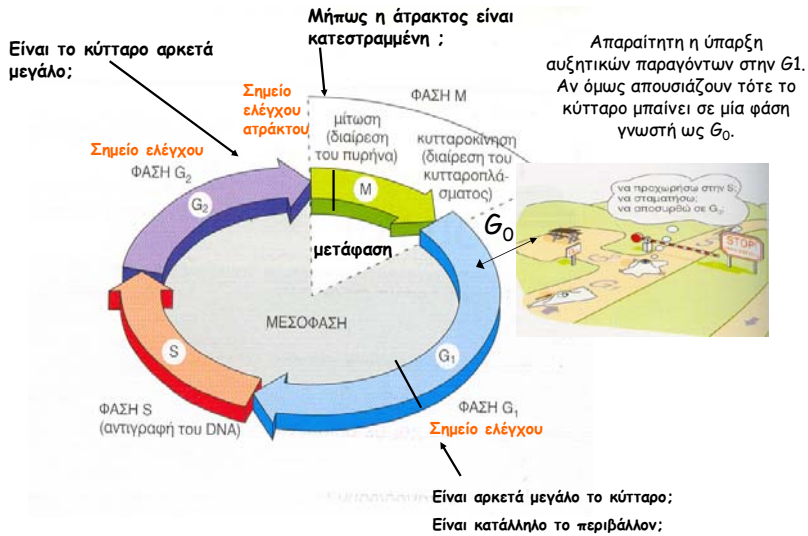


Ο κυτταρικός κύκλος είναι τυπικά διαιρεμένος σε τέσσερις φάσεις



15°

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

1. Ο κυτταρικός κύκλος

Αρχές της κυτταρικής ρύθμισης

Κρίσιμα γεγονότα και μεταπτώσεις του κυτταρικού κύκλου

2. Στοιχεία-κλειδιά του κυτταρικού κύκλου

Οι κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες (CDKs)

Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των CDKs με φωσφορυλίωση

Οι κυκλίνες

Σταθερότητα των κυκλινών

Δομική βάση της ενεργοποίησης των CDKs. Το σύμπλεγμα CDK2-κυκλίνη A

Οι αναστολείς των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CKIs)

Υποστρώματα των CDKs

3. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω πρωτεόλυσης

Στοχευμένη πρωτεόλυση στη μετάπτωση G₁/S

Πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Το κυκλόσωμα

4. Η μετάβαση από τη φάση G₁ στην S

Η λειτουργία των κυκλινών τύπου D

Η λειτουργία της πρωτεΐνης pRb στον κυτταρικό κύκλο

Το μοντέλο της λειτουργίας της pRb

5. Ο έλεγχος της αντιγραφής του DNA στον κυτταρικό κύκλο

Έλεγχος το αρχικό επίπεδο

Έλεγχος στα συστατικά της αντιγραφής

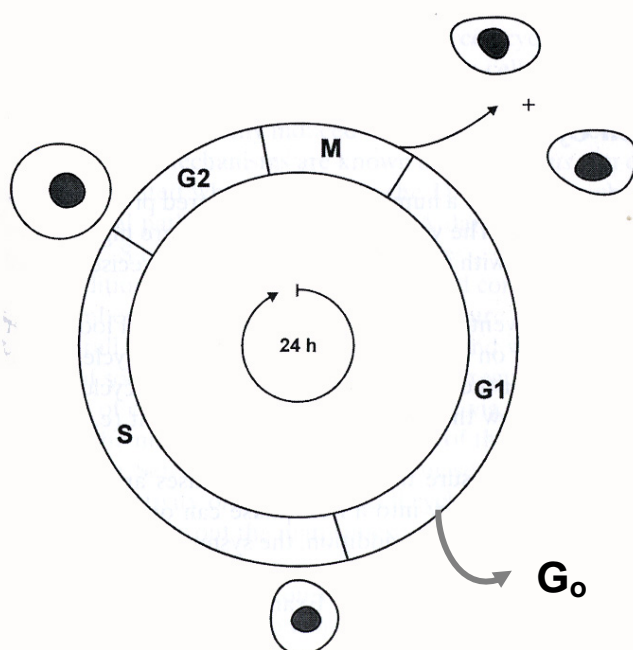
6. Η μετάβαση από τη φάση G₂ στην M

7. Το σημείο ελέγχου της βλάβης του DNA

1. Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Η αναπαραγωγή των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι μία κυκλική διαδικασία, στην οποία διακρίνονται δύο τουλάχιστον φάσεις, η **φάση M** (Μίτωση) και η **φάση S** (Σύνθεση), οι οποίες μπορούν να διαφοροποιηθούν με βάση τα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Το βιοχημικό χαρακτηριστικό της φάσης S είναι η αντιγραφή του πυρηνικού DNA και συνεπώς ο διπλασιασμός της γενετικής πληροφορίας. Κατά τη φάση M συμβαίνει η μίτωση, η διαίρεση δηλαδή των χρωμοσωμάτων των δυο αδελφών κυττάρων.

Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους μπορούμε να διακρίνουμε ακόμα δύο φάσεις: τη G_1 , που είναι η φάση ανάμεσα στην M και S και τη φάση G_2 ανάμεσα στην S και M. Η G_1 ακολουθεί την M ενώ η G_2 ακολουθεί την S. Επιπλέον, το κύτταρο μπορεί να μεταβεί από την G_1 σε μία αδρανή φάση την G_0 , από την οποία μπορεί να εξέλθει μέσω συγκεκριμένων σημάτων. Ένα από αυτά είναι οι αυξητικοί παράγοντες.



Εικόνα 15.1 Οι τέσσερις φάσεις ενός τυπικού κυτταρικού κύκλου ευκαρυωτικού κυττάρου. Οι φάσεις G_1 , S, G_2 αποτελούν τη μεσόφαση, εφόσον το κύτταρο αυξάνεται συνεχώς. Η κυτταρική διαίρεση συμβαίνει στη φάση M. Η σύνθεση του DNA περιορίζεται στη φάση S. Η φάση G_1 είναι η περίοδος ανάμεσα στη φάση M και S, ενώ η G_2 ανάμεσα στη φάση S και M. Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου 24 ώρες είναι ενδεικτική. Υπάρχουν κύτταρα με κυτταρικούς κύκλους μεγαλύτερης και μικρότερης διάρκειας.

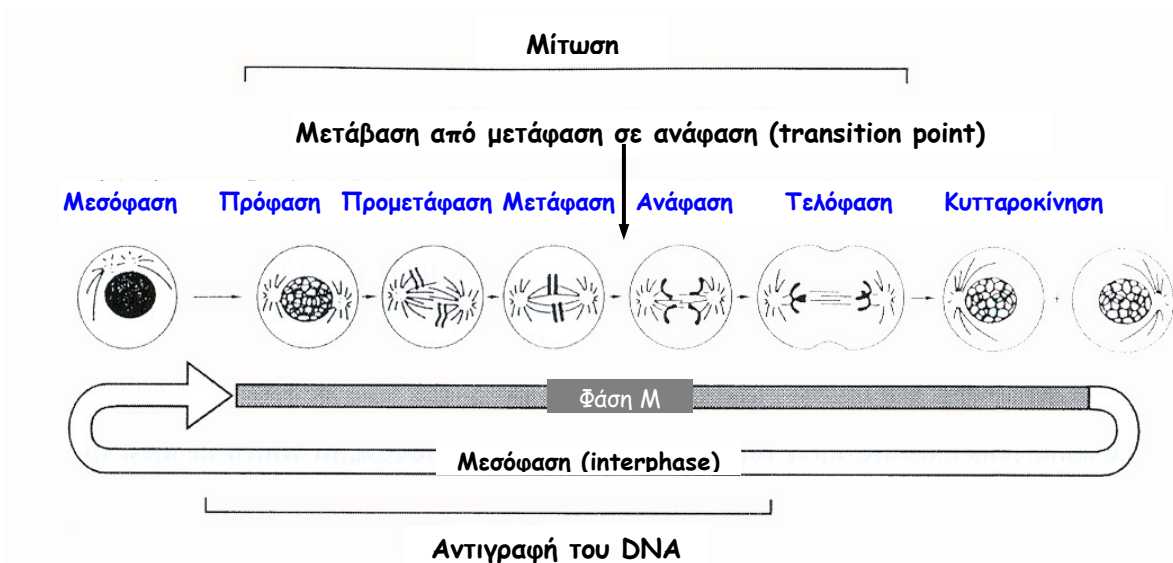
Η κυκλική αλληλουχία των G_1 , S, G_2 και M περιγράφει ένα τυπικό κυτταρικό κύκλο (Εικόνα 15.1). Στα κύτταρα των θηλαστικών ένας πλήρης κυτταρικός κύκλος διαρκεί μεταξύ 12 και 24 ωρών, ενώ σε ορισμένους τύπους κυττάρων, όπως είναι τα εμβρυϊκά κύτταρα, ο κύκλος διαρκεί 8 – 60 λεπτά, γεγονός που εμποδίζει τη σαφή αναγνώριση των φάσεων G_1 και G_2 . Μορφολογικά, η κυτταρική διαίρεση είναι ορατή μόνο στη φάση M (Εικόνα 15.2).

■ Αρχές της κυτταρικής ρύθμισης

Οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνουν έναν αριθμό διαδικασιών, που τελικά οδηγούν στο διπλασιασμό του κυττάρου. Τα διάφορα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου είναι συντονισμένα ώστε να συμβαίνουν με μια προσδιορισμένη σειρά και έναν ακριβή χρονικό προσδιορισμό, και γι' αυτό απαιτούν την παρουσία μηχανισμών που ελέγχουν τη σωστή πραγματοποίησή τους.

Η ακριβής αλληλουχία των γεγονότων του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζεται από διάφορες ρυθμιστικές θηλιές, οι οποίες έχουν ένα ανασταλτικό ή διεγερτικό αποτέλεσμα στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αυτοί είναι μηχανισμοί παρακολούθησης και καταγραφής

της ολοκλήρωσης σημαντικών γεγονότων του κυτταρικού κύκλου (πχ. εάν ολοκληρώθηκε η σύνθεση του DNA) και επιτρέπουν να συμβεί η μετάβαση στο επόμενο γεγονός (πχ είσοδος στη μίτωση).



Εικόνα 15.2 Κυτταρολογικά χαρακτηριστικά της φάσης Μ. Σημαντικό σημείο ελέγχου είναι το σημείο μετάβασης από τη μετάφαση στην ανάφαση. Τα κύτταρα μπορούν να σταματήσουν πριν αυτό το σημείο, αν όμως το περάσουν τότε η κυτταρική διαίρεση θα ολοκληρωθεί.

Τα ρυθμιστικά συστήματα του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζουν ότι οι διάφορες φάσεις ολοκληρώνονται σωστά και με σωστή αλληλουχία. Η είσοδος σε μια νέα φάση μπορεί να συμβεί μόνο εάν η προηγούμενη φάση έχει ολοκληρωθεί. Πολλοί από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς είναι *εσωτερικής φύσης* και είναι ιδιοσυστατοί (δηλ. είναι λειτουργικοί σε κάθε κυτταρικό κύκλο και εξασφαλίζουν τη σειρά των μεμονωμένων βημάτων). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που δεν είναι ενεργοί σε κάθε κυτταρικό κύκλο, αλλά ενεργοποιούνται όταν εμφανιστούν ανωμαλίες και είναι γνωστοί ως *σημεία ελέγχου* (checkpoints). Ένα παράδειγμα είναι το σημείο ελέγχου της καταστροφής του DNA. Είναι ένα βιοχημικό μονοπάτι που εντοπίζει την καταστροφή του DNA και δημιουργεί ένα σήμα που σταματάει το κύτταρο στη φάση G1, S ή G2 του κυτταρικού κύκλου.

Εκτός από τους ιδιοσυστατους, εσωτερικούς, μηχανισμούς ρύθμισης και προστασίας, το κύτταρο υπόκειται σε έναν αριθμό *εξωτερικών ρυθμίσεων*, που εξασφαλίζουν ότι η κυτταρική διαίρεση συμβαίνει σε ισορροπία με τη συνολική ανάπτυξη του οργανισμού και με τις εξωτερικές συνθήκες αύξησης. Αυτό είναι ένα είδος ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης που ρυθμίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου με τη βοήθεια σηματοδοτικών μορίων που βρίσκονται στην κυκλοφορία ή μέσω αλληλεπιδράσεων κυττάρου – κυττάρου.

Στο κέντρο του κυτταρικού κύκλου βρίσκεται ένα βιοχημικό σύστημα, του οποίου οι σημαντικότεροι ρυθμιστές είναι πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr και ρυθμιστικές πρωτεΐνες που συνδέονται μαζί τους.

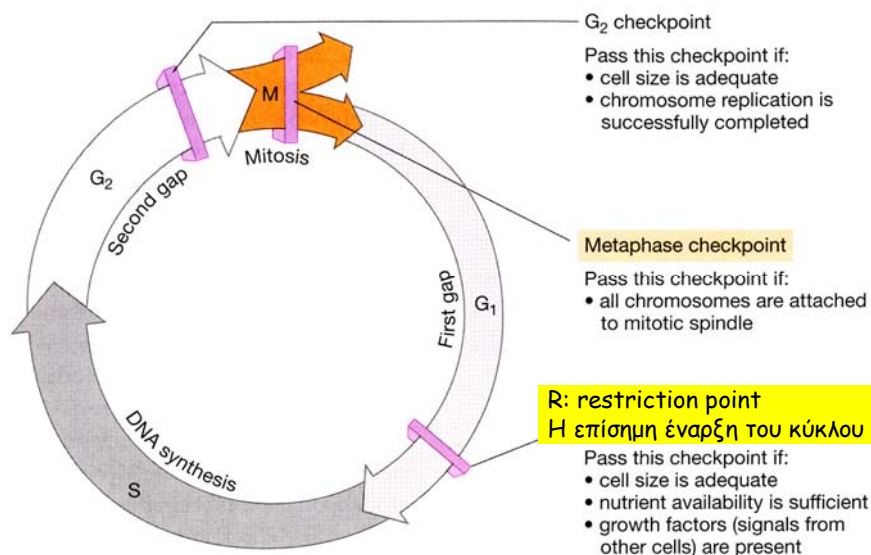
Επιρροές που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιούνται σε διάφορα επίπεδα, τα οποία συνδέονται το ένα με το άλλο (Εικόνα 15.3).

