

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
○○○	○○○○○	○	○○○○○	○○○○○	○○○	○○○○○○○○○○	

Rakutsükkel ja selle kontroll

Taavi Päll

Vähiuuringute tehnoloogia arenduskeskus

22. oktoober 2014

Rakutsükkel 1

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
●○○	○○○○○	○	○○○○○	○○○○○	○○○	○○○○○○○○○○	

Rakkude kasv ja jagunemine

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

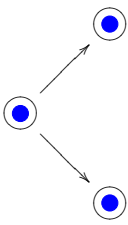



Rakutsükkel 2

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
○○○	○○○○○	○	○○○○○	○○○○○	○○○	○○○○○○○○○○	

Rakutsükkel

- Jagunemisprotsess, mis võimaldab rakkudel duplitseeruda.
- Rakutsükli lõpp-produktid (tütararakud) on samad mis algne materjal (emarakud).



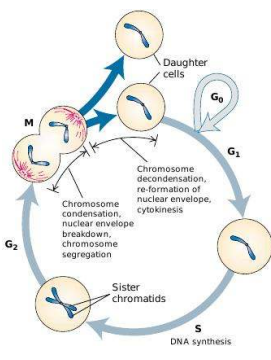
Rakutsükkel 3

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
○○●	○○○○○	○	○○○○○	○○○○○	○○○	○○○○○○○○○○	

Kromosomaalne tsükkel

$2N \rightarrow 4N \rightarrow 2N + 2N$

- Kromosoomide duplitseerumine ja jagunemine tütarakkude vahel.

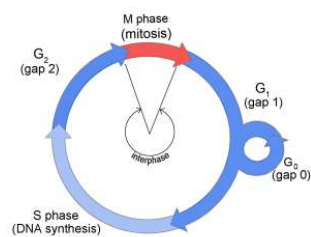


Rakutsükkel 4

Rakutsükli faasid

Raku pooldumisel

- 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 **telo faas**.

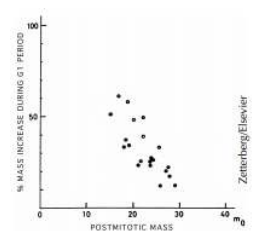


G_1 -faas

G_1 on raku tsükli faas, mis algab peale mitoosi ja kestab kuni DNA replikatsiooni alguseni S-faasis.

G_1 -faasis toimub

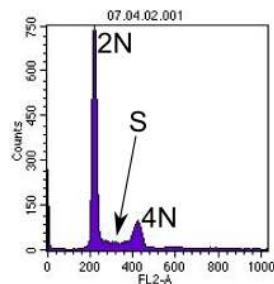
- rakkude kasv** – pärmil kindlasti, imetaja rakkude puhul pole päris kindel.
- ettevalmistus S-faasiks** – pre-replikatsiooni komplekside moodustumine.



Rakkudel mis on G_1 alguses suuremad on G_1 -s väiksem juurdekasv.

S-faasis toimub genoomse DNA süntees

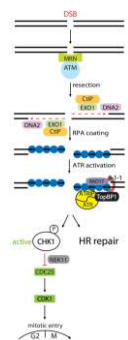
- Kromosoomide duplitseerumine leiab aset S faasis.
- Kogu genoom tuleb kopeerida täpselt ja ainult üks kord.
- Kõiki replikatsiooni alguspunkte kasutatakse ainult ja ainult üks kord.
- Duplitseerunud ödekromsoomid peavad jääma kõrvuti, mille eest vastutavad kohesiinid.



G_2 -faas

G_2 -faas on intervall DNA sünteesi eduka lõpu ja mitoosis toimuva kromosoomide lahkumise vahel

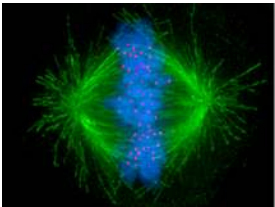
- suhteliselt lühike
- M-faasis vajalike valkude süntees
- viimane DNA kvaliteedikontroll – G_2 kontrollpunkt



Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	oooo●	o	ooooo	ooooo	ooo	oooooooooooo	

M-faasis toimub kromosoomide lahkumine

- **Profaasis** toimub kromosoomide kondenseerumine.
- Moodustub mitoosikääv.
- **Metafaasis** joonduvad ödekromatiidid.
- **Anafaasis** toimub ödekromatiidide lahkumine poolustele.
- **Telofaasis** moodustub uuesti tuumamembraan ja tuum.
- Tsütokinees.



