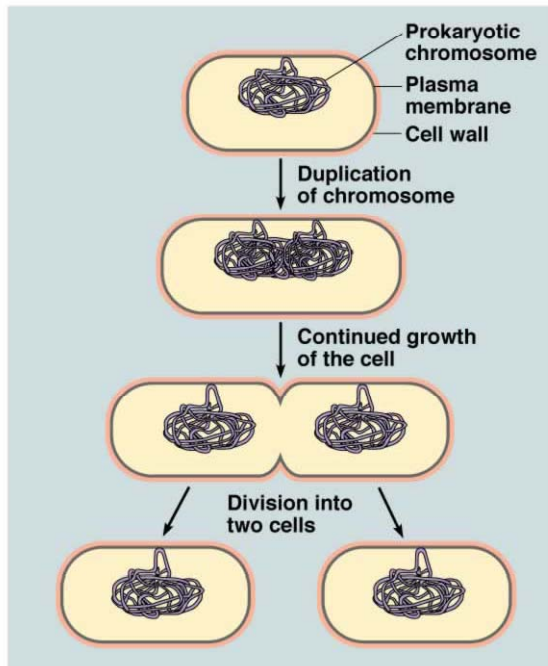


Η ικανότητα αυτο-αναπαραγωγής αποτελεί θεμελιώδες χαρακτηριστικό των κυττάρων αλλά και όλων των ζωντανών οργανισμών.

Όλα τα κύτταρα αναπαράγονται με διαίρεση, κατά την οποία από ένα κύτταρο παράγονται δύο θυγατρικά κύτταρα.

Τα θυγατρικά κύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος και διαιρούνται με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κυτταρικού πληθυσμού που προέρχεται από την αύξηση και διαίρεση του αρχικού κυττάρου και των απογόνων του.

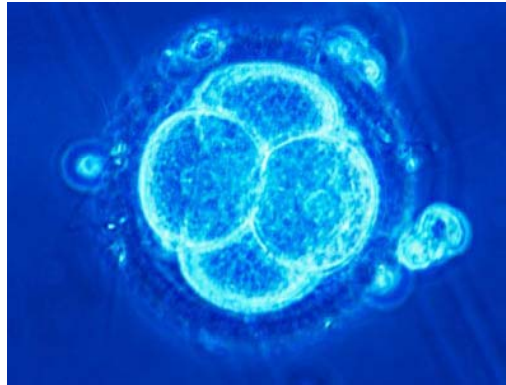
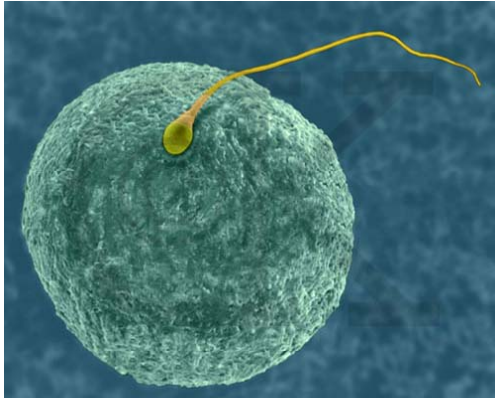


©Addison Wesley Longman, Inc.



Στην πιο απλή περίπτωση, διαδοχικοί κύκλοι αύξησης και διαίρεσης επιτρέπουν σε ένα βακτήριο να σχηματίσει μια αποικία εκατομμυρίων απογόνων κυττάρων κατά την επώαση μερικών ωρών στην επιφάνεια τρυβλίου με θρεπτικό άγαρ.

Μια πολυπλοκότερη περίπτωση είναι η ανάπτυξη του ανθρώπινου σώματος. Τα  $10^{14}$  κύτταρα του ανθρώπινου σώματος προκύπτουν από επαναλαμβανόμενους κύκλους κυτταρικής αύξησης και διαίρεσης ενός αρχικού κυττάρου, του γονιμοποιημένου ωαρίου.



Η διαίρεση όλων των κυττάρων πρέπει να **ρυθμίζεται** προσεκτικά και να **συντονίζεται** τόσο με την κυτταρική αύξηση όσο και με την αντιγραφή του DNA, ώστε τα θυγατρικά κύτταρα να φέρουν ακέραιο το γονιδίωμα των μητρικών.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από **μια σειρά πρωτεϊνικών κινασών**, οι οποίες είναι συντηρημένες σε ολόκληρο το φάσμα των ευκαρυωτικών οργανισμών, από τους ζυμομύκητες ως τα θηλαστικά.

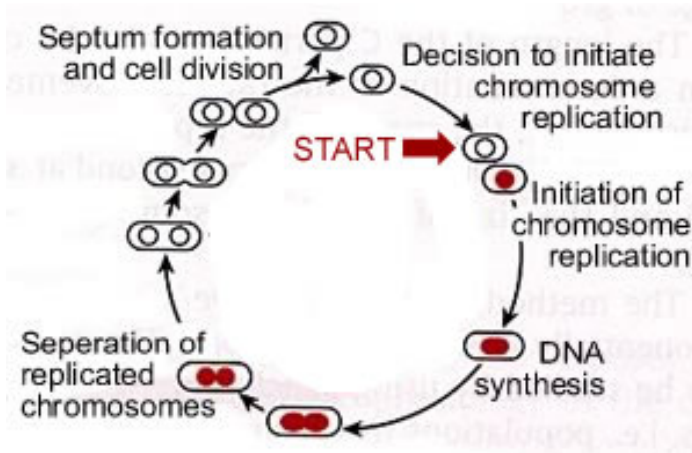
Στους ανώτερους ευκαρυώτες, ο μηχανισμός του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από **αυξητικούς παράγοντες**, οι οποίοι ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και συντονίζουν τη διαίρεση των μεμονωμένων κυττάρων σύμφωνα με τις ανάγκες του οργανισμού ως συνόλου.

Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η ελαττωματική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι η συνήθης αιτία του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, η μελέτη του κυτταρικού κύκλου συνδέεται στενά με τη μελέτη του καρκίνου, αλλά και με τη μελέτη των μονοπατιών της κυτταρικής σηματοδότησης.

## Ο Κυτταρικός Κύκλος των Ευκαρυωτών

Κατά τον κυτταρικό κύκλο επιτελούνται 4 συγχρονισμένες διεργασίες:

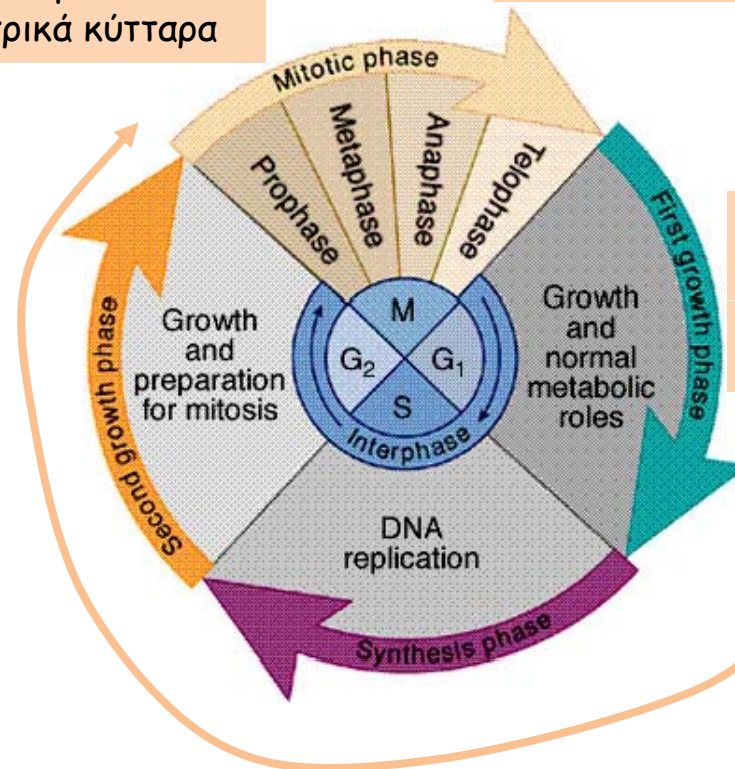
## Ο Κυτταρικός Κύκλος των Βακτηρίων



Στα βακτήρια, η κυτταρική αύξηση και η αντιγραφή του DNA λαμβάνουν χώρα κατά το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού κύκλου και τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα είναι συνδεδεμένα σε συγκεκριμένες θέσεις της μεμβράνης.

3. Κατανομή των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα

4. Κυτταρική διαίρεση



1. Κυτταρική αύξηση: συνεχής διαδικασία

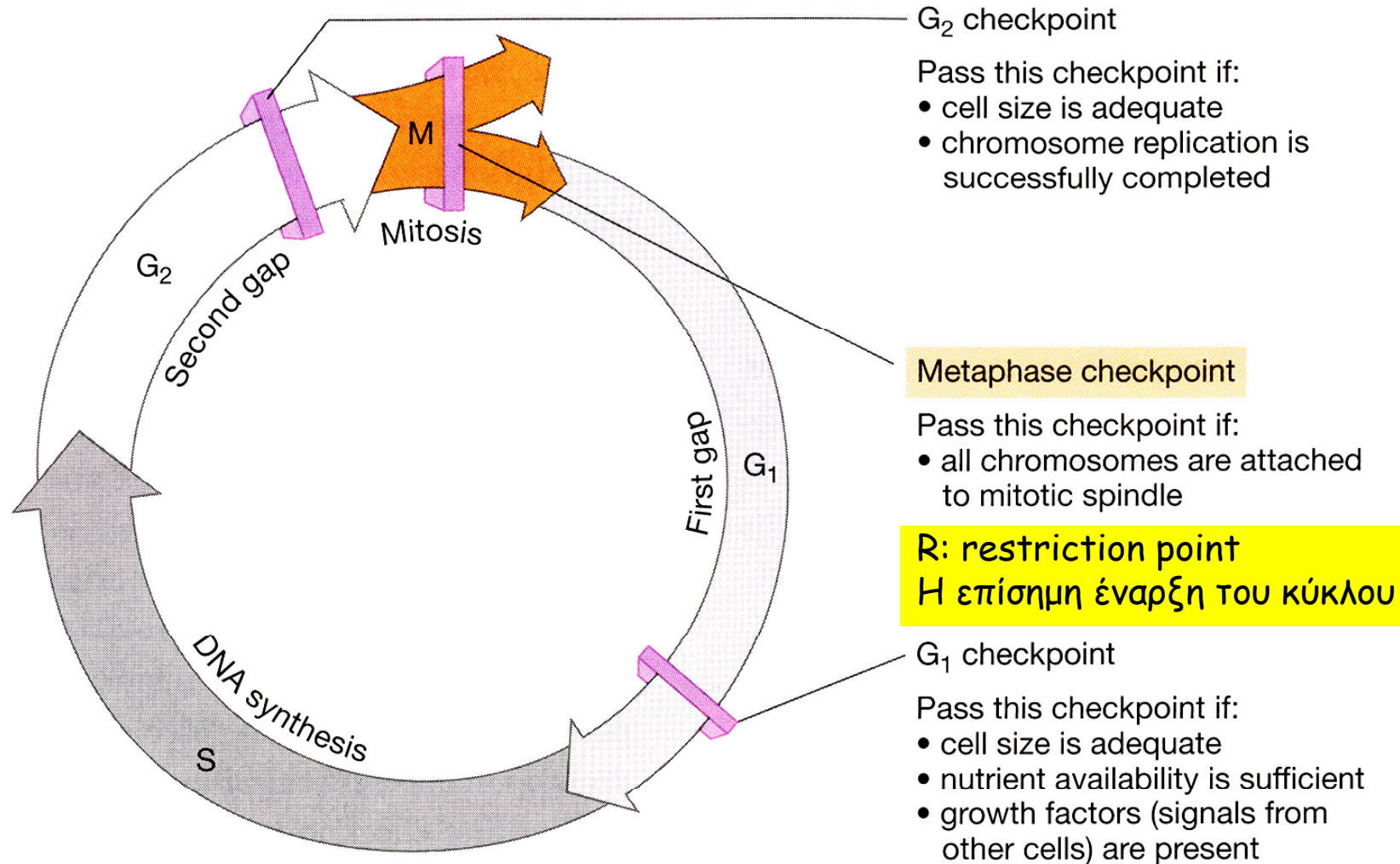
2. Αντιγραφή του DNA: στη φάση S

Στους ευκαρυώτες, ο κυτταρικός κύκλος είναι πιο πολύπλοκος και αποτελείται από 4 διακριτές φάσεις



Η μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη ελέγχεται από ένα συντηρημένο ρυθμιστικό μηχανισμό, ο οποίος

- αφενός συντονίζει τη ροή των γεγονότων του κυτταρικού κύκλου και
- αφετέρου συνδέει τον κυτταρικό κύκλο με εξωκυτταρικά σήματα που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

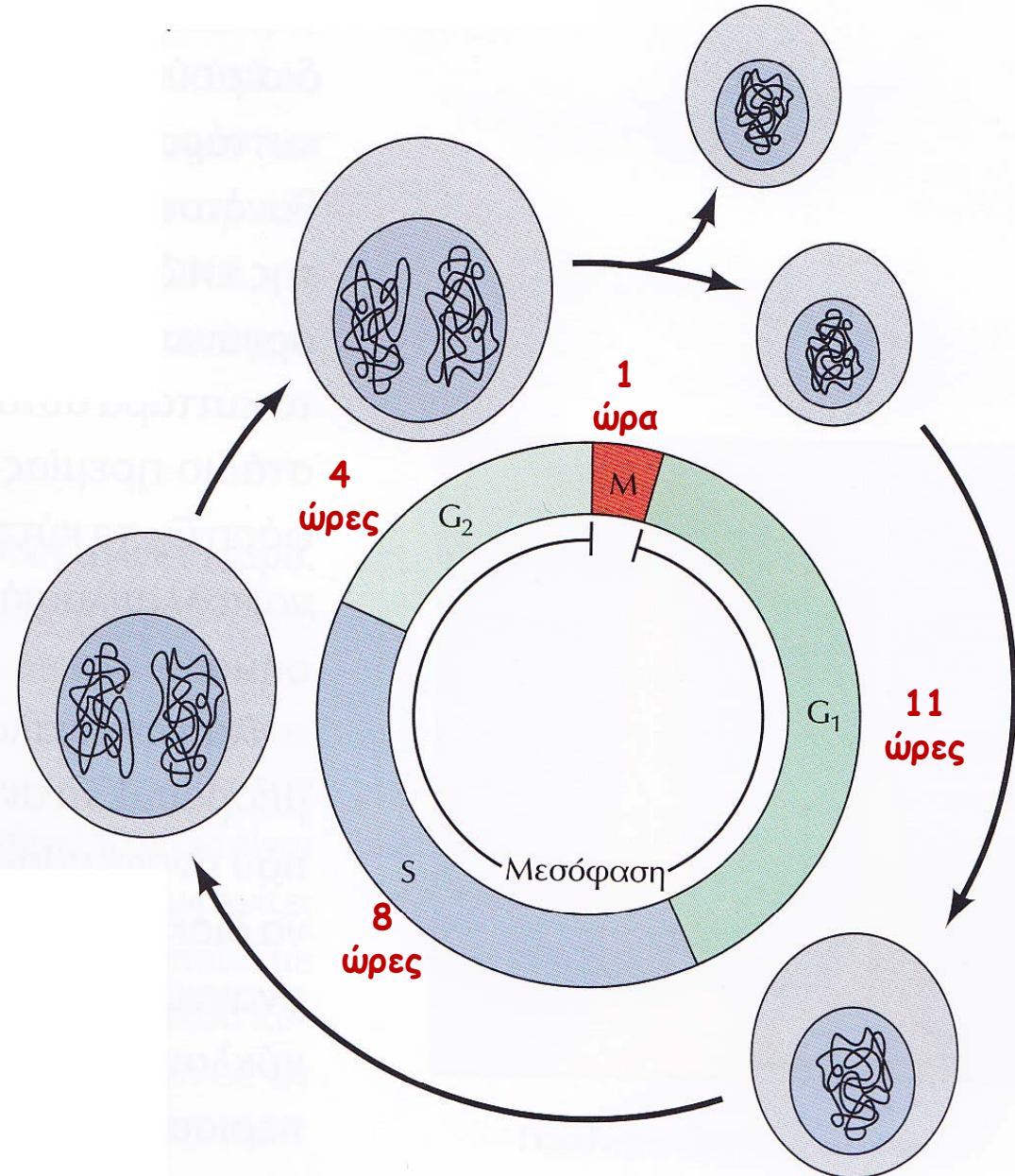


Σε κυτταροκαλλιέργεια, ένα τυπικό ευκαρυωτικό ανθρώπινο κύτταρο διαιρείται κάθε 24 περίπου ώρες.

