

Received: 2014.02.03
Accepted: 2014.07.08
Published: 2014.08.29

Rola centrosomów w komórkach i ich potencjalny udział w kancerogenezie

The role of centrosomes in cells and their potential contribution to carcinogenesis

Aneta Białkowska¹, Aleksandra M. Koczorowska¹, Katarzyna Kluzek^{1,2}

¹Katedra i Zakład Genetyki Molekularnej Komórki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

²Zakład Genetyki Molekularnej Człowieka, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Streszczenie

Centrosomy są organellami komórkowymi zbudowanymi z pary centrioli otoczonej materiałem pericentriolarnym. W komórkach zwierząt odpowiadają za organizację mikrotubul w trakcie interfazy cyklu komórkowego, która jest uwarunkowana przebiegiem procesu nukleacji i elongacji mikrotubul, ich mocowaniem oraz uwalnianiem. Centrosomy biorą także udział w budowie podziałowego wrzeciona mitotycznego i segregacji chromosomów. Ponad sto lat temu zasugerowano, że struktury te mogą być związane z rozwojem chorób u ludzi, między innymi nowotworów. Komórki nowotworowe charakteryzuje częste występowanie zaburzeń centrosomów, zwłaszcza ich amplifikacja. Nieprawidłowe centrosomy mogą prowadzić do wielobiegunowej mitozy, której wynikiem jest wadliwa segregacja chromosomów i aneuploidia, główny rodzaj zaburzeń stabilności genomu obecny w guzach litych u ludzi. Właściwą liczbę centrosomów w komórkach warunkuje między innymi niezakłócony przebieg ich cyklu podziałowego. Wiele genów, których mutacje są często odnajdywane w nowotworach, koduje białka uczestniczące w regulacji tego cyklu. W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania potencjalnym udziałem centrosomów w procesie nowotworzenia, zwłaszcza że ich nieprawidłowości zaobserwowano we wczesnych zmianach przednowotworowych. Powszechna obecność nieprawidłowych centrosomów w komórkach nowotworowych oraz rola jaką pełnią w komórce sugeruje, że czynniki regulujące liczbę centrosomów mogą być potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych.

Słowa kluczowe:

centrosomy • mikrotubule • stabilność genomu • niestabilność chromosomalna • zaburzenia centrosomów • nowotwory

Summary

The centrosomes are subcellular organelles composed of two centrioles surrounded by a pericentriolar material. In animal cells they are responsible for the organization of the interphase microtubule cytoskeleton including microtubule nucleation and elongation, their attachment and release. The centrosomes are also involved in the construction of the mitotic spindle and chromosome segregation. More than a century ago it was suggested that these structures might be involved in human diseases, including cancer. Cancer cells show a high frequency of centrosome aberrations, especially amplification. Centrosome defects may increase the incidence of multipolar mitoses that lead to chromosomal segregation abnormalities and aneuploidy, which is the predominant type of genomic instability found in human solid tumors. The number of these organelles in cells is strictly controlled and is dependent on the proper process of centrosome duplication. Multiple genes that are frequently found mutated

	in cancers encode proteins which participate in the regulation of centrosome duplication and the numeral integrity of centrosomes. In recent years there has been growing interest in the potential participation of centrosomes in the process of carcinogenesis, especially because centrosome abnormalities are observed in premalignant stages of cancer development. The common presence of abnormal centrosomes in cancer cells and the role these organelles play in the cells suggest that the factors controlling the number of centrosomes may be potential targets for cancer therapy.
Key words:	centrosomes • microtubules • genome stability • chromosomal instability • centrosome aberrations • cancer
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1119029
Word count:	4623
Tables:	1
Figures:	3
References:	120

Adres autorki: dr n. med. Aneta Białkowska, Katedra i Zakład Genetyki Molekularnej Komórki, Collegium Medicum w Bydgoszczy, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: anetab@cm.umk.pl

Wykaz skrótów: **CIN** – niestabilność chromosomalna, **CINn** – niestabilność chromosomalna dotycząca liczby chromosomów (liczbowy CIN), **CINs** – niestabilność chromosomalna, dotycząca struktury chromosomów (strukturalny CIN), **MTOC** – centrum organizujące sieć mikrotubul w komórce, **PCM** – materiał pericentriolarny, **γ-TuSC** – mały kompleks tubuliny γ, **γ-TuRC** – pierścieniowy kompleks tubuliny γ, **HR** – rekombinacja homologiczna.

WPROWADZENIE

Onkogeneza jest wieloetapowym procesem prowadzącym do postępującej transformacji komórek prawidłowych w komórki wykazujące cechy zezłośliwienia. Wynikiem tych zmian jest ominięcie mechanizmów kontrolnych, które zapobiegają nieprawidłowej proliferacji komórek i ograniczają ich podziały do określonej biologicznie niszy. Właściwością charakteryzującą prawie wszystkie nowotwory u ludzi jest niestabilność genomu, która może mieć różnorodne podłoże i formy. Jest ona definiowana jako seria zmian genomu występujących ze znacznie zwiększoną częstością w populacji komórek mających wspólne pochodzenie, skutkiem czego jest rozwiniecie agresywnego fenotypu [9].

Niestabilność może być typu mikrosatelitarnego (microsatellite instability, MIN) i wiązać się ze zmianami (skróceniem lub wydłużeniem) krótkich, powtarzających się sekwencji w DNA lub może być związana z delecjami, insercjami oraz zmianami pojedynczych nukleotydów w DNA.

Przeważającą liczbę ludzkich nowotworów charakteryzuje niestabilność chromosomalna (chromosomal instability, CIN), która odnosi się do liczby i struktury chromosomów [76]. Jednym z mechanizmów prowadzących do wadliwej liczby chromosomów w komórce jest nieprawidłowy przebieg mitozy, który może być uwarunkowany zaburzeniami centrosomów [33,46]. W wielu komórkach nowotworowych obecność dodatkowych lub nieprawidłowych centrosomów ściśle koreluje z niestabilnością chromosomalną [33,115]. Za-

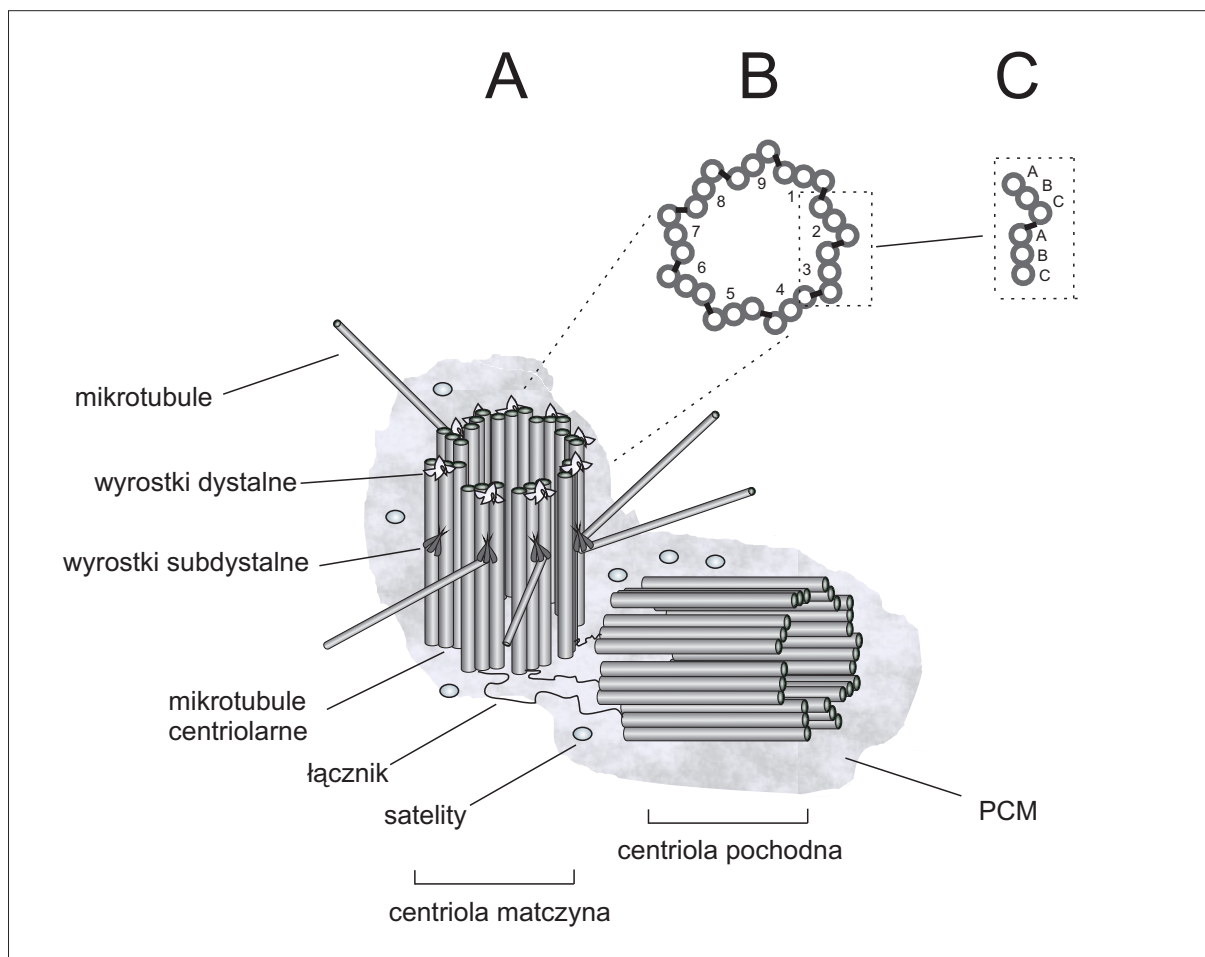
burzenia centrosomów są obserwowane już we wczesnych zmianach przednowotworowych oraz wykazują współzależność ze stopniem zaawansowania nowotworu [17,96]. Wskazuje to na ogromne znaczenie tych organelli, jak również mechanizmów kontrolujących ich prawidłową liczbę i funkcje w stabilizacji genomu.

W artykule opisano budowę i znaczenie centrosomów w organizacji sieci mikrotubul w komórce, zaburzenia organelli oraz czynniki odpowiedzialne za ich występowanie w komórkach nowotworowych w kontekście ich potencjalnego udziału w kancerogenezie.

BUDOWA I ROLA CENTROSOMÓW W KOMÓRCE

Centrosom jest niewielkim, pozbawionym błony komórkowej, wyspecjalizowanym organellum komórkowym, które spełnia rolę centrum organizującego sieć mikrotubul w komórce (microtubule organizing centre, MTOC) [71,74]. Związany jest z kontrolą wielu procesów wymagających udziału mikrotubul, takich jak utrzymywanie kształtu komórki, ruchliwość i adhezja komórek oraz wewnątrzkomórkowy transport białek i organelli. W proliferujących komórkach centrosom uczestniczy w formowaniu wrzeciona mitotycznego i segregacji chromosomów [11,71].

W komórkach zwierzęcych centrosom leży w pobliżu jądra komórkowego i strukturalnie jest zbudowany z dwóch głównych komponentów: części korowej, zawierającej parę centrioli, które są strukturami organizującymi centrosomy oraz



Ryc. 1. Schemat budowy centrosomu w komórkach zwierząt; A - dwie centriole, maczyną i pochodną, połączone elastycznym łącznikiem, otoczone materiałem pericentriolarnym (PCM); B - dziewięć tripletów mikrotubulinowych tworzących cylindryczną strukturę centrioli; C - triplet mikrotubul. Szczegółowy opis w tekście

z otaczającego materiału pericentriolarnego (pericentriolar material, PCM), gęstej elektronowo-białkowej macierzy rekrutowanej przez centriole (ryc. 1.A).

Centriole

W komórkach zwierzęcych centrosom tworzą dwie centriole: starsza, dojrzała, nazywana centriolą maczyną (mother centriole) oraz młodsza, centriola pochodna (daughter centriole), która została utworzona podczas ostatniego cyklu podziałowego. Usunięcie centrioli z komórek oryginalnie zawierających te struktury prowadzi do zaburzeń progresji cyklu komórkowego i cytokinezy [56]. Centriole mogą się przemieszczać do powierzchni komórki i formować rzęski oraz wici (w tym kontekście są ciałkami podstawowymi, basal bodies), dzięki czemu biorą także udział w lokomocji komórek, transporcie i przekazywaniu sygnałów [36].

Centriole mają budowę cylindryczną, a ich wymiary mogą się różnić w zależności od organizmu oraz typu komórek. Średnia długość centrioli to około 0,5 μm , natomiast śred-

nica zewnętrzna i wewnętrzna wynosi odpowiednio około 0,25 i 0,13 μm [36]. W komórkach ludzkich centriole najczęściej mają długość równą 0,40 μm , a średnicę 0,20 μm [105]. W każdej centrioli wyróżnia się dwa końce – proksymalny oraz dystalny. Centriole są połączone ze sobą proksymalnymi końcami i przez większą część cyklu komórkowego ułożone względem siebie w prostopadłej orientacji przestrzennej.

Symetryczną budowę centrioli warunkuje dziewięć tripletów mikrotubulinowych. Każdy triplet składa się z mikrotubuli A, B i C, oznaczonych w kolejności alfabetycznej od wewnętrznej strony centrioli. Są połączone ze sobą w ściśle określonym porządku, warunkującym utworzenie cylindrycznej struktury. Mikrotubule A jednego tripletu łączą się z mikrotubulami C kolejnego (ryc. 1.B i C). Mikrotubule zazwyczaj mają 13 protofilamentów, z których każdy jest polimerem tubuliny α i β ułożonych równolegle do osi mikrotubuli [11,117]. W centriolach jedynie mikrotubule A są kompletnymi mikrotubulami zbudowanymi z 13 protofilamentów, natomiast pozostałe dwie są niekompletne. U kręgowców mikrotubule C są znacznie krótsze niż pozostałe, dlatego dystalna część centrioli jest zbudowana z dziewię-

ciu dubletów mikrotubul, a ich połączenie następuje przez mikrotubule A jednego dubletu i B kolejnego [36]. Mikrotubulowe triplety są zorganizowane wokół struktury morfologicznie przypominającej „koło wozu” (cartwheel structure), będącej pierwszą wyjściową strukturą formowania procentrioli. Zbudowana jest z centralnego rdzenia (hub) połączonego dziewięcioma ramionami z wewnętrzną tubulą każdego tripletu. Struktura ta znajduje się przede wszystkim w proksymalnej części niedojrzałej centrioli, chociaż u niektórych gatunków jest zauważana również w centrioli matczynej [5], a u wielu organizmów jednokomórkowych utrzymuje się w proksymalnym regionie ciałek podstawowych. U ssaków struktura ta występuje sporadycznie, tylko w początkowym stadium formowania centrioli pochodnej.

