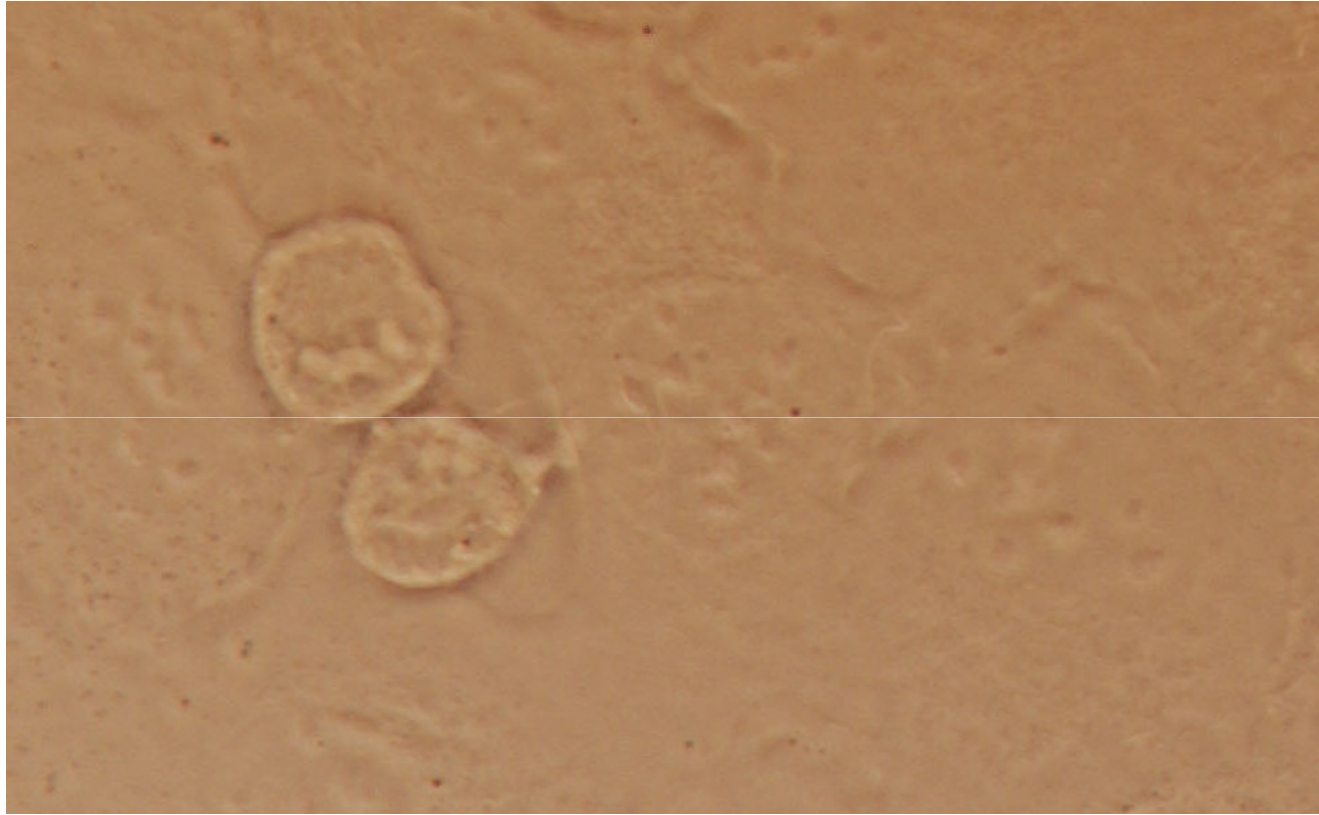
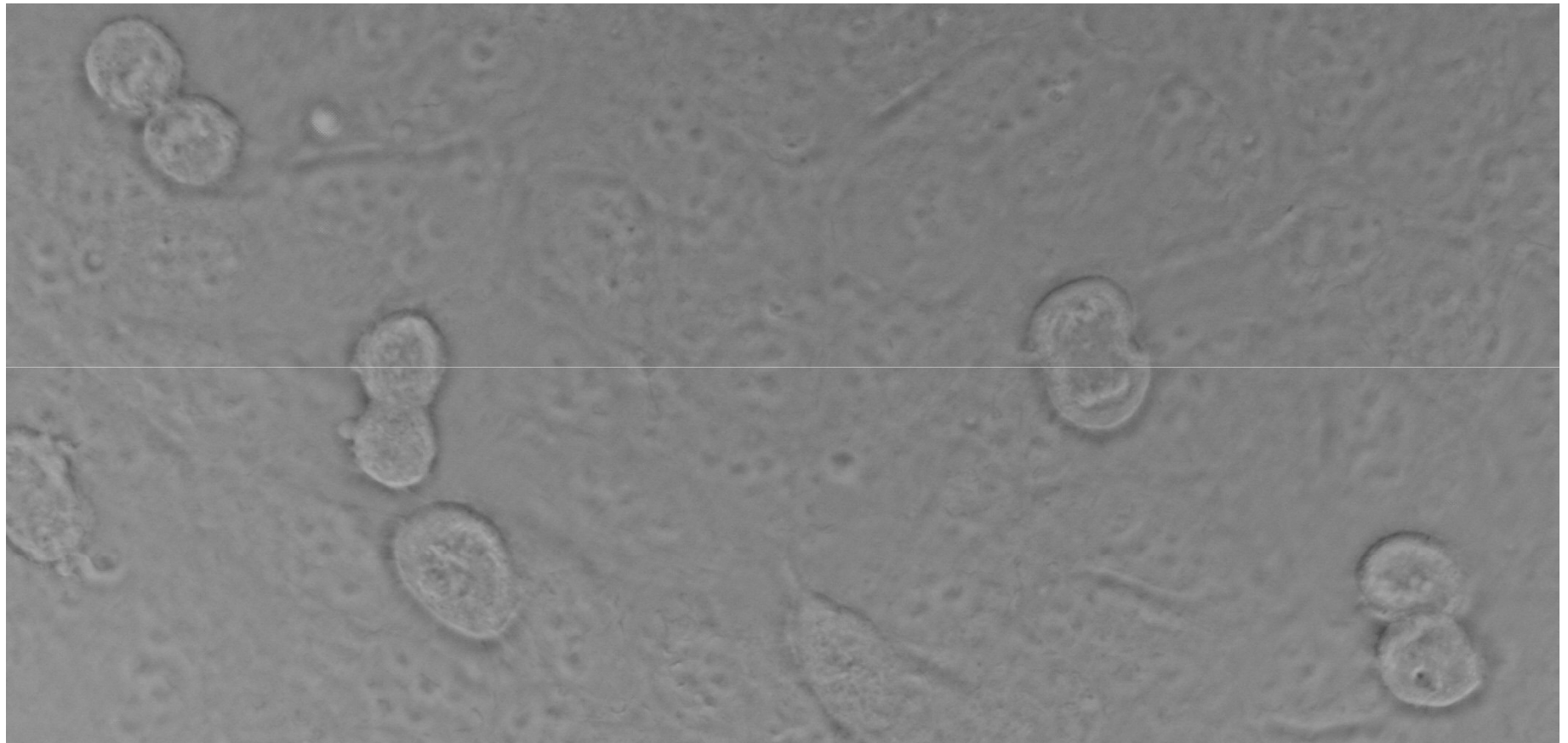
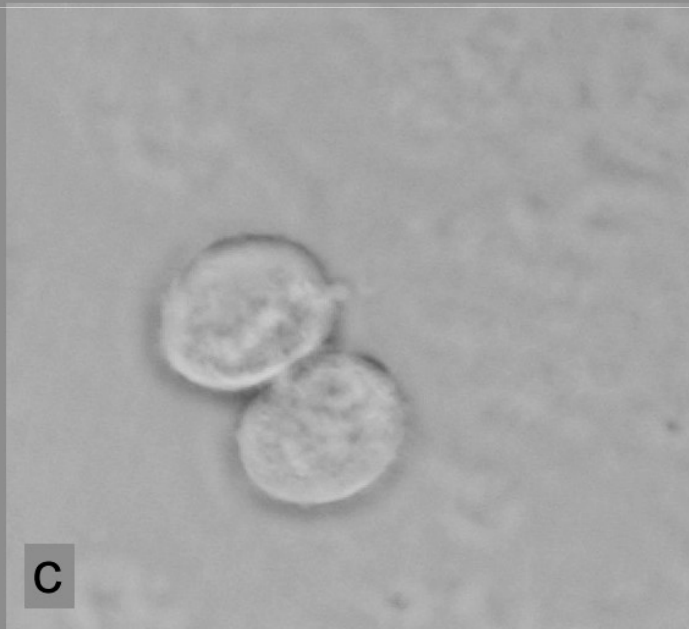
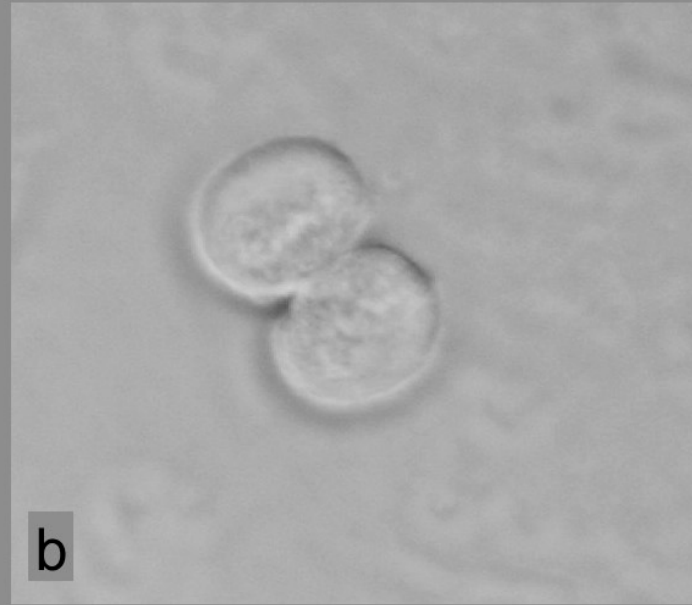


