

Buněčný cyklus, spojení se signálními cestami a molekulární mechanismy onkogeneze

MUDr. Jiří Vachtenheim, CSc.

Přehled regulace buněčného cyklu

Základní terminologie:

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

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

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

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

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

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

Rb rodina: Rb, p107, p130.

Cdk inhibitory – váží se na a inaktivují cyclin-cdk complexy.

E2F transkripční faktory – heterodimery E2Fs (1-5) a DPs (1,2) aktivují transkripci genů důležitých pro syntézu DNA.

Aktivita E2F transkripčních faktorů je inhibována Rb proteinem, event. p107 a p130. Pouze de(hypo)fosforylovaný Rb protein inhibuje tuto transkripční aktivitu. Po fosforylaci cyclin-dependentními kinasami je Rb protein inaktivní.

Cílové promotery pro E2F: DNA polymerasa α , dihydrofolát-reduktasa, thimidin kinasa, Cyclin E, cyclin A, c-myc, E2F-1 (pozitivní zpětná vazba), cdc6.

Přehled cyklin-cdk komplexů a regulace během buněčného cyklu

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

Cdk inhibitory

INK4 rodina:

p16 (INK4a), p15 (INK4b) p18 (INK4c) p19 (INK4d)

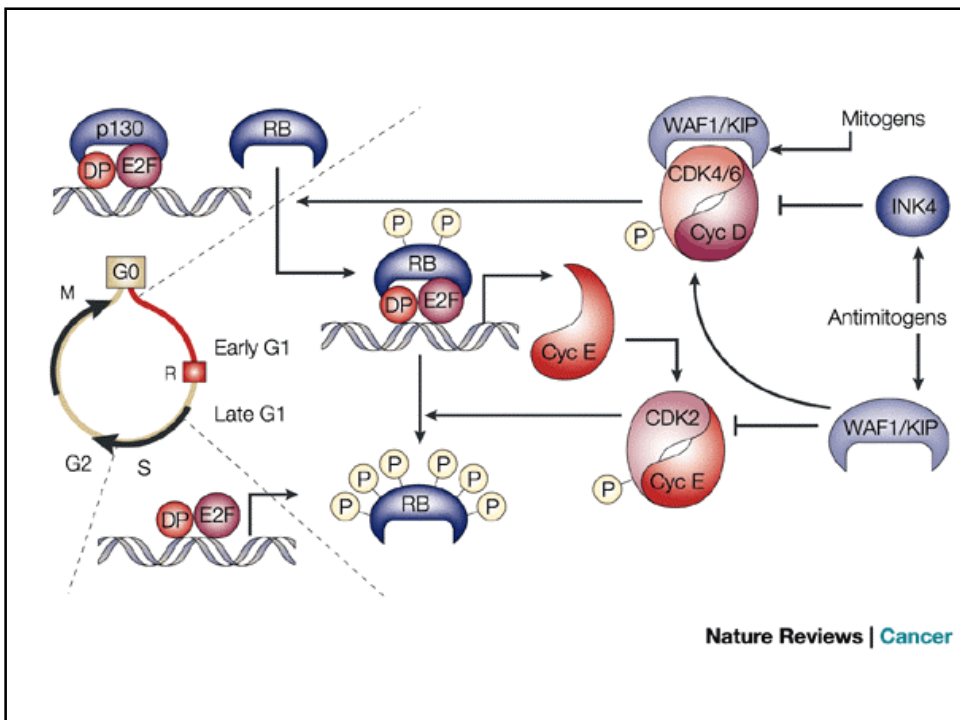
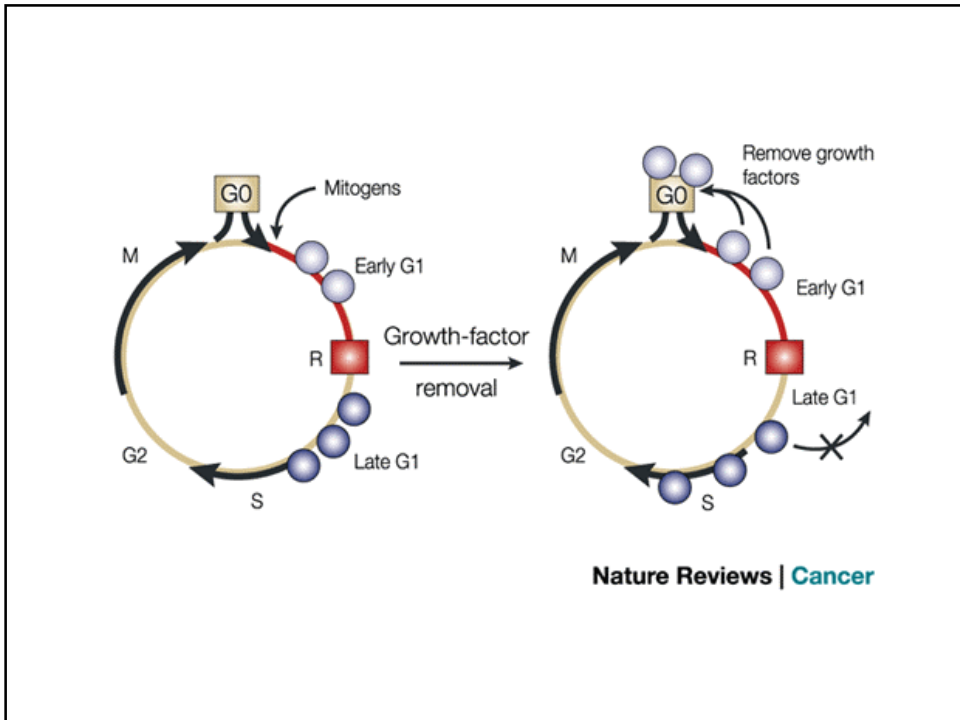
Inhibují pouze cyclin D/cdk 4,6 complexy

