

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: bgs@nencki.gov.pl.

## REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO — UDZIAŁ JONÓW WAPNIA, FAKTY I HIPOTEZY

Udział jonów wapnia w stymulacji komórek do podziałów oraz w przebiegu określonych etapów cyklu komórkowego jest niepodważalny. Świadczą o tym wyniki publikowane od wczesnych lat osiemdziesiątych i uzyskane na ogół przy badaniu podziałów zarodków zwierząt bezkręgowych, komórek hodowanych *in vitro*, czy też komórek grzybów. Dokumentują one:

- gwałtowny wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  po zapłodnieniu komórki jajowej i rozpoczęciu przez nią podziałów;
- wzrost poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  po zadziałaniu na komórki spoczynkowe hormonów lub czynników wzrostowych;
- podejmowanie przez komórki spoczynkowe podziałów po mikroiniekcjach  $\text{Ca}^{2+}$  lub  $\text{IP}_3$ , uwalniającego wapń z wewnątrzkomórkowych magazynów;
- opóźnienie lub zahamowanie podziałów komórek po mikroiniekcjach buforów chelatujących wapń lub przeciwciał skierowanych przeciwko określonym białkom wiążącym wapń lub białkom będącym składnikami pomp wapienych;
- występowanie różnic w wewnątrzkomórkowym stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  w określonych etapach cyklu podziałowego;
- ścisłe powiązania siateczki śródplazmatycznej z mikrotubulami wrzeciona mitotycznego i błoną jądrową;
- obecność w różnych częściach aparatu mitotycznego (przede wszystkim w mikrotubulach i biegunach wrzeciona kariokinetycznego) białek wiążących wapń — zwłaszcza kalmoduliny i kaldesmonu oraz licznych enzymów re-

gulowanych przez wapń, na przykład kinazy Ca/kalmodulina II, kalpains II, kinazy łańcucha lekkiego miozyny i innych;

— modulowanie przez  $\text{Ca}^{2+}$  powstawania i degradacji mikrotubul, głównego składnika wrzeciona mitotycznego;

— wpływ  $\text{Ca}^{2+}$  na układ aktomiozyny;

— wpływ  $\text{Ca}^{2+}$  na kondensację i dekondensację chromatyny;

— wpływ  $\text{Ca}^{2+}$  na stan błon komórkowych i związane z tym procesy transportu różnych składników.

Powyższa lista procesów modulowanych przez  $\text{Ca}^{2+}$  i istotnych dla przebiegu cyklu z pewnością nie jest wyczerpująca. Szczegółowsze dane na ten temat znaleźć można w opublikowanych artykułach przeglądowych (RATAN i SHELDANSKI 1986, WHITAKER i PATEL 1990, HEPLER 1992 i 1994, LU i MEANS 1993, MEANS 1994, SHORT i współaut. 1993, BARBIERO i współaut. 1995, WHITFIELD i współaut. 1995, WILDING 1996, BARAŃSKA 1997). Podłoże molekularne tych procesów jednak nie jest dotąd w pełni zrozumiane.

W artykule zamierzam przede wszystkim skoncentrować się na omówieniu najnowszych danych o wpływie  $\text{Ca}^{2+}$  na układy enzymatyczne decydujące o przebiegu cyklu komórkowego, takie jak układ serynowo-treoninowych kinaz cyklino-zależnych oraz układ proteolityczny ubikwityna/proteasom. Znaczenie tych układów dla przebiegu cyklu staje się coraz bardziej zrozumiałe i doceniane. Przypomnę też krótko podstawowe wiadomości o fluktuacjach wewnątrzkomórkowego poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  i odpowiedzialnych za nie mechanizmach.

CYKL KOMÓRKOWY I FLUKTUACJE POZIOMU  $\text{Ca}^{2+}$ 

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA CYKLU

Komórki eukariotyczne wkraczają w cykl komórkowy po zadziałaniu na ich powierzchnię różnorodnych sygnałów zewnętrznych, jak hormony, mitogeny, czynniki troficzne, a także w wyniku kontaktu ze składnikami matryksu międzykomórkowej. Ulega wówczas uruchomieniu kaskada procesów biochemicznych przenoszących sygnał mitogeny do jądra komórkowego, w którym następuje skoordynowana transkrypcja genów tak zwanej wczesnej i późnej odpowiedzi. Jest to część programu genetycznego odpowiedzialnego za wyjście komórek ze stanu spoczynkowego, wywołanie w nich syntezy DNA, podwojenie chromosomów i doprowadzenie do podziału. Istotnym elementem tego programu jest obecność wewnętrznych „punktów kontrolnych” w różnych etapach cyklu, przede wszystkim na granicy faz G1/S i G2/M, a także podczas określonych etapów mitozy i przy tworzeniu wrzeciona kariokinetycznego. Funkcja „punktów kontrolnych” polega na uniemożliwieniu komórkom wejścia w kolejną fazę cyklu przed zakończeniem syntezy wszystkich niezbędnych makrocząsteczek i uformowaniu struktur (EILLEDGE 1996, NIGG 1995, RUDNER i MURRAY 1996). Czy obserwuje się zmiany poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w tych krytycznych dla przebiegu cyklu momentach?

