Regulacija staničnog ciklusa ubikvitinacijom proteina

Klasić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:428700

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

REGULACIJA STANIČNOG CIKLUSA UBIKVITINACIJOM PROTEINA

CELL CYCLE REGULATION BY PROTEIN UBIQUITINATION

SEMINARSKI RAD

Marija Klasić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Zagreb, 2009.

KRATICE

APC/C (od engl. Anaphase-promoting complex/cyclosome) – kompleks koji potpomaže anafazu

BTB (od engl. Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac) – domena BTB

CDK (od engl. Cyclin-dependent kinase) – kinaza ovisna o ciklinima

CDK1 (od engl. Cyclin-dependent kinase) - ciklin ovisna kinaza 1

CeMEI-1 (od engl. Defective MEIosis-1) – protein MEI-1 iz organizma *Caenorhabditis elegans*

CeMEL-26 (od engl. Maternal Effect Lethal 26) – protein MEL-26 iz organizma *C. elegans*

MAB (MATH-BTB) - protein s domenama MATH i BTB

MATH (od engl. Meprin and TRAF homology) – domena MATH

MCC (od engl. Mitotic checkpoint complex) - kompleks kontrolne točke mitoze

Nek2A - NIMA-povezana kinaza 2A

POZ (od engl. Poxvirus and zincfinger) – domena POZ

SAC (od engl. Spindle assembly checkpoint) - kontrolna točka diobenog vretena

SCF complex (od engl. Skp, Cullin, F-box containing complex) – kompleks koji sadrži protein Skp, kulin i protein s domenom F-box

T1-Kv - naponom regulirani kalijevi kanali T1

Tome-1 (od engl. Trigger of mitotic entry 1) – protein Tome-1, okidač ulaska u mitozu

ZF (od engl. Zincfinger) – domena cinkov prst

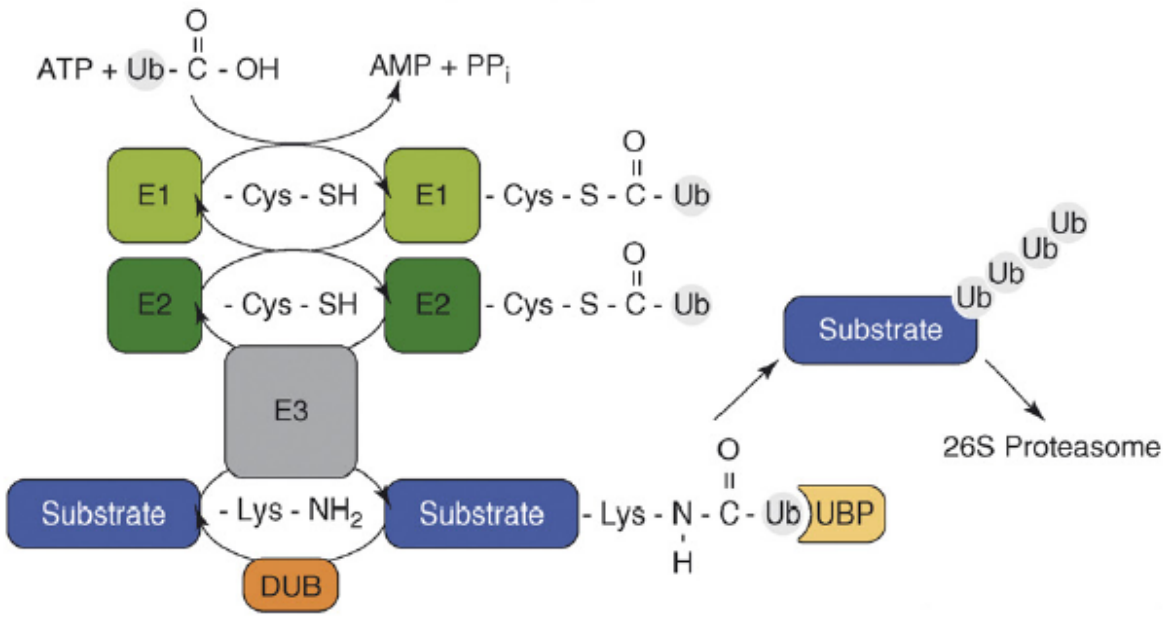
NPH (od engl. nonphototropic hypocotyls) – domena NPH

