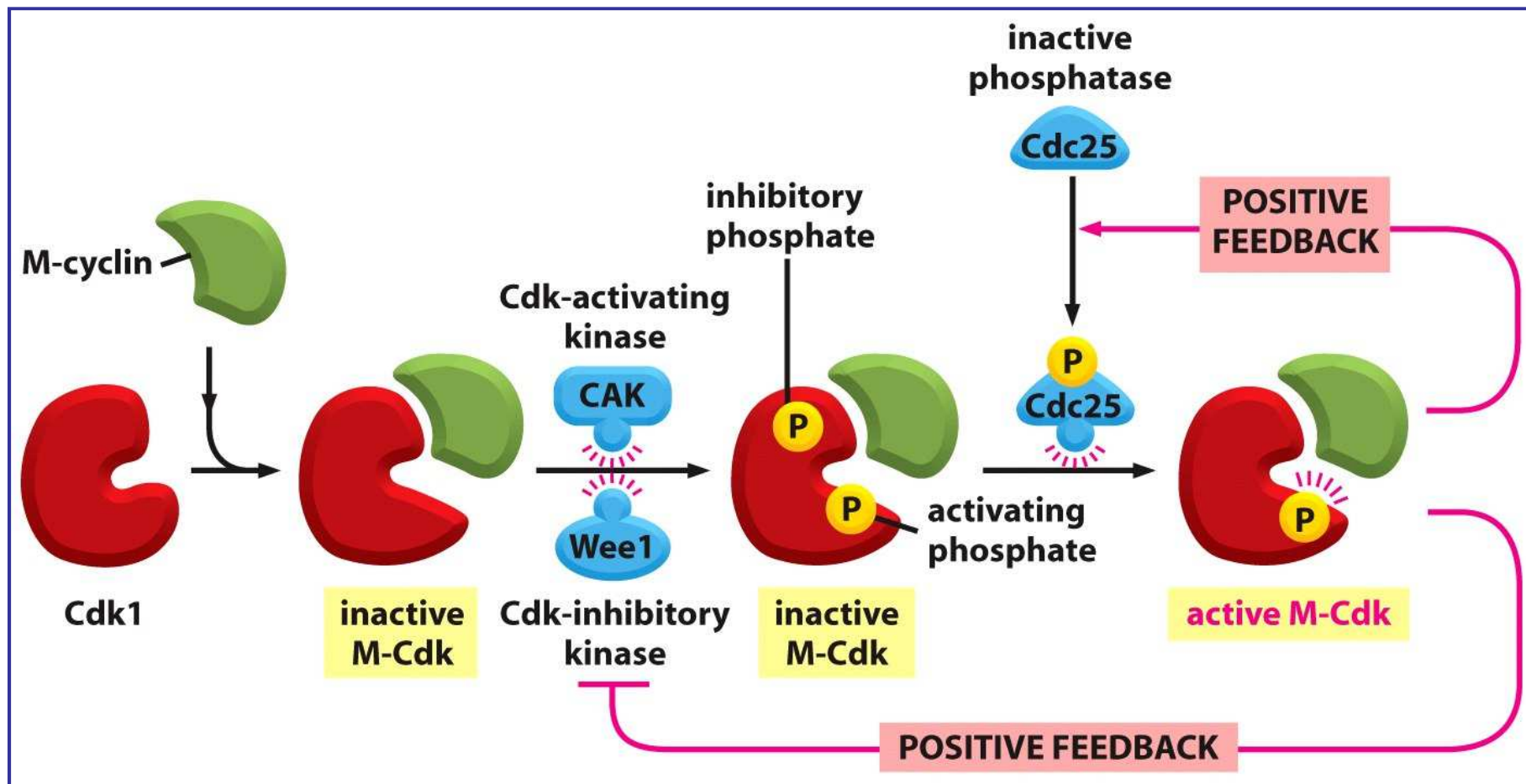
Mitóza

- oddělení chromatid a jejich distribuce do dceřiných jader, každá s úplnou kopií genomu
- cytokineze

Pro regulaci jsou zásadní dva procesy:

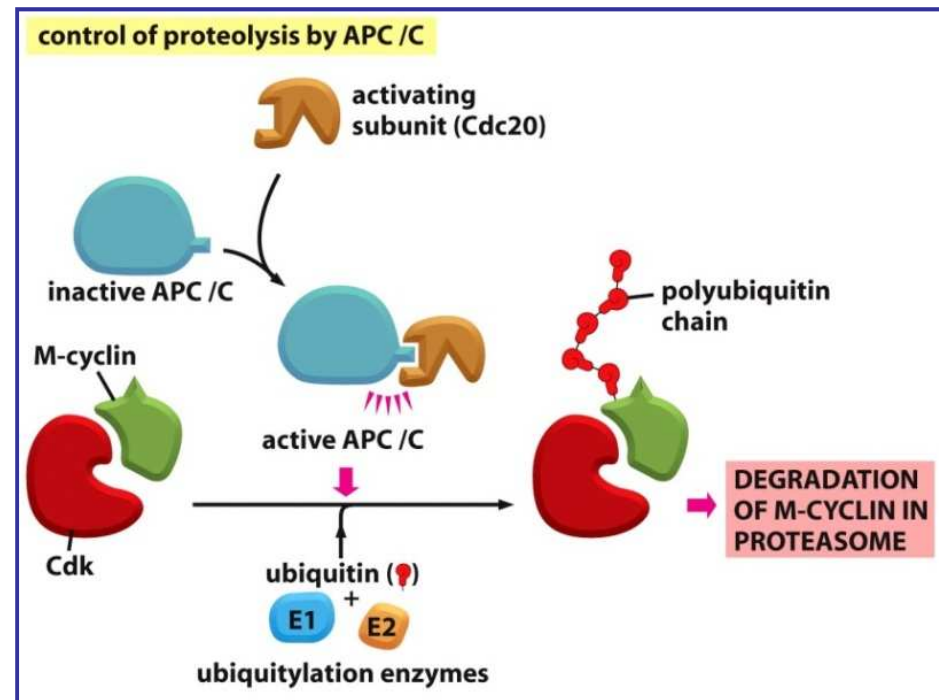
- prudké zvýšení aktivity **M-Cdk** v kontrolním bodě G2/M, které vede k procesům rané mitózy (sestavení vřeténka a jeho připojení sesterským chromatidám)
- ubikvitinligáza **APC/C** zajistí likvidaci (a) sekurinu: štěpení kohezinu a oddělení chromatid, (b) cyklinu M-fáze: inaktivace a defosforylace cílových proteinů (anafáze, telofáze, cytokineze)

