

22. A SEJTCIKLUS GENETIKAI SZABÁLYOZÁSA.

Sejtméret. A sejtciklus szakaszai. Kromoszóma- és centroszóma-ciklus. A *cdc* mutációk és jelentőségük. Ciklinek és Cdk-k. Kontrollpontok és szabályozó tényezők. A telomeráz és a sejtek öregedése.

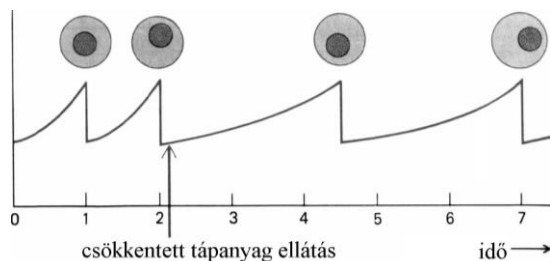
A fejezetet Szabad János jegyzetét és Kovács János Sejtten című könyvét felhasználva Lippai Mónika állította össze.

BEVEZETÉS

A soksejtű élőlények testét alkotó sejtek nagyon sok osztódás eredményeként jönnek létre. Egy felnőtt ember testében minden másodpercben milliónyi új sejt képződik. A leánysejtek nagyon hasonlítanak az anyasejthez: ugyanannyi kromoszóma és centroszóma van bennük, és többnyire osztóznak az anyasejt citoplazmáján. A sejtosztódások folyamán a sejtek ugyanazokat az eseményeket ismétlik: a sejtek életének van egy ciklusa, az úgynevezett sejtciklus. Mi szabja meg a sejtek méretét? Honnan tudják a sejtek, hogy osztódniuk kell? Hogyan kétszerezik meg kromoszóma-állományukat és osztják szét "igazságosan" a leánysejtek között? Melyek azok a molekuláris tényezők, amelyek a sejtosztódások ciklikus menetét szabályozzák? Hogyan lehet megismerni a sejtciklust szabályozó tényezőket? Meddig osztódnak a sejtek? Van kapcsolat a sejtosztódások és az élőlények öregedése között? Ez a fejezet az itt felsorolt kérdésekre igyekszik válaszolni.

A sejtek mérete és osztódása közötti kapcsolat

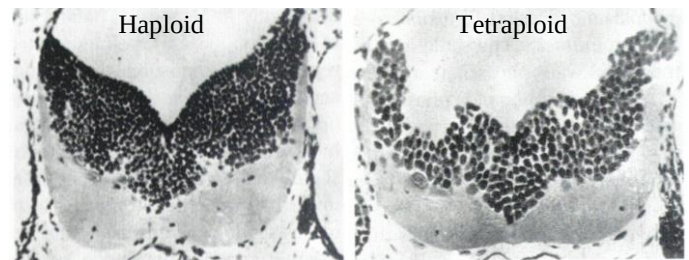
A sejtek mérete az osztódást követően általában növekszik, és akkor osztódhatnak újra, ha térfogatuk átlép egy határértéket. A sejt növekedésének mértékét a tápanyag-ellátottság mértéke is befolyásolja, tehát az osztódást magát is meghatározzák külső tényezők is (22.1. ábra). Vannak azonban kivételek: közismert példa a megtermékenyített petesejtek úgynevezett hasadási (angolul: cleavage) osztódása, amely során a sejtek térfogata osztódásonként felére csökken.



22.1. ábra. A sejtek térfogat-változása az idő függvényében. A sejtek akkor osztódnak, miután térfogatuk eléri a megfelelő mértéket: az osztódás kezdete tehát függ a sejt méretétől. Tápanyaghiány esetén a sejtek ezért lassabban osztódnak.

Honnan "tudják" a sejtek, hogy mekkorára nőhetnek, illetve milyen méret elérése után kell osztódniuk? Bár a pontos válasz nem ismert, egyes esetekben úgy tűnik, a

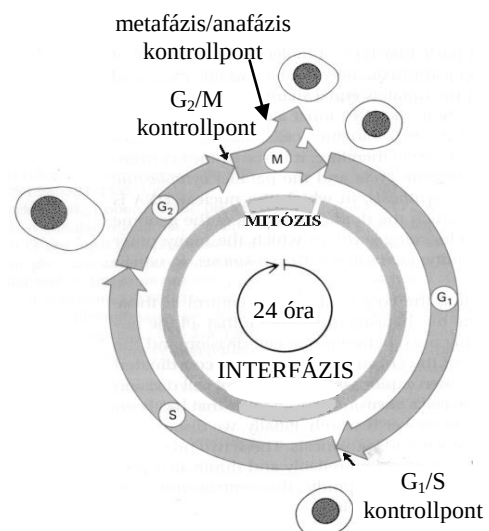
sejtekben konstitutívan expresszálódik egy rövid életű fehérjét kódoló gén (nevezzük *A* génnek), amelynek terméke gátolja egy másik (*B*) gén expresszióját. A *B* gén terméke a sejtosztódás elkezdődéséhez szükséges. A sejt növekedése során az *A* gén termékének koncentrációja fokozatosan csökken a citoplazmában, majd miután egy kritikus érték alá esik, megszűnik a *B* génre kifejtett gátló hatása. A *B* gén expressziója után kezdődhet el a sejtosztódás. Ezen elképzelés lét-jogosultságát az a megfigyelés is alátámaszthatja, hogy a haploid szalamandrák utóagyát (amelyben kevesebb *A* fehérje expresszálódik) sok kicsi sejt alkotja, szemben a tetraploid szalamandrák utóagyában lévő kevesebb, de jóval nagyobb sejtrel (22.2. ábra).



22.2. ábra. A haploid szalamandrák utóagyában (bal oldal) a kis sejtek nagyjából ugyanakkora területet töltenek ki, mint a tetraploid szalamandrák nagy sejtjei

A SEJTCIKLUS SZAKASZAI

A sejtciklus azt jelenti, hogy a sejtek életében az osztódásra felkészülés és az osztódások szakaszai periodikusan követik egymást. A sejtciklus osztódási fázisát, a mitózist, M-el jelölik. A két mitózis közötti szakaszt interfázisnak nevezik. Az interfázis legelőször tanulmányozott szakasza az S, vagy *szintézis* fázis volt, amikor a kromoszómák a DNS replikációja után megkettőződnek. Az M és az S fázisokat a G (angolul *gap*) szakaszok választják el: az M és az S között a G_1 , az S és az M között a G_2 (22.3. ábra).



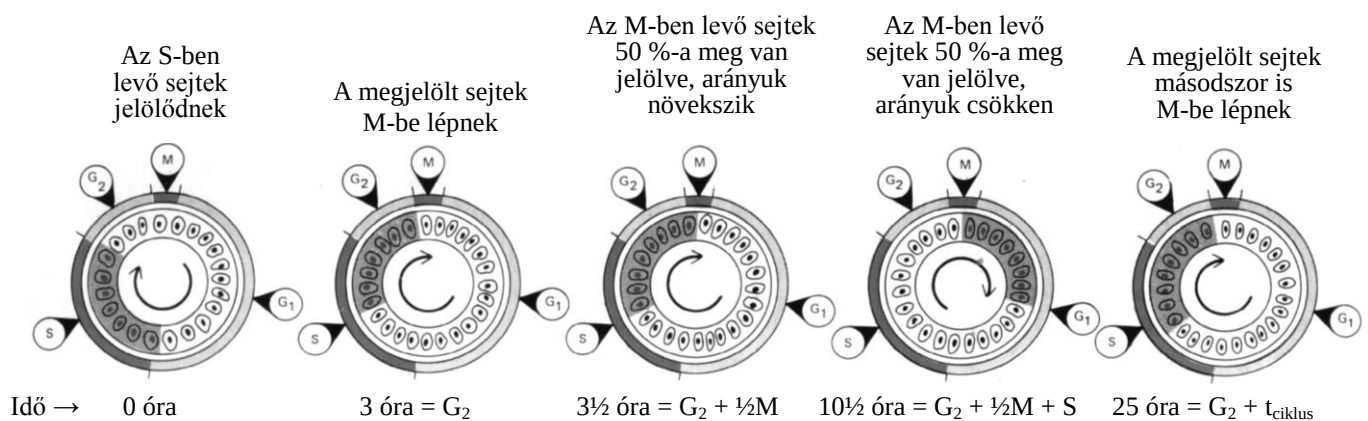
22.3. ábra. A sejtciklus szakaszai. Két M közötti szakasz, az interfázis G_1 , S és G_2 szakaszokra oszlik. A G_1/S , a G_2/M és a metafázis/anafázis átmenetek a sejtciklus fontos szabályozási pontjai.