FLUKTUACJE POZIOMU  $\text{Ca}^{2+}$ 

Wysoki poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w środowisku zewnętrznym jest niezbędny, aby komórki weszły w cykl podziałowy, czyli aby rozpoczęły się w nich procesy metaboliczne, charakterystyczne dla fazy G1 cyklu. Komórki różnego pochodzenia wymagają innego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  by mogły wejść w cykl podziałowy: komórki nabłonkowe jelita i komórki skóry — rzędu 0,05–0,10 mM, hepatocyty, fibroblasty czy limfocyty — 1,0–1,5 mM. Natomiast komórki nowotworowe wymagają do rozpoczęcia proliferacji jedynie śladowych ilości jonów wapnia w środowisku (WHITFIELD i współaut. 1995, LU i MEANS 1993). Wapń po przedostaniu się do komórek może ulec związaniu przez bardzo liczne białka receptorowe, przede wszystkim jednak przez kalmodulinę (CAM). Kompleks  $\text{Ca}^{2+}$ -CAM jest zdolny do aktywacji ponad 20 enzymów, w tym także kinaz fosforylujących określone czynniki transkrypcyjne, na przykład CREB. Stymuluje to ekspresję wielu genów wczesnej odpowiedzi, których produkty z kolei

uruchamiają i koordynują ekspresję genów kodujących, między innymi enzymy związane z replikacją DNA oraz inaktywacją genów supresorowych. Należy sobie jednak zdawać sprawę, że nie tylko kinazy aktywowane przez  $\text{Ca}^{2+}$  biorą udział w tych regulacjach (WHITFIELD i współaut. 1995, MEANS 1994).

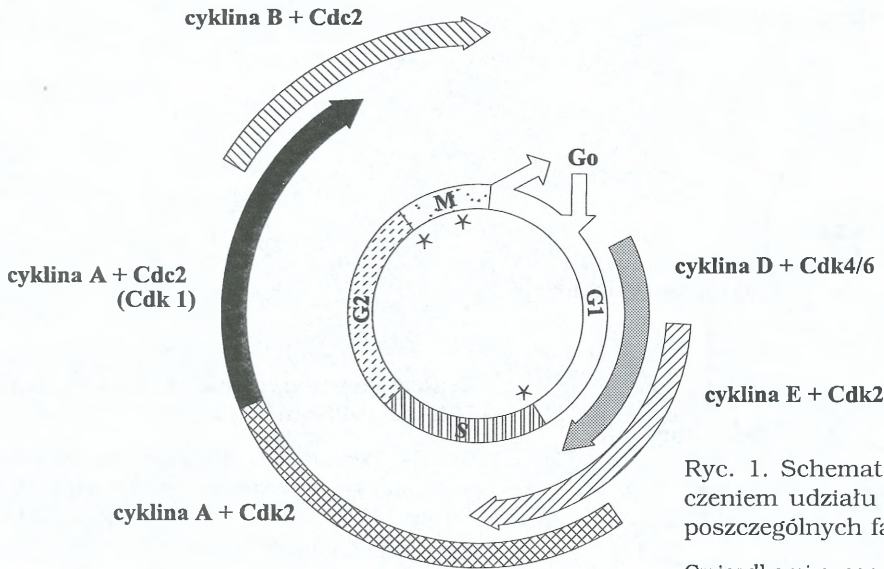
W komórkach już dzielących się aż czterokrotnie dochodzi do przejściowego wzrostu poziomu  $\text{Ca}^{2+}$ . Następuje on w późnej fazie G1 przed rozpoczęciem fazy S, w której zachodzi synteza DNA, w późnej fazie G2 przez rozpoczęciem mitozy — pomiędzy stadium metafazy i anafazy, a także w czasie cytokinezy, w której następuje podział cytoplazmy.

Powyższe fluktuacje poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  wykrywane w całych komórkach są stosunkowo niewielkie i sięgają 50–70 nM ponad poziom podstawowy, ale z pewnością lokalne zmiany stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  są większe (HEPLER 1994, WHITFIELD i współaut. 1995). Wykrywanie tych oscylacji wapniowych stało się możliwe po wprowadzeniu do badań bardzo czułych elektrod wapniowych, chelatorów i jonoforów wapniowych, różnego typu barwników fluorescencyjnych, a także dzięki rozwojowi technik mikroskopowych. Zastosowanie ich umożliwia, na przykład wykrycie podwyższonego poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w okolicach jądra komórkowego bezpośrednio przed rozpoczęciem mitozy (WILDING i współaut. 1996).

Fluktuacje poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  są rezultatem jego napływu ze środowiska zewnętrznego i uwalniania w ściśle regulowanych procesach z wewnątrzkomórkowych magazynów, przede wszystkim siateczki śródplazmatycznej. Kluczową rolę w mobilizacji  $\text{Ca}^{2+}$  pełni trifosforan inozytolu,  $\text{IP}_3$ , sam  $\text{Ca}^{2+}$  oraz prawdopodobnie cykliczna ADP-ryboza. Omówienie tych zagadnień przekracza łamy tego opracowania, są one wyczerpująco potraktowane w artykułach przeglądowych (MAKOWSKA i DUSZYŃSKI 1996, THOMAS i współaut. 1996, BARAŃSKA 1997, ZABŁOCKI 1997).

