

JACEK Z. KUBIAK¹, ZBIGNIEW POLAŃSKI²

¹CNRS-UPR 41, Université Rennes 1, Biologie et Génétique du Développement
Ave, du General Leclerc, 35042 Rennes Cédex, France

E-mail: jacek.kubiak@univ-rennes1.fr

²Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński
Ingardena 6, 30-060 Kraków

E-mail: pola@zuk.iz.uj.edu.pl

MEJOTYCZNY CYKL KOMÓRKOWY U ZWIERZĄT

Powielanie identycznej informacji genetycznej w dzielących się komórkach zapewnione jest przez replikację DNA, a następnie jego segregację podczas podziału. W życiu każdej komórki somatycznej, między kolejnymi podziałami, powtarzają się więc cyklicznie i w określonej kolejności wydarzenia zapewniające prawidłowy przebieg obu tych procesów. Jest to zjawisko zwane cyklem komórkowym dzielonym zwyczajowo na cztery fazy (ryc. 1): G1, S (faza, w której zachodzi replikacja DNA), G2 i M (faza, w której dochodzi do podziału, składająca się z profazy, metafazy i anafazy). Na najprostszym poziomie istnienie cyklu komórkowego zauważalne jest jako następowanie po sobie kolejno interfazy (stan utrzymujący się w fazach G1, S i G2, w

którym zdekondensowana chromatyna otoczona jest osłonką jądrową) i fazy M (stan, w którym chromatyna jest skondensowana i nie jest otoczona osłonką jądrową).

W komórkach somatycznych zachodzi podział mitotyczny, w wyniku którego taka sama informacja genetyczna jest przekazywana do komórek potomnych. Natomiast w związku z rozmnażaniem płciowym, w komórkach szlaku płciowego prowadzącego do utworzenia gamet, wykształcił się cykl mejotyczny, powodujący redukcję liczby chromosomów i przetasowanie informacji genetycznej pochodzącej od ojca i matki. Cykl mejotyczny, który jest modyfikacją cyklu mitotycznego, jest znacznie bardziej skomplikowany i słabiej poznany.

MITOZA

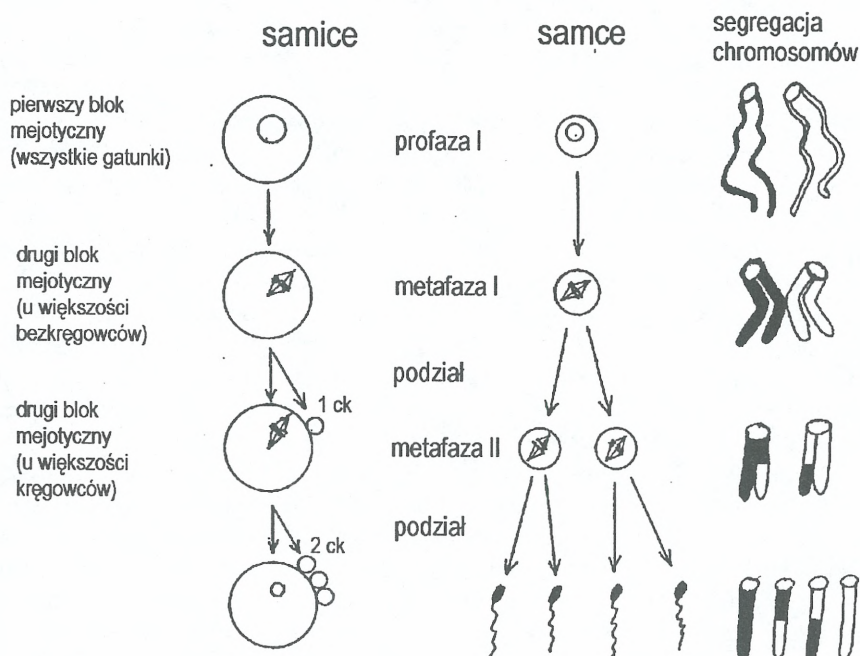
W kontroli cyklu komórkowego główną rolę spełniają dwie rodziny białek: cykliny i zależne od nich kinazy cdk (ang. cyclin-dependent kinases). Ich działanie polega na tworzeniu kompleksu, w którym cyklina jest jednostką regulacyjną, a kinaza katalityczną. Różne kombinacje tych dwóch typów podjednostek odpowiedzialne są za kontrolę różnych zdarzeń cyklu. I tak, rozpoczęcie replikacji DNA i dalsza jej regulacja związana jest z pojawieniem się aktywnych kompleksów kinaz z cyklinami z grup A, D i E. Wejście w fazę M wymaga z kolei powstania i aktywacji kompleksów cyklin A i B z kinazą cdc2. Jest to również kinaza z grupy cdk, ale ze względów historycznych stosuje się pierwotną nazwę cdc2. Bezspornie główną rolę odgrywa tu kompleks cyklin B/cdc2, czyli tak zwany czynnik MPF (zostanie on dokładniej omówiony

poniżej; ryc. 3). Jego aktywacja przeprowadza komórkę w fazę M, a wyjście do interfazy możliwe jest dopiero po inaktywacji tego kompleksu poprzez degradację cykliny B (MURRAY 1992). Cykl ten powtarza się w kolejnych generacjach aktywnie dzielących się komórek somatycznych (ryc. 1).

Bezpośrednia kontrola cyklu jest więc sprawowana przez cykliny i zależne od nich kinazy, jednakże występuje tu jeszcze nadrzędny poziom kontroli — system tak zwanych punktów kontrolnych (ang. checkpoint control). Dzięki istnieniu tego typu kontroli kolejność faz cyklu komórkowego jest dokładnie nadzorowana i niektóre fazy nie mogą się rozpocząć dopóki nie zostaną zakończone ściśle określone elementy faz poprzednich (MURRAY 1994). Na przykład, aby komórka podzieliła się w sposób prawidłowo-

ty. Warunek ten jest spełniony dzięki utrzymywaniu się połączeń między chromosomami homologicznymi w rejonie chiasm, czyli w obszarach, gdzie wcześniej zaszła rekombinacja (crossing-over). W anafazie chromosomy homo-

plodnieniu. Przebieg mejozy męskiej jest zdecydowanie krótszy (u ludzi ok. 6 tygodni) i bez blokowania poszczególnych stadiów, a w jej wyniku z komórki wyjściowej powstają cztery plemniki (ryc. 2). Skupimy się tutaj na ostate-



Ryc. 2. Przebieg mejozy u samic i samców.

