

MONIKA REWERS

*Zakład Biologii Molekularnej i Cytometrii
Katedra Genetyki, Fizjologii i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy
Al. Prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz
E-mail: mrewers@utp.edu.pl*

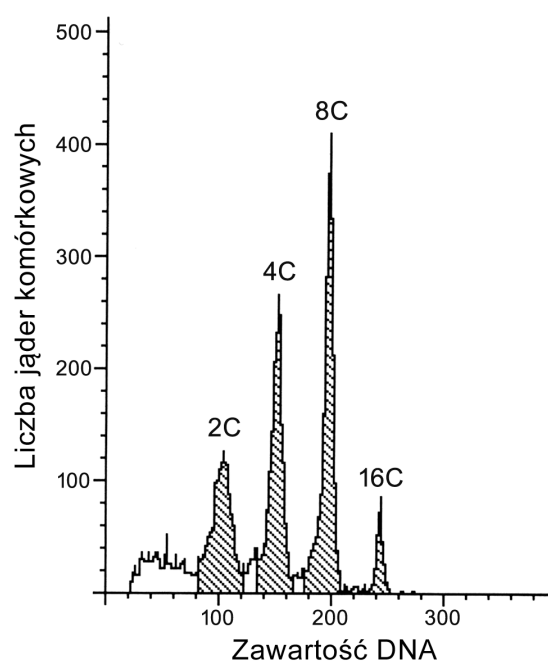
MOLEKULARNY MECHANIZM ENDOREDUPLIKACJI U ROŚLIN WYŻSZYCH

WPROWADZENIE

Rozwój roślin jest warunkowany szeregiem procesów, wśród których ważną rolę odgrywa cykl komórkowy. Typowy cykl komórkowy (mitotyczny) składa się następujących po sobie faz: G_1 , S, G_2 i mitozy, podczas których zmienia się zawartość DNA w jądrze komórkowym. Komórki w fazie G_1 zawierają 2C jądrowego DNA [gdzie wartość C oznacza charakterystyczną dla danego organizmu zawartość DNA w całym zestawie chromosomów (n), niezależnie od stopnia ploidalności organizmu], w G_2 – 4C, a w fazie S – ilość DNA pośrednią między 2C a 4C. Po fazie G_2 następuje mitoz (M) i cytokineza, po których powstają dwie komórki potomne posiadające jądra z zawartością DNA 2C (DECKERT 2000, ŚLIWIŃSKA 2008).

Alternatywną formę cyklu komórkowego, występującą w komórkach somatycznych roślin, stanowi proces endoreduplikacji. Polega on na amplifikacji jądrowego DNA, po której nie zachodzi mitoz. Pojedynczy cykl endoreduplikacyjny, nazywany endocyklem, składa się z fazy G, podczas której komórka zwiększa swój rozmiar i przygotowuje się do replikacji DNA oraz następującej po niej fazy S. W efekcie wystąpienia tego procesu powstają endopoliploidalne komórki somatyczne, które charakteryzują się wyższą (>4C) zawartością DNA w jądrze komórkowym (Ryc. 1). Endopoliploidalność jest więc zjawiskiem poliploidyzacji (z wielokrotnienia zawartości DNA) komórek somatycznych, w wyniku wystąpienia endoreduplikacji. Podczas endoreduplikacji liczba chromatyd ulega podwojeniu, lecz

nie podlegają one segregacji, a tym samym liczba chromosomów pozostaje niezmienną. Nie obserwuje się również zaniku i odbudowy otoczki jądrowej oraz kondensacji i dekondukcji chromatyny (MALUSZYŃSKA i współaut. 2013). Pomimo iż endoreduplikacja występuje powszechnie w wielu typach tkanek, u większości roślin okrytonasiennych, jej znaczenie nie zostało do tej pory ostatecznie wyjaśnione. Jedną z hipotez zakłada, że endoreduplikacja odgrywa istotną rolę we wzroście i rozwoju rośliny, ponieważ poprzez zwiększenie zawartości DNA następuje zwiększenie rozmiarów jądra, a w konsekwencji również całej komórki i organu (SABELLI i LARKINS 2009, REWERS i ŚLIWIŃSKA 2014). Endopoliploidalność może również stanowić rozwiązanie ewolucyjne, dzięki któremu u roślin z małymi genomami endoreduplikacja jest sposobem na zwiększenie ilości DNA, a zwłaszcza aktywnej transkrypcyjnie matrycy DNA (NAGL 1976). Zgodnie z tą hipotezą endoreduplikacja powinna występować głównie u gatunków z małymi genomami, jednakże obserwuje się zarówno gatunki o małych genomach, w których nie zachodzi endoreduplikacja, jak i gatunki z dużymi genomami, gdzie proces ten występuje (BAROW i MEISTER 2003, REWERS i ŚLIWIŃSKA 2012). Dzięki endoreduplikacji wzrasta ilość aktywnej transkrypcyjnie matrycy DNA, co może stanowić mechanizm zwiększający poziom ekspresji genów (D'AMATO 1984). Prawdopodobne jest również, że przez zwiększenie, poprzez endoreduplikację, liczby kopii funkcjonalnych genów organizmy stają się bar-



Ryc. 1. Histogram, uzyskany metodą cytometrii przepływowej, prezentujący proces endoreduplikacji w strefie przejściowej, między korzeniem a hipokotylem młodej siewki ogórka zwyczajnego (*Cucumis sativus*). Jądra komórkowe z zawartością DNA >4C są endopoliploidalne.

dziej odporne na niekorzystny wpływ środowiska (KUDO i KIMURA 2001).

Endoreduplikacja jest genetycznie determinowanym procesem, na co wskazują badania BAROWA i MEISTERA (2003), którzy analizując poziom endopoliploidalności 54 gatunków roślin nasiennych dowiedli, że najistotniejszym czynnikiem wpływającym na poziom endopoliploidalności jest pozycja taksonomiczna. Potwierdzeniem tego założenia są również badania gatunków należących do rodzaju kapusta (*Brassica*) (KUDO i KIMURA 2001) oraz odmian portulaki wielkokwiatowej (*Portulaca grandiflora*) (MISHIBA i MII 2000), pomidora zwyczajnego (*Solanum lycopersicum*) (SMULDERS i współaut. 1994) i buraka cukrowego (*Beta vulgaris*) (ŚLIWIŃSKA i ŁUKASZEWSKA 2005), gdzie u blisko spokrewnionych roślin poziom endoreduplikacji jest podobny.

Zarówno w cyklu mitotycznym, jak i endoreduplikacyjnym ważną rolę odgrywają cyklicznie współdziałające ze sobą białka, wśród których najważniejsze to kinazy zależne od cyklin (ang. cyclin dependent kinases, CDK) oraz ich białka regulatorowe - cykliny (ang. cyclins, CYC). U rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), który jest gatunkiem modelowym w badaniach roślin, zidentyfikowano 12 różnych białek CDK (typy A-G) i 49 CYC (typy A-D, H, P, T) (WANG i współaut. 2004, DE ALMEIDA ENGLER i współaut. 2009). Białka CDK po przyłącze-

Tabela 1. Wykaz i funkcja najważniejszych białek biorących udział w cyklu mitotycznym i endoreduplikacyjnym.

