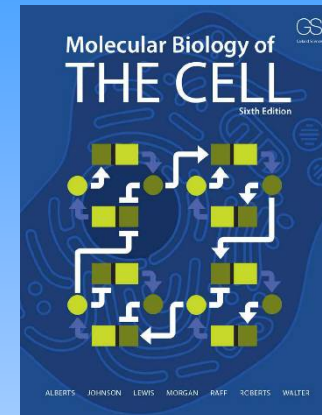
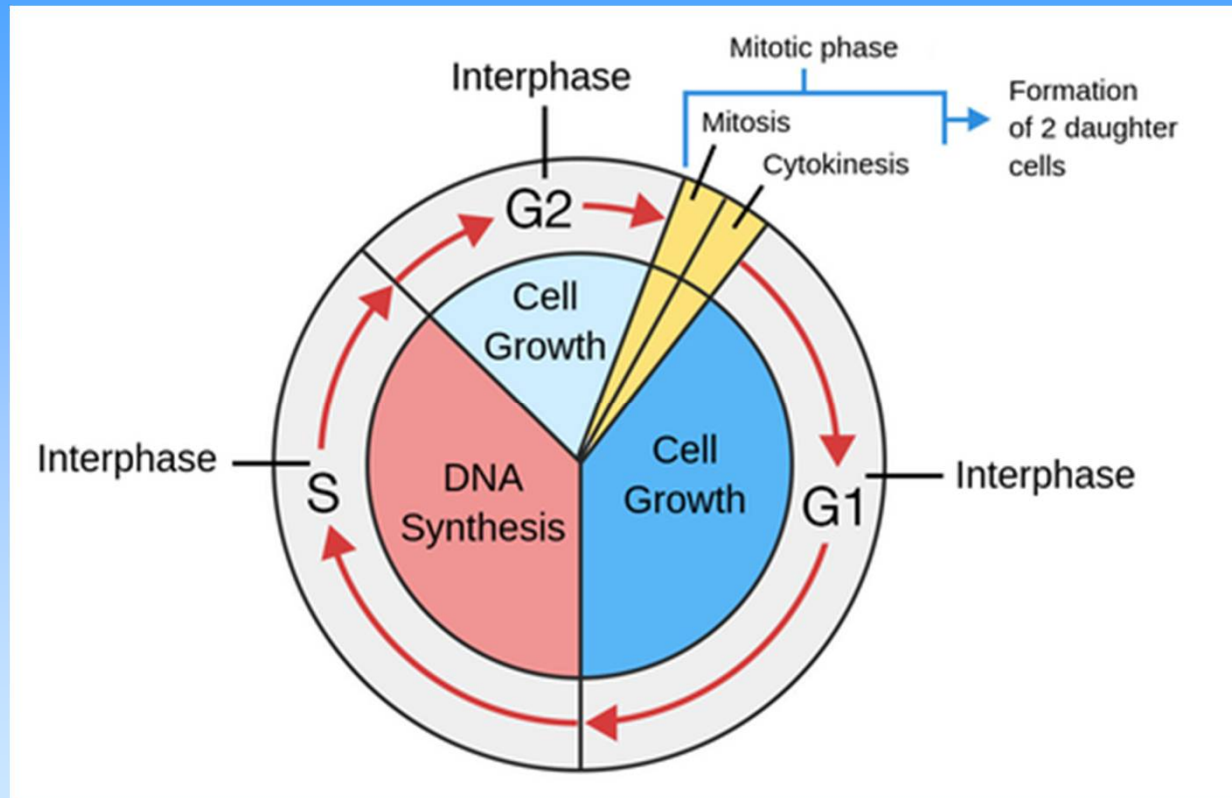


12) Buněčný cyklus a apoptóza



Bruce Alberts

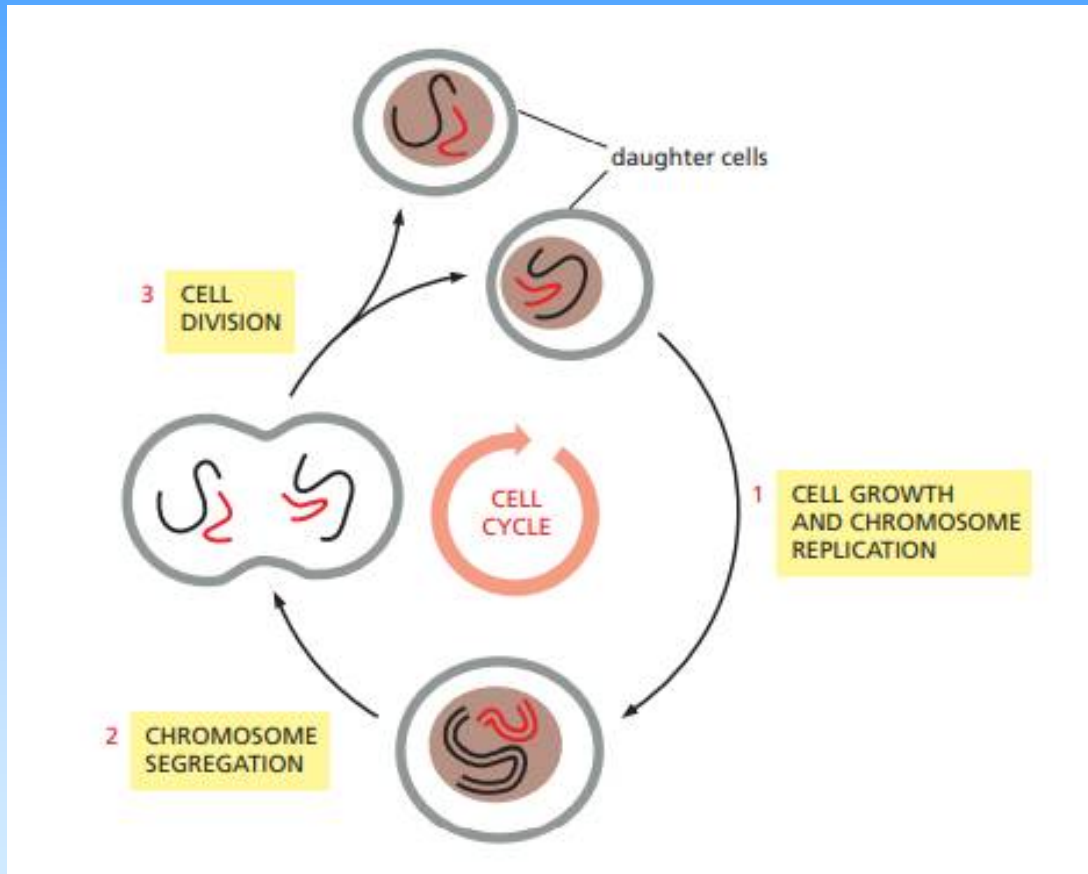
Martin Fellner, LRR, Přf UP v Olomouci

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

Buněčný cyklus

2

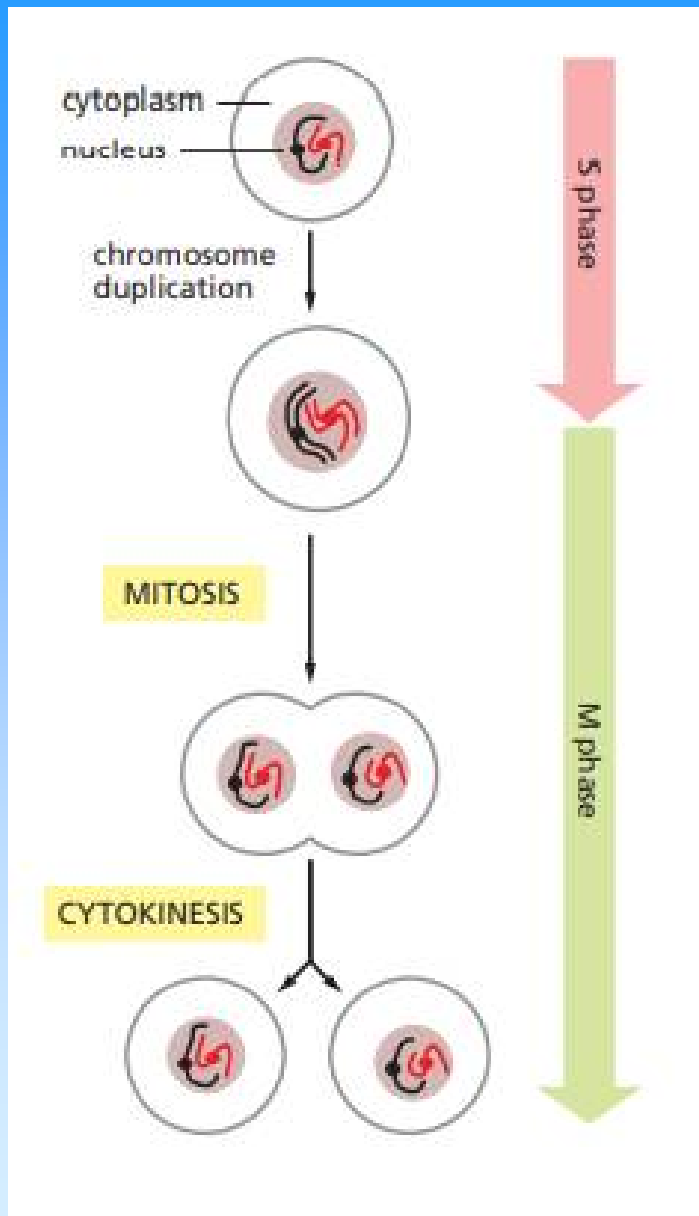
Jediný způsob, jak vytvořit novou buňku, je duplikovat buňku, která již existuje. Tento fakt byl poprvé zjištěn v polovině 19. století.



Buňka se reprodukuje =
duplikuje svůj obsah a poté
se rozdělí na dvě části.

Buněčný cyklus = základní
mechanismus, kterým se
všechny organizmy rozmnožují.

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



Dvě základní fáze buněčného cyklu:

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

M fáze (**m**itóza); < 1 hodina

- jaderné dělení (mitóza) – distribuce zkopírovaných chromozomů do páru dceřiných buněk
- cytoplazmatické dělení (cytokineze) – rozdělení buňky na 2 části

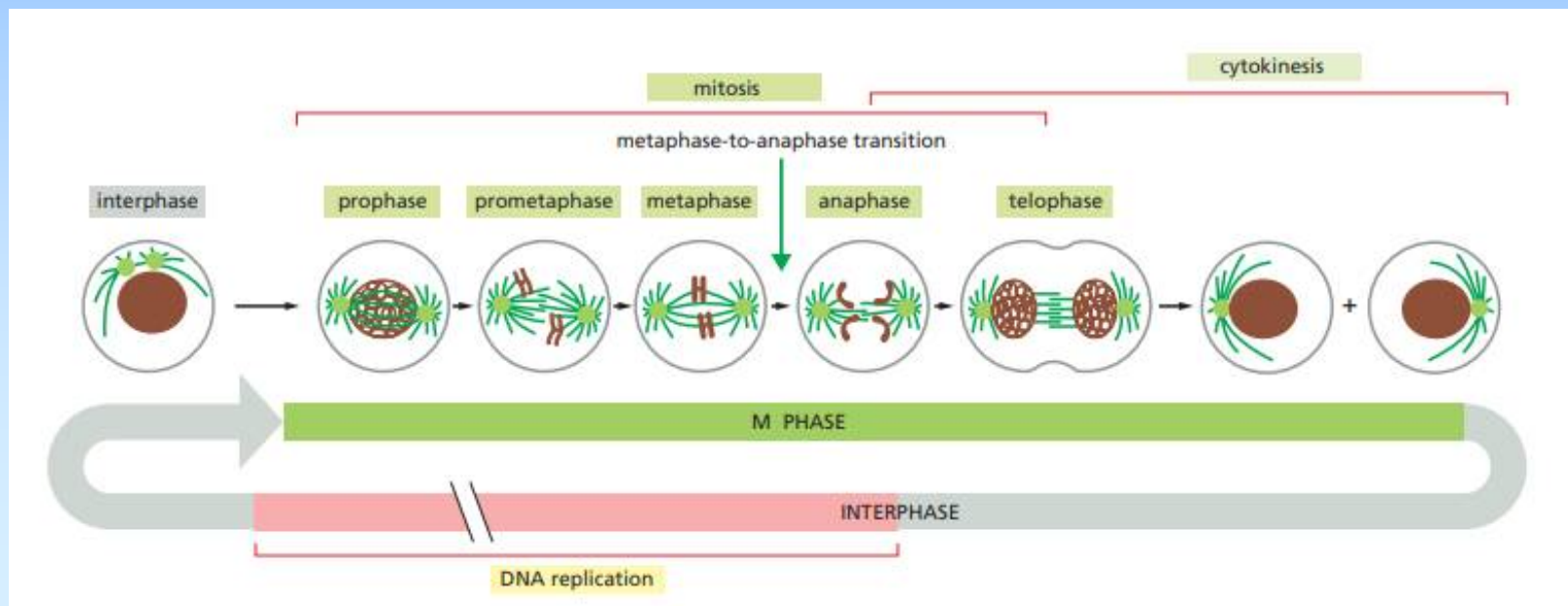
Konec **S-fáze** – molekuly DNA duplikovaných chromozomů jsou propleteny a drženy pohromadě specializovanými proteinovými vazbami

Začátek **M-fáze** – **profáze**: dvě molekuly DNA se oddělují => vznik **sesterských chromatid**

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

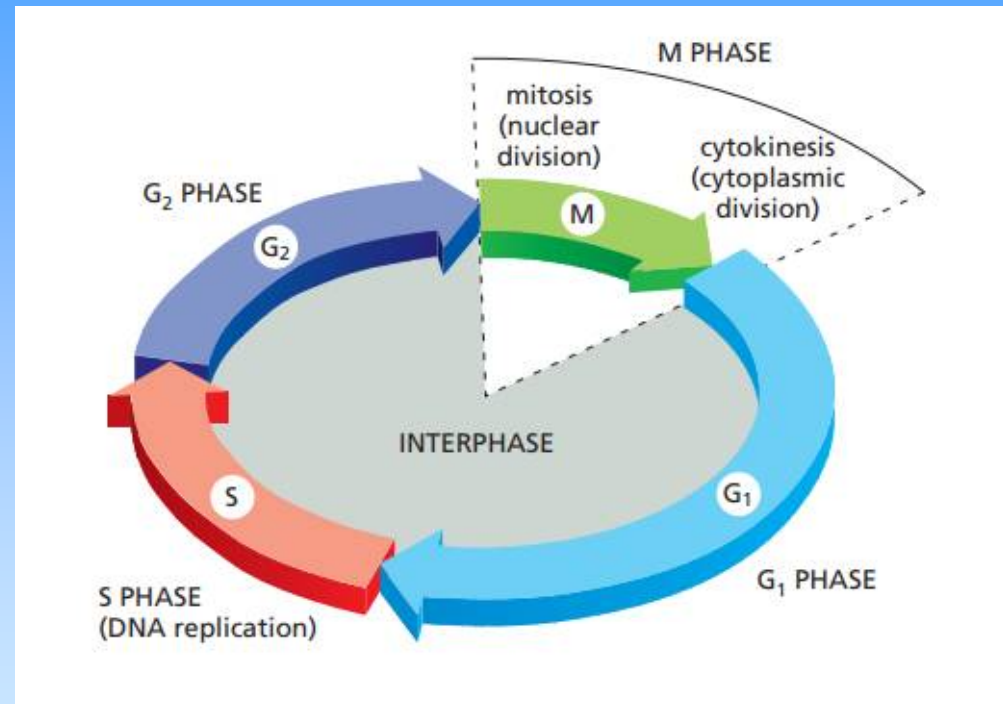


Eukaryotický buněčný cyklus se skládá ze 4 fází: G_1 , S, G_2 a M

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 - **čas pro růst buněk**:

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

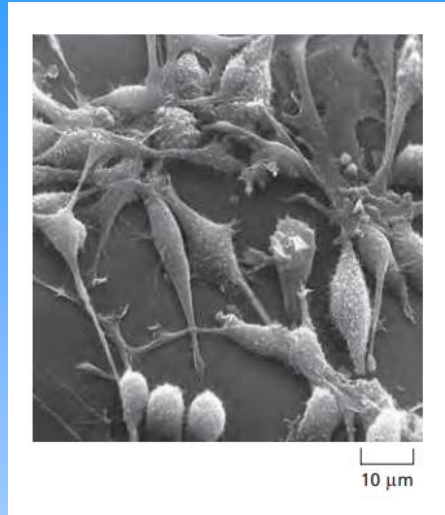
Interfáze v lidské buňce v kultuře může trvat 23 hodin, 1 hodinu trvá M fáze.



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.

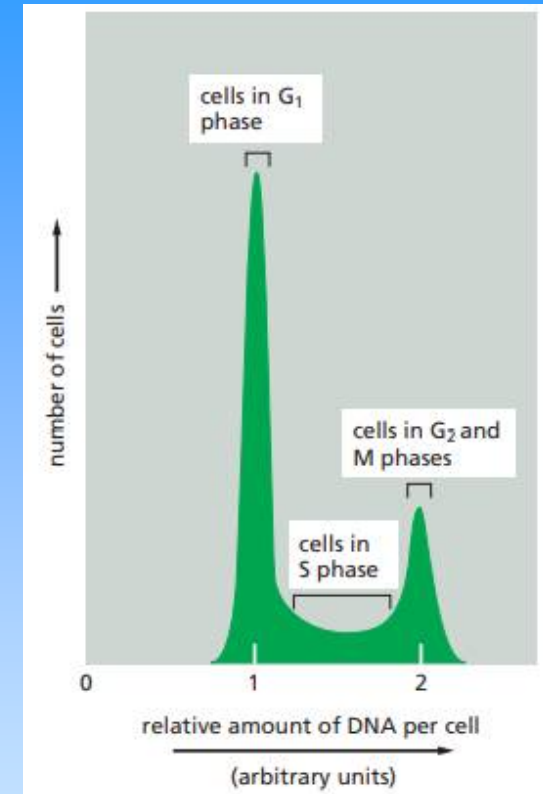
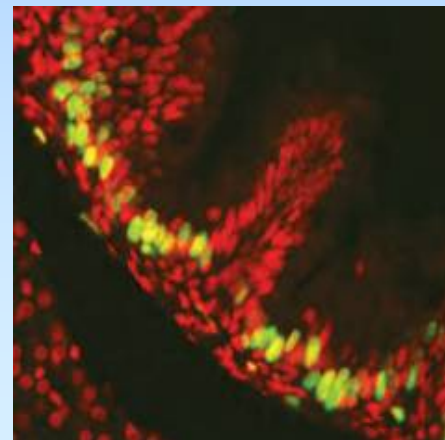
Fluorescenční barviva vázající se k DNA

Protilátky - 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



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

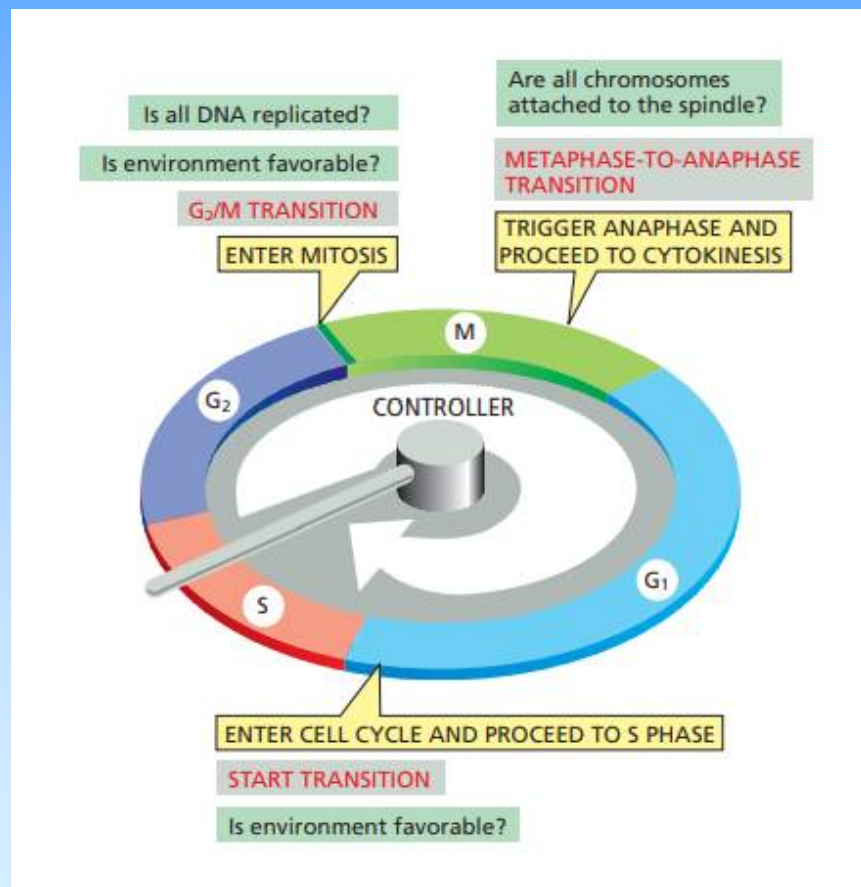


Měření obsahu DNA - během S fáze se zdvojnásobuje.

Fluorescenční barviva vázající DNA - průtokový cytometr - umožňuje rychlou a automatickou analýzu velkého počtu buněk

System řízení buněčného cyklu

Konec 80. let - identifikace klíčových proteinů řídicího systému a proteinů, které jsou zapojeny do procesu replikace DNA a segregace chromozomů.

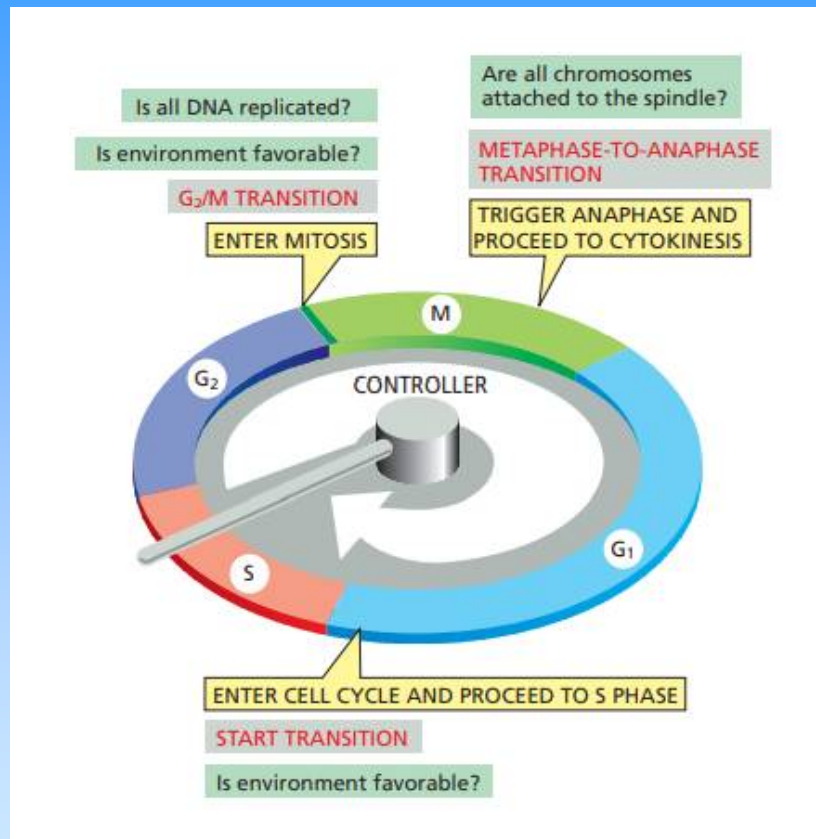


System řízení buněčného cyklu = časovač, který spouští události buněčného cyklu v nastavené sekvenci.

Ve většině buněk řídicí systém reaguje na informace přijaté zpět od procesů, které řídí.

Příklad: 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 = **system biochemických přepínačů** – každý spouští specifickou událost buněčného cyklu.



