

## Rakutsükkel ja selle kontroll

Taavi Päll

Vähiuuringute tehnoloogia arenduskeskus

23. oktoober 2013

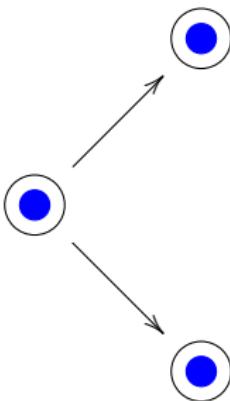
## Rakkude kasv ja jagunemine

- 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

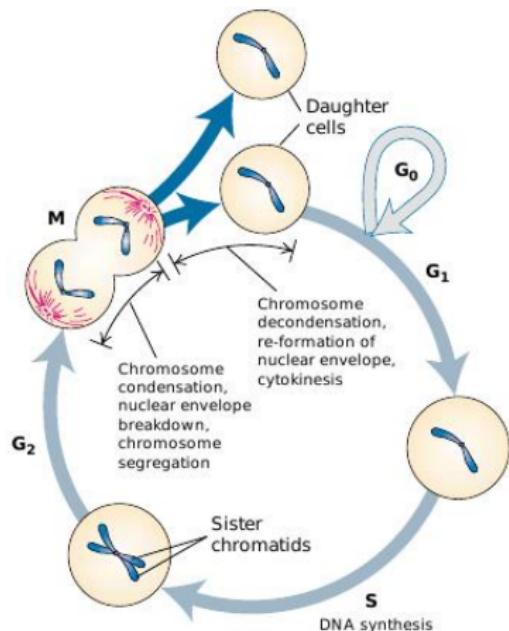
- Jagunemisprotsess, mis võimaldab rakkudel duplitseeruda.
  - Rakutsükli lõpp-produktid (tütarrakud) on samad mis algne materjal (emarakud).



## Kromosomaalne tsükkeli

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

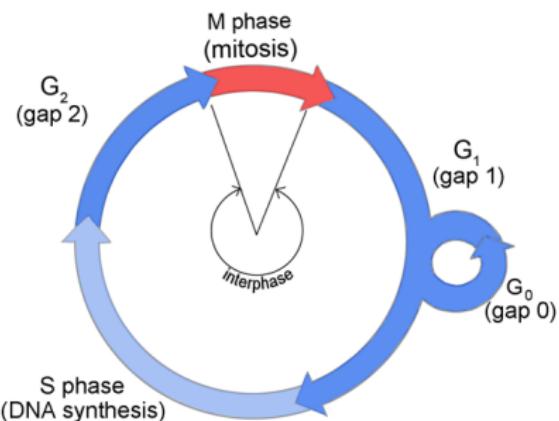
- Kromosoomide duplitseerumine ja jagunemine tütarakkude vahel.



## Rakutsükli faasid

## Raku pooldumisel

- Neli üksteisele järgnevat faasi: G1 → S → G2 → M faas.
  - G1, S ja G2 moodustavad **interfaasi**.
  - Mitoosi faasid on **profaas**, **metafaas**, **anafaas** ja **telofaas**.

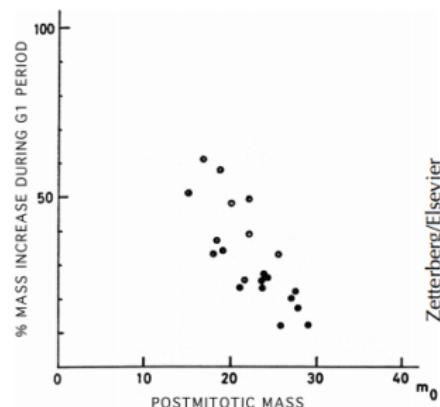


G<sub>1</sub>-faas

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

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

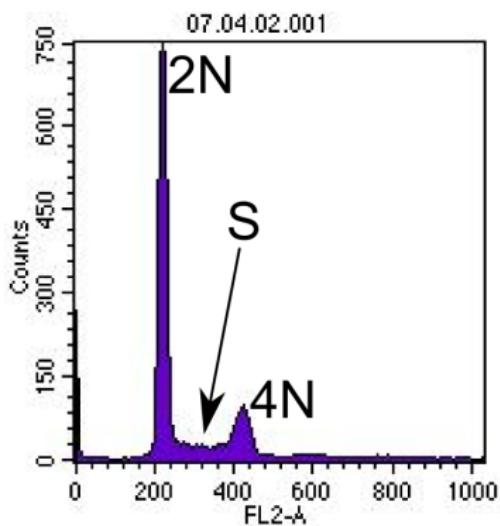
- **rakkude kasv** – pärmil kindlasti, imetaja rakkude puhul pole päris kindel.
  - **ettevalmistus S-faasiks** – pre-replikatsiooni komplekside moodustumine.