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. E3 UBIKVITIN LIGAZE 2
   - 2.1. E3 LIGAZE TIPA APC/C 3
   - 2.2. E3 LIGAZE TIPA SCF 3
   - 2.3. E3 LIGAZE OVISNE O KULINU 3 4
3. REGULACIJA MITOZE POMOĆU E3 LIGAZA OVISNIH O KULINU 6
   - 3.1. ULAZAK U MITOZU 6
   - 3.2. PROMETAFAZA I METAFAZA 7
   - 3.3. POČETAK ANAFAZE 8
   - 3.4. CITOKINEZA 9
   - 3.5. IZLAZ IZ MITOZE 9
4. ZAKLJUČAK 11
5. LITERATURA 12
6. SAŽETAK 14
7. SUMMARY 15

1. UVOD

Stanični ciklus eukariotskih stanica sastoji se od četiriju zasebnih, ali međusobno povezanih procesa: rasta stanice, replikacije molekula DNA, raspodjele tih molekula stanicama kćerima i na kraju podjele stanica. Prilikom G1-faze stanica je metabolički aktivna i raste, ali ne dolazi do replikacije DNA. Molekule DNA udvostručuju se u S-fazi staničnog ciklusa, nakon čega slijedi njihova postupna kondenzacija, tj. formiranje metafaznih kromosoma. Nakon S-faze slijedi G2-faza u kojoj stanica opet raste i sintetiziraju se proteini potrebni tijekom mitoze. Mitoza se sastoji od četiriju događaja, a to su profaza, metafaza, anafaza i telofaza. Formiranje diobenog vretena u profazi i vezanje na kromosome omogućuje njihovu pravilnu segregaciju i određuje mjesto gdje će se dogoditi citokineza. Svaki od gore navedenih procesa mora biti precizno reguliran. Pravilna dioba eukariotskih stanica zahtjeva vremensku i prostornu koordinaciju morfoloških promjena koje omogućuju da se genom jednako raspodijeli u stanice kćeri prilikom mitoze. Stanični ciklus reguliran je fosforilacijom i ciljanom proteolizom. Varirajuća aktivnost ciklin-ovisnih kinaza (CDK, od engl. Cyclin-dependent kinase) Aurore i Polo-sličnih kinaza određuje fosforilacijska stanja mnogih važnih regulatora (Nigg 2001). Ciljana proteoliza omogućuje ireverzibilnost određenih procesa tijekom staničnog ciklusa. Razgradnja proteina koja je ovisna o ubikvitinu jedan je od vrlo važnih mehanizama regulacije staničnog ciklusa. Prilikom tog događaja, mali protein ubikvitin se veže na protein koji se treba razgraditi i omogućuje njegov prijenos na kompleks 26S proteosom gdje će doći do njegove razgradnje. Molekule ubikvitina se ne mogu same vezati na protein koji se treba razgraditi, nego u tome sudjeluju tri enzima: E1, enzim koji aktivira ubikvitin, E2, enzim koji spaja ubikvitin i E3, ubikvitin protein ligaza (Sl. 1.).



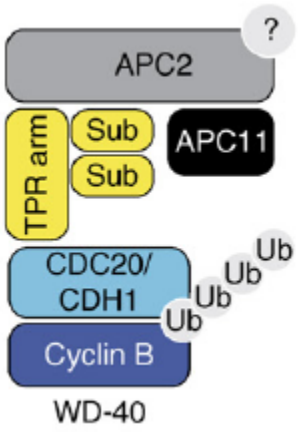
Slika 1. Put kojim se ubikvitin veže na supstrat. Ubikvitin (Ub) se veže na supstrat u tri koraka u koja su uključeni enzimi E1, E2 i E3, što rezultira nastankom poliubikvitinskog lanca. Protein DUB može deubikvitinirati supstrat, a protein UBP može sprječiti nastanak poliubikvitinskog lanca iz monoubikvitinskog, cilja supstrat na razgradnju u 26S proteosomu ili posreduje u novim signalnim događajima (preuzeto iz Sumara i sur. 2007b).

2. E3 UBIKVITIN LIGAZE

E3 ubikvitin ligaze su multiproteinski kompleksi koji specifično prepoznaju supstrat i sudjeluju u njegovoj razgradnji ovisnoj o ubikvitinu. Dijele se u dvije velike skupine, E3 ligaze sa domenom homolognom E6 karboksi kraju (HECT) i ligaze RING-H2. E3 ligaze sa HECT domenom su direktno uključene u prijenos ubikvitina, dok se kod ligaza RING-H2 njihova domena RING veže na enzim E2 koji onda prenosi aktivirani ubikvitin na supstrat. Ovoj skupini pripadaju E3 ligaze ovisne o kulinu.