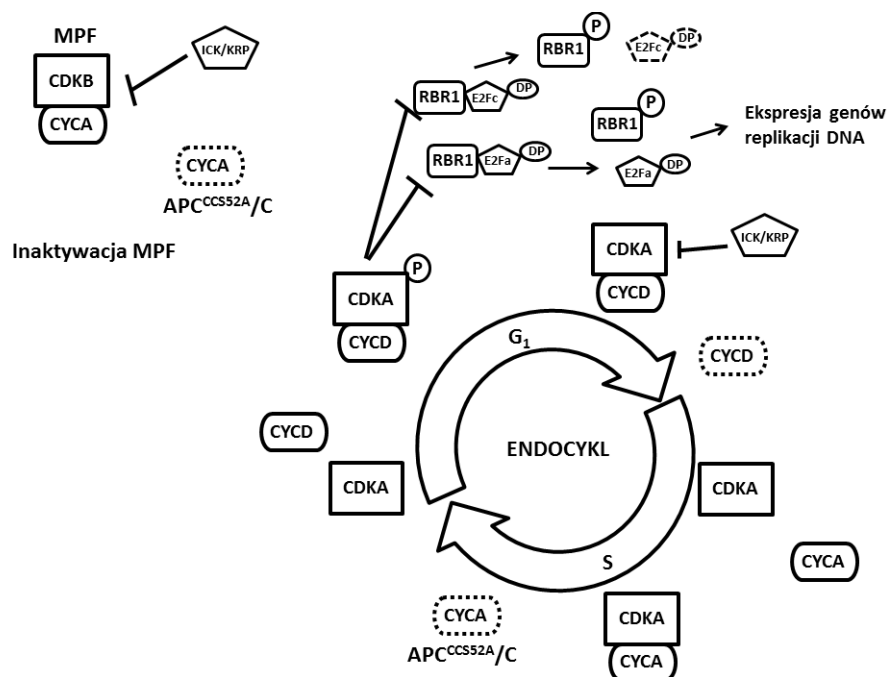
Nazwa		Funkcja
APC/C	Kompleks promujący anafazę/cyklosom (ang. anaphase-promoting complex/cyclosome)	Wysoko wyspecjalizowane białko (1,7-MDa) o charakterze ligazy ubikwiny E3, które rozpoznaje białka posiadające sekwencję destrukcji (D-box, KEN-box i A-box). Głównym jego celem są regulatory cyklu komórkowego – mitotyczne cykliny A i B oraz PDS1/SECURIN. U <i>A. thaliana</i> białko to zbudowane jest z 11 podjednostek.
CAK	Kinazy aktywujące CDK (ang. kinases activating CDK)	Do kinaz aktywujących CDK u roślin należą CDKF aktywujące kompleksy CDKD/CYCH, które to następnie fosforylują kompleksy CDK/CYC.
CCS52	CELL CYCLE SWITCH 52	Aktywator APC/C. Występują dwie formy genu <i>CCS52</i> : <i>CCS52A</i> i <i>CCS52B</i> . Białko <i>CCS52A</i> odpowiada za wystąpienie endoreduplikacji, natomiast <i>CCS52B</i> najprawdopodobniej za kontynuację występowania endocykli. Gen <i>CCS52</i> jest homologiem genu <i>Cdh1</i> u ssaków i <i>Fzr</i> u <i>Drosophila melanogaster</i> .
CDK	Kinaza zależna od cyklin (ang. cyclin dependent kinase)	Ser/Tre-specyficzna kinaza. Grupa białek biorących udział w przejściu między fazami cyklu komórkowego. Są aktywne po związaniu z odpowiednimi CYC oraz po fosforylacji przez CAK. Fosforylacja Thr160 tych kinaz indukuje zmiany konformacyjne pozwalające na właściwe rozpoznanie substratu.
CDKA	Kinaza A zależna od cyklin (ang. cyclin dependent kinase A)	Kinaza zależna od cyklin biorąca udział w przejściu z fazy G ₁ do S oraz G ₂ do M. Zawiera motyw PSTAIRE w miejscu wiązania cyklin.

CDKB	Kinaza B zależna od cyklin (ang. cyclin dependent kinase B)	Specyficzna dla roślin kinaza zależna od cyklin, aktywna podczas przejścia z fazy G_2 do M. Obejmuje dwie podrodziny białek CDKB1 i CDKB2. Geny CDKB1 ulegają ekspresji bardzo wcześnie w cyklu komórkowym, podczas fazy S i są aktywne do M. Ekspresja CDKB2 występuje podczas przejścia z fazy G_2 do M. Kinazy te w miejscu wiązania cyklin zawierają motywy PPTALRE (CDKB1) lub PPTTLRE (CDKB2).
CKI	Inhibitory CDK (ang. CDK inhibitors)	Regulują aktywność CDK pod wpływem czynników rozwojowych i środowiskowych. U roślin występują dwa rodzaje CKI: KRP/ICK i SIM/SMR.
CYC	Cyklina (ang. cyclin)	Wiąże się z CDK powodując ich aktywację. Obecne są podczas całego cyklu komórkowego. U <i>A. thaliana</i> zidentyfikowano 32 rodzaje cyklin (10 CYCA, 11 CYCB, 10 CYCD, 1 CYCH). Wykazują czasową ekspresję w cyklu komórkowym i są degradowane przez APC/C.
CYCA	Cyklina A (ang. cyclin A)	Kontroluje fazę S i przejście z fazy G_2 do M.
CYCB	Cyklina B (ang. cyclin B)	Reguluje przejście z fazy G_2 do M oraz całą mitozę.
CYCD	Cyklina D (ang. cyclin D)	Reguluje przejście z fazy G_1 do S.
E2F/DP	Czynnik transkrypcyjny E2F/DP (ang. adenovirus E2 promoter-binding factor/dimerization partner)	Czynnik transkrypcyjny kontrolujący ekspresję genów biorących udział w replikacji DNA. <i>A. thaliana</i> zawiera sześć typów E2F (E2Fa, E2Fb, E2Fc, E2Fd/DEL2, E2Fe/DEL1 i E2Ff/DEL3). Trzy pierwsze E2F posiadają jedną domenę wiązania DNA i do prawidłowego działania wymagają związania z DP. Natomiast trzy pozostałe E2F posiadają dwie domeny wiązania DNA, co pozwala im związać się z DNA jako monomery, niezależnie od DP. E2Fa i E2Fb są aktywatorami transkrypcji genów replikacji DNA, natomiast pozostałe E2F są jej represorami.
WEE1	Kinaza WEE1 (ang. WEE1 kinase)	Kinaza tyrozynowa, która inaktywuje CDK poprzez bezpośrednią fosforylację Thr14 i Thr15, przez co hamuje wiązanie ATP i substratu.
ICK/KRP	(ang. interactor of CDKs/ Kip-related protein)	Specyficzna dla roślin grupa inhibitorów kompleksów CDK/CYC. ICK/KRP występujące u <i>A. thaliana</i> dzielą się na dwie grupy w zależności od tego, czy wiążą się z CDKA (ICK1/KRP1, ICK2/KRP2, ICK6/KRP3), czy z CYCD (ICK4/KRP6, ICK5/KRP7). ICK7/KRP4 wiążą się zarówno z CDKA, jak i z CYCD.