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

## S-faasis toimub genoomse DNA süntees

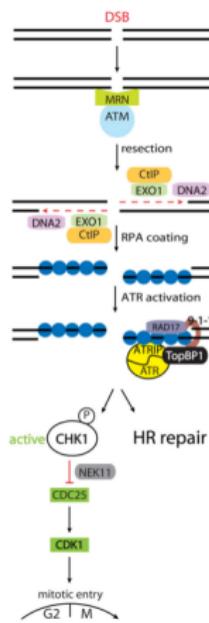
- Kromosoomide duplitseerumine leiab aset S faasis.
  - Kogu genoom tuleb kopeerida täpselt ja ainult üks kord.
  - Kõiki replikatsiooni alguspunkte kasutatakse ainult ja ainult üks kord.
  - Duplitseerunud õdekromsoomid peavad jäälma kõrvuti, mille eest vastutavad kohesiinid.



G<sub>2</sub>-faas

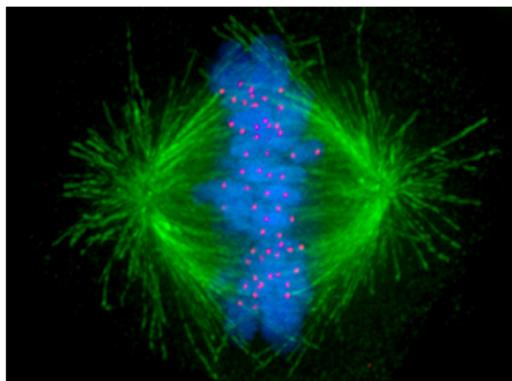
$G_2$ -faas on intervall DNA sünteesi eduka lõpu ja mitoosis toimuva kromosoomide lahknemise vahel

- 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.

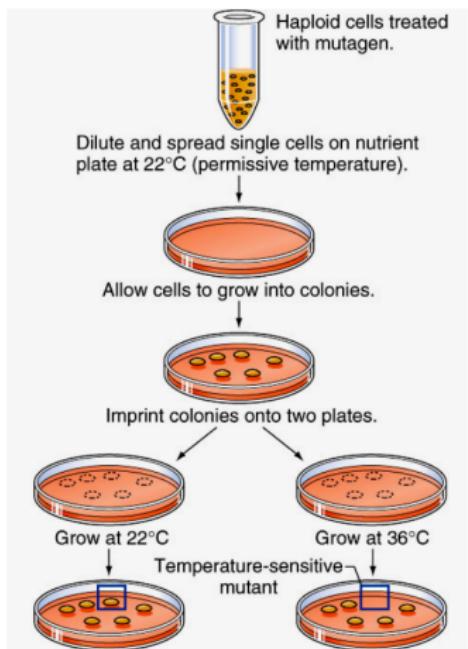


# Põhiline rakutsükli regulatsioonis

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.

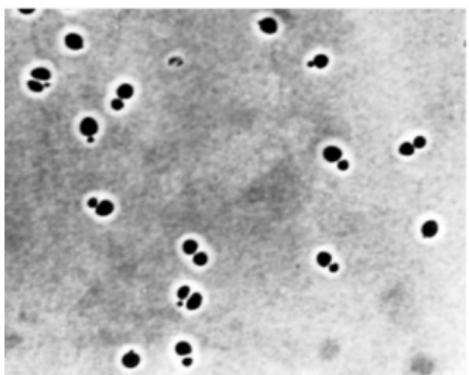
# Temperatuuritundlike mutantide isoleerimine pärnis



