

Κεφάλαιο 16

Ο κυτταρικός κύκλος

16.1 Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτών

16.2 Ρυθμιστές της προόδου του κυτταρικού κύκλου

16.3 Τα γεγονότα της φάσης M

16.4 Μείωση και γονιμοποίηση

ΠΕΙΡΑΜΑ-ΣΤΑΘΜΟΣ

Η ανακάλυψη του MPF

ΠΕΙΡΑΜΑ-ΣΤΑΘΜΟΣ

Η ανακάλυψη της κυκλίνης

Η ικανότητα αυτοαναπαραγωγής ίσως είναι το θεμελιώδες χαρακτηριστικό των κυττάρων και κατ' επέκταση όλων των οργανισμών. Όλα τα κύτταρα αναπαράγονται με διαίρεση, κατά την οποία από ένα γονικό κύτταρο παράγονται δύο θυγατρικά κύτταρα.... Τα θυγατρικά κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κυτταρικού πληθυσμού που προέρχεται από την ανάπτυξη και τη διαίρεση του αρχικού κυττάρου και των απογόνων του. Στην πιο απλή περίπτωση, αυτοί οι κύκλοι ανάπτυξης και διαίρεσης επιτρέπουν σε ένα βακτήριο να σχηματίσει μια αποικία εκατομμυρίων κυττάρων-

απογόνων κατά τη διάρκεια ολονύχτιας επώασης στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου ενός τρυβλίου. Μια πολυπλοκότερη περίπτωση είναι η ανάπτυξη του ανθρώπινου σώματος το οποίο αποτελείται από 10^{14} περίπου κύτταρα. Όλα αυτά τα κύτταρα προκύπτουν από ένα γονιμοποιημένο ωάριο μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης.

Η διαίρεση όλων των κυττάρων πρέπει να ρυθμίζεται προσεκτικά και να συντονίζεται τόσο με την κυτταρική ανάπτυξη όσο και με την αντιγραφή του DNA, ώστε να σχηματίζονται θυγατρικά κύτταρα με πλήρες γονιδίωμα. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από μια σειρά πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες είναι συντηρημένες σε ολόκληρο το φάσμα των ευκαρυωτικών οργανισμών, από τους ζυμομύκητες ως τα θηλαστικά. Στους ανώτερους ευκαρυώτες, αυτός ο μηχανισμός του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τους αυξητικούς παράγοντες που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, συντονίζοντας τη διαίρεση των μεμονωμένων κυττάρων με τις ανάγκες του οργανισμού ως συνόλου. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η ελαττωματική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι η συνήθης αιτία του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, η μελέτη του κυτταρικού κύκλου συνδέεται στενά με τη μελέτη του καρκίνου, αλλά και με τη μελέτη των μονοπατιών της κυτταρικής σηματοδότησης που συζητήθηκαν στο Κεφάλαιο 15.

16.1 Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτών

Κατά τον κυτταρικό κύκλο επιτελούνται τέσσερις συντονισμένες διεργασίες: η κυτταρική ανάπτυξη, η αντιγραφή του DNA, η κατανομή των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα και η κυτταρική διαίρεση. Στα βακτήρια, η κυτταρική **ανάπτυξη** και η αντιγραφή του DNA συμβαίνουν κατά το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού κύκλου και τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα, συνδεδεμένα σε συγκεκριμένες θέσεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, κατανέμονται μαζί με αυτή στα θυγατρικά κύτταρα.. Στους ευκαρυώτες όμως ο κυτταρικός κύκλος είναι πιο πολύπλοκος και αποτελείται από τέσσερις διακριτές φάσεις. Ενώ η κυτταρική **ανάπτυξη** είναι συνήθως μια συνεχής διεργασία, η σύνθεση του DNA διεξάγεται σε μία μόνο φάση του κυτταρικού κύκλου και ακολουθεί ένας πολύπλοκος μηχανισμός που οδηγεί στην κατανομή των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων στους θυγατρικούς

πυρήνες πριν από την κυτταρική διαίρεση. Η μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη ελέγχεται από ένα **αν** συντηρημένο ρυθμιστικό μηχανισμό, ο οποίος αφενός συντονίζει τη ροή των γεγονότων του κυτταρικού κύκλου και αφετέρου συνδέει τον κυτταρικό κύκλο με εξωκυτταρικά σήματα που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου

Σε κυτταροκαλλιέργεια, ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο διαιρείται κάθε 24 περίπου ώρες. Κατά τη μικροσκοπική εξέταση του κυτταρικού κύκλου διακρίνονται δύο κύρια τμήματα: τη **μίτωση** (mitosis) και τη **μεσόφαση** (interphase). Η μίτωση (πυρηνική διαίρεση) αποτελεί το πιο εντυπωσιακό στάδιο του κυτταρικού κύκλου, αντιστοιχεί στο διαχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων και συνήθως καταλήγει σε κυτταρική διαίρεση (**κυτταροκίνηση**, cytokinesis). Ωστόσο, η μίτωση και η κυτταροκίνηση διαρκούν μόλις μία ώρα και επομένως το 95% περίπου της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου καλύπτεται από τη μεσόφαση, η οποία είναι η περίοδος ανάμεσα σε δύο διαδοχικές μιτώσεις. Κατά τη μεσόφαση, τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και καταλαμβάνουν ολόκληρο τον πυρήνα, ο οποίος εμφανίζει σχετικά ομοιόμορφη μορφολογία. Στο μοριακό επίπεδο, η μεσόφαση είναι η περίοδος κατά την οποία διεξάγεται, με μεγάλη τάξη και οργάνωση, τόσο η κυτταρική αύξηση όσο και η αντιγραφή του DNA καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για την επικείμενη διαίρεση.

Κατά τη μεσόφαση, η κυτταρική αύξηση γίνεται με σταθερό ρυθμό ώστε τα περισσότερα διαιρούμενα κύτταρα να διπλασιάζονται σε μέγεθος ανάμεσα σε δύο μιτώσεις. Αντίθετα, η σύνθεση του DNA γίνεται μόνο κατά τη διάρκεια ενός τμήματος της μεσόφασης. Έτσι, η χρονική περίοδος της σύνθεσης του DNA χωρίζει τον κύκλο των ευκαρυωτικών κυττάρων σε τέσσερις διακριτές φάσεις (**Εικόνα 16.1**). Η **φάση M** (M phase) του κύκλου αντιστοιχεί στη μίτωση, η οποία συνήθως ακολουθείται από την κυτταροκίνηση. Μετά τη φάση M ακολουθεί η **φάση G₁** (G₁ phase, Gap 1 phase: φάση 1ου διαστήματος), η οποία αντιστοιχεί στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα μεταξύ της μίτωσης και της έναρξης της αντιγραφής του DNA. Κατά την G₁, το κύτταρο είναι μεταβολικά ενεργό και αυξάνεται συνεχώς χωρίς να αντιγράφεται το DNA του. Η G₁ ακολουθείται από τη **φάση S** (S phase, Synthesis phase: φάση σύνθεσης), κατά την οποία διεξάγεται η αντιγραφή του DNA. Μετά την

ολοκλήρωση της σύνθεσης του DNA ξεκινά η **φάση G₂** (G₂ phase, Gap 2 phase: φάση 2ου διαστήματος), κατά την οποία συνεχίζεται η κυτταρική αύξηση και συντίθενται πρωτεΐνες καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για τη μίτωση.

Η διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου εμφανίζει σημαντικές διαφορές σε διαφορετικά είδη κυττάρων. Σε ένα διαιρούμενο, τυπικό ανθρώπινο κύτταρο με συνολική διάρκεια κύκλου 24 ωρών, η φάση G₁ μπορεί να διαρκέσει περίπου 11 ώρες, η S περίπου 8 ώρες, η G₂ περίπου 4 ώρες και η M περίπου 1 ώρα. Ωστόσο, άλλα κύτταρα μπορεί να διαιρούνται ταχύτερα. Για παράδειγμα, οι ζυμομύκητες που αναπαράγονται με εκβλάστηση μπορούν να ολοκληρώσουν και τα τέσσερα στάδια του κυτταρικού κύκλου σε μόλις 90 λεπτά. Ακόμα συντομότεροι κυτταρικοί κύκλοι (διάρκειας 30 λεπτών ή λιγότερο) παρατηρούνται σε κύτταρα πρώιμων εμβρύων αμέσως μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου (**Εικόνα 16.2**). Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, το κυτταρόπλασμα του ωαρίου απλώς διαιρείται σε μικρότερα κύτταρα χωρίς να συμβαίνει κυτταρική ανάπτυξη. Δε διακρίνονται οι φάσεις G₁ και G₂ και η αντιγραφή του DNA διεξάγεται ταχύτατα. Επομένως, στα πρώιμα έμβρυα οι κυτταρικοί κύκλοι χαρακτηρίζονται από πολύ σύντομες φάσεις S που εναλλάσσονται με φάσεις M.

Σε αντίθεση με τον ταχύτατο πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών κυττάρων, ορισμένα ενήλικα ζωικά κύτταρα (π.χ. τα νευρικά κύτταρα) παύουν οριστικά να διαιρούνται, ενώ πολλά άλλα κύτταρα διαιρούνται κατά περίπτωση, όταν χρειάζεται η αντικατάσταση κυττάρων που έχουν χαθεί εξαιτίας τραυματισμού ή κυτταρικού θανάτου. Στην τελευταία περίπτωση περιλαμβάνονται οι ινοβλάστες της επιδερμίδας, καθώς και τα κύτταρα ορισμένων εσωτερικών οργάνων (π.χ. τα ηπατικά κύτταρα). Όπως συζητείται παρακάτω, τα κύτταρα αυτά εξέρχονται από τη φάση G₁ και εισέρχονται σε ένα στάδιο ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου που ονομάζεται G₀. Στη φάση G₀, τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά, αλλά παύουν να πολλαπλασιάζονται, εκτός αν δεχτούν κατάλληλα εξωκυτταρικά σήματα.

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου προϋποθέτει να μπορούμε να αναγνωρίσουμε τα κύτταρα στις διαφορετικές φάσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ενώ τα μιτωτικά κύτταρα μπορούν να διακριθούν με τη βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου, για την αναγνώριση των κυττάρων που βρίσκονται στις άλλες φάσεις του κύκλου (G₁, S και G₂) χρησιμοποιούνται βιοχημικά κριτήρια. Στις περισσότερες περιπτώσεις, κύτταρα σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου διακρίνονται από την ποσότητα του DNA που περιέχουν (**Εικόνα 16.3**). Για παράδειγμα, τα ζωικά κύτταρα στη φάση G₁

είναι διπλοειδή, δηλαδή διαθέτουν δύο αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος, επομένως η ποσότητα του DNA που περιέχουν αναφέρεται ως $2n$ (με n συμβολίζεται το DNA του απλοειδούς γονιδιώματος). Κατά τη φάση S, με την αντιγραφή διπλασιάζεται η ποσότητα του DNA του κυττάρου (από $2n$ σε $4n$), με αποτέλεσμα τα κύτταρα στη φάση S να διαθέτουν ποσότητα DNA που κυμαίνεται μεταξύ $2n$ και $4n$. Η ποσότητα του κυτταρικού DNA παραμένει $4n$ στις φάσεις G_2 και M και μειώνεται σε $2n$ μετά την κυτταροκίνηση. Η ποσότητα του κυτταρικού DNA μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά με επώαση των κυττάρων με μια φθορίζουσα χρωστική που δεσμεύεται στο DNA. Ακολουθεί ανάλυση της έντασης φθορισμού μεμονωμένων κυττάρων σε **κυτταρομετρητή ροής** (flow cytometer) ή σε **κυτταρομετρητή ροής εξαρτώμενο από φθορισμό** (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorter), μέθοδοι που επιτρέπουν το διαχωρισμό των κυττάρων ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται: G_1 , S και G_2/M .

Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την κυτταρική αύξηση και από εξωκυτταρικά σήματα

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται τόσο από εξωκυτταρικά σήματα που προέρχονται από το περιβάλλον, όσο και από ενδοκυτταρικά σήματα, ώστε να συντονίζονται οι διάφορες διεργασίες που εξελίσσονται κατά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ένα παράδειγμα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από εξωκυτταρικά σήματα είναι η επίδραση αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό των ζωικών κυττάρων. Επιπλέον, διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταρική αύξηση, η αντιγραφή του DNA και η μίτωση, πρέπει να συντονίζονται κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αυτό επιτυγχάνεται με μια σειρά σημείων ελέγχου που ρυθμίζουν τη μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη.

Σε πολλούς τύπους κυττάρων, προς το τέλος της G_1 υπάρχει ένα πολύ σημαντικό σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου το οποίο ρυθμίζει τη μετάβαση από την G_1 στην S. Αυτό το σημείο ελέγχου ταυτοποιήθηκε αρχικά από μελέτες σε ζυμομύκητες που αναπαράγονται με εκβλάστηση (*Saccharomyces cerevisiae*), στους οποίους είναι γνωστό ως σημείο **START** (που σημαίνει «αφετηρία»). Μόλις περάσουν από το σημείο START, τα κύτταρα έχουν καθοριστεί να εισέλθουν στη φάση S και να ολοκληρώσουν μια κυτταρική διαίρεση (**Εικόνα 16.4**). Ωστόσο, η διέλευση από το

σημείο START στον κυτταρικό κύκλο του ζυμομύκητα ρυθμίζεται με αυστηρό τρόπο από εξωκυτταρικά σήματα, όπως είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, καθώς και από το κυτταρικό μέγεθος. Για παράδειγμα, αν οι ζυμομύκητες αντιμετωπίσουν έλλειψη θρεπτικών συστατικών, ο κυτταρικός τους κύκλος σταματά στο σημείο START και τα κύτταρα εισέρχονται σε ένα στάδιο ηρεμίας αντί να μεταβούν στη φάση S. Επομένως, το START αντιπροσωπεύει ένα σημείο λήψης απόφασης στο οποίο το κύτταρο προσδιορίζει αν τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά είναι επαρκή για να του επιτρέψουν να ολοκληρώσει τις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Μάλιστα, οι σηματοδοτικοί πολυπεπτιδικοί παράγοντες που επάγουν τη σύζευξη των ζυμομυκήτων προκαλούν τη στάση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο START, επιτρέποντας σε δύο απλοειδή κύτταρα ζυμομυκήτων να συζευχθούν αντί να μεταβούν στη φάση S.

Εκτός από την απόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα, το σημείο START εμπλέκεται και στο συντονισμό της κυτταρικής αύξησης με την αντιγραφή του DNA και με την κυτταρική διαίρεση. Η σημασία της ρύθμισης αυτής είναι ιδιαίτερα εμφανής σε ζυμομύκητες που αναπαράγονται με εκβλάστηση, από την κυτταρική διαίρεση των οποίων παράγονται κύτταρα διαφορετικών μεγεθών: ένα μεγάλο μητρικό κύτταρο και ένα μικρό θυγατρικό κύτταρο. Προκειμένου να διατηρηθεί σταθερό το κυτταρικό μέγεθος, το μικρό θυγατρικό κύτταρο είναι απαραίτητο να αναπτυχθεί περισσότερο από το μεγάλο μητρικό κύτταρο, προτού διαιρεθούν ξανά. Επομένως, το κυτταρικό μέγεθος πρέπει να ελέγχεται έτσι ώστε η κυτταρική αύξηση να συντονίζεται με τα διάφορα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου. Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται με ένα μηχανισμό ελέγχου που επιτρέπει σε κάθε κύτταρο να διέλθει από το σημείο START, εφόσον έχει αποκτήσει ένα ελάχιστο μέγεθος. Κατά συνέπεια, το μικρό θυγατρικό κύτταρο παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στη φάση G₁ και αναπτύσσεται περισσότερο απ' ό,τι το μητρικό κύτταρο.

Ο πολλαπλασιασμός των περισσότερων ζωικών κυττάρων ρυθμίζεται με παρόμοιο τρόπο στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, ένα σημείο λήψης απόφασης προς το τέλος της φάσης G₁, το οποίο ονομάζεται **σημείο περιορισμού** (restriction point), έχει στα ζωικά κύτταρα ανάλογη λειτουργία με αυτή του START στους ζυμομύκητες (**Εικόνα 16.5**). Σε αντίθεση ωστόσο με τους ζυμομύκητες, η πρόοδος του ζωικού κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται κυρίως από εξωκυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και όχι από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Αν υπάρχουν οι κατάλληλοι αυξητικοί

παράγοντες, τα κύτταρα διέρχονται από το σημείο περιορισμού και εισέρχονται στη φάση S. Εφόσον το κύτταρο έχει περάσει το σημείο περιορισμού, είναι δεσμευμένο να διεξαγάγει τη φάση S και τον υπόλοιπο κυτταρικό κύκλο ακόμα και απουσία περαιτέρω διέγερσης από αυξητικούς παράγοντες. Αντίθετα, αν οι κατάλληλοι αυξητικοί παράγοντες δεν είναι διαθέσιμοι στη φάση G_1 , η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου σταματά στο σημείο περιορισμού. Τα στάσιμα κύτταρα στη συνέχεια εισέρχονται σε ένα στάδιο ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου, τη **φάση G_0** (G_0 phase) όπου μπορούν να παραμείνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς να πολλαπλασιαστούν. Τα κύτταρα στη φάση G_0 είναι μεταβολικά ενεργά, αλλά σταματούν να αναπτύσσονται και έχουν μειωμένο ρυθμό πρωτεϊνσύνθεσης. Όπως έχει αναφερθεί, πολλά είδη ζωικών κυττάρων παραμένουν στη φάση G_0 , εκτός αν διεγερθούν για να πολλαπλασιαστούν από κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες ή άλλα εξωκυτταρικά σήματα. Για παράδειγμα, οι ινοβλάστες του δέρματος παραμένουν στη φάση G_0 μέχρι να διεγερθούν και να αρχίσουν να διαιρούνται στην περίπτωση που χρειάζεται να επουλωθεί κάποιο τραύμα. Ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων επάγεται από τον αυξητικό παράγοντα αιμοπεταλίων (PDGF, Platelet-Derived Growth Factor), ο οποίος απελευθερώνεται από αιμοπετάλια κατά την πήξη του αίματος και σηματοδοτεί τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών στην περιοχή του τραυματισμένου ιστού.

Ενώ ο πολλαπλασιασμός των περισσότερων κυττάρων ρυθμίζεται κυρίως στην G_1 , σε ορισμένες περιπτώσεις η ρύθμιση γίνεται κυρίως στην G_2 . Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο κυτταρικός κύκλος του αναπαραγόμενου με διχοτόμηση μύκητα *Schizosaccharomyces pombe* (**Εικόνα 16.6**). Σε αντίθεση με τον *Saccharomyces cerevisiae*, ο κυτταρικός κύκλος του *S. pombe* ρυθμίζεται κυρίως στο σημείο μετάβασης από την G_2 στην M. Αυτό είναι το κύριο σημείο ελέγχου του κυτταρικού μεγέθους και της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Στους ζωικούς οργανισμούς, το κλασικότερο παράδειγμα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στην G_2 συναντάται στα ωοκύτταρα. Τα ωοκύτταρα των σπονδυλωτών μπορούν να παραμείνουν σε στάση στην G_2 για μεγάλα χρονικά διαστήματα (αρκετές δεκαετίες στον άνθρωπο) μέχρι να πυροδοτηθεί η μετάβασή τους στη φάση M μετά από ορμονική διέγερση. Συνεπώς, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ελέγχεται από εξωκυτταρικά σήματα που ρυθμίζουν τόσο τη μετάβαση από τη φάση G_2 του κυτταρικού κύκλου στην M όσο και τη μετάβαση από τη φάση G_1 στην S.

Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Οι μηχανισμοί ελέγχου που συζητήθηκαν παραπάνω ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ανάλογα με το κυτταρικό μέγεθος και ως απόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα, όπως είναι η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών και οι αυξητικοί παράγοντες. Επιπλέον, τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά τα διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου πρέπει να συντονίζονται ώστε να διεξάγονται με τη σωστή σειρά. Για παράδειγμα, είναι ζωτικής σημασίας να μην ξεκινήσει η μίτωση πριν από την ολοκλήρωση της αντιγραφής του γονιδιώματος. Στην αντίθετη περίπτωση, η κυτταρική διαίρεση θα είχε καταστροφικές συνέπειες, αφού τα θυγατρικά κύτταρα δε θα κληρονομούσαν πλήρη αντίγραφα του γενετικού υλικού. Στα περισσότερα κύτταρα, ο συντονισμός μεταξύ των φάσεων του κυτταρικού κύκλου βασίζεται σε μια σειρά από **σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου** (cell cycle checkpoints) που εμποδίζουν την είσοδο στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου πριν από την ολοκλήρωση της φάσης που προηγείται.

Μερικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, που ονομάζονται **σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA** (DNA damage checkpoints), αποτρέπουν την αντιγραφή του DNA στην περίπτωση που φέρει βλάβες, ώστε να αποφευχθεί η μεταβίβασή τους στα θυγατρικά κύτταρα (**Εικόνα 16.7**). Αυτά τα σημεία ελέγχου λειτουργούν ως αισθητήρες για τον εντοπισμό DNA που φέρει βλάβες ή έχει αντιγραφεί ατελώς και συντονίζουν την περαιτέρω πρόοδο του κυτταρικού κύκλου με την ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA ή με την επιδιόρθωσή του. Τα σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA επιτηρούν τις φάσεις G_1 , S και G_2 του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα, το σημείο ελέγχου στην G_2 εμποδίζει την έναρξη της μίτωσης στην περίπτωση που το DNA δεν έχει αντιγραφεί πλήρως ή περιέχει μη επιδιορθωμένα τμήματα με βλάβες. Οι βλάβες του DNA ενεργοποιούν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που προκαλεί τη στάση του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, ο έλεγχος που διεξάγεται στο σημείο ελέγχου της G_2 εμποδίζει την έναρξη της φάσης M μέχρι το γονιδίωμα να αντιγραφεί πλήρως και να επιδιορθωθούν όλες οι βλάβες. Μόνο τότε αίρεται η αναστολή της προόδου της G_2 , επιτρέποντας στο κύτταρο να ξεκινήσει τη μίτωση και να διανείμει τα πλήρως αντιγραμμένα χρωμοσώματα στα θυγατρικά κύτταρα. Εξάλλου, η στάση στο σημείο ελέγχου της G_1 επιτρέπει την επιδιόρθωση οποιασδήποτε βλάβης στο DNA πριν το κύτταρο εισέλθει στη φάση S, όπου το καταστραμμένο DNA θα έπρεπε να αναδιπλασιαστεί. Το σημείο ελέγχου στη φάση S, όχι μόνο παρακολουθεί συνεχώς

την ακεραιότητα του DNA προκειμένου να διασφαλιστεί η επιδιόρθωσή του πριν από την αντιγραφή, αλλά επιπλέον λειτουργεί και ως όργανο ελέγχου ποιότητας, το οποίο προωθεί την επιδιόρθωση τυχόν σφαλμάτων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, όπως η ενσωμάτωση αταίριαστων βάσεων ή η ατελής αντιγραφή ορισμένων περιοχών του DNA.