Buněčný cyklus a molekulární mechanismy onkogeneze







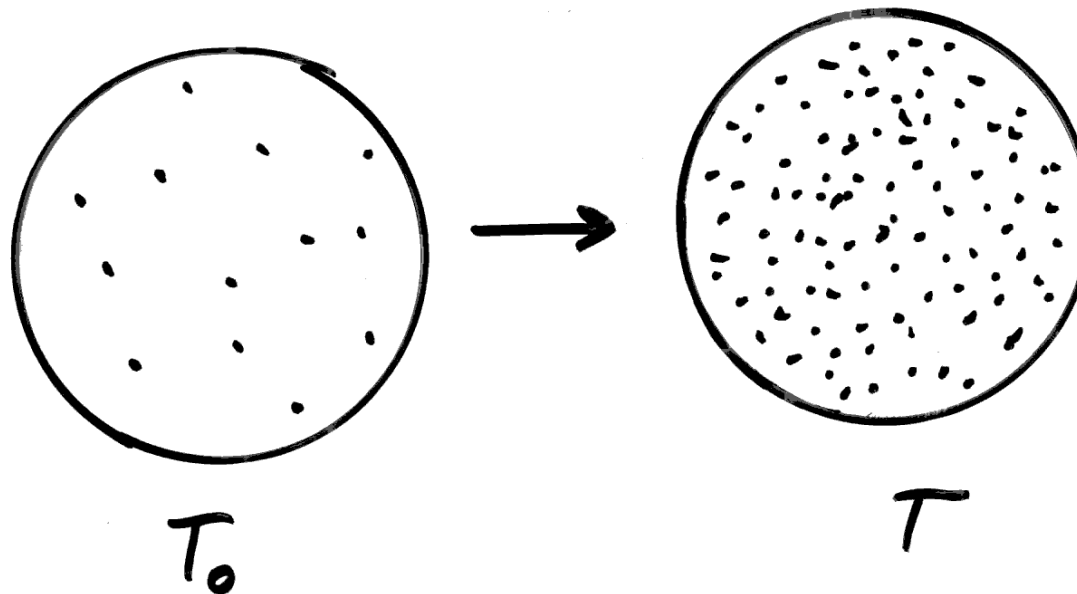
buňky v buněčné kultuře:

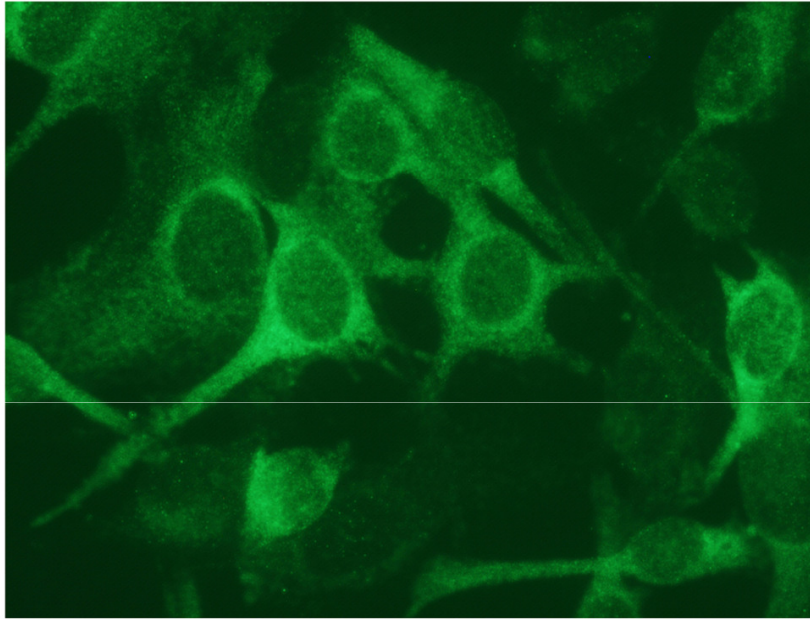
čas zdvojení (doubling time): časový interval, ve kterém se počet buněk zdvojnásobí.

$$\text{Počet zdvojení} = \log N/N_0 \times 3,33$$

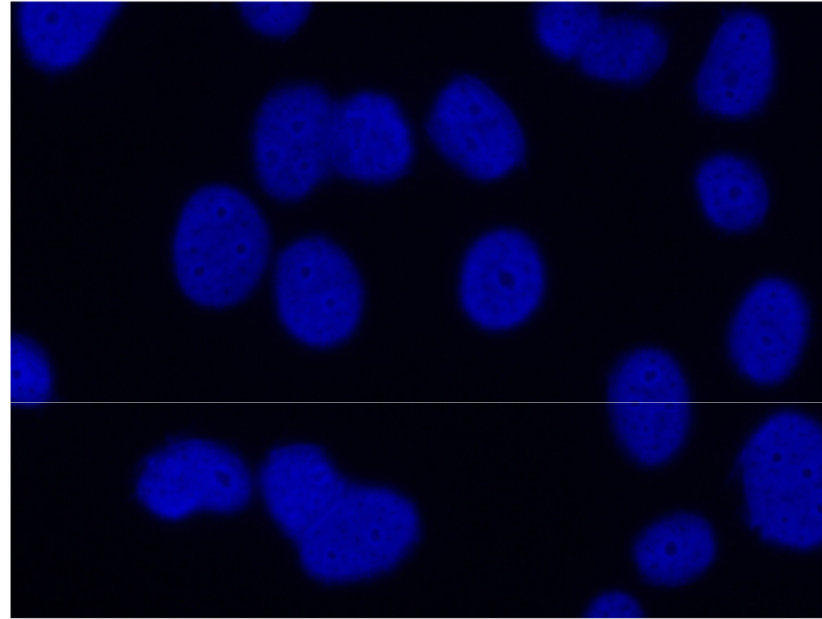
N_0počet buněk v čase T_0

Npočet buněk v čase T





Imunofluorescence



DAPI

Přehled regulace buněčného cyklu

Základní terminologie:

Cycliny – evolučně konzervované proteiny s homologními oblastmi; jejich buněčná hladina výrazně osciluje během buněčného cyklu vlivem transkripční regulace a různě rychlé degradace proteinu. Cycliny jsou katalytické podjednotky aktivních cyklin-cdk komplexů.

CYKLINY A, B1, D(1,2,3), E

Cyclin-dependentní kinázy (cdks) – protein-kinázy vyžadující jako katalytickou podjednotku cyklin a jejich aktivita je regulována fosforylací a defosforylací a pomocí cdk-inhibitorů.

CDK 1,2,3,4,6,7

Cdc25 fosfatasy – defosforylují cdk na N-konci a tím je aktivují

Substráty cyklin-cdk komplexů – nejdůležitější je the retinoblastoma protein (Rb).

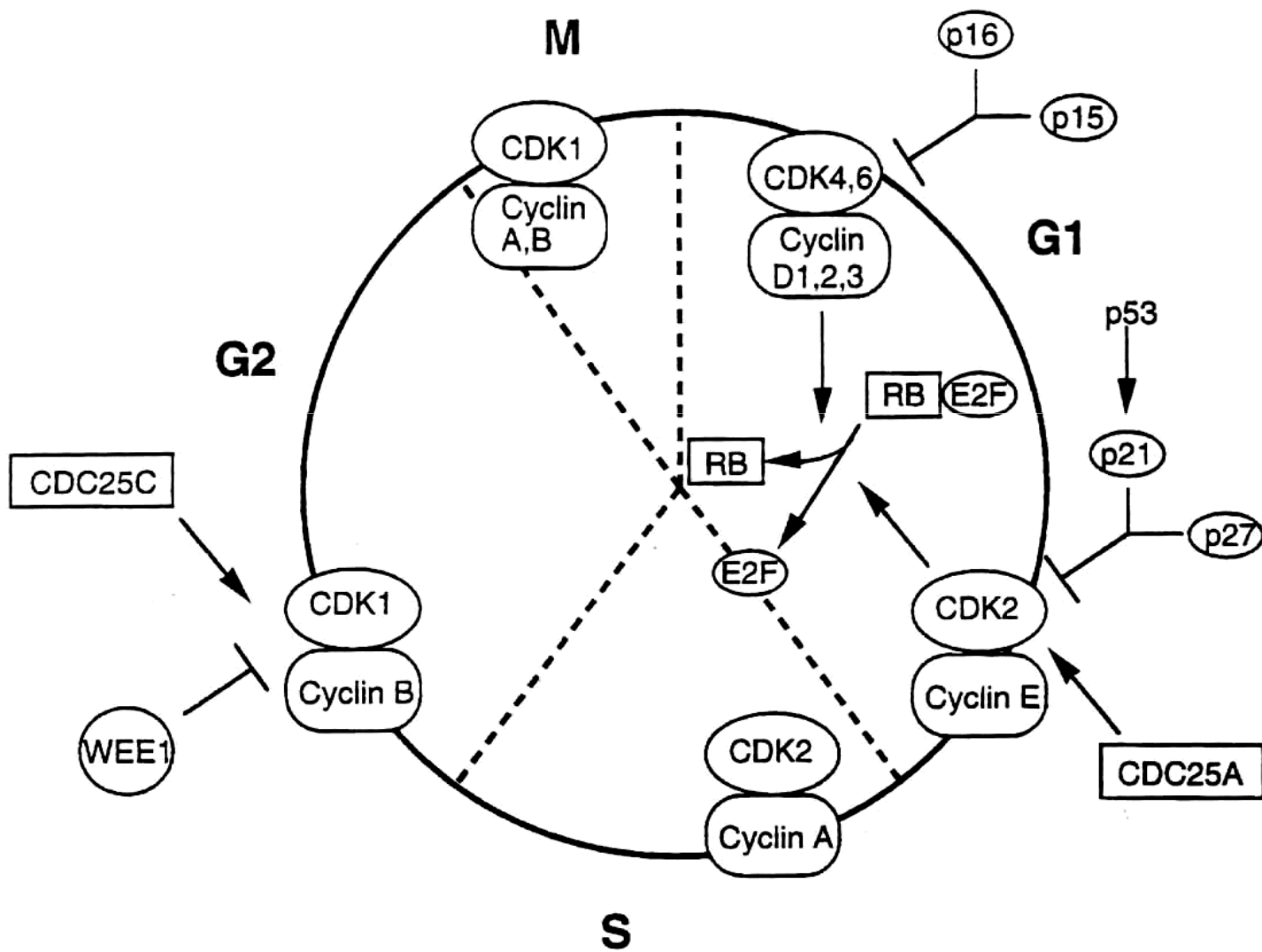
Rb rodina: Rb, p107, p130.

Cdk inhibitory – váží se na a inaktivují cyklin-cdk complexy

E2F transkripční faktory – heterodimery E2Fs (1-5) a DP_s (1,2) aktivují transkripci genů důležitých pro syntézu DNA. Aktivita E2F transkripčních faktorů je inhibována Rb proteinem, event. p107 a p130. Pouze de(hypo)fosforylovaný Rb protein inhibuje tuto transkripční aktivitu. Po fosforylaci cyklin-dependentními kinasami je Rb protein inaktivní

Cílové promotery pro E2F: DNA polymerasa α , dihydrofolate-reductasa, thimidine kinasa, Cyclin E, cyclin A, c-myc, E2F-1 (pozitivní zpětná vazba), cdc6

Cyklin-cdk komplexy během buněčného cyklu



Přehled cyklin-cdk komplexů a regulace během buněčného cyklu.

