

Sissejuhatus  
oo

Rakutsükli faasid  
oooooo

Pärm  
oooooo

Tsükliinide avastamine  
oooooo

Regulatsioon  
oooooooo

Kontrollid  
oooooooooooo

# Rakutsükkel ja selle kontroll

Taavi Päll

Vähiuuringute tehnoloogia arenduskeskus

22. oktoober 2014

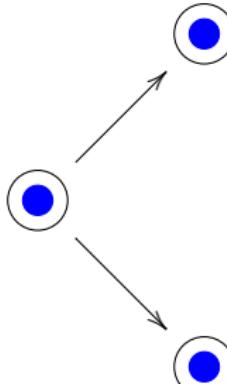
# Rakkude kasv ja jagunemine

- Tsükliline rakkude kasv ja jagunemine on fundamentaalne protsess, millel põhineb igaüksne bioloogiline kasv, organismi areng ja paljunemine.
- Inimestel põhjustavad rakkude kasvu ja jagunemisega seotud defektid paljusid erinevaid haigusi, sealhulgas vähki.



# Rakutsükkel

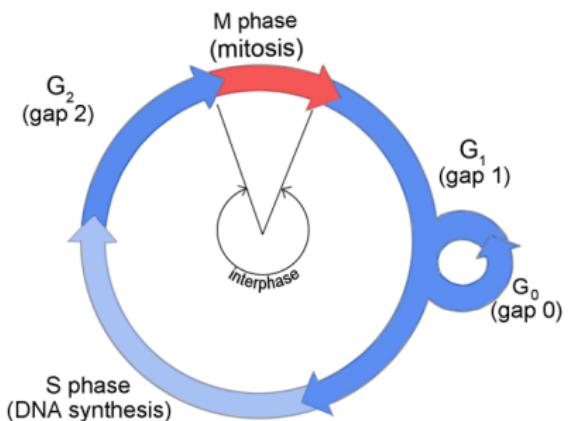
- Rakutsükkel on järjestikuste sündmuste jada mille käigus rakk duplitseerib kõik oma koostisosad ja jaguneb kaheks tütarakuks.
- Rakutsükli kontrolliv 'masinavärk' on universaalne kõigis organismi rakutüüpides.
- Raku rakutsükliisse sisenemist ja 'masinavärgi käivitamist' reguleerivad raku väliskeskkonna signaalid.



# Rakutsükli faasid

## Neli üksteisele järgnevat faasi

- $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$  faas.
- $G_1$ ,  $S$  ja  $G_2$  moodustavad **interfaasi**.
- Mitoosi faasid on **profaas**, **metafaas**, **anafaas** ja **telofaas**.
- Mittejagunev rakk on vaikeolekus (*quiescence*) ehk  $G_0$  faasis.

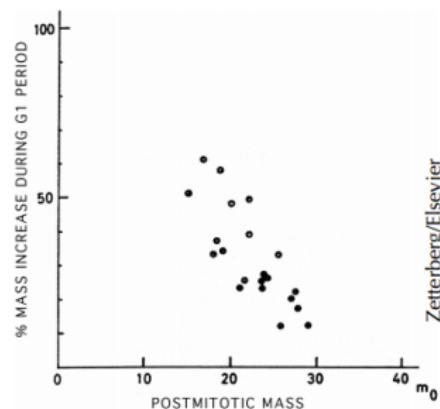


## G<sub>1</sub>-faas

G<sub>1</sub> on raku tsükli faas, mis algab peale mitoosi ja kestab kuni DNA replikatsiooni alguseni S-faasis.

### G<sub>1</sub>-faasis toimub

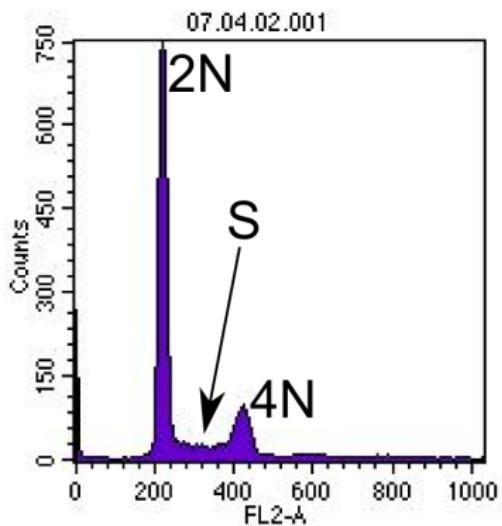
- **rakkude kasv** – pärmil kindlasti, imetaja rakkude puhul pole päris kindel.
- **ettevalmistus S-faasiks** – pre-replikatsiooni komplekside moodustumine.



Rakkudel mis on G<sub>1</sub> alguses suuremad on G<sub>1</sub>-s väiksem juurdekasv.

## S-faasis toimub genoomse DNA süntees

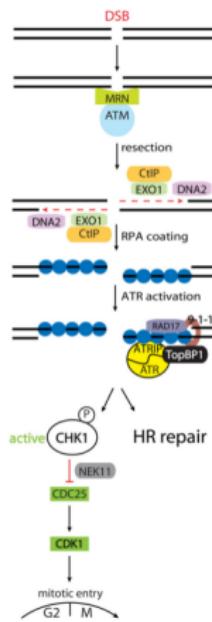
- Kromosoomide duplitseerumine leiab aset S faasis.
- Kogu genoom tuleb kopeerida täpselt ja ainult üks kord.
- Kõiki replikatsiooni alguspunkte kasutatakse ainult ja ainult üks kord.
- Duplitseerunud õdekromsoomid peavad jäama kõrvuti, mille eest vastutavad kohesiinid.