2.1. E3 ligaze tipa APC/C

Kompleksi APC/C (od engl. Anaphase-promoting complex/cyclosome) otkriveni su u proteinskim ekstraktima jajne stanice vrste *Xenopus,* te genetičkim analizama u kvascima koji nisu mogli normalno razgrađivati mitotske cikline. Imaju važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Na primjer, kod vrste *Xenopus* reguliraju ulazak u anafazu. (Peters 2006). Te E3 ligaze su strukturalno najkompleksnije. Sastoje se od čak 13 esencijalnih podjedinica (Thornton i Toczyski 2006, Sl. 2.).

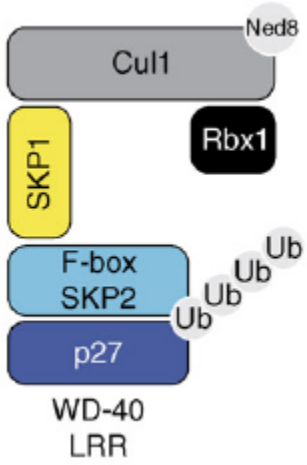


Slika 2. Kompleks APC/C sadrži najmanje 13 različitih podjedinica (obilježeno sa Sub) kojima još nije utvrđena funkcija. Proteini CDC20 i CDH1 vežu se na ruku TPR i služe za vezanje supstrata (preuzeto iz Sumara i sur. 2007b).

2.2. E3 ligaze tipa SCF

SCF-kompleksi (od engl. Skp, Cullin, F-box containing complex) otkriveni su u pivskom kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Sastoje se od kulina1, proteina Rbx1 koji se veže na C-terminalni dio kulina i dijela koji služi za prepoznavanje supstrata - Skp1 koji je vezan na N-terminalni dio kulina (Willems i sur. 2004, Sl. 3.). Rbx1 je važna komponentna u ovoj vrsti E3 ligaza jer služi za interakciju s enzimom E2. Kulin1 služi za pozicioniranje supstrata i enzima E2 da bi moglo doći do uspješne ubikvitinacije (Zheng i sur. 2002). Aktivnost ovih ligaza regulirana je dostupnošću supstrata i fosforilacijskim stanjem. Također, važna je dostupnost proteina F-box

i nedilacija. Nedilacijom se za kulin kovalentno veže protein Nedd8 i aktivira ligazu (Parry i Estelle 2004).

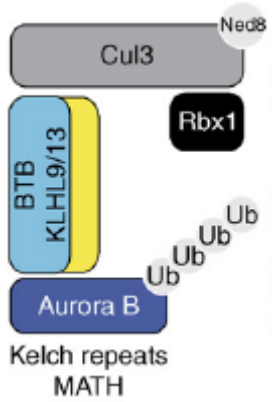


Slika 3. U kulin1-ovisnim (SCF) kompleksima, dio koji prepoznaje supstrat sastoji se od protein Skp1 i proteina koji ima domenu F-box. Ona se sa svojih 40 aminokiselina veže na Skp1. Većina proteina s domenom F-box ima različite motive koji služe za interakciju s drugim proteinima, poput WD-40 i ponavljanja bogatih leucinom (preuzeto iz Sumara i sur. 2007b).

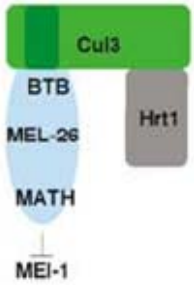
2.3. E3 ligaze ovisne o KULINU 3

Ove ligaze prvi puta su opisane u obliću *Caenorhabditis elegans*, te je ustanovljeno da su evolucijski konzervirane u stanicama sisavaca. Struktura ovih ligaza može se usporediti sa strukturom SCF-kompleksa, osim što protein koji sadrži domenu BTB (od engl. Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac) zamjenjuje modul Skp1-F-box na koji se veže supstrat (Pintard i sur. 2004, Sl. 4.). Domena BTB ili POZ (od engl. Poxvirus and zincfinger) otkrivena je prvotno u genima pox virusa i vinske mušice. Do danas je pronađena u organizmima od kvasaca do čovjeka. Raznovrsne domene BTB imaju različite funkcije u stanici. Neke od njih su transkripcijska regulacija, sastavljanje ionskih kanala, dinamika citoskeleta i obilježavanje proteina za ubikvitinaciju. Domene BTB se nalaze u jednoj kopiji u proteinima koji imaju jedan ili dva tipa drugih domena. Neki od njih su BTB-ZF, BTB-NPH3, BTB-BACK-PHR (BBP), naponom regulirani kalijevi kanali T1 (T1-Kv), BTB-BACK-Kelch (BBK) i MATH-BTB obitelji proteina (Stogios i sur. 2005). Proteini MATH-BTB dio su kompleksa E3 ligaza ovisnih o kulinu3 čovjeka i *C. elegans.* Te ligaze uključene su u različite procese u stanici: reguliraju