Fáze buň. cyklu	Cyclin-cdk komplex	inhibitor	aktivace	Substrát(y)
G1	Cyklin D/cdk 4,6	p16 family, p21 family	CAK, Cdc25A	Rb protein
G1/S	Cyklin E/cdk 2	p21 family	CAK, Cdc25A	Rb protein, NPAT, cdc6
S	Cyklin A/cdk 2 (Cyclin A/cdk 1)	p21 family	CAK, Cdc25	Rb protein, pre-RC, E2F
G2/M	Cyklin B/cdk 1 (cdk1= cdc2) (Cyclin A/cdk 1)	p21 family	CAK, Cdc25C	Mitotické proteiny (APC, lamins, cohesins,..)

Cdk inhibitory

INK4 rodina:

p16 (INK4a),

p15 (INK4b)

p18 (INK4c)

Inhibují pouze cyclin D/cdk 4,6 complexy

p21 (Cip1) family

p21 (Cip1, WAF1),

p27 (kip1),

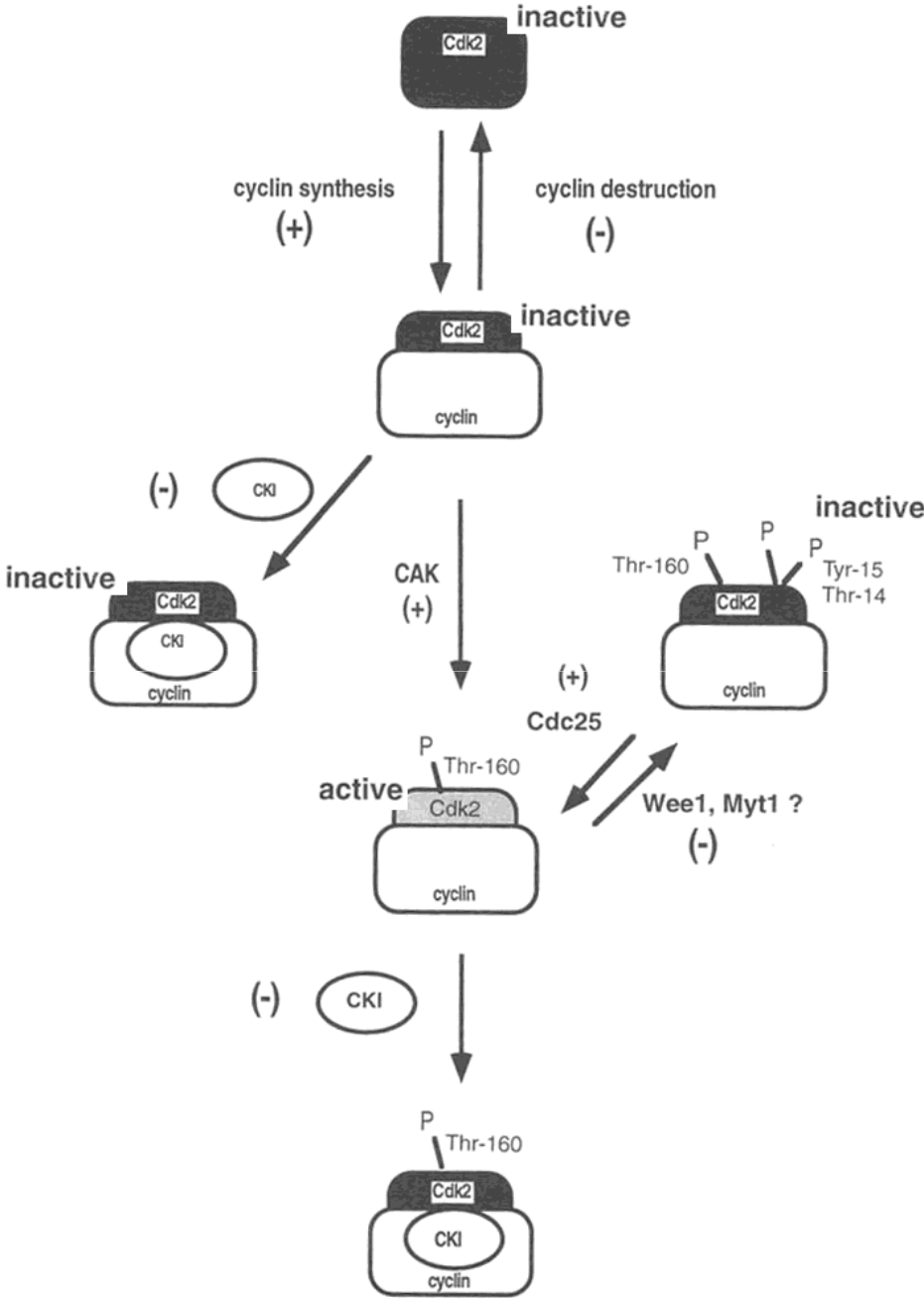
p57 (Kip2)

Univerzální inhibitory, inhibují cyclin D/cdk 4,6 complexy i cyclin E/cdk2 a cyclin A/cdk2 complexy.

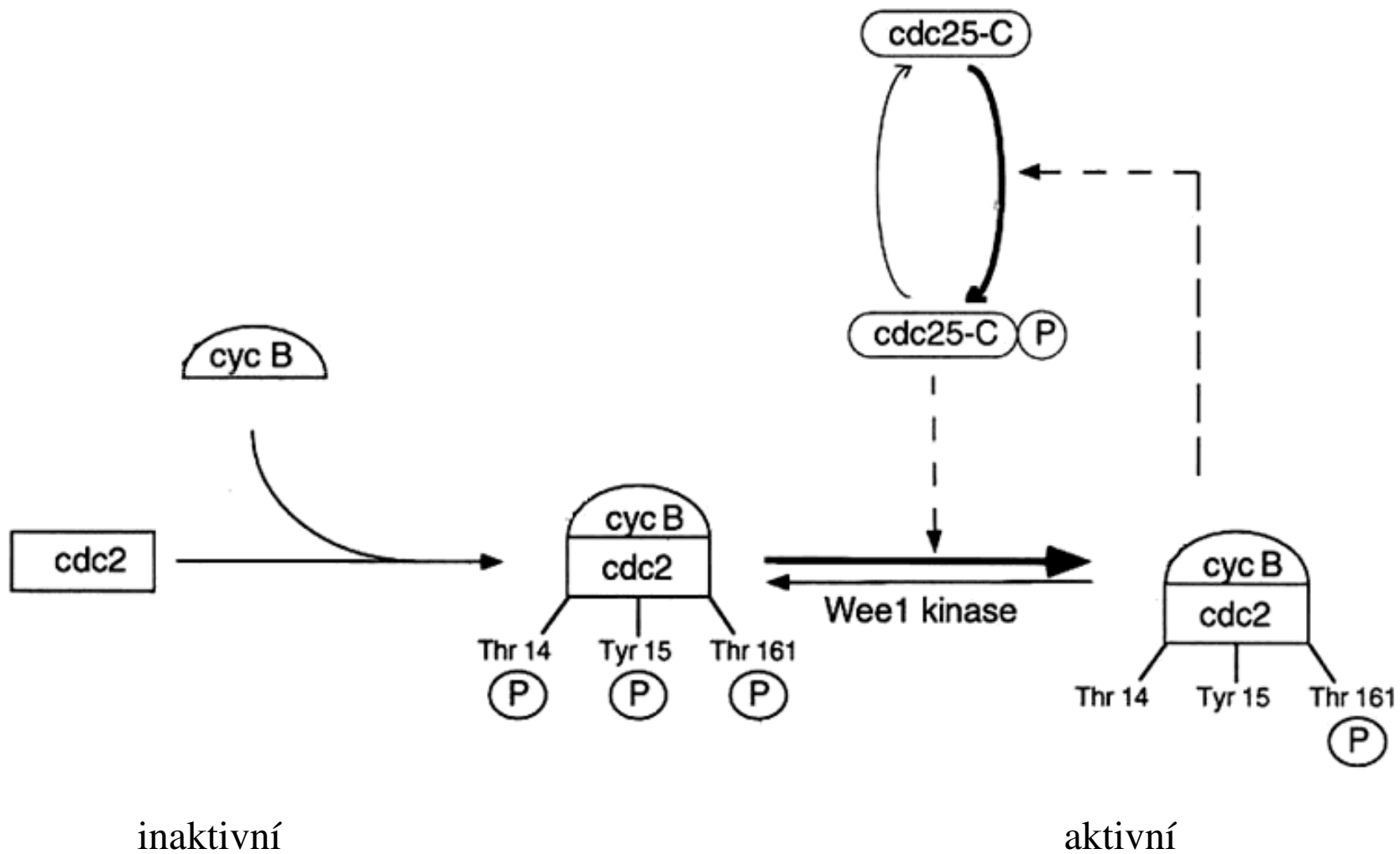
p14ARF (p19ARF u myši)