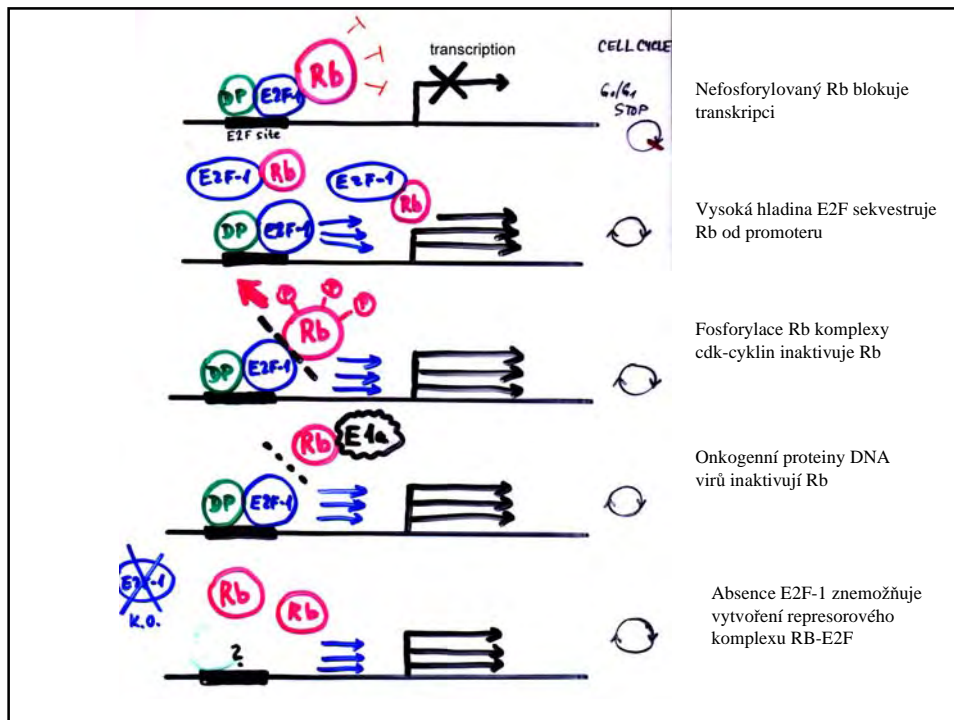
p21 (Cip1) family

p21 (Cip1, WAF1), p27 (kip1), p57 (Kip2)

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

p14ARF (p19ARF u myši)
stabilizuje p53 protein





Buněčné procesy, které mají následek vystoupení z buněčného cyklu nebo přechodný blok v buněčném cyklu.

Diferenciace.