A G_1 szakaszban kiléphetnek a sejtek a sejtciklusból (G_0 -fázis), és akár végleg abbahagyhatják az osztódást, mint például az idegsejtek esetében. Vannak speciális, módosult sejtciklusok is: a korai embriók hasadási osztódásai gyakorlatilag csak M és S fázisokból állnak.

A sejtciklus menetének pontos megismerése nem volt könnyű feladat, hiszen az interfázis egyes stádiumait mikroszkópban nem lehet elkülöníteni, csak a mitózisnak vannak „szemmel látható” jelei. A sejtciklus egyes szakaszainak időtartamát szellemes módszerrel állapították meg (22.4. ábra). Pulzusjelölés során ^3H -timidint adtak nagyon rövid időre olyan sejtenyészethez, amelyben a sejtek a sejtciklus különböző szakaszaiban voltak. A ^3H -timidin csak az éppen replikálódó DNS-be épül be, így gyakorlatilag csak az S fázisban levő sejtek jelölődnek.

Időről időre mintákat vettek a sejtenyészetből, és kromoszóma-preparátumokat készítettek. A preparátumokat az autoradiográfia módszerével vizsgálták.

Pontosan G_2 -nyi idő múltán válik a ^3H -timidinből származó, az S-fázis legvégén beépült jel az első M fázisú sejtek részévé. G_2 +M idő elteltével már valamennyi, az M fázisban levő sejt tartalmaz jelölést - és így tovább (22.4. ábra). Ezzel a módszerrel meghatározhatták a sejtciklus egyes szakaszainak hosszát. Az emberi eredetű sejtek *tenyésztésében* a G_2 , az M, a G_1 és az S szakaszok hossza kb. 3, 1, 11 és 7 óra, nagyjából egy nap. Az élő szervezetben a különféle sejtípusok esetében elsősorban a G_1 szakasz időtartama igen széles határok között változhat.

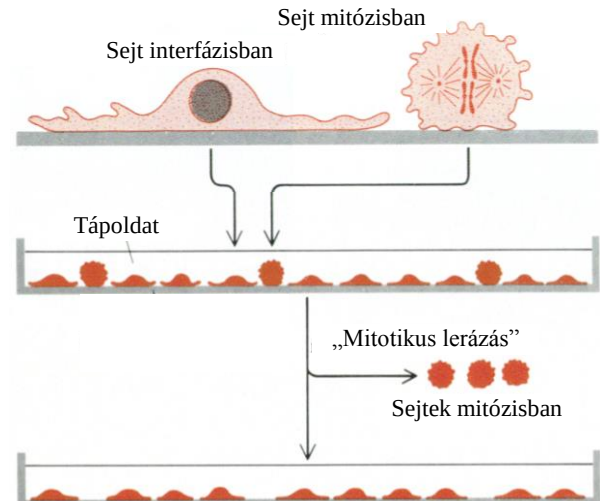


22.4. ábra. Módszer a sejtciklus-szakaszok hosszának megállapítására.

Sejtfúziók: S-fázis-aktiválás, re-replikációs blokk és MPF

Arra a tényre, hogy sejtciklus egyes szakaszai molekuláris összetétel alapján pontosan elkülönülnek, és bennük jellegzetes események történnek, *sejtfúziós kísérletekből* derült fény. A kísérletek során olyan sejteket fuzionáltak, amelyekben a sejtek a sejtciklus különböző stádiumaiban voltak, majd a fúzió után a közös citoplazmában lévő két sejtmag viselkedését tanulmányozták. A sejtfúziós kísérletekhez olyan sejtenyészetekre van szükség, amelyekben valamennyi sejt biztosan a sejtciklus adott stádiumában van, még ha nem is a jól azonosítható M fázisról van szó. A

sejtenyészet *szinkronizálásának* legegyszerűbb módja az ún. "mitotikus lerázásos" módszer. A módszer lényege az, hogy az M fázisú sejtek legömbölyödnék, és alig tapadnak a tenyészedény aljához. Rázással könnyen elkülöníthetők az interfázisban levő sejtektől (22.5. ábra). A mikrotubulusok rövidülését, azaz a mitotikus orsó működését gátló szerek szintén alkalmasak arra, hogy a sejteket megállítsák metafázisban. A sejtciklus-szakaszok hosszának ismeretében pedig lehet olyan sejtenyészetet készíteni, amelyben minden sejt például S fázisban van.



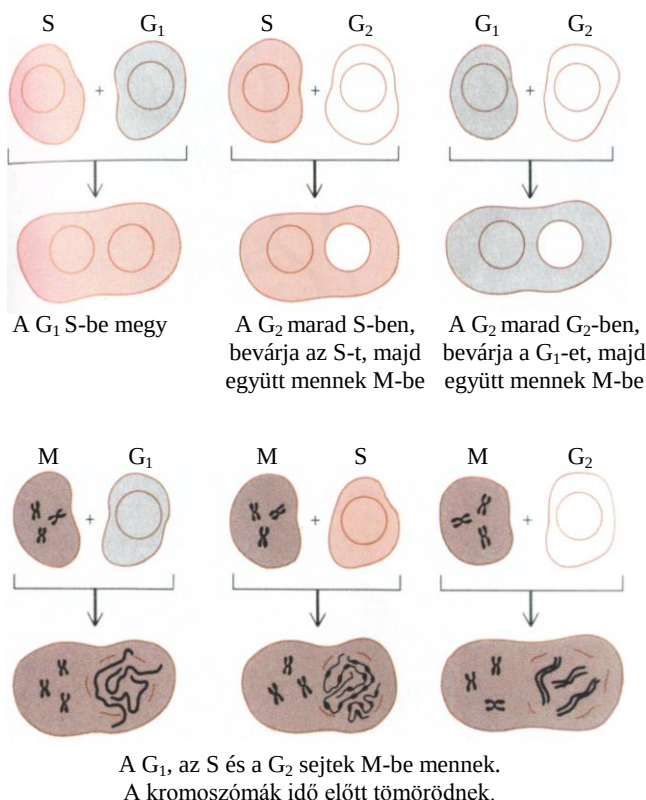
22.5. ábra. A sejtciklus M fázisában levő sejtek legömbölyödnék, és könnyen elválaszthatóak az interfázisban lévőktől, amelyek az edény aljához tapadnak.

A G_1 - és az S-fázisú sejtek fúziója után a G_1 -es sejt azonnal S fázisba lép, akkor is, ha éppen csak befejezte az M fázist, és még nem telt le a G_1 -ben töltendő idő. A G_1 +S fúziós kísérletek eredményei azt mutatják, hogy az S-fázisú sejtek citoplazmájában olyan tényező van (régén ezt SPA-nak, S-phase activator-nak nevezték), amely az S fázis elkezdődéséhez – aktiválásához – szükséges. Ezek szerint normális körülmények között a G_1 stádiumú sejtek addig vesztegelnek a G_1 /S fázis határán, amíg bennük meg nem jelenik ez a tényező. Mivel a G_1 /S határ szerepe kitüntetett a sejtek életében, *restrikciós pontnak* (élesztőkben *start*) nevezik, hiszen a sejtciklus olyan szabályozási pontja (kontrollpont), ahol a sejtciklus megáll, és ahonnan adott jelre indítható (22.3. ábra).

