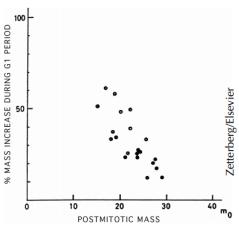
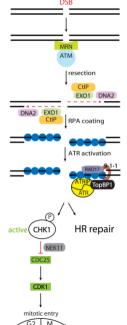


Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsüklendi avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooo●ooo	o	oooooo	ooooooo	oooo	oooooooooooo	
Rakutsükli faasid							
Raku pooldumisel							
<ul style="list-style-type: none"> Neli üksteisele järgnevat faasi: G₁ → S → G₂ → M faas. G₁, S ja G₂ moodustavad interfaasi. Mitoosi faasid on profaas, metafaas, anafaas ja telofaas. 							
Rakutsükkel				5			

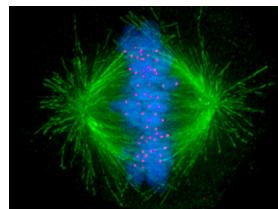
Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsüklendi avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooo●ooo	o	oooooo	ooooooo	oooo	oooooooooooo	
G₁-faas							
G ₁ on raku tsüklki faas, mis algab peale mitoosi ja kestab kuni DNA replikatsiooni alguseni S-faasis.							
							
Rakutsükkel				6			

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsüklendi avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooo●ooo	o	oooooo	ooooooo	oooo	oooooooooooo	
S-faasis toimub genoomse DNA süntees							
<ul style="list-style-type: none"> Kromosoomide duplitseerumine leiab aset S faasis. Kogu genoom tuleb kopeerida täpselt ja ainult üks kord. Kõiki replikatsiooni alguspunkte kasutatakse ainult ja ainult üks kord. Duplitseerunud õdekromosomid peavad jääma körvuti, mille eest vastutavad kohesiinid. 							
Rakutsükkel				7			

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsüklendi avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooo●ooo	o	oooooo	ooooooo	oooo	oooooooooooo	
G₂-faas							
G ₂ -faas on intervall DNA sünteesi eduka lõpu ja mitoosis toimuva kromosoomide lahknemise vahel							
<ul style="list-style-type: none"> suhteliselt lühike M-faasis vajalike valkude süntees viimane DNA kvaliteedikontroll – G₂ kontrollpunkt 							
							
Rakutsükkel				8			

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliajade avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk	Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliajade avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
M-faasis toimub kromosoomide lahknemine															
Põhiline rakutsükli regulatsioonis															

- **Profaasis** toimub kromosoomide kondenseerumine.
- Moodustub mitoosikäav.
- **Metafaasis** joonduvad õdekromatiigid.
- **Anafaasis** toimub õdekromatiidide lahknemine poolustele.
- **Telofaasis** moodustub uuesti tuumamembraan ja tuum.
- Tsütokinees.



Rakutsükkel

9

Kuidas tagada et rakutsükli faasid toimuksid õiges järjekorras

- Tuuma tsükliajade koordineerimine raku kasvu ja poodlumisega.
- Replikatsioon peab toimuma vaid üks kord rakutsükli jooksul.
- Replikatsioon peab eelnema kromosoomide lahknemisele.
- Kromosoomide lahknemine peab omakorda olema toiminud enne tsütokineesi e. raku jagunemist.

Rakutsükkel

10

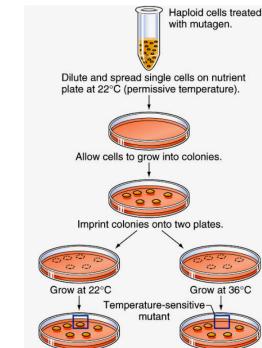
Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliajade avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk	Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliajade avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
Rakkude jagunemisel oluliste geenide kirjeldamine sai alguse pärmis															
Temperatuuritundlike mutantide isoleerimine pärmis															



- Paul Nurse jt. poolt kirjeldati poolduvas pärmis *Schizosaccharomyces pombe* mutant/geen cdc2 mis reguleerib S-faasi ja mitoosi algust.