Diferencované buňky jsou většinou v G₀ fázi buněčného cyklu. Terminální diferenciace norm. nedovoluje návrat do buněčného cyklu (neurony, myocyty). Diferencované buňky mají specifickou morfologii a exprimují specifické markery pro příslušnou tkáň. Blok a výstup z buněčného cyklu je zprostředkován tkáňově specifickými transkripčními faktory, které aktivují expresi blokátorů buněčného cyklu (např. inhibitorů cdk)

Senescence (buněčné stárnutí).

Replikativní senescence má za následek výstup z buněčného cyklu do G₀ fáze. Z tohoto stavu nejsou norm. buňky schopny vrátit se do buněčného cyklu. Senescentní buňky mají specifickou morfologii a exprimují specifické markery.

Buňky: normální – imortalizované - transformované

„Checkpoints“ buněčného cyklu.

Přechodný blok v buněčném cyklu po signálu (např. poškození DNA)

Trvalé defekty v regulaci buněčného cyklu:

Trvale porušená regulace buněčného cyklu u nádorových buněk.

Většinou porucha regulace v G₁ fázi a/nebo porucha kontrolních bodů

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

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

- restriction point

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

- DNA replication checkpoint (v G2/M)

buňka kontroluje v G2 fázi, zda nedošlo k chybám při replikaci a zda replikace byla kompletní.

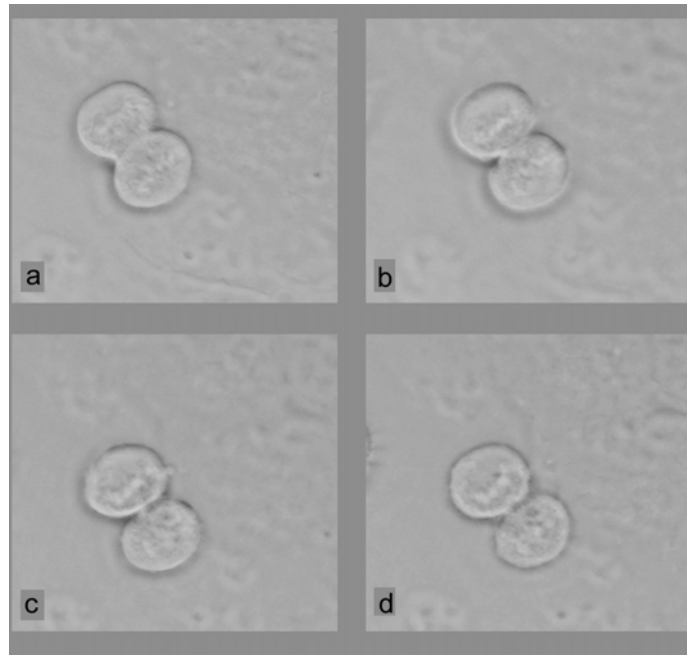
Po replikaci dojde vždy k mitóze, ale výjimečně v některých buňkách dochází k endoreduplikaci (opakování replikace bez mitózy).

- spindle assembly checkpoint

zajišťuje správnou segregaci chromosomů při mitóze.

- DNA damage checkpoint(s)

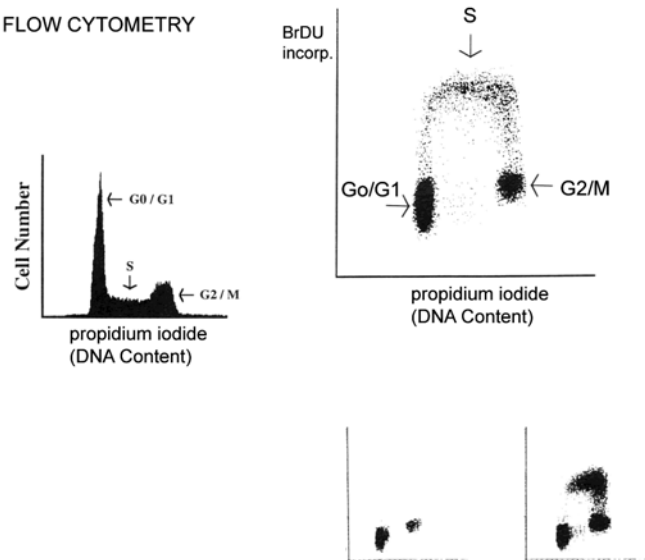
při poškození DNA může buňka zpomalit nebo zastavit cyklus v G1, S, i G2 fázi.