Pozitivní zpětná vazba při aktivaci MPF



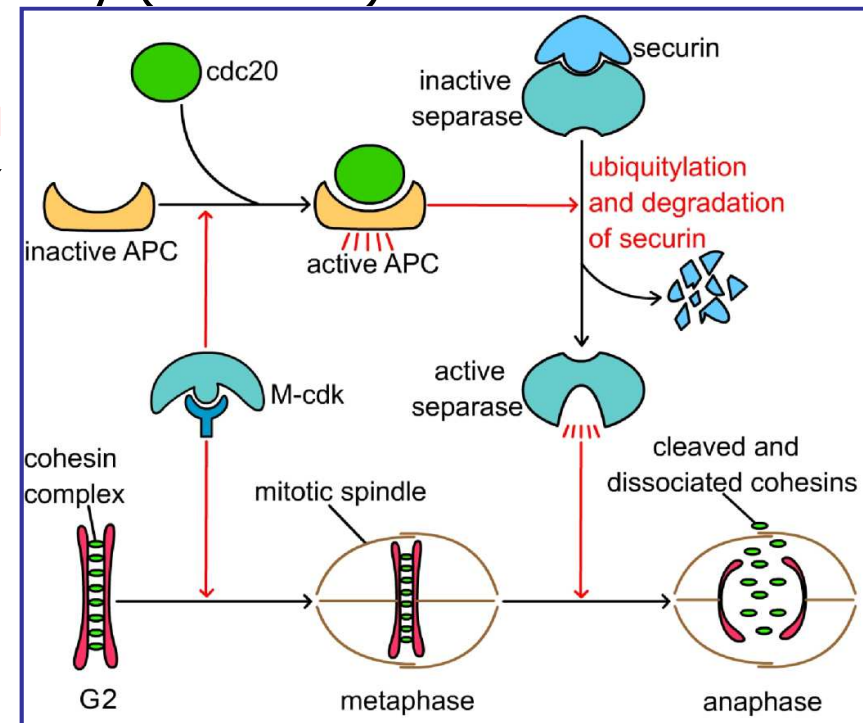
Dokončení M-fáze

- jakmile je každý kinetochor připojen k vláknům vřeténka, faktor **Cdc20** aktivuje ubikvitin ligázu APC/C
- APC/C katalyzuje vazbu ubikvitinu na **cyklin M-fáze** a **sekurin**
- následuje rozklad označených proteinů proteazomem
- absence cyklinu B inaktivuje MPF a zakončuje mitózu



Dokončení M-fáze

- **sekurin** (inhibitor anafáze) chrání vazby, které udržují sesterské chromatidy pohromadě na počátku mitózy (**kohezin**)
- rozklad sekurinu při přechodu metafáze/anafáze aktivuje **separázu**
- separáza oddělí chromatidy a umožní anafázi
- po připojení kinetochorů k dělicímu vřeténku **Cdc20** aktivuje **APC/C**
- ubikvitin ligáza **APC/C** označí **sekurin**
- degradací sekurinu se aktivuje **separáza**
- separáza rozloží **kohezin**, který spojuje chromatidy - nastává anafáze