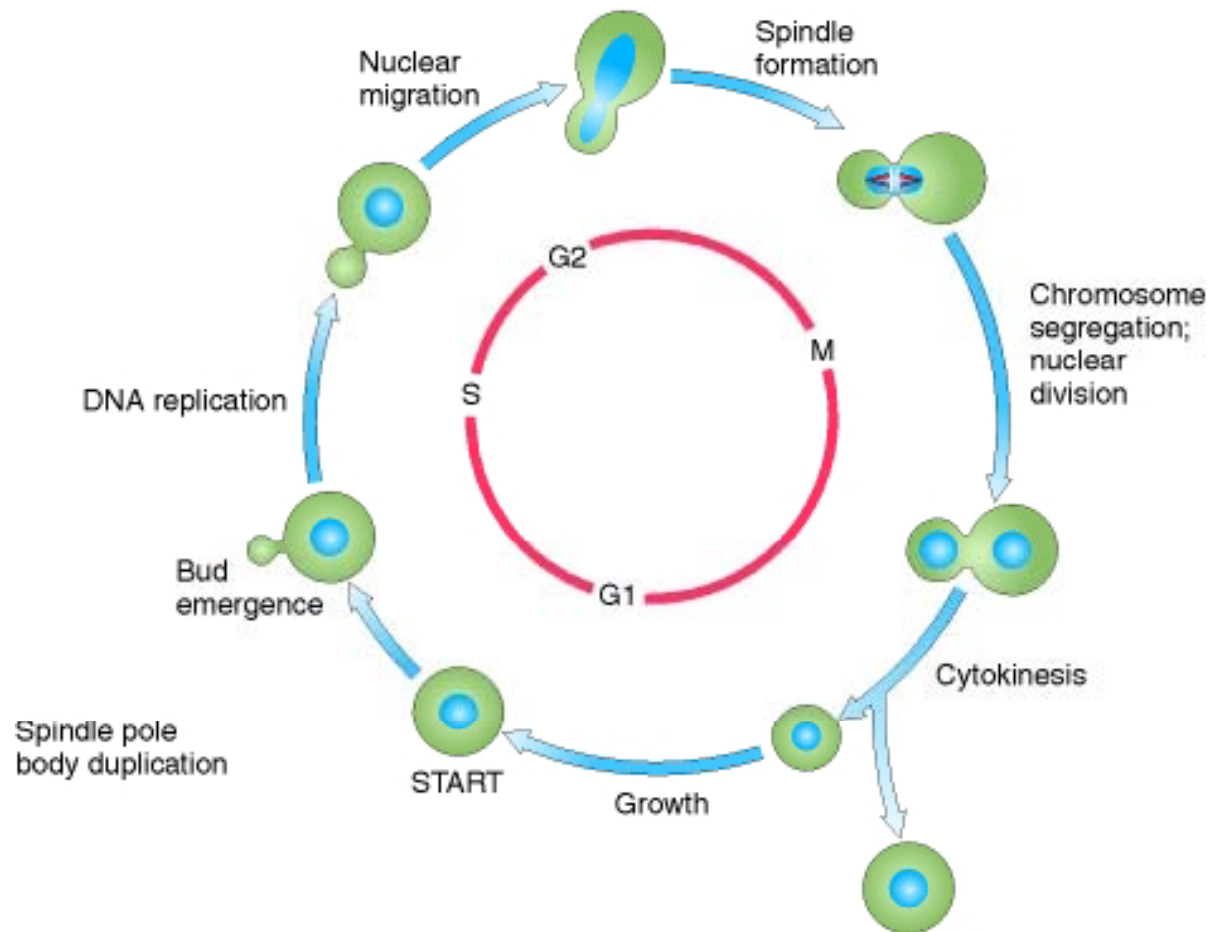
Κατά τη μικροσκοπική εξέταση του κυτταρικού κύκλου διακρίνονται δύο κύρια τμήματα : τη μίτωση (mitosis) και τη μεσόφαση (interphase).

Η μίτωση (πυρηνική διαίρεση) αποτελεί το πιο εντυπωσιακό στάδιο του κυτταρικού κύκλου, αντιστοιχεί στον διαχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων και συνήθως καταλήγει σε κυτταρική διαίρεση (κυτταροκίνηση, cytokinesis). Ωστόσο, η μίτωση και η κυτταροκίνηση διαρκούν μόλις μία ώρα και επομένως το 95% περίπου της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου καλύπτεται από τη μεσόφαση, η οποία είναι η περίοδος ανάμεσα σε δύο διαδοχικές μιτώσεις.

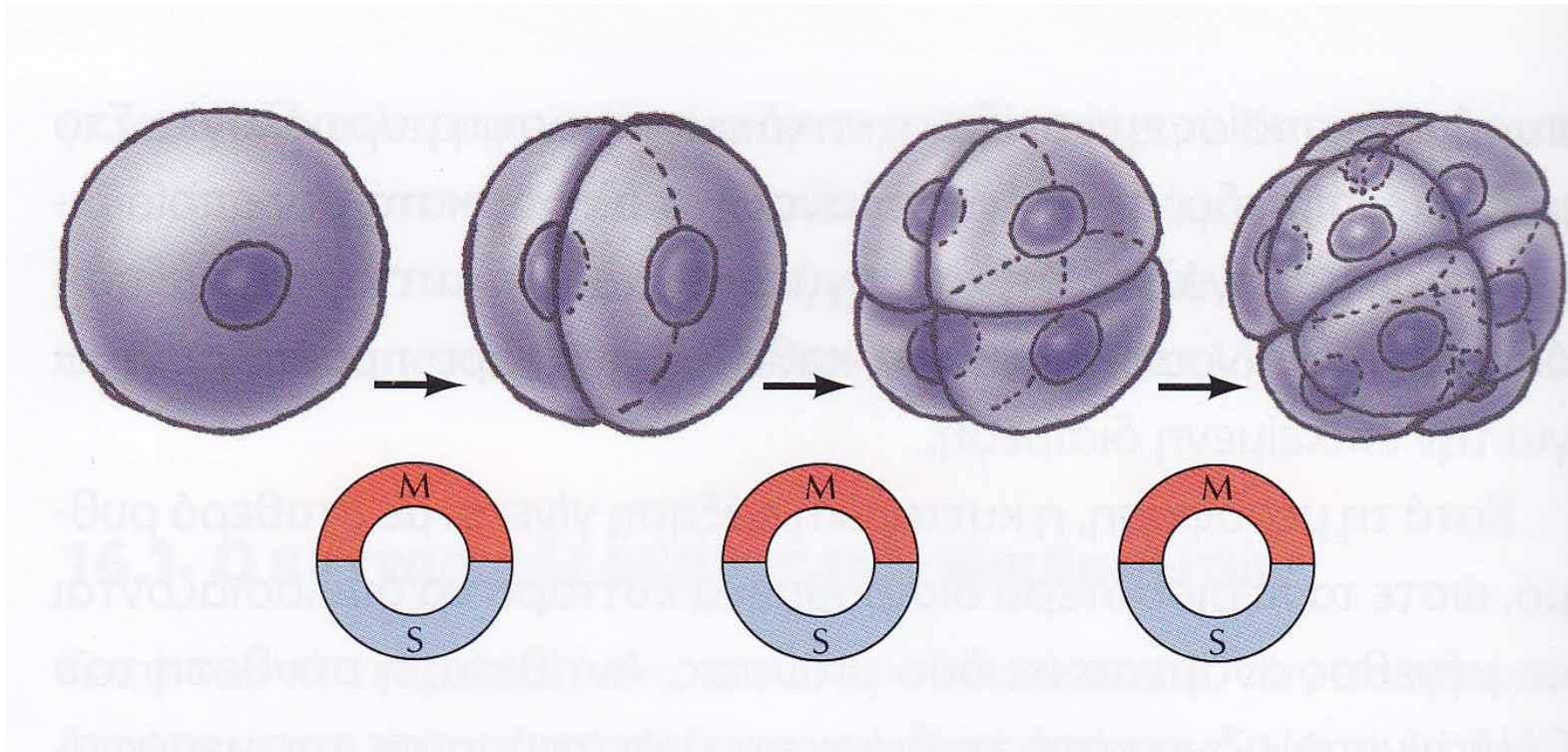
Κατά τη μεσόφαση, τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και καταλαμβάνουν ολόκληρο τον πυρήνα, ο οποίος εμφανίζει σχετικά ομοιόμορφη μορφολογία



Άλλα κύτταρα μπορεί να διαιρούνται ταχύτερα. Για παράδειγμα, οι ζυμομύκητες που αναπαράγονται με εκβλάστηση μπορούν να ολοκληρώσουν και τα τέσσερα στάδια του κυτταρικού κύκλου σε μόλις 90 λεπτά.







Ακόμα συντομότεροι κυτταρικοί κύκλοι (διάρκειας 30 λεπτών ή λιγότερο) παρατηρούνται στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, αμέσως μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου.

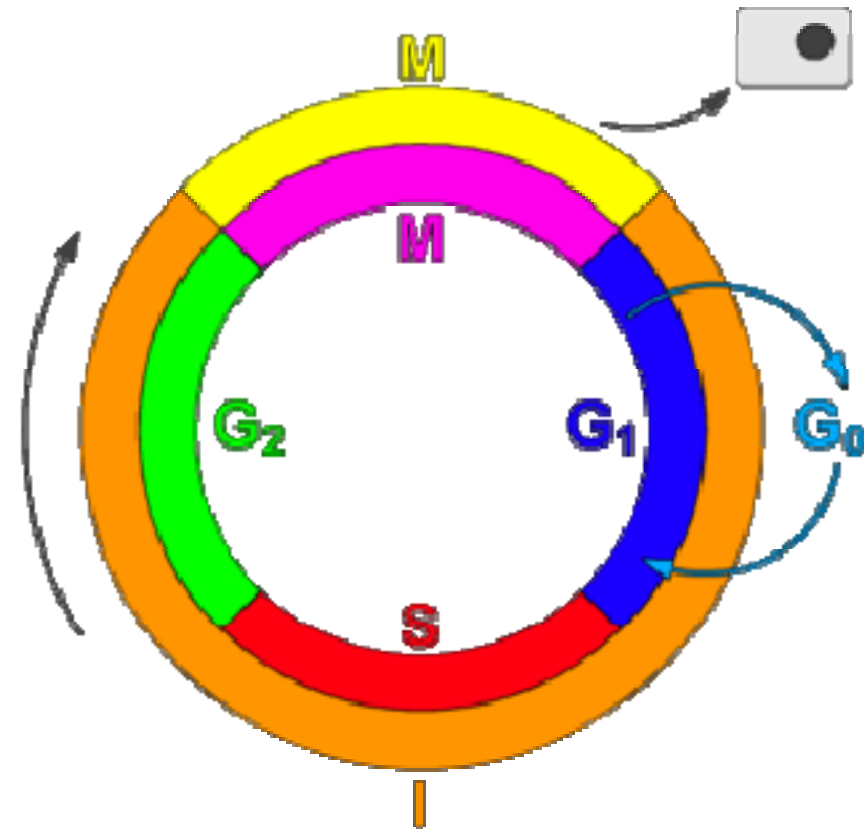
Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, το κυτταρόπλασμα του ωαρίου απλώς διαιρείται σε μικρότερα κύτταρα, **χωρίς να συμβαίνει κυτταρική αύξηση**. Οι φάσεις *G1* και *G2* απουσιάζουν και η αντιγραφή του DNA διεξάγεται ταχύτατα.

Επομένως, στα πρώιμα έμβρυα οι κυτταρικοί κύκλοι χαρακτηρίζονται από πολύ σύντομες φάσεις *S* που εναλλάσσονται με φάσεις *M*.



Σε αντίθεση με τον ταχύτατο πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών κυττάρων, ορισμένα ενήλικα ζωικά κύτταρα (π.χ. τα νευρικά κύτταρα) παύουν οριστικά να διαιρούνται, ενώ πολλά άλλα κύτταρα διαιρούνται κατά περίπτωση, όταν χρειάζεται η αντικατάσταση κυττάρων που έχουν χαθεί εξαιτίας τραυματισμού ή κυτταρικού θανάτου. Στην τελευταία περίπτωση περιλαμβάνονται οι ινοβλάστες της επιδερμίδας, καθώς και τα κύτταρα ορισμένων εσωτερικών οργάνων (π.χ. τα ηπατικά κύτταρα).

Τα κύτταρα αυτά εξέρχονται από τη φάση  $G_1$  και εισέρχονται σε ένα **στάδιο ηρεμίας, αδράνειας «Quiescent stage»** του κυτταρικού κύκλου που ονομάζεται  $G_0$ . Στη φάση  $G_0$ , τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά, αλλά παύουν να πολλαπλασιάζονται, εκτός αν δεχτούν κατάλληλα εξωκυτταρικά σήματα.

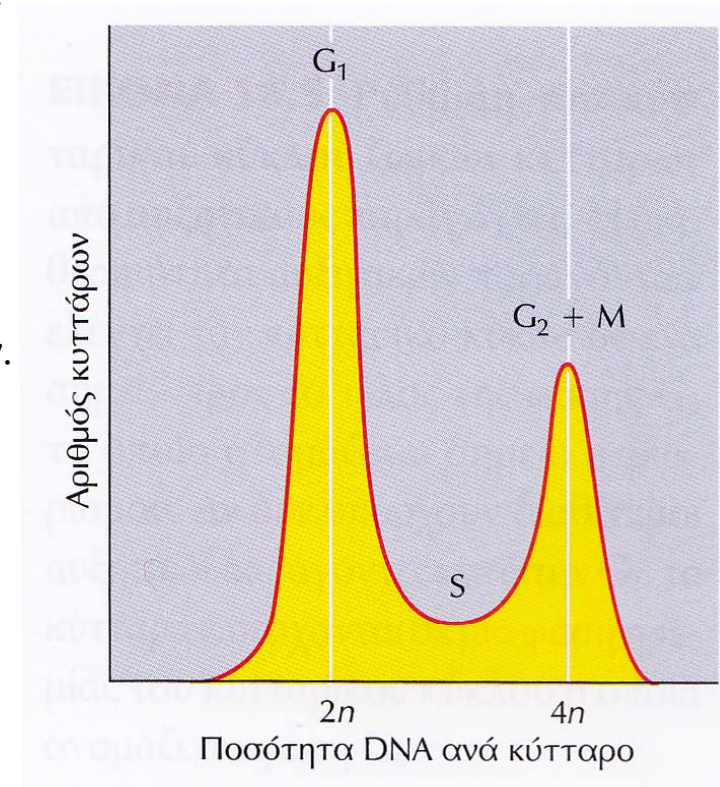


Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου προϋποθέτει να μπορούμε να αναγνωρίσουμε τα κύτταρα στις διαφορετικές φάσεις.

