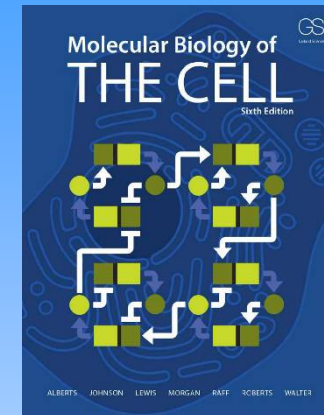
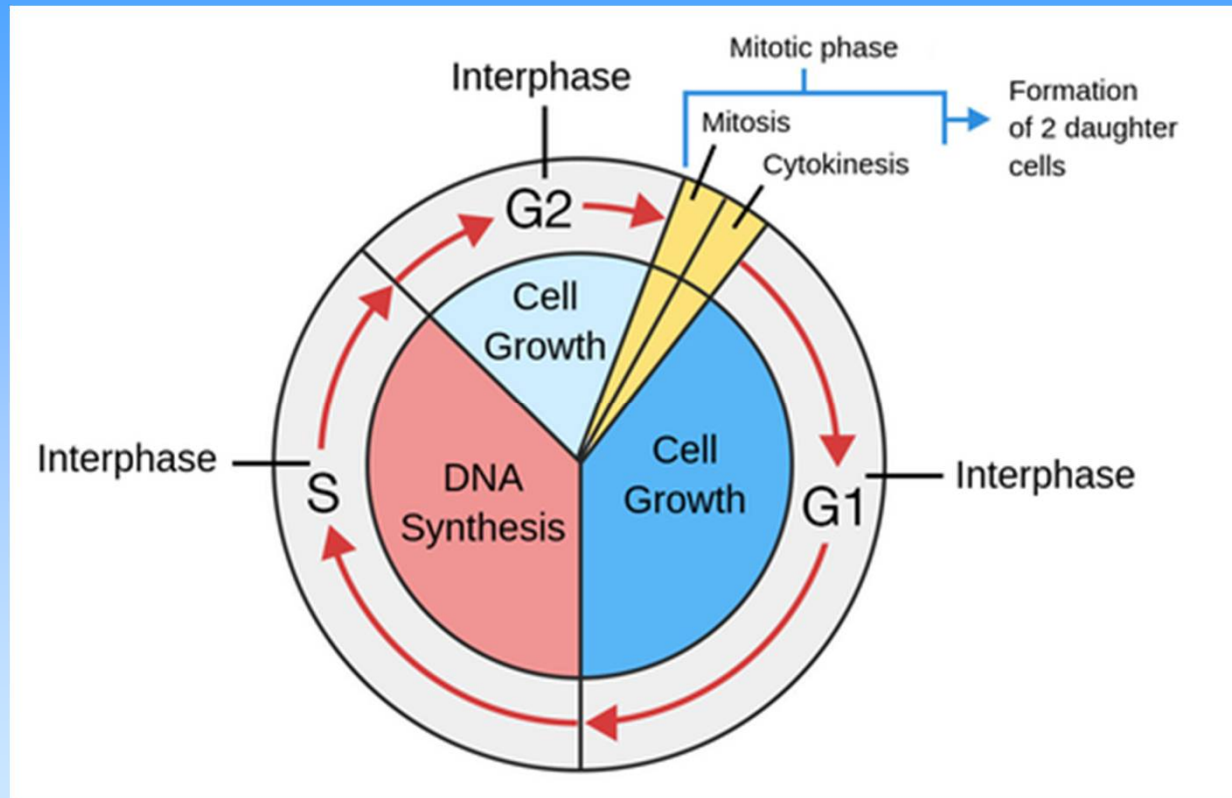


12) Buněčný cyklus a apoptóza



Bruce Alberts

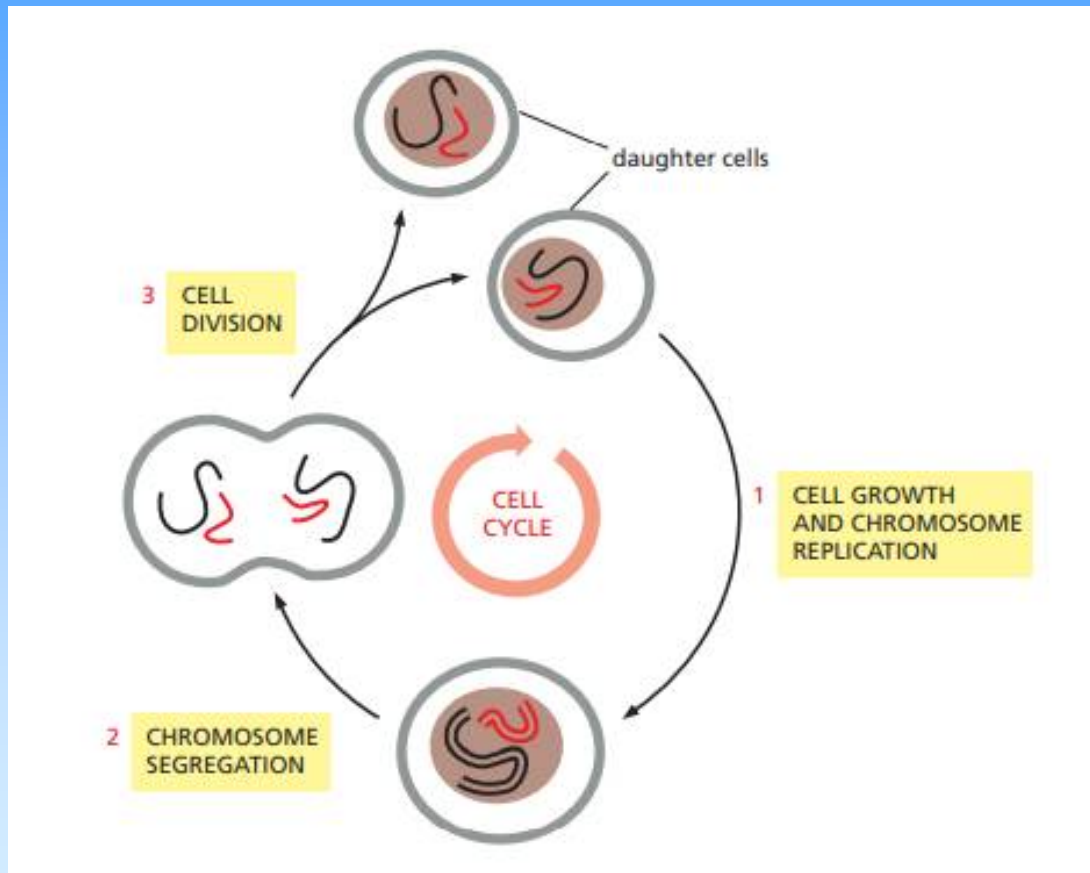
Martin Fellner, LRR, Přf UP v Olomouci

Podle Alberts B et al. (2015) Molecular Biology of the Cell, 6th ed., Garland Science

Buněčný cyklus

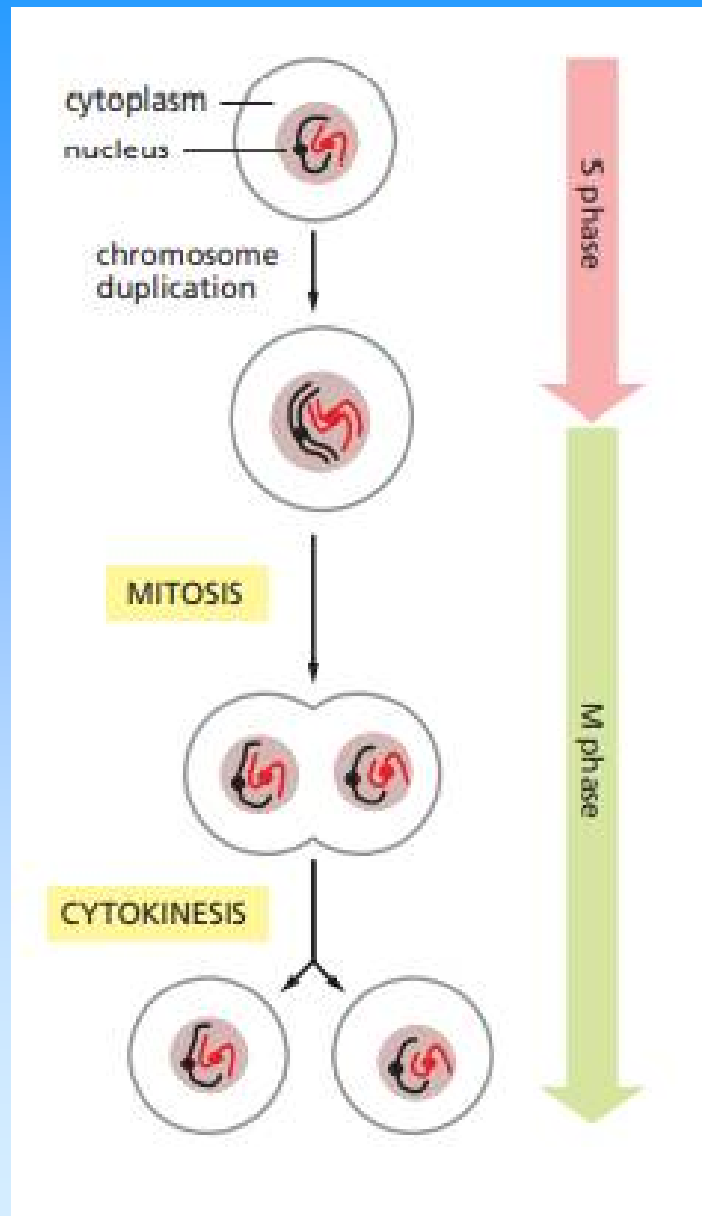
2

Jediný způsob, jak vytvořit novou buňku, je duplikovat buňku, která již existuje. Tento fakt byl poprvé zjištěn v polovině 19. století.



Buňka se reprodukuje prováděním uspořádané sekvence událostí, ve kterých **duplikuje svůj obsah a poté se rozdělí na dvě části**. Tento cyklus duplikace a dělení, známý jako **buněčný cyklus**, je základním mechanismem, kterým se všechny živé věci rozmnožují.

Univerzální vlastnost buněčného dělení: buňka musí splnit svůj nezákladnější úkol – **předat svou genetickou informaci** další generaci buněk.



Dvě fáze buněčného cyklu:

**S fáze (syntéza DNA) – duplikace chromozomů;
10-12 hod**

M fáze (mitóza); < 1 hodina

– jaderné dělení (mitóza) – distribuce zkopírovaných chromozomů do páru dceřiných buněk

– cytoplazmatické dělení (cytokineze) – rozdělení buňky na 2 části

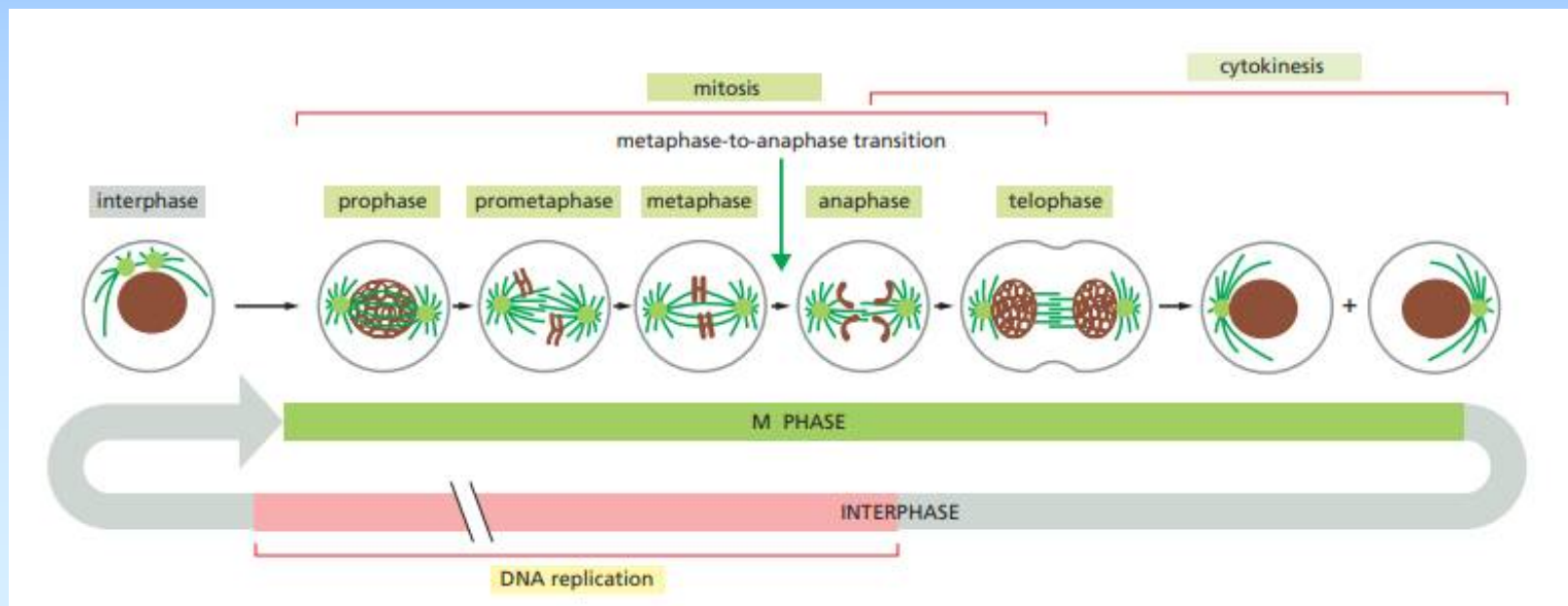
Konec S-fáze – molekuly DNA duplikovaných chromozomů jsou propleteny a drženy pohromadě specializovanými proteinovými vazbami

Začátek M-fáze – **profáze**: dvě molekuly DNA se oddělují, kondenzace do páru tuhých tyčinek = **sesterské chromatidy**

Rozpad jaderného obalu => připojení sesterských chromatid k opačným pólům mitotického vřeténka (seskupení mikrotubulů) a následně zarovnání na rovníku vřeténka - **metafáze**

Destrukce spojení sesterských chromatid => oddělení sesterských chromatid => transport k opačným pólům vřeténka - **anafáze**. Vřeténko je poté rozebráno a oddělené chromozomy jsou zabaleny do samostatných jader – **telofáze**.

Cytokineze - rozštěpení buňky na dvě části => každá dceřiná buňka zdědí jedno ze dvou jader



Eukaryotický buněčný cyklus se skládá ze čtyř fází.

Většina buněk potřebuje k růstu a zdvojnásobení své hmoty proteinů a organel mnohem více času, než potřebují k duplikaci svých chromozomů a dělení. Většina buněčných cyklů má mezerové fáze:

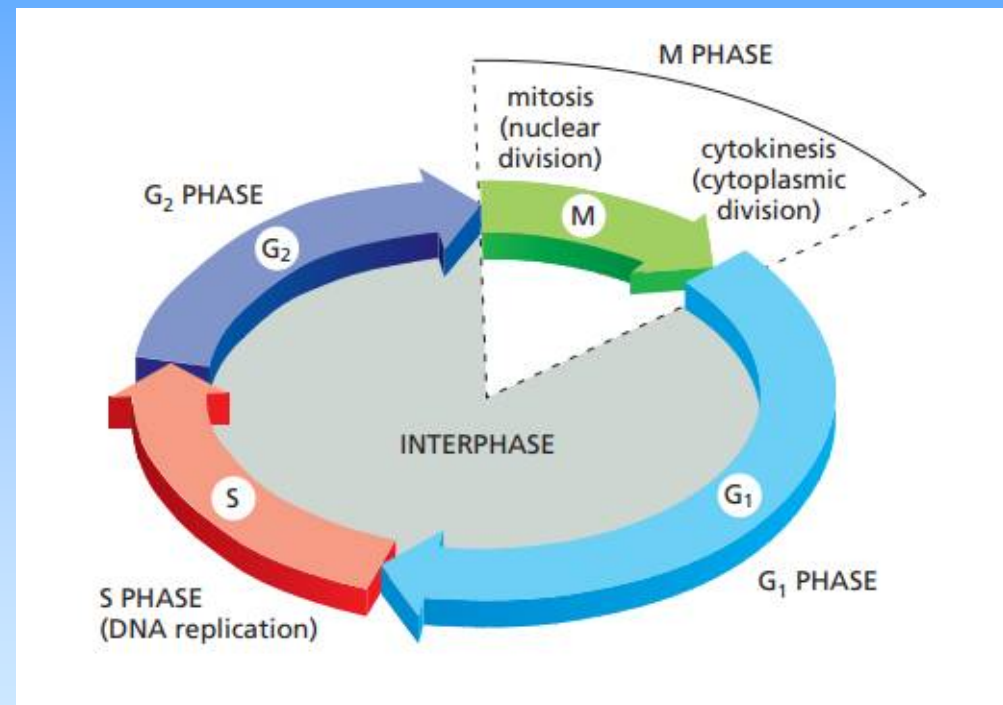
- fáze G_1 – mezi M fází a S fází
- fáze G_2 – mezi S fází a mitózou

Cyklus eukaryotických buněk – 4 fáze:

G_1 , S, G_2 a M

G_1 , S a G_2 = **interfáze – čas pro růst buněk**

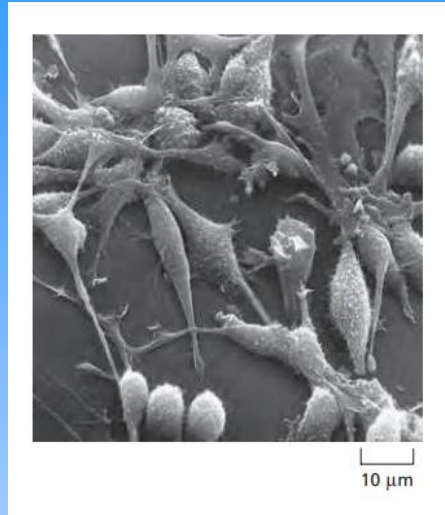
Interfáze v lidské buňce v kultuře může trvat 23 hodin, 1 hodinu trvá M fáze.



Délka G_1 se liší v závislosti na vnějších podmínkách – nepříznivé podmínky => G_1 delší => G_0 fáze = klidový stav (dny, týdny, roky)

Start (restrikční bod) = příznivé podmínky; na konci G_1 fáze. Po překonání startu začne replikace DNA a pokračuje i po překonání extracelulárních signálů.

Studium progresu buněčného cyklu



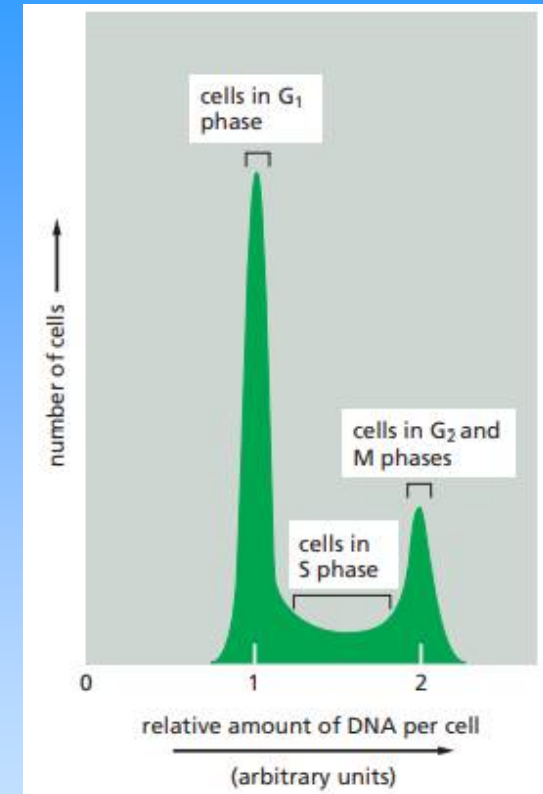
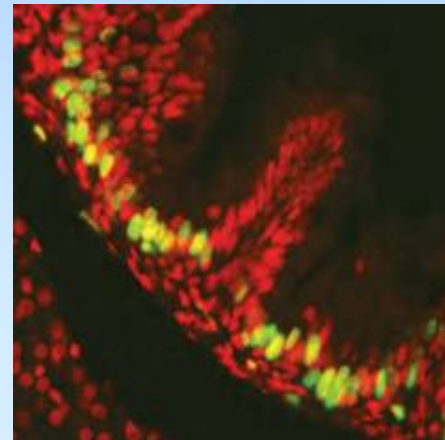
Populace savčích buněk proliferujících v kultuře - část buněk se zakulatila a je v mitóze.



Pučící kvasinkové buňky pod mikroskopem – velikost pupenu určuje stádium buněčného cyklu.

Fluorescenční barviva vázající se k DNA, nebo protilátky, které rozpoznávají specifické buněčné složky – mikrotubuly – odhalují mitotická vřeténka

Zobrazitelné molekuly začleněny do nově syntetizované DNA - umělý analog thymidinu bromodeoxyuridin (BrdU); inkorporovaný BrdU je odhalen barvením anti-BrdU protilátkami (žlutá barva) – rozpoznání S-fáze

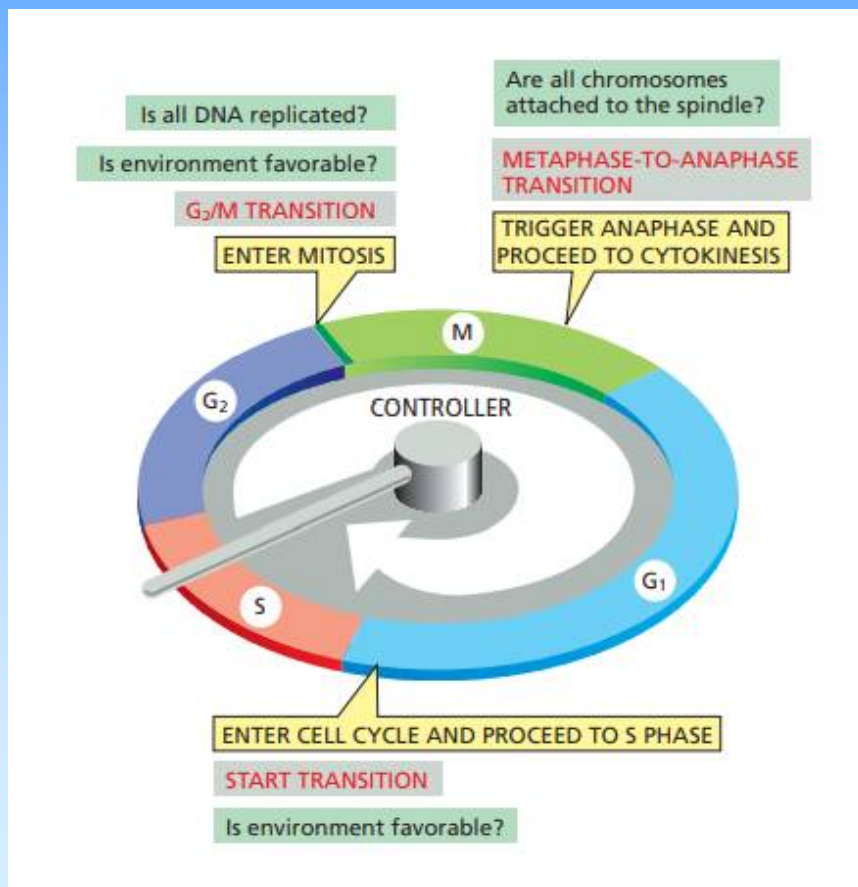


Měření obsahu DNA – během S fáze se zdvojnásobuje. Fluorescenční barviva vázající DNA – průtokový cytometr – umožňuje rychlou a automatickou analýzu velkého počtu buněk

System řízení buněčného cyklu

7

Do konce 80. let nebylo ještě známo, zda existuje samostatný kontrolní systém, nebo zda se procesy syntézy DNA, mitózy a cytokineze řídí nějakým způsobem samy. Velký průlom nastal na konci 80. let s identifikací klíčových proteinů řídicího systému spolu s uvědoměním, že se liší od proteinů, které provádějí procesy replikace DNA, segregace chromozomů.

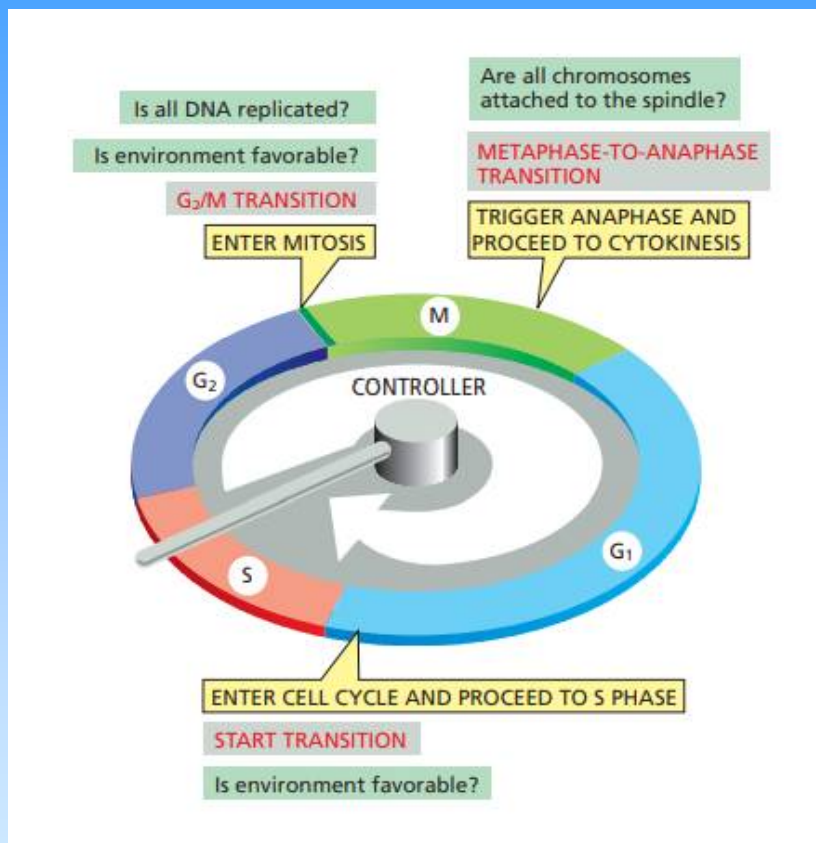


System řízení buněčného cyklu funguje podobně jako časovač, který spouští události buněčného cyklu v nastavené sekvenci.

Ve většině buněk řídicí systém reaguje na informace přijaté zpět od procesů, které řídí. Pokud porucha brání úspěšnému dokončení syntézy DNA, jsou odeslány signály do řídicího systému, aby se oddálila progresse do M fáze. Taková zpoždění poskytují čas na opravu zařízení a také zabraňují katastrofě, která by mohla nastat, pokud by cyklus předčasně postoupil do další fáze – například segregace neúplně replikovaných chromozomů.

Řídicí systém buněčného cyklu je založen na propojené řadě biochemických přepínačů – každý spouští specifickou událost buněčného cyklu.

System přepínačů má mnoho **důležitých vlastností**, které zvyšují přesnost a spolehlivost průběhu buněčného cyklu.



1. Přepínače jsou obecně binární (zapnuto/vypnuto) a spouštějí události úplným, nevratným způsobem.

2. Řídicí systém buněčného cyklu je robustní a spolehlivý – záložní mechanismy a další funkce umožňují systému efektivně pracovat za různých podmínek, i v případě, že některé komponenty selžou

3. Kontrolní systém je vysoce adaptabilní – může být modifikován tak, aby vyhovoval specifickým typům buněk nebo reagoval na specifické intracelulární nebo extracelulární signály.

Tři hlavní regulační přechody:

1) **Start (restrikční bod)** – na konci G₁ fáze – buňka chystá vstup do buněčného cyklu a duplikaci chromozomů.

2) **Přechod G₂/M** – řídicí systém spouští rané mitotické události – zarovnání chromozomů v mitotickém vřeténku

3) **Přechod z metafáze do anafáze** – stimulace separace sesterských chromatid – dokončení mitózy a cytokineze

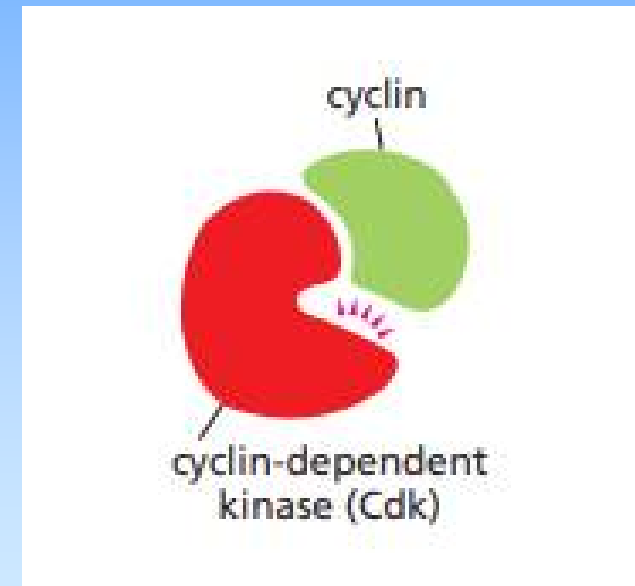
Řídicí systém buněčného cyklu závisí na cyklicky aktivovaných cyklin-dependentních protein kinázách (Cdks).

Centrální složky řídicího systému buněčného cyklu – rodina protein kináz známých jako **cyklin-dependentní kinázy (Cdks)**.

Aktivita kináz stoupá a klesá, jak buňka postupuje cyklem => cyklické změny ve fosforylaci intracelulárních proteinů, které iniciují nebo regulují hlavní události buněčného cyklu.

Cyklické změny v aktivitě Cdk jsou řízeny komplexní řadou enzymů a dalších proteinů – nejdůležitější **cykliny**.

Pokud nejsou CDK pevně vázány na cyklin, nemají žádnou protein kinázovou aktivitu.