Centriole budujące centrosom różnią się nie tylko wiekiem, ale również rozmiarem i budową. Różnica wielkości między centriolą pochodną a matczyną (po jej uformowaniu w fazie S cyklu komórkowego) zmniejsza się wraz z progresją cyklu komórkowego i ostatecznie jej długość stanowi około 80% centrioli matczynej (cykl duplikacji centrosomów opisano niżej). Strukturalne różnice między centriolami dotyczą obecności dwóch rzędów dodatkowych wypustek (appendages), subdystalnych oraz dystalnych (nazywanych również włóknami przejściowymi; transition fibers) w centrioli matczynej. Odgrywają one odpowiednio rolę w stabilnym mocowaniu cytoplazmatycznych mikrotubuli oraz w zakotwiczeniu centrioli do błony komórkowej w procesie formowania rzęsek. Centriola pochodna nabywa te struktury podczas kolejnego cyklu komórkowego, w trakcie dojrzewania i przekształcania w centriolę matczyną [100]. Inną cechą odróżniającą obydwie centriole są też ich właściwości biochemiczne oraz asynchroniczna odpowiedź na zewnętrzne sygnały pomiędzy komórkami siostrzanymi uzależniona od tego, czy komórka podczas podziału otrzymała starszą czy młodszą centriolę [4].

Za utrzymywanie konserwowanej struktury centrioli i tworzenie funkcjonalnego prekursora jest odpowiedzialnych niewiele genów. Badania wykazały, że w komórkach ludzkich dojrzały centrosom buduje ponad 100 różnych białek, ale nadal niewiele wiadomo na temat dokładnej roli poszczególnych elementów w jego biogenezie [3]. Duża część tych białek ma struktury nazywane „coiled-coil”. Domeny te często występują w białkach strukturalnych oraz motorycznych i są odpowiedzialne przede wszystkim za interakcje białkowe, co sugeruje, że ich podstawową rolę w centrosomie są oddziaływania z innymi białkami [11]. Przegląd białek budujących oraz umiejscowionych w obrębie centrioli, mechanizm syntezy centrioli i omówienie roli poszczególnych elementów w tym procesie są szeroko omówione w innych publikacjach [3,55,105].

PCM i jego rola w organizacji sieci mikrotubul w komórce

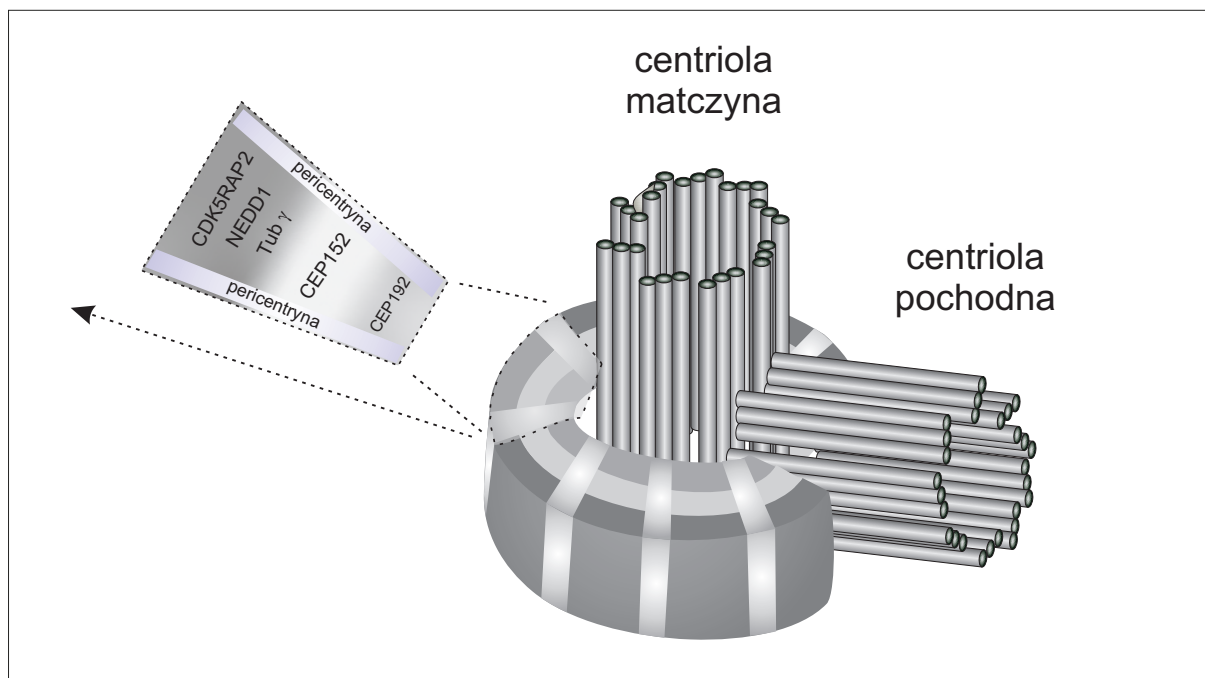
Materiał pericentriolarny najczęściej jest opisywany jako bezpostaciowa (amorficzna) chmura otaczająca centriole, ulegająca rozdzieleniu do poszczególnych centrioli w trakcie ich rozdzielenia. Jego wielkość zmienia się podczas trwania

cyklu komórkowego, osiągając największe rozmiary w fazie M, a najmniejsze w fazie G1 [85]. PCM jest zmieniającą się, dynamiczną przestrzenią, a wiele jego elementów podlega intensywnej wymianie pomiędzy obszarem centrosomu a cytoplazmą. Elementy te są aktywnie transportowane do lub z centrosomu lub ich relokacja jest związana z dyfuzją. Bierna dyfuzja dotyczy białek, które w dużej ilości są obecne w komórce, jednak większość składników centrosomu występuje w komórce w niewielkim stężeniu, dlatego w system ich dostawy są zaangażowane mechanizmy oparte na transporcie związanym z działaniem białkowego kompleksu dyneina/dynaktyna [120].

Budowa PCM

Badania wykorzystujące techniki mikroskopii elektronowej wykazują, że PCM ma strukturę fibrylarną lub włóknistą, a jego część jest bezpośrednio związana z powierzchnią centrioli. Powiązanie PCM z centriolami jest również zachowane w izolowanych centrosomach, dlatego sugeruje się, że PCM jest znacznie bardziej zorganizowany niż powszechnie uważano przez długi czas. Obecnie jest opisywany jako zespół białek podzielonych na dwie główne podgrupy, z których jedna jest bezpośrednio związana z powierzchnią centrioli, a druga rozciąga się na zewnątrz tego obszaru, tworząc chmurę elektronowo gęstego materiału. PCM powiązany z centriolami najobficiej występuje na ich proksymalnym końcu [85]. Pozostały jest umiejscowiony głównie w ich bliskim sąsiedztwie, ale rozciąga się też do pewnej odległości od centrioli, tworząc część zewnętrzną materiału pericentriolarnego. Materiałem tym są elektronowo gęste cząstki o średnicy 70–100 nm, nazywane satelitami pericentriolarnymi/centriolarnymi [8]. Ich liczba waha się w zależności od fazy cyklu komórkowego, wzrasta podczas interfazy i spada w trakcie mitozy [64].

Badania ostatnich lat z wykorzystaniem nowych technik mikroskopowych umożliwiły dokładniejsze poznanie struktury i organizacji białek w PCM. Podczas interfazy większość z nich jest zorganizowana w sposób warstwowy. Poszczególne białka formują przylegające do siebie pierścienie o powiększającej się średnicy, które są ułożone wokół proksymalnego końca centrioli matczynej. Struktura tych pierścieni jest nieciągła, ponieważ z jednej strony występuje w nich niewielka przerwa, w której znajduje się centriola pochodna (ryc. 2). Poprzez pierścienie innych białek poprzecznie rozciąga się pericentryna, jedno z białek związane z nukleacją mikrotubul. Jest ona niezmiernie ważna dla organizacji PCM, ponieważ tworzy rusztowanie dla reszty materiału pericentriolarnego, a jej nieobecność w komórkach prowadzi do poważnych zakłóceń i nieprawidłowej budowy PCM. Taka organizacja strukturalna PCM wydaje się stabilna, ponieważ utrzymuje się również mimo braku kompleksów odpowiedzialnych za nukleację mikrotubuli lub całkowitej absencji mikrotubul. Białka PCM zachowują swoje określone pozycje wokół centrioli matczynej również w trakcie mitozy [66]. Brak centrioli prowadzi do strukturalnej niestabilności PCM i może być także przyczyną jego całkowitego zaniknięcia, a ich nieprawidłowa budowa, np. redukcja wielkości, skutkuje natomiast zmianą wielkości PCM.



Ryc. 2. Schemat organizacji centrosomu w interfazie cyklu komórkowego. Białka centrosomalne wokół proksymalnego końca centrioli maczyną tworzą nieciągły, przylegający do siebie pierścień o powiększających się średnicach, przecięty poprzecznie warstwami pericentriolarnymi. Na schemacie zaznaczono białka opisane w tekście

SATELITY

Cechą charakterystyczną satelit centriolarnych jest ogromna dynamika, ponieważ ich obecność w centrosomie jest okresowa i wydaje się tylko przejściowo powiązana z PCM [85]. Struktury te poruszają się pomiędzy cytoplazmą a centrosomem i prawdopodobnie uczestniczą w transporcie komponentów centrosomu z cytoplazmy (białek centriolarnych i pericentriolarnych) wzdłuż mikrotubuli [18,64]. Transport odbywa się w kierunku końca „minus” mikrotubuli i w tym rejonie często obserwuje się nagromadzenie satelit centriolarnych [64].

Pierwszym zidentyfikowanym molekularnym komponentem satelit był materiał pericentriolarny-1 (pericentriolarny materiał-1, PCM-1) [64], który do tej pory jest najczęściej wykorzystywanym markerem molekularnym tych struktur. Zahamowanie funkcji PCM-1 zaburza lokalizację białek centrosomalnych, takich jak nineina, centryna i pericentriolarna oraz zakłóca radialną organizację mikrotubul [18]. PCM-1 nie jest włączany w strukturę centrosomów, co wskazuje, że najprawdopodobniej spełnia rolę białka platformowego (scaffold protein) dla innych białek centrosomalnych, które są przenoszone do struktur docelowych w centrosomie poprzez mechanizm transportowy związany z białkiem motorycznym dyneiną w kompleksie z dynektyną [64]. Satelity centriolarne, a przede wszystkim bezpośredni udział PCM-1 w transporcie białek, mają ogromne znaczenie w trakcie reorganizacji centrosomów związanej z ich dojrzewaniem i duplikacją. W czasie trwania tego procesu materiał pericentriolarny zostaje znacznie powięk-

szony dzięki rekrutacji dodatkowych składników, które są również wykorzystywane do nukleacji odpowiedniej ilości mikrotubul i organizacji wrzeciona mitotycznego.

W ostatnich latach w satelitach centriolarnych stwierdzono obecność wielu innych białek, np. BBS4, CEP290, CEP90, CEP72, DISC1, Kizuna (szeroki przegląd białek satelitarnych oraz ich potencjalnej funkcji [8]). Wydaje się także, że część białek występujących w satelitach, np. BBS4, FOR20, CEP90 czy Hook-3 jest odpowiedzialna za wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie i integrację satelit centriolarnych, ponieważ komórki pozbawione tych białek charakteryzują się znacznym rozproszeniem tych struktur. Białka satelit centriolarnych mają również związek z utrzymywaniem zdolności nukleacji mikrotubul oraz prawidłową budową wrzeciona podziałowego. Pozbawienie komórek np. funkcjonalnego Cep72, które jest związane z rekrutacją pierścieniowego kompleksu γ -TuRC (γ tubulin ring complex) do centrosomu, powoduje obniżenie zdolności nukleacji mikrotubul. Brak białka Par6a prowadzi natomiast do powstawania wielobiegunowych wrzecion mitotycznych, a nieobecność CEP90 jest związana z fragmentacją bieguna wrzeciona podziałowego.

NUKLEACJA MIKROTUBUL

Z materiałem pericentriolarnym oraz z centriolami nieodłącznie wiąże się organizacja sieci mikrotubul w komórce. Uwarunkowana jest ona przede wszystkim dynamiką przebiegu kilku procesów, do których należy nukleacja i elongacja mikrotubul, ich umocowanie oraz uwalnianie.

Nukleacja to proces inicjujący formowanie mikrotubul *de novo* przez polimeryzację dimerów tubuliny α i β , które są podstawowym budulcem mikrotubul w komórkach eukariotycznych, uzależniony przede wszystkim od obecności tubuliny γ w PCM. Tubulina ta jest paralogiem tubuliny α i β .

W komórkach zwierzęcych cytosolowa tubulina γ występuje głównie w postaci dwóch proteinowych kompleksów: małego kompleksu γ -TuSC (g tubulin small complex), zawierającego tubulinę γ i dwa białka GCP2 i GCP3, oraz pierścieniowego kompleksu γ -TuRC, który funkcjonalnie odpowiada za nukleację mikrotubul [117]. U organizmów wielokomórkowych jest on zbudowany z sześciu do siedmiu kompleksów γ -TuSC zorganizowanych w otwarty pierścień, przykryty co najmniej trzema białkami GSP: GSP4, GSP5 i GSP6. U ssaków dodatkowym elementem budującym γ -TuRC jest białko GSP-WD/NEDD1. W większości komórek eukariotycznych formowanie γ -TuRC zachodzi w cytoplazmie, a następnie struktura ta jest przenoszona do centrosomu, gdzie następuje nukleacja mikrotubul. Tubulina γ nie łączy się do struktury tworzonej mikrotubuli, natomiast jest związana z ich spolaryzowanym końcem „minus”. W przypadku γ -TuSC obecność każdego z jego komponentów jest niezbędna do zachowania budowy i prawidłowego funkcjonowania wrzeczona mitotycznego, natomiast u wyższych *Eukaryota* białka GCP4, GCP5 i GCP6 najprawdopodobniej pełnią rolę strukturalną przy formowaniu γ -TuRC [97]. Dodatkową rolę γ -TuRC, oprócz nukleacji, jest najprawdopodobniej również stabilizacja mikrotubul poprzez zabezpieczanie końca „minus”, co zapobiega ich depolimeryzacji [71].

Proces nukleacji mikrotubul jest uzależniony również od wiązania γ -TuRC do centrosomu i bezpośredniej interakcji tego kompleksu z wieloma białkami. Należą do nich między innymi: pericentryna, CPAP, CG-Nap, CDK5RAP2, kendryna, Nlp czy dyneina.