Rakutsükel 9

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	●	ooooo	ooooo	ooo	oooooooooooo	

Põhiline rakutsükli regulatsioon

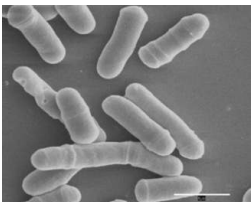
Kuidas tagada et rakutsükli faasid toimuksid õiges järjekorras

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

Rakutsükel 10

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	●ooooo	ooooo	ooo	oooooooooooo	

Rakkude jagunemisel oluliste geenide kirjeldamine sai alguse pärmis

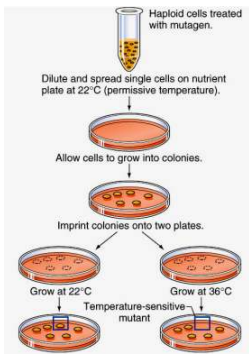


- Paul Nurse jt. poolt kirjeldati poolduvas pärmis *Schizosaccharomyces pombe* mutant/geen *cdc2* mis reguleerib S-faasi ja mitoosi algust.

Rakutsükel 11

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	●ooooo	ooooo	ooo	oooooooooooo	

Temperatuuritundlike mutantide isoleerimine pärmis

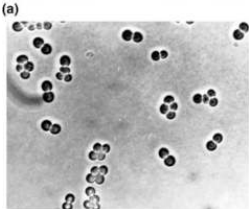
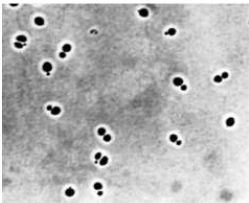


Haploidsetel organismidel, nagu pärm, on kõik mutatsioonid dominantsed

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

Rakutsükel 12

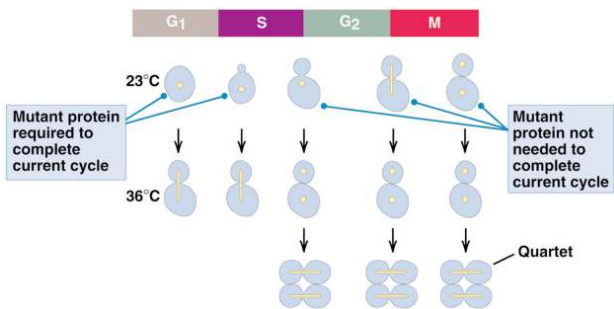
Pärmi rakutsükli mutandid



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



Mutantide isoleerimine

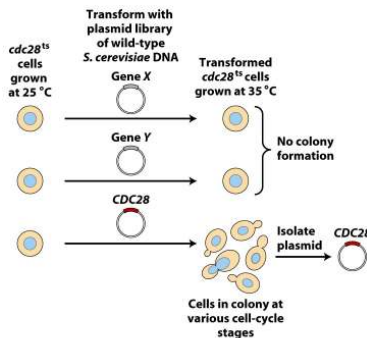


Figure 20-4 Molecular Cell Biology, Sixth Edition © 2008 W. H. Freeman and Company

Pärmist isoleeritud rakutsükliit 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 cyclins	Cln1, Cln2
Early S-phase cyclins	Cib5, Cib6
Late S-phase and early mitotic cyclins	Cib3, Cib4
Late mitotic cyclins	Cib1, Cib2

NOTE: These 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 mitotic 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: These 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 mitotic promoting factor (MPF).

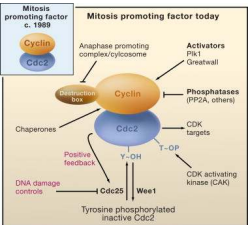
Sissejuhatus ooo	Rakutsükli faasid ooooo	Paradigma o	Pärm ooooooo	Tsükliinide avastamine ●ooooo	Regulatsioon oooo	Kontrollid oooooooooooo	Vähk
MPF kannuskonnas ja merisiilikus							
<ul style="list-style-type: none"> Aafrika kannuskonna (<i>Xenopus laevis</i>) ja merisiiliku (<i>Arbacia punctulata</i>) meioosi uurimine 1970 ja 1980 aastatel viis MPF faktori (<i>maturation-promoting factor</i>) kirjeldamiseni. 							
Rakutsükkel							17