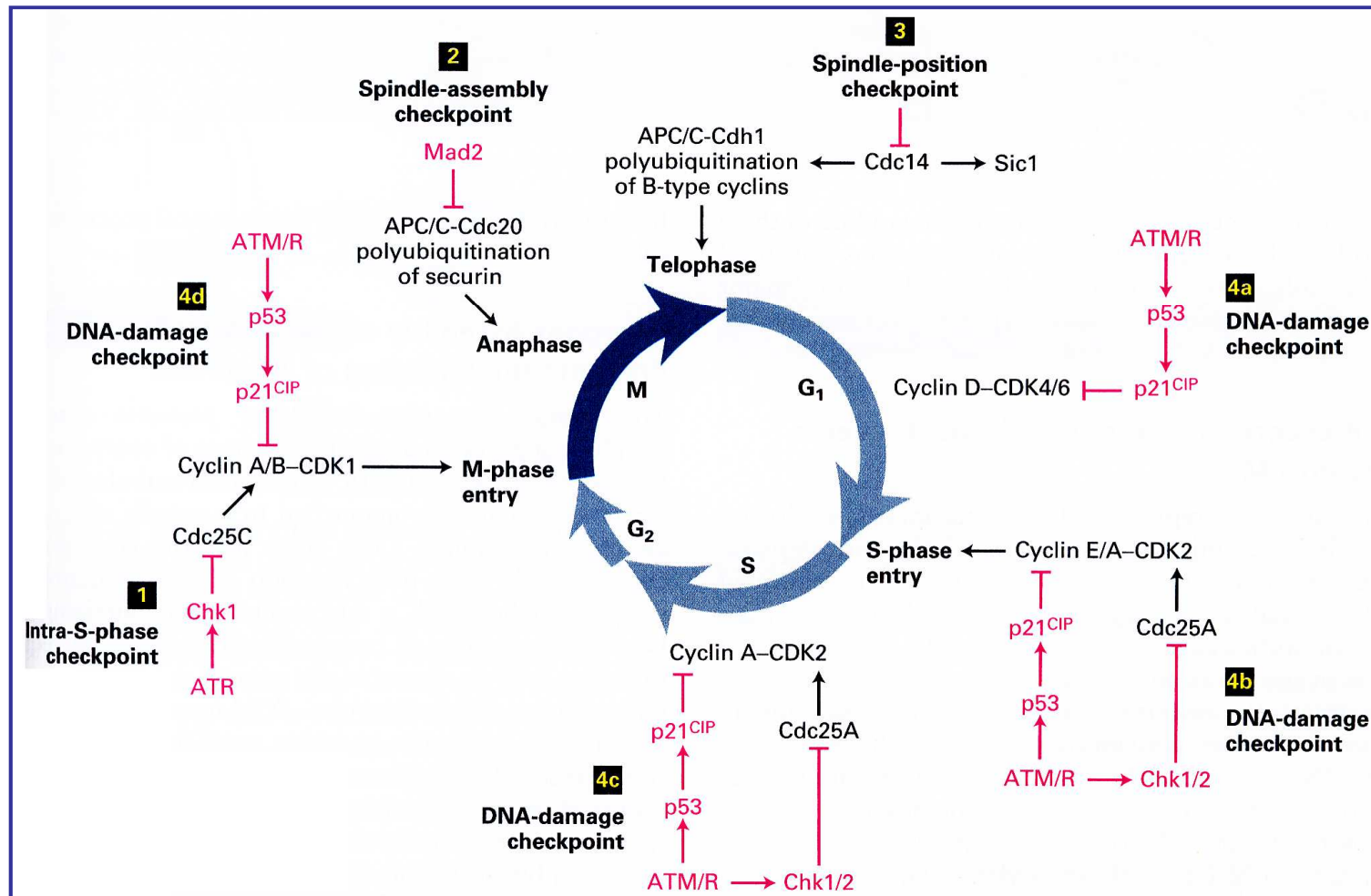




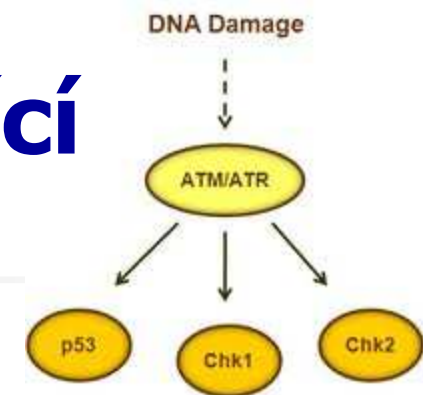
Kontrolní body



Hlavní kontrolní body cyklu



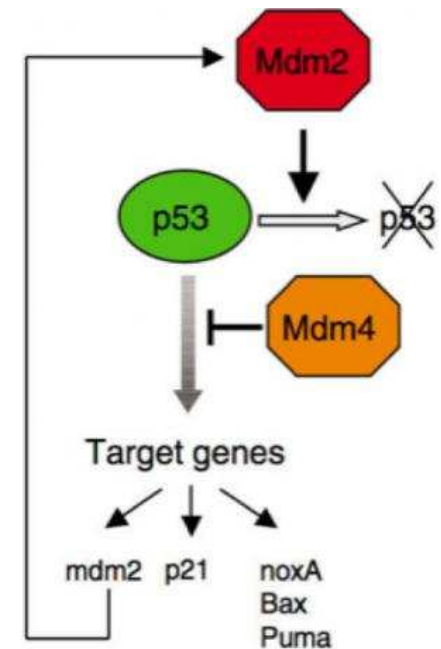
Kontrolní body monitorující poškození DNA