mitozu, citokinezu, dinamiku mikrotubula i sastavljanje diobenog vretena pri prijelazu iz mejoze u mitozu. Funkcionalno najistraženiji protein MATH-BTB je CeMEL-26 (od engl. Maternal Effect Lethal 26, sl. 5.). On je odgovoran za prostorno i vremensko upućivanje proteina CeMEI-1 (od engl. Defective MEIosis-1, katanin) za razgradnju u proteosomima (Luke-Glaser i sur. 2007, Pintard i sur. 2003). CeMEI-1 veže se za CeMEL-26 preko njegove domene MATH (od engl. Meprin and TRAF homology). CeMEL-26 odgovoran je za specifičnost prema kataninu, ali se pretpostavlja da su drugi proteini MAB (MATH-BTB) odgovorni za specifičnu razgradnju proteina koji trebaju biti uklonjeni u određenoj fazi razvoja. BTB-proteini koji sadrže ponavljanja Kelch su također sastavni dio E3 ligaza ovisnih o kulinu 3. Ponavljanja Kelch proteina KLHL9 i KLHL13 su dovoljna za vezanje proteina Aurora B u uvjetima *in vitro*. Također, mutacije u C-terminalnom dijelu ponavljanja Kelch proteina KLHL12 sprječavaju vezanje supstrata.



Slika 4. U ligazama ovisnim o kulinu3 BTB-protein čini most između kulina i supstrata. Domena MATH ili ponavljanja Kelch su često odgovorna za interakciju sa supstratom (preuzeto iz Sumara i sur. 2007b).



Slika 5. CeMEL-26 je protein MATH-BTB koji se svojom domenom BTB veže za kulin3, a domenom MATH za supstrat CeMEI-1 koji se ubikvitinira i upućuje na razgradnju u 26S proteosomu (preuzeto iz Luke-Glaser i sur. 2007).

3. REGULACIJA MITOZE POMOĆU E3 LIGAZA OVISNIH O KULINU

Prilikom staničnog ciklusa, veliku ulogu u regulaciji imaju ligaze E3 tipa APC/C koje su aktivne tijekom mitoze i G1-faze u kojima reguliraju razgradnju proteina koji sprječavaju napredovanje mitoze i čija je akumulacija štetna u G1-fazi. Ligaze E3 tipa APC/C omogućuju prijelaz iz metafaze u anafazu degradiranjem sekurina koji je inhibitor separaze. Izlazak iz mitoze reguliraju razgradnjom mitotskih ciklina. Također, u regulaciji mitoze sudjeluju i SCF-kompleksi koji kontroliraju rane događaje u mitozi kod kralježnjaka. Kod kvasaca, SCF-kompleksi utječu na pravilnu citokinezu. "Kulin-3-ovisne ligaze" također reguliraju napredovanje mitoze, kontrolirajući položaj kromosoma i citokinezu.

3.1. ULAZAK U MITOZU

Jedan od ključnih regulatora staničnog ciklusa je kompleks Cdc2-ciklin B poznat još i kao ciklin ovisna kinaza 1 (CDK1). Njegovom aktivacijom potiče se ulazak u mitozu, tj. prijelaz iz G2- u M-fazu staničnog ciklusa. U tom kompleksu, Cdc2 je protein-kinaza, a ciklin B je regulatorna podjedinica koja je potrebna za katalitičko djelovanje Cdc2. Aktivnost tog enzima regulirana je fosforilacijom podjedinice Cdc2. Fosforilacija na Thr161 omogućuje vezanje na