Εσωτερικοί μηχανισμοί ρύθμισης

Οι εσωτερικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί εξασφαλίζουν ότι ο κύκλος εκτελείται πλήρως, συνεπώς μετά την κυτταρική διαίρεση τα δυο αδελφά κύτταρα είναι εφοδιασμένα με την ίδια

γενετική πληροφορία, όσο είναι δυνατόν. Οι κυριότεροι από τους πολλούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς είναι:

- Η αρχή της μίτωσης όταν η φάση S ολοκληρώνεται, όταν δηλαδή το DNA έχει πλήρως αναδιπλασιαστεί.
- Είσοδος στη φάση S μόνο όταν θα ακολουθήσει μίτωση, γιατί αν το κύτταρο διπλασιάσει το DNA του χωρίς να λάβει χώρα μίτωση, θα οδηγηθεί σε πολυπλοειδία.
- Έλεγχος του μεγέθους του κυττάρου στη φάση G₁, ώστε να ξεκινήσει ένας άλλος κύκλος κυτταρικής διαίρεσης. Τα αδελφά κύτταρα που προέρχονται από την κυτταρική διαίρεση πρέπει να αποκτήσουν ένα κρίσιμο μέγεθος κατά τη διάρκεια της φάσης G₁, πριν να αρχίσει η φάση S.
- Πιθανή καταστροφή του DNA πρέπει να επιδιορθωθεί από ειδικά ένζυμα για να αποφευχθούν μεταλλάξεις. Εάν η επιδιόρθωση αποτύχει, ρυθμιστικοί μηχανισμοί που καταγράφουν τις καταστροφές στο DNA σταματούν τον κυτταρικό κύκλο.



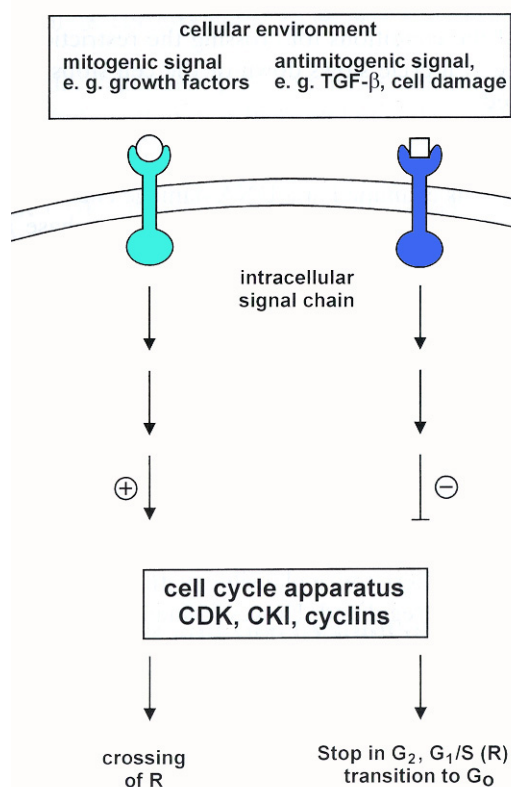
Εικόνα 15.3 Σημεία ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου: εσωτερικοί και εξωτερικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί. Σημαντικά σημεία ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου βρίσκονται στο τέλος της φάσης G₂ (μετάβαση G₂/M), στη μίτωση (μετάβαση μετάφασης/ανάφασης) και στη φάση G₁ (σημείο περιορισμού).

Εξωτερικοί μηχανισμοί ρύθμισης

Οι δραστηριότητες της κυτταρικής διαίρεσης ρυθμίζονται σε ένα μεγάλο βαθμό από εξωτερικά καθορισμένες **συνθήκες αύξησης**, όπως πχ επάρκεια θρεπτικών. Ένα κύτταρο μπορεί να σταματήσει την κυτταρική διαίρεση εάν οι φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές.

Κατά τη διακυτταρική επικοινωνία, **μιτογόνα σήματα** με τη μορφή αυξητικών παραγόντων παράγονται από τον οργανισμό. Οι αυξητικοί αυτοί παράγοντες συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς στο κύτταρο στόχο και ξεκινούν μια αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων που επηρεάζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα μιτογόνα σήματα ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της κυτταρικής διαίρεσης και την προσαρμόζουν στην ολική ανάπτυξη του οργανισμού.

Εκτός από τα σήματα που προωθούν την αύξηση, υπάρχουν και αντι-μιτογόνα σήματα, τα οποία σταματούν τον κυτταρικό κύκλο και μπορεί να οδηγήσουν το κύτταρο στη φάση G_0 .



Εικόνα 15.4 Μιτογόνα και αντι-μιτογόνα σήματα στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Το κυτταρικό περιβάλλον μπορεί να απελευθερώσει μιτογόνα και αντιμιτογόνα σήματα. Τα μιτογόνα σήματα (πχ αυξητικοί παράγοντες) προωθούν τον κυτταρικό κύκλο, ενώ τα αντι-μιτογόνα σήματα (πχ TGFβ) σταματούν τον κυτταρικό κύκλο. Και στις δυο περιπτώσεις, τα σήματα λαμβάνονται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς και μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω βιοχημικών μηχανισμών. TGFβ: transforming growth factor β, CDK: cyclin dependent protein kinase, CKI: inhibitor of CDK, R: restriction point (σημείο περιορισμού).

■ Κρίσιμα γεγονότα και μεταπτώσεις του κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος περιλαμβάνει κρίσιμα γεγονότα μέσω των οποίων το κύτταρο περνάει από τη μία βιοχημική φάση στην άλλη με μη αναστρέψιμο τρόπο. Τα γεγονότα αυτά ονομάζονται μεταπτώσεις ή μεταβάσεις του κυτταρικού κύκλου (cell cycle transitions) και αποτελούν στόχους διεγερτικών ή ανασταλτικών σημάτων.

Ένα παράδειγμα μιας σημαντικής μετάπτωσης του κυτταρικού κύκλου αποτελεί το **σημείο περιορισμού R** (restriction point), το οποίο παρατηρείται στο τέλος της φάσης G_1 και σχετίζεται με τη μετάβαση ή όχι του κυττάρου στη φάση S. Σε αυτό το σημείο, το κύτταρο μεταβαίνει από μία κατάσταση που εξαρτάται από αυξητικούς παράγοντες σε μία άλλη ανεξάρτητη από αυξητικούς παράγοντες κατάσταση. Το κύτταρο διασχίζει το σημείο περιορισμού, όταν πχ είναι αρκετά μεγάλο για διαίρεση και όταν υπάρχουν αρκετά εξωτερικά διεγερτικά σήματα (αυξητικοί παράγοντες) κατά τη διάρκεια της φάσης G_1 , συνεπώς το κύτταρο είναι έτοιμο να εισέλθει στη φάση S. Από τη στιγμή που το κύτταρο περάσει το σημείο περιορισμού, συνεχίζει τον κυτταρικό κύκλο αυτόματα και δεν υπάρχει ανάγκη από επιπλέον διεγερτικά σήματα για την είσοδο στη φάση S. Εάν οι συνθήκες δεν πληρούνται και το κύτταρο δεν μπορεί να περάσει το σημείο περιορισμού, ο κυτταρικός κύκλος σταματάει μέχρι οι συνθήκες να είναι οι κατάλληλες.

Άλλες κυτταρικές μεταπτώσεις είναι η έξοδος από τη φάση S, και η μετάβαση από τη G_2 στη M. Στη μετάπτωση G_2/M καταγράφεται κατά πόσο η φάση S έχει ολοκληρωθεί πλήρως, και η ακεραιότητα του DNA ελέγχεται στο σημείο ελέγχου καταστροφής του DNA. Υπάρχουν και άλλες σημαντικές μεταπτώσεις του κυτταρικού κύκλου στη φάση M ανάμεσα στη μετάφαση και την ανάφαση. Σε αυτό το σημείο, τα κύτταρα παίρνει μια σημαντική και αμετάκλητη απόφαση αν θα συνεχίσει τη μίτωση: εάν η άτρακτος έχει δημιουργηθεί σωστά

και οι αδελφές χρωματίδες είναι σωστά ευθυγραμμισμένες, τότε ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να συνεχίσει.

2. Στοιχεία - κλειδιά στο μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου

Μετά από έρευνες σε κύτταρα ζύμης βρέθηκαν δύο σημαντικές διαδικασίες στον έλεγχο των οποίων βασίζεται η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου:

- Κυμαινόμενες αλλαγές στη δραστηριότητα του μηχανισμού δράσης του κυτταρικού κύκλου, με τις πρωτεϊνικές κινάσες να είναι το πιο σημαντικό στοιχείο.
- Η εξειδικευμένη πρωτεόλυση των μορίων – ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου.

Οι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν το μηχανισμό δράσης του κυτταρικού κύκλου είναι:

- Οι CDKs (Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες)
- Οι Κυκλίνες
- Οι CKIs (Αναστολείς των CDKs)

■ Οι κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες (CDKs)

Οι CDKs είναι πρωτεΐνες μεγέθους 34-40 kDa με δράση πρωτεϊνικής κινάσης και για την ενεργοποίησή τους απαιτείται η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη κυκλίνη. Οι ενεργές κυκλινο-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες είναι συνεπώς ετεροδιμερή, όπου η κινάση διαθέτει την περιοχή με την καταλυτική δράση ενώ η δεύτερη υπομονάδα, η κυκλίνη, είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του μορίου και για την εξειδικευμένη δράση του. Το καταλυτικό κέντρο των CDKs περιέχει μια περιοχή 300 αμινοξέων, στην οποία παρατηρείται υψηλός βαθμός ομολογίας μεταξύ των διαφορετικών μελών της οικογένειας των κινασών. Μέσα σ' αυτήν την περιοχή υπάρχει μια διατηρημένη αλληλουχία 16 αμινοξέων, **η περιοχή PSTAIRE**, η οποία συμμετέχει στη δέσμευση της κυκλίνης και βοηθά στην εξειδικευμένη σύνδεση κυκλίνης CDK.

Στη ζύμη *Schizosaccharomyces pombe*, η περιοδική λειτουργία επιτελείται μόνο από μια CDK υπομονάδα, την CDC2-CDK (επίσης γνωστή και ως p^{34cdc2}), ενώ στον *Saccharomyces cerevisiae*, από την CDC28-CDK ($p^{34cdc28}$). Στα θηλαστικά, υπάρχουν τουλάχιστον επτά διαφορετικές καταλυτικές υπομονάδες, γνωστές ως CDC2 κινάση (ή CDK1) και CDK2 – CDK7.

■ Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των CDKs με φωσφορυλίωση

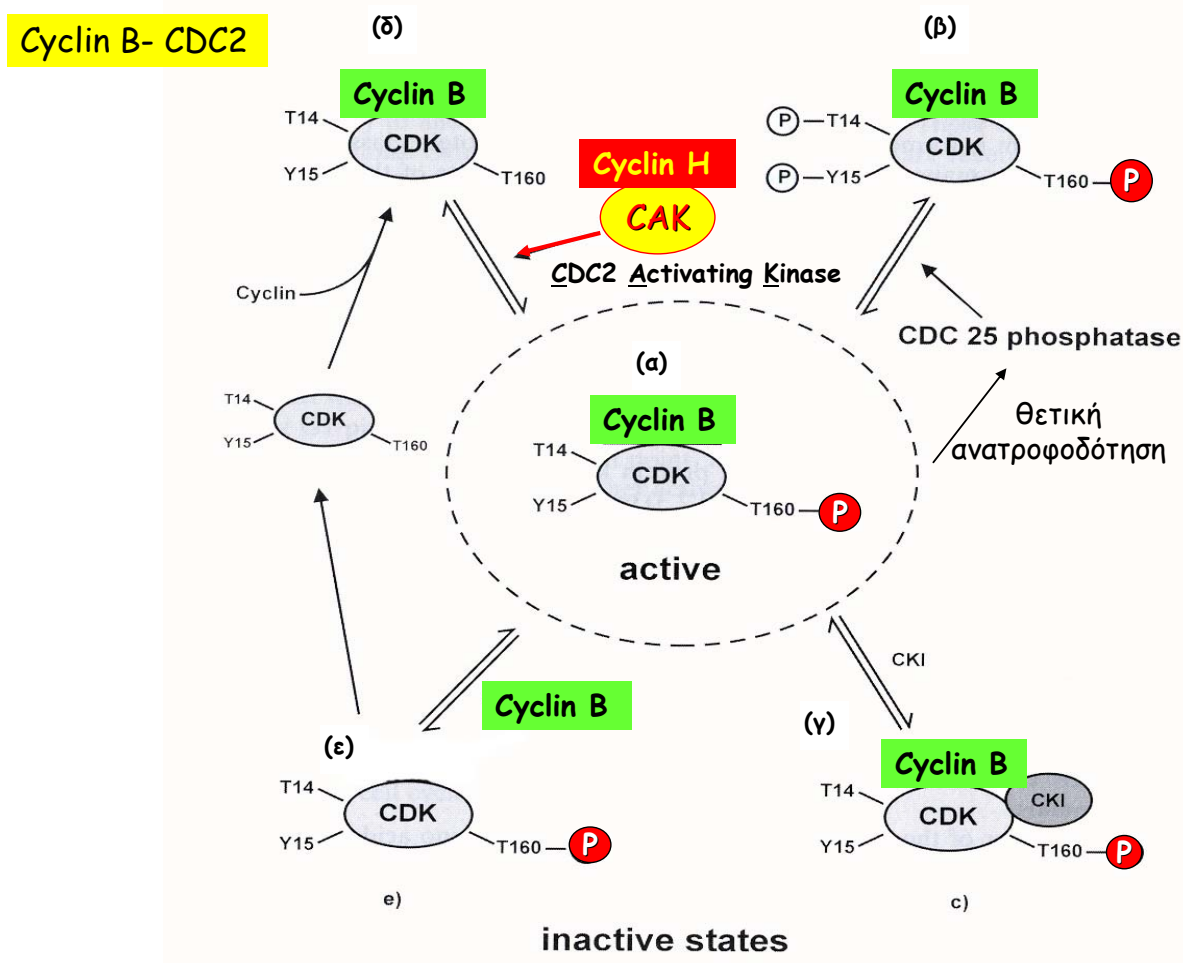
Οι CDKs μπορεί να εμφανίζονται τόσο σε ενεργή όσο και σε ανενεργή μορφή. Η μετάβαση ανάμεσα στις δυο μορφές ρυθμίζεται με διάφορους τρόπους. Η εξειδικευμένη φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση είναι καθοριστικές στον έλεγχο της δραστηριότητας των CDKs. Οι CDKs έχουν ειδικές θέσεις φωσφορυλίωσης για πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες μπορεί να έχουν ενεργοποιητικό ή ανασταλτικό αποτέλεσμα. Φωσφορυλίωση της Thr160 της CDC2, ή της αντίστοιχης Thr161 της CDK2 και Thr172 της CDK4 οδηγούν την κινάση σε ενεργοποίηση. Φωσφορυλίωση της Thr14 και της Tyr15 οδηγεί σε απενεργοποίηση. Απαραίτητη για να συμβεί αυτή η ρύθμιση είναι η σύνδεση της CDK με την αντίστοιχη κυκλίνη της.