Elongacja mikrotubul odbywa się poprzez wiązanie kolejnych heterodimerów tubulin α i β . Należą one do jednych z najbardziej zachowawczych białek w komórkach eukariotycznych. W N-końcowej domenie tych tubulin występują miejsca wiążące nukleotydy (nucleotide sites), GDP/GTP. Centralna część jest odpowiedzialna za interakcje pomiędzy tubulinami α i β w obrębie heterodimeru, natomiast C-końcowa domena jest miejscem interakcji z grupą białek wiązanych z mikrotubulami (MAPs). Podczas formowania mikrotubuli heterodimery tubuliny α i β łączą się ze sobą w porządku „głowa do ogona”, tworząc trzon mikrotubuli (microtubule nucleus). Następnie trzon wydłuża się liniowo do protofilamentów, a te łączą się bocznie, formując mikrotubule. Polimeryzacja mikrotubul następuje po związaniu do tubuliny β cząsteczki GTP i jej hydrolizie z uwolnieniem fosforanu (Pi). Hydroliza GTP znacznie zmienia konformację tubuliny, co powoduje jej osadzenie w strukturze mikrotubuli. Obecność GTP stabilizuje koniec „plus” mikrotubuli, czego rezultatem jest polimeryzacja, natomiast utrata tej właściwości prowadzi do szybkiej depolimeryzacji mikrotubuli. Cechą charakte-

rystyczną mikrotubuli jest także kierunkowa polaryzacja, którą warunkuje określone ułożenie tubulin. Tubulina β zawsze znajduje się od końca „plus” (plus end) mikrotubuli, a tubulina α od jej ujemnego końca (minus end) [51]. Wzrost mikrotubul następuje od końca „plus” w kierunku zewnętrznym, do błony komórkowej i skutkuje wytworzeniem w interfazie struktury gwieżdzistej mikrotubul, z większością mikrotubuli skierowanych końcem „plus” do cytoplazmy. Koniec „plus”, w przeciwieństwie do końca „minus” zwróconego do centrosomu, cechuje duża dynamika i szybki wzrost [51,71,117].

MOCOWANIE MIKROTUBUL

Inną ważną funkcją, którą pełnią PCM i centriole jest zamocowanie mikrotubul w obrębie centrosomu. W odróżnieniu od procesu nukleacji, który w komórkach ssaków przebiega w pobliżu obydwu centrioli, bezpośrednie mocowanie mikrotubul do tej struktury jest charakterystyczne tylko dla centrioli matczynej i odbywa się w jej subdystalnych wyrostkach, na których mikrotubule tworzą charakterystyczną gwieżdźastą strukturę podczas interfazy. Wiązanie to jest uwarunkowane obecnością swoistych białek, do których należą między innymi EB1 oraz nineina. Nineina jest związana z subdystalnymi wyrostkami centrioli matczynej poprzez C-koniec, natomiast N-koniec tego białka wchodzi w interakcje z γ -TuRC, który w przypadku braku nineiny nie umocowuje samodzielnie mikrotubuli w centrosomie. Komórki wykazujące nadekspresję nineiny cechuje obniżony poziom uwalniania mikrotubul do cytoplazmy oraz również zahamowanie ich migracji [1]. Obniżenie poziomu nineiny, np. poprzez wyciszenie przez siRNA, prowadzi do znacznych zaburzeń w organizacji mikrotubul [18]. W niektórych wyspecjalizowanych typach komórek, np. komórkach epitelialnych, z udziałem nineiny następuje zakotwiczanie mikrotubul poza centrosomem. Komórki takie mają unikalne miejsca zakotwiczające mikrotubule w domenach wierzchołkowych (apical domains), w których obecna jest także centriolina [1]. Nineina jest uwalniana z centrosomu razem z mikrotubulami, co sugeruje, że oprócz mocowania mikrotubul może spełniać rolę białka okrywającego i chroniącego ujemny koniec mikrotubul.

UWALNIANIE MIKROTUBUL

Uwalnianie mikrotubuli z centrosomów jest fizjologicznym procesem zachodzącym między innymi podczas różnicowania niektórych typów komórek. U ssaków np. w neuronach, komórkach mięśni szkieletowych oraz epitelialnych są obecne mikrotubule niezwiązane z centrosomami, niezmiennie istotne dla prawidłowego funkcjonowania tych komórek w organizmie. Nie są one zorganizowane w promienistą strukturę charakterystyczną dla proliferujących i migrujących komórek, a przyjmują najczęściej strukturę liniową. Specyficznym białkiem związanym z uwalnianiem mikrotubul do cytoplazmy jest katanina, która reguluje również ich długość po uwolnieniu z centrosomu. Oddzielanie mikrotubuli przez kataninę następuje poprzez zaburzenia ich polimerowej struktury

z wykorzystaniem energii z hydrolizy ATP. Zahamowanie jej aktywności, np. w neuronach, prowadzi do nieprawidłowego procesu uwalniania mikrotubul i akumulacji dużej ich ilości w centrosomie [2].

NIESTABILNOŚĆ CHROMOSOMALNA, CENTROSOMY I ICH ZNACZENIE W KANCEROGENEZIE

Niestabilność chromosomalna, która u ludzi jest obserwowana w wielu typach nowotworów, odnosi się zarówno do liczby, jak i struktury chromosomów. Liczbowy CIN (CINn) dotyczy zmian prawidłowej liczby chromosomów w komórce wynikających z uzyskania lub utraty całych chromosomów. Strukturalny CIN (CINs) wiąże się natomiast z obecnością nieprawidłowych strukturalnie chromosomów, które powstają przez włączenie lub utratę ich fragmentów, jak również przez amplifikacje DNA, inwersje, delecje oraz translokacje, będące jedną z najczęstszych zmian w obrębie CINs nowotworów [32].

Dokładne mechanizmy molekularne leżące u podstaw CIN wciąż pozostają niewyjaśnione. Przypuszczalnymi procesami prowadzącymi do występowania liczbowego CIN w komórkach nowotworowych może być nieprawidłowy przebieg mitozy wynikający między innymi z zaburzeń punktu kontrolnego, wadliwej kohezji chromosomów, nieprawidłowego połączenia chromosomów z wrzecionem mitotycznym, jak również obecności wielobiegunowego wrzeciona mitotycznego związanego z liczbowymi zaburzeniami centrosomów [7,33,38,46].

Zmiany struktury i liczby chromosomów często obserwowane w komórkach nowotworowych są przedmiotem badań od wielu lat. Na początku XX wieku Theodor Boveri jako pierwszy zasugerował, że nowotwory mogą być konsekwencją zaburzeń podziałów komórki prowadzących do nieprawidłowego rozdziału chromosomów. Wadliwa segregacja chromosomów jest przyczyną aneuploidii, która jest uważana za jeden z głównych czynników niestabilności genetycznej w nowotworach [115]. W komórkach nowotworowych, które charakteryzuje CIN, nieprawidłowa segregacja chromosomów w czasie podziałów zachodzi 10-100 razy częściej niż w komórkach prawidłowych lub komórkach nowotworowych o stabilnym diploidalnym kariotypie [33]. Defektywny rozdział materiału wiąże się z wadliwym funkcjonowaniem centrosomów, które ze względu na rolę jaką pełnią w komórce, mogą także wpływać na jej cechy związane z organizacją MTOC, takie jak kształt, polarność i ruchliwość. Zaburzenia centrosomów sprzyjają więc nie tylko niestabilności chromosomalnej, ale również utracie organizacji tkanek, co stanowi dwie najczęstsze cechy fenotypowe nowotworów litych u ludzi [89].

CIN i zaburzenia centrosomów

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania możliwością udziału centrosomów w rozwoju nowotworów, tym bardziej że nieprawidłowości centrosomów są już obserwowane we wczesnych stadiach stanów zapal-

nych, zmianach przednowotworowych oraz dodatkowo korelują z aneuploidią [70,96]. Istnieją liczne dowody, że zaburzenia regulacji cyklu podziałowego centrosomów lub brak koordynacji pomiędzy cyklem centrosomów i komórkowym nieuchronnie prowadzą do zmian liczby chromosomów i niestabilności chromosomalnej [88]. Często obserwowana w komórkach nowotworowych i leżąca u podstaw CIN amplifikacja centrosomów prowadzi do formowania wielobiegunowego wrzeciona, co jest uważane za bezpośrednią przyczynę błędnej segregacji chromosomów oraz może powodować zaburzenia cytokinezy i podział na więcej niż dwie komórki potomne [33,69]. Wielobiegunowa mitoz może być jednak niekorzystna dla samych komórek nowotworowych, ponieważ znacząco zmniejsza żywotność komórek i często prowadzi do ich śmierci [63]. W większości przypadków komórki mające trzybiegunowe wrzeciono kończą cytokinezę, natomiast większa liczba biegunów podziałowych skutkuje zatrzymaniem tego procesu. Zaburzenia cytokinezy włączają punkt kontrolny zależny od p53, co powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego lub śmierć komórki [29]. Komórki wykształciły mechanizmy eliminujące skutki obecności nadmiernej liczby centrosomów, do których należą: inaktywacja centrosomu, asymetryczna segregacja centrosomów oraz zjawisko grupowania centrosomów (centrosome clustering) występujące np. w komórkach neuroblastomy, raka piersi oraz w wielu innych typach nowotworów [34,65]. W komórkach tych nadliczbowe centrosomy grupują się przed utworzeniem wrzeciona podziałowego i formują wrzeciono dwubiegunowe, złożone z kilku centrosomów (szczegółowy opis mechanizmu ich tworzenia [34,63]). Zahamowanie tworzenia takich skupisk prowadzi do wzrostu wielobiegunowych podziałów, znacznie obniżonej żywotności komórek i zwiększonej liczby komórek martwych, proporcjonalnie do liczby nieprawidłowych centrosomów [65].

Nieprawidłowości centrosomów w nowotworach

Wiele komórek nowotworowych cechuje występowanie różnego rodzaju zaburzeń centrosomów, mimo że funkcje i liczba tych organelli podlegają wielu mechanizmom kontrolnym. Nieprawidłowości centrosomów obserwowane w nowotworach można podzielić na dwie kategorie: strukturalne i numeryczne [88,89,95]. Często występują razem, ale źródło ich powstawania oraz funkcjonalne konsekwencje są różnicowane [89].

STRUKTURALNE ZABURZENIA CENTROSOMÓW

Aberracje strukturalne centrosomów obserwowane w komórkach nowotworowych mogą obejmować: nieprawidłową wielkość centrosomu (najczęściej powiększenie rozmiarów, czego przyczyną może być również nadmierna akumulacja PCM), kształt centrosomu (np. występowanie atypowych filamentów, zakłócenie cylindrycznej budowy centrioli) czy zaburzoną kompozycję centrosomu (wynikającą przykładowo ze zmian poziomu białek centrosomalnych na skutek defektywnej ekspresji genów lub zaburzeń modyfikacji potranslacyjnych białek cen-

trosomalnych, np. fosforylacji) [69,89,95]. Do strukturalnych nieprawidłowości można także zaliczyć obecność ciałek niecentriolarnych (acentriolar bodies), stanowiących zgromadzenie białek centrosomalnych bez centrioli [88,89]. Wszystkie te zaburzenia są odzwierciedleniem deregulacji ekspresji i aktywności białek centrosomalnych, co ma znaczący wpływ na ich funkcje. Działanie wadliwych centrosomów jest zróżnicowane i może je cechować zwiększona lub zmniejszona rekrutacja kompleksów γ -TuRC oraz różny poziom nukleacji mikrotubul [12,89]. W komórkach nowotworowych nukleacja mikrotubul często jest nieprawidłowa, co prowadzi do formowania zdeorganizowanego wrzeciona, aberracji mitotycznych i ujawnia się w zaburzeniach kształtu, polarności komórek i organizacji tkanek [89,95]. Dodatkowo w komórkach nowotworowych są obserwowane zaburzenia procesu dojrzewania centrosomu, nieprawidłowe ułożenie centrosomu w komórce oraz pozacentrosomalna lokalizacja tubuliny γ [24]. Prowadzi to do zaburzeń organizacji mikrotubul, których poziom koreluje z agresywnością wykazywaną przez komórki nowotworowe [15].

NUMERYCZNE ZABURZENIA CENTROSOMÓW

Numeryczne zaburzenia centrosomów dotyczą komórek, które w zależności od fazy cyklu komórkowego zawierają więcej niż 1 lub 2 centrosomy lub mają odpowiednio więcej niż 2 lub 4 centriole. Do nadmiernej liczby centrosomów w komórkach może prowadzić kilka mechanizmów. Jednym z nich jest zwielokrotniony podział centrosomów w ciągu jednego cyklu komórkowego. Dodatkowa reduplikacja może dotyczyć części centrosomów, dlatego końcowa ich liczba może być parzysta lub nieparzysta. Inną przyczyną mogą być zaburzenia cytokinezy, co skutkuje zarówno duplikacją centrosomów, jak i materiału genetycznego, a całkowita liczba zamplifikowanych centrosomów powstająca na tej drodze odpowiada ploidalności materiału genetycznego. Kolejnym mechanizmem jest niewłaściwe rozdzielenie centrioli centrosomu, które wynika z zaburzeń mechanizmów kontrolujących separację centrioli w ciągu cyklu podziałowego. W takim przypadku każda z błędnie rozdzielonych centrioli może utworzyć własną centriolę pochodną i samodzielny centrosom [28]. Nadliczbowe centrosomy w komórkach nowotworowych mogą być wynikiem obecności wirusów, np. wirusa brodawczaka ludzkiego typu 16 (HPV-16) i działaniem onkoproteiny E7. Ekspresja tego wirusa powoduje zwiększenie liczby formujących centrioli oraz liczebności komórek z nieprawidłową liczbą centrosomów. Nieprawidłowości centrosomów indukowane przez HPV-16 E7 występują w bardzo wczesnych zmianach przednowotworowych, które mogą w konsekwencji prowadzić do progresji nowotworu i destabilizacji genomu [25]. Wirusy mogą być potencjalnie odpowiedzialne za jeszcze jeden mechanizm liczbowych zaburzeń centrosomów związany z fuzją komórek. Jest to również zjawisko fizjologiczne i występuje np. podczas rozwoju włókien mięśniowych. Mogą je wywoływać także ludzkie wirusy onkogenne, co potencjalnie może prowadzić do kancerogenezy. Do nadmiernej liczby centrosomów w komórkach prowadzi także ich fragmen-

tacja. W trakcie mitozy centrosomy podlegają działaniu ogromnych sił rozciągających, których występowanie jest związane z ich bezpośrednim połączeniem z wrzecionem. Może to prowadzić do rozerwania centrosomu i jego fragmentacji, a powstałe części mogą funkcjonować jako dodatkowe organella i formować wielobiegunowe wrzeciona [29]. Hipotetyczną przyczyną numerycznych zaburzeń może być również formowanie centrosomów *de novo*, jednak zjawisko to i jego ewentualny udział w rozwoju nowotworów jest dyskusyjne i wymaga dalszych badań.

