

**Anders H D Zetterberg**, professor i tumörцитologi, ledamot av Nobelförsamlingen och adjungerad ledamot av Nobelkommittén

**Ralf F Pettersson**, professor i molekylärbiologi, adjungerad ledamot av Nobelkommittén

**Sten G E Lindahl**, professor i anestesivård och intensivvård, ledamot av Nobelförsamlingen och ordförande i Nobelkommittén; samtliga vid Karolinska institutet, Stockholm

Hartwell, Hunt och Nurse delar 2001 års Nobelpris i fysiologi eller medicin

## CDK och cyklin – cellcykelns molekylära motor

II Det var först i mitten av 1800-talet som begreppet cell och dess funktioner etablerades. Man var dock okunnig om hur celler förökar sig och trodde länge att dotterceller uppstod ur existerande celler genom processer som liknade precipitation eller kristallisering [1]. Mot slutet av 1800-talet började man förstå att en cell uppstår från en annan cell genom delning. Till och med de mest komplexa multicellulära organismerna har sitt ursprung i ett encelligt stadium. I början av 1900-talet var således den allmänna uppfattningen att celledelning är basen för både tillväxt och utveckling av såväl växter som djur och att alla celler på jorden härstammar från en urcell.

Framstegen inom cellforskningen under den första hälften av 1900-talet var främst ett resultat av att bättre mikroskop-tekniker utvecklades. Med dessa nya tekniker kunde man studera celledelningens olika stadier i detalj. Samtidigt med detta aktualiserades Mendels ärftlighetslagar från sent 1800-tal. Man började inse sambanden mellan celledelningsprocess och genetik. Celledelningen uppfattades nu, några decennier in på 1900-talet, som den centrala processen för tillväxt, utveckling och ärftlighet [2]. De följande decennierna ägnades huvudsakligen åt morfologiska studier av celledelningen, och mitosens olika faser (profas, metafase, anafas och telofas) beskrevs i detalj. År 1953 publicerade Watson och Crick sin modell av DNA-molekylens struktur som en dubbelhelix [3]. Man fick nu en förklaring till hur kromosomduplikationen kunde ske med så hög precision. Det tidsmässiga sambandet mellan kromosomduplikation och mitos var dock okänt. I och med Howards och Pelcs arbete 1953 klarnade detta, och cellcykelns olika faser beskrevs för första gången [4]. De kunde med autoradiografiska metoder visa att kromosomduplikationen inträffade långt före mitosen, under en begränsad del av interfasen, den så kallade DNA-syntesfasen eller S-fasen. De kunde också visa att denna fas (S-fasen) var tidsmässigt skild från mitosfasen (M-fasen). Mellan S- och M-faserna kunde två andra faser identifieras, G<sub>1</sub>-fas och G<sub>2</sub>-fas. Under G<sub>1</sub>-fasen, som börjar omedelbart efter celledelningen, tillväxer cellen och förbereder sig för DNA-syntes (DNA-replikation) under S-fasen. Under G<sub>2</sub>-fasen kontrolleras att DNA-replikationen är avslutad och har förlöpt komplikationsfritt. Om DNA-skador

### SAMMANFATTAT

Leland Hartwell upptäckte en klass gener som kontrollerar cellcykeln. En av dessa gener (CDC28) har en central roll i igångsättningen av varje ny cellcykel (funktionen »start«). Hartwell införde också begreppet kontrollstation (checkpoint) och därmed ett nytt synsätt på cellcykeln.

Paul Nurse identifierade en av nyckelkomponenterna i kontrollen av cellcykeln, CDK (cyklinberoende kinas) med genetiska och molekylärbiologiska metoder. Han visade att CDK har bevarat sin funktion genom evolutionen. CDK driver cellcykeln genom att kemiskt påverka (fosforylera) andra proteiner.

Tim Hunt upptäckte ett protein som reglerar CDKs funktion och kallade det cyklin. Han visade att cyklin bryts ned i samband med celledelningen, en mekanism som visat sig vara central för kontrollen av cellcykeln.

uppstått avstannar cellcykeln och reparationsprocesser initieras. Detta cykliska förlopp med S-fas och M-fas i sekvens, med mellanliggande G<sub>1</sub>- och G<sub>2</sub>-faser, kännetecknar den eukaryota cellcykeln som vi beskriver den ännu idag (Figur 1).

Ännu vid början av 1960-talet hade man en mycket begränsad uppfattning om de molekylära mekanismer som reglerar cellcykeln. En bild av att cytoplasmatiska faktorer inducerar såväl S-fas som M-fas började dock växa fram under mitten av 1960-talet. I plasmodier av typ *Physarum*, i vilka ett stort antal cellkärnor är inneslutna i en och samma cytoplasma, kunde man visa att alla cellkärnor genomgick synkron mitosfas [5]. I andra experiment från mitten av 1960-talet kunde visas att utmognande oocyter från groda innehöll faktorer som kunde inducera både meios och mitos [6, 7]. År 1970 kunde Rao och Johnson, på basen av uppmärksammade cellfusionsexperiment, påvisa en aktivitet i humana celler



FOTO: RAUF PETERSSON

Leland H Hartwell är född 1939. Han är »President and Director« för Fred Hutchinson Cancer Research Center i Seattle, USA. Han har fått ett stort antal utmärkelser tidigare, bland vilka kan nämnas General Motors Sloan Award 1991 och Albert Lasker Basic Medical Research Award 1998.



