

STRES REPLIKACYJNY A WEWNĘTRZNY PUNKT KONTROLNY FAZY S*

DNA-REPLICATION STRESS AND THE INTRA-S-PHASE CHECKPOINT

Dorota RYBACZEK, Magdalena GRAŻUL

Katedra Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

Streszczenie: Wiele programów badawczych koncentruje się na poznaniu mechanizmu działania wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S, który nadzoruje zarówno procesy związane z częstością inicjacji replikacji DNA (gęstość regionów *origin*), jak i z ruchem widełek replikacyjnych (tempo elongacji). Tempo replikacji maleje w odpowiedzi na działanie hydroksymocznika, afidikoliny lub czynników uszkadzających DNA. Zmniejszenie szybkości replikacji jest spowodowane zaktywowaniem szlaków biochemicznych związanych z wewnętrznym punktem kontrolnym fazy S. Funkcją wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S jest: (1) spowalnianie tempa lub blokowanie ruchu widełek replikacyjnych, (2) zapobieganie przedwczesnemu uruchamianiu późnych *origin*, (3) inicjowanie szlaków sygnałowych związanych z odpowiedzią na wystąpienie defektów strukturalnych DNA, w celu uniemożliwienia replikacji uszkodzonych cząsteczek DNA, a także (4) opóźnianie wejścia w mitozę, do momentu zaprzestania działania bodźca stresowego. W pracy przedstawiono najnowsze informacje dotyczące kinaz białkowych ATR, ATM, Chk1 i Chk2 zaangażowanych w kontrolę fazy S, opisano aktualny stan wiedzy o pozostałych białkach uczestniczących w reakcjach związanych z odpowiedzią na stres replikacyjny oraz dodatkowo podjęto próbę wyjaśnienia ich wzajemnych korelacji. Kinazy białkowe ATM i ATR należą do rodziny kinaz 3-fosfatydylinozytolu. Pomimo wykazania istotnej roli, jaką pełnią kinazy ATM i ATR w szlakach sygnałowych cyklu komórkowego, nadal niewiele wiadomo o mechanizmach aktywacji tych kinaz. Ufosforylowane kinazy ATM i ATR aktywują podległe im białka docelowe (kinazy Chk2 i Chk1) poprzez ich fosforylowanie na resztach serynowych i treoninowych. Dwuniciowe pęknięcia DNA aktywują kinazę ATM, która fosforyluje na N-końcu podległą jej kinazę Chk2 (Thr68). Fosforylacja treoniny 68 jest warunkiem niezbędnym do pełnego zaktywowania kinazy Chk2, które przypisywane jest procesowi jej autofosforylacji, dokonywanej na treoninach 383 i 387. Kinaza ATR jest aktywowana w odpowiedzi na stres replikacyjny lub uszkodzenia DNA wywołane wpływem promieniowania UV. Po zaktywowaniu, dokonuje fosforylacji kinazy Chk1 na resztach serynowych: Ser317 i Ser345. Fosforylacja seryny 345 wzmaga szybkie lokalizowanie kinazy Chk1 na obszarze jądra komórkowego, podczas aktywacji punktu kontrolnego. Stan ufosforylowania seryny 317 gwarantuje zablokowanie przejścia S→G2 i zapobiega wchodzeniu w mitozę, w warunkach zaburzonego przebiegu replikacji DNA. W niektórych sytuacjach, warunkowanych rodzajem działającego bodźca stresowego, kinazy

*Praca finansowana z grantu MNiSW Nr N N303 355935.

sensoryczne ATM i ATR mogą fosforylować wspólne białka docelowe. Ufosforylowana aktywująca kinaza Chk1 oddaje grupy fosforanowe fosfatazom białkowym Cdc25A-C, co prowadzi do zablokowania kinaz Cdk1 i Cdk2, a w konsekwencji do zatrzymania przebiegu cyklu komórkowego. Kinaza Chk1 może także stabilizować widelki replikacyjne, prawdopodobnie poprzez nakierowywanie białek Cdc6 i MCM2-7 oraz – po ustąpieniu działania bodźca stresowego – ponownie je uruchamiać. Funkcjonalna zmienność białek tworzących oś ATM/ATR-Chk2/Chk1-Cdc25/Cdk stanowi molekularny fundament wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S. Substratem podległym kinazie ATR jest także histon H2AX, fosforylowany na serynie 139. Po wystąpieniu w DNA uszkodzeń typu dwuniciowych pęknięć, liczne cząsteczki histonów H2AX, ufosforylowanych na Ser139, gromadzone są w miejscach uszkodzenia, tworząc wewnątrzjądrowe foci. Większość fluoryzujących ognisk jest rozproszona po całym obszarze nukleoplazmy, jednak największe z nich związane są zazwyczaj z obszarami heterochromatyny okołojąderkowej. Ufosforylowana postać histonu H2AX tworzy platformę, dzięki której do miejsc uszkodzenia nakierowywane są czynniki naprawcze i białka sygnałowe. W artykule opisano także konsekwencje przełamania funkcji wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S i ominięcia zależności S-M oraz wynikającą z tego indukcję przedwczesnej kondensacji chromosomów. Poza licznymi mutacjami, które eliminują poszczególne elementy składowe szlaku biochemicznego związanego z wewnętrznym punktem kontrolnym fazy S, system ten może być zaburzony także poprzez oddziaływanie wielu czynników chemicznych. Należy do nich kofeina, która przełamuje zależność S-M i prowadzi do indukcji PCC w tych komórkach, które nie są przygotowane do wejścia w mitozę, z powodu niezakończenia fazy S i poreplikacyjnych procesów naprawczych w fazie G2. Komórki zablokowane w przebiegu fazy S, a następnie poddane działaniu kofeiny, inicjują aberracyjne podziały mitotyczne. W komórkach takich obserwujemy wystąpienie ubytków i przerw w ciągłości chromosomów, zagubienie w płaszczyźnie równikowej chromosomów acentrycznych i fragmentów chromatyd oraz formowanie się mostków chromosomowych i mikrojąder. Wynika z tego nowe pojmowanie funkcji wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S: jako ściśle oddziałującego na późniejsze formowanie struktur wyższego rzędu: chromosomów metafazowych, a tym samym zapewniającego równocześnie rozdzielenie DNA do dwóch jąder siostrzanych. Zjawisko przedwczesnej mitozy stanowi nie tylko istotny problem podstawowy biologii cyklu komórkowego, ale także zagadnienie ważne ze względu na potencjalne zastosowania medyczne. Metody radio- i chemioterapii stosowane w leczeniu chorób nowotworowych prowadzą do rozległych uszkodzeń DNA, wstrzymujących proces replikacji materiału genetycznego. Zdaniem wielu badaczy, nasilenie oddziaływania terapeutycznego wynikać może z pobudzenia tych mechanizmów biochemicznych, które omijając działanie wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S, wywoływać będą przedwczesną kondensację chromosomów.

Słowa kluczowe: stres replikacyjny, wewnętrzny punkt kontrolny fazy S, zależność S-M.

Summary: A wide array of research programs have been directed towards a comprehension of roles the intra-S-phase checkpoint which controls either frequency of DNA replication initiation (origin densities) or replication fork movement (rates of elongation). In response to treatment with either hydroxyurea or aphidicolin and after the addition of the DNA-damaging agents, the total rate of DNA replication per cell is reduced. This reduction is due to activation of an intra-S-phase checkpoint-dependent biochemical pathway network. The activated intra-S-phase checkpoint slows down or arrests replication forks, inhibits the premature firing of late origins, starts up the DNA damage response pathways to prevent replication of a damaged DNA, and delays the onset of mitosis until the cells are exposed to replicational stress. This work focuses on ATR, ATM, Chk1 and Chk2 protein kinases that are required for the control of the S phase, illustrates the state of knowledge about the other proteins involved in DNA-replication stress-response, and in addition explains their relationship. Ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase (ATR) are PI-3 Kinase-related Kinase (PIKK) family members. Despite the essential role of ATM and ATR in cell cycle signaling, little is known about their activation. The activated ATM and ATR kinases turn on their downstream target proteins (like Chk2 and Chk1) by phosphorylating specific serine or threonine residues. ATM responds primarily to double strand breaks and phosphorylates Chk2 protein kinase at the amino-terminal domain contains a threonine residue (Thr68). Phosphorylation on Thr68 is a precondition for the successive activation step, which is attributable to autophosphorylation of Chk2 on Thr383 and Thr387. ATR is activated by replicational stress or UV-induced DNA damages and in response phosphorylates Chk1 protein kinase at serine residues (Ser317 and Ser345). Phosphorylation at Ser345 serves to localize Chk1 to the nucleus following checkpoint activation, while phosphorylation at Ser317 was shown to forbid entry into G2 phase and

mitosis following stalled DNA replication. It is known, however, that ATM and ATR protein kinases share some phosphorylation targets and their precise roles in the intra-S-phase checkpoint pathway may differ depending on the nature of stress involved. Chk1-mediated Cdc25A-C phosphorylation leading to blocking of Cdk1 and Cdk2 (thus preventing cell cycle progression). Chk1 can stabilize the replisome, possibly by targeting replication proteins (e.g., Cdc6, MCM2-7), and after resolving the replication problems can restart of stalled replication forks. Functional changeability of the ATM/ATR-Chk2/Chk1-Cdc25/Cdk axis underlie the molecular foundation of the intra-S-phase checkpoint. ATR also phosphorylates histone H2AX on serine 139. After DSB-like DNA damage a number of Ser139-phosphorylated-H2AX localizes to sites of DNA damage at subnuclear foci. Although most of them spread throughout the whole area of nucleoplasm, the largest of them, localized at perinucleolar heterochromatin regions. This newly phosphorylated-H2AX forming a platform for the recruitment DNA repair and signaling proteins. This paper also briefly describes abrogating the intra-S-phase checkpoint function will result in overriding the S-M dependency and induction of premature chromosome condensation (PCC). Apart from numerous mutations that eliminate particular elements of the intra-S-phase checkpoint pathway, systems which monitor the course of DNA replication can be affected by many types of chemical agents. Caffeine, can override the S-M dependency and induce PCC in cells not prepared to undertake mitotic division, i.e. those which did not complete DNA replication and stay underreplicated. S-phase-blocked cells treated with caffeine start out aberrant mitotic divisions. The full array of aberrations includes: chromosomal breaks and gaps lost and lagging chromatids and chromosomes, chromosome bridges and micronuclei. Thus, drug-induced PCC (due to caffeine action) clearly provided the new insight that DNA replication is tightly coupled with the construction of the higher-ordered structure of the eukaryote chromosome. In the hope of unraveling targets for cytostatic drugs and cellular factors which inhibit or potentiate healing of cancer, a wide array of research programs have been directed towards an understanding of molecular mechanisms that underlie the intra-S-phase signaling pathways. A bulk of research-work is thus focused on methods increasing the effects of radio- and chemotherapy.

Key words: DNA-replication stress, intra-S-phase checkpoint, S-M dependency.

