

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 29, 2002

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

Suplement nr 19

Redaktorzy: Zofia Osuchowska i Jerzy Kawiak

REGULACJE CYKLU KOMÓRKOWEGO

CELL CYCLE REGULATION

www.pbkom.pl

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybridocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŹY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

REGULACJE CYKLU KOMÓRKOWEGO
CELL CYCLE REGULATION

30 KONFERENCJA SZKOLENIOWA Z BIOLOGII KOMÓRKI

Redaktorzy: Zofia Osuchowska i Jerzy Kawiak

PUNKTY KONTROLNE W CYKLU KOMÓRKOWYM

CHECKPOINTS IN CELL CYCLE

Irena SZUMIEL

Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,
03-195 Warszawa

Komórka jest nieustannie narażona na czynniki środowiskowe uszkadzające DNA i hamujące replikację DNA. Mechanizmem obronnym jest bardzo skomplikowana sieć dróg sygnalizacyjnych, zapewniająca skoordynowane uruchomienie procesów naprawy DNA i zatrzymanie przechodzenia komórki przez cykl komórkowy. Zapobiega to powieleniu uszkodzeń w procesie replikacji, a także przekazaniu uszkodzeń komórkom potomnym.

Obecnie uważa się, że uszkodzenia DNA są rozpoznawane przez białka czujnikowe (Rad9, Rad1 i Hus1), co zapoczątkowuje sygnał alarmowy, przenoszony na przekaźniki, mające charakter kinaz typu PI3-K. Kinazy te (ATM, ATR) fosforylują białka efektorowe. Zależnie od rodzaju uszkodzeń i kontekstu komórkowego drogi sygnalizacyjne mogą powodować:

- rekrutację składników układów naprawy DNA do miejsc uszkodzonych,
- aktywację apoptozy,
- hamowanie transkrypcji,
- aktywację układów kontrolujących przechodzenie komórki przez określone punkty cyklu komórkowego.

Pierwszym z nich jest granica faz G1/S. W większości komórek uszkodzenie DNA powoduje fosforylację białek Tp53 i mdm2, co prowadzi do zwiększenia stabilności Tp53, jego tetrameryzacji i działania w charakterze czynnika transkrypcyjnego. Wśród genów, których transkrypcja zostaje pobudzona, jest gen kodujący białko p21/Waf1/Cip1 (CDKN1), inhibitor kinaz cyklinozależnych, kluczowy dla zahamowania wejścia komórki w fazę S.

Jeżeli komórka w momencie uszkodzenia znajduje się w fazie S, ważnym efekтором, modyfikowanym przez Atm jest nibryna (Nbs1), stanowiąca część działającego w

naprawie pęknięć podwójnoniciowych kompleksu Mre11-Rad50-Nbs1. Mutacja tego białka powoduje, że pomimo uszkodzenia DNA replikacja DNA postępuje i komórka przechodzi przez fazę S bez opóźnienia. Innymi efektorami są kinaza Chk2 i Brcal, białko o wielu funkcjach, często zmutowane w raku piersi.

Kolejny punkt kontrolny zlokalizowany jest w fazie G2. Najważniejszym efektem jest kinaza Chk1, aktywowana przez Atm lub Atr w sposób swoisty dla typu uszkodzenia. Chk1 fosforyluje i inaktywuje fosfatę Cdc25. Dzięki temu nie następuje aktywacja kinazy p34/Cdc2, niezbędnej do wejścia komórki w mitozę. Równolegle, Tp53 hamuje transkrypcję genów kodujących Cdc2 i cyklinę B1, wzmacniając blok w fazie G2.

Niezbędne do zatrzymania komórki w punktach kontrolnych są także niektóre białka czujnikowe. Przytoczone przykłady ilustrują przeplatanie się funkcji niektórych białek w drogach naprawy DNA i regulacji cyklu komórkowego, jak również wskazują, że komórka dysponuje zapasowymi mechanizmami zatrzymywania w cyklu komórkowym, co jest podstawą komórkowego „bezpieczeństwa i higieny pracy”. Inhibitory przeciwdziałające tym mechanizmom uczulają na czynniki uszkodzające i sprzyjają wystąpieniu niestabilności genetycznej, istotnemu czynnikowi w procesie nowotworzenia.

MECHANIZMY KONTROLUJĄCE PRZEBIEG I POLARYZACJĘ MITOZY

MECHANISMS CONTROLLING MITOSIS AND POLARITY OF MITOTIC SPINDLE

Janina Kaczanowska

Zakład Cytofizjologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski,
Warszawa 02-096 ul. Miecznikowa 1
E-mail: kaczan@biol.uw.edu.pl

W trakcie podziału komórki, zreplikowane chromosomy (w mitozie lub w mejozie II) lub też chromosomy homologiczne (w mejozie I) są segregowane przez dwubiegunowe wrzeciono kariokinetyczne. Dwubiegunowość wrzeciona, jego prawidłowa budowa i funkcjonowanie oraz prawidłowa segregacja materiału genetycznego są warunkami niezbędnymi do uzyskania po podziale identyczności genetycznej dwóch potomnych komórek.

TYPY REGULACJI PRZEBIEGU MITOZY

Wytworzenie, funkcjonowanie i zanik dwubiegunowego wrzeciona mitotycznego jest procesem cyklicznym. W fazach cyklu: interfaza (G1+sDNA+G2) następuje przygotowanie do mitozy. Pojęcie „przygotowania” obejmuje aż trzy typy specyficznych transkrypcji, syntez białek lub aktywacji enzymów, które sterują mitozą:

- 1) kolejne syntezy i aktywacje białek uczestniczących w samym przeprowadzaniu kariokinezy (np. syntezy cyklin aktywujących odpowiednie cyklinozależne kinazy, czy też białek motorycznych przeprowadzających sam proces segregacji chromosomów),