Cytokinesa: konečný stupeň dělení buněk – oddělení cytoplasmy

Analýza fází buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

FLOW CYTOMETRY



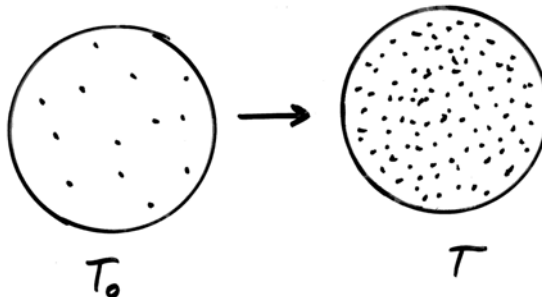
buňky v buněčné kultuře:

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

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

N_0počet buněk v čase T_0

Npočet buněk v čase T



Anaphase promoting complex (APC)

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

Signální cesty mitogenů a receptorů růstových faktorů konvergují při pozitivní regulaci G1 fáze (vstupu do S-fáze).

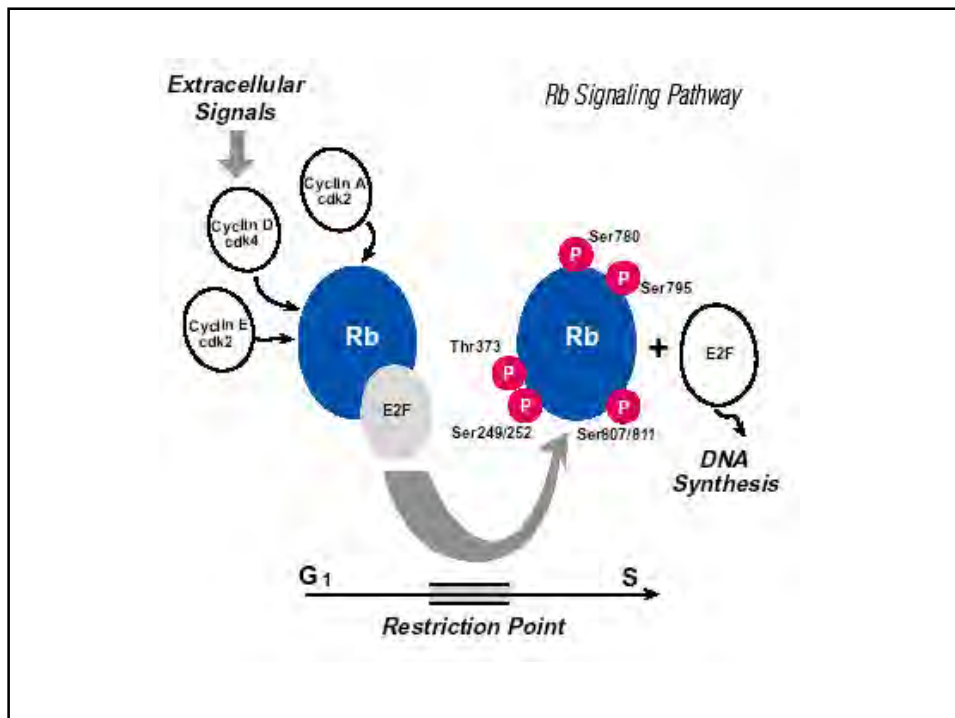
Přechod G1 → S

1. Retinoblastoma protein: Rb >>> P-Rb
aktivní inaktivní
2. Akumulace konc. cyklinů a cdk kinas, které fosforylují Rb

Cyklin D-cdk 4,6
Cyklin E-cdk 2
Cyklin A-cdk 2

Akumulace proteinů nutných pro syntézu DNA:

Thymidin kinasa, DNA polymerasa a, DHFR, cyklin A, cyklin E. Promotery jsou aktivovány E2F.