ciklin B, a fosforilacija na Thr14 i Tyr15 sprječava vezanje na ciklin B. Protein koji obavlja tu inhibitornu fosforilaciju je kinaza Wee1. Pošto je ta kinaza ključni negativni regulator mitoze, ona mora biti eliminirana u interfazi da bi moglo doći do mitoze. Ona se degradira u G2-fazi. Za njenu degradaciju potreban je E2-enzim Cdc34 i 2 različita F-box-proteina. Jedan od njih je Tome-1 (od engl. Trigger of mitotic entry 1) koji je dio jednog od SCF-kompleksa, a vezan je na protein Skp1 (Sumara i sur. 2007b). Važno je naglasiti kako se kinaza Wee1 mora sintetizirati početkom interfaze kako bi inhibirala CDK 1. Da bi došlo do njene sinteze, treba se razgraditi Tome-1. On se razgrađuje u G1-fazi uz pomoć E3 ligaze tipa APC/C. Ovim primjerom vidi se da kompleksi SCF i APC zajedno sudjeluju u regulaciji CDK1 i ulaska stanice u mitozu (Ayad i sur. 2003). Drugi kompleks kojim se eliminira Wee1 je $SCF^{\beta TrCP1}$. Za ulazak u mitozu važna je i aktivacija fosfataze CDC25 koja defosforilira Tyr15 na podjedinici Cdc2 i na taj način omogućuje ulazak u mitozu. Ukoliko je genom oštećen ili nije dobro repliciran, CDC25 se inaktivira pomoću $SCF^{\beta TrCP1}$ nakon fosforilacije kinazom Chk. Znači, kompleks $SCF^{\beta TrCP1}$ je odgovoran za degradaciju CDC25 i Wee1, ovisno o uvjetima u kojima se stanica nalazi. Za ulazak u mitozu bitna je i aktivnost E3 ligaze APC^{Cdc20} koja obilježava protein p21 za degradaciju. Taj protein je inhibitor CDK1 i prisutan je tijekom G2-faze staničnog ciklusa, pa je za ulazak u mitozu potrebna njegova razgradnja (Sumara i sur. 2007b). Za ulazak stanice u mitozu važan je i ciklin A. Ciklini A i B nakupljaju se tijekom interfaze, a počinju se degradirati pred kraj mitoze i na taj način kontroliraju izlazak stanice iz mitoze. Ciklin B degradira se kompleksom APC/C (Ayad i sur. 2003).

3.2. PROMETAFAZA I METAFAZA

Pravilno postavljanje i orijentiranje kromosoma u diobenom vretenu vrlo je važno, jer osigurava pravilnu raspodjelu kromosoma u stanice-kćeri. Na centromernu DNA kondenziranih kromosoma vežu se kinetohori, proteinske strukture koje služe za povezivanje kromosoma s diobenim vretenom. Cijeli proces nadgleda kontrolna točka diobenog vretena (SAC, od engl. Spindle assembly checkpoint). Ako se svi kromosomi ne rasporede pravilno u metafaznoj ploči, tj. ako kinetohori nisu dobro vezani za mikrotubule, mitoza se zaustavlja u metafazi i ne može početi anafaza. Glavni cilj kompleksa SAC je kompleks kontrolne točke mitoze (MCC, od engl.

Mitotic checkpoint complex) koji inhibira aktivnost APC/C i na taj način sprječava preuranjeno odvajanje kromosoma (Sudakin i sur. 2001). Tijekom profaze i prometafaze je važna aktivnost ligaza APC/C. APC^{Cdc20} degradira ciklin A i NIMA-povezanu kinazu 2A (Nek2A) koja regulira odvajanje centrosoma tijekom ranih stadija mitoze. Uz E3 ligaze APC/C, u ovom stadiju mitoze potrebne su i E3 ligaze ovisne o kulinu3. Kod ljudi je kompleks kulin3-KLHL9-KLHL-13 potreban za pravilno vezanje kromosoma i napredovanje mitoze tako što ubikvitinira protein Aurora B. Ubikvitinirana Aurora B dolazi u interakciju sa AAA-ATP-azom p97 koja omogućava disocijaciju proteina Aurora B s mitotskih kromosoma prilikom njihovog poravnavanja u metafaznu ploču. Zanimljivo je što inaktivacijom kompleksa kulin3-KLHL9-KLHL-13 ne dolazi do povećanja količine Aurore B u citoplazmi, što ukazuje da se ova ubikvitinacija događa lokalno. Također, Aurora B se ne ubikvitinira da bi se razgradila, nego se na taj način signalizira njeno micanje s mitotskih kromosoma (Ramadan i sur. 2007). Postoji još jedan primjer gdje se supstrat samo ubikvitinira, ali se ne razgrađuje. To je protein survivin koji sudjeluje u poravnavanju kromosoma, a čija se lokalizacija regulira ubikvitinacijom (Vong i sur. 2005).