## G<sub>2</sub>-faas

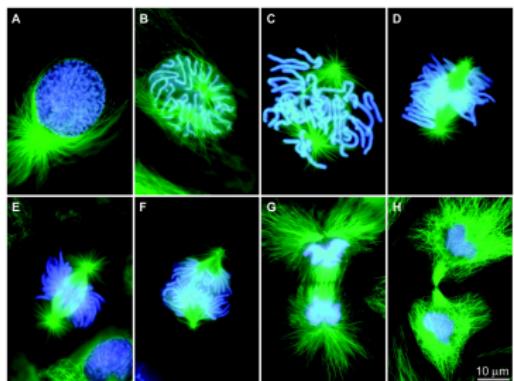
G<sub>2</sub>-faas on intervall DNA sünteesi eduka lõpu ja mitoosis toimuva kromosoomide lahknemise vahel

- suhteliselt lühike
- M-faasis vajalike valkude süntees
- viimane DNA kvaliteedikontroll – G<sub>2</sub> kontrollpunkt



# M-faasis toimub kromosoomide lahknemine

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



Sissejuhatus  
oo

Rakutsükli faasid  
ooooo●

Pärm  
ooooo

Tsükliinide avastamine  
oooooo

Regulatsioon  
oooooooo

Kontrollid  
oooooooooo

# Rakutsükkel liigub õhes suunas

## Kuidas tagada et rakutsükli faasid toimuksid õiges järjekorras

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

Sissejuhatus  
oo

Rakutsükli faasid  
oooooo

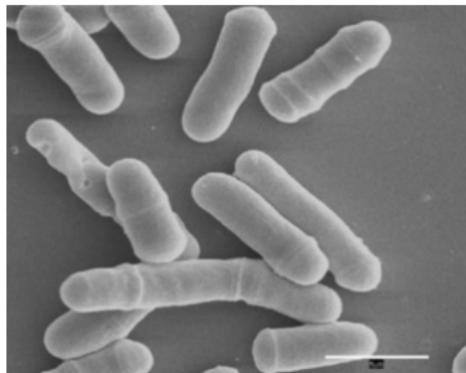
Pärm  
●ooooo

Tsükliajide avastamine  
oooooo

Regulatsioon  
oooooooo

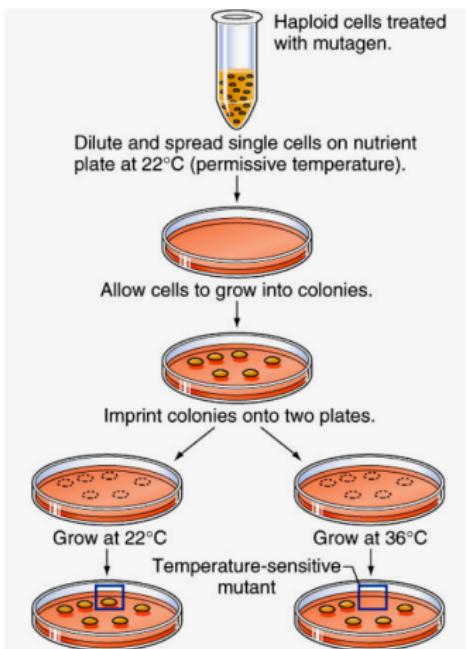
Kontrollid  
oooooooooooo

# Rakkude jagunemist kontrollivate geenide kirjeldamine sai alguse pärmis



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

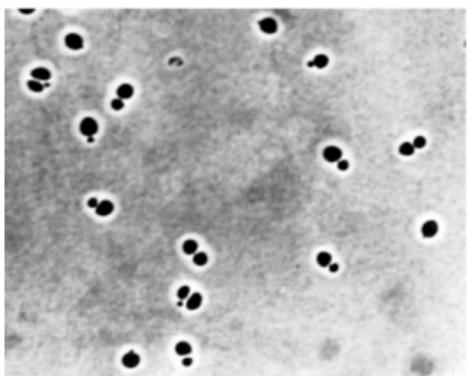
# Temperatuuritundlike mutantide isoleerimine pärmis



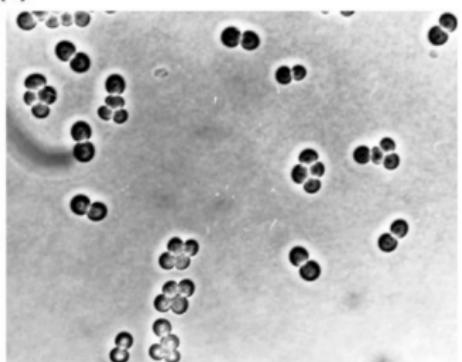
Haploidsetel organismidel,  
nagu pärm, on kõik  
mutatsioonid dominantsed