1ck, 2ck — pierwsze i drugie ciało kierunkowe. Pierwsze ciało kierunkowe często ulega podziałowi w momencie zachodzenia drugiego podziału mejotycznego; w efekcie powstaje jedna komórka jajowa i trzy degenerujące ciała kierunkowe. Pokazano również układ chromosomów i chromatyd oraz sposób ich segregacji w kolejnych fazach mejozy na przykładzie jednej hipotetycznej pary chromosomów homologicznych.

logiczne (każdy składający się z dwóch chromatyd) rozdzielane są do dwóch komórek potomnych. Odrębność pierwszego cyklu mejotycznego polega więc na unikatowej konfiguracji chromosomów homologicznych w profazie i metafazie i ich segregacji w anafazie. Z kolei drugi cykl mejotyczny niepodobny jest do każdego innego cyklu, gdyż nie dochodzi w nim do replikacji DNA. Taka modyfikacja dwóch kolejnych cykli komórkowych umożliwia wykonanie głównego zadania mejozy — wytworzenia haploidalnych gamet, których informacja genetyczna odziedziczona po matce i ojcu została przetasowana w procesie rekombinacji genetycznej (artykuł przeglądowy: POLAŃSKI i KUBIAK 1998). Jest to osiagane w nieco odmienny sposób w mejozie męskiej i żeńskiej. W wyniku mejozy żeńskiej, z jednej komórki wyjściowej powstaje jedna gameta żeńska (oocyt) i małe degenerujące ciała kierunkowe, a sama mejoza trwa bardzo długo (u ludzi 12-50 lat). Przebieg mejozy zablokowany jest czasowo, najpierw w profazie pierwszego podziału, a potem w metafazie pierwszego lub (zależnie od gatunku) drugiego podziału (ryc. 2). Dopiero wnikięcie plemnika uwalnia oocyt z drugiego bloku mejotycznego, tak więc do zakończenia mejozy żeńskiej dochodzi już po za-

cznym efekcie przełączenia maszyneryj regulacyjnej cyklu komórkowego z mitotycznego na mejotyczny, żeby wykazać jakim zmianom podlega kontrola cyklu komórkowego w mejocytach.

KONTROLA MEJOZY W OOGENEZIE

Profaza I

Mejoza rozpoczyna się pierwszą profazą mejotyczną, która w oocytach może trwać nawet kilkadziesiąt lat. W tym stadium mejozy zachodzi rekombinacja genetyczna. Następuje ona na skutek wymiany homologicznych fragmentów DNA między chromosomami pochodzącymi od ojca i od matki — proces crossing-over. Mejoocyty muszą być zaopatrzone w całą serię enzymów kontrolujących ten proces. Jednym z elementów przełączania genów w momencie indukcji mejozy jest właśnie ekspresja genów niezbędnych dla rekombinacji. Wykazano, że wiele z produktów genów specyficznych dla tej ważnej funkcji mejozy jest spokrewnionych z produktami genów odpowiedzialnych za naprawę DNA. Skoro crossing-over polega na przecinaniu nici DNA i sklejanu jej z inną, pochodzącą

z chromosomu homologicznego, to podobieństwo z mechanizmami naprawczymi DNA nie może zbytnio dziwić.

O ewolucyjnej wadze tego zjawiska świadczyć może fakt, że enzymy kontrolujące proces są niezwykle konserwowane. Wykryto bowiem, że u myszy pewne z genów niezbędnych dla zajścia crossing-over są homologami genów reperacji DNA bakterii (HASSOLD 1996). Aktywność produktów tych genów nie modyfikuje przebiegu samego cyklu. Poświęcamy im tu nieco uwagi, gdyż właśnie dzięki modyfikacji cyklu komórkowego mogą one sprawnie wypełniać swoje funkcje. Długotrwała profaza meiotyczna jest przykładem takiej modyfikacji, a przedłużenie jej wydaje się mieć kapitalne znaczenie dla umożliwienia zajścia rekombinacji genetycznej. U człowieka oocyty wchodzą w profazę meiotyczną jeszcze w okresie płodowym i są zatrzymane w tej fazie aż do okresu dojrzałości płciowej, kiedy poszczególne oocyty sukcesywnie podejmują dalsze etapy mejozy.

Aktywacja MPF

W cyklu mitotycznym profaza jest fazą krótkotrwałą. Wówczas rozpoczyna się kondensacja chromosomów, następuje migracja centrosomów na bieguny przyszłego wrzeciona podziałowego i rozpad osłonki jądrowej. W mejozie, podobnie jak w cyklu mitotycznym, komórka pod koniec profazy aktywuje czynnik cytoplazmatyczny indukujący wejście w fazę M. Czynnik ten został nazwany MPF (ang. M-phase promoting factor), czyli czynnik indukujący fazę M. Ze względu na fakt iż czynnik ten został wykryty właśnie w trakcie mejozy oocytów żaby (MASUI i MARKERT 1971), początkowo nazwany został "maturation promoting factor", czyli czynnik indukujący dojrzewanie (meiotyczne oocytu). MPF jest dimerem złożonym z podjednostki katalitycznej — kinazy cdc2 (homolog produktu genu *cdc2* drożdży) i podjednostki regulacyjnej — cykliny B. Aktywacja MPF jest wielostopniowym procesem wymagającym najpierw utworzenia kompleksu obu podjednostek, a następnie odpowiedniej fosforylacji i defosforylacji specyficznych reszt aminokwasowych w cząsteczce cdc2.

Pod koniec profazy meiotycznej muszą zadziałać enzymy fosforylujące kinazę cdc2 na treoninie 161 oraz defosforylujące na treoninie 14 i tyrozynie 15 (ryc. 3). Pierwszy z tych enzymów — kinaza zwana CAK (ang. cdc2-activating kinase) jest aktywny w trakcie całego cyklu komórkowego. Nowosyntetyzowana kinaza cdc2 ulega więc fosforylacji zależnej od CAK w trakcie każdej fazy cyklu. Podczas aktywacji MPF regulacyjne znaczenie ma głównie fosfata-