stabilizuje p53 protein

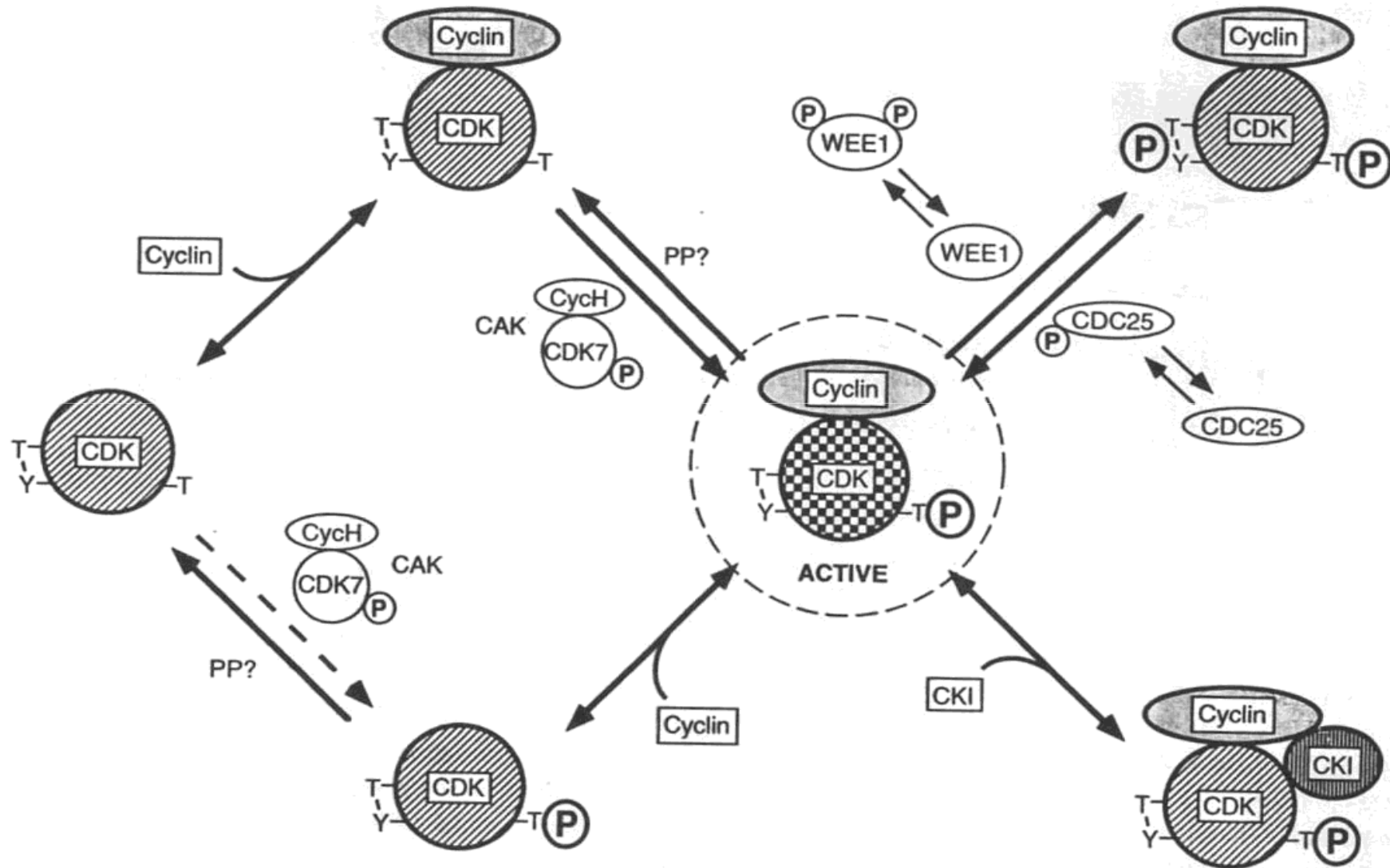
Aktivace/inaktivace cdk2



Aktivace cdk1 fosforylací/defosforylací

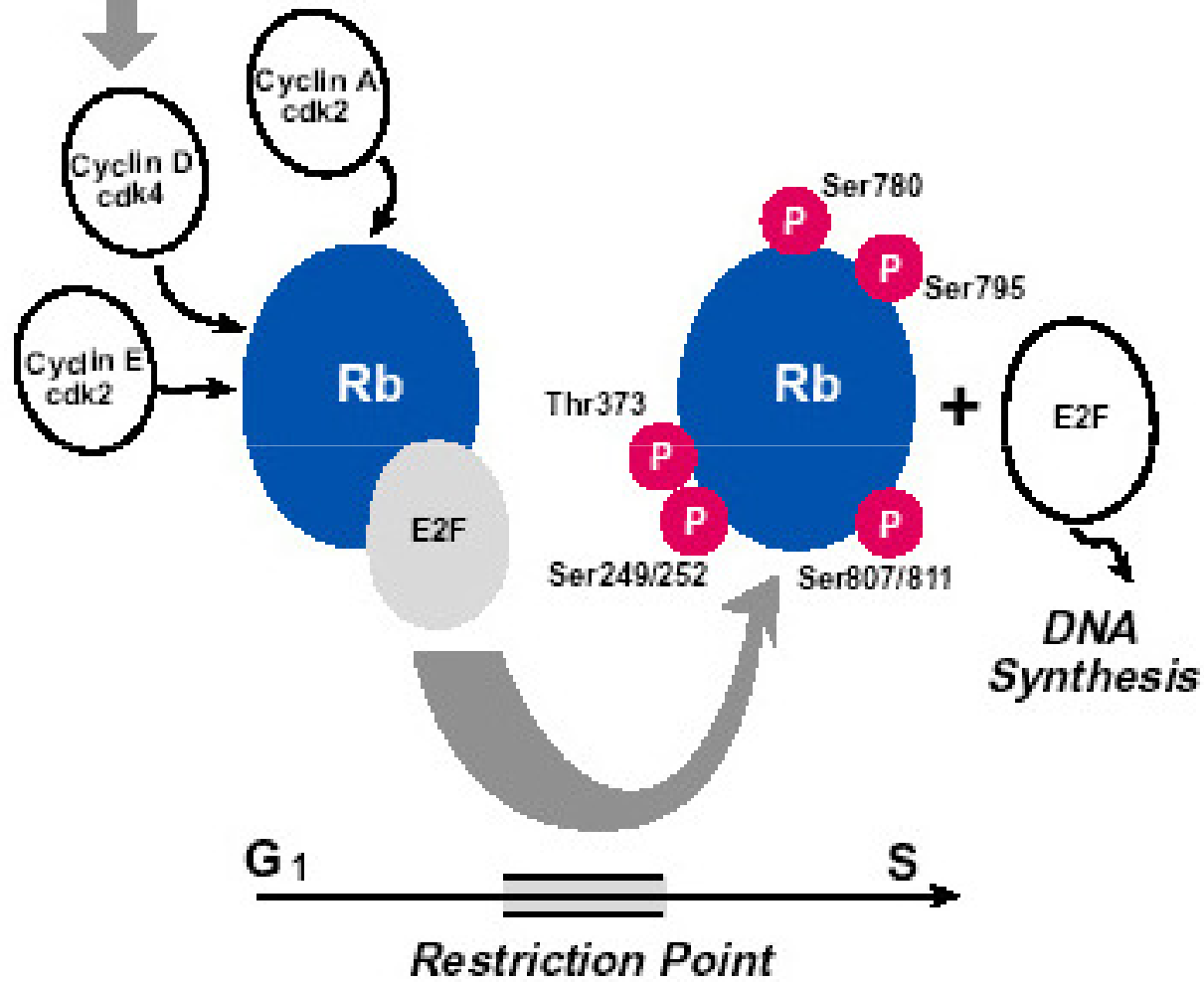


Regulace aktivity komplexů cyklin-cdk fosforylací a defosforylací