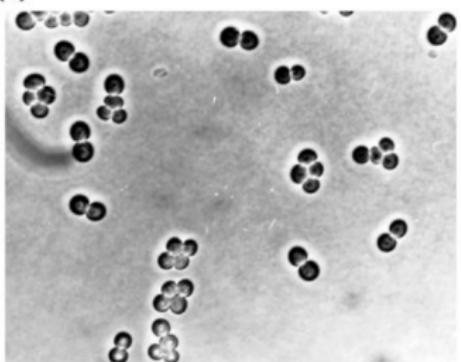
Haploidsetel organismidel, nagu pärn, on kõik mutatsioonid dominantsed

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

# Pärmi rakutsükli mutandid



(a)

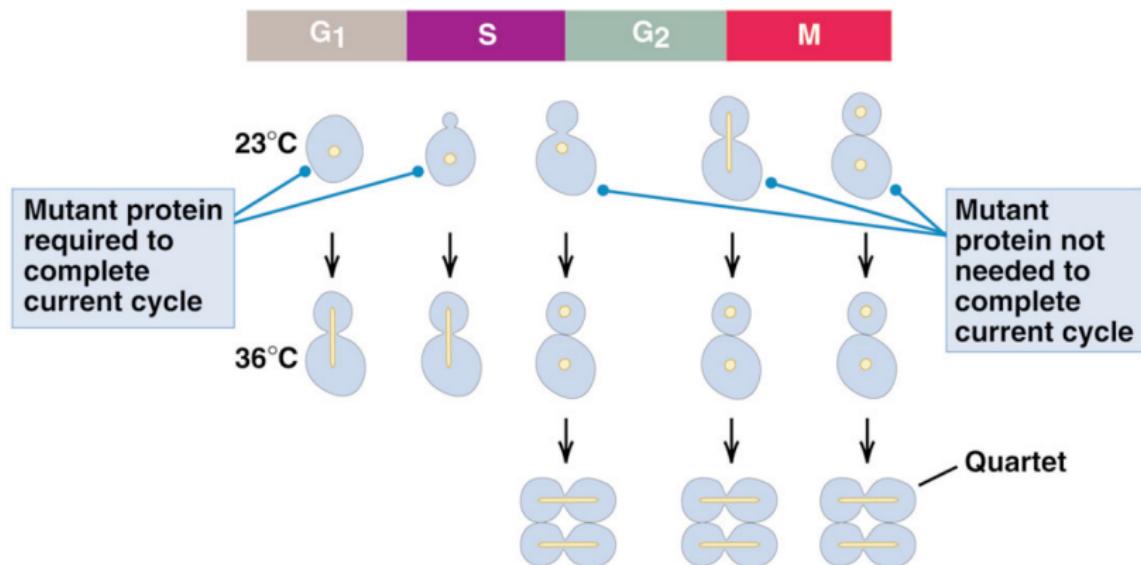


Rakutsükkel

Permissiivsel temperatuuril on pärmpopulatsioonis 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

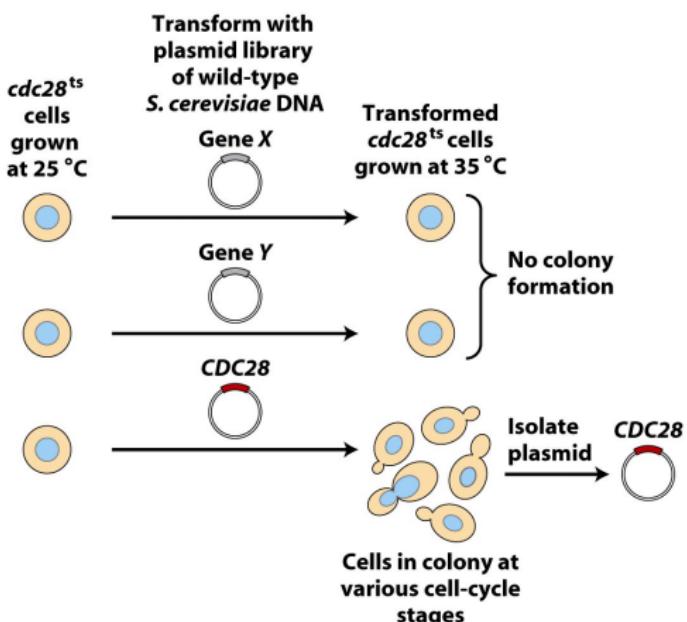


Figure 20-4  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Pärmist isoleeritud rakutsüklit reguleerivad geenid