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

2. Řídicí systém buněčného cyklu je robustní a spolehlivý – záložní mechanismy

3. Kontrolní systém je vysoce adaptabilní – reaguje na specifické intracelulární a extracelulární signály.

Tři hlavní regulační přechody:

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

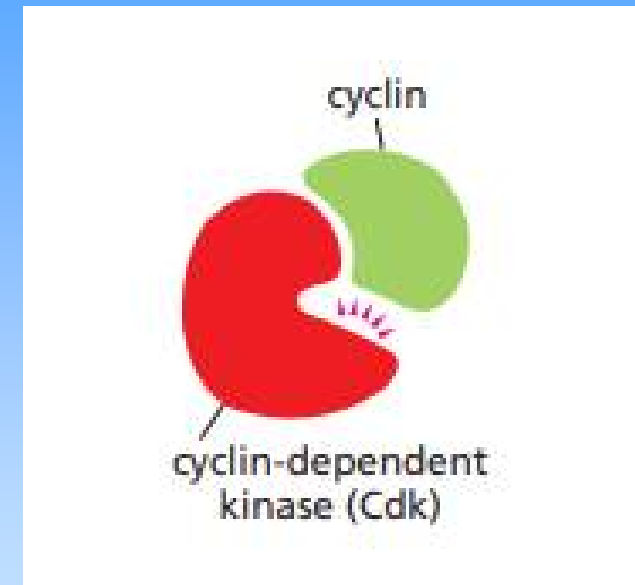
2) **Přechod G₂/M** – řídicí systém spouští rané mitotické události – zarovnání chromozomů v mitotickém vřeténku

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)**.

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.

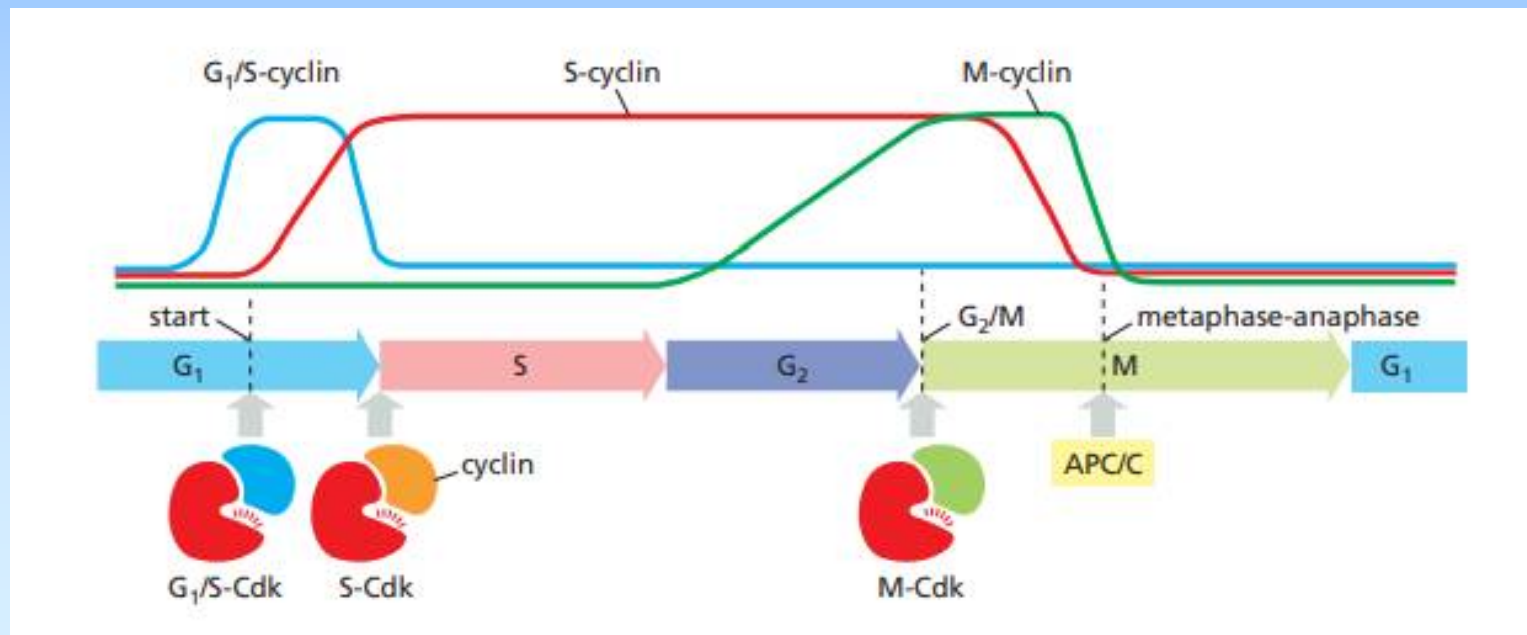


Cykliny – procházejí cyklem syntézy a degradace v každém buněčném cyklu. Hladiny Cdk proteinů jsou naopak konstantní. Cyklické změny hladin cyklinového proteinu vedou k cyklickému sestavení a aktivaci **komplexů cyklin-Cdk** ve specifických fázích buněčného cyklu.

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 jsou vysoké až 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

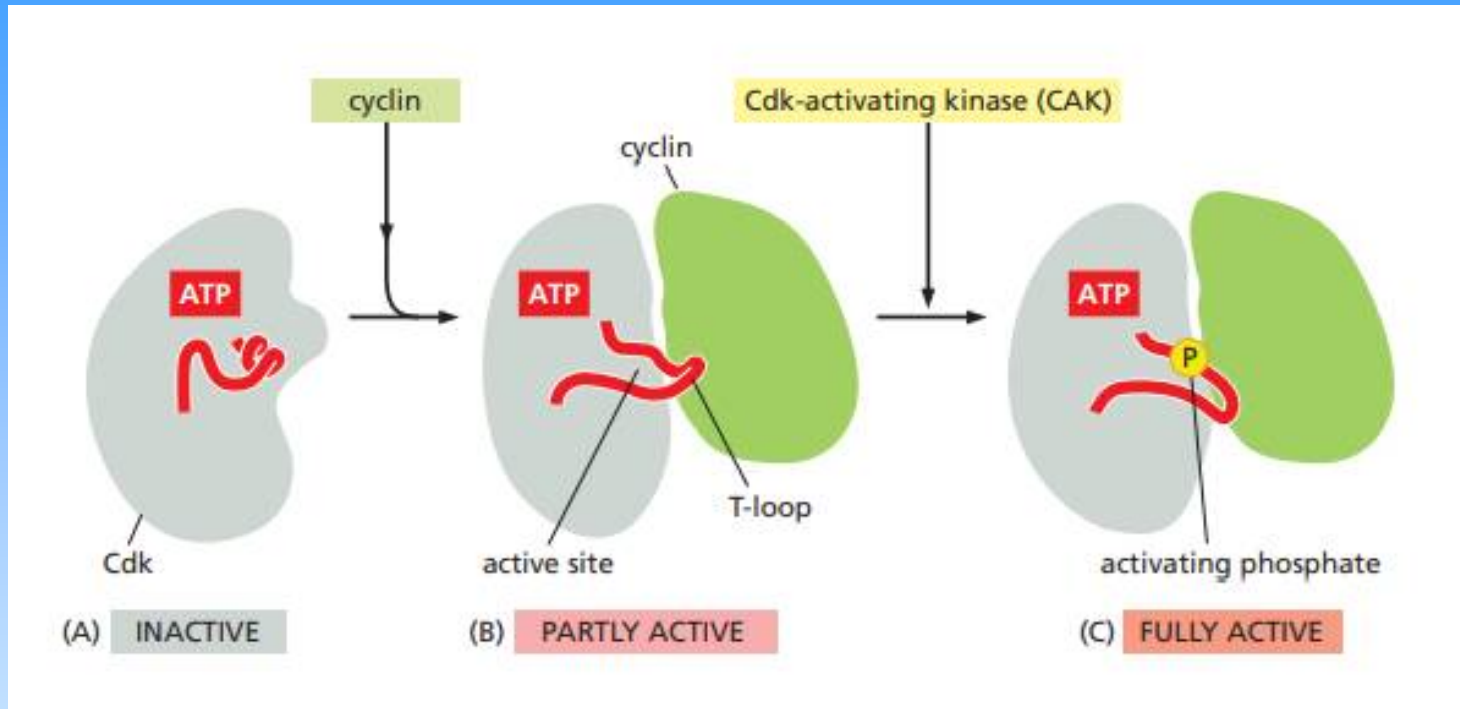
Cyclin-Cdk complex	Vertebrates		Budding yeast	
	Cyclin	Cdk partner	Cyclin	Cdk partner
G ₁ -Cdk	Cyclin D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G ₁ /S-Cdk	Cyclin E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	Cyclin A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
M-Cdk	Cyclin B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

* 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: Cyklin 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.

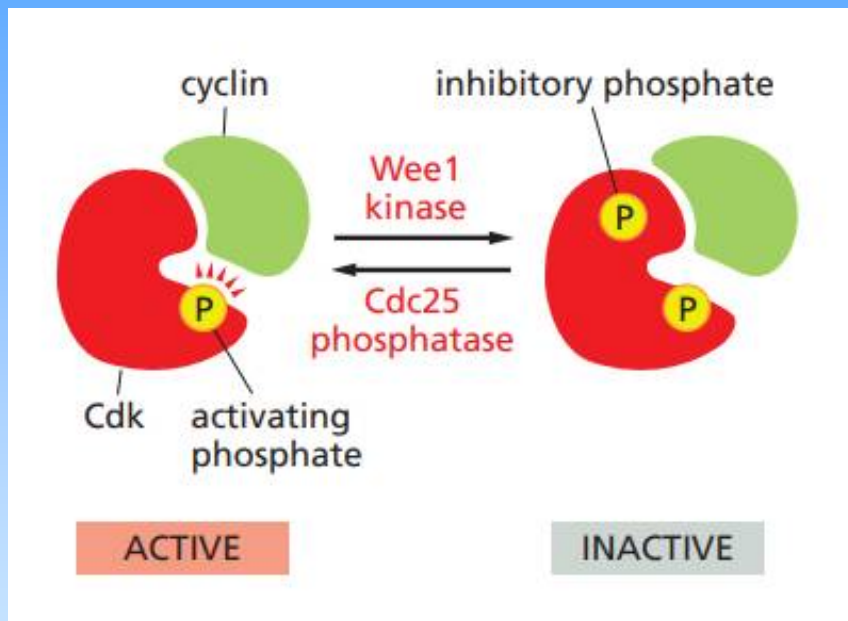


Vazba cyklinu – smyčka se vzdaluje od aktivního místa => částečná aktivace enzymu Cdk

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.

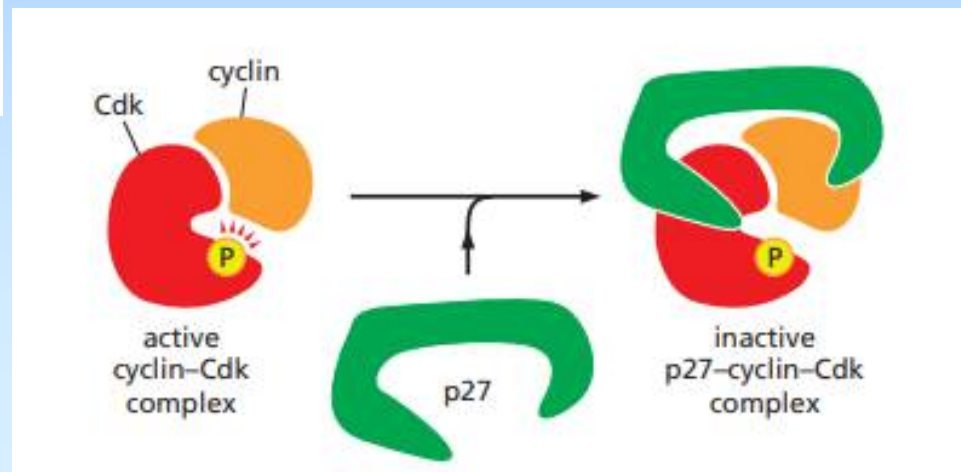
Aktivitu Cdk lze potlačit inhibiční fosforylací a specifickými inhibičními proteiny Cdk (CKI).

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



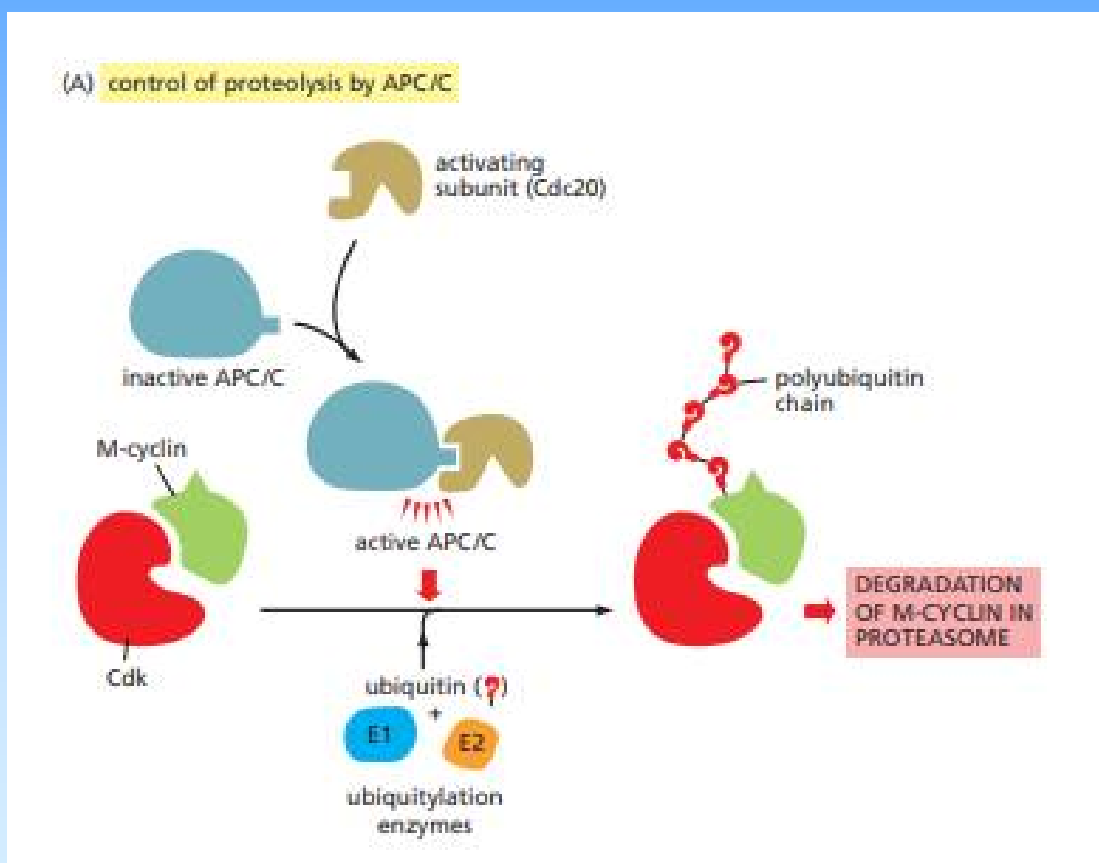
Snížení aktivity komplexu cyklin-Cdk: fosforylace páru aminokyselin ve střeše aktivního místa kinázou **Wee1**

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



Regulovaná proteolýza spouští přechod **z metafáze do anafáze**.

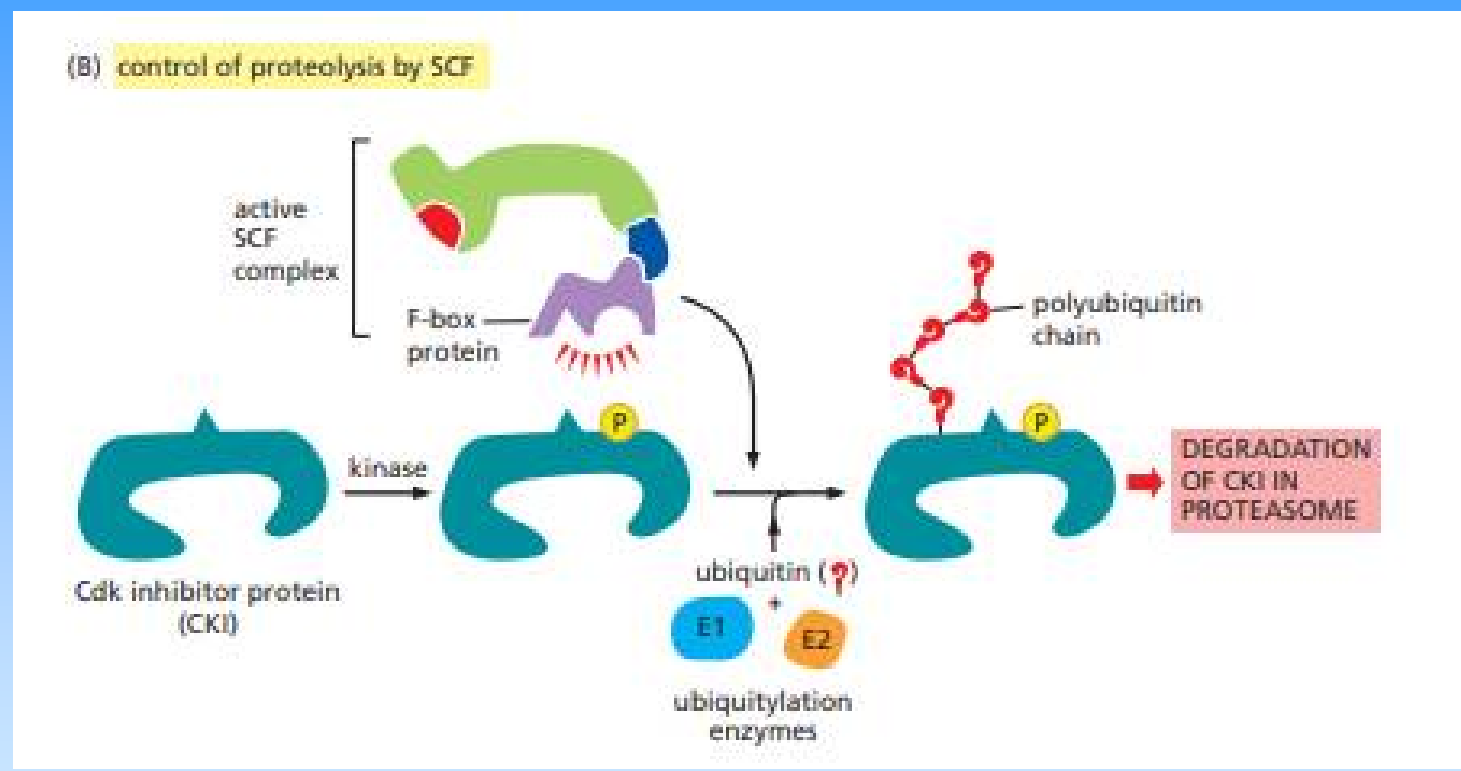
Klíčovým regulátorem přechodu z metafáze do anafáze je komplex podporující anafázi neboli **cyklozom (APC/C)** – ubiquitin ligáza – katalyzuje ubiquitinaci:



- **Securinu** – chrání proteinové vazby, které drží páry sesterských chromatid pohromadě v časně mitóze => oddělení sesterských chromatid => nástup anafáze

- **S-cyklinů a M-cyklinů** => inaktivace většiny proteinů v anafázi = nutné pro dokončení pozdní části M-fáze a cytokineze

Ubiquitin ligáza **SCF** – regulátor přechodu z **G1 do S-fáze** => řízení aktivace S-Cdk a replikace DNA. SCF je také zodpovědná za destrukci G₁/S-cyklinů v pozdní G₁ => aktivace S-Cdk a replikace DNA



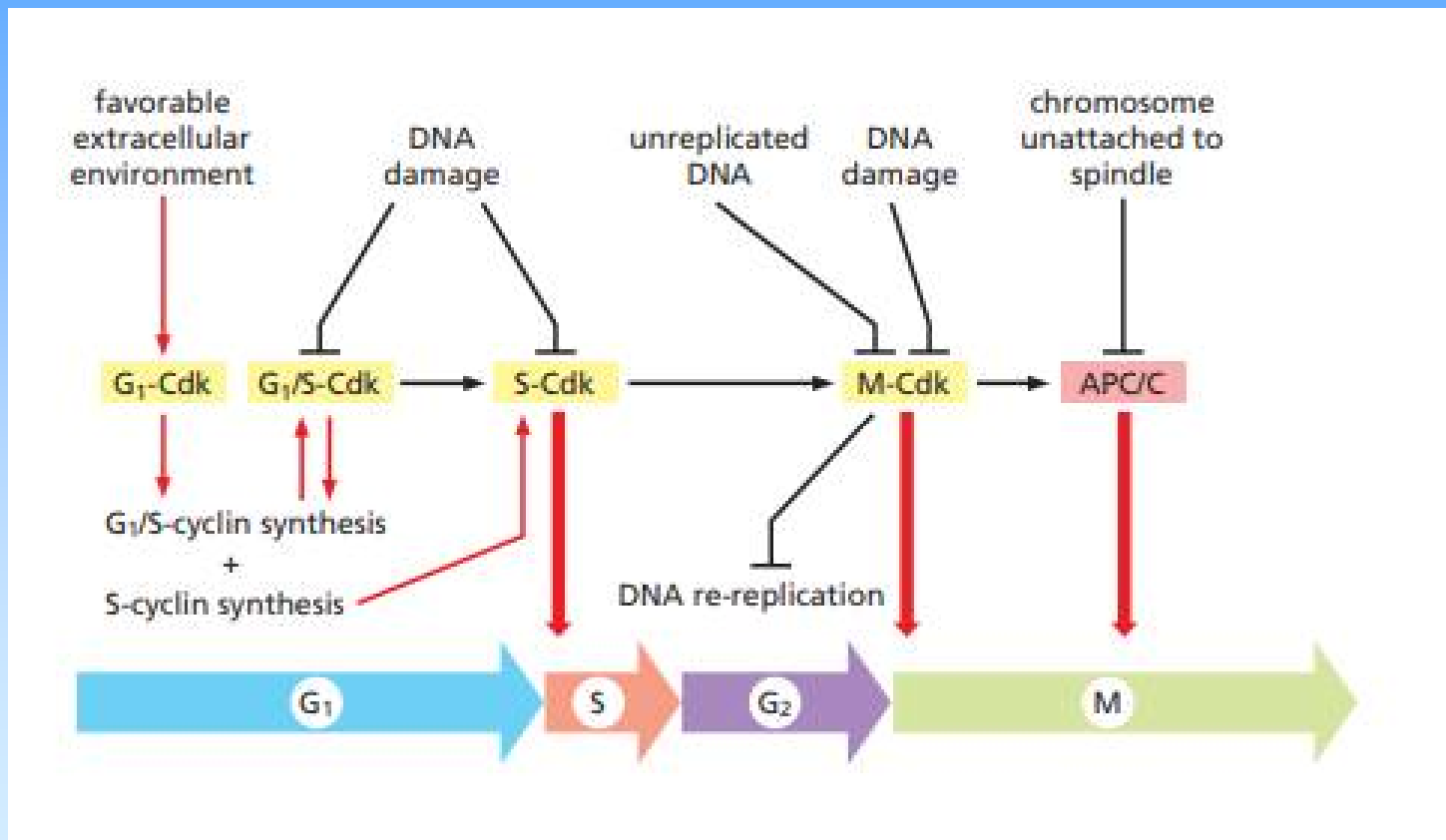
Aktivita SCF je během buněčného cyklu konstantní – aktivita je řízena změnami ve stavu fosforylace jeho cílových proteinů, protože podjednotky F-boxu rozpoznávají pouze specificky fosforylované proteiny.