A G_1/S határon "átlendült" sejtek már mindenképpen befejezik az S fázist, és eljutnak a következő szabályozási pontig, ami G_2/M határ lesz.

Ugyanakkor, ha egy S-stádiumú sejtet G_2 stádiumúval fuzionáltatnak, a G_2 -ben levő sejt megmarad a G_2 stádiumban, nem hat rá az S-fázisú sejtben jelen levő faktor. Az S-ben levő sejt magja szabályosan, a megfelelő idő alatt befejezi az S és a G_2 fázisokat, a G_2 -es sejt pedig a saját ideje letelte után is várakozik, majd a két sejtmag együtt lép az M fázisba.

A $G_2 + S$ fúziós kísérletek eredményei azt jelzik, hogy (i) a G_2 sejtek magjában van egy olyan tényező, amely megakadályozza, hogy a már korábban kettőződött kromoszómák újból replikálódjanak, az S fázis újra (abnormálisan) lejátszódjon. A jelenség a *re-replikációs blokk*. A blokkot biztosító faktor csak a G_2 -es sejt kromatinjához asszociálódik, hiszen az S-fázisos sejtmagban nem akadályozza a replikációt. (ii) A G_2+S fúziós kísérleteknek van egy további fontos tanulsága. A G_2 stádiumú sejtek addig maradtak a G_2 stádiumban (vagyis jóval tovább, mint a normális G_2 időtartam), amíg a velük fuzionált S-társsejtek fel nem zártak hozzájuk, és együtt el nem érték a G_2/M határt (22.6. ábra). Az M-fázisba nem léphettek be addig, míg a másik sejt nem fejezte be a replikációt.



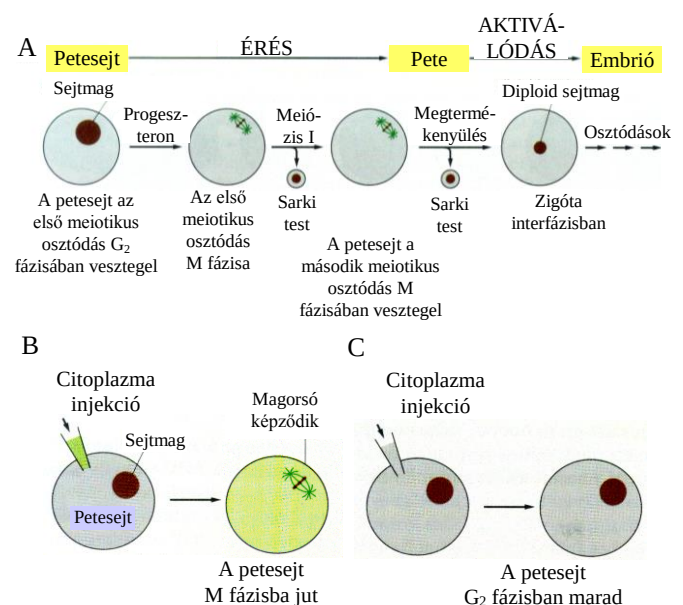
22.6. ábra. A sejtciklus különféle stádiumaiban levő sejtek sorsának alakulása a sejtek fúziója után.

Nagy meglepetést keltettek azok a kísérletek, amelyekben M fázisú sejteket fuzionáltattak a sejtciklus más stádiumaiban levő sejtekkel (22.6. ábra). Az M sejtekkel fuzionáltatott sejt, legyen az G_1 , S vagy G_2 stádiumú, rövidesen az M fázisba lépett, kromoszómája

(ha még nem is replikálódott) tömörödik. Azt a faktort, amely az M fázisú sejtek citoplazmájában van és mitózist indukál, MPF-nek, mitózist promótáló (elősegítő) faktornak nevezték el.

Az MPF eredetileg *maturáció* promótáló faktort jelentett, azért, mert ugyanez az MPF segíti az éretlen petesejtek érését, maturációját is. A *Xenopus laevis* karmosbékafaj petéinek képződése során az elsődleges oociták az első meiotikus osztódás G_2 stádiumában vesztegelnek. Progeszteron hatására megérnek: befejezik az első meiotikus osztódást, és eljutnak a második meiotikus osztódás metafázisába, ahol fejlődésük ismét "elakad" (22.7. ábra). A második meiotikus osztódás a megtermékenyülést követően fejeződik be, majd rövidesen elkezdődik az embrio-genezis, hasadási osztódások sorozatával. Ha a meiózis-II metafázisban veszteglő másodlagos oocita citoplazmájának kis részét a meiózis-I G_2 stádiumban veszteglő elsődleges oocitába injektálják, a G_2 -ben veszteglő petesejt gyorsan megér, és progeszteron nélkül is eljut a meiózis-II metafázisába (22.7. ábra) - azért, mert a másodlagos oocita citoplazmájában jelen van egy faktor, amelyet MPF-nek neveztek el. A G_2 -ben veszteglő *Xenopus* elsődleges oocita tehát alkalmas rendszer az MPF jelenlétének kimutatására: ráadásul bármely fajból származó MPF képes helyettesíteni a *Xenopus* MPF-et.

Tehát a sejtek életében mitózisok és interfázisok ismétlődnek. A sejtciklus normális lefolyását és irányát citoplazmatikus és a kromoszómákkal kapcsolódó tényezők biztosítják - később ezek molekuláris természetét is megismerhetjük. A sejt tömeg-növekedési és osztódási ciklusával összehangoltan folyik a genetikai állomány, azaz a kromoszómák és a centroszómák számának ciklikus változása is.



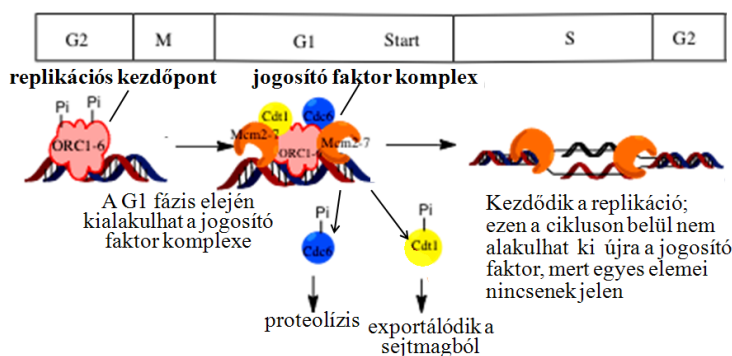
22.7. ábra. (A) A *Xenopus* oociták fejlődésének fontosabb "állomásai" (részletek a szövegben). (B) Ha az injektált citoplazma tartalmaz MPF-et (zöld), az elsődleges oocita megér, és eljut a meiózis-II metafázisáig. (C) Ha nincs az injektált citoplazmában MPF, a *Xenopus* elsődleges oocita a meiózis-I G_2 stádiumában vesztegel továbbra is.

A kromoszóma-ciklus

A kromoszóma-ciklus a DNS replikációját (a leánykromatidák képződését) és a mitózis során a kromoszómák utódsejtek közötti igazságos elosztását foglalja magába (lásd 4. fejezet). Míg a G₁ fázisban minden egyes kromoszóma egy DNS-molekulából áll (egy kromatidás állapot), az S fázisból kilépő sejtek kromoszómái már két DNS-molekulát tartalmaznak (két leánykromatidából állnak), melyek fehérjék révén kapcsolatban maradnak, és a következő mitózisban válnak csak szét egymástól. A replikáció az S fázis folyamán történik, ahogyan azt a 4. fejezet bemutatja.

