

# ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κάθε αλλαγή ή βλάβη στο σύστημα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έχει δραματικές επιπτώσεις για τον οργανισμό και μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου. Ένα καρκινικό κύτταρο χαρακτηρίζεται από απώλεια των φυσιολογικών μηχανισμών ρύθμισης της αύξησης, πολλαπλασιάζεται όταν δεν πρέπει και σχηματίζει πολύστοιβες αποικίες (όγκος).

Η καρκινογένεση είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία, η οποία διαρκεί δύο, τρεις ή και περισσότερες δεκαετίες. Αρχίζει με την αλλοίωση του γενετικού υλικού του κυττάρου (στάδια έκθεσης και έναρξης) και «προωθείται» προς το τελικό (κλινικό) στάδιο με την επίδραση και άλλων παραγόντων.

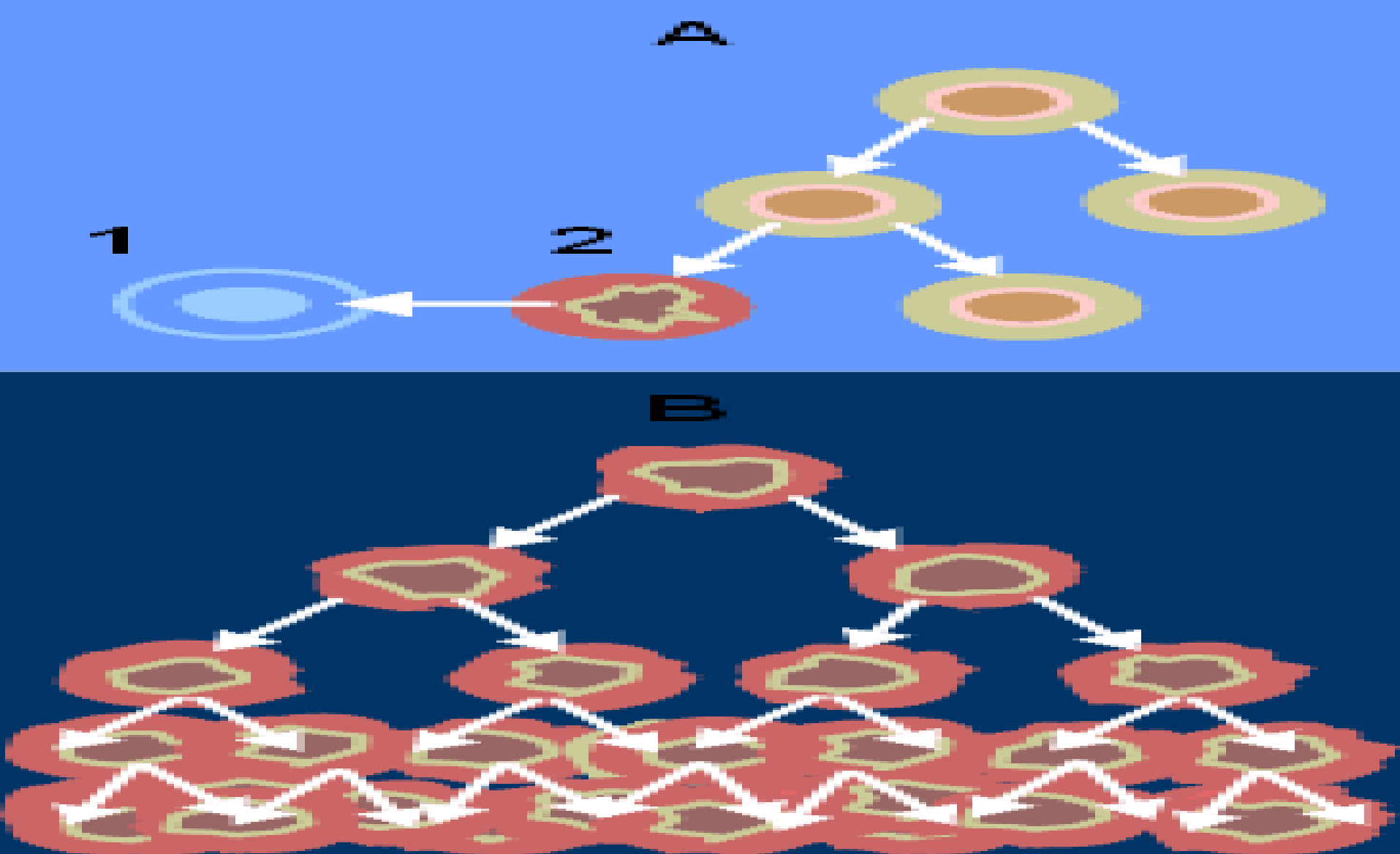
Συνήθως ο καρκίνος γίνεται αντιληπτός κατά το τελευταίο στάδιο, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η αντιμετώπισή του.

Κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση διαδραματίζουν τα **ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και οι αυξητικοί παράγοντες.**

Θα εξετασθούν οι κατηγορίες ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων και αυξητικών παραγόντων, οι μηχανισμοί δράσης τους στο κύτταρο καθώς και οι παράγοντες που ενεργοποιούν ή αλλάζουν την έκφρασή τους.

Ακόμη, θα γίνει αναφορά στους μηχανισμούς μεταλλαξογένεσης αλλά και επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού, που διαθέτουν τα κύτταρα, δεδομένης της σημασίας τους για την εγκατάσταση οποιασδήποτε αλλαγής στο DNA.

Θα αναφερθούν επίσης οι κατηγορίες των ογκογόνων ιών που προσβάλλουν τα ευκαρυωτικά κύτταρα, λόγω της συμμετοχής τους στην εμφάνιση ορισμένων καρκίνων, όπως στην περίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.



When normal cells are damaged beyond repair, they are eliminated by [apoptosis](#) (A).

Cancer cells avoid apoptosis and continue to multiply in an unregulated manner (B).

## ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

### ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ

Στο DNA γίνεται ένας σημαντικός αριθμός αυθόρμητων αλλαγών. Οι περισσότερες από τις αλλαγές αυτές επιδιορθώνονται από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης που διαθέτει το κύτταρο διατηρώντας έτσι την πιστότητα του DNA. Όμως ένας μικρός αριθμός αλλαγών (μεταλλάξεις) παραμένουν στο κύτταρο και ευθύνονται για τη γενετική ποικιλομορφία.

Όλοι οι οργανισμοί υπόκεινται σε **αυθόρμητες μεταλλάξεις** ως αποτέλεσμα των φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών ή των τυχαίων περιβαλλοντικών επιδράσεων. Ο ρυθμός με τον οποίο πραγματοποιούνται είναι χαρακτηριστικός για κάθε οργανισμό. Οι μεταλλάξεις είναι σπάνια γεγονότα. Ο ρυθμός εμφάνισης μεταλλάξεων μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση ορισμένων χημικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές αποκαλούνται **μεταλλαξιγόνα** (mutagens) και οι αλλαγές που προκαλούν αναφέρονται ως **επαγόμενες μεταλλάξεις** (induced mutations). Τα περισσότερα μεταλλαξιγόνα δρουν είτε τροποποιώντας άμεσα μια συγκεκριμένη βάση του DNA είτε μέσω της ενσωμάτωσής τους στο νουκλεϊκό οξύ. Στα βακτήρια ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης αντιστοιχεί σε ~10<sup>-6</sup> μεταλλάξεις ανά γενετικό τόπο ανά γενιά ή σε μέσο ρυθμό αλλαγής ανά ζεύγος βάσεων 10<sup>-9</sup> - 10<sup>-10</sup> ανά γενιά. Ο ρυθμός αυτός ποικίλλει πολύ από το ένα ζεύγος βάσεων στο άλλο. Δεν διαθέτουμε ακριβείς μετρήσεις του ρυθμού μεταλλαξιγένεσης στους ευκαρυώτες, μολονότι συνήθως θεωρείται ότι είναι παρόμοιος με αυτόν των βακτηρίων ανά γενετικό τόπο και ανά γενιά.



Μια **σημειακή μετάλλαξη** (point mutation) μεταβάλλει μόνο ένα ζεύγος βάσεων και μπορεί να προκληθεί από:

- Τη χημική τροποποίηση του DNA, που μεταβάλλει άμεσα μια βάση σε μια άλλη.
- Μια δυσλειτουργία κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, που προκαλεί την εισαγωγή λάθος βάσης στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα.

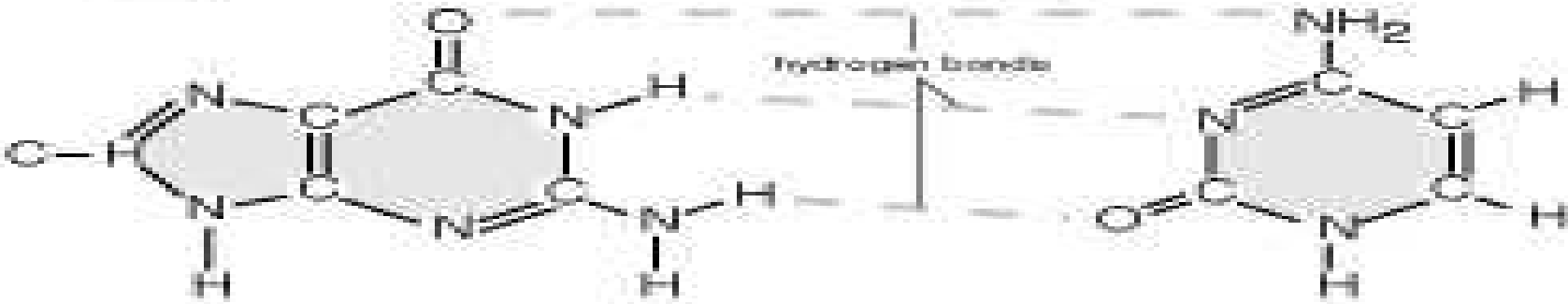
Οι μεταλλάξεις σημείου διακρίνονται σε δύο τύπους:

- Ο πιο συνηθισμένος τύπος είναι η **μετάπτωση** (transition), κατά την οποία μια πυριμιδίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πυριμιδίνη, ή μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πουρίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός ζεύγους G·C με ένα ζεύγος A·T και αντίστροφα.
- Σπανιότερος τύπος είναι η **μεταστροφή** (transversion), κατά την οποία μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη και αντίστροφα.

# Base pair

**G** Guanine

**C** Cytosine

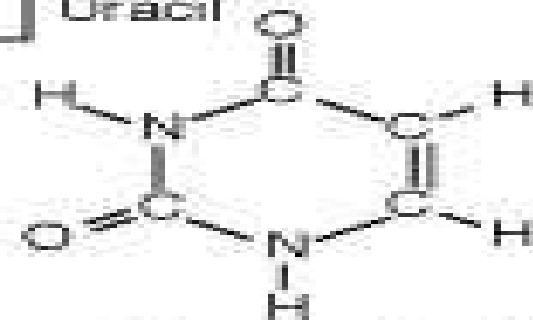


**A** Adenine

**T** Thymine

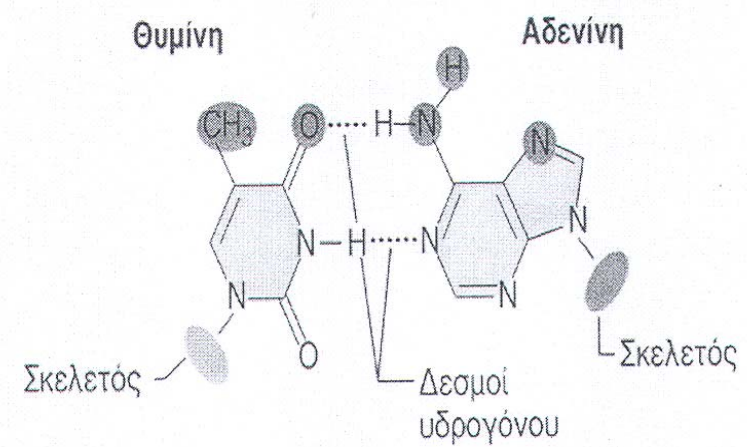
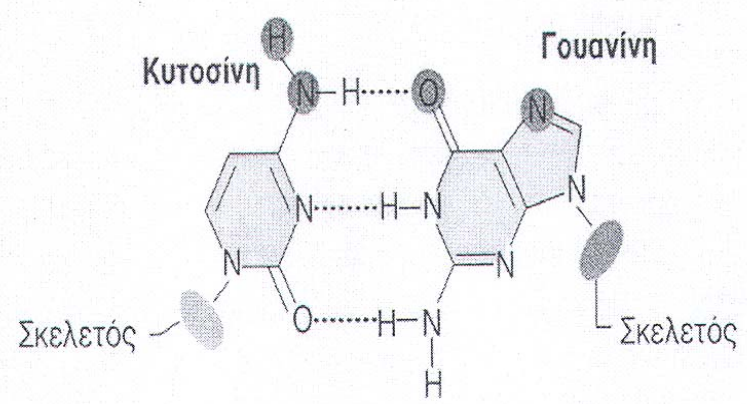
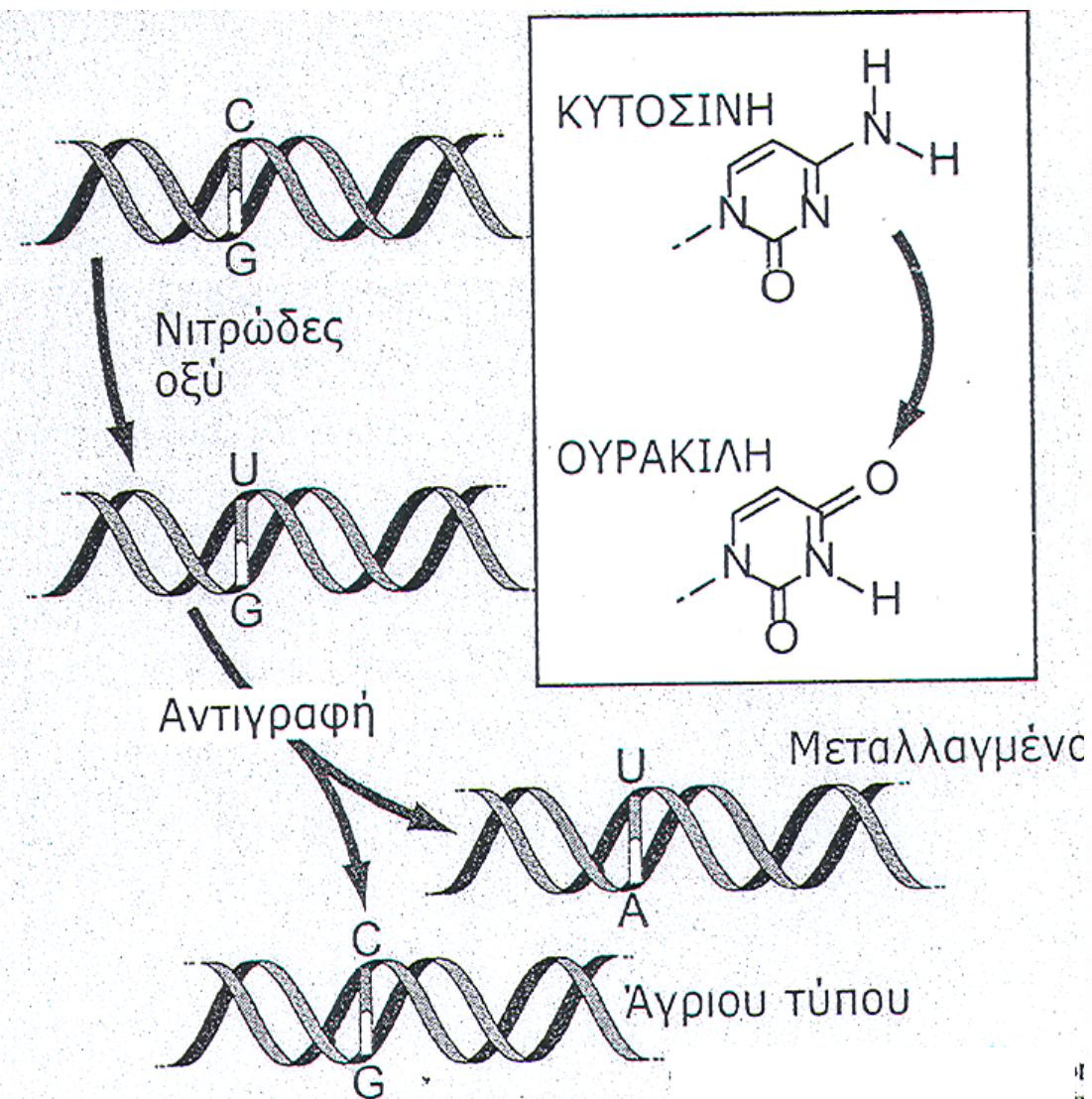


**U** Uracil



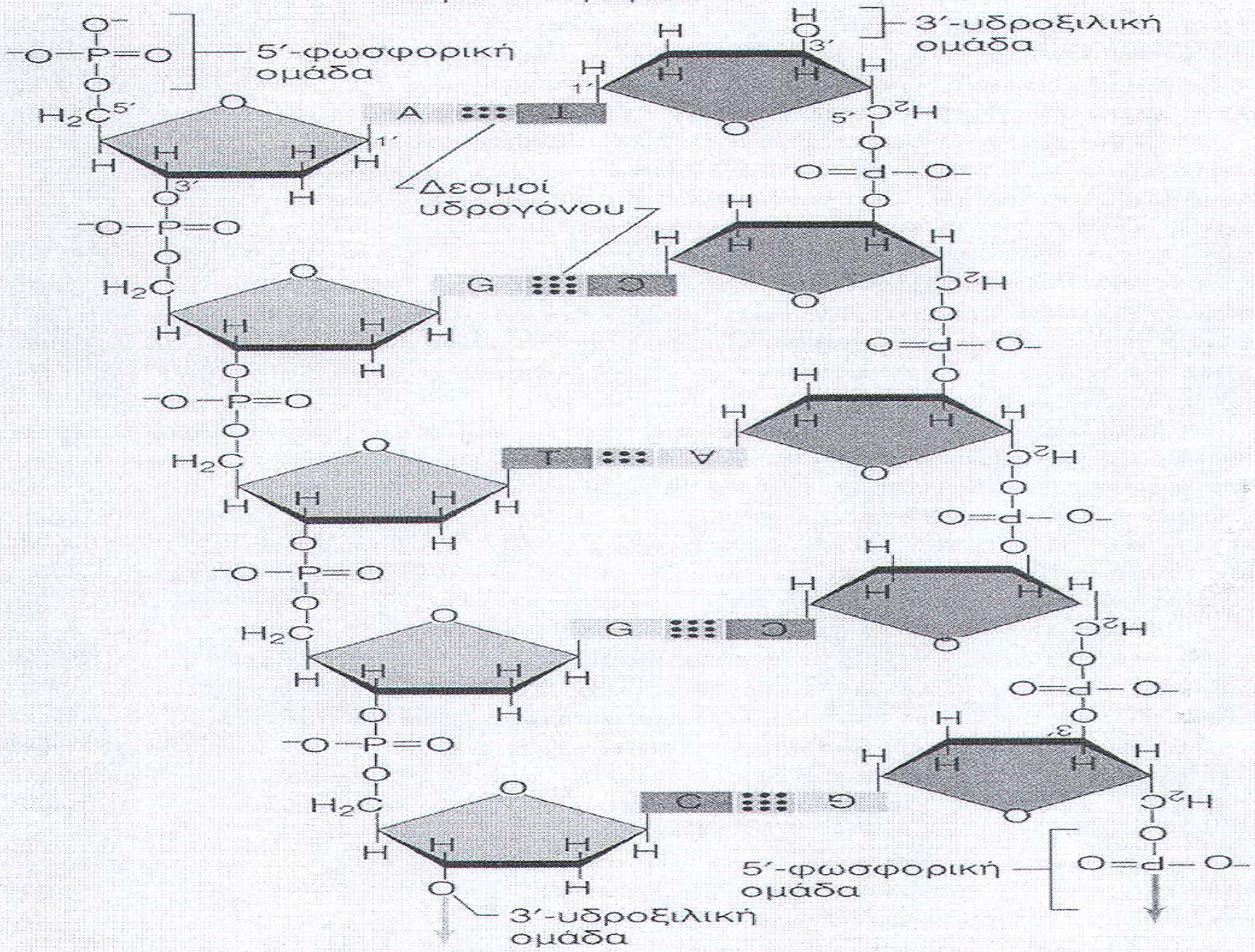
replaces Thymine in RNA

Το νιτρώδες οξύ προκαλεί οξειδωτική απαμίνωση που μετατρέπει την κυτοσίνη σε ουρακίλη. Κατά τη διαδικασία της αντιγραφής που ακολουθεί, η ουρακίλη ζευγαρώνει με αδενίνη αντί για γουανίνη, με την οποία θα ζευγάρωνε η αρχική κυτοσίνη. Έτσι, το ζεύγος C·G αντικαθίσταται από ένα ζεύγος T·A, αφού η αδενίνη ζευγαρώνει με θυμίνη στον επόμενο αντιγραφικό κύκλο.





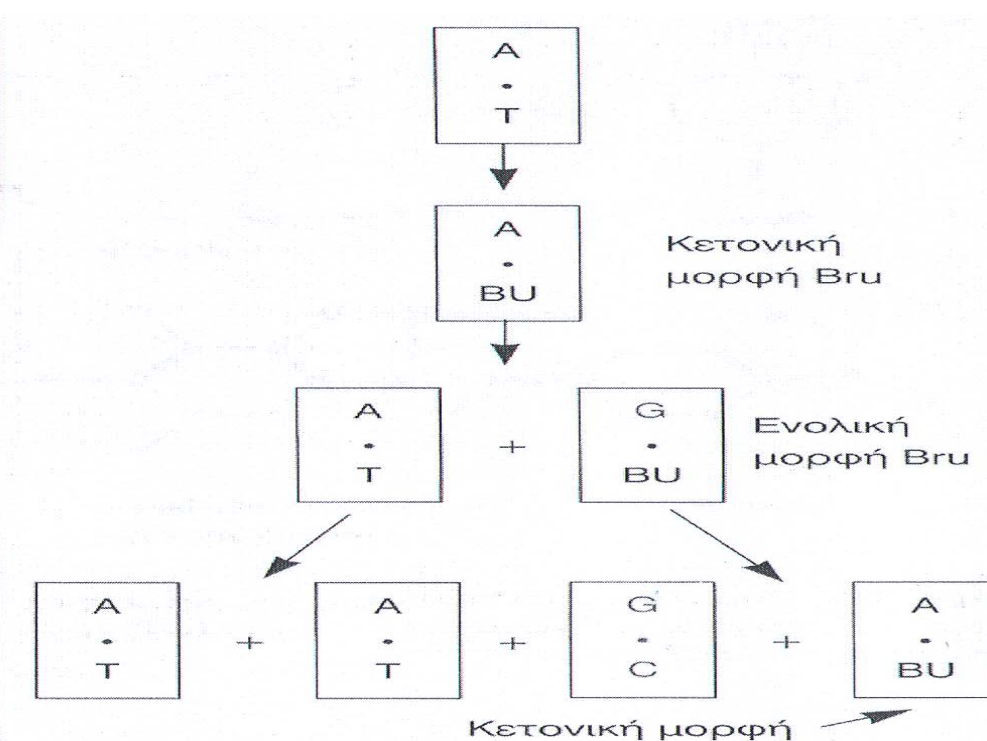
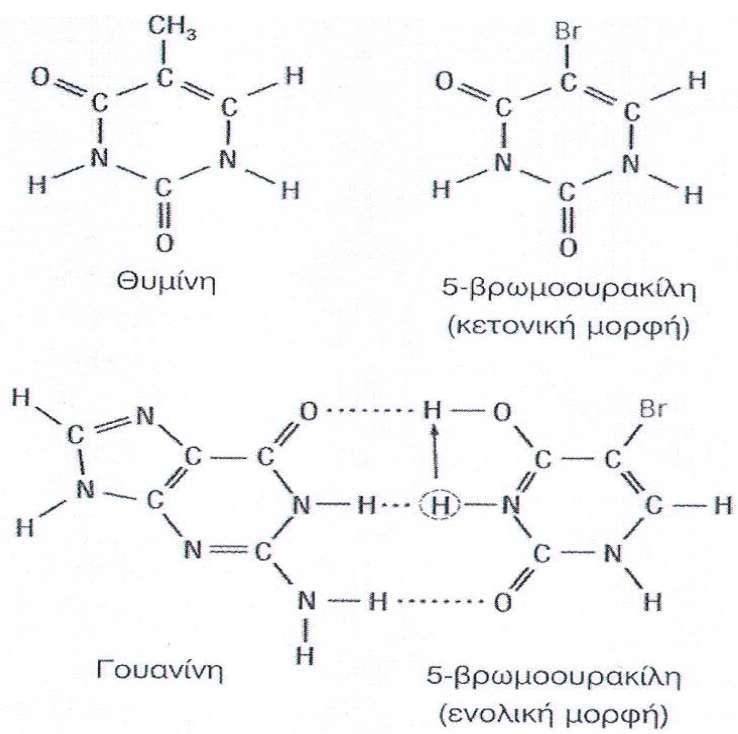
Άκρο των μορίων





Το νιτρώδες οξύ μπορεί να απαμινώσει και την αδενίνη, προκαλώντας την αντίστροφη μετάπτωση από A·T σε G·C. Οι μεταπτώσεις μπορεί επίσης να προκληθούν από ζευγάρωμα αταίριαστων βάσεων.

Το ζευγάρωμα αταίριαστων βάσεων είναι μια ανώμαλη κατάσταση που συνήθως προκύπτει από την ενσωμάτωση στο DNA μια αντικανονικής βάσης με διττές ιδιότητες ζευγαρώματος. Όπως για παράδειγμα η βρωμοουρακίλη (BrdU), η οποία είναι μόριο ανάλογο της θυμίνης και περιέχει ένα άτομο βρωμίου στη θέση της μεθυλικής ομάδας της θυμίνης. Η BrdU ενσωματώνεται στο DNA στη θέση της θυμίνης. Ωστόσο, έχει διττές ιδιότητες ζευγαρώματος, επειδή η παρουσία του ατόμου βρωμίου επιτρέπει την αλλαγή της δομής της βάσης από την κετονική (=O) στην ενολική (-OH) μορφή. Η ενολική μορφή μπορεί να ζευγαρώσει με γουανίνη, κάτι που οδηγεί στην αντικατάσταση του αρχικού ζεύγους A·T από το ζεύγος G·C.



Οι **προσθήκες** (insertions) υλικού είναι αρκετά συχνές. Η προέλευση του ένθετου υλικού είναι τα **μεταθετά στοιχεία** (transposable elements), τα οποία είναι αλληλουχίες DNA που έχουν την ικανότητα να μετακινούνται από ένα σημείο σε άλλο. Η προσθήκη συνήθως απενεργοποιεί τελείως ένα γονίδιο. Στις θέσεις όπου συμβαίνουν τέτοιες προσθήκες μπορεί ακολούθως να δημιουργηθούν **ελλείμματα** (deletions) μέρους ή ολόκληρου του ένθετου υλικού, ή ακόμα και γειτονικών περιοχών.

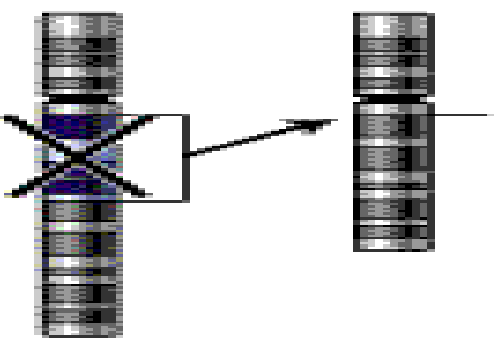
Μια σημειακή μετάλλαξη μπορεί να αναστραφεί είτε με αποκατάσταση της αρχικής αλληλουχίας είτε με κάποια αντισταθμιστική μετάλλαξη σε άλλο σημείο του γονιδίου. Μια προσθήκη μπορεί να αναστραφεί αν συμβεί έλλειμμα του υλικού που προστέθηκε.  
Ένα έλλειμμα τμήματος ενός γονιδίου δεν αναστρέφεται.

Μεταλλάξεις που απενεργοποιούν ένα γονίδιο ονομάζονται **πρόσθιες μεταλλάξεις** (forward mutations). Οι επιπτώσεις τους αναστρέφονται από τις **ανάδρομες μεταλλάξεις** (back mutations). Η ακριβής αντιστροφή της αρχικής μετάλλαξης, που αποκαθιστά την πρωταρχική αλληλουχία, ονομάζεται **αληθινή αναστροφή** (true reversion). Έτσι, αν ένα ζεύγος A·T αντικατασταθεί από ένα ζεύγος G·C, τότε μια άλλη μετάλλαξη που θα επαναφέρει το ζεύγος A·T στην ίδια θέση θα ξαναδημιουργήσει την αλληλουχία του άγριου τύπου.

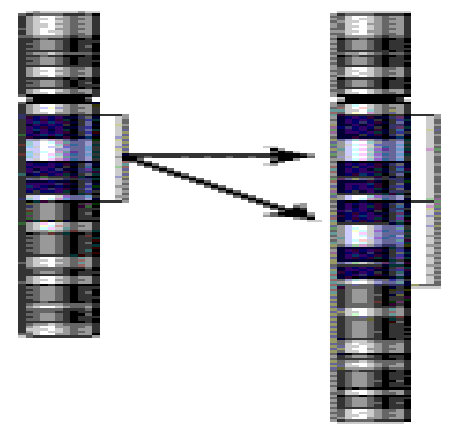
Εναλλακτικά, μπορεί να συμβεί κάποια άλλη μετάλλαξη, σε άλλο σημείο του γονιδίου, και η επίδρασή της να αντισταθμίσει την πρώτη μετάλλαξη. Αυτή ονομάζεται **ισοδύναμη αναστροφή** (second-site reversion).

# Types of mutation

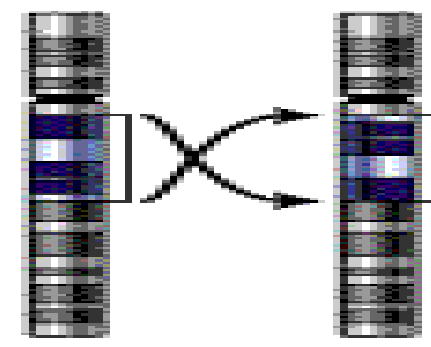
## Deletion



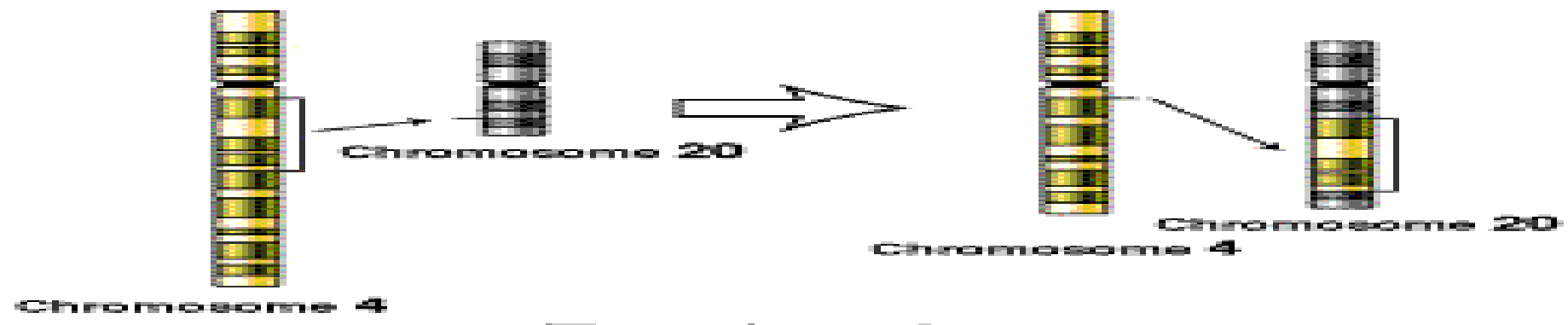
## Duplication



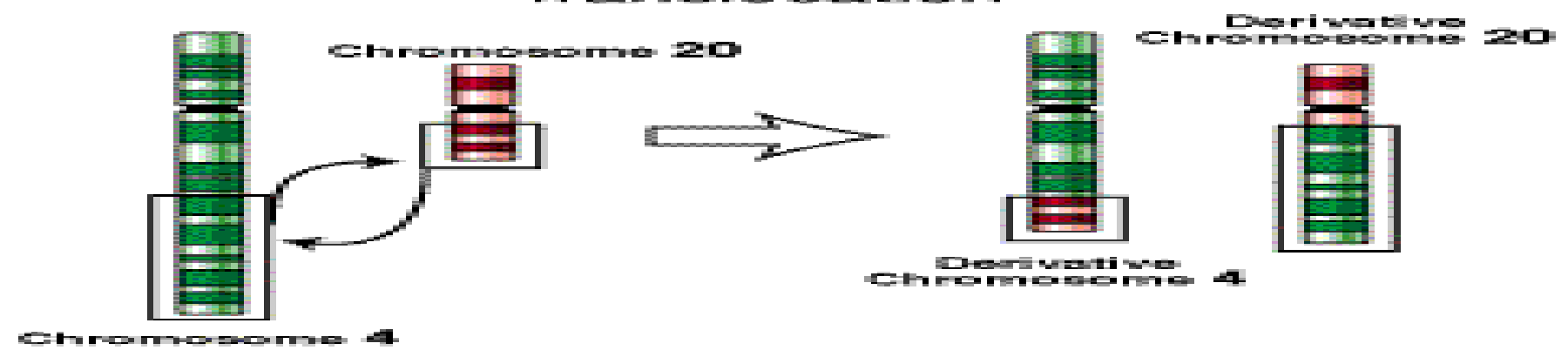
## Inversion



## Insertion



## Translocation



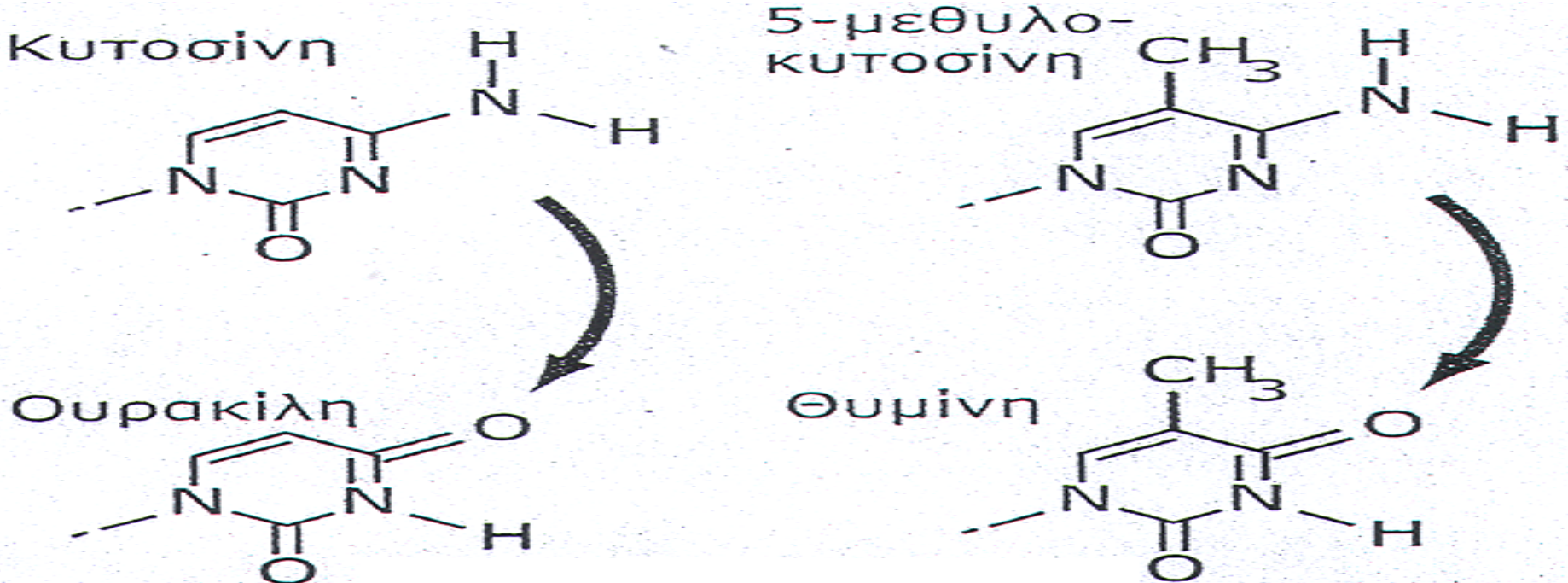
Οποιαδήποτε αλλαγή απενεργοποιεί ένα γονίδιο εκδηλώνεται ως πρόσθια μετάλλαξη, ενώ μια ανάδρομη μετάλλαξη πρέπει να αποκαθιστά τη λειτουργία της πρωτεΐνης που αδρανοποιήθηκε από μια συγκεκριμένη πρόσθια μετάλλαξη. Ο ρυθμός εμφάνισης μιας ανάδρομης μετάλλαξης είναι περίπου 10 φορές χαμηλότερος απ' αυτόν μιας πρόσθιας. Οι συνέπειες μιας μετάλλαξης μπορεί επίσης να αντισταθμιστούν από μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια, διαφορετικά από αυτό στο οποίο συνέβη η αρχική μετάλλαξη. Η επίδραση αυτή καλείται **καταστολή της μετάλλαξης** (suppression). Ένας γενετικός τόπος του οποίου οι μεταλλάξεις καταστέλλουν την επίδραση μιας άλλης μετάλλαξης σε διαφορετικό γενετικό τόπο ονομάζεται **καταστολέας της μετάλλαξης** (suppressor).

Η πιθανότητα να συμβούν περισσότερες από μία μεταλλάξεις σε ένα συγκεκριμένο σημείο ακολουθεί κατανομή Poisson, δηλαδή αφορά τυχαία, ανεξάρτητα μεταξύ τους συμβάντα. Έτσι, σε ορισμένα σημεία μπορεί να συμβαίνουν μία, δύο ή τρεις μεταλλάξεις ενώ σε άλλα καμία. Όμως, σε μερικά σημεία συμβαίνουν πολύ περισσότερες μεταλλάξεις, δεκαπλάσιες ή ακόμα και εκατονταπλάσιες, απ' ό,τι αναμένεται από την κατανομή τυχαίων γεγονότων. Αυτά τα σημεία ονομάζονται **θερμά** (hotspots). Οι αυθόρμητες μεταλλάξεις τείνουν να συσσωρεύονται σε θερμά σημεία.



Εκτός από τις τέσσερις βάσεις που εισέρχονται στο DNA κατά τη σύνθεσή του, μερικές φορές απαντώνται και **τροποποιημένες βάσεις** (modified bases), οι οποίες παράγονται με χημική τροποποίηση μιας από τις τέσσερις συνήθεις βάσεις του DNA. Η πιο συχνά τροποποιημένη βάση είναι η 5-μεθυλοκυτοσίνη, η οποία δημιουργείται από το ένζυμο που προσθέτει μία μεθυλική ομάδα σε κυτοσίνες, σε ειδικές θέσεις του DNA.

Τα θερμά σημεία προκαλούνται από την υψηλή συχνότητα της αυθόρμητης απαμίνωσης της κυτοσίνης. Στην αντίδραση αυτή, η αμινομάδα αντικαθίσταται από μια κετονομάδα. Το αποτέλεσμα της απαμίνωσης είναι ο σχηματισμός **αταίριαστων** (mismatch) ζευγών βάσεων G·U και G·T αντίστοιχα. Η απαμίνωση της (σπάνιας) 5-μεθυλοκυτοσίνης καταλήγει σε μετάλλαξη, ενώ η απαμίνωση της κοινής κυτοσίνης δεν έχει το ίδιο αποτέλεσμα. Αυτό συμβαίνει διότι οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης αναγνωρίζουν πιο αποτελεσματικά το αταίριαστο ζεύγος G·U απ' ότι το G·T.



Η *E. Coli* διαθέτει ένα ένζυμο, την DNA-γλυκοζυλάση της ουρακίλης (uracil-DNA-glycosylase), το οποίο απομακρύνει τις ουρακίλες από το DNA, αφήνοντας μια αζευγάρωτη βάση G. Στη συνέχεια, ένας «μηχανισμός επιδιόρθωσης» εισάγει μια βάση C, που ζευγαρώνει με αυτήν. Η απαμίνωση της 5-μεθυλοκυτοσίνης σχηματίζει θυμίνη. Έτσι, σχηματίζεται το αταίριαστο ζεύγος G·T. Αν το αταίριαστο αυτό ζεύγος δεν διορθωθεί πριν από τον επόμενο κύκλο αντιγραφής, θα προκύψει μετάλλαξη. Στην επόμενη αντιγραφή, οι βάσεις που ζευγαρώθηκαν λανθασμένα, σχηματίζοντας το ζεύγος G·T, αποχωρίζονται. Ύστερα ζευγαρώνουν με νέες βάσεις, σχηματίζοντας ένα ζεύγος άγριου τύπου G·C και ένα μεταλλαγμένο ζεύγος A·T. Η απαμίνωση της 5-μεθυλοκυτοσίνης αποτελεί την πιο κοινή αιτία σχηματισμού αταίριαστων ζευγών G·T στο DNA.

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των αταίριαστων ζευγών G·T δείχνουν μια μεροληψία στην αντικατάσταση της θυμίνης με κυτοσίνη (σπανιότερα αντικαθιστούν εναλλακτικά την γουανίνη με αδενίνη), η οποία βοηθάει στη μείωση του ρυθμού μεταλλαξιγένεσης. Οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί δεν είναι το ίδιο αποτελεσματικοί όπως στην περίπτωση της απομάκρυνσης της ουρακίλης από το αταίριαστο ζεύγος G·U. Συνεπώς η απαμίνωση της 5-μεθυλοκυτοσίνης οδηγεί σε μετάλλαξη πολύ συχνότερα απ' ό,τι η απαμίνωση της κυτοσίνης. Η 5-μεθυλοκυτοσίνη δημιουργεί θερμά σημεία και στο ευκαρυωτικό DNA. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συχνά σε δινουκλεοτίδια CpG, τα οποία συγκεντρώνονται σε περιοχές που ονομάζονται νησίδες CpG. Αν και η 5-μεθυλοκυτοσίνη αντιπροσωπεύει μόνο ~1% των βάσεων του ανθρώπινου DNA, τα σημεία που φέρουν την τροποποιημένη αυτή βάση αφορούν περίπου το 30% όλων των σημειακών μεταλλάξεων.

Οι περισσότερες μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη λειτουργία ενός γονιδίου είναι υποτελείς (recessive): *αντιπροσωπεύουν μια απώλεια λειτουργίας, αφού το μεταλλαγμένο γονίδιο δεν μπορεί να παράγει λειτουργικό προϊόν.* Όταν ένας ετεροζυγώτης περιέχει ένα αλληλόμορφο άγριου τύπου και ένα μεταλλαγμένο, αυτό του άγριου τύπου παράγει λειτουργικό προϊόν. Για το λόγο αυτό, το αλληλόμορφο του άγριου τύπου είναι επικρατές (dominant). Προϋποθέτει όμως ότι το μοναδικό αλληλόμορφο άγριου τύπου είναι σε θέση να παραγάγει επαρκή ποσότητα προϊόντος. Όταν δεν ισχύει αυτό, η μικρότερη ποσότητα του παράγεται από το μοναδικό αλληλόμορφο σε σχέση με αυτήν που παράγεται από δύο έχει ως αποτέλεσμα ο ετεροζυγώτης να εμφανίζει τον ενδιάμεσο φαινότυπο, που χαρακτηρίζει ένα μερικώς επικρατές (partially dominant) αλληλόμορφο.

Μια μετάλλαξη που εξουδετερώνει απόλυτα τη γονιδιακή λειτουργία, συνήθως λόγω εξάλειψης του γονιδίου, ονομάζεται **εκμηδενιστική μετάλλαξη** (null mutation). Αν το γονίδιο είναι απαραίτητο (essential gene), τότε η εκμηδενιστική μετάλλαξη είναι θανατηφόρα (lethal). Αν μια μετάλλαξη δεν επηρεάζει το φαινότυπο, τότε είναι πιθανόν να πρόκειται για λανθάνουσα μετάλλαξη, που επιτρέπει τη σύνθεση αρκετού ενεργού προϊόντος ώστε να επιτελείται επαρκώς η λειτουργία του, ακόμη και αν η ενεργότητα του προϊόντος μειώνεται ποσοτικά ή αλλοιώνεται ποιοτικά σε σχέση με αυτήν του άγριου τύπου. Οι εκμηδενιστικές μεταλλάξεις, ή άλλες μεταλλάξεις που εμποδίζουν τη γονιδιακή λειτουργία (χωρίς όμως να την καταργούν εντελώς), ονομάζονται **μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας** (loss-of-function).

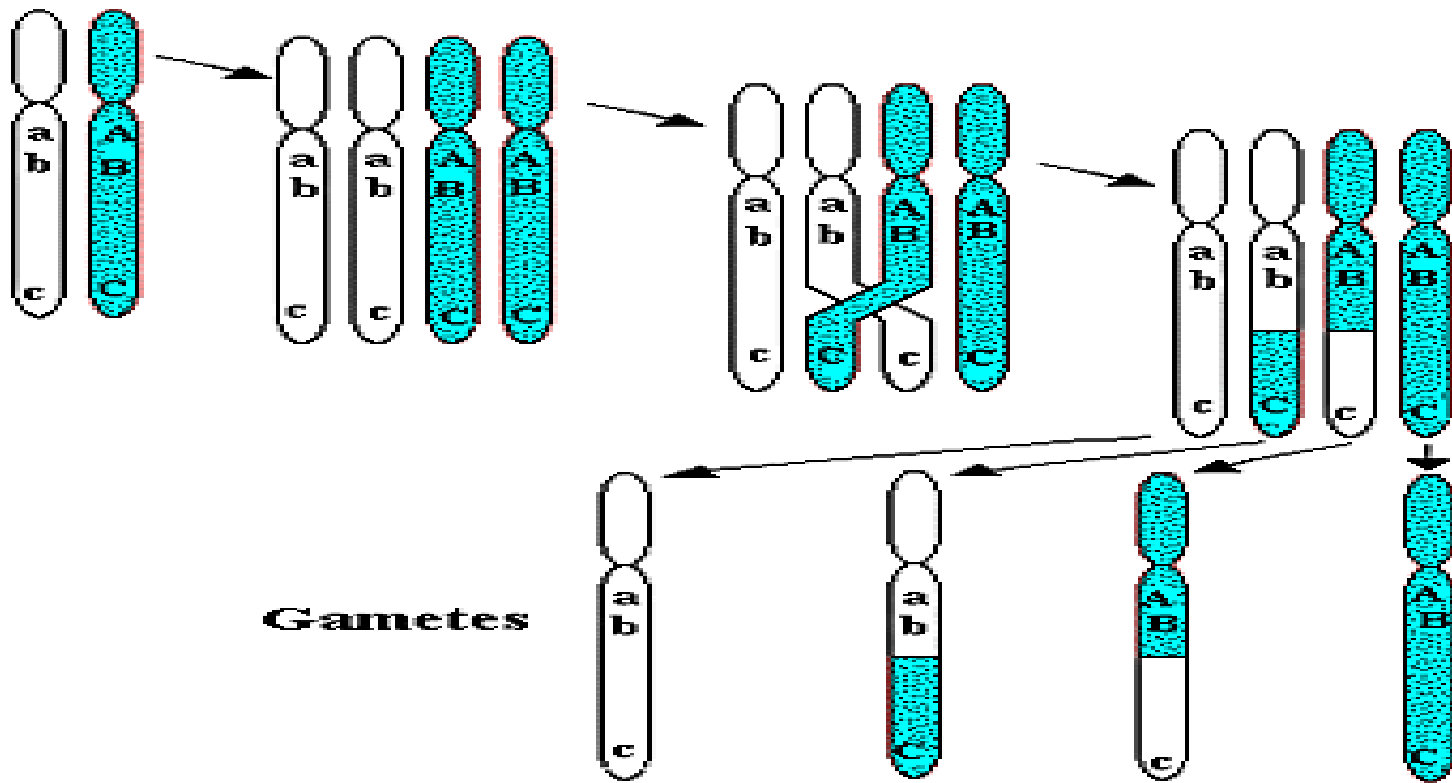
Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας είναι υποτελείς. Μερικές φορές μια μετάλλαξη έχει το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή κάνει την πρωτεΐνη να αποκτήσει μια νέα λειτουργία. Τέτοιες αλλαγές καλούνται μεταλλάξεις **κέρδους λειτουργίας** (gain-of-function) και είναι επικρατείς.

Δεν οδηγούν όμως όλες οι μεταλλάξεις σε ανιχνεύσιμες αλλαγές του φαινοτύπου. Οι μεταλλάξεις χωρίς εμφανή αποτελέσματα ονομάζονται **σιωπηλές μεταλλάξεις** (silent mutations). Όπως αλλαγές βάσεων στο DNA, οι οποίες δεν προκαλούν αλλαγή αμινοξέων της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Άλλες προκαλούν την αντικατάσταση κάποιου αμινοξέος, η οποία όμως δεν επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Αυτές οι μεταλλάξεις ονομάζονται **ουδέτερες αντικαταστάσεις** (neutral substitutions).

Οι διαφορετικές παραλλαγές του ίδιου γονιδίου ονομάζονται πολλαπλά **αλληλόμορφα** (multiple alleles) και η ύπαρξή τους καθιστά δυνατή τη δημιουργία ενός ετεροζυγώτη με μεταλλαγμένα αλληλόμορφα. Στην απλούστερη περίπτωση, ένα γονίδιο άγριου τύπου κωδικοποιεί ένα λειτουργικό πρωτεϊνικό προϊόν και τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα κωδικοποιούν μη λειτουργικές πρωτεΐνες.

Όταν σε έναν πληθυσμό υπάρχουν πολλαπλά λειτουργικά αλληλόμορφα, αυτά αναφέρονται ως **πολυμορφισμοί**. Ο γενετικός ανασυνδυασμός (genetic recombination) είναι η δημιουργία νέων συνδυασμών αλληλομόρφων από τη μία γενιά στην άλλη, στους διπλοειδείς οργανισμούς. Τα δύο αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος μπορεί να φέρουν διαφορετικά αλληλόμορφα σε κάποιους γενετικούς τόπους. Με ανταλλαγή αντίστοιχων περιοχών μεταξύ των χρωμοσωμάτων, μπορεί να δημιουργηθούν ανασυνδυασμένα χρωμοσώματα (recombinant chromosomes) τα οποία είναι διαφορετικά από τα πατρικά.

Ο ανασυνδυασμός προκύπτει από την ανταλλαγή χρωμοσωμικού υλικού με τη διαδικασία του **διασκελισμού** (crossing-over) κατά τη μείωση (meiosis), δηλαδή κατά την ειδική διαίρεση που παράγει απλοειδή γαμετικά κύτταρα. Το κύτταρο που εισέρχεται στη μείωση έχει ολοκληρώσει την αντιγραφή κι έτσι έχει τέσσερα αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος. Στην αρχή της μείωσης, και τα τέσσερα αυτά αντίγραφα βρίσκονται σε στενή επαφή σχηματίζοντας μια δομή που ονομάζεται **δισθενές** (bivalent). Στο στάδιο αυτό, κάθε μεμονωμένη χρωμοσωμική μονάδα (συνολικά υπάρχουν 4) ονομάζεται **χρωματίδα** (chromatid). Οι ανταλλαγές γενετικού υλικού συμβαίνουν μεταξύ των χρωματίδων. Η ορατή δομή που σχηματίζεται κατά το διασκελισμό ονομάζεται **χίασμα** (chiasma). Ένα χίασμα αντιπροσωπεύει μια θέση όπου δύο από τις χρωματίδες ενός δισθενούς παθαίνουν ρήξη (breakage) σε αντίστοιχα σημεία. Τα άκρα ενώνονται ξανά χιαστικά σχηματίζοντας νέες χρωματίδες. Κάθε νέα χρωματίδα αποτελείται από το συνδυασμένο υλικό που προέρχεται τόσο από τη χρωματίδα που βρίσκεται στην μία πλευρά του σημείου ρήξης όσο και από την άλλη χρωματίδα, στην αντίθετη πλευρά του σημείου ρήξης. Οι δύο ανασυνδυασμένες χρωματίδες έχουν αμοιβαία αντίστοιχες δομές οι οποίες δημιουργούνται με **ρήξη και επανένωση** (breakage and reunion).



**Gametes**

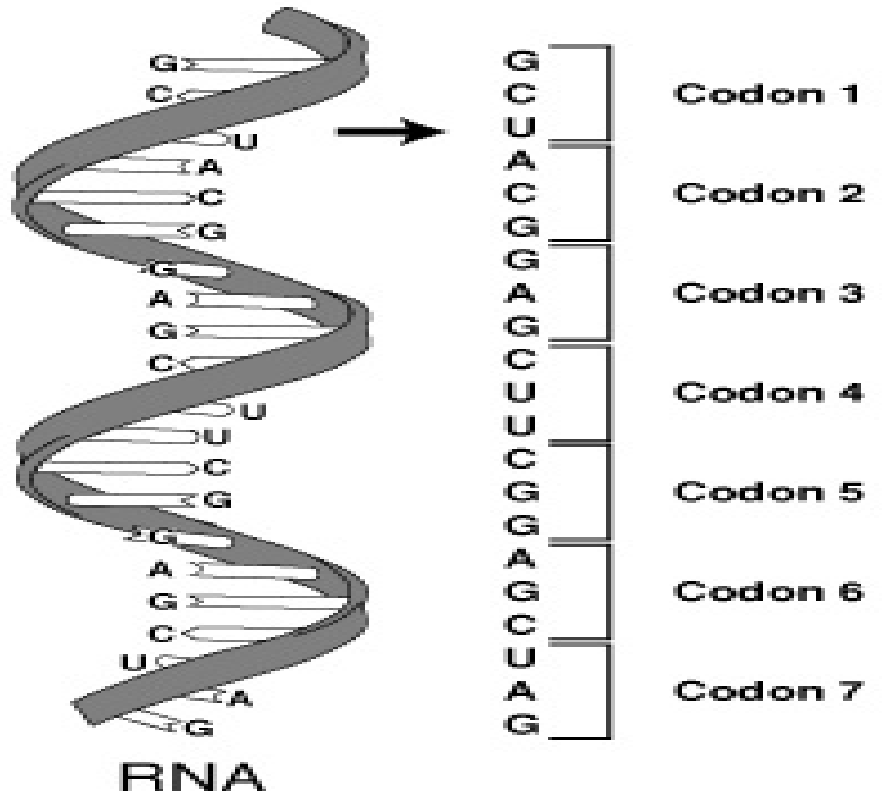
### **Crossing-over and recombination during meiosis**

Ο σχηματισμός υβριδικού DNA προϋποθέτει ότι οι αλληλουχίες των δύο δίκλωνων μορίων που ανασυνδυάζονται βρίσκονται αρκετά κοντά η μία στην άλλη, ώστε να επιτρέπεται το ζευγάρωμα των συμπληρωματικών αλυσίδων. Αν στη συγκεκριμένη περιοχή δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο γονικών γονιδιωμάτων, τότε ο σχηματισμός του υβριδικού DNA έχει θέσεις με αταίριαστες βάσεις, όπου μία βάση από τον ένα κλώνο βρίσκεται απέναντι από μία **μη συμπληρωματική** βάση του άλλου κλώνου. Η επιδιόρθωση παρόμοιων αταίριαστων ζευγών αποτελεί ένα άλλο χαρακτηριστικό του γενετικού ανασυνδυασμού.

Ένα γονίδιο περιλαμβάνει μια σειρά από κωδικόνια που διαβάζονται διαδοχικά από ένα σημείο έναρξης, στο ένα άκρο, έως ένα σημείο τερματισμού, στο άλλο άκρο. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA γράφεται, κατά σύμβαση, με κατεύθυνση 5'→3' και αντιστοιχεί στην αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης που γράφεται με κατεύθυνση από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο.

Ο γενετικός κώδικας διαβάζεται ως *μη επικαλυπτόμενες τριπλέτες* από ένα καθορισμένο σημείο έναρξης:

Η χρήση ενός *καθορισμένου σημείου έναρξης* σημαίνει ότι η σύνθεση μιας πρωτεΐνης ξεκινάει από ένα άκρο και κατευθύνεται προς το άλλο.



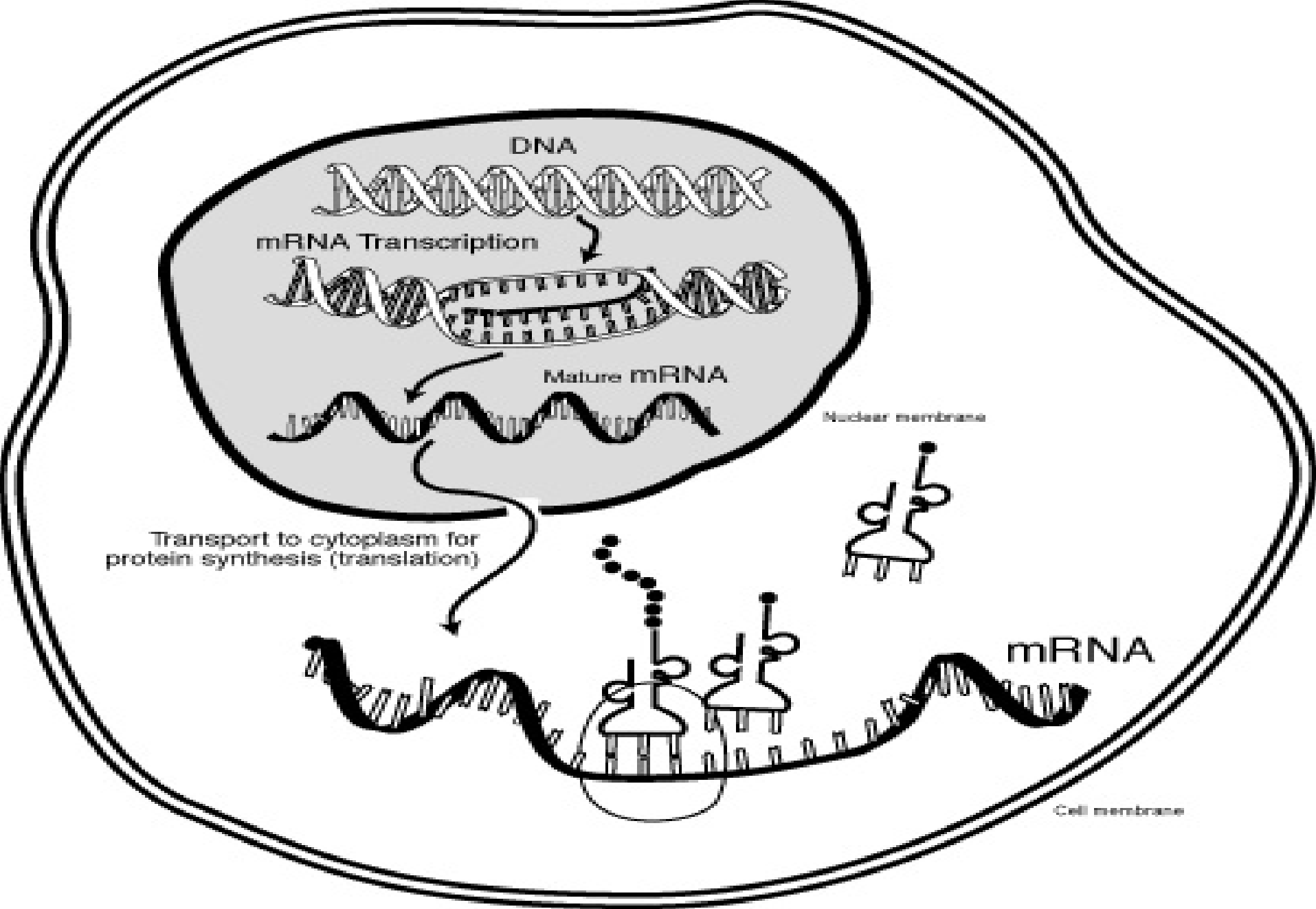
RNA

Ribonucleic acid

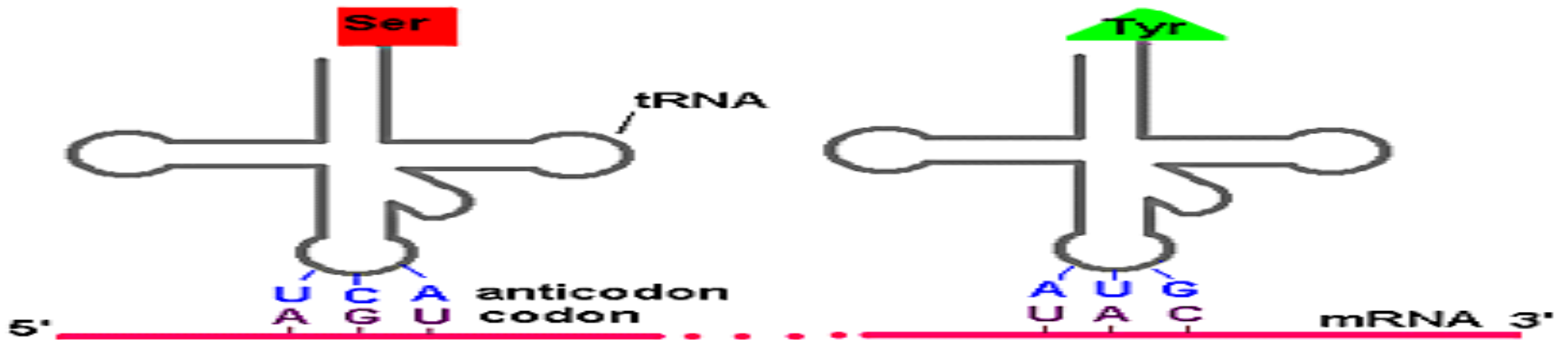
Μια μετάλλαξη που προσθέτει ή αφαιρεί μια βάση θα αλλάξει τις τριάδες των βάσεων σε όλες τις τριπλέτες της υπόλοιπης αλληλουχίας των βάσεων που ακολουθούν. Μια τέτοιου είδους αλλαγή ονομάζεται **μετατόπιση αναγνωστικού πλαισίου**. Επειδή η νέα αλληλουχία τριπλετών είναι τελείως διαφορετική από την παλιά, μεταβάλλεται ολόκληρη η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης πέρα από το σημείο της μετάλλαξης. Έτσι, είναι πιθανόν να χαθεί εντελώς η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Πολλές από τις μεταλλάξεις αφορούν την τρίτη βάση του κωδικονίου με αποτέλεσμα πολλές φορές να μη μεταβάλλεται το αμινοξύ για το οποίο κωδικοποιεί. Άλλες μεταλλάξεις όμως **μεταβάλλουν το αμινοξύ με αποτέλεσμα να έχουμε ελαττωματική πρωτεΐνη** (π.χ. πρόωρο κωδικόνιο λήξης ή μεγαλύτερη σε μήκος πρωτεΐνη της φυσιολογικής) **ή και απώλεια δραστηριότητας της πρωτεΐνης** (π.χ. μετάλλαξη σε αμινοξύ που παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα του ενζύμου, όπως αμινοξύ του ενεργού κέντρου). Άλλοτε η μετάλλαξη οδηγεί σε καρκινογένεση, π.χ. λόγω ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίου ή απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικού γονιδίου.





Ανάλογα με το σημείο έναρξης, υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι μετάφρασης μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε πρωτεΐνη, που ονομάζονται **πλαίσια ανάγνωσης** (reading frames). Μια αλληλουχία που μεταφράζεται σε πρωτεΐνη έχει ένα πλαίσιο ανάγνωσης το οποίο ξεκινάει με ένα ειδικό **κωδικόνιο έναρξης** (initiation codon), το AUG, και εκτείνεται με μια σειρά τριπλετών που αντιπροσωπεύουν αμινοξέα, μέχρι να λήξει με ένα από τα τρία **κωδικόνια τερματισμού** (termination codon). Ένα πλαίσιο ανάγνωσης που αποτελείται αποκλειστικά από τριπλέτες οι οποίες αντιπροσωπεύουν αμινοξέα ονομάζεται **ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF, Open Reading Frame)**.



		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	3rd base in codon	
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg		
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg		
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly		

## The Genetic Code

Υπάρχουν 64 δυνατές τριπλέτες (4X4X4) , εκ των οποίων 3 κωδικοποιούν για τον τερματισμό της πολυπεπτιδικής αλληλουχίας. Κατά συνέπεια απομένουν 61 κωδικόνια για την κωδικοποίηση 20 διαφορετικών αμινοξέων. Έτσι κάθε κωδικόνιο κωδικοποιεί για περισσότερα από ένα αμινοξέα.

Ένα πλαίσιο ανάγνωσης που δεν μπορεί να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη εξαιτίας της συχνής παρουσίας κωδικονίων τερματισμού ονομάζεται **κλειστό** (blocked). Αν μια αλληλουχία είναι κλειστή και στα τρία πλαίσια ανάγνωσης, τότε είναι αδύνατο να κωδικοποιεί πρωτεΐνη.

Όταν γνωρίζουμε την αλληλουχία μιας περιοχής DNA άγνωστης λειτουργίας, αναλύεται κάθε πιθανό πλαίσιο ανάγνωσης για να διευκρινιστεί αν είναι ανοικτό ή κλειστό.

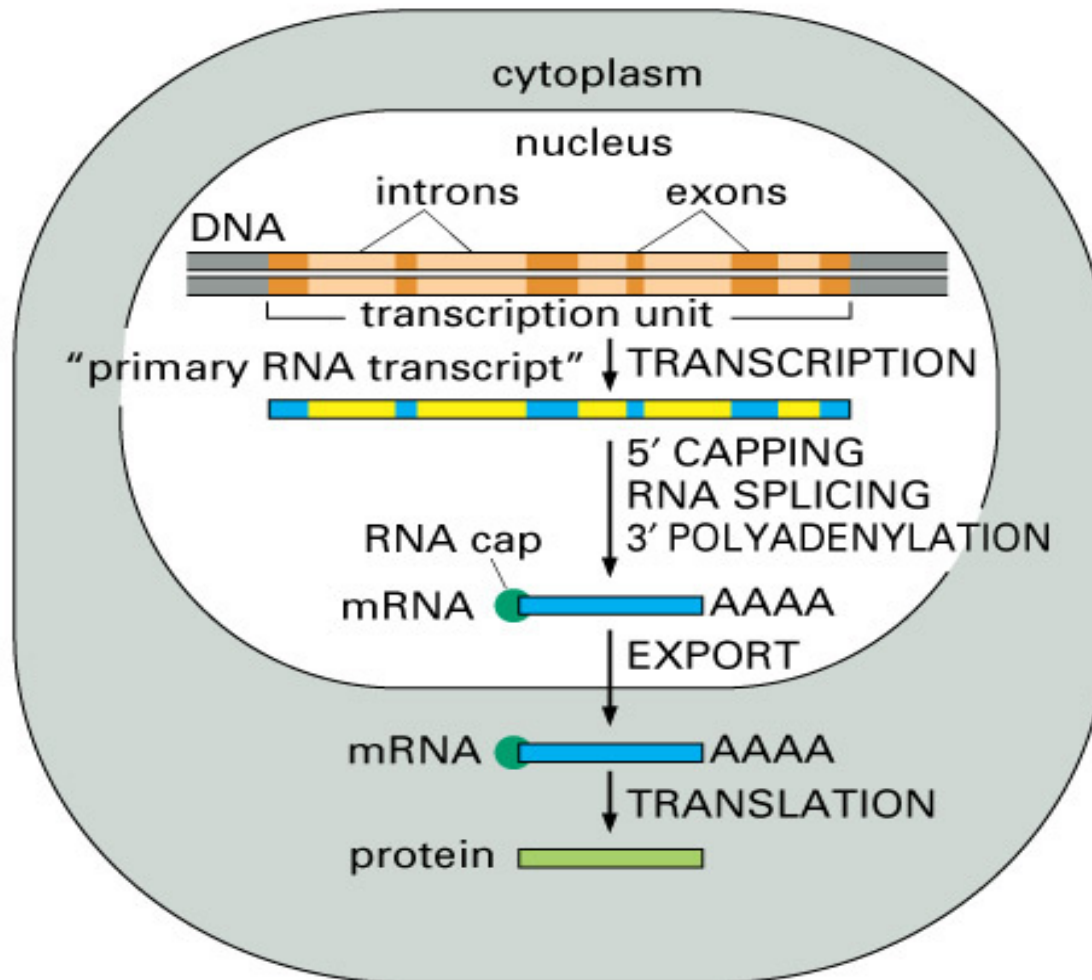
Συνήθως, σε ένα τμήμα DNA, μόνο ένα από τα τρία πιθανά πλαίσια ανάγνωσης μπορεί να είναι ανοικτό. Η αναγνώριση ενός μακρού ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης θεωρείται ως απόδειξη ότι η αλληλουχία αυτού του πλαισίου μεταφράζεται σε πρωτεΐνη.

Συγκρίνοντας την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός γονιδίου με την αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, μπορούμε να προσδιορίσουμε άμεσα αν το γονίδιο και η πρωτεΐνη είναι **συγγραμμικά** (collinear) μόρια, δηλαδή αν η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο γονίδιο αντιστοιχεί ακριβώς στην αλληλουχία των αμινοξέων στην πρωτεΐνη.

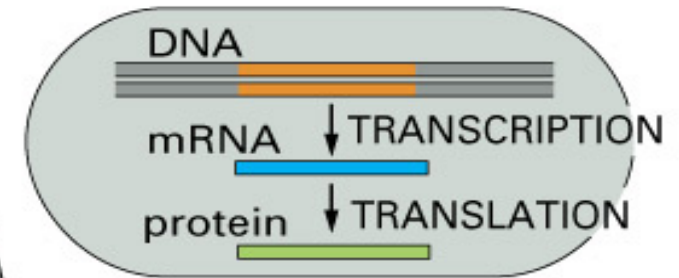
Στα βακτήρια υπάρχει ακριβής αντιστοιχία. Κάθε γονίδιο περιλαμβάνει ένα συνεχές τμήμα DNA με μήκος ευθέως ανάλογο προς το πλήθος των αμινοξέων της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Σύμφωνα με το γενετικό κώδικα, για την κωδικοποίηση μιας πρωτεΐνης με  $N$  αμινοξέα απαιτείται ένα γονίδιο με  $3N$  ζεύγη βάσεων (bp). Η σύγκριση μεταξύ γονιδίου και πρωτεΐνης περιορίζεται στην αλληλουχία του DNA η οποία εκτείνεται μεταξύ των σημείων που αντιστοιχούν στα δύο άκρα της πρωτεΐνης.

Ωστόσο, ένα γονίδιο δεν μεταφράζεται απευθείας σε πρωτεΐνη, αλλά εκφράζεται μέσω της σύνθεσης ενός **αγγελιαφόρου RNA (mRNA, messenger RNA)**, το οποίο στην πραγματικότητα καθοδηγεί την πρωτεϊνοσύνθεση.

(A) **EUCARYOTES**



(B) **PROCARYOTES**



Το αγγελιαφόρο RNA συντίθεται με την ίδια διαδικασία ζευγαρώματος συμπληρωματικών βάσεων που χρησιμοποιείται στην αντιγραφή του DNA, με τη σημαντική διαφορά ότι αντιστοιχεί σε μία μόνο αλυσίδα της διπλής έλικας του DNA. Η αλληλουχία του αγγελιαφόρου RNA είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία της μιας αλυσίδας του DNA και είναι όμοια (εκτός της αντικατάστασης της T με U) με την άλλη αλυσίδα του DNA. Κατά σύμβαση, οι αλληλουχίες DNA γράφονται έτσι, ώστε η πάνω αλυσίδα, με κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$ , να έχει την ίδια αλληλουχία με αυτήν του RNA. Η διαδικασία με την οποία ένα γονίδιο δημιουργεί μια πρωτεΐνη ονομάζεται γονιδιακή έκφραση (gene expression).

Στα βακτήρια περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η σύνθεση ενός αντιγράφου mRNA από τη μία αλυσίδα του DNA. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **μεταγραφή** (transcription). Το δεύτερο στάδιο είναι η **μετάφραση** (translation) του mRNA, οπότε η αλληλουχία του mRNA διαβάζεται σε τριπλέτες, καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο τη σειρά των αμινοξέων της πρωτεΐνης που συντίθεται. Το αγγελιαφόρο RNA περιλαμβάνει την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που αντιστοιχεί στην αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Αυτό το τμήμα του νουκλεϊκού οξέος ονομάζεται **κωδική περιοχή** (coding region). Ωστόσο, το αγγελιαφόρο RNA περιλαμβάνει και πρόσθετες αλληλουχίες σε κάθε άκρο, οι οποίες δεν εκφράζονται άμεσα σε πρωτεΐνη. Η  $5'$  μη μεταφραζόμενη περιοχή ονομάζεται **οδηγός** (leader) και η  $3'$  μη μεταφραζόμενη περιοχή ονομάζεται **μετά-τερματική** .

Τα βακτήρια αποτελούνται από ένα ενιαίο κυτταρικό διαμέρισμα. Επομένως, η μεταγραφή και η μετάφραση γίνονται στον ίδιο χώρο. Στους ευκαρυώτες, η μεταγραφή γίνεται στον πυρήνα, όμως το προϊόν RNA πρέπει να **μεταφερθεί** στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστεί.

Στην περίπτωση των περισσότερων σύνθετων γονιδίων, το μετάγραφο του γονιδίου είναι ένα **προ-mRNA** (pre-mRNA), το οποίο χρειάζεται **επεξεργασία** (processing) για να δημιουργηθεί το ώριμο mRNA. Το πιο σημαντικό στάδιο της επεξεργασίας είναι το **μάτισμα του RNA** (RNA splicing). Η πλειονότητα των γονιδίων στους ανώτερους ευκαριωτικούς οργανισμούς περιέχει εσωτερικές περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη. Η διαδικασία του ματίσματος απομακρύνει αυτές τις περιοχές από το προ-mRNA, έτσι ώστε να σχηματιστεί RNA με ενιαίο, συνεχές ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Η επεξεργασία του RNA περιλαμβάνει επίσης την τροποποίηση των 5' και 3' άκρων του προ-mRNA.

## **Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του**

Όσα RNA προέρχονται από γονίδια που περιέχουν ιντρόνια πρέπει να υποστούν μάτισμα, ώστε να αφαιρεθούν τα ιντρόνια και να παραχθεί ένα μικρότερο mRNA που να περιέχει μια άθικτη κωδική αλληλουχία.

Οι δύο άκρες του μεταγράφου τροποποιούνται με προσθήκη επιπλέον νουκλεοτιδίων (εμπλέκοντας πρόσθετα ενζυμικά συστήματα).

Το 5' άκρο του RNA τροποποιείται αμέσως μετά την εμφάνισή του, εξαιτίας της προσθήκης μιας «καλύπτρας». Η τριφωσφορική ομάδα του αρχικού μεταγράφου αντικαθίσταται από ένα νουκλεοτίδιο που προστίθεται σε αντίθετο πορσανατολισμό (3' → 5'), «σφραγίζοντας» με αυτόν τον τρόπο το άκρο. Το 3' άκρο τροποποιείται εξαιτίας της προσθήκης μιας σειράς νουκλεοτιδίων αδενυλικού οξέος [πολυαδενυλικό οξύ ή **πολυ(A)**, poly(A)] αμέσως μετά την αποκοπή του. Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.

**Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί ~20 λεπτά για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται. Η μεταγραφή στα ζωικά κύτταρα συμβαίνει με την ίδια περίπου ταχύτητα που συμβαίνει και στα βακτήρια (~40 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο).**

**Πολλά ευκαρυωτικά γονίδια είναι μεγάλα: ένα γονίδιο 10.000 bp χρειάζεται ~5 λεπτά για να μεταγραφεί.**

Μια συντονισμένη σειρά γεγονότων δημιουργεί το 3' άκρο του mRNA με αποκοπή ενός τμήματος και προσθήκη μιας αλληλουχίας πολυ(A) στο πρόσφατα δημιουργημένο 3' άκρο. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυώτες: το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 και 24 ωρών. Η μεταγραφή αρχίζει με ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Το πρώτο νουκλεοτίδιο διατηρεί την 5' τριφωσφορική ομάδα του και δημιουργεί το συνήθη φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ της 3' θέσης του και της 5' θέσης του επόμενου νουκλεοτιδίου.

Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:

**5' pppA/GpNpNpNp...**

**Περιλαμβάνει δύο νουκλεοτίδια συνδεδεμένα με 5'-5' τριφωσφορικό δεσμό, ενώ φέρει και μεθυλομάδες. Η ακραία βάση είναι πάντα μια γουανίνη, η οποία προστίθεται στο αρχικό μόριο RNA μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλυλο-τρανσφεράση. Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μία συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA.**

**Συνεπώς:**

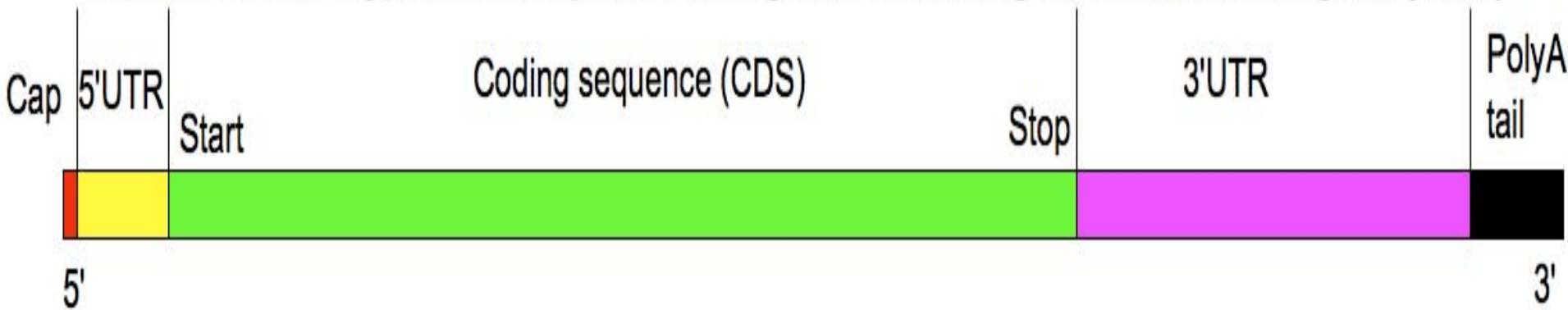
**Gppp + pppApNpNp...**

↓

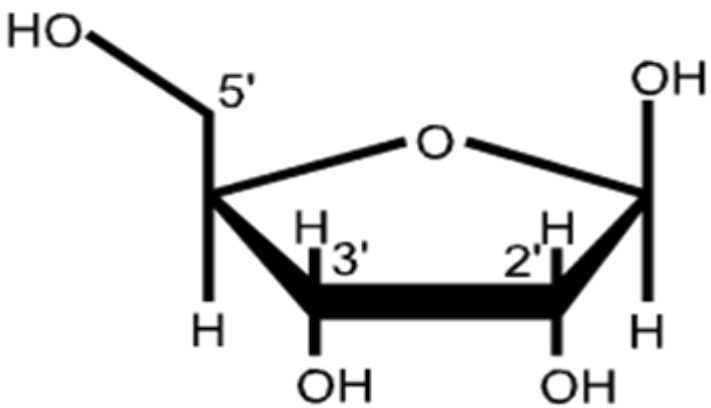
**GpppApNpNp... + pp + p**



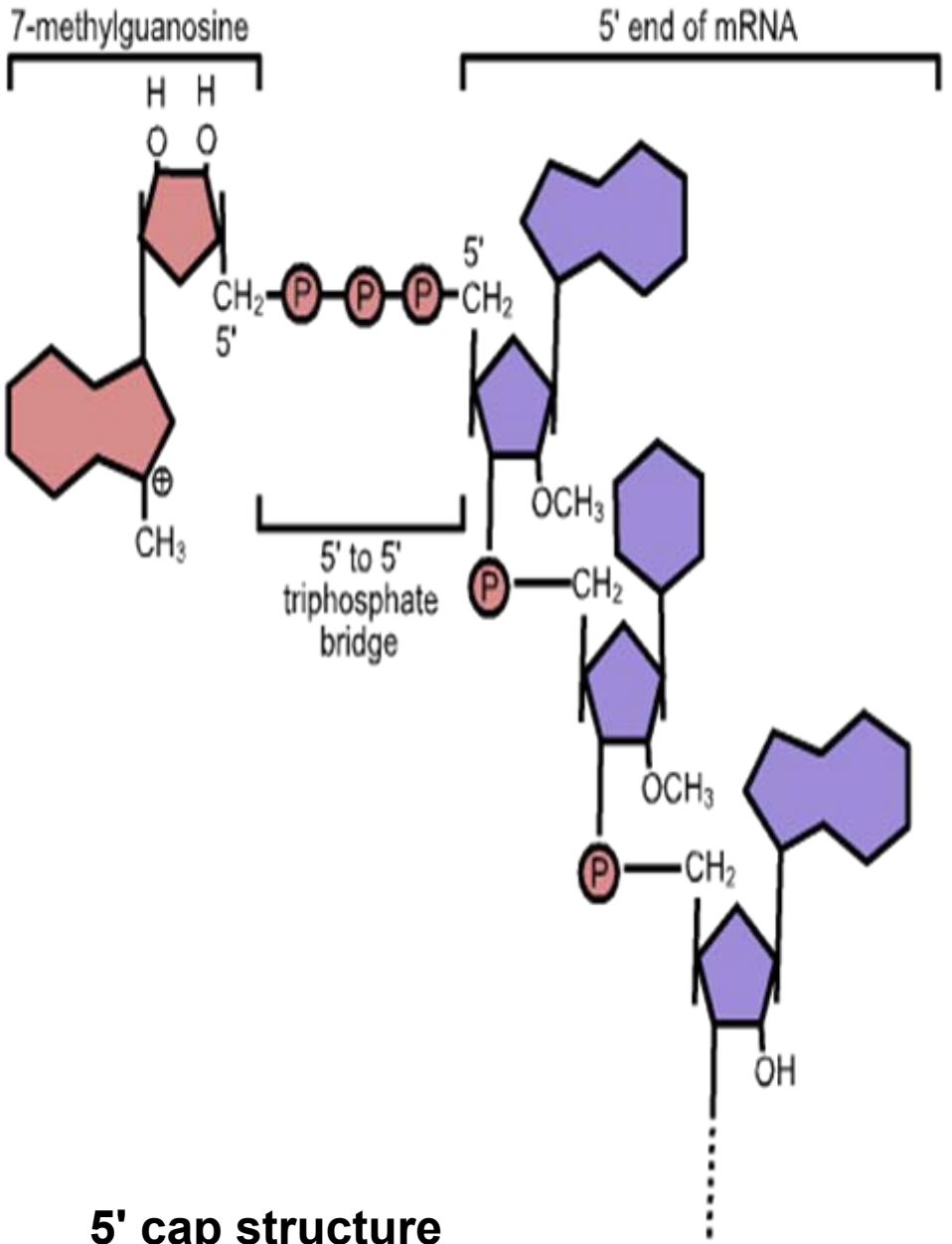
## The structure of a typical human protein coding mRNA including the untranslated regions (UTRs)



The structure of a mature eukaryotic mRNA. A fully processed mRNA includes a 5' cap, 5' UTR, coding region, 3' UTR, and poly(A) tail.



**Ribose structure showing the positions of the 2', 3' and 5' carbons**



**5' cap structure**

Αυτή η δομή ονομάζεται **καλύπτρα** (cap) και αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης.

Οι τύποι των καλυπτρών διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλιώσεων που έχουν συμβεί.

**Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυώτες και αποτελείται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση 7 της ακραίας γουανίνης. Μια καλύπτρα που έχει μόνο αυτή τη μεθυλομάδα ονομάζεται καλύπτρα 0 (cap 0). Το ένζυμο που ευθύνεται γι' αυτή την τροποποίηση λέγεται 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης.**

**Το επόμενο βήμα είναι η προσθήκη μιας ακόμη μεθυλομάδας στη 2'-Ο θέση της προτελευταίας βάσης (η οποία ήταν η πρώτη βάση του μεταγράφου πριν γίνουν οι τροποποιήσεις). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από ένα άλλο ένζυμο, τη 2'-Ο-μεθυλο-τρανσφεράση. Μια καλύπτρα με δύο μεθυλομάδες ονομάζεται καλύπτρα 1 (cap 1) και είναι ο κύριος τύπος καλύπτρας σε όλους τους ευκαρυώτες, εκτός από τους μονοκύτταρους οργανισμούς.**

**Σε ελάχιστες περιπτώσεις, στους ανώτερους ευκαρυώτες προστίθεται μια ακόμη μεθυλομάδα στη δεύτερη βάση. Αυτό συμβαίνει μόνο όταν η θέση αυτή καταλαμβάνεται από αδερίνη: η αντίδραση περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση N6. Το υπεύθυνο ένζυμο δρα μόνο σε ένα υπόστρωμα αδενοσίνης που έχει ήδη μεθυλομάδα στη 2'-Ο θέση.**

Σε ορισμένα είδη προστίθεται μια μεθυλομάδα στην τρίτη βάση του καλυμμένου mRNA. Το υπόστρωμα γι' αυτή την αντίδραση είναι το mRNA με καλύπτρα 1, που περιέχει ήδη δύο μεθυλομάδες. Η τροποποίηση της τρίτης βάσης είναι πάντα μια 2'-Ο μεθυλίωση της ριβόζης. Έτσι, δημιουργείται η καλύπτρα 2 (cap 2). Αυτή η καλύπτρα συνήθως αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 10-15% του συνολικού πληθυσμού του mRNA που είναι καλυμμένο.

Εκτός από τη μεθυλίωση που πραγματοποιείται στην καλύπτρα, μια εσωτερική μεθυλίωση συμβαίνει με μικρή συχνότητα στο mRNA μόνο των ανώτερων ευκαρυωτών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία καταλοίπων N6 μεθυλοαδενίνης, με συχνότητα περίπου μία τροποποίηση ανά 1.000 βάσεις.

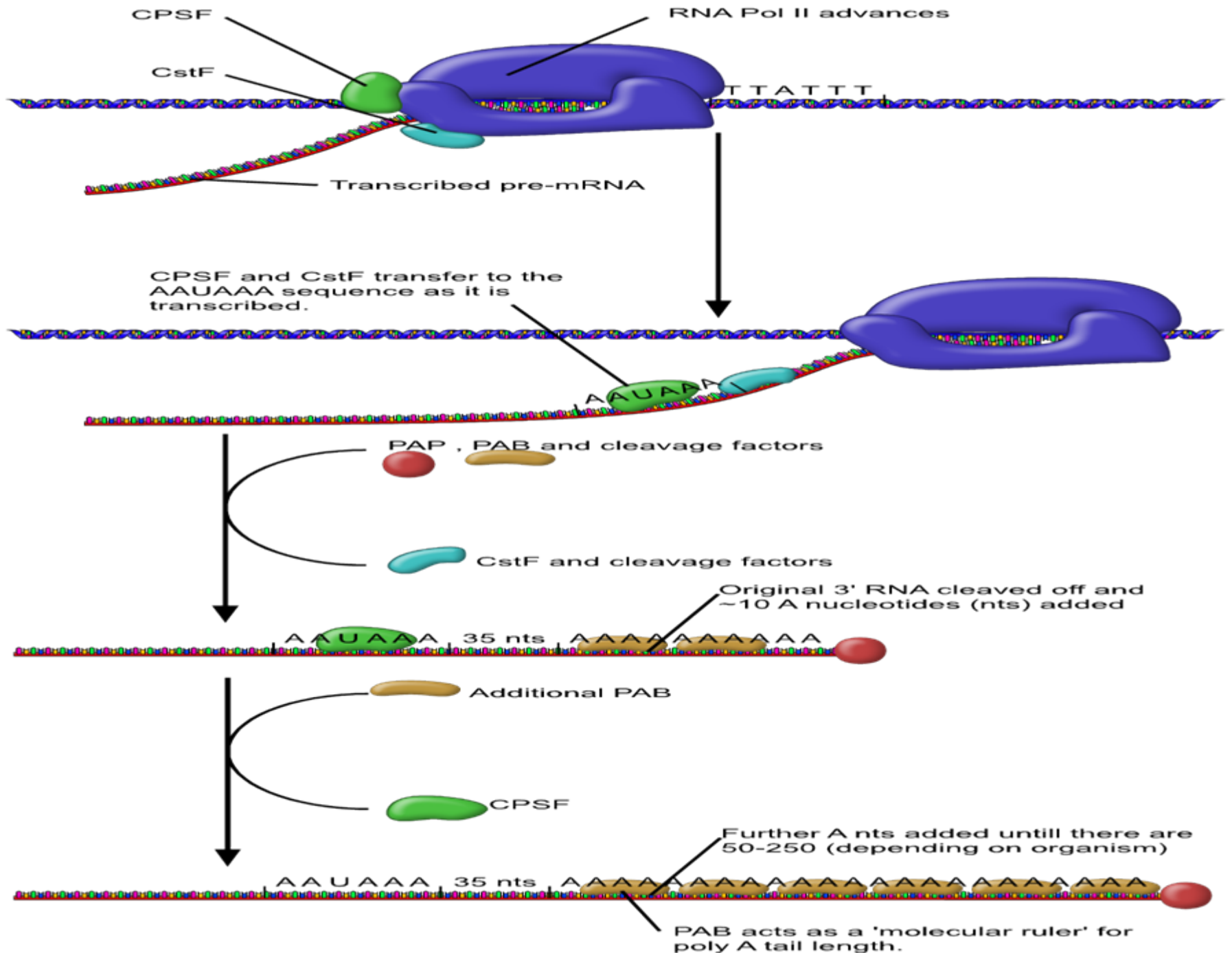
Η 3' τερματική αλληλουχία από κατάλοιπα A συχνά περιγράφεται ως ουρά πολυ(A), ενώ το mRNA που έχει αυτό το χαρακτηριστικό δηλώνεται ως πολυ(A)+ [poly(A)+]. Η αλληλουχία πολυ(A) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στον πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(A) καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A) πολυμεράση [poly(A) polymerase], η οποία προσθέτει ~200 κατάλοιπα A στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA. Η αλληλουχία πολυ(A), τόσο του πυρηνικού RNA όσο και του mRNA, είναι συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP, Poly(A)-Binding Protein).

Ένα μονομερές PABP των ~70 kD συνδέεται σε κάθε 10-35 βάσεις της ουράς πολυ(A). Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η πολυ(A) συνήθως σταθεροποιεί το mRNA. Η ικανότητα της πολυ(A) να προστατεύει το mRNA από την αποικοδόμηση απαιτεί τη σύνδεσή της με την PABP.

Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA αποθηκεύονται σε μη πολυαδενυλιωμένη μορφή και η πολυ(A) προστίθεται όταν είναι απαραίτητη η μετάφρασή τους. Σε άλλες περιπτώσεις, τα πολυ(A)+ mRNA αποαδενυλιώνονται, με συνέπεια τη μείωση της μετάφρασής τους.

**Οι παράγοντες, Cleavage Polyadenylation Specificity Factor (CPSF) και Cleavage Stimulation Factor (CstF) είναι πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που συνδέονται πλησίον της RNA πολυμεράσης II. Ο παράγων CPSF συνδέεται στην αλληλουχία AAUAAA και ο CstF σε παρακείμενες αλληλουχίες GU ή πλούσιες σε U και κόβουν περίπου 35 νουκλεοτίδια μετά το τέλος της αλληλουχίας AAUAAA. Τότε το ένζυμο πολυ(A) πολυμεράση [poly(A) polymerase, Polyadenylate Polymerase (PAP)], προσθέτει ανά 10 A νουκλεοτίδια μέχρι και ~250 νουκλεοτίδια A στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA.**

**Η PAP συνδέεται στο σύμπλοκο και προσελκύει την πυρηνική πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP, Poly(A)-Binding Protein) η οποία συνδέεται με τη σειρά της σε κάθε 10-35 βάσεις της ουράς πολυ(A). Στο τέλος της πολυαδενυλίωσης η PAP αποσυνδέεται ενώ η PABP, παραμένει συνδεδεμένη και πιστεύεται ότι παίζει βασικό ρόλο στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα.**

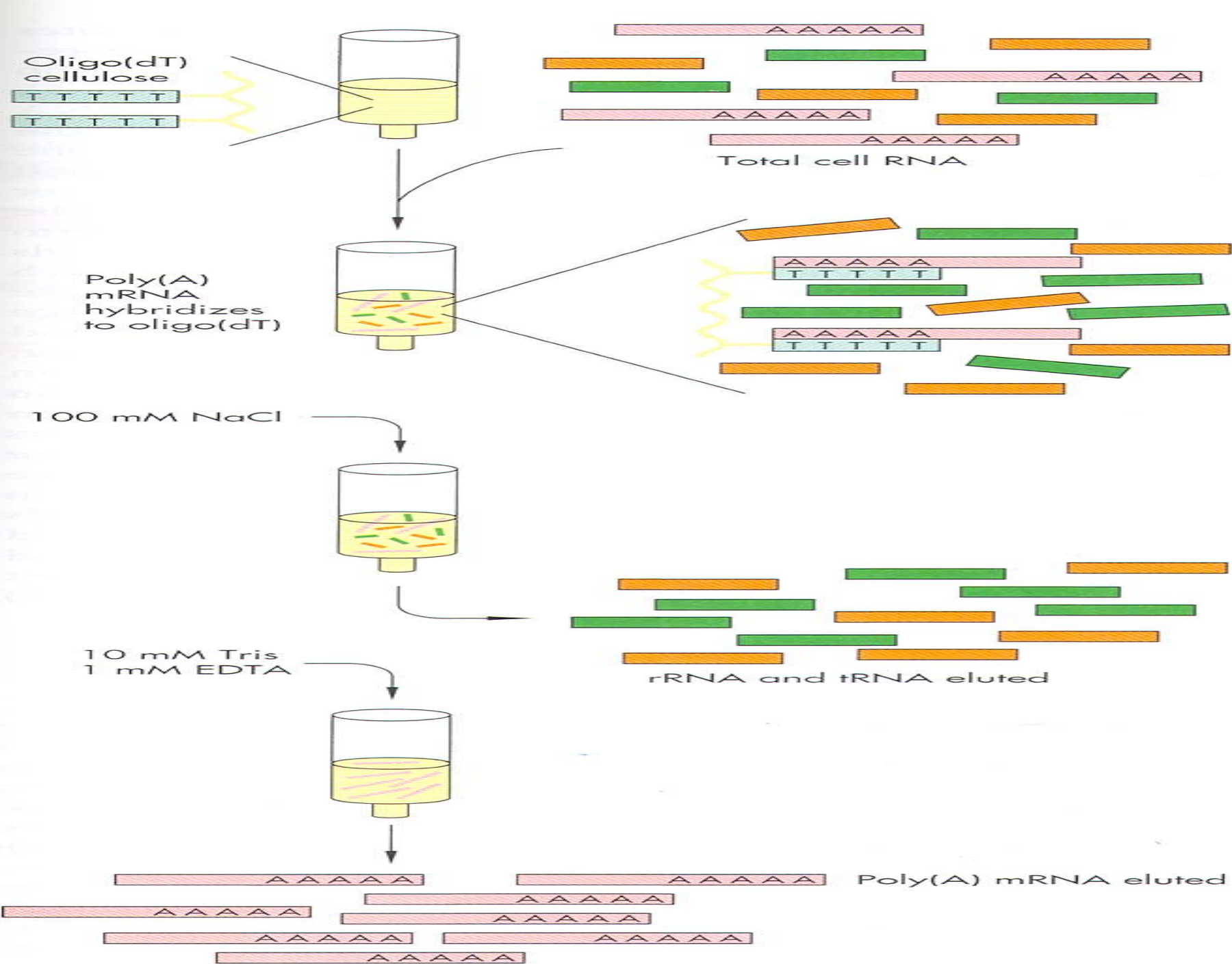


Η περιοχή πολυ(A) του mRNA μπορεί να δημιουργήσει ζεύγη βάσεων με ολιγο(U) ή ολιγο(dT) και η αντίδραση αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί για την απομόνωση των πολυ(A)+ mRNA. Η πιο εύκολη τεχνική είναι η ακινητοποίηση των ολιγο(U ή dT) σε ένα στερεό υλικό υποστήριξης π.χ. μια στήλη sepharose .

Στη συνέχεια, όταν ένας πληθυσμός RNA περάσει από τη στήλη, όπως φαίνεται στην εικόνα κατωτέρω , συγκρατείται μόνο το πολυ(A)+ RNA. Προσθέτοντας στη στήλη ένα διάλυμα που διασπά τους δεσμούς, το πολυ(A)+ RNA μπορεί να ανακτηθεί.

Εάν χρησιμοποιηθεί το RNA από ολόκληρο το κύτταρο, τότε θα συγκρατηθεί τόσο το πυρηνικό όσο και το κυτταροπλασματικό πολυ (A)+ RNA. Εκτός από το mRNA, υπάρχουν επίσης ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωμάτια στο κυτταρόπλασμα, τα οποία αν και περιέχουν πολυ(A)+ mRNA, δε μεταφράζονται.

Αυτό το RNA είναι πιθανόν «αποθηκευμένο» για να χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη στιγμή. Συνεπώς το συνολικό πολυ(A)+ mRNA που απομονώνεται δεν αντιστοιχεί ακριβώς στον ενεργό πληθυσμό του mRNA.



Oligo(dT)  
cellulose  
TTTTT  
TTTTT

Poly(A)  
mRNA  
hybridizes  
to oligo(dT)

100 mM NaCl

10 mM Tris  
1 mM EDTA

Total cell RNA

rRNA and tRNA eluted

Poly(A) mRNA eluted



Το mRNA είναι δυνατόν να αντιγραφεί για να παραχθεί μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA (γνωστή ως **cDNA**, **complementary DNA**). Στη συνέχεια, το cDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για τη σύνθεση μιας αλυσίδας DNA που είναι ταυτόσημη με την αρχική αλληλουχία του mRNA. Το προϊόν αυτών των αντιδράσεων είναι ένα δίκλωνο DNA που αντιστοιχεί στην αλληλουχία του mRNA. Αυτό το DNA μπορεί να κλωνοποιηθεί και να αναπαραχθεί σε μεγάλες ποσότητες. Η ύπαρξη κλωνοποιημένου DNA καθιστά εύκολη την απομόνωση του αντίστοιχου mRNA με τεχνικές υβριδισμού. Ακόμη και μόρια mRNA που βρίσκονται μόνο σε πολύ λίγα αντίγραφα ανά κύτταρο είναι δυνατόν να απομονωθούν με αυτή την έμμεση τεχνική. Πράγματι, μόνο τα mRNA που βρίσκονται σε σχετικά μεγάλες ποσότητες μπορούν να απομονωθούν άμεσα, χωρίς κλωνοποίηση.

Σχεδόν όλα τα κυτταρικά mRNA περιέχουν πολυ(A). Μια σημαντική εξαίρεση είναι τα mRNA που κωδικοποιούν τις ιστόνες. Αυτά τα mRNA αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος ή όλο το κλάσμα **πολυ(A)- RNA** [poly(A)- RNA]. Η σημασία της απουσίας της ουράς πολυ(A) από το mRNA των ιστονών δεν είναι κατανοητή.

## **Πολλά ένζυμα συμμετέχουν στη διαδικασία αποικοδόμησης του βακτηριακού mRNA**

**Το βακτηριακό mRNA αποικοδομείται διαρκώς από ένα συνδυασμό ενδονουκλεασών και εξωνουκλεασών. Οι ενδονουκλεάσες διασπούν το RNA σε μια εσωτερική θέση. Οι εξωνουκλεάσες, αντίθετα, αφαιρούν, μία προς μία, τις βάσεις από τα άκρα του RNA.**

**Οι βακτηριακές εξωνουκλεάσες που δρουν πάνω σε μονόκλωνο RNA προχωρούν κατά μήκος της αλυσίδας του νουκλεϊκού οξέος ξεκινώντας από το 3' άκρο.**

**Η αποικοδόμηση του βακτηριακού mRNA ξεκινάει με μία ενδονουκλεολυτική διάσπαση. Είναι δυνατόν να παραχθούν αρκετά 3' άκρα από ενδονουκλεολυτικές πέψεις του mRNA. Η κατεύθυνση της αποικοδόμησης είναι συνολικά από το 5' προς το 3' άκρο. Στη συνέχεια, τα τμήματα του mRNA που απελευθερώνονται αποικοδομούνται σε νουκλεοτίδια με εξωνουκλεολυτική δράση από το 3' -OH άκρο προς το 5' άκρο.**

**Μια περιοχή δευτεροταγούς δομής μέσα στο mRNA μπορεί να αποτελεί εμπόδιο στην εξωνουκλεάση, προστατεύοντας έτσι τις περιοχές που βρίσκονται προς την 5' πλευρά. Συνεπώς η σταθερότητα του κάθε mRNA καθορίζεται από την ευαισθησία της συγκεκριμένης αλληλουχίας του τόσο στην ενδο- όσο και εξωνουκλεολυτική πέψη.**

**Υπάρχουν ~12 ριβονουκλεάσες στην *E. coli*. Η RNAάση E είναι το βασικό ένζυμο για την έναρξη της διάσπασης του mRNA. Μπορεί να είναι το ένζυμο που προκαλεί την πρώτη πέψη σε πολλά mRNA. Μεταλλαγμένα βακτήρια που έχουν ελαττωματική ριβονουκλεάση E παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα (2-3 φορές) του mRNA. Η διαδικασία της αποικοδόμησης μπορεί να καταλύεται από ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο, το οποίο περιλαμβάνει τη ριβονουκλεάση E, την PNPάση (πολυνουκλεοτιδική φωσφορυλάση, μία 3' → 5' εξωνουκλεάση) και μία ελικάση.**

**Η σταθερότητα του mRNA εξαρτάται από τη δομή και την αλληλουχία του. Οι 5' και 3' τερματικές δομές προστατεύουν από την αποικοδόμηση, ενώ ειδικές αλληλουχίες μέσα στο mRNA μπορεί είτε να χρησιμεύουν ως στόχοι που πυροδοτούν την αποικοδόμηση είτε να παρέχουν προστασία από την αποικοδόμηση:**

**Οι τροποποιήσεις στα 5' και 3' άκρα του mRNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της προσβολής από εξωνουκλεάση. Η καλύπτρα εμποδίζει τις 5' → 3' εξωνουκλεάσες να διασπάσουν το 5' άκρο και η πολυ(A) εμποδίζει τις 3' → 5' εξωνουκλεάσες να διασπάσουν το 3' άκρο.**

**Μέσα στην κωδική περιοχή, οι μεταλλάξεις που δημιουργούν κωδικόνια τερματισμού πυροδοτούν ένα σύστημα επιτήρησης, το οποίο αποικοδομεί το mRNA.**

Ένα κοινό στοιχείο σε μερικά ασταθή mRNA είναι η παρουσία μιας πλούσιας σε AU αλληλουχίας μήκους ~50 βάσεων (καλείται αλληλουχία ARE), η οποία απαντάται στην 3' μετα-τερματική αλληλουχία. Η πρότυπη αλληλουχία στην ARE είναι το πεντανουκλεοτίδιο AUUUA, το οποίο επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. **Η ARE πυροδοτεί την αποσταθεροποίηση μέσω μιας διαδικασίας δύο σταδίων: πρώτα το mRNA αποαδενυλιώνεται και μετά αποσυντίθεται. Η αποαδενυλίωση είναι πιθανόν αναγκαία, διότι προκαλεί απώλεια της πολυ(A)-συνδεόμενης πρωτεΐνης (PABP), η παρουσία της οποίας σταθεροποιεί την 3' περιοχή.**

Ένα άλλο μονοπάτι αποικοδόμησης προσδιορίζεται από την **εξαρτώμενη από ανερμηνεύσιμα κωδικόνια αποσύνθεση του mRNA** (nonsense-mediated mRNA decay). Η εισαγωγή μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης συχνά οδηγεί σε αυξημένη αποικοδόμηση του mRNA. Η εξάρτηση της αποικοδόμησης από ένα κωδικόνιο τερματισμού αποδεικνύει ότι η αποικοδόμηση συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα. Πιθανόν αυτός ο μηχανισμός επιλεκτικής αποικοδόμησης των μορίων mRNA που φέρουν ανερμηνεύσιμα κωδικόνια να αντιπροσωπεύει ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου ή **επιτήρησης (surveillance)** που απομακρύνει τα μη λειτουργικά mRNA. Αυτό το σύστημα επιτήρησης έχει μελετηθεί καλύτερα στο ζυμομύκητα αλλά ίσως είναι σημαντικό και για τα ζωικά κύτταρα

**Η μεταφορά του RNA στους ευκαρυώτες**

**Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το RNA μεταγράφεται στον πυρήνα, αλλά η μετάφραση συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα.**

**Κάθε τύπος RNA πρέπει να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα για να συναρμολογηθεί η μεταφραστική συσκευή.**

**Το rRNA μαζί με τις ριβοσωμικές υπομονάδες συνιστούν υπόστρωμα του συστήματος μεταφοράς από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.**

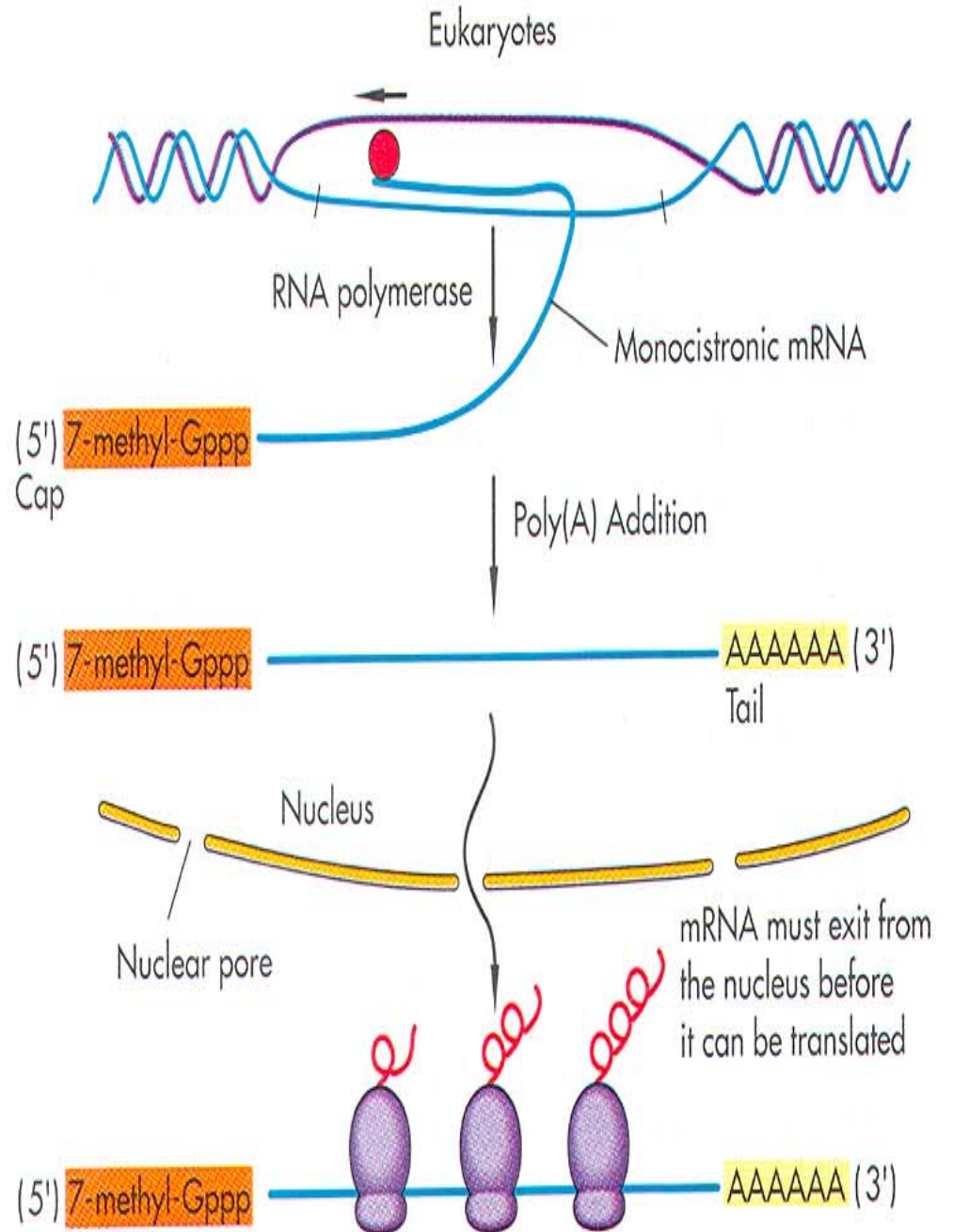
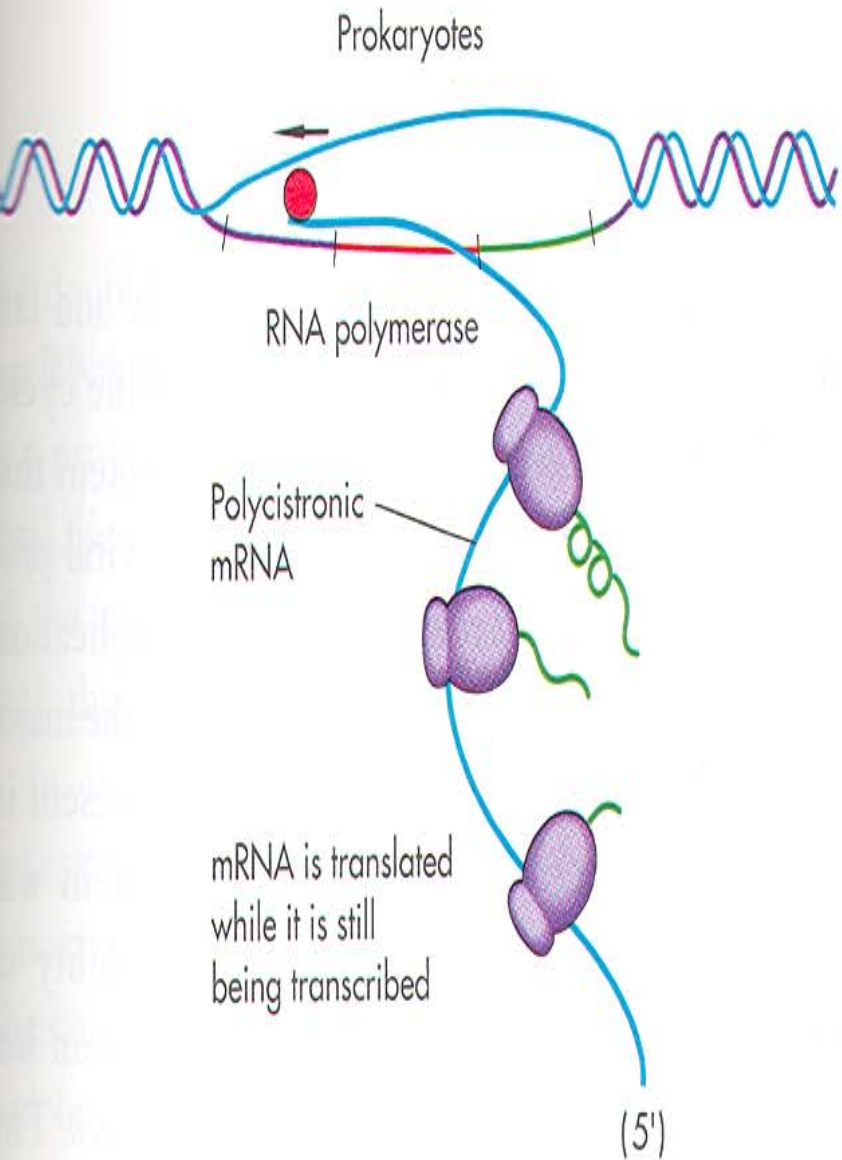
**Το tRNA μεταφέρεται από ένα εξειδικευμένο πρωτεϊνικό σύστημα.**

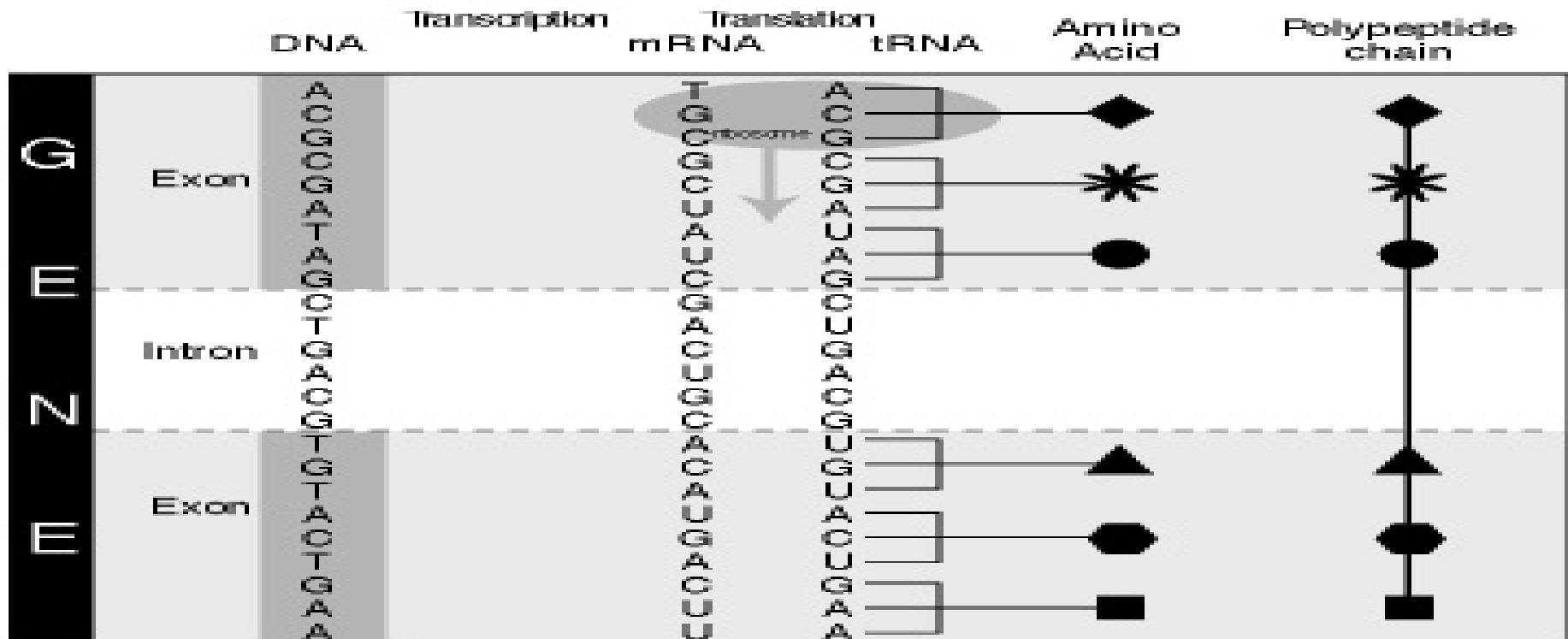
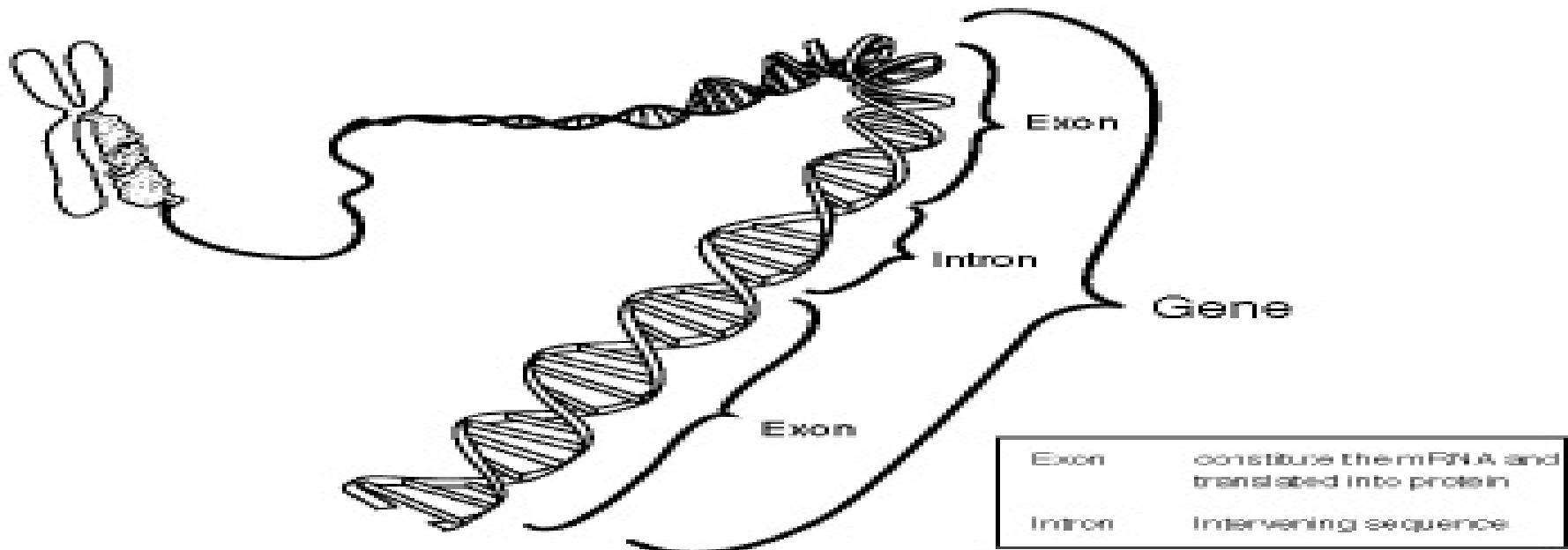
**Το mRNA μεταφέρεται ως μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη, η οποία σχηματίζεται πάνω στο μετάγραφο RNA, μέσα στον πυρήνα.**

**Πολλά mRNA μεταφράζονται στο διαλυτό κυτταρόπλασμα, αλλά ορισμένα μπορεί να προσκολλώνται σε κάποιο κυτταροσκελετικό στοιχείο και να εντοπίζονται σε συγκεκριμένες θέσεις του κυττάρου. Κάποια RNA δημιουργούνται μέσα στον πυρήνα, εξάγονται στο κυτταρόπλασμα και μετά εισάγονται στα μιτοχόνδρια.**

**Το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων κάποιων οργανισμών δεν κωδικοποιεί όλα τα tRNA που απαιτούνται για την πρωτεϊνοσύνθεση μέσα στο οργανίδιο.**

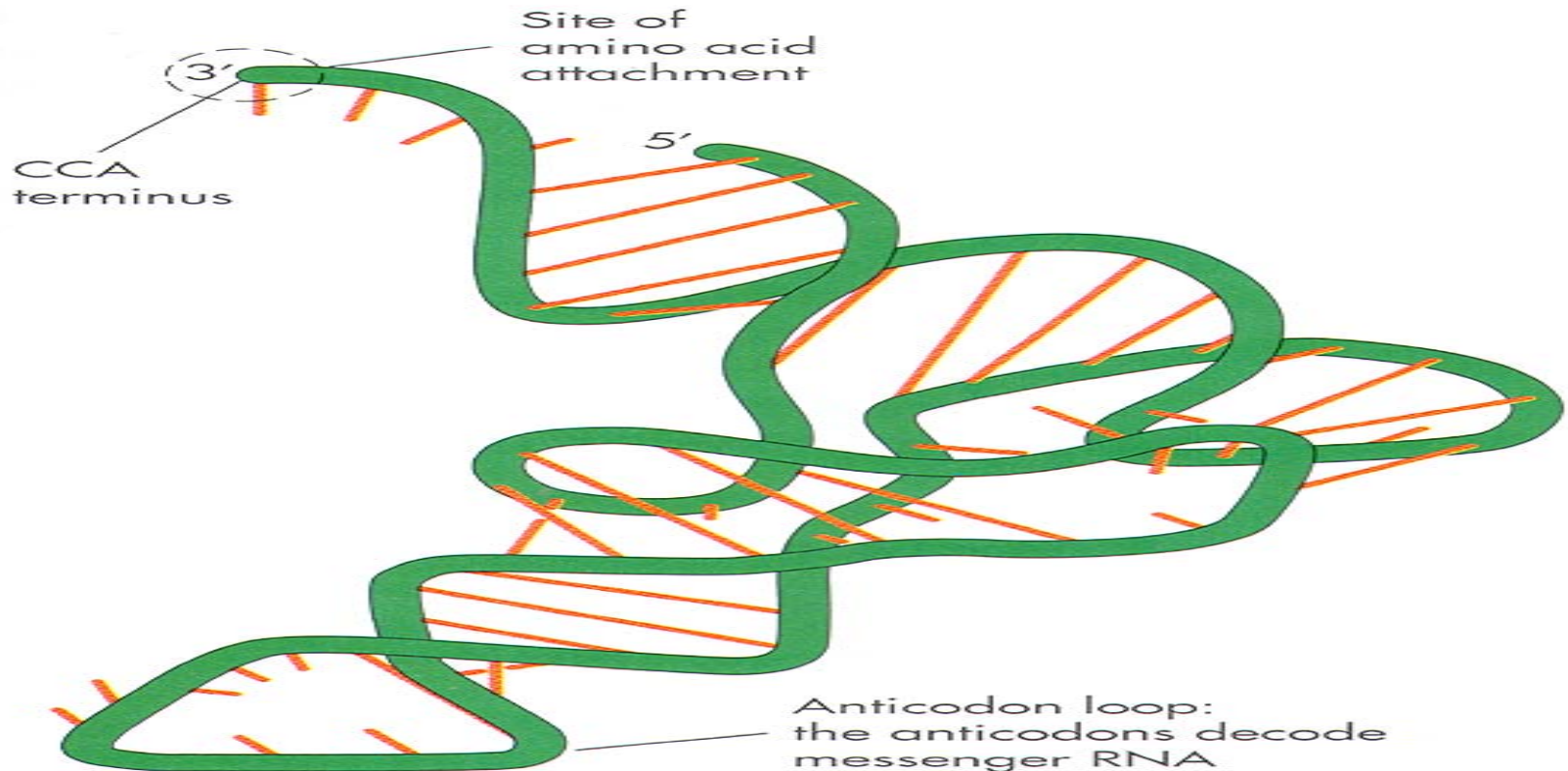
**Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα επιπλέον tRNA θα πρέπει να εισαχθούν στο οργανίδιο από το κυτταρόπλασμα.**





Η μετάφραση επιτυγχάνεται από μια πολύπλοκη μοριακή «μηχανή» το ριβόσωμα . Το ριβόσωμα, ως μια μεγάλη δομή που μετακινείται κατά μήκος του mRNA, είναι ένα μεγάλο σύμπλοκο που περιέχει μερικά μεγάλα μόρια *ριβοσωμικού RNA* (rRNA, **ribosomal RNA**) και πολλές μικρές πρωτεΐνες. Η διαδικασία αναγνώρισης του κατάλληλου αμινοξέος που αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική τριπλέτα απαιτεί ένα ενδιάμεσο *μεταφορικό RNA* (tRNA, **transfer RNA**). Για κάθε αμινοξύ υπάρχει τουλάχιστον ένα είδος tRNA.

Τα μόρια rRNA και tRNA κωδικοποιούνται από γονίδια και συντίθενται με τη διαδικασία της μεταγραφής (όπως και το mRNA), η οποία όμως δεν ακολουθείται από τη μετάφραση.

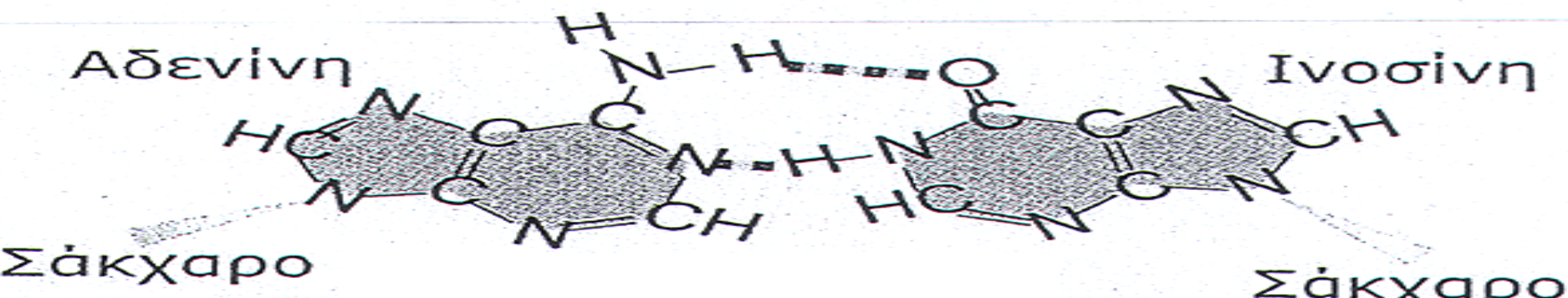
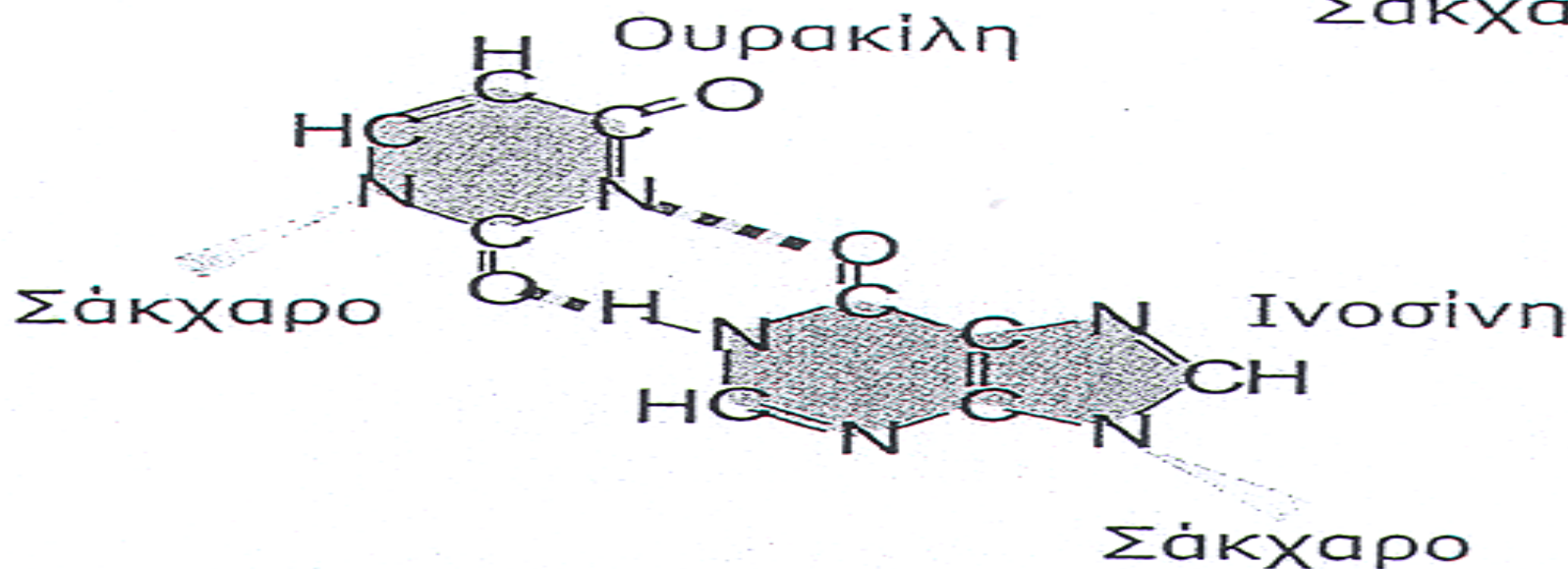
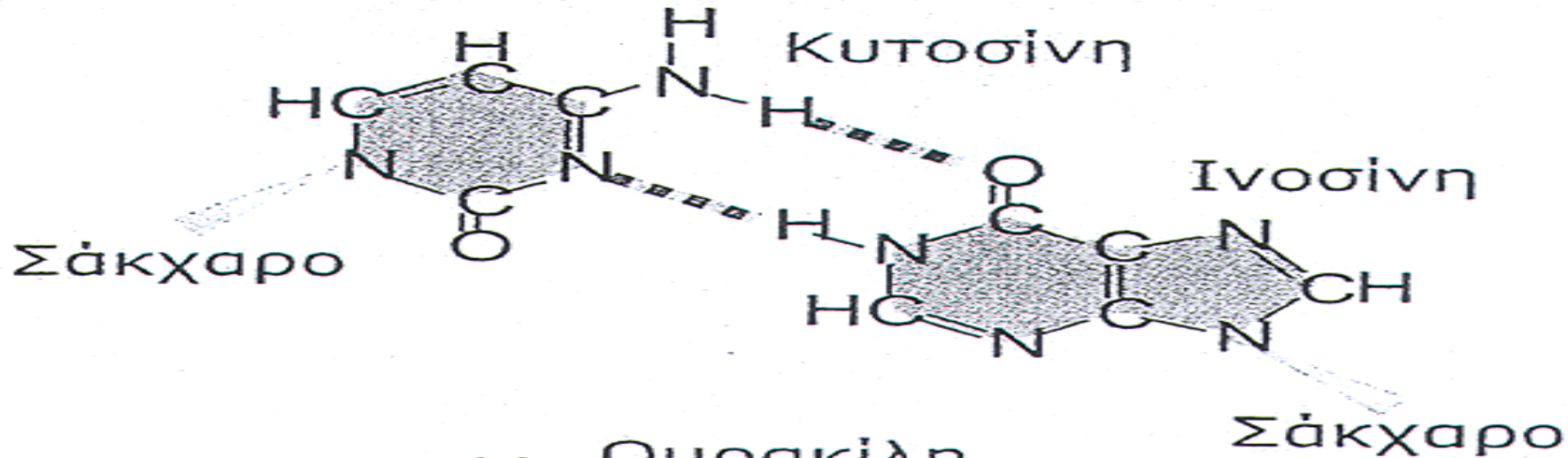




Η τροποποίηση των βάσεων του αντικωδικονίου επιτρέπει ζευγάρωμα βάσεων κατά τρόπο πέρα από τις προβλέψεις του συμβατικού ζευγαρώματος και της ταλάντευσης που αφορούν τις κανονικές βάσεις A, C, U και G.

Η ινοσίνη μπορεί να ζευγαρώσει με οποιαδήποτε από τις τρεις βάσεις, U, C και A. Η ικανότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στα κωδικόνια ισολευκίνης, όπου το AUA κωδικοποιεί την ισολευκίνη ενώ το AUG τη μεθειονίνη. Επειδή με τις συνηθισμένες βάσεις δεν είναι δυνατή η σαφής αναγνώριση της **A στην τρίτη θέση**, κάθε tRNA του οποίου το αντικωδικόνιο αρχίζει από U θα αναγνώριζε τόσο το AUG όσο και το AUA. Ωστόσο, το AUA πρέπει να διαβαστεί όπως τα AUU και AUC. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με την ύπαρξη ενός tRNA με I στο αντικωδικόνιό του

Η ινοσίνη δεν αναγνωρίζει τη γουανίνη, διαφοροποιώντας έτσι τη μετάφραση των κωδικονίων AUA και AUG. Φαίνεται να μη χρησιμοποιείται ποτέ η βάση A, η οποία συνήθως μετατρέπεται σε I. Επίσης, η U στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου συνήθως τροποποιείται, ώστε να έχει αλλαγμένες ιδιότητες ζευγαρώματος. Εκτός από την αναγνώριση πολλαπλών κωδικονίων από ένα tRNA, συχνά ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο μπορεί να αναγνωρίζεται από περισσότερα από ένα tRNA. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ίσως υπάρχουν διαφορές στην αποτελεσματικότητα των εναλλακτικών αντιδράσεων αναγνώρισης.



Προκειμένου ένα κωδικόνιο τερματισμού να αποκτήσει κωδική λειτουργία, απαιτούνται δύο αλλαγές: αφενός η μετάλλαξη ενός tRNA, ώστε να αναγνωρίζει το κωδικόνιο τερματισμού, και αφετέρου η μετάλλαξη του παράγοντα αποδέσμευσης τάξης I, ώστε να μην τερματίζει τη μεταγραφή σε αυτό το κωδικόνιο. Μια άλλη συνηθισμένη αλλαγή είναι η απώλεια ενός tRNA που αντιστοιχεί σε ένα κωδικόνιο, με αποτέλεσμα το κωδικόνιο αυτό να μην μπορεί πλέον να μεταφραστεί σε αμινοξύ. Όλες αυτές οι αλλαγές είναι σποραδικές. Απαντώνται συχνότερα σε κωδικόνια τερματισμού, επειδή αυτές οι αλλαγές δεν προκαλούν την αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο.

Αποκλίσεις από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα απαντώνται και στα μιτοχόνδρια αρκετών ειδών. Η παλαιότερη αλλαγή ήταν η χρήση του UGA για την κωδικοποίηση της τρυπτοφάνης, η οποία είναι κοινή σε όλα τα μιτοχόνδρια. Κάποιες από αυτές τις αλλαγές απλουστεύουν τον κώδικα, αντικαθιστώντας δύο κωδικόνια που είχαν διαφορετικό νόημα με ένα ζεύγος ίδιου νοήματος. Ζεύγη που υπέστησαν μια τέτοια αλλαγή είναι τα UGG και UGA (και τα δύο κωδικοποιούν Trp, αντί το ένα να κωδικοποιεί Trp και το άλλο να είναι κωδικόνιο τερματισμού), καθώς και τα AUG και AUA (και τα δύο κωδικοποιούν Met, αντί το ένα να κωδικοποιεί Met και το άλλο Ile).



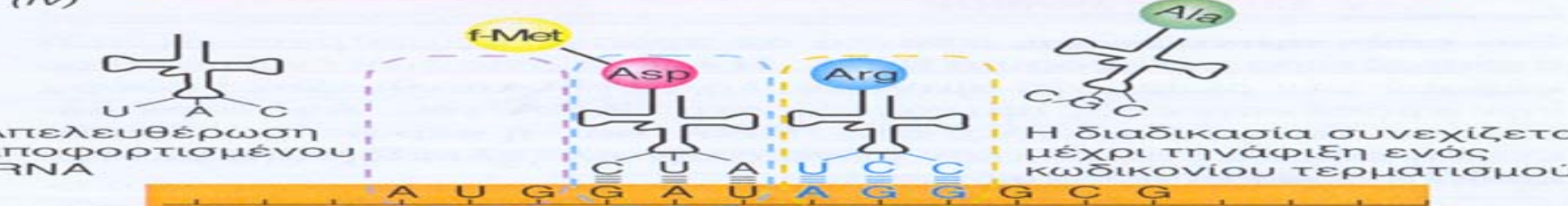
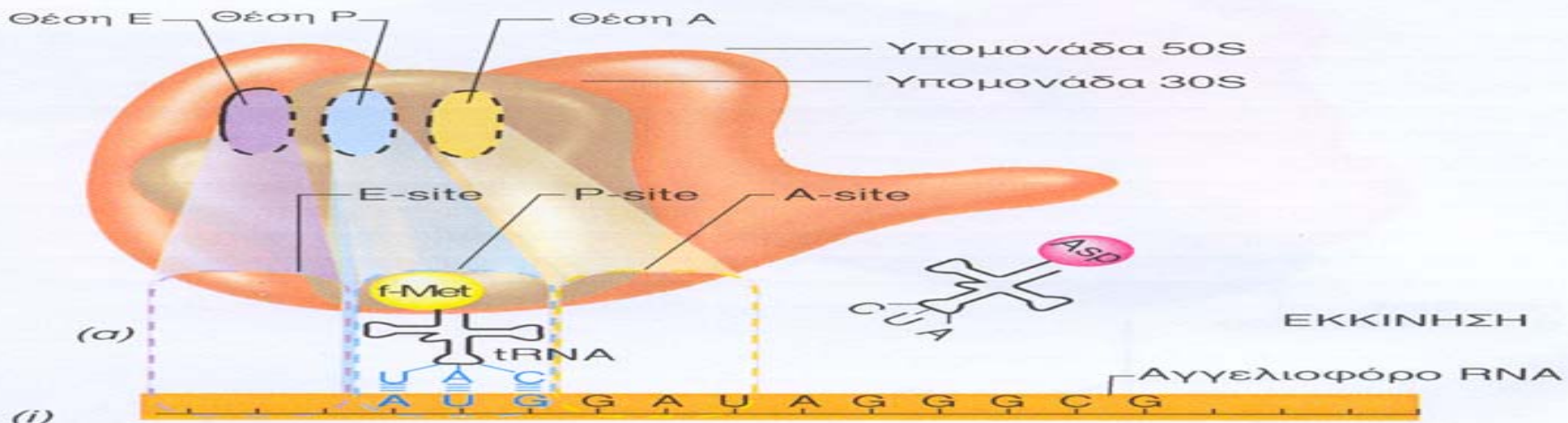
Κωδικόνιο	Αμινοξύ	Κωδικόνιο	Αμινοξύ	Κωδικόνιο	Αμινοξύ	Κωδικόνιο	Αμινοξύ
UUU	Φαινυλαλανίνη	UCU	Σερίνη	UAU	Τυροσίνη	UGU	Κυστεΐνη
UUC	Φαινυλαλανίνη	UCC	Σερίνη	UAC	Τυροσίνη	UGC	Κυστεΐνη
UUA	Λευκίνη	UCA	Σερίνη	UAA	Κανένα (σήμα τερματισμού)	UGA	Κανένα (σήμα τερματισμού)
UUG	Λευκίνη	UCG	Σερίνη	UAG	Κανένα (σήμα τερματισμού)	UGG	Τρυπτοφάνη
CUU	Λευκίνη	CCU	Προλίνη	CAU	Ιστιδίνη	CGU	Αργινίνη
CUC	Λευκίνη	CCC	Προλίνη	CAC	Ιστιδίνη	CGC	Αργινίνη
CUA	Λευκίνη	CCA	Προλίνη	CAA	Γλουταμίνη	CGA	Αργινίνη
CUG	Λευκίνη	CCG	Προλίνη	CAG	Γλουταμίνη	CGG	Αργινίνη
AUU	Ισολευκίνη	ACU	Θρεονίνη	AAU	Ασπαραγίνη	AGU	Σερίνη
AUC	Ισολευκίνη	ACC	Θρεονίνη	AAC	Ασπαραγίνη	AGC	Σερίνη
AUA	Ισολευκίνη	ACA	Θρεονίνη	AAA	Λυσίνη	AGA	Αργινίνη
AUG (έναρξη) <sup>β</sup>	Μεθειονίνη	ACG	Θρεονίνη	AAG	Λυσίνη	AGG	Αργινίνη
GUU	Βαλίνη	GCU	Αλανίνη	GAU	Ασπार्टικό οξύ	GGU	Γλυκίνη
GUC	Βαλίνη	GCC	Αλανίνη	GAC	Ασπάρτικό οξύ	GGC	Γλυκίνη
GUA	Βαλίνη	GCA	Αλανίνη	GAA	Γλουταμικό οξύ	GGA	Γλυκίνη
GUG	Βαλίνη	GCG	Αλανίνη	GAG	Γλουταμικό οξύ	GGG	Γλυκίνη

Σύμφωνα με την υπόθεση ταλάντευσης, απαιτούνται 31 tRNA (εκτός από το tRNA έναρξης) για την αναγνώριση και των 61 κωδικονίων ( εκτός των 3 κωδικονίων τερματισμού ).

Στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών υπάρχουν μόνο 22 διαφορετικά tRNA. Το χαρακτηριστικό του κώδικα των μιτοχονδρίων είναι η απλούστευση του τρόπου ζευγαρώματος κωδικονίου-αντικωδικονίου, οπότε ένα tRNA αναγνωρίζει και τα τέσσερα μέλη μιας οικογένειας κωδικονίων. Έτσι μειώνεται ο ελάχιστος αριθμός των tRNA που απαιτούνται για την κάλυψη όλων των κωδικονίων σε 23. Η χρήση των κωδικονίων  $AG^A/G$  για τον τερματισμό μειώνει τον παραπάνω αριθμό κατά ένα ακόμα tRNA.

Όλα τα tRNA ταιριάζουν στις θέσεις P και A του ριβοσώματος, όπου το ένα άκρο τους προσδένεται στο mRNA μέσω του ζευγαρώματος κωδικονίου-αντικωδικονίου, ενώ το άλλο άκρο τους συμμετέχει στη μεταφορά του πολυπεπτιδίου. Όλα τα tRNA αναγνωρίζονται από τους παράγοντες μετάφρασης (eIF-1) εκτός από το εναρκτήριο tRNA, που αναγνωρίζεται αντίστοιχα από τον IF-2 ή τον eIF-2. Άρα, στο σύνολό τους, τα tRNA πρέπει να διαθέτουν κοινά χαρακτηριστικά για την αλληλεπίδρασή τους με τους παράγοντες επιμήκυνσης, με εξαίρεση τη διάκριση του εναρκτήριου tRNA.





Τα αμινοξέα εισέρχονται στο μονοπάτι της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών, οι οποίες μεσολαβούν για τη σύνδεσή τους με τα νουκλειικά οξέα.

Όλες οι συνθετάσες λειτουργούν με το μηχανισμό δύο σταδίων:

Πρώτα, το αμινοξύ αντιδρά με ATP για να σχηματίσει ένα αμινοακυλο-αδενυλικό οξύ (AA-AMP), απελευθερώνοντας μία πυροφωσφορική ομάδα. Η απαιτούμενη ενέργεια για την αντίδραση παρέχεται από τη διάσπαση του δεσμού υψηλής ενέργειας του ATP.

Στη συνέχεια, το ενεργοποιημένο αμινοξύ μεταφέρεται στο tRNA, απελευθερώνοντας AMP.



Το ενδιαμέσο προϊόν που σχηματίζεται, το αμινοακυλο-AMP, κανονικά παραμένει δεσμευμένο στο ένζυμο μέχρι την σύγκρουση με το κατάλληλο μόριο tRNA και το ενεργοποιημένο αμινοξύ μεταφέρεται κατόπιν στο tRNA, για τον σχηματισμό ενός φορτισμένου tRNA:



Το πυροφωσφορικό (P-P) που σχηματίζεται κατά τη πρώτη αντίδραση διασπάται από μια πυροφωσφατάση, σχηματίζοντας δύο μόρια ανόργανου φωσφορικού. Επειδή καταναλώνεται ATP και προκύπτει AMP, έπεται ότι απαιτούνται δύο φωσφορικοί δεσμοί μεγάλου ενεργειακού περιεχομένου για την ενεργοποίηση ενός αμινοξέος και τη φόρτιση ενός tRNA. Αφ' ότου λάβουν χώρα η ενεργοποίηση και η φόρτιση, το αμινοακυλο-tRNA (AA-tRNA) εγκαταλείπει τη συνθετάση και μεταφέρεται στο ριβόσωμα από έναν πρωτεϊνικό παράγοντα.

Οι συνθετάσες διακρίνουν τα tRNA και τα αμινοξέα σε αντίστοιχες ομάδες. Κάθε συνθετάση αναγνωρίζει ένα μόνο αμινοξύ και όλα τα tRNA τα οποία φορτώνονται με αυτό το αμινοξύ. Συνήθως, κάθε αμινοξύ αντιστοιχεί σε περισσότερα από ένα tRNA. Αρκετά tRNA μπορεί να αποκρίνονται σε συνώνυμα κωδικόνια, ενώ μερικές φορές υπάρχουν πολλαπλά είδη tRNA που αναγνωρίζουν το ίδιο κωδικόνιο. Τα πολλαπλά tRNA που αντιστοιχούν στο ίδιο αμινοξύ ονομάζονται **ισοαποδεκτικά tRNA** (isoaccepting tRNAs). Επειδή όλα αναγνωρίζονται από την ίδια συνθετάση, αναφέρονται και ως **ομότυπα tRNA** (cognate tRNAs) της συγκεκριμένης συνθετάσης. Είναι γνωστό από τις κρυσταλλικές δομές ότι το στέλεχος του βραχίονα-δέκτη και το στέλεχος του αντικωδικονίου δημιουργούν ισχυρές επαφές με τη συνθετάση.

