

Sissejuhatus
OO

Rakutsükli faasid
OOOOOO

Pärm
OOOOOO

Tsüklendi avastamine
OOOOO

Regulatsioon
OOOOOOOO

Kontrollid
OOOOOOOOOOOO

Rakutsükkel ja selle kontroll

Taavi Päll

Tallinna Tehnikaülikool

22. oktoober 2015

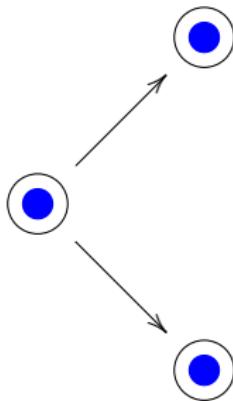
Rakkude kasv ja jagunemine

- 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

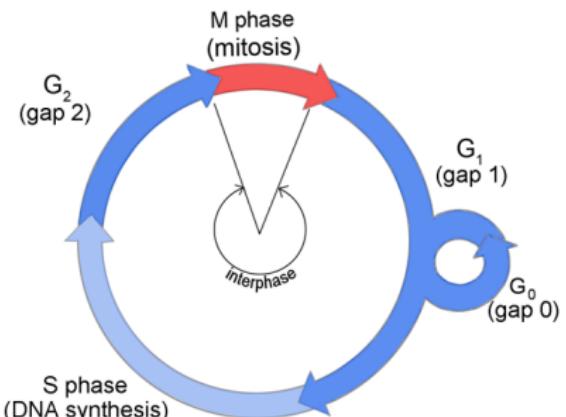
- Rakutsükkel on järjestikuste sündmuste jada mille käigus rakk duplitseerib kõik oma koostisosad ja jaguneb kaheks tütarraukuks.
- Rakutsüklit kontrolliv 'masinaväärk' on universaalne kõigis organismi rakutüüpides.
- Raku rakutsüklisse sisenemist ja 'masinavärgi käivitamist' reguleerivad raku väliskeskkonna signaalid.



Rakutsükli faasid

Neli üksteisele järgnevat faasi

- $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ faas.
- **G₁, S ja G₂ moodustavad interfaasi.**
- Mitoosi faasid on **profaas, metafaas, anafaas ja telofaas**.
- Mittejagunev rakk on vaikeolekus (*quiescence*) ehk G₀ faasis.



G₁-faas

G₁ on raku tsükli faas, mis algab peale mitoosi ja kestab kuni DNA replikatsiooni alguseni S-faasis.

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

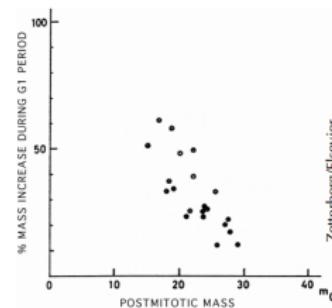


Figure 1: *

Rakkudel mis on G₁ alguses suuremad on G₁-s väiksem juurdekasv.

Sissejuhatus
○○

Rakutsükli faasid
○○●○○○

Pärm
○○○○○

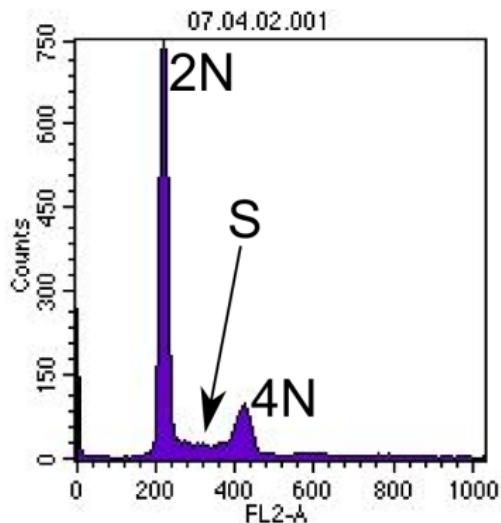
Tsükliajade avastamine
○○○○○

Regulatsioon
○○○○○○○○

Kontrollid
○○○○○○○○○○○○

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 õdekromosoomid peavad jäma kõrvuti, mille eest vastutavad kohesiinid.



