

MOLEKULARNE PODŁOŻE REPLIKACJI I ENDOREDUPLIKACJI

MOLECULAR BASIS OF REPLICATION AND ENDOREDUPLICATION

Andrzej PAWLIK, Alina GRZANKA

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Streszczenie: Powstanie komórek o podwojonej zawartości jądrowego DNA może nastąpić w wyniku przebiegu endomitozy, niekompletnej mitozy bądź endoreduplikacji. Ta ostatnia polega na przeprowadzeniu duplikacji genomu bez wejścia w mitozę. W świecie zwierząt jest ona najczęściej spotykana u owadów, a u ssaków zachodzi w komórkach trofoblastu. Wielokrotne rundy endoreduplikacji prowadzą do powstania komórek o zawartości 8C, 16C, 32C (itd.) DNA. Aby było to możliwe, muszą zostać ominięte liczne mechanizmy zapobiegające zajściu ponownej replikacji. Zmiany wewnątrz komórki obejmują wszystkie fazy jej cyklu i dotyczą funkcjonowania wielu białek, w tym kompleksu prereplikacyjnego (Cdc6, Cdt1, Mcm2-7, Orc1-6) i Gemininy. W ich regulacji biorą udział kinazy zależne od cyklina (Cdk), odpowiedzialne za przyłączanie reszt fosforanowych oraz kompleksy o właściwościach ligazy ubikwityny (APC, SCF). Natomiast brak aktywności kinazy Cdk1 ułatwia komórce pominięcie mitozy.

Słowa kluczowe: replikacja, endoreduplikacja, cykl komórkowy, kompleks prereplikacyjny, Geminina, Cdk, APC, SCF.

Summary: Formation of cells with a duplicated genome may be a consequence of endomitosis, incomplete mitosis or endoreduplication. During endoreduplication, nuclear DNA is replicated without entering mitosis. In mammals it gives rise to trophoblast cells with extra copies of the genomic DNA, but in the animal world endoreduplication is the most widespread in insects. Multiple rounds of endoreduplication cycles produce cells with nuclei with 8C, 16C, 32C (etc.) DNA contents. To make it happen, cells must escape the mechanisms that prevent another round of replication. Intracellular changes cover all the cycle phases and involve many proteins, including pre-replication complex (Cdc6, Cdt1, Mcm2-7, Orc1-6) and Geminin. Cyclin-dependent kinases (Cdk) and ubiquitin ligase complexes (APC, SCF) are both involved in the regulation of these proteins. Besides, depletion of Cdk1 activity facilitates skipping mitosis.

Key words: replication, endoreduplication, cell cycle, pre-replication complex, Geminin, Cdk, APC, SCF.

Wykaz użytych skrótów: **β -TrCP** (*β -transducin repeat-containing protein*) – białko zawierające powtórzenie β -transducyny; **APC** (*Anaphase-Promoting Complex*) – kompleks promujący anafazę; **ATM** – białko 'ataxia-telangiectasia mutated'; **ATR** – białko 'ataxia-telangiectasia and Rad-3-related'; **Cdc** (*cell division cycle*) – białko cyklu podziału komórkowego; **Cdh1** (*cadherin 1*) – kadheryna 1; **Cdk** (*cyclin-dependent kinase*) – kinaza zależna od cykliny; **Cdt1** (*chromatin licensing and DNA replication factor 1*) – czynnik 1 licencjonowania chromatyny i replikacji DNA; **Chk** (*checkpoint kinase*) – kinaza punktu kontrolnego;

Cip1 (*Cdk-interacting protein 1*) – białko 1 oddziałujące na Cdk; **CK2** (*casein kinase 2*) – kinaza kazeiny 2; **Cul** (*cullin*) – kulina; **Dbf4** – białko 'dumbbell former 4'; **Ddb1** (*DNA damage-binding protein 1*) – białko 'uszkodzenie DNA-wiązanie' 1; **Ddk** (*Dbf4-dependent kinase*) – kinaza zależna od Dbf4; **DP** (*E2F dimerization partner*) – białko tworzące dimer z E2F; **DpB11** (*DNA polymerase B subunit 11*) – podjednostka 11 polimerazy DNA B; **Emi1** (*early mitotic inhibitor 1*) – wczesny mitotyczny inhibitor 1; **FGF4** (*fibroblast growth factor 4*) – czynnik 4 wzrostu fibroblastu; **GIN5** (jap. *Go-Ichi-Ni-San = 5-1-2-3*) – kompleks GINS; **Kip1** (*kinase inhibitor protein 1*) – białko 'inhibitor kinazy' 1; **MAPKAPK-2** (*Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*) – kinaza białkowa 2 aktywowana przez p38MAPK; **MCM** – kompleks 'MiniChromosome Maintenance'; **Mdm2** – białko 'mouse double minute 2'; **Myt1** (*membrane-associated tyrosine- and threonine-specific Cdc2-inhibitory kinase*) – hamująca kinaza związana z błoną komórkową specyficzna wobec tyrozyny i treoniny Cdc2; **ORC** (*Origin Recognition Complex*) – kompleks rozpoznający miejsce początku replikacji; **p38MAPK** (*p38 mitogen-activated protein kinase*) – p38 kinaza białkowa aktywowana przez mitogen; **PCNA** (*proliferating cell nuclear antigen*) – jądrowy antygen komórki proliferującej; **Pik1** (*polo-like kinase 1*) – kinaza polo-podobna 1; **PP1** (*protein phosphatase 1*) – fosfataza białkowa 1; **PP2A-B56δ** (*protein phosphatase 2-regulatory subunit B56δ*) – fosfataza białkowa 2-podjednostka regulująca B56δ; **pRb** (*protein retinoblastoma*) – białko Retinoblastoma; **pre-RC** (*pre-Replication Complex*) – kompleks prereplikacyjny; **Psf** (*peptide supply factor*) – czynnik dostarczania peptydu; **RASSF1A** (*Ras-association domain family protein 1, isoform A*) – białko 1 z rodziny domeny białek Ras, izoforma A; **RFC** (*replication factor C*) – czynnik replikacji C; **Roc1** (*regulator of cullins 1*) – regulator kulin 1; **RPA** (*replication protein A*) – białko replikacji A; **SCF** (*Skp1-Cul1-F-box*) – kompleks Skp1-Cul1-białko z rodziny F-box; **SCF^{β-TrCP}** – kompleks Skp1-Cul1-β-TrCP; **SCF^{Cdc4}** – kompleks Skp1-Cul1-Cdc4; **SCF^{Skp2}** – kompleks Skp1-Cul1-Skp2; **Skp** (*S-phase kinase associated protein*) – białko związane z kinazą fazy S; **Sld** – białko 'synthetic lethal with dpb11'; **TopBP1** (*DNA topoisomerase II-binding protein 1*) – białko wiążące topoizomerazę DNA II 1; **UbcH10** (*ubiquitin-conjugating enzyme H10*) – enzym H10 wiążący ubikwitynę; **Waf1** (*wildtype p53-activated fragment 1*) – fragment 1 aktywowany przez dziką formę białka p53.

1. WPROWADZENIE

Podwojenie zawartości jądrowego DNA w fazie S i segregacja materiału genetycznego pomiędzy dwie komórki potomne w mitozie to główne cechy charakterystyczne cyklu komórkowego organizmów eukariotycznych. Okres między tymi procesami jest dla komórek niezwykle ważny, ponieważ w jego trakcie nie może nastąpić kolejna replikacja [66]. Istnieje jednak wiele przypadków, w których doszło do powstania dodatkowych kopii DNA. Mogą być one wynikiem uszkodzeń DNA, zaburzeń cyklu komórkowego bądź naturalnym procesem będącym częścią programu rozwoju oraz wzrostu wielu zwierząt i roślin [11, 19, 82]. W odróżnieniu od poliploidyzacji, w wyniku której następuje zwielokrotnienie podstawowego zestawu chromosomów x całego organizmu, opisane poniżej procesy ograniczają się jedynie do określonych organów, tkanek bądź komórek.

2. ENDOMITOZA I NIEKOMPLETNA MITOZA

Istnieją trzy główne mechanizmy prowadzące do powstania komórek o podwojonej zawartości jądrowego DNA. Pierwszym z nich jest endomitoza (ang. *endomitosis*), zaobserwowana między innymi u owadów i mięczaków [4]. W przeciwieństwie do

normalnej mitozy zachodzi ona w nienaruszonej otoczce jądrowej, a w jej trakcie nie zanika jąderko i nie tworzy się wrzeciono kariokinetyczne. Rezultatem jest brak podziału komórki i podwojenie podstawowego zestawu chromosomów x (endopoliploidyzacja). Drugim, znacznie częściej występującym procesem jest niekompletna mitoza (ang. *incomplete/acytokinetic/restitutional mitosis*) [1, 4]. W jej trakcie komórka rozpoczyna mitozę, jednak przechodzi tylko przez profazę, metafazę i anafazę A. W wyniku pominięcia anafazy B, telofazy i cytokinezy, rozłączone w anafazie A chromatydy siostrzane nie rozchodzą się do przeciwległych biegunów i zamykane są wewnątrz jednej odtworzonej otoczki jądrowej. Wielokrotne niekompletne mitozy są jednym z etapów rozwoju megakariocytów wchodzących w skład szpiku kostnego [71]. W ich efekcie powstają duże, endopoliploidalne komórki, które są zdolne do produkcji płytek krwi. W przypadku hepatocytów niekompletna mitoza może być rozwiązaniem dla problemów związanych z ich wzrostem, które występują, gdy wątroba pracuje na granicy swoich możliwości [3]. Natomiast w kardiomiocytach wytworzone w ten sposób dodatkowe kopie genomu mogą być przydatne w regeneracji komórek oraz obronie przed stresem oksydacyjnym [3].