Wykaz skrótów: ATM (ang. *Ataxia Telangiectasia Mutated*) – serynowo-treoninowa kinaza ATM; ATR (ang. *Ataxia Telangiectasia mutated - Rad3related*) – kinaza związana z kinazą ATM i helikazą Rad3; ATRIP (ang. *ATR-Interacting Protein*) – białko występujące w trwałym połączeniu z kinazą ATR; CDK (ang. *Cyclin-Dependent Kinases*) – rodzina kinaz zależnych od cyklin, DNA PK (ang. *DNA-dependent Protein Kinase*) – serynowo-treoninowa kinaza białkowa zależna od DNA; DSBs (ang. *Double Strand Breaks*) – pęknięcie obu nici; ICC (ang. *Initiation of Chromosome Condensation*) – moment rozpoczęcia procesu kondensacji chromosomów; MCM2-7 (ang. *Mini-Chromosome Maintenance 2-7*) – białka tworzące heksameryczny kompleks wykazujący aktywność helikazy; MPF (ang. *M-phase Promoting Factor*) – kompleks promujący mitozę; MRC1 (ang. *Mediator of the Replication Checkpoint 1*) – białko adaptorowe występujące w komórkach drożdży; NHEJ (ang. *Non-Homologous End-Joining*) – niehomologiczne łączenie końców; *Origin* – miejsce inicjacji replikacji; ORC (ang. *Origin Recognition Complex*) – kompleks białkowy rozpoznający miejsce inicjacji replikacji; PCC (ang. *Premature Chromosome Condensation*) – przedwczesna kondensacja chromosomów; PCNA (ang. *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) – składnik kompleksu replikacyjnego; PCP1 (ang. *Principal Control Point 1*) – pierwszy główny punkt kontrolny; PCP2 (ang. *Principal Control Point 2*) – drugi główny punkt kontrolny; PIKK (ang. *PI-3Kinase-related Kinase*) – rodzina kinaz 3-fosfatydiloizotylo; RFC (ang. *Replication Factor-C*) – czynnik replikacji C; RPA (ang. *Replication-Factor-A*) – czynnik replikacji A; system RLS (ang. *Replication Licensing System*) – system „zezwalający na replikację DNA”.

1. WSTĘP

W cyklu komórkowym typu G1-S-G2-M funkcje dwóch głównych punktów kontrolnych wiążą się bezpośrednio z koordynacją stadiów przejściowych, decydujących o zachowaniu tożsamości genetycznej. Pierwszy z nich monitoruje metabo-

liczny stan komórki w fazie G1, integralność struktury jądrowego DNA przed przystąpieniem do syntezy komplementarnego zespołu chromosomów, poziom niezbędnych substratów, enzymów i czynników replikacyjnych. W cytologii roślin, znany jest jako „pierwszy główny punkt kontrolny”, PCP1 (ang. *Principal Control Point 1*). Jest on odpowiednikiem punktu START u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) i punktu restrykcyjnego (R) w komórkach zwierzęcych. Drugi punkt kontrolny, PCP2, o bardziej konserwatywnym charakterze, odgrywa podobną rolę w fazie G2. Jego funkcje związane są z oceną wewnętrznych i zewnętrznych warunków środowiska komórki, niezbędnych do jej przebudowy w czasie mitozy i cytokinezy; informuje, że replikacja DNA została zakończona oraz kontroluje integralność struktury chromatyny przed jej mitotyczną kondensacją [69].

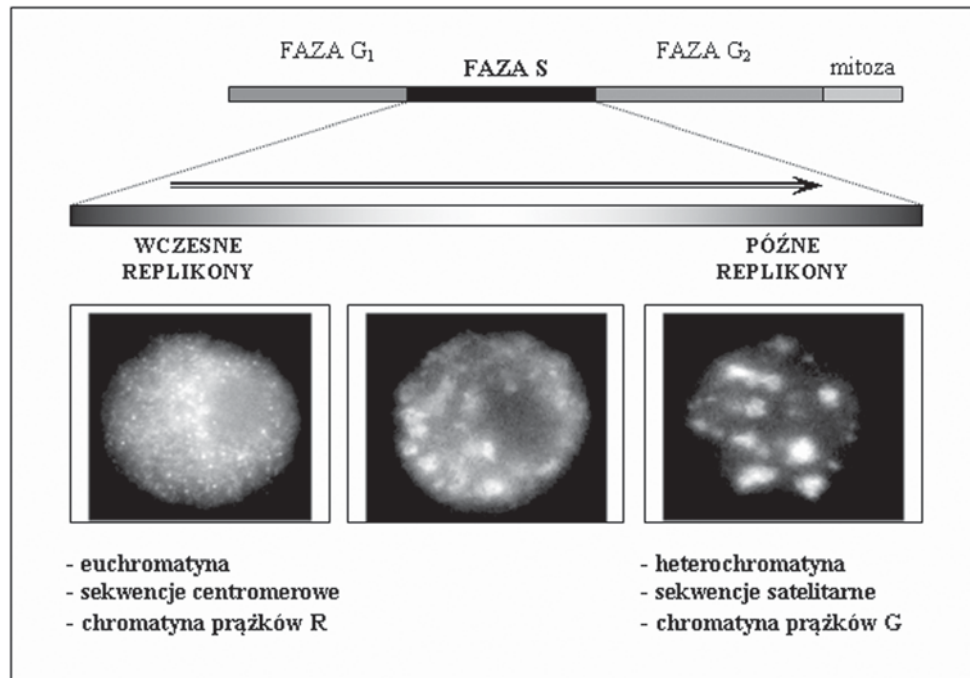
Szlaki biochemiczne systemów kontrolnych w fazie G1 i G2 stanowią jednak tylko część złożonego układu mechanizmów zapobiegających powstawaniu błędów replikacyjnych i możliwości wadliwego przebiegu mitozy. Nadzór nad stabilnością genomu dokonuje się poprzez harmonijne działanie wszystkich podległych mu elementów regulacyjnych i jest wynikiem, w głównej mierze, przemienności fazy S i mitozy. Zgodnie z nią, profazowa kondensacja chromosomów możliwa jest dopiero po zakończeniu replikacji DNA (zależność „S-M” [26, 77, 80]), natomiast rozpoczęcie fazy S może być zainicjowane nie wcześniej niż po telofazowej dekonkondensacji (zależność „M-S” [83]), ponieważ uruchomienie nowych miejsc inicjacji replikacji uzależnione jest od niskiej aktywności mitotycznych CDK (ang. *Cyclin-Dependent Kinases*) [71, 97]. Nadzór nad zależnością „S-M” pełni wewnętrzny punkt kontrolny fazy S (ang. *intra-S-phase checkpoint*). Funkcje tego mechanizmu zależne są od sprawności systemu transmisji sygnałów wyzwalanych przez aparat sensoryczny komórki i przekazywanych do cząsteczek efektorowych. Chociaż mechanizmy inicjacji fazy S i mitozy uruchamiane są poprzez aktywację podobnych, a niekiedy identycznych enzymów, fizjologiczny status każdej z tych faz jest krańcowo odmienny. Struktura chromosomów mitotycznych wyklucza możliwość prawidłowej organizacji aparatu replikacyjnego i ogranicza przestrzeń niezbędną dla ruchu widełek replikacyjnych. Rozproszona chromatyna interfazowa z równie oczywistych powodów nie jest przystosowana do segregacji cząsteczek DNA.

2. REPLIKACJA DNA W FAZIE S

Wierność informacji genetycznej przekazywanej z pokolenia na pokolenie komórek zależy od dokładności mechanizmów powielających chromosomy w fazie S i precyzji, z jaką zostaną one następnie rozdzielone do dwóch jąder potomnych podczas mitozy. Systemy regulacji tych procesów narzucają odmienną specyfikę metaboliczną każdej z faz cyklu komórkowego, a pełniąc nadzór nad właściwą chronologią zdarzeń, warunkują zachowanie strukturalnej i funkcjonalnej integralności sekwencji eu- i heterochromatynowych [21, 34].

Kopiując swoje chromosomy, komórki eukariotyczne wykorzystują jednocześnie liczne miejsca inicjacji replikacji (od 10^3 do 10^5 w każdym jądrze), co sprawia, że

czas trwania fazy S do pewnego tylko stopnia zależy od wielkości genomu [17, 82]. Jest to spowodowane m.in. brakiem konieczności koordynowania ruchu cząsteczek polimeraz DNA i polimeraz RNA na wspólnej matrycy. Taka „modułowa” strategia replikacji umożliwiającą kopiowanie całego materiału genetycznego w stosunkowo krótkich odcinkach czasu (przy zachowaniu zasady jednokrotnej syntezy każdej sekwencji jądrowego DNA) wymaga precyzyjnego mechanizmu ochrony regionów *origin* funkcjonujących we wczesnych stadiach fazy S („*early*” *replicons*), przed ich ponownym uruchomieniem w późniejszych stadiach tej fazy („*late*” *replicons*) [27, cyt. za 46]. Przyczyny tej asynchroniczności są różne. Pierwszą z nich może być wykształcone w toku filogenezy uporządkowanie czasu replikacji poszczególnych sekwencji genomu: euchromatyna (zawierająca DNA aktywny pod względem genetycznym) oraz sekwencje centromerowe replikowane są, z reguły, w początkowych stadiach fazy S, natomiast heterochromatyna (zawierająca DNA nieaktywny,



RYCINA 1. Charakterystyczne dla wczesnych, środkowych i późnych podokresów fazy S wzory immunofluorescencyjnego znakowania nowo syntetyzowanych cząsteczek DNA (w jądrach wyizolowanych z merystematycznych komórek korzeni *Vicia faba*, po ich uprzedniej inkubacji z bromodeoksyurudyną – BrdUrd). BrdUrd jest włączana do potomnych łańcuchów DNA, a następnie wykrywana fluorescencyjnie znakowanymi przeciwciałami (detekcja pośrednia: I-rzędowe przeciwciała α -BrdUrd, II-rzędowe przeciwciała znakowane izotiocyanianem fluoresceiny – FITC), pow. ok. 500 \times

FIGURE 1. Localization of BrdUrd labeling patterns in interphase nuclei of individual subphase of S-phase: early, middle, and late (BrdUrd labeling patterns of cell nuclei isolated from root meristems of *Vicia faba*; immunocytochemical procedure with anti-BrdUrd primary monoclonal antibodies, and FITC-conjugated secondary antibodies), magnification: about 500 \times

w tym także sekwencje satelitarne) – w końcowych (ryc. 1). Drugą przyczyną jest najprawdopodobniej korzystne (ze względu na endoergiczny charakter procesów replikacyjnych), rozłożone w czasie, zapotrzebowanie na dNTP, białka strukturalne i enzymatyczne biorące udział w biosyntezie DNA (np. histony, polimerazy DNA). Trzeci powód asynchronicznej aktywacji sekwencji *origin* stanowić może ewolucyjnie utrwalona preferencja dla spowolnionej fazy S, a więc takiej replikacji, która zapewnia dość czasu, aby podczas jej trwania dokonywane były również niezbędne naprawy uszkodzonych cząsteczek DNA [74].