Ένα άλλο σημαντικό σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, το οποίο διατηρεί την ακεραιότητα του γονιδιώματος, συναντάμε προς το τέλος της μίτωσης (βλ. Εικόνα 16.7). Πρόκειται για το **σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου** (spindle assembly checkpoint), το οποίο παρακολουθεί τη στοίχιση των χρωμοσωμάτων στη μιτωτική άτρακτο ώστε να διασφαλιστεί η διανομή, με ακρίβεια, μιας πλήρους σειράς χρωμοσωμάτων σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Η αποτυχία ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων να στοιχιστούν κανονικά στην άτρακτο προκαλεί στάση της μίτωσης στη μετάφαση, πριν από τον διαχωρισμό των νεοαντιγραμμένων χρωμοσωμάτων. Επομένως, το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου δεν επιτρέπει στα χρωμοσώματα να διαχωριστούν πριν οργανωθεί από μία πλήρης σειρά χρωμοσωμάτων για καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα.

Περιορισμός της αντιγραφής του DNA σε μία μόνο φορά ανά κυτταρικό κύκλο

Το σημείο ελέγχου στην G_2 εμποδίζει την έναρξη της μίτωσης πριν από την ολοκλήρωση της φάσης S, διασφαλίζοντας ότι στα θυγατρικά κύτταρα θα διανεμηθεί πλήρως αντιγραμμένο DNA. Είναι εξίσου σημαντικό να διασφαλιστεί ότι το γονιδίωμα θα αντιγραφεί μόνο μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Επομένως, μετά την αντιγραφή ενός τμήματος DNA στη φάση S, ειδικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί εμποδίζουν την επανέναρξη της αντιγραφής του DNA μέχρι να ολοκληρωθεί ο κυτταρικός κύκλος και να έχει μεσολαβήσει η μίτωση. Όπως συζητήθηκε στο Κεφάλαιο 6, τα κύτταρα των θηλαστικών χρησιμοποιούν χιλιάδες θέσεις έναρξης για την αντιγραφή του DNA τους. Συνεπώς, η έναρξη της αντιγραφής σε καθεμία από αυτές τις θέσεις έναρξης πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, ώστε κάθε τμήμα του γονιδιώματος να αντιγράφεται μόνο μία φορά κατά τη φάση S σε κάθε κυτταρικό κύκλο.

Στο μοριακό μηχανισμό που δεν επιτρέπει την αντιγραφή του DNA περισσότερες από μία φορές ανά κυτταρικό κύκλο εμπλέκεται η δράση των ελικασών MCM που

προσδένονται στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής μαζί με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο αναγνώρισης της θέσης έναρξης της αντιγραφής (ORC, Origin Recognition Complex) (βλ. Εικόνα 6.15). Οι πρωτεΐνες MCM ρυθμίζονται από «παράγοντες αδειοδότησης» (licensing factors) που επιτρέπουν την έναρξη της αντιγραφής (**Εικόνα 16.8**). Η ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών MCM στο DNA ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα να προσδένονται σε θέσεις έναρξης της αντιγραφής μόνο κατά τη φάση G₁ και να επιτρέπεται η έναρξη της αντιγραφής του DNA όταν το κύτταρο εισέρχεται στη φάση S. Αμέσως μετά την έναρξη της αντιγραφής, οι πρωτεΐνες MCM εκτοπίζονται από τις θέσεις έναρξης, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η επανέναρξη της αντιγραφής μέχρι το κύτταρο να περάσει από τη μίτωση και να εισέλθει στη φάση G₁ του επόμενου κύκλου. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών MCM στο DNA κατά τις φάσεις S, G₂ και M του κυτταρικού κύκλου παρεμποδίζεται από τη δράση πρωτεϊνικών κινασών που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (βλ. επόμενη ενότητα).

16.2 Ρυθμιστές της προόδου του κυτταρικού κύκλου

Μία από τις πιο συναρπαστικές ανακαλύψεις στη σύγχρονη κυτταρική βιολογία είναι η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι γνώσεις μας για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου έχουν προέλθει από την πειραματική ανάλυση οργανισμών τόσο ετερόκλητων, όπως είναι οι ζυμομύκητες, οι αχινοί, οι βάτραχοι και τα θηλαστικά. Από τις μελέτες αυτές αποκαλύφθηκε ότι ο κυτταρικός κύκλος όλων των ευκαρυωτών ρυθμίζεται από μια συντηρημένη ομάδα πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες ευθύνονται για την ενεργοποίηση των καθοριστικών μηχανισμών μετάβασης από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Τρεις διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις οδήγησαν στην ταυτοποίηση των ρυθμιστικών μορίων που κατευθύνουν τον κυτταρικό κύκλο. Η πρώτη προσέγγιση αφορούσε τη μελέτη ωοκυττάρων βατράχου (**Εικόνα 16.9**). Τα ωοκύτταρα αυτά παραμένουν σταματημένα στη φάση G₂ του κυτταρικού κύκλου μέχρι να πυροδοτηθεί, με ορμονική διέγερση, η είσοδός τους στη φάση M της μείωσης

(συζητείται παρακάτω σε αυτό το κεφάλαιο). Το 1971, δύο ομάδες ερευνητών (οι Yoshio Masui και Clement Markert και οι Dennis Smith και Robert Ecker) ανακάλυψαν, ανεξάρτητα η μία από την άλλη, ότι τα ωοκύτταρα που βρίσκονται σταματημένα στην G_2 μπορούσαν να διεγερθούν για να εισέλθουν στη φάση M με μικροένεση κυτταροπλάσματος από ωοκύτταρα που είχαν υποστεί ορμονική διέγερση. Ήταν λοιπόν προφανές ότι ένας παράγοντας από το κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων στα οποία είχε χορηγηθεί ορμόνη πυροδοτούσε τη μετάβαση από τη φάση G_2 στην M στα ωοκύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί σε ορμόνη. Επειδή η είσοδος των ωοκυττάρων στη μείωση αναφέρεται συχνά ως ωρίμανση του ωοκυττάρου, αυτός ο κυτταροπλασματικός παράγοντας ονομάστηκε **παράγοντας προώθησης της ωρίμανσης** (MPF, Maturation Promoting Factor). Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η δράση του MPF δεν περιορίζεται στην είσοδο των ωοκυττάρων στη μείωση. Ο MPF βρίσκεται και στα σωματικά κύτταρα, όπου ευθύνεται για την επαγωγή της εισόδου στη φάση M του μιτωτικού κύκλου. Δηλαδή ο MPF δρα ως γενικός ρυθμιστής της μετάβασης από την G_2 στην M και η δράση του δεν περιορίζεται αποκλειστικά στα ωοκύτταρα.

Η δεύτερη προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την κατανόηση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου αφορούσε τη γενετική ανάλυση ζυμομυκήτων, με πρωτοπόρους τον Lee Hartwell και τους συνεργάτες του στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Μελετώντας τον αναπαραγόμενο με εκβλάστηση ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, οι ερευνητές αυτοί ταυτοποίησαν θερμοευαίσθητα μεταλλάγματα που παρουσίαζαν ελαττωματική πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των μεταλλαγμάτων ήταν ότι η ανάπτυξή τους σταματούσε σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου και γι' αυτό ονομάστηκαν μεταλλάγματα *cdc* (cell division cycle mutants: μεταλλάγματα του κύκλου της κυτταρικής διαίρεσης). Για παράδειγμα, σε ένα ιδιαίτερα σημαντικό μέταλλαγμα, το οποίο ονομάστηκε *cdc28*, ο κυτταρικός κύκλος σταματούσε στο σημείο START, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη Cdc28 ήταν απαραίτητη για τη διέλευση από το καθοριστικό αυτό ρυθμιστικό σημείο της G_1 (**Εικόνα 16.10**). Μια ομάδα παρόμοιων μεταλλαγμάτων του κυτταρικού κύκλου απομονώθηκε από τον Paul Nurse και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελετούσαν τον αναπαραγόμενο με διχοτόμηση μύκητα *Schizosaccharomyces pombe*. Στα μεταλλάγματα αυτά περιλαμβάνονταν το *cdc2*. Στα κύτταρα με τη μεταλλαγή *cdc2*, ο κυτταρικός κύκλος σταματούσε τόσο στην G_1 όσο και στο όριο των φάσεων G_2 και M, το οποίο είναι το κύριο ρυθμιστικό σημείο στους

ζυμομύκητες που αναπαράγονται με διχοτόμηση. Συγκρίνοντας το γονίδιο *cdc28* του *S. cerevisiae* με το *cdc2* του *S. pombe*, βρέθηκε ότι είναι λειτουργικά ομόλογα γονίδια, απαραίτητα τόσο για τη διέλευση από το START όσο και για την είσοδο στη μίτωση και στα δύο είδη ζυμομύκητα. Περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι τα *cdc2* και *cdc28* κωδικοποιούν μια πρωτεϊνική κινάση, γεγονός που αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη για τον κύριο ρόλο της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, συγγενικά γονίδια ταυτοποιήθηκαν και σε άλλους ευκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Η πρωτεϊνική κινάση που κωδικοποιείται από τα γονίδια *cdc2* και *cdc28* είναι ένας ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου συντηρημένος σε όλους τους ευκαρυώτες, ο οποίος είναι γνωστός ως κινάση **Cdk1**.

Η τρίτη ερευνητική προσέγγιση που τελικά συνέκλινε με την ταυτοποίηση του MPF και τη γενετική των ζυμομυκήτων αφορούσε τη μελέτη της πρωτεϊνοσύνθεσης σε πρώιμα έμβρυα αχινών. Μετά τη γονιμοποίηση, τα έμβρυα αυτά διεξάγουν μια σειρά γρήγορων κυτταρικών διαιρέσεων. Η χρήση καταστολέων της πρωτεϊνοσύνθεσης αποκάλυψε το αξιοπερίεργο γεγονός ότι για την είσοδο στη φάση M αυτών των εμβρυϊκών κυτταρικών κύκλων είναι απαραίτητη η πρωτεϊνοσύνθεση. Το 1983, ο Tim Hunt και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν δύο πρωτεΐνες που εμφάνιζαν ένα περιοδικό πρότυπο συσσώρευσης και αποικοδόμησης σε έμβρυα αχινών και στρειδιών. Αυτές οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της μεσόφασης και στη συνέχεια αποικοδομούνται ταχύτατα προς το τέλος κάθε μίτωσης (**Εικόνα 16.11**). Ο Hunt ονόμασε τις πρωτεΐνες αυτού του τύπου **κυκλίνες** (cyclins), και πιο συγκεκριμένα κυκλίνη A και κυκλίνη B. Διατύπωσε μάλιστα την υπόθεση ότι οι κυκλίνες λειτουργούν ως επαγωγείς της μίτωσης και ότι η περιοδική τους συσσώρευση και αποικοδόμηση ρυθμίζουν την είσοδο και την έξοδο από τη φάση M. Η υπόθεσή του αυτή υποστηρίχτηκε άμεσα από την έρευνα της Joan Ruderman και των συνεργατών της το 1986, όταν παρατήρησαν ότι μια μικροένεση κυκλίνης A σε ωοκύτταρα βατράχου είναι επαρκής για να πυροδοτήσει τη μετάβαση από την G₂ στην M.

Αυτές οι τρεις ανεξάρτητες προσεγγίσεις οδηγήθηκαν σε σύγκλιση το 1988, όταν στο εργαστήριο του James Maller απομονώθηκε ο MPF από ωάρια βατράχου. Στη συνέχεια, με το μοριακό χαρακτηρισμό του MPF σε διάφορα εργαστήρια αποκαλύφθηκε ότι ο συντηρημένος αυτός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου αποτελείται από δύο υπομονάδες: τη Cdk1 και την κυκλίνη B (**Εικόνα 16.12**). Η

κυκλίνη B είναι μια ρυθμιστική υπομονάδα απαραίτητη για την καταλυτική ενεργότητα της πρωτεϊνικής κινάσης Cdk1, γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι η ενεργότητα του MPF ρυθμίζεται μέσω της περιοδικής συσσώρευσης και αποικοδόμησης της κυκλίνης B κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Αργότερα, ο ρόλος της κυκλίνης B επιβεβαιώθηκε από πολλές ανεξάρτητες μελέτες, με τις οποίες αποδείχθηκε επίσης ότι ο MPF ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσης και της αποφωσφορυλίωσης της Cdk1 (**Εικόνα 16.13**). Στα κύτταρα των θηλαστικών, η κυκλίνη B συντίθεται και σχηματίζει σύμπλοκα με τη Cdk1 κατά την G₂. Καθώς σχηματίζονται τα σύμπλοκα, η Cdk1 φωσφορυλιώνεται σε δύο καθοριστικές ρυθμιστικές θέσεις. Η μία από αυτές τις φωσφορυλίώσεις (στη θρεονίνη 161) είναι απαραίτητη για την ενεργότητα κινάσης της Cdk1. Η δεύτερη φωσφορυλίωση γίνεται στην τυροσίνη 15, και στα κύτταρα των σπονδυλωτών συνοδεύεται από τη φωσφορυλίωση και της παρακαείμενης θρεονίνης 14. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης 15, η οποία καταλύεται από μια πρωτεϊνική κινάση που ονομάζεται Wee1, καταστέλλει την ενεργότητα της Cdk1, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται ανενεργά σύμπλοκα Cdk1/κυκλίνης B σε όλη τη διάρκεια της G₂. Στη συνέχεια, για τη μετάβαση από την G₂ στην M είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της αποφωσφορυλίωσης της θρεονίνης 14 και της τυροσίνης 15 από μια πρωτεϊνική φωσφατάση που ονομάζεται Cdc25.

Μόλις η πρωτεϊνική κινάση Cdk1 ενεργοποιηθεί, φωσφορυλιώνει διάφορες πρωτεΐνες-στόχους, οι οποίες ευθύνονται για την έναρξη των γεγονότων της φάσης M (βλ. παρακάτω). Επιπλέον, η ενεργότητα της Cdk1 πυροδοτεί την αποικοδόμηση της κυκλίνης B με πρωτεόλυση που εξαρτάται από την ουβικιτίνη. Η αποικοδόμηση της κυκλίνης B απενεργοποιεί τη Cdk1 προκαλώντας έξοδο του κυττάρου από τη μίτωση, κυτταροκίνηση και επιστροφή στη μεσόφαση.

Οικογένειες κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών

Η κατανόηση της δομής και της λειτουργίας του MPF (σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B) αποκάλυψε τη μοριακή βάση του μηχανισμού εισόδου και εξόδου από τη φάση M και αποτέλεσε ένα χρησιμότερο υπόδειγμα για την κατανόηση της ρύθμισης και άλλων σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B συνέβαλε σημαντικά στην αποκρυπτογράφηση του

μηχανισμού της ρύθμισης ολόκληρου του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι τόσο η Cdk1 όσο και η κυκλίνη B ανήκουν σε οικογένειες συγγενικών πρωτεϊνών, τα μέλη των οποίων ρυθμίζουν διαφορετικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, η Cdk1 ελέγχει τη διέλευση από το σημείο START, καθώς και την είσοδο στη μίτωση στους ζυμομύκητες. Εντούτοις, για τον έλεγχο στα δύο αυτά σημεία η Cdk1 συνδέεται με διαφορετικές κυκλίνες (**Εικόνα 16.14**). Συγκεκριμένα, για τη μετάβαση από την G₂ στην M απαιτείται η δράση της Cdk1 σε σύμπλοκο με τις μιτωτικές κυκλίνες τύπου B (Clb, b-type Cyclins) Clb1, Clb2, Clb3 και Clb4. Η διέλευση από το σημείο START όμως ελέγχεται από την Cdk1 σε συνδυασμό με μια άλλη κατηγορία κυκλινών οι οποίες ονομάζονται **κυκλίνες της G₁** (G₁ cyclins) ή **Cln** (Cln, Cyclins). Στη συνέχεια, η Cdk1 συνδέεται με διαφορετικές κυκλίνες τύπου B, τις Clb5 και Clb6, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διέλευση από τη φάση S. Η σύνδεση της Cdk1 με κυκλίνες τύπου B ή με κυκλίνες της G₁ καθορίζει ποιες πρωτεΐνες-υποστρώματα θα φωσφορυλιώσει η Cdk1, ανάλογα με τις απαιτήσεις κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου.

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο κυτταρικός κύκλος δε ρυθμίζεται μόνο από τις διάφορες κυκλίνες αλλά και από μια ποικιλία πρωτεϊνικών κινασών που σχετίζονται με τη Cdk1, οι οποίες είναι γνωστές ως **κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες** (Cdk, Cyclin-dependent kinases). Τα μέλη της οικογένειας των Cdk συνδέονται με συγκεκριμένες κυκλίνες και δημιουργούν σύμπλοκα απαραίτητα για την προώθηση κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου (βλ. Εικόνα 16.14). Για παράδειγμα, η μετάβαση από τη φάση G₁ στην S ρυθμίζεται κυρίως από τις Cdk2, Cdk4 και Cdk6 σε σύμπλοκο με την κυκλίνη D ή με την κυκλίνη E. Τα σύμπλοκα των Cdk4 και Cdk6 με κυκλίνες τύπου D (κυκλίνες D1, D2 και D3) πρωταγωνιστούν στη διέλευση από το σημείο περιορισμού της G₁. Οι κυκλίνες τύπου E (E1 και E2) εκφράζονται αργότερα στην G₁ και τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E είναι απαραίτητα για τη μετάβαση από την G₁ στην S και για την έναρξη της σύνθεσης του DNA. Σύμπλοκα της Cdk2 με κυκλίνες τύπου A (A1 και A2) δρουν κατά τη διάρκεια της φάσης S. Στη συνέχεια, η Cdk1 ρυθμίζει τη διέλευση από την S στην G₂ και από την G₂ στην M σε σύμπλοκο με κυκλίνες τύπου A και με κυκλίνες τύπου B (B1, B2 και B3) αντίστοιχα.

Μολονότι τα διάφορα σύμπλοκα Cdk/κυκλίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες δρουν σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου, η μελέτη των Cdk και των κυκλινών σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια αποκάλυψε ένα εκπληκτικά υψηλό επίπεδο

πλαστικότητας, καθώς σε μεταλλαγμένα ποντίκια, διαφορετικές κυκλίνες και Cdk μπορούν να αναπληρώσουν την απώλεια άλλων κυκλινών ή Cdk. Η πιο εντυπωσιακή παρατήρηση αφορούσε κύτταρα τα οποία στερούνταν όλες τις Cdk που δρουν κατά τη μεσόφαση (Cdk2, Cdk4 και Cdk6), και κατά παράδοξο τρόπο μπορούσαν να πολλαπλασιάζονται. Η ανάλυσή τους έδειξε ότι, απουσία άλλων Cdk, η Cdk1 προσδένεται σε όλες τις κυκλίνες και ρυθμίζει όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, τα ποντίκια που στερούνται τη Cdk1 δεν μπορούν να αναπτυχθούν. Επομένως, η Cdk1 είναι η μόνη απαραίτητη Cdk στα κύτταρα των θηλαστικών (όπως και στους ζυμομύκητες) και μπορεί να αντικαταστήσει όλες τις άλλες Cdk όταν απουσιάζουν.

Η ενεργότητα των Cdk κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τέσσερις μοριακούς μηχανισμούς (**Εικόνα 16.15**). Όπως ήδη αναφέρθηκε για τη Cdk1, το πρώτο επίπεδο ρύθμισης βασίζεται στη σύνδεση των Cdk με τις αντίστοιχες κυκλίνες τους. Κατά συνέπεια, ο σχηματισμός ειδικών συμπλόκων Cdk/κυκλίνης ρυθμίζεται από τη σύνθεση και την αποικοδόμηση των κυκλινών. Ο δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης της ενεργοποίησης των συμπλόκων Cdk/κυκλίνης αφορά τη φωσφορυλίωση μιας συντηρημένης θρεονίνης των Cdk η οποία εντοπίζεται γύρω από τη θέση 160. Η φωσφορυλίωση αυτή καταλύεται από το ένζυμο CAK (Cdk-Activating Kinase: κινάση που ενεργοποιεί τη Cdk). Μάλιστα, το ίδιο το ένζυμο CAK είναι σύμπλοκο που αποτελείται από μια κινάση Cdk, τη Cdk7, και από την κυκλίνη H. Το σύμπλοκο Cdk7/κυκλίνης H συνδέεται και με τον μεταγραφικό παράγοντα TFIIF, ο οποίος είναι απαραίτητος για την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II (βλ. Κεφάλαιο 6). Επομένως, η Cdk7 είναι ένα μέλος της οικογένειας των Cdk το οποίο συμμετέχει τόσο στη μεταγραφή όσο και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Ο τρίτος μηχανισμός ρύθμισης των Cdk βασίζεται στη φωσφορυλίωση τυροσινών κοντά στο αμινοτελικό άκρο των Cdk, η οποία καταλύεται από την πρωτεϊνική κινάση Wee1. Σε αντίθεση με τη φωσφορυλίωση από τη CAK, η φωσφορυλίωση από τη Wee1 προκαλεί την καταστολή των Cdk. Συγκεκριμένα, τόσο η Cdk1 όσο και η Cdk2 καταστέλλονται από τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης 15 (στα σπονδυλωτά καταστέλλονται και από τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 14). Αυτές οι Cdk στη συνέχεια ενεργοποιούνται με αποφωσφορυλίωση των παραπάνω αμινοξέων από πρωτεϊνικές φωσφατάσες της οικογένειας Cdc25.