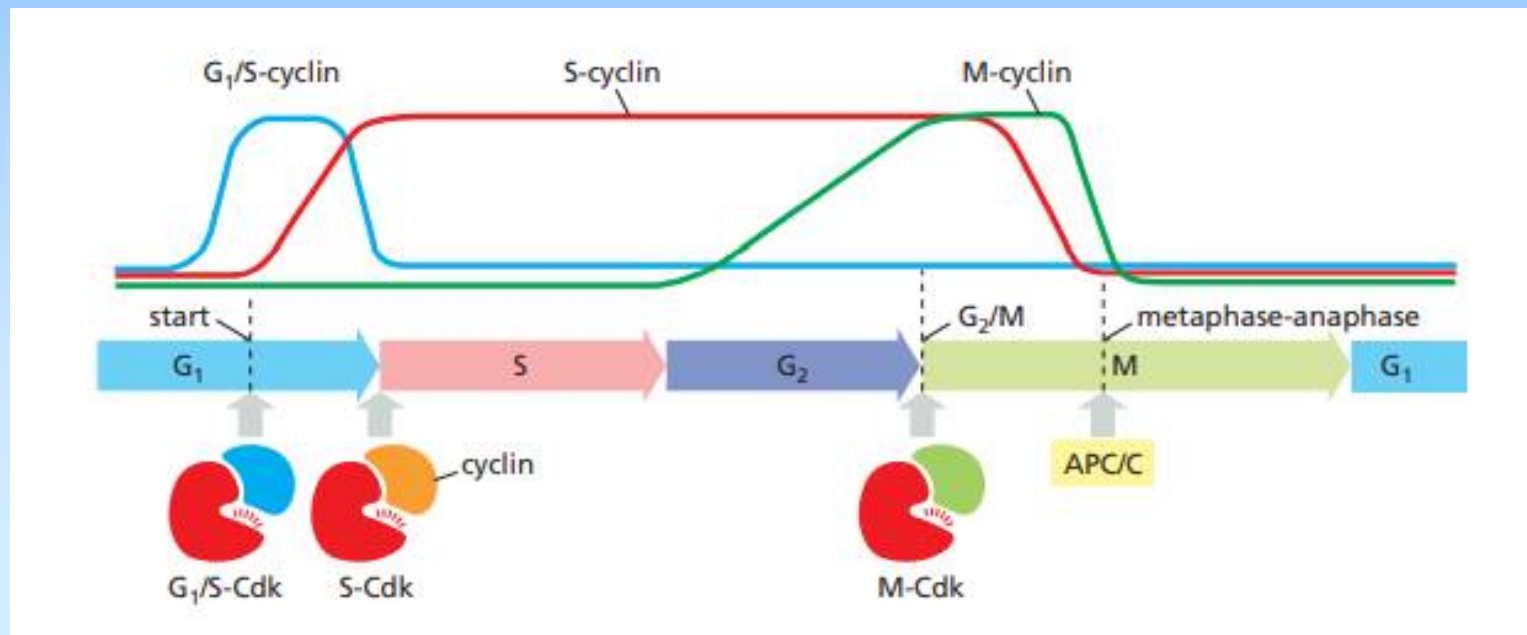


Cykliny – procházejí cyklem syntézy a degradace v každém buněčném cyklu. Hladiny Cdk proteinů jsou naopak konstantní. Cyklické změny hladin cyklinového proteinu vedou k cyklickému sestavení a aktivaci **komplexů cyklin-Cdk** ve specifických fázích buněčného cyklu.

Existují 4 třídy cyklinů – každá je definována fází buněčného cyklu, ve které vážou Cdk a fungují.

Eukaryotické buňky vyžadují tři z těchto tříd:

1. **G₁/S-cykliny** – aktivují Cdk v pozdním G₁ => pomáhají spouštět progresi přes Start => vstup do buněčného cyklu. Jejich hladiny spadají do fáze S.
2. **S-cykliny** – vážou Cdk brzy po progresi přes Start => pomáhají stimulovat duplikaci chromozomů. Hladiny S-cyklinu zůstávají zvýšené až do mitózy.
3. **M-cykliny** – aktivují Cdk, které stimulují vstup do mitózy při přechodu G₂/M. Hladiny M-cyklinu klesají uprostřed mitózy.



V buňkách obratlovců existují 4 Cdk (Cdk1, 2, 5 a 6). Dva interagují s G₁-cykliny, jeden s G₁/S, dva s S-cykliny a jeden s M-cykliny.

TABLE 17-1 The Major Cyclins and Cdks of Vertebrates and Budding Yeast

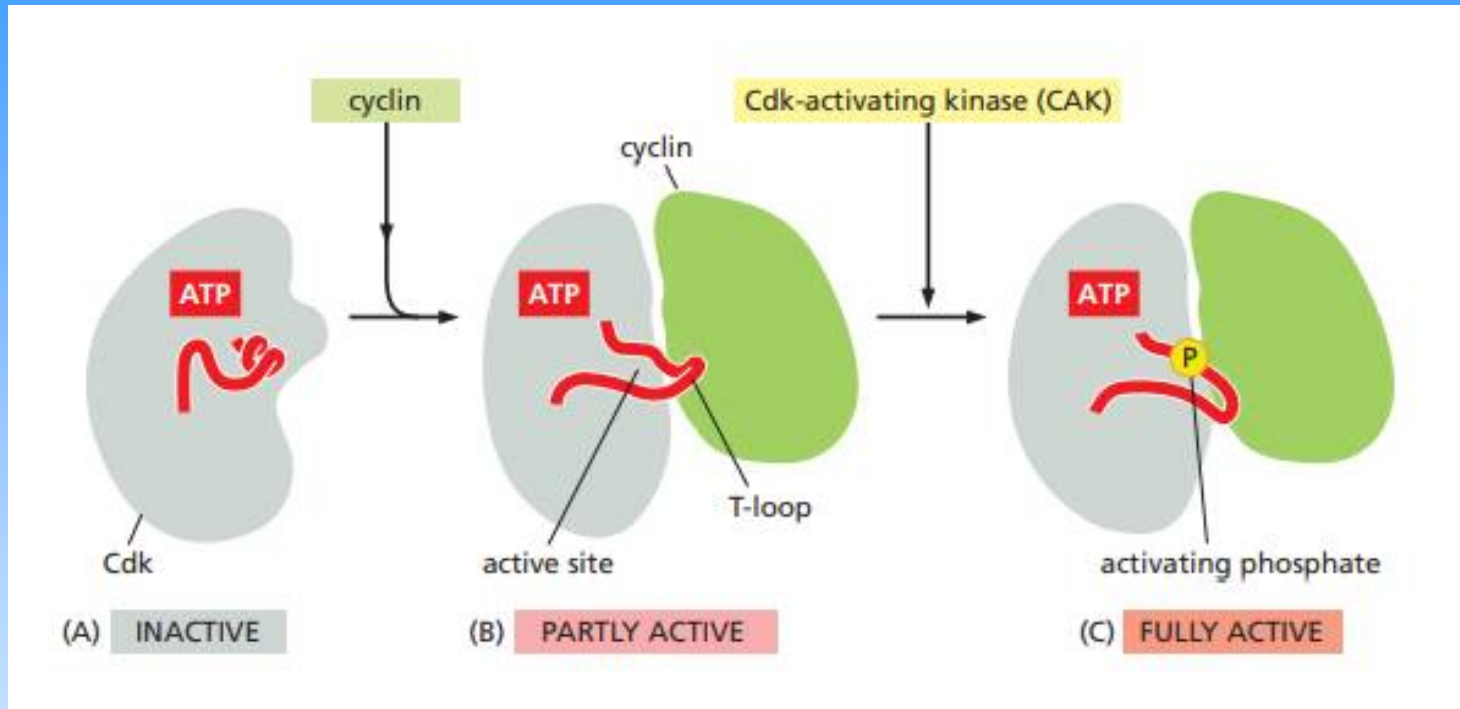
Cyclin-Cdk complex	Vertebrates		Budding yeast	
	Cyclin	Cdk partner	Cyclin	Cdk partner
G ₁ -Cdk	Cyclin D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G ₁ /S-Cdk	Cyclin E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	Cyclin A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
M-Cdk	Cyclin B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

* There are three D cyclins in mammals (cyclins D1, D2, and D3).
 ** The original name of Cdk1 was Cdc2 in both vertebrates and fission yeast, and Cdc28 in budding yeast.

Jak různé komplexy cyklin-Cdk spouštějí různé události buněčného cyklu?

Odpověď: Cyklinový protein nejen aktivuje svého Cdk partnera, ale také jej nasměruje na specifické cílové proteiny => každý komplex cyklin-Cdk fosforyluje jinou sadu substrátových proteinů. Stejný komplex cyklin-Cdk může také vyvolat různé účinky v různých časech cyklu.

Nepřítomnost cyklinu – aktivní místo v proteinu Cdk je částečně zakryto proteinovou smyčkou, jako kámen blokuji vchod do jeskyně – Cdk neaktivní.



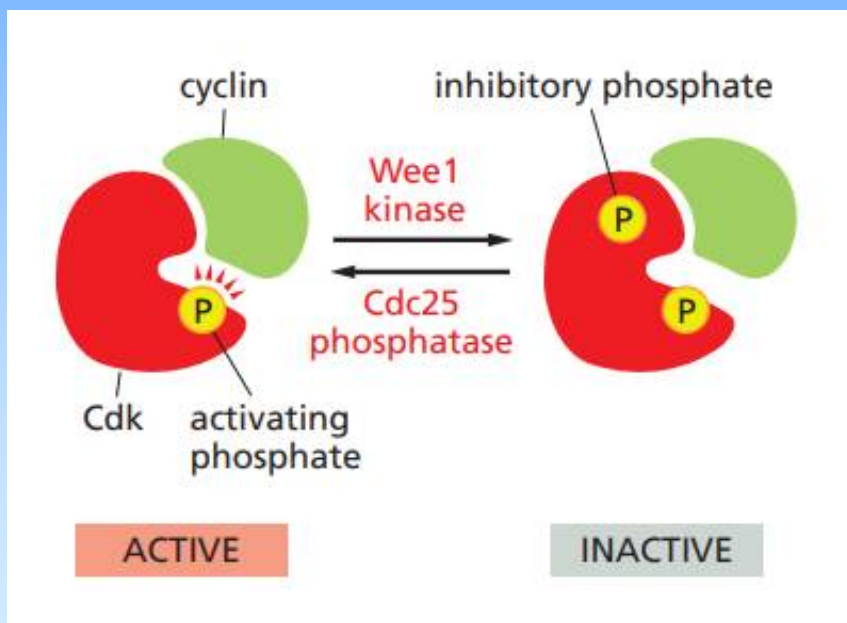
Vazba cyklinu – smyčka se vzdaluje od aktivního místa => částečná aktivace enzymu Cdk

Kináza aktivující Cdk (CAK) fosforyluje aminokyselinu poblíž vstupu do aktivního místa Cdk => malá konformační změna => zvýšení aktivity Cdk (= plná aktivace komplexu) => kináza účinně fosforyluje své cílové proteiny a indukuje specifické události buněčného cyklu.

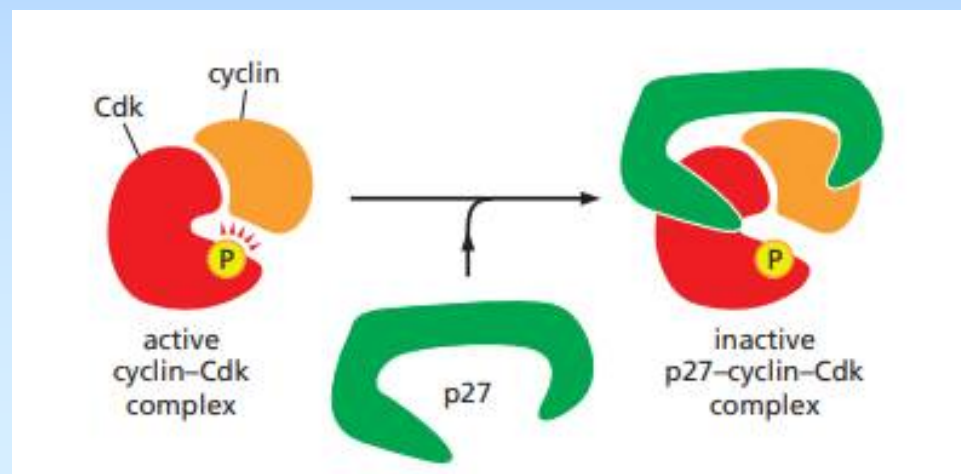
Aktivitu Cdk lze potlačit inhibiční fosforylací a proteiny inhibitoru Cdk (CKI).

Zvýšení aktivity komplexu cyklin-Cdk: defosforylace páru aminokyselin ve střeše aktivního místa kinázy fosfatázou **Cdc25**

Snížení aktivity komplexu cyklin-Cdk: fosforylace páru aminokyselin ve střeše aktivního místa kinázy **Wee1**



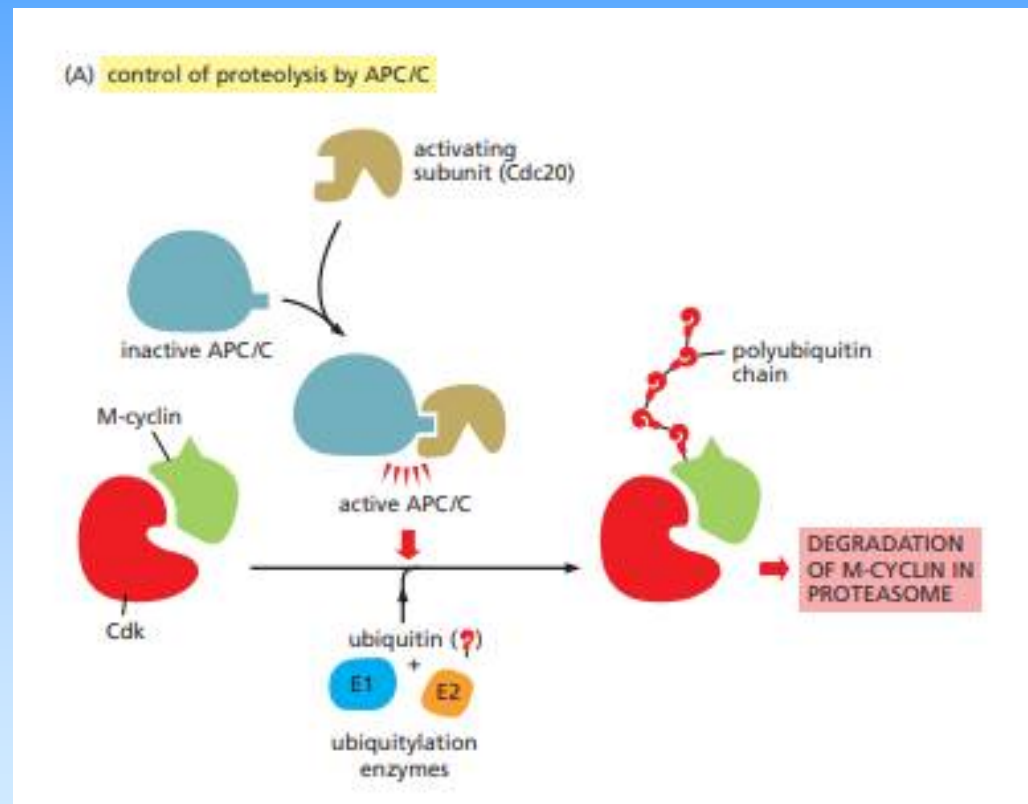
Inaktivace komplexu cyklin-Cdk – vlivem Cdk inhibičních proteinů (CKI) – **příklad CKI-p27**



Buňky používají CKI primárně k tomu, aby pomohly řídit aktivity G₁/S- a S-Cdks na začátku buněčného cyklu.

Regulovaná proteolýza spouští přechod z metafáze do anafáze.

Progrese přes přechod z metafáze do anafáze je spouštěna destrukcí proteinu => konečné stádium buněčného dělení. Klíčovým regulátorem přechodu z metafáze do anafáze je komplex podporující anafázi neboli **cyklozom (APC/C)** – ubiquitin ligáza.



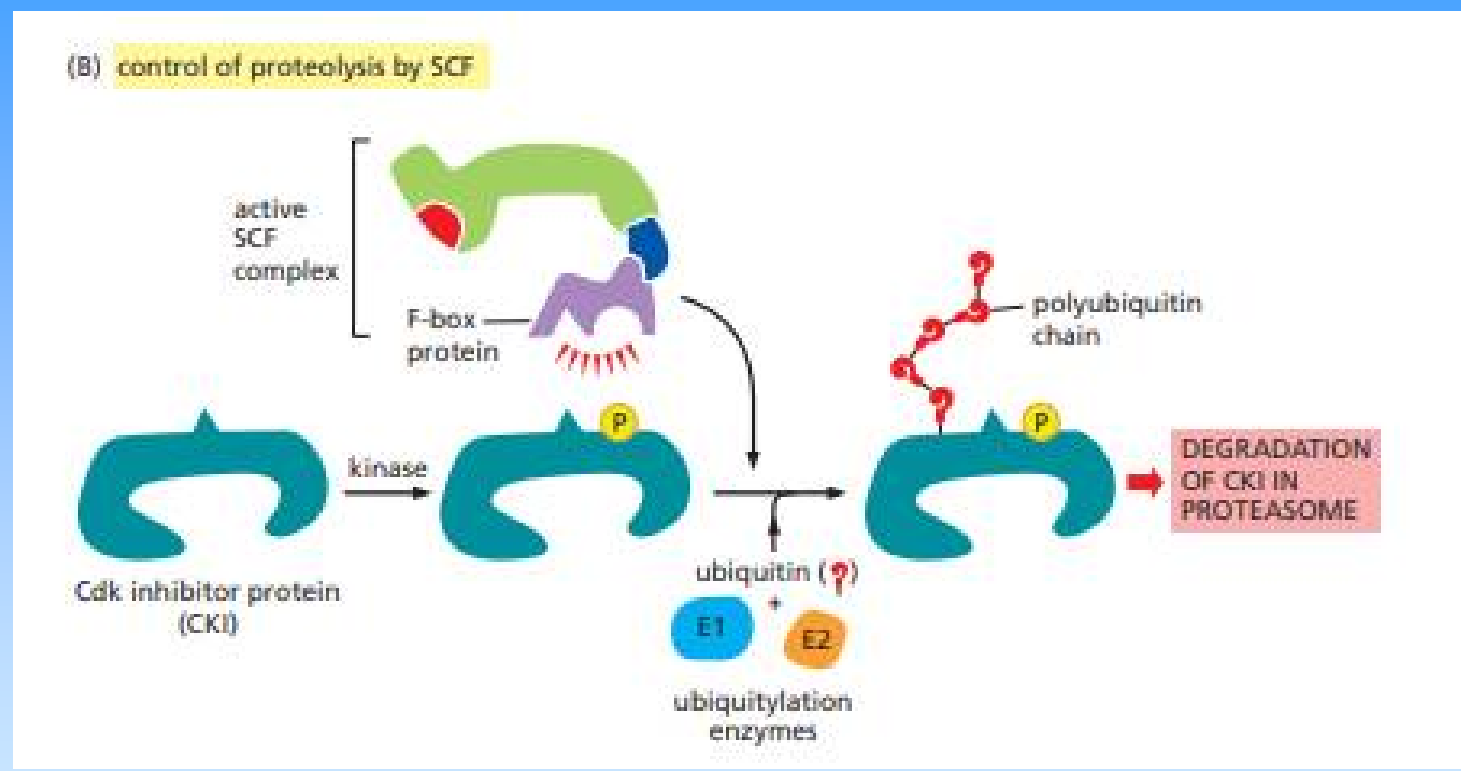
Aktivita APC/C se mění v průběhu buněčného cyklu = asociace s aktivační podjednotkou **Cdc20** ve střední mitóze, nebo Cdh1 z pozdní mitózy přes časnou G_1 . Tyto podjednotky pomáhají APC/C rozpoznat jeho cílové proteiny.

APC/C katalyzuje ubiquitinaci a destrukci dvou hlavních typů proteinů:

- **Securin** – chrání proteinové vazby, které drží páry sesterských chromatid pohromadě v časně mitóze. Zničení securinu v metafázi => aktivace proteázy => oddělení sesterských chromatid => uvolnění anafáze

- **S-cykliny** a **M-cykliny** – zničení těchto cyklinů => inaktivace většiny Cdk v buňce => mnoho proteinů fosforylovaných Cdk od S fáze do časně mitózy je defosforylováno různými fosfatázami v anafázi = nutné pro dokončení M-fáze a cytokineze

System řízení buněčného cyklu také využívá ubikvitin ligázu **SCF** – hlavní úloha v buněčném cyklu – ubiquitinace vybraných CKI proteinů v pozdní G₁ fázi => řízení aktivace S-Cdk a replikace DNA. SCF je také zodpovědná za destrukci G₁/S-cyklinů v časně S fázi.

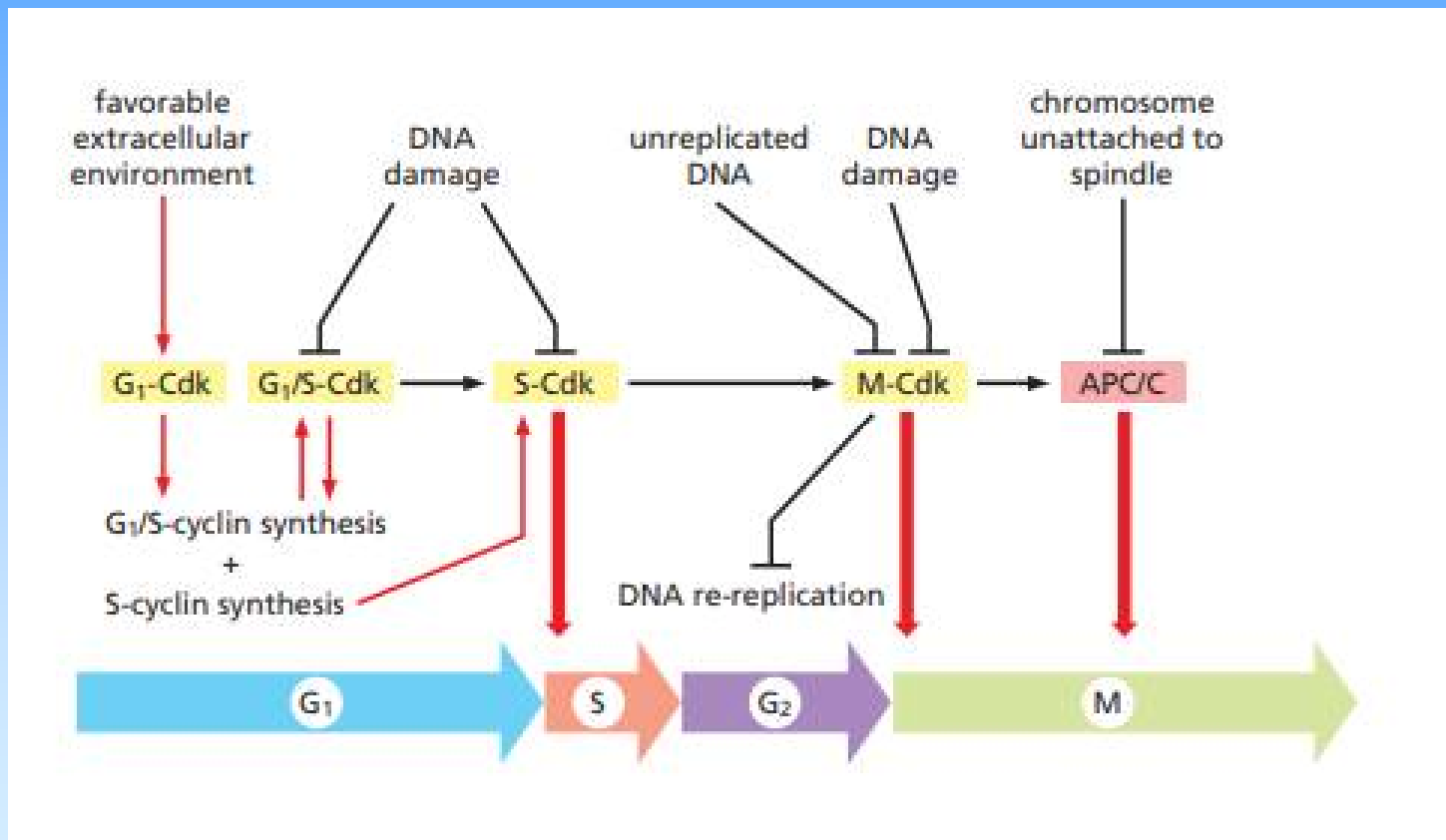


Aktivita SCF závisí na podjednotkách = proteiny F-box. Aktivita SCF je během buněčného cyklu konstantní. Všudypřítomnost pomocí SCF je místo toho řízena změnami ve stavu fosforylace jeho cílových proteinů, protože podjednotky F-boxu rozpoznávají pouze specificky fosforylované proteiny.

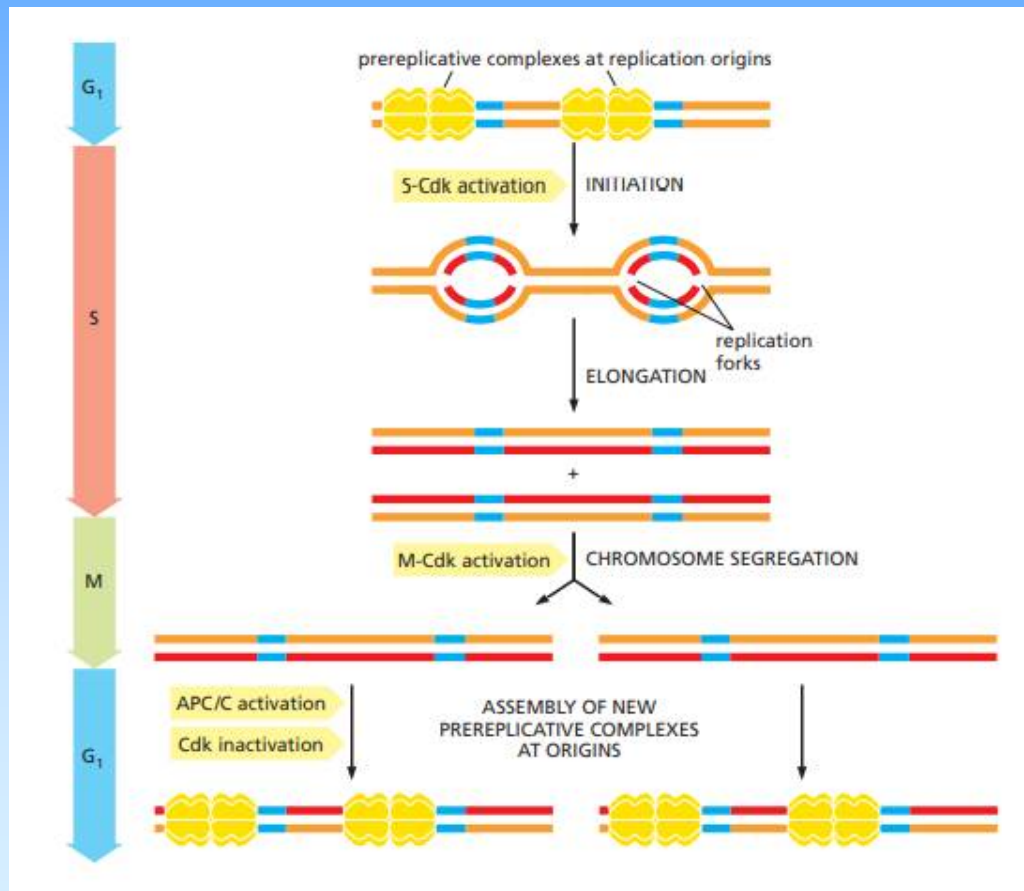
Přehled hlavních součástí systému řízení buněčného cyklu – proteiny jsou funkčně spojeny, tvoří robustní síť - funguje autonomně => aktivace biochemické spínače => spouštění specifických událostí buněčného cyklu.

TABLE 17-2 Summary of the Major Cell Cycle Regulatory Proteins	
General name	Functions and comments
Protein kinases and protein phosphatases that modify Cdks	
Cdk-activating kinase (CAK)	Phosphorylates an activating site in Cdks
Wee1 kinase	Phosphorylates inhibitory sites in Cdks; primarily involved in suppressing Cdk1 activity before mitosis
Cdc25 phosphatase	Removes inhibitory phosphates from Cdks; three family members (Cdc25A, B, C) in mammals; primarily involved in controlling Cdk1 activation at the onset of mitosis
Cdk inhibitor proteins (CKIs)	
Sic1 (budding yeast)	Suppresses Cdk1 activity in G ₁ ; phosphorylation by Cdk1 at the end of G ₁ triggers its destruction
p27 (mammals)	Suppresses G ₁ /S-Cdk and S-Cdk activities in G ₁ ; helps cells withdraw from cell cycle when they terminally differentiate; phosphorylation by Cdk2 triggers its ubiquitylation by SCF
p21 (mammals)	Suppresses G ₁ /S-Cdk and S-Cdk activities following DNA damage
p16 (mammals)	Suppresses G ₁ -Cdk activity in G ₁ ; frequently inactivated in cancer
Ubiquitin ligases and their activators	
APC/C	Catalyzes ubiquitylation of regulatory proteins involved primarily in exit from mitosis, including securin and S- and M-cyclins; regulated by association with activating subunits Cdc20 or Cdh1
Cdc20	APC/C-activating subunit in all cells; triggers initial activation of APC/C at metaphase-to-anaphase transition; stimulated by M-Cdk activity
Cdh1	APC/C-activating subunit that maintains APC/C activity after anaphase and throughout G ₁ ; inhibited by Cdk activity
SCF	Catalyzes ubiquitylation of regulatory proteins involved in G ₁ control, including some CKIs (Sic1 in budding yeast, p27 in mammals); phosphorylation of target protein usually required for this activity

Příznivé podmínky – stimulace aktivace G₁-Cdk vnitřními a vnějšími signály => **stimulace exprese genů kódujících G₁/S- a S-cykliny** => řízení přechodu Start => uvolnění S-Cdk => duplikace chromozomů v S fázi a časně události mitózy = aktivace M-Cdk => vyrovnání sesterských chromatid na rovníku mitotického vřeténka. Aktivace APC/C => destrukce securinu a cyklinů => separace a oddělení sesterských chromatid a dokončení mitózy => potlačení aktivity Cdk => perioda G₁.



Duplikace lineárních chromozomů eukaryotických buněk je složitý proces. Musí být přesně duplikována dlouhá molekula DNA každého chromozomu a také musí být reprodukován proteinový obal obklopující každou oblast této DNA – zajištění toho, že dceřiné buňky zdědí všechny rysy chromozomové struktury.