Ενώ τα μιτωτικά κύτταρα μπορούν να διακριθούν με τη βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου, για την αναγνώριση των κυττάρων που βρίσκονται στις άλλες φάσεις του κύκλου ( $G_1$ ,  $S$  και  $G_2$ ) χρησιμοποιούνται βιοχημικά κριτήρια. Στις περισσότερες περιπτώσεις, κύτταρα σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου διακρίνονται από την ποσότητα του DNA που περιέχουν.

Για παράδειγμα, τα ζωικά κύτταρα στη φάση  $G_1$  είναι διπλοειδή, δηλαδή διαθέτουν δύο αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος, επομένως η ποσότητα του DNA που περιέχουν αναφέρεται ως  $2n$ . Κατά τη φάση  $S$ , με την αντιγραφή διπλασιάζεται η ποσότητα του DNA του κυττάρου (από  $2n$  σε  $4n$ ), με αποτέλεσμα τα κύτταρα στη φάση  $S$  να διαθέτουν ποσότητα DNA που κυμαίνεται μεταξύ  $2n$  και  $4n$ . Η ποσότητα του κυτταρικού DNA παραμένει  $4n$  στις φάσεις  $G_2$  και  $M$  και μειώνεται σε  $2n$  μετά την κυτταροκίνηση.

Η ποσότητα του κυτταρικού DNA μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά με επώαση των κυττάρων με μια φθορίζουσα χρωστική που δεσμεύεται στο DNA (βρωμιούχο αιθίδιο). Ακολουθεί ανάλυση της έντασης φθορισμού μεμονωμένων κυττάρων σε **κυτταρομετρητή ροής** (flow cytometer) ή σε **κυτταρομετρητή ροής εξαρτώμενο από φθορισμό** (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorter), μέθοδοι που επιτρέπουν το διαχωρισμό των κυττάρων ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται:  $G_1$ ,  $S$  και  $G_2/M$ .



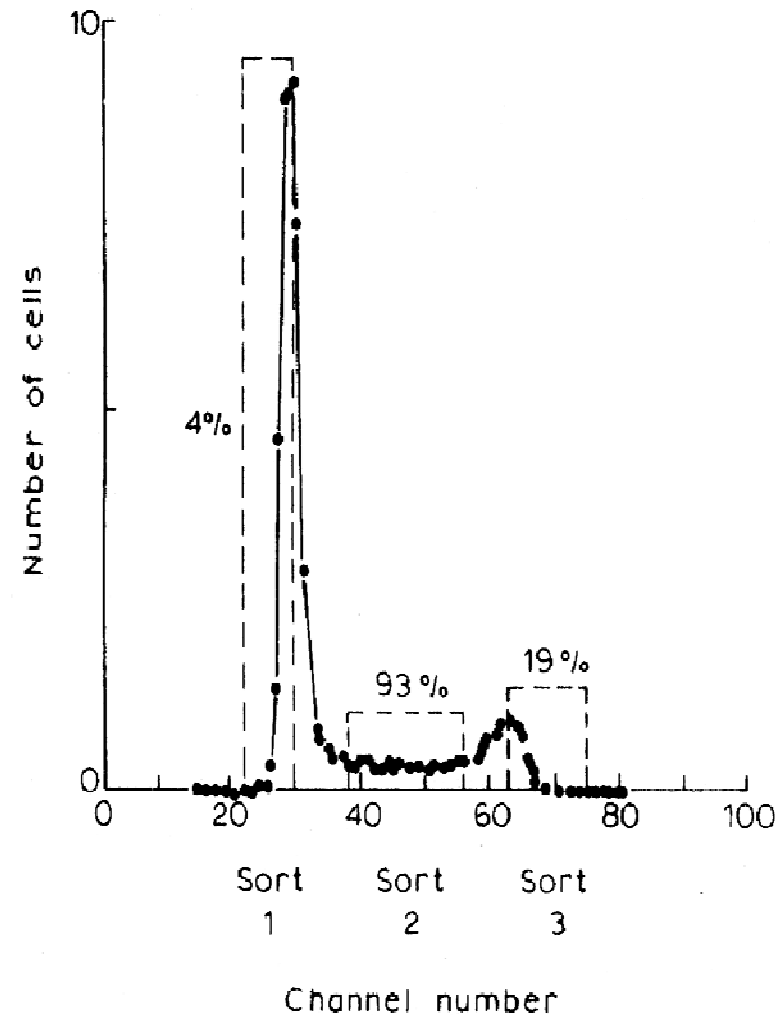
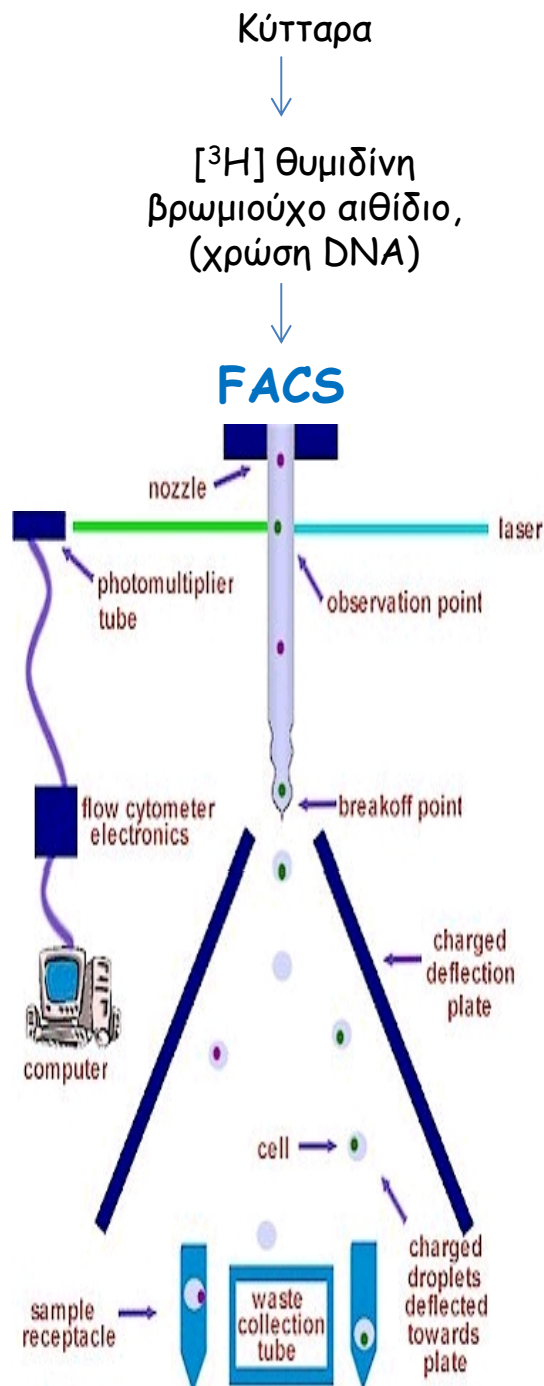
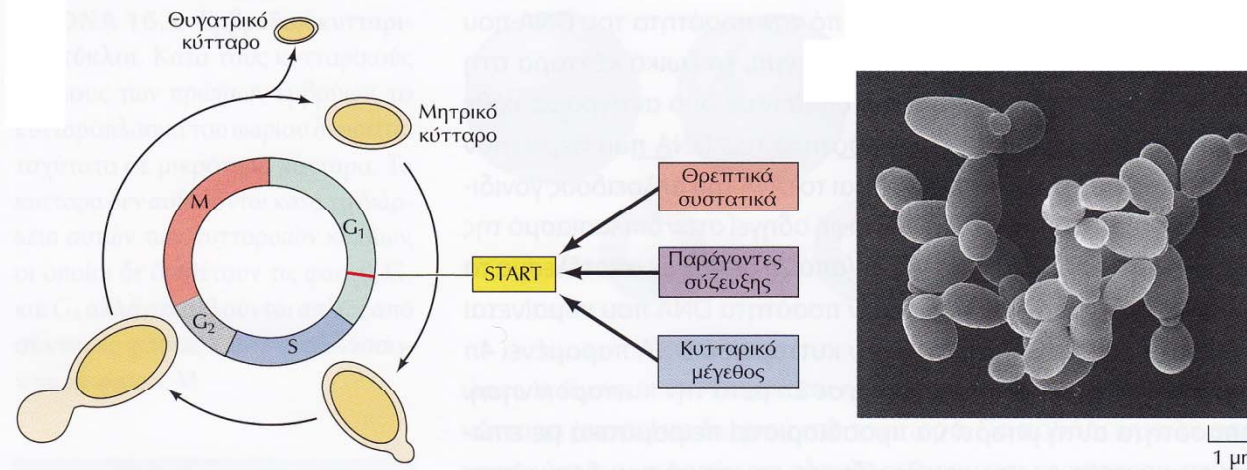


Fig. 10.13. Distribution of cells separated by flow microfluorometry. CHO cells were pulse labelled for 15 min with [<sup>3</sup>H]thymidine (1  $\mu$ Ci/ml) and stained with ethidium bromide. They were then submitted to flow microfluorometry and cell sorting on the basis of cellular DNA content. Cells from the indicated portions (sort 1, 2 and 3) were then subjected to autoradiography and shown to contain respectively 4%, 93% and 19% of the cells labelled. (Reproduced from Kraemer et al., 1973, with kind permis-

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται τόσο από εξωκυτταρικά σήματα που προέρχονται από το περιβάλλον, όσο και από ενδοκυτταρικά σήματα, ώστε να συντονίζονται οι διάφορες διεργασίες που εξελίσσονται κατά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Ένα παράδειγμα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από εξωκυτταρικά σήματα είναι η επίδραση αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό των ζωικών κυττάρων.

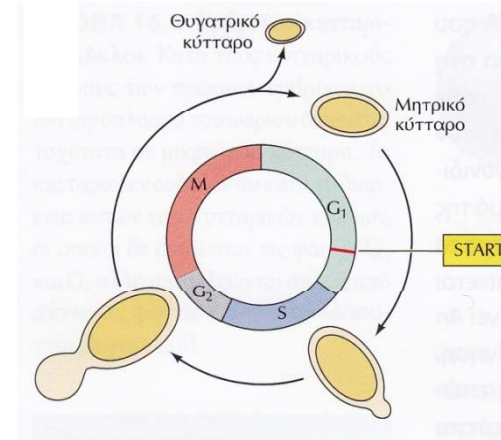
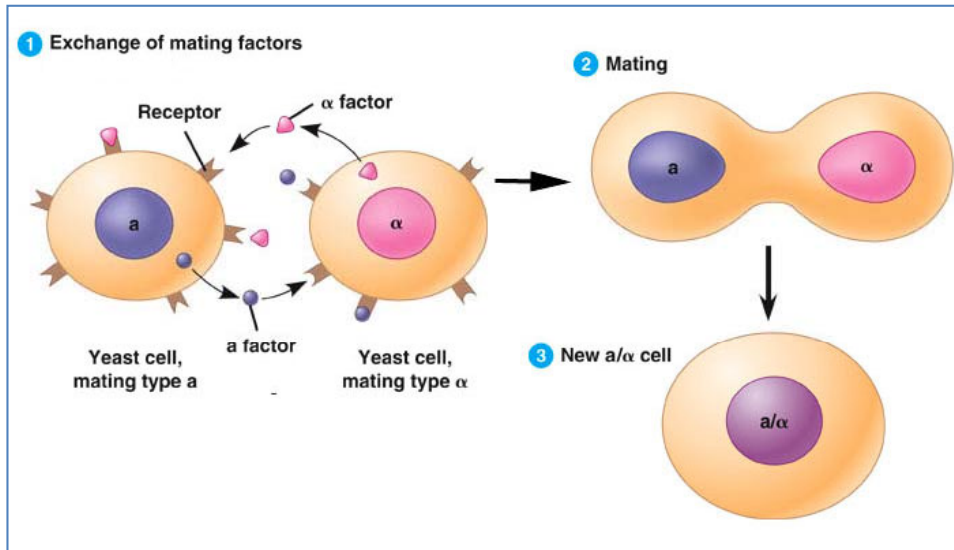


Σε πολλούς τύπους κυττάρων, προς το τέλος της  $G_1$  υπάρχει ένα πολύ σημαντικό σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου το οποίο ρυθμίζει τη μετάβαση από την  $G_1$  στην  $S$ . Αυτό το σημείο ελέγχου ταυτοποιήθηκε αρχικά από μελέτες σε *Saccharomyces cerevisiae*, στους οποίους είναι γνωστό ως σημείο 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