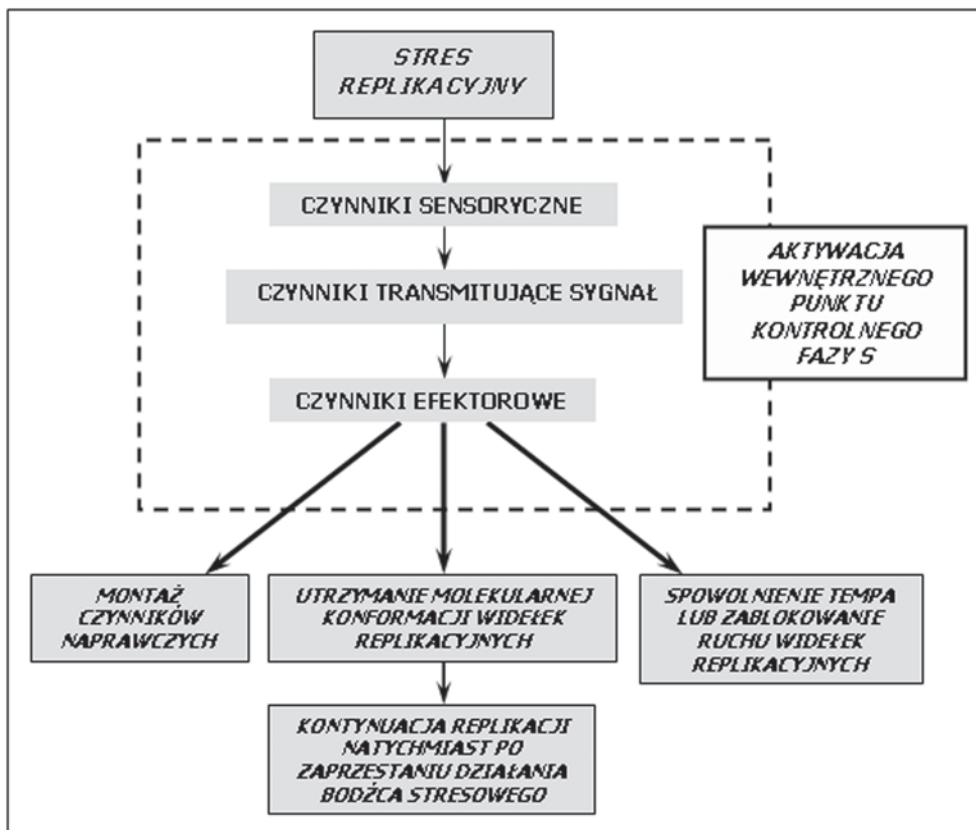
Mechanizm uniemożliwiający ponowne uruchamianie wczesnych replikonów podczas późnych podokresów fazy S wiąże się z funkcją trzech typów białek, będących centralnymi elementami systemu RLS: „zezwalającego na replikację DNA” (ang. *Replication Licensing System*) [8, 20]. Są nimi: białko Cdc6 (Cdc18 u *S. pombe*), białko Cdt1, znane także pod nazwą RLF-B (ang. *Replication Licensing Factor B*) lub *double-parked* oraz kompleks białkowy MCM2-7 (ang. *Mini-Chromosome Maintenance 2-7*). Montaż tego kompleksu (MCM2-7) w obrębie chromatyny, będący swoistym aktem nadania jej „licencji na replikację”, zależy od wcześniejszej asocjacji białek Cdc6 i Cdt1 z kompleksami ORC (ang. *Origin Recognition Complex*), w skład których wchodzi 6 podjednostek polipeptydowych: ORC1-6. Tylko wtedy sekwencja *origin* utworzyć może parę widełek replikacyjnych. Po zainicjowaniu ich dwukierunkowego ruchu, kompleksy MCM2-7 odsuwają się od regionu *origin* i, prawdopodobnie, zaczynają pełnić nową funkcję – helikazy, rozkręcającej spiralę obu nici DNA [51, 58]. Utrzymywanie się białek Mcm w asocjacji z jego replikującymi odcinkami nie jest już wówczas uzależnione od kompleksów ORC, białek Cdc6 i Cdt1. Czynnikiem ograniczającym replikacyjne funkcje kompleksów MCM2-7 nie jest też wysoka aktywność cyklinozależnych kinaz; stanowi ona jednak istotną przeszkodę w procesie łączenia się białek ORC, Cdc6 i Cdt1 z sekwencjami *origin*. System zezwalający na replikację DNA jest więc aktywny tylko jeden raz w cyklu komórkowym – podczas fazy G1. Natomiast w chwili rozpoczęcia fazy S ulega inaktywacji, blokując zarazem możliwość resyntezy DNA [3, 57].

2.1. Wewnętrzny punkt kontrolny fazy S

W obronie przed wieloma, potencjalnie groźnymi, zaburzeniami w przebiegu biosyntezy DNA, komórki rozwinęły skomplikowaną sieć reakcji biochemicznych, które określić można, najogólniej, jako odpowiedź na stres replikacyjny (ang. *DNA-replication stress-response*). Podstawową strategią tej odpowiedzi jest zwolnienie tempa procesów, których kontynuacja groziłaby powielaniem lub przekazem wadliwych lub niekompletnych cząsteczek DNA nowemu pokoleniu komórek [21, 76, 78, 79]. W warunkach stresu replikacyjnego, tempo biosyntezy DNA ulega więc zwolnieniu, a możliwość wejścia w mitozę jest, najczęściej, całkowicie zablokowana do czasu ekspresji specyficznych genów i aktywacji czynników naprawczych [5, 61].

Proces biosyntezy DNA angażuje system wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S, który ogranicza tempo replikacji w przypadku pojawienia się fizycznych uszkodzeń DNA, przede wszystkim, pęknięć jego obu nici – DSBs (ang. *Double Strand*

Breaks) oraz blokuje możliwość inicjowania dalszych etapów cyklu komórkowego przez te komórki, które na skutek działania różnych czynników zostały zatrzymane w przebiegu niezakończonych jeszcze fazy S [9, 27]. Każde zaburzenie o charakterze strukturalnym (np. DSB) wymusza zwolnienie szybkości ruchu widełek replikacyjnych, a dodatkowo każde ograniczenie sprawności aparatu replikacyjnego (wynikające np. z deficytu trójfosforanów nukleotydów lub dysfunkcji polimeraz) może sprzyjać powstawaniu, a nawet generować uszkodzenia DNA [9, 21, 61]. Działanie czynników sensorycznych (np. kinaz ATR/ATM [14, 48, 60]) wyzwała wówczas kaskadową transmisję sygnałów, które poprzez elementy pośredniczące w ich przekazie dostarczane są do różnych białek efektorowych (np. kinaz Chk1/Chk2 [16, 33, 96]). Wydaje się, że wszystkie komórki eukariotyczne wyposażone są w czynniki sensoryczne, układy transmisji sygnału i czynniki efektorowe (ryc. 2) [83]. Ich

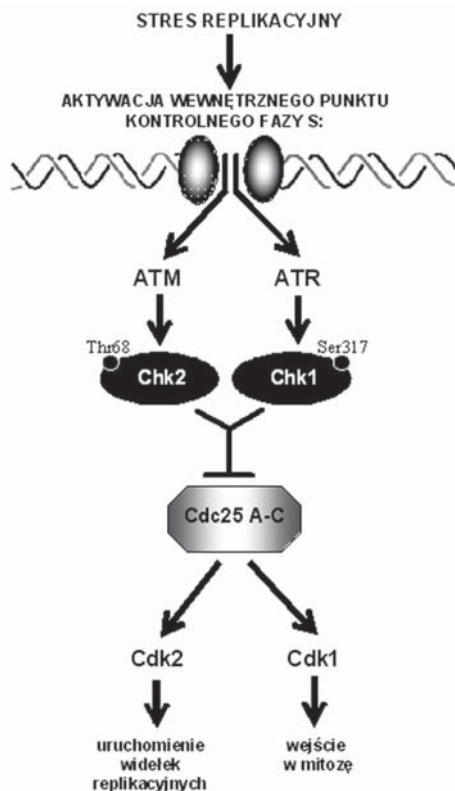


RYCINA 2. Konceptualna organizacja szlaku sygnałowego wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S, wyposażonego w: (1) elementy sensoryczne – wykrywające zaburzenia strukturalne, (2) elementy przekaźnikowe – transmitujące sygnał o uszkodzeniu oraz (3) elementy efektorowe (opracowano na podstawie [27, 61, 77], zmodyfikowano)

FIGURE 2. The conceptual organization of intra-S-phase signaling pathways, which is composed of: (1) sensors, which detect structural aberrations, (2) transducers, which convey a signal about structural alteration or dysfunction, and (3) effectors (according to [27, 61, 77], modified)

znaczenie polega na tym, że umożliwiają replikację DNA i podział chromosomów, bez zagrożenia całości zawartej w nich informacji, niezbędnej dla rozwoju organizmu i zachowania ciągłości gatunkowej.

Wykrycie dwuniciowych pęknięć w cząsteczkach DNA aktywuje szlak biochemiczny, w którym elementem nadrzędnym jest kinaza ATM (ang. *Ataxia Telangiectasia Mutated*). Procesy zachodzące z jej udziałem wyzwalane są we wszystkich fazach cyklu komórkowego, a czynniki biorące udział w tych procesach mogą być wykorzystywane także w drugim, równoległym przebiegającym szlaku, gdzie funkcję nadrzędną pełni kinaza ATR (ang. *Ataxia Telangiectasia mutated - Rad3-related*). Ona także aktywowana jest pod wpływem uszkodzeń powodujących przerwanie ciągłości obu nici DNA, jednak wzbudzenie jej aktywności następuje znacznie wolniej. Szlak podległy kinazie ATR wykazuje przede wszystkim zdolność reagowania na zaburzenia funkcji widełek replikacyjnych. Mogą one być efektem oddziaływań o charakterze endogennym, skutkiem chemioterapii lub zabiegów eksperymentalnych prowadzących do zahamowania lub zakłócenia procesów replikacyjnych poprzez inhibicyjny wpływ takich czynników, jak hydroksymocznik (HU) [15, 44, 47], promieniowanie nadfioletowe (UV) [86, 94] lub alkilujący DNA metylo-metano-sulfonian (MMS) [11, 29]. Obydwa szlaki biochemiczne funkcjonują zgodnie z następującymi schematami zdarzeń: dwuniciowe pęknięcia DNA → ATM → Chk2



RYCINA 3. Schemat ilustrujący działanie czynników białkowych zaangażowanych w szlak biochemiczny wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S. Uruchomienie mechanizmów związanych z wewnętrznym punktem kontrolnym fazy S następuje w warunkach stresu replikacyjnego; dochodzi wówczas do fosforylacji kinaz Chk1 i Chk2 poprzez kinazy sensoryczne ATR i ATM. Ufosforylowane aktywują kinazy Chk1 (na Ser317) i Chk2 (na Thr68) mogą inaktywować fosfatazę Cdc25 (fosforylując ją blokującą na Ser216), a tym samym mogą: (1) blokować aktywację Cdk2 i postęp przez kolejne podokresy fazy S oraz (2) hamować aktywację Cdk1 i przejście G2/M w cyklu komórkowym (opracowano na podstawie [66, 76], zmodyfikowano)

FIGURE 3. Selected elements of biochemical pathways organizing the intra-S-phase checkpoint function. ATR and ATM protein kinases phosphorylate Chk1 and Chk2 kinases, respectively. Phosphorylated and then activated Chk1 (at Ser317) and Chk2 (on Thr68) may either block Cdc25 phosphatase (by Ser216 phosphorylation) and inhibit S phase progression (by Cdk2 inactivation) or block Cdk1 and prevent G2/M cell cycle progression (according to [66, 76], modified)

oraz blok replikacyjny \rightarrow ATR \rightarrow Chk1. W każdym z nich substratem docelowym jest fosfataza Cdc25 (ryc. 3) [54].