FOTO: RAUF PETERSSON

Paul M Nurse är född 1949. Han är »Director General« vid ICRF (Imperial Cancer Research Fund), London. Även han har fått General Motors Sloan Award 1991 och Albert Lasker Basic Medical Research Award 1998 och också många andra utmärkelser.



FOTO: RAUF PETERSSON

Timothy (Tim) Hunt är född 1943. Han är verksam som Principal Scientist vid ICRFs (Imperial Cancer Research Fund) Clare Hall Laboratory i South Mims utanför London. Han är medlem av EMBO (The European Molecular Biology Organization) sedan 1979 och valdes in i Royal Society 1991.

(HeLa-celler), som kunde driva celler in i både S- och M-fas [8, 9]. M-fasaktiviteten var dominant över alla andra cellcykelfaser. Ovannämnda experiment med grod-oocyter från mitten av 1960-talet följdes upp av Masui och Markert, som i elegant experiment år 1971 beskrev en cytoplasmatisk aktivitet i extrakt från meiotiska och mitotiska oocyter [10]. Denna faktor kunde vid mikroinjektion inducera meios i inaktiva oocyter. Faktorn kallades »maturation promoting factor«, MPF. Nästan samtidigt rapporterade Smith och Ecker [11] samma fenomen, likaledes hos aktiverade grod-oocyter. Forskningen kring MPF gick vid denna tidpunkt in i ett intensivt skede, men man kom ingen vart med att karakterisera MPF biokemiskt eller molekylärt. Det skulle dröja ytterligare nästan två decennier innan man lyckades rena MPF [12] och beskriva dess komponenter (se nedan). Man kan således konstatera att Hartwells, Nurses och Hunts upptäckter de facto var helt frikopplade från, och inte stödde sig på, de tidiga cellfysiologiska studierna kring MPF och liknande fenomen. Alla tre slog in på helt andra experimentella linjer och utnyttjade andra modellsystem.

Utvecklingen av celldelningen mot ett cykliskt förlopp karakteriserat av S- och M-faser med mellanliggande G1- och G2-faser var en synnerligen viktig och troligen helt avgörande förutsättning för den inriktning evolutionen fick då de eukaryota cellerna med sitt kraftigt ökade DNA-innehåll gjorde entré på jorden för cirka två miljarder år sedan. Fram till de senaste årtiondena har de molekylära mekanismer som styr cellcykeln varit okända. Det är upptäckterna av nyckelkomponenterna i dessa viktiga styrningsmekanismer som belönas med årets Nobelpris i fysiologi eller medicin.

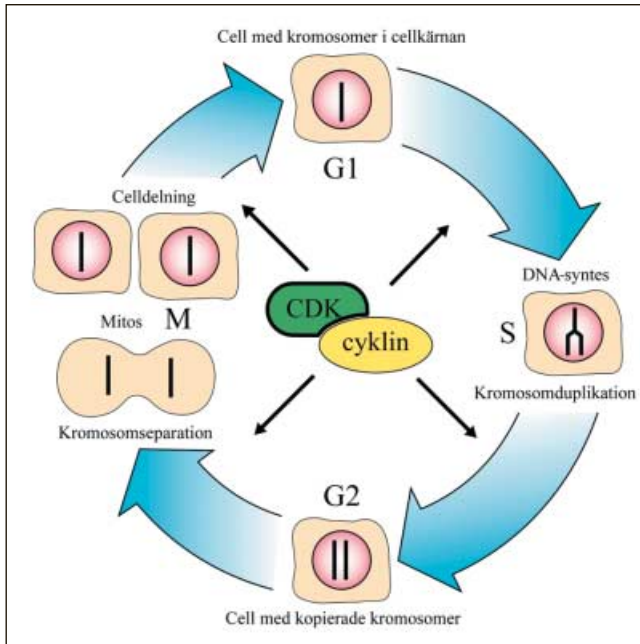
### Cellcykelns motor och växellåda

De tre Nobelpristagarna har upptäckt nyckelkomponenterna cyklinberoende kinas (CDK, cyclin-dependent kinase) och cyklin i den molekylära mekanism som reglerar cellcykeln. Denna mekanism är av universell natur, dvs fungerar på samma sätt i alla eukaryota celler, såsom i jästceller, växter, djur och människor. Mängden CDK-molekyler är konstant under cellcykeln, men deras aktivitet varierar under inflytande av cyklinernas reglerande funktion. Tillsammans driver CDK-molekyler och cykliner cellen från fas till fas i cellcykeln.