3. ENDOREDUPLIKACJA

Trzecim procesem, który powoduje podwojenie zawartości jądrowego DNA jest endoreduplikacja (ang. *endoreduplication*). W jej trakcie dochodzi do więcej niż jednej duplikacji genomu, a komórka nie przechodzi przez mitozę [21]. Charakterystycznym objawem pojedynczej endoreduplikacji są diplochromosomy zbudowane z czterech, a nie jak w przypadku normalnych chromosomów dwóch połączonych ze sobą chromatyd. Są one wynikiem zajścia dwóch, następujących po sobie replikacji, pomiędzy którymi nie dochodzi do mitozy, a tym samym segregacji chromatyd siostrzanych [19]. Efektem wielokrotnych endoreduplikacji jest sukcesywne podwajanie ilości DNA z 4C do 8C, a następnie do 16C, 32C itd. Zjawisko to często jest również określane mianem politenii, a połączone ze sobą liczne chromatydy siostrzane nazywane są chromosomami politenicznymi [40]. Nie zawsze różnice pomiędzy politenią a endopoliploidalnością są wyraźnie widoczne – efektem endoreduplikacji mogą być różne pośrednie konfiguracje DNA, różniące się między sobą stopniem asocjacji pomiędzy podwojonymi chromatydami. Z tego właśnie względu termin 'endopoliploidalność' jest stosowany nie tylko w odniesieniu do komórek, które przeszły endomitozę lub niekompletną mitozę, ale czasami również do tych, w których zaszła endoreduplikacja [22].

W normalnym cyklu komórkowym faza G1 następuje po mitozie, natomiast komórki przechodzące endoreduplikację mogą wejść w G1 z wczesnej mitozy, G2 lub S [66]. Stąd w cyklach endoreduplikacyjnych wyróżnia się tylko dwie główne fazy: S, podczas której zachodzi replikacja DNA oraz G-podobną (ang. *Gap-like phase*), w której ma miejsce przygotowanie do kolejnej replikacji [33]. Jeśli komórka przechodząca endoreduplikację wchodzi w G1 z fazy S, w jej jądrze nie zachodzi replikacja heterochromatyny, w tym regionów centromerowych i telomerowych [24].

W normalnym cyklu replikacja heterochromatyny zostaje zainicjowana w późnym etapie fazy S i jest kontynuowana już po zakończeniu replikacji innych regionów chromatyny, natomiast gdy komórka wchodzi w G1 z S, faza S jest skrócona i w rezultacie nie dochodzi do duplikacji heterochromatyny.

W przypadku endoreduplikacji w trakcie danej fazy S inicjacja replikacji w miejscach początku replikacji (ang. *origins*) zachodzi tylko raz. Następna runda replikacji może zostać zainicjowana dopiero po fazie G, w kolejnej fazie S. Inaczej jest w przypadku tzw. re-replikacji (ang. *re-replication*), gdzie może dojść do zainicjowania wielu rund replikacji w obrębie jednego miejsca początku replikacji podczas danej fazy S [66]. Re-replikacja, w odróżnieniu od endoreduplikacji, nie jest jednak częścią jakiegokolwiek naturalnego programu rozwoju, a komórki, w których zaszedł ten proces, zazwyczaj są kierowane na drogę apoptozy.

Endoreduplikacja, jako naturalny proces występujący w trakcie rozwoju i wzrostu komórek, jest znacznie częściej spotykana u roślin niż u zwierząt. Zachodzi ona u ponad 90% gatunków roślin okrytonasiennych [11]. W królestwie zwierząt spotykana jest najczęściej w gromadzie owadów, które endoreduplikują swój genom w większości tkanek larwalnych, a także w wielu tkankach dorosłych [82]. Najbardziej znanym przykładem występowania endoreduplikacji są komórki ślinianek *Drosophila melanogaster*, w których zawartość DNA dochodzi do 2048C, co równa się 9 rundom endoreduplikacji [22]. U ssaków proces ten zachodzi w komórkach warstwy zewnętrznej kosmówki – trofoblastie [82]. Wiedza na temat roli endoreduplikacji jest wciąż dość uboga. Przypuszcza się, że w wyspecjalizowanych i aktywnych komórkach zapewnia ona odpowiednią ilość DNA, dzięki której możliwy jest wzrost poziomu ekspresji genów [4]. Inna przypisywana rola dotyczy pozytywnej korelacji, jaka występuje pomiędzy zawartością DNA a wielkością komórek [41]. Wielokrotne rundy endoreduplikacji przyczyniają się do wzrostu rozmiarów komórek, co w przypadku roślin zwiększa zdolności magazynujące ich tkanek i organów spichrzowych [6].

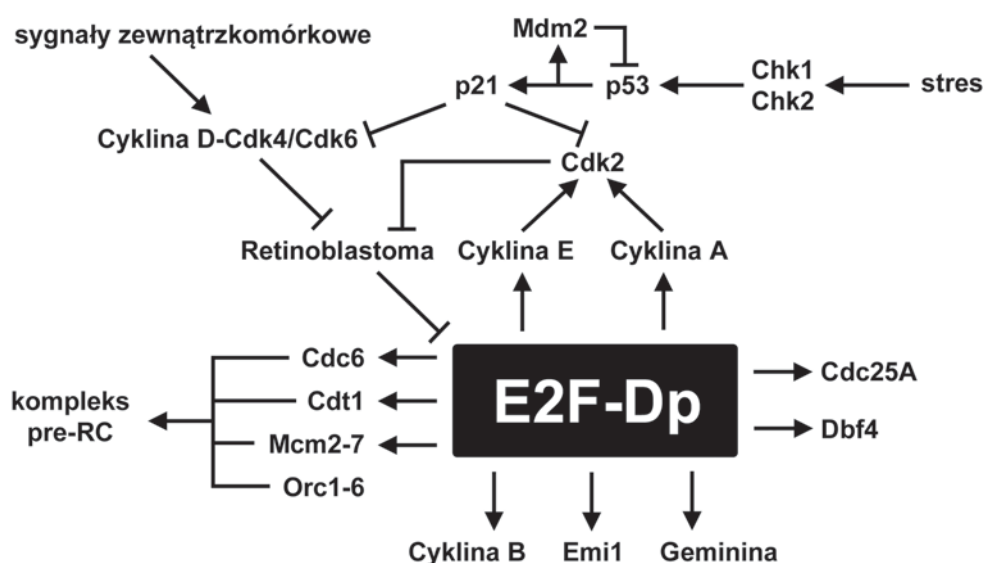
Nieznane są dokładne cytologiczne procesy prowadzące do endoreduplikacji, jednak w ostatnim czasie poznano wiele mechanizmów spotykanych w komórkach ludzkich i innych kręgowców, które są odpowiedzialne za przeprowadzenie tylko jednej replikacji w trakcie trwania danego cyklu komórkowego i tym samym zapobiegają ponownej duplikacji genomu. Zmiany w ich prawidłowym funkcjonowaniu mogą prowadzić do wystąpienia endoreduplikacji.

4. ZAPOBIEGANIE PONOWNEJ REPLIKACJI

Endoreduplikacja wymaga zmian nie tylko w procesie inicjacji replikacji, ale w sposobie regulacji wszystkich faz cyklu komórkowego i białek odpowiedzialnych za ich prawidłowy przebieg [21].

4.1. FAZA G1

p53. Niezwykle ważną rolę w kontroli cyklu komórkowego pełni białko p53. W zdrowych komórkach jego aktywność jest niska, ponieważ regulują ją różne białka, w tym Mdm2 (ryc. 1) [18]. W przypadku braku zapotrzebowania na p53, jest ono



RYCINA 1. Białka fazy G1 cyklu komórkowego (\perp – inhibicja; \uparrow – aktywacja). W prawidłowym cyklu sygnały zewnątrzkomórkowe indukują powstanie kompleksu Cyklina D-Cdk4/Cdk6, który hamuje aktywność białek Retinoblastoma, co umożliwia ekspresję czynników transkrypcyjnych E2F, regulujących syntezę białek cyklu komórkowego. W przypadku stresu komórki aktywują kinazy Chk1/Chk2, które indukują aktywność białka p53, odpowiedzialnego za inicjację transkrypcji białka p21. p21 inaktywuje kinazy Cdk2, Cdk4 i Cdk6, powodując wzrost aktywności Retinoblastoma i zahamowanie aktywności E2F. p53 inicjuje także transkrypcję białka Mdm2, które w pętli sprzężenia zwrotnego hamuje aktywność p53