- 2) syntezy zarówno aktywatorów, jak i inhibitorów funkcjonowania tych białek, które zapewniają prawidłową kolejność ich funkcjonowania (np. aktywatory i inhibitory systemu GTPazy kotwiczącej wrzeczono mitotyczne do błony komórki, np. Tem 1, patrz niżej) oraz
- 3) syntezy **transkryptów i białek ścieżek kontrolnych, które aktywują się tylko w przypadku wyczuwanych nieprawidłowości w przebiegu mitozy**. Znowu istnieją co najmniej trzy typy reakcji komórek na odczuwane zakłócenia lub nieukończenie wszystkich procesów niezbędnych dla danej fazy mitozy, które stanowią sygnały modyfikujące automatyczny przebieg mitozy:

a) **uruchomienie nadrzędnego inhibitora** (są to zwykle tzw. kinazy systemu kontrolnego (ang. *checkpoint kinase*), np. taką kinazą jest kinaza Mps1, której aktywność jest niezbędna dla wytworzenia prawidłowego wrzeczona metafazowego z podczepionymi chromosomami (ang. *checkpoint spindle assembly kinase*) znaleziona tak u drożdży, jak i u człowieka [Stucke i in. 2002], która to kinaza umożliwia komórce rozpoznanie, czy jest prawidłowo przeprowadzona polimeryzacja mikrotubularnego wrzeczona mitotycznego; w przypadku defektu polimeryzacji odbywa się wstrzymanie przebiegu mitozy niejednokrotnie jednak z uruchomieniem specjalnego systemu naprawy doraźnie istniejących uszkodzeń (ang. *checkpoint arrest and activation of repairing system*);

b) **aktywowanie się inhibitorów**, które wstrzymują przejście do dalszych stadiów mitozy w przypadku nieukończenia fazy poprzedniej, co oznacza zatrzymanie cyklu mitotycznego na określonym stadium, bez możliwości dalszej kontynuacji (ang. *checking and waiting*); przykładem może być zatrzymanie przejścia komórki z metafazy do anafazy, o ile wszystkie chromosomy nie zostaną uprzednio zlokalizowane w prawidłowej płytce metafazowej (patrz szczegóły tego mechanizmu poniżej);

c) **kierowanie defektywnie dzielącej się komórki na ścieżkę samozagłady (apoptozy)**, jest to więc mechanizm zabezpieczający przed powstaniem nieprawidłowych komórek potomnych.

Tak więc, punkty zwrotne w cyklu (ang. *checkpoints*), czyli progi kontrolne zapewniają kolejność i wchodzenie w kolejną fazę mitozy dopiero po wykonaniu zadań fazy poprzedniej [Hartwell i Weinert, 1989, Surana i in. 2002, Millband i in. 2002].

PODSTAWOWE PROGI PRZEJŚĆ PRZEZ KOLEJNE FAZY MITOZY

Cykl komórkowy rozpoczyna się: fazą przygotowawczą w G1, S DNA i G2, a następnie **przejściem G2/M, gdy występuje aktywacja głównej cyklinozależnej kinazy z jej częścią regulatorową w postaci cykliny B** (ang. *master mitotic kinase*), czyli aktywacja MPF (ang. *mitosis/meiosis promoting factor*). **Faza wstępna**

obejmuje wytworzenie struktury wrzeciona i interakcji ze skondensowanymi chromosomami, a także z błoną komórkową lokującą wrzeciono w określony sposób we wnętrzu komórki (profaza) [Waters i Salmon, 1997]. W profazie z centrów polimeryzacji mikrotubul (MTOC) prędkiej czy później ułożonych w biegunach wrzeciona mitotycznego poprzez ciągle powtarzające się próbną i niestabilną polimeryzację i depolimeryzację promienistych włókien mikrotubularnych w końcu powstaje nieprzypadkowe rozmieszczenie przestrzenne chromosomów w obrębie mikrotubularnego wrzeciona mitotycznego. Te ponawiane próby prowadzą bowiem do momentu stabilizacji niektórych wiązek mikrotubuli wtedy, gdy z obu biegunów wiązki podłączą się do kinetochorów poszczególnych chromosomów. Wtedy powstaje zrównoważona pod względem napięć strukturalnych lokalizacja chromosomów w tak zwaną płytkę metafazową (metafaza). Taki moment pojawia się, gdy wszystkie chromosomy będą obustronnie podłączone włókienkami do obu biegunów wrzeciona, a także oś wrzeciona będzie stabilizowana białkami motorycznymi pomiędzy włókienkami międzybiegunowymi wychodzącymi z obu biegunów wrzeciona. Dodatkowo niektóre z promienistych włókien mikrotubularnych trafiają na odpowiednie receptory błony komórki i także będą stabilizowane, a to oznacza określoną orientację przestrzenną tworzonego wrzeciona we wnętrzu komórki [Li i Nicklas, 1995, Stern i Murray, 2001].

Przejście od metafazy do anafazy to uruchomienia systemu proteolitycznego związanego z proteasomami aktywującymi rozlepianie się chromatyd i nieprzypadkową segregację materiału genetycznego do dwóch biegunów wrzeciona mitotycznego. Ta segregacja odbywa się przez uruchomienie systemu motorycznego, związanego z depolimeryzacją włókien wrzeciona związanych z chromosomami i ślizgiem międzybiegunowych włókien wrzeciona w sumie powodujących przeciwległe rozejście się rozlepionych chromatyd (anafaza) [Michaelis i in. 1997, Clarke i Gimenez-Abian, 2000].

Przejście do telofazy to kształtowanie komórek potomnych i przemiany w cytoplazmie i szkieletie podbłonowym komórki sprzęgającymi tworzenie dwóch potomnych jąder z mechanizmem podziału komórki macierzystej na dwie komórki potomne (cytokineza). Etap ten równocześnie obejmuje całkowitą proteolizę cykliny B, a więc inaktywację głównej kinazy mitotycznej (cdc2³⁴) [Chang i Nurse 1993, Surana i in. 2001].

OMÓWIENIE MECHANIZMÓW NIEKTÓRYCH PROGÓW KONTROLI PRZEBIEGU MITOZY

Istnieje szereg uniwersalnych mechanizmów kontroli przebiegu mitozy (ang. *cell cycle checkpoints*) wspólnych dla wszystkich komórek mitotycznych roślin, zwierząt, grzybów i pierwotniaków. Charakterystyczne jest to, że istnieją mutacje poszczególnych punktów kontrolnych cyklu, w których komórki z defektami wrzeciona lub współdziałania wrzeciona z chromosomami będą dalej kontynuować mitozę, chociaż to nieuchronnie prowadzi do niestabilności genomu komórek potomnych.