Man kan säga att CDK-molekylerna är cellcykelns motor, medan cyklinerna kan jämföras med växellådan, som bestämmer om cellen skall »gå på tomgång« eller drivas framåt i cellcykeln (Figur 2). Jästceller har, i likhet med alla andra celler, flera närbesläktade varianter av cykliner men endast en typ av CDK-molekyl. Denna fungerar såväl vid övergången från G1 till S som vid övergången från G2 till M. För att styra övergången från G1 till S binder sig CDK-molekylen till G1-cykliner, som selekterar de substrat som måste fosforyleras för att DNA-replikationen skall kunna initieras. För att styra övergången från G2 till M binder sig CDK-molekylen till G2-cykliner, som selekterar mitosspecifika substrat för fosforylering. I högre eukaryoter, såsom människa, har komplexiteten ökat, och olika varianter av CDK-molekyler har utvecklats under evolutionen med specialiserade funktioner för de olika cellcykelfaserna. Sålunda styr CDK1, tillsammans med cyklin A och B, övergången från G2 till mitos, medan den mycket närbesläktade varianten CDK2 styr övergången från G1 till S med hjälp av cyklin E. Övergången mellan cellcykel och vilofas (Go) styrs av varianterna CDK4 och CDK6 i kombination med cyklin D.

### Upptäckten av gener som styr cellcykeln

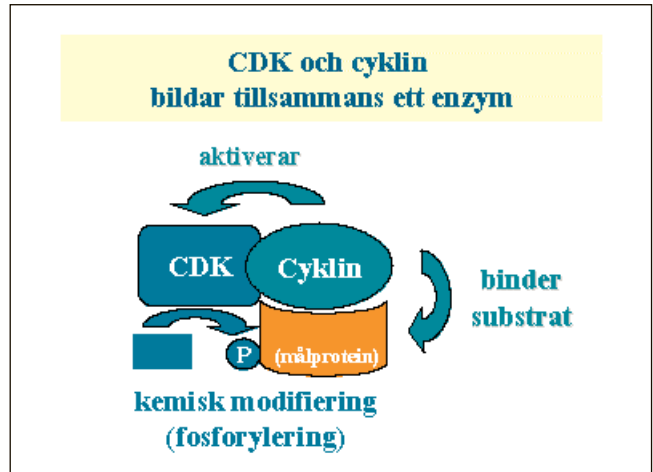
Leland Hartwell är pionjären bland de tre cellcykelforskarna. Han insåg i slutet av 1960-talet möjligheten att kunna studera cellcykeln med genetiska metoder. Han valde vanlig bagerijäst, *Saccharomyces cerevisiae*, som modellsystem för cellcykelanalys, ett noga övervägt och lyckosamt val. Jästcellernas progression genom cellcykeln kan följas i mikroskopet genom morfologisk analys. När cellen vuxit och uppnått en viss storlek fattar den beslutet att gå igenom cellcykeln. Som första tecken på detta utvecklar den en knopp. Denna knopp växer sedan i storlek och utvecklas så småningom till en dottercell. Utveckling av knopp, dess form och storlek, avslöjar om cellen påbörjat en cellcykel och hur långt den hunnit i cellcykeln på sin väg mot delning (Figur 3). Denna metod för »positionsbestämning« av jästcellen i cellcykeln kombinerade Hartwell med genetisk metodik, där temperaturkänsliga mutanter (ts-mutanter) studerades. Ts-mutanter, som användes inom den mikrobiologiska genetiken under 1960-talet, är mutanter som uppvisar den muterade fenotypen endast vid



**Figur 1.** Cellens olika faser. I den första fasen (G1) tillväxer cellen. När den nått en viss storlek går den in i DNA-syntesfasen (S). Då kopieras arvsmassan i kromosomerna. Under nästa fas (G2) förbereder sig cellen för delning. I mitosfasen (M) separeras kromosomerna, och cellen delar sig i två dotterceller som får exakt samma arvs massa. Därefter är cellen tillbaka i G1-fasen, och cellcykeln är fullbordad.

Årets Nobelpristagare har med genetiska och molekylärbio-logiska metoder upptäckt mekanismer som kontrollerar cellcykeln. CDK-molekyler och cykliner, som tillsammans bildar molekylära komplex, driver cellen från fas till fas i cellcykeln. CDK-molekylerna kan liknas vid en motor, medan cyklinerna är växellådan som bestämmer om cellen skall gå på tomgång eller drivas framåt i cellcykeln.

förhöjd (icke-permissiv) temperatur och har en normal fenotyp vid fysiologisk (permissiv) temperatur. I en serie eleganta experiment i början av 1970-talet kunde Hartwell visa att en viss kategori av temperaturkänsliga jästcellsmutanter stannade upp i cellcykeln vid den förhöjda, icke-permissiva temperaturen (36° Celsius) men fortsatte att växa i storlek [13-15]. Vid den fysiologiska temperaturen (23° Celsius) uppförde sig dessa ts-mutanter som normala, icke-muterade celler. Ts-mutanter kunde identifieras morfologiskt på basen av cellstorlek och knoppens form, och Hartwell kunde därmed avgöra var i cellcykeln cellerna hade stannat. Eftersom dessa mutanter hade förmågan att växa i storlek, var det inte fråga om mutationer i gener som styr cellens metabolism, utan istället mutationer i cellcykelspecifika gener. Detta var nyckeln till framgång, nämligen att kunna identifiera och skilja äkta cellcykelmutanter från den stora merparten av mutanter som endast var defekta i cellmetabolism och tillväxt. Hartwell kunde därmed definiera och identifiera cellcykelspecifika gener, som han gav namnet CDC-gener efter »cell division cycle«. Olika CDC-gener kontrollerar passagen genom olika cellcykelstadier. Hartwell identifierade över hundra cdc-mutanter, som han karakteriserade cellfysiologiskt och delade in i ett trettiotal grupper (komplementationsgrupper). En av dessa mutanter, cdc28, skulle senare visa sig bli mycket betydelsefull för utvecklingen inom cellcykelfältet. Denna mutant kunde varken utveckla knopp eller replikera DNA. Hartwell insåg betydelsen av detta fynd och förslog att genen, CDC28, som formulerar funktionen »start«, kodade för ett protein som behövdes för att sätta igång en ny cellcykel [16]. Det visade