Eukariótákban a replikáció egyszerre több ponton kezdődik. Az S fázis kezdetén elsőként a "háztartási gének" DNS-e replikálódik, mert ott a DNS polimeráz kényelmesen hozzáférhet a DNS-hez: a kromatin állapota (eukromatin) teszi ezt lehetővé. A hetero-kromatin és a Barr test kondenzált kromatinja az S fázis vége felé replikálódik. Például az immunoglobulin (ellenanyag) szintézisét kódoló kb. 3×10^5 bp-ből álló génkomplex replikációja az S fázis kezdetén és egyszerre több ponton kezdődik az ellenanyagokat előállító B-sejtekben. Azokban a sejtekben viszont, amelyekben ez a gén nem expresszálódik, a gén replikációja az S fázis vége felé történik meg, egyetlen pontból kiindulva, amely ráadásul a génen kívül van.

Az S fázis során minden kromoszómális DNS-szakasz egyszer, és csakis egyszer replikálódik. A szabályozó mechanizmus, mely minden DNS-ről csak egy kópia készítését engedélyezi, egy fehérjekomplex, a *jogosítófaktor* (licensing factor) működésén alapul. Ez a komplex a mitózis végén a DNS-molekulák azon szakaszaira kötődik, ahol majd a következő S fázisban megindul a replikáció. A másolást végző DNS-polimeráz csak a jogosítófaktor által kijelölt helyekről tudja megindítani a replikációt, de ehhez a G₁/S fázis

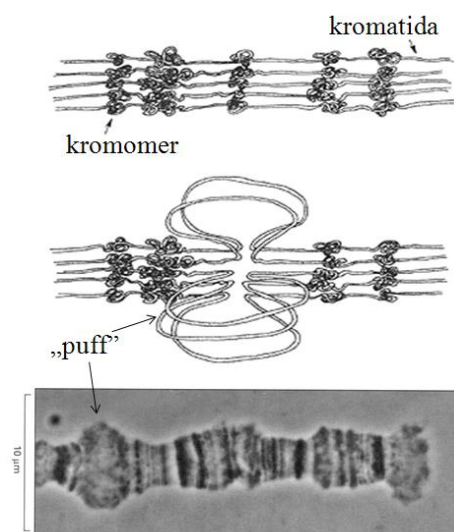


22.8. ábra. A re-replikációs blokk természete. Az ORC1-6 komplex (origin recognition complex) ismeri fel a replikációs starthelyet. A G₁ fázisban (specifikus kinázok hiányában) a jogosító faktor alegységei kötődnek az ORC-hoz, majd az S fázisban a DNS-polimeráz is kapcsolódhat. Ekkor azonban egyes aktiválódó kinázok (lásd később) hatására foszforilálódnak, leválnak és lebomlanak vagy kikerülnek a sejtmagból a jogosító faktor egyes komponensei – már csak egy következő ciklus G₁ fázisában szerelődhetnek újra össze.

határán aktiválódó fehérjék (lásd később) közreműködése is szükséges. Hatásukra a jogosító faktor egyes fehérjéi foszforilálódnak, majd leválnak a DNS-ről, utat nyitva a DNS-polimeráznak (22.8. ábra). Ez utóbbi viszont a jogosító faktor hiányában ismételt már nem tud a replikációs kezdőpontokhoz kötődni, tehát nem indulhat meg ugyanazon szakasz ismételt lemásolása. Ez az alapja a korai fúziós kísérletek során megismert, az előzőekben ismertetett re-replikációs blokknak.

A sejtek a rájuk jellemző funkciót az interfázis, azon belül is a G₁ fázis folyamán töltik be. S fázisba csak akkor lépnek (megfelelő növekedési/osztódási jelek hatására), ha ezután rövid időn belül osztódni fognak. Másképp: ha átlépték a G₁/S határt, akkor mindenképp kilépnek a nyugalmi állapotból, „felveszik a sejtciklus fonálát”. A sejtciklus G₂ és M szakaszában a sejtek csak az osztódással közvetlenül kapcsolatos funkciókat látják el. Azok a sejtek, amelyek nem függeszthetik fel működésüket, nem is osztódnak. A szívizom- vagy idegsejtek végigkísérnek bennünket életünk végéig.

Egyes sejtípusok speciális, módosult sejtciklust „hajtanak végre”. Vannak sejtek, amelyek M fázis nélkül többször átmennek az S fázison és poliploidokká válnak, vagyis a kromoszómák nem két, hanem több kópiában fordulnak elő bennük –például májsejtjeinkben (ismeretlen okból) fordul ez elő. Más sejtek – mint például a muslica nyálmirigy-sejtjei – politenizálódnak, azaz bennük nem két, hanem akár ezer leánykromatidából álló óriáskromoszómák képződnek. A politén („sokfonalas”) kromoszómák létezése óriási jelentőséggel bírt a génműködés vizsgálatával kapcsolatos kutatások során, mert az aktív gének interfázisban is jól láthatóak az úgynevezett „puffok” megjelenése miatt (22.9. ábra).



22.9. ábra. A politén kromoszóma. A két felső rajzon az egyszerűség kedvéért csak öt kromatidából álló politén kromoszóma rajza látható. Legalul egy muslica politén-kromoszóma részlete. Kromomer: erősebben színeződő kromoszóma-részlet. „Puff”: jellegzetes megvastagodás, kialakulása lazább kromatin-szerkezetre és ezzel összefüggésben aktív gén-működésre utal.

A centroszóma-ciklus

A mitózisban alapvető jelentősége van a centroszómáknak, amelyek a mikrotubulusokból álló mitotikus orsó kialakulását szervezik (21.9. és 22.10. ábra). A centroszóma-ciklus elsősorban a centriólumok sejtciklussal összehangolt osztódását jelenti. Az ily módon duplikálódott centroszómák a kétpólusú orsó által biztosítják a replikálódott kromoszómák elrendeződését a sejt egyenlítői síkjában, a kromoszómák megfelelő szegregációját a mitózis végén, valamint a leánysejtek elkülönülését.

A SEJTCIKLUS MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSA

A sejtciklus „genetikai boncolása”

Hogyan ismerték meg az „S-fázist aktiváló faktor”, az MPF és a sejtciklus további szereplőinek molekuláris természetét? A megoldást két élesztőfaj és a *genetikai boncolás* módszere jelentette. Az élesztők egysejtű gombafélék, sejtciklusuk kényelmesen követhető (22.11. ábra). Ha a sejtciklus lefolyását szabályozó tényezők fehérjék, az őket kódoló géneket mutációkkal el lehet rontani. A szabályozó tényezőkben indukált, a funkció vesztésével járó mutációk következményeként azonban a sejtek képtelenek lesznek az osztódásra, nem lehet őket fenntartani, vagyis a mutáns géneket nem lehet vizsgálni, meghatározni. *Kondicionális letális* mutációkkal viszont egyszerűen lehetett azonosítani a sejtciklus szabályozásában résztvevő, úgynevezett *cdc* géneket (angolul *cell division cycle*). A kondicionális letális mutáció azt jelenti, hogy a mutánsok permisszív (megengedő, az életfolyamatokat lehetővé tevő) környe-