A oto krótki i niepełny przegląd typów punktów kontrolnych i mechanizmów kontrolujących przebieg i prawidłowość mitozy:

I. Mechanizmy dotyczące wytworzenia wrzeciona mitotycznego

Można wyróżnić co najmniej trzy rodzaje różnych mechanizmów kontrolujących samo wytworzenie i orientację wrzeciona mitotycznego (ang. *spindle assembly checkpoint*) w okresie wczesnej mitozy. Wszystkie te mechanizmy zaczynają funkcjonować wtedy, gdy odbędzie się przejście od stadium G2 do profazy i towarzyszy temu aktywacja kompleksu cykliny B i odpowiedniej kinazy cyklinozależnej (ang. *MPF, mitosis/meiosis promoting factor*).

A. Regulacja interakcji wrzeciona z korteksem komórki

W komórce pączkujących drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, warunkiem prawidłowej mitozy jest wejście jednego bieguna (ang. *spindle polar body*) wrzeciona do wytwarzającego się pączka. Jeżeli ten biegun nie przesunie się do pączka, to zostaje zatrzymane w ogóle tworzenie się wrzeciona. Jak się okazało, taka prawidłowa orientacja jądra, a następnie wrzeciona mitotycznego regulowana jest przez wzajemne oddziaływanie kinazy typu NIMA (ang. *never in mitosis*) zlokalizowanej w biegunie wrzeciona z pewnymi składnikami cytoszkieletu szyjki pączka (z aktyną i septynami). Poza tym różne typy białek typu kinaz NIMA regulują także kondensację chromosomów. Mutacje tych białek powodują zatrzymanie cyklu na stadium G2/M, a więc przed profazą zarówno u drożdży, jak i w komórkach ssaków [Fry i Nigg, 1995, Segal i Bloom, 2001]. Ale tych zależności typu oddziaływań bieguna wrzeciona mitotycznego z korteksem komórki jest kilka typów i NIMA jest tylko jednym z bardziej znanych przykładów istnienia kontroli pozycji wrzeciona mitotycznego w komórce (ang. *spindle positioning checkpoint*) [Gönczy, 2002].

B Regulacja dwubiegunowości wrzeciona mitotycznego.

Nie bardzo wiadomo, jak w różnych typach wrzecion mitotycznych jest regulowana dwubiegunowość. Zapewne jest parę mechanizmów zapewniających dwubiegunowość wrzeciona. Podamy tu tylko jeden mechanizm kontroli. W przypadku drożdży *Schisosaccharomyces pombe* w stadium G1, gdy tworzy się potomny drugi biegun (ang. *spindle polar body duplication*), w jądrze odbywa się jednocześnie zlokalizowanie w tym nowym biegunie zarówno białka gamma tubuliny, jak i dwóch towarzyszących jej białek. Brak prawidłowej lokalizacji gamma tubuliny wraz z dwoma towarzyszącymi jej białkami w tym nowopowstałym biegunie powoduje w mutantach typu *alp* (ang. *altered polarity*) zatrzymanie dzielących się komórek na stadium metafazy [Vardy i Toda, 2000].

C. Kontrola tworzenia i podtrzymania obecności wrzeciona mitotycznego

W obecności czynników zapobiegających tworzeniu się wrzeciona (np. w obecności kolchicyny lub nokodazolu, które nie pozwalają na polimeryzację mikrotubuli) komórki nieuszkodzone, czyli normalne (dzikie), jeżeli są w fazie G2 lub w profazie, nie wytworzą płytki metafazowej. Natomiast jeżeli komórki są już w metafazie, to wtedy podanie

nokodazolu czy kolchicyny wstrzymuje przejście tych komórek do następnego stadium mitozy, czyli do anafazy. Zatem obecność wrzeciona jest niezbędna do osiągnięcia zarówno metafazy, jak i anafazy.

W pączkujących drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* wykryto co najmniej siedem mutacji kontrolujących prawidłowość wytwarzania wrzeciona mitotycznego i siedem odpowiadających im białek (BUB1, BUB2, BUB3, MAD1, MAD2, MAD3, MPS1). Te białka regulują punkty kontrolne tworzenia i funkcjonowania samego wrzeciona mitotycznego. Przejście to regulują białka MAD (ang. *mitotic arrest deficient*), jak i białka BUB (ang. *budding uninhibited by benzimidazole*) i kinaza nadrzędna Mps1. Natomiast białka BUB są dodatkowo związane z kontrolą polimeryzacji mikrotubuli i regulują przejście do telofazy. Są to uniwersalne mechanizmy kontroli mitozy, skoro homologi tych białek zostały zidentyfikowane także w *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus* i *Homo sapiens* [Hoyt, 2000, Gardner i Burke, 2000].

Niezmutowane białka tych siedmiu genów regulują prawidłowe zależności przestrzenne pomiędzy kinetochorami poszczególnych chromosomów a wrzecionem mitotycznym. Uproszczony schemat działania tych białek wygląda następująco. Wspomniana już Mps1 kinaza fosforyluje białko MAD1, a to prawdopodobnie decyduje o rekrutacji i zakotwiczeniu na kinetochorze całego zespołu innych białek; białka CENP-E (ang. *centromere protein E*), ufosforylowanego białka MAD2 i MAD3 oraz białek grupy BUB [Abrieu i in. 2001], a także dodatkowo nieaktywnego białka CDC20 [Sudakin i in. 2001]. Białko MAD2 rywalizuje na kinetochorze prawdopodobnie o wiązanie na CENP-E z włóknami mikrotubularnymi tworzącego się wrzeciona kariokinetycznego. Jeżeli z obu stron kinetochoru zostają podczepione włókienką mikrotubularną wychodzącą z obu biegunów wrzeciona, to taki układ jest zrównoważony pod względem napięcia i naprężeń. Podłączenie i stabilizacja włókienek mikrotubularnych na kinetochorze prawdopodobnie wypiera ufosforylowane MAD2 z kinetochoru. Zapewne jakaś jego pochodna MAD2* (być może forma oligomeryczna MAD2) odrywa się od kinetochoru wraz z białkami CDC20, BUB3, MAD3 i kinazą BUB. Oznacza to, że dany chromosom znalazł się prawidłowo w zrównoważonej napięciowo płycie metafazowej, chociaż cały zespół cytoplazmatyczny MAD2*, CDC20, BUB3, MAD3 i kinaza BUB stanowią nadal inhibitor przejścia komórki do anafazy (*metaphase-anaphase checkpoint*). Dopiero jeżeli wszystkie MAD2 wraz z towarzyszącymi białkami zostaną wyparte z kinetochorów przez włókienka wrzeciona, a inaczej mówiąc, gdy wszystkie chromosomy znajdują się w płycie metafazowej, a wszystkie MAD2 przekształcą się na MAD2*, w cytoplazmie odbywa się proces fosforylacji (w którym prawdopodobnie uczestniczy kinaza typu polokinaza) i inaktywacji inhibitora powodujący aktywację proteasomu wraz z połączeniem go z białkiem CDC20. To oznacza, że metafaza została ukończona i komórka przechodzi przez próg pozwalający jej na wejście w anafazę [Sudakin i in. 2001].