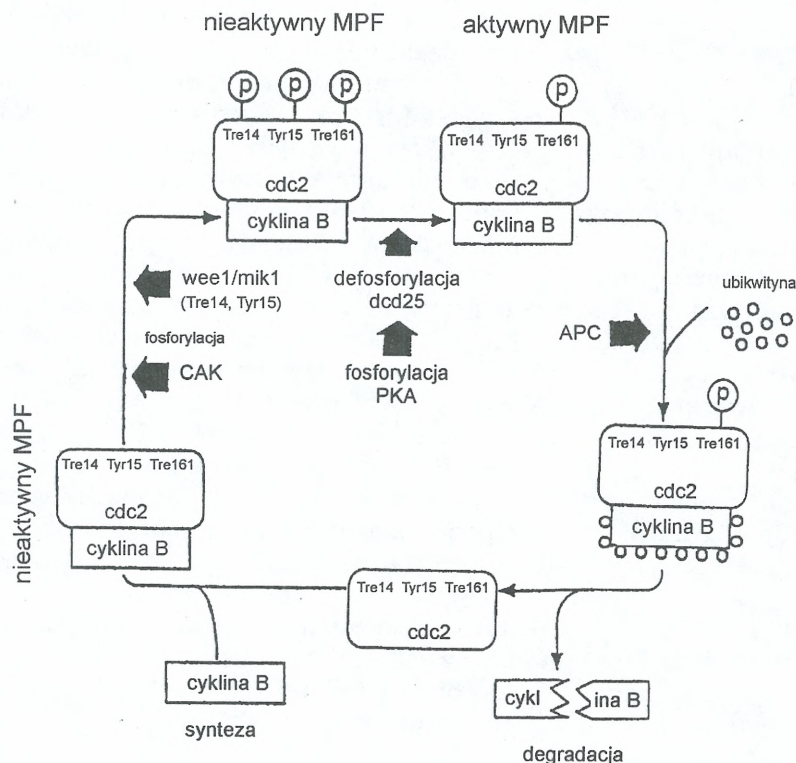
za cdc25, która defosforyluje miejsca fosforylacji inhibicyjnej w cząsteczce cdc2 (LEW i KORNBLUTH 1996). Dopiero aktywacja tej właśnie fosfatazy pozwala na włączenie MPF i rozpoczęcie przez mejocyt pierwszej meiotycznej fazy M. Niedopuszczenie do aktywacji fosfatazy cdc25 podczas długotrwałej profazy meiotycznej jest głównym mechanizmem zabezpieczającym przed przedwczesnym przejściem do kolejnej fazy cyklu meiotycznego.

W oocytach ssaków profaza meiotyczna trwa tak długo między innymi dzięki utrzymaniu wysokiej aktywności kinazy PKA (ang. protein kinase A), zależnej od cyklicznego AMP. Aktywność PKA podtrzymywana jest dzięki obecności wysokiego poziomu cyklicznego AMP w oocycie. Cykliczny AMP dostarczany jest do oocytu przez komórki pęcherzykowe, które otaczają oocyt i kontaktują się bezpośrednio z jego cytoplazmą przez wypustki przechodzące przez osłonki jajowe. Oocyt sam nie produkuje cAMP, tak więc u wielu ssaków wystarczy izolować oocyty z jajnika, aby zaindukować w nich spadek stężenia tego związku chemicznego. Obniżenie stężenia cAMP w cytoplazmie oocytu powoduje obniżenie aktywności PKA i rozpoczęcie pierwszej fazy M meiotycznej (HANDEL i EPPIG 1998). Dokładny mechanizm działania PKA na fosfatazę cdc25 nie jest znany. Możliwe, że jest to działanie pośrednie wymagające także udziału innych enzymów. Za bardziej skomplikowanym mechanizmem kontroli tego zjawiska przemawia fakt, że aktywacja fosfatazy cdc25 jest również kontrolowana przez punkt kontrolny monitorujący czy zaszła replikacja DNA. Działa tu więc sprzężenie zwrotne niedopuszczające do aktywacji tego enzymu w obecności niezreplikowanego DNA.

Jeszcze jednym regulatorem aktywności MPF, szczególnie ważnym w komórkach o dużych rozmiarach jakimi są oocyty, jest subkomórkowa lokalizacja enzymu. W oocytach i zarodkach *Xenopus laevis* istnieje gradient aktywności MPF. Dodatkowo, fałdowanie powierzchni komórki podczas aktywacji i inaktywacji MPF prawdopodobnie powoduje przesuwanie się fali MPF w cytoplazmie. Poszczególne regiony tak dużej komórki mogą więc równocześnie przejawiać różną aktywność MPF — gdy jedna część komórki znajduje się w fazie M, inna może już posiadać charakterystykę interfazową (RANKIN i KIRSCHNER 1997). Stan ten ma, oczywiście, charakter przejściowy.

Faza MI

W pierwszej metafazie meiotycznej (MI) ujawnia się kolejna modyfikacja cyklu komórkowego. Mianowicie w wielu oocytach ta faza



Ryc. 3. Regulacja aktywności MPF.

Nieaktywny czynnik MPF powstaje z połączenia cykliny B (na dole, z lewej strony) z kinazą cdc2, która ulega następnie fosforylacji na trzech resztach aminokwasowych: Tre 161, Tre 14, i Tyr 15. Dwie ostatnie muszą z kolei zostać zdefosforylowane, aby powstał aktywny MPF. Aktywny MPF bezpośrednio, jak i pośrednio, (poprzez kaskadę fosforylacji) indukuje liczne procesy zachodzące w fazie M. Pod koniec tej fazy ubiquityna naznacza cyklinę B, co kieruje ją do degradacji proteolitycznej. W ten sposób MPF przestaje istnieć, a kinaza cdc2 pozostaje w komórce i jest gotowa do utworzenia MPF w kolejnym cyklu, (według KISHIMOTO 1994; zmienne).

cyklu mejotycznego trwa niezwykle długo. U niektórych gatunków dochodzi do zablokowania oocytów w metafazie pierwszego podziału mejotycznego aż do momentu zapłodnienia. Tak dzieje się u wielu stawonogów, na przykład u owadów. W tej ostatniej grupie zablokowanie pierwszej metafazy mejotycznej wywołane jest mechanicznym sprzężeniem chromatyd chromosomów homologicznych w obszarze chiasm, czyli w miejscach gdzie zachodzi crossing-over. Oocyty much mutantów, u których nie występuje rekombinacja genetyczna, nie blokują się w tej fazie cyklu komórkowego (MCKIM i współaut. 1993). W przypadku bloku mejotycznego oocytów w MI specyficzny dla tej fazy mejozy charakter chromosomów powoduje modyfikację cyklu komórkowego — wydłużenie fazy M. Jest to przykład modyfikacji przebiegu cyklu komórkowego poprzez specyfikę samego procesu mejozy, a nie — jak w przypadku profazy mejotycznej — wskutek nadrzędnej kontroli modyfikacji cyklu komórkowego umożliwiającej zajście procesów mejotycznych.