Η ενεργότητα των Cdk ρυθμίζεται επίσης από κατασταλτικές πρωτεΐνες, τους **αναστολείς των Cdk** (CKI, Cdk Inhibitors). Στα κύτταρα των θηλαστικών, δύο οικογένειες αναστολέων των Cdk ευθύνονται για τη ρύθμιση διαφορετικών Cdk (**Πίνακας 16.1**). Μέλη της οικογένειας Ink4 προσδένονται ειδικά στις Cdk4 και Cdk6 και τις καταστέλλουν, λειτουργώντας κατά συνέπεια ως καταστολείς της προόδου της G₁. Αντίθετα, μέλη της οικογένειας Cip/Kip προσδένονται ταυτόχρονα τόσο σε κυκλίνες όσο και σε Cdk και μπορούν να καταστέλλουν την ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης των συμπλόκων κυκλίνης/Cdk. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες Cip/Kip επιδρούν στα διάφορα σύμπλοκα κυκλίνης/Cdk με διαφορετικό τρόπο. Για παράδειγμα, πρωτεΐνες Cip/Kip μπορούν να διευκολύνουν το σχηματισμό συμπλόκων Cdk4 και Cdk6 με την κυκλίνη D, με συνέπεια να μην καταστέλλουν αλλά να διεγείρουν την ενεργότητα αυτών των Cdk. Επίσης, η επίδραση πρωτεϊνών Cip/Kip σε σύμπλοκα Cdk1/κυκλίνης B ρυθμίζεται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε κάτω από ορισμένες συνθήκες οι πρωτεΐνες Cip/Kip να επάγουν αντί να καταστέλλουν τη μετάβαση από την G₂ στην M. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες Cip/Kip διακρίνονται για την κατασταλτική τους επίδραση σε σύμπλοκα της Cdk2 με την κυκλίνη A ή με την κυκλίνη E, καταστέλλοντας επομένως την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσα από τις φάσεις G₁ και S. Συνεπώς, ο έλεγχος που ασκείται από την Ink4 και τις πρωτεΐνες Cip/Kip παρέχει έναν επιπρόσθετο μηχανισμό για τη ρύθμιση της ενεργότητας των Cdk. Η συνδυασμένη δράση των πολλαπλών μηχανισμών ρύθμισης των Cdk ευθύνεται για τον έλεγχο της προόδου του κυτταρικού κύκλου σε συντονισμό τόσο με τα σημεία ελέγχου όσο και με τα διάφορα εξωκυτταρικά ερεθίσματα που επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Πλαίσιο 1: Ορισμένα μεταλλάγματα του κυτταρικού κύκλου του *S. pombe*, τα οποία απομονώθηκαν από τον Paul Nurse και τους συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο του Εδιμβούργου, αναγνωρίστηκαν επειδή τα κύτταρα διαιρούνταν όταν είχαν μικρότερο μέγεθος από το κανονικό. Τα μεταλλάγματα αυτά ονομάστηκαν *Wee* από τη σκοτσέζικη λέξη που σημαίνει μικρό.

Αυξητικοί παράγοντες και η ρύθμιση των Cdk της G₁

Όπως έχει συζητηθεί, ο πολλαπλασιασμός των ζωικών κυττάρων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από διάφορους εξωκυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν τη διέλευση των κυττάρων από το σημείο περιορισμού που εντοπίζεται προς το τέλος της φάσης G₁. Απουσία αυξητικών παραγόντων, τα κύτταρα δεν

μπορούν να διέλθουν από το σημείο περιορισμού και συχνά εισέρχονται στην κατάσταση ηρεμίας που είναι γνωστή ως G_0 , από την οποία μπορούν να επανέλθουν στον κυτταρικό κύκλο ως απόκριση στη διέγερση από αυξητικούς παράγοντες. Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα εξωκυτταρικών αυξητικών παραγόντων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία διεγείρονται από τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων (βλ. Κεφάλαιο 15) ρυθμίζουν διάφορα στοιχεία του μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου.

Ένα καθοριστικό σημείο σύνδεσης της σηματοδότησης από αυξητικούς παράγοντες με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου αποτελούν οι κυκλίνες τύπου D (**Εικόνα 16.16**). Η σύνθεση της κυκλίνης D1 επάγεται από αυξητικούς παράγοντες, εν μέρει μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK, και συνεχίζεται για όσο διάστημα οι αυξητικοί παράγοντες είναι διαθέσιμοι. Ωστόσο, η κυκλίνη D1 αποικοδομείται ταχύτατα μετά την απομάκρυνση των αυξητικών παραγόντων και η συγκέντρωσή της μειώνεται ραγδαία. Επομένως, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμοι αυξητικοί παράγοντες κατά την G_1 , δημιουργούνται σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D1 τα οποία προωθούν τη διέλευση από το σημείο περιορισμού. Αν όμως οι αυξητικοί παράγοντες απομακρυνθούν πριν από αυτό το καθοριστικό ρυθμιστικό σημείο του κυτταρικού κύκλου, τα επίπεδα της κυκλίνης D1 μειώνονται ταχύτατα και τα κύτταρα δεν μπορούν να μεταβούν από την G_1 στην S, αλλά εισέρχονται στην G_0 . Με άλλα λόγια, η δυνατότητα επαγωγής της σύνθεσής της και η ταχύτατη ανακύκλωση της κυκλίνης D1 επιτρέπουν τη σύνδεση της σηματοδότησης από αυξητικούς παράγοντες με το μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου, επιτρέποντας τη ρύθμιση της διέλευσης των κυττάρων από την G_1 ανάλογα με τη διαθεσιμότητα εξωκυτταρικών αυξητικών παραγόντων.

Δεδομένου ότι η κυκλίνη D1 είναι ένας σημαντικός στόχος της σηματοδότησης από αυξητικούς παράγοντες, θα ήταν αναμενόμενο ότι η αδυναμία στη ρύθμιση της κυκλίνης D1 μπορεί να συνεισφέρει στην ανεξέλεγκτη αύξηση, χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι το ποσοστό των καρκίνων του ανθρώπου που οφείλονται στην ελαττωματική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι περίπου ίσο με το ποσοστό των καρκίνων που προκαλούνται από την ελαττωματική ρύθμιση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (βλ. Κεφάλαιο 15). Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις που προκαλούν ιδιοστατική έκφραση της κυκλίνης D1 εμπλέκονται στην ανάπτυξη

πολλών τύπων καρκίνου του ανθρώπου, όπως είναι τα λεμφώματα και ο καρκίνος του στήθους. Εξάλλου, μεταλλάξεις οι οποίες απενεργοποιούν τους αναστολείς Ink4 που προσδένονται στη Cdk4 και στη Cdk6 εντοπίζονται πολύ συχνά σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα.

Η σύνδεση της κυκλίνης D με τη ρύθμιση της ανάπτυξης και τον καρκίνο ενισχύεται επιπλέον από το γεγονός ότι μία από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες-υποστρώματα των συμπλόκων Cdk4, 6/κυκλίνης D συχνά βρίσκεται μεταλλαγμένη σε πολλούς ανθρώπινους όγκους. Πρόκειται για την πρωτεΐνη **Rb**, η οποία ταυτοποιήθηκε αρχικά ως το γονιδιακό προϊόν που ευθύνεται για το ρετινοβλάστωμα, έναν σπάνιο κληρονομικό καρκίνο του οφθαλμού που εμφανίζεται στην παιδική ηλικία (βλ. Κεφάλαιο 18). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις που απενεργοποιούν την πρωτεΐνη Rb δεν περιορίζονται στο ρετινοβλάστωμα, αλλά συνεισφέρουν και σε πολλούς άλλους κοινούς ανθρώπινους καρκίνους. Το γονίδιο *Rb* είναι υπόδειγμα **ογκοκατασταλτικού γονιδίου** (tumor suppressor gene), δηλαδή ενός γονιδίου του οποίου η απενεργοποίηση οδηγεί στην ανάπτυξη όγκου. Ενώ οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια, όπως η Ras (βλ. Κεφάλαιο 15) και η κυκλίνη D, επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια (συμπεριλαμβανομένων της Rb και των αναστολέων των Cdk της οικογένειας Ink4) λειτουργούν ως τροχοπέδη που επιβραδύνει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Έχει επίσης βρεθεί ότι η Rb και άλλες συγγενικές της πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια Rb συνδέουν τον μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου με την έκφραση γονιδίων που είναι απαραίτητα τόσο για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όσο και για τη σύνθεση του DNA (**Εικόνα 16.17**). Η ενεργότητα των πρωτεϊνών Rb ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, η Rb φωσφορυλιώνεται από σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D καθώς τα κύτταρα διέρχονται από το σημείο περιορισμού της G₁. Στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της (κατά την G₀ ή νωρίς στην G₁), η Rb προσδένεται σε μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας **E2F**, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου που κωδικοποιεί την κυκλίνη E. Ο E2F μπορεί να προσδεθεί στις αλληλουχίες-στόχους του ανεξάρτητα από την παρουσία της Rb. Ωστόσο, η Rb δρα ως καταστολέας και το σύμπλοκο Rb/E2F καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον E2F. Η φωσφορυλίωση της Rb από σύμπλοκα Cdk4,

6/κυκλίνης D προκαλεί την αποδέσμευσή της από τον E2F, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. Επομένως, η Rb δρα ως μοριακός διακόπτης που μετατρέπει τον E2F από καταστολέα σε ενεργοποιητή των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η ρύθμιση της Rb με φωσφορυλίωση από τα σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D συνδέει τον καθοριστικό αυτό μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης με τη διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων κατά την G₁.

Η διέλευση από το σημείο περιορισμού της G₁ και η είσοδος στη φάση S καθορίζονται από την ενεργοποίηση των συμπλόκων Cdk2/κυκλίνης E (**Εικόνα 16.18**). Η ενεργοποίηση των συμπλόκων αυτών οφείλεται εν μέρει στην επαγωγή της σύνθεσης κυκλίνης E από τον E2F μετά τη φωσφορυλίωση της Rb. Επιπλέον, η ενεργότητα του συμπλόκου Cdk2/κυκλίνης E καταστέλλεται κατά την G₀ ή νωρίς κατά τη φάση G₁ από τον αναστολέα των Cdk, p27, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια Cip/Kip (βλ. Πίνακα 16.1). Η καταστολή της Cdk2 από τον p27 αναιρείται με πολλαπλούς μηχανισμούς καθώς τα κύτταρα διέρχονται από την G₁. Πρώτον, η σηματοδότηση από αυξητικούς παράγοντες, τόσο μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης Ras/Raf/MEK/ERK όσο και μέσω του μονοπατιού των κινασών PI 3/Akt, καταστέλλει τη μεταγραφής και της μετάφρασης του p27, μειώνοντας τα ενδοκυτταρικά του επίπεδα. Επιπλέον, ο αυξημένος ρυθμός σύνθεσης της κυκλίνης D προκαλεί τη δέσμευση του p27 σε σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D, με αποτέλεσμα ο p27 να μην μπορεί να προσδεθεί σε σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E. Όταν η Cdk2 ενεργοποιηθεί, φωσφορυλιώνει τον p27 και πυροδοτεί την ουβικιτινίωσή του, προκαλώντας την πλήρη αποικοδόμησή του. Στη συνέχεια, αυτός ο βρόχος θετικής ανάδρασης προκαλεί την πλήρη ενεργοποίηση των συμπλόκων Cdk2/κυκλίνης E. Η Cdk2 φωσφορυλιώνει και την Rb, ολοκληρώνοντας την απενεργοποίησή της. Ακολούθως, τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E ενεργοποιούν τις ελικάσες MCM στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής (βλ. Εικόνα 16.8), προκαλώντας την έναρξη της σύνθεσης του DNA και την είσοδο στη φάση S.

Σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ρυθμίζεται όχι μόνο από αυξητικούς παράγοντες αλλά και από ποικίλα σήματα που δρουν καταστέλλοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Τα σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA είναι εξαιρετικά σημαντικά για τη

διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, επειδή προκαλούν στάση του κυτταρικού κύκλου στην περίπτωση που ανιχνευθούν βλάβες στο DNA ή αν δεν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή. Αυτά τα σημεία ελέγχου, τα οποία δρουν κατά τη διάρκεια των φάσεων G_1 , S και G_2 του κυτταρικού κύκλου, εξασφαλίζουν αρκετό χρόνο για την επιδιόρθωση των βλαβών προτού συνεχιστεί η αντιγραφή DNA ή η κυτταρική διαίρεση (βλ. Εικόνα 16.7).

Η στάση του κυτταρικού κύκλου προκαλείται από δύο συγγενικές πρωτεϊνικές κινάσες, τις **ATM** και **ATR**, οι οποίες ενεργοποιούνται ως απόκριση σε βλάβες στο DNA. Στη συνέχεια, οι ATM και ATR ενεργοποιούν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί σε κυτταρική στάση, αλλά και στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και, σε ορισμένες περιπτώσεις, σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η σημασία αυτής της απόκρισης σε βλάβες στο DNA φαίνεται από το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αυτές ταυτοποιήθηκαν αρχικά από μεταλλάξεις στο γονίδιο της ATM που θεωρήθηκαν υπεύθυνες για την ασθένεια αταξία-τελαγγειεκτασία, κατά την οποία εκδηλώνονται ανωμαλίες στο νευρικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και υψηλή συχνότητα καρκίνου.

Τόσο η ATM όσο και η ATR είναι συστατικά πρωτεϊνικών συμπλόκων που αναγνωρίζουν, αντίστοιχα, βλάβες στο DNA και περιοχές του DNA στις οποίες δεν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή (**Εικόνα 16.19**). Η ATM ενεργοποιείται από **δίκλωνες ρήξεις του DNA**, ενώ η ATR ενεργοποιείται από μονόκλωνο ή μη αντιγραμμένο DNA. Όταν οι ATM και ATR ενεργοποιηθούν, φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις **κινάσες σημείου ελέγχου** (Chk, Checkpoint kinases) Chk2 και Chk1 αντίστοιχα. Οι Chk2 και Chk1 επάγουν στάση του κυτταρικού κύκλου φωσφορυλιώνοντας και καταστέλλοντας τις φωσφατάσες Cdc25 ή επάγοντας την αποικοδόμησή τους. Οι φωσφατάσες Cdc25 είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των κινασών Cdk1 και Cdk2 καθώς αφαιρούν τις κατασταλτικές φωσφορυλιώσεις κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (βλ. Εικόνα 16.15). Επομένως, οι βλάβες στο DNA καταστέλλουν τόσο τη Cdk2, η οποία προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στην G_1 και στην S, όσο και τη Cdk1, η οποία προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στην G_2 .

Στα κύτταρα των θηλαστικών, η στάση στο σημείο ελέγχου της G_1 μπορεί να προκληθεί και από τη δράση μιας επιπλέον πρωτεΐνης που ονομάζεται **p53** και φωσφορυλιώνεται τόσο από την ATM όσο και από τη Chk2 (**Εικόνα 16.20**). Στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της η p53 αποικοδομείται ταχύτατα. Ωστόσο, όταν

φωσφορυλιωθεί, σταθεροποιείται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται άμεσα η συγκέντρωσή της ως απόκριση στην ανίχνευση βλαβών στο DNA. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που, όταν βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση, προκαλεί την επαγωγή της πρωτεΐνης p21, ενός αναστολέα των Cdk της οικογένειας Cip/Kip. Η p21 καταστέλλει τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E, προκαλώντας τη στάση του κυτταρικού κύκλου στην G₁ (βλ. Πίνακα 16.1).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την p53 έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς συχνά είναι μεταλλαγμένο σε ανθρώπινα ογκοκύτταρα. Η απώλεια της λειτουργίας της p53 εξαιτίας αυτών των μεταλλαγών αποτρέπει τη στάση στην G₁ ακόμα κι αν υπάρχουν βλάβες στο DNA. Κατά συνέπεια, το DNA με τις βλάβες αντιγράφεται στα μεταλλαγμένα κύτταρα και μεταβιβάζεται στα θυγατρικά κύτταρα χωρίς να έχει επιδιορθωθεί. Η δυνατότητα μεταβίβασης γενετικού υλικού με βλάβες συνεπάγεται αυξημένη συχνότητα μεταλλαγών και γενική αστάθεια του κυτταρικού γονιδιώματος οι οποίες συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Οι μεταλλαγές του γονιδίου p53 είναι από τις πιο συνηθισμένες γενετικές τροποποιήσεις στους ανθρώπινους καρκίνους (βλ. Κεφάλαιο 18), γεγονός που αναδεικνύει την καθοριστική σημασία της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου στους πολυκύτταρους οργανισμούς.

16.3 Τα γεγονότα της φάσης M

Η φάση M είναι η πιο εντυπωσιακή περίοδος του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία αναδιοργανώνονται οι περισσότερες από τις δομές που συνιστούν το κύτταρο. Κατά τη μίτωση (τη διαίρεση του πυρήνα), τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται, ο πυρηνικός φάκελος στα περισσότερα είδη κυττάρων αποσυναρμολογείται, ο κυτταροσκελετός αναδιοργανώνεται για να σχηματιστεί η μιτωτική άτρακτος και τα χρωμοσώματα μετακινούνται προς αντίθετους πόλους. Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων συνήθως ακολουθείται από κυτταρική διαίρεση (κυτταροκίνηση). Τα γεγονότα αυτά έχουν ήδη συζητηθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, αλλά εδώ επανεξετάζονται στο πλαίσιο μιας θεώρησης της φάσης M σε συνδυασμό με τη δράση του παράγοντα MPF (σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B).

Τα στάδια της μίτωσης

Παρόλο που στα κύτταρα διαφορετικών οργανισμών η μίτωση εμφανίζει πολλές διαφορές σε ορισμένες λεπτομέρειες, οι θεμελιώδεις διαδικασίες που διασφαλίζουν τον αξιόπιστο διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων είναι συντηρημένες σε όλους τους ευκαρυώτες. Τα βασικά γεγονότα της μίτωσης είναι η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου και η σύνδεση των χρωμοσωμάτων με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου. Τελικά, οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται και μετακινούνται προς τους αντίθετους πόλους της ατράκτου, όπου σχηματίζονται οι θυγατρικοί πυρήνες.

Η μίτωση χωρίζεται σε τέσσερα στάδια: την **πρόφαση** (prophase), τη **μετάφαση** (metaphase), την **ανάφαση** (anaphase) και την **τελόφαση** (telophase), όπως παρουσιάζονται για ένα ζωικό κύτταρο στις **Εικόνες 16.21** και **16.22**. Η αρχική φάση της πρόφασης χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων, καθένα από τα οποία αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες (τα θυγατρικά μόρια DNA που σχηματίστηκαν κατά τη φάση S). Αυτά τα νεοαντιγραμμένα μόρια DNA παραμένουν στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους κατά τις φάσεις S και G₂, ενώ αρχίζουν να διακρίνονται ως ξεχωριστές οντότητες κατά τη διαδικασία της συμπύκνωσης της χρωματίνης. Στη συνέχεια, οι συμπυκνωμένες αδελφές χρωματίδες παραμένουν συνδεδεμένες στο **κεντρομερές** (centromere), δηλαδή στη χρωμοσωμική περιοχή όπου προσδένονται οι ειδικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν τον **κινητοχώρο** (kinetochore), ο οποίος αποτελεί τη θέση πρόσφυσης των μικροσωληνίσκων (βλ. Κεφάλαιο 5). Παράλληλα με τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, κατά την πρόφαση ξεκινούν και οι κυτταροπλασματικές αλλαγές που οδηγούν στην ανάπτυξη της μιτωτικής ατράκτου. Τα **κεντροσωμάτια** (centrosomes), τα οποία είχαν διπλασιαστεί κατά τη μεσόφαση, διαχωρίζονται και μετακινούνται προς αντίθετες πλευρές του πυρήνα. Εκεί αναλαμβάνουν τον ρόλο των δύο πόλων της **μιτωτικής ατράκτου** (mitotic spindle), ο σχηματισμός της οποίας ξεκινά προς το τέλος της πρόφασης.

Στους ανώτερους ευκαρυώτες, το τέλος της πρόφασης αντιστοιχεί στην αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου. Ωστόσο, σε κάποια κύτταρα δε συμβαίνει αποσυναρμολόγηση του πυρήνα κατά τη μίτωση. Σε ορισμένους μονοκύτταρους ευκαρυώτες (π.χ. στους ζυμομύκητες) παρατηρείται η αποκαλούμενη κλειστή μίτωση (closed mitosis), κατά την οποία ο πυρηνικός φάκελος διατηρείται ανέπαφος (**Εικόνα**

16.23). Κατά την κλειστή μίτωση, τα θυγατρικά χρωμοσώματα μετακινούνται στους αντίθετους πόλους του πυρήνα και στη συνέχεια ο πυρήνας διαιρείται στα δύο. Τα πολικά σωματίδια της ατράκτου αυτών των κυττάρων είναι ενσωματωμένα στον πυρηνικό φάκελο και ο πυρήνας διαιρείται μετά τη μετανάστευση των αδελφών χρωμοσωμάτων στους αντίθετους πόλους της ατράκτου.

Μετά την ολοκλήρωση της πρόφασης, το κύτταρο εισέρχεται στην **προμετάφαση** (prometaphase), που είναι η μεταβατική περίοδος μεταξύ πρόφασης και μετάφασης. Κατά την προμετάφαση, οι μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου συνδέονται με τους κινητοχώρους των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων. Οι κινητοχώροι των αδελφών χρωματίδων προσανατολίζονται στις αντίθετες πλευρές του χρωμοσώματος, ώστε να συνδεθούν με μικροσωληνίσκους που εκφύονται από αντίθετους πόλους της ατράκτου. Τα χρωμοσώματα μετακινούνται μπρος πίσω, μέχρι τελικά να στοιχιστούν στο επίπεδο της μεταφασικής πλάκας στο μέσο της ατράκτου. Σ' αυτό το στάδιο το κύτταρο εισέρχεται στη μετάφαση.