Rakutsükkel

11



Rakutsükkel

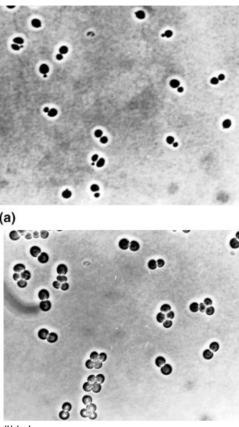
Haploidsetel organismidel,
nagu pärm, on kõik
mutatsioonid dominantsed

- Mutandid kasvavad normaalselt permissiivsel temperatuuril
- Mutandid kaotavad geeni funktsiooni restrikteerival temperatuuril

12

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliaaside avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooo●	oooooo	oooo	oooooooooooo	

Pärm rakutsükli mutandid

(a) 

Permissiivsel temperatuuril on pärmipopulaatsioonis erineva suurusega pungasid.

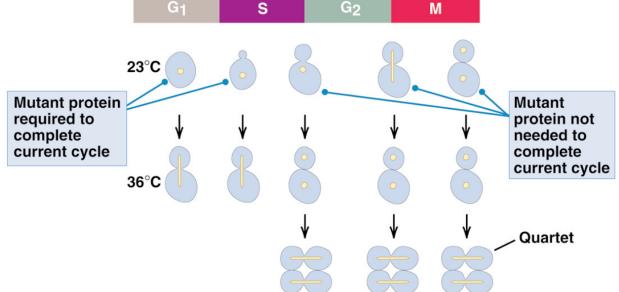
Restrikteerival temperatuuril kasvatamine näitab et rakud on läbinud esimene rakutsükli ja arresteerunud teises.

Rakutsükkel

13

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliaaside avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooo●	oooooo	oooo	oooooooooooo	

Temperatuuritundlike mutantide kasutamine geenifunktsiooni sidumisel rakutsükli faasiga



Rakutsükkel

14

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliaaside avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooo●	oooooo	oooo	oooooooooooo	

Mutantide isoleerimine

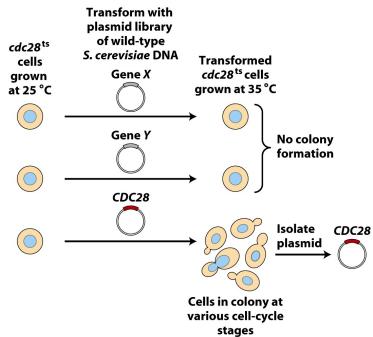


Figure 20-4
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Rakutsükkel

15

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliaaside avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooo●	oooooo	oooo	oooooooooooo	

Pärmist isoleeritud rakutsüklist reguleerivad geenid

ORGANISM / PROTEIN	NAME
<i>S. POMBE</i>	
CDK (one only)	Cdc2
Mitotic cyclin (one only)	Cdc13
<i>S. CEREVISIAE</i>	
CDK (one only)	Cdc28
Mid-G ₁ cyclin	Cln3
Late-G ₁ cyclin	Cln1, Cln2
Early S-phase cyclins	Cib5, Cib6
Late S-phase and early mitotic cyclins	Cib3, Cib4
Late mitotic cyclins	Cib1, Cib2

NOTE: Those cyclins and CDKs discussed in this chapter are listed and classified by the period in the cell cycle in which they function. A heterodimer composed of a mitotic cyclin and CDK is commonly referred to as a maturation-promoting factor (MPF).

ORGANISM / PROTEIN	NAME
VERTEBRATES	
Mid-G ₁ CDKs	CDK4, CDK6
Late-G ₁ and S-phase CDK	CDK2
Mitotic CDKs	CDK1, CDK2
Mid-G ₁ cyclins	D-type cyclins
Late-G ₁ and S-phase cyclin	Cyclin E
S-phase and mitotic cyclin	Cyclin A
Mitotic cyclins	Cyclin A, Cyclin B

NOTE: Those cyclins and CDKs discussed in this chapter are listed and classified by the period in the cell cycle in which they function. A heterodimer composed of a mitotic cyclin and CDK is commonly referred to as a maturation-promoting factor (MPF).