**Figur 2.** Schematisk bild av »cellcykelmotorns« uppbyggnad. En CDK-molekyl och en cyklinmolekyl bildar tillsammans ett molekylärt komplex. Detta komplex är huvudkomponenten i den »molekylära motor« som driver cellen från fas till fas. Komplexet fungerar som ett enzym, som kemiskt modifierar (fosforylerar) andra proteiner (enzymets substrat). CDK-molekylen utför arbetet (fosforyleringen), medan cyklinet dels kontrollerar CDK-molekylens enzymatiska aktivitet, dels bestämmer vilket substrat (målprotein) som skall fosforyleras.

sig senare, mycket tack vare de upptäckter som Nurse gjorde, att Hartwells idé om »start« och genen CDC28 var helt korrekt. Detta kan betraktas som början på jakten efter cellcykelns nyckelregulatorer. CDC-gener är idag ett välkänt begrepp för alla som arbetar inom cellcykelområdet och angränsande forskningsfält, och vi känner idag till många av dessa geners funktion på molekylär nivå.

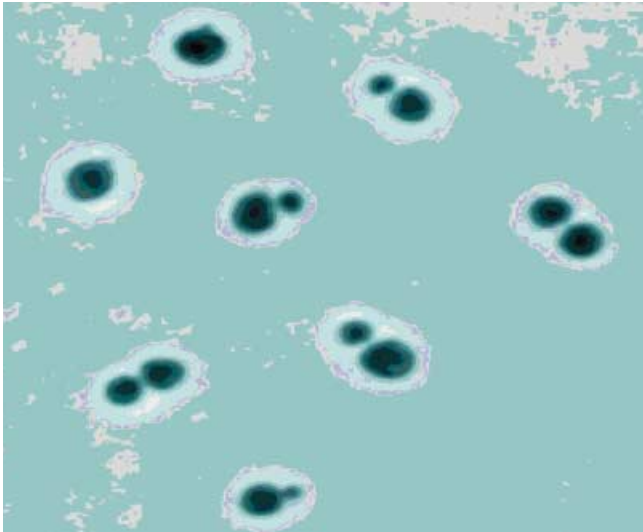
Hartwell införde också begreppet »checkpoint«, (kontrollstation), som ett resultat av hans fynd att vissa cdc-mutanter uppvisade extrem känslighet för strålning. Han ställde sig frågan om strålkänsligheten i vissa fall primärt kunde bero på oförmåga hos cellen att bromsa cellcykeln, dvs inte kunna ge cellen tid att hinna reparera DNA-skadan före celldelningen, snarare än defekter i själva reparationsmekanismerna. Han fann att detta var fallet. Celler med mutationer i RAD9-genen (en i raden av många RAD-gener) fortsatte att dela sig efter strålning, i motsats till icke-muterade celler, som stannade upp i G2-fas [17]. En motsvarande roll har p53 i däggdjursceller. Checkpoint-begreppet utvidgades senare till att omfatta en övervakningsmekanism, som kontrollerar att cellcykelns olika faser kommer i rätt ordning [18]. Med begreppet skapade Hartwell ett nytt sätt att se på cellcykelkontrollen.

### Upptäckten av CDK1, nyckelkomponent i »cellcykelmotorn«

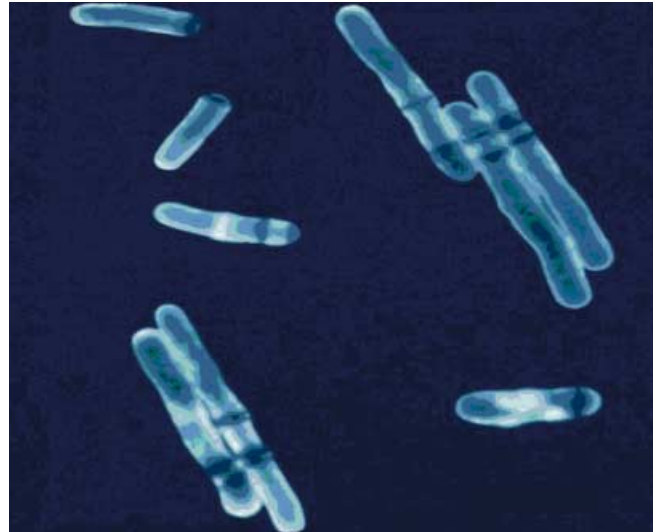
Paul Nurse inspirerades av Hartwells arbete och satte upp ett liknande system för identifiering av cdc-mutanter. Han använde sig dock av en helt annan jästsort (Figur 4), Schizosaccharomyces pombe [19, 20], en mycket avlägsen släkting till bagerijäst. Sett ur ett evolutionärt perspektiv kan dessa två jästsorter betraktas vara lika långt ifrån varandra som var och en av dessa är ifrån människa, något som visade sig vara betydelsefullt vid upptäckten av en universell mekanism för cellcykelkontroll (se nedan). S pombe växer till skillnad från bagerijäst som en cylinder, och celltillväxten kan enkelt mätas som längden på cylindern. Därigenom kunde cdc-mutanter relativt enkelt identifieras med cylinderns längd som mått på cellcykelposition. Detta skulle visa sig vara en betydelsefull egenskap vid identifieringen av cellcykelns nyckelregulatorer. Nurse, då verksam vid Murdoch Mitchisons laboratorium i Edinburgh, upptäckte nämligen en ny sorts cdc-mutant,