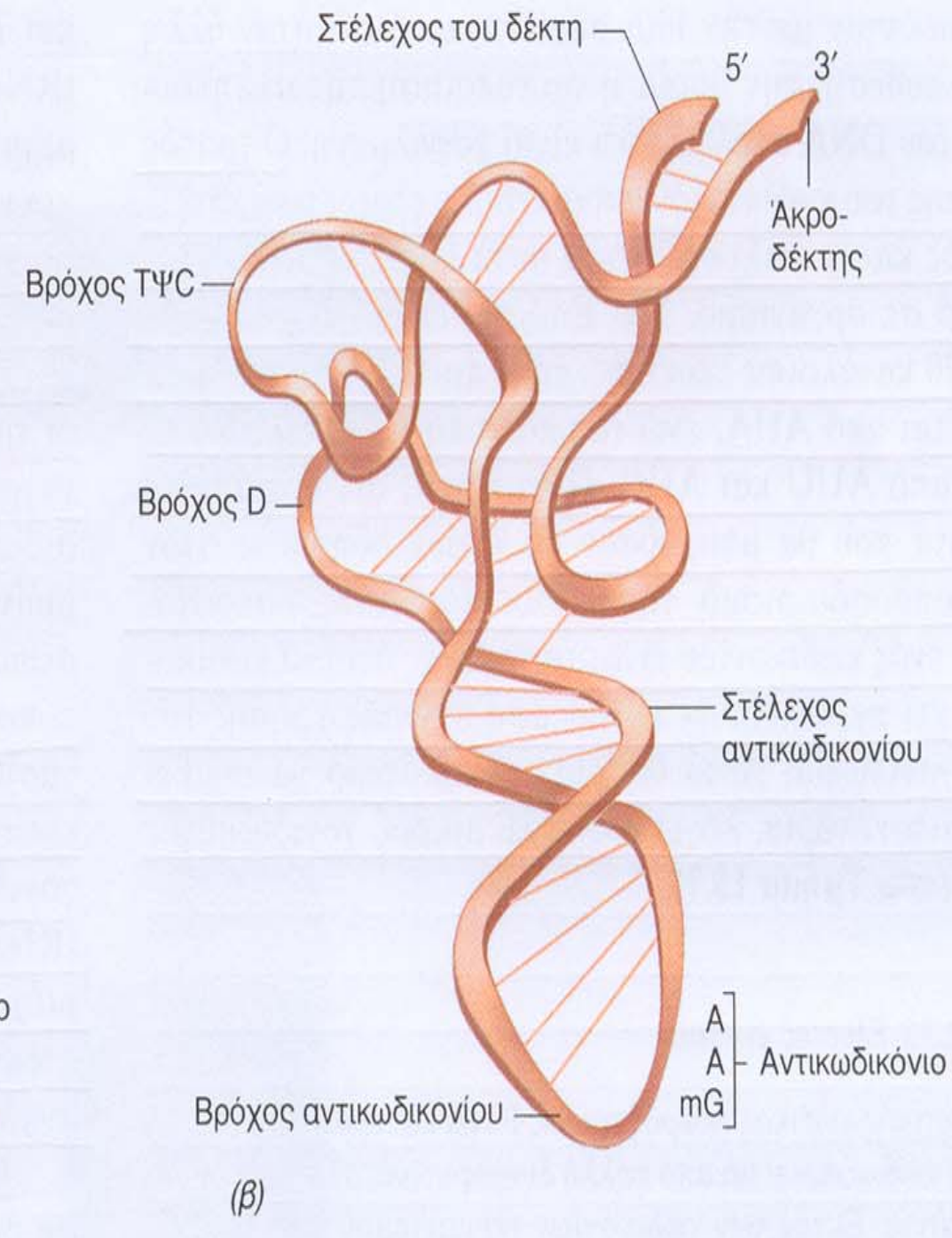
Επίσης, αρκετές από τις μεταλλάξεις που αλλάζουν την αναγνώριση ενός tRNA απαντώνται στις δύο αυτές περιοχές. Τα tRNA αναγνωρίζονται από τη συνθετάση τους μέσω επαφών με ένα μικρό αριθμό από βάσεις, συνήθως 1-5. Τις περισσότερες φορές χρησιμοποιούνται τρεις τύποι επαφών:

Συνήθως αναγνωρίζεται τουλάχιστον μία βάση του αντικωδικονίου.

Συχνά αναγνωρίζεται ένα από τα τελευταία τρία ζεύγη βάσεων στο στέλεχος-δέκτη.

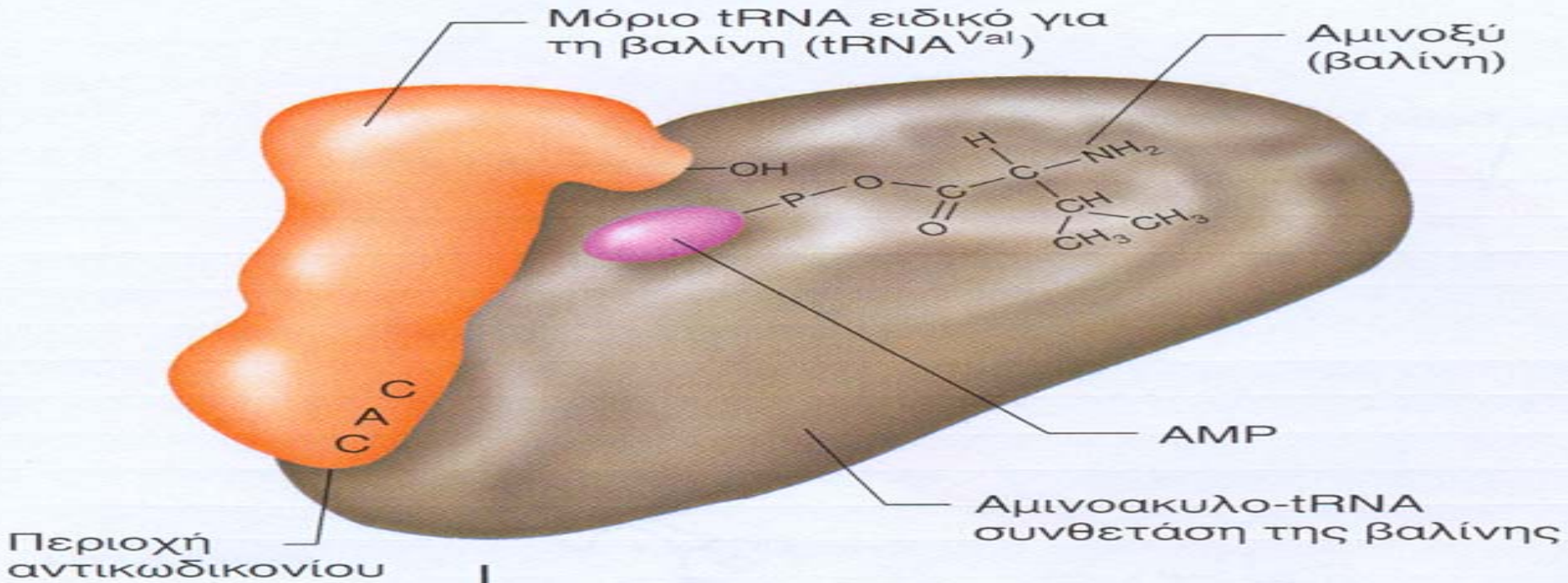
Η επονομαζόμενη διακριτική (discriminator) βάση, που βρίσκεται ανάμεσα στο στέλεχος-δέκτη και στο άκρο CCA, είναι πάντα ίδια στα ισοαποδεκτικά tRNA.





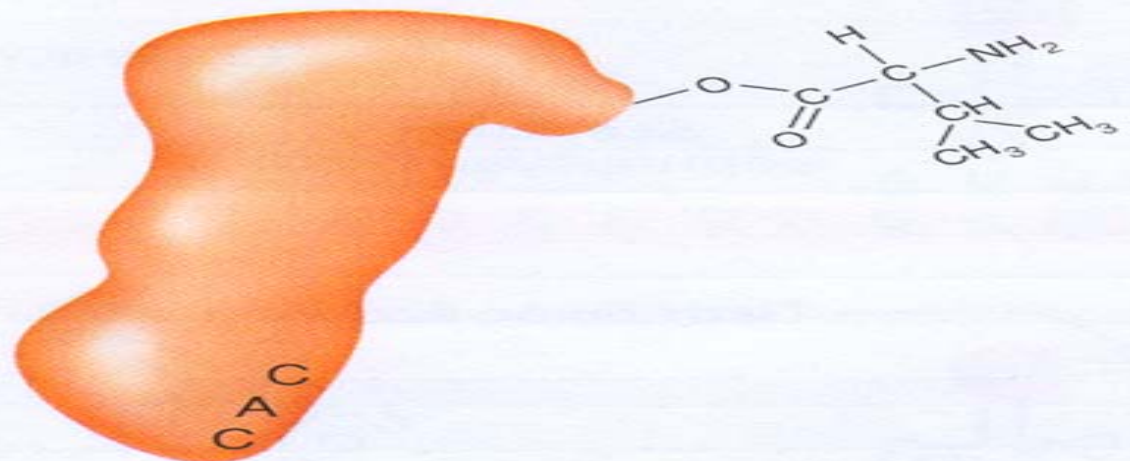
(α)

(β)



Σύνδεση της βαλίνης με το μόριο tRNA<sup>Val</sup>

AMP



(a)

Η αναγνώριση βασίζεται σε λίγα σημεία επαφής του tRNA, τα οποία είναι συγκεντρωμένα στα άκρα του, με μερικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Η σημασία του ρόλου που διαδραματίζουν το στέλεχος-δέκτης και το στέλεχος του αντικωδικονίου είναι διαφορετική σε κάθε tRNA συνθετάση.

Οι συνθετάσες συνιστούν μια ποικιλόμορφη ομάδα πρωτεϊνών. Οι ξεχωριστές υπομονάδες ποικίλλουν από **40-110 kD** και τα ένζυμα μπορεί να είναι μονομερή, διμερή ή τετραμερή. Οι ομολογίες μεταξύ τους είναι περιορισμένες.

**Οι συνθετάσες έχουν διαιρεθεί σε δύο γενικές ομάδες, κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει 10 ένζυμα, σύμφωνα με τη δομή της επικράτειας που φέρει το ενεργό κέντρο.** Η καταλυτική επικράτεια περιλαμβάνει τις θέσεις πρόσδεσης του ATP και του αμινοξέος. Πρόκειται για μια μεγάλη περιοχή στην οποία παρεμβάλλεται η επικράτεια που δεσμεύει την έλικα του βραχίονα-δέκτη του tRNA. Όσες συνθετάσες αποτελούνται από πολλές υπομονάδες διαθέτουν και μία επικράτεια ολιγομερισμού.

Κάθε συνθετάση πρέπει να διακρίνει ένα από τα 20 αμινοξέα, καθώς και τα αντίστοιχα ομότυπα tRNA (συνήθως 1-3) από ~100 διαφορετικά tRNA. Είναι ιδιαίτερα δύσκολη η διάκριση ανάμεσα σε δύο αμινοξέα που διαφέρουν μόνο στο μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας (δηλαδή κατά μία ομάδα CH<sub>2</sub>).

**Η ενδογενής ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στα tRNA είναι ευκολότερη, επειδή το tRNA προσφέρει μια μεγαλύτερη επιφάνεια για τη δημιουργία επαφών. Αν και όλα τα tRNA έχουν την ίδια γενική δομή, μάλλον υπάρχει μια περιορισμένη ομάδα γνωρισμάτων των ομότυπων tRNA που τα διακρίνει από τα μη ομότυπα. Οι συνθετάσες χρησιμοποιούν μηχανισμούς διορθωτικού ελέγχου για να επαληθεύσουν την ταυτότητα και των δύο υποστρωμάτων. Οι μηχανισμοί αυτοί βελτιώνουν την διάκριση εξαιτίας των ενδογενών διαφορών ανάμεσα στα αμινοξέα ή τα tRNA, αλλά όπως είναι αναμενόμενο από τις διαφορές ανάμεσα στα μέλη κάθε ομάδας, εξακολουθούν να γίνονται περισσότερα λάθη κατά την επιλογή των αμινοξέων (συχνότητα σφάλματος 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-5</sup>) παρά κατά την επιλογή των tRNA (συχνότητα σφάλματος ~10<sup>-6</sup>).**

Το μεταφορικό RNA προσδένεται στη συνθετάση με μια διαδικασία δύο σταδίων. Τα ομότυπα tRNA έχουν μεγαλύτερη ενδογενή συγγένεια για τη θέση πρόσδεσης, με αποτέλεσμα να συνδέονται ταχύτερα και να αποσυνδέονται πιο αργά. Μετά τη σύνδεση, το ένζυμο εξετάζει προσεκτικά το tRNA που προσδέθηκε. Αν το tRNA είναι σωστό, η σύνδεση σταθεροποιείται μέσω αλλαγής στη διαμόρφωση του ενζύμου. Το γεγονός αυτό επιτρέπει να πραγματοποιηθεί γρήγορα η αμινοακυλίωση. Αν το tRNA δεν είναι το σωστό, δεν αλλάζει η διαμόρφωση, με αποτέλεσμα η αντίδραση να προχωράει πολύ αργά. Έτσι αυξάνεται η πιθανότητα να αποσυνδεθεί το tRNA από το ένζυμο, πριν φορτωθεί με αμινοξύ. Ο συγκεκριμένος τύπος ελέγχου ονομάζεται **κινητικός διορθωτικός έλεγχος**.

Υπάρχουν δύο σημεία κατά το σχηματισμό του αμινοακυλο-tRNA στα οποία ένα λανθασμένο AA-AMP μπορεί να υποστεί διορθωτικό έλεγχο. Και στα δύο πραγματοποιείται **χημικός διορθωτικός έλεγχος**, ο οποίος αντιστρέφει την καταλυτική αντίδραση



**Ο βαθμός στον οποίο υπερिσχύει το ένα ή το άλλο μονοπάτι ποικίλλει ανάλογα με τη συνθετάση:**

**Το μη ομότυπο AA-AMP υδρολύεται όταν προσδεθεί το ομότυπο tRNA στη συνθετάση. Αυτός είναι ο κύριος μηχανισμός που χρησιμοποιείται από αρκετές συνθετάσες, όπως η συνθετάση της μεθειονίνης, της ισολευκίνης και της βαλίνης. Σε μερικές συνθετάσες, ο χημικός διορθωτικός έλεγχος γίνεται σε ένα μεταγενέστερο στάδιο. Το μη ομότυπο αμινοξύ μεταφέρεται στο tRNA, αλλά αναγνωρίζεται από τη δομή του στη συνέχεια ως λανθασμένο, στη θέση πρόσδεσης του tRNA, και έτσι υδρολύεται και αποβάλλεται. Η διαδικασία αυτή βασίζεται σε ένα συνεχή κύκλο δημιουργίας και υδρόλυσης του δεσμού με το tRNA, μέχρι να μεταφερθεί στο tRNA το σωστό αμινοξύ.**

**Άρα η σύνθεση λανθασμένου αμινοακυλο-tRNA ( $1,5 \times 10^{-5}$ ) ευθύνεται μόνο για ένα μικρό ποσοστό από τα λάθη που συμβαίνουν κατά την πρωτεϊνοσύνθεση.**

**Η Ile-tRNA συνθετάση διακρίνει τα αμινοξέα βάσει του μεγέθους τους.**

**Διαθέτει δύο ενεργά κέντρα: το κέντρο σύνθεσης (ή ενεργοποίησης) και το κέντρο διόρθωσης (ή υδρόλυσης).**

**Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου δείχνει ότι το κέντρο σύνθεσης είναι υπερβολικά μικρό. Όλα τα αμινοξέα που είναι μεγαλύτερα από την ισολευκίνη εξαιρούνται από την ενεργοποίηση, επειδή δεν μπορούν να εισέλθουν στο κέντρο σύνθεσης. Οποιοδήποτε αμινοξύ που μπορεί να εισέλθει στο κέντρο σύνθεσης φορτώνεται στο tRNA.**

**Στη συνέχεια, το ένζυμο προσπαθεί να το μεταφέρει στο κέντρο διόρθωσης. Η ισολευκίνη δεν κινδυνεύει να υποστεί υδρόλυση, διότι είναι πολύ μεγάλη για να εισέλθει στο κέντρο διόρθωσης. Αντίθετα, η βαλίνη μπορεί να εισέλθει σε αυτό το κέντρο, με συνέπεια το λανθασμένο σύμπλοκο Val-tRNA<sup>Ile</sup> να υδρολύεται.**

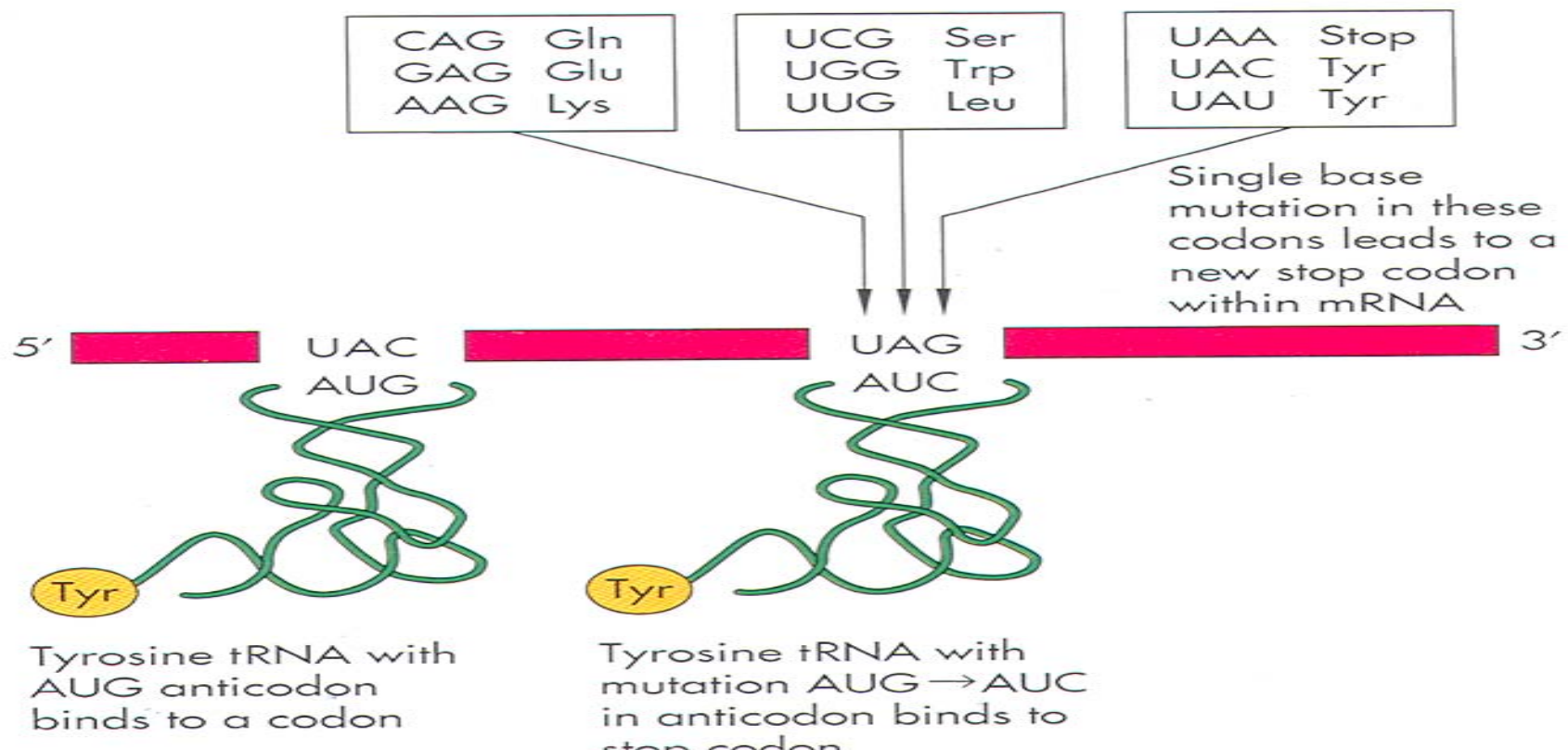
**Οι καταστολείς διακρίνονται σε καταστολείς ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων (nonsense suppressors) και σε καταστολείς παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων (missense suppressors), ανάλογα με τη φύση της αρχικής μετάλλαξης.**

**Μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη δημιουργεί ένα κωδικόνιο που αναγνωρίζεται μόνο από έναν παράγοντα αποδέσμευσης, τερματίζοντας έτσι πρόωρα την πρωτεϊνοσύνθεση.**

**Μια μετάλλαξη-καταστολέας δημιουργεί ένα αμινοακυλο-tRNA το οποίο αναγνωρίζει το κωδικόνιο τερματισμού και προσθέτει ένα αμινοξύ, επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη συνέχιση της πρωτεϊνοσύνθεσης πέρα από τη θέση της ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης. Αυτή η καινούρια ιδιότητα του μεταφραστικού συστήματος επιτρέπει τη σύνθεση μιας ολοκληρωμένης πρωτεΐνης. Εάν το αμινοξύ που προστίθεται μέσω της καταστολής είναι διαφορετικό από το αμινοξύ που βρισκόταν αρχικά στην ίδια θέση στην πρωτεΐνη άγριου τύπου, υπάρχει το ενδεχόμενο να αλλάξει η ενεργότητα της πρωτεΐνης.**

tRNA καταστολέας : Μεταλλάξεις στο U, A ή G στην πρώτη , δεύτερη ή τρίτη βάση αντίστοιχα των κωδικονίων θα οδηγήσει στο κωδικόνιο τερματισμού UAG μέσα στην κωδικοποιούσα περιοχή του mRNA.

Ένα από τα κωδικόνια της Τυροσίνης είναι 5'-UAC-3' και το αντίστοιχο αντικωδικόνιο είναι 3'-AUG-5'. Αν μια μετάλλαξη στο αντικωδικόνιο της tRNA τυροσίνης το μετατρέπει σε 3'-AUC-5', τότε αυτό το tRNA συνδέεται με το κωδικόνιο τερματισμού UAG και ενσωματώνει την τυροσίνη στην πεπτιδική αλυσίδα . Με αυτό τον τρόπο η σύνθεση της πρωτεΐνης συνεχίζεται και μετά το κωδικόνιο τερματισμού . Αν η τυροσίνη σε αυτή την θέση επαναφέρει την αρχική λειτουργία της πρωτεΐνης τότε η ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη έχει κατασταλεί.





**Μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη τροποποιεί ένα κωδικόνιο ώστε να αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό αμινοξύ. Η αντικατάσταση του αρχικού αμινοξέος στη θέση του μεταλλαγμένου κωδικονίου έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μη λειτουργικής πρωτεΐνης.**

Τυπικά, οποιαδήποτε αντικατάσταση αμινοξέος συνιστά μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη, αλλά στην πράξη μια τέτοια μετάλλαξη είναι δυνατόν να ανιχνευθεί μόνο εάν αλλάζει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη μπορεί να κατασταλεί με την εισαγωγή είτε του αρχικού αμινοξέος είτε ενός αμινοξέος που είναι συμβατό με τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Οι καταστολείς ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων διαιρούνται σε τρεις τάξεις, μία για κάθε τύπο κωδικονίου τερματισμού.

**Οι καταστολείς των μεταλλάξεων amber. Στην *E. coli* έχουν μεταλλαχθεί τουλάχιστον 6 tRNA ώστε να αναγνωρίζουν κωδικόνια UAG. Όλα τα tRNA-καταστολείς των μεταλλάξεων amber έχουν ως αντικωδικόνιο το CUA←, το οποίο σχηματίζεται από την αλλαγή μίας βάσης στο αντικωδικόνιο του tRNA άγριου τύπου. Η θέση της μετάλλαξης μπορεί να βρίσκεται σε οποιαδήποτε από τις τρεις βάσεις του αντικωδικονίου. Κάθε tRNA-καταστολέας δεν αναγνωρίζει πλέον το αρχικό του κωδικόνιο αλλά μόνο το κωδικόνιο UAG. Τα αμινοξέα που προστίθενται είναι η σερίνη, η γλουταμίνη ή η τυροσίνη, τα ίδια δηλαδή με εκείνα που μεταφέρονται από τα αντίστοιχα tRNA άγριου τύπου.**

**Οι καταστολείς των μεταλλάξεων ochre προκύπτουν επίσης από μεταλλάξεις στο αντικωδικόνιο. Οι πιο γνωστές περιπτώσεις είναι μόρια tRNA τα οποία αναγνωρίζουν τόσο τα κωδικόνια ochre (UAA) όσο και τα amber (UAG) και ευθύνονται για την προσθήκη τυροσίνης ή λυσίνης στο κωδικόνιο όπου προηγουμένως τερματιζόταν η μετάφραση.**

**Καταστολέας του UGA.** Προέρχεται από το tRNA<sup>Trp</sup>, αλλά η μοναδική του μετάλλαξη είναι η αντικατάσταση της G από την A . Αυτή η αλλαγή αντικαθιστά ένα ζεύγος G·U με ένα ζεύγος A·U, αυξάνοντας τη σταθερότητα της έλικας. Η αλληλουχία του αντικωδικονίου, CCA←, παραμένει η ίδια με εκείνη του άγριου τύπου.

**Έτσι, η μετάλλαξη θα πρέπει κατά κάποιον τρόπο να αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση του βρόχου του αντικωδικονίου, επιτρέποντας στο CCA← να ζευγαρώσει με το UGA, δηλαδή προκαλώντας ένα ασυνήθιστο ζευγάρωμα ταλάντευσης του C με το A.**

**Το tRNA-καταστολέας εξακολουθεί να αναγνωρίζει το συνηθισμένο του κωδικόνιο UGG.**

**Αυτές οι παρατηρήσεις αποδεικνύουν ότι η αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου, είτε ενός άγριου τύπου είτε ενός μεταλλαγμένου tRNA, δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί απόλυτα από τις αντίστοιχες αλληλουχίες των τριπλετών, αλλά επηρεάζεται και από άλλα χαρακτηριστικά του μορίου του tRNA. Σε ένα κύτταρο άγριου τύπου, το νόημα κάθε κωδικονίου είναι μοναδικό και αντιστοιχεί είτε σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ είτε σε ένα σήμα τερματισμού.**

**Ένα tRNA-καταστολέας μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης ανταγωνίζεται τους παράγοντες αποδέσμευσης που αναγνωρίζουν τα κωδικόνια τερματισμού.**

**Ένα tRNA-καταστολέας μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης ανταγωνίζεται τα φυσιολογικά tRNA που αποκρίνονται στο νέο κωδικόνιο.**

**Το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της καταστολής.**

Η ανάγνωση ενός κωδικονίου επηρεάζεται από τη θέση του, γι' αυτό η αποτελεσματικότητα της καταστολής μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης από ένα tRNA μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό, ανάλογα με το πλαίσιο (contex) του κωδικονίου. Η βάση στην 3' πλευρά του κωδικονίου φαίνεται να έχει ιδιαίτερα ισχυρή επίδραση.

Το μεταλλαγμένο tRNA που καταστέλλει την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη είναι ουσιαστικά ικανό να καταστέλλει το φυσικό τερματισμό οποιουδήποτε γονιδίου χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο κωδικόνιο τερματισμού με αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας μεγαλύτερης σε μήκος πρωτεΐνης, με πρόσθετα αμινοξέα στο C-τελικό άκρο. Η πρωτεΐνοσύνθεση θα σταματήσει στην επόμενη τριπλέτα τερματισμού στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης.

Η εκτενής καταστολή του τερματισμού ενδέχεται να είναι καταστροφική για το κύτταρο, αφού παράγονται μεγαλύτερες πρωτεΐνες των οποίων οι ιδιότητες μπορεί να μην είναι φυσιολογικές.

Μία μετάλλαξη που δημιουργεί έναν tRNA-καταστολέα μπορεί να έχει δύο συνέπειες. Πρώτον, επιτρέπει στο tRNA να αναγνωρίζει ένα νέο κωδικόνιο. Δεύτερον, μερικές φορές εμποδίζει το tRNA να αναγνωρίζει τα κωδικόνια στα οποία αποκρίνονταν πριν τη μετάλλαξη.

Εάν υπάρχει μόνο ένα tRNA που αποκρίνεται σε ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο, κάθε μετάλλαξη που εμποδίζει αυτή την απόκριση είναι θανατηφόρα.

**Δύο είναι τα στάδια στην πρωτεϊνοσύνθεση στα οποία μπορεί να γίνουν σφάλματα:**

**Η φόρτωση ενός tRNA αποκλειστικά με το σωστό αμινοξύ είναι προφανώς πολύ σημαντική. Η λειτουργία αυτή επιτελείται από τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες. Πιθανόν η συχνότητα σφάλματος να ποικίλλει σε κάθε ένζυμο, αλλά γενικά είναι  $<1/10^5$  αντιδράσεις αμινοακυλίωσης.**

**Η ειδικότητα της αναγνώρισης κωδικονίου-αντικωδικονίου είναι καθοριστικής σημασίας, αλλά παραμένει αινιγματική. Αν και οι σταθερές πρόσδεσης είναι διαφορετικές για κάθε ζεύγος κωδικονίου-αντικωδικονίου, η ειδικότητα ποτέ δεν είναι επαρκώς υψηλή για να διασφαλίσει συχνότητα σφάλματος  $<10^{-5}$ .**

**Η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου συμβαίνει σε δύο περιπτώσεις: Κατά την ολίσθηση του αναγνωστικού πλαισίου, το αμινοακυλο-tRNA ολισθαίνει κατά μία βάση (+1 προς τα εμπρός ή -1 προς τα πίσω) η μετάφραση συνεχίζεται πέρα από το κωδικόνιο τερματισμού εξαιτίας της ολίσθησης.**

**Η παράκαμψη (bypassing) οφείλεται στη μετακίνηση του ριβοσώματος, ώστε να αλλάξει το κωδικόνιο που ζευγαρώνει με το πεπτιδυλο-tRNA στη θέση P. Η αλληλουχία που βρίσκεται μεταξύ των δύο κωδικονίων δεν θα εμφανιστεί στην πρωτεΐνη. Η παράκαμψη επιτρέπει τη συνέχιση της μετάφρασης πέρα από τα κωδικόνια τερματισμού που τυχόν βρίσκονται στην ενδιάμεση περιοχή που παρακάμπτεται.**

mRNA 5' A A C A U A C C G A U C A C

(a) -1 A A C A U A C C G A U C A C  
Asn Ile Pro Ile Thr

(β) 0 A A C A U A C C G A U C A C  
Thr Tyr Arg Ser

(γ) +1 A A C A U A C C G A U C A C  
His Thr Asp His

**Η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου σχετίζεται με ειδικά tRNA σε δύο περιπτώσεις:**

**Κάποια μεταλλαγμένα tRNA-καταστολείς αναγνωρίζουν τέσσερις βάσεις ως ένα «κωδικόνιο» αντί για τις συνηθισμένες τρεις βάσεις.**

**Ορισμένες «ολισθηρές» αλληλουχίες επιτρέπουν σε ένα tRNA να μετακινηθεί κατά μία βάση ανοδικά ή καθοδικά στο mRNA στη θέση A.**

**Το απλούστερο παράδειγμα καταστολέα μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου αφορά την αποκατάσταση του αναγνωστικού πλαισίου μετά από την προσθήκη μίας επιπλέον βάσης ανάμεσα σε όμοιες βάσεις (π.χ. προσθήκη μίας βάσης G ανάμεσα σε αρκετές συνεχόμενες βάσεις G). Ο καταστολέας της μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου είναι σε αυτή την περίπτωση ένα tRNA<sup>Gly</sup> που φέρει μία επιπλέον βάση στο βρόχο του αντικωδικονίου του, μετατρέποντας τη συνηθισμένη τριπλέτα CCC← στην τετράδα CCC←. Το tRNA-καταστολέας αναγνωρίζει λοιπόν ένα «κωδικόνιο» με τέσσερις βάσεις.**

**Ορισμένοι καταστολείς μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου αναγνωρίζουν περισσότερα από ένα «κωδικόνια» τεσσάρων βάσεων. Για παράδειγμα, ένα βακτηριακό tRNA<sup>Lys</sup>-καταστολέας μπορεί να αναγνωρίσει είτε AAAA είτε AAUA αντί για το συνηθισμένο κωδικόνιο AAA.**

**Ένας άλλος καταστολέας μπορεί να διαβάσει οποιοδήποτε «κωδικόνιο» τεσσάρων βάσεων με ACC στις τρεις πρώτες θέσεις. Η επόμενη βάση δεν έχει σημασία.**

**Τα γεγονότα αυτά υποδεικνύουν ότι η σπάνια (αλλά προβλέψιμη) «λανθασμένη ανάγνωση» μπορεί να θεωρηθεί ως ένα απαραίτητο (φυσιολογικό) βήμα της μετάφρασης. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται προγραμματισμένη μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου (programmed frameshift) και συμβαίνει σε συγκεκριμένες θέσεις με συχνότητα 100-1.000 φορές μεγαλύτερη απ' ό,τι σε μη προγραμματισμένες θέσεις.**

**Οι μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου αυτού του είδους έχουν 2 κοινά χαρακτηριστικά:**

**Η «ολισθηρή» αλληλουχία επιτρέπει στο πεπτιδυλο-tRNA να ζευγαρώσει με το κωδικόνιό του και μετά να προχωρήσει +1 (σπάνια) ή -1 (πιο σπάνια) βάση για να ζευγαρώσει με μια επικαλυπτόμενη τριπλέτα, η οποία μπορεί επίσης να συνδεθεί με το αντικωδικόνιό του.**

**Το ριβόσωμα καθυστερεί στο σημείο που συμβαίνει η μετατόπιση, ώστε να επιτραπεί η αναδιάταξη του ζευγαρώματος του πεπτιδυλο-tRNA.**

**Αιτία της καθυστέρησης μπορεί να είναι ένα παρακείμενο κωδικόνιο που απαιτεί ένα σπάνιο αμινοακυλο-tRNA, ένα κωδικόνιο τερματισμού που αναγνωρίζεται αργά από τον παράγοντα αποδέσμευσης ή ένα δομικό εμπόδιο στο mRNA, για παράδειγμα ένας «ψευδοκόμπος» που παρεμποδίζει το ριβόσωμα.**

**Η αλληλουχία 7 νουκλεοτιδίων, CUUAGGC, αναγνωρίζεται συνήθως από το Leu-tRNA στην τριπλέτα CUU και ακολουθείται από το Arg-tRNA στην τριπλέτα AGG.**

**Ωστόσο, το Arg-tRNA είναι σπάνιο και, όταν η έλλειψή του οδηγεί σε καθυστέρηση, το Leu-tRNA ολισθαίνει από το κωδικόνιο CUU στην**

**επικαλυπτόμενη με αυτό τριπλέτα UUA, προκαλώντας μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου, επειδή η επόμενη τριπλέτα που είναι σε φάση με το νέο ζευγάρι (GGC) διαβάζεται από το Gly-tRNA.**

**Η ολίσθηση συνήθως συμβαίνει στη θέση P (όταν το Leu-tRNA έχει γίνει στην πραγματικότητα ένα πεπτιδυλο-tRNA ).**

**Η βάση στην 3' πλευρά του κωδικονίου τερματισμού επηρεάζει τις σχετικές συχνότητες του τερματισμού και της μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου και κατά συνέπεια επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του σήματος τερματισμού.**

**Έτσι εξηγείται η σημασία του αναγνωστικού πλαισίου στον τερματισμό.**

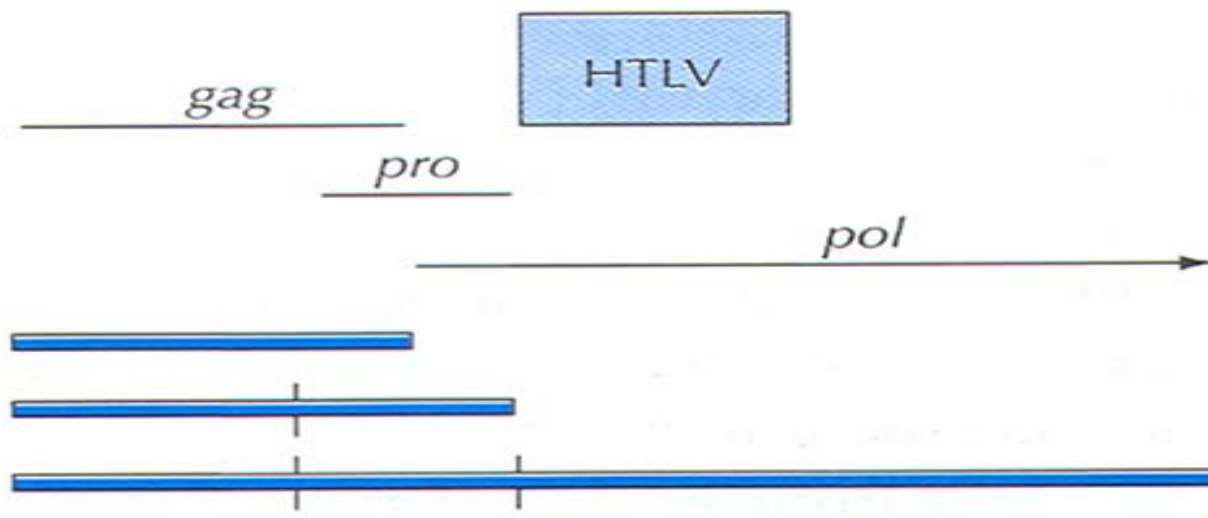
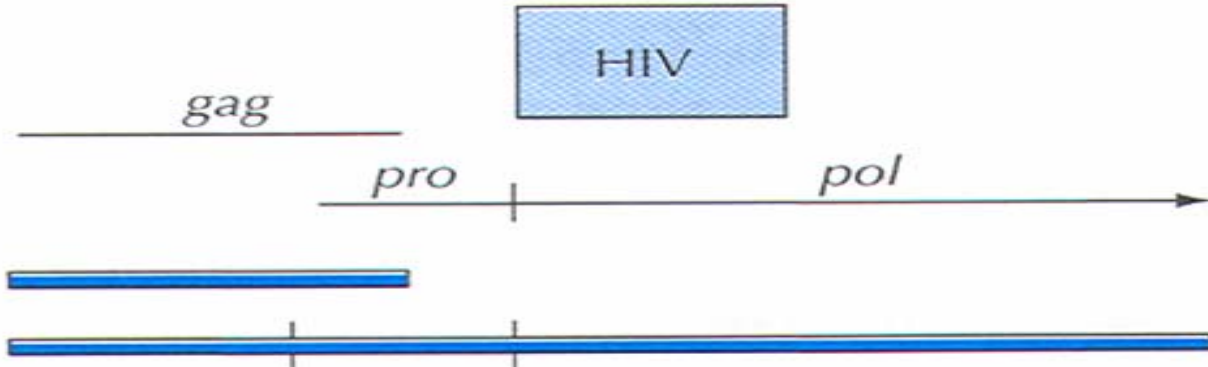


Στους ρετροϊούς, η μετάφραση του πρώτου γονιδίου τερματίζεται σε ένα ανερμηνεύσιμο κωδικόνιο στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο. Το δεύτερο γονίδιο βρίσκεται σε διαφορετικό αναγνωστικό πλαίσιο και (σε κάποιους ιούς) μεταφράζεται μέσω μιας μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου, η οποία παρακάμπτει το κωδικόνιο τερματισμού. Η αποτελεσματικότητα της μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου είναι χαμηλή, συνήθως ~5%.

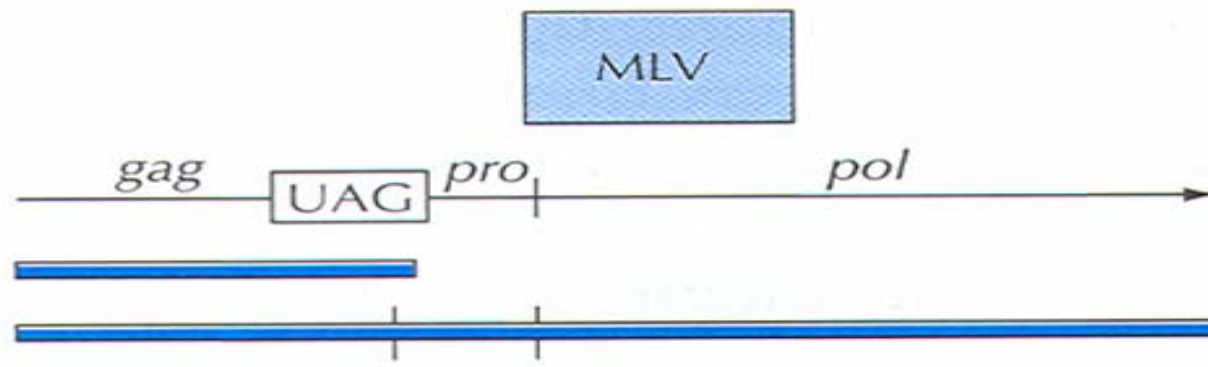
Ο μηχανισμός, γνωστός ως «ribosomal frameshifting» χρησιμοποιείται από μερικές ομάδες ιών. Τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα προέρχονται από τους ρετροϊούς.

Το γένωμα των ρετροϊών μεταγράφεται για να παραχθούν δύο 5' capped, και 3' polyadenylated mRNAs. Τα mRNAs κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες gag, env, pol και στους πιο σύνθετους ρετροϊούς όπως ο HTLV και ο HIV και για επιπρόσθετες πρωτεΐνες όπως οι tax/tat και rex/rev κ.α.

Ένα μακρύ μη ματισμένο μετάγραφο κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες gag, pro και pol. Το πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι ρετροϊοί είναι πως να εκφράσουν τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες από ένα μακρύ μετάγραφο. Η θέση των τριών γονιδίων ποικίλει στους διάφορους ρετροϊούς. Σε μερικές περιπτώσεις (π.χ. HTLV), καταλαμβάνουν τρία διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης, ενώ σε άλλους (π.χ. HIV), το γονίδιο της πρωτεάσης (protease-pro) σχηματίζει μια επέκταση στο 5' άκρο του γονιδίου pol. Στην περίπτωση αυτή, η πρωτεάση και η πολυμεράση (δηλ. η αντίστροφη μεταγραφάση) εκφράζονται ως μια πολυπρωτεΐνη η οποία αυτοδιασπάται στις ώριμες πρωτεΐνες με μια διαδικασία που είναι παρόμοια με εκείνη της πολυπρωτεΐνης των picorna ιών.



Ribosomal frameshifting



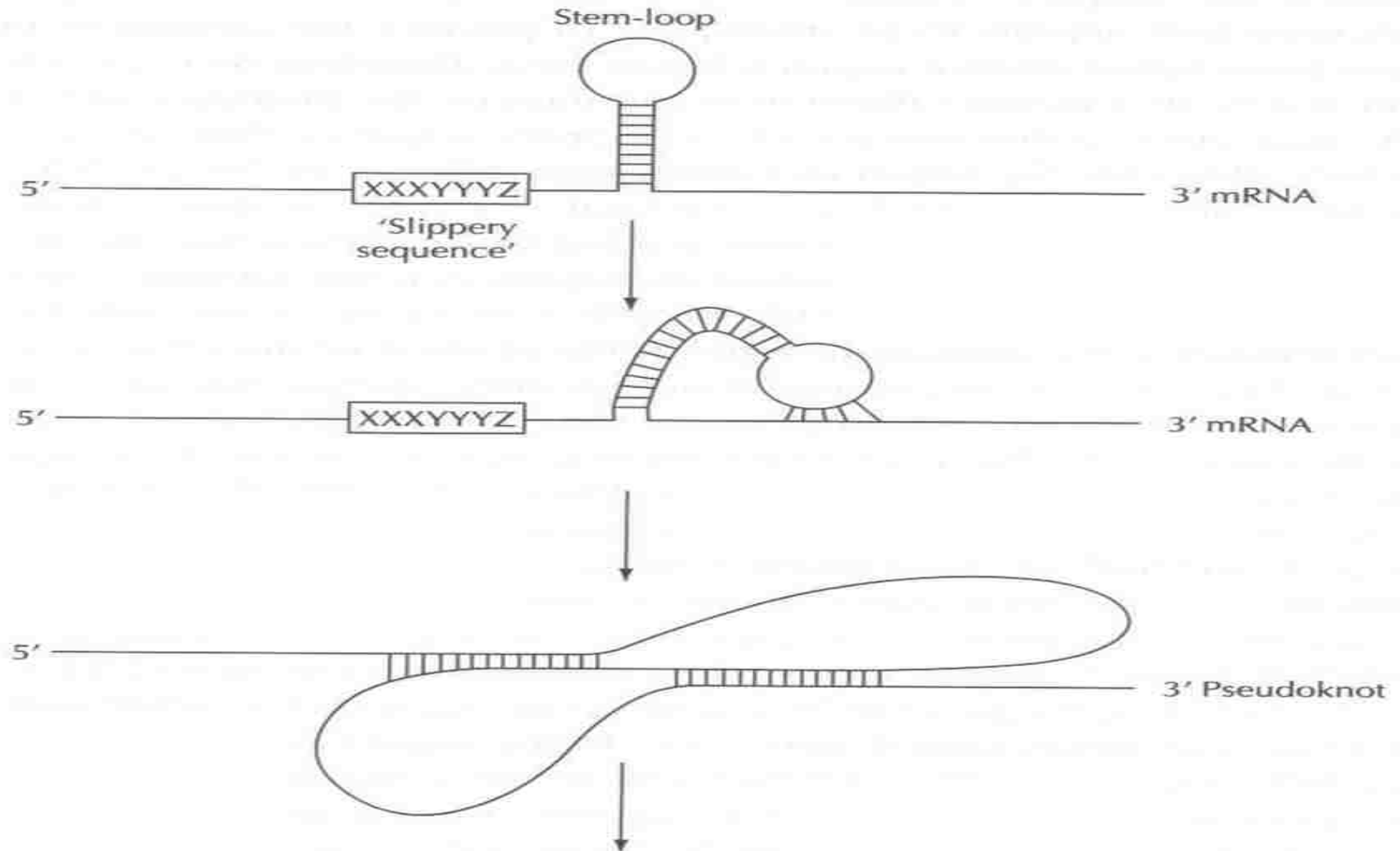
Termination suppression

Στο σύνορο μεταξύ του κάθε γονιδίου υπάρχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία συνήθως αποτελείται από επαναλαμβανόμενα νουκλεοτιδία , όπως UUUAAAC. Αυτή η αλληλουχία σπάνια βρίσκεται στις αλληλουχίες που κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη και συνεπώς εμφανίζεται να χρησιμοποιείται ειδικώς για αυτόν τον τύπο ρύθμισης. Τα περισσότερα ριβοσώματα που συναντούν αυτήν την αλληλουχία θα την μεταφράσουν χωρίς δυσκολία και θα συνεχίσουν μέχρι να συναντήσουν ένα κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Ωστόσο, ένα ποσοστό ριβοσωμάτων που επιχειρεί να μεταφράσει αυτήν την αλληλουχία θα μετατοπίσει κατά ένα νουκλεοτίδιο το πλαίσιο ανάγνωσης πριν να συνεχίσει να μεταφράζει το μήνυμα, αλλά τώρα σε ένα διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης (δηλαδή -1).

Εξαιτίας αυτού, η UUUAAAC αλληλουχία έχει ορισθεί ως ‘ αλληλουχία ολίσθησης ’, και το αποτέλεσμα ( -1 frameshifting) είναι η μετάφραση μιας πολυπρωτεΐνης που περιέχει εναλλακτική πληροφορία λόγω του διαφορετικού πλαισίου ανάγνωσης.

Αυτός ο μηχανισμός επίσης επιτρέπει στον ιό να ελέγχει τα ποσοστά των πρωτεϊνών που παράγονται. Διότι μόνο ένα ποσοστό των ριβοσωμάτων υφίσταται frameshifting και για κάθε αλληλουχία ολίσθησης , υπάρχει μια βαθμίδωση της μετάφρασης από τα πλαίσια ανάγνωσης από το 5' άκρο του mRNA προς το 3' άκρο.

Υπάρχουν επιπρόσθετες αλληλουχίες που ρυθμίζουν αυτό το σύστημα και αυξάνουν την συχνότητα των γεγονότων frameshifting. Σε μικρή απόσταση μετά την αλληλουχία ολίσθησης, υπάρχει μια ανεστραμμένη αλληλουχία επανάληψης η οποία επιτρέπει τον σχηματισμό μιας δομής στελέχους – θηλιάς του mRNA.



Επιπλέον μια πιθανή επιπρόσθετη αλληλουχία συμπληρωματική των νουκλεοτιδίων της θηλιάς η οποία επιτρέπει το « ζευγάρωμα» μεταξύ αυτών των δύο περιοχών του RNA θα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της δομής η οποία είναι γνωστή ως RNA pseudoknot. Αυτή η δευτεροταγής δομή στο mRNA οδηγεί τα ριβοσώματα τα οποία μεταφράζουν το μήνυμα να σταματήσουν στην θέση της αλληλουχίας ολίσθησης και αυτή η κατάσταση αργοπορίας ή η παύση του ριβοσώματος κατά την διάρκεια της μετάφρασης αυξάνει την συχνότητα με την οποία το frameshifting συμβαίνει και επομένως δίνει μια ώθηση στις κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες από τα μετέπειτα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης.

Η τελευταία μέθοδος του μεταγραφικού ελέγχου είναι η περάτωση της καταστολής. Αυτός είναι ένας παρόμοιος μηχανισμός με εκείνο του frameshifting και επιτρέπει στα πολλαπλά πολυπεπτίδια να εκφραστούν από ξεχωριστά πλαίσια ανάγνωσης από ένα μόνο mRNA. Σε μερικούς ρετροϊούς, όπως στον Murine leukaemia virus (MLV), το γονίδιο της πρωτεΐνης χωρίζεται από το gag γονίδιο από το κωδικόνιο λήξης UAG και όχι από μια 'αλληλουχία ολίσθησης' ή pseudoknot. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η μετάφραση του MLV mRNA περατώνεται σε αυτήν την αλληλουχία, δίνοντας τις gag πρωτεΐνες. Ωστόσο, σε λίγα παραδείγματα, το κωδικόνιο λήξης UAG καταστέλεται και η μετάφραση συνεχίζεται, παράγοντας μια gag-pro-pol πολυπρωτεΐνη, η οποία ακολούθως αυτοδιασπάται και παράγει τις ώριμες πρωτεΐνες.

Το αποτέλεσμα αυτής της ρύθμισης είναι ανάλογο με εκείνο του ribosomal frameshifting, με το ποσοστό των gag και gag, pro, pol πρωτεϊνών να ελέγχεται από την συχνότητα με την οποία τα ριβοσώματα διασχίζουν ή περατώνουν στο κωδικόνιο λήξης UAG.

Οι γενετικοί τόποι που βρίσκονται στο ίδιο μόριο DNA (χρωμόσωμα) ονομάζονται **cis**, ενώ αυτό που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά μόρια DNA περιγράφονται ως **trans**. Έτσι, δύο μεταλλάξεις μπορεί να είναι, η μία σε σχέση με την άλλη, *cis* (στο ίδιο DNA) ή *trans* (σε διαφορετικό DNA). Οι έννοιες *cis* και *trans* μπορούν να εφαρμοστούν όχι μόνο στον καθορισμό της κωδικής περιοχής (coding region) ενός γονιδίου, αλλά και στην περιγραφή της επίδρασης των ρυθμιστικών στοιχείων στο γονίδιο. Ας υποθέσουμε ότι η έκφραση ενός γονιδίου ελέγχεται από μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο DNA κοντά στην κωδική περιοχή. **Το αγγελιαφόρο RNA μπορεί να συντεθεί μόνο αν η πρωτεΐνη δεσμευτεί στο DNA.**

Αν συμβεί μια μετάλλαξη στην αλληλουχία όπου προσδένεται η ρυθμιστική πρωτεΐνη, έτσι ώστε η πρωτεΐνη να μην μπορεί να αναγνωρίσει το DNA, τότε δεν μπορεί πλέον να εκφραστεί το γονίδιο.

*Ένα γονίδιο μπορεί να απενεργοποιηθεί είτε από μετάλλαξη μιας ρυθμιστικής θέσης είτε από μετάλλαξη της κωδικής περιοχής. Ένα ελάττωμα στη ρυθμιστική περιοχή επηρεάζει μόνο την κωδική περιοχή με την οποία είναι συνδεδεμένη. Δεν επηρεάζει την έκφραση άλλων αλληλομόρφων. Μια μετάλλαξη που επηρεάζει τις ιδιότητες μόνο της γειτονικής αλληλουχίας DNA ονομάζεται **cis-δραστική**.*

Η απουσία της ρυθμιστικής πρωτεΐνης εμποδίζει την έκφραση και των δύο αλληλομόρφων. Τέτοιες μεταλλάξεις ονομάζονται *trans*-δραστικές. Αν μία μετάλλαξη είναι *trans*-δραστική, θεωρούμε ότι οι επιδράσεις της θα πρέπει να ασκούνται μέσω κάποιου προϊόντος που διαχέεται ( μιας πρωτεΐνης) και το οποίο δρα σε πολλαπλούς στόχους μέσα στο κύτταρο.

Όμως, αν μία μετάλλαξη είναι *cis*-δραστική, θα πρέπει να λειτουργεί επηρεάζοντας με άμεσο τρόπο τις ιδιότητες των αλληλουχιών του DNA με τις οποίες είναι συνεχής.

Το γονιδίωμα όλων των ζωντανών οργανισμών αποτελείται από δίκλωνο DNA.

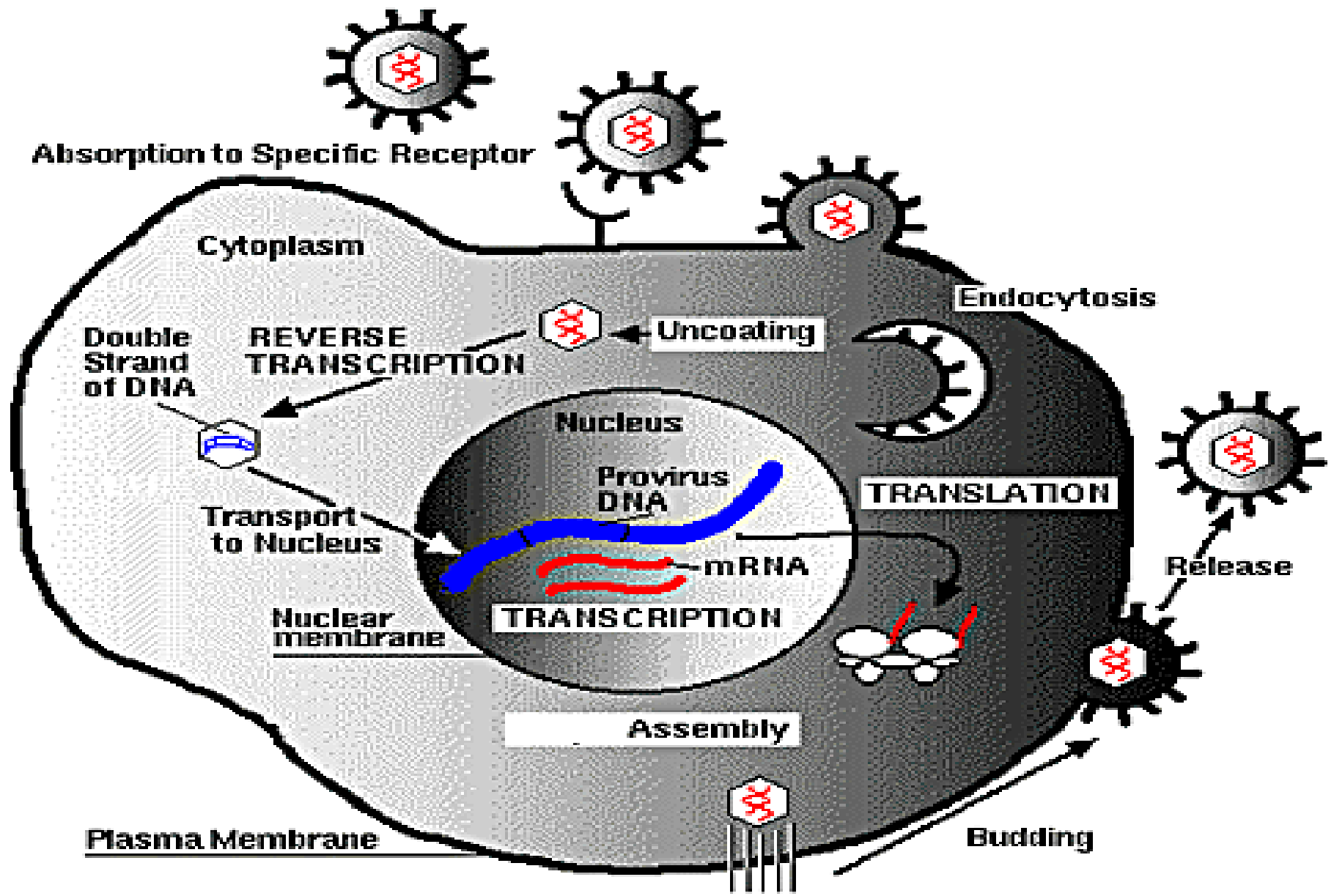
Το γονιδίωμα των ιών μπορεί να αποτελείται από DNA ή RNA, σε διαμόρφωση είτε δίκλωνου (ds, **double-stranded**) είτε μονόκλωνου (ss, **single-stranded**) μορίου.

Οι ιοί με μονόκλινα γονιδιώματα χρησιμοποιούν τη μοναδική αλυσίδα τους ως μήτρα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας, η οποία χρησιμοποιείται με τη σειρά της για να συντεθεί η συμπληρωματική με αυτήν αλυσίδα, που είναι ίδια με την αρχική αλυσίδα.

Κατά την αντιγραφή, μπορεί να σχηματίζεται ένα δίκλωνο προϊόν το οποίο μπορεί να είναι είτε σταθερό είτε παροδικό ενδιαμέσο.

Οι **ρετροϊοί** (retroviruses) αποτελούν εξαίρεση στον κανόνα της μεταβίβασης της γενετικής πληροφορίας προς μία μόνο κατεύθυνση, από το DNA στο RNA. Το γονιδίωμά τους αποτελείται από **δύο μονόκλινα RNA**.

Κατά τη μόλυνση, το RNA μετατρέπεται, με τη διαδικασία της **αντίστροφης μεταγραφής** (reverse transcription), σε μονόκλωνο DNA το οποίο με τη σειρά του μετατρέπεται σε δίκλωνο. Το δίκλωνο αυτό DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου και κληρονομείται σαν να ήταν ένα γονίδιο του ξενιστή.



# Retrovirus replication



Μερικοί ιοί (δορυφόροι) δεν μπορούν να αντιγραφούν ανεξάρτητα, αλλά απαιτούν την ταυτόχρονη παρουσία ενός «βοηθητικού» ιού (helper virus), ο οποίος φυσιολογικά είναι μολυσματικός.

Τα **ιοειδή** (viroids) είναι μολυσματικοί παράγοντες που προκαλούν ασθένειες στα ανώτερα φυτά. Είναι πολύ μικρά κυκλικά μόρια RNA. Σε αντίθεση με τους ιούς, στους οποίους ο μολυσματικός παράγοντας αποτελείται από ένα **ικόν σωματίδιο** (virion), δηλαδή ένα γονιδίωμα συμπυκνωμένο μέσα σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, *το ιοειδές RNA είναι αυτό καθαυτό ο μολυσματικός παράγοντας*. Το ιοειδές αποτελείται αποκλειστικά από RNA του οποίου η δευτεροταγής δομή παρουσιάζει εκτεταμένες δίκλωνες περιοχές, αν και παρεμβάλλονται αζευγάρωτες βάσεις, σχηματίζοντας μια χαρακτηριστική ραβδόμορφη δομή. Οι μεταλλάξεις που αποδιοργανώνουν τη δομή της ράβδου ελαττώνουν τη μολυσματικότητα. Το μοναδικό μόριο RNA που συνιστά ένα ιοειδές αντιγράφεται αυτόνομα στα μολυσμένα κύτταρα.

Το RNA των ιοειδών δε φαίνεται να μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Γι' αυτό δεν μπορεί από μόνο του να κωδικοποιήσει τις απαραίτητες για την επιβίωσή του λειτουργίες. Η αντιγραφή θα πρέπει να πραγματοποιείται με ένζυμα του κυττάρου-ξενιστή, τα οποία εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Η κληρονομικότητα της αλληλουχίας του ιοειδούς υποδηλώνει ότι το RNA του ιοειδούς λειτουργεί ως μήτρα.

Η παθογένεια των ιοειδών πιθανόν να οφείλεται στο ότι παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες. Εναλλακτικά, μπορεί να συμπεριφέρονται ως μη φυσιολογικά ρυθμιστικά μόρια, επηρεάζοντας την έκφραση ορισμένων γονιδίων.

Ένας ακόμα πιο ασυνήθιστος μολυσματικός παράγοντας είναι το **scrapie**, η αιτία μιας νευροεκφυλιστικής (neurodegenerative) ασθένειας των αιγοπροβάτων. Η ασθένεια αυτή σχετίζεται με τις ανθρώπινες ασθένειες kuru και το σύνδρομο Creutzfeldt-Jacob, που επηρεάζουν την εγκεφαλική λειτουργία. Ο μολυσματικός παράγοντας *scrapie* δεν περιέχει νουκλεϊκό οξύ. Αυτός ο ασυνήθιστος παράγοντας, που ονομάζεται **πρωτεόνιο** (prion, πρωτεϊνικός μολυσματικός παράγοντας), είναι μια υδρόφοβη γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 28 kD, η **PrP**. Η PrP κωδικοποιείται από ένα κυτταρικό γονίδιο (συντηρημένο στα θηλαστικά) το οποίο εκφράζεται στο φυσιολογικό εγκέφαλο. Η πρωτεΐνη απαντάται σε δύο μορφές. Το προϊόν που εντοπίζεται στο φυσιολογικό εγκέφαλο ονομάζεται PrP<sup>c</sup> και είναι ευαίσθητο στις πρωτεάσες. Η πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μολυσμένους εγκεφάλους ονομάζεται PrP<sup>sc</sup> και είναι εξαιρετικά ανθεκτική στη αποικοδόμηση από πρωτεάσες. Η PrP<sup>c</sup> μετατρέπεται σε PrP<sup>sc</sup> με την τροποποίησή της ή με την αλλαγή της διαμόρφωσής της, η οποία της προσδίδει ανθεκτικότητα στις πρωτεάσες. Όπως ο μολυσματικός παράγοντας scrapie, έτσι και η PrP<sup>sc</sup> πρέπει με κάποιον τρόπο να τροποποιεί το αντίστοιχο φυσιολογικό μόριο του κυττάρου, ώστε από αβλαβές να μετατρέπεται στη μολυσματική μορφή.

Οι ποντικοί από τους οποίους απουσιάζει το γονίδιο της PrP δεν μπορούν να μολυνθούν και να ασθενήσουν από scrapie, γεγονός που αποδεικνύει ότι η ενδογενής PrP είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της ασθένειας.

## Η μεθυλίωση του DNA

Το DNA μεθυλιώνεται σε συγκεκριμένες, ειδικές θέσεις. Στα βακτήρια, το πρότυπο μεθυλίωσης έχει σχέση με τον καθορισμό του βακτηριακού στελέχους, καθώς και με τη διάκριση του DNA που έχει ή δεν έχει αντιγραφεί.

Στους ευκαρυώτες, ο κυριότερος γνωστός ρόλος της μεθυλίωσης σχετίζεται με τον έλεγχο της μεταγραφής, μια και προκαλεί απενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Ένα ποσοστό 2-7% των καταλοίπων κυτοσίνης στο DNA ενός ζωικού κύτταρου είναι μεθυλιωμένο (ο αριθμός ποικίλλει ανάλογα με το είδος του οργανισμού).

Οι περισσότερες μεθυλομάδες εντοπίζονται σε δινουκλεοτίδια CG. Μάλιστα, οι περισσότερες αλληλουχίες CG είναι μεθυλιωμένες. Συνήθως, τα κατάλοιπα C αυτών των σύντομων παλινδρομικών αλληλουχιών είναι μεθυλιωμένα και στις δύο αλυσίδες, δημιουργώντας τη δομή:



Μια τέτοια θέση ονομάζεται **πλήρως μεθυλιωμένη**. Κάθε θυγατρικό δίκλωνο μόριο αποτελείται από μία μεθυλιωμένη και μία μη μεθυλιωμένη αλυσίδα. Μια τέτοια θέση ονομάζεται **ημιμεθυλιωμένη**. Η διαιώνιση της μεθυλιωμένης θέσης εξαρτάται από το τι θα συμβεί στο ημιμεθυλιωμένο DNA. Εάν μεθυλιωθεί η μη μεθυλιωμένη αλυσίδα, η θέση θα ξαναγίνει πλήρως μεθυλιωμένη. Ωστόσο, εάν προηγηθεί αντιγραφή, η ημιμεθυλιωμένη κατάσταση θα διαιωνιστεί σε ένα μόνο από τα δίκλινα μόρια DNA που θα προκύψουν, ενώ το άλλο δίκλωνο μόριο θα είναι μη μεθυλιωμένο.

Η μεθυλίωση του DNA ελέγχεται από **μεθυλάσες** (methylases) ή **μεθυλοτρανσφεράσες** (methyltransferases), οι οποίες προσθέτουν μεθυλομάδες στη θέση 5 της κυτοσίνης, καθώς και από **απομεθυλάσες** (demethylases), οι οποίες αφαιρούν μεθυλομάδες. Για την τροποποίηση μιας νέας θέσης του DNA απαιτείται η δράση της **de novo μεθυλοτρανσφεράσης** (*de novo* methyltransferase), η οποία αναγνωρίζει μια ειδική αλληλουχία DNA. Επιδρά **μόνο** σε μη μεθυλιωμένο DNA και προσθέτει μία μεθυλομάδα στη μία από τις δύο αλυσίδες του δικλώνου.

Οι **μεθυλοτρανσφεράσες διατήρησης** δρουν **μόνο** σε ημιμεθυλιωμένες θέσεις, τις οποίες μετατρέπουν σε πλήρως μεθυλιωμένες. Η παρουσία τους εξασφαλίζει ότι το πρότυπο μεθυλίωσης διατηρείται μετά την αντιγραφή. Εάν συμβεί μια *de novo* μεθυλίωση στο ένα αλληλόμορφο ενός γενετικού τόπου αλλά όχι στο άλλο, αυτή η διαφορά θα δαιωνιστεί κατά τις επακόλουθες κυτταρικές διαιρέσεις, διατηρώντας τη διαφορετικότητα των δύο αλληλομόρφων ανεξάρτητα από την αλληλουχία τους.

**Οι υποκινητές είναι μεθυλιωμένοι όταν το γονίδιο είναι ανενεργό αλλά μη μεθυλιωμένοι όταν είναι ενεργό.**

**Στον ποντικό, η απουσία της πρωτεΐνης Dnmt1 προκαλεί εκτεταμένη απομεθυλίωση στους υποκινητές και λογικά είναι θανατηφόρα εξαιτίας του ότι προκαλεί ανεξέλεγκτη γονιδιακή έκφραση.**

**Εάν μια θέση DNA δεν είναι μεθυλιωμένη, τότε μια πρωτεΐνη που αναγνωρίζει τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία θα μπορούσε να την προστατεύσει από τη μεθυλίωση. Από τη στιγμή που μεθυλιώνεται μια θέση, υπάρχουν δύο δυνατοί τρόποι για να ξαναμετατραπεί σε μη μεθυλιωμένη. Ο ένας τρόπος είναι να παρεμποδιστεί η δράση της μεθυλοτρανσφεράσης διατήρησης στη συγκεκριμένη θέση, μετά την αντιγραφή της. Ύστερα από ένα δεύτερο κύκλο αντιγραφής, το ένα από τα θυγατρικά δίκλινα θα είναι απομεθυλιωμένο.**

**Ο δεύτερος τρόπος είναι η ενεργητική απομεθυλίωση της θέσης, είτε με άμεση αφαίρεση της μεθυλομάδας από την κυτοσίνη είτε με αποκοπή της μεθυλιωμένης κυτοσίνης από το DNA και επακόλουθη αντικατάστασή της από ένα σύστημα επιδιόρθωσης.**

## Ορισμένα επιγενετικά χαρακτηριστικά κληρονομούνται

Η **επιγενετική κληρονομικότητα** (epigenetic inheritance) αναφέρεται στην κληρονόμηση διακριτών φαινοτύπων, οι οποίοι δεν προκύπτουν από αλλαγές στο γενετικό υλικό των ατόμων που τις εμφανίζουν. Η μεθυλίωση μπορεί να καθιερώσει ένα πρότυπο επιγενετικής κληρονομικότητας με την προϋπόθεση ότι η μεθυλοτρανσφεράση διατήρησης δρα συνεχώς, αποκαθιστώντας τη μεθυλίωση μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής. Το πρότυπο μεθυλίωσης μπορεί να δαιωνίζεται για άπειρο αριθμό σωματικών μιτώσεων.

Η γονιδιακή έκφραση συνδέεται με την απομεθυλίωση

**Η κατανομή των μεθυλικών ομάδων μπορεί να μελετηθεί με τη βοήθεια ενζύμων περιορισμού τα οποία πέπτουν στόχους που περιέχουν το δινουκλεοτίδιο CG.**

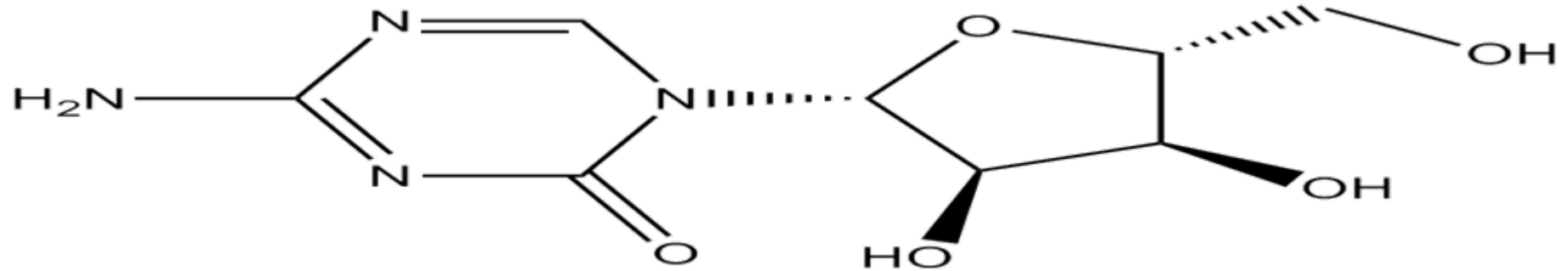
Τα **ισοσχιζομερή** (isoschizomers) είναι ένζυμα που πέπτουν το DNA στην ίδια αλληλουχία-στόχο, αλλά μπορεί να επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο από τη μεθυλίωσή του. Το ένζυμο **HpaII** πέπτει την αλληλουχία **CCGG** (γράφεται η αλληλουχία της μίας μόνο αλυσίδας του DNA). Αν όμως η δεύτερη κυτοσίνη (C) είναι μεθυλιωμένη, το ένζυμο δεν μπορεί πλέον να αναγνωρίσει την αλληλουχία-στόχο. Αντίθετα, το ένζυμο **MspI** πέπτει την ίδια περιοχή-στόχο, ανεξαρτήτως της μεθυλίωσης αυτής της κυτοσίνης. Έτσι, το ένζυμο **MspI** μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αναγνωριστούν όλες οι αλληλουχίες **CCGG**, ενώ το ένζυμο **HpaII** μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί αν είναι μεθυλιωμένες ή όχι.

Αν χρησιμοποιηθεί μη μεθυλιωμένο DNA ως υπόστρωμα, τα δύο ένζυμα θα παραγάγουν τις ίδιες ζώνες περιορισμού. Αντίθετα, στο μεθυλιωμένο DNA οι τροποποιημένες θέσεις δε θα κόβονται από το ένζυμο HpaII. Για κάθε τέτοια θέση, ένα μεγαλύτερο τμήμα HpaII αντικαθιστά δύο μικρότερα τμήματα MspI.

**Πολλά γονίδια εμφανίζουν ένα πρότυπο μεθυλίωσης που είναι σταθερό στις περισσότερες θέσεις. Ορισμένες θέσεις είναι μεθυλιωμένες σε ιστούς όπου το γονίδιο δεν εκφράζεται, αλλά δεν είναι μεθυλιωμένες σε ιστούς όπου το γονίδιο είναι ενεργό. Έτσι, ένα ενεργό γονίδιο μπορεί να περιγραφεί ως υπομεθυλιωμένο.** Η χρήση της ένωσης 5'-αζακυτιδίνη παρέχει έμμεσες πειραματικές αποδείξεις ότι η απομεθυλίωση μπορεί να προκαλέσει γονιδιακή έκφραση. Το χημικό αυτό ενσωματώνεται στο DNA, στη θέση της κυτιδίνης, καθιστώντας αδύνατη τη μεθυλίωση της 5' θέσης. Έτσι, εμφανίζονται απομεθυλιωμένες περιοχές του DNA ως συνέπεια της αντιγραφής. Η επίδραση της 5-αζακυτιδίνης μπορεί, μεταξύ άλλων, να επάγει αλλαγές στην κυτταρική διαφοροποίηση.

Για παράδειγμα, τα πρόδρομα μη μυϊκά κύτταρα επάγονται να διαφοροποιηθούν σε μυϊκά κύτταρα. Η υπομεθυλιωμένη περιοχή συμπίπτει με τη μέγιστη ευαισθησία στην DNAάση I. Αυτό σημαίνει ότι η υπομεθυλίωση είναι γνώρισμα περιοχών που φέρουν ένα ή περισσότερα μεταγραφόμενα γονίδια. Η απομεθυλίωση ενός υποκινητή ίσως είναι προϋπόθεση για να τον καταστήσει διαθέσιμο για την έναρξη της μεταγραφής. .





5-Azacytidine or 5-aza-2'-deoxycytidine is a chemical analogue of the [cytosine](#). Cells in the presence of 5-azacytidine incorporate it into DNA during [replication](#) and RNA during [transcription](#). The incorporation of 5-azacytidine into DNA or RNA inhibits [methyltransferase](#) thereby causing [demethylation](#) in that sequence

Μερικά γονίδια εκφράζονται ακόμα και όταν έχουν υποστεί εκτεταμένη μεθυλίωση. Δηλαδή δεν υπάρχει πάντα συσχετισμός ανάμεσα στη μεθυλίωση και στη γονιδιακή έκφραση. Ωστόσο, κατά κανόνα, η μεθυλίωση αποτρέπει την έκφραση, ενώ η απομεθυλίωση είναι πιθανότατα προϋπόθεση γι' αυτή.

Η παρουσία νησίδων CpG (CpG islands) στο 5' άκρο μερικών γονιδίων συνδέεται με την επίδραση της μεθυλίωσης στη γονιδιακή έκφραση. Οι νησίδες ανιχνεύονται από την παρουσία αυξημένης συχνότητας δινουκλεοτιδίων CpG. Το δινουκλεοτίδιο CpG απαντάται στο DNA των σπονδυλωτών με συχνότητα μόνο ~20% της αναμενόμενης συχνότητας, που υπολογίζεται από την αναλογία των βάσεων C•G στο γονιδίωμα. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι το δινουκλεοτίδιο CpG είναι μεθυλιωμένο στο C και επομένως η αυθόρμητη απαμίνωση της μεθυλοκυτοσίνης τη μετατρέπει σε θυμίνη, εισάγοντας μια μετάλλαξη που αλλάζει το δινουκλεοτίδιο. Ωστόσο, σε ορισμένες περιοχές η συχνότητα των δινουκλεοτιδίων CpG αγγίζει την αναμενόμενη τιμή. Σε αυτές τις περιοχές, τα δινουκλεοτίδια CpG δεν είναι μεθυλιωμένα. Αυτές οι πλούσιες σε CpG νησίδες περιέχουν κατά μέσο όρο 60% C•G, συγκριτικά με το 40% του συνολικού DNA, και συνήθως έχουν μήκος 1-2 kb. Υπάρχουν ~45.000 τέτοιες νησίδες στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

**Η δομή της χρωματίνης σε αυτές τις περιοχές εμφανίζει τροποποιήσεις που σχετίζονται με τη γονιδιακή έκφραση. Αυτές οι περιοχές έχουν μειωμένη περιεκτικότητα ιστόνης H1 (γεγονός που πιθανόν να σημαίνει ότι η δομή τους είναι λιγότερο συμπαγής), οι υπόλοιπες ιστόνες είναι σε μεγάλο βαθμό ακετυλιωμένες (χαρακτηριστικό που τείνει να σχετίζεται με τη γονιδιακή έκφραση), ενώ υπάρχουν και υπερευαίσθητες θέσεις (όπως άλλωστε αναμένεται σε ενεργούς υποκινητές). Σε αρκετές περιπτώσεις, οι νησίδες CpG ξεκινούν μόλις ανοδικά ενός υποκινητή και εκτείνονται καθοδικά εντός της μεταγραφόμενης περιοχής, όπου σταδιακά εκφυλίζονται. Η παρουσία μη μεθυλιωμένων νησίδων CpG μπορεί να είναι αναγκαία, όμως δεν είναι ικανή συνθήκη για τη μεταγραφή.**

**Άρα η παρουσία μη μεθυλιωμένων νησίδων CpG μπορεί να θεωρηθεί περισσότερο ως ένδειξη ότι ένα γονίδιο είναι εν δυνάμει ενεργό παρά ότι σίγουρα μεταγράφεται.**

**Πολλές νησίδες που δεν είναι μεθυλιωμένες στα ζώα μεθυλιώνονται σε κυτταρικές σειρές σε ιστοκαλλιέργεια, γεγονός που ίσως σχετίζεται με την ανικανότητα των κυτταρικών σειρών να εκφράσουν όλες τις τυπικές λειτουργίες των ιστών από τους οποίους έχουν προέλθει.**

Σχέση ανάμεσα στη μεταγραφή και στην επιδιόρθωση

Τόσο στα βακτήρια όσο και στους ευκαρυώτες η RNA πολυμεράση συνδέεται άμεσα με τη ενεργοποίηση της επιδιόρθωσης. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε αρχικά ως επιλεκτική επιδιόρθωση των μεταγραφόμενων γονιδίων.

Στα βακτήρια, η ενεργότητα επιδιόρθωσης εξασφαλίζεται με το σύστημα επιδιόρθωσης εκτομής (excision-repair) *uvr*. Η επιλεκτική επιδιόρθωση καταργείται από μεταλλάξεις του γονιδίου *mfd*, το προϊόν του οποίου αποτελεί το συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην RNA πολυμεράση και στα ένζυμα *Uvr*.

Όταν η RNA πολυμεράση συναντά μια θέση βλάβης της αλυσίδας-μήτρας, σταματά γιατί δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει τις κατεστραμμένες αλληλουχίες ως μήτρα για να κατευθύνει το ζευγάρι των συμπληρωματικών βάσεων. Η πρωτεΐνη *Mfd* έχει δύο ρόλους. Πρώτον, εκτοπίζει το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης από το DNA. Δεύτερον, προκαλεί την πρόσδεση του ενζύμου *UvrABC* στο κατεστραμμένο DNA. Αυτό οδηγεί στην επιδιόρθωση του DNA με τη βοήθεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης εκτομής .

Μετά την επιδιόρθωση του DNA, η επόμενη RNA πολυμεράση που θα διασχίσει το γονίδιο θα είναι ικανή να παράγει ένα κανονικό μετάγραφο

Ένας παρόμοιος μηχανισμός, που όμως βασίζεται σε διαφορετικά συστατικά, χρησιμοποιείται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η αλυσίδα-μήτρα ενός μεταγραφόμενου γονιδίου διορθώνεται επιλεκτικά, ύστερα από βλάβη που προκαλείται π.χ. από έκθεση σε ακτινοβολία UV. **Στο μοριακό μηχανισμό της επιδιόρθωσης ενέχεται ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας TFIIH. Ο TFIIH βρίσκεται σε εναλλακτικές μορφές, οι οποίες αποτελούνται από έναν κοινό πυρήνα που συνδέεται με διαφορετικές κάθε φορά υπομονάδες, ιδιαίτερες για κάθε εναλλακτική μορφή. Ο TFIIH έχει μια κοινή δράση τόσο κατά την έναρξη της μεταγραφής όσο και κατά την επιδιόρθωση. Η ίδια υπομονάδα του TFIIH, που φέρει ενεργότητα ελικάσης, αφενός δημιουργεί την αρχική μεταγραφική θηλιά και αφετέρου αποδιατάσσει το DNA στο σημείο της βλάβης.**

Ο βασικός παράγοντας που ενέχεται στη μεταγραφή αποτελείται από έναν πυρήνα (5 υπομονάδων) συνδεδεμένο με άλλες υπομονάδες που έχουν ενεργότητα κινάσης. Το εναλλακτικό σύμπλοκο αποτελείται από τον πυρήνα, ο οποίος συνδέεται με μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια επιδιόρθωσης (repair genes). Ανάμεσα στις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης συμπεριλαμβάνεται η υπομονάδα XPC, που αναγνωρίζει τη βλάβη του DNA, κατά τη στάση της RNA πολυμεράσης, προωθώντας την επιλεκτική επιδιόρθωση της αλυσίδας-μήτρας. Στις υπόλοιπες πρωτεΐνες, που συνδέονται με το σύμπλοκο, συμπεριλαμβάνονται και ενδονουκλεάσες. Οι υπομονάδες με το όνομα XP κωδικοποιούνται από γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις προκαλούν μελαχρωματική ξηροδερμία (xeroderma pigmentosum).

**Το σύμπλοκο της κινάσης και το σύμπλοκο της επιδιόρθωσης μπορούν να συνδεθούν και να αποχωριστούν με αντιστρεπτό τρόπο από τον πυρήνα του TFIIF. Ο TFIIF αποχωρίζεται από την RNA πολυμεράση σε ένα πρώιμο στάδιο της επιμήκυνσης (μετά τη μεταγραφή ~50 bp). Η λειτουργία της επιδιόρθωσης μπορεί να απαιτεί την τροποποίηση ή την αποικοδόμηση της RNA πολυμεράσης. Η ενεργότητα ελικάσης είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση. Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ενεργότητα ελικάσης προκαλούν ανεπάρκεια επιδιόρθωσης, που οδηγεί στη μελαχρωματική ξηροδερμία.**

Οι ενεργοποιητές προσδένονται σε μικρά στοιχεία αλληλουχιών

Η αποτελεσματικότητα και η ειδικότητα αναγνώρισης ενός υποκινητή εξαρτώνται από βραχείες αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται ακόμα πιο ανοδικά και αναγνωρίζονται από μια διαφορετική ομάδα παραγόντων που συνήθως ονομάζονται **ενεργοποιητές** (activators). Συνήθως αυτές οι αλληλουχίες-στόχοι βρίσκονται ~100 bp ανοδικά από το σημείο έναρξης, αλλά μερικές φορές βρίσκονται και σε μεγαλύτερες αποστάσεις. Η πρόσδεση παραγόντων σε αυτές τις θέσεις μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό του εναρκτήριου συμπλόκου, πιθανόν σε οποιαδήποτε από τα επιμέρους στάδιά του.

**Τέσσερις τύποι στοιχείων εντοπίζονται συνολικά σε αυτούς τους υποκινητές: πλαίσια TATA, GC, CAAT και οκταμερές (στοιχείο μεγέθους 8 bp).**

**Τα στοιχεία που απαντώνται σε κάθε υποκινητή διαφέρουν σε αριθμό, τοποθεσία και προσανατολισμό. Κανένα στοιχείο δεν είναι κοινό σε όλους τους υποκινητές.**

**Μολονότι οι πληροφορίες που μεταφέρει ο υποκινητής έχουν ορισμένη κατεύθυνση (η μεταγραφή γίνεται πάντα με καθοδική κατεύθυνση), εντούτοις τα πλαίσια GC και CAAT φαίνεται να λειτουργούν με οποιονδήποτε προσανατολισμό. Αυτό σημαίνει ότι τα στοιχεία δρουν απλώς ως θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, για να διευκολύνουν την προσέγγιση στο σημείο έναρξης.**

**Οι ενεργοποιητές, οι οποίοι βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν από όποιον υποκινητή φέρει ένα αντίγραφο του στοιχείου που αναγνωρίζουν. Στα κοινά στοιχεία που αναγνωρίζονται από τέτοιους ενεργοποιητές περιλαμβάνονται το πλαίσιο CAAT, το πλαίσιο GC και το οκταμερές. Ένας τυπικός ενεργοποιητής αναγνωρίζει ένα πρότυπο αλληλουχίας πρόσδεσης <10 bp έως περίπου ~20 bp.**

**Ένας ενεργοποιητής που βρίσκεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ο Oct-1, προσδένεται στο οκταμερές κατά την ενεργοποίηση των γονιδίων της ιστόνης H2B ( και άλλων γονιδίων). Στα λεμφοειδή κύτταρα, ένας διαφορετικός ενεργοποιητής, ο Oct-2, προσδένεται στο οκταμερές κατά την ενεργοποίηση του γονιδίου της ελαφριάς αλυσίδας κ των ανοσοσφαιρινών. Συνεπώς ο Oct-2 είναι ένας ιστοειδικός ενεργοποιητής, ενώ ο Oct-1 εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς.**



Οι ενισχυτές διεγείρουν υποκινητές ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό τους. Ενίοτε, η δράση ενός υποκινητή αυξάνεται κατά πολύ από την παρουσία ενός **ενισχυτή** (enhancer), ο οποίος αποτελείται από ένα άλλο σύνολο στοιχείων, τοποθετημένων όμως σε μεταβλητή απόσταση από τα στοιχεία του υποκινητή. Πρώτον, η θέση του ενισχυτή ως προς τον υποκινητή δε χρειάζεται να είναι σταθερή, αλλά μπορεί να ποικίλλει σημαντικά και μπορεί να βρίσκεται είτε ανοδικά είτε καθοδικά. Δεύτερον, ο ενισχυτής είναι λειτουργικός ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό του (μπορεί δηλαδή να αντιστραφεί η κατεύθυνσή του χωρίς να επηρεαστεί η λειτουργικότητά του) ως προς τον υποκινητή.

**Οι ενισχυτές αποτελούνται από τα ίδια σύντομα στοιχεία αλληλουχιών που βρίσκονται και στους υποκινητές.**

**Η πυκνότητα των ρυθμιστικών στοιχείων είναι μεγαλύτερη στους ενισχυτές απ' ό,τι στους υποκινητές.**

Η ευθύνη για την ιστοειδική μεταγραφή μπορεί να ανήκει είτε στον υποκινητή είτε στον ενισχυτή. Ένας υποκινητής είναι δυνατόν να ρυθμίζεται με ειδικό τρόπο, ενώ ο γειτονικός του ενισχυτής μπορεί να χρησιμοποιείται για να αυξήσει την αποδοτικότητα της έναρξης. Επίσης, ένας υποκινητής μπορεί να στερείται ειδικής ρύθμισης αλλά να ενεργοποιείται μόνο όταν ενεργοποιηθεί ο γειτονικός του ενισχυτής. Η διάκριση μεταξύ ενισχυτών και υποκινητών δεν είναι απόλυτη: **οι ενισχυτές μπορεί να θεωρηθούν ότι περιέχουν στοιχεία του υποκινητή τα οποία είναι συγκεντρωμένα πολύ κοντά μεταξύ τους και έχουν την ικανότητα να λειτουργούν από μεγάλες αποστάσεις από το σημείο έναρξης.**

**Τυπικά, ένας ενισχυτής επιδρά στον πλησιέστερο υποκινητή. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου ένας ενισχυτής εντοπίζεται μεταξύ δύο υποκινητών, αλλά ενεργοποιεί μόνο έναν από αυτούς.**

**Η δράση ενός ενισχυτή μπορεί να περιορίζεται από ένα μονωτή, δηλαδή ένα στοιχείο DNA που εμποδίζει τη δράση του ενισχυτή σε παρακείμενους υποκινητές. Ορισμένοι ενισχυτές ενεργοποιούνται μόνο στους ιστούς στους οποίους εκφράζονται τα γονίδια που ρυθμίζουν, ενώ κάποιοι άλλοι μπορεί να είναι ενεργοί σε όλα τα κύτταρα**

## **Οι τροποποιήσεις των ιστονών**

**Ο όρος «αποσιώπηση» (silencing) αναφέρεται στην τοπική καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου εντός μιας χρωμοσωμικής περιοχής. Ο όρος «ετεροχρωματίνη» (heterochromatin) περιγράφει συμπυκνωμένες χρωμοσωμικές περιοχές οι οποίες είναι αρκετά μεγάλες, ώστε να έχουν μια χαρακτηριστική συμπαγή δομή που μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο. Οι δύο αυτές περιπτώσεις έχουν κοινή βάση: συγκεκριμένες πρωτεΐνες προσδένονται στη χρωματίνη και – είτε άμεσα είτε έμμεσα – εμποδίζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες και την RNA πολυμεράση να ενεργοποιήσουν τους υποκινητές της περιοχής αυτής. Οι αλλαγές της χρωματίνης σε ένα μεμονωμένο υποκινητή ελέγχουν την έναρξη της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου. Τέτοιου είδους αλλαγές μπορεί να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές συνέπειες στη γονιδιακή έκφραση.**

Οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης απαιτούν τροποποίηση των N-τελικών άκρων των ιστονών, ειδικά των H3 και H4 ( περιλαμβάνει τα ~20 N-τελικά αμινοξέα και προεκβάλλει από το νουκλεόσωμα). Τα άκρα των ιστονών μπορούν να τροποποιηθούν με μεθυλίωση, ακετυλίωση ή φωσφορυλίωση σε διάφορα αμινοξέα. Οι τροποποιήσεις επηρεάζουν το ηλεκτρικό φορτίο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και είναι δυνατόν να επηρεάζουν άμεσα τη δομή του νουκλεοσώματος ή να δημιουργούν θέσεις πρόσδεσης για την προσκόλληση μη ιστονικών πρωτεϊνών, οι οποίες αλλάζουν τις ιδιότητες της χρωματίνης.

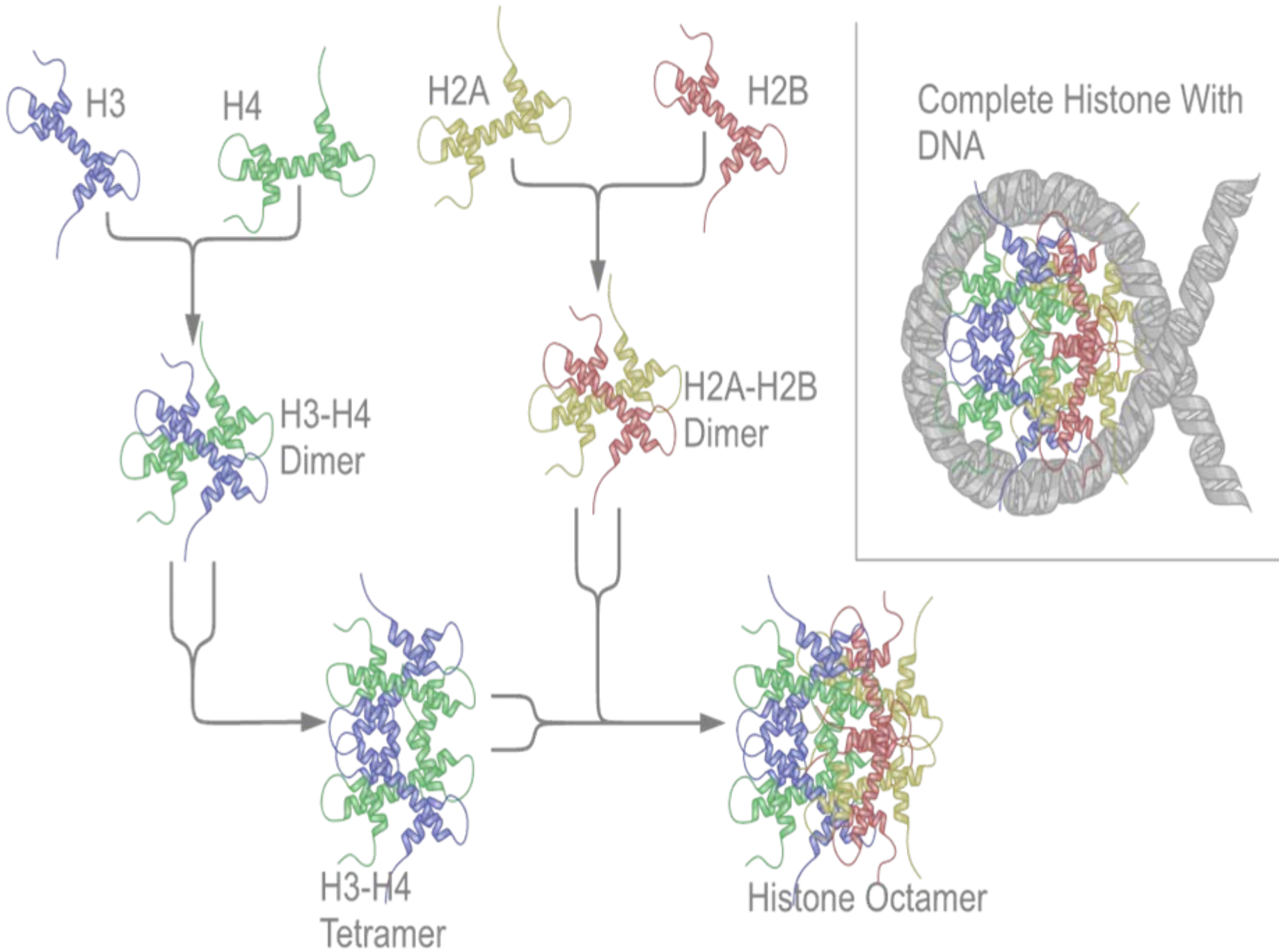
Η τροποποίηση μπορεί να αποτελεί τοπικό γεγονός, για παράδειγμα να περιορίζεται στα νουκλεοσώματα ενός υποκινητή. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι ένα γενικευμένο γεγονός και να εκτείνεται ακόμη και σε ολόκληρο το χρωμόσωμα. Η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται με την ενεργή χρωματίνη, ενώ, αντίθετα, η μεθυλίωση σχετίζεται με την ανενεργή. Ωστόσο, αυτό δεν αποτελεί απαραίτητο κανόνα.

Η ακετυλίωση ιστονών

Οι κυριότεροι στόχοι ακετυλίωσης είναι οι λυσίνες των N-τελικών άκρων των ιστονών H3 και H4.

**Η ακετυλίωση συμβαίνει σε δύο περιπτώσεις:  
κατά την αντιγραφή του DNA  
κατά την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης**

Όταν τα χρωμοσώματα αντιγράφονται, κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, οι ιστόνες υφίστανται παροδική ακετυλίωση. Γνωρίζουμε ότι οι ιστόνες H3 και H4 ακετυλιώνονται στο στάδιο κατά το οποίο συνδέονται η μία με την άλλη, ώστε να σχηματίσουν το τετραμερές H3<sub>2</sub>•H4<sub>2</sub>. Το τετραμερές στη συνέχεια ενσωματώνεται στα νουκλεοσώματα. Ακολούθως, και μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, οι ακετυλομάδες αφαιρούνται από τις νουκλεοσωμικές ιστόνες. **Είναι πιθανόν η ακετυλίωση να βοηθάει στον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης - πρωτεΐνης, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την ενσωμάτωση των ιστονών στα νουκλεοσώματα.** Η ακετυλίωση των ιστονών της χρωματίνης συσχετίζεται με τη γονιδιακή έκφραση. Η συσχέτιση αυτή αρχικά διαπιστώθηκε από την παρατήρηση αυξημένων επιπέδων ακετυλίωσης των ιστονών σε επικράτειες του γονιδιώματος που περιέχουν μεταγραφόμενα γονίδια, καθώς και από την ευαισθησία της ακετυλιωμένης χρωματίνης σε πέψη με DNAάση I.



Είναι γνωστό σήμερα ότι η ακετυλίωση των ιστονών είναι συνηθισμένη σε νουκλεοσώματα που βρίσκονται σε περιοχές υποκινητών ενεργών γονιδίων. Τα ένζυμα που ακετυλιώνουν τις ιστόνες ονομάζονται **ακετυλάσες (acetylases)** ή **ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών ή HAT (Histone Acetyltransferases)**. Οι ακετυλομάδες αφαιρούνται από τις **απακετυλάσες των ιστονών ή HDAC (Histone Deacetylases)**.

Υπάρχουν δύο ομάδες ενζύμων HAT: στην ομάδα A ανήκουν εκείνα που ενέχονται στη μεταγραφή ενώ στην ομάδα B εκείνα που ενέχονται στη συναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων. Η ανακάλυψη ότι οι HAT δεν είναι ένζυμα που σχετίζονται αποκλειστικά με τη χρωματίνη, αλλά ότι αποτελούν ενεργότητα ορισμένων ήδη γνωστών ενεργοποιητών της μεταγραφής, οδήγησε σε ουσιαστική αλλαγή της αντίληψής μας για την ακετυλίωση των ιστονών.

Η σχέση αυτή καθιερώθηκε όταν η καταλυτική υπομονάδα μιας πρωτεΐνης HAT της ομάδας A αναγνωρίστηκε ως ομόλογη της ρυθμιστικής πρωτεΐνης GCN5 της ζύμης. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι η ίδια η GCN5 διαθέτει ενεργότητα HAT και ότι είναι σε θέση να χρησιμοποιεί τις ιστόνες H3 και H4 ως υποστρώματα. Η GCN5 είναι συστατικό ενός συμπλόκου συναρμογής (adaptor complex), το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση ορισμένων ενισχυτών με τους υποκινητές-στόχους τους. Η ενεργότητα HAT της GCN5 απαιτείται για την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων.

**Αυτό το αποτέλεσμα οδήγησε στην αναθεώρηση της αντίληψης μας για τους συνενεργοποιητές (co-activators). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η RNA πολυμεράση προσδένεται σε μια υπερευαίσθητη θέση και μαζί με αυτή στρατολογούνται οι συνενεργοποιητές, οι οποίοι ακετυλιώνουν τις ιστόνες στα γύρω νουκλεοσώματα. Ένας από τους πρώτους γενικούς ενεργοποιητές της μεταγραφής που χαρακτηρίστηκε ως HAT ήταν ο p300/CBP. Στην πραγματικότητα, πρόκειται για δύο διαφορετικές πρωτεΐνες (p300 και CBP), οι οποίες όμως είναι τόσο συγγενικές μεταξύ τους, ώστε συχνά αναφέρονται σαν να πρόκειται για ένα πολυπεπτίδιο. Ο p300/CBP είναι ένα συνενεργοποιητής, δηλαδή συνδέει ένα ενεργοποιητή με τη βασική συσκευή.**

**Ο p300/CBP αλληλεπιδρά με ποικίλους ενεργοποιητές, όπως οι υποδοχείς ορμονών, ο AP-1 (c-Jun και c-Fos). Η αλληλεπίδραση καταστέλλεται από τις ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1A του αδενοϊού και το αντιγόνο T του SV40, τα οποία προσδένονται στον p300/CBP και εμποδίζουν την αλληλεπίδρασή του με τους μεταγραφικούς παράγοντες. Έτσι εξηγείται πώς αυτές οι ιικές πρωτεΐνες καταστέλλουν την κυτταρική μεταγραφή. Αυτή η καταστολή είναι σημαντική για την ογκογονικότητα των ιικών πρωτεϊνών.**

**Ο p300/CBP ακετυλιώνει τα N-τελικές άκρα της H4 στα νουκλεοσώματα.**



**Ένας δεύτερος συνενεργοποιητής, ο PCAF, ακετυλιώνει επιλεκτικά τις H3 στα νουκλεοσώματα.**

**Οι p300/CBP και PCAF σχηματίζουν ένα σύμπλοκο που δρα κατά την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Ένα γενικό χαρακτηριστικό των HAT είναι η ιδιότητά τους να ενσωματώνονται σε μεγάλα σύμπλοκα. Τυπικά, το σύμπλοκο περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπομονάδες στόχευσης, οι οποίες αναγνωρίζουν τις θέσεις πρόσδεσης στο DNA προσδιορίζοντας τους στόχους της HAT. Το σύμπλοκο περιέχει επίσης υπομονάδες που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης ή επιδρούν άμεσα στη μεταγραφή. Πιθανότατα, η ακετυλίωση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου να δράσουν ορισμένες τουλάχιστον από αυτές τις υπομονάδες του συμπλόκου.**

**Η ακετυλίωση λαμβάνει χώρα τόσο κατά την αντιγραφή (οπότε είναι παροδική) όσο και κατά τη μεταγραφή (οπότε διατηρείται όσο το γονίδιο παραμένει ενεργό).**

**Η ακετυλίωση ίσως να «χαλαρώνει» τον πυρήνα του νουκλεοσώματος. Εναλλακτικά, η ακετυλίωση πιθανόν να δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη μεταγραφή.**

**Οι απακετυλάσες συνδέονται με καταστολείς**

**Η απακετυλίωση σχετίζεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.**

**Οι απακετυλάσες εντοπίζονται σε σύμπλοκα με κατασταλτική δράση.**

**Στα κύτταρα των θηλαστικών βρίσκεται το σύστημα καταστολής, το ετεροδιμερές Mad:Max.**

**Το ετεροδιμερές Mad:Max, το οποίο προσδένεται σε ειδικές θέσεις στο DNA, αλληλεπιδρά με ένα σύμπλοκο καταστολής, το οποίο περιλαμβάνει πρωτεΐνες που προσδένονται σε ιστόνες, καθώς και τις απακετυλάσες HDAC1 και HDAC2. Η ενεργότητα απακετυλάσης είναι απαραίτητη για την καταστολή.**

Η μεθυλίωση των ιστονών

Η μεθυλίωση τόσο του DNA όσο και των ιστονών είναι ένα γνώρισμα της ανενεργής χρωματίνης.

Η μεθυλίωση τόσο των ιστονών όσο και του DNA σχετίζεται με μεταγραφική αδράνεια. Οι θέσεις των ιστονών που μεθυλιώνονται περιλαμβάνουν δύο λυσίνες στα άκρα της H3 και μία αργινίνη στα άκρα της H4. Η μεθυλίωση του καταλοίπου 9Lys της H3 αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των συμπυκνωμένων περιοχών της χρωματίνης. Άλλες μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών δρουν πάνω σε κατάλοιπα αργινίνης. Επιπρόσθετα, είναι δυνατόν να μεθυλιωθεί το κατάλοιπο 79Lys της H3. Αυτού του τύπου η μεθυλίωση πιστεύεται ότι είναι απαραίτητη για το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης των τελομερών.

Η πλειοψηφία των θέσεων μεθυλίωσης στο DNA είναι νησίδες CpG. Στην ετεροχρωματίνη, οι αλληλουχίες CpG είναι συνήθως μεθυλιωμένες. Αντίθετα, οι νησίδες CpG που εντοπίζονται σε περιοχές υποκινητών απαιτείται να είναι μη μεθυλιωμένες προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο. Πιστεύεται ότι υπάρχει σύνδεση ανάμεσα στη μεθυλίωση του DNA και στη μεθυλίωση των ιστονών. Είναι πιθανόν η μεθυλίωση του DNA να οδηγεί σε πρόσδεση μιας μεθυλοτρανσφεράσης που με τη σειρά της μεθυλιώνει τις παρακείμενες ιστόνες της περιοχής.

Η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται με τη γονιδιακή ενεργοποίηση.

Η μεθυλίωση του DNA και των ιστονών σχετίζεται με το σχηματισμό ετεροχρωματίνης.

**Συνοψίζοντας τις τρεις βασικές διαφορές της ενεργής από την ανενεργή χρωματίνη:**

**Η ενεργή χρωματίνη είναι ακετυλιωμένη στα άκρα των ιστονών H3 και H4.**

**Η ανενεργή χρωματίνη είναι μεθυλιωμένη στο κατάλοιπο 9Lys της ιστόνης H3.**

**Η ανενεργή χρωματίνη είναι μεθυλιωμένη στις κυτοσίνες των νησίδων CpG.**

**Η απακετυλίωση επιτρέπει να πραγματοποιηθεί η μεθυλίωση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου ετεροχρωματίνης.**

**Αντίστροφα, η ακετυλίωση προσδιορίζει τις ενεργές περιοχές της χρωματίνης.**

# ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΒΛΑΒΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

## 1. Ταξινόμηση βλαβών

### α) Κυτταροτοξικές βλάβες

Είναι τοξικές για το κύτταρο και το οδηγούν σε θάνατο .

### β) Μεταλλαξογόνες βλάβες

Η μεταβολή αυτή δεν είναι πάντα επιζήμια για τον οργανισμό, καθώς συμβάλλουν στην εξέλιξη και την ποικιλομορφία των οργανισμών.

## 2. Ταξινόμηση μεταλλάξεων

Με βάση το **φαινότυπο** στον οποίο οδηγούν διακρίνουμε τις μεταλλάξεις σε:

α) **Κυρίαρχες** π.χ. μετάλλαξη που οδηγεί σε φαινοτυπική μεταβολή και η οποία μεταβιβάζεται στην επόμενη γενιά με τον κυρίαρχο τρόπο.

β) **Υποτελείς**. Στη περίπτωση αυτή η αλλαγή δεν θα διαπιστωθεί στην επόμενη γενιά αλλά σε μεταγενέστερη όταν π.χ. συνδυαστούν δύο υποτελείς μορφές → ομόζυγο άτομο.

γ) **Σιωπηλές**. Δεν γίνονται εύκολα αντιληπτές. Δεν προσφέρει πλεονέκτημα ή μειονέκτημα.

Ανάλογα με τον **τρόπο πρόκλησης** των μεταλλάξεων τις διακρίνουμε σε:

### α) Αυθόρμητες μεταλλάξεις.

β) **Επαγώγιμες μεταλλάξεις**. Επάγονται από τη χρήση μεταλλαξογόνων παραγόντων. Ένας άλλος συνήθης τρόπος ταξινόμησης των μεταλλάξεων βασίζεται στη **φύση της αλλαγής** που αυτές προκαλούν στο DNA καθώς και στον αριθμό των ζευγών βάσεων που αλλάζει.

Έτσι διακρίνουμε

- α) τις **Σημειακές Μεταλλάξεις** όπου η αλλαγή αφορά ένα ζεύγος βάσεων και
- β) τις **Μακρο-Μεταλλάξεις**, όπου οι αλλαγές αφορούν μεγαλύτερα τμήματα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Οι ανωμαλίες αυτές που παρατηρούνται στα χρωμοσώματα είναι γνωστές με το όνομα **ατυπίες**. Μεταλλαξογόνοι παράγοντες (ακτινοβολίες, χημικές ουσίες) ευθύνονται συχνότατα για τις ατυπίες αυτές.

Οι σημειακές μεταλλάξεις υποδιαιρούνται σε:

### **1. Υποκατάσταση (Substitution)**

Έχουμε αλλαγή ενός ζεύγους βάσεων από άλλο. Η υποκατάσταση του ζεύγους βάσεων διακρίνεται σε **μετάπτωση** (transition) και σε **μεταστροφή** (transversion). Στη μετάπτωση ένα ζεύγος πουρίνης-πυριμιδίνης αντικαθίσταται από ένα άλλο ζεύγος πουρίνης-πυριμιδίνης π.χ.  $G-C \rightarrow A-T$ .

Στη μεταστροφή μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία πυριμιδίνη ή και το αντίστροφο, π.χ.  $A \rightarrow T$ ,  $G \rightarrow C$ .

### **2. Παρεμβολή ή Προσθήκη (Insertion)**

Πρόκειται για ενσωμάτωση ενός ζεύγους βάσεων στην αλληλουχία του DNA.

### **3. Έλλειψη (Deletion)**

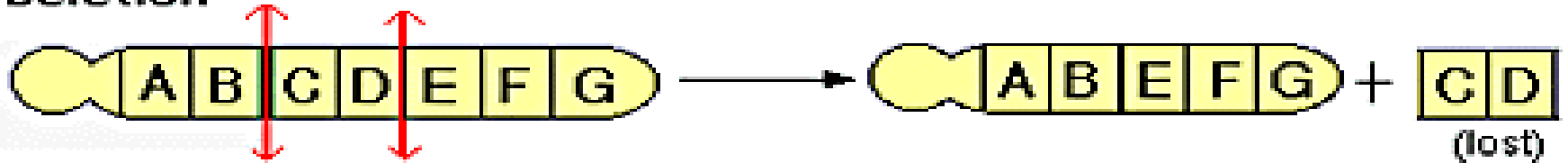
Έχουμε αφαίρεση ενός ζεύγους βάσεων από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία.

### **4. Αντιστροφή ( Inversion)**

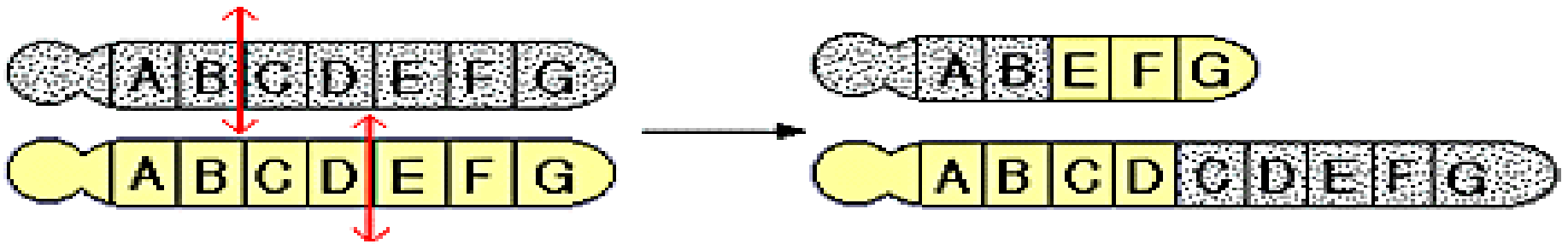
## Point mutation



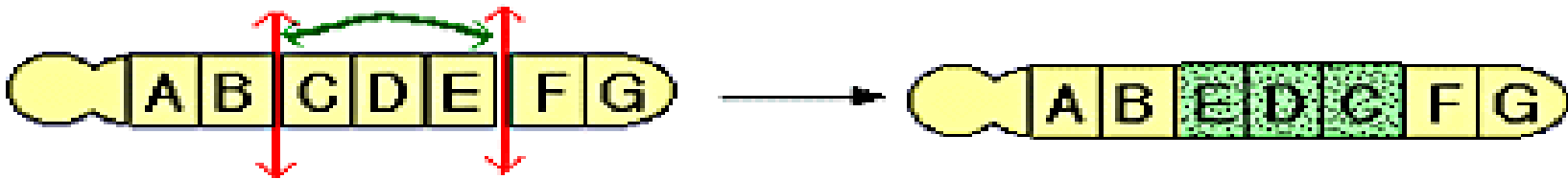
## Deletion



## Translocation



## Inversion



# Mutations of Chromosomes

**Ο πιο συνηθισμένος ίσως τρόπος για την ταξινόμηση των σημειακών μεταλλάξεων βασίζεται στις συνέπειες που προκαλεί η αλλαγή βάσεων του DNA στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης.**

- α) Αν η μετάλλαξη οδηγεί στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος στη πρωτεΐνη, τότε έχουμε μία **παρερμηνεύσιμη** μετάλλαξη (missence mutation).
- β) Αν η μετάλλαξη οδηγεί στην εμφάνιση ενός κωδικονίου λήξης τότε έχουμε μία **ανερμηνεύσιμη** μετάλλαξη (nonsense mutation).
- γ) Αν έχουμε προσθήκες ή απώλεια ενός νουκλεοτιδίου στην περιοχή του DNA που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη, τότε η μετάλλαξη ονομάζεται **πλαισιοτροπική** (frameshift mutation) καθώς έχουμε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.
- δ) Σε ορισμένες περιπτώσεις η μετάλλαξη οδηγεί σε μια πρωτεΐνη η οποία είναι δραστική στους 37° C και όχι στους 42° C. Σ' αυτή την περίπτωση έχουμε μία **θερμοευαίσθητη** μετάλλαξη.

Από τις ακτινοβολίες, κυριότερες στη πρόκληση μεταλλάξεων είναι οι ακτίνες Χ, η υπεριώδης ακτινοβολία και οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες. Σημαντικό ρόλο στη μεταλλαξογένεση παίζουν και οι ελεύθερες ρίζες. Παρόλο που ο χρόνος ζωής των ελευθέρων ριζών είναι πολύ μικρός, 10-11 sec, αυτές είναι πολύ δραστικές. Προκαλούν οξειδώσεις οργανικών ενώσεων καθώς και διασπάσεις και μεταβολές στα νουκλεοτίδια και κατ' επέκταση στο DNA. Η UV ακτινοβολία αποτελεί ένα ισχυρό μεταλλαξογόνο παράγοντα δημιουργώντας διμερή θυμίνης .

Η δημιουργία του διμερούς T-T είναι τοξική βλάβη για το κύτταρο καθότι το σύμπλοκο που δημιουργείται εμποδίζει την αντιγραφή του DNA.

**Η ευαισθησία των κυττάρων στις ακτινοβολίες είναι διαφορετική στις διάφορες φάσεις του κύκλου ζωής. Τη μεγαλύτερη ευαισθησία τα κύτταρα την έχουν στη φάση S όπου γίνεται ο διπλασιασμός του DNA.**

Οι ακτινοβολίες οδηγούν στη πρόκληση μεταλλάξεων αφενός μέσω σχηματισμού ελευθέρων ριζών και αφετέρου μέσω ενεργειακής διέγερσης των βάσεων με αποτέλεσμα τα λάθος ζευγαρώματα.

Οι κυριότεροι χημικοί μεταλλαξογόνοι παράγοντες είναι οι **αζωτούχες ενώσεις (νιτρώδες οξύ, υδροξυλαμίνη), οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και οι αρωματικές αμίνες.**

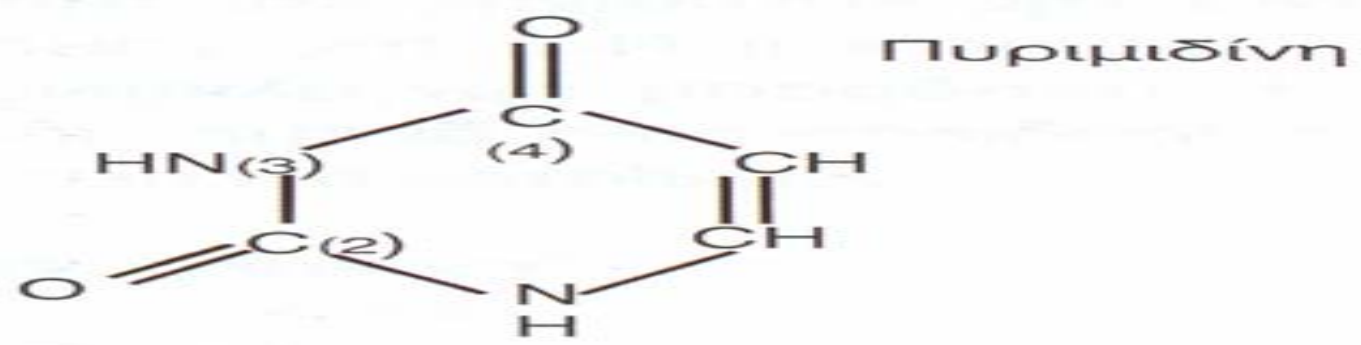
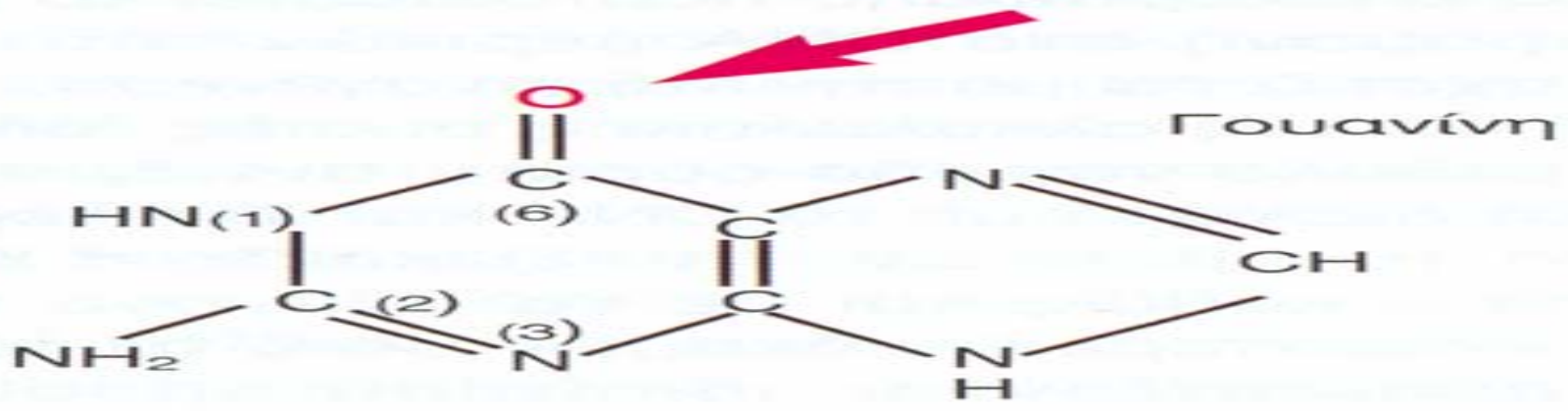
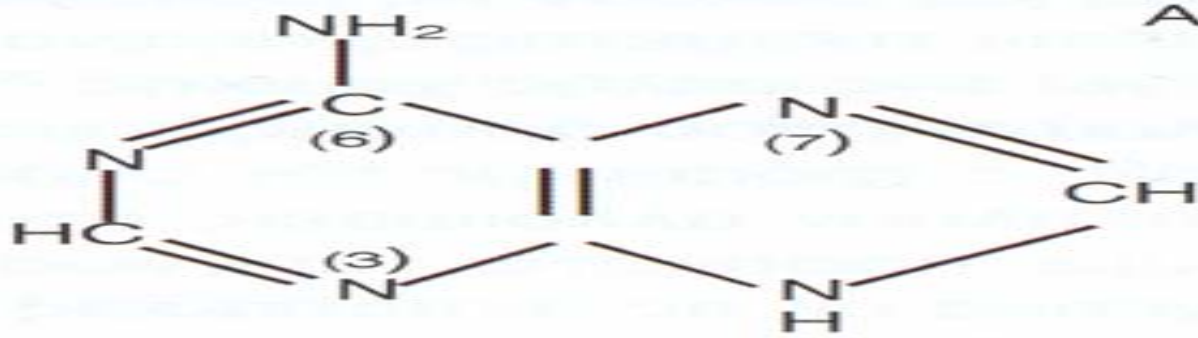


Οι **N-νιτροδοενώσεις** αποτελούν μια ευρεία ομάδα χημικών ουσιών, που βρίσκονται κυρίως στο περιβάλλον. Όλοι είμαστε συνεχώς εκτεθειμένοι σ' αυτές, σε πολύ χαμηλές **δόσεις (περιβαλλοντικοί ρύποι)**. **Εισέρχονται επίσης στον οργανισμό με την τροφή**, συχνά δε, είναι οι ενεργοί μεταβολίτες αυτών των εισερχομένων ουσιών που ασκούν τη βιολογική δράση.

Στην κατηγορία των N-νιτροδοενώσεων ανήκουν και τα **αλκυλιωτικά**. Τα τελευταία είναι ουσίες που αντιδρούν με τα μακρομόρια του κυττάρου και ασκούν τις βιολογικές τους επιπτώσεις μέσω της μεταφοράς ενός αλκυλίου σ' αυτά.

Οι απλές αλκυλιωτικές ουσίες, όπως η **MNU (μεθυλο-νιτροδο-ουρία)**, αντιδρούν σε υδατικό διάλυμα με το **DNA** και ιδιαίτερα με τα άζωτα των βάσεων, τα εξωκυκλικά άτομα οξυγόνου καθώς και με τα οξυγόνα των φωσφοδιεστερικών δεσμών.

Από τα σύμπλοκα που σχηματίζονται, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στις αντιδράσεις στις θέσεις **N-7 (άζωτο στη θέση 7)** και **O-6 (οξυγόνο στη θέση 6)** της γουανίνης. **Αλκυλίωση επίσης παρατηρείται στις θέσεις: N-3 και N-7 της αδενίνης, O-2 και N-3 της κυτοσίνης και της θυμίνης, O-4 της θυμίνης και N-3 της γουανίνης.**



Τις βλάβες που προκαλούνται από τα αλκυλιωτικά στο DNA, μπορούμε να τις διακρίνουμε σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

**α) Μεταλλαξογόνες**

Αυτές αλλάζουν τις κωδικοποιητικές ιδιότητες των βάσεων με αποτέλεσμα να οδηγούν σε μεταλλάξεις. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν οι

**O-6-αλκυλογουανίνη (O-6 alkG) και η O-4-αλκυλοθυμίνη (O-4 alkT).**

**β) Τοξικές**

Εμποδίζουν την αντιγραφή του DNA από την πολυμεράση. Αποτέλεσμα αυτού είναι να οδηγείται το κύτταρο σε θάνατο λόγω μη αντιγραφής του γενετικού του υλικού.

**Κυριότερες τοξικές βλάβες προκαλούμενες από αλκυλιωτικά είναι η N3-G, N3-A και N7-A.**

**Η O-6 αλκυλογουανίνη (O-6 alkG) ζευγαρώνει επιλεκτικά με θυμίνη (αντί της κυτοσίνης), με αποτέλεσμα από το ζεύγος \*G:T που σχηματίζεται, στον επόμενο κύκλο διπλασιασμού του DNA να έχουμε εισαγωγή αδενίνης απέναντι από τη θυμίνη.**

Αποτέλεσμα αυτής της αρχικής προτίμησης της μεθυλιωμένης γουανίνης είναι να οδηγεί σε μεταλλάξεις που χαρακτηρίζονται ως **G→A μεταπτώσεις.**

**Συνεπώς η αλκυλίωση της γουανίνης στο οξυγόνο 6 αλλάζει τις κωδικοποιητικές της ιδιότητες, με αποτέλεσμα αυτή η βλάβη να θεωρείται προμεταλλαξογόνος.**

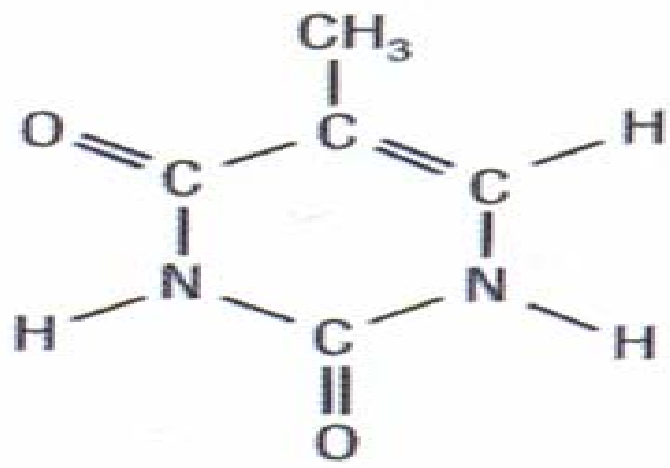
# ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

## ΠΩΣ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΜΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ

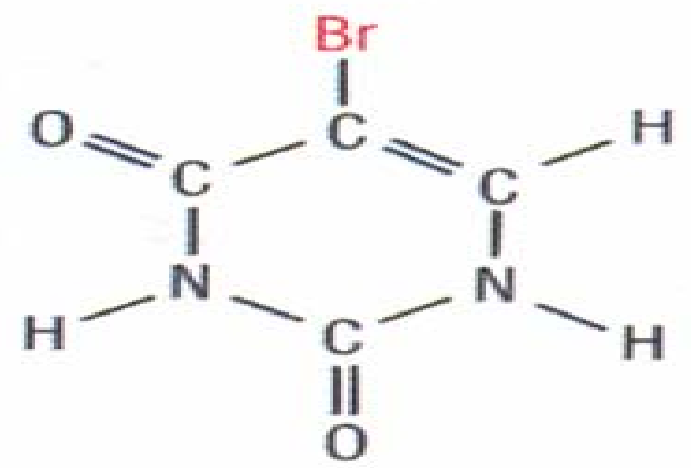
### 1. Μέσω ταυτομερικής μετατροπής

Οι αζωτούχες βάσεις μπορούν να υπάρχουν σε δύο μορφές **κετονική και ενολική**. Η διαφορά τους είναι ως προς τη θέση ενός ατόμου υδρογόνου. Η πιο συνηθισμένη μορφή είναι η κετονική. Υπό φυσιολογικές καταστάσεις είναι γνωστό ότι η αδερίνη ζευγαρώνει με τη θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη, δηλ. **A=T** και **G≡C**, όπου αναπτύσσονται αντίστοιχα δύο και τρεις δεσμοί υδρογόνου. Αν έχουμε μετάπτωση μιας βάσης σε ενολική μορφή, τότε έχουμε άτυπα ζευγαρώματα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι αυτό της **5-βρωμο-ουρακίλης(5BrU)**, που είναι ανάλογο της θυμίνης και το οποίο ζευγαρώνει με την αδερίνη, όταν εύρισκεται υπό κετονική μορφή. Αν όμως η **5 BrU** μεταπέσει σε ενολική μορφή-πράγμα που είναι μεν σπάνιο αλλά συμβαίνει - η **5BrU** μπορεί να ζευγαρώσει με μία γουανίνη. Αυτό οδηγεί κατά την αντιγραφή του **DNA** σε ζεύγος **G- BrU**. Στον επόμενο αναδιπλασιασμό η **G** ζευγαρώνει με **C** οδηγώντας σε μία μετάπτωση, δηλαδή από ένα αρχικό ζεύγος **A-T** έχουμε **G-T**.

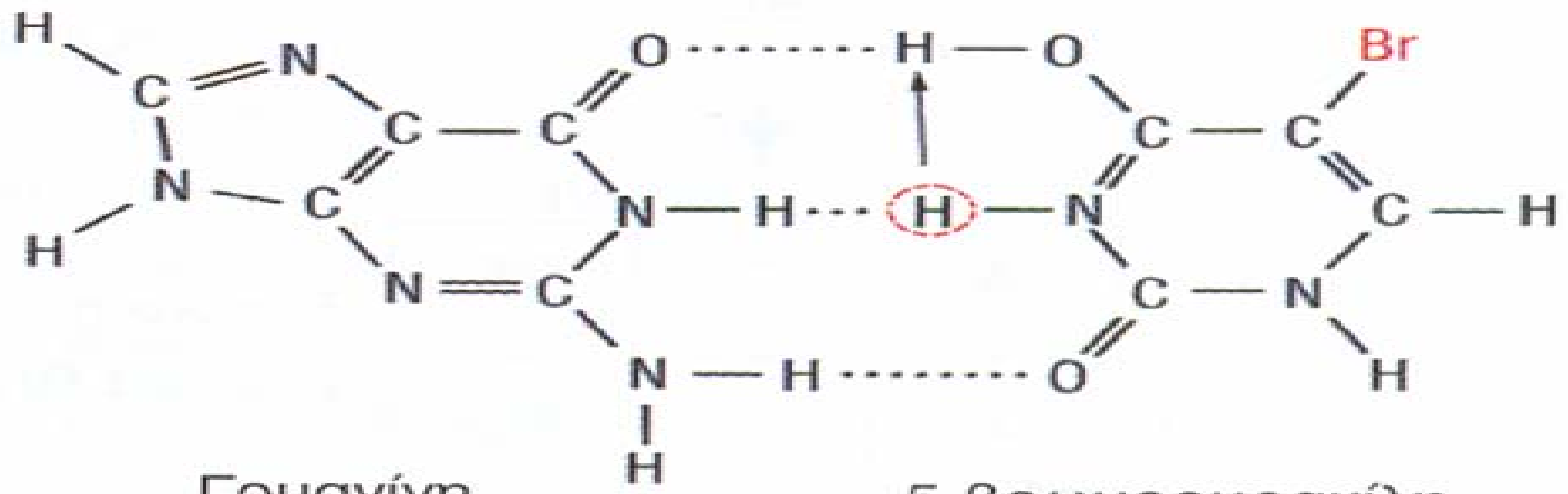
Το άτυπο ζεύγος που αναπτύσσεται μεταξύ **Br-U** και **G** καθώς και ο τρόπος πρόκλησης της μετάπτωσης απεικονίζονται κατωτέρω.



Θυμίνη

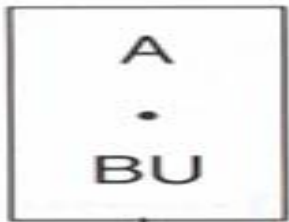


5-βρωμοουρακίλη  
(κετονική μορφή)

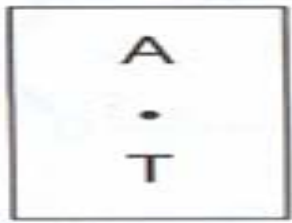


Γουανίνη

5-βρωμοουρακίλη  
(ενολική μορφή)



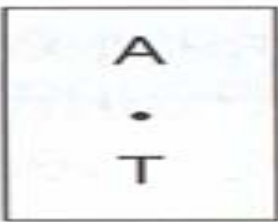
Κετονική  
μορφή Bru



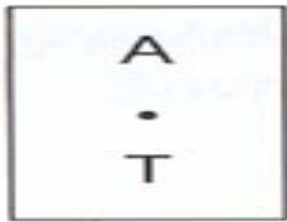
+



Ενολική  
μορφή Bru



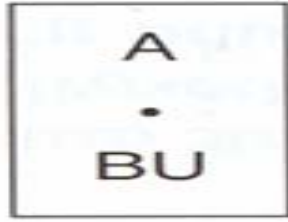
+



+



+



Κετονική μορφή



## 2. Μέσω αποπουρίνωσης και απαμίνωσης

Η απώλεια πουρινών (A,G) και η απαμίνωση που παρατηρείται στο DNA οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με μόρια ύδατος. Έχουμε δηλαδή αντιδράσεις υδρόλυσης.

α) Η απώλεια πουρινών οφείλεται στην καταστροφή του N-γλυκοσιδικού δεσμού που συνδέει τη δεσοξυριβόζη με τη βάση. Θερμοκρασία και pH επηρεάζουν το δεσμό.

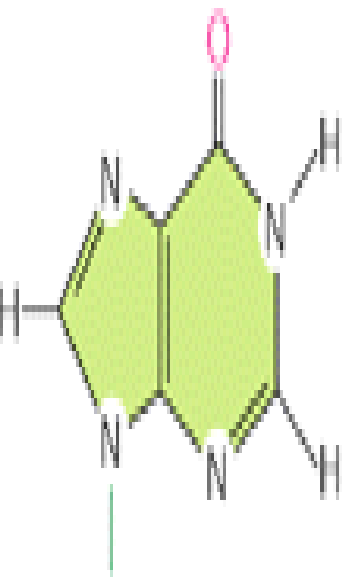
Συνήθως απέναντι σε μια αποουρινική θέση (AP site) έχουμε εισαγωγή αδενίνης. Έτσι η απώλεια πουρινών οδηγεί σε μεταλλάξεις **μεταστροφής** δηλαδή πουρίνη αντικαθίσταται από πυριμιδίνη ή το αντίστροφο.

β) Η απαμίνωση γίνεται αυθόρμητα στις βάσεις C, A και G. Ιδίως όμως στη C η οποία μετατρέπεται σε ουρακίλη U. Στο DNA του ανθρώπου έχουμε αρκετές απαμινώσεις την ημέρα. Συνήθως έναντι της ουρακίλης εισέρχεται αδενίνη και έτσι έχουμε G→A μετάπτωση.

(A) : Απαμίνωση Αδενίνης και Γουανίνης

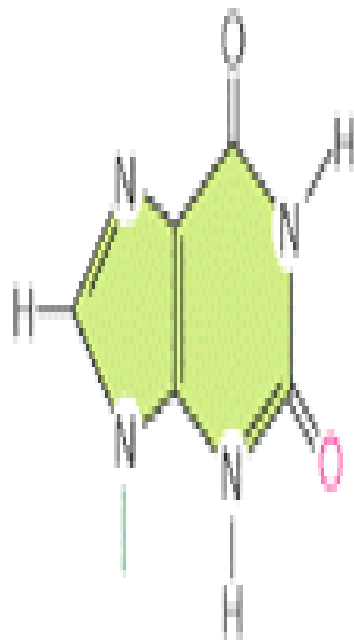
(B): Απαμίνωση της 5' μεθυλο-Γουανίνης η οποία θα οδηγήσει στον σχηματισμό θυμίνης και η οποία θα συνδεθεί στον αντίθετο κλώνο με Γουανίνη οδηγώντας σε λάθος ζευγάριωμα.

### DEAMINATION OF A



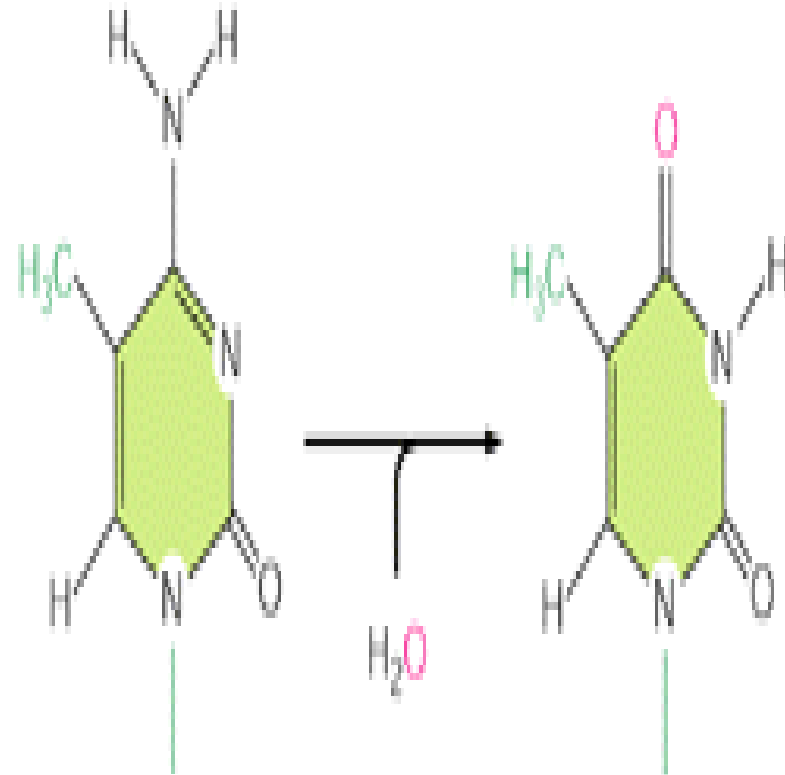
hypoxanthine

### DEAMINATION OF G



xanthine

### DEAMINATION OF 5-METHYL C



5-methyl cytosine

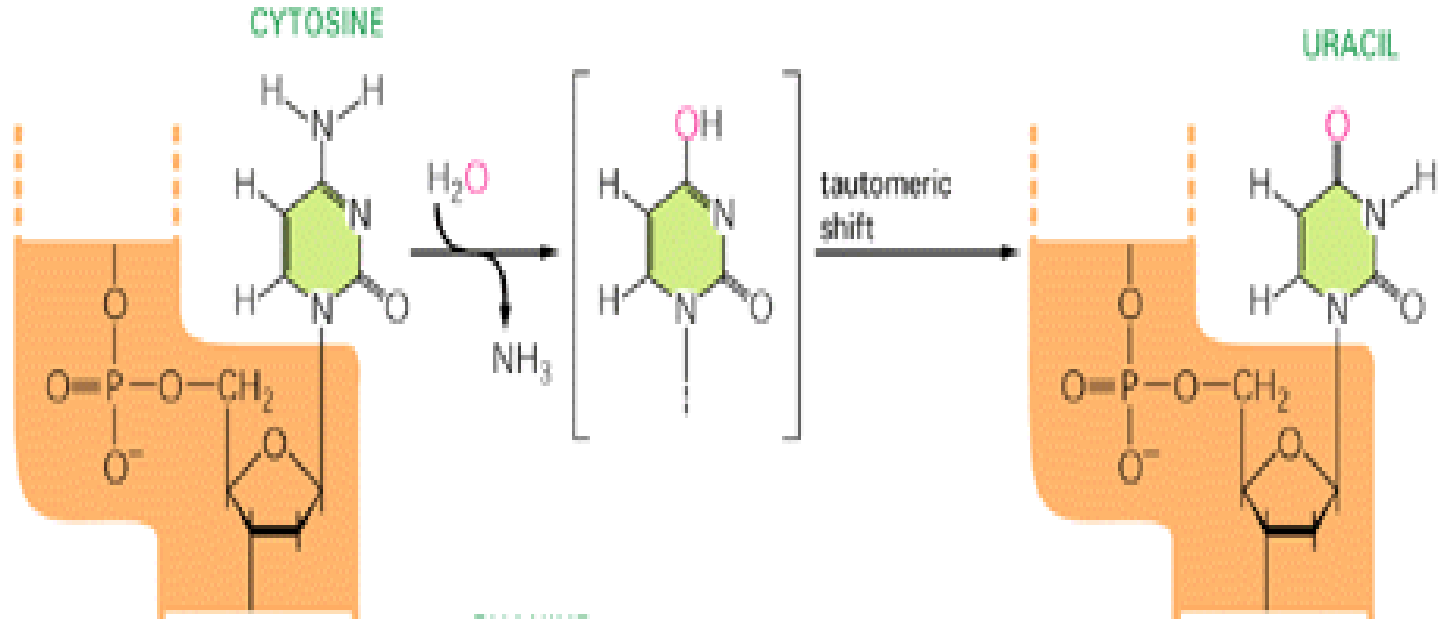
thymine

(A)

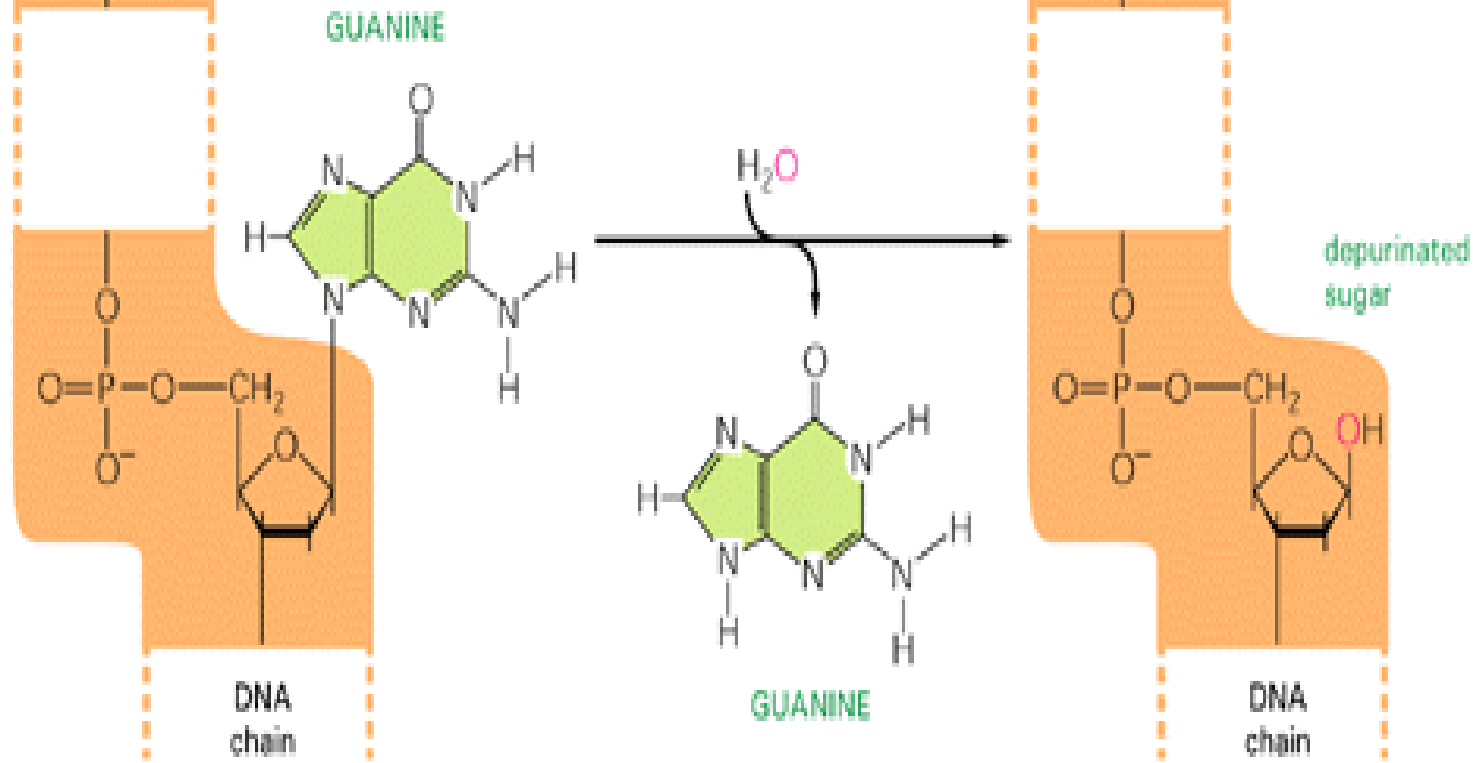
(B)



DEAMINATION  
by spontaneous  
hydrolysis (e.g.,  
cytosine to uracil)



DEPURINATION  
by spontaneous  
hydrolysis (e.g.,  
removal of guanine)



## ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Αλλαγές μιας βάσης επηρεάζουν την αλληλουχία, αλλά όχι και τη γενική δομή του DNA. Οι επιβλαβείς επιπτώσεις των αλλαγών αυτού του είδους εκδηλώνονται σε επόμενες κυτταρικές γενεές. Αλλαγές στην αλληλουχία του DNA μπορεί να προκύψουν ως αποτέλεσμα *in situ* τροποποίησης μιας βάσης ή ακόμη από σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA. Η απαμίνωση (deamination) της κυτοσίνης σε ουρακίλη (είτε αυθόρμητα είτε λόγω της επίδρασης ενός χημικού μεταλλαξιγόνου) δημιουργεί ένα αταίριαστο ζεύγος U·G.

Ένα σφάλμα κατά την αντιγραφή μπορεί να εισαγάγει μια αδενίνη αντί για μια κυτοσίνη, δημιουργώντας ένα ζεύγος A·G. Οι αταίριαστες βάσεις παραμένουν μόνο μέχρι την επόμενη αντιγραφή. Επομένως υπάρχει περιορισμένος χρόνος για να επιδιορθωθεί το σφάλμα, πριν αυτό οδηγήσει στην εμφάνιση ενός μεταλλαγμένου μορίου DNA μετά την αντιγραφή.