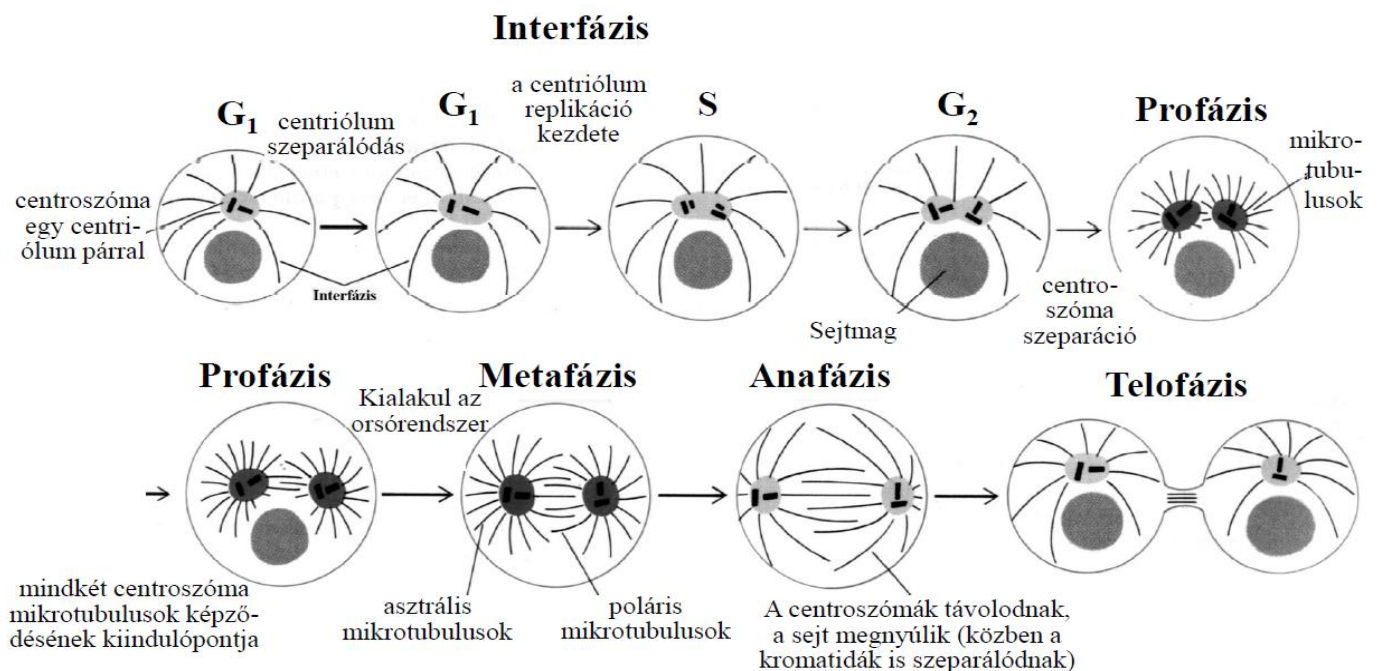
zeti feltételek mellett, például 25 °C-on életben maradnak és osztódnak. Restriktív körülmények között viszont, például 37 °C-on, elpusztulnak.

Az várható, hogy a sejtciklust szabályozó valamelyik génben mutáns, hőmérséklet-érzékeny élesztősejtek fejlődése restriktív hőmérsékleten megáll azon pontok valamelyikén (például a G₁/S vagy a G₂/M határon), amelyeken való átjutáshoz szükséges lenne az adott gén terméke is. Mutagenézis-kísérletek során így ki lehetett válogatni az élesztő *cdc* mutánsait.

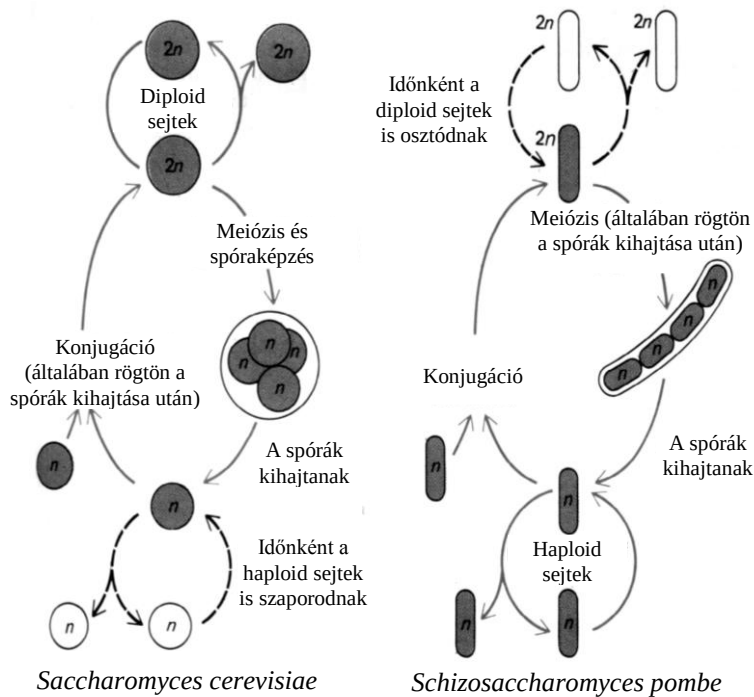
A *cdc* mutánsok tulajdonképpen eszközök: olyan géneket azonosítanak, amelyeknek szerepe van a sejtciklus szabályozásában. Hogyan ismerték meg a *cdc* mutációkkal azonosított gének funkcióit?

Először előállítottak egy adott *cdc* mutáns fenotípust mutató élesztősejt-tenyészetet (22.12. ábra). Az élesztősejtekbe (transzfekcióval) plazmidokat vittek: a plazmidok az élesztőgenom különböző szakaszait tartalmazták. Az élesztő-tenyészetet restriktív hőmérsékletre helyezték. Ezután csak az olyan élesztősejtek tudtak osztódni és így képeztek telepeket szilárd táptalajon, amelyekbe olyan plazmid jutott, amely tartalmazta a *cdc* mutációnak megfelelő ép (*cdc*⁺) gént (22.12. ábra). Ezeket az élesztősejteket ezután szaporítani lehetett, izolálni lehetett belőlük a plazmidot, a plazmidból ki lehetett nyerni a *cdc*⁺ gént tartalmazó plazmidot, majd azonosítani lehetett az ép gént és a továbbiakban a géntermék funkcióját.

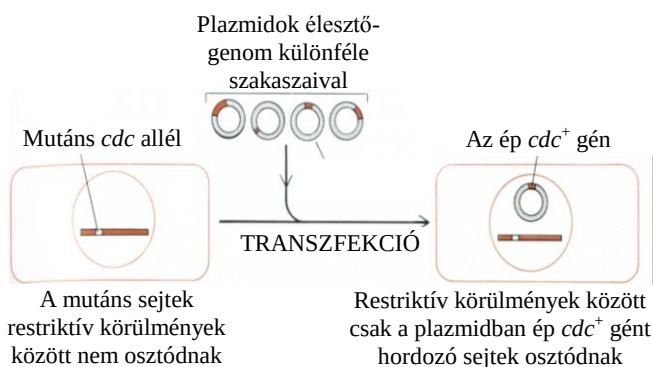
Az élesztő *cdc*⁺ génjeiről az is kiderült, hogy evolúciósan erősen konzerváltak - csakúgy, mint a teljes sejtciklus-szabályozás mechanizmusa.



22.10. ábra. A centroszóma-ciklus eseményei. A centroszóma-ciklus során a centriólumok – ismeretlen módon – replikálódnak, és két új centroszóma szerveződik körülöttük. A mitózis elején a centroszómák szétválnak és a sejt ellentétes pólusaira vándorolnak, ahol kialakítják a mitotikus orsót (az ábrán a kromoszómák és a kinetochor mikrotubulusok nincsenek feltüntetve).



22.11. ábra. A sarjadzó (*Saccharomyces cerevisiae*), és a hasadó (*Schizosaccharomyces pombe*) élesztőgombák életciklusai. A sarjadzó élesztők sejtei életüket inkább diploidként, míg a hasadók inkább haploidként élik.



22.12. ábra. A *cdc* mutációkkal azonosított ép *cdc+* gének klónozása.