**Annons**

**Annons**



**Figur 3.** Mikroskopisk bild av jästceller (bagerijäst, *Saccharomyces cerevisiae*). Dessa celler förökar sig genom avknoppning. När en cell »bestämmer sig« för att gå igenom en cellcykel utvecklas en knopp, som växer i storlek under cellcykeln för att i samband med celldelningen ge upphov till en dottercell. Knoppens storlek och form kan användas som ett mått på var i cellcykeln jästcellen befinner sig. På bilden ses jästceller i olika stadier av cellcykeln. (Efter Culotti och Hartwell [15].)



**Figur 4.** Mikroskopisk bild av jästceller av typ *Schizosaccharomyces pombe*. Dessa jästceller är mycket avlägsna släktingar till bagerijäst. Mer än en miljard år av biologisk evolution skiljer denna jästsort från bagerijäst. Till skillnad från bagerijästen växer jästcellerna på längden som cylindrar och delar sig på mitten. Den enskilda jästcellens längd kan mätas upp och användas som ett mått på var i cellcykeln jästcellen befinner sig. (Efter Nurse och medarbetare [20].)

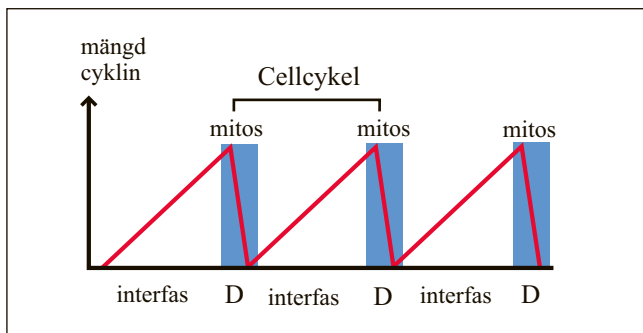
där cellerna endast var hälften så stora som de normala, icke-muterade jästcellerna. Han kallade denna *cdc*-mutant *wee1*, eftersom *wee* betyder liten på skotska [19, 20]. Detta fynd var första steget i upptäckten av nyckelgenen *cdc2* (se nedan). Nurse insåg betydelsen av *wee1*-mutanten. Cellerna blev inte små på grund av att cellcykeln var kortare. Cellcykeln hade samma längd som hos icke-muterade celler, men *wee1*-cellerna hade helt enkelt tappat den kontrollmekanism som avgör hur stor en cell skall vara. Nurse insåg att upptäckten av *wee1* öppnade nya möjligheter att studera hur en cell kontrollerar sin storlek. Han fortsatte därför att försöka isolera nya *wee1*-mutanter. Samma *wee1*-mutant dök emellertid ständigt upp, utom i ett fall, då en ny mutant med samma fenotyp (små celler) kunde identifieras. Denna nya *wee*-variant fick benämningen *wee2-1* [21] och visade sig vara en annan gen, nämligen *cdc2*, tidigare identifierad av Nurse som en gen nödvändig för mitos. Med utgångspunkt från denna upptäckt drog Nurse den viktiga och korrekta slutsatsen att *cdc2* är en nyckelgen för mitoskontrollen [21]. Vissa mutationer av *cdc2* fördröjer cellen i G<sub>2</sub>, medan andra aktivt driver G<sub>2</sub>-cellen in i en för tidig mitos. Nurse skriver: »... some aspect of *cdc2* gene product activity (such as an allosteric interaction with another component in the system) is important for determining when mitosis takes place« [21]. Efter denna upptäckt stod det helt klart att *cdc2*-genen inte bara var en i mängden av cellcykelgener, utan istället en helt essentiell nyckelgen för mitoskontroll. Nästa steg i karakteriseringen av *cdc2*-genen var att utnyttja teknik för kloning genom komplementation. Denna teknik innebär att olika gener (DNA från ett »genbibliotek«) förs in i jästcellen, och man undersöker därefter om någon av dessa gener kan ersätta (komplementera) funktionen hos den skadade (muterade) genen. Sådan teknik hade tidigare utvecklats för bagerijäst [22] men måste vidareutvecklas för att kunna fungera vid kloning av *cdc2* i *S pombe*. I ett genombrottsexperiment kunde Nurse, efter att ha klonat *cdc2*-genen, också visa att Hartwells *CDC28* (»start«-funktionen), från den avlägsna släktingen bagerijäst, kunde komplementera *cdc2*-mutationen i *S pombe* [23]. Två viktiga slutsatser kunde dras från detta fynd, dels att *cdc2/CDC28*-funktionen be-