3.3. POČETAK ANAFAZE

Nakon što se DNA udvostruči u S-fazi, sestrinske kromatide drže se zajedno uz pomoć multiproteinskog kompleksa kohezina. Da bi u anafazi došlo do razdvajanja sestrinskih kromatida, kohezin se mora ukloniti. Njegova razgradnja događa se u dva koraka: prvo dolazi do fosforilacije u ranom stadiju mitoze, a zatim dolazi do proteolize njegove podjedinice Scc1. To obavlja proteaza separaza. Prije anafaze separaza je inaktivirana djelovanjem inhibitora sekurina. Da bi stanica ušla u anafazu, sekurin se mora degradirati kompleksom APC/C^{Cdc20}. On se razgrađuje nakon što se svi kinetohori vežu za diobeno vreteno, tj. nakon inaktivacije kontrolne točke diobenog vretena, zajedno s ciklinom B. Također, ustanovljeno je da je razgradnja nekih supstrata ligaza APC/C prostorno uvjetovana. Na primjer, proteoliza ciklina B događa se na diobenom vretenu, s tim da započinje na polovima. Moguće je da je ta lokalizacija određena položajem proteina CDC20 koji je aktivator APC/C, te se nalazi na mikrotubulima (Raff i sur. 2002). Važnu ulogu u prostornoj kontroli proteolize ciklina B ima i E2-enzim Vihar koji se nalazi na centrosomima (Mathe i sur. 2004).

3.4. CITOKINEZA

Nakon anafaze, dolazi do puno morfoloških promjena kojima se stanica priprema na citokinezu. Dobro uspostavljeno anafazno diobeno vreteno je preduvjet za vjernu citokinezu. Jedan od ciljnih proteina prilikom citokineze je Klp2 (TPX1), protein koji je vezan na mikrotubule. Njegova količina je velika tijekom mitoze, a naglo se smanjuje pri izlasku iz mitoze. On se degradira uz pomoć APC/C-kompleksa i njegova degradacija utječe na strukturu diobenog vretena u anafazi i tijekom citokineze (Stewart i Fang 2005). Postoji još jedan protein, anilin, koji je također supstrat kompleksa APC, a vezan je za aktin i sudjeluje u prostornoj kontroli kontrakcije aktomiozinskog prstena prilikom citokineze. Njegova količina je slična kao i količina TPX1 tijekom staničnog ciklusa, tj. velika je tijekom mitoze, a naglo se smanjuje pri izlasku iz mitoze i ulasku u interfazu. Jedan od načina na koji se regulira prijelaz iz anafaze u telofazu, kao i sama citokineza je kontrola proteolize proteina vezanih za stanični kostur. Također, ako dođe do inaktivacije ligaze kulin3-KLHL9-KLHL13, neće doći do citokineze, vjerojatno jer je poremećana regulacija proteina Aurora B (Sumara i sur. 2007a). Aurora B se tijekom anafaze lokalizira u središnjem dijelu stanice, određujući gdje će doći do citokineze. Ako je ligaza kulin3-KLHL9-KLHL13 inaktivna, neće doći do disocijacije Aurore B s kromosoma i neće se lokalizirat u središnjem dijelu, pa neće doći ni do citokineze.

3.5. IZLAZ IZ MITOZE

Za izlazak iz mitoze važna je inaktivacija CDK. Da bi se održala jednosmjernost svih prijelaza, vrlo je važna proteoliza ključnih regulatora. Jedan od tih regulatora je ciklin B, čijom razgradnjom stanica izlazi iz mitoze i proces je ireverzibilan. Ako se ciklin B ne razgradi na vrijeme, izlazak iz mitoze i citokineza postaju reverzibilni procesi, čak i u onim stanicama u kojima se već dogodila dekondenzacija kromosoma i gdje je uspostavljena interfazna jezgra (Potapova i sur. 2006). Za izlazak iz mitoze potrebna je i inaktivacija proteina PLK1 koja se događa u anafazi uz pomoć kompleksa APC (Lindon i Pines 2004). APC^{Cdh1} također ubikvitinira protein Skp2 tijekom G1-faze, omogućujući akumulaciju p27, inhibitora CDK2. Ukoliko je Skp2 mutiran i na njega se ne može vezati kompleks APC, neće doći do akumulacije p27 i stanica će

ranije ući u S-fazu (Wei i sur. 2004). Kompleks APC također razgrađuje i Tome-1 tijekom G1-faze (Ayad i sur. 2003). Znači, mehanizam kojim APC regulira pravilnu degradaciju SCF-supstrata i održavanje G1-faze je degradacija sastavnih dijelova kompleksa SCF, pa dolazi do njihove inaktivacije.