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

TABLE 20-1 Selected Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases (CDKs)	
ORGANISM /PROTEIN	NAME
<b><i>S. POMBE</i></b>	
CDK (one only)	Cdc2
Mitotic cyclin (one only)	Cdc13
<b><i>S. CEREVISIAE</i></b>	
CDK (one only)	Cdc28
Mid-G <sub>1</sub> cyclin	Cln3
Late-G <sub>1</sub> 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)

TABLE 20-1 Selected Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases (CDKs)	
ORGANISM /PROTEIN	NAME
<b>VERTEBRATES</b>	
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

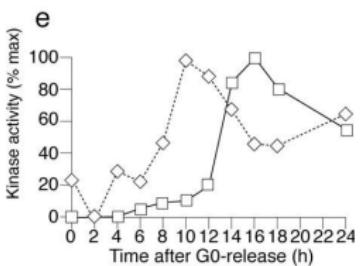
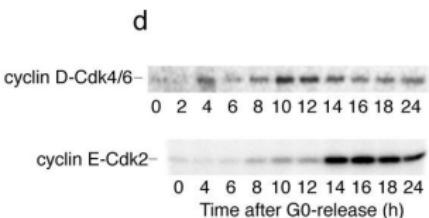
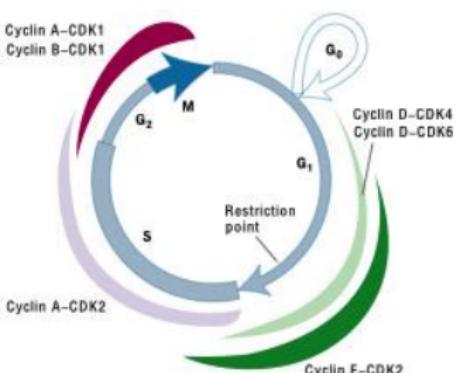
**NOTE:** Those cyclins and CDKs discussed in this chapter are listed and classified by the period in the cell cycle in which they function. A heterodimer composed of a mitotic cyclin and CDK is commonly referred to as a *mitosis-promoting factor (MPF)*.

Table 20-1 part 2

Molecular Cell Biology, Sixth Edition

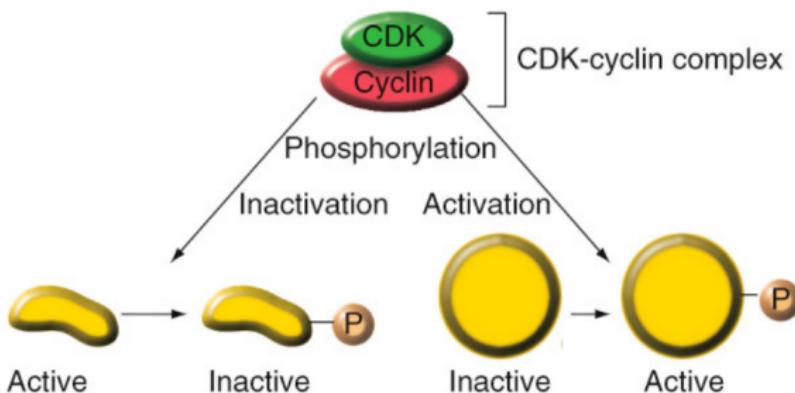
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Tsükliin-CDK komplekside järjestikune aktivatsioon