- Mutandid kasvavad normaalselt permissiivsel temperatuuril
- Mutandid kaotavad geenifunktsiooni restrikteerival temperatuuril

## Pärm rakutsükli mutandid



(a)

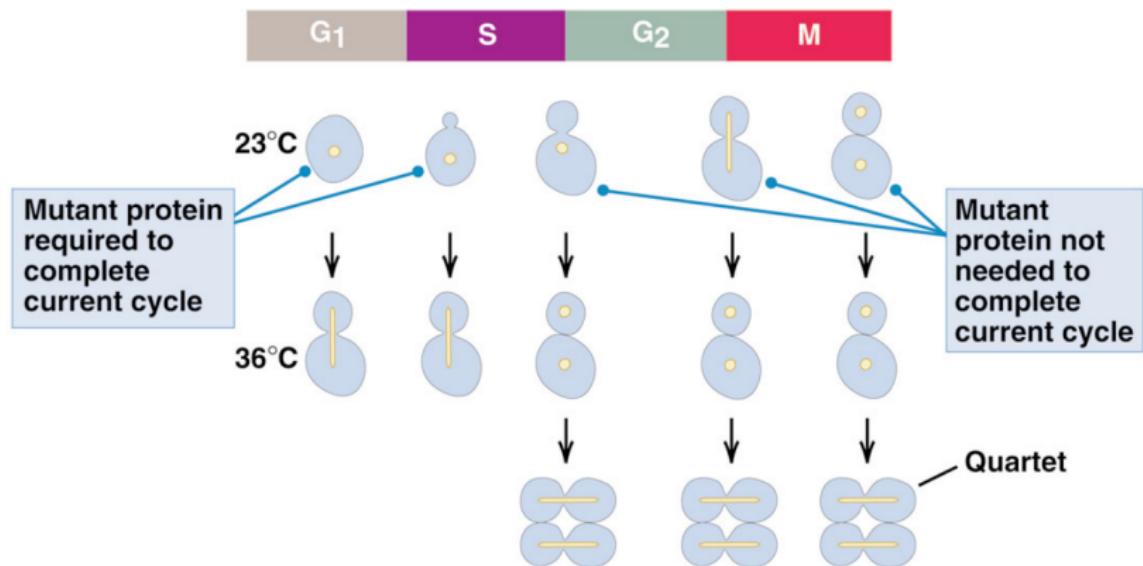


Rakutsükkel

Permissiivsel temperatuuril on pärmipopulatsioonis erineva suurusega pungasid.

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

# Temperatuuritundlike mutantide kasutamine geeni funktsiooni sidumisel rakutsükli faasiga



Sissejuhatus  
○○

Rakutsükli faasid  
○○○○○

Pärm  
○○○○●○

Tsükliainide avastamine  
○○○○○

Regulatsioon  
○○○○○○○○

Kontrollid  
○○○○○○○○○○

# Mutantide isoleerimine

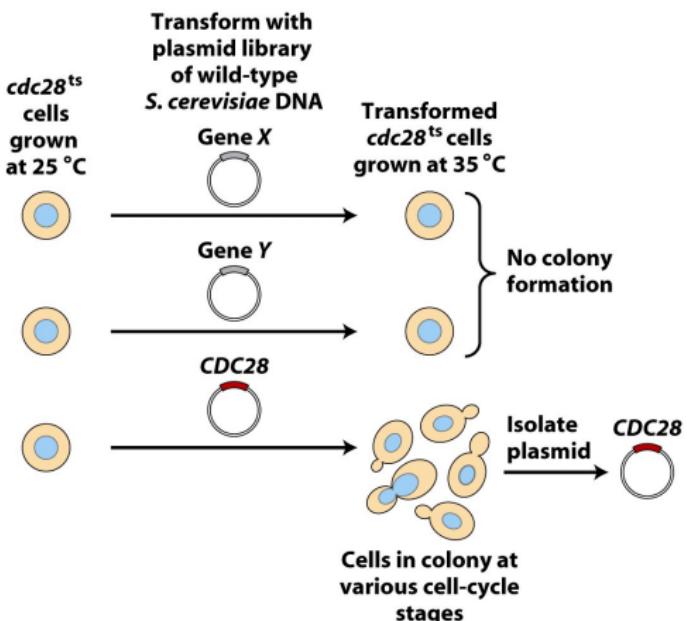


Figure 20-4  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

# Pärmist isoleeritud rakutsüklit reguleerivad geenid

TABLE 20-1 Selected Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases (CDKs)

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 <sub>1</sub> cyclin	Cln3
Late-G <sub>1</sub> cyclins	Cln1, Cln2
Early S-phase cyclins	Cln5, Clb6
Late S-phase and early mitotic cyclins	Clb3, Clb4
Late mitotic cyclins	Clb1, Clb2

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 *mitosis-promoting factor (MPF)*.

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

TABLE 20-1 Selected Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases (CDKs)

ORGANISM /PROTEIN	NAME
VERTEBRATES	
Mid-G <sub>1</sub> CDKs	CDK4, CDK6
Late-G <sub>1</sub> and S-phase CDK	CDK2
Mitotic CDKs	CDK1, CDK2
Mid-G <sub>1</sub> cyclins	D-type cyclins
Late-G <sub>1</sub> 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 *mitosis-promoting factor (MPF)*.