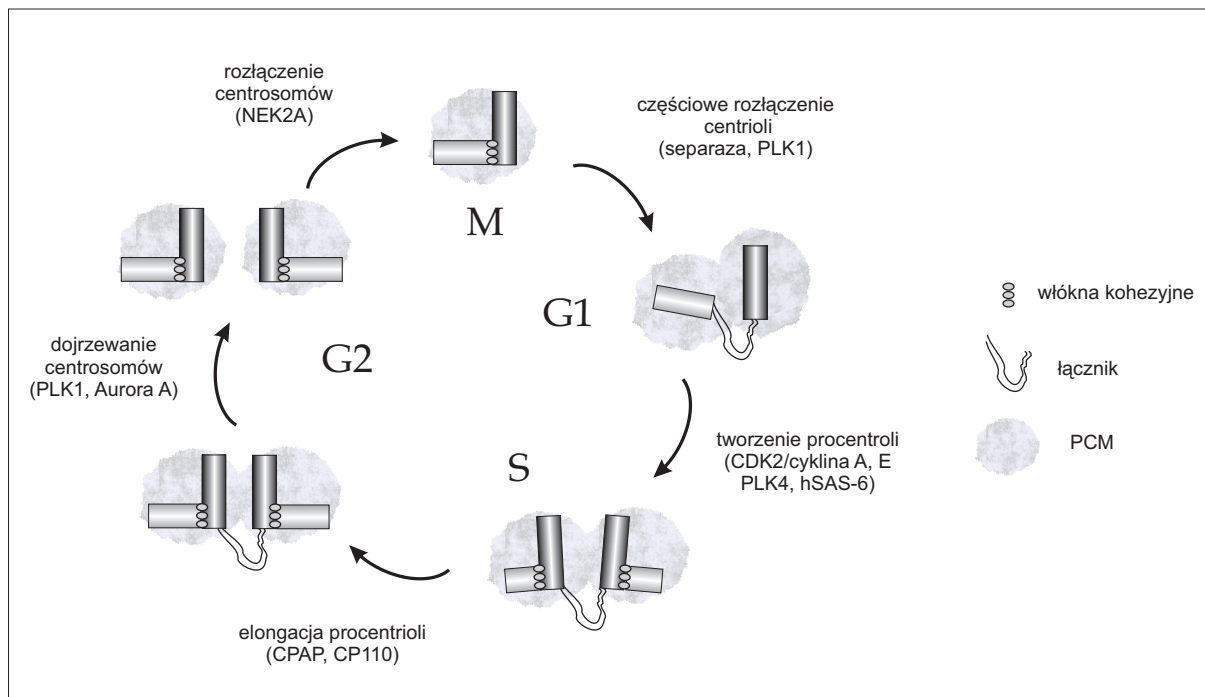
Ogromne znaczenie w utrzymywaniu prawidłowej liczby centrosomów w komórkach ma niezakłócony przebieg i właściwa regulacja cyklu podziałowego tych organelli. Zaburzenia procesu, związane z wadliwym działaniem czynników zaangażowanych w jego regulację, są często obserwowane w nowotworach.

CYKL PODZIAŁOWY CENTROSOMÓW I JEGO KONTROLA

Regulacja cyklu podziałowego centrosomów dotyczy jego dwóch podstawowych aspektów: każda centriola musi ulegać duplikacji tylko raz w ciągu cyklu komórkowego, a liczba nowo powstających centrioli musi być ściśle kontrolowana. Formowanie nowych centrioli podczas cyklu podziałowego może następować dwiema drogami: *de novo*, kiedy nowa centriola powstaje bez widocznego związku ze starszą centriolą, oraz ścieżką semikonserwatywną, w której nowe centriole są formowane w połączeniu z centriolą matczyną [100].

Powstawanie centrioli *de novo* jest często obserwowane np. u małży, grzybów i roślin niższych, ale u kręgowców fizjologicznie zachodzi również w komórkach nabłonka tchawicy podczas ciliogenezy. Zjawisko to odnotowano również po usunięciu lub laserowym uszkodzeniu centrioli w komórkach HeLa oraz w chemicznych CHO. W takich komórkach nowe centriole powstawały w obszarze gromadzącego się na terenie cytoplazmy materiału pericentriolarnego, jednak liczba formujących się w ten sposób centrioli pochodnych często była nieprawidłowa, a dodatkowo część z nich wykazywała poważne aberracje strukturalne [57].

Na poziomie ultrastrukturalnym semikonserwatywna ścieżka formowania procentrioli jest dobrze opisana, natomiast wiedza na temat czynników kontrolujących ten proces poszerzyła się dopiero w ciągu ostatnich lat. Powstawanie nowej centrioli wydaje się niezmiernie zachowawczym procesem pod względem udziału białek, które w różnych organizmach mają swoje wzajemne homologie lub funkcjonalne analogi. Wiele białek związanych z tym procesem wykazuje związek z kancerogenezą. Ścieżkę formowania centrosomów dzieli się na cztery następujące po sobie fazy: częściowe rozłączenie centrioli, nukleację centrioli pochodnej (nazywanej również procentriolą do chwili, gdy nie osiągnie całkowitej długości), elongację procentrioli i dojrzewanie centrosomów oraz ich separację [11,100]. Cykl jest ściśle synchronizowany z cyklem komórkowym.



Ryc. 3. Cykl podziałowy centrosomów. Zaznaczono główne etapy cyklu oraz najważniejsze czynniki regulujące ten proces. Szczegółowy opis w tekście

Komórki w końcowej fazie M cyklu komórkowego mają pojedynczy centrosom złożony z dwóch centrioli ułożonych prostopadle względem siebie i połączonych przez włókna kohezyjne [6,74,105] (ryc. 3). To połączenie tworzy się podczas formowania procentrioli w fazie S i blisko wiąże nowo powstającą centriolę do centrioli matczynej. Jest ono jednym z czynników zapobiegających tworzeniu nadmiernej liczby centrioli, a jego rozpad to jeden z najważniejszych etapów umożliwiających przejście centrosomu do następnego cyklu podziałowego [114]. Częściowe rozdzielanie (disengagement) centrioli matczynej od centrioli pochodnej następuje podczas późnej mitozy i wczesnej fazy G1, co zmienia ich wcześniejsze prostopadłe ułożenie przestrzenne, ale centriole nadal pozostają połączone elastycznym łącznikiem (linker) [74]. Głównymi enzymami zaangażowanymi w częściowe rozdzielanie centrioli są separaza (proteaza biorąca także udział w oddzieleniu chromatyd siostrzanych) oraz kinaza PLK1, będąca niezależnym aktywatorem tego etapu. Jednoczesna utrata proteazy i PLK1 uniemożliwia rozłączenie centrioli i prowadzi do całkowitej blokady duplikacji centrosomów [113,114]. Podczas wyjścia komórki z fazy M cyklu komórkowego separaza specyficznie nacina pericentrynę B. W mutantach komórkowych, w których białko to nie podlega nacięciu, centriole nie rozdzielają się, a proces ich duplikacji jest zahamowany [67]. PLK1 i separaza są aktywowane tylko w trakcie mitozy, co warunkuje sprzężenie procesu duplikacji centrioli z cyklem komórkowym.

Każda z dwóch centrioli w późnej fazie G1 lub wczesnej S zostaje centriolą matczyną i formuje nową procentriolę. Powstaje ona z udziałem struktury podobnej do „koła wozu” na bocznej powierzchni proksymalnego końca każ-

dej z centrioli matczynej i jest z nią ściśle połączona [105]. Rozpoczęcie syntezy procentrioli wymaga aktywności kinazy CDK2 w kompleksach z cyklina E lub cyklina A, które regulują również rozpoczęcie procesu replikacji DNA [81]. Jednym z białek centrosomalnych fosforylowanych przez CDK2/cyklina E jest nukleofozmina (NPM/B23), występująca swoiście tylko w niezreplikowanych centrosomach [93]. Po fosforylacji białko to wykazuje podwyższone powinowactwo do wiązania z kinazą ROCK2 obecną w centrosomach, co prowadzi do jej aktywacji [73]. Skutkiem fosforylacji nukleofozminy jest także jej usunięcie z centrosomu, umożliwiające rozpoczęcie formowania procentrioli [93]. Ponowna relokacja NPM/B23 do centrosomu następuje w trakcie mitozy [113]. Innymi substratami dla kompleksu Cdk2/cyklina E są białka CEP110 i kinaza MPS1. Kinaza ta odgrywa rolę w duplikacji centrosomów, punkcie kontrolnym wrzeciona oraz jest białkiem regulatorowym kinazy Aurory A, biorącej udział w późniejszej fazie cyklu powielania centrosomów [30]. Inicjacja powstawania procentrioli u kręgowców wymaga także obecności i enzymatycznej aktywności kinazy PLK4, która w centrosomie bezpośrednio oddziałuje z białkiem CEP152 [43]. Białko to tworzy rusztowanie dla kinazy i jest konieczne do rekrutacji tego enzymu do centrosomu. Redukcja poziomu CEP152 prowadzi do zaburzeń procesu duplikacji centrioli i tworzenia jednobiegunowego wrzeciona podziałowego. W formowaniu centrioli bierze również udział białko SIL/STIL. Jest ono niezbędne do rekrutacji konserwowanego białka budującego rdzeń struktury „koła wozu” hSAS-6 do centrioli, z którym formuje kompleks oraz bezpośrednio oddziałuje również z innym centrosomalnym białkiem CPAP [108,116]. Nadekspresja SIL/STIL prowadzi do formowania wielu centrioli wokół centrioli matczynej [108,116].

Od chwili powstania procentriole wydłużają się i osiągają rozmiar zbliżony do centrioli matczynej w końcowej fazie G2 lub w fazie M, w zależności od typu komórek [105]. Elongacja nowo powstającej centrioli wymaga obecności kolejnych białek, wspomnianego wcześniej CPAP oraz CP110 i CEP97, których zadaniem jest przede wszystkim kontrola formowania i stabilizacja nowo powstających mikrotubuli procentrioli. Nadekspresja białka CPAP w komórkach prowadzi do formowania znacznie wydłużonych centrioli, a także powstawania większej, nieprawidłowej liczby procentrioli [61]. Funkcja CP110 i partnerskiego CEP97 jest okrywanie rosnących centrioli i prawdopodobnie ograniczanie ich wydłużania. Białko CEP97 jest odpowiedzialne za rekrutację CP110 do centrosomu, a jego brak w komórce prowadzi do nieobecności CP110 w centrosomie oraz defektów wrzeciona. W trakcie trwania fazy G2 oprócz elongacji centrioli następuje także dojrzewanie całego centrosomu przez rekrutację czynników niezbędnych do formowania PCM i mikrotubuli, do których należą między innymi pericentryna, CEP192, Cep215/CDK5RAP2, tubulina γ [12]. Ogromne znaczenie w procesie dojrzewania centrosomu i akumulacji PCM w późnej fazie G2 odgrywają kinazy PLK1 i Aurora A. Pełnią one również ważną rolę w aktywacji czynników odpowiedzialnych za wejście komórki w fazę podziałową. PLK1 fosforyluje cyklinę B, aktywując kompleks CDK1/cykлина B1, który jest bezpośrednim czynnikiem umożliwiającym rozpoczęcie mitozy. Aurora A jest natomiast odpowiedzialna między innymi za fosforylację fosfatazy CDC25B, której działanie jest konieczne do aktywacji kinaz zależnych od cyklin i umożliwia wejście komórki w fazę M [90].

Rozpoczęcie fazy podziałowej cyklu komórkowego jest poprzedzone utratą drugiego typu połączenia występującego pomiędzy proksymalnymi częściami centrioli matczynej [74]. Czynniki związane z funkcjonowaniem tego połączenia są: białko zakotwiczące C-Nap 1, fibrylarny składnik rutletyna (rootletin) oraz białko CEP68 i CEP215/CDK5RAP2 [6,37,78]. Utrata tego połączenia następuje w końcowej fazie G2, co jest związane z fosforylacją C-Nap 1 oraz rutletyny przez kinazę NEK2A. Fosforylacja białek łącznikowych inicjuje ich usunięcie z centrosomów i całkowitą utratę połączenia pomiędzy centrosomami [6,74]. Czasowa nadekspresja aktywności kinazy NEK2A lub wyłączenie funkcji C-Nap 1 prowadzi do przedwczesnego rozdziału centrioli [78]. Wyciszenie aktywności rutletyny przez siRNA skutkuje natomiast rozpadem centrosomu, co potwierdza udział tego białka w kohezji centrioli przed mitozą [6]. Przedwczesna separacja centrosomów następuje również po zniesieniu przez siRNA funkcji białek CEP68 i CEP215/CDK5RAP2 [37]. Utrata połączenia pomiędzy centriolami skutkuje ich separacją i utworzeniem dwóch oddzielnych centrosomów odsuwających się do przeciwnych biegunów komórki. Następnie każdy z nich uczestniczy w formowaniu bieguna wrzeciona mitotycznego. Po zakończeniu mitozy i cytokinezy komórki potomne otrzymują po jednym centrosomie, zamykając cykl podziałowy tego organellum [11,74].

Proces podziału centrosomów jest ściśle zsynchronizowany z cyklem replikacji DNA. Obydwa cykle są inicjo-

wane w podobnym czasie i regulowane przez te same kompleksy białek, do których zalicza się między innymi CDK2 i cyklinę A/E. Obydwa procesy wymagają także proteolizy materiału kohezyjnego w celu separacji podjednostek (rozdzielenie centrioli matczynej i chromatyd siostrzanych) i są procesami semikonserwatywnymi. Innym ważnym czynnikiem synchronizującym proces replikacji DNA i duplikacji centrosomów jest białko retinoblastoma. Ulega ono fosforylacji, co prowadzi do aktywacji kinazy CDK2, uwolnienia czynnika transkrypcyjnego E2F i umożliwia wejście komórki w fazę S cyklu komórkowego [81]. Zaburzenia mechanizmów kontrolujących duplikację centrosomów i ich liczbę w komórce oraz brak koordynacji pomiędzy cyklem centrosomów i replikacji DNA może prowadzić do niestabilności chromosomalnej, która jest cechą wielu komórek nowotworowych.