niu CYC tworzą aktywny kompleks CDK/CYC, który odpowiedzialny jest za regulację punktów kontrolnych cyklu mitotycznego między fazą G_1 i S oraz G_2 i M (Ryc. 2) (DECKERT 2000, OKELLO i współaut. 2016). Działanie kompleksów CDK/CYC polega na uruchamianiu kaskadowych reakcji fosforylacji i defosforylacji białek uczestniczących w określonych fazach cyklu komórkowego (DECKERT 2000). W klasycznym cyklu komórkowym podczas przejścia z fazy G_1 do fazy S, CDKA tworzy kompleks z CYCD, który po aktywacji, prowadzi do destrukcji kompleksu RBR1-E2Fc-DP (represora genów replikacji DNA; ang. retinoblastoma-related-1/E2Fc/dimerisation partner) oraz do fosforylacji kompleksu RBR1-E2Fa-DP (ang. retinoblastoma-related-1/E2Fa/dimerisation partner), dzięki czemu uwolniony zostaje czynnik transkrypcyjny E2Fa-DP, który jest aktywatorem genów fazy S cyklu komórkowego (INZÉ i DE VEYLDER 2006). W kontroli przejścia z fazy G_2 do M uczestniczą CDKA i CDKB wraz z CYCA i CYCB, których ekspresja ma miejsce odpowiednio w fazach S- G_2 i G_2 -M (DE ALMEIDA ENGLER i współaut. 2009). Powsta-

ją kompleksy CDKA/B z CYCA/B, które po aktywacji stymulują ekspresję genów odpowiedzialnych za podział mitotyczny. Wyjście z mitozy następuje w wyniku degradacji cyklin mitotycznych przez kompleks promujący anafazę/cyklosom (ang. anaphase promoting complex/cyclosome, APC/C) aktywowany przez białko CCS52 (ang. cell cycle switch 52) (Tabela 1) (INZÉ i DE VEYLDER 2006).

Aktywność cyklu komórkowego oraz endoreduplikacyjnego jest regulowana na kilku poziomach. Zmiana aktywności CDK może wynikać ze zmniejszenia dostępności CYC w wyniku zablokowania ich transkrypcji oraz zmian statusu fosforylacji CDK. Fosforylacja 160 treoniny (Thr160) w strukturze CDK następuje w wyniku reakcji katalizowanej przez białka CDKF oraz kompleksy CDKD/CYCH i jest warunkiem niezbędnym, aby CDK były aktywne (VANDEPOELE i współaut. 2002). Aktywność CDK może być również negatywnie regulowana poprzez fosforylację podjednostki CDK przez kinazę WEE1 oraz poprzez ich interakcję z inhibitorami kinaz białkowych zależnych od cyklin (ang. cyclin dependent kinases inhibitor, CKI) takich



Ryc. 2. Schemat molekularnego mechanizmu endoreduplikacji u roślin wyższych. Zablokowanie mitozy zachodzi poprzez inaktywację kompleksu MPF (CYCB/CYCA) po związaniu z ICK/KRP lub degradację przez APC^{CCS52A}/C. Podczas endocyklu aktywny kompleks CDKA/CYCD powoduje fosforylację RBR1/E2Fa/DP i uwolnienie E2Fa/DP prowadząc do replikacji DNA. Na schemacie nieciągłą linią oznaczono brak aktywności białek/czynników. Szczegółowy opis w tekście.

jak: ICK/KRP (ang. interactors of CDK/Kip related proteins) oraz SIM/SMR (ang. SIAMESE/SIAMESE related proteins) (WANG i współaut. 2004). Może być ona również regulowana na poziomie potranslacyjnym poprzez ukierunkowaną degradację CYC oraz innych białek cyklu komórkowego przez APC/C (JOUBÉS i CHEVALIER 2000, BRAMSIEPE i współaut. 2010).

INICJACJA ENDOREDUPLIKACJI

Przejście z cyklu mitotycznego do endoreduplikacji następuje w fazie G₂, kiedy komórka przygotowuje się do mitozy (KRAWCZYK i WĄSEK 2011). Dlatego też, aby wystąpiła endoreduplikacja musi nastąpić zablokowanie mechanizmów odpowiadających za zapoczątkowanie mitozy, przy jednoczesnym zniesieniu barier odpowiadających za wystąpienie replikacji DNA tylko raz w całym cyklu, a następnie zainicjowanie kolejnej replikacji DNA (SUGIMOTO-SHIRASU i ROBERTS 2003). Zmiana cyklu mitotycznego na endoreduplikacyjny wiąże się więc z inaktywacją czynnika promującego mitozę (MPF), będącego kompleksem mitotycznych CDK/CYC, co w efekcie blokuje przejście komórki przez punkt kontrolny między fazą G₂ i M (Ryc. 2) (JOHN i QI 2008). Zredukowanie aktywności kompleksów CDK/CYC może

odbywać się poprzez regulację na poziomie transkrypcyjnym, proteolizę lub interakcję z CKI.

Zmniejszenie dostępności CYC jest wynikiem zahamowania ich transkrypcji lub ich degradacji pod wpływem czynników rozwojowych i środowiskowych (JOHN i QI 2008). SCHNITTGER i współaut. (2002) wykazali, że CYC mitotyczne (CYCB1;1 i CYCB1;2) nie ulegają ekspresji we włoskach epidermalnych (trichomach) *A. thaliana*, w których zachodzi endoreduplikacja. Jednocześnie wykazali, że nadekspresja genu *cycB1;2* redukuje liczbę endocykli i indukuje podziały komórkowe, prowadząc do powstania wielokomórkowych włosków epidermalnych, które u roślin niezmutowanych są jednokomórkowe i endopoliploidalne. Zaobserwowano również, że podczas rozwoju bielma kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), w fazie gdy następuje zmiana cyklu mitotycznego na endoreduplikacyjny, następuje zmniejszenie ekspresji *cycB* (SUN i współaut. 1999a). U *A. thaliana*, czynnik transkrypcyjny TCP15 odpowiada za regulację endoreduplikacji poprzez wiązanie do promotora genów *cycA2;3* oraz *RBR*, modulując tym samym ekspresję wielu innych genów cyklu komórkowego (LI i współaut. 2012). Podobnie, czynnik transkrypcyjny TCP20, wykryty u *A. thaliana*, wiąże się z promotorem *cycB1;1* pozytywnie regu-

lując ekspresję genu *cycB1;1* (Li i współaut. 2005). Również czynniki transkrypcyjne MYB, wykryte u tytoniu zwyczajnego (*Nicotiana tabacum*), odpowiadają za kontrolę ekspresji *cycB*; MYBB powodują zahamowanie ekspresji *cycB*, a MYBA ich aktywację (BONIOTTI i GRIFFITH 2002). Pomimo licznych badań nadal nie jest jednak znany dokładny mechanizm regulacji dostępności CYC na etapie ich ekspresji.