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

Sissejuhatus  
oo

Rakutsükli faasid  
oooooo

Pärm  
oooooo

Tsükliinide avastamine  
●ooooo

Regulatsioon  
oooooooo

Kontrollid  
oooooooooooo

## MPF kannuskonnas ja merisiilikus

- Aafrika kannuskonna (*Xenopus laevis*) ja merisiiliku (*Arbacia punctulata*) meioosi uurimine 1970 ja 1980 aastatel viis **MPF** faktori (*maturating-promoting factor*) kirjeldamiseni.

## MPF kannuskonnas ja merisiilikus

1982. aastal avastasid Tim Hunt jt. merisiiliku valgusünteesi uurides valgud mis akumuleerusid tugevalt interfaasis ja mille tase langes kiiresti peale ootsüütide jagunemist.

- Nad nimetasid need ja teised sarnaselt käituvald rakutsüklist ostssilleeruvad valgud **tsükliinideks**.
- Kõigepealt kirjeldati molekulmassist lähtuvalt kaks tsükliini - A ja B.
- Sarnasus MPF ja tsükliinide vahel oli silmatorkav.

# Tsükliini süntees on vajalik rakutsükli töös hoidmiseks

Marc Kirschner ja Andrew Murray uurisid 1989 tsükliinide rolli Xenopuse raku ekstraktides.

- Põhinedes Yoshio Masui varasemalt läbi viidud tööl, lõid nad rakuvaba mudeli mis võis läbida kolm ja enam tsüklit.
- Nad näitasid, et valgusüntees on vajalik *in vitro* rakutsüklite läbimiseks.
- *In vitro* transkribeeritud merisiiliku tsükliin B mRNA taastas rakutsükli ekstraktides kus mRNA oli ensümaatiiselt lagundatud.
- Samuti taastas tsükli *in vitro* transleeritud tsükliin B valk ekstraktides kus valgusüntees oli blokeeritud.

# Tsükliin B lagundamine on vajalik meioosist ja mitoosist väljumisel

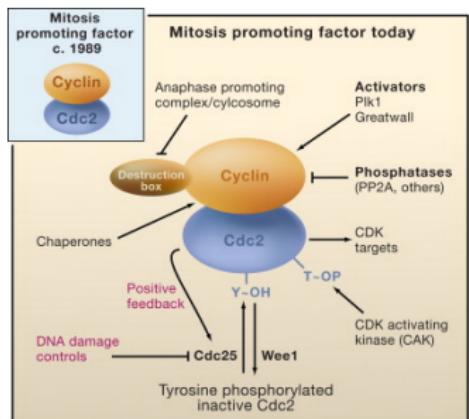
- Murray ja Kirschner genereerisid tsükliin B amino-terminaalse deletsioonimutandi,
  - deletsioonimutant oli resistentne proteolüütileile lagundamisele mitoosis,
  - kuid aktiveeris MPF-i ja viis ekstraktid M faasi.
- See mutant arresteeris ekstrakti M faasi.
- Sama juhtus ka trunkeeritud tsükliini B süstimesel ootsüütidesse.

# Tsükliin on otsene Cdc2 (Cdk1) regulaator

MPF-i puastamine viis tsükliin-kinaasi kompleksi kirjeldamiseni.

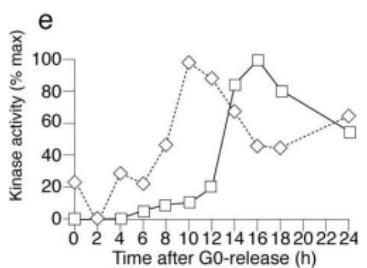
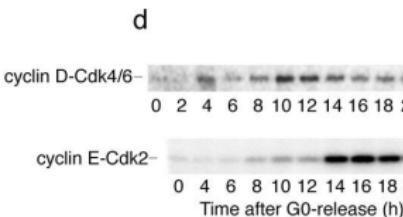
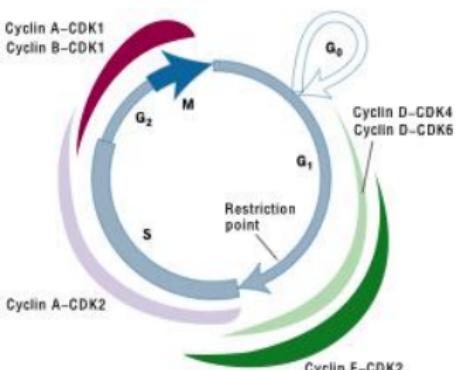
- Kuigi MPF kirjeldati juba 1971, siis puhas MPF eraldati Xenopuse munadest alles 1988.
- Puhas MPF sisaldas kahte valku massiga 32 kDa ja 45 kDa ning omas kinaasset aktiivsust (Lohka et al., 1988). 32 kDa valk võis olla Cdc2.
- Pärmi Cdc2 konserveerunud 16-aa järjestuse vastane antikeha (nn. PSTAIRE antikeha) sadestas MPF-ist kinaasse aktiivsuse massiga 32 kDa ( Gautier et al., 1988).
- Puhas Cdc2 üksi ei näidanud kinaasset aktiivsust.
- Lõpuks näidatigi, et merekarbi (*Spisula solidissima*) embrüote homogenaadist ko-sadestusid tsükliinid koos Cdc2 kinaasse aktiivsusega (Draetta et al., 1989).