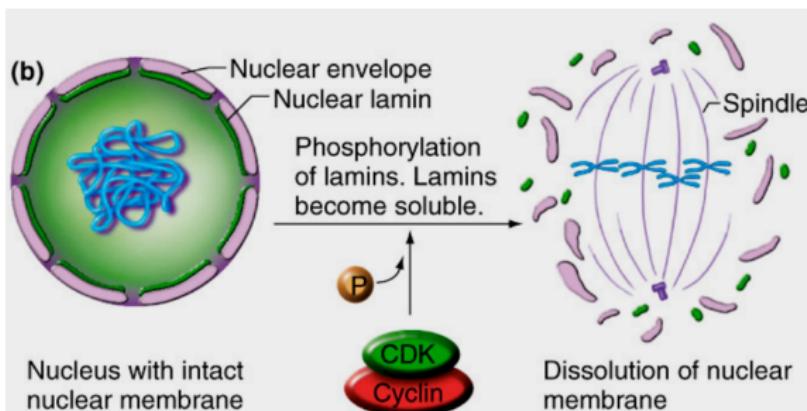


# Tsükliinid ja tsükliin kinaasid

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



# Tuumma lamiinid on CDK substraadiks



# Rakutsükli eri faasides on aktiivsed erinevad tsükliin-kinaasi kompleksid

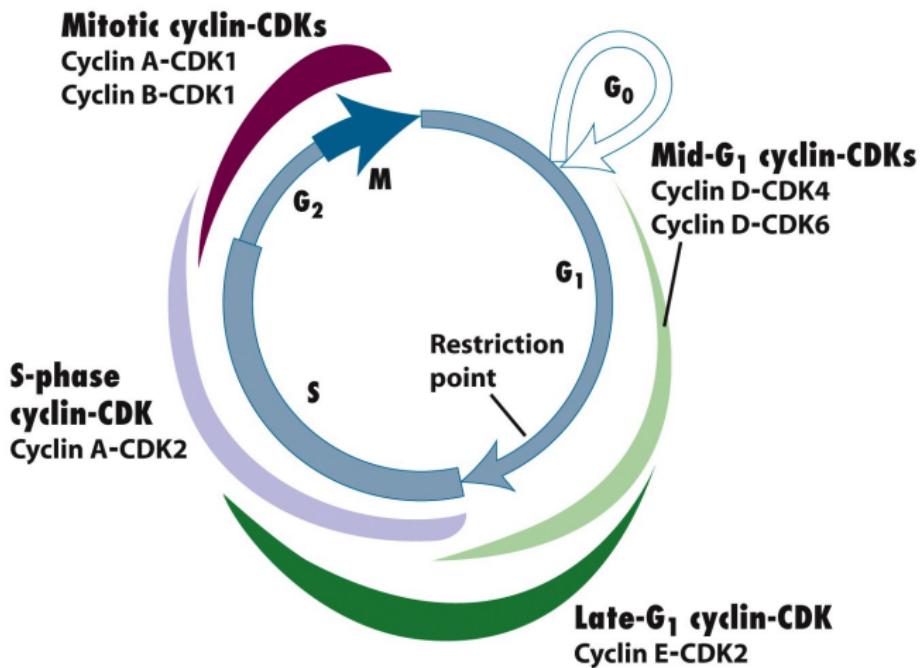
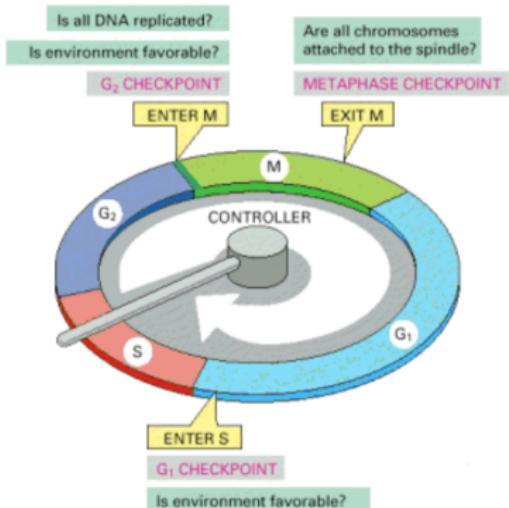


Figure 20-32  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Rakutsükli kontrollpunktid

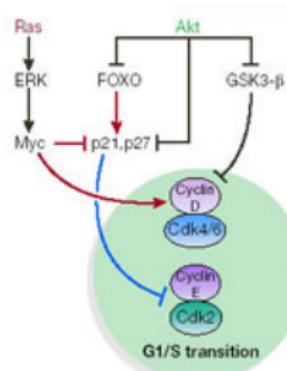


Genoomi stabiilsuse rakutsüklis tagavad kolm kontrollpunktit

- $G_1 \rightarrow S$  kontrollpunkt
  - $G_2 \rightarrow M$ -faasi kontrollpuntid
  - metafaasi kontrollpunkt