Inhibicja kompleksu MPF, a przez to zapoczątkowanie procesu endoreduplikacji, może zachodzić nie tylko poprzez hamowanie ekspresji genów kodujących cykliny mitotyczne (CYCA i CYCB), ale również potranslacyjnie, poprzez kierowanie tych cyklin do degradacji (INZÈ i DE VEYLDER 2006). Cykliny mitotyczne mają tzw. motyw destrukcji (D-box), czyli sekwencję rozpoznawaną przez kompleks APC/C, który pełni funkcję ligazy ubikwitynowej E3 i kieruje białka do degradacji (DE VEYLDER i współaut. 2011, ELOY i współaut. 2015). Kompleks APC/C jest multiproteiną złożoną z 11 głównych podjednostek, która jest regulowana przez kilka aktywatorów i inhibitorów (BREUER i współaut. 2014). Do aktywatorów APC/C należą białka: CCS52, CDC20 (ang. cell division cycle 20) i SAMBA (LIMA i współaut. 2010, ELOY i współaut. 2012). CCS52 odpowiedzialne jest za zablokowanie cyklu mitotycznego i indukcję endoreduplikacji u roślin poprzez aktywację APC/C i skierowanie CYC mitotycznych do degradacji przez proteosom 26S (MATHIEU-RIVET i współaut. 2010). To, że aktywność białka CCS52 powoduje wystąpienie endoreduplikacji w różnych organach roślin, zostało potwierdzone w brodawkach korzeniowych roślin z rodziny bobowatych (Fabaceae), rozwijających się owocach pomidora oraz w liściach, trichomach i korzeniach *A. thaliana* (VINARDELL i współaut. 2003, LARSON-RABIN i współaut. 2009, VANSTRAELEN i współaut. 2009, KASILI i współaut. 2010, CHEVALIER i współaut. 2011). Utrata funkcji genu *ccs52A* powoduje obniżenie poziomu endoreduplikacji, a jego nadekspresja powoduje jego zwiększenie (DE VEYLDER i współaut. 2011). Potwierdzeniem udziału genu *ccs52A* w procesie endoreduplikacji, są badania jego ekspresji podczas rozwoju brodawek korzeniowych *Medicago truncatula*, lucerny siewnej (*Medicago sativa*), łubinu białego (*Lupinus albus*) i *Lotus japonicus* (CEBOLLA i współaut. 1999, VINARDELL i współaut. 2003, GONZÁLEZ-SAMA i współaut. 2006). Zaobserwowano, że ekspresja genu *CCS52A* wzrasta w czasie różnicowania się komórek brodawki i jest pozytywnie skorelowana z poziomem endopoliploidalności oraz wielkością tych komórek (CEBOLLA i współaut. 1999). Obni-

żenie ekspresji tego genu u roślin *M. truncatula* spowodowało zaburzenia w rozwoju brodawek korzeniowych: obniżenie poziomu endopoliploidalności symbiotycznych komórek, zmniejszenie ich rozmiarów, niewystarczającą infekcję bakteriami oraz szybsze starzenie się brodawek i ich zamieranie (VINARDELL i współaut. 2003). U *A. thaliana* wykazano, że białko CCS52A jest pozytywnym regulatorem endoreduplikacji, a mutacje w jego genie również powodują obniżenie endopoliploidalności i rozmiarów komórki. Ponadto wykazano, że w genomie *A. thaliana* występują dwie kopie tego genu: *CCS52A1* i *CCS52A2*. Dowiedziono, że *CCS52A2* odpowiada za przejście z cyklu mitotycznego do endoreduplikacyjnego oraz za wystąpienie pierwszego endocyklu (4C→8C), a *CCS52A1* za wystąpienie kolejnych endocykli (>8C) (BALOBAN i współaut. 2013). Podczas rozwoju liści *A. thaliana* zaobserwowano, że najpierw wzrasta ekspresja *CCS52A2*, a podczas dalszego rozwoju liści, również *CCS52A1* (BALOBAN i współaut. 2013). Potwierdzeniem udziału genu *ccs52A* w procesie endoreduplikacji są również badania owoców pomidora, gdzie podczas zwiększania rozmiarów komórek owocni zaobserwowano wzrost ekspresji genu *CCS52A* wraz ze wzrostem intensywności endoreduplikacji (MATHIEU-RIVET i współaut. 2010). Świadczy to o ważnej roli genu *ccs52A* i powiązanego z nim szlaku proteolizy białek cyklu komórkowego w regulacji endoreduplikacji na etapie przejścia przez punkt kontrolny G₂/M (VINARDELL i współaut. 2003, BALOBAN i współaut. 2013).

SAMBA, kolejny specyficzny dla roślin aktywator kompleksu APC/C, został zidentyfikowany jako negatywny regulator cyklu mitotycznego podczas embriogenezy i wczesnego rozwoju siewki (ELOY i współaut. 2012). Działanie tego białka polega na fizycznej interakcji z CYCA2, która skutkuje ich degradacją. Inaktywacja genu *SAMBA* powoduje stabilizację poziomu CYCA i zwiększenie liczby cykli mitotycznych, co objawia się powiększeniem regionu merystematycznego, zwiększeniem rozmiarów nasion, liści i korzeni, ale również występowaniem defektów podczas tworzenia gamet męskich. Co ciekawe, mutacja w tym genie nie wpływa negatywnie na poziom endoreduplikacji w liściach, a wręcz przeciwnie, powoduje że mutanty *samba* mają wyższy poziom endopoliploidalności w tym organie niż rośliny typu dzikiego (ELOY i współaut. 2012). Do inhibitorów APC/C specyficznych dla roślin należy natomiast białko UVI4 (ang. *ultraviolet-b-insensitive 4*), które poprzez bezpośrednią interakcję z *CCS52A1* blokuje aktywność APC/C, hamując destrukcję CYCA2;3. Prowadzi to do stabilizacji cyklu mitotycznego

i zapobiega wystąpieniu endoreduplikacji. Mutacja w genie *uvi4* prowadzi natomiast do zablokowania mitozy i przejścia do cyklu endoreduplikacyjnego (HEYMAN i DE VEYLDER 2012).

Aktywność MPF może być również zahamowana na poziomie potranslacyjnym poprzez interakcję CDK z ich inhibitorami ICK/KRP. Białka te wiążą się z kompleksami CDK/CYC, hamując aktywność kinazy, przy czym poszczególne białka należące do rodziny ICK/KRP wykazują specyficzność względem różnych kompleksów CDK/CYC (Ryc. 2) (WANG i współaut. 2007). W roślinach *A. thaliana* wykazujących silną nadekspresję genów *ICK/KRP*, poziom endopoliploidalności ulega redukcji, natomiast w liniach wykazujących umiarkowaną ekspresję endopoliploidalność wzrasta (DE VEYLDER i współaut. 2001, WEINL i współaut. 2005, WANG i współaut. 2008). Najprawdopodobniej, działanie ICK/KRP uzależnione jest od ich stężenia; w pierwszej kolejności wiążą się z mitotycznymi kompleksami CDK/CYC blokując mitozę i stymulując wystąpienie endoreduplikacji. Jeśli natomiast występują w nadmiarze, wiążą się również z kompleksami CDK/CYC fazy S, blokując zarówno mitozę, jak i endoreduplikację (WANG i współaut. 2007, DE VEYLDER i współaut. 2011). Wykazano również, że białka ICK2/KRP2 są fosforylowane przez CDKB, co powoduje skierowanie ich do proteolitycznej degradacji, i w następstwie, utrzymanie wysokiego poziomu CDKA wymaganego do zajścia mitozy. Natomiast, gdy aktywność CDKB spada, białko ICK2/KRP2 jest zdolne do inaktywacji CDKA, co powoduje wystąpienie endoreduplikacji (BISBIS i współaut. 2006). Dane te potwierdzają udział ICK/KRP w zmianie cyklu mitotycznego na endoreduplikacyjny. Chociaż ekspresję genów *ICK/KRP* wykryto w większości tkanek roślinnych, obserwuje się zróżnicowanie w ekspresji poszczególnych rodzajów *ICK/KRP*. Na przykład, ekspresja *ICK1/KRP1* i *ICK2/KRP2* zachodzi w tkankach, w których występuje endoreduplikacja, ale nie w apikalnym merystemie pędu i tkance naczyniowej, ekspresja genu *KRP3* zachodzi w tkankach aktywnych metabolicznie, ale nie w korzeniach i kwiatach, natomiast ekspresję genów *KRP4* i *KRP5* obserwuje się głównie w proliferujących komórkach (ORMENESE i współaut. 2004). Podczas rozwoju owocu pomidora najwyższa ekspresja genu *KRP1* zbiega się z zakończeniem fazy intensywnych podziałów mitotycznych i wystąpieniem cykli endoreduplikacyjnych, a z kolei najwyższa ekspresja *KRP2* występuje w fazie dojrzewania (BISBIS i współaut. 2006). Może to sugerować udział różnych genów *ICK/KRP* w cyklu mitotycznym i endoreduplikacyjnym,

w zależności od typu sygnału rozwojowego bądź środowiskowego (ORMENESE i współaut. 2004).