Sejtosztódás a megismert molekulák tükrében

Élesztőfajok fenti *cdc* mutációiból kiindulva lehetett megismerni a sejtciklus szabályozásának meghatározó molekuláit. A hasadó élesztő *cdc13* jelű génje például egy olyan fehérjét kódol, amelynek koncentrációja ciklikusan változik a sejtciklus folyamán (22.13. ábra). A fehérjét ezért *ciklin*nek nevezték el. A *cdc13* ciklin a ciklin család B jelű tagja, melynek koncentrációja a metafázisban a legnagyobb. Jelen van nem csak az élesztőkben, hanem valamennyi eukarióta fajban is. A ciklin B koncentrációja az M fázis legvégén nagyon alacsony, az interfázis során fokozatosan emelkedik, majd a metafázisos csúcstól kezdve rohamosan csökken. A csökkenés oka az, hogy egy idő után a ciklin fehérjék N-terminális végük közelében olyan módosító jelet kapnak

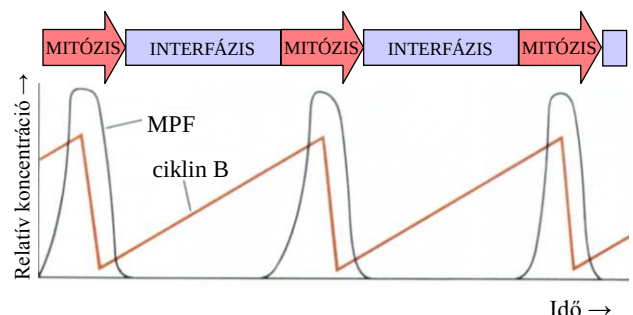
(poliubikvitinálódnak), amelyet felismernek a proteasómák, és degradálják a ciklineket. (Emlékeztetőül: a proteasómák olyan fehérje-alegységekből álló komplexek, amelyek lebontják a poliubikvitinnel megjelölt fehérjéket – lásd 10. fejezet.)

A hasadó élesztő *cdc2* (sarjadzó élesztőben *cdc28*) génjének terméke pedig egy úgynevezett *ciklin-dependens-protein-kináz* (= Cdk) fehérje. Élesztőben egyféle, emlősökben négy különböző Cdk van. A Cdk-k folyamatosan jelen vannak a sejtciklus folyamán, de csak a ciklinekkel kapcsolódva képeznek működő fehérjekomplexeket. Kinázként más fehérjék foszforilálása révén fejtik ki hatásukat.

Élesztőben az egyetlen Cdk enzim, attól függően, hogy a sejtciklus során milyen ciklinnel kapcsolódik, különböző célpontokat foszforilál, és így más folyamatokat indít be (22.14. ábra).

Emlősökben az SPA-nak megfelelő, a G_1 sejteket is S-fázisba léptető faktor valójában a Cdk4 és a ciklin D komplexe. A Cdk4/ciklin D foszforilálja például a jogosító faktor komponenseit és más olyan fehérjéket, amelyek aktivitása miatt elkezdődhet a DNS replikációja. Az MPF emlősökben a Cdk2 és a ciklin B komplexének felel meg. A Cdk2/ciklin B komplex aktivitása nyomán szerelődik szét a sejtmembrán, tömörödik a kromatin, hogy metafázisos kromoszómák képződjenek.

A különböző Cdk-komplexek aktivitásának csökkenése a ciklinek degradációja miatt következik be. Ráadásul párhuzamosan foszfatázokat kódoló gének aktivitása is fokozódik. A foszfatázok hasítják le a célfehérjéről a kinázok által rájuk kapcsolt foszfátcsoportokat, hogy folytatódhasson a sejtciklus.

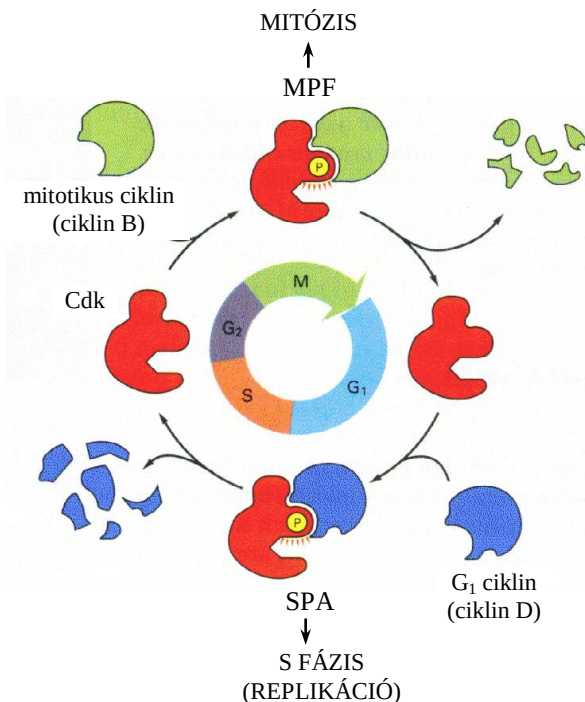


22.13. ábra. A ciklin B koncentráció és az MPF-aktivitás változása a sejtciklus során.

A sejtciklus ellenőrző pontjai

Ahogy már láthattuk, az egyes fázisok határára *ellenőrző pontok* – molekuláris mechanizmusok – működnek, melyek a továbblépést csak akkor engedik, ha a fázisra jellemző részfolyamatokat a sejt végrehajtotta. Ilyen ellenőrző pont van például a **G_1/S fázis határára** (22.3. ábra). Mint korábban már kiderült, a sejt csak akkor tud osztódni, azaz G_1 -ből S fázisba lépni, ha a G_1 fázis során tömege megfelelő méretűre növekedett, elegendő

tápanyag és növekedési faktorok hatására. Ez azonban csak szükséges, de nem elégséges feltétel: a továbblépéshez még az is kell, hogy az osztódásra külön jelet kapjon (*mitogén szignál*), DNS-állománya ép legyen és a replikációhoz szükséges apparátus és anyagok (pl. polimerázok, nukleotidok stb.) is rendelkezésre álljanak.

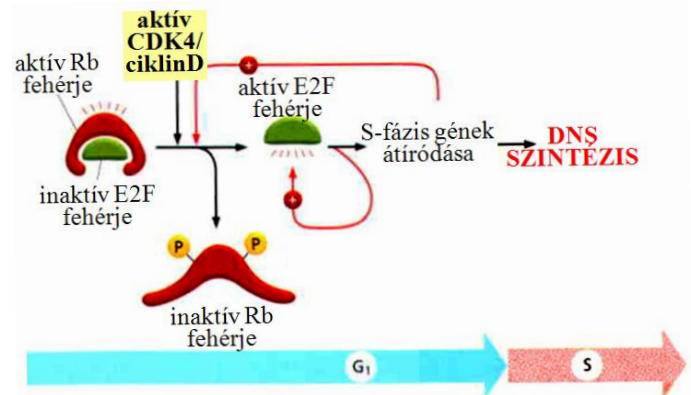


22.14. ábra. A sejtciklus szabályozásban résztvevő molekulák és szerepük. Az ábrán az élesztő sejtciklusának egyszerűsített sémája látható, ahol egyetlen Cdk különböző ciklinekkel kapcsolódva szabályoz. Emlősökben négyféle Cdk található.

Ellenőrzési pont működik a **G₂ fázis végén (G₂/M határ)** is, mely nem engedi mitózisba lépni a sejtet akkor, ha DNS-e károsodott vagy hiányosan replikálódott az S fázis során. További ellenőrzési pont van a mitózis **meta-fázis/anafázis** határán: a sejt addig nem lép át az anafázisba, amíg az összes kromoszóma rá nem kötődik a szegregációt biztosító mitotikus orsó kinetochor mikrotubulusaira és el nem helyezkedik az egyenlítői síkban.