Sissejuhatus
○○

Rakutsükli faasid
○○○●○○

Pärm
○○○○○○

Tsüklinide avastamine
○○○○○

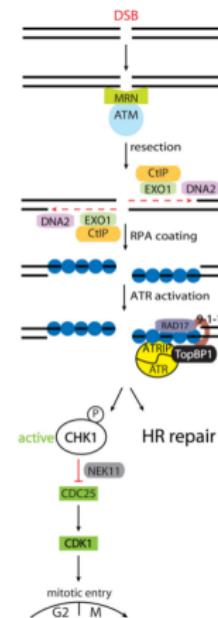
Regulatsioon
○○○○○○○○

Kontrollid
○○○○○○○○○○○○

G₂-faas

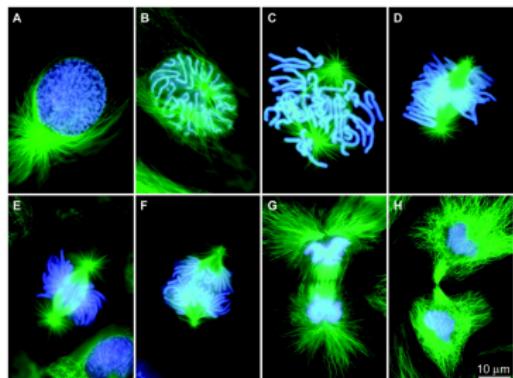
G₂-faas on intervall DNA sünteesi eduka lõpu ja mitoosis toimuva kromosoomide lahknemise vahel

- suhteliselt lühike
- M-faasis vajalike valkude süntees
- viimane DNA kvaliteedikontroll – G₂ kontrollpunkt



M-faasis toimub kromosoomide lahknemine

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



Sissejuhatus
OO

Rakutsükli faasid
OOOO●

Pärm
OOOOO

Tsükliajade avastamine
OOOO

Regulatsioon
OOOOOOO

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



Rakutsükli faasid



Pärm



Tsükliajide avastamine



Regulatsioon



Kontrollid



Rakkude jagunemist kontrollivate geenide kirjeldamine sai alguse pärmis

GENETIC ANALYSIS OF *cdc* MUTANTS

269

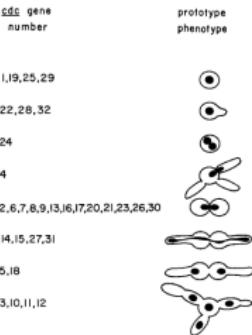
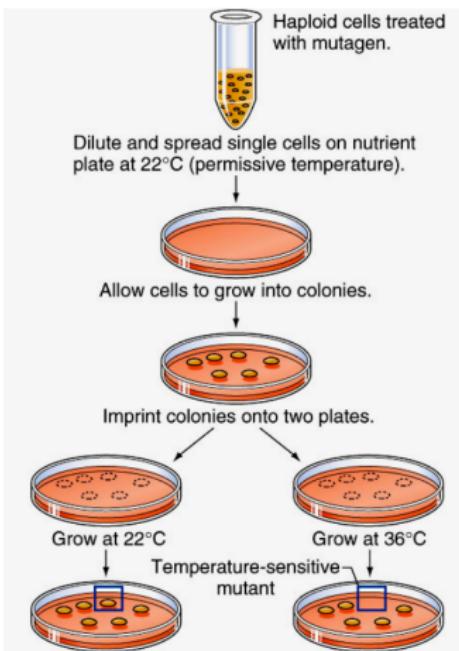


FIGURE 1.—Prototype phenotypes of *cdc* mutants after the termination of cell cycle development at the restrictive temperature.

- Leland H. (Lee) Hartwell jt. kirjeldasid 1970ndate alguses terve rea *Saccharomyces cerevisiae* jagunemise mutante

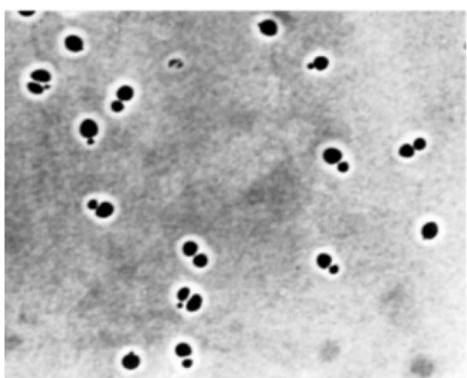
Temperatuuritundlike mutantide isoleerimine pärmis



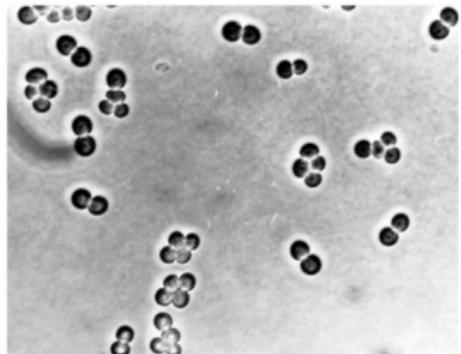
Haploidsetel organismidel,
nagu pärm, on kõik
mutatsioonid dominantsed

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

Pärmi rakutsükli mutandid



(a)



Permissiivsel temperatuuril
on pärmi populatsioonis
erineva suurusega pungasid.