# G<sub>1</sub> restriktioonipunkt

- toimib hilises G<sub>1</sub>-s
- kontrollib G<sub>1</sub>→S üleminekut
- rakud ei sõltu enam mitogeensetest signaalidest S-faasi sisenemisel (nt. kasvufaktorid) kui D-tsükliinid on aktiveeritud ja pRb inaktiveeritud



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

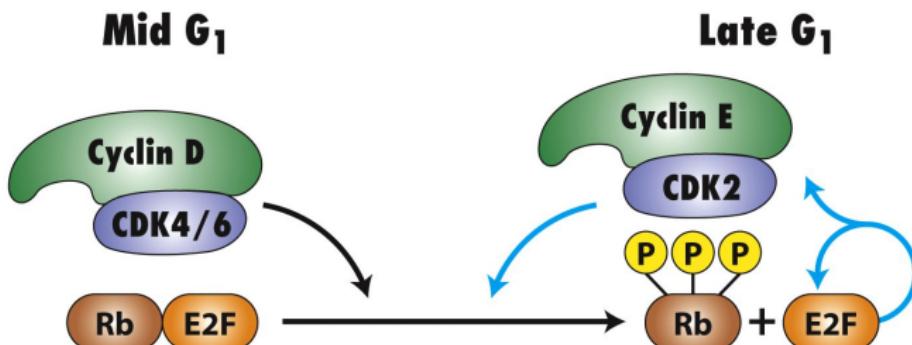


Figure 20-33  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Positiivsed signaalid

- kasv, ellujäämissignaalid, mitogeenid

## Negatiivsed signaalid

- tsütostaatilised, genotoksilised, metaboolsed, onkogeensed, oksüdatiivne stress

# E2F märklaudgeenid

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

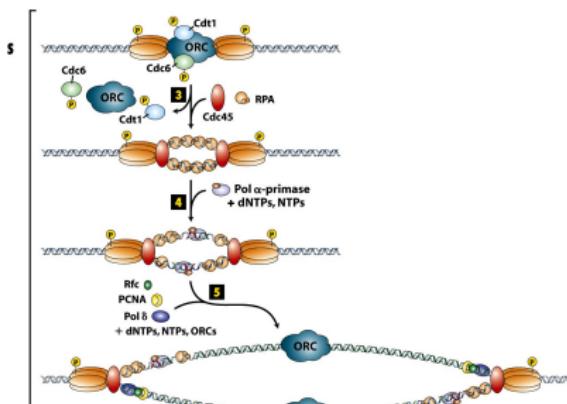


Figure 18-32 part Z  
Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2009 W.H. Freeman and Company

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

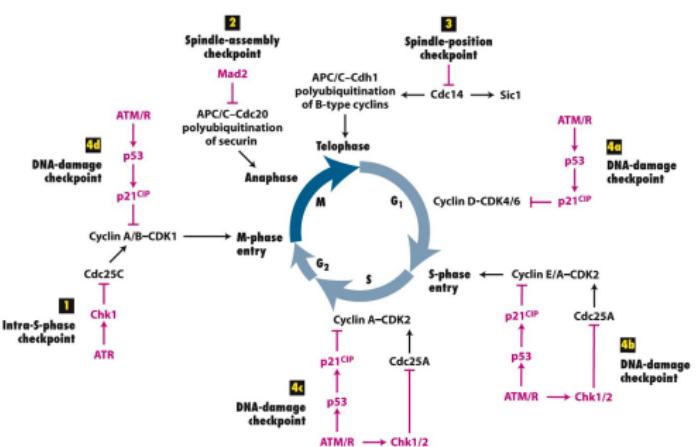
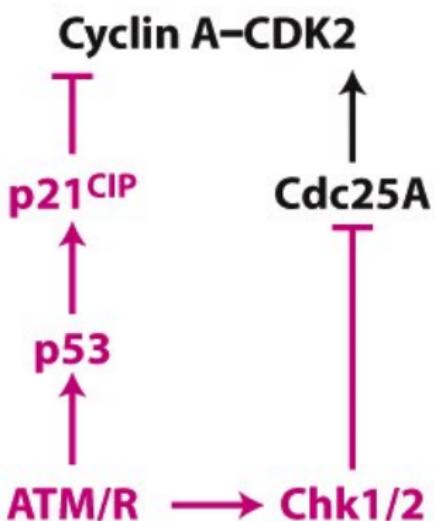