MAPK signální cesta zahrnuje kaskádu fosforylaci třemi hlavními kinázami, Raf, MEK a ERK:

RAS signalizace (ras: H-ras, K-ras, N-ras – GTP-vázající membránové proteiny, s GTPázovou aktivitou), aktivní forma: GTP-ras (mutované ras proteiny jsou konstitutivně aktivní) – u nádorů)



RAF = MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)



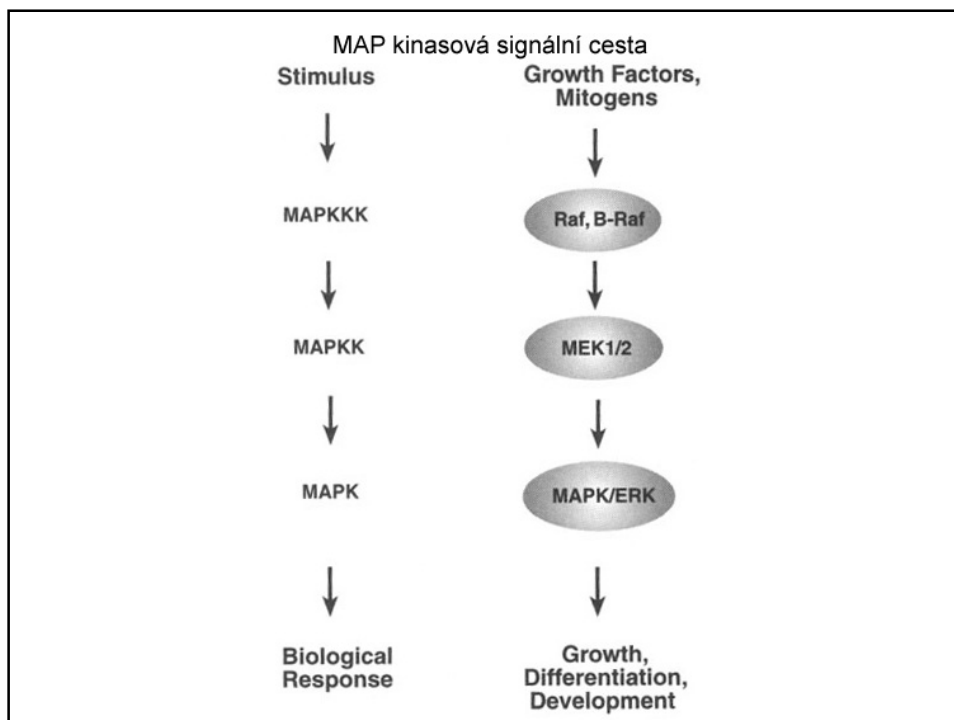
MEK = MAP kinase kinase (MAPKK)



ERK = MAP kinase (MAPK), extracelulárně regulovaná kináza (extracellular signal-regulated kinase)



proteinové substráty



**Poruchy funkce regulátorů buněčného cyklu
u nádorových buněk**

Cykliny:

Cyklin D – amplifikace genu, zvýšená exprese
Cyklin E – zvýšená exprese, porušená degradace

Cyklin-dependentní kinasy:

Cdk4 – amplifikace, zvýšená exprese, mutace
Cdk6 – zvýšená exprese, amplifikace

Cdc25A – zvýšená exprese

Rb protein:

Mutace, delece = ztráta funkce

Cdk inhibitory:

p16(INK4a) – mutace, delece,
methylace promoteru = snížená exprese
(p21, p27 – zvýšená degradace)

p53 protein

bodové mutace

Familiární formy nádorů

Gen	Lokus	Somatické mutace u nádorů
Rb	13q14	Retinoblastom osteosarkom, SCLC,
p53	17p13	Syndrom Li-Fraumeni, většina nádorů
NF1,2	17q11; 22q12	Neurofibromatosa typ 1,2 neurofibrom,..
p16	9p21	"Familiární" melanom melanom, ca. pankreatu, ca. plic,...
WT1	11p13	Wilmsův tu.