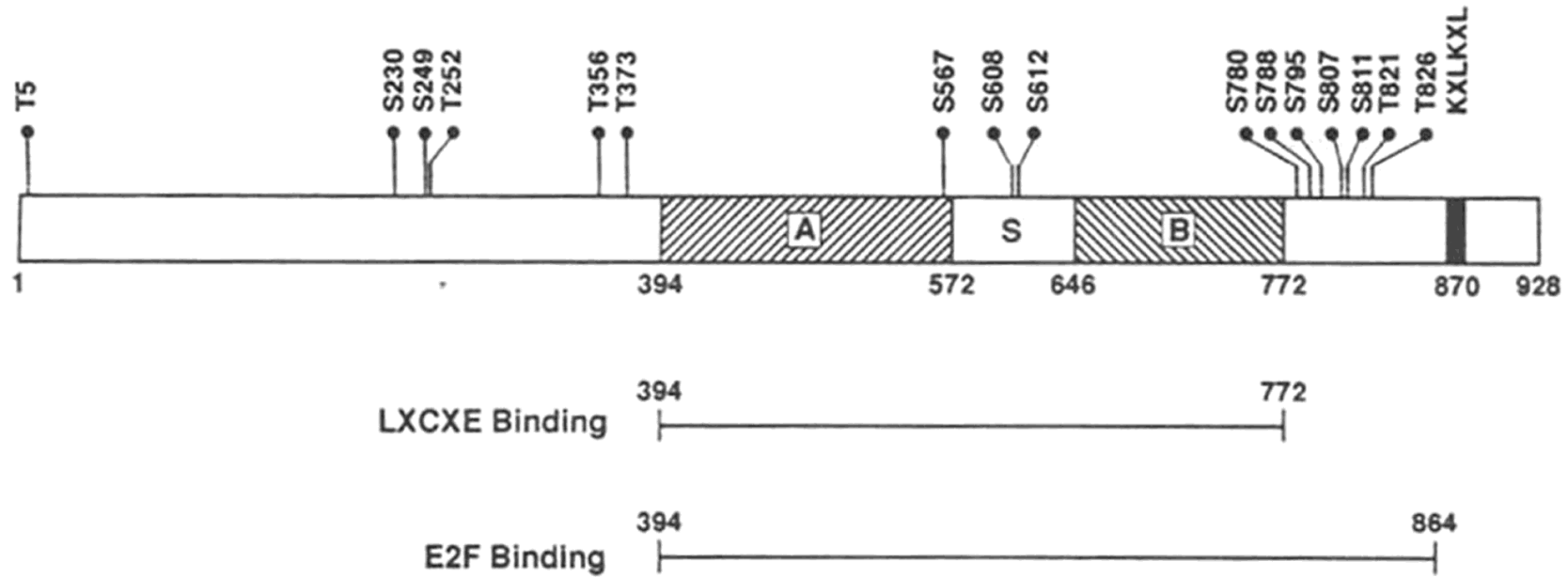


**Extracellular
Signals**

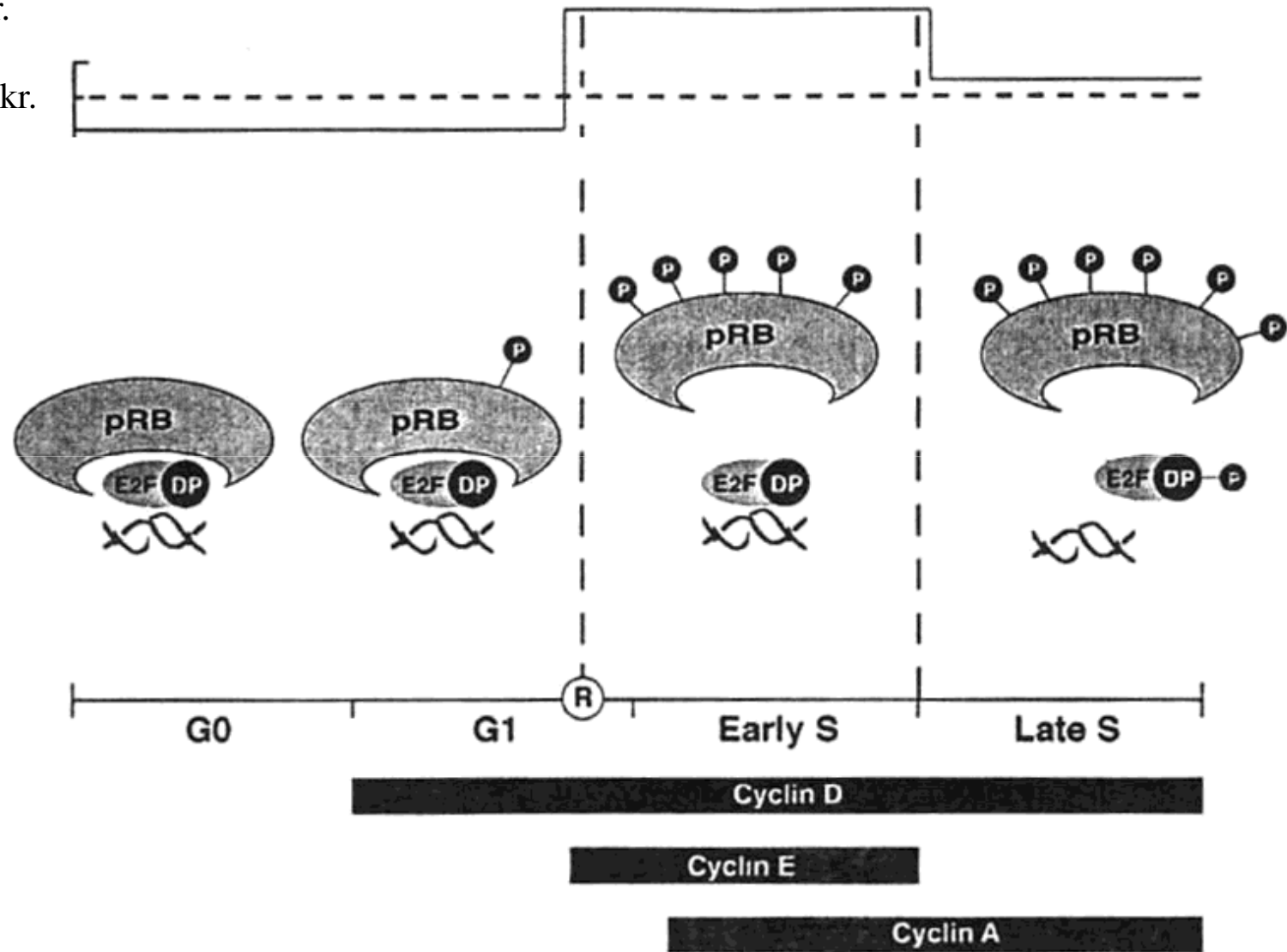
Rb Signaling Pathway



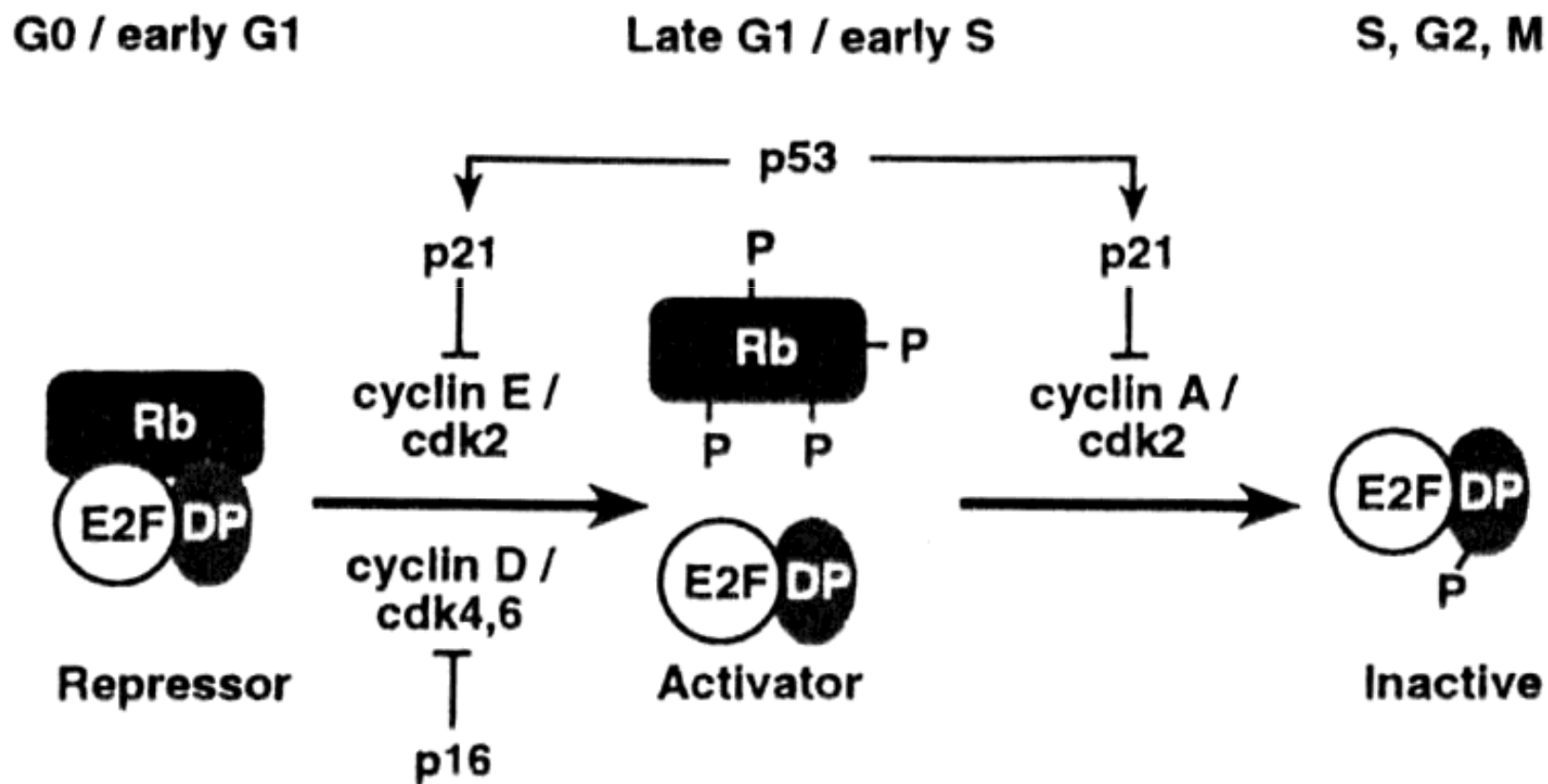
Struktura molekuly Rb proteinu



Aktivovaná transkr.
Bazální transkr.
Reprimovaná transkr.