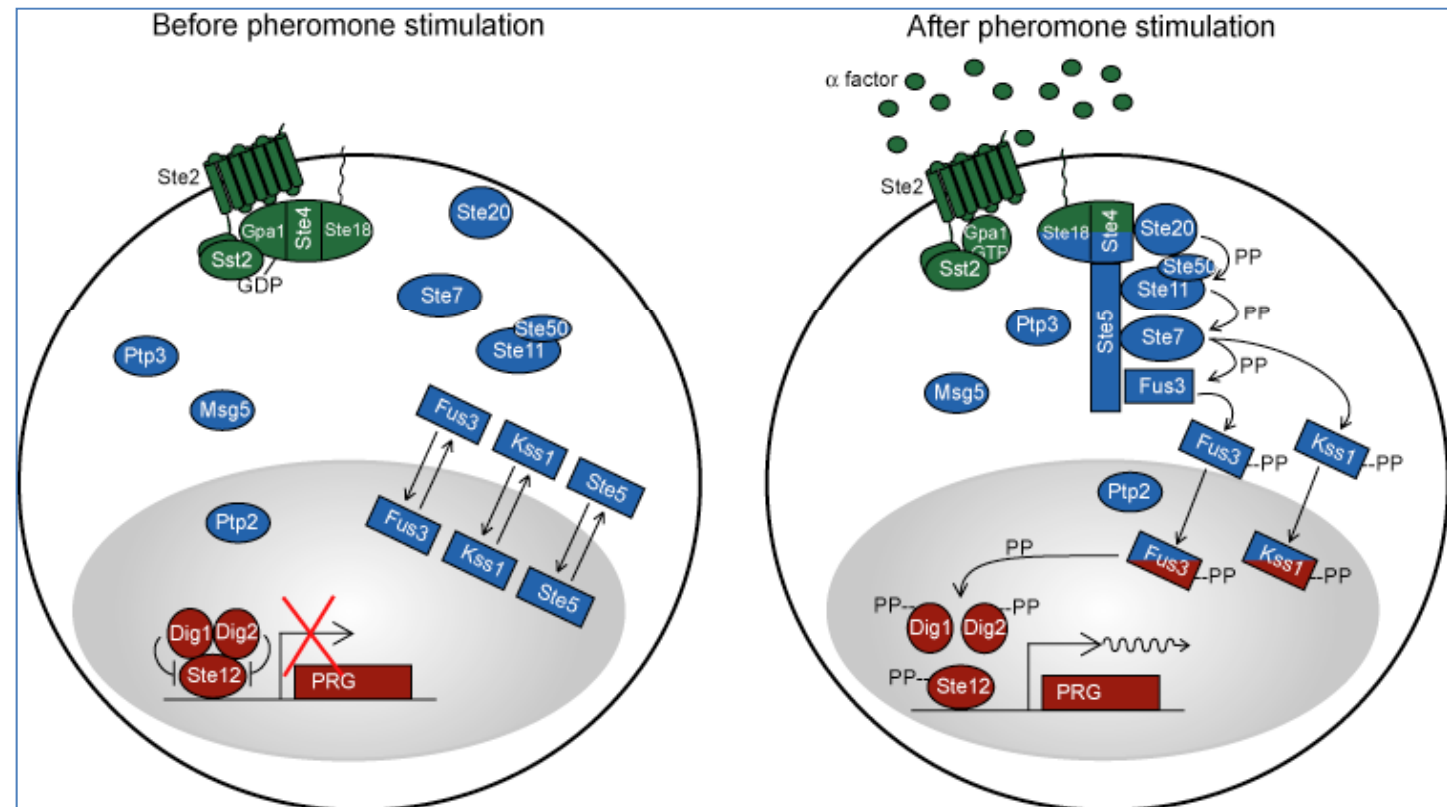
Η διέλευση από το σημείο  $START$  στον κυτταρικό κύκλο του ζυμομύκητα ρυθμίζεται με αυστηρό τρόπο από εξωκυτταρικά σήματα, όπως είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, καθώς και από το κυτταρικό μέγεθος. Για παράδειγμα, αν οι ζυμομύκητες αντιμετωπίσουν έλλειψη θρεπτικών συστατικών, ο κυτταρικός τους κύκλος σταματά στο σημείο  $START$  και τα κύτταρα εισέρχονται σε ένα στάδιο ηρεμίας αντί να μεταβούν στη φάση  $S$ .

**Επομένως, το  $START$  αντιπροσωπεύει ένα σημείο λήψης απόφασης στο οποίο το κύτταρο προσδιορίζει αν τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά είναι επαρκή για να του επιτρέψουν να ολοκληρώσει τις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.**

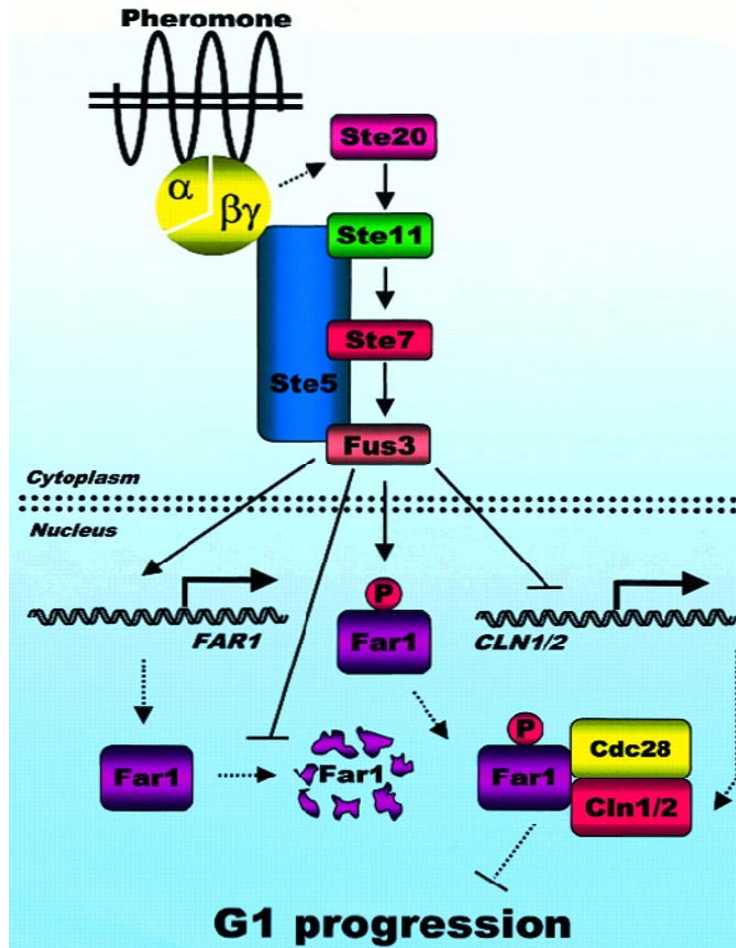




Επιπλέον, οι σηματοδοτικοί πολυπεπτιδικοί παράγοντες που επάγουν τη σύζευξη των ζυμομυκήτων (mating factors) προκαλούν τη στάση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο START, επιτρέποντας στα δύο απλοειδή κύτταρα ζυμομυκήτων να συζευχθούν αντί να μεταβούν στη φάση S.



## A. Budding yeast

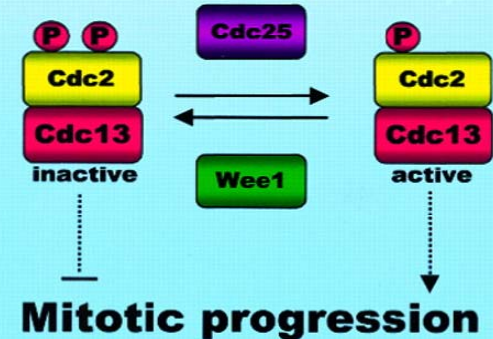
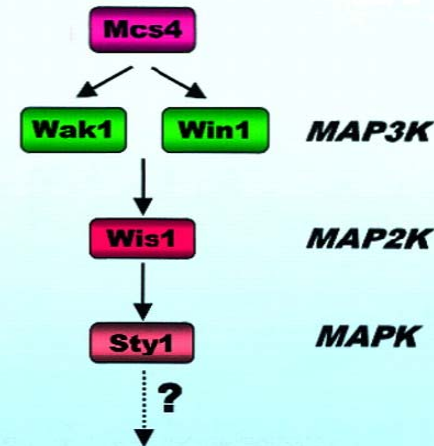


**G1 progression**

1. Η μεταφορά της Fus3 στον πυρήνα ενεργοποιεί την έκφραση της Far1, ενός αναστολέα της CDK, και ταυτόχρονα αναστέλλει την ουβικουιτινίωση της Far1.
2. Η Fus3 φωσφορυλιώνει την Far1, η οποία συνδέεται και αναστέλλει το σύμπλοκο Cln1/2-Cdc28, οδηγώντας στο σταμάτημα της φάσης G1 στον σημείο START.
3. Η Fus3 καταστέλλει τη μεταγραφή των κυκλινών της φάσης G1, Cln1 and Cln2, οι οποίες ενεργοποιούν την κινάση Cdc28.

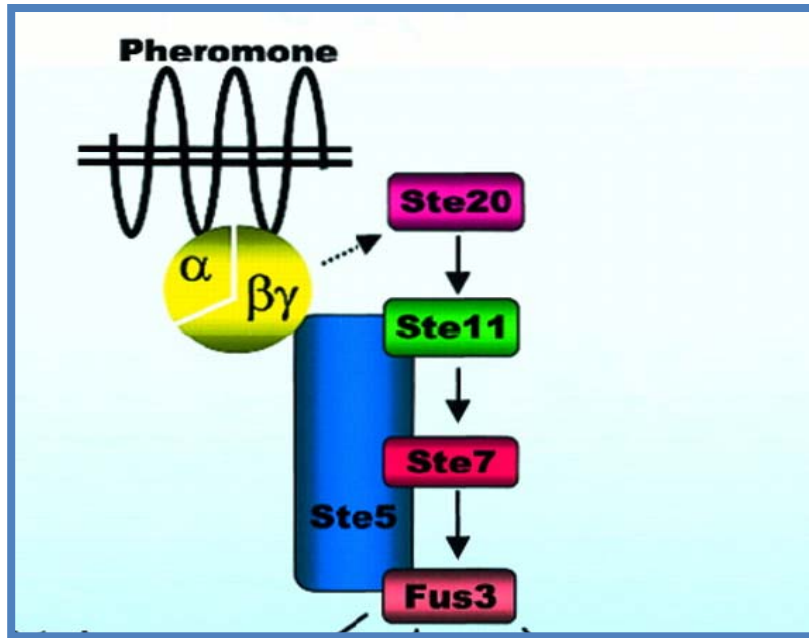
## B. Fission yeast

Nutrient limitation/stress

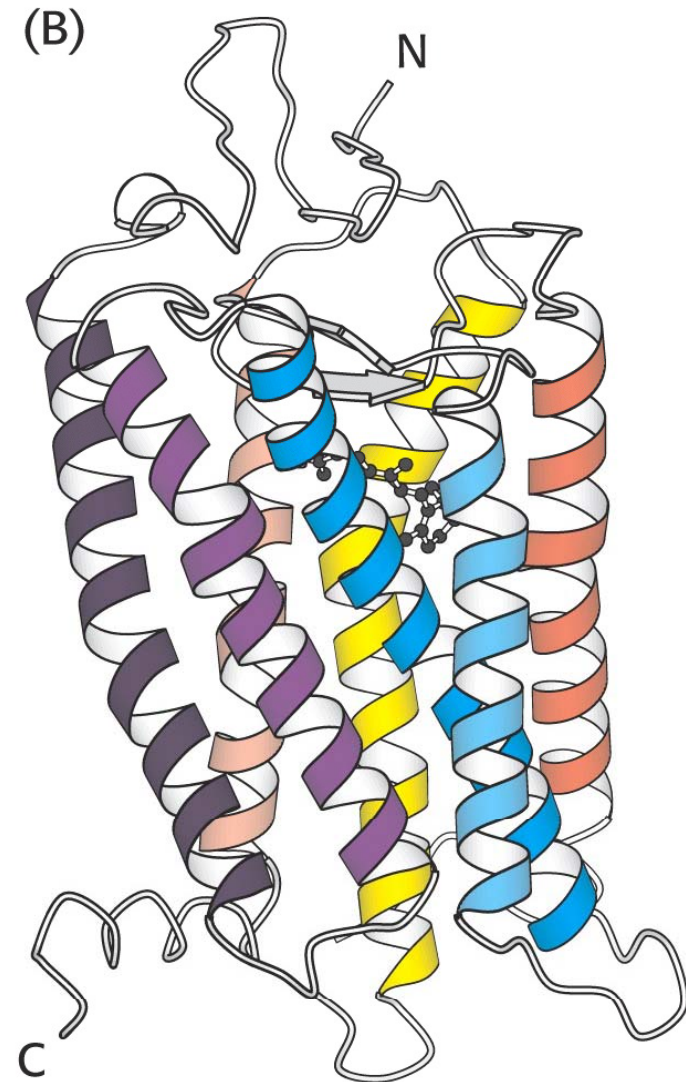
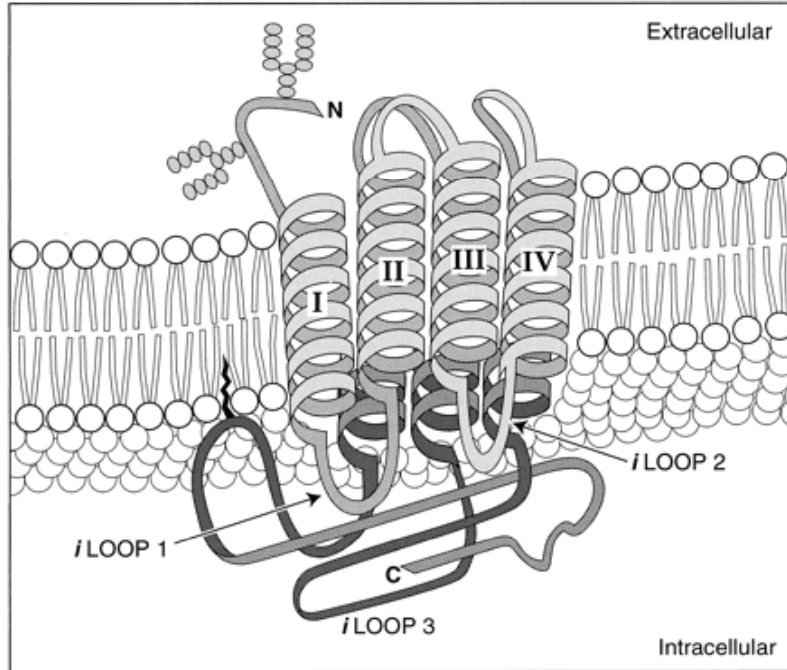


**Mitotic progression**

Η ενεργοποίηση της κεντρικής κινάσης CDK Cdc2 απαιτεί τη σύνδεσή της με την κυκλίνη Cdc13. Αυτό το σύμπλοκο αναστέλλεται μετά από φωσφορυλίωση της Cdc2 από την κινάση Wee1 και ενεργοποιείται μετά από από-φωσφορυλίωση της tyrosine-15 από την φωσφατάση Cdc25, αμέσως μετά το ξεκίνημα της φάσης M. Το μονοπάτι MAPK StyI/Spc1 περιλαμβάνει τις MAPKKKs Wak1 και Win1, την MAPKK Wis1 και τις MAPK StyI/Spc1, οι οποίες είναι ομόλογες με τις p38 MAP κινάσες.