Další geny: BRCA 1,2, FHIT, APC, VHL, p300

ONKOGENY x SUPRESOROVÉ GENY

Aktivace buněčných onkogenů:

- bodové mutace (*ras*)
- zvýšená exprese (transkripce) (*jun, neu, ...*)
- amplifikace genu (*myc, myb, EGFR, cyklin D1...*)
- translokace do blízkosti silného promotoru/enhanceru (*c-myc*)
- vytvoření chimerického proteinu translokací
Abl-Bcr t(9;22)
Pax3-FKHR t(2;13)
- zvýšená stabilita proteinu

bodové mutace a fúze translokací:
vznik dominantního onkogenu

Inaktivace supresorových genů:

- bodové mutace (*Rb, p53*)
- delece různého rozsahu (od několika bazí po ztrátu lokusu (LOH))
- snížená exprese (transkripce)
methylace promoteru (*p16*)
- zvýšená degradace proteinu (*p53 x mdm2*)

Genom retroviru:

2 identické molekuly RNA (každá 35S),
„cap“ na 3'-konci, polyA na 5'-konci

sekvence RNA kóduje:

gag - strukturní proteiny virové kapsidy

pol - reverzní transkriptasu (+ proteasu)

env - virový obal



Onkogenní DNA viry.

Virus:	Onkoprotein:	Genom (kb):
SV-40 virus	large T Ag	5
Polyomavirus	middle T (large T)	5
Adenoviry (Ad12)	E1a (E1b)	35
Papilomaviry (HPV16)	E7, E6	8

Hepatitis B viry
Herpesviry, Epstein-Barr virus
Poxviry

Ras-signalizace

RAS proteiny mohou být aktivovány (např. změna aminokyseliny v pozici 12 a 13 u K-ras, 61 u H-ras), a stanou se tak onkogenními – mutace časté v nádorových buňkách.

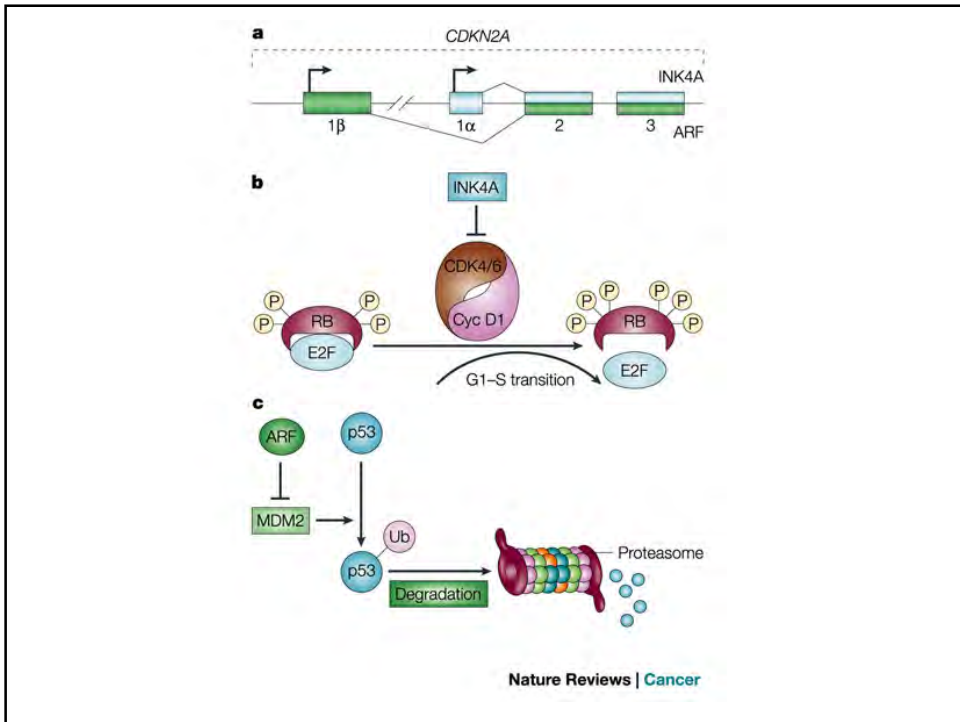
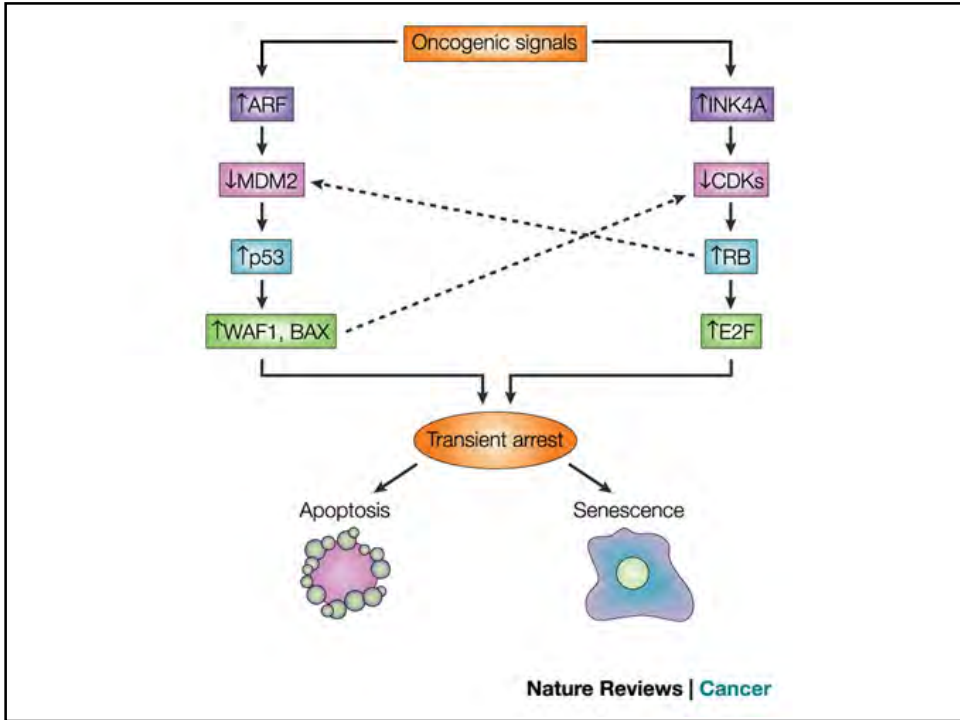
Fyziologicky jsou RAS proteiny aktivovány signálními cestami, např. epidermálním růstovým faktorem přes EGFR (=EGF receptor).