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

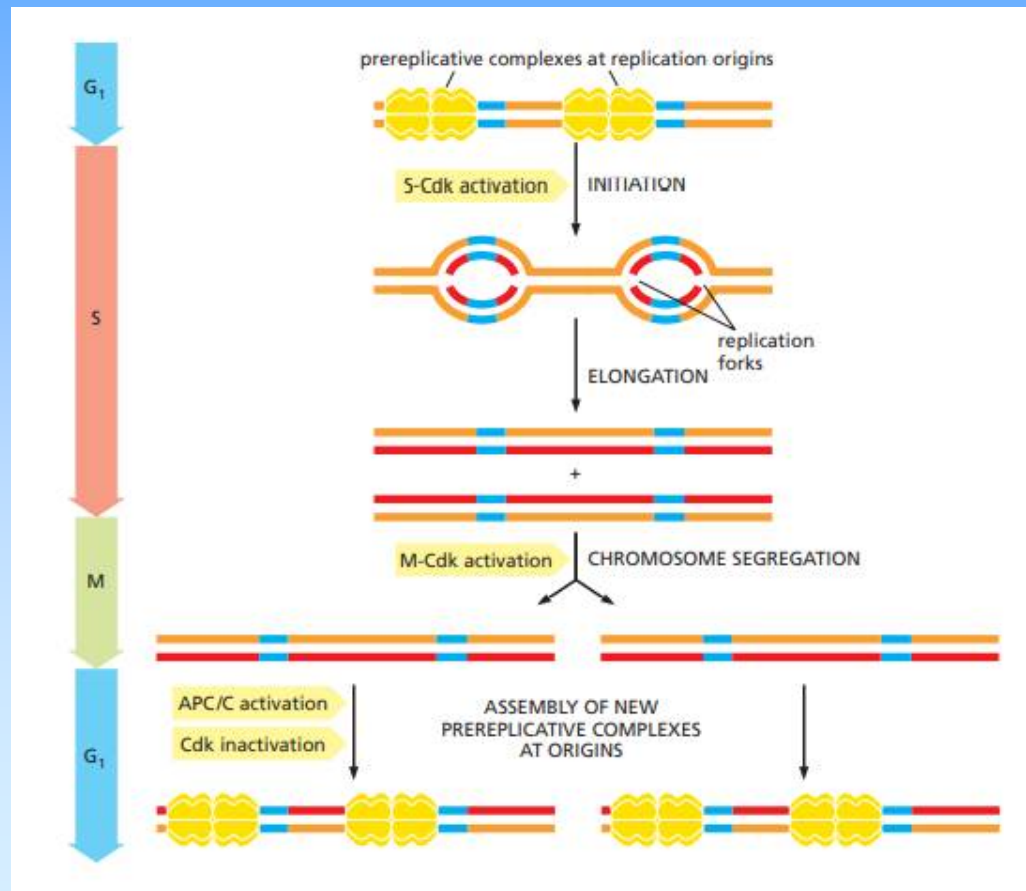
TABLE 17-2 Summary of the Major Cell Cycle Regulatory Proteins

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 pro proliferaci buněk – 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.

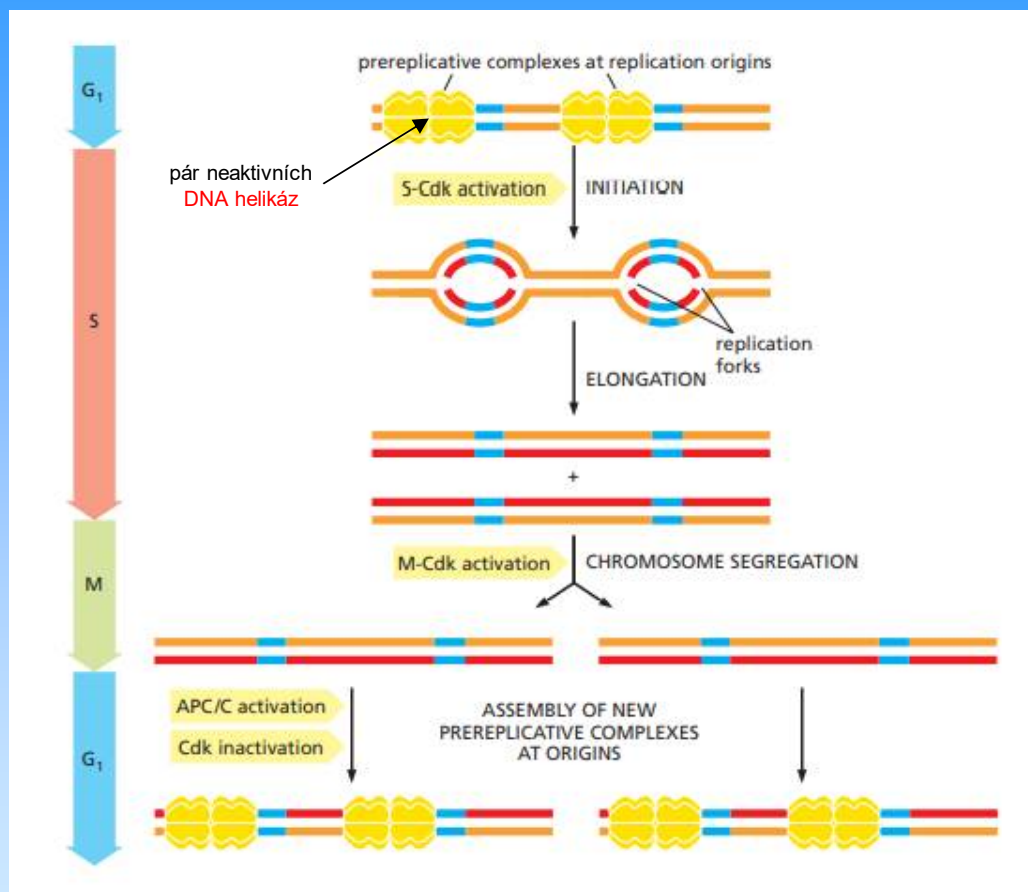


Replikace DNA = **dva problémy**

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.

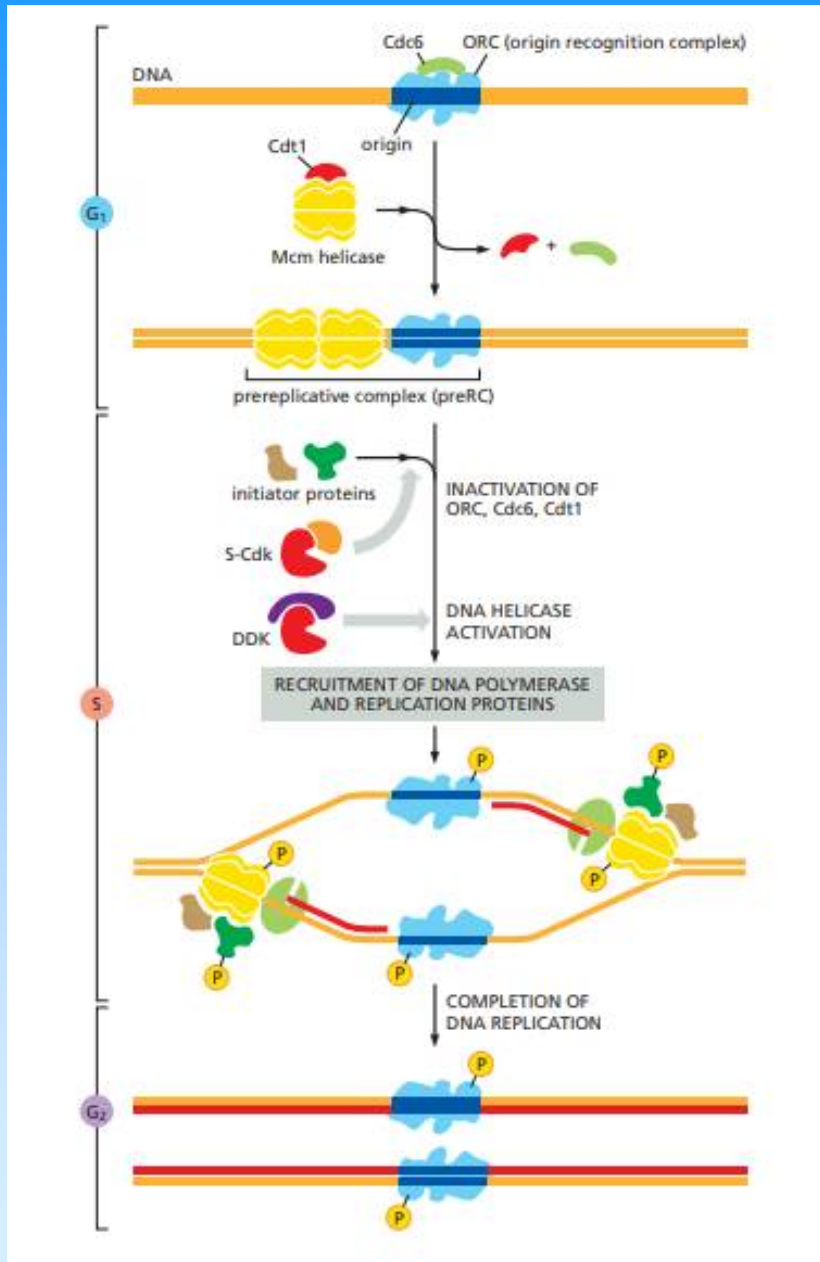
Iničiační fáze replikace DNA – dva kroky:

1) Nalezení počátku replikace - pár neaktivních DNA helikáz je navázán na počátek replikace => vznik komplexu prereplikativního komplexu (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 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; proteiny Cdc6 a Cdt1 spolupracují s ORC – připojení neaktivní DNA helicázy na počátek replikace => vznik **preRC** => možnost zahájení replikace.

Začátek S fáze – S-Cdk spouští aktivaci počátku fosforylací specifických iniciačních proteinů => aktivace DNA helicázy. Proteinkináza DDK je aktivována a aktivuje specifické podjednotky DNA helicázy (fosforylací).

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

Duplikace chromozomů vyžaduje **duplikaci chromatinové struktury**.

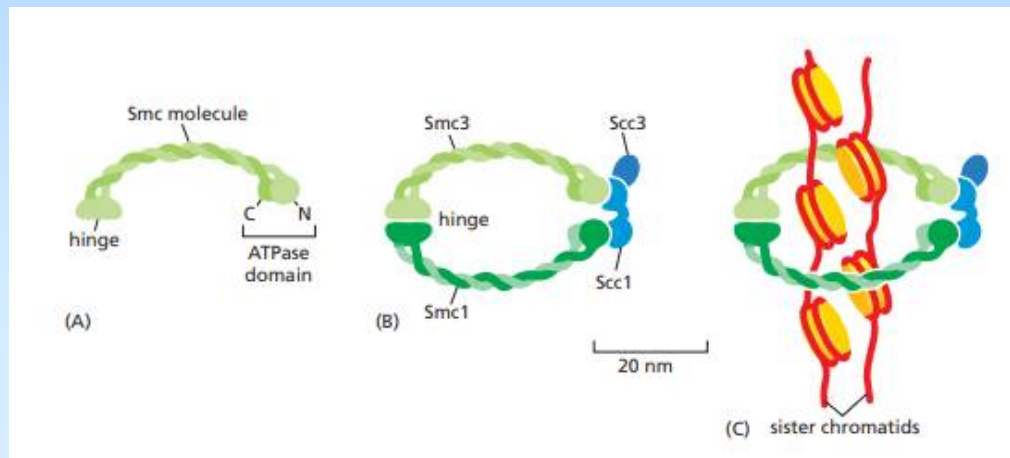
DNA chromozomů je zabalena různými proteiny, včetně histonů a různých regulačních proteinů zapojených do řízení genové exprese => potřeba duplikace těchto chromatinových proteinů a správné zabalení nově syntetizované DNA.

Produkce chromatinových proteinů se zvyšuje **během S fáze**.

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**.

Reprodukce chromatinové struktury není zatím zcela objasněna.

Konec S fáze - každý replikovaný chromozom se skládá z páru identických sesterských chromatid – chromatidy drží pohromadě díky proteinu **kohezinu (SMC proteiny)**.



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

M fáze začíná **mitózou** – sesterské chromatidy jsou odděleny a distribuovány do páru identických dceřiných jader.

5 stádií mitózy – profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze – definovaných na základě chování chromozomů pod mikroskopem.

Cytokineze – druhá hlavní událost M fáze – rozdělení buňky na dvě poloviny; každá buňka 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; M-Cdk fosforyluje různé proteiny => sestavení mitotického vřeténka a jeho připojení k párům sesterských chromatid.

2) Druhá hlavní část mitózy – začíná na **přechodu z metafáze do anafáze**: destrukce sekurinu vlivem cyklozomu APC/C a uvolnění proteáz => štěpení kohezinu => oddělení 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.

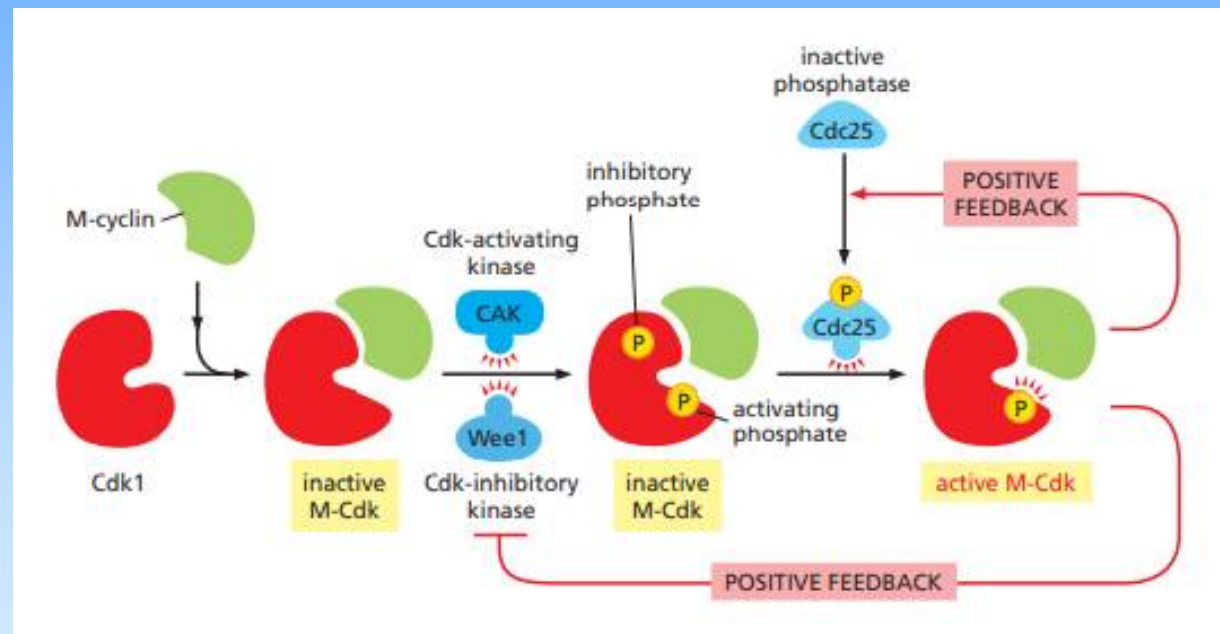
Protein kináza M-Cdk pohání vstup do mitózy:

- 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.

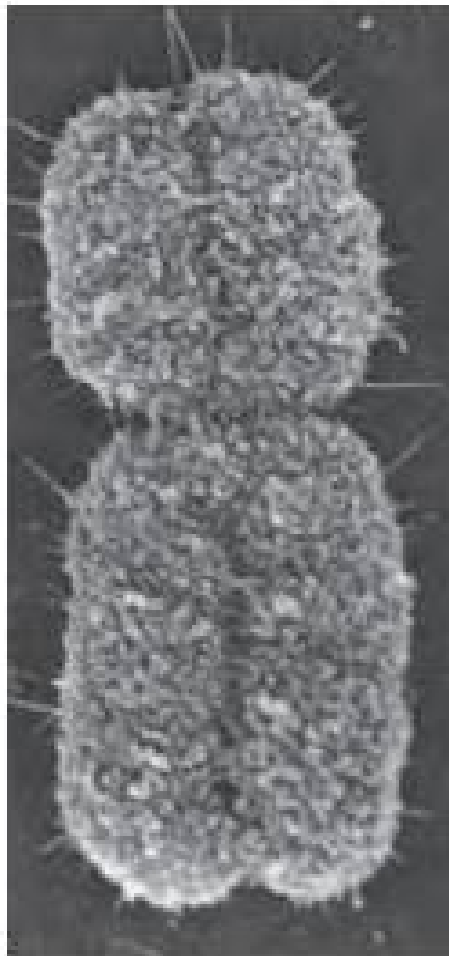
Na konci G_2 obsahuje buňka zásobu M-Cdk, která je aktivovaná a připravená působit, ale je potlačena fosfáty, které blokují aktivní místo kinázy.

Co tedy spouští aktivaci zásob M-Cdk?



1) Aktivace proteinové fosfatázy Cdc25, která odstraňuje inhibiční fosfáty. 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.



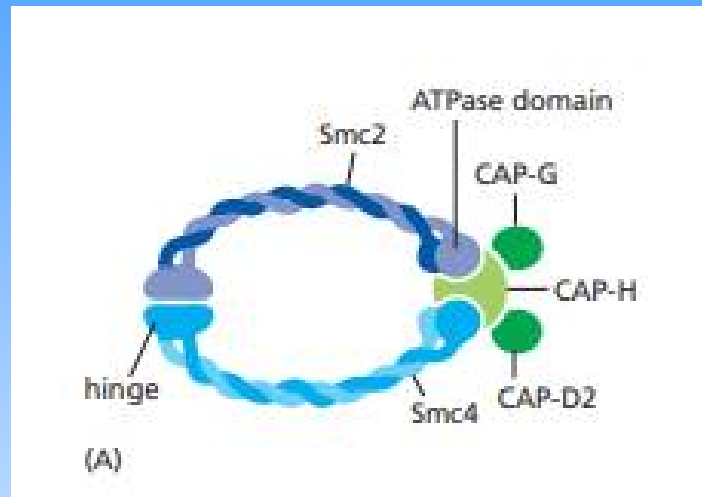
Buňka potřebuje velké množství energie na reorganizaci sesterských chromatid do krátkých struktur, které lze v anafázi snadněji oddělit.

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 pěti-podjednotkovém proteinovém komplexu - **kondenzinu**.

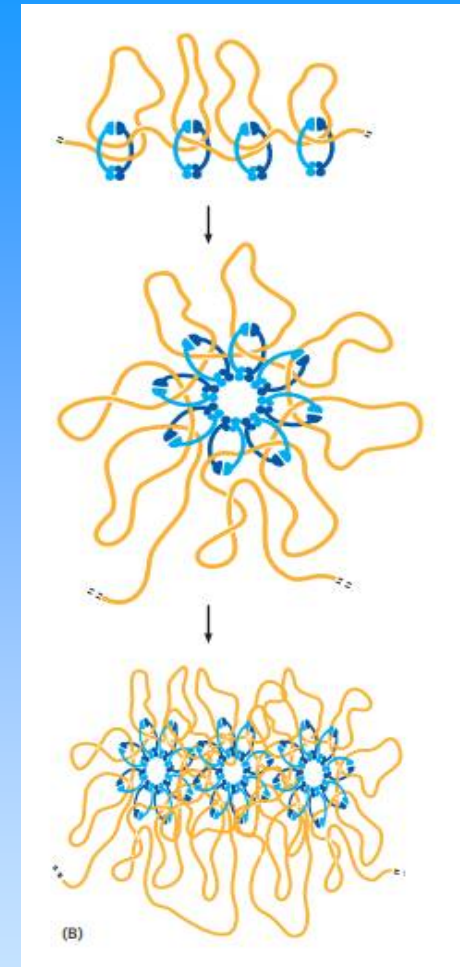
Kondenzin obsahuje dvě podjednotky Smc2 a Sma4 a tři podjednotky odlišné od SMC.



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

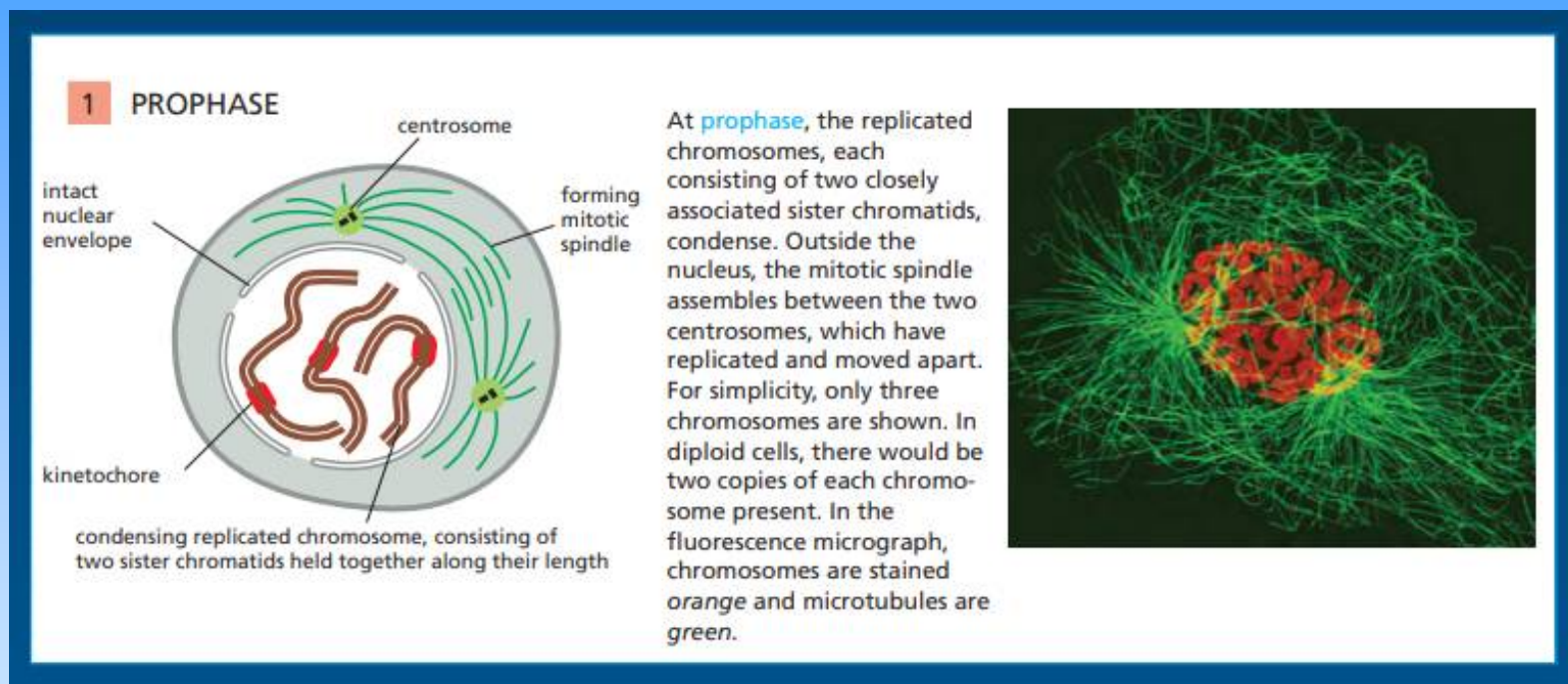
Kondensin je schopen změnit svinutí molekul DNA - důležité pro kondenzaci chromozomů během mitózy.

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 na **mitotickém vřeténku**.



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 v časně mitóze paralelně s restrukturalizací chromozomů.

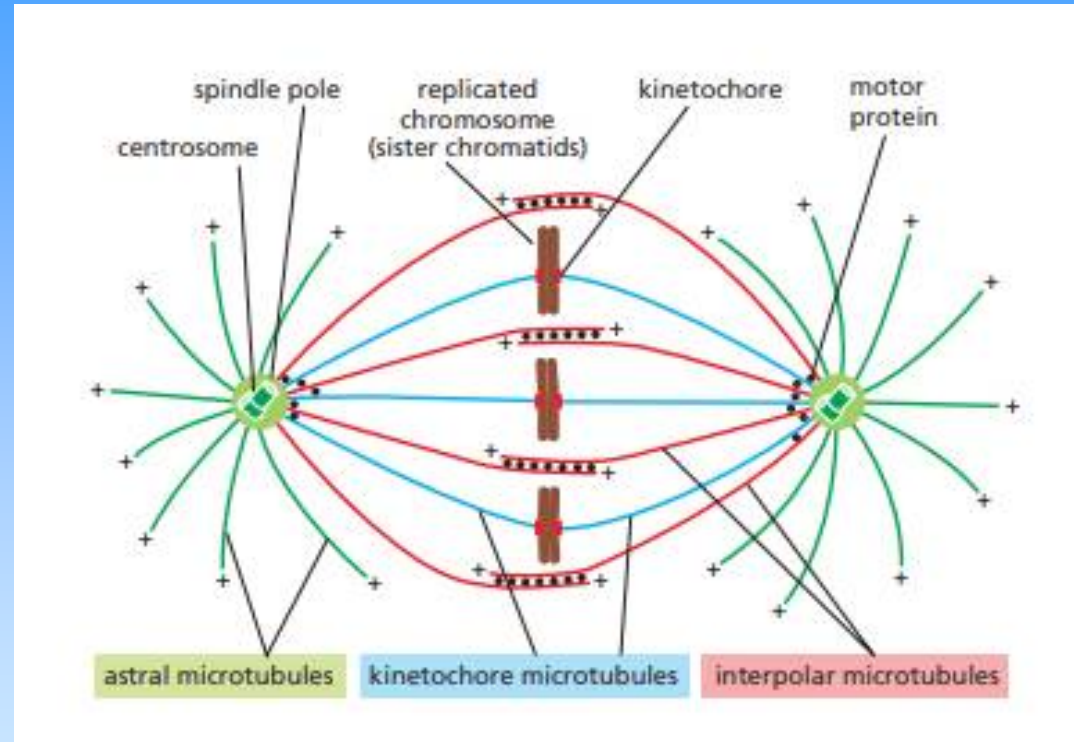
Jádrem mitotického vřeténka je bipolární pole mikrotubulů – záporné konce jsou umístěny na pólech vřeténka a plusové konce směřují ven z pólů.