Wydaje się rzeczą oczywistą, że wzbudzenie reakcji charakterystycznej dla wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S wywołać mogą przede wszystkim różnorodne oddziaływania blokujące przebieg biosyntezy DNA. Hydroksymocznik, jeden z najlepiej poznanych i najczęściej stosowanych „aktywatorów” takiej reakcji, hamuje ruch widełek replikacyjnych pośrednio, poprzez zubożanie puli trójfosforanów nukleotydów (dNTP) [78]. Afidikolina indukuje odpowiedź typową dla punktu kontrolnego fazy S w wyniku zablokowania aktywności polimeraz DNA typu α i δ (Pol α i Pol δ) [76]. Podobne efekty wywoływane są przez mutacje niektórych genów kodujących białka aparatu replikacyjnego, alkilację DNA (MMS) [11], promieniowanie UV [79], pęknięcia związane z procesami rekombinacji i naprawy oraz poprzez zablokowanie aktywności topoizomerazy I i/lub II [88, 98].

Homologami obu konserwatywnych kinaz „sygnałowych” (ATM/ATR), są kinazy Mec1 i Tel1 u *S. cerevisiae* i Rad3 i Tel1 u *Schizosaccharomyces pombe*. Każda z nich tworzy stabilny związek z białkowym partnerem (Ddc2/Pie1/Lcd1 u *S. cerevisiae* i Rad26 u *S. pombe*), pełniącym rolę podjednostki regulatorowej kinazy. Czynniki podrzędne, aktywowane przez ATM/ATR/Mec1/Rad3 są ich substraty – kinazy rodziny CHK [12, 83]. Obie grupy, wspólnie, tworzą centralny moduł szlaku odpowiedzi na stres replikacyjny, który zarówno rejestruje napływające informacje o stanie DNA, jak i kieruje sygnały do widełek replikacyjnych [61].

W komórkach ludzkich i u *Xenopus* kinaza ATR jest niezbędna w procesie fosforylacji kinazy Chk1 – fosforylacji będącej podstawową odpowiedzią indukowaną pod wpływem bloku replikacyjnego [30, 37]. ATR występuje w trwałym połączeniu z białkiem ATRIP (ang. *ATR-Interacting Protein*), a ich kompleksy zogniskowane są w obszarze jądra komórkowego w tych regionach, które prawdopodobnie odpowiadają miejscom uszkodzeń DNA [50, 70]. Aktywatorem kompleksów ATR-ATRIP w komórkach kręgowców jest białko TopBP1 [35, 36]. Podobne związki tworzą się także między kinazą Rad3 i białkiem Rad26 (homolog ATRIP u *S. pombe*) [1, 6, 87] oraz między kinazami Mec1-Ddc2 (homolog ATR-ATRIP u *S. cerevisiae*) [42, 53].

Mechanizm rozpoznawania defektów w strukturze DNA przez kompleksy ATR-ATRIP nie został dotychczas w pełni wyjaśniony. Ludzka kinaza ATR, białko TopBP1 i kinaza Chk1 wykazują zdolność wiązania się z cząsteczkami DNA, przy czym nie tylko ich powinowactwo, ale także aktywność wzrasta w obecności DNA zawierającego uszkodzenia wywołane promieniowaniem UV [94]. Badania prowadzone z użyciem cytoplazmatycznych ekstraktów komórek jajowych *Xenopus* wykazały, że asocjacja ATR z chromatyną następuje w okresie replikacji DNA, natomiast po jej zakończeniu – zanika [cyt. za 45]. Związek ATR-DNA przerwany zostaje także w wyniku eliminacji czynnika replikacji A – RPA (ang. *Replication-Factor-A*), natomiast jego pojawianie się jest niezależne od obecności polimerazy DNA typu α . Wydaje się więc, że doprowadzanie ATR następuje po częściowym uformowaniu widełek replikacyjnych w regionie *origin*, ale jeszcze przed asocjacją Pol α [40, 52, 100].

Chociaż kompleksy ATR-ATRIP mogą przyłączać się do niektórych struktur DNA, ich udział w aktywowaniu reakcji komórki na stres replikacyjny nie jest możliwy bez zaangażowania dwóch innych czynników: pierwszym z nich jest czynnik replikacji C – RFC (ang. *Replication-Factor-C*), drugim – białka typu PCNA (*PCNA-like*; *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen-like*). Podczas replikacji, RFC rozpoznaje miejsca połączeń starterowych odcinków RNA z DNA matrycowym i montuje wokół niego toroidalny, białkowy homotrimer – PCNA, tzw. ruchomą obręcz (*sliding clamp*), decydującą o ruchu związanych z nią polimeraz DNA [41]. W komórkach *S. pombe*, Rad17 (czynnik typu RFC1, wraz z czterema małymi podjednostkami: RFC2-5 [55]) oraz Rad9/Hus1/Rad1 (kompleks 9-1-1, typu PCNA [42]), uczestniczą nie tylko w funkcjonalnej organizacji wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S, ale także innych punktów kontrolnych cyklu komórkowego, których zadaniem jest monitorowanie uszkodzeń strukturalnych DNA (np. w fazie G2 [42, cyt. za 38]). Doprowadzanie kompleksów typu PCNA do miejsc uszkodzeń w cząsteczce DNA jest, prawdopodobnie, zjawiskiem niezależnym od aktywacji ATR i Chk1 [56, 84], stanowi jednak istotny element mechanizmu sygnalizującego pojawienie się zaburzeń o charakterze strukturalnym. W komórkach *S. pombe* i u ssaków, Rad 17 i Hus1 są czynnikami warunkującymi możliwość fosforylacji kinazy Chk1 przez ATR. Rad 17 jest także substratem ATR. Chociaż obydwie te białka łączą się z chromatyną komórek nieuszkodzonych, fosforylacja Rad17 przez ATR wyraźnie nasila się wraz z ilościowym wzrostem kompleksów typu PCNA, następującym po wystąpieniu zaburzeń konformacyjnych DNA. Wydaje się zatem, że pierwszym etapem uruchamianego wówczas szlaku sygnalizacji jest niezależne lokowanie się Rad17 i kompleksów ATR-ATRIP w rejonach uszkodzeń; drugim – zależne od Rad17 montowanie kompleksów typu PCNA wokół DNA. Kompleksy typu PCNA umożliwiają zaktywowanie cząsteczek ATR i w konsekwencji fosforylację jej substratów zlokalizowanych w obrębie chromatyny, takich jak: Rad17 i Rad9 [42, 55].

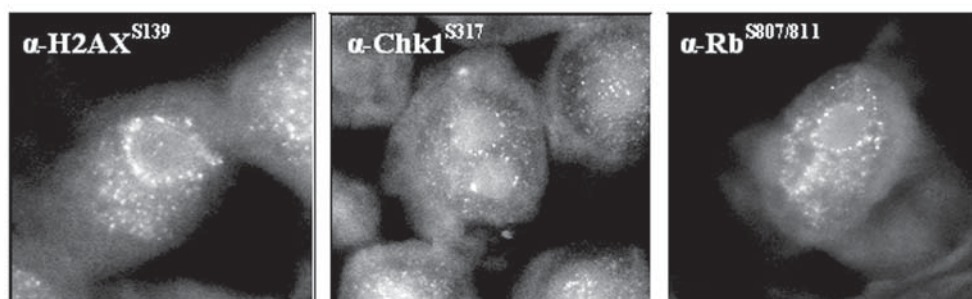
Nie jest pewne, czy wszystkie zaburzenia replikacji DNA są wykrywane przy pomocy jednego tylko, uniwersalnego mechanizmu sensorycznego. Być może, bez względu na rodzaj czynnika blokującego fazę S, struktura DNA generowana przez widelki replikacyjne w miejscu uszkodzenia lub adduktu jest jednakowa. Nie można jednak wykluczyć, że każdy rodzaj zaburzenia struktury DNA wywiera odmienny, specyficzny wpływ na widelki replikacyjne, a czynniki rozpoznające poszczególne rodzaje uszkodzeń są także różne. Wydaje się ponadto, że niektóre mechanizmy wewnętrznego punktu kontrolnego replikacji funkcjonują także w przebiegu prawidłowej, niczym niezakłóconej biosyntezy DNA w fazie S. Dla poparcia takiej tezy wskazuje się na warunkującą przeżywalność komórek obecność kinazy Mec1 (typu PIKK) i efektorowej kinazy Rad53 (typu CHK) u *S. cerevisiae* oraz kinaz ATR i Chk1 u ssaków [66, 68, 99, cyt. za 61].

Oprócz kinaz ATM i ATR u ludzi, a także ich homologów w komórkach drożdży, do białek sygnałowych rodziny PIKK należy DNA-PK (ang. *DNA-dependent Protein Kinase*). Enzym ten składa się z podjednostki katalitycznej – DNA-PKcs (ang. *DNA-PK catalytic subunit*) i heterodimerycznej podjednostki Ku70-Ku80. DNA-PKcs jest zależną od DNA kinazą serynowo-treoninową, wykazującą stosunkowo słabą zdolność wiązania się z wolnymi końcami cząsteczek DNA; powinno-

wactwo to ulega wzmocnieniu i stabilizacji pod wpływem heterodimeru Ku70-Ku80. Uważa się, że DNA-PK uczestniczy przede wszystkim w naprawie pęknięć dwuniciowych (DSBs) poprzez niehomologiczne łączenie końców – NHEJ (ang. *Non-Homologous End-Joining*) [49, 65, 85].