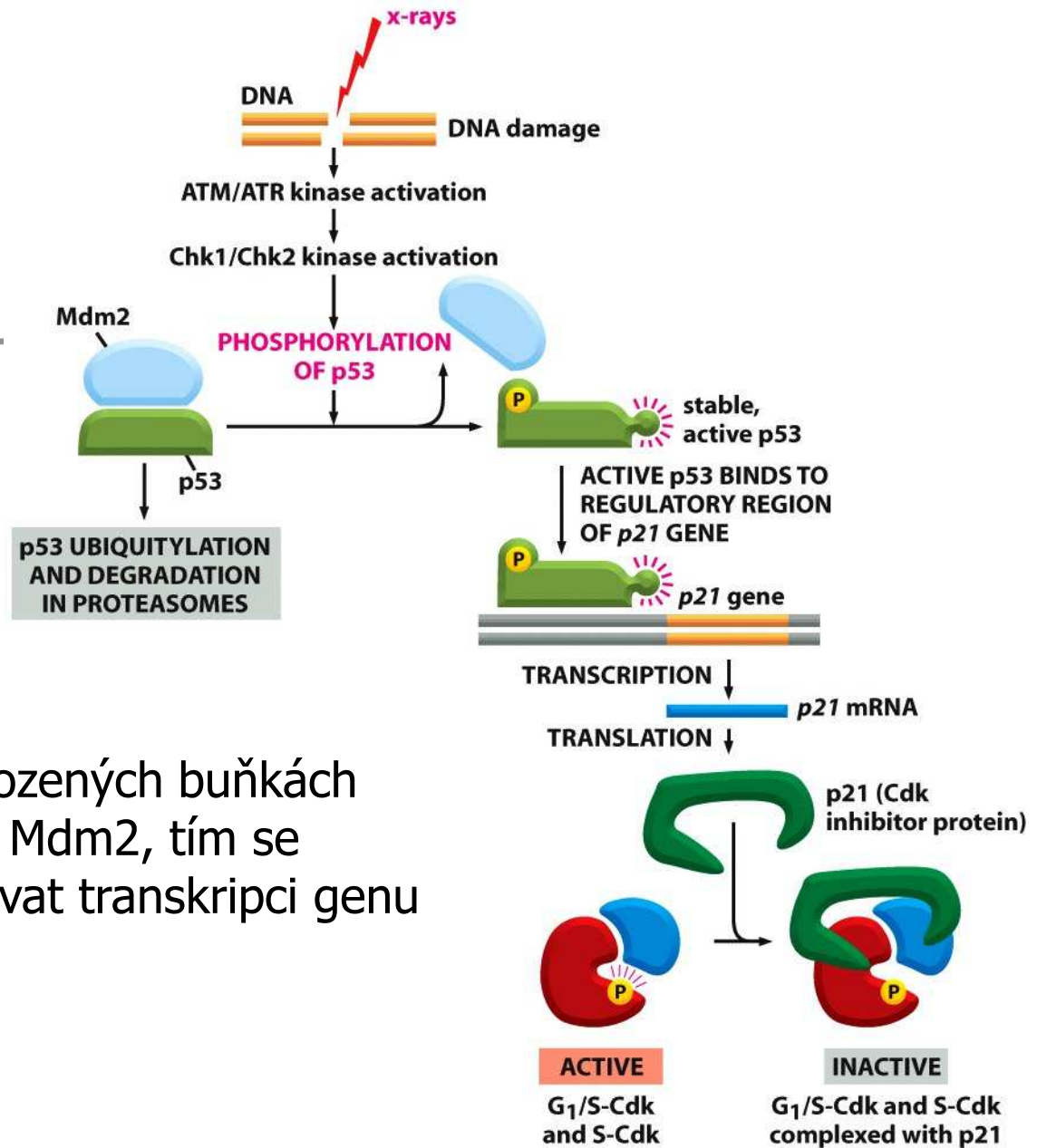
- chyby při replikaci, záření nebo chemikálie poškozují DNA
- oprava nutná před replikací nebo segregací
- kontrolní systém: detekce poškození DNA a zastavení cyklu v kontrolních bodech před začátkem S-fáze nebo M-fáze
- detekci poškození DNA zajišťují kinázy **ATM** a **ATR**, které fosforylují své cílové proteiny, včetně kináz **Chk1** a **Chk2**
- fosforylace proteinů těmito kinázami zastavuje cyklus
- hlavním cílovým genem je **p53**
- fosforylovaný **p53** stimuluje transkripci genu **p21**
- protein p21 jedním z inhibitorů (CKI) komplexů **G1-Cdk** a **G1/S-Cdk**

p53

- p53 je nestabilní protein, v nepoškozených buňkách přítomen v nízké koncentraci
- důsledek jeho interakce s ubikvitinligázou Mdm2, jejíž expresi sám aktivuje
- Mdm2 zprostředkovává rozklad p53 v proteazomu



p53



- fosforylace p53 v poškozených buňkách omezuje jeho interakci s Mdm2, tím se stabilizuje a může aktivovat transkripci genu p21



Poškození DNA a rakovina

- hromadění neopravovaných poruch v DNA zvyšuje riziko vzniku nádorotvorných mutací
- mutace, které vyřadí z činnosti systém reakcí na poškozenou DNA jsou velmi nebezpečné
- absence funkčního p53 provází alespoň polovinu lidských nádorů, protože umožňuje hromadění mutací

Ataxia telangiectasia

- vzácné genetické neurodegenerativní onemocnění
- důsledek defektu ATM, tj. kinázy určené pro reakci na poškození DNA (reparační mechanismy oslabeny)
- pacienti jsou velmi citliví na záření a mají zvýšené riziko vzniku rakoviny