UKŁAD KINAZ CYKLINO-ZALEŻNYCH I WPŁYW  $\text{Ca}^{2+}$   
NA JEGO AKTYWNOŚĆ

Przejście komórek przez krytyczne punkty kontrolne cyklu jest związane z fosforylacją bardzo różnych białek dokonywaną przez liczne kinazy serynowo-treoninowe, znane jako kinazy cyklino-zależne (kinazy cdk) (ryc.1). Stopniowa aktywacja poszczególnych kinaz



Ryc. 1. Schemat cyklu komórkowego z zaznaczeniem udziału różnych kinaz cdk i cyklin w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

Gwiazdkami oznaczono punkty kontrolne cyklu.

cdk i wynikająca z tego fosforylacja właściwych białek (białek strukturalnych, enzymatycznych, regulatorowych), pośrednio lub bezpośrednio zapoczątkowuje takie kluczowe wydarzenia cyklu komórkowego, jak rozpad otoczki jądrowej, kondensacja chromosomów czy też przekształcenia cytoszkieletu.

Aktywność kinaz cdk jest regulowana wielostopniowo poprzez:

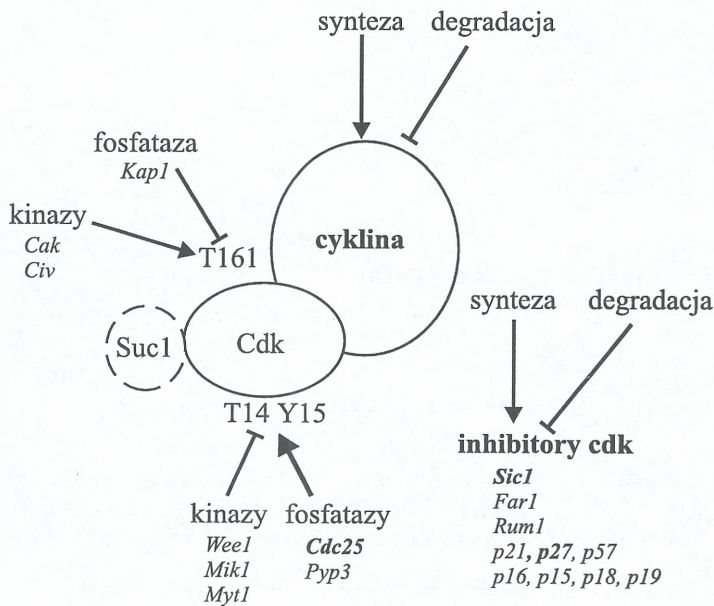
- dołączanie cyklin stanowiących podjednostki regulatorowe kinaz,
- tworzenie labilnych kompleksów z wewnątrzkomórkowymi białkowymi inhibitorami,
- fosforylację, tak zwaną aktywującą, treoniny obecnej w pozycji 161 łańcucha,
- fosforylację, tak zwaną hamującą, tyrozyny w pozycji 15 i treoniny w pozycji 14, które znajdują się w miejscu wiązania ATP,
- zmiany aktywności wielu kinaz i fosfataz przeprowadzających fosforylację i defosforylację kinaz cyklino-zależnych,
- zmiany aktywności enzymów uczestniczących w syntezie i degradacji poszczególnych elementów tego układu.

Na rycinie 2 przedstawiono schematycznie powyższe możliwości regulacji aktywności kinaz cdk. Wskazano na niej także miejsce działania tyrozynowo-treoninowej fosfatazy cdc25, która aktywuje kinazy cdk poprzez odszczepienie reszty fosforanowej od tyrozyny 15 i treoniny 14. Regulacja aktywności kinaz białkowych zaangażowanych w fosforylację kinaz cdk i fosfatazy cdc25 jest również bardzo złożona. Uczestniczy w niej kaskada różnych kinaz i fosfataz oraz różne nieenzymatyczne białka komórkowe. Zagadnienia regulacji cyklu komórkowego przez układ kinaz cyklino-zależnych są

omówione szczegółowo w bardzo licznych artykułach przeglądowych (LEW i KORNBLUTH 1996, MARTIN-CASTELLANOS i MORENO 1997, FISHER 1997, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992, 1993, 1995a). Nadrzędnym elementem regulacyjnym cyklu stają się też wykryte niedawno kinazy typu POLO, których aktywność wydaje się koordynować działanie kinaz cdk z procesami replikacji DNA i tworzeniem wrzeciona mitotycznego (LANE i NIGG 1997).

Nasuwa się pytanie, czy i w jakim stopniu aktywność układu kinaz cdk może zależeć od wewnątrzkomórkowego poziomu  $Ca^{2+}$  i jakie elementy kaskady sygnałowej, uwalnianej przez  $Ca^{2+}$  mogą w tym uczestniczyć. Pytanie to wydaje się być zasadne. Podwyższony poziom  $Ca^{2+}$ , jak już wspomniano (w rozdziale *Ogólna charakterystyka cyklu*), stwierdza się w krytycznych punktach cyklu przed rozpoczęciem syntezy DNA oraz przed rozpoczęciem i w trakcie trwania mitozy.