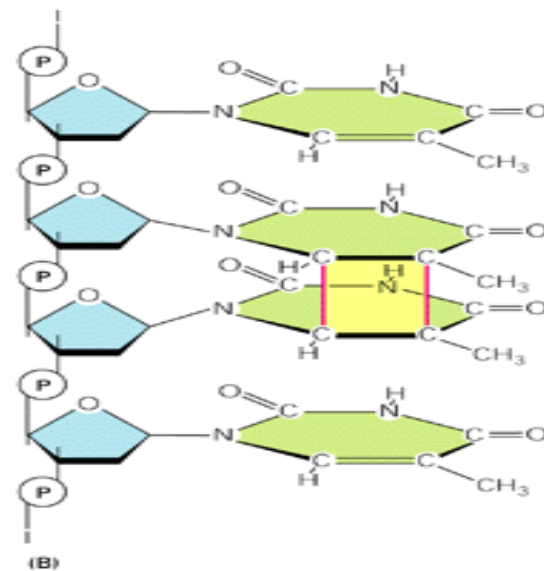
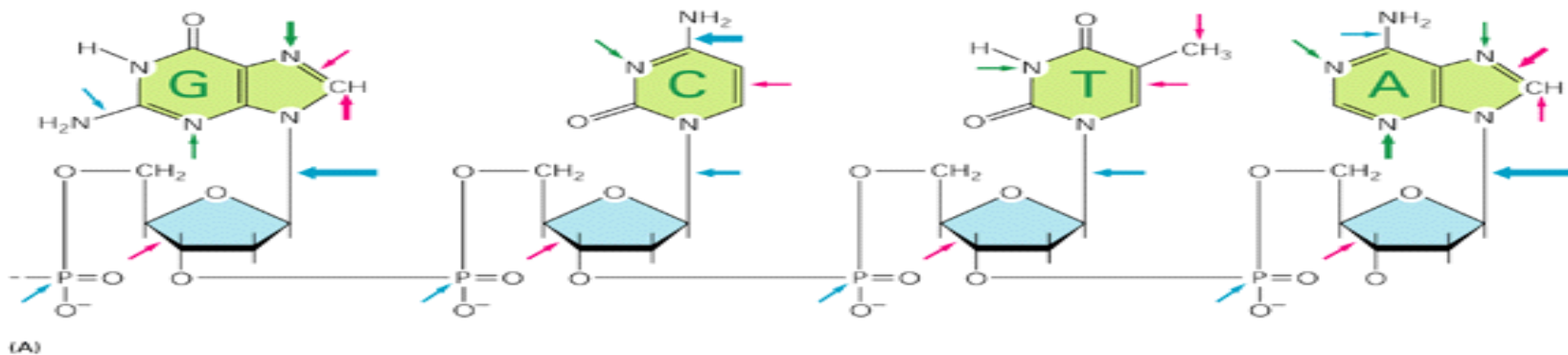
Οι **δομικές παραμορφώσεις** (structural distortions) μπορεί να αποτελούν φυσικά εμπόδια της αντιγραφής ή της μεταγραφής. Ο σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα σε βάσεις ενός κλώνου ή ανάμεσα σε βάσεις των απέναντι κλώνων αναστέλλει την αντιγραφή και τη μεταγραφή. Η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα σε δύο γειτονικές βάσεις θυμίνης. Έτσι σχηματίζεται ένα **διμερές θυμίνης** πάνω στον ένα κλώνο. Παρόμοιες επιπτώσεις μπορεί να έχει η προσθήκη μιας ογκώδους χημικής ομάδας σε μία βάση που θα παραμορφώσει τη δομή της διπλής έλικας. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των αλλαγών είναι ότι η βλάβη παραμένει στο DNA, συνεχίζοντας να διαταράσσει τη δομή και/ή να προκαλεί την εμφάνιση μεταλλάξεων, μέχρι να αφαιρεθεί.

Στην κατωτέρω εικόνα :

(A) απεικονίζονται οι πιθανές θέσεις οι οποίες μπορούν να τροποποιηθούν είτε μέσω οξείδωσης ( κόκκινα βέλη ) , είτε μέσω υδρόλυσης ( μπλε βέλη) , είτε μέσω μεθυλίωσης ( πράσινα βέλη ).

Η ένταση κάθε βέλους συμβολίζει την συχνότητα εμφάνισης της αντίστοιχης τροποποίησης.

(B) Απεικόνιση του σχηματισμού διμερών θυμίνης.

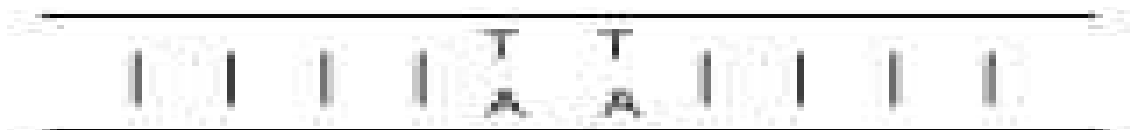


Η σημασία της επιδιόρθωσης του DNA στους ευκαρυώτες φαίνεται από το γεγονός ότι έχουν ταυτοποιηθεί ήδη περισσότερα από 130 γονίδια επιδιόρθωσης στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

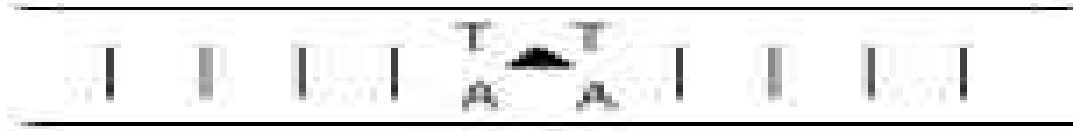
Υπάρχουν μηχανισμοί επιδιόρθωσης που βασίζονται στην εκτομή βάσης (base excision repair), στην εκτομή νουκλεοτιδίων (nucleotide excision repair), καθώς και στην επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων (mismatch repair).

Υπάρχουν συστήματα που λειτουργούν χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμό για την ανάκτηση ενός φυσιολογικού αντιγράφου, το οποίο χρησιμοποιείται για την αντικατάσταση της δίκλωνης αλληλουχίας που έχει υποστεί τη βλάβη.

Η άμεση επιδιόρθωση (direct repair) είναι σπάνια και γίνεται με άμεση επαναφορά στη φυσιολογική κατάσταση. Ένα σχετικό παράδειγμα είναι η **φωτο-επανενεργοποίηση** (photoreactivation) των διμερών πυριμιδίνης (pyrimidine dimers), κατά την οποία οι λανθασμένοι ομοιοπολικοί δεσμοί διασπώνται από ένα φωτο-εξαρτώμενο ένζυμο. Αυτό το σύστημα είναι πολύ διαδεδομένο στα φυτά.



UV light

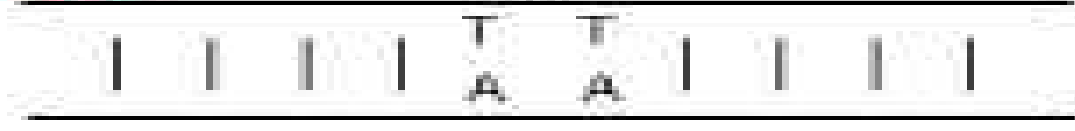
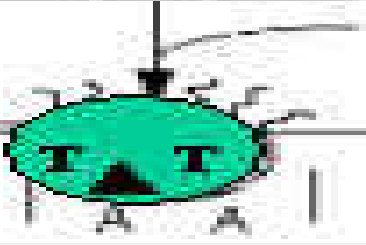


Thymidine dimer



Photolyase

Visible light



Photoreactivation

Η **επιδιόρθωση αταίριαστου ζεύγους** (mismatch repair) επιτυγχάνεται με τη σάρωση του DNA, ώστε να εντοπιστούν οι βάσεις που δεν σχηματίζουν σωστά ζεύγη, παρ' ότι βρίσκονται η μία απέναντι από την άλλη. Άλλα συστήματα αντιμετωπίζουν αταίριαστα ζεύγη που δημιουργούνται από τροποποίηση των βάσεων, όπως η απαμίνωση. Η σημασία αυτών των συστημάτων υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι συχνά ο καρκίνος στον άνθρωπο οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση αταίριαστων ζευγών βάσεων.

Τα αταίριαστα ζεύγη συνήθως διορθώνονται με **επιδιόρθωση εκτομής** (excision repair). Στις περιπτώσεις αυτές, το πρώτο βήμα είναι ο εντοπισμός της βλάβης από ένα κατάλληλο ένζυμο, το οποίο έχει την ιδιότητα να αναγνωρίζει βάσεις που έχουν υποστεί βλάβη.

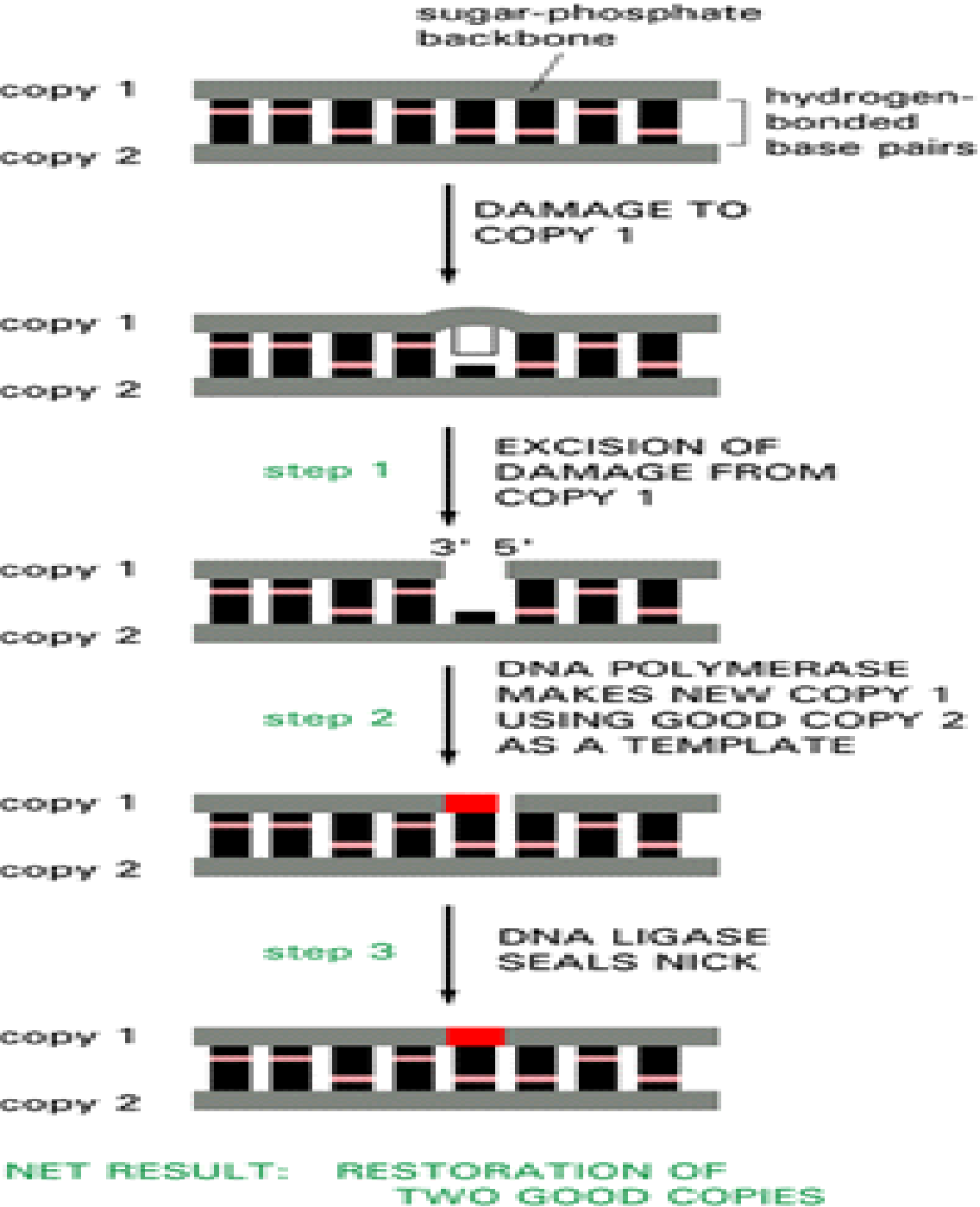
Τα συστήματα επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης αντικαθιστούν απευθείας τη βάση που φέρει τη βλάβη. Η DNA γλυκοζυλάση της ουρακίλης, η οποία αφαιρεί ουρακίλες που είναι λανθασμένα ζευγαρωμένες με γουανίνες.

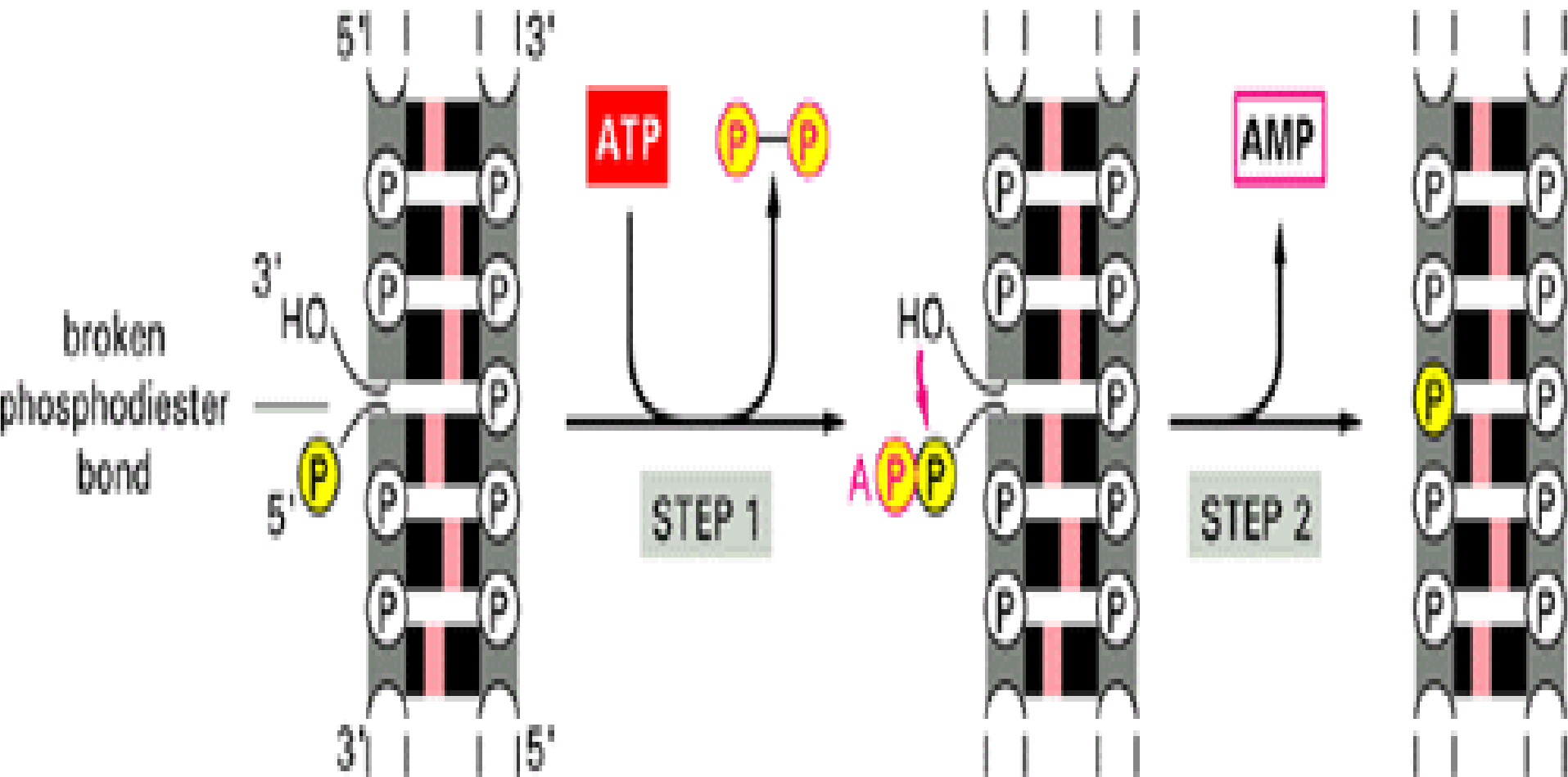
Στις κατωτέρω εικόνες απεικονίζονται :

(A) η εκτομή της λάθος βάσης , η επανασύνθεση του DNA κλώνου μέσω της DNA πολυμεράσης με την προσθήκη της σωστής βάσης και τέλος μέσω της λιγάσης η επανένωση του DNA τμήματος.

(B) η λιγάση επανενώνει ένα κατεστραμμένο φωσφοδιεστερικό δεσμό χρησιμοποιώντας ένα μόριο ATP για την παροχή της απαραίτητης ενέργειας για τον σχηματισμό ενός νέου φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Στο σύνδρομο Bloom , το οποίο χαρακτηρίζεται από μερικό τουλάχιστον έλλειμμα στην σωστή λειτουργία της DNA λιγάσης , τα άτομα φορείς αυτού του συνδρόμου παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου.

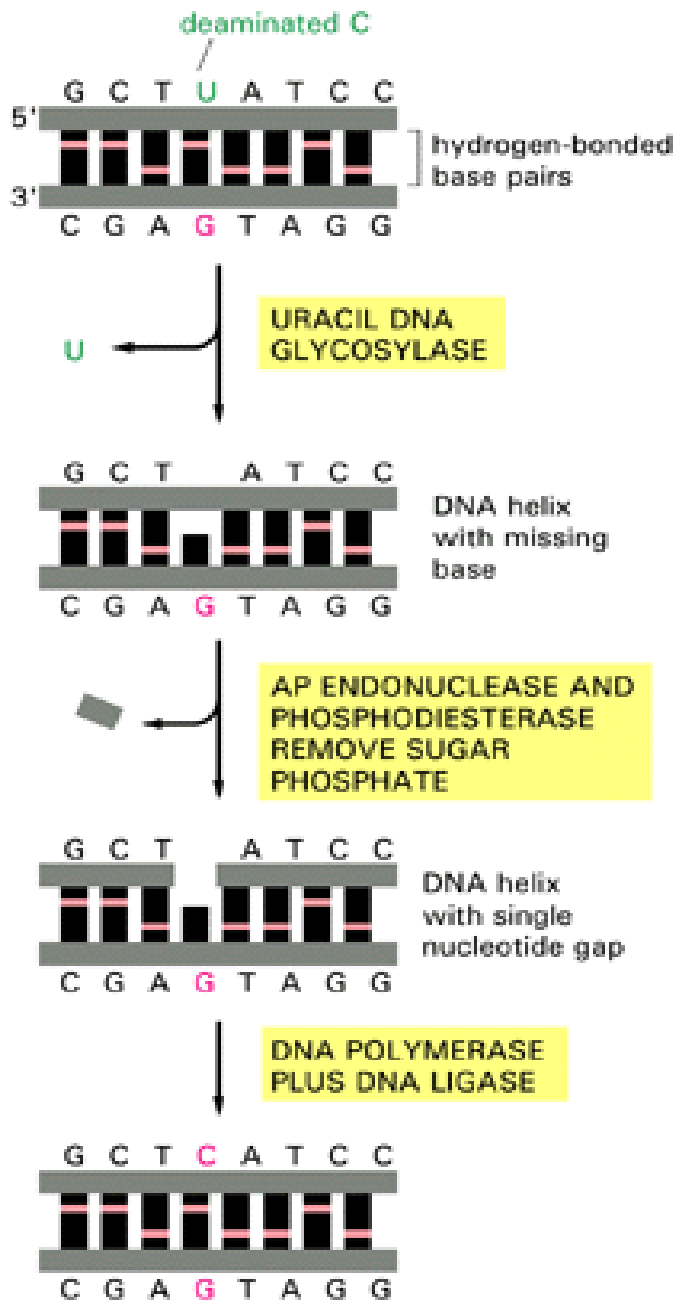
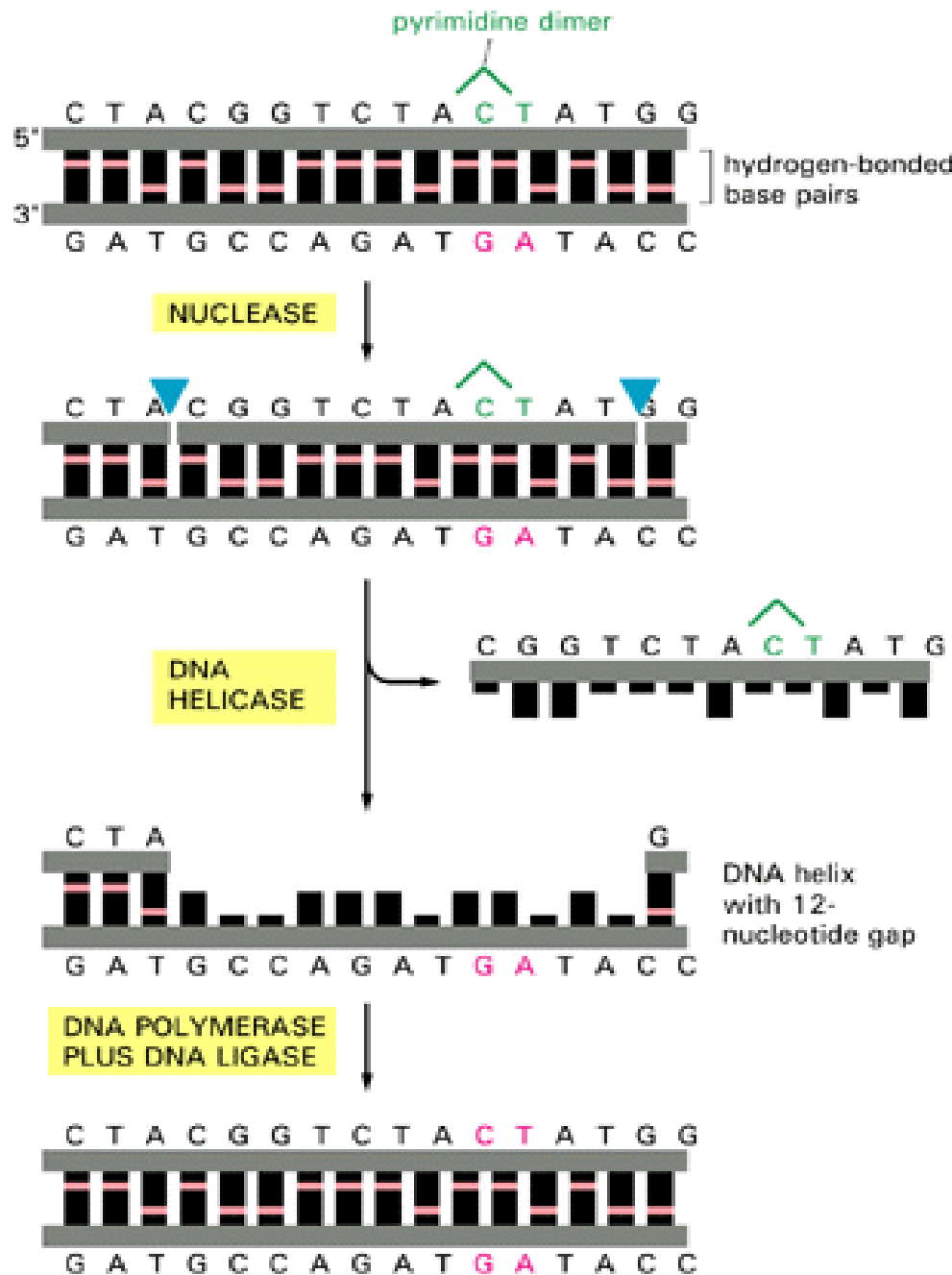






Η DNA γλυκοζυλάση της ουρακίλης αφαιρεί ουρακίλες που είναι λανθασμένα ζευγαρωμένες με γουανίνες **(A)** .

Τα συστήματα επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων (nucleotide excision repair) αφαιρούν ένα μικρό μονόκλωνο τμήμα το οποίο περιλαμβάνει τη βάση ή τις βάσεις που φέρουν τη βλάβη και στη συνέχεια συνθέτουν ένα νέο τμήμα DNA για να αντικαταστήσει το υλικό που αφαιρέθηκε. Συχνά, ο ίδιος κυτταρικός τύπος διαθέτει πολλαπλά συστήματα επιδιόρθωσης εκτομής **(B)**.

**(A) BASE EXCISION REPAIR****(B) NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR**

**(A) : AP ενδονουκλεάση αναγνωρίζει θέσεις στο DNA όπου σε μια δεσοξυριβόζη λείπει η βάση ( πουρίνη ή πυριμιδίνη).**

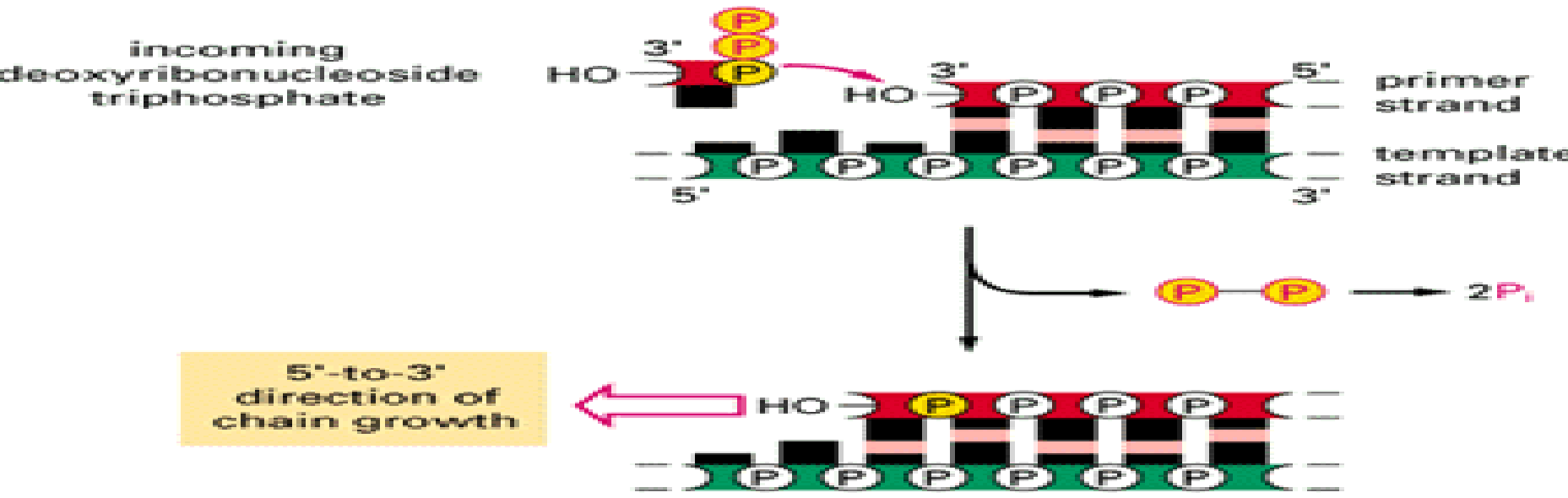
**(B) : ένα πολύ-ενζυμικό σύμπλοκο (nuclease) αναγνωρίζει π.χ. τα διμερή πυριμιδίνης κόβει εκατέρωθεν των διμερών και με την βοήθεια μιας ελικάσης ( η οποία αποτελεί μέρος του συμπλόκου ) αφαιρεί το τμήμα του κλώνου ( το οποίο στα βακτήρια είναι 12 νουκλεοτίδια ενώ στον άνθρωπο είναι τουλάχιστον 24 νουκλεοτίδια).**

**Η δράση της DNA πολυμεράσης της E. Coli συνοψίζεται κατωτέρω.**

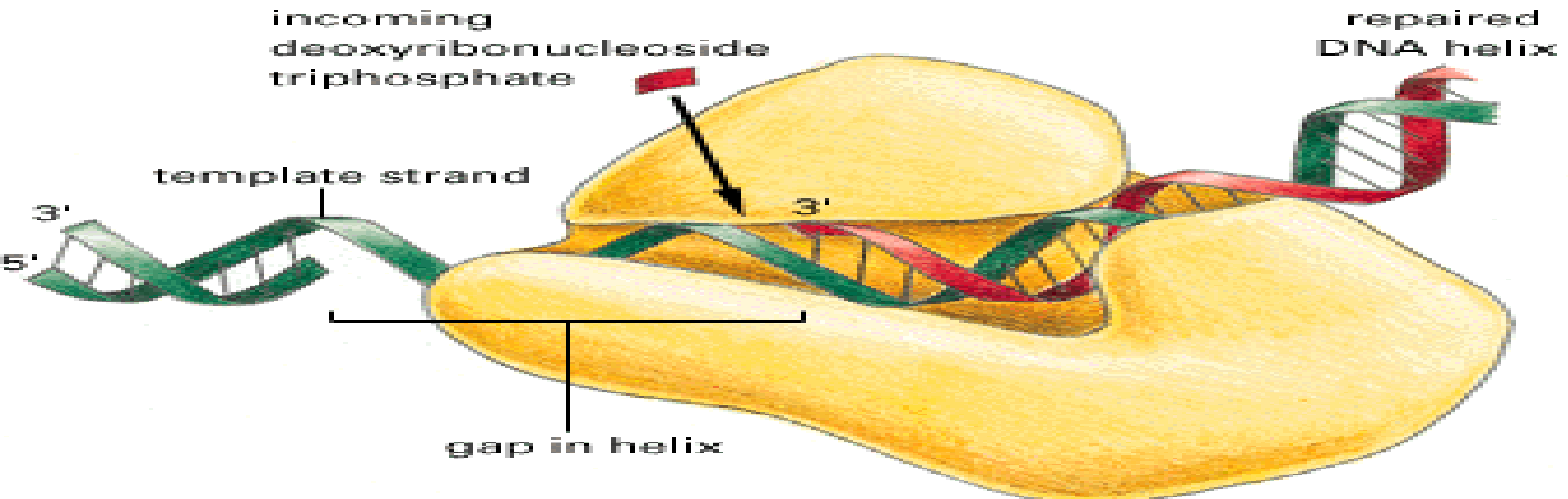
**(A) : Η DNA πολυμεράση προσθέτει σε ένα δεσοξυριβονουκλεοτίδιο στο 3' -OH μιας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας συμπληρωματικής προς τον 2ο κλώνο του DNA. Ο νέος κλώνος επεκτείνεται με κατεύθυνση από το 5' προς το 3' .**

**(B) : κάθε νεοεισερχόμενο τριφωσφορικό δεσοξυριβονουκλεοτίδιο θα πρέπει να δημιουργήσει «ζευγάρι» με το αντίστοιχο δεσοξυριβονουκλεοτίδιο του 2ου κλώνου για να αναγνωρισθεί από την DNA πολυμεράση.**

(A)



(B)



Η επιβίωση ενός οργανισμού εξαρτάται από την ακρίβεια αντιγραφής του γονιδιώματος του. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, κατά την αντιγραφή του γονιδιώματος στο βακτήριο *E. Coli* η συχνότητα λάθους κυμαίνεται από  $10^{-9}$  έως  $10^{-10}$ . Αυτή η μεγάλη ακρίβεια επιτυγχάνεται κυρίως, χάρη στον ρόλο του ενζύμου **DNA πολυμεράση III** το οποίο :

α) διαλέγει το σωστό νουκλεοτίδιο που πρέπει να εισάγει απέναντι από την αντιγραφόμενη βάση κατά την επιμήκυνση της αλυσίδας στην κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$  και β) αφαιρεί με την ιδιότητα της εξωνουκλεάσης που έχει ( $3' \rightarrow 5'$ ), τυχόν λάθος βάση που έχει εισέλθει.

**Επιπλέον όμως, η ακρίβεια της αντιγραφής διασφαλίζεται και με την επιδιόρθωση που γίνεται μετά την αντιγραφή (post replicative repair), με τους διάφορους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς.**

**Από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που υπάρχουν σε ένα κύτταρο, άλλοι δρουν επαναφέροντας το DNA στην αρχική του μορφή με αναίρεση της ίδιας βλάβης**

**δηλαδή έχουμε άμεση επιδιόρθωση, και άλλοι δρουν αποκαθιστώντας τη δικλωνικότητα του DNA με βάση την ύπαρξη γενετικής πληροφορίας στη συμπληρωματική αλυσίδα. Στη περίπτωση αυτή έχουμε έμμεση επιδιόρθωση και μπορούμε να έχουμε είτε αφαίρεση της αλλοιωμένης βάσης, είτε τμήματος βάσεων με τη μορφή ολιγονουκλεοτιδίου (επιδιόρθωση με εκτομή βάσης και επιδιόρθωση με εκτομή ολιγονουκλεοτιδίου αντίστοιχα).**

## Συστήματα επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό.

Ένα σύστημα επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό λειτουργεί λαμβάνοντας ένα αντίγραφο της απύσας αλληλουχίας από ένα φυσιολογικό ομόλογο μόριο. Το νέο αντίγραφο χρησιμοποιείται για να καλυφθεί το χάσμα, ενώ στο φυσιολογικό μόριο, που το χορήγησε, το χάσμα που δημιουργείται αποκαθίσταται με σύνθεση DNA. Όταν οι δίκλωνες ρήξεις προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (για παράδειγμα, λόγω ακτινοβολίας) ή από βράχυνση των τελομερών, μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις.

Τα σημαντικότερα από τα γνωστά αυτά μονοπάτια είναι το **σύστημα επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό *uvr***, το **μεθυλο-εξαρτώμενο σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστου ζεύγους**, καθώς και τα μονοπάτια ανασυνδυασμού και επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό ***recBC*** και ***recF***.

Οι ενζυμικές ενεργότητες που σχετίζονται με αυτά τα συστήματα είναι ενδονουκλεάσες και εξωνουκλεάσες (σημαντικές για την απομάκρυνση τμημάτων DNA με βλάβη), ρεσολβάσες (ενδονουκλεάσες που δρουν ειδικά στα σημεία ανασυνδυασμού), ελικάσες (που καταλύουν την αποπεριέλιξη του DNA), αλλά και DNA πολυμεράσες (που συνθέτουν νέο DNA).

## Συστήματα επιδιόρθωσης εκτομής στην *E. Coli*

Ο βασικός μηχανισμός της επιδιόρθωσης εκτομής.

Στο βήμα της **τομής** (incision), η θέση που φέρει τη βλάβη αναγνωρίζεται από μία ενδονουκλεάση η οποία διασπά τον κλώνο του DNA και από τις δύο πλευρές της βλάβης.

Στο βήμα της **εκτομής** (excision), μία εξωνουκλεάση που λειτουργεί στην κατεύθυνση 5' → 3' αφαιρεί το τμήμα του κλώνου που φέρει τη βλάβη.

Στο βήμα της **σύνθεσης**, η μονόκλωνη περιοχή που προκύπτει λειτουργεί ως μήτρα, ώστε η DNA πολυμεράση να συνθέσει ένα τμήμα που θα αντικαταστήσει την αλληλουχία που αφαιρέθηκε.

Τέλος, μία DNA λιγάση συνδέει μέσω ομοιοπολικού δεσμού το 3' άκρο του νέου υλικού με το παλαιό υλικό.

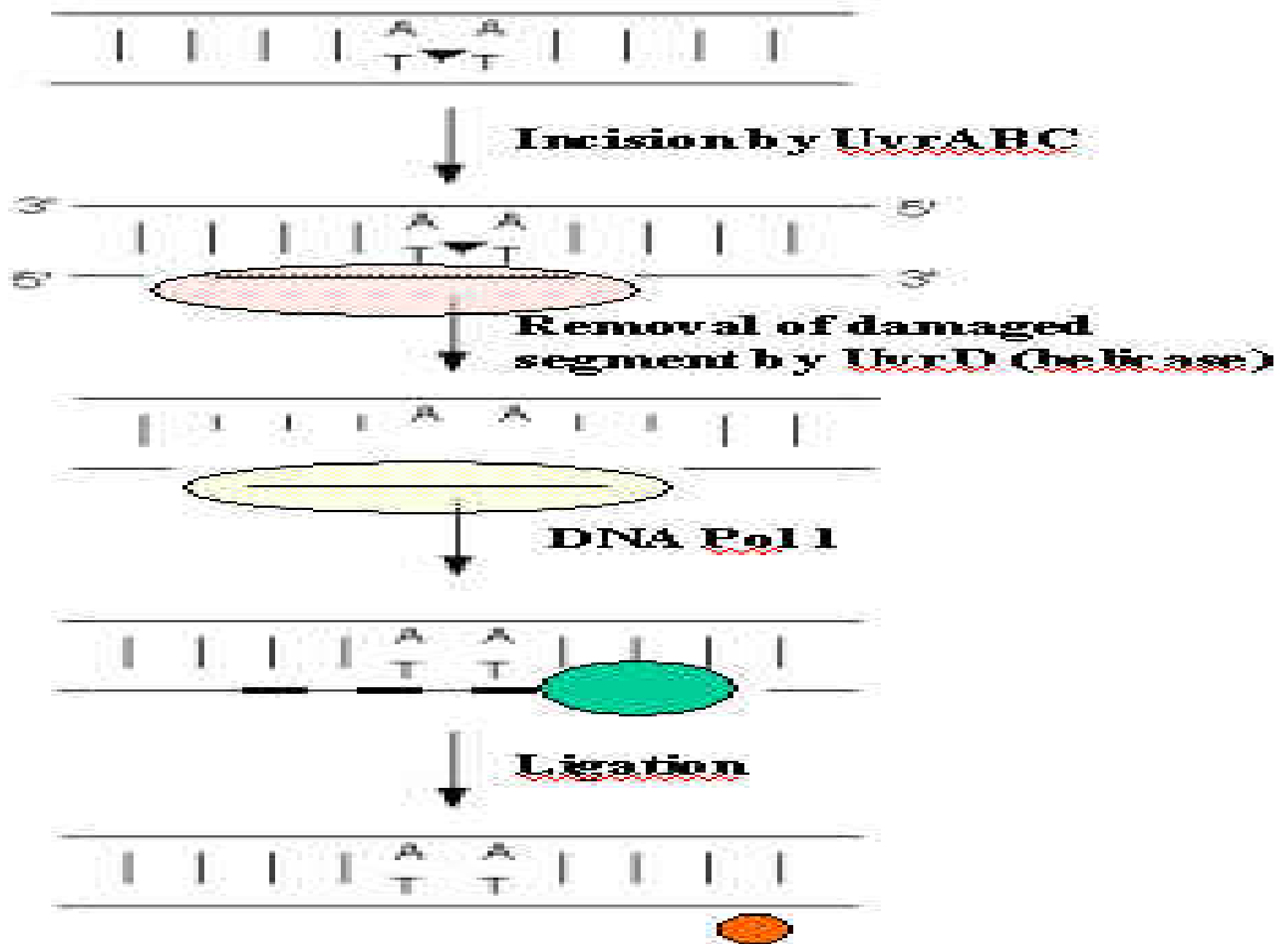
**Το σύστημα επιδιόρθωσης εκτομής *uvr* περιλαμβάνει τρία γονίδια, τα *uvrA,B,C*, που κωδικοποιούν τα μέρη μιας επιδιορθωτικής ενδονουκλεάσης.**

**Αρχικά το σύμπλοκο *UvrAB* αναγνωρίζει τα διμερή πυριμιδίνης ή άλλες ογκώδεις αλλοιώσεις. Τότε η *UvrA* αποσυνδέεται (αυτό απαιτεί **ATP**) και *UvrC* ενώνεται με τη *UvrB*.**

**Το σύμπλοκο *UvrBC* κάνει μία τομή σε κάθε πλευρά, τη μία σε απόσταση 7 νουκλεοτιδίων από το 5' άκρο της θέσης με τη βλάβη και την άλλη σε απόσταση 3-4 νουκλεοτιδίων από το 3' άκρο της ίδιας θέσης (αυτό επίσης απαιτεί **ATP**).**

Η *UvrD* είναι μια ελικάση που βοηθάει στην αποπεριέλιξη του DNA, έτσι ώστε να επιτραπεί η απελευθέρωση του μονού κλώνου ανάμεσα στις δύο τομές. Το ένζυμο που αφαιρεί τον κλώνο με τη βλάβη είναι η DNA πολυμεράση I. Το ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση του νέου DNA είναι πιθανόν η DNA πολυμεράση I (αν και οι DNA πολυμεράσες II και III μπορούν να την αντικαταστήσουν). Στο 99% των περιπτώσεων, το μέσο μήκος του DNA που αντικαθίσταται είναι ~12 νουκλεοτίδια. Στο υπόλοιπο 1% των περιπτώσεων εμπλέκονται τμήματα DNA με μήκος ~1.500 νουκλεοτιδίων, αλλά μπορεί και να ξεπερνούν τα 9.000 νουκλεοτίδια (η διαδικασία αυτή ονομάζεται επιδιόρθωση μακρού τμήματος – long-patch repair).





## Excision Repair

## Μηχανισμός απόσπασης βάσης από μεθυλάσες και γλυκοζυλάσες

Οι γλυκοζυλάσες (glycosylases) και οι λυάσες (lyases) μπορούν επίσης να αφαιρούν βάσεις από μια λυσίδα DNA.

Μια γλυκοζυλάση διασπά το δεσμό ανάμεσα στη δεσοξυριβόζη και στην αταίριαστη ή προβληματική βάση. Κάποιες γλυκοζυλάσες είναι παράλληλα και λυάσες, δηλαδή μπορούν να προωθήσουν την αντίδραση κατά ένα ακόμη βήμα, χρησιμοποιώντας μία αμινομάδα (NH<sub>2</sub>) για να προσβάλουν χημικά το δακτύλιο της δεσοξυριβόζης. Μία από τις πιο συχνές αντιδράσεις, κατά την οποία μία βάση απομακρύνεται άμεσα από το DNA, καταλύεται από την DNA γλυκοζυλάση της ουρακίλης (uracil-DNA glycosylase). Η παρουσία ουρακίλης στο DNA συνήθως οφείλεται στην αυθόρμητη απαμίνωση της κυτοσίνης. Η ουρακίλη αναγνωρίζεται από τη γλυκοζυλάση και απομακρύνεται.

Οι αλκυλιωμένες βάσεις (στις οποίες έχει συνήθως προσδεθεί μια μεθυλομάδα) αφαιρούνται με έναν παρόμοιο μηχανισμό. Ένα μόνο ένζυμο στον άνθρωπο, η DNA γλυκοζυλάση της αλκυλαδενίνης (**alkyladenine DNA glycosylase** – AAG), αναγνωρίζει και απομακρύνει ποικιλία αλκυλιωμένων υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένης της 3-μεθυλαδενίνης, της 7-μεθυλγουανίνης κ.α.

Η 1-μεθυλαδενίνη διορθώνεται από ένα ένζυμο που χρησιμοποιεί ένα διαφορετικό μηχανισμό, ο οποίος βασίζεται στην οξυγόνωση της μεθυλομάδας.

Στην *E. coli*, το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από το γονίδιο *alkB*, ομόλογα του οποίου είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και περιλαμβάνουν τρία γονίδια στον άνθρωπο. Η μεθυλομάδα οξειδώνεται σε –CH<sub>2</sub>OH και με την απελευθέρωση -HCHO (φορμαλδεΰδη) αποκαθίσταται η δομή της αδενίνης.

Τόσο το βακτηριακό ένζυμο όσο και ένα από τα ανθρώπινα ένζυμα μπορούν επίσης να επιδιορθώσουν την ίδια προβληματική βάση σε μόρια RNA. Στην περίπτωση του ανθρώπινου ενζύμου, ο κύριος στόχος μπορεί να είναι ριβοσωμικό RNA. Πρόκειται για την πρώτη γνωστή περίπτωση επιδιόρθωσης που έχει ως στόχο το RNA.

Όταν αφαιρεθεί μία βάση από το DNA, ακολουθεί εκτομή του φωσφοδιεστερικού σκελετού από μία ενδονουκλεάση. Ακολούθως, πραγματοποιείται σύνθεση DNA από μία DNA πολυμεράση, η οποία γεμίζει το χάσμα που δημιουργείται από την ενδονουκλεάση. Τέλος, γίνεται σύνδεση των ελεύθερων άκρων του νεοσύστατου και του προϋπάρχοντος τμήματος από μία λιγάση, έτσι ώστε να αποκατασταθεί η ακεραιότητα της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας

Τα γονίδια *mut* κωδικοποιούν ένα σύστημα που στοχεύει στην επιδιόρθωση αταίριαστων ζευγών βάσεων.

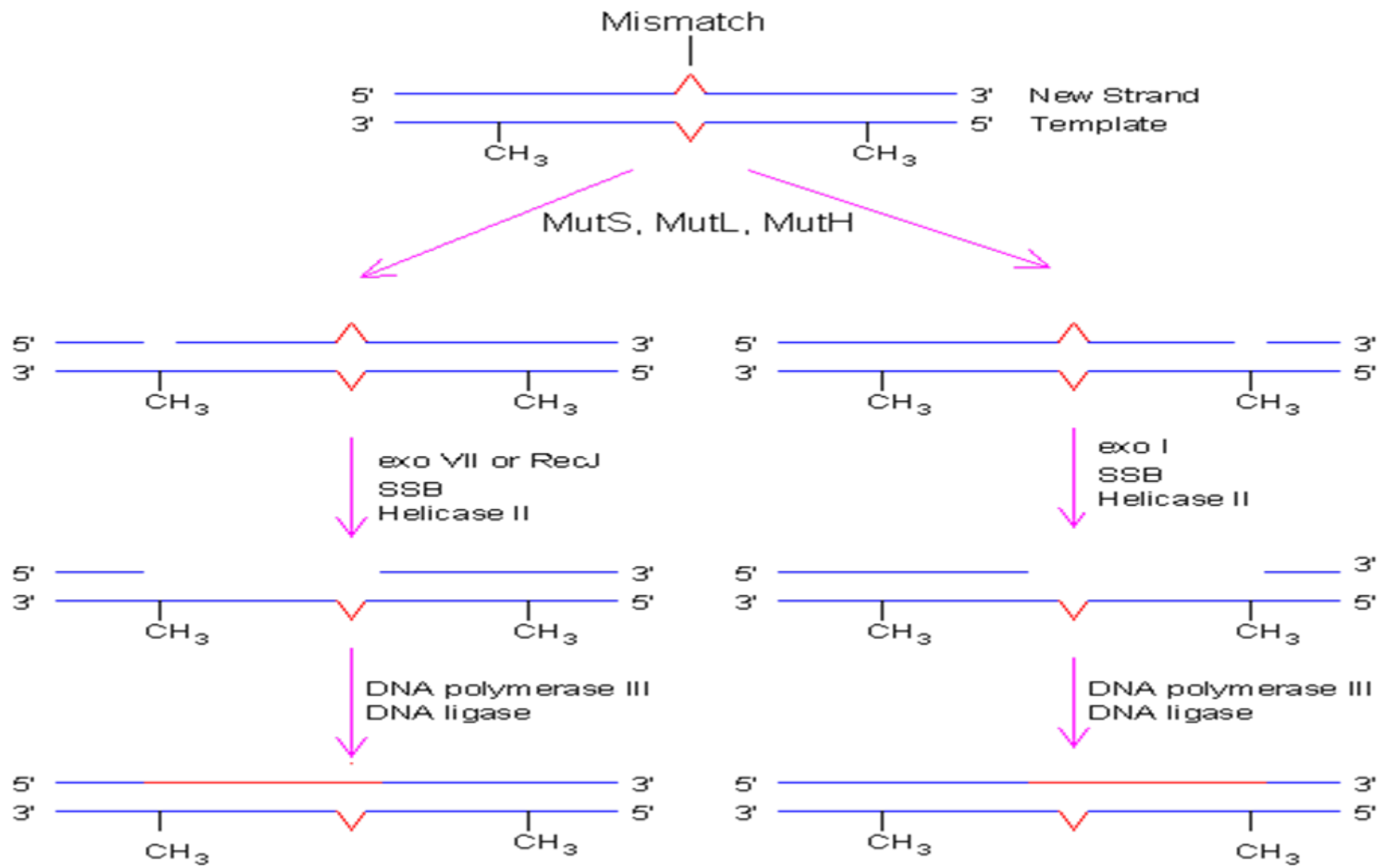
Υπάρχει μια στατιστική προκατάληψη (bias) στην επιλογή του κλώνου που θα αντικατασταθεί στα αταίριαστα σημεία.

Ο νεοσύστατος κλώνος διακρίνεται από το γεγονός ότι στερείται μεθυλίωσης στις ημιμεθυλιωμένες θέσεις GATC/CTAG και είναι αυτός που συνήθως επιδιορθώνεται. Σε αταίριαστα ζεύγη G·T και C·T αφαιρείται κατά προτίμηση η T. Οι ενεργότητες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mut* κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες:

**Στην πρώτη και κυριότερη ομάδα περιλαμβάνονται στοιχεία των συστημάτων επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων. Η μη απομάκρυνση πριν από την αντιγραφή των αταίριαστων βάσεων ή των βάσεων με βλάβη οδηγεί σε μεταλλάξεις.**

Σε αυτή την ομάδα συγκαταλέγονται λειτουργίες όπως της μεθυλοτρανσφεράσης, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *dam* και αναγνωρίζει το στόχο για επιδιόρθωση,

καθώς και ένζυμα που συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στην αποκατάσταση συγκεκριμένων τύπων βλάβης (*mutH*, *S*, *L*, *Y*). Σε μια μικρότερη ομάδα, που κωδικοποιεί μια υπομονάδα της DNA πολυμεράσης III, περιλαμβάνονται γονίδια που ελέγχουν την ακρίβεια με την οποία συντίθεται νέο DNA.



Για να διορθωθούν οι αταίριαστες βάσεις το σύστημα επιδιόρθωσης θα πρέπει να μπορεί να διακρίνει την σωστή από την λαθασμένη βάση. Στην *E. coli*, αυτό επιτυγχάνεται από μια ειδική μεθυλάση την "Dam methylase", η οποία μεθυλιώνει την Αδενίνη που συναντιέται στην αλληλουχία (5')GATC . Μετά τον αναδιπλασιασμό του DNA , ο κλώνος μήτρα είναι μεθυλιωμένος αλλά όχι ακόμη ο νεοσυντεθειμένος. Έτσι είναι δυνατόν να ξεχωρίσουν οι δύο κλώνοι.

**Η πρωτεΐνη MutS συνδέεται στο αταίριαστο ζεύγος. Τότε η MutL προσελκύεται από το σύμπλοκο και ενεργοποιεί την MutH η οποία συνδέεται στην αλληλουχία GATC και κόβει τον μη μεθυλιωμένο κλώνο στην αλληλουχία GATC. Εν συνεχεία το τμήμα αυτό αφαιρείται με την βοήθεια μίας εξωνουκλεάσης της ελικάσης II. Αν η κοπή πραγματοποιείται στην 3' πλευρά του αταίριαστου ζευγαρώματος η αντίδραση πραγματοποιείται από την εξωνουκλεάση I (η οποία κόβει το μονόκλωνο DNA στην κατεύθυνση 3' προς 5' ). Αν η κοπή λαμβάνει χώρα στην 5' πλευρά του αταίριαστου ζευγαρώματος η εξωνουκλεάση VII ή η RecJ χρησιμοποιούνται για την κοπή του μονόκλωνου DNA. Το κενό συμπληρώνεται από την DNA polymerase III και την DNA ligase.**

**Στον άνθρωπο ομόλογα του MutS είναι τα MSH1 to MSH5 ενώ MLH1, PMS1 and PMS2 είναι ομόλογα του MutL. Μεταλλάξεις των MSH2, PMS1 και PMS2 συνδέονται με τον καρκίνο του παχέως εντέρου.**

**Στις περισσότερες περιπτώσεις, η παραμόρφωση οφείλεται στη δημιουργία μιας βάσης που δεν υπάρχει φυσιολογικά στο DNA και η οποία αναγνωρίζεται και απομακρύνεται από το σύστημα επιδιόρθωσης.**

**Όταν όμως ο στόχος της επιδιόρθωσης είναι ένα αταίριαστο ζεύγος βάσεων, τότε, θεωρητικά, το σύστημα επιδιόρθωσης δεν έχει τρόπο να γνωρίζει ποια είναι η βάση άγριου τύπου και ποια η μεταλλαγμένη . Αυτό που αντιλαμβάνεται είναι δύο λανθασμένα ζευγαρωμένες βάσεις, καθεμιά από τις οποίες θα μπορούσε να αποτελεί στόχο για επιδιόρθωση εκτομής. Αν αφαιρεθεί η αλλαγμένη βάση, τότε αποκαθίσταται η αλληλουχία άγριου τύπου. Αν όμως η βάση που αφαιρείται είναι η αρχική (άγριου τύπου), τότε θα προκύψει μια νέα (μεταλλαγμένη) αλληλουχία και θα εγκαθιδρυθεί.**

**Ωστόσο, η κατεύθυνση της επιδιόρθωσης εκτομής συχνά δεν είναι τυχαία, αλλά εμφανίζει στατιστική προκατάληψη (bias), έτσι ώστε να ευνοείται η αποκατάσταση της αλληλουχίας άγριου τύπου.**

Το σύστημα *mutT*, *M*, *Y*, διαχειρίζεται τις επιπτώσεις της οξειδωτικής βλάβης. Το σημαντικότερο είδος χημικής βλάβης προκαλείται από οξείδωση της G σε 8-οξο-G.

Η MutT υδρολύει το πρόδρομο μόριο (8-οξο-dGTP), αποτρέποντας την εισαγωγή του στο DNA. Όταν όμως η γουανίνη που οξειδώνεται βρίσκεται ήδη πάνω στο DNA, η συμπληρωματική της βάση εξακολουθεί να είναι η κυτοσίνη.

Το σύστημα MutM αφαιρεί κατά προτίμηση την G από τα ζεύγη 8-οξο-G·C.

Η οξειδωμένη γουανίνη μπορεί επίσης να ζευγαρώσει αταίριαστα με A και έτσι, όταν η 8-οξο-G παραμείνει στην αλυσίδα και αντιγραφεί, δημιουργεί ένα ζεύγος 8-οξο-G·A.

Η MutY αφαιρεί την A από τέτοια ζεύγη. Οι MutM και MutY είναι γλυκοζυλάσες που αφαιρούν άμεσα μία βάση από το DNA.

Αυτό δημιουργεί μια θέση χωρίς πουρίνες που αναγνωρίζεται από την ενδονουκλεάση, η δράση της οποίας ενεργοποιεί το σύστημα επιδιόρθωσης εκτομής.

Αμέσως μετά την αντιγραφή μεθυλιωμένου DNA, μόνο ο αρχικός πατρικός κλώνος φέρει μεθυλομάδες. Κατά την περίοδο που μεσολαβεί μέχρι να προστεθούν μεθυλομάδες στο νεοσυντιθέμενο κλώνο, οι δύο κλώνοι μπορούν να διακριθούν ο ένας από τον άλλο. Το γονίδιο *dam* κωδικοποιεί μία μεθυλάση, ο στόχος της οποίας είναι η αδενίνη στην αλληλουχία GATC/CTAG. Το DNA που περιέχει αταίριαστα ζεύγη βάσεων επιδιορθώνεται κατά προτίμηση με εκτομή του μη μεθυλιωμένου κλώνου. Η εκτομή είναι αρκετά εκτεταμένη. Αταίριαστα ζεύγη μπορούν να επιδιορθωθούν σε απόσταση μεγαλύτερη από 1 kb γύρω από μία θέση GATC, με αποτέλεσμα η αλληλουχία του νεοσύστατου κλώνου να ταιριάζει στην αλληλουχία του πατρικού.

Τα μεταλλάγματα *dam-* της *E. Coli* παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό αυθόρμητων μεταλλάξεων. Συνεπώς αυτό το σύστημα επιδιόρθωσης βοηθάει στη μείωση των μεταλλάξεων που δημιουργούνται από σφάλματα κατά την αντιγραφή.

Αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια *mut*. Αρχικά η MutS προσδένεται στο αταίριαστο ζεύγος και στη συνέχεια συνδέεται μαζί τους η MutL. Η MutS μπορεί να χρησιμοποιήσει δύο θέσεις πρόσδεσης στο DNA.

Η πρώτη αναγνωρίζει με ειδικότητα αταίριαστα ζεύγη.

Η δεύτερη δεν εμφανίζει ειδικότητα ως προς την αλληλουχία ή τη δομή του DNA στη θέση της βλάβης, αλλά μετακινείται κατά μήκος του DNA, μέχρι να συναντήσει μια αλληλουχία GATC. Η αναγνώριση της αλληλουχίας GATC γίνεται αιτία για την πρόσδεση της ενδονουκλεάσης MutH στο σύμπλοκο MutSL.

Η ενδονουκλεάση διασπά τότε το μη μεθυλιωμένο κλώνο. Ακολούθως, ο κλώνος αυτός υφίσταται εκτομή από το σημείο GATC μέχρι το σημείο του αταίριαστου ζεύγους βάσεων. Η εκτομή μπορεί να γίνει είτε προς την κατεύθυνση 5' → 3' (χρησιμοποιώντας τη RecJ ή την εξωνουκλεάση VII) είτε προς την κατεύθυνση 3' → 5' (χρησιμοποιώντας την εξωνουκλεάση I) και υποβοηθείται από την ελικάση UvrD.

Το χάσμα που δημιουργείται κλείνει με σύνθεση DNA από την DNA πολυμεράση III.



**Ομόλογα του συστήματος MutSL υπάρχουν και στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση αταίριαστων ζευγών που προκύπτουν λόγω ολίσθησης των κλώνων κατά την αντιγραφή. Σε μικροδορυφορικές (microsatellite) περιοχές, όπου μία πολύ μικρή αλληλουχία επαναλαμβάνεται πολλές φορές, η επανευθυγράμμιση ανάμεσα στο νεοσύστατο θυγατρικό κλώνο και στη μήτρα του μπορεί να προκαλέσει «γλίστρισμα» της DNA πολυμεράσης: το ένζυμο γλιστράει προς τα πίσω και συνθέτει επιπλέον επαναλαμβανόμενες μονάδες. Αυτές οι επιπλέον μονάδες του θυγατρικού κλώνου προεκβάλλουν από τη διπλή έλικα ως ένας μονόκλωνος βρόχος. Η επιδιόρθωση γίνεται από συστήματα ομόλογα του MutSL. Η σημασία του συστήματος MutSL υποδηλώνεται και από το γεγονός ότι συχνά διαπιστώνεται πως υπολειτουργεί σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου. Απώλεια αυτού του συστήματος οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού μεταλλαξιγένεσης.**

***Η αναποτελεσματικότητα των συστημάτων επιδιόρθωσης προκαλεί συσσώρευση μεταλλάξεων και δημιουργία όγκων.***

**ΕΝΖΥΜΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΣΤΗΝ *E. coli*.**

Repair System	Enzymes/proteins	Repair System	Enzymes/proteins
Base excision	DNA glycosylase	Mismatch	Dam methylase
	AP endonuclease		MutS, MutL, MutH
	DNA polymerase I		Exonuclease
	DNA ligase		DNA helicase II
Nucleotide excision	Uvr-A, Uvr-B, Uvr-C		SSB protein
	DNA polymerase I		DNA polymerase III
	DNA ligase		DNA ligase

**Συστήματα επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό στην *E. coli***

**Ο βασικός ρόλος των συστημάτων διόρθωσης με ανασυνδυασμό φαίνεται να είναι η επανεκκίνηση μιας σταματημένης αντιγραφικής διχάλας.**

**Ας υποθέσουμε πως υπάρχει μια δομική παραμόρφωση , ένα διμερές πυριμιδίνης, σε έναν κλώνο της διπλής έλικας.**

**Κατά την αντιγραφή του DNA, το διμερές εμποδίζει το σημείο με τη βλάβη να λειτουργήσει ως μήτρα. Η DNA πολυμεράση, μόλις φτάσει στο διμερές πυριμιδίνης ή κοντά σε αυτό, σταματά τη σύνθεση του αντίστοιχου θυγατρικού κλώνου. Η αντιγραφή ξεκινά πάλι μετά από κάποια απόσταση, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα χάσμα στον νεοσύστατο κλώνο. Τα θυγατρικά δίκλιωνα που προκύπτουν έχουν διαφορετική σύσταση.**

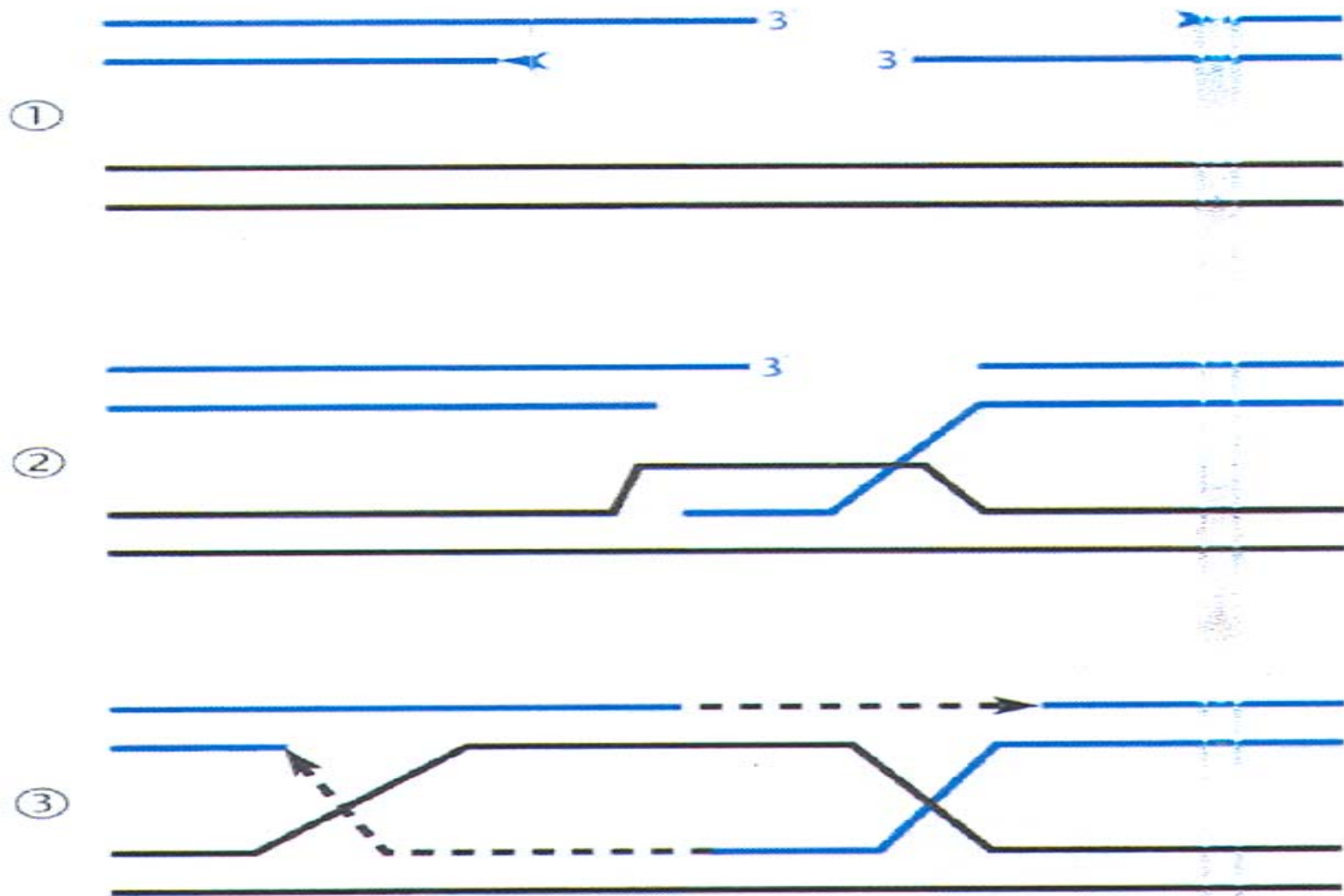
**Το ένα αντίγραφο περιέχει τον πατρικό κλώνο με τη δομική παραμόρφωση απέναντι από ένα χάσμα στο νεοσύστατο κλώνο. Το άλλο αντίγραφο περιέχει τον άθικτο πατρικό κλώνο και ένα φυσιολογικό κλώνο που έχει προκύψει από αυτόν.**

**Το σύστημα επιδιόρθωσης επωφελείται από την παρουσία του φυσιολογικού θυγατρικού δίκλωνου. Το χάσμα απέναντι από τη θέση με τη βλάβη στο πρώτο δίκλιωνα συμπληρώνεται δανειζόμενο τον ομόλογο μονό κλώνο από το φυσιολογικό δίκλιωνα.**

**Μετά από αυτή την ανταλλαγή μονού κλώνου (single strand exchange), το δίκλιωνα-δέκτης φέρει έναν πατρικό κλώνο (με βλάβη) απέναντι από έναν κλώνο άγριου τύπου. Το δίκλιωνα-δότης αποτελείται από ένα φυσιολογικό πατρικό κλώνο και έναν κλώνο με χάσμα. Αυτό το χάσμα, το οποίο τώρα βρίσκεται απέναντι από ένα φυσιολογικό κλώνο, μπορεί να συμπληρωθεί μέσω επιδιορθωτικής σύνθεσης κατά το συνήθη τρόπο, ώστε να σχηματιστεί ένα φυσιολογικό δίκλιωνα μόριο.**

Τα ίδια γεγονότα επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό πρέπει να επαναληφθούν μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής, έως ότου αφαιρεθεί η βλάβη από ένα σύστημα επιδιόρθωσης εκτομής.

1. Η αντιγραφική διχάλα σταματάει στη θέση της βλάβης. Μια ρεσολβή κόβει τον κόμβο και δημιουργεί μια δίκλωνη ρήξη.



**Το κυριότερο μονοπάτι επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό στην *E. coli* είναι αυτό των γονιδίων *rec*. Ένα καλά μελετημένο μονοπάτι *rec* περιλαμβάνει τα γονίδια *recBC*, ενώ το *recF* εμπλέκεται σε ένα δεύτερο μονοπάτι, για το οποίο γνωρίζουμε λιγότερα.**

**Το μονοπάτι *RecBC* εμπλέκεται στην επανέναρξη μιας σταματημένης αντιγραφικής διχάλας. Το μονοπάτι *RecF* εμπλέκεται στην επιδιόρθωση των χασμάτων που παραμένουν στο θυγατρικό κλώνο, όταν η αντιγραφή προσπεράσει ένα διμερές πυριμιδίνης.**

**Τα συστήματα *RecBC* και *RecF*, αν και λειτουργούν με διαφορετικούς τρόπους, καταλήγουν και τα δύο στη *RecA*, οδηγώντας στη σύνδεσή της με μονόκλωνο DNA. Η ικανότητα της *RecA* να ανταλλάσσει μονούς κλώνους της επιτρέπει να εκτελέσει την ανταλλαγή μονού κλώνου. Στη συνέχεια, ενεργότητες νουκλεασών και πολυμερασών ολοκληρώνουν την επιδιόρθωση.**

**Τα μονοπάτια *uvr* και *rec* δεν είναι εντελώς ανεξάρτητα, γιατί στα μεταλλάγματα *uvr* η αποτελεσματικότητα της επιδιόρθωσης ανασυνδυασμού είναι μειωμένη. Τα συστήματα επιδιόρθωσης αποτελούνται από ένα δίκτυο ενεργοτήτων νουκλεάσης, πολυμεράσης και άλλων ενζύμων, τα οποία επικαλύπτονται μερικώς.**

**Τα μονοπάτια επιδιόρθωσης εκτομής μπορούν, θεωρητικά, να χρησιμοποιηθούν ανά πάσα στιγμή.**

Αντίθετα, η επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό προϋποθέτει ότι υπάρχει διαθέσιμο ένα δεύτερο δίκλωνο αντίγραφο της αλληλουχίας που έχει τη βλάβη, δηλαδή μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο μετά την αντιγραφή.

**Αντιγραφικές διχάλες που έχουν σταματήσει μπορεί να διασωθούν μέσω επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό.**

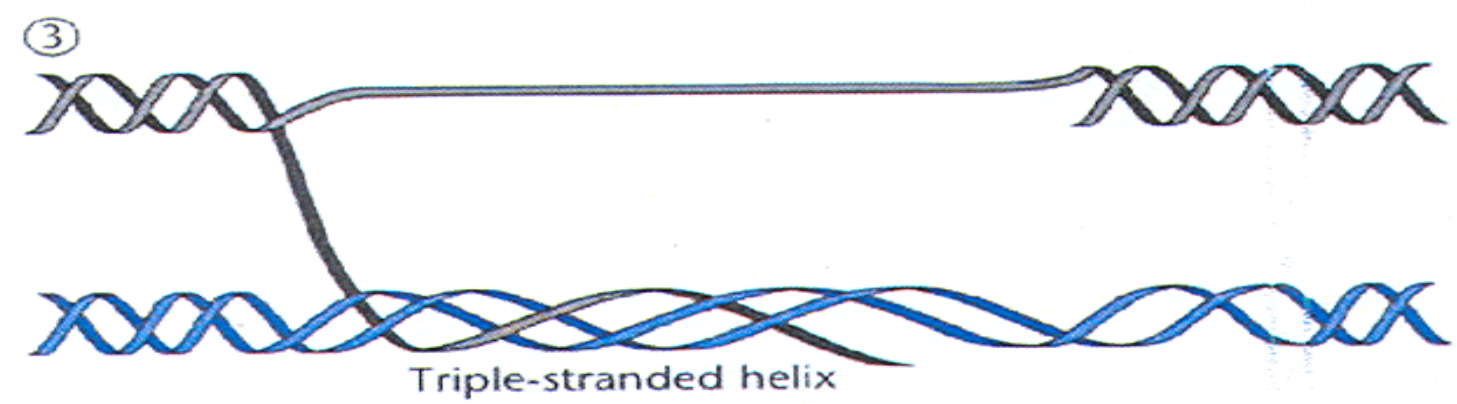
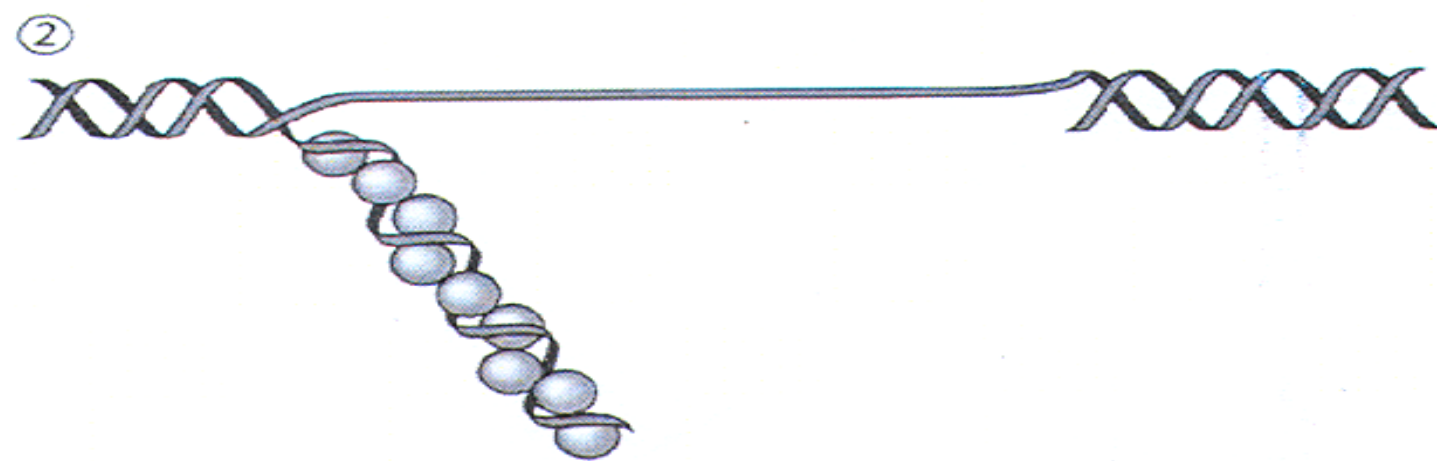
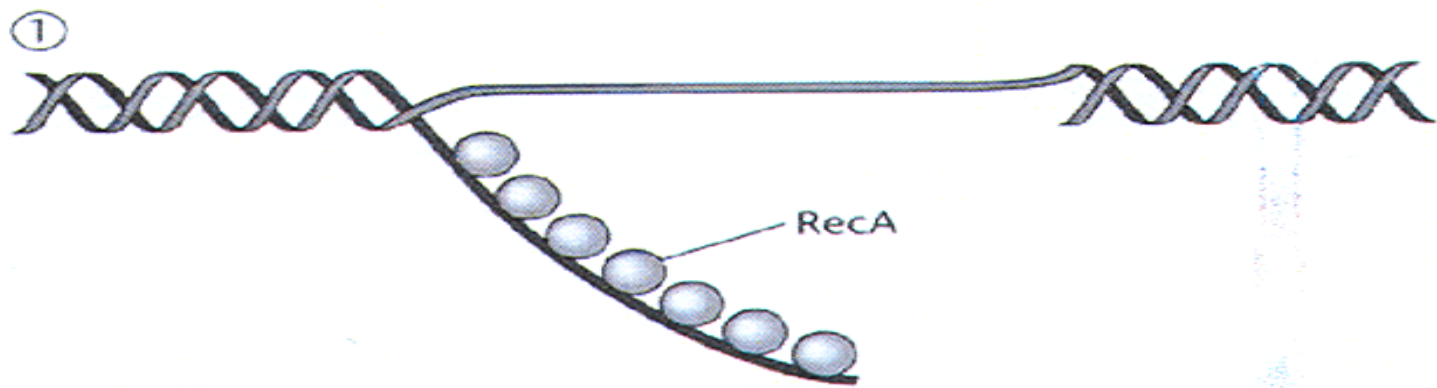
**Δεν γνωρίζουμε ακριβώς τη σειρά των γεγονότων, αλλά η παραδοχή είναι ότι συμβαίνει ανασυνδυασμός εκατέρωθεν του σημείου με τη βλάβη, επιτρέποντας σε έναν κλώνο χωρίς βλάβη να ζευγαρώσει με τον κλώνο που έχει τη βλάβη.**

**Αυτό επιτρέπει στην αντιγραφική διχάλα να ανασχηματιστεί ώστε να συνεχιστεί η αντιγραφή, ουσιαστικά παρακάμπτοντας το σημείο με τη βλάβη.**

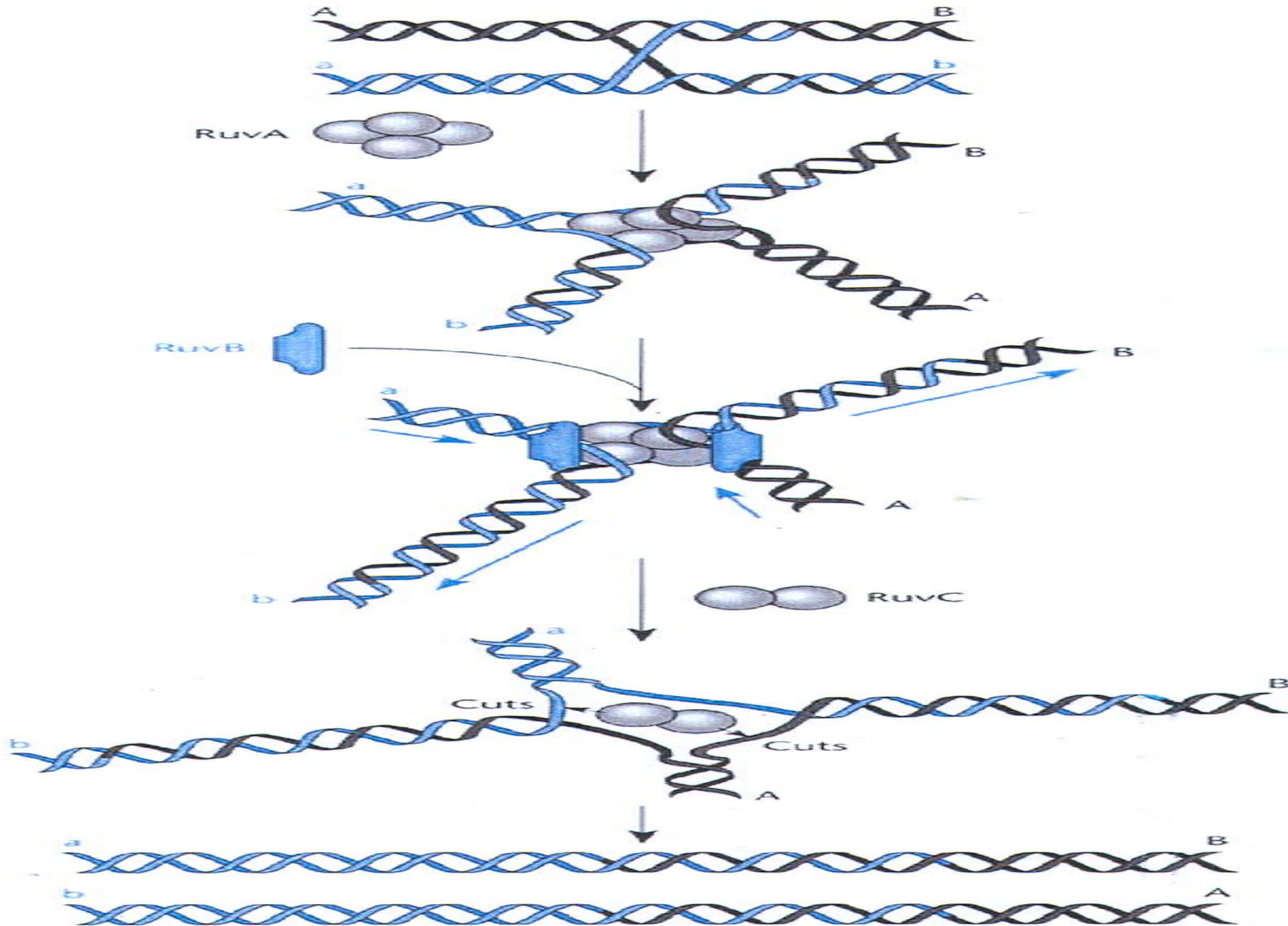
Στην *E. coli*, το σύστημα RecBC παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό σε σταματημένες αντιγραφικές διχάλες.

**Στα βήματα 1 και 2 της κατωτέρω εικόνας η πρωτεΐνη RecA συνδέεται στα άκρα του μονόκλωνου DNA προσδίδοντάς του μια σαφώς ελικοειδή δομή.**

**Στο βήμα 3 το μονόκλωνο DNA ελικοειδούς δομής συνδέεται σε ένα ομόλογο δίκλωνο DNA στην μεγάλη αύλακά του για να σχηματίσει μια δομή τριπλής έλικας.**



Οι πρωτεΐνες RuvA συνδέονται στην δομή Holliday η οποία αποτελείται από δύο δίκλινα μόρια ( AB & ab ). Τότε η πρωτεΐνη RuvB συνδέεται με την RuvA προκαλώντας την σύνδεση της RuvC στην δομή Holliday με ταυτόχρονη αποδέσμευση των RuvA και RuvB. Η RuvC κόβει τους δύο κλώνους της δομής Holliday αποδίδοντας δύο δίκλινα μόρια DNA ( aB & bA ).





## Η RecA και το σύστημα SOS

Διάφορες κατεργασίες οι οποίες προκαλούν βλάβες στο DNA ή αναστέλλουν την αντιγραφή ενεργοποιούν μια ιδιότυπη ενεργότητα «συν-πρωτεάσης» (co-protease) της RecA. Μέσω αυτής, η RecA μπορεί να επάγει την αυτοπρωτεόλυση ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, προκαλώντας έτσι μια περίπλοκη διαδοχή γεγονότων που ονομάζεται **απόκριση SOS** (SOS response) και στην οποία εμπλέκεται η έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιδιόρθωσης.

Η βλάβη που επάγει την απόκριση SOS μπορεί να προκαλείται από υπεριώδη ακτινοβολία ή από ομοιοπολική χημική σύνδεση ή από παράγοντες αλκυλίωσης. Η απόκριση SOS οδηγεί σε αύξηση της δυνατότητας για επιδιόρθωση βλαβών του DNA, γεγονός που επιτυγχάνεται με επαγωγή της σύνθεσης των πρωτεϊνών τόσο του συστήματος επιδιόρθωσης εκτομής μακρού τμήματος όσο και των μονοπατιών Rec που ενέχονται στην επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό. Επιπλέον, αναστέλλεται η κυτταρική διαίρεση.

Το αρχικό βήμα της απόκρισης είναι η επαγωγή της ενεργότητας συν-πρωτεάσης της RecA από κάποιον επιβλαβή παράγοντα. *In vitro*, η ενεργοποίηση της RecA απαιτεί την παρουσία μονόκλωνου DNA και ATP. Συνεπώς το σήμα ενεργοποίησης θα μπορούσε να είναι η παρουσία μιας μονόκλωνης περιοχής στο σημείο της βλάβης. Η ενεργοποίηση της RecA προκαλεί την πρωτεολυτική διάσπαση του προϊόντος του γονιδίου *lexA*.

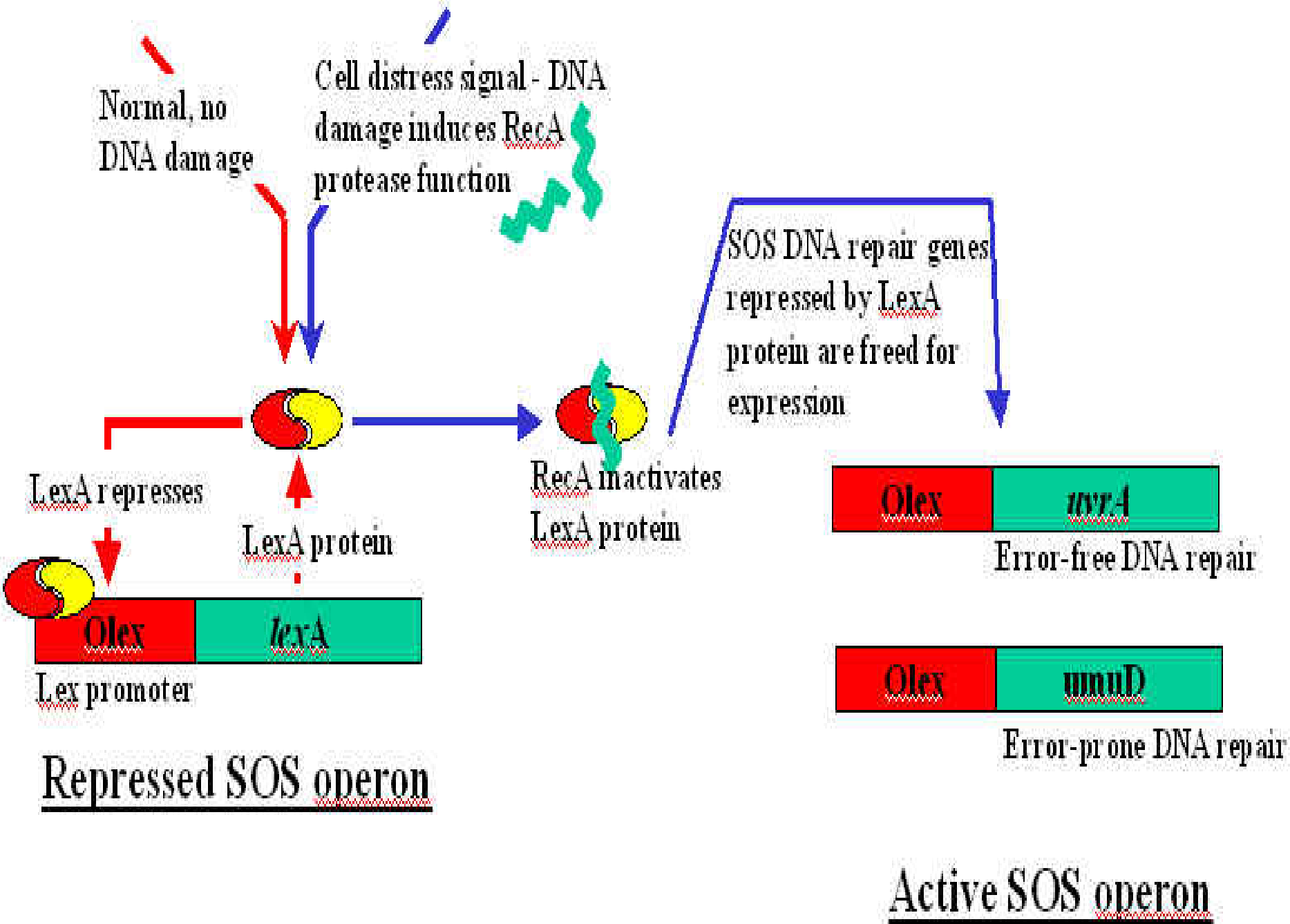
**Η LexA είναι μια μικρή πρωτεΐνη (22kD) η οποία λειτουργεί ως καταστολέας πολλών οπερονίων και είναι σχετικά σταθερή σε κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί σε επιβλαβείς παράγοντες. Η LexA έχει λανθάνουσα ενεργότητα πρωτεάσης που επάγεται από τη RecA.**

**Όταν η RecA ενεργοποιείται, εξαναγκάζει τη LexA να υποστεί μια αυτοκαταλυτική διάσπαση που προκαλεί την αδρανοποίησή της. Αυτό έχει ως φυσικό επακόλουθο τη συγχρονισμένη έκφραση όλων των οπερονίων τα οποία κανονικά καταστέλλονται από τη LexA.**

**Στα γονίδια που καταστέλλει η LexA περιλαμβάνονται αρκετά που κωδικοποιούν λειτουργίες επιδιόρθωσης. Στην περίπτωση του *uvrB*, το οποίο είναι μέλος του συστήματος επιδιόρθωσης εκτομής, το γονίδιο έχει δύο υποκινητές; ο ένας απ' αυτούς λειτουργεί ανεξάρτητα από τη LexA, ενώ ο άλλος υπόκειται στον έλεγχό της. Συνεπώς, μετά τη διάσπαση της LexA το γονίδιο μπορεί να εκφράζεται και από τους δύο υποκινητές.**

Η LexA καταστέλλει τα γονίδια-στόχους της μέσω πρόσδεσης σε ένα τμήμα DNA μήκους 20 bp που ονομάζεται **πλαίσιο SOS** (SOS box) και περιλαμβάνει μια αλληλουχία με 8 απολύτως συντηρημένες θέσεις. Η RecA ενεργοποιεί τη διάσπαση της LexA, η οποία παύει έτσι να καταστέλλει τόσο το γονίδιο *recA* όσο και το δικό της. Επομένως η απόκριση SOS προκαλεί αύξηση των επιπέδων τόσο της πρωτεΐνης RecA όσο και του καταστολέα LexA. Μετά την επαγωγή, η ποσότητα της RecA αυξάνεται μέχρι και 50 φορές. Έτσι, υπάρχει αρκετή RecA, ώστε να εξασφαλιστεί η αυτοκαταλυτική διάσπαση όλης της LexA. Αυτό εμποδίζει τη LexA να καταστείλει τα γονίδια-στόχους της, συμπεριλαμβανομένου και του δικού της. Όταν το σήμα ενεργοποίησης της RecA απομακρυνθεί, τότε αυτή χάνει την ικανότητά της να αποσταθεροποιεί τη LexA. Εκείνη τη δεδομένη στιγμή, όμως, το γονίδιο *lexA* εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης, οπότε, μόλις απουσιάσει η ενεργοποιημένη μορφή της RecA, η LexA γρήγορα συσσωρεύεται στην ακέραια φυσιολογική της μορφή και απενεργοποιεί τα γονίδια SOS. Η απόκριση SOS είναι εύκολα αναστρέψιμη.

Η ενεργοποίηση της RecA προκαλεί επίσης τη διάσπαση κάποιων άλλων κατασταλτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων πολλών που ανήκουν σε προφάγους. Ανάμεσά τους είναι ο καταστολέας του φάγου λ. Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει το λυτικό μονοπάτι του φάγου λ. Η συγκεκριμένη αντίδραση δε συνδέεται με την απόκριση SOS, αλλά αντανακλά την αναγνώριση από πλευράς προφάγου ότι το κύτταρο αντιμετωπίζει δυσκολίες. Η επιβίωση του φάγου εξασφαλίζεται με την άμεση είσοδό του στο λυτικό κύκλο, ώστε να δημιουργηθούν πολλοί απόγονοι φάγοι. Επομένως ο προφάγος εκμεταλλεύεται προς όφελός του το ίδιο ερέθισμα που επάγει την κυτταρική απόκριση διάσωσης στον ξενιστή: την ενεργοποίηση της RecA.



Repressed SOS operon

Active SOS operon

## Ευκαρυωτικά κύτταρα και συστήματα επιδιόρθωσης

Τα γονίδια *RAD* της ζύμης που εμπλέκονται σε λειτουργίες επιδιόρθωσης έχουν ταυτοποιηθεί χάρη στο φαινότυπο ευαισθησίας στην ακτινοβολία που επιφέρουν οι μεταλλάξεις τους. Υπάρχουν τρεις γενικές κατηγορίες γονιδίων επιδιόρθωσης στη ζύμη *S. cerevisiae*: η ομάδα *RAD3* (που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση εκτομής), η ομάδα *RAD6* (που είναι απαραίτητη για τη μετα-αντιγραφική επιδιόρθωση) και η ομάδα *RAD52* (που εμπλέκεται σε μηχανισμούς ανασυνδυασμού). Μια υπεροικογένεια DNA πολυμερασών που εμπλέκονται στη σύνθεση DNA απέναντι από σημεία με βλάβες κωδικοποιείται από τα γονίδια *dinB* και *umuCD* καθώς και από το γονίδιο *rad30* (που κωδικοποιεί την DNA πολυμεράση στον *S. cerevisiae*). Μία διαφορά ανάμεσα στα ένζυμα των βακτηρίων και της ζύμης είναι ότι η DNA πολυμεράση της ζύμης δεν είναι αναξιόπιστη στην επιδιόρθωση διμερών θυμίνης, αλλά εισάγει με ακρίβεια ένα ζεύγος A-A απέναντι από ένα διμερές T-T. Όταν όμως εκτελεί αντιγραφή σε σημεία με άλλου είδους βλάβες, τότε παρουσιάζει αναξιοπιστία. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της επιδιόρθωσης που έχει χαρακτηριστεί στη ζύμη είναι η σύνδεσή της με τη μεταγραφή. Γονίδια που είναι μεταγραφικά ενεργά επιδιορθώνονται κατά προτεραιότητα. Η αιτία φαίνεται να είναι μια μηχανιστική σύνδεση ανάμεσα στη συσκευή επιδιόρθωσης και στην RNA πολυμεράση. Η πρωτεΐνη *RAD3*, η οποία είναι μια ελικάση απαραίτητη για την επιτέλεση του σταδίου της εκτομής, αποτελεί συστατικό ενός μεταγραφικού παράγοντα που αλληλεπιδρά με την RNA πολυμεράση.

Μια ένδειξη για την ύπαρξη και τη σημασία των συστημάτων επιδιόρθωσης στα θηλαστικά παρέχεται από κάποιες κληρονομικές διαταραχές στον άνθρωπο. Η καλύτερα μελετημένη από αυτές είναι η μελαγχρωματική ξηροδερμία (xeroderma pigmentosum – XP), μια υποτελής ασθένεια που προσδίδει υπερευαισθησία στο ηλιακό φως, ειδικά στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η ανεπάρκεια αυτή οδηγεί σε δερματολογικά προβλήματα. Η ασθένεια οφείλεται σε ελάττωμα που αφορά την επιδιόρθωση εκτομής. Ασθενείς με XP δεν μπορούν να εκτελέσουν εκτομή διμερών πυριμιδίνης ή άλλων ογκωδών αλλοιώσεων. Οι υπεύθυνες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε 8 γονίδια, που ονομάζονται *XPA-XPG* και *XPV* και έχουν ομολογία με τα γονίδια RAD της ζύμης. Φαίνεται, λοιπόν, ότι αυτό το μονοπάτι χρησιμοποιείται ευρέως στους ευκαρυώτες. Ορισμένα από τα προϊόντα των γονιδίων *XPA* είναι συστατικά του παράγοντα TFIIH, ο οποίος εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA που συναντά η RNA πολυμεράση κατά την μεταγραφή. Το γονίδιο *XPV* είναι το ανθρώπινο ομόλογο του *rad30* της ζύμης. Καρκίνοι του δέρματος που εμφανίζονται σε άτομα ομόζυγα για μεταλλάξεις του *XPV* πιστεύεται ότι οφείλονται σε απώλεια της ενεργότητας της DNA πολυμεράσης, η οποία διασφαλίζει την ακρίβεια της αντιγραφικής διαδικασίας, παρά την παρουσία διμερών θυμίνης.

Οι δίκλωνες ρήξεις αποτελούν την απαρχή της διαδικασίας ομόλογου ανασυνδυασμού. Συμβαίνουν επίσης ως αποτέλεσμα βλάβης στο DNA, για παράδειγμα από ακτινοβολία.

Ο βασικός μηχανισμός επιδιόρθωσης αυτών των ρήξεων ονομάζεται **σύνδεση μη ομόλογων άκρων** (non-homologous end-joining – NHEJ) και πραγματοποιεί συνένωση λείων άκρων DNA. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η αναγνώριση των κομμένων άκρων από ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τις πρωτεΐνες Ku70 και Ku80. Οι παραπάνω πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα ικρίωμα μέσω του οποίου συγκρατούνται τα άκρα κοντά το ένα στο άλλο, γεγονός που επιτρέπει σε άλλα ένζυμα να δράσουν πάνω τους. Ένας βασικός παράγοντας του μηχανισμού αυτού είναι η DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (DNA-dependent protein kinase – DNA-PKcs), η οποία ενεργοποιείται από το DNA και φωσφορυλιώνει πρωτεϊνικούς στόχους. Η σύνδεση των δίκλωνων άκρων πραγματοποιείται από την DNA λιγάση IV, η οποία λειτουργεί σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη XRCC4.

Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από αυτά τα ένζυμα μπορούν να κάνουν τα ευκαρυωτικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στην ακτινοβολία. Κάποια από τα γονίδια αυτών των πρωτεϊνών είναι μεταλλαγμένα σε ασθενείς με ορισμένες ανεπάρκειες στα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA. Η αδυναμία αποτελεσματικής επιδιόρθωσης του DNA προκαλεί πολλές ασθένειες στον άνθρωπο. Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι η ανικανότητα επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρήξεων στο DNA οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια. Η αστάθεια αυτή καταλήγει σε αυξημένη προδιάθεση σε καρκίνο. Η βασική αιτία των ασθενειών μπορεί να είναι μετάλλαξη είτε σε μονοπάτια που ελέγχουν την επιδιόρθωση του DNA είτε σε γονίδια που κωδικοποιούν τα ίδια τα ένζυμα των συμπλεγμάτων επιδιόρθωσης.

Το σύνδρομο θραύσης Nijmegen (NBS, **Nijmegen Breakage Syndrome**) προκαλείται από μετάλλαξη ενός ένζυμου επιδιόρθωσης. Το σύνδρομο NBS προκαλείται από μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία ονομάζεται Nibrin ή NBS1 και αποτελεί συστατικό του συμπλόκου επιδιόρθωσης Mre11/Rad50. Η κινάση ATMP (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *AT*) φωσφορυλιώνει την NBS1 ενεργοποιώντας το σύμπλοκο, το οποίο εντοπίζεται σε σημεία βλάβης του DNA. Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού που παρεμποδίζει τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου, μέχρι να επιδιορθωθεί η βλάβη και τη στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών που απαιτούνται για την επιδιόρθωση.

Το σύνδρομο Bloom (Bloom's syndrome) στον άνθρωπο είναι μια υποτελής διαταραχή που οφείλεται σε μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο ελικάσης το οποίο ονομάζεται *BLM* και είναι ομόλογο του *recQ* στην *E. coli*. Η μετάλλαξη προκαλεί αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμικών θραύσεων και ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων. Η πρωτεΐνη BLM συνδυάζεται με άλλες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης, ως μέρος ενός μεγαλύτερου συμπλόκου. Μία από τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά είναι η hMLH1, μια πρωτεΐνη επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών που είναι η ομόλογη του βακτηριακού *mutL* στον άνθρωπο.

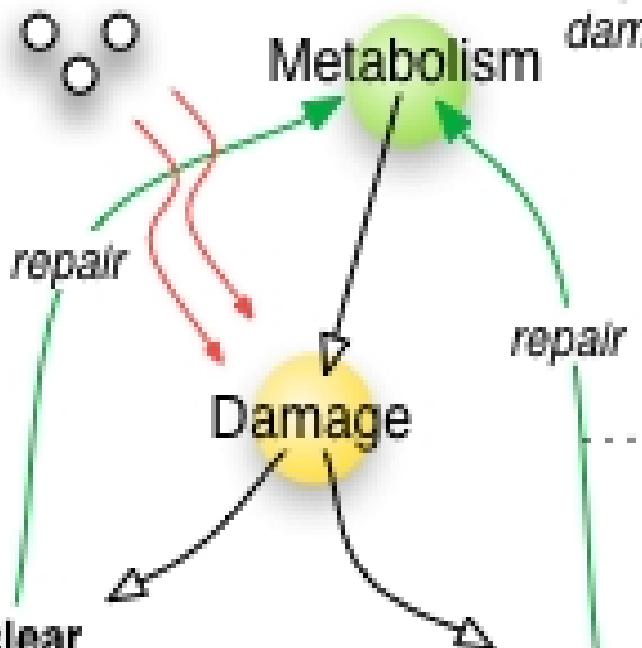


exogenous  
damage

endogenous  
damage

**healthy cell**

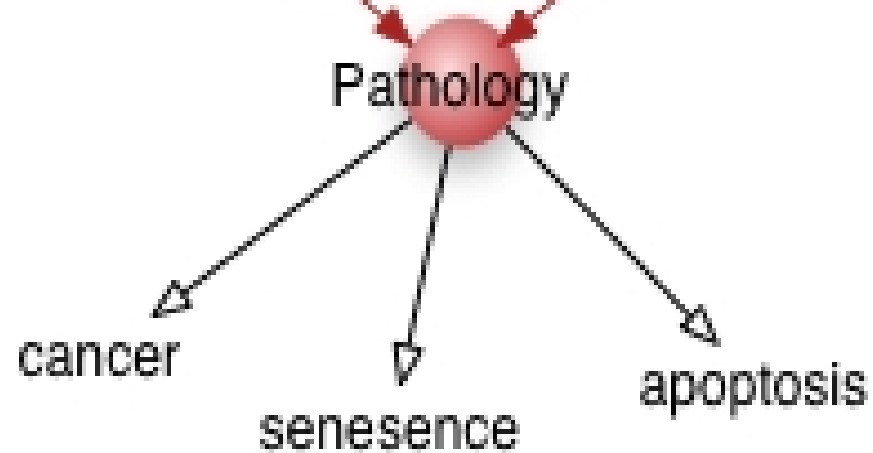
*rate of DNA damage = rate of repair*



up to 500,000  
DNA  
modification  
events per  
cell per day

**diseased cell**

*rate of DNA damage > rate of repair*



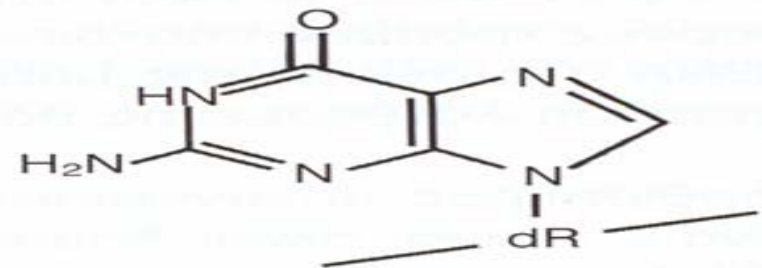
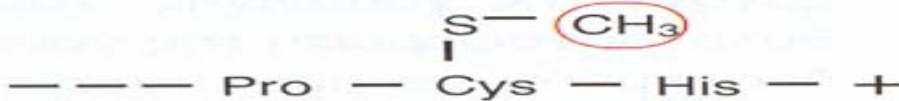
# ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ ΜΕ ΜΕΡΙΚΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

## Άμεση Επιδιόρθωση

### Η επιδιόρθωση της O6-μεθυλογουανίνης

Χαρακτηριστικό παράδειγμα άμεσης επιδιόρθωσης αποτελεί η **επιδιόρθωση της βλάβης O6mG στα βακτήρια αλλά και στον άνθρωπο**, όπου το μεθύλιο αφαιρείται από το οξυγόνο της γουανίνης, χάρη στο ενζυμο μεθυλοτρανσφεράση της γουανίνης. Το μεθύλιο δεσμεύεται σε μία κυστεΐνη του ενζύμου και το ένζυμο αδρανοποιείται. Έχουμε μία στοιχειομετρική αντίδραση, ένα μόριο ενζύμου μπορεί να επιδιορθώσει μόνο μία βλάβη. Επειδή η επιδιόρθωση συνοδεύεται από αδρανοποίηση του ενζύμου ο μηχανισμός αυτός καλείται και **μηχανισμός αυτοκτονίας**.

Στο κατωτέρω σχήμα παρουσιάζεται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης της βλάβης και η παρακράτηση του μεθυλίου από την κυστεΐνη του ενζύμου.



## Έμμεση επιδιόρθωση

### A. Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base excision repair)

Η τροποποιημένη βάση απομακρύνεται από το DNA με υδρόλυση του N-γλυκοζιδικού δεσμού, μεταξύ της δεσοξυριβόζης και της βάσης, από μία DNA γλυκοζυλάση. Αυτή η αντίδραση παράγει μια απουρινική/απυριμιδική (**AP**) θέση. Στη συνέχεια οι ενδονουκλεάσες υδρολύουν το φωσφοδιεστερικό δεσμό στις θέσεις **AP** που έχουν παραχθεί από τη δράση των DNA γλυκοζυλασών. Το νουκλεοτίδιο απομακρύνεται και αντικαθίσταται από το σωστό νουκλεοτίδιο με δράση των ενζύμων DNA πολυμεράση και λιγάση .

### B. Επιδιόρθωση με εκτομή ολιγονουκλεοτιδίου (oligonucleotide excision repair)

Σε αυτό τον τύπο επιδιόρθωσης, οι αλλοιωμένες βάσεις απομακρύνονται από το DNA ως ένα ολιγονουκλεοτίδιο και το κενό που δημιουργείται, γεμίζει με επιδιορθωτική σύνθεση από την DNA πολυμεράση.

Πολλές βλάβες επιδιορθώνονται μέσω αυτού του μηχανισμού, ο οποίος συναντάται τόσο στα προκαρυωτικά όσο και στα ευκαρυωτικά. Στο βακτήριο E.Coli, μια εξαρτώμενη από ATP νουκλεάση φτιαγμένη από τρεις υπομονάδες, η **ABC νουκλεάση εκτομής** (ABC excinuclease), υδρολύει τον όγδοο φωσφοδιεστερικό δεσμό προς το 5' άκρο και τον τέταρτο ή πέμπτο φωσφοδιεστερικό δεσμό προς το 3' άκρο του συμπλόκου, απομακρύνοντας ένα 12-13μερές από το DNA και δημιουργώντας ένα κενό ίδιου μεγέθους το οποίο γεμίζει από τη DNA πολυμεράση I και σφραγίζεται από τη λιγάση . Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις τρεις υπομονάδες της **ABC νουκλεάσης είναι το unrA, unrB και unrC .**

## **Γ. Επιδιόρθωση λανθασμένων ζευγών βάσεων (mismatch repair)**

Είναι ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης πολύ καλά μελετημένος τόσο στα βακτήρια όσο και στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Επιδιορθώνει λανθασμένα ζεύγη βάσεων όπως π.χ. A/C, G/T, G/G κλπ., που μπορούν να προκύψουν κυρίως λόγω κάποιας ανακρίβειας στην αντιγραφή του DNA από την πολυμεράση που δεν επιδιορθώθηκε, π.χ. της **O-6 μεθυλογουανίνης από το ένζυμο μεθυλοτρανσφεράση.**

Δηλαδή είναι δυνατόν η μεθυλιωμένη γουανίνη να προλάβει να ζευγαρώσει πρώτα άτυπα με τη θυμίνη (\*G-T) και στη συνέχεια να της αφαιρεθεί η **μεθυλομάδα από τη μεθυλοτρανσφεράση**, οπότε προκύπτει ένα λανθασμένο ζεύγος (G-T) που αποτελεί πλέον υπόστρωμα για τους έμμεσους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς.

Στα βακτήρια E. Coli, η επιδιόρθωση των λανθασμένων ζευγών (mismatches) γίνεται από το σύστημα MUT, που έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

α) διαφορετική ικανότητα επιδιόρθωσης ανάλογα με το λάθος ζεύγος που υπάρχει. π.χ. **το ζεύγος G/T επιδιορθώνεται πιο εύκολα από το ζεύγος C/A.**

β) δεν αναγνωρίζει σημαντικές διαταραχές της δομής της διπλής έλικας, δηλαδή **δεν αναγνωρίζει «ογκώδη» σύμπλοκα.**

γ) δρα στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα και η επιδιόρθωση εξαρτάται από την παρουσία ή όχι **φυσιολογικά μεθυλιωμένων A στην αλληλουχία GATC.**

Σε περίπτωση δηλαδή που ένας από τους δύο κλώνους του DNA φέρει **αλληλουχίες GATC, φυσιολογικά μεθυλιωμένες, η επιδιόρθωση γίνεται στον απέναντι κλώνο του DNA.**

## Ουβικιτινίωση

Η σύνδεση ουβικιτίνης σε μια πρωτεΐνη την καθιστά υπόστρωμα για αποικοδόμηση από ένα μηχανισμό που αποτελείται από τρία συστατικά.

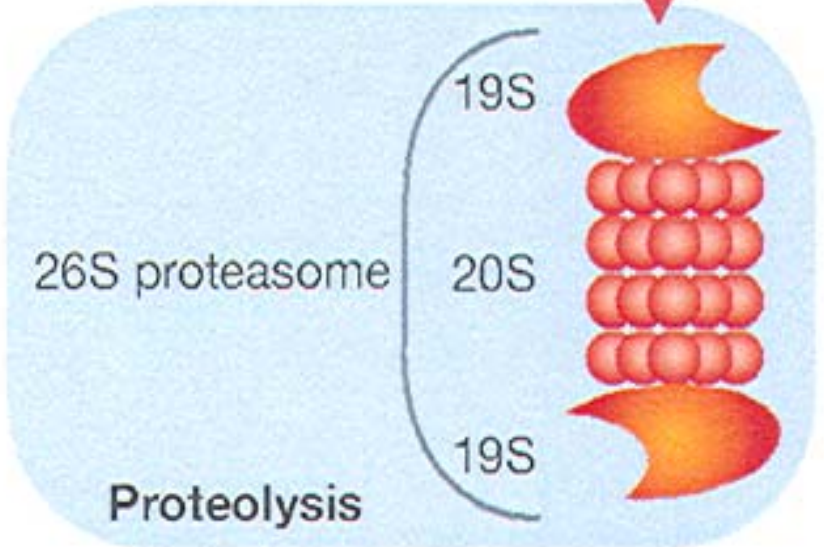
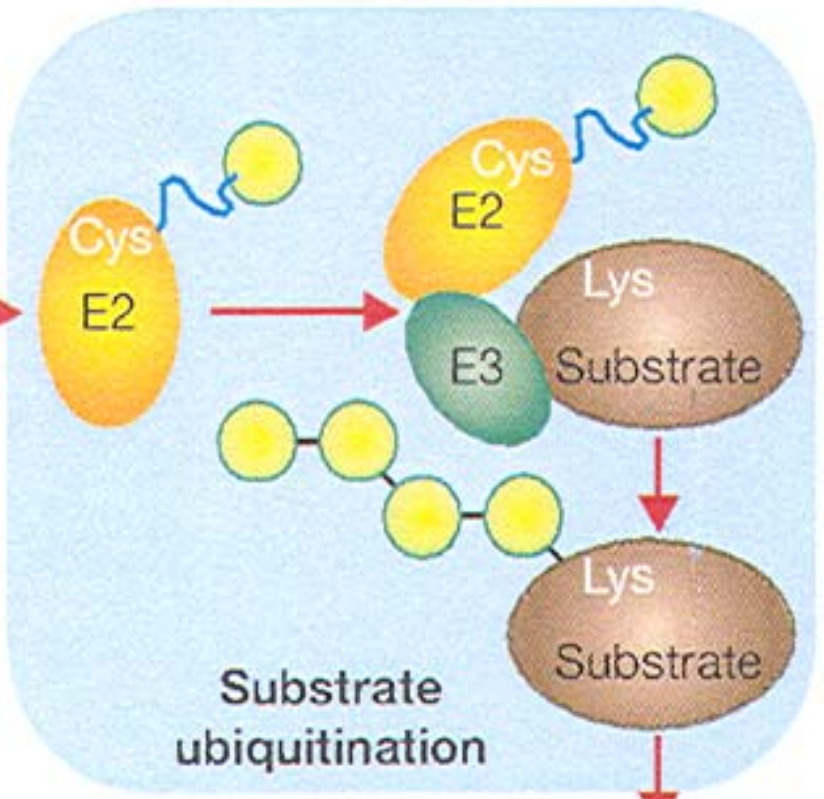
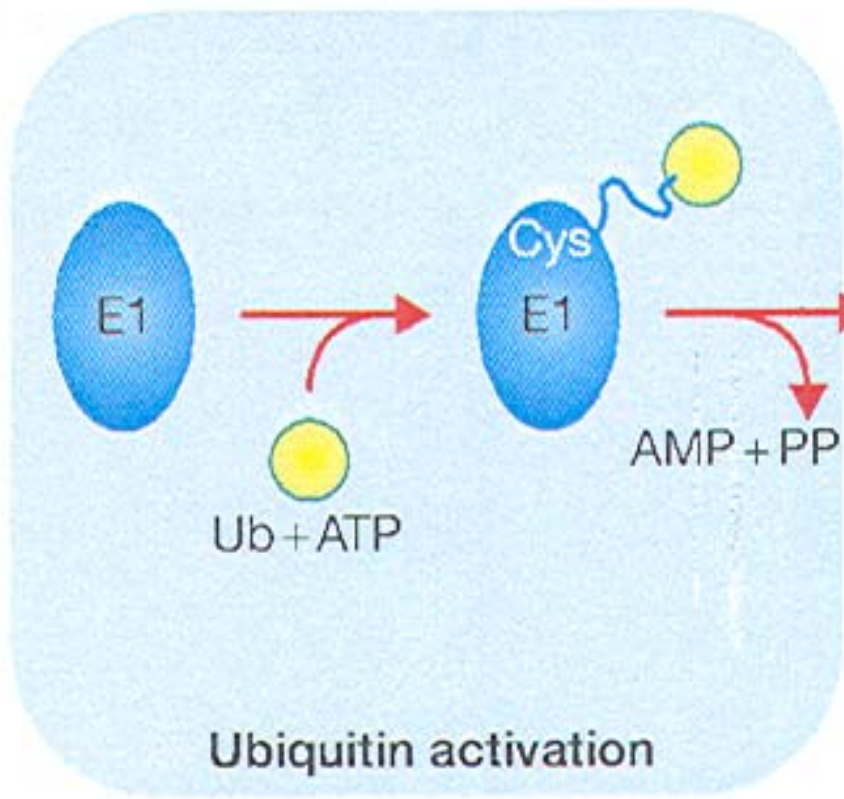
Ένα μικρό πολυπεπτίδιο, που ονομάζεται **ουβικιτίνη** (ubiquitin), συνδέεται ομοιοπολικά στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα που πρόκειται να αποικοδομηθεί.

Υπάρχουν τρία συστατικά του συστήματος ουβικιτινίωσης (ubiquitination system).

Το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης E1 (ubiquitin-activating enzyme) υδρολύει ATP προκειμένου να συνδεθεί με την ουβικιτίνη μέσω ενός θειολεστερικού δεσμού υψηλής ενέργειας που σχηματίζεται ανάμεσα σε ένα κατάλοιπο Cys και στο C-τελικό κατάλοιπο Gly της ουβικιτίνης.

Στη συνέχεια, η ουβικιτίνη μεταφέρεται στο ένζυμο σύζευξης της ουβικιτίνης E2 (ubiquitin-conjugating enzyme).

Η λιγάση της ουβικιτίνης E3 (ubiquitin-ligase) μεταφέρει την ουβικιτίνη από το E2 στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα σχηματίζοντας έναν ισοπεπτιδικό δεσμό με την ε-αμινομάδα μιας λυσίνης του υποστρώματος.



Μια ισοπεπτιδάση (isopeptidase) αποδεσμεύει την ουβικιτίνη από το αποικοδομημένο υπόστρωμα. Η επιλογή του πρωτεϊνικού υποστρώματος που θα ουβικιτινιωθεί γίνεται από τα ένζυμα E2 και E3. Σε πολλές περιπτώσεις, το E3 επιλέγει το πρωτεϊνικό υπόστρωμα, καθώς συνδέεται με αυτό πριν αρχίσει η μεταφορά της ουβικιτίνης. Η προσθήκη ενός μορίου ουβικιτίνης σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την αποικοδόμησή του. Φαίνεται ότι προστίθενται περισσότερα μόρια ουβικιτίνης. Κάθε υπομονάδα ουβικιτίνης συνδέεται στο κατάλοιπο Lys-46 της προηγούμενης υπομονάδας, σχηματίζοντας μια αλυσίδα πολυουβικιτίνης. Η στόχευση για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα (proteasome) στο κυτταρόπλασμα είναι η κύρια λειτουργία της ουβικιτινίωσης.

Αυτός ο γενικός τύπος δομής είναι κοινός στις ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες. Η αποικοδόμηση είναι συνεχής: από τη στιγμή που ένα υπόστρωμα εισέλθει στην κεντρική κοιλότητα, η αντίδραση προχωράει ως το τέλος της. **Το ευκαρυωτικό πρωτεάσωμα 20S είναι περίπλοκο, καθώς αποτελείται από 7 διαφορετικές υπομονάδες α και 7 διαφορετικές υπομονάδες β. Έχει την ίδια γενική διάταξη δακτυλίων (α-β-β-α).**

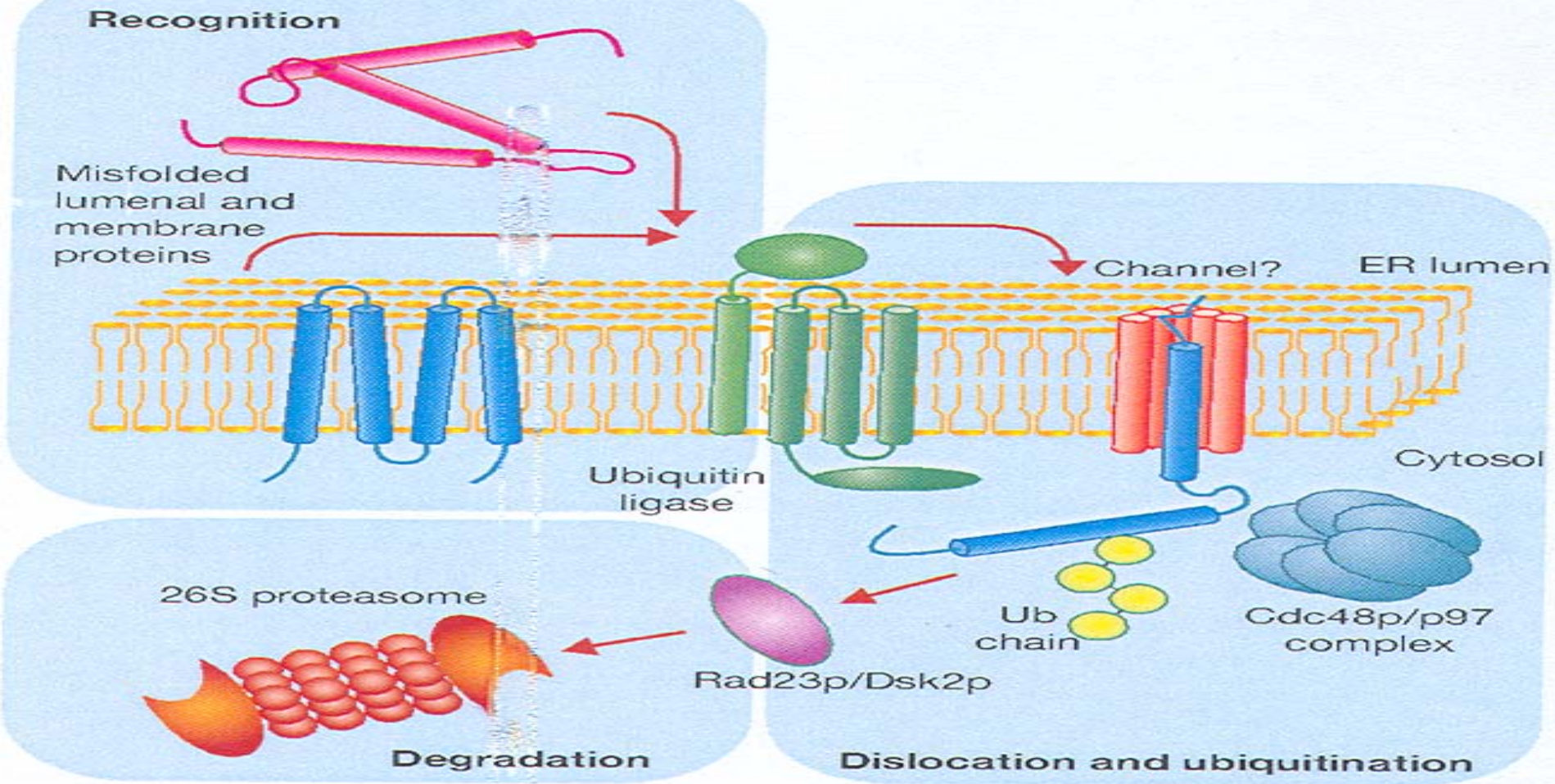
Μια σημαντική δομική διαφορά με το πρωτεάσωμα των αρχαιοβακτηρίων είναι ότι η κεντρική οπή είναι φραγμένη, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει κάποια φανερή είσοδος από τα άκρα του κυλίνδρου. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι η δομή αναδιοργανώνεται σε κάποια δεδομένη στιγμή, ώστε να επιτρέψει την είσοδο από τα άκρα.

Το ευκαρυωτικό πρωτεάσωμα 26S σχηματίζεται όταν η καλύπτρα 19S συνδέεται στο ένα ή και στα δύο άκρα του κεντρικού τμήματος 20S, δημιουργώντας μια επιμήκη δομή με μήκος ~45nm. **Καλύμματα 19S απαντώνται μόνο στα ευκαρυωτικά πρωτεασώματα (κι όχι στα βακτήρια ή στα αρχαιοβακτήρια). Τα καλύμματα αναγνωρίζουν τις ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες και τις μεταφέρουν στο κεντρικό τμήμα 20S για πρωτεόλυση. Τα καλύμματα 19S περιέχουν ~18 υπομονάδες, αρκετές από τις οποίες είναι ATPάσες. Η υδρόλυση του ATP παρέχει την ενέργεια για τη διαχείριση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.**

Το πρωτεάσωμα περιέχει πολλές ενεργότητες πρωτεάσης με διαφορετικές ειδικότητες, που διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς μετά από βασικά, όξινα ή υδρόφοβα αμινοξέα, κι έτσι έχει την ικανότητα να προσβάλλει ποικιλία στόχων.

Περισσότερες από μία υπομονάδες β μπορεί να απαιτούνται για μια συγκεκριμένη ενζυμική δράση. Τα πεπτιδικά προϊόντα συνήθως είναι οκτά- ή εννεαμερή. Ένα υπόστρωμα αποικοδομείται πλήρως μέσα στην κοιλότητα χωρίς να απελευθερώνονται ενδιάμεσα προϊόντα. Ουσιαστικά, το κεντρικό διαμέρισμα παγιδεύει τις πρωτεΐνες, έως ότου αυτές να αποικοδομηθούν σε τμήματα μικρότερα ενός συγκεκριμένου μεγέθους.





Λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες οδηγούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η λιγάση της ουβικιτίνης E3 (ubiquitin-ligase) συνδέεται σε κατάλοιπα λυσίνης στο προς αποδόμηση πολυπεπτίδιο και το μεταφέρει μέσω των καναλιών του ενδοπλασματικού δικτύου στο κυτταρόπλασμα όπου με την βοήθεια διαφόρων συμπλόκων ( Cdc 48p/p97 , Rad23p/Dsk2p) οδηγείται στο πρωτεόσωμα. Άλλες αντιδράσεις στις οποίες οι πρωτεΐνες-στόχοι αποικοδομούνται πλήρως περιλαμβάνουν την απομάκρυνση των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, συγκεκριμένα την αποικοδόμηση των κυκλινών κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

## ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗ

Στα ενήλικα άτομα, υπάρχει μια αυστηρά ελεγχόμενη ισορροπία ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο. Σ' αυτή τη φάση, η δημιουργία νέων κυττάρων καλύπτει τις ανάγκες ανανέωσης των ιστών για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Όλοι οι ιστοί ενός οργανισμού δεν ανανεώνονται στον ίδιο βαθμό και με την ίδια συχνότητα. Αυτό εξαρτάται από το είδος του ιστού: ιστοί με αυξημένες ανάγκες ανανέωσης ή με μεγάλη αναγεννητική ικανότητα (π.χ. εντερικό επιθήλιο, λευκά αιμοσφαίρια), διαθέτουν κύτταρα με διάρκεια ζωής λίγων ημερών και τα οποία διαιρούνται, για την αντικατάσταση αυτών που πεθαίνουν. Τα πολύ διαφοροποιημένα κύτταρα (π.χ. νευρικά), ζουν όσο περίπου και ο οργανισμός, συνήθως δεν διαιρούνται και επομένως σε περίπτωση καταστροφής τους δεν ανανεώνονται.

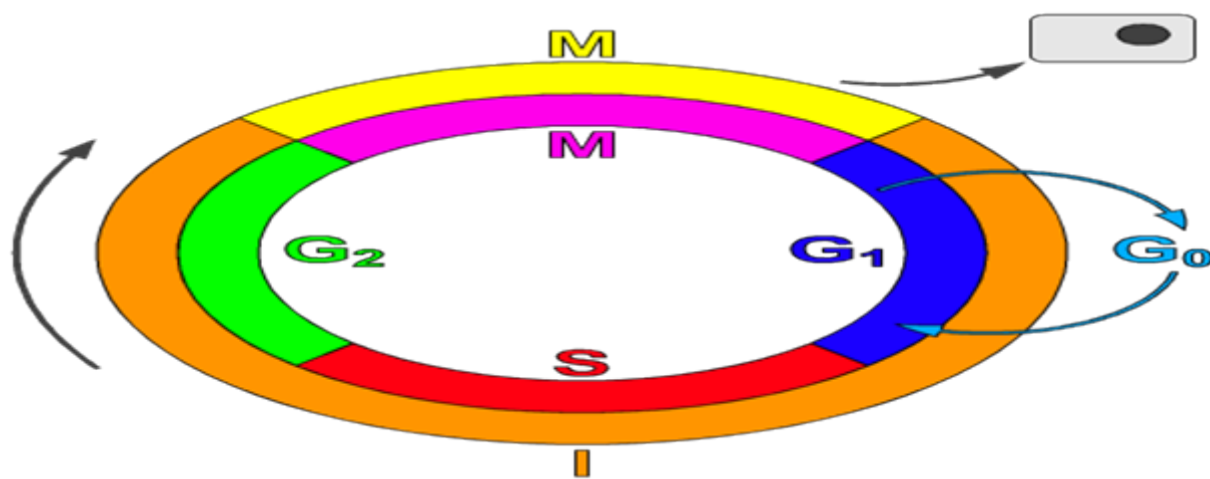
### Φάσεις και Ρύθμιση του Κυτταρικού Κύκλου

Η περίοδος ανάμεσα σε δύο διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις ορίζει τον **κυτταρικό κύκλο** των σωματικών κυττάρων. Ένας κυτταρικός κύκλος διαχωρίζεται από τον επόμενο με την μίτωση ( **φάση M** ).

Ο χρόνος που μεσολαβεί από το τέλος της μίτωσης έως την αρχή της επόμενης ονομάζεται **μεσόφαση και διαιρείται στις περιόδους G1 , S , και G2**.

Η περίοδος αυτής καθαυτής της διαίρεσης, που αντιστοιχεί στην ορατή μίτωση, ονομάζεται **φάση M**.

Για να διαιρεθεί ένα ευκαρυωτικό σωματικό κύτταρο, θα πρέπει να διπλασιάσει τη μάζα του και μετά να διανεμηθούν ισόποσα τα συστατικά του στα δύο **θυγατρικά κύτταρα**. Η μίτωση ενός σωματικού κυττάρου δημιουργεί δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα, το καθένα από τα οποία φέρει ένα διπλοειδές σετ χρωμοσωμάτων.



Μετά τη μίτωση, τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση **G<sub>1</sub>**, κατά την οποία πραγματοποιείται σύνθεση RNA και πρωτεϊνών, αλλά δεν γίνεται αντιγραφή του DNA.

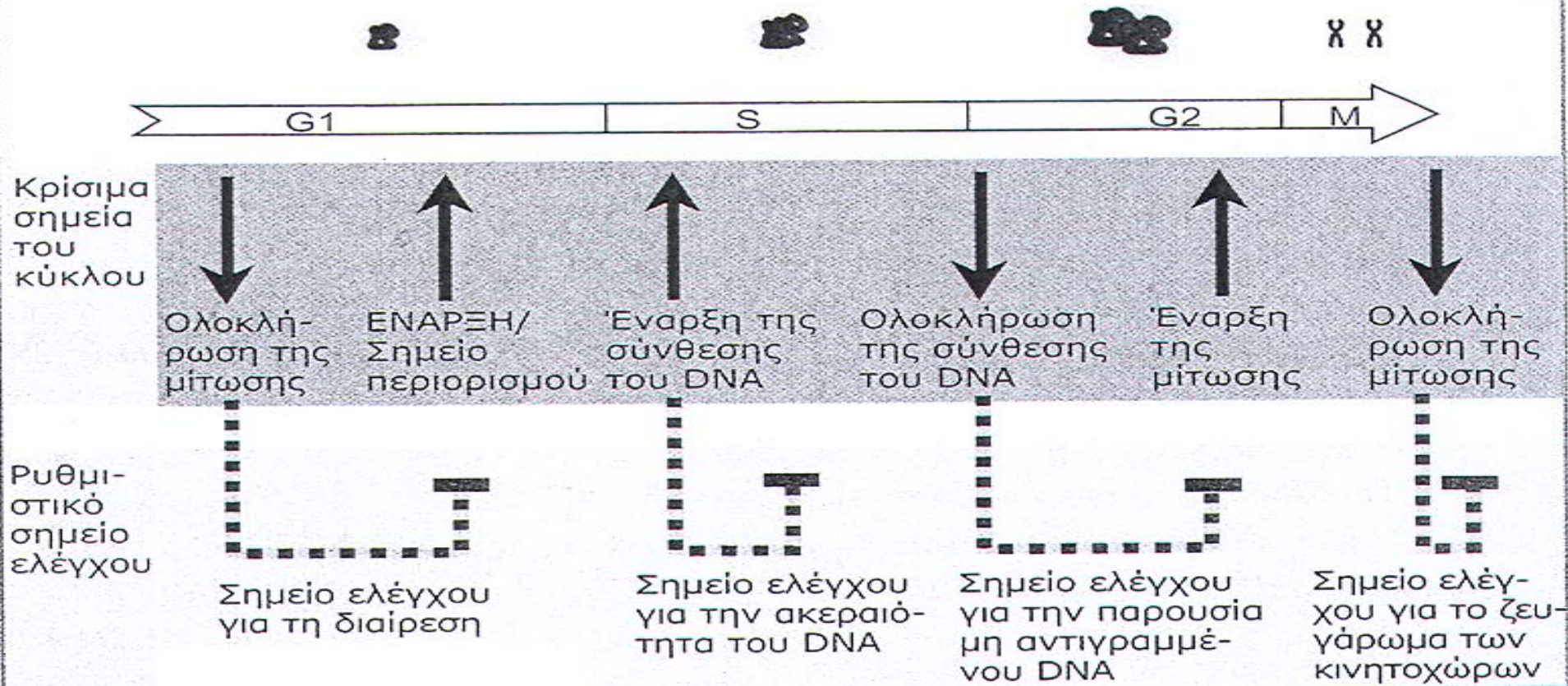
Η έναρξη της αντιγραφής του DNA σηματοδοτεί τη μετάβαση από τη φάση G<sub>1</sub> στη **φάση S**. Η φάση S διαρκεί έως ότου αντιγραφεί όλο το DNA. **Κατά τη διάρκεια της φάσης S, το συνολικό περιεχόμενο του κυττάρου σε DNA αυξάνεται από τη διπλοειδή του τιμή  $2n$  στην τιμή  $4n$ .**

Η περίοδος από το τέλος της φάσης S έως τη μίτωση ονομάζεται φάση **G<sub>2</sub>**: κατά την περίοδο αυτή, το κύτταρο φέρει δύο πλήρη αντίγραφα όλων των χρωμοσωμάτων.

Ο πυρήνας αυξάνεται σε μέγεθος κυρίως κατά τη διάρκεια της φάσης S, καθώς συσσωρεύονται σε αυτόν πρωτεΐνες που συνδέονται με το νεοσυντιθέμενο DNA. Η μίτωση διανέμει από ένα διπλοειδές σετ χρωμοσωμάτων σε κάθε θυγατρικό κύτταρο, κατά τη διάρκεια της οποίας ο πυρηνικός φάκελος διαλύεται και το κύτταρο αναδιοργανώνεται πάνω σε μια **άτρακτο**.

**Σε ένα διαιρούμενο σωματικό ζωικό κύτταρο, αυτή η διαδοχή των γεγονότων επαναλαμβάνεται κάθε 18-24 ώρες.**





Η φάση G1 συνήθως καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού κύκλου και η διάρκειά της ποικίλλει από ~6 ώρες σε ένα αρκετά γρήγορα αναπτυσσόμενο ζωικό κύτταρο έως ~12 ώρες σε ένα πιο αργά αναπτυσσόμενο κύτταρο.

Η διάρκεια της φάσης S καθορίζεται από το χρόνο που απαιτείται για την αντιγραφή του συνόλου του γονιδιώματος και συνήθως είναι 6-8 ώρες.

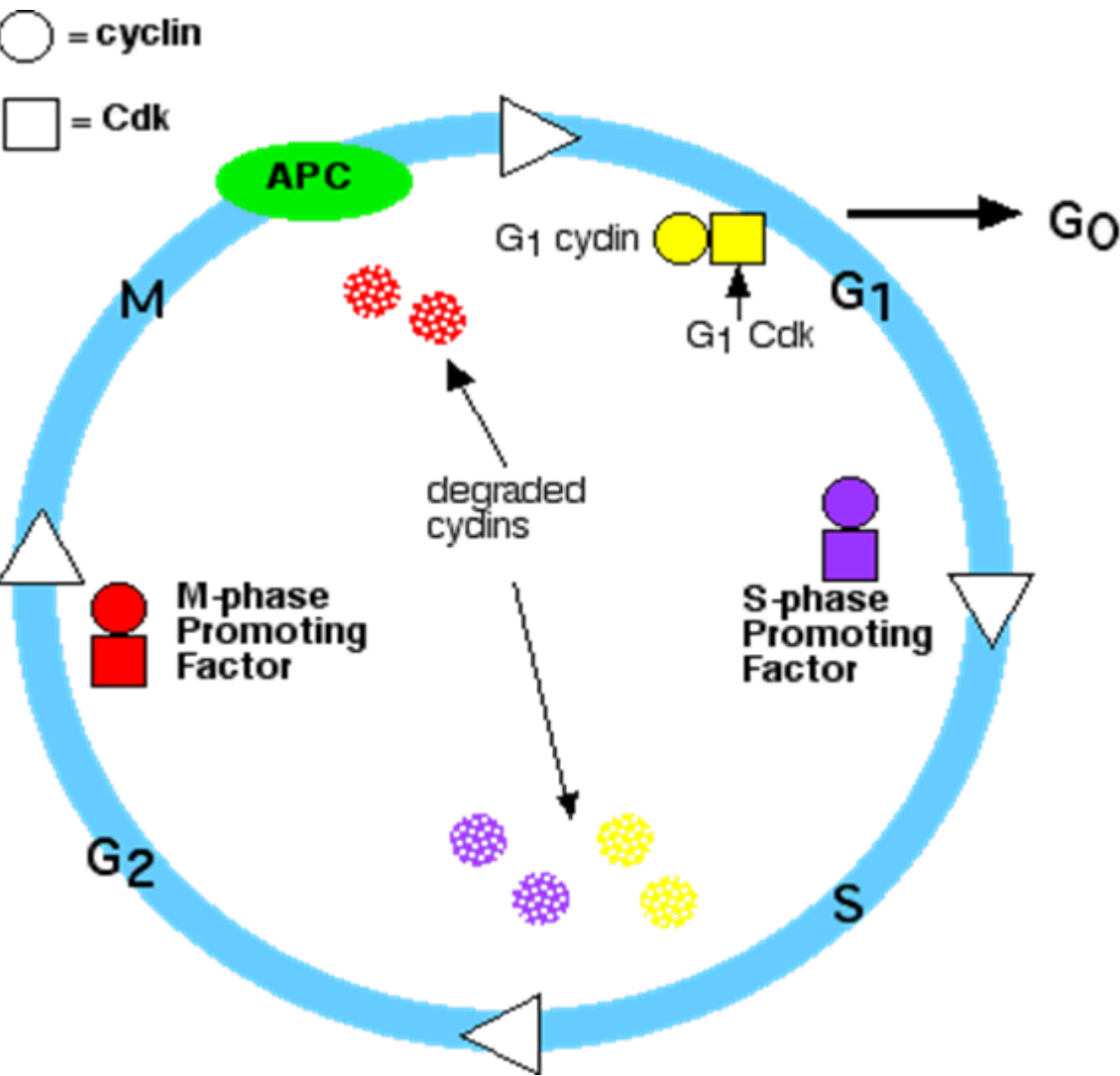
Η φάση G2 είναι η μικρότερη σε διάρκεια φάση της μεσόφασης, κατά την οποία το κύτταρο κυρίως προετοιμάζεται για τη μίτωση.

Η φάση M (μίτωση) διαρκεί συνήθως λιγότερο από 1 ώρα.

Η απόφαση για την αντιγραφή των χρωμοσωμάτων λαμβάνεται κατά τη φάση G1. Το κύτταρο περνάει ένα σημείο δέσμευσης και, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, μεταβαίνει σε φάση S. Αυτό το σημείο ονομάζεται **ENAPΞΗ** ή και **σημείο περιορισμού**. Στη διάρκεια της φάσης G1 το κύτταρο καλείται να αποφασίσει αν θα συνεχίσει τον κύκλο, δηλαδή αν θα προχωρήσει, διαμέσου των φάσεων S και G2, στην επόμενη διαίρεση ή αν θα παραμείνει στη μεσόφαση.

**Φαίνεται πως υπάρχει στη φάση G1 ένα «σημείο χωρίς επιστροφή» γνωστό και ως Start point ή Restriction point, απ' το οποίο όταν το κύτταρο περάσει, θα οδηγηθεί οπωσδήποτε στη φάση S για ολοκλήρωση του κύκλου. Στη περίπτωση που το κύτταρο δεν περάσει στο υπόλοιπο του κύκλου, βγαίνει εκτός, στη φάση «ηρεμίας» ή G0.**

**Στην κατάσταση αυτή διατηρείται μεταβολικά ενεργό, αλλά δεν διπλασιάζει το γενετικό υλικό του και δεν διαιρείται. Στη φάση G0 θεωρείται ότι βρίσκονται τα περισσότερα διαφοροποιημένα κύτταρα ενός οργανισμού.**



Η απόφαση για τη μιτωτική διαίρεση λαμβάνεται στο τέλος της G<sub>2</sub>. Εάν το κύτταρο δε διαιρεθεί σε αυτό το σημείο, παραμένει με το διπλάσιο αριθμό χρωμοσωμάτων. Όταν ένα κύτταρο περάσει τη φάση G<sub>1</sub>, τότε, εκτός απροόπτου, θα ολοκληρώσει τη φάση S, θα συνεχίσει στη φάση G<sub>2</sub> και θα διαιρεθεί.

Τα καλλιεργούμενα κύτταρα δεν σταματούν στη φάση G<sub>2</sub>. Ο έλεγχος κατά τη φάση G<sub>1</sub> είναι πιθανότατα χαρακτηριστικός των περισσότερων διπλοειδών κυττάρων, είτε σε καλλιέργεια είτε *in vivo*.

Μερικοί κυτταρικοί τύποι δεν διαιρούνται καθόλου. Τα κύτταρα αυτά θεωρείται ότι έχουν αποσυρθεί από τον κυτταρικό κύκλο. **Αυτή η κατάσταση αποχής από τον κυτταρικό κύκλο ονομάζεται G0.** Ορισμένοι τύποι κυττάρων μπορούν να ενεργοποιηθούν, ώστε να εξέλθουν από την κατάσταση G0 και να επανέλθουν στον κυτταρικό κύκλο. Η αποχώρηση από τον κυτταρικό κύκλο ή η επανείσοδος σε αυτόν μπορεί να συμβεί πριν από το σημείο περιορισμού G1.

Η ομαλή διαδοχή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου πιστοποιείται σε σημεία ελέγχου (checkpoints), τα οποία παρεμποδίζουν τη μετάβαση στην επόμενη φάση του κύκλου. Ο έλεγχος για βλάβες στο DNA πραγματοποιείται σε κάθε στάδιο του κύκλου. Κατά τη φάση S λειτουργούν σημεία ελέγχου, για να αποτραπεί η συνέχιση της αντιγραφής σε περίπτωση που διαπιστωθούν προβλήματα στην ακεραιότητα του DNA.

Ένα κύτταρο που ξεκίνησε την αντιγραφή του DNA του θα πρέπει να την ολοκληρώσει και δε θα πρέπει να διαιρεθεί μέχρις ότου να ολοκληρωθεί η αντιγραφή του. Αυτός ο έλεγχος πραγματοποιείται στη μίτωση.

Ένα κύτταρο δεν πρέπει να αρχίσει τον κύκλο αντιγραφής, εκτός κι αν η μάζα του επαρκεί για να υποστηρίξει τη διαίρεσή του.

Η διάρκεια του κύκλου για ένα τυπικό ζωικό κύτταρο είναι περίπου 30 ώρες. Απ' αυτές, το μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνει η φάση G1. Είναι αυτή που επιδέχεται τις περισσότερες ρυθμίσεις και που η διάρκειά της καθορίζει εν πολλοίς τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Κατά τη διάρκεια της φάσης G1, το κύτταρο περνάει από την ΕΝΑΡΞΗ και δεσμεύεται για την κυτταρική διαίρεση.

**Το γεγονός-κλειδί είναι μια φωσφορυλίωση. Η πρωτεΐνη-στόχος ονομάζεται RB και στη μη φωσφορυλιωμένη κατάστασή της καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που απαιτούνται για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η καταστολή αυτή αίρεται όταν η RB φωσφορυλιωθεί.**

Η μίτωση εξαρτάται από την ενεργοποίηση μιας προϋπάρχουσας πρωτεΐνης, της **κινάσης της φάσης M**, που αποτελείται από δύο υπομονάδες. Η μία είναι η καταλυτική υπομονάδα με ενεργότητα κινάσης που ενεργοποιείται μετά από τροποποίηση, στην αρχή της φάσης M. η δεύτερη υπομονάδα είναι η κυκλίνη (cyclin), η οποία ονομάστηκε έτσι επειδή συντίθεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, αλλά καταστρέφεται απότομα κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

Η καταστροφή της κυκλίνης ευθύνεται για την απενεργοποίηση της κινάσης της φάσης M και για την έξοδο των θυγατρικών κυττάρων από τη μίτωση.

**Παράγοντας προώθησης της ωρίμανσης (MPF, maturation promoting factor).**

Ο MPF είναι υπεύθυνος για την είσοδο των σωματικών κυττάρων στη φάση M, καλείται και παράγοντας προώθησης της φάσης M (**M phase promoting factor**). Ο MPF είναι μια κινάση που μπορεί να φωσφορυλιώσει μια πληθώρα πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.

Φωσφορυλιώνοντας κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου πρωτεΐνες-στόχους, σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο, ο MPF ελέγχει την ικανότητά τους να λειτουργήσουν (κινάση της φάσης M).

Η κινάση της φάσης M αποτελείται από δύο υπομονάδες με διαφορετικές λειτουργίες: Η Cdc2 είναι η καταλυτική υπομονάδα η οποία φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες-στόχους σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης.

Η δεύτερη υπομονάδα είναι μια κυκλίνη: αυτή είναι μια ρυθμιστική υπομονάδα η οποία είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της κινάσης.

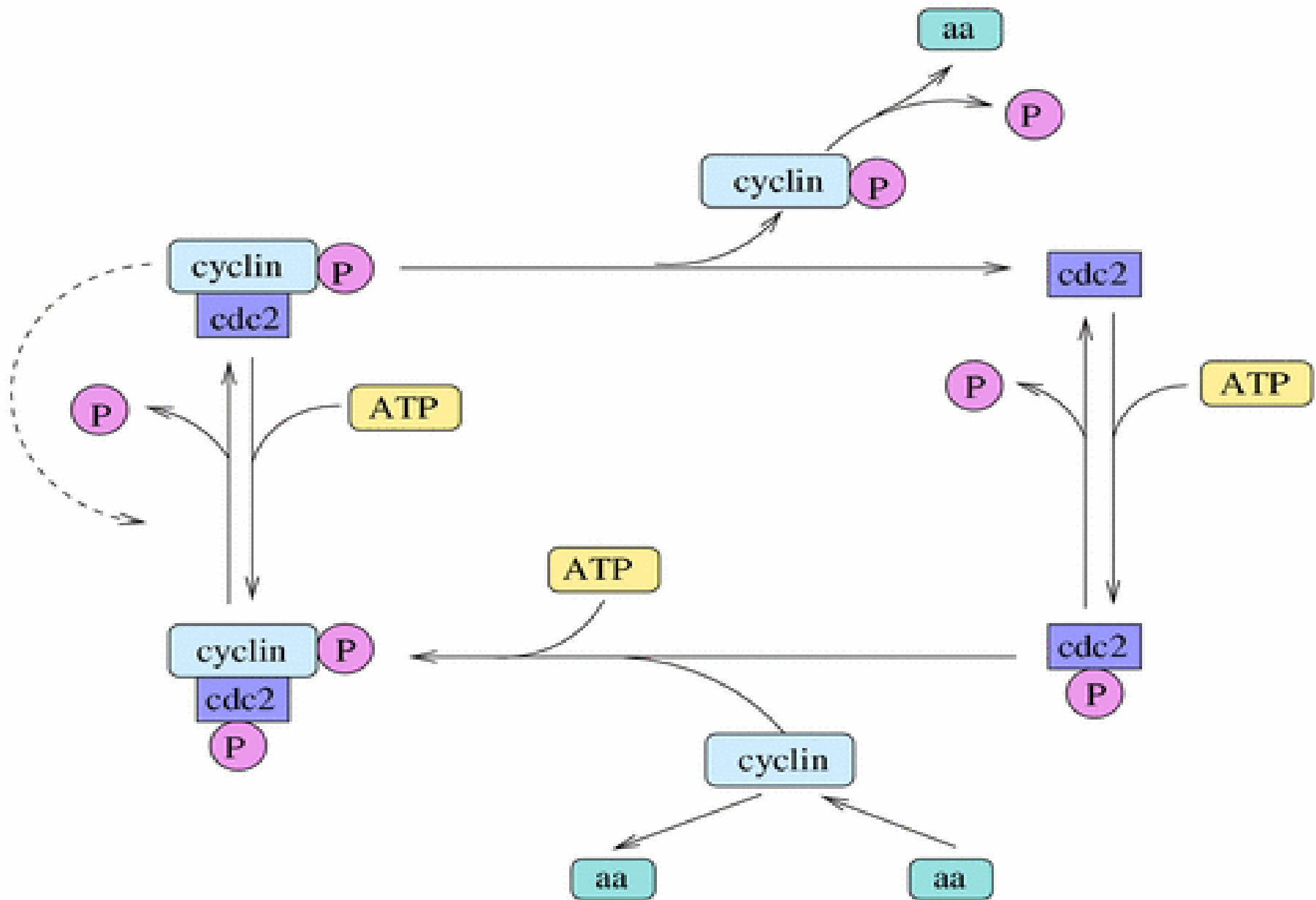


Η καταλυτική υπομονάδα της Cdc2 είναι αδρανής και ενεργοποιείται μόνο όταν ενωθεί με την κυκλίνη. Υπάρχουν δύο γενικές μορφές της κινάσης της φάσης M: η Cdc2-κυκλίνη A και η Cdc2-κυκλίνη B. Οι δύο τύποι των κυκλινών παρουσιάζουν μικρή μόνο ομοιότητα στην αλληλουχία.

Τα γεγονότα που ενεργοποιούν την κινάση της φάσης M στην G2/M και την απενεργοποιούν κατά τη διάρκεια της φάσης M αντιστοιχούν σε κρίσιμα σημεία του κυτταρικού κύκλου.