Z aktywnością samych widełek replikacyjnych (w reakcji stresowej) związane jest białko RPA: w regionach zablokowanych widełek replikacyjnych wykazano wspólną lokalizację białek RPA, γ -H2AX i PCNA [4]. Jednym z podstawowych mechanizmów ochronnych aparatu replikacyjnego są ogniska koncentrujące cząsteczki ufosforylowanych histonów H2AX [78, 79]. Sekwencją wyróżniającą H2AX jest C-końcowy motyw SQ(D/E)(I/L/Y), w którym γ -fosforylacja seryny (u ssaków Ser139) uznawana jest za modyfikację markerową dwuniciowych pęknięć DNA. Zbieżność miejsc znakowania przeciwciałami przeciwko Chk1S317 i przeciwko H2AXS139 wydaje się sugerować, że ogniska kumulujące cząsteczki ufosforylowanych histonów H2AX pokrywają się, przynajmniej częściowo, z regionami wzmożonej aktywności kinazy Chk1 [76], a także z lokalizacją białek typu Rb, ufosforylowanych na serynach 807/811 (ryc. 4) [Rybaczek, n. publ.].

O sprawności systemu wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S decyduje zatem kilka czynników: (1) efektywność blokowania cyklu komórkowego po wystąpieniu defektów strukturalnych DNA lub zaburzeń widełek replikacyjnych, (2) szybkość montażu czynników naprawczych oraz (3) możliwość powrotu komórek do dalszych etapów interfazy (i mitozy) po ustąpieniu oddziaływań wywołujących stan stresu replikacyjnego. Istotną funkcją tego systemu jest więc zachowanie zdolności do kontynuacji przerwanej biosyntezy DNA, czyli utrzymanie takiej konformacji



RYCINA 4. Immunocytochemiczna identyfikacja ufosforylowanych form: kinazy Chk1 (Ser317), histonu H2AX (Ser139; markera dwuniciowych pęknięć w cząsteczkach DNA) i białka Rb (Ser807/811) w merystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba*. Zbieżność miejsc znakowania przeciwciałami α -Chk1^{S317}, α -H2AX^{S139}, α -Rb^{S807/811} z regionami heterochromatyny okołojądrowej. Drugorzędowe przeciwciała skoniugowane z FITC – konwersja na skalę szarości. Pow. ok. 900 \times

FIGURE 4. Immunocytochemical identification of phospho-Chk1 (Ser317), phospho-H2AX (Ser139; this modification of H2AX is a marker of DSBs-like DNA damage occurs in the DNA duplex), and phospho-Rb protein (Ser807/811) in root meristem cells of *Vicia faba*. Immunolocalization of Chk1^{S317}, H2AX^{S139}, and Rb^{S807/811} suggest that these phosphoproteins accumulates most intensively at perinucleolar heterochromatin regions. FITC-conjugated secondary antibodies – grey scale conversion. Magnification: about 900 \times

molekularnej w obrębie widełek replikacyjnych, która umożliwi ich ponowne, szybkie uruchomienie już po ustąpieniu działania bodźca stresowego [10, 64, 89]).

2.2. System monitorowania funkcji widełek replikacyjnych

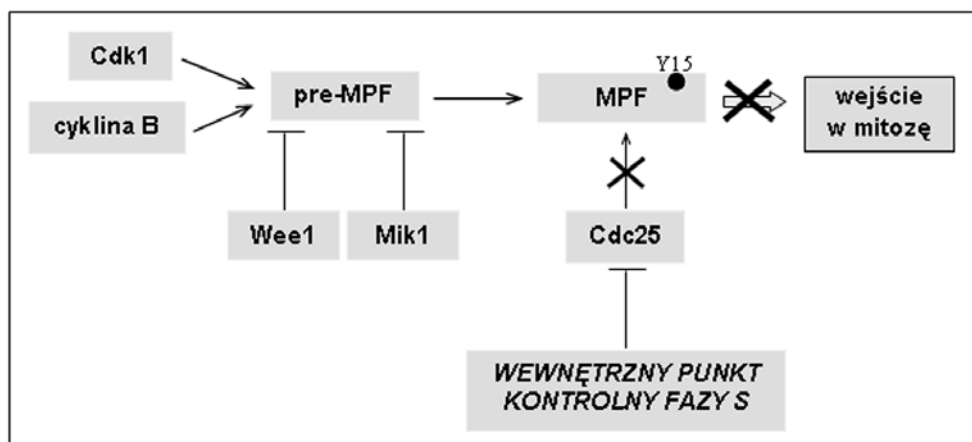
Wydaje się rzeczą bezsporną, że związek elementów sensorycznych z zablokowanymi widełkami replikacyjnymi jest wstępnym, lecz nieodzownym warunkiem aktywacji kinaz CHK. Sposób, w jaki elementy te łączą się ze sobą, nie jest jednak do końca poznany. Rozwiązanie tego problemu przynieść mogą badania nowej grupy „białek adaptorowych” – klaspiny, wykrytej w komórkach *Xenopus* (*xClaspin*) [93] i MRC1 (ang. *Mediator of the Replication Checkpoint 1*) w komórkach drożdży (*scMRC1*) [39, 92]. Badania cytoplazmatycznych ekstraktów z komórek *Xenopus* ujawniły, że interakcje z klaspiną poprzedzają aktywację kinazy Chk1 wywołaną bądź to wpływem afidikoliny, bądź też przez wprowadzenie cząsteczek syntetycznych oligonukleotydów [cyt. za 67]. Klaspina charakteryzuje się licznymi motywami serynowo-glutaminowymi (SQ) i treoninowo-glutaminowymi (TQ), potencjalnie podatnymi na fosforylację zależną od kinaz typu PIKK. Możliwe jest zatem, że białko to uczestniczy w kontrolowaniu procesu aktywacji Chk1 przez ATR [24]. Gdyby lokalizacja kinaz typu PIKK (ATR/ATM/Rad3/Mec1) była zgodna z regionami zablokowanych widełek replikacyjnych, wówczas asocjacja białka MRC1 (lub klaspiny) z aparatem replikacyjnym chromatyny mogłaby formować pomost między czynnikami sensorycznymi (wykrywającymi uszkodzenia struktury DNA) i efektorowymi kinazami CHK, fosforylującymi inne, podległe im czynniki białkowe. Transdukcja sygnału PIKK → CHK zachodziłaby więc w zorganizowanych centrach, integrujących wszystkie elementy biochemiczne wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S [18, 61].

Możliwość zachowania zdolności komórki do biosyntezy DNA w warunkach stresu replikacyjnego, a także do jej wznowienia po jego ustąpieniu, pozbawione są zmutowane w genach *mec1* i *rad53* komórki *S. cerevisiae*, które choćby przejściowo zostały zablokowane w trakcie replikacji DNA. Wydaje się więc, że funkcje wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S odgrywają znaczącą rolę zarówno w utrzymywaniu struktury widełek replikacyjnych, kontrolowaniu tempa ich ruchu, jak też w ich ponownym uruchamianiu [cyt. za 73]. Wniosek ten znajduje poparcie w wynikach Tercero i współpracowników [90]. Przeprowadzone przez nich badania wykazały, że niezmutowane komórki *S. cerevisiae* (mające funkcjonalne białka Mec1 i Rad53) przechodzą powoli przez kolejne stadia replikacji aż do końca fazy S, mimo hamującego wpływu MMS. Ponadto wykazano, że w komórkach, znajdujących się pod wpływem hydroksymocznika lub MMS, replikony wczesne są aktywne, natomiast replikony późne ulegają zablokowaniu (funkcja represyjna punktu kontrolnego), zachowując jednak stan kompetencji do replikacji (funkcja ochronna punktu kontrolnego) [9, 63]. Szczególnie istotną rolę w stabilizacji widełek replikacyjnych odgrywają wówczas kinazy Chk1 i Chk2, a dzięki ochronnemu działaniu wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S możliwe jest kontynuowanie fazy S tuż po zniesieniu bloku replikacyjnego, bez konieczności montażu *de novo* jej skomplikowanego aparatu enzymatycznego.

Obserwacje te wskazują wyraźnie na rolę elementów biochemicznych, stanowiących integralną część mechanizmu punktu kontrolnego, w strukturalnej i funkcjonalnej organizacji aparatu widełek replikacyjnych. Rolę integrującą, stabilizującą molekularną konstrukcję tego aparatu podczas bloku komórki w fazie S i po jego ustąpieniu, pełni prawdopodobnie kinaza Rad53 [2, 32].

Analiza widełek replikacyjnych w preparatach mikroskopowo-elektronowych z chromatyny komórek zmutowanych w genie *rad53* i poddawanych działaniu hydroksymocznika ujawniły dwie klasy struktur DNA niewystępujących w komórkach prawidłowych. Pierwsza z nich obejmuje długie odcinki jednoniciowe; druga – figury krzyżowe zwane strukturami Hollidaya [23, 59, 62]. Obecność fragmentów jednoniciowych stanowić może efekt nieskoordynowanej replikacji obu nici DNA (wiodącej i opóźnionej) w środowisku hydroksymocznika. W przypadku uszkodzeń DNA lub w warunkach stresu replikacyjnego, widełki replikacyjne o kształcie Y ulegać mogą rewersji i w procesie rekombinacji tworzyć przejściowe produkty krzyżowe – figury Hollidaya. Gdy naprawa uszkodzonych fragmentów cząsteczek DNA przez wycinanie i resyntezę nie jest możliwa, rozwiązaniem problemu staje się z konieczności rekombinacja homologiczna. Udział w tym procesie biorą liczne helikazy i endonukleazy [61]. Obecność figur Hollidaya w komórkach znajdujących się pod wpływem hydroksymocznika sugeruje istnienie ścisłych związków między mechanizmem punktu kontrolnego fazy S a naprawą rekombinacyjną. W komórkach *S. cerevisiae*, współdziałanie obu tych systemów biochemicznych znajduje odzwierciedlenie w funkcjach białka Rad55 [7, 28]. U drożdży rozszczepkowych (*S. pombe*) elementem łączącym krzyżowe struktury Hollidaya z efektorową kinazą Cds1 jest białko Mus81, fosforylowane podczas fazy S, a hyperfosforylowane – w odpowiedzi na blok replikacyjny [cyt. za 31].

Ze wszystkich opisanych wyżej faktów wynika, że wewnętrzny punkt kontrolny fazy S należy do najbardziej skomplikowanych systemów regulacyjnych cyklu komórkowego u Eukaryota, a analiza jego konstrukcji wiąże się z uwikłaniem w liczne współzależności między elementami wielofunkcyjnymi. Aktywacja wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S może nastąpić tylko wówczas, gdy replikacja została już zainicjowana. Wydaje się też, że jego główna rola polega na zatrzymaniu tych mechanizmów napędowych w interfazie, które prowadzą komórkę ku mitozie. Wewnętrzny punkt kontrolny fazy S, poprzez mechanizm blokujący fosfatę Cdc25, utrzymuje kinazy mitotyczne w stanie nieaktywnym, z ufosforylowaną tyrozyną (Y15) w kieszonce wiążącej ATP (ryc. 5). W komórkach *S. pombe*, ekspresja kinazy Mik1 (partnera kinazy Wee1) nasila się w sposób specyficzny w fazie S, a wysoki poziom jej stężenia nie maleje przez cały czas trwania bloku replikacyjnego. Tak więc, system monitorowania funkcji widełek replikacyjnych staje się zarazem „strażnikiem” zależności „S-M”. Jednocześnie, skompleksowanie czynników sensorycznych, efektorowych i reperacyjnych tworzy aparat umożliwiający: (1) naprawę uszkodzonych odcinków DNA, (2) jego powolną replikację w warunkach stresu oraz (3) szybkie zakończenie fazy S po ustąpieniu działania czynnika stresowego.