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

Sissejuhatus



Rakutsükli faasid



Pärm



Tsükliajade avastamine



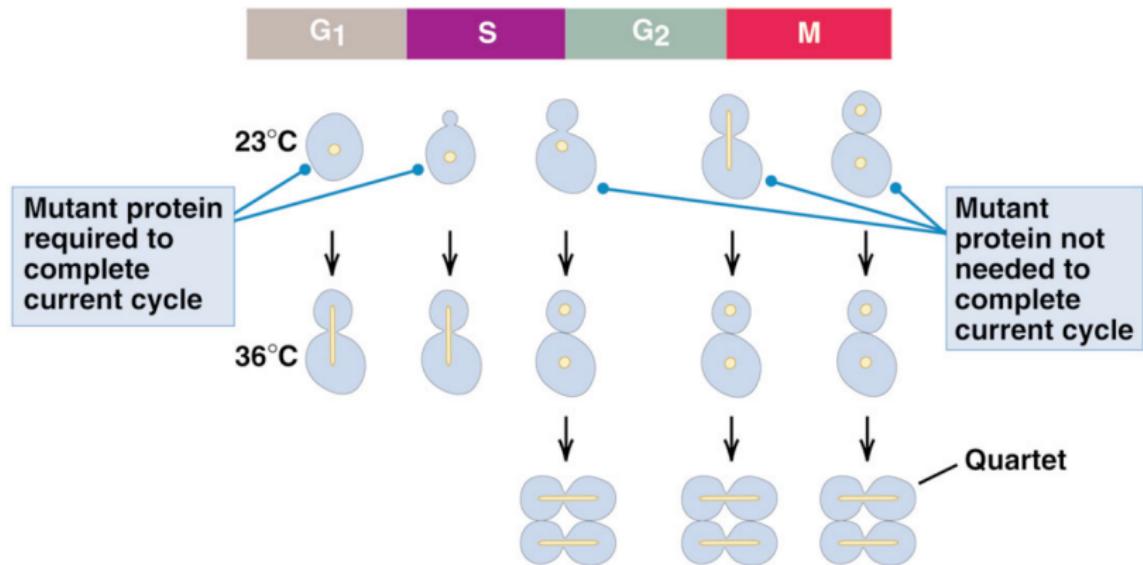
Regulatsioon



Kontrollid



Temperatuuritundlike mutantide kasutamine geeni funktsiooni sidumisel rakutsükli faasiga



Sissejuhatus
○○

Rakutsükli faasid
○○○○○

Pärm
○○○○●○

Tsükliaastamine
○○○○○

Regulatsioon
○○○○○○○○

Kontrollid
○○○○○○○○○○○○

Mutantide isoleerimine

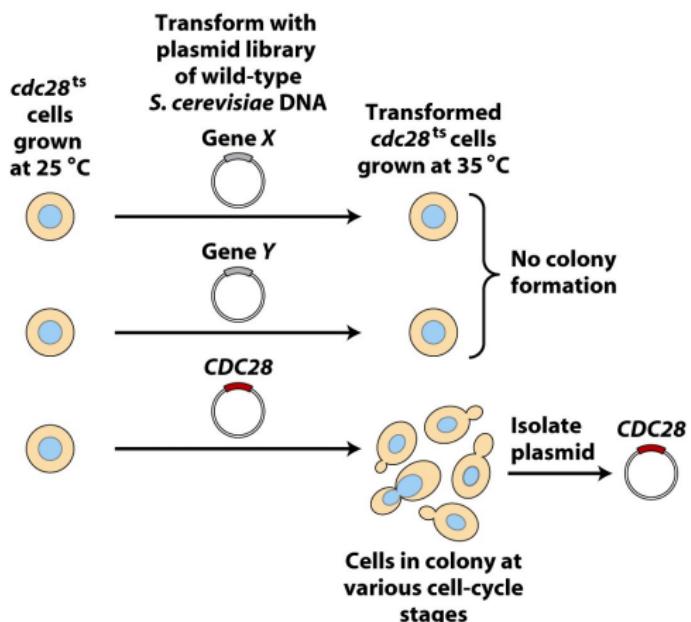


Figure 20-4
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Pärmist isoleeritud rakutsüklit reguleerivad geenid

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

ORGANISM /PROTEIN	NAME
S. POMBE	
CDK (one only)	Cdc2
Mitotic cyclin (one only)	Cdc13
S. CEREVISIAE	
CDK (one only)	Cdc28
Mid-G ₁ cyclin	Cln3
Late-G ₁ cyclins	Cln1, Cln2
Early S-phase cyclins	Clb5, 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 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 *mitosis-promoting factor* (MPF).