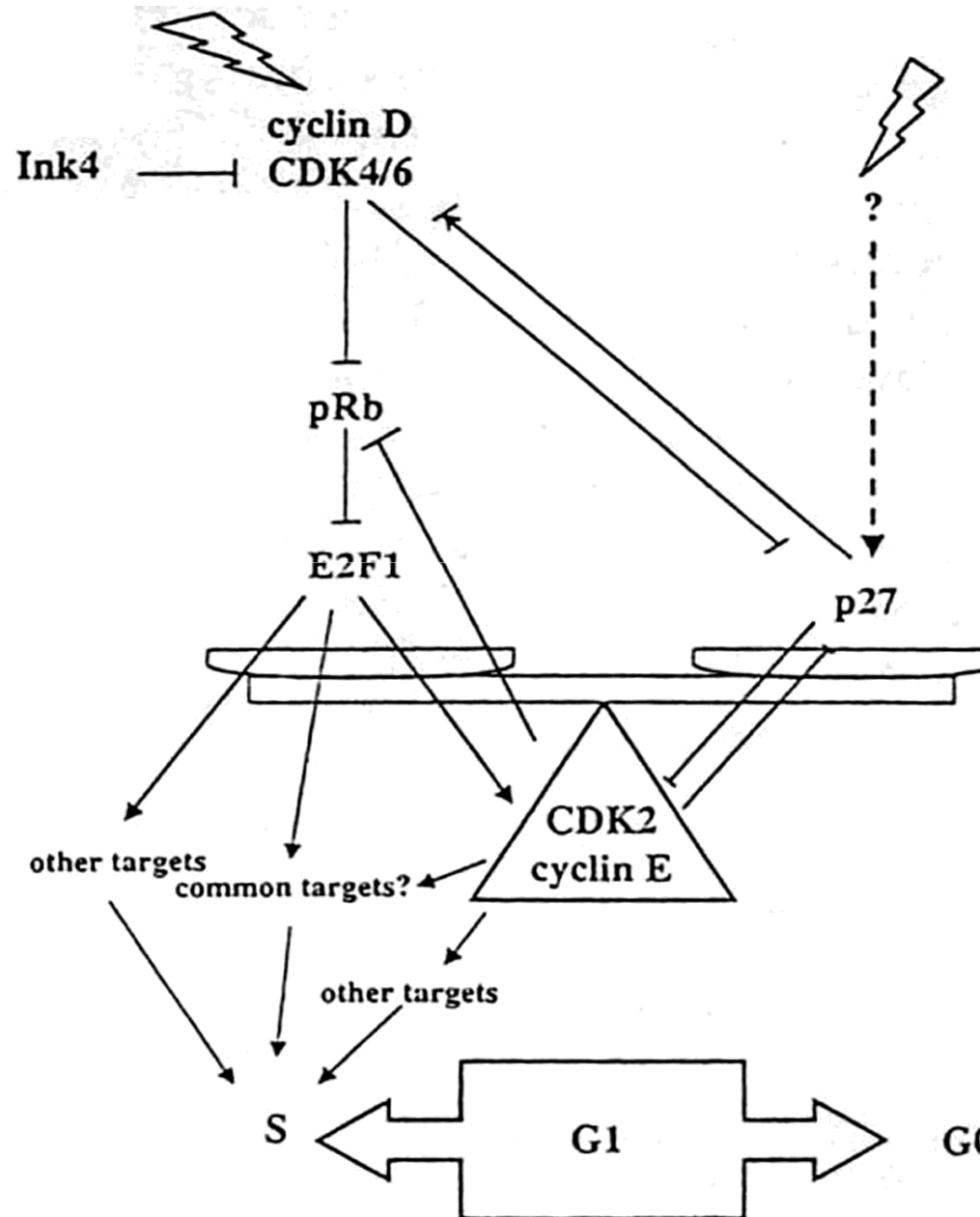


Aktivace E2F/DP transkripční aktivity fosforylací Rb proteinu

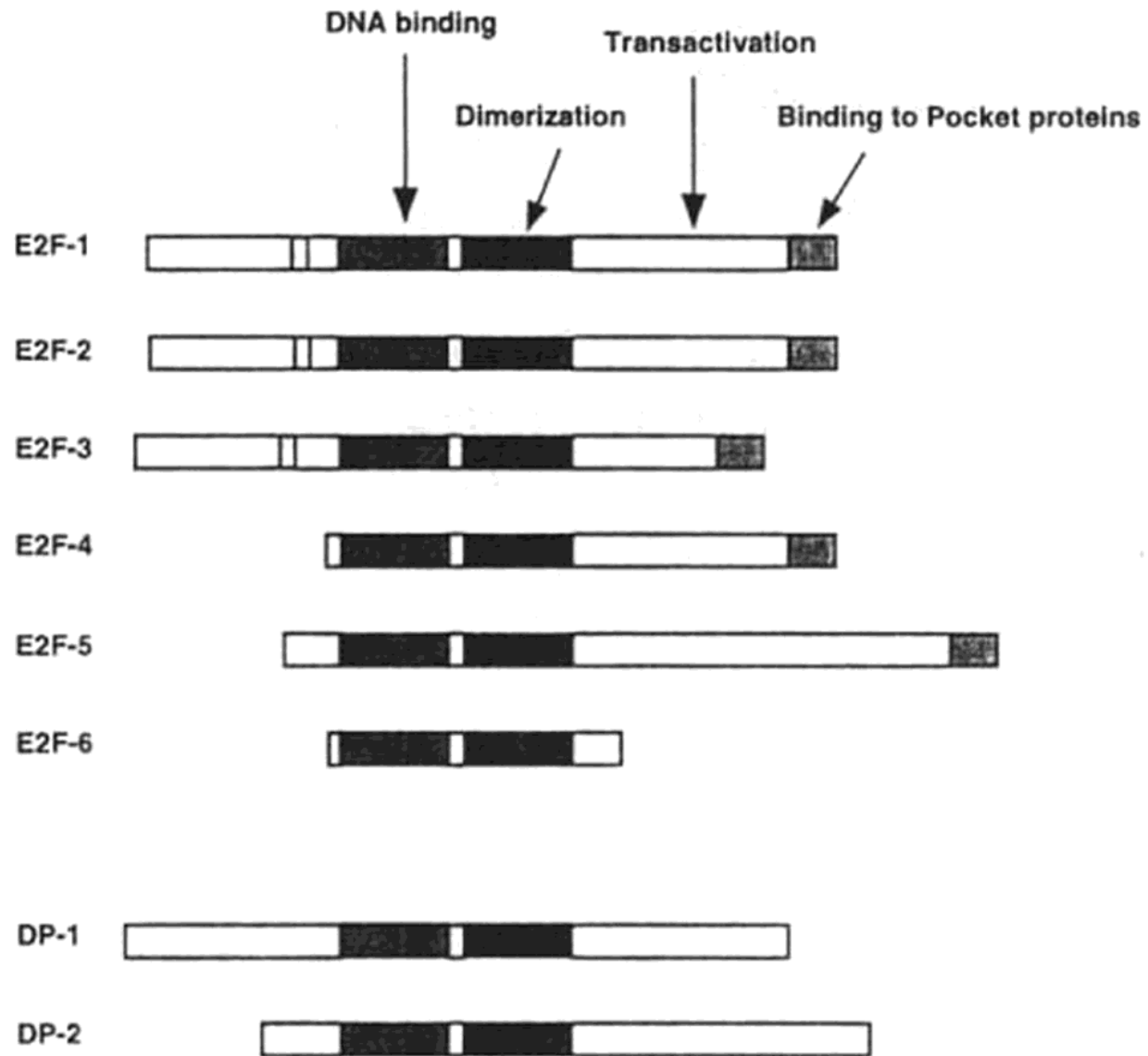


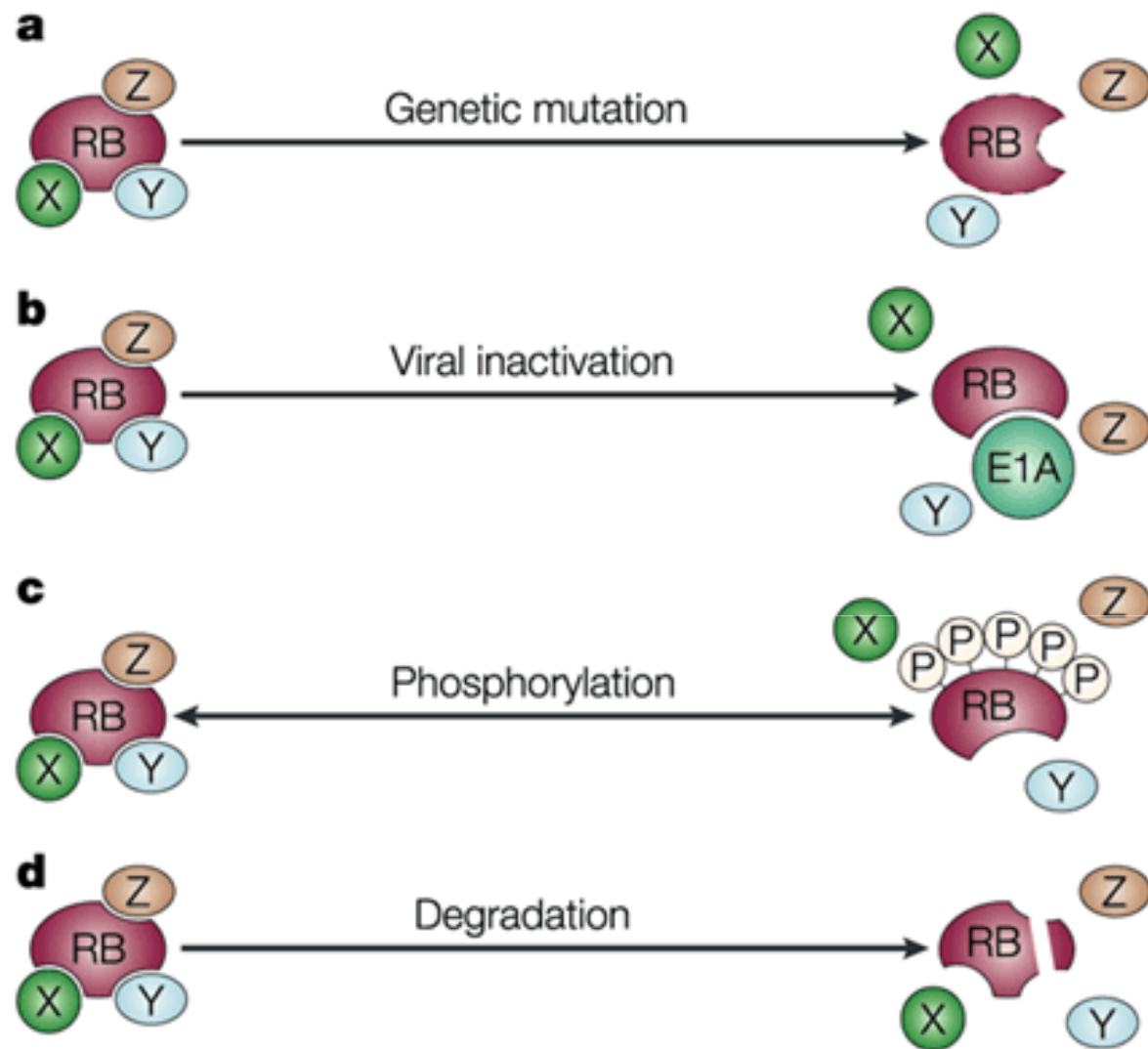
Mitogenní stimuly

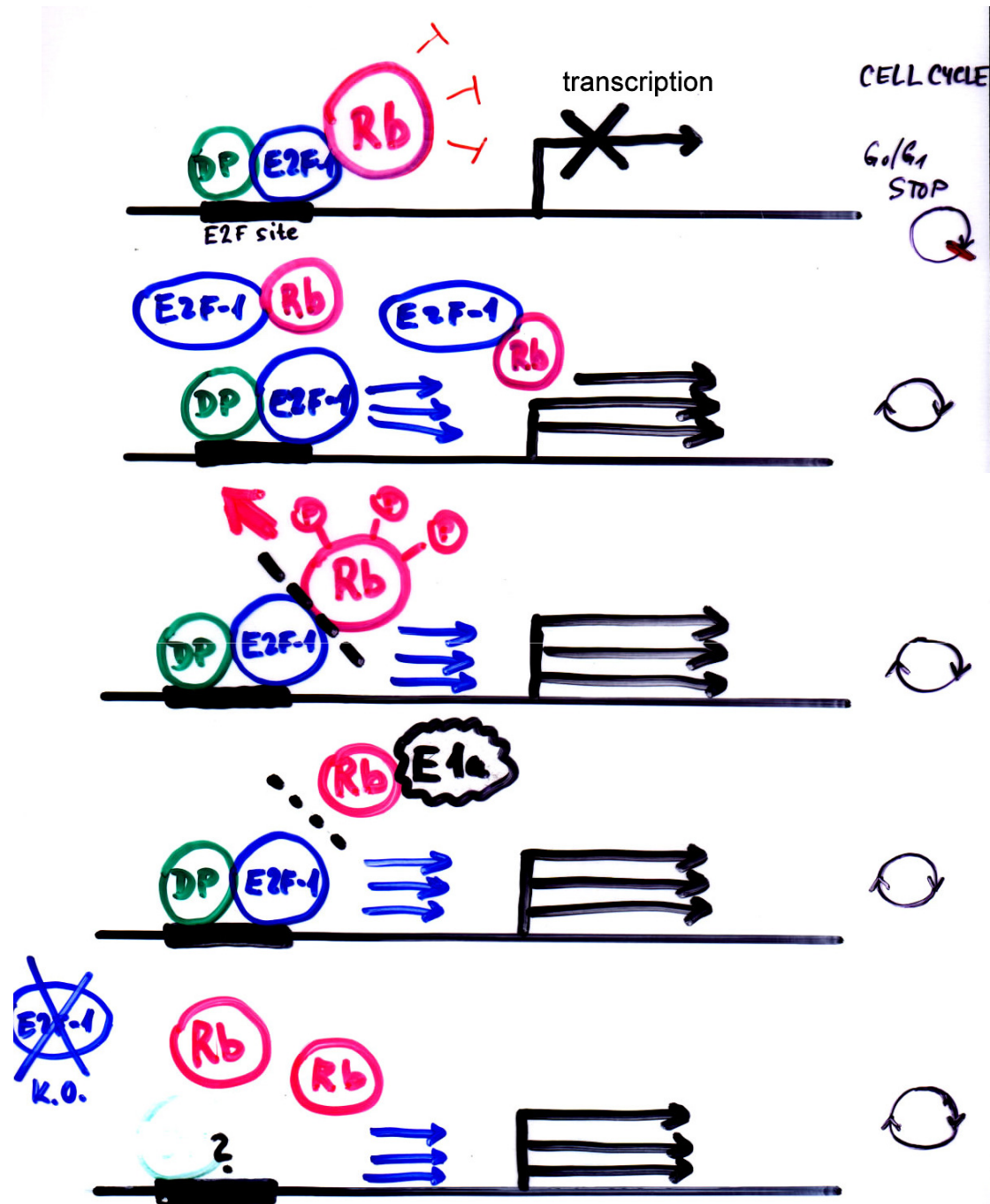
Anti-mitogenní stimuly



Struktura E2F transkripčních faktorů.