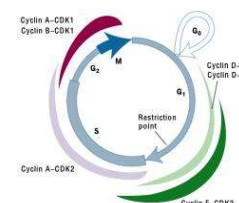
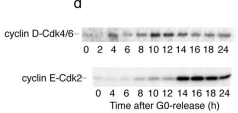
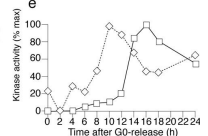
Sissejuhatus ooo	Rakutsükli faasid ooooo	Paradigma o	Pärm ooooooo	Tsükliinide avastamine ●ooooo	Regulatsioon oooo	Kontrollid oooooooooooo	Vähk
MPF kannuskonnas ja merisiilikus							
<p>1982. aastal avastasid Tim Hunt jt. merisiiliku valgusünteesi uurides valgud mis akumulerusid tugevalt interfaasis ja mille tase langes kiiresti peale ootsüütide jagunemist.</p> <ul style="list-style-type: none"> Nad nimetasid need ja teised sarnaselt käituvad rakutsükliks ostsilleeruvad valgud tsükliinideks. Kõigepealt kirjeldati molekulmassist lähtuvalt kaks tsükliini - A ja B. Sarnasus MPF ja tsükliinide vahel oli silmatorkav. 							
Rakutsükkel							18

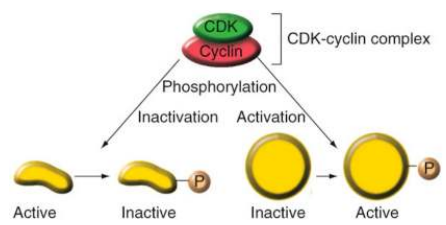
Sissejuhatus ooo	Rakutsükli faasid ooooo	Paradigma o	Pärm ooooooo	Tsükliinide avastamine ●ooooo	Regulatsioon oooo	Kontrollid oooooooooooo	Vähk
Tsükliini süntees on vajalik rakutsükli töös hoidmiseks							
<p>Marc Kirschner ja Andrew Murray uurisid 1989 tsükliinide rolli <i>Xenopuse</i> raku ekstraktides.</p> <ul style="list-style-type: none"> Põhinedes Yoshio Masui varasemalt läbi viidud töö, löid nad rakuvara mudeli mis võis läbida kolm ja enam tsükliit. Nad näitasid, et valgusüntees on vajalik <i>in vitro</i> rakutsükli läbimiseks. <i>In vitro</i> 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. 							
Rakutsükkel							19

Sissejuhatus ooo	Rakutsükli faasid ooooo	Paradigma o	Pärm ooooooo	Tsükliinide avastamine ●ooooo	Regulatsioon oooo	Kontrollid oooooooooooo	Vähk
Tsükliin B lagundamine on vajalik meioosist ja mitoosist väljumisel							
<ul style="list-style-type: none"> Murray ja Kirschner genereerisid tsükliin 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 arreteeris ekstrakti M faasi. Sama juhtus ka trunkeeritud tsükliini B süstimisel ootsüütidesse. 							
Rakutsükkel							20

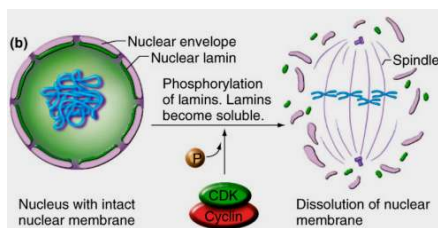
Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	ooooo	ooo	oooooooooooo	
Tsükliin on otsene Cdc2 (Cdk1) regulaator							
MPF-i puhastamine viis tsükliin-kinaasi kompleksi kirjeldamiseni.							
<ul style="list-style-type: none"> Kuigi 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 kinaasest 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 kinaasest aktiivsust. Lõpuks näidatigi, et merekarbi (<i>Spisula solidissima</i>) embrüote homogeneaadist ko-sadestusid tsükliinid koos Cdc2 kinaasse aktiivsusega (Draetta et al., 1989). 							
Rakutsükkel							21

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	ooooo	ooo	oooooooooooo	
Kirjeldati uus klass kinaase							
							
<ul style="list-style-type: none"> Kõik tsükliinidega seotud kinaasid otsustati 1991. aastal nimetada tsükliin-sõltuvateks kinaasideks ehk <i>i.k.</i> CDK. Cdc2 nimetati nii esimesena Cdk1. 							
Rakutsükkel							22

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

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo	ooo	oooooooooooo	
Tsükliinid ja tsükliin kinaasid							
Tsükliin-sõltuvad kinaasid (CDK) reguleerivad rakutsükliit fosforüleerides teisi valke							
							