Podobne działanie wykazują białka SIAMESE (SIM) i SIAMESE-RELATED PROTEINS (SMR), posiadające miejsce wiązania CDK i CYC, których funkcją jest zablokowanie mitozy i stymulacja endoreduplikacji (OKELLO i współaut. 2016). Ekspresja genu *SIM* została wykryta w trichomach oraz w strefie elongacyjnej korzenia *A. thaliana* (WALKER i współaut. 2000, CHURCHMAN i współaut. 2006). W badaniach trichomów *A. thaliana* mutacja genu *SIM* spowodowała stymulację podziałów komórkowych i, w efekcie, powstanie wielokomórkowych trichomów o zredukowanym poziomie endopoliploidalności, w porównaniu do typu dzikiego. Z kolei zwiększona ekspresja *SIM* spowodowała powstanie dużych, wysoko-endopoliploidalnych komórek liści (CHURCHMAN i współaut. 2006). Sugeruje to, że produkt genu *SIM* jest represorem mitozy, umożliwiającym zajście endoreduplikacji (WALKER i współaut. 2000). Najprawdopodobniej *SIM*, wspólnie z *CCS52A1*, prowadzi do obniżenia ilości CYC mitotycznych, co skutkuje wystąpieniem endoreduplikacji w trichomach *A. thaliana* (KASILI i współaut. 2010). Przypuszcza się, że *SIM* blokuje transkrypcję CYC mitotycznych, jednakże do tej pory nie ustalono w jaki sposób - być może poprzez inhibicję fosforylacji czynników transkrypcyjnych MYB3R lub innych czynników transkrypcyjnych fazy G_2/M . Akumulacja białek *SIM* blokuje rozpoczęcie transkrypcyjnego programu G_2/M , a ekspresja *ccs52A1* dodatkowo wzmacnia blokadę wywołaną przez *SIM* i zabezpiecza niski poziom CDK, aby mogła zajść ponowna replikacja DNA (KASILI i współaut. 2010).

Aktywność mitotycznych CDK może być również zredukowana poprzez kinazę *WEE1*. Ekspresję genu *WEE1* wykryto zarówno w dzielących się komórkach liści, korzeni oraz kwiatach *A. thaliana* i kukurydzy, jak i w endopoliploidalnych komórkach owocu pomidora i bielma kukurydzy (SUN i współaut. 1999b; GONZALEZ i współaut. 2004, 2007). Wykazano, że białko *WEE1* przyłącza się do kompleksów CDKA/CYCB, negatywnie regulując ich aktywność poprzez fosforylację CDKA, która powoduje zablokowanie wiązania ATP i rozpoznawania substratu przez te białka (DE SCHUTTER i współaut. 2007). DE SCHUTTER i współaut. (2007), analizując mutant *A. thaliana* pozbawionego genu *WEE1* zaobserwowali, że gdy rośliny rosną w optymalnych warunkach, nie obserwuje się żadnych zaburzeń ani w cyklu mitotycznym, ani w endoreduplikacyjnym. Udowodniono jednak, że gen *WEE1* jest aktywowany podczas uszkodzenia DNA i że jego funkcją jest

zabezpieczenie komórki przed rozpoczęciem mitozy zanim naprawa i replikacja DNA się zakończy. Zarówno w rozwijających się owocach pomidora, jak i w bielmie kukurydzy, ekspresja *WEE1* występuje na początku rozwoju w fazie aktywnych podziałów, jednak znacząco wzrasta, kiedy następują intensywne cykle endoreduplikacyjne i powiększanie się komórek tych tkanek (SUN i współaut. 1999b, GONZALEZ i współaut. 2004, CHEVALIER i współaut. 2011). Analiza cytometryczna owoców pomidora, w których zmniejszona została ekspresja genu *WEE1*, wykazała zmniejszenie udziału endopoliploidalnych komórek, co w efekcie doprowadziło do zmniejszenia rozmiaru owoców. W porównaniu do roślin typu dzikiego, w owocni roślin ze zmniejszoną ekspresją genu *WEE1* nie zaobserwowano obecności jąder 64C, a udział jąder 16C i 32C zmniejszył się z 61% do 34%. Wykazano również, że zmniejszenie ekspresji genu *WEE1* nie wpływa na proces mitozy, ponieważ liczba warstw komórek owocni nie uległa zmianie (GONZALEZ i współaut. 2007). Wyniki te sugerują, że *WEE1* bierze udział w regulacji endoreduplikacji, zabezpieczając przed przedwczesnym rozpoczęciem kolejnego endocyklu, oraz odpowiada za długość fazy G determinując wielkość komórki (SUN i współaut. 1999b, GONZALEZ i współaut. 2007, COOK i współaut. 2013).

Po zablokowaniu mitozy, w procesie endoreduplikacji musi nastąpić aktywacja replikacji DNA, czyli przejście z fazy G do fazy S cyklu komórkowego. Przeprowadzone badania sugerują, że główną rolę w regulacji tego przejścia odgrywa szlak RBR1/E2F/DP (DE VEYLDER i współaut. 2003). Szlak ten kontroluje ekspresję szeregu genów fazy S i odgrywa kluczową rolę w regulacji endoreduplikacji (SABELLI i LARKINS 2009). Defosforylowane białko RBR1 wiąże czynniki transkrypcyjne E2F-DP, które są ważnymi regulatorami genów niezbędnych do syntezy DNA, blokując tym samym ich aktywność i syntezę DNA. Po fosforylacji RBR1 przez kompleks CDKA/CYCD następuje jego inaktywacja i uwolnienie czynników transkrypcyjnych E2Fa/DP, które powodują ekspresję genów fazy S takich jak: *ORC*, *MCM*, *CDC6a* i *CDT1*, odpowiadających za inicjację replikacji DNA (Ryc. 2) (DE VEYLDER i współaut. 2003, DE ALMEIDA ENGLER i współaut. 2009). Obniżenie ekspresji *RBR1* u *A. thaliana* i tytoniu powoduje przedłużenie fazy proliferacji, wzrost ekspresji *E2Fa* oraz specyficzną stymulację endoreduplikacji w różnicujących się organach/tkankach (SABELLI i LARKINS 2009). Również zwiększenie ekspresji czynników transkrypcyjnych, takich jak *E2Fa* i *DPa*, stymuluje proces endoreduplikacji (DE VEYLDER i współaut. 2011).