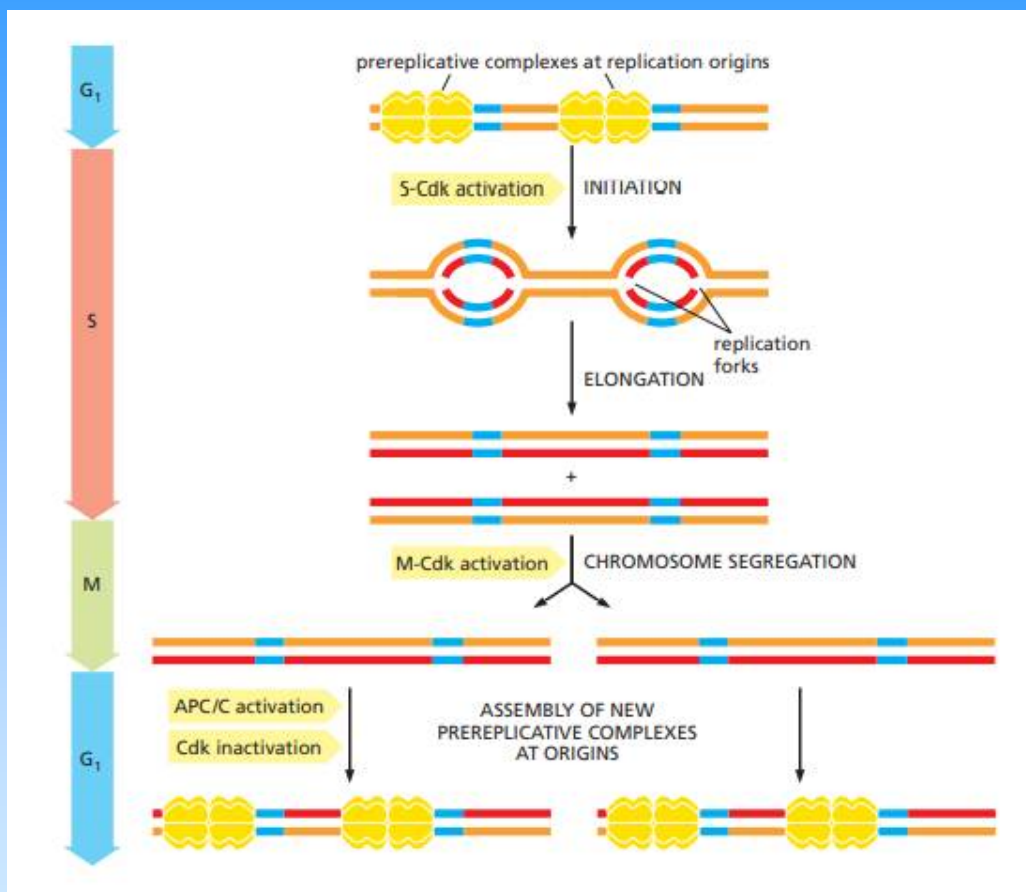


Replikace DNA = **dva problémy**

1) Replikace musí probíhat s extrémní přesností.

2) Každý nukleotid v genomu musí být zkopírován jednou a pouze jednou, aby se zabránilo škodlivým účinkům amplifikace genu.

S-Cdk zahajuje replikaci DNA jednou za cyklus.



Replikace DNA začíná v počátcích replikace - jsou rozptýleny na mnoha místech v každém chromozomu. Replikace DNA je zahájena v těchto počátcích, když DNA helikáza rozvine dvojitou šroubovici a enzymy replikace DNA jsou naneseny na dva jednovláknové templáty.

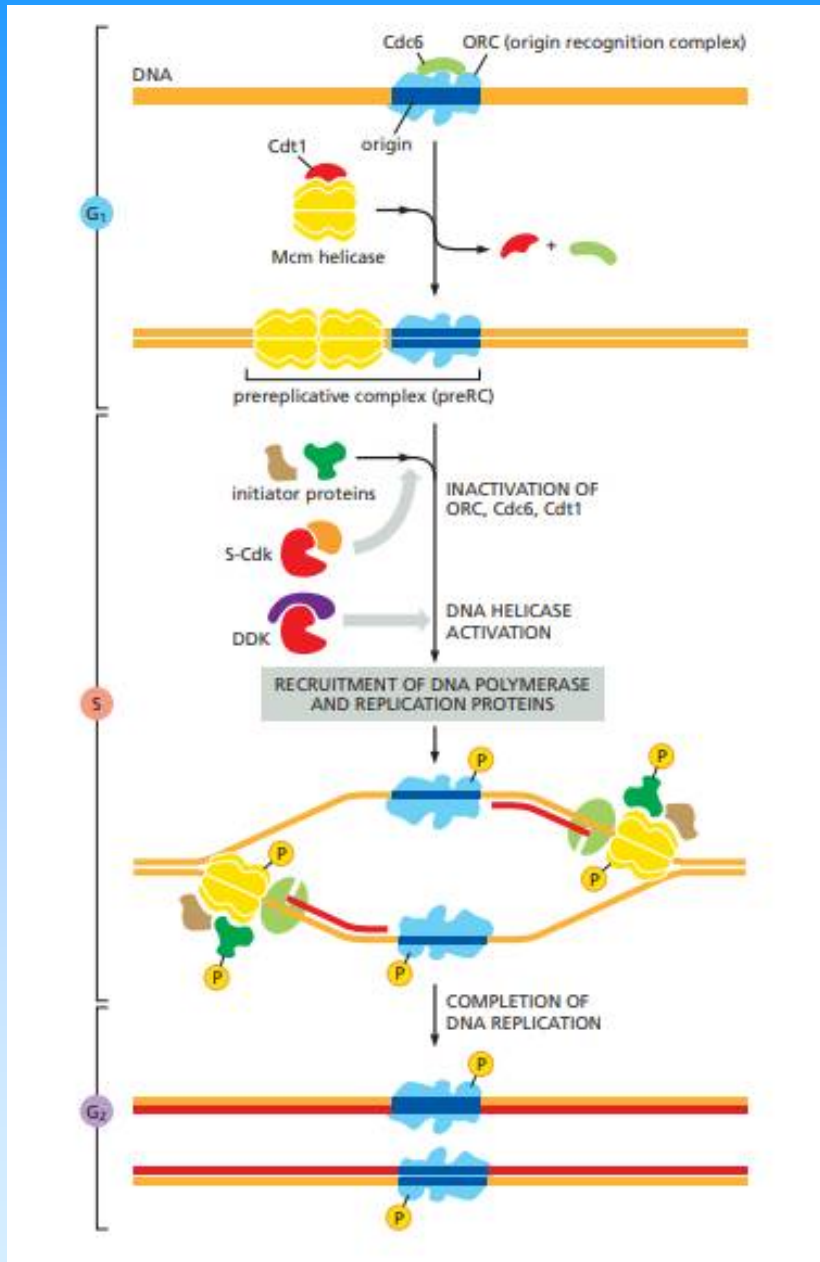
Iniciační fáze replikace DNA – dva kroky:

1) Licencování počátků replikace - pár neaktivních DNA helikáz je načten na počátek replikace => vznik komplexu **prereplikativní komplex (preRC)** (v pozdní mitóze a časně G₁)

2) Aktivace DNA helikázy => odvíjení DNA a zahájení syntézy DNA

Dvě helikázy se přesunou z počátku s replikačními vidličkami a tento počátek nelze znovu použít, dokud tam není na konci mitózy sestaven nový preRC => počátky replikace mohou být aktivovány pouze jednou za buněčný cyklus.





Molekulární detaily – základy kontroly dvou kroků při zahájení replikace DNA.

Multiproteinový komplex nazývaný **komplex rozpoznávání původu (ORC)** – váže se na počátky replikace v průběhu buněčného cyklu. V pozdní mitóze a časném G₁ proteiny Cdc6 a Cdt1 spolupracují s ORC, aby nanesly neaktivní DNA helicázy kolem DNA vedle počátku. Výsledný velký komplex je preRC a původ je nyní licencován pro replikaci.

Pozdní mitóza a časná G₁ – proteiny **Cdc6** a **Cdt1** spolupracují s ORC – navázání neaktivní DNA helicázy na DNA vedle počátku => výsledný velký komplex **preRC** => licencování pro replikaci.

Začátek S fáze – S-Cdk spouští aktivaci počátku fosforylací specifických iniciačních proteinů => aktivace DNA helicázy a rekrutuje mechanismus syntézy DNA. Proteinkináza DDK je aktivována a pomáhá řídit aktivaci fosforylací specifických podjednotek DNA helicázy.

Ve stejné době S-Cdk inhibuje proteiny ORC, Cdc6 a Cdt1, aby nedocházelo k sestavení nových preRC.

Duplikace chromozomů vyžaduje duplikaci chromatinové struktury.

DNA chromozomů je zabalena různými proteiny, včetně histonů a různých regulačních proteinů zapojených do řízení genové exprese. Duplikace chromozomu tedy není pouze záležitostí replikace DNA v jejím jádru, ale také vyžaduje duplikaci těchto chromatinových proteinů a jejich správné sestavení na DNA.

Produkce chromatinových proteinů se zvyšuje během S fáze, aby poskytly suroviny potřebné k zabalení nově syntetizované DNA.

Chromatinové balení pomáhá kontrolovat genovou expresi. V některých částech chromozomu je chromatin vysoce kondenzovaný = **heterochromatin**. V jiných oblastech má otevřenější strukturu a nazývá se **euchromatin**. Tyto rozdíly ve struktuře chromatinu závisí na řadě mechanismů, včetně modifikace histonových konců a přítomnosti nehistonových proteinů.

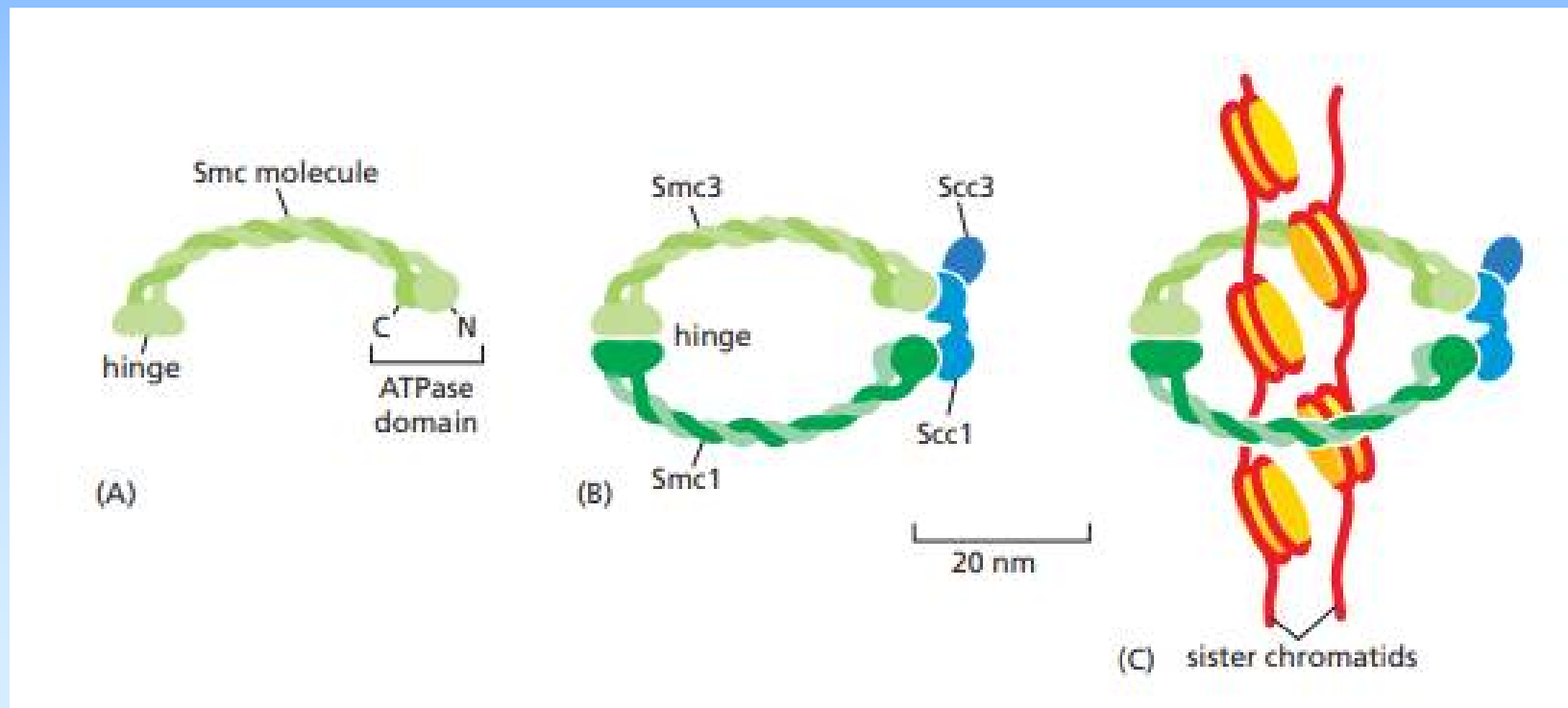
Reprodukce chromatinové struktury není zatím zcela objasněna.

Na konci S fáze se každý replikovaný chromozom skládá z páru identických sesterských chromatid slepených k sobě podél jejich délky. Tato koheze sesterských chromatid připravuje půdu pro úspěšnou mitózu.

Koheze sesterských chromatid závisí na velkém proteinovém komplexu zvaném **kohezin**, který je uložen na mnoha místech podél délky každé sesterské chromatidy.

Dvě z podjednotek kohesinu jsou členy velké rodiny proteinů nazývaných **SMC proteiny**.

Kohesin tvoří obří prstencové struktury, který tyto dvě sesterské chromatidy obklopují.



Po dokončení S fáze a přechodu přes G_2 buňka prochází dramatickým převratem **M fáze**. Ta začíná **mitózou**, během níž jsou sesterské chromatidy odděleny a distribuovány do páru identických dceřiných jader, z nichž každé má svou vlastní kopii genomu. Mitóza je tradičně rozdělena do pěti stádií – profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze – definovaných primárně na základě chování chromozomů, jak je vidět v mikroskopu.

Mitóza je tradičně rozdělena do pěti stádií – profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze – definovaných primárně na základě chování chromozomů viditelného v mikroskopu.

Po dokončení mitózy, druhá hlavní událost M fáze – **cytokineze** – rozdělí buňku na dvě poloviny - každá má identické jádro.

Dvě hlavní fáze mitózy z hlediska její regulace:

- 1) Náhlé zvýšení aktivity M-Cdk na přechodu G_2/M – spouští události časně mitózy: profáze, prometafáze a metafáze. Během tohoto období M-Cdk a několik dalších mitotických proteinkináz fosforyluje různé proteiny => sestavení mitotického vřeténka a jeho připojení k páru sesterských chromatid.**
- 2) Druhá hlavní část mitózy – začíná na přechodu z metafáze do anafáze: APC/C spouští destrukci sekurinu, uvolňuje proteázu, která štěpí kohezín a tím iniciuje separaci sesterských chromatid. APC/C také podporuje destrukci cyklinů => inaktivace Cdk a defosforylace Cdk cílů – vyžadováno pro všechny události pozdní M fáze, včetně dokončení anafáze, demontáže mitotického vřeténka a dělení buňky cytokinezí.**

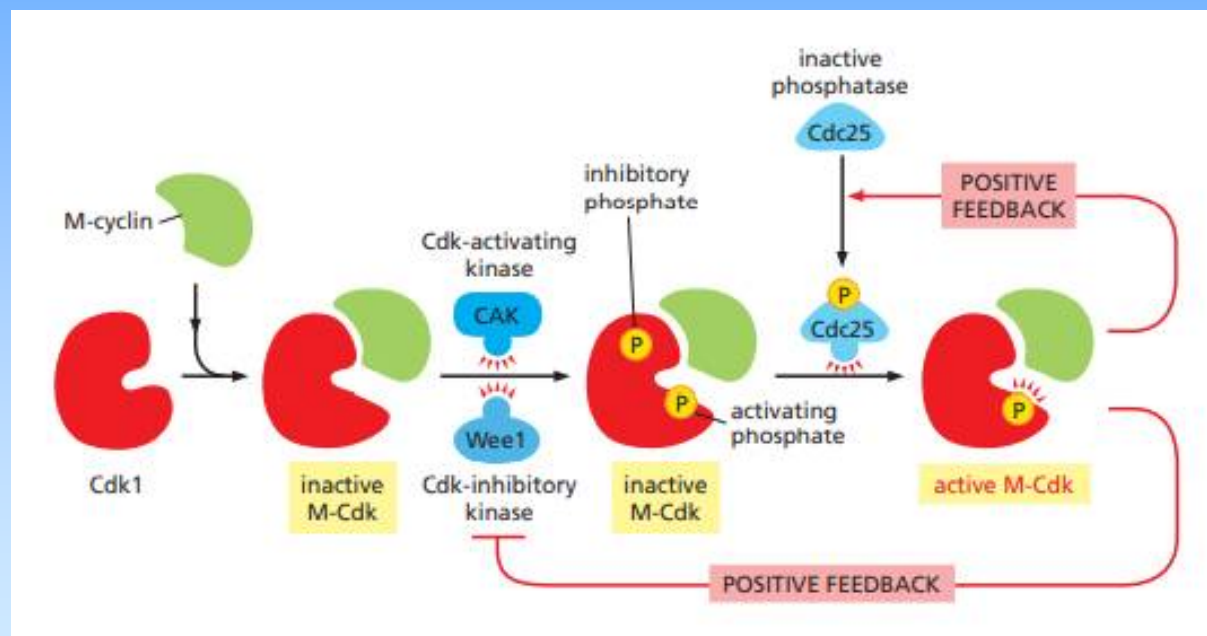
Protein kináza M-Cdk pohání vstup do mitózy:

- vyvolává sestavení mitotického vřeténka
- spouští také kondenzaci chromozomů
- spouští reorganizaci propletených sesterských chromatid do kompaktních tyčovitých struktur
- podporuje rozpad jaderného obalu, přestavbu aktinového cytoskeletu a Golgiho aparátu

Protein kináza M-Cdk se v buňce akumuluje vlivem M-cyklinu. Zvýšení M-cyklinu vede k odpovídající akumulaci M-Cdk (komplexu Cdk1 a M-cyklinu), když se buňka blíží k mitóze.

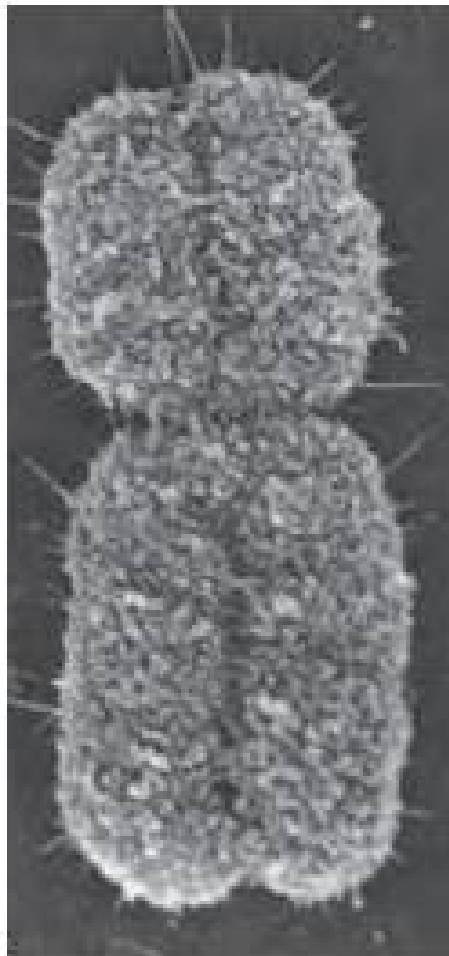
Na konci G₂ obsahuje buňka zásobu M-Cdk, která je aktivovaná a připravená působit, ale je potlačena fosfáty, které blokují aktivní místo kinázy.

Co tedy spouští aktivaci zásob M-Cdk?



1) Aktivace proteinové fosfatázy Cdc25, která odstraňuje inhibiční fosfáty, které omezují M-Cdk. Mechanismy, které uvolňují aktivitu Cdc25, nejsou dobře známy.

2) Potlačení inhibiční aktivity kinázy Wee1 pozitivní zpětnou vazbou.

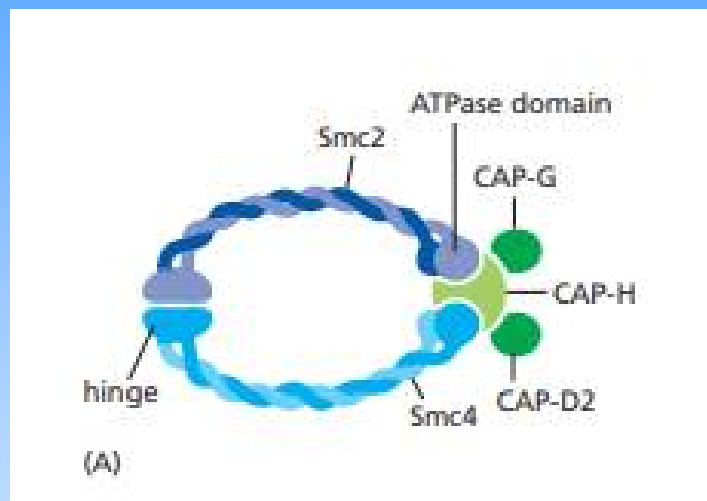


1 μm

Na konci S fáze jsou dlouhé molekuly DNA sesterských chromatid zapleteny do hmoty částečně řetězené DNA a proteinů. Jakýkoli pokus oddělit sesterské chromatidy v tomto stavu by vedlo ke zlomům v chromozomech => buňka v časně mitóze věnuje velké množství energie na reorganizaci sesterských chromatid do krátkých struktur, které lze v anafázi snadněji oddělit. Tyto chromozomální změny zahrnují dva procesy:

- 1) Kondenzaci chromozomů, při které jsou chromatidy dramaticky zhutněny.
- 2) Rozlišení sesterských chromatid, kdy jsou dvě chromatidy rozděleny na odlišné a oddělitelné jednotky.

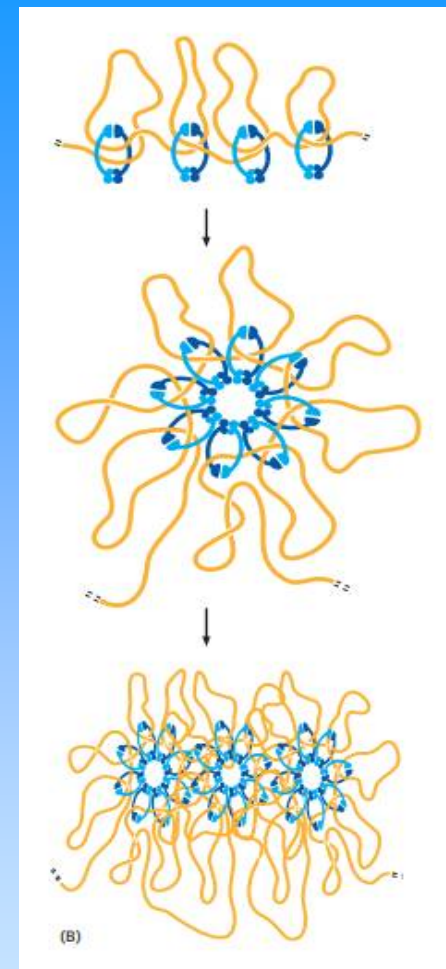
Kondenzace a rozlišení sesterských chromatid závisí na pětipodjednotkovém proteinovém komplexu zvaném **kondenzin**. Struktura kondenzinu souvisí se strukturou kohezinového komplexu, který drží sesterské chromatidy pohromadě. Kondenzin obsahuje dvě podjednotky SMC, jako jsou podjednotky kohezinu, plus tři podjednotky odlišné od SMC.



Kondenzin tvoří prstencovou strukturu - využívá energii poskytovanou hydrolýzou ATP k podpoře zhuštění a rozlišení sesterských chromatid.

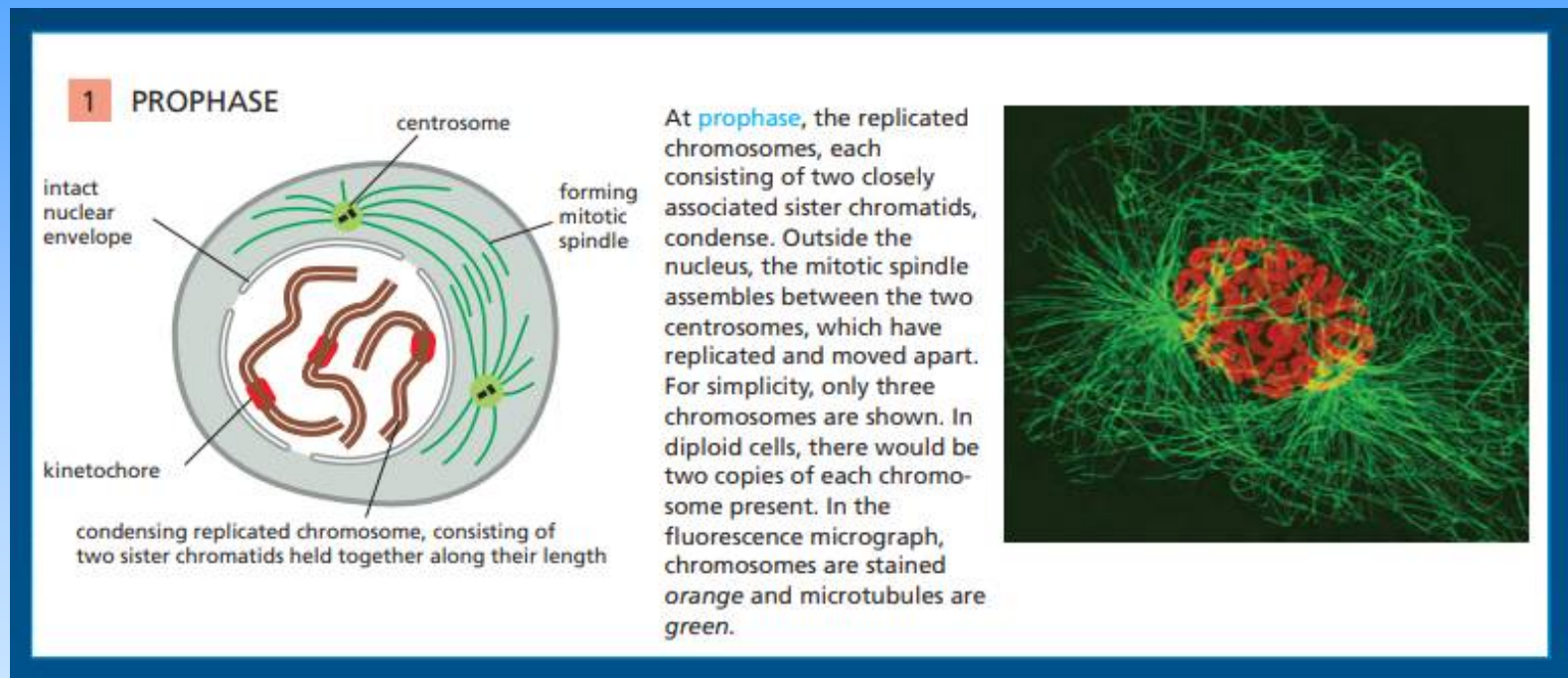
Kondenzin je schopen změnit svinutí molekul DNA - aktivita svinutí je považována za důležitou pro kondenzaci chromozomů během mitózy.

Fosforylace podjednotek kondenzinu pomocí M-Cdk stimuluje tuto aktivitu vinutí => jeden z málo známých mechanismů, kterým M-Cdk může podporovat restrukturalizaci chromozomů v časně mitóze.



Mitotické vřeténko je stroj na bázi mikrotubulů.

Ústřední událost mitózy – segregace chromozomů – závisí u všech eukaryot na složitém a krásném stroji zvaném mitotické vřeténko.



Mitotické vřeténko je bipolární spořádání mikrotubulů - odděluje sesterské chromatidy v anafázi => segregují dvě sady chromozomů na opačné konce buňky => zabalení chromozomů do dceřiných jader. M-Cdk spouští sestavení vřeténka časně v mitóze paralelně s restrukturalizací chromozomů.