FIGURE 1. Proteins of the G1 phase of the cell cycle (\perp – inhibition; \uparrow – activation). In the normal cell cycle extracellular signals induce the formation of Cyclin D-Cdk4/Cdk6 complexes that inhibit the activity of Retinoblastoma proteins, which allows the expression of E2F transcription factors regulating the synthesis of cell cycle proteins. In response to stresses, cells activate Chk1/Chk2 kinases that induce the activity of p53 protein, which is responsible for the initiation of p21 transcription. The p21 protein inactivates Cdk2, Cdk4 and Cdk6 kinases and causes the increase of the Retinoblastoma activity and the decrease of the E2F activity. p53 also initiates the transcription of Mdm2 protein that regulates the p53 activity in a negative feedback loop

albo hamowane przez bezpośrednie związanie się z Mdm2, albo ubikwitynowane przez Mdm2 i transportowane do cytoplazmy, gdzie ulega degradacji w proteasomach 26S. Natomiast w przypadku stresu komórkowego w fazie G1 zostają aktywowane kinazy białkowe (m.in. ATM, ATR, Chk1, Chk2), które fosforylują N-terminalny region białka p53, uniemożliwiając tym samym jego interakcję z Mdm2. Aktywne p53 łączy się z regulatorowym regionem genu kodującego inhibitor CDK – białko p21^{Waf1/Cip1} i zwiększa jego transkrypcję [14]. p21^{Waf1/Cip1} inaktywuje kinazy: Cyklinę D-Cdk4 i Cyklinę D-Cdk6 oraz Cyklinę A-Cdk2 i Cyklinę E-Cdk2, co powoduje zahamowanie fosforylacji białek Retinoblastoma (pRb), nagromadzenie się ich nieufosforylowanej formy i tym samym zatrzymanie cyklu w G1. Daje to możliwość naprawy uszkodzonych fragmentów nici DNA. Białko p53 aktywuje także syntezę zwiększonej ilości Mdm2, które w pętli sprzężenia zwrotnego hamuje aktywność p53, powodując powrót do cyklu podziałowego [18]. Zmiany w prawidłowym funkcjonowaniu białka p53 skutkują niezatrzymaniem podziałów

komórkowych i przekazywaniem zaburzeń genetycznych komórkom potomnym. Cechą charakterystyczną komórek niemających prawidłowej formy p53 (ang. *wild-type p53*) jest ich zdolność do indukcji endocykli, co obserwuje się m.in. w komórkach nowotworowych zawierających zmutowaną formę p53 (ang. *mutant-type p53*) [23, 29].

Retinoblastoma. Wspomniane wcześniej białka Retinoblastoma regulują syntezę wielu białek cyklu komórkowego. W fazie G1 sygnały zewnątrzkomórkowe indukują ekspresję Cykliny D, która łączy się z kinazami Cdk4 i Cdk6, tworząc kompleks Cykliny D-Cdk4/Cdk6 (ryc. 1). Kompleks ten w późnej G1 fosforyluje i tym samym inaktywuje pRb (pRb ma 16 miejsc, do których mogą zostać przyłączone reszty fosforanowe) [80]. Funkcja regulatorowa białka Retinoblastoma polega na hamowaniu czynników transkrypcyjnych E2F, które są związane z promotorami genów białek odpowiedzialnych za przebieg fazy S, m.in. Cykliny E, A i B [90], Cdc6, Cdt1, Mcm2-7 [12], Cdc45, Dbf4 [88], Cdc25A [15], Gemininy [89] i Emi1 [50]. Prawdopodobnie pRb aktywnie pozyskuje deacetylazę histonów (HDAC), która w kompleksie HDAC-Rb-E2F zmienia strukturę chromatyny na nieaktywną i tym samym uniemożliwia transkrypcję [79]. Fosforylacja białek Retinoblastoma przez kompleks Cykliny D-Cdk4/Cdk6 powoduje zmiany w ich konformacji, w wyniku których następuje odłączenie HDAC od pRb i zaprzestanie hamowania aktywności E2F. Białka z rodziny E2F (E2F1-6) łącząc się z białkami DP (DP1 lub DP2) tworzą aktywne czynniki transkrypcyjne i rozpoczynają transkrypcję białek koniecznych do przeprowadzenia replikacji [42]. Powstała Cyklina E i kinaza Cdk2 tworzą kompleks, którego jedną z funkcji jest dalsze fosforylowanie białek Retinoblastoma i aktywacja czynnika transkrypcyjnego E2F w późnej G1. W fazie S za fosforylację pRb odpowiada z kolei kompleks Cykliny A-Cdk2 [79]. Białka Retinoblastoma są ufosforylowane od końca G1 do początku mitozy, a pod jej koniec ulegają gwałtownej defosforylacji z udziałem fosfatazy PP1 [10]. Ze względu na swoją kluczową rolę w przejściu komórki z fazy G1 do S, w przypadku endoreduplikacji pRb muszą mieć nieaktywną, ufosforylowaną formę [32]. Poza tym zaobserwowano, że aby inhibitory kinazy Cdk1 odpowiedzialnej za przebieg G2 i mitozy mogły wywołać endoreduplikację, komórki nie mogą mieć funkcjonalnych białek Retinoblastoma [66].

Kompleks prereplikacyjny. Duplikacja DNA rozpoczyna się tam, gdzie znajdują się kompleksy rozpoznające miejsca początku replikacji (ORC). Białka Orc2-Orc5 tworzą rdzeń kompleksu, z którym słabo wiążą się podjednostki Orc1 i Orc6 [20]. Rdzeń ORC jest przyłączony do miejsca początku replikacji przez cały cykl komórkowy, natomiast Orc1 musi być połączone z rdzeniem tylko w fazie G1. Poziom białek Orc podczas cyklu komórkowego oraz ilość każdej podjednostki związanej z chromatyną w czasie trwania cyklu jest stała – wyjątkiem jest jedynie białko Orc1 [20, 36]. Podjednostki Orc1, Orc4 i Orc5 wiążą ATP, przez co kompleks wykazuje aktywność ATPazy, natomiast białka Orc1 i Orc2 mają miejsca, które mogą zostać ufosforylowane przez Cdk, dzięki czemu biorą udział w regulacji aktywności całego kompleksu ORC [31, 62]. ORC pełni rolę wyznacznika miejsca początku replikacji, do którego dołączane są białka replikacji.

Jako pierwsze z ORC wiąże się białko Cdc6 o właściwościach ATPazy. Cdc6 przeprowadza hydrolizę ATP w momencie przyłączania następnych białek – Cdt1 i kompleksu MCM (Mcm2-7) [69]. Cdt1 odpowiada za złożenie podwójnego heksamery MCM, składającego się z dwóch kompletów sześciu różnych podjednostek białkowych (Mcm2, Mcm3, Mcm4, Mcm5, Mcm6 i Mcm7). Mcm2-7 przypomina swą budową pierścień, który po przyłączeniu się do ORC okala dwuniciowy DNA [12]. Struktura złożona z kompleksów ORC i MCM oraz białek Cdc6 i Cdt1 tworzy tzw. kompleks prereplikacyjny (pre-RC). Od chwili jego utworzenia miejsce początku replikacji ma „zezwolenie” (ang. *licensing*) na rozpoczęcie replikacji.

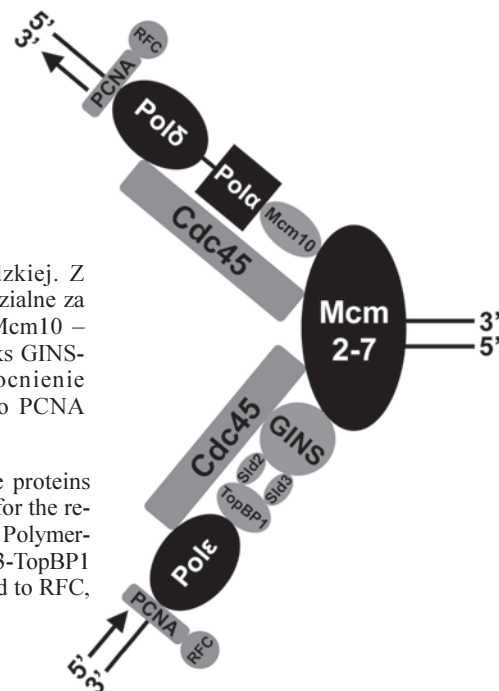
Pod koniec fazy G1, swoją pracę zaczynają kompleksy Cyklina A/Cyklina E-Cdk2. Jest to efektem ufosforylowania białek Retinoblastoma, w wyniku którego zostały aktywowane czynniki E2F odpowiedzialne za transkrypcję Cykliny A i E oraz fosfatazy Cdc25A [15, 90]. Cdc25A odłącza od Cdk2 hamujące reszty fosforanowe i tym samym aktywuje powstałe kompleksy Cyklina A-Cdk2 i Cyklina E-Cdk2 [25]. Ponadto przed rozpoczęciem replikacji komórka nie ma białka p27^{Kip1}, będącego inhibitorem Cdk. p27^{Kip1} podlega ufosforylowaniu przez kinazę Cyklina E-Cdk2, ubikwitynacji przy udziale kompleksu SCF^{Skp2}, a następnie degradacji w proteasomach 26S [61].