WYSTĘPOWANIE KOLEJNYCH ENDOCYKLI

W przeciwieństwie do coraz lepszego poznania mechanizmów inicjacji endoreduplikacji, stosunkowo niewiele wiadomo, w jaki sposób proces endoreduplikacji jest kontynuowany. Prawdopodobnie, każda runda endoreduplikacji wymaga zmieniającego się na przemian niskiego i umiarkowanego poziomu aktywności CDK. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że istotną rolę w zachodzeniu kolejnych endocykli odgrywają CDKA (DE VEYLDER i współaut. 2011). Potwierdzają to badania mutantu *cdka;1 A. thaliana*, w którym występuje zwiększona liczba komórek w fazie G_1 , przy jednoczesnym zmniejszeniu intensywności endoreduplikacji (DIS-SMEYER i współaut. 2009). Za kontynuację występowania endocykli (>8C) najprawdopodobniej odpowiada również gen *ccs52A1*, zidentyfikowany podczas rozwoju liści *A. thaliana*, którego ekspresja wzrasta podczas dalszego rozwoju liści, po tym jak endoreduplikacja zostanie zainicjowana przez *ccs52A2* (BALOBAN i współaut. 2013).

Prawdopodobnymi kandydatami, biorącymi udział w zachodzeniu kolejnych endocykli, są również białka z rodziny ICK/KRP, które wiążą kompleksy CDKA/CYCD. Nadekspresja *ICK1/KRP1* lub *ICK2/KRP2* u *A. thaliana* w komórkach aktywnych mitotycznie powoduje zablokowanie podziałów komórkowych i stymuluje endoreduplikację (WEINL i współaut. 2005). Natomiast nadekspresja tych genów w komórkach postmitotycznych hamuje endoreduplikację (DE VEYLDER i współaut. 2001). Najprawdopodobniej ten podwójny efekt wynika z tego, że sposób działania ICK/KRP jest uzależniony od ich stężenia; niskie stężenie powoduje zablokowanie cyklu mitotycznego i stymulację endoreduplikacji, natomiast za wysokie blokuje również endoreduplikację.

Badania karłowatych mutantów *A. thaliana*, które mają mutacje w podjednostkach topoizomery VI wykazują również, że enzym ten jest niezbędny do zajścia kolejnych endocykli (> 8C) (KIRIK i współaut. 2007). Jednak dokładny mechanizm działania i jego funkcja podczas endoreduplikacji nie są do końca poznane.

TERMINACJA ENDOREDUPLIKACJI

Większość zidentyfikowanych regulatorów endoreduplikacji bierze udział w inicjacji endoreduplikacji i nie jest wiadomo, czy istnieje mechanizm, który odpowiada za terminację czy też zablokowanie endocykli. Wyniki badań wskazują na możliwe zaangażowanie kilku białek w proces terminacji endoredu-

plikacji. IMAI i współaut. (2006), badający mutanty *cycA2;3 A. thaliana* wykazali, że CYCA2;3 tworzy kompleks z CDKA1, który jest zaangażowany w terminację endoreduplikacji, najprawdopodobniej przez obniżenie aktywności kompleksów replikacyjnych. Co więcej, w trichomach *A. thaliana* został zidentyfikowany czynnik transkrypcyjny GTL1 (GT-2-LIKE1), który może również odpowiadać za terminację endocykli. W normalnych warunkach ekspresja *GTL1* zachodzi dopiero, gdy trichomy wytworzą rozgałęzienia i osiągają maksymalną wielkość. Utrata funkcji tego genu nie wpływa na powstawanie i rozgałęzianie się trichomów, ale prowadzi do wystąpienia dodatkowej rundy endoreduplikacji i przedłużonego wzrostu trichomów. Mutacja w genie *GTL1* modyfikuje ekspresję regulatorów cyklu komórkowego, wpływając w ten sposób na terminację występowania endocykli. Ekspresję genu *GTL1* zaobserwowano również w późnych fazach różnicowania się tkanek, w korzeniach i płatkach kwiatów *A. thaliana* (BREUER i współaut. 2010).

PODSUMOWANIE

Liczne badania procesu endoreduplikacji pozwoliły w dużym stopniu poznać ten powszechny w świecie roślin proces. Jednak nadal nie ustalono jego funkcji i nie jest wiadomo dlaczego u jednych roślin endoreduplikacja występuje, a u innych nie. Dopiero dokładne poznanie mechanizmów molekularnych i czynników regulujących endoreduplikację pozwoli odpowiedzieć na te pytania. Co więcej, poznanie mechanizmów molekularnych endoreduplikacji umożliwi skuteczną manipulację genetyczną tym procesem, co może mieć duże znaczenie w hodowli roślin w celu zwiększenia plonu oraz jakości produktów rolniczych.

PODZIĘKOWANIA

Autorka serdecznie dziękuje prof. dr hab. inż. Elwirze Śliwińskiej oraz dr inż. Iwonie Jędrzejczyk (Zakład Biologii Molekularnej i Cytometrii, UTP w Bydgoszczy), za cenne uwagi i wskazówki podczas przygotowywania niniejszej pracy.

Streszczenie

Proces endoreduplikacji stanowi alternatywną formę cyklu komórkowego, podczas której następuje amplifikacja jądrowego DNA, po której nie zachodzi jednak mitozy i podział komórki. Mechanizm molekularny tego procesu w dużej mierze opiera się na białkach uczestniczących w typowym cyklu komórkowym i polega na zablokowaniu mitozy wraz z ponownym zainicjowaniem replikacji DNA. W endoreduplikacji ważną rolę odgrywają kinazy zależne od cyklin oraz ich białka regulatorowe – cykliny. Podczas tego procesu aktywność tych białek jest regulowana

na poziomie transkrypcyjnym i potranslacyjnym. Zmiana aktywności kinaz zależnych od cyklin może wynikać ze zmniejszenia dostępności cyklin w wyniku zablokowania ich transkrypcji oraz ze zmian statusu fosforylacji kinaz zależnych od cyklin. Może być również negatywnie regulowana poprzez fosforylację podjednostki kinazy zależnej od cyklin przez kinazę WEE1 oraz poprzez interakcje z inhibitorami kinaz zależnych od cyklin. Regulacja na poziomie potranslacyjnym polega natomiast na ukierunkowanej destrukcji cyklin przez kompleks promujący anafazę/cyklosom. Szczegółowe omówienie mechanizmów molekularnych tego procesu zostało przedstawione w poniższym artykule.