varats under evolutionen, dels att denna funktion kontrollerar två steg i cellcykeln, såväl övergången från G<sub>1</sub> till S (*CDC28*) som övergången från G<sub>2</sub> till M (*cdc2*). I ett uppmärksammat arbete [24] klonade Nurse den humana *cdc2*-genen och visade att den kunde fungera i jästceller. Den funktion som styrs av *cdc2* hade sålunda bevarats under mer än en miljard år av biologisk evolution, från jäst till människa. Kloningsarbetet, och efterföljande molekylära karakterisering av *cdc2*-genens produkt, visade att proteinet, med molekylvikt på 34 kDa, var ett kinas, som kan fosforylera ett antal olika substrat. Kinasaktivitet och substratspecificitet regleras av ett annat protein, cyklin (se Figur 5 och nedan). Kinaset, som förekommer i alla eukaryota celler, har idag fått beteckningen CDK1.

Nurse följde också upp sitt ursprungsfynd med de små cellerna (*wee1*-cellerna), det fynd som ledde till upptäckten av *cdc2*-genens centrala roll. Han visade att också *wee1*-genen, i likhet med *cdc2*-genen, kodar för ett kinas. Detta kinas hämmar aktiviteten hos CDK1 (*cdc2*-genens produkt) genom att placera en fosfatgrupp i den ATP-bindande »fickan« på CDK1-molekylen. Han visade också att *wee1*-kinasets hämmande inflytande på CDK1 kunde motverkas av ett annat protein, ett fosfat, kodat av genen *cdc25*, som tar bort den hämmande fosfatgruppen från CDK1-molekylen [25, 26]. Sålunda regleras CDK1-molekylens egen kinasaktivitet genom reversibel fosforylering av *wee1*-kinaset och *cdc25*-fosfatet, vilket är en av flera molekylära mekanismer som cellen använder som checkpoint. Även generna *wee1* och *cdc25* återfinns hos människa och har sålunda i likhet med CDK och cyklin bevarats under den biologiska evolutionen.

### Upptäckten av cyklin

Tidpunkten för upptäckten av cyklin, den regulatoriska subenheten av cellcykelns »motor«, kan intressant nog exakt fastställas till den 23 juli 1982 [27, 28]. Bakgrunden är följande. Tim Hunt hade sedan 1967 studerat regleringen av proteinsyntesen in vivo och in vitro. Han hade främst fokuserat på mekanismerna för globinets syntes men sedan början av 1980-talet även blivit intresserad av proteinsyntesens reglering under den tidiga embryonala utvecklingen av marina



**Figur 5.** En schematisk bild av hur cyklinmängden varierar under cellcykeln. När cellen förbereder sig för delning ökar mängden cyklin. För att mitosen skall kunna fullbordas måste cyklinet brytas ned. Denna periodicitet hos cyklinet var en av Tim Hunts viktigaste upptäckter. D = celldelning.

evrtebrater. Sommaren 1982 undervisade Hunt i en kurs på den marinbiologiska stationen i Woods Hole på Cape Cod i Massachusetts. Som sin tillfälliga laboratorieassistent hade han med sig en sommarstudent, Tom Evans från Cambridge. I ett av experimenten ville man studera om det fanns en skillnad i proteinsyntesmönstret mellan befruktade och partonogenetiskt aktiverade sjöborreägg (*Arbacia punctulata*). Detta studerades genom inmärkning av nysyntetiserade proteiner med en radioaktiv aminosyra (metionin). Genom att sedan ta prov var tionde minut och analysera dessa med hjälp av SDS-polyakrylamidgelelektrofores kunde förändringar i proteinmönstret lätt följas fram till celldelningen. Hunt observerade då att ett specifikt protein fanns i stora mängder i det icke aktiverade ägget, men att proteinet sedan försvann abrupt i samband med äggets delning. Hemligheten bakom att man lyckades observera denna periodicitet hos proteinet var att man tog prov med mycket korta intervaller under cellcykelns alla faser. På grundval av proteinets cykliska beteende döpte Hunt det till cyklin [28]. Han fann senare samma sommar att liknande proteiner också kunde påvisas hos ägg från musslan *Spisula solidissima*, en organism som evolutionärt är en tämligen avlägsen släkting till sjöborren. I detta fall iakttog man två proteiner vars mängd ökade kraftigt kort efter befruktningen. Man hade de facto noterat dessa proteiner redan ett par år tidigare [29] men då inte lagt märke till den cykliska nedbrytningen och följaktligen inte kopplat ihop proteinerna med cellcykeln. Fyndet ledde till klassificeringen av cykliner i A- och B-typer. Det är remarkabelt att dessa relativt enkla experiment och observationer gav en av de viktigaste nycklarna till förståelsen av cellcykelns reglering. Det bör noteras att varken Hartwell eller Nurse bland sina cellcykelmutanter kunde identifiera cyklin, eftersom jästsvamparna har flera närbesläktade cykliner, som kan ersätta varandra.