Η ενεργοποίηση και η απενεργοποίηση της κινάσης της φάσης M επιτυγχάνονται με διαφορετικούς τρόπους. Η Cdc2 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη και η κατάσταση της φωσφορυλίωσής της είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την ενεργότητα της κινάσης. Για να είναι ενεργή η κινάση της φάσης M, θα πρέπει οι φωσφορικές ομάδες να είναι απύσες από κάποιες θέσεις αλλά παρούσες σε κάποια άλλη θέση. **Για να ενεργοποιηθεί η κινάση, θα πρέπει να αποφωσφορυλιωθούν δύο κατάλοιπα της Cdc2 στη θέση πρόσδεσης του ATP. Αυτές οι φωσφορικές ομάδες βρίσκονται στις θέσεις Thr-14 και Tyr-15 και αφαιρούνται και οι δύο από την ίδια φωσφατάση. Η κίνηση της φάσης M έχει αυτοκαταλυτική δράση.**

Μια άλλη φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στη θέση Thr-161 της Cdc2. Αυτή η φωσφορική ομάδα προστίθεται στη φάση G2 και αφαιρείται στο τέλος της μίτωσης. Η συγκεκριμένη φωσφορική ομάδα είναι *απαραίτητη* για την ενεργότητα της Cdc2. Οι μεταλλάξεις που εισάγουν σε αυτή τη θέση ένα αμινοξύ το οποίο δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί απενεργοποιούν την ενεργότητα της κινάσης. Η κυκλίνη B συνδέεται ειδικά *in vitro* με τη μορφή της Cdc2 που είναι *αποφωσφορυλιωμένη* στην τυροσίνη. Αυτή η ένωση δημιουργεί ένα εν δυνάμει ενεργό διμερές. Ωστόσο, η δημιουργία του διμερούς οδηγεί στη φωσφορυλίωση των Thr-14 και Tyr-15. Έτσι, η σύνδεση της κυκλίνης με τη Cdc2 επάγει την απενεργοποίηση της κινάσης. Το διμερές παραμένει σε ανενεργό μορφή μέχρι να του αφαιρεθούν οι φωσφορικές ομάδες. **Και οι δύο κυκλίνες, A και B, φέρουν κοντά στο αμινοτελικό τους άκρο ένα βραχύ μοτίβο – το κουτί καταστροφής της κυκλίνης (cyclin destruction box) – το οποίο αποτελεί το στόχο για την πρωτεόλυση της κυκλίνης.** Οι κυκλίνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα (ένα σύμπλοκο που διαθέτει πρωτεολυτική ενεργότητα και αναγνωρίζει τα υποστρώματά του όταν προστίθενται σε αυτά ουβικιτίνη). Η καταστροφή των υπομονάδων της κυκλίνης ευθύνεται για την απενεργοποίηση της κινάσης της φάσης M κατά τη διάρκεια της μίτωσης και απαιτείται για την έξοδο των κυττάρων από τη μίτωση.



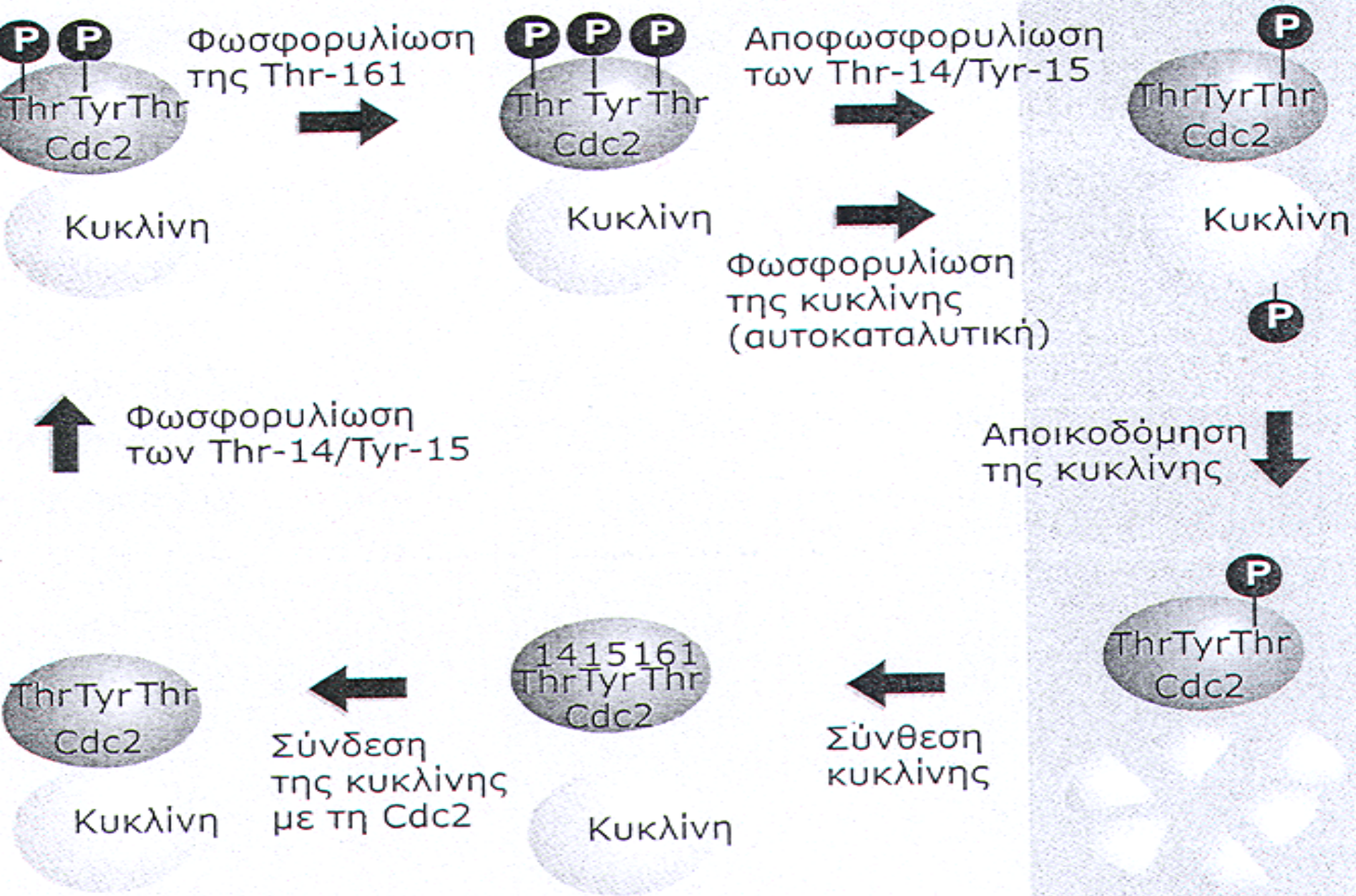
Κυκλίνη και cdc2 σχηματίζουν τον παράγοντα MPF (κινάση της φάσης M) .

Για να ενεργοποιηθεί η κινάση, θα πρέπει να *αποφωσφορυλιωθούν* δύο κατάλοιπα της Cdc2 στη θέση πρόσδεσης του ATP. Αυτές οι φωσφορικές ομάδες βρίσκονται στις θέσεις Thr-14 και Tyr-15 και αφαιρούνται και οι δύο από την ίδια φωσφατάση. Η κινάση της φάσης M έχει αυτοκαταλυτική δράση.

Μια άλλη φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στη θέση Thr-161 της Cdc2. Αυτή η φωσφορική ομάδα προστίθεται στη φάση G2 και αφαιρείται στο τέλος της μίτωσης. Η συγκεκριμένη φωσφορική ομάδα είναι *απαραίτητη* για την ενεργότητα της Cdc2. Η κυκλίνη B συνδέεται ειδικά *in vitro* με τη μορφή της Cdc2 που είναι *αποφωσφορυλιωμένη* στην τυροσίνη. Το διμερές οδηγεί στη φωσφορυλίωση των Thr-14 και Tyr-15. Έτσι, η σύνδεση της κυκλίνης με τη Cdc2 επάγει την απενεργοποίηση της κινάσης. Το διμερές παραμένει σε ανενεργό μορφή μέχρι να του αφαιρεθούν οι φωσφορικές ομάδες. Και οι δύο κυκλίνες, A και B, φέρουν κοντά στο αμινοτελικό τους άκρο ένα βραχύ μοτίβο – το κουτί καταστροφής της κυκλίνης (cyclin destruction box) – το οποίο αποτελεί το στόχο για την πρωτεόλυση της κυκλίνης. Οι κυκλίνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα. Το ρυθμιστικό κύκλωμα του κυτταρικού κύκλου αποτελείται από μια σειρά κινασών και φωσφατασών, οι οποίες αποκρίνονται σε εξωτερικά σήματα και σημεία ελέγχου, φωσφορυλιώνοντας ή αποφωσφορυλιώνοντας το επόμενο στοιχείο του μονοπατιού. **Τα γεγονότα που ρυθμίζονται από την κινάση της φάσης M είναι αναστρέψιμα: η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων χρειάζεται για την αναδιοργάνωση του κυττάρου σε μια μιτωτική άτρακτο, ενώ η αποφωσφορυλίωση των ίδιων υποστρωμάτων απαιτείται για την επιστροφή σε μια οργάνωση μεσόφασης.**

ΜΕΣΟΦΑΣΗ

ΜΙΤΩΣΗ



Φαίνεται ότι η κινάση της φάσης M δρα απευθείας πάνω σε πολλές από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν άμεσα στην αλλαγή της κυτταρικής δομής κατά τη μίτωση.

Υποστρώματα της φαίνεται να είναι :

η ιστόνη H1 (που ίσως απαιτείται για τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων),

οι λαμίνες (πιθανώς για την αποικοδόμηση του πυρηνικού φακέλου),

η νουκλεολίνη (που ενδεχομένως συμμετέχει στη διακοπή της ριβοσωμικής σύνθεσης)

και άλλες δομικές και ενζυμικές ενεργότητες.

Η H1 φωσφορυλιώνεται, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με δύο φωσφορικές ομάδες, οι οποίες προστίθενται κατά τη φάση S, και τέσσερις επιπλέον φωσφορικές ομάδες, οι οποίες προστίθεται κατά τη μίτωση. Η κυριότερη φωσφορυλίωση για την H1 παρέχεται από την κινάση της φάσης M. Κατά τη διάρκεια της G1, τα ζωικά κύτταρα έχουν, για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, πολλαπλές κινάσες, οι οποίες διαφέρουν τόσο στην καταλυτική υπομονάδα όσο και στη ρυθμιστική υπομονάδα (κυκλίνη) τους.

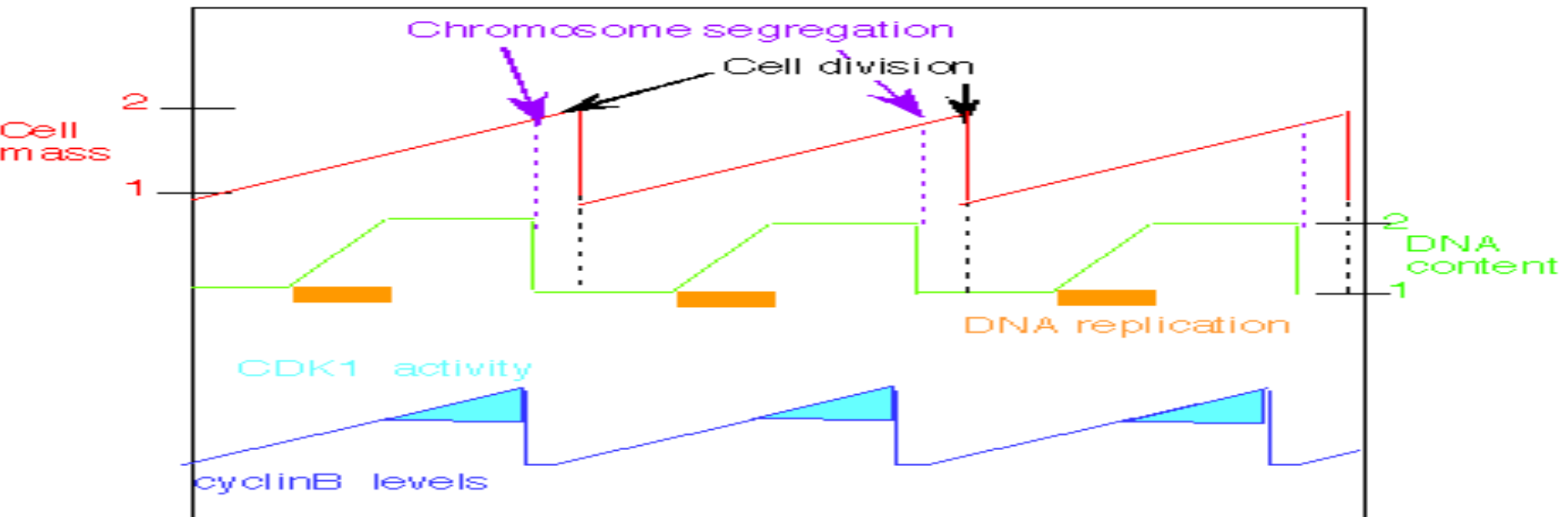
Οι καταλυτικές υπομονάδες που συνδέονται με κυκλίνες ονομάζονται **κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες** (cyclin-dependent kinases, **cdks**). Οι ανώτεροι ευκαρυώτες διαθέτουν ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων (~10) συγγενικών με το πραγματικό ομόλογο του *cdc2*. Τα διμερή cdk-κυκλίνης παρουσιάζονται με πολλαπλούς συνδυασμούς ζευγών μεταξύ των καταλυτικών και των ρυθμιστικών υπομονάδων, με αποτέλεσμα μια συγκεκριμένη κυκλίνη να συνδυάζεται με διαφορετικές καταλυτικές υπομονάδες, αλλά και μια καταλυτική υπομονάδα να μπορεί να συνδυαστεί με αρκετές κυκλίνες. Οι πρωτεΐνες που περιγράφονται ως «κυκλίνες» είναι επομένως σημαντικά πιο ετερογενείς από τις τάξεις A και B, οι οποίες περιλαμβάνονταν στον αρχικό ορισμό.

Ένα κύτταρο εγκαταλείπει τη μίτωση με μονομερή Cdc2 και χωρίς καθόλου μιτωτικές κυκλίνες (γιατί οι κυκλίνες A και B αποικοδομήθηκαν κατά τη μίτωση).

Οι κυκλίνες στη συνέχεια συντίθενται ξανά. Μετά από μία φάση υστέρησης, το επίπεδο των κυκλινών φτάνει ένα οριακό επίπεδο και τότε σχηματίζουν διμερή με τη Cdc2.

Η φωσφορική ομάδα που είναι απαραίτητη στην Thr-161 προστίθεται από τη CAK (Cdc2-activating kinase: Cdc2-ενεργοποιητική κινάση).

Η φωσφατάση Cdc25 αφαιρεί τη φωσφορική ομάδα από την Tyr-15. Η Cdc25 ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση. Η κινάση της φάσης M μπορεί και η ίδια να πραγματοποιήσει αυτή τη φωσφορυλίωση. Η αφαίρεση της φωσφορικής ομάδας από την Tyr-15 είναι το γεγονός που προκαλεί την έναρξη της μίτωσης. Η Cdc25 ρυθμίζεται μέσω αρκετών μονοπατιών, τα οποία περιλαμβάνουν φωσφατάσες που την απενεργοποιούν.





Στα ζωικά κύτταρα ποικίλα διμερή cdk-κυκλίνης μπορεί να ρυθμίζουν την είσοδο στη φάση S και την πρόοδο μέσω αυτής. Ορισμένα από αυτά μπορεί να σχετίζονται με την επανείσοδο στον κύκλο από τη φάση G0 ή με την έξοδο προς αυτήν. Όλα αυτά τα διμερή ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης της Thr-161 από την CAK.

**Η σύνθεση των κυκλίνων D ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι διεγείρουν τα κύτταρα να επανέλθουν στον κύκλο από την G0. Οι κυκλίνες D έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και τα επίπεδά τους ελαττώνονται μετά την απομάκρυνση του αυξητικού ερεθίσματος. Οι κυκλίνες D σχετίζονται με την επαναφορά στον κύκλο των κυττάρων που βρίσκονται σε στάδιο αδράνειας. Η απώλεια των κυκλίνων D μπορεί να αποτελέσει για ένα κύτταρο το έναυσμα για να αποχωρήσει από τον κυτταρικό κύκλο και να περάσει στην κατάσταση G0. Η ενεργότητα των κυκλίνων D απαιτείται προς το τέλος της G1.**

**Η ενεργότητα του συμπλόκου cdk2-κυκλίνης E είναι απαραίτητη για την είσοδο στη φάση S. Η κυκλίνη E συντίθεται κατά τη διάρκεια μιας περιόδου που καλύπτει τη μετάπτωση G1/S.**

**Η πρόοδος διαμέσου της φάσης S απαιτεί το σύμπλοκο cdk2-κυκλίνης A. Η κυκλίνη A πρέπει επίσης να συνδεθεί με τη Cdc2, ώστε να γίνει η είσοδος στη μίτωση. Η διττή εφαρμογή της κυκλίνης A στα ζωικά κύτταρα φαίνεται να είναι η μόνη περίπτωση στην οποία μια κυκλίνη χρησιμοποιείται τόσο για τη μετάπτωση G1/S όσο και για την G2/M.**

**Τα σύμπλοκα cdk2-κυκλίνης B αποτρέπουν την τοποθέτηση της Cdc6 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Κατ' αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται μια οργανωμένη διαδοχή γεγονότων, αφού η αποικοδόμηση της κυκλίνης B στη μίτωση αίρει τη φραγή και επιτρέπει να ξεκινήσει η διαδικασία για το σχηματισμό ενός προαντιγραφικού συμπλόκου στη θέση έναρξης.**

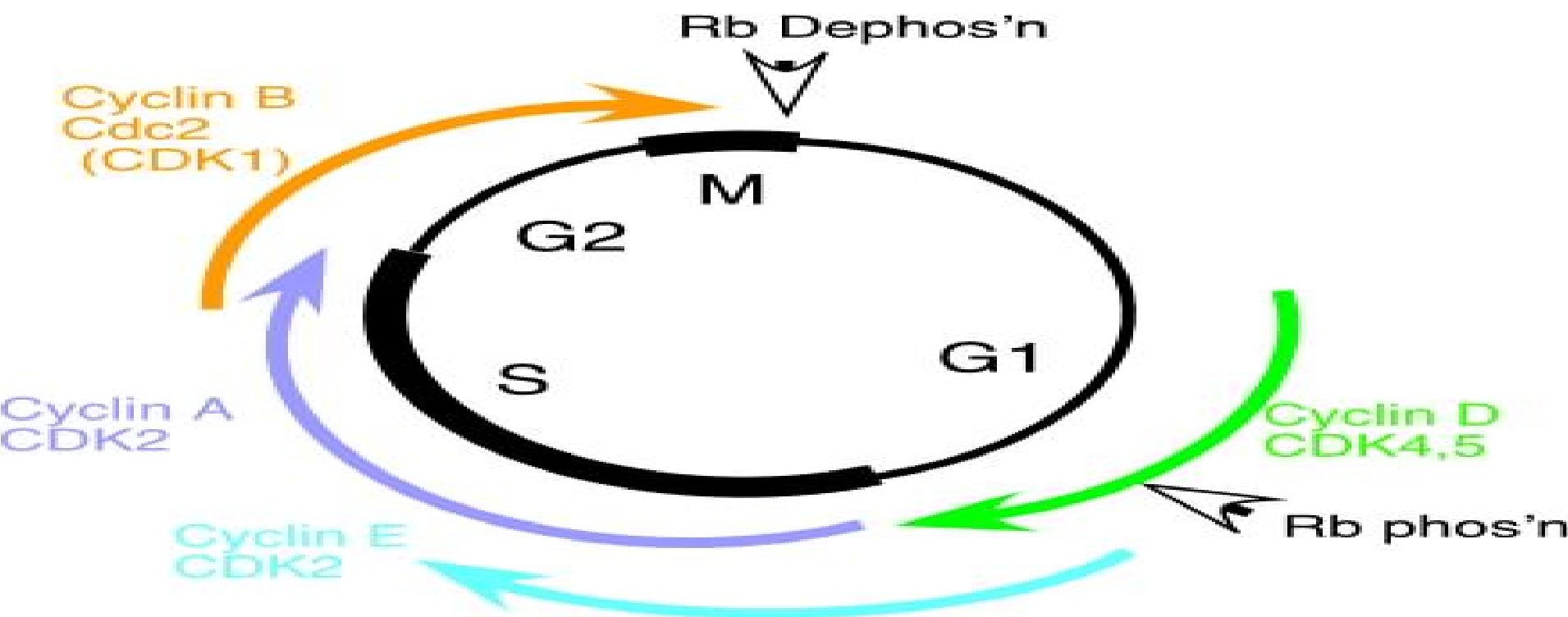
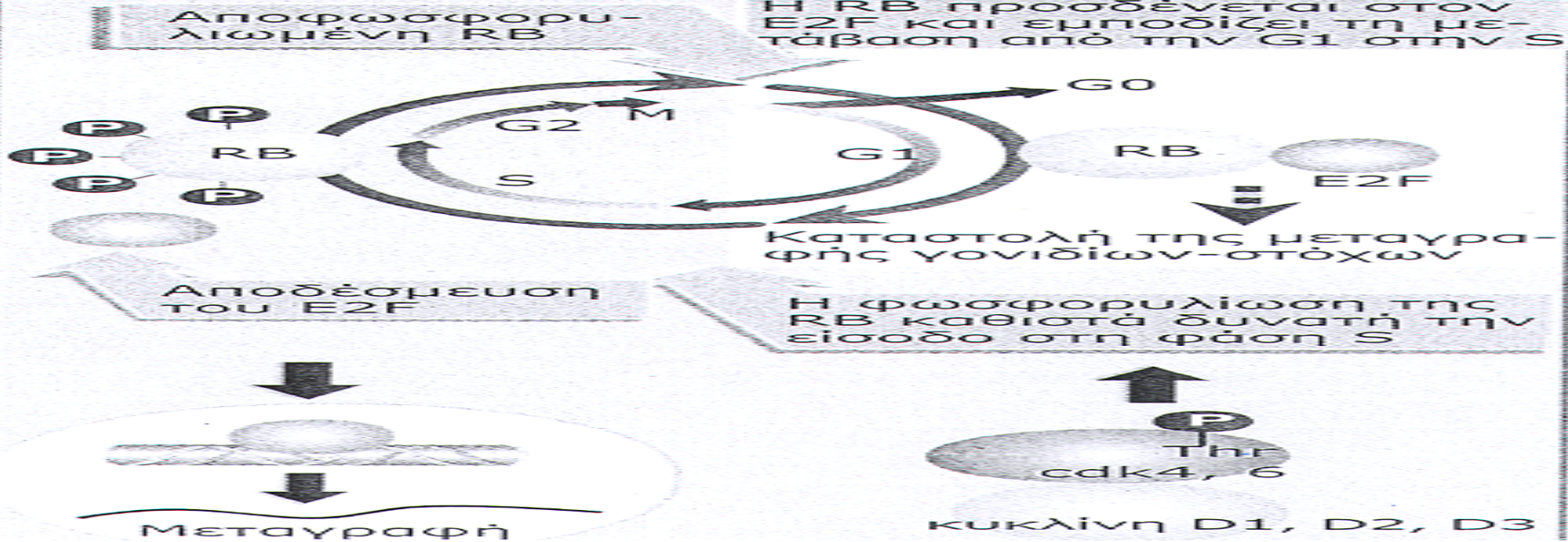


**Ο ογκοκαταστολέας RB (πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος) είναι ένα συστατικό-κλειδί στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου.** Η πρωτεΐνη RB είναι ένα υπόστρωμα για σύμπλοκα cdk-κυκλίνης D και εξασκεί τις επιδράσεις της κατά τη διάρκεια της περιόδου της G1, η οποία προηγείται του σημείου περιορισμού. Σε αδρανή κύτταρα ή σε κύτταρα κατά τη διάρκεια του πρώτου μέρους της φάσης G1, η RB είναι προσδεσμένη στο μεταγραφικό παράγοντα E2F. Αυτό έχει δύο συνέπειες.

Πρώτον, η μεταγραφή ορισμένων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα είναι καθοριστικής σημασίας για τη φάση S εξαρτάται από την ενεργότητα του E2F. Απομονώνοντας τον παράγοντα E2F, η RB διασφαλίζει τη μη ενεργοποίηση της φάσης S.

Δεύτερον, το σύμπλοκο E2F-RB καταστέλλει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων. Αυτός είναι ίσως ο κύριος λόγος της ικανότητας που έχει η RB να συγκρατεί τα κύτταρα στη φάση G1. Η μη φωσφορυλιωμένη μορφή της RB δημιουργεί ένα σύμπλοκο με τις cdk-κυκλίνες. Το σύμπλοκο cdk4, 6-κυκλίνων D (1,2,3, ...6) είναι το επικρατέστερο, αλλά η RB είναι υπόστρωμα και για το σύμπλοκο cdk2-κυκλίνης E. Πλησιάζοντας στο σημείο περιορισμού, η RB φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες cdk4, 6-κυκλίνη D. Η φωσφορυλίωση προκαλεί την αποδέσμευση της RB από τον παράγοντα E2F, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων των οποίων η λειτουργία είναι απαραίτητη για τη φάση S, σταματώντας ταυτόχρονα την καταστολή των γονιδίων από το σύμπλοκο E2F-RB.

Υπάρχει μια ιδιαίτερα στενή σχέση ανάμεσα στην RB και στην κυκλίνη D1. Η υπερέκφραση της D1 προκαλεί τα κύτταρα να εισέλθουν πρώιμα στη φάση S. Η αναστολή της έκφρασης της D1 διακόπτει τον κύκλο των κυττάρων πριν τη φάση S. Ο μοναδικός ρόλος της D1 θα μπορούσε να είναι η απενεργοποίηση της RB, έτσι ώστε να επιτραπεί στο κύτταρο να εισέλθει στη φάση S.



Δύο ακόμη πρωτεΐνες, οι p107 και p130, που είναι συγγενικές με την RB, συμπεριφέρονται με παρόμοιο τρόπο και δεσμεύουν τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας E2F. Επομένως η RB μαζί με την p107 μπορούν να ελέγξουν την ενεργότητα της ομάδας παραγόντων E2F. Η πρωτεΐνη RB είναι στόχος για αρκετά μονοπάτια που αναστέλλουν την αύξηση.

Πολλά από αυτά τα σήματα δρουν μέσω αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. **Οι αναστολείς αυτοί ονομάζονται CKI (από Cyclin Kinase Inhibitors) και δημιουργούν με τα διμερή cdk-κυκλινών ανενεργά σύμπλοκα.** Διατηρώντας τα σύμπλοκα cdk-κυκλίνης σε ανενεργή μορφή, οι πρωτεΐνες αυτές εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της RB και έτσι είναι αδύνατον να επιτραπεί στα κύτταρα να εισέλθουν στη φάση S.

**Οι πρωτεΐνες CKI διαιρούνται σε δύο τάξεις.**

**Η οικογένεια INK4 είναι ειδική για τις cdk4 και cdk6 και περιλαμβάνει τέσσερα μέλη: τις p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C, p19INK4D.**

**Η οικογένεια Kip αναστέλλει όλα τα ένζυμα cdk των φάσεων G1 και S και περιλαμβάνει τρία μέλη: τις p21Cip/WAF1, p27Kip1, p57Kip2.**

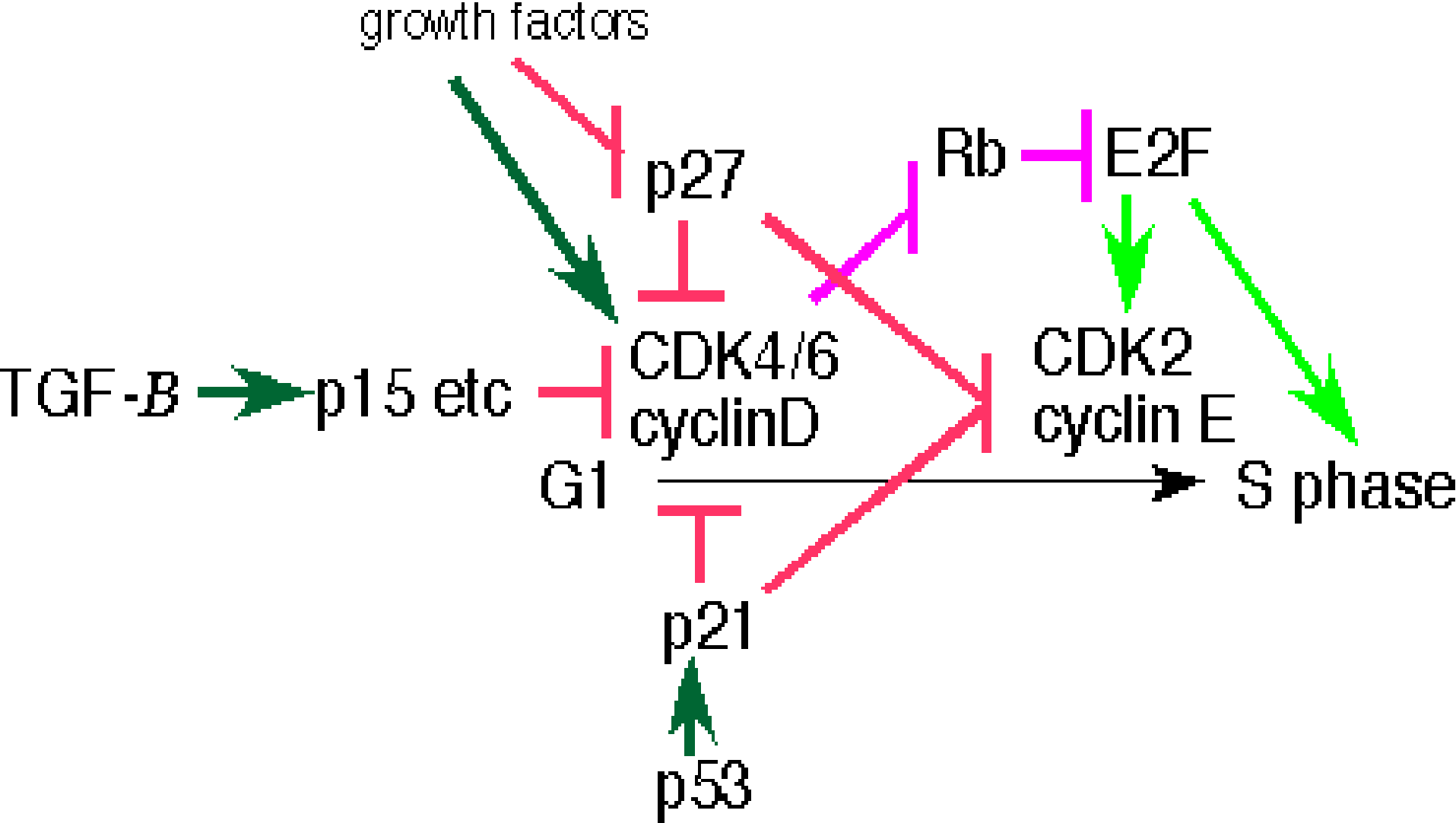
Κάθε πρωτεΐνη ονομάζεται σύμφωνα με το μέγεθός της, με το ανεπίσημο όνομά της να χρησιμοποιείται ως εκθέτης.

**Τα μέλη της οικογένειας INK4 προσδένονται συγκεκριμένα στις cdk4 και cdk6.** Η p16 δεν μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που στερούνται RB, γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί εμποδίζοντας την κινάση του διμερούς cdk-κυκλίνης να χρησιμοποιεί την RB ως υπόστρωμα. Μέσω της πρόσδεσής τους στις υπομονάδες cdk, οι πρωτεΐνες INK4 εμποδίζουν τις ενεργότητες των δύο συμπλόκων cdk4-κυκλίνης D και cdk6-κυκλίνης D.

Όπως και στην περίπτωση των p16 και p19, οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται στη cdk6 δίπλα στη θέση πρόσδεσης ATP. Το γεγονός αυτό αναστέλλει την καταλυτική δράση της cdk6 και πυροδοτεί μια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση, η οποία αποτρέπει την πρόσδεση κυκλίνης.

Η p21 είναι ένας καθολικός αναστολέας των cdk και προσδένεται σε όλα τα σύμπλοκα των cdk2, 4, 6. Δηλαδή είναι πιθανό να παρεμποδίζει την πρόοδο του κύκλου σε όλα τα στάδια της G1/S. Ο αναστολέας p21 είναι σταθερά προσδεδμένος με το διμερές cdk-κυκλίνης, αλλά έχει αποδειχθεί ότι σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1 η p21 δεν έχει ανασταλτική δράση. Η αύξηση του αριθμού των υπομονάδων της p21 που συνδέονται με τα διμερή cdk-κυκλίνης ευθύνεται για την αναστολή της λειτουργίας της κινάσης.

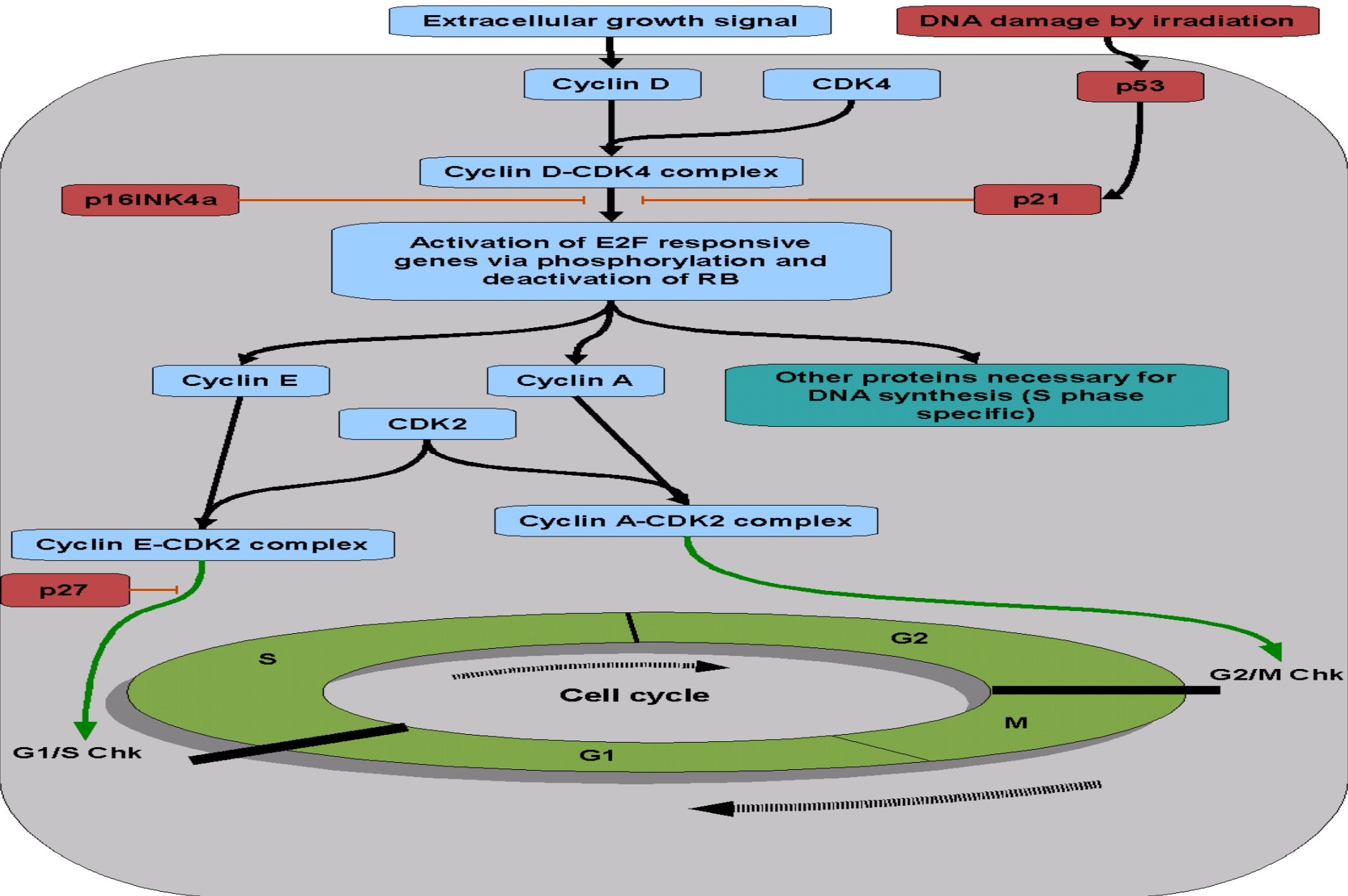
**Σε μετασχηματισμένα κύτταρα (από κυτταρικές σειρές που έχουν διαιωνιστεί σε καλλιέργεια), τα σύμπλοκα cdk-κυκλίνης στερούνται της p21. Αυτό υποδηλώνει ότι η p21 πιθανώς συμμετέχει στον έλεγχο της G1/S και ότι η εξασθένιση αυτού του ελέγχου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διαιώνιση των κυττάρων σε καλλιέργεια.**



Η αλληλουχία της p27 είναι εν μέρει συγγενική με εκείνη της p21 και η πρωτεΐνη αυτή επίσης προσδένεται χωρίς ειδικότητα σε σύμπλοκα cdk-κυκλίνης. Η συμπεριφορά της p27 αναστέλλει την πρόοδο διαμέσου της φάσης S, ενώ τα επίπεδα της p27 αυξάνονται μετά από χορήγηση TGFβ, που προκαλεί την είσοδο των κυττάρων σε αδρανή κατάσταση.

Οι p21 και p27 εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της καταλυτικής υπομονάδας των διμερών cdk-κυκλίνης από τη CAK. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτρέπουν και την καταλυτική ενεργότητα του συμπλόκου cdk-κυκλίνης. Οι p21 και p27 έχουν πιθανώς εν μέρει πλεονάζουσες λειτουργίες. Το μονοπάτι μέσω του οποίου αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο δεν είναι τελείως σαφές, αλλά γνωρίζουμε ότι δεν υπόκεινται στον έλεγχο της RB, αφού μπορούν να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων που στερούνται RB. Εφόσον και οι δύο είναι παρούσες σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, η φυσιολογική εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ίσως να απαιτεί την αύξηση του επιπέδου των διμερών cdk-κυκλίνης, προκειμένου να ξεπεράσουν ένα ανασταλτικό οριακό επίπεδο. Η p27 φέρεται να είναι ο κυριότερος συνδετικός κρίκος μεταξύ των εξωκυτταρικών μιτογόνων και του κυτταρικού κύκλου.

# Regulation of cell cycle - Schematic

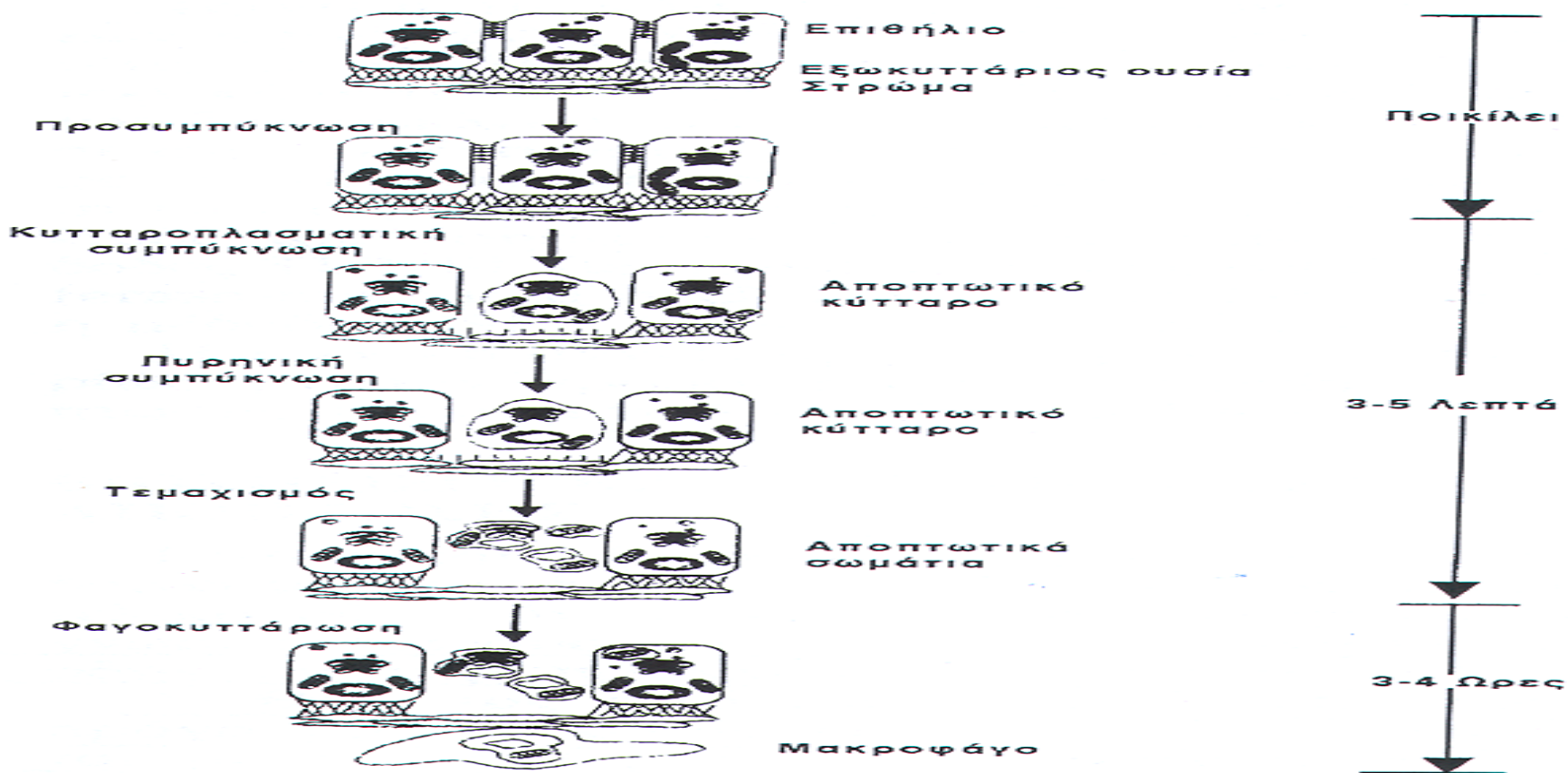


CDK – Cyclin Dependent Kinase  
G1/S Chk – G1/S checkpoint  
G2/M Chk – G2/M checkpoint

# ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός πολυκύτταρου ευκαρυωτικού οργανισμού, κάποια κύτταρα είναι αναγκαίο να πεθάνουν. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται **προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος** (programmed cell death) ή **απόπτωση** (apoptosis).

Η απόπτωση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός μονοπατιού που οδηγεί στην αυτοκτονία του κυττάρου με μια χαρακτηριστική διαδικασία: το κύτταρο γίνεται πιο συμπαγές, δημιουργούνται αποπτωτικά κυστίδια, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και το DNA κατακερματίζεται. Τα νεκρά κύτταρα διασπώνται σε οριοθετημένα από μεμβράνη θραύσματα και μπορεί να εγκολπωθούν από γειτονικά κύτταρα.



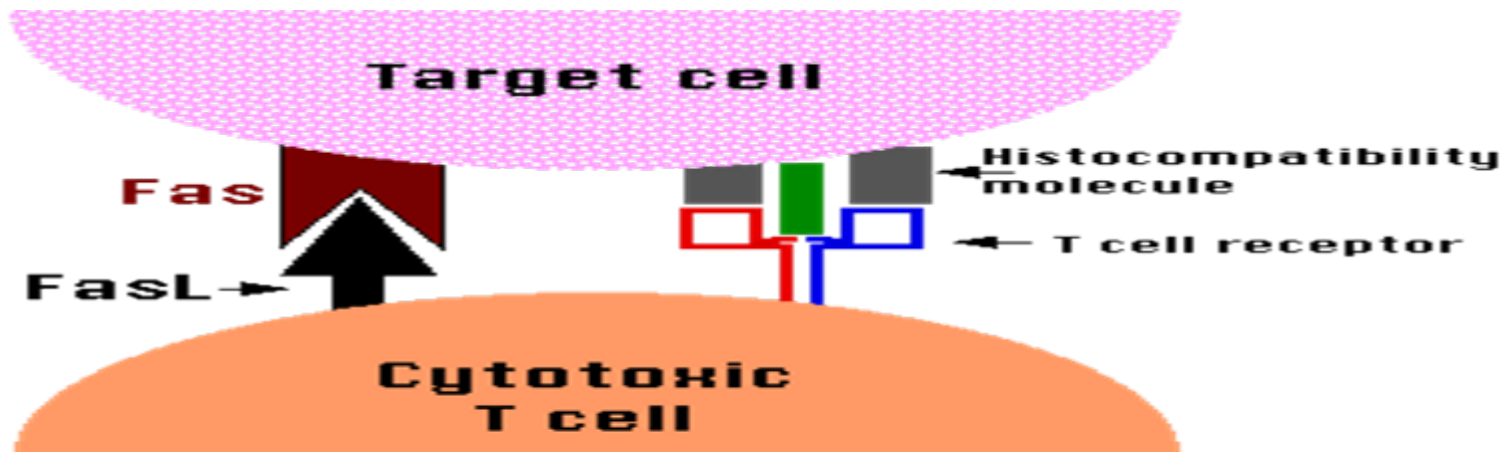


Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί από μια ποικιλία ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένης της απουσίας απαραίτητων αυξητικών παραγόντων, της ακτινοβολίας γ και της ενεργοποίησης συγκεκριμένων υποδοχέων.

Ένα άλλο μέσο ενεργοποίησης της απόπτωσης χρησιμοποιείται στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπου τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα προσβάλλουν κύτταρα-στόχους. **Η απόπτωση είναι ένας σημαντικός μηχανισμός και για την απομάκρυνση την απόπτωση είναι μια σημαντική άμυνα ενάντια στον καρκίνο.**

Επομένως η απόπτωση είναι σημαντική όχι μόνο στην ανάπτυξη των ιστών, αλλά και στην ανοσοποιητική άμυνα, καθώς και στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, η λανθασμένη ενεργοποίηση της απόπτωσης ενέχεται σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Ο υποδοχέας Fas ( FasR ) και ο προσδέτης Fas (Fas Ligand) είναι ένα ζεύγος πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης των οποίων η αλληλεπίδραση πυροδοτεί ένα από τα μείζονα μονοπάτια της απόπτωσης. Ο Fas σχηματίζει ένα ομοτριμερές. Το τριμερές συναρμολογείται πριν από την αλληλεπίδραση με τον προσδέτη. Η επίδραση του προσδέτη οδηγεί τα τριμερή να συγκροτήσουν μεγάλα συσσωματώματα.



One method by which cytotoxic T cells induce their targets (e.g., virus-infected cells) to commit suicide (apoptosis)

Ο Fas είναι ένας υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας, συγγενικός με τον υποδοχέα του TNF (**tumor necrosis factor**). Ο προσδέτης FasL είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που είναι συγγενική με τον TNF. Μια οικογένεια συγγενικών υποδοχέων περιλαμβάνει δύο υποδοχείς TNF, τον Fas και αρκετούς υποδοχείς που βρίσκονται στα T λεμφοκύτταρα. Και οι δύο υποδοχείς, Fas και TNF, παράγονται αρχικά με τη μορφή πρωτεϊνών προσδεδεδμένων σε μεμβράνη, αλλά μπορούν επίσης να αποκοπούν και να παράγουν διαλυτές πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν ως διαχεόμενοι παράγοντες. Η διαλυτή μορφή του TNF παράγεται κυρίως από μακροφάγα και αποτελεί έναν πλειοτροπικό παράγοντα που σηματοδοτεί πολλές κυτταρικές αποκρίσεις, όπως την κυτταροτοξικότητα. Οι περισσότερες αποκρίσεις στη διαλυτή μορφή του TNF, προκαλούνται μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα TNF-R1. Φαίνεται ότι η απόκριση ενεργοποιείται από μια ενδοκυτταρική επικράτεια των υποδοχέων, μήκους ~80 αμινοξέων, που εντοπίζεται κοντά στο C-άκρο. Η επικράτεια αυτή είναι μέτρια συντηρημένη (~28%) μεταξύ του υποδοχέα Fas και του TNF-R1 και ονομάζεται **επικράτεια θανάτου** (death domain).

Το μονοπάτι αυτό απαιτείται για τον περιορισμό του αριθμού των ώριμων λεμφοκυττάρων.

Τα μέλη της οικογένειας των **κασπασών (caspases, πρωτεάσες κυστεΐνης , ασπαρτικού οξέως)** είναι **σημαντικά συστατικά του μονοπατιού της απόπτωσης.**

Οι κασπάσες αποκόπτουν τους στόχους τους μετά από ένα κατάλοιπο ασπαρτικού.

Διαφορετικές κασπάσες δρουν σε συγγενείς αλλά όχι πανομοιότυπους στόχους.

Υπάρχουν ~14 μέλη της οικογένειας κασπασών στα θηλαστικά. Οι κασπάσες κατατάσσονται σε δύο ομάδες.

Η υποομάδα της κασπάσης 1 συμμετέχει στη φλεγμονώδη απόκριση. Η υποομάδα της κασπάσης 3 (που περιλαμβάνει την κασπάση 3 και τις κασπάσες 6-10) συμμετέχει στην απόπτωση.

Όλες οι κασπάσες συντίθενται με τη μορφή ανενεργών προκασπασών, οι οποίες φέρουν επιπρόσθετες αλληλουχίες (πρόδρομες επικράτειες) στο αμινοτελικό άκρο τους. Η αντίδραση ενεργοποίησης περιλαμβάνει την αποκοπή του προπεπτιδίου και την επακόλουθη διάσπαση της υπόλοιπης πρωτεΐνης σε μια μικρή και μια μεγάλη υπομονάδα.

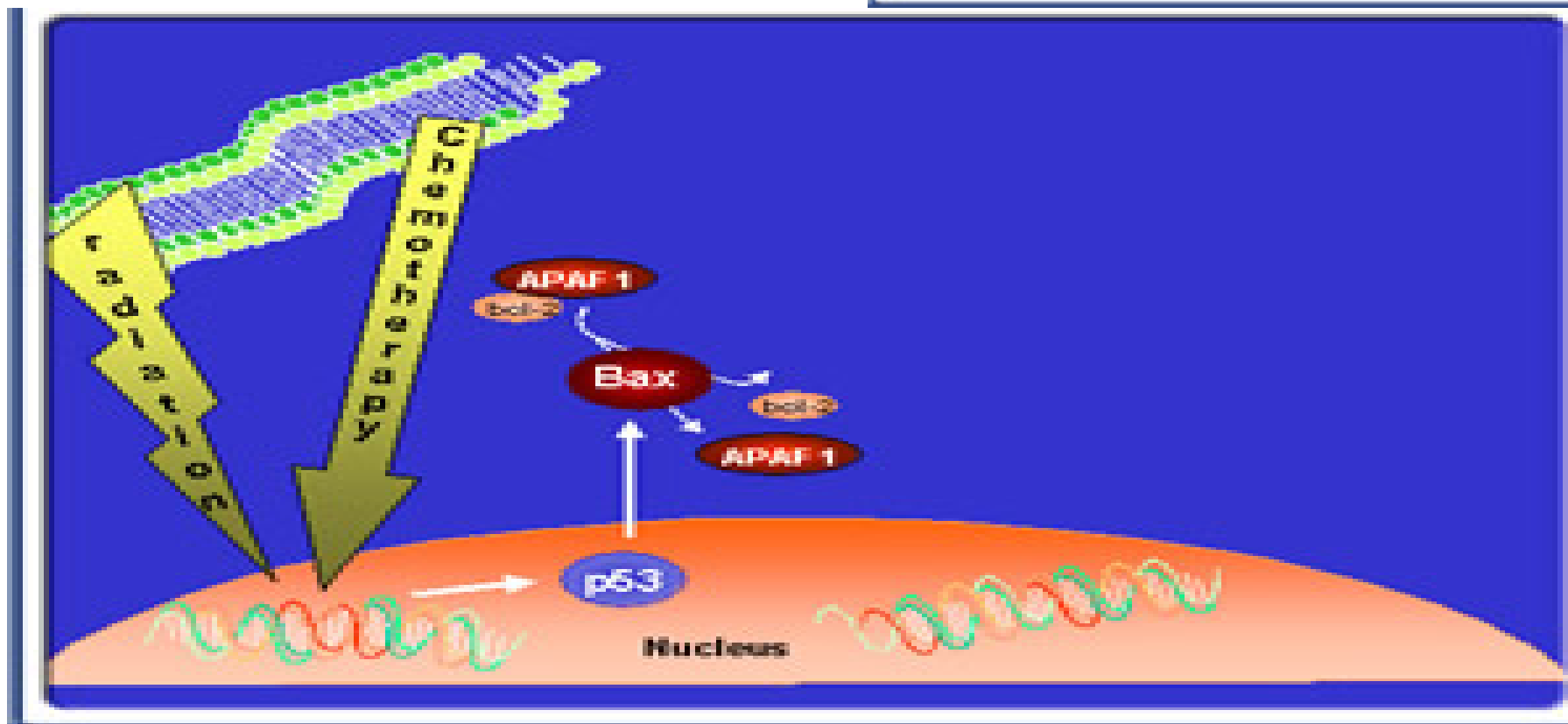
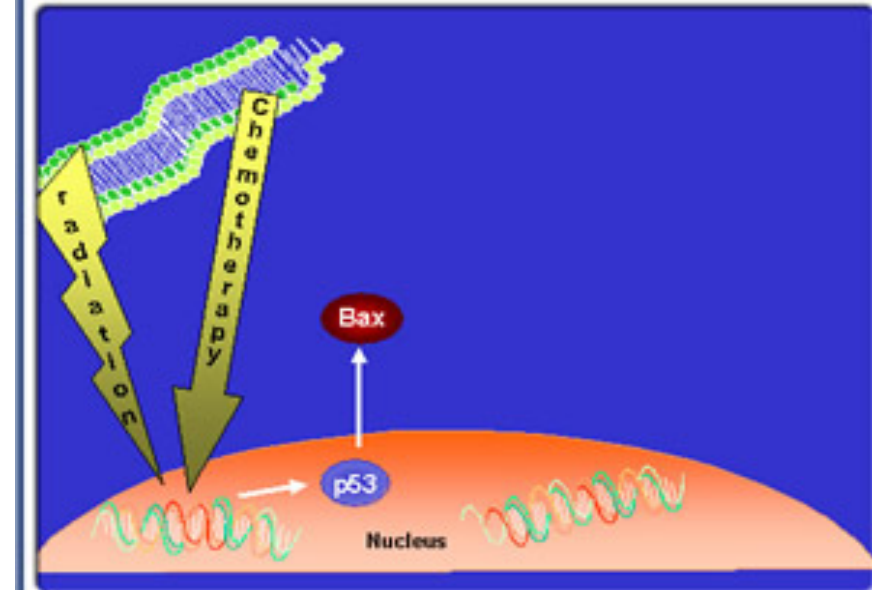
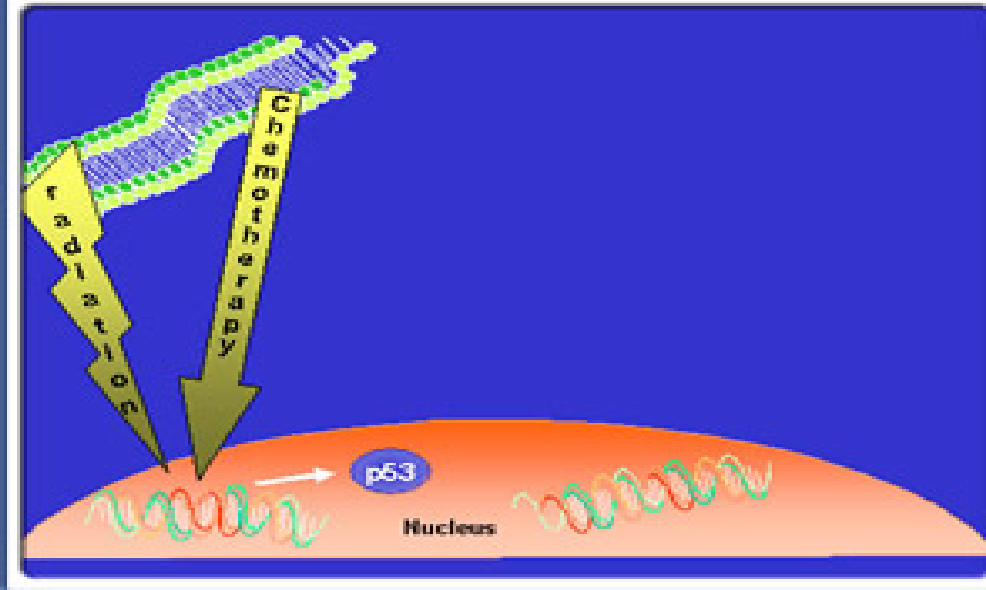
Όλες οι προκασπάσες, εκτός της προκασπάσης 9, πιθανότατα απαντώνται ως διμερή.

Στην έναρξη του μονοπατιού της απόπτωσης συμμετέχουν κασπάσες που φέρουν εκτενείς πρόδρομες επικράτειες. Ο διμερισμός προκαλεί μια αυτοκαταλυτική αποκοπή, η οποία ενεργοποιεί την κασπάση.

Η πρόδρομη επικράτεια της κασπάσης 8 φέρει δύο επικράτειες θανάτου που είναι υπεύθυνες για τη σύνδεσή της με το σύμπλοκο του υποδοχέα. Η αποκοπή για τη δημιουργία της ενεργής μορφής λαμβάνει χώρα μόλις η προκασπάση 8 στρατολογείται στο σύμπλοκο του υποδοχέα.

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης λαμβάνουν χώρα αλλαγές στα μιτοχόνδρια. Οι αλλαγές αυτές συνήθως ανιχνεύονται από αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και το κυτόχρωμα *c* απελευθερώνεται στο κυτταροδιάλυμα. Το μονοπάτι μετατοπίζεται από την κυτταρική μεμβράνη στο μιτοχόνδριο, όταν η κασπάση 8 τέμνει μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Bid. Η τομή αυτή απελευθερώνει την καρβοξυτελική επικράτεια της Bid, η οποία στη συνέχεια μετατοπίζεται στη μιτοχονδρική μεμβράνη. Η δράση της Bid ευθύνεται για την έκλυση του κυτοχρώματος *c*. Η Bid είναι μέλος της οικογένειας Bcl2.

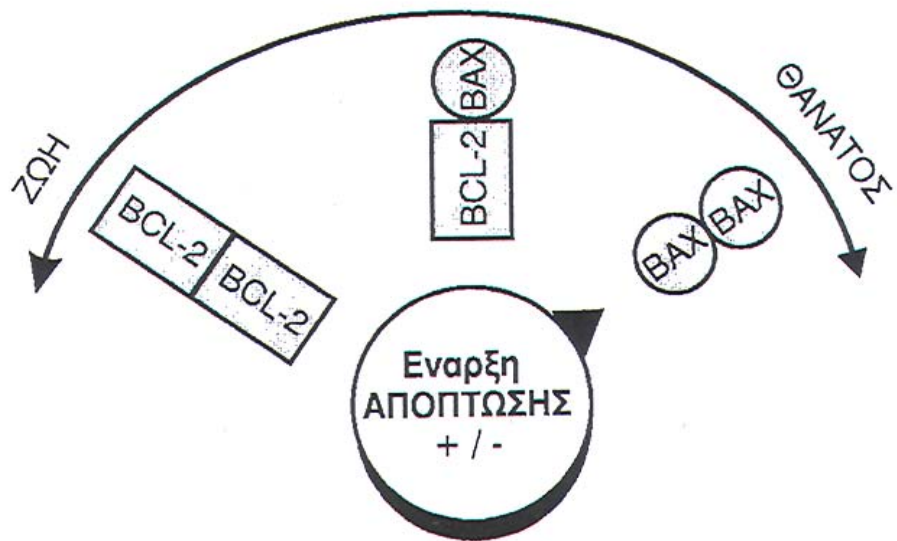
Βλάβη του DNA ενεργοποιεί την p53 η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί τον παράγοντα BAX ο οποίος απελευθερώνει τον αποπτωτικό παράγοντα Bcl 2 από την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1.



Κάποια μέλη αυτής της οικογένειας είναι απαραίτητα για την απόπτωση ενώ άλλα για την επιβίωση του κυττάρου. Η Bcl2, που αναστέλλει την απόπτωση σε πολλά κύτταρα, φέρει μια C-τελική επικράτεια αγκίστρωσης στη μεμβράνη και εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στην πυρηνική μεμβράνη και στις μεμβράνες του ΕΔ. Η Bcl2 αποτρέπει την έκλυση του κυτοχρώματος c. Το γονίδιο bcl 2 αρχικά ανακαλύφθηκε ως πρωτο-ογκογονίδιο το οποίο ενεργοποιείται σε λεμφώματα, εξαιτίας χρωμοσωμικών μεταθέσεων που έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του. Αυτό σημαίνει ότι η Bcl2 είναι μέλος μιας ομάδας πρωτεϊνών που, όταν εκφράζονται με λανθασμένο τρόπο, προκαλούν πολλαπλασιασμό ή ογκογένεση.

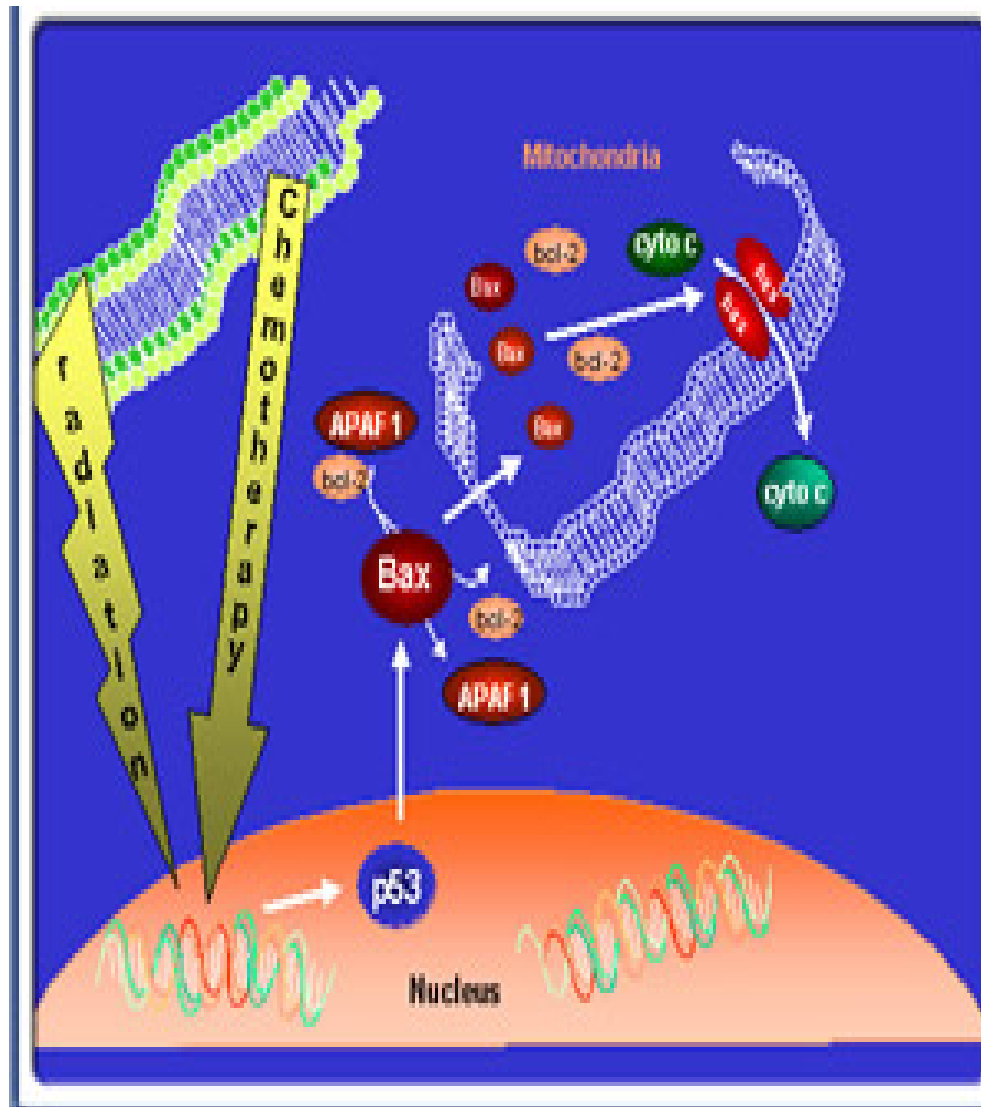
Κύτταρα θηλαστικών που υφίστανται απόπτωση από μια ποικιλία ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των μονοπατιών TNF/TNF-R1, μπορούν να επιβιώσουν με έκφραση της Bcl2. Υπάρχουν ορισμένα συστήματα στα οποία η Bcl2 δεν μπορεί να αποτρέψει την απόπτωση, άρα το μονοπάτι το οποίο παρεμποδίζει μπορεί να είναι κοινό, αλλά όχι μοναδικό. Η Bcl2 ανήκει σε μια οικογένεια της οποίας τα μέλη μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή.

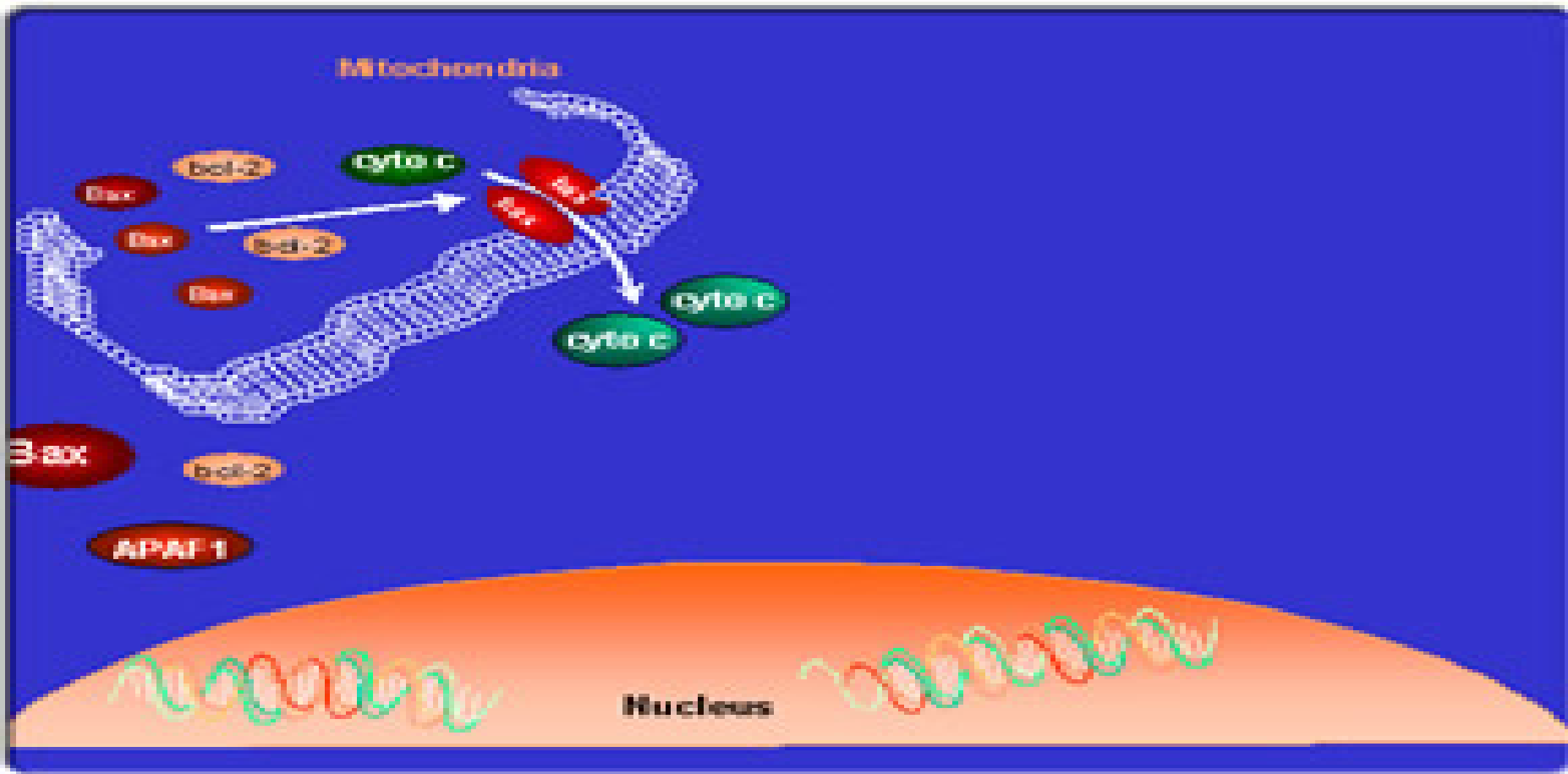
Δύο άλλα μέλη της οικογένειας αυτής είναι η bcl-x στην όρνιθα και η Bax στον άνθρωπο. Συνδυασμοί μεταξύ των μελών της οικογένειας μπορούν να παράγουν διμερή με διαφορετικές επιδράσεις στη απόπτωση και ενδεχομένως η σχετική αναλογία των μελών της οικογένειας που εκφράζονται σε ένα κύτταρο να είναι σημαντική. Η επιδεκτικότητα ενός κυττάρου στην απόπτωση ίσως είναι ανάλογη με το λόγο των Bax/ Bcl2.



Η πρωτεΐνη Araf-1  
 απελευθερώνεται στο  
 κυτταρόπλασμα και ο παράγοντας  
 BAX εισέρχεται στα μιτοχόνδρια  
 δημιουργώντας πόρους με  
 αποτέλεσμα την έκλυση εκτός

μιτοχονδρίων του  
 κυτοχρώματος C .



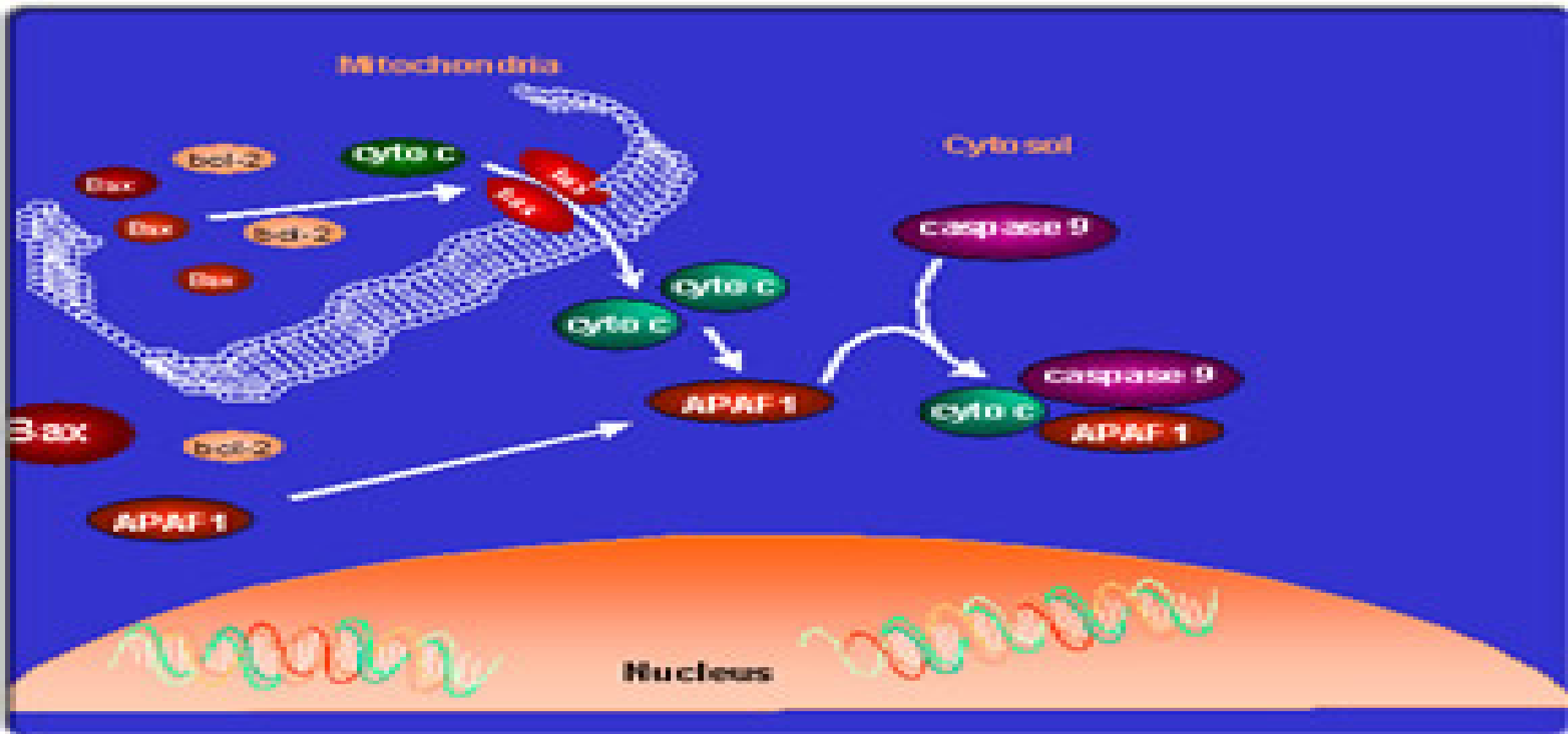


Στο κυτταρόπλασμα πλέον έρχονται σε επαφή η πρωτεΐνη Apaf-1 και το κυτόχρωμα c.

Το μιτοχόνδριο αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου για την επαγωγή της απόπτωσης.

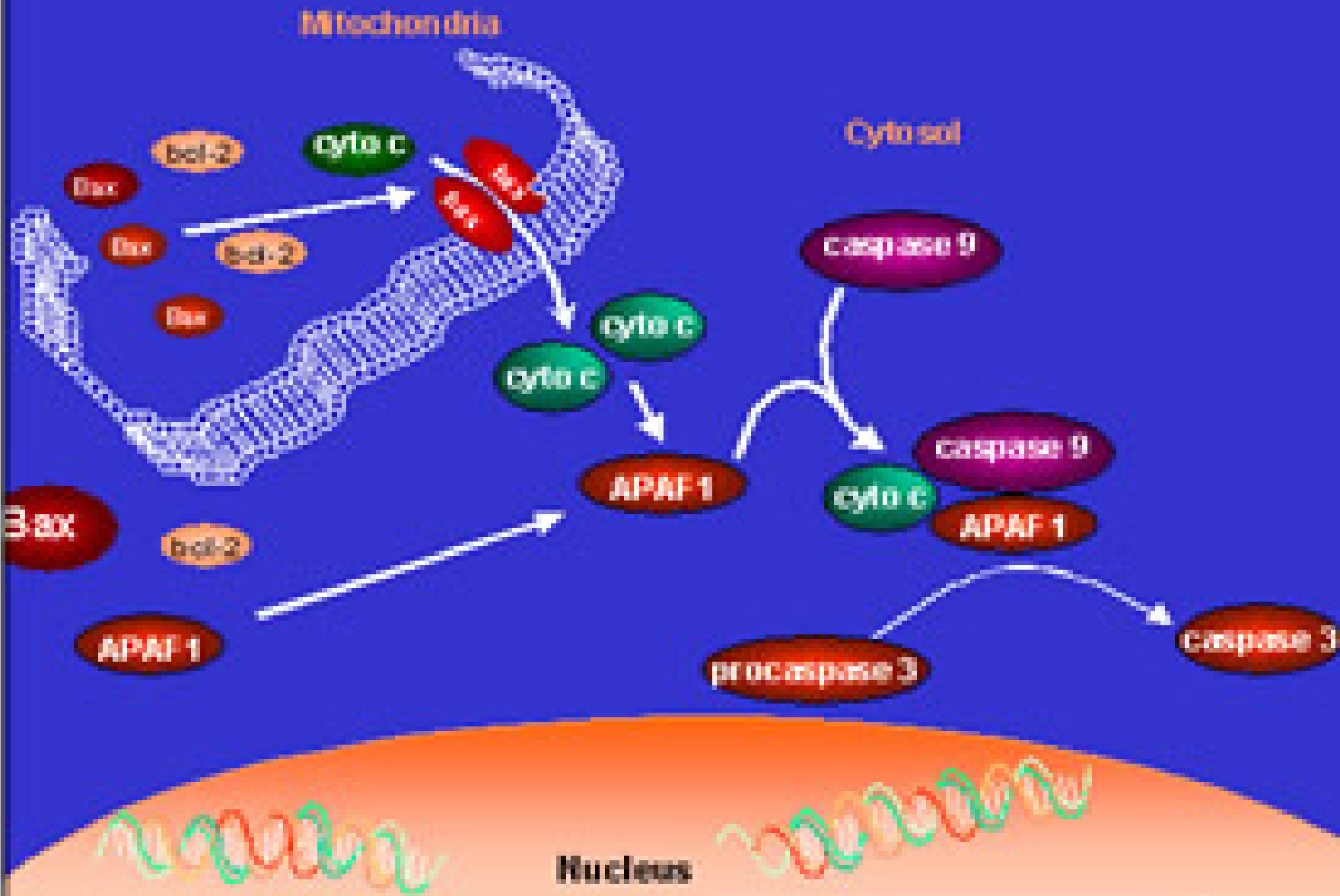
Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c έπεται των αλλαγών στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c είναι ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου στο μονοπάτι της απόπτωσης. Ο βασικός ρόλος του κυτοχρώματος c είναι να πυροδοτήσει την ενεργοποίηση της κασπάσης 9.





Το κυτόχρωμα c πυροδοτεί την αλληλεπίδραση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Araf-1 με την κασπάση 9 σε ένα σύμπλοκο που ονομάζεται αποπτώσωμα. Το κυτόχρωμα c προσδένεται στην Araf-1 και τη διευκολύνει να προσδέσει ATP.

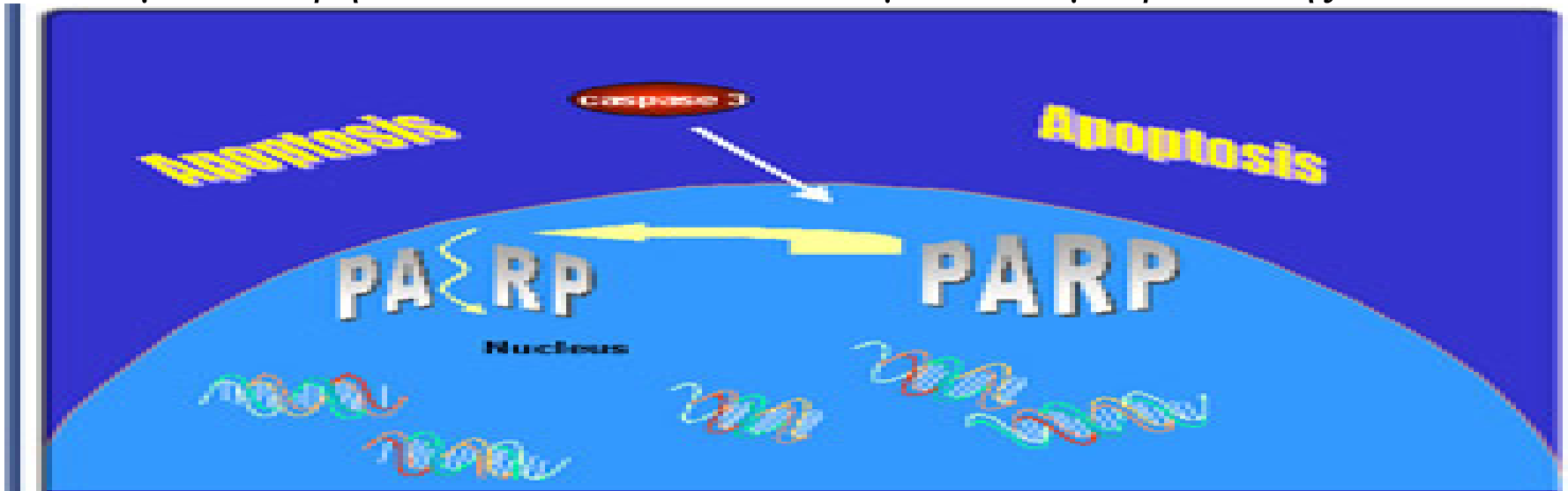
Το γεγονός αυτό προκαλεί τον ολιγομερισμό της Araf-1, η οποία αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωσή της και εκθέτει την επικράτεια πρόσδεσης κασπάσης. Στη συνέχεια, η Araf-1 προσδένει την προκασπάση 9. Η ενσωμάτωση της προκασπάσης 9 στο αποπτώσωμα πυροδοτεί την αυτό-ενεργοποιητική τομή της. Η κασπάση 9 με τη σειρά της τέμνει την προκασπάση 3, για να δημιουργήσει την κασπάση 3. Η κασπάση 9 ενεργοποιεί επίσης τις κασπάσες 6 και 7.



Η κασπάση 3 μέσω άγνωστων μηχανισμών εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και διασπά την πρωτεΐνη PARP (polyADP ribose polymerase) και οδηγεί σε κατάτμηση του DNA.

Δεν έχουμε προσδιορίσει όλους τους στόχους της πρωτεάσης που είναι απαραίτητοι για την απόπτωση. Έχει προσδιοριστεί ένα μονοπάτι που οδηγεί στον κατακερματισμό του DNA. Η κασπάση 3 αποκόπτει μία υπομονάδα ενός διμερούς που ονομάζεται DFF (**D**N**A** **f**ragmentation **f**actor, παράγοντας θραυσματοποίησης του DNA). Στη συνέχεια, η άλλη υπομονάδα του DFF ενεργοποιεί μια νουκλεάση που αποικοδομεί το DNA.

Ένα άλλο μονοπάτι για την αποικοδόμηση του DNA πυροδοτείται άμεσα από την απελευθέρωση ενός ενζύμου από το μιτοχόνδριο. Μέσα στο μιτοχόνδριο, η ενδονουκλεάση G εμπλέκεται στην αντιγραφή του DNA. Παρ' όλα αυτά, σε κύτταρα που διενεργούν απόπτωση, το ένζυμο αυτό απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο και αποικοδομεί το πυρηνικό DNA. Το αποπτωτικό μονοπάτι μπορεί επίσης να ανασταλεί.



Πρωτεΐνες καλούμενες **IAP** (inhibitor of **ap**optosis, αναστολέας της απόπτωσης) μπορούν να προσδεθούν σε προκασπάσες και ενεργοποιημένες κασπάσες και να αναστείλουν την ενεργότητά τους.

Τα κύτταρα των σπονδυλωτών περιέχουν μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Smac, η οποία απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια την ίδια στιγμή με το κυτόχρωμα c και δρα προσδένοντας τις IAP.

Η ύπαρξη μηχανισμών που αναστέλλουν και ενεργοποιούν την απόπτωση υποδεικνύει ότι πολλά αν όχι όλα τα κύτταρα έχουν μια εγγενή ικανότητα να διενεργούν απόπτωση.

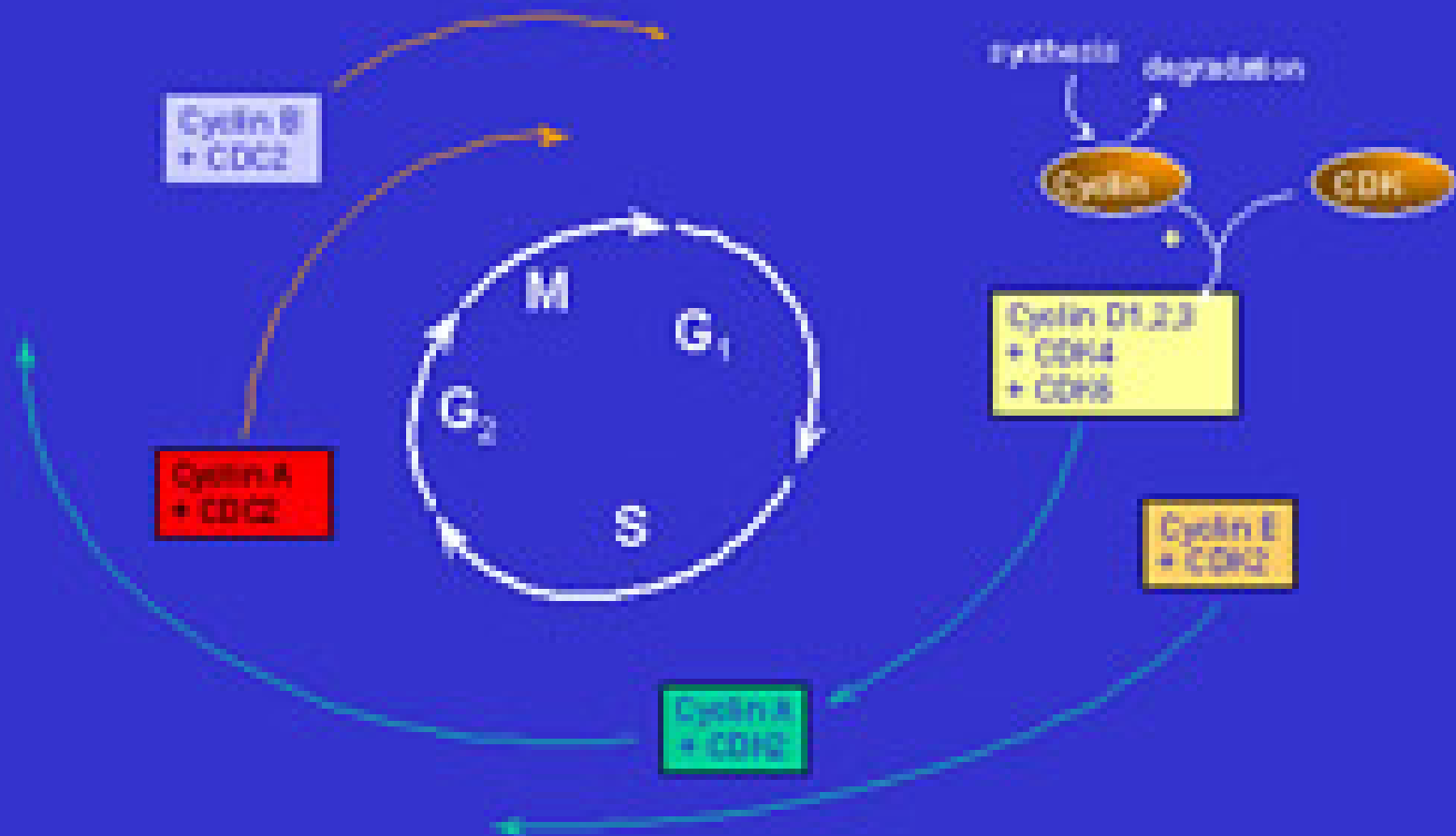
Οι CDKs είναι υπεύθυνες για την «κίνηση» του κυττάρου μέσω του κυτταρικού κύκλου. Π.Χ. ενεργοποίηση του CDK-4 θα ωθήσει το κύτταρο από την φάση G-1 στην φάση S. Χωρίς αυτές τις CDKs το κύτταρο δεν μπορεί να αναπτυχθεί και να ζήσει. Καταστέλλοντας τις CDKs οδηγούμε το κύτταρο σε απόπτωση. Αντιθέτως οι κυκλίνες ενεργοποιούν τις CDKs.

Αναστολείς των CDKs όπως η p21 δεσμεύονται πάνω στην CDK-2 σταματούν τον κυτταρικό κύκλο και οδηγούν σε απόπτωση

# Cyclin Dependent Kinase Inhibition and Apoptosis



# Cyclin Dependent Kinases and Cell Cycle Regulation



## Υπάρχουν πολλά αποπτωτικά μονοπάτια

Ο Fas μπορεί να ενεργοποιήσει την απόπτωση και μέσω ενός εναλλακτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει την κινάση JNK, της οποίας το πιο σημαντικό υπόστρωμα είναι ο μεταγραφικός παράγοντας c-Jun. Φαίνεται ότι αυτό το μονοπάτι πραγματοποιείται μέσω της πρωτεΐνης Daxx. Η πρόσδεση της FADD και της Daxx στον Fas είναι ανεξάρτητη: κάθε προσαρμοστής αναγνωρίζει μια διαφορετική θέση πάνω στον Fas. Μετά την πρόσδεση του Fas στον προσαρμοστή, τα δύο μονοπάτια λειτουργούν ανεξάρτητα. Ο υποδοχέας TNF μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την JNK μέσω ξεχωριστών πρωτεϊνών-προσαρμοστών.

Ένα άλλο αποπτωτικό μονοπάτι πυροδοτείται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, τα οποία σκοτώνουν τα κύτταρα-στόχους τους με μια διαδικασία που ενέχει την απελευθέρωση κοκκίων που περιέχουν πρωτεάσες σερίνης και άλλα συστατικά λύσης.

Ένα τέτοιο συστατικό είναι η περφορίνη, η οποία μπορεί να δημιουργήσει οπές στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου και κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να σκοτώσει τα κύτταρα-στόχους.

## ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

### **Ρύθμιση της μετάβασης από την G1 στη φάση S**

Ο κύριος ρυθμιστής στη φάση G1, αλλά και στις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, είναι ένα **σύμπλοκο δύο πρωτεϊνών: μιας κινάσης και μιας κυκλίνης.**

Η κυκλίνη ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών, που κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι η συγκέντρωσή τους στα κύτταρα παρουσιάζει σημαντική **διακύμανση στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.**

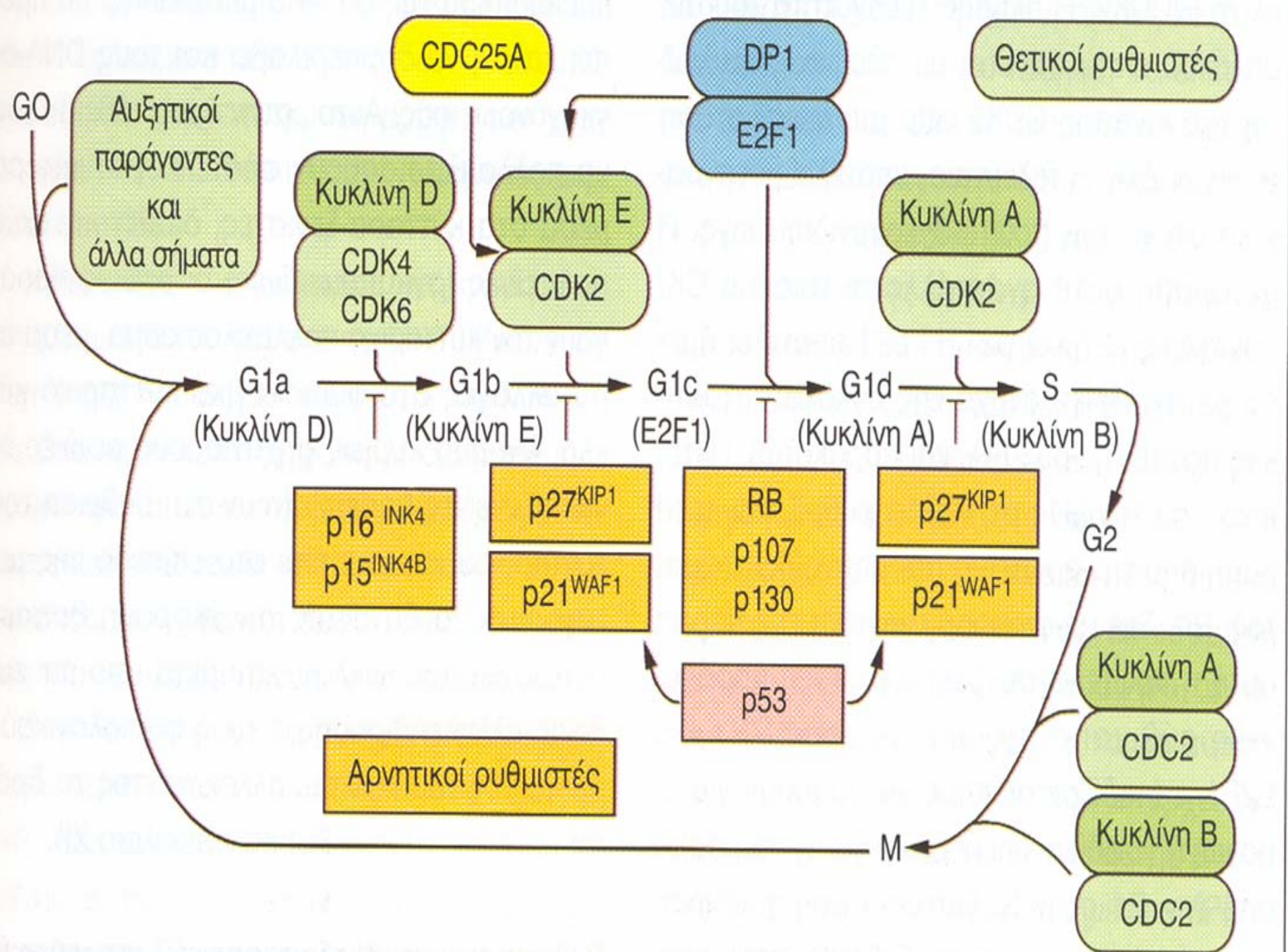
Έχουν βρεθεί στους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς αρκετές κυκλίνες (κυκλίνη A έως και κυκλίνη H), η συγκέντρωση των οποίων εμφανίζει μέγιστο σε διαφορετική **χρονική στιγμή στη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου.**

Το έτερο συστατικό του ρυθμιστικού συμπλόκου, η κινάση, με κύριο χαρακτηριστικό της ότι η ενεργότητα της εκδηλώνεται μόνο μετά από την ένωσή της με μία κυκλίνη. Ονομάσθηκαν δε γι' αυτό το λόγο κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases ή Cdks).

Διευκρινίζεται ότι η ρύθμιση της μετάβασης σε κάθε χρονικό σημείο του κύκλου μπορεί να γίνεται από περισσότερα του ενός ζεύγη κυκλίνης/κινάσης και ακόμη ότι το ίδιο μόριο κυκλίνης μπορεί να δράσει ως σύμπλοκο με άλλη κινάση ή και το αντίστροφο, σε άλλο σημείο του κύκλου.

Στο κατωτέρω σχήμα απεικονίζεται διαγραμματικά η ρύθμιση της μετάβασης από την G1 στη φάση S.





Εκτός από την ύπαρξη των συμπλόκων κυκλίνης/κινάσης, στη ρύθμιση συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες. Μια κατηγορία τέτοιων παραγόντων είναι **οι αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών** (Cyclin-dependent Kinase Inhibitors CKIs), οι οποίοι ανήκουν είτε στην οικογένεια **Cip/Kip** (όπως οι πρωτεΐνες **p21, p27, p57**), είτε στην **οικογένεια Ink4** (όπως οι πρωτεΐνες **p16, p15, p18, p19**).

Οι CKIs ενώνονται με την κινάση, στο σύμπλοκο κυκλίνης/κινάσης που αναγνωρίζουν και αδρανοποιούν την ενεργότητα κινάσης του συμπλόκου, εμποδίζοντας έτσι την περαιτέρω πορεία του κυτταρικού κύκλου.

Για τη μετάβαση από την αρχή της φάσης G1 (G1a) στην G1b απαιτείται η δράση των συμπλόκων της κυκλίνης D με CDK4 και CDK6. Η μετάβαση αναστέλλεται από τις CKI p16 και p15.

Για τη μετάβαση από την G1b στην G1c, απαιτείται η δράση του συμπλόκου κυκλίνη E/CDK2. Η πλήρης ενεργότητα του συμπλόκου επιτυγχάνεται με αποφωσφορυλίωση της κινάσης CDK2 από μια φωσφατάση την CDC25A. Η τελευταία, αποτελεί μεταγραφικό στόχο του πρωτο-ογκογονιδίου myc. Η μετάβαση αυτή αναστέλλεται από τις CKI πρωτεΐνες p27 και p21.

**Η p21 αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53.** Η πορεία από την G1c στην G1d ρυθμίζεται κατά βάση από την πρωτεΐνη του **ρετινοβλαστώματος, Rb**. Στη μη-φωσφορυλιωμένη της μορφή αυτή η πρωτεΐνη συνδέεται με τους παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής DP1 & E2F1, εμποδίζοντας τους να δράσουν για επαγωγή γονιδίων υπεύθυνων για το πέρασμα από την G1 στην S. Ωστόσο, ενεργοποίηση του συμπλόκου κυκλίνης E/CDK2 στην αμέσως προηγούμενη φάση (G1b), έχει ως αποτέλεσμα φωσφορυλίωση της Rb από την CDK2 και απομάκρυνση έτσι της Rb από το σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων DP1 και E2F1.

Οι τελευταίοι, ωθούν το κύτταρο στο τέλος της G1(G1d), όπου υπεύθυνο για τη μετάβαση στη φάση S είναι το σύμπλοκο κυκλίνης A/CDK2 . Στο σημείο αυτό, μπορεί πάλι να εμποδισθεί η πορεία του κύκλου από τις CK1 **p27** και **p21**.

### **Ρύθμιση της μετάβασης από την G2 στη φάση M**

Μια άλλη σημαντική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου συνδέεται με τη **φάση G2**. Στη φάση αυτή δρουν παράγοντες που ελέγχουν την είσοδο του κυττάρου στη φάση διαίρεσης και τα φαινόμενα που τη συνοδεύουν (**συμπύκνωση της χρωματίνης στη μορφή των χρωμοσωμάτων, αποδόμηση της πυρηνικής μεμβράνης** ).

Η είσοδος του κυττάρου στη φάση M ελέγχεται από τον παράγοντα **MPF (Maturation Promoting Factor)**

Ο MPF στην ενεργοποιημένη του μορφή αποτελείται από το σύμπλοκο δύο πρωτεϊνών: Η **CDK1**(cyclin-dependent kinase), με μοριακό βάρος 34 Kda, διαθέτει ιδιότητες πρωτεϊνικής κινάσης. Όταν ενεργοποιείται (από την επαφή της με το έτερο συστατικό, την κυκλίνη B) **φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα. Ανάμεσα σ' αυτά συγκαταλέγονται η ιστόνη H1 και οι πυρηνικές λαμίνες.**

Η φωσφορυλίωση της H1 έχει ως αποτέλεσμα συμπύκνωση της χρωματίνης, ενώ αποφωσφορυλίωσή της οδηγεί σε αποσυμπύκνωση.

Αντίθετα, φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών του πυρηνικού περιβλήματος (**λαμίνες**), έχει ως αποτέλεσμα αποδόμηση της πυρηνικής μεμβράνης. Η συγκέντρωση της κυκλίνης B στο κύτταρο εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα επίπεδά της αυξάνουν σε όλη τη διάρκεια της μεσόφασης και ελαττώνονται δραματικά κατά τη διάρκεια της διαίρεσης .

Τα επίπεδα της **κυκλίνης B** είναι αυτά που καθορίζουν ουσιαστικά την **αδρανοποίηση/ενεργοποίηση του MPF** και το πέρασμα από τη μεσόφαση στη **διαίρεση**. Ενεργοποίηση του **MPF** στο τέλος της μεσόφασης σηματοδοτεί την **έναρξη της διαίρεσης** (συσπείρωση χρωματίνης, αποδόμηση της πυρηνικής μεμβράνης, δημιουργία ατράκτου). **Ο ενεργοποιημένος MPF ενεργοποιεί με τη σειρά του ένζυμα (σύστημα ουμπικιτίνης), για γρηγορότερη αποδόμηση της κυκλίνης B, με τελικό αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του ίδιου του MPF και επιστροφή στη μεσόφαση για ένα νέο κυτταρικό κύκλο.**

### **Γενική θεώρηση των σημείων ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου**

Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη εσωτερικών σημείων ελέγχου (checkpoints) στον κύκλο, ώστε να επιβεβαιώνεται ότι μια κρίσιμη διαδικασία έχει ολοκληρωθεί επιτυχώς, πριν το κύτταρο συνεχίσει στην επόμενη. Αν διαπιστωθεί βλάβη στο DNA κατά την διάρκεια της **G1, εμποδίζεται η μετάβαση στη φάση S**, με σκοπό να επιδιορθωθεί αυτή πριν το κύτταρο την «αναπαράγει» με διπλασιασμό του DNA του στη φάση S.

Η ύπαρξη ακέραιου γενετικού υλικού είναι προϋπόθεση και για την είσοδο ενός κυττάρου στη φάση της διαίρεσης που τοποθετούν ένα ακόμη σημείο ελέγχου **στη μετάβαση G2→M**. Ένα τρίτο σημείο ελέγχου βρίσκεται **στη μετάβαση από τη φάση S στη G2** και σταματάει τον κύκλο σε περίπτωση που η διαδικασία αντιγραφής του γενετικού υλικού δεν έχει ολοκληρωθεί επιτυχώς.

**Τα μόρια-αισθητήρες, που ανιχνεύουν τη δυσλειτουργία σε καθένα από τα προαναφερθέντα σημεία ελέγχου δεν είναι πλήρως γνωστά.**

**Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις αναφέρουν τη δυσλειτουργία σε ένα κεντρικό συντονιστή, με ρόλο «κλειδί» στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την πρωτεΐνη p53.**

**Η πρωτεΐνη p53, προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, βρίσκεται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε μικρή συγκέντρωση στον πυρήνα των κυττάρων, όπου λειτουργεί ως παράγοντας ρύθμισης της μεταγραφής.**

Βλάβες στο DNA, προσβολή του κυττάρου από ιό, υπερέκφραση κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων(όπως το myc), αλλά και βλάβη ή αδρανοποίηση της πρωτεΐνης Rb, οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων της φυσιολογικής μορφής της p53.

Η p53 επάγει την έκφραση του γονιδίου για την p21, ενός αναστολέα πολλών κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Μέσω αυτού του μηχανισμού επιτυγχάνεται το σταμάτημα του κύκλου σε διάφορα σημεία, με σκοπό να δοθεί στο κύτταρο η δυνατότητα να διορθώσει τη βλάβη.Όταν επιτευχθεί αυτό αίρεται η αναστολή και το κύτταρο μπορεί να συνεχίσει τον κύκλο.

Σε περίπτωση που η δυσλειτουργία δεν μπορεί να αντιμετωπισθεί επιτυχώς από το κύτταρο, τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε **απόπτωση**, μέσω της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων κυτταρικού θανάτου.

**Με βάση τα παραπάνω, καθίσταται προφανής ο κρίσιμος ρόλος της p53 αλλά και της p21 στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Δεν είναι τυχαίο εξάλλου ότι το μόριο της p53 βρίσκεται συχνά μεταλλαγμένο στους περισσότερους ανθρώπινους όγκους.**

**Σε περιπτώσεις αλλαγής ή απώλειας ενός ή περισσότερων από τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη φυσιολογική κυτταρική αύξηση, συχνά εμφανίζονται κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα.**

**Η συσσώρευση τέτοιων κυττάρων, που δεν δημιουργούνται για να καλύψουν συγκεκριμένες ανάγκες ενός ιστού, αλλά ύστερα από βλάβη στο σύστημα ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, δημιουργεί τους όγκους.**

**Οι όγκοι διακρίνονται σε καλοήθεις που δεν δημιουργούν διηθήσεις σε άλλους ιστούς και κακοήθεις που έχουν την τάση να μεταναστεύουν σε άλλα σημεία του οργανισμού δημιουργώντας μεταστάσεις.**

## **ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ** **Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες (primary cell cultures) και κυτταρικές** **σειρές (cell lines).**

Μια πρωτογενής καλλιέργεια κυττάρων προκύπτει αν μεταφέρουμε κύτταρα του οργανισμού σε καλλιεργητικό υλικό που περιέχει όλα τα απαραίτητα για τη θρέψη των κυττάρων συστατικά και βόειο ορό , ως πηγή αυξητικών παραγόντων. Τα κύτταρα που ευκολότερα επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε μια τέτοια καλλιέργεια είναι οι «ινοβλάστες» και τα «επιθηλιακά» κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά προσκολλώνται στο στερεό θρεπτικό υλικό του τρυβλίου με τη βοήθεια των πρωτεϊνών που τα ίδια εκκρίνουν (φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη, κολλαγόνο). Η προσκόλλησή τους σε στερεό υπόστρωμα είναι μια συνθήκη απαραίτητη για την αύξησή τους. Ένα χαρακτηριστικό των πρωτογενών καλλιεργειών είναι ότι τα κύτταρά τους δεν διατηρούνται επ' άπειρον, όσο και αν φροντίζουμε να παρέχουμε στην καλλιέργεια όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Τα κύτταρα πεθαίνουν μετά από 50 περίπου διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις.

Οι φάσεις που διανύει μια πρωτογενής κυτταρική καλλιέργεια από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί, μέχρι τη στιγμή που θα πεθάνουν τα κύτταρα είναι οι εξής: Στη φάση I αμέσως μετά την ενοφθάλμιση του θρεπτικού υλικού με τα κύτταρα, αρκετά από τα κύτταρα πεθαίνουν, ενώ κάποια επικρατούν στον πληθυσμό και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται π.χ. οι «ινοβλάστες» (**πρωτογενής κυτταρική σειρά**).

Στη φάση II οι ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται με σταθερό ρυθμό για περίπου 50 κυτταρικές γενιές. Είναι ευνόητο, ότι κατά το διάστημα αυτό τα κύτταρα αραιώνονται συνεχώς και τα θρεπτικά υλικά ανανεώνονται (**ημι-συνεχής κυτταρική σειρά**).

Στη φάση III ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων αρχίζει να επιβραδύνεται και αυξάνει αντίστοιχα ο ρυθμός των θανάτων, μέχρι την εξαφάνιση όλης της καλλιέργειας. Ωστόσο, ορισμένες πρωτογενείς καλλιέργειες μπορεί να αποκτήσουν αθανασία και έτσι να διατηρηθούν ενεργές για πάντα. Στη περίπτωση αυτή έχουν μετατραπεί σε **συνεχείς κυτταρικές σειρές.**

Η πρωτογενής καλλιέργεια μετά από ορισμένες κυτταρικές γενιές περνάει μια «κρίση» κατά τη διάρκεια της οποίας τα περισσότερα κύτταρα πεθαίνουν. Σε ορισμένα όμως κύτταρα της καλλιέργειας συμβαίνουν αλλαγές (π.χ. ενεργοποίηση γονιδίων συνεχούς αύξησης) που τους επιτρέπουν να αυξηθούν με γοργούς ρυθμούς και να παραμείνουν ζωντανά για «πάντα». **Η «αθανασία» αποτελεί τη μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στα κύτταρα των πρωτογενών και ημι-συνεχών καλλιεργειών και των συνεχών κυτταρικών σειρών.**

Συνήθως τα κύτταρα μιας κυτταρικής σειράς συνήθως παρουσιάζουν χρωμοσωμικές ατυπίες (ανευπλοειδίες) και διαφορετικές ιδιότητες από τα κύτταρα της πρωτογενούς καλλιέργειας από τα οποία προήλθαν.

Μια πολύ γνωστή και ευρύτατα χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά είναι η σειρά NIH 3T3. Πρόκειται για κυτταρική σειρά κυττάρων ποντικού, που αποτελείται από επίπεδα κύτταρα, τύπου ινοβλαστών. Πήρε το όνομα της από τον τρόπο με τον οποίο η πρωτογενής καλλιέργεια αυτών των κυττάρων αραιώνεται ώστε να υπάρχει πάντα συγκεκριμένη πυκνότητα κυττάρων στο τρυβλίο της καλλιέργειας: (3 X 10<sup>5</sup> κύτταρα μεταφέρονται κάθε 3 μέρες σε τρυβλία διαμέτρου 50 mm.)



## **Χαρακτηριστικά Φυσιολογικών Κυττάρων σε Καλλιέργεια**

Μια καλλιέργεια κυττάρων συνήθως εμφανίζει τα εξής χαρακτηριστικά:

1. εξάρτηση από την επιφάνεια προσκόλλησης,
2. εξάρτηση από την παροχή ορού αίματος, και
3. πυκνότητα κορεσμού της αύξησης.

### **Εξάρτηση από την επιφάνεια προσκόλλησης**

Όταν τα καλλιεργούμενα κύτταρα μεγαλώνουν σε εναιώρημα έχουν σφαιρικό σχήμα και σπάνια διαιρούνται. Αν στη συνέχεια μεταφερθούν σε περιβάλλον όπου μπορούν να προσκολληθούν σε στερεό υπόστρωμα αποκτούν πεπλατυσμένο σχήμα και διαιρούνται κανονικά.

### **Εξάρτηση από την παροχή ορού αίματος και πυκνότητα κορεσμού αύξησης**

Καλλιεργούμενα κύτταρα, στα οποία χορηγούνται όλα τα θρεπτικά συστατικά αλλά όχι βόειος ορός, δεν μπορούν να διαιρεθούν και συνήθως βγαίνουν εκτός κύκλου σε φάση ηρεμίας G0. Όταν στο καλλιεργητικό μέσο προστεθεί και ορός τότε τα κύτταρα αυτά ξαναμπαίνουν σε κύκλο. Στον ορό του περιέχονται σε πολύ μικρές ποσότητες πρωτεΐνες που λειτουργούν ως σηματοδότες για την κυτταρική αύξηση και διαίρεση, **οι αυξητικοί παράγοντες. Οι πιο συνηθισμένοι και απαραίτητοι στα θρεπτικά υλικά είναι ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF), ο αυξητικός παράγοντας των επιδερμικών κυττάρων (EGF) και ο αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με την ινσουλίνη (IGF-I).**

Παράγοντες όπως ο PDGF και οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGFs) είναι απαραίτητοι στο πρώτο στάδιο της μιτογονικής διέγερσης. Αυτοί προετοιμάζουν τα εν ηρεμία κύτταρα, ώστε να δεχθούν στη συνέχεια τη δράση άλλων αυξητικών παραγόντων, όπως οι EGF και IGF-I.

Για όλα τα φυσιολογικά κύτταρα σε καλλιέργεια υπάρχει μια συγκεκριμένη πυκνότητα κυττάρων πάνω από την οποία η αύξηση του πληθυσμού σταματάει. Η πυκνότητα αυτή καλείται πυκνότητα κορεσμού (saturation density). Τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά αλλά δεν διαιρούνται. Τα επίπεδα της πυκνότητας κορεσμού διαφέρουν από ένα είδος κυττάρου σε άλλο και ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων στο θρεπτικό υλικό.

### **Μετασχηματισμό κυττάρων σε καλλιέργεια**

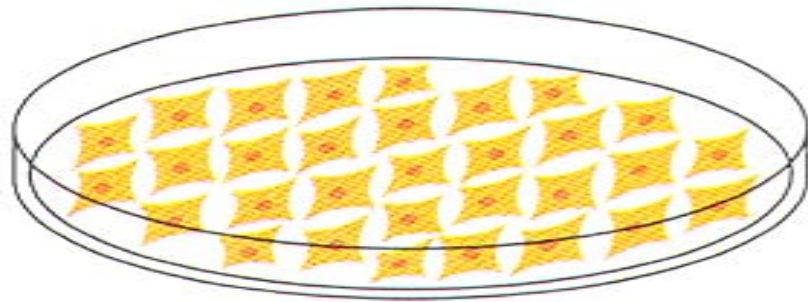
Σημαντικές αλλαγές στα χαρακτηριστικά αύξησης φυσιολογικών κυττάρων σε καλλιέργεια μπορεί να προκύψουν όταν αυτά εκτεθούν σε ακτινοβολίες, χημικές ουσίες ή προσβληθούν από ογκογόνους ιούς.

Ορισμένα από τα κύτταρα αυτά αν ενεθούν στη συνέχεια σε πειραματόζωα, μπορούν να προκαλέσουν τη δημιουργία όγκου in vivo. Τα κύτταρα αυτά καλούνται μετασχηματισμένα (transformed). Ο μετασχηματισμός κυττάρων σε καλλιέργεια βρίσκει μεγάλη εφαρμογή ως μοντέλο για την πρόκληση καρκίνου σε πειραματόζωα.

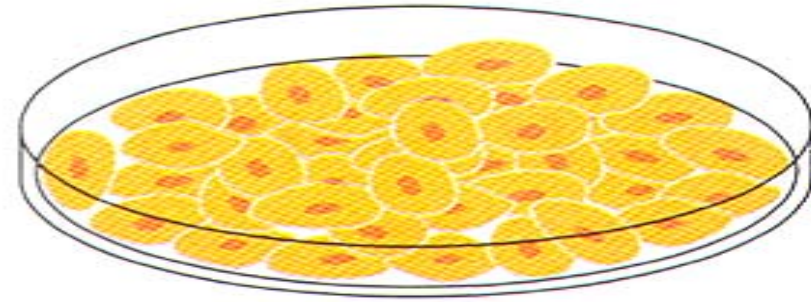
Τα αρχικά φυσιολογικά κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν μπορεί να ανήκουν είτε σε μια πρωτογενή καλλιέργεια, είτε σε μια κυτταρική σειρά. Κύτταρα της κυτταρικής σειράς NIH 3T3, που έχουν προσβληθεί από τον ιό των πιθήκων SV40 (μετασχηματισμένα SV-NIH 3T3 κύτταρα) μπορεί να προκαλέσουν τη δημιουργία όγκων όταν ενεθούν σε αθυμικά ποντίκια. Τα κύτταρα SV-NIH 3T3 αποτελούν, αν καλλιεργηθούν, μια μετασχηματισμένη κυτταρική σειρά (transformed cell line) με ιδιότητες διαφορετικές της κυτταρικής σειράς NIH 3T3 από την οποία προήλθαν. Η βασική διαφορά ανάμεσα σε κυτταρικές

σειρές και μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές είναι ότι οι πρώτες δεν μπορούν να προκαλέσουν μετασχηματισμό όταν ενεθούν σε πειραματόζωα in vivo.

NORMAL CELLS



TRANSFORMED CELLS



Flat and organized  
Contact inhibited  
Serum dependent  
Anchorage dependent  
Nontumorigenic

Piled up and disorganized  
Not contact inhibited  
Growth factor independent  
Anchorage independent  
Form tumors in nude mice

### **Αύξηση ανεξάρτητη από την επιφάνεια προσκόλλησης**

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα μετασχηματισμένα δεν έχουν ανάγκη να προσκολληθούν σε στερεό υπόστρωμα προκειμένου να πολλαπλασιασθούν. Έτσι, γύρω από ένα κύτταρο που αιωρείται σε υγρό θρεπτικό υλικό μπορεί να δημιουργηθεί μια ολόκληρη αποικία κυττάρων. Αυτή η ιδιότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων εξηγεί ίσως τη μεγάλη ικανότητά τους να φτιάχνουν όγκους όταν ενίονται σε πειραματόζωα.

### **Απώλεια του μηχανισμού αναστολής εξ επαφής της κίνησης**

Όταν φυσιολογικά κύτταρα σε καλλιέργεια έρθουν σε επαφή, το ένα ή και τα δύο αλλάζουν κατεύθυνση κίνησης για να μην αλληλοκαλυφθούν. Ενώ όταν δεν υπάρχει ελεύθερος χώρος, σταματούν την κίνησή τους. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως αναστολή εξ επαφής της κίνησης (contact inhibition of movement).

Αντίθετα, τα μετασχηματισμένα κύτταρα, φαίνεται πως δεν αντιλαμβάνονται τα γειτονικά τους κύτταρα. Όταν έλθουν σε επαφή μ' ένα άλλο κύτταρο δε σταματάνε να κινούνται, αλλά συνεχίζουν, και φτιάχνουν πολύστοιβες σειρές.

### **Ελαττωμένες απαιτήσεις για αυξητικούς παράγοντες**

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύσσονται σε καλλιεργητικά υλικά με μικρότερες συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων και ορμονών από αυτές που χρειάζονται για την αύξηση των φυσιολογικών κυττάρων.

### **Απώλεια της ικανότητας εξόδου από τον κύκλο στην G0**

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα έχουν χάσει τους μηχανισμούς που οδηγούν τα φυσιολογικά κύτταρα εκτός κύκλου (φάση ηρεμίας ή G0) όταν τα απαραίτητα για την συνέχιση του κύκλου θρεπτικά συστατικά λείπουν από το περιβάλλον τους.

### **Μορφολογικά χαρακτηριστικά**

#### **Αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη**

Οι γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα στα μετασχηματισμένα κύτταρα. Ακόμη, υπάρχουν αλλαγές σε σάκχαρα γλυκοπρωτεϊνών και γλυκολιπιδίων της εξωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης, ελάττωση του σιαλικού οξέος κ.α. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα εμφανίζουν αλλαγές όσον αφορά την κίνηση των ουσιών διαμέσου της μεμβράνης τους. Η γλυκόζη, για παράδειγμα, μεταφέρεται ταχύτερα στο εσωτερικό αυτών των κυττάρων.

#### **Αλλαγές στη φιμπρονεκτίνη**

Το δίκτυο ινιδίων φιμπρονεκτίνης που περιβάλλει τα φυσιολογικά κύτταρα σε καλλιέργεια είναι εξαιρετικά ελαττωμένο ή λείπει εντελώς στην περίπτωση των μετασχηματισμένων κυττάρων. Σε πολλές περιπτώσεις η έλλειψη του δικτύου φιμπρονεκτίνης μπορεί να ευθύνεται για το λιγότερο πεπλατυσμένο σχήμα και τη χαλαρή σύνδεση με το υπόστρωμα που εμφανίζουν τα μετασχηματισμένα κύτταρα.

## **Αλλαγές στον κυτταροσκελετό**

Στα μετασχηματισμένα κύτταρα συχνά παρατηρούνται αλλαγές στην κατανομή ή/και ελλείψεις κυτταροσκελετικών στοιχείων (ινίδια ακτίνης κ.ά.). Οι αλλαγές αυτές στον κυτταροσκελετό μπορούν πιθανόν να ερμηνεύσουν τις παρατηρούμενες αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων και στην κινητικότητα των γλυκοπρωτεϊνών στη μεμβράνη τους.

## **Αλλαγές στον κυτταροσκελετό**

Στα μετασχηματισμένα κύτταρα συχνά παρατηρούνται αλλαγές στην κατανομή ή/και ελλείψεις κυτταροσκελετικών στοιχείων (ινίδια ακτίνης κ.ά.). Οι αλλαγές αυτές στον κυτταροσκελετό μπορούν πιθανόν να ερμηνεύσουν τις παρατηρούμενες αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων και στην κινητικότητα των γλυκοπρωτεϊνών στη μεμβράνη τους.

## **ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

### **Γενικά Χαρακτηριστικά**

Ως αυξητικοί παράγοντες χαρακτηρίζονται πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους που προάγουν την αύξηση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι αυξητικοί παράγοντες διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού, στην αύξηση και διαφοροποίηση των ιστών.

Οι αυξητικοί παράγοντες συντίθενται σε μικρές ποσότητες *in vivo*. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι μόρια εξαιρετικά συντηρημένα στη διάρκεια της εξέλιξης. Εμφανίζουν αμινοξική ομολογία σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, από τη Δροσόφιλα μέχρι τον άνθρωπο. Οι αυξητικοί παράγοντες δρουν συνήθως σε τοπική κλίμακα: δηλαδή επιδρούν είτε στα ίδια κύτταρα που τους παράγουν (**αυτοκρινής δράση**), είτε σε παρακείμενα κύτταρα (**παρακρινής δράση**).

Παράγοντες όπως οι IGFs εμφανίζουν **ενδοκρινή δράση**. Κυκλοφορούν σε **ανιχνεύσιμες ποσότητες στο αίμα, συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες-φορείς και δρουν σε απόσταση από τον τόπο παραγωγής τους όπως οι «κλασσικές» ορμόνες διαθέτοντας ειδικές πρωτεΐνες-φορείς.**

Οι πρωτεΐνες αυτές εκτός από τη μεταφορά των αυξητικών παραγόντων σε παρακείμενα κύτταρα ή μακρινούς στόχους, πιστεύεται πως προστατεύουν τους αυξητικούς παράγοντες από την αποδόμηση, αλλά και ελέγχουν τη συγκέντρωση των βιολογικά δραστηκών μορίων.



# Κατηγορίες αυξητικών παραγόντων

Οι αυξητικοί παράγοντες αποτελούν μια μεγάλη και συνεχώς διευρυνόμενη υπερ-οικογένεια μορίων. Οι μέχρι σήμερα γνωστοί αυξητικοί παράγοντες κατατάσσονται σε οικογένειες με κριτήρια τις κοινές δράσεις, την ομολογία στη δομή ή τη κοινή τους προέλευση

Οικογένεια (Μέλη)	Δομή	Εντόπιση - Παραγωγή	Βιολογική δράση
Αυξητικού παράγοντα προερχόμενου από τα αιμοπετάλια PDGF (PDGF AA, AB & BB).	Διμερή των A (17 KDa) ή/και B (16 KDa) αλυσίδων. Η B αλυσίδα προϊόν του πρωτοογκογονιδίου c-sis	Αιμοπετάλια, πλακούντας, ενδοθηλιακά κύτταρα,	Μιτογόνο για κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης γλοιακά, πλακουντιακός τροφοβλάστης. Επιδιόρθωση αγγείων.
Αυξητικού παράγοντα επιδερμικών κυττάρων, EGF (EGF, TGFα κ.ά.)	Προκύπτουν από πρωτεόλυση πρόδρομων μορφών που είναι αγκυροβολημένες στη μεμβράνη. MB 6 KDa, Ομολογία 40%.	Σιελογόνοι αδένες και πλήθος εμβρυϊκών ιστών ποντικού. Ο TGFα επιπλέον σε πλακούντα και μετασχηματισμένα κύτταρα.	Μιτογόνο για επιθηλιακά και γλοιακά κύτταρα
Αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού, TGFβ (TGF-β1, -β2, -β3, GDNF, κ.α.).	Ομοδιμερή 25 KDa. Εκκρίνονται ως αδρανή σύμπλοκα	Πλήθος εμβρυϊκών και ώριμων ιστών, αιμοπετάλια	Μιτογόνο για ορισμένα κύτταρα, αναστολέας της αύξησης για άλλα. Συμμετοχή στη δημιουργία μετασχηματισμένων κυττάρων.
Αυξητικών παραγόντων που μοιάζουν με την ινσουλίνη, IGFs (IGFI, IGFII).	Μονομερή 7 KDa έκαστο, με ομολογία μεταξύ τους και με το μόριο της προΐνσουλίνης. Προκύπτουν από ωρίμανση πρόδρομων μορίων. Κυκλοφορούν και στο αίμα με πρωτεΐνες φορείς.	Ήπαρ και άλλοι ιστοί. Σημαντική εντόπιση IGF II στον εγκέφαλο. Παραγωγή και από κύτταρα όγκων	Διαμεσολάβηση δράσεων αυξητικής ορμόνης (ο IGF I) Μιτογόνα για πλήθος κυττάρων
Αυξητικών παραγόντων ινοβλαστών (aFGF, bFGF, FGF-3, -4, -5).	a και bFGF 16-17 KDa. Ο FGF3, 27-32 KDa, προκύπτει από διαφορεική μετάφραση του πρωτο-ογκογονιδίου int-2. FGF-4 19 KDa, προϊόν των hst (ή KS3) πρωτοογκογονιδίων. Ομολογία δομής όλων των μελών.	Διάφορες κατηγορίες φυσιολογικών και μετασχηματισμένων κυττάρων. "Αποθήκευση" στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία	Μιτογόνα για ενδοθηλιακά, ινοβλάστες, επιθηλιακά, μεσεγχυματικά και κύτταρα νευρικού ιστού
Αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF, BDNF, NT-3, -4, -5)	NGF και BDNF ομοδιμερή με ομολογία μεταξύ τους και με τα υπόλοιπα μονομερή μέλη της οικογένειας. Συντίθενται ως πρόδρομα μεγαλύτερα μόρια.	Νευρικός αλλά και άλλοι ιστοί.	Ανάπτυξη και επιβίωση συμπαθητικών και αισθητικών νευρώνων ΠΝΣ. Επιβίωση και διαφοροποίηση χολινεργικών νευρώνων στο ΚΝΣ.
Αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων (ερυθροποιητίνη, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, ILs, TNFs IFNs)	Μονομερή ή Ομοδιμερή, συνήθως γλυκοσυλιωμένα μικρού MB.	Λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά μονοκύτταρα κ.ά.	Βιολογικό στόχο τους αποτελούν κυρίως τα αιμοποιητικά κύτταρα αλλά και κύτταρα άλλων ιστών (π.χ. νευρικός).

## **Οικογένεια του αυξητικού παράγοντα των νεύρων (NGF)**

Ο αυξητικός παράγοντας των νεύρων (Nerve Growth Factor, **NGF**) είναι ο αντιπρόσωπος της οικογένειας των νευροτροφινών στην οποία περιλαμβάνονται ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (Brain-derived neurotrophic factor, **BDNF**), και οι νευροτροφίνες 3, 4 και 5 (**NT-3,-4,-5**).

Ο NGF συντίθεται σε διάφορους ιστούς που νευρώνονται από νευρώνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Επίσης, παράγεται από κύτταρα του Schwann μετά από τραυματισμό των περιφερικών νεύρων. Στον εγκέφαλο, παράγεται κυρίως στη περιοχή του ιπποκάμπου και του φλοιού. Μετά την έκκρισή του στις παραπάνω περιοχές, ο NGF προσδένεται στους μεμβρανικούς υποδοχείς που βρίσκονται στις νευρικές απολήξεις.

Ο NGF προάγει την **επιβίωση και διατηρεί τη διαφοροποίηση συμπαθητικών και αισθητικών νευρώνων**. Στο ΚΝΣ, εμφανίζει επιδιορθωτική δράση σε νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου, που έχουν υποστεί τραυματισμό.

Ο **εγκέφαλος των θηλαστικών** αποτελεί έναν ιστό-στόχο για μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων που εμφανίζουν **νευροτροφική δράση**.

Τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος χαρακτηρίζονται από υπερπαραγωγή νευρικών και γλοιακών κυττάρων. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός αυτών των κυττάρων καταστρέφεται στη συνέχεια με **προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση)**. Πιστεύεται ότι οι παραγόμενοι νευροτροφικοί παράγοντες στο περιβάλλον των αναπτυσσόμενων νευρώνων λειτουργούν ως σήματα τα οποία, όταν υπάρχουν, καταστέλλουν την έκφραση ενός προγράμματος κυτταρικού θανάτου, το οποίο σε αντίθετη περίπτωση εκφράζεται στα κύτταρα και τα οδηγεί σε απόπτωση.



## **Αυξητικοί Παράγοντες που μοιάζουν με την Ινσουλίνη(IGFs)**

Πρόκειται για δύο διαφορετικούς παράγοντες τους IGF I (Insulin-like Growth Factor I) και IGF II. Μετά την απομόνωση των πρωτεϊνών των IGF και τον προσδιορισμό της αμινοξικής αλληλουχίας αποδείχθηκε ότι ο IGF I (70 αμινοξέα) και ο IGF II(67 αμινοξέα) εμφανίζουν περίπου 50% ομολογία με το μόριο της προ-ινσουλίνης. Οι IGFs εμφανίζουν σημαντική (64%) αμινοξική ομολογία μεταξύ τους. Προσδένονται και οι δύο στον **υποδοχέα τύπου I (IGFRI)** και στον **υποδοχέα της ινσουλίνης** και διαθέτουν τουλάχιστον έξι **πρωτεΐνες-φορείς (IGF-BP 1-6)**.

Οι **IGFs προάγουν την αύξηση των κυττάρων και των ιστών, ιδιαίτερα κατά την εμβρυϊκή ζωή (κυρίως ο IGF II) και επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό**.  
Ο **IGF I δρα ως μιτογόνο**, προάγοντας τη μετάβαση από το τέλος της **G1** στη **φάση S**, για αρκετούς τύπους κυττάρων όπως: **οστεοβλάστες, λεία και γραμμωτά μυϊκά κύτταρα, κύτταρα του θυρεοειδούς κ.ά.**

Ο **IGF II** είναι ένας κατ' εξοχήν εμβρυϊκός αυξητικός παράγοντας. Συντίθεται κατά την εμβρυϊκή ζωή σε αρκετές ποσότητες στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους ιστούς, όπως ο νευρικός. Η σύνθεσή του περιορίζεται **σημαντικά ή/και σταματάει κατά τη μετεμβρυϊκή ανάπτυξη στους περισσότερους ιστούς**. Το γονίδιο του IGF II εκφράζεται στους διαφόρους ιστούς ανάλογα με την προέλευση του αλληλόμορφου: μόνο το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο εκφράζεται, ενώ το μητρικό αλληλόμορφο είναι μεταγραφικά ανενεργό. (Εξαίρεση αποτελεί το ΚΝΣ όπου εκφράζονται και τα δύο αλληλόμορφα). Το σχετικά σπάνιο αυτό φαινόμενο αναφέρεται ως **γονιδιακή ανάμνηση (genetic imprinting)**.

## Παράγοντες διέγερσης των αποικιών(CSFs)

Χαρακτηρίσθηκαν τέσσερις κατηγορίες CSFs:

**Ο M-CSF** επάγει μόνο την ανάπτυξη αποικιών μονοκυττάρων/μακροφάγων.

**Ο GM-CSF**, την ανάπτυξη αποικιών κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων/μακροφάγων.

**Ο G-CSF**, την ανάπτυξη αποικιών κοκκιοκυττάρων μόνο, και ο **Multi-CSF** την ανάπτυξη διαφόρων τύπων αποικιών. Ο τελευταίος παράγοντας ταυτίζεται με την ιντερλευκίνη-3.

Οι CSFs παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού, αλλά και ενδοθηλιακά και ινοβλάστες.

Μετά από είσοδο ενός αντιγόνου στον οργανισμό και διέγερση των **T λεμφοκυττάρων**, λειτουργεί ένα κύκλωμα παραγωγής **CSFs (και άλλων κιτοκινών)** με σκοπό την ενδυνάμωση της ανοσολογικής απόκρισης. Τα T λεμφοκύτταρα εκκρίνουν τα ίδια CSFs και άλλες λεμφοκίνες. Αυτές διεγείρουν τα μακροφάγα για παραγωγή CSFs. Παράλληλα τα **μακροφάγα** εκκρίνουν **TNF και ιντερλευκίνες**, που με τη σειρά τους διεγείρουν άλλα κύτταρα (ενδοθηλιακά, ινοβλάστες) για παραγωγή CSFs.

### **Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια(PDGF)**

Ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (Platelet-derived growth factor, PDGF) συναντάται με τη μορφή **ομο-ή ετεροδιμερούς** αποτελούμενου από δύο πεπτιδικές αλυσίδες.

Οι ώριμες μορφές των αλυσίδων **A (125 αμινοξέα)** και **B (160 αμινοξέα)** εμφανίζονται κατά 60% αμινοξική ομολογία. Διακρίνονται τρεις ισομορφές του PDGF:

**ο PDGF AA, ο PDGF BB και ο PDGF AB**, που προσδένονται σε δύο τύπους υποδοχέων.

Η απομόνωση του PDGF το 1983 βασίστηκε αρχικά στην παρατήρηση ότι ινοβλάστες σε καλλιέργεια πολλαπλασιάζονταν **παρουσία ορού**, αλλά όχι **παρουσία πλάσματος** (δηλαδή όταν είχαν αφαιρεθεί από το αίμα τα έμμορφα συστατικά του και τα αιμοπετάλια). Τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν από τα εκκριτικά τους κυστίδια τον PDGF, μαζί με παράγοντες που συντελούν στην πήξη του αίματος.

Ανάλογη δράση εμφανίζει ο PDGF και στον οργανισμό, π.χ. μετά από καταστροφή ενός ιστού. Τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν PDGF (ο οποίος πιθανόν εκκρίνεται και από άλλα κύτταρα στην περιοχή του τραύματος όπως μακροφάγα, ενδοθηλιακά κλπ.) ο οποίος επάγει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών και λείων μυϊκών κυττάρων στην περιοχή, συντελώντας στην επούλωση του τραύματος.

Σημαντική είναι η δράση του PDGF και ως νευρογλοιακού τροφικού παράγοντα. Ο PDGF βρίσκεται συχνά σε αυξημένα επίπεδα σε περιπτώσεις ανθρώπινων γλοιωμάτων και γλοιοβλαστωμάτων.

Η **B αλυσίδα του PDGF** κωδικοποιείται από το πρωτο-ογκογονίδιο **c-sis**. Το ιϊκό ανάλογό του, το v-sis, προέρχεται από τον ιό Simian Sarcoma Virus, που προκαλεί σαρκώματα σε πιθήκους. Ενεργοποίηση του **πρωτο-ογκογονιδίου sis** μπορεί να οδηγήσει σε **συνεχή μη-φυσιολογική έκφρασή του με αποτέλεσμα υπερπαραγωγή PDGF-B**.

**Αν η υπερέκφραση του ογκογονιδίου sis γίνει σε κύτταρα που διαθέτουν υποδοχείς για τον PDGF, τα κύτταρα αυτά μπορεί να μετασχηματισθούν από τον συνεχώς παραγόμενο PDGF μέσω ενός αυτοκρινούς μηχανισμού.**

Τέλος, ένας σημαντικός τομέας δράσης αρκετών αυξητικών παραγόντων στη διαδικασία της **ογκογένεσης** είναι αυτός της **αγγειογένεσης**. Συμπαγείς όγκοι μεγαλύτεροι από 0.5 mm δεν μπορούν να αναπτυχθούν παρά αφού αποκαταστήσουν άμεση επαφή με το κυκλοφοριακό σύστημα για την τροφοδοσία τους και για την απομάκρυνση των μεταβολικών κατάλοιπων τους. Αυτή η σύνδεση με την κυκλοφορία επιτυγχάνεται με τη δημιουργία νέων τριχοειδών σε προϋπάρχοντα αγγεία ή/και νέων αγγείων. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως **νέο-αγγειογένεση**.

Στη διαδικασία της νέο-αγγειογένεσης παίζουν σημαντικό ρόλο αρκετοί αυξητικοί παράγοντες, άλλοι άμεσα και άλλοι έμμεσα.

Άμεσοι αγγειογενετικοί παράγοντες θεωρούνται αυτοί που επάγουν τη διαίρεση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vivo*.

Ενώ έμμεσοι είναι εκείνοι οι αυξητικοί παράγοντες που δεν έχουν άμεση επίπτωση στη διαίρεση των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*, προάγουν όμως τη νέο-αγγειογένεση *in vivo*, πιθανότατα επάγοντας τη σύνθεση των άμεσων αγγειογενετικών παραγόντων.

**Στους άμεσους αγγειογενετικούς παράγοντες κατατάσσονται οι: VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF, EGF και ο PDGF. Στους έμμεσους αγγειογενετικούς παράγοντες κατατάσσονται διάφοροι άλλοι (TNF, προσταγλανδίνες) μεταξύ των οποίων και οι IGFs.**

## Υποδοχείς Αυξητικών Παραγόντων

Ένα κύτταρο αποτελεί στόχο για έναν αυξητικό παράγοντα, μόνον όταν αυτό διαθέτει στη μεμβράνη του υποδοχείς που προσδένουν αυτόν τον αυξητικό παράγοντα.

Στον κατωτέρω Πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά οι υποδοχείς ορισμένων αυξητικών παραγόντων. Στις περισσότερες περιπτώσεις ένας αυξητικός παράγοντας μπορεί να προσδέεται σε περισσότερους από έναν υποδοχείς (π.χ. υψηλής και χαμηλής χημικής συγγένειας για NGF), οι οποίοι είτε ανήκουν στην ίδια οικογένεια υποδοχέων (π.χ. PDGF), είτε είναι εντελώς διαφορετικοί μεταξύ τους (π.χ. IGFs). Ακόμα, υπάρχουν διαφορετικοί αυξητικοί παράγοντες (π.χ. EGF, TGF $\alpha$ , κ.ά.) που χρησιμοποιούν ίδιο υποδοχέα.





Αυξητικός Παράγων	Υποδοχέας
PDGF	Δύο τύπων υποδοχείς. Ο υποδοχέας τύπου $\alpha$ (170 KDa) προσδένει και τις 3 ισομορφές του PDGF. Ο τύπου $\beta$ (180 KDa) προσδένει τον PDGF BB και ασθενώς τον AB. Γλυκοπρωτεΐνες. Τυροσινικές κινάσες.
EGF/TGF- $\alpha$	Κοινός υποδοχέας (175 KDa) για EGF, TGF $\alpha$ και WGF. Τυροσινική κινάση. Προϊόν του πρωτο-ογκογονιδίου c-erb B.
TGF- $\beta$	Τρεις διαφορετικοί υποδοχείς: Τύπου I (50-80 KDa), Τύπου II (115-140 KDa), Τύπου III (280-330 KDa). Προσδένουν όλοι τους TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 και - $\beta$ 3. Κύριοι υποδοχείς οι τύπου I και II, που είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης.
IGF-I	Προσδένει IGF I > IGF II > ινσουλίνη. Γλυκοπρωτεΐνη με 2 $\alpha$ υπομονάδες (130 KDa) και 2 $\beta$ (90 KDa). Τυροσινική κινάση.
IGF-II	Προσδένει IGF II και ασθενώς IGF I. Ταυτόσημος του υποδοχέα της 6-φωσφορικής μαννόζης.
FGF	Γνωστοί οι υποδοχείς για $\alpha$ και $\beta$ FGF (150 KDa και 130 KDa αντίστοιχα). Τυροσινικές κινάσες.
NGF	Υπάρχουν υποδοχείς με υψηλή και χαμηλή χημική συγγένεια για τον NGF. Ο υποδοχέας υψηλής συγγένειας είναι προϊόν του πρωτο-ογκογονιδίου trkA με ιδιότητες τυροσινικής κινάσης.
Ιντερφερόνη, Ερυθροποιητίνη, Ιντερλευκίνες	Υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες JAK.
M-CSF	Τυροσινική κινάση, MB 150 KDa. Προϊόν του πρωτο-ογκογονιδίου c-fms.

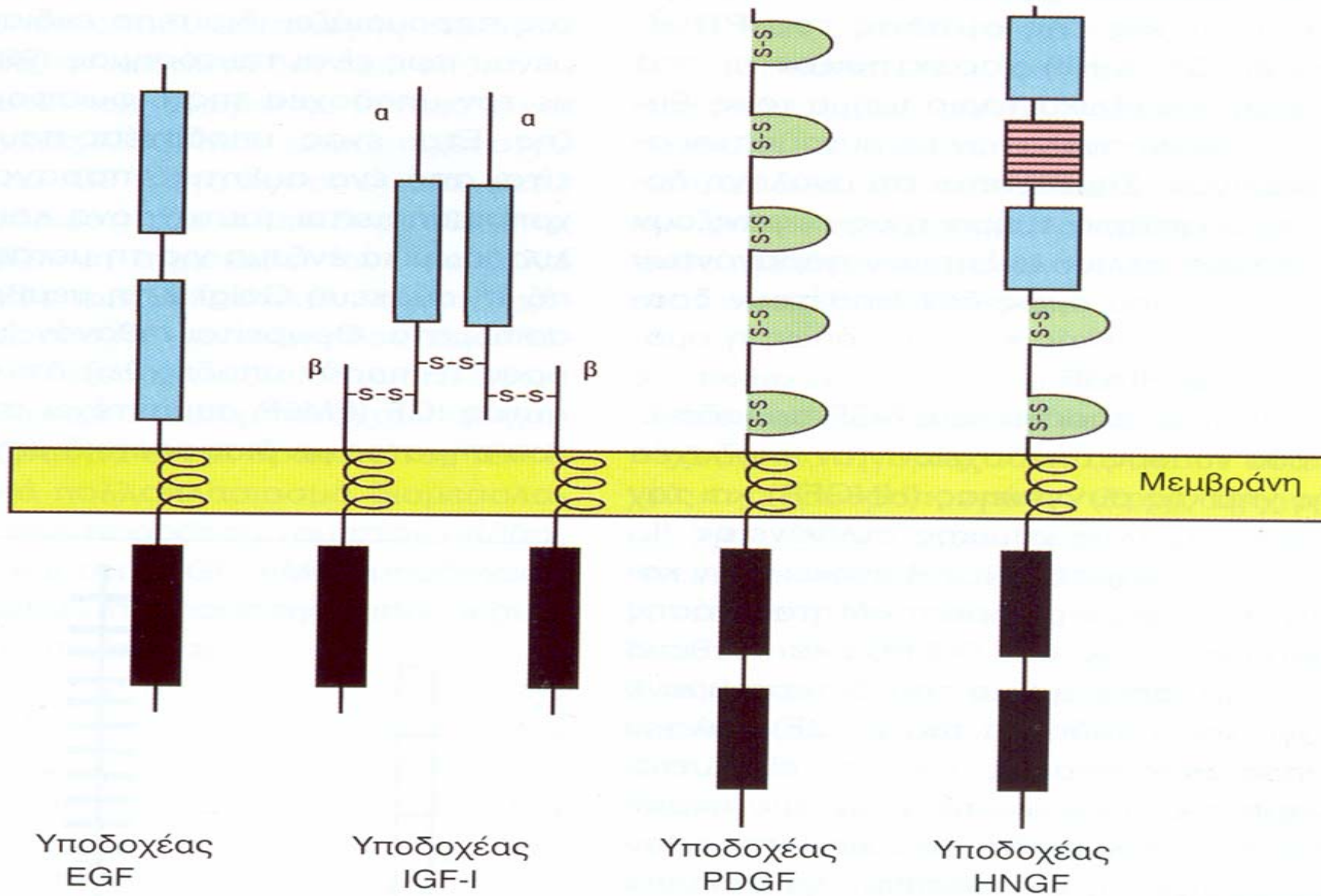
Ο βασικός ρόλος του υποδοχέα είναι η ενδοκυττάρια **μεταβίβαση του σήματος** που αντιπροσωπεύει ο αυξητικός παράγων. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχει το ενδοκυττάριο τμήμα του μορίου του υποδοχέα και με κριτήριο τις ιδιότητες αυτού του πρωτεϊνικού τμήματος οι υποδοχείς ταξινομούνται στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες:

### **1. Υποδοχείς με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης**

Η υποπεριοχή με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης (θύλακος κινάσης) στους υποδοχείς περιλαμβάνει αλληλουχία 200-300 αμινοξέων εξαιρετικά διατηρημένη στη διάρκεια της εξέλιξης. Πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα ενεργοποιεί την κινάση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα φωσφορυλίωση-μεταξύ των άλλων υποστρωμάτων-και του ίδιου του υποδοχέα (αυτοφωσφορυλίωση).

Ανάλογα με τη μορφολογία του εξωκυττάρια τμήματος του μορίου τους, οι υπο-οδοχείς με δραστικότητα κινάσης της τυροσίνης ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες: π.χ. ομάδα του EGF, ομάδα ινσουλίνης /IGF I, ομάδα του PDGF κ.ά.

-  = Περιοχή θυλάκων ανοσοσφαιρινών
-  = Περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη
-  = Περιοχή πλούσια σε λευκίνη
-  = Θύλακος κινάσης



Οι υποδοχείς της ομάδας EGF (EGF/TGF- $\alpha$ , NEU) διαθέτουν δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη στο εξωκυττάριο τμήμα του μορίου τους. Οι υποδοχείς της ομάδας ινσουλίνης (ινσουλίνη, IGF I) είναι ετεροτετραμερή. Αποτελούνται από δύο  $\alpha$  εξωκυττάρια και δύο  $\beta$  διαμεμβρανικές υπομονάδες που συγγρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς S-S (γέφυρες θείου). Ο αυξητικός παράγοντας προσδένεται στις  $\alpha$  υπομονάδες, που διαθέτουν μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη. Οι  $\beta$  υπομονάδες, διαμεμβρανικές, έχουν την ιδιότητα της τυροσινικής κινάσης.

Οι υποδοχείς της ομάδας του PDG (PDGF, M-CSF) χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη στο εξωκυττάριο τμήμα τους, θυλάκων (domains) ανάλογων με αυτούς των ανοσοσφαιρινών. Σημειώνεται ότι ανάλογη δομή στο εξωκυττάριο τμήμα τους εμφανίζουν και υποδοχείς άλλων αυξητικών παραγόντων (π.χ. IL-1, -2), που όμως δεν διαθέτουν δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης, όπως η ομάδα υποδοχέων PDGF. Ο αυξητικός παράγοντας NGF προσδένεται σε δύο τύπους υποδοχέων: τον υποδοχέα υψηλής χημικής συγγένειας (HNGFR) και τον υποδοχέα χαμηλής χημικής συγγένειας (L-NGFR).