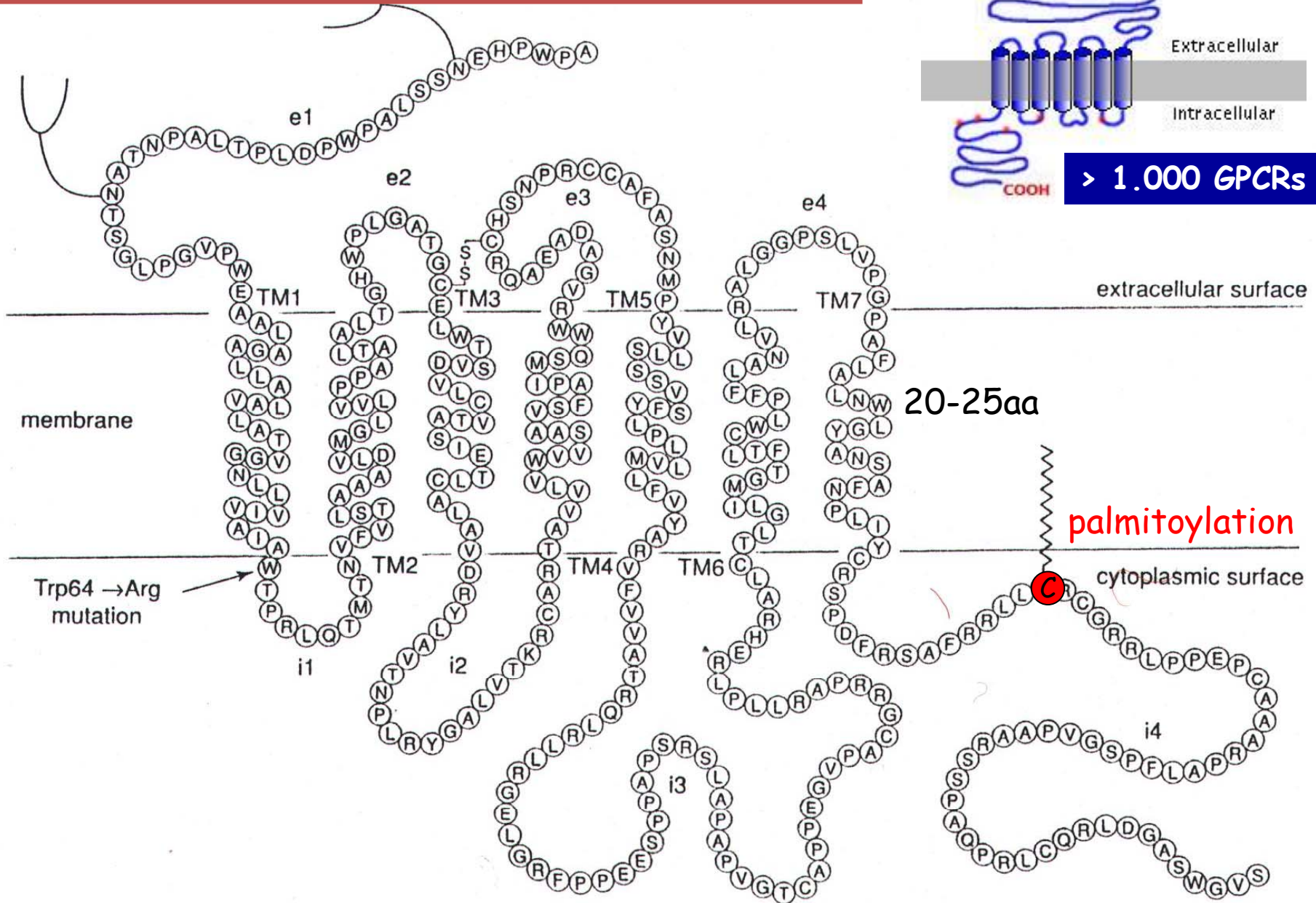


Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες

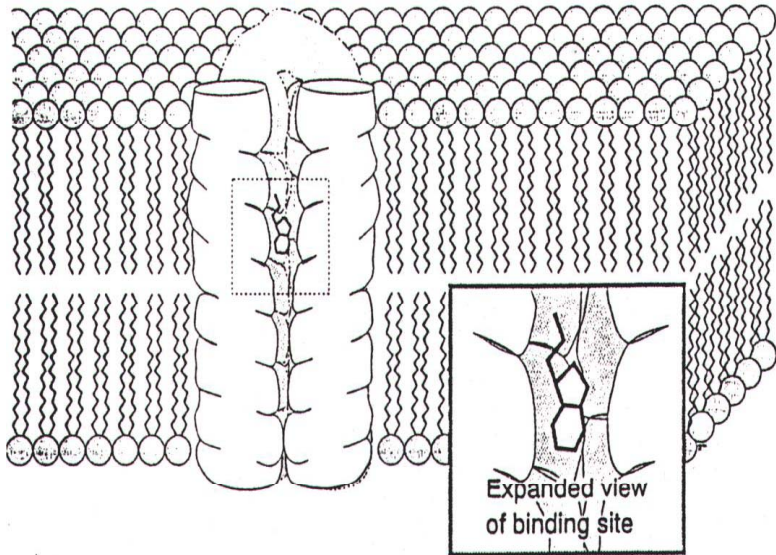




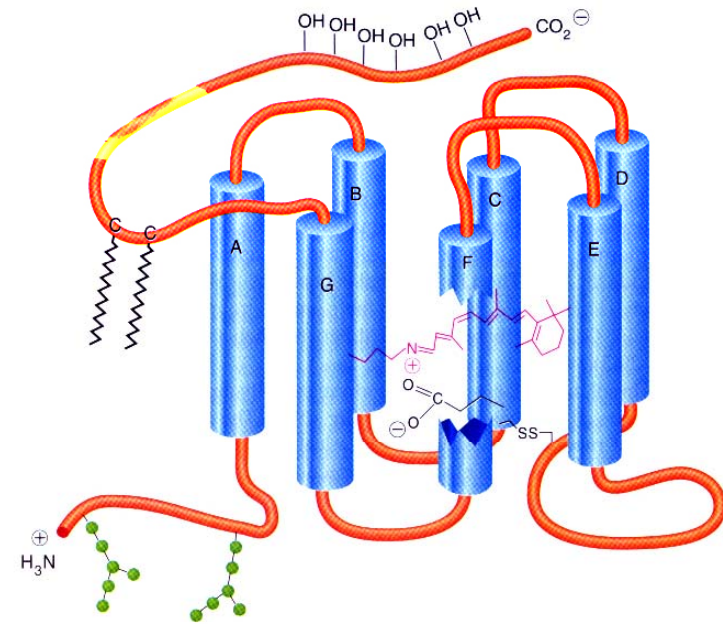
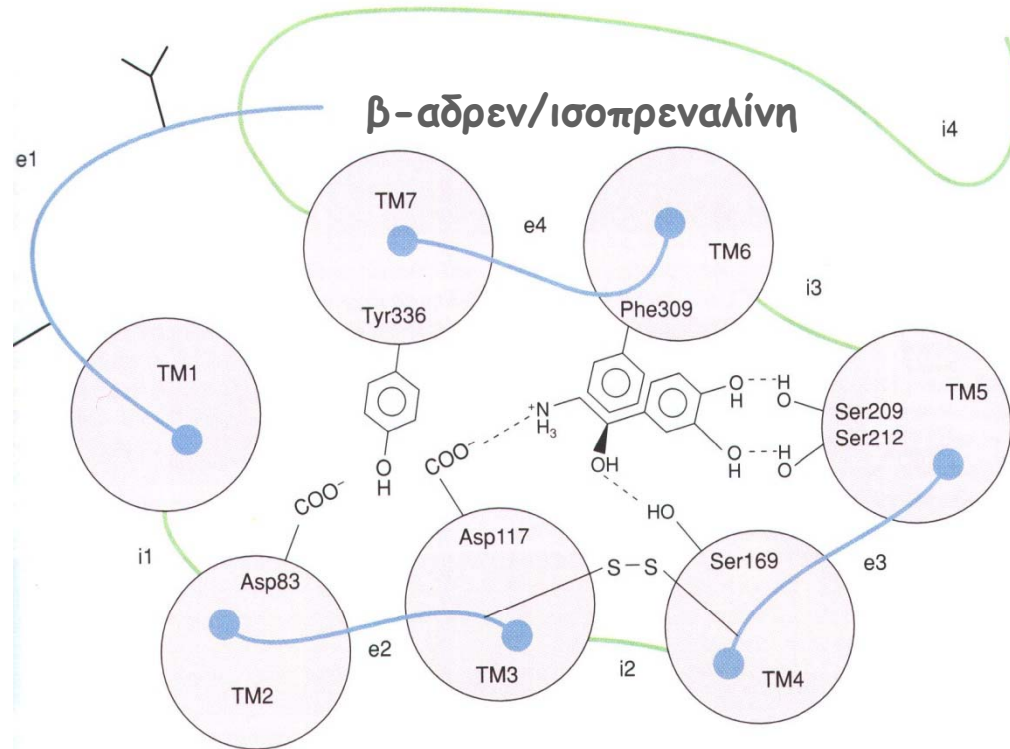
Δομή υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες:  
Μονομερείς πρωτεΐνες 400 - 600 αα



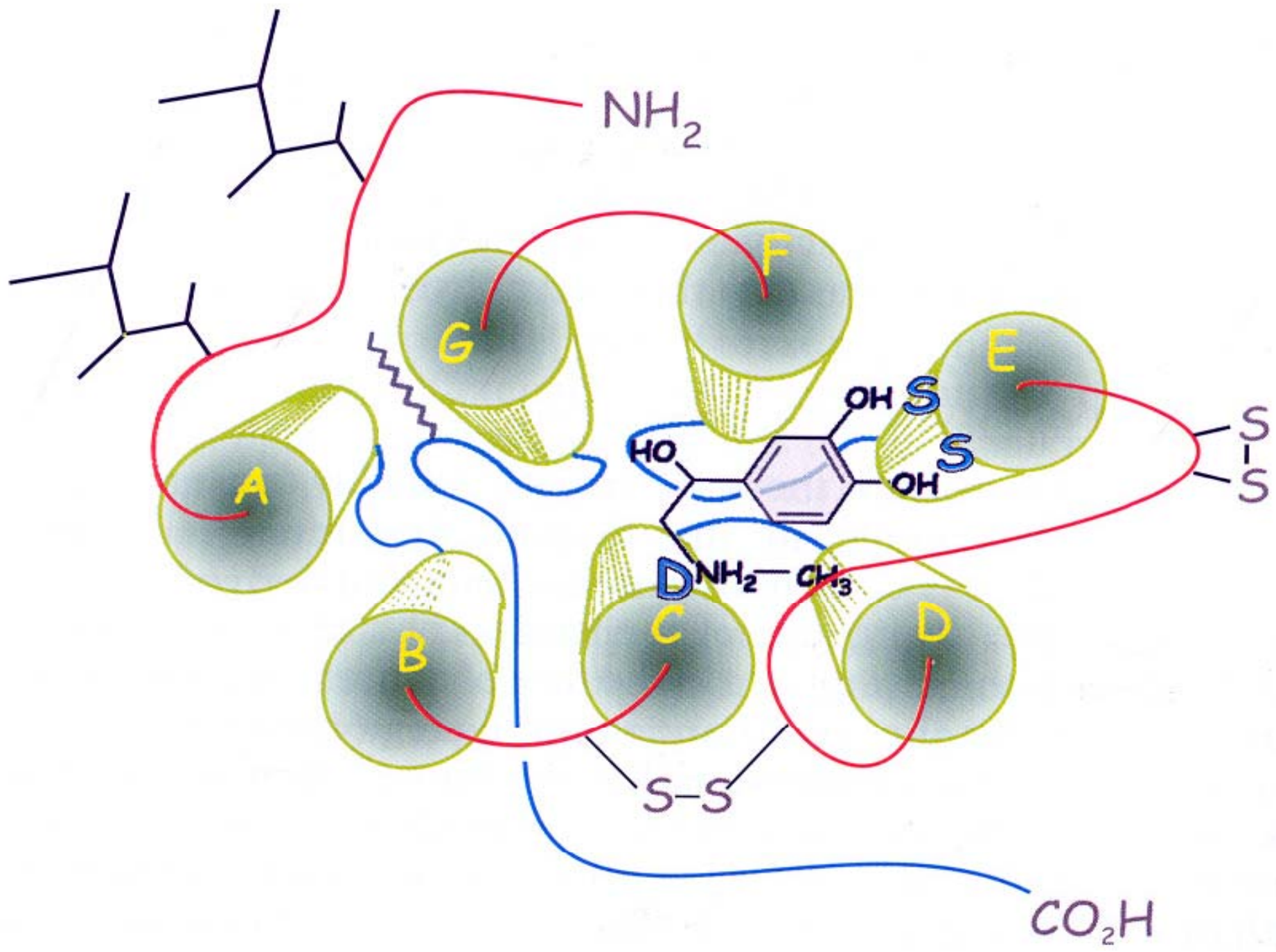




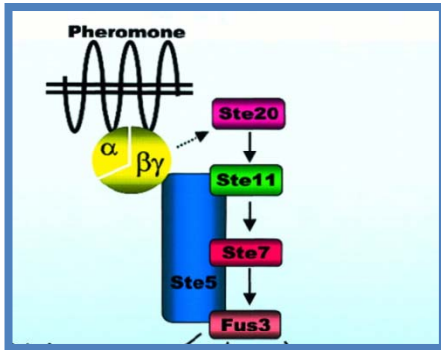
Σχηματική αναπαράσταση της θήκης σύνδεσης μορίου-υποδοχέα (binding pocket) Από *C.D. Strader et al, Faseb J., 1989, 3, 1825-32. B.*



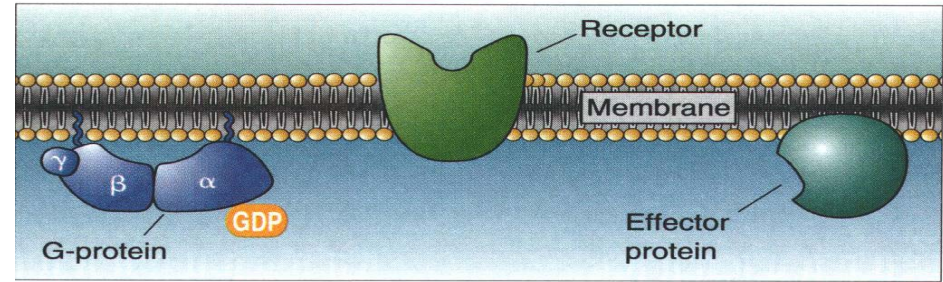
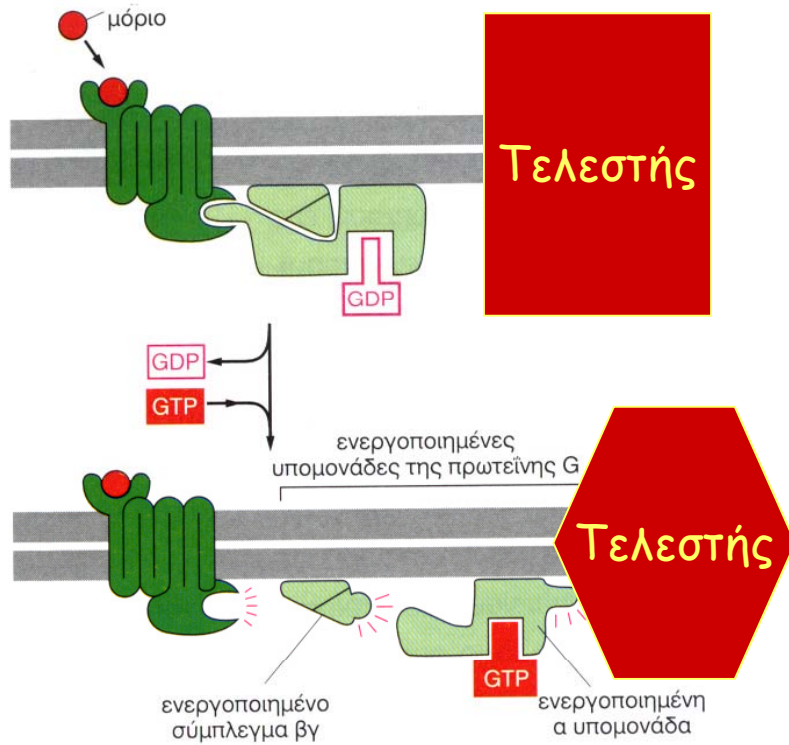
Αναπαράσταση του υποδοχέα ροδοψίνης, όπου διακρίνεται η θήκη σύνδεσης της ρετινάλης, Από *Zubay G, Biochemistry 1998*