REGULATORY LICZBY CENTROSOMÓW I ICH ZWIĄZEK Z KANCEROGENEZĄ

Amplifikacja centrosomów jest jednym z najczęstszych zaburzeń tych organelli obecnym w guzach litych u ludzi. Obserwowana jest między innymi w nowotworach: piersi, jajników, płuc, mózgu, okrężnicy, wątroby, trzustki, jąder, szyjki macicy, woreczka żółciowego i dróg żółciowych, stercza, kory nadnerczy, głowy i szyi, pęcherza, odbytu oraz występuje w białaczkach, chłoniakach i kostniakomięsakach. Pomimo że zaburzenia centrosomów są powszechnym zjawiskiem w komórkach nowotworowych, wiedza na temat molekularnych mechanizmów prowadzących do tego zjawiska i ich związek z nowotworzeniem jest niewielka. Wiadomo, że część białek kodowanych przez geny, których mutacje często obserwuje się w komórkach nowotworowych, bierze również udział w regulacji procesu podziałowego centrosomów, utrzymaniu ich prawidłowej liczby oraz jest związana z odpowiedzialnością komórki na obecność uszkodzeń DNA.

Kinazy w zaburzeniach centrosomów

Wydaje się, że CDK2 jako jedyna z kinaz zależnych od cyklin odpowiada za koordynację cyklu komórkowego i cyklu podziałowego centrosomów oraz regulację innych czynników wpływających na proces duplikacji tego organellum. CDK2 wraz z cyklina E i cyklina A jest czynnikiem inicjującym jednoczesne rozpoczęcie syntezy DNA i procesu formowania nowych centrioli oraz warunkuje przejście komórki poprzez fazę S [77,81]. Brak aktywności tej kinazy całkowicie hamuje duplikację centrosomów, natomiast nadekspresja cykliny E skutkuje aktywacją jej kompleksu z kinazą CDK2, co indukuje duplikację centrosomów w bardzo wczesnej fazie G1 [77,86] (informacje podsumowujące znaczenie białek w regulacji struktury i liczby centrosomów oraz ich związek z kancerogenezą znajdują się w tabeli 1).

Kinaza CDK2 fosforyluje także wiele białek centrosomalnych, których modyfikacje warunkują prawidłowy przebieg cyklu podziałowego centrosomów, jak również modyfikuje aktywność innych kinaz związanych z regulacją tego cyklu. CDK2 wraz z cyklina E wydają się odgrywać

Tabela 1. Białka, których dysfunkcje prowadzą do zaburzeń i nieprawidłowej duplikacji centrosomów oraz nowotworów

BIAŁKO	FUNKCJA	ZABURZENIE	SKUTEK CENTROSOMY/NOWOTWORY	PIŚM.
Cykl podziałowy centrosomów				
CDK2	kinaza niezbędna do przejścia fazy G1/S cyklu komórkowego i rozpoczęcia cyklu podziałowego centrosomów, fosforyluje białka centrosomalne i inne kinazy regulujące cykl centrosomów	brak aktywności nadekspresja (łącznie z cykliną E)	zahamowanie cyklu duplikacji centrosomów przedwczesna indukcja cyklu centrosomów na początku fazy G1; rak jelita grubego, przerzuty do węzłów chłonnych	[13,77,81,86]
NPM/B2 (nukleo- fozmina)	fosfoproteina regulująca cykl duplikacji centrosomów poprzez wpływ na formowanie procentrioli i oddziaływanie z kinazami ROCK2 i Aurorą A	brak lub modyfikacje białka uniemożliwiające jego fosforylację	zahamowanie cyklu duplikacji centrosomów	[93,111]
		nadekspresja translokacje	rak żołądka, okrężnicy, jajnika, stercza białaczki (AML, APL), chłoniaki	[41,119]
ROCK2	kinaza najprawdopodobniej synchronizująca inicjację cyklu podziałowego centrosomów z rozpoczęciem cyklu komórkowego	brak obecności	opóźnienie rozpoczęcia cyklu centrosomów	[73]
		nadekspresja	rak jelita grubego, pęcherza, piersi, wątrobowokomórkowy	[84]
MPS1	kinaza występująca w centrosomach, związana z punktem kontrolnym wrzeciona podziałowego	zwiększona ilość w centrosomie związana z zaburzeniami degradacji kinazy	nadmierna duplikacja centrosomów w liniach komórkowych raka piersi i kostniakomięsaka	[26,54]
PLK4	kinaza inicjująca powstawanie procentrioli, bezpośrednio oddziałująca z rekrutującym białkiem centrosomalnym CEP152	nadekspresja	nadmierna liczba procentrioli	[58]
		brak aktywności heterozygotyczność	brak duplikacji centrosomów	[43]
			amplifikacja centrosomów; nowotwory wątroby i płuc oraz zwiększona zachorowalność na chłoniaki i mięsaki (przy braku p53)	[60] [99]
Aurora A	kinaza odgrywająca ogromną rolę podczas mitozy w procesie segregacji chromosomów i cytokinezie, występująca w centrosomach od początku cyklu duplikacji tych organelli do końca mitozy	nadekspresja, zwiększona aktywność	nadliczbowe centrosomy, wielobiegunowe wrzeciona podziałowe; nowotwory piersi, jajnika, przełyku	[42,80,90,107]
PLK1	kinaza odpowiedzialna za dojrzewanie centrosomów, pełniąca także wiele innych funkcji podczas fazy M cyklu komórkowego	nadekspresja	nadliczbowe centrosomy; nowotwory głowy, szyi, płuc, jelita grubego, żołądka, piersi, jajnika, stercza	[47,59,80,101]
p53	białko obecne w centrosomach i prawdopodobnie regulujące cykl podziałowy centrosomów, czynnik transkrypcyjny aktywowany przez wiele czynników stresowych, regulujący ekspresję genów związanych z zatrzymaniem cyklu komórkowego, apoptozą, starzeniem i aktywacją szlaków naprawy DNA	brak obecności, mutacje	nadliczbowe centrosomy; nowotwory stercza, piersi, płaskonabłonkowy rak głowy i szyi	[31,109]
Odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA				
BRCA1	białko obecne w centrosomach, odpowiedzialne za ubikwitynację tubuliny γ i prawdopodobnie za parowanie centrioli, udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA w procesie HR	zaburzenia ubikwitynacji tubuliny γ mutacje	nadliczbowe centrosomy	[52,104]
			nadliczbowe centrosomy; rak piersi, jajnika, stercza	[102]
BRCA2	białko obecne w centrosomach, bezpośrednio oddziałujące z białkami centrosomalnymi: nukleofozminą, ROCK2 oraz tubuliną γ, udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA w procesie HR	mutacje	strukturalnie nieprawidłowe centrosomy, aneuploidia, zaburzenia regulacji cyklu centrosomów (poprzez oddziaływanie z nukleofozminą i kinazą ROCK2); rak piersi, jajnika, stercza	[39,73,87,94]
RAD51	rekombinaza DNA obecna w centrosomach, razem z BRCA2 oddziałuje z tubuliną γ, buduje nukleofilament i bierze udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA w procesie HR	brak obecności	amplifikacja i fragmentacja centrosomów, aneuploidia; nowotwory piersi	[10,14,22,48]
RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3	paralogi RAD51 obecne w centrosomach, biorą udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA w procesie HR, budują nukleofilament razem z RAD51	obniżona ekspresja lub brak obecności	amplifikacja i fragmentacja centrosomów; nowotwory piersi, jajnika	[19,35,40,98,103]
PARP1	białko obecne w centrosomach katalizujące reakcję poli(ADP-rybozylacji) białek centrosomalnych i jądrowych, bierze udział w regulacji cyklu podziałowego centrosomów, zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA	brak aktywności	amplifikacja centrosomów	[53,83,92]
		obniżona ekspresja	linie komórkowe raka żołądka, okrężnicy oraz niektórych nowotworów piersi	

AML - ostra białaczka limfoblastyczna (acute myeloid leukaemia); APL - ostra białaczka promielocytowa (acute promyelocytic leukaemia); HR - rekombinacja homologiczna (homologous recombination)

znaczącą rolę np. w rozwoju raka jelita grubego, a komórki tego nowotworu wykazują podwyższony poziom kinazy [13]. Nadekspresja CDK2 jest związana z przerzutami do węzłów chłonnych, a jednocześnie wysoki poziom tej kinazy i cykliny E promuje progresję wczesnych stadiów raka [68].

Jednym z białek podlegających potranslacyjnej modyfikacji przez kompleks CDK2/cyklina E jest nukleofozmina (NPM/B23), która po fosforylacji Thr199 opuszcza centrosom, co umożliwia rozpoczęcie procesu syntezy procentrioli [93,111]. Inhibicja nukleofozminy w komórkach ssaków przez przeciwciała lub ekspresja zmienionego białka niepodlegającego fosforylacji hamuje duplikację centrosomów w bardzo wczesnej fazie [111]. Nukleofozmina najprawdopodobniej reguluje duplikację centrosomów poprzez swoją obecność w centrosomie, co zapobiega formowaniu nowej centrioli. Jest ona fosfoproteiną oddziałującą z wieloma białkami i zaangażowaną w różne procesy w komórce. Oprócz udziału w regulacji duplikacji centrosomów wiąże się między innymi z biogenezą rybosomów, duplikacją DNA, może również regulować aktywność innych białek, np. p53 i ROCK2, przez ich bezpośrednie wiązanie [118]. Ostatnie badania wykazały także, iż nukleofozmina to silny aktywator kinazy Aurory A w centrosomie, która jest ważnym czynnikiem regulującym przebieg cyklu podziałowego centrosomów. Mutacje w genie kodującym NPM/B23 są obecne w wielu ludzkich nowotworach, co prowadzi do nadekspresji, zmiany struktury lub całkowitego braku tego białka [41]. Nadekspresję nukleofozminy obserwuje się np. w raku żołądka, jajnika, stercza i raku okrężnicy, co prowadzi do hamowania procesu starzenia się tych komórek związanego z aktywacją białka p53 [41,119].

Białko ROCK2, którego aktywność wzrasta po wiązaniu do ufosforylowanej nukleofozminy, to kolejny czynnik wpływający na cykl podziałowy centrosomów pośrednio związany z aktywnością CDK2. ROCK2 jest serynowo/treoninową kinazą kontrolowaną przez małe GTP-azy Rho (rodzina enzymów pełniących rolę molekularnych przełączników kontrolujących wiele ścieżek przekazywania sygnału w komórkach eukariotycznych) i wraz z innym członkiem tej rodziny, kinazą ROCK1, jest związana z funkcjonowaniem cytoszkieletu aktynowego. Ekspresja aktywnej postaci enzymu ROCK2 promuje duplikację centrosomów, natomiast brak tej kinazy opóźnia rozpoczęcie cyklu podziałowego centrosomów [73]. Najprawdopodobniej jest więc niezbędna do synchronizacji czasu inicjacji procesu duplikacji centrosomów z cyklem komórkowym. Opóźnienie przebiegu cyklu centrosomów, wynikające z braku aktywności tej kinazy sugeruje, że funkcje tego białka muszą być częściowo kompensowane przez inny czynnik, najprawdopodobniej należący do tej samej rodziny kinazę ROCK1. Występuje ona również w centrosomach i ma taką samą swoistość substratową jak ROCK2 [29]. Mutacje w genie kodującym ROCK2 stwierdzono w raku żołądka i czerniaku, a podwyższony poziom tego białka odnaleziono w nowotworach jelita grubego, pęcherza, piersi i raku wątrobowokomórkowym [84].

Kolejnym białkiem podlegającym regulacji poprzez CDK2 jest kinaza MPS1, której funkcja związana jest przede wszystkim z punktem kontrolnym wrzeciona podziałowego. Zaburzenia jej aktywności prowadzą do fenotypu komórek, charakteryzującego się występowaniem nieprawidłowości mitotycznych i zaburzeniami duplikacji centrosomów [26]. Nadmierna duplikacja centrosomów wiąże się z koncentracją tego białka w centrosomie i wynika z nieprawidłowego działania mechanizmów kierujących tę kinazę do proteolitycznej degradacji. Zaburzenia tych procesów są obserwowane w różnych liniach nowotworowych, np. raka piersi i kostniakomięsaka [54].

Inną kinazą związaną z cyklem podziałowym centrosomów jest kinaza PLK4. Nadekspresja tego enzymu prowadzi do amplifikacji centrosomów przez formowanie nadmiernej liczby procentrioli przylegających do każdej z centriol matczyńskich [58]. Brak aktywności tego enzymu uniemożliwia natomiast duplikację centrioli i prowadzi do zaburzeń mitozy [43]. Poziom PLK4 w komórce jest ściśle związany z aktywnością SCF^{Slimb} ligazy ubikwityny (SCF^{Slimb} ubiquitin ligase), kierującej tę kinazę na drogę proteolitycznej degradacji, a jej nadekspresja jest związana z nowotworami [16]. Brak jednego funkcjonalnego allele genu *Plk4*^{-/-} u myszy prowadzi do zaburzeń związanych z amplifikacją centrosomów, obecnością wielobiegunkowych wrzecion oraz nieprawidłowej cytokinezy, której skutkiem jest poliploidalny kariotyp [60,99]. *In vivo* heterozygotyczność tego genu jest związana z około 15-krotnym wzrostem zachorowań na nowotwory wątroby i płuc u myszy [60]. Fenotyp ten jest jeszcze bardziej zarysowany przy jednoczesnym braku aktywności białka p53 (*Plk4*^{-/-}*p53*^{-/-}), skutkującej znacznie zwiększoną zachorowalnością na chłoniaki i mięsaki w porównaniu z myszami o genotypie *Plk4*^{-/-}*p53*^{-/-} [99].

Kolejna kinaza powiązana z amplifikacją centrosomów to Aurora A należąca do rodziny serynowo/treoninowych kinaz, których główna aktywność wiąże się z metabolizmem centrosomów i chromosomów podczas mitozy. Kinaza ta jest umiejscowiona w centrosomie od chwili rozpoczęcia duplikacji centrosomów do końca mitozy, a jej zaburzenia odnaleziono w wielu nowotworach (przegląd udziału Aurory A w kancerogenezie [72,90]). W niektórych typach raka zaburzenia te dotyczą znacznej części wszystkich przebadanych zmian i przykładowo nadekspresję tej kinazy wykazuje 94% raków przewodowych, powyżej 70% nowotworów przełyku i 57% nowotworów jajników, w których zaburzenia Aurory A są obserwowane już w bardzo wczesnych zmianach [42,107]. Gen Aurory A jest umiejscowiony w chromosomie 20q13, we fragmencie, który często podlega amplifikacji w różnego typu nowotworach. Nadekspresja tego enzymu może wynikać z amplifikacji wspomnianego fragmentu chromosomu, zwiększonej aktywacji transkrypcji genu lub zahamowania degradacji tego białka [72]. Nadmierna aktywność Aurory A jest związana z charakterystycznym fenotypem komórek, który cechuje między innymi obecność nadliczbowych centrosomów i wielobiegunkowych wrzecion podziałowych, wielojądrowość, aneuploidia, zaburzenia

punktów kontrolnych cyklu komórkowego oraz zahamowanie apoptozy [80,90]. Obniżenie aktywności Aurory A skutkuje natomiast formowaniem jednobiegunowego wrzeciona, co bezpośrednio wskazuje na udział tego enzymu w procesie separacji i duplikacji centrosomów. Aurora A fosforyluje między innymi białko p53, co prowadzi do jego ubiquitynacji przez MDM2/HDM2 i degradacji poprzez proteolizę, hamuje również jego funkcje transkrypcyjne poprzez zniesienie wiązania białka p53 do DNA. Wyciszenie Aurory A obniża fosforylację p53, a to zwiększa stabilność tego białka i zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G2/M. Nadekspresja kinazy prowadzi natomiast do zwiększonej degradacji tego białka, której skutkiem jest zaburzenie punktu kontrolnego i transformacja nowotworowa komórek.