Przejście z fazy MI do anafazy I

Dla inaktywacji MPF i zajścia anafazy mejotycznej (jak i każdej innej anafazy) niezbędna jest degradacja proteolityczna cykliny B. Proces ten zachodzi dzięki aktywacji proteosomów degradujących odpowiednio naznaczone białka. Znacznikiem białek, które mają ulec proteolizie, jest najczęściej ubiquityna. Jej łańcuchy przyłączane są do cząsteczek określonego białka,

które dopiero wtedy rozpoznawane jest przez proteosomy i degradowane. Kontrola cyklu poprzez proteolityczną degradację odpowiednich białek regulacyjnych zachodzi również w innych fazach cyklu, tak więc kapitalne znaczenie ma oznaczenie tylko tych specyficznych białek, które powinny ulec degradacji w określonej fazie cyklu. Białka przeznaczone do degradacji w anafazie rozpoznawane są i oznaczane przez tak zwany kompleks APC (ang. anaphase promoting complex), przestrzennie uorganizowany zespół białek złożony z ośmiu podjednostek (KING i współaut. 1996). W ten sposób rozpoznawana, a następnie degradowana jest między innymi cykliną B. Dzięki temu procesowi kompleks cdc2/cyklina B przestaje istnieć i komórka bardzo szybko wyłącza MPF (ryc. 3). Mechanizm przedłużający MI wydaje się działać na zasadzie podobnej do mitotycznego metafazowego punktu kontrolnego. Wiadomo, że w mitotycznym punkcie kontrolnym chromosomy nie podczepiane prawidłowo do wrzeciona wysyłają sygnał uniemożliwiający aktywację kompleksu APC, blokując degradację cykliny B, a tym samym inaktywację MPF (GORBSKY 1997). Wydaje się, że również w pierwszej metafazie mejotycznej degradacja cykliny B nie może nastąpić dopóki nie stanie się możliwa prawidłowa separacja chromosomów homologicznych tworzących biwalent. Jednakże, metabolizm tej drogi kontroli inaktywacji MPF jak i uczestniczące w nim cząsteczki pośredniczące w przekazywaniu sygnału do proteosomów nie

są znane, stąd trudno na razie porównać oba procesy — mitotyczny i mejotyczny.

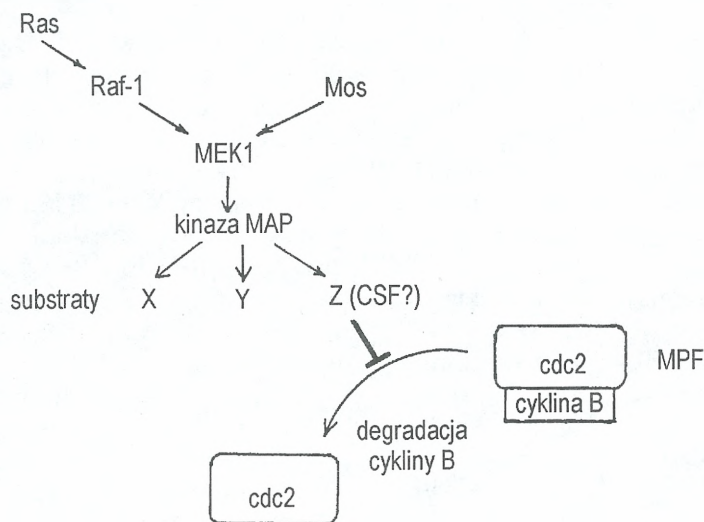
Mechanizmy znoszące replikację DNA

W mitozie po anafazie i inaktywacji MPF rozpoczyna się interfaza, w której odtwarza się jądro komórkowe, struktura niezbędna do replikacji DNA i powstania dwuchromatydowej struktury chromosomów. Natomiast w mejozie, w oocytach wielu gatunków, po pierwszej anafazie mejotycznej następuje szybka reaktywacja MPF, bez replikacji DNA i często bez odtwarzania struktury jądra interfazowego. Szybka reaktywacja MPF nie jest jednak jedynym sposobem uniemożliwiającym replikację DNA w trakcie mejozy, gdyż w trakcie mejozy męskiej, a także w oocytach niektórych gatunków, może dochodzić do odtwarzania jąder, a więc indukcji stanu interfazowego, a mimo to replikacja nie zachodzi.

Mechanizm znoszący replikację DNA w cyklu mejotycznym oocytów *Xenopus laevis* i myszy wydaje się stosunkowo nieźle poznany. Głównymi czynnikami tego procesu są białka z

wacji kinazy MAP w trakcie mejozy (ryc. 4). Kinazy MAP są również aktywowane w pewnych fazach cyklu mitotycznego, lecz wówczas w ten proces muszą być zaangażowane inne drogi aktywacji (np. za pośrednictwem produktów proto-onkogenów *raf* lub *ras*).

Istnieją dane eksperymentalne sugerujące, że kinaza MAP, aktywna w trakcie pierwszego i drugiego podziału mejotycznego, jak również w okresie pomiędzy tymi podziałami, może być zaangażowana w proces umożliwiający postęp cyklu komórkowego bez replikacji DNA. Tego typu obserwacje uzyskano pozbawiając oocyty *Xenopus* jak i myszy białka Mos na drodze wprowadzenia antysensownych oligodezoksynukleotydów w stosunku do sekwencji nukleotydów genu *Mos*. Białko Mos syntetyzowane jest podczas mejozy począwszy od wejścia oocytu w fazę M pierwszego cyklu. Po wprowadzeniu do cytoplazmy oocytów, oligodezoksynukleotydy antysensowne do genu *Mos* wiążą się specyficznie z jego mRNA, co blokuje syntezę Mos. Takie oocyty nie reaktywują MPF, natomiast rozpoczynają replikację DNA i równocześnie in-



Ryc. 4. Schemat dróg aktywacji kinazy MAP i potencjalny sposób działania jej substratów na stabilność MPF (jako CSF).

Czynnik CSF utrzymujący stabilność MPF podczas drugiej metafazy mejotycznej związany jest z kaskadą fosforylacji kolejnych kinaz: Mos/MEK1/kinaza MAP; potencjalny substrat kinazy MAP mógłby przyczyniać się do zablokowania oocytu w drugiej metafazie zapobiegając degradacji cykliny B. Zaznaczone są też drogi (Ras/Raf-1) aktywacji kinazy MAP w cyklu mitotycznym.

grupy kinaz MAP (ang. mitogen-activated protein kinase). U kręgowców aktywacja kinaz MAP jest ściśle zależna od białka Mos. Ekspresja genu *Mos* jest ściśle ograniczona w warunkach fizjologicznych do mejocytów (MUTTER i VOLGEMUTH 1987). Wykrywa się znaczne ilości białka Mos zarówno w spermatocytach jak i w oocytach. Mos jest kinazą białkową fosforylującą reszty serynowe i treoninowe swych substratów. Wykryto niedawno, że kinaza ta aktywuje poprzez fosforylację inną kinazę, zwaną MEK 1 (ang. mitogen/extracellular kinase 1) i będącą kinazą bezpośrednio aktywującą kinazę MAP (SAGATA, 1997). Ta kaskada fosforylacji (Mos/MEK1/kinaza MAP) zależna od białka Mos wydaje się u kręgowców jedyną drogą aktyw-

dują rozwój partenogenetyczny zarodka bezpośrednio po zakończeniu pierwszego podziału mejotycznego (FURUNO i współaut. 1994). Również oocyty myszy pozbawionych genu *Mos* nie aktywują kinazy MAP (VERLHAC i współaut. 1996) i zachowują się podobnie jak oocyty pozbawione samego białka Mos, to znaczy tworzą jądra interfazowe po pierwszym podziale mejotycznym i rozpoczynają rozwój partenogenetyczny, a więc również i replikację DNA (COLLEDGE i współaut. 1994, HASHIMOTO i współaut. 1994). Wiele z nich może jednak reaktywować MPF i rozpoczynać drugą mejotyczną fazę M (VERLHAC i współaut. 1996). Te obserwacje sugerują, że białko Mos rzeczywiście bierze udział w procesie zniesienia replikacji w trakcie mejozy za pośred-

nictwem kinazy MAP. Mechanizm ten nie jest jednak do końca poznany i wymaga dalszych badań.