Ο υποδοχέας HNGFR ανήκει στην κατηγορία υποδοχέων με δραστηριότητα κινάσης της τυροσίνης. Έχει MW 140 KDa και διαθέτει στο ενδοκυττάριο τμήμα του διακεκομμένο (ανάλογο του υποδοχέα του PDGF) θύλακο της τυροσινικής κινάσης, ενώ στο εξωκυττάριο τμήμα του μορίου υπάρχουν δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλεται μια υποπεριοχή πλούσια σε λευκίνη, καθώς και περιοχές ανάλογες με θυλάκους ανοσοσφαιρινών. Ο υποδοχέας αυτός του NGF (HNGFR) κωδικοποιείται από ένα πρωτο-ογκογονίδιο, το trkA, μέλος μιας οικογένειας πρωτο-ογκογονιδίων (trk), τα οποία κωδικοποιούν και για υποδοχείς άλλων νευροτροφινών.



**2. Υποδοχείς χωρίς δραστικότητα κινάσης, που συνδέονται με G πρωτεΐνες**  
Μεταξύ των υποδοχέων αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνονται ο υποδοχέας χαμηλής συγγένειας για τον NGF (LNGFR), ο υποδοχέας του IGF II, κ.ά.

Ο υποδοχέας του IGF II διαθέτει 15 επαναλήψεις τμημάτων 150 αμινοξέων. Ο υποδοχέας αυτός παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι είναι ταυτόσημος (99% ομολογία) με τον υποδοχέα της 6-φωσφορικής μαννόζης.

Έτσι, ένας υποδοχέας που χρησιμοποιείται από ένα αυξητικό παράγοντα (IGF II), χρησιμοποιείται ταυτόχρονα και από αρκετά λυσοσωμικά ένζυμα για τη μεταφορά τους από τη συσκευή Golgi ή τη μεμβράνη στα λυσοσώματα. Θεωρείται πιθανόν ότι ο υποδοχέας αυτός IGF II/M6P συμμετέχει στη μεταγωγή του σήματος με διαφορετικό μηχανισμό, ανάλογα με την προσδεδεμένη ουσία. Αυτό που θεωρείται βέβαιο είναι πως ο υποδοχέας IGF II/M6P συμμετέχει στην αποδόμηση του IGF II στα λυσοσώματα, μετά από ενδοκυττάρωση του συμπλόκου IGF-II υποδοχέα. Οι δράσεις του IGF II στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό διαμεσολαβούνται μετά από πρόσδεσή του στον υποδοχέα του IGF I και ο IGF II/M6P υποδοχέας ελέγχει τον ρυθμό αποδόμησης (απομάκρυνσης) του IGF II στα κύτταρα.

Ο υποδοχέας χαμηλής συγγένειας του NGF (LNGFR) διαθέτει στο εξωκυττάριο τμήμα του 4 επαναλήψεις τμημάτων πλούσιων σε κυστεΐνη. Στην περιοχή αυτή, προσδένει τον NGF, με χημική συγγένεια χαμηλότερη από τον υποδοχέα HNGFR. Ωστόσο ο LNGFR διαθέτει πολύ μεγαλύτερο αριθμό μορίων ανά κύτταρο, σε σύγκριση με τον HNGFR. Ο LNGFR, που είναι γνωστός και ως p75NGFR

διαθέτει στο ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο του μια μικρή διατηρημένη περιοχή, η οποία πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με G πρωτεΐνες.




Ο p75 υποδοχέας ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων του TNF. Το γεγονός αυτό τον εμπλέκει και σε διαδικασίες κυτταρικής απόπτωσης. Ο NGF μπορεί να προάγει τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών (ολιγοδενδροκύτταρα), αφού συνδεθεί με τον υποδοχέα του p75.

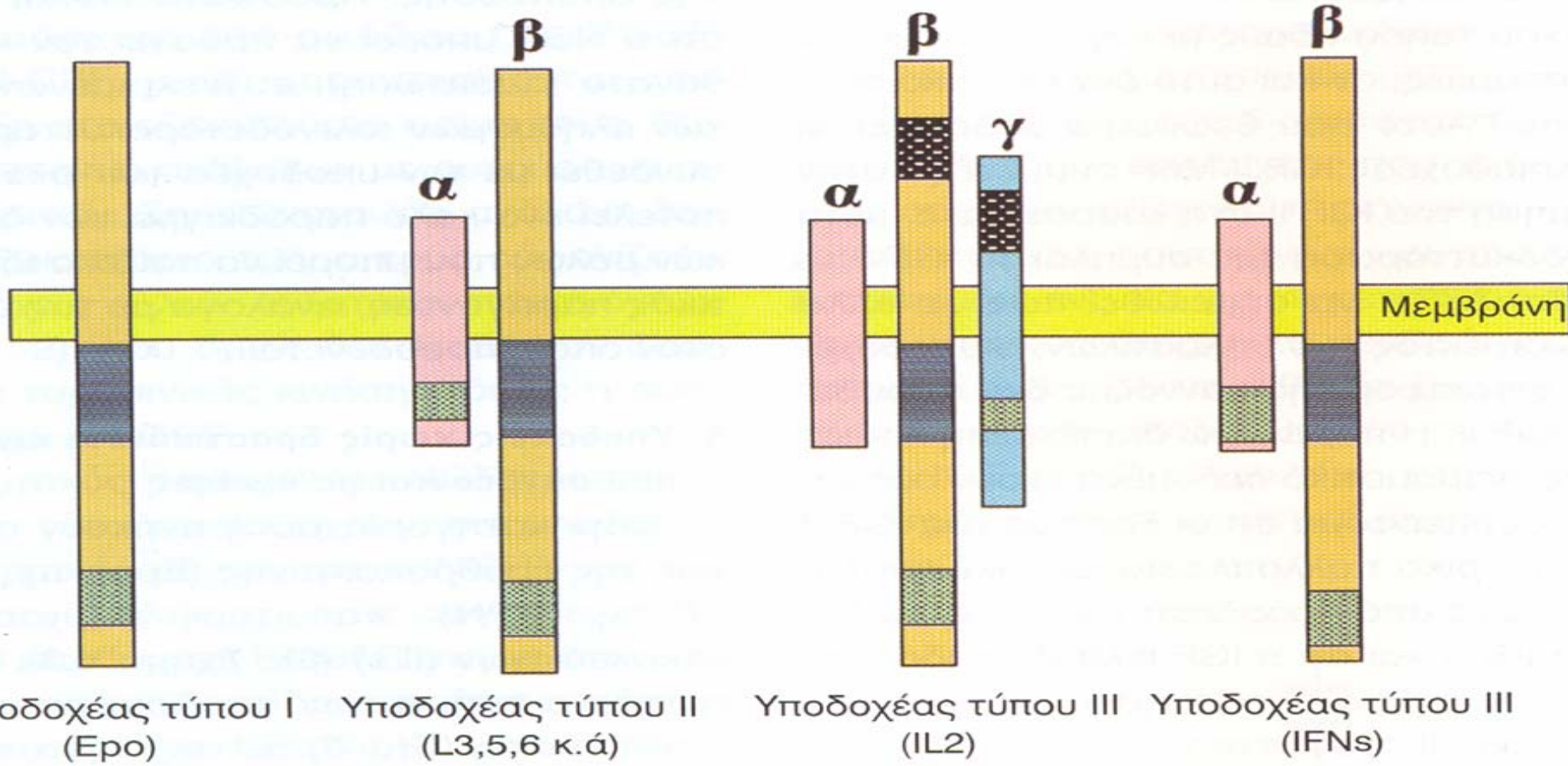
Ο ίδιος αυξητικός παράγοντας, ανάλογα με τον υποδοχέα στον οποίο προσδένεται, παίζει διαφορετικό ρόλο.

### **3. Υποδοχείς χωρίς δραστικότητα κινάσης, που συνδέονται με κινάσες**

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υποδοχείς της ερυθροποιητίνης (Epo), της ιντερφερόνης (IFN) και των περισσότερων Ιντερλευκινών (ILs).

Το ενδοκυττάριο τμήμα των υποδοχέων αυτών δεν διαθέτει το ίδιο δραστικότητα κινάσης. Συνδέεται ωστόσο με κινάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται από την πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα και μπορούν να φωσφορυλιώσουν άλλα υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου και του ίδιου του υποδοχέα.

-  = Περιοχή σύνδεσης με JAK2
-  = Περιοχή φωσφορυλίωσης σε τυροσίνες
-  = Περιοχή με κυστεΐνες



Ανάλογα με τις υπομονάδες που απαιτούνται για τη λειτουργικότητα του υποδοχέα διακρίνονται τρεις τύποι υποδοχέων:

Οι υποδοχείς τύπου I, με χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο τον υποδοχέα της Ερυθροποιητίνης (Epo), αποτελούνται από μια υπομονάδα. Στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα που βρίσκεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη υπάρχουν διατηρημένες περιοχές στις οποίες συνδέεται η κινάση (π.χ. μια από τις κινάσες της ομάδας JAK). Με την πρόσδεση της ερυθροποιητίνης στον υποδοχέα της, η κινάση ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει άλλες κινάσες (π.χ. STAT), αλλά και τον ίδιο τον υποδοχέα σε τυροσίνες.

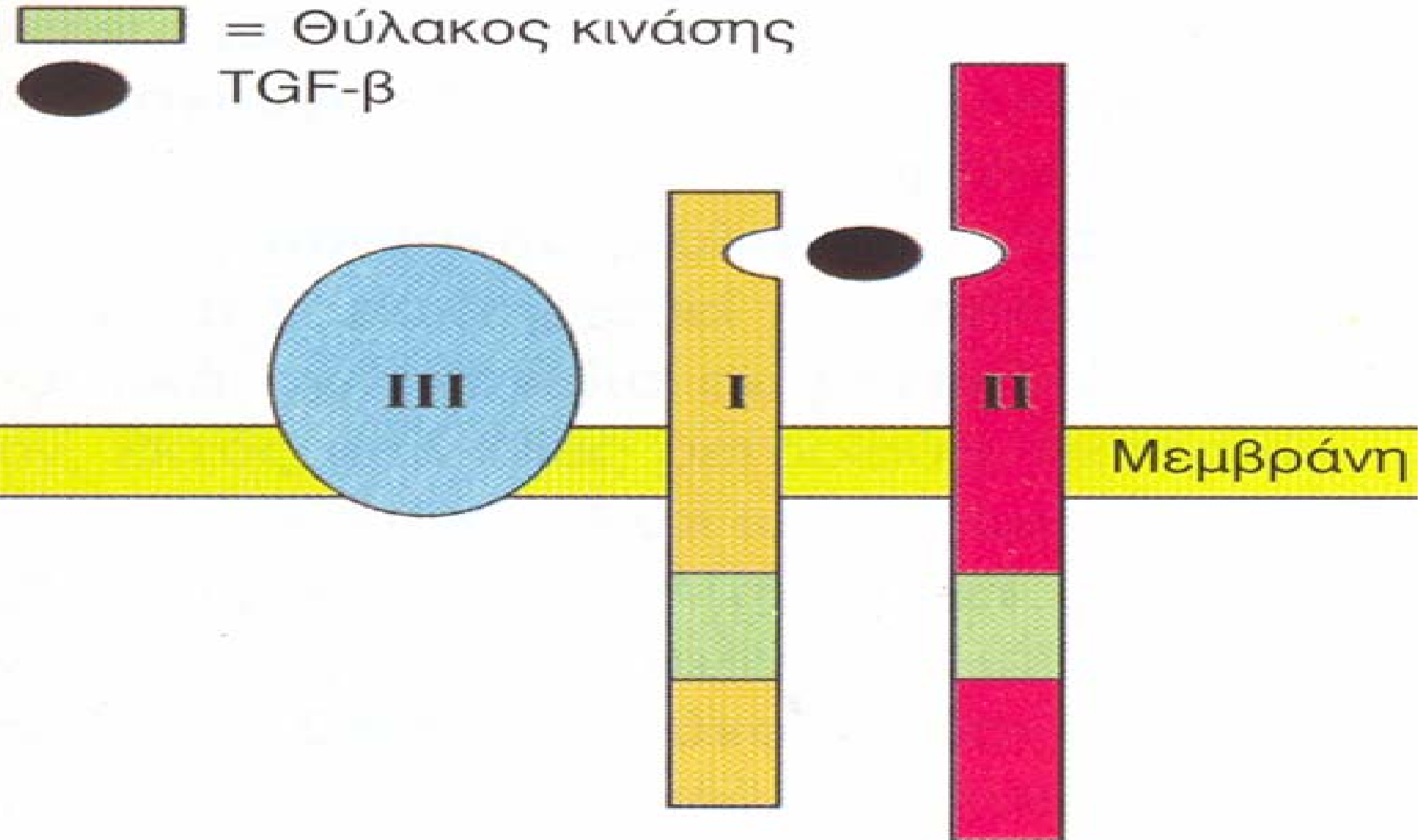
Οι υποδοχείς τύπου II αποτελούνται από α και β υπομονάδες (π.χ. υποδοχείς για ιντερλευκίνες 3,5,6 κ.ά.). Η α υπομονάδα είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της ιντερλευκίνης και διαφέρει από υποδοχέα σε υποδοχέα. Η β υπομονάδα μπορεί να είναι πανομοιότυπη για διάφορους υποδοχείς τύπου II και είναι η υπεύθυνη για τη μεταβίβαση του σήματος. Η β υπομονάδα διαθέτει θέση σύνδεσης με JAK κινάσες. Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούνται με την πρόσδεση της ιντερλευκίνης στη υπομονάδα α και την προσέγγιση της α με την β υπομονάδα.

Οι υποδοχείς τύπου III χρειάζονται δύο υπομονάδες για τη μεταβίβαση του σήματος. Έτσι, ορισμένοι υποδοχείς διαθέτουν συνολικά τρεις υπομονάδες (α,β και γ, όπως στην περίπτωση του υποδοχέα της IL-2), δύο για τη μεταβίβαση του σήματος (β και γ) και μια (την α) για την πρόσδεση της κυτοκίνης.

Άλλοι υποδοχείς του τύπου III διαθέτουν μόνο δύο υπομονάδες (α και β) όπως ο υποδοχέας για τις ιντερφερόνες. Στη περίπτωση αυτή, η α υπομονάδα συμμετέχει και στην πρόσδεση της ιντερφερόνης και στην μεταγωγή του σήματος, μαζί με τη β υπομονάδα.

#### 4. Υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υποδοχείς για την οικογένεια αυξητικών παραγόντων του TGF- $\beta$ . Στην επιφάνεια των κυττάρων εντοπίστηκαν τρία πεπτιδία-υποδοχείς, που ονομάστηκαν υποδοχείς τύπου I, II και III



Οι υποδοχείς τύπου I (55 KDa) και II (85 KDa) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης στο ενδοκυττάριο τμήμα τους. Οι υποδοχείς I και II προσδένουν τον TGF- $\beta$ , ετεροδιμερίζονται και ενεργοποιείται έτσι η δραστικότητα κινάσης αυτών των μορίων. Με τη δράση της κινάσης φωσφορυλιώνεται τόσο ο υποδοχέας (αυτοφωσφορυλίωση), όσο και άλλα υποστρώματα σε σερίνη ή θρεονίνη. Οι υποδοχείς για τον TGF- $\beta$  τύπου III είναι γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας με MB 280 KDa. Προσδένουν τον TGF- $\beta$  στο εξωτερικό του κυττάρου και πιστεύεται ότι διευκολύνουν την πρόσδεσή του στους υποδοχείς τύπου I και II.

Οι υποδοχείς τύπου III διαθέτουν ένα ενδοκυττάριο τμήμα μόλις 40 αμινοξέων, χωρίς δραστικότητα κινάσης και δεν συμμετέχουν στη μεταβίβαση σημάτων, αλλά μπορούν να ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητα του TGF- $\beta$  για τους υποδοχείς I και II.

## ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΩΝ

Οι δύο βασικοί τύποι απόκρισης του κυττάρου σε εξωκυτταρικές ουσίες που δεν μπορούν να διαπεράσουν τη μεμβράνη συνοψίζονται:

Μια *ουσία* – μοριακή ή μακρομοριακή – αλληλεπιδρά ειδικά με ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα και στη συνέχεια μετατοπίζεται, με φυσικό τρόπο, από την εξωτερική στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης.

Μια ουσία αλληλεπιδρά ειδικά με ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα και δεσμεύεται σε αυτόν, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής του επικράτειας. Στην περίπτωση αυτή, η ίδια η ουσία δεν μετατοπίζεται, αλλά, μέσω αλλαγών των ιδιοτήτων του υποδοχέα της, μετάγεται στο εσωτερικό του κυττάρου ένα *σήμα*.

Στις ουσίες που εισέρχονται στο κύτταρο με φυσική μεταφορά περιλαμβάνονται ιόντα, μικρά μόρια, όπως τα σάκχαρα, αλλά και μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες.

Οι **δίαυλοι** (channels) ελέγχουν συνήθως τη διέλευση των ιόντων. Υπάρχουν διαφορετικοί δίαυλοι για τα ιόντα καλίου, νατρίου, ασβεστίου και χλωρίου. Οι δίαυλοι ανοιγοκλείνουν αλλάζοντας τη στερεοδιαμόρφωσή τους. Η μετάβαση από την κλειστή στην ανοικτή διαμόρφωση ελέγχεται από εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές συνθήκες και έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων στο εσωτερικού του κυττάρου.

Οι **μεταφορείς** (transporters) είναι πρωτεΐνες που ευθύνονται για την εισαγωγή, διαμέσου της μεμβράνης, μικρών μορίων, όπως τα σάκχαρα. Το μόριο-στόχος προσδένεται στην πρωτεΐνη-υποδοχέα στην εξωκυτταρική πλευρά και στη συνέχεια μεταφέρεται διαμέσου της μεμβράνης και απελευθερώνεται τελικά στην κυτταροπλασματική της πλευρά.

Η δέσμευση ενός προσδέτη στον υποδοχέα του μπορεί, τέλος, να πυροδοτήσει τη διαδικασία της **εγκόλπωσης**, κατά την οποία το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου με **ενδοκυττάρωση** (endocytosis). Στη συνέχεια, ο υποδοχέας και ο προσδέτης συνήθως αποχωρίζονται. Ο υποδοχέας μπορεί είτε να επιστρέψει στην επιφάνεια, ώστε να πραγματοποιήσει έναν ακόμα κύκλο μεταφοράς, είτε να αποικοδομηθεί. Η *διαβίβαση ενός σήματος* περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση ενός εξωκυτταρικού προσδέτη με μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη-υποδοχέα. Η δέσμευση του προσδέτη στον υποδοχέα του επηρεάζει τη στερεοδιαμόρφωσή του και οδηγεί στην ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής του επικράτειας. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **μεταγωγή σήματος** (signal transduction). Η δέσμευση του προσδέτη στην εξωκυτταρική επικράτεια ενός υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση του τελευταίου. Ακολούθως, η κυτταροπλασματική επικράτεια του υποδοχέα αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε: είτε αυξάνεται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ενός μικρού μορίου ( το οποίο ονομάζεται **δεύτερος αγγελιαφόρος**) είτε ενεργοποιείται με άμεσο τρόπο μια πρωτεΐνη, της οποίας ο ρόλος είναι να ενεργοποιήσει, στη συνέχεια, άλλες πρωτεΐνες. **Κοινό χαρακτηριστικό της περαιτέρω διάδοσης του σήματος μέσω του κυτταροπλάσματος αποτελεί η ενεργοποίηση μιας πρωτεϊνικής κινάσης, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί μια σειρά άλλων πρωτεϊνικών κινασών. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση μορίων που πυροδοτούν τις αλλαγές μέσα στο κύτταρο και που δρουν στο**



κυτταρόπλασμα (επιδρώντας, για παράδειγμα, στην οργάνωση του κυτταροσκελετού), ενώ άλλα στον πυρήνα, όπου ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες-στόχους οι οποίοι μεταβάλλουν το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου. Τα κυριότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος έχουν συντηρηθεί κατά την εξέλιξη των ζώων και απαντώνται στα περισσότερα, αν όχι σε όλα, τα ζωικά κύτταρα



Ο υποδοχέας διαθέτει στην κυτταροπλασματική του επικράτεια ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης, η οποία ενεργοποιείται κατά το διμερισμό που ακολουθεί τη δέσμευση του προσδέτη στην εξωκυτταρική του επικράτεια. Η ενεργότητα κινάσης φωσφορυλιώνει την κυτταροπλασματική επικράτεια του υποδοχέα. Αυτή η **αυτοφωσφορυλίωση** επιτρέπει στον υποδοχέα να αλληλεπιδράσει με μια πρωτεΐνη-στόχο και να την ενεργοποιήσει. Η πρωτεΐνη αυτή επιδρά με τη σειρά της σε άλλα υποστρώματα που εντοπίζονται στο εσωτερικό του κυττάρου. **Οι πιο γνωστοί υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης είναι κινάσες τυροσίνης, αλλά υπάρχουν και υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Τέτοια μονοπάτια συνήθως οδηγούν στην ενεργοποίηση μιας μονομερούς πρωτεΐνης G, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί έναν καταρράκτη κυτταροπλασματικών κινασών.**

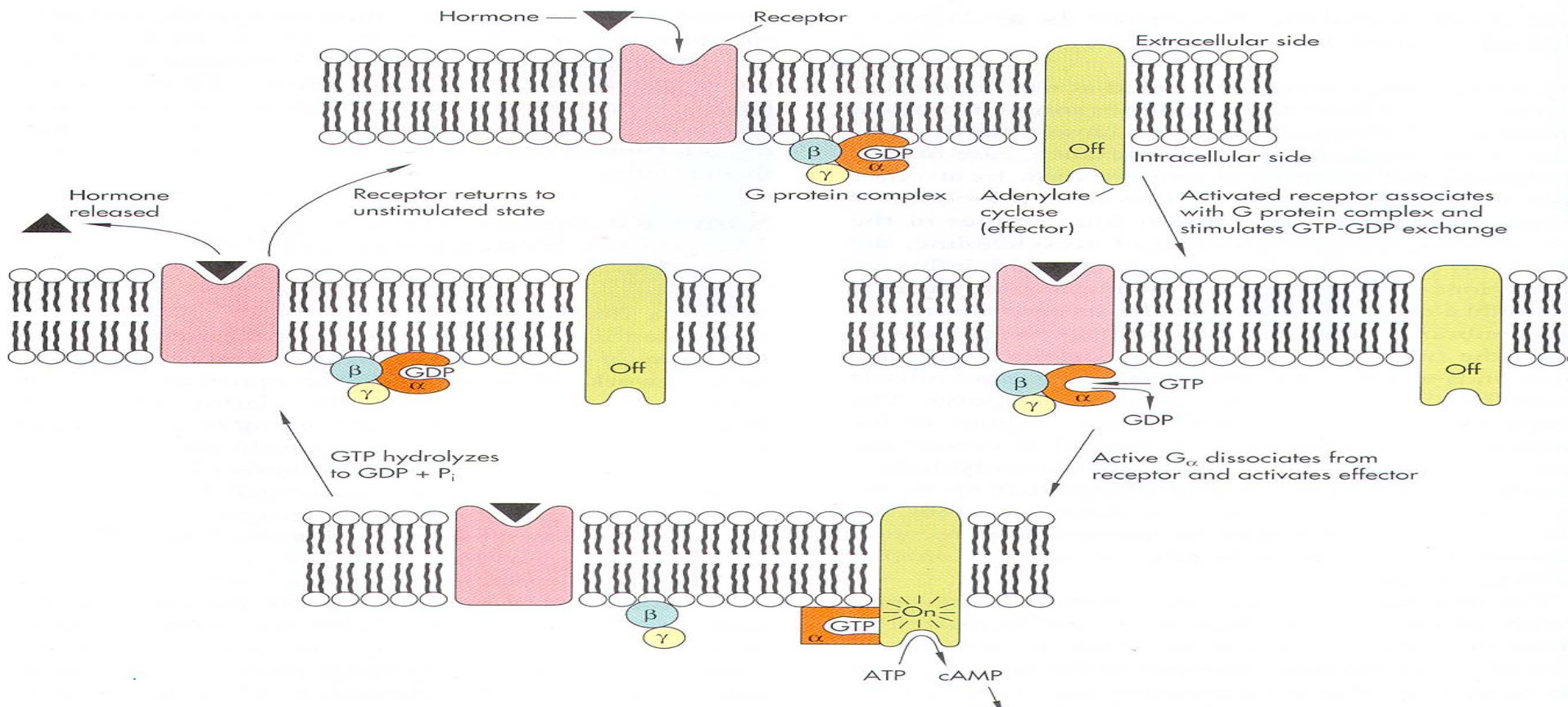
Σε άλλες περιπτώσεις, μετά τη δέσμευση του προσδέτη ο υποδοχέας μπορεί να αλληλεπιδράσει με μια τριμερή **πρωτεΐνη G**, η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της μεμβράνης. Η ανενεργή μορφή μιας τέτοιας πρωτεΐνης G είναι τριμερής και φέρει GDP προσδεδεδεμένο σε αυτή. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί την αντικατάσταση του GDP από GTP. Ακολουθώντας, η τριμερής πρωτεΐνη G αποδιατάσσεται σε ένα μονομερές που φέρει το GTP και ένα διμερές. Στη συνέχεια, είτε το μονομερές είτε το διμερές επιδρά σε μια πρωτεΐνη-στόχο με συνέπεια η πρωτεΐνη αυτή να αντιδράσει με κάποιο άλλο μόριο-στόχο στο κυτταρόπλασμα.

Οι πρωτεΐνες G μεταγούν σήματα από διάφορους υποδοχείς σε μια ποικιλία στόχων.  
Ο υποδοχέας (receptor) είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από ένα εξωκυτταρικό σήμα.

Ως συνέπεια της ενεργοποίησης του υποδοχέα μια **πρωτεΐνη G** ενεργοποιείται μέσω της αντικατάστασης του δεσμευμένου σε αυτήν GDP από το GTP.

Η πρωτεΐνη G ενεργοποιεί μια πρωτεΐνη-στόχο.

Ως συνέπεια της ενεργοποίησης απελευθερώνονται στο κύτταρο μικρά μόρια, οι **δεύτεροι αγγελιαφόροι**.



Δύο από τις κλασικές πρωτεΐνες G είναι η Gs, που αυξάνει το επίπεδο του cAMP διεγείροντας την αδενυλική κυκλάση (adenylate cyclase), και η Gt, που ελαττώνει το επίπεδο του cGMP διεγείροντας την ενεργότητα της φωσφοδιεστεράσης του cGMP. Τα κυκλικά νουκλεοτίδια αποτελούν μια κύρια τάξη δεύτερων αγγελιαφόρων. Μια άλλη σημαντική ομάδα δεύτερων αγγελιαφόρων περιλαμβάνει μικρά λιπιδικά μόρια, όπως η φωσφορική ινοσιτόλη (inositol phosphate) και η διακυλογλυκερόλη (DAG, Diacylglycerol). Οι πρωτεΐνες G αποτελούνται από τρεις πρωτεϊνικές υπομονάδες (α,β,γ). η ενεργοποίηση ενός υποδοχέα που είναι σε επαφή με το σύμπλοκο μιας πρωτεΐνης G πυροδοτεί την απόσυγκρότηση του τριμερούς προς μια υπομονάδα α και ένα διμερές βγ. Στην ανενεργή της μορφή, η υπομονάδα α της πρωτεΐνης G δεσμεύει GDP. Το γεγονός αυτό επιφέρει την αποσυγκρότηση της τριμερούς πρωτεΐνης G προς μία ελεύθερη υπομονάδα α (σε σύμπλοκο με το GTP) και ένα διμερές των υπομονάδων βγ. Μόλις μια πρωτεΐνη G αποδεσμευτεί από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα, αυτός προσδένει ένα (ανενεργό) τριμερές και ο κύκλος επαναλαμβάνεται.

Συνεπώς ένα σύμπλοκο προσδέτη-υποδοχέα μπορεί να ενεργοποιήσει πολλά μόρια πρωτεΐνης G σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενισχύοντας έτσι το αρχικό σήμα. Το επόμενο στάδιο του μονοπατιού αφορά συνήθως την αλληλεπίδραση της ενεργοποιημένης υπομονάδας α. στην περίπτωση της Gs, η υπομονάδα αs, ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, ενώ, στην περίπτωση της Gt, η υπομονάδα αt, ενεργοποιεί τη φωσφοδιεστεράση του cGMP. Σε ορισμένες περιπτώσεις τόσο η υπομονάδα α όσο και το διμερές βγ αλληλεπιδρούν με τελεστές.



Υπάρχουν πολλοί τύποι πρωτεϊνικών κινασών (protein kinase) που εμπλέκονται στη μεταγωγή σημάτων. Όλες αυτές οι πρωτεϊνικές κινάσες διαθέτουν την ίδια βασική καταλυτική ενεργότητα: προσθέτουν σε ένα αμινοξικό κατάλοιπο της πρωτεΐνης-στόχου μια φωσφορική ομάδα. Η φωσφορική ομάδα προέρχεται από την υδρόλυση του ATP σε ADP. Μια πρωτεϊνική κινάση φέρει μία θέση δέσμευσης για το ATP και ένα καταλυτικό ενεργό κέντρο, στο οποίο προσδένεται το κατάλοιπο-στόχος. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης-στόχου αλλάζει τις ιδιότητές της, καθιστώντας δυνατή τη μεταγωγή του σήματος στο επόμενο στοιχείο του μονοπατιού. Ανάλογα με το αμινοξικό κατάλοιπο-στόχο, διακρίνονται τρεις τύποι πρωτεϊνικών κινασών:

**Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης**, φωσφορυλιώνουν στην πρωτεΐνη-στόχο σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης.

**Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης** φωσφορυλιώνουν στην πρωτεΐνη-στόχο σε κατάλοιπα τυροσίνης.

**Οι κινάσες διττής εξειδίκευσης.**

Στο κύτταρο, οι πρωτεϊνικές κινάσες εντοπίζονται σε δύο θέσεις:

*Οι κυτταροδιαλυτές πρωτεϊνικές κινάσες* είναι συνήθως κινάσες Ser/Thr και ευθύνονται για τη μεγάλη πλειοψηφία των φωσφορυλιώσεων που λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο, π.χ. τα ένζυμα cdk (cyclin-dependent kinase: κινάση εξαρτώμενη από κυκλίνη), τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο.

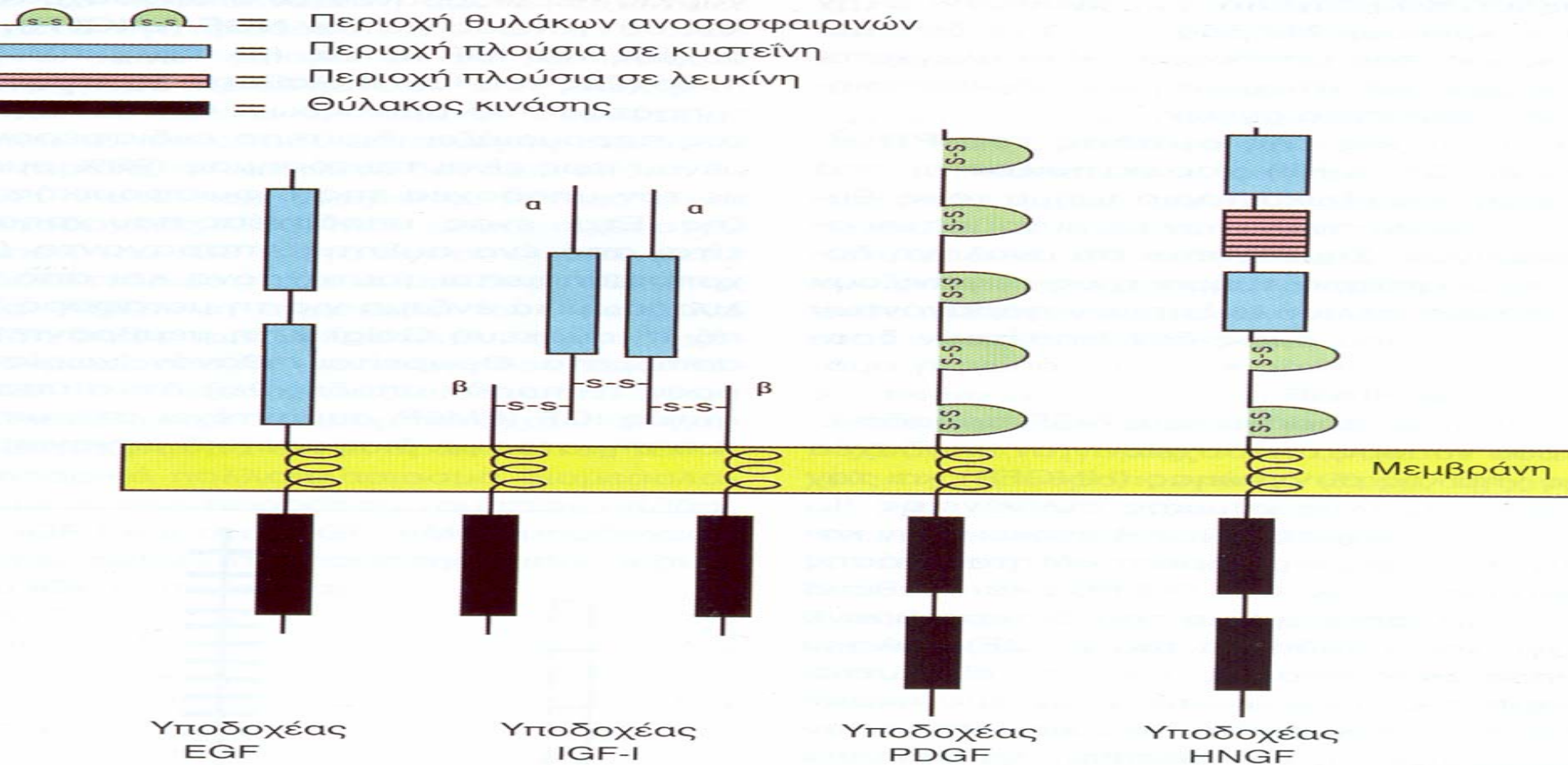
*Οι κινάσες διττής εξειδίκευσης* απαντώνται στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω της κινάσης MAP. Τα προϊόντα ορισμένων ογκογονιδίων, π.χ. του src, είναι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης.

Οι υποδοχείς με ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Οι κινάσες αυτές φέρουν στο εξωτερικό του κυττάρου μια επικράτεια που δεσμεύει έναν προσδέτη και μέσα στο κύτταρο μια καταλυτική επικράτεια η οποία μπορεί να επιδράσει σε μια πρωτεΐνη-στόχο. Οι περισσότεροι υποδοχείς με ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης είναι κινάσες τυροσίνης, μολονότι υπάρχουν και ορισμένοι υποδοχείς που ανήκουν στην τάξη των κινασών Ser/Thr.

Οι υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Η εξωκυτταρική τους επικράτεια φέρει χαρακτηριστικά επαναλαμβανόμενα μοτίβα και περιέχει τη θέση δέσμευσης του προσδέτη. Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από μία μονή  $\alpha$ -έλικα. Η καταλυτική επικράτεια είναι μεγάλη (~250 αμινοξέα) και συνήθως καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλασματικού τμήματος του υποδοχέα. Μερικές φορές, η καταλυτική επικράτεια διαχωρίζεται σε δύο τμήματα.

Οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων είναι συνήθως μικρά πολυπεπτίδια που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό ορισμένων κυτταρικών τύπων. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν στο κύτταρο ποικιλία αποκρίσεων, όπως μεταβολή στην πρόσληψη μικρών μορίων, έναρξη ή διέγερση του κυτταρικού κύκλου και τελικά κυτταρική διαίρεση. Οι προσδέτες συνήθως εκκρίνονται από έναν κυτταρικό τύπο και επιδρούν σε κύτταρα άλλου τύπου που διαθέτουν τον κατάλληλο υποδοχέα. Παραδείγματα εκκρινόμενων κυτοκινών είναι ο EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας), ο PDGF (**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor, αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια) και η ινσουλίνη (insulin).

Οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων διαθέτουν ενεργότητα κινάσης τυροσίνης και εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά: είναι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη μία φορά και φέρουν την N-τελική τους επικράτεια στην εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης και την C-τελική τους επικράτεια στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης. Οι περισσότεροι υποδοχείς, όπως αυτοί του EGF ή του PDGF, αποτελούνται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Μια εξαίρεση υφίσταται στην οικογένεια υποδοχέων της ινσουλίνης. Οι υποδοχείς αυτοί είναι διμερή ενωμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς.



Τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης διακρίνονται σε δύο ομάδες:

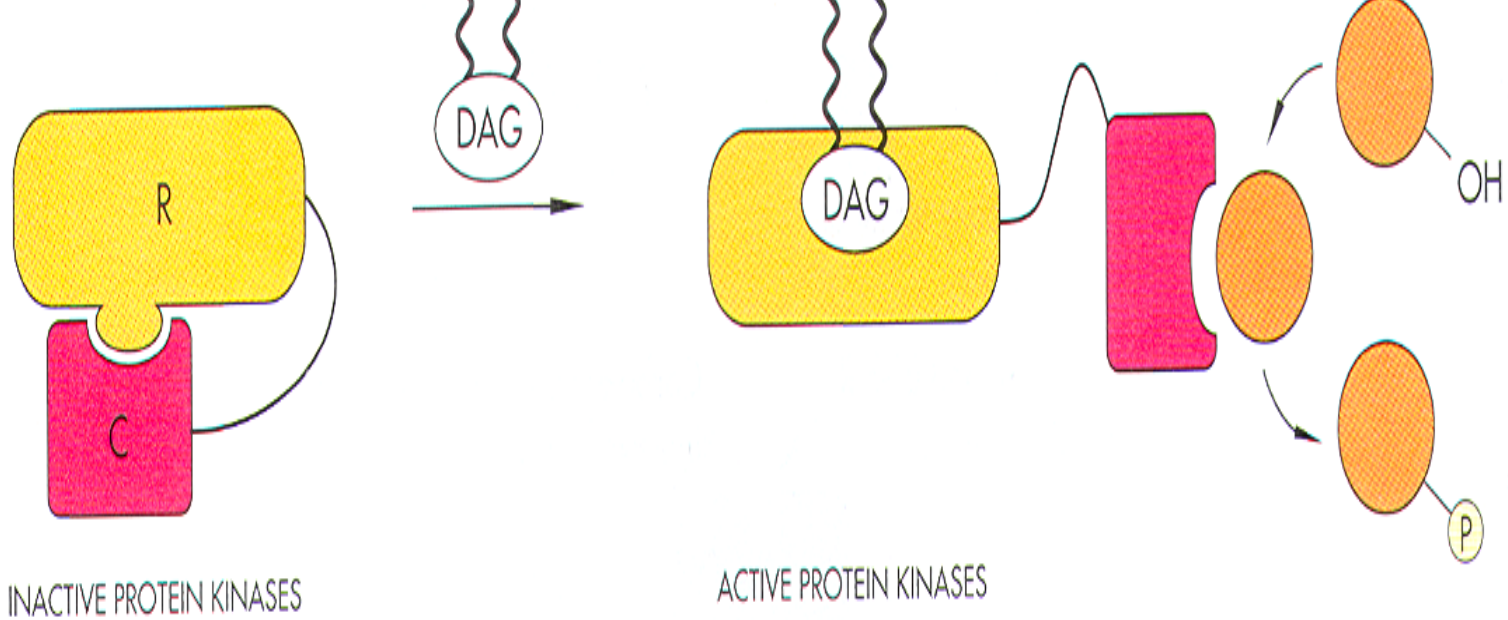
*Σε πολλές περιπτώσεις, η ενεργοποίηση ενός ενζύμου οδηγεί στην παραγωγή ενός μικρομοριακού δεύτερου αγγελιαφόρου. Συνήθεις δεύτεροι αγγελιαφόροι στα μονοπάτια αυτά είναι λιπίδια. Τα ένζυμα περιλαμβάνουν φωσφολιπάσες (οι οποίες αποκόπτουν λιπίδια από μεγαλύτερα υποστρώματα) και κινάσες που φωσφορυλιώνουν λιπιδικά υποστρώματα.*

Κάποια χαρακτηριστικά μονοπάτια συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα

PLC (φωσφολιπάση C / 3 οικογένειες PLC $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	P1P2 (4,5 – διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη)	DAG (διακυλογλυκερόλη) + IP3 (1,4,5 – τριφωσφορική ινοσιτόλη) Η DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, η IP3 κινητοποιεί το Ca <sup>2+</sup>
Κινάση PI3 (κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης)		PI3 (3-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη)

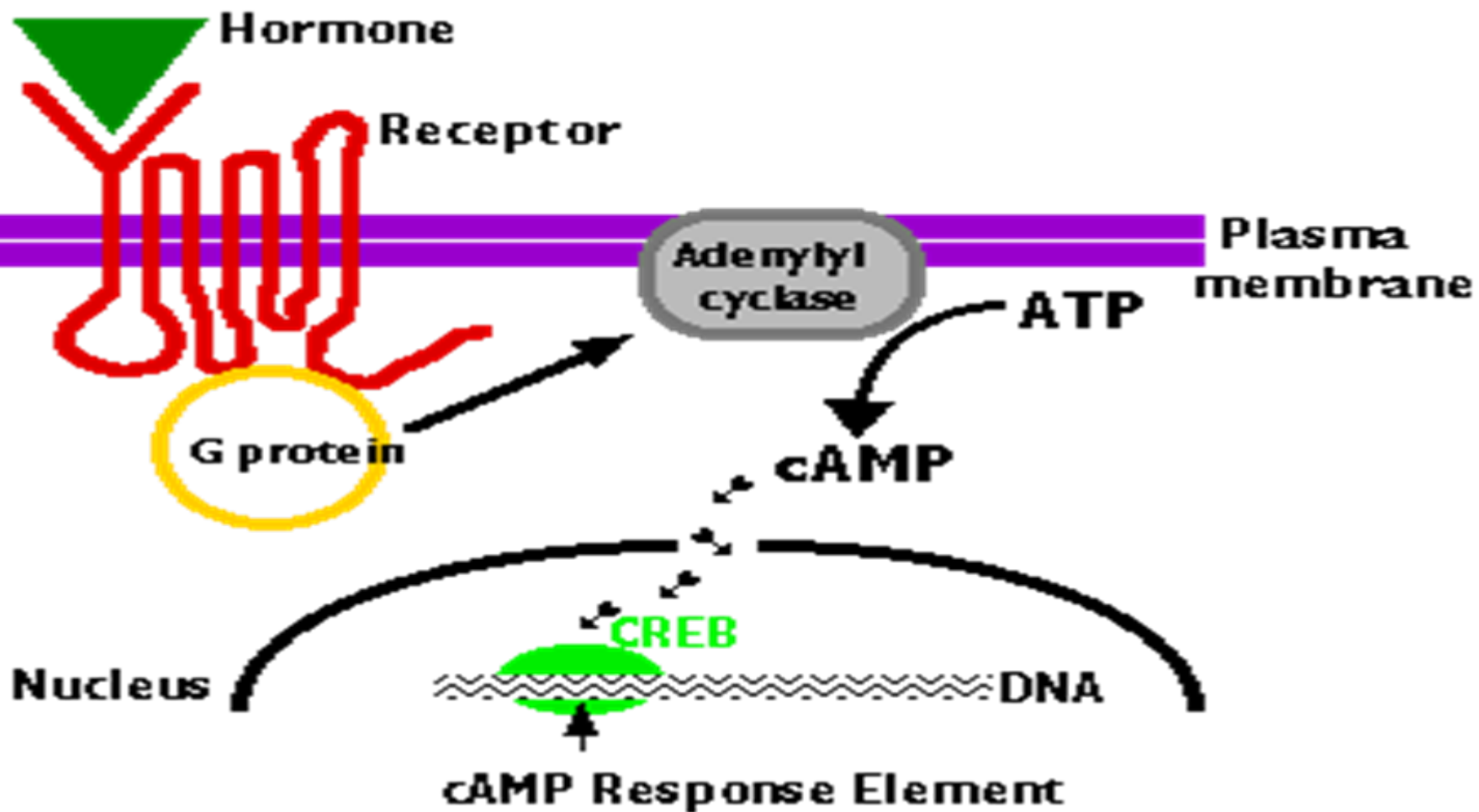


Protein kinase C



Οι δεύτεροι αγγελιαφόροι, που απελευθερώνονται σε κάθε μονοπάτι, δρουν ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας πρωτεΐνες-στόχους.

*Εναλλακτικά, το μονοπάτι περιλαμβάνει έναν καταρράκτη αντιδράσεων στον οποίο εμπλέκεται μια σειρά μακρομορίων που αλληλεπιδρούν διαδοχικά. Τα πιο κοινά στοιχεία τέτοιων μονοπατιών είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες. Κάθε κινάση ενεργοποιεί την επόμενη στο μονοπάτι φωσφορυλιώνοντάς την. Οι τελικές κινάσες του μονοπατιού επιδρούν συνήθως σε πρωτεΐνες, όπως είναι, για παράδειγμα, οι μεταγραφικοί παράγοντες.*



Η βασική αρχή που χαρακτηρίζει τη λειτουργία των μονοπατιών αυτών είναι ότι το σήμα, καθώς περνά από το ένα στοιχείο του μονοπατιού στο επόμενο, ενισχύεται. Όταν ο προσδέτης δεσμευτεί στην εξωκυτταρική επικράτεια του υποδοχέα ενός αυξητικού παράγοντα, τότε ενεργοποιείται η καταλυτική ενεργότητα της κυτταροπλασματικής επικράτειάς του.

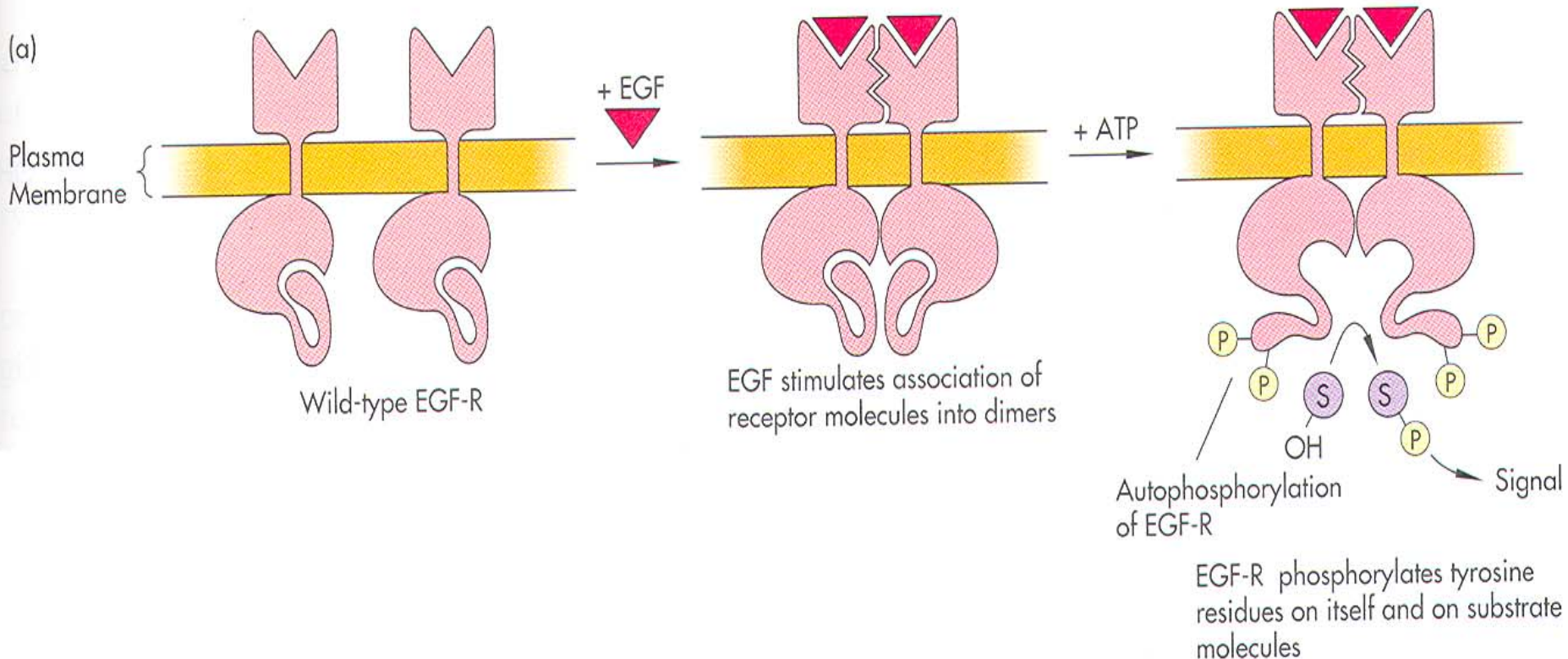
**Η φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης αποτελεί το θεμελιώδες γεγονός μέσω του οποίου λειτουργούν οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων.**

## Οι υποδοχείς ενεργοποιούνται με διμερισμό

Μετά τη δέσμευση του προσδέτη η N-τελική εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα υφίσταται αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωσή της, με αποτέλεσμα το διμερισμό της.

Η σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο C-τελικών, κυτταροπλασματικών επικρατειών επιφέρει μεταβολή στη στερεοδιαμόρφωσή τους, οπότε ενεργοποιείται η ενζυμική δράση της κινάσης, με αποτέλεσμα το ένα μονομερές να φωσφορυλιώνει το άλλο.

Ενας προσδέτης δεσμεύεται σε ένα ή και στα δύο μονομερή και τα ωθεί να διμεριστούν.



Εναλλακτικά, ένας διμερής προσδέτης δεσμεύεται σε δύο μονομερή φέρνοντάς τα σε επαφή. Στην περίπτωση της οικογένειας των υποδοχέων της ινσουλίνης, ο προσδέτης δεσμεύεται σε ένα διμερή υποδοχέα (που σταθεροποιείται με εξωκυτταρικές δισουλφιδικές γέφυρες) και προκαλεί μια ενδομοριακή αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής του. Η βασική συνέπεια του διμερισμού είναι ότι επιτρέπει τη μετάδοση της αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης από την εξωκυτταρική προς την κυτταροπλασματική επικράτεια, χωρίς όμως να απαιτείται αλλαγή στη δομή της διαμεμβρανικής περιοχής.

Ο διμερισμός αποτελεί το έναυσμα του σηματοδοτικού μονοπατιού, που ξεκινά με την **αυτοφωσφορυλίωση** των κυτταροπλασματικών επικρατειών του υποδοχέα. Όταν οι κυτταροπλασματικές επικράτειες των δύο μονομερών έρχονται σε επαφή κατά το διμερισμό, τότε η μία φωσφορυλιώνει την άλλη.

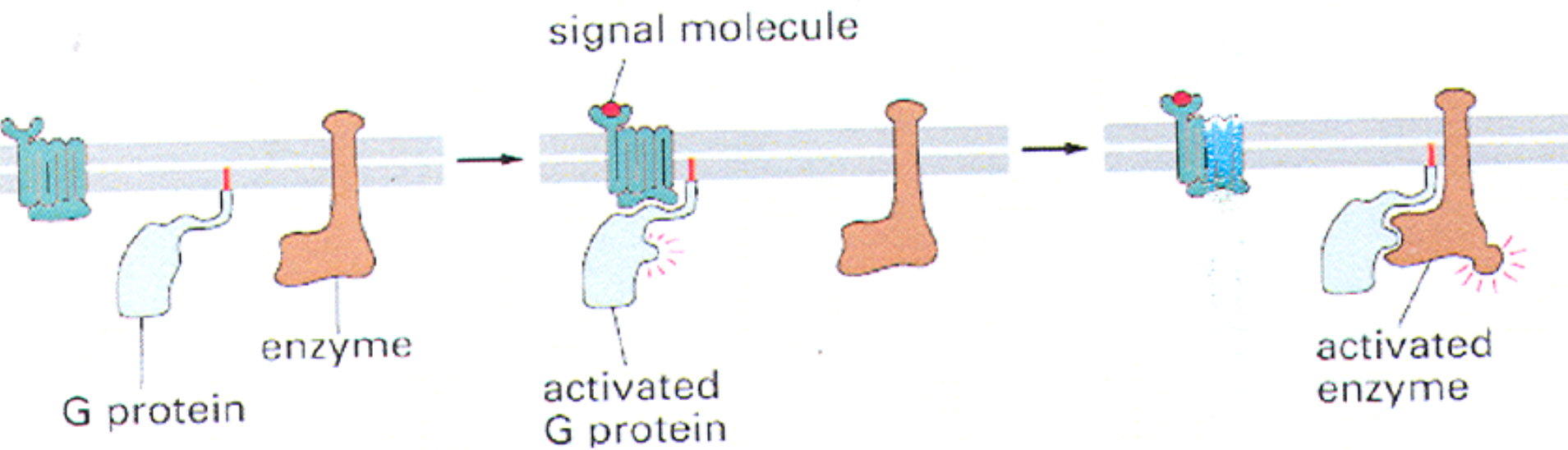
Σε ορισμένες περιπτώσεις, η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποδοχέα αποτελεί ένα *ενδιάμεσο στοιχείο* του μονοπατιού, το οποίο δεν έχει καταλυτική ενεργότητα από μόνο του, αλλά λειτουργεί στρατολογώντας άλλες πρωτεΐνες κοντά στον υποδοχέα.

Μερικές φορές, η ίδια η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα αποτελεί το *στόχο* που ενεργοποιείται, παρότι η ίδια δεν φωσφορυλιώνεται..

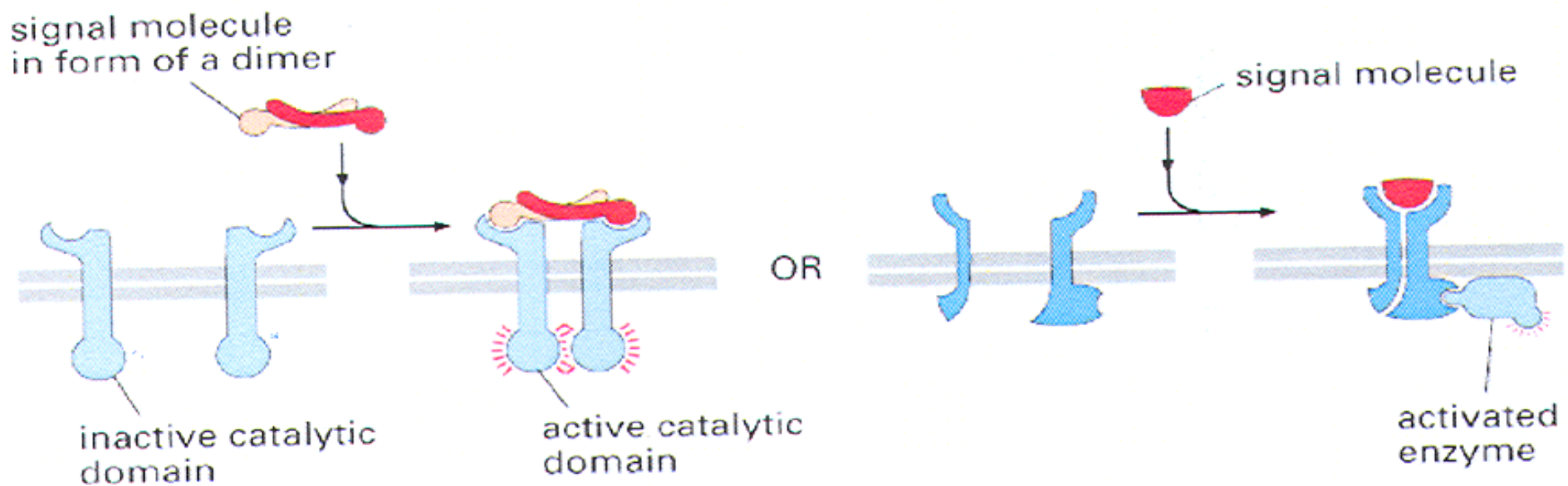
Σε άλλες περιπτώσεις, η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα αποτελεί η ίδια *υπόστρωμα* φωσφορυλίωσης γι' αυτόν. Εάν το υπόστρωμα είναι και το ίδιο ένα ένζυμο, τότε είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί με φωσφορυλίωση (π.χ. PLCγ).

Τέλος, μερικά υποστρώματα μπορεί να αποτελούν τα *τελικά μόρια-στόχους* του μονοπατιού. Τέτοια μόρια είναι, για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, οι οποίες, όταν φωσφορυλιωθούν, μπορεί να προκαλέσουν τη δημιουργία μιας νέας δομής.

## G-PROTEIN-LINKED RECEPTORS



## (C) ENZYME-LINKED RECEPTORS



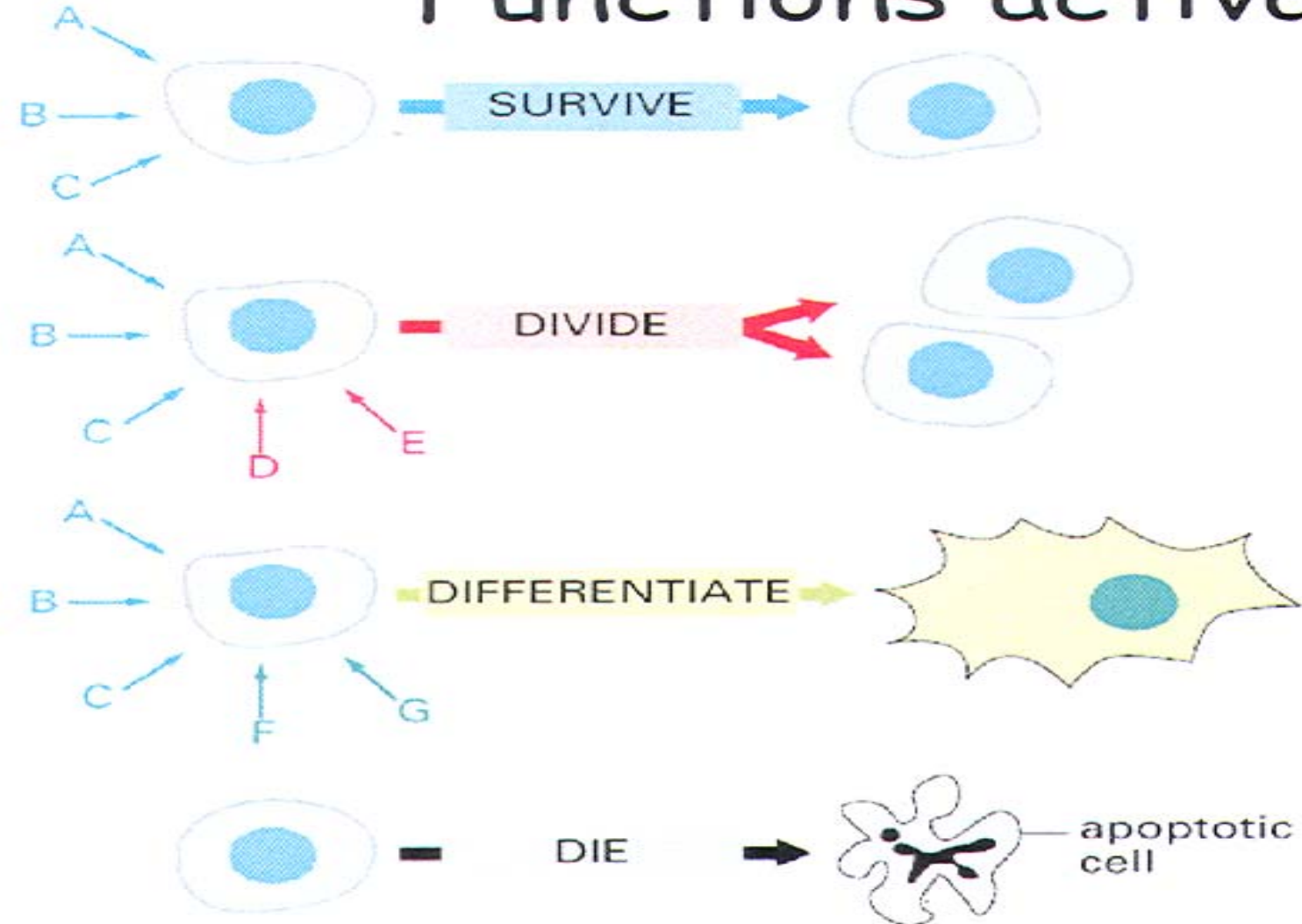
Σε πολλές περιπτώσεις, η ενεργοποίηση της κινάσης ακολουθείται από ενδοκυττάρωση, απομάκρυνση δηλαδή από τη μεμβράνη και μεταφορά μέσα στο κύτταρο μέσω ενός κυστιδίου που περιβάλλεται από τμήμα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης ίσως χρησιμεύει στην απομάκρυνση του υποδοχέα (και του προσδέτη) από την επιφάνεια του κυττάρου, έτσι ώστε να σταματήσει η ενεργοποίηση του μονοπατιού ή η επακόλουθη ενδοκυττάρωσή τους ίσως αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου αυτοί να επιδράσουν στους στόχους τους. Επειδή οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων μετάγουν σήματα που οδηγούν το κύτταρο σε διαίρεση, η κατά λάθος ενεργοποίησή τους ενδέχεται να είναι επιβλαβής για τον οργανισμό, επειδή μπορεί να οδηγήσει σε μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του. Πολλά από τα γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων ανήκουν στα **ογκογονίδια**.



Οι τελικές επιπτώσεις από την μεταγωγή σημάτων στο κύτταρο συνοψίζονται στην κατωτέρω εικόνα.

# Functions activated



## Τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων συχνά ενέχουν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – πρωτεΐνης

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνονται οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – πρωτεΐνης στα σηματοδοτικά μονοπάτια περιλαμβάνει συνήθως την αναγνώριση ενός σχετικά σύντομου μοτίβου αμινοξέων, που απαντάται στη μία πρωτεΐνη, από μια επικράτεια μιας άλλης πρωτεΐνης.

Συχνά, σε τέτοια μοτίβα-στόχους περιλαμβάνονται κατάλοιπα τυροσίνης, γεγονός που επιτρέπει την ενεργοποίηση του μοτίβου μετά από τη φωσφορυλίωσή του ή, αντιστρόφως, την απενεργοποίηση του με αποφωσφορυλίωση.

Ένα άλλο κοινό χαρακτηριστικό των μοτίβων-στόχων είναι η παρουσία καταλοίπων προλίνης, τα οποία προκαλούν μια χαρακτηριστική στροφή στην πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Σε πολλές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος, απαντώνται τα μοτίβα **SH2** και **SH3** (**Src Homology**, ομολογία *Src*), δύο επικράτειες που χρησιμοποιούνται για να συνδέσουν τις πρωτεΐνες αυτές με άλλα στοιχεία του μονοπατιού. Οι επικράτειες SH2 και SH3 πήραν αυτά τα ονόματα επειδή είχαν αρχικά περιγραφεί στην κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης c-Src. Οι επικράτειες SH2 και SH3 απαντώνται σε διάφορες πρωτεΐνες ή ομάδες πρωτεϊνών, όπως οι κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης, ή φωσφολιπάση Cγ.

Ένας υποδοχέας μπορεί να φέρει διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης SH2, επιτρέποντας έτσι την ενεργοποίηση πολλών πρωτεϊνών-στόχων. Μια πρωτεΐνη που φέρει μια επικράτεια SH2 ενεργοποιείται όταν προσδένεται σε μια θέση πρόσδεσης SH2. Η ενεργοποίηση μπορεί να είναι άμεση, να αφορά δηλαδή την ίδια την πρωτεΐνη που φέρει την επικράτεια SH2 (όταν αυτή η ίδια έχει καταλυτική ενεργότητα), ή έμμεση.

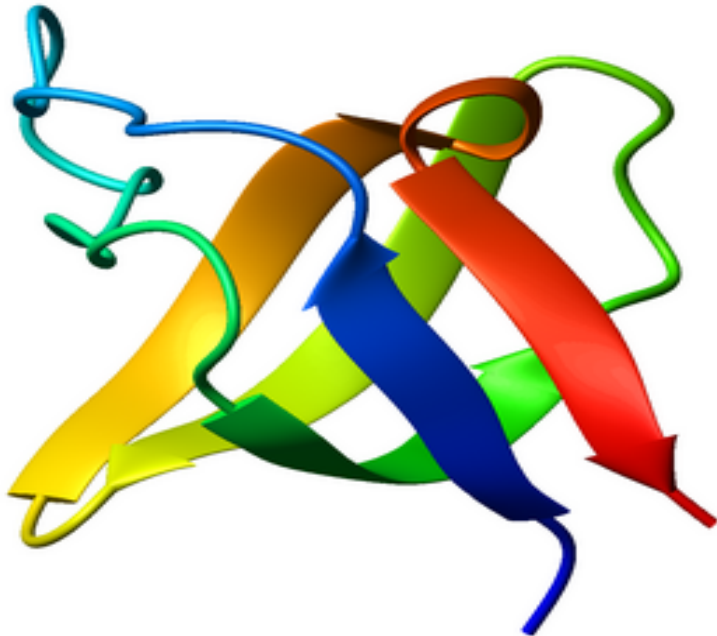


Οι ενζυμικές ενεργότητες που ρυθμίζονται άμεσα είναι συνηθέστερα ενεργότητες κινάσης, φωσφατάσης ή φωσφολιπάσης.

Ribbon diagram of the SH2 domain of human P56-Lck tyrosine kinase (PDB accession code 1LKK, chain A), colored from blue (N-terminus) to red (C-terminus).



Η περίπτωση της πρωτεΐνης-προσαρμοστή Grb2, η οποία αποτελείται μόνο από επικράτειες SH2 και SH3. Ο προσαρμοστής αυτός χρησιμοποιεί την επικράτεια SH2 για να αλληλεπιδράσει με το μόριο που βρίσκεται ανοδικά στο σηματοδοτικό μονοπάτι και την επικράτεια SH3 για να αλληλεπιδράσει με το επόμενο στοιχείο, καθοδικά στο μονοπάτι. Η επικράτεια SH3 αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στο μοτίβο PXXP. Έτσι, όταν ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί και δεσμεύσει την Grb2, η επικράτεια SH3, που φέρει η Grb2, προσδένεται σε μια πρωτεΐνη-στόχο η οποία διαθέτει την αλληλουχία PXXP. Οι επικράτειες SH3 αλληλεπιδρούν συχνά με μικρές πρωτεΐνες που δεσμεύουν GTP (GTP-binding proteins), όπως η πρωτεΐνη Ras. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι επικράτειες SH3 (και ιδιαίτερα η επικράτεια SH3 της πρωτεΐνης c-Src) έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν και με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, πυροδοτώντας έτσι άμεσα αλλαγές στην κυτταρική δομή.



**Ribbon diagram of the SH3 domain,  $\alpha$ -spectrin, from [chicken](#) ([Gallus gallus](#)) (PDB accession code 1SHG), colored from blue (N-terminus) to red (C-terminus).**

Μια επικράτεια που απαντάται συχνά στις πρωτεΐνες-στόχους των υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης είναι η PTB (**P**hospho**t**yrosine-**B**inding motif). Η PTB αλληλεπιδρά με ένα τμήμα του υποδοχέα το οποίο φέρει συνήθως την πρότυπη αλληλουχία Asn-Pro-X-phospho-Tyr και περιλαμβάνει ένα κατάλοιπο φωσφοτυροσίνης δίπλα από κατάλοιπα που σχηματίζουν β-στροφή.

Η επικράτεια PTB λειτουργεί διαφορετικά από τις επικράτειες SH2 και SH3, αφού χρησιμοποιείται για την πρόσδεση πρωτεϊνών συναρμογής. Μια πρωτεΐνη συναρμογής είναι ένα ενδιάμεσο μόριο, το οποίο στρατολογεί στον υποδοχέα άλλες πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη συναρμογής χρησιμοποιεί την επικράτεια PTB για να προσδεθεί σε μια φωσφορυλιωμένη θέση στον υποδοχέα. Στη συνέχεια, άλλες πρωτεΐνες του σηματοδοτικού μονοπατιού προσδένονται σε άλλες θέσεις. Η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε μια επικράτεια PTB και στον ενεργοποιημένο υποδοχέα καθορίζεται από υδρόφιλα αμινοξέα που εντοπίζονται κοντά στο φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο Tyr (προς την N-τελική πλευρά). Η αλληλεπίδραση αντιπαράλληλων β-κλώνων ως τρόπος αναγνώρισης πρωτεϊνών είναι συνηθισμένο φαινόμενο.

Η επικράτεια PDZ έχει μήκος 90-100 αμινοξέων και συχνά απαντάται σε πολλαπλές επαναλήψεις σε μια πρωτεΐνη. Η επικράτεια PDZ παίζει σημαντικό ρόλο στη συνάθροιση μεμβρανικών πρωτεϊνών και στην πρόσδεση πρωτεϊνών, που ενέχονται σε μονοπάτια σηματοδότησης, σε μεμβρανικά σύμπλοκα. Μια επικράτεια PDZ δεσμεύει τα τέσσερα τελευταία αμινοξέα του C-τελικού άκρου μιας πρωτεΐνης-στόχου. Η πρότυπη αλληλουχία που αναγνωρίζει είναι η X-Thr/Ser-X-Val-COOH.

## Το μονοπάτι Ras/MAPK

Σε κύτταρα θηλαστικών, το μονοπάτι Ras/MAPK συνιστά έναν καταρράκτη που συχνά ξεκινά με την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, όπως είναι, για παράδειγμα, ο υποδοχέας του EGF ή του PDGF. Ο υποδοχέας μετά την αλληλεπίδρασή του με τον προσδέτη ενεργοποιεί, με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης-προσαρμοστή το μονοπάτι Ras. Η ενεργοποίηση της Ras οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης/θρεονίνης Raf, κι αυτή με τη σειρά της κινητοποιεί την κινάση MEK, η οποία παλαιότερα ήταν γνωστή ως κινάση της MAP (**Mitogen Activated Protein Kinase**).

Μια οικογένεια κινασών MAP ονομάστηκε ERK επειδή τα μέλη της ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα (ERK, **Extracellular signal-Regulated Kinases**).

Ο καταρράκτης που περιλαμβάνει όσες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα από την ενεργοποίηση της κινάσης MEK μέχρι και τα τελικά προϊόντα αναφέρεται ως μονοπάτι της κινάσης MAP (μονοπάτι MAPK). Ο καταρράκτης των φωσφορυλιώσεων οδηγεί τελικά στη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων.

Οι αλλαγές αυτές ποικίλλουν, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ως τη διαφοροποίηση. Άλλοι στόχοι των κινασών είναι οι πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη δομή του κυττάρου. Το συνολικό μονοπάτι αναφέρεται επίσης και ως «μονοπάτι Ras/MAPK».

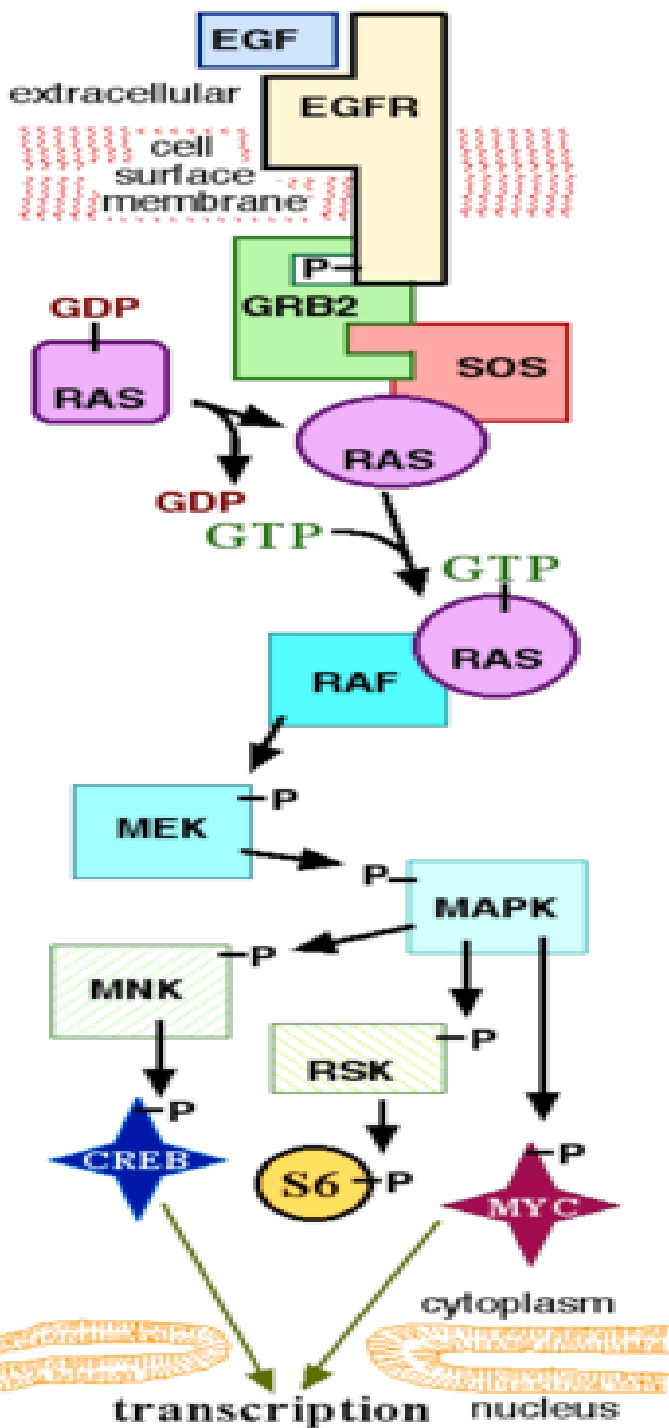
Αρκετά από τα στοιχεία αυτού του μονοπατιού στα θηλαστικά σχετίζονται με ογκογονίδια, μια που η μη φυσιολογική ενεργοποίηση οποιουδήποτε από τα στάδια αυτού του μονοπατιού μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία όγκων. Μετά την ενεργοποίησή του, ένας υποδοχέας με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης συνδέεται με την επικράτεια SH2 της πρωτεΐνης-προσαρμοστή Grb2.

Η Grb2 δεν φωσφορυλιώνεται, αλλά μέσω της επικράτειας SH3 που διαθέτει συνδέεται με την πρωτεΐνη SOS, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Ras.

Η SOS προκαλεί την αντικατάσταση του GDP της Ras από GTP, γεγονός που αρκεί για την ενεργοποίηση της Ras. Η Grb2 δεν είναι ο μοναδικός προσαρμοστής που μπορεί να ενεργοποιήσει τη Ras. Όταν ένας υποδοχέας με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης ενεργοποιείται, η ενδοκυτταρική του επικράτεια μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε περισσότερες από μία θέσεις, καθεμία από τις οποίες μπορεί να πυροδοτήσει ένα διαφορετικό μονοπάτι. Η συνήθης συνέπεια μιας φωσφορυλίωσης είναι η ενεργοποίηση ενός μονοπατιού μεταγωγής σήματος. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η φωσφορυλίωση μπορεί να έχει αρνητική επίδραση, περιορίζοντας τη δράση του μονοπατιού.

MEK , MAPK και MNK είναι κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα.

MAPK ονομάζεται αρχικά "extracellular signal-regulated kinase" (ERK) και microtubule-associated protein kinase (MAPK). Αργότερα μετονομάστηκαν σε «mitogen-activated protein kinase» (MAPK)



Μια από τις συνέπειες της ενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK είναι η αλλαγή του επιπέδου μετάφρασης του mRNA σε πρωτεΐνες. Η MAPK φωσφορυλιώνει την ριβοσωμική (40S) πρωτεΐνη S6 (RSK). Η MAPK ρυθμίζει την ενεργότητα αρκετών μεταγραφικών παραγόντων όπως [C-myc](#). Η MAPK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την MNK η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει τον [CREB](#). Η MAPK ρυθμίζει επίσης την μεταγραφή του γονιδίου [Fos](#). Κατά συνέπεια η MAPK οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές των μεταγραφόμενων γονιδίων επηρεάζοντας τον κύκλο του κυττάρου.

## **Η ενεργοποίηση της Ras ελέγχεται από το GTP**

Η Ras ανήκει στην οικογένεια των μονομερών πρωτεϊνών G. Οι μονομερείς πρωτεΐνες G είναι ενεργές όταν είναι συνδεδεμένες με GTP και ανενεργές όταν είναι συνδεδεμένες με GDP.

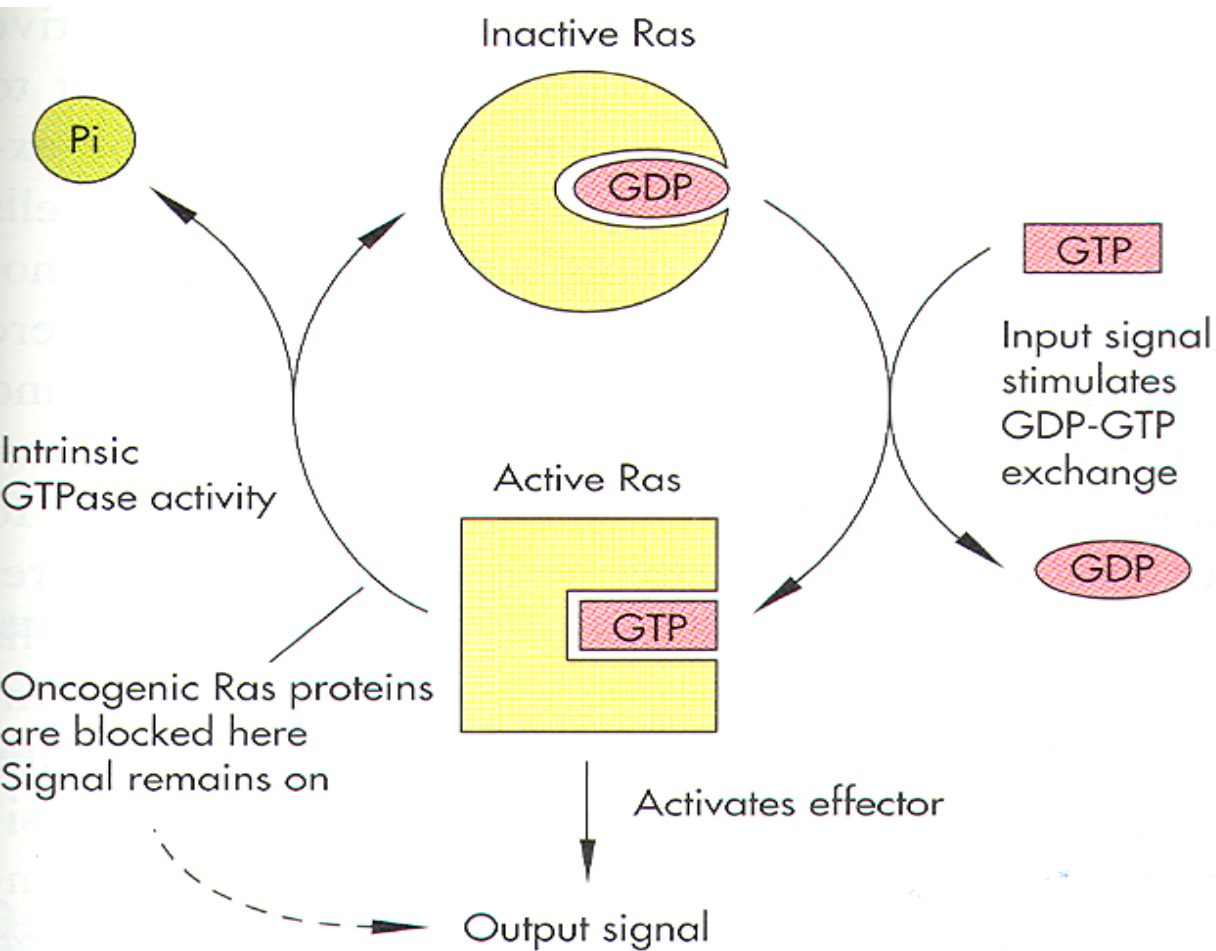
Όπως και οι τριμερείς πρωτεΐνες G, έτσι και οι μονομερείς διαθέτουν εγγενή ενεργότητα GTPάσης, η οποία ευθύνεται για την υδρόλυση του GTP που οδηγεί στην απενεργοποίησή τους. Η πρωτεΐνη GAP (**G**T**P**ase **A**ctivating **P**rotein), η οποία ενεργοποιεί την εγγενή ενεργότητα GTPάσης της Ras, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της. Η πρωτεΐνη SOS είναι ο παράγοντας Ras-GEF (**G**uanine nucleotide **E**xchange **F**actor), ο οποίος διεγείρει τη Ras να ανταλλάξει το συνδεδεμένο σε αυτήν GDP με GTP. Επομένως η πρωτεΐνη SOS ενεργοποιεί τη Ras. Η ενεργοποίηση της SOS είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής της με την Grb2, η οποία στρατολογείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη από έναν ενεργοποιημένο υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης.

Γενική δομή των πρωτεϊνών Ras των θηλαστικών

**Οι περιοχές μεταξύ των καταλοίπων 5-22 και 109-120 ενέχονται στην πρόσδεση των νουκλεοτιδίων γουανίνης.**

Η Ras προσκολλάται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της μεμβράνης κοντά στο C-τελικό άκρο της. Μεταλλάξεις που αποτρέπουν την τροποποίηση αυτή καταστέλλουν την ογκογόνο δράση της Ras, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τη μεμβράνη είναι σημαντική για τη λειτουργία της. Τα 3 C-τελικά αμινοξέα αποκόπτονται από την πρωτεΐνη και η καρβοξυλική ομάδα της Cys186 μεθυλιώνεται. Επίσης, κάποια άλλα κατάλοιπα Cys που βρίσκονται στην περιοχή αυτή παλμιτυλιώνονται αντιστρεπτά.

Οι αλλαγές αυτές φαίνεται ότι αυξάνουν περαιτέρω τη συγγένεια της Ras για τη μεμβράνη.  
 Η επικράτεια-τελεστής (κατάλοιπα 30-40) περιλαμβάνει την περιοχή της Ras που αντιδρά με το μόριο-στόχο. Αυτή η περιοχή είναι απαραίτητη για την ογκογόνο δράση των πρωτεϊνών **Ras**, οι οποίες είναι μόνιμα ενεργές λόγω μετάλλαξης της θέσης 12. Η ίδια περιοχή είναι απαραίτητη και για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Ras-GAP.



Όταν το GTP υδρολύεται, αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση της Ras. Στην αλλαγή αυτή εμπλέκεται η θέση 61, στην οποία εντοπίζονται ογκογόνες μεταλλάξεις, δηλαδή μεταλλάξεις που ενεργοποιούν μόνιμα τη Ras. Συνεπώς η ογκογόνος δράση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Ras βασίζεται πρωταρχικά στη μειωμένη τους ικανότητα να υδρολύουν το GTP.



Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/MAPK οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που ευθύνονται για ένα σύνολο σημαντικών αλλαγών. Επιπλέον, η ενεργοποίηση μιας ομάδας μονομερών πρωτεϊνών G (Rac, Rho και Cdc42) πυροδοτεί και άλλες αλλαγές.

Ωστόσο, αυτές οι δομικές αλλαγές είναι δυνατόν να συμβούν και ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση της Ras, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ενεργοποιούν εκτός από το μονοπάτι της Ras και άλλα εναλλακτικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται διαφορετικές μονομερείς πρωτεΐνες G.

Υπάρχουν τουλάχιστον 3 οικογένειες κινασών MAP. Οι κινάσες αυτές λειτουργούν ως σημεία-διακόπτες των μονοπατιών. Οι κινάσες MAP ενεργοποιούνται κατά την ανάπτυξη ή η διαφοροποίηση. Οι κινάσες MAP είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Όλα τα στοιχεία που βρίσκονται καθοδικά από αυτές στο μονοπάτι ενεργοποιούνται από φωσφορυλιώσεις σερίνης/θρεονίνης. **Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ενός μονοπατιού κινάσης MAP είναι η μεταβολή της μεταγραφής. Ενώ το εναρκτήριο γεγονός πραγματοποιείται στην κυτταρική επιφάνεια, η τελική ερμηνεία του συμβαίνει στον πυρήνα, όπου ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες. Στο κλασικό μονοπάτι των κινασών MAP, η ίδια η κινάση MAP μετακινείται στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει μεταγραφικούς παράγοντες-στόχους.**

Ένα εναλλακτικό μονοπάτι βασίζεται στη φωσφορυλίωση ενός κυτταροπλασματικού παράγοντα. Ο παράγοντας αυτός μπορεί να είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος στη συνέχεια μετακινείται στον πυρήνα ή μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει ένα μεταγραφικό παράγοντα.

Το καταληκτικό γεγονός μιας διακλάδωσης του καταρράκτη είναι η φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι c-myc. Ο σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας c-Jun φωσφορυλιώνεται από μια άλλη κινάση MAP, την JNK. Στο μονοπάτι της κινάσης MAP, η MEK αποτελεί ένα σημείο σύγκλισης. Η Ras ενεργοποιεί τη Raf, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τη MEK. Μια άλλη κινάση που μπορεί να ενεργοποιήσει τη MEK είναι η MEKK (κινάση της MEK), η οποία ενεργοποιείται από τριμερείς πρωτεΐνες G.

Έτσι, η ενεργοποίηση των υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης και η ενεργοποίηση των τριμερών πρωτεϊνών G αποτελούν τους δύο βασικούς τύπους ερεθίσματος στην κυτταρική επιφάνεια που δρουν μέσω καταρρακτών της κινάσης MAP. Είναι δυνατόν να υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών και στοιχεία άλλων μονοπατιών. Όλες οι κινάσες του μονοπατιού σηματοδότησης μέσω κινασών MAP εμφανίζουν κοινό τρόπο δράσης.

Καθεμία από τις κινάσες αυτές έχει ένα ενεργό κέντρο στο οποίο προσδένεται και φωσφορυλιώνεται μια πεπτιδική αλληλουχία-στόχος. Η αλληλουχία-στόχος περιέχει ένα κατάλοιπο σερίνης ή θρεονίνης το οποίο ακολουθείται από ένα κατάλοιπο προλίνης. Η ενεργότητα του ενζύμου ελέγχεται από τη φωσφορυλίωσή του σε μια σύντομη αλληλουχία (Thr-X-Tyr), η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί από μια κινάση ή να απενεργοποιηθεί από μια φωσφατάση.

Η αναγνώριση του κατάλληλου υποστρώματος από μια κινάση MAP εξαρτάται από δύο τύπους αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικές περιοχές του μορίου: η αλληλουχία-στόχος δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο, ενώ άλλες περιοχές της κινάσης αλληλεπιδρούν και προσδένονται σε μοτίβα συναρμογής της πρωτεΐνης-στόχου. Η μία περιοχή είναι η C-τελική **επικράτεια CD** (**C**ommon **D**ocking region). Η άλλη είναι η **αύλακα συναρμογής** που εντοπίζεται κοντά στο καταλυτικό κέντρο.

Η JNK ρυθμίζεται από δύο είδη εξωκυτταρικών σημάτων: το υπεριώδες φως (τυπική απόκριση στρες) και την ενεργοποίηση της Ras. Η JNK, όπως και οι κινάσες ERK, είναι συγγενής των κινασών MAP και εμφανίζει κλασικά χαρακτηριστικά θρεονίνης και τυροσίνης και φωσφορυλιώνει τους στόχους της σε κατάλοιπα σερίνης. Η μεταγωγή σημάτων προκαλεί διαφορετικές αποκρίσεις σε ερεθίσματα που διαφέρουν ποιοτικά (ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια) ή ποσοτικά (ενεργοποιούν μονοπάτια με διαφορετική ένταση ή διάρκεια). Ένα συγκεκριμένο ερέθισμα μπορεί να ενεργοποιήσει ένα ή περισσότερα μονοπάτια. Ένα χαρακτηριστικό του μονοπατιού Ras/MAPK είναι ότι η ενεργοποίηση του ίδιου μονοπατιού, σε διαφορετικές περιστάσεις, μπορεί να προκαλέσει διαφορετικά αποτελέσματα.

Π.χ. όταν τα κύτταρα PC12 επωαστούν με τον αυξητικό παράγοντα NGF, διαφοροποιούνται (γίνονται παρόμοια με τα νευρικά) και παύουν να διαιρούνται. Όταν όμως επωαστούν με τον EGF, πολλαπλασιάζονται διαρκώς. Και στις δύο περιπτώσεις, το κύριο γεγονός για τη μεταγωγή του σήματος είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK/MAPK. Η κύρια διαφορά που ευθύνεται για τη διαφορετική απόκριση στις δύο αυτές περιπτώσεις αφορά τη διάρκεια της ενεργοποίησης. Η διέγερση του NGF προκαλεί παρατεταμένη ενεργοποίηση της Ras-GTP, ενώ η διέγερση του EGF παράγει μόνο ένα παροδικό αποτέλεσμα.

Η διάρκεια του ερεθίσματος φαίνεται να αποτελεί την κρίσιμη παράμετρο στο μονοπάτι ERK/MAPK. Συνθήκες που προκαλούν ένα συνεχές ερέθισμα οδηγούν σε διαφοροποίηση των κυττάρων. Αντίθετα, όλες οι συνθήκες που προκαλούν παροδική ενεργοποίηση φαίνεται ότι οδηγούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση πιθανόν να απαιτείται για τη μετατόπιση στον πυρήνα αντίθετα η παροδική διέγερση δεν αρκεί για τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση πυρηνικών μεταγραφικών έτσι ώστε να προκαλέσει τη μετατόπιση της ERK2 στον πυρήνα.

### **Το κυκλικό AMP και η ενεργοποίηση του CREB**

Το κυκλικό AMP είναι ένας κλασικός δεύτερος αγγελιαφόρος που σχετίζεται με τη μεταγραφή, μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα CREB (**cAMP Response Element Binding protein**).

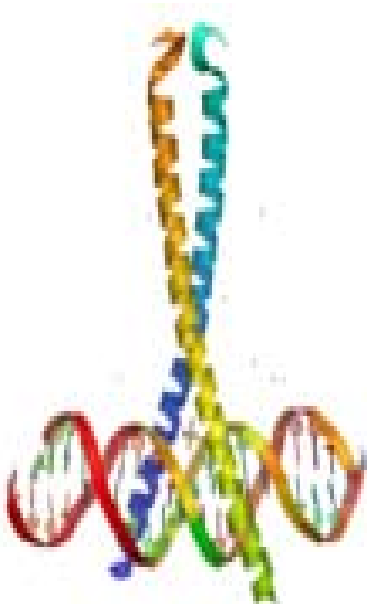
Στο μονοπάτι αυτό εμπλέκεται επίσης η κινάση σερίνης/θρεονίνης PKA. Το έναυσμα του μονοπατιού αυτού είναι η ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης από μια ενεργοποιημένη πρωτεΐνη G που πραγματοποιείται στην πλασματική μεμβράνη. Το cAMP που παράγεται δεσμεύεται στη ρυθμιστική υπομονάδα R της PKA, η οποία βρίσκεται αγκυροβολημένη σε μεμβρανικές δομές στον περιπυρηνικό χώρο.

Όταν το επίπεδο του cAMP είναι χαμηλό το ένζυμο είναι ανενεργό. Όταν η συγκέντρωση του cAMP αυξάνει (π.χ. ενεργοποίηση της [adenylate cyclases](#) από [G protein-coupled receptors](#), ή λόγω αναστολής των φωσφοδιεστερασών οι οποίες όταν είναι ενεργές καταστρέφουν το cAMP). Το cAMP συνδέεται στην ρυθμιστική υπομονάδα R η οποία αλλάζει την διαμόρφωσή της και απελευθερώνει την καταλυτική υπομονάδα. Η ελεύθερη υπομονάδα καταλύει τότε την μεταφορά φωσφόρου από το ATP σε σερίνη ή θρεονίνη διαφόρων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Αυτή η φωσφορυλίωση συνήθως συντελεί στην αλλαγή της ενεργότητας του υποστρώματος.

Αυτή η ρύθμιση PKA and cAMP εμπλέκεται σε πολλά και διαφορετικά κύτταρα και κατά συνέπεια σε πολλά μονοπάτια. Τα αποτελέσματα της φωσφορυλίωσης της PKA είναι κατά κανόνα παροδικά καθώς οι φωσφατάσες γρήγορα αποφωσφορυλιώνουν την PKA.

Η πρόσδεση του cAMP στη ρυθμιστική υπομονάδα R της PKA οδηγεί στην αποδέσμευση της καταλυτικής της υπομονάδας (C), η οποία είναι ελεύθερη πλέον να μετατοπιστεί προς τον πυρήνα. Η μετατόπιση γίνεται με διάχυση και αφορά μόνο ένα ποσοστό των αποδεσμευμένων υπομονάδων C. Οι ελεύθερες υπομονάδες C φωσφορυλιώνουν στόχους τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα.

Οι τελικοί στόχοι της PKA αποτελούν επίσης υποστρώματα για τη φωσφατάση PPάση I, η οποία ουσιαστικά αντιστρέφει τη δράση της PKA. Ωστόσο, ένας άλλος στόχος της PKA είναι μια πρωτεΐνη η οποία, όταν είναι φωσφορυλιωμένη, καταστέλλει την PPάση I, αποτρέποντας έτσι την αντιστροφή της φωσφορυλίωσης από την PKA.



**Οι πρωτεΐνες CREB** ([cAMP response element-binding](#)) είναι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι δένονται σε αλληλουχίες DNA οι οποίες ονομάζονται [cAMP response elements](#) και αυξάνουν ή ελαττώνουν την μεταγραφή ορισμένων γονιδίων. Η σύνδεση του CREB στο DNA γίνεται μέσω της επικράτειας του «φερμουάρ» λευκίνης ([bZIP domain](#)).

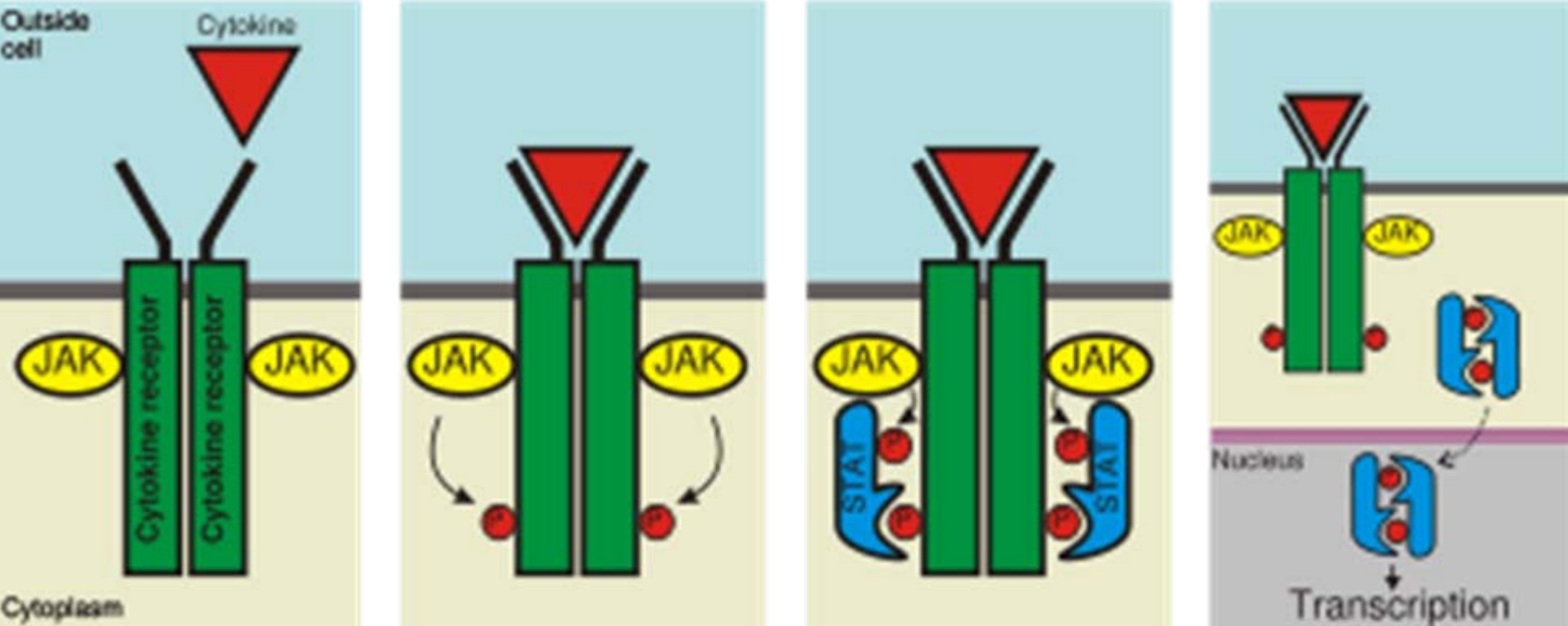
Ο μεταγραφικός παράγοντας CREB είναι ένα από τα κύρια υποστρώματα της PKA στον πυρήνα. Η φωσφορυλίωση ενός μόνο καταλοίπου σερίνης αυξάνει κατά πολύ την ενεργότητα του CREB. Ο CREB προσδένεται στο στοιχείο απόκρισης του cAMP, CRE (**c**AMP **R**esponse **E**lement), το οποίο απαντάται στα γονίδια που επάγονται από το cAMP. Ο ρυθμός της μεταγραφής των γονιδίων αυτών είναι ευθέως ανάλογος της συγκέντρωσης του φωσφορυλιωμένου CREB στον πυρήνα. Η κινητική της απόκρισης περιορίζεται από το σχετικά αργό ρυθμό διάχυσης της ελεύθερης υπομονάδας C προς τον πυρήνα και στη συνέχεια αποφωσφορυλιώνεται με αργό ρυθμό. Στην αποφωσφορυλίωση μπορεί να συμμετέχουν αρκετά ρυθμιστικά κυκλώματα. Άμεσος έλεγχος μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της ενεργότητας ειδικών φωσφατασών.

## Τα μονοπάτια JAK-STAT

Τα μονοπάτια JAK-STAT ενεργοποιούνται από αρκετούς υποδοχείς κυτοκινών. Οι υποδοχείς αυτοί δεν διαθέτουν εγγενή ενεργότητα κινάσης. Ωστόσο, η δέσμευση των κυτοκινών προκαλεί το διμερισμό τους. Οι διμερείς υποδοχείς αναγνωρίζονται από τις κινάσες JAK που προσδένονται σε αυτούς και ενεργοποιούνται. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε έναν ενεργοποιημένο (διμερή) υποδοχέα κυτοκίνης και στην αντίστοιχη κινάση JAK ουσιαστικά έχει το ίδιο αποτέλεσμα με το διμερισμό ενός υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης.

Οι κινάσες JAK είναι κινάσες τυροσίνης των οποίων τα κυριότερα υποστρώματα είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που ονομάζονται STAT. Περισσότεροι από 7 παράγοντες STAT φωσφορυλιώνονται από μία συγκεκριμένη ομάδα κινασών JAK. Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ενώ η JAK είναι συνδεδεμένη με τον υποδοχέα.

Η φωσφορυλίωση των STAT οδηγεί στο σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών. Οι διμερείς STAT μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου σε ορισμένες περιπτώσεις αλληλεπιδρούν και με άλλες πρωτεΐνες, και προσδένονται σε ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων-στόχων τους ενεργοποιώντας τη μεταγραφή τους. Ο έλεγχος της εξειδίκευσης έγκειται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει τον υποδοχέα, τις JAK και τους STAT. Οι STAT αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποδοχέα, όπως επίσης και με τις JAK. Μια επικράτεια SH2 σε έναν ορισμένο παράγοντα STAT αναγνωρίζει μια θέση δέσμευσης σε ένα συγκεκριμένο υποδοχέα. Έτσι, ο έλεγχος της εξειδίκευσης επιτυγχάνεται κυρίως μέσω του παράγοντα STAT.



Η διέγερση ενός μονοπατιού JAK-STAT είναι παροδική. Η ενεργοποίηση των STAT μπορεί να τερματιστεί από τη δράση μιας φωσφατάσης.

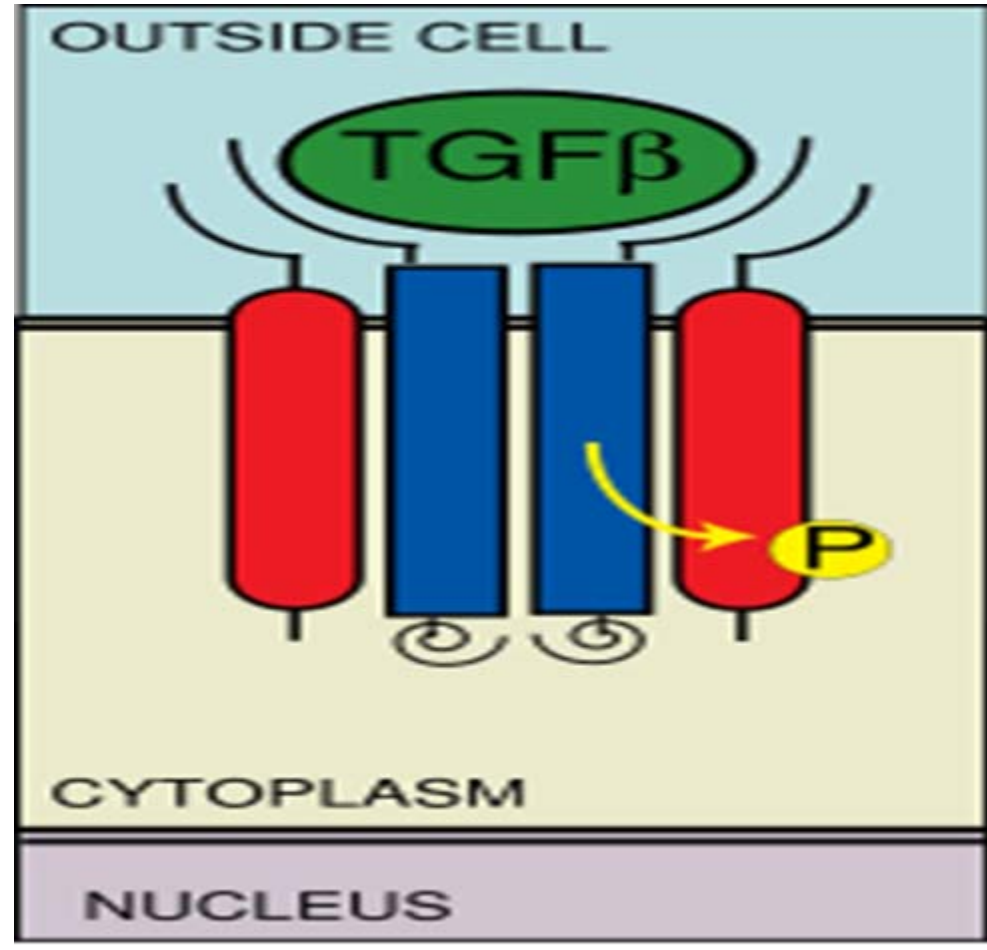
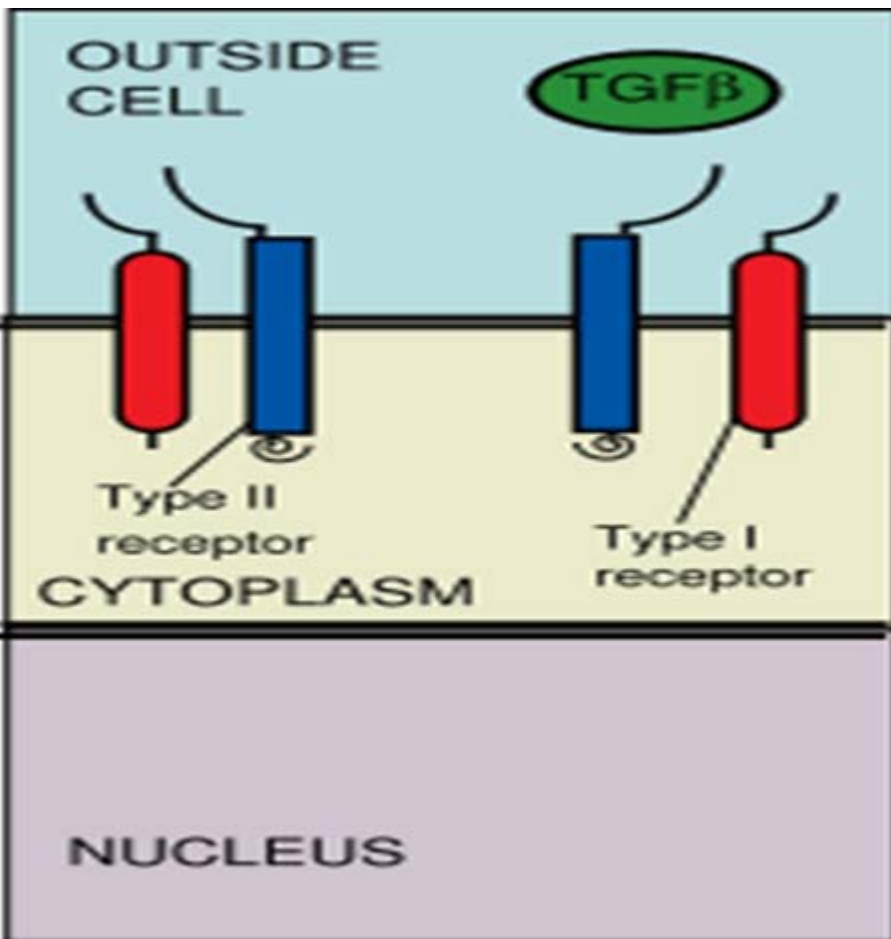
Η πρόσδεση της ερυθροποιητίνης στον υποδοχέα της ενεργοποιεί την κινάση JAK2. Η ενεργοποίηση της φωσφατάσης SH-PTP1, που προσδένεται μέσω μιας επικράτειας SH2 σε ένα κατάλοιπο φωσφοτυροσίνης στον υποδοχέα της ερυθροποιητίνης, μπορεί να τερματίσει την αντίδραση. Αυτή η τυροσίνη του υποδοχέα πιθανόν να φωσφορυλιώνεται από την JAK2. Επομένως η αλληλεπίδρασή της με τη φωσφατάση οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση της JAK2 και σταματά την ενεργοποίηση των αντίστοιχων STAT. Έτσι δημιουργείται ένα απλό κύκλωμα ανάδρασης: ο υποδοχέας ερυθροποιητίνης ενεργοποιεί την JAK2, η JAK2 επιδρά σε μία θέση στον υποδοχέα και αυτή η θέση αναγνωρίζεται από τη φωσφατάση, η οποία με τη σειρά της επιδρά στην

JAK2

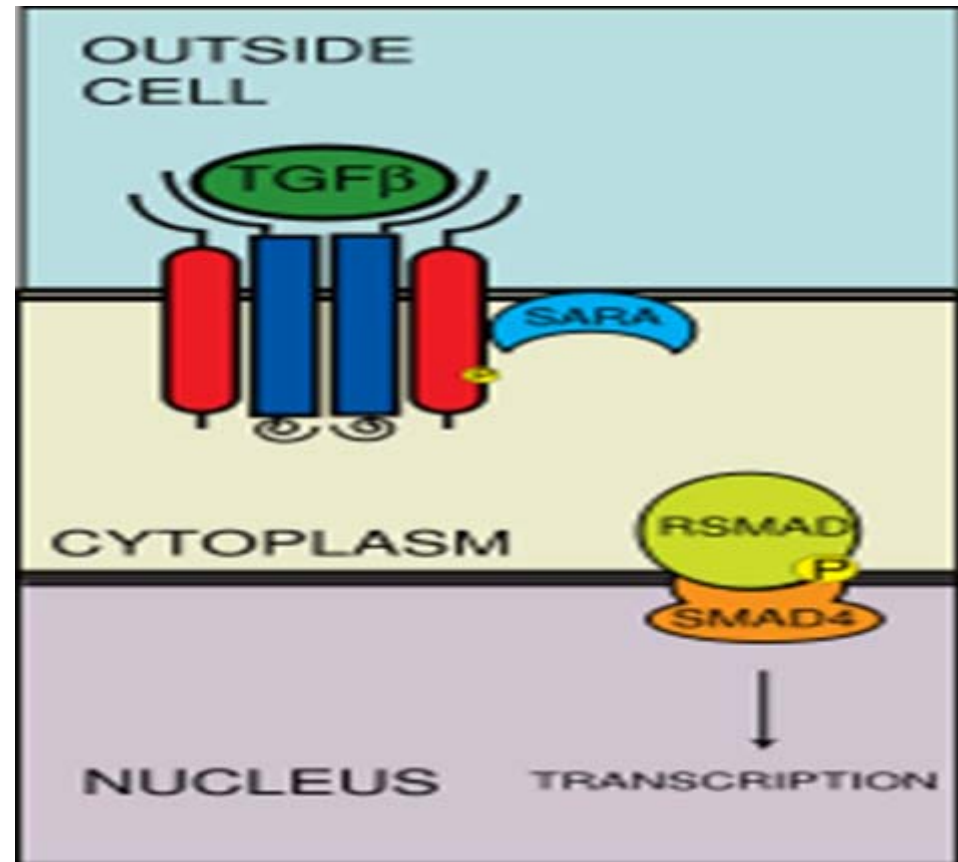
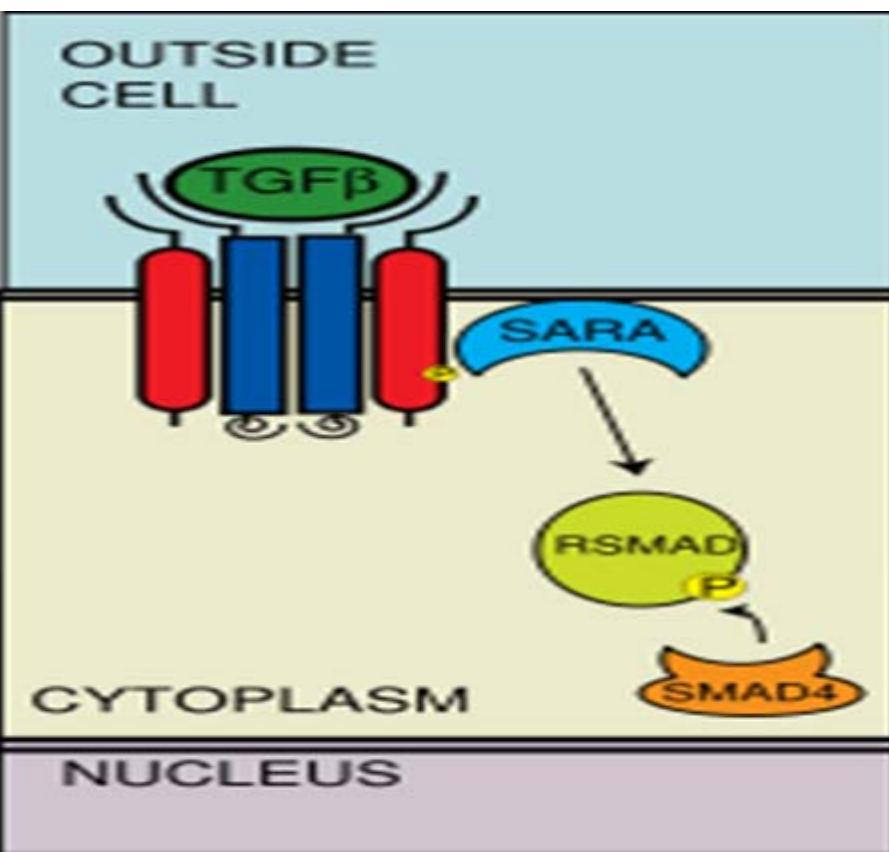


## Στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TGFβ

Οι παράγοντες της οικογένειας του TGFβ προσδένονται σε υποδοχείς που συγκροτούνται από διαφορετικές υπομονάδες (τύπου I και II) οι οποίες έχουν ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Αρχικά ο προσδέτης δεσμεύεται από έναν υποδοχέα τύπου II (διμερές υπομονάδων τύπου II) δημιουργώντας ένα σύμπλοκο το οποίο έχει υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα τύπου I (διμερές υπομονάδων τύπου I). Τελικά σχηματίζεται ένα τετραμερές σύμπλοκο στο οποίο ο υποδοχέας τύπου II φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I.



Μόλις σχηματιστεί το ενεργό, τετραμερές, σύμπλοκο, ο υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνει ένα μέλος της οικογένειας των κυτταροδιαλυτών παραγόντων Smad. Συνήθως, ένας ενεργοποιητής Smad φωσφορυλιώνεται στο C-τελικό άκρο. Το γεγονός αυτό προκαλεί το διμερισμό του με έναν κοινό εταίρο, τον Smad4. Το ετεροδιμερές των Smad μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Υπάρχουν 9 πρωτεΐνες Smad. Οι ενεργοποιητές που λειτουργούν αποκλειστικά σε ένα συγκεκριμένο μονοπάτι είναι οι Smad2 και 3 και οι Smad1 και 5. Η Smad4 αποτελεί τον κοινό εταίρο διμερισμού για όλες τις Smad, όλων των μονοπατιών. Οι κατασταλτικές Smad δρουν ως ανταγωνιστές των ενεργοποιητών Smad.



## SARA ( **SMAD Anchor for Receptor Activation** )

SARA προσανατολίζει τον R-SMAD με τέτοιο τρόπο ώστε η σερίνη στο C-καρβοξυτελικό άκρο να τοποθετηθεί απέναντι από το καταλυτικό κέντρο του υποδοχέα τύπου I και ο οποίος φωσφορυλιώνει την σερίνη του R-SMAD. Η φωσφορυλίωση προκαλεί στερεοχημική αλλαγή του R-SMAD ο οποίος παρουσιάζει πλέον υψηλή συγγένεια τον SMAD4 με τον οποίο σχηματίζει σύμπλοκο. Αυτό το σύμπλοκο εισέρχεται στον πυρήνα και προκαλεί μεταγραφή του DNA.

Στην υπεροικογένεια του TGFβ, κάθε προσδέτης ενεργοποιεί ένα συγκεκριμένο υποδοχέα που μετάγει σήματα μέσω ενός χαρακτηριστικού συνδυασμού πρωτεϊνών Smad.

Επειδή ο TGFβ είναι ισχυρός καταστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, το μονοπάτι αυτό ενέχεται και στην καταστολή όγκων.

## ΟΓΚΟΓΟΝΟΙ ΙΟΙ

### Γενική Περιγραφή Ιών Ευκαρυωτικών Κυττάρων

Ένας ιός αποτελείται από ένα μόνο νουκλεϊκό οξύ (DNA ή RNA), καθώς και ένα νουκλεοκαψίδιο, που περικλείει και προστατεύει το γενετικό υλικό του ιού και βοηθάει την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή.

Το καψίδιο αποτελείται από πολλές ίδιες πρωτεϊνικές υπομονάδες, τα καψομερίδια, των οποίων η διάταξη προσδίδει στον ιό το χαρακτηριστικό του σχήμα.

Με τον μεγάλο αριθμό ομοίων καψομεριδίων επιτυγχάνεται οικονομία στο γενετικό υλικό, δεδομένου πως το γενετικό υλικό των ιών είναι περιορισμένο. Η εξωκυττάρια μορφή του ιού ονομάζεται **virion ή ιϊκό σωματίδιο**. Μερικοί ιοί, είναι δυνατόν να περιέχουν, επιπλέον του καψιδίου, και ένα προστατευτικό φάκελο, ο οποίος αποκτάται από τη μεμβράνη του ξενιστή. Στον φάκελο του ιού βρίσκονται ενσωματωμένες και οι ιϊκές πρωτεΐνες.

Η σύνδεση του ιού με το κύτταρο-ξενιστή γίνεται μέσω ενός υποδοχέα του κυττάρου, ο οποίος αναγνωρίζει τις ιϊκές γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου ή τις πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου. Κατά τη μόλυνση ενός κυττάρου από έναν ιό, ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση μαζί με το καψίδιό του, από το οποίο απαλλάσσεται αμέσως μετά.

## Ογκογόνοι ιοί

Το ογκογόνο δυναμικό τους προέρχεται από την ικανότητά τους να ενσωματώνουν το γενετικό τους υλικό στο DNA του κυττάρου ξενιστή και από τη συνεχή παραγωγή μιας ή/και περισσοτέρων ιϊκών πρωτεϊνών που ονομάζονται **ογκογόνες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες μετασχηματισμού** (transforming proteins).

Όσον αφορά τους **DNA ογκογόνους ιούς**, τα υπεύθυνα για το μετασχηματισμό γονίδια ανήκουν στο ιϊκό γονιδίωμα.

Αντίθετα, **στους ρετροϊούς**, τα υπεύθυνα για το μετασχηματισμό γονίδια είναι είτε κανονικά, είτε ελαφρώς αλλοιωμένα κυτταρικά γονίδια, που οι ιοί φέρουν μαζί με το γενετικό τους υλικό. Αυτά, προκαλούν το μετασχηματισμό των κυττάρων, είτε λόγω υπερέκφρασης είτε λόγω της αλλοίωσης που φέρουν.

### Κύκλος ζωής του ιού SV40

Ο φυσικός ξενιστής του ιού SV40 είναι ο πίθηκος (Simian Virus). Ο ιός ανήκει στην κατηγορία των DNA ιών Παπόβα. Διαθέτει δίκλωνο κυκλικό DNA μεγέθους 5 Kb που περιέχει 6 μόνο γονίδια. Έχει σφαιρική μορφή με εικοσαεδρικό καψίδιο, το οποίο αποτελείται από 72 ίδιες υπομονάδες (καψομερίδια). Στα κύτταρα του φυσικού ξενιστή του (πίθηκος, για τον SV40) ένας DNA ιός ακολουθεί λυτικό κύκλο, με δημιουργία πολυάριθμων νέων ιϊκών σωματιδίων, που καταλήγει στη λύση του κυττάρου.

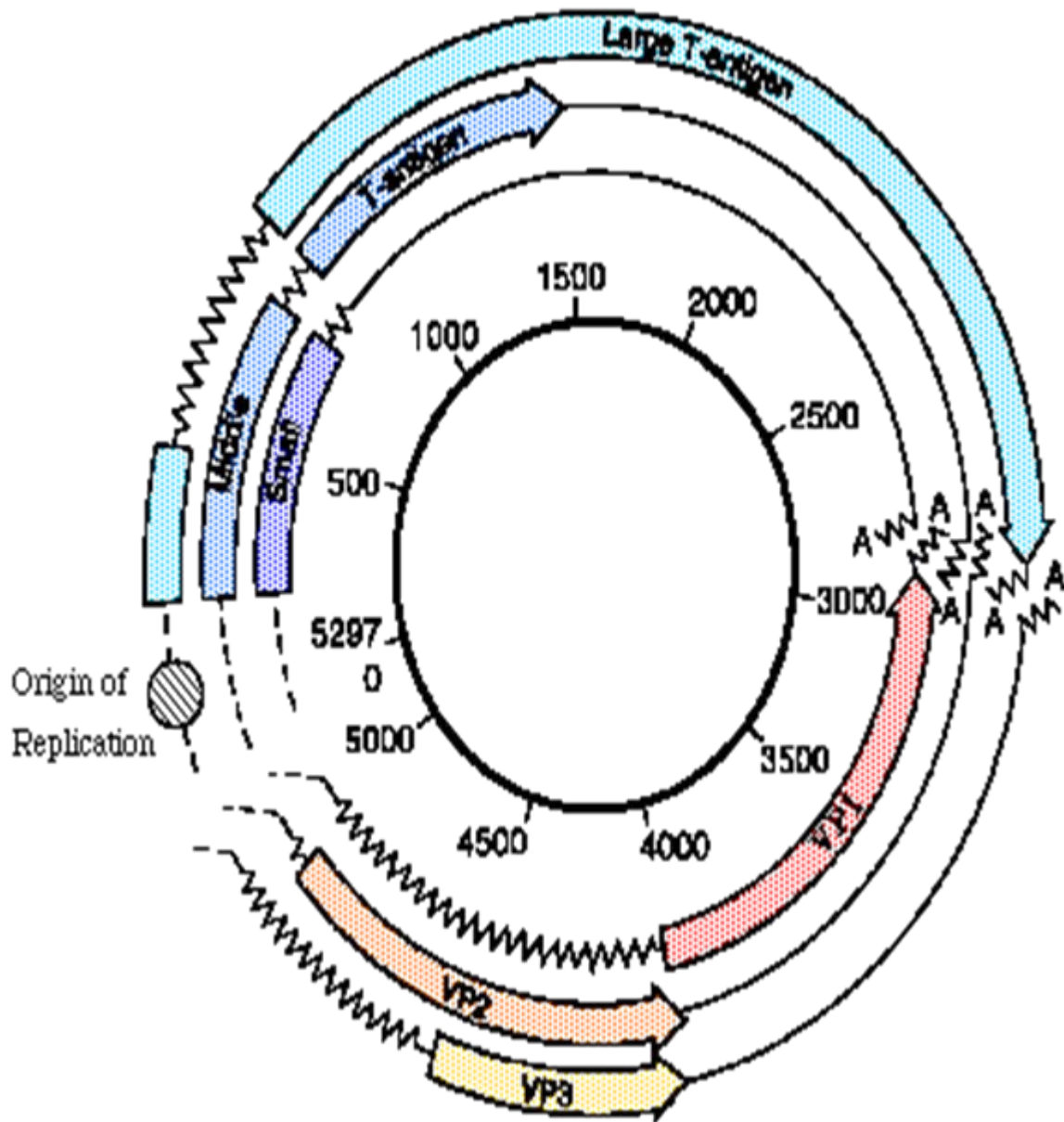
Τα κύτταρα στα οποία ένας DNA ιός ακολουθεί λυτικό κύκλο ονομάζονται **επιτρεπτικά** (permissive cells).

Η παρουσία ή όχι των υποδοχέων στο κύτταρο καθορίζει αν το κύτταρο θα μολυνθεί ή όχι από τον ιό.

Οι υποδοχείς αυτοί είναι κανονικές κυτταρικές πρωτεΐνες. Συνήθως πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνες και φτάνουν σε αριθμό 104 - 105 ανά κύτταρο. Την προσκόλληση του ιού ακολουθεί η είσοδος του στο κύτταρο.

Ο ιός εισέρχεται μαζί με το καψίδιο, το οποίο αποδομείται στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, ο ιός χρησιμοποιεί τον αντιγραφικό και μεταγραφικό/μεταφραστικό μηχανισμό του κυττάρου για να πολλαπλασιασθεί και να συνθέσει τις ιϊκές πρωτεΐνες, με σκοπό τη συγκρότηση των νέων ιϊκών σωματιδίων.

Στον κύκλο ζωής του SV40 μέσα στο ξενιστικό κύτταρο διακρίνουμε δύο φάσεις: την **πρώιμη** (Early) και την **όψιμη ή καθυστερημένη** (Late) φάση. Σε κάθε μία από αυτές τις δύο φάσεις, μεταγράφεται διαφορετική περιοχή του κυκλικού DNA του ιού: κατά την πρώιμη φάση μεταγράφεται η «πρώιμη περιοχή» και κατά την καθυστερημένη φάση μεταγράφεται η «καθυστερημένη περιοχή». Αυτές οι δύο περιοχές έχουν κοινό σημείο έναρξης της μεταγραφής (ori), μεταγράφονται δε προς αντίθετες κατευθύνσεις. Η πρώτη περιοχή του γονιδιώματος κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες, ονομαζόμενες T οι οποίες πρωτεΐνες, προέρχονται από διαφορετικό μάτισμα από ένα κοινό αρχικό μετάγραφο. Η πρωτεΐνη T, είναι απαραίτητη για την έναρξη της αντιγραφής του DNA του SV40 και παίζει σημαντικό ρόλο στο μετασχηματισμό των κυττάρων. Η μεταγραφή της καθυστερημένης περιοχής του γονιδιώματος οδηγεί στη σύνθεση των τριών κυρίων πρωτεϊνών του καψιδίου, VP1, VP2 και VP3. Και εδώ έχουμε διαφορετικό μάτισμα του ίδιου αρχικού μεταγράφου.



Small and Medium T εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια και στον μετασχηματισμό των κυττάρων. Large T λειτουργεί ως διακόπτης από την πρώτη στην καθυστερημένη μεταγραφή /μετάφραση του ιικού γενώματός.





Large T παρουσιάζει πολλαπλές λειτουργίες .

Εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα ( 98% nuclear ), συνδέεται με το DNA , έχει ενεργότητα ATP dependent DNA helicase , συνδέεται με DNA polymerases, με την p53 και το Rb .Τέλος μπορεί να φωσφορυλιώνεται και να ακυλιώνεται.

Τα τελευταία 140 αμινοξέα (N-terminal amino acids ) του αντιγόνου large T εμπλέκονται στον μετασχηματισμό .

Συνδέεται με το Rb. Μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή ( 90- 140 AA) αποτρέπουν τον μετασχηματισμό κυττάρων in vitro.

Συνδέεται με την p53 προς το C- καρβοξυτελικό άκρο.

**Η σύνδεση του T antigen με αυτές τις δυο πρωτεΐνες πιστεύεται ότι υπερνικά την αναστολή της κυτταρικής αύξησης.**

Η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση όταν η κατάστασή του δεν του επιτρέπει «ένα υγιή αναδιπλασιασμό». Ένα εξουδετερωμένο p53 συμβάλλει στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση.

Σε σπάνιες περιπτώσεις, συνήθως υπό εργαστηριακές συνθήκες και όχι στη φύση, ο SV40 μπορεί να προσβάλλει κύτταρα άλλου είδους από το φυσικό ξενιστή του. Σε αυτά τα κύτταρα, που ονομάζονται μη-επιτρεπτικά, μερικά στάδια της έκφρασης του ιϊκού γονιδιώματος και επομένως του κύκλου ζωής του ιού μπλοκάρονται.

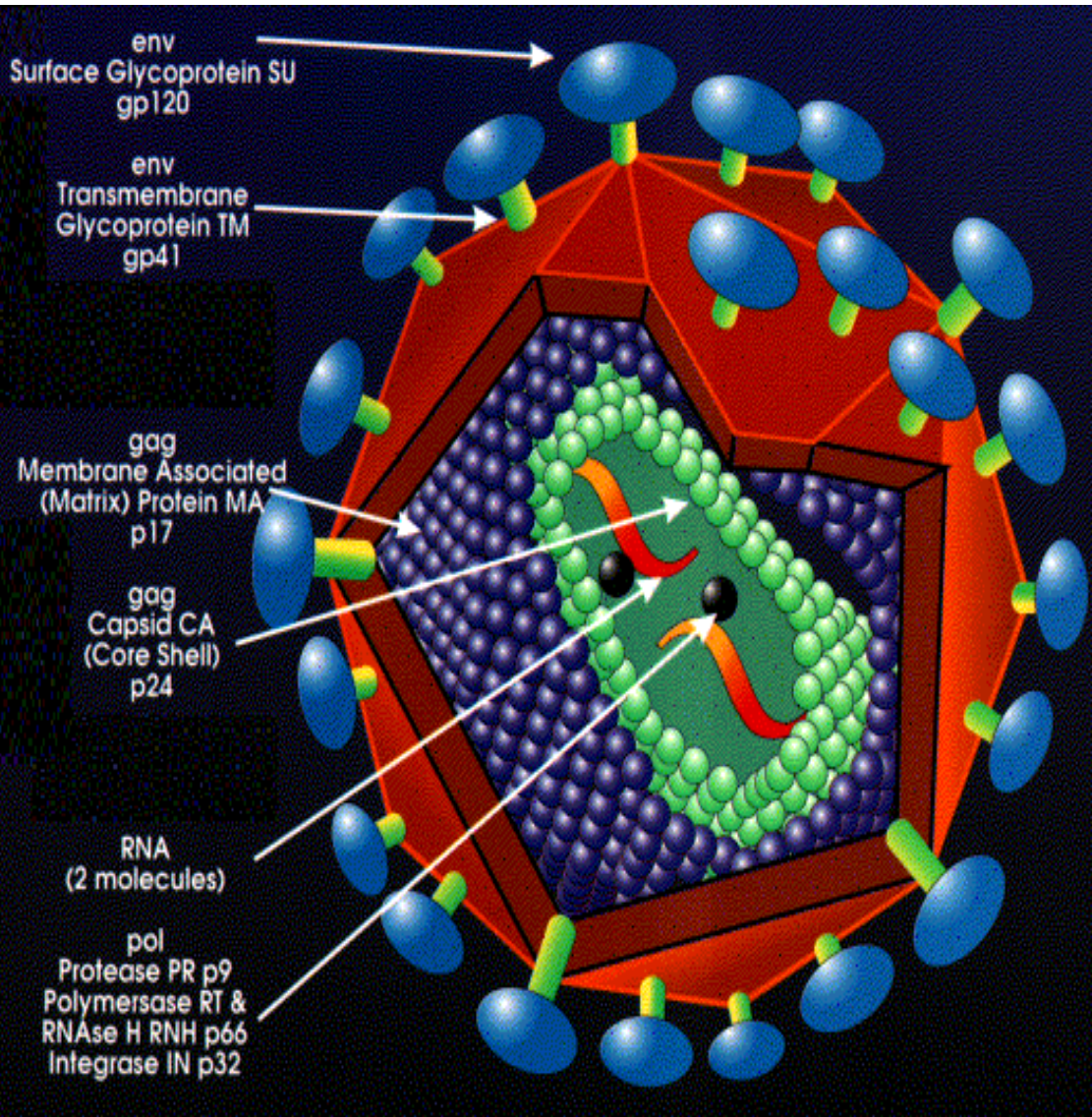
Συγκεκριμένα, στα **μη-επιτρεπτικά** κύτταρα η πρώιμη περιοχή του DNA του SV40 εκφράζεται, η T πρωτεΐνη του ιού παράγεται, αλλά δεν έχουμε αντιγραφή του ιϊκού DNA και μεταγραφή της καθυστερημένης περιοχής. Το αποτέλεσμα είναι ότι δεν δημιουργούνται νέοι απόγονοι του ιού και δεν λύεται το κύτταρο. Επειδή όμως κατά το τέλος της πρώιμης φάσης το προσβεβλημένο κύτταρο «ωθείται» από τη δράση των ιϊκών πρωτεϊνών της πρώιμης φάσης να αντιγράψει το γενετικό του υλικό, με συνακόλουθο τη διαίρεσή του, θεωρείται ότι εκτρέπεται από το φυσιολογικό κύκλο του.

Αυτή η «εκτροπή» από το φυσιολογικό ρυθμό αύξησης ενός μη-επιτρεπτικού κυττάρου, από έναν DNA ιό (όπως ο SV-40) συνήθως είναι προσωρινή και η πλειο- νότητα των προσβεβλημένων κυττάρων επανέρχεται στη φυσιολογική κατάσταση λόγω αποδόμησης του ιϊκού γονιδιώματος κατά την επόμενη κυτταρική διαίρεση. Σε ένα μικρό ποσοστό όμως μη-επιτρεπτικών κυττάρων (1/10<sup>5</sup>), το ιϊκό γονιδίωμα ενσωματώνεται σε τυχαίες θέσεις του κυτταρικού DNA. Στα κύτταρα αυτά δεν δημιουργούνται απόγονοι των ιών και δεν επέρχεται λύση, ωστόσο παρατηρείται πλέον μόνιμη «εκτροπή» από το φυσιολογικό ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης, δεδομένου πως οι υπεύθυνες ιϊκές πρωτεΐνες της πρώιμης φάσης εκφράζονται πλέον μόνιμα ως τμήμα του γονιδιώματος του κυττάρου. Η συνεχής έκφραση των πρώιμων πρωτεϊνών T και t, ευθύνεται για τη διατήρηση του μετασχηματισμένου φαινότυπου αυτών των κυττάρων .

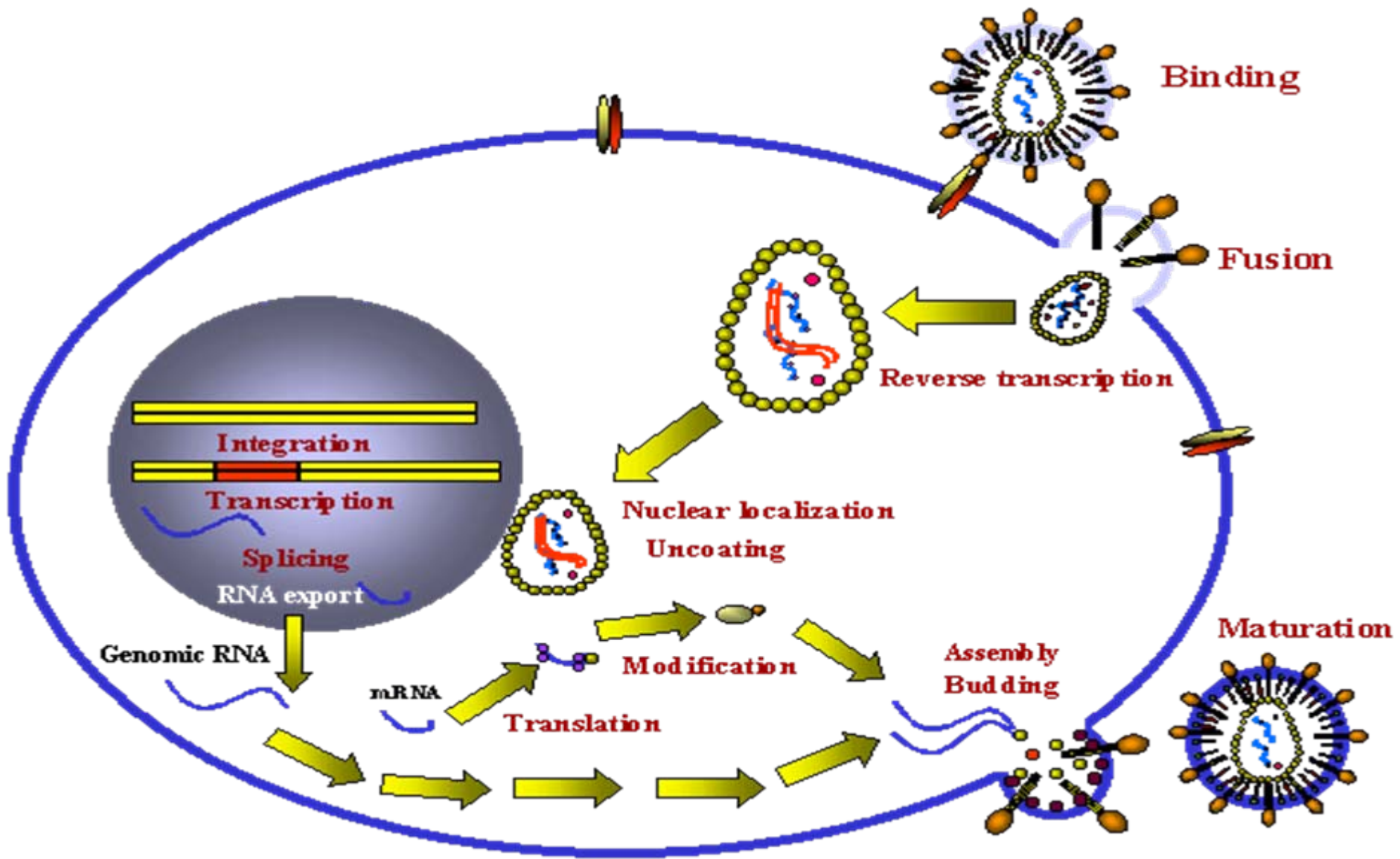
Ο ιός SV-40 είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα **ογκογόνου DNA ιού**. Η ογκογόνος δράση του εξασκείται μόνο σε μη-επιτρεπτικά κύτταρα/ξενιστές και οφείλεται στην έκφραση των πρώιμων πρωτεϊνών του T . Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται **ογκοπρωτεΐνες**.

## Κύκλος ζωής ενός ρετροϊού

Οι ρετροϊοί έχουν γενετικό υλικό αποτελούμενο από δύο ανεξάρτητα μόρια (+) RNA αλυσίδων και χαρακτηρίζονται από την παρουσία του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.



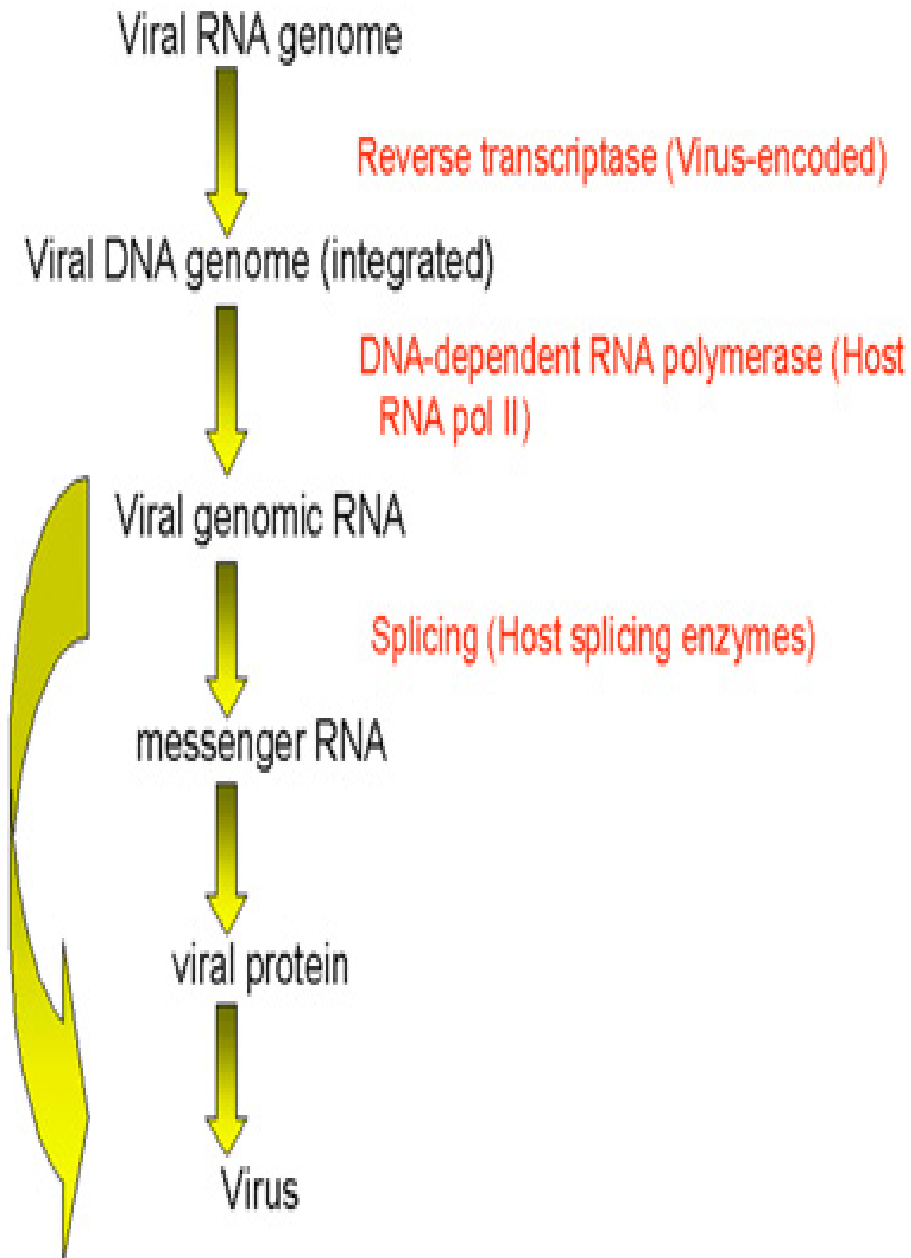
Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιώντας ένα tRNA ως έναυσμα έχει την ικανότητα να αντιγράφει RNA προκειμένου να συνθέσει DNA. Το RNA γίνεται πρώτα μονόκλωνο DNA και στη συνέχεια το ίδιο ένζυμο συνθέτει και το συμπληρωματικό κλώνο, με αποτέλεσμα να έχουμε δίκλωνο DNA. Στη συνέχεια το δίκλωνο DNA ενσωματώνεται, με τη βοήθεια του ενζύμου ενσωματάση, στο κυτταρικό γονιδίωμα ως προιός. Η μεταγραφή του αρχίζει μόνο όταν αυτό ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή. Έτσι βλέπουμε ότι η ενσωμάτωση είναι απαραίτητο στάδιο στη ζωή ενός ρετροϊού, και γι' αυτό η συχνότητα ενσωμάτωσης είναι πολύ υψηλή.



Κατά συνέπεια η ροή της γενετικής πληροφορίας είναι:  
 RNA ογκογόνος ιός → DNA προϊόν → RNA ογκογόνος ιός

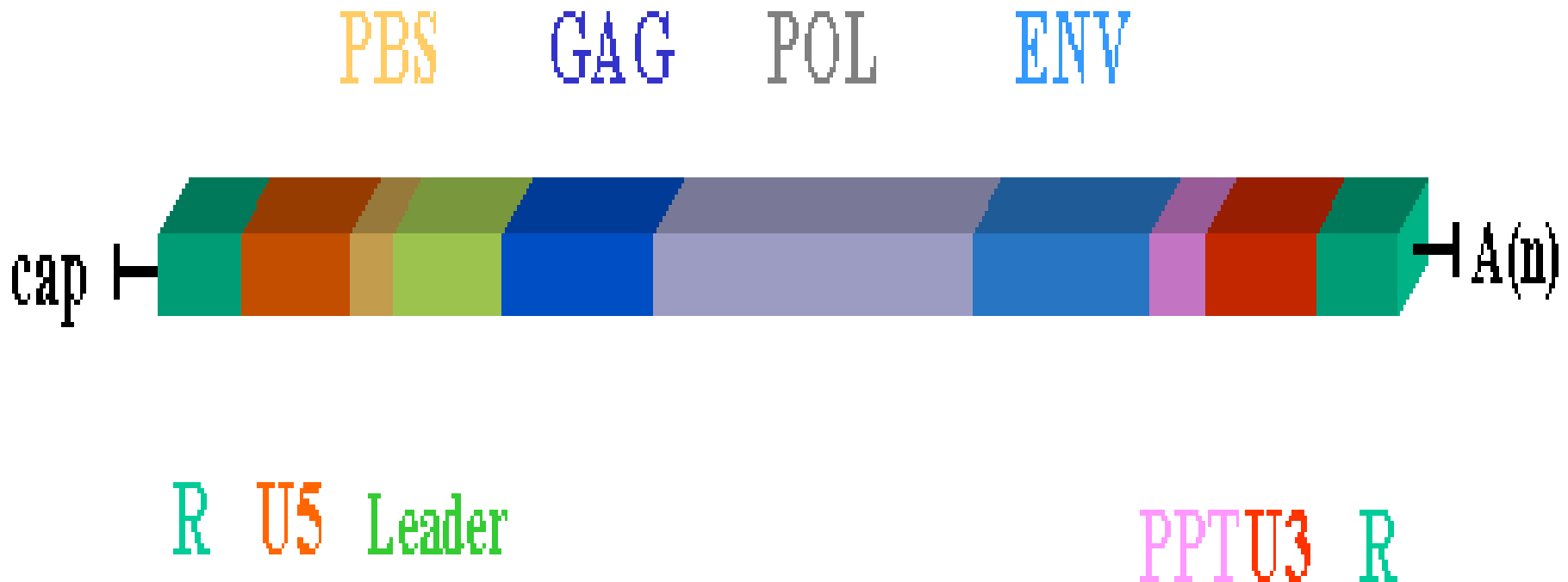


# RNA Tumor Viruses



Για τον πολλαπλασιασμό του προϊού, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που υπάρχουν στα άκρα του RNA, και κατ' επέκταση και στα άκρα του DNA του προϊού, οι οποίες ονομάζονται LTR (Long Terminal Repeats). Αυτές περιέχουν υποκινητές (promoters) και ενισχυτές (enhancers), που δίνουν τα αναγκαία σήματα για την μεταγραφή του προϊού σε RNA. Το τελευταίο έχει διπλό ρόλο καθ' ότι χρησιμεύει αφ' ενός ως mRNA για τη σύνθεση των ιϊκών πρωτεϊνών και αφ' ετέρου ως γενετικό υλικό για τη δημιουργία νέων απογόνων.