Jak się okazało, większość komórek zwierzęcych i drożdże w obecności inhibitorów tworzenia lub funkcjonowania wrzeciona mitotycznego (gdy jest MAD2 na

kinetochorach) wykazują także zatrzymanie białek spajających chromatydę, tzw. kohezyn na chromosomach, a to zlepienie uniemożliwia mechanicznie segregację chromatyd [Losada i Hirano, 2001]. Natomiast kohezyny, przynajmniej niektórych komórek roślinnych, po pewnym czasie opuszczają chromosomy i chromatydę podlegają rozdziałowi nawet wtedy, gdy nie dojdzie do anafazy i podziału jądra (endomitotyzacja). Jest to zjawisko spowodowane podwojeniem genomu w komórce nazwanej również inaczej poliploidyzacją.

II. Mechanizmy kontrolujące funkcjonowanie wrzeciona mitotycznego (ang. *metaphase-anaphase checkpoint*)

A. Fizyczne czynniki regulujące przejście z metafazy do anafazy

Jak to jest objaśnione powyżej, defekty w procesach wiązania się wrzeciona mitotycznego z kinetochorami w płycie metafazowej wiążą się z regulacją sił ciągnących wrzeciono do miejsc jego podczepienia zarówno do biegunów wrzeciona, jak i do cytoszkieletu korteksu. Nie tylko defekty w białkach w kinetochorach, ale samo niezrównoważone napięcie powstające w kinetochorze w sensie braku mechanicznego naprężenia przyczepionych włókienek powodują sygnał mechaniczny, który wstrzymuje wejście komórek w anafazę. W bardzo pomysłowych i precyzyjnych doświadczeniach wykazano, że (obok opisanej powyżej roli MAD2) same fizyczne siły naprężenia są także regulatorami przejścia metafazowo-anafazowego (ang. *metaphase-anaphase checkpoint*) [Li i Nicklas, 1995, Stern i Murray, 2001].

B. Kontrolne procesy związane z aktywacją proteolizy w stymulacji przejścia metafazowo-anafazowego

Mutanty typu *mad* i badania nad białkami MAD wykazały ich ważną rolę w przejściu metafazowo-anafazowym w inicjacji i aktywacji proteolizy szeregu białek przez proteasomy. Wejście w anafazę oznacza proteolizę czynnika Pds1 noszącego nazwę sekuryny (ang. *securin*). Destrukcja sekuryny uwalnia dotąd inhibowanego partnera, którym jest białko zwane separazą. Separaza rozdziela chromatydę rozchodzącą się do dwóch biegunów wrzeciona mitotycznego. Ten próg jest wrażliwy na każdą nieprawidłowość podczepienia kinetochoru do wrzeciona wysyłając sygnał, który działa hamująco na białko CDC20. A białko CDC20 jest bezpośrednim aktywatorem proteolizy związanej z APC/cyklosomami [Amon, 1999]. Dopiero aktywacja CDC20, zapewne regulowana przez różne czynniki i wspomagana przez aktywność polokinazy, powoduje aktywację proteasomu. Taki aktywowany proteasom nosi nazwę APC^{cdc20}/cyklosom (ang. *anaphase promoting complex/cyclosome*) [Zachariae i Nasmyth, 1999, Sudakin i in. 2001, May i in. 2002].

C. Kontrolne procesy związane z funkcjonowaniem wrzeciona

Białka BUB (ang. *budding uninhibited by benzimidazole*) są związane z kontrolą polimeryzacji mikrotubuli. Kontrola progu BUB2 (ang. *BUB2 checkpoint pathway*) nie pozwala komórkom na przedwczesne wyjście z mitozy, tzn. na przedwczesny

podział jądra oraz nie pozwala na proteolizę cykliny B i inaktywację cyklinozależnej kinazy mitotycznej *cdc2*³⁴. Natomiast kompleksy białka BUB2 z innymi białkamiprawdo-podobnie kontrolują wejście w proteolizę związaną z aktywacją białka Cdh1, a więc taką, która prowadzi do całkowitej proteolizy cyklin. To oznacza przejście od anafazy do telofazy. Białka BUB regulują także funkcjonowanie białek motorycznych wrzeciona i kinetochorów, a więc także regulują punkt przejścia metafazowo-anafazowego [Pereira i in. 2000].

D. Kontrolne procesy związane z przemieszczaniem się białek na wrzecionie mitotycznym

Szczególną grupą są białka tzw. podróźujące (ang. *messenger protein complex*). Białka podróźujące to zestaw: białka kinetochorowego INCENP (*inner centromere protein*), specjalnej kinazy typu Aurora 2 oraz białko BIR. Kinaza typu Aurora 2 w profazie przyczepia się do chromosomów na całej długości, ale w metafazie przemieszcza się w region kinetochoru tworząc kompleks z białkiem INCENP. Jak się wydaje, ta kinaza przyłącza kondensyny do chromosomów przez ich fosforylację, a także przez fosforylowanie histonu H3 charakterystycznego dla chromosomów mitotycznych. W trakcie rozchodzenia się chromatyd w anafazie główna kinaza *cdc2*³⁴ i kinaza Aurora 2 powodują, że proces usuwania kohezyn regulowany separazą odbywa się najpierw na ramionach chromosomów, a następnie w regionie kinetochorów [Losada i Hirano, 2001]. Trzeci komponent białek podróźujących – białko BIR jest białkiem decydującym o wejściu komórki na ścieżkę apoptozy. Białko BIR dołącza do kompleksu INCENP i Aurora B na kinetochorze i już razem przemieszczają się z włókienek mikrotubularnych przyłączonych do kinetochorów do włókienek mikrotubularnych międzybiegunowych. Ostatecznie znajdują się one w regionie resztek wrzeciona mitotycznego, a więc w regionie tzw. śródciałka (ang. *midbody*), gdzie odbywa się cytokineza. Odpowiedniki tych trzech białek podróźujących występują w komórkach zarówno drożdży, jak i ssaków. Te białka regulują przebieg cytokinezy, a także decydują o przeżyciu komórki w trakcie mitozy, to znaczy zapobiegają jej wejściu w apoptozę [Bischoff i Plozman 1999, Adams i in. 2001].