4.2. FAZA S

Fosforylacja – rozpoczęcie replikacji. Kluczowym momentem w procesie replikacji jest ufosforylowanie białek kompleksu prereplikacyjnego. Fosforylacja w fazie S przebiega przy udziale trzech różnych kompleksów białkowych – Cdc7-Dbf4

RYCINA 2. Widełki replikacyjne komórki ludzkiej. Z kompleksem MCM2-7 wiążą się białka odpowiedzialne za przyłączanie poszczególnych polimeraz DNA: Mcm10 – Polimeraza α , Cdc45 – Polimeraza δ i ϵ , kompleks GINS-Sld2, Sld3-TopBP1 – Polimeraza ϵ . Za wzmocnienie wydajności polimeraz δ i ϵ odpowiada białko PCNA związane z katalizatorem RFC

FIGURE 2. Replication fork of human cells. The proteins binding to the MCM2-7 complex and responsible for the recruitment of particular DNA polymerases: Mcm10 – Polymerase α , Cdc45 – Polymerases δ and ϵ , GINS-Sld2, Sld3-TopBP1 complex – Polymerase ϵ , PCNA protein, connected to RFC, enhances the efficiency of Polymerase δ and ϵ

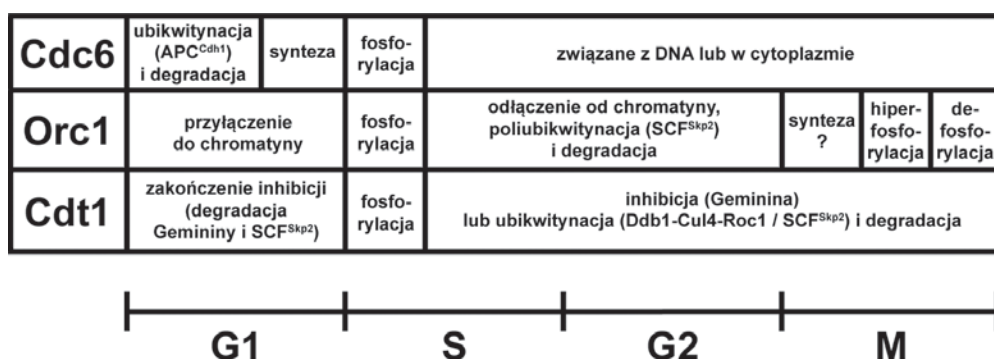


(Ddk), Cyklina A-Cdk2 i Cyklina E-Cdk2. Ekspresja kinaz Cdk2 i Cdc7 jest na stałym poziomie w ciągu całego cyklu komórkowego, jednak ich aktywność zależy od związków, które są pod kontrolą E2F – Cyklin A i E (w przypadku Cdk2) i Dbf4 (w przypadku Cdc7) [88, 90]. Przyłączenie reszt fosforanowych do białek kompleksu prereplikacyjnego rozpoczyna replikację DNA.

Aktywny kompleks Mcm2-7 ma właściwości ATPazy i helikazy rozplątającej helisę DNA [74]. Po utworzeniu pojedynczych nici swoją pracę rozpoczynają polimerazy DNA. Za ich przyłączenie do miejsc początku replikacji odpowiedzialne są białka wiążące się z kompleksem prereplikacyjnym, które razem z nim tworzą tzw. widełki replikacyjne (ryc. 2). Pierwszym białkiem jest Mcm10, które łączy się z Orc2 oraz Mcm2-7 i najprawdopodobniej odpowiada za przyłączenie polimerazy α [72]. Mcm10 bierze także udział w pozyskaniu kolejnego białka – Cdc45, które wiąże się z kompleksem Mcm2-7 [73]. Cdc45 jest odpowiedzialne za przyłączenie polimeraz δ i ϵ [7]. Wydajność obu polimeraz jest wzmacniana przez białko PCNA, które otacza nic DNA po związaniu się z katalizatorem RFC [51]. Z Cdc45 oraz Mcm2-7 wiąże się następnie kompleks GINS złożony z czterech podjednostek – Psf2-Sld5-Psf1-Psf3 [44]. GINS łączy się z polimerazą ϵ przypuszczalnie poprzez białka Sld2 i Sld3 (ufosforylowane przez Cdc7-Dbf4) oraz z TopBP1 (ludzkim homologiem białka DpB11 drożdży pączkujących) [28, 76]. Wciąż nie jest poznana dokładna rola kompleksu GINS, jednak wiadomo, że jest on niezbędny do przeprowadzenia replikacji. Bez GINS, Mcm2-7 i Cdc45 pozostają w miejscu początku replikacji i nie przesuwały się wzdłuż nici DNA, w związku z czym kopiowanie DNA zostaje zahamowane [37]. Poza tym GINS jest potrzebny do pozyskania białek RPA, które przyłączają się do rozplecionych nici DNA i zapobiegają powstaniu podwójnej helisy [37].

Fosforylacja – inaktywacja preRC. Aby nie dopuścić do „zezwolenia” na kolejną rundę replikacji (ang. *re-licensing*) w danym cyklu komórkowym, komórka reguluje aktywność kompleksu prereplikacyjnego (ryc. 3). Ponieważ białka ORC, Cdc6 i Cdt1 są niezbędne przy wiązaniu się kompleksu Mcm2-7 z DNA, ale nie są mu potrzebne do dalszej pracy w trakcie replikacji, komórka inaktywuje kompleks preRC po odłączeniu się Mcm2-7 od miejsca początku replikacji. Ufosforylowanie białek kompleksu prereplikacyjnego nie tylko rozpoczyna kopiowanie DNA, ale jednocześnie hamuje ich aktywność, znakuje je do ubiquitynacji i przeznaczają do degradacji. W zapobieganiu ponownej replikacji ważny udział mają kompleksy o właściwościach ligazy ubiquityny – APC (cyklosom) i SCF.

Proces fosforylacji Cdc6 zachodzi przy udziale kinazy Cyklina A-Cdk2. Nie jest on jednak konieczny do przeprowadzenia replikacji, ale ma znaczenie w kontroli cyklu komórkowego. Pewna pula Cdc6 jest połączona z kompleksem ORC w fazie S i G₂, natomiast reszta, która nie została związana z DNA, po fosforylacji przemieszcza się z jądra do cytoplazmy [64]. W przypadku uszkodzenia DNA dochodzi do wzmożonej ekspresji Cdc6 i wzrostu ilości jego ufosforylowanej formy w cytoplazmie w fazie G₂, co przyczynia się do fosforylacji i aktywacji białka Chk1 [2, 57]. Chk1 hamuje aktywność fosfatazy Cdc25 odpowiedzialnej za indukcję kinazy Cdk1, w wyniku czego komórka nie wchodzi w mitozę. Cdc6 jest obecne w komórce do



RYCINA 3. Regulacja białek kompleksu prereplikacyjnego podczas cyklu komórkowego
 FIGURE 3. Regulation of pre-replication complex proteins during the cell cycle

fazy G1, w trakcie której zachodzi jego ubikwytynacja przy udziale kompleksu APC^{Cdh1}, a następnie degradacja w proteasomach 26S [13].

Aktywność kompleksu ORC jest regulowana poprzez modyfikację podjednostki Orc1. Po rozpoczęciu replikacji białko Orc1 odłącza się od chromatyny i zostaje ubikwytynowane przez kompleks SCF^{Skp2} [36]. Ubikwytynacja nie dopuszcza do dalszego funkcjonowania kompleksu ORC i tym samym zabezpiecza komórkę przed ponowną replikacją. Zaobserwowano, że w przypadku komórek ludzkich większość Orc1 poddawana jest poliubikwytynacji, co skutkuje transportem białek do cytoplazmy i ich degradacją w proteasomach 26S [20]. Natomiast do Orc1 komórek chemicznych przyłączana jest tylko jedna cząsteczka ubikwityny, w wyniku czego białka pozostają w jądrze [20]. W obu przypadkach, w komórkach będących w fazie mitozy białka Orc1 nie są już jednak związane z ubikwityną. Przypuszcza się, że w komórkach ludzkich, po zakończeniu fazy G2 następuje resynteza Orc1, a w komórkach chemicznych działa hydrolaza odłączająca cząsteczki ubikwityny. W mitozie do Orc1 przyłącza się z kolei Cykliny A-Cdk1, dzięki której białko staje się hiperfosforylowane [48]. Dzięki temu również w trakcie mitozy kompleks ORC jest nieaktywny. Pod jej koniec następuje ubikwytynacja Cykliny A przez APC^{Cdc20} i fosforylacja Cdk1 przez kinazy Wee1 i Myt1, w wyniku czego białko Orc1 ulega defosforylacji i zostaje przyłączone do chromatyny [27, 85, 86]. Od chwili, kiedy do kompleksu ORC dołącza się podjednostka Orc1, może nastąpić przyłączenie białek replikacji i stworzenie kompleksu prereplikacyjnego.

Regulacja aktywności białka Cdt1 odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu ponownej replikacji DNA [63]. Wiąże się to z funkcją, jaką Cdt1 pełni przy formowaniu i przyłączaniu kompleksu Mcm2-7. Wykazano, że nadekspresja białka Cdt1 może spowodować rozpoczęcie kolejnej rundy replikacji w ciągu trwania jednego cyklu komórkowego [5, 47]. O tym, jak ważna jest inaktywacja Cdt1 z chwilą rozpoczęcia replikacji, świadczy liczba odpowiedzialnych za nią mechanizmów. Cdt1 może zostać poddane inhibicji za pomocą Gemininy lub proteolizie przy udziale jednego z dwóch kompleksów o właściwościach ligazy ubikwityny – SCF^{Skp2} lub Ddb1-Cul4-Roc1. Aby kompleks Ddb1-Cul4-Roc1 mógł przyłączyć ubikwitynę, Cdt1 musi być związane z białkiem PCNA, a ponieważ PCNA wykazuje wysoką aktywność jedynie

podczas replikacji w fazie S, kompleks Ddb1-Cul4-Roc1 może pełnić swoją funkcję tylko w tym okresie cyklu [63]. SCF^{Skp2} może natomiast pracować aż do końca mitozy, kiedy to zostaje ubikwitynowany przez APC^{Cdh1} i przeznaczony do degradacji [87].