LITERATURA

- BALOBAN M., VANSTRAELEN M., TARAYRE S., REZEZEAU C., CULTRONE A., MERGAERT P., KONDOROSI E., 2013. *Complementary and dose-dependent action of AtCCS52A isoforms in endoreduplication and plant size control*. *New Phytol.* 198, 1049-1059.
- BAROW M., MEISTER A., 2003. *Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size*. *Plant Cell, Environ.* 26, 571-584.
- BISBIS B., DELMAS F., JOUBÉS J., SICARD A., HERNOULD M., INZÉ D., MOURAS A., CHEVALIER C., 2006. *Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors regulate the CDK-Cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit*. *J. Biol. Chem.* 281, 7374-7383.
- BONIOTTI M. B., GRIFFITH M. E., 2002. *“Cross-talk” between cell division cycle and development in plants*. *Plant Cell* 14, 11-16.
- BRAMSIEPE J., WESTER K., WEINL C., ROODBARKE-LARI F., KASILI R., LARKIN J. C., HÜLSKAMP M., SCHNITTGER A., 2010. *Endoreduplication controls cell fate maintenance*. *PLoS Genet.* 6, e1000996.
- BREUER C., ISHIDA T., SUGIMOTO K., 2010. *Developmental control of endocycles and cell growth in plants*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 654-660.
- BREUER C., BRAIDWOOD L., SUGIMOTO K., 2014. *Endocycling in the path of plant development*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 78-85.
- CEBOLLA A., VINARDELL J. M., KISS E., OLÁH B., ROUDIER F., KONDOROSI A., KONDOROSI E., 1999. *The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants*. *EMBO J.* 18, 4476-4484.
- CHEVALIER C., NAFATI M., METHIEU-RIVET E., BPURDON M., FRANGNE N., CHENICLET C., RENAUDIN J.-P., GÉVAUDANT F., HERNOULD M., 2011. *Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development*. *Ann. Bot.* 107, 1159-1169.
- CHURCHMAN M. L., BROWN M. L., KATO N., KIRIK V., HÜLSKAMP M., INZÉ D., DE VEYLDER L., WALKER J. D., ZHENG Z., OPPENHEIMER D. G., GWIN T., CHURCHMAN J., LARKIN J. C., 2006. *SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreduplication onset in Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18, 3145-3157.
- COOK G. S., LENTZ GRÖNLUND A., SICILIANO I., SPADAFORA N., AMINI M., HERBERT R. J., BITONTI M. B., GRAUMANN K., FRANCIS D., ROGERS H. J., 2013. *Plant WEE1 kinase is cell cycle regulated and removed at mitosis via the 26S proteasome machinery*. *J. Exp. Bot.* 64, 2093-2106.

- D'AMATO F., 1984. *Role of polyploidy in reproductive organs and tissue*. [W:] *Embryology of angiosperms*. JOHRI B. M (red.). Springer, Berlin/Heidelberg/New York, 519-566.
- DE ALMEIDA ENGLER J., DE VEYLDER L., DE GROODT R., ROMBAUTS S., BOUDOLF V., DE MAYER B., HEMERLY A., FERREIRA P., BEECKMAN T., KARIMI M., HILSON P., INZÉ D., ENGLER G., 2009. *Systematic analysis of cell-cycle gene expression during Arabidopsis development*. *Plant J.* 59, 645-660.
- DECKERT J., 2000. *Regulacja genów cyklu komórkowego roślin*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
- DE SCHUTTER K., JOUBÉS J., COOLS T., VERKEST A., CORELLOU F., BABIYCHUK E., VAN DER SCHUEREN BEECKMAN T., KUSHNIR S., INZÉ D., DE VEYLDER L., 2007. *Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint*. *Plant Cell* 19, 211-225.
- DE VEYLDER L., BEECKMAN T., BEEMSTER G. T. S., KROLS L., TERRAS F., LANDRIEU I., VAN DER SCHUEREN E., MAES S., NAUDTS M., INZÉ D., 2001. *Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1653-1668.
- DE VEYLDER L., JOUBÉS J., INZÉ D., 2003. *Plant cell cycle transitions*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 536-543.
- DE VEYLDER L., LARKIN J. C., SCHNITTGER A., 2011. *Molecular control and function of endoreduplication in development and physiology*. *Trends Plant Sci.* 16, 624-634.
- DISSMEYER N., WEIMER A. K., PUSCH S., DE SCHUTTER K., ALVIM KAMEI C. L., NOWACK M. K., NOVAK B., DUAN G. L., ZHU Y. G., DE VEYLDER L., SCHNITTGER A., 2009. *Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the Arabidopsis Cdk1 homolog CDKA;1*. *Plant Cell* 19, 3641-3654.
- ELOY N. B., GONZALEZ N., VAN LEENE J., MALEUX K., VANHAEREN H., DE MILDE L., DHONDT S., VERCRUYSE L., WITTERS E., MERCIER R., CROMER L., BEEMSTER G. T. S., REMAUT H., VAN MONTAGU M. C. E., DE JAEGER G., FERREIRA P. C. G., INZÉ D., 2012. *SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 13853-13858.
- ELOY N. B., DE FREITAS LIMA M., FERREIRA P. C. G., INZÉ D., 2015. *The Role of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Plant Growth*. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 487-505.
- GONZALEZ N., HERNOULD M., DELMAS F., GÉVAUDANT F., DUFFE P., CAUSSE M., MOURAS A., CHEVALIER C., 2004. *Molecular characterization of a WEE1 gene homologue in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.)*. *Plant Mol. Biol.* 56, 849-861.
- GONZÁLEZ-SAMA A., COBA DE LA PENA T., KEVEI Z., MERGAERT P., LUCAS M. M., DE FELIPE M. R., KONDOROSI E., PUEYO J. J., 2006. *Nuclear DNA endoreduplication and expression of the mitotic inhibitor Ccs52 associated to determine and lupinoid nodule organogenesis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 173-180.
- GONZALEZ N., GÉVAUDANT F., HERNOULD M., CHEVALIER C., MOURAS A., 2007. *The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit*. *Plant J.* 51, 642-655.
- HEYMAN J., DE VEYLDER L., 2012. *The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in control of plant development*. *Mol. Plant* 5, 1182-1194.
- IMAI K. K., OHASHI Y., TSUGE T., YOSHIZUMI T., MATSUI M., OKA A., AOYAMA T., 2006. *The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in Arabidopsis endoreduplication*. *Plant Cell* 18, 382-396.
- INZÉ D., DE VEYLDER L., 2006. *Cell cycle regulation in plant development*. *Ann. Rev. Genet.* 40, 77-105.
- JOHN P. C. L., QI R., 2008. *Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth*. *Trends Plant Sci.* 13, 121-127.
- JOUBÉS J., CHEVALIER C., 2000. *Endoreduplication in higher plants*. *Plant Mol. Biol.* 43, 737-747.
- KASILI R., WALKER J. D., SIMMONS L. A., ZHOU J., DE VEYLDER L., LARKIN J. C., 2010. *SI-MESE cooperates with the CDH1-like protein CCS52A1 to establish endoreduplication in Arabidopsis thaliana trichomes*. *Genetics* 185, 257-268.
- KIRIK V., SCHRADER A., UHRIG J. F., HULSKAMP M., 2007. *MIDGET unravels functions of the Arabidopsis topoisomerase VI complex in DNA endoreduplication, chromatin condensation, and transcriptional silencing*. *Plant Cell* 19, 3100-3110.
- KRAWCZYK J., WĄSEK I., 2011. *Endoreduplikacja jako jeden z mechanizmów zmiany ilości jądrowego DNA w komórce roślinnej*. *Wiadomości Botaniczne* 55, 7-22.
- KUDO N., KIMURA Y., 2001. *Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some Brassica species*. *Theor. Appl. Genet.* 102, 104-110.
- LARSON-RABIN Z., LI Z., MASSON P. H., DAY C. D., 2009. *FZR2/CCS52A1 expression is a determinant of endoreduplication and cell expansion in Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149, 874-884.
- LI C., POTUSCHAK T., COLÓN-CARMONA A., GUTIÉRREZ R., DOERNER P., 2005. *Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12978-12983.
- LI Z.-Y., LI B., DONG A.-W., 2012. *The Arabidopsis transcription factor AtTCP15 regulates endoreduplication by modulating expression of key cell cycle genes*. *Mol. Plant* 5, 270-280.
- LIMA M. DE F., ELOY N. B., PEGORARO C., SAGIT R., ROJAS C., BRETZ T., VARGAS L., ELOFSSON A., COSTA DE OLIVEIRA A., HEMERLY A. S., FERREIRA P. C. G., 2010. *Genomic evolution and complexity of the Anaphase-Promoting Complex (APC) in land plants*. *BMC Plant Biol.* 10, 254.
- MATHIEU-RIVET E., GÉVAUDANT F., CHENICKLET C., HERNOULD M., CHEVALIER C., 2010. *The anaphase promoting complex activator CC-S52A, a key factor for fruit growth and endoreduplication in tomato*. *Plant Signaling Behav.* 5, 985-987.
- MALUSZYNSKA J., KOLANO B., SAS-NOWOSIELSKA H., 2013. *Endopoliploidy in plants*. [W:] *Plant genome diversity. Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. LEICH I. J. (red.). Springer-Verlag Wien 2, 99-119.
- MISHIBA K., MII M., 2000. *Polysomaty analysis in diploid and tetraploid Portulaca grandiflora*. *Plant Sci.* 156, 213-219.
- NAGL W., 1976. *DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies*. *Nature* 261, 614-615.
- OKELLO R. C. O., DE VISSER P. H. B., HEUVELINK E., MARCELIS L. F. M., STRUIK P. C., 2016. *Light mediated regulation of cell division, en-*