Figure 20-35  
Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

DNA kahjustused või replikatsioonikahvli arrest aktiveerivad kinaasid

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

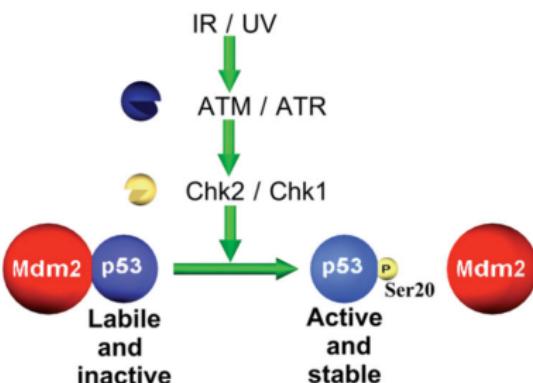
# DNA kvaliteedikontrolli mehhanismid: p53 sõltuv ja p53-sõltumatu rada



# p53 tuumorsupressor

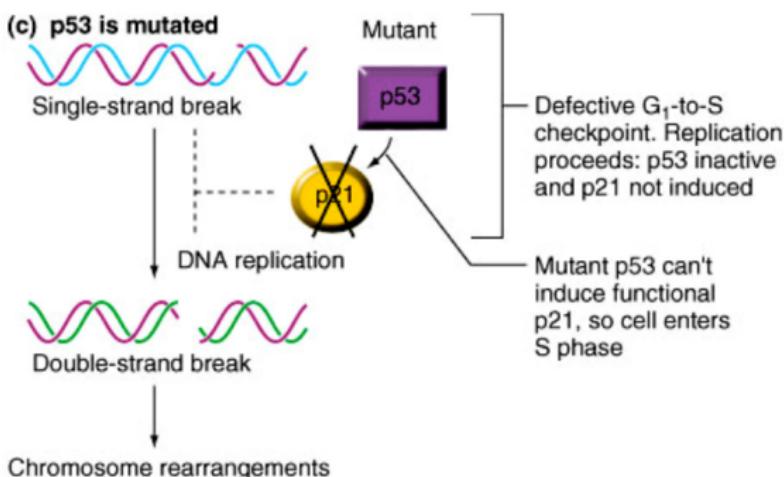
p53 toimib mitme mehhanismi kaudu:

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



# Mutantne p53

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



# Kromatiidide lahknemine

Õdekromatiide hoiavad koos kohesiinid

Kohesiinide lagundamist kontrollib APC<sup>CDC20</sup> ubikvitiin-ligaasi kompleks.

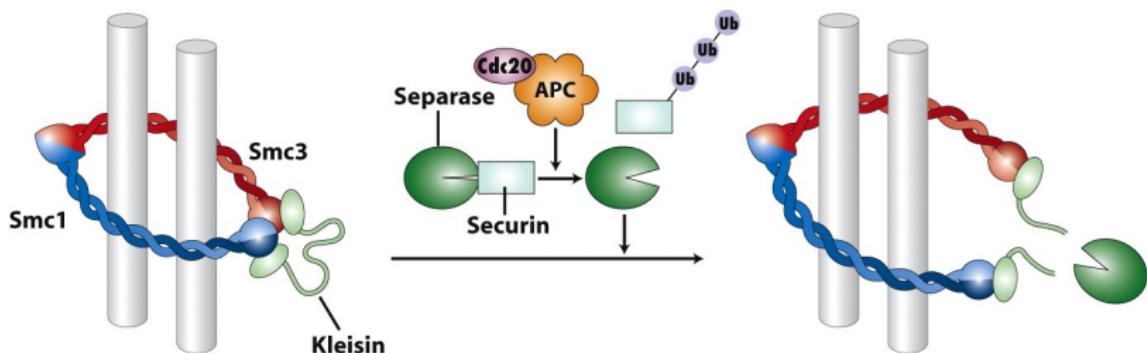


Figure 20-23  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W.H. Freeman and Company

# Mitoosikäävi kontrollpunkt

Kas kõik kinetohoorid on seotud mitoosikäävi mikrotuubulitega?