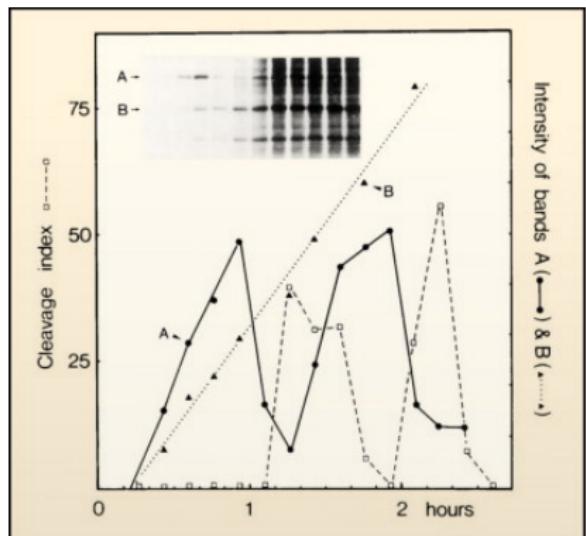
Table 20-1 part 2

Molecular Cell Biology, Sixth Edition

© 2008 W.H. Freeman and Company

MPF merisiilikus

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

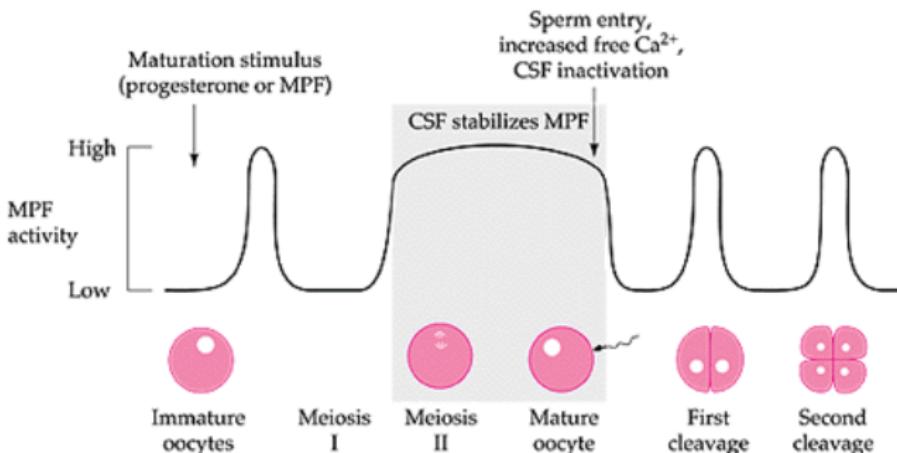


- Nad nimetasid need ja teised sarnaselt käituvad rakutsüklist ostssilleeruvad valgud **tsükliaastideks**
- Kõigepealt kirjeldati kaks tsükliaasti - A ja B

Tsükliini süntees on vajalik rakutsükli töös hoidmiseks

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

- *In vitro* transkribeeritud merisiiliku tsükliin B mRNA taastas rakutsükli ekstraktides kus mRNA oli ensümaatiiselt lagundatud.
- Samuti taastas tsüklii *in vitro* transleeritud tsükliin B valk ekstraktides kus valgusüntees oli blokeeritud.



Sissejuhatus

00

Rakutsükli faasid

○○○○○○

Pärm

○○○○○○

Tsüklüinide avastamine

○○●○○

Regulatsioon

○○○○○○○○

Kontrollid

○○○○○○○○○○

Tsükliin B lagundamine on vajalik meioosist ja mitoosist väljumisel

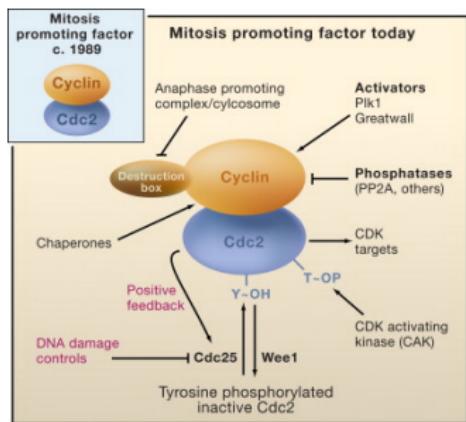
- Murray ja Kirschner genereerisid tsüklipi B amino-terminaalse deletsioonimutandi,
 - deletsioonimutant oli resistentne proteolüütilese lagundamisele mitoosis,
 - kuid aktiveeris MPF-i ja viis ekstraktid M faasi.
 - See mutant arresteris ekstrakti M faasi.
 - Sama juhtus ka trunkeeritud tsüklipi B süstimesel 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 tsüklinskiidega seotud kinaasid otsustati 1991. aastal nimetada tsüklinski-sõltuvateks kinaasideks ehk *i.k.* **CDK**.
- Cdc2 nimetati nii esimesena Cdk1.