A fázisátmenetek molekuláris szabályozásának egy jól ismert részletét a 22.15. ábra szemlélteti. Kellő tápanyag-ellátottság esetén a sejtek a G₁ fázisban gyorsan növekszenek, és a növekedési/osztódási faktorok hatására aktiválódik bennük a tirozin-kináz receptor/Ras/MAP kináz jelátviteli út (lásd 16. fejezet). Így szintetizálódnak vagy aktiválódnak olyan transzkripciós faktorok, melyek az osztódáshoz szükséges gének expresszióját irányítják. Közülük az egyik éppen a ciklin D génje. Fokozódó átíródása következtében megnő a ciklin D mennyisége és aktiválódik a Cdk4/ciklin D komplex. Ennek egyik szubsztrátja az *Rb fehérje* (a retinoblasztóma gén terméke, az elnevezés arra utal, hogy a gén deléciója tumoros megbetegedést, retinoblasztómát okozhat – lásd majd a 23. fejezetet). Az Rb egy transzkripciós faktort (E2F) tart kötött állapotban, de ha a Cdk4 foszforilálja őt, ez a faktor felszabadul és a magban megindítja a G₁/S átmenethez és

a DNS replikációjához szükséges gének átírását: a sejt át lép a G₁-ből az S fázisba. Növekedési faktorok hiányában ez a szabályozás nem működik, a növekedés és a ciklin D-szintézis lelassul vagy leáll, a G₁ fázis elhúzódik, sőt a sejt tartósan kiléphet a ciklusból és aG₀ fázisba kerülhet.



22.15. ábra. Osztódási jel hiányában az Rb fehérje köti és ezzel inaktív állapotban tartja az E2F transzkripciós faktort. A mitogén (mitózist kiváltó) jelátvitel (pl. Ras-MAPK) aktiválódásának hatására kialakul a Cdk4/ciklin D komplex, foszforilálódik és ezáltal inaktíválódik az Rb fehérje. Felszabadul az E2F, és beindítja az S fázis beindításához szükséges gének kifejeződését. Piros + jel: pozitív visszacsatolás.

Megakad a sejt a G₁/S határon akkor is, ha növekedése ugyan kellő mértékű volt, de DNS-állományát valamilyen károsodás (például száltörés) érte. Ilyenkor hirtelen emelkedni kezd egy transzkripciós faktor, a p53 (53 kDa-os) fehérje mennyisége. A p53-at a sejtek folyamatosan termelik, de normális körülmények között gyorsan degradálódik, ezért szintje nagyon alacsony. DNS-száltörés után viszont stabilizálódik és hatására egy gátló fehérje, a p21 (21 kDa-os fehérje) kezd képződni, mely a Cdk4/ciklin D komplexhez kötődve azt inaktív állapotban tartja. Ezáltal megakadályozza, hogy a sejt S fázisba lépjen és így időt hagy a hiba kijavítására. Ha a hiba olyan mértékű, hogy kijavítása lehetetlen, a p53 olyan fehérjék képződését is képes stimulálni, melyek sejtpusztulást (apoptózist) okoznak. Ezért a p53 a genom integritásának egyik fontos "őre", megakadályozza, hogy a sejt károsodott, hibás DNS-molekuláit replikálja és utódaiba örökítse.

A valóságban még számos más tényező befolyásolja a G₁/S fázisátmenetet, de a szabályozás lényegét a fenti két mechanizmus is jól megvilágítja: a külső és belső hatások úgy szabályozzák a fázisátmeneteket, hogy különböző át-tételeken keresztül gátló vagy aktiváló jeleket generálnak, melyek célpontja valamelyik Cdk. Ez integrálja a pozitív és negatív jeleket, és attól függően, hogy melyik van túlsúlyban, engedi tovább vagy állítja meg a sejtet a ciklus valamelyik fázisában.

A SEJTOSZTÓDÁSOK SZÁMÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

A sejtciklusból való kilépés vagy visszatérés szabályozását *in vivo* nehéz vizsgálni. Szövettenyészetben tartott sejteken végzett kísérletek alapján azonban néhány törvényszerűség megállapítható. Biztos, hogy osztódásra csak *növekedési faktorok jelenlétében* képesek a sejtek, és ezen faktorok hatása, ahogy fentebb láthattuk, a G_1 fázisban érvényesül. Ugyancsak szükséges az osztódáshoz, hogy a sejtek *ki tudjanak tapadni* valamilyen hordozófelületre. A sejt-sejt kapcsolatok kialakulása ugyanakkor a további osztódást gátló tényező. A sejtosztódások megszűnnek az úgynevezett *kontakt gátlás* következtében, miután a sejtek kitöltötték a rendelkezésre álló felületet és érintkeznek egymással. A sejtek csak akkor kezdenek ismét osztódni, ha szomszédjaikat elvesztik és betöltetlen tér támadt (22.16. ábra).



22.16. ábra. A tápedényt kitöltött sejtek nem osztódnak tovább, jelezve a sejtek közötti kapcsolat jelentőségét a sejtosztódás szabályozásában.

A sejtek száma egy szövetféleségen belül szintén ciklusszabályozó tényező. Ezt világosan mutatják a regenerációs kísérletek. Ha például a máj egy részét eltávolítják, a megmaradt csonk sejtei néhány órán belül S fázisba lépnek, majd osztódnak, és egészen addig teszik ezt, míg a szerv normális mérete helyre nem áll. Ekkor a sejtek többsége G_0 fázisba lép, a további proliferáció leáll. Hasonló

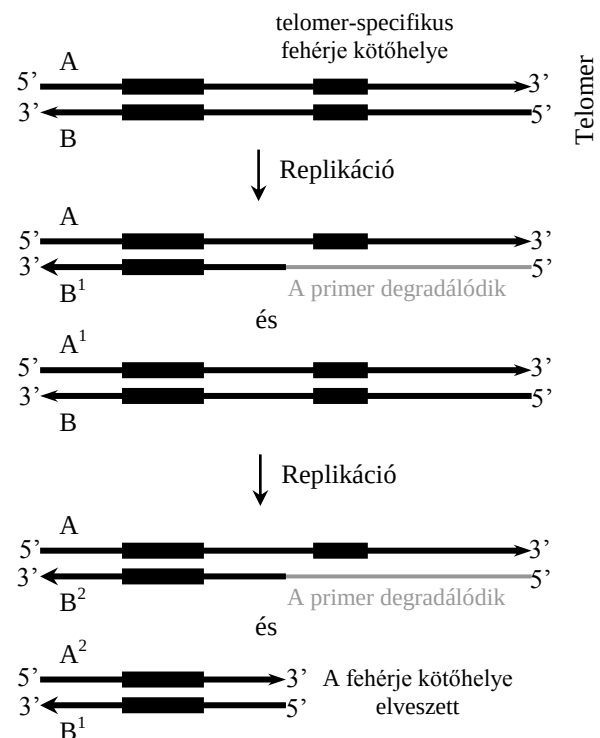
jelenség mindennaposan tapasztalható a bőr hám sérülését követően a sebgyógyulás során.

Egy sejt és utódjainak *osztódási potenciálját*, tehát azt, hogy hány cikluson tudnak keresztül menni élő szervezetben, nem tudjuk vizsgálni. Azonban szövettenyészeteken kimutatható, hogy normális sejtek esetében az elméletileg lehetséges *ciklusszám fajra jellemző*, valószínűleg genetikailag szabályozott érték. Így például humán embrióból származó fibroblasztok (kötszöveti sejtek) tenyészetben kb. 50 sejtcikluson tudnak keresztül menni, azután G_0 fázisba lépnek, növekedési faktorokra többé nem reagálnak, és végül elpusztulnak. A mesterséges körülmények között, tenyészetekben tapasztalható teljes osztódási potenciált a szervezet nem használja ki (50 ciklus elméletileg 2^{50} számú – tonnányi súlyú – sejtömeget eredményezhet), még akkor sem, ha az utódsejtek egy része elpusztul.

Az osztódóképesség kimerülését/elvesztését *celluláris öregedésnek* nevezik. A jelenség okát valószínűleg a kromoszómák telomerjeinek fokozatos rövidülése okozza.