III. Mechanizmy regulujące zakończenia mitozy

A. Procesy kontrolujące przejście komórki do telofazy (ang. *telophase checkpoint*)

Białka typu TEM 1 o charakterze regulatorów podczepiania się bieguna wrzeciona do tworzącego się pączka (w fazie G1) *Saccharomyces cerevisiae* są również regulatorem przebiegu cytokinezy. Tylko w prawidłowo podczepionych wrzecionach dochodzi do cytokinezy i odcięcia pączka od komórki macierzystej. Nieaktywne białko TEM 1 związane z GDP znajduje się na nowym biegunie wrzeciona mitotycznego, który powinien wejść do pączka. Jeżeli tak się stanie, to białko TEM 1 ma kontakt z receptorowym białkiem błony komórkowej pączka o charakterze wymieniacza grupy GDP w białku TEM1 na grupę GTP (GEF, ang. *GDP/GTP exchange factor*) i staje się GTPazą. Otóż białko BUB2 wraz z dodatkowym białkiem (Bfa1) stanowi o aktywacji

tej GTPazy w anafazie, a to umożliwia zarówno cytokinezę, jak i aktywację białka *cdc14* (p. niżej) [Hoyt, 2000]. Jak się wydaje, w tym stadium odbywa się także kontrola ploidalności jąder potomnych, albowiem mutanty typu *tem 1* charakteryzują się właśnie niekontrolowanym i zmiennym poziomem ploidalności. W mutantach *nud-1*, białko TEM-1 nie podłącza się do bieguna wrzeciona mitotycznego i wówczas komórki zostają zatrzymane w stadium telofazy. Te wyniki wskazują na istnienie jeszcze jednego nieznanego do niedawna telofazowego punktu kontrolnego (ang. *telophase check point*) [Bardin i in. 2000, Lippincott i in. 2001].

B. Uniwersalne białka typu fosfatazy Cdc 14 niezbędne do przeprowadzenia cytokinezy

Białko Cdc14 normalnie znajduje się na terenie jąderka i jest uwalniane w trakcie zanikania struktury jąderka w trakcie profazy. To zanikanie jąderka jest w gruncie rzeczy tylko rozpraszaniem jego zawartości na terenie jądra, a następnie po rozproszeniu otoczki jądrowej w obrębie całej cytoplazmy. Fosfataza typu Cdc14 defosforyluje pewne białko, które jest inhibitorem degradacji cyklin. Ta defosforylacja pobudza proteolizę cyklin B przez proteasomy aktywowane białkiem CDH1, czyli APC^{cdh1}. W drożdżach pączkujących mutanty *Cdc14* nie kończyły cytokinezy, natomiast cały telofazowy podział jądra zachodził wyłącznie na terenie komórki macierzystej [Visintin i in. 1998, Surana i in. 2002].

Na te ogólne i uniwersalne występowanie mechanizmów kontrolujących przebieg mitozy komórek eukaryotycznych nakładają się jeszcze dwa inne zjawiska:

- 1) **Mitoza różnicująca, czyli nieprzypadkowe rozmieszczenie przestrzenne wrzeciona w dzielącej się komórce, które decyduje o nieprzypadkowym rozdziale zawartości komórki do komórek potomnych.** Chodzi tu zarówno o takie ułożenie wrzeciona w komórce pączkującego drożdża *Saccharomyces cerevisiae*, aby jeden biegun wszedł do wyodrębniającego się pączka, które jest regulowane przez związanie i interakcję pomiędzy kinazą typu NIMA (ang. *never in mitosis*) z pewnymi składnikami cytoszkieletalnego szyjki pączka (patrz punkt I B), jak też o aktywację podobnych procesów sterujących wytworzeniem polarności zapłodnionego jaja, w którym jeden blastomer daje początek części przedniej, a drugi – części tylnej zarodka.
- 2) **Odbiór sygnałów zewnętrznych regulujących wzajemne położenie wrzecion w siostrzanych komórkach mitotycznych w ten sposób, aby kolejne mitozy dawały bądź to:**
 - a) wydłużającą się jednolitą warstwę nabłonka,
 - b) możliwość delaminacji drugiej warstwy podścielającej ten nabłonek,
 - c) taką regulację wzajemnych orientacji wrzecion mitotycznych w rozrastającej się tkance, aby spowodować mięsaszowe wypełnianie przestrzeni ograniczonej nabłódkami.

Wszystkie te dane dotyczą regulacji i kontroli przebiegu mitozy, a także regulacji polaryzacji i mechanizmów regulacji mitoz różnicujących to odkrycia ostatnich pięciu lat, a w większości nawet ostatnich dwóch lat. Jak się wydaje ta dyscyplina nauk

biologicznych jest niezwykle płodna i możemy oczekiwać w najbliższej przyszłości jeszcze dalszych równie ważnych odkryć.

LITERATURA

- ABRIEU A, MAGNAGHI-JAULIN L, KAHANA JA, PETER M, CASTRO A, VIGNERON S, LORCA T, CLEVELAND DW, LABBE J-C. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 2001; **106**: 83–93.
- ADAMS RR, CARMENA M, EARNSHAW WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2000; **11**: 49–54.
- AMON A. The spindle checkpoint. *Curr Op Genet Dev* 1999; **9**: 69–75.
- CHANG F, NURSE P. Finishing the cell cycle: control of mitosis and cytokinesis in fission yeast. *Trend Gen* 1999; **9**: 333–335.
- BARDIN AJ, VISINTIN R, AMON A. A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* 2000; **102**: 21–31.
- BISCHOFF JR, PLOWMAN GD. The Aurora/Ipl1p kinase family : regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 454–459.
- CLARKE DJ, GIMENEZ-ABIAN JF Checkpoints controlling mitosis. *BioEssays* 2000; **22**: 351–363.
- FRY AM, NIGG EA. The NIMA kinase join forces with Cdc2. *Curr Biol* 1995; **5**: 1122–1125.
- GARDNER RD, BURKE DJ. The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 154–158.
- GÖNCZY P. Mechanisms of spindle positioning: focus on flies and worms. *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 332–339.
- HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- HOYT MA. Exit from mitosis: Spindle pole power. *Cell* 2000; **102**: 267–270.
- HOYT MA. A new view of the spindle checkpoint. *J Cell Biol* 2001; **154**: 909–911.
- LI X, NICKLAS RB. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* 1995; **373**: 630–632.
- LIPPINCOTT J, SHANNON KB, SHOU W, DESHAIES RJ, LI R. The Tem 1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. *J Cell Sci* 2001; **114**: 1379–1386.
- LOSADA A, HIRANO T. Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation. *BioEssays* 2001; **23**: 924–935.
- MAY KM, REYNOLDS NR, CULLEN F, YANAGIDA M, OHKURA H. Poloboxes and cut 23 (APC8) mediate an intermediate between polokinese and the anaphase promoting complex for fission yeast mitosis. *J Cell Biol* 2002; **156**: 23–28.
- MICHAELIS C, CIOSK R, NASMYTH K. Cohesins, chromosomal proteins that prevents premature separation of sister chromatids. *Cell* 1997; **91**: 35–45.
- MILLBAND DN, CAMPBELL L, HARDWICK KG. The awesome power of multiple model systems: interpreting the complex nature of spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* 2002; **12**: 205–208.
- PEREIRA G, HOFKEN T, GRINDLAY J, MANSON C, SHIEBEL E. The Bub 2 p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol Cell* 2000; **6**: 1–10.
- SEGAL M, BLOOM K. Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 160–166.
- STERN BM, MURRAY AW. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol* 2001; **11**: 1462–1467