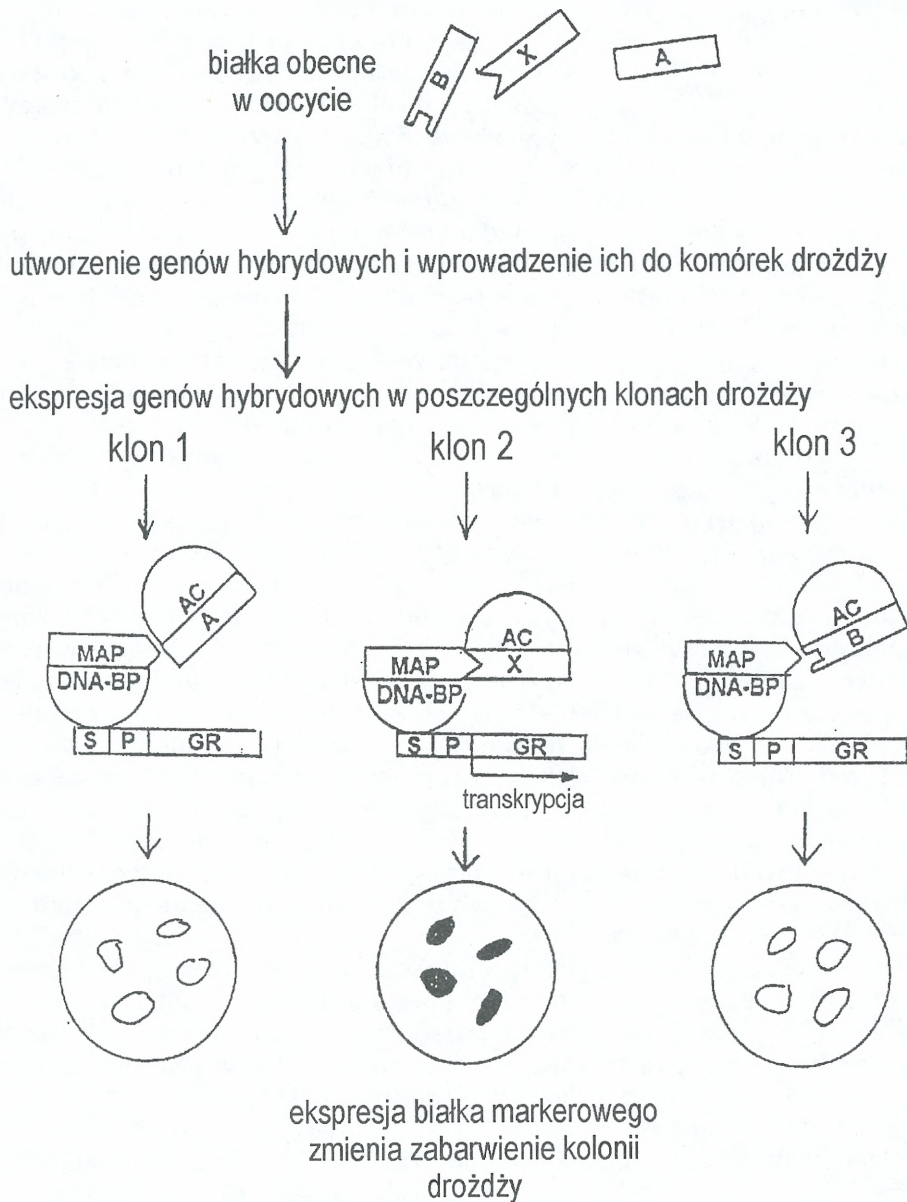
Faza MII

W oocytach kręgowców mejoza zablokowana zostaje w drugiej metafazie mejotycznej, a nie w pierwszej jak u stawonogów. Dzieje się tak dzięki aktywności tak zwanego czynnika cytotatycznego CSF (ang. cytostatic factor), który oddziałuje w nieznany dotąd sposób na MPF stabilizując jego aktywność na wysokim poziomie, co pozwala na utrzymanie przedłużonego stanu metafazowego. Zarówno Mos, jak i kinaza MAP zostały zidentyfikowane jako składniki CSF i są zaangażowane bezpośrednio w zablokowanie drugiej fazy M mejotycznej w oocytach kręgowców, co wykazano u *Xenopus* (HACCARD i współaut. 1993) i myszy (COLLEDGE i współaut. 1994, HASHIMOTO i współaut. 1994, VERLHAC i współaut. 1996). Wydaje się, że aktywność CSF tylko częściowo jest zależna od aktywności kinazy MAP, gdyż sama aktywność tej kinazy nie jest wystarczająca do wywołania efektu trwałej stabilizacji MPF. Jest ona jednak niezbędna dla aktywności CSF (SAGATA 1997). Zapewne obok białka Mos i kinazy MAP również inne, nieznane składniki biorą udział w utworzeniu CSF. Jednym z diskutowanych potencjalnych składników CSF jest kinaza cdk2 tworząca kompleks z cykliną E (REMPEL i współaut. 1995, POLAŃSKI 1997). Wydaje się, że CSF wywiera swe działanie stabilizujące MPF poprzez reakcje fosforylacji, ponieważ wszystkie znane i potencjalne składniki CSF (jak cdk2) są kinazami. Pewien substrat kinazy MAP mógłby oddziaływać na mechanizm destrukcji cykliny B w ten sposób, że nie dopuszczałby do jej uruchomienia. W ten sposób inaktywacja procesu degradacji cykliny B mogłaby stabilizować MPF (ryc. 4). Nie jest to jednak pewne i pomimo, że zidentyfikowano wiele substratów kinazy MAP, to nie znany jest żaden, który byłby dobrym kandydatem do takiego działania. Co więcej, skoro fosforylacja przez inne kinazy wydaje się niezbędna dla wywołania aktywności CSF, to w grę może wchodzić więcej niż jeden substrat.