RYCINA 5. Podstawowe procesy związane z aktywacją MPF, poprzedzające inicjację mitozy (opracowano na podstawie [9], zmodyfikowano)

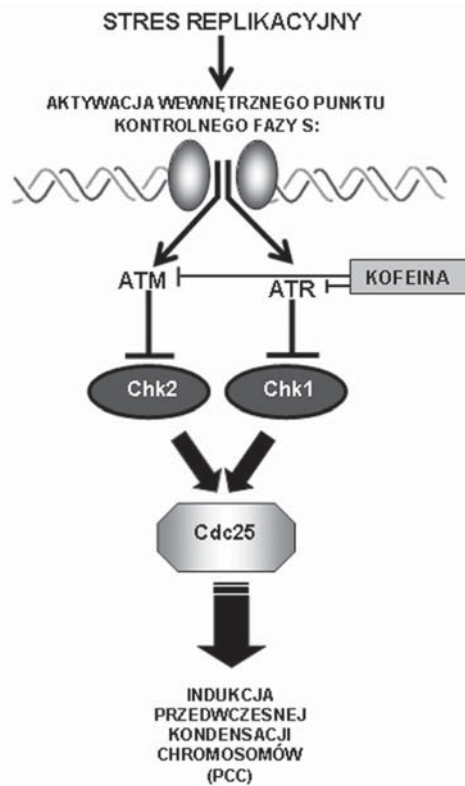
FIGURE 5. Basic processes connected with the activation of MPF prior to the onset of mitosis (according to [9], modified)

3. PRZEDWCZESNA KONDENSACJA CHROMOSOMÓW

Przedstawione dotychczas mechanizmy, kontrolujące inicjację i przebieg fazy S, ukazują ogromną złożoność biochemicznych systemów pobudzających i hamujących. Na tę skomplikowaną sieć regulacyjną składają się procesy aktywujące ekspresję genów w pożądanym dla komórki momencie oraz blokujące przebieg reakcji chemicznych wówczas, gdy ich produkty mogłyby w zbytnej ilości gromadzić się lub przedwcześnie wywoływać kolejne zjawiska.

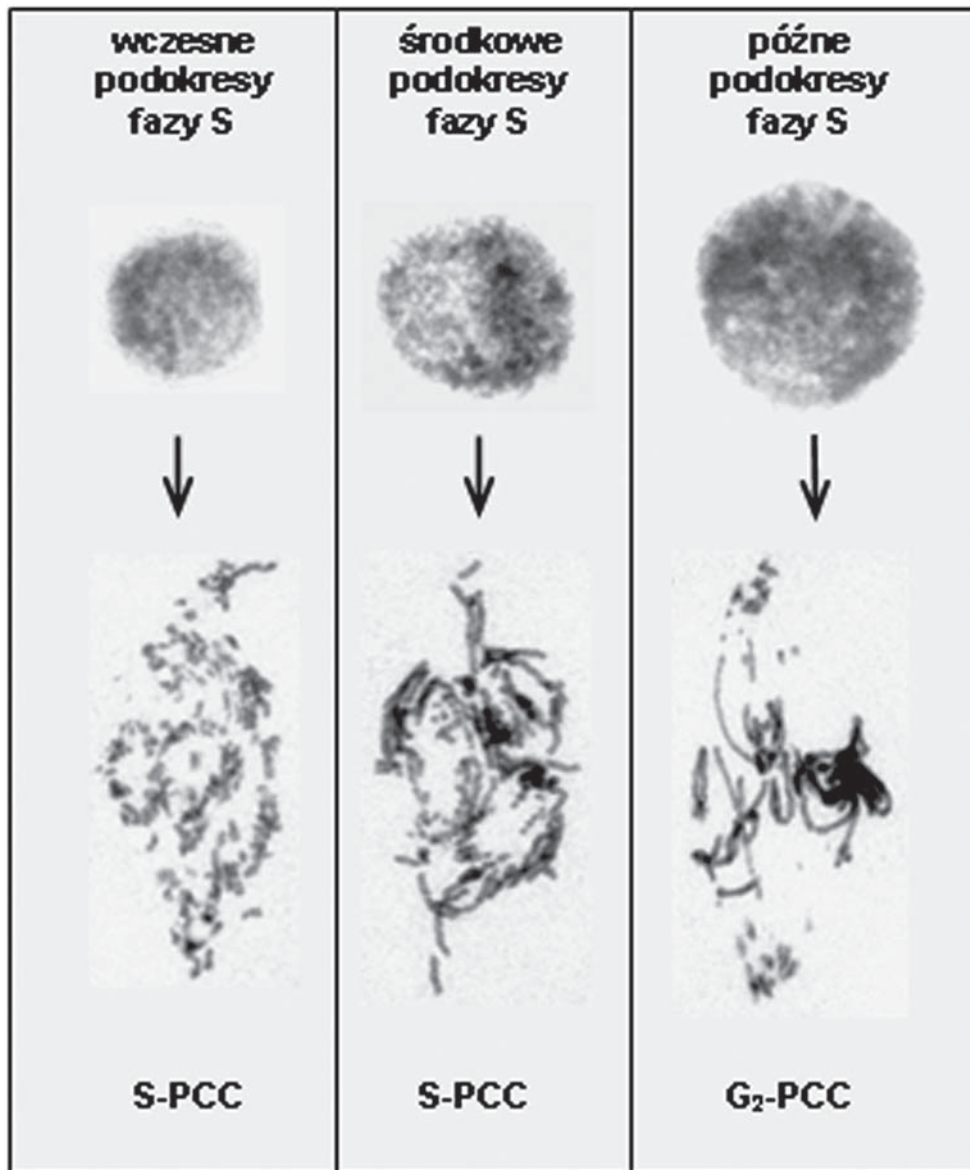
Zaburzenie sprawności systemu wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S może być efektem działania wielu czynników chemicznych. Następuje wówczas omińnięcie (*overriding*) lub przerwanie (*breakage*) nadzoru nad integralnością genomu i prawidłowym przebiegiem fazy S, a w konsekwencji – zniesienie zależności „S-M” i nieuprawnione inicjowanie mitozy (przedwcześnie kondensacja chromosomów – PCC, ang. *Premature Chromosome Condensation*). Proces PCC może być indukowany działaniem inhibitorów fosfataz, wpływem czynników antagonistycznych wobec kinaz białkowych lub alkaloidów purynowych (metyloksantyn), wśród których stosunkowo znaczną efektywnością charakteryzuje się kofeina [80]. Zainteresowanie działaniem kofeiny oraz innych czynników uwalniających komórki z zależności „S-M” wiąże się zatem z poszukiwaniem skutecznych chemioterapeutyków proapoptotycznych lub stymulatorów samobójczej śmierci komórek nowotworowych [43, 81, 95]. Wyłączenie lub omińnięcie funkcji wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S prowadzi do uwrażliwienia komórek tumorowych na działanie czynników antynowotworowych i wpływ promieniowania jonizującego. Kofeina blokuje aktywność kinaz ATM/ATR *in vitro* [19], a indukowany przez nią proces przedwcześnie kondensacji

chromosomów *in vivo*, jest wynikiem wprowadzenia w stan inercji całego szlaku biochemicznego, którego zadaniem jest kaskadowy przekaz sygnału o dysfunkcji aparatu replikacyjnego (ryc. 6). Inhibicyjne wobec kinaz sensorycznych działanie kofeiny blokuje ich zdolność do fosforylacji kinaz efektorowych Chk1/Chk2 [76], a w konsekwencji, utrzymuje katalityczną aktywność fosfataz Cdc25, które spełniają rolę induktorów kompleksów Cdk1-cykлина B – MPF (ang. *M-phase Promoting Factor*) i wyzwalają fosforylacje mitotyczne [25]. Przebieg kolejnych faz przedwcześnie zainicjowanej mitozy ma wówczas charakter aberracyjny i prowadzi najczęściej do śmierci komórki. Mitozy takie opisywane są jako „katastroficzne” (*mitotic catastrophe*), „nieżywotne” (*abortive*) lub „samobójcze” (*suicidal*) [91, cyt. za 22]. Obserwowane gubienie stosunkowo dużych odcinków chromosomów w części subpopulacji komórek wykazujących objawy przedwczesnej inicjacji mitozy sugeruje, że źródłem aberracji mogą być zaburzenia poreplikacyjnych procesów naprawczych w fazie G2 (G2-PCC: ryc. 7). Natomiast specyficzna morfologia tych chromosomów, które cechuje dużo większy stopień dezintegracji materiału genetycznego, skłania do wniosku, że jest ona przejawem mitozy zainicjowanej z subpopulacji komórek, które nie zakończyły jeszcze procesu replikacji DNA (S-PCC: ryc. 7) [80]. Nie bez wpływu na stopień pofragmentowania DNA podczas indukcji PCC pozostaje sama kofeina, która nasila destrukcję chromosomów w procesie ich indywidualizacji. Pewne jest, że niezreplikowane obszary genomu ujawniają się w postaci ubytków lub przerw w ciągłości chromosomów powstałych także na skutek fizycznych naprężeń, do jakich dochodzi podczas ich mitotycznej kondensacji i segregacji oraz prawdopodobnie także na skutek względnej kruchości jednoniciowych odcinków DNA, generowanych podczas powolnego ruchu widełek replikacyjnych w warunkach niedoboru trifosforanów nukleozydów [13].