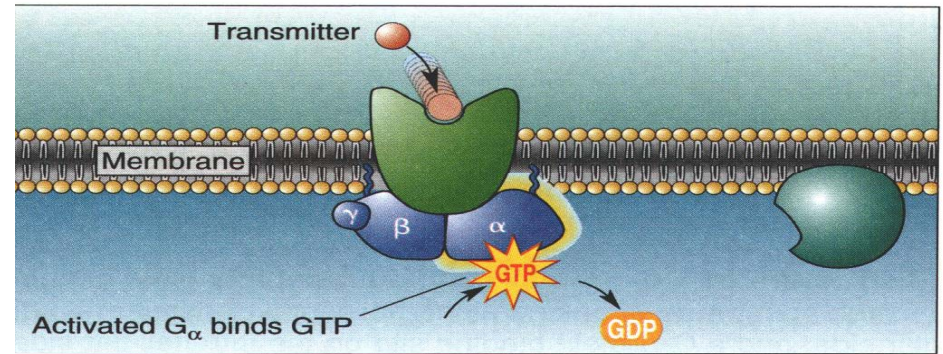




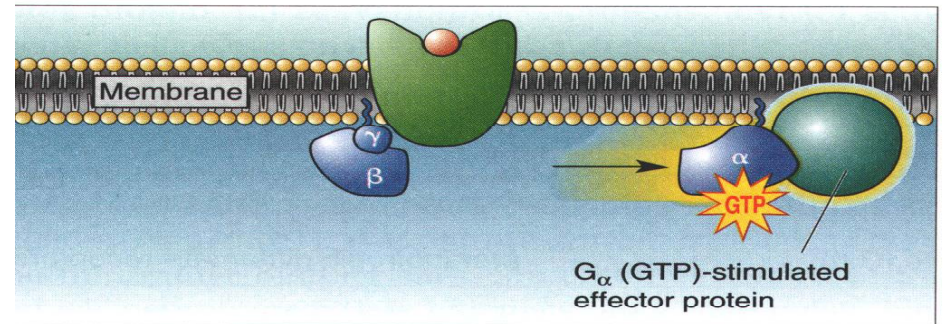
Σύνδεση GPCRs με τις πρωτεΐνες G και ενεργοποίηση του ΤΕΛΕΣΤΗ



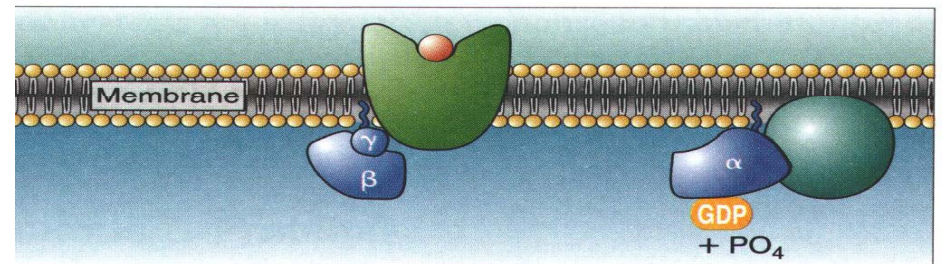
(a)



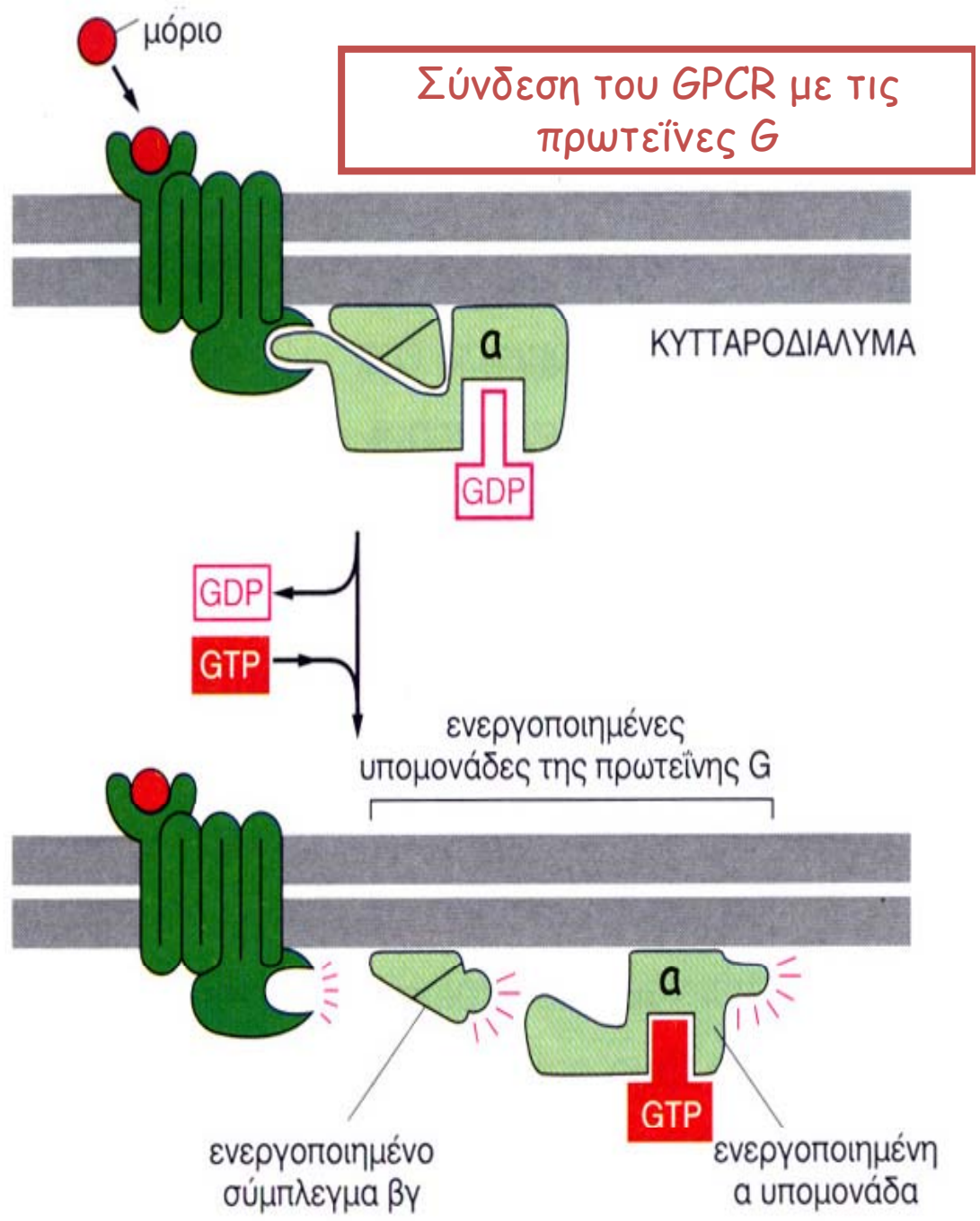
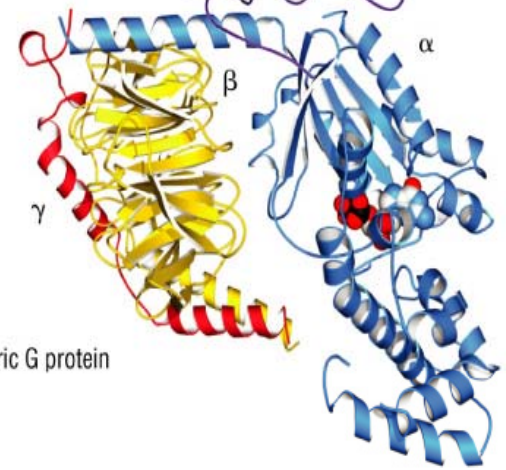
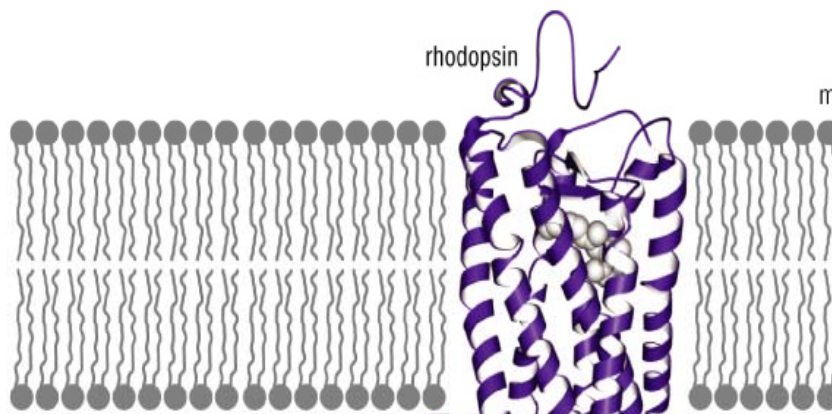
(b)



(c)