Czy zatem  $Ca^{2+}$  i wiążąca  $Ca^{2+}$  kalmodulina uczestniczą w regulacji aktywności kinaz cdk? Badania tego problemu w dzielących się komórkach grzyba *Aspergillus nidulans* wykazują, że określony poziom  $Ca^{2+}$ -CAM decyduje o aktywności dwóch kinaz — cdc2 i NIMA (ta ostatnia nie występuje w komórkach wyższych eukariota). Przy zbyt niskim poziomie  $Ca^{2+}$ -CAM nie następuje bowiem uaktywnienie kinaz w wyniku defosforylacji aminokwasów (Thr14 i Tyr15) znajdujących się w miejscu wiązania przez enzym ATP (LU i MEANS 1993). Wynik ten wskazuje zatem, że procesem regulowanym przez  $Ca^{2+}$ -CAM jest aktywacja specyficznej fosfatazy cdc25 w komórkach kręgowców (MILLAR i RUSSEL 1992, GRZELAKOW-



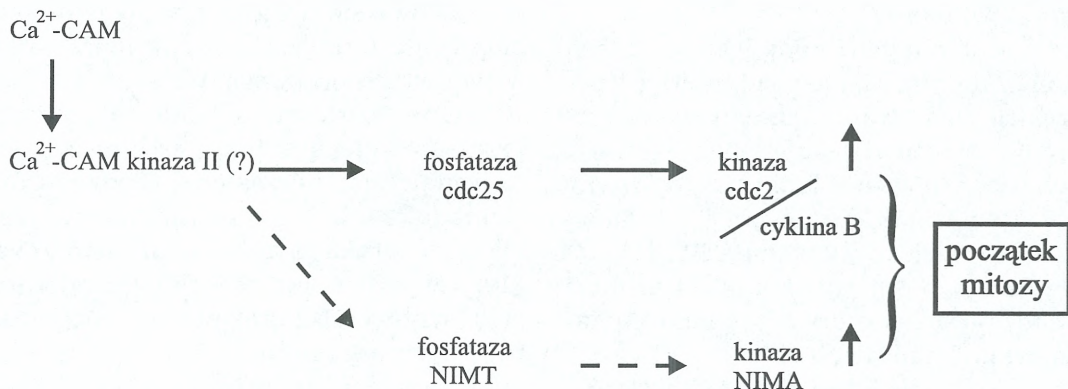
2. Regulacje aktywności kinaz cdk (wg. Elledge 1996 zmodyf.)

Strzałki → oznaczają działania aktywujące, - hamujące. Kursywą oznaczono geny kodujące białka uczestniczące w regulacjach, linią pogrubioną szlaki (procesy) i białka, o których będzie mowa w tekście.

SKA-SZTABERT 1993) i NIMT w *Aspergillus*. Aktywność fosfatasy *cdc25* podlega bardzo precyzyjnej kontroli, przede wszystkim przez dołączanie cyklin B oraz stopień ufosforylowania samego enzymu. Jest więc wielce prawdopodobne, że zależne od  $Ca^{2+}$ -CAM kinazy, na przykład CAMKII lub inne białka wiążące  $Ca^{2+}$  uczestniczą w fosforylacji, a tym samym w aktywacji fosfatasy *cdc25* (LU i MEANS 1993), brak jest jeszcze jednak eksperymentalnego

udokumentowania tej sugestii (ryc. 3). Poziom cykliny B, której proteoliza również pozostaje pod kontrolą  $Ca^{2+}$ -CAM (patrz rozdział *Degradacja cyklin mitotycznych i udział jonów  $Ca^{2+}$* ), ma też niewątpliwie wpływ na aktywność fosfatasy *cdc25*.

Należy sądzić, że  $Ca^{2+}$ -CAM wpływa również w podobny sposób na kinazy cdk aktywne w fazie G1. Jak dotąd nie doniesiono o badaniach prowadzonych w tym kierunku.



Ryc. 3. Schemat udziału jonów  $Ca^{2+}$  w regulacji rozpoczęcia mitozy.

W komórkach wyższych eukariota do rozpoczęcia mitozy wystarczy aktywacja tylko kinazy *cdc2*, u grzybów (*Aspergillus*) aktywacji musi ulec także kinaza NIMA.

## UKŁAD UBIKWITYNA/PROTEASOM, JEGO REGULACJA I UDZIAŁ W DEGRADACJI REGULATORÓW CYKLU KOMÓRKOWEGO

### CHARAKTERYSTYKA UKŁADU

Ubikwityna/proteasom stanowią pozalizosomalny układ proteolityczny przeprowadzający degradację białek o krótkim okresie półtrwania, których obecność jest niezbędna tylko w określonych momentach życia komórki. Są

to przede wszystkim liczne czynniki transkrypcyjne, niektóre błonowe układy transportujące, błonowe receptory różnych czynników wzrostowych oraz wiele kinaz i fosfataz, a także białka zmutowane o nieprawidłowej strukturze (CIECHANOVER i SCHWARTZ 1994, KING i współaut. 1996, WEISSMAN 1997).