Φωσφορυλίωση των Thr160 (161, 172): Ενεργοποίηση

Η φωσφορυλίωση του συμπλόκου κυκλίνηA-CDC2 στη Thr160 οδηγεί σε μια 300-φορές αύξηση της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης. Η Thr160 βρίσκεται στην περιοχή ενεργοποίησης (T loop), η οποία εμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο όταν η πρωτεΐνη είναι σε ανενεργή μορφή. Η φωσφορυλίωση της T θηλιάς, σε

συνδυασμό με τη δέσμευση της κυκλίνης, προωθεί τη δέσμευση του υποστρώματος στο σημείο πρόσδεσής του στο μόριο.

Η πρωτεϊνική κινάση, που είναι υπεύθυνη γι' αυτήν τη φωσφορυλίωση ανήκει και αυτή στις CDKs και είναι γνωστή ως CAK (*CDC2 activating kinase*). Η καταλυτική της υπομονάδα είναι γνωστή ως CDK7 και απαιτεί την κυκλίνη H για να ενεργοποιηθεί. Η CAK εμφανίζει συνεχή δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς δεν μπορεί να είναι ο ρυθμιστικός παράγοντας για τη φωσφορυλίωση της Thr160. Η φωσφορυλίωση που καταλύεται από την CAK απαιτεί τη σύνδεση της κυκλίνης στην CDK και ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση της κυκλίνης.



Εικόνα 15.5 Ρύθμιση των κυκλινο-εξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών. Το παράδειγμα αναφέρεται στην CDC2 κινάση, η οποία αναφέρεται απλά ως CDK. (α) Στην ενεργή της μορφή, η CDK είναι συνδεδεμένη με την κυκλίνη, η Thr160 είναι φωσφορυλιωμένη, ενώ η Thr14 και Tyr15 δεν είναι φωσφορυλιωμένες. Η απενεργοποίησή της συμβαίνει μετά από φωσφορυλίωση της Thr14 και Tyr15 (β) ή μετά από σύνδεση της CKI (γ). Είναι επίσης ανενεργό το σύμπλοκο CDK-κυκλίνης, στο οποίο η Thr160 δεν είναι φωσφορυλιωμένη (δ). Επιπλέον η CDK χωρίς την κυκλίνη είναι ανενεργή (ε).

Φωσφορυλίωση των Thr14 και Tyr15: Απενεργοποίηση

Η φωσφορυλίωση των Thr14 και Tyr15 οδηγεί σε απενεργοποίηση των CDKs. Στη ζύμη η φωσφορυλίωση γίνεται από την κινάση *wee1* ενώ στα θηλαστικά υπάρχουν ομόλογα ένζυμα με τη συγκεκριμένη κινάση. Η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση είναι πολύ σημαντική καθώς διατηρεί το σύμπλοκο κυκλίνη B-CDC2 ανενεργό μέχρι το τέλος της φάσης G₂. Στο σημείο μετάπτωσης G₂/M, με τη δράση της φωσφατάσης CDC25 αποφωσφορυλιώνονται τα δυο κατάλοιπα και η κινάση ενεργοποιείται.

Αποφωσφορυλίωση των Thr14 και Tyr15: Απενεργοποίηση

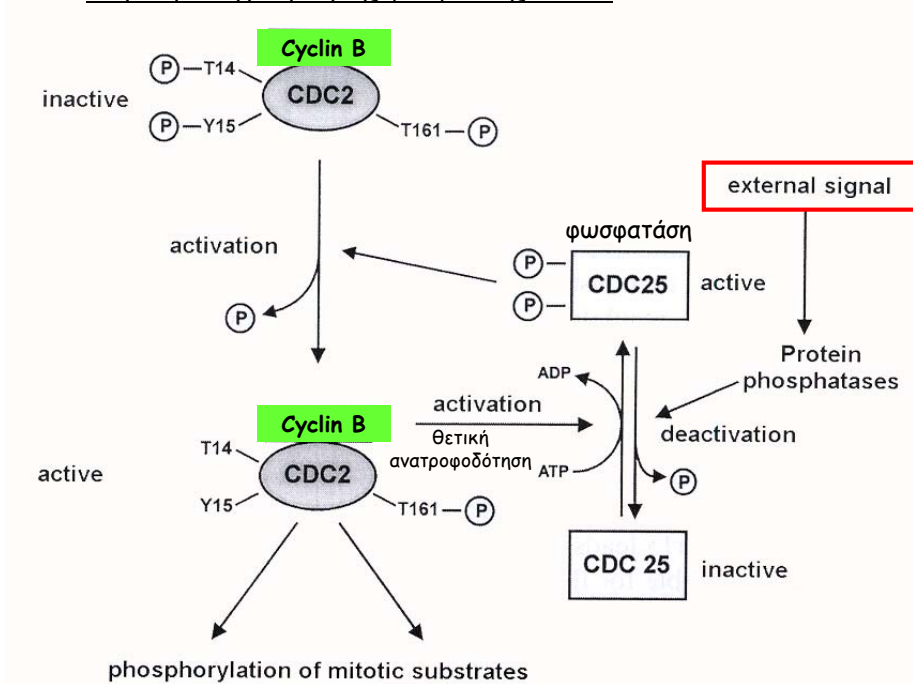
Η αποφωσφορυλίωση γίνεται από τη φωσφατάση CDC25. Είναι μία πρωτεΐνη (πρώτα μελετήθηκε στον *S. pombe* και μετά και σε ευκαρυώτες) που αφαιρεί φωσφορικές ομάδες από τη φωσφοσερίνη και τη φωσφοτυροσίνη των CDKs.

Στον *S. pombe* η ενεργοποίηση του συμπλέγματος κυκλίνη B-CDC2 συμβαίνει στην αρχή της μίτωσης με ένα μηχανισμό ανατροφοδότησης. Η φωσφατάση CDC25 παίζει ένα σημαντικό ρόλο σε αυτόν το μηχανισμό (Εικόνα 15.6). Η φωσφατάση CDC25 του *S. pombe* ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα Ser/Thr. Οι φωσφορυλίωσεις μπορεί να έχουν διεγερτικό ή ανασταλτικό αποτέλεσμα στη δράση της φωσφατάσης. Φωσφορυλίωση, από το σύμπλοκο κυκλίνηB/CDC2, σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης στο καρβοξυτελικό άκρο ενεργοποιούν τη φωσφατάση. Αυτό το αποτέλεσμα είναι ένας θετικός μηχανισμός ανατροφοδότησης που οδηγεί σε επιπλέον ενεργοποίηση του συμπλόκου κυκλίνηB/CDC2.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες PP1 και PP2A αποφωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα σερίνης της διεγερτικής φωσφατάσης CDC25 και έτσι έχουν έναν αρνητικό ρόλο καταστέλλοντας τη δράση της φωσφατάσης CDC25.

Η δράση της φωσφατάσης CDC25 παίζει επίσης έναν κεντρικό ρόλο στην καταστροφή του DNA και στα σημεία ελέγχου αναδιπλασιασμού του DNA του κυτταρικού κύκλου. Κατά την ενεργοποίηση αυτών των σημείων ελέγχου λόγω καταστροφής του DNA ή μη αναδιπλασιασμού του, η φωσφατάση CDC25 απενεργοποιείται και το αποτέλεσμα είναι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Η απενεργοποίηση της φωσφατάσης CDC25 προκαλείται από τη φωσφορυλίωση ειδικών καταλοίπων Ser (Ser99, 192, 359).

Η δράση και η ρύθμιση της φωσφατάσης CDC25



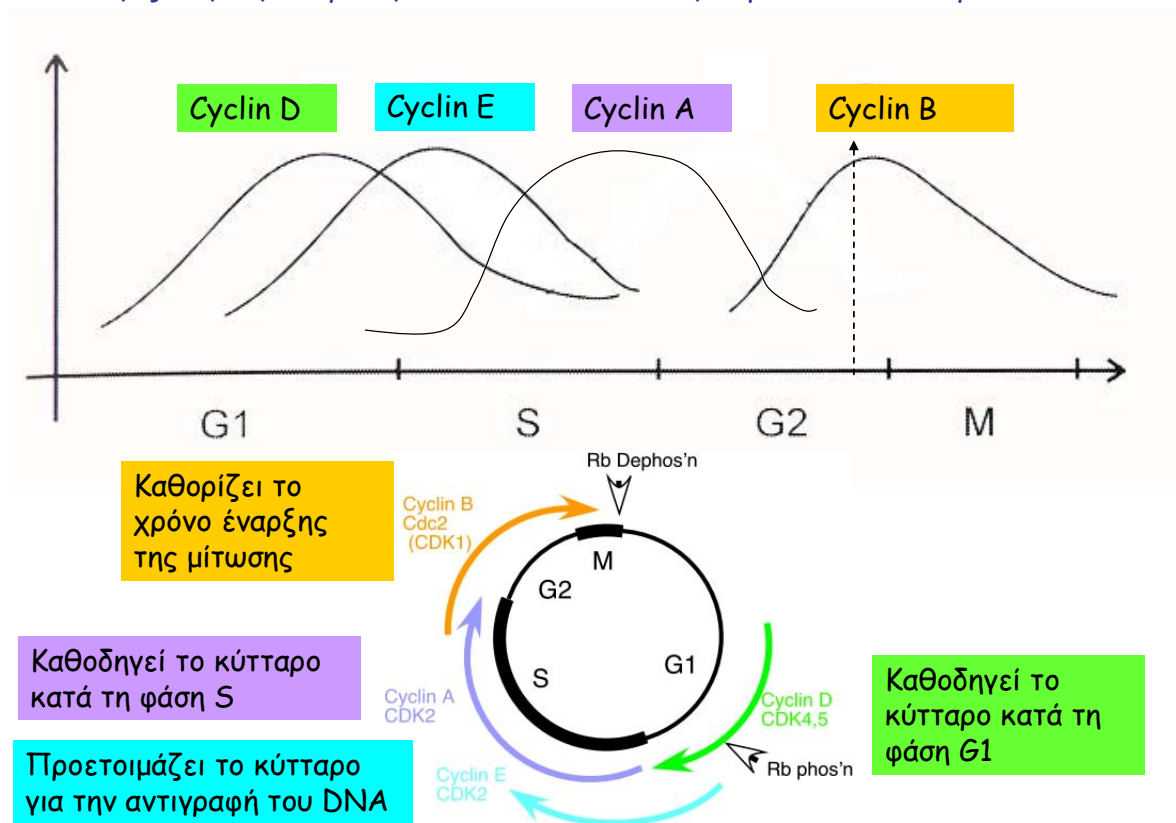
Εικόνα 15.6 Δράση και ρύθμιση της φωσφατάσης CDC25. Το σύμπλοκο κυκλίνηB/CDC2 είναι ανενεργό όταν τα κατάλοιπα Thr14 και Tyr15 είναι φωσφορυλιωμένα. Η φωσφατάση CDC25 αποφωσφορυλιώνει τα δυο κατάλοιπα και ενεργοποιεί το σύμπλοκο κυκλίνηB/CDC2. Η δραστηριότητα της φωσφατάσης CDC25 επίσης ρυθμίζεται από φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση. Το σύμπλοκο κυκλίνηB/CDC2 καταλύει τη φωσφορυλίωση της φωσφατάσης CDC25, η οποία έτσι ενεργοποιείται. Ως συνέπεια, το σήμα του συμπλόκου κυκλίνηB/CDC2 ενισχύεται και το κύτταρο μεταβαίνει γρήγορα από τη φάση G2 στη μίτωση. Καταστολή της δράσης της φωσφατάσης CDC25 προέρχεται από πρωτεϊνικές φωσφατάσες, οι οποίες μπορεί να ενεργοποιούνται από εξωτερικά σήματα.

■ Οι Κυκλίνες

Οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες που εμφανίζουν κυκλικές μεταβολές της συγκέντρωσής τους κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η πρόσδεσή τους στις CDKs οφείλεται σε μια αλληλουχία 100 αμινοξέων, το κουτί κυκλίνης (cyclin box). Τα μέλη της οικογένειας των κυκλινών γίνονται ενεργά σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ως επί το πλείστον βρίσκονται στον πυρήνα αλλά υπάρχουν και οι κυκλίνες B1 και B2 που κατά τη φάση G₂ βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στον πυρήνα κατά τη μίτωση.

Στα θηλαστικά μπορούν να χωριστούν σε κατηγορίες ανάλογα με τη δραστηριότητά τους στις διάφορες φάσεις του κύκλου. Έτσι, διακρίνονται οι κυκλίνες της φάσης G₁/S (κυκλίνες D και E), οι κυκλίνες της φάσης M (κυκλίνες τύπου B) και οι τύπου A, που ενεργοποιούνται στις φάσεις S και G₂.

Αλλαγές στη συγκέντρωση των κυκλινών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου



Εικόνα 15.7 Οι αλλαγές της συγκέντρωσης των κυκλινών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Ο ρόλος των κυκλινών είναι να μετατρέπουν τις CDKs σε ενεργή διαμόρφωση. Με εξαίρεση τις CDK4 και CDK6, οι CDKs βρίσκονται ανενεργές σε μια σταθερή συγκέντρωση και συνήθως σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από τις αντίστοιχες κυκλίνες τους. Συνεπώς η ποσότητα των CDKs που θα ενεργοποιηθούν περιορίζεται από τη συγκέντρωση των κυκλινών, και γι' αυτόν το λόγο οι αλλαγές στη συγκέντρωση των κυκλινών είναι ένας ρυθμιστικός παράγοντας του κυτταρικού κύκλου.

■ Σταθερότητα των κυκλινών

Στον κυτταρικό κύκλο, οι διαφορετικές κυκλίνες εμφανίζουν χαρακτηριστικές αλλαγές συγκέντρωσης. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στην ενεργοποίηση της σύνθεσης και της πρωτεόλυσής τους.

Οι κυκλίνες χωρίζονται σε δυο τάξεις, ανάλογα με τη σταθερότητά τους. Οι κυκλίνες, οι οποίες είναι ασταθείς σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και η συγκέντρωσή τους καθορίζεται από το ρυθμό μεταγραφής, και οι κυκλίνες, οι οποίες είναι ασταθείς μόνο κατά τη διάρκεια ορισμένων φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

Ο καταβολισμός των G_1 Κυκλινών

Οι κυκλίνες D και E στα θηλαστικά έχουν χρόνο ζωής μόνο 20 λεπτά και η αστάθειά τους οφείλεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (τις PEST) στο καρβοξυτελικό άκρο, οι οποίες αν απομακρυνθούν οδηγούν στη σταθεροποίηση των κυκλινών. Λόγω του πολύ σύντομου χρόνου ζωής τους οι κυκλίνες τύπου D απαιτούν ένα συνεχές ερέθισμα στο επίπεδο της μεταγραφής ώστε να φτάσουν την επιθυμητή συγκέντρωση στη φάση G_1 και να ενεργοποιήσουν τις CDK4/6 ώστε το κύτταρο να μπορέσει να διασχίσει το σημείο περιορισμού.