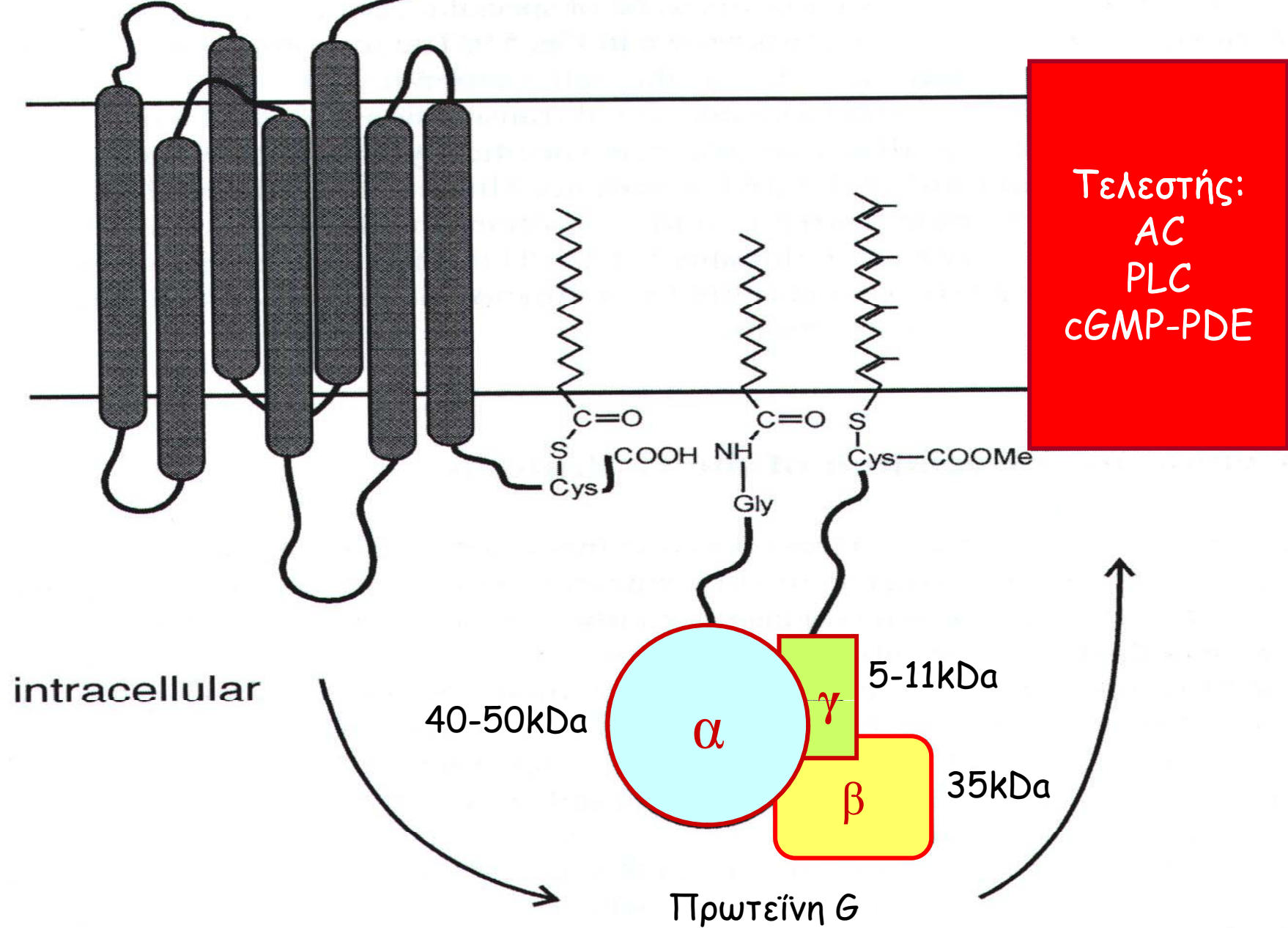




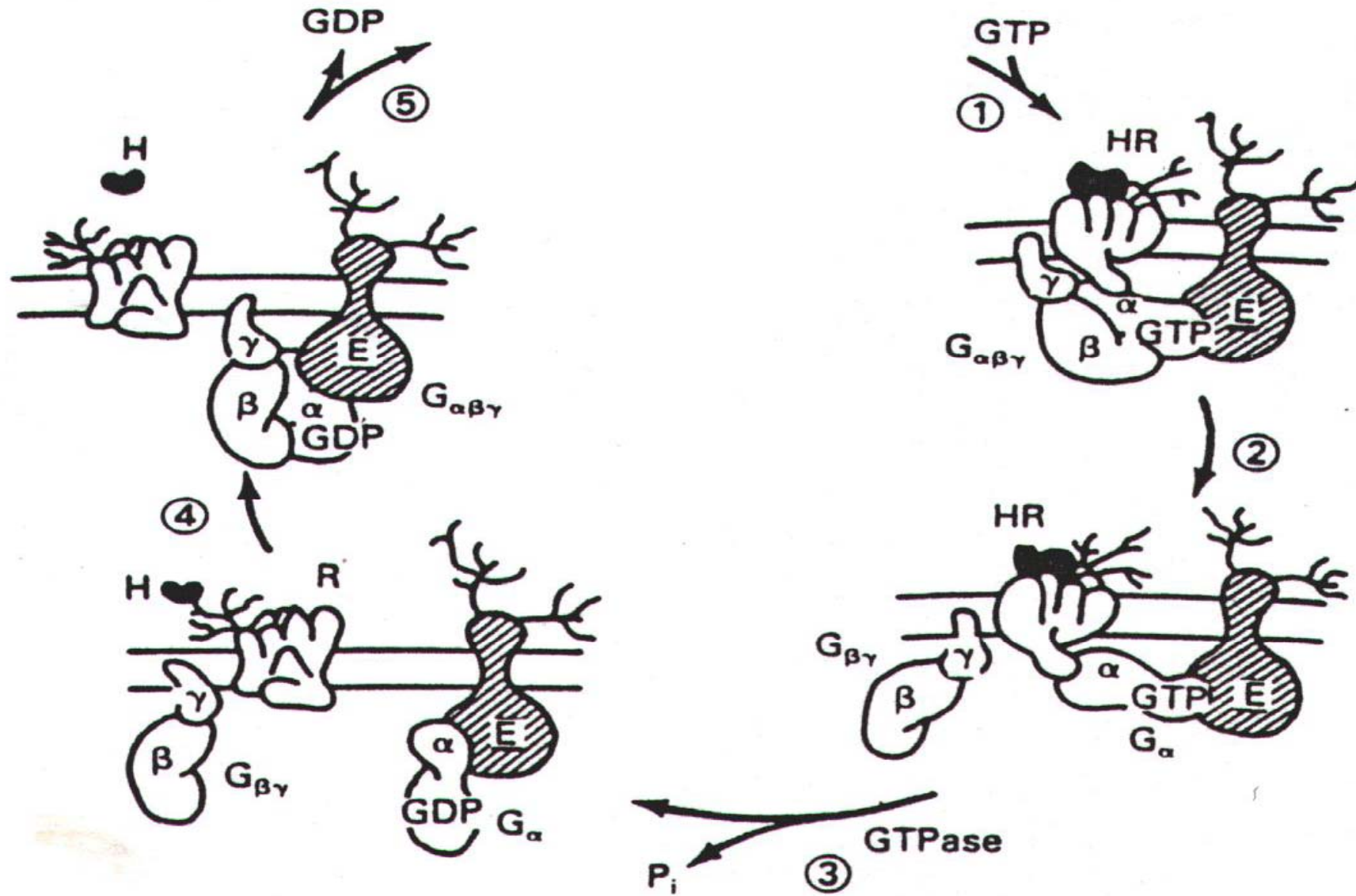




# Δομή των G-πρωτεϊνών

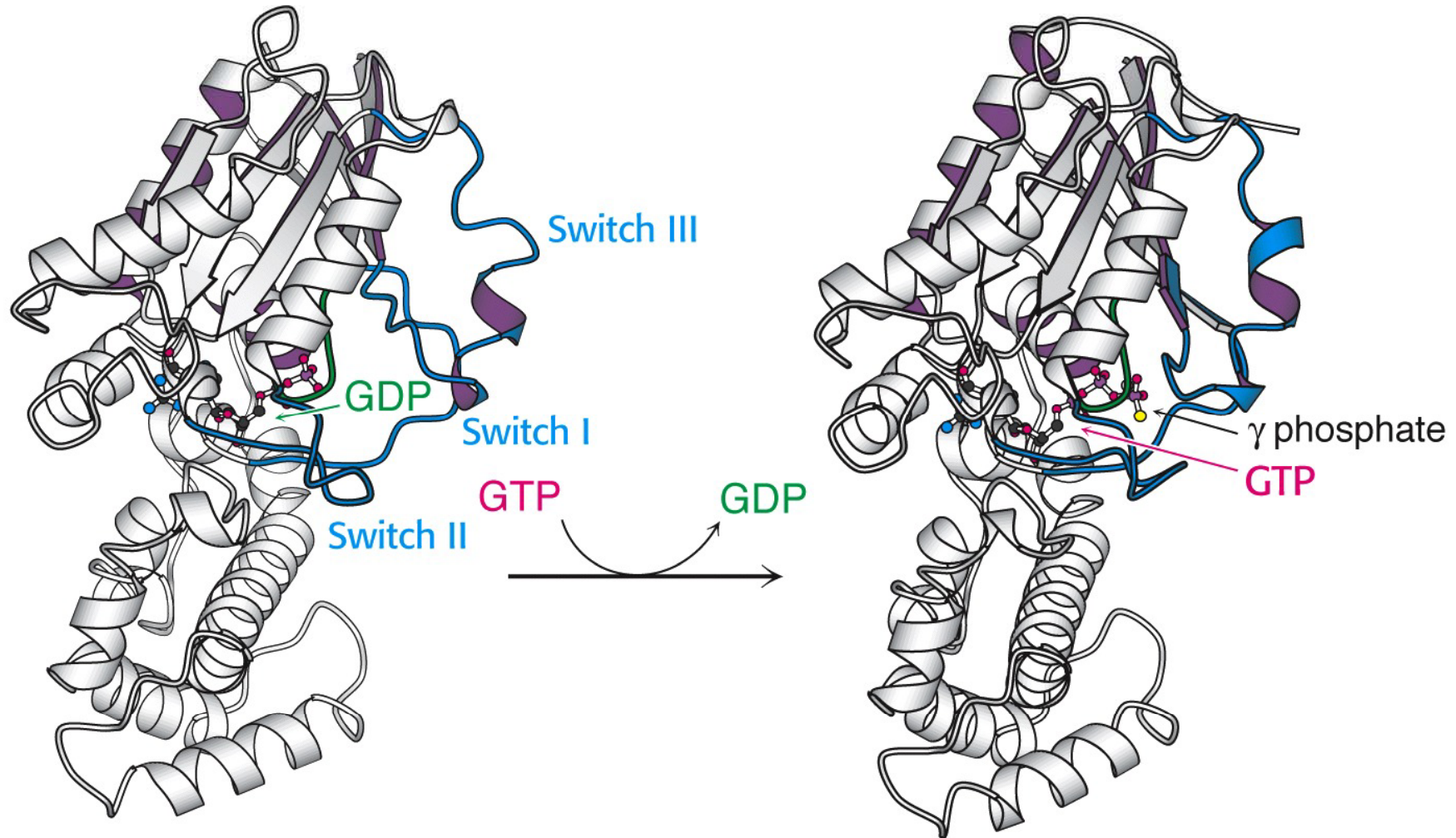


Η μετάδοση του μηνύματος μέσω των πρωτεϊνών G περιλαμβάνει μια σειρά πολύπλοκων διεργασιών



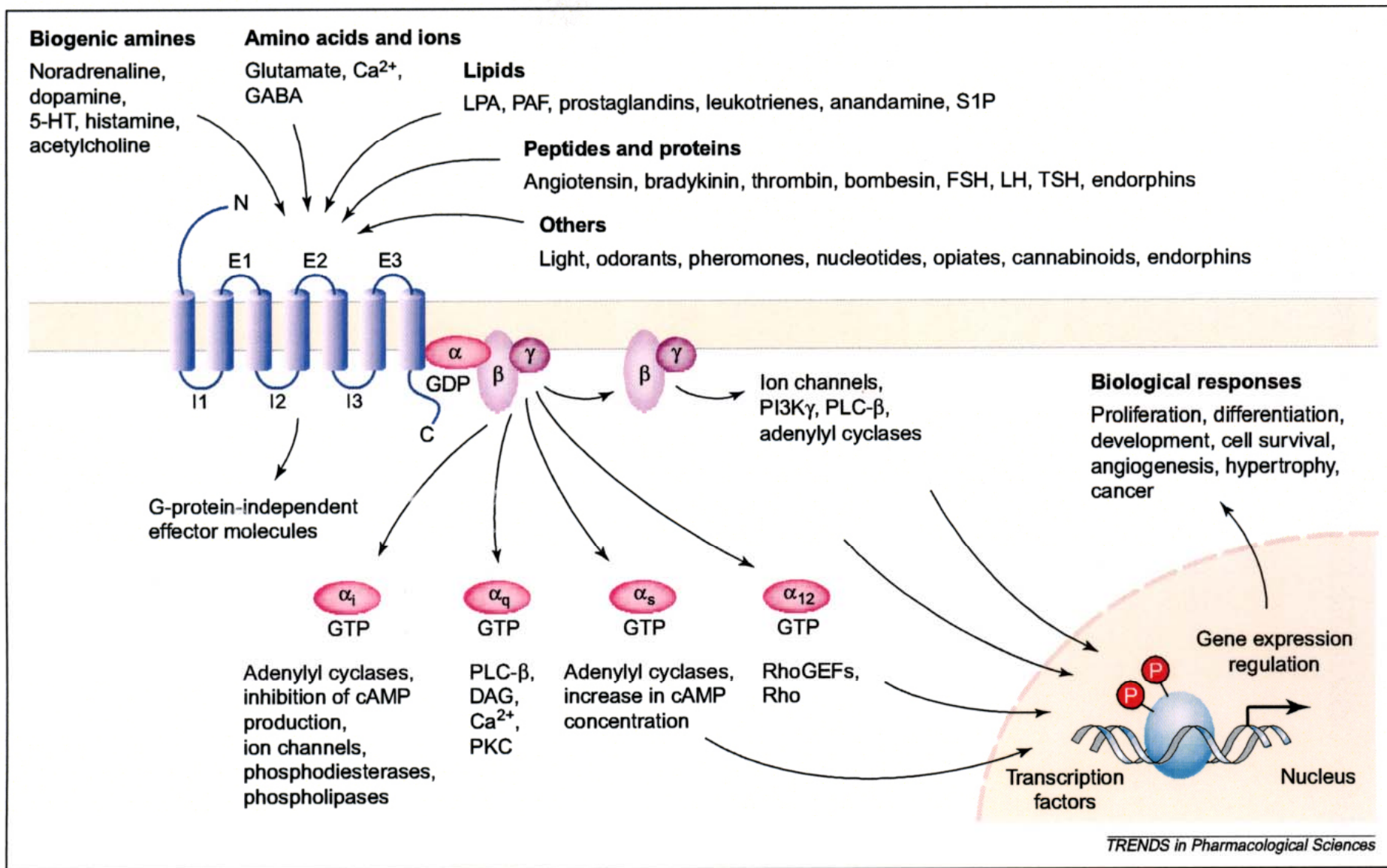
Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με την  $G\alpha$ , και ανοίγει τη θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου ώστε το  $GDP$  να αποδεσμευτεί και να συνδεθεί το  $GTP$ .

Η  $G\alpha$ -υπομονάδα αποτελείται από τρία πολυπεπτιδικά τμήματα-κλειδιά: το διακόπτη I, διακόπτη II και διακόπτη III, τα οποία αλληλεπιδρούν είτε άμεσα είτε έμμεσα με τη γ-φωσφορική ομάδα του  $GTP$  αλλάζοντας τη διαμόρφωσή τους. Οι δομικές αυτές αλλαγές μειώνουν τη συγγένεια της  $G\alpha$  προς το διμερές  $G\beta\gamma$ .

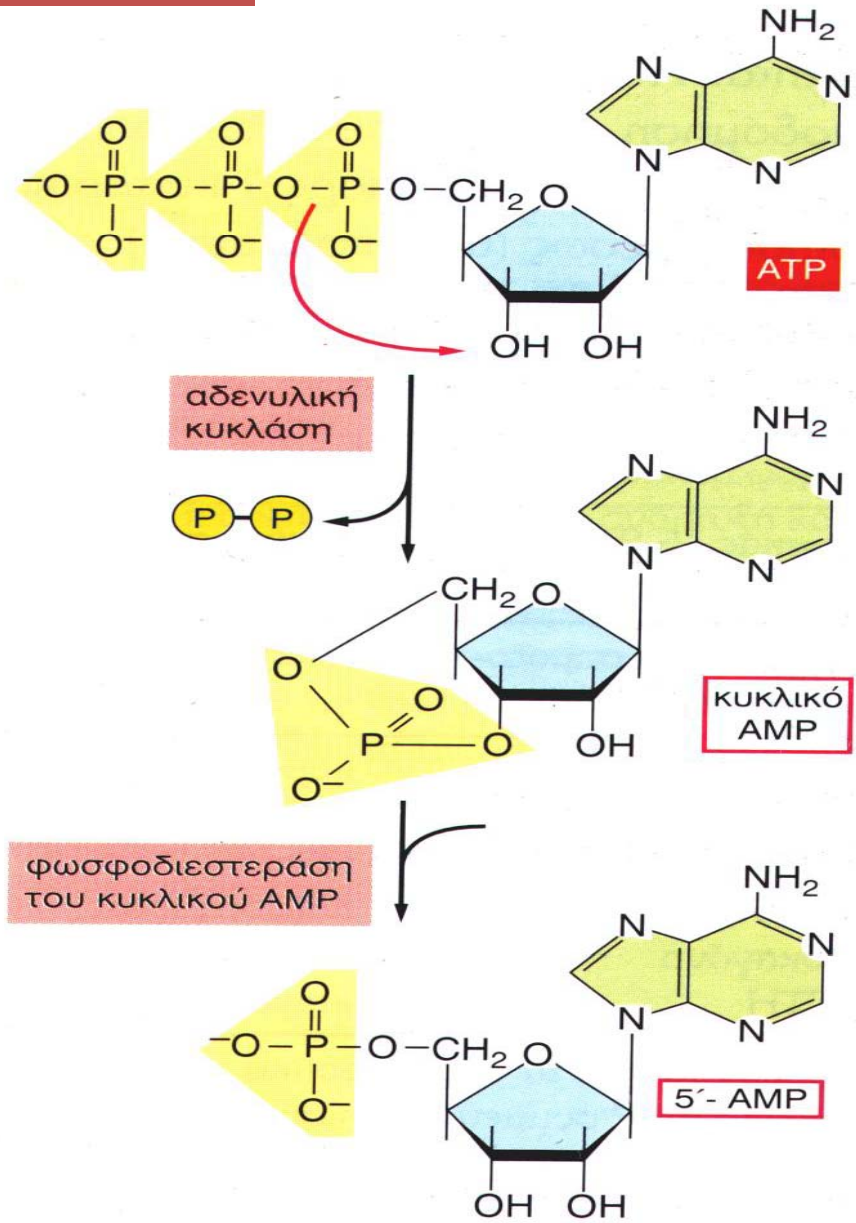
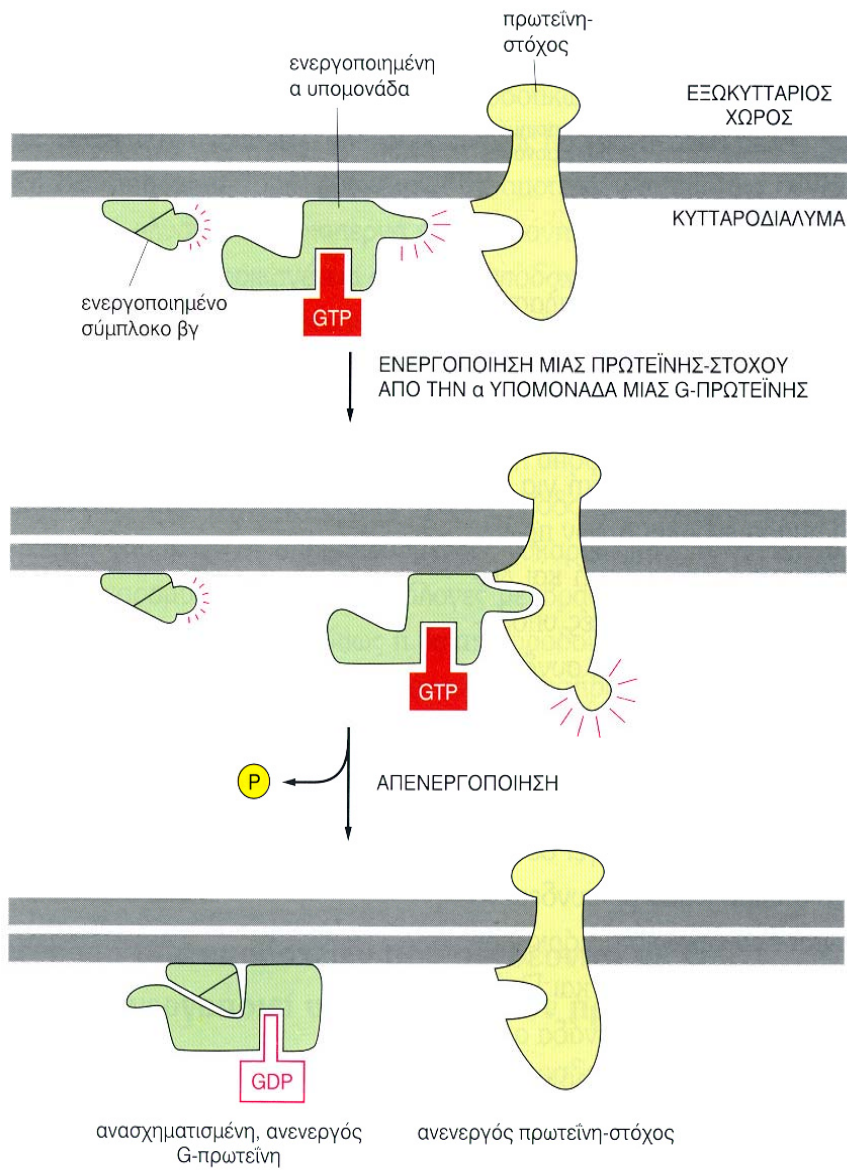