Proteasom stanowi multikatalityczny kompleks białkowy, charakteryzujący się zdolnością do degradacji białek uprzednio wyznakowanych dołączeniem jednej lub wielu cząsteczek małego białka (76 AA; 8,5 kDa) — ubikwityny, chociaż znane są już dziś wyjątki od tej reguły (CIECHANOVER i SCHWARTZ 1994, MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA 1996). Proces ubikwitynacji białkowych substratów jest bardzo złożony i wymaga uaktywnienia samej cząsteczki ubikwityny w procesie zachodzącym na koszt energii pochodzącej z hydrolizy ATP (enzym E1) oraz udziału odrębnych enzymów w przenoszeniu (enzym E2) i dołączaniu (enzym E3) zaktywowanej ubikwityny na białkowy substrat.

Informacje o poziomie aktywności proteasomu w poszczególnych fazach cyklu komórkowego są nieliczne i niejednoznaczne. Różnice w poziomie aktywności proteasomu (wysoka w profazie i metafazie) znaleziono w dzielących się synchronicznie komórkach embriónów zachwy *Halocynthia rosetzi* (KAWAHARA i współaut. 1992). Nie obserwowano natomiast różnic w aktywności proteasomu badając ekstrakty dzielących się jaj żaby szponiastej *Xenopus* (MAHAFFEY i współaut. 1993). Ostatnio doniesiono jednak o wzroście aktywności proteasomu w zaktywowanych, działaniem jonoforu wapniowego A23187, jajach *Xenopus*. Wysłunięto zatem hipotezę o możliwości regulacji (w nieznanym jeszcze sposób) aktywności proteasomu przez  $Ca^{2+}$  uwalniany z wewnątrzkomórkowych magazynów (AIZAWA i współaut. 1996). Czy podobne zależności zostaną wykryte w innych układach pokażą dalsze badania. Niemniej jednak, hipoteza o udziale  $Ca^{2+}$  w modulacji aktywności proteasomu jest bardzo pociągająca. Proteasom bowiem przeprowadza degradację tak istotnych regulatorów cyklu komórkowego jak cykliny (podjednostki regulatorowe kinaz cdk), białkowe inhibitory kinaz cdk oraz białka PDS1 i CUT2, spajające chro-

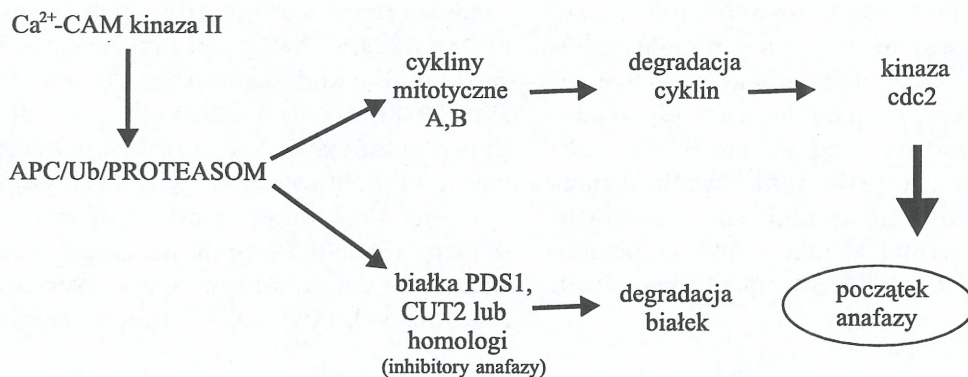
matydy aż do momentu rozpoczęcia anafazy.

#### DEGRADACJA CYKLIN MITOTYCZNYCH I UDZIAŁ JONÓW $Ca^{2+}$

Już w 1991 roku udowodniono, że spektakularny spadek aktywności kinazy cdc2 podczas przejścia komórek ze stadium metafazy w anafazę jest wywołany degradacją cyklin mitotycznych A i B w układzie ubikwityna/proteasom (GLOTZER i współaut. 1991, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1993, KING i współaut. 1996). Zbieżność wysokiego poziomu  $Ca^{2+}$  w tym właśnie momencie cyklu i inaktywacji kinazy cdc2 pozwala przypuszczać, że  $Ca^{2+}$  może wpływać decydująco na zakończenie przez komórki podziału mitotycznego (BARAN 1994, 1996). Pozostaje do wykazania, czy ma to związek z poziomem aktywności proteasomu.

Początkowo sądzono, że tylko cykliny mitotyczne są degradowane w układzie ubikwityna/proteasom. Wiązano to z obecnością w ich cząsteczkach specjalnej (określonej) sekwencji aminokwasowej (9 AA), tak zwanego boksus destrukcyjnego, i sądzono, że obecność tej sekwencji predestynuje cykliny A i B do dawania połączeń z ubikwityną. Obecnie wiadomo, że również cykliny, regulujące aktywność kinaz cdk w fazie G1 i nie zawierające boksus destrukcyjnego lecz sekwencję PEST, są degradowane przy udziale proteasomu, a o ich podatności na ubikwitynację i proteolizę wydaje się decydować stopień ich ufosforylowania (fosforylacja przez kinazę cdc2, KING i współaut. 1996). Cykliny mitotyczne są ubikwitynowane przy udziale enzymów obecnych w tak zwanym cyklosomie, wielobiałkowym kompleksie promującym przejście dzielących się komórek ze stadium metafazy w anafazę (APC, *anaphase promoting complex*).