- STUCKE VM, SILLJE HHW, ARNAUD L., NIGG EA Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *The EMBO J* 2002; **21**: 1723–1732
- SUDAKIN V, CHAN GKT, YEN TJ Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20 and MAD2. *J Cell Biol* 2001; **154**: 925–936.
- SURANA U., YEONG FM, LIM HH. MEN, destruction and separation: mechanistic links between mitotic exit and cytokinesis in budding yeast *BioEssays* 2002; **24**: 659–666.
- VARDY L, TODA T. The fission yeast gamma tubulin complex is required in G1 phase and is a spindle assembly checkpoint. *EMBO J* 2000; **19**: 6098–6111.
- VISINTIN R, CRAIG K, HWANG ES, PRINZ S, TYERS M, AMON A. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 1998; **2**: 709–718.
- WATERS JC, SALMON ED. Pathways of spindle assembly. *Curr Op Cell Biol* 1997; **9**: 37–43.
- ZACHARIAE W, NASMYTH K. Where end is destruction: cell division and the anaphase promoting complex. *Gen Dev* 1999; **9**: 69–75.

PROTEOLIZA REGULATORÓW CYKLU KOMÓRKOWEGO

PROTEOLYSIS OF CELL CYCLE REGULATORS

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa

W odpowiedzi na różne zewnętrzne i wewnętrzne bodźce stabilność, a zatem ilość, licznych białek regulatorowych podlega w komórkach eukariotycznych „dynamicznej” kontroli w wyniku precyzyjnej proteolizy. Na ogół białka mające ulec degradacji są w specyficzny sposób wyznakowywane przez skompleksowanie z ubikwityną, małym (76 AA) powszechnie występującym białkiem globularnym. W kaskadowej, zachodzącej przy udziale ATP ubikwitynacji białek, uczestniczą co najmniej trzy enzymy: enzym aktywujący ubikwitynę (E1), enzym łączący się z zaktywowaną ubikwityną (E2) i przenoszący ją na białkowy substrat bądź bezpośrednio, bądź też częściej we współdziałaniu z ligazą ubikwitynową (E3). Ligazy ubikwitynowe stanowią kompleksy kilku (kilkunastu?) białek uczestniczących w precyzyjnym rozpoznawaniu i wiązaniu białkowych substratów i ich translokacji do proteasomu 26S, w którym ulegają degradacji do krótkich peptydów. W ostatnich latach „odkrywane” są coraz to nowe białka, którym przypisuje się funkcje ligaz ubikwitynowych, a dzięki poznaniu struktury i działania poszczególnych podjednostek staje się możliwe wysuwanie wniosków co do ich homologii w określonych ligazach.

Degradacja większości białek biorących udział w kontroli przebiegu kolejnych faz cyklu komórkowego następuje przede wszystkim w proteasomie 26S. W szczególności dotyczy to cyklin, białkowych inhibitorów kinaz cyklozależnych (kinaz Cdk), białek odpowiedzialnych za rozpoczęcie syntezy DNA, czy też za precyzyjną segregację chromatyd podczas mitozy, a także białek kodowanych przez liczne geny supresorowe i protoonkogeny, których działanie jest również niezmiernie istotne dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego.

Ostatni etap ubikwitynacji białek bezpośrednio regulujących przebieg cyklu komórkowego przeprowadzają dwa wieloskładnikowe kompleksy ligaz ubikwitynowych – SCF (*Skp1-Cullin-Fbp*) i APC/C (*Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome*).

Ligaza SCF działa od połowy fazy G1 poprzez fazę S do połowy fazy G2. W komórkach ludzkich ubikwitynuje ona cykliny fazy G1 (cykliny D i E) i białkowe inhibitory kinaz cyklinozależnych (przede wszystkim p27, p21), a także czynnik transkrypcyjny E2F-1 regulujący ekspresję genów kodujących białka konieczne do rozpoczęcia w komórkach syntezy DNA czy też białko Cdc6 (*DNA replication factor*) wiążące się z miejscem rozpoczęcia transkrypcji. Podstawowymi podjednostkami ligazy SCF są: białko Skp1, kullina (pomost, na którym dochodzi do współdziałania poszczególnych podjednostek), jedno z białek z motywem *F-box* (Fbp) odpowiedzialne za rozpoznanie i związanie białka mającego ulec ubikwitacji oraz białko Rbx1/Hit 1/Roc 1 charakteryzujące się obecnością motywu *RING-finger* i pośredniczące w interakcji kulliny z enzymem E2. Większość białkowych substratów ligazy SCF przed ubikwitynacją jest fosforylowana przez różne kinazy.