Ο καταβολισμός των G_2/M Κυκλινών

Οι G_2/M κυκλίνες, τύπου A και B, είναι σταθερές κατά τη διάρκεια της μεσόφασης και καταβολίζονται κατά τη διάρκεια και μετά τη μίτωση μέσω πρωτεόλυσης. Το σήμα για την πρωτεόλυση είναι το **κουτί καταστροφής** (destruction box) που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της κυκλίνης. Το σήμα του καταβολισμού είναι μια αλληλουχία, υπεύθυνη για τη σήμανση των κυκλινών για καταβολισμό από το σύμπλοκο που προωθεί την ανάφαση, APC (anaphase-promoting complex) (κυκλόσωμα).

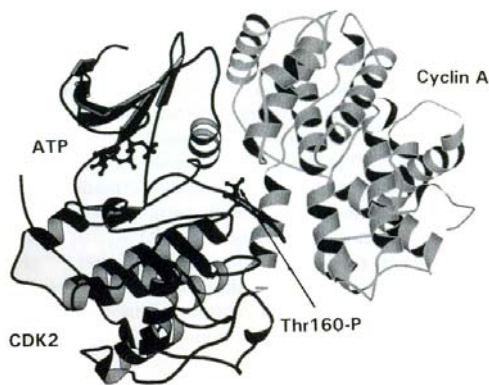
■ Δομική βάση της ενεργοποίησης των CDKs. Το σύμπλεγμα CDK2-κυκλίνης A

Για την πλήρη ενεργοποίηση των CDKs απαιτείται η πρόσδεση της αντίστοιχης κυκλίνης και φωσφορυλίωση. Το σύμπλεγμα CDK-κυκλίνης έχει δράση κινάσης, η οποία γίνεται πιο έντονη με φωσφορυλίωση της θρεονίνης στη θέση 160.

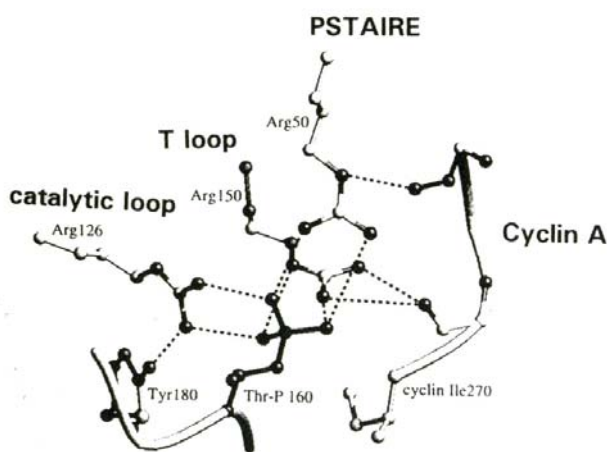
Μετά από σύγκριση της ενεργούς και ανενεργούς μορφής της CDK γίνεται αντιληπτό ότι η αιτία της μη δραστηκότητάς της χωρίς την πρόσδεση της κυκλίνης οφείλεται σε δύο λόγους: Στη μη δραστική της μορφή, το σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος μπλοκάρεται από την περιοχή T loop και για να αναιρεθεί αυτό απαιτείται φωσφορυλίωση της θρεονίνης στη θέση 160 στην ίδια περιοχή (T loop). Ο δεύτερος λόγος συνίσταται στο ότι τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, που συμμετέχουν στη διάσπαση του ATP προσανατολίζονται στη μη ενεργή περιοχή με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η διάσπαση του ATP. Η απελευθέρωσή τους από τη μη ενεργή περιοχή προκαλεί αλλαγή στον προσανατολισμό της περιοχής T loop και του σχηματισμού του ενεργού κέντρου.

Όταν η κυκλίνη A συνδεθεί στη CDK, η τελευταία υφίσταται κάποιες δομικές μεταβολές:

- Το ενεργό κέντρο επανα-οργανώνεται ώστε το ATP να μπορεί να προσδεθεί στην ενεργή μορφή της κινάσης.
- Η περιοχή T loop μετακινείται από την καταλυτική περιοχή και η CAK έχει πλέον πρόσβαση για τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης.
- Το κουτί κυκλίνης της κυκλίνης A αλληλεπιδρά με την PSTAIRE της CDK και διαλύεται μια έλικα που είχε ανασταλτική δράση. Ακολουθεί μεταφορά του Glu51 στο ενεργό κέντρο για να πάρει μέρος στην κατάλυση.



Η φωσφορυλίωση της Thr160 αυξάνει κατά πολύ τη δραστηριότητα της κινάσης και αυτό γίνεται γιατί οι διαφορές που προκαλούνται από την πρόσδεση της κυκλίνης σχετίζονται με το καρβοξυτελικό άκρο, την περιοχή T loop και την αλληλεπίδραση κυκλίνης-CDK.



Εικόνα 15.8 Δομή του συμπλόκου κυκλίνης A/CDK2 με φωσφορυλιωμένη την Thr160 και συνδεδεμένο ένα μόριο ATP.

■ Οι αναστολείς των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CKIs)

Οι CKIs (cyclin-dependent kinase inhibitors) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών, που συνδέονται στις CDK ή στο σύμπλεγμα κυκλίνης-CDK με αναστρέψιμο τρόπο και αναστέλλουν τη δραστηριότητα των CDK.

Ανάλογα με την ομολογία τους χωρίζονται σε δύο οικογένειες, τις CIP/KIP (αναστέλλουν το σύμπλεγμα κυκλίνης-CDK στη φάση G₁) και τις INK (αναστέλλουν τα συμπλέγματα των CDK4 και CDK6).

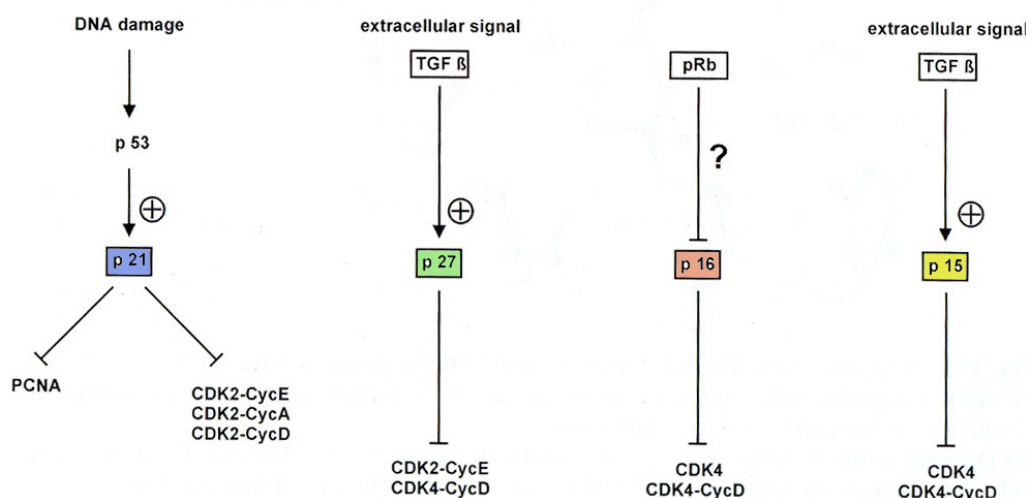
Οικογένεια CIP/KIP: p21^{CIP1} (CIP1 ή Waf1), p27^{KIP1} (KIP1), p57^{KIP2}

Οικογένεια INK: p15^{ink4b}, p16^{ink4a}, p18^{ink4c}, p19^{ink4d}

Για την εύρεση του μηχανισμού της αναστολής χρησιμοποιήθηκαν οι κρυσταλλικές δομές της κυκλίνης A, της CDK και του αναστολέα p27^{KIP1} και βρέθηκε ότι ο αναστολέας δεσμεύεται στο τμήμα της CDK, όπου δεσμεύεται το ATP ώστε να μην μπορεί να δεσμευτεί περαιτέρω και σπάει την περιοχή με το φώσφορο και τη γλυκίνη. Ανάλογο μηχανισμό δράσης έχει και ο αναστολέας p21^{CIP1}. Όσον αφορά την αναστολή από τον p16^{ink4a} ο συγκεκριμένος αναστολέας δεσμεύεται στη CDK6 σε σημείο αντίθετο από εκείνο της δέσμευσης της κυκλίνης και μπλοκάρει τη σύνδεση της κυκλίνης D. Επιπλέον, μετασχηματίζεται και η περιοχή σύνδεσης του ATP.

Ρύθμιση και λειτουργία των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου

Οι CKIs είναι σημαντικά σημεία εισόδου για σήματα που έχουν ως αποτέλεσμα το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου. Το ανασταλτικό αποτέλεσμα των CKIs εξαρτάται από την αναλογία της συγκέντρωσης CKIs/κυκλίνης, γι' αυτό η ρύθμιση των αναστολέων είναι πολύ μεγάλης σημασίας.



Εικόνα 15.9 Η ρύθμιση και τα σημεία επίθεσης των CKIs στα θηλαστικά. Οι διάφοροι CKIs ενεργοποιούνται και ρυθμίζονται από διαφορετικά σήματα.

Ο αναστολέας $p21^{CIP1}$ έχει διπλή ανασταλτική δράση. Από τη μία ενώνεται στο σύμπλεγμα της CDK2 με τις κυκλίνες A, D και E και οδηγεί στην απενεργοποίησή τους και από την άλλη έχει μια περιοχή σύνδεσης για τη συμπληρωματική πρωτεΐνη αναδιπλασιασμού PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), η οποία είναι σημαντική για τη σύνθεση του DNA και τη σύνδεση της πολυμεράσης δ με το DNA. Η πρόσδεση του αναστολέα αποτρέπει τον αναδιπλασιασμό του DNA από την πολυμεράση δ , *in vitro*.

Η συγκέντρωση του $p21^{CIP1}$ ρυθμίζεται στο επίπεδο μεταγραφής της και κύριο ρόλο σ' αυτό παίζει η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η p53 προωθεί τη μεταγραφή του $p21^{CIP1}$ μέσω σύνδεσής της στον προαγωγέα του. Η ενεργοποίηση της p53 παρατηρείται κυρίως κατά την καταστροφή του DNA. Ο κύριος σκοπός της ρύθμισης είναι η επιδιόρθωση των βλαβών ή η προώθηση της απόπτωσης.

Ρύθμιση στο μεταγραφικό επίπεδο έχει παρατηρηθεί και για τον αναστολέα $p15^{ink4a}$ με την κυτοκίνη TGFβ να παίζει σημαντικό ρόλο. Η σύνδεσή του TGFβ στον υποδοχέα του προκαλεί την εμφάνιση σήματος για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της p15, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.

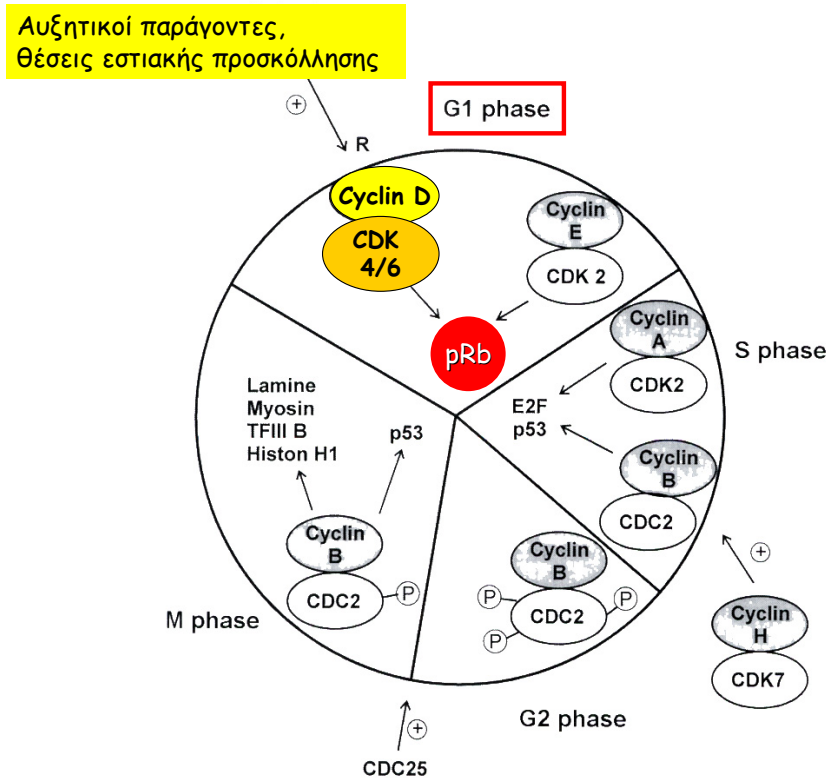
Ο αναστολέας $p16^{ink4a}$ έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο καθώς το γονίδιο του μεταλλάσσεται σε πολλές κυτταρικές καρκινικές σειρές. Υπάρχουν στοιχεία ότι η πρωτεΐνη pRb έχει ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή του $p16^{ink4a}$.

Ο αναστολέας $p27^{KIP1}$ ρυθμίζεται στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο και παρατηρείται σε ανενεργή μορφή σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Μπορεί να μετατραπεί σε ενεργή μορφή από τη δράση του TGFβ, από την αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP και από την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Περισσότερες λεπτομέρειες γύρω από αυτό το σημείο δεν είναι γνωστές.

■ Υποστρώματα των CDKs

Υποστρώματα των CDKs στην G_1/S φάση

Σημαντικά υποστρώματα είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb και ο μεταγραφικός παράγοντας E2F, ο οποίος ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων για την πρόοδο της φάσης S. Η πρωτεΐνη pRb είναι υπόστρωμα για φωσφορυλίωση από το σύμπλεγμα CDK-κυκλίνη D1.



Εικόνα 15.10 Υποστρώματα και ενεργοποίηση των CDKs σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Τα βέλη συμβολίζουν ενεργοποίηση και φωσφορυλίωση.

Υποστρώματα των CDKs στην G₂/M φάση

Στη φάση της μίτωσης, η φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών ξεκινάει από το σύμπλοκο CDC2-κυκλίνη B και επηρεάζει κυρίως πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, της πυρηνικής μεμβράνης και στο σχηματισμό της ατράκτου. Σαν συνέπεια εμφανίζεται γενική αναστολή της μεταγραφής.

Παραδείγματα πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνονται εξειδικευμένα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι οι λαμίνες. Υπερφωσφορυλίωση των λαμινών οδηγεί σε αποσύνθεση της πυρηνικής μεμβράνης. Επίσης τα ινίδια ακτίνης και μιοσίνης φωσφορυλιώνονται κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Παρατηρείται επίσης φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο TFIIIB (προκαλεί αναστολή της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση III) και ο TAF (οδηγεί σε γενική αναστολή της μεταγραφής).