Sissejuhatus
○○

Rakutsükli faasid
○○○○○○

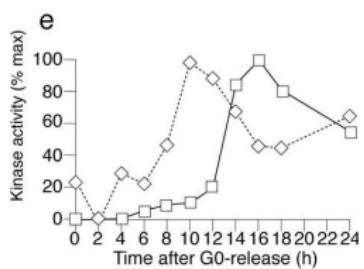
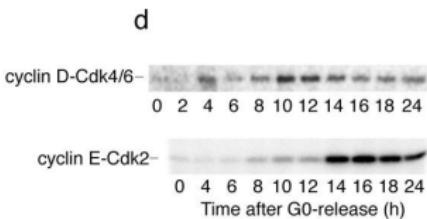
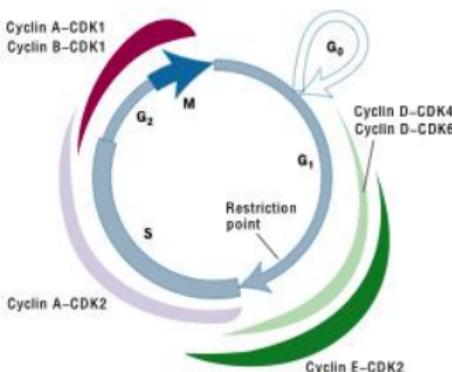
Pärm
○○○○○○

Tsükliinide avastamine
○○○○○

Regulatsioon
●○○○○○○○

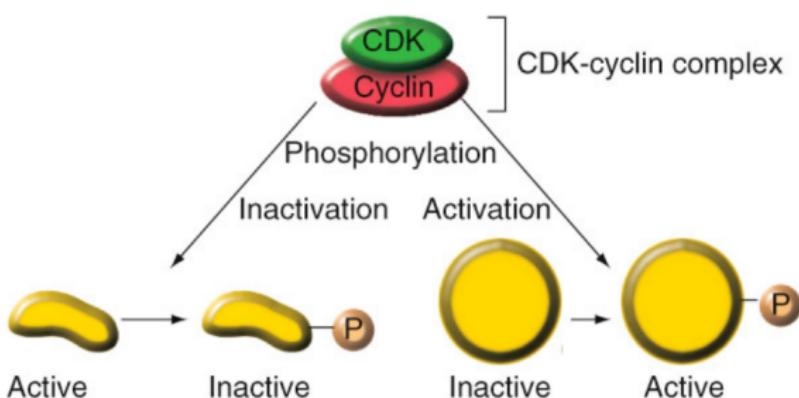
Kontrollid
○○○○○○○○○○○○

Tsükliin-CDK komplekside järjestikune aktivatsioon



Tsükliinid ja tsükliin kinaasid

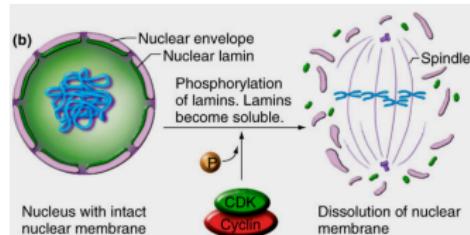
Tsükliin-sõltuvad kinaasid (CDK) reguleerivad rakutsüklist fosforüleerides teisi valke