4. ZAKLJUČAK

Stanični ciklus mora biti vrlo precizno reguliran, jer bi greške prilikom ciklusa mogle biti kobne za samu stanicu ili čak čitavi organizam. Važan mehanizam regulacije staničnog ciklusa je proteoliza, a njena značajna osobina važna za preciznu kontrolu je ireverzibilnost. Jedan od najvažnijih načina regulacije razgradnje proteina je ona ovisna o ubikvitinu. Važno je istaknuti da prilikom ovakve kontrole, nakon ubikvitinacije supstrata ne mora uvijek doći do njegove razgradnje, nego takav ubikvitinirani supstrat može promjeniti svoju konformaciju što utječe na mogućnost vezanja s drugim proteinima. Pravovremena razgradnja kontrolira se dodatnom uzajamnom regulacijom ligaza E3 i samih supstrata, a aktivnost samih ligaza E3 regulirana je proteolizom njihovih sastavnica.

Veliku ulogu u regulaciji ulaska u mitozu, izlaska iz nje i ulaska u S-fazu imaju E3 ligaze tipa SCF i APC/C. U novije vrijeme pronađeno je da su i E3 ligaze ovisne o kulinu3 značajni regulatori mitoze. Zanimljivo kod E3 ligaza ovisnih o kulinu3 je to što se na jedan kulin može vezati više E3 ligaza, pa se povećava kompleksnost regulacije staničnog ciklusa ubikvitinskom razgradnjom.

Kod ljudi postoji više od 50 proteina s domenom F-box, 200 proteina BTB i otprilike 320 gena koji kodiraju za motiv WD-40 koji svi mogu stvarati komplekse s ligazama E3, a što ukazuje na veliku raznovrsnost mogućih interakcija. Ipak, još se malo zna o E3 ligazama ovisnim o kulinu3, njihovim supstratima i fiziološki značajnim interakcijama.

Važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa imaju i posttranslacijske modifikacije kao što je fosforilacija. Određeni supstrati moraju se prije vezanja na specifični adaptor fosforilirati, da bi vezanje uopće bilo moguće. Jedan od primjera fosforilacije tijekom staničnog ciklusa je fosforilacija proteina Emi1 (fosforilira ju PLK1 u profazi) da bi se vezao na kompleks $SCF^{\beta TrCP}$ i degradirao se. Degradacijom Emi1 dolazi do aktivacije APC/C čime se omogućuje napredovanje u prometafazu.

Iz svih gore navedenih podataka može se zaključiti da je regulacija staničnog ciklusa jedan vrlo složen proces u kojem sudjeluje puno proteina koji su indirektno ili direktno povezani. U cijeloj toj mreži proteina, vrlo je teško otkriti sve proteine i njihove funkcije koje su vjerojatno mnogobrojne.

5. LITERATURA

Ayad NG, Rankin S, Murakarni M, Jebanathirajah, Gygi S, Kirschner MW, 2003. Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* **113**, 101-113.

Lindon C, Pines J, 2004. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *The Journal of Cell Biology* **164,** 233-241.

Luke-Glaser S, Pintard L, Tyers M, Peter M, 2007. The AAA-ATPase FIGL-1 controls mitotic progression, and its levels are regulated by the CUL-3^{MEL-26} E3 ligase in *C. elegans* germ line. *Journal of Cell Science* **120***,* 3179-3187.

Mathe E, Kraft C, Giet R, Deak P, Peters J, Glover D, 2004. The E2-vihar is required for the correct spatiotemporal proteolysis of cyclin B and itself undergoes cyclical degradation. *Current Biology* **14**, 1723-1733.

Nigg EA, 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoint. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 21-32.

Parry G, Estelle M, 2004. Regulation of cullin-based ubiquitin ligases by the Nedd8/RUB ubiquitin-like proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **15**, 221-229.

Peters JM, 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 644-656.

Pintard L, Willems A, Peter M, 2004. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *The Embo Journal* **23**, 1681-1687.

Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson JLF, Srayko M, Kurz T, Glaser S, Mains PE, Tyers M, Bowerman B, Peter M, 2003. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* **425**, 311-316.

Potapova TA, Daum JR, Pittman BD, Hudson JR, Jones TN, Satinover DL, Stukenberg PT, Gorbsky GJ, 2006. The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature* **440**, 954-958.

Raff JW, Jeffers K, Huang Yy, 2002. The roles of Fzy/Cdc and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. *The Journal of Cell Biology* **157**, 1139-1149.

Ramadan K, Bruderer R, Spiga FM, Popp O, Baur T, Gotta M, Meyer HH, 2007. Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature* **450**, 1258-1262.

Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJS, Nandra SK, Privé GG, 2005. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biology* **6**, R82.

Stewart S, Fang G, 2005. Anaphase-promoting complex/cyclosome controls the stability of TPX2 during mitotic exit. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 10516-10527.

Sudakin V, Chan GK, Yen TJ, 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of Cell Biology* **154**, 925-936.