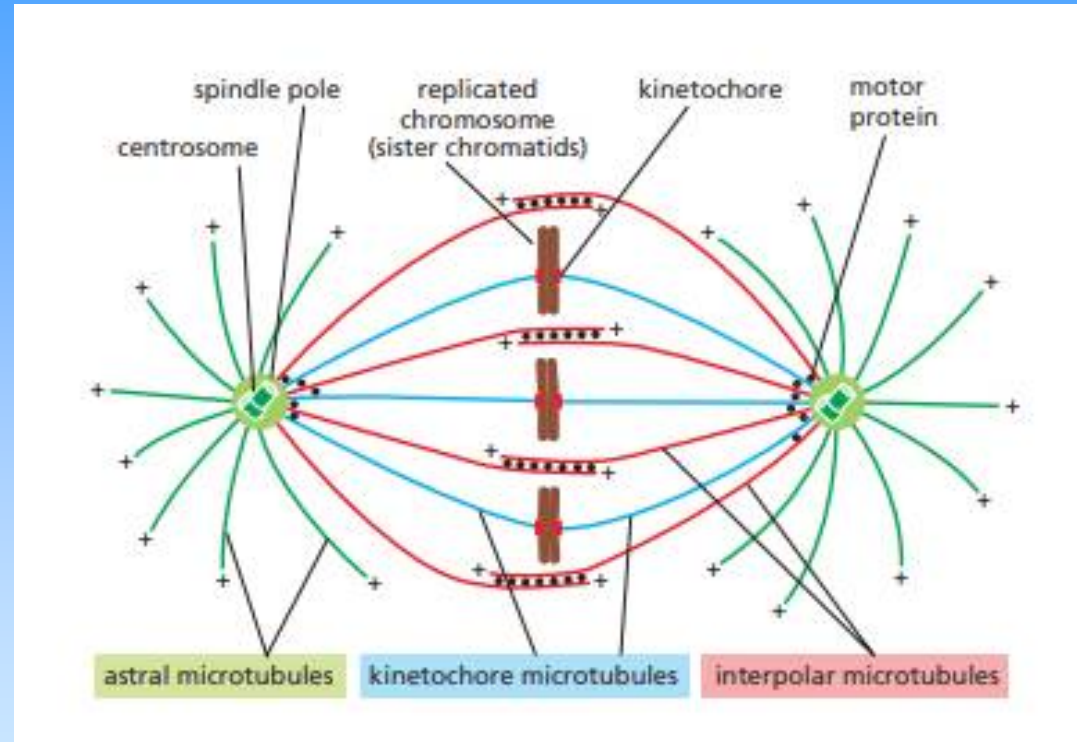
Jádrem mitotického vřeténka je bipolární pole mikrotubulů – záporné konce jsou zaměřeny na dva póly vřeténka a jejichž plusové konce vyzařují směrem ven z pólů

3 typy mikrotubulů:

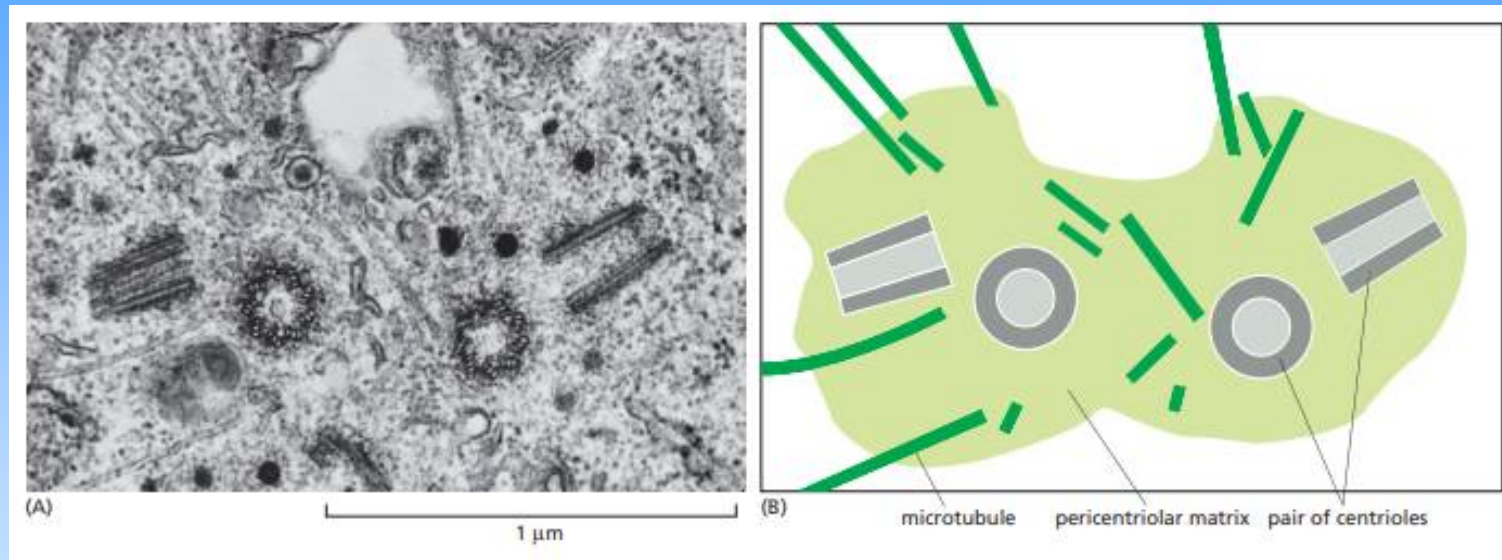
1) Interpolární mikrotubuly – kladné konce se překrývají s kladnými konci mikrotubulů z druhého pólu => vznik antiparalelního pole ve střední zóně vřeténka.

2) Kinetochorové mikrotubuly – plusové konce jsou připojeny k sestersko-chromatidovým párům ve velkých proteinových strukturách nazývaných kinetochory, které jsou umístěny v centromere každé sesterské chromatidy.

3) Astrální mikrotubuly – vyzařují ven z pólů a dotýkají se povrchu buňky – pomáhá umístit vřeténka v buňce.



Ve většině somatických živočišných buněk je každý pól vřeténka lokalizován v proteinové organelle zvané **centrozom**. Každý centrosom se skládá z oblaku amorfního materiálu (**pericentriolární matrice**), který obklopuje pár centriol.



Pericentriolární matrice vytváří radiální řadu mikrotubulů - rychle rostoucí plusové konce vyčnívají ven a jejich mínusové konce jsou spojené s centrosomem.

Buňky vyšších rostlin a oocyty mnoha obratlovců centrosomy nemají.

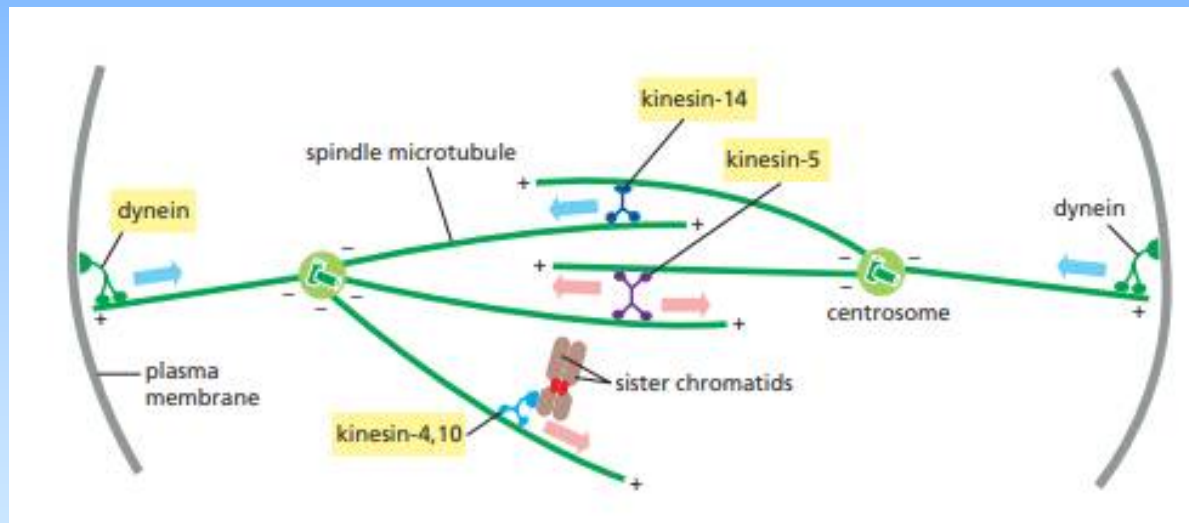
Sestavení a funkci dělicího vřeténka řídí motorické proteiny závislé na mikrotubulech.

Funkce mitotického vřeténka závisí na řadě **motorických proteinů** závislých na mikrotubulech.

2 rodiny proteinů: - **kinesiny** – pohybují se směrem k plusovému konci mikrotubulů

- **dyneiny** - pohybují se směrem k minusovému konci

Čtyři hlavní typy motorických proteinů: kinesin-5, kinesin-14, kinesin-4/10 a dynein – jsou zvláště důležité při sestavování a funkci vřeténka



Kinesin-5 – posouvá dva antiparalelní mikrotubuly kolem sebe směrem k vřetenovým pólům => tlačí póly od sebe

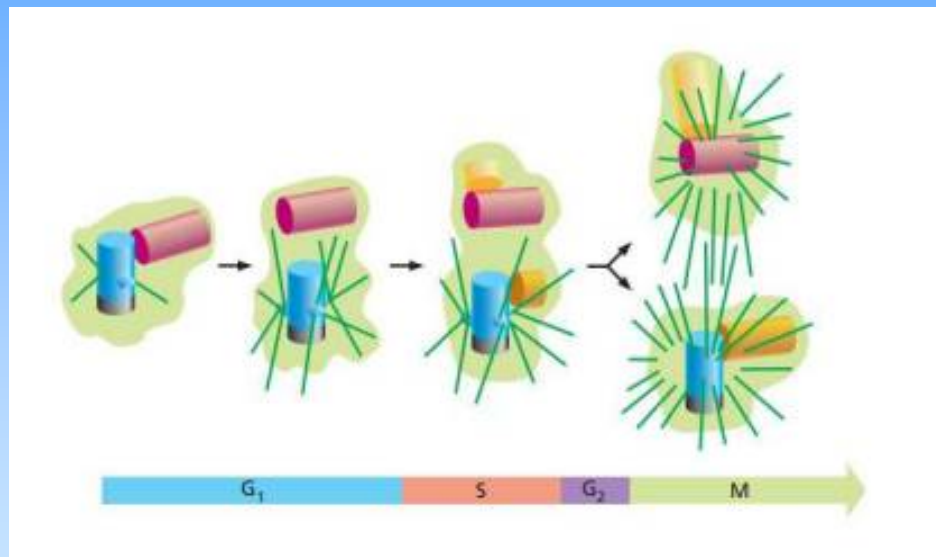
Kinesin-14 – zesiluje antiparalelní interpolární mikrotubuly ve střední zóně vřetena a má tendenci přitahovat póly k sobě

Kinesin-4 a kinesin 10 – chromokineziny – motory orientované na kladný konec - spojují se s rameny chromozomu a odtlačují připojený chromozom pryč od pólu

Dynein – chromokineziny – organizuje mikrotubuly na různých místech v buňce; spojuje kladné konce astrálních mikrotubulů například se složkami aktinového cytoskeletu v buněčné kůře; pohybem směrem k minus konci mikrotubulů, dynein táhne póly vřeténka směrem k buněčné kůře a od sebe.

K duplikaci centrozomů dochází časně v buněčném cyklu.

Většina živočišných buněk obsahuje jeden centrozom, který tvoří jádro většiny cytoplazmatických mikrotubulů buňky. Když buňka vstoupí do buněčného cyklu, centrozom se duplikuje => v době, kdy buňka dosáhne mitózy, jsou centrozomy dva.



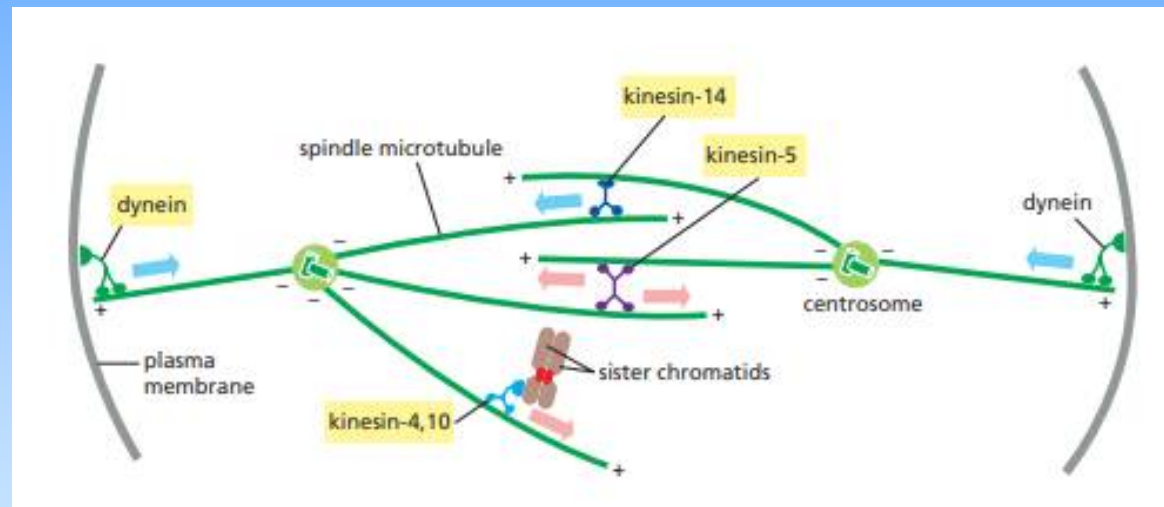
Duplikace centrozomů začíná ve stejnou dobu, kdy buňka vstupuje do S fáze. G₁/S-Cdk spouští vstup do buněčného cyklu a pomáhá zahájit duplikaci centrozomů. Dvě centrioly v centrozomu se oddělí a každá nukleuje tvorbu jedné nové centrioly => vznik 2 párů centriol v rámci zvětšené pericentriolární matrice. Pár centrozomů zůstává pohromadě na jedné straně jádra, dokud buňka nevstoupí do mitózy.

Centrozomy se musí replikovat pouze jednou za buněčný cyklus => zajištění, že buňka vstoupí do mitózy pouze se dvěma kopiemi: nesprávný počet centrozomů => defekty v sestavení vřeténka a chyby v segregaci chromozomů.

M-Cdk zahajuje tvorbu vřetena v profázi

Sestavení vřeténka začíná v časně mitóze. Rovnováha protichůdných sil generovaných různými typy motorických proteinů určuje konečnou délku vřeténka. **Dynein a kinesin-5** podporují separaci centrozomů a prodlužují délku vřetena. Proteiny **kinesin-14** dělají opak: přitahují póly k sobě. Mechanizmy, jak buňka reguluje rovnováhu protichůdných sil, aby vytvořila vhodnou délku vřeténka, nejsou zcela jasné. **M-Cdk** a další mitotické proteinkinázy jsou nutné pro separaci a zrání centrozomů.

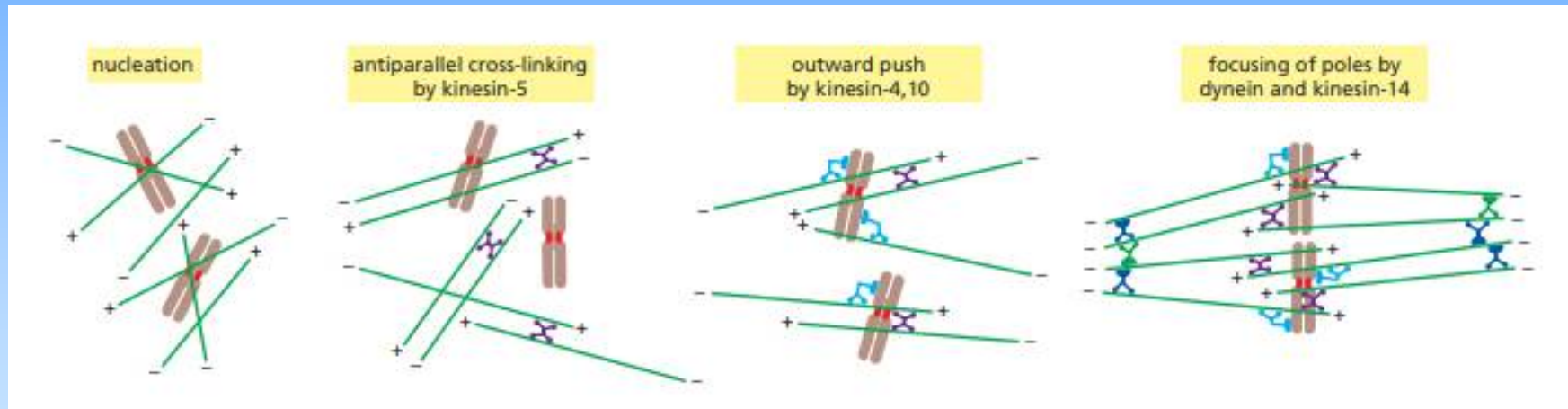
Dokončení montáže vřeténka v živočišných buňkách vyžaduje rozpad jaderné obálky.



Rozpad jaderné obálky je složitý, vícestupňový proces – začíná fosforylací podjednotek komplexů jaderných pórů vlivem M-Cdk => iniciace rozkladu komplexů jaderných pórů a jejich oddělení od obalu. M-Cdk také fosforyluje složky jaderné laminy, strukturního rámce pod obalem => rozpad jaderné laminy a obalových membrán na malé vezikuly.

Mitotické chromozomy podporují sestavení bipolárního vřeténka.

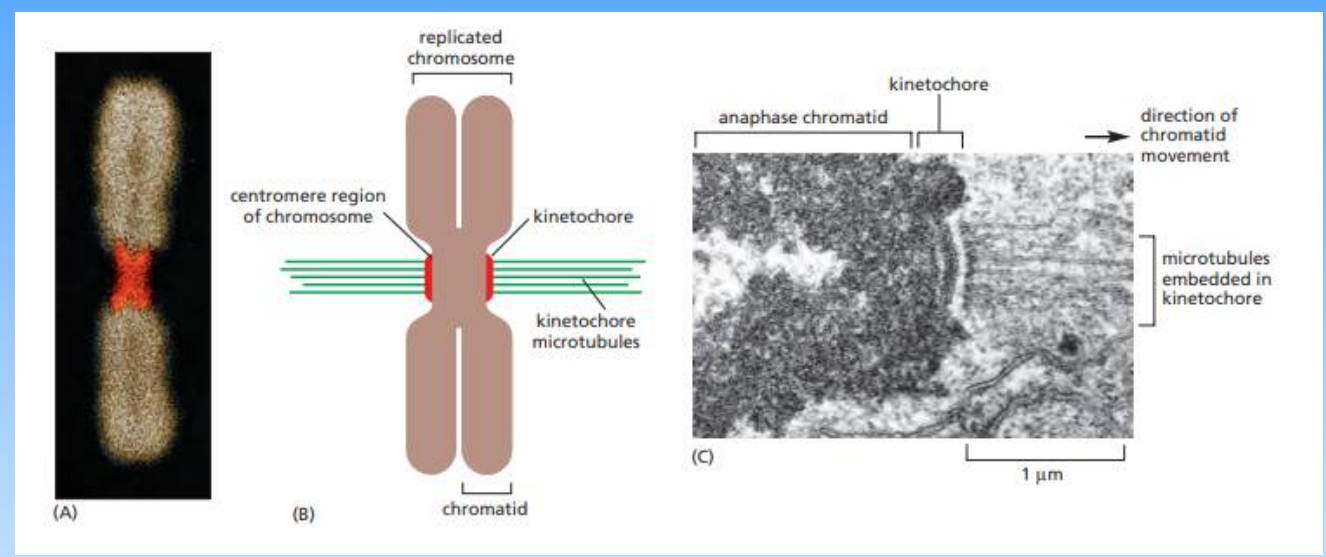
Chromozomy nejsou jen pasivními pasažéry v procesu sestavování vřeténka. Vytváří prostředí podporující nukleaci mikrotubulů a tím jejich stabilizaci => hrají aktivní roli při tvorbě vřeténka.



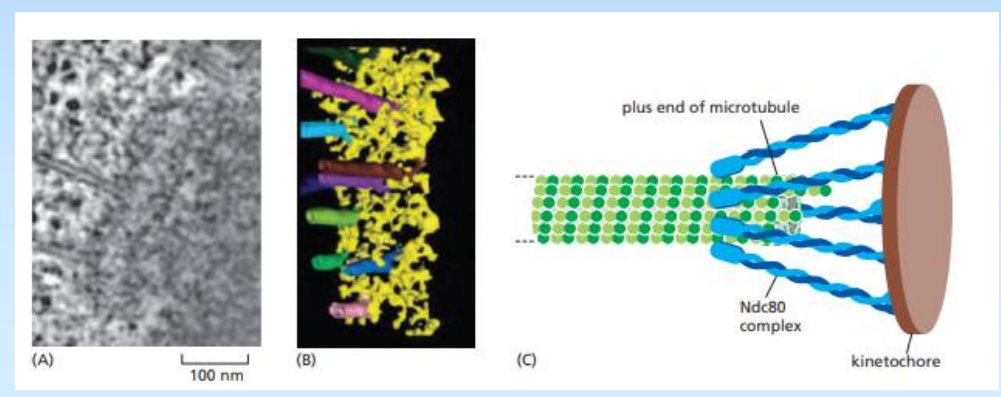
Aktivita chromozomů závisí na guaninovém nukleotidovém výměnném faktoru (GEF), který je vázán na chromatin – GEF stimuluje malou GTPázu v cytosolu nazývanou Ran => aktivovaná Ran-GTP uvolňuje proteiny stabilizující mikrotubuly z proteinových komplexů v cytosolu => stimulace lokální nukleace a stabilizace mikrotubulů kolem chromozomů.

Kinetochory připojují sesterské chromatidy k vřeténku.

Po sestavení bipolárního mikrotubulového pole je druhým hlavním krokem při tvorbě dělicího vřeténka připojení pole k párům sesterských chromatid. Mikrotubuly dělicího vřeténka se připojují ke každé chromatidě v jejím **kinetochoru** = obrovská vícevrstvá proteinová struktura, která je vybudována v centromerické oblasti chromatidy.

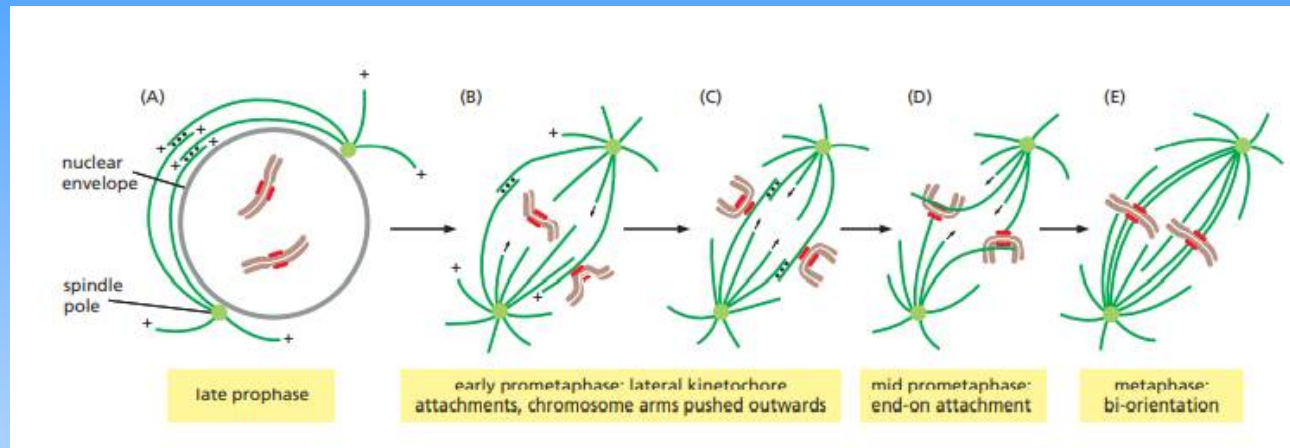


Kinetochor může vázat 10–40 mikrotubulů. Přichycení každého mikrotubulu závisí na více kopiích proteinového komplexu ve tvaru tyčinky zvaného **komplex Ndc80** – na jednom konci je ukotven v kinetochoru a na druhém konci interaguje se stranami mikrotubulu.



K připojení kinetochoru na dělicí vřeténko dochází složitým sledem událostí.

Po rozpadu jaderného obalu jsou sesterské chromatidové páry bombardovány mikrotubulovými konci přicházejícími ze dvou směrů. Kinetochory se však nepřipojují k mikrotubulům hned správně. Většina počátečních připojení je nestabilních laterální připojení. Brzy však dynamické mikrotubuly plus konce zachycují kinetochory ve správné orientaci.



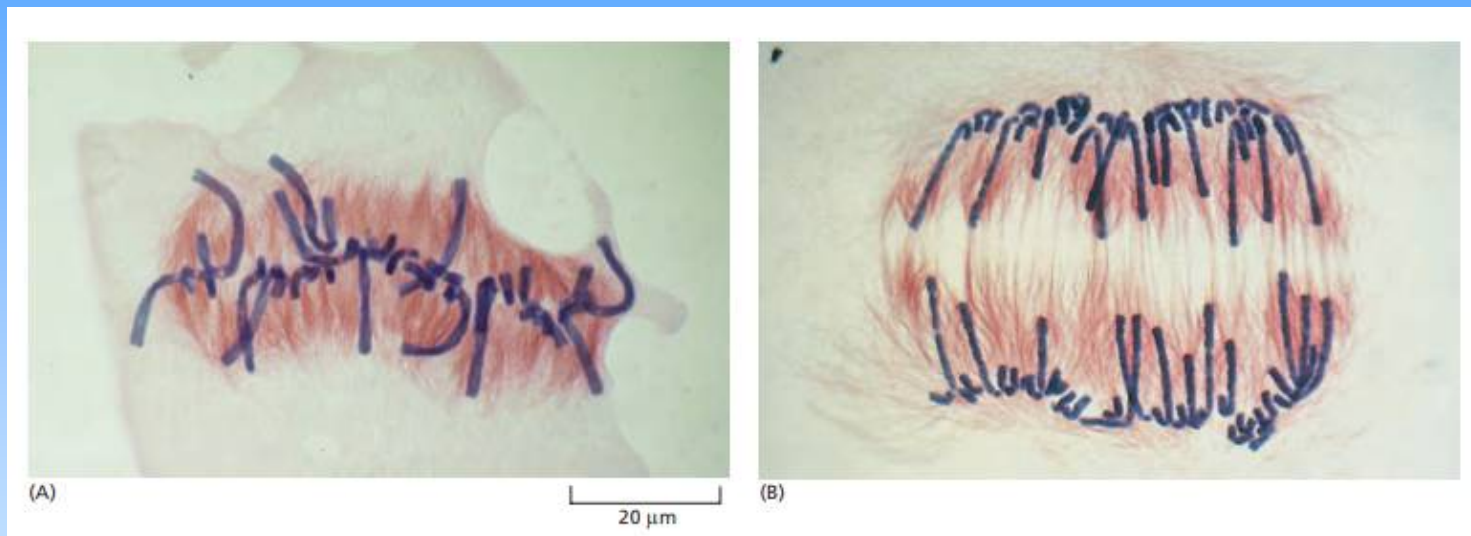
Po připojení sesterských chromatid ke dvěma vřetenovým pólům chromozomy zaujmou polohu stejně vzdálenou mezi dvěma póly - poloha zvaná **metafázová destička**. Chromozomy pak jemně oscilují na metafázové destičce a čekají na signál, aby se sesterské chromatidy oddělily.

Na chromozomy ve vřeténku působí vícenásobné síly:

- 1) Síla táhnoucí kinetochor a jeho přidruženou chromatidu podél kinetochorového mikrotubulu směrem k pólu vřeténka. Je produkován proteiny na samotném kinetochoru.
- 2) Síla toku mikrotubulů – samotné mikrotubuly jsou taženy směrem k pólům vřeténka a demontovány na jejich minusových koncích – mechanismus není jasný.
- 3) Polární ejekční síla (polární vítr) – motory kinesinu-4 a 10 na ramenech chromozomů řízené plusovými konci interagují s interpolárními mikrotubuly a transportují chromozomy pryč od pólů vřeténka.

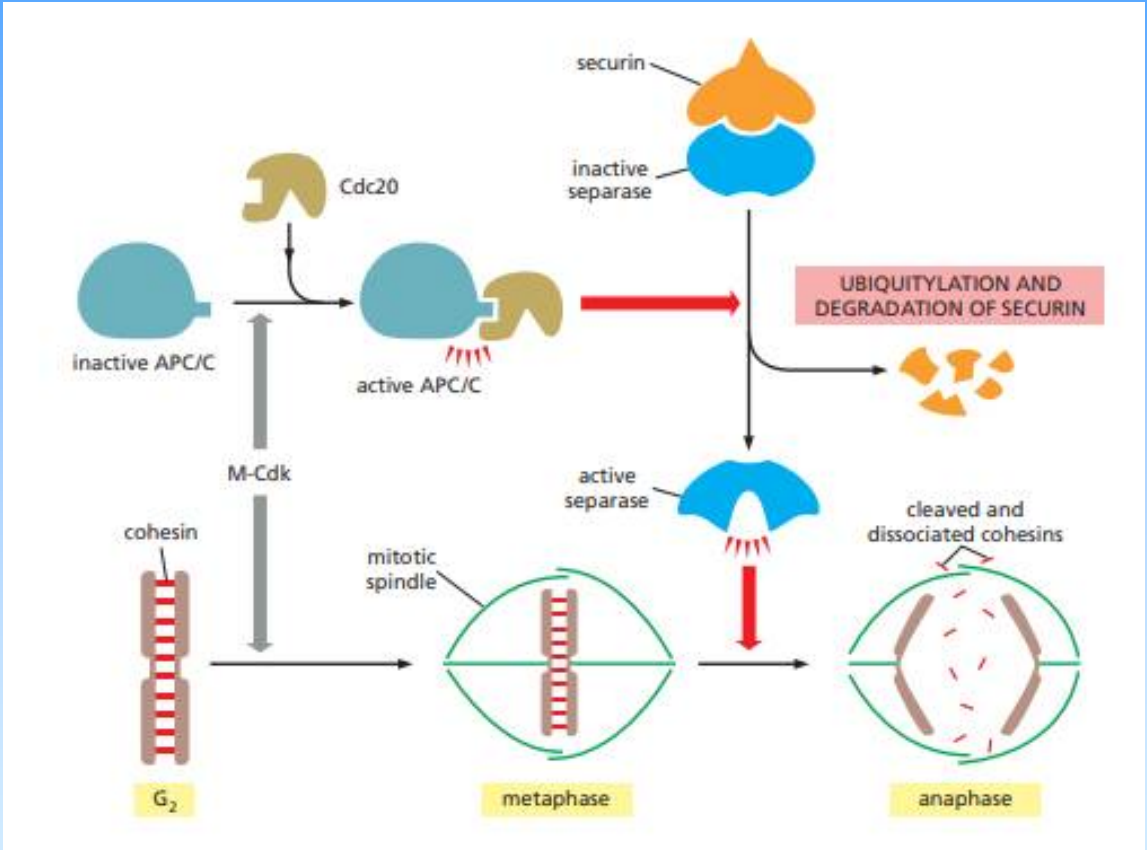
APC/C spouští separaci sesterských chromatidů a dokončení mitózy.

Buněčný cyklus dosáhne svého vyvrcholení oddělením sesterských chromatid při přechodu z metafáze do anafáze.