3 typy mikrotubulů:

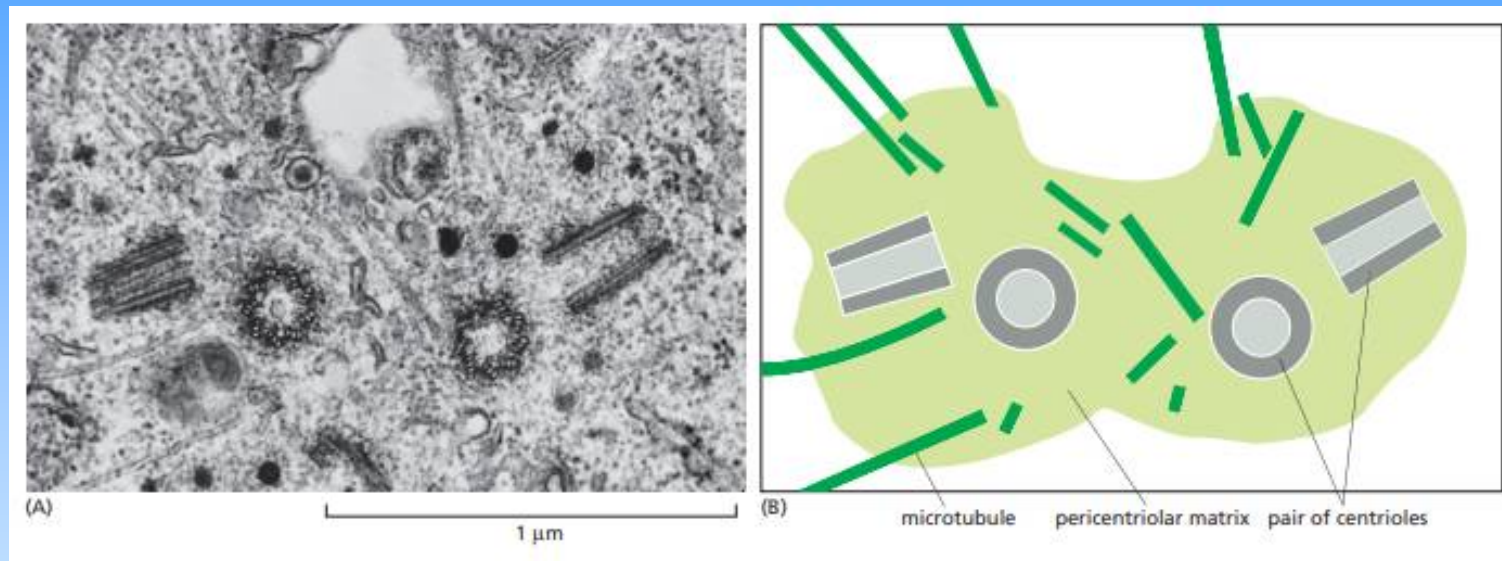
1) Interpolární mikrotubuly – kladné konce se překrývají s kladnými konci mikrotubulů z druhého pólu => vznik antiparalelního pole ve střední zóně vřeténka.

2) Kinetochorové mikrotubuly – plusové konce jsou připojeny k sesterským 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 vřeténko v buňce.



Ve většině somatických živočišných buněk je každý pól vřeténka lokalizován v proteinové organelle zvané **centrozom**. Každý centrozom 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 minusové konce jsou spojené s centrozomem.

Buňky vyšších rostlin a oocyty mnoha obratlovců centrozomy nemají.

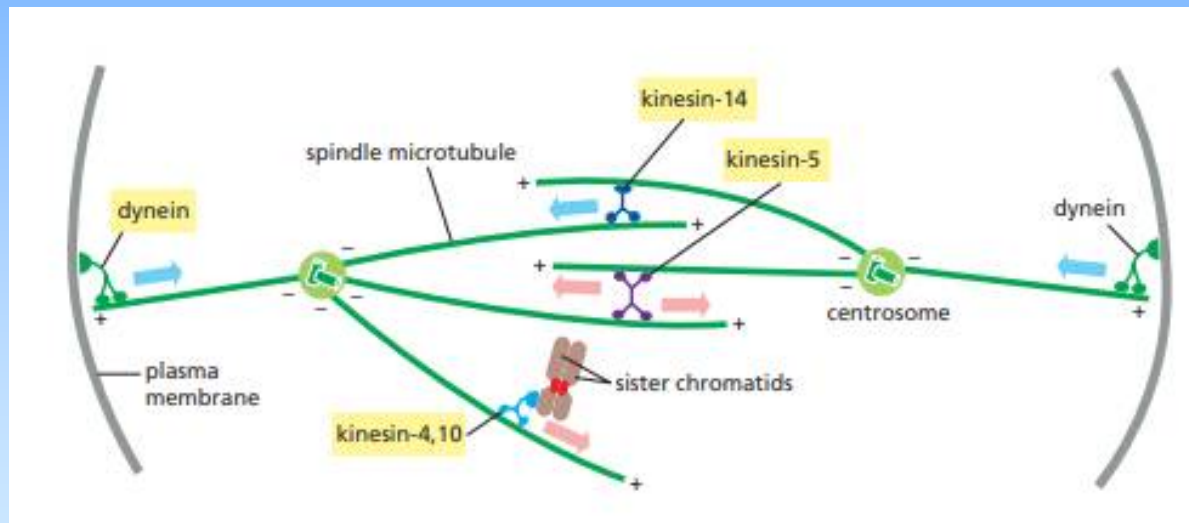
Sestavení a funkci dělicího vřeténka řídí motorické proteiny závislé na mikrotubulech.

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 – zvláště důležité při sestavování a funkci vřeténka



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

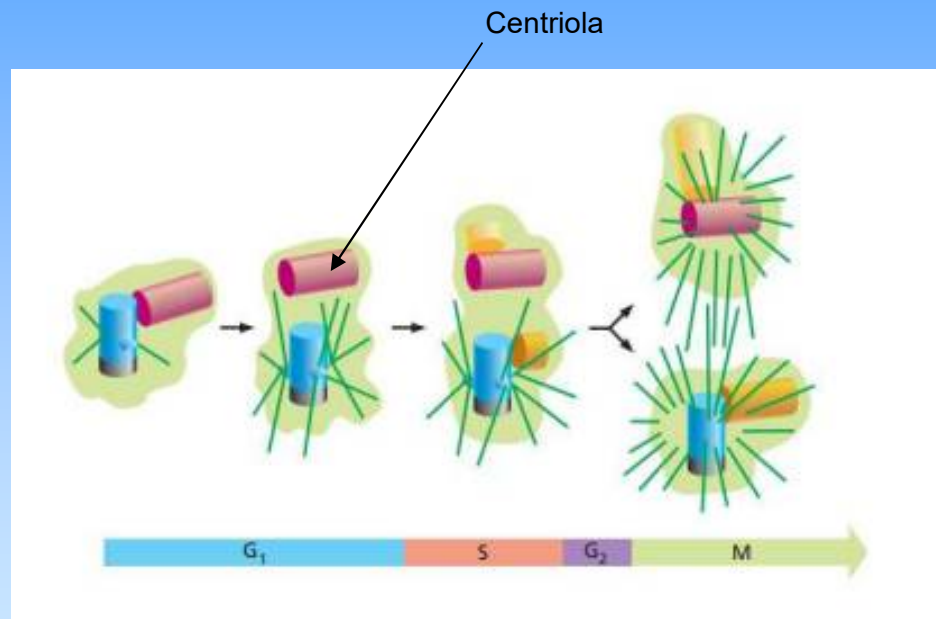
Kinesin-14 – zesiluje antiparalelní interpolární mikrotubuly ve střední zóně vřetena a má tendenci přitahovat póly k sobě.

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 se složkami aktinového cytoskeletu v buněčné kůře; pohybem směrem k minus konci mikrotubulů táhne dynein 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. G_1/S -Cdk spouští vstup do buněčného cyklu a pomáhá zahájit duplikaci centrozomů.

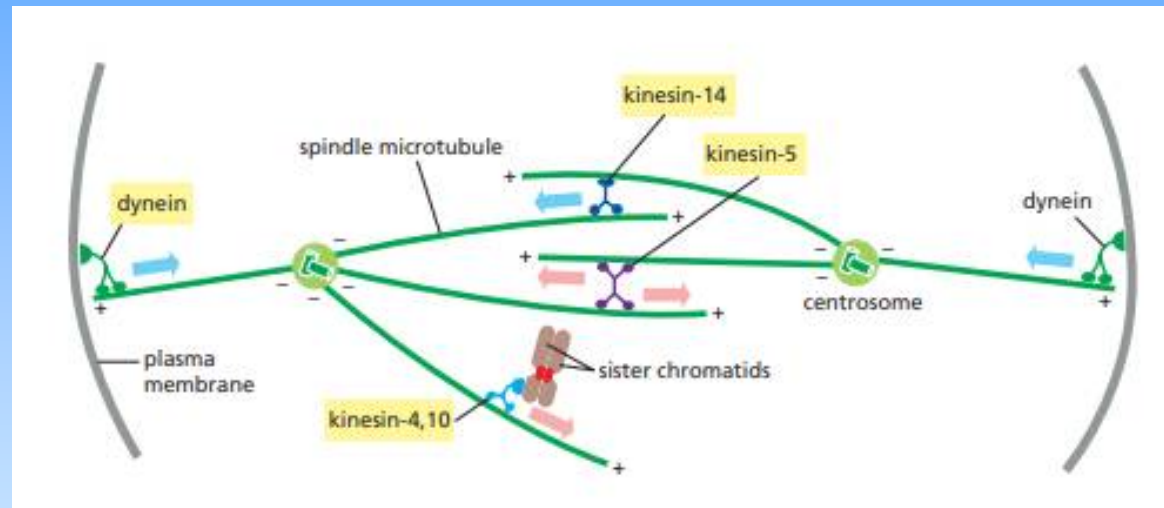
Dvě centrioly v centrozomu se oddělí a každá generuje tvorbu jedné nové centrioly => vznik 2 párů centriol. Pár centrozomů zůstává pohromadě na jedné straně jádra, dokud buňka nevstoupí do mitózy.

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. **Dynein a kinesin-5** podporují separaci centrozomů a zvětšují 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 známy. **M-Cdk** a další mitotické proteinkinázy jsou nutné pro separaci a zrání centrozomů.

Dokončení montáže vřeténka v živočišných buňkách vyžaduje rozpad jaderné obálky.

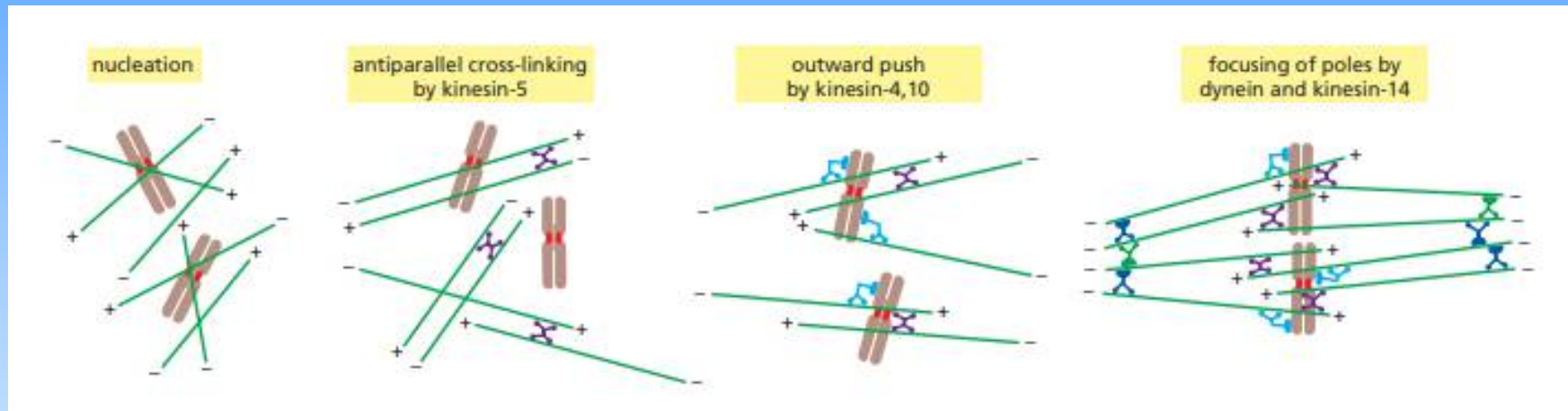


Rozpad jaderné obálky je složitý a vícestupňový proces:

- fosforylace podjednotek komplexů jaderných pórů vlivem M-Cdk => rozklad komplexů jaderných pórů a jejich oddělení od obalu.
- fosforylace 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.

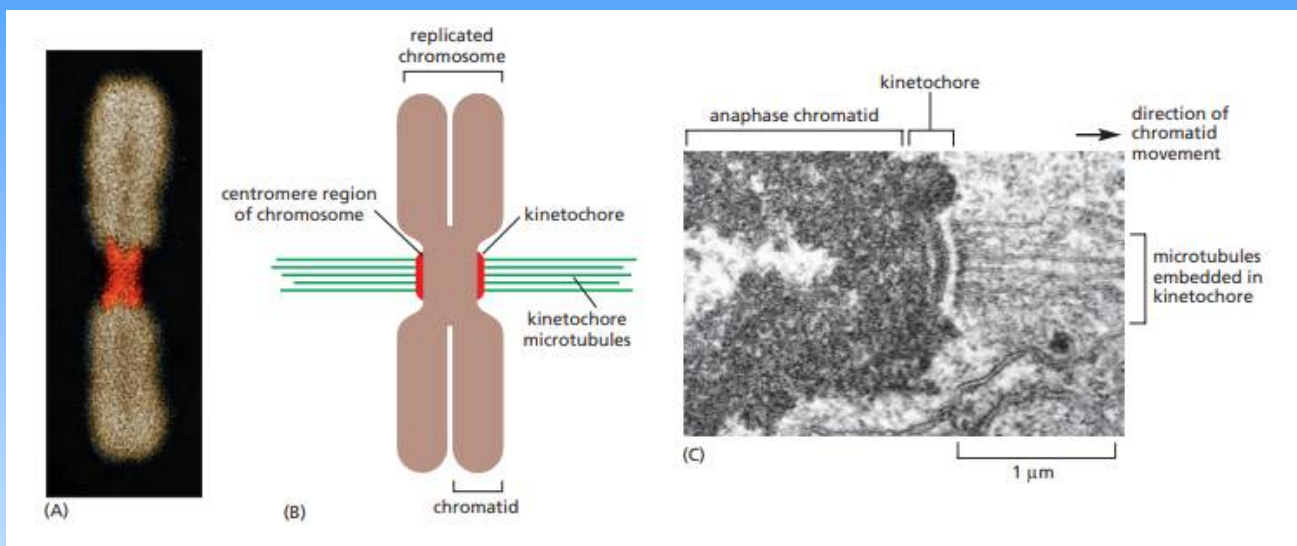


Aktivita chromozomů závisí na guaninovém nukleotidovém výměnném faktoru (GEF), který je vázán na chromatin – GEF stimuluje malou GTPázu v cytosolu nazývanou Ran-GTP.

Aktivovaná Ran-GTP uvolňuje proteiny stabilizující mikrotubuly z proteinových komplexů v cytosolu => stimulace lokální nukleace a stabilizace mikrotubulů kolem chromozomů.

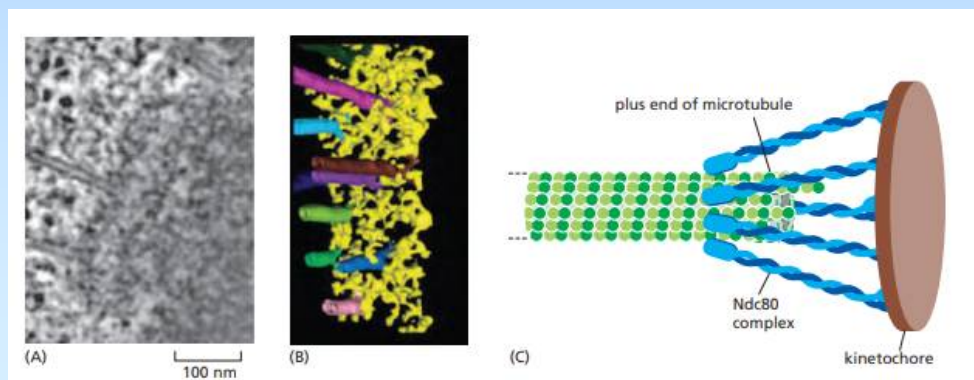
Kinetochoxy připojují sesterské chromatidy k vřetenku.

Po sestavení bipolárního dělicího vřetenka dochází k připojení mikrotubulů k párům sesterských chromatid. Mikrotubuly dělicího vřetenka se připojují ke každé chromatidě v jejím **kinetochoru** = vícevrstvá proteinová struktura, která je vybudována v centromerické oblasti chromatidy.



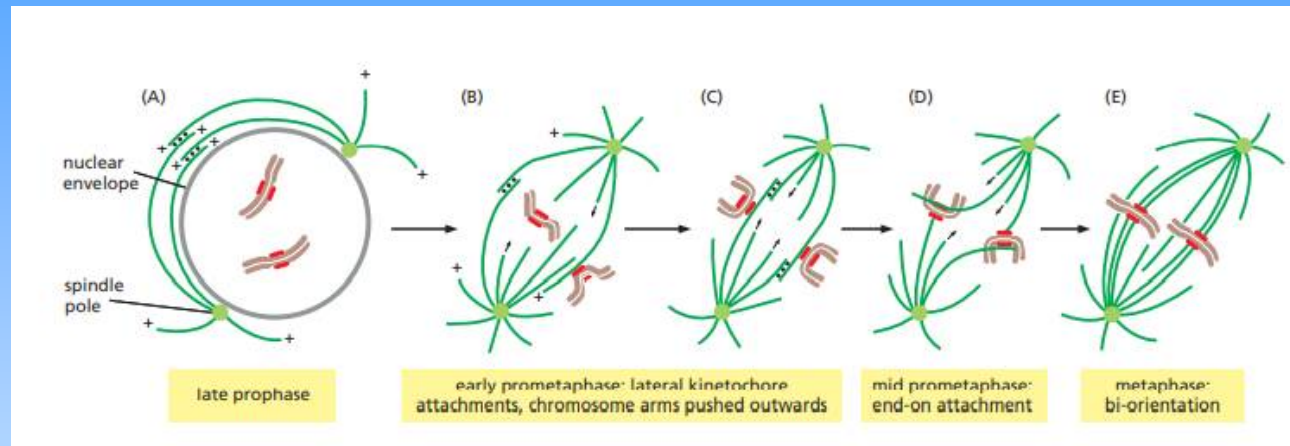
Kinetochox může vázat 10–40 mikrotubulů. Přichycení každého mikrotubulu závisí na více kopiích proteinového komplexu ve tvaru tyčinky zvaného **komplex Ndc80**.

Ndc80 je na jednom konci ukotven ke kinetochoru a na druhém konci interaguje s mikrotubuly.



K připojení kinetochoru na dělicí vřeténko dochází složitým sledem událostí.

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



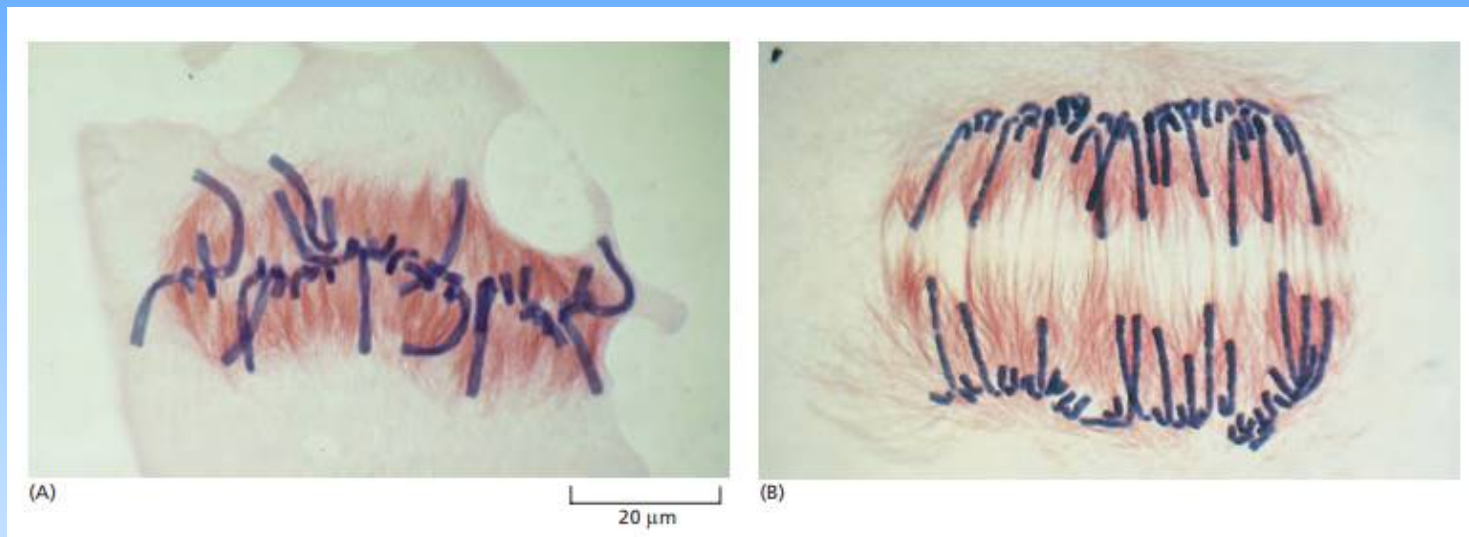
Po připojení sesterských chromatid k pólům chromozomy zaujmou polohu zvanou **metafázová destička**.

Na chromozomy ve vřeténku působí vícenásobné síly:

- 1) Síla táhnoucí kinetochor a jeho přidruženou chromatidu podél kinetochorového mikrotubulu směrem k pólu vřeténka. Je vyvolána 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.

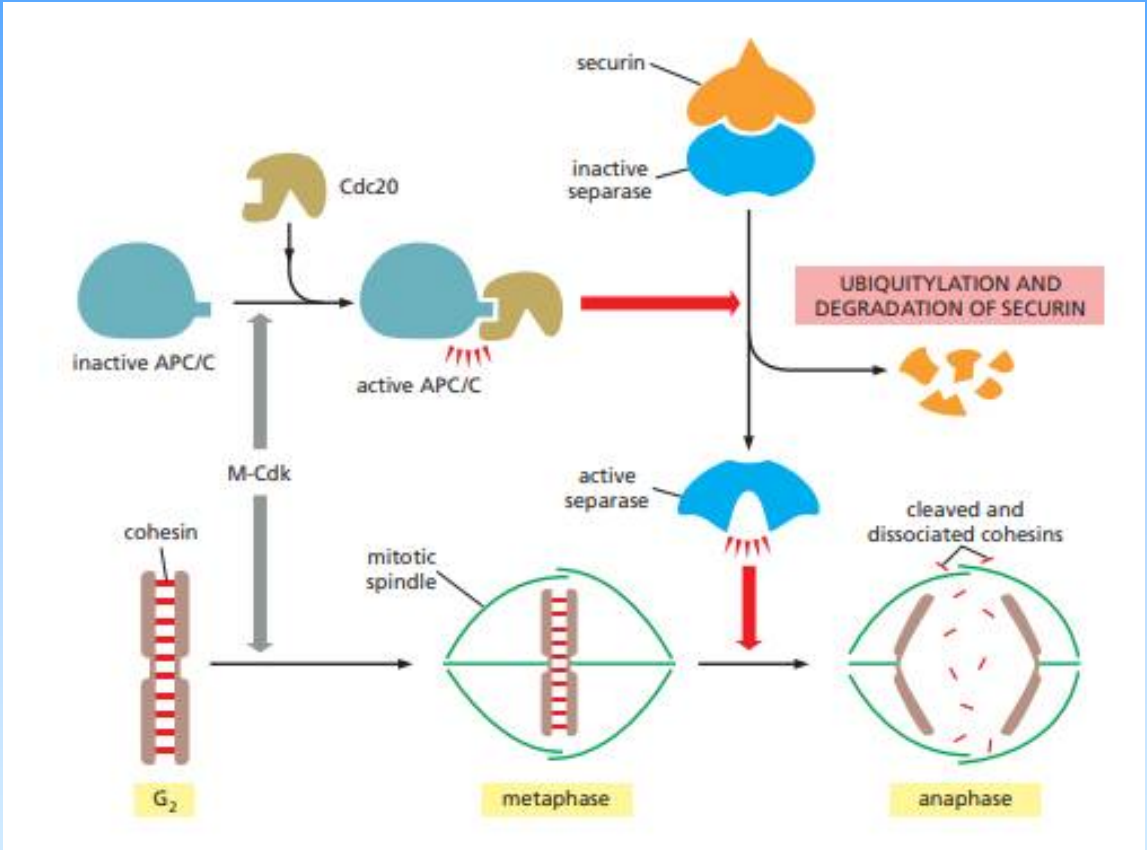
APC/C spouští **separaci sesterských chromatid** a dokončení mitózy.