Τα περισσότερα κύτταρα παραμένουν για σύντομο χρονικό διάστημα στη μετάφαση, προτού προχωρήσουν στην ανάφαση. Η μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση πυροδοτείται από τη διάσπαση των συνδέσμων που συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες, οι οποίες στη συνέχεια διαχωρίζονται και μετακινούνται προς τους αντίθετους πόλους της ατράκτου. Η μίτωση ολοκληρώνεται με την τελόφαση, κατά την οποία οι πυρήνες ανασχηματίζονται και τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται. Η κυτταροκίνηση συνήθως ξεκινά προς το τέλος της ανάφασης και έχει σχεδόν ολοκληρωθεί στο τέλος της τελόφασης, με το σχηματισμό δύο μεσοφασικών θυγατρικών κυττάρων.

Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B και η πρόοδος της μετάφασης

Κατά τη μίτωση, πολλά συστατικά του κυττάρου υφίστανται εντυπωσιακές αλλαγές και ολόκληρη η κυτταρική δομή αναδιοργανώνεται. Όπως συζητήθηκε παραπάνω, τα γεγονότα αυτά ξεκινούν με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης Cdk1/κυκλίνης B (MPF). Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B δρα ως ο κύριος ρυθμιστής (master regulator) της μετάβασης στη φάση M, αφενός ενεργοποιώντας άλλες μιτωτικές πρωτεϊνικές κινάσες και αφετέρου φωσφορυλιώνοντας άμεσα ορισμένες από τις δομικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική αναδιοργάνωση (**Εικόνα 16.24**).

Η συμπίκνωση της μεσοφασικής χρωματίνης που οδηγεί στο σχηματισμό των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων των μιτωτικών κυττάρων είναι το σημαντικότερο φαινόμενο της μίτωσης, με καθοριστική σημασία για τη μετακίνηση των χρωμοσωμάτων κατά μήκος της μιτωτικής ατράκτου χωρίς να υποστούν θραύσεις ή να μπερδευτούν. Όπως συζητήθηκε στο Κεφάλαιο 5, κατά τον σχηματισμό των μεταφασικών χρωμοσωμάτων η χρωματίνη των μεσοφασικών πυρήνων καθίσταται σχεδόν 1.000 φορές πιο συμπυκνωμένη. Είναι τόσο υψηλός ο βαθμός συμπίκνωσης, που η χρωματίνη είναι αδύνατον να μεταγραφεί πλέον. Παρά τη θεμελιώδη σημασία αυτού του γεγονότος, δεν έχουμε κατανοήσει πλήρως ούτε τη δομή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων ούτε τον μοριακό μηχανισμό της συμπίκνωσης της χρωματίνης. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι η συμπίκνωση της χρωματίνης επιτυγχάνεται από σύμπλοκα πρωτεϊνών που ονομάζονται **κοντενσίνες** (condensins). Οι κοντενσίνες ανήκουν στην ομάδα των πρωτεϊνών «διατήρησης της δομής της χρωματίνης» (SMC, Structural Maintenance of Chromatin), που έχουν σημαντικούς ρόλους στην οργάνωση των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων.

Τόσο οι κοντενσίνες όσο και μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών SMC, οι **κοχεσίνες** (cohesins), συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση (**Εικόνα 16.25**). Οι κοχεσίνες προσδένονται στο DNA κατά τη φάση S και διατηρούν τη σύνδεση μεταξύ των αδελφών χρωματίδων μετά την αντιγραφή του DNA. Καθώς το κύτταρο εισέρχεται στη φάση M, οι κοντενσίνες ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση από το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B. Στη συνέχεια, οι κοντενσίνες αντικαθιστούν τις κοχεσίνες στο μεγαλύτερο μήκος του χρωμοσώματος, έτσι ώστε οι αδελφές χρωματίδες να παραμένουν συνδεδεμένες μόνο στο κεντρομερές. Επιπλέον, οι κοντενσίνες επάγουν τη συμπίκνωση της χρωματίνης, οδηγώντας στο σχηματισμό των μεταφασικών χρωμοσωμάτων.

Η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου είναι ένα από τα πιο εντυπωσιακά γεγονότα της μίτωσης και οφείλεται σε τροποποιήσεις όλων των συστατικών του: οι πυρηνικές μεμβράνες κατακερματίζονται, τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων αποσυναρμολογούνται και η πυρηνική λάμινα αποπολυμερίζεται. Ο αποπολυμερισμός της πυρηνικής λάμινας (του δικτύου των ινιδίων που πλαισιώνουν την εσωτερική πλευρά του πυρηνικού φακέλου) προκαλείται από τη φωσφορυλίωση των λαμινών από τη Cdk1 (**Εικόνα 16.26**). Η φωσφορυλίωση προκαλεί τη διάσπαση των ινιδίων της λάμινας σε ελεύθερα διμερή λαμινών, επιτυγχάνοντας τον άμεσο αποπολυμερισμό της πυρηνικής λάμινας. Επιπλέον, η Cdk1 φωσφορυλιώνει διάφορες

πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων, οδηγώντας στην αποσυναρμολόγηση των πυρηνικών πόρων και στην αποσύνδεση της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης από τις λαμίνες και τη χρωματίνη. Στην περίπτωση των ζωικών κυττάρων ακολουθεί η ενσωμάτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο διατηρείται άθικτο και διανέμεται στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη μίτωση.

Κατά τη μίτωση, η συσκευή Golgi αποδιατάσσεται και μετατρέπεται σε μικρά κυστίδια, τα οποία είτε απορροφούνται από το ενδοπλασματικό δίκτυο είτε διανέμονται άμεσα στα θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταροκίνηση. Η αποδιάταξη της συσκευής Golgi προκαλείται από τη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών του στρώματος του Golgi από την κινάση Cdk1 και από άλλες πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται κατά τη μίτωση. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες του στρώματος του Golgi (όπως οι GM130 και GRASP-65) είναι απαραίτητες για τη συγχώνευση των καλυμμένων με COP I κυστιδίων με τη μεμβράνη Golgi. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αυτών από τη Cdk1 αποτρέπει την πρόσδεσή τους και την ενσωμάτωσή τους στη συσκευή Golgi, προκαλώντας την αποδιάταξη της συσκευής Golgi.

Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού που κορυφώνεται με το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου είναι αποτέλεσμα της δυναμικής αστάθειας των μικροσωληνίσκων (βλ. Κεφάλαιο 12). Στην αρχή της πρόφασης, η ενεργοποίηση της Cdk1 επάγει το διαχωρισμό των κεντροσωματίων, τα οποία είχαν διπλασιαστεί κατά τη φάση S. Τα κεντροσωμάτια στη συνέχεια μετακινούνται προς αντίθετες πλευρές του πυρήνα και υποβάλλονται σε μια διαδικασία ωρίμανσης κατά την οποία αυξάνονται σε μέγεθος και στρατολογούν γ-τουμπουλίνη και άλλες πρωτεΐνες απαραίτητες για τη συγκρότηση της ατράκτου. Η ωρίμανση των κεντροσωματίων και η συγκρότηση της ατράκτου εξαρτώνται από τη δράση πρωτεϊνικών κινασών των οικογενειών των **κινασών Aurora** (Aurora kinases) και των **κινασών τύπου Polo** (Polo-like kinases), οι οποίες εντοπίζονται στα κεντροσωμάτια. Όπως η Cdk1, έτσι και οι κινάσες Aurora και τύπου-Polo ενεργοποιούνται σε μιτωτικά κύτταρα και έχουν σημαντικούς ρόλους στο σχηματισμό της ατράκτου και στη λειτουργία του κινητοχώρου, καθώς και στην κυτταροκίνηση. Κατά τη μίτωση, ο ρυθμός ανακύκλωσης των μικροσωληνίσκων αυξάνεται από πέντε έως δέκα φορές, προκαλώντας τον αποπολυμερισμό και τη συρρίκνωση των μεσοφασικών μικροσωληνίσκων. Ο αυξημένος ρυθμός ανακύκλωσης θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών που συνδέονται με τους

μικροσωληνίσκους, είτε από τη Cdk1 είτε από άλλες μιτωτικές πρωτεϊνικές κινάσες, όπως είναι οι κινάσες Aurora και οι τύπου-Polo. Ο αριθμός των μικροσωληνίσκων που εκφύονται από τα κεντροσωμάτια επίσης αυξάνεται, με αποτέλεσμα οι μεσοφασικοί μικροσωληνίσκοι να αντικαθίστανται από μεγάλο αριθμό μικροσωληνίσκων μικρού μήκους, που εκφύονται ακτινωτά από τα κεντροσωμάτια (radiating).

Η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου επιτρέπει στη συνέχεια τη σύνδεση μερικών από τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων (**Εικόνα 16.27**). Έτσι ξεκινάει η διαδικασία της μετακίνησης των χρωμοσωμάτων που χαρακτηρίζει την προμετάφαση. Στις πρωτεΐνες που συγκεντρώνονται στον κινητοχώρο περιλαμβάνονται μοριακοί κινητήρες των μικροσωληνίσκων που κατευθύνουν την κίνηση των χρωμοσωμάτων προς τα αρνητικά άκρα των μικροσωληνίσκων της ατράκτου, τα οποία είναι συνδεδεμένα σταθερά στο κεντροσωμάτιο. Στη δράση αυτών των πρωτεϊνών, οι οποίες έλκουν τα χρωμοσώματα προς το κεντροσωμάτιο, αντιτίθενται αφενός η δράση πρωτεϊνών - κινητήρων οι οποίοι κατευθύνονται προς το θετικό άκρο των μικροσωληνίσκων και αφετέρου η επιμήκυνση των μικροσωληνίσκων της ατράκτου, που απωθούν τα χρωμοσώματα από τους πόλους της ατράκτου. Οι αντίρροπες λοιπόν δυνάμεις που ασκούνται στα προμεταφασικά χρωμοσώματα τα ωθούν να μετακινούνται παλινδρομικά ανάμεσα στα κεντροσωμάτια και το μέσο της ατράκτου.

Τελικά, οι μικροσωληνίσκοι που εκφύονται από αντίθετους πόλους της ατράκτου συνδέονται με τους δύο κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων, οι οποίοι βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του χρωμοσώματος και η εξισορρόπηση των δυνάμεων που επιδρούν στα χρωμοσώματα επιφέρει τη στοίχισή τους στη μεταφασική πλάκα στο μέσο της ατράκτου (**Εικόνα 16.28**). Όπως συζητήθηκε στο Κεφάλαιο 12, η άτρακτος αποτελείται από μικροσωληνίσκους του κινητοχώρου και των χρωμοσωμάτων, οι οποίοι συνδέονται με τα χρωμοσώματα, καθώς επίσης και από μικροσωληνίσκους των αστέρων, οι οποίοι αλληλεπικαλύπτονται στο κέντρο του κυττάρου. Επιπλέον, μικρού μήκους μικροσωληνίσκοι των αστέρων εκτείνονται ακτινωτά από τα κεντροσωμάτια προς την κυτταρική περιφέρεια.

Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου και η μετάβαση στην ανάφαση

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα στο κεφάλαιο, το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου ελέγχει τη στοίχιση των χρωμοσωμάτων στη μεταφασική άτρακτο. Από τη στιγμή που θα ολοκληρωθεί, το κύτταρο μπορεί να προχωρήσει στην έναρξη της ανάφασης και στην ολοκλήρωση της μίτωσης. Για τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση είναι απαραίτητη η πρωτεόλυση μέσω ουβικιτινίωσης ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, από το ενεργοποιημένο **σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης/κυκλόσωμα** (APC/C, Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome), το οποίο λειτουργεί ως μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης (βλ. Εικόνες 8.43 και 8.44). Η ενεργοποίηση του APC/C επάγεται στην αρχή της μίτωσης. Αυτό σημαίνει ότι η ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B πυροδοτεί τελικά την αυτοκαταστροφή του. Ωστόσο, το σύμπλοκο APC/C διατηρείται σε καταστολή μέχρι το κύτταρο να περάσει το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου, σημείο στο οποίο η ενεργοποίηση του συστήματος ουβικιτινίωσης προκαλεί τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση και την ολοκλήρωση της μίτωσης.

Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου έχει την εκπληκτική ικανότητα να παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του APC/C ακόμα κι αν ένα μόνο χρωμόσωμα δεν είναι στοιχισμένο. Η λειτουργία αυτού του σημείου ελέγχου βασίζεται σε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών (τις πρωτεΐνες Mad/Bub) που καταστέλλει την πρωτεΐνη Cdc20, η οποία είναι απαραίτητο συστατικό του APC/C (**Εικόνα 16.29**). Οι πρωτεΐνες Mad/Bub συγκροτούνται σε ένα ενεργό σύμπλοκο σε όσους κινητοχώρους δεν έχουν συνδεθεί ακόμα με μικροσωληνίσκους. Όταν οι κινητοχώροι συνδεθούν με μικροσωληνίσκους, το σύμπλοκο Mad/Bub αποσυναρμολογείται και σταματά να καταστέλλει τη Cdc20, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το σύμπλοκο APC/C.

Η ενεργοποίηση του APC/C επάγει την ουβικιτινίωση και ακολούθως την αποικοδόμηση δύο σημαντικών πρωτεϊνών-στόχων. Η έναρξη της ανάφασης είναι αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης των κοχρεσινών, οι οποίες συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες συνδεδεμένες καθώς στοιχίζονται στη μεταφασική πλάκα (βλ. Εικόνα 16.25). Η αποικοδόμηση των κοχρεσινών δεν καταλύεται άμεσα από το APC/C. Το APC/C διασπά μια πρωτεΐνη που ονομάζεται σεκουρίνη (securin), η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής μιας πρωτεάσης που ονομάζεται σεπαράση (separase). Η αποικοδόμηση της σεκουρίνης ενεργοποιεί τη

σεπαράση, η οποία με τη σειρά της διασπά τις κοχεσίνες. Η πέψη των κοχεσινών προκαλεί την αποσύνδεση των αδελφών χρωματίδων, επιτρέποντάς τους να μετακινηθούν προς τους αντίθετους πόλους της ατράκτου (**Εικόνα 16.30**). Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση είναι συνεπώς αποτέλεσμα της δράσης διαφόρων πρωτεϊνών-κινητήρων που συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου (βλ. Εικόνες 12.59 και 12.60).

Η δεύτερη σημαντική ρυθμιστική πρωτεΐνη που ουβικιτινιώνεται από το σύμπλοκο APC/C και αποικοδομείται είναι η κυκλίνη B. Η αποικοδόμηση της κυκλίνης B οδηγεί στην απενεργοποίηση της Cdk1, η οποία είναι απαραίτητη για την έξοδο του κυττάρου από τη μίτωση και την επιστροφή του στη μεσόφαση. Πολλές από τις κυτταρικές αλλαγές που συμβαίνουν σε αυτό το σημείο είναι οι αντίστροφες από αυτές που επάγονται από τη Cdk1 κατά την είσοδο στη μίτωση. Για παράδειγμα, η ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου, η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και η επαναφορά των μικροσωληνίσκων στη μεσοφασική κατάσταση είναι άμεσες συνέπειες της απώλειας της ενεργότητας της Cdk1 και της αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών που είχαν φωσφορυλιωθεί από τη Cdk1 στην αρχή της μίτωσης. Όπως συζητείται παρακάτω, η απενεργοποίηση της Cdk1 πυροδοτεί και την κυτταροκίνηση.

Πλαίσιο 1: Οι ανωμαλίες στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων που οφείλονται στη μη φυσιολογική λειτουργία του σημείου ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου είναι συνηθισμένες σε καρκινικά κύτταρα και θεωρείται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη πολλών όγκων.

Η κυτταροκίνηση

Η ολοκλήρωση της μίτωσης συνήθως συνοδεύεται από την κυτταροκίνηση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό δύο θυγατρικών κυττάρων. Η κυτταροκίνηση κατά κανόνα ξεκινά λίγο μετά την έναρξη της ανάφασης, και πυροδοτείται από την απενεργοποίηση της Cdk1, συντονίζοντας με τον τρόπο αυτό την πυρηνική και την κυτταροπλασματική διαίρεση του κυττάρου. Όπως συζητήθηκε στο Κεφάλαιο 12, η κυτταροκίνηση στους ζυμομύκητες και στα ζωικά κύτταρα επιτυγχάνεται με τη δράση ενός **συσταλτού δακτυλίου** (contractile ring) ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης II που σχηματίζεται κάτω από την πλασματική μεμβράνη (**Εικόνα 16.31**). Η θέση του δακτυλίου καθορίζεται από τη θέση της μιτωτικής ατράκτου, με αποτέλεσμα το

κύτταρο να διαιρείται στο επίπεδο της μεταφασικής πλάκας κάθετα στην άτρακτο. Η διαίρεση επιτυγχάνεται μέσω της συστολής των ινιδίων ακτίνης-μυοσίνης που περισφίγγουν την πλασματική μεμβράνη προς τα μέσα, ώσπου τελικά το κύτταρο να χωριστεί στα δύο. Στη συνέχεια, η σύνδεση ανάμεσα στα δύο θυγατρικά κύτταρα σπάει και η πλασματική μεμβράνη κάθε κυττάρου κλείνει.

Ο μηχανισμός της κυτταροκίνησης είναι διαφορετικός στα ανώτερα φυτικά κύτταρα. Αντί να χωρίζονται στη μέση υπό την πίεση που ασκείται από ένα συσταλλτό δακτύλιο, τα κύτταρα αυτά διαιρούνται ως αποτέλεσμα του σχηματισμού νέων κυτταρικών τοιχωμάτων και πλασματικών μεμβρανών στο εσωτερικό του κυττάρου (**Εικόνα 16.32**). Νωρίς κατά την τελόφαση, κυστίδια που μεταφέρουν δομικά στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος από τη συσκευή Golgi συνδέονται με υπολειμματικές δομές των μικροσωληνίσκων της ατράκτου και συσσωρεύονται στη θέση όπου βρισκόταν προηγουμένως η μεταφασική πλάκα. Στη συνέχεια, τα κυστίδια συγχωνεύονται, σχηματίζοντας μια μεγάλη δομή που περικλείεται σε μεμβράνη και μοιάζει με δίσκο. Από τους πολυσακχαρίτες που περιέχονται στα κυστίδια συναρμολογείται το υλικό ενός νέου κυτταρικού τοιχώματος, η αποκαλούμενη κυτταρική πλάκα. Η κυτταρική πλάκα επεκτείνεται περιφερειακά, στο επίπεδο που είναι κάθετο στην άτρακτο, μέχρι να φτάσει στην πλασματική μεμβράνη. Τότε η μεμβράνη που περιβάλλει την κυτταρική πλάκα συγχωνεύεται με την πλασματική μεμβράνη του αρχικού κυττάρου διαιρώντας το στα δύο. Δηλαδή από τη σύντηξη των κυστιδίων κατά την κυτταροκίνηση δημιουργείται η επιφάνεια επαφής των δύο θυγατρικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά παραμένουν συνδεδεμένα με γέφυρες επικοινωνίας του κυτταροπλάσματος (πλασμοδέσμες – βλ. Εικόνα 14.30), οι οποίες εμφανίζονται ως ασυνέχειες της επιφάνειας επαφής.

16.4 Μείωση και γονιμοποίηση

Οι κυτταρικοί κύκλοι των σωματικών κυττάρων που έχουν παρουσιαστεί μέχρι τώρα σε αυτό το κεφάλαιο καταλήγουν στη δημιουργία δύο διπλοειδών θυγατρικών κυττάρων με πανομοιότυπη γενετική σύσταση. Αντίθετα, η μείωση είναι ένα ιδιαίτερο είδος κυτταρικού κύκλου, μέσω του οποίου ο αριθμός των χρωμοσωμάτων μειώνεται στο μισό και παράγονται απλοειδή θυγατρικά κύτταρα. Ορισμένοι μονοκύτταροι ευκαρυώτες, όπως οι ζυμομύκητες, μπορούν να υφίστανται μείωση,

αλλά και να αναπαράγονται με μίτωση. Για παράδειγμα, ο διπλοειδής *Saccharomyces cerevisiae*, όταν αντιμετωπίζει δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, υφίσταται μείωση και παράγει ανθεκτικά σπόρια. Στα πολυκύτταρα φυτά και ζώα, ωστόσο, η μείωση περιορίζεται στα γαμετικά κύτταρα και αποτελεί το κλειδί της φυλετικής αναπαραγωγής. Ενώ τα σωματικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με μίτωση, τα γαμετικά κύτταρα υφίστανται μείωση προκειμένου να παραγάγουν απλοειδείς γαμέτες (σπερματοζώαρια και ωάρια). Η ανάπτυξη ενός νέου απογόνου οργανισμού ξεκινά με τη σύντηξη αυτών των γαμετών κατά τη γονιμοποίηση.