Identyfikacja składników CSF jest szczególnie trudna, gdyż jego aktywność jest stosunkowo nowym „wynalazkiem” ewolucji i nie istnieje u drożdży będących najlepszym materiałem do doświadczeń genetycznych dostarczających najbardziej jednoznacznych informacji o funkcji produktów poszczególnych genów. To właśnie dzięki badaniom genetycznym nad drożdżami, połączonym z biochemicznymi badaniami ekstraktów komórkowych oocytów *Xenopus* ustalono ostatecznie skład MPF. Właśnie gene-

tyczna analiza drożdży metodą określaną jako „double hybrids”, czyli podwójne hybrydy, pozwala na identyfikację coraz większej liczby substratów kinazy MAP. Jeden, lub kilka z nich mogą w niedalekiej przyszłości okazać się kolejnymi składnikami CSF. Ewentualne interakcje zachodzące normalnie pomiędzy produktami genów w komórkach innych organizmów, można badać w komórkach drożdży metodą podwójnych hybryd. Polega to na testowaniu banku genów pochodzących z interesujących nas komórek, np. oocytów myszy (ryc. 5). Każdy gen w tym banku zostaje sprzężony z genem aktywatora polimerazy RNA (gen aktywujący transkrypcję, AC). Taka kombinacja daje pierwszą hybrydę. Ekspresja takich hybryd w komórkach drożdży włącza więc syntezę białek oocytu połączonych z aktywatorem transkrypcji. Druga hybryda pochodzi ze sprzężenia genu interesującego nas białka, w tym przypadku kinazy MAP, z białkiem wiążącym się specyficznie z DNA promotora transkrypcji genu reporterowego (DNA-BP) i jest wprowadzana do każdego z testowanych klonów drożdży. Białko reporterowe (np. dające zabarwienie koloniom drożdży) jest w tym przypadku markerem wskazującym na interakcje pomiędzy hybrydami. Łatwo zauważyć, że uruchomienie promotora i pojawienie się markera nastąpi tylko w tych klonach, w których białko związane z promotorem transkrypcji genu reporterowego będzie wchodzić w bliski kontakt z białkiem sprzężonym z aktywatorem polimerazy RNA (ryc. 5). Dzięki temu badania nad drożdżami przyczynią się zapewne do wykrycia składników CSF, pomimo całkowitego braku jego aktywności w trakcie ich mejozy.

Mechanizm zablokowania degradacji cykliny B przez CSF wydaje się istotnie różnić od bloku wywołanego przez mechanizm punktu kontrolnego. W trakcie bloku CSF wrzeczono mejotyczne nie wykazuje żadnych defektów i jest gotowe w każdym momencie podjąć funkcje rozdzielania chromatyd potomnych, jeśli nastąpi zapłodnienie lub zadziała mechanizm aktywacji partenogenetycznej. Efekt działania punktu kontrolnego jest z reguły przejściowy, i nawet jeśli nie dochodzi do prawidłowego podczepienia chromosomów do wrzeciona, po pewnym czasie następuje inaktywacja MPF, podczas gdy CSF bez zadziałania bodźca zewnętrznego może definitywnie zablokować fazę M w oocycie. Istnieją dane sugerujące, że oba mechanizmy są prowokowane przez kinazę MAP (MINSHULL i współaut. 1994). Możliwe jest jednak, że w każdy z nich są zaangażowane dwa (lub więcej), różnego typu choć bardzo podobne, enzymy.



Ryc. 5. Schemat zastosowania metody podwójnych hybryd do identyfikacji substratów dla kinazy MAP w oocytach myszy.

AC — aktywator transkrypcji; DNA-BP — białko wiążące się z DNA promotora genu reporterowego; S — sekwencja rozpoznawana przez DNA-BP; P — promotor genu reporterowego; GR — gen reporterowy, MAP — kinaza MAP. Po utworzeniu hybrydowych genów klonuje się je w komórkach drożdży tak, aby w pojedynczym klonie uzyskać ekspresję genu hybrydowego jednego z testowanych białek z AC. Transkrypcja genu reporterowego i w efekcie synteza markera zachodzi tylko w tym klonie, w którym białko związane z AC wchodzi w interakcje z białkiem związanym z DNA-BP (w tym przypadku MAP i X). W warunkach fizjologicznych AC i DNA-BP stanowią jedną cząsteczkę, jednak dzięki metodom rekombinacji DNA uzyskuje się te dwie domeny jako osobne cząsteczki, które mogą ze sobą współpracować dopiero po połączeniu poprzez sprzężone z nimi białka.

Przejście z fazy MII do anafazy II

W ten sposób docieramy do ostatniej fazy mejozy — drugiej anafazy mejotycznej i zakończenia cyklu mejotycznego. Warto tu zadać sobie pytanie w jaki sposób dochodzi do anafazy II w oocycie zablokowanym w M II, jeśli system degradacji cykliny B jest wyłączony przez CSF? Wydaje się, że wnikięcie plemnika albo bodziec partenogenetyczny zmienia w taki sposób warunki cytoplazmatyczne oocytu, iż następuje inaktywacja CSF i w jego wyniku indukcja degradacji cykliny B, a co za tym idzie inaktywacja MPF. Decydującą rolę odgrywa tu zwiększenie poziomu stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie (PARRINGTON i współaut. 1996). Zakończenie anafazy II jest więc ściśle regulowane przez bodziec zewnętrzny, który podwyższa poziom

wapnia w ooplazmie. Jest to zjawisko nieznanne w cyklu mitotycznym, gdzie wyłącznie bodziec wewnętrzny zaangażowany jest w wywołanie anafazy. Co więcej, wydaje się, że w mitozie samo utworzenie funkcjonalnego wrzeciona jest wystarczające do wywołania inaktywacji MPF i rozdzielania chromatyd potomnych. Ten warunek jest również niezbędny dla inaktywacji MPF w oocytach na przykład myszy, które wymagają obecności funkcjonalnego wrzeciona mejotycznego dla sprawnej degradacji cykliny B (KUBIAK i współaut. 1993).

REGULACJA CYKLU MEJOTYCZNEGO PODCZAS SPERMATOGENEZY

Badania regulacji mejotycznego cyklu komórkowego podczas spermatogenezy nastę-

czają zdecydowanie więcej trudności niż podczas oogenezy. Jednym z powodów są mniejsze o kilka rzędów wielkości rozmiary spermatocytów w porównaniu z oocytami, co utrudnia zebranie dostatecznej ilości materiału do badań biochemicznych. Inny problem stanowi brak występowania w spermatogenezie bloków w określonych fazach cyklu, co uniemożliwia uzyskanie dużej liczby komórek synchronicznie przechodzących kolejne etapy mejozy. Kontrola cyklu mejotycznego jest więc w tym przypadku znacznie słabiej poznana.