Ka rakutsükli masinavärki reguleerivad kinaasid

CDK substraadid

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



Sissejuhatus

Rakutsükli faasid

Pärm

Tsükliinide avastamine

Regulatsioon

Kontrollid

Rakutsükli eri faasides on aktiivsed erinevad tsüklia-kinaasi kompleksid

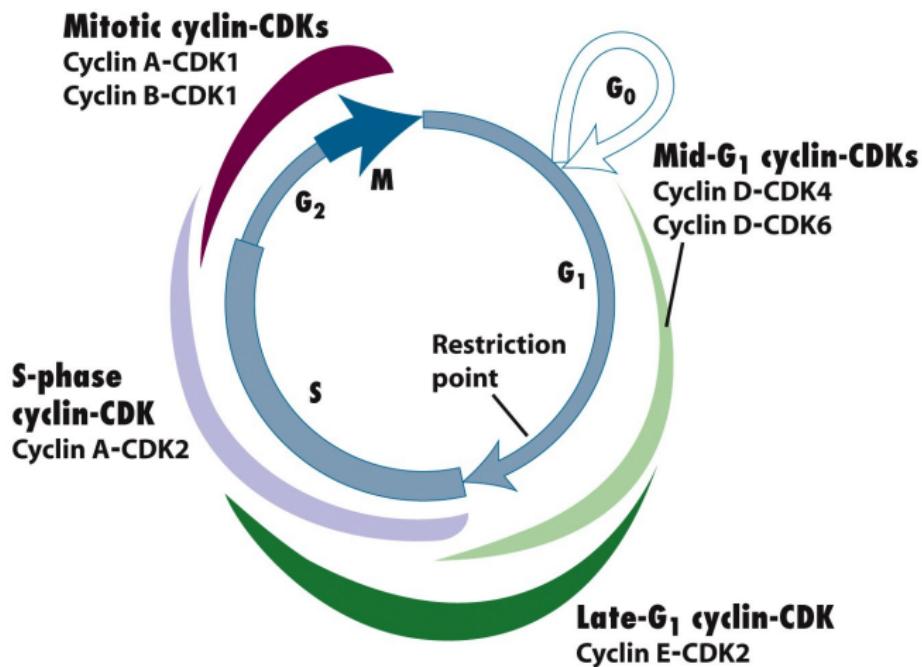
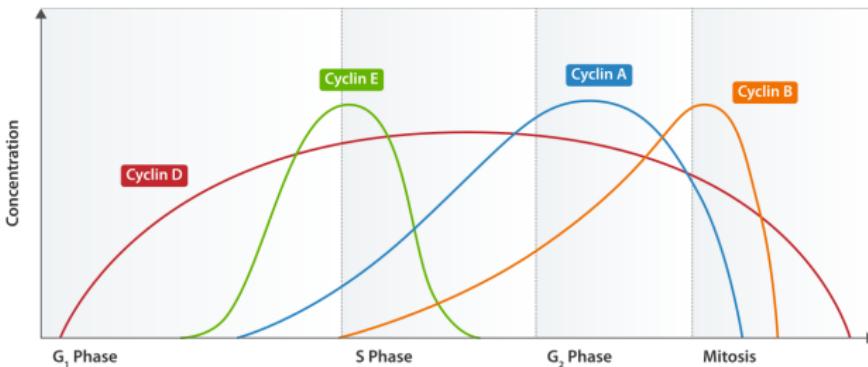


Figure 20-32
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W.H. Freeman and Company

Tsükliinide hulk rakus muutub rakutsükli käigus

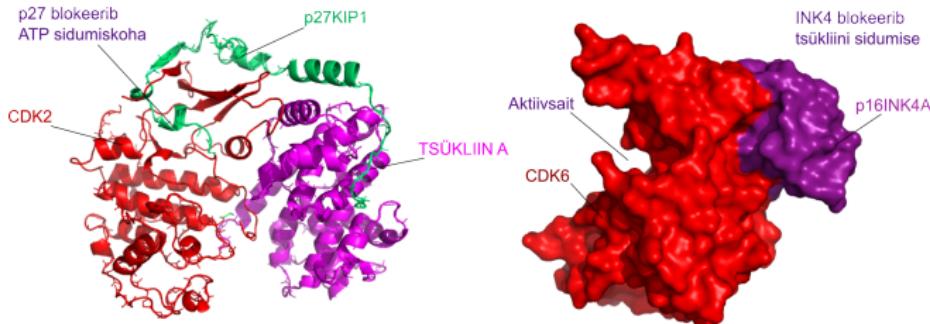
- Tsükliine kontrollitakse läbi proteolüüt�ise lagundamise.
- Tsükliini järkjärguline tõus ja kiire lagundamine tagab rakutsükli 'hammasrataste' liikumise ühes sunas.
- D-tsükliinid erinevad: nende puhu ei toimu järske kõikumisi rakutsükli käigus.
- D-tsükliinid on reguleeritud mitogeensete sinaalide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



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

Praeguseks on kirjeldatud seitse erinevat Cdki-d.

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



TGF- β indutseerib p15^{INK4B}

- TGF- β peamine raku jagunemist pidurdav mehhanism töötab läbi p15^{INK4B}.
- p15^{INK4B} blokeerib tsükliajade D-CDK4/6 komplekside moodustumise ja inhibeeriib olemasolevaid.
- Ilma aktiivse tsükliajade D-CDK4/6 pole rakutsükkel võimeline arenema läbi varase ja keskmise G1 faasi restriktioonipunktini.
- Kui rakk on juba restriktioonipunkti läbinud pole enam D-CDK4/6 aktiivsus vajalik.
- Peale restriktioonipunkti muutub rakk 'tundetuks' ka TGF- β inhibeerivale toimele.

Sissejuhatus
OO

Rakutsükli faasid
OOOOOO

Pärm
OOOOOO

Tsükliainide avastamine
OOOOO

Regulatsioon
OOOOOO●

Kontrollid
OOOOOOOOOOOO

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 maha.