### Η δομή του ίικου γενώματος ενός ώριμου Ρετροϊού



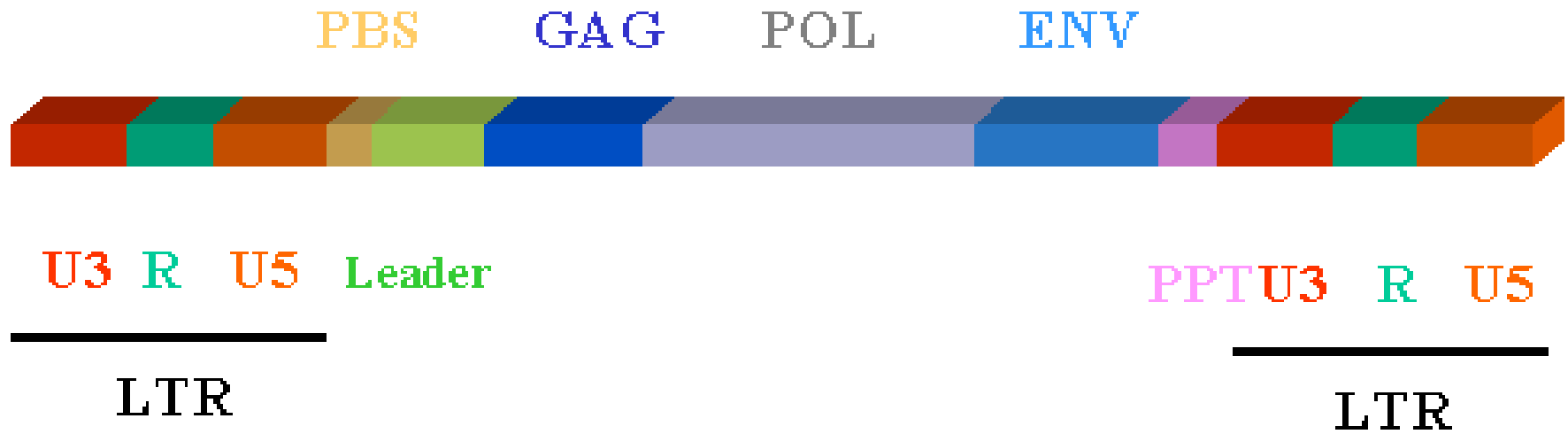
**R Region:** επαναλήψεις 18-250nt επαναλαμβανόμενες στα 2 άκρα του γενώματος. **U5:** μοναδική μη κωδικοποιούσα περιοχή 75-250nt η οποία μεταγράφεται πρώτη (reverse transcribed ), σχηματίζοντας το τέλος 3' του προιού.

**Primer Binding Site:** 18nt συμπληρωματικά του τέλους 3' του ειδικού tRNA το οποίο χρησιμοποιείται για την αρχή της αντίστροφης μεταγραφής .

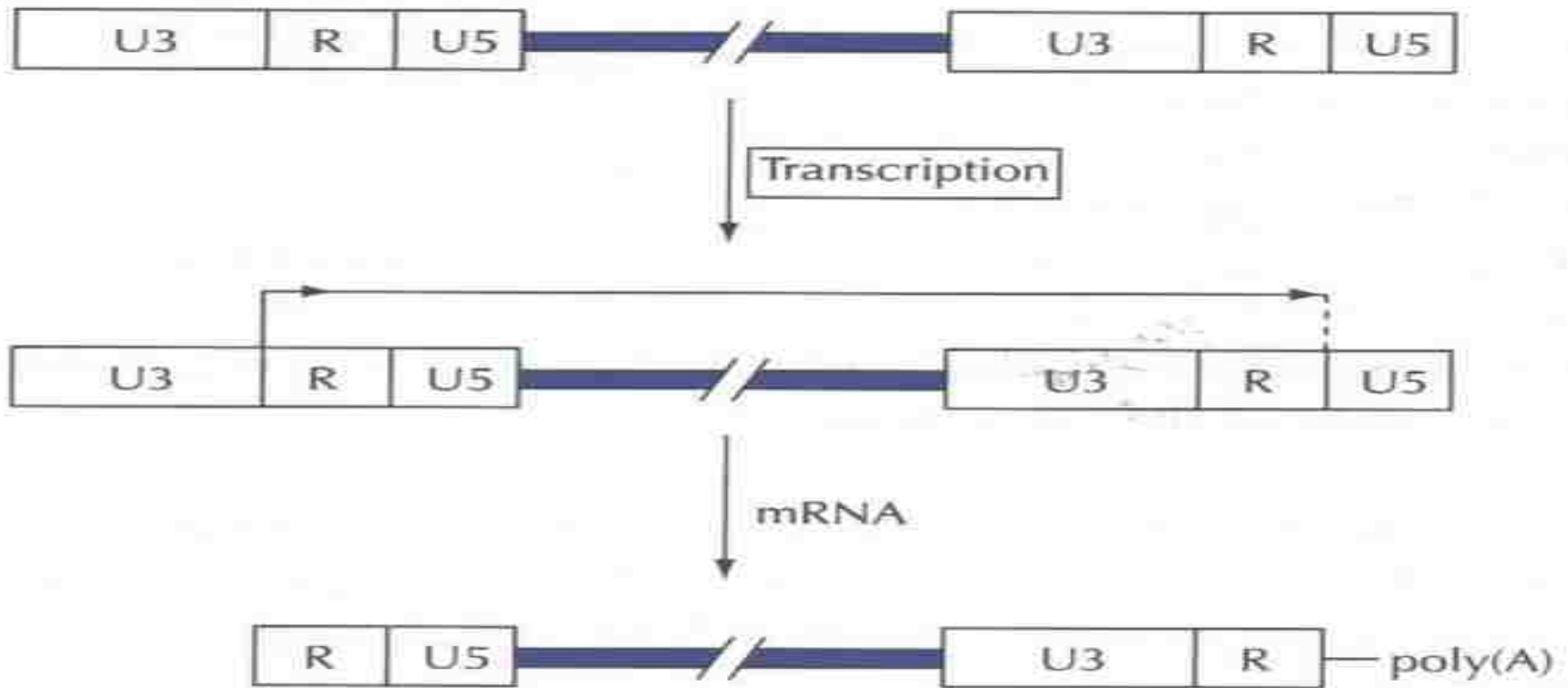
**Leader:** σχετικά μεγάλη αλληλουχία 90-500nt , μη μεταφραζόμενη περιοχή αμέσως μετά το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής και κατά συνέπεια παρούσα στο 5' του ιικού mRNAs.

**Polypurine Tract:** μια μικρή (~10 ) νουκλεοτιδίων αλληλουχία A/G υπεύθυνη για την έναρξη της σύνθεσης του θετικού κλώνου (+) κατά την διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής.

**Η δομή του γενώματος ενός Ρετροϊού υπό μορφή DNA προιού**



### Integrated provirus



Υπενθυμίζεται ότι οι ρετροϊοί όπως και άλλοι ιοί, είναι αναγκαστικά παράσιτα των κυττάρων, μια και στερούνται των απαραίτητων οργανιδίων που είναι αναγκαία για την επιβίωσή τους (π.χ. στερούνται ριβοσωμάτων και συνεπώς δεν μπορούν να αυτοεπιτελέσουν πρωτεϊνοσύνθεση).

Στους ρετροϊούς ανήκει ο HTLV που προσβάλλει τα Τ-λεμφοκύτταρα του ανθρώπου προκαλώντας λευχαιμίες, καθώς και ο ιός HIV, ο οποίος προκαλεί το σύνδρομο της Επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Ορισμένοι ρετροϊοί μπορούν να μετασχηματίσουν σε καρκινικά τα κύτταρα που μολύνουν. Αυτοί οι ρετροϊοί ονομάζονται ογκογόνοι ρετροϊοί.



## Ογκογόνοι ρετροϊοί

Υπάρχουν δύο κατηγορίες ογκογόνων ρετροϊών:

α) ογκογόνοι ρετροϊοί που προκαλούν κυρίως λευχαιμίες μετά από μακρά λανθάνουσα περίοδο. Δεν μετασχηματίζουν κύτταρα *in vitro* και δεν φέρουν ογκογονίδια.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι ο ιός HTLV, και

β) ογκογόνοι ρετροϊοί που φέρουν ογκογονίδια και μπορούν να προκαλέσουν άμεσο μετασχηματισμό των κυττάρων που μολύνουν. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και ο ιός του Rous (RSV). Οι ιοί αυτής της κατηγορίας-με την εξαίρεση του RSV- είναι ελαττωματικοί, δηλαδή χρειάζονται και έναν άλλο «βοηθητικό» ιό για να πολλαπλασιασθούν.

### Ο ιός του Rous (Rous Sarcoma Virus)

Ο πρώτος ρετροϊός που ανακαλύφθηκε είναι ο ιός του Rous. Είναι ίσως ο πιο καλά μελετημένος ογκογόνος ρετροϊός και φέρει το ογκογονίδιο **src**. Ο ιός προσβάλλει τα κοτόπουλα, στα οποία προκαλεί σαρκώματα. Ο ιός διαθέτει γονιδίωμα 10 Kb που φέρει 4 γονίδια, τα gag, pol, env και src. Τα τρία πρώτα είναι ιϊκά γονίδια, που φέρουν όλοι οι «πλήρεις» ρετροϊοί, προκειμένου να μολύνουν επιτυχώς τα κύτταρα και να αναπαράγονται :

- gag: κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 67 KDa, η οποία κόβεται για να δώσει τις 4 πρωτεΐνες του ιϊκού σώματος (core).

- pol: κωδικοποιεί για την αντίστροφη μεταγραφάση.

-env: κωδικοποιεί για μία γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου που παίζει ρόλο στην πρόσδεση του ιού στην επιφάνεια του ξενιστή.

Το γονίδιο src του ιού είναι υπεύθυνο για τον καρκινικό μετασχηματισμό των κυττάρων που μολύνει ο RSV. Το src ονομάζεται ιϊκό ογκογονίδιο και δεν αποτελεί δομικό γονίδιο του ρετροϊού. Οι υπόλοιποι ογκογόνοι ρετροϊοί, που φέρουν ογκογονίδια, δεν διαθέτουν ακέραια τα γονίδια gag, pol, env, τα υπεύθυνα για την αναπαραγωγή τους.

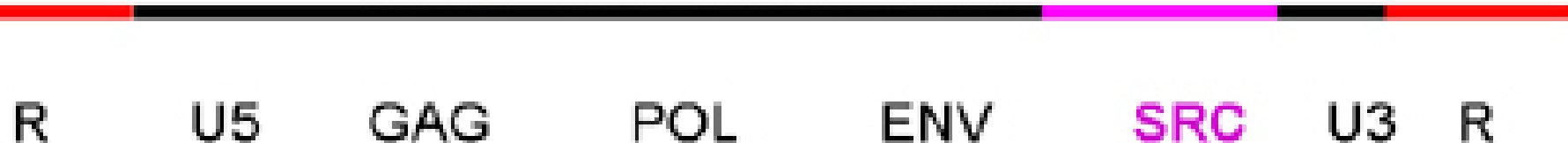
Ένα ή περισσότερα από αυτά έχει απωλεσθεί ή αλλοιωθεί κατά την απόκτηση του ογκογονιδίου που φέρουν. Χαρακτηρίζονται, έτσι «ελαττωματικοί» δεδομένου ότι έχουν ανάγκη από έναν πλήρη-βοηθητικό-ρετροϊό, για να αναπαραχθούν, χρησιμοποιώντας τα γονιδιακά προϊόντα του βοηθητικού αυτού ρετροϊού.

## Some retroviruses have an extra gene

“typical retrovirus”



Rous Sarcoma Virus



Ο κύκλος ζωής ενός ρετροϊού περιλαμβάνει υποχρεωτικά ένα στάδιο κατά το οποίο το δίκλωνο DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή με ένα γεγονός που μοιάζει με μετάθεση. Ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης δημιουργούνται μικρές επαναλήψεις στο DNA-στόχο.

Αν η ρετροϊική αλληλουχία ενσωματωθεί στη γαμετική σειρά (germline), τότε παραμένει στο γονιδίωμα ως ένας ενδογενής **προϊός** (provirus). Προϊός συμπεριφέρεται ως μέρος του γενετικού υλικού του οργανισμού και μεταφέρεται στους απογόνους του.

Περιστασιακά, κυτταρικές αλληλουχίες ανασυνδυάζονται με τη ρετροϊική αλληλουχία, μετατίθενται μαζί της και ενσωματώνονται σε νέες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα.

Οι κυτταρικές αλληλουχίες που μετατίθενται από ένα ρετροϊό σε νέες θέσεις μπορεί να αλλάξουν τις ιδιότητες ενός κυττάρου που έχει μολυνθεί από τον ιό.

Το ένζυμο που ευθύνεται για τη δημιουργία του αντιγράφου DNA από το RNA είναι η **αντίστροφη μεταγραφάση** (reverse transcriptase). Το ένζυμο αυτό μετατρέπει, μέσα στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου, το RNA σε γραμμικό δίκλωνο DNA. Μετά τη σύνθεσή του, το γραμμικό DNA κατευθύνεται προς τον πυρήνα, όπου ένα ή περισσότερα αντίγραφα του ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Ένα ένζυμο που ονομάζεται **ιντεγράση** (integrase) είναι αποκλειστικά υπεύθυνο για την ενσωμάτωση. Ο προϊός μεταγράφεται από τους μηχανισμούς του ξενιστή και παράγει ιικά RNA, τα οποία χρησιμεύουν τόσο ως μόρια mRNA όσο και ως γονιδιώματα που συσκευάζονται σε ιοσωμάτια (virions).

Η ενσωμάτωση είναι φυσιολογικό μέρος του βιολογικού κύκλου του ιού και είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή του. Σε κάθε ιοσωμάτιο συσκευάζονται δύο αντίγραφα του γονιδιώματος RNA, καθιστώντας το ουσιαστικά διπλοειδές..

Όταν ένα κύτταρο μολυνθεί ταυτόχρονα από δύο διαφορετικούς αλλά συγγενικούς ιούς, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν ετεροζυγωτικά ιοσωμάτια που φέρουν ένα γονιδίωμα από κάθε τύπο ιού. Η διπλοειδία ίσως επιτρέπει στον ιό να αποκτά κυτταρικές αλληλουχίες

Τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφή και ιντεγράση μεταφέρονται μέσα στο ιοσωμάτιο μαζί με το γονιδίωμα. Ένα τυπικό ρετροϊικό γονιδίωμα φέρει τρία γονίδια διαταγμένα με τη σειρά *gag-pol-env*. Το ρετροϊικό mRNA φέρει καλύπτρα (*cap*) στο 5' άκρο και είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3' άκρο. Μπορεί να μεταφραστεί με δύο τρόπους: η μετάφραση του ολικού μήκους mRNA (full length mRNA) έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση των πολυπρωτεϊνών Gag και Pol. Η σύνθεση του προϊόντος Gag από το mRNA απαιτεί την αναγνωστική διέλευση από το κωδικόνιο έναρξης ως το πρώτο κωδικόνιο τερματισμού. Για να εκφραστεί η Pol, όμως, θα πρέπει να παρακαμφθεί το πρώτο κωδικόνιο τερματισμού. Όταν τα πλαίσια ανάγνωσης των *gag* και *pol* είναι σε συνεχή σειρά και στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο, τότε η καταστολή του τερματισμού της μετάφρασης από ένα Glu-tRNA που αναγνωρίζει το κωδικόνιο λήξης επιτρέπει τη σύνθεση μιας πολυπρωτεΐνης (Gag – Pol). Όταν τα *gag* και *pol* βρίσκονται σε διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης, η παραγωγή της πολυπρωτεΐνης Gag-Pol γίνεται με μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου από το ριβόσωμα. Η αναγνωστική διέλευση που παράγει Gag-Pol έχει απόδοση ~5% σε σχέση με την παραγωγή της Gag (για την οποία δεν απαιτείται μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου). Το αποτέλεσμα είναι ότι η πρωτεΐνη Gag ξεπερνά ποσοτικά την Gag-Pol κατά περίπου 20 φορές.

**Η πολυπρωτεΐνη Env εκφράζεται με άλλον τρόπο: δημιουργείται με μάτισμα ένα βραχύτερο υπογονιδιωματικό (subgenomic) αγγελιαφόρο μόριο, το οποίο μεταφράζεται στο προϊόν Env.**

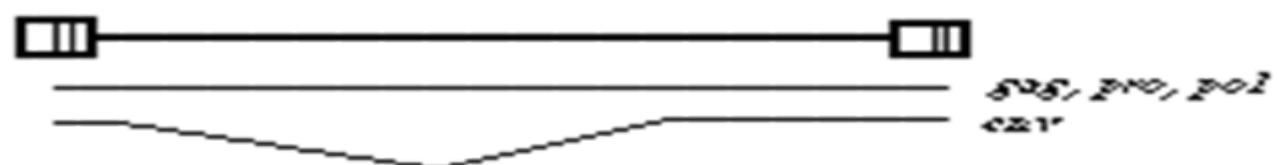
Το γονίδιο *gag* παράγει τις πρωτεΐνες που συνιστούν το νουκλεοπρωτεϊνικό καψίδιο του ιοσωματίου.

Το γονίδιο *pol* κωδικοποιεί τις λειτουργίες που σχετίζονται με τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, καθώς και με τον ανασυνδυασμό.

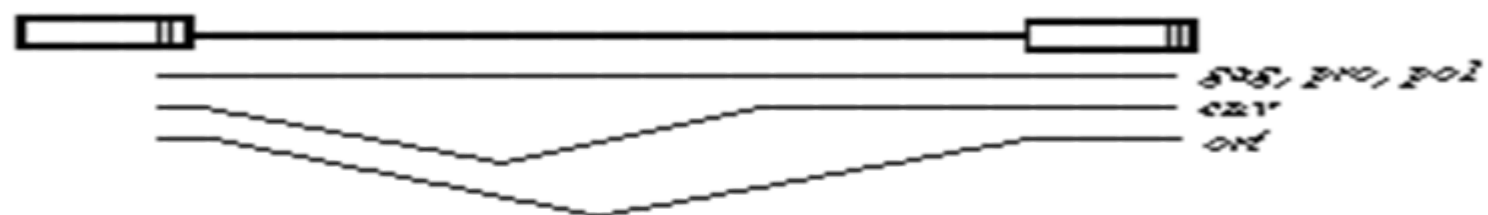
Το γονίδιο *env* κωδικοποιεί συστατικά του φακέλου του ιοσωματίου, ο οποίος περιλαμβάνει συστατικά και από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ξενιστή.

Τόσο το προϊόν του *gag* ή του *rag-pol* όσο και του *env* είναι πολυπρωτεΐνες οι οποίες διασπώνται από μία πρωτεάση, έτσι ώστε να απελευθερωθούν οι μεμονωμένες πρωτεΐνες που απαντώνται στα ώριμα ιοσωμάτια. Η λειτουργία της πρωτεάσης κωδικοποιείται στους ρετροϊούς με διάφορους τρόπους: μπορεί να είναι μέρος της Gag ή της Pol, ή, κάποιες φορές, να αποτελεί ανεξάρτητο αναγνωστικό πλαίσιο.

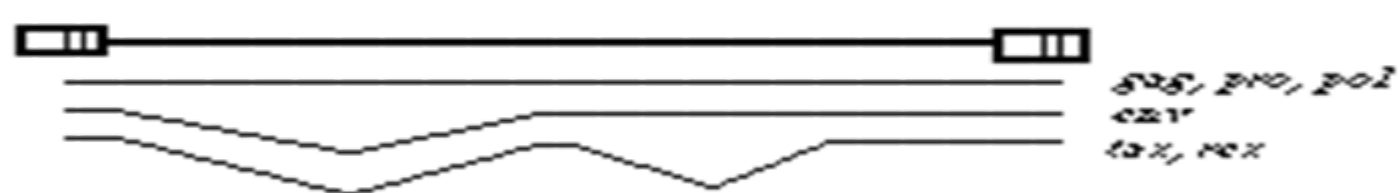
ALV,  
MLV



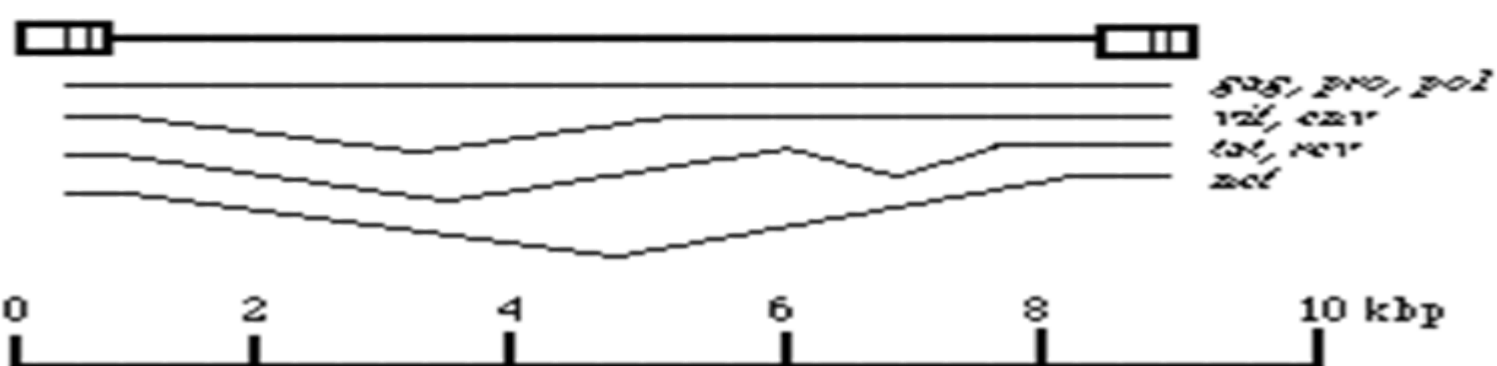
MMTV



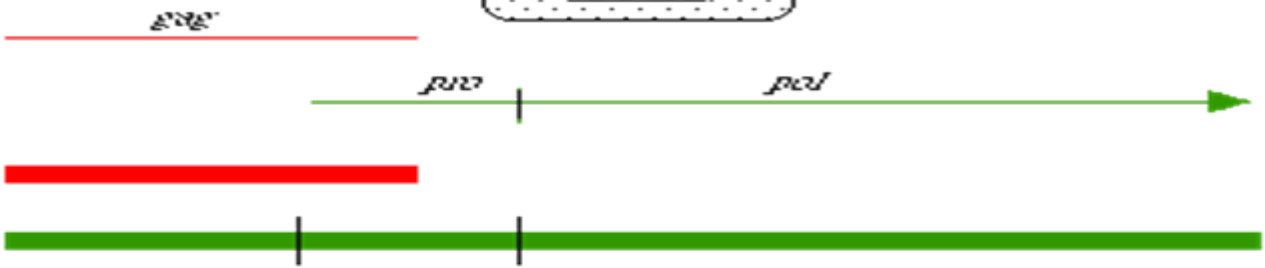
HTLV



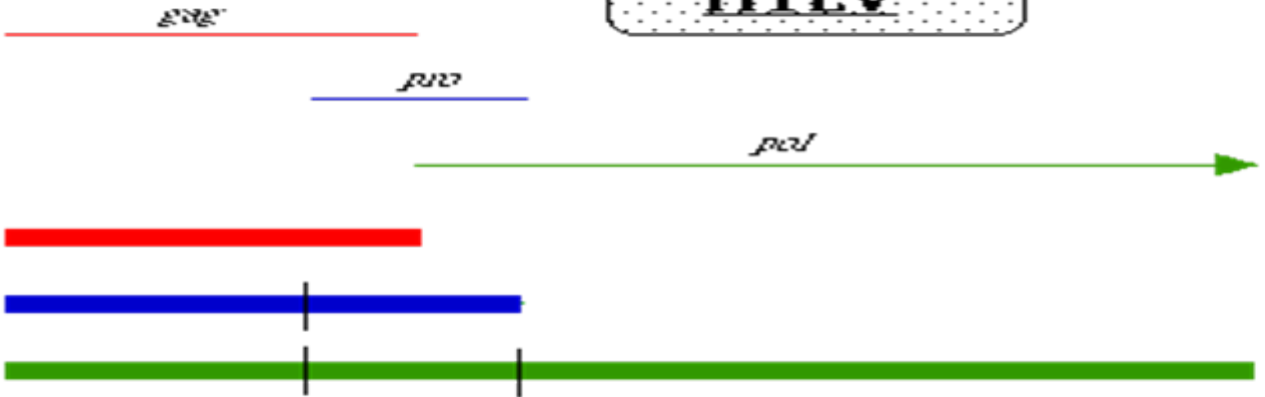
HIV



# HIV



# HTLV



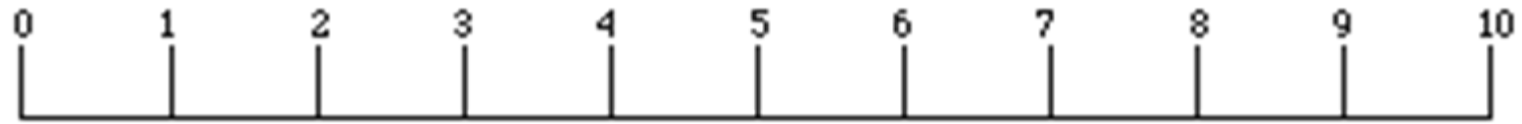
**Ribosomal  
Frameshifting**

# MLV



**Termination  
Suppression**

# ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ HIV

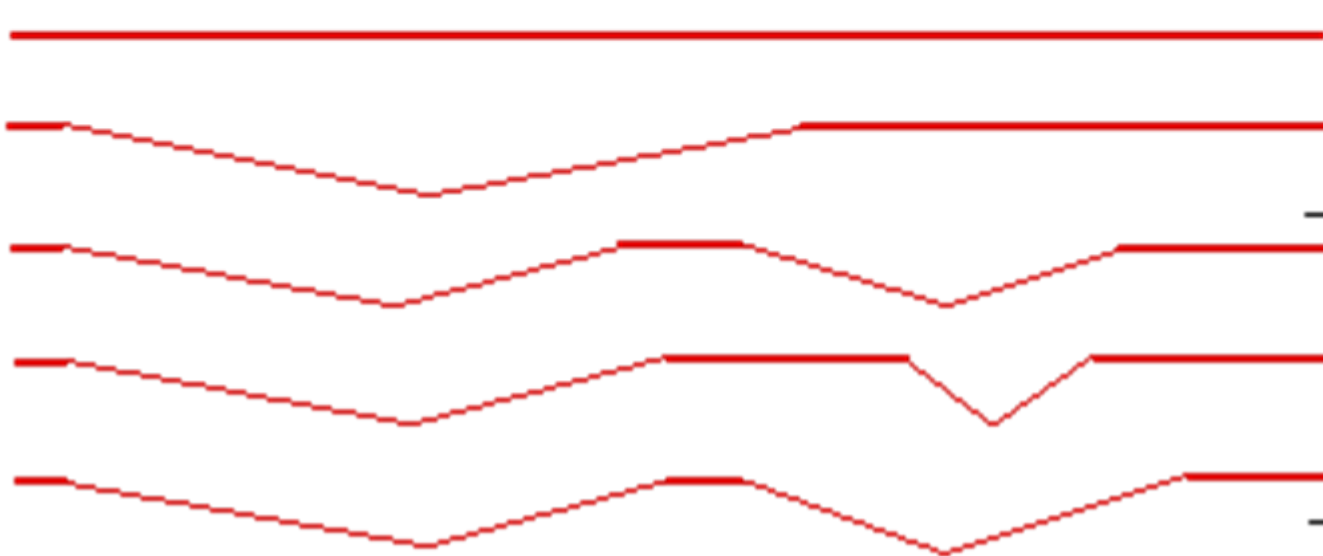


**HIV**



**Encodes:**

**mRNAs:**



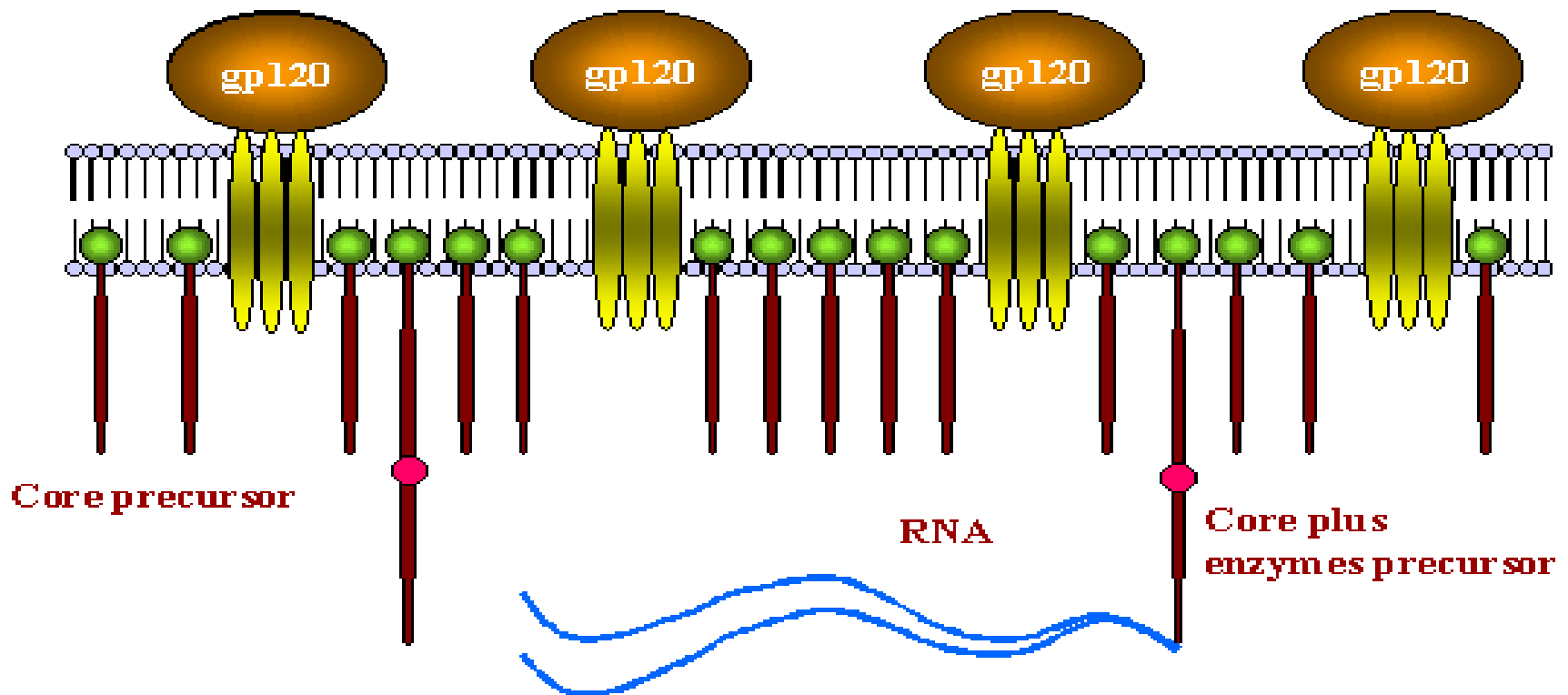
gag, pro, pol

env

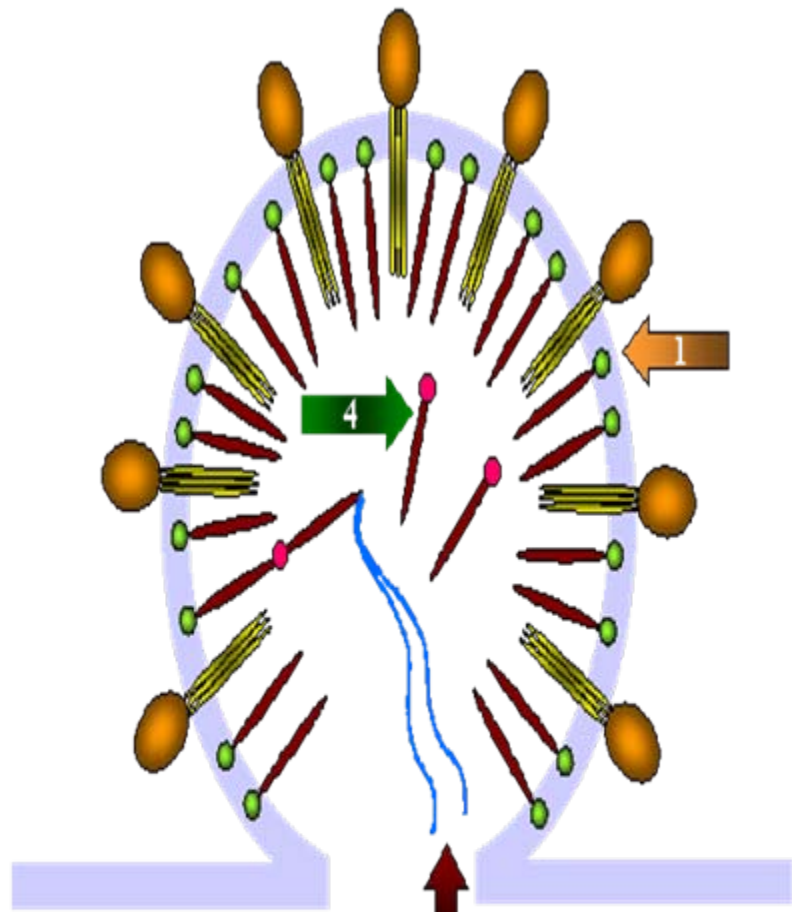
regulatory proteins



Η παραγωγή ενός ιοσωματίου ρετροϊού περιλαμβάνει τη συσκευασία του RNA σε ένα νουκλεοπρωτεϊνικό καψίδιο, την περιβολή του από πρωτεΐνες και τελικά την αποκοπή ενός τμήματος της μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή, ώστε να σχηματιστεί ο φάκελος.



**Assembly of the new virion takes place at the cell membrane. Three types of protein make up the virion. These are the membrane protein (gp120 and gp41 complex) plus two precursor proteins of different sizes**

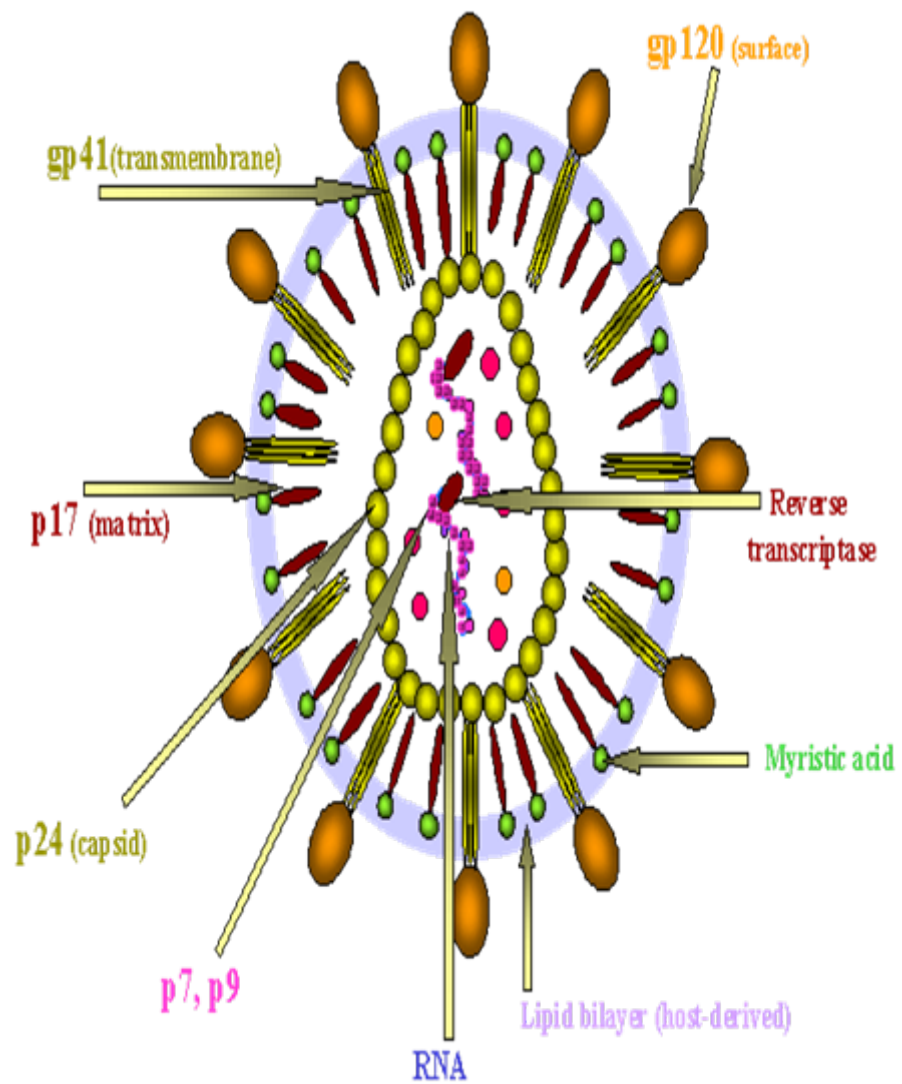


1. Proteins aggregate at cell membrane

2. Membrane pinches off

3. Precursor protein draws two strands of RNA into nascent virion

4. Protease cuts itself free



gp41 (transmembrane)

gp120 (surface)

p17 (matrix)

Reverse transcriptase

Myristic acid

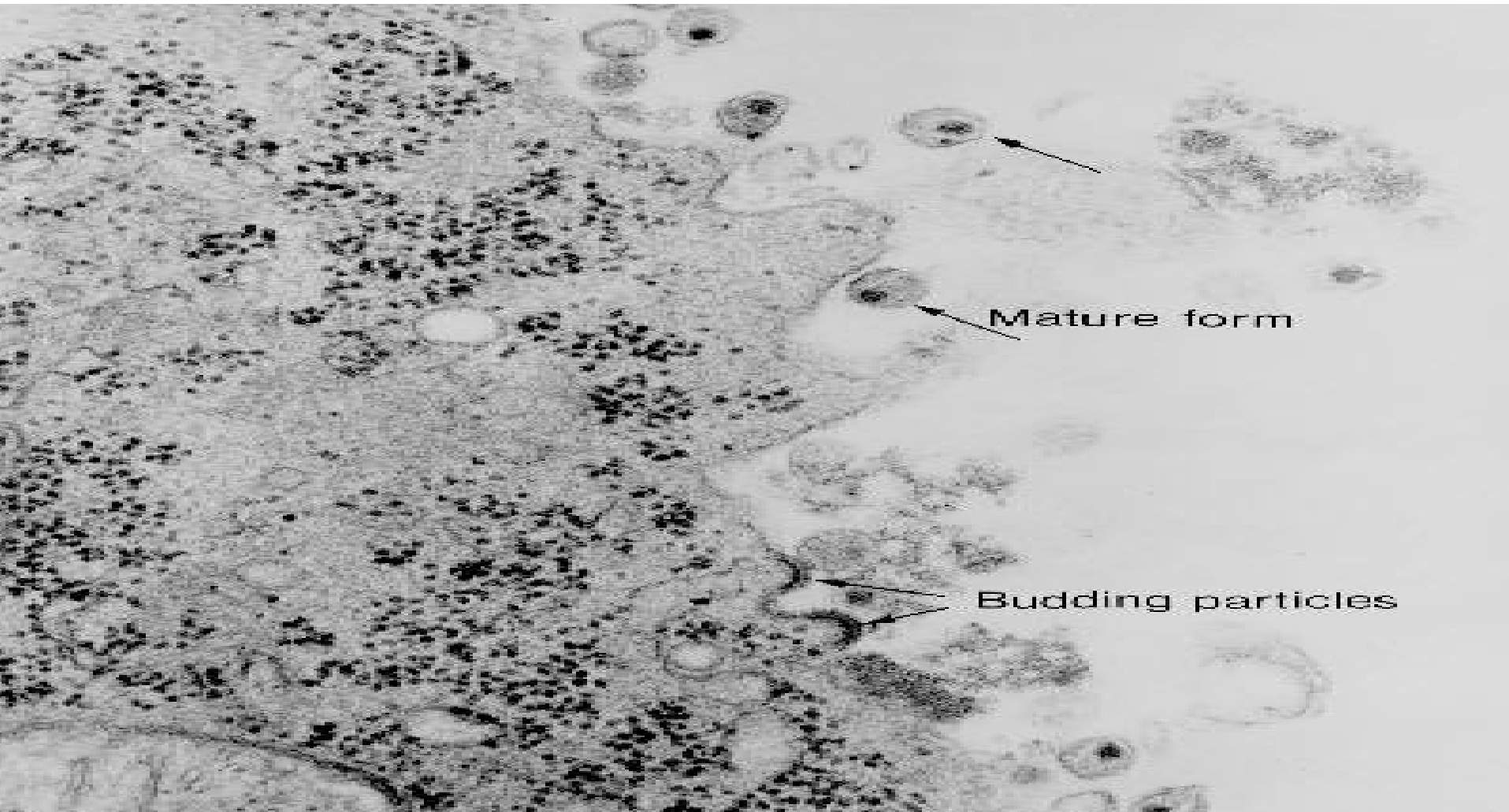
p24 (capsid)

p7, p9

Lipid bilayer (host-derived)

RNA

## ΗIV ΙΙΚΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΣΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



Ο ιός μολύνει ένα νέο κύτταρο-ξενιστή με σύντηξη του φακέλου του με την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ξενιστή και ακολουθεί η απελευθέρωση του περιεχομένου του ιοσωματίου στο κυτταρόπλασμα.

Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που ευθύνεται για τη σύνθεση, με μήτρα τη θετική αλυσίδα RNA (plus strand RNA), ενός συμπληρωματικού κλώνου DNA που ονομάζεται **αρνητική αλυσίδα DNA** (minus strand DNA). Η αντίστροφη μεταγραφάση καταλύει και τα μετέπειτα στάδια παραγωγής του δίκλωνου DNA, καθώς διαθέτει ακόμη ενεργότητα DNA πολυμεράσης, η οποία της επιτρέπει να συνθέσει ένα δίκλωνο DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα την αρνητική αλυσίδα DNA. Ο δεύτερος κλώνος DNA αυτού του δίκλωνου μορίου ονομάζεται θετική αλυσίδα DNA (plus strand DNA). Η αντίστροφη μεταγραφάση φέρει επιπλέον και ενεργότητα RNAάσης Η, η οποία αναγνωρίζει ως υπόστρωμα το υβρίδιο RNA-DNA και αποικοδομεί το RNA του.

Το ιικό RNA φέρει στα άκρα του ομόρροπες επαναλήψεις που ονομάζονται **τμήματα R** (R segments, ποικίλλει από 10 ως 80 νουκλεοτίδια). Η αλληλουχία στο 5' άκρο του ιού συμβολίζεται με **R-U5** και η αλληλουχία στο 3' άκρο με **U3-R**. Τα τμήματα R χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεση του DNA, ώστε να δημιουργηθούν οι πιο εκτεταμένες ομόρροπες επαναλήψεις που απαντώνται στο γραμμικό DNA του ιού. Στην ενσωματωμένη του μορφή, το δίκλωνο DNA του ιού βραχύνεται σε κάθε άκρο κατά 2 kb περίπου, γεγονός που αποτελεί συνέπεια του μηχανισμού ενσωμάτωσης

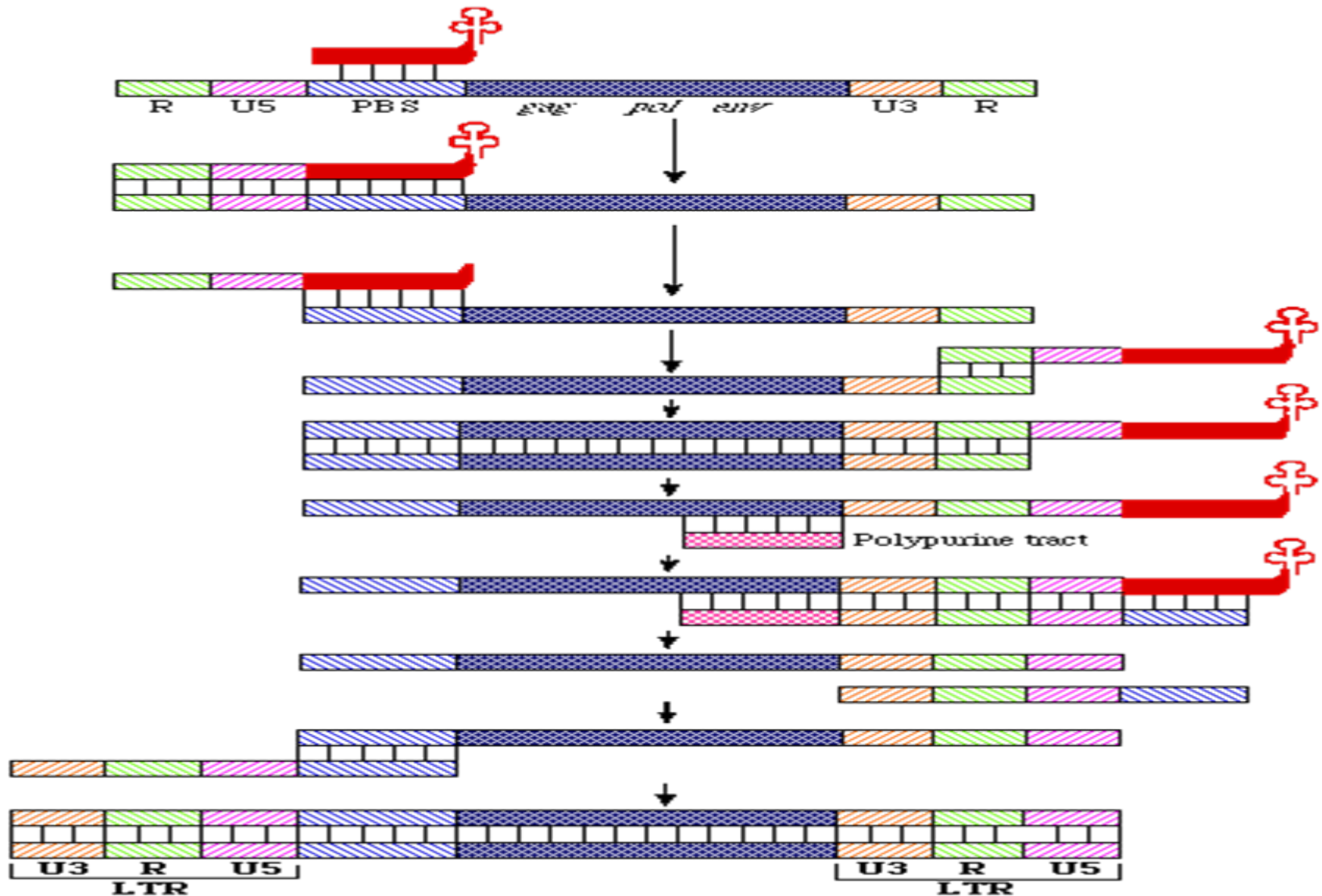
**Η αντίστροφη μεταγραφάση χρειάζεται έναν εκκινητή. Ο φυσικός εκκινητής της είναι ένα μόριο tRNA. Ένα αφόρτιστο tRNA του ξενιστή βρίσκεται μέσα στο ιοσωμάτιο.** Μια αλληλουχία 18 βάσεων στο 3' άκρο αυτού του tRNA ζευγαρώνει με μια θέση που απέχει 100-200 βάσεις από το 5' άκρο ενός από τα ιικά μόρια RNA. Το tRNA μπορεί να ζευγαρώσει και με μια άλλη θέση κοντά στο 5' άκρο του δεύτερου ιικού RNA, βοηθώντας έτσι το σχηματισμό διμερών ανάμεσα στα δύο ιικά μόρια RNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση αρχίζει να συνθέτει DNA από μια θέση που απέχει 100-200 βάσεις καθοδικά από το 5' άκρο.

## Πώς όμως είναι δυνατόν να συντεθεί το DNA που αντιπροσωπεύει το ακέραιο γονιδίωμα του ιού;

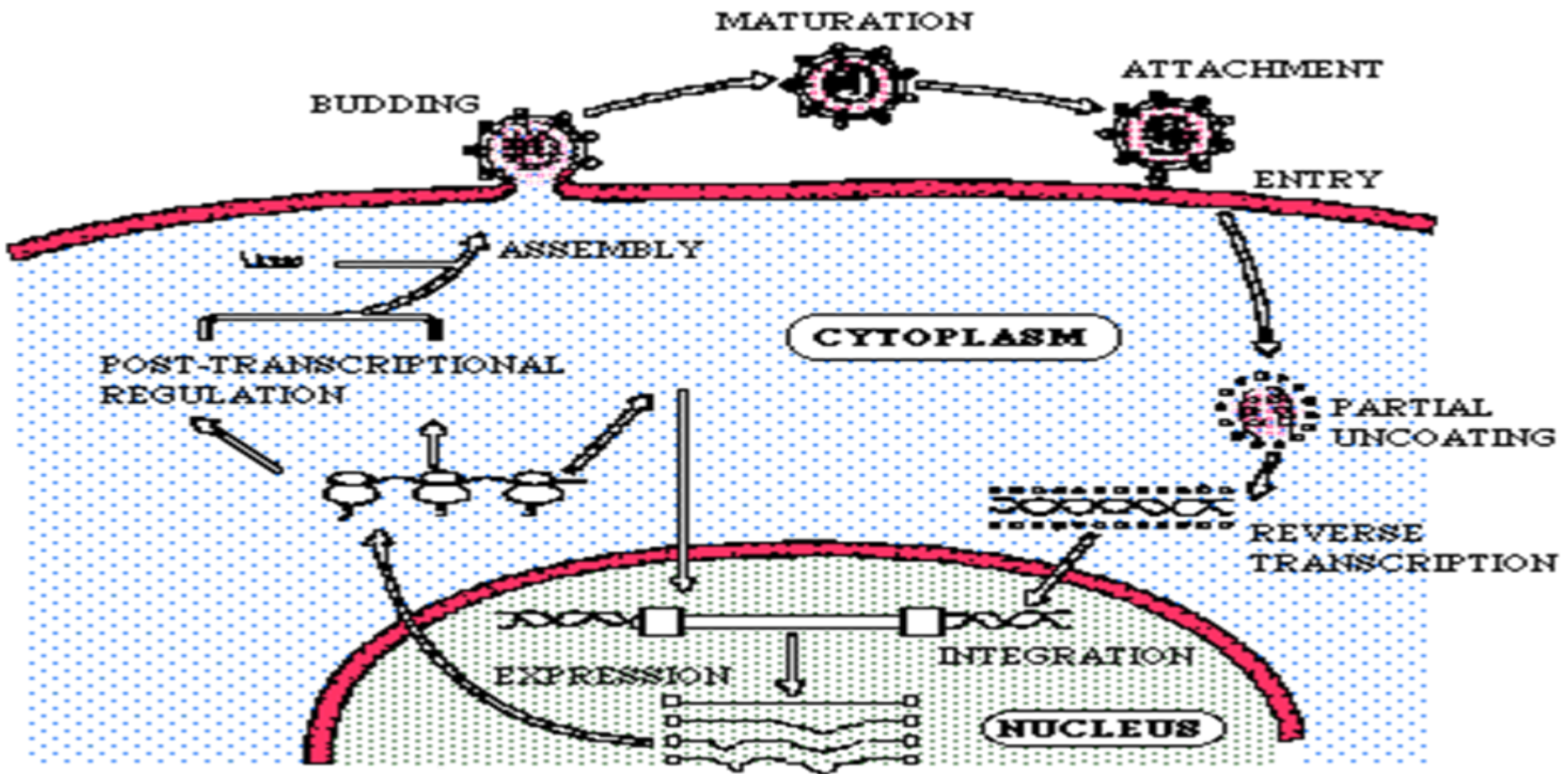
Η αντίστροφη μεταγραφάση μεταπηδά από τη μια μήτρα στην άλλη, μεταφέροντας το αρτιγενές μόριο DNA. Μετά τη σύνθεση του αρνητικού DNA, η περιοχή R στο 5' άκρο της μήτρας RNA αποικοδομείται χάρη στην ενεργότητα RNAάσης H της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η αφαίρεση αυτής της περιοχής επιτρέπει στο τμήμα R που βρίσκεται στο νεοσυντιθέμενο DNA να ζευγαρώσει με το τμήμα R στο 3' άκρο. Ακολούθως, η αντίστροφη μεταγραφή συνεχίζεται, μέσω της περιοχής U3, στο κύριο τμήμα του ιικού RNA.

Η περιοχή R που, μετά το πρώτο άλμα, ζευγαρώνει με το αρνητικό DNA μπορεί να είναι είτε αυτή που βρίσκεται στο 3' άκρο του ίδιου μορίου RNA (ενδομοριακό ζευγάρωμα) είτε αυτή που βρίσκεται στο 3' άκρο ενός άλλου μορίου RNA (διαμοριακό ζευγάρωμα). Το αποτέλεσμα της μεταπήδησης και της επακόλουθης επιμήκυνσης είναι να προστεθεί ένα τμήμα U3 στο 5' άκρο. Το τμήμα του RNA με τη δομή U3-R-U5 ονομάζεται **μακριά τερματική επανάληψη (LTR – Long Terminal Repeat)**. Με μια παρόμοια διαδικασία προστίθεται στη συνέχεια ένα τμήμα U5 στο 3' άκρο, καθιστώντας τη δομή των δύο άκρων ίδια (U5-R-U3). Το μήκος τη **LTR** ποικίλλει από 250-1.400 bp. Στο επόμενο στάδιο χρειάζεται να σχηματιστεί η θετική αλυσίδα του DNA και η LTR στο 3' άκρο. Η αντίστροφη μεταγραφάση κάνει εκκίνηση της σύνθεσης της θετικής αλυσίδας DNA από ένα τμήμα RNA που έχει παραμείνει μετά την αποικοδόμηση του αρχικού μορίου RNA. Όταν το ένζυμο φτάσει στο άκρο της μήτρας, ολοκληρώνεται η σύνθεση της θετικής αλυσίδας DNA. Στη συνέχεια, αυτή η αλυσίδα DNA μεταφέρεται στο άλλο άκρο της αρνητικής αλυσίδας. Η θετική αλυσίδα DNA χρησιμοποιεί την περιοχή R για να ζευγαρώσει με το 3' άκρο της αρνητικής αλυσίδας DNA.

Ακολούθως, αυτό το μερικά δίκλωνο DNA υφίσταται συμπλήρωση και των δύο κλώνων του, ώστε να σχηματιστούν δίκλωνες περιοχές LTR σε κάθε άκρο.







Κάθε ιοσωμάτιο του ρετροϊού φέρει δύο γονιδιώματα RNA. Έτσι, είναι δυνατόν να συμβεί ανασυνδυασμός κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού. Το διαμοριακό ζευγάριωμα επιτρέπει τον ανασυνδυασμό ανάμεσα στις αλληλουχίες των δύο μορίων RNA οι οποίες χρησιμοποιούνται διαδοχικά ως μήτρες για τη σύνθεση της αρνητικής αλυσίδας του DNA. Σε αυτό το στάδιο, ο ανασυνδυασμός των ρετροϊών οφείλεται κυρίως σε μεταφορά κλώνου, καθώς ο αρτιγενής κλώνος DNA μεταπηδά από τη μία μήτρα RNA στην άλλη κατά τη διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής.

**Ο ανασυνδυασμός προκύπτει από την εναλλαγή της μήτρας κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Πρόκειται για ένα είδος γενικότερου μηχανισμού του ανασυνδυασμού που ονομάζεται επιλογή αντιγράφου (copy choice).**

**Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί έναν κοινό μηχανισμό ανασυνδυασμού κατά τη μόλυνση από ιούς RNA, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που αντιγράφονται αποκλειστικά μέσω μορφών RNA, όπως ο ιός της πολιομυελίτιδας.**

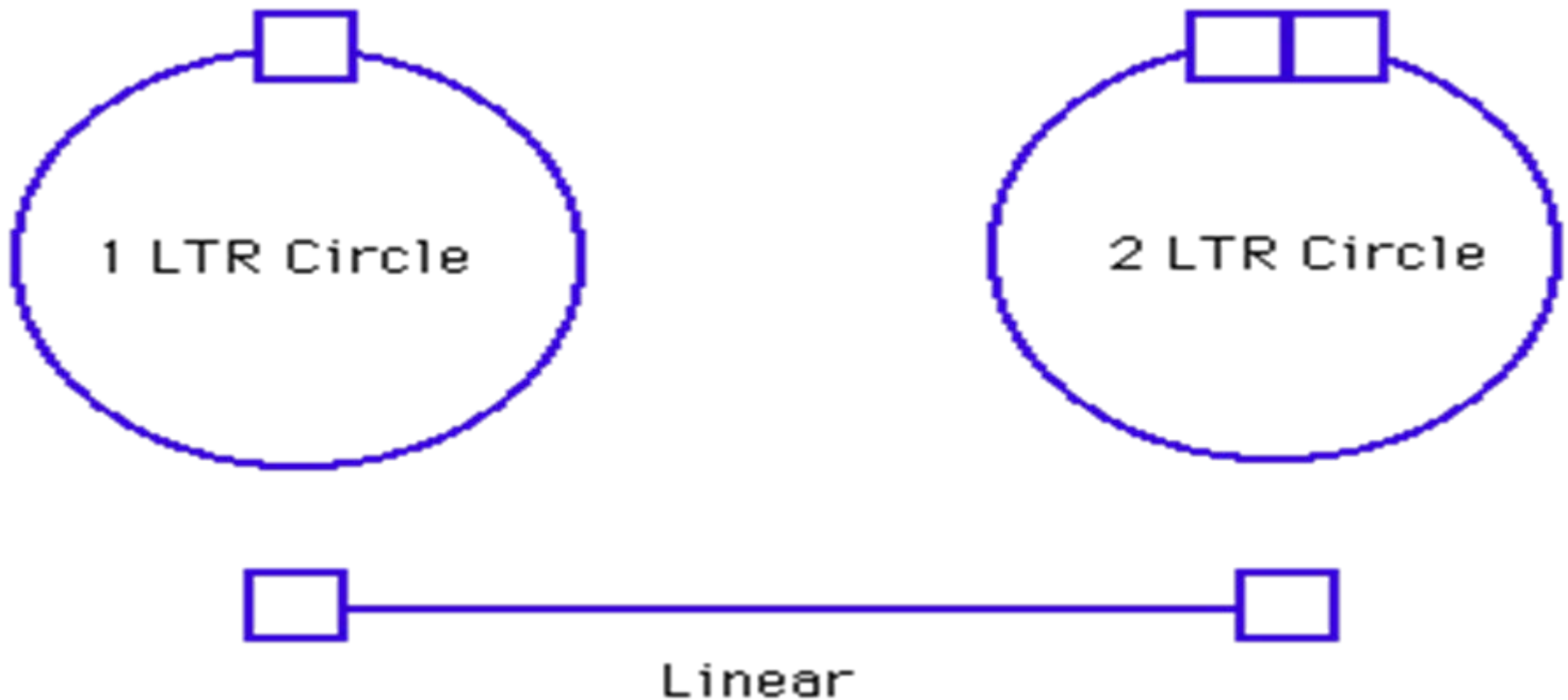
**Η αντίστροφη μεταγραφή συμβαίνει *in vivo* μέσα σε ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα, όπου η μήτρα RNA είναι προσδεδεμένη στα συστατικά του ιοσωματίου, στα οποία συμπεριλαμβάνεται και η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου.**

**Ανασυνδυασμός με επιλογή αντιγράφου συμβαίνει όταν η αντίστροφη μεταγραφάση απελευθερώνει την αρχική μήτρα και συνεχίζει τη σύνθεση DNA χρησιμοποιώντας μια νέα μήτρα.**

**Οι LTR στα άκρα του είναι πανομοιότυπες. Το 3' άκρο του U5 περιλαμβάνει μια βραχεία αλληλουχία που επαναλαμβάνεται, ανάστροφη, στο 5' άκρο του U3. Έτσι, κάθε LTR τερματίζει σε βραχείες ανάστροφες επαναλήψεις.**



Ετσι η αλληλουχία του προϊού τερματίζει σε ανάστροφες επαναλήψεις και περικλείεται από βραχείες ομόροπες επαναλήψεις του DNA-στόχου. Εκτός από το γραμμικό DNA, σε ένα μολυσμένο κύτταρο απαντώνται και κυκλικές μορφές των αλληλουχιών του ιού. Η μία από αυτές φέρει δύο συνεχόμενες αλληλουχίες LTR και σχηματίζεται από τη συνένωση των γραμμικών άκρων του μορίου. Η άλλη κυκλική μορφή, που πιθανώς σχηματίζεται μέσω ανασυνδυασμού και αποτελεί την πλειοψηφία των κυκλικών μορίων, φέρει μόνο μία LTR.



Η ενσωμάτωση του γραμμικού DNA καταλύεται από ένα μόνο προϊόν του ιού, την ιντεγράση. Η ιντεγράση δρα τόσο στο γραμμικό DNA του ρετροϊού όσο και στο DNA-στόχο. Κοντά στο άκρο κάθε ανάστροφης επανάληψης υπάρχει μια δινουκλεοτιδική αλληλουχία CA, η οποία αποτελεί το καλύτερα συντηρημένο χαρακτηριστικό των άκρων.

Η ιντεγράση φέρνει κοντά τα άκρα του γραμμικού DNA μέσα σε ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο και τα μετατρέπει από λεία (blunt ends) σε υπολειπόμενα (recessive ends), αφαιρώντας τις βάσεις που βρίσκονται πέρα από το συντηρημένο δινουκλεοτίδιο CA. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι συνήθως η απώλεια 2 βάσεων από κάθε άκρο. Οι θέσεις-στόχοι επιλέγονται τυχαία από πλευράς αλληλουχίας.

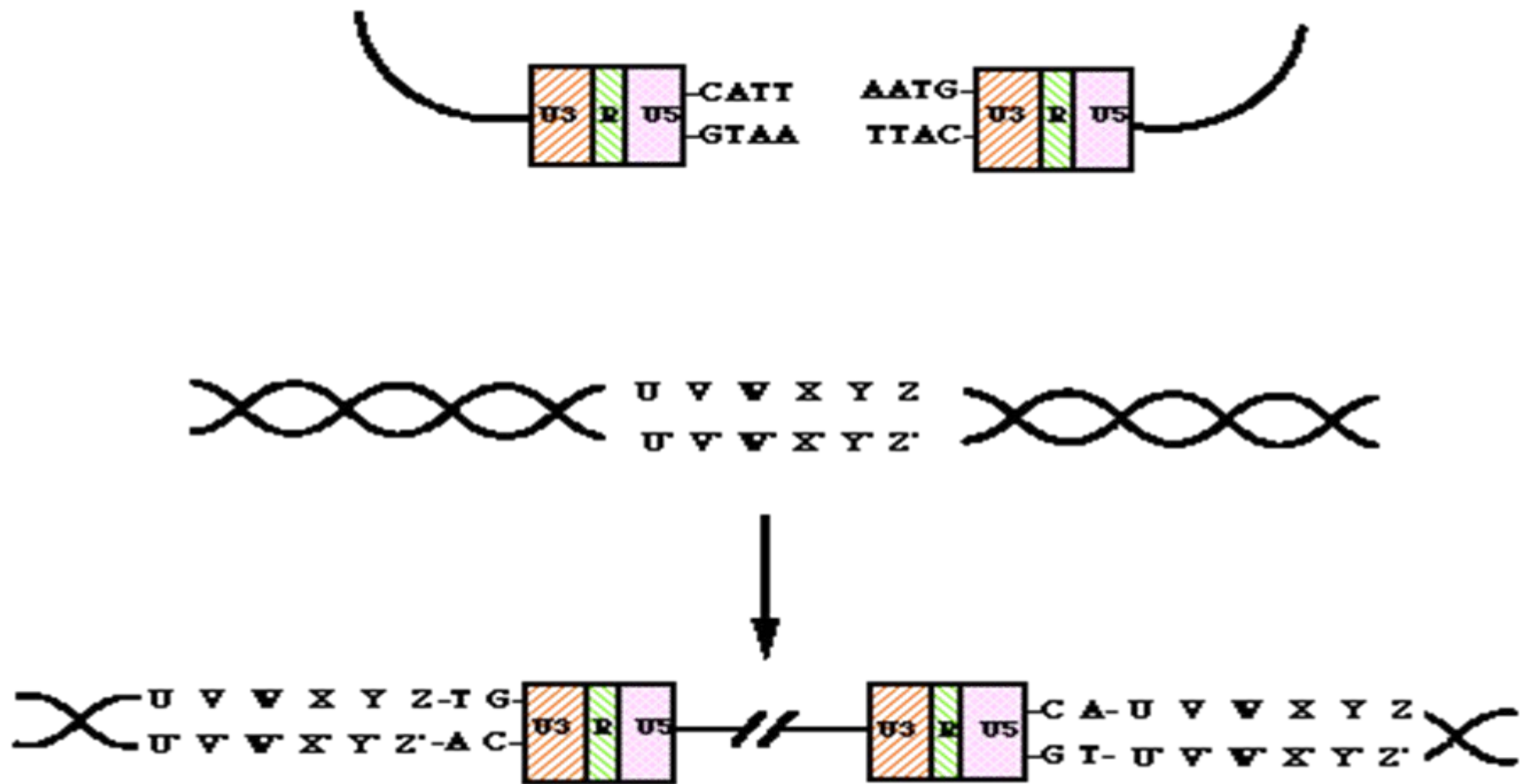
Η ιντεγράση δημιουργεί ασυμπτωτικές εγκοπές στη θέση-στόχο. Η απόσταση των ασυμπτωτικών εγκοπών και επομένως το μήκος της αλληλουχίας που επαναλαμβάνεται εκατέρωθεν της θέσης-ένθεσης του προϊού εξαρτώνται από το συγκεκριμένο ρετροϊό και μπορεί να είναι 4, 5 ή 6 bp.

Τα 5' άκρα που σχηματίζονται από τη θραύση του DNA-στόχου ενώνονται ομοιοπολικά με τα υπολειπόμενα 3' άκρα του ιικού DNA.

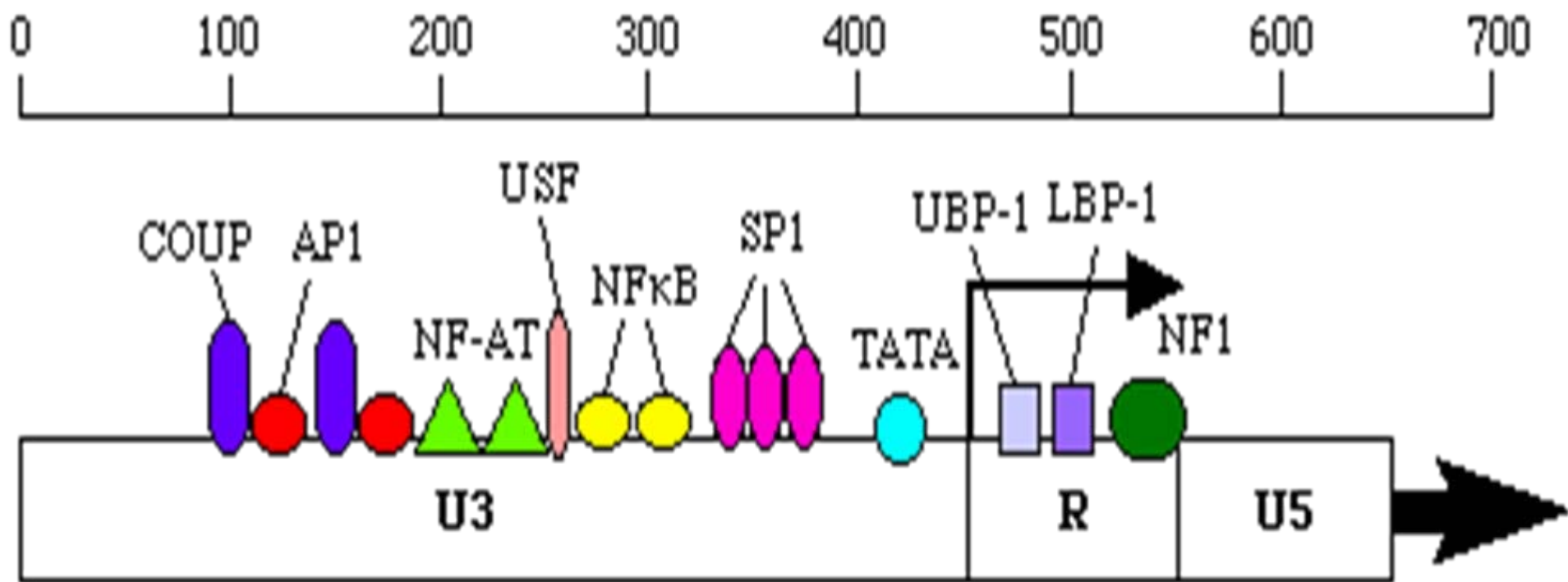
Τα δύο 3' άκρα του ιικού DNA συνδέονται με έναν από τους κλώνους του DNA-στόχου.

Στη συνέχεια, ένζυμα του κυττάρου-ξενιστή επιδιορθώνουν τις μονόκλωνες περιοχές. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αυτής αφαιρούνται οι 2 προεξέχουσες βάσεις από τα 5' άκρα του ιικού DNA, με αποτέλεσμα το ενσωματωμένο ιικό DNA να χάσει 2 bp από κάθε LTR. Αυτό σημαίνει απώλεια 2 bp από το αριστερό άκρο του 5' τερματικού U3 και 2 bp από το δεξί άκρο του 3' τερματικού U5.

Το ιικό DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή σε θέσεις που επιλέγονται τυχαία.



Κάθε LTR φέρει έναν υποκινητή που εντοπίζεται στην περιοχή U3. Ο υποκινητής στην αριστερή LTR ευθύνεται για την έναρξη της μεταγραφής του προϊόντος. Η LTR φέρει επίσης έναν ενισχυτή (enhancer) στην περιοχή U3, δηλαδή μία αλληλουχία που ενεργοποιεί υποκινητές σε γειτονικές με αυτή περιοχές και μπορεί να δρα τόσο σε κυτταρικές όσο και σε ιικές αλληλουχίες.



U3 περιοχή του HIV στην οποία απεικονίζονται τα σημεία σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων όπως : TATA , SP1 , NF-AT , AP1 , NFκB κ.α.

NFκB είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής των T λεμφοκυττάρων.

Η παρουσία τόσο πολλών σημείων σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή LTR του HIV εξηγεί γιατί ο ιός ενεργοποιείται σε τόσα πολλά και διαφορετικά κύτταρα.

**Η ένθεση ενός ρετροϊού μπορεί να ενεργοποιήσει κάποιους τύπους γονιδίων, με αποτέλεσμα τη μετατροπή του κυττάρου-ξενιστή σε καρκινικό.**

**Μπορούν οι ενσωματωμένοι προϊοί να απομακρυνθούν με εκτομή από το γονιδίωμα;**

Θα μπορούσε να συμβεί μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού ανάμεσα στις LTR ενός προϊού. Ο χαρακτηρισμός, σε μερικά γονιδιώματα κυττάρων, μεμονωμένων LTR, οι οποίες πιθανόν να είναι υπολείμματα ενός γεγονότος εκτομής, αποτελεί μια ένδειξη που υποστηρίζει την ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού. Όταν το ιικό DNA ενσωματώνεται σε ένα κύτταρο της γαμετικής σειράς, κληρονομείται πλέον ως ένας «ενδογενής προϊός» του οργανισμού.

## Μεταγωγοί Ιοί

Οι μεταγωγοί ιοί (transducing viruses) είναι παραλλαγές ιών που έχουν αντικαταστήσει ένα τμήμα του γονιδιώματός τους με κυτταρικές αλληλουχίες. Ένα τμήμα της ιικής αλληλουχίας έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο *v-onc*, με αποτέλεσμα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση να παράγεται, αντί για τις συνήθεις πρωτεΐνες Gag, Pol και Env, μια πρωτεΐνη π.χ. Gag-*v-onc*.

Ο ιός αυτός δεν είναι ικανός να ολοκληρώσει ένα μολυσματικό κύκλο μόνος του και γι' αυτό ονομάζεται **ιός ελαττωματικός ως προς την αντιγραφή** (replication-defective virus). Ωστόσο, μπορεί να αναπαραχθεί υποβοηθούμενος από ένα **βοηθητικό ιό** (helper virus), ο οποίος του παρέχει τις κρίσιμες λειτουργίες που του λείπουν. Η σύντμηση *onc* προέρχεται από τη λέξη **ογκογένεση** (oncogenesis), η οποία αναφέρεται στην ικανότητα που έχουν τα γονίδια αυτά να **μετασχηματίζουν** κύτταρα σε καλλιέργεια, να προκαλούν δηλαδή τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. Οι γενετικοί τόποι του γονιδιώματος του ξενιστή οι οποίοι περιλαμβάνουν αλληλουχίες ομόλογες με αυτές **των *v-onc*** αποκαλούνται ***c-onc***.

# Some retroviruses have an oncogene instead of their regular genes

## Avian Myeloblastosis Virus



## Feline Sarcoma Virus (FSV)



## Avian Myelocytoma Virus (MC29)



## Μοντέλο δημιουργίας μετασχηματισμού σε κύτταρα του ξενιστή.

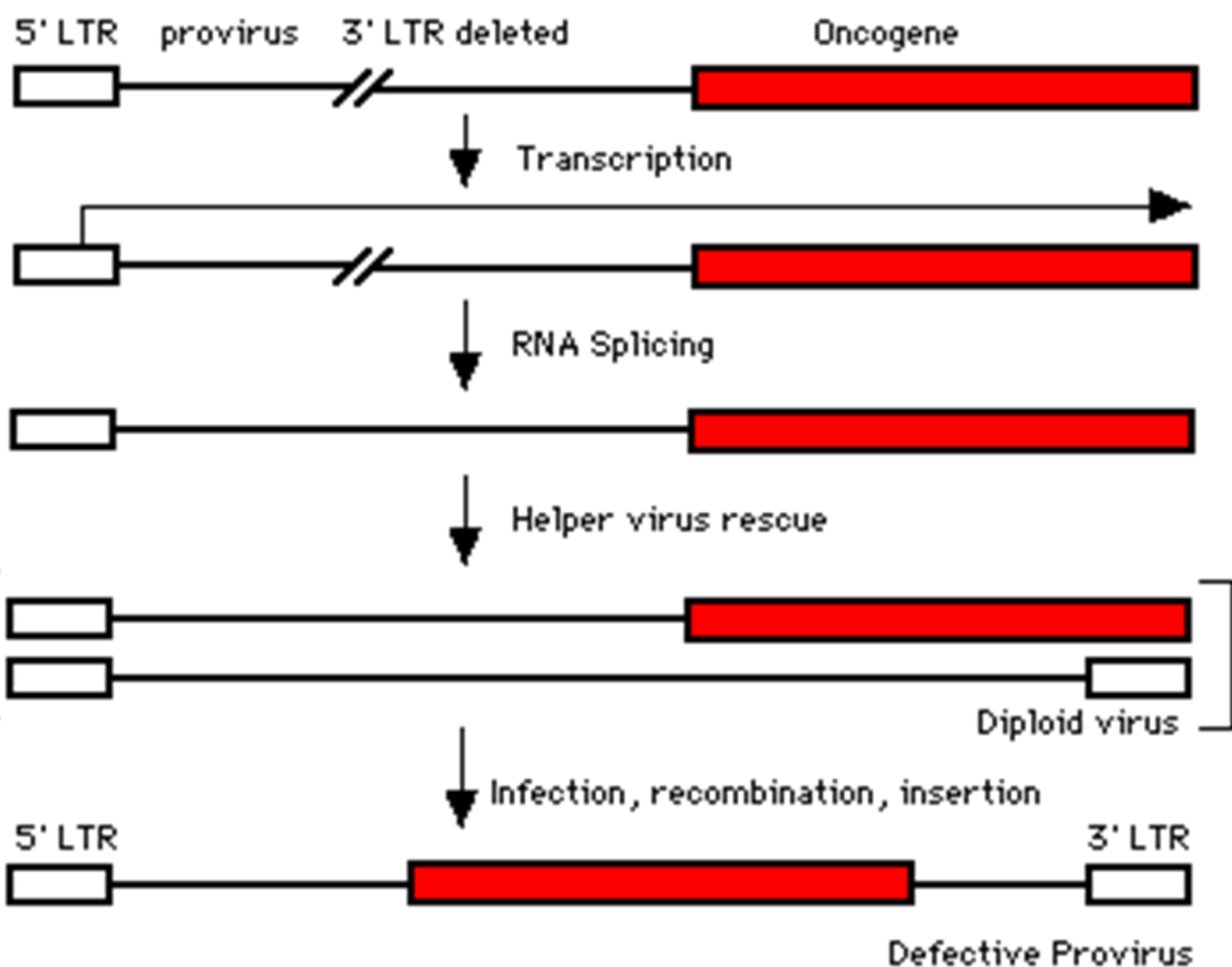
Ενας ρετροϊός ενσωματώνεται κοντά σε ένα γονίδιο *c-onc* και δημιουργείται ένα έλλειμμα που περιλαμβάνει την ενδιάμεση αλληλουχία, οπότε ο προϊός συγχωνεύεται με το γονίδιο *c-onc*.

Στην περίπτωση αυτή, από τη μεταγραφή του ιού παράγεται ένα ενιαίο μόριο RNA, το οποίο περιέχει στο ένα του άκρο ιικές αλληλουχίες και στο άλλο του άκρο κυτταρικές αλληλουχίες *onc*.

Όλα τα ιντρόνια αφαιρούνται με μάτιασμα από τα ιικά και τα κυτταρικά τμήματα του ενιαίου μορίου RNA. Το RNA που προκύπτει διαθέτει τα κατάλληλα σήματα που του επιτρέπουν να συσκευαστεί σε ιοσωμάτιο.

Ιοσωμάτια θα σχηματιστούν τελικά μόνο αν το κύτταρο φέρει παράλληλα και ένα δεύτερο, ακέραιο αντίγραφο του προιού, το οποίο είναι απαραίτητο για να συντεθούν όλα τα προϊόντα του ιού στο κύτταρο-ξενιστή. Κάποιο από τα διπλοειδή ιοσωμάτια μπορεί να περιέχει ένα συγχωνευμένο RNA μαζί με ένα φυσιολογικό ιικό RNA. Προκύπτει ένα υβριδικό μετάγραφο με αλληλουχίες προερχόμενες από τον ιό και το κύτταρο, το οποίο συσκευάζεται μαζί με ένα φυσιολογικό γονιδίωμα του ιού. Για να σχηματιστεί το γονιδίωμα ενός ελαττωματικού ως προς την αντιγραφή ιού, είναι αναγκαίο να γίνει μη ομόλογος ανασυνδυασμός. Ένα γεγονός ανασυνδυασμού ανάμεσα στις δύο αυτές αλληλουχίες θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχηματισμό του γονιδιώματος ενός μετασχηματιστικού ιού, που φέρει και στα δύο άκρα του τις χαρακτηριστικές ιικές επαναλήψεις.





## **Διαφορές DNA και RNA Ογκογόνων Ιών**

Στους ρετροϊούς, η ενσωμάτωση του ιού ως προϊόν στο κυτταρικό γονιδίωμα είναι απαραίτητη για την επιβίωση. Αντίθετα στους DNA ογκογόνους ιούς η ενσωμάτωση είναι ένας εναλλακτικός τρόπος επιβίωσης και συμβαίνει μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των ιών και μόνο στα μη επιτρεπτικά κύτταρα.

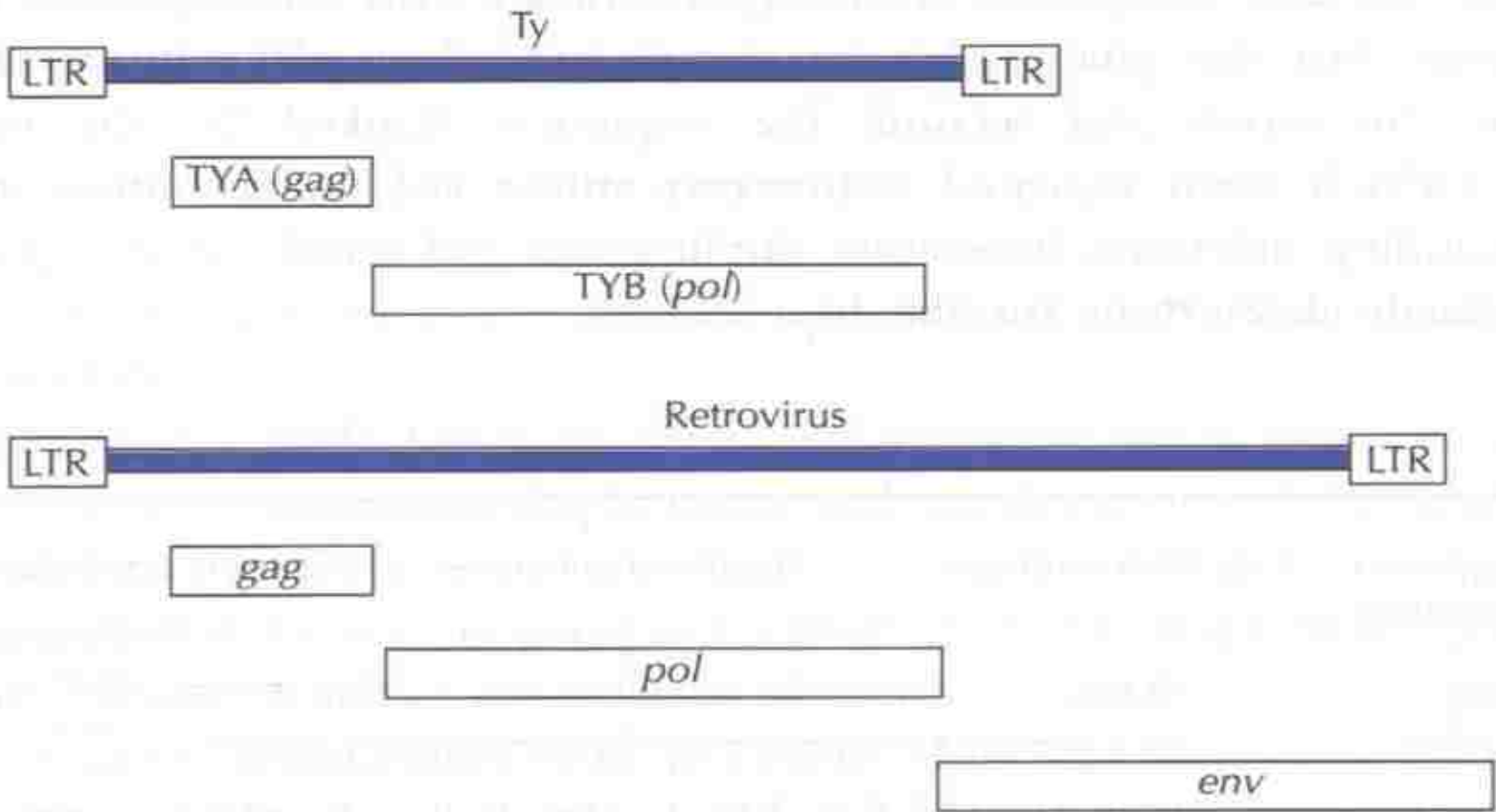
Οι ρετροϊοί δεν σκοτώνουν συνήθως το ξενιστικό κύτταρο μια που δεν παρουσιάζουν λυτικό κύκλο, αλλά ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή με τη μορφή του προϊόντος.

Πολλοί όμως ρετροϊοί μπορούν να προκαλέσουν όγκους σε ζώα και ανθρώπους που μολύνουν, επειδή περιέχουν επιπλέον των δομικών γονιδίων και ένα αλλοιωμένο κυτταρικό γονίδιο που έχουν «αρπάξει» κάποια στιγμή από ευκαρυωτικά κύτταρα.

## Τα στοιχεία *Ty* της ζύμης

Τα στοιχεία *Ty* αποτελούν μια οικογένεια επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA, οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικές θέσεις του γονιδιώματος διαφόρων στελεχών του ζυμομύκητα. Η ονομασία «*Ty*» είναι συντομογραφία του όρου «transposon yeast». Τα περισσότερα στοιχεία *Ty* ανήκουν σε μία από τις δύο κύριες κατηγορίες, τις *Ty1* και *Ty917*, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη γενική οργάνωση ότι κάθε στοιχείο *Ty* έχει μήκος 6,3 kb και τα δύο ακραία τμήματά του, μήκους 330 bp, συνιστούν ομόρροπες επαναλήψεις που ονομάζονται  $\delta$ . Σε ένα τυπικό γονιδίωμα ζυμομύκητα υπάρχουν ~30 αντίγραφα του τύπου *Ty1* και ~6 του τύπου *Ty917*. Υπάρχουν ~100 ανεξάρτητα στοιχεία  $\delta$ . Οι αλληλουχίες  $\delta$  παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια. Συνήθως, όμως, οι δύο επαναλήψεις  $\delta$  ενός συγκεκριμένου στοιχείου *Ty* είναι πανομοιότυπες ή εμφανίζουν πολύ υψηλή ομολογία μεταξύ τους.

Από τη μεταγραφή ενός στοιχείου *Ty* δημιουργούνται δύο είδη πολυαδενυλιωμένου RNA, τα οποία αποτελούν περισσότερο από 5% του συνολικού mRNA ενός απλοειδούς κυττάρου ζυμομύκητα. Και τα δύο RNA αρχίζουν από έναν υποκινητή που βρίσκεται στο στοιχείο  $\delta$  του αριστερού άκρου. Το ένα μετάγραφο τερματίζει μετά από 5 kb, ενώ το άλλο τερματίζει μετά από 5,7 kb, εντός της αλληλουχίας  $\delta$  στο δεξί άκρο. Η αλληλουχία του στοιχείου *Ty* περιέχει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τα οποία εκφράζονται προς την ίδια κατεύθυνση, αλλά διαβάζονται με διαφορετικές φάσεις και επικαλύπτονται κατά 13 αμινοξέα. Η αλληλουχία του πλαισίου ανάγνωσης *TyA* φαίνεται ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA (DNA-binding protein). Η αλληλουχία του πλαισίου ανάγνωσης *TyB* περιλαμβάνει περιοχές που έχουν ομολογία με τις αλληλουχίες των ρετροϊών, οι οποίες κωδικοποιούν την αντίστροφη μεταγραφάση, την πρωτεάση και την ιντεγράση.



Η οργάνωση και οι λειτουργίες των *TyA* και *TyB* είναι ανάλογες με τις λειτουργίες των *gag* και *pol* των ρετροϊών. Η πρωτεΐνη *TyA* αντιστοιχεί στο αναγνωστικό πλαίσιο *TyA* και η *TyB* στο αναγνωστικό πλαίσιο *TyB*, ωστόσο, εκφράζεται μόνο ως μέρος μιας συνδεδεμένης πρωτεΐνης, στην οποία η πρωτεΐνη *TyA* έχει συγχωνευθεί με την πρωτεΐνη *TyB*. Αυτό γίνεται χάρη σε μια συγκεκριμένη μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου η οποία επιτρέπει στο κωδικόνιο τερματισμού του πλαισίου ανάγνωσης *TyA* να παρακαμφθεί (όπως και τις πρωτεΐνες *gag-pol* στους ρετροϊούς).

Τα στοιχεία *Ty* μπορούν να αφαιρεθούν με εκτομή, μέσω ομολόγου ανασυνδυασμού που πραγματοποιείται ανάμεσα στις ομόρροπες επαναλήψεις των αλληλουχιών  $\delta$ . Ο μεγάλος αριθμός των μοναχικών στοιχείων  $\delta$  πιθανός να υποδεικνύει ίχνη τέτοιων γεγονότων. Παρόλο που και τα δύο στοιχεία  $\delta$  ενός *Ty* έχουν την ίδια αλληλουχία, το στοιχείο  $\delta$  που βρίσκεται στο ένα άκρο φέρει έναν ενεργό υποκινητή, ενώ στο στοιχείο  $\delta$  που βρίσκεται στο άλλο άκρο διαθέτει μια ενεργή αλληλουχία τερματισμού.

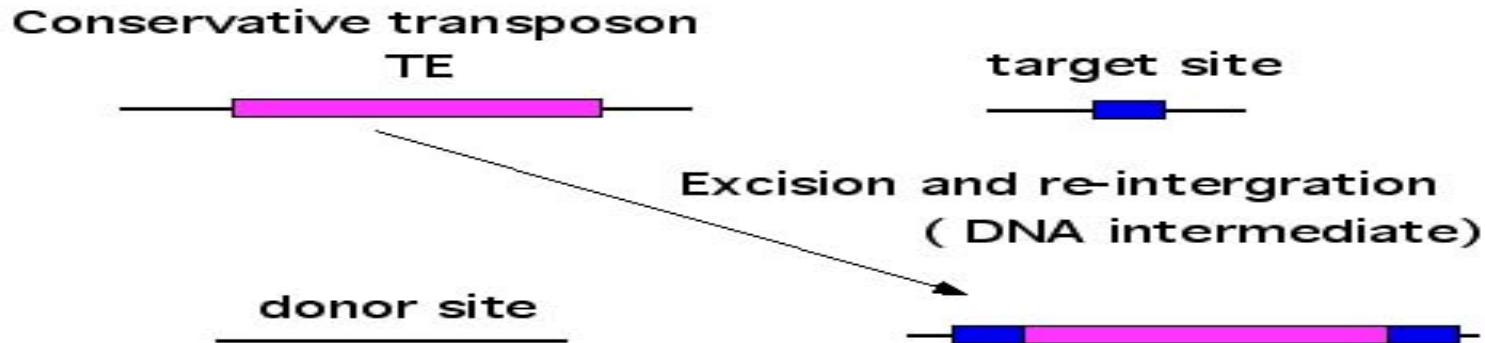
Τα στοιχεία *Ty* είναι τυπικά ρετροποζόνια που μετατίθενται μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου RNA. Η μετάθεση ελέγχεται από γονίδια του στοιχείου *Ty*. Η επαγωγή του υποκινητή έχει δύο συνέπειες: ενεργοποιεί τη μετάθεση του στοιχείου *Ty*, και αυξάνει τη συχνότητα της μετάθεσης των άλλων στοιχείων *Ty* στο χρωμόσωμα του ζυμομύκητα. Αν και τα στοιχεία *Ty* δεν παράγουν μολυσματικά σωμάτια, σωμάτια που μοιάζουν με ιούς (virus-like particles – VLPs) συγκεντρώνονται μέσα στα κύτταρα στα οποία έχει επαχθεί η μεταγωγή. Τα σωμάτια περιέχουν το ολικό μήκος RNA, το δίκλωνο DNA, την ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης και το προϊόν TyB, το οποίο διαθέτει ενεργότητα ιντεγράσης. Το προϊόν TyA διασπάται (όπως το πρόδρομο προϊόν του γονιδίου *gag*), για να σχηματίσει τις ώριμες πρωτεΐνες καψιδίου του VLP. Η παραπάνω παρατήρηση κάνει την αναλογία ανάμεσα στα τρανσποζόνια *Ty* και στους ρετροϊούς ακόμα πιο εμφανή.

**Κατά συνέπεια , το στοιχείο *Ty* συμπεριφέρεται όπως ένας ρετροϊός που έχει χάσει το γονίδιο *env* και συνεπώς δεν μπορεί να συσκευάσει σωστά το γονιδίωμά του σε ιοσωμάτιο. Μόνο κάποια από τα στοιχεία *Ty* στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα είναι ενεργά: τα περισσότερα έχουν χάσει την ικανότητα να μετατίθενται. Ωστόσο, εφόσον αυτά τα «νεκρά» στοιχεία διατηρούν επαναλήψεις  $\delta$ , εξακολουθούν να είναι στόχοι για μετάθεση και ανταποκρίνονται στη δράση των πρωτεϊνών που συντίθενται από ένα ενεργό στοιχείο.**

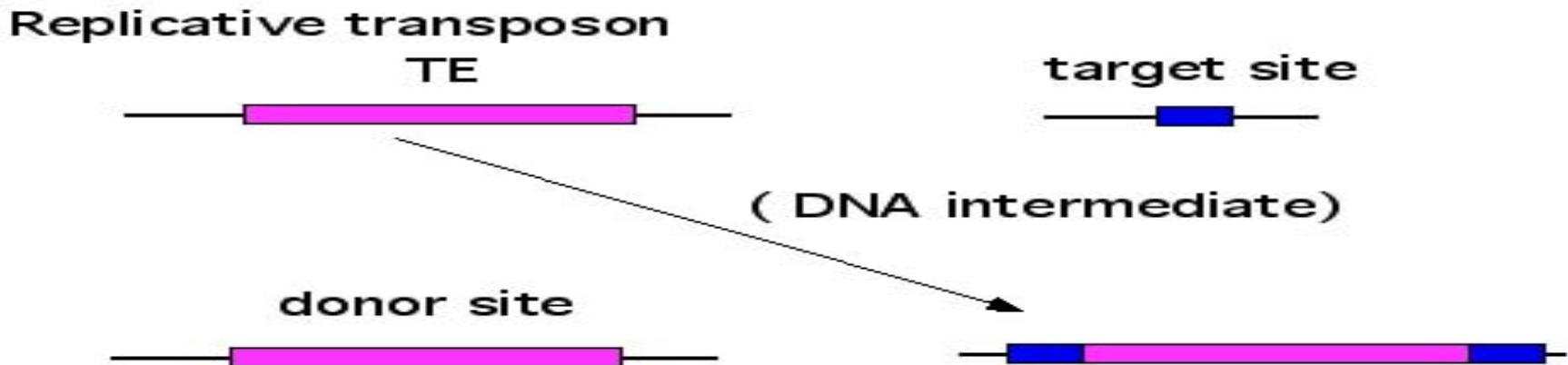
# Μεταθετά στοιχεία Transposons ή Transposable elements (TE)

Τρεις μηχανισμοί μετάθεσης :

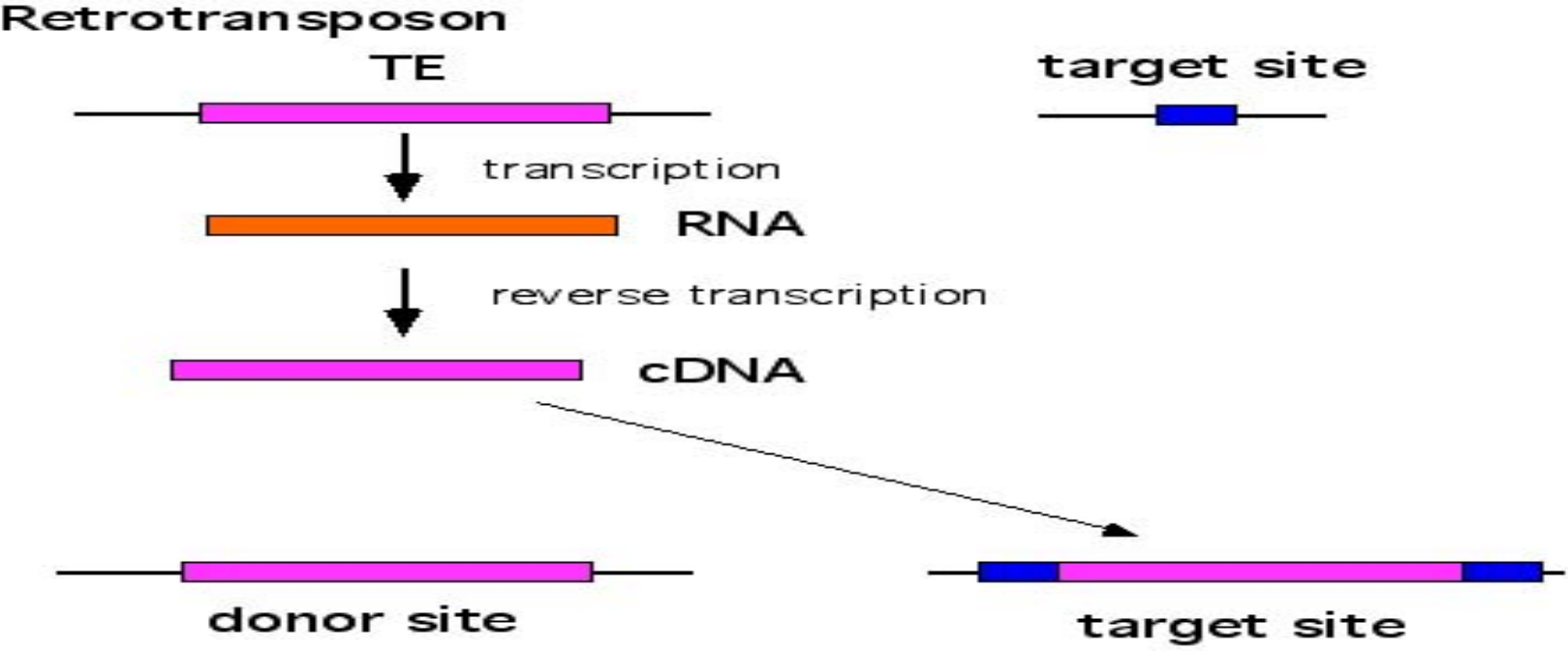
**Conservative transposition:** το στοιχείο μετατίθεται από μόνο του από μια αλληλουχία δότη σε μια αλληλουχία στόχο.



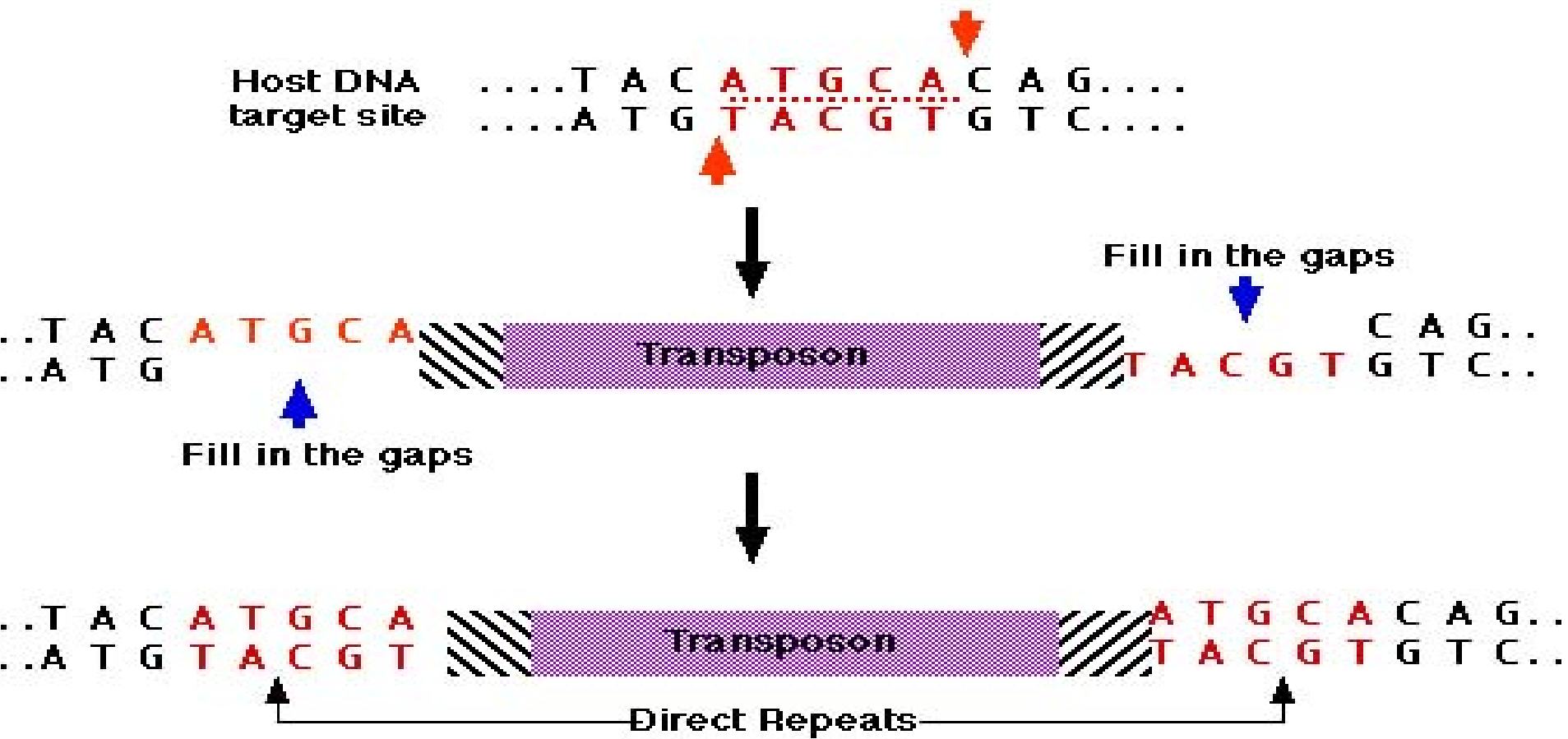
**Replicative transposition:** το στοιχείο κινεί από μόνο του ένα αντίγραφο του μέσω ενός ενδιάμεσου DNA σε μια νέα θέση.



**Retrotransposition:** το στοιχείο δημιουργεί ένα RNA αντίγραφο του εαυτού του το οποίο μεταγράφεται ( reversed-transcribed ) σε ένα αντίγραφο DNA και το οποίο ενσωματώνεται στο DNA στόχο.



Όπως δείχνουν και οι τρεις ανωτέρω μηχανισμοί το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ο διπλασιασμός μιας μικρής αλληλουχίας στην θέση στόχο, γεγονός που δημιουργεί μικρές επαναλήψεις οι οποίες περιβάλλουν το ένθετο ( μεταθετό ) στοιχείο



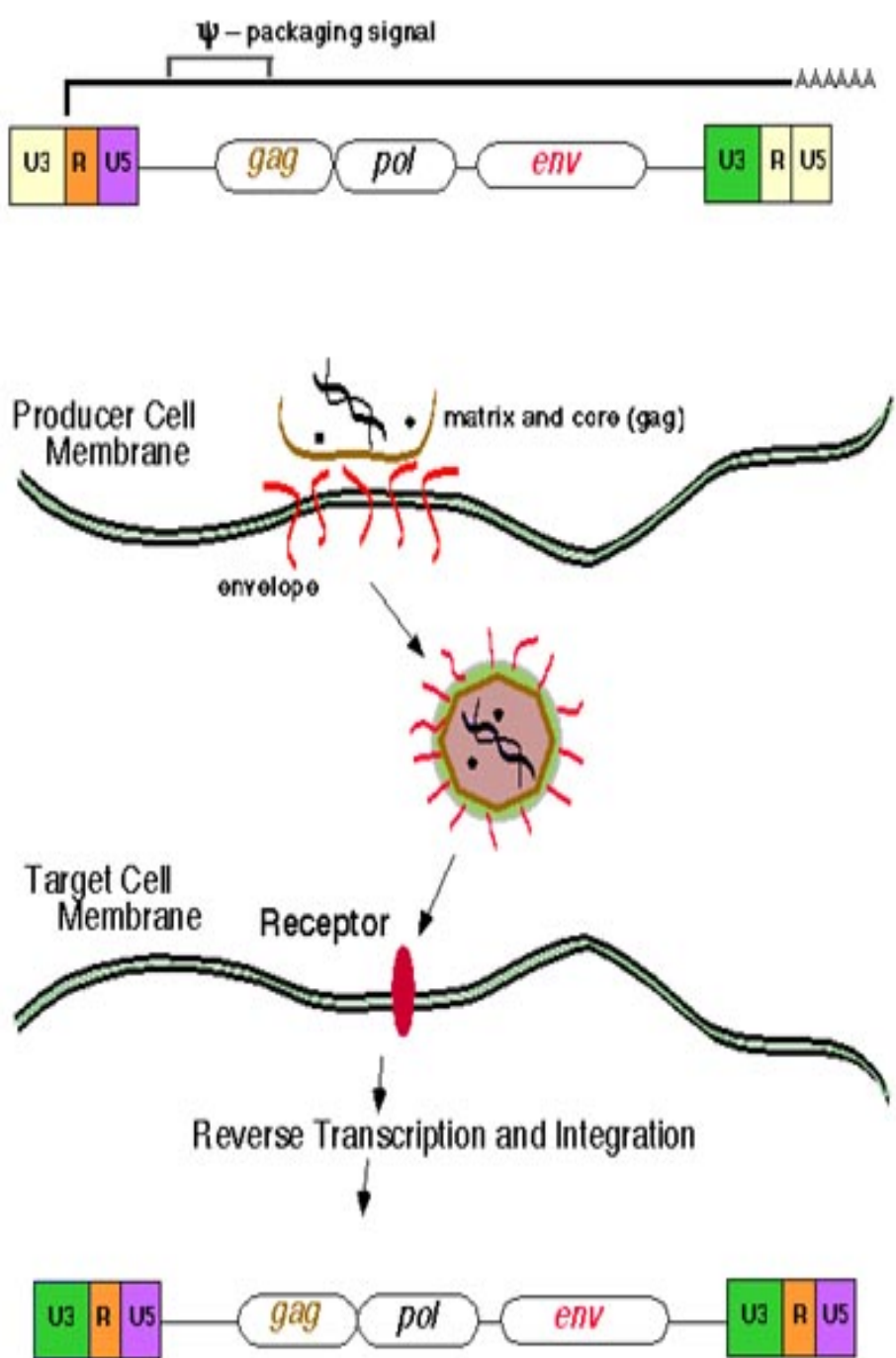
**Τα μεταθετά στοιχεία έχουν σχετικά περιορισμένο χρόνο ζωής γιατί:**

DNA transposase παράγεται στο κυτταρόπλασμα και εισερχόμενη στον πυρήνα δεν μπορεί να διακρίνει ενεργά από μη ενεργά στοιχεία.

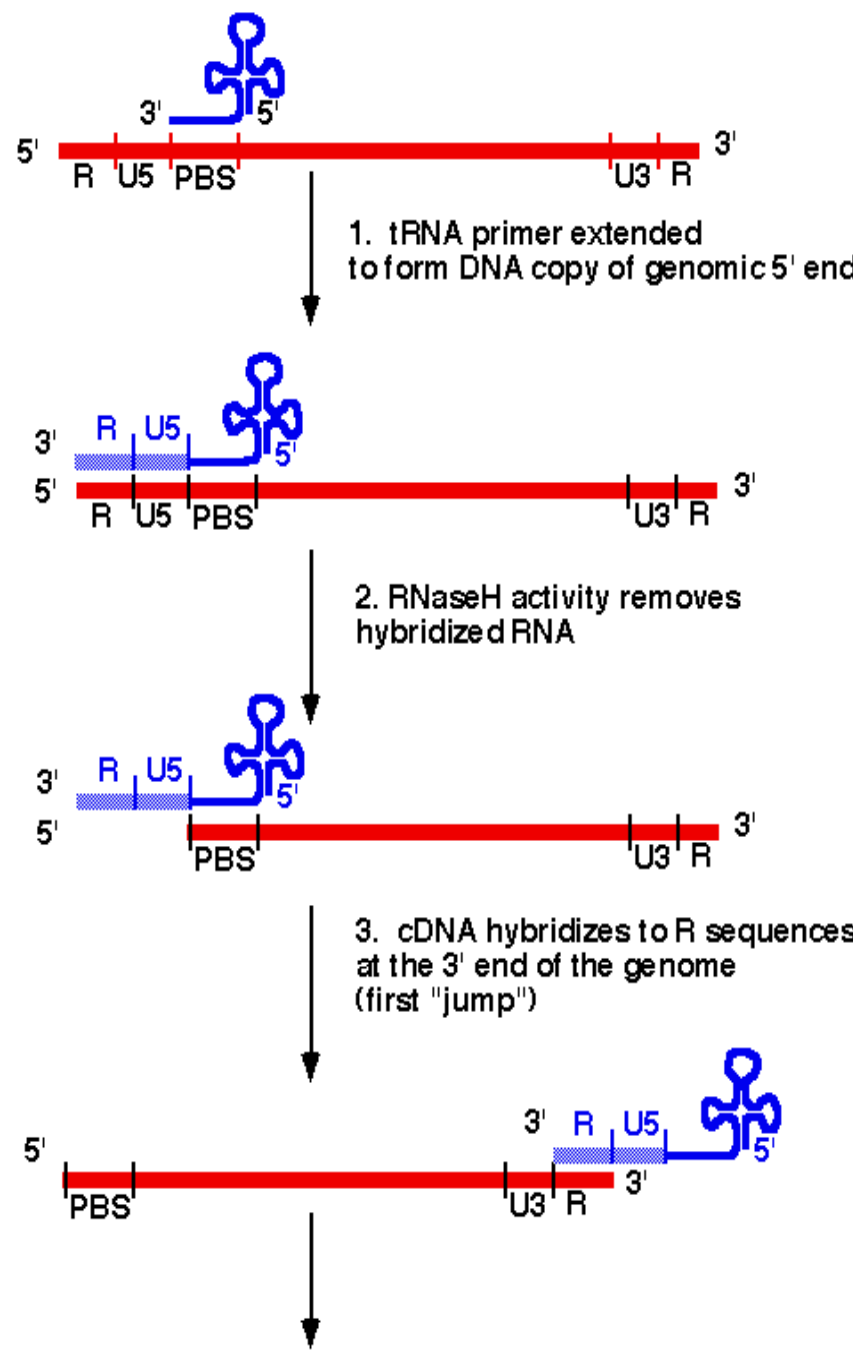
Καθώς τα μη ενεργά στοιχεία συσσωρεύονται στο γένωμα η μετάθεση γίνεται αναποτελεσματική. Γεγονώς που οδηγεί μακροπρόθεσμα στην εξαφάνιση των στοιχείων αυτών.

Για να «επιζήσουν» αυτά τα μεταθετά στοιχεία θα πρέπει να μπορούν να μεταφερθούν μέσω οριζόντιας μεταφοράς «horizontal transfer» σε θυγατρικά γενώματα.





### Retrovirus Replication Carried Out by Reverse Transcriptase



### · **LTR retrotransposons**

Βασικά πρόκειται για ρετροϊούς οι οποίοι δεν έχουν την πρωτεΐνη ενν , έχουν την περιοχή LTR , το γονίδιο Pol και συνήθως το γονίδιο gag .

Τα ρετροτρανσποζόνια χαρακτηρίζονται από μηχανισμούς μετάθεσης στους οποίους εμπλέκεται η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA. Τα ρετροτρανσποζόνια διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες.

Τα μέλη της **ϊικής υπερικογένειας** (viral superfamily) κωδικοποιούν ενεργότητες αντίστροφης μεταγραφάσης και/ή ιντεγράσης. Όπως και τα υπόλοιπα ρετροτρανσποζόνια, αναπαράγονται με τον τρόπο που αναπαράγονται οι ρετροϊοί, αλλά διαφέρουν από αυτούς στο ότι δεν περνούν από μια ανεξάρτητη μολυσματική μορφή ( στοιχεία Ty του ζυμομύκητα ).

### · **Non-LTR retrotransposons**

Τα στοιχεία LINES έχουν κι αυτά ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, αλλά δεν διαθέτουν LTR και χρησιμοποιούν διαφορετικό μηχανισμό για την εκκίνηση της αντίστροφης μεταγραφής σε σχέση με τους ρετροϊούς. Προκύπτουν από μετάγραφα της RNA πολυμεράσης II. Ένα μικρό ποσοστό των στοιχείων αυτών στο γονιδίωμα είναι πλήρως λειτουργικό και μπορεί να μετατίθεται αυτόνομα.

Μέλη της **μη ιικής υπερικογένειας** (nonviral superfamily). Τα μέλη της μη ιικής υπερικογένειας προέρχονται από κυτταρικά μετάγραφα και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες με λειτουργίες μετάθεσης. Τα πιο γνωστά μέλη της οικογένειας αυτής είναι τα στοιχεία SINES, τα οποία προέρχονται από μετάγραφα της RNA πολυμεράσης III.

**Ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των ρετροτρανσποζονίων που περιέχουν LTR αφορά την παρουσία των ενεργοτήτων αντίστροφης μεταγραφάσης και ιντεγράσης.**

**Τα τυπικά στοιχεία LINES των θηλαστικών έχουν δύο αναγνωστικά πλαίσια: το ένα κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα και το άλλο ενεργότητες αντίστροφης μεταγραφάσης και ενδονουκλεάσης.**

Τα στοιχεία LINES και SINES αποτελούν σημαντικό μέρος του γονιδιώματος των ζώων. Ο αρχικός χαρακτηρισμός τους βασίστηκε στην ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού σχετικά μικρών αλληλουχιών που ήταν μεταξύ τους ομόλογες.

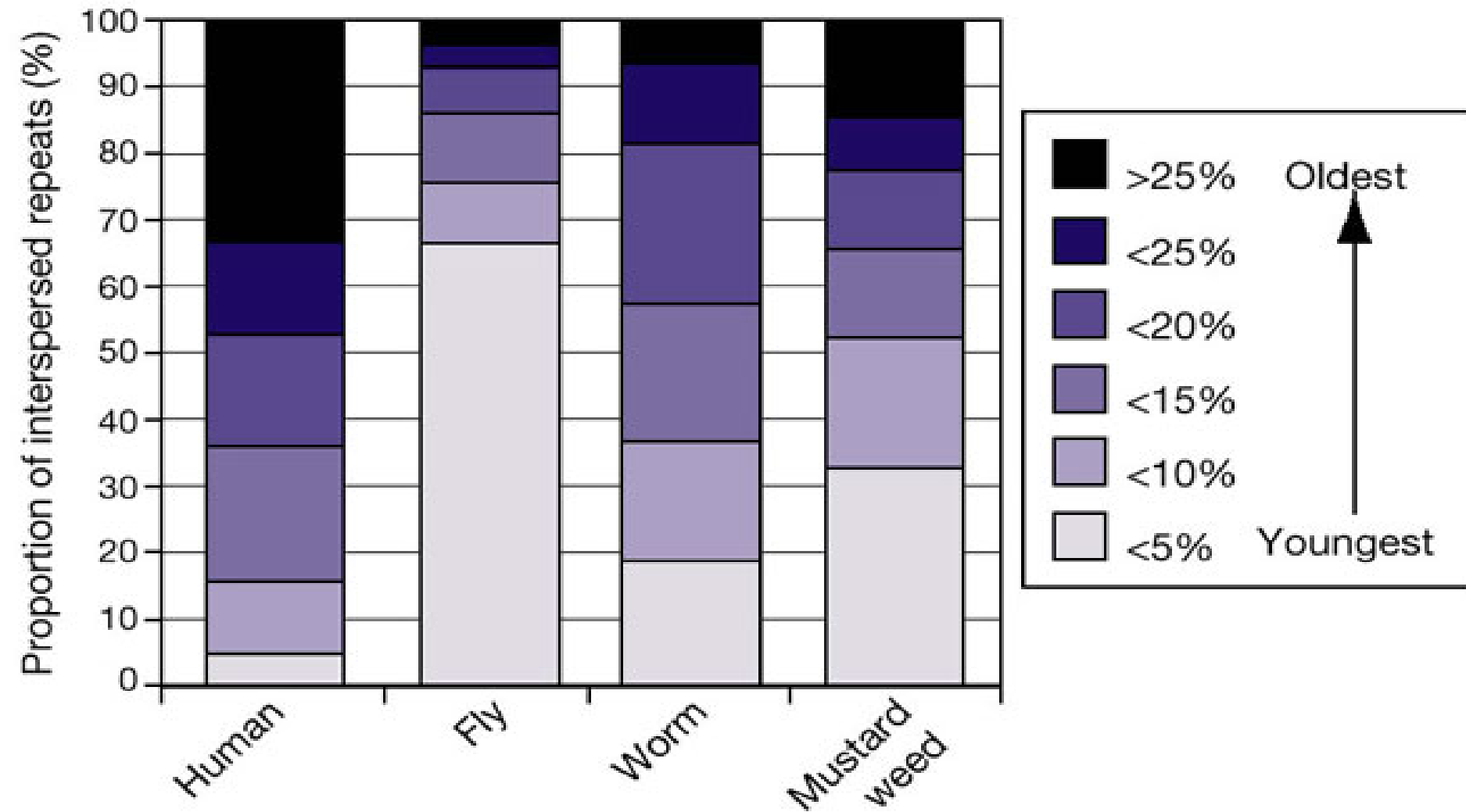
**Τα LINES αποτελούνται από μακριές διάσπαρτες αλληλουχίες και τα SINES από μικρές διάσπαρτες αλληλουχίες (interspersed repeats-λόγω της συχνής παρουσίας και της ευρείας κατανομής τους στο γονιδίωμα).**

**Τα στοιχεία LINES και SINES αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό του επαναλαμβανόμενου DNA των γονιδιωμάτων των ζώων.**

**TE  
TRANSPOSABLE  
ELEMENTS**

:

Element	Human	Fly	Worm	Arabodopsis
LINE/SINE	33.4%	0.7%	0.4%	0.5%
LTR	8.1%	1.5%	0.0%	4.8%
DNA	2.8%	0.7%	5.3%	5.1%
All TEs	44.4%	3.1%	6.5%	10.5%



Αν και ο άνθρωπος έχει το υψηλότερο ποσοστό μεταθετών στοιχείων ( ακόμη υψηλότερο και από αυτό του ποντικού ) η συντριπτική πλειοψηφία των στοιχείων αυτών είναι μη λειτουργικά εδώ και μερικές δεκάδες χιλιετιών.

**Εκτός από τα SINES, που είναι πάντοτε μη λειτουργικά, όλα τα άλλα είδη στοιχείων περιλαμβάνουν τόσο λειτουργικά όσο και μη λειτουργικά στοιχεία. Τα μη λειτουργικά στοιχεία έχουν υποστεί ελλείμματα με τα οποία έχουν απαλειφθεί τμήματα των αναγνωστικών πλαισίων που κωδικοποιούσαν τις απαραίτητες για τη μετάθεση πρωτεΐνες.**

### **LINEs (Long interspersed elements)**

Ένα κοινό στοιχείο LINEs που απαντάται στα γονιδιώματα των θηλαστικών ονομάζεται L1. Συνήθως έχει μήκος ~6.500 bp και τερματίζει σε μια αλληλουχία πλούσια σε αδενίνες. Φέρει ένα εσωτερικό polymerase II promoter και κωδικοποιεί για δύο ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια (ORF1 και ORF2).

**Στο γονιδίωμα, ο αριθμός των στοιχείων ολικού μήκους είναι συνήθως μικρός (~50), ενώ τα υπόλοιπα αντίγραφα φέρουν ελλείμματα. Το L1 είναι το μόνο μέλος την οικογένειας LINEs που υπήρξε ενεργό στην εξελικτική πορεία (lineage) τόσο του ποντικού όσο και του ανθρώπου .**

μετά την μετάφραση το LINE RNA συνδυάζεται με τις πρωτεΐνες του στον πυρήνα όπου μια ενδονουκλεάση κόβει σε ένα σημείο και η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί το κομμένο αυτό DNA για να εκκινήσει την μεταγραφή από το 3' άκρο του LINE RNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση συχνά αποτυγχάνει να φθάσει στο 5' άκρο με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη λειτουργικών ενθεμάτων.

Συνήθως οι επαναλήψεις LINE είναι μήκους από 900 bp -1200 bp για τα ακόμη ενεργά μεταθετά στοιχεία LINE1 (L1Hs).

Η LINE «μηχανή» πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες αντίστροφες μεταγραφές στο γένωμα.

Τρεις διαφορετικές οικογένειες LINE ευρίσκονται στο ανθρώπινο γένωμα : LINE1, LINE2 and LINE3. Μόνο η LINE1 είναι ακόμη ενεργή.

### **SINEs (Short interspersed elements)**







Μικρές αλληλουχίες (περίπου 100 -400 bp), φέρουν ένα εσωτερικό promoter polymerase III και κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Χρησιμοποιούν την «μηχανική» LINE για τις μεταθέσεις.

Τα περισσότερα στοιχεία SINEs μοιράζονται το 3' άκρο τους με το στοιχείο LINE . Οι περισσότερες περιοχές γνωστών SINEs promoter προέρχονται από tRNA αλληλουχίες.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει τρεις διαφορετικές μονοφυλετικές οικογένειες SINEs: την ενεργό Alu, και τις μη ενεργές MIR και Ther2/MIR3.

**Το μόνο στοιχείο SINES που έχει υπάρξει ενεργό κατά την εξέλιξη του ανθρώπου είναι το πολύ κοινό στοιχείο Alu.**

# Classes of interspersed repeat in the human genome

			Length	Copy number	Fraction of genome
LINEs	<b>Autonomous</b>		6-8 kb	850,000	21%
	<b>Non-autonomous</b>		100-300 bp		
SINEs	<b>Autonomous</b>		6-11 kb	450,000	8%
	<b>Non-autonomous</b>		1.5-3 kb		
Retrovirus-like elements	<b>Autonomous</b>		2-3 kb	300,000	3%
	<b>Non-autonomous</b>		80-3,000 bp		

Τα LINES δεν διαθέτουν LTR. Τα ρετροποζόνια αυτά κωδικοποιούν για μια ενδονουκλεάση που δημιουργεί μια εγκοπή, η οποία λειτουργεί ως το άκρο εκκίνησης για την αντίστροφη μεταγραφή.

Τα ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια αυτών των στοιχείων στερούνται πολλών από τις λειτουργίες των ρετροϊών, όπως αυτές της πρωτεάσης και της ιντεγράσης. Ωστόσο, συνήθως κωδικοποιούν προϊόντα που έχουν ομολογία με τις αντίστροφες μεταγραφάσες και ενεργότητα ενδονουκλεάσης.

Στα ανθρώπινα στοιχεία L1 της οικογένειας LINES, το ORF1 είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA και το ORF2 διαθέτει ενεργότητες τόσο αντίστροφης μεταγραφάσης όσο και ενδονουκλεάσης. Και τα δύο αυτά προϊόντα είναι απαραίτητα για τη μετάθεση. Μια ενεργότητα ενδονουκλεάσης, που κωδικοποιείται από το ρετροτρανσποζόνιο, δημιουργεί στη θέση-στόχο του DNA μια εγκοπή. Το προϊόν RNA του ρετροτρανσποζονίου αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA στη θέση της εγκοπής. Η εγκοπή παρέχει ένα 3'-OH άκρο που γίνεται εκκινητής της σύνθεσης cDNA από μήτρα RNA.

Μια δεύτερη διάσπαση απαιτείται για τη θραύση του δεύτερου κλώνου DNA, και το υβρίδιο RNA/DNA συνδέεται στο άλλο άκρο του χάσματος. Όταν το mRNA των LINES μεταφράζεται, οι πρωτεΐνες που παράγονται δείχνουν μια προτίμηση να προσδεθούν στο mRNA από το οποίο μεταφράστηκαν, δηλαδή είναι *cis*-δραστικές. Το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταφέρεται στη συνέχεια στον πυρήνα, όπου οι πρωτεΐνες εισάγουν ένα αντίγραφο DNA στο γονιδίωμα. Συχνά, η αντίστροφη μεταγραφή δεν ολοκληρώνεται, οπότε το αντίγραφο είναι ανενεργό.



Ωστόσο, εφόσον οι πρωτεΐνες δρουν πάνω σε ένα μετάγραφο ενός ενεργού στοιχείου, υπάρχει η πιθανότητα να ενσωματωθεί ένα ενεργό αντίγραφο στο γονιδίωμα. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα τρανσποζόνια DNA πρέπει να εισαχθούν στον πυρήνα, αφού συντεθούν στο κυτταρόπλασμα. Δεν έχουν, ωστόσο, τρόπο να διακρίνουν τα πλήρη τρανσποζόνια από τα ανενεργά τρανσποζόνια που φέρουν ελλείμματα. Οι πρωτεΐνες αυτές θα αναγνωρίσουν αδιάκριτα κάθε στοιχείο, με βάση τις επαναλήψεις που σημαδεύουν τα άκρα του, μειώνοντας έτσι σημαντικά τις πιθανότητες να δράσουν σε ένα πλήρες στοιχείο.

**Το αποτέλεσμα είναι ότι τα ανενεργά στοιχεία συσσωρεύονται και τελικά η οικογένεια εξαφανίζεται, επειδή η τρανσποζάση έχει προοδευτικά όλο και μικρότερη πιθανότητα να βρει κάποιον στόχο που αποτελεί ένα πλήρως λειτουργικό τρανσποζόνιο.**

**Λίγα ενεργά τρανσποζόνια υπάρχουν σήμερα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ενώ είναι γνωστά πολλά ενεργά τρανσποζόνια στο γονιδίωμα του ποντικού. Αυτό εξηγεί το γεγονός ότι οι αυθόρμητες μεταλλάξεις που οφείλονται σε ενθέσεις στοιχείων LINES συμβαίνουν με ρυθμό ~3% στον ποντικό, αλλά μόνο 0,1% στον άνθρωπο.**

**Φαίνεται ότι υπάρχουν ~10-50 ενεργά στοιχεία LINES στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η μετάθεση των στοιχείων αυτών μπορεί να προκαλέσει διάφορα παράπλευρα προβλήματα, όπως χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και ελλείμματα, παράλληλα με την ενσωμάτωση σε κάποια νέα θέση. Τέτοια γεγονότα μπορούν να θεωρηθούν ως παράγοντες γενετικής αλλαγής.**

## Οι αλληλουχίες Alu

Στα γονιδιώματα των θηλαστικών, ένα μεγάλο ποσοστό του επαναλαμβανόμενου DNA αποτελείται από μέλη της οικογένειας Alu, τα οποία έχουν προκύψει από μετάγραφα της RNA πολυμεράσης III και είναι οργανωμένα όπως τα τρανσποζόνια.

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ένα μεγάλο μέρος μετρίως επαναλαμβανόμενου DNA απαντάται σε αλληλουχίες μήκους ~300 bp, οι οποίες εντοπίζονται διάσπαρτες μέσα σε μη επαναλαμβανόμενο DNA.

Όταν το δίκλωνο DNA πέπτεται με το περιοριστικό ένζυμο Alu I, οι αλληλουχίες που διασπώνται είναι όλες μέλη μιας οικογένειας γνωστής από τον τρόπο με τον οποίο αναγνωρίζονται τα μέλη της ως **οικογένεια Alu**. Υπάρχουν ~300.000 μέλη της οικογένειας αυτής στο απλοειδές γονιδίωμα.

Οι αλληλουχίες Alu είναι ευρέως διαδεδομένες στα θηλαστικά. Συγγενικές οικογένειες των αλληλουχιών Alu υπάρχουν στον ποντικό (όπου τα 50.000 μέλη συγκροτούν την οικογένεια B1), καθώς και σε άλλα θηλαστικά. Τα στοιχεία Alu αποτελούνται από δύο εν σειρά επαναλήψεις μιας αλληλουχίας μήκους 130 bp, οι οποίες συχνά αποκαλούνται «δεξί ήμισυ» και «αριστερό ήμισυ». Στη μία από τις δύο αλληλουχίες (στη δεξιά) υπάρχει ένθεση μιας αλληλουχίας μήκους 31bp. Τα μέλη της οικογένειας Alu εμφανίζουν κατά μέσο όρο 87% ομολογία με την πρότυπη αλληλουχία του στοιχείου. Τα στοιχεία B1 του ποντικού αποτελούνται από δύο επαναλαμβανόμενες ομόλογες μονάδες μήκους 130 bp.

Η επαναλαμβανόμενη μονάδα του B1 εμφανίζει 70-80% ομολογία με την επαναλαμβανόμενη μονάδα του ανθρώπινου στοιχείου Alu.

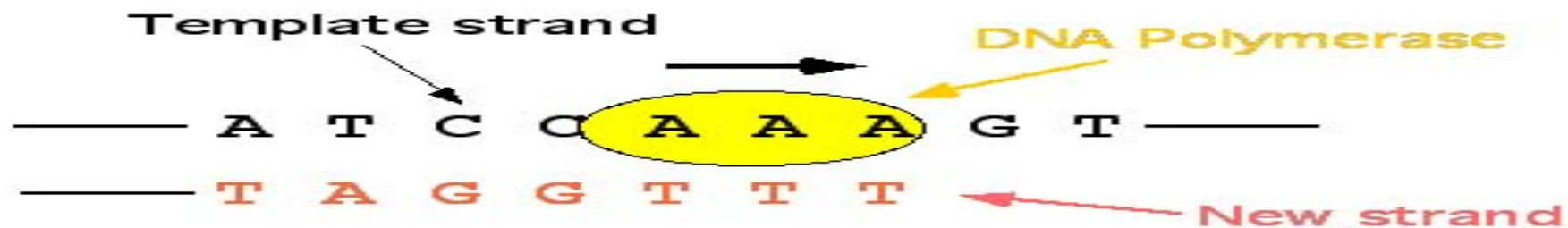
Τα μέλη της οικογένειας Alu μοιάζουν με τρανσποζόνια λόγω του γεγονότος ότι περικλείονται από βραχείες ομόρροπες επαναλήψεις. Όμως, έχουν το ασυνήθιστο γνώρισμα ότι τα μήκη των επαναλήψεων διαφέρουν ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας. **Αφού προέρχονται από μετάγραφα γονιδίων που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III, τα μέλη της οικογένειας μπορεί να φέρουν εσωτερικούς ενεργούς υποκινητές. Τα μέλη της οικογένειας Alu μπορεί να απαντώνται μέσα σε μεταγραφικές μονάδες δομικών γονιδίων**

### Ψευδογονίδιο

Το ψευδογονίδιο μπορεί να ξεκινά από το σημείο που αντιστοιχεί στο 5' άκρο του mRNA ενός συγγενικού λειτουργικού γονιδίου. Πολλά ψευδογονίδια αποτελούνται από αλληλουχίες συγγενικές προς τα εξόνια ενός λειτουργικού γονιδίου. Η αλληλουχία του ψευδογονιδίου μπορεί να τερματίζει σε ένα μικρό τμήμα πλούσιο σε ζεύγη βάσεων A·T, τα οποία προφανώς προέρχονται από την ουρά πολυαδενίνης του mRNA. Εκατέρωθεν του ψευδογονιδίου απαντάται μια βραχεία ομόρροπη επανάληψη, η οποία είναι πιθανόν να δημιουργήθηκε από ένα γεγονός παρόμοιο με μετάθεση. **Τα ψευδογονίδια βρίσκονται σε θέσεις που δεν έχουν σχέση με τις θέσεις στις οποίες εντοπίζονται τα αρχικά γονίδια από τα οποία προήλθαν. Τα επεξεργασμένα ψευδογονίδια δεν κωδικοποιούν προϊόντα που θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τη μετάθεση (ή να πραγματοποιήσουν την αντίστροφη μεταγραφή του RNA, η οποία πρέπει να προηγηθεί της μετάθεσης). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο RNA υπήρξε κάποτε υπόστρωμα για κάποιο άλλο σύστημα που κωδικοποιείται από ένα ρετροποζόνιο.**

# Άλλοι Μηχανισμοί Γονιδιακού πολλαπλασιασμού

Η DNA πολυμεράση όταν συναντά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες π.χ. AAA όπως κατωτέρω σπάνια μεν αλλά είναι πιθανόν να «γλιστρήσει» κατά την αντιγραφή και να εισάγει μια επιπλέον βάση T.



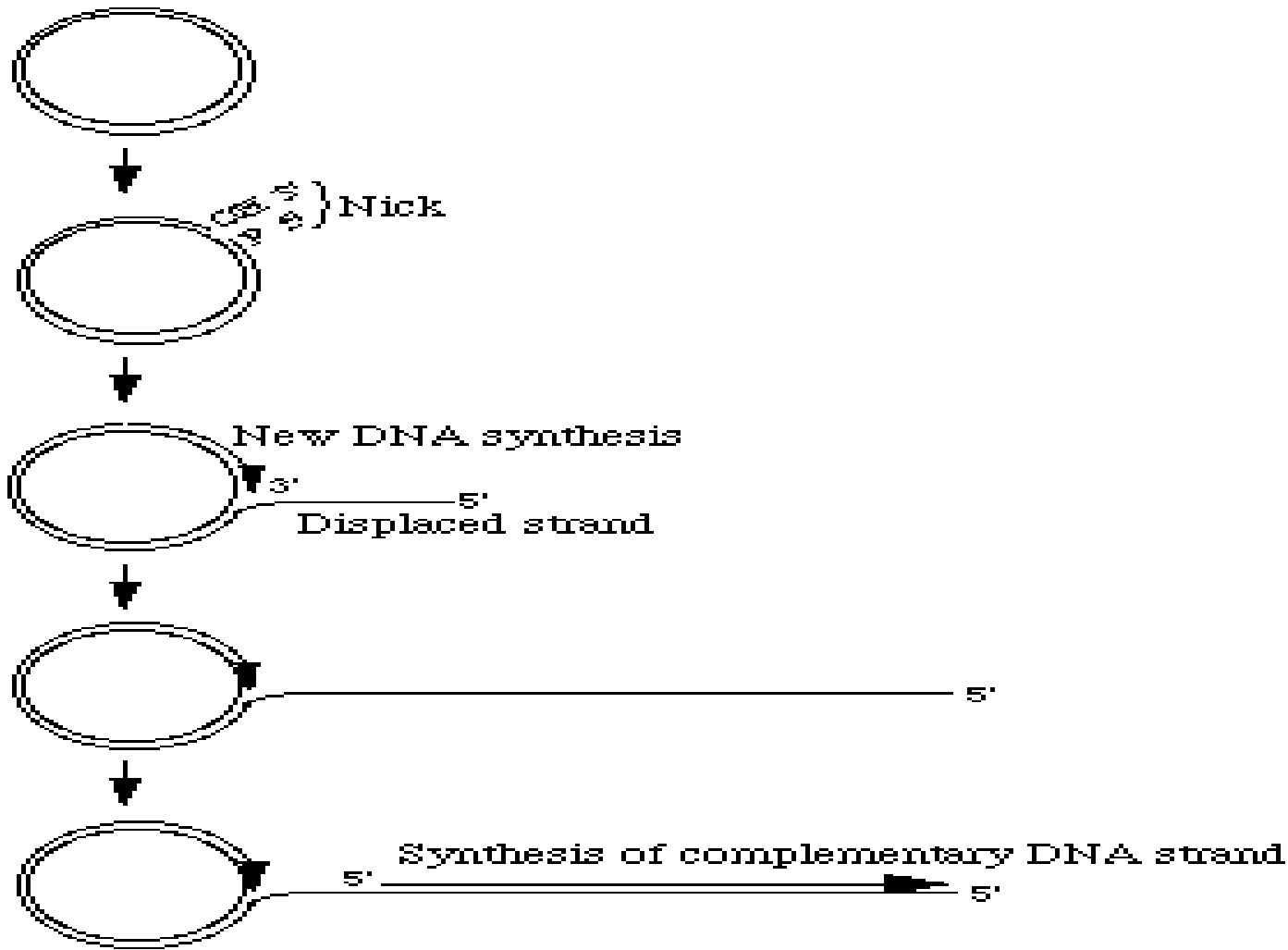
## Strand slippage

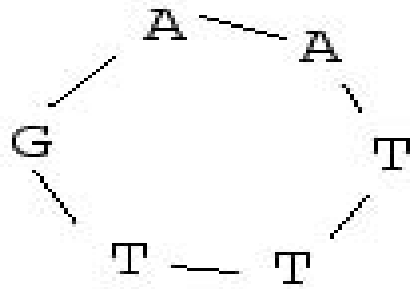


## Final strand



Κατά την αντιγραφή του «κυλιόμενου κύκλου» η οποία συναντάται σε ιούς με κυκλικό DNA (rolling circle replication) η DNA πολυμεράση κατά λάθος γυρνά γύρω από την αλληλουχία εκκίνησης της αντιγραφής με αποτέλεσμα την δημιουργία επαναλαμβανόμενων αντιγράφων της αλληλουχίας εκκίνησης της αντιγραφής.





**Rolling circle replication:**



A A T T T G A A T T T G A A T T T G A A T T T G

A A T T T G | A A T T T G | A A T T T G | A A T T T G

Η ένθεση μιας τέτοιας επαναλαμβανόμενης στη σειρά αλληλουχίας ( long tandem repeat ) σε ένα χρωμόσωμα θα έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας νέας αλληλουχίας δορυφορικού DNA ( **satellite DNA** ).

## Ογκογονίδια και καρκίνος

Η κακοήθης εξαλλαγή συνιστά μια πολυσταδιακή διαδικασία. Οι δύο σημαντικότεροι τύποι αλλαγών που συμβαίνουν στο γονιδίωμα κατά την κακοήθη εξαλλαγή είναι η συσσώρευση σωματικών αλλαγών και η ανάπτυξη γενετικής αστάθειας. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα φέρουν αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Καθώς ο καρκίνος εξελίσσεται, ο αριθμός των μεταλλάξεων αυξάνεται περαιτέρω. Η γενετική αστάθεια αντικατοπτρίζεται σε αλλαγές στον αριθμό των γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα, ως αποτέλεσμα μικρών διπλασιασμών ή ελλειμμάτων, μετατοπίσεων υλικού από ένα χρωμόσωμα σε ένα άλλο ή ακόμη και αλλαγών που επηρεάζουν ολόκληρα χρωμοσώματα.

Μια μετάλλαξη που αυξάνει το δυναμικό πολλαπλασιασμού ενός κυττάρου του προσδίδει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα. Σε κάθε στάδιο της καρκινογένεσης σε έναν ιστό, επιλέγονται από τον κυτταρικό πληθυσμό εκείνα τα κύτταρα που μπορούν να αναπτυχθούν πιο επιθετικά, δηλαδή εκείνα που αρχικά πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα, ενώ αργότερα μπορούν να μεταναστεύουν δημιουργώντας αποικίες σε νέες θέσεις.

Η καρκινογένεση εξελίσσεται με πολλαπλούς κύκλους μετάλλαξης και επιλογής: ο αυξημένος ρυθμός μετάλλαξης ευθύνεται για τη δημιουργία κυττάρων με διαφορετικές ικανότητες πολλαπλασιασμού, από τα οποία στη συνέχεια επιλέγονται τα κύτταρα με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού.

**Τα γονίδια, εκείνα που έχουν άμεση επίδραση στη δημιουργία καρκίνου μπορούν να διακριθούν σε ογκογονίδια (oncogenes, γονίδια των οποίων η λειτουργία ενεργοποιείται από μια μετάλλαξη και συμβάλλει στην ογκογένεση) και σε ογκοκαταστολείς (tumor suppressors, γονίδια των οποίων η φυσιολογική λειτουργία παρεμποδίζει την ογκογένεση). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο καρκίνος εκδηλώνεται εξαιτίας της συσσώρευσης μιας ποικιλίας μεταλλάξεων σε ένα σωματικό κύτταρο, οι οποίες ενεργοποιούν τα ογκογονίδια και/ή απενεργοποιούν τους ογκοκαταστολείς.**

Τα τρία είδη των αλλαγών που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο, όταν γίνεται ογκογόνο, συνοψίζονται στα εξής:

Η **αθανατοποίηση** (immortalization) είναι η ικανότητα για συνεχή και επ' άοριστον ανάπτυξη.

Ο **μετασχηματισμός** (transformation) περιγράφει τη διαφυγή από τον έλεγχο των φυσιολογικών ρυθμιστικών περιοριστικών μηχανισμών της ανάπτυξης.

Η **μετάσταση** (metastasis) περιγράφει το στάδιο στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εισβάλουν σε φυσιολογικούς ιστούς διαφορετικούς από αυτόν από τον οποίο προέρχονται και να ιδρύουν νέες δευτερογενείς αποικίες (μεταστατικές εστίες).



*In vitro*, τα φυσιολογικά κύτταρα από ένα σπονδυλωτό οργανισμό αναπτύσσονται για καθορισμένο αριθμό διαιρέσεων και στη συνέχεια η ανάπτυξή τους σταματά λόγω φυσικής γήρανσης κατά την οποία τα περισσότερα πεθαίνουν. Μερικά κύτταρα επιβιώνουν και ορισμένα αποκτούν την ικανότητα να διαιρούνται επ' αόριστον (αθανατοποίηση). Τα κύτταρα του ποντικού εισέρχονται στη φάση της κρίσης μετά από ~12 γενιές, ενώ τα κύτταρα του ανθρώπου εισέρχονται μετά από ~40 γενιές.

Τα **πρωτογενή κύτταρα** (primary cells) είναι οι άμεσοι απόγονοι των κυττάρων που απομονώθηκαν από τον οργανισμό. Τα κύτταρα αυτά μιμούνται πιστά τον *in vivo* φαινότυπο διατηρώντας τα χαρακτηριστικά του ιστού από τον οποίο προέρχονται, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις επιβιώνουν μόνο για μια σύντομη σχετικά περίοδο.

Τα κύτταρα που επιβιώνουν και ανακάμπτουν μετά την κρίση συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται για 40-50 αναδιπλασιασμούς και καθιερώνουν μια **ημι-συνεχή κυτταρική σειρά (established cell line)**, όμως οι ιδιότητες τους έχουν αλλάξει και μπορεί να συνεχίσουν να αλλάζουν κατά τη διάρκεια της προσαρμογής τους στην καλλιέργεια.

Μια κυτταρική σειρά που δημιουργείται με την παραπάνω διαδικασία δεν είναι ογκογόνος. Οι σειρές αυτές παρουσιάζουν χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των πρωτογενών καλλιιεργειών, όπως:

**Η αναγκαιότητα προσκόλλησης (anchorage dependence)** – τα κύτταρα μεγαλώνουν δημιουργώντας στιβάδες προσκολλημένες σε μια σταθερή επιφάνεια.

**Η εξάρτηση από την παρουσία ορού** ή αυξητικών παραγόντων – η προσθήκη ορού στο καλλιεργητικό μέσο είναι απαραίτητη ως πηγή βασικών αυξητικών παραγόντων.

**Η αναστολή ανάπτυξης της καλλιέργειας** όταν αυτή φτάσει σε αυξημένη κυτταρική πυκνότητα με τη διαδικασία της αναστολής εξ επαφής.

**Η κυτταροσκελετική οργάνωση.** Τα κύτταρα είναι επίπεδα, εκτείνονται στην επιφάνεια όπου μεγαλώνουν και διαθέτουν ένα δίκτυο ινών που αποτελείται από ινίδια ακτίνης.

Συνέπεια αυτών των ιδιοτήτων είναι ότι τα κύτταρα μεγαλώνουν πάνω στο υπόστρωμα, ως **μονοστιβάδα** (monolayer). Οι ιδιότητες αυτές αποτελούν κριτήρια με τα οποία μπορούμε να εκτιμήσουμε αν ένα κύτταρο είναι φυσιολογικό. Σχεδόν πάντα, τέτοιες κυτταρικές σειρές υφίστανται αλλαγές στο χρωμοσωμικό τους περιεχόμενο και παύουν να είναι διπλοειδείς. Ένα κύτταρο του οποίου η χρωμοσωμική σύνθεση παρεκκλίνει από τη διπλοειδία ονομάζεται **ανευπλοειδής** (aneuploid).

Τα κύτταρα που προέρχονται από όγκους και όχι από φυσιολογικούς ιστούς παρουσιάζουν αλλαγές σε μερικές ή σε όλες τις παραπάνω ιδιότητες όταν μεγαλώνουν σε καλλιέργεια. Οι κυτταρικές σειρές που δημιουργούν ονομάζονται **μετασχηματισμένες** (transformed). Έχουν ελαττωμένη εξάρτηση από την παρουσία ορού και από την προσκόλληση σε στερεή επιφάνεια και, αντί να αναπτύσσονται σε μονοστιβάδα, αναπτύσσονται σε πολυστιβάδα κυττάρων που ονομάζεται εστία (focus). Επιπρόσθετα, τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να δημιουργούν όγκους όταν ενεθούν σε κατάλληλα πειραματόζωα.

Ο μετασχηματισμός των ευκαρυωτικών κυττάρων μπορεί να συμβεί αυτόματα, να προκληθεί από συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες ή ακόμη και να είναι το αποτέλεσμα μόλυνσης από έναν **ογκογόνο ιό** τόσο DNA όσο και RNA. Ο ογκογόνος ιός ενεργοποιεί ένα ρυθμιστικό διακόπτη που αλλάζει τις αναπτυξιακές ιδιότητες του κυττάρου-ξενιστή (ή προσθέτει στο γονιδίωμα ένα ρυθμιστικό διακόπτη που επάγει τις αναπτυξιακές ιδιότητες του κυττάρου-ξενιστή).