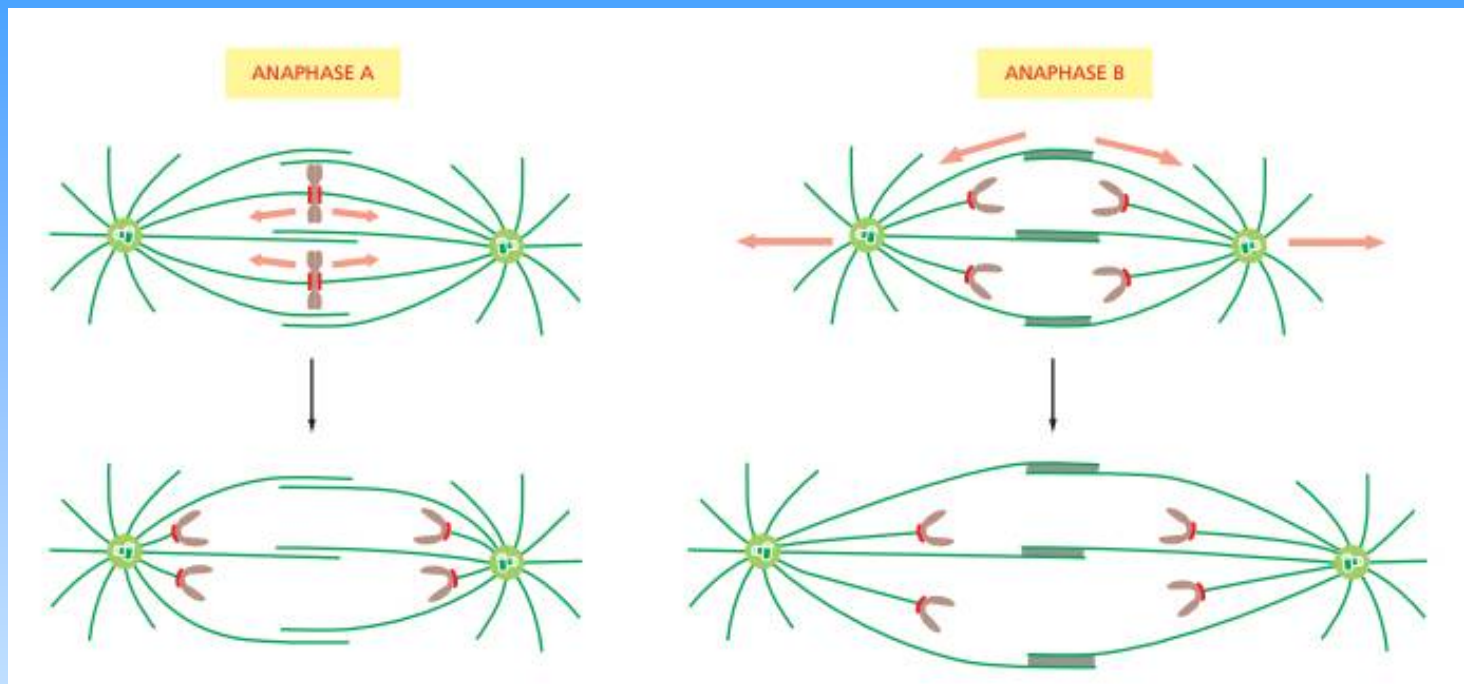
Oddělení chromatid připravuje svou aktivitou M-Cdk. Komplex cyklozom APC/C (ubiquitin ligáza) funguje jako spínač, který separaci sesterských chromatid iniciuje – ubiquitínuje několik mitotických regulačních proteinů => spouští jejich destrukci.

Inaktivní komplex APC/C je aktivován pomocí proteinu Cdc20. Aktivní APC/C zahajuje proces destrukce inhibičního proteinu **sekurinu**. Před anafází se proteáza **separáza** váže na sekurin a inhibuje její aktivitu => destrukce sekurinu na konci metafáze => uvolnění separázy => volně štěpí jednu z podjednotek kohezinu => koheziny odpadnou a sesterské chromatidy se oddělí.



APC/C ničí rovněž S- a M-cykliny => ztráta aktivity většiny Cdk v anafázi => fosfatázy defosforylují cílové substráty Cdk => dokončení mitózy a cytokineze.

Náhlá ztráta koheze (spojení) sesterských chromatid na začátku anafáze vede k oddělení sesterských chromatid => síly mitotického vřeténka přitáhnou sesterské chromatidy k opačným pólům buňky = nazývané **segregace chromozomů**.



Chromozomy se pohybují dvěma nezávislými a překrývajícími se procesy:

- 1) **Anafáze A** – počáteční pólový pohyb chromozomů, doprovázen zkrácením kinetochorových mikrotubulů.
- 2) **Anafáze B** – oddělení samotných pólů vřeténka - začíná poté, co se sesterské chromatidy oddělí a dceřiné chromozomy se od sebe vzdálí o určitou vzdálenost.

Segregované chromozomy jsou zabaleny v dceřiných jádrech v telofázi.

Na konci anafáze se dceřiné chromozomy segregovaly do dvou stejných skupin na opačných koncích buňky.

V **telofázi** – konečná fáze mitózy – dochází k zabalení každé sady chromozomů do dceřiných jader:

1) Rozpad mitotického vřeténka

2) Znovuvytvoření jaderného obalu - fragmenty jaderné membrány se spojují s povrchem jednotlivých chromozomů. Membránové fragmenty se pak spojí => částečně uzavřou shluky chromozomů => vytvoření kompletního jaderného obalu.

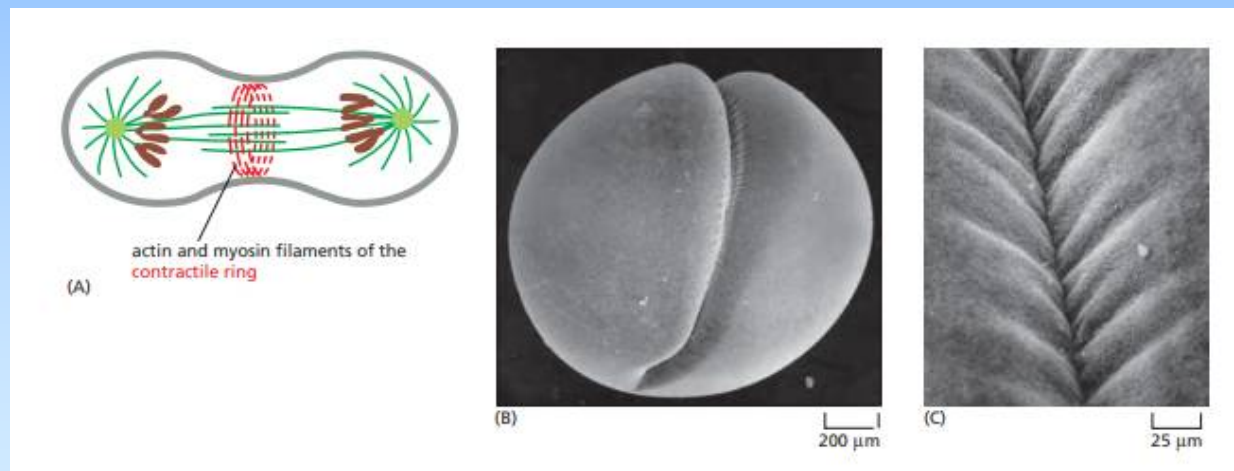
3) Komplexy jaderných pórů napumpují jaderné proteiny => jádro se rozšíří a mitotické chromozomy se reorganizují do svého mezifázového stavu => což umožní obnovení genové transkripce => vytvořeno nové jádro a mitóza je dokončena.



Cytokineze = rozdělení buňky na dvě

Posledním krokem v buněčném cyklu je **cytokineze** = rozdělení cytoplazmy na dvě části. Ve většině buněk následuje cytokineze po každé mitóze. U většiny živočišných buněk **začíná cytokineze v anafázi a končí krátce po dokončení mitózy v telofázi**.

První viditelnou změnou cytokineze v živočišné buňce je náhlý výskyt vrásek nebo štěpné rýhy na povrchu buňky. Brázda se rychle prohlubuje a rozšiřuje kolem buňky, dokud buňku úplně nerozdělí na dvě části. Struktura, která je základem tohoto procesu, je **kontraktilní prstenec** = dynamická sestava složená z aktinových vláken, vláken myosinu II a mnoha strukturálních a regulačních proteinů. Během anafáze se prstenec sestaví těsně pod plazmatickou membránou.



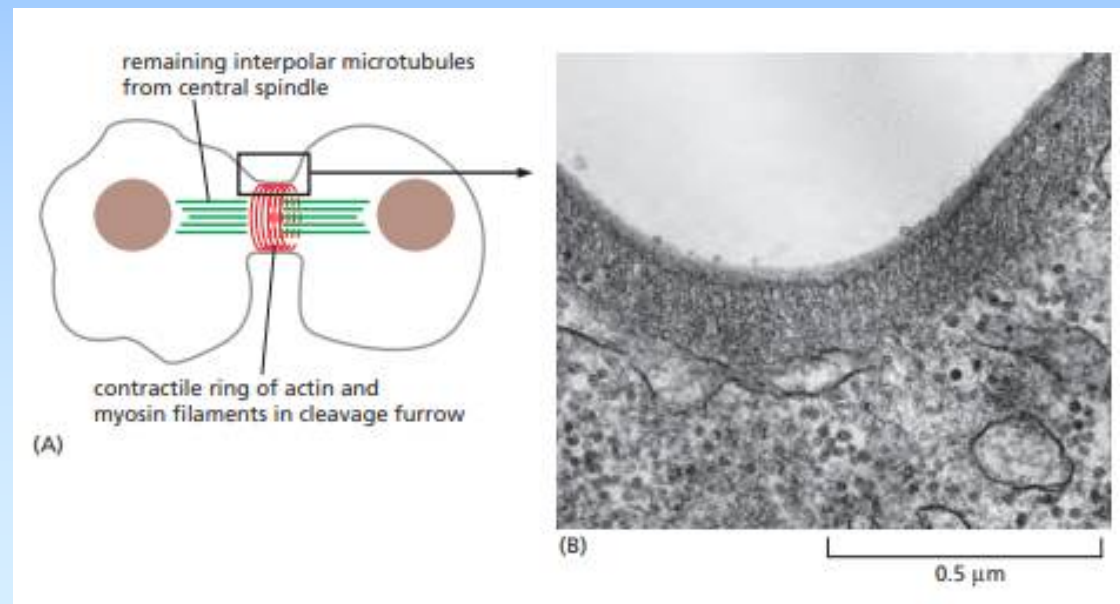
Prstenec se postupně smršťuje a současně fúzí intracelulárních váčků s plazmatickou membránou vzniká nová membrána sousedící s prstencem. Když je kontrakce prstence dokončena, vložení membrány a fúze utěsní mezeru mezi dceřinými buňkami.

Aktin a myosin II v kontraktilním prstenci generují sílu pro cytokinezi.

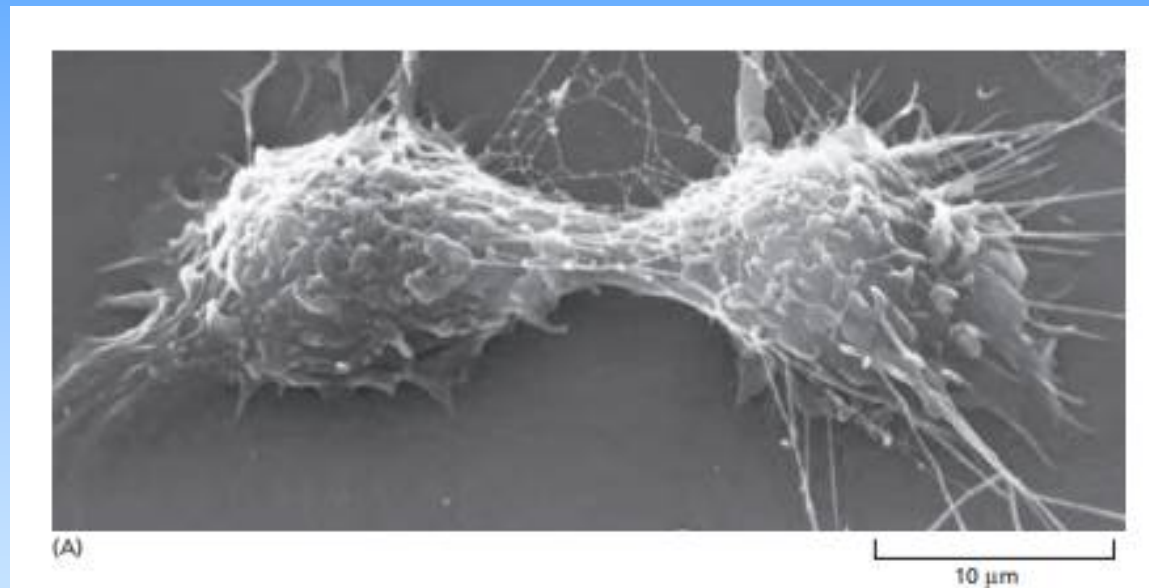
V interfázních buňkách tvoří vlákna aktinu a myosinu II kortikální síť pod plazmatickou membránou.

Po vstupu do mitózy se pole aktinu a myosinu II rozkládají; velká část aktinu se reorganizuje a uvolňují se vlákna myosinu II.

V anafázi, při oddělování sesterských chromatid se aktin a myosin II začnou hromadit v rychle se skládajícím kontraktilním prstenci – obsahuje i další proteiny – poskytují strukturální podporu nebo pomáhají při sestavování prstence.

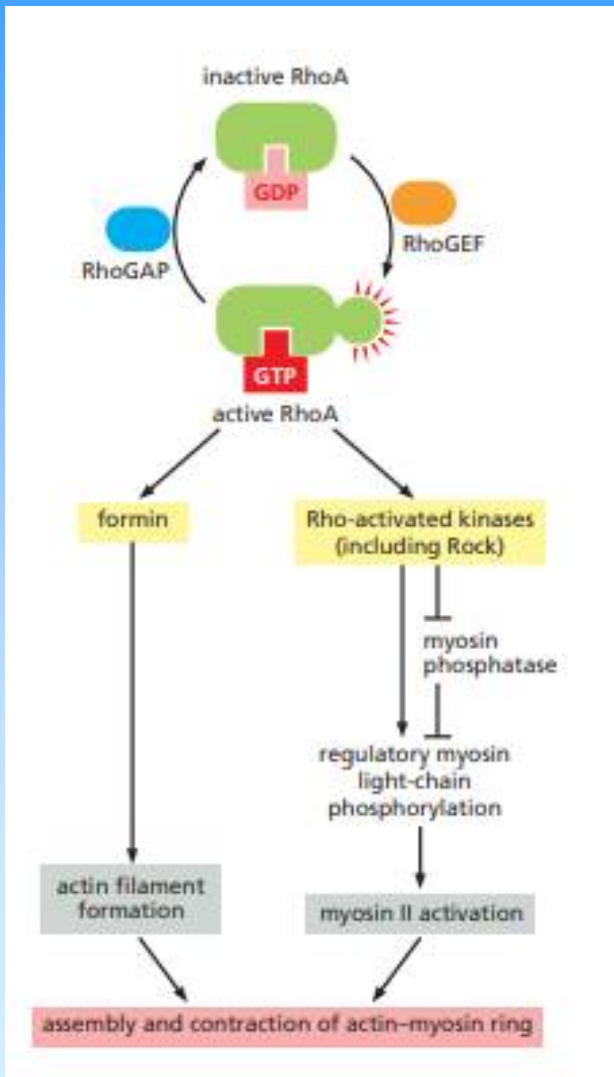


Po anafázi se překrývající se pole aktinu a filamentů myosinu II stahují a vytvářejí sílu => rozdělení cytoplazmy na dvě části. Jakmile začne kontrakce, prstenec vyvine sílu => prstenec se zužuje. Po konci štěpení kontraktilní prstenec zmizí – plazmatická membrána štěpné rýhy se zužuje => vzniká **střední část těla**.



Po úplném oddělení dceřiných buněk zůstávají některé složky zbytkového středního těla na vnitřní straně plazmatické membrány každé buňky => slouží jako značka – pomáhá orientovat vřeténka při následném buněčném dělení.

Lokální aktivace RhoA spouští sestavení a kontrakci kontraktilního prstence.



RhoA, malá GTPáza z nadrodiny Ras, řídí sestavení a funkci kontraktilního prstence v místě štěpení.

RhoA je aktivována guaninovým nukleotidovým výměnným faktorem (Rho-GEF), který se nachází v místě budoucího dělení buňky, a stimuluje uvolňování GDP a vazbu GTP na RhoA => podporuje tvorbu aktinového vlákna, sestavení myosinu II a kontrakci prstence.

1) Stimuluje tvorbu aktinového vlákna aktivací forminů.

2) Aktivuje proteinkinázy, včetně Rho-aktivované kinázy. Kinázy fosforylují regulační lehký řetězec myosinu, podjednotku myosinu II => sestavení, motorická aktivita a kontrakce myosinu II.

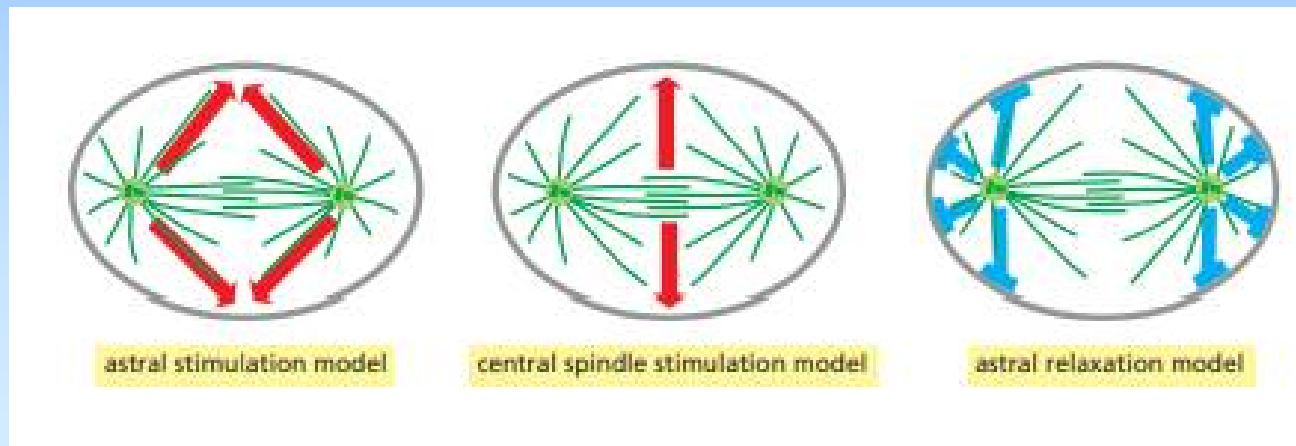
Mikrotubuly mitotického vřeténka určují rovinu dělení živočišných buněk.

Ústředním problémem cytokineze je, jak zajistit, aby k dělení došlo ve správný čas a na správném místě. Cytokineze musí nastat až poté, co jsou obě sady chromozomů od sebe plně odděleny, a místo dělení musí být umístěno mezi dvě sady dceřiných chromozomů, čímž se zajistí, že každá dceřiná buňka obdrží kompletní sadu.

Jak mitotické vřeteno určuje místo dělení? Byly navrženy tři obecné mechanismy a zdá se, že většina buněk využívá jejich kombinaci

1) Model astrální stimulace – astrální mikrotubuly nesou signály vyvolávající brázdu - signály jsou nějakým způsobem soustředěny v prstenci uprostřed mezi póly vřeténka

2) Model stimulace centrálního vřeténka – střední zóna vřeténka generuje signál vyvolávající brázdu, který specifikuje místo tvorby brázdy v buněčné kůře



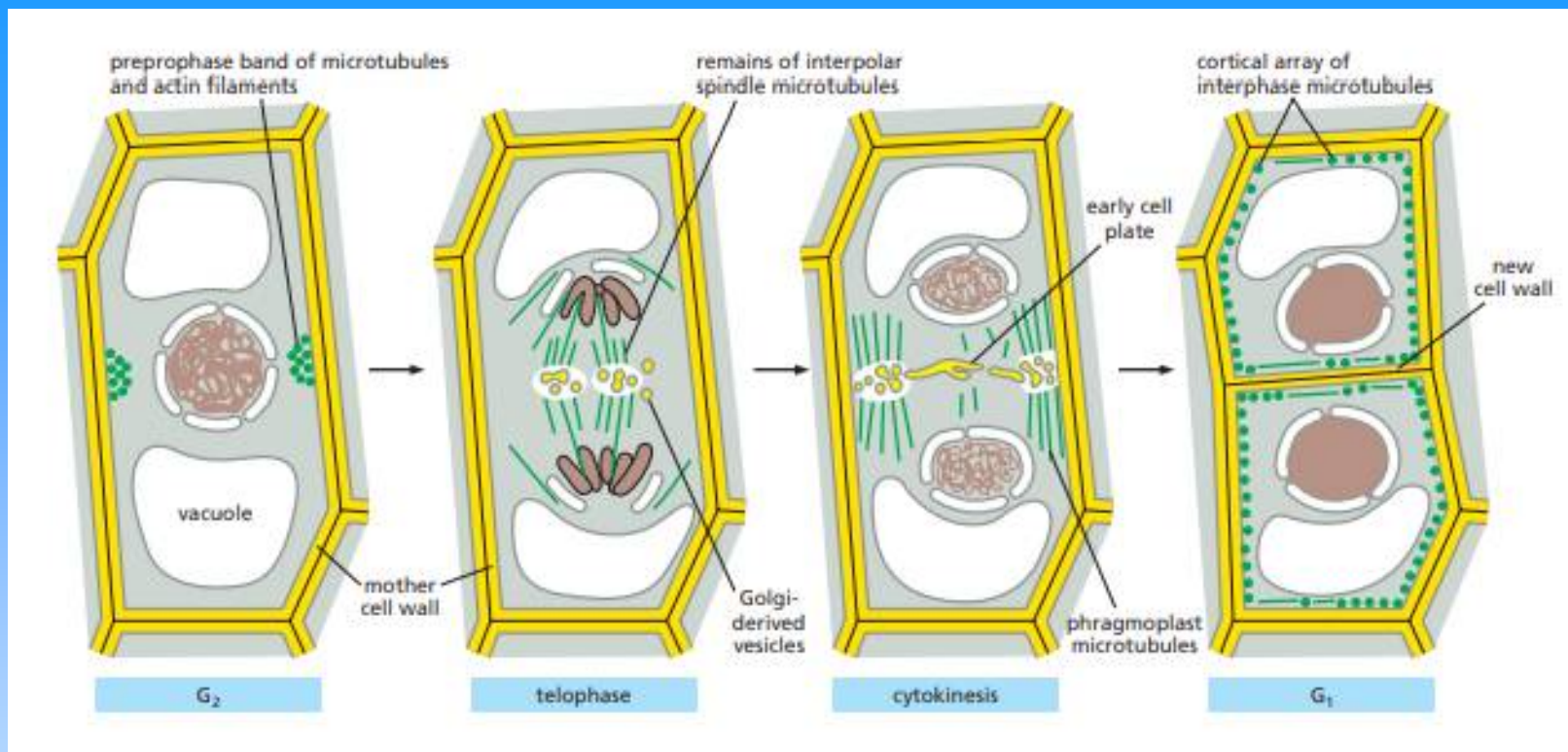
3) Model astrální relaxace – astrální mikrotubuly podporují lokální relaxaci aktin-myosinových svazků při povrchu buňky => minimální kortikální relaxace na rovníku vřetena minimální => podporuje kortikální kontrakci v tomto místě.

Fragmoplast řídí cytokinezi u vyšších rostlin.

Pohyb štěpné rýhy směrem dovnitř závisí na zvětšení povrchu plazmatické membrány. Nová membrána je přidávána na vnitřní okraj štěpné prostřednictvím malých membránových vezikul, které jsou transportovány na mikrotubulech z Golgiho aparátu do rýhy.



Membránová depozice je zvláště důležitá pro cytokinezi v buňkách vyšších rostlin. Rostlinné buňky jsou uzavřeny polotuhou buněčnou stěnou => cytoplazma je rozdělena zevnitř ven (spíše než zvenčí dovnitř kontraktilním prstencem) konstrukcí nové buněčné stěny mezi dvěma dceřinými jádry – vzniká **buněčná destička**



Sestavení buněčné destičky začíná v pozdní anafázi a je řízeno strukturou zvanou **fragmoplast**. Fragmoplast obsahuje mikrotubuly odvozené z mitotického vřeténka. Motorické proteiny transportují malé váčky podél těchto mikrotubulů z Golgiho aparátu do buněčného centra.

Vezikuly – obsahují polysacharidy a glykoproteiny potřebné pro syntézu nové buněčné stěny – spojují se => buněčná destička. Destička se rozšiřuje směrem ven dalším splynutím vezikul => dosáhne plazmatické membrány a původní buněčné stěny => rozdělení buňky na dvě části.

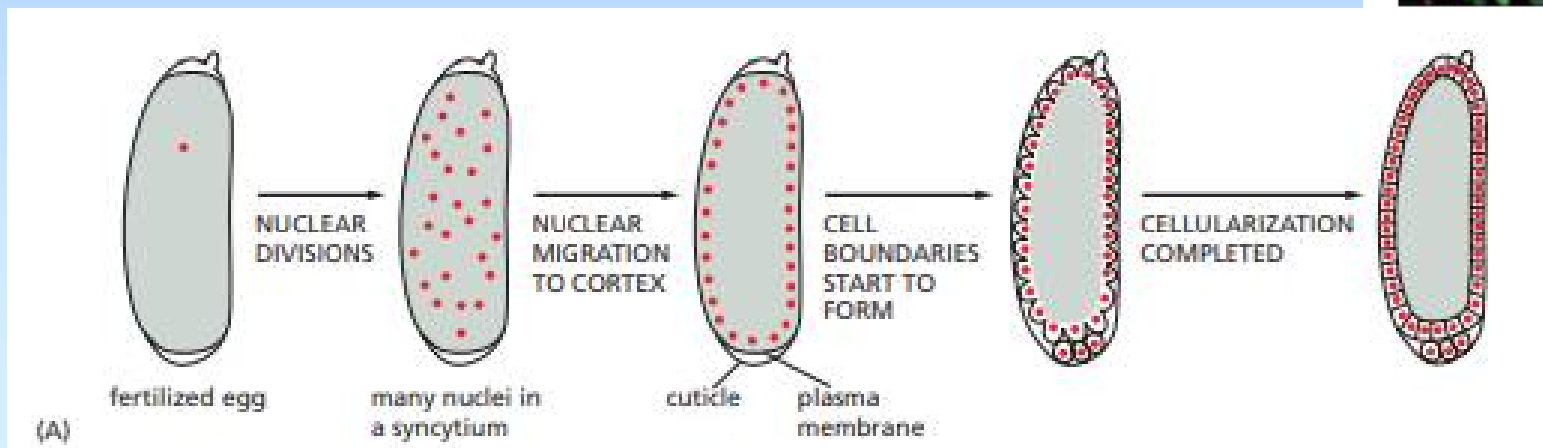
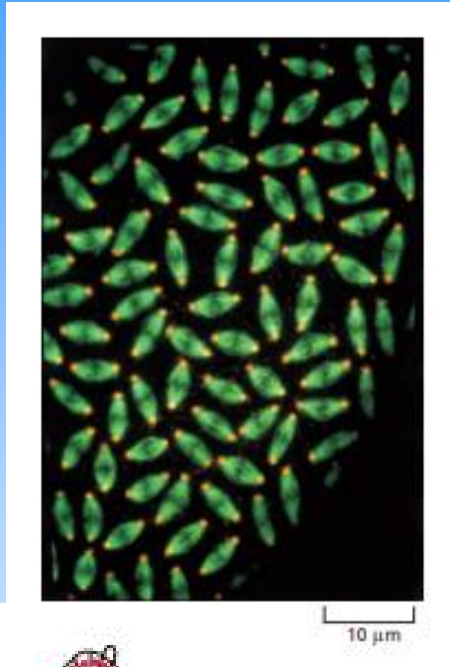
Později jsou celulózové mikrofibrily uloženy do matrice buněčné desky, aby se dokončila stavba nové buněčné stěny.

Mitóza může nastat bez cytokineze.

Některé buňky procházejí několika koly jaderného dělení bez toho, aby docházelo k cytoplazmatickému dělení. Buňka, ve které více jader sdílí stejnou cytoplazmu, se nazývá **syncytium**.

Toto uspořádání značně urychluje raný vývoj – buňky nemusejí věnovat čas tomu, aby prošly všemi kroky cytokineze pro každé dělení.

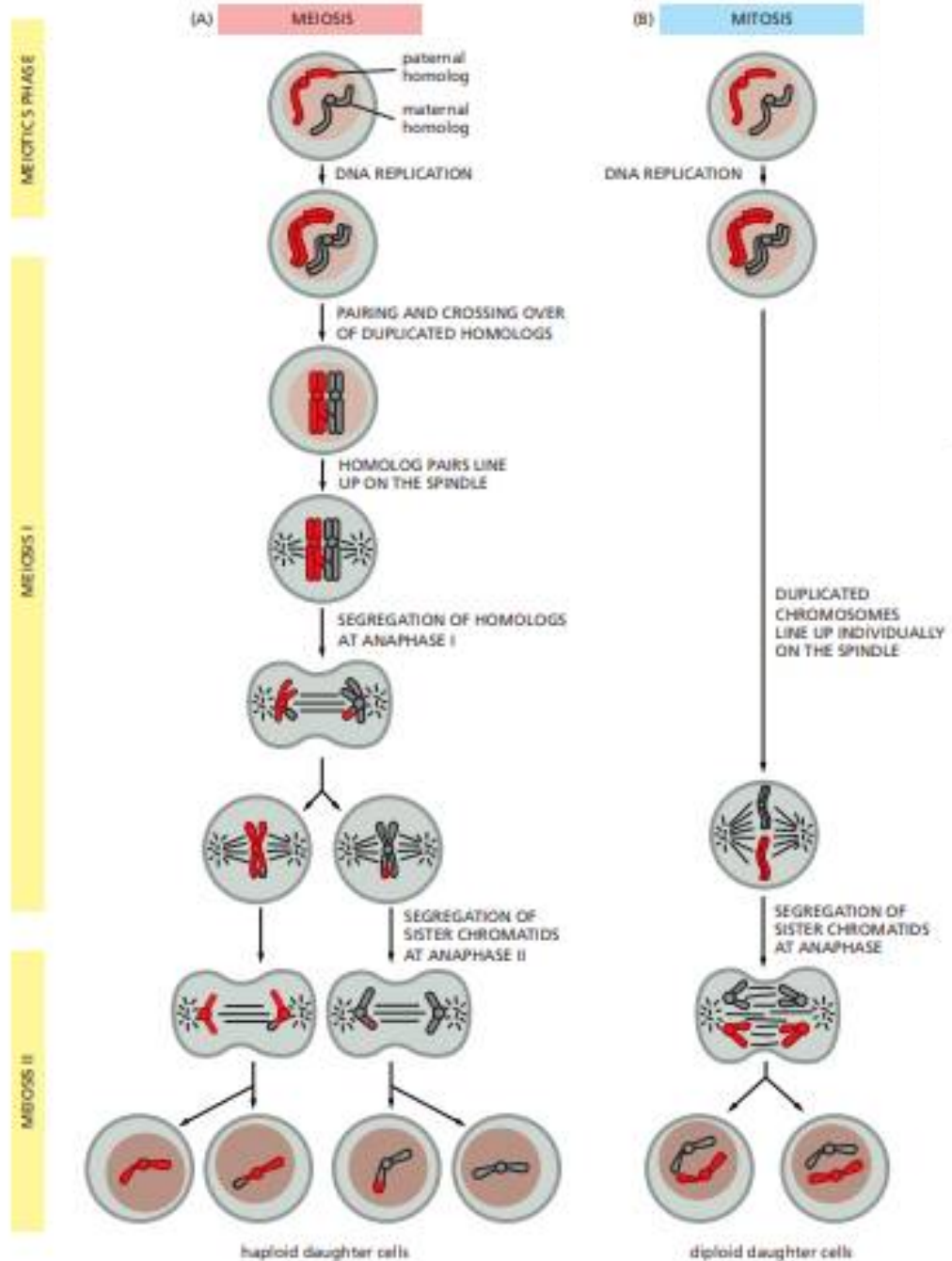
Po těchto rychlých jaderných děleních se kolem každého jádra vytvoří membrány v jednom kole koordinované cytokineze = **celulární cytokineze**. Plazmatická membrána se rozšiřuje dovnitř a pomocí aktin-myosinového prstence se odštípne => uzavření každého jádra.