RYCINA 6. Schemat ilustrujący działanie kofeiny, stosowanej w badaniach nad indukcją PCC w merystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba*. Kofeina – inhibitor sensorycznych kinaz ATM/ATR indukuje przedwczesną kondensację chromosomów w wyniku ominięcia mechanizmu wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S (opracowano na podstawie [61, 76, 80], zmodyfikowano)

FIGURE 6. The mechanism of caffeine action during PCC induction in root meristem cells of *Vicia faba* (biochemical pathway). Caffeine – an inhibitor of ATM/ATR sensor kinases brings about premature chromosome condensation (PCC) by omitting of intra-S-phase checkpoint function (according to [61, 76, 80], modified)



RYCINA 7. Przykłady fenotypów PCC (anafazy typu S-PCC i G₂-PCC) w merystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba* indukowanych w roztworze 2,5 mM hydroksymocznika i postinkubowanych w roztworze 5 mM kofeiny. Fenotypy PCC odzwierciedlają podokresy fazy S (wczesne, środkowe i późne), z których komórki inicjowały PCC w wyniku ominięcia mechanizmu wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S i przełamania zależności S-M

FIGURE 7. Examples of PCC phenotypes (S-PCC and G₂-PCC anaphases) in root meristem cells of *Vicia faba* incubated with 2.5 mM hydroxyurea and posttreated with 5 mM caffeine. The PCC phenotypes reflect the induction of PCC by omitting of the mechanism of intra-S-phase checkpoint function and breakage the S-M dependency from individual subphase of S-phase: early, middle, and late

Zaburzenia funkcji wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S ujawniają także komórki zmutowane. Delecje genów *wee1* i *mkl1* powodują zanik białek przekazujących sygnały o uszkodzeniach struktury DNA lub zablokowaniu replikacji. Komórki takie inicjują mitozę i formują aparat podziałowy, jednak efektem niedoreplikowania są poprzerywane chromosomy, zagubione w centralnej strefie wrzeciona. Do podobnych efektów prowadzi zmiana bilansu aktywności kinaz i fosfataz białkowych spowodowana nadekspresją genów *cdc25* [72]. Również zanik funkcji wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S, spowodowany np. brakiem (lub mutacją) *atr*, powoduje inicjację mitozy przez te komórki, które zawierają częściowo tylko zreplikowany materiał genetyczny (w odróżnieniu od komórek prawidłowych, w których widełki replikacyjne, jeśli napotykają defekt utrudniający proces biosyntezy DNA, aktywują ATR, co prowadzi do zaktywowania wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S i zablokowania cyklu komórkowego). Natomiast przy braku *atr* komórki nie są blokowane i wchodzi w mitozę mimo występowania odcinków niezreplikowanych. W rozwoju embrionalnym *Drosophila melanogaster*, jednym z genów punktów kontrolnych funkcjonujących w tym okresie morfogenezy jest *grapes* (*grp*). Jego produkt – Grp jest homologiem kinazy Chk1. Mutanty *grapes* wykazują skrócony przebieg interfazy, defektywną kondensację chromosomów i opóźnienia inicjacji metafazy. W tym przypadku przyczyną przedwcześnie rozpoczynającej się mitozy także staje się omińnięcie wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S (kondensacja chromosomów nie jest wówczas zależna od ukończenia fazy S), ale jednocześnie moment rozpoczęcia procesu kondensacji chromosomów – ICC (ang. *Initiation of Chromosome Condensation*) następuje bez opóźnienia; skróceniu ulega jedynie okres pomiędzy ICC i metafazą, co jest bezpośrednią przyczyną niepełnej kondensacji chromosomów. Wydaje się zatem, że u *D. melanogaster* przyczyną opóźnień we wchodzeniu embrionów *grp* w metafazę są raczej defekty w kondensacji chromatyny, a nie częściowa tylko replikacja DNA [cyt. za 75].

Zjawisko przedwczesnej mitozy stanowi nie tylko istotny problem podstawowy biologii cyklu komórkowego, ale także zagadnienie ważne ze względu na potencjalne zastosowania medyczne. Metody radio- i chemioterapii stosowane w leczeniu chorób nowotworowych prowadzą do rozległych uszkodzeń DNA, wstrzymujących proces replikacji materiału genetycznego. Zdaniem wielu badaczy, nasilenie oddziaływania terapeutycznego wynikać może z pobudzenia tych mechanizmów biochemicznych, które omijając działanie wewnętrznego punktu kontrolnego fazy S, wywoływać będą przedwczesną kondensację chromosomów.

LITERATURA

- [1] ALAO JP, SUNNERHAGEN P. Rad3 and Sty1 function in *Schizosaccharomyces pombe*: an integrated response to DNA damage and environmental stress? *Mol Microbiol* 2008; **68**: 246–254.
- [2] ALVINO GM, COLLINGWOOD D, MURPHY JM, DELROW J, BREWER BJ, RAGHURA-MAN MK. Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 6396–6406.
- [3] BAILIS JM, LUCHE DD, HUNTER T, FORSBURG SL. Minichromosome maintenance proteins interact with checkpoint and recombination proteins to promote S-phase genome stability. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 1724–1738.
- [4] BALAJEE AS, GEARD CR. Replication protein A and gamma-H2AX foci assembly is triggered by cellular response to DNA double-strand breaks. *Exp Cell Res* 2004; **300**: 320–334.
- [5] BARTEK J, LUKAS C, LUKAS J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 792–804.
- [6] BASCHAL EE, CHEN KJ, ELLIOT LG, HERRING MJ, VERDE SC, WOLKOW TD. The fission yeast DNA structure checkpoint protein Rad26^{ATRIPLCDI/UVSD} accumulates in the cytoplasm following microtubule destabilization. *BMC Cell Biology* 2006; **7**: 32–49.
- [7] BASHKIROV VI, HERZBERGK, HAGHNAZARI E, VLASENKO AS, HEYER WD. DNA damage-induced phosphorylation of Rad55 protein as a sentinel for DNA damage checkpoint activation in *S. cerevisiae*. *Methods Enzymol* 2006; **409**: 166–182.
- [8] BLOW JJ, HODGSON B. Replication licensing – defining the proliferative state? *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 72–78.
- [9] BODDY MN, RUSSELL P. DNA replication checkpoint control. *Front Biosci* 1999; **1**: D841–848.
- [10] BRANZEI D, FOIANI M. Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair* 2007; **6**: 994–1003.
- [11] BREM R, FERENT M, CHAPORT B, HALL J. The methyl methanesulfonate induced S-phase delay in XRCC1-deficient cells requires ATM and ATR. *DNA Repair* 2008; **7**: 849–857.
- [12] CHEN Y, POON RY. The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Front Biosci* 2008; **13**: 5016–5029.
- [13] CIMPRICH KA. Fragile sites: breaking up over a slowdown. *Curr Biol* 2003; **13**: R231–R233.
- [14] CIMPRICH KA, CORTEZ D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 616–627.
- [15] COBB JA, SCHLEKERT T, ROJAS V, BJERGBAEEK L, TERCERO JA, GASSER SM. Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* 2005; **19**: 3055–3069.
- [16] COMESS KM, TRUMBULL JD, PARK C, CHEN Z, JUDGE RA, VOORBACH MJ, COEN M, GAO L, TANG H, KOVAR P, CHENG X, SCHURDAK ME, ZHANG H, SOWIN T, BURNS DJ. Kinase drug discovery by affinity selection/mass spectrometry (ASMS): application to DNA damage checkpoint kinase Chk1. *J Biomol Screen* 2006; **11**: 755–764.
- [17] CONSTANTINI M, BERNARDI G. Replication timing, chromosomal bands, and isochores. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 3433–3437.
- [18] CONTI C, SEILER JA, POMMIER Y. The mammalian DNA replication elongation checkpoint. *Cell Cycle* 2007; **6**: 2760–2767.
- [19] CORTEZ D. Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases. *J Biol Chem* 2003; **278**: 37139–37145.
- [20] DAVIDSON IF, LIA, BLOW JJ. Deregulated replication licensing causes DNA fragmentation consistent with head-to-tail fork collision. *Mol Cell* 2006; **24**: 433–443.
- [21] ELLEDGE SJ. Cell cycle checkpoint: preventing an identity crisis. *Science* 1996; **274**: 1664–1672.
- [22] ERENPREISA J, KALEJS M, IANZINI F, KOSMACEK EA, MACKKEY MA, EMZINSH D, CRAGG MS, IVANOVA, ILLIDGE TM. Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe. *Cell Biol Int* 2005; **29**: 1005–1011.
- [23] FENG W, COLLINGWOOD D, BOECK ME, FOX LA, ALVINO GM, FANGMAN WL, RAGHURA-MAN MK, BREWER BJ. Genomic mapping of single-stranded DNA in hydroxyurea-challenged yeast identifies origins of replication. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 148–155.

- [24] FREIRE R, VAN VUGT MA, MAMELY I, MEDEMA RH. Claspin: timing the cell cycle arrest when the genome is damaged. *Cell Cycle* 2006; **5**: 2831–2834.
- [25] GOTOH E, DURANTE M. Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J Cell Physiol* 2006; **209**: 297–304.
- [26] HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- [27] HERRICK J, BENSIMON A. Global regulation of genome duplication in eukaryotes: an over-view from the epifluorescence microscope. *Chromosoma* 2008; **117**: 243–260.
- [28] HERZBERG K, BASHKIROV VI, ROLFSMEIER M, HAGHNAZARI E, McDONALD WH, ANDERSON S, BASHKIROVA EV, YATES JR 3RD, HEYER WD. Phosphorylation of Rad55 on serines 2, 8, and 14 is required for efficient homologous recombination in the recovery of stalled replication forks. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 8396–83409.
- [29] HORTON JK, STEFANICK DF, KEDAR PS, WILSON SH. ATR signaling mediates an S-phase checkpoint after inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *DNA Repair* 2007; **6**: 742–750.
- [30] JIANG K, PEREIRA E, MAXFIELD M, RUSSELL B, GOUDELOCK DM, SANCHEZ Y. Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. *J Biol Chem* 2003; **278**: 25207–25217.
- [31] KAI M, BODDY MN, RUSSELL P, WANG TS-F. Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev* 2005; **19**: 919–932.
- [32] KAI M, WANG TS-F. Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis. *Mutat Res* 2003; **532**: 59–73.
- [33] KING JB, GROSS J, LOVLY CM, ROHRS H, PIWNICA-WORMS H, TOWNSEND RR. Accurate mass-driven analysis for the characterization of protein phosphorylation. Study of the human Chk2 protein kinase. *Anal Chem* 2006; **78**: 2171–2181.
- [34] KINNER A, WU W, STAUDT C, ILIAKIS G. γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**: 5678–5694.
- [35] KUMAGAI A, LEE J, YOO HY, DUNPHY WG. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 2006; **124**: 943–955.
- [36] LEE J, KUMAGAI A, DUNPHY WG. The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J Biol Chem* 2007; **282**: 28036–28044.
- [37] LEUNG-PINEDA V, RYAN CE, PIWNICA-WORMS H. Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 7529–7538.
- [38] LIN JJ, DUTTA A. ATR pathway is the primary pathway for activating G2/M checkpoint induction after re-replication. *J Biol Chem* 2007; **282**: 30357–30362.
- [39] LONGHESE MP, CLERICI M, LUCCHINI G. The S-phase checkpoint and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 2003; **532**: 41–58.
- [40] LUCIANI MG, OEHLMANN M, BLOW JJ. Characterization of a novel ATR-dependent, Chk1-independent, intra-S-phase checkpoint that suppresses initiation of replication in *Xenopus*. *J Cell Sci* 2004; **117**: 6019–6030.
- [41] MAJKA J, BURGERS PM. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004; **78**: 227–260.
- [42] MAJKA J, NIEDZIELA-MAJKA A, BURGERS PMJ. The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol Cell* 2006; **24**: 891–901.
- [43] MANSILLA S, BATALLER M, PORTUGAL J. Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2006; **6**: 589–602.
- [44] MANTHEY KC, OPIYO S, GLANZER JG, DIMITROVA D, ELLIOTT J, OAKLEY GG. NBS1 mediates ATR-dependent RPA hyperphosphorylation following replication-fork stall and collapse. *J Cell Sci* 2007; **120**: 4221–4229.
- [45] MARHEINEKE K, HYRIEN O. Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint. *J Biol Chem* 2004; **279**: 28071–28081.
- [46] MASZEWSKI J, POLIT J. Kontrola replikacji DNA w cyklu komórkowym. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 571–589.
- [47] MICKLE KL, RAMANATHAN S, ROSEBROCK A, OLIVA A, CHAUDARI A, YOMPA-KDEE C, SCOTT D, LEATHERWOOD J, HUBERMAN JA. Checkpoint independence of most DNA replication origins in fission yeast. *BMC Mol Biol* 2007; **8**: 112–139.