Table 20-1 part 1
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Table 20-2 part 1
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Rakutsükkel

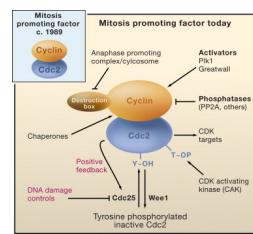
16

Sissejuhatus ooo	Rakutsükli faasid ooooo	Paradigma o	Pärm oooooo	Tsükliaalide avastamine ●●●●●	Regulatsioon oooo	Kontrollid oooooooooooo	Vähk	Sissejuhatus ooo	Rakutsükli faasid ooooo	Paradigma o	Pärm oooooo	Tsükliaalide avastamine ○○●○○	Regulatsioon oooo	Kontrollid oooooooooooo	Vähk		
MPF kannuskonnas ja merisiilikus								MPF kannuskonnas ja merisiilikus									
<ul style="list-style-type: none"> • Aafrika kannuskonna (<i>Xenopus laevis</i>) ja merisiiliku (<i>Arbacia punctulata</i>) meioosi uurimine 1970 ja 1980 aastatel viis MPF faktori (<i>maturation-promoting factor</i>) kirjeldamiseni. 								<p>1982. aastal avastasid Tim Hunt jt. merisiiliku valgusünteesi urides valgud mis akumuleerisid tugevalt interfaasis ja mille tase langes kiiresti peale ootsüütide jagunemist.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nad nimetasid need ja teised sarnaselt käituvald rakutsüklist ostsilleeruvad valgud tsükliaalideks. • Kõigepealt kirjeldati molekulmassist lähtuvalt kaks tsükliaali - A ja B. • Sarnasus MPF ja tsükliaalide vahel oli silmatorkav. 								18	

Sissejuhatus ooo	Rakutsükli faasid ooooo	Paradigma o	Pärm oooooo	Tsükliaalide avastamine ○○●○○	Regulatsioon oooo	Kontrollid oooooooooooo	Vähk	Sissejuhatus ooo	Rakutsükli faasid ooooo	Paradigma o	Pärm oooooo	Tsükliaalide avastamine ○○●○○	Regulatsioon oooo	Kontrollid oooooooooooo	Vähk		
Tsükliaal B süntees on vajalik rakutsükli töös hoidmiseks								Tsükliaal B lagundamine on vajalik meioosist ja mitoosist väljumisel									
<p>Marc Kirschner ja Andrew Murray uurisid 1989 tsükliaalide rolli Xenopuse raku ekstraktides.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Põhinedes Yoshio Masui varasemalt läbi viidud tööl, löid nad rakuvaba mudeli mis võis läbida kolm ja enam tsüklit. • Nad näitasid, et valgusüntees on vajalik <i>in vitro</i> rakutsüklike läbimiseks. • <i>In vitro</i> transkribeeritud merisiilikku tsükliaali B mRNA taastas rakutsükli ekstraktides kus mRNA oli ensümaatiiselt lagundatud. • Samuti taatas tsükliaal B <i>in vitro</i> transleeritud tsükliaali B valk ekstraktides kus valgusüntees oli blokeeritud. 								<ul style="list-style-type: none"> • Murray ja Kirschner genereerisid tsükliaali B amino-terminaalse deletsioonimutandi, <ul style="list-style-type: none"> • deletsioonimutant oli resistentne proteolüütilisele lagundamisele mitoosis, • kuid aktiveeris MPF-i ja viis ekstraktid M faasi. • See mutant arresteeris ekstrakti M faasi. • Sama juhtus ka trunkeeritud tsükliaali B süstimesse ootsüütidesse. 								20	

Sissejuhatus	Rakutsüklilised faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo●	oooo	oooooooooooo	
Tsükliin on otsene Cdc2 (Cdk1) regulaator							
MPF-i puhastamine viis tsükliin-kinaasi kompleksi kirjeldamiseni.							
<ul style="list-style-type: none"> • Kuigi MPF kirjeldati juba 1971, siis puhas MPF eraldati Xenopuse munadest alles 1988. • Puhas MPF sisaldas kahte valku massiga 32 kDa ja 45 kDa ning omas kinaasset aktiivsust (Lohka et al., 1988). 32 kDa valk võis olla Cdc2. • Pärmi Cdc2 konserveerunud 16-aa järjestuse vastane antikeha (nn. PSTAIRE antikeha) sadestas MPF-ist kinaasse aktiivsuse massiga 32 kDa (Gautier et al., 1988). • Puhas Cdc2 üks ei näidanud kinaasset aktiivsust. • Lõpuks näidatigi, et merekarbi (<i>Spisula solidissima</i>) embrüotide homogenaadist ko-sadestusid tsükliinid koos Cdc2 kinaasse aktiivsusega (Draetta et al., 1989). 							
Rakutsükkeli					21		

Sissejuhatus	Rakutsüklilised faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo●	oooo	oooooooooooo	
Kirjeldati uus klass kinaase							



- Kõik tsükliinidega seotud kinaasid otsustati 1991. aastal nimetada tsükliin-sõltuvateks kinaasideks ehk i.k. **CDK**.
- Cdc2 nimetati nii esimesena Cdk1.