Centralt i Hunts observation var att syntesen av cyklinet var konstant under hela cellcykeln men att cyklinet bröts ned i samband med celldelningen. Detta innebär att cyklinmängden stadigt ökar före mitosen och sedan abrupt minskar följt av möjliggöra utträde ur M-fasen och den påföljande celldelningen (Figur 5). Aktivering av det cellcykelreglerande katalytiska kinaset (CDK) kräver att detta binds till cyklinsubenheten, medan inaktivering förutsätter att cyklinet degraderas. Denna reglering av cyklinmängden visade sig senare vara universell i eukaryota celler och en av de viktigaste mekanismerna för regleringen av cellcykeln. Vi vet nu att cyklinerna innehåller en speciell aminosyrasekvens, en »destruction box« [30], som känns igen av ett komplex kallat »anaphase promoting complex« (APC) eller »cyclosome« [31]. Bindningen av APC till cyklin leder till att det ubiquitineras, dvs »märks« för nedbrytning via kovalent modifiering med ett

protein kallat ubiquitin (ubiquitin), och därefter bryts ned av proteosomer (ett proteaskomplex). Hunt har ända sedan upptäckten av cyklin aktivt studerat mekanismerna för cyclindegradationen och härvidlag givit viktiga bidrag till området.

Redan i nyckelarbetet från 1983 [28] spekulerar författarna över att cyklin kunde spela en viktig roll i cellcykeln. Detta baserades bl a på experiment som visade att nedbrytningen av cyklin inhiberades om cellcykeln stoppades genom behandling med kolchicin, taxol eller cytokalacin. De noterade också att den periodiska nedbrytningen påminde om beteendet hos »maturation promoting factor« (MPF), den i början av 1970-talet påvisade cytoplasmatiske mitosinducerande aktiviteten (se ovan). Spekulationerna visade sig sedermera vara korrekta. Man lyckades i slutet av 1980-talet rena MPF från groddagg (*Xenopus*) [12] och fann att det innehöll två huvudkomponenter, ett 32 kDa- och ett 45 kDa-protein. Det förra visades vara identiskt med *cdc2*-kinaset (*cdk1*) [32, 33] och det senare med cyklin B [34]. Det första komplementära DNA (cDNA) klonades från en mussla 1983 [35], medan Hunt några år senare klonade cyklin-cDNA från sjöborren *Arbacia* [36]. Idag har antalet kända mammala cellcykelreglerande cykliner vuxit till ett tiotal. De binder sig till olika cdk-molekyler och reglerar olika faser av cellcykeln (se ovan).

### Upptäckternas betydelse

Ett av de viktigaste momenten i cellcykeln är hur arvsmassan hanteras, dvs kromosomernas duplikation (DNA-replikation) och kromosomernas segregation (kromatidseparation). Under den biologiska evolutionen uppstod ett behov av att kunna separera dessa två processer från varandra i tid och rum. I prokaryota celler, såsom bakterier, som har endast en kromosom, är mekanismen för DNA-replikation kopplad till segregationen av de två DNA-kopiorna. I samband med uppkomsten av eukaryota celler, när mängden DNA i cellen ökade och generna blev fördelade på flera kromosomer, kunde replikation och segregation av DNA inte längre vara kopplade till samma process av rent spatiala skäl. Dessa processer måste separeras, samordnas och kontrolleras var för sig. CDK och cyklin, vars upptäckter belönas med årets Nobelpris i fysiologi eller medicin, ingår i den molekylära motor som har som en huvuduppgift att samordna kromosomreplikation och kromosomsegregation. Den har bevarats under evolutionen och utgör ett molekylärt fundament såväl hos encelliga organismer som hos människa. Den precision med vilken cellcykelns olika faser är samordnade är fundamental för genomets integritet och garanterar organismernas överlevnad. Defekter i denna samordning kan ge upphov till genetisk instabilitet, dvs en kategori av mutationer där delar av arvsmassan fördelas ojämnt mellan dottercellerna, går förlorad eller omlagras. Detta kan leda till många olika tillstånd beroende på vilken eller vilka gener som påverkas. För att sätta in årets Nobelpris i ett större vetenskapligt sammanhang kan man, något tillspetsat och förenklat, säga att Watsons och Cricks DNA-modell från 1953 gav oss en molekylär förklaring till hur en gen kopieras. Nu börjar vi få en molekylär förklaring till hur hela cellen kopieras.

### Cellcykelkontroll och cancer

Upptäckterna av hur cellcykeln kontrolleras är av fundamental betydelse för förståelsen av tillväxt och tillväxtstörningar i alla typer av växtceller och djurceller, inklusive människans celler. Betydelsen för förståelsen av cancersjukdomarna är härvidlag helt uppenbar. Cancer karakteriseras av okontrollerad cellförökning, och cancercellerna genomgår upprepade cellcykler. Basal kunskap om cellcykelkontroll är därför ytterst betydelsefull. Komponenterna i cellcykelmotorn, såväl CDK som cykliner, har i vissa tumörformer visat sig ha funk-