Meióza

Většina eukaryotických organismů se rozmnožuje sexuálně = genomy dvou rodičů se mísí a vytvářejí potomky – geneticky odlišné od obou rodičů. Buňky těchto organismů jsou obecně diploidní = obsahují dvě mírně odlišné kopie nebo homology každého chromozomu, jednu od každého rodiče.

Sexuální reprodukce závisí na specializovaném procesu jaderného dělení zvaného **meióza** = vznik haploidních buněk nesoucích pouze jednu kopii každého chromozomu.



Meiůza zahrnuje dvě kola segregace chromozomů.



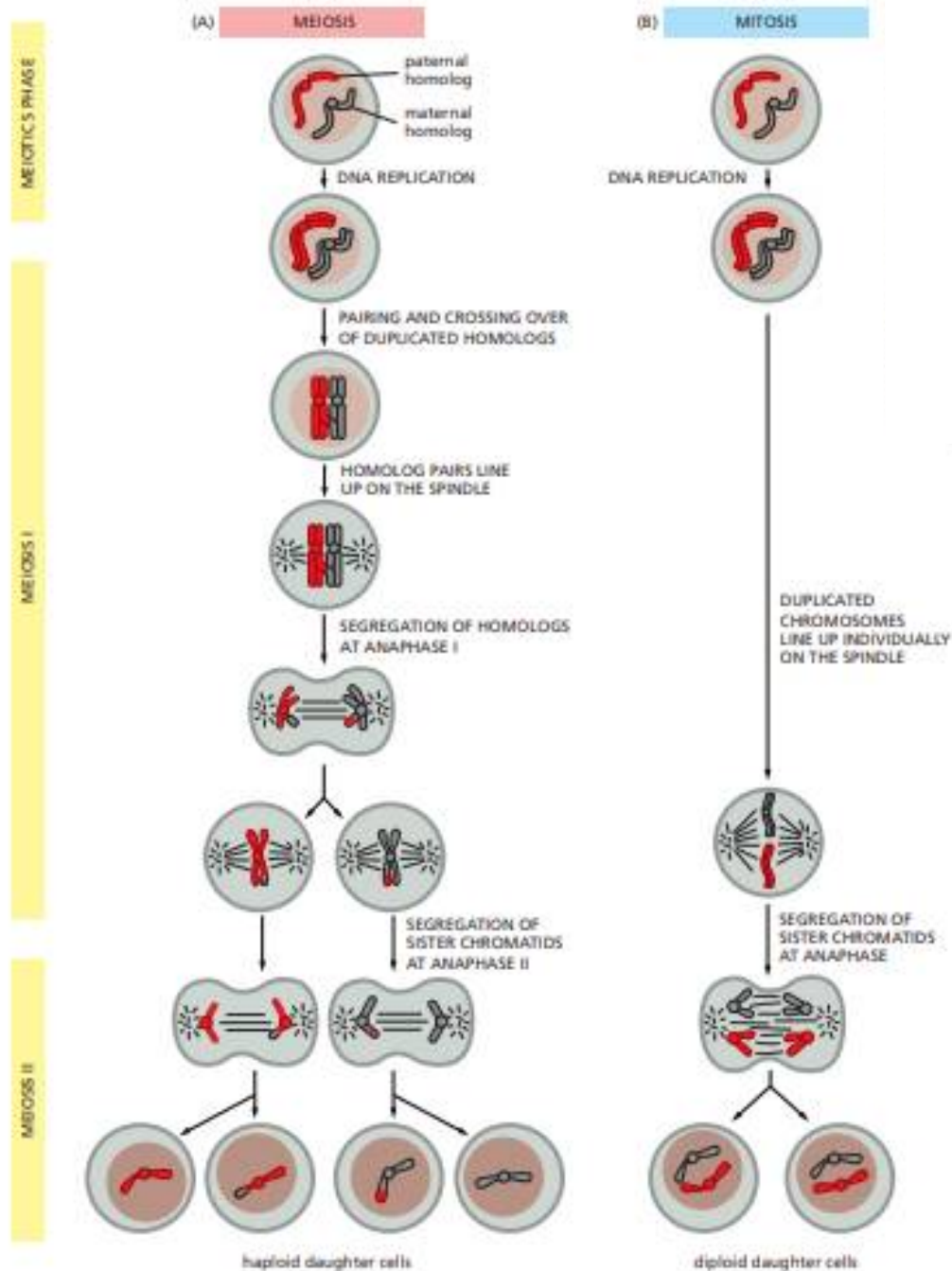
Meiůza snižuje počet chromozomů na polovinu.

Buňka zahajuje meiotický program duplikací chromozomů v meiotické S fázi => vznik párů sesterských chromatid spojených po celé délce kohezinovými komplexy. Na rozdíl od mitózy však poté probíhají dvě po sobě jdoucí kola segregace chromozomů.

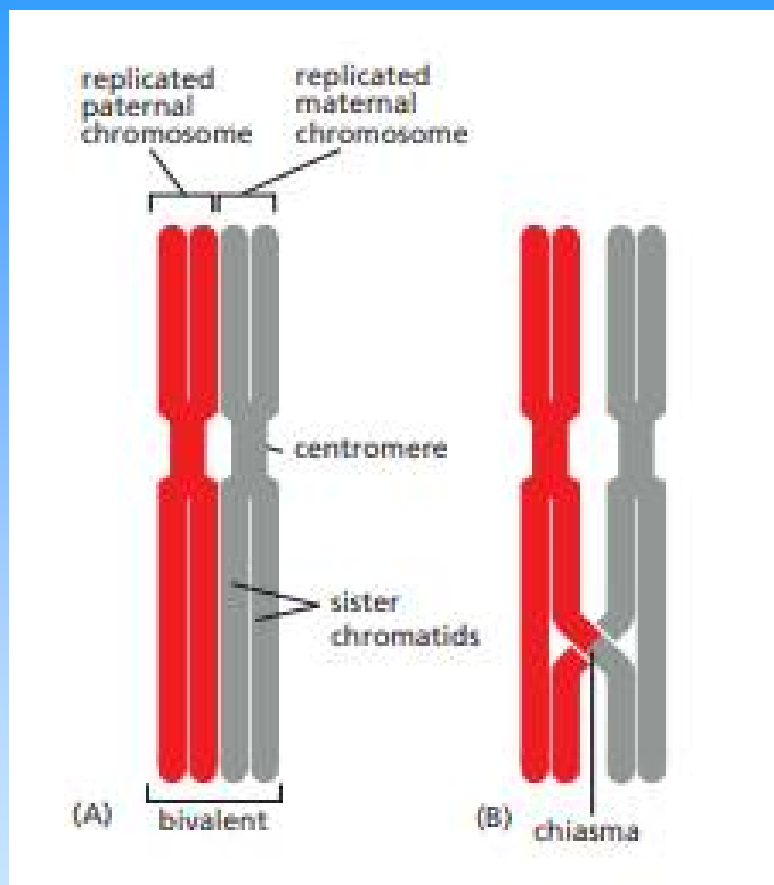
Meiůza I - řeší problém, jedinečný pro meiůzu = **segregace homologů**

Páry homologů, z nichž každý obsahuje pár sesterských chromatid, se seřadí na prvním meiotickém vřeténku. Duplikované homology jsou odtrženy a segregovány do dvou dceřiných jader.

Meiůza II - nedochází k replikaci DNA - sesterské chromatidy jsou odtrženy a segregovány => vznik haploidních dceřiných jader.



Duplicitní homologové páry během meiotické profáze.



Během mitózy se u většiny organismů homologní chromozomy chovají nezávisle na sobě. Během meiózy I je však klíčové, aby se homology vzájemně poznaly a fyzicky se spojily. Tyto interakce zprostředkovávají speciální mechanismy.

Během rané profáze I se homology začnou spojovat podél své délky = párování – proces, který začíná interakcemi mezi komplementárními sekvencemi DNA (nazývanými párovacími místy) ve dvou homologuech.

Homology se dostávají postupně těsněji vedle sebe a vytvářejí čtyřchromatidovou strukturu nazývanou **bivalentní**.

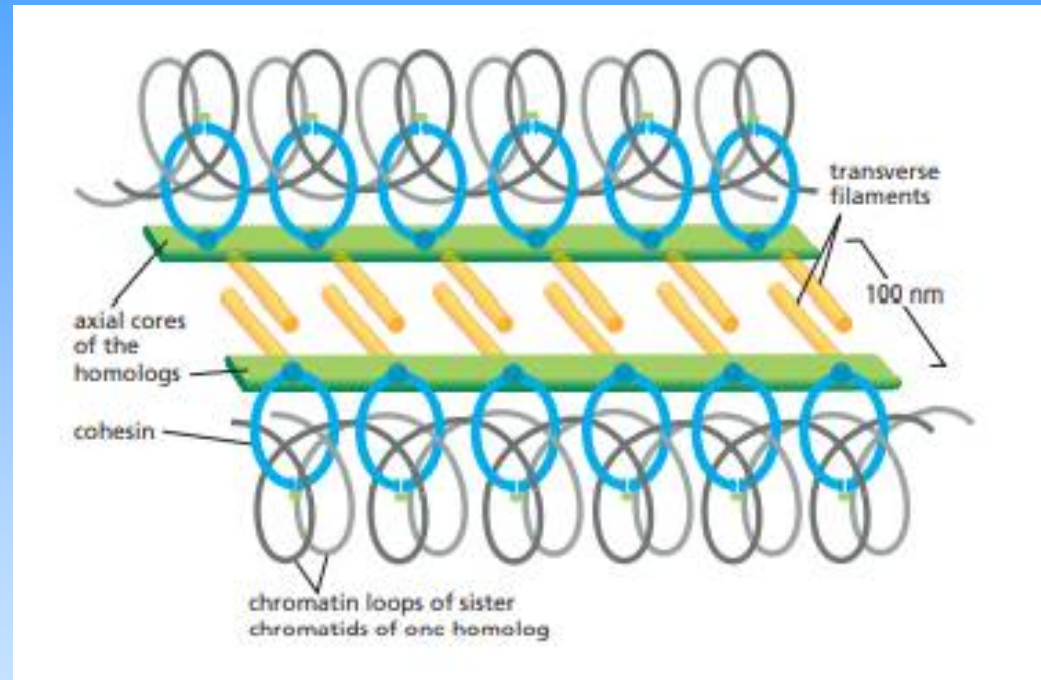
Homologní páry jsou pak uzamčeny dohromady homologní rekombinací: DNA dvouřetězcové zlomy se tvoří na několika místech v každé sesterské chromatidě => velký počet dějů rekombinace DNA mezi homology. Některé z těchto událostí vedou k reciproční výměně DNA nazývané **crossover**: DNA chromatidy se kříží, aby se stala spojitou s DNA homologní chromatidy.

Homologické párování vrcholí tvorbou synaptonemálního komplexu.

Párové homology se dostanou do těsného sousedství svými strukturálními osami (axiálními jádry) vzdálenými asi 400 nm, a to mechanismy které závisí na zlomech dvouřetězcové DNA u sesterských chromatid.

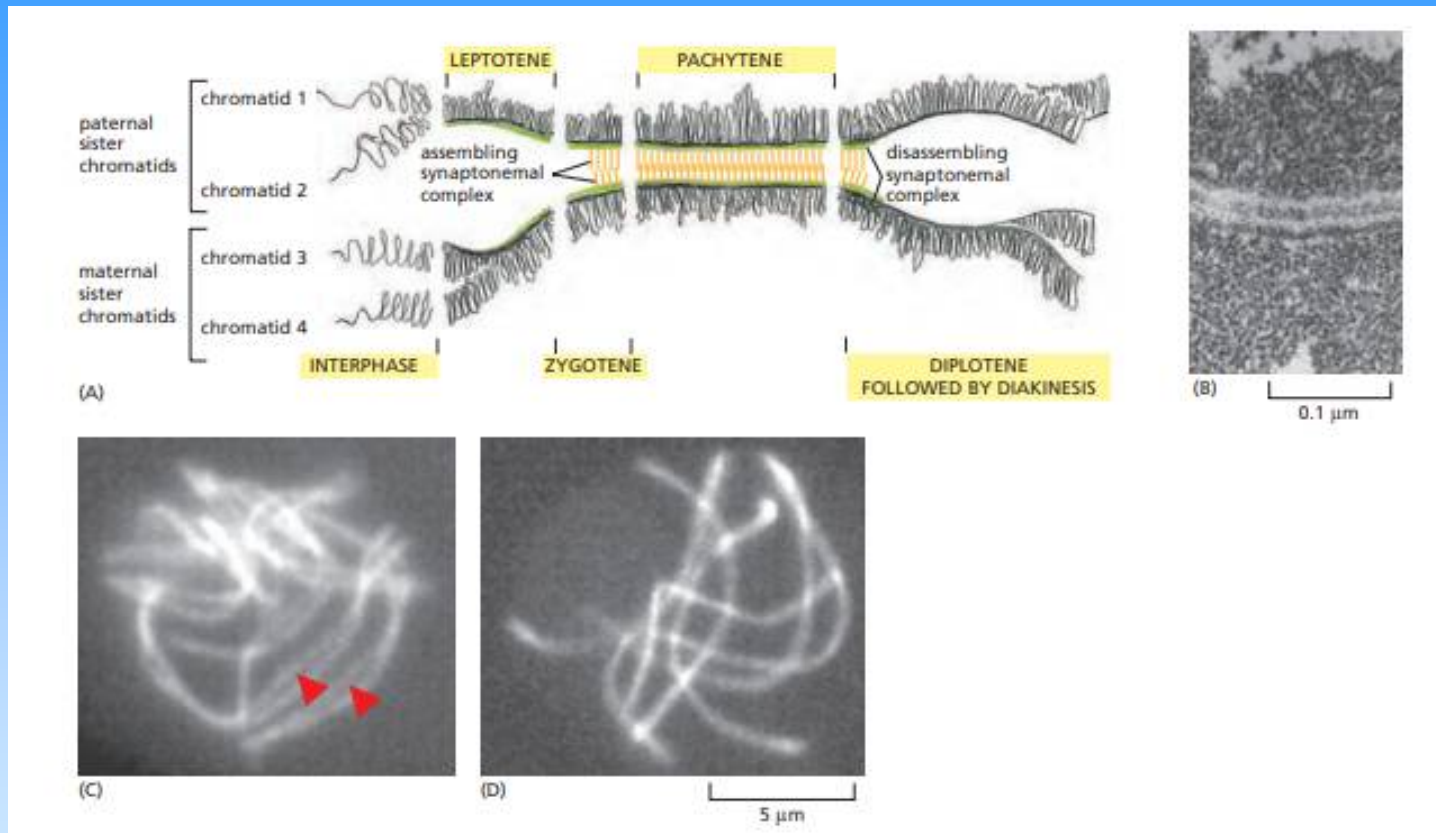
Co táhne osy k sobě?

Rekombinační komplex (proteinový „stroj“) vzniklý na dvouvláknovém zlomu v chromatidě, váže odpovídající sekvenci DNA párového homologní a pomáhá ji navinout = **presynaptickém zarovnání homologů**.



Následuje **synapse** – axiální jádro homologu se pevně spojí s axiálním jádrem partnera pomocí příčných vláken => vzniká **synaptonemální komplex** – přemostňuje mezeru mezi homology na 100 nm.

Morfologické změny, ke kterým dochází během párování homologů, jsou základem pro rozdělení meiotické profáze do pěti následných fází – **leptotene**, **zygotene**, **pachytene**, **diplotene** a **diakineze**.

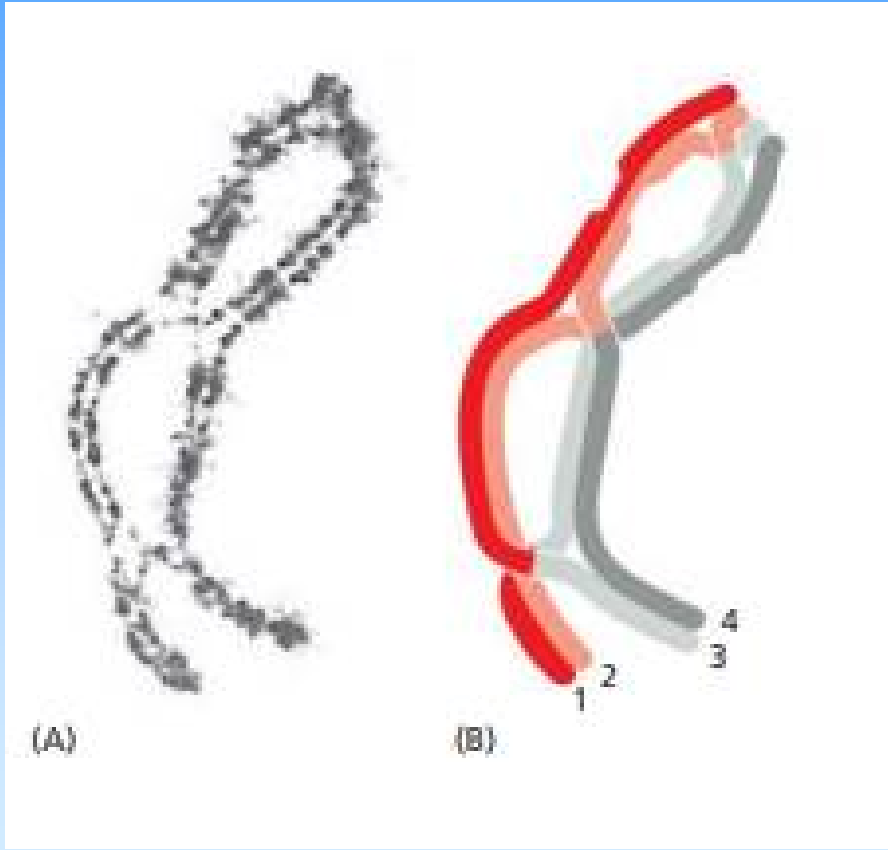


Leptotene – kondenzacie a párování homologů a začíná genetická rekombinace.

Zygotene - synaptonemální komplex se začíná shromažďovat v místech, kde jsou homology úzce spojeny a dochází k rekombinačním událostem.

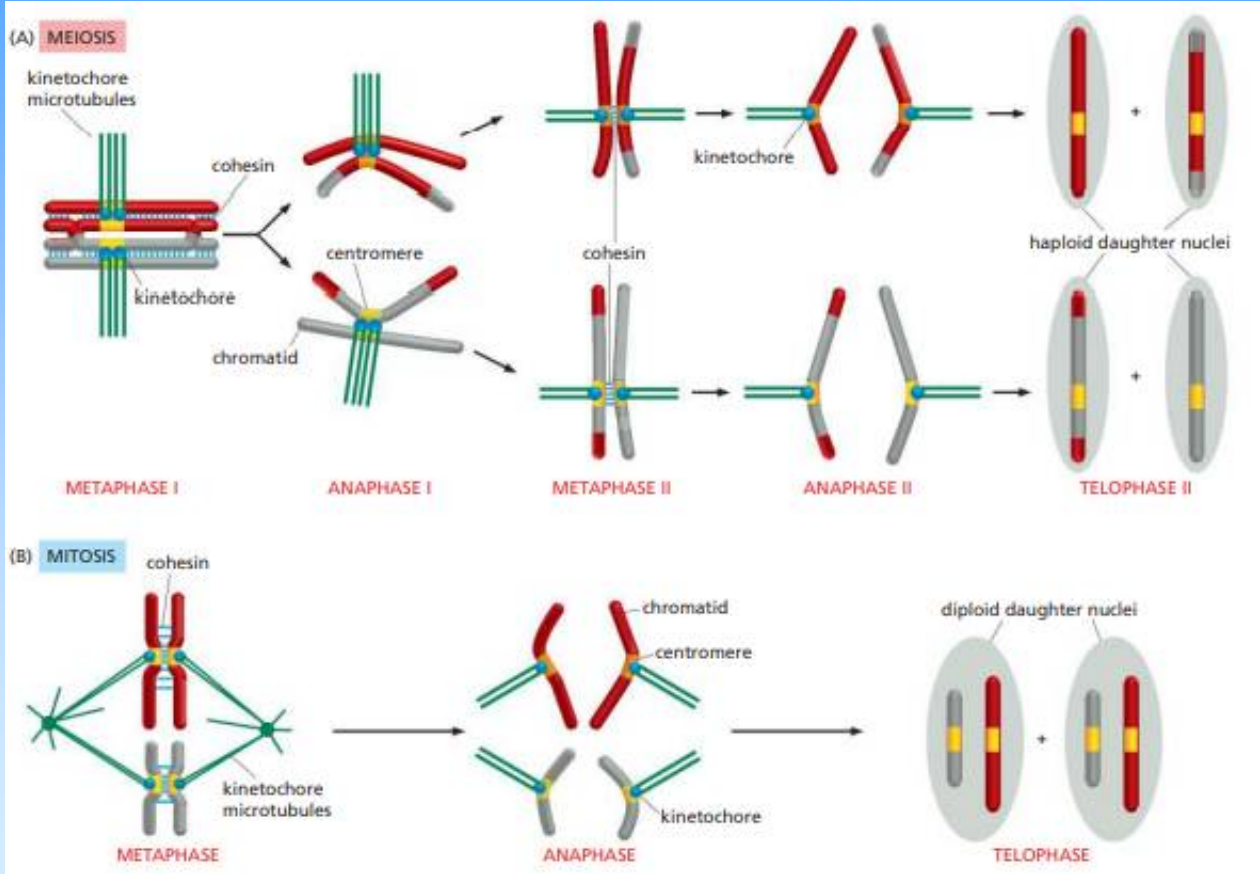
Pachytene - proces sestavení dokončen a homology jsou synapsovány po celé své délce. Pachytenové stadium může přetrvávat dny nebo déle.

Diplotene – zahájení desynapse s rozkladem synaptonemálních komplexů a současnou kondenzací a zkrácením chromozomů – jsou pozorovatelná interhomologická spojení nazývaná **chiasmata** - udržují kompaktní homology pohromadě. Homology jsou nyní připraveni zahájit proces segregace.



Homologická segregace závisí na několika jedinečných rysech meiózy I.

Zásadní rozdíl mezi meiózou I a mitózou (a meiózou II) spočívá v tom, že v meióze I se oddělují a poté segregují homology nikoliv sesterské chromatidy. Tento rozdíl závisí na třech rysech meiózy I, které ji odlišují od mitózy:

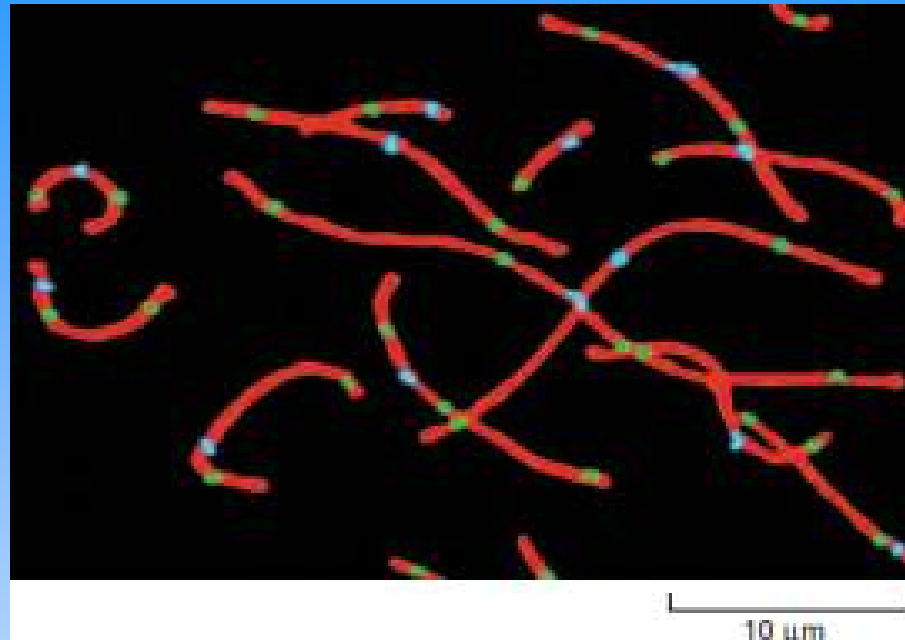


1) Oba sesterské kinetochory v homologue se stabilně připojují ke stejnému vřetenovému pólu. U mitózy se kinetochory připojují k odlišným pólům. V meióze I jsou sesterské kinetochory sloučeny do jediné jednotky vázající mikrotubuly.

2) Křížení vytváří silné fyzické spojení mezi homology => umožňuje jejich bi-orientaci na rovníku vřeténka (podobně jsoudržnost mezi sesterskými chromatidami je důležitá pro jejich bi-orientaci v mitóze či meióze II). Křížení drží páry homologů pohromadě pouze proto, že ramena sesterských chromatid jsou spojena kohezí sesterských chromatid.

3) Koheze je odstraněna v anafázi I pouze z ramen chromozomu a nikoli z oblastí blízko centromer, kde jsou umístěny kinetochory => spuštění separace homologů na začátku anafáze I. Tento proces závisí na aktivaci APC/C => destrukce sekurin, aktivace separázy a štěpení kohezinu podél ramen.

Crossing-over je vysoce regulovaný.



Crossing-over má dvě odlišné funkce v meióze:

- 1) Pomáhá udržet homology pohromadě, aby byly správně odděleny ke dvěma dceřiným jádrům produkovaným meiózou I
- 2) Přispívá ke genetické diverzifikaci gamet, které jsou nakonec vyrobeny.



Crossing-over je vysoce regulován: počet a umístění dvouřetězcových zlomů podél každého chromozomu je řízeno, stejně jako pravděpodobnost, že se zlom přemění na crossing-over.

Výsledkem této regulace je to, že každý pár lidských homologů je spojen asi dvěma nebo třemi kříženími.

Kontrola dělení a buněčného růstu

Oplodněná myší vejce a oplodněné lidské vajíčko jsou podobné velikosti, přesto produkují zvířata velmi rozdílných velikostí. Jaké faktory v řízení chování buněk u lidí a myší jsou zodpovědné za tyto rozdíly ve velikosti?

Velikost orgánu nebo organismu závisí na jeho celkové buněčné hmotě, která závisí jak na celkovém počtu buněk, tak na jejich velikosti. Počet buněk zase závisí na množství buněčného dělení a buněčné smrti.

Velikost orgánu a těla je proto určována třemi základními procesy:

- buněčným růstem
- dělením buněk
- přežíváním buněk

Každý z nich je přísně regulován – jak intracelulárními programy, tak **extracelulárními signálními molekulami (proteiny)**, které tyto programy řídí:

1. Mitogeny – stimulují buněčné dělení – spouští vlnu aktivity G_1/S -Cdk => uvolnění intracelulárních negativních kontrol, které jinak blokuji postup v buněčném cyklu
2. Růstové faktory – stimulují buněčný růst podporou syntézy proteinů a dalších makromolekul a inhibicí jejich degradace
3. Faktory přežití – podporují přežití buněk potlačením formy programované buněčné smrti – apoptózy

Mitogeny stimulují buněčné dělení

Buňky mnohobuněčného organismu se dělí pouze tehdy, když organismus potřebuje více buněk. Aby se živočišná buňka množila, musí přijímat **stimulační extracelulární signály** ve formě **mitogenů** obvykle ze sousedních buněk.

Růstový faktor PDGF odvozený z krevních destiček; stimuluje mnoho typů buněk k dělení, včetně fibroblastů, buněk hladkého svalstva a neurogliálních buněk.

Epidermální růstový faktor (EGF) – působí nejen na epidermální buňky, ale také na mnoho dalších typů buněk, včetně jak epiteliálních, tak neepiteliálních buněk.

Erythropoetin – úzká specifita – indukuje pouze proliferaci prekurzorů červených krvinek.

Mnoho mitogenů, včetně PDGF, má také jiné účinky než stimulaci buněčného dělení: mohou stimulovat buněčný růst, přežití, diferenciaci nebo migraci v závislosti na okolnostech a typu buňky.