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



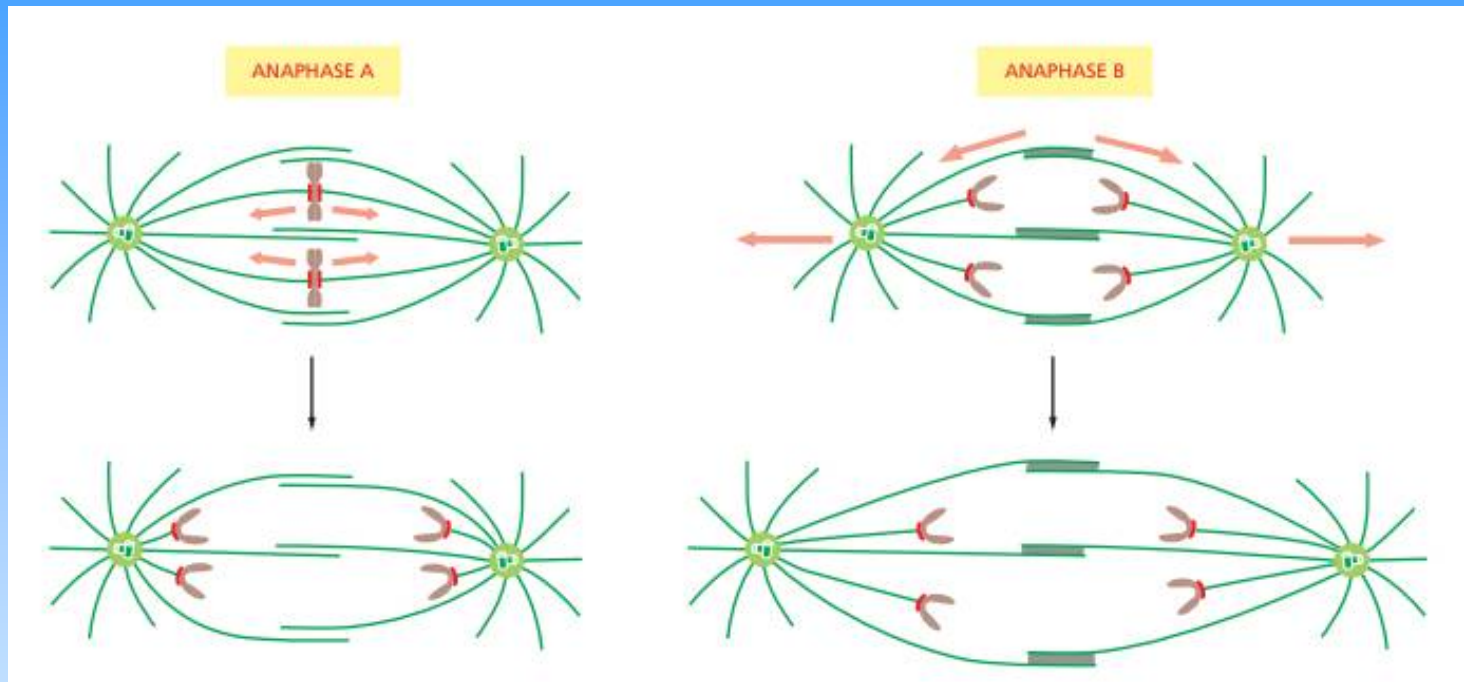
Oddělení chromatid připravuje M-Cdk. Separaci sesterských chromatid iniciuje komplex cyklozomu APC/C (ubiquitin ligáza) – ubiquitinuje několik mitotických regulačních proteinů => spouští jejich destrukci.

Inaktivní komplex APC/C je aktivován pomocí proteinu Cdc20 => destrukce inhibičního proteinu **sekurinu**. Před anafází se proteáza **separáza** váže na sekurin, který 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.

Ztráta spojení sesterských chromatid na začátku anafáze vede k oddělení sesterských chromatid => síly mitotického vřeténka přitáhnou sesterské chromatidy k opačným pólům buňky = proces **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 => částečně uzavřou shluky chromozomů => vytvoření kompletního jaderného obalu.

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

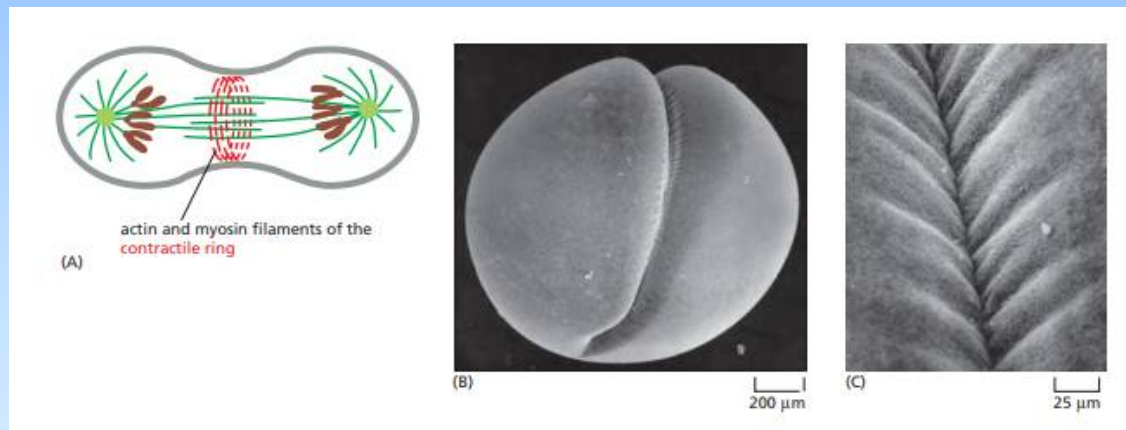


Cytokineze = rozdělení buňky na dvě

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

První viditelnou fází cytokineze v živočišné buňce je náhlý výskyt vrásek nebo štěpné rýhy na povrchu buňky. Prohlubující se brázda (**kontraktilní prstenec**) postupně buňku úplně nerozdělí na dvě části.

Kontraktilní prstenec = dynamická sestava složená z aktinových vláken, vláken myosinu II a dalších proteinů.



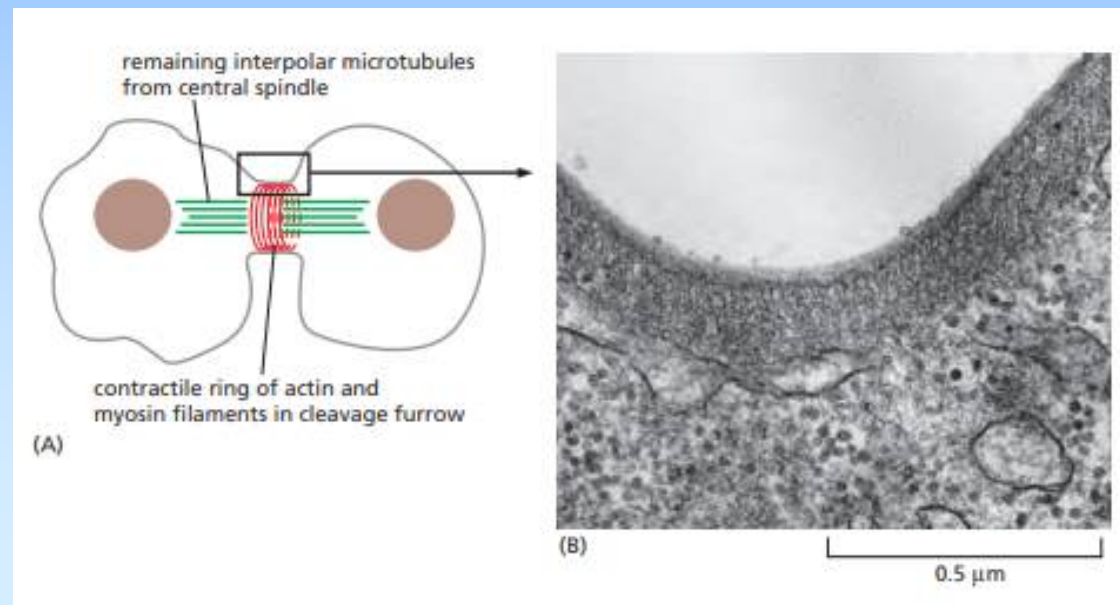
Během zužování prstence dochází k fúzi intracelulárních váčků s plazmatickou membránou => vzniká nová membrána sousedící s prstencem => utěsnění mezery mezi buňkami.

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

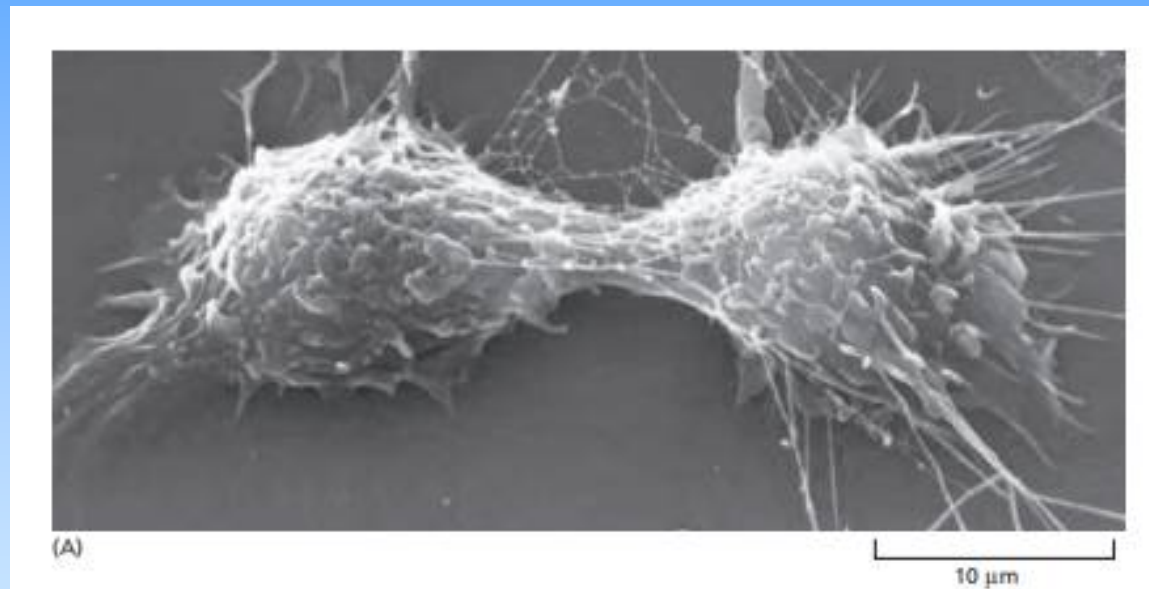
V interfázních buňkách tvoří vlákna aktinu a myosinu II kortikální síť pod plazmatickou membránou.

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.

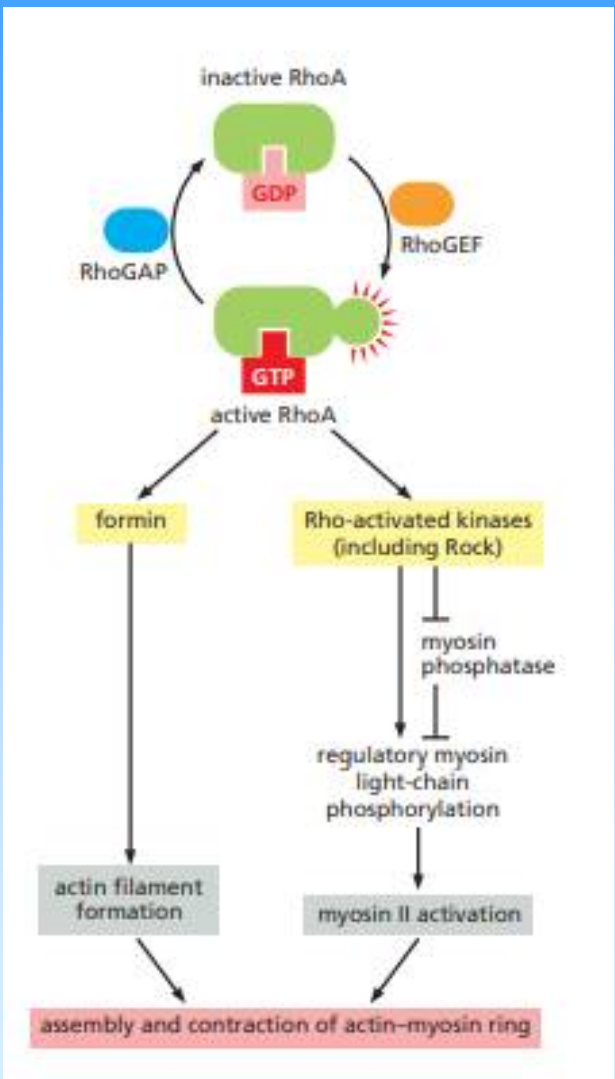


Po anafázi se překrývající se pole aktinu a filamentů myosinu II stahují a vytvářejí sílu => rozdělení cytoplazmy na dvě části. Po konci štěpení kontraktilní prstenec zmizí – plazmatická membrána štěpné rýhy se zužuje => vzniká **střední část těla**.



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

Lokální aktivace RhoA spouští sestavení a kontrakci kontraktálního prstence.



RhoA, malá GTPáza (protein typu Ras) řídí sestavení a funkci kontraktálního prstence v místě štěpení.

RhoA je aktivována guaninovým nukleotidovým výměnným faktorem (Rho-GEF) => stimulace uvolňování GDP a vazbu GTP na RhoA.



- 1) Tvorba aktinového vlákna aktivací forminů.
- 2) Aktivace proteinkinázy, včetně Rho-aktivované kinázy. Kinázy fosforylují regulační lehký řetězec myosinu, podjednotku myosinu II => sestavení, motorická aktivita a kontrakce myosinu II.

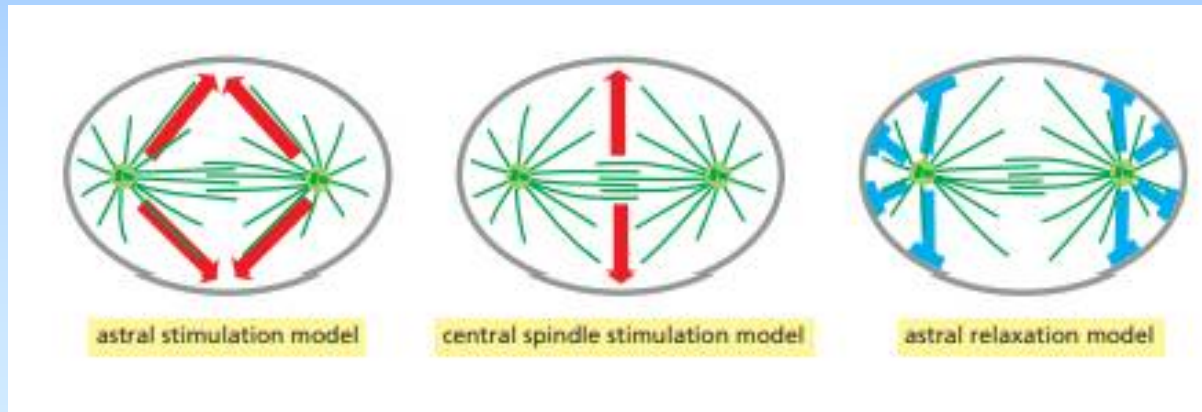
Mikrotubuly mitotického vřeténka určují rovinu dělení živočišných buněk.

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.

Jak mitotické vřeteno určuje místo dělení?

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



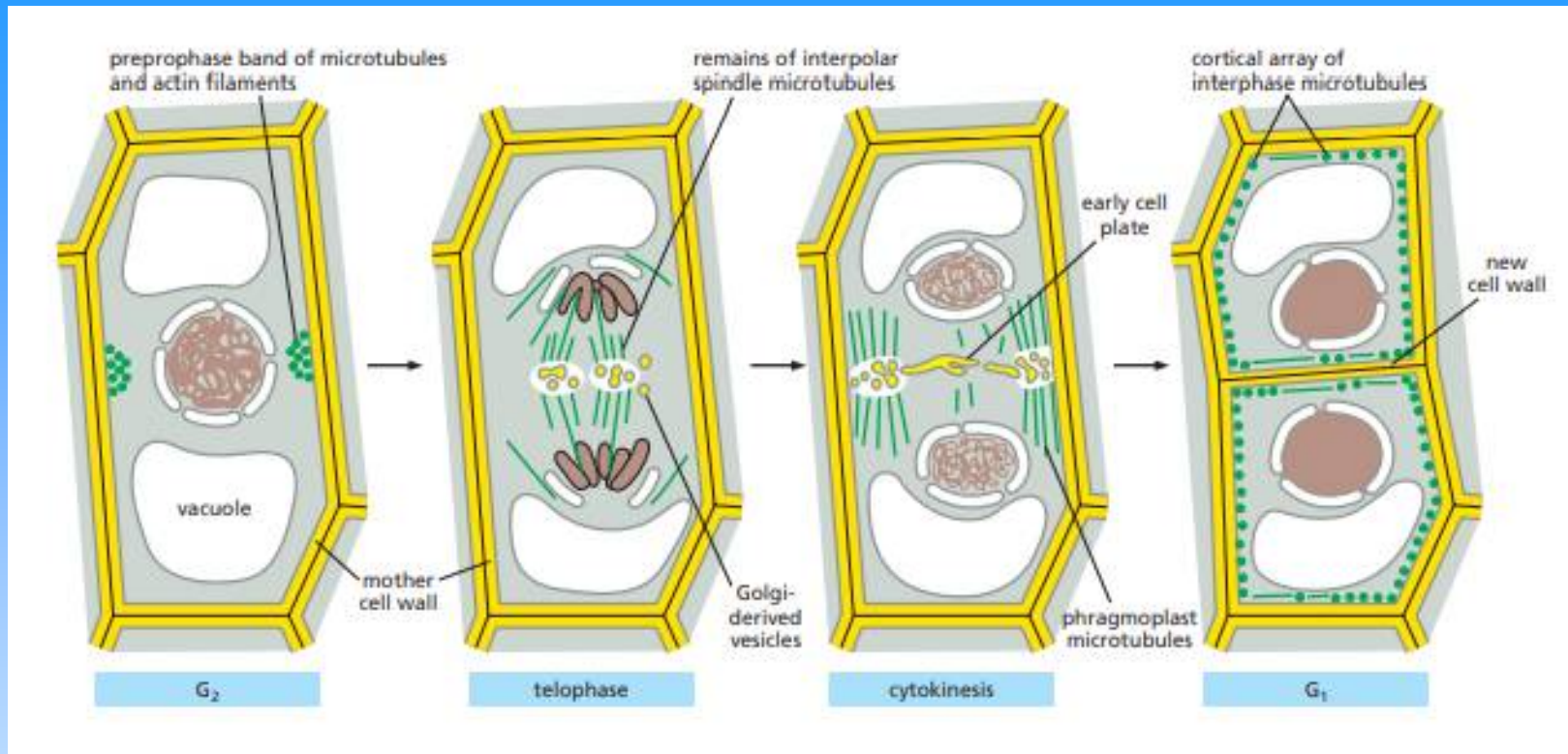
3) Model astrální relaxace – astrální mikrotubuly podporují lokální relaxaci aktin-myosinových svazků při povrchu buňky => minimální kortikální relaxace na rovníku vřetena => podporuje kortikální kontrakci v tomto místě.

Mechanismus cytokineze u vyšších rostlin

Pohyb štěpné rýhy směrem dovnitř závisí na zvětšení povrchu plazmatické membrány. Nová membrána je přidávána na vnitřní okraj štěpné rýhy 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 (spíše než zvenčí kontraktilním prstencem) konstrukcí nové buněčné stěny mezi dvěma dceřinými jádry – vzniká **buněčná destička**



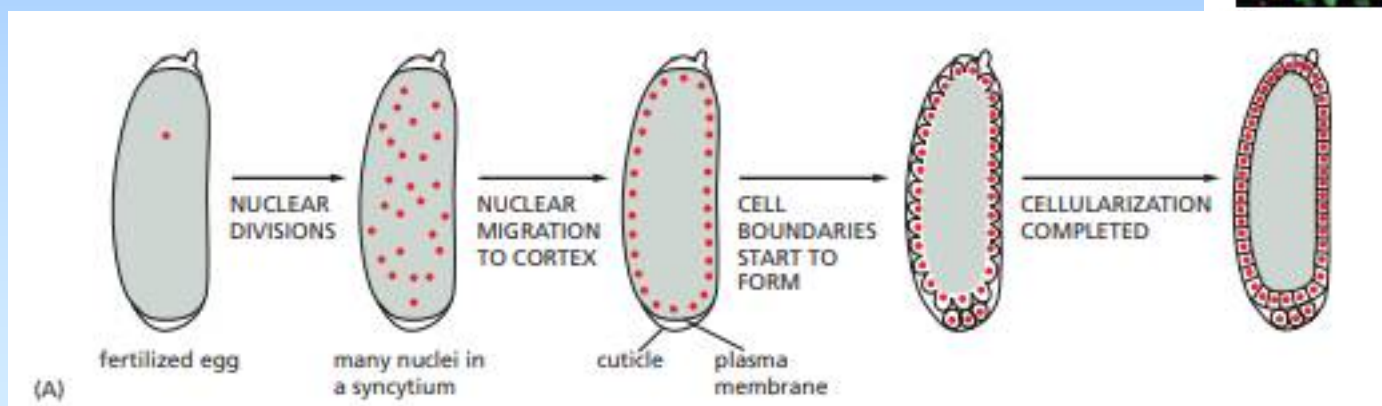
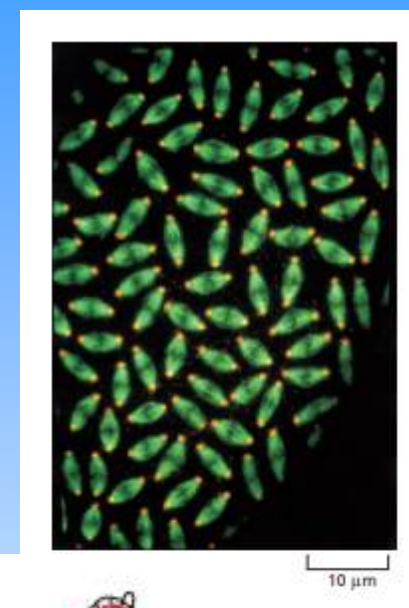
Sestavení buněčné destičky je řízeno strukturou zvanou **fragmoplastem**. Fragmoplast obsahuje mikrotubuly odvozené z mitotického vřeténka – podél mikrotubulů motorické proteiny transportují malé váčky z Golgiho aparátu do buněčného centra => vznik buněčné destičky.

Destička se rozšiřuje směrem ven dalším splynutím vezikul => dosáhne plazmatické membrány a původní buněčné stěny => rozdělení buňky na dvě části.

Mitóza může nastat bez cytokineze.

Některé buňky procházejí několika koly jaderného dělení bez toho, aby docházelo k cytoplazmatickému dělení => buňka s více jádry = **syncytium**.