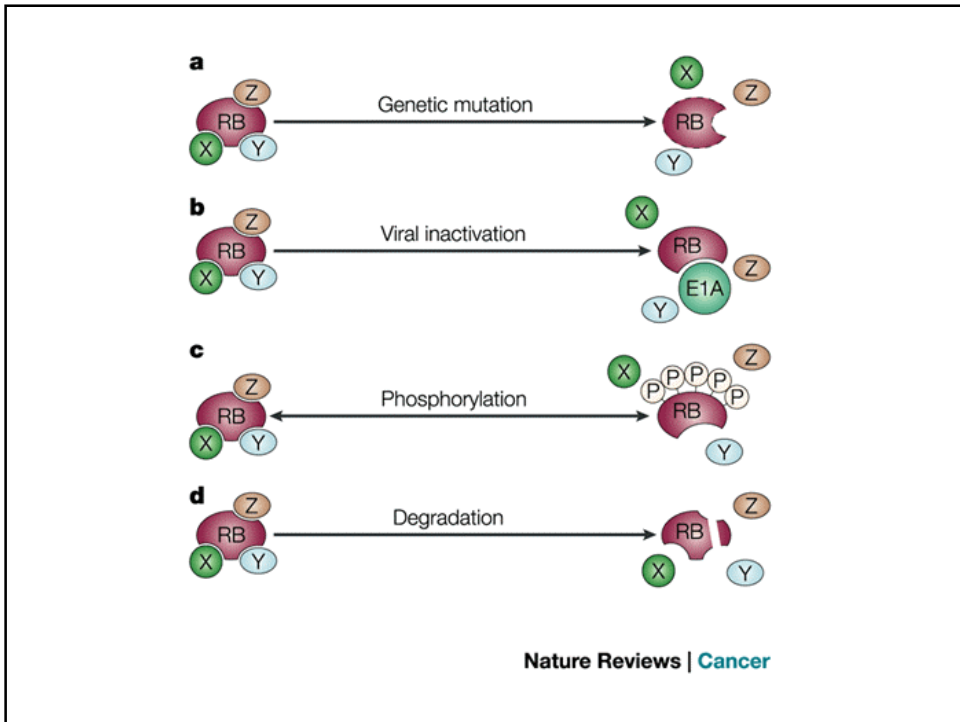
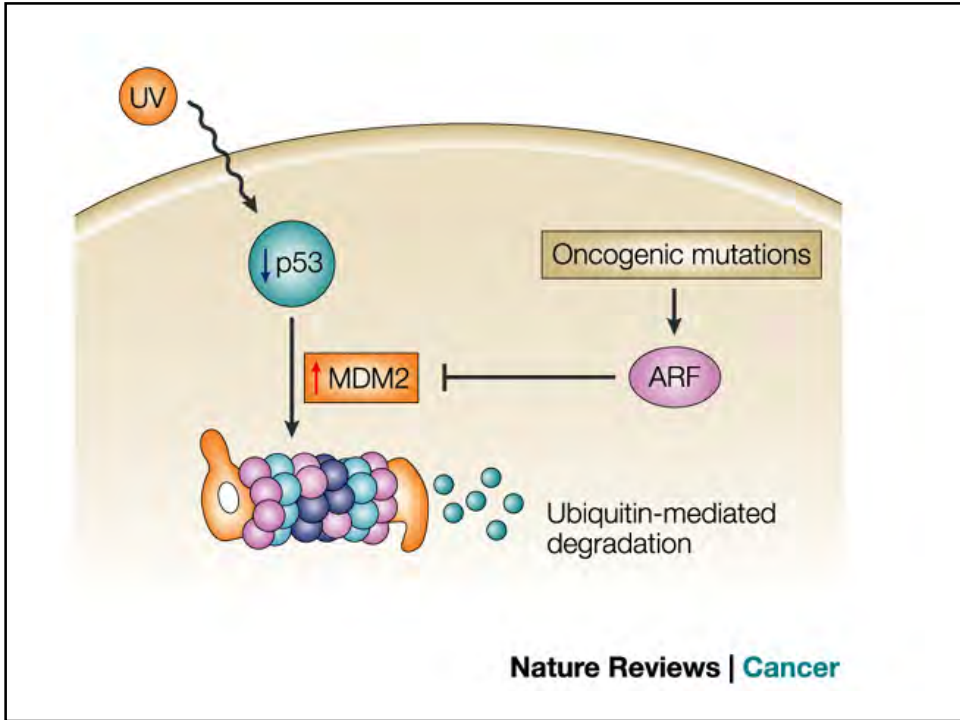
Při hyperstimulaci ras proteiny aktivují "checkpoint" který má za následek blok v G1 fázi buněčného cyklu za předpokladu, že ostatní proteiny regulující buň. cyklus nejsou mutovány nebo inaktivovány (p16, p14ARF, p53) Tento ras-indukovaný blok připomíná blok v b. cyklu při senescenci.