■ Πολλαπλή ρύθμιση των CDKs

Οι παρακάτω διαδικασίες έχουν θετικό αποτέλεσμα στη δραστικότητα των CDKs:

- Αύξηση της συγκέντρωσης των κυκλινών (μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής ή αναστολής της πρωτεολυτικής διάσπασής τους)
- Φωσφορυλίωση των CDKs στη Thr160
- Αποφωσφορυλίωση των CDKs στις Thr14/Tyr15
- Αύξηση στη συγκέντρωση των CDK4 και CDK6
- Ελάττωση της συγκέντρωσης των CKIs (μέσω πρωτεόλυσης ή σε μεταγραφικό επίπεδο).

Οι παρακάτω διαδικασίες έχουν αρνητικό αποτέλεσμα.

- Ελάττωση της συγκέντρωσης των κυκλινών (μέσω μείωσης της μεταγραφής ή ενεργοποίησης της πρωτεολυτικής διάσπασής τους)
- Φωσφορυλίωση των CDKs στις Thr14/Tyr15
- Αύξηση της συγκέντρωσης των CKIs

3. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω πρωτεόλυσης

Η σωστή πορεία του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζεται μέσω δύο διαδικασιών:

- των ρυθμιζόμενων αλλαγών στη δραστηριότητα των CDKs και
- της πρωτεόλυσης που εξαρτάται από την ουβικουΐτινη.

Και οι δυο διαδικασίες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους και βρίσκονται σε αμοιβαία αλληλεξάρτηση. Η επιλογή μιας πρωτεΐνης για ουβικουΐτινο-εξαρτώμενη πρωτεόλυση γίνεται μέσω των ενζύμων E3 του μονοπατιού της ουβικουΐτινης, τα οποία καταλύουν τη σύνδεση της ουβικουΐτινης με την πρωτεΐνη-στόχο. Η εξειδίκευση της σύνδεσης ουβικουΐτινης-πρωτεΐνης καθορίζεται από τη φύση των ενζύμων E3, τα οποία αποτελούνται από αρκετές υπομονάδες. Η σύνθεση αυτού του συμπλόκου ποικίλει και μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με τις απαιτήσεις.

Η χρήση εξειδικευμένης πρωτεόλυσης σαν ένα εργαλείο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου έχει πολλά πλεονεκτήματα:

- Η πρωτεόλυση οδηγεί σε ταυτόχρονη και πλήρη απενεργοποίηση όλων των λειτουργιών πολυλειτουργικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, όπως οι κυκλίνες.
- Η πρωτεόλυση καθιστά ικανή την εξειδικευμένη αναδιοργάνωση υπομονάδων ετεροολιγομερών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Πχ στοχευμένη πρωτεόλυση ενός CDI.
- Το σύνολο των υποστρωμάτων ρυθμιστικών ενζύμων του κυτταρικού κύκλου μπορούν να απενεργοποιηθούν με πρωτεόλυση.

Δύο είδη συμπλόκων E2/E3 είναι ειδικής σημασίας για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Το πρώτο είναι το SCF εξαιρετικής σημασίας για τη μετάπτωση G_1/S , και το άλλο το κυκλώσωμα APC (σύμπλοκο που προωθεί την ανάφαση), σημαντικό για τον έλεγχο της μίτωσης.

■ Στοχευμένη πρωτεόλυση στη μετάπτωση G_1/S

Η μετάπτωση από τη φάση G_1 στη φάση S σχετίζεται με πρωτεόλυση σημαντικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών, όπως οι τύπου G_1 ή D κυκλίνες, και με αποικοδόμηση συγκεκριμένων CKIs. Οι λιγάσες ουβικουΐτινης δρουν στο εξειδικευμένο υπόστρωμά τους μόνο μετά από τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος. Συνεπώς, ο ρυθμιστής αυτού του μονοπατιού αποικοδόμησης είναι η φωσφορυλίωση του υποστρώματος από μια ρυθμιστική πρωτεϊνική κινάση, ενώ το σύστημα της λιγάσης της ουβικουΐτινης είναι συνεχώς ενεργό.

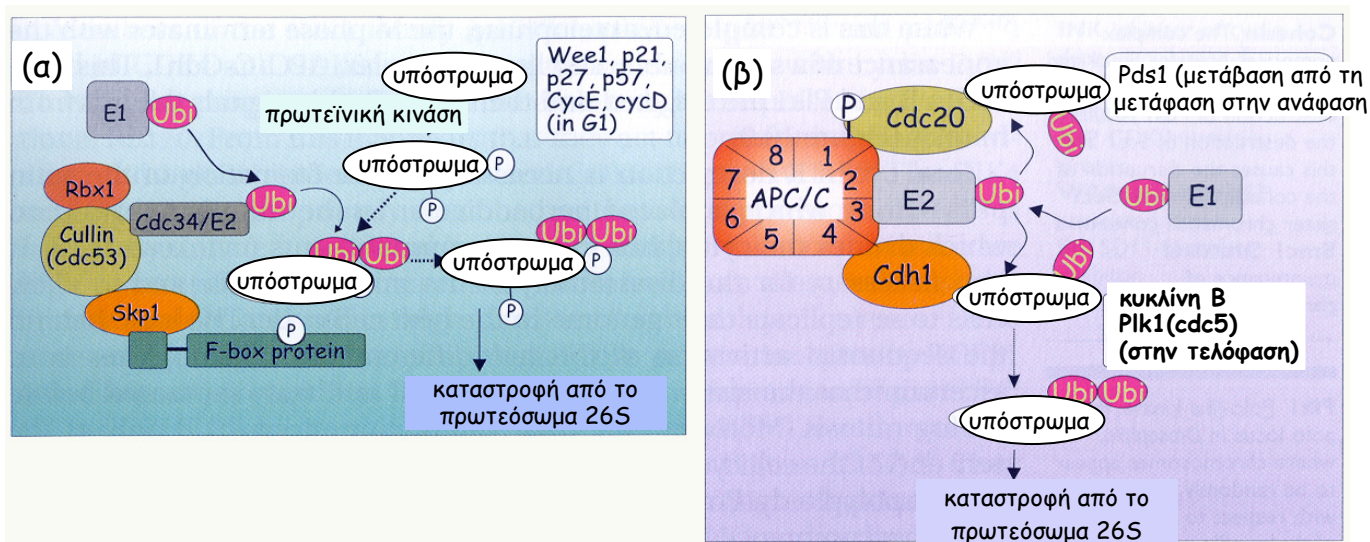
Οι λιγάσες αυτές οργανώνονται σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, που ονομάζονται σύμπλοκα SCF (Skp1, cullin, F box protein). Στο *S. cerevisiae* το σύμπλοκο αποτελείται από τις πρωτεΐνες Cdc24, Cdc53 και Skp1. Ένα κοινό χαρακτηριστικό αυτών των πρωτεϊνών είναι η αλληλουχία γνωστή ως F-κουτί.

Οι πρωτεΐνες που επιλέγονται για υποστρώματα της σύνδεσης με την ουβικουΐτινη έχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο, τις αλληλουχίες PEST, οι οποίες είναι στόχος φωσφορυλίωσης. Μετά τη φωσφορυλίωσή τους αναγνωρίζονται από τη λιγάση και σημαίνονται για αποικοδόμηση.

■ Πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Το Κυκλώσωμα

Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, ενεργοποιείται ένα εξειδικευμένο σύμπλοκο λιγάσης ουβικουϊτίνης, το οποίο ξεκινά την πρωτεόλυση διάφορων ρυθμιστών της μίτωσης. Το σύμπλοκο αυτό, γνωστό ως κυκλώσωμα ή APC (Anaphase-Promoting Complex) είναι ένας ρυθμιστής της μίτωσης, του οποίου η δραστηριότητα εμφανίζει σημαντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με μεγαλύτερη δράση στη μετάπτωση μετάφασης/ανάφασης και μειωμένη δράση στις φάσεις S και G₂. Το APC διαφέρει σημαντικά από το ιδιόσυστατα ενεργό σύμπλοκο SCF, το οποίο αποικοδομεί τις κυκλίνες G1 απαιτώντας την προηγούμενη φωσφορυλίωση τους.

Το APC είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τουλάχιστον 8 διαφορετικές πρωτεϊνικές υπομονάδες, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για τη ρύθμιση της δράσης του. Στο *S. cerevisiae* υπάρχουν οι πρωτεΐνες Cdc20 και Hct1 (γνωστές και ως Cdh1). Υπάρχουν πολυάριθμες μορφές του APC, οι οποίες δρουν ρυθμιζόμενες από τον κυτταρικό κύκλο. Πχ η σύνδεση της Hct1 στο APC αναστέλλεται μετά από φωσφορυλίωση από την CDK. Η ελεγχόμενη από τον κυτταρικό κύκλο φωσφορυλίωση των συστατικών του APC είναι ένας κύριος ρυθμιστικός παράγοντας της δραστηριότητας ουβικουϊτίνης.



Εικόνα 15.11 Ουβικουϊτίνη. Οι πρωτεΐνες σημαίνονται για καταστροφή με πρόσδεση της ουβικουϊτίνης σε ένα κατάλοιπο λυσίνης στο “κιβώτιο καταστροφής” (destruction box) τους και αποικοδομούνται από το 26S πρωτεόσωμα. Η ρύθμιση γίνεται από δύο ενζυμικά σύμπλοκα SCF και APC/C, καθένα από τα οποία περιλαμβάνει αρκετές υπομονάδες και έχει τα δικά του εξειδικευμένα υποστρώματα. (α) Στην περίπτωση του SCF (συμπλόκου του Skp1, cullin και της πρωτεΐνης F-box), το σήμα-στόχο αποτελεί η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών σε εξειδικευμένα κατάλοιπα. Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη δεσμεύει την F-box πρωτεΐνη και ακολουθεί ουβικουϊτινίωση, καταλυόμενη από τις υπομονάδες E1 και E2. Αυτό το σύμπλοκο της λιγάσης της ουβικουϊτίνης κυρίως καταστρέφει τα συστατικά εκείνα από τον κυτταρικό κύκλο, τα οποία ρυθμίζουν την πρόοδο κατά τη φάση G₁. (β) Στην περίπτωση του APC/C, το σήμα-στόχο αποτελεί η φωσφορυλίωσή του και η έκφραση της υπομονάδας Cdc20 ή Cdh1. Αυτές οι υπομονάδες προσδέονται διαφορετικά υποστρώματα, τα οποία στη συνέχεια ουβικουϊτινιώνονται από τις υπομονάδες E1 και E2. Αυτό το σύμπλοκο της λιγάσης της ουβικουϊτίνης έχει ένα σημαντικό ρόλο στη διαδοχική καταστροφή των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη μετάβαση από τις φάσεις G₂ και M.

Το APC έχει δράση λιγάσης ουβικουϊτίνης με ειδικότητα σε πρωτεΐνες – υποστρώματα που έχουν μία αλληλουχία, το κουτί καταστροφής (destruction box). Κατά τη διάρκεια αλλά

και μετά τη μίτωση, η προκαλούμενη από το APC πρωτεόλυση συμβαίνει στις μιτωτικές κυκλίνες τύπου B και A, και σε έναν αριθμό άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων η Cut2, η οποία αποτελεί αναστολέα της ανάφασης. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα του κουτιού καταστροφής. Η πρωτεόλυση των μιτωτικών κυκλινών ενεργοποιείται κατά τη μετάπτωση μετάφασης/ανάφασης και σταματά στην αρχή της φάσης S. Η μιτωτική κυκλίνη A διασπάται πριν από τη B.

4. Η μετάβαση από την φάση G_1 στην S

Η φάση G_1 έχει ένα πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο για τον κυτταρικό κύκλο καθώς εδώ το κύτταρο αποφασίζει για το αν θα υπάρξει ένας νέος κύκλος κυτταρικών διαιρέσεων ή θα μπει σε μία ήρεμη φάση.

Όταν η μίτωση ολοκληρώνεται, το κύτταρο χρειάζεται σήματα με τη μορφή αυξητικών παραγόντων, τα οποία θα το οδηγήσουν σε ένα νέο κύκλο διαίρεσης. Τα σήματα αυτά είναι αποτελεσματικά μόνο στα 2/3 της φάσης G_1 . Σε αυτό το χρονικό διάστημα κρίνεται αν θα ξεκινήσει καινούριος κυτταρικός κύκλος ή αν θα μπει το κύτταρο στη φάση G_0 . Μετά από αυτό το συγκεκριμένο σημείο, το σημείο περιορισμού R, δεν απαιτούνται εξωτερικά σήματα για να συνεχίσει ο κύκλος. Οι φάσεις S, G_2 και M ακολουθούν η μία την άλλη χωρίς καμιά εξωτερική σηματοδότηση. Ο κυτταρικός μπορεί να σταματήσει, όμως μόνο εάν ανιχνεύσει από εσωτερικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς ή σημεία ελέγχου, καταστροφές που συμβαίνουν στις διάφορες φάσεις,

■ Λειτουργία των κυκλινών τύπου D

Η πρόοδος της φάσης G_1 ελέγχεται κυρίως από τις κυκλίνες τύπου D και E και από τους αναστολείς των CDKs.

Κυκλίνη D

Από τις 3 κυκλίνες τύπου D (D1, D2, D3) μόνο η D1 έχει δράση σε όλα τα είδη κυττάρων. Η βασική λειτουργία των κυκλινών αυτών είναι η εισαγωγή εξωτερικών μηνυμάτων στο εσωτερικό του κυττάρου. Μιτογόνα σήματα, όπως αυξητικοί παράγοντες, ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου της κυκλίνης D1 και τη σύνδεση των κυκλινών τύπου D με τις CDKs. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των CDK4 και CDK6 είναι πολύ σημαντική και ταυτόχρονα με τη σύνδεσή τους με την κυκλίνη, απαιτείται και η φωσφορυλίωση της Thr172 της CDK4, βήμα που καταλύεται από την CAK. Το σύμπλεγμα CDK4-κυκλίνη D1 (και το σύμπλεγμα CDC2-κυκλίνη E), που έχει δημιουργηθεί είναι έτοιμο να φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη pRb. Ακολουθεί η μετάβαση του κυττάρου από το σημείο περιορισμού (restriction point).