Inhibiční extracelulární signální proteiny proti pozitivním regulátorům a tím inhibují růst orgánů. Nejznámějšími inhibičními signálními proteiny jsou transformující růstový faktor- β (TGF β)

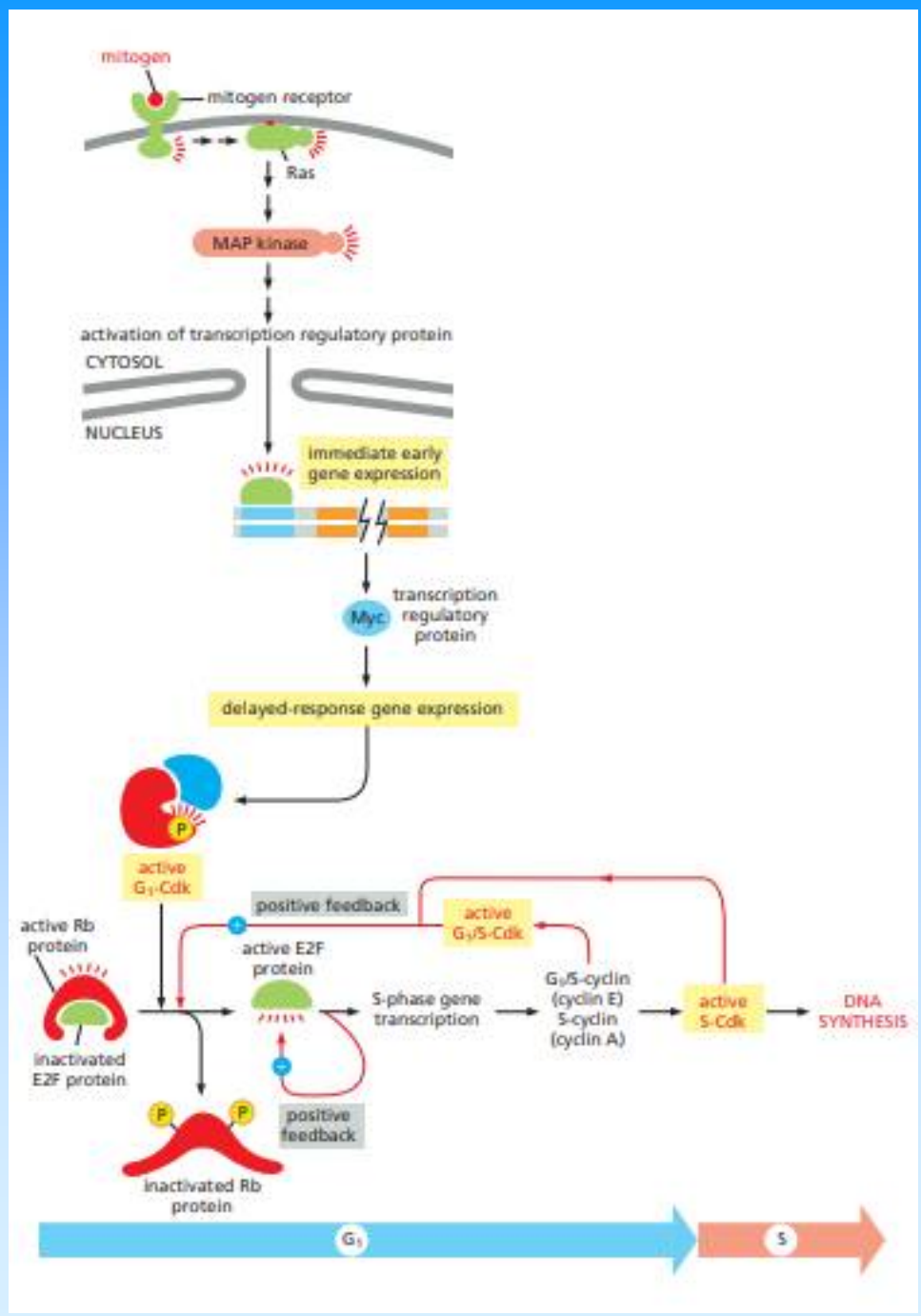
V nepřítomnosti mitogenního signálu k proliferaci je inhibice Cdk v G_1 udržována různými mechanismy. Většina buněk v našem těle je v G_0 , ve kterém je jejich řídicí systém buněčného cyklu zcela demontován: exprese genů kódujících různé Cdk a cykliny je trvale vypnuta a buněčné dělení se vyskytuje zřídka.

Mitogeny stimulují aktivity G1-Cdk a G1/S-Cdk.

U většiny živočišných buněk řídí mitogeny rychlost buněčného dělení působením v G₁ fázi buněčného cyklu.

Mitogeny interagují s receptory buněčného povrchu => aktivace GTPázy Ras => aktivace proteinkinázové kaskády (MAP kináza) => zvýšení produkce transkripčních regulačních proteinů Myc => zvýšení exprese genů kódujících G₁ cykliny (D cykliny) => zvýšení aktivity G₁-Cdk (cyklin D-Cdk4).

V nepřítomnosti mitogenní stimulace je genová exprese závislá na E2F inhibována interakcí mezi E2F a členy rodiny **retinoblastomových proteinů (Rb)**. Při stimulaci mitogeny buňky, aktivní G₁-Cdk se akumuluje a fosforyluje členy rodiny Rb => snížení vazby na E2F => uvolněné proteiny E2F aktivují expresi svých cílových genů.

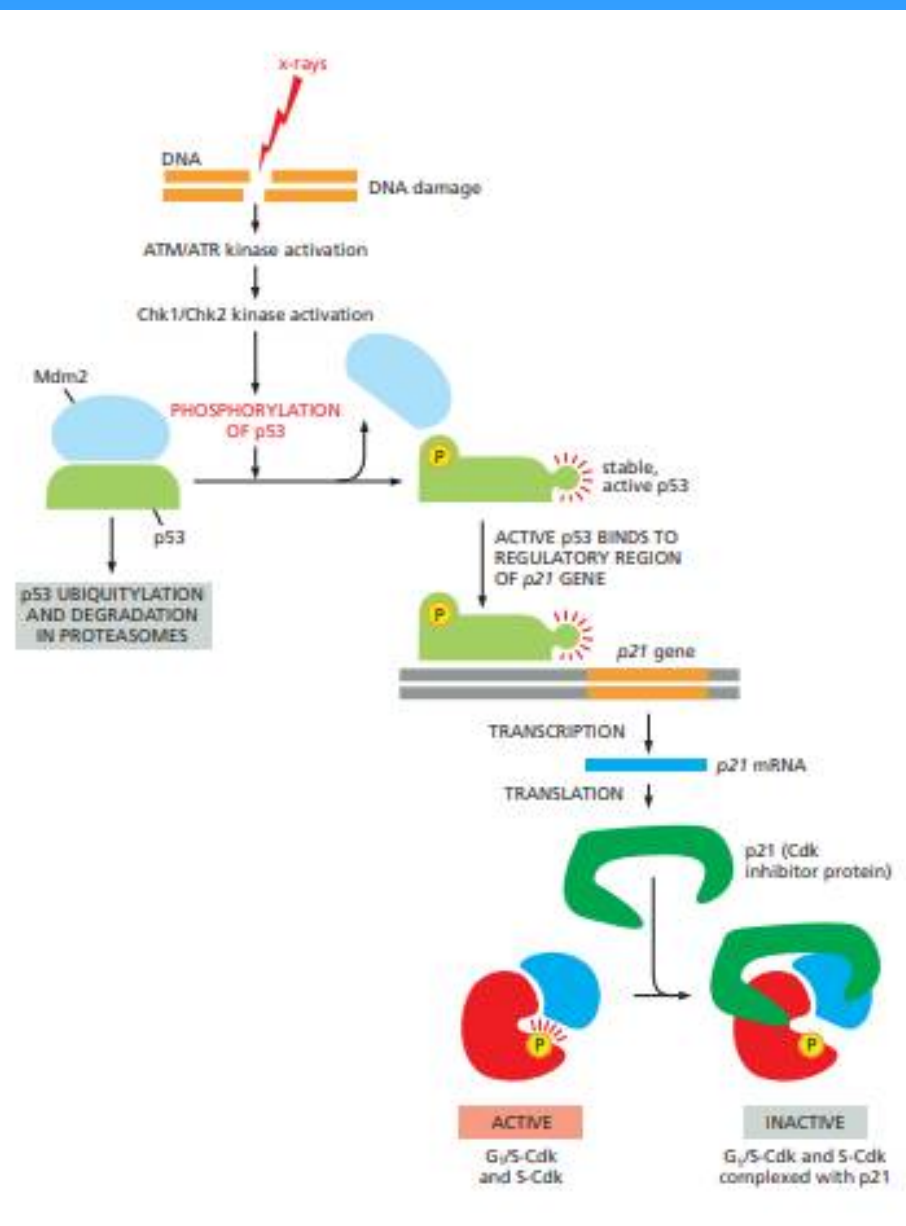


Poškození DNA blokuje dělení buněk: reakce na poškození DNA.

Buněčný cyklus a rychlost buněčné proliferace je řízena také dalšími extracelulárními a intracelulárními signály – **poškození DNA** – důsledek spontánních chemických reakcí v DNA, chyb v replikaci DNA nebo vystavení záření a chemickým látkám.

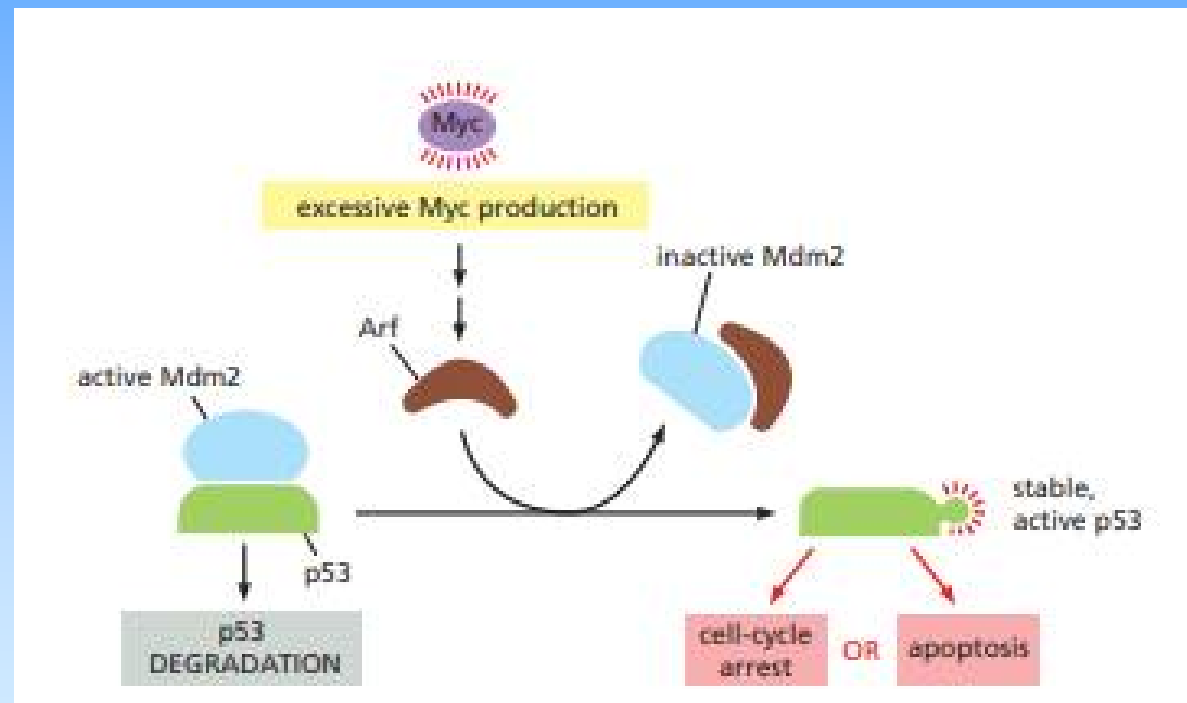
Řídicí systém buněčného cyklu může snadno detekovat poškození DNA a zastavit cyklus v jednom ze dvou přechodů: **1)** Na začátku, který zabraňuje vstupu do buněčného cyklu a do S fáze; **2)** Na přechodu G₂/M, který brání vstupu do mitózy.

Poškození DNA => spuštění aktivace proteinkináz ATM a ATR – spojují se s místem poškození a fosforylují proteinkinázy Chk1 a Chk2 => fosforylace proteinů, které vedou k zastavení buněčného cyklu = regulační protein **p53** => fosforylace p53 snižuje jeho vazbu na Mdm2 => zvýšení koncentrace p53 v buňce => stimulace transkripce genu p21 => inhibice aktivity komplexů G₁/S-Cdk a S-Cdk => blokáce vstupu do buněčného cyklu.



Abnormální signály proliferace způsobují zástavu buněčného cyklu nebo apoptózu, s výjimkou rakovinných buněk.

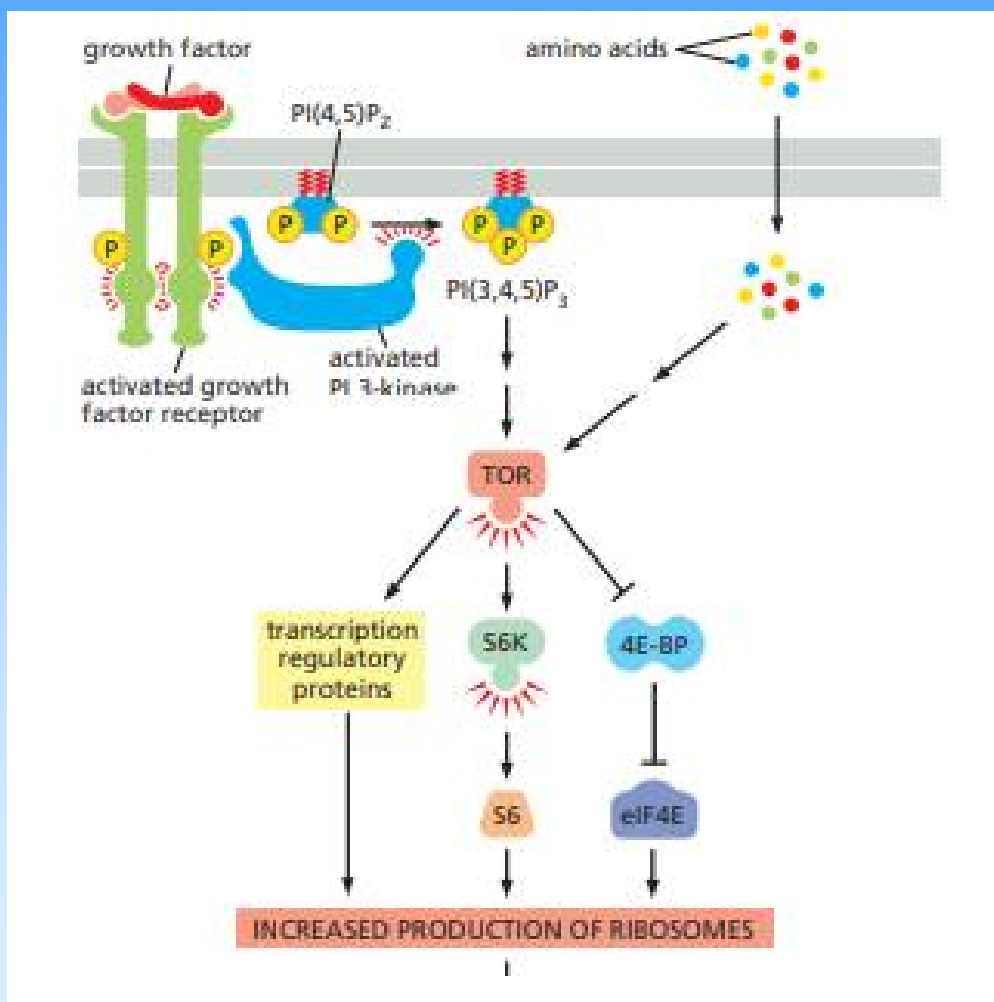
Mutace, které způsobují nadměrnou expresi Myc, stimulují nadměrný buněčný růst a proliferaci, a tím podporují rozvoj rakoviny. Překvapivě, hyperaktivovaná forma Ras nebo overexprese Myc nevede k nadměrné proliferaci, ale naopak k zastavení buněčného cyklu nebo apoptóze => normální buňka detekuje abnormální mitogenní stimulaci => brání dalšímu dělení.



Mechanismus? Stimulace => produkce proteinu Arf = inhibitor buněčného cyklu => vazba k Mdm2 a jeho inhibice => zvýšení hladiny p53 => zástava buněčného cyklu, nebo apoptóza.

Buněčná proliferace je doprovázena buněčným růstem.

Pokud by se počet buněk zvyšoval bez růstu, buňky by byly postupně menší a nedocházelo by k žádnému čistému nárůstu celkové buněčné hmoty => ve většině proliferujících buněčných populací buněčný růst doprovází buněčné dělení.



Extracelulární růstové faktory – stimulují růst živočišných buněk; vážou se na receptory na buněčném povrchu a aktivují intracelulární signální dráhy – nejdůležitější je dráha zahrnující enzym **fosfoinositid 3-kinázu (PI 3-kinázu)**.

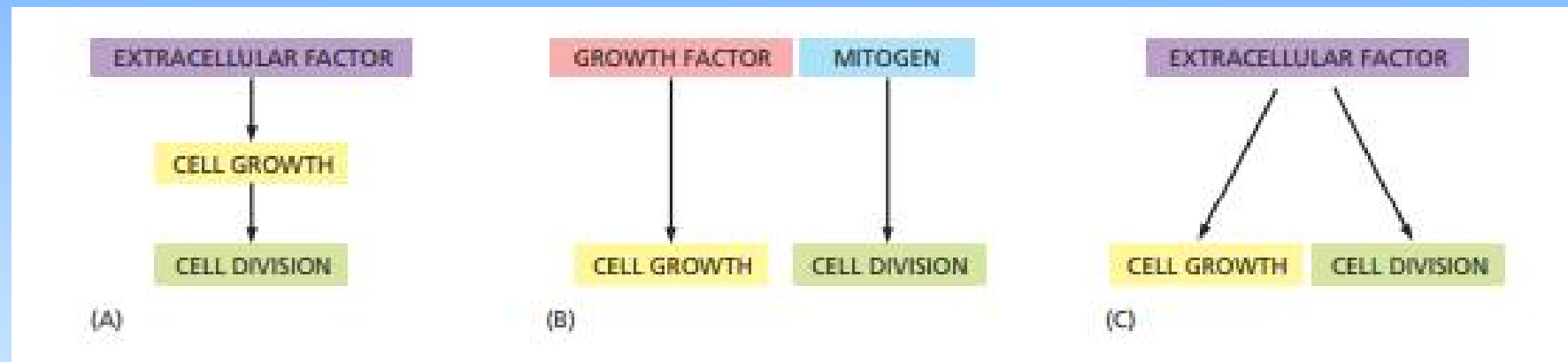
Aktivace PI 3-kinázy => aktivace kinázy TOR, klíčová u všech eukaryot. TOR aktivuje syntézu proteinů. Jedním z cílů je i proteinkináza S6 kináza (S6K) – fosforyluje ribozomální protein S6 => zvýšení schopnosti ribozomů překládat podskupinu mRNA kodující ribozomální složky.

TOR také aktivuje translační iniciační faktor eIF4E => aktivace transkripčních regulátorů => zvýšení exprese genů kodujících ribozomální podjednotky.

Proliferující buňky obvykle koordinují svůj růst a dělení.

Aby si proliferující buňky udržely konstantní velikost, musí koordinovat svůj růst s buněčným dělením. Tak se zajistí, že se velikost buněk po každém dělení zdvojnásobí: pokud buňky porostou příliš pomalu, budou se s každým dělením zmenšovat, a pokud porostou příliš rychle, budou po každém dělení větší

Není jasné, jak buňky dosahují této koordinace, ale pravděpodobně zahrnuje více mechanismů, které se liší v různých organismech, a dokonce i v různých typech buněk stejného organismu.



Růst a dělení živočišných buněk však nejsou vždy koordinované. **V mnoha případech jsou zcela rozpojené, aby umožnily růst bez dělení nebo dělení bez růstu.** Svalové buňky a nervové buňky mohou dramaticky růst poté, co se trvale stáhly z buněčného cyklu. Podobně vejce mnoha zvířat dorůstají do extrémně velkých rozměrů bez dělení - po oplození je však tento vztah obrácený a mnoho kol dělení probíhá bez růstu.

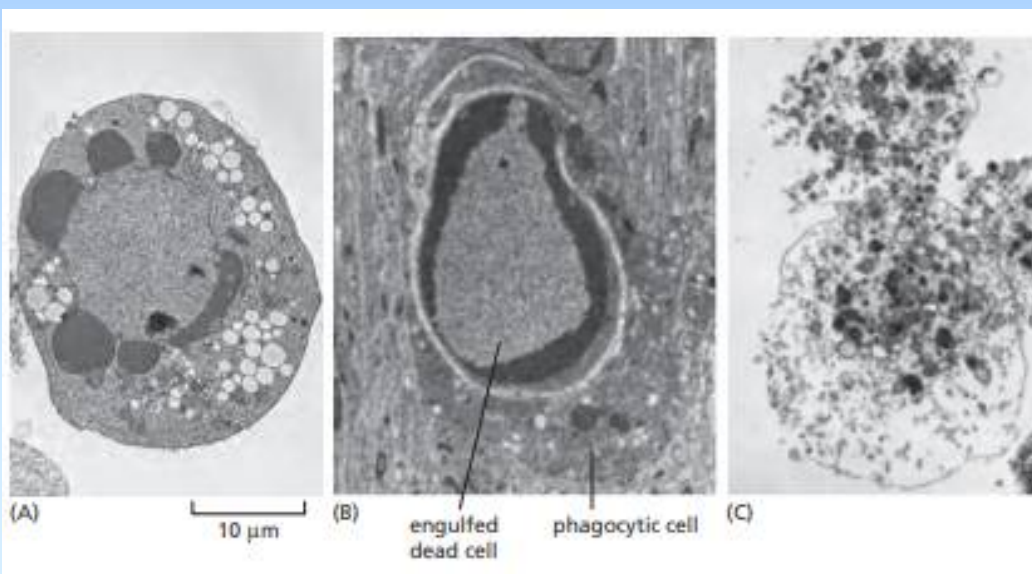
Apoptóza

63

Růst, vývoj a udržování mnohobuněčných organismů závisí nejen na produkci buněk, ale také na mechanismech jejich likvidace. Udržení velikosti tkáně vyžaduje, aby buňky umíraly stejnou rychlostí, jakou jsou produkovány. Během vývoje pomáhají pečlivě uspořádané vzorce buněčné smrti určit velikost a tvar končetin a dalších tkání. Buňky také umírají, když jsou poškozeny nebo infikovány, což zajišťuje, že jsou odstraněny dříve, než ohrozí zdraví organismu.

V těchto a většině dalších případů není buněčná smrt náhodným procesem, ale nastává naprogramovanou sekvencí molekulárních událostí, ve kterých se buňka systematicky ničí zevnitř a je pak požírána jinými buňkami, aniž by zanechávala stopy. Ve většině případů k této **programované buněčné smrti** dochází procesem zvaným **apoptóza** – z řeckého slova znamenajícího „opadání“, jako listů ze stromu.

A) Buňky odumírající apoptózou procházejí charakteristickými morfologickými změnami. Stahují se a kondenzují, cytoskelet se zhroutí, jaderný obal se rozpadne a jaderný chromatin kondenzuje a rozpadá se na fragmenty.



B) Povrch buňky nebo apoptotických těl se chemicky změní => sousední buňka nebo makrofág (specializovaná fagocytární buňka) je rychle pohltna, než mohou vylít svůj obsah.

C) Na rozdíl od apoptózy, zvířecí buňky, které umírají v reakci na akutní poškození, to obvykle dělají procesem zvaným **nekróza** buněk. Nekrotické buňky bobtnají a praskají, vylévají svůj obsah na své sousedy a vyvolávají zánětlivou reakci. Nekróza je pravděpodobně způsobena vyčerpáním energie => metabolické defekty a ztráta iontových gradientů.

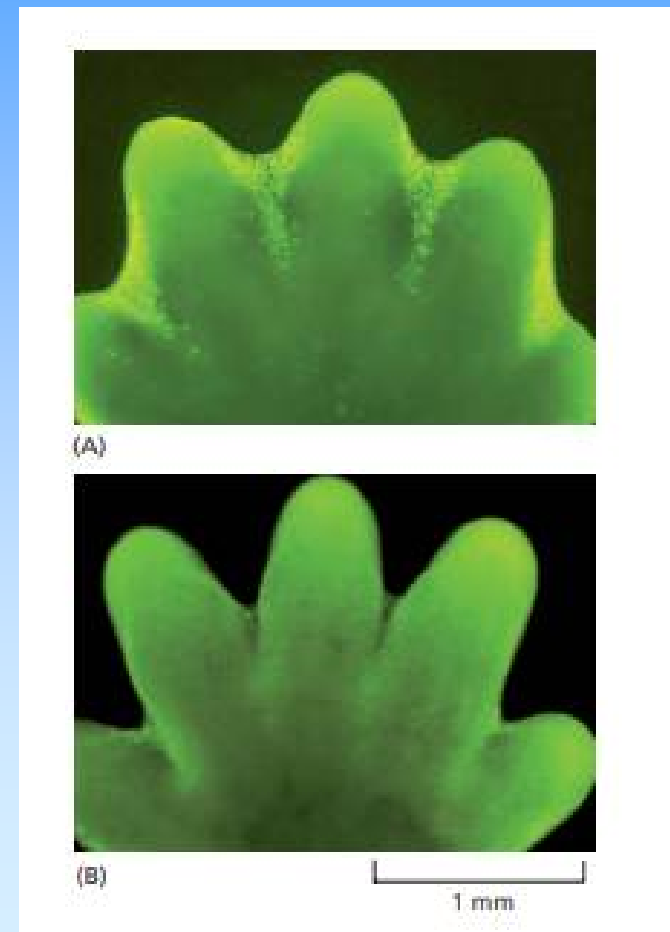
Apoptóza eliminuje nežádoucí buňky.

Ve vyvíjejícím se nervovém systému obratlovců například více než polovina z mnoha typů nervových buněk normálně odumírá brzy po jejich vytvoření. Zdá se pozoruhodně marnotratné, že umírá tolik buněk, zvláště když velká většina je v době, kdy se zabíjejí, naprosto zdravá. **K jakým účelům tato masivní buněčná smrt slouží?**

Např. Buněčná smrt pomáhá tvarovat ruce a nohy během embryonálního vývoje: začínají jako rýčovitě struktury a jednotlivé prsty se oddělují, až když buňky mezi nimi odumírají (**Obr. myší tlapky**).

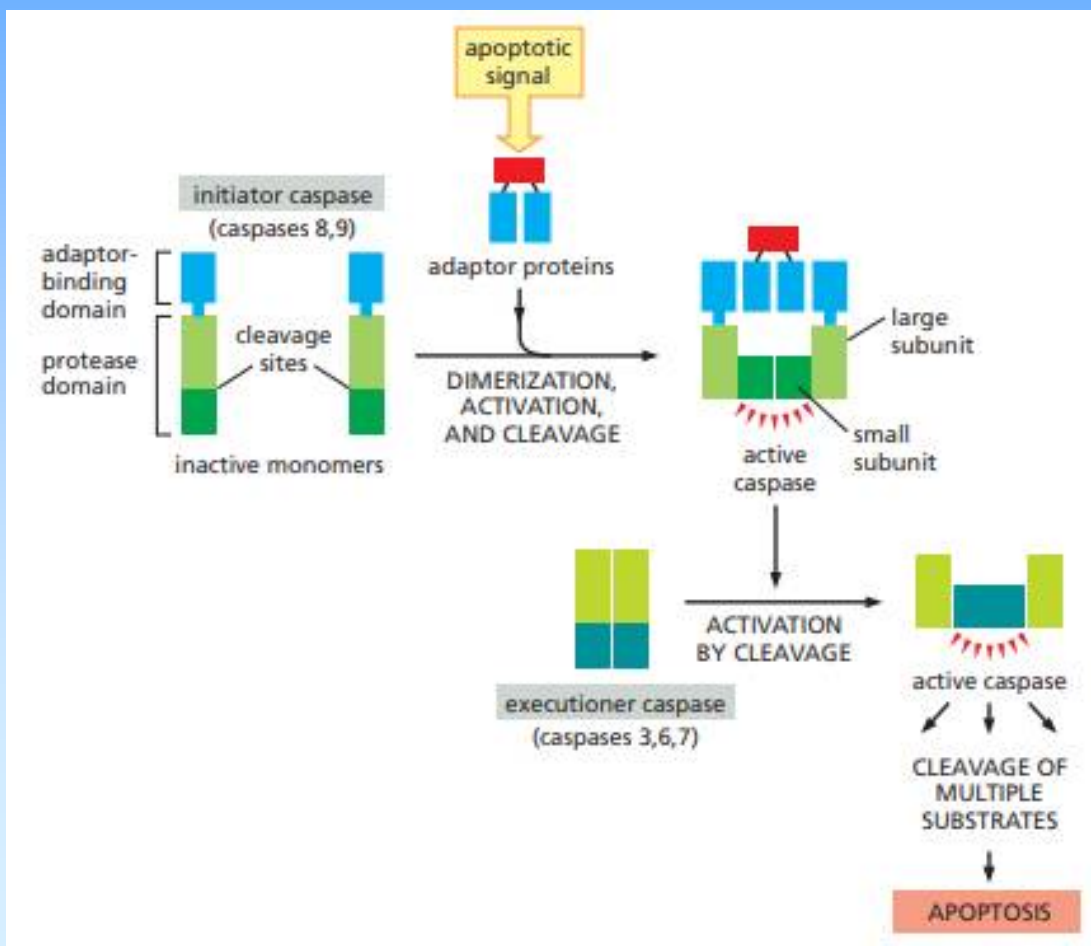
Např. V jiných případech buňky umírají, když struktura, kterou tvoří, již není potřeba. Když se pulec při metamorfóze změní v žábu, buňky v ocasu odumírají a ocas, který žába nepotřebuje, zmizí.

Živočišné buňky dokážou rozpoznat poškození ve svých různých organelách => pokud je poškození dostatečně velké, mohou se zabít apoptózou. **Příklad:** Poškození DNA => produkce mutace podporující rakovinu => apoptóza, pokud nedojde k opravě.



Apoptóza závisí na intracelulární proteolytické kaskádě, která je zprostředkována kaspázami.

Apoptóza je spouštěna specializovanými proteázami – **kaspázy** – štěpí specifické sekvence => dramatické změny => buněčná smrt a pohlcení. Kaspázy mají ve svém aktivním místě cystein a štěpí své cílové proteiny na specifických asparagových kyselinách => kaspáza (**c**aspase = **c**ystein a kyselinu **a**sparagovou)



Dva typy kaspáz:

Iniciační kaspázy – zahajují apoptotický proces; existují jako neaktivní, rozpustné monomery v cytosolu. Apoptotický signál spouští sestavení velkých proteinových platform => spojují více iniciačních kaspáz do velkých komplexů. Kaspázy se sdružují => dimery => aktivace kaspázy

Exekutivní kaspázy – neaktivní dimery štěpeny iniciační kaspázou v proteázové doméně => aktivní místo se přeskupí z neaktivní na aktivní konformaci. Po aktivaci exekutivní kaspázy katalyzují rozsáhlé štěpení proteinů, které zabíjí buňku.