Nadekspresja kolejnej kinazy PLK1, podobnie jak w przypadku Aurory A, prowadzi do powstawania wielojądrowych komórek i wzrostu liczby centrosomów. Dodatkowo akumulacja nadliczbowych centrosomów w komórkach jest potęgowana poprzez brak białka p53, dlatego wydaje się, że źródłem nieprawidłowej liczby centrosomów mogą być zaburzenia podziałów komórkowych, szczególnie w przypadku nieobecności funkcjonalnego p53 [80]. PLK1 to konserwowana kinaza serynowo-treoninowa, której aktywność jest niezbędna do prawidłowego przejścia komórki przez fazę M cyklu komórkowego. Umożliwia ona między innymi wejście komórki w fazę podziałową (poprzez aktywację fosforylacji fosfatazy CDC25), formowanie wrzeciona, segregację chromosomów i cytokinezę. Nadekspresja tej kinazy jest obserwowana w wielu nowotworach, np. głowy, szyi, płuc, jelita grubego i żołądka, a wysoki poziom transkryptu PLK1 wykazuje około 80% nowotworów piersi, jajników i stercza [47,59,101].

Białko p53 w amplifikacji centrosomów

Komórki pozbawione funkcjonalnego białka p53 charakteryzuje występowanie nadliczbowych centrosomów, co sugeruje jego udział w regulacji cyklu podziałowego tych organelli [31]. Białko to jest również obecne w centrosomach, ale funkcjonalne znaczenie tej lokalizacji ciągle pozostaje niejasne. Wydaje się jednak, że jego fizyczna obecność w tych organelach oraz transaktywacyjna funkcja p53 są ważne dla kontroli cyklu duplikacji centrosomów. W różnych typach nowotworów, np. stercza, piersi oraz płaskonabłonkowym raku głowy i szyi, obserwuje się ścisłą zależność pomiędzy nadliczbowymi centrosomami i mutacjami p53 [109]. Zmiany w tym genie występują w więcej niż połowie wszystkich ludzkich nowotworów, korelują z aneuploidią oraz prowadzą do niestabilności chromosomalnej [31,34]. W modelowych liniach komórkowych obecność tylko jednego zmutowanego allele genu p53 jest związana z wczesnym pojawieniem się zaburzeń liczby chromosomów, a u heterozygotycznych myszy prowadzi do zwiększonej kancerogenezy [45].

W komórce białko p53 jest zaangażowane w kontrolę przebiegu wielu procesów. Jako czynnik transkrypcyjny reguluje odpowiedź komórki na różnego rodzaju czynniki

poprzez aktywację wielu procesów, do których należy autofagia, apoptoza, reperacja uszkodzeń DNA, starzenie się lub zatrzymanie cyklu komórkowego (w punktach kontrolnych cyklu G1/S i G2/M), co wiąże się z utrzymaniem integralności genomu. W komórkach nieekspresjonowanych na żaden czynnik stresowy poziom białka p53 jest niski, natomiast stres genotoksyczny wywołuje serię potranslacyjnych modyfikacji tego białka, co skutkuje jego stabilizacją, jądrową akumulacją i biochemiczną aktywacją [82]. Nawet podczas optymalnych warunków wzrostu komórki są poddawane zarówno wewnętrznym, jak i zewnętrznym czynnikom stresowym, co prowadzi do czasowego zatrzymania cyklu, niezależnie od statusu p53. W komórkach pozbawionych funkcjonalnego p53 następuje reduplikacja centrosomów [30]. Powrót takich komórek do prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego i ich przejście przez fazę podziałową wiąże się z wadliwą mitozą i błędną segregacją chromosomów, wynikającą z nieprawidłowej liczby centrosomów. Dodatkowym czynnikiem prowadzącym do obecności nadliczbowych centrosomów i CIN w komórkach pozbawionych białka p53 jest również nadekspresja cykliny E, która jest często obserwowana w różnego typu nowotworach, np. raku piersi, płuc, macicy [49].

Działanie p53 jako czynnika kontrolującego cykl podziałowy centrosomów zależy również od funkcjonowania białek oddziałujących z p53, np. białka p21 (głównego produktu transaktywacyjnego, będącego efektorowym białkiem p53), MDM2/HDM2 i MDMX/MDM4 oraz GADD25, regulującego działanie białka MDM2/HDM2 [75,88]. MDM2/HDM2 razem z MDMX/MDM4 należą do negatywnych regulatorów p53 i wpływają na obniżenie transkrypcyjnej aktywności tego białka [75]. MDM2/HDM2 mające aktywność ligazy ubiquityny jest odpowiedzialne za ubiquitynację i proteolityczną degradację p53, MDMX/MDM4 natomiast stabilizuje MDM2/HDM2 [82]. Amplifikacja MDM2/HDM2 i MDMX/MDM4 jest obserwowana w wielu nowotworach o różnym pochodzeniu, między innymi raku płuca i żołądka, a nadekspresję białka MDMX/MDM4 odnaleziono w nowotworach piersi, jelita grubego i retinoblastomie [112].

W prawidłowych komórkach poddanych działaniu stresu fizjologicznego lub środowiskowego białko p53 jest stabilizowane i nie podlega proteolizie inicjowanej przez MDM2/HDM2. Skutkuje to zwiększoną ekspresją białka p21, blokującego inicjację reduplikacji centrosomów przez inhibicję kompleksów CDK2 z cykliną E. Również podczas niezakłóconego przebiegu cyklu komórkowego białko p21 podlega ekspresji na poziomie podstawowym w sposób zależny od p53, co zapobiega przedwczesnej aktywacji CDK2/cykliny E. Wiązanie białka p21 do kompleksów CDK2 hamuje również fosforylację białka retinoblastomy (RB), procesu który jest niezbędny do oddysocjowania czynnika transkrypcyjnego E2F (znajdującego się przed fosforylacją w kompleksie z białkiem RB) i progresji cyklu komórkowego z fazy G1 do S. Dodatkowy efekt oddziaływania białka p21 na cykl komórkowy dotyczy również hamowania PCNA i cykliny B1 oraz degradowania

białka retinoblastomy, niezależnie od oddziaływania na funkcję kompleksów cyklina/CDK, czego rezultatem jest aktywacja punktów kontrolnych G1/S i S. Zablokowanie ekspresji p21 prowadzi do formowania nadmiernej liczby centrioli, co może powodować niestabilność genomu [23]. W komórkach bez obecności p53 nie zostają uruchomione procesy prowadzące do ekspresji białka p21, w wyniku czego następuje aktywacja CDK2 i w konsekwencji reduplikacja centrosomów [29].

Białka odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA i zaburzenia centrosomów

Czynnikami wpływającymi na regulację liczby centrosomów są również białka odpowiedzi komórkowej na obecność uszkodzeń DNA, zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA i/lub aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Należą do nich między innymi BRCA1/2, NBS1, kinazy ATM i ATR oraz polimeraza 1 poli(ADP-rybozy) (PARP1). Nieprawidłowa liczba centrosomów jest często obserwowana w komórkach ekspozowanych na czynniki uszkadzające DNA oraz wiąże się z mutacjami genów kodujących białka naprawy DNA [22], jednak mechanizmy prowadzące do tego zjawiska są wciąż mało poznane.

Wiele białek, których dysfunkcje zaburzają centrosomy należy do systemu rekombinacji homologicznej (HR), odpowiedzialnego w komórkach ssaków za naprawę podwójnych pęknięć DNA (DSBs). BRCA1 i BRCA2 są produktami genów związanych z rodzinną podatnością do zachorowań na raka piersi/jajników odgrywającymi ważną rolę w HR. Białko BRCA2 bezpośrednio wiąże się z rekombinazą RAD51, enzymem budującym nukleofilament w jądrze komórkowym w miejscach obecności DSBs. Nukleofilament jest złożony z wielu monomerów tego białka i odpowiada za poszukiwanie homologicznych sekwencji na nieuszkodzonej chromatydzie siostrzanej, stanowiącej matrycę replacyjnej syntezy DNA. Prawidłowe tworzenie nukleofilamentu białek RAD51 zależy od wiązania tego białka do BRCA2, które transportuje RAD51 do miejsc uszkodzeń DNA [20]. Formowanie tej struktury jest także warunkowane obecnością BRCA1, które współdziała w tym procesie z BRCA2 za pośrednictwem białka łącznikowego PALB2/FANCD1 oraz od obecności pięciu paralogów białka RAD51: RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 i XRCC3 [106].

Białka BRCA1/2 wykazują zarówno jądrową, jak i centrosomalną lokalizację. Obecność BRCA2 w centrosomach stwierdzono podczas fazy S i wczesnej M, natomiast centrosomalna lokalizacja BRCA1 jest przedmiotem dyskusji [87]. Część badań wykazała występowanie BRCA1 w tych organellach podczas interfazy i mitozy, inne natomiast zakwestionowały jego obecność w centrosomach. Ostatnio udowodniono jednak, że BRCA1 występuje w niezduplikowanych centrosomach i jest związane z centriolą matczyną, natomiast centriola pochodna uzyskuje to białko przed rozpoczęciem syntezy procentrioli [110]. Brak funkcjonalnych białek BRCA1/2 w komórkach skutkuje amplifikacją centrosomów, którą w przypadku dys-

funkcji BRCA1 zaobserwowano np. w nowotworach piersi [21,44,102].

Udział BRCA1 w regulacji liczby centrosomów może być najprawdopodobniej związany z jego bezpośrednim oddziaływaniem z wieloma białkami regulującymi proces duplikacji centrosomów, np. CDK2/cykliną A, CDK2/cykliną E, GADD45, p21, p53 i RB [21], jak również z oddziaływaniem z tubuliną γ . BRCA1 w kompleksie z białkiem towarzyszącym BARD1 ubikwitynuje tę tubulinę, a ekspresja zmienionej tubuliny γ , która nie podlega tej modyfikacji, prowadzi do amplifikacji centrosomów [104]. Molekularny mechanizm kontrolowania liczby centrosomów z udziałem BRCA1 poprzez potranslacyjny mechanizm modyfikacji białek wymaga dalszych badań. Inną prawdopodobną funkcją BRCA1 jest również udział w parowaniu centrioli i utrzymywaniu prawidłowej struktury centrosomu [52].

Mechanizm kontroli liczby centrosomów z udziałem BRCA2 najprawdopodobniej jest związany z białkami centrosomalnymi - nukleofozminą i kinazą ROCK2. W centrosomach białka te bezpośrednio oddziałują ze sobą, wiążą się również z BRCA2, tworząc trójbiałkowy kompleks, który kontroluje liczbę centrosomów oraz prawidłowy podział komórki [73]. Dysfunkcje BRCA2 prowadzą do zaburzeń tych procesów [118]. W centrosomach BRCA2 (podobnie jak BRCA1) bezpośrednio oddziałuje z tubuliną γ i prawdopodobnie interakcja ta ma również wpływ na regulację liczby centrosomów [87]. Komórki pozbawione funkcjonalnego BRCA2 charakteryzuje spontaniczna akumulacja strukturalnie nieprawidłowych chromosomów, a komórki nowotworowe z mutacjami BRCA2 są aneuploidalne [39,94]. Zaburzenia funkcji BRCA2 prowadzą także do nieprawidłowej cytokinezy komórek związanej z organizacją miozyny II podczas końcowej fazy tego procesu, czego wynikiem jest obecność dwujądrowych komórek [44]. Powyższe cechy fenotypowe związane z zaburzeniami funkcji BRCA2 sugerują ogromne znaczenie tego białka w procesie kancerogenezy.

Z zaburzeniami centrosomów jest również związane nieprawidłowe działanie innych białek systemu HR. Ekspresja dominująco-negatywnego allelu RAD51 odpowiada za fragmentację centrosomów i aneuploidię, a komórki pozbawione tego białka charakteryzują się nadmierną ilością centrosomów [10,22]. Zaburzenia centrosomów i niestabilność chromosomalna objawiająca się aneuploidią oraz obecność nieprawidłowych wrzecion mitotycznych związana jest także z obniżoną ekspresją lub nieobecnością paralogów RAD51 [19,98]. Haploinsuficjencja RAD51B oraz brak ekspresji Rad51D są przyczynami fragmentacji centrosomów [19,103]. Komórki pozbawione aktywności Xrcc2 i Xrcc3 również charakteryzuje fragmentacja i/lub amplifikacja tych organelli (szczególnie podczas mitozy), a podwyższona ich liczba występuje w komórkach mutantów Rad51C [40,98]. Białka Xrcc2, Rad51C i Rad51 kolokalizują ze sobą w centrosomach, a ich obecność w tych organellach jest obserwowana przez większość cyklu komórkowego. Dodatkowo białko RAD51 ma taką

samą lokalizację w centrosomach jak BRCA2 i wspólnie oddziałując z tubuliną γ [14]. Mutacje genów kodujących białko RAD51 i jego paralogi zostały odnalezione u pacjentów z rakiem piersi/jajnika, co wskazuje na ich związek z kancerogenezą, jednak dokładna ocena ich penetracji wymaga dalszych badań [35,48].

Od dawna wiadomo, że wiele czynników uszkadzających DNA, np. promieniowanie jonizujące czy cytostatyki, jest przyczyną formowania wielobiegunowych wrzecion mitotycznych oraz prowadzi do amplifikacji i fragmentacji centrosomów, zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych. Uszkodzenia DNA są przyczyną opóźnienia cyklu komórkowego związanego między innymi z aktywacją punktu kontrolnego G2/M, co zapobiega podziałom komórkowym w ich obecności [27]. Aktywacja punktu kontrolnego G2/M wiąże się z udziałem serynowo-treoninowych kinaz należących do rodziny kinaz 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K), ATM i ATR oraz przebiega drogą niezależną lub zależną od białka p53. Bez względu na udział p53 obydwa mechanizmy wymagają obecności kinaz ATM i ATR, spełniających rolę sensorów obecności uszkodzeń DNA oraz koordynatorów ścieżki odpowiedzi komórki na te uszkodzenia [30].