Sissejuhatus	Rakutsüklilised faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo●	oooo	oooooooooooo	
Tsükliin-CDK komplekside järjestikune aktivatsioon							
<p>d</p> <p>e</p>							
Rakutsükkeli					23		

Sissejuhatus	Rakutsüklilised faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo●	oooo	oooooooooooo	
Tsükliinid ja tsükliin kinaasid							
Tsükliin-sõltuvad kinaasid (CDK) reguleerivad rakutsüklit fosforüleerides teisi valke							
Rakutsükkeli					24		

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliaaside avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	ooooooo	ooo•o	oooooooooooo	

Tuuma lamiinid on CDK substraadiks

(b) Nuclear envelope
Nuclear lamin
Phosphorylation of lamins. Lamins become soluble.
CDK Cyclin
Dissolution of nuclear membrane

Rakutsükkel

25

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliaaside avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	ooooooo	ooo•	oooooooooooo	

Rakutsükli eri faasides on aktiivsed erinevad tsükliaaside kompleksid

Mitotic cyclin-CDKs
Cyclin A-CDK1
Cyclin B-CDK1

Mid-G1 cyclin-CDKs
Cyclin D-CDK4
Cyclin D-CDK6

S-phase cyclin-CDK
Cyclin A-CDK2

Mid-M cyclin-CDKs

Restriction point

Late-G1 cyclin-CDK
Cyclin E-CDK2

G₀

G₂

M

G₁

S

Figure 20-32 Molecular Cell Biology, Sixth Edition © 2008 W.H. Freeman and Company

Rakutsükkel

26

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliaaside avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	ooooooo	ooo•o	oooooooooooo	

Rakutsükli kontrollpunktid

G₁ CHECKPOINT
ENTER M
M
EXIT M
G₂ CHECKPOINT
ENTER S
G₁ CHECKPOINT
Is environment favorable?

Genoomi stabiilsuse rakutsüklis tagavad kolm kontrollpunktia:

- G₁→S kontrollpunkt
- G₂→M-faasi kontrollpunktid
- metafaasi kontrollpunkt

Rakutsükkel

27

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliaaside avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	ooooooo	ooo•o	oooooooooooo	

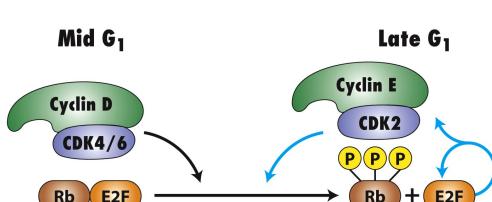
G₁ restriktiionipunkt

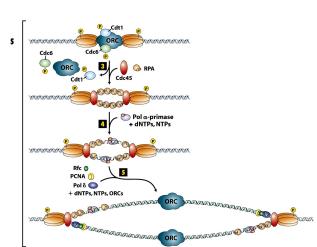
- toimib hilises G₁-s
- kontrollib G₁→S üleminekut
- rakud ei sõltu enam mitogeensetest signaalidest S-faasi sisemisel (nt. kasvufaktorid) kui D-tsükliaid on aktiveeritud ja pRb inaktiveeritud

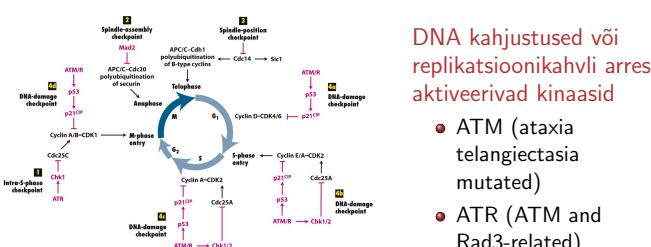
Ras
ERK
Myc
p21/p27
FOXO
GSK3-β
Akt
Cyclin D
Cyclin E
CDK2
G1/S transition