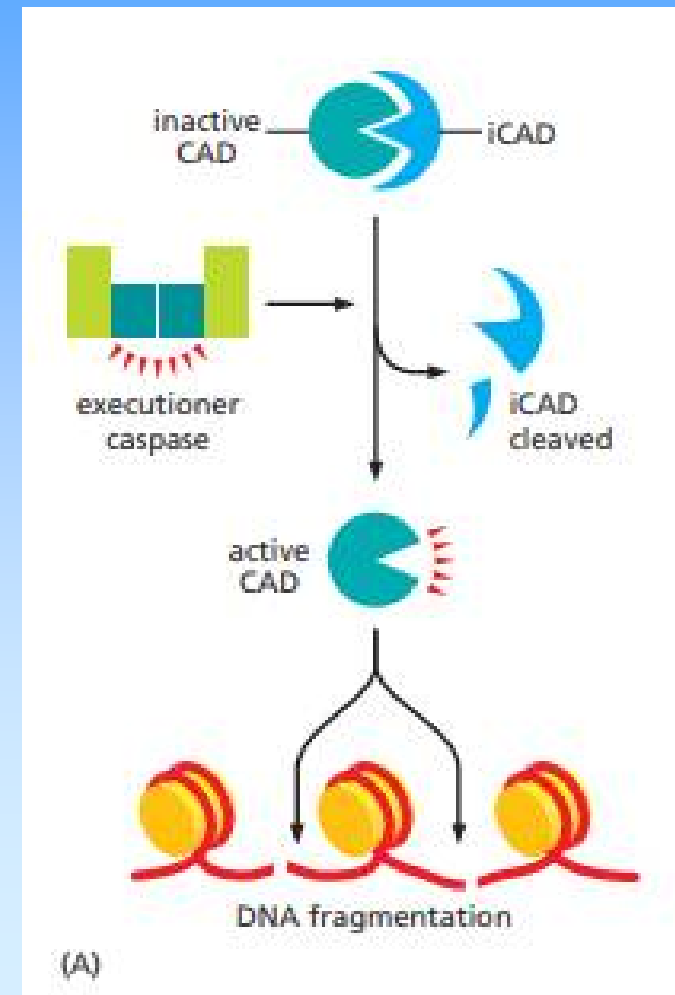
Kaspázy během apoptózy štěpí tisíce proteinů. Pouze několik z těchto proteinů bylo podrobně studováno.

Jaderné laminy – štěpením dochází k nevratnému rozpadu jaderné laminy

CAD – endonukleáza degradující DNA – v neaktivní formě spojena s iCAD – štěpení tohoto proteinu (= oddělení inaktivní iCAD od aktivní CAD) => uvolnění aktivní endonukleázy CAD => rozštěpení DNA v buněčném jádře

Kaskáda kaspáz je nejen destruktivní a samozesilující, ale také nevratná => jakmile se buňka vydá na cestu ke zničení, nemůže se vrátit zpět.

U rostlin jsou některé procesy apoptózy v určitém stádiu vratné.

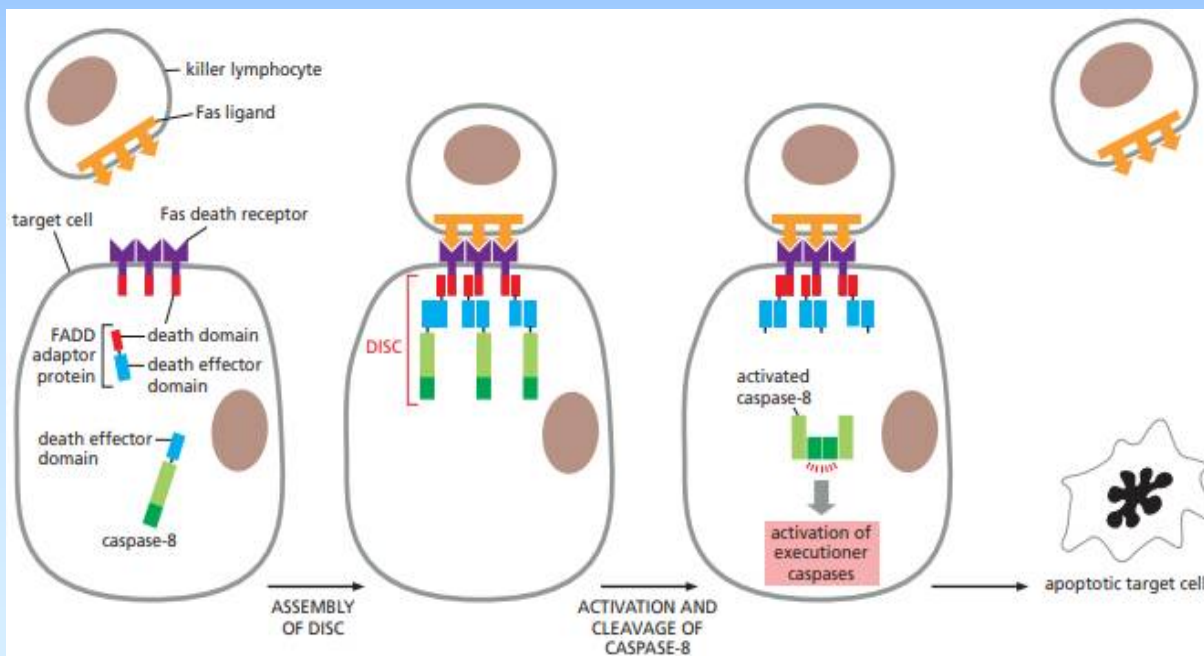


Povrchové receptory buněčné smrti aktivují vnější cestu apoptózy.

Extracelulární signální proteiny vázající se na povrchové receptory buněčné smrti spouštějí **vnější dráhu apoptózy**. Receptory smrti – transmembránové proteiny obsahující extracelulární doménu vázající ligand = jediná transmembránová doména a intracelulární doména smrti, která je vyžadována pro receptory k aktivaci apoptotického programu.

Receptory – homotrimery, rodina receptorů **tumor nekrotizujícího faktoru (TNF)** – patří sem receptory pro samotný TNF a receptory smrti **Fas**. Ligandy – jsou také homotrimery; navzájem strukturně příbuzné a patří do rodiny signálních proteinů TNF.

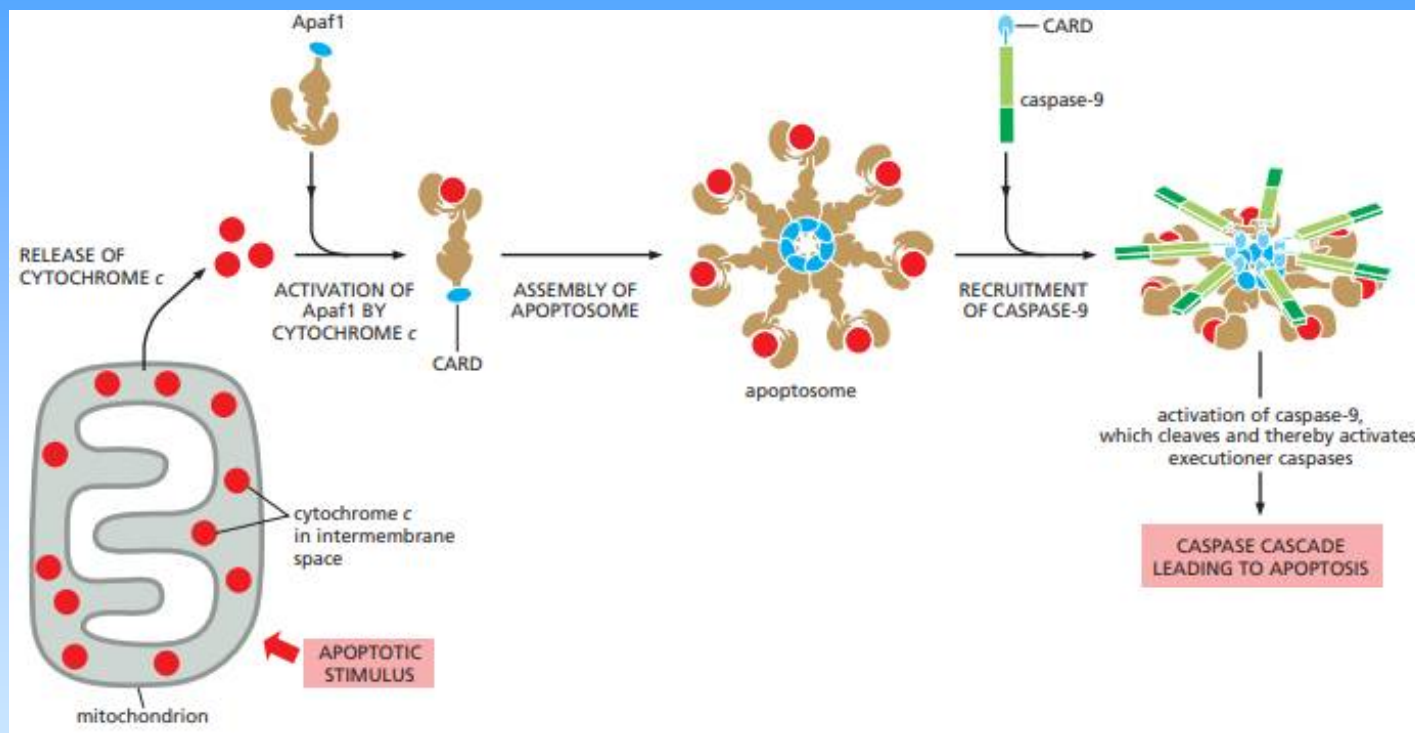
Příklad: Vnější dráha apoptózy spouštěné receptory smrti - aktivace Fas na povrchu cílové buňky pomocí Fas ligandu na povrchu zabíjäckého (cytotoxického) lymfocytu.



Vazba ligandu Fas => domény smrti na cytosolových koncích receptorů smrti Fas vážou intracelulární adaptorové proteiny FADD => vazba iniciační kaspázy 8 => vznik signálního komplexu indukující smrt (DISC) => iniciační kaspáza štěpí své partnery a poté aktivuje následné popravní kaspázy => apoptóza

Vnitřní cesta apoptózy závisí na mitochondriích.

Buňky mohou aktivovat svůj program apoptózy i zevnitř buňky = reakce na stresy (poškození DNA), nebo v reakci na vývojové signály. V buňkách obratlovců jsou tyto reakce řízeny **vnitřní** **neboli mitochondriální cestou apoptózy** - závisí na uvolňování mitochondriálních proteinů do cytozolu.



Klíčovým proteinem ve vnitřní dráze je **cytochrom c**. Když se uvolní do cytosolu, převezme novou funkci: váže se na adaptorový protein zvaný Apaf1 (faktor aktivující apoptotickou proteázu-1) => Apaf1 oligomerizuje na heptamer zvaný apoptozom. Proteiny Apaf1 v apoptozomu pak váží iniciační proteiny kaspázy-9 => aktivované kaspázy-9 pak aktivují následné exekutivní kaspázy => apoptóza.

Bcl2 proteiny regulují vnitřní cestu apoptózy.

Vnitřní dráha apoptózy je přísně regulována, aby bylo zajištěno, že se buňky zabíjejí samy pouze tehdy, když je to vhodné.

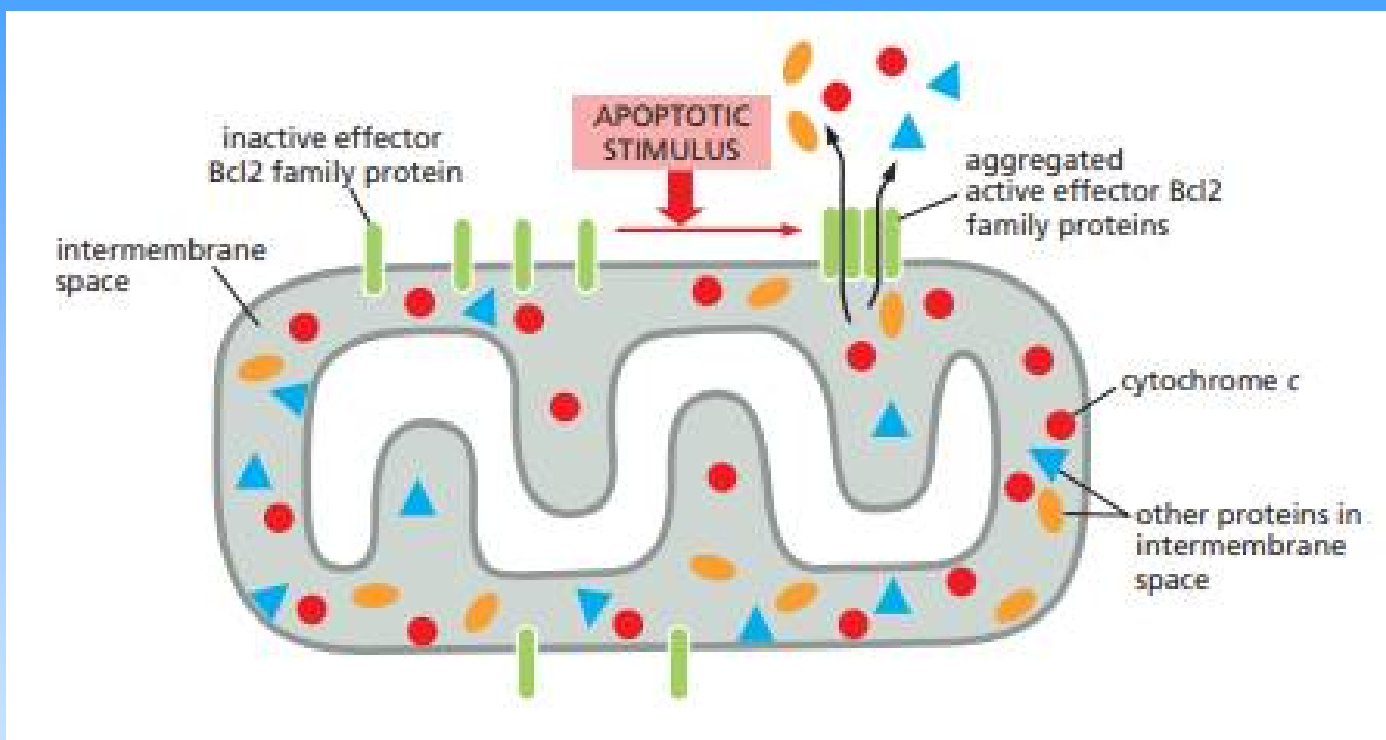
Hlavní třídou intracelulárních regulátorů vnitřní dráhy je rodina proteinů **Bcl2** – konzervovaná skupina proteinů zachována v evoluci od červů k lidem – některé Bcl2 proteiny jsou **proapoptotické** – podporují apoptózu, zatímco jiné jsou **antiapoptotické** – inhibují apoptózu. Rovnováha mezi aktivitami těchto dvou funkčních tříd proteinů rodiny Bcl2 určuje, zda savčí buňka žije nebo umírá vnitřní cestou apoptóz.

Antiapoptotické proteiny rodiny Bcl2 (např. Bcl2, BclX_L) sdílejí čtyři výrazné domény homologie Bcl2 (BH) (BH1–4).

Proapoptotické proteiny rodiny Bcl2 (např. Bax, Bak) se skládají ze dvou podrodin – efektorových proteinů rodiny Bcl2 a proteinů rodiny Pouze BH3.



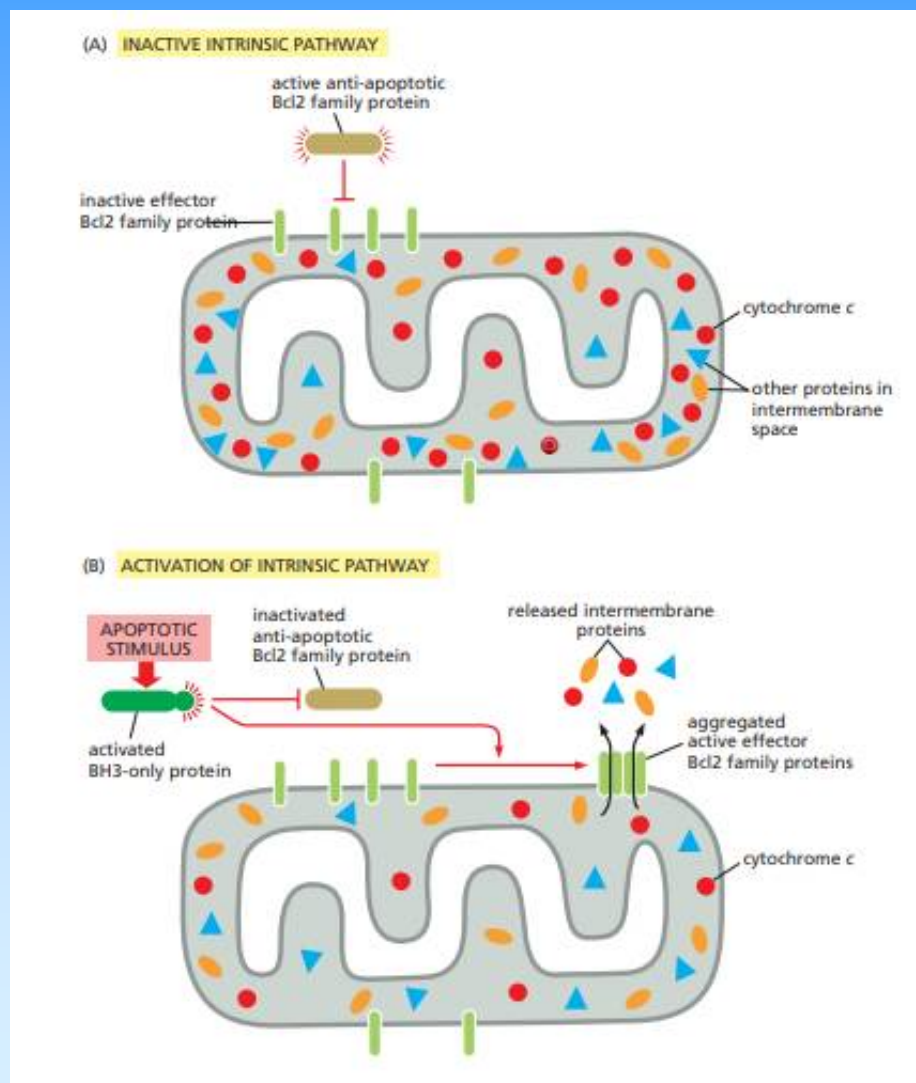
Když apoptotický stimul spustí vnitřní dráhu, proapoptické efektorové proteiny rodiny Bcl2 se aktivují a vytváří oligomery ve vnější membráně mitochondrií => uvolňování cytochromu c a dalších intermembránových proteinů (zatím neznámým způsobem).



V savčích buňkách jsou Bax a Bak hlavními efektorovými proteiny rodiny Bcl2.

Zatímco Bak je vázán na vnější membránu mitochondrie i při absenci apoptotického signálu, Bax se nachází v cytosolu a do mitochondrií se přemísť až poté, co jej aktivuje apoptotický signál.

Proteiny nazývané Pouze BH3 jsou největší podtřídou proteinů rodiny Bcl2. Buňka je buď produkuje nebo aktivuje v reakci na apoptotický stimul; podporují apoptózu hlavně inhibicí antiapoptotických proteinů rodiny Bcl2.



Doména BH3 se váže na dlouhou hydrofobní drážku na antiapoptotických proteinech rodiny Bcl2 => neutralizace jejich aktivity. Tato vazba a inhibice umožňuje agregaci Bax a Bak na povrchu mitochondrií => uvolňování mezimembránových mitochondriálních proteinů => indukce apoptózy

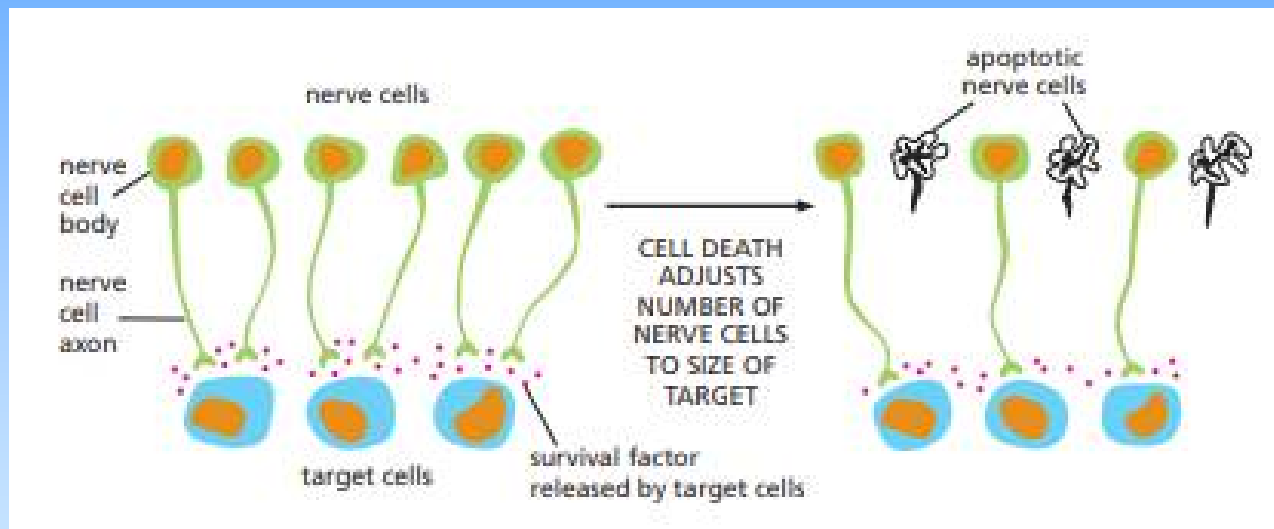
Aktivace kaspázové kaskády vede k jisté smrti => buňka využívá mnoho robustních mechanismů k zajištění toho, že tyto proteázy jsou aktivovány pouze tehdy, když je to vhodné. Jednu obrannou linii poskytuje rodina **proteinů inhibujících apoptózu (IAP)**.

Všechny IAP mají jednu nebo více domén BIR (bakulovirové opakování IAP) – umožňují vázat se na aktivované kaspázy a inhibovat je.

Extracelulární faktory přežití inhibují apoptózu různými způsoby.

Mezibuněčné signály regulují většinu aktivit živočišných buněk, včetně apoptózy. Tyto extracelulární signály jsou součástí normálních „sociálních“ kontrol, které zajišťují, že se jednotlivé buňky chovají pro dobro organismu jako celku – v tomto případě tím, že přežívají, když jsou potřeba, a zabíjejí se, když potřeba nejsou.

Existují extracelulární signální molekuly, které inhibují apoptózu, a souhrnně se nazývají **faktory přežití**.



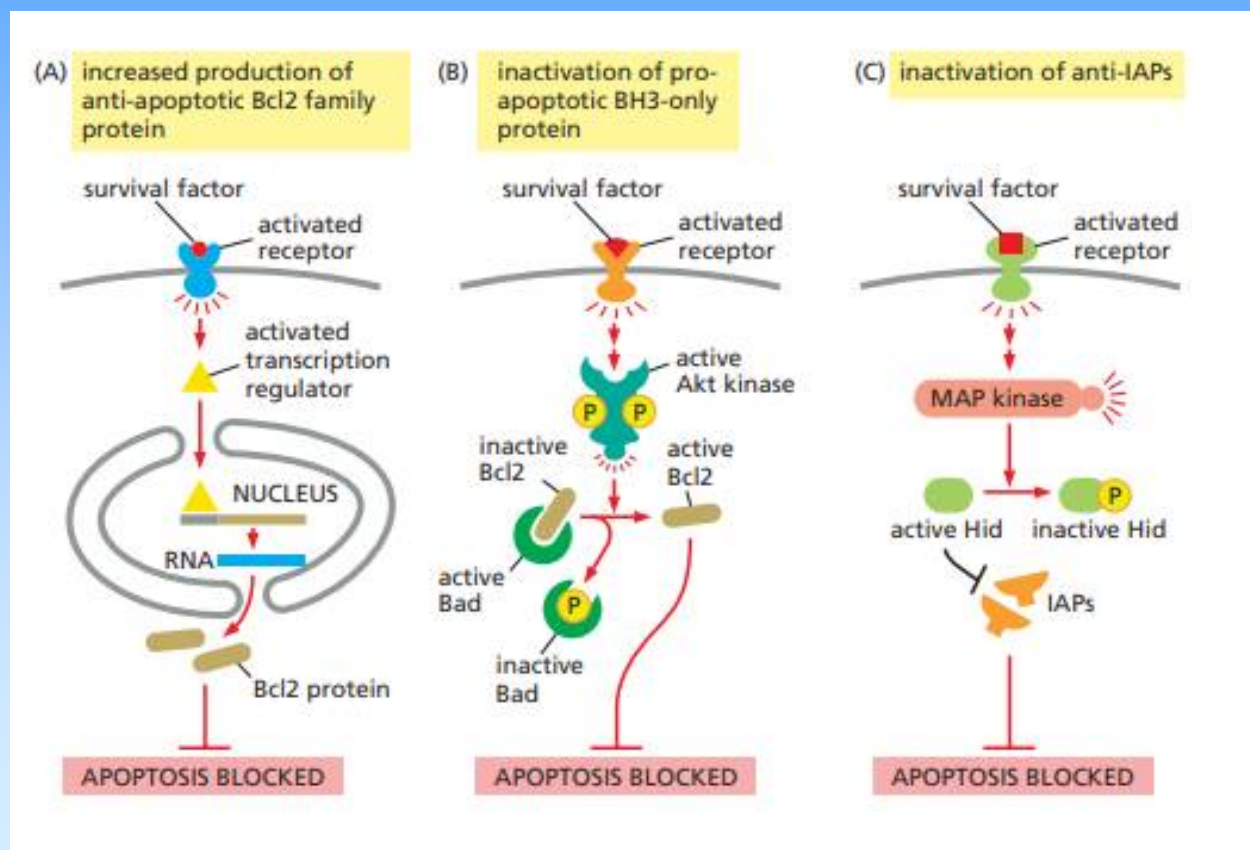
Většina živočišných buněk vyžaduje nepřetržitou signalizaci od jiných buněk, aby se zabránilo apoptóze => zajišťuje, že buňky přežijí pouze tehdy a tam, kde jsou potřeba. **Příklad:** Nervové buňky jsou produkovány v přebytku ve vyvíjejícím se nervovém systému a soutěží o omezené množství faktorů přežití => nervové buňky, které dostanou dostatek signálů pro přežití, žijí, zatímco ostatní umírají => počet přeživších neuronů se automaticky upraví tak, aby odpovídal počtu cílových buněk, se kterými se spojují.

Faktory přežití se obvykle vážou na receptory buněčného povrchu, které aktivují intracelulární signální dráhy potlačující apoptotický program, často regulací členů rodiny proteinů Bcl2.

A) Faktory přežití například stimulují syntézu antiapoptotických proteinů rodiny Bcl2 - samotný Bcl2 nebo BclXL

B) Jiné působí inhibiční funkce proapoptotických proteinů Pouze BH3, jako je např. protein Bad.

C) Některé faktory přežití působí fosforylací a inaktivací anti-IAP proteinů, jako je Hid => umožňují proteinům IAP potlačit apoptózu.

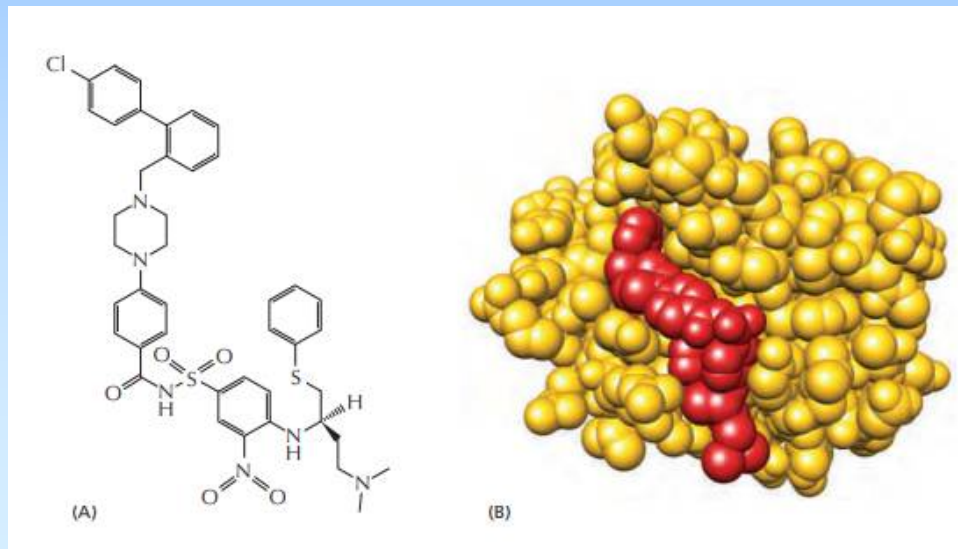


Nadměrná nebo nedostatečná apoptóza může přispět k onemocnění.

Existuje mnoho lidských poruch, při kterých nadměrné množství buněk podléhá apoptóze a tím přispívá k poškození tkáně. Mezi nejdramatičtější příklady patří infarkty a mrtvice. Při těchto akutních stavech mnoho buněk odumírá nekrozou v důsledku ischemie (nedostatečné prokrvení), ale některé méně postižené buňky odumírají apoptózou.

Snížená apoptóza také významně přispívá k mnoha nádorům, protože rakovinné buňky často abnormálně regulují svůj apoptotický program.

Gen kódující tumor supresorový protein p53 je mutován u přibližně 50 % lidských rakovin => již nepodporuje apoptózu nebo zastavení buněčného cyklu v reakci na poškození DNA => nedostatek funkce p53 proto umožňuje rakovinným buňkám přežít a proliferovat, i když je jejich DNA poškozena => v buňkách se hromadí více mutací, z nichž některé činí rakovinu zhubnější.



Pokud snížená apoptóza přispívá k mnoha rakovinám, pak by bylo možno léčit tyto rakoviny léky, které stimulují apoptózu. Tento směr myšlení nedávno vedl k vývoji malých chemikálií, které interferují s funkcí antiapoptotických proteinů rodiny Bcl2. Tyto chemikálie se vážou s vysokou afinitou k hydrofobnímu žlábků na antiapoptotických proteinech rodiny Bcl2 => blokují jejich funkci stejným způsobem, jako to dělají proteiny Pouze BH3