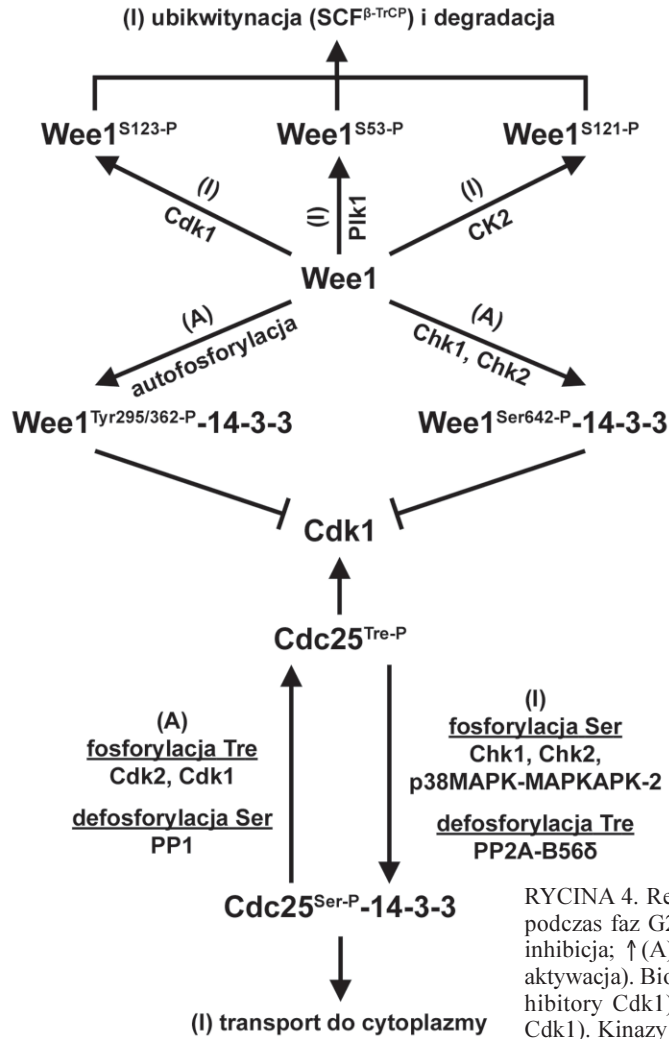
Komórki redukują ilość białka Cdt1, ale nie eliminują go całkowicie – część Cdt1 jest inaktywowana przez związanie się z Gemininą [45]. Geminina jest aktywna w fazie S, G2 i wczesnej M, a następnie, tak jak SCF^{Skp2}, zostaje ubikwitynowana przy udziale APC^{Cdh1} [46]. Zachowanie części Cdt1 umożliwi w komórce szybkie rozpoczęcie montowania kompleksu prereplikacyjnego w fazie G1. O tym, jak ważna jest funkcja Gemininy, świadczy fakt, że w przypadku jej usunięcia, komórka rozpoczyna w danym cyklu kolejną rundę replikacji [56, 90]. Poza tym w komórkach olbrzymich trofoblastu zaobserwowano wyraźnie niższy poziom Gemininy podczas endoreduplikacji oraz jej brak w fazie G-podobnej, co pozwala przypuszczać, że jest ona częścią mechanizmu regulującego endoreduplikację [33].

Nie tylko białka Cdc6, Orc1 i Cdt1, ale sam kompleks Mcm2-7 ulega fosforylacji. Reszty fosforanowe są przyłączane do podjednostek Mcm2, Mcm4 i Mcm6 w dwóch różnych momentach cyklu. Fosforylacja Mcm2-7 w trakcie przejścia z fazy G1 do S zachodzi przy udziale Cdc7-Dbf4 i prawdopodobnie kinazy Cyklina E-Cdk2 [26, 30]. W jej wyniku następuje związanie się kompleksu Mcm2-7 z Cdc45 oraz aktywacja jego właściwości helikazy i ATPazy [55, 75, 81]. Druga fosforylacja zachodzi przy udziale kinaz Cyklina A-Cdk2 i Cyklina B-Cdk1 po zakończeniu replikacji i odłączeniu się Mcm2-7 od DNA [43]. Przyłączone liczne reszty fosforanowe uniemożliwiają ponowne związanie się kompleksu z chromatyną i zapobiegają rozpoczęciu kolejnej rundy replikacji.

Wzmózona aktywność Cykliny E przypada na okres G1/S, jednak wraz z upływem fazy S jej poziom spada. Ufosforylowana przez kinazę Cdk2 Cyklina E zostaje poddana ubikwitynacji przy udziale kompleksu SCF^{Cdc4}, a następnie jest przeznaczana do degradacji w proteasomach 26S [83]. Gdy poziom Cykliny E zmniejsza się, wzrasta stężenie Cykliny A, przez co uważa się, że to aktywność kompleksu Cyklina A-Cdk2 umożliwia przejście komórki przez fazę S. Zaobserwowano, że komórki pozbawione Cykliny E dzielą się i rozwijają normalnie, ponieważ jej funkcje może przejąć Cyklina A, jednak obecność kompleksu Cyklina E-Cdk2 jest niezbędna w przypadku endoreduplikacji [12, 32]. Co więcej, komórki przechodzące endoreduplikację często wykazują nadekspresję Cykliny E, co zauważono m.in. w guzach nowotworowych [35]. Wciąż jednak nie wiadomo, jaka jest jej dokładna rola w tym procesie. Odwrotnie jest w przypadku Cykliny A, której wyczerpanie a nie nadekspresja może wywołać endoreduplikację, co najprawdopodobniej wiąże się z jej udziałem w fosforylacji białek Cdc6, Orc1 i Cdt1 [21].

4.3. FAZY G2 i M

Inaktywacja Cdk1. Główną rolę w przebiegu mitozy pełnią kompleksy Cyklina A-Cdk1 i Cyklina B-Cdk1. Aż do późnej G2 są one nieaktywne dzięki zachodzeniu dwóch odrębnych procesów: inaktywacji kinazy Cdk1 oraz inhibicji jej aktywatorów – fosfataz Cdc25A, Cdc25B i Cdc25C (ryc. 4).



RYCINA 4. Regulacja aktywności kinazy Cdk1 podczas faz G2 i M komórek ludzkich (↑(I) – inhibicja; ↑(A) – aktywacja; ⊥ – inhibicja; ↑ – aktywacja). Biorą w niej udział kinazy Wee1 (inhibitory Cdk1) i fosfatazy Cdc25 (aktywatory Cdk1). Kinazy Wee1 mogą być aktywowane w

dwóch procesach indukujących przyłączenie białka 14-3-3 – fosforylacji Ser642 (z udziałem Chk1 lub Chk2) bądź autofosforylacji Tyr295/362. Za inhibicję Wee1 odpowiadają natomiast kinazy Cdk1, Plk1 i CK2 fosforylujące określone seryny. Aktywacja fosfataz Cdc25 przebiega w wyniku fosforylacji w miejscu treoniny (przez Cdk1 i Cdk2) i defosforylacji seryny (przy udziale PP1). Hamowanie aktywności Cdc25 odbywa się natomiast przez defosforylację w miejscu treoniny (przez PP2A-B56δ) i fosforylację seryny (z udziałem Chk1, Chk2 lub p38MAPK-MAPKAPK-2)

FIGURE 4. Regulation of the activity of Cdk1 kinase during G2 and M phases of human cells (↑(I) – inhibition; ↑(A) – activation; ⊥ – inhibition; ↑ – activation). Wee1 kinases (Cdk1 inhibitors) and Cdc25 phosphatases (Cdk1 activators) participate in the regulation. The binding of Wee1 kinases to 14-3-3 protein, which activates Wee1 kinases, may be carried out in two different ways – by the phosphorylation of Ser642 (with participation of Chk1 and Chk2) or autophosphorylation of Tyr295/362. Cdk1, Plk1 and CK2 kinases, which phosphorylate particular serines, are responsible for the Wee1 inhibition. Cdc25 phosphatases are activated by the phosphorylation of threonine (with participation of Cdk1 and Cdk2) and dephosphorylation of serine (with participation of PP1). Whereas the Cdc25 inhibition is carried out by the dephosphorylation of threonine (with participation of PP2A-B56δ) and phosphorylation of serine (with participation of Chk1, Chk2 or p38MAPK-MAPKAPK-2)

Za hamowanie aktywności Cdk1 odpowiadają kinazy z rodziny Wee1 – jądrowa Wee1 i związana z błoną komórkową Myt1. Wee1 i Myt1 rozpoczynają swoją pracę, gdy komórka przechodzi z mitozy do fazy G1 nowego cyklu, wówczas zachodzi rozpad kompleksu Cykliny B-Cdk1 i degradacja Cykliny B [67]. Ponadto ich aktywność może zostać wzmożona w przypadku uszkodzenia DNA i ekspresji kinaz Chk1 i Chk2, które fosforylują określoną serynę Wee1 (Ser642 w przypadku człowieka) oraz indukują przyłączenie białka 14-3-3 [65]. Możliwa jest również autofosforylacja białek Wee1 w miejscu określonej tyrozyny (Tyr295 i Tyr362 w przypadku człowieka), która przyczynia się do ich pozytywnej regulacji [39].