- MAD (*mitotic arrest deficient*) valk seostub vabadele kinetohooridele ja inhibeeriib APC<sup>CDC20</sup> aktivatsiooni.
- MAD seob ning blokeerib CDC20.

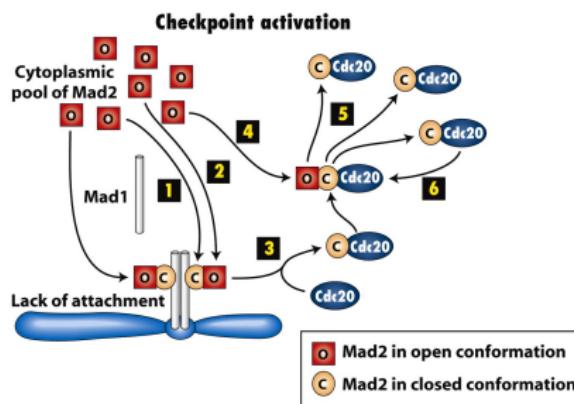


Figure 20-36a  
Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

# Sagedasemad mutatsioonid kasvajates

Cell cycle

4.1	0.0	0.5	0.7	<b>21.3</b>	1.0	0.0	6.6	<b>14.9</b>	0.0	0.4	3.6	CDKN2A
<b>14.3</b>	1.8	0.5	8.3	3.0	0.2	0.0	5.3	<b>6.9</b>	1.9	3.9	3.2	RB1
<b>4.1</b>	0.9	1.6	0.3	1.7	<b>1.4</b>	0.0	3.1	0.6	2.9	2.2	1.5	CDK12
<b>2.0</b>	0.9	1.0	0.3	0.7	0.0	0.0	1.8	0.0	0.3	0.9	0.7	CDKN1B
2.0	0.1	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.9	0.6	0.0	<b>5.2</b>	0.6	CCND1
<b>12.2</b>	0.0	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	0.4	<b>1.2</b>	0.3	0.0	0.6	CDKN1A
0.0	0.0	0.0	<b>1.0</b>	0.0	0.2	0.0	0.0	0.6	0.6	0.0	0.2	CDKN2C

Genome integrity

50.0	<b>32.9</b>	58.6	28.3	69.8	2.2	7.5	<b>51.8</b>	79.3	<b>94.6</b>	<b>27.8</b>	42.0	TP53	
<b>11.2</b>	2.1	<b>5.7</b>	1.4	2.7	2.9	0.0	7.9	4.0	1.3	6.5	3.3	ATM	
<b>8.2</b>	1.2	1.0	<b>5.5</b>	4.3	1.9	0.0	6.1	5.8	0.6	3.0	2.8	ATRX	
<b>6.1</b>	1.7	1.6	1.4	3.7	1.9	0.0	5.7	5.8	3.2	4.4	2.7	BRCA2	
4.1	0.8	2.1	1.4	<b>5.3</b>	1.2	0.0	5.7	4.0	0.6	<b>7.0</b>	2.4	ATR	
<b>10.2</b>	0.9	1.0	<b>4.1</b>	0.7	<b>1.7</b>	3.0	3.0	2.6	3.5	1.0	3.9	2.2	STAG2
4.1	0.3	0.0	0.7	1.0	<b>10.1</b>	0.0	1.3	0.6	0.6	2.2	2.0	BAP1	
4.1	1.6	0.0	1.0	2.7	1.0	0.0	3.5	<b>5.2</b>	3.5	0.9	1.9	BRCA1	
3.1	0.8	1.6	1.7	1.0	0.5	3.5	1.3	0.6	1.3	<b>4.4</b>	1.5	SMC1A	
1.0	0.4	0.0	1.4	1.7	1.2	<b>3.5</b>	2.6	2.3	0.3	0.4	1.2	SMC3	
2.0	0.4	0.0	1.7	<b>2.3</b>	0.7	0.0	0.9	1.2	0.3	1.3	0.9	CHEK2	
2.0	0.5	1.0	0.3	1.0	0.0	<b>2.5</b>	<b>2.6</b>	1.2	0.3	0.9	0.9	RAD21	
<b>12.2</b>	0.1	0.5	0.0	0.3	0.2	0.0	1.3	0.0	0.3	0.4	0.7	ERCC2	