Ligaza APC/C aktywna jest od połowy fazy G2, w mitozie i na początku fazy G1. Dołącza ona ubikwitynę przede wszystkim do cyklin mitotycznych (cyklin A i B, podjednostek regulatorowych kinaz cdk1 i cdk2 działających podczas mitozy), do tzw. sekuryń, białek będących inhibitorami rozdziału chromatyd i anafazy, do własnych białek regulatorowych (np. Cdc20), do kinazy Polo/Cdc5 fosforylującej między innymi fosfatą Cdc25 oraz podjednostki APC, a także do białka Ase wiążącego się z mikrotubulami wrzeciona mitotycznego czy też gemininy regulującej rozpoczęcie syntezy DNA w fazie S przez hamowanie formowania kompleksu prereplikacyjnego (pre-RC). Stałymi składnikami kompleksu APC/C (złożonego z kilkunastu białek) są białka APC2 i APC11, homologiczne z kulliną oraz białkiem Rbx1/Roc1 w omawianej już ligazie SCF. Białko APC2 jest jednostką podstawową, do której dołączają się inne podjednostki, białko APC11 (z motywem *RING-finger*) pośredniczy zaś, jak się sądzi, w interakcjach z odpowiednim enzymem E2.

Regulacja funkcjonowania ligazy APC następuje przede wszystkim przez dołączanie do kompleksu określonych podjednostek regulatorowych – białka Cdc20/Fizzy lub białka Cdh1/Hct1/Fizzy-related, uczestniczących, podobnie jak białka z motywem *F-box*, w rozpoznawaniu i wiązaniu białkowych substratów. Ufosforylowanie zarówno kompleksu APC/C, jak i podjednostek regulatorowych jest istotne dla działania ligazy APC/C. Fosforylacji dokonują kinazy Cdk aktywne w mitozie, kinazy Polo, a także kinaza A, przy czym fosforylacja może zarówno aktywować, jak i hamować działanie ligazy APC/C. Co więcej, ligaza APC/C pozostaje również pod wpływem białek punktu kontrolnego wrzeciona mitotycznego, które są odpowiedzialne za precyzyjną kontrolę prawidłowości rozdziału chromatyd, przebiegu anafazy i zakończenia mitozy. Białka z rodzin MAD i BUB tworzą, po uaktywnieniu punktu kontrolnego wrzeciona, przejściowe kompleksy z białkiem Cdc20, regulatorem aktywności ligazy APC/C, inaktywując w ten sposób jej działanie i zatrzymując komórki w metafazie. W ostatnich latach poznano także mechanizm odpowiedzialny za inaktywację ligazy APC/C w interfazie. Zidentyfikowano bowiem białko Emi1/Rca1 działające jako inhibitor ligazy

APC/C, którego syntezę reguluje czynnik transkrypcyjny E2F, a degradację poprzedza ubikwitinacja przeprowadzana przez ligazę SCF.

Białka będące substratami ligazy APC/C charakteryzuje na ogół obecność tzw. boksu destrukcyjnego (*D-box*), sekwencji aminokwasowej opisanej po raz pierwszy w cyklinach mitotycznych, niezbędnej do rozpoznania substratu przez ligazę i odpowiedni enzym E2. Mutacje w boksie destrukcyjnym lub też brak tej sekwencji aminokwasowej wywołują stabilizację białek i zatrzymanie procesów, w których uczestniczą. Wydaje się także, że sekwencja KEN występująca w niektórych białkach może być również konieczna do ich rozpoznania i ubikwitynacji przez ligazę APC/C skompleksowaną z białkiem regulatorowym Cdh1.

Ostatnio wykazano, że ligazą ubikwitinową jest także białko Chfr działające w punkcie kontrolnym występującym w profazie podziału mitotycznego i monitorujące kondensację chromosomów i ruch centrosomów ku biegunom komórki. Charakteryzuje je obecność domeny FHA (*Forkhead-Associated*) i motywu *RING-finger*, znajdującego w białkach Rbx1/Roc1 i APC11 omawianych wcześniej ligaz. Ligaza Chfr katalizuje *in vitro* swoją własną ubikwitinację, a przede wszystkim ubikwitynuje i skierowuje na drogę proteolizy kinazę Polo1 (Plk1), której udział w regulacji cyklu staje się coraz bardziej doceniany i rozumiały. Jest ona bowiem w znacznym stopniu odpowiedzialna za odpowiedni stan ufosforylowania, a tym samym aktywności, fosfatazy Cdc25 aktywującej kinazy Cdk i kinazy Wee, która je hamuje. Rezultatem obniżonego poziomu kinazy Plk1 jest opóźnienie aktywacji fosfatazy Cdc25 i inaktywacji kinazy Wee, czego efektem są zakłócenia procesów przebiegających z udziałem kinaz Cdk przed rozpoczęciem metafazy. Należy jednakże pamiętać, że oprócz kinazy Plk1 i inne kinazy białkowe fosforylują powyższe enzymy. Zarówno fosfataza Cdc25, jak i kinaza Wee są degradowane w układzie ubikwityna-proteasom, a ich ubikwitinację przeprowadza prawdopodobnie ligaza SCF.

Motyw *RING-finger* występuje także w białku MDM2, które jest ligazą ubikwitynującą białko supresorowe p53, degradowane następnie w proteasomie 26S. Wewnątrzkomórkowy poziom MDM2 jest ściśle regulowany na poziomie transkrypcji, a także bardzo efektywnie poprzez kompleksowanie z różnymi białkami komórkowymi i wirusowymi. Mutanty p53, a także pokrewne p53 białka p73 i p63 nie są rozpoznawane i ubikwitynowane przez ligazę MDM2. O możliwości utworzenia kompleksu p53-MDM2 decyduje wewnątrzkomórkowa lokalizacja tych białek oraz fosforylacja w każdym z nich określonych reszt aminokwasowych. Drugim, ostatnio zidentyfikowanym substratem ligazy MDM2, okazał się receptor androgenowy. Jego ubikwitinacja przez ligazę MDM2 w znacznym stopniu zależy od aktywności kinazy Akt. Chociaż ani p53, ani receptor androgenowy nie biorą bezpośredniego udziału w poszczególnych etapach cyklu, to jednak ich precyzyjnie kontrolowana proteoliza jest bardzo istotna ze względu na wpływ tych czynników transkrypcyjnych na ekspresję wielu białek bezpośrednio zaangażowanych w regulację przebiegu cyklu komórkowego, a także apoptozy.

Degradowane w proteasomie 26S są również błonowe receptory (o aktywności kinaz tyrozynowych) wielu czynników wzrostu, takich jak np. FGF, PDGF czy też

HGF. Ich ubiquitynacji dokonuje ligaza Cbl, oddziałująca poprzez motyw *RING-finger* z odpowiednim białkiem E2 przenoszącym ubiquitynę.