- [48] MORDES DA, CORTEZ D. Activation of ATR and related PIKKs. *Cell Cycle* 2008; **7**: 2809–2812.
- [49] MÜLLER B, BLACKBURN J, FEIJOO C, ZHAO X, SMYTHE C. DNA-activated protein kinase functions in a newly observed S phase checkpoint that links histone mRNA abundance with DNA replication. *J Cell Biol* 2007; **179**: 1385–1398 [Erratum in: *J Cell Biol* 2008; **180**: 843].
- [50] MYERS JS, ZHAO R, XU X, HAMA A-JL, CORTEZ D. Cyclin-dependent kinase 2-dependent phosphorylation of ATRIP regulates the G₂-M checkpoint response to DNA damage. *Cancer Res* 2007; **67**: 6685–6690.
- [51] NALLAMSHETTY S, CROOK M, BOEHM M, YOSHIMOTO T, OLIVE M, NABEL EG. The cell cycle regulator p27Kip1 interacts with MCM7, a DNA replication licensing factor, to inhibit initiation of DNA replication. *FEBS Lett* 2005; **579**: 6529–6536.
- [52] NAMIKI Y, ZOU L. ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 580–585.
- [53] NAVADGI-PATIL VM, BURGERS PM. Yeast DNA replication protein Dpb11 activates the Mec1/ATR checkpoint kinase. *J Biol Chem* 2008; doi/10.1074/jbc.M807435200.
- [54] NG C-P, LEE HC, HO CW, ARKOZ T, SIU WY, LAU A, POON RYC. Differential mode of regulation of the checkpoint kinases CHK1 and CHK2 by their regulatory domain. *J Biol Chem* 2004; **279**: 8808–8819.
- [55] NIIDA H, NAKANISHI M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 2006; **21**: 3–9.
- [56] NIIMI A, BROWN S, SABBIONEDA S, KANNOUCHE PL, SCOTT A, YASUI A, GREEN CM, LEHMANN AR. Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 16125–16130.
- [57] NISHITANI H, LYGEROU Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* 2002; **6**: 523–534.
- [58] NISHITANI H, LYGEROU Z. DNA replication licensing. *Front Biosci* 2004; **9**: 2115–2132.
- [59] NOGUCHI E, NOGUCHI C, DU LL, RUSSELL P. Swi1 prevents replication fork collapse and controls checkpoint kinase cds1. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 7861–7874.
- [60] NOJIMA H. Protein kinases that regulate chromosome stability and their downstream targets. *Genome Dyn* 2006; **1**: 131–148.
- [61] OSBORN AJ, ELLEDGE SJ, ZOU L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 509–516.
- [62] OSMAN F, DIXON J, DOE CL, WHITBY MC. Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol Cell* 2003; **12**: 761–774.
- [63] PASERO P, SHIMADA K, DUNCKER BP. Multiple roles of replication forks in S phase checkpoints: sensors, effectors and targets. *Cell Cycle* 2003; **2**: 568–572.
- [64] PAULSEN RD, CIMPRICH KA. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair* 2007; **6**: 953–966.
- [65] PAWELCZAK KS, TURCHI JJ. A mechanism for DNA-PK activation requiring unique contributions from each strand of a DNA terminus and implications for microhomology-mediated nonhomologous DNA end joining. *Nucleic Acid Res* 2008; **36**: 4022–4031.
- [66] PETERMANN E, CALDECOTT KW. Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. *Cell Cycle* 2006; **5**: 2203–2209.
- [67] PETERMANN E, HELLEDAY T, CALDECOTT KW. Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 2373–2378.
- [68] PETERMANN E, MAYA-MENDOZA A, ZACHOS G, GILLESPIE DAF, JACKSON DA, CALDECOTT KW. Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 3319–3326.
- [69] POLIT J, MASZEWSKI J, KAŻMIERCZAK A. Effect of BAP and IAA on the expression of G1 and G2 control points and G1-S and G2-M transitions in root meristem cells of *Vicia faba*. *Cell Biol Int* 2003; **27**: 559–566.
- [70] POST SM, TOMKINSON AE, LEE EY-HP. The human checkpoint Rad protein Rad17 is chromatin-associated throughout the cell cycle, localizes to DNA replication sites, and interacts with DNA polymerase ϵ . *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 5568–5575.
- [71] RAPE M, KIRSCHNER MW. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 2004; **432**: 588–595.
- [72] RAY D, KIYOKAWA H. CDC25A phosphatase: a rate-limiting oncogene that determines genomic stability. *Cancer Res* 2008; **68**: 1251–1253.

- [73] RHIND N. An intrinsic checkpoint model for regulation of replication origins. *Cell Cycle* 2008; **7**: 2619–2620.
- [74] ROMERO J, LEE H. Asymmetric bidirectional replication at the human DBF4 origin. *Nat Struct Mol Biol* 2008; **15**: 722–729.
- [75] ROYOU A, MACIAS H, SULLIVAN W. The *Drosophila* Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. *Curr Biol* 2005; **15**: 334–349.
- [76] RYBACZEK D, BODYS A, MASZEWSKI J. H2AX foci in late S/G2- and M-phase cells after hydroxyurea- and aphidicolin-induced DNA replication stress in *Vicia*. *Histochem Cell Biol* 2007; **128**: 227–241.
- [77] RYBACZEK D, MASZEWSKI J. Komórkowe systemy regulacyjne. Mechanizmy sprzężeń zwrotnych i zależność substrat-produkt w cyklu komórkowym. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 631–645.
- [78] RYBACZEK D, MASZEWSKI J. Phosphorylation of H2AX histones in response to double-strand breaks and induction of premature chromatin condensation in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Raphanus sativus*, *Vicia faba*, and *Allium porrum*. *Protoplasma* 2007a; **230**: 31–39.
- [79] RYBACZEK D, MASZEWSKI J. Induction of foci of phosphorylated H2AX histones and pre-mature chromosome condensation after DNA damage in *Vicia faba* root meristem. *Biol Plantarum* 2007b; **51**: 443–450.
- [80] RYBACZEK D, ŻABKAA, PASTUCHAA, MASZEWSKI J. Various chemical agents can induce premature chromosome condensation in *Vicia faba*. *Acta Physiol Plant* 2008; **30**: 663–672.
- [81] SABISZ M, SKŁADANOWSKI A. Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Curr Pharm Biotechnol* 2008; **9**: 325–336.
- [82] SCHMEGNER C, HAMEISTER H, VOGEL W, ASSUM G. Isochores and replication time zones: a perfect match. *Cytogenet Genome Res* 2007; **116**: 167–172.
- [83] SCLAFANI RA, HOLZEN TM. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet* 2007; **41**: 237–280.
- [84] SCORAH J, DONG M-Q, YATES III JR, SCOTT M, GILLESPIE D, MCGOWAN CH. A conserved PCNA-interacting protein sequence in Chk1 is required for checkpoint function. *J Biol Chem* 2008; **283**: 17250–17259.
- [85] SHIMURA T, MARTIN MM, TORRES MJ, GU C, PLUTH JM, DEBERNARDI MA, Mc-DONALD JS, ALADJEM MI. DNA-PK is involved in repairing a transient surge of DNA breaks induced by deceleration of DNA replication. *J Mol Biol* 2007; **367**: 665–680 [Erratum in: *J Mol Biol* 2007; **370**: 1033].
- [86] SIFF T, WALKER SA, CEROSALETTI K, GOODARZII AA, PETERMANN E, CONCANNON P, O'DRISCOLL M, JEGGO PA. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 2006; **25**: 5775–5782.
- [87] SINGH VK, NURMOHAMED S, DAVEY SK, JIA Z. Tri-cistronic cloning, overexpression and purification of human Rad9, Rad1, Hus1 protein complex. *Protein Express Purif* 2007; **54**: 204–211.
- [88] SIU WY, LAU A, AROOZ T, CHOW JP, HO HT, POON RY. Topoisomerase poisons differentially activate DNA damage checkpoints through ataxia-telangiectasia mutated-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**: 621–632.
- [89] SYLJUÅSEN RG, SØRENSEN CS, HANSEN LT, FUGGER K, LUNDIN C, JOHANSSON F, HELLEDAY T, SEHESTED M, LUKAS J, BARTEK J. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 3553–3562.
- [90] TERCERO JA, LONGHESE MP, DIFFLEY JF. A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* 2003; **11**: 1323–1336.
- [91] TOMINAGA Y, WANG A, WANG RH, WANG X, CAO L, DENG CX. Genistein inhibits Brca1 mutant tumor growth through activation of DNA damage checkpoints, cell cycle arrest, and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 472–479.
- [92] TOURRIÈRE H, PASERO P. Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair* 2007; **6**: 900–913.
- [93] TRENZ K, ERRICO A, COSTANZO V. Plx1 is required for chromosomal DNA replication under stressful conditions. *EMBO J* 2008; **27**: 876–885.
- [94] UNSAL-KAÇMAZ K, CHASTAIN PD, QU PP, MINOO P, CORDEIRO-STONE M, SANCARA, KAUFMANN WK. The human Tim/Tipin complex coordinates an intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 3131–3142.
- [95] VAKIFAHMETOGLU H, OLSSON M, ZHIVOTOVSKY B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1153–1162.

- [96] WAKABAYASHI M, ISHII C, INOUE H, TANAKA S. Genetic analysis of CHK1 and CHK2 homologues revealed a unique cross talk between ATM and ATR pathways in *Neurospora crassa*. *DNA Repair* 2008; **7**: 1951–1961.
- [97] WALKER A, ACQUAVIVA C, MATSUSAKA T, KOOP L, PINES J. UbcH10 has a rate-limiting role in G1 phase but might not act in the spindle checkpoint or as part of an autonomous oscillator. *J Cell Sci* 2008; **121**: 2319–2326.
- [98] XIAO Z, XUE J, SOWIN TJ, ZHANG H. Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 1935–1943.
- [99] ZACHOS G, GILLESPIE DAF. Role of Chk1 in regulating the onset and progression of unperturbed mitosis in vertebrate cells. *Cell Cycle* 2007; **6**: 810–813.
- [100] ZOU L, ELLEDGE SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 2003; **300**: 1542–1548.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 02.12.2008 r.

Przyjęto: 19.01. 2009 r.

Dorota Rybaczek, Katedra Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego,

90-231 Łódź, ul. Pilarskiego 14

e-mail: doryb@biol.uni.lodz.pl