# Kirjeldati uus klass kinaase



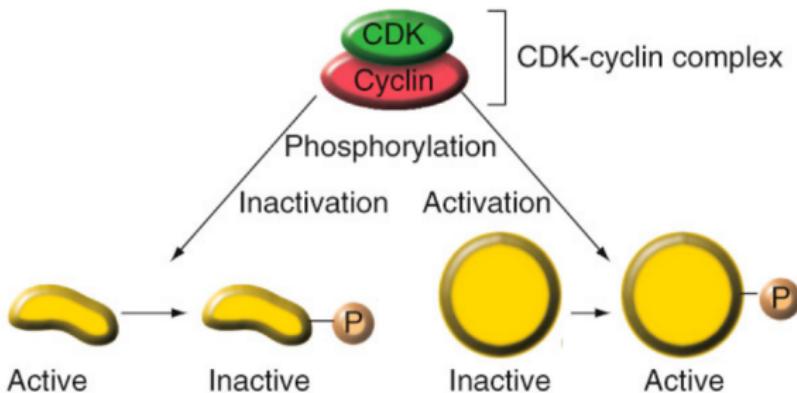
- Kõik tsükliinidega seotud kinaasid otsustati 1991. aastal nimetada tsükliin-sõltuvateks kinaasideks ehk *i.k.* **CDK**.
- Cdc2 nimetati nii esimesena Cdk1.

# Tsüklendi-CDK komplekside järjestikune aktivatsioon



# Tsükliinid ja tsükliin kinaasid

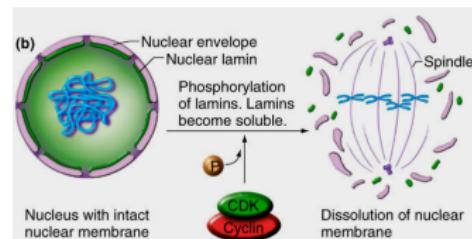
Tsükliin-sõltuvad kinaasid (CDK) reguleerivad rakutsüklit fosforüleerides teisi valke



# Ka rakutsükli masinavärki reguleerivad kinaasid

## CDK substraadid

- Tsentrosoomi valke (CP110) fosforüleeritakse G1/S üleminekul tsentrosoomi duplitseerumiseks.
- Enne S-faasi aktiveeritakse replikatsioonikompleksi (Treslin).
- Histoone fosforüleerimine S ja M faasis kromatiini kondenseerumiseks.
- Tuumamebraani valkude (Lamiin) fosforüleerimine põhjustab tuumamembraani lagunemise M-faasis.



# Rakutsükli eri faasides on aktiivsed erinevad tsükliin-kinaasi kompleksid

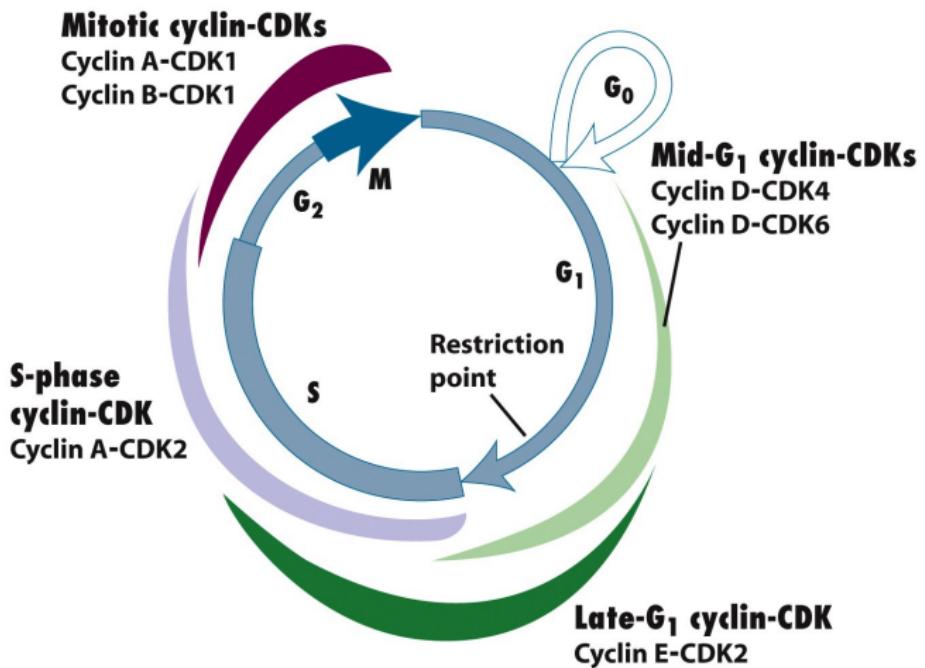
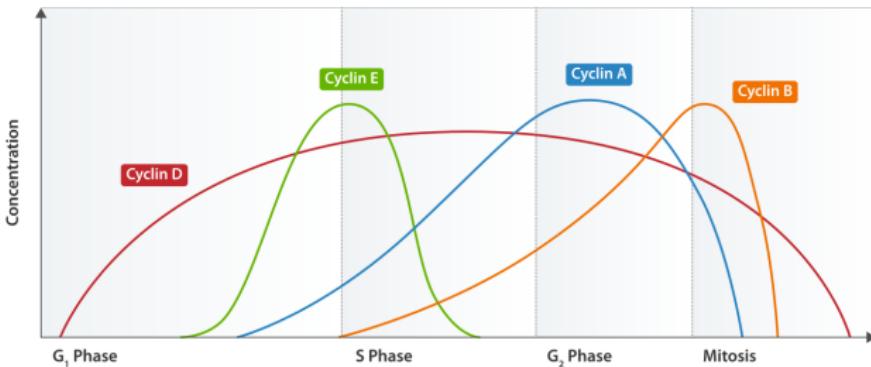