Podobnie jak w przypadku mejozy żeńskiej i cyklu mitotycznego, główną rolę odgrywa MPF. Jego aktywność wzrasta w pierwszorzędowych spermatocytach przechodzących z profazy do fazy M (WILTSHIRE i współaut. 1995). Wysoki poziom cykliny B wykrywalny w spermatocytach (CHAPMAN i VOLGEMUTH 1994), pozwala przypuszczać, że również w tym przypadku działa powszechny mechanizm aktywacji i inaktywacji MPF poprzez metabolizm cykliny B. Istnieją także dane eksperymentalne wskazujące na występowanie w mejozie męskiej wydajnego mechanizmu typu punkt kontrolny. W spermatocytach modliszki nieprawidłowe podłączenie biwalentów do mikrotubul wrzeczona opóźnia zajście anafazy o kilka godzin (LI i NICKLAS 1995). U myszy aktywacja tego punktu kontrolnego nieodwracalnie blokuje pierwszorzędowe spermatocyty w pierwszej metafazie mejotycznej. W szczepie myszy CBA/Kw para chromosomów płci (XY) nie tworzy biwalentu u około 30% pierwszorzędowych spermatocytów (KRZANOWSKA 1989). W takim przypadku można by oczekiwać nieprawidłowej segregacji chromosomów płci podczas pierwszej anafazy mejotycznej i w konsekwencji tworzenia aneuploidalnych plemników. Jednakże samce CBA/Kw nie odbiegają pod względem liczby aneuploidalnych plemników od samców z innych szczepów, natomiast wydajność spermatogenezy jest u nich wyraźnie niższa (POLAŃSKI i KRZANOWSKA 1991). Wskazuje to na eliminację spermatocytów z nieprawidłowym układem chromosomów płci. U samców myszy pozbawionych genu *Mlh1* (homolog genu *E. coli* zaangażowanego w naprawę DNA), defekt w parowaniu chromosomów homologicznych jest jeszcze większy, gdyż nie dochodzi tu w ogóle do tworzenia biwalentów. Spermatocyty takich myszy zostają nieodwracalnie zablokowane w pierwszej metafazie mejotycznej, co prowadzi oczywiście do bezpłodności (HASSOLD 1996). W obu przypadkach jest to klasyczny przykład działania punktu kontrolnego, który blokuje anafazę w sytuacji, gdy konfiguracja chromosomów nie zapewnia ich prawidłowej segregacji.

Obok uniwersalnych mechanizmów występujących we wszystkich typach komórek, spotykamy specyficzne modyfikacje kontroli mejozy męskiej. Elementem kontroli cyklu, unikatowym dla spermatogenezy, jest białko Hsp70-2. Należy ono do rodziny białek szoku cieplnego, które zaangażowane są w modyfikacje konformacji białek. Białko Hsp70-2 ulega ekspresji jedynie w profazowych spermatocytach pierwszego rzędu, a jego brak powoduje zaburzenia w formowaniu kompleksu między kinazą *cdc2* a cykliną B, uniemożliwiając aktywację MPF w profazie pierwszego cyklu mejotycznego (ZHU i współaut. 1997).

Nie sposób nie wspomnieć przy tej okazji o białku Mos. Jest ono wykrywalne w dużych ilościach zarówno w spermatocytach, jak i oocytach (MUTTER i VOLGEMUTH 1987). Jednakże, mimo kluczowej funkcji spełnianej przez Mos w kontroli mejozy żeńskiej nie udało się wykazać jakiegokolwiek jego roli w spermatogenezie. Spermatocyty myszy pozbawionych genu *Mos* dojrzewają normalnie i samce takich mutantów, w przeciwieństwie do samic, nie wykazują zaburzeń płodności (COLLEDGE i współaut. 1994, HASHIMOTO i współaut. 1994). Białko Mos, które jak pamiętamy kandyduje do roli czynnika blokującego replikację DNA w mejozie żeńskiej, jest zatem u samców zastąpione jakimś innym białkiem. Jak dotąd nie zaproponowano jednak żadnego czynnika, który mógłby być odpowiedzialny za zniesienie replikacji podczas mejozy męskiej.

Powyższe przykłady wskazują, że różnice w specyfice mejozy żeńskiej i męskiej związane są z wykształceniem się pewnych odmiennych mechanizmów regulacji cyklu. Okazuje się jednak, że jądra profazowych, pierwszorzędowych spermatocytów (w fazie pachytenu profazy) wprowadzone do cytoplazmy oocytów przechodzą bez przeszkód obydwa podziały mejotyczne (OGURA i współaut. 1997, SASAGAWA i współaut. 1998), równolegle z chromatyną oocytu gospodarza. Takie komórki jajowe, w których mejozę przechodziły równocześnie chromatyna spermatocytu i oocytu, po pobudzeniu do rozwoju embrionalnego są nawet zdolne rozwinąć się w żywe myszy (SASAGAWA i współaut. 1998). Tak więc, czynniki sterujące mejozą oocytów zdolne są wywoływać te same procesy w jądrach spermatocytów, mimo wszelkich różnic dzielących przebieg mejozy w obu typach komórek.

Anafaza II zachodzi w trakcie mejozy spermatocytów, podobnie jak w trakcie mitozy, na skutek zadziałania bodźca wewnętrznego. Nie występuje tu zablokowanie drugiej metafazy mejotycznej. Pod tym względem mejoza męska przypomina bardzo proces mejotyczny sporula-

cji drożdży. Jest to proces ciągły, nieprzerwany przedłużeniem poszczególnych faz mejozy, jak dzieje się to w trakcie mejozy żeńskiej. W jego wyniku powstają cztery morfologicznie identyczne komórki płciowe, podobnie jak cztery identyczne morfologicznie spory u drożdży. Wydaje się więc, że proces ewolucji cyklu komórkowego z mitotycznego, pozwalającego na proste powielenie materiału genetycznego, do mejotycznego prowadził najpierw przez etap podobny do obserwowanego dziś w trakcie sporulacji drożdży. Sprzężenie dwóch podziałów komórkowych i eliminacja replikacji DNA były zapewne krokami milowymi w wykształceniu się cyklu mejotycznego. Kolejne modyfikacje, obserwowane szczególnie w przypadku mejozy żeńskiej oocy-

tów, pozwoliły na dalsze usprawnienie tego procesu i umożliwiły powstanie w wyniku mejozy z pojedynczej komórki wyjściowej tylko jednej gamety żeńskiej, zawierającej maksimum cytoplazmy zaopatrzonej w czynniki niezbędne dla podtrzymania rozwoju przyszłego zarodka. O takim przebiegu ewolucji cyklu mejotycznego świadczą zachowanie wspólnych dla mitozy i mejozy cząsteczek i mechanizmów regulatorowych jak MPF, sposób jego aktywacji, mechanizm kontroli przebiegu cyklu na zasadzie monitorowania zajścia poszczególnych faz przez system punktów kontrolnych i powszechnie obserwowany sposób inaktywacji MPF poprzez degradację cykliny B.