- doreduplication and cell expansion. *Environ. Exp. Bot.* 121, 39-47.
- ORMENESE S., DE ALMEIDA ENGLER J., DE GROODT R., DE VEYLDER L., INZÉ D., JACQARD A., 2004. *Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip Related Proteins (KRPs) in the shoot apex of Arabidopsis thaliana.* *Ann. Bot.* 93, 575-580.
- REWERS M., ŚLIWIŃSKA E., 2012. *Endoreduplication intensity as a marker of seed developmental stage in the Fabaceae.* *Cytometry Part A* 81, 1067-1075.
- REWERS M., ŚLIWIŃSKA E., 2014. *Endoreduplication in the germinating embryo and young seedling is related to the type of seedling establishment but is not coupled with superoxide radical accumulation.* *J. Exp. Bot.* 65, 4385-4396.
- SABELLI P. A., LARKINS B. A., 2009. *Regulation and function of retinoblastoma-related plant genes.* *Plant Sci.* 177, 540-548.
- SCHNITTGER A., SCHÖBINGER U., STIERHOF Y.-D., HÜLSKAMP M., 2002. *Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating Arabidopsis trichomes.* *Curr. Biol.* 12, 415-420.
- SMULDERS M. J. M., RUS-KORTEEKAS W., GILISSEN L. J. W. 1994. *Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (Lycopersicon esculentum) plants.* *Plant Sci.* 97, 53-60.
- SUGIMOTO-SHIRASU K., ROBERTS K., 2003. *"Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants.* *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 554-553.
- SUN Y., FLANNIGAN B. A., SETTER T. L., 1999a. *Regulation of endoreduplication in maize (Zea mays L.) endosperm. Isolation of a novel B1-type cyclin and its quantitative analysis.* *Plant Mol. Biol.* 41, 245-258.
- SUN Y., DILKES B. P., ZHANG C., DANTE R. A., CARNEIRO N. P., LOWE K. S., JUNG R., GORDON-KAMM W. J., LARKINS B. A., 1999b. *Characterization of maize (Zea mays L.) Wee1 and its activity in developing endosperm.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4180-4185.
- ŚLIWIŃSKA E., 2008. *Zastosowanie cytometrii przepływowej do oznaczania DNA zawartości DNA u roślin.* *Post. Biol. Kom.* 35, 165-176.
- ŚLIWIŃSKA E., ŁUKASZEWSKA E., 2005. *Polysomaty in growing in vitro sugar beet (Beta vulgaris) seedlings of different ploidy level.* *Plant Sci.* 168, 1067-1074.
- VANDEPOELE K., RAES J., DE VEYLDER L., ROUZE P., ROMBAUTS S., INZÉ D., 2002. *Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis.* *Plant Cell* 14, 903-916.
- VANSTRAELEN M., BALOBAN M., DA INES O., CULTRONE A., LAMMENS T., BOUDOLF V., BROWN S.C., DE VEYLDER L., MERGAERT P., KONDOROSI E., 2009. *APC/CCSS2A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 11806-11811.
- VINARDELL J. M., FEDOROVA E., CEBOLLA A., KEVEI Z., HORVATH G., KELEMEN Z., TARAYRE S., ROUDIER F., MERGAERT P., KONDOROSI A., KONDOROSI E., 2003. *Endoreduplication mediated by the Anaphase-Promoting Complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in Medicago truncatula nodules.* *Plant Cell* 15, 2093-2105.
- WALKER J. D., OPPENHEIMER D. G., CONCINNE J., LARKIN J. C., 2000. *SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in Arabidopsis thaliana trichomes.* *Development* 127, 3931-3940.
- WANG G., KONG H., SUN Y., ZHANG X., ZHANG W., ALTMAN N., DEPAMPHILIS C. W. MA H., 2004. *Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins.* *Plant Physiol.* 135, 1084-1099.
- WANG H., ZHOU Y., TORRES-ACOSTA L., FOWKE L. C., 2007. *CDK inhibitors. [W:] Cell cycle control and plant development.* INZÉ D. (red.). Blackwell Publishing, Oxford, 62-86.
- WANG H., ZHOU Y., BIRD D. A., FOWKE L. C., 2008. *Functions, regulations and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors.* *J. Microsc.* 231, 234-246.
- WEINL C., MARQUARDT S., KUIJT S. J. H., NOWACK M. K., JAKOBY M. J., HÜLSKAMP M., SCHNITTGER A., 2005. *Novel functions of plant Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis.* *Plant Cell* 17, 1704-1722.

KOSMOS Vol. 66, 3, 475–485, 2017

MONIKA REWERS

Laboratory of Molecular Biology and Cytometry, Department of Plant Genetics, Physiology and Biotechnology, UTP University of Science and Technology, Kaliskiego Ave. 7, 85-796 Bydgoszcz, E-mail: mrewers@utp.edu.pl

MOLECULAR MECHANISM OF ENDOREDUPPLICATION IN HIGHER PLANTS

Summary

Endoreduplication represents an alternative form of the cell cycle in which nuclear DNA amplification occurs, but it is not followed by mitosis and cell division. The molecular mechanism of this process is largely based on proteins involved in typical cell cycle and involves block of mitosis and re-initiation of DNA replication. Cyclin-dependent kinases and their regulatory proteins – cyclins are the key components of endoreduplication. During the process, activity of these proteins is regulated at the transcriptional and post-translational levels. Changes in the activity of cyclin dependent kinases may be due to a reduced availability of cyclins resulting from blocking of respective genes transcription and to changes in the status of cyclin-dependent phosphorylation of kinases. It can be also negatively regulated by phosphorylation of the cyclin-dependent kinase subunit by kinase WEE1, and by interaction with inhibitors of cyclin dependent kinases. Post-translational regulation occurs *via* targeted destruction of cyclins by the anaphase promoting complex/cyclosome. A detailed discussion of the molecular mechanism of these processes is presented in this article.

Key words: CDK, cyclins, endocycle, endopolyploidy, polysomaty