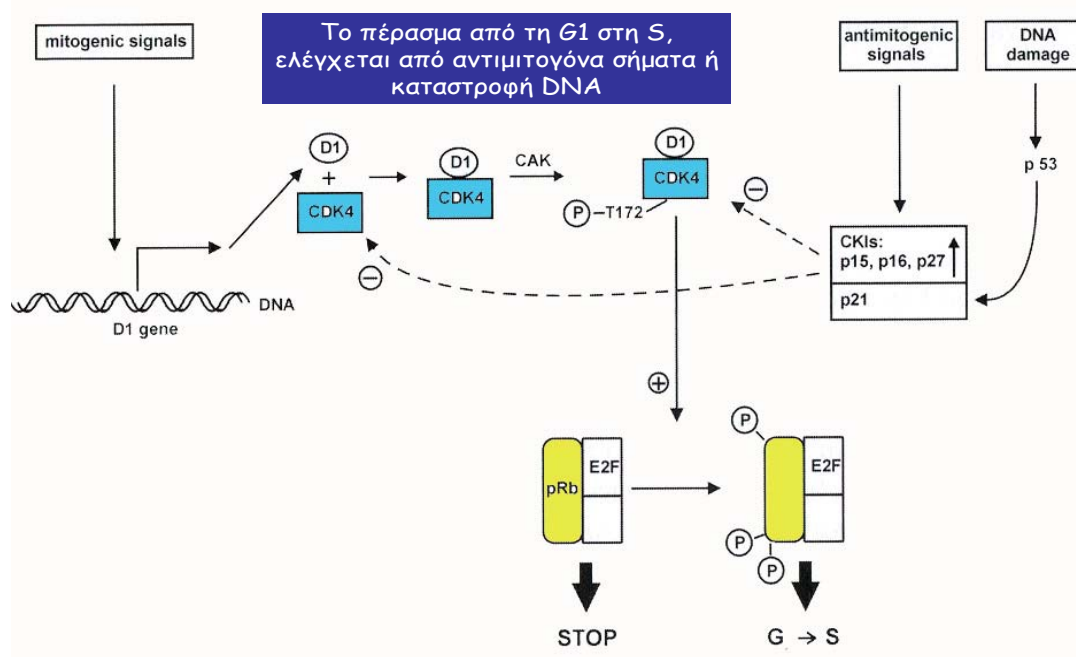
Κυκλίνη E

Η κυκλίνη E εμφανίζει περιοδική μεταβολή στη συγκέντρωσή της με μέγιστη τιμή στην αρχή της φάσης S. Η μεταγραφή του γονιδίου της επάγεται από το μεταγραφικό παράγοντα E2F. Η κυκλίνη δεσμεύεται στην CDK2 και την ενεργοποιεί κι αυτή συμμετέχει στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb. Συνέπεια όλων αυτών είναι η μεταφορά σήματος, σε συνεργασία με τις κυκλίνες D, για τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου.

Αρνητική ρύθμιση της φάσης G_1/S

Εκτός από μιτογόνα σήματα, εμφανίζονται στη φάση G_1 και αντιμιτογόνα σήματα, τα οποία οδηγούν σε παύση του κύκλου στη φάση αυτή και σχετίζονται με τον παράγοντα TGF β , το cAMP και την επικοινωνία των κυττάρων. Η αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού

κύκλου οφείλεται κυρίως στους αναστολείς $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ και $p15^{ink4}$, που ενεργοποιούνται από εξωτερικά σήματα. Επιπλέον, ο αναστολέας $p16^{ink4}$ συνδέεται στην κυκλίνη τύπου D και την αποσταθεροποιεί.



Εικόνα 15.12 Ρύθμιση της μετάβασης G1/S από τις κυκλίνες τύπου D. Εξωτερικά σήματα μπορεί να προκαλέσουν το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στο σημείο μετάβασης G1/S ή τη μετάβαση στη φάση S. Οι κυκλίνες τύπου D (εδώ αντιπροσωπεύονται από την D1) συμμετέχουν και στις δυο διαδικασίες. Μιτογόνα σήματα, όπως αυξητικοί παράγοντες, διεγείρουν την έκφραση της D1, η οποία συνδέεται στην CDK4. Το σύμπλοκο κυκλίνηD1/CDK4 ενεργοποιείται μετά τη φωσφορυλίωσή του από την CAK, και φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη pRb, προετοιμάζοντας την είσοδο στη φάση S. Αντι-μιτογόνα σήματα ή καταστροφή του DNA ενεργοποιούν τις CKIs, οι οποίες συνδέονται στο σύμπλοκο κυκλίνηD1/CDK4 και αναστέλλει τη δραστηριότητά του. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το σύμπλοκο pRb/E2F παραμένει μη φωσφορυλιωμένο και ο κυτταρικός κύκλος σταματά στο σημείο μετάβασης G1/S.

Η ισορροπία μεταξύ του ενεργοποιημένου συμπλόκου CDK4-κυκλίνη D και των διάφορων αναστολέων ελέγχει την πρόοδο στη φάση G₁. Αν η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι μεγαλύτερη τότε δημιουργείται θετικό σήμα για τη συνέχεια του κύκλου ενώ αν συμβαίνει το αντίθετο, το κύτταρο σταματάει στη φάση G₁. Στην περαιτέρω αλληλεπίδραση θετικών και αρνητικών σημάτων σημαντικό ρόλο παίζουν το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος και η πρωτεΐνη pRb.

■ Η λειτουργία της πρωτεΐνης pRb στον κυτταρικό κύκλο

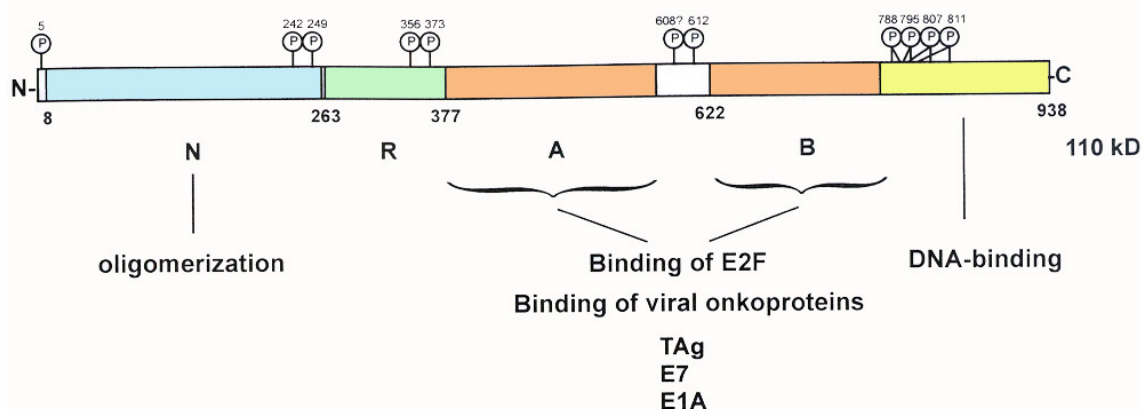
Η pRb είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη περίπου 100 kDa. Η Εικόνα 15.12 δείχνει τη δομή της. Περιέχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης Ser/Thr, θέσεις δέσμευσης για το μεταγραφικό παράγοντα E2F, για τις ικές ογκοπρωτεΐνες Tag, E1A και E7, και μια μη ειδική θέση σύνδεσης στο DNA. Επιπλέον, έχει βρεθεί και μια καρβοξυτελική αλληλουχία υπεύθυνη για ολιγομερισμό της πρωτεΐνης.

Η πρωτεΐνη pRb έχει τα χαρακτηριστικά μιας **ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης**. Επομένως, απώλεια της λειτουργίας της σχετίζεται με απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου και

σηματισμό όγκων. Η λειτουργία της pRb στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου έγκειται στα παρακάτω γεγονότα:

- Στο τέλος της μίτωσης μέχρι το R (restriction point), η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μη φωσφορυλιωμένη μορφή έχοντας ανασταλτικό ρόλο όσον αφορά την αύξηση καθώς μπλοκάρει την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων της φάσης S.
- Κατά τη διάρκεια και μετά το πέρασμα από το σημείο περιορισμού, η πρωτεΐνη βρίσκεται σε υπερ-φωσφορυλιωμένη μορφή και μένει έτσι μέχρι το τέλος της μίτωσης προωθώντας την αύξηση.

Γενικά, μπορούμε να πούμε ότι η pRb παίζει το ρόλο του φύλακα για την έξοδο από τη φάση G₁, ενσωματώνοντας εξωτερικά μιτωτικά και αντι-μιτωτικά σήματα.



Εικόνα 15.13 Σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος pRb. Φαίνονται οι θέσεις φωσφορυλίωσης (P) και οι περιοχές που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τις ιικές ογκοπρωτεΐνες και με το μεταγραφικό παράγοντα E2F. Επιπλέον, διακρίνονται μια περιοχή ολιγομερισμού και μια περιοχή σύνδεσης στο DNA.

■ Το μοντέλο της λειτουργίας της pRb

Φωσφορυλίωση της pRb

Το σημαντικό στοιχείο στη λειτουργία της πρωτεΐνης είναι η φωσφορυλίωσή της. Στην αρχή της φάσης G₁ βρίσκεται σε μη φωσφορυλιωμένη μορφή και δρα σαν τροχοπέδη στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που παύει να ισχύει όταν αυτή φωσφορυλιωθεί. Τα σύμπλοκα που συμμετέχουν σ' αυτήν τη φωσφορυλίωση είναι τα CDK4-κυκλίνη D, CDK2-κυκλίνη E και CDK2-κυκλίνη A. Η φωσφορυλίωση γίνεται σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης.

Δράση τελεστή της pRb: Έλεγχος του E2F

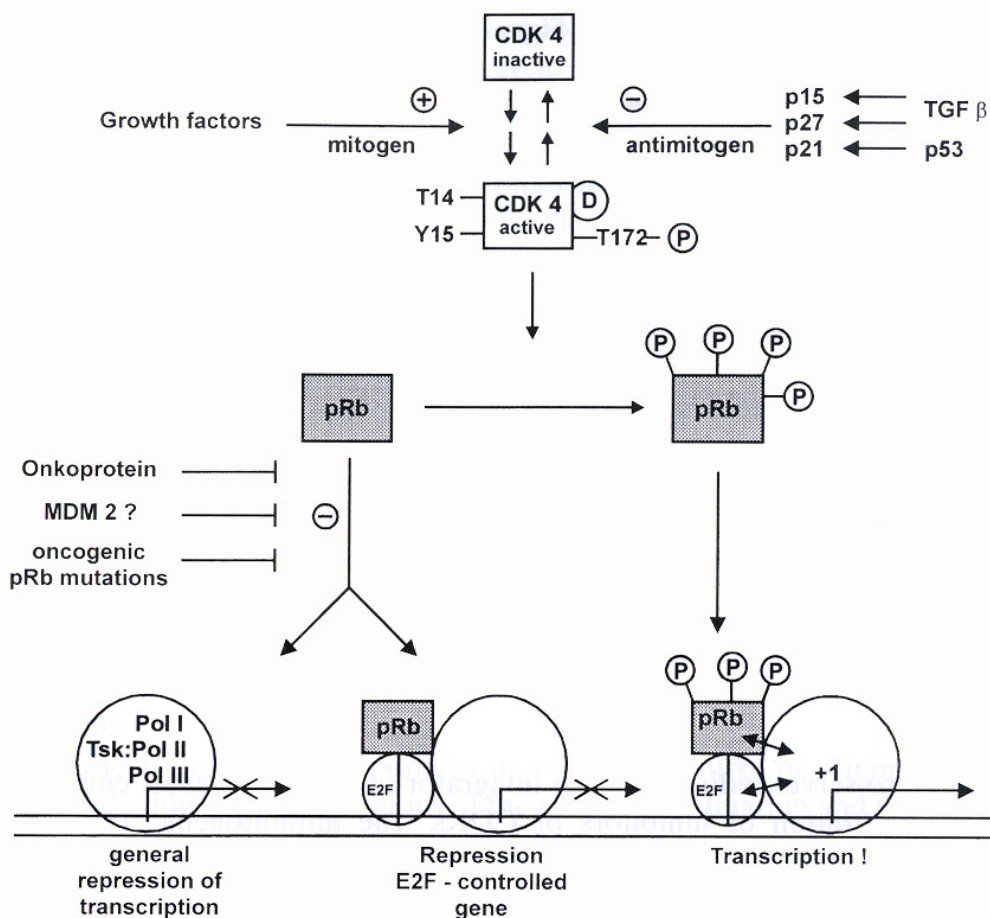
Η δράση τελεστή της pRb είναι η ρύθμιση της λειτουργίας μεταγραφικών παραγόντων που ανήκουν στην οικογένεια E2F. Με τη σύνδεση της pRb στις πρωτεΐνες της οικογένειας E2F (πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA και έχουν επιπλέον θέση δέσμευσης για την pRb), η πρωτεΐνη ελέγχει τη μεταγραφική τους ενεργοποίηση.

Σε ορισμένα κύτταρα οι πρωτεΐνες E2F βρίσκονται ως ετεροδιμερή με μια άλλη πρωτεΐνη που επίσης δεσμεύεται στο DNA, την DP-1. Υπάρχουν τουλάχιστον 5 διαφορετικές E2F (E2F-1 - E2F-5) εκ των οποίων 3 (E2F-1 - E2F-3) είναι υπό τον έλεγχο της pRb. Η κοινή αλληλουχία του DNA, όπου συνδέονται οι E2F είναι η TTTCGCGC. Η αλληλουχία αυτή έχει βρεθεί σε πολλά γονίδια, στις περιοχές προαγωγών τους:

- Κινάση της θυμιδίνης
- Αναγωγάση του διυδροφολικού
- DNA πολυμεράση α

- Κυκλίνη A, κυκλίνη E
- Μεταγραφικός παράγοντας c-myc
- E2F-1
- pRb

Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών, απαραίτητων για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ο κύριος ρυθμιστικός του ρόλος είναι η πρόοδος στις φάσεις G₁ και S. Η pRb ελέγχει τη λειτουργία του E2F σχηματίζοντας μαζί του ένα σύμπλοκο, το οποίο όταν δεν είναι φωσφορυλιωμένο αναστέλλει τη μεταγραφή του DNA ενώ όταν φωσφορυλιωθεί ενεργοποιείται η μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Ο ακριβής μηχανισμός της καταστολής της μεταγραφής δεν είναι απόλυτα γνωστός αλλά από τις πληροφορίες που υπάρχουν είναι σαφές ότι η pRb αλληλεπιδρά όταν δεν είναι φωσφορυλιωμένη με μια απακετυλάση ιστονών στη χρωματίνη προκαλώντας αναδιοργάνωσή της και καταστολή της μεταγραφής.



Εικόνα 15.14 Μοντέλο της λειτουργίας των pRb/E2F. Στην εικόνα αναφέρονται περιληπτικά οι λειτουργίες της pRb στο σημείο μετάβασης G₁/S καθώς και η σημασία της φωσφορυλίωσης.

Εκτός από την αρνητική ρύθμιση της pRb στη δράση του E2F, έχει βρεθεί ότι η pRb καταστέλλει την πρωτεϊνσύνθεση αναστέλλοντας τη δράση και των τριών RNA πολυμερασών στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Υπάρχουν δύο ακόμα πρωτεΐνες με παρόμοια δράση με αυτή της pRb, αλλά η δράση τους δεν εντοπίζεται στον πυρήνα. Αυτές είναι οι p170 και p130.