Poza wymienionymi białkami również wiele innych białek istotnych dla przebiegu cyklu jest degradowanych proteolitycznie i to nie tylko przy udziale układu ubiquityna-proteasom. Przykładem takich białek są c-Myc i pRb, degradowane zarówno w proteasomie (nieznana dotąd ligaza ubiquitynowa), jak i przez zależną od jonów wapnia proteazę cysteinową – kalpainę (c-Myc) oraz kaspazy (pRb).

W powyższym opracowaniu skoncentrowano się na omówieniu ubiquitynacji białek regulujących cykl komórkowy. Należy zdawać sobie sprawę, że równie istotny, chociaż mniej poznany jest proces ich deubiquitynacji w sytuacjach nieprawidłowego wyznakowania ubiquityną. Przeprowadzają go liczne (>90 dotąd poznanych) proteazy cysteinowe, których rola w regulacji cyklu komórkowego zaczyna obecnie być doceniana.

Jak pokazano, w proteolizie białkowych regulatorów cyklu uczestniczy bardzo wiele białek. Należy sobie zdawać sprawę, że również ich wewnątrzkomórkowy poziom może zmieniać się pod wpływem różnych czynników, czego efektem może być bądź niepożądana w danym momencie stabilizacja białka regulatorowego, bądź też jego przyspieszony rozkład. Jak już obecnie wiadomo, zaburzenia ubiquitynacji i deubiquitynacji białek leżą u podłoża wielu schorzeń, zwłaszcza proliferacyjnych, autoimmunologicznych i neurologicznych. Dotychczasowy stan wiedzy na temat przebiegu podstawowych szlaków ubiquitynacji i degradacji białek sprawia, że w ostatnich latach mogły się już rozpocząć badania ukierunkowane na farmakologiczną kontrolę proteolizy białek regulatorowych cyklu.

LITERATURA

- CIECHANOVER A, ORAN A, SCHWARTZ AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays* 2000; **22**: 442–451.
- DESTERRO JMP, RODRIGUEZ MS, HAY RT. Regulation of transcription factors by protein degradation. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 1207–1219.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego – udział ubiquitynacji. *Post Biochem* 2002; **48**: 34–47.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Punkty kontrolne cyklu komórkowego – czy znamy ich molekularne podłoże? *Post Biol Kom* 2002; **29**: 157–175.
- KIRSCHNER M. Intracellular proteolysis. *Trends Genet* 1999; **15**: M24–M45.
- KOEPP DM, HARPAL JW, ELLEDGE SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 1999; **97**: 431–434.
- VEW PR. Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators. *J Cell Physiol* 2001; **187**: 1–10.

WPŁYW MITOTYCZNEJ FOSFORYLACJI BIAŁEK HMGN NA ODDZIAŁYWANIE Z CHROMATYNĄ ORAZ ICH IMPORT DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO

MITOTIC PHOSPHORYLATION OF HMGN PROTEINS REGULATE BOTH CHROMATIN INTERACTION AND NUCLEAR IMPORT

Marta PRYMAKOWSKA-BOSAK

Białka HMGN (*high mobility group N*) tworzą rodzinę białek jądrowych, które wiążą się z nukleosomami, kształtują strukturę chromatyny, wzmacniają transkrypcję oraz replikację z matrycy chromatynowej. Dwie cząsteczki białka HMGN wiążą się z nukleosomem niezależnie od sekwencji DNA. Wiązanie to stabilizuje nukleosom jednocześnie nie usztywniając struktur chromatyny wyższego rzędu. Białka HMGN stanowią element architektury chromatyny, wspomagają rozluźnianie włókien chromatynowych obniżając hamujący wpływ histonów na proces transkrypcji.

W trakcie podziału mitotycznego podstawowe procesy zachodzące w komórce to kondensacja chromatyny oraz zahamowanie aktywności transkrypcyjnej. Oba zjawiska są związane z usunięciem wielu czynników transkrypcyjnych, a także białek strukturalnych z obszaru chromatyny. Zmiana sposobu oddziaływania białek z chromatyną w trakcie mitozy często zależna jest od miejsca i stopnia ich ufosforylowania.

Podczas mitozy białka HMGN podlegają masowej fosforylacji, modyfikacja ta dotyczy konserwowanej ewolucyjnie domeny decydującej o wiązaniu się tych białek z nukleosomem (*NBD-nucleosomal binding domain*). Wykazano, że fosforylacja domeny NBD hamuje wiązanie białek HMGN z nukleosomem, a także negatywnie wpływa na ich import do jądra komórkowego po odtworzeniu błony jądrowej w późnej telofazie. W wyniku fosforylacji następuje obniżenie powinowactwa HMGN do nukleosomu, co jest spowodowane zmianą ładunku białka na negatywny, natomiast hamowanie importu do jądra jest związane z obecnością grupy fosforanowej, która

decyduje o specyficznym oddziaływaniu białek HMGN z niektórymi izoformami białka 14-3-3. Wykazano, że istnieje ścisły związek między oddziaływaniem HMGN z chromatyną a ich importem do jądra komórkowego. Mitotyczna fosforylacja jednocześnie wpływa na oba te procesy regulując w ten sposób dostępność białek HMGN dla chromatyny.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

* Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 687) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] *Histone and Nucleohistones*. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64..

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na białym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza **odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.**

Redakcja prosi także o dołączenie tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	Treść pracy nie była uprzednio publikowana, tak nie nie została wysłana do innej redakcji tak nie
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	tak nie Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	tak nie z komputera IBM tak nie

Odpowiadam za całość pracy opisaną w załączonym maszynopisie **tak nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postępach Biologii Komórki” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

SZUMIEL I.: Punkty kontrolne w cyklu komórkowym Checkpoints in cell cycle	3
KACZANOWSKA J.: Mechanizmy kontrolujące przebieg i polaryzację mitozy Mechanisms controlling mitosis and polarity of mitotic spindle	5
GRZELAKOWSKA-SZTABERT B.: Proteoliza regulatorów cyklu komórkowego Proteolysis of cell cycle regulators	15
PRYMAKOWSKA-BOSAK M.: Wpływ mitotycznej fosforylacji białek HMGN na oddziaływanie z chromatyną oraz ich import do jądra komórkowego Mitotic phosphorylation of HMGN proteins regulate both chromatin interaction and nuclear import	19
MALESZEWSKI M.: Mejoza Meiosis	(brak streszczenia)

Indeks 369705

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2003

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2003 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2003:
dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł,
dla odbiorców indywidualnych 50 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2003

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,
tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 25 dollars USA