Proteoliza cyklin mitotycznych jest niezbędnym, ale nie wystarczającym czynnikiem umożliwiającym rozpoczęcie anafazy (ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat udziału jonów  $Ca^{2+}$  w kontroli przejścia komórek ze stadium metafazy w anafazę.

Konieczny jest jeszcze rozpad dwóch białek ściśle powiązanych z chromatydami. U drożdży są to białka PDS1 i CUT2, postuluje się występowanie podobnych białek w komórkach wyższych eukariota. Sposób ich działania jest jeszcze w sferze hipotez; wiadomo natomiast, że ich degradacja zachodzi w proteasomie (KING i współaut. 1996).

Zbieżność czasowa degradacji cyklin mitotycznych i inaktywacja kinazy *cdc2* z podwyższonym w tym stadium mitozy poziomem  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny od lat intrygowała badaczy cyklu komórkowego. Przez długi czas sądzono, że niezbędność wysokiego poziomu  $Ca^{2+}$  niezbędna jest do aktywacji proteazy — kalpajny. Proteaza ta miałaby degradować białko *p39<sup>mos</sup>*, czynnik cytostatyczny (CSF) ochraniający cyklony mitotyczne przed degradacją (LU i MEANS 1993). Pogląd o udziale aktywowanej przez  $Ca^{2+}$  kalpajny w proteolizie cyklin mitotycznych podważyły jednak wyniki doświadczeń wykazujące, że stymulowana przez  $Ca^{2+}$  CAM ich proteoliza może zachodzić w obecności nieaktywnej kalpajny i niezdegradowanego czynnika cytostatycznego. Obecnie udowodniono, że nie kalpajna lecz kinaza białkowa II aktywowana przez  $Ca^{2+}$  i kalmodulinę (CAMKII) stymuluje proteolizę cyklin mitotycznych i białka *p39<sup>mos</sup>* (LORCA i współaut. 1993, 1994, WHITAKER 1993, BARAN 1994). Nadal jednak nie są znane białka fosforylowane przez tę kinazę. Pozostaje do wyjaśnienia, czy są nimi białka (enzymy) wchodzące w skład cyklosomu i uczestniczące w ubikwitynacji cyklin, czy też ma miejsce aktywacja samego proteasomu. Są pewne sugestie, że białka wchodzące w skład cyklosomu są fosforylowane przez kinazę *cdc2* i kinazę białkową A (LU i MEANS 1993, NAGAI i współaut. 1995). Być może również kinaza CAMKII ma swój udział w fosforylowaniu podjednostek cyklosomu.

Szybka i precyzyjna degradacja cyklin mitotycznych jest problemem na tyle fascynującym, iż opracowywane są modele matematyczne, starające się wyjaśnić czasowe zależności zmian wewnątrzkomórkowego poziomu  $Ca^{2+}$ , zachodzące pod wpływem  $IP_3$  z aktywacją kinazy CAMKII i inaktywacją kinazy *cdc2*. Uwzględnia się w nich również możliwość wpływu samej kinazy *cdc2* na poziom  $IP_3$  (BARAN 1994, 1996, SWANSON i współaut. 1997).

#### DEGRADACJA CYKLIN FAZY G1, BIAŁKOWYCH INHIBITORÓW KINAZ CDK I BIAŁEK SUPRESOROWYCH — HIPOTETYCZNY UDZIAŁ JONÓW $Ca^{2+}$

Brak jest, jak dotąd, danych na temat wpływu  $Ca^{2+}$  na degradację cyklin skompleksowanych z kinazami cdk, działającymi w fazie G1 cyklu. Można sądzić, że wpływ taki ma miejsce, gdyż zarówno cyklony fazy G1, jak i specyficzne białkowe inhibitory kinaz cdk, działających w fazie G1 (białko *p40<sup>sic1</sup>* drożdży i *p27<sup>kip1</sup>* wyższych eukariota) muszą być ufosforylowane przed wyznakowaniem cząsteczkami ubikwityny i późniejszą degradacją w proteasomie (KING i współaut. 1996, PAGANO i współaut. 1995). Uczestniczy w tym kompleks kilku białek (innych niż w cyklosomie) kodowanych w komórkach drożdży przez geny *cdc34* (enzym E2) oraz geny *cdc4*, *cdc53* i *skip1*, których skoordynowane działanie doprowadza do ubikwitynacji, a następnie do proteolizy cykliny obecnej w fazie G1 i inhibitora *p40<sup>sic1</sup>*. Należy podkreślić, że dopiero degradacja tego inhibitora umożliwia komórkom rozpoczęcie fazy S (JACKSON 1996).