W ścieżce niezależnej od p53 aktywacja tych kinaz prowadzi do uruchomienia kaskady czynników sygnalizacyjnych obejmujących aktywację kolejnych kinaz, do których należą CHK1 i CHK2 oraz inhibicję kinazy PLK1. Hamowanie aktywności PLK1 przebiega przez defosforylację tego białka w ścieżce zależnej od aktywności ATM i CHK1. Inhibicja aktywności tego enzymu prowadzi do hamowania fosfataz z rodziny CDC25, CDC25A, -B i -C, których działanie wiąże się z defosforylacją CDK1 i przekształceniem jej do aktywnej postaci. Kompleks CDK1/cykliny B jest kluczowy dla rozpoczęcia mitozy, a brak aktywnej formy CDK1 prowadzi do zatrzymania komórki w fazie G2 lub do opóźnienia rozpoczęcia fazy podziałowej [27].

W aktywacji punktu kontrolnego G2/M zależnego od p53 kinazy ATM lub ATR fosforylują i stabilizują p53. Fosforylacja dotyczy Ser 15 i 20 białka p53, a odpowiedzią na nią jest aktywacja genów kodujących białka p21 i 14-3-3, które hamują kompleks CDK1/cykliny B i tym samym uruchamiają punkt kontrolny G2/M. Zatrzymanie komórek w fazie G2 może prowadzić do desynchronizacji cyklu komórkowego i centrosomów, co potencjalnie umożliwia reduplikację centrosomów prowadzącą do ich amplifikacji. Proces wymaga aktywności CDK2 i zachodzi w komórkach, w których aktywacja punktu kontrolnego G2/M przebiegała drogą niezależną od p53, ponieważ kinaza CDK2 jest efektywnie hamowana przez białko p21. Po uruchomieniu tego punktu kontrolnego przez mechanizm niezależny od p53 w komórkach występuje aktywna postać CDK2, która może inicjować reduplikację centrosomów [29].

Kolejnym białkiem, które bierze udział w naprawie DNA oraz wykazuje powiązanie z amplifikacją centrosomów jest polimeraza 1 poli(ADP-rybozy), która w komórkach

ulega aktywacji i wiąże się do DNA w miejscach pojedynczych i podwójnych pęknięć [83]. Komórki pozbawione aktywności tego białka mają zamplifikowane centrosomy, dlatego przypuszcza się, że obserwowana w nich niestabilność chromosomalna może być związana z dysfunkcją centrosomów [53]. Poziom ekspresji PARP1 najprawdopodobniej wiąże się z kancerogenezą, ponieważ obniżoną ekspresję tego białka obserwuje się między innymi w liniach komórkowych raka żołądka i okrężnicy oraz w niektórych nowotworach piersi [83]. PARP1 występuje w centrosomach podczas całego cyklu komórkowego i katalizuje reakcje poli(ADP-rybozylacji) białek centrosomalnych [53]. Ponieważ także inni członkowie rodziny PARP, np. PARP3, PARP4 i PARP5 oraz również poli(ADP-rybozyl)owane białka są odnajdywane w różnych elementach aparatu mitotycznego, przypuszczalnie mogą wpływać na regulację prawidłowego rozdziału chromosomów w trakcie mitozy [83]. Mechanizm prowadzący do amplifikacji centrosomów w przypadku braku funkcjonalnego PARP1 nie jest dokładnie poznany. Przypuszcza się jednak, że nieobecność tego enzymu, podobnie do innych białek związanych z reperacją DNA, powoduje akumulację uszkodzonego DNA, wydłużoną aktywację punktów kontrolnych i zatrzymanie cyklu komórkowego, co umożliwia nadmierną amplifikację centrosomów [29]. Występowanie w centrosomach poli(ADP-rybozyl)owanych białek, np. p53 oraz poli(ADP-rybozo) glikohydrolazy, hydrolizującej łańcuchy poli(ADP-rybozo) wskazuje, że metabolizm poli(ADP-rybozo) może odgrywać znaczącą rolę w regulacji progresji cyklu komórkowego i duplikacji centrosomów [53,92].

PERSPEKTYWY

Do tej pory wciąż nie jest oczywiste czy nieprawidłowe centrosomy rzeczywiście aktywnie uczestniczą w inicjacji i progresji nowotworów, czy są tylko pośrednim wynikiem innych, niewłaściwie przebiegających procesów powiązanych z kancerogenezą. Związek centrosomów z nowotworzeniem wydaje się potwierdzać obecność nieprawidłowych centrosomów we wczesnych zmianach przednowotworowych oraz ich korelacja z aneuploidią [96]. Nadliczbowe centrosomy niewątpliwie sprzyjają niestabilności chromosomalnej, będącej cechą charakterystyczną większości ludzkich nowotworów i wykazują współzależność ze stopniem zaawansowania nowotworu [17,69]. Amplifikacja centrosomów, powszechnie występująca w różnego rodzaju nowotworach u ludzi, może wynikać z zaburzeń kilku mechanizmów opisanych w artykule. Wydaje się jednak, że mechanizmami najczęściej odpowiedzialnymi za nadmierną liczbę centrosomów w komórkach nowotworowych są zaburzenia mitozy i cytokinezy, nieprawidłowa ekspresja białek centrosomalnych oraz zaburzone procesy odpowiedzi komórki na występowanie uszkodzeń DNA [22,61,108,115,116]. Bardzo ważne jest więc szczegółowe poznanie mechanizmów oraz regulacji procesów, w których uczestniczą i którym podlegają te organella. Ze względu na częstość występowania nieprawidłowych centrosomów w komórkach nowotworowych niezwykle obiecująca, w perspektywie kliniczne-

go zastosowania, jest możliwość wykorzystania ich jako czynnika diagnostycznego i prognostycznego nowotworów, a także kontrola i regulacja ich liczby w komórkach mająca znaczenie lecznicze.

Potencjalne możliwości wykorzystania terapeutycznego centrosomów zapoczątkowało wiele różnokierunkowych i intensywnie prowadzonych badań skierowanych na wykorzystanie ich jako celu leczenia przeciwnowotworowego. Strategie farmakologicznej interwencji mogą dotyczyć zablokowania zjawiska grupowania centrosomów, które umożliwia komórkom mającym nadliczbowe centrosomy prawidłowy podział dwubiegunowy [63,91]. Mechanizm ten, pomimo częstej amplifikacji centrosomów w komórkach nowotworowych, zapobiega ich zmasowanej śmierci spowodowanej niesymetrycznymi podziałami. Identyfikacja czynników blokujących to zjawisko i skonstruowanie specyficznych leków przywracających wielobiegunowe podziały komórek, skutkujące katastrofą mitotyczną, może być drogą selektywnego usuwania komórek nowotworowych z organizmu oraz stanowić nietoksyczną i celowaną terapię przeciwnowotworową. Obecnie są poszukiwane inhibitory czynników odpowiedzialnych za to zjawisko oraz jest analizowana możliwość ich terapeutycznego wykorzystania [91]. Badania ostatnich lat, wnoszące dużo nowych informacji na temat regulacji cyklu podziałowego centrosomów i procesów związanych z tymi organellami, umożliwiły także wyodrębnienie kolejnych celów strategii leczniczych, do których należą np. mikrotubule, będące do tej pory jednym z najbardziej zaawansowanych i odnoszących sukcesy celem terapii przeciwnowotworowych [50]. Intensywne badania dotyczą również regulacji aktywności kinaz białkowych, np.

CDK2, PLK1/4, Aurora A i NEK2A, które biorą udział w różnych etapach cyklu duplikacji centrosomów, a zaburzenia ich funkcji często prowadzą do amplifikacji centrosomów [62,79]. Obecnie jest dostępnych wiele inhibitorów ich aktywności, a wyniki badań uzyskane z ich udziałem są obiecujące. Przeprowadzone *in vitro* hamowanie działania np. CDK2 powoduje skuteczne zablokowanie nadmiernej duplikacji centrosomów i prowadzi do znacznej redukcji komórek aneuploidalnych [62]. Obecnie testowanych jest wiele inhibitorów kinaz regulujących cykl duplikacji centrosomów, których ocena skuteczności i możliwość zastosowania terapeutycznego znajdują się w różnych fazach badań, zarówno przedklinicznych, jak i klinicznych (przegląd [62,79]). Najbardziej zaawansowane badania dotyczą związków hamujących aktywność kinaz, np. PLK1, takich jak ON-01910 czy BI 2536, stosowanych odpowiednio u pacjentów z przewlekłą białaczką mielomonocytową (CMML) i rakiem stercza, znajdujące się na III i II etapie badań klinicznych. W II fazie badań klinicznych znajdują się także inhibitory aktywności Aurory A, np. MLN 8237, podawane pacjentom z czerniakiem w III i IV stadium zaawansowania choroby lub AT-9283, aplikowane chorem w zaawansowanych i przerzutowych stadiach guzów litych oraz chłoniaków (<http://clinicaltrials.gov>, [62]).

W tym kontekście dokładne zrozumienie molekularnych czynników koordynujących duplikację i segregację centrosomów, poznanie mechanizmów zaburzeń centrosomów w nowotworach oraz ich potencjalnego współdziałania może się przyczynić nie tylko do pełniejszego zrozumienia roli centrosomów w kancerogenezie, ale także być podstawą rozwoju diagnostyki klinicznej i terapeutycznych aplikacji związanych z centrosomami.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abal M., Piel M., Bouckson-Castaing V., Mogensen M., Sibarita J.B., Bornens M.: Microtubule release from the centrosome in migrating cells. *J. Cell Biol.*, 2002; 159: 731-737
- [2] Ahmad F.J., Yu W., McNally F.J., Baas P.W.: An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J. Cell Biol.*, 1999; 145: 305-315
- [3] Andersen J.S., Wilkinson C.J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E.A., Mann M.: Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 2003; 426: 570-574
- [4] Anderson C.T., Stearns T.: Centriole age underlies asynchronous primary cilium growth in mammalian cells. *Curr. Biol.*, 2009; 19: 1498-1502
- [5] Azimzadeh J., Marshall W.F.: Building the centriole. *Curr. Biol.*, 2010; 20: R816-R825
- [6] Bahe S., Stierhof Y.D., Wilkinson C.J., Leiss F., Nigg E.A.: Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J. Cell Biol.*, 2005; 171: 27-33
- [7] Bakhom S.F., Thompson S.L., Manning A.L., Compton D.A.: Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 27-35
- [8] Bärenz F., Mayilo D., Gruss O.J.: Centriolar satellites: busy orbits around the centrosome. *Eur. J. Cell Biol.*, 2011; 90: 983-989
- [9] Bayani J., Selvarajah S., Maire G., Vukovic B., Al-Romaih K., Zielenska M., Squire J.A.: Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin. Cancer Biol.*, 2007; 17: 5-18
- [10] Bertrand P., Lambert S., Joubert C., Lopez B.S.: Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells. *Oncogene*, 2003; 22: 7587-7592
- [11] Bettencourt-Dias M., Glover D.M.: Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 451-463
- [12] Bettencourt-Dias M., Hildebrandt F., Pellman D., Woods G., Godinho S.A.: Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet.*, 2011; 27: 307-315
- [13] Cam W.R., Masaki T., Shiratori T.Y., Kato N., Okamoto M., Yamaji Y., Igarashi K., Sano T., Omata M.: Activation of cyclin E-dependent kinase activity in colorectal cancer. *Dig. Dis. Sci.*, 2001; 46: 2187-2198
- [14] Cappelli E., Townsend S., Griffin C., Thacker J.: Homologous recombination proteins are associated with centrosomes and are required for mitotic stability. *Exp. Cell Res.*, 2011; 317: 1203-1213