Τα ογκογονίδια που φέρουν οι ιοί DNA κωδικοποιούν πρωτεΐνες που απενεργοποιούν τα πρωτεϊνικά προϊόντα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων των κυττάρων και έτσι η δράση τους μιμείται εν μέρει την απώλεια λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Αντίθετα, τα ογκογονίδια που φέρουν οι ρετροϊοί προέρχονται από κυτταρικά γονίδια ευκαρυωτικών οργανισμών και μιμούνται τη συμπεριφορά μεταλλάξεων κέρδους λειτουργίας των πρωτο-ογκογονιδίων

Μια ποικιλία παραγόντων αυξάνει τη συχνότητα με την οποία τα κύτταρα μεταπίπτουν σε κατάσταση μετασχηματισμού. Αυτοί οι παράγοντες ονομάζονται **καρκινογόνοι**.

# Τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια

Υπάρχουν δύο κλάσεις γονιδίων που, όταν μεταλλαχτούν, προκαλείται μετασχηματισμός:

Τα **ογκογονίδια** (oncogenes) αρχικά ταυτοποιήθηκαν σε ιούς ως τα γονίδια εκείνα που προκαλούν μετασχηματισμό στα κύτταρα-ξενιστές. Τα γονίδια αυτά καλούνται **πρωτο-ογκογονίδια** (proto-oncogenes) και σε ορισμένες περιπτώσεις η μετατροπή τους σε ογκογονίδια εξαιτίας μετάλλαξης ή ανώμαλης ενεργοποίησής τους σχετίζεται με το σχηματισμό όγκων.

Έχουν αναγνωριστεί περίπου 100 ογκογονίδια.

Η δημιουργία ενός ογκογονιδίου χαρακτηρίζεται ως κέρδος λειτουργίας (gain-of-function) ενός κυτταρικού πρωτο-ογκογονιδίου που φυσιολογικά θα παρέμενε ανενεργό. Αυτό μπορεί να οφείλεται **π.χ. σε κάποια μετάλλαξη που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης, η οποία είναι μόνιμα ενεργοποιημένη, υπερεκφράζεται ή αποτυγχάνει να τερματιστεί η έκφρασή της την κατάλληλη στιγμή.**

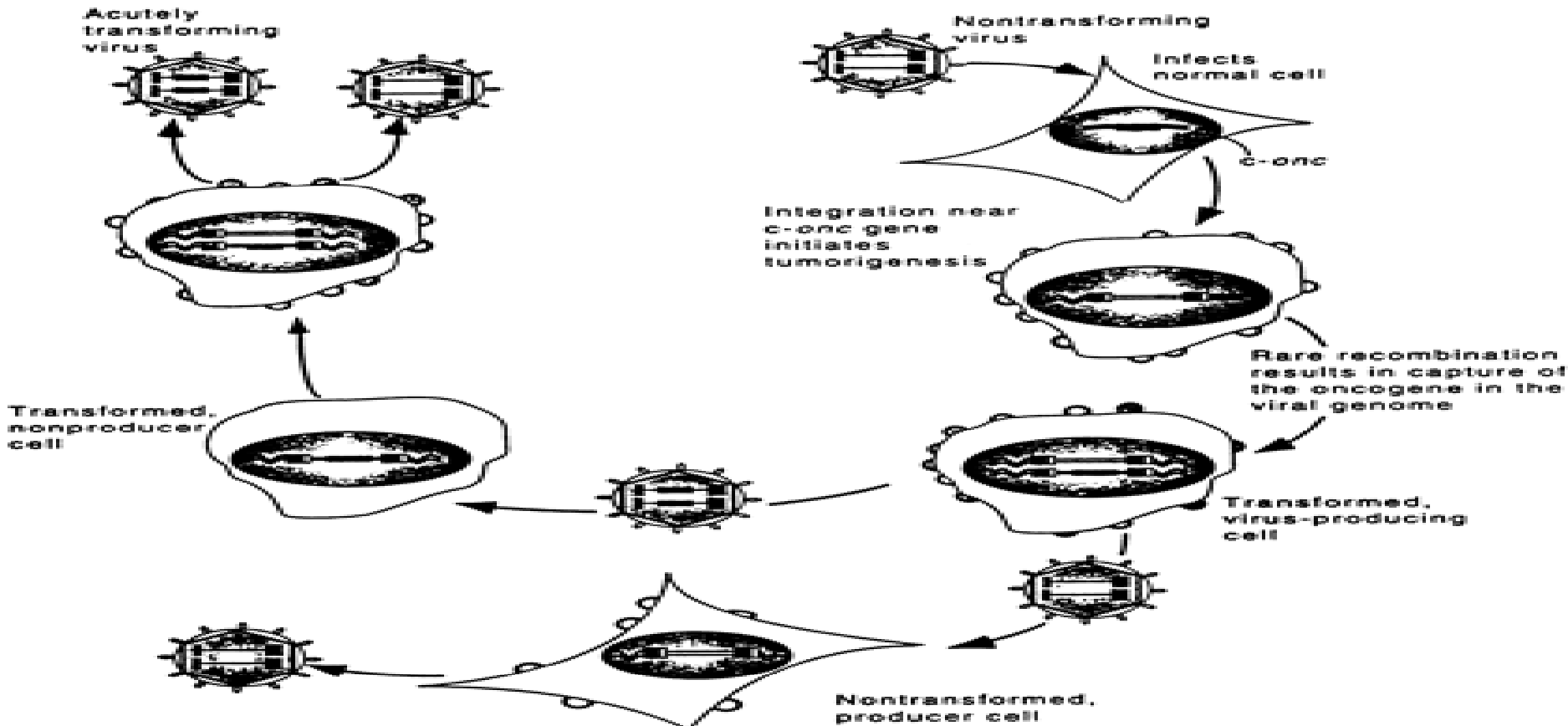
Οι **ογκοκαταστολείς** (tumor suppressors) ταυτοποιούνται βάσει της ανίχνευσης ογκογόνων μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας (loss-of-function) γονιδίων που συνήθως επιβάλλουν κάποιον περιορισμό στον κυτταρικό κύκλο ή στην κυτταρική αύξηση.

Η άρση του περιορισμού είναι ογκογόνος και είναι απαραίτητη η απενεργοποίηση και των δύο αντιγράφων του γονιδίου. Η πιο ισχυρή απόδειξη για τη φύση των ογκοκαταστολέων παρέχεται από ορισμένους κληρονομικούς καρκίνους, στους οποίους οι ασθενείς αναπτύσσουν όγκους που έχουν χάσει και τα δύο αλληλόμορφα και επομένως στερούνται παντελώς του ενεργού ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Γνωρίζουμε ~10 ογκοκαταστολείς.

# Η απόκριση ενός κυττάρου στην ιική μόλυνση εμπίπτει σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες:

Τα κύτταρα επιτρέπουν την επιτυχή μόλυνση από τον ιό και την αναπαραγωγή του (permissive cells). Ο ιός πολλαπλασιάζεται πραγματοποιώντας ένα λυτικό κύκλο, που διακρίνεται σε πρώιμα και όψιμα στάδια.

Τα κύτταρα που δεν επιτρέπουν ολοκληρωμένη μόλυνση και η αναπαραγωγή του ιού είναι ανεπιτυχής, ονομάζονται μη επιτρεπτικά κύτταρα (nonpermissive cells) και μερικά από αυτά τα μολυσμένα κύτταρα μετασχηματίζονται. Ο φαινότυπος καθενός από τα κύτταρα αλλάζει και η καλλιέργεια αναπτύσσεται επ' άοριστον.



Η ογκογονικότητα του ιού οφείλεται σε μία λειτουργία ή σε ομάδα συγγενικών λειτουργιών οι οποίες λαμβάνουν χώρα στην πρώιμη φάση του λυτικού κύκλου. Τα σχετικά με τις λειτουργίες αυτές γονίδια του ιού ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των κυττάρων που μετασχηματίζονται χωρίς να αποκρίνονται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς. **Αυτή η διαδικασία αποτελεί το γενικό μοντέλο για το μετασχηματισμό από ιούς DNA. Η έκφραση του ογκογονιδίου παράγει πρωτεΐνες που είναι ικανές να μετασχηματίσουν το φυσιολογικό κύτταρο, δηλαδή ογκοπρωτεΐνες (oncoproteins).**

Όλοι οι ιοί πολυόμα είναι γενικά μικροί. Ο κοινός ιός πολυόμα βρίσκεται συχνά σε ποντικούς, ενώ ο ανάλογος SV40 (Simian Virus 40) απομονώθηκε από κύτταρα πιθήκων ρέζους. Πιο πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν οι ανθρώπινοι ιοί BK και JC. Όλοι οι ιοί πολυόμα μπορούν να προκαλέσουν όγκους όταν ενεθούν σε νεογέννητα τρωκτικά. Οι ιοί πολυόμα χρησιμοποιούν εναλλακτικό μάτισμα των πρώιμων γονιδίων τους, για να συνθέσουν πρωτεΐνες που καλούνται αντιγόνα T (tumor antigens). Τα αντιγόνα T επιτελούν διάφορες σημαντικές λειτουργίες κατά τη διάρκεια του λυτικού κύκλου. Είναι απαραίτητα τόσο για την έκφραση των όψιμων γονιδίων όσο και για την αντιγραφή του ιικού DNA. Τα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί από ιούς πολυόμα περιέχουν στα χρωμοσώματά τους αντίγραφα ενός τμήματος ή ολόκληρου του γονιδιώματος του ιού. Οι ενσωματωμένες αλληλουχίες πάντοτε περιέχουν πρώιμα γονίδια. Τα αντιγόνα T που συντίθενται έχουν μετασχηματιστικό δυναμικό το οποίο οφείλεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με κυτταρικές πρωτεΐνες, ανεξάρτητα από το αν αλληλεπιδρούν απευθείας και με το ιικό γονιδίωμα. Ο ιός SV40 απαιτεί «μεγάλα T» και «μικρά t» αντιγόνα για να προκαλέσει μετασχηματισμό, ενώ ο ιός πολυόμα απαιτεί «μεγάλα T» και «μεσαία T».

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) είναι μικροί ιοί DNA που προκαλούν όγκους των επιθηλίων. Υπάρχουν ~130 ιοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο (HPV, Human papillomavirus) αν και, οι περισσότεροι δημιουργούν καλοήθεις όγκους, όπως τα κονδυλώματα, ορισμένοι έχουν συσχετιστεί με κακοήθεις νεοπλασίες και συγκεκριμένα με καρκίνους του τραχήλου της μήτρας. Δύο ιικά προϊόντα που έχουν βρεθεί σε καρκίνους του τραχήλου (οι πρωτεΐνες E6 και E7) είναι ικανά να αθανοτοποιήσουν κύτταρα-στόχους.

Οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου (HPV-Human Papilloma Viruses) αποτελούν μια ομάδα επιθηλιο-πολλαπλασιαζομένων ιών που οδηγούν συνήθως σε καλοήθεις και σπανιότερα σε κακοήθεις όγκους. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί στον άνθρωπο περισσότεροι από 130 υπότυποι ενώ περί τους είκοσι προσβάλλουν το ουρογεννητικό του σύστημα. Μεταξύ αυτών ορισμένοι, όπως οι τύποι **HPV High risk : 16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,55,56,58,59,68,73,82,83** που συναντιώνται σε δυσπλασίες και επιδερμικής προέλευσης καρκίνους χαρακτηρίζονται ως «υψηλής επικινδυνότητας», άλλοι όπως **HPV Low risk: 6,11,40,42,53,54,57,66,84** που βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε καλοήθεις βλάβες, οξυτενή κονδυλώματα (condyloma acuminata) και σχεδόν ποτέ σε καρκινώματα, χαρακτηρίζονται ως «χαμηλής επικινδυνότητας» και τέλος μια τρίτη κατηγορία «ενδιάμεσης επικινδυνότητας» περιλαμβάνει ιούς, όπως οι τύποι -33, -39, που μπορεί να ανευρισκονται σε δυσπλασίες.



Το DNA των ιών HPV είναι δίκλωνο, κυκλικό και έχει μέγεθος περί τα 7800 ζεύγη. Οι ιοί «υψηλής επικινδυνότητας» εμπλέκονται στη καρκινογένεση του ουρογεννητικού συστήματος, ειδικότερα στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

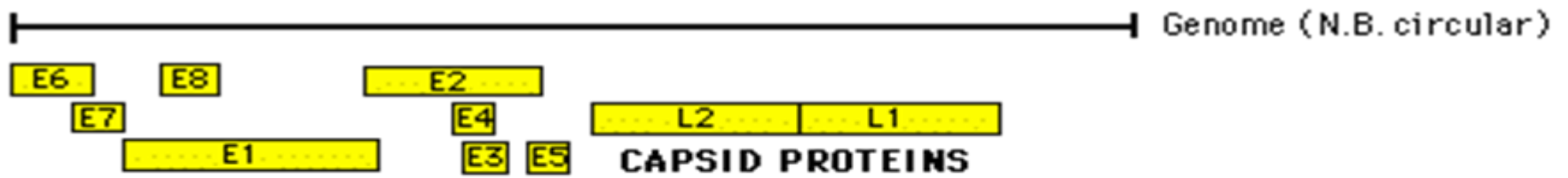
1. Το DNA των ιών HPV υψηλής επικινδυνότητας ανευρίσκεται στο 90% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

2. Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του ουρογεννητικού στήματος, το ιϊκό DNA των ιών υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16 και -18) βρίσκεται ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της αλληλουχίας του πλαισίου ανάγνωσης ORF E2 στους ιούς αυτούς.

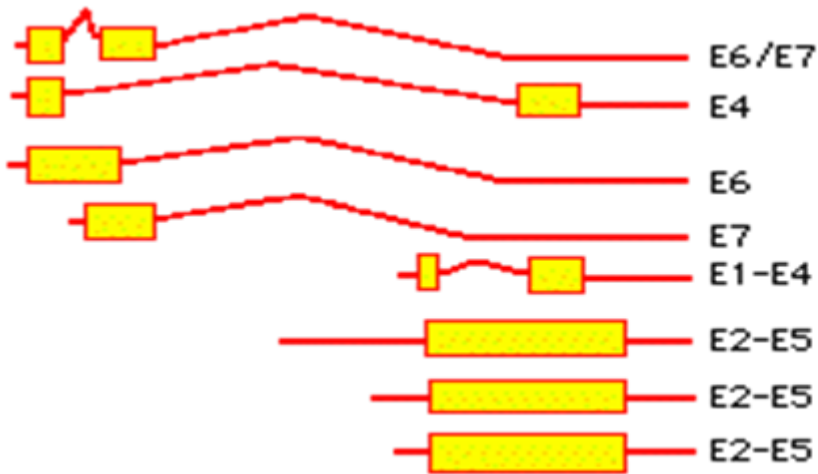
3. Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος, έχουμε έκφραση ιϊκών γονιδίων που χαρακτηρίζουν τους ιούς υψηλής επικινδυνότητας. Σ' αυτές τις περιπτώσεις συγκεκριμένα ανιχνεύονται μετάγραφα των περιοχών ORF-E6 και ORF-E7.βάσεων. Περιλαμβάνει περιοχές που ονομάζονται «ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης» ή ORF (Open Reading Frames) και οι οποίες διακρίνονται σε πρώιμες E (Early) και καθυστερημένες L (Late).

Διακρίνουμε τις E1-E2, E4-E5-E6-E7 που περιέχουν την πληροφορία για το διπλασιασμό του ιού και ταυτόχρονα είναι υπεύθυνες και για το καρκινικό μετασχηματισμό του κυττάρου-ξενιστή.

Οι περιοχές L1 και L2 κωδικοποιούν για τα δομικά πολυπεπτίδια του καψιδίου του ιού.



**mRNAs:**



**Κύκλος ζωής των HPV**

Οι HPV είναι ιοί χωρίς φάκελο με καψίδιο εικοσαεδρικής δομής που αντιγράφονται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή.

Το DNA του ιού βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες και σχηματίζει σύμπλοκα παρόμοια με την χρωματίνη.

Το γένωμα τους περιέχει περίπου 8 ORFs τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNA που μεταγράφονται μόνο από τον ένα κλώνο DNA.

Στους HPV υψηλού κινδύνου έχουν αναγνωρισθεί δυο σημαντικοί εκκινητές εκ των οποίων:

Ο ένας βρίσκεται upstream του E6 ORF και κωδικοποιεί για τις πρώιμες πρωτεΐνες (HPV 16 και 31 → p97 ενώ HPV 18 → p105).

Ο 2ος εκκινητής βρίσκεται downstream του E6 ORF και κωδικοποιεί για τις όψιμες πρωτεΐνες (πρωτεΐνες καψιδίου) περίπου στη θέση 742 → στον HPV 31

Η μόλυνση, από τους HPV, συμβαίνει μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου, εκθέτοντας τα κύτταρα της βασικής στιβάδας στον ιό.

Ο υποδοχέας για την είσοδο του ιού είναι άγνωστος .

Η παραγωγή των ώριμων ιικών σωματιδίων περιορίζεται στα διαφοροποιημένα κύτταρα πάνω από τη βασική στιβάδα.

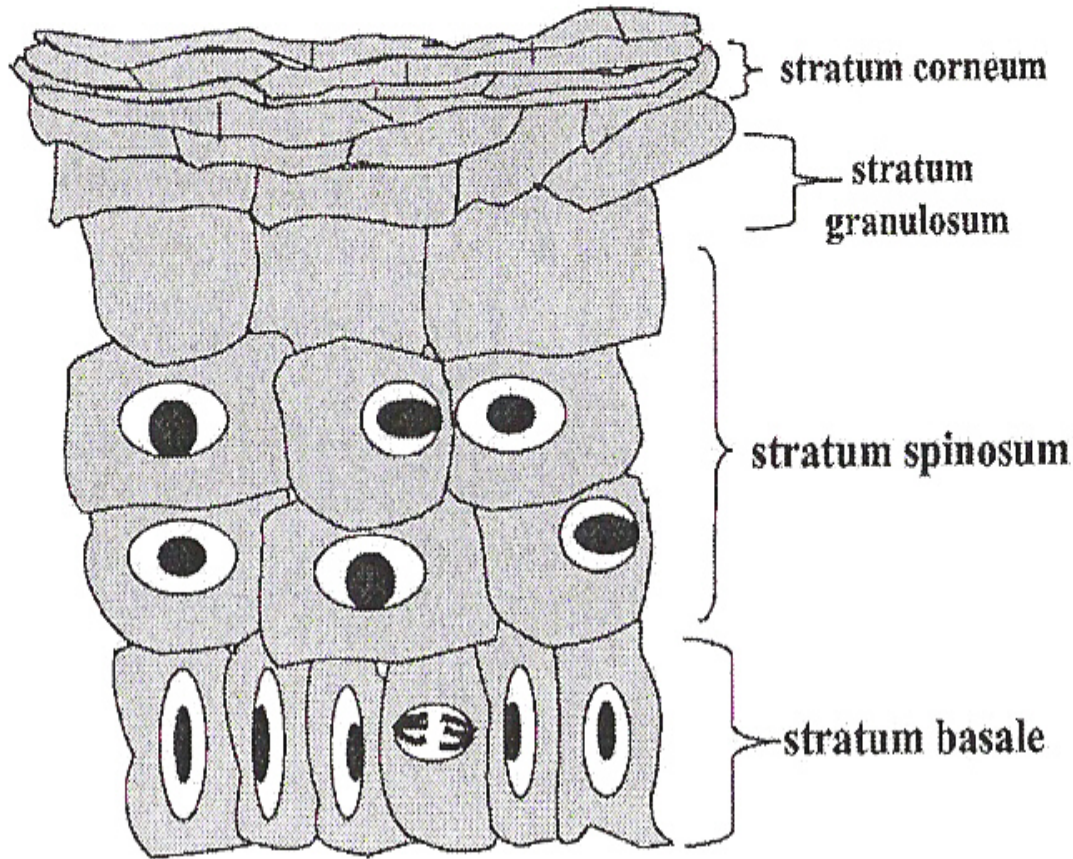
Η μόλυνση των κυττάρων της βασικής στιβάδας από HPV οδηγεί:

στην ενεργοποίηση της έκφρασης ενός καταρράκτη ιικών γονιδίων με αποτέλεσμα την παραγωγή ~20-100 αντιγράφων ιικού DNA ανά κύτταρο.

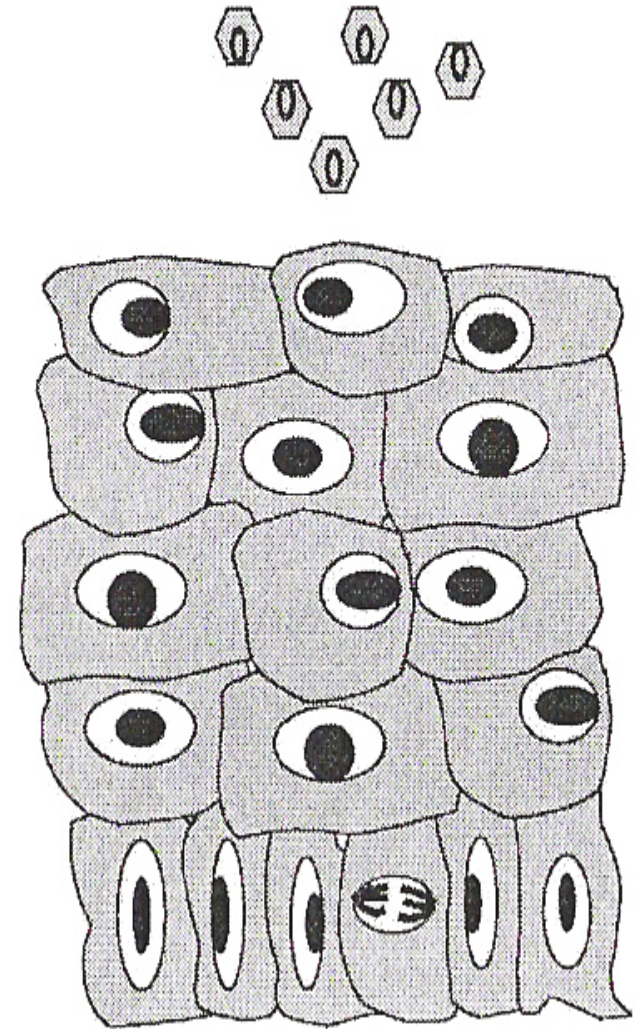
στην συνέχιση του κυτταρικού κύκλου και στην διατήρηση του πυρήνα σε όλες τις στιβάδες του επιθηλίου.

Το dsDNA των HPV κωδικοποιεί για 6 πρώιμες (E) και 2 όψιμες (L) πρωτεΐνες.

# Uninfected Epithelium



# HPV Infected Epithelium



Cartoon of uninfected (left) and HPV-infected (right) epithelia showing various differentiated layers and virion presence.

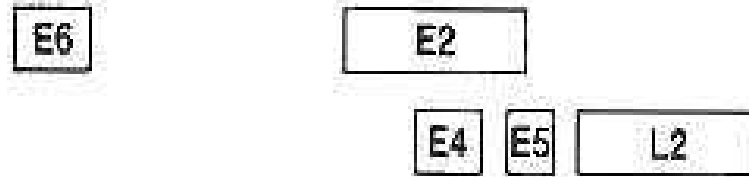
**Genome**



**NCR**



**Open Reading Frames**



**Transformation**



**Transformation**



**Gene Functions**

**Non-coding**



**Transcription**



## **E2:**

Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA σε εξειδικευμένες αλληλουχίες και στρατολόγηση της E1 στην αφετηρία έναρξης αντιγραφής  $\Rightarrow$  δημιουργία συμπλόκου  $\Rightarrow$  στρατολόγηση DNA πολυμεράσης και άλλων πρωτεϊνών με σκοπό την έναρξη της αντιγραφής

Ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιικού γενώματος από τον πρώιμο promoter.

## **E1:**

Δραστικότητα 3'-5' ελικάσης

Δραστικότητα ATPάσης

## **E6 και E7:**

Όγκοπρωτεΐνες στους HPV υψηλού κινδύνου αλλά όχι στους HPV χαμηλού κινδύνου.

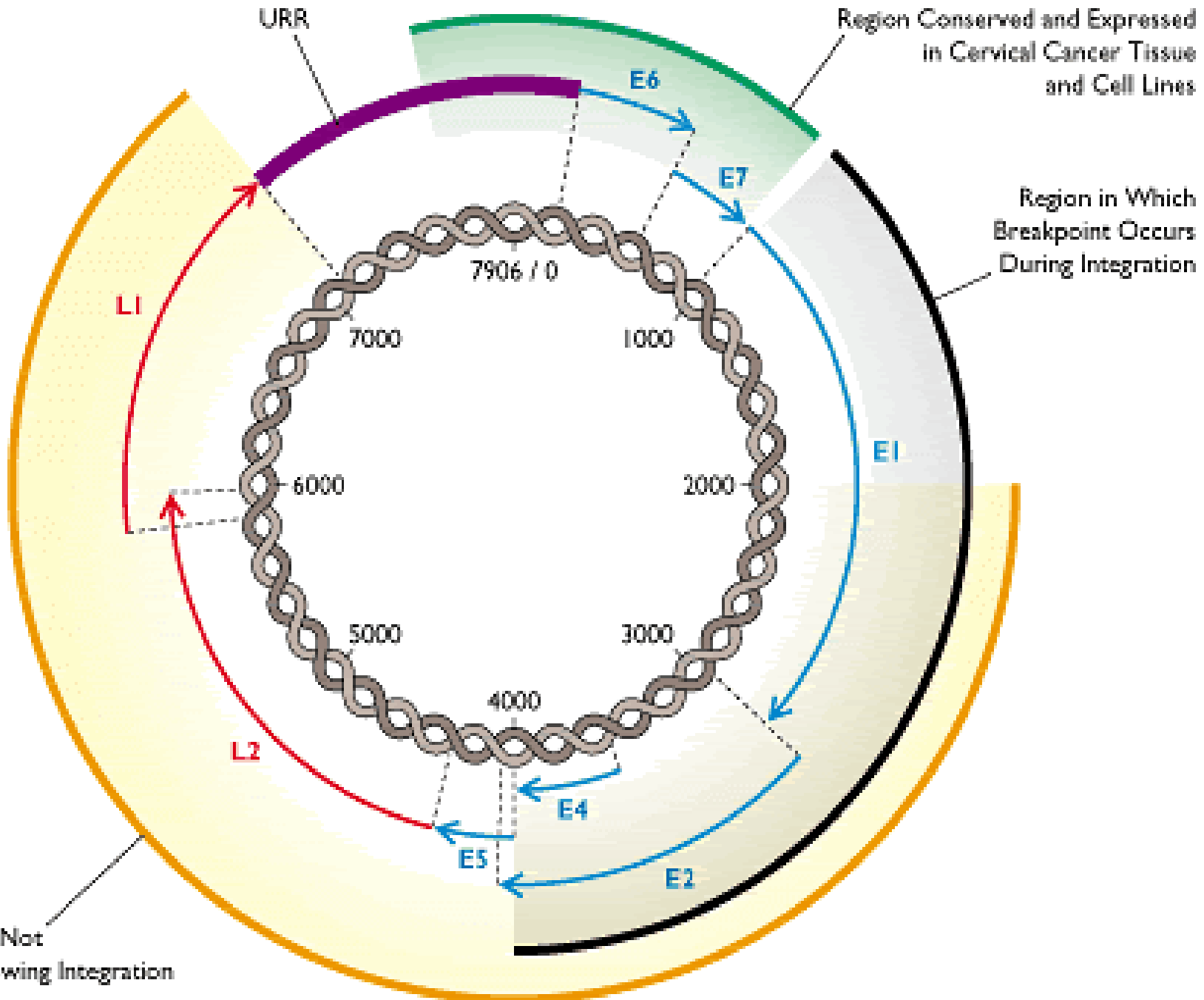
## **E4 και E5:**

Ρύθμιση των όψιμων ιικών λειτουργιών

L1 και L2:

Εκφράζονται κατά την όψιμη φάση και σχηματίζουν τα καψίδια.

Σε μολύνσεις χαμηλού βαθμού το γένωμα των HPV υψηλού κινδύνου είναι σαν επίσωμα ενώ κατά την πρόοδο σε καρκίνωμα ενσωματώνεται στο γένωμα του κυττάρου (συνήθως στο E2 ORF)  $\Rightarrow$  υπερέκφραση των E6 και E7.



Region Lost or Not Expressed Following Integration

Region Conserved and Expressed in Cervical Cancer Tissue and Cell Lines

Region in Which Breakpoint Occurs During Integration

## **Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των HPV**

Δύο κύριοι promoters κατευθύνουν την έκφραση των ORFs των HPV κατά τη διάρκεια των πρώιμων και όψιμων σταδίων του κύκλου ζωής τους.

Τα περισσότερα mRNA τους είναι πολυκιστρονικά και η έκφραση των πρώιμων γονιδίων ρυθμίζεται εν μέρει με το εναλλακτικό μάτισμα.

Ο κύριος promoter (P97) των HPV υψηλού κινδύνου κατευθύνει την μεταγραφή σε σημεία upstream του E6 ORF.

Παράγοντες μεταγραφής που ελέγχουν τον πρώιμο promoter προσδένονται σε μια περιοχή μεγέθους 1Kb που βρίσκεται upstream του E6 ORF και ονομάζεται URR (upstream regulator region).

Κάποιες τέτοιες θέσεις πρόσδεσης είναι κοινές σε όλους τους HPV τύπους ενώ κάποιες άλλες είναι μοναδικές (π.χ η πρόσδεση των Sp-1 και AP-1 παραγόντων upstream των TATA boxes είναι κοινές σε όλους τους HPV).

Η μεταγραφή των όψιμων γονιδίων ενεργοποιείται κατά τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε σημεία έναρξης μέσα στο E7 ORF (P742).



## Λειτουργίες της E6 ογκοπρωτεΐνης

Η E6 είναι περίπου 150 αα και περιέχει δύο περιοχές πρόσδεσης Zn με το μοτίβο Cys-X-X-Cys.

Εντοπίζεται σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα και προσδένεται σε περισσότερες από 12 διαφορετικές πρωτεΐνες εκ των οποίων η πιο σημαντική είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53.

Η p53 ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου όπως της p21 (αναστολέας κινάσης κυκλίνης).

Σε περίπτωση μόλυνσης από HPV υψηλού κινδύνου παρεμποδίζεται η προαποπτωτική δραστηριότητα της p53 με αποτέλεσμα την ακύρωση των G1/S και G2/M σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, την διαιώνιση των DNA βλαβών (όπως χρωμοσωμικοί αναδιπλασιασμοί) και την αυξημένη πιθανότητα καρκινογένεσης.

Η παρεμπόδιση της δράσης της p53 επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης σε αυτήν του συμπλόκου E6-E6AP (λιγάση της ουβικιτίνης) και τη δημιουργία τριμερούς συμπλόκου που οδηγεί σε → ουβικιτινίωση της p53 → αποδόμηση από το 26S πρωτεόσωμα → μείωση του χρόνου ημιζωής της p53 από μερικές ώρες σε λιγότερο από 20min στα κερατινοκύτταρα. Επίσης η E6 έμμεσα μειώνει την δραστικότητα της p53 μέσω αλληλεπίδρασής της με την p300/CBP (συνενεργοποιητής της p53).

Ακόμη η E6 μέσω πρόσδεσής της στους myc παράγοντες → ενεργοποίηση της μεταγραφής της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) → επανενεργοποίηση της hTERT σε σωματικά κύτταρα → απεριόριστες κυτταρικές διαιρέσεις → αθανασία των κυττάρων.

Η αποδόμηση της p53 είναι η πιο σημαντική για τον πλήρη μετασχηματισμό των κυττάρων αλλά και η πρόσδεση στις PDZ και η ενεργοποίηση της hTERT έκφρασης είναι απαραίτητες για την αθανασία τους.

Ο κυρίαρχος ρόλος της E6 στον κύκλο ζωής του ιού δεν είναι ο μετασχηματισμός ή η αθανασία των κυττάρων αλλά η διευκόλυνση της ιικής αντιγραφής.

### **Λειτουργίες της E7 ογκοπρωτεΐνης**

Βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και είναι περίπου 100 αα.

Κύρια δράση της είναι η αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες της οικογένειας Rb.

Η πρόσδεση της E7 στην Rb μεσολαβείται μέσω της περιοχής της CR2 που αποτελεί τη μία από τις τρεις διατηρημένες περιοχές της:

CR1 → στο –NH άκρο της

CR2 → περιέχει μοτίβο LXCXE όπου προσδένεται η Rb.

CR3 → χαρακτηρίζεται από 2 μοτίβα παρόμοια με τα δάκτυλα Zn τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της E7.

### **Λειτουργίες της E7 ογκοπρωτεΐνης**

Βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και είναι περίπου 100 αα.

Κύρια δράση της είναι η αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες της οικογένειας Rb.

Η πρόσδεση της E7 στην Rb μεσολαβείται μέσω της περιοχής της CR2 που αποτελεί τη μία από τις τρεις διατηρημένες περιοχές της:

CR1 → στο –NH άκρο της

CR2 → περιέχει μοτίβο LXCXE όπου προσδένεται η Rb.

CR3 → χαρακτηρίζεται από 2 μοτίβα παρόμοια με τα δάκτυλα Zn τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της E7.

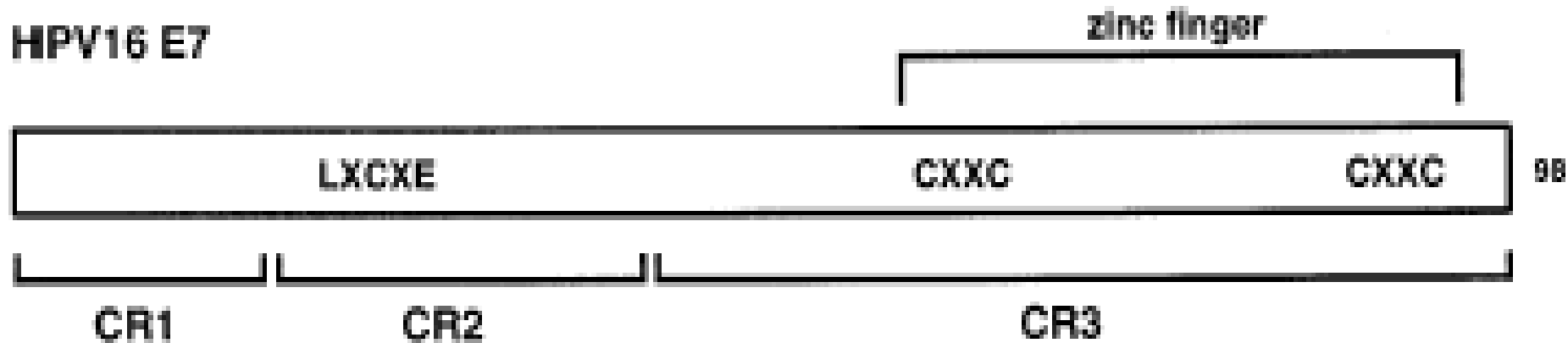
Η Rb παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου.

Στην μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της σχηματίζει σύμπλοκο με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F/DP1 → μέσω στρατολόγησης της HDAC αναστέλλεται η μεταγραφή γονιδίων που ευθύνονται για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου → έξοδος κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο → διαφοροποίηση και τελικά απόπτωση.

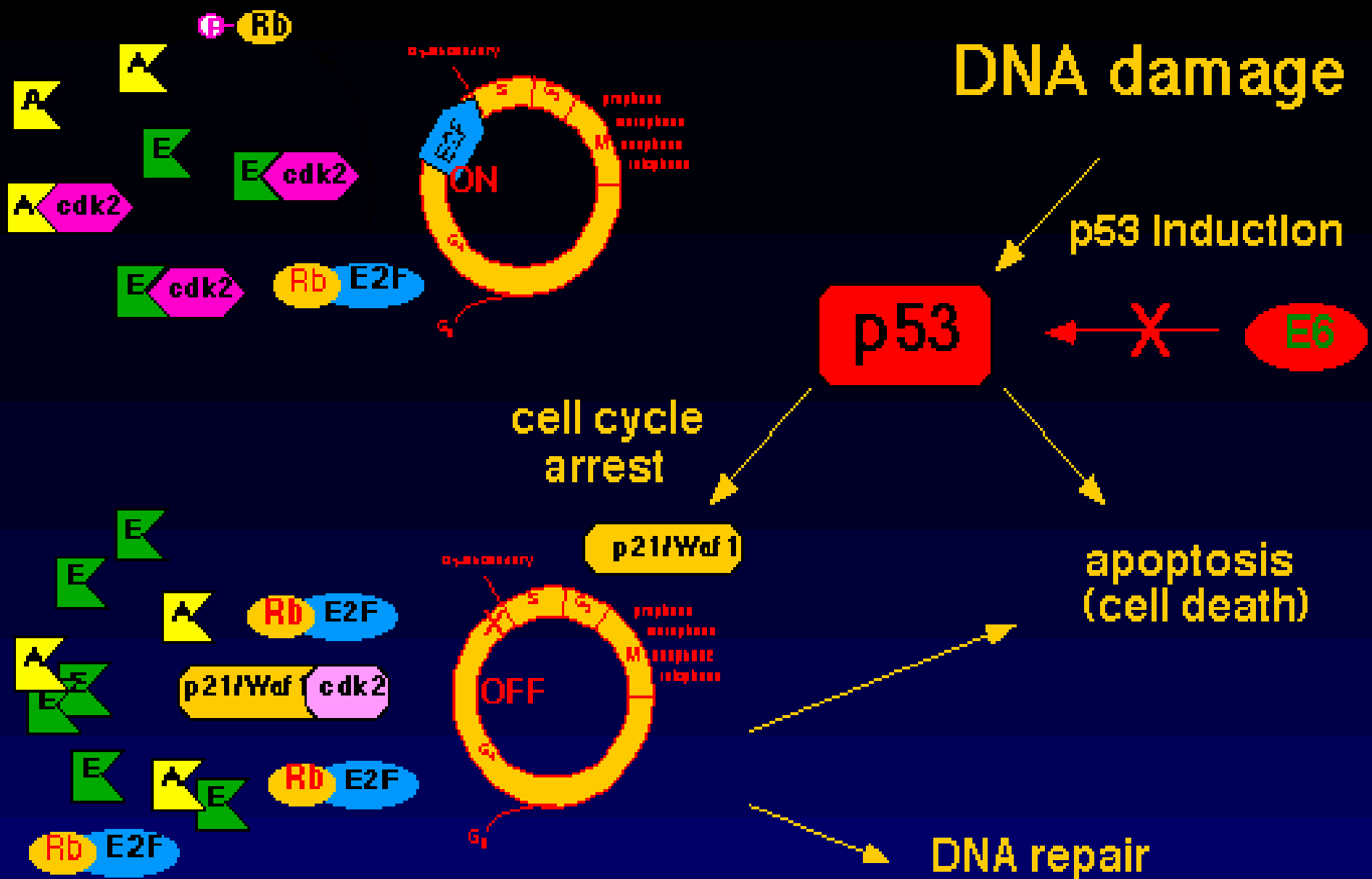
Κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S, η Rb φωσφορυλιώνεται μέσω συμπλόκων κυκλίνης-κινάσης → ελευθέρωση της Rb από το σύμπλοκο → μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την σύνθεση του DNA.

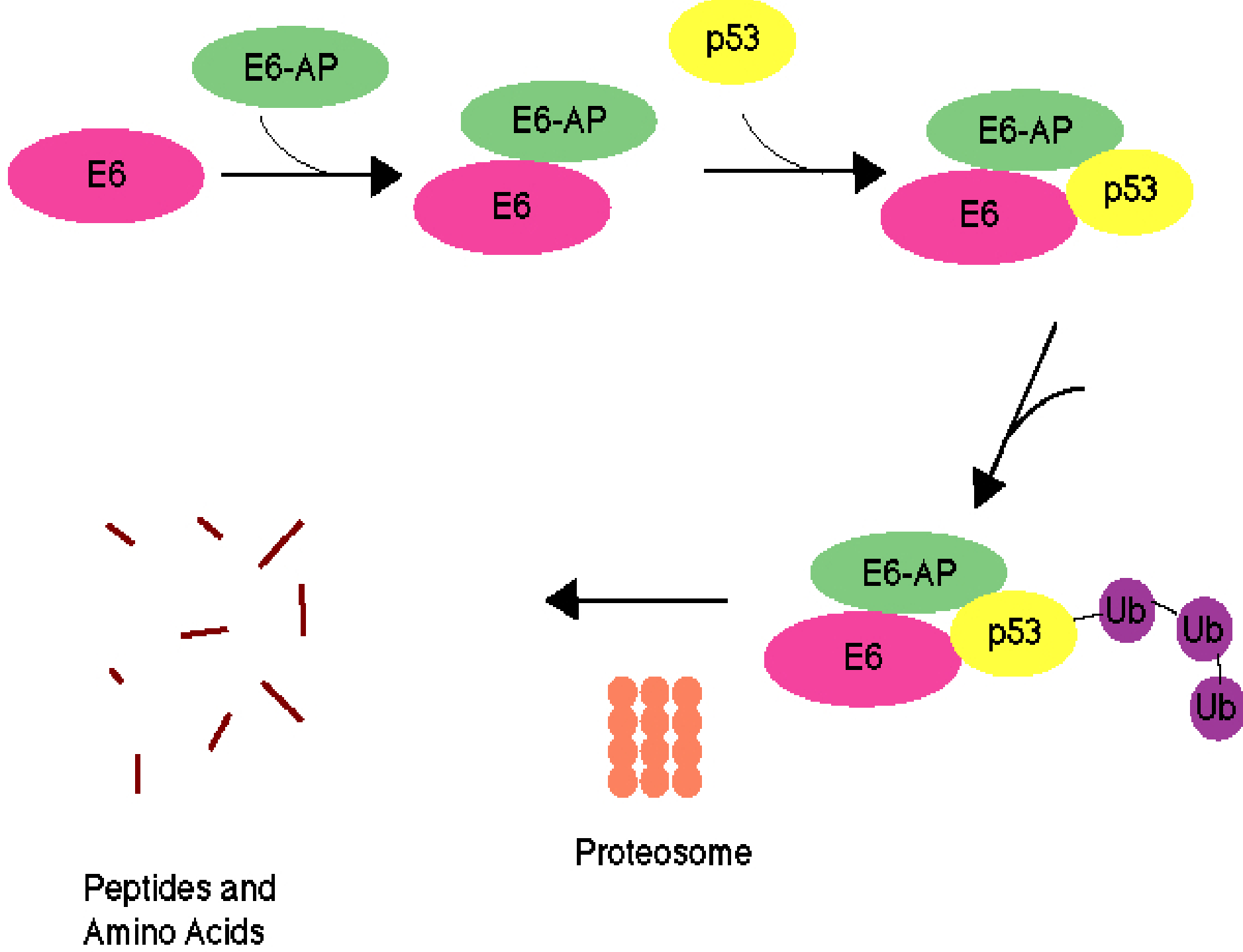
Παρουσία της E7 η Rb απομακρύνεται από σύμπλοκο λόγω πρόσδεσής της στην E7 → συνεχής ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων → συνεχής πρόοδος του κυτταρικού κύκλου → παραγωγικός πολλαπλασιασμός των διαφοροποιημένων κυττάρων των ανώτερων στιβάδων.

**A**



# p53 Mechanisms





Οι E7 των HPV χαμηλού κινδύνου αλληλεπιδρούν επίσης με την Rb αλλά με πολύ μικρότερη συγγένεια λόγω της παρόμοιας αλλά όχι ταυτόσημης αμινοξικής αλληλουχίας της CR2 περιοχής με αυτή των HPV υψηλού κινδύνου.

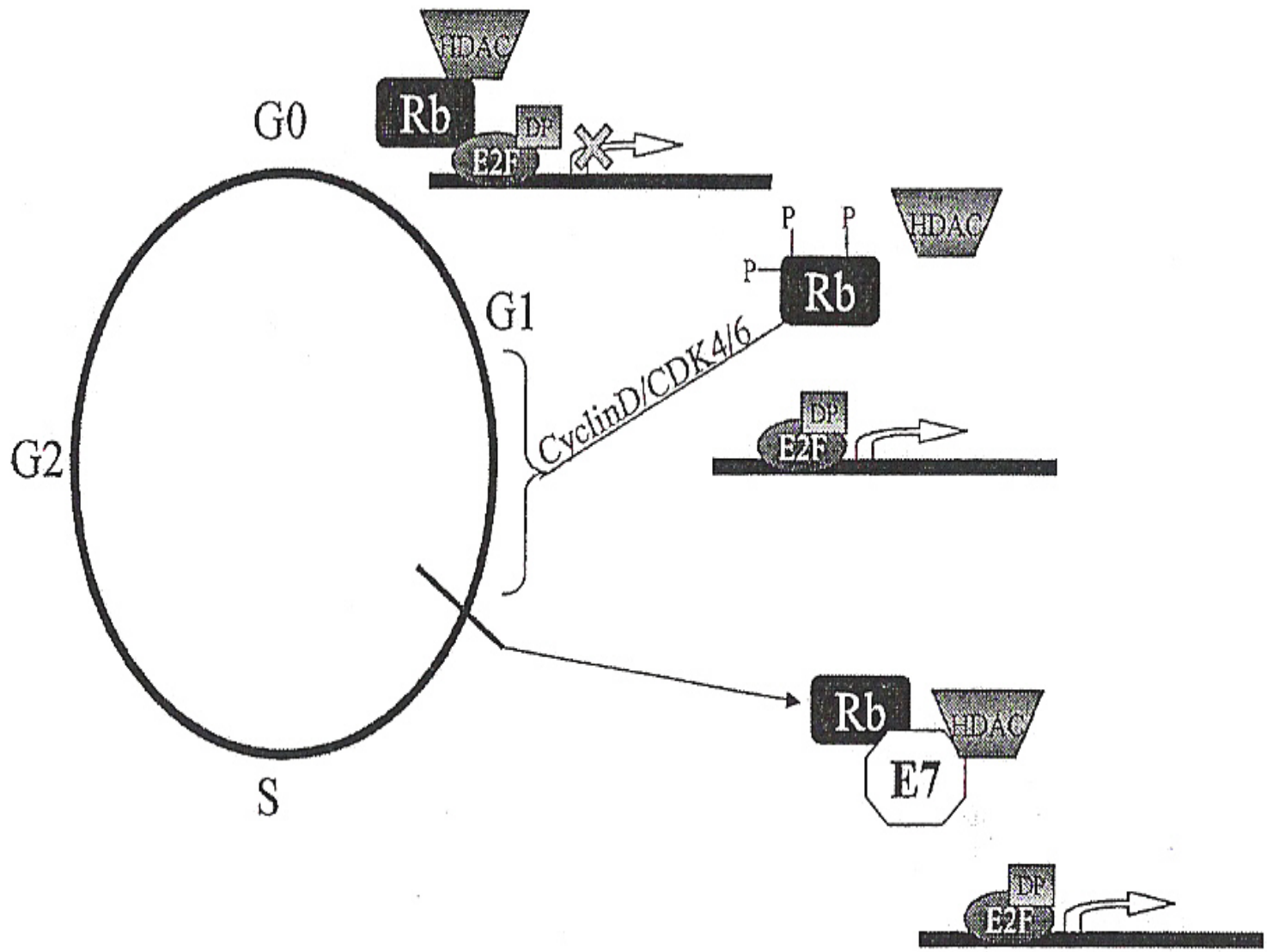
Εκτός των πρωτεϊνών της οικογένειας Rb, οι E7 αλληλεπιδρούν με τις κυκλίνες (A και E) και τους αναστολείς cdk (p21 και p27). Συγκεκριμένα αυξάνουν τα επίπεδα των A και E κυκλινών και μπλοκάρουν την δράση των p21 και p27 με αποτέλεσμα την ενισχυμένη φωσφορυλίωση της Rb και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Μία τρίτη ομάδα πρωτεϊνών που προσδένονται στις E7 είναι οι HDACs (histone deacetylases).

Σε φυσιολογικά κύτταρα η Rb προσδένεται στις HDACs και τις στρατολογεί στους E2F-επαγόμενους promoters. Οι HDACs απομακρύνουν τις ακυλομάδες από τις ιστόνες με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής του. Επίσης αυτό επιτυγχάνεται μέσω απακυλίωσης του E2F και απώλεια της λειτουργίας του.

Παρουσία της E7 των HPV υψηλού κινδύνου, αυτή προσδένεται στις HDACs 1 και 2 ανεξάρτητα της Rb και τις απομακρύνει από την Rb → συνεχής έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων (π.χ του γονιδίου της cdc25 A φωσφατάσης απαραίτητης για την αποφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των cdk).

Η σύνδεση της E7 στις Rb και HDACs είναι σημαντική τόσο για την αθανασία των κυττάρων όσο και για την διατήρηση των επισωμάτων του ιού.



## Λειτουργίες των E1 και E2 πρωτεϊνών

### E1:

Το ORF της E1 είναι το πιο διατηρημένο των HPV.

Η E1 έχει μέγεθος 68 KDa και εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα HPV-θετικά κύτταρα.

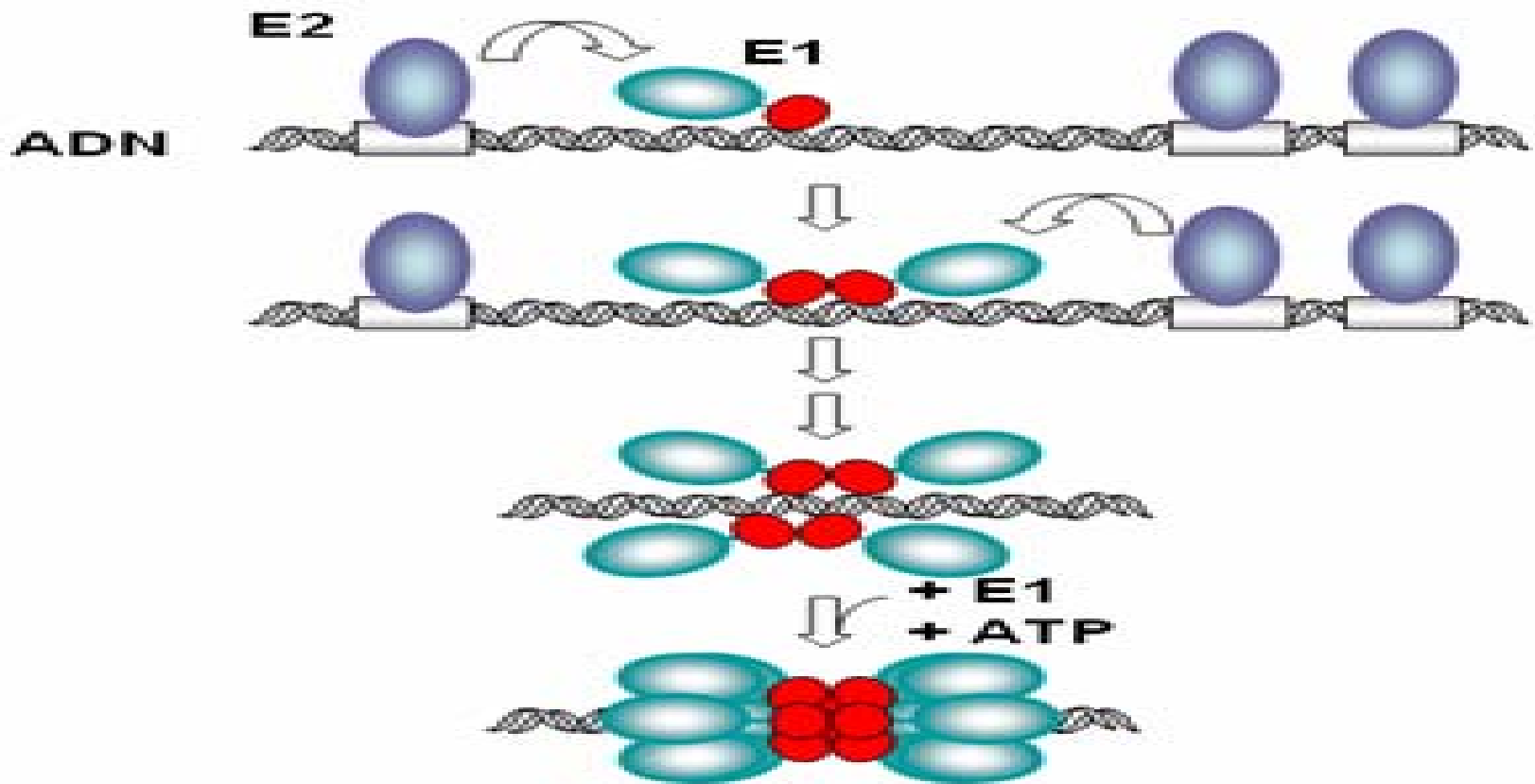
Συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής του ιικού γενώματος και εμφανίζει δράση ATPάσης και 3'-5' ελικάσης.

Προσδένεται αδύναμα στις αλληλουχίες αναγνώρισής της αλλά αυτό διευκολύνεται μέσω σχηματισμού συμπλόκου με την E2.

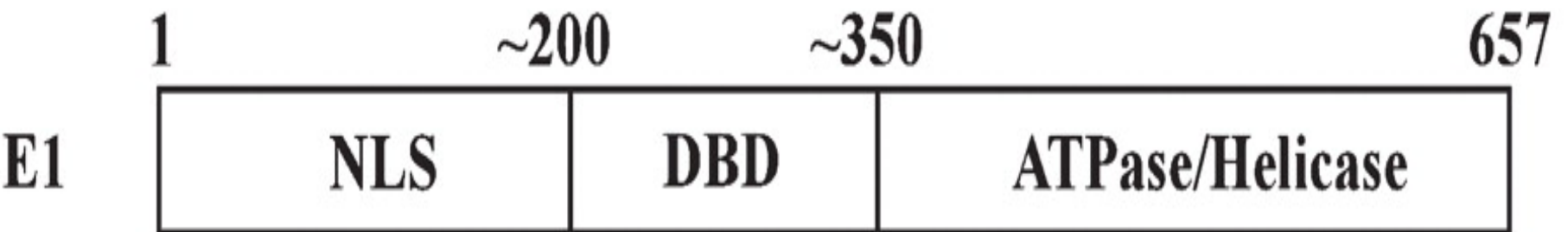
Μόλις η E1 προσδεθεί στο DNA σχηματίζει έναν εξαμερή δακτύλιο διαμέσου του οποίου περνά το DNA του ιού και ξετυλίγεται.

Επίσης η E1 προσδένει την DNA πολυμεράση και βοηθά στην στρατολόγηση και άλλων κυτταρικών συμπλόκων στην αφετηρία έναρξης της αντιγραφής.





Η DBD (DNA binding domain) της E1 χαρακτηρίζεται από μία εκτεταμένη loop και μία α-έλικα τα οποία είναι σημαντικά για την αναγνώριση του DNA. Τέλος, η δραστηριότητα της E1 ρυθμίζεται μέσω αλληλεπίδρασής της με τις κυκλίνες A και E αλλά και μέσω φωσφορυλίωσής της από cdk's σε 4 εξειδικευμένες θέσεις της.



## E2:

Η E2 έχει μέγεθος 50 KDa λειτουργεί ως διμερές συμμετέχοντας τόσο στην αντιγραφή του ιικού DNA όσο και στην ρύθμιση της μεταγραφής.

Το –COOH άκρο της κωδικοποιεί για μία DBD η οποία αποτελείται από μία διμερή δομή β-βαρελιού ενώ το –NH<sub>2</sub> άκρο της φέρει μια περιοχή trans-ενεργοποίησης.

Κατά την μόλυνση από HPV, η μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων αρχικά ενεργοποιείται μέσω πρόσδεσης κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων στην URR περιοχή.

Η μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων ενισχύεται περαιτέρω παρουσία χαμηλών συγκεντώσεων της E2 ενώ αντίθετα καταστέλλεται παρουσία υψηλών συγκεντώσεων της E2.

Αυτή η ρύθμιση της μεταγραφής συμβάλλει στον έλεγχο του αριθμού των ιικών αντιγράφων στα αδιαφοροποίητα κύτταρα της βασικής στιβάδας.

Στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ανώτερων στιβάδων του επιθηλίου, συμβαίνει μια μετάβαση της έκφρασης από τον πρώιμο στον όψιμο επαγωγέα ο οποίος δεν καταστέλλεται από την E2 οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση των E1 και E2 και συνεπώς σε ενίσχυση του ιικού DNA.



## Λειτουργίες των E1^E4 και E5 πρωτεϊνών

Οι E4 και E5 πρωτεΐνες εκφράζονται κατά την πρώιμη φάση αλλά σε πολύ μικρά ποσά λόγω της θέσης των ORF στα πρώιμα mRNA (3ο και 4ο ORF).

Αντίθετα, στα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα οι E4 και E5 εκφράζονται σε μεγάλα ποσά (1ο και 2ο αντίστοιχα ORF) στα όψιμα mRNA.

Επειδή όμως από το E4 ORF απουσιάζει το κωδικόνιο AUG χρησιμοποιείται η αρχική αλληλουχία της E1 για την έναρξη της, με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πρωτεΐνης σύντηξης E1^E4.



E6, E7, E1^E4, E5



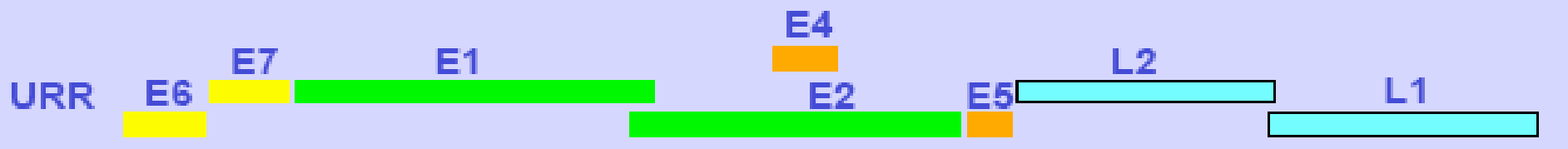
E1^E4, E5

Οι E1^E4 των HPV υψηλού κινδύνου αλληλεπιδρούν με δίκτυα κερατίνης στα κύτταρα και όταν υπερεκφράζονται επάγουν την καταστροφή τους.

Οι E5 είναι μικρές υδροφώβες πρωτεΐνες που εντοπίζονται κυρίως στις ενδοσωμικές μεμβράνες και σε αυτές του Golgi.

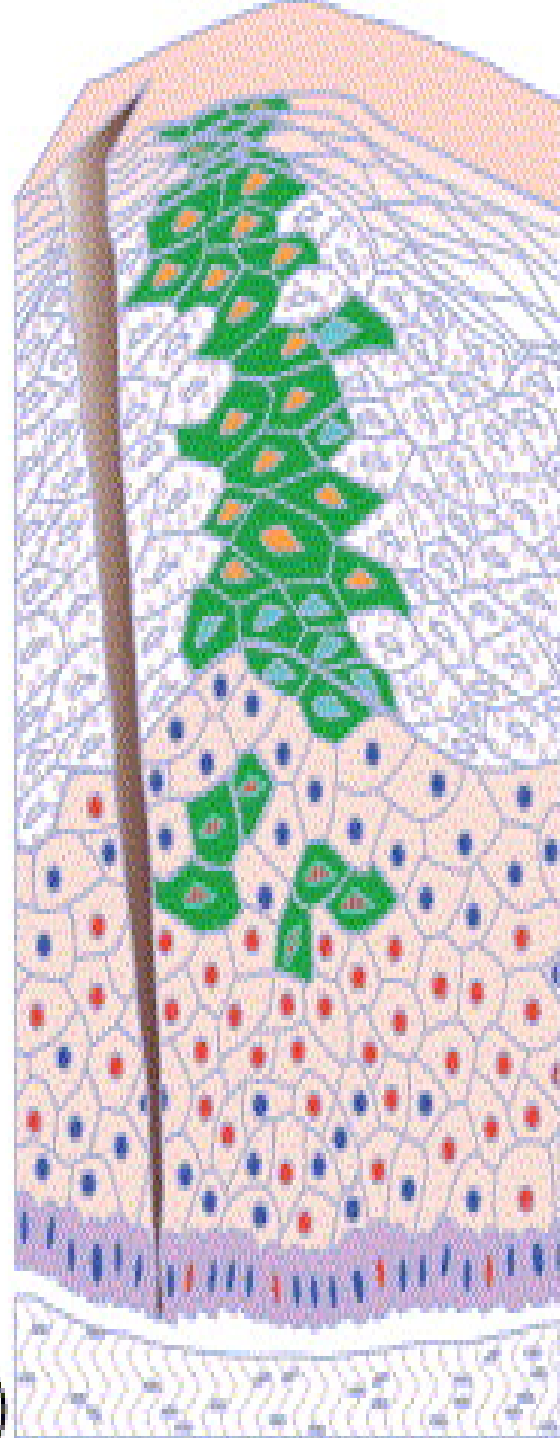
Η ακριβής λειτουργία της E5 δεν έχει εξακριβωθεί αλλά έχει προταθεί ότι η E5 παίζει ρόλο στο μετασχηματισμό των κυττάρων μέσω πρόσδεσης της στον υποδοχέα του EGF.

## HPV Genome Organization



- URR:** Up-stream regulatory region, viral replication origin and differentiation-dependent transcription enhancer/promoter
- E6:** Inactivation and degradation of host p53 through ubiquitin ligase E6AP; up-regulation of telomerase
- E7:** Inactivation of pRb, with reactivation of cellular replication machinery and S phase progression in differentiated cells
- E1:** DNA helicase for viral DNA replication, interacts with E2 and together they recruit cellular replication proteins to origin
- E2:** Origin recognition protein; spindle fiber interaction & DNA segregation; regulation of URR promoter
- E4:** Association with cytoskeleton; can stall cells in G2 phase
- E5:** Transmembrane protein; enhancement of EGF receptor recycling & signal transduction; modulation of protein trafficking
- L2, L1:** Minor and major viral capsid proteins

(A)



p97



E6, E7, (E1, E2, E4, E5)

p670



E4, (E2, E1, E5)

Viral DNA



L2, L1

E7

E7/E4

E4

E4  
E4/L1

(B)



S-phase competent



Viral DNA

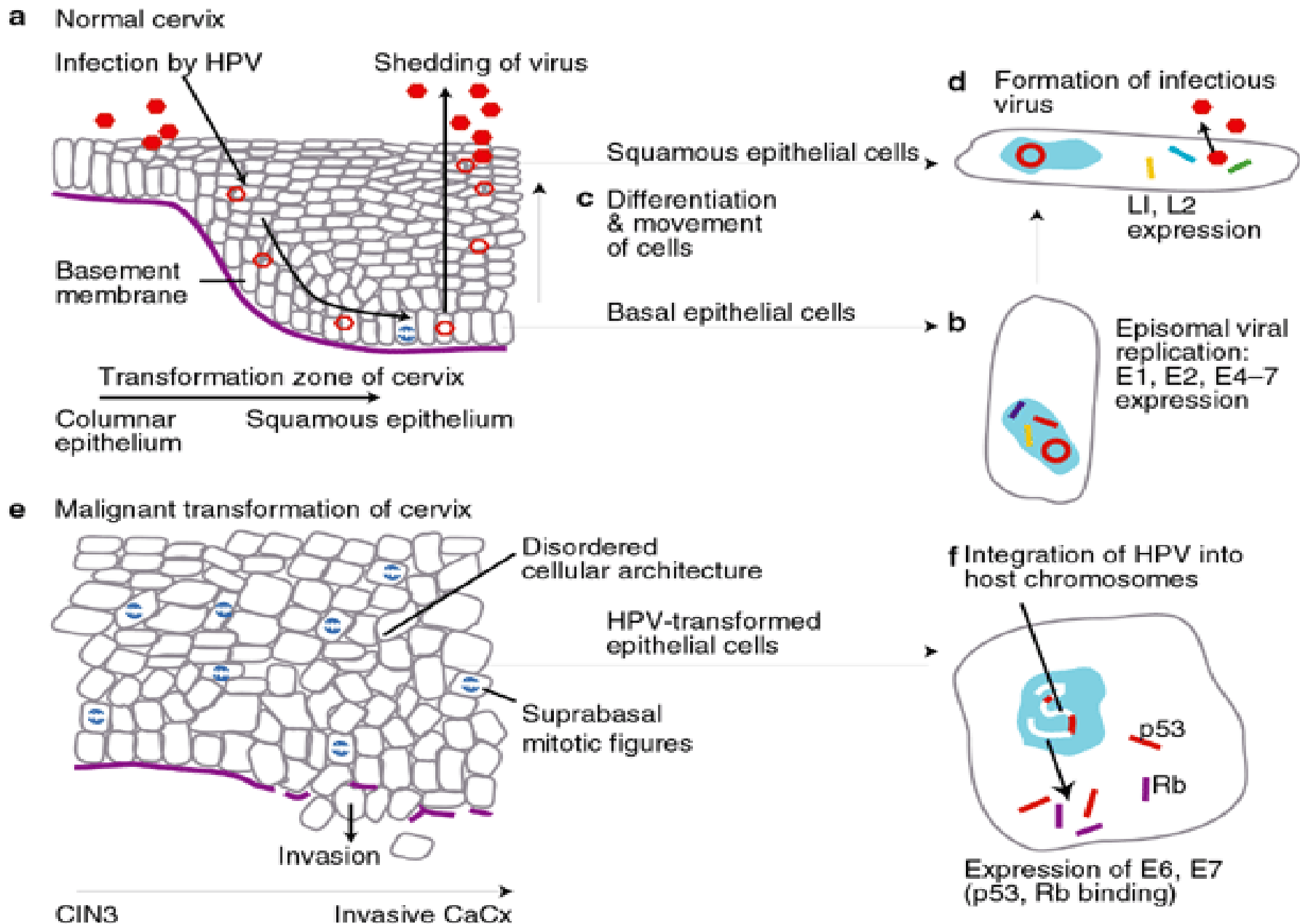
Genome Maintenance

Proliferation

Genome Amplification

Packaging

Virus Release



## Ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες pRb και p53

### Αλληλεπιδράσεις με τις ιϊκές ογκοπρωτεΐνες E6 και E7

Η ογκοπρωτεΐνη E7 του HPV-16 συνδέεται με την πρωτεΐνη του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (pRb), ενώ η ογκοπρωτεΐνη E6 των ιών HPV-16 και -18 με την p53.

Αξίζει να τονισθεί ότι η πρωτεΐνη E7 των ιών HPV, τόσο των ιών υψηλής όσο και των χαμηλής επικινδυνότητας, συνδέεται με την πρωτεΐνη Rb, όμως η συγγένεια πρόσδεσης διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του ιού HPV.

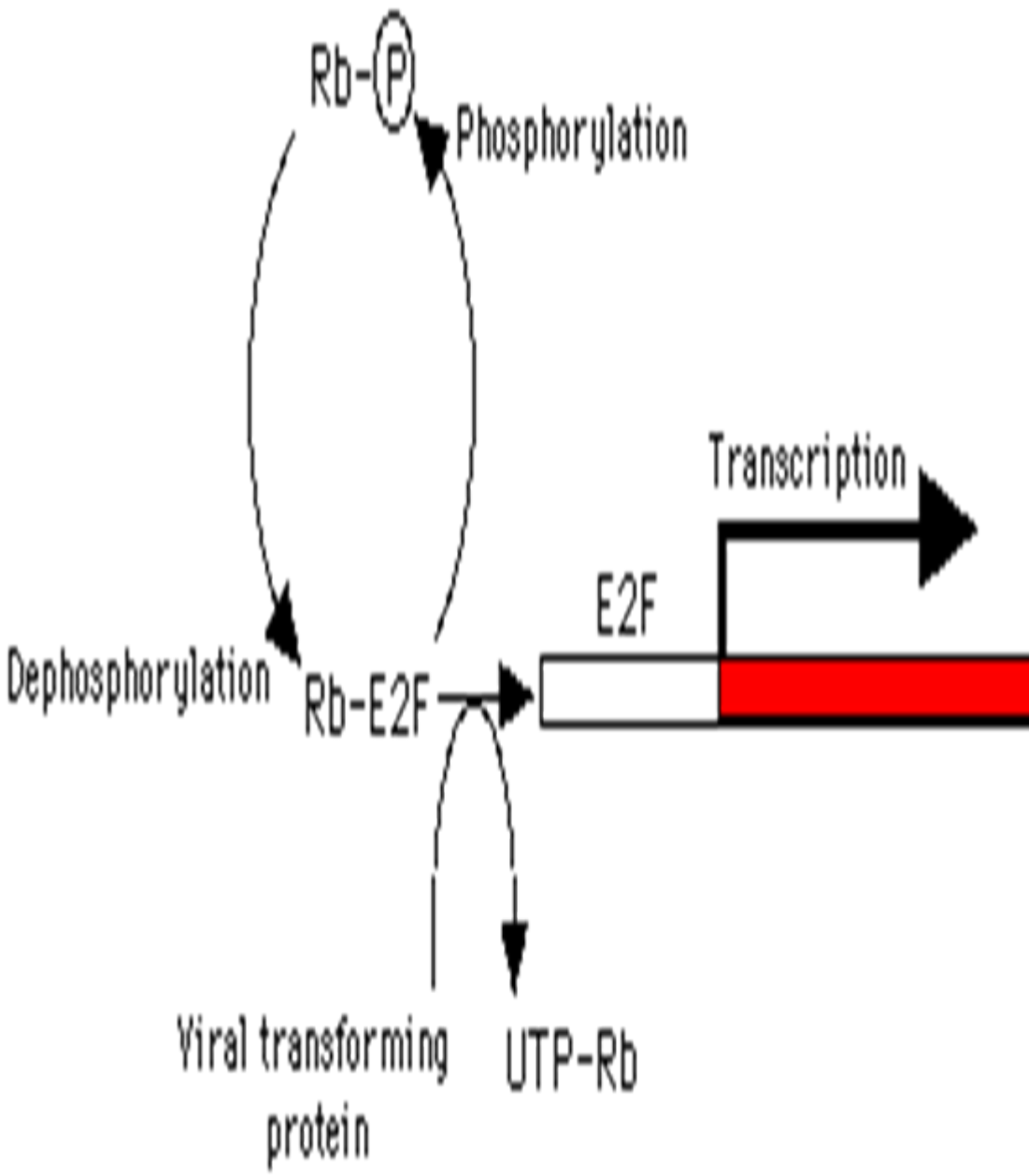
Η πρωτεΐνη E7 των τύπων -6 και -11 έχει αντίστοιχα 20 και 5 φορές μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με την E7 των ιών του τύπου -16 και -18.

### Πιο συγκεκριμένα:

**α) Απουσία ιού HPV.** Στη φάση G1 η πρωτεΐνη pRb η οποία δεν είναι φωσφορυλιωμένη, συνδέεται με τον παράγοντα E2F, εμποδίζοντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον παράγοντα αυτό. Με τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb υπό την επίδραση κινασών, έχουμε αποδέσμευση του συμπλόκου pRb-E2F. Ο παράγοντας E2F μπορεί πλέον να εξασφαλίσει την μεταγραφική δραστηριότητα και την έκφραση των γονιδίων που ελέγχει στη φάση S

**β) Παρουσία ιού HPV.** Η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τη μη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη pRb, αναιρώντας έτσι την αρνητική επίδραση της pRb στη μεταγραφική δραστηριότητα του E2F. Με το πέρασμα του κυττάρου στη φάση S και τη φωσφορυλίωση της pRb, επέρχεται απελευθέρωση της E7 από την pRb. Οι ελεύθερες τώρα E7 συνδέονται με την πρωτεΐνη p107, εμποδίζοντας την αδρανοποίηση του παράγοντα E2F από την p107 στη φάση G2. Η πλήρης απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι αποτέλεσμα της συνεχιζόμενης άκαιρης δράσης (στη φάση G2) του μεταγραφικού παράγοντα E2F.





**β) Παρουσία ιού HPV.** Η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τη μη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη pRb, αναιρώντας έτσι την αρνητική επίδραση της pRb στη μεταγραφική δραστηριότητα του E2F. Με το πέρασμα του κυττάρου στη φάση S και τη φωσφορυλίωση της pRb, επέρχεται απελευθέρωση της E7 από την pRb. Οι ελεύθερες τώρα E7 συνδέονται με την πρωτεΐνη p107, εμποδίζοντας την αδρανοποίηση του παράγοντα E2F από την p107 στη φάση G2. Η πλήρης απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι αποτέλεσμα της συνεχιζόμενης άκαιρης δράσης (στη φάση G2) του μεταγραφικού παράγοντα E2F.

### **Ενσωμάτωση του ιϊκού DNA του HPV στο κυτταρικό γονιδίωμα**

Ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV σ' αυτό του κυττάρου- ξενιστή παρατηρείται σε περιπτώσεις καρκίνου. Αυτό είναι σύμφωνο και με το μοντέλο καρκινικού μετασχηματισμού που ισχύει για τη δράση των DNA ογκογόνων ιών. Αντίθετα σε προκαρκινωματώδεις βλάβες συνήθως ο ιός βρίσκεται σε επισωματική κατάσταση. Η ενσωμάτωση του ιού στο κυτταρικό γονιδίωμα προκαλεί γονιδιακή απορύθμιση όπως άλλωστε παρατηρείται στους καρκίνους. Έχουμε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων E6 και E7 λόγω της διαταραχής των περιοχών ORF E1 ή E2 (οι οποίες ασκούν κατασταλτική δράση στις ORF E6 και E7) στους HPV υψηλής επικινδυνότητας. Συνεπώς η ενσωμάτωση οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 με αποτέλεσμα την ειδική σύνδεσή τους με τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRb και τελικό επακόλουθο τον κυτταρικό μετασχηματισμό .

**Οι αδενοϊοί** απομονώθηκαν αρχικά από αδενοειδείς εκβλαστήσεις (adenoids) ανθρώπου. Παρόμοιοι ιοί έχουν απομονωθεί και από άλλα θηλαστικά. Αποτελούν μια μεγάλη ομάδα συγγενικών ιών, με >80 διαφορετικά μέλη. Οι ανθρώπινοι αδενοϊοί, που είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι, προκαλούν ασθένειες του αναπνευστικού και μπορούν να μολύνουν ευρύ φάσμα κυττάρων από διαφορετικά είδη. Τα ανθρώπινα κύτταρα επιτρέπουν ολοκληρωμένη μόλυνση από αδενοϊούς, οι οποίοι αντιγράφονται και αναπαράγονται μέσα στο μολυσμένο κύτταρο. Αντίθετα, τα κύτταρα κάποιων τρωκτικών δεν επιτρέπουν πλήρη μόλυνση και αναπαραγωγή του ιού και έτσι μετασχηματίζονται. Το γονιδίωμα των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν από αδενοϊούς έχει αποκτήσει ένα τμήμα από την πρώιμη ιική περιοχή, η οποία φέρει τα γονίδια E1A και E1B που κωδικοποιούν αρκετές πυρηνικές πρωτεΐνες.

Η πρωτεΐνη E1A είναι ένας ρυθμιστής της μεταγραφής των πρώιμων γονιδίων του αδενοϊού. Όπως το T-αντιγόνο έτσι και η E1A πρωτεΐνη προσδένεται στο Rb, αδρανοποιώντας το ρυθμιστικό αποτέλεσμα αυτής της πρωτεΐνης, επιτρέποντας την αντιγραφή του ιικού DNA. Η πρωτεΐνη E1B προσδένεται στην p53 και ενισχύει τις επιδράσεις της E1A.

Το συνδυασμένο αποτέλεσμα των δυο αυτών πρωτεϊνών γίνεται ορατό στον φαινότυπο των κυττάρων τα οποία μέσω διαλοίμωξης έχουν δεχθεί και τα δύο γονίδια. Η έκφραση μόνο του γονιδίου E1A οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Η έκφραση των γονιδίων της E1A και της E1B μαζί επιτρέπουν στα μετασχηματισμένα κύτταρα να επιζήσουν και να πολλαπλασιασθούν.

**Ο Epstein-Barr (EBV)** είναι ένας ανθρώπινος ερπητοϊός που σχετίζεται με διάφορες ασθένειες, μεταξύ των οποίων, την λοιμώδη μονοπυρήνωση (infectious mononucleosis), τον καρκίνο του ρινοφάρυγγα (nasopharyngeal carcinoma), το αφρικανικό λέμφωμα Burkitt (African Burkitt lymphoma) και άλλες λεμφοϋπερπλαστικές παθήσεις (lymphoproliferative disorders). Τα ανθρώπινα Β λεμφοκύτταρα μπορούν να μολυνθούν *in vitro* και καθίστανται αθάνατα. Μολονότι το ιικό DNA ανιχνεύεται σε μετασχηματισμένα κύτταρα, δεν είναι ξεκάθαρο αν γίνεται ενσωμάτωση στο χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου, ενώ παραμένει αδιευκρίνιστο ποια ακριβώς ιικά γονίδια είναι απαραίτητα για το μετασχηματισμό.

Υπάρχουν πλέον επιδημιολογικά και / ή μοριακά στοιχεία ότι η μόλυνση από τον ιό EBV σχετίζεται με την πρόκληση τουλάχιστον πέντε όγκων στον άνθρωπο :

#### Λέμφωμα Burkitt

Καρκίνος του ρινοφάρυγγα (Nasopharyngeal carcinoma - NPC), ένας κακοήθης όγκος που παρατηρείται συχνότερα στην ΝΑ Ασία . Υπάρχει μια ισχυρότατη σύνδεση μεταξύ του ιού EBV και του NPC: ο ιός ανιχνεύεται σε όλους τους όγκους του NPC.

Περιβαλλοντικοί και διατροφικοί παράγοντες, όπως η κατανάλωση νιτροσο-αμινών (nitrosamines) μέσω της κατανάλωσης μεγάλων ποσοτήτων παστών ψαριών , πιστεύεται ότι εμπλέκονται επίσης στο σχηματισμό του NPC.

Λέμφωμα Β-κυτταρικού τύπου σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (π.χ. ασθενείς με AIDS)

Σε μερικές μορφές του λεμφώματος Hodgkin.

Το Χ-συνδεόμενο λεμφοπαραγωγικό σύνδρομο (XLP-κληρονομούμενη ασθένεια η οποία συνδέεται με το χρωμόσωμα Χ ), μια σπάνια ασθένεια που συνήθως παρατηρείται σε άρρενες όπου η μόλυνση από τον ιό EBV οδηγεί σε μια υπερ-ανοσο απάντηση που μερικές φορές προκαλεί καρκίνο των λεμφαδένων.

## **Συσχέτιση μεταξύ του ιού EBV και του λεμφώματος Burkitt .**

Ο EBV αθανατοποιεί ένα σημαντικό πληθυσμό Β λεμφοκυττάρων. Ταυτοχρόνως, η μαλάρια προκαλεί μείωση των Τ-λεμφοκυττάρων με συνέπεια την πολυκλωνική διέργεση των Β λεμφοκυττάρων. Οι περισσότεροι όγκοι λεμφώματος Burkitt περιέχουν μετατοπίσεις οι οποίες περιλαμβάνουν το χρωμόσωμα 8 το οποίο φέρει το γονίδιο *c-myc*. Πρόκειται για ανταλλαγές τμημάτων ανάμεσα στο χρωμόσωμα 8 (περιοχή όπου βρίσκεται το πρωτο-ογκογονίδιο *c-myc*) και στα χρωμοσώματα 14, 2 ή 22 (όπου βρίσκονται τα γονίδια για την παραγωγή των βαρειών και ελαφρών αλυσίδων κ και λ των ανοσοσφαιρινών αντίστοιχα). Όταν το *c-myc* μετατοπίζεται στον τόπο *Ig*, το επίπεδο της έκφρασής του αυξάνεται. Η αύξηση μπορεί να κυμαίνεται από 2 έως 10 φορές και ποικίλλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών όγκων. Η μετατόπιση έχει δύο συνέπειες. Πρώτον, το *c-myc* μεταφέρεται σε μια νέα περιοχή, στην οποία το γονίδιο *Ig* εκφραζόταν ενεργά. Δεύτερον, η ίδια η δομή του γονιδίου *c-myc* μπορεί να αλλάξει με τη μετατόπιση (συνήθως χωρίς να αλλάξουν οι κωδικές περιοχές).

Η συνεχής υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης *c-myc*, είτε λόγω προσθήκης είτε λόγω μετατόπισης, είναι ογκογόνος, γιατί εμποδίζει τα ανώριμα λεμφοκύτταρα να διαφοροποιηθούν σε ώριμα Β κύτταρα. Τα κύτταρα παραμένουν αδιαφοροποίητα και συνεπώς συνεχίζουν να διαιρούνται.

**Ο ιός της Ηπατίτιδας Β (HBV)** ο οποίος προκαλεί ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Η ηπατίτιδα είναι μια φλεγμονή του ήπατος. Η μόλυνση από τον ιό HBV συνήθως συμβαίνει μέσω μεταγγίσεων, μεταμοσχεύσεων οργάνων, μέσω της χρήσης κοινών συρίγγων (μεταξύ των ενδοφλέβιων χρηστών ναρκωτικών) κλπ. Ο ιός μεταδίδεται επίσης σεξουαλικά και από την μητέρα στο έμβryo.

Ο ιός HBV δεν αναπτύσσεται σε κυτταροκαλλιέργεια γεγονός που έχει παρεμποδίσει τις έρευνες της παθογένεσης του ιού.

Η μόλυνση με τον ιό μπορεί να οδηγήσει σε :

Μια οξεία λοίμωξη που ακολουθείται από ανάρρωση και ανοσία έναντι επαναμόλυνσης (>90% των περιπτώσεων).

Ιδιαίτερα επιθετική ηπατίτιδα, που αναπτύσσεται γρήγορα, διαρκεί για μικρό χρονικό διάστημα, προκαλώντας ηπατική ανεπάρκεια με ρυθμό θνησιμότητας που προσεγγίζει περίπου 90% (<1% των περιπτώσεων).

Χρόνια μόλυνση, όπου στον ασθενή εγκαθιδρύεται μια κατάσταση «φορέα» για τον ιό (περίπου 10% των περιπτώσεων).

Περίπου το 5% του παγκόσμιου πληθυσμού είναι φορείς του ιού HBV. Όλοι αυτοί οι χρόνια φορείς του ιού παρουσιάζουν 100-200 φορές υψηλότερο κίνδυνο σε σχέση με τους μη φορείς για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Ο HCC είναι ένας σπάνιος όγκος στις αναπτυγμένες χώρες, όπου αντιπροσωπεύει το <2% των θανατηφόρων περιστατικών καρκίνου. Στις περισσότερες περιπτώσεις HCC στην Δύση είναι περιπτώσεις που συσχετίζονται με την κύρωση του ήπατος λόγω αλκοολισμού. Στην ΝΑ Ασία και στην Κίνα, ο HCC είναι ο πιο κοινός θανατηφόρος καρκίνος, προκαλώντας περίπου ένα εκατομμύριο θανάτους ετησίως.

Πιθανοί τρόποι με τους οποίους ο ιός προκαλεί τον σχηματισμό του όγκου:  
άμεση δραστηριοποίηση ενός κυτταρικού ογκογονιδίου ή ογκογονιδίων ( π.χ. c-myc)  
trans-ενεργοποίηση ενός κυτταρικού ογκογονιδίου ή ογκογονιδίων ή εμμέσως μέσω  
κάποιου άλλου μηχανισμού όπως π.χ. ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA κλπ. .

Θα μπορούσε να ισχυρισθεί κανείς ότι η χρόνια καταστροφή του ήπατος ( χρόνια  
λοίμωξη–εμμένουσα μόλυνση) επιφέρει την αναπαραγωγή του ιστού του ήπατος και ότι  
ελαττωματικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA οδηγούν τελικώς σε κακοήθη  
κυτταρικό μετασχηματισμό.

Άλλοι ιοί οι οποίοι προκαλούν χρόνια ηπατίτιδα, όπως ο **ιός της ηπατίτιδας C (HCV-  
flavivirus)**, επίσης συσχετίζονται με το HCC μετά από μια μακρά λανθάνουσα περίοδο.

**Οι ρετροϊοί (retroviruses) διαφέρουν από τους ογκογόνους DNA ιούς στο ότι μπορούν να διαβιβάσουν γενετικές πληροφορίες τόσο οριζόντια όσο και κάθετα. Η οριζόντια διαβίβαση επιτυγχάνεται με τη συνήθη διαδικασία της ιικής μόλυνσης, κατά την οποία μολύνεται εκ νέου ολοένα μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων μέσα στον ίδιο ξενιστή ή σε νέους ξενιστές. Η κάθετη διαβίβαση συντελείται κάθε φορά που ο ιός ενσωματώνεται στην αναπαραγωγική σειρά (germline) ενός οργανισμού και έτσι κληρονομείται ως ενδογενής προϊός (endogenous provirus) με μεντελικό τρόπο. Στον κύκλο ζωής των ρετροϊών, το RNA μεταγράφεται αντίστροφα σε μονόκλωνο DNA, στη συνέχεια μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA και τελικά ενσωματώνεται στο γονιδίωμα, όπου μπορεί να μεταγραφεί εκ νέου σε μολυσματικό RNA. Η ενσωμάτωση στο γονιδίωμα αφενός είναι προϋπόθεση για την κάθετη μεταβίβαση του προϊού, αφετέρου οδηγεί στην παραγωγή ρετροϊικών σωματίων που συνεχίζουν την οριζόντια μόλυνση. Η ενσωμάτωση είναι δηλαδή ένα φυσιολογικό στάδιο του κύκλου ζωής κάθε ρετροϊού, είτε είναι μετασχηματιστικός είτε όχι.**



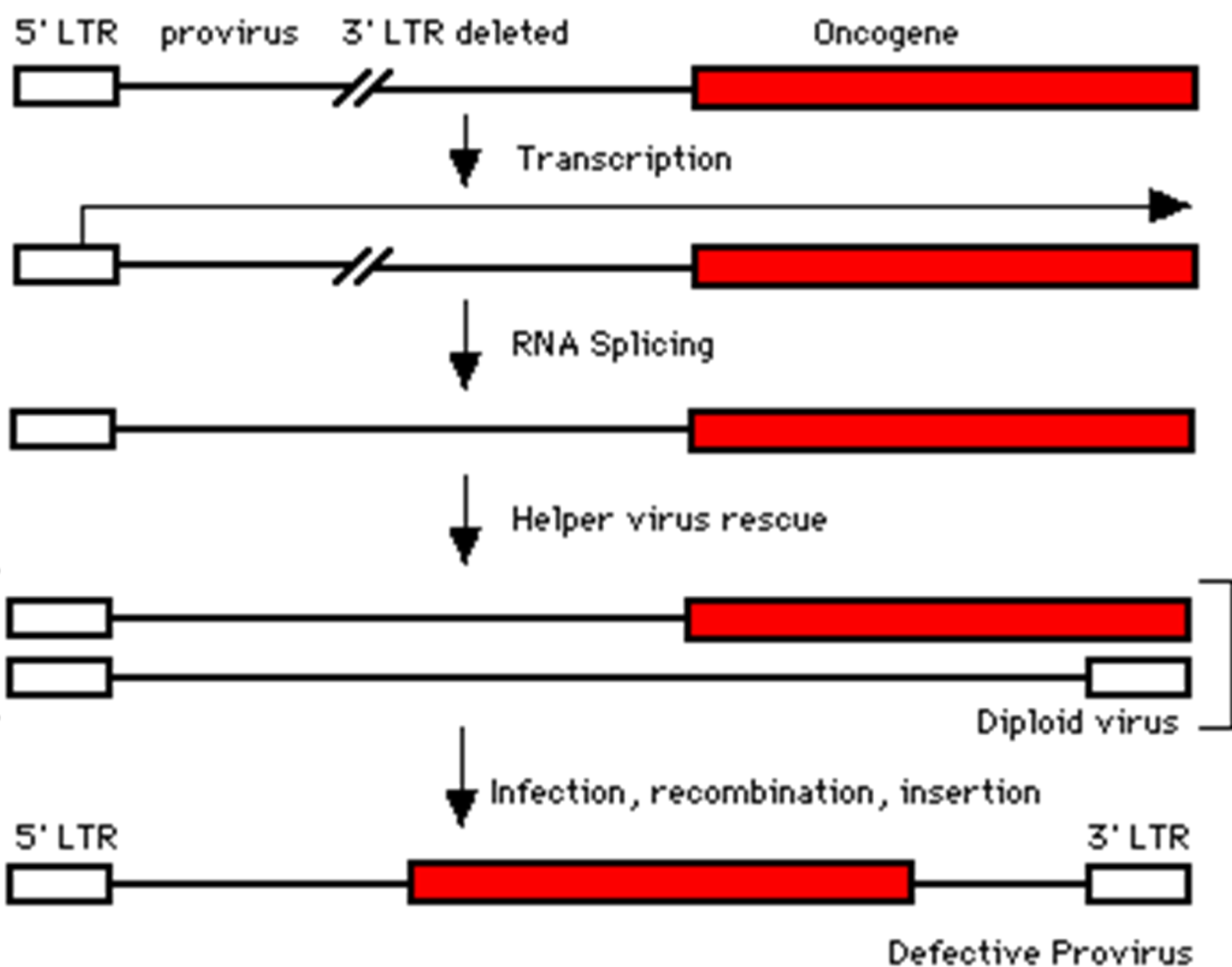
Οι μη ελαττωματικοί ιοί (nondefective viruses). **Η ογκογονικότητά τους δεν βασίζεται σε ιικά ογκογονίδια αλλά στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν ένα ή περισσότερα κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια.** Χαρακτηρίζονται από μακρά λανθάνουσα περίοδο και συχνά σχετίζονται με την επαγωγή λευχαιμίας. Δύο κλασικά παραδείγματα είναι ο FeLV (**Feline Leukemia Virus**, ιός της λευχαιμίας των γάτων) και ο MMTV (**Mouse Mammary Tumor Virus**, ιός των όγκων του μαστού ποντικών).

Η ογκογονικότητα των **ιών οξέος μετασχηματισμού** (acute transforming viruses) **βασίζεται σε ένα κυτταρικό ογκογονίδιο το οποίο έχουν αποσπάσει από τον ξενιστή τους με το φαινόμενο της μεταγωγής (transduction) κατά τη διάρκεια ενός μολυσματικού κύκλου.** Συνήθως τέτοιοι ιοί επιφέρουν το σχηματισμό όγκων *in vivo* σχετικά γρήγορα και μπορούν να μετασχηματίσουν καλλιέργειες κυττάρων *in vitro*. Δεδομένου ότι κάθε ιός οξέος μετασχηματισμού εξειδικεύεται σε ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρων-στόχων, αυτοί οι ιοί χωρίζονται σε κατηγορίες σύμφωνα με τον τύπο του όγκου που προκαλούν στα ζώα: λευχαιμία, σάρκωμα, καρκίνωμα κτλ.

Όταν ένας ρετροϊός αποσπά ένα κυτταρικό γονίδιο του ξενιστή ανταλλάσσοντας μέρος της δικής του ιικής αλληλουχίας με κυτταρικές αλληλουχίες, σχηματίζεται μια χιμαιρική δομή. Κάποιο τμήμα από τις αρχικές ρετροϊικές αλληλουχίες (οι οποίες συνήθως οργανώνονται στα γονίδια *gag-pol-env*) αντικαθίσταται από μια αλληλουχία που προκύπτει από την αντίστροφη μεταγραφή ενός κυτταρικού mRNA. Το συγκεκριμένο γεγονός είναι σπάνιο, αλλά δημιουργεί ένα μεταγωγό ιό που έχει δύο σημαντικές ιδιότητες:

Συνήθως δεν μπορεί να αντιγραφεί μόνος του, διότι δεν έχει τα απαραίτητα για την αναπαραγωγή ιικά γονίδια, τα οποία χάθηκαν κατά την ανταλλαγή με τις κυτταρικές αλληλουχίες. Αυτοί οι ιοί είναι ελαττωματικοί ως προς την αντιγραφή. Είναι δυνατόν να πολλαπλασιαστούν όταν υπάρχει ταυτόχρονη μόλυνση με έναν ιό άγριου τύπου, το «βοηθό» ιό (*helper virus*), ο οποίος παρέχει τις λειτουργίες που χάθηκαν κατά την διαδικασία του ανασυνδυασμού. Εξαίρεση τέτοιου μεταγωγού ρετροϊού αποτελεί ο RSV (**Rous Sarcoma Virus**), καθώς διατηρεί την ικανότητα του να αντιγράφεται.

Κατά την διάρκεια μιας μόλυνσης, ο μεταγωγός ιός φέρει μαζί του το κυτταρικό γονίδιο (ή τα γονίδια) που απέκτησε κατά τον ανασυνδυασμό, το οποίο, όταν εκφραστεί, μπορεί να αλλάξει το φαινότυπο του μολυσμένου κυττάρου. Δηλαδή, αν ένας ιός αποκτήσει ένα γονίδιο του οποίου το προϊόν διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη, η εξάπλωσή του διευκολύνεται, γιατί ευνοείται η αύξηση των κυττάρων που έχει μολύνει. Επιπλέον, μετά την ενσωμάτωση του κυτταρικού γονιδίου στον ιό, το γονίδιο έχει την ευκαιρία να συσσωρεύσει μεταλλάξεις που ενισχύουν περαιτέρω την ικανότητά του να επηρεάζει τον κυτταρικό φαινότυπο.



Οι νέες αλληλουχίες που φέρει ένας ρετροϊός οξέος μετασχηματισμού μπορούν να εντοπιστούν συγκρίνοντας την αλληλουχία του γονιδιώματός του με αυτήν του πατρικού (μη ογκογόνου) ιού. Συνήθως η προστιθέμενη περιοχή συγγενεύει στενά με κάποια αλληλουχία του κυτταρικού γονιδιώματος, η οποία από μόνη της δεν είναι ογκογόνος, αλλά αποτελεί ένα **πρωτο-ογκογονίδιο** (proto-oncogene). **Ο ιός αποκτά το αντίγραφο ενός πρωτο-ογκογονιδίου από το κυτταρικό γονιδίωμα, αλλά μερικές φορές το αντίγραφο διαφέρει από την κυτταρική αλληλουχία, συνήθως λόγω ελλειμμάτων στα άκρα. Η διαφορά αυτή μπορεί να είναι αρκετή για να μετατρέψει το πρωτο-ογκογονίδιο σε ογκογονίδιο. Σε άλλες περιπτώσεις, μεταλλάξεις που συμβαίνουν πάνω στην αλληλουχία του ιικού αντιγράφου το μετατρέπουν σε ογκογονίδιο.** Ανάλογα με τη θέση τους, τα ογκογονίδια (*onc*) περιγράφονται χρησιμοποιώντας τα **προθέματα v και c για τα ιικά γονίδια και για τα κυτταρικά ομόλογά τους αντίστοιχα.** Ο τύπος του όγκου που θα αναπτυχθεί εξαρτάται από το χρόνο και τον ιστό στον οποίο εκφράζεται το συγκεκριμένο ογκογονίδιο.

Μία από τις ελάχιστες εξαιρέσεις ρετροϊού που φέρει περισσότερα από ένα ογκογονίδια είναι ο ιός AEV. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί σε ρετροϊούς περισσότερα από 30 γονίδια *c-onc*.

Είναι δυνατόν το ίδιο γονίδιο *c-onc* να απαντάται σε διαφορετικούς μετασχηματιστικούς ιούς: για παράδειγμα, ο ιός του πιθήκου SSV και το στέλεχος PI του ιού της γάτας FeSV φέρουν ένα *v-onc*, το οποίο προέρχεται από το *c-sis*. Μερικοί ιοί φέρουν συγγενικά γονίδια *v-onc*, όπως τα στελέχη Harvey και Kirsten του MuSV, τα οποία φέρουν γονίδια *v-ras* που προέρχονται από δύο διαφορετικά μέλη της οικογένειας κυτταρικών γονιδίων *c-ras*. Σε άλλες περιπτώσεις, τα γονίδια *v-onc* συγγενικών ιών προέρχονται από μη συγγενικούς κυτταρικούς προγόνους: για παράδειγμα, τρεις ιοί FeSV, που έχουν απομονωθεί ανεξάρτητα, μπορεί να έχουν προκύψει από τον ίδιο αρχικό (μη μετασχηματιστικό) ιό, αλλά φέρουν τα ογκογονίδια *sis*, *fms* και *fes* αντίστοιχα. Είναι φανερό ότι τα γεγονότα που ενέχονται στη δημιουργία ενός μεταγωγού ιού μπορεί να είναι σύνθετα: μερικοί ιοί φέρουν αλληλουχίες που προέρχονται από περισσότερα από ένα κυτταρικά γονίδια.

Το γονίδιο *c-onc* έχει μεταφερθεί σε διαφορετικούς ιούς που απομονώθηκαν ανεξάρτητα. Για παράδειγμα, κάποιοι τύποι ιών φέρουν γονίδια *v-myc*, που όλα έχουν ένα κοινό προγονικό γονίδιο *c-myc*, αλλά μεταξύ τους διαφέρουν στα άκρα τους και σε σημειακές μεταλλάξεις, προφανώς λόγω διαφορετικού μηχανισμού απόσπασής τους από το γονιδίωμα του ξενιστή.

Σάρκωμα του Rous	RSV	κοτόπουλο	σάρκωμα	<i>src</i>
Σάρκωμα των Muridae του Harvey	Ha-MuSV	αρουραίος	σάρκωμα & λευχαιμία	<i>H-ras</i>
Σάρκωμα των Muridae του Kirsten	Ki-MuSV	αρουραίος	σάρκωμα & λευχαιμία	<i>K-ras</i>
Σάρκωμα των Muridae του Moloney	Mo-MuSV	ποντικός	σάρκωμα	<i>mos</i>
Σάρκωμα των πιθήκων	SSV	πίθηκος	σάρκωμα	<i>sis</i>
Σάρκωμα των αιλουροειδών	PI-FeSV	γάτα	σάρκωμα	<i>sis</i>
Σάρκωμα των αιλουροειδών	SM-FeSV	γάτα	ινοσάρκωμα	<i>fms</i>
Σάρκωμα των αιλουροειδών	ST-FeSV	γάτα	ινοσάρκωμα	<i>fes</i>
Σάρκωμα των πτηνών	ASV-17	κοτόπουλο	ινοσάρκωμα	<i>jun</i>
Μυελοκυττομάτωση των πτηνών	MC29	κοτόπουλο	σάρκωμα, καρκίνωμα & μυελοκύττωμα	<i>myc</i>
Λευχαιμία του Abelson	MuLV	ποντικός	λέμφωμα Β κυττάρων	<i>abl</i>
Ερυθροβλάστωση των πτηνών	AEV	κοτόπουλο	ερυθρολευχαιμία & ινοσάρκωμα	<i>erbB, A</i>
Μυελοβλάστωση των πτηνών	AMV	κοτόπουλο	μυελοβλαστική λευχαιμία	<i>myb</i>

Πώς μετατρέπεται ένα πρωτο-ογκογονίδιο σε ογκογονίδιο;

Σε μερικές περιπτώσεις, οι μόνες αλλαγές είναι ένας πολύ μικρός αριθμός σημειακών μεταλλάξεων. Παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια *sis* και *myc*, που έχουν μεταφερθεί

ολόκληρα στον ιό φέροντας μόνο μικρό αριθμό μεταλλάξεων. Οι αμινοξικές αντικαταστάσεις που προκύπτουν δεν φαίνεται να επηρεάζουν την πρωτεϊνική λειτουργία και δεν είναι απαραίτητες για τη μετασχηματιστική δράση. **Έτσι, είναι πιθανόν το προϊόν του *v-onc* να εκτελεί τις ίδιες ενζυμικές λειτουργίες με το προϊόν του *c-onc*, αλλά να έχει διαφοροποιηθεί η ρύθμισή του.**

**Στις περιπτώσεις αυτές, το ογκογόνο δυναμικό μπορεί να είναι αποτέλεσμα υπερέκφρασης.** Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το *c-myc*: η ογκογένεση μπορεί να προκληθεί είτε από υπερέκφραση του γονιδίου *v-myc* ενός μετασχηματιστικού ρετροϊού είτε από αλλαγές στο κυτταρικό γονιδίωμα που προκαλούν την υπερέκφραση του *c-myc*.

**Αντίθετα, οι σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* και *src* παίζουν αποφασιστικό ρόλο στη δημιουργία ογκογόνου πρωτεΐνης.** Στην περίπτωση του *ras*, οι αλλαγές στο ρυθμιστικό μηχανισμό της έκφρασης της πρωτεΐνης Ras, που την καθιστούν ενεργοποιημένη, μπορούν να αποδοθούν άμεσα στις σημειακές μεταλλάξεις του ιικού γονιδίου.

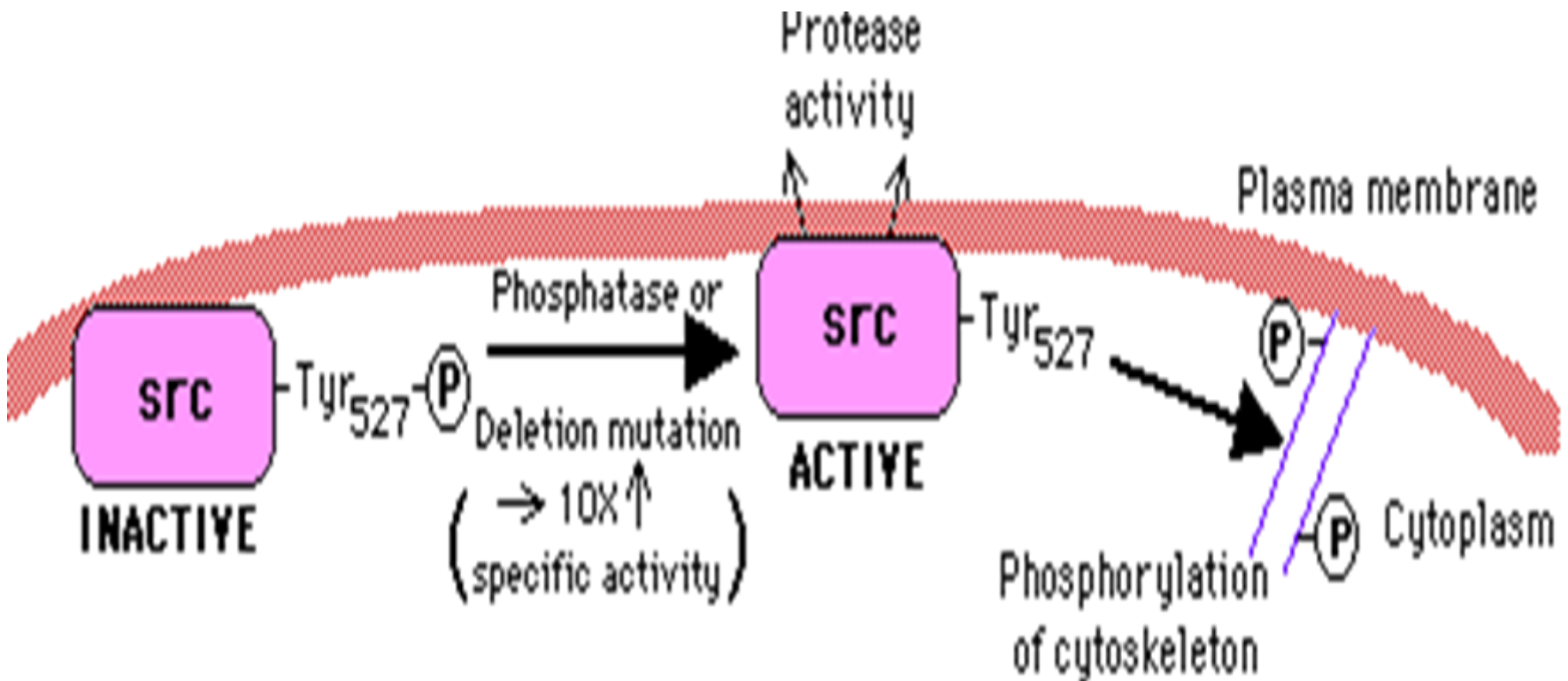
Σε μερικές περιπτώσεις, ένα γονίδιο *v-src* έχει χάσει αλληλουχίες του N-τελικού ή του C-τελικού άκρου (ή και των δύο άκρων) του γονιδίου *c-src*, πιθανότατα ως αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού. Οι αλληλουχίες αυτές μπορεί να κωδικοποιούν ρυθμιστικές περιοχές με περιοριστική δράση στην ενεργότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης και η απώλειά τους να της προσδίδει ογκογόνες ικανότητες. Έτσι, μικρές ποσότητες του πρωτεϊνικού προϊόντος του *v-src* επαρκούν για να προκαλέσουν ογκογένεση, ενώ το *c-src* δεν είναι ογκογόνο ακόμη και σε υψηλά επίπεδα έκφρασης (>10 φορές της κανονικής ποσότητας).

Το προϊόν του γονιδίου *src* είναι μια φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 60 Kd της οποίας η λειτουργία κινάσης ενεργοποιείται μετά την σύνδεσή της με τον υποδοχέα της. Η πρωτεΐνη συνδέεται μέσω της N-τελικής της γλυκίνης με το μυριστικό οξύ στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και παρουσιάζει τις εξής περιοχές : **N-SH3-SH2- Κινάσης – Ρυθμιστική περιοχή –COOH**. Ενεργοποίηση του γονιδίου *src* έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού καθώς και αύξηση της έκκρισης του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου ( που συντελεί στην αύξηση της πλασμίνης και κατά συνέπεια στην αποδόμηση των πρωτεϊνών στον εκτός του κυττάρου χώρο) , διεργασίες οι οποίες αμφότερες συμβάλλουν στην ελαστικότητα της σύνδεσης των κυττάρων μεταξύ τους .



Αυτό οφείλεται στο ότι στην πρωτεΐνη που παράγεται από το *v-src* τα 19 C-τελικά αμινοξέα έχουν αντικατασταθεί από μια διαφορετική αλληλουχία 12 αμινοξέων η οποία προέρχεται από το 3' UTR του *c-src*. Η ενεργότητα κινάσης προσδιορίζεται μέσω φωσφορυλίωσης στην Tyr 527 και στο *v-src* λείπει στην συγκεκριμένη θέση 527 η Tyr με αποτέλεσμα να μην μπορεί να φωσφορυλιωθεί. Η συγκεκριμένη αλλαγή έχει μια σημαντική ρυθμιστική συνέπεια, αφού καθιστά την πρωτεΐνη Src μόνιμα ενεργοποιημένη.

Στην Src, μεταλλάξεις που δημιουργούν αλλαγές σε δύο κατάλοιπα τυροσίνης, τα οποία είναι στόχοι φωσφορυλίωσης, έχουν ισχυρές επιπτώσεις στο ογκογόνο δυναμικό.



Μερικά ογκογονίδια μπορούν να ανιχνευθούν με μια άμεση μέθοδο μετασχηματισμού *in vitro*, κατά την οποία διαμολύνονται «φυσιολογικά» κύτταρα-δέκτες με DNA που προέρχεται από όγκους. Συνήθως ως δέκτης χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά NIH 3T3 (ινοβλάστες ποντικού). Αρχικά, σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε DNA από *en masse* εκχυλίσματα όγκων, όμως σήμερα χρησιμοποιούνται συνήθως απομονωμένα ογκογονίδια. Η ικανότητα ενός γονιδίου να μετασχηματίζει κύτταρα άγριου τύπου αποτελεί άμεση απόδειξη ότι πρόκειται για ογκογονίδιο.

Μια άλλη μέθοδος για να εκτιμηθεί η ογκογόνος ικανότητα είναι η ένεση κυττάρων που φέρουν το ογκογονίδιο σε «γυμνούς» ποντικούς (*nude mice*, ζώα που έχουν χάσει τεχνητά την ικανότητα να απορρίπτουν μη ιστοσυμβατά μοσχεύματα) και ο έλεγχος δημιουργίας όγκων στο ζώο.

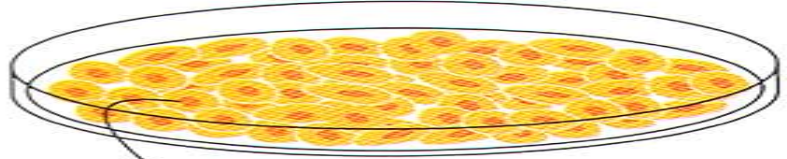
Όταν μετασχηματίζεται ένα κύτταρο μιας καλλιέργειας 3T3, οι απόγονοί του δημιουργούν μία εστία (*focus*). Ο αριθμός των εστιών που δημιουργούνται αποτελεί μέτρο της ικανότητας μετασχηματισμού ενός δείγματος DNA. Όταν το δείγμα προέρχεται από κυτταρικό εκχύλισμα όγκων, η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού είναι σχετικά χαμηλή, ενώ, αν αντ' αυτού χρησιμοποιηθεί το ίδιο το ογκογονίδιο που έχει απομονωθεί και κλωνοποιηθεί, μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Extract DNA directly from tumor



Tumor

Separate and culture cells



Tumor cell line

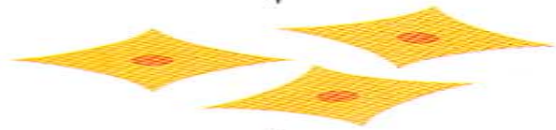
Extract DNA from cells



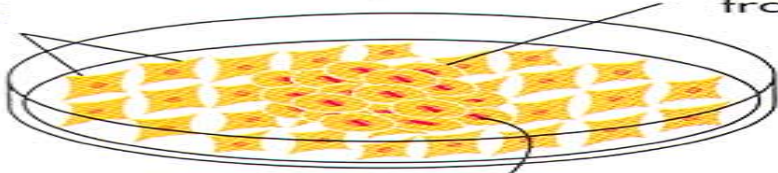
Oncogene

Cellular DNA

Transfect NIH 3T3 cells



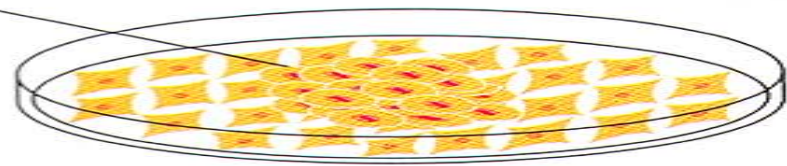
Nontransformed cells



"Focus" of transformed cells

Culture transformed cells  
Isolate cellular DNA  
Repeat transfection

Focus



## Η Οικογένεια των Γονιδίων *ras*

Τα τρία μέλη της οικογένειας των γονιδίων *ras* είναι:

- το *c-Ha-ras* 1 (κυτταρικό ομόλογο του ογκογονιδίου του Harvey murine sarcoma virus), το οποίο εντοπίζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 11.
- το *c-Ki-ras* 2 (κυτταρικό ομόλογο του ογκογονιδίου του Kirsten murine sarcoma virus), το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12.
- το *N-ras* το οποίο απομονώθηκε από ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος, δεν έχει ιϊκό ομόλογο και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1.

Τα ογκογονίδια που προέρχονται από την οικογένεια *c-ras* συχνά εντοπίζονται με τη μέθοδο της διαμόλυνσης. Η οικογένεια αποτελείται από διάφορα ενεργά γονίδια στον άνθρωπο και στον αρουραίο, τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα. Τα γονίδια *N-ras*, *H-ras* και *K-ras* συγγενεύουν στενά και κωδικοποιούν πρωτεϊνικά προϊόντα μεγέθους ~21 kD, που είναι γνωστά όλα μαζί ως p21ras. Τα γονίδια *H-ras* και *K-ras* έχουν αντίστοιχα ομόλογα γονίδια *v-ras*, στα στελέχη Harvey και Kirsten του ιού του σαρκώματος των τρωκτικών. **Η μετάλλαξη μιας κωδικής αλληλουχίας μπορεί να μετατρέψει ένα κυτταρικό πρωτο-ογκογονίδιο σε ογκογονίδιο το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση ενός σποραδικού όγκου στονοργανισμό. Ένα τέτοιο ογκογονίδιο μπορεί επίσης να φέρεται από ένα ρετροϊό. Στην περίπτωση αυτή, ο όγκος προκαλείται μετά από ιική μόλυνση.** Τα γονίδια *ras* αποκτούν ογκογονικότητα πολύ εύκολα: σχεδόν κάθε μετάλλαξη που οδηγεί σε αμινοξική υποκατάσταση στις θέσεις 12 ή 61 μπορεί να μετατρέψει ένα πρωτο-ογκογονίδιο *c-ras* σε ενεργό ογκογονίδιο: Και τα τρία γονίδια *c-ras* έχουν γλυκίνη στη θέση 12.

**Αν αυτή αντικατασταθεί *in vitro* από οποιοδήποτε από τα υπόλοιπα 19 αμινοξέα, εκτός από την προλίνη, το μεταλλαγμένο γονίδιο *c-ras* αποκτά ογκογονικότητα και η ταυτότητα του αμινοξέος που θα αντικαταστήσει τη γλυκίνη επηρεάζει το δυναμικό μετασχηματισμού.**

**Στα άγριου τύπου γονίδια *c-ras* υπάρχει γλουταμίνη στη θέση 61. Η αντικατάστασή της από ένα άλλο αμινοξύ δημιουργεί συνήθως ένα γονίδιο με δυναμικό μετασχηματισμού. Μερικές αντικαταστάσεις είναι λιγότερο αποτελεσματικές από άλλες, ενώ η προλίνη και το γλουταμικό οξύ είναι οι μόνες αντικαταστάσεις που δεν έχουν καμία επίδραση.**

**Τα γονίδια της οικογένειας *ras* κωδικοποιούν για πρωτεΐνες στενής συγγένειας μεταξύ τους και μεγέθους 21 KDa που ονομάζονται p21. Αυτές εντοπίζονται στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης, δεσμεύονται δε στη λιπιδική διπλοστοιβάδα μέσω ενός παλμιτικού οξέος ομοιοπολικά δεμένου από το καρβοξυτελικό τους άκρο. Μπορούν να δεσμεύουν GTP και GDP με υψηλή χημική συγγένεια και επίσης έχουν δραστηριότητα GTPάσης.**

**Οι p21 είναι δραστικές (ενεργός μορφή) όταν δεσμεύουν το GTP ενώ αδρανοποιούνται, όταν με τη δραστηριότητα GTPάσης που διαθέτουν, μετατρέπουν το GTP σε GDP. Η απώλεια της δραστηριότητας GTPάσης τις μετατρέπει σε πρωτεΐνες ικανές για μετασχηματισμό, καθώς έχουν συνεχώς δεσμευμένο GTP, δηλαδή είναι διαρκώς σε ενεργή μορφή.**

**Οι p21 είναι σε θέση να επάγουν τη κυτταρική αύξηση και τη διαφοροποίηση δρώντας ως ενδοκυττάριοι μεταγωγείς σημάτων από εξωτερικά ερεθίσματα.**

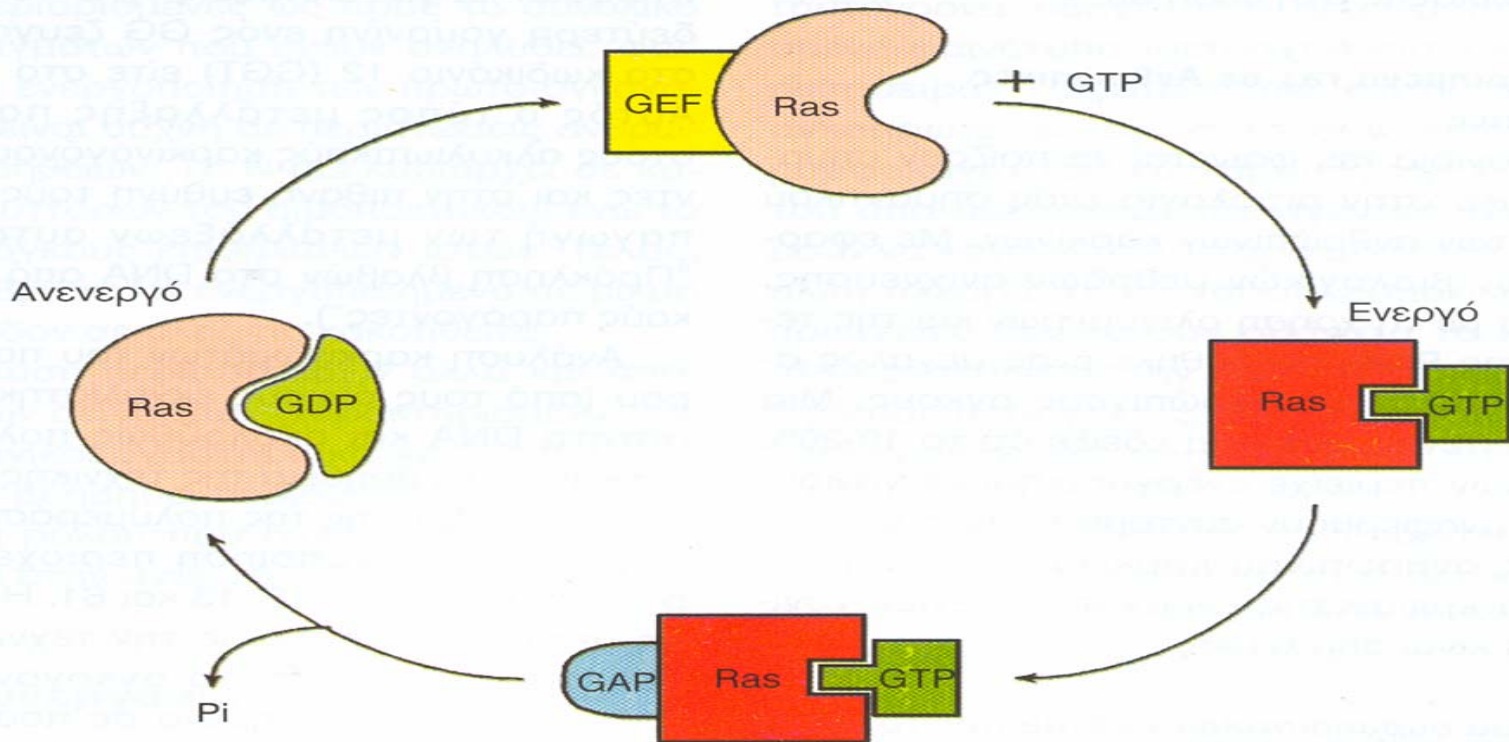
## Ο μηχανισμός αυτός πιστεύεται πως μπορεί να διαταραχθεί με δύο τρόπους στις πρωτεΐνες Ras:

α) Με απώλεια της δραστικότητας GTPάσης, που εμποδίζει τη μετάβαση από το σύμπλοκο p21/ GTP στο σύμπλοκο p21/ GDP και επομένως υπάρχει συνεχής ενεργοποίηση του εκτελεστικού μορίου.

β) Με μείωση της συγγένειας της p21 για το GTP και GDP. Όμως επειδή η συγκέντρωση GTP μέσα στο κύτταρο είναι περίπου δεκαπλάσια αυτής του GDP, η p21 βρίσκεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην ενεργοποιημένη της μορφή.

Η πρώτη από τις παραπάνω ανωμαλίες εμφανίζεται στη περίπτωση μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12, 13 ή 61 και η δεύτερη σε περίπτωση μετάλλαξης στο κωδικόνιο 116. Η Ras είναι μια μονομερής πρωτεΐνη που δεσμεύει νουκλεοτίδια γουανίνης: είναι ενεργή όταν δεσμεύει GTP, απενεργοποιείται όταν δεσμεύει GDP, ενώ φέρει εγγενή ενεργότητα GTPάσης. Η μετατροπή της Ras από τη μία μορφή της στην άλλη καταλύεται από άλλες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες GAP διεγείρουν τη δυνατότητα της Ras να υδρολύει GTP, μετατρέποντας κατά συνέπεια την ενεργή μορφή της Ras σε ανενεργή. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες GEF διεγείρουν την αντικατάσταση του GDP από το GTP, επανενεργοποιώντας την πρωτεΐνη. Η ενεργοποίηση της Ras θα μπορούσε να προκαλείται από μεταλλάξεις που είτε παρεμποδίζουν την υδρόλυση του GTP είτε καθιστούν το σύμπλοκο Ras-GDP ενεργό.

Ποιες όμως είναι οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων αυτών; Σε κάποιες περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις που προσδίδουν ικανότητα μετασχηματισμού αναστέλλουν την ενεργότητα GTPάσης των ογκογόνων πρωτεϊνών Ras και η GAP δεν μπορεί να τη διεγείρει. **Με άλλα λόγια η Ras χάνει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την GAP που την απενεργοποιεί και αυτό καθλώνει μόνιμα τη Ras στην ενεργή μορφή της.** Συνεπώς ασκεί συνεχή επίδραση στην πρωτεΐνη-στόχο και αυτό ευθύνεται για την ογκογόνο δράση της. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το επίπεδο έκφρασης βρίσκεται σε ευαίσθητη ισορροπία, δεδομένου ότι η υπερδιέγερση της Ras, είτε λόγω αυξημένης έκφρασης είτε λόγω μετάλλαξης, έχει ογκογόνες συνέπειες.



## Ενεργοποιημένα ras γονίδια σε Ανθρώπινες Κακοήθειες

### Όγκοι του παχέος εντέρου και του πρωκτού (Colorectal cancers)

Ένας σημαντικός αριθμός ενεργοποιημένων γονιδίων ras ανιχνεύτηκε σε DNA από όγκους του παχέος εντέρου. Στις περισσότερες περιπτώσεις βρέθηκε **ενεργοποιημένο το Ki-Ras** και στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οι μεταλλάξεις ήταν **G→A**, στη δεύτερη γουανίνη ενός **GG ζευγαριού**, είτε στο κωδικόνιο **12 (GGT)** είτε στο **13 (GGC)**. Ανάλυση καρκινωμάτων του παχέος εντέρου με αλληλούχιση έδειξε ότι το ογκογονίδιο **Ki-ras** βρίσκεται ενεργοποιημένο σε ποσοστό **40%**.

### Οξεία μυελογενής λευχαιμία (Acute myeloid leukemia, AML)

Τουλάχιστον στο **20%** των **AML** ενέχεται ένα ενεργοποιημένο γονίδιο ras. Φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων ras είναι συχνή σε περιπτώσεις ανθρωπίνων κακοηθειών. Το **N-ras** κυριαρχεί σε κακοήθειες κυττάρων του αιμοποιητικού, ενώ το **Ki-ras** σε όγκους επιθηλιακών ιστών. Τέλος, το **Ha-ras** βρίσκεται ενεργοποιημένο σε μικρό βαθμό σχεδόν σε όλες τις κακοήθειες.



**Μια προσθήκη (insertion), μια μετατόπιση (translocation) ή ένας γονιδιακός πολλαπλασιασμός (amplification) μπορεί να αποτελούν αιτίες ογκογένεσης.**

Η γονιδιακή ενίσχυση – καθώς και διάφορες άλλες καρυοτυπικές αλλαγές – είναι συνήθεις και στις μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές. Η παρουσία γνωστών ογκογονιδίων στις ενισχυμένες περιοχές και η κατ' επανάληψη ενίσχυση συγκεκριμένων ογκογονιδίων σε μεγάλο αριθμό όγκων του ίδιου τύπου ενισχύουν το συσχετισμό ανάμεσα στην αυξημένη έκφραση και στην ανάπτυξη όγκων.

Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα πρωτο-ογκογονιδίου που ενεργοποιείται από μηχανισμούς οι οποίοι μεταβάλλουν τα επίπεδα έκφρασής του χωρίς να αλλάζουν την κωδική αλληλουχία του είναι το *c-myc*.

Η υπερέκφραση *c-myc* γίνεται με διάφορους μηχανισμούς, όπως είναι, για παράδειγμα, η ενσωμάτωση ενός μη ελαττωματικού ρετροϊού σε γειτονική θέση στο *c-myc*. Σε πολλούς όγκους, ο ιός έχει ενσωματωθεί στο κυτταρικό γονιδίωμα είτε μέσα είτε κοντά στο γονίδιο *c-myc*.

## **Το γονίδιο *c-myc*.**

Το γονίδιο αποτελείται από τρία εξόνια. Το πρώτο είναι μη μεταφράσιμος οδηγός (leader) και τα άλλα δύο κωδικοποιούν την πρωτεΐνη *c-myc*.

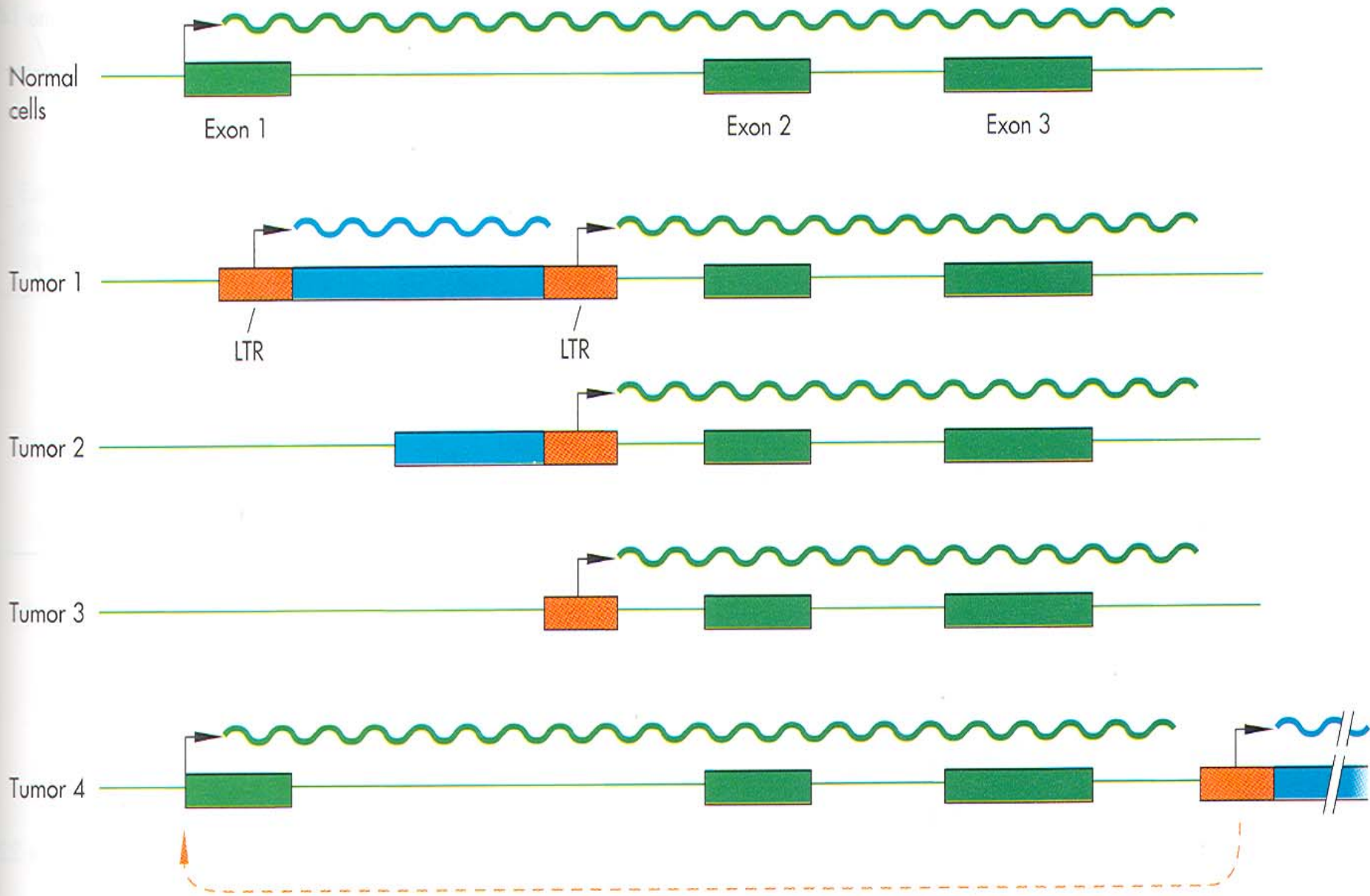
Ο ιός ενσωματώνεται στο πρώτο ιντρόνιο και η περιοχή του ιικού γονιδιώματος LTR παρέχει ένα υποκινητή για τη μεταγραφή των δύο κωδικών εξονίων. Η μεταγραφή του *c-myc* υπό ιική ρύθμιση είναι πολύ αυξημένη σε σχέση με τη φυσιολογική (επειδή η περιοχή LTR παρέχει έναν ισχυρό υποκινητή). Η έκφραση δεν μπορεί να διακοπεί ως απόκριση στα συνήθη σήματα διαφοροποίησης των Β και Τ κυττάρων, και το mRNA που παράγεται δεν φέρει το μη μεταφράσιμο οδηγό (ο οποίος συνήθως μειώνει την έκφραση). Όλες αυτές οι αλλαγές οδηγούν αθροιστικά στην υπερέκφραση του γονιδίου καθώς το εξόνιο 1 του *c-myc* δεν κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη *c-myc* (κατωτέρω εικόνα 1-3).

Το ρετροϊικό γονιδίωμα μπορεί επίσης να ενσωματωθεί καθοδικά του γονιδίου *c-myc*.

Σε αυτή την περίπτωση ο ιικός ενισχυτής LTR ευθύνεται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του *c-myc*, επηρεάζοντας είτε τη λειτουργία του κανονικού υποκινητή *c-myc* εξ αποστάσεως είτε κάποιας άλλης τυχαίας αλληλουχίας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί περιστασιακά ως υποκινητής (κατωτέρω εικόνα 4).

(c)

*c-myc* gene



**Τα πρωτο-ογκογονίδια μπορεί να ενεργοποιηθούν από μετατόπιση**

Ένας άλλος μηχανισμός ενεργοποίησης των ογκογονιδίων είναι η μετατόπιση σε μια νέα χρωμοσωμική θέση. Κατά τον ανασυνδυασμό μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων έχουμε το φαινόμενο της αμοιβαίας μετατόπισης (reciprocal translocation). Το κοινό χαρακτηριστικό σε αυτές τις περιπτώσεις είναι ότι η μετατόπιση μεταφέρει ένα ογκογονίδιο από κάποιο χρωμόσωμα σε ένα άλλο, κοντά σε έναν γενετικό τόπο που φέρει γονίδια ανοσοσφαιρινών *Ig* .

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο γενετικός τόπος που συνδυάζεται με αυτόν των ανοσοσφαιρινών είναι ο *c-myc*. Στον άνθρωπο, οι μετατοπίσεις στα Β λεμφοκύτταρα γίνονται, στο μεγαλύτερο ποσοστό, ανάμεσα στο χρωμόσωμα 8, το οποίο φέρει το γονίδιο *c-myc*, και στο χρωμόσωμα 14, το οποίο φέρει τον τόπο *IgH*, ενώ, με συχνότητα ~10%, η μετατόπιση αφορά το χρωμόσωμα 8 και είτε το χρωμόσωμα 2 (τόπος *κ*) είτε το χρωμόσωμα 22 (τόπος *λ*). **Τα πρωτο-ογκογονίδια μπορεί να ενεργοποιηθούν από μετατόπιση**

Ένας άλλος μηχανισμός ενεργοποίησης των ογκογονιδίων είναι η μετατόπιση σε μια νέα χρωμοσωμική θέση. Κατά τον ανασυνδυασμό μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων έχουμε το φαινόμενο της αμοιβαίας μετατόπισης (reciprocal translocation). Το κοινό χαρακτηριστικό σε αυτές τις περιπτώσεις είναι ότι η μετατόπιση μεταφέρει ένα ογκογονίδιο από κάποιο χρωμόσωμα σε ένα άλλο, κοντά σε έναν γενετικό τόπο που φέρει γονίδια ανοσοσφαιρινών *Ig* .

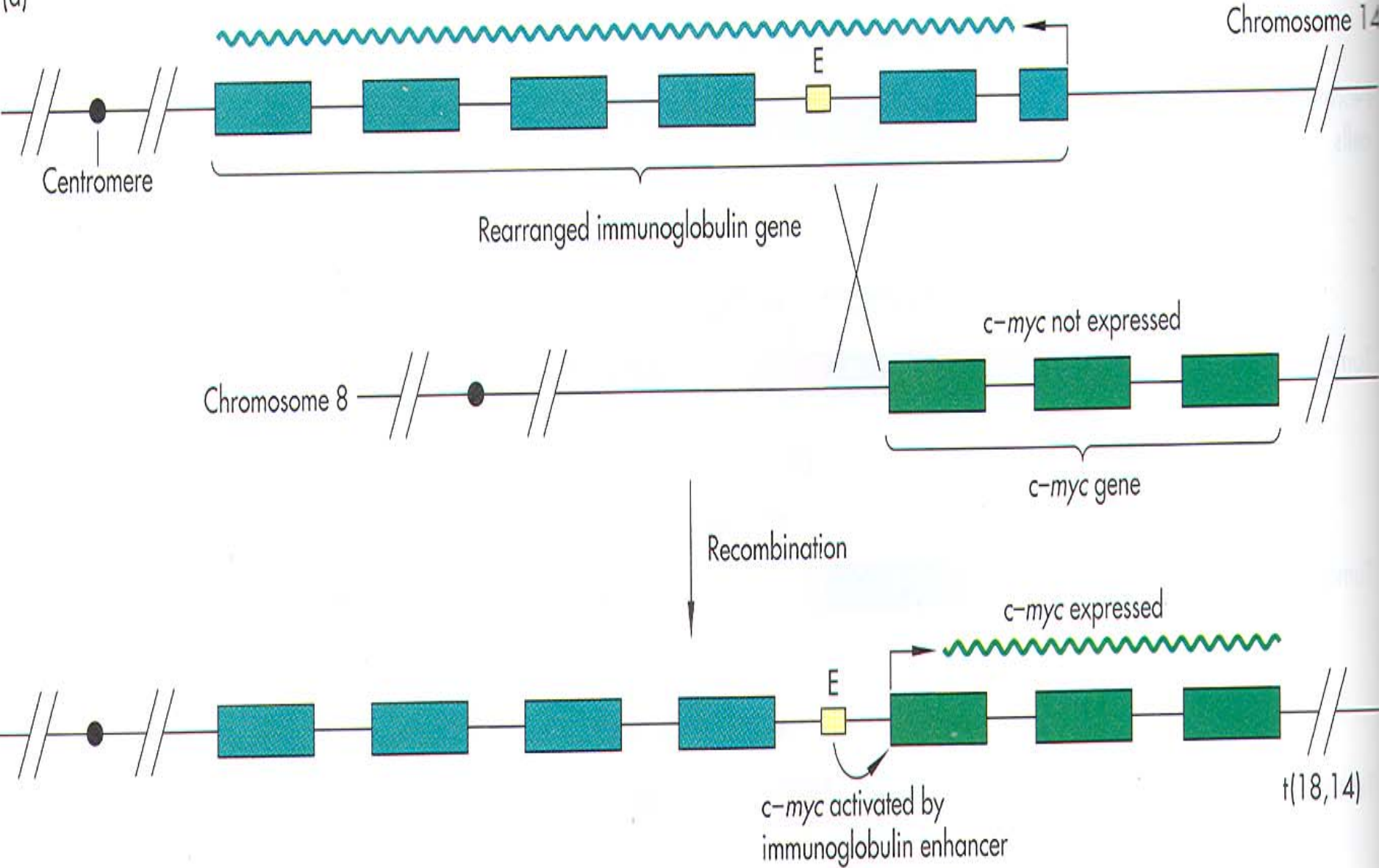
Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο γενετικός τόπος που συνδυάζεται με αυτόν των ανοσοσφαιρινών είναι ο *c-myc*.

Στον άνθρωπο, οι μετατοπίσεις στα Β λεμφοκύτταρα γίνονται, στο μεγαλύτερο ποσοστό, ανάμεσα στο χρωμόσωμα 8, το οποίο φέρει το γονίδιο *c-myc*, και στο χρωμόσωμα 14, το οποίο φέρει τον τόπο *IgH*, ενώ, με συχνότητα ~10%, η μετατόπιση αφορά το χρωμόσωμα 8 και είτε το χρωμόσωμα 2 (τόπος *κ*) είτε το χρωμόσωμα 22 (τόπος *λ*). Όταν το *c-myc* μετατοπίζεται στον τόπο *Ig*, το επίπεδο της έκφρασής του αυξάνεται. Η αύξηση μπορεί να κυμαίνεται από 2 έως 10 φορές και ποικίλλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών όγκων. Η μετατόπιση έχει δύο συνέπειες. Πρώτον, το *c-myc* μεταφέρεται σε μια νέα περιοχή, στην οποία το γονίδιο *Ig* εκφραζόταν ενεργά. Δεύτερον, η ίδια η δομή του γονιδίου *c-myc* μπορεί να αλλάξει με τη μετατόπιση (συνήθως χωρίς να αλλάξουν οι κωδικές περιοχές).

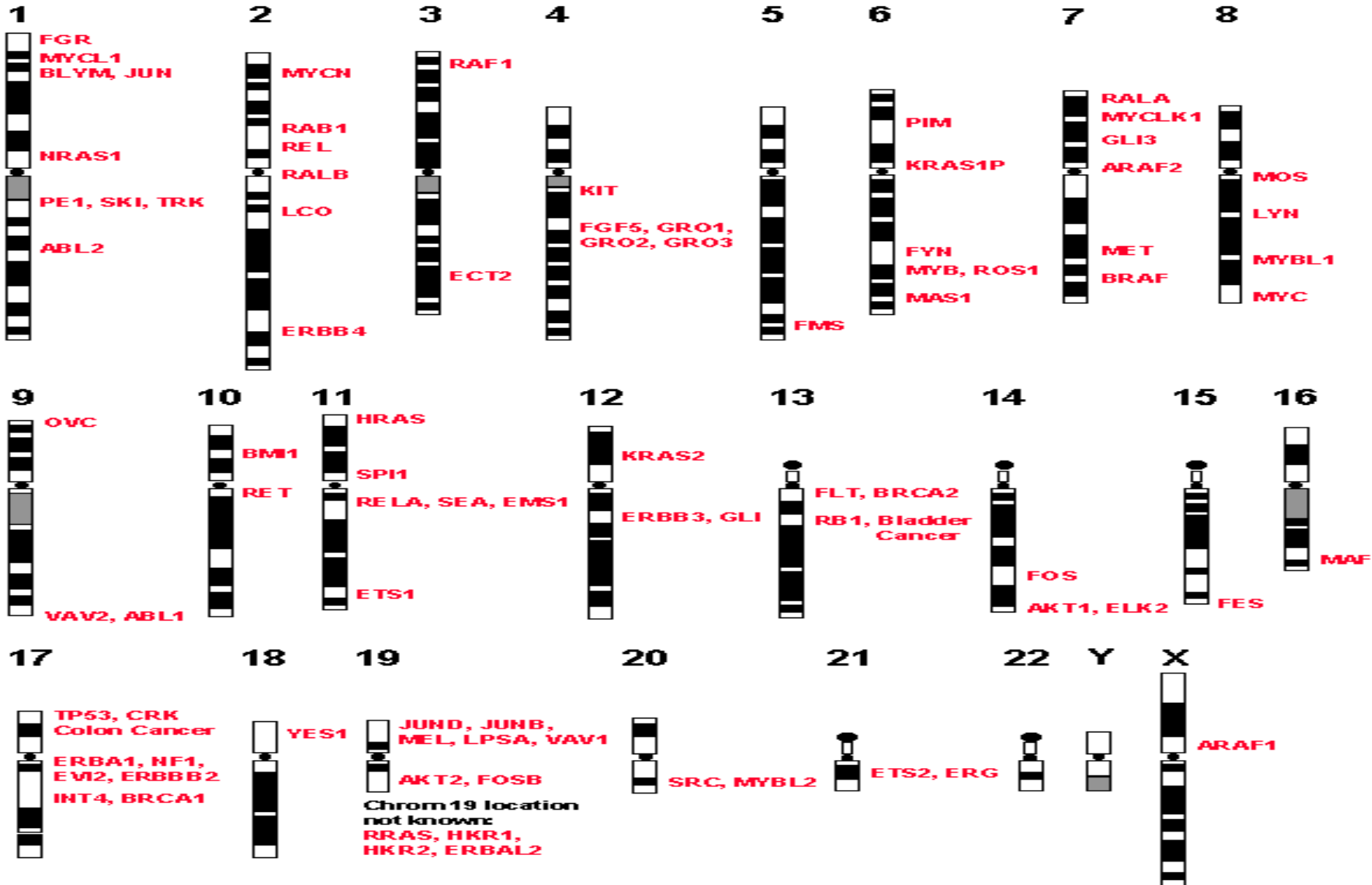
Η συνεχής υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης *c-myc*, είτε λόγω προσθήκης είτε λόγω μετατόπισης, είναι ογκογόνος, γιατί εμποδίζει τα ανώριμα λεμφοκύτταρα να διαφοροποιηθούν σε ώριμα Β κύτταρα. Τα κύτταρα παραμένουν αδιαφοροποίητα και συνεπώς συνεχίζουν να διαιρούνται.

Το *c-myc* μπορεί να ενεργοποιηθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους: ενσωμάτωση ρετροϊών, χρωμοσωμική μετατόπιση και γονιδιακή ενίσχυση. Σε μερικές περιπτώσεις, η μετατόπιση δημιουργεί ένα χιμαιρικό γονίδιο, διακόπτοντας μια ενεργή μεταγραφική μονάδα και ενώνοντας τα εξόνια ενός γονιδίου με ένα άλλο. Σε αυτές τις περιπτώσεις, υπάρχουν δύο πιθανές αιτίες ογκογένεσης. Το πρωτο-ογκογονιδιακό τμήμα της πρωτεΐνης μπορεί να ενεργοποιηθεί με τρόπο ανεξάρτητο από το υπόλοιπο τμήμα, επειδή, για παράδειγμα, μπορεί να υπερεκφράζεται υπό τον έλεγχο των νέων ρυθμιστικών στοιχείων (περίπτωση ανάλογη με αυτήν του *c-myc*). Εναλλακτικά, μπορεί το άλλο τμήμα του χιμαιρικού γονιδίου να έχει κάποια θετική επίδραση που δημιουργεί κέρδος λειτουργίας στο τμήμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το πρωτο-ογκονογίδιο.

(a)



# ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

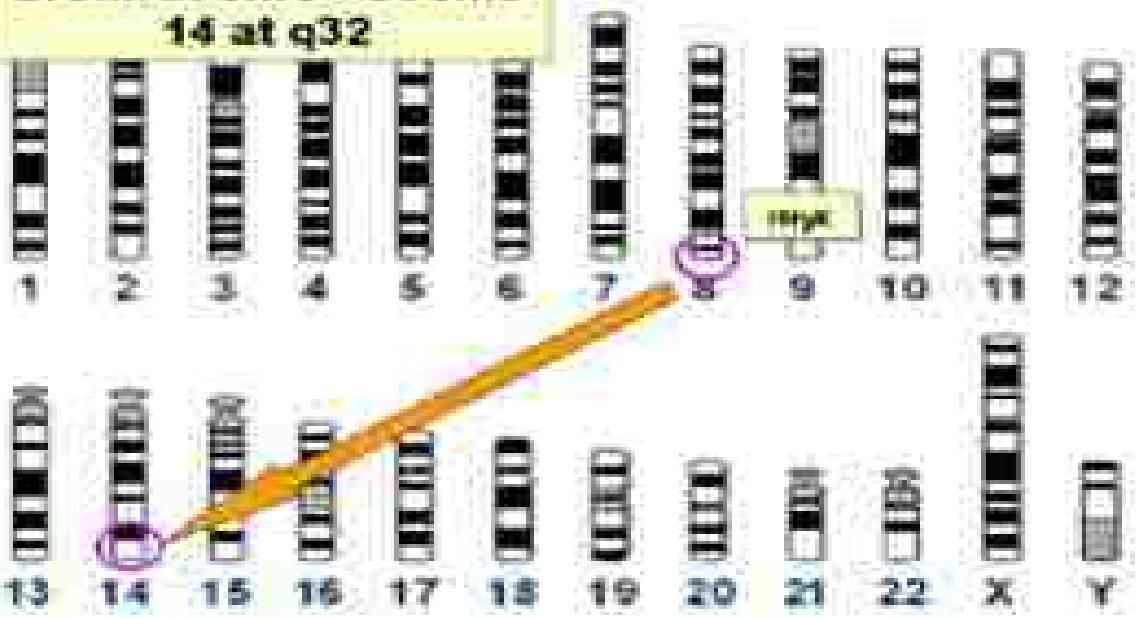


Unassigned to a specific chromosome:  
YUASA, HS2, INT3, SNO, RMYC,  
BMYC, HRASP, TC21, TIM, PTI-1

**Burkitt's Lymphoma**

**8:14 translocation**

**Break in chromosome  
14 at q32**



**Acute myelocytic leukemia**

**7:15  
9:19  
11:15:17**





Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ενεργοποίησης ογκογονιδίου που οφείλεται σε μετατόπιση είναι αυτό του λεμφώματος Burkitt. Πρόκειται για ανταλλαγές τμημάτων ανάμεσα στο χρωμόσωμα 8 (περιοχή όπου βρίσκεται το πρωτο-ογκογονίδιο c-myc) και στα χρωμοσώματα 2, 14 ή 22 (όπου βρίσκονται τα γονίδια για την παραγωγή των βαρειών και ελαφρών αλυσίδων κ και λ των ανοσοσφαιρινών). Σε όλες τις περιπτώσεις t (8:14), t (2:8), t (8:22) το c-myc ενεργοποιείται, ευρισκόμενο κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο των ρυθμιστικών περιοχών που ελέγχουν την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών στα λεμφοκύτταρα. Η περίπτωση υπερέκφρασης (ενεργοποίησης) ενός πρωτο-ογκογονιδίου λόγω της γειτνίασής του με ρυθμιστική περιοχή άλλου γονιδίου, που διαθέτει ισχυρό υποκινητή ή/και ενισχυτή είναι αρκετά συχνή και κατά την προσβολή ενός κυττάρου από έναν ιό.