Figure 20-32  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

# Tsükliinide hulk rakus muutub rakutsükli käigus

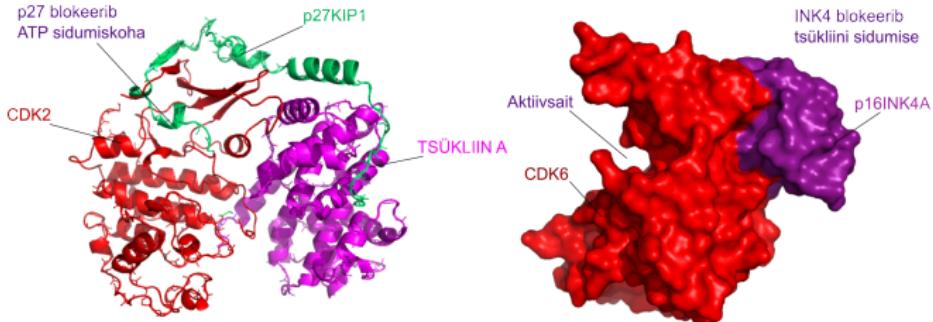
- Tsükliine kontrollitakse läbi proteolüütilise lagundamise.
- Tsükliini järkjärguline tõus ja kiire lagundamine tagab rakutsükli 'hammasrataste' liikumise ühes sunas.
- D-tsükliinid erinevad: nende puhu ei toimu järske kõikumisi rakutsükli käigus.
- D-tsükliinid on reguleeritud mitogeensete sinaalide poolt.



# Lisaks tsükliinidele reguleerivad tsükliin-sõltuvaid kinaase ka CDK inhibiitorid (Cdkl)

Praeguseks on kirjeldatud seitse erinevat Cdkl-d.

- INK4 valgud (**inhibitors of CDK4**), mis inhibeerivad spetsiifiiselt ainult CDK4 ja CDK6.
  - p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup>, p19<sup>INK4D</sup>.
- p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>: inhibeerivad kõiki teisi tsükliin-CDK komplekse.



## TGF- $\beta$ indutseerib p15<sup>INK4B</sup>

- TGF- $\beta$  peamine raku jagunemist pidurdav mehhanism töötab läbi p15<sup>INK4B</sup>.
- p15<sup>INK4B</sup> blokeerib tsükliin D-CDK4/6 komplekside moodustumise ja inhibeeriib olemasolevaid.
- Ilma aktiivse tsükliin D-CDK4/6 pole rakutsükkel võimeline arenema läbi varase ja keskmise G1 faasi restriktsoonipunktini.
- Kui rakk on juba restriktsoonipunkti läbinud pole enam D-CDK4/6 aktiivsus vajalik.
- Peale restriktsoonipunkti muutub rakk 'tundetuks' ka TGF- $\beta$  inhibeerivale toimele.

## p21Cip1 aktiveeritakse vastusena stressile

- p21Cip1 toimib läbi terve rakutsükli.
- Peamine p21Cip1 induktor on DNA kahjustused.
- p21Cip1 inhibeerib E-CDK2, A-CDK2, A-CDC2, B-CDC2 komplekse.
- Kui DNA kahjustused on parandatud, siis võetakse p21Cip1-blokk mahal.

# Rakutsükli kontrollpunktid

Genoomi stabiilsuse rakutsüklis tagavad *checkpointid*

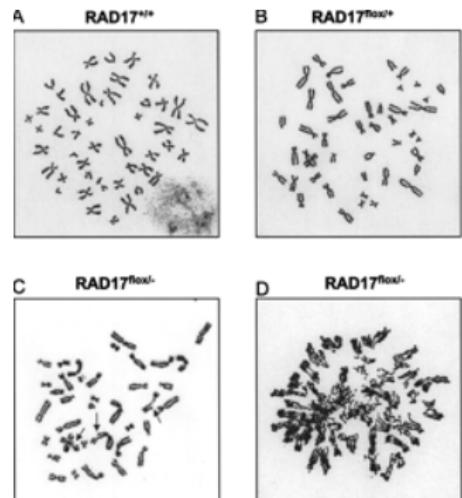
- **G1-S DNA kahjustuste kontrollpunkt:** S-faasi sisenemine on blokeeritud kui genoom on vigane.
- **S-faasi kontroll:** replikatsioon aeglustub või seisub vastusena DNA kahjustustele.
- **G2-M kontroll** blokeerib raku mitoosi sisenemise kuni genoomi replikatsioon S-faasis on lõpule viidud.
- **M faasis kontrollpunkt** mis blokeerib sisenemise anafase kuni kõik kromosoomid on korrektelt käavile kinnitunud.
- Eksisteerib veel **hilise G2 dekatenatsiooni kontroll** mis monitoorib, et kromosoomid ei oleks omavahel 'sõlmes'.