Η πρωτεΐνη MDM2 αναγνωρίστηκε ως ένα επιπλέον στοιχείο ελέγχου της δράσης του συμπλόκου pRb-E2F. Η MDM2 είναι μια ογκοπρωτεΐνη που ενεργοποιείται λόγω υπερέκφρασης. Συνδέεται στην πρωτεΐνη p53 και την pRb αναστέλλοντας την ικανότητά τους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επίσης συνδέεται και με τον E2F ενεργοποιώντας τη μεταγραφική του δράση. Γενικά η MDM2 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την αύξηση του κυττάρου.

Θετικά σήματα

Η έκταση της φωσφορυλίωσης και άρα η δραστηριότητα της pRb εξαρτάται από τη συγκέντρωση κυκλινών και ειδικά της κυκλίνης D1. Αν η συγκέντρωση της D1 αυξηθεί πάνω από μία ορισμένη τιμή, λόγω σημάτων που προωθούν τη διαίρεση του κυττάρου, τότε προωθείται η φωσφορυλίωση της pRb και συνεπώς η μεταγραφή γονιδίων που ελέγχονται από τον E2F.

Επιπλέον επίδραση στη δράση της pRb έχουν οι ιικές ογκοπρωτεΐνες. Αυτές συνδέονται στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της pRb και ανταγωνίζονται με τον E2F για τη σύνδεση στην pRb. Ο E2F απελευθερώνεται από την αρνητική επίδραση της pRb και ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους του.

Αρνητικά σήματα

Η pRb επίσης ενσωματώνει έμμεσα και αρνητικά σήματα, τα οποία βρίσκονται υπό μορφή αναστολέων των CDKs. Πχ ο αντιμιτογόνος παράγοντας TGFβ αυξάνει τη συγκέντρωση του αναστολέα p15^{ink4b}, ο οποίος δεσμεύεται στις CDK4 και CDK6 και ανταγωνίζεται με την κυκλίνη D τη σύνδεση στις CDKs. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η συγκέντρωση του δραστηρικού συμπλόκου της CDK και εμποδίζεται η φωσφορυλίωση της pRb.

Επιπλέον, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 έμμεσα ρυθμίζει τη δράση της pRb. Η p53 επάγει τη μεταγραφή του αναστολέα p21, ο οποίος αναστέλλει τη δράση των CDK4, CDK2 και CDK6, και συμβάλλει στο να διατηρηθεί η pRb σε μη φωσφορυλιωμένη μορφή. Η ενεργοποίηση της p53 παρατηρείται σε περίπτωση καταστροφής του DNA.

5. Ο έλεγχος της αντιγραφής του DNA στον κυτταρικό κύκλο

Η αντιγραφή του DNA στη φάση S υπόκειται σε έλεγχο στον κυτταρικό κύκλο, σύμφωνα με τα ακόλουθα στοιχεία:

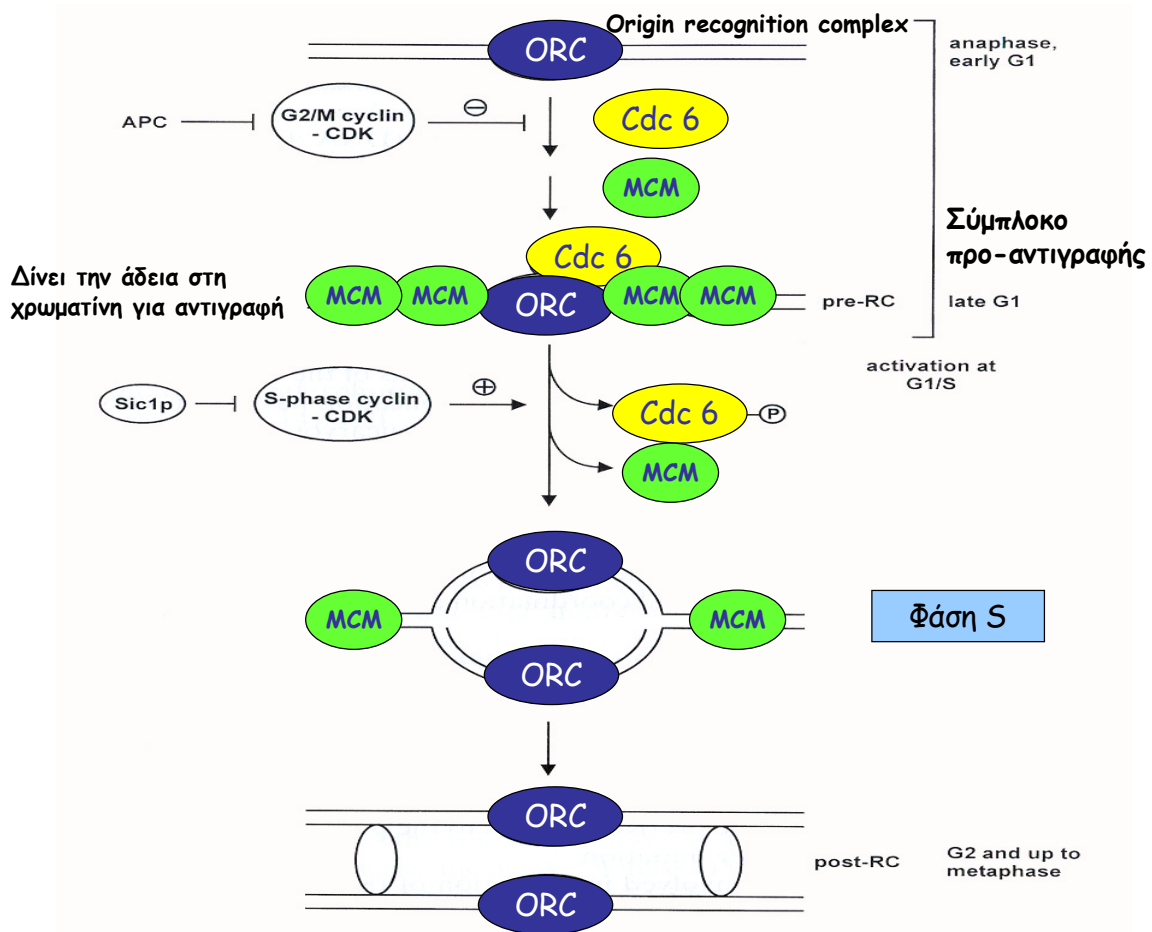
- Η αντιγραφή του DNA περιορίζεται στη φάση S
- Το DNA αντιγράφεται μόνο μία μόνο φορά σε έναν κύκλο
- Ο χρόνος για την αντιγραφή του DNA κατά τη φάση S και τη μίτωση διατηρείται
- Αν παρατηρηθεί βλάβη στο DNA, η αντιγραφή μπορεί να σταματήσει.

Ο έλεγχος της αντιγραφής του DNA γίνεται κυρίως σε δύο επίπεδα.

■ Έλεγχος στο αρχικό επίπεδο

Ο κύριος έλεγχος της αντιγραφής του DNA γίνεται στο αρχικό στάδιο, στην έναρξη της αντιγραφής. Η αντιγραφή του DNA ξεκινάει από ειδικές αλληλουχίες του DNA, γνωστές ως αρχές της αντιγραφής (replication origins). Σ' αυτές τις αλληλουχίες δεσμεύονται πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία χωρίζονται σε δύο μορφές, την προ-αντιγραφική και τη μετα-αντιγραφική. Η πρώτη (pre-RC) σχηματίζεται στην ανάφαση και κληρονομείται από τις αδερφές χρωματίδες. Μετά την είσοδο στη φάση S, το σύμπλοκο pre-RC καταστρέφεται για να ξεκινήσει η αντιγραφή. Τότε το σύμπλοκο μετατρέπεται σε μετα-αντιγραφικό.

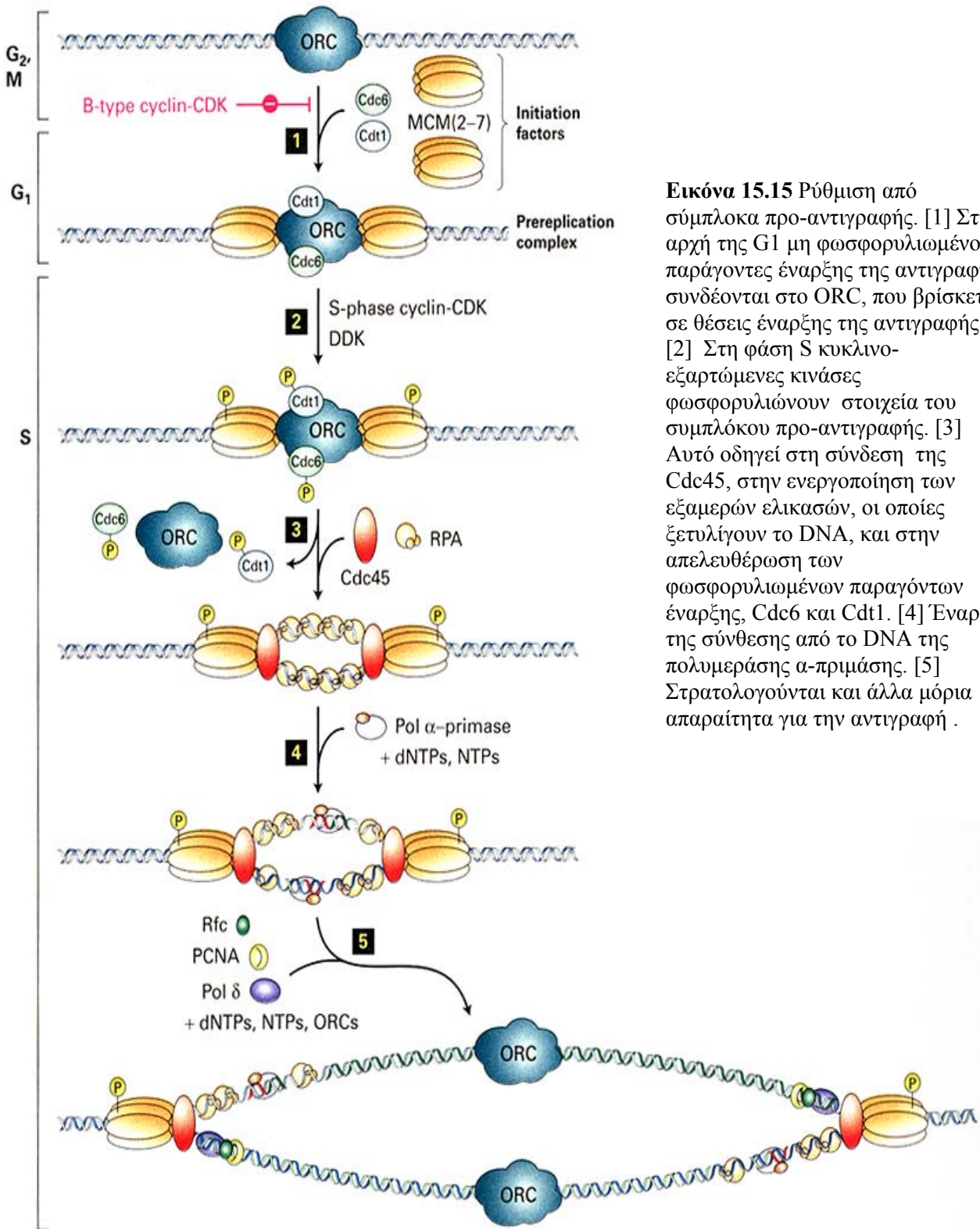
Τουλάχιστον 4 πρωτεϊνικά συμπλέγματα συμμετέχουν στο σχηματισμό των συμπλόκων της έναρξης της αντιγραφής:



Εικόνα 15.14 Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου στην αντιγραφή του DNA στους ευκαριώτες. Στην ανάφαση και κατά τη διάρκεια της G1, δημιουργείται σε θέσεις έναρξης της αντιγραφής ένα σύμπλοκο προ-αντιγραφής, pre-RC (pre-replication complex), το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες Cdc6 και MCM, και το ιδιόσυστατα συνδεδεμένο σύμπλοκο αναγνώρισης της αρχής, ORC (origin recognition complex). Η δημιουργία του pre-RC ρυθμίζεται αρνητικά από το σύμπλοκο G2/M κυκλίνη-CDK. Οι πρωτεΐνες Cdc6 και MCM απομακρύνονται στη μετάβαση G1/S, λόγω φωσφορυλίωσης από το σύμπλοκο της φάσης S κυκλίνη-CDK, οδηγώντας στην έναρξη της αντιγραφής. Η δραστηριότητα των συμπλόκων κυκλίνη-CDK ρυθμίζεται με διάφορους τρόπους: αποικοδόμηση (από το APC, σύμπλοκο που επάγει την ανάφαση) και αναστολείς (Sic1 στις ζύμες). Μετά την ολοκλήρωση της φάσης S, δημιουργείται ένα σύμπλοκο μετά-αντιγραφής (post-RC). Τα pre-RC και post-RC δεν μπορεί να υπάρχουν ταυτόχρονα στο κύτταρο, γεγονός που εμποδίζει επαν-αντιγραφή του DNA στη φάση G2 και M. Το κύτταρο μπορεί να εισέλθει σε μια νέα φάση S, μόνο μετά την έγκριση της χρωματίνης για ένα νέο κύκλο αντιγραφής του DNA, λόγω της σύνδεσης των πρωτεϊνών Cdc6 και MCM.

- **ORC (Origin Recognition Complex)**. Αποτελείται από 6 διαφορετικές πρωτεΐνες, δεσμεύεται στο σημείο έναρξης της αντιγραφής και μένει εκεί σε όλη τη διάρκεια του κύκλου.
- Πρωτεΐνες **MCM** (6 διαφορετικές πρωτεΐνες, MCM2-MCM7). Δεσμεύονται στο σύμπλοκο ORC-DNA και αποδεσμεύονται κατά τη διαδικασία της αντιγραφής στη φάση S.

- Πρωτεΐνη Cdc6: είναι βασικό συστατικό του pre-RC. Συντίθεται κατά τη φάση G₁ και είναι διαθέσιμο για τη δημιουργία του pre-RC στη μίτωση.
- “Licensing Complexes”. Είναι σημαντικές πρωτεΐνες για το σχηματισμό του pre-RC.
-



Εικόνα 15.15 Ρύθμιση από σύμπλοκα προ-αντιγραφής. [1] Στην αρχή της G₁ μη φωσφορυλιωμένοι παράγοντες έναρξης της αντιγραφής συνδέονται στο ORC, που βρίσκεται σε θέσεις έναρξης της αντιγραφής. [2] Στη φάση S κυκλιν-εξαρτώμενες κινάσες φωσφορυλιώνουν στοιχεία του συμπλόκου προ-αντιγραφής. [3] Αυτό οδηγεί στη σύνδεση της Cdc45, στην ενεργοποίηση των εξαμερών ελικασών, οι οποίες ξετυλίγουν το DNA, και στην απελευθέρωση των φωσφορυλιωμένων παραγόντων έναρξης, Cdc6 και Cdt1. [4] Έναρξη της σύνθεσης από το DNA της πολυμεράσης α-πριμάσης. [5] Στρατολογούνται και άλλα μόρια απαραίτητα για την αντιγραφή.