Η διαδικασία της μείωσης

Σε αντίθεση με τη μίτωση, κατά τη **μείωση** (meiosis) ένα διπλοειδές κύτταρο διαιρείται σε απλοειδείς απογόνους, καθένας από τους οποίους διαθέτει μόνο ένα μέλος από κάθε ζεύγος ομόλογων χρωμοσωμάτων που υπήρχαν στο αρχικό διπλοειδές κύτταρο (**Εικόνα 16.33**). Αυτή η μείωση του αριθμού των χρωμοσωμάτων επιτυγχάνεται με δύο διαδοχικούς κύκλους πυρηνικής και κυτταρικής διαίρεσης, οι οποίοι ονομάζονται μείωση I και μείωση II και διεξάγονται μετά από έναν μόνο κύκλο αντιγραφής του DNA. Όπως η μίτωση, έτσι και η μείωση I ξεκινά μετά την ολοκλήρωση της φάσης S και το σχηματισμό των δύο πανομοιότυπων αδελφών χρωματίδων κάθε χρωμοσώματος. Εντούτοις, το πρότυπο διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση I διαφέρει δραματικά από αυτό της μίτωσης. Κατά τη μείωση I, τα ομόλογα χρωμοσώματα αρχικά ζευγαρώνουν μεταξύ τους και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε διαφορετικά θυγατρικά κύτταρα. Οι αδελφές χρωματίδες παραμένουν συνδεδεμένες, και κατά συνέπεια, η ολοκλήρωση της μείωσης I οδηγεί στη δημιουργία δύο θυγατρικών κυττάρων που περιέχουν ένα μόνο μέλος από κάθε ζεύγος χρωμοσωμάτων (αποτελούμενο από δύο αδελφές χρωματίδες). Η μείωση I ακολουθείται από τη μείωση II, κατά την οποία, όπως και στη μίτωση, οι αδελφές χρωματίδες αποσυνδέονται και διαχωρίζονται σε διαφορετικά θυγατρικά κύτταρα. Επομένως, από την ολοκλήρωση της μείωσης II παράγονται τέσσερα απλοειδή θυγατρικά κύτταρα, καθένα από τα οποία διαθέτει ένα αντίγραφο από κάθε χρωμόσωμα.

Η σύναψη των ομόλογων χρωμοσωμάτων μετά την αντιγραφή του DNA είναι αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού μεταξύ χρωμοσωμάτων πατρικής και μητρικής προέλευσης. Επομένως, ο γενετικός ανασυνδυασμός σχετίζεται άρρηκτα με το

διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Ο ανασυνδυασμός μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων συμβαίνει κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης πρόφασης της μείωσης I, η οποία χωρίζεται σε πέντε στάδια με βάση τη μορφολογία των χρωμοσωμάτων (**Εικόνα 16.34**): **λεπτοταινία** (leptotene), **ζυγοταινία** (zygotene), **παχυταινία** (pachytene), **διπλοταινία** (diplotene) και **διακίνηση** (diakinesis). Ο ανασυνδυασμός, που συμβαίνει με υψηλή συχνότητα κατά τη μείωση, ξεκινάει με δίκλωνες ρήξεις του DNA που δημιουργούνται σε ένα πρώιμο στάδιο της μειωτικής πρόφασης, στη λεπτοταινία, από μια πολύ συντηρημένη ενδονουκλεάση που ονομάζεται Spo11. Όπως συζητήθηκε στο Κεφάλαιο 6, η δημιουργία **δίκλωνων ρήξεων** οδηγεί σε σχηματισμό μονόκλωνων περιοχών που εισβάλλουν στα ομόλογα χρωμοσώματα εξαιτίας της συμπληρωματικότητας των βάσεων (βλ. Εικόνα 6.33). Η στενή σύνδεση των ομόλογων χρωμοσωμάτων, η **σύναψη** (synapsis), ξεκινά στο στάδιο της ζυγοταινίας. Κατά το στάδιο αυτό, μια πρωτεϊνική δομή που μοιάζει με φερμουάρ, το **συναπτονημικό σύμπλοκο** (synaptonemal complex), σχηματίζεται κατά μήκος των ζευγαρωμένων χρωμοσωμάτων (**Εικόνα 16.35**). Το σύμπλοκο αυτό διατηρεί τα ομόλογα χρωμοσώματα στενά συνδεδεμένα και στοιχισμένα μεταξύ τους σε όλη τη διάρκεια του σταδίου της παχυταινίας, το οποίο μπορεί να διαρκέσει αρκετές ημέρες. Ο ανασυνδυασμός μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων ολοκληρώνεται ως το τέλος της παχυταινίας, αφήνοντας τα χρωμοσώματα συνδεδεμένα στα **χιάσματα** (chiasmata, ενικός: chiasma), δηλαδή στις θέσεις των διασκελισμών. Το συναπτονημικό σύμπλοκο εξαφανίζεται στο στάδιο της διπλοταινίας και τα χρωμοσώματα αποσυνδέονται σε όλο το μήκος τους. Ωστόσο, παραμένουν συνδεδεμένα στα χιάσματα, γεγονός που έχει καθοριστική σημασία για τη σωστή στοίχισή τους στη μετάφαση. Στο στάδιο αυτό, κάθε ζεύγος χρωμοσωμάτων ονομάζεται **δισθενές** (bivalent) και αποτελείται από τέσσερις χρωματίδες με χιάσματα ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο (**Εικόνα 16.36**). Κατά τη διακίνηση, το τελικό στάδιο της πρόφασης I, το οποίο αντιπροσωπεύει τη μετάβαση στη μετάφαση, η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων έχει ολοκληρωθεί.

Κατά τη μετάφαση I, τα δισθενή χρωμοσώματα στοιχίζονται στην άτρακτο. Αντίθετα με τη μίτωση (βλ. Εικόνα 16.28), οι κινητοχώροι των αδελφών χρωματίδων βρίσκονται ο ένας δίπλα στον άλλο και προσανατολίζονται προς την ίδια κατεύθυνση, ενώ οι κινητοχώροι των ομόλογων χρωμοσωμάτων προσανατολίζονται προς αντίθετους πόλους της ατράκτου (**Εικόνα 16.37**). Κατά συνέπεια, μικροσωληνίσκοι από τον ίδιο πόλο της ατράκτου συνδέονται με αδελφές χρωματίδες, ενώ

μικροσωληνίσκοι από αντίθετους πόλους συνδέονται με ομόλογα χρωμοσώματα. Η ανάφαση I ξεκινά με τη διάρρηξη των χιασμάτων στα οποία συγκρατούνταν συνδεδεμένα τα ομόλογα χρωμοσώματα. Έτσι, τα ομόλογα χρωμοσώματα διαχωρίζονται, ενώ οι αδελφές χρωματίδες παραμένουν συνδεδεμένες στα κεντρομερή τους. Με την ολοκλήρωση της μείωσης I, κάθε θυγατρικό κύτταρο έχει αποκτήσει ένα χρωμόσωμα (με δύο αδελφές χρωματίδες) από κάθε ομόλογο ζεύγος χρωμοσωμάτων.

Η μείωση II ξεκινά αμέσως μετά την κυτταροκίνηση, συνήθως πριν από την πλήρη αποσυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων. Σε αντίθεση με τη μείωση I, η μείωση II μοιάζει με μια φυσιολογική μίτωση. Κατά τη μετάφαση II, τα χρωμοσώματα στοιχίζονται στην άτρακτο, με μικροσωληνίσκους από αντίθετους πόλους της άτρακτου να συνδέονται με τους κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων. Η σύνδεση των κεντρομερών των αδελφών χρωματίδων σπάει κατά την ανάφαση II και οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται σε αντίθετους πόλους. Ακολουθεί η κυτταροκίνηση, από την οποία προκύπτουν απλοειδή θυγατρικά κύτταρα.

Η ρύθμιση της μείωσης στα ωοκύτταρα

Τα ωοκύτταρα (αναπτυσσόμενα ωάρια) των σπονδυλωτών είναι ιδιαίτερα χρήσιμα μοντέλα για την έρευνα του κυτταρικού κύκλου, εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους τους και της ευκολίας στο χειρισμό τους. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα, που συζητήθηκε νωρίτερα σε αυτό το κεφάλαιο, ήταν η ανακάλυψη και η απομόνωση του MPF (του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B) από ωοκύτταρα βατράχου. Η μείωση σ' αυτά τα ωοκύτταρα, όπως και σε ωοκύτταρα άλλων ειδών, ρυθμίζεται σε δύο συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου και από τη μελέτη της έχουν αποκαλυφθεί πολύ σημαντικά στοιχεία για τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου.

Το πρώτο σημείο ρύθμισης της μείωσης των ωοκυττάρων εντοπίζεται στο στάδιο της διπλοταινίας της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (**Εικόνα 16.38**). Τα ωοκύτταρα μπορούν να παραμείνουν σε στάση στο στάδιο αυτό για μεγάλα χρονικά διαστήματα, τα οποία φτάνουν μέχρι τα 50 χρόνια στον άνθρωπο. Κατά τη στάση στη διπλοταινία, τα χρωμοσώματα των ωοκυττάρων αποσυμπυκνώνονται και μεταγράφονται ενεργά. Η μεταγραφική ενεργότητα αντικατοπτρίζεται στην τεράστια ανάπτυξη των ωοκυττάρων κατά την περίοδο αυτή. Για παράδειγμα, τα ανθρώπινα ωοκύτταρα

έχουν διάμετρο περίπου 100 μm (περισσότερο από 100 φορές μεγαλύτερα σε όγκο από ένα τυπικό σωματικό κύτταρο). Τα ωοκύτταρα του βατράχου είναι ακόμα μεγαλύτερα, με διάμετρο περίπου 1 mm. Κατά την περίοδο της κυτταρικής ανάπτυξης, τα ωοκύτταρα συσσωρεύουν αποθέματα υλικών, μεταξύ των οποίων RNA και πρωτεΐνες που χρειάζονται για την αύξηση του πρώιμου εμβρύου. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι κυτταρικοί κύκλοι του πρώιμου εμβρύου διεξάγονται χωρίς κυτταρική αύξηση, με ταχύτατες διαιρέσεις του γονιμοποιημένου ωαρίου σε ολοένα και μικρότερα κύτταρα (βλ. Εικόνα 16.2).

Στα ωοκύτταρα διαφορετικών ειδών, το χρονικό σημείο επανεκκίνησης της μείωσης και διεξαγωγής της γονιμοποίησης μπορεί να διαφέρει. Σε ορισμένα ζώα, τα ωοκύτταρα παραμένουν σε στάση στο στάδιο της διπλοταινίας μέχρι να γονιμοποιηθούν και μόνο τότε προχωρούν στην ολοκλήρωση της μείωσης. Ωστόσο, στα ωοκύτταρα των περισσότερων σπονδυλωτών (συμπεριλαμβανομένων του βατράχου, του ποντικού και του ανθρώπου) η μείωση συνεχίζεται ως απόκριση σε ορμονική διέγερση, με αποτέλεσμα η μείωση I να ολοκληρώνεται πριν από τη γονιμοποίηση. Από την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση που ακολουθεί τη μείωση I προκύπτει ένα μικρό **πολικό σωματίο** (polar body) και ένα ωοκύτταρο, το οποίο διατηρεί το μεγάλο του μέγεθος. Στη συνέχεια, το ωοκύτταρο εισέρχεται στη μείωση II χωρίς να έχει σχηματιστεί ο πυρήνας του ή να έχουν αποσυμπυκνωθεί τα χρωμοσώματά του. Τα ωοκύτταρα των περισσότερων σπονδυλωτών σταματούν ξανά στη μετάφαση II, όπου παραμένουν σταματημένα μέχρι να γονιμοποιηθούν.

Όπως η φάση M των σωματικών κυττάρων, έτσι και η μείωση των ωοκυττάρων ρυθμίζεται από την ενεργότητα του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B. Εντούτοις, η ρύθμιση της Cdk1 κατά τη μείωση των ωοκυττάρων εμφανίζει μοναδικά χαρακτηριστικά που ευθύνονται για τη μετάβαση από τη μείωση I στη μείωση II και για τη στάση στη μετάφαση II (**Εικόνα 16.39**). Η ορμονική διέγερση ωοκυττάρων που βρίσκονται σταματημένα στη διπλοταινία αρχικά πυροδοτεί τη συνέχιση της μείωσης μέσω της ενεργοποίησης της Cdk1, όπως συμβαίνει και κατά τη μετάβαση από την G₂ στην M στα σωματικά κύτταρα. Όπως και στη μίτωση, η Cdk1 στη συνέχεια επάγει τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου και το σχηματισμό της ατράκτου. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου προώθησης της ανάφασης/κυκλώσωνα (APC/C) προκαλεί τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση της μείωσης I, η οποία συνοδεύεται από την ελάττωση της ενεργότητας της Cdk1. Αντίθετα όμως με ό,τι συμβαίνει στη μίτωση,

στην ανάφαση της μείωσης η ενεργότητα της Cdk1 μειώνεται μόνο εν μέρει, με αποτέλεσμα τα ωοκύτταρα να παραμένουν στη φάση M, η χρωματίνη να παραμένει συμπυκνωμένη και οι πυρηνικοί φάκελοι να μην αναδιοργανώνονται. Μετά την κυτταροκίνηση, η ενεργότητα της Cdk1 αυξάνεται και διατηρείται υψηλή όσο το ωάριο παραμένει σταματημένο στη μετάφαση II. Επομένως, τα ωοκύτταρα διαθέτουν ένα μοναδικό ρυθμιστικό μηχανισμό που διατηρεί την ενεργότητα της Cdk1 κατά τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση της μείωσης I και κατά τη διάρκεια της επακόλουθης στάσης στη μετάφαση II. Αυτός ο μηχανισμός αποτρέπει την απενεργοποίηση της Cdk1 εξαιτίας της πρωτεόλυσης της κυκλίνης B που παρατηρείται σε μια φυσιολογική μίτωση.

Ο παράγοντας που ευθύνεται για τη στάση στη μετάφαση II ταυτοποιήθηκε από τους Yoshio Masui και Clement Markert το 1971, κατά τη διάρκεια πειραμάτων που οδήγησαν στην ανακάλυψη του MPF. Στην περίπτωση αυτή, ωστόσο, κυτταρόπλασμα από ένα ωάριο σε στάση στη μετάφαση II χορηγήθηκε με ένεση σε ένα κύτταρο πρώιμου εμβρύου που διεξήγαγε μιτωτικούς κυτταρικούς κύκλους (**Εικόνα 16.40**). Αυτή η ένεση του κυτταροπλάσματος του ωαρίου προκάλεσε στάση του εμβρυϊκού κυττάρου στη μετάφαση, υποδεικνύοντας ότι η στάση επάγεται από έναν κυτταροπλασματικό παράγοντα που υπήρχε στο ωάριο. Καθώς αυτός ο παράγοντας προκαλούσε τη στάση της μίτωσης ονομάστηκε **κυτταροστατικός παράγοντας** (CSF, Cytostatic Factor).

Με πιο πρόσφατα πειράματα ταυτοποιήθηκε μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, η **Mos**, ως απαραίτητο συστατικό του CSF. Η Mos συντίθεται αποκλειστικά σε ωοκύτταρα λίγο πριν την ολοκλήρωση της μείωσης I και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ενεργότητας του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B κατά τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση της μείωσης I, καθώς και για τη στάση στη μετάφαση II. Η Mos ενεργοποιεί την MAP κινάση ERK, η οποία έχει κεντρικό ρόλο στα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης που συζητήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στα ωοκύτταρα, όμως, η ERK έχει διαφορετικό ρόλο: ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Rsk, η οποία διατηρεί την ενεργότητα του MPF σε υψηλά επίπεδα καταστέλλοντας την αποικοδόμηση της κυκλίνης B (**Εικόνα 16.41**). Για την παρεμπόδιση της αποικοδόμησης της κυκλίνης B είναι απαραίτητη η καταστολή του συμπλόκου APC/C από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Emi2/Egfp1, η οποία φωσφορυλιώνεται από την Rsk και καταστέλλει το σύμπλοκο APC/C αλληλεπιδρώντας με την υπομονάδα Cdc20. Η παραπάνω διαδικασία εμφανίζει

ομοιότητες με τον μηχανισμό δράσης των πρωτεϊνών Mad/Bub, ο οποίος προκαλεί τη στάση στο σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου (βλ. Εικόνα 16.29). Με τον τρόπο αυτό, η Mos διατηρεί το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B ενεργό κατά τη μείωση των ωοκυττάρων, προκαλώντας τη στάση των ωοκυττάρων στη μετάφαση II. Τα ωοκύτταρα μπορούν να παραμείνουν σε στάση σε αυτό το σημείο του κυτταρικού κύκλου για αρκετές ημέρες, αναμένοντας τη γονιμοποίησή τους.

Πλαίσιο 1: Η κλωνοποίηση θηλαστικών μπορεί να επιτευχθεί με τη διαδικασία της μεταφοράς πυρήνα σωματικού κυττάρου, κατά την οποία ο πυρήνας ενός σωματικού κυττάρου μεταφέρεται σε ένα ωοκύτταρο μετάφασης II απ' όπου έχουν αφαιρεθεί τα ενδογενή χρωμοσώματα. Το ωοκύτταρο στη συνέχεια διεγείρεται για να αρχίσει να διαιρείται και τελικά εμφυτεύεται σε μια θετή μητέρα. Έτσι παράγεται ένα ζώο γενετικά πανομοιότυπο με τον δότη του πυρήνα του σωματικού κυττάρου. Η πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή της μεθόδου αυτής ήταν η κλωνοποίηση του προβάτου Dolly το 1997. Από τότε, αυτή η τεχνολογία κλωνοποίησης έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά είδη θηλαστικών. Επίσης, η τεχνολογία αυτή παρέχει τη δυνατότητα θεραπευτικής κλωνοποίησης για την αντιμετώπιση διαφόρων ανθρώπινων ασθενειών.

Η γονιμοποίηση

Κατά τη **γονιμοποίηση** (fertilization), το σπερματοζώαριο συνδέεται σ'έναν υποδοχέα στην επιφάνεια του ωαρίου και συγχωνεύεται στην πλασματική του μεμβράνη, ξεκινώντας την ανάπτυξη ενός νέου διπλοειδούς οργανισμού που φέρει γενετικές πληροφορίες και από τους δύο γονείς (**Εικόνα 16.42**). Κατά τη γονιμοποίηση αφενός αναμειγνύονται τα χρωμοσώματα πατρικής και μητρικής προέλευσης και αφετέρου επάγονται πολλαπλές αλλαγές στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου οι οποίες έχουν καθοριστική σημασία για την περαιτέρω ανάπτυξη. Οι τροποποιήσεις αυτές ενεργοποιούν το ωάριο, προκαλώντας την ολοκλήρωση της μείωσης του ωοκυττάρου και την έναρξη των μιτωτικών κυτταρικών κύκλων του πρώιμου εμβρύου.

Ένα καθοριστικό σήμα που επάγεται από τη σύνδεση του σπερματοζωαρίου στον υποδοχέα του στην πλασματική μεμβράνη του ωαρίου είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, πιθανόν μέσω της διέγερσης της υδρόλυσης της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP₂) (βλ. Εικόνα 15.27). Μία από τις συνέπειες της αύξησης των επιπέδων του ενδοκυτταρικού

Ca^{2+} είναι η επαγωγή τροποποιήσεων της κυτταρικής επιφάνειας που εμποδίζουν τα υπόλοιπα σπερματοζωάρια να εισέλθουν στο ωάριο. Πρόκειται για ένα γεγονός καθοριστικής σημασίας που διασφαλίζει τον σχηματισμό ενός φυσιολογικού διπλοειδούς εμβρύου, αφού τα ωάρια συνήθως εκτίθενται σε πολύ μεγάλους αριθμούς σπερματοζωαρίων. Οι τροποποιήσεις αυτές της κυτταρικής επιφάνειας είναι αποτέλεσμα της Ca^{2+} εξαρτώμενης εξωκυττάρωσης εκκριτικών κυστιδίων που υπάρχουν σε μεγάλους αριθμούς κάτω από την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου. Τα βιομόρια που απελευθερώνονται από τα κυστίδια τροποποιούν το εξωκυτταρικό κάλυμμα του ωαρίου ώστε να παρεμποδίζεται η είσοδος επιπλέον σπερματοζωαρίων. Η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα αμέσως μετά τη γονιμοποίηση σηματοδοτεί την ολοκλήρωση της μείωσης (**Εικόνα 16.43**). Στα ωάρια που βρίσκονται σταματημένα στη μετάφαση II, η μετάβαση στην ανάφαση πυροδοτείται από την ενεργοποίηση του συμπλόκου APC/C λόγω της Ca^{2+} -εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης και της αποικοδόμησης του αναστολέα Emi2/Egfp1 του APC/C, ο οποίος ευθύνεται για τη στάση στη μετάφαση II (βλ. Εικόνα 16.41). Η επακόλουθη αποικοδόμηση της κυκλίνης B και των κοχεσινών οδηγεί στην ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, με μια ασύμμετρη κυτταροκίνηση (όπως και στη μείωση I), η οποία οδηγεί στη δημιουργία ενός δεύτερου μικρού πολικού ωαρίου..

Μετά την ολοκλήρωση της μείωσης του ωοκυττάρου, το γονιμοποιημένο ωάριο, το οποίο πλέον ονομάζεται **ζυγωτό** (zygote), διαθέτει δύο απλοειδείς πυρήνες, τους **προπυρήνες** (pronuclei), καθένα από τους οποίους προέρχεται από διαφορετικό γονέα. Στα θηλαστικά, οι δύο προπυρήνες εισέρχονται στη συνέχεια στη φάση S και το DNA τους αντιγράφεται καθώς μετακινούνται ο ένας προς τον άλλο. Όταν συναντηθούν, το ζυγωτό εισέρχεται στη φάση M της πρώτης μιτωτικής του διαίρεσης. Οι δύο πυρηνικοί φάκελοι αποδιοργανώνονται και τόσο τα μητρικά όσο και τα πατρικά συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στοιχίζονται σε μία κοινή άτρακτο. Από την ολοκλήρωση της μίτωσης παράγονται δύο εμβρυϊκά κύτταρα, καθένα από τα οποία διαθέτει διπλοειδές γονιδίωμα. Κατόπιν, τα κύτταρα αυτά ξεκινούν μια σειρά εμβρυϊκών κυτταρικών διαιρέσεων που οδηγούν τελικά στην ανάπτυξη ενός νέου οργανισμού.

Πλαίσιο 1: Η γονιμοποίηση *in vitro* (IVF, *In Vitro* Fertilization) είναι συνηθισμένη πρακτική υποβοήθησης μη γόνιμων ζευγαριών. Διάφορες αναπαραγωγικές διαταραχές μπορούν να ξεπεραστούν με τη συγκεκριμένη διαδικασία, κατά την οποία

ωάρια σε μετάφαση II αφαιρούνται από την ωοθήκη, γονιμοποιούνται *in vitro* και επανατοποθετούνται στις ωαγωγούς σάλπιγγες ή στη μήτρα της μητέρας. Το πρώτο νεογνό από γονιμοποίηση *in vitro* γεννήθηκε το 1978 και έκτοτε δεκάδες χιλιάδες μη γόνιμα ζευγάρια έχουν υποβληθεί σε IVF.