Rakutsükli kontrollpunktid

Genoomi stabiilsuse rakutsüklis tagavad *checkpointid*

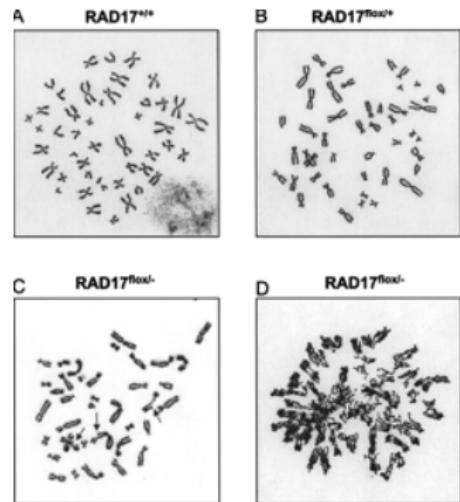
- **G1-S DNA kahjustuste kontrollpunkt:** S-faasi sisenemine on blokeeritud kui genoom on vigane.
- **S-faasi kontroll:** replikatsioon aeglustub või seiskub vastusena DNA kahjustustele.
- **G2-M kontroll** blokeerib raku mitoosi sisenemise kuni genoomi replikatsioon S-faasis on lõpule viidud.
- **M faasis kontrollpunkt** mis blokeerib sisenemise anafaasi 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-kahjustustele poolt indutseeritud G2-faasi blokiks.

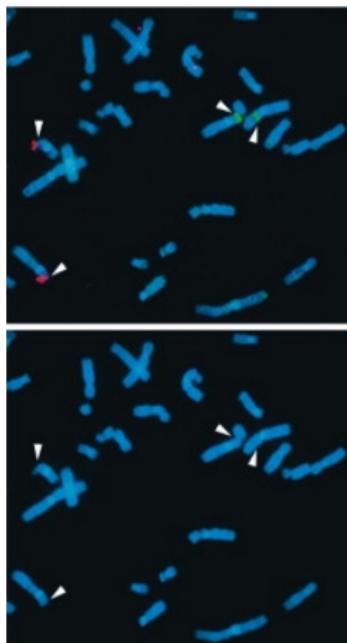
Komosoomi aberratioonid RAD17^{flox/-} rakkudes.

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



ATR replikatsiooni check

Seriin-treoniin kinaas ATR tagab fragiilsete saitide stabiilsuse.



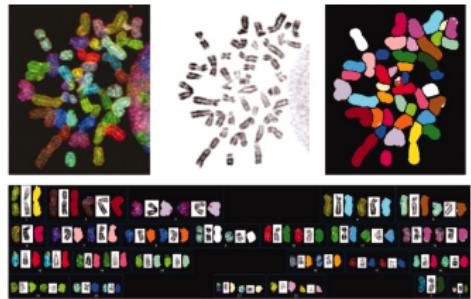
- **ATR aktiveeritakse vastuseks üheahelalisele DNA-le.**
- Aktiveeritud ATR fosforüleerib CHK1 kinaasi ja käivitatakse signaalirada mis viib rakutsükli blokini.

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 funktsooni eksperimentaalne pärsimine on piisav rakkudes aneuploidse fenotüüpi tekkeks.

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



Sissejuhatus
OO

Rakutsükli faasid
OOOOOO

Pärm
OOOOOO

Tsükliajade avastamine
OOOOO

Regulatsioon
OOOOOOOO

Kontrollid
OOOO●OOOOOOOO

G₁ restriktiivpunkt

Tagab mitogeense kontrolli rakutsükli kulgemise üle.

- Varases- ja keskmises G₁ faasis on S-faasi sisenemine seerum sõltuv.
- Samuti on rakud tundlikud TGF- β anti-mitogeensele toimele.
- Hilises G₁ 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 hüpoposforüleerib RB.
- Hüpoposforüleeritud RB muutub tsükliin E-CDK2 substraadiiks ja hüperfosforüleeritakse.
- RB jäääb hüperfosforüleerituks kogu ülejääenud raku tsükli (kuni jälle G1-ni).

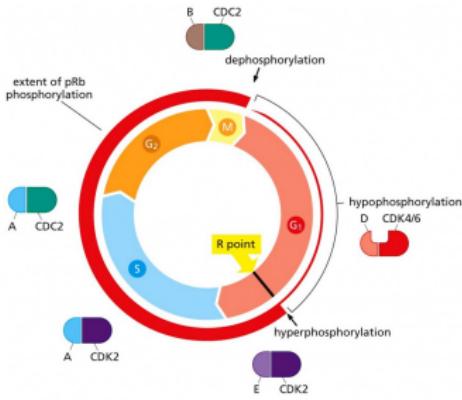


Figure 8.19 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

$G_1 \rightarrow S$ kontroll: raku kasv ja rakuvälised signaalid

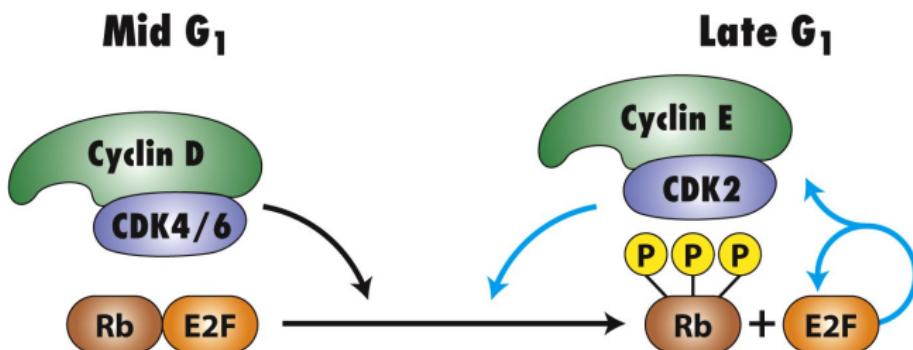


Figure 20-33
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Positiivsed signaalid