Jest wielce prawdopodobne, że inne jeszcze białka, pełniące funkcje regulacyjne w cyklu, są degradowane w proteasomie. I tak pokazano, że proteasom przeprowadza proteolizę białka *p21*, inhibitora kinaz cdk, działających we wszystkich fazach cyklu komórkowego (BLAGOSKLONNY i współaut. 1996, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995a). Wysłunięto nawet sugestie, że zahamowanie proteasomalnej degradacji tego białka mogłoby wywoływać efekty cytostatyczne. Fosfataza *cdc25*, aktywująca kinazy cdk, jest także ubikwitynowana (NEFSKY i BEACH 1996), co pośrednio wskazuje na możliwość jej degradacji w proteasomie. Również białko kodowane przez gen supresorowy *p53*, tak zwany strażnik integralności genomu (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995b, LEVINE 1997), jest degradowane przez proteasom, a ponadto przez zależną od  $Ca^{2+}$  kalpajnę (KUBBUTAT i VOUSDEN 1997). Przypuszcza się także, że białko kodowane przez gen supresorowy *Rb* (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995b) i decydujące o intensywności przebiegu wielu procesów metabolicznych w fazie G1 cyklu, może być degradowane w układzie ubikwityna/proteasom (BOYER i współaut. 1996). Tak więc udział  $Ca^{2+}$  w monitorowaniu poziomu białek regulujących cykl jest nie do przecenienia.

## UWAGI KOŃCOWE

W artykule przedstawiono fakty i hipotezy o udziale jonów wapnia w regulacji cyklu komórkowego. Faktem jest wpływ tego jonu na aktywność układu kinaz cyklino-zależnych i degradację cyklin mitotycznych. Hipotetyczne są natomiast tłumaczenia udziału  $Ca^{2+}$  w regulacji aktywności proteasomu i/lub aktywności enzymów uczestniczących w ubikwitynacji substratów mających ulec degradacji w proteasomie. Faktem jest, że wielofunkcyjna kinaza CAMKII, o aktywności zależnej od  $Ca^{2+}$

i kalmoduliny oraz proteaza — kalpaina są elementami uruchamianej przez  $Ca^{2+}$  kaskady fosforylacji i defosforylacji. Hipotetyczne są natomiast enzymy (z wyjątkiem fosfatazy cdc25), których stan ufosforylowania jest istotny dla prawidłowego przebiegu cyklu. Za bardzo ważny fakt należy też traktować rosnące zainteresowanie badaczy różnych komórkowych dróg przekazywania sygnałów problemami regulacji przebiegu cyklu komórkowego.

## CELL CYCLE REGULATION - PARTICIPATION OF CALCIUM IONS, FACTS AND HYPOTHESES

## S u m m a r y

The involvement of calcium in cell cycle progression has been known for many years. However, there is little information about precise molecular mechanisms by which it functions. In the article facts and hypotheses

about the role of calcium in functioning of cyclin-dependent kinases and ubiquitin/proteasom system, two groups of regulatory proteins driving the cell cycle, are described.

## LITERATURA

- AIZAWA H., KAWAHARA H., TANAKA K., YOKOSAWA H., 1996. *Activation of the proteasome during Xenopus egg activation implies a link between proteasome activation and intracellular calcium release.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 218, 224–228.
- BARAN I., 1994. *Exit from mitosis induced by a calcium transient: the relation to the MPF and  $InsP_3$  dynamics.* BioSystems 33, 203–214.
- BARAN I., 1996. *Calcium and cell cycle progression: possible effects of external perturbations on cell proliferation.* Biophys. J. 70, 1198–1213.
- BARAŃSKA J., 1997. *Wapń jako pierwotny i wtórny przekaznik informacji. Udział  $Ca^{2+}$  w cyklu komórkowym, sekrecji i adhezji.* Kosmos 46, 33–44.
- BARBIERO G., MUNARON L., ANTONIOTTI S., BACCINO F. M., BONELLI G., LOVISOLO D., 1995. *Role of mitogen-induced calcium influx in the control of the cell cycle in Balb-c 3T3 fibroblasts.* Cell Calcium 18, 542–556.
- BLAGOSKLONNY M. V., WU G. S., OMURA S., EL-DEIRY W. S., 1996. *Proteasome-dependent regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 227, 564–569.
- BOYER S. N., WAZER D. E., BAND V., 1996. *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway.* Cancer Res. 56, 4620–4624.
- CIECHANOVER A., SCHWARTZ A. L., 1994. *The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins.* FASEB J. 8, 182–191.
- ELLEDGE S. J., 1996. *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis.* Science 274, 1664–1672.
- FISHER R. P., 1997. *CDKs and cyclins in transition(s).* Curr. Op. Gen. Develop. 7, 32–38.
- GLOTZER M., MURRAY A. W., KIRSCHNER M. W., 1991. *Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway.* Nature 349, 132–138.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1992. *Regulacja cyklu komórkowego — historii i komplikacji ciąg dalszy.* Post. Biochem. 38, 98–107.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1993. *Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego.* Post. Biochem. 39, 16–25.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1995a. *Regulacja cyklu komórkowego — udział inhibitorów kinaz cyklino-zależnych.* Post. Biochem. 41, 80–93.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1995b. *Geny supresorowe — molekularne mechanizmy działania i ich znaczenie w kontroli proliferacji komórek.* Kosmos 44, 323–352.
- HEPLER P. K., 1992. *Calcium and mitosis.* Int. Rev. Cytol. 138, 239–268.
- HEPLER P. K., 1994. *The role of calcium in cell division.* Cell Calcium 16, 322–330.
- JACKSON P. K., 1996. *Cell cycle: cull and destroy.* Curr. Biol. 6, 1209–1212.
- KAWAHARA H., SAWADA H., YOKOSAWA H., 1992. *The 26S proteasome is activated at two points in the ascidian cell cycle.* Febs Lett. 310, 119–122.
- KING R. W., DESHAIES R. J., PETERS J. -M., KIRSCHNER M. W., 1996. *How proteolysis drives the cell cycle.* Science 274, 1652–1659.
- KUBBUTAT M. H. G., VOUSDEN K. H., 1997. *Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability.* Mol. Cell. Biol. 17, 460–468.
- LANE H. A., NIGG E. A., 1997. *Cell-cycle control: POLO-like kinases join the outer circle.* Trends in Cell Biol. 7, 63–68.
- LEVINE A. J., 1997. *p53, the cellular gatekeeper for growth and division.* Cell 88, 323–331.