Περίληψη

Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτών (Animation: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου – Κυτταρικοί κύκλοι εμβρύων – Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου)

Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου: Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτών χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις: την M, την G₁, την S και την G₂. Η φάση M αντιστοιχεί στη μίτωση, η οποία συνήθως ακολουθείται από την κυτταροκίνηση. Η φάση S είναι η περίοδος αντιγραφής του DNA.

[**Σημαντικοί όροι:** μίτωση (mitosis), μεσόφαση (interphase), κυτταροκίνηση (cytokinesis), φάση M (M phase), φάση G₁ (G₁ phase), φάση S (S phase), φάση G₂ (G₂ phase), κυτταρομετρητής ροής (flow cytometer), κυτταρομετρητής ροής εξαρτώμενος από φθορισμό (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorter).]

Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την κυτταρική αύξηση και από εξωκυτταρικά σήματα: Διάφορα εξωκυτταρικά σήματα καθώς και το κυτταρικό μέγεθος ρυθμίζουν τη μετάβαση από συγκεκριμένα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

[**Σημαντικοί όροι:** START (START), σημείο περιορισμού (restriction point), G₀, G₀.]

Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου: Η λειτουργία διαφόρων σημείων ελέγχου και ρυθμιστικών μηχανισμών ανάδρασης συντονίζει τα γεγονότα που συμβαίνουν σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου και σταματούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου αν εντοπιστούν βλάβες στο DNA.

[**Σημαντικοί όροι:** σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoint), σημείο ελέγχου βλαβών στο DNA (DNA damage checkpoint), σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου (spindle assembly checkpoint).]

Περιορισμός της αντιγραφής του DNA σε μία μόνο φορά ανά κυτταρικό κύκλο:

Μόλις συμβεί η αντιγραφή του DNA, η έναρξη μιας νέας φάσης S παρεμποδίζεται μέχρι να ολοκληρωθεί η επόμενη μίτωση.

Ρυθμιστές της προόδου του κυτταρικού κύκλου (Animation: Οι κυκλίνες, οι κινάσες Cdk και ο κυτταρικός κύκλος)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου: Ο MPF είναι ο παράγοντας-κλειδί που ευθύνεται για τη ρύθμιση της μετάβασης από την G₂ στην M σε όλους τους ευκαρυώτες. Ο MPF είναι ένα διμερές της κυκλίνης B και της πρωτεϊνικής κινάσης Cdk1.

[Σημαντικοί όροι: παράγοντας προώθησης της ωρίμανσης (MPF, Maturation Promoting Factor), Cdk1, κυκλίνη (cyclin).]

Οικογένειες κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών: Συγκεκριμένοι συνδυασμοί κυκλινών και πρωτεϊνικών κινασών που μοιάζουν με τη Cdk1 ρυθμίζουν κάθε μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη. Η ενεργότητα των Cdk ρυθμίζεται από τη σύνδεσή τους με κυκλίνες, από ενεργοποιητικές και κατασταλτικές φωσφορυλιώσεις, καθώς και μέσω της πρόσδεσης αναστολέων των Cdk.

[Σημαντικοί όροι: κυκλίνη της G₁ (G₁ cyclin) ή Cln, Cdk, αναστολείς των Cdk (CKI, Cdk Inhibitors).]

Αυξητικοί παράγοντες και η ρύθμιση των Cdk της G₁: Οι αυξητικοί παράγοντες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ζωικών κυττάρων επάγοντας τη σύνθεση κυκλινών τύπου D. Κατόπιν, τα σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D προωθούν τα κύτταρα πέρα από το σημείο περιορισμού της G₁. Ένα σημαντικό υπόστρωμα των συμπλόκων Cdk4, 6/κυκλίνης D είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Rb, η οποία ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι το γονίδιο της κυκλίνης E. Η ενεργοποίηση συμπλόκων Cdk2/κυκλίνης E ευθύνεται για την είσοδο στη φάση S.

[Σημαντικοί όροι: Rb, ογκοκατασταλτικό γονίδιο (tumor suppressor gene), E2F.]

Σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA: Οι βλάβες στο DNA και η μη ολοκλήρωση της αντιγραφής προκαλούν στάση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G₁, S και G₂. Η στάση του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από βλάβες στο DNA και καταστέλλουν τις φωσφατάσες Cdc25, οι

οποίες είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των Cdk. Στα κύτταρα των θηλαστικών, η στάση στο σημείο ελέγχου της G_1 προκαλείται και από τον παράγοντα p53, ο οποίος επάγει τη σύνθεση του αναστολέα των Cdk p21.

[Σημαντικοί όροι: ATM, ATR, κινάση σημείου ελέγχου (checkpoint kinase), p53.]

Τα γεγονότα της φάσης M (Animation: Μίτωση ενός ζωικού κυττάρου – Η κυτταροκίνηση στα ανώτερα φυτά)

Τα στάδια της μίτωσης: Η μίτωση χωρίζεται σε τέσσερα στάδια: την πρόφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση. Τα κύρια γεγονότα της μίτωσης είναι η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου, η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου και η σύνδεση των μικροσωληνίσκων της ατράκτου με τον κινητοχώρο των χρωμοσωμάτων. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων και η μετακίνησή τους σε αντίθετους πόλους της ατράκτου. Τέλος, οι πυρήνες σχηματίζονται ξανά, τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και η κυτταροκίνηση διαιρεί το κύτταρο στη μέση.

[Σημαντικοί όροι: πρόφαση (prophase), μετάφαση (metaphase), ανάφαση (anaphase), τελόφαση (telophase), κεντρομερές (centromere), κινητοχώρος (kinetochore), κεντροσωμάτιο (centrosome), μιτωτική άτρακτος (mitotic spindle), προμετάφαση (prometaphase).]

Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B και η μετάβαση στη μετάφαση: Η έναρξη της φάσης M επάγεται με την ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B, το οποίο φωσφορυλιώνει άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, όπως είναι οι πυρηνικές λαμίνες και άλλες πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου, οι κοντενσίνες και πρωτεΐνες του στρώματος της συσκευής Golgi. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B ευθύνεται για τη συμπύκνωση της χρωματίνης, την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου, τον κατακερματισμό της συσκευής Golgi και την αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων για τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Στη συνέχεια, η σύνδεση των μικροσωληνίσκων της ατράκτου με τους κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων οδηγεί στη στοίχιση των χρωματίδων στη μεταφασική πλάκα.

[Σημαντικοί όροι: κοντενσίνη (condensin), κοχεσίνη (cohesin), κινάση Aurora (Aurora kinase), κινάση τύπου Polo (Polo-like kinase).]

Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου και η μετάβαση στην ανάφαση: Η ενεργοποίηση του συμπλόκου προώθησης της ανάφασης/κυκλώσωμα (APC/C) που έχει ενεργότητα λιγάσης της ουβικιτίνης προκαλεί την αποικοδόμηση κύριων ρυθμιστικών πρωτεϊνών επάγοντας τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση. Η ενεργότητα του συμπλόκου APC/C βρίσκεται σε καταστολή μέχρι το κύτταρο να περάσει το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου και όλα τα χρωμοσώματα να στοιχιστούν σωστά στην άτρακτο. Η επαγόμενη από ουβικιτινίωση πρωτεόλυση που πυροδοτείται από το APC/C οδηγεί στην αποικοδόμηση των κοχεσινών, με συνέπεια την αποδέσμευση των αδελφών χρωματίδων κατά την έναρξη της ανάφασης. Το σύμπλοκο APC/C επίσης ουβικιτινιώνει την κυκλίνη B, προκαλώντας την απενεργοποίηση της Cdk1 και την έξοδο από τη μίτωση.

[Σημαντικοί όροι: σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης/κυκλώσωμα (APC/C, Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome).]

Η κυτταροκίνηση: Η απενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B πυροδοτεί επίσης την έναρξη της κυτταροκίνησης. Στους ζυμομύκητες και στα ζωικά κύτταρα, η κυτταροκίνηση πραγματοποιείται μέσω της συστολής ενός δακτυλίου που αποτελείται από ινίδια ακτίνης και μυοσίνης. Στα κύτταρα των ανώτερων φυτών, η κυτταροκίνηση είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού ενός νέου κυτταρικού τοιχώματος και μιας κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο επίπεδο της μεταφασικής πλάκας.

[Σημαντικοί όροι: συσταλτός δακτύλιος (contractile ring).]

Μείωση και γονιμοποίηση (Animation: Η μειωτική διαίρεση – Σύγκριση μεταξύ μείωσης I και μίτωσης – Η πρόφαση I της μείωσης – Ο σχηματισμός των πολικών σωματίων)

Η διαδικασία της μείωσης: Η μείωση είναι ένας ιδιαίτερος κυτταρικός κύκλος κατά τον οποίο δημιουργούνται απλοειδή θυγατρικά κύτταρα. Ένας κύκλος σύνθεσης DNA ακολουθείται από δύο διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις. Κατά τη μείωση I, τα ομόλογα χρωμοσώματα αρχικά σχηματίζουν ζευγάρια και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε διαφορετικά θυγατρικά κύτταρα. Ακολουθεί η μείωση II, κατά την οποία, όπως και σε μια φυσιολογική μίτωση, οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται.

[Σημαντικοί όροι: μείωση (meiosis), λεπτοταινία (leptotene), ζυγοταινία (zygotene), παχυταινία (pachytene), διπλοταινία (diplotene), διακίνηση (diakinesis), σύναψη (synapsis), συναπτονημικό σύμπλοκο (synaptonemal complex), χίασμα (chiasma).]

Η ρύθμιση της μείωσης στα ωοκύτταρα: Η μείωση στα ωοκύτταρα των σπονδυλωτών ρυθμίζεται σε δύο χαρακτηριστικά σημεία του κυτταρικού κύκλου: στο στάδιο της διπλοταινίας της μείωσης I και στη μετάφαση της μείωσης II. Η στάση στη μετάφαση II είναι αποτέλεσμα της καταστολής του συμπλόκου APC/C από μια πρωτεϊνική κινάση που εκφράζεται στα ωοκύτταρα.

[Σημαντικοί όροι: πολικό σωματίο (polar body), κυτταροστατικός παράγοντας (CSF, Cytostatic Factor), Mos.]

Η γονιμοποίηση: Η γονιμοποίηση προκαλεί την εξαρτώμενη από ιόντα Ca^{2+} ενεργοποίηση του συμπλόκου APC/C, γεγονός που πυροδοτεί τη συνέχιση του κύκλου της μείωσης των ωοκυττάρων. Το γονιμοποιημένο ωάριο διαθέτει πλέον δύο απλοειδείς πυρήνες από τους οποίους σχηματίζεται ένα νέο διπλοειδές γονιδίωμα. Στη συνέχεια ξεκινούν οι εμβρυϊκές κυτταρικές διαιρέσεις.

[Σημαντικοί όροι: γονιμοποίηση (fertilisation), ζυγωτό (zygote), προπυρήνας (pronucleus).]

Ερωτήσεις

1. Ποιες είναι οι ομοιότητες και ποιες οι διαφορές των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G_0 και G_1 ;
2. Θεωρήστε μια κυτταρική σειρά θηλαστικού που διαιρείται κάθε 30 ώρες. Η μικροσκοπική παρατήρηση έδειξε ότι το 3,3% των κυττάρων είναι στη διαδικασία της μίτωσης σε οποιαδήποτε στιγμή. Η ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής αποκάλυψε ότι το 53,3% των κυττάρων διαθέτει ποσότητα DNA $2n$, το 16,7% $4n$ και το 30% μεταξύ $2n$ και $4n$. Ποια είναι η διάρκεια των φάσεων G_1 , S, G_2 και M του κυτταρικού κύκλου αυτών των κυττάρων;
3. Η έκθεση σε ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στο DNA και σταματά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου των G_1 , S και G_2 . Εξηγήστε γιατί η στάση του κυτταρικού κύκλου είναι ωφέλιμη στις περιπτώσεις αυτές.
4. Ποιοι μηχανισμοί ρυθμίζουν τη δράση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών;
5. Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της απράκτου αναστέλλει την έναρξη της ανάφασης έως ότου όλα τα χρωμοσώματα να στοιχιστούν σωστά στην άτρακτο. Ποια θα ήταν η συνέπεια πιθανής αποτυχίας της λειτουργίας του συγκεκριμένου σημείου ελέγχου που θα επέτρεπε την έναρξη της ανάφασης ενώ κάποιο χρωμόσωμα θα έχει συνδεθεί με τους μικροσωληνίσκους ενός μόνο κεντροσώματος;
6. Ποιες κυτταρικές διεργασίες θα επηρεάζονταν από την έκφραση ενός siRNA που θα στόχευε τη Cdk7;
7. Η πρωτεΐνη p16, που ανήκει στους αναστολείς των Cdk p16, προσδένεται ειδικά σε σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D. Ποια θα ήταν η αναμενόμενη επίδραση της υπερέκφρασης της p16 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου; Θα είχε κάποια επίδραση η υπερέκφραση της p16 σε ένα καρκινικό κύτταρο που δε διαθέτει λειτουργική πρωτεΐνη Rb;

- 8.** Η *in vitro* μεταλλαξιγένεση κλωνοποιημένου cDNA λαμινών έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μεταλλαγμάτων που δεν μπορούν να φωσφορυλιωθούν από τη Cdk1. Ποιες θα ήταν οι συνέπειες της έκφρασης αυτών των μεταλλαγμένων λαμινών στην καταστροφή του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της πρόφασης;
- 9.** Ποια υποστρώματα φωσφορυλιώνονται από το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B ώστε να ξεκινήσει η μίτωση;
- 10.** Έχει παραχθεί μια μεταλλαγμένη μορφή της κυκλίνης B η οποία είναι ανθεκτική στην αποικοδόμηση από το σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης/κυκλώσωμα (APC/C). Ποια επίδραση θα είχε η έκφραση αυτής της μεταλλαγμένης κυκλίνης B στη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση;
- 11.** Πώς προκαλείται ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων από τη δράση του συμπλόκου προώθησης της ανάφασης/κυκλώσωμα (APC/C);
- 12.** Έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο *mos* σε ποντίκια με ομόλογο ανασυνδυασμό. Ποιες είναι οι αναμενόμενες συνέπειες στη μείωση των ωοκυττάρων;
- 13.** Πώς επιτυγχάνεται η οριστική παρεμπόδιση της εισόδου άλλων σπερματοζωαρίων στο γονιμοποιημένο ωάριο;

Λεζάντες

ΕΙΚΟΝΑ 16.1 Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ο κύκλος διαίρεσης των περισσότερων ευκαρυωτικών κυττάρων χωρίζεται σε τέσσερις διακριτές φάσεις: την M, την G₁, την S και την G₂. Η φάση M (μίτωση) συνήθως ακολουθείται από την κυτταροκίνηση. Η φάση S είναι η περίοδος κατά την οποία αντιγράφεται το DNA. Το κύτταρο αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια της μεσόφασης, η οποία συμπεριλαμβάνει τις φάσεις G₁, S και G₂. Η σχετική διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου που απεικονίζονται εδώ αφορά την περίπτωση κυττάρων θηλαστικών τα οποία διπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό.

ΕΙΚΟΝΑ 16.2 Κύκλοι εμβρυϊκών κυττάρων. Κατά τους κυτταρικούς κύκλους στα πρώιμα έμβρυα, το κυτταρόπλασμα του ωαρίου διαιρείται ταχύτατα σε μικρότερα κύτταρα. Τα κύτταρα δεν αυξάνονται κατά τη διάρκεια αυτών των κυτταρικών κύκλων, οι οποίοι δε διαθέτουν τις φάσεις G₁ και G₂ αλλά αποτελούνται απλώς από σύντομες φάσεις S που εναλλάσσονται με φάσεις M.

ΕΙΚΟΝΑ 16.3 Προσδιορισμός της ποσότητας του κυτταρικού DNA. Ένας πληθυσμός κυττάρων σημαίνεται με μια φθορίζουσα χρωστική που δεσμεύεται στο DNA. Στη συνέχεια, τα κύτταρα διέρχονται από έναν κυτταρομετρητή ροής, ο οποίος μετρά την ένταση φθορισμού κάθε κυττάρου χωριστά. Τα δεδομένα στο γράφημα εκφράζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με την ένταση φθορισμού, η οποία είναι ανάλογη με την ποσότητα του DNA που διαθέτουν. Στην κατανομή εμφανίζονται δύο κορυφές, που αντιστοιχούν σε ποσότητα DNA $2n$ και $4n$, οι οποίες με τη σειρά τους αντιστοιχούν στις φάσεις G₁ και G₂/M του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα στη φάση S περιέχουν ποσότητα DNA μεταξύ $2n$ σε $4n$ και κατανέμονται ανάμεσα στις δύο αυτές κορυφές.

ΕΙΚΟΝΑ 16.4 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε ζυμομύκητες που αναπαράγονται με εκβλάστηση. (A) Ο κυτταρικός κύκλος του *Saccharomyces cerevisiae* ρυθμίζεται κυρίως σε ένα σημείο προς το τέλος της G₁ το οποίο ονομάζεται START. Η διέλευση από το σημείο START ελέγχεται από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, από παράγοντες σύζευξης και από το

κυτταρικό μέγεθος. Οι συγκεκριμένοι ζυμομύκητες διαιρούνται με εκβλάστηση. Το εκβλάστημα σχηματίζεται αμέσως μετά το σημείο START και συνεχίζει να αναπτύσσεται μέχρι να χωριστεί από το μητρικό κύτταρο μετά τη μίτωση. Το θυγατρικό κύτταρο που σχηματίζεται με την εκβλάστηση είναι μικρότερο από το μητρικό και επομένως χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να αναπτυχθεί κατά τη φάση G_1 του επόμενου κυτταρικού κύκλου. Οι φάσεις G_1 και S διεξάγονται κανονικά, αλλά η μιτωτική άτρακτος αρχίζει να σχηματίζεται κατά τη φάση S. Έτσι, ο κυτταρικός κύκλος του ζυμομύκητα που αναπαράγεται με εκβλάστηση δε διαθέτει διακριτή φάση G_2 . (B) Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης που δείχνει τον *Saccharomyces cerevisiae*. Το μέγεθος κάθε εκβλαστήματος αντικατοπτρίζει τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται. (B. David M. Phillips/Visuals Unlimited.)

ΕΙΚΟΝΑ 16.5 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ζωικών κυττάρων από αυξητικούς παράγοντες. Η διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο σε ένα σημείο προς το τέλος της φάσης G_1 το οποίο ονομάζεται σημείο περιορισμού. Αν δεν υπάρχουν διαθέσιμοι αυξητικοί παράγοντες κατά την G_1 , τα κύτταρα εισέρχονται σε μια φάση ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου η οποία ονομάζεται φάση G_0 .

ΕΙΚΟΝΑ 16.6 Ο κυτταρικός κύκλος του σχιζομύκητα. (A) Οι σχιζομύκητες αναπαράγονται με διχοτόμηση. Αναπτύσσονται μέσω της επιμήκυνσης των δύο άκρων τους και διαιρούνται σχηματίζοντας ένα τοίχωμα στη μέση του κυττάρου. Αντίθετα με τον κυτταρικό κύκλο των ζυμομυκήτων που αναπαράγονται με εκβλάστηση, ο κυτταρικός κύκλος των σχιζομυκήτων έχει κανονικές φάσεις G_1 , S, G_2 και M. Να σημειωθεί ότι η κυτταροκίνηση συμβαίνει κατά τη φάση G_1 . Το μήκος του κυττάρου υποδεικνύει τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται. (B) Φωτογραφίες οπτικής μικροσκοπίας που δείχνουν τα διαδοχικά στάδια της μίτωσης και της κυτταροκίνησης στον *Schizosaccharomyces pombe*. (B, ευγενική προσφορά του C. F. Robinow, University of Western Ontario.)

ΕΙΚΟΝΑ 16.7 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Πολλαπλά σημεία ελέγχου διασφαλίζουν τη μεταβίβαση ακέραιων γονιδιωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα. Τα σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA στις φάσεις G_1 , S και G_2 προκαλούν τη στάση του

κυτταρικού κύκλου αν υπάρχει ελαττωματικό ή μη αντιγραμμένο DNA. Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου διακόπτει τη μίτωση όταν τα χρωμοσώματα δε στοιχίζονται σωστά στη μιτωτική άτρακτο.

ΕΙΚΟΝΑ 16.8 Η αντιγραφή του DNA δεν είναι δυνατόν να ξεκινήσει

περισσότερες από μία φορές σε έναν κυτταρικό κύκλο. Η αντιγραφή του DNA επιτρέπεται να συμβεί μόνο μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Οι DNA ελικάσες MCM, που προσδένονται στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής μαζί με πρωτεΐνες του συμπλόκου ORC, είναι απαραίτητες για την έναρξη της αντιγραφής. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες MCM μπορούν να προσδεθούν στο DNA μόνο κατά τη φάση G₁, επιτρέποντας την έναρξη της αντιγραφής του DNA στη φάση S. Αμέσως μετά την έναρξη, οι πρωτεΐνες MCM εκτοπίζονται από τη θέση έναρξης, ώστε να μην μπορεί να επαναληφθεί η έναρξη της αντιγραφής πριν ολοκληρωθεί η επόμενη μίτωση.