Nefosforylovaný Rb blokuje transkripci

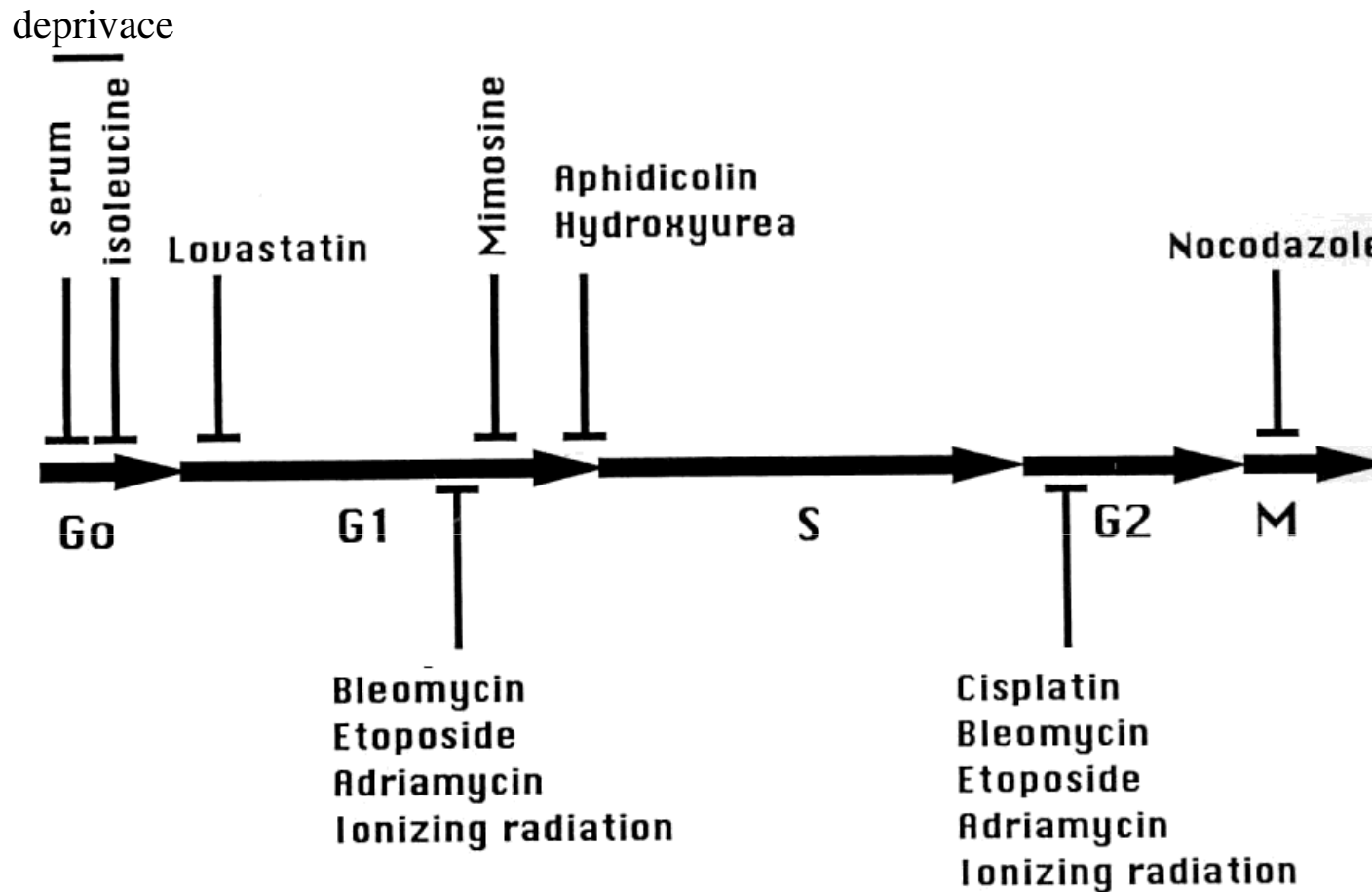
Vysoká hladina E2F sekvstruje Rb od promoteru

Fosforylace Rb komplexy cdk-cyklin inaktivuje Rb

Onkogenní proteiny DNA virů inaktivují Rb

Absence E2F-1 znemožňuje vytvoření represorového Komplexu RB-E2F

Blok v buněčném cyklu a synchronizace buněk



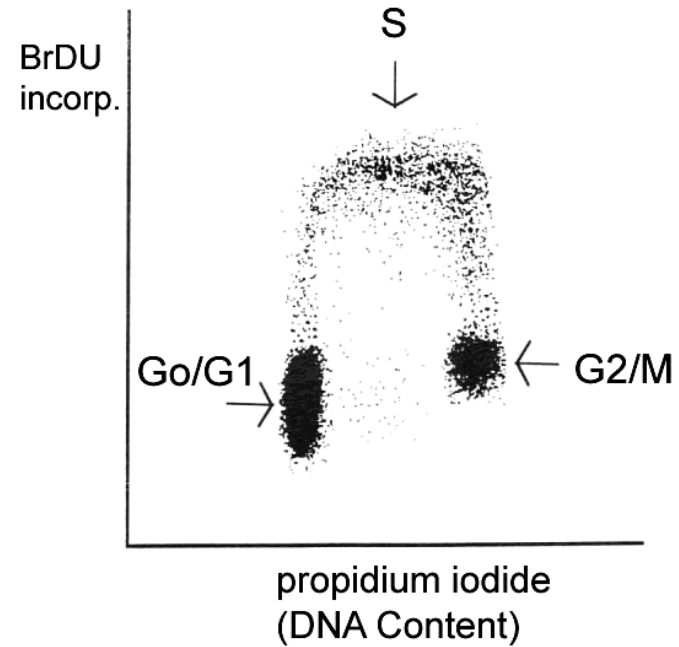
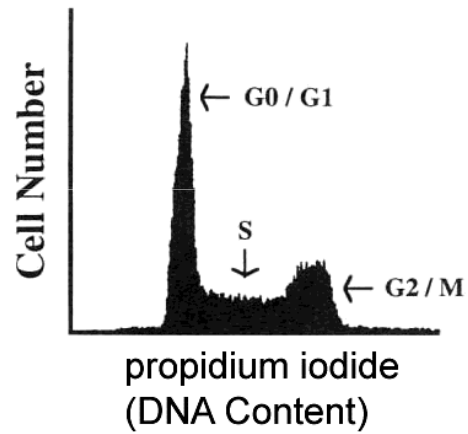
Lovastatin – inhibitor HMG-CoA reduktázy

Aphidicolin – inhibitor DNA polymeráz

Hydroxyurea – inhibitor ribonukleotidreduktázy

Analýza fází buň. cyklu pomocí průtokové cytometrie

FLOW CYTOMETRY

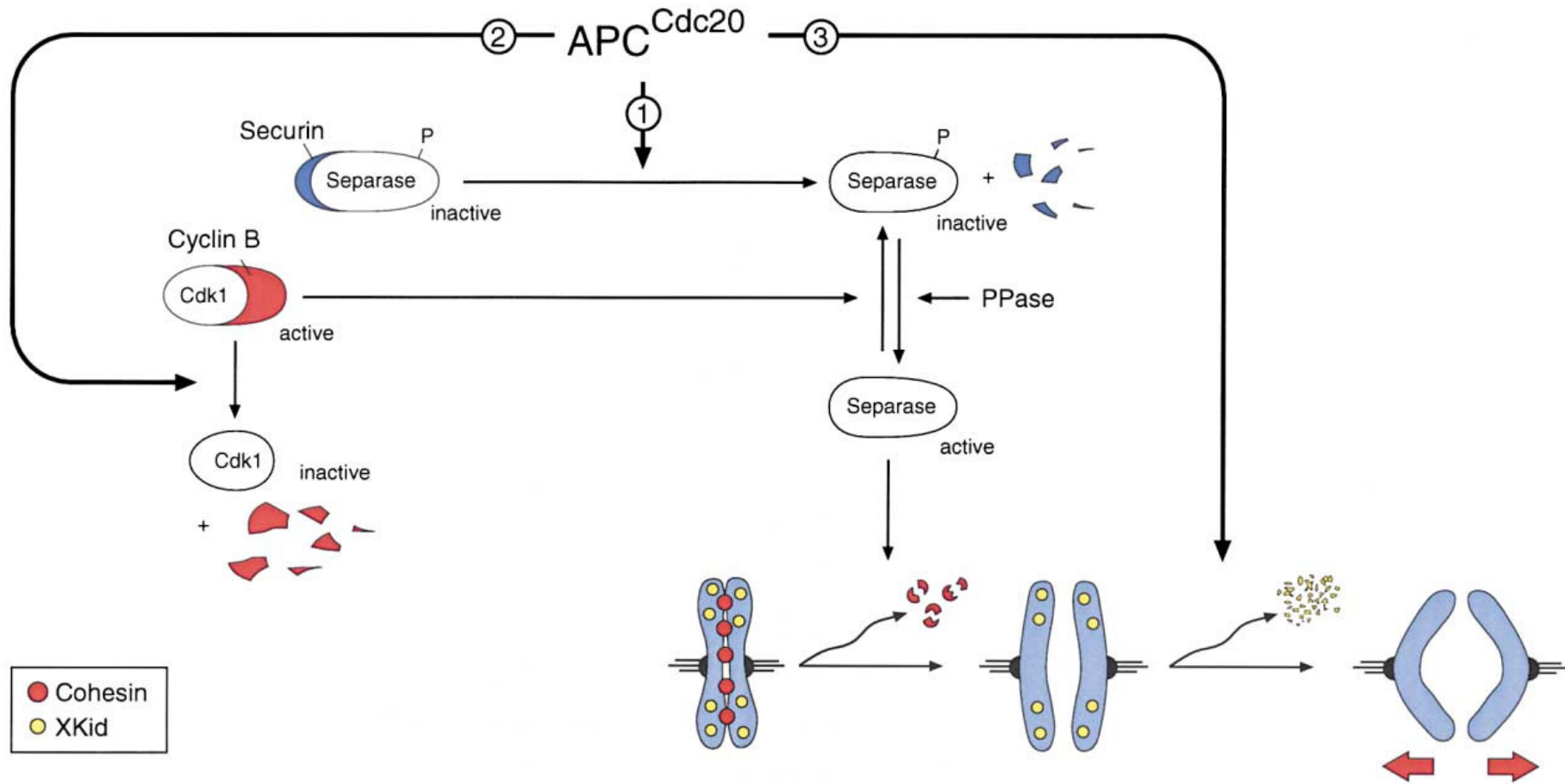


Anaphase promoting complex (APC)

Je nutný pro dokončení mitózy a segregaci chromosomů.
Specifický komplex umožňující rychlou degradaci proteinů.