- [15] Cho E.H., Whipple R.A., Matrone M.A., Balzer E.M., Martin S.S.: Delocalization of γ -tubulin due to increased solubility in human breast cancer cell lines. *Cancer Biol. Ther.*, 2010; 9: 66-76
- [16] Cunha-Ferreira I., Rodrigues-Martins A., Bento I., Riparbelli M., Zhang W., Laue E., Callaini G., Glover D.M., Bettencourt-Dias M.: The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4. *Curr. Biol.*, 2009; 19: 43-49
- [17] D'Assoro A.B., Lingle W.L., Salisbury J.L.: Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene*, 2002; 21: 6146-6153
- [18] Dammermann A., Merdes A.: Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J. Cell Biol.*, 2002; 159: 255-266
- [19] Date O., Katsura M., Ishida M., Yoshihara T., Kinomura A., Sueda T., Miyagawa K.: Haploinsufficiency of *RAD51B* causes centrosome fragmentation and aneuploidy in human cells. *Cancer Res.*, 2006; 66: 6018-6024
- [20] Davies A.A., Masson J.Y., McIlwraith M.J., Stasiak A., Venkitaraman A.R., West S.C.: Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol. Cell*, 2001; 7: 273-282
- [21] Deng C.X.: Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene*, 2002; 21: 6222-6227
- [22] Dodson H., Bourke E., Jeffers L.J., Vagnarelli P., Sonoda E., Takeda S., Earnshaw W.C., Merdes A., Morrison C.: Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *EMBO J.*, 2004; 23: 3864-3873
- [23] Duensing A., Ghanem L., Steinman R.A., Liu Y., Duensing S.: p21^{Waf1/Cip1} deficiency stimulates centriole overduplication. *Cell Cycle*, 2006; 5: 2899-2902
- [24] Duensing S.: A tentative classification of centrosome abnormalities in cancer. *Cell Biol. Int.*, 2005; 29: 352-359
- [25] Duensing S., Duensing A., Crum C.P., Mürner K.: Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.*, 2001; 61: 2356-2360
- [26] Fisk H.A., Mattison C.P., Winey M.: Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 14875-14880
- [27] Fletcher L., Muschel R.J.: The centrosome and the DNA damage induced checkpoint. *Cancer Lett.*, 2006; 243: 1-8
- [28] Fukasawa K.: Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett.*, 2005; 230: 6-19
- [29] Fukasawa K.: Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat. Rev. Cancer*, 2007; 7: 911-924
- [30] Fukasawa K.: P53, cyclin-dependent kinase and abnormal amplification of centrosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1786: 15-23
- [31] Fukasawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S., Vande Woude G.F.: Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 1996; 271: 1744-1747
- [32] Futreal P.A., Coin L., Marshall M., Down T., Hubbard T., Wooster R., Rahman N., Stratton M.R.: A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 177-183
- [33] Ganem N.J., Godinho S.A., Pellman D.: A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*, 2009; 460: 278-282
- [34] Godinho S.A., Kwon M., Pellman D.: Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. *Cancer Metastasis Rev.*, 2009; 28: 85-98
- [35] Golmard L., Caux-Moncoutier V., Davy G., Al Ageeli E., Poirot B., Tirapo C., Michaux D., Barbaroux C., D'Enghien C.D., Nicolas A., Castera L., Sastre-Garau X., Stern M.H., Houdayer C., Stoppa-Lyonnet D.: Germline mutation in the *RAD51B* gene confers predisposition to breast cancer. *BMC Cancer*, 2013; 13: 484
- [36] Gönczy P.: Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2012; 13: 425-435
- [37] Graser S., Stierhof Y.D., Nigg E.A.: Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J. Cell Sci.*, 2007; 120: 4321-4331
- [38] Gregan J., Polakova S., Zhang L., Tolić-Nørrelykke I.M., Cimini D.: Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. *Trends Cell Biol.*, 2011; 21: 374-381
- [39] Gretarsdottir S., Thorlacius S., Valgardsdottir R., Gudlaugsdottir S., Sigurdsson S., Steinarsdottir M., Jonasson J.G., Ananthawat-Jonsson K., Eyfjörð J.E.: BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res.*, 1998; 58: 859-862
- [40] Griffin C.S., Simpson P.J., Wilson C.R., Thacker J.: Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.*, 2000; 2: 757-761
- [41] Grisendi S., Mecucci C., Falini B., Pandolfi P.P.: Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 493-505
- [42] Gritsko T.M., Coppola D., Paciga J.E., Yang L., Sun M., Shelley S.A., Fiorica J.V., Nicosia S.V., Cheng J.Q.: Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 1420-1426
- [43] Habedanck R., Stierhof Y.D., Wilkinson C.J., Nigg E.A.: The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat. Cell Biol.*, 2005; 7: 1140-1146
- [44] Han X., Saito H., Miki Y., Nakanishi A.: A CRM1-mediated nuclear export signal governs cytoplasmic localization of BRCA2 and is essential for centrosomal localization of BRCA2. *Oncogene*, 2008; 27: 2969-2977
- [45] Harvey M., Sands A.T., Weiss R.S., Hegi M.E., Wiseman R.W., Pantazis P., Giovanella B.C., Tainsky M.A., Bradley A., Donehower L.A.: In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene*, 1993; 8: 2457-2467
- [46] Holland A.J., Cleveland D.W.: Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009; 10: 478-487
- [47] Holtrich U., Wolf G., Bräuninger A., Karn T., Böhme B., Rüb-samen-Waigmann H., Strebhardt K.: Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 1736-1740
- [48] Hu J., Wang N., Wang Y.J.: XRCC3 and RAD51 expression are associated with clinical factors in breast cancer. *PLoS One*, 2013; 8: e72104
- [49] Hwang H.C., Clurman B.E.: Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*, 2005; 24: 2776-2786
- [50] Jordan M.A., Kamath K.: How do microtubule-targeted drugs work? An overview. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2007; 7: 730-742
- [51] Jordan M.A., Wilson L.: Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 253-265
- [52] Kais Z., Chiba N., Ishioka C., Parvin J.D.: Functional differences among BRCA1 missense mutations in the control of centrosome duplication. *Oncogene*, 2012; 31: 799-804
- [53] Kanai M., Tong W.M., Sugihara E., Wang Z.Q., Fukasawa K., Miwa M.: Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 and poly(ADP-ribosylation) in regulation of centrosome function. *Mol. Cell Biol.*, 2003; 23: 2451-2462
- [54] Kasbek C., Yang C.H., Fisk H.A.: Mps1 as a link between centrosomes and genomic instability. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2009; 50: 654-665

- [55] Keller L.C., Romijn E.P., Zamora I., Yates J.R., Marshall W.F.: Proteomic analysis of isolated *chlamydomonas* centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Curr. Biol.*, 2005; 15: 1090-1098
- [56] Khodjakov A., Rieder C.L.: Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J. Cell Biol.*, 2001; 153: 237-242
- [57] Khodjakov A., Rieder C.L., Sluder G., Cassels G., Sibon O., Wang C.L.: De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *J. Cell Biol.*, 2002; 158: 1171-1181
- [58] Kleylein-Sohn J., Westendorf J., Le Clech M., Habedanck R., Stierhof Y.D., Nigg E.A.: Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev. Cell*, 2007; 13: 190-202
- [59] Knecht R., Elez R., Oechler M., Solbach C., von Ilberg C., Strebhardt K.: Prognostic significance of *polo-like kinase* (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.*, 1999; 59: 2794-2797
- [60] Ko M.A., Rosario C.O., Hudson J.W., Kulkarni S., Pollett A., Dennis J.W., Swallow C.J.: Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 883-888
- [61] Kohlmaier G., Loncarek J., Meng X., McEwen B.F., Mogensen M.M., Spektor A., Dynlacht B.D., Khodjakov A., Gönczy P.: Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP. *Curr. Biol.*, 2009; 19: 1012-1018
- [62] Korzeniewski N., Hohenfellner M., Duensing S.: The centrosome as potential target for cancer therapy and prevention. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2013; 17: 43-52
- [63] Krämer A., Maier B., Bartek J.: Centrosome clustering and chromosomal (in)stability: a matter of life and death. *Mol. Oncol.*, 2011; 5: 324-335
- [64] Kubo A., Sasaki H., Yuba-Kubo A., Tsukita S., Shiina N.: Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. *J. Cell Biol.*, 1999; 147: 969-980
- [65] Kwon M., Godinho S.A., Chandhok N.S., Ganem N.J., Azioune A., Thery M., Pellman D.: Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev.*, 2008; 22: 2189-2203
- [66] Lawo S., Hasegan M., Gupta G.D., Pelletier L.: Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat. Cell Biol.*, 2012; 14: 1148-1158
- [67] Lee K., Rhee K.: Separase-dependent cleavage of pericentrin B is necessary and sufficient for centriole disengagement during mitosis. *Cell Cycle*, 2012; 11: 2476-2485
- [68] Li J., Miki H., Ohmori M., Wu F., Funamoto Y.: Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.*, 2001; 32: 945-953
- [69] Lingle W.L., Barrett S.L., Negron V.C., D'Assoro A.B., Boeneman K., Liu W., Whitehead C.M., Reynolds C., Salisbury J.: Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 1978-1983
- [70] Lothschütz D., Jennewein M., Pahl S., Lausberg H.F., Eichler A., Mutschler W., Hanselmann R.G., Oberringer M.: Polyploidization and centrosome hyperamplification in inflammatory bronchi. *Inflamm. Res.*, 2002; 51: 416-422
- [71] Lüders J., Stearns T.: Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 161-167
- [72] Lukasiewicz K.B., Lingle W.L.: Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2009; 50: 602-619
- [73] Ma Z., Kanai M., Kawamura K., Kaibuchi K., Ye K., Fukasawa K.: Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 9016-9034
- [74] Mardin B.R., Schiebel E.: Breaking the ties that bind: new advances in centrosome biology. *J. Cell Biol.*, 2012; 197: 11-18
- [75] Marine J.C., Jochemsen A.G.: Mdmx and Mdm2: brothers in arms? *Cell Cycle*, 2004; 3: 900-904
- [76] Martin S.A., Hewish M., Lord C.J., Ashworth A.: Genomic instability and the selection of treatments for cancer. *J. Pathol.*, 2010; 220: 281-289
- [77] Matsumoto Y., Hayashi K., Nishida E.: Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.*, 1999; 9: 429-432
- [78] Mayor T., Stierhof Y.D., Tanaka K., Fry A.M., Nigg E.A.: The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J. Cell Biol.*, 2000; 151: 837-846
- [79] Mazzorana M., Montoya G., Mortuza G.B.: The centrosome: a target for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2011; 11: 600-612
- [80] Meraldi P., Honda R., Nigg E.A.: Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J.*, 2002; 21: 483-492
- [81] Meraldi P., Lukas J., Fry A.M., Bartek J., Nigg E.A.: Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat. Cell Biol.*, 1999; 1: 88-93
- [82] Michael D., Oren M.: The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.*, 2003; 13: 49-58
- [83] Miwa M., Masutani M.: PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci.*, 2007; 98: 1528-1535
- [84] Morgan-Fisher M., Wewer U.M., Yoneda A.: Regulation of ROCK activity in cancer. *J. Histochem. Cytochem.*, 2013; 61: 185-198
- [85] Moser J.J., Fritzler M.J., Ou Y., Rattner J.B.: The PCM-basal body/primary cilium coalition. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2010; 21: 148-155
- [86] Mussman J.G., Horn H.F., Carroll P.E., Okuda M., Tarapore P., Donehower L.A., Fukasawa K.: Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene*, 2000; 19: 1635-1646
- [87] Nakanishi A., Han X., Saito H., Taguchi K., Ohta Y., Imajoh-Ohmi S., Miki Y.: Interference with BRCA2, which localizes to the centrosome during S and early M phase, leads to abnormal nuclear division. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 355: 34-40
- [88] Nigg E.A.: Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 815-825
- [89] Nigg E.A.: Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int. J. Cancer*, 2006; 119: 2717-2723
- [90] Nikonova A.S., Atsaturov I., Serebriiskii I.G., Dunbrack R.L., Golemis E.A.: Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell growth. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013; 70: 661-687
- [91] Ogden A., Rida P.C., Aneja R.: Let's huddle to prevent a muddle: centrosome declustering as an attractive anticancer strategy. *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 1255-1267
- [92] Ohashi S., Kanai M., Hanai S., Uchiumi F., Maruta H., Tanuma S., Miwa M.: Subcellular localization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 307: 915-921
- [93] Okuda M., Horn H.F., Tarapore P., Tokuyama Y., Smulian A.G., Chan P.K., Knudsen E.S., Hofmann I.A., Snyder J.D., Bove K.E., Fukasawa K.: Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, 2000; 103: 127-140
- [94] Patel K.J., Yu V.P., Lee H., Corcoran A., Thistlethwaite F.C., Evans M.J., Colledge W.H., Friedman L.S., Ponder B.A., Venkitaraman A.R.: Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol. Cell*, 1998; 1: 347-357
- [95] Pihan G.A., Purohit A., Wallace J., Knecht H., Woda B., Quesenberry P., Doxsey S.J.: Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.*, 1998; 58: 3974-3985

- [96] Pihan G.A., Wallace J., Zhou Y., Doxsey S.J.: Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.*, 2003; 63: 1398-1404
- [97] Raynaud-Messina B., Merdes A.: γ -tubulin complexes and microtubule organization. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2007; 19: 24-30
- [98] Renglin Lindh A., Schultz N., Saleh-Gohari N., Helleday T.: RAD51C (RAD51L2) is involved in maintaining centrosome number in mitosis. *Cytogenet. Genome Res.*, 2007; 116: 38-45
- [99] Rosario C.O., Ko M.A., Haffani Y.Z., Gladly R.A., Paderova J., Pollett A., Squire J.A., Dennis J.W., Swallow C.J.: Plk4 is required for cytokinesis and maintenance of chromosomal stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 6888-6893
- [100] Salisbury J.L.: A mechanistic view on the evolutionary origin for centrin-based control of centriole duplication. *J. Cell. Physiol.*, 2007; 213: 420-428
- [101] Schöffski P.: Polo-like kinase (PLK) inhibitors in preclinical and early clinical development in oncology. *Oncologist*, 2009; 14: 559-570
- [102] Shimomura A., Miyoshi Y., Taguchi T., Tamaki Y., Noguchi S.: Association of loss of BRCA1 expression with centrosome aberration in human breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2009; 135: 421-430
- [103] Smiraldi P.G., Gruver A.M., Osborn J.C., Pittman D.L.: Extensive chromosomal instability in *Rad51d*-deficient mouse cells. *Cancer Res.*, 2005; 65: 2089-2096
- [104] Starita L.M., Machida Y., Sankaran S., Elias J.E., Griffin K., Schlegel B.P., Gygi S.P., Parvin J.D.: BRCA1-dependent ubiquitination of γ -tubulin regulates centrosome number. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 8457-8466
- [105] Strnad P., Gönczy P.: Mechanisms of procentriole formation. *Trends Cell Biol.*, 2008; 18: 389-396
- [106] Suwaki N., Klare K., Tarsounas M.: RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2011; 22: 898-905
- [107] Tanaka T., Kimura M., Matsunaga K., Fukada D., Mori H., Okano Y.: Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res.*, 1999; 59: 2041-2044
- [108] Tang C.J., Lin S.Y., Hsu W.B., Lin Y.N., Wu C.T., Lin Y.C., Chang C.W., Wu K.S., Tang T.K.: The human microcephaly protein STIL interacts with CPAP and is required for procentriole formation. *EMBO J.*, 2011; 30: 4790-4804
- [109] Tarapore P., Fukasawa K.: Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene*, 2002; 21: 6234-6240
- [110] Tarapore P., Hanashiro K., Fukasawa K.: Analysis of centrosome localization of BRCA1 and its activity in suppressing centrosomal aster formation. *Cell Cycle*, 2012; 11: 2931-2946
- [111] Tokuyama Y., Horn H., Kawamura K., Tarapore P., Fukasawa K.: Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr¹⁹⁹ by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 21529-21537
- [112] Toledo F., Wahl G.M.: MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 1476-1482
- [113] Tsou M.F., Stearns T.: Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature*, 2006; 442: 947-951
- [114] Tsou M.F., Wang W.J., George K.A., Uryu K., Stearns T., Jallepalli P.V.: Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. *Dev. Cell*, 2009; 17: 344-354
- [115] Vitre B.D., Cleveland D.W.: Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2012; 24: 809-815
- [116] Vulprecht J., David A., Tibelius A., Castiel A., Konotop G., Liu F., Bestvater F., Raab M.S., Zentgraf H., Izraeli S., Krämer A.: STIL is required for centriole duplication in human cells. *J. Cell Sci.*, 2012; 125: 1353-1362
- [117] Wade R.H.: On and around microtubules: an overview. *Mol. Biotechnol.*, 2009; 43: 177-191
- [118] Wang H.F., Takenaka K., Nakanishi A., Miki Y.: BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with the Rho effector kinase ROCK2. *Cancer Res.*, 2011; 71: 68-77
- [119] Wong J.C., Hasan M.R., Rahman M., Yu A.C., Chan S.K., Schaeffer D.F., Kennecke H.F., Lim H.J., Owen D., Tai I.T.: Nucleophosmin 1, upregulated in adenomas and cancers of the colon, inhibits p53-mediated cellular senescence. *Int. J. Cancer*, 2013; 133: 1567-1577
- [120] Zimmerman W., Doxsey S.J.: Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles. *Traffic*, 2000; 1: 927-934

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.