Inaktywacja fosfataz Cdc25 zachodzi przez ufosforylowanie określonej seryny wewnątrz ich cząsteczek (Ser216, w przypadku Cdc25C u człowieka) oraz defosforylację treoniny w ich końcu aminowym. Istnieją trzy znane izoformy Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C) – wszystkie kontrolują przejście z fazy G2 do M, a Cdc25A dodatkowo odpowiada za wejście komórki w fazę S. Tak jak w przypadku Cdk1, fosforylacja ich seryny może przebiegać przy udziale kinaz Chk1 i Chk2 [38]. W warunkach stresowych może ona również zostać przeprowadzona przez kompleks p38MAPK-MAPKAPK-2 [52]. Defosforylacja treoniny zachodzi natomiast przy udziale kompleksu PP2A-B56 δ , aktywowanego przez Chk1 [53]. W wyniku ufosforylowania seryny, do fosfatazy Cdc25 przyłączane jest białko 14-3-3, co prowadzi do jej eksportu z jądra do cytoplazmy. Ilość Cdc25A jest regulowana przez jego ubikwitynację za pomocą kompleksów o właściwościach ligazy ubikwityny – SCF ^{β -TrCP} (w fazie S i G2) i APC^{Cdh1} (w późnej mitozie) oraz degradację w proteasomach 26S [15].

Aktywacja Cdk1. W późnej G2, na skutek inhibicji kinaz Wee1 i aktywacji fosfataz Cdc25, następuje wzrost aktywności Cdk1 (ryc. 4). Zahamowanie pracy Wee1 jest efektem przyłączenia reszt fosforanowych przez kinazy Plk1 (do Ser53) i CK2 (do Ser121) [85, 86]. Plk1 jest obecna w komórce aż do późnej mitozy, po czym ulega ubikwitynacji przy udziale APC^{Cdh1} i degradacji w proteasomach 26S, natomiast CK2 jest aktywna przez cały czas trwania cyklu i w różnych jego momentach odpowiada za fosforylację różnego rodzaju białek [49, 85]. Inaktywacja Wee1 i aktywacja Plk1 odbywa się również na zasadzie sprzężenia zwrotnego – aktywne kompleksy Cykliny A-Cdk1 i Cykliny B-Cdk1 fosforylują Wee1 (Ser123 – prowadząc do jej inhibicji) oraz Plk1 (przyczyniając się do wzmożenia jej aktywności) [59, 85, 86]. Wee1 po ufosforylowaniu zostaje poddana ubikwitynacji za pomocą SCF ^{β -TrCP}, a następnie ulega degradacji w proteasomach [86].

Aktywacja fosfataz Cdc25 przebiega dwuetapowo. Najpierw są one poddawane fosforylacji w miejscu treoniny końca aminowego. Może być ona przeprowadzona przez jedną z kinaz – kompleks Cykliny A-Cdk2 lub Cykliny E-Cdk2, Cykliny B-Cdk1 (w wyniku sprzężenia zwrotnego) lub prawdopodobnie także przez Plk1 [38, 54, 60]. W jej wyniku od Cdc25 odłącza się białko 14-3-3. Drugi etap aktywacji polega na defosforylacji uprzednio ufosforylowanej seryny i zachodzi przy udziale fosfatazy PP1 [54].

Po zahamowaniu aktywności Wee1 i odłączeniu hamujących reszt fosforanowych przez Cdc25, kinaza Cdk1 łącząc się z Cyklinami A i B tworzy aktywne kompleksy Cykliny A-Cdk1 i Cykliny B-Cdk1, które odpowiadają za przebieg mitozy. W jej trakcie biorą one udział w takich procesach, jak: indukcja i montaż wrzeciona

kariokinetycznego, rozpad otoczki jądrowej czy kondensacja chromosomów [9, 68]. W prometafazie Cdk1 wraz z Plk1 fosforyluje kompleks APC, co indukuje przyłączenie się do niego aktywatora Cdc20 [17]. Wcześniej aktywność Cdc20 była hamowana przez białko Emi1 (w trakcie fazy S, G2 i profazy) i RASSF1A (podczas profazy i prometafazy) [78, 84]. O tym, jak ważny jest odpowiedni moment aktywacji kompleksu APC, świadczy fakt, że wyczerpanie białka Emi1 powoduje zbyt wczesne zakończenie cyklu i ponowną replikację [50].

Kompleks promujący anafazę. APC^{Cdc20} pełni kluczową rolę w trakcie mitozy, ponieważ odpowiada za ubikwitynację cyklin związanych z Cdk1 i tym samym znakuje je do degradacji w proteasomach 26S. Wciąż nie wiadomo, dlaczego najpierw ubikwitynowana jest Cyklina A, której degradacja zaczyna się w prometafazie i kończy w metafazie [27]. Rozkład Cykliny B zachodzi na granicy metafazy i anafazy, i jest przełomowym momentem cyklu, indukującym zakończenie mitozy [27]. Wraz z degradacją Cykliny B kończy się hamująca fosforylacja białka Cdh1 przez kinazę Cyklina B-Cdk1. Cdh1 jest drugim aktywatorem APC i tworzy wraz z nim kompleks APC^{Cdh1} , który ubikwitynuje białko Cdc20, prowadząc do jego degradacji. Oprócz tego APC^{Cdh1} odpowiada za ufosforylowanie wielu innych białek, m.in. wcześniej wspomnianych Plk1, SCF^{Skp2} , Cdc6 i Gemininy. Aktywność APC^{Cdh1} zostaje zahamowana w fazie G1 na skutek przebiegu trzech różnych procesów. Pierwszym z nich jest autoubikwitynacja przez kompleks APC^{Cdh1} APC-specyficznego enzymu wiążącego ubikwitynę – UbcH10 [70]. Współpracujące z APC białko UbcH10 w wyniku ubikwitynacji zostaje przeznaczone do degradacji, co jednocześnie powoduje zahamowanie aktywności APC^{Cdh1} . Autoubikwitynacja UbcH10 jest hamowana przez substraty APC^{Cdh1} , stąd kompleks jest aktywny aż do momentu degradacji wszystkich jego substratów. Inaktywacja APC^{Cdh1} umożliwia syntezę Cykliny A, która wraz z kinazą Cdk1 przeprowadza dalszą inhibicję APC^{Cdh1} . Kompleks Cyklina A-Cdk2 fosforyluje i tym samym inaktywuje białko Cdh1, co w rezultacie prowadzi do unieczynnienia APC [58]. Z czasem inaktywującą rolę kompleksu Cyklina A-Cdk2 przejmuje kinaza Cyklina B-Cdk1. Trzecią drogą hamowania aktywności APC jest związanie się białka Emi1 z podjednostką Cdh1 [70]. Emi1 łączy się z obydwoma aktywatorami kompleksu APC – Cdc20 i Cdh1 i hamuje je od końca fazy G1, gdy zostają uaktywnione czynniki transkrypcyjne E2F kontrolujące syntezę Emi1, aż do profazy, podczas której Emi1 jest fosforylowane przez Plk1, ubikwitynowane za pomocą $SCF^{\beta-TrCP}$ i degradowane w proteasomach 26S [34].

5. Cdk1 I APC A ENDOREDUPLIKACJA

Ze względu na ważny udział kinazy Cyklina B-Cdk1 w promowaniu mitozy, brak jej aktywności jest uważany za cechę charakterystyczną endoreduplikacji. Zaobserwowano, że zarówno wyciszenie ekspresji genu *cdk1*, jak i *cykliny B* za pomocą siRNA może skutkować endoreduplikacją [8, 16]. Zahamowanie aktywności Cdk1 wykazano również w przechodzących endoreduplikację komórkach olbrzymich

trofoblastu [82]. Zauważono, że zachodząca w trakcie ich rozwoju utrata czynnika FGF4 wywołuje gwałtowną ekspresję Cdk-specyficznych inhibitorów – p57 i p21^{Waf1/Cip1}. p57 hamuje aktywność Cdk1, przez co umożliwia komórkom przejście prosto z fazy G2 do G1, z pominięciem mitozy. Stąd wyróżnia się fazę G-podobną z obecnym p57 oraz fazę S – pozbawioną p57. p21^{Waf1/Cip1} hamuje natomiast ekspresję kinazy Chk1, przez co zapobiega indukcji apoptozy. Inhibicja Cdk1 sprawia, że po zakończeniu fazy S białko Orc1 nie podlega fosforylacji i inaktywacji, dzięki czemu możliwe jest utworzenie kompleksu ORC. Poza tym ufosforylowane podczas fazy S białko Cdc6 w obecności p57 i p21^{Waf1/Cip1} ulega defosforylacji i aktywacji. Z kolei aktywność Cdt1 nie ulega zahamowaniu, ponieważ Geminina jest degradowana z udziałem APC^{Cdh1}. To wszystko sprawia, że możliwe jest uformowanie kompleksu prereplikacyjnego i wraz z degradacją inhibitorów p57 i p21^{Waf1/Cip1} (przy udziale kompleksów Cyklina E-Cdk2 i SCF^{Skp2}) może rozpocząć się kolejna runda replikacji.