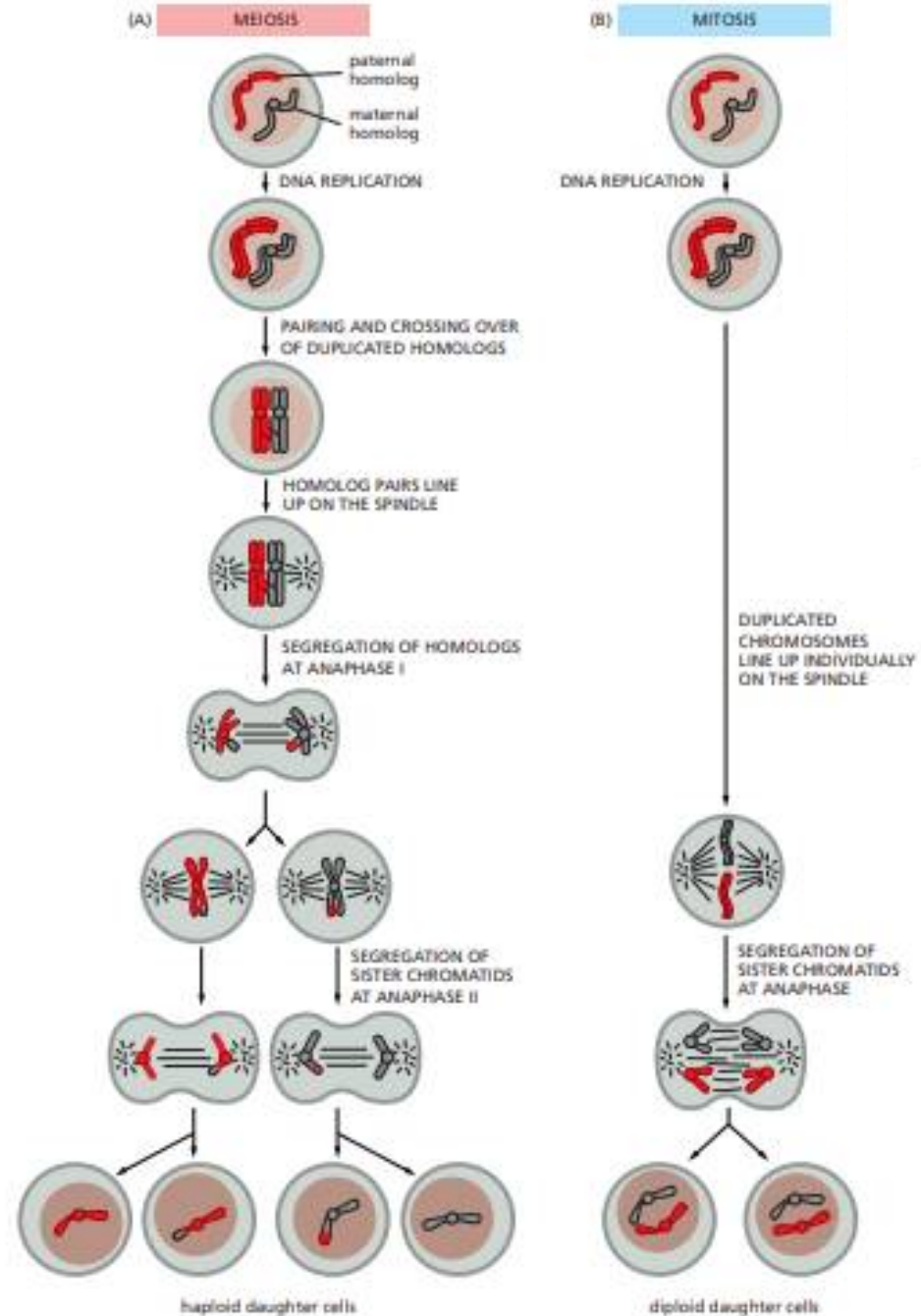
Po těchto rychlých jaderných děleních se kolem každého jádra vytvoří membrány během koordinované cytokineze = **celulární cytokineze**. Plazmatická membrána se rozšiřuje dovnitř a pomocí aktin-myosinového prstence se odštípne => uzavření každého jádra.



Meióza

Většina eukaryotických organismů se rozmnožuje sexuálně => potomci jsou geneticky odlišní od obou rodičů. Buňky potomků obsahují homology každého chromozomu, jednu od každého rodiče.

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



Meiůza zahrnuje dvě kola segregace chromozomů.



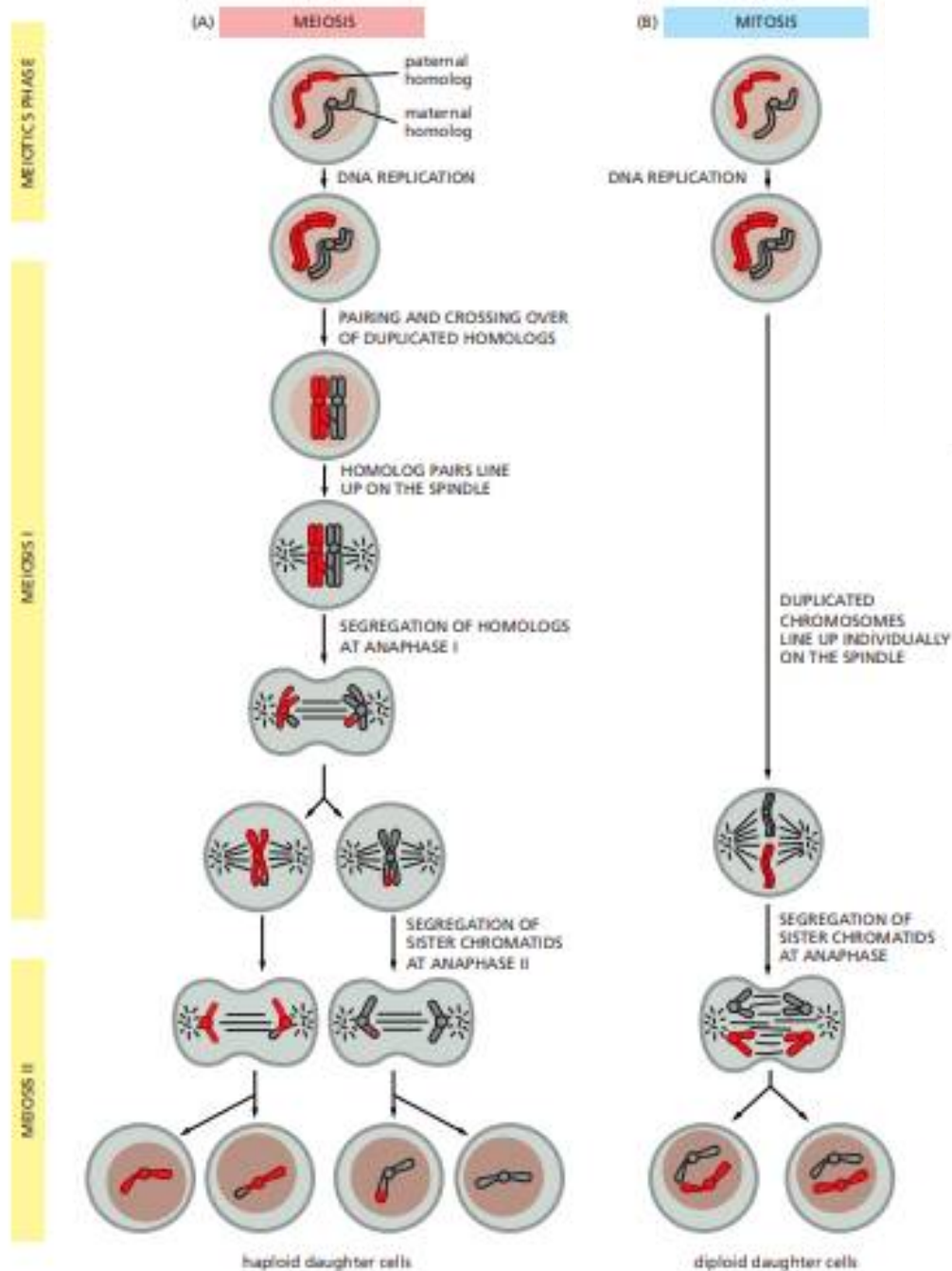
Meiůza snižuje počet chromozomů na polovinu.

Buňka zahajuje meiotický program duplikací chromozomů v meiotické S fázi => vznik párů sesterských chromatid spojených po celé délce kohezinovými komplexy.

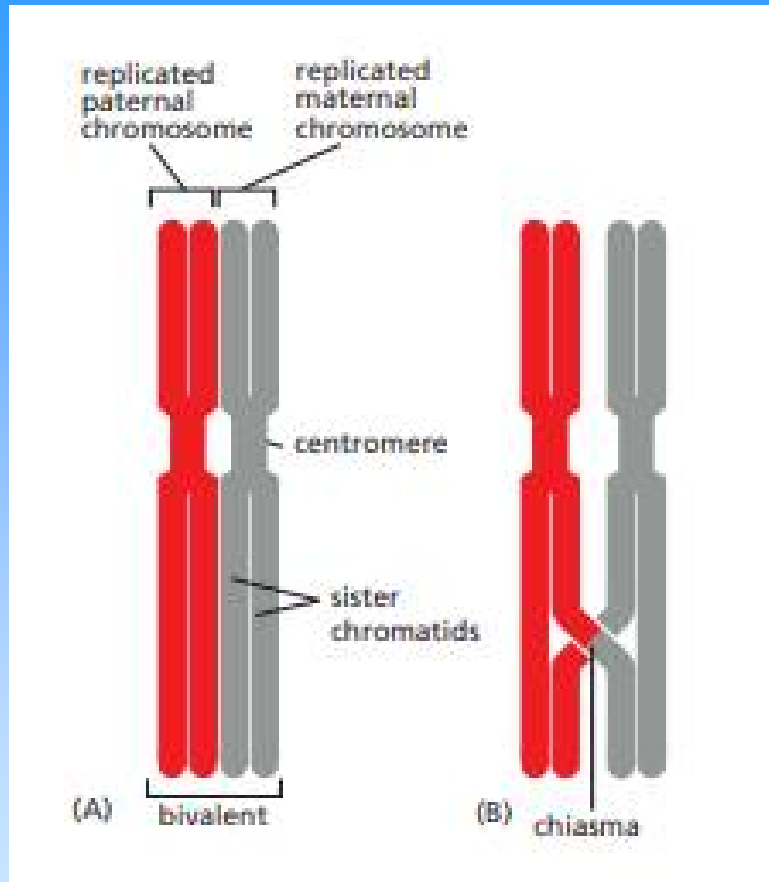
Meiůza I – řeší problém, jedinečný pro meiůzu = segregace homologů

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, ale dochází k segregaci sesterských chromatid => vznik haploidních dceřiných jader.



Duplicitní homologové páry během meiotické profáze.



Mitóza – homologní chromozomy chovají nezávisle na sobě.

Meióza I - homology se vzájemně poznávají a fyzicky se spojují.

Raná profáze I – homology se spojují podél své délky = **párování** = interakce mezi komplementárními sekvencemi DNA (párovacími místy) homologů.



Čtyřchromatidová = **bivalentní** struktura

Homologní páry jsou pak spojeny dohromady homologní rekombinací = tvoří se **zlomy** na několika místech v každé sesterské chromatidě => velký počet dějů rekombinace DNA mezi homology.

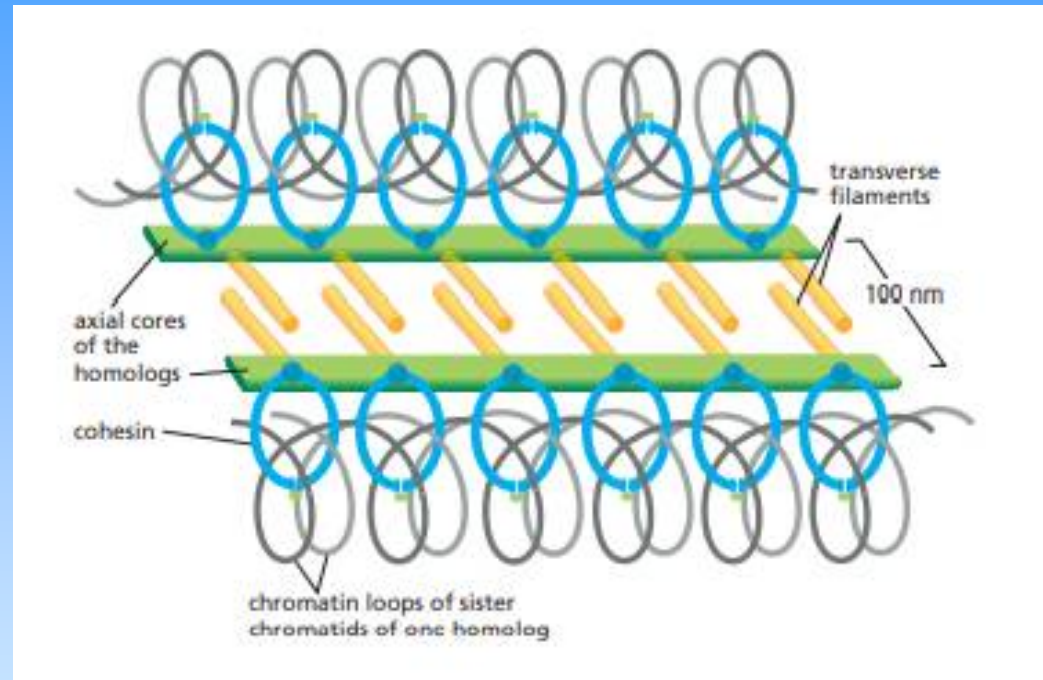
Některé z těchto událostí vedou k reciproční výměně DNA nazývané **crossing-over**: DNA chromatid se kříží, aby se stala spojitou s DNA homologní chromatidy.

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.

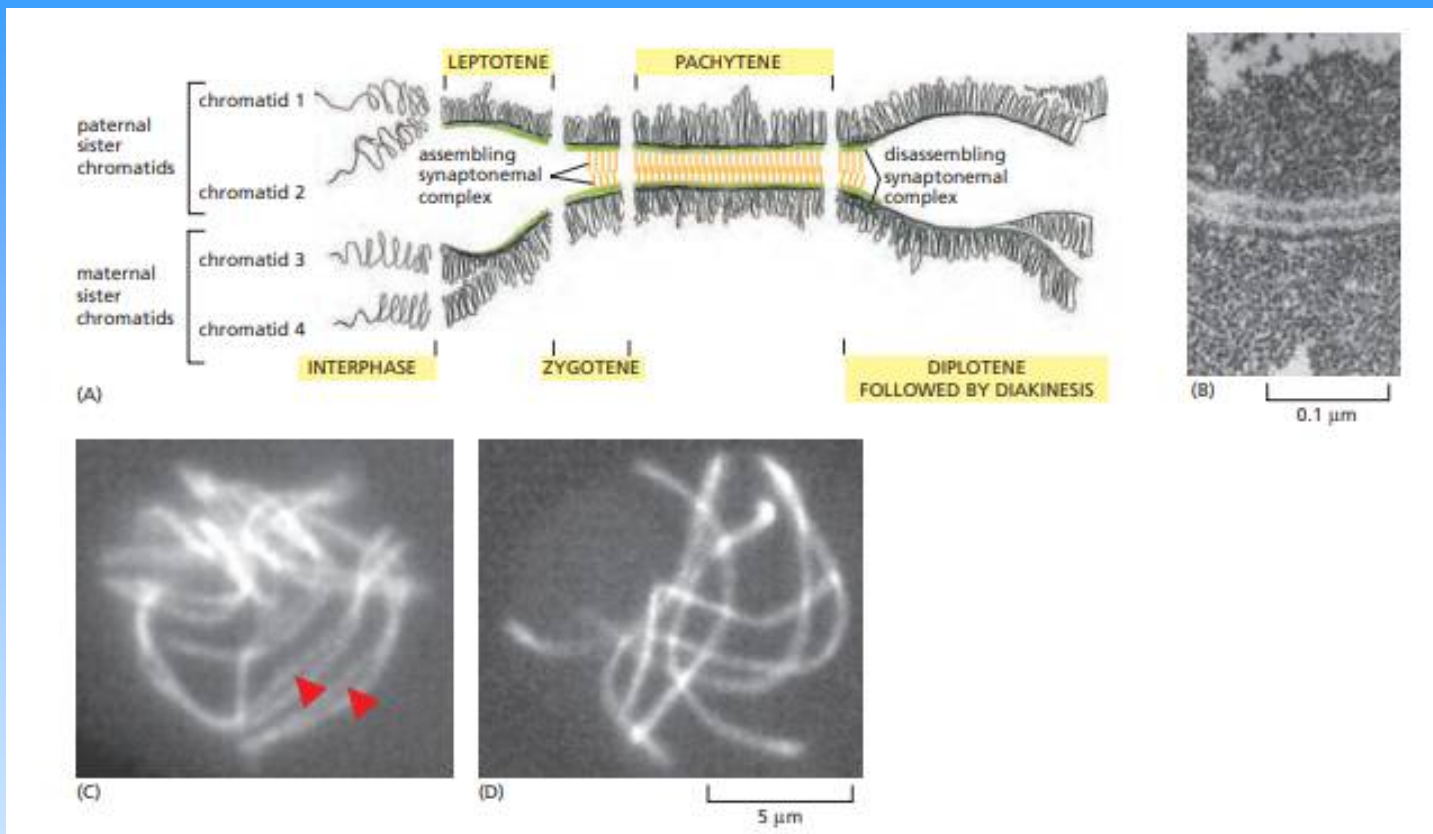
Co táhne osy k sobě?

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

Meiotická profáze má 5 následných fází (podle morfologických změn) – **leptotene**, **zygotene**, **pachytene**, **diplotene** a **diakineze**.

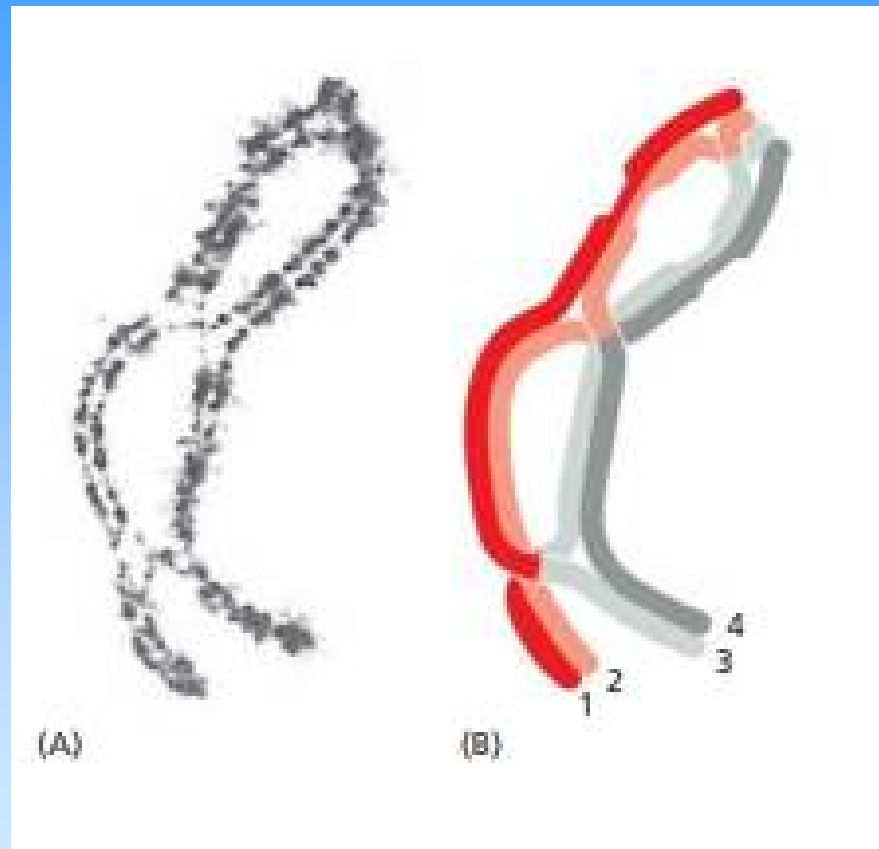


Leptotene – kondenzace a párování homologů a začíná genetická rekombinace.

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

Pachytene – homology jsou spojeny (synapsovány) po celé své délce (pachytenové stadium může přetrvávat dny nebo déle).

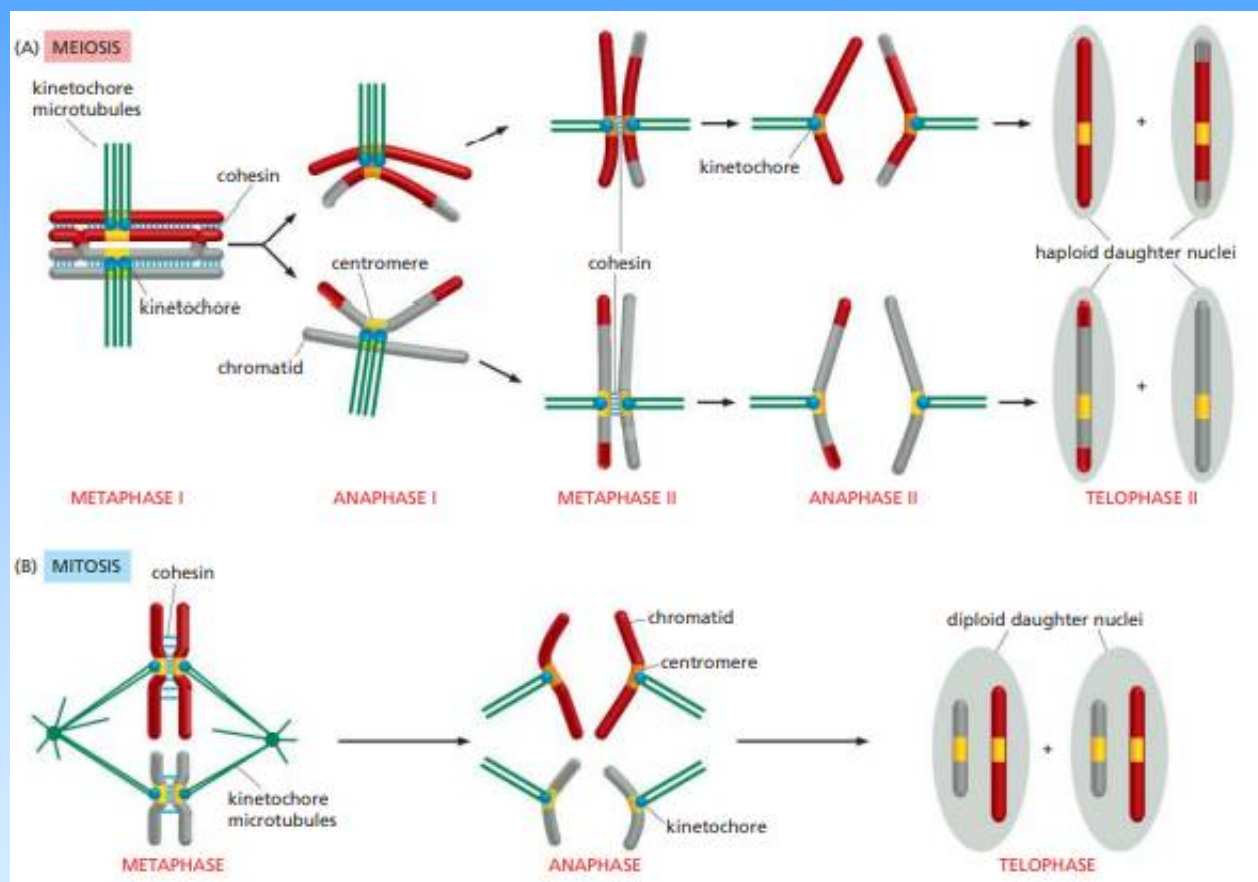
Diplotene – zahájení oddělování (desynapse) se současnou kondenzací a zkrácením chromozomů => jsou pozorovatelná inter-homologická spojení nazývaná **chiasmata** - udržují kompaktní homology pohromadě.



Diakineze – dochází k rozchodu homologických chromozomů. Chiazmata se posunují na konec chromatid, kde zanikají (terminalizace chiazmat).

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:



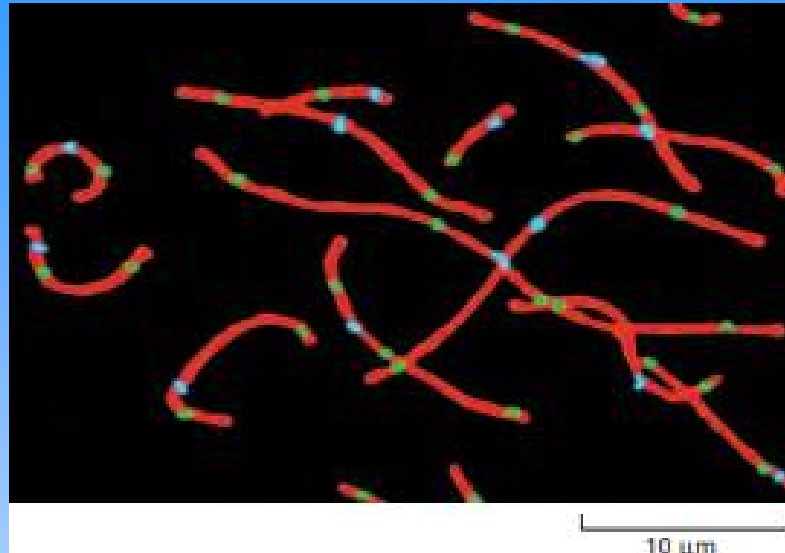
1) Oba sesterské kinetochory v homologue se stabilně připojují ke stejnému vřetenovému pólu. U mitózy se kinetochory připojují k odlišným pólům. V meióze I jsou sesterské kinetochory sloučeny do jediné jednotky vázající mikrotubuly.