APC je nutný pro výstup z mitózy – indukci proteinové degradace několika proteinů, zejména cyklinu B a securinu. APC má ubiquitin-ligasovou aktivitu a je složen z min. 11 podjednotek.

Funkce anaphase promoting komplexu (APC) v mitose



APC^{Cdc20} enables activation of the protease separase by mediating the degradation of securin. Active separase separates sister chromatids from each other by cleaving cohesin complexes.

APC^{Cdc20} also helps to activate separase by initiating the degradation of cyclin B and other mitotic cyclins.

Mechanismy zastavení buněčného cyklu při poškození DNA

ATM (ataxia teleangiectasia mutated), ATR
Chk 1,2

Cell cycle „checkpoints“ (kontrolní body buň. cyklu)

„Checkpoints“ umožňují zpomalit nebo zastavit buněčný cyklus při poškození DNA, neúplné replikaci nebo chybě při sestavování mitotických chromosomů.

- restriction point

regulační bod v G1 fázi, po kterém je již buňka předurčena k dokončení buněčného cyklu nezávisle na přítomnosti mitogenů.

- DNA replication checkpoint

DNA replikuje pouze jednou a po replikaci dojde k mitóze, Výjimka: endoreduplikace (opakování replikace bez mitózy). K endoreduplikaci je nezbytný cyklin E.

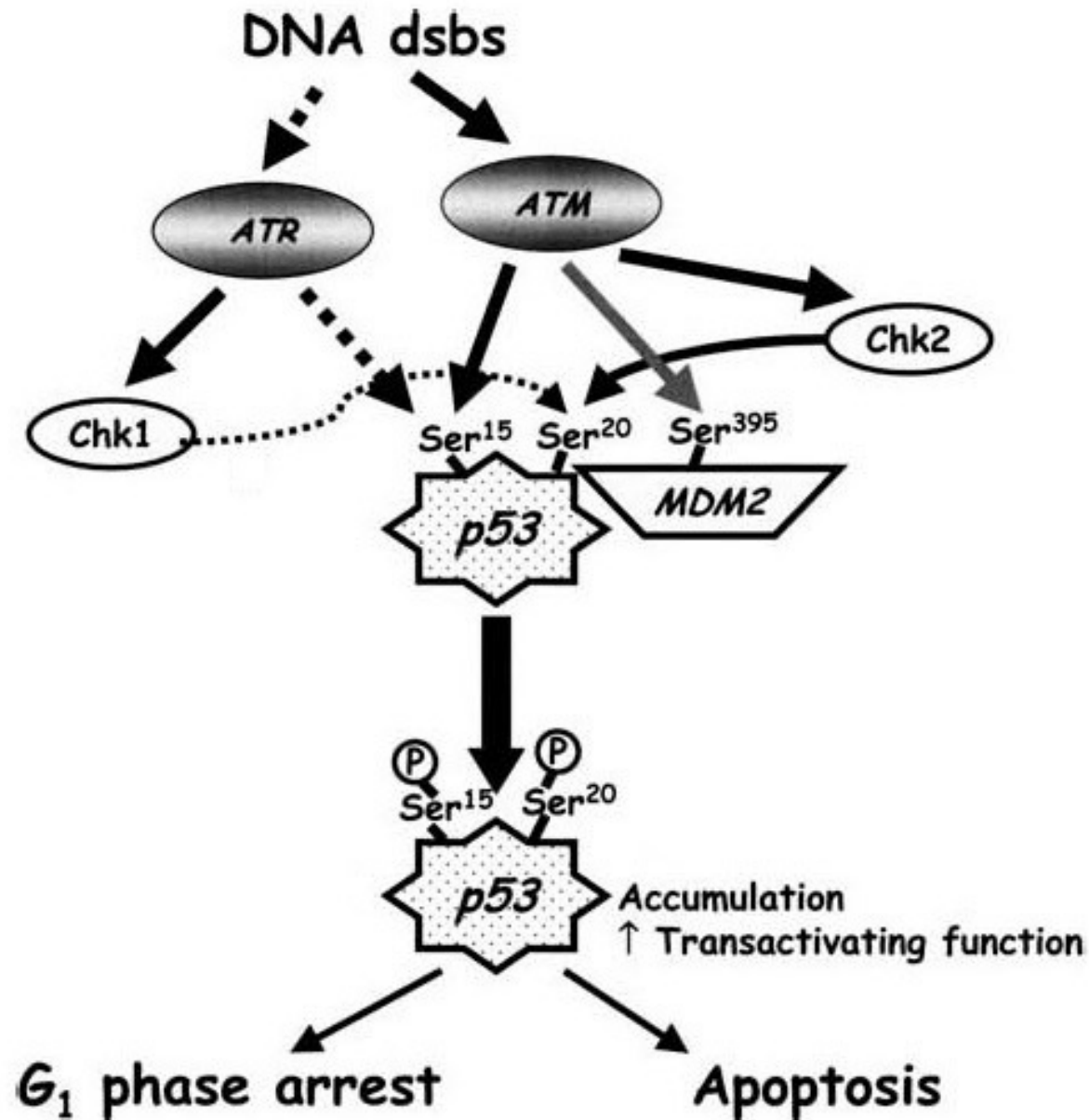
- spindle assembly checkpoint

zajišťuje správnou segregaci chromosomů při mitóze.

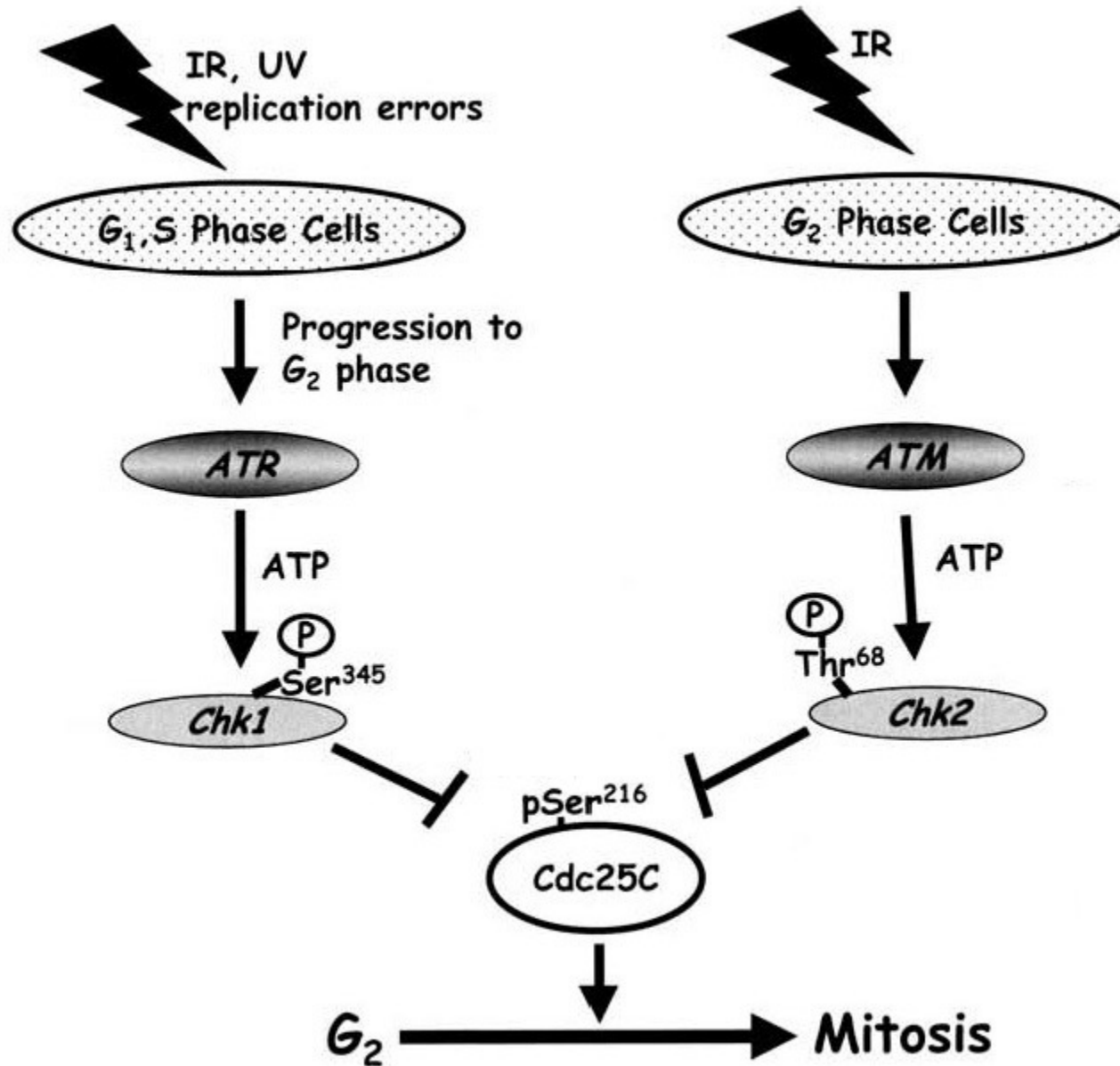
- DNA damage checkpoint(s)

při poškození DNA může buňka zpomalit cyklus v G1, S , i G2 fázi.

ATM/ATR aktivace a blok v G1



ATM/ATR aktivace a blok v G2



Poškození DNA