Π.χ. η ενεργοποίηση του c-myc λόγω ενσωμάτωσης του ιού ALV στο DNA του κυττάρου, στη ρυθμιστική περιοχή του c-myc. Η έκφραση του c-myc σ' αυτήν την περίπτωση τίθεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του ιϊκού γονιδιώματος. Ο ALV, που μ' αυτόν τον τρόπο δημιουργεί όγκους των Β λεμφοκυττάρων στα κοτόπουλα, είναι ένας ογκογόνος ρετροϊός που δεν φέρει ο ίδιος ογκογονίδια.

**Μία από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες περιπτώσεις μετατόπισης που δημιουργεί ένα υβριδικό ογκογονίδιο είναι το χρωμόσωμα *Philadelphia (PH1)* ασθενών με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML, Chronic Myelogenous Leukemia).**

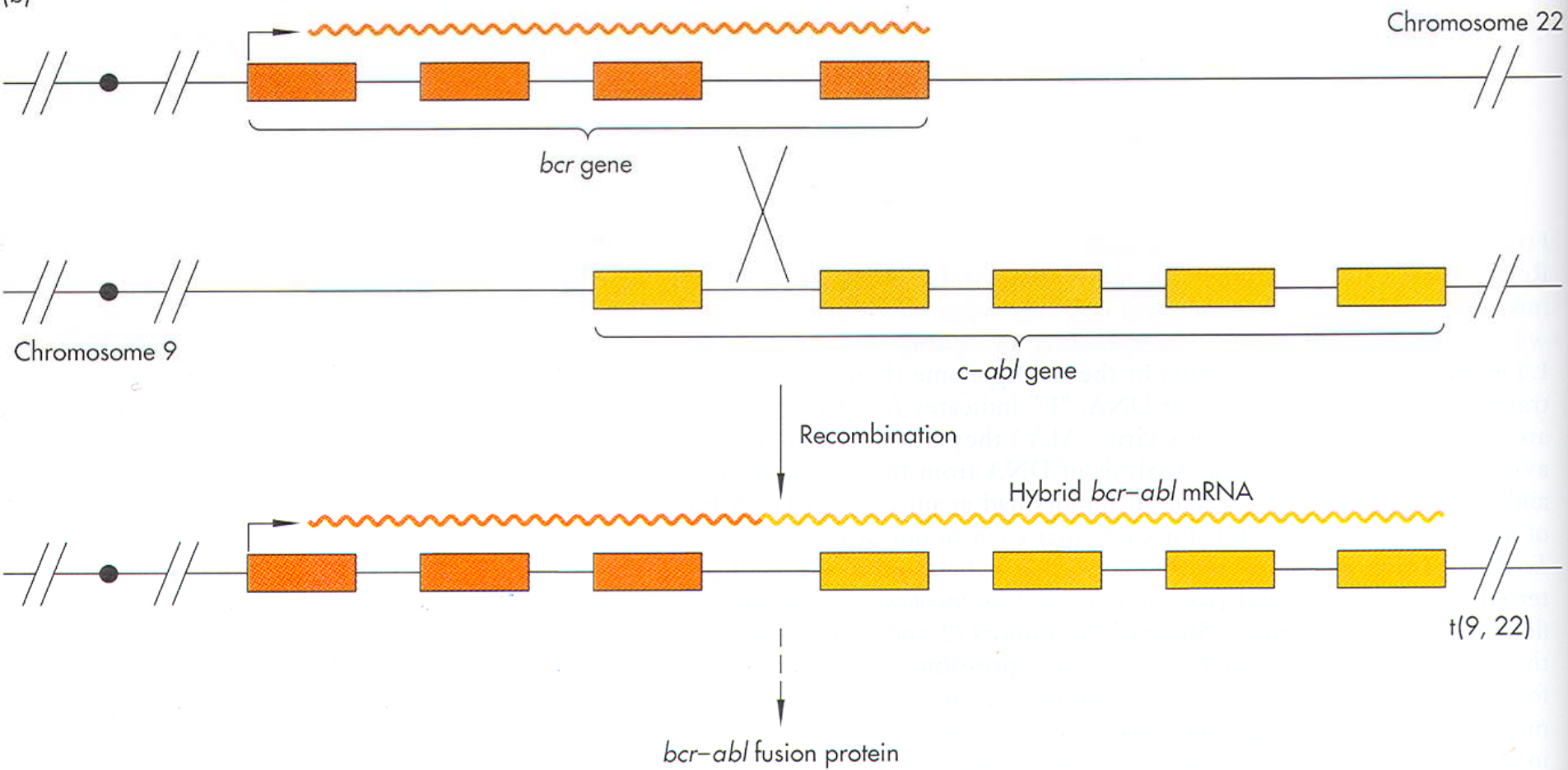
Αυτή η αμοιβαία μετατόπιση είναι πολύ μικρή για να είναι εμφανής στον καρυότυπο.

**Συνδέει μια περιοχή 5 Mb του άκρου του χρωμοσώματος 9, η οποία φέρει το γονίδιο *c-abl*, με την περιοχή *bcr* του χρωμοσώματος 22.** Η περιοχή *bcr* (~5,8 kb) (**breakpoint cluster region**, περιοχή χρωμοσωμικής θραύσης) ονομάστηκε έτσι γιατί σ' αυτήν εντοπίζονται τα σημεία θραύσης του χρωμοσώματος 22. Η περιοχή *bcr* βρίσκεται μέσα σε ένα μεγάλο γονίδιο (>90 kb) που είναι γνωστό σήμερα ως γονίδιο *bcr*. Τα σημεία θραύσης του χρωμοσώματος 22 στη CML εμφανίζονται συνήθως μέσα σε ένα από τα δύο ιντρόνια στο μέσο του γονιδίου.

Το ίδιο γονίδιο ενέχεται επίσης στις μετατοπίσεις που προκαλούν οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL, **A**cute **L**ymphopl**a**stic **L**eukemia). Στην περίπτωση αυτή, το σημείο της θραύσης στο γονίδιο *bcr* βρίσκεται στο πρώτο ιντρόνιο. Το γονίδιο *c-abl* εκφράζεται με εναλλακτικό μάτισμα που χρησιμοποιεί ένα από τα δύο πρώτα εξόνια. Τα σημεία θραύσης, τόσο στη CML όσο και στην ALL, βρίσκονται στο ιντρόνιο που προηγείται του πρώτου κοινού εξονίου. Αν και τα ακριβή σημεία θραύσης στα χρωμοσώματα 9 και 22 ποικίλλουν στους διάφορους ασθενείς, το κοινό αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός mRNA που κωδικοποιεί τη χιμαιρική πρωτεΐνη περιλαμβάνει Bcr-Abl, η οποία αποτελείται από το N-τελικό άκρο της Bcr συνδεδεμένο με την Abl.

Στην ALL, η χιμαιρική πρωτεΐνη περιλαμβάνει ~45 kD της πρωτεΐνης Bcr, ενώ στη CML περιλαμβάνει ~70 kD. Σε κάθε περίπτωση, η χιμαιρική πρωτεΐνη περιέχει ~140 kD από τα ~145 kD της φυσιολογικής πρωτεΐνης c-Abl, δηλαδή έχει χάσει μόνο μερικά N-τελικά αμινοξέα της c-Abl. Σε μια μετασχηματιστική μορφή του ρετροϊικού γονιδίου *v-abl* έχει βρεθεί ότι ορισμένες αλλαγές του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης ενέχονται στην ενεργοποίηση της ογκογόνου δραστηριότητας. Η Abl είναι μια κινάση τυροσίνης, η ενεργότητα της οποίας είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό κυττάρων. Τα ελλείμματα (ή οι αντικαταστάσεις) των N-τελικών περιοχών ενεργοποιούν την κινάση και της προσδίδουν μετασχηματιστικό δυναμικό. Επομένως οι N-τελικές περιοχές ασκούν ρυθμιστική δράση στην ενεργότητα της κινάσης και η απώλειά τους μπορεί να προκαλέσει μη φυσιολογική ενεργοποίησή της. Τα ογκογονίδια μπορεί να θεωρηθεί ότι επηρεάζουν, άμεσα ή έμμεσα, λειτουργίες που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη, ανεξάρτητα από το αν ενεργοποιούνται από ποσοτικές ή ποιοτικές αλλαγές. Τόσο τα ογκογονίδια όσο και οι ρυθμιστές της ανάπτυξης μπορούν να θεωρηθούν μοριακοί διακόπτες που ευθύνονται για τη μετάπτωση από έναν ορισμένο φαινότυπο σε κάποιον άλλο.

(b)



# Retroviruses containing cellular oncogenes

## Virus

General class	Oncogene	Name	Abbreviation	Origin	Protein product
Non-receptor protein tyrosine kinase	<i>abl</i>	Abelson murine leukemia virus	Ab-MLV	Mouse	Tyrosine kinase
	<i>fes</i>	ST feline sarcoma virus	ST-FeSV	Cat	Tyrosine kinase
	<i>fps</i>	Fujinami sarcoma virus	FuSV	Chicken	Tyrosine kinase
	<i>src</i>	Rous sarcoma virus	RSV	Chicken	Tyrosine kinase
Receptor protein tyrosine kinase	<i>erbB</i>	Avian erythroblastosis virus	AEV-ES4	Chicken	Epidermal growth factor receptor
	<i>fms</i>	McDonough feline sarcoma virus	SM-FeSV	Cat	Colony-stimulating factor receptor
	<i>kit</i>	Hardy–Zuckerman-4 feline sarcoma virus	HZ4-FeSV	Cat	Stem cell factor receptor

<b>Serine/threonine protein kinase</b>	<i>mil</i>	<b>Avian myelocytoma virus</b>	<b>MH2</b>	<b>Chicken</b>	<b>Serine/threonine kinase</b>
	<i>mos</i>	<b>Moloney murine sarcoma virus</b>	<b>Mo-MSV</b>	<b>Mouse</b>	<b>Serine/threonine kinase</b>
	<i>raf</i>	<b>Murine sarcoma virus 3611</b>	<b>MSV3611</b>	<b>Mouse</b>	<b>Serine/threonine kinase</b>
<b>Growth factor</b>	<i>sis</i>	<b>Simian sarcoma virus</b>	<b>SSV</b>	<b>Monkey</b>	<b>Platelet-derived growth factor</b>
<b>G protein</b>	<i>H-ras</i>	<b>Harvey murine sarcoma virus</b>	<b>Ha-MSV</b>	<b>Rat</b>	<b>GDP/GTP binding</b>
	<i>K-ras</i>	<b>Kirsten murine sarcoma virus</b>	<b>Ki-MSV</b>	<b>Rat</b>	<b>GDP/GTP binding</b>
<b>Transcription factor</b>	<i>erbA</i>	<b>Avian erythroblastosis virus</b>	<b>AEV-ES4</b>	<b>Chicken</b>	<b>Transcription factor (thyroid hormone receptor)</b>
	<i>ets</i>	<b>Avian myeloblastosis virus E26</b>	<b>AMV-E26</b>	<b>Chicken</b>	<b>Transcription factor</b>
	<i>fos</i>	<b>FBJ osteosarcoma virus</b>	<b>FBJ-MSV</b>	<b>Mouse</b>	<b>Transcription factor (AP1 component)</b>
	<i>jun</i>	<b>Avian sarcoma virus-17</b>	<b>ASV-17</b>	<b>Chicken</b>	<b>Transcription factor (AP1 component)</b>
	<i>myb</i>	<b>Avian myeloblastosis virus</b>	<b>AMV</b>	<b>Chicken</b>	<b>Transcription factor</b>
	<i>myc</i>	<b>MC29 myelocytoma virus</b>	<b>MC29</b>	<b>Chicken</b>	<b>Transcription factor</b>

# Cellular oncogenes activated by insertion of retroviruses lacking oncogenes

## Virus

General class	Oncogene	Name	Abbreviation	Origin	Protein product
Non-receptor protein tyrosine kinase	<i>Lck</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Tyrosine kinase
Receptor protein tyrosine kinase	<i>c-erbB</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Epidermal growth factor receptor
	<i>c-fms</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	Colony stimulating factor receptor
Serine/threonine protein kinase	<i>Pim1</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Serine/threonine kinase
Growth factor	<i>Fgf3/Int2</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Fibroblast growth factor
	<i>Wnt1/Int1</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Secreted glycoprotein
	<i>Wnt3/Int4</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Secreted glycoprotein
G protein	<i>c-Ki-ras</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	GDP/GTP binding

Transcription factor	<i>Ets1</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Rat	Transcription factor
	<i>c-fos</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor (AP1 component)
	<i>c-myb</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor
	<i>c-myb</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Transcription factor
	<i>c-myc</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor
	<i>c-myc</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Transcription factor
Cyclin	<i>Fis1/Cyclin D1</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	G <sub>1</sub> cyclin
	<i>Vin1/Cyclin D2</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	G <sub>1</sub> cyclin



οι αυξητικοί παράγοντες (growth factors) είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από ένα κύτταρο και επιδρούν στο ίδιο ή σε γειτονικά κύτταρα με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο. Η αντίστοιχη ογκοπρωτεΐνη μπορεί να μετασχηματίσει μόνο τα κύτταρα που φέρουν τον κατάλληλο υποδοχέα.

Οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (growth factor receptors) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται με την εξειδικευμένη σύνδεση ενός εξωκυτταρικού προσδέτη (συνήθως ενός πολυπεπτιδίου). Τις περισσότερες φορές, ο υποδοχέας είναι μια κινάση τυροσίνης. Η ογκογονικότητα μπορεί να προκληθεί από την ενεργοποίηση της κινάσης.

Μια σημαντική ομάδα ενδοκυτταρικών κινασών φωσφορυλιώνει κατάλοιπα τυροσίνης σε πρωτεΐνες-στόχους. Η c-Src, η οποία συνδέεται με τον κυτταροσκελετό, καθώς και με την κυτταρική μεμβράνη, αποτελεί πρότυπο μιας οικογένειας κινασών με παρόμοιες καταλυτικές ιδιότητες. Άλλες ενδοκυτταρικές κινάσες τυροσίνης είναι η c-Abl, η οποία βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα.

Μια ομάδα κυτταροδιαλυτών ενζύμων είναι οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, ένζυμα δηλαδή που φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες-στόχους σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης. Οι πυρηνικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες διαφόρων τύπων.

Καθεμία από αυτές τις ομάδες πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει γενικές αλλαγές του κυτταρικού φαινοτύπου, είτε πυροδοτώντας αλλαγές στη διαδικασία της κυτταρικής αύξησης είτε μεταβάλλοντας άμεσα τη γονιδιακή έκφραση.

Αυξητικός παράγοντας



Υποδοχέας αυξητικού παράγοντα (κινάση τυροσίνης)



Ras



Καταρράκτης κινασών (κινάσες σερίνης/θρεονίνης)



Παράγοντας/ες μεταγραφής

Όταν ένας αυξητικός παράγοντας αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του, επάγεται η ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Το σήμα περνά στην πρωτεΐνη Ras. Από αυτό το σημείο, το μονοπάτι συνεχίζεται με μια σειρά κινασών σερίνης/θρεονίνης. Οι πρωτεϊνικοί στόχοι στο τέλος του μονοπατιού μπορεί να ρυθμίζονται άμεσα ή έμμεσα με φωσφορυλίωση και περιλαμβάνουν παράγοντες μεταγραφής, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν ευρύ φάσμα αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση. Ένα μονοπάτι μεταγωγής σημάτων διακλαδίζεται σε διάφορα σημεία, έτσι ώστε το αρχικό ερέθισμα να πυροδοτεί ποικίλες αποκρίσεις. Σε αυτά τα μονοπάτια, η ενεργοποίηση στοιχείων στην κάθοδο θα προκαλέσει πιο περιορισμένο αριθμό αποκρίσεων απ' ό,τι η ενεργοποίηση των στοιχείων που βρίσκονται στην αρχή του μονοπατιού. Στο παράδειγμα του Ras γνωρίζουμε ότι το μονοπάτι μεταγωγής σήματος ενεργοποιείται από πολλούς αυξητικούς παράγοντες, για να επάγει τη μιτωτική απόκριση.



SIS

GF

REC

KINASE

GP

ERB-B  
FMS

RAS

SRC

ABL

YES

FES

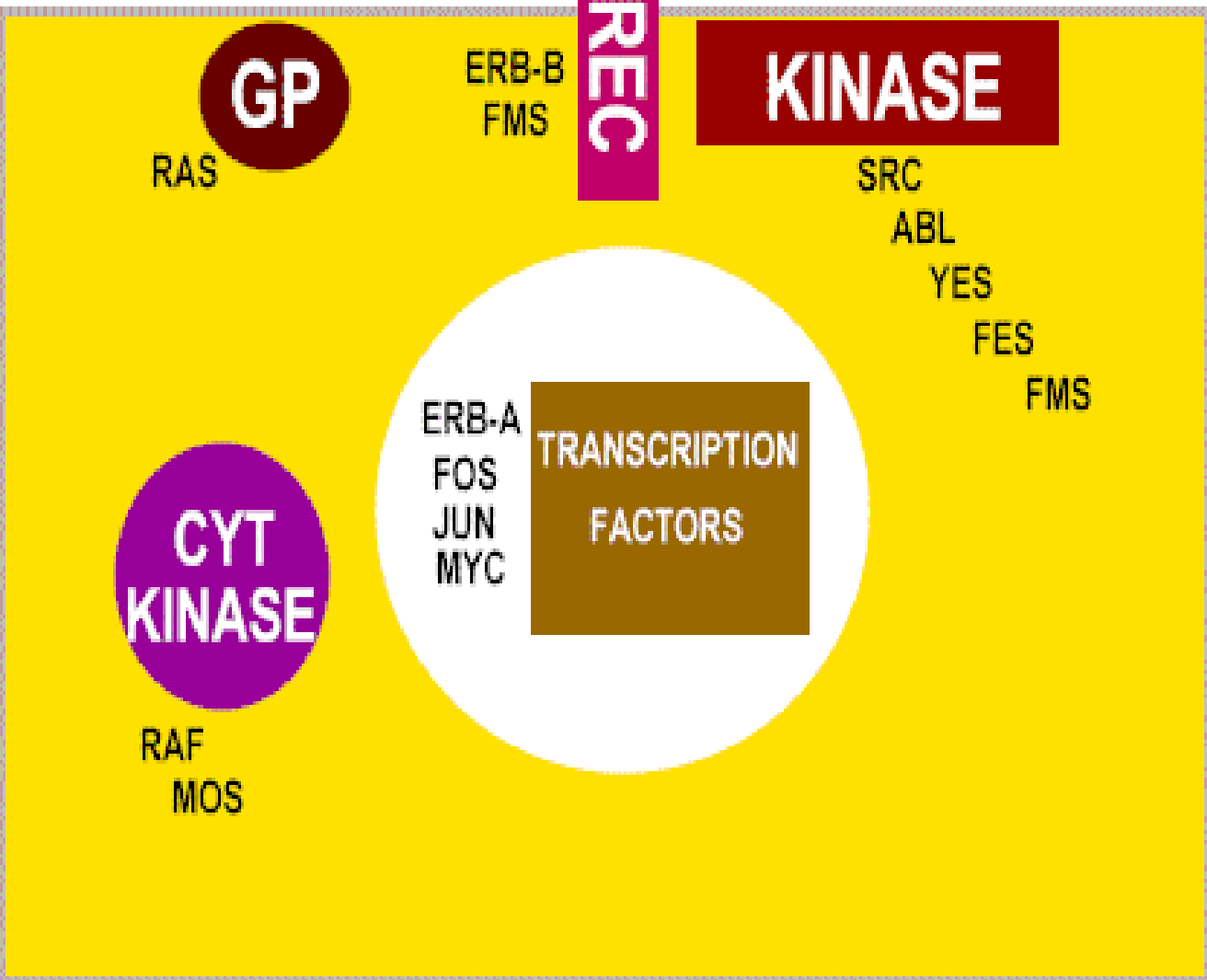
FMS

ERB-A  
FOS  
JUN  
MYC

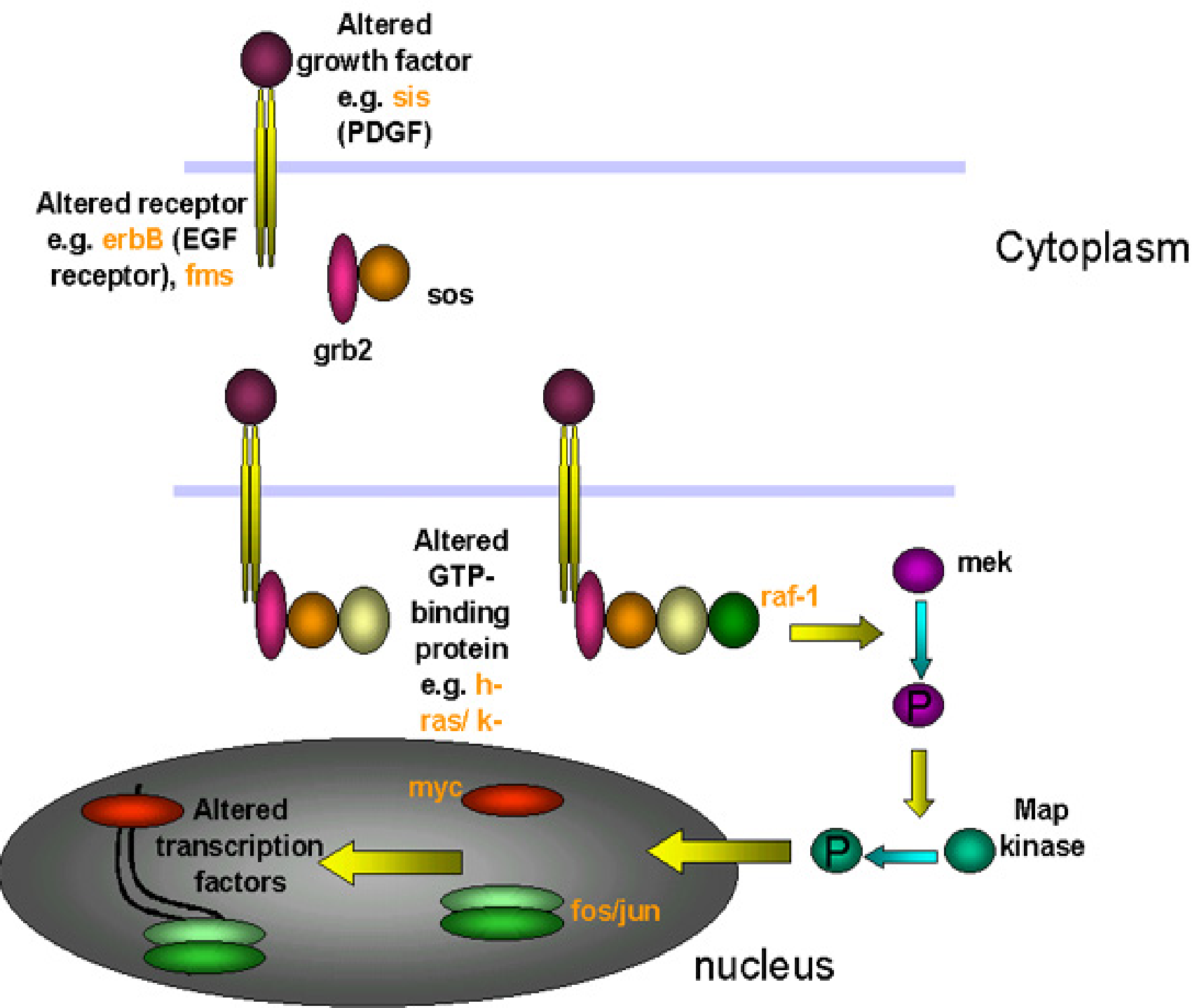
TRANSCRIPTION  
FACTORS

CYT  
KINASE

RAF  
MOS



**Η ανώμαλη ενεργοποίηση μιτογόνων μονοπατιών μπορεί να συνεισφέρει στην ογκογονικότητα.** Οι κινάσες τυροσίνης αποτελούν μια σημαντική τάξη ογκοπρωτεϊνών και διακρίνονται σε δύο γενικές ομάδες: σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και σε κυτταροπλασματικά ένζυμα. Οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων που έχουν ενεργότητα κινάσης συνήθως είναι μεγάλες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Ο υποδοχέας του EGF είναι ένα παράδειγμα υποδοχέα-κινάσης τυροσίνης. Η εξωκυτταρική N-τελική περιοχή του δεσμεύει τον προσδέτη που ενεργοποιεί τον υποδοχέα. Η ενδοκυτταρική C-τελική περιοχή έχει την ενζυμική ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Οι περισσότεροι από τους υποδοχείς που κωδικοποιούνται από κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια έχουν παρόμοια οργάνωση. Ο διμερισμός της εξωκυτταρικής περιοχής ενός υποδοχέα ενεργοποιεί την κινάση τυροσίνης της ενδοκυτταρικής πλευράς. Όταν οι κυτταροπλασματικές περιοχές των μονομερών έρχονται σε επαφή, επάγεται φωσφορυλίωση του ενός μονομερούς από το άλλο. Ο υποδοχέας άγριου τύπου ενεργοποιείται από τη δέσμευση με τον κατάλληλο προσδέτη, ο οποίος πυροδοτεί το σχηματισμό διμερούς. **Η δημιουργία του διμερούς υποδοχέων πυροδοτεί με τη σειρά της τη μεταγωγή του σήματος. Αντίθετα, η ογκογόνος παραλλαγή του υποδοχέα σχηματίζει αυθόρμητα διμερή, τα οποία είναι ενεργά, χωρίς να προηγηθεί σύνδεση με τον προσδέτη.**



Ο μετασχηματισμός ο οποίος προκαλείται από τον ιό του **ανθρώπου της T-λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (HTLV)** και από τους συναφείς ιούς οι οποίοι προσβάλλουν ζώα, κωδικοποιούν για έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή, την πρωτεΐνη του γονιδίου tax του ιού. Η tax πρωτεΐνη δρα σε trans για να ενεργοποιήσει την μεταγραφή πολλών κυτταρικών γονιδίων αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς κυτταρικούς παράγοντες.

Ωστόσο, η ογκογένεση από τον ιό HTLV, δηλαδή ο σχηματισμός λευχαιμίας παρουσιάζει μια λανθάνουσα περίοδο 20-30 ετών. Πιστεύεται ότι χρωμοσωμικές ανωμαλίες οι οποίες συμβαίνουν κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων από τον ιό HTLV είναι επίσης απαραίτητη προϋπόθεση για την προαγωγή της κακοήθειας

Το ογκογονίδιο *v-erb* είναι μια περικομμένη έκδοση του *c-erbB*, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του EGF. Η ογκοπρωτεΐνη διατηρεί την περιοχή της κινάσης τυροσίνης και τις διαμεμβρανικές επικράτειες, αλλά δεν έχει το N-τελικό άκρο. Και τα δύο ελλείμματα φαίνεται να είναι απαραίτητα για την ογκογονικότητα. Η αλλαγή στην εξωκυτταρική N-τελική επικράτεια επιτρέπει στην πρωτεΐνη να διμερίζεται αυθόρμητα, ενώ το C-τελικό έλλειμμα αφαιρεί από την κυτταροπλασματική πλευρά μια περιοχή που έχει την ικανότητα να καταστέλλει το δυναμικό μετασχηματισμού. Το *erbB2*, το οποίο κωδικοποιεί για έναν υποδοχέα που σχετίζεται στενά με τον υποδοχέα του EGF. Η ογκογόνος παραλλαγή φέρει μια μετάλλαξη-κλειδί στη διαμεμβρανική της περιοχή, η οποία αυξάνει την τάση των μονομερών του υποδοχέα να σχηματίζουν διμερή. Μερικά πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν υποδοχείς ή παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη συγκεκριμένων τύπων κυττάρων. Η μετάλλαξη ενός τέτοιου υποδοχέα μπορεί να προάγει την επ' άοριστον αύξηση των κυττάρων αυτών. Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-fms* κωδικοποιεί τον υποδοχέα του παράγοντα CSF-I (**C**olony **S**timulating **F**actor I, παράγοντας διέγερσης αποικιών I), δηλαδή του αυξητικού παράγοντα των μακροφάγων που προάγει την αύξηση και την ωρίμανση των πρόδρομων μυελοειδών κυττάρων. Και σε αυτή την περίπτωση, το *c-fms* καθίσταται ογκογόνο από μία μετάλλαξη στην εξωκυτταρική επικράτεια, η οποία προάγει το διμερισμό και ενεργοποιεί τον υποδοχέα ακόμη και απουσία του CSF-I. Η ογκογονικότητα ενισχύεται από C-τελικές μεταλλάξεις, οι οποίες πιθανόν να απενεργοποιούν την ενδοκυτταρική περιοχή αρνητικής ρύθμισης.

Το ογκογονίδιο *v-erb* είναι μια περικομμένη έκδοση του *c-erbB*, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του EGF. Η ογκοπρωτεΐνη διατηρεί την περιοχή της κινάσης τυροσίνης και τις διαμεμβρανικές επικράτειες, αλλά δεν έχει το N-τελικό άκρο. Και τα δύο ελλείμματα φαίνεται να είναι απαραίτητα για την ογκογονικότητα. Η αλλαγή στην εξωκυτταρική N-τελική επικράτεια επιτρέπει στην πρωτεΐνη να διμερίζεται αυθόρμητα, ενώ το C-τελικό έλλειμμα αφαιρεί από την κυτταροπλασματική πλευρά μια περιοχή που έχει την ικανότητα να καταστέλλει το δυναμικό μετασχηματισμού. Το *erbB2*, το οποίο κωδικοποιεί για έναν υποδοχέα που σχετίζεται στενά με τον υποδοχέα του EGF. Η ογκογόνος παραλλαγή φέρει μια μετάλλαξη-κλειδί στη διαμεμβρανική της περιοχή, η οποία αυξάνει την τάση των μονομερών του υποδοχέα να σχηματίζουν διμερή. Μερικά πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν υποδοχείς ή παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη συγκεκριμένων τύπων κυττάρων. Η μετάλλαξη ενός τέτοιου υποδοχέα μπορεί να προάγει την επ' άοριστον αύξηση των κυττάρων αυτών. Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-fms* κωδικοποιεί τον υποδοχέα του παράγοντα CSF-I (**C**olony **S**timulating **F**actor I, παράγοντας διέγερσης αποικιών I), δηλαδή του αυξητικού παράγοντα των μακροφάγων που προάγει την αύξηση και την ωρίμανση των πρόδρομων μυελοειδών κυττάρων. Και σε αυτή την περίπτωση, το *c-fms* καθίσταται ογκογόνο από μία μετάλλαξη στην εξωκυτταρική επικράτεια, η οποία προάγει το διμερισμό και ενεργοποιεί τον υποδοχέα ακόμη και απουσία του CSF-I. Η ογκογονικότητα ενισχύεται από C-τελικές μεταλλάξεις, οι οποίες πιθανόν να απενεργοποιούν την ενδοκυτταρική περιοχή αρνητικής ρύθμισης.



Η κυτταροπλασματική ομάδα περιλαμβάνει τα ιικά ογκογονίδια *src*, *yes*, *abl* και *ros* (η *c-Src* στην πραγματικότητα είναι αγκιστρωμένη σε μεμβράνες). Ένα μεγάλο τμήμα των αλληλουχιών όλων αυτών των γονιδίων, το οποίο αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 80-516 του *c-src* παρουσιάζει ομοιότητες μεταξύ των γονιδίων και περιλαμβάνει τις επικράτειες SH2 και SH3, καθώς και την καταλυτική επικράτεια της κινάσης. Αρχέτυπο της ομάδας των κυτταροπλασματικών κινασών τυροσίνης αποτελεί η ομάδα των πρωτεϊνών *Src* που μελετήθηκαν στον ιό RSV. Έχουν προκύψει πολλά στελέχη του ιού, που φέρουν ποικίλες παραλλαγές του γονιδίου *v-src*. Το κοινό χαρακτηριστικό των *v-src* είναι ότι η C-τελική αλληλουχία του *c-src* έχει αντικατασταθεί, ενώ περιέχουν διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις. Σε κύτταρα που μετασχηματίζονται από τον ιό RSV, το επίπεδο της φωσφοτυροσίνης αυξάνεται κατά ~10 φορές. Επιπλέον, η *Src* μπορεί να φωσφορυλιώσει και τον εαυτό της. Οι πρωτεΐνες *v-Src* και *c-Src* είναι και οι δύο τροποποιημένες στο N-τελικό άκρο. Το N-τελικό αμινοξύ αποκόπτεται και η N-τελική γλυκίνη που αποκαλύπτεται συνδέεται ομοιοπολικά με μυριστικό οξύ. Η μυριστυλίωση επιτρέπει στις πρωτεΐνες *Src* να αγκιστρώνονται στην κυτταροπλασματική πλευρά των μεμβρανών. Η μυριστυλίωση είναι απαραίτητη για την ογκογόνο δράση της *v-Src* και *c-Src*. Η ενεργότητα της *v-Src* είναι ~20 φορές υψηλότερη από αυτήν της *c-Src*.

Η πρωτεΐνη Src ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση

Δύο θέσεις της Src ελέγχουν την ενεργότητα της κινάσης της. Φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Tyr-527, το οποίο ανήκει στα 19 αμινοξέα του C-τελικού άκρου που λείπουν από την πρωτεΐνη v-Src, απενεργοποιεί την κινάση. Η πρωτεΐνη c-Src φωσφορυλιώνεται *in vivo* σε αυτή τη θέση από την κινάση Csk, έτσι ώστε να διατηρείται ανενεργή.

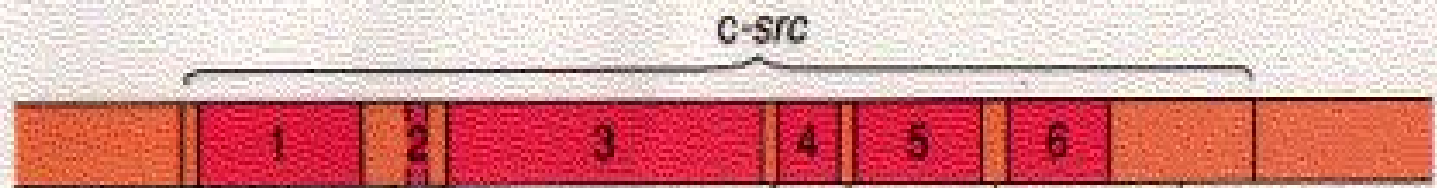
Αντίθετα, η Src ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Tyr-416.

***Η φωσφορυλίωση της Tyr-527 καταστέλλει την ογκογονικότητα της c-Src. Η απομάκρυνση αυτού του καταλοίπου λόγω του ελλείμματος της C-τελικής περιοχής στη v-Src συμβάλλει σημαντικά στην ογκογονικότητα της μετασχηματιστικής πρωτεΐνης.***

***Η φωσφορυλίωση στην Tyr-416 ενεργοποιεί την ογκογονικότητα της Src.***

Η μειωμένη φωσφορυλίωση της Tyr-527 ευθύνεται για την αυξημένη φωσφορυλίωση της Tyr-416, γεγονός με κρίσιμη σημασία για τη ρύθμιση. Σημειακές μεταλλάξεις σε άλλες θέσεις της c-Src υποστηρίζουν το συσχετισμό του ογκογόνου δυναμικού με τα χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης της Tyr-527 και τα υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης της Tyr-416. Η κατάσταση αυτών των τυροσινών μπορεί να είναι ένας γενικός δείκτης του ογκογόνου δυναμικού της c-Src. Ωστόσο, η v-Src εξαρτάται λιγότερο από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της Tyr-416, αφού τα μεταλλάγματα αυτής της θέσης διατηρούν κάποιο δυναμικό μετασχηματισμού. Πιθανόν τα γονίδια v-src να έχουν συσσωρεύσει και άλλες μεταλλάξεις που αυξάνουν το δυναμικό μετασχηματισμού

Cellular gene



Retrovirus genome without oncogene



Genome of Rous sarcoma virus



V-SRC

Οι πρωτεΐνες c-Src και v-Src είναι παρόμοιες: έχουν ίδια N-τελική μετα-μεταφραστική τροποποίηση, ίδιο κυτταρικό εντοπισμό και ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Η c-Src εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε διάφορους τύπους οριστικά διαφοροποιημένων κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η c-Src ενεργοποιείται από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως ο υποδοχέας του PDGF.

**Η ρυθμιστική περιοχή της c-Src περιλαμβάνει δύο μοτίβα τα οποία εντοπίζονται και σε διάφορες άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που ενέχονται στη μεταγωγή σημάτων: αυτά τα μοτίβα μπορούν να συνδέουν την πρωτεΐνη με τα άλλα στοιχεία του μονοπατιού, ανοδικά ή καθοδικά από αυτήν. Τα ονόματα αυτών των δύο περιοχών, SH2 και SH3, δηλώνουν ότι αρχικά προσδιορίστηκαν ως περιοχές ομολογίας των πρωτεϊνών Src (Src homology). Οι περισσότερες μεταλλάξεις στην περιοχή SH2 μειώνουν το δυναμικό μετασχηματισμού (υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία της SH2 απαιτείται για την ενεργοποίηση της c-Src), ενώ οι περισσότερες μεταλλάξεις της SH3 τον αυξάνουν (υποδεικνύοντας ότι η SH3 έχει αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο).**

Στην ανενεργή c-Src, η Tyr-527 είναι φωσφορυλιωμένη και αυτό επιτρέπει στην C-τελική περιοχή του μορίου της πρωτεΐνης να αναδιπλώνεται και να δεσμεύεται στην επικράτεια SH2 της N-τελικής περιοχής της. Όταν ενεργοποιείται ένας κατάλληλος υποδοχέας-κινάση τυροσίνης (όπως ο υποδοχέας του PDGF), αυτοφωσφορυλιώνεται και δημιουργεί μια θέση δέσμευσης της επικράτειας SH2.

**Σύνδεση του υποδοχέα με την SH2 της Src εκτοπίζει την Tyr-527 που αποφωσφορυλιώνεται, προκαλώντας μια δομική αλλαγή στο μόριο της πρωτεΐνης που επιτρέπει την φωσφορυλίωση της Tyr-416. Η επικράτεια SH2 προσδένεται στην C-τελική προεκβολή της επικράτειας της κινάσης που περιέχει την Tyr-527. Η επικράτεια SH3 προσδένεται σε μια μικρή αλληλουχία που συνδέει την επικράτεια SH2 με την καταλυτική επικράτεια. Οι επικράτειες SH2 και SH3 βρίσκονται πίσω από την καταλυτική επικράτεια και έτσι αυτές οι αλληλεπιδράσεις κλειδώνουν το ένζυμο στην ανενεργή κατάσταση. Ο βρόχος ενεργοποίησης στην καταλυτική επικράτεια έχει μια διαμόρφωση που δεν επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της Tyr-416. Ένας ενεργοποιητής προσδένεται και στις δύο επικράτειες SH2 και SH3. Αυτό προκαλεί την αποφωσφορυλίωση της Tyr-527, η οποία με τη σειρά της προκαλεί μια δομική μεταβολή του βρόχου ενεργοποίησης που επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της Tyr-416.**

Η ογκογόνος πρωτεΐνη v-Src είναι ιδιοστατικά ενεργή, επειδή έχει απολέσει την Tyr-527, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να σχηματιστεί η ανενεργή μορφή της.

**Σε ορισμένες περιπτώσεις ογκογένεσης μπορεί να ενέχονται εναλλακτικοί τρόποι ενεργοποίησης της c-Src. Για παράδειγμα, η δέσμευση του μεσαίου αντιγόνου T του ιού πολυόμα στην C-τελική περιοχή της c-Src αποτρέπει τη φωσφορυλίωσή της στη θέση Tyr-527 (η οποία εντοπίζεται στην περιοχή όπου δεσμεύεται το αντιγόνο) και έτσι ενεργοποιεί τη c-Src.**

Οι ογκοπρωτεΐνες μπορεί να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση

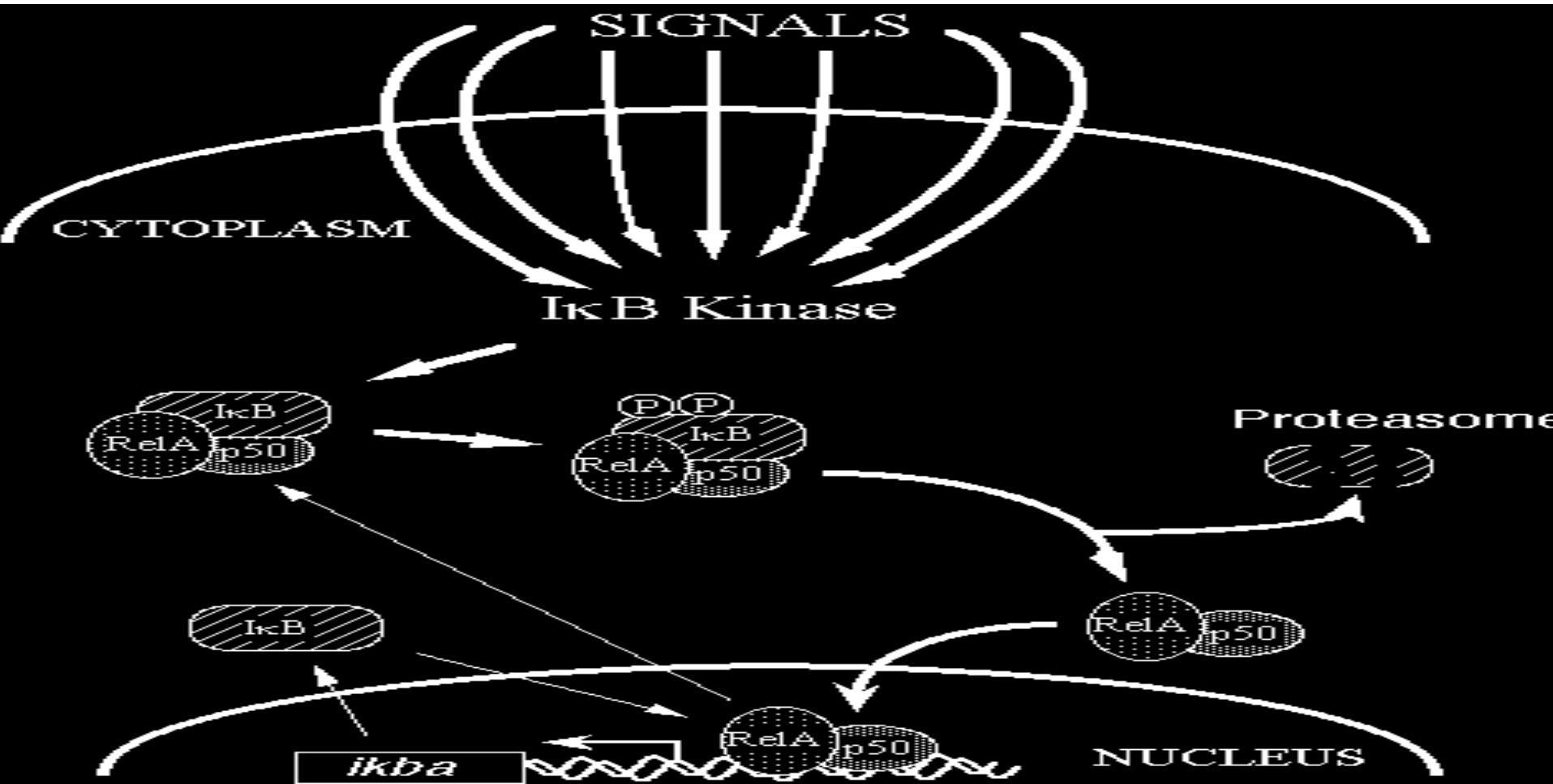
Πολλά ογκογονίδια δρουν σε πρώιμα στάδια μονοπατιών που τελικά οδηγούν σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης, ενώ άλλα δρουν άμεσα στο επίπεδο της μεταγραφής.

Τα ογκογονίδια *rel*, *jun*, *fos*, *erbA*, *myc* και *myb* αντιπροσωπεύουν κύριες οικογένειες γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες. Στις περιπτώσεις των πρωτεϊνών Rel, Jun και ErbA, η μεταγραφική ενεργότητα των πρωτεϊνών c-Onc και v-Onc είναι διαφορετική και αυτό ίσως σχετίζεται με το μετασχηματισμό. Η δράση των γονιδίων v-onc μπορεί καταρχήν να είναι ποσοτική ή και ποιοτική. Τα ογκογονίδια που επηρεάζουν τη μεταγραφή μπορούν είτε να αυξήσουν είτε να μειώσουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων. Αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης ή ενεργότητάς τους μπορεί να είναι η επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων των οποίων τα προϊόντα επιτρέπουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων μόνο όταν βρίσκονται σε χαμηλές ποσότητες. Ένα παράδειγμα ογκογονιδίου που επηρεάζει τη γονιδιακή μεταγραφή είναι το v-rel, παράγοντας μετασχηματισμού του ιού της δικτυοενδοθηλίωσης (reticuloendotheliosis) των πτηνών. Ο ρετροϊός είναι ιδιαίτερα ογκογόνος στα κοτόπουλα, όπου προκαλεί λεμφώματα B κυττάρων. Το v-rel είναι μια περικομμένη έκδοση του c-rel, που στερείται ~100 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο και φέρει μικρό αριθμό σημειακών μεταλλάξεων στην υπόλοιπη αλληλουχία.

**Το γονίδιο *rel* ανήκει σε μια οικογένεια της οποίας το πλέον καλά χαρακτηρισμένο μέλος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB. Ο παράγοντας αυτός είναι ένα διμερές των υπομονάδων p65 και p50, το οποίο συγκρατείται στο κυτταρόπλασμα από ένα ρυθμιστή, τον I-κB. Όταν ο I-κB φωσφορυλιώνεται, αποικοδομείται και επομένως απελευθερώνει τον NF-κB, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων που διαθέτουν υποκινητές και/ή ενισχυτές με το μοτίβο κB.**

## Μεταγωγή σήματος Rel/NF-κB .

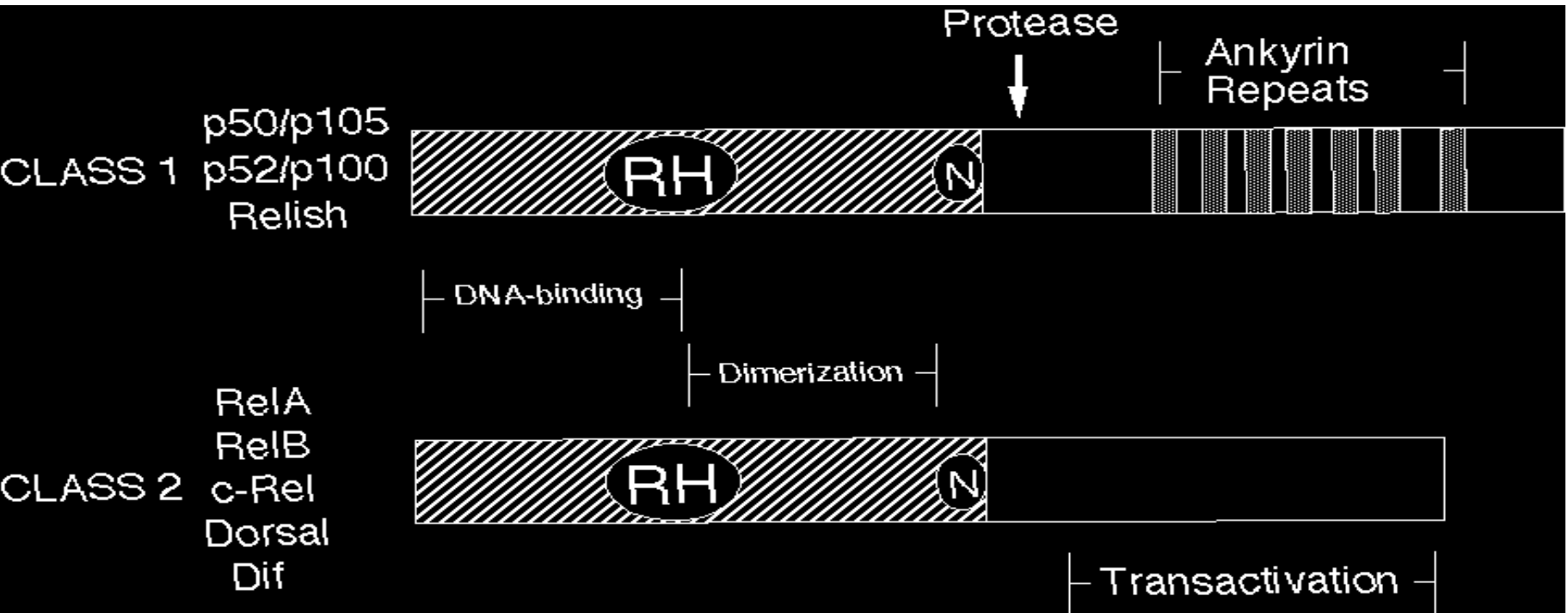
Οι παχιές γραμμές συμβολίζουν ενεργοποίηση οι λεπτές απενεργοποίηση.  
Η φωσφορυλίωση του παράγοντα IκB σε δύο αμινοτελικές σερίνες, επάγει την ουβουκτινίωση και την πρωτεόλυση. Τότε p50-RelA, εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την γονιδιακή έκφραση. Ένας στόχος γονίδιο NF-κB κωδικοποιεί για τον παράγοντα IκB ο οποίος μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να εκδιώξει από το DNA τον παράγοντα NF-κB πίσω στο κυτταρόπλασμα



## Δομές των μεταγραφικών παραγόντων Rel . Rel I & Rel II.

Οι δύο τάξεις διαθέτουν μια συντηρημένη περιοχή υπεύθυνη για την σύνδεση του DNA/διμερισμό την ομολογία Rel (Rel homology ,RH) η οποία επιπλέον φέρει αλληλουχίες για τον πυρηνικό εντοπισμό και για την σύνδεση του αναστολέα IκB. Οι πρωτεΐνες της τάξης I έχουν επιπρόσθετες αλληλουχίες ενσωματωμένες στην περιοχή RH ( ankyrin repeat-containing inhibitory domains) , οι οποίες μπορούν να αφαιρεθούν μετά από την δράση του πρωτεασώματος.

Το C- αμινοτελικό ήμισυ της τάξης II Rel πρωτεϊνών διαθέτουν περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης.





Πολλοί τύποι κυτταρικών ερεθισμάτων ενεργοποιούν τον NF-κB, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί ένα ευρύ φάσμα γονιδίων που διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης κB. Τα μέλη της οικογένειας NF-κB σχηματίζουν διμερή με διάφορους συνδυασμούς των υπομονάδων τους ανά ζεύγη. Όταν η *v-Rel* σχηματίζει διμερή με άλλα μέλη της οικογένειας, μπορεί να επηρεάζει την ενεργότητά τους είτε αρνητικά είτε θετικά, αλλάζοντας έτσι το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης. Η *v-Rel* βρίσκεται αποκλειστικά στον πυρήνα, επειδή έχει χάσει τις αλληλουχίες που απαιτούνται για την εξαγωγή της στο κυτταρόπλασμα.

Ο μεταγραφικός παράγοντας AP1 είναι ο πυρηνικός παράγοντας που επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που αποκρίνονται στους ογκογόνους φορβολικούς εστέρες. Ο κανονικός παράγοντας AP1 αποτελείται από ένα ετεροδιμερές των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *c-jun* και *c-fos*. Οι Jun και Fos είναι παράγοντες μεταγραφής που ανήκουν σε δύο οικογένειες πρωτεϊνών με φερμουάρ λευκίνης. Οι συνδυασμοί των μελών της οικογένειας Jun με τα μέλη της οικογένειας Fos δημιουργούν μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με τον AP1. Οι μεταλλάξεις του *v-jun* ή του *v-fos* που δεν έχουν ικανότητα πρόσδεσης στο DNA ή που δεν διαθέτουν την ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής δεν μπορούν να μετασχηματίσουν κύτταρα, αποδεικνύοντας άμεσα ότι η ενεργοποίηση της μεταγραφής είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό.

Ο c-Jun ενεργοποιείται με τη φωσφορυλίωση δύο καταλοίπων σερίνης από την κινάση JNK, η οποία ανήκει στο μονοπάτι Ras. Η v-Jun παρουσιάζει έλλειμμα των αμινοξέων 34-60, το οποίο περιλαμβάνει και τις δύο θέσεις φωσφορυλίωσης, και έτσι δεν ρυθμίζεται από το μονοπάτι Ras. Η v-Jun μπορεί επίσης να παρεμβάλλεται στην ικανότητα της c-Jun να ενεργοποιεί κάποια από τα γονίδια-στόχους. Το δυναμικό μετασχηματισμού της v-Jun μπορεί να εξαρτάται τόσο από ποσοτικές (υπερέκφραση ή υποέκφραση ορισμένων γονιδίων-στόχων) όσο και από ποιοτικές αλλαγές (τροποποίηση του προτύπου των γονιδίων που αποκρίνονται στον παράγοντα).

Το κυτταρικό γονίδιο *c-erbA* κωδικοποιεί έναν υποδοχέα θυρεοειδικών ορμονών ο οποίος ανήκει στην ευρύτερη τάξη των υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Ο υποδοχέας εντοπίζεται μόνιμα στον πυρήνα και μάλιστα μπορεί να προσδένεται στα στοιχεία απόκρισης, είτε ο προσδέτης είναι παρόν είτε όχι. Η παρουσία της ορμόνης μπορεί επομένως να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή μέσω του υποδοχέα που είναι ήδη προσδεμένος στο DNA. Η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό.

Το *v-erbA* είναι περικομμένο και στα δύο άκρα και έχει ένα μικρό αριθμό αντικαταστάσεων σε σχέση με το *c-erbA*. Οι ιδιότητες δέσμευσης της ορμόνης είναι τροποποιημένες. Το προϊόν του *c-erbA* δεσμεύει τριιωδοθυρονίνη (T3) με υψηλή συγγένεια, ενώ το προϊόν του *v-erbA* έχει μικρή ή καμία συγγένεια για τον προσδέτη αυτόν. Αυτό αποδεικνύει ότι η απώλεια της δυνατότητας δέσμευσης του προσδέτη μπορεί να δημιουργήσει μια πρωτεΐνη-υποδοχέα με ορμονο-ανεξάρτητη λειτουργία.

Συνέπεια της απώλειας απόκρισης στον προσδέτη είναι να μην μπορεί πλέον ο παράγοντας να διεγερθεί για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Το παραπάνω φαινόμενο καθιστά το *v-erbA* κυρίαρχο αρνητικό ογκογονίδιο.

Η λειτουργία του είναι να εμποδίζει τη μεταγραφή των γονιδίων που συνήθως ενεργοποιούνται από τη c-erbA. Τα γονίδια που συνήθως ενεργοποιούνται από τη c-erbA καταστέλλουν το μετασχηματισμό, πιθανόν επειδή προάγουν τη διαφοροποίηση. Παρεμπόδιση της δράσης τους επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Η ογκοπρωτεΐνη E1A του αδενοϊού αποτελεί παράδειγμα έμμεσης ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, δηλαδή χωρίς την πρόσδεση της ογκοπρωτεΐνης στο DNA. Η γονιδιακή περιοχή E1A εκφράζεται με τη μορφή τριών mRNA, που παράγονται με εναλλακτικό μάτισμα. Τα mRNA 13S και 12S κωδικοποιούν δύο πολύ όμοιες πρωτεΐνες 289 και 243 αμινοξέων που παράγονται σε πρώιμα στάδια της μόλυνσης. Έχουν την ικανότητα αθανατοποίησης κυττάρων και συνεργάζονται με άλλες ογκοπρωτεΐνες (ειδικότερα τις Ras) για το μετασχηματισμό πρωτογενών κυττάρων. Οι πρωτεΐνες E1A ενεργοποιούν τη μεταγραφή κάποιων γονιδίων, ενώ καταστέλλουν άλλα. Οι μεταλλάξεις των πρωτεϊνών E1A υποδεικνύουν ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση απαιτεί ένα μικρό τμήμα το οποίο υπάρχει μόνο στην πρωτεΐνη των 289 αμινοξέων που κωδικοποιείται από το mRNA 13S. Η καταστολή της μεταγραφής, η επαγωγή της σύνθεσης DNA και ο μορφολογικός μετασχηματισμός εξαρτώνται από τις περιοχές που είναι κοινές και στις δύο πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες E1A δρουν με την πρόσδεσή τους σε διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια καταστέλλουν ή ενεργοποιούν τη μεταγραφή των κατάλληλων γονιδίων-στόχων. Σ' αυτούς τους στόχους περιλαμβάνονται και οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου RB και p27.

## Μετάσταση

Μόνο ένας μικρός αριθμός (<20) γονιδίων παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές στη μεταγραφή, υπονοώντας ότι η μεταστατική ικανότητα πιθανόν να ενέχει σχετικά μικρές αλλαγές του προτύπου της γονιδιακής έκφρασης. Ανάμεσα στα γονίδια που επηρεάζονται είναι αρκετά των οποίων τα προϊόντα επιδρούν στον κυτταροσκελετό ακτίνης. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει ότι οι αλλαγές της κυτταρικής κινητικότητας και/ή της πρόσφυσης σε άλλα κύτταρα ή στο υπόστρωμα μπορεί να αποτελούν τη βάση της μετάστασης.

Συγκρίνοντας καλοήθεις όγκους του προστάτη με μεταστατικούς καρκίνους ανιχνεύτηκαν μεγαλύτερες αλλαγές. Κατά μέσο όρο, αυξήθηκε η έκφραση 55 γονιδίων, ενώ μειώθηκε η έκφραση 480 γονιδίων.

Κατά συνέπεια η παρεμπόδιση λειτουργιών που φυσιολογικά καταστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα μπορεί να έχει σημαντική συμβολή στην εξέλιξη του καρκίνου. Ένα από τα γονίδια του οποίου η έκφραση αυξάνεται είναι το *EZH2*, που σχηματίζει σύμπλοκα τα οποία ενέχονται στην καταστολή της ενεργότητας της χρωματίνης. Το *EZH2* ευθύνεται για την καταστολή περίπου του ενός τρίτου από τα γονίδια που έχουν μειωμένη έκφραση στους μεταστατικούς καρκίνους του προστάτη.

RB μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο

Είδαμε ότι το κοινό χαρακτηριστικό των διαφόρων ογκογονιδίων είναι ότι η αυξημένη ή απλά διαφοροποιημένη ενεργότητα του γονιδιακού προϊόντος είναι ογκογόνος. Είτε το ογκογονίδιο εισάγεται στο γονιδίωμα από έναν ιό είτε προκύπτει από μετάλλαξη, είναι κυρίαρχο έναντι των αλληλόμορφων πρωτο-ογκογονιδίων. Εφόσον μια μετάλλαξη που ενεργοποιεί ένα αλληλόμορφο είναι ογκογόνος, η ογκογένεση είναι αποτέλεσμα κέρδους λειτουργίας.

Ορισμένοι όμως όγκοι προκαλούνται με διαφορετικό μηχανισμό: απαιτείται η απώλεια και των δύο αλληλομόρφων ενός γονιδιακού τόπου. Η προδιάθεση δημιουργίας όγκων τέτοιου είδους μπορεί είτε να κληρονομηθεί μέσω της αναπαραγωγικής σειράς (germline) είτε να είναι αποτέλεσμα σωματικής μετάλλαξης. Τέτοιες περιπτώσεις χαρακτηρίζουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου και η απώλειά τους προκαλεί όγκους.

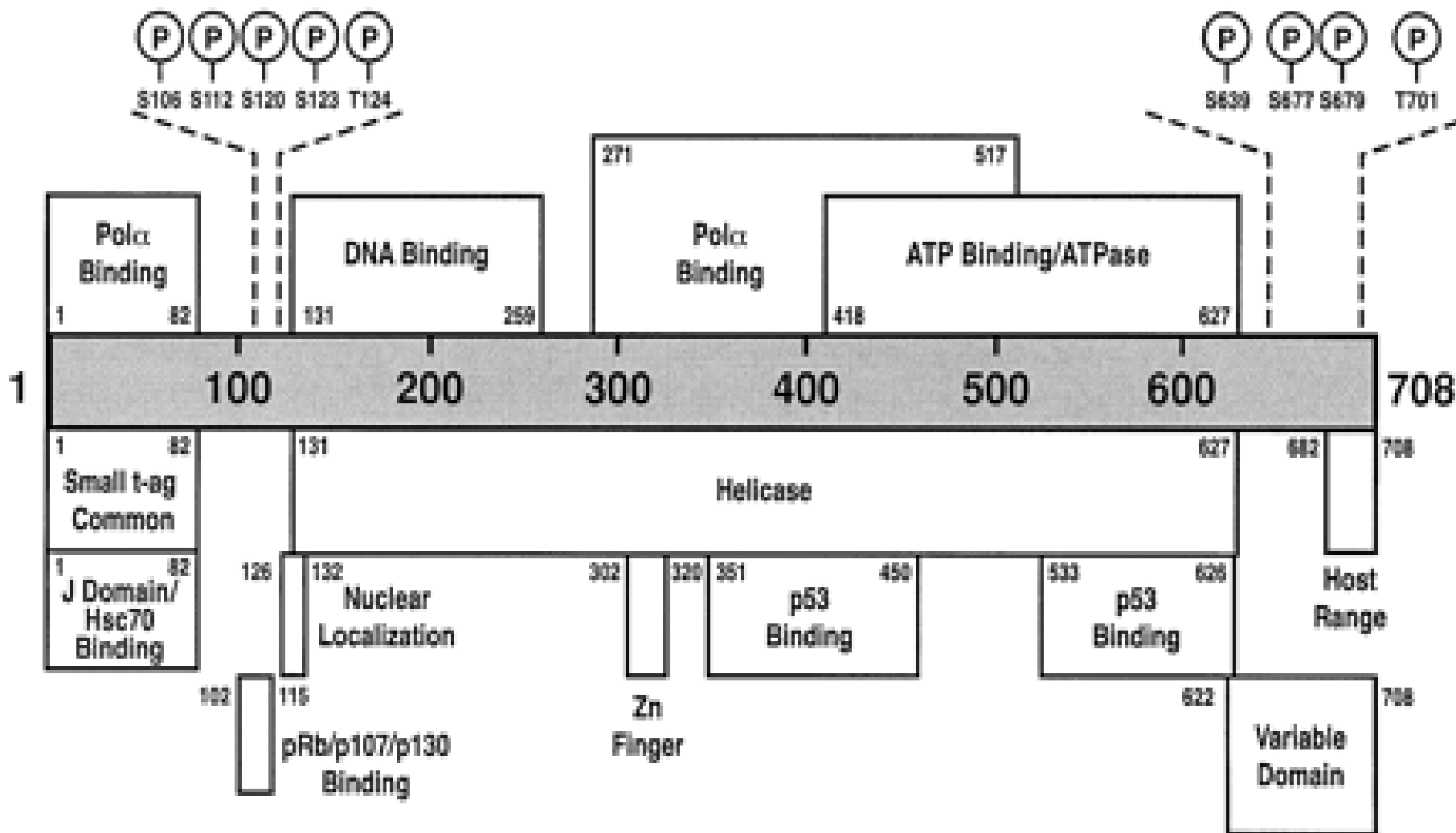
Το ρετινοβλάστωμα είναι μια ασθένεια που εμφανίζεται στην παιδική ηλικία και χαρακτηρίζεται από όγκο στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού. Μπορεί να παρουσιάζεται είτε ως κληρονομικό χαρακτηριστικό είτε σποραδικά (από σωματική μετάλλαξη). Συχνά σχετίζεται με ελλείμματα της ζώνης q14 του χρωμοσώματος 13. Το ρετινοβλάστωμα εκδηλώνεται όταν και τα δύο αντίγραφα του *RB* είναι απενεργοποιημένα. Στην κληρονομική μορφή της ασθένειας, ένα γονικό χρωμόσωμα φέρει μια αλλαγή σε αυτή την περιοχή. Μια σωματική μετάλλαξη στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια και του δεύτερου αντιγράφου του γονιδίου *RB*, προκαλεί όγκο.

Επομένως η αιτία του ρετινοβλαστώματος είναι η απώλεια της λειτουργίας της πρωτεΐνης RB, συνήθως ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων που εμποδίζουν την έκφραση του γονιδίου. Η απώλεια του *RB* ενέχεται και σε άλλες μορφές καρκίνου, όπως το οστεοσάρκωμα (osteosarcoma) και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (small cell lung cancer).

Η RB είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο. Σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία (G0/G1), η RB δεν είναι φωσφορυλιωμένη, αλλά φωσφορυλιώνεται στη συνέχεια του κυτταρικού κύκλου, ειδικά στο τέλος της φάσης G1, από σύμπλοκα κυκλίνης cdk και τέλος αποφωσφορυλιώνεται κατά τη μίτωση.

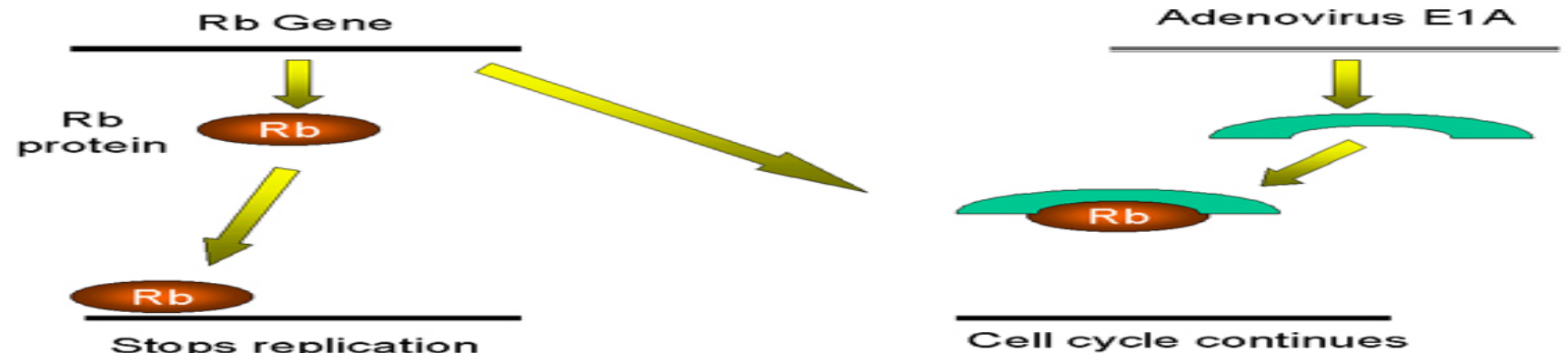
**Η μη φωσφορυλιωμένη μορφή της RB προσδένεται εξειδικευμένα σε διάφορες πρωτεΐνες, ενώ η φωσφορυλίωση απελευθερώνει τις πρωτεΐνες αυτές. Συνεπώς οι αλληλεπιδράσεις αυτές συμβαίνουν μόνο σε καθορισμένο χρονικό διάστημα του κυτταρικού κύκλου (πριν τη φάση S).**

Λειτουργικές περιοχές του μεγάλου καρκινικού αντιγόνου του SV40 .  
 1-708 η αρίθμηση των αμινοξέων του .Απεικονίζονται οι διάφορες περιοχές  
 σύνδεση του με πρωτεϊνικούς παράγοντες και με το DNA.



Οι πρωτεΐνες-στόχοι περιλαμβάνουν την ομάδα των μεταγραφικών παραγόντων E2F, οι οποίοι ενεργοποιούν γονίδια απαραίτητα για τη φάση S. Η πρόσδεση στην RB καταστέλλει την ικανότητα των παραγόντων E2F να ενεργοποιούν την μεταγραφή, οπότε η RB παίζει κατασταλτικό ρόλο στην έκφραση των E2F-εξαρτώμενων γονιδίων. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η RB εμποδίζει έμμεσα τα κύτταρα να εισέλθουν στη φάση S. Ορισμένα ιικά καρκινογόνα αντιγόνα συνδέονται ειδικά στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της RB. Το καλύτερα χαρακτηρισμένο είναι το αντιγόνο T του ιού SV40 και το E1A του αδενοϊού. Η μη φωσφορυλιωμένη RB καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η δράση της πρέπει να κατασταλεί ώστε το κύτταρο να περάσει στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αυτό επιτυγχάνεται με την κυκλική φωσφορυλίωση που υφίσταται η RB ή, εναλλακτικά, με την πρόσδεση ενός ιικού αντιγόνου στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της. Επειδή το σύμπλοκο της RB με το καρκινικό αντιγόνο δεν προσδένεται στους E2F, οι παράγοντες αυτοί είναι ελεύθεροι να επάγουν την είσοδο του κυττάρου στη φάση S (ενώ παράλληλα δεν υπάρχει το σύμπλοκο RB-E2F, ώστε να καταστείλει τα γονίδια-στόχους). Η υπερέκφραση της RB εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη.

### Anti-Oncogenes Retinoblastoma





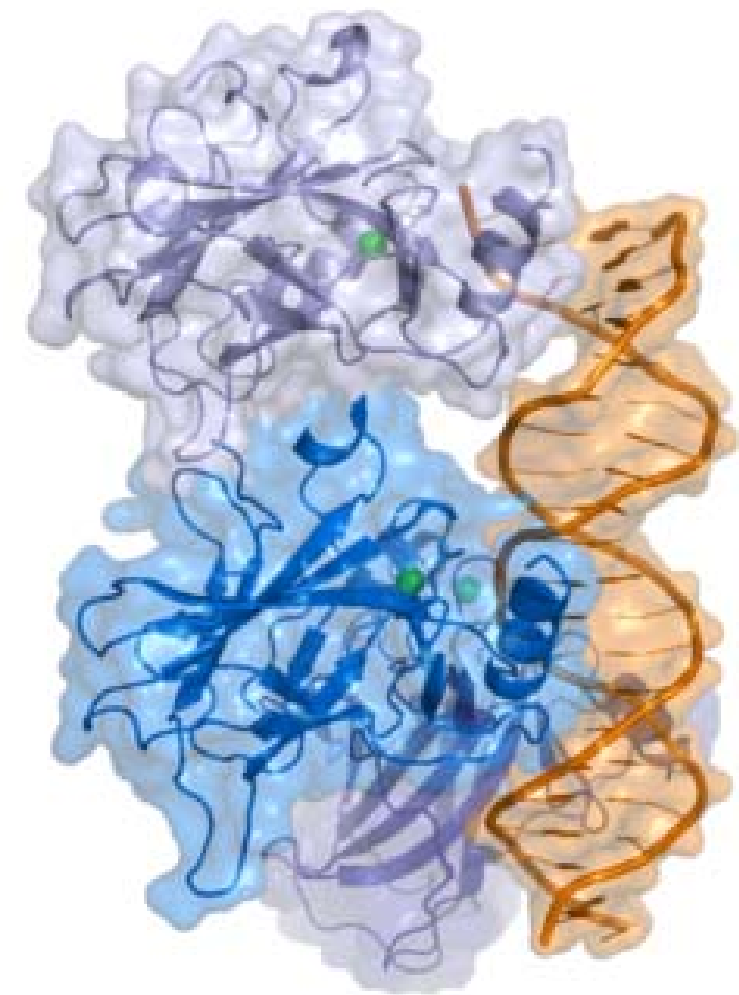
Η RB δεν είναι η μοναδική πρωτεΐνη του είδους: δύο ομόλογες πρωτεΐνες, οι p107 και p130, έχουν παρόμοιες ιδιότητες. Εκτός από τις μεταλλάξεις της ίδιας της RB, βρίσκονται μεταλλάξεις και στις μικρές κατασταλτικές πρωτεΐνες (κυρίως στην p16 και πιθανόν στην p21) και στις κυκλίνες D. Παρόλο που οι πρωτεΐνες αυτές (κυρίως η RB) παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο ενός πολλαπλασιαζόμενου κυττάρου, η λειτουργία τους, η οποία ενδεχομένως σχετίζεται με την ογκογένεση, εντοπίζεται στη φάση ηρεμίας (G0) του κυττάρου. Στα κύτταρα της φάσης αυτής, η RB δεν είναι φωσφορυλιωμένη, τα επίπεδα των κυκλινών D είναι χαμηλά ή ανύπαρκτα και οι p16, p21 και p27 εξασφαλίζουν την απενεργοποίηση των συμπλόκων cdk-κυκλινών. Η ενεργότητα της κυκλίνης D είναι αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό. Η απώλεια του μοριακού κυκλώματος που την καταστέλλει (p16 ή p21) προκαλεί μη ελεγχόμενη αύξηση. Ο έλεγχος της κυκλίνης D είναι ιδιαίτερα σημαντικός στον καρκίνο του μαστού. Το γονίδιο της κυκλίνης D1 βρίσκεται πολλαπλασιασμένο σε 20% των περιπτώσεων όγκων του μαστού στον άνθρωπο, ενώ η πρωτεΐνη υπερεκφράζεται σε >50% των καρκινωμάτων του μαστού.

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53 καταστέλλει την κυτταρική αύξηση ή προκαλεί απόπτωση

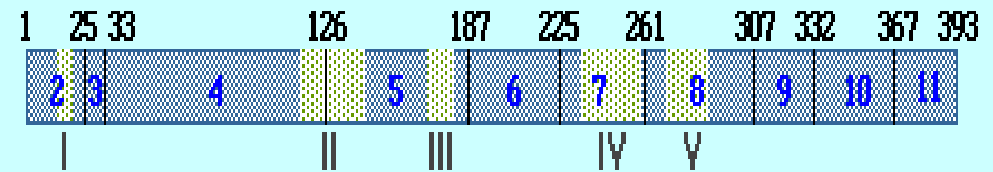
Περισσότερα από τα μισά περιστατικά καρκίνου στον άνθρωπο οφείλονται είτε σε έλλειμμα είτε σε μετάλλαξη του γονιδίου της p53, καθιστώντας την απώλεια της p53 την πιο κοινή (με μεγάλη διαφορά) μετατροπή που παρατηρείται σε καρκίνους στον άνθρωπο. Η p53 είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη. Αρχικά ανακαλύφθηκε σε κύτταρα μετασχηματισμένα από τον ιό SV40, στα οποία συνδέεται με το αντιγόνο T του ιού. Στα μετασχηματισμένα κύτταρα ή στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από όγκους παρατηρείται μεγάλη αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης p53. Αποδείχθηκε ότι όλες οι μετασχηματιστικές μορφές της p53 ήταν μεταλλαγμένες παραλλαγές της πρωτεΐνης.

Επρόκειτο για επικρατή αρνητικά (dominant negative) μεταλλάγματα, που παρεμβάλλονται και υπερκαλύπτουν τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης άγριου τύπου. Η πιο συνηθισμένη μορφή κυρίαρχου αρνητικού μεταλλάγματος σχηματίζει ένα ετερομερές σύμπλοκο που περιέχει τόσο την υπομονάδα άγριου τύπου όσο και τη μεταλλαγμένη. **Στο σύμπλοκο αυτό όμως, η υπομονάδα άγριου τύπου είναι ανίκανη να λειτουργήσει. Η p53 πιθανόν να υφίσταται ως τετραμερές.** Όταν συνδέονται οι μεταλλαγμένες υπομονάδες και οι υπομονάδες άγριου τύπου της p53, το τετραμερές λαμβάνει τη μεταλλαγμένη στερεοδιαμόρφωση. Οι μεταλλάξεις του p53 συσσωρεύονται σε πολλούς τύπους καρκίνου, ενδεχομένως επειδή η απώλειά του προσδίδει στα κύτταρα ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης. Δηλαδή ο άγριος τύπος της p53 περιορίζει την ανάπτυξη.

# Η p53 συνδεόμενη σε ένα μικρό τμήμα DNA



## Structural organization of p53 protein



Transcriptional  
activation Domain

Sequence-specific  
DNA binding Domain

Tetramerization  
Domain

█ : Exon

█ : Evolutionarily conserved regions

Η απώλεια αυτού του ελέγχου ίσως να είναι ένα δευτερογενές γεγονός που υποβοηθά την ανάπτυξη πολλών όγκων. Η p53 ορίζεται επίσης ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, γιατί μπορεί να καταστείλει ή να εμποδίσει το μετασχηματισμό κυττάρων καλλιέργειας από διάφορα ογκογονίδια. Μια μετάλλαξη της p53 αποτελεί την αιτία του συνδρόμου Li-Fraumeni, μιας σπάνιας μορφής κληρονομικού καρκίνου. Οι φορείς της μετάλλαξης εκδηλώνουν καρκίνους σε διάφορους ιστούς. Είναι ετεροζυγώτες μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης. Αυτές οι μεταλλάξεις συμπεριφέρονται ως κυρίαρχες αρνητικές, υπερκαλύπτοντας τη λειτουργία του αλληλόμορφου άγριου τύπου. Όλα τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν χαμηλά επίπεδα p53. Οι θεραπείες που προκαλούν βλάβες στο DNA (όπως συχνά η ακτινοβολία) επιφέρουν μεγάλη αύξηση της ποσότητας της p53.

**Η ενεργοποίηση της p53 μπορεί να πυροδοτήσει δύο τύπους γεγονότων: τη διακοπή της αύξησης και την απόπτωση.**

Το αποτέλεσμα εξαρτάται εν μέρει από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο. Σε κύτταρα που βρίσκονται νωρίς στη φάση G1, η p53 ενεργοποιεί ένα σημείο ελέγχου και έτσι παρεμποδίζει την περαιτέρω πρόοδο στον κυτταρικό κύκλο. Αυτό επιτρέπει τη διόρθωση του DNA που έχει υποστεί βλάβη, πριν το κύτταρο εισέλθει στη φάση S. Εάν όμως έχει ήδη καθοριστεί το κύτταρο να προχωρήσει σε διαίρεση, τότε η p53 πυροδοτεί το πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου. Οι τυπικές συνέπειες της απόπτωσης είναι η συρρίκνωση του κυττάρου σε μια μικρή μάζα με ετερογενή πυκνότητα και η κατάτμηση του πυρηνικού DNA. Εάν αυτό είναι εφικτό, ενεργοποιείται το σημείο ελέγχου και επιβραδύνεται ο κυτταρικός κύκλος, ώστε να επιτραπεί η επιδιόρθωση της βλάβης. Εάν όμως αυτό δεν είναι δυνατό, το κύτταρο καταστρέφεται.

Η πρωτεΐνη p53 προσδένεται στο DNA αναγνωρίζοντας ένα διακοπτόμενο παλινδρομικό μοτίβο 10 bp. Η κεντρική της επικράτεια παρέχει την ικανότητα πρόσδεσης στην ειδική αλληλουχία-στόχο.

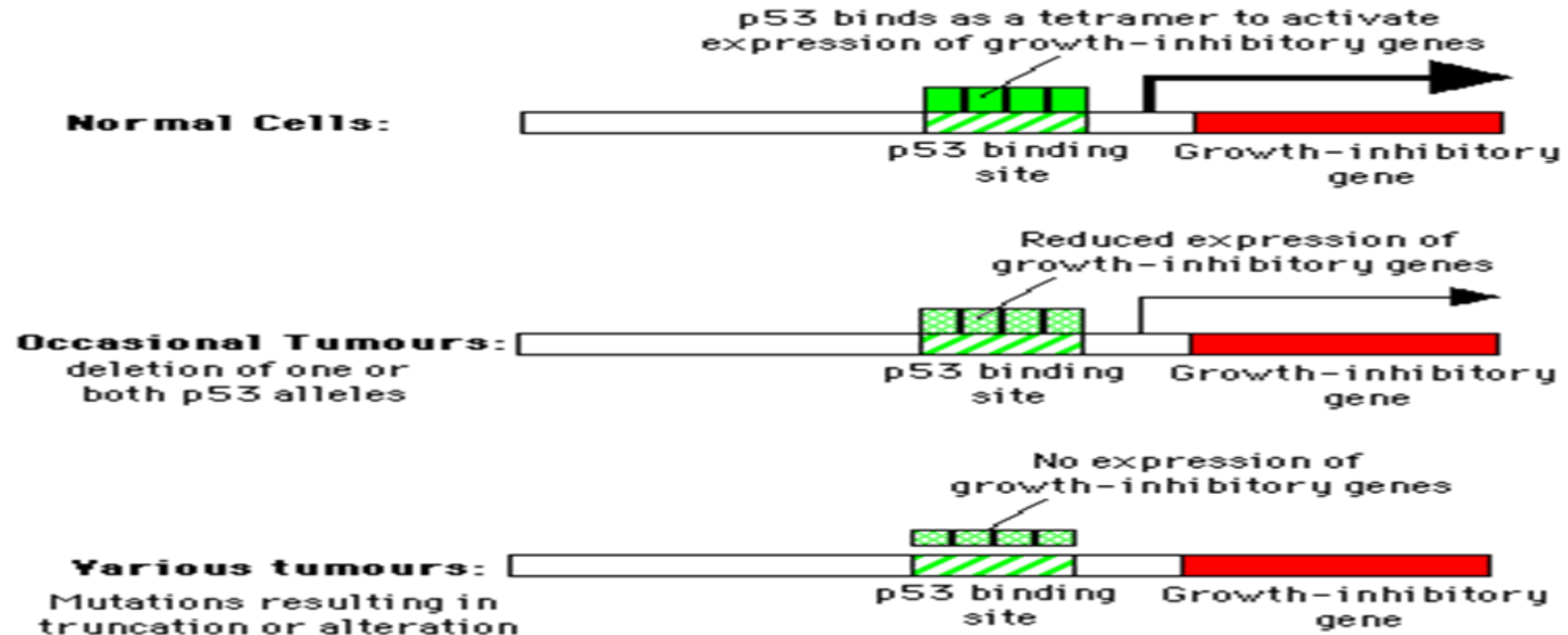
Η p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή υποκινητών που φέρουν πολλαπλά αντίγραφα αυτού του μοτίβου. Η επικράτεια *trans*-ενεργοποίησης βρίσκεται στο N-τελικό άκρο.

Η p53 επίσης προσδένεται σε DNA που έχει υποστεί βλάβες. Η C-τελική περιοχή της αναγνωρίζει μονόκλωνες περιοχές DNA.

Η p53 είναι ένα τετραμερές. Ο ολιγομερισμός απαιτεί την C-τελική περιοχή.

Οι διάφορες μεταλλάξεις της p53 έχουν ποικίλες επιδράσεις στις ιδιότητες της πρωτεΐνης, όπως αύξηση του χρόνου ημιζωής από 20 λεπτά σε αρκετές ώρες, πρόκληση μιας αλλαγής στη στερεοδιαμόρφωσή της, αλλαγή στη θέση εντοπισμού της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, καθώς και κατάργηση της ικανότητας πρόσδεσης στο DNA και στο αντιγόνο T του ιού SV40. Η πλειοψηφία αυτών των μεταλλάξεων χαρτογραφείται στην κεντρική επικράτεια πρόσδεσης στο DNA, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για μια σημαντική περιοχή για τη λειτουργία της πρωτεΐνης

Η p53, ως μεταγραφικός παράγοντας, ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια, τα οποία διακρίνονται σε τρεις ομάδες. Στο κύριο μονοπάτι, το οποίο οδηγεί στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, μεσολαβεί η ενεργοποίηση της p21, ενός καταστολέα του κυτταρικού κύκλου (cki, cell cycle kinase inhibitor) ο οποίος αποτρέπει την προώθηση των κυττάρων στην G1. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου και η γονιδιωματική σταθερότητα αποτελούν εναλλακτικές οδούς προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή του κυττάρου με την απόπτωση. Όταν λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας, η πρωτεΐνη p53 χρησιμοποιεί την κεντρική επικράτειά της για να προσδεθεί στην αλληλουχία-στόχο του γονιδίου. Η N-τελική επικράτεια *trans*-ενεργοποίησης αλληλεπιδρά άμεσα με την TBP (πρωτεΐνη που προσδένεται στο πλαίσιο TATA).

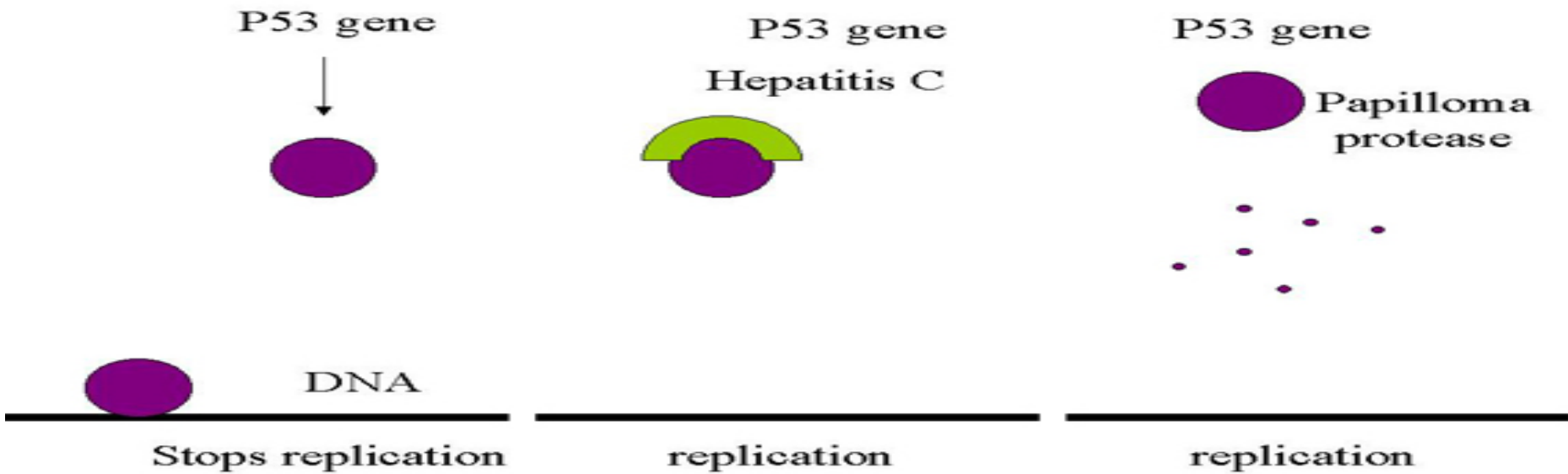


Αυτή η περιοχή αλληλεπίδρασης της p53 αποτελεί στόχο και διαφόρων άλλων πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα της E1B του αδενοϊού. Αλληλεπίδραση της p53 με την E1B 55 kD επιτρέπει στον αδενοϊό να εμποδίσει τη δράση της p53, ένα απαραίτητο βήμα για το μετασχηματισμό.

Το αντιγόνο T του ιού SV40 προσδένεται στην ειδική περιοχή πρόσδεσης στο DNA, εμποδίζοντας έτσι την αναγνώριση των γονιδίων-στόχων. Για να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας, η p53 απαιτεί τους συνενεργοποιητές p300/CBP. Ο συνενεργοποιητής προσδένεται στην επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-τελική) της p53. Η αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και P300 είναι απαραίτητη και για την πρόσδεση της p53 στην Mdm2, η οποία καταστέλλει την ενεργότητα της p53.

### Anti-Oncogenes

#### p53



**Η C-τελική επικράτεια της p53 προσδένεται μη ειδικά σε (<40 βάσεις) μονόκλωνες περιοχές DNA ανεξάρτητα από την αλληλουχία τους και σε αταίριαστες περιοχές (mismatches) που δημιουργούνται από 1-3 βάσεις. Τέτοιοι στόχοι δημιουργούνται από βλάβες του DNA. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι σαφής, ίσως όμως πρόκειται για μια διαδικασία δύο φάσεων. Όταν η p53 προσδένεται μέσω της C-τελικής επικράτειάς της σε μια θέση βλάβης του DNA, αλλάζουν οι ιδιότητές της. Στη συνέχεια, αποσυνδέεται από τη θέση βλάβης και προσδένεται σε ένα γονίδιο-στόχο, το οποίο ενεργοποιεί.**

Η ικανότητα της p53 να πυροδοτεί την απόπτωση είναι λιγότερο κατανοητή. Οι δύο λειτουργίες μπορούν να διαχωριστούν βάσει της απόκρισης στην πρωτεΐνη E1B 19 kD του αδενοϊού, η οποία εμποδίζει την αποπτωτική δράση της p53, αλλά δεν καταστέλλει τη δράση της στην ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων. Το γεγονός ότι πρόκειται για δύο ανεξάρτητα μονοπάτια επιβεβαιώνεται από την παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη E1B 55 kD καταστέλλει την ικανότητα *trans*-ενεργοποίησης, αλλά δεν επηρεάζει την απόπτωση.

Η p53 μπορεί να ενεργοποιήσει την απόπτωση με δύο τρόπους. Ο ένας είναι να προκαλέσει την παραγωγή πρωτεϊνών που επιδρούν στο μιτοχόνδριο πυροδοτώντας τις αποπτωτικές λειτουργίες του.

Ο άλλος τρόπος είναι η παραγωγή ή η ενεργοποίηση υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης που πυροδοτούν την απόπτωση, (ο υποδοχέας *Fas* πυροδοτεί ένα από τα μείζονα μονοπάτια της απόπτωσης).



## Ογκογονίδιο *bcl2*

Αρχικά, το *bcl2* αναγνωρίστηκε ως ένας γονιδιακός στόχος που ενεργοποιείται από μετατοπίσεις σε συγκεκριμένους όγκους. Φαίνεται ότι η Bcl-2 έχει την ιδιότητα να καταστέλλει τα περισσότερα μονοπάτια της απόπτωσης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή της ογκογένεσης, πιθανότατα επειδή εξολοθρεύει τα εν δυνάμει ογκογόνα κύτταρα. Όταν αποτρέπεται η απόπτωση εξαιτίας της ενεργοποίησης του *bcl2*, τα κύτταρα αυτά επιβιώνουν αντί να πεθαίνουν.

Οι RB και p53 είναι ογκοκαταστολείς που φυσιολογικά ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η απουσία τους αίρει αυτόν τον έλεγχο και συμβάλλει στο σχηματισμό όγκου. Στους περισσότερους όγκους του ανθρώπου, η p53 λειτουργεί προβληματικά όμως μόνο στις μισές περίπου περιπτώσεις η αιτία του προβλήματος εντοπίζεται στο ίδιο το γονίδιο.

**Οι μεταλλάξεις της ίδιας της p53 συνήθως εντοπίζονται στην επικράτεια πρόσδεσης στο DNA. Επειδή αυτές οι μεταλλάξεις εμποδίζουν την πρόσδεση σε υποκινητές δεν επιτρέπουν στην p53 να ενεργοποιήσει την προστατευτική απόκριση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις βρίσκονται στην C-τελική περιοχή, η οποία ευθύνεται για το σχηματισμό τετραμερών, με αποτέλεσμα να μην παράγονται ενεργές πρωτεΐνες.**

Το σημαντικότερο μονοπάτι ελέγχου της p53 διέρχεται από την πρωτεΐνη Mdm2, η οποία απενεργοποιεί την p53. Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου *mdm2* προκαλεί αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης, η οποία μειώνει τη λειτουργία της p53. Η Mdm2 απενεργοποιείται από την πρωτεΐνη p19ARF. Έτσι, τα ελλείμματα του γονιδίου p19ARF οδηγούν στην αύξηση της Mdm2 και επομένως στη μείωση της p53.

Επειδή η P53 καταστέλλει την κυτταρική αύξηση ή προκαλεί απόπτωση όταν ενεργοποιείται, είναι προφανώς κρίσιμο για το κύτταρο να περιορίσει τη δράση της όταν δεν τη χρειάζεται. Η Mdm2 καταστέλλει την ενεργότητα της p53 με δύο τρόπους: Επηρεάζει τη σταθερότητα της p53, δρώντας όμοια με τη λιγάση E3 της ουβικιτίνης, η οποία μετατρέπει την p53 σε στόχο της συσκευής αποικοδόμησης.

Επιδρά άμεσα στο N-τελικό άκρο της p53, εμποδίζοντάς της να δράσει ως *trans*-ενεργοποιητής.

Στην αντίστροφη κατεύθυνση, η p53 επάγει τη μεταγραφή του *mdm2*. Συνέπεια αυτού του μοριακού κυκλώματος είναι ότι η Mdm2 περιορίζει την ενεργότητα της p53, ενώ η ενεργοποίηση της p53 αυξάνει την ποσότητα της Mdm2.

**Έτσι, καθένα από τα δύο συστατικά περιορίζει τη δράση του άλλου. Ένας γενετικός τόπος, που ελέγχει τόσο την p53 όσο και την RB, είναι ο INK4A-ARF.**

Το μετάγραφο του γονιδίου INK4A-ARF υποβάλλεται σε εναλλακτικό μάτισμα και παράγει δύο mRNA τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αλληλουχίες που δεν έχουν καμία σχέση μεταξύ τους.

Η πρώτη πρωτεΐνη, η p16INK4a, βρίσκεται ανοδικά της RB.

Η δεύτερη πρωτεΐνη ονομάζεται p19ARF και βρίσκεται ανοδικά της p53.

**Ελλείμματα του γενετικού τόπου INK4A-ARF εμφανίζονται συχνά σε καρκίνους του ανθρώπου (σχεδόν το ίδιο συχνά όσο οι μεταλλάξεις του p53) και έχουν εξαιρετικά σημαντικές επιπτώσεις, επειδή χάνεται τόσο η p16INK4a όσο και η p19ARF. Επομένως οδηγούν στην απώλεια και των δύο μονοπατιών ογκοκαταστολής (το μονοπάτι της p53 και αυτό της RB).**

Η p16INK4a καταστέλλει την κινάση cdk4/6 και έτσι την εμποδίζει να φωσφορυλιώσει την RB. Χωρίς αυτή τη φωσφορυλίωση, καταστέλλεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. Η p16INK4a συνήθως καταστέλλεται από σημειακές μεταλλάξεις στους όγκους του ανθρώπου.

Η p19ARF προσδένεται στην Mdm2 και εμποδίζει άμεσα την ουβικιτινίωση της p53. Αυτό σταθεροποιεί την p53 και επιτρέπει τη συσσώρευσή της. Κατά συνέπεια, η p19ARF λειτουργεί ως ογκοκαταστολέας, αφού παρεμποδίζει τον καταστολέα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Η απώλεια της p19ARF και η απώλεια της p53 έχουν παρόμοιες επιπτώσεις στην κυτταρική αύξηση.

Διαφορετικά μονοπάτια ενεργοποίησης της P53 τροποποιούν διαφορετικά αμινοξέα της Διακρίνονται τρία κύρια μονοπάτια που επιδρούν στην P53:

Η ιονίζουσα ακτινοβολία (ionizing radiation) προκαλεί θραύσεις του DNA οι οποίες ενεργοποιούν την κινάση ATM (**A**taxia **T**elangiectasia **M**utated: μετάλλαγμα που προκαλεί τη νόσο τελαγγειεκτατική αταξία). Η ATM φωσφορυλιώνει τη σερίνη 15 της p53 (S15). Η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί επίσης τη φωσφορυλίωση της S33, την αποφωσφορυλίωση της S376 και την ακετυλίωση της L382.

Η υπεριώδης ακτινοβολία και άλλοι τύποι κυτταρικού στρες ενεργοποιούν τις κινάσες ATR (**A**taxia **T**elangiectasia **R**elated: συγγενικές με την τελαγγειεκτατική αταξία) η οποία φωσφορυλιώνει τις S15 και S33 (παράλληλα με την φωσφορυλίωση της S392). Ορισμένα ανώμαλα σήματα αύξησης, όπως εκείνα που παράγονται από τα ογκογονίδια *ras* ή *myc*, μπορεί να ενεργοποιήσουν την p19ARF, η οποία απενεργοποιεί την Mdm2, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της p53.

Οι θέσεις-στόχοι των διαφόρων αυτών μονοπατιών εντοπίζονται στις ακραίες ρυθμιστικές επικράτειες της πρωτεΐνης. Οι τροποποιήσεις μπορεί να επηρεάσουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, τον ολιγομερισμό, την πρόσδεση στο DNA και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες.

Έτσι, η p53 δρα ως ένας αισθητήρας που συγκεντρώνει τις πληροφορίες από πολλά μονοπάτια τα οποία επηρεάζουν την ικανότητα του κυττάρου να διαιρείται. Σε κάποια από τα αμινοξικά κατάλοιπα της p53, η φωσφορυλίωση έχει μια πιο γενικευμένη επίπτωση, αλλάζοντας τη διαμόρφωση του πολυπεπτιδικού σκελετού της πρωτεΐνης. Ορισμένες από τις θέσεις-στόχους φωσφορυλίωσης της P53 είναι κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης που ακολουθούνται από μία προλίνη. Δύο γειτονικά αμινοξέα έχουν συνήθως διαμόρφωση *trans*, με την έννοια ότι βρίσκονται σε διαφορετικές πλευρές του πεπτιδικού δεσμού που τα συνδέει.

**Ο δακτύλιος της προλίνης επιτρέπει τον ισομερισμό γύρω από το δεσμό που τη συνδέει με το προηγούμενο αμινοξύ, δημιουργώντας τη διαμόρφωση *cis*, στην οποία και τα δύο αμινοξέα βρίσκονται στην ίδια πλευρά του πεπτιδικού δεσμού. Η φωσφορυλίωση αλλάζει το ενεργειακό δυναμικό, ευνοώντας τον ισομερισμό *trans-cis*. Η αντίδραση διευκολύνεται από την πεπτιδυλο-προλυλο-ισομεράση Pin1, η οποία προσδένεται στο διπεπτίδιο μόνο όταν το πρώτο αμινοξύ είναι φωσφορυλιωμένο.**

Η σημασία της αντίδρασης αποδεικνύεται από το ότι οι μεταλλάξεις της Pin1 εξασθενούν την ικανότητα της p53 να αποκρίνεται σε βλάβες του DNA.

- 1) Η ποσότητα της πρωτεΐνης p53 στο κύτταρο καθορίζεται κυρίως από την αποικοδόμησή της, η οποία αντικατοπτρίζει την ενεργότητα της Mdm2.**
- 2) Οι αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσης θα πρέπει να πυροδοτηθούν από μία ή περισσότερες τροποποιήσεις, ως απόκριση στα διάφορα «αισθητήρια» συστήματα.**

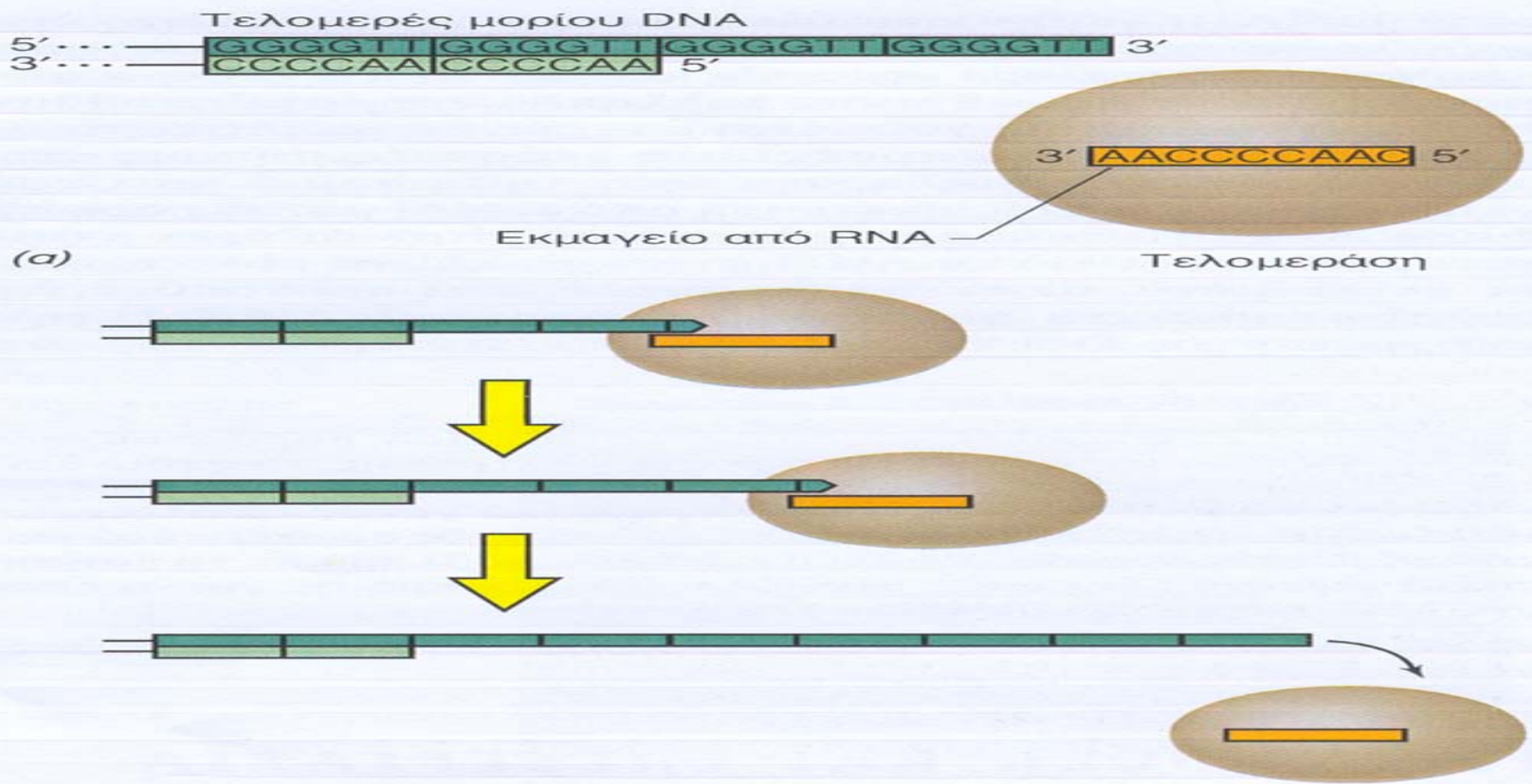
## Η βράχυνση των τελομερών

Τα τελομερή των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων περιέχουν επαναλαμβανόμενο DNA, δηλαδή μια μικρή αλληλουχία (συχνά μήκους έξι ζευγών βάσεων) η οποία επαναλαμβάνεται σειριακά από 20 έως πολλές εκατοντάδες φορές . Οι αλληλουχίες στους διάφορους ευκαρυώτες εμφανίζουν σχέση στενής συγγένειας και η μία αλυσίδα των τελομερών περιέχει πάντοτε πολλές γουανίνες. Αυτή η πλούσια σε γουανίνες αλληλουχία προστίθεται στο άκρο 3΄ του DNA από ένα ένζυμο που ονομάζεται **τελομεράση** . Οι τελομεράσες προσθέτουν νουκλεοτίδια στα 3΄-άκρα γραμμικών μορίων DNA. *Για την αντίδραση αυτή οι τελομεράσες δεν χρειάζονται εκμαγείο από DNA, επειδή περιέχουν ως συμπ παράγοντα ένα μικρό εκμαγείο από RNA.* Τα ένζυμα αυτά μπορούν να προσθέτουν πολλαπλά τμήματα στο ίδιο άκρο και να δημιουργούν έτσι μακρές προεκτάσεις του.

*Η τελομεράση στον άνθρωπο αποτελείται από δυο υπομονάδες την [Telomerase Reverse Transcriptase](#) (TERT) και την human [Telomerase RNA](#) (hTR or TERC). Αυτές οι 2 υπομονάδες κωδικοποιούνται από 2 διαφορετικά γονίδια . Η κωδικοποιούσα περιοχή του TERT αποτελείται από 3396bp και μεταφράζεται σε μια πρωτεΐνη 1131 αμινοξέων η οποία αναδιπλώνεται με το TERC (451 νουκλεοτίδια ), και το οποίο δεν μεταφράζεται και παραμένει ως RNA. Η TERT έχει μια δομή «κουβαριού» η οποία του επιτρέπει να περιτυλίξει μέρος του χρωμοσώματος και να προσθέσει μικρές μονόκλωνες αλληλουχίες επαναλαμβανόμενων τελομερών (single-stranded telomere repeats). Η TERT έχει λειτουργία αντίστροφης μεταγραφάσης δημιουργώντας μονόκλωνο DNA, χρησιμοποιώντας ως μήτρα μονόκλωνο RNA δηλ. χρησιμοποιώντας ως μήτρα την TERC.*

Χρησιμοποιώντας την TERC, η TERT προσθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 6 νουκλεοτιδίων , **5'-TTAGGG** (η αλληλουχία αυτή διαφέρει στα μη σπονδυλωτά ) στο 3' του χρωμοσώματος. Αυτές οι επαναλήψεις **TTAGGG** αποκαλούνται τελομερή .Η μήτρα της TERC είναι **3'-CAAUCCCAAUC-5'**.

Με αυτό τον τρόπο η τελομεράση στην τελευταία τελομερή αλληλουχία του χρωμοσώματος προσθέτει και κάθε φορά και μια νέα αλληλουχία **5'-TTAGGG**. Ένα ειδικό λοιπόν ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ένζυμο, η τελομεράση (telomerase), ευθύνεται για την επιμήκυνση των τελομερών. Η λειτουργία της τελομεράσης είναι να αντισταθμίζει τη μείωση του μήκους των τελομερών που συμβαίνει σε κάθε κύκλο αντιγραφής. Η τελομεράση απενεργοποιείται σε πολλά σωματικά κύτταρα, συνήθως μετά τη διαφοροποίησή τους. Οι διαιρέσεις των κυττάρων που δε διαθέτουν ενεργότητα τελομεράσης (π.χ. σε καλλιέργεια πρωτογενών κυττάρων) έχουν ως αποτέλεσμα τη διαδοχική μείωση του μήκους των τελομερών από τη μία γενιά στην άλλη. Τα κύτταρα καθίστανται ανίκανα να πολλαπλασιαστούν κανονικά όταν τα τελομερή γίνουν τόσο μικρά ώστε να μη διασφαλίζουν την απαιτούμενη σταθερότητα των χρωμοσωμικών άκρων. Η κρίση συμβαίνει όταν τα κύτταρα δεν μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω και η καλλιέργεια πεθαίνει. Στις σπάνιες περιπτώσεις που κάποια κύτταρα επιβιώνουν από την κρίση, περνούν ένα στάδιο κατά το οποίο τα άκρα των χρωμοσωμάτων τους είναι ασταθή. Αυτά τα άκρα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με άλλες χρωμοσωμικές περιοχές και πιθανόν αυτή είναι η αιτία για τη συχνή εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε κύτταρα καλλιέργειας. Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από αυτές τις ανωμαλίες μπορεί να συμβάλουν στην ογκογένεση.

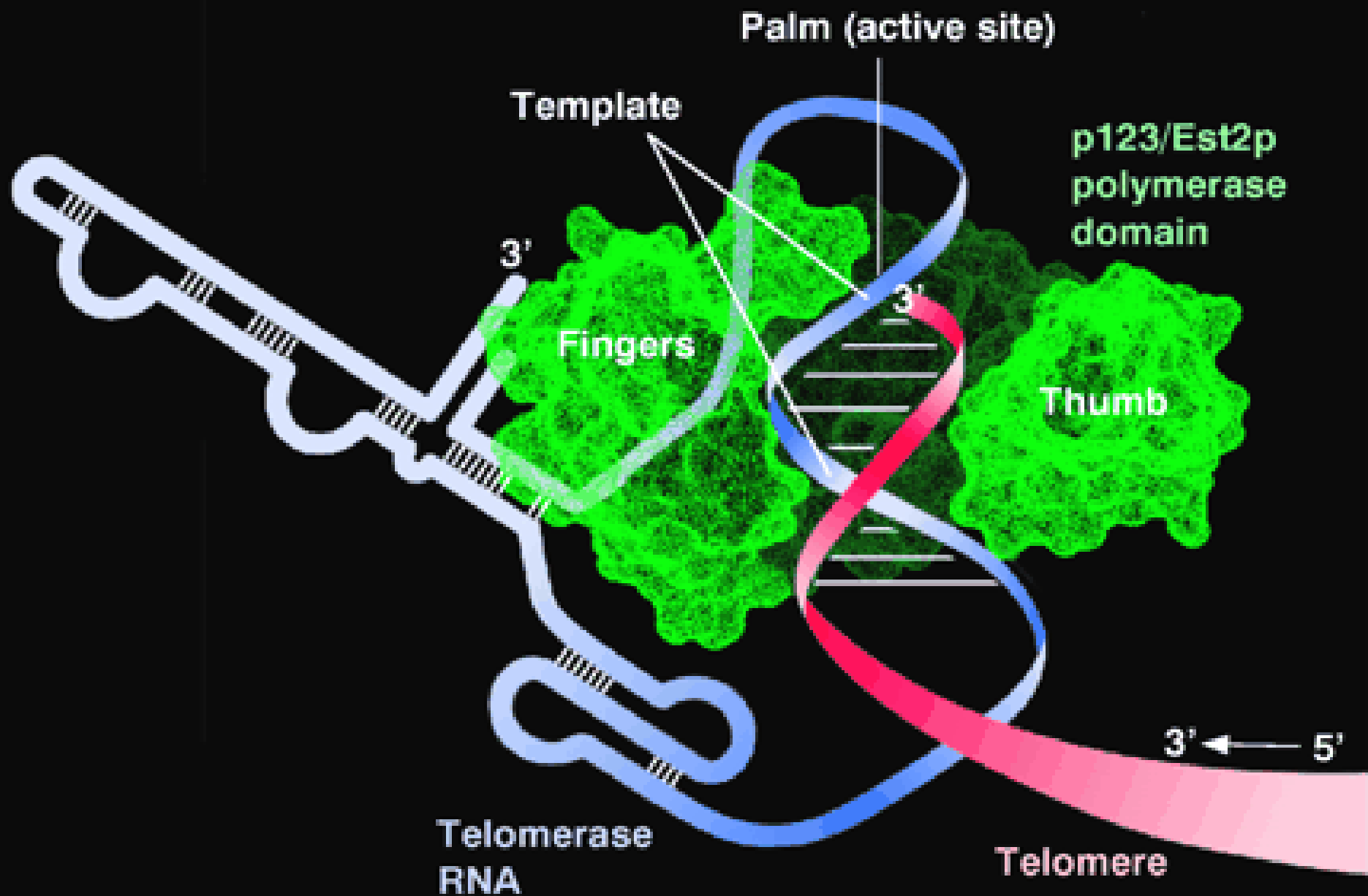


Τα σωματικά κύτταρα συνήθως δε διαθέτουν ενεργότητα τελομεράσης, γεγονός που σημαίνει ότι σε κάθε κυτταρική διαίρεση τα τελομερή μικραίνουν.

Τα κύτταρα καλλιέργειας μπορεί να εισέλθουν σε κρίση, ως αποτέλεσμα της ολοκληρωτικής βράχυνσης των τελομερών.

Η επανενεργοποίηση της τελομεράσης δίνει τη δυνατότητα στα κύτταρα να επιβιώσουν από την κρίση και να αθανατοποιηθούν.





Προκειμένου να συνεχίσει να διαιρείται ένα κύτταρο που πέρασε από κρίση, θα πρέπει να ανακτήσει την ικανότητά του να αντιγράφει τα τελομερή του. Μπορούμε να θεωρήσουμε την ανικανότητα συνέχισης του πολλαπλασιασμού τους, όταν το μήκος των τελομερών γίνει πολύ μικρό, ως ένα μηχανισμό ογκοκαταστολής, ο οποίος αποτρέπει τα κύτταρα να διεξάγουν διαιρέσεις επ' άοριστον. Η αθανατοποίηση είναι απαραίτητη για την επ' άοριστον διαιώνιση των κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια .

Η παραγωγή της τελομεράσης περιορίζεται από τη μεταγραφή της καταλυτικής υπομονάδας της, η οποία καταστέλλεται σε διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα και αποκαθίσταται σε καρκινικά κύτταρα. Το φαινόμενο της ενεργοποίησης της τελομεράσης στα καρκινικά κύτταρα είναι ανάλογο με την επανενεργοποίησή της σε κύτταρα καλλιέργειας που ανακάμπτουν από την κρίση.

Οι ποντικοί στους οποίους έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την τελομεράση μπορούν να επιβιώνουν για 6-7 γενιές. Με την παρατηρούμενη μείωση του μήκους των τελομερών κατά ~4,8 kb ανά γενιά αρσενικών ποντικών. Συνεπώς, μετά από 7 γενιές αναμένεται ότι τα τελομερή ενός ποντικού αρνητικού σε τελομεράση θα έχουν εκφυλιστεί σε περίπου μηδενικό μήκος. Από την έκτη γενιά, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες γίνονται συχνότερες και οι ποντικοί καθίστανται στείροι, λόγω αδυναμίας παραγωγής σπέρματος. Οι συνέπειες της έλλειψης τελομεράσης, όπως είναι αναμενόμενο, παρατηρούνται πρώτα σε ιστούς με έντονο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Κύτταρα που προέρχονται από ποντικούς που στερούνται του γονιδίου της τελομεράσης μπορούν να περάσουν από τη διαδικασία της κρίσης και να μετασχηματιστούν σε ογκογόνα κύτταρα. Επομένως η ύπαρξη τελομεράσης δεν είναι αναγκαία ή τουλάχιστον δεν αποτελεί το μόνο μέσο για να επιτευχθεί η αθανατοποίηση, αν και η επανενεργοποίηση της τελομεράσης είναι ο πλέον συνηθισμένος μηχανισμός.

Οι αρνητικοί σε τελομεράση ποντικοί μπορούν να αναπτύξουν όγκους, αλλά με χαμηλότερη συχνότητα απ' ό,τι οι ποντικοί άγριου τύπου.

**Συνεπώς η σημασία της απώλειας των τελομερών στο σχηματισμό καρκινικών κυττάρων έγκειται αποκλειστικά στην πρόκληση γενετικής αστάθειας που διεγείρει την έναρξη της ογκογένεσης.**

Η έλλειψη τελομεράσης συνδέεται αναμφισβήτητα με την αδυναμία συνέχισης της ανάπτυξης και η επανενεργοποίησή της είναι ένας από τους τρόπους με τον οποίο τα κύτταρα μπορούν να αθανатоποιηθούν. Κατά τη γήρανση των κυττάρων λόγω της βράχυνσης των τελομερών, ενεργοποιείται η p53 και οδηγεί στη διακοπή της ανάπτυξης ή σε απόπτωση.

**Το ερέθισμα που ενεργοποιεί την p53 είναι η απώλεια από τα άκρα των χρωμοσωμάτων της πρωτεΐνης TRF2, η οποία προσδένεται στα τελομερή. Η TRF2 προστατεύει το άκρο του DNA όταν είναι συνδεδεμένη και, όταν χάνεται, το 3' προεξέχον άκρο που αποκαλύπτεται ενεργοποιεί την p53.**

Οι καθιερωμένες κυτταρικές σειρές έχουν συνήθως χάσει τη λειτουργία της p53. Ωστόσο, η απώλεια των γνωστών λειτουργιών της p53 δεν είναι αρκετή από μόνη της να ερμηνεύσει την αθανатоποίηση, αφού, για παράδειγμα, ένας ποντικός p53-επιβιώνει και συνεπώς είναι ικανός να διενεργεί το συνηθισμένο πρότυπο της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης. Όμως, τα πρωτογενή κύτταρα ενός ποντικού p53- μπορούν να δημιουργήσουν κυτταρικές σειρές πιο εύκολα απ' ό,τι κύτταρα που διαθέτουν λειτουργική p53, υποδηλώνοντας ότι η απώλεια της ενεργής p53 διευκολύνει ή είναι απαραίτητη για την αθανатоποίηση.

Η πρωτεΐνη E1A του αδενοϊού προσδένεται στην RB, ενώ η E1B προσδένεται στην p53. Η πρωτεΐνη E7 του ιού HPV προσδένεται στην RB, ενώ η E6 προσδένεται στην p53. Το αντιγόνο T του SV40 μπορεί να προσδεθεί και στις δύο πρωτεΐνες, RB και p53.

Η απώλεια της p53 (και/ή της RB) είναι ένα σημαντικό βήμα στη μετασχηματιστική δράση των ογκογόνων ιών DNA. Τα κρίσιμα γεγονότα είναι η καταστολή της ικανότητας της p53 να ενεργοποιεί τη μεταγραφή και η απώλεια της ικανότητας της RB να προσδένεται σε υποστρώματα όπως ο E2F. Η ανικανότητα πυροδότησης της διακοπής της ανάπτυξης ή της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε συνεχή αύξηση. Γνωρίζουμε ότι για τη συμβολή της p53 στην καρκινογένεση απαιτείται κάτι παραπάνω από το μονοπάτι της διακοπής της ανάπτυξης, επειδή ένας ποντικός p21- εμφανίζει (όπως θα αναμενόταν) ανεπαρκές σημείο ελέγχου της G1, αλλά δεν αναπτύσσει όγκους. Αντίθετα, οι ποντικοί p53- έχουν αυξημένη τάση δημιουργίας όγκων, γεγονός που δείχνει ότι και άλλες λειτουργίες της p53 (εκτός από τον έλεγχο της p21) ενέχονται στην ογκογένεση.

## **Τα διάφορα γεγονότα που ενέχονται στην αθανатоποίηση.**

Τα σημεία ελέγχου κανονικά σταματούν τη διαίρεση ενός κυττάρου όταν τα τελομερή του βραχυνθούν υπερβολικά. Τα κύτταρα εισέρχονται στη γήρανση και σταματούν να αναπτύσσονται. Εάν καταφέρουν να παρακάμψουν τα σημεία ελέγχου και να εισέλθουν στην πρόωμη κρίση, η απώλεια της TRF2 από τα τελομερή ενεργοποιεί την p53, η οποία προκαλεί διακοπή της ανάπτυξης και/ή απόπτωση. Απουσία λειτουργικής p53, περνούν στην όψιμη φάση της κρίσης, όπου η δυσλειτουργία των τελομερών προκαλεί γενετική αστάθεια που εκδηλώνεται με χρωμοσωμικές αναδιατάξεις μεγάλης κλίμακας. Για να επιβιώσουν από αυτό το στάδιο, θα πρέπει να ενεργοποιήσουν την τελομεράση ή να βρουν εναλλακτικούς τρόπους για τη διατήρηση των τελομερών. **Ένα κύτταρο που επιβιώνει μέσα από όλα αυτά τα στάδια γίνεται αθάνατο, όμως είναι σχεδόν σίγουρο ότι θα έχει αλλοιωμένη γενετική σύσταση.**

**Οι περισσότεροι όγκοι προκύπτουν από μια σειρά πολλών βημάτων, που άλλα ενέχουν την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και άλλα την απενεργοποίηση ογκοκαταστολέων.**

Η ανάγκη να συμβούν πολλαπλά γεγονότα αντικατοπτρίζει τους πολλαπλούς μηχανισμούς ρύθμισης της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των φυσιολογικών κυττάρων, που, για να παρακαμφθούν όλοι, απαιτούνται αρκετές ανεξάρτητες αλλαγές.

Παραμένει αναπάντητο το ερώτημα αν τα ογκογονίδια και τα γονίδια των ογκοκαταστολέων που έχουν προσδιοριστεί με τις διαθέσιμες τεχνικές είναι από κοινού επαρκή για να ερμηνεύσουν τελείως την εμφάνιση καρκίνου.

**Υπάρχουν δύο διακριτά στάδια, τα οποία γενικώς μπορεί να θεωρηθεί ότι σχετίζονται αντίστοιχα με την αθανατοποίηση και το μετασχηματισμό.**

Η κρίση προκαλείται όταν τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται απουσία τελομεράσης.

Όταν τα τελομερή βραχυνθούν υπερβολικά, οι προσπάθειες αντιγραφής προκαλούν βλάβες του DNA, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν την ενεργοποίηση της p53. Εάν η p53 απουσιάζει, ένα κύτταρο μπορεί να επιβιώσει αναλαμβάνοντας το κόστος της γενετικής καταστροφής, αφού η προβληματική λειτουργία των τελομερών οδηγεί σε χρωμοσωμικές συντήξεις και άλλες αναδιατάξεις.

Το δεύτερο βήμα, ο μετασχηματισμός, μετατρέπει τα αθανατοποιημένα κύτταρα σε ογκογόνα. Η φύση του όγκου καθορίζει αν απαιτούνται επιπλέον αλλαγές για τη δημιουργία της κακοήθειας.

**Έτσι, ένα λευχαιμικό κύτταρο μπορεί να πολλαπλασιάζεται ελεύθερα στο αίμα, ενώ ένας κυτταρικός τύπος που σχηματίζει συμπαγείς όγκους χρειάζεται να αναπτύξει και την τροφοδοσία του όγκου με αίμα (αγγειογένεση) και μπορεί αργότερα να περάσει στο στάδιο της μετάστασης, δηλαδή στην αποκόλληση κυττάρων από τον όγκο και τη μετανάστευσή τους σε άλλες θέσεις για να σχηματίσουν νέους όγκους.**

Η ελάχιστη προϋπόθεση για την είσοδο στην ογκογόνο κατάσταση είναι επομένως η πραγματοποίηση διαδοχικών, ανεξάρτητων βημάτων, που εμπλέκουν διαφορετικά ογκογονίδια και/ή ογκοκαταστολείς. Αυτή η ανάγκη για συμμετοχή πολλαπλών λειτουργιών μπορεί να περιγραφεί ως προϋπόθεση **συνέργειας**.

Η εμπλοκή πολλαπλών δράσεων ταιριάζει με το πρότυπο που προέκυψε από τη μελέτη ορισμένων ογκογόνων ιών DNA, οι οποίοι χρειάζονται (τουλάχιστον) δύο τύπους δράσεων για το μετασχηματισμό κυττάρων-στόχων:

Το γονιδίωμα του αδενοϊού φέρει την περιοχή *E1A*, η οποία επιτρέπει στα πρωτογενή κύτταρα να αναπτύσσονται απεριόριστα σε καλλιέργεια, και την περιοχή *E1B*, η οποία προκαλεί μορφολογικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν το μετασχηματισμένο κύτταρο. Ο ιός πολυόμα παράγει τρία αντιγόνα T: το μεγάλο T επιτρέπει την απεριόριστη αύξηση, το μεσαίο T ευθύνεται για το μορφολογικό μετασχηματισμό και το μικρό T δεν έχει ακόμη γνωστή λειτουργία. Το μεγάλο και το μεσαίο T μπορούν από κοινού να μετασχηματίσουν πρωτογενή κύτταρα.

Η πρωτεΐνη *E1A* του αδενοϊού και το μεσαίο T του ιού πολυόμα μπορούν μαζί να μετασχηματίσουν πρωτογενή κύτταρα. Αυτό υποδηλώνει ότι αρκεί μία λειτουργία από κάθε τύπο.

Αρκετά κυτταρικά ογκογονίδια ταυτοποιήθηκαν βάσει της ικανότητάς τους να προκαλούν μετασχηματισμό κατά τη διαμόλυνση κυττάρων 3T3. Το DNA από το 10-20% των σποραδικών όγκων στον άνθρωπο έχει ικανότητα μετασχηματισμού, η οποία είναι ανιχνεύσιμη με αυτή τη δοκιμή. Μετά από πολλά χρόνια καλλιέργειας, τα κύτταρα 3T3 έχουν βεβαίως προσαρμοστεί στην ανάπτυξη χωρίς περιορισμούς και έχουν υποστεί κάποιες από τις χαρακτηριστικές αλλαγές των καρκινικών κυττάρων. Η ακριβής φύση αυτών των αλλαγών δεν είναι ξεκάθαρη, αλλά γενικά μπορούμε να τις ταξινομήσουμε ως λειτουργίες που σχετίζονται με την αθανατοποίηση.

Τα κυριότερα γονίδια που ταυτοποιήθηκαν από το μετασχηματισμό κυττάρων 3T3 με διαμόλυνση ήταν μεταλλαγμένες παραλλαγές του γονιδίου *c-ras*. Τα ογκογονίδια αυτά δεν μπορούν να μετασχηματίσουν πρωτογενή κύτταρα *in vitro*, ενισχύοντας την άποψη ότι οι λειτουργίες τους αφορούν το μετασχηματισμό κυττάρων που είχαν προηγουμένως αθανатоποιηθεί. Τα ογκογονίδια *ras* παρέχουν ένα σημαντικό μονοπάτι μετασχηματισμού αθανатоποιημένων κυττάρων. Ενώ τα ογκογονίδια *ras* δεν μπορούν μόνο τους να μετασχηματίσουν πρωτογενείς ινοβλάστες, η παράλληλη διαμόλυνση του *ras* μαζί με ένα άλλο ογκογονίδιο προκαλεί μετασχηματισμό. Η ικανότητα μετασχηματισμού πρωτογενών κυττάρων σε συνδυασμό με το *ras* παρέχει μια γενική δοκιμή ελέγχου ογκογονιδίων που μοιάζουν να προκαλούν αθανатоποίηση. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει αρκετά ογκογονίδια ρετροϊών, όπως τα *v-myc*, *v-jun* και *v-fos*. Επίσης, περιλαμβάνει το *E1A* του αδενοϊού και το μεγάλο *T* του ιού πολυόμα. Τα μεταλλαγμένα γονίδια p53 έχουν το ίδιο αποτέλεσμα.

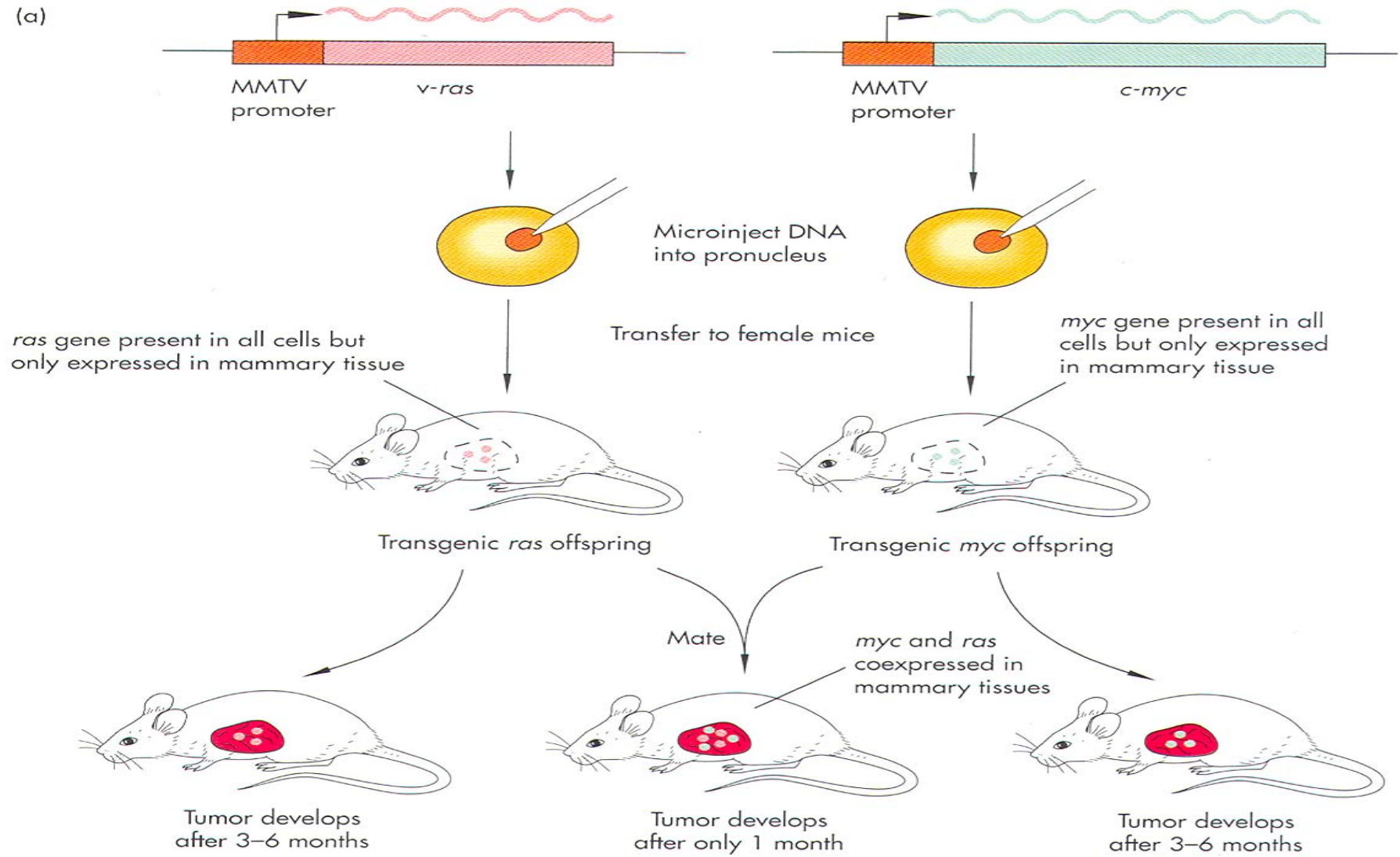
Η δράση των ογκογονιδίων που προκαλούν αθανатоποίηση πιθανόν να προκαλεί την απενεργοποίηση ή την απώλεια της p53. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διάκριση μεταξύ των πρωτεϊνών που προκαλούν αθανатоποίηση και μετασχηματισμό δεν είναι απόλυτα σαφής. Ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός (υπερπλασία) είναι συνήθως επιζήμιος και μερικές φορές ακόμα και θανατηφόρος για το ζώο (συνήθως επειδή ένας κυτταρικός τύπος αναπτύσσεται εις βάρος ενός άλλου). Ωστόσο, η έκφραση ενός μόνο ογκογονιδίου συνήθως δεν αρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή που δημιουργεί θανατηφόρες νεοπλασίες (neoplasia). Οι όγκοι που παρατηρούνται μετά από την εισαγωγή ενός ογκογονιδίου (για παράδειγμα, σε διαγονιδιακούς ποντικούς) οφείλονται πιθανόν στην παράλληλη ύπαρξη και ενός δεύτερου παράγοντα.



## Το ογκογονίδιο *v-ras* – Το ενεργοποιημένο *c-myc*.

Οι ποντικοί που φέρουν ένα από τα δύο ογκογονίδια αναπτύσσουν κακοήθειες με συχνότητα 10% για το *c-myc* και 40% για το *v-ras*, ενώ το 100% των ποντικών που φέρουν και τα δύο ογκογονίδια αναπτύσσει κακοήθειες σε συντομότερο χρονικό διάστημα.

(a)



Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση είναι συνήθως αμοιβαία αποκλειόμενες, εφόσον ένα κύτταρο πρέπει να σταματήσει να διαιρείται προκειμένου να διαφοροποιηθεί. Μια ογκοπρωτεΐνη που σταματά τη διαφοροποίηση μπορεί έτσι να επιτρέπει σε ένα κύτταρο να συνεχίσει τον πολλαπλασιασμό (όπως και η αθανατοποίηση κυττάρων καλλιέργειας), παρέχοντας συγχρόνως μια ευκαιρία συσσώρευσης και άλλων ογκογόνων μεταλλάξεων.

## Ο ιός της ερυθροβλάστωσης των πτηνών (AEV)

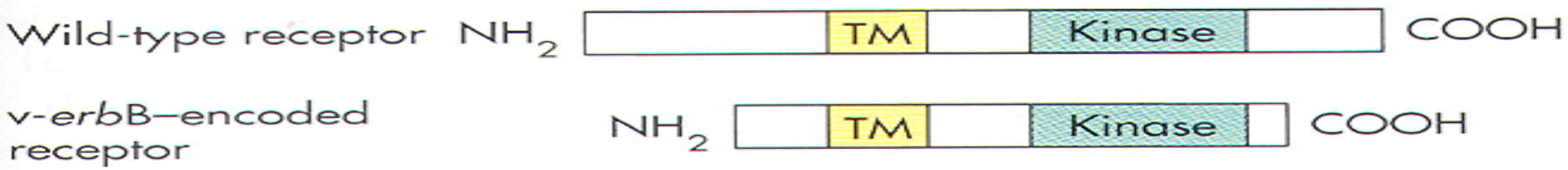
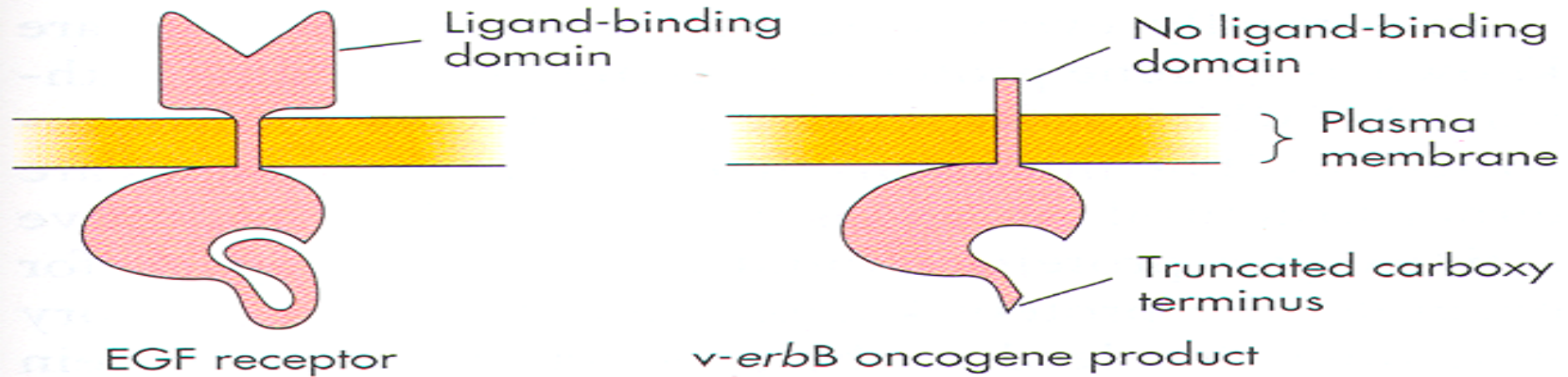
Το στέλεχος AEV-H φέρει μόνο το *v-erbB*, ενώ το στέλεχος AEV-E54 φέρει δύο ογκογονίδια, τα *v-erbB* και *v-erbA*. Η κύρια ικανότητα μετασχηματισμού του AEV σχετίζεται με το ***v-erbB***, μια περικομμένη μορφή του υποδοχέα του EGF η οποία μπορεί να μετασχηματίζει ερυθροβλάστες και ινοβλάστες. **Το άλλο γονίδιο, το *v-erbA*, δεν μπορεί να μετασχηματίσει κύτταρα-στόχους μόνο του, αλλά αυξάνει την αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού του *v-erbB*.**

Η έκφραση του ίδιου του *v-erbA* έχει δύο επιδράσεις στο φαινότυπο των κυττάρων-στόχων: αποτρέπει την αυθόρμητη διαφοροποίηση (προς ερυθροκύτταρα) των ερυθροβλαστών που έχουν μετασχηματιστεί από το *v-erbB*. Το *v-erbA* επομένως συμβάλλει στην ογκογονικότητα με ένα συνδυασμό καταστολής της διαφοροποίησης και διευκόλυνσης του πολλαπλασιασμού. Σημειώνεται ότι ο υποδοχέας του EGF «ενεργοποιείται» από την πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα, στο εξωκυττάριο τμήμα του και στη συνέχεια δρα (ο υποδοχέας) ως τυροσινική κινάση για μεταγωγή του σήματος ενδοκυτταρίως. Στην περίπτωση του προϊόντος του *v-erbB* θεωρείται πολύ πιθανόν ότι ο «κομμένος» υποδοχέας αντιπροσωπεύει μια μόνιμως ενεργοποιημένη μορφή υποδοχέα με τις συνακόλουθες δραματικές συνέπειες για τα κύτταρα.

Το κύτταρικό ανάλογο του ετέρου ογκογονιδίου του ιού που προκαλεί ερυθροβλάστωμα στα πτηνά, το *v-erbA*, βρέθηκε πως κωδικοποιεί για τον υποδοχέα των θυρεοειδικών ορμονών. Οι θυρεοειδικές ορμόνες προάγουν τη διαφοροποίηση των ερυθροβλαστών σε ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία διαφοροποιούμενα σταματούν να πολλαπλασιάζονται. Πιστεύεται ότι το προϊόν του *v-erbA* είναι μια ανενεργός μορφή υποδοχέα των θυρεοειδικών ορμονών, που ανταγωνίζεται τη φυσιολογική μορφή του υποδοχέα για τις θέσεις πρόσδεσης.

Μ' αυτόν τον τρόπο, εμποδίζεται η διαφοροποίηση των ερυθροβλαστών και διευκολύνεται ο μετασχηματισμός τους.

***v-erbB*, μια περικομμένη μορφή του υποδοχέα του EGF.**



Ορισμένοι όγκοι ζώων προέρχονται επίσης από την ενσωμάτωση ενός ρετροϊού στο γονίδιο *c-erbB*, γεγονός που οδηγεί επίσης σε μια παρομοίου τύπου περικομμένη μορφή υποδοχέα.

## Γενετική αστάθεια και εκδήλωση καρκίνου

Η απενεργοποίηση ογκοκαταστολέων και η ενεργοποίηση ογκογονιδίων είναι γεγονότα-κλειδιά για την ογκογένεση, αλλά απαιτούνται αρκετά τέτοια γεγονότα (περισσότερα των 4-5 στην περίπτωση καρκίνων του ανθρώπου) για να ολοκληρωθεί η ογκογένεση.

Πολλοί καρκίνοι σχετίζονται με **γενετική αστάθεια** (genetic instability), η οποία αυξάνει σημαντικά το ρυθμό εμφάνισης τέτοιων γεγονότων. Η πλειοψηφία των όγκων του ορθού παρουσιάζει υψηλή συχνότητα μεγάλων χρωμοσωμικών αλλαγών, που συχνά συνεπάγονται την αλλαγή του αριθμού των αντιγράφων ενός γονιδίου.

Στη μειοψηφία των περιπτώσεων (~15%) δεν υπάρχουν μεγάλες αλλαγές, αλλά πολλές μεμονωμένες μεταλλάξεις, οι οποίες προκύπτουν από τον πολύ αυξημένο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης.

***Η αναποτελεσματικότητα των συστημάτων επιδιόρθωσης προκαλεί συσσώρευση μεταλλάξεων και δημιουργία όγκων.***

Οι μεγάλες χρωμοσωμικές αλλαγές περιλαμβάνουν ελλείμματα, διπλασιασμούς ή μετατοπίσεις. Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά την κυτταρική κρίση αποτελούν παράδειγμα για την δημιουργία χρωμοσωμικών αλλαγών. Η απώλεια των τελομερών επάγει αναδιατάξεις του DNA και η αποτυχία των φυσιολογικών μηχανισμών προστασίας επιτρέπει την επιβίωση των ελαττωματικών κυττάρων. Μεγάλες αναδιατάξεις μπορούν επίσης να προκληθούν από αποτυχημένη δράση των μηχανισμών προστασίας κατά τη διάρκεια του κανονικού κυτταρικού κύκλου. Τα σημεία ελέγχου αποκρίνονται στη βλάβη του DNA διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο. Ενώ η συνέχιση του κυτταρικού κύκλου επιτρέπεται αφού ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση. Όλα τα κύτταρα διαθέτουν συστήματα προστασίας από τις βλάβες που προκαλούνται από το περιβάλλον ή από λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή.

Το σύστημα MutSL είναι ένας ιδιαίτερα σημαντικός στόχος. Αυτό το σύστημα ευθύνεται για την αφαίρεση των αταίριαστων ζευγών βακτηριακού DNA αμέσως μετά την αντιγραφή του. Αντίστοιχα ομόλογα συστήματα επιτελούν παρόμοιες λειτουργίες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής μικροδορυφορικού DNA, η DNA πολυμεράση μπορεί να «ολισθήσει» προς τα πίσω κατά μία ή περισσότερες μονάδες επανάληψης. Οι επιπλέον μονάδες προεξέχουν από το δίκλωνο DNA ως μια μονόκλωνη περιοχή. Εάν δεν αφαιρεθούν, προκαλούν αύξηση του μήκους του μικροδορυφόρου στον επόμενο κύκλο αντιγραφής. Αυτό αποφεύγεται όταν τα ομόλογα του συστήματος MutSL αναγνωρίζουν τη μονόκλωνη προεξοχή και αντικαθιστούν το νεοσυντιθέμενο υλικό με μια νουκλεοτιδική αλληλουχία που ταιριάζει με τη μήτρα.

Στην ασθένεια του ανθρώπου HNPCC (**H**ereditary **N**on**P**olyposis **C**olorectal **C**ancer, μη πολυποειδής κληρονομικός καρκίνος του ορθού), οι νέες μικροδορυφορικές αλληλουχίες εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε κύτταρα όγκων σε σύγκριση με τις αλληλουχίες των σωματικών κυττάρων του ίδιου ασθενή. Ο μικροδορυφόρος έχει μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία βάσεων AC (διαβάζοντας μόνο τη μία αλυσίδα του DNA). Το πλήθος των επαναλήψεων ποικίλει στον πληθυσμό από 14-27 αντίγραφα. Κάθε άτομο εμφανίζει δύο σταθερά πλήθη επαναλήψεων, ένα για κάθε αλληλόμορφο στο διπλοειδές κύτταρο. Σε πολλούς ασθενείς, το πλήθος των επαναλήψεων είναι αλλαγμένο στα καρκινικά κύτταρα και στις περισσότερες περιπτώσεις βρίσκεται μειωμένο και στα δύο αλληλόμορφα. Ο φυσιολογικός ιστός ενός ασθενή έχει δύο αλληλόμορφα για ένα μικροδορυφόρο, το καθένα με διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου (AC). Σε καρκινικά κύτταρα, και τα δύο αυτά αλληλόμορφα φέρουν ελλείμματα. Στο ένα αλληλόμορφο μειώνεται ο αριθμός των επαναλήψεων από 25 σε 23 και στο άλλο μειώνεται από 19 σε 16.

Η απώλεια των συστημάτων επιδιόρθωσης των αταίριαστων ζευγών επιβεβαιώθηκε από το εύρημα ότι τα ομόλογα γονίδια των *mutS* και *mutL* (*hMSH2*, *hMLH1*) είναι μεταλλαγμένα στους όγκους. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα καρκινικά κύτταρα δεν διαθέτουν ικανότητα επιδιόρθωσης των μη συμπληρωματικών ζευγών.

Απαιτούνται τουλάχιστον 7 γενετικές τροποποιήσεις για το σχηματισμό ενός πλήρως μεταστατικού όγκου του ορθού. Περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων έχει μεταλλάξεις στα συστήματα επιδιόρθωσης μη συμπληρωματικών ζευγών, ενώ τα κύτταρα του όγκου έχουν ρυθμούς μεταλλαξιγένεσης υψηλότερους κατά 2-3 τάξεις μεγέθους σε σχέση με τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα. Αρκετές ασθένειες του ανθρώπου προκαλούνται από μεταλλάξεις των συστημάτων των σημείων ελέγχου, όπως η τελαγγειεκτατική αταξία, το σύνδρομο θραύσης Nijmegen και το σύνδρομο του Bloom, τα οποία χαρακτηρίζονται από χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που ακολουθούν τη θραύση του DNA.