2) Křížení vytváří silné fyzické spojení mezi homology => umožňuje jejich bi-orientaci na rovníku vřetenka.

Podobně soudržnost mezi sesterskými chromatidami je důležitá pro jejich bi-orientaci v mitóze či meióze II.

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 v meióze dvě odlišné funkce:

- 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 a těla je určována třemi základními procesy:

- dělením buněk
- buněčným růstem
- přežíváním buněk

Každý tento proces 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 blokátorů buněčného 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

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 specificita – indukuje pouze proliferaci prekurzorů červených krvinek.

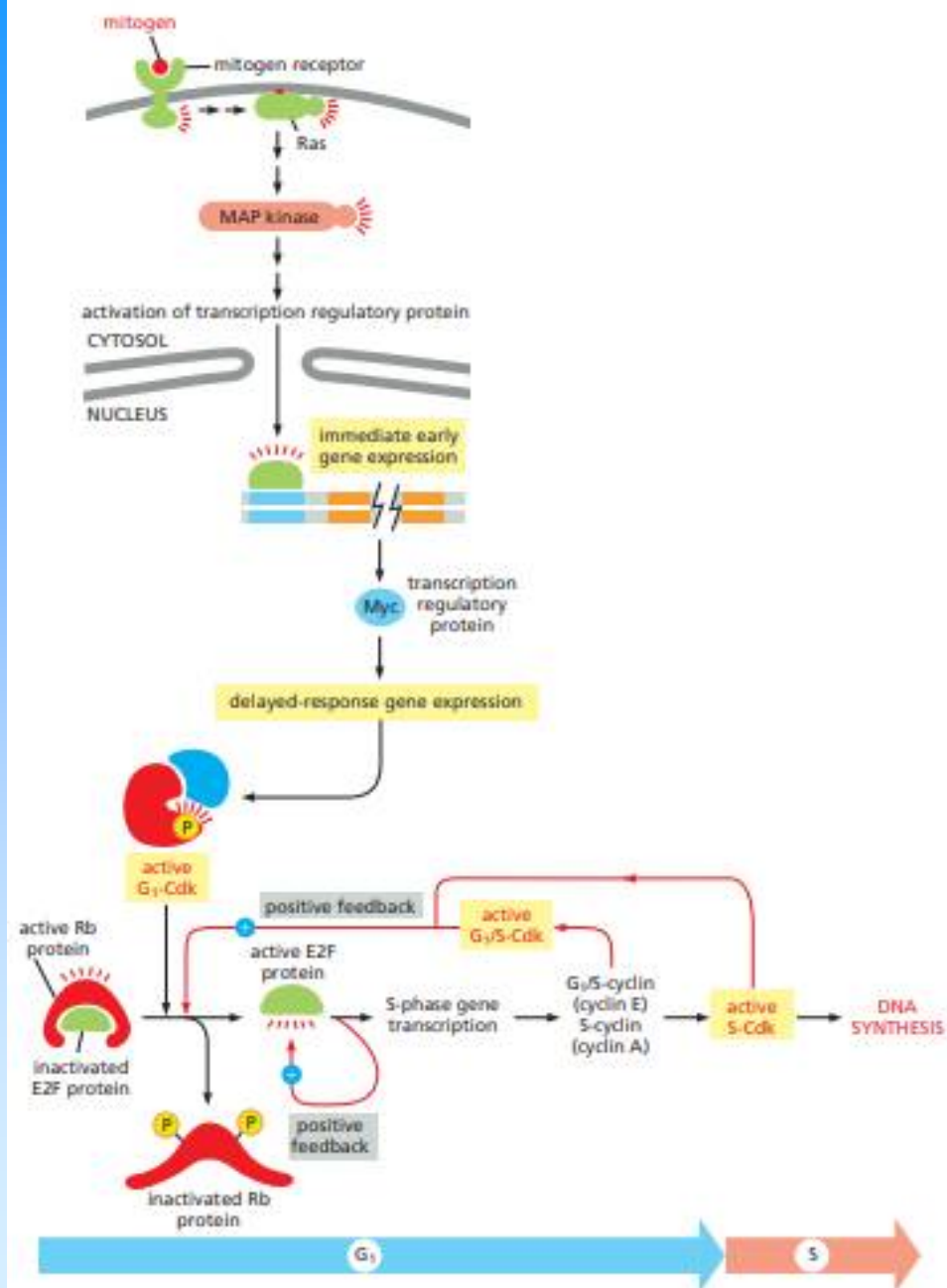
Inhibiční extracelulární signální proteiny působí proti pozitivním regulátorům a tím inhibují růst orgánů. Nejznámějšími inhibičními signálními proteiny je **transformující růstový faktor- β (TGF β)**

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 aktivitu 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 vlivem mitogenů, aktivní G₁-Cdk se akumuluje a fosforyluje proteiny Rb => snížení vazby na E2F => uvolněné proteiny E2F aktivují expresi svých cílových genů.

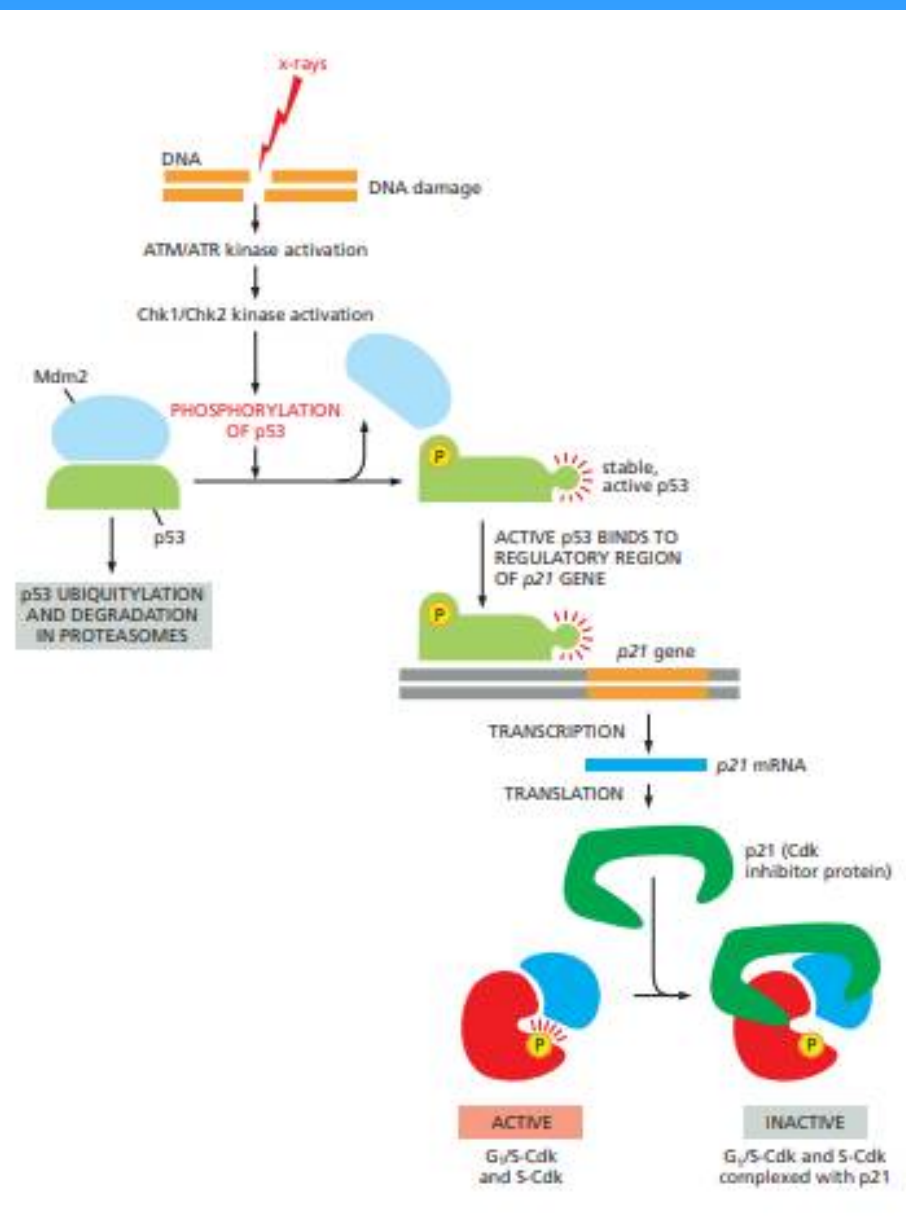
Poškození DNA blokuje dělení buněk: reakce na poškození DNA.

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 snadno detekuje poškození DNA a zastavuje cyklus v jednom ze dvou přechodů:

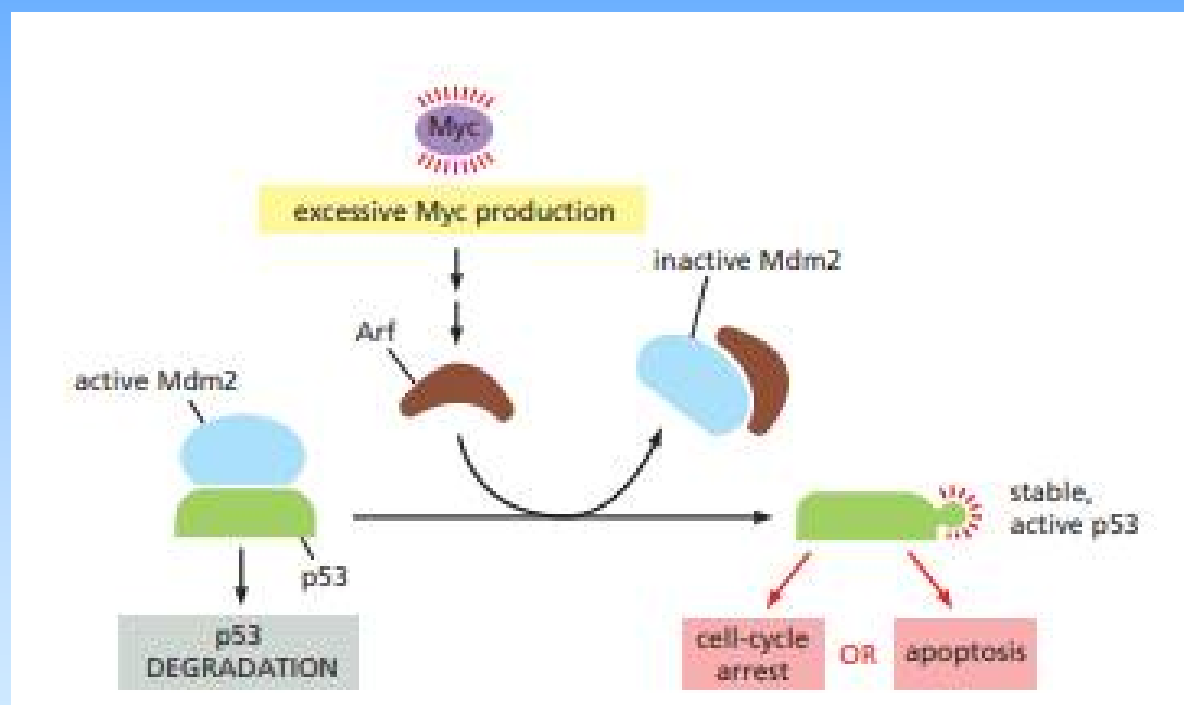
- 1) Na začátku, který zabraňuje vstupu do buněčného cyklu a do S fáze;
- 2) Na přechodu G_2/M , který brání vstupu do mitózy.

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 G_1/S -Cdk a S-Cdk => blokáce vstupu do buněčného cyklu.



Zástavu buněčného cyklu nebo apoptózu způsobují abnormální signály proliferace, s výjimkou rakovinných buněk.

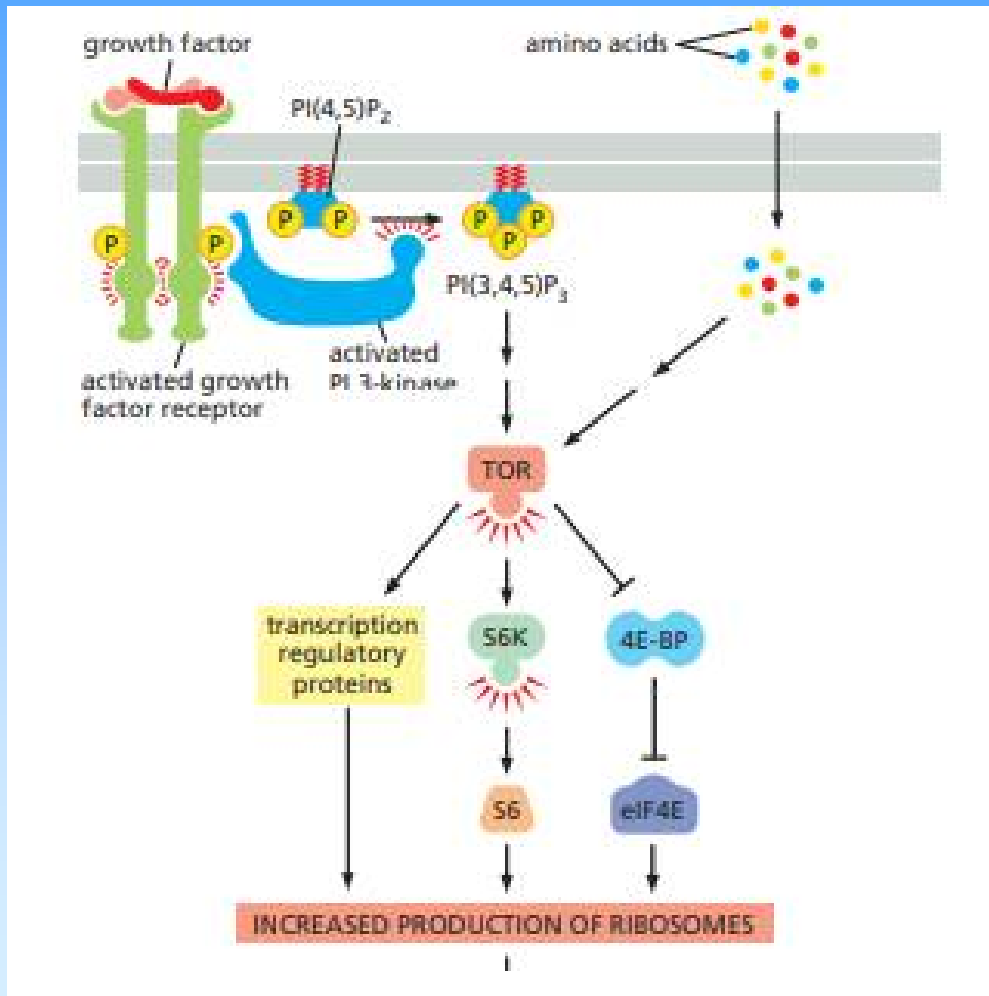
Mutace, které způsobují nadměrnou expresi Myc, stimulují nadměrný buněčný růst a proliferaci, a tím podporují rozvoj rakoviny. Překvapivě, hyperaktivovaná forma Ras nebo overexprese Myc nevede k nadměrné proliferaci, ale naopak k **zastavení buněčného cyklu nebo apoptóze** => normální buňka detekuje 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 – vazbou na receptor stimulují růst živočišných buněk.

Nejdůležitější je dráha zahrnující enzym **fosfoinositid 3-kinázu (PI 3-kinázu)**.

Aktivace PI 3-kinázy => aktivace klíčové kinázy TOR => aktivace syntézy proteinů, např. **proteinkináza S6 kináza (S6K)** – fosforyluje ribozomální protein S6 => zvýšení množství a aktivity ribozomů.

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

Aby si proliferující buňky udržely konstantní velikost, musí koordinovat svůj růst s buněčným dělením. Naopak, v mnoha případech je nutný růst bez dělení nebo dělení bez růstu. Přesné mechanismy koordinace však nejsou známy.

Apoptóza

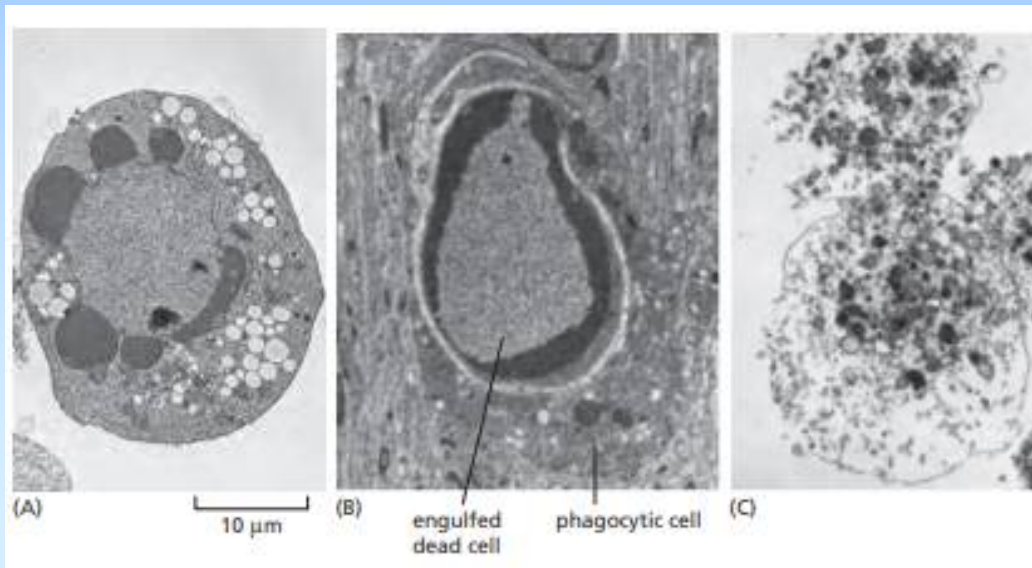
61

Udržení velikosti tkáně rovněž vyžaduje, aby buňky zanikaly, a to 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.



Apoptóza = nedílná součást vývoje a života organismu = naprogramovaná sekvence molekulárních událostí = **programová buněčná smrt**.

Buňky odumírající apoptózou procházejí charakteristickými morfologickými změnami - cytoskelet se hroutí, jaderný obal se rozpadá a jaderný chromatin kondenzuje a rozpadá se na fragmenty. Sousední buňka nebo makrofág (specializovaná fagocytární buňka) mrtvou buňku rychle pohltí, než praskne a vyleje svůj obsah.



Buňky odumírají i následkem akutního poškození – **nekróza** buněk.

Nekrotické buňky bobtnají a praskají, vylévají svůj obsah na své sousedy => zánětlivá reakce.

Nekróza je pravděpodobně způsobena vyčerpáním energie => metabolické defekty a ztráta iontových gradientů.

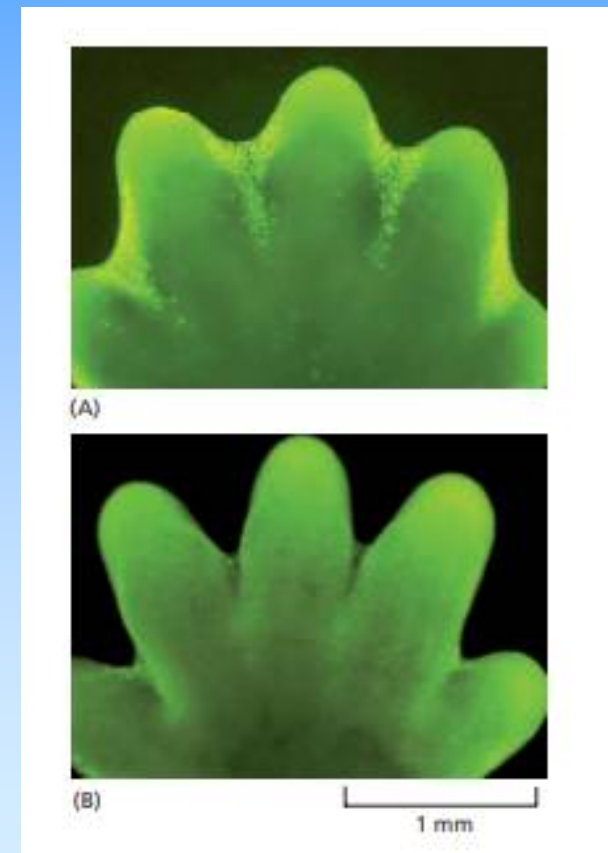
Apoptóza eliminuje nežádoucí buňky.

Ve vyvíjejícím se nervovém systému obratlovců více než polovina z mnoha typů nervových buněk normálně odumírá brzy po jejich vytvoření. **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 – buňky mezi nimi odumírají (**Obr. myší tlapky**).

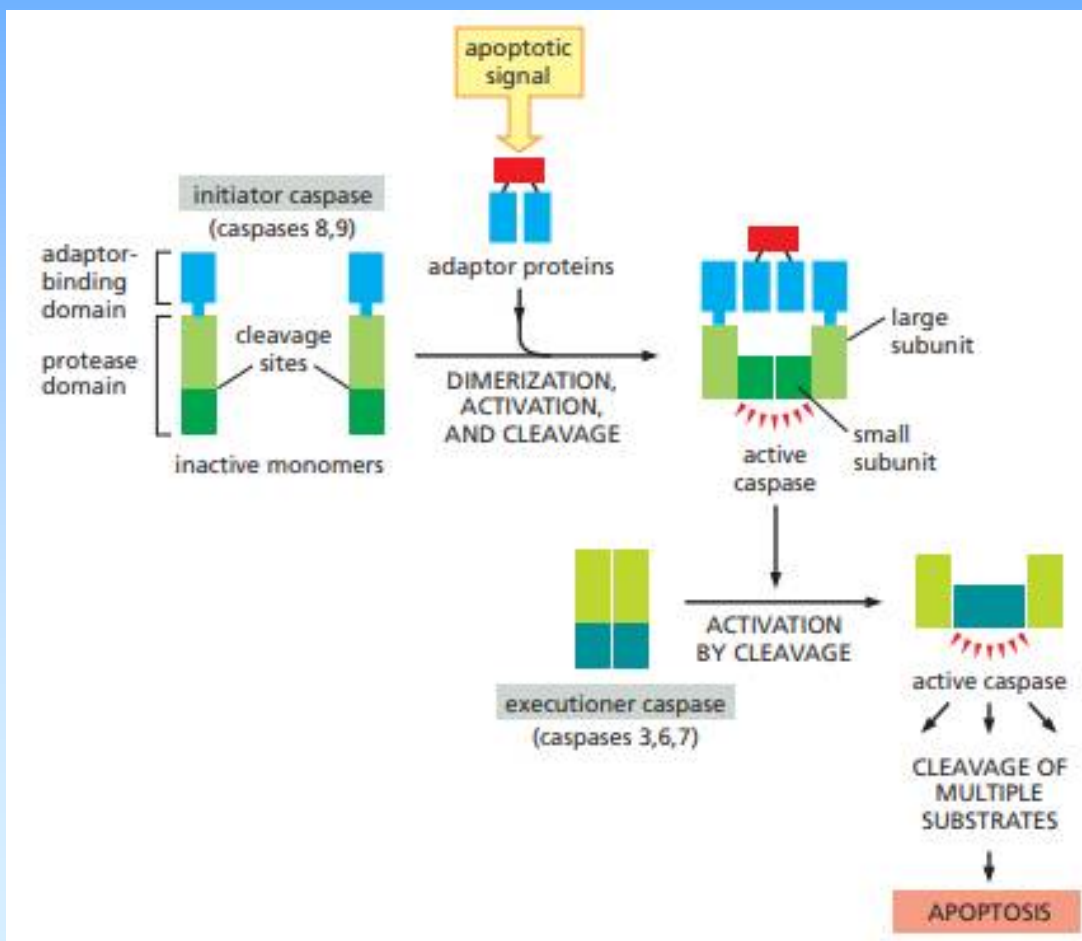
Např. Buňky umírají také, když struktura, kterou tvoří, již není potřeba – pulec se změně v žábu => buňky v ocasu odumírají a ocas, který žába nepotřebuje, zmizí.

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.

Apoptózu spouští specializované proteázy – **kaspázy** – štěpí specifické sekvence => dramatické změny => buněčná smrt a pohlcení. Kaspázy mají ve svém aktivním místě cystein a štěpí cílové proteiny na specifických asparagových kyselinách => kaspáza (**caspase** = **c**ystein a **a**sparagová).