# Rad17: genoomi replitseeritakse ainult üks kord

Rad17 sensorvalgu fosfrüleerimine ATRi poolt on vajalik DNA-kahjustuste poolt indutseeritud G2-faasi blokiks.

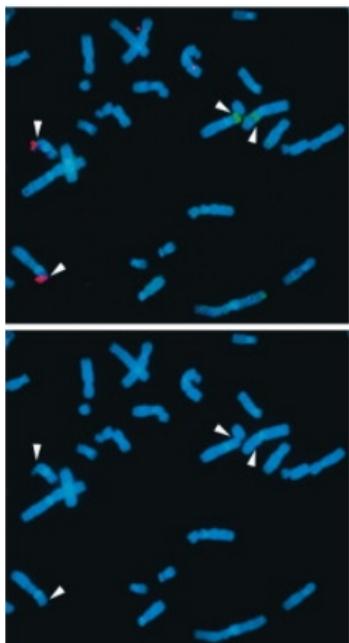
Komosoomi aberratioonid RAD17<sup>flox/-</sup> rakkudes.

- Katkenud komosoomid (all vasak, nool).
- Endoreduplitseerunud kromosoomid (all parem).



## ATR replikatsiooni check

Seriin-treoniin kinaas ATR tagab fragiilsete saitide stabiilsuse.



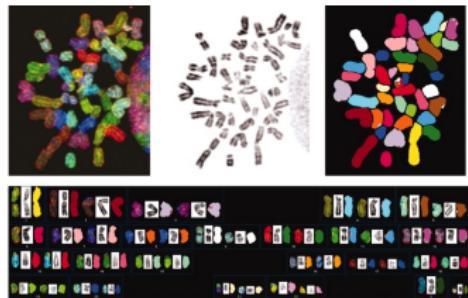
- **ATR aktiveeritakse vastuseks üheahelalisele DNA-le.**
- Aktiveeritud ATR fosforüleerib CHK1 kinaasi ja käivitatakse signaalirada mis viib rakutsükli blokini.

## BUB1: käävi kontrollpunkt

Käävi kontrollpunkt (*spindle assembly checkpoint, SAC*) hoiab ära aneuploidia tekke.

- Mutatsioonid mitoosikäävi kontrollpunktis võib põhjustada kromosomaalse ebastabiilsuse ja aneuplooidsuse,
- üle 90% tahketest kasvajatest sisaldab kromosomaalseid aberratsioone.
- BUB1 funktsiooni eksperimentaalne pärssimine on piisav rakkudes aneuploidse fenotüüpi tekkeks.

See BUB1-vigistatud rakk on kaotanud kromosoomid 1 ja 6.



## G<sub>1</sub> restriktiivpunkt

Tagab mitogeense kontrolli rakutsükli kulgemise üle.

- Varases- ja keskmises G<sub>1</sub> faasis on S-faasi sisenemine seerum sõltuv.
- Samuti on rakud tundlikud TGF- $\beta$  anti-mitogeensele toimele.
- Hilises G<sub>1</sub> faasis on rakud juba pühendunud S-faasi sisenemisele ja ei sõltu enam rakuvälistest signaalidest.

# RB fosforülatsoon reguleerib restriktsoonipunkti

- Kui rakud läbivad M/G1 ülemineku, siis RB defosforüleeritakse täielikult.
- G1 faasis tsükliin D-CDK4/6 hüpfosforüleerib RB.
- Hüpfosforüleeritud RB muutub tsükliin E-CDK2 substraadiks ja hüperfosforüleeritakse.
- RB jäab hüperfosforüleerituks kogu ülejäänud raku tsükli (kuni jälle G1-ni).

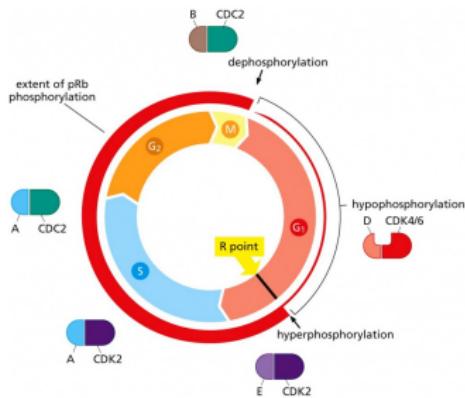


Figure 8.19 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

# $G_1 \rightarrow S$ kontroll: raku kasv ja rakuvälisted signaalid

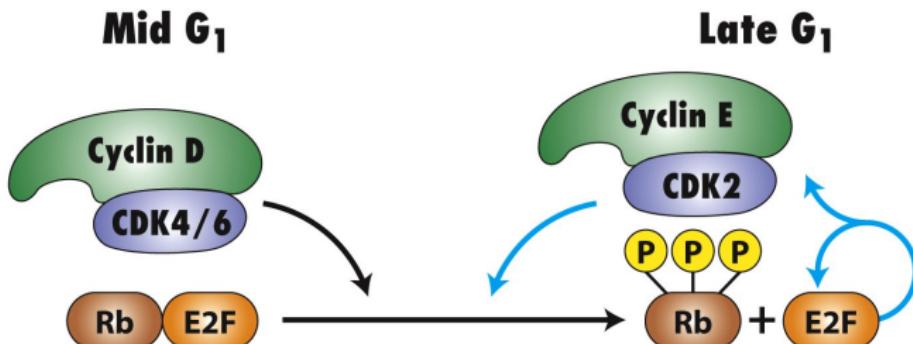


Figure 20-33  
Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Positiivsed signaalid