- LEW D. J., KORNBLUTH S., 1996. *Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 795–804.
- LORCA T., CRUZALEGUL F.H., FESQUET D., CAVADORE J. -C., MERY J., MEANS A., DOREE M., 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 366, 270–273.
- LORCA T., ABRIEU A., MEANS A., DOREE M., 1994.  $Ca^{2+}$  is involved through type II calmodulin-dependent protein kinase in cyclin degradation and exit from metaphase. *Biochim. Biophys. Acta* 1223, 325–332.
- LU K. P., MEANS A. R., 1993. *Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin*. *Endocrin. Rev.* 14, 40–58.
- MAHAFFEY D., YOO Y., RECHSTEINER M., 1993. *Ubiquitin metabolism in cycling Xenopus egg extracts*. *J. Biol. Chem.* 268, 21205–21212.
- MAKOWSKA A., DUSZYŃSKI J., 1996. *Oscylacje i fale wapniowe w komórce*. *Post. Biochem.* 42, 146–158.
- MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M., 1996. *Dekarboksylaza ornitynowa jedynym nieubikwitynowanym białkiem degradowanym przez 26S proteasomy?* *Post. Biochem.* 42, 113–120.
- MARTIN-CASTELLANOS C., MORENO S., 1997. *Recent advances on cyclins, CDKs and CDK inhibitors*. *Trends in Cell Biol.* 7, 95–98.
- MEANS A. R., 1994. *Calcium, calmodulin and cell cycle regulation*. *FEBS Lett.* 347, 1–4.
- MILLAR J. B. A., RUSSEL P., 1992. *The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase*. *Cell* 68, 407–410.
- NAGAI Y., KANEDA S., NOMURA K., YASUDA H., SENO T., YAMAOKA F., 1995. *Ubiquitin-activating enzyme, E1, is phosphorylated in mammalian cells by the protein kinase Cdc2*. *J. Cell Sci.* 108, 2145–2152.
- NEFSKY B., BEACH D., 1996. *Pub1 acts as an E6-AP-like protein ubiquitin ligase in the degradation of cdc-25*. *EMBO J.* 15, 1301–1312.
- NIGG E. A., 1995. *Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle*. *BioEssays* 7, 471–480.
- PAGANO M., TAM S. W., THEODORAS A. M., BEER-ROMERO P., DEL SAL G., CHAU V., YEW P. R., DRAETTA G. F., ROLFE M., 1995. *Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*. *Science* 269, 682–685.
- RATAN R. R., SHELANSKI M. L., 1986. *Calcium and the regulation of mitotic events*. *TIBS* 11, 456–459.
- RUDNER A. D., MURRAY A. W., 1996. *The spindle assembly check-point*. *Curr. Op. Cell Biol.* 8, 773–780.
- SHORT A. D., BIAN J., GHOSH T. K., WALDRON R. T., RYBAK S. L., GILL D. L., 1993. *Intracellular  $Ca^{2+}$  pool content is linked to control of cell growth*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4986–4990.
- SWANSON C.A., ARKIN A.P., ROSS J., 1997. *An endogenous calcium oscillator may control early embryonic division*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1194–1199.
- THOMAS A. P., BIRD G. S., HAJNOCZKY G., ROBB-GASPERS L. D., PUTNEY J. W., Jr., 1996. *Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling*. *FASEB J.* 10, 1505–1517.
- WEISSMAN A. M., 1997. *Regulating protein degradation by ubiquitination*. *Immunol. Today* 18, 189–198.
- WHITAKER M., PATEL R., 1990. *Calcium and cell cycle control*. *Development* 108, 525–542.
- WHITAKER M., 1993. *Sharper than a needle*. *Nature* 366, 211–212.
- WHITFIELD J. F., BIRD R. P., CHAKRAVARTHY B. R., ISAACS R. J., MORLEY P., 1995. *Calcium — cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, t6, u-mor promoter*. *J. Cell. Biochem. suppl.* 22, 74–91.
- WILDING M., 1996. *Calcium and cell cycle control in early embryos*. *Zygote* 4, 1–6.
- WILDING M., WRIGHT E. M., PATEL R., ELLIS-DAVIES G., WHITAKER M., 1996. *Local perinuclear calcium signals associated with mitosis-entry in early sea urchin embryos*. *J. Cell Biol.* 135, 191–199.
- ZABŁOCKI K., 1997. *Cykliczna ADP-ryboza — nowa cząsteczka sygnałowa w metabolizmie wapnia*. *Kosmos* 46, 147–154.