A sejtek osztódóképességének gátja: a telomer rövidülése

Az eukarióták kromoszómaiban a DNS-polimerek nem zárulnak gyűrűbe. A replikáció mechanizmusának ismeretében arra lehet számítani, hogy az ismétlődő replikációk során a késlekedő szál egyre rövidebb lesz (22.17. ábra). (Emlékeztetőül: a DNS-polimeráz nem képes primer nélkül DNS-t szintetizálni, a primer éppen ezért csak RNS lehet, amit egy speciális RNS-polimeráz állít elő. A DNS legvégén, a 3' szálvégen tehát a replikáció végén az RNS primer marad meg, ami idővel lebontódik – lásd még: 4. fejezet.)

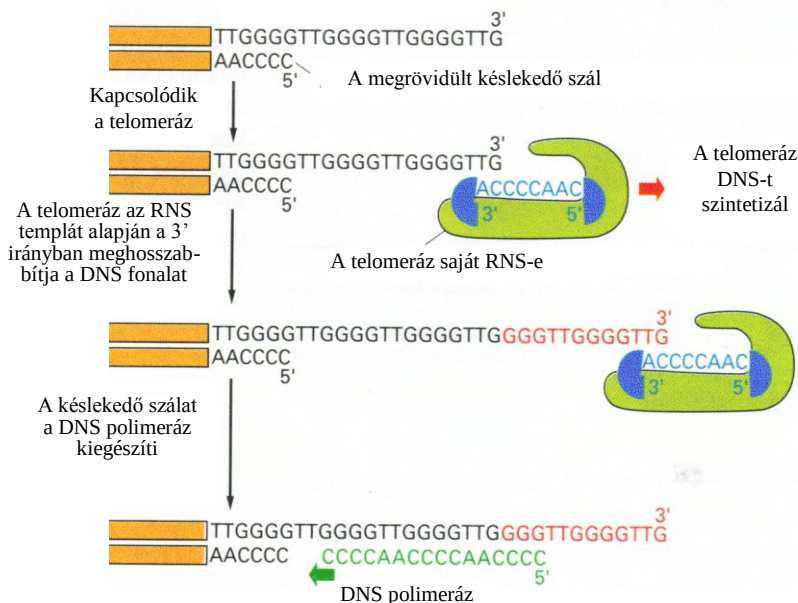


22.17. ábra. A telomer rövidülése miatt egy idő után nem tudnak kötődni egyes specifikus fehérjék, az ép kromoszóma-végekre jellemző kromatin-szerkezet megszűnik.

Miután nem tudnak tovább kapcsolódni, így a rövidülés során lassan elvesznek a kromoszómák végéről azok a speciális fehérjék, amelyek a telomerek jellegzetes kromatin-összetételét biztosítják. Hiányukban a sejtek zavart érzékelnek, nem tudják többé megkülönböztetni a telomereket a kromoszóma-törések következtében kialakuló abnormális szabad DNS-végektől, és a hibát érzékelve leállítják a sejtciklust, „nyugalomba vonulnak”, vagy akár öngyilkos programot, apoptózist indítanak be.

A telomer hossza és a rövidülés megakadályozása révén szabályozható is a sejtek élettartama. Egyes testi sejtekben a telomer rövidülését az úgynevezett *telomeráz* enzim küszöböli ki. A telomeráz a legtöbb sejtben nem, vagy kis aktivitással működik, ezért az egymást követő ciklusokból a sejt egyre rövidebb kromoszómákkal kerül ki, míg végül életképtelenné válik. A telomeráz gén ugyanakkor expresszálódik például a szöveti őssejtekben, amelyek a differenciálódott és elpusztult sejteket pótolják. Ezért van az, hogy ezekben az őssejtekben nem rövidülnek a kromoszómavégek, és korlátlan számú osztódásra képesek (lásd 24. fejezet).

A telomeráz a szülői DNS-szállhoz kapcsolódik, és azt 5'→3' irányban meghosszabbítja (22.18. ábra). Templát szál hiányában a telomeráz úgy szintetizálja meg az ismétlődő egység újabb darabját, hogy közben templátként RNS-t használ, ráadásul maga tartalmazza ezt az RNS-t. A telomeráz működése hatására a szülői szál annyira hosszabbodik meg, hogy azzal együtt, hogy a késlekedő szálon az RNS-primert tartalmazó darab később lebomlik, végül megfelelő hosszúságú DNS kettős spirál képződhet (22.18. ábra). A meghosszabbított telomerekben ezért ugyanaz a rövid DNS szekvencia (emberben GGGTTA) ismétlődik tandem módon.



22.18. ábra A telomer replikációjának mechanizmusa. (Az ábráról hiányzik az utolsó lépésben a DNS-polimeráz kapcsolódását a késlekedő szálon biztosító RNS-primert.)

A telomeráz tehát hiányzik a testi sejtek többségéből, a telomer hossza ezért ezekben a sejtekben megszabja a lehetséges sejtosztódások számát is: a *telomer-rövidülés* az öregedés egyik fontos tényezője. A telomeráz enzim gyakran aktiválódik a tumoros sejtekben is, biztosítva azok korlátlan osztódását.

A sejtosztódás zavarának következményei

A sejtciklust szabályozó mechanizmusok el is romolhatnak, és ennek következtében ún. immortális – állandóan, kontrollálatlanul osztódó – sejtvonalak alakulnak ki. Ennek sokféle oka lehet, ilyen például a fentebb említett tartós telomeráz enzim-aktivitás, mely kikapcsolja a sejtosztódások számának korlátját, vagy az Rb gén funkcióvesztéses mutációja, ami miatt a E2F típusú növekedési faktorok állandóan szabad állapotban vannak, és ez felfüggeszti a G₁/S átmenet ellenőrzését (lásd 22.15. ábra).

Nem lehet meglepő az sem, hogy a Cdk/ciklin komplexek megváltozott működése is gyakran hozzájárul a daganatos sejtek kialakulásához. Bizonyos típusú emlőrák-sejtek ciklin D koncentrációja abnormálisan magas, és közismert a funkció-nyeréses típusú mutáns ciklinek jelenléte egyes daganatokban. A rákos daganatoknak kb. felében sérült a p53 fehérjét kódoló gén funkciója. A p53 fehérje Cdk4 aktivitását gátló hatása hiányában a Cdk4 folyamatosan az S fázis beindítására, a sejtciklus folytatására, osztódásra készíti a sejteket, és hozzájárul a daganatok képződéséhez. Hasonló hatása van a Cdk-k aktivitását gátló más gének deléciójának és még sok más ellenőrzési mechanizmus lehetséges hibájának.

A daganatos sejteket tenyésztetben arról is meg lehet ismerni, hogy számukra megszűnik a kontakt gátlás, és képesek osztódni akkor is, ha már nem tudnak a felszínre kitapadni.

A fentiek a sejtciklus szabályozásának olyan hibáira példák, amelyek fokozott sejtosztódáshoz vezetnek. Olyan sejtciklus-zavarok is ismeretesek, amelyek következtében a sejtek éppen hogy elvesztik osztódó-képességüket. A Werner-szindrómás emberek egy olyan recesszív mutációra homozigóták, amely miatt sejtjeikből hiányzik egyfajta DNS-helikáz enzim aktivitása. A helikáz az ép sejtekben a DNS két szálát tekeri szét, lehetővé téve a replikációt, és szükséges a telomer régió fenntartásához is. A Werner-szindrómás emberek korán öregszenek, mert sejtjeik egy idő után alig osztódnak. Összehasonlítva az egészséges emberekből és Werner-szindrómásokból izolált fibroblasztok tenyésztését, utóbbiak egyáltalán nem, vagy csak néhányat osztódnak (22.1 táblázat).

22.1. táblázat. A különböző eredetű fibroblasztok osztódóképessége

A donor sejtek forrása	Hányat osztódnak a sejtek?
Magzat	~ 50
40. éves ember	~ 40
80. éves ember	~ 30
Werner-szindrómás (fiatal) ember	~ 0