Η δράση των πρωτεϊνών αυτών έχει μελετηθεί στο *S. cerevisiae*. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής δημιουργείται το pre-RC, το οποίο ευνοεί την αντιγραφή. Αυτό περιέχει τις πρωτεΐνες ORC, MCM και Cdc6. Ο σχηματισμός αυτός στο τέλος της φάσης M και στην G1 δίνει την άδεια στην χρωματίνη για την αντιγραφή του DNA. Μετά την είσοδο στη φάση S, οι πρωτεΐνες MCM και Cdc6 αποδεσμεύονται από τη θέση έναρξης. Υπεύθυνη για την αποδέσμευση είναι η φωσφορυλίωσή τους από ένα σύμπλοκο CDK-κυκλίνης, η δράση του οποίου ελέγχεται από τον αναστολέα Sic-1 και απενεργοποιείται στην αρχή της G1. Ακολουθεί ενεργοποίηση της αντιγραφής. Στη φωσφορυλίωση παίρνει μέρος και ένα άλλο σύμπλοκο με δράση κινάσης, το Cdc7/Dbf4p. Όταν η αντιγραφή ξεκινήσει, ο σχηματισμός του pre-RC σταματάει με τη δράση του συμπλόκου G2/M κυκλίνη-CDK.

■ Έλεγχος στα συστατικά της αντιγραφής

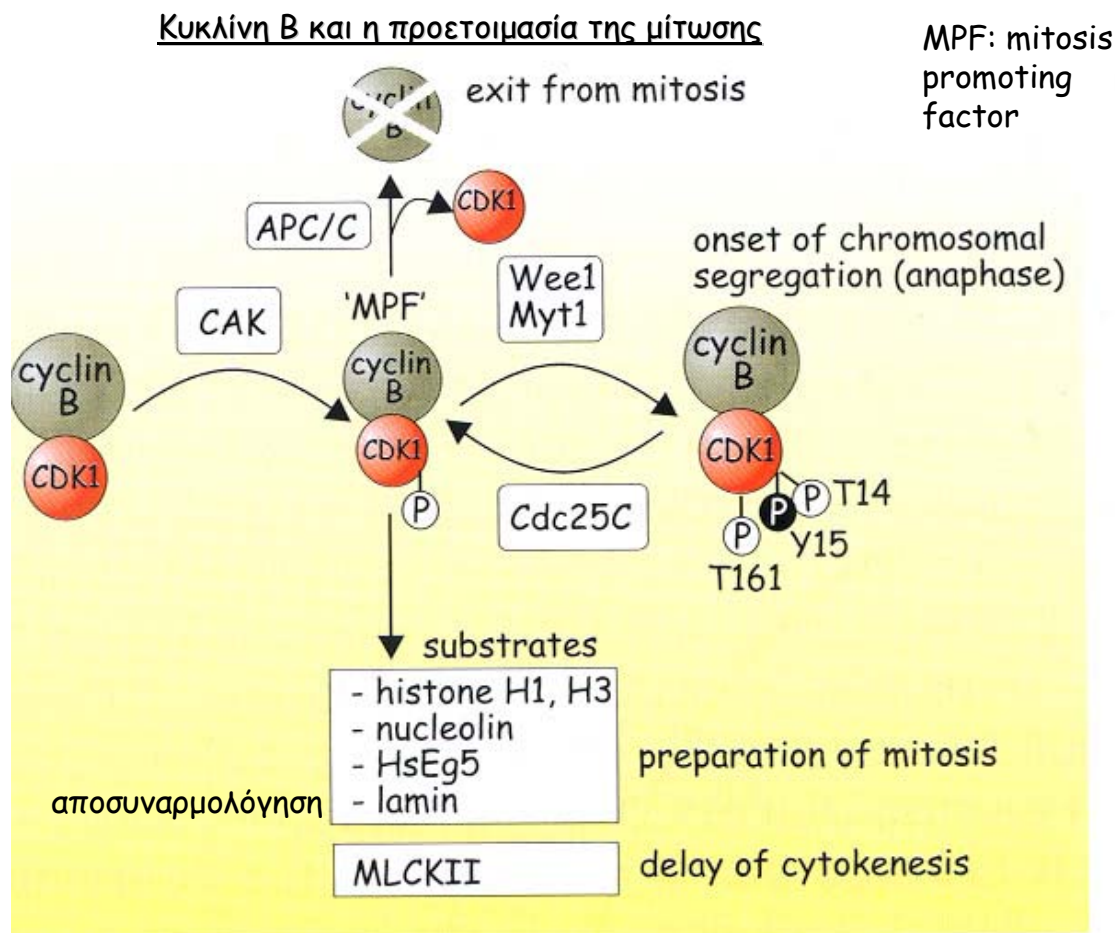
Στην αρχή και κατά τη διάρκεια της φάσης S, όλες οι πρωτεΐνες και τα dNTPs πρέπει να είναι διαθέσιμα σε επαρκείς ποσότητες. Σ' αυτό βοηθάει ο E2F. Σε ορισμένες καταστάσεις, όπως σε περιπτώσεις βλάβης του DNA, η αντιγραφή πρέπει να σταματάει λόγω απενεργοποίησης μιας σημαντικής πρωτεΐνης για την αντιγραφή. Ένα παράδειγμα είναι η δέσμευση της PCNA στην p53. Εάν υπάρχει καταστροφή του DNA, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται και συνδέεται στην PCNA, συνεπώς δεν είναι πια διαθέσιμη για την αντιγραφή και η αντιγραφή διακόπτεται.

6. Η μετάβαση από τη φάση G₂ στην M

Σημαντικά ορόσημα στον κυτταρικό κύκλο για την πρόοδο της μίτωσης είναι η μετάβαση G₂/M και η μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση.

Η είσοδος στη μίτωση αποφασίζεται από την κινάση CDC2, η οποία στην ενεργή της μορφή εμφανίζεται ως σύμπλοκο με την κυκλίνη B και σχηματίζουν τον παράγοντα προώθησης της μίτωσης, MPF (mitosis promoting factor). Η δραστηριότητα του MPF κυμαίνεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και είναι ο παράγοντας που προωθεί την είσοδο του κυττάρου στη φάση M.

Ένα σημαντικό ρυθμιστικό στοιχείο για την είσοδο του κυττάρου στη μίτωση είναι η συγκέντρωση της κυκλίνης B, η οποία αυξάνεται στη φάση S αλλά η μίτωση δεν ξεκινάει αμέσως καθώς απαιτείται ενεργοποίηση του συμπλόκου με φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση συμβαίνει στις Thr161, Thr14 και Tyr15. Σε αυτήν την τριπλά φωσφορυλιωμένη μορφή, το σύμπλοκο CDC2-κυκλίνη B είναι ανενεργό και παραμένει έτσι μέχρι το τέλος της φάσης G₂. Η ενεργοποίηση μέσω αποφωσφορυλίωσης των Thr14 και Tyr15 γίνεται στη μετάβαση G₂/M από τη φωσφατάση CDC25, η δράση της οποίας ελέγχεται επίσης από φωσφορυλίωση. Το αποτέλεσμα είναι η πολύ έντονη αύξηση στη δραστηριότητα του MPF και η προώθηση της μίτωσης. Η έκταση της φωσφορυλίωσης και της δραστηριότητας της φωσφατάσης CDC25 υπόκειται σε θετικό και αρνητικό έλεγχο.



Εικόνα 15.16 Το σύμπλοκο κυκλίνη Β – κινάση CDK1 (ή CDC2) γνωστό ως παράγοντας προώθησης της μίτωσης, MPF, αποφασίζει για την είσοδο του κυττάρου στη μίτωση.

8. Το σημείο ελέγχου της βλάβης του DNA

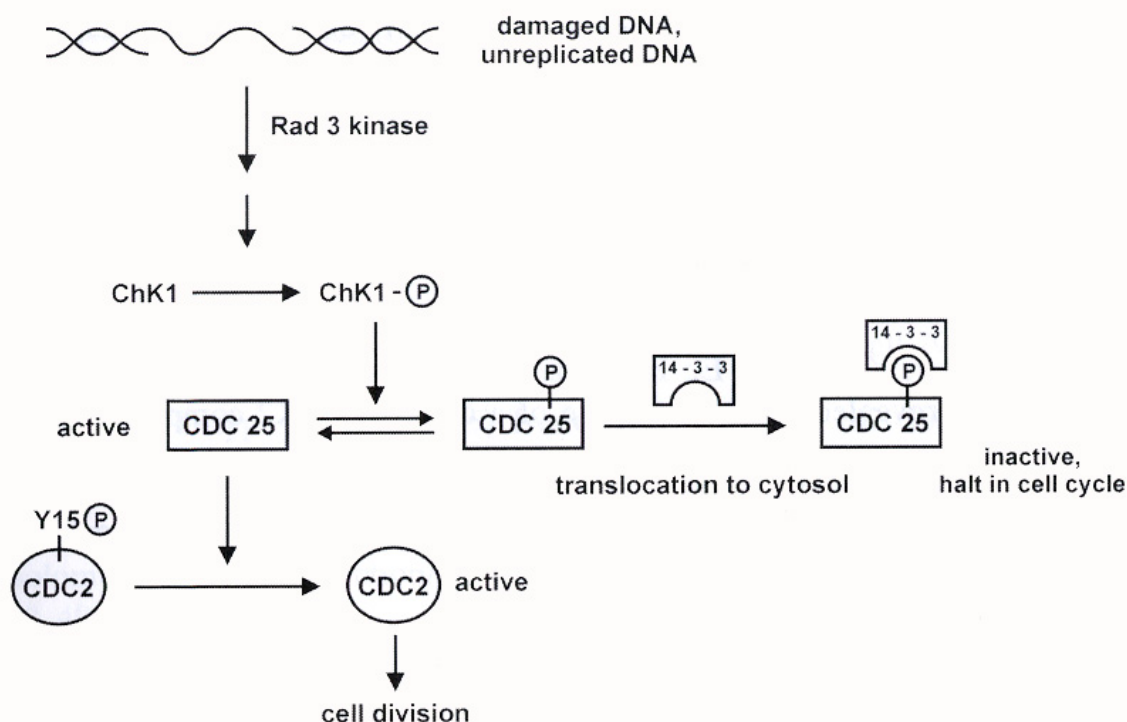
Το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς, οι οποίοι ανιχνεύουν τυχόν βλάβες στο DNA και προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου ώστε αυτές να διορθωθούν. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι τα σημεία ελέγχου (checkpoints). Είναι δηλαδή βιοχημικά μονοπάτια, που ενεργοποιούνται και επηρεάζουν σημαντικά βήματα του κυτταρικού κύκλου. Πολύ σημαντικά σημεία ελέγχου είναι αυτά της βλάβης του DNA και του σχηματισμού της ατράκτου. Ως αντίδραση στη βλάβη του DNA το κύτταρο έχει μηχανισμούς που βοηθούν στην επιδιόρθωσή του.

- Διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G₁, S ή G₂
- Ελάττωση του ρυθμού της αντιγραφής του DNA
- Προώθηση της μεταγραφής γονιδίων σημαντικών για την επιδιόρθωση του DNA
- Προώθηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, της απόπτωσης.

Έχει βρεθεί ότι στα μονοπάτια αυτά σημαντικό ρόλο παίζουν οι κινάσες της οικογένειας PI3 και στη ζύμη *S. pombe* συμμετέχουν στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Ο στόχος του ανασταλτικού μονοπατιού είναι η φωσφατάση CDC25, που ενεργοποιεί τη μετάπτωση G₂/M μέσω αποφωσφορυλίωσης του μιτωτικού συμπλόκου κυκλίνη-CDC2. Η αρχή του μονοπατιού αυτού είναι η βλάβη στο DNA, η οποία γίνεται αντιληπτή από την κινάση Rad3.

Αυτή φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση Chk1, της οποία υπόστρωμα είναι η CDC25. Η τελευταία φωσφορυλιώνεται από την Chk1 στα κατάλοιπα σερίνης 33, 192 και 359. Τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης χρησιμεύουν ως θέσεις σύνδεσης για τις πρωτεΐνες 14-3-3. Το σύμπλοκο της φωσφατάσης CDC25 με τις 14-3-3 μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου η CDC25 δεν είναι πλέον διαθέσιμη για να ενεργοποιήσει το σύμπλοκο κυκλίνη/CDC2 κι έτσι ο κύκλος διακόπτεται.

Στα θηλαστικά υπάρχουν παρόμοια σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, όταν ανιχνεύεται βλάβη στο DNA. Σημαντικά μόρια σ' αυτά τα μονοπάτια είναι η κινάση ATM και η πρωτεΐνη p53.



Εικόνα 15.17 Ο αναδιπλασιασμός του DNA και το σημείο ελέγχου βλάβης στο DNA, στη ζύμη. Η ύπαρξη κατεστραμμένου DNA κατά τη μίτωση ενεργοποιεί ένα σημείο ελέγχου, όπου η φωσφατάση CDC25 παίζει κυρίαρχο ρόλο. Κατά την καταστροφή του DNA, ένα σήμα μεταφέρεται στην πρωτεϊνική κινάση Chk1, η οποία φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη Chk1 στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τη CDC25 σε πολλά κατάλοιπα σερίνης. Οι φωσφορυλιωμένες σερίνες αποτελούν σημεία προσκόλλησης για τις πρωτεΐνες 14-3-3. Στη συνδεδεμένη με την 14-3-3 κατάσταση, η φωσφατάση CDC25 δεν είναι πια διαθέσιμη για αποφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της CDC2 κινάσης. Συνεπώς, ο κυτταρικός κύκλος σταματά.

Βιβλιογραφία

- Adams, P.D. and Kaelin, W.D., Negative control elements of the cell cycle in human tumors, *Curr. Biol.* 1998, 10, 791-797
- Bernards, R "E2F: a nodal point in cell cycle regulation, *Biochem. Biophys. Acta* 1997, 1333, M33-M40
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription, *Nature* 1998, 391, 597-601

- Draetta, G and Eckstein, J., Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation, *Biochem. Biophys. Acta* 1997, 1332, M53-63
- Cavanaugh, A.H., Hempel, W.M., Taylor, L.J., Rogalsky, V., Todorov, G and Rothblum, L.I., Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF locked by Rb gene product *Nature* 374, 177-180