Dva typy kaspáz:

Iniciační kaspázy – zahajují apoptotický proces; fungují jako dimery. Apoptotický signál => vznik dimerů => aktivace kaspázy

Exekutivní kaspázy – neaktivní dimery štěpeny iniciační kaspázou v proteázové doméně => aktivace kaspázy => štěpení proteinů => apoptóza

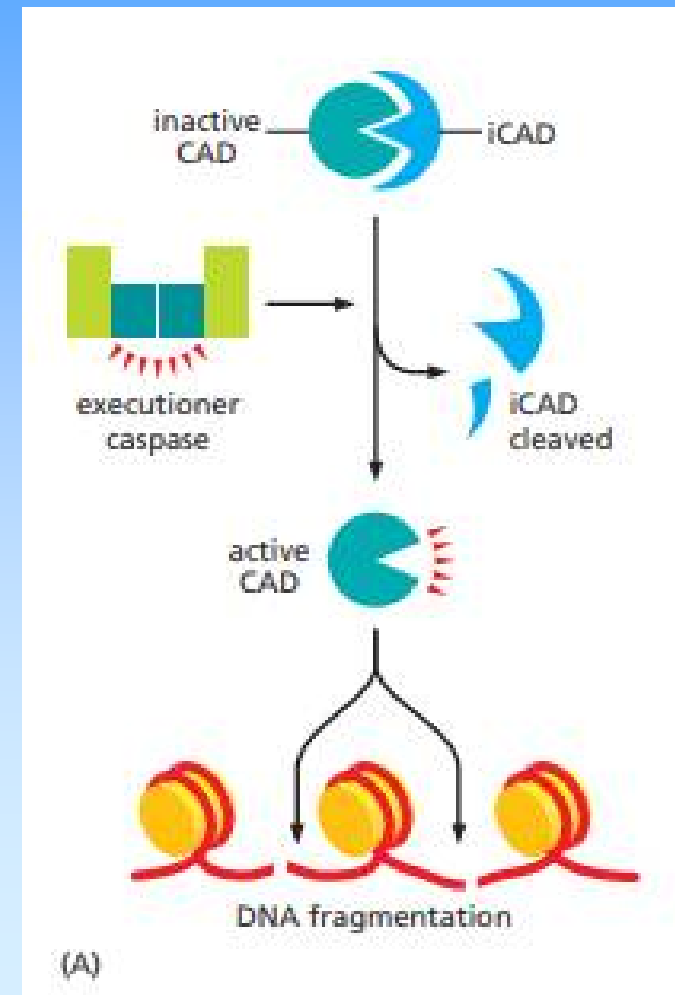
Kaspázy během apoptózy štěpí tisíce proteinů. Pouze několik z těchto proteinů bylo podrobně prostudováno.

Jaderné laminy – štěpením dochází k nevratnému rozpadu jaderné laminy

CAD – endonukleáza degradující DNA – v neaktivní formě je spojena s iCAD (inaktivní iCAD); exekutivní kaspáza degraduje iCAD => uvolnění aktivní 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.

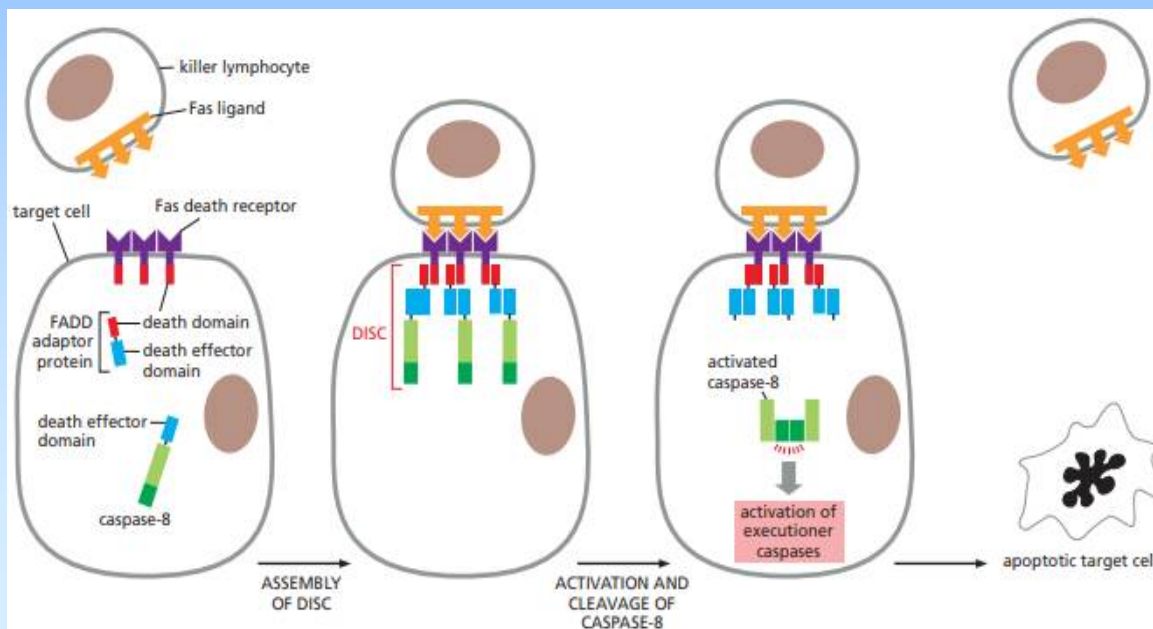


Povrchové receptory buněčné smrti aktivují **vnější cestu apoptózy**.

Extracelulární signální proteiny vázající se na povrchové receptory buněčné smrti spouštějí **vnější dráhu apoptózy**.

Receptory – transmembránové homotrimery, rodina receptorů pro **tumor nekrotizující faktor (TNF)** – patří sem receptory pro samotný TNF a receptory smrti **Fas**. Ligandy –homotrimery; patří do rodiny signálních proteinů TNF.

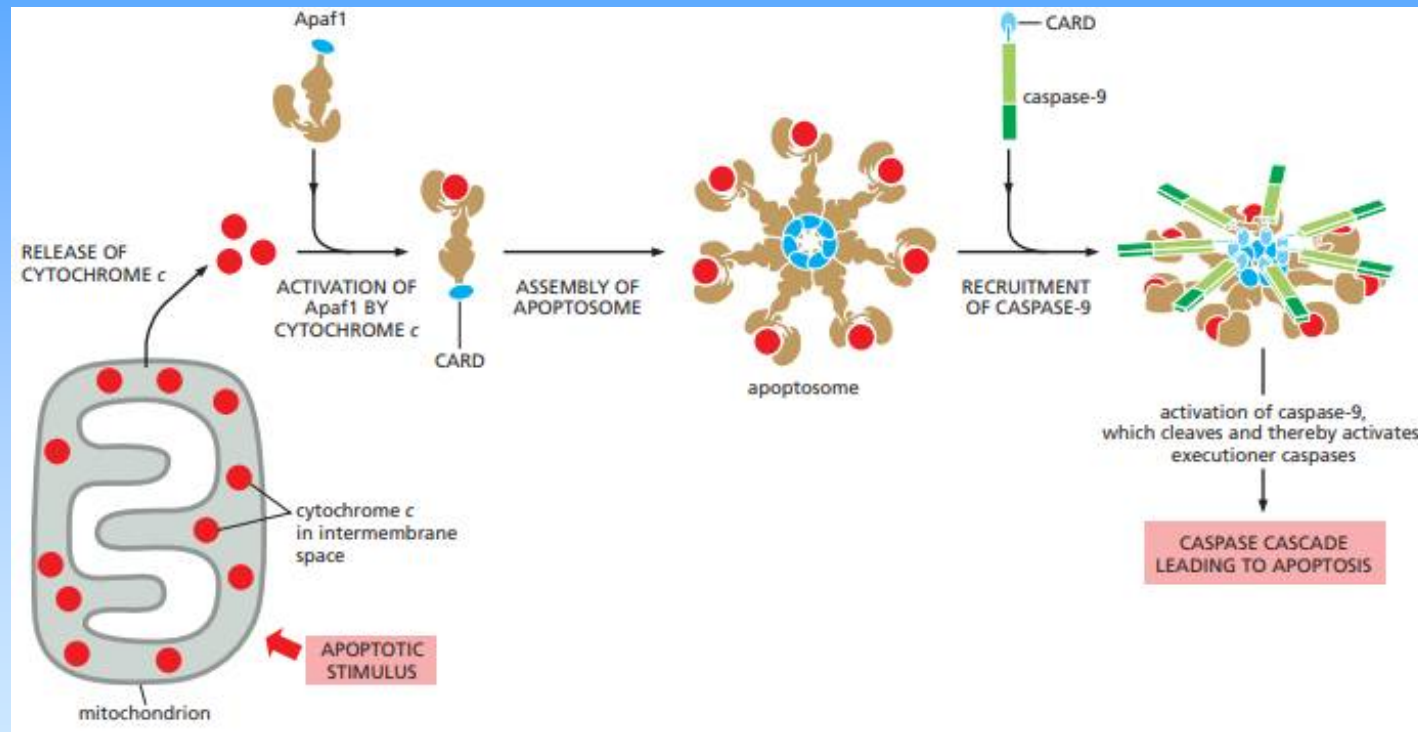
Příklad: Vnější dráha apoptózy spouštěná receptory smrti - aktivace Fas na povrchu cílové buňky pomocí Fas ligandu na povrchu zabíjäckého (cytotoxického) lymfocytu.



Vazba ligandu Fas => cytosolická doména receptoru váže intracelulární adaptorové proteiny FADD => vazba iniciační kaspázy 8 => vznik DISC (signální komplex indukující smrt) => iniciační kaspáza štěpí své partnery a aktivuje následně popravčí kaspázy => **apoptóza**

Vnitřní cesta apoptózy závisí na mitochondriích.

Vnitřní neboli mitochondriální cestou apoptózy – aktivována zevnitř buňky = reakce na stresy (poškození DNA), nebo na vývojové signály; závisí na uvolňování mitochondriálních proteinů do cytozolu (**klíčový protein je cytochrom c**).



Uvolnění **cytochromu c** do cytosolu => vazba na adaptorový protein zvaný Apaf1 (faktor aktivující apoptotickou proteázu-1) => vznik Apaf1 heptameru (apoptozom) => vazba iniciačních proteinů kaspáza-9 => aktivace kaspázy-9 => aktivace exekutivní kaspázy => apoptóza.

Regulace vnitřní cesty apoptózy

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

Proteiny **Bcl2** – hlavní regulační proteiny; konzervovaná skupina proteinů

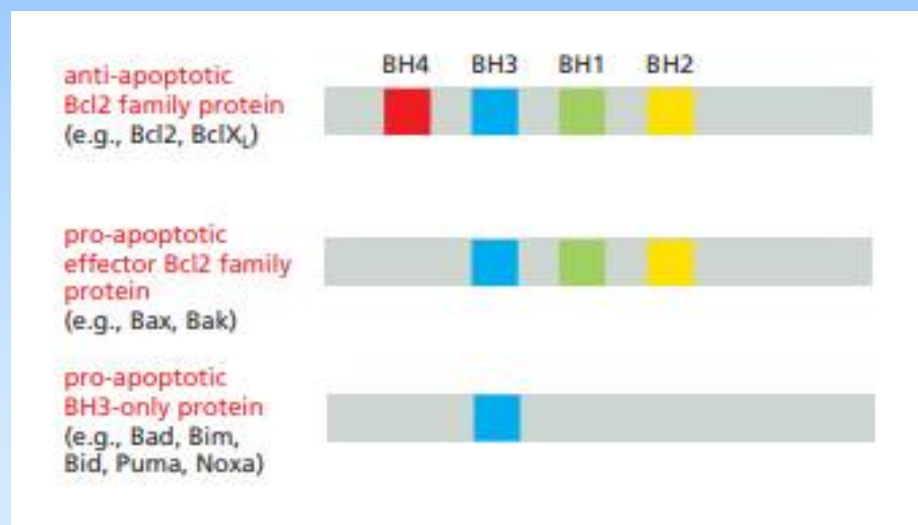
- **anti-apoptické** – inhibují apoptózu

- **pro-apoptické** – podporují apoptózu

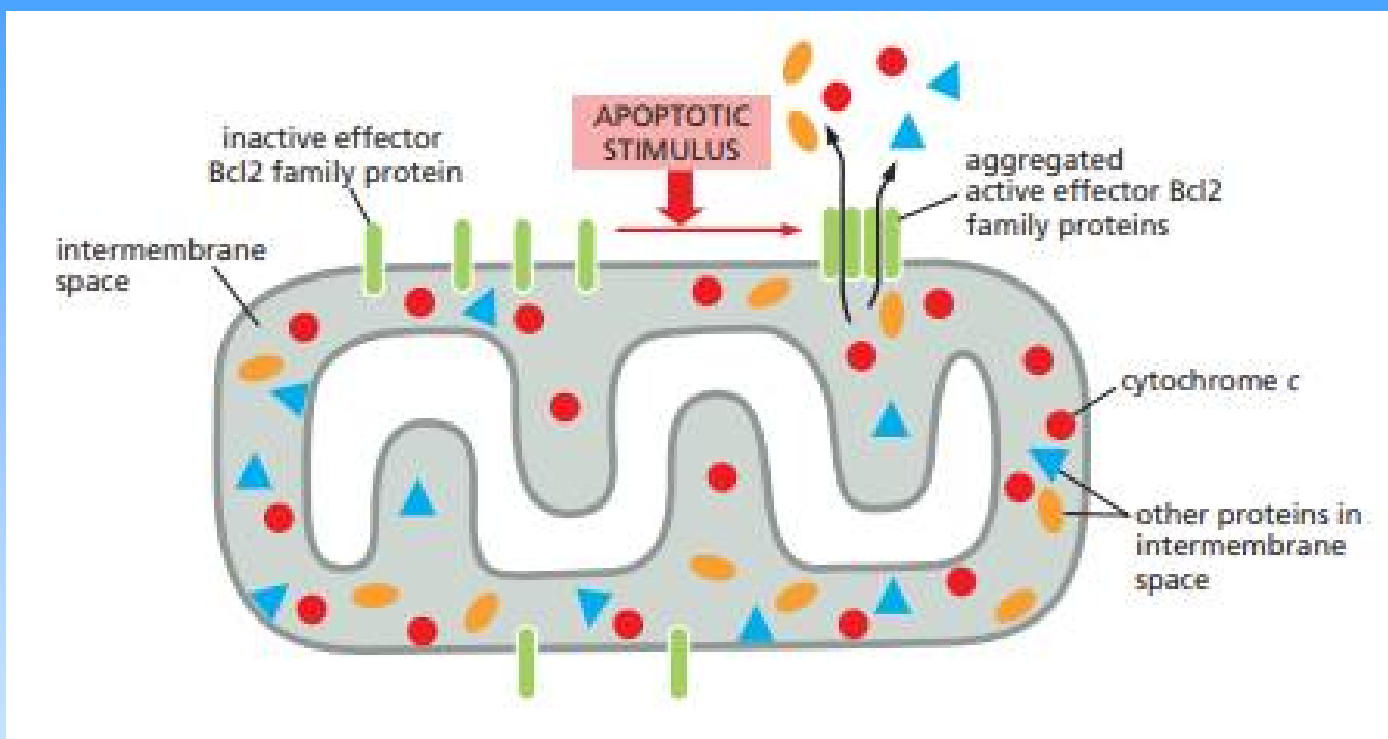
} Rovnováha určuje, zda savčí buňka žije nebo umírá vnitřní cestou apoptózy.

Anti-apoptické proteiny Bcl2 (např. Bcl2, Bcl_L) – 4 typické domény (BH1–4)

Pro-apoptické proteiny Bcl2 – dvě podskupiny proteinů (domény BH1-3 a pouze soména BH3)



Apoptotický stimul => spuštění vnitřní dráhy => aktivace pro-apoptotických proteinů Bcl2 => vznik oligomerů ve vnější membráně mitochondrií => uvolňování cytochromu c a dalších intermembránových proteinů (způsob není znám).



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

Bak – vázán na vnější membránu mitochondrie i při absenci apoptotického signálu

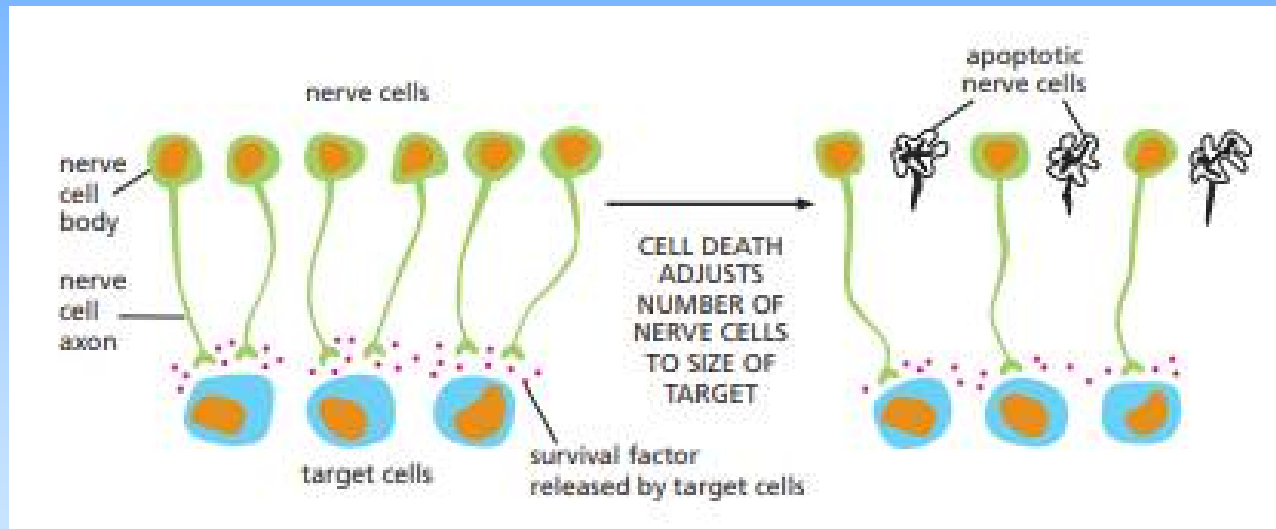
Bax – v cytosolu; do mitochondrií se přemístí po aktivaci apoptotického signálu

Extracelulární faktory přežití inhibují apoptózu různými způsoby.

Extracelulární (mezibuněčné) signály regulují většinu aktivit živočišných buněk, včetně apoptózy.

Faktory přežití = extracelulární signální molekuly inhibující apoptózu

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.

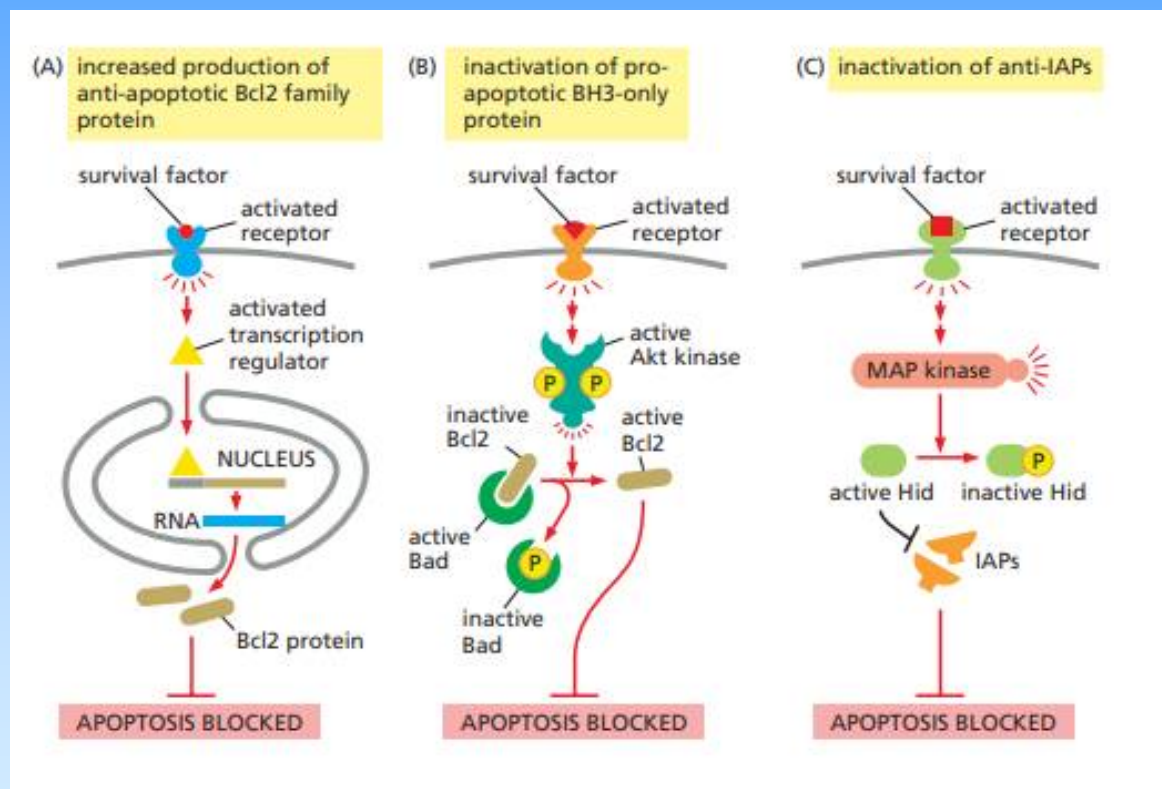
Faktory přežití – vážou se na receptory buněčného povrchu => aktivace intracelulárních signálních drah => potlačení apoptotického programu

Příklady:

A) Stimulují syntézu anti-apoptických proteinů rodiny Bcl2 (Bcl2 nebo BclXL).

B) Inaktivují pro-apoptické proteinů (Bad)

C) Působí fosforylací a inaktivací anti-IAP proteinů, (Hid) => umožňují proteinům IAP potlačit apoptózu.

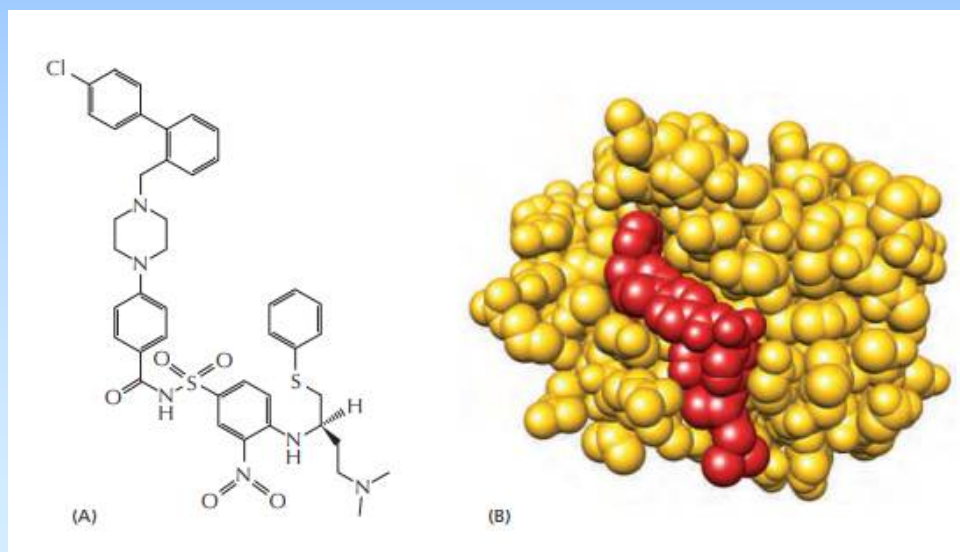


Nadměrná nebo nedostatečná apoptóza může přispět k onemocnění.

Nadměrná apoptóza – mnoho buněk umírá = infarkty a mrtvice; nekróza v důsledku ischemie (nedostatečné prokrvení) + apoptóza (méně postižené buňky).

Snížená apoptóza – nádory; rakovinné buňky abnormálně regulují svůj apoptotický program.

Gen pro tumor-supresorový protein p53 je mutován u přibližně 50 % lidských nádorových onemocnění => nezabraňuje apoptóze nebo zastavení buněčného cyklu v reakci na poškození DNA => přežívání rakovinných buněk.



Léčení nádorů léky stimulujícími apoptózu.

Vývoji chemikálií, které interferují s funkcí anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl2.

Tyto látky se vážou s vysokou afinitou k anti-apoptotickým proteinům rodiny Bcl2 => blokáce jejich funkce => zastavení růstu nádoru.