Rakutsükkel							24

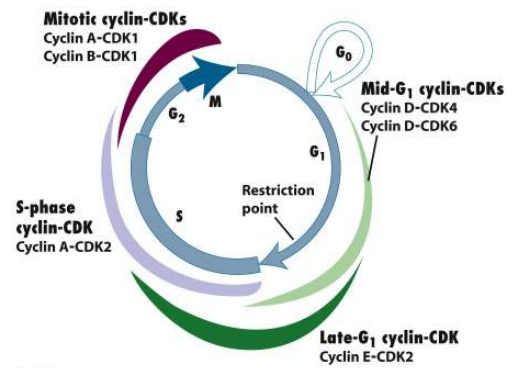
Tuuma lamiinid on CDK substraadiks



Rakutsükkel

25

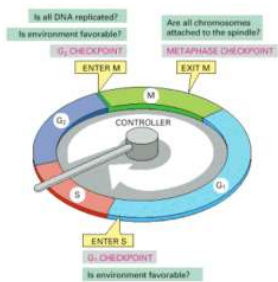
Rakutsükli eri faasides on aktiivsed erinevad tsükliin-kinaasi kompleksid



Rakutsükkel

26

Rakutsükli kontrollpunktid



Genoomi stabiilsuse rakutsüklis tagavad kolm kontrollpunkti

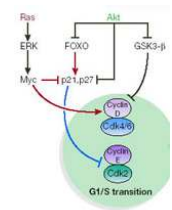
- G₁→S kontrollpunkt
- G₂→M-faasi kontrollpunkt
- metafaasi kontrollpunkt

Rakutsükkel

27

G₁ restriktsoonipunkt

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



Rakutsükkel

28

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	ooooo	ooooo

G₁→S kontroll: raku kasv ja rakuvälised signaalid

Mid G₁

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

Late G₁

Positiivsed signaalid

- kasv, ellujäämissignaalid, mitogeenid

Negatiivsed signaalid

- tsütostaatilised, genotoksilised, metaboolsed, onkogeensed, oksüdatiivne stress

Rakutsükkel 29

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	ooooo	ooooo

E2F märklaudgeenid

- 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.

Figure 20-24 Molecular Cell Biology, Sixth Edition © 2008 W. H. Freeman and Company

Rakutsükkel 30

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	ooooo	ooooo

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

Figure 20-25 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)

Rakutsükkel 31

Sissejuhatus	Rakutsükli faasid	Paradigma	Pärm	Tsükliinide avastamine	Regulatsioon	Kontrollid	Vähk
ooo	ooooo	o	oooooo	oooooo	oooo	ooooo	ooooo

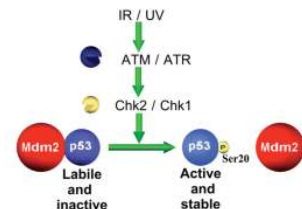
DNA kvaliteedikontrolli mehhanismid: p53 sõltuv ja p53-sõltumatu rada

Rakutsükkel 32

p53 tuumorsupressor

p53 toimib mitme mehhanismi kaudu:

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

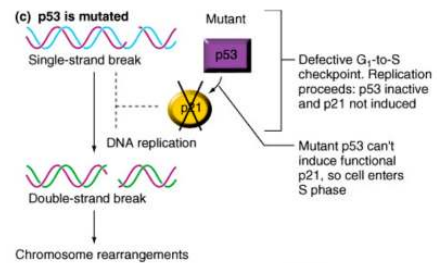


Rakutsükkel

33

Mutantne p53

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



Rakutsükkel

34

Kromatiidide lahkne mine

Õdekromatiidide hoiavad koos kohesiinid

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

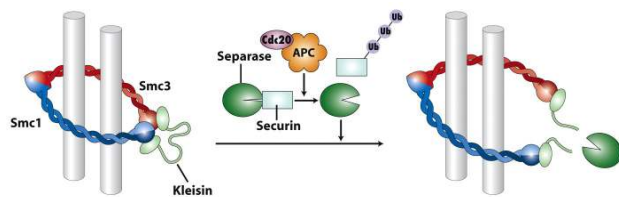


Figure 20-23
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Rakutsükkel

35

Mitoosikäävi kontrollpunkt

Kas kõik kinetohoorid on seotud mitoosikäävi mikrotuubulitega?

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

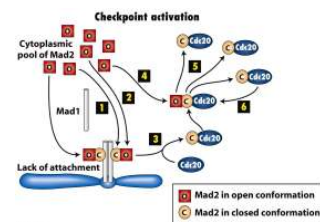


Figure 20-25
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Rakutsükkel

36

Sagedasemad mutatsioonid kasvajates