W odróżnieniu od Cdk1, kompleks APC wykazuje dużą aktywność w trakcie endoreduplikacji. Pomimo że komórki, które przechodzą przez ten proces, nigdy nie wchodzi w mitozę, APC jest im niezbędny. Ponieważ w normalnym cyklu APC reguluje tworzenie kompleksu prereplikacyjnego, musi być on aktywny również w przypadku endoreduplikacji [77]. Rola APC w regulacji endocyklu opiera się głównie na ubikwitynacji Gemininy i tym samym zwiększeniu dostępności białka Cdt1, koniecznego do rozpoczęcia replikacji. Zahamowanie aktywności kompleksu APC skutkuje stabilizacją Gemininy i zablokowaniem postępu endoreduplikacji [91].

Pomimo że znane są mechanizmy zapobiegające ponownej replikacji, wciąż dokładnie nie wiadomo, w jaki sposób są one omijane podczas endoreduplikacji. Liczne analizy tego procesu pozwoliły jednak wyodrębnić kilka cech charakterystycznych endoreduplikacji, takich jak: wspomniana wcześniej inaktywacja Cdk1 i Gemininy, podwyższone stężenie cykliny E i wysoka aktywność APC. Aby poznać dokładny sposób indukcji i regulacji endoreduplikacji, potrzebne są dalsze badania.

LITERATURA

- [1] AHUJA P, SDEK P, MacLELLAN RM. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration. *Physiol Rev* 2007; **87**: 521–544.
- [2] ALEXANDROW MG, HAMLIN JL. Cdc6 chromatin affinity is unaffected by serine-54 phosphorylation, S-phase progression, and overexpression of cyclin A. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 1614–1627.
- [3] ANATSKAYA OV, VINOGRADOV AE. Heart and liver as developmental bottlenecks of mammal design: evidence from cell polyploidization. *Biol J Linn Soc* 2004; **83**: 175–186.
- [4] ANISIMOV AP. Endopolyploidy as a morphogenetic factor of development. *Cell Biol Int* 2005; **29**: 993–1004.
- [5] ARIAS EE, WALTER JC. Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 2005; **19**: 114–126.
- [6] BAROW M. Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays* 2006; **28**: 271–281.
- [7] BAUERSCHMIDT C, POLLOK S, KREMMER E, NASHEUER H-P, GROSSE F. Interactions of human Cdc45 with the Mcm2-7 complex, the GINS complex, and DNA polymerases δ and ϵ during S phase. *Genes Cells* 2007; **12**: 745–758.

- [8] BELLANGER S, DE GRAMONT A, SOBCZAK-THÉPOT J. Cyclin B2 suppresses mitotic failure and DNA re-replication in human somatic cells knocked down for both cyclins B1 and B2. *Oncogene* 2007; **26**: 7175–7184.
- [9] BENTLEY AM, NORMAND G, HOYT J, KING RW. Distinct sequence elements of cyclin B1 promote localization to chromatin, centrosomes, and kinetochores during mitosis. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 4847–4858.
- [10] BERNDT N, LUDLOW JW. Interaction between the retinoblastoma protein and protein phosphatase 1 during the cell cycle. *Methods Mol Biol* 2004; **281**: 17–32.
- [11] BERTIN N, LECOMTE A, BRUNEL B, FISHMAN S, GÉNARD M. A model describing cell polyploidization in tissues of growing fruit as related to cessation of cell proliferation. *J Exp Bot* 2007; **58**: 1903–1913.
- [12] BLOW JJ, DUTTA A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 476–486.
- [13] BORLADO LR, MÉNDEZ J. CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. *Carcinogenesis* 2008; **29**: 237–243.
- [14] BROUDE EV, SWIFT ME, VIVO C, CHANG B-D, DAVIS BM, KALURUPALLE S, BLAGOSKLONNY MV, RONINSON IB. p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mediates retinoblastoma protein degradation. *Oncogene* 2007; **26**: 6954–6958.
- [15] BUSINO L, CHIESA M, DRAETTA GF, DONZELLI M. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 2004; **23**: 2050–2056.
- [16] CAID, LATHAM VM Jr, ZHANG X, SHAPIRO GI. Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 9270–9280.
- [17] CASTRO A, BERNIS C, VIGNERON S, LABBÉ J-C, LORCA T. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 2005; **24**: 314–325.
- [18] CHAN WM, MAK MC, FUNG TK, LAU A, SIU WY, POON RYC. Ubiquitination of p53 at multiple sites in the DNA-binding domain. *Mol Cancer Res* 2006; **4**: 15–25.
- [19] CORTÉS F, MATEOS S, PASTOR N, DOMÍNGUEZ I. Toward a comprehensive model for induced endoreduplication. *Life Sci* 2004; **76**: 121–135.
- [20] DePAMPHILIS ML. Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex. *Cell Cycle* 2005; **4**: 70–79.
- [21] DePAMPHILIS ML, BLOW JJ, GHOSH S, SAHA T, NOGUCHI K, VASSILEVA. Regulating the licensing of DNA replication origins in metazoa. *Curr Opin Cell Biol* 2006; **18**: 231–239.
- [22] EDGAR BA, ORR-WEAVER TL. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 2001; **105**: 297–306.
- [23] ERENPREISA J, IVANOV A, WHEATLEY SP, KOSMACEK EA, IANZINI F, ANISIMOV AP, MACKAY M, DAVIS PJ, PLAKHINS G, ILLIDGE TM. Endopolyploidy in irradiated p53-deficient tumour cell lines: persistence of cell division activity in giant cells expressing Aurora B-kinase. *Cell Biol Int* 2008; **32**: 1044–1056.
- [24] ERENPREISA J, KALEJS M, CRAGG MS. Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution. *Cell Biol Int* 2005; **29**: 1012–1018.
- [25] FERNANDEZ-VIDALA, MAZARS A, MANENTI S. CDC25A: a rebel within the CDC25 phosphatases family? *Anticancer Agents Med Chem* 2008; **8**: 825–831.
- [26] FRANCIS L, RANDELL JCW, TAKARA TJ, UCHIMA L, BELL SP. Incorporation into the prereplicative complex activates the Mcm2-7 helicase for Cdc7-Dbf4 phosphorylation. *Genes Dev* 2009; **23**: 643–654.
- [27] FUNG TK, POON RYC. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**: 335–342.
- [28] GARCIA S, FURUYA K, CARRAM. Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs. *DNA Repair (Amst)* 2005; **4**: 1227–1239.
- [29] GATTI G, MARESCA G, NATOLI M, FLORENZANO F, NICOLINA, FELSANIA, D'AGNANO I. Myc prevents apoptosis and enhances endoreduplication induced by paclitaxel. *PLoS One* 2009; **4**: e5442.
- [30] GENG Y, LEE Y-M, WELCKER M, SWANGER J, ZAGOZDZONA, WINER JD, ROBERTS JM, KALDIS P, CLURMAN BE, SICINSKI P. Kinase-independent function of cyclin E. *Mol Cell* 2007; **25**: 127–139.
- [31] GIORDANO-COLTART J, YING CY, GAUTIER J, HURWITZ J. Studies of the properties of human origin recognition complex and its Walker A motif mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 69–74.
- [32] GIZATULLIN F, YAO Y, KUNG V, HARDING MW, LODA M, SHAPIRO GI. The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function. *Cancer Res* 2006; **66**: 7668–7677.