Jestliže ras signální cesta je hyperstimulována (např. mutací) při současné inaktivaci supresorového genu (p16, p14ARF, p53) nastává deregulace buněčného cyklu a vznik nádoru (u myši).

Ras aktivita je za fyziologických podmínek nutná pro překonání G1/S bariéry, stimulací ras se zvyšuje hladina cyklinu D.

Ras aktivuje: MAPK signální cestu a PI3K signální cestu (PIP3 – Akt kináza – důsledkem je zvýšená hladina cyklinu D posttranskripčně, translokace p21 a p27 do cytoplasmy).





Knock-out myši:

GENOTYP	FENOTYP	
Rb -/-	embryon. letalita	poruchy diferenciace nervových a krevních b., zvýš. apoptosa, abn. mitosy, pituitární tumory
E2F-1 -/-	viabilní --->	dysplasie exokrinních žláz, testikul. atrofie, pozdní nádory
Ink4a lokus (p16 ^{Ink4a} + p19ARF)	-/- viabilní --->	predisposice k tu. (fibrosarkom, lymfom)
p19ARF	-/- viabilní	predisposice k tu. (fibrosarkom, lymfom)
p16 ^{Ink4a}	-/- viabilní	zvýšená incidence tu. (melanom), hyperplasie thymu
p21 -/-	normální	fibroblasty defektní v kontrole G1 fáze
p27 -/-	gigantismus, hyperplasie mnoha tk., pituitární tu, dysplasie retiny	
p53 -/-	zvýšená incidence nádorů různých typů (zejména lymfomy a sarkomy)	
p107 -/-	normální	
p130 -/-	normální	
p107 -/-, p130 -/-	neonatální letalita	defekty ve vývoji končetin
p300 -/- nebo CBP -/-	embryon. letalita	embryon. fibroblasty rostou pomalu