ΕΙΚΟΝΑ 16.9 Η ανακάλυψη της ύπαρξης του MPF. Τα ωοκύτταρα του βατράχου παραμένουν σταματημένα στη φάση G₂ του κυτταρικού κύκλου μέχρι η ορμόνη προγεστερόνη να πυροδοτήσει την είσοδο στη φάση M της μείωσης. Στο πείραμα που παρουσιάζεται διαγραμματικά, χορηγήθηκε με μικροένεση κυτταρόπλασμα από κύτταρα που είχαν ολοκληρώσει τη μετάβαση από την G₂ στην M σε ωοκύτταρα σταματημένα στην G₂. Τέτοιου είδους μεταγγίσεις κυτταροπλάσματος προκαλούσαν μετάβαση από την G₂ στην M χωρίς να απαιτείται ορμονική διέγερση, αποδεικνύοντας ότι η ύπαρξη ενός κυτταροπλασματικού παράγοντα, του MPF, αρκεί για την επαγωγή της εισόδου στη φάση M της μείωσης.

ΕΙΚΟΝΑ 16.10 Ιδιότητες των μεταλλαγμάτων *cdc28* του *Saccharomyces*

***cerevisiae*.** Το θερμοευαίσθητο μετάλλαγμα *cdc28* αντιγράφεται φυσιολογικά στην επιτρεπτική θερμοκρασία. Στην αποτρεπτική θερμοκρασία, όμως, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου μπλοκάρεται στο σημείο START.

ΕΙΚΟΝΑ 16.11 Συσσώρευση και αποικοδόμηση κυκλινών σε έμβρυα αχινών.

Οι κυκλίνες ταυτοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες που συσσωρεύονται σε όλη τη διάρκεια της μεσόφασης και αποικοδομούνται ταχύτατα προς το τέλος της μίτωσης.

ΕΙΚΟΝΑ 16.12 Δομή του MPF. Ο MPF είναι ένα διμερές που αποτελείται από την κυκλίνη B και την πρωτεϊνική κινάση Cdk1.

ΕΙΚΟΝΑ 16.13 Η ρύθμιση του MPF. Η κινάση Cdk1 σχηματίζει σύμπλοκο με την κυκλίνη B κατά την G_2 . Στη συνέχεια, η Cdk1 φωσφορυλιώνεται στη θρεονίνη 161 καθώς και στην τυροσίνη 15 (και στη θρεονίνη 14 σε κύτταρα σπονδυλωτών). Οι φωσφορυλιώσεις αυτές επάγουν ή καταστέλλουν, αντίστοιχα, την ενεργότητα της Cdk1. Η αποφωσφορυλίωση της Thr14 και της Tyr15 ενεργοποιεί τον MPF, επιτρέποντας τη μετάβαση από την G_2 στην M. Η ενεργότητα του MPF εξουδετερώνεται προς το τέλος της μίτωσης από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση της κυκλίνης B.

ΕΙΚΟΝΑ 16.14 Σύμπλοκα κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Στους ζυμομύκητες, η διέλευση από το σημείο START ελέγχεται από τη Cdk1 σε σύμπλοκο με κυκλίνες της G_1 (Cln1, Cln2 και Cln3). Σύμπλοκα της Cdk1 με διαφορετικές κυκλίνες τύπου B (Clb) ρυθμίζουν στη συνέχεια την πρόοδο μέσα από τη φάση S και την είσοδο στη μίτωση. Στα ζωικά κύτταρα, η διέλευση από το σημείο περιορισμού της G_1 ελέγχεται από σύμπλοκα των Cdk4 και Cdk6 με κυκλίνες τύπου D. Σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E δρουν αργότερα στην G_1 και είναι απαραίτητα για τη μετάβαση από την G_1 στην S. Σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης A είναι απαραίτητα για την πρόοδο της φάσης S. Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης A ρυθμίζει τη μετάβαση στην G_2 , ενώ σύμπλοκα Cdk1/κυκλίνης B ρυθμίζουν τη μετάβαση από την G_2 στην M.

ΕΙΚΟΝΑ 16.15 Μηχανισμοί ρύθμισης των Cdk. Οι ενεργότητες των Cdk ρυθμίζονται με τέσσερις μοριακούς μηχανισμούς.

ΕΙΚΟΝΑ 16.16 Επαγωγή των κυκλινών τύπου D. Αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου επιτρέποντας τη διέλευση από το σημείο περιορισμού της G_1 . Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της επαγωγής της σύνθεσης κυκλινών τύπου D από το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK.

ΕΙΚΟΝΑ 16.17 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την Rb και τον E2F. Στη μη φωσφορυλιωμένη της μορφή, η πρωτεΐνη Rb προσδένεται σε μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F. Με τον τρόπο αυτό η Rb καταστέλλει τη

μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον E2F. Η φωσφορυλίωση της Rb από σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D προκαλεί την αποσύνδεσή της από τον E2F προς το τέλος της φάσης G₁. Στη συνέχεια, ο E2F επάγει την έκφραση των γονιδίων-στόχων του, τα οποία κωδικοποιούν απαραίτητες πρωτεΐνες για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

ΕΙΚΟΝΑ 16.18 Το σύμπλοκο Cdk2/κυκλίνης E και η είσοδος στη φάση S. Νωρίς στη φάση G₁, τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E καταστέλλονται από τον αναστολέα p27. Η διέλευση από το σημείο περιορισμού επάγει τη σύνθεση κυκλίνης E μέσω της ενεργοποίησης του E2F. Επιπλέον, η σηματοδότηση από αυξητικούς παράγοντες μειώνει τα επίπεδα του p27 μέσω της καταστολής τόσο της μεταγραφής όσο και της μετάφρασής του. Η επακόλουθη ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk2/κυκλίνης E οδηγεί στην ενεργοποίηση της ελικάσης MCM και στην έναρξη της αντιγραφής του DNA.

ΕΙΚΟΝΑ 16.19 Στάση του κυτταρικού κύκλου σε σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA. Οι πρωτεϊνικές κινάσες ATM και ATR ενεργοποιούνται στο πλαίσιο πρωτεϊνικών συμπλόκων που αναγνωρίζουν βλάβες στο DNA. Η ATM ενεργοποιείται κυρίως από δίκλωνες ρήξεις στο DNA και η ATR από μονόκλωνο ή από μη αντιγραμμένο DNA. Στη συνέχεια, οι ATM και ATR φωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν τις πρωτεϊνικές κινάσες Chk2 και Chk1 αντίστοιχα. Οι Chk1 και Chk2 φωσφορυλιώνουν και καταστέλλουν τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες Cdc25. Οι φωσφατάσες Cdc25 είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση τόσο της Cdk1 όσο και της Cdk2, με αποτέλεσμα η καταστολή των φωσφατασών αυτών να οδηγεί σε στάση του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA (στις φάσεις G₁, S και G₂).

ΕΙΚΟΝΑ 16.20 Ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 κατά τη στάση στη φάση G₁. Η πρωτεΐνη p53 έχει ρόλο-κλειδί στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου της G₁ στα κύτταρα των θηλαστικών. Η p53 σταθεροποιείται με φωσφορυλίωση από τις ATM και Chk2, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή της να αυξάνεται ταχύτατα ως απόκριση στην ύπαρξη βλαβών στο DNA. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί τον

αναστολέα των Cdk, p21, επιφέροντας έτσι την καταστολή των συμπλόκων Cdk2/κυκλίνης E και τη στάση του κυτταρικού κύκλου.

ΕΙΚΟΝΑ 16.21 Τα στάδια της μίτωσης σε ένα ζωικό κύτταρο. Κατά την πρόφαση, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και τα κεντροσωμάτια μετακινούνται προς αντίθετες πλευρές του πυρήνα, ξεκινώντας τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Στη συνέχεια, η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου επιτρέπει στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου να συνδεθούν με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων. Κατά την προμετάφαση, τα χρωμοσώματα μετακινούνται μπρος πίσω ανάμεσα στα κεντροσωμάτια και το μέσο του κυττάρου, ώσπου να στοιχιστούν τελικά στο ισημερινό επίπεδο της ατράκτου (μετάφαση). Κατά την ανάφαση, οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται και μετακινούνται προς τους αντίθετους πόλους της ατράκτου. Τέλος, η μίτωση ολοκληρώνεται με τον ανασχηματισμό των πυρηνικών φακέλων και την αποσυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων κατά την τελόφαση. Από την κυτταροκίνηση που ακολουθεί προκύπτουν δύο μεσοφασικά θυγατρικά κύτταρα. Να σημειωθεί ότι καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα λαμβάνει ένα κεντροσωμάτιο, το οποίο θα διπλασιαστεί πριν από την επόμενη μίτωση.

ΕΙΚΟΝΑ 16.22 Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού που δείχνουν τη χρωματίνη, την κερατίνη και τους μικροσωληνίσκους κατά τη μίτωση κυττάρων του πνεύμονα ενός τρίτωνα. Η χρωματίνη χρωματίστηκε μπλε, η κερατίνη κόκκινη και οι μικροσωληνίσκοι πράσινοι. (Conly L. Rieder/Biological Photo Service.)

ΕΙΚΟΝΑ 16.23 Κλειστή και ανοικτή μίτωση. Κατά την κλειστή μίτωση, ο πυρηνικός φάκελος διατηρείται ανέπαφος και τα χρωμοσώματα μετακινούνται προς τους πόλους της ατράκτου στο εσωτερικό του πυρήνα. Κατά την ανοικτή μίτωση, ο πυρηνικός φάκελος αποδιοργανώνεται και στην τελόφαση επανασχηματίζονται δύο νέοι φάκελοι γύρω από τις δύο ομάδες χρωμοσωμάτων στη θέση όπου υπήρχαν οι πόλοι της ατράκτου.

ΕΙΚΟΝΑ 16.24 Στόχοι του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B. Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B επάγει πολλαπλές αλλαγές στην οργάνωση τόσο του πυρήνα όσο και του κυτταροπλάσματος με την έναρξη της φάσης M, αφενός ενεργοποιώντας

άλλες πρωτεϊνικές κινάσες και αφετέρου φωσφορυλιώνοντας πρωτεΐνες όπως είναι οι κοντενσίνες, διάφορα συστατικά του πυρηνικού φακέλου, πρωτεΐνες της μήτρας του συστήματος Golgi και πρωτεΐνες που συνδέονται με τα κεντροσωμάτια και τους μικροσωληνίσκους.

EIKONA 16.25 Η δράση των κοχεσινών και των κοντενσινών. Οι κοχεσίνες προσδένονται στο DNA κατά τη φάση S και συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες συνδεδεμένες μεταξύ τους και μετά την αντιγραφή του DNA, καθ' όλη τη διάρκεια της S και της G₂, μέχρι την ανάφαση. Καθώς το κύτταρο εισέρχεται στη φάση M, οι κοχεσίνες αντικαθίστανται από κοντενσίνες σε όλο το μήκος του χρωμοσώματος, παμαμένοντας μόνο στο κεντρομερές. Η φωσφορυλίωση από την κινάση Cdk1 ενεργοποιεί τις κοντενσίνες, οι οποίες στη συνέχεια συμπυκνώνουν τη χρωματίνη.

EIKONA 16.26 Αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου. Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B φωσφορυλιώνει τις πυρηνικές λαμίνες, καθώς και πρωτεΐνες του συμπλόκου των πυρηνικών πόρων και της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Η φωσφορυλίωση των λαμινών προκαλεί την αποσυναρμολόγηση των ινιδίων που σχηματίζουν την πυρηνική λαμίνα σε ελεύθερα διμερή λαμινών.

EIKONA 16.27 Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που δείχνει μικροσωληνίσκους συνδεδεμένους με τον κινητοχώρο ενός χρωμοσώματος. (Conly L. Rieder/Biological Photo Service.)

EIKONA 16.28 Η μεταφασική άτρακτος. (A) Η άτρακτος αποτελείται από τέσσερις τύπους μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι του κινητοχώρου και οι χρωμοσωμικοί μικροσωληνίσκοι είναι συνδεδεμένοι με τα χρωμοσώματα, οι πολικοί μικροσωληνίσκοι από αντίθετους πόλους συνδέονται μεταξύ τους στο μέσο του κυττάρου και οι μικροσωληνίσκοι των αστέρων εκτείνονται ακτινωτά από τα κεντροσωμάτια προς την κυτταρική περιφέρεια. (B) Ένα κύτταρο κορήγονου (ψάρι της οικογένειας Salmonidae) στη μετάφαση (B, Michael Abbey/Photo Researchers, Inc.)

EIKONA 16.29 Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου. Η μετάβαση στην ανάφαση εξαρτάται από την ενεργοποίηση του συμπλόκου προώθησης της

ανάφασης/κυκλώσωμα (APC/C) που έχει ενεργότητα λιγάσης ουβικιτίνης. Σε όσους κινητοχώρους δεν έχουν συνδεθεί με τους μικροσωληνίσκους συγκροτείται και ενεργοποιείται το σύμπλοκο των πρωτεϊνών Mad/Bub, το οποίο καταστέλλει το APC/C μέσω της πρόσδεσής τους στην υπομονάδα Cdc20. Όταν όλα τα χρωμοσώματα στοιχιστούν και συνδεθούν με την άτρακτο, το σύμπλοκο Mad/Bub διασπάται, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η καταστολή της Cdc20 και να ενεργοποιείται το APC/C. Το APC/C ουβικιτινιώνει την κυκλίνη B, οδηγώντας έτσι στην αποικοδόμηση και στην απενεργοποίηση της Cdk1. Επιπλέον, το APC/C ουβικιτινιώνει τη σεκουρίνη, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση της σεπαράσης. Η πεπτιδάση σεπαράση διασπά μια υπομονάδα της κοχεσίνης, προκαλώντας την αποσύνδεση των αδελφών χρωματίδων και την έναρξη της ανάφασης.

ΕΙΚΟΝΑ 16.30 Κύτταρο κορήγονου σε ανάφαση. (Michael Abbey/Photo Researchers, Inc.)

ΕΙΚΟΝΑ 16.31 Κυτταροκίνηση σε ζωικά κύτταρα. (A) Η κυτταροκίνηση προκαλείται από τη συστολή ενός δακτυλίου ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης, ο οποίος χωρίζει το κύτταρο στα δύο. (B) Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης που δείχνει ένα ωάριο βατράχου κατά την κυτταροκίνηση. (B, David M. Phillips/Visuals Unlimited.)

ΕΙΚΟΝΑ 16.32 Κυτταροκίνηση σε ανώτερα φυτά. Κυστίδια Golgi που μεταφέρουν δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος συνδέονται με πολικούς μικροσωληνίσκους στο επίπεδο όπου βρισκόταν η μεταφασική πλάκα. Από τη σύντηξη των κυστιδίων δημιουργείται μια δομή που περιβάλλεται από μεμβράνη και μοιάζει με δίσκο. Η πρόιμη αυτή κυτταρική πλάκα επεκτείνεται περιφερειακά και συγχωνεύεται με την πλασματική μεμβράνη. Τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν από το διαχωρισμό του αρχικού κυττάρου παραμένουν συνδεδεμένα με πλασμοδέσμες.

ΕΙΚΟΝΑ 16.33 Σύγκριση μειωτικής και μιτωτικής διαίρεσης. Τόσο η μείωση όσο και η μίτωση ξεκινούν μετά την αντιγραφή του DNA, με κάθε χρωμόσωμα να αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες. Κατά τη μείωση I, τα ομόλογα

χρωμοσώματα ζευγαρώνουν και στη συνέχεια αποχωρίζονται και διανέμονται σε διαφορετικά κύτταρα. Οι αδελφές χρωματίδες χωρίζονται κατά τη μείωση II, η οποία μοιάζει με μια μιτωτική διαίρεση. Από τη μείωση επομένως παράγονται τέσσερα απλοειδή θυγατρικά κύτταρα.

ΕΙΚΟΝΑ 16.34 Στάδια της πρόφασης της μείωσης I. Φωτογραφίες μικροσκοπίου στις οποίες διακρίνεται η μορφολογία των χρωμοσωμάτων του κρίνου. (C. Hasenkampf/Biological Photo Service.)

ΕΙΚΟΝΑ 16.35 Το συναπτονημικό σύμπλοκο. Οι βρόχοι της χρωματίνης συνδέονται με πλευρικά δομικά στοιχεία, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μια δομή που μοιάζει με φερμουάρ.

ΕΙΚΟΝΑ 16.36 Ένα δισθενές χρωμόσωμα στο στάδιο της διπλοταινίας. Το δισθενές χρωμόσωμα αποτελείται από ζευγαρωμένα ομόλογα χρωμοσώματα. Οι αδελφές χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος συνδέονται στο κεντρομερές. Οι χρωματίδες των ομόλογων χρωμοσωμάτων συνδέονται σε χιάσματα, τα οποία είναι θέσεις όπου έχει συμβεί γενετικός ανασυνδυασμός. (B. John/Visuals Unlimited.)

ΕΙΚΟΝΑ 16.37 Διαχωρισμός χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση I. Κατά τη μετάφαση I, οι κινητοχώροι των αδελφών χρωματίδων είτε έχουν συνενωθεί είτε βρίσκονται ο ένας δίπλα στον άλλο. Επομένως, μικροσωληνίσκοι από τον ίδιο πόλο της ατράκτου συνδέονται με τους κινητοχώρους αδελφών χρωματίδων, ενώ μικροσωληνίσκοι από αντίθετους πόλους συνδέονται με τους κινητοχώρους ομόλογων χρωμοσωμάτων. Τα χιάσματα μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων διαρρηγνύονται κατά την ανάφαση I και τα ομόλογα χρωμοσώματα μετακινούνται προς τους αντίθετους πόλους της ατράκτου.

ΕΙΚΟΝΑ 16.38 Μείωση σε ωοκύτταρα σπονδυλωτών. Η διαδικασία της μείωσης σταματάει στο στάδιο της διπλοταινίας, κατά την οποία τα ωοκύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος. Στη συνέχεια, τα ωοκύτταρα συνεχίζουν τη μείωση ως απόκριση σε ορμονική διέγερση και ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση, με ασύμμετρη κυτταροκίνηση από την οποία παράγεται ένα μικρό πολικό σωματίο. Στα ωοκύτταρα των περισσότερων σπονδυλωτών, η μείωση σταματά και πάλι στη μετάφαση II.

ΕΙΚΟΝΑ 16.39 Τα επίπεδα της ενεργότητας του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B κατά τη μείωση των ωοκυττάρων. Η ορμονική διέγερση των ωοκυττάρων στο στάδιο της διπλοταινίας ενεργοποιεί το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B, με αποτέλεσμα τη μετάβαση στη μετάφαση I. Η ενεργότητα Cdk1/κυκλίνης B μειώνεται μόνο μερικώς κατά τη μετάβαση από τη μετάφαση I στην ανάφαση I και το ωοκύτταρο παραμένει στη φάση M. Μετά την ολοκλήρωση της μείωσης I, η ενεργότητα Cdk1/κυκλίνης B αυξάνεται και πάλι και παραμένει σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της στάσης στη μετάφαση II.

ΕΙΚΟΝΑ 16.40 Ταυτοποίηση του κυτταροστατικού παράγοντα. Κυτταρόπλασμα από ένα ωάριο που βρισκόταν στη μετάφαση II χορηγήθηκε με μικροένεση σε ένα κύτταρο ενός εμβρύου το οποίο αποτελούνταν συνολικά από δύο κύτταρα. Ο κυτταρικός κύκλος αυτού του κυττάρου σταμάτησε στη μετάφαση, ενώ το δεύτερο κύτταρο συνέχισε να διαιρείται. Επομένως, ένας παράγοντας από το κυτταρόπλασμα του ωαρίου της μετάφασης II (κυτταροστατικός παράγοντας) προκάλεσε τη στάση του εμβρυϊκού κυττάρου στο οποίο έγινε η μικροένεση στη μετάφαση.

ΕΙΚΟΝΑ 16.41 Διατήρηση της ενεργότητας του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B από την πρωτεϊνική κινάση Mos. Η πρωτεϊνική κινάση Mos διατηρεί το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B ενεργό αποτρέποντας την αποικοδόμηση της κυκλίνης B από το σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης/κυκλώσωμα (APC/C). Η δράση της Mos απαιτεί τις πρωτεϊνικές κινάσες MEK, ERK και Rsk. Η Rsk φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Emi2/Eip1, η οποία προσδέεται στη Cdc20 και καταστέλλει το σύμπλοκο APC/C.

ΕΙΚΟΝΑ 16.42 Γονιμοποίηση. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης που δείχνει ένα ανθρώπινο σπερματοζώαριο να γονιμοποιεί ένα ωάριο. (David M. Philips/Visuals Unlimited.)

ΕΙΚΟΝΑ 16.43 Η γονιμοποίηση και η ολοκλήρωση της μείωσης. Η γονιμοποίηση επάγει τη μετάβαση από τη μετάφαση II στην ανάφαση II, οδηγώντας στην ολοκλήρωση της μείωσης του ωοκυττάρου και στην παραγωγή ενός δεύτερου πολικού σωματίου (το οποίο συνήθως εκφυλίζεται). Ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου αποσυμπυκνώνεται, με αποτέλεσμα το γονιμοποιημένο ωάριο

(ζυγωτό) να διαθέτει δύο απλοειδείς πυρήνες (αρσενικό και θηλυκό προπυρήνα). Στα θηλαστικά, το DNA των προπυρήνων αντιγράφεται καθώς αυτοί μετακινούνται ο ένας προς τον άλλο. Στη συνέχεια, ξεκινά η μίτωση, με τα χρωμοσώματα από τους δύο γονείς (αρσενικό και θηλυκό) να στοιχίζονται σε μια κοινή άτρακτο. Από την ολοκλήρωση της μίτωσης και την κυτταροκίνηση παράγεται τελικά ένα έμβρυο δύο κυττάρων, με κάθε κύτταρο να διαθέτει διπλοειδές γονιδίωμα.