- kasv, ellujäämissignaalid, mitogeenid

Negatiivsed signaalid

- tsütostataatilised, genotoksilised, metaboolsed, onkogeensed, oksüdatiivne stress

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.

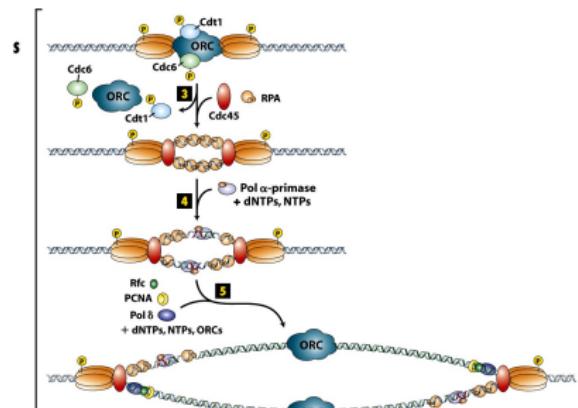


Figure 20-30 part 2
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

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

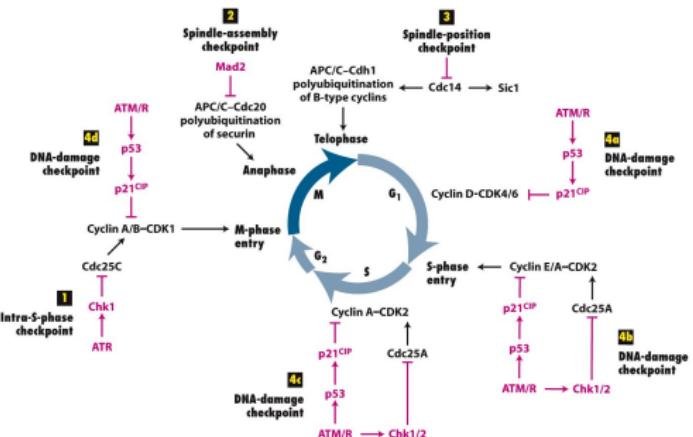
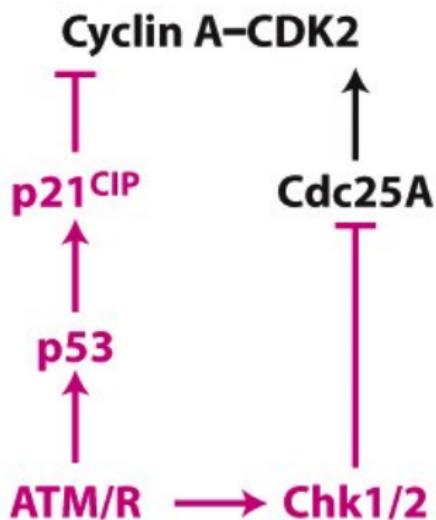


Figure 20-35
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

DNA kahjustused või replikatsioonikahvli arrest aktiveerivad kinaasid

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

DNA kvaliteedikontrolli mehanismid: p53 sõltuv ja p53-sõltumatu rada



Sissejuhatus
OO

Rakutsükli faasid
OOOOOO

Pärm
OOOOOO

Tsükliaalide avastamine
OOOOO

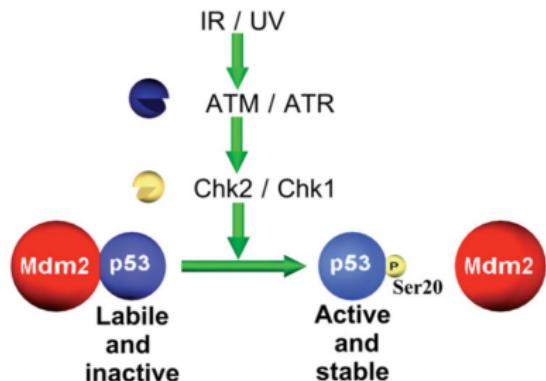
Regulatsioon
OOOOOOOO

Kontrollid
OOOOOOOOOO●○

p53 tuumorsuppressor

p53 toimib mitme mehhanismi kaudu:

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



Mutantne p53

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