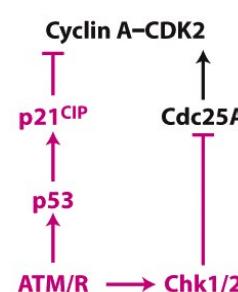
Rakutsükkel

28

Sissejuhatus	Rakutsüklilised faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	oooooooo	
G₁→S kontroll: raku kasv ja rakuvälised signaalid							
 <p>Mid G₁ Cyclin D-CDK4/6 phosphorylates Rb, releasing E2F. Late G₁ Cyclin E-CDK2 phosphorylates Rb and E2F further, activating transcription.</p> <p>Positiivsed signaalid</p> <ul style="list-style-type: none"> • kasv, ellujäämissignaalid, mitogeenid <p>Negatiivsed signaalid</p> <ul style="list-style-type: none"> • tsütostaatilised, genotoksilised, metaboolsed, onkogeensed, oksüdatiivne stress 							
Rakutsükkeli			29				

Sissejuhatus	Rakutsüklilised faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	oooooooo	
E2F märklaudgeenid							
<p>• tsükliin E, • DNA replikatsiooni toetava kompleksi valgud: ORC-id, MCMs, DNA polymerase alfa, • järgmistes sammudes vajalikud valgud: tsükliin B, Cdk1 ja erinevad DNA kvaliteedikontrolli valgud.</p>  <p>Figure 20-32 Molecular Cell Biology, Sixth Edition © 2008 W.H. Freeman and Company</p>							
Rakutsükkeli							30

Sissejuhatus	Rakutsüklilised faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	oooooooo	
DNA metabolismi kontroll: ATM & ATR – DNA kahjustusi kontrollivad kinaasid							
 <p>DNA kahjustused või replikatsioonikahvli arrest aktiveerivad kinaasid</p> <ul style="list-style-type: none"> • ATM (ataxia telangiectasia mutated) • ATR (ATM and Rad3-related) 							
Rakutsükkeli			31				

Sissejuhatus	Rakutsüklilised faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	oooooooo	
DNA kvaliteedikontrolli mehhanismid: p53 sõltuv ja p53-sõltumatu rada							
							
Rakutsükkeli							32

Sissejuhatus	Rakutsüklki faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	oooooooo●oooo	

p53 tuumorsuppressor

p53 toimib mitme mehhanismi kaudu:

- Aktiveerib DNA reparatsiooni ensüüme, kui DNA on kahjustatud.
- Blokeerib rakutsükli üleminekut G1/S kontrollpunktis.
- Suunab rakke apoptoosi.

IR / UV
ATM / ATR
Chk2 / Chk1
Mdm2 p53
Labile and inactive
p53²⁰ Ser20
Active and stable
Mdm2

Sissejuhatus	Rakutsüklki faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	oooooooo●oooo	

Mutantne p53

p53 on muteerunud keskmiselt 45% kasvajates. Munasarja-vähi puhul isegi 95% juhtudel.

(c) p53 is mutated
Single-strand break
DNA replication
Double-strand break
Chromosome rearrangements
Defective G₁-to-S checkpoint. Replication proceeds; p53 inactive and p21 not induced
Mutant p53 can't induce functional p21, so cell enters S phase

Rakutsükkel 33 Rakutsükkel 34

Sissejuhatus	Rakutsüklki faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	oooooooo●oooo	

Kromatiidide lahknemine

Õdekromatiide hoiavad koos kohesiinid

Kohesiinide lagundamist kontrollib APC^{CDC20} ubikvitiin-ligaasi kompleks.

Figure 20-23
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Smc1
Kleisin
Separase
Securin
Cdc20
APC

Sissejuhatus	Rakutsüklki faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	oooooooo●oooo	

Mitoosikäävi kontrollpunkt

Kas kõik kinetohoorid on seotud mitoosikäävi mikrotubulitega?

- MAD (mitotic arrest deficient) valk seostub vabadele kinetohooridele ja inhibeerib APC^{CDC20} aktivatsiooni.
- MAD seob ning blokeerib CDC20.

Cytosolic pool of Mad2
Mad1
Cdc20
Checkpoint activation
Lack of attachment
Figure 20-24
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Red square = Mad1 in open conformation
Blue circle = Mad1 in closed conformation
Orange square = Cdc20 in open conformation

Rakutsükkel 35 Rakutsükkel 36