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 16.1 Αναστολείς των Cdk

Καταστολέας	Cdk ή σύμπλοκο Cdk/κυκλίνης	Φάση του κυτταρικού κύκλου που καταστέλλεται
Οικογένεια Ink4 (p15, p16, p18, p19)	Cdk4 και Cdk6	G ₁
Οικογένεια Cip/Kip (p21, p27, p57)	Cdk2/κυκλίνη E	G ₁
	Cdk2/κυκλίνη A	S

Πειράματα-σταθμοί

16.2 Πείραμα-σταθμός: Η ανακάλυψη του MPF

Το ευρύτερο πλαίσιο

Σε πειράματα μεταμόσχευσης κυτταρικού πυρήνα και κυτταρικής σύντηξης που διεξήχθησαν κατά τη δεκαετία του 1960 παρατηρήθηκε ότι οι πυρήνες που μεταφέρονται σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια του μιτωτικού κυτταρικού κύκλου υιοθετούν κατά κανόνα τη συμπεριφορά του κυττάρου-ξενιστή. Επομένως, ήταν προφανές ότι ο μιτωτικός κύκλος του πυρήνα ρυθμιζόταν από κάποιους άγνωστους παράγοντες του κυτταροπλάσματος. Ωστόσο, η ύπαρξη των υποθετικών κυτταροπλασματικών παραγόντων που ρυθμίζουν τον μιτωτικό κύκλο του πυρήνα έπρεπε να αποδειχθεί με μια άμεση πειραματική προσέγγιση. Η απόδειξη προήλθε από τις μελέτες των Masui και Markert, οι οποίοι ερεύνησαν το ρόλο των κυτταροπλασματικών παραγόντων στη ρύθμιση της συμπεριφοράς του πυρήνα κατά τη μείωση σε ωκύτταρα βατράχου.

Διάφορα χαρακτηριστικά της μείωσης των ωοκυττάρων του βατράχου υποδείκνυαν ότι ρυθμίζεται από κυτταροπλασματικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, στα ωοκύτταρα του βατράχου ο μειωτικός κύκλος παραμένει σε στάση στο τέλος της πρόφασης της μείωσης I. Η χορήγηση προγεστερόνης πυροδοτεί τη συνέχιση της μείωσης, γεγονός που αντιστοιχεί στη μετάβαση των σωματικών κυττάρων από τη φάση G_2 στην M. Στη συνέχεια, τα ωοκύτταρα πραγματοποιούν μια δεύτερη στάση στη μετάφαση της μείωσης II και παραμένουν σε στάση μέχρι να γονιμοποιηθούν. Οι Masui και Markert υπέθεσαν ότι οι επιδράσεις στη μείωση τόσο από τη χορήγηση ορμόνης όσο και από τη γονιμοποίηση οφείλονταν σε μεταβολές του κυτταροπλάσματος οι οποίες ευθύνονταν για τη ρύθμιση της συμπεριφοράς του πυρήνα. Έλεγξαν την υπόθεσή τους μεταφέροντας κυτταρόπλασμα από διεγερμένα με ορμόνη ωοκύτταρα σε μη διεγερμένα ωοκύτταρα. Με τα πειράματά τους απέδειξαν ότι ένας κυτταροπλασματικός παράγοντας, τον οποίο ονόμασαν παράγοντα προώθησης της ωρίμανσης (MPF), ευθύνεται για την επαγωγή της μείωσης κατά τη χορήγηση ορμόνης.

Τα πειράματα

Εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους και της ανθεκτικότητάς τους που τους επιτρέπει να επιβιώνουν μετά από ένεση με γυάλινες μικροπιπέτες, τα ωοκύτταρα του βατράχου αποτελούν ιδιαίτερα κατάλληλο πειραματικό σύστημα για την ανάλυση κυτταροπλασματικών παραγόντων. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων των Masui και Markert βασίστηκε στην αφαίρεση κυτταροπλάσματος από ωοκύτταρα-δότες στα οποία είχε χορηγηθεί προγεστερόνη που επάγει την προώθηση της μείωσης. Στη συνέχεια, διαφορετικές ποσότητες αυτού του κυτταροπλάσματος μεταφέρονταν με ένεση σε ωοκύτταρα-δέκτες στα οποία δεν είχε χορηγηθεί ορμόνη. Το σημαντικότερο αποτέλεσμα ήταν ότι το κυτταρόπλασμα που είχε απομονωθεί από τα ωοκύτταρα-δότες έξι ή περισσότερες ώρες μετά τη χορήγηση ορμόνης προκαλούσε την προώθηση της μείωσης στα ωοκύτταρα-δέκτες (βλ. εικόνα). Αντίθετα, η ένεση κυτταροπλάσματος από ωοκύτταρα-μάρτυρες τα οποία δεν είχαν εκτεθεί σε προγεστερόνη δεν είχε καμία επίδραση στους δέκτες. Επομένως, ήταν προφανές ότι τα ωοκύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί ορμόνη περιείχαν έναν κυτταροπλασματικό παράγοντα που μπορούσε να επάγει την προώθηση της μείωσης σε κύτταρα-δέκτες που δεν είχαν εκτεθεί ποτέ σε προγεστερόνη.

Πειράματα με δείγματα αναφοράς (για αρνητικό έλεγχο) απέκλεισαν την πιθανότητα να είναι η προγεστερόνη ο κυτταροπλασματικός παράγοντας που επάγει τη μείωση στα κύτταρα-δέκτες. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η ένεση προγεστερόνης σε ωοκύτταρα-δέκτες δεν επάγει μείωση. Μόνο η εξωτερική εφαρμογή της ορμόνης είναι αποτελεσματική, γεγονός που υποδεικνύει ότι η προγεστερόνη επιδρά σε κάποιον επιφανειακό υποδοχέα με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί έμμεσα έναν ειδικό κυτταροπλασματικό παράγοντα. Παρόμοια πειράματα που διεξήχθησαν ανεξάρτητα από τους Dennis Smith και Robert Ecker (The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 232-247, 1971) οδήγησαν στο ίδιο συμπέρασμα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η δράση της προγεστερόνης σε αυτό το σύστημα διαφέρει από τη δράση της στα περισσότερα κύτταρα, στα οποία διαχέεται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και προσδέεται σε έναν ενδοκυτταρικό υποδοχέα (βλ. Κεφάλαιο 15). Στα ωοκύτταρα, ωστόσο, η προγεστερόνη είναι σαφές ότι επιδρά σε έναν επιφανειακό υποδοχέα, μέσω του οποίου ενεργοποιεί έναν παράγοντα στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου. Οι Masui και Markert επινόησαν τον όρο «παράγοντας προώθησης της ωρίμανσης» για το ρυθμιστή της μείωσης που πρώτοι

ανακάλυψαν, εμπνεόμενοι από το γεγονός ότι η προώθηση της μείωσης στα ωοκύτταρα συνήθως αποκαλείται ωρίμανση του ωοκυττάρου.

Ο αντίκτυπος

Μετά την ανακάλυψή του σε ωοκύτταρα βατράχων, ο MPF βρέθηκε και σε σωματικά κύτταρα, στα οποία επάγει τη μετάβαση από τη φάση G_2 της μίτωσης στη φάση M. Επομένως, ο MPF είναι ο γενικός ρυθμιστής της εισόδου στη φάση M των κυτταρικών κύκλων τόσο της μίτωσης όσο και της μείωσης. Ο MPF απομονώθηκε τελικά από ωοκύτταρα βατράχου το 1988. Στη συνέχεια, με τη γενετική ανάλυση στον ζυμομύκητα και με μελέτες σε έμβρυα αχινών οδήγησε στην αποκάλυψη της ταυτότητας αυτού του καθοριστικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, ο MPF ταυτοποιήθηκε ως ένα διμερές της κυκλίνης B με την πρωτεϊνική κινάση Cdk1. Περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι τόσο η κυκλίνη B όσο και η Cdk1 είναι μέλη μεγάλων οικογενειών πρωτεϊνών. Σε αυτές ανήκουν πολλές διαφορετικές κυκλίνες και πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες εμπλέκονται, κατά αναλογία με τον MPF, στη ρύθμιση της μετάβασης από μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη. Συνεπώς, η ανακάλυψη του MPF σε ωοκύτταρα βατράχου άνοιξε τον δρόμο για την κατανόηση του ρυθμιστικού μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου, ενός μηχανισμού που είναι συντηρημένος σε όλους τους ευκαρυώτες.

Λεζάντα:

Οι αναγραφόμενες στο διάγραμμα ποσότητες κυτταροπλάσματος από ωοκύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί προγεστερόνη μεταφέρθηκαν με ένεση σε ωοκύτταρα-δέκτες. Το κυτταρόπλασμα του δότη είτε αφαιρέθηκε από την κεντρική περιοχή των ωοκυττάρων με μικροπιπέτα (συμπαγής γραμμή) είτε παρασκευάστηκε με ομογενοποίηση ολόκληρων ωοκυττάρων (διακεκομμένη γραμμή). Τα αποτελέσματα δίνονται ως ποσοστό των ωοκυττάρων-δεκτών στα οποία παρατηρήθηκε επαγωγή της προώθησης της μείωσης.

16.2 Η ταυτοποίηση της κυκλίνης

Το ευρύτερο πλαίσιο

Ο Tim Hunt και οι συνεργάτες του μελέτησαν την πρωτεϊνοσύνθεση σε ωάρια αχινού μετά τη γονιμοποίηση, με σκοπό να ταυτοποιήσουν νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες που πιθανόν να ήταν απαραίτητες για την κυτταρική διαίρεση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Διάφορα πειράματα είχαν ήδη δείξει ότι η μετάφραση των μορίων mRNA μητρικής προέλευσης, τα οποία είναι αποθηκευμένα στα αγονιμοποιητά ωάρια, ενεργοποιείται κατά τη γονιμοποίηση, προκαλώντας εντυπωσιακές μεταβολές στο πρότυπο της πρωτεϊνοσύνθεσης. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας καταστολείς της μετάφρασης είχε αποδειχθεί ότι η πρωτεϊνοσύνθεση είναι απαραίτητη για την κυτταρική διαίρεση κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Για παράδειγμα, η καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης μετά τη γονιμοποίηση ωαρίων αχινού παρεμποδίζει την αποσύνθεση του πυρηνικού φακέλου, τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και το σχηματισμό της ατράκτου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδείκνυαν ότι για τις κυτταρικές διαιρέσεις του εμβρύου είναι απαραίτητες ορισμένες πρωτεΐνες που συντίθενται στα γονιμοποιημένα ωάρια από mRNA μητρικής προέλευσης.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο Hunt και οι συνεργάτες του αποφάσισαν να μελετήσουν την πρωτεϊνοσύνθεση σε γονιμοποιημένα ωάρια, με την ελπίδα να καταφέρουν να ταυτοποιήσουν νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση. Τα πειράματά τους οδήγησαν στην ταυτοποίηση των κυκλινών και στην αποσαφήνιση του θεμελιώδους μηχανισμού που ωθεί τον κύκλο διαίρεσης των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Τα πειράματα

Γονιμοποιημένα και μη γονιμοποιημένα ωάρια αχινού επώαστηκαν παρουσία ραδιενεργής μεθειονίνης. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα και οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες. Παρατηρήθηκε ότι στα γονιμοποιημένα ωάρια συντίθενται διάφορες πρωτεΐνες, όπως είχε ήδη βρεθεί σε ωάρια άλλων οργανισμών. Ωστόσο, έπειτα από πολύ προσεκτική εξέταση των προτύπων των ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών σε διαφορετικούς χρόνους μετά τη γονιμοποίηση παρατηρήθηκε ένα εκπληκτικό φαινόμενο. Ο Hunt και οι συνεργάτες του ανέλυσαν το πρότυπο των

πρωτεϊνών ανά διαστήματα 10 λεπτών μετά τη γονιμοποίηση και ταυτοποίησαν μια πρωτεΐνη η οποία βρισκόταν σε μεγάλη συγκέντρωση στα γονιμοποιημένα ωάρια, αλλά στη συνέχεια σχεδόν εξαφανιζόταν 85 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση. Η πρωτεΐνη επανεμφανιζόταν σε υψηλά επίπεδα 95 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση και εξαφανιζόταν πάλι ύστερα από 30 λεπτά. Εξαιτίας των κυκλικών διακυμάνσεων της εμφάνισής της, η πρωτεΐνη ονομάστηκε κυκλίνη.

Οι ερευνητές κατέληξαν σε ένα ακόμη εκπληκτικό αποτέλεσμα όταν αντιπαρέβαλαν τις διακυμάνσεις στα επίπεδα της κυκλίνης με τις χρονικές στιγμές των κυτταρικών διαίρεσεων στα αναπτυσσόμενα έμβρυα αχινού (βλ. εικόνα). Η πρώτη διαίρεση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο έμβρυο δύο κυττάρων συνέβαινε 85 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση και συνέπιπτε με την απότομη μείωση στα επίπεδα της κυκλίνης. Έπειτα από την πρώτη κυτταρική διαίρεση, τα επίπεδα της κυκλίνης αυξάνονταν και μειώνονταν ξανά 125 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση, συμπίπτοντας με τον δεύτερο κύκλο κυτταρικής διαίρεσης του εμβρύου. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι η σύνθεση της κυκλίνης ήταν συνεχής μετά τη γονιμοποίηση, αλλά η αποικοδόμησή της ήταν ταχύτατη ακριβώς πριν από κάθε κυτταρική διαίρεση.

Ο αντίκτυπος

Με βάση την περιοδικότητα της αποικοδόμησης της κυκλίνης, που συμπίπτει με την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης στα έμβρυα, ο Hunt και οι συνεργάτες του συμπέραναν ότι «ήταν δύσκολο να πιστέψει κανείς πως η συμπεριφορά των κυκλινών δε συνδέεται με τις διεργασίες που εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση». Χωρίς όμως να έχουν πειραματικά δεδομένα που να δείχνουν τη βιολογική δράση της κυκλίνης, δεν μπορούσαν να αποδείξουν με άμεσο τρόπο το συμπέρασμά τους. Ωστόσο, ήταν γνωστό ότι η ενεργότητα του MPF επίσης κυμαινόταν περιοδικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ενώ είχε αποδειχθεί ότι για το σχηματισμό ενεργού MPF ήταν απαραίτητη η πρωτεϊνοσύνθεση. Οι ομοιότητες της συμπεριφοράς του MPF και της κυκλίνης ώθησαν τον Hunt και τους συνεργάτες του να διατυπώσουν την υπόθεση ότι η βιολογική ενεργότητα που ήταν γνωστή ως MPF σχετιζόταν άμεσα με την κυκλίνη, μια πρωτεΐνη με επίπεδα που αυξομειώνονται περιοδικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Αργότερα, με τα πειράματα της Joan Ruderman και των συνεργατών της αποδείχθηκε ότι μια ένεση κυκλίνης αρκούσε να πυροδοτήσει την είσοδο των ωοκυττάρων του βατράχου στη μείωση, επιβεβαιώνοντας ότι η κυκλίνη πράγματι διέθετε τη βιολογική

ενεργότητα του MPF. Η βιοχημική σχέση μεταξύ της κυκλίνης και του MPF αποκαλύφθηκε στη συνέχεια με την απομόνωση του MPF από ωάρια βατράχου στο εργαστήριο του James Maller και τον επακόλουθο χαρακτηρισμό του MPF ως διμερούς της κυκλίνης B με την κινάση Cdk1. Η περιοδική αποικοδόμηση της κυκλίνης B, που ανακαλύφθηκε από την ομάδα του Tim Hunt, ελέγχει την ενεργότητα της κινάσης Cdk1 κατά την είσοδο και την έξοδο από τη μίτωση. Επιπλέον, άλλες κυκλίνες έχουν παρόμοιους ρόλους στη ρύθμιση της μετάβασης άλλων φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, η ανακάλυψη της κυκλίνης ως πρωτεΐνης με περιοδικά μεταβαλλόμενη συγκέντρωση σε έμβρυα αχινού ήταν το κομβικό σημείο για την αποσαφήνιση της μοριακής βάσης της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου.

Λεζάντα:

Πέντε λεπτά μετά τη γονιμοποίηση χορηγήθηκε ραδιενεργή μεθειονίνη στα αυγά του αχινού. Σε χρονικά διαστήματα 10 λεπτών συλλέγονταν δείγματα και αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση προκειμένου να καθοριστούν τα επίπεδα της κυκλίνης. Παράλληλα, τα δείγματα εξετάζονταν με το οπτικό μικροσκόπιο για να υπολογιστεί το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση της μίτωσης.

Απαντήσεις στις ερωτήσεις

1. Τόσο τα κύτταρα στην G_0 όσο και τα κύτταρα στην G_1 διαθέτουν την ίδια ποσότητα DNA ($2n$) και είναι μεταβολικά ενεργά. Τα κύτταρα στην G_0 διαφέρουν από τα κύτταρα στην G_1 καθώς βρίσκονται σε μια κατάσταση αδράνειας, στην οποία δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν, παρά μόνο αν διεγερθούν για να εισέλθουν και πάλι στον κυτταρικό κύκλο.

2. Το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε μια ορισμένη φάση του κυτταρικού κύκλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της διάρκειας της συγκεκριμένης φάσης. Εφόσον το κύτταρο ολοκληρώνει όλες τις φάσεις σε 30 ώρες και το 53,3% των κυττάρων περιέχει ποσότητα DNA $2n$ (κύτταρα στην G_1), η διάρκεια της φάσης G_1 είναι 16 ώρες (αντιστοιχεί στο 53,3% των 30 ωρών). Τα κύτταρα στη φάση S περιέχουν ποσότητα DNA μεταξύ $2n$ και $4n$ και αντιστοιχούν στο 30% των κυττάρων. Επομένως, η διάρκεια της φάσης S είναι 9 ώρες. Το 16,7% των κυττάρων περιέχει ποσότητα DNA $4n$ και αντιστοιχεί στα κύτταρα που βρίσκονται στις φάσεις G_2 και M. Εφόσον το 3,3% των κυττάρων είναι στη φάση M, το 13,4% (δηλαδή $16,7\% - 3,3\%$) θα είναι στη φάση G_2 . Επομένως, η διάρκεια της G_2 είναι 4 ώρες και η διάρκεια της M είναι 1 ώρα.

3. Η στάση του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου των G_1 και S επιτρέπει την επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA πριν από την αντιγραφή του. Η στάση στο σημείο ελέγχου της G_2 δίνει τη δυνατότητα επιδιόρθωσης ρήξεων ή άλλων βλαβών στο DNA πριν από τη διεξαγωγή της μίτωσης, εμποδίζοντας τη μεταβίβαση DNA με βλάβες στα θυγατρικά κύτταρα.

4. Οι Cdk ρυθμίζονται με τέσσερις διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι δύο μηχανισμοί είναι θετικοί και αφορούν τη φωσφορυλίωση ειδικών θέσεων και τη σύνδεση των Cdk με κυκλίνες. Οι δύο άλλοι μηχανισμοί είναι αρνητικοί και αφορούν τη σύνδεση των Cdk με τους αναστολείς τους και τη φωσφορυλίωσή τους σε διαφορετικές ειδικές θέσεις.

5. Το ένα θυγατρικό κύτταρο θα λάμβανε δύο αντίγραφα του συγκεκριμένου μη ευθυγραμμισμένου χρωμοσώματος, ενώ το άλλο θυγατρικό κύτταρο δε θα λάμβανε κανένα.

6. Το σύμπλοκο Cdk7/κυκλίνης H είναι μια κινάση απαραίτητη τόσο για την ενεργοποίηση κινασών Cdk όσο και για την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II. Η καταστολή της Cdk7 θα οδηγούσε στη στάση του κυτταρικού κύκλου και στην καταστολή της μεταγραφής.

7. Σε ένα φυσιολογικό κύτταρο, η υπερέκφραση του p16 θα προκαλούσε αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου και στάση στο σημείο περιορισμού της G₁. Ένα καρκινικό κύτταρο που δε διαθέτει λειτουργική Rb δε θα επηρεαζόταν από την υπερέκφραση του p16, επειδή η Rb είναι ο κύριος στόχος των πρωτεϊνικών συμπλόκων Cdk4, 6/κυκλίνης D.

8. Η φωσφορυλίωση των πυρηνικών λαμινών είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση της πυρηνικής λάμινας. Η έκφραση μεταλλαγμένων λαμινών που δε διαθέτουν θέση φωσφορυλίωσης για τη Cdk1 θα εμπόδιζε την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου.

9. Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B φωσφορυλιώνει πολλές δομικές πρωτεΐνες μεταβάλλοντας (alter) άμεσα τις ιδιότητές τους και προκαλώντας την έναρξη της μίτωσης. Στις πρωτεΐνες αυτές συμπεριλαμβάνονται οι κοντενσίνες, οι πυρηνικές λαμίνες, διάφορες πρωτεΐνες του στρώματος της συσκευής Golgi και πρωτεΐνες που συνδέονται με μικροσωληνίσκους. Επιπλέον, το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B ενεργοποιεί κι άλλες πρωτεϊνικές κινάσες.

10. Η ανάφαση θα ξεκινούσε κανονικά. Ωστόσο, το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B θα παρέμενε ενεργό, με αποτέλεσμα να μην ξανασηματιστεί ο πυρήνας και τα χρωμοσώματα να παραμείνουν συμπυκνωμένα χωρίς να συμβαίνει κυτταροκίνηση.

11. Το σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης/κυκλόσωμα (APC/C) πυροδοτεί την αποικοδόμηση της σεκουρίνης, με συνέπεια να ενεργοποιείται η πρωτεάση

σεπαράση. Στη συνέχεια, η σεπαράση πέπτει τις κοχεςίνες, σπάζοντας το δεσμό ανάμεσα στις αδελφές χρωματίδες.

12. Τα ωκύτταρα των ποντικών αυτών δε θα μπορούσαν να σταματήσουν τον κυτταρικό κύκλο στη μετάφαση II.

13. Η αλληλεπίδραση του πρώτου σπερματοζωαρίου με τον υποδοχέα του προκαλεί απελευθέρωση ασβεστίου στο εσωτερικό του ωαρίου, πιθανότατα μέσω της υδρόλυσης της PIP_2 και της απελευθέρωσης IP_3 , η οποία ανοίγει IP_3 -εξαρτώμενους διαύλους Ca^{2+} στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το ασβέστιο που απελευθερώνεται επάγει την εξωκυττάρωση εκκριτικών κοκκίων των οποίων το περιεχόμενο τροποποιεί το εξωκυτταρικό κάλυμμα του ωαρίου. Αυτές οι τροποποιήσεις του καλύμματος παρεμποδίζουν την είσοδο άλλων σπερματοζωαρίων.