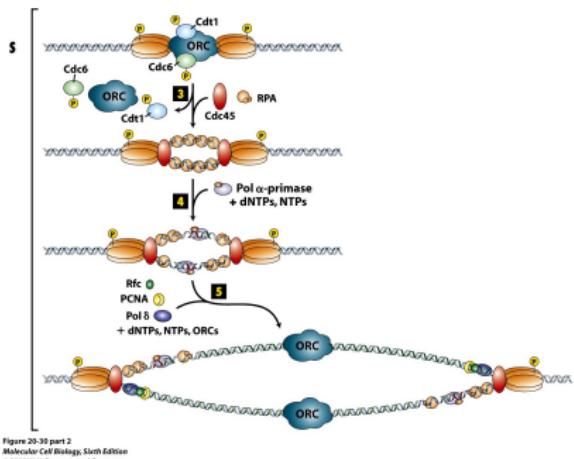
- kasv, ellujäämissignaalid, mitogeenid

## Negatiivsed signaalid

- tsütostaatilised, genotoksilised, metaboolsed, onkogeensed, oksüdatiivne stress

# E2F märklaudgeenid

- tsükliaan E,
- DNA replikatsiooni toetava kompleksi valgud: ORC-id, MCMs, DNA polymerase alfa,
- järgmistes sammudes vajalikud valgud: tsükliaan B, Cdk1 ja erinevad DNA kvaliteedikontrolli valgud.



# DNA metabolismi kontroll: ATM & ATR – DNA kahjustusi kontrollivad kinaasid

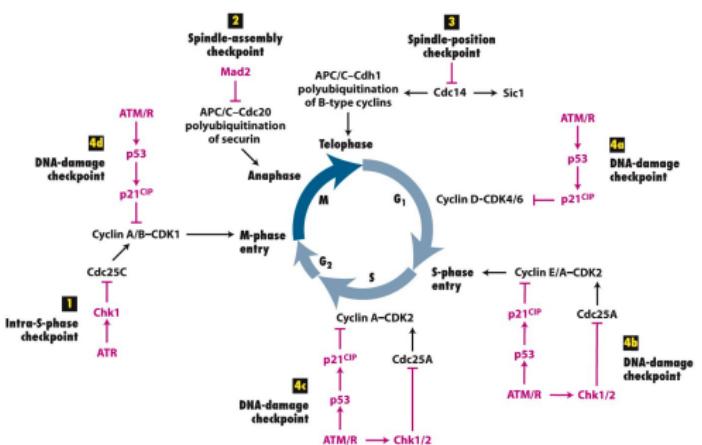
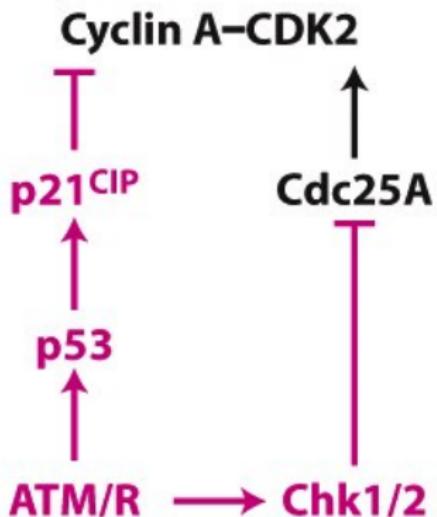


Figure 20-35  
Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

DNA kahjustused või replikatsioonikahvli arrest aktiveerivad kinaasid

- ATM (ataxia telangiectasia mutated)
- ATR (ATM and Rad3-related)

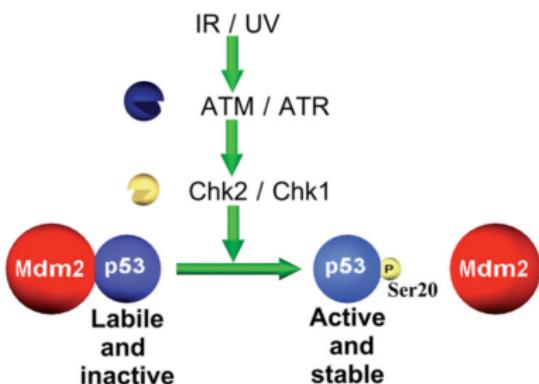
# DNA kvaliteedikontrolli mehhanismid: p53 sõltuv ja p53-sõltumatu rada



# p53 tuumorsupressor

p53 toimib mitme mehhaniymi kaudu:

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



# Mutantne p53

**p53 on muteerunud keskmiselt 45% kasvajates. Munasarjavähi puhul isegi 95% juhtudel.**