Sumara I, Quadroni M, Frei C, Olma MH, Sumara G, Ricci R, Peter M, 2007a. A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. *Developmental Cell* **12**, 887-900.

Sumara I, Maerki S, Peter M, 2007b. E3 ubiquitin ligases and mitosis: embracing the complexity. *Trends in Cell Biology* **18(2)**, 84-94.

Thornton BR, Toczyski DP, 2006. Precise destruction: an emerging pictureof the APC. *Genes and Development* **20**, 3069-3078.

Vong QP, Cao K, Li HY, Iglesias PA, Zheng Y, 2005. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science* **310**, 1499-1504.

Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW, Kaelin WG Jr, 2004. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* **428**, 194-198.

Willems AR, Schwab M, Tyers M, 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1965**, 133-170.

Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway RC, Conaway JW, Harper JW, Pavletich NP, 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**, 703-709.

6. SAŽETAK

Stanični ciklus eukariotskih stanica mora biti vrlo precizno reguliran. Prilikom stanične diobe događaju se morfološke promjene koje su prostorno i vremenski dobro regulirane tako da bi se genom jednako raspodijelio u stanice kćeri. Regulacija se postiže fosforilacijom proteina i ciljanom razgradnjom. Razgradnja je ovisna o ubikvitinu, a u cijelom procesu sudjeluju 3 tipa enzima: E1, enzim koji aktivira ubikvitin, E2, enzim koji spaja ubikvitin i E3, ubikvitin protein ligaza. Najvažnije vrste E3 ubikvitin ligaza koje sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa su ligaze tipa APC/C, SCF i E3 ligaze ovisne o kulinu3. Ligaze APC/C omogućuju prijelaz iz metafaze u anafazu degradiranjem sekurina koji je inhibitor separaze i izlazak iz mitoze degradiranjem mitotskih ciklina. SCF-kompleksi reguliraju rane stadije mitoze i citokinezu. Oni sudjeluju u kontroli aktivnosti kompleksa Cdc2-ciklin B, jednog od ključnih regulatora staničnog ciklusa. Njegovom aktivacijom potiče se prijelaz iz G2- u M-fazu. Ligaze ovisne o kulinu3 kontroliraju položaj kromosoma i citokinezu. Kod ljudi je kompleks kulin3-KLHL9-KLHL-13 potreban za pravilno vezanje kromosoma i napredovanje mitoze tako što ubikvitinira protein Aurora B koji disocira s mitotskih kromosoma prilikom njihovog poravnavanja u metafaznu ploču. Da bi došlo do razdvajanja sestrinskih kromatida u anafazi, mora se degradirati kohezin koji ih drži zajedno. Za izlazak iz mitoze važna je inaktivacija kinaza ovisnih o ciklinima (CDK).

U regulaciji staničnog ciklusa sudjeluje puno proteina koji su indirektno ili direktno povezani. U cijeloj toj mreži proteina, vrlo je teško otkriti sve proteine i njihove funkcije koje su vjerojatno mnogobrojne.

7. SUMMARY

Cell cycle of eukaryotic cells has to be strictly regulated. During cell division, many morphological changes which are temporary and spatially precisely regulated occur to ensure equal distribution of the newly replicated copies of genome into the two daughter cells. Two mechanisms ensure cell cycle regulation: phosphorylation and targeted proteolysis. Targeted, ubiquitin-dependent proteolysis is regulated by three types of enzymes: E1, ubiquitin-activating enzyme, E2, ubiquitin-conjugating enzyme and E3, ubiquitin protein ligase. Most important E3 ligases which regulate cell cycle are APC/C, SCF and Cullin3-based E3 ligase complex. The APC/C is required for triggering the metaphase to anaphase transition and mitotic exit regulation. This complex degrades the separase inhibitor securin and mitotic cyclins. SCF complexes regulate early stages of mitosis and citokinesis by the control of Cdc2-cyclin B activity, a key regulator of cell cycle. It ensures G2 to M phase transition. Cullin3-based E3 ligases control chromosome position and citokinesis. Human Cullin3- KLHL9-KLHL-13 complex ensures chromosome attachment and progress of mitotis by degradation of Aurora B which dissociate from mitotic chromosome during chromosome alignment in prometaphase. Sister chromatids are held together by cohesin, which has to be eliminated for proper chromosome segregation in anaphase. Cyclin-dependend kinases (CDKs) inactivation is very important for mitotic exit.

Many proteins, which are directly or indirectly connected, are involved in cell cycle regulation. In this network, it is very difficult to find out every single protein and its functions.