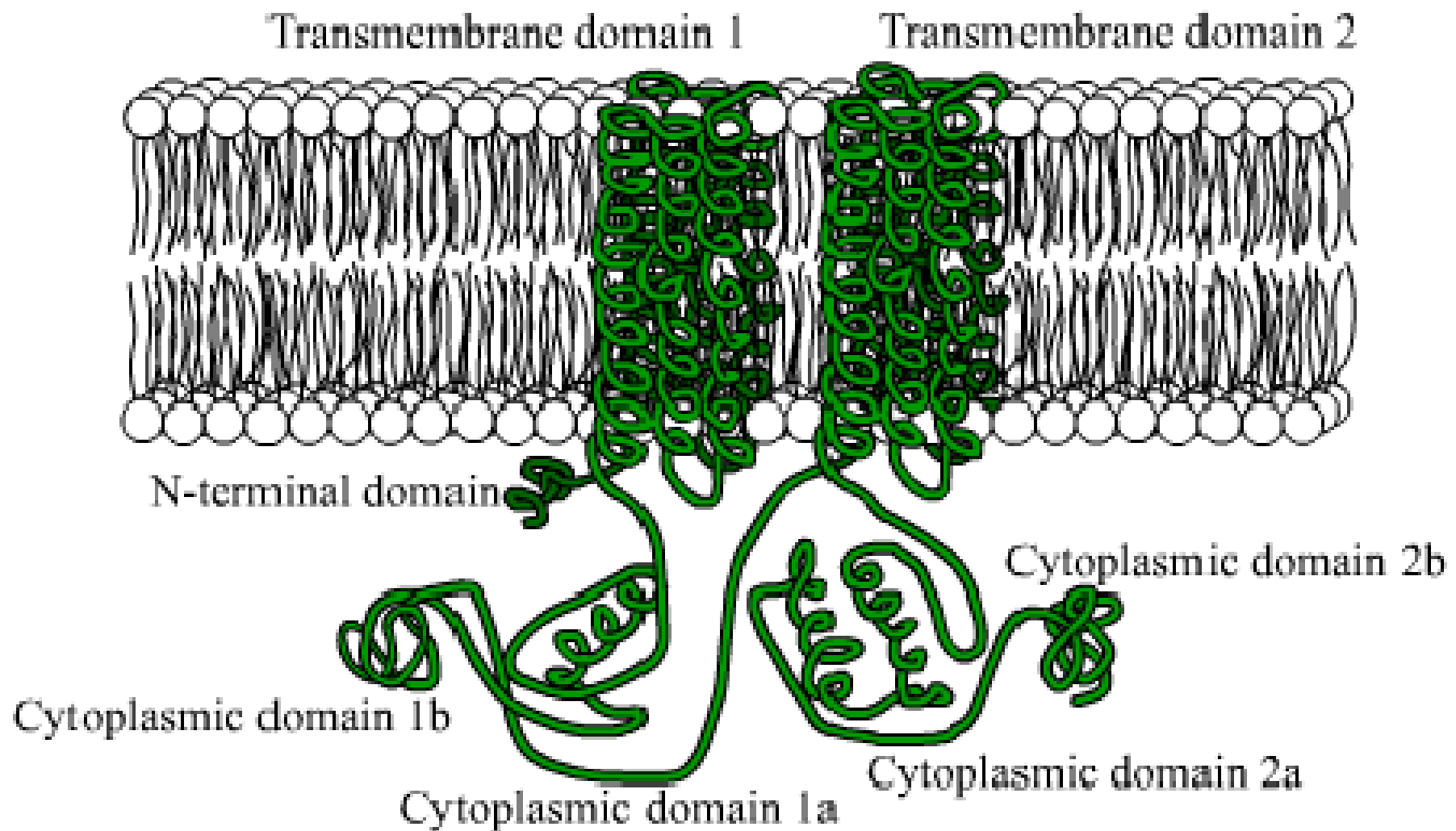


# Ποικιλομορφία των α-υπομονάδων των πρωτεϊνών G

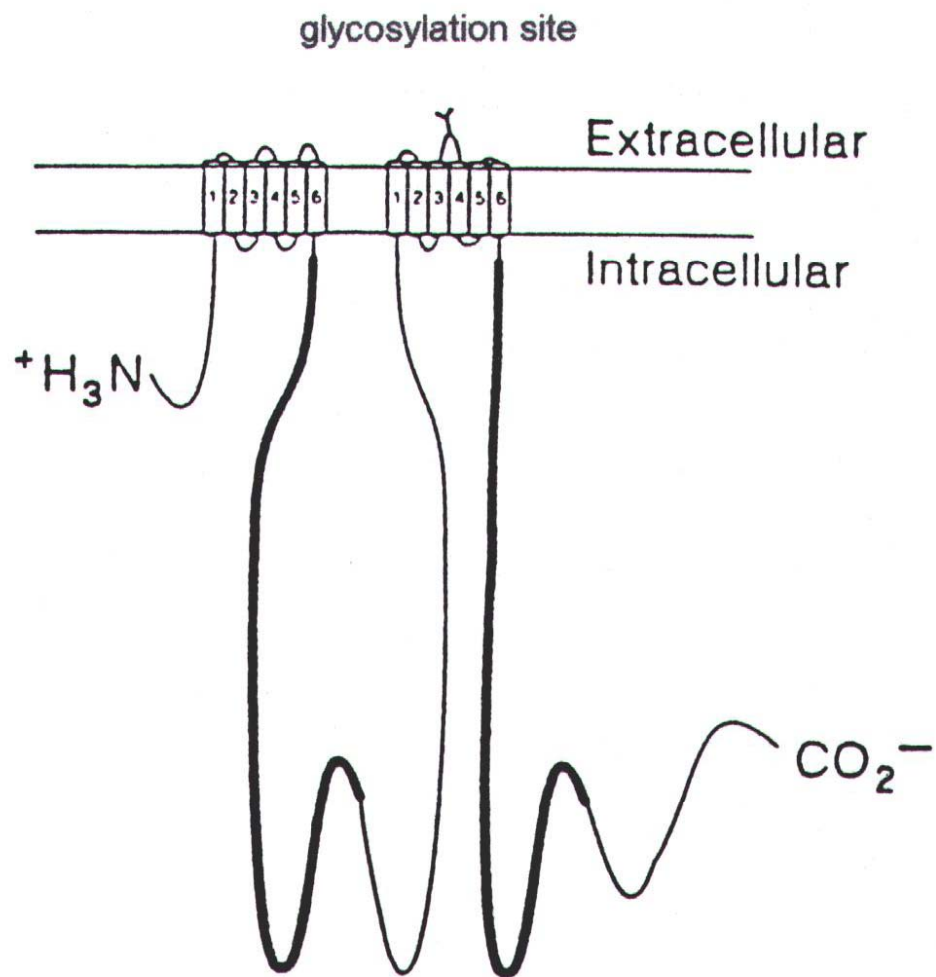


# Αδενυλική κυκλάση

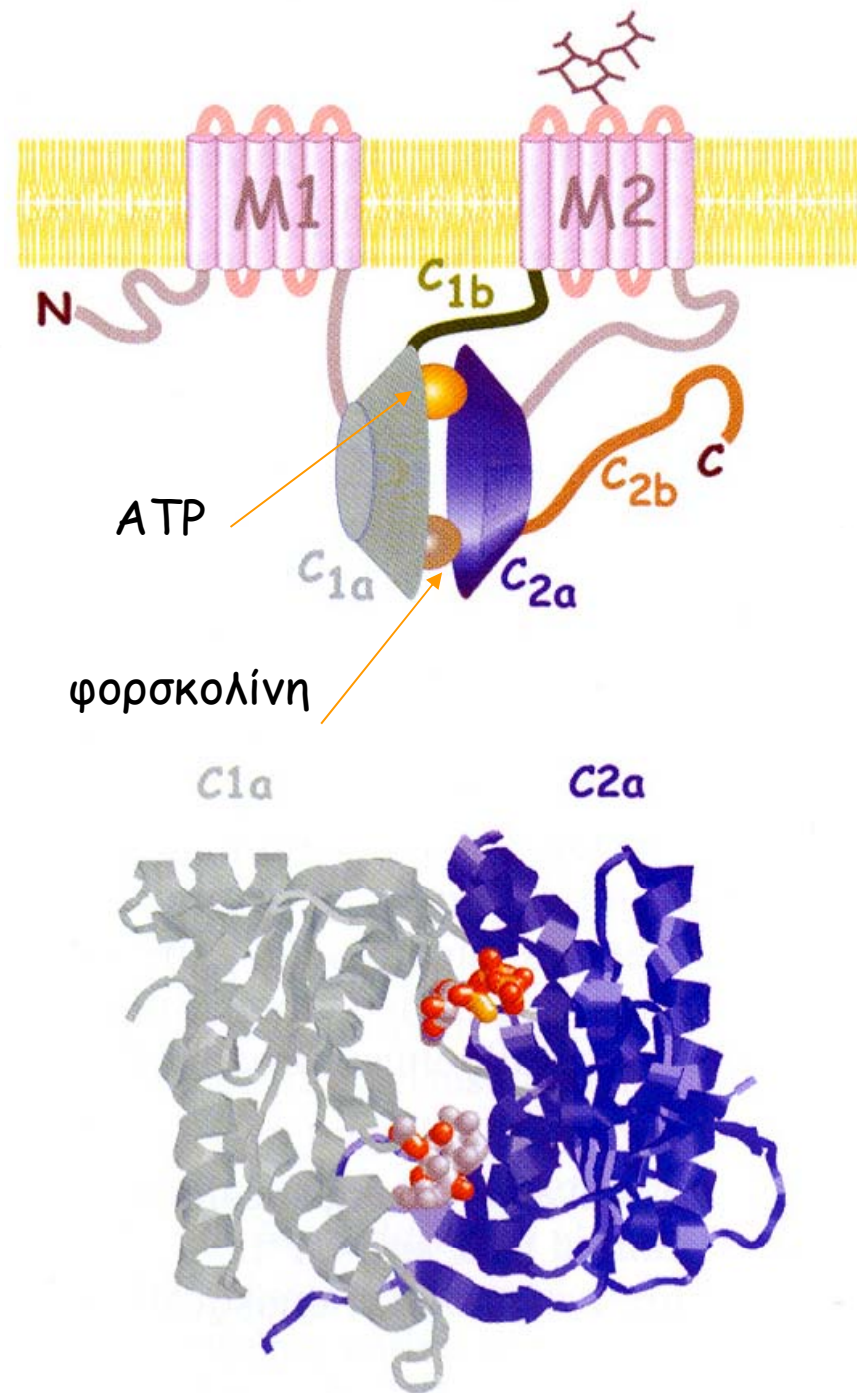




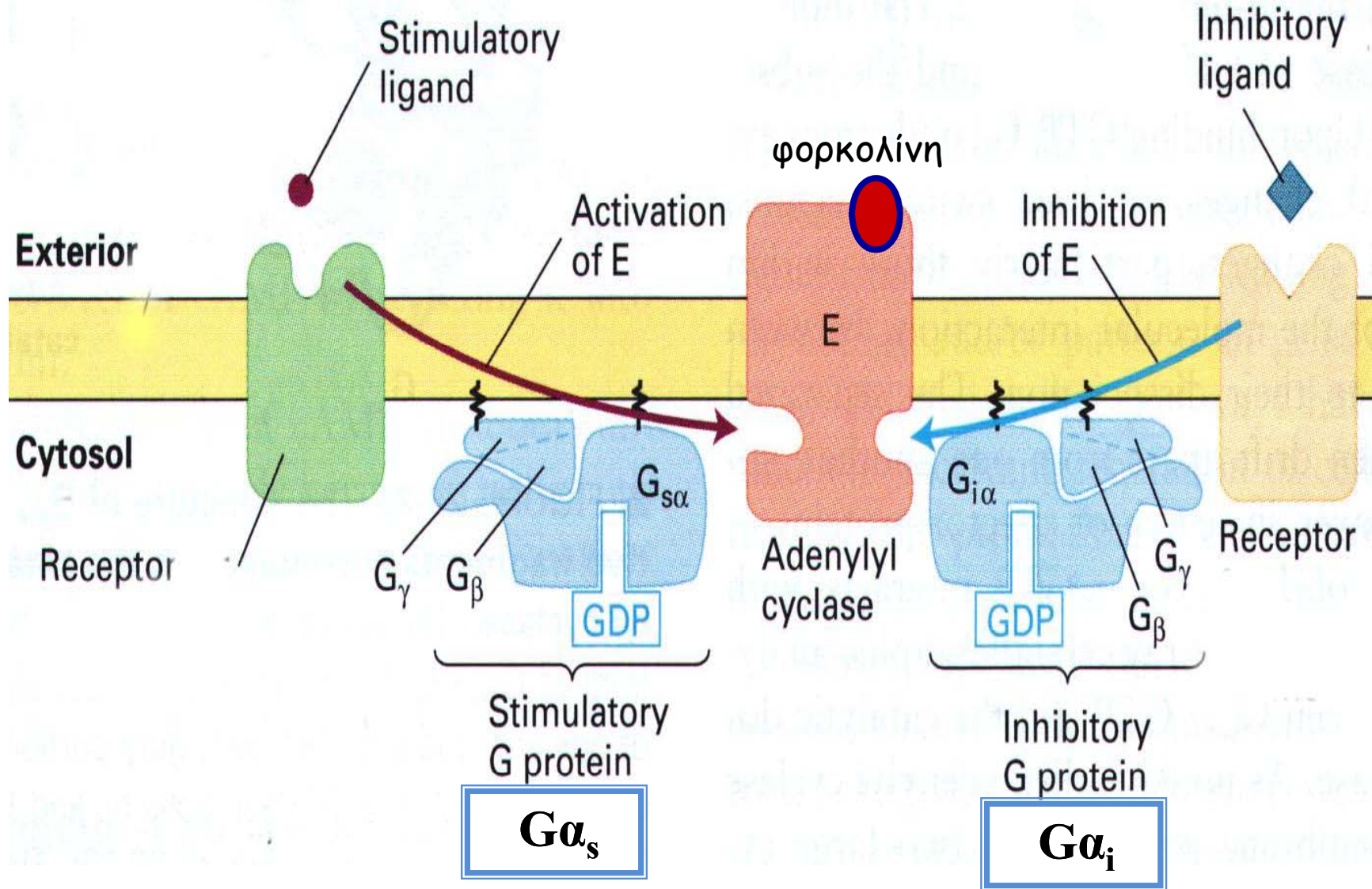