tion som onkgenprodukter, dvs driver cellen mot okontrollerad celledelning. Hyperaktivering av CDK-molekyler och cykliner har också visat sig motverka tumörsuppressorfunktion, en funktion som är helt avgörande för balanserad tillväxt. Utveckling av kemiska substanser som hämmar CDK-aktivitet tilldrar sig därför ett stort intresse. Ett antal sådana substanser genomgår för närvarande kliniska prövningar. Ännu viktigare i cancersammanhang är sannolikt cellcykelns organisation med checkpoints (kontrollstationer), som utgör en garanti för genomets stabilitet och exakta fördelning mellan dottercellerna. Det är via dessa checkpoints som exempelvis p53, ofta muterad i cancerceller, har sin inverkan på cellcykeln. Vid DNA-skada inducerar p53-molekylen syntes av ett annat protein, p21. Detta protein binds till CDK-cyklinkomplexet och hämmar dess kinasaktivitet, varvid cellcykeln stannar. Det börjar nu framstå som allt tydligare att checkpoint-störning är en viktig mekanism bakom uppkomst av kromosomal instabilitet i cancerceller [37]. Såväl aneuploidi som kromosomala omlagringar (genamplifiering, deletioner och translokationer) kan ha sin förklaring i checkpoint-defekter. Eftersom dessa kromosomala förändringar är tumörspecifika, kan ökad kunskap på molekylär nivå om defekter i cellcykelkontrollen i det långsiktiga perspektivet öppna principiellt nya vägar för tumörspecifika behandlingsstrategier. Då många av de molekylära system som ingår i cellcykelkontrollen bevarats under evolutionen, kan dessa med fördel analyseras på ett kraftfullt sätt med genetiska och molekylärbiologiska metoder i lämpliga modellsystem, t ex jästceller. Inom tumördiagnostiken har upptäckterna av CDK och cyklin redan börjat få sin tillämpning. Med immunhistokemiska metoder kan olika typer av cykliner påvisas i cancerceller, vilket kan ge information om såväl tillväxthastighet som cellcykelstörningar. Sådan information kan ligga till grund för bedömning av tumörens aggressivitet och för val av behandling. Även genetiska metoder som bygger på analys av CDK och cykliner har sin plats inom diagnostiken. Som exempel kan nämnas att genen för cyklin D förekommer i ett starkt förhöjt antal kopior (genamplifiering) i 10 till 20 procent av bröstcancerfallen hos människor. Genamplifiering med avseende på CDK-gener har också påvisats i andra tumörformer. Mycket arbete återstår för att utreda det praktiska värdet av cellcykelanalys inom tumördiagnostiken, men sådan typ av diagnostik har sannolikt kommit för att stanna.

## Referenser

- Schwann T. Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants. London: Sydenham Society; 1857.
- Wilson E. The cell in development and heredity. New York: Macmillan; 1925.
- Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737-8.
- Howard A, Pelc S. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 1953;6:261-73.
- Rusch HP, Sachsenmaier W, Behrens K, Gruter V. Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of *Physarum polycephalum*. *J Cell Biol* 1966;31:204-9.
- Detlaff TA, Nikitina LA, Stroeve OG. The role of the germinal vesicle in oocyte maturation in anurans as revealed by the removal and transplantation of nuclei. *J Embryol Exp Morphol* 1964;12:851-73.
- Gurdon JB. Changes in somatic cell nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. *Science* 1968;183:46-51.
- Rao PN, Johnson RT. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature (London)* 1970;255:159-64.
- Johnson RT, Rao PN. Nucleo-cytoplasmic interactions in the achievements of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells. *Biol Rev* 1971;46:97-155.
- Masui Y, Markert C. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971;177:129-46.
- Smith LD, Ecker RE. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol* 1971;25:232-47.
- Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3009-13.
- Hartwell L, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970;66:352-9.
- Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation. *J Mol Biol* 1971;59:183-94.
- Culotti J, Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Seven genes controlling nuclear division. *Exp Cell Res* 1971;67:389-401.
- Hartwell L, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. *Science* 1974;183:46-51.
- Weinert TA, Hartwell LH. The RAD 9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1988;241:317-32.
- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629-34.
- Nurse P. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 1975;256:547-51.
- Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molec Gen Genet* 1976;146:167-78.
- Nurse P, Thuriaux P. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 1980;96:627-37.
- Nasmyth KA, Reed SI. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:2119-23.
- Beach D, Durkacz B, Nurse P. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 1982;300:706-9.
- Lee MG, Nurse P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell-cycle control gene *cdc2*. *Nature* 1987;327:31-5.
- Russell P, Nurse P. Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 1987;49:559-67.
- Gould KL, Nurse P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 1989;342:39-45.
- Evans T, Hunt T, Youngblom J. On the role of maternal mRNA in sea urchins: studies of a protein which appears to be destroyed at a particular point during each cell division cycle. *Biol Bull* 1982;163:372.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; 33:389-96.
- Rosenthal ET, Hunt T, Ruderman JV. Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam *Spisula solidissima*. *Cell* 1980;20:487-94.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991;349(6305):132-8.
- King RW, Peters JM, Tugendreich S, Rolfe M, Hieter P, Kirschner MW. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 1995;81(2):279-88.
- Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J. The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 1988;54:423-31.
- Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 1988;54:433-9.
- Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 1990;60:487-94.
- Rosenthal ET, Tansey TR, Ruderman JV. Sequence-specific adenylations and deadenylations accompany changes in the translation of maternal messenger RNA after fertilization of *Spisula* oocytes. *J Mol Biol* 1983;166:309-27.
- Pines J, Hunt T. Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *EMBO J* 1987;6:2987-95.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell-cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-8.