CELL CYCLE CONTROL DURING ANIMAL MEIOSIS

Summary

Mitotic divisions ensure equal segregation of genetic information throughout the successive cell generations. The succession of mitotic stages is controlled by the cell cycle regulatory machinery. Sexual reproduction is associated with meiotic divisions which result in recombination of genetic material and reduction of the chromosome number from diploid to haploid. These two functions of meiosis depend largely on modifications of the cell cycle control mechanism observed during meiosis. The main feature of the mitotic cell cycle remains unchanged in meiosis and depends on cdc2/cyclin B complex (MPF or M-phase promoting factor). The regulation of correct succession of events in meiosis is ensured by a checkpoint control system similar to the mitotic one. Most important modifications of the cell cycle control in meiosis of females concern i) the

appearance of cell cycle arrests during the first meiotic prophase and the first or the second meiotic metaphase and ii) the prevention of replication. Proteins acting specifically at meiosis like PKA, Mos and MAP kinase are involved in these processes. Meiosis in males is accomplished in a slightly different way involving at specific stages functions of regulatory molecules different from those acting during meiosis in females. Surprisingly, certain molecules whose function is clear during female meiosis are present during the male meiosis although their function does not seem to be necessary for normal progression of this process in males. We summarize here current knowledge on the regulation of cell cycle progression during meiosis in animal cells.

LITERATURA

- CHAPMAN D. L., VOLGEMUTH D. J., 1994. *Regulation of M-Phase Promoting Factor activity during development of mouse male germ cells*. Dev. Biol. 165, 500-506.
- COLLEDGE W., CARLTON M., UDY G., EVANS M., 1994. *Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs*. Nature 370, 65-68.
- FURUNO N., NISHIZAWA M., OKAZAKI K., TANAKA H., IWASHITA J., NAKAJO N., OGAWA Y. i SAGATA N., 1994. *Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in mouse oocytes*. EMBO J. 13, 2399-2410.
- GORBSKY G. J., 1997. *Cell cycle checkpoints: arresting progress in mitosis*. Bioessays 19, 193-197.
- HACCARD O., SARCEVIC B., LEWELLYN A., HARTLEY R., ROY L., IZUMI T., ERIKSON E., MALLER J. L., 1993. *Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase*. Science 262, 1262-1265.
- HANDEL M. A., EPPIG J. J., 1998. *Sexual dimorphism in the regulation of mammalian meiosis*. Curr. Top. Dev. Biol. 37, 333-358.
- HASHIMOTO N., WATANABE N., FURUTA Y., TAMEMOTO H., SAGATA N., YOKOYAMA M., OKAZAKI K., NAGAYOSHI M., TAKEDA N., IKAWA Y., AIZAWA S., 1994. *Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos deficient mice*. Nature 370, 68-71.
- HASSOLD T. J., 1996. *Mismatch repair goes meiotic*. Nature Genet. 13, 261-262.
- KING R. W., DESHAIES R. J., PETERS J. M., KIRSCHNER M. W., 1996. *How proteolysis drives the cell cycle*. Science 274, 1652-1659.
- KISHIMOTO T., 1994. *Cell reproduction: induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase*. Int. J. Dev. Biol. 38, 185-191.
- KRZANOWSKA H., 1989. *X-Y chromosome dissociation in mouse strains differing in efficiency of spermatogenesis: elevated frequency of univalents in pubertal males*. Gamete Res. 23, 357-365.
- KUBIAK J. Z., WEBER M., de PENNART H., WINSTON N. J., MARO B., 1993. *The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF*. EMBO J. 12, 3773-3778.
- LEW D. J., KORNBLUTH S., 1996. *Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control*. Curr. Opin. Cell Biol. 8, 795-804.
- LI X., NICKLAS R. B., 1995. *Mitotic forces control a cell cycle checkpoint*. Nature 373, 630-632.
- MASUI J., MARKERT C. L., 1971. *Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes*. J. Exp. Zool. 177, 129-145.
- McKIM K. S., JANG J. K., THEURKAUF W. E., HAWLEY R. S., 1993. *Mechanical basis of meiotic metaphase arrest*. Nature 362, 364-366.

- MINSHULL J., SUN H., TONKS N. K. i MURRAY A. W., 1994. MAP-kinase dependent mitotic feedback arrest in *Xenopus* egg extract. *Cell* 79, 475–486.
- MURRAY A. W., 1992. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359, 599–604.
- MURRAY A. W., 1994. Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 872–876.
- MUTTER G. L. i VOLGEMUTH D. J., 1987. Distinct developmental patterns of *c-mos* proto-oncogene expression in female and male mouse germ cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84, 5301–5305.
- OGURA A., WAKAYAMA T., SUZUKI O., SHIN T. Y., MATSUDA J., KOBAYASHI Y., 1997. Chromosomes of mouse primary spermatocytes undergo meiotic divisions after incorporation into homologous immature oocytes. *Zygote* 5, 177–182.
- PARRINGTON J., SWANN K., SHEVCHENKO V. I., SESAY A. K. i LAY F. A., 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379, 364–368.
- POLAŃSKI Z., 1997. Genetic background of the differences in timing of meiotic maturation in mouse oocytes: a study using recombinant inbred strains. *J. Reprod. Fert.* 109, 109–114.
- POLAŃSKI Z., KRZANOWSKA H., 1991. Similar level of aneuploidy in mouse spermatozoa from two inbred strains differing in the frequency of X-Y dissociation at meiosis. *Genetica Polonica* 32, 43–49.
- POLAŃSKI Z., KUBIAK J. Z., 1998. Meiosis. [W:] *Encyclopedia of Reproduction*. E. KNOBIL, J. D. NEIL, (red.). Academic Press, San Diego, w druku.
- RANKIN S., KIRSCHNER M. W., 1997. The surface contraction waves of *Xenopus* eggs reflect the metachronous cell-cycle state of the cytoplasm. *Current Biology* 7, 451–454.
- REMPEL R. E., SLEIGHT S. B., MALLER J., 1995. Maternal *Xenopus* Cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase. *J. Biol. Chem.* 270, 6843–6855.
- SAGATA N., 1997. What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays* 19, 13–21.
- SASAGAWA I., KURETAKE S., EPPIG J. J., YANAGIMACHI R., 1998. Mouse primary spermatocytes can complete two meiotic divisions within the oocyte cytoplasm. *Biol. Reprod.* 58, 248–254.
- VERLHAC M. H., KUBIAK J. Z., WEBER M., Geraud G., COLLEDGE W. H., EVANS M. J., MARO B., 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122, 815–822.
- WILTSHIRE T., PARK C., CALDWELL K. A., HANDEL M. A., 1995. Induced premature G2/M transition in pachytene spermatocytes includes events unique to meiosis. *Dev. Biol.* 169, 557–567.
- ZHU D., DIX D. J., EDDY E. M., 1997. Hsp70-2 is required for *cdc2* kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* 124, 3007–3014.