- [33] GONZALEZ MA, TACHIBANA KK, ADAMS DJ, VAN DER WEYDEN L, HEMBERGER M, COLEMAN N, BRADLEY A, LASKEY RA. Geminin is essential to prevent endoreduplication and to form pluripotent cells during mammalian development. *Genes Dev* 2006; **20**: 1880–1884.
- [34] HANSEN DV, LOKTEV AV, BAN KH, JACKSON PK. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCF^{TrCP}-dependent destruction of the APC inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 5623–5634.
- [35] HONDA R, LOWE ED, DUBININA E, SKAMNAKI V, COOK A, BROWN NR, JOHNSON LN. The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *EMBO J* 2005; **24**: 452–463.
- [36] HU R, APLIN AE. Skp2 regulates G2/M progression in a p53-dependent manner. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 4602–4610.
- [37] KANEMAKI M, LABIB K. Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks. *EMBO J* 2006; **25**: 1753–1763.
- [38] KARLSSON-ROSENTHAL C, MILLAR JBA. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol* 2006; **16**: 285–292.
- [39] KATAYAMA K, FUJITA N, TSURUO T. Akt/protein kinase B-dependent phosphorylation and inactivation of WEE1Hu promote cell cycle progression at G2/M transition. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 5725–5737.
- [40] KLISCHK, BEVILACQUA E, OLIVERALVM. Mitotic polyploidization in trophoblast giant cells of the alpaca. *Cells Tissues Organs* 2005; **181**: 103–108.
- [41] KNIGHT CA, MOLINARI NA, PETROV DA. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Ann Bot* 2005; **95**: 177–190.
- [42] KOHN M, LEUNG SW, CRINITI V, AGROMAYOR M, YAMASAKI L. Dp1 is largely dispensable for embryonic development. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 7197–7205.
- [43] KUDOH A, DAIKOKU T, ISHIMI Y, KAWAGUCHI Y, SHIRATA N, IWAHORI S, ISOMURA H, TSURUMI T. Phosphorylation of MCM4 at sites inactivating DNA helicase activity of the MCM4-MCM6-MCM7 complex during Epstein-Barr virus productive replication. *J Virol* 2006; **80**: 10064–10072.
- [44] LABIB K, GAMBUS A. A key role for the GINS complex at DNA replication forks. *Trends Cell Biol* 2007; **17**: 271–278.
- [45] LEE C, HONG B, CHOI JM, KIM Y, WATANABE S, ISHIMI Y, ENOMOTO T, TADA S, KIM Y, CHO Y. Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature* 2004; **430**: 913–917.
- [46] LI A, BLOW JJ. Non-proteolytic inactivation of geminin requires CDK-dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 260–267.
- [47] LIA, BLOW JJ. Cdt1 downregulation by proteolysis and geminin inhibition prevents DNA re-replication in *Xenopus*. *EMBO J* 2005; **24**: 395–404.
- [48] LI C, VASSILEV A, DePAMPHILIS ML. Role for Cdk1 (Cdc2)/cyclin A in preventing the mammalian origin recognition complex's largest subunit (Orc1) from binding to chromatin during mitosis. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 5875–5886.
- [49] LINDON C, PINES J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol* 2004; **164**: 233–241.
- [50] MACHIDA YJ, DUTTA A. The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. *Genes Dev* 2007; **21**: 184–194.
- [51] MAJKA J, BURGERS PMJ. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004; **78**: 227–260.
- [52] MANKE IA, NGUYEN A, LIM D, STEWART MQ, ELIA AEH, YAFFE MB. MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell* 2005; **17**: 37–48.
- [53] MARGOLIS SS, PERRY JA, FORESTER CM, NUTT LK, GUO Y, JARDIM MJ, THOMENIUS MJ, FREEL CD, DARBANDI R, AHN J-H, ARROYO JD, WANG X-F, SHENOLIKAR S, NAIRN AC, DUNPHY WG, HAHN WC, VIRSHUP DM, KORNBLUTH S. Role for the PP2A/B56 δ phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. *Cell* 2006; **127**: 759–773.
- [54] MARGOLIS SS, PERRY JA, WEITZEL DH, FREEL CD, YOSHIDA M, HAYSTEAD TA, KORNBLUTH S. A role for PPI in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 1779–1789.

- [55] MASAI H, TANIYAMA C, OGINO K, MATSUI E, KAKUSHO N, MATSUMOTO S, KIM J-M, ISHII A, TANAKA T, KOBAYASHI T, TAMAI K, OHTANI K, ARAI K. Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem* 2006; **281**: 39249–39261.
- [56] MELIXETIAN M, BALLABENI A, MASIERO L, GASPARINI P, ZAMPONI R, BARTEK J, LUKAS J, HELIN K. Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J Cell Biol* 2004; **165**: 473–482.
- [57] MIMURA S, SEKI T, TANAKA S, DIFFLEY JFX. Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature* 2004; **431**: 1118–1123.
- [58] MITRA J, ENDERS GH, AZIZKHAN-CLIFFORD J, LENGEL KL. Dual regulation of the anaphase promoting complex in human cells by cyclin A-Cdk2 and cyclin A-Cdk1 complexes. *Cell Cycle* 2006; **5**: 661–666.
- [59] MORTENSEN EM, HAAS W, GYGI M, GYGI SP, KELLOG DR. Cdc28-dependent regulation of the Cdc5/polo kinase. *Curr Biol* 2005; **15**: 2033–2037.
- [60] MYER DL, BAHASSI EM, STAMBROOK PJ. The Plk3-Cdc25 circuit. *Oncogene* 2005; **24**: 299–305.
- [61] NAKAYAMA K, NAGAHAMA H, MINAMISHIMA YA, MIYAKE S, ISIDA N, HATAKEYAMA S, KITAGAWA M, IEMURA S, NATSUME T, NAKAYAMA KI. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 2004; **6**: 661–672.
- [62] NIELSEN O, LØBNER-OLESEN A. Once in a lifetime: strategies for preventing re-replication in prokaryotic and eukaryotic cells. *EMBO Rep* 2008; **9**: 151–156.
- [63] NISHITANI H, SUGIMOTO N, ROUKOS V, NAKANISHI Y, SAIJO M, OBUSE C, TSURIMOTO T, NAKAYAMA KI, NAKAYAMA K, FUJITA M, LYGEROU Z, NISHIMOTO T. Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J* 2006; **25**: 1126–1136.
- [64] OEHLMANN M, SCORE AJ, BLOW JJ. The role of Cdc6 in ensuring complete genome licensing and S phase checkpoint activation. *J Cell Biol* 2004; **165**: 181–190.
- [65] PERRY JA, KORNBLUTH S. Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div* 2007; **2**: 12.
- [66] PORTER ACG. Preventing DNA over-replication: a Cdk perspective. *Cell Div* 2008; **3**: 3.
- [67] POTAPOVA TA, DAUM JR, BYRD KS, GORBSKY GJ. Fine tuning the cell cycle: activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 1737–1748.
- [68] RAHAL R, AMON A. Mitotic CDKs control the metaphase-anaphase transition and trigger spindle elongation. *Genes Dev* 2008; **22**: 1534–1548.
- [69] RANDELL JCW, BOWERS JL, RODRÍGUEZ HK, BELL SP. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol Cell* 2006; **21**: 29–39.
- [70] RAPE M, KIRSCHNER MW. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 2004; **432**: 588–595.
- [71] RASLOVA H, BACCINI V, LOUSSAIEF L, COMBA B, LARGHERO J, DEBILIN, VAINCHENKER W. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates both proliferation of megakaryocyte progenitors and late stages of megakaryocyte differentiation. *Blood* 2006; **107**: 2303–2310.
- [72] RICKE RM, BIELINSKY A-K. Mem10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- α . *Mol Cell* 2004; **16**: 173–185.
- [73] SAWYER SL, CHENG IH, CHAI W, TYE BK. Mem10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 2004; **340**: 195–202.
- [74] SHECHTER D, GAUTIER J. MCM proteins and checkpoint kinases get together at the fork. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 10845–10846.
- [75] SHEU Y-J, STILLMAN B. Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Mol Cell* 2006; **24**: 101–113.
- [76] SHIKATA K, SASA-MASUDA T, OKUNO Y, WAGA S, SUGINO A. The DNA polymerase activity of Pol ϵ holoenzyme is required for rapid and efficient chromosomal DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *BMC Biochem* 2006; **7**: 21.
- [77] SIVAPRASAD U, MACHIDA YJ, DUTTA A. APC/C – the master controller of origin licensing? *Cell Dev* 2007; **2**: 8.
- [78] SONG MS, SONG SJ, AYAD NG, CHANG JS, LEE JH, HONG HK, LEE H, CHOI N, KIM J, KIM H, KIM JW, CHOI E-J, KIRSCHNER MW, LIM D-S. The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 129–137.
- [79] TAKAKI T, FUKASAWA K, SUZUKI-TAKAHASHI I, HIRAI H. Cdk-mediated phosphorylation of pRB regulates HDAC binding *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **316**: 252–255.

- [80] TAKAKI T, FUKASAWA K, SUZUKI-TAKAHASHI I, SEMBA K, KITAGAWA M, TAYA Y, HIRAI H. Preferences for phosphorylation sites in the retinoblastoma protein of D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6, *in vitro*. *J Biochem* 2005; **137**: 381–386.
- [81] TSUJI T, FICARRO SB, JIANG W. Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 4459–4472.
- [82] ULLAH Z, KOHN MJ, YAGI R, VASSILEV LT, DePAMPHILIS ML. Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. *Genes Dev* 2008; **22**: 3024–3036.
- [83] VAN DROGEN F, SANGFELT O, MALYUKOVA A, MATSKOVA L, YEH E, MEANS AR, REED SI. Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms. *Mol Cell* 2006; **23**: 37–48.
- [84] VERSCHUREN EW, BAN KH, MASEK MA, LEHMAN NL, JACKSON PK. Loss of Emi1-dependent anaphase-promoting complex/cyclosome inhibition deregulates E2F target expression and elicits DNA damage-induced senescence. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 7955–7965.
- [85] WATANABE N, ARAI H, IWASAKI J, SHIINA M, OGATA K, HUNTER T, OSADA H. Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11663–11668.
- [86] WATANABE N, ARAI H, NISHIHARA Y, TANIGUCHI M, WATANABE N, HUNTER T, OSADA H. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCF ^{β -TrCP}. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 4419–4424.
- [87] WEI W, AYAD NG, WAN Y, ZHANG G-J, KIRSCHNER MW, KAELIN WG Jr. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 2004; **428**: 194–198.
- [88] WOO RA, POON RYC. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2003; **2**: 316–324.
- [89] YOSHIDA K, INOUE I. Regulation of geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene* 2004; **23**: 3802–3812.
- [90] ZHU W, GIANGRANDE PH, NEVINS JR. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J* 2004; **23**: 4615–4626.
- [91] ZIELKE N, QUERINGS S, ROTTIG C, LEHNER C, SPRENGER F. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes Dev* 2008; **22**: 1690–1703.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 17.11. 2009 r.

Przyjęto: 25.11. 2009 r.

Mgr inż. Andrzej Pawlik

Katedra Histologii i Embriologii UMK CM

ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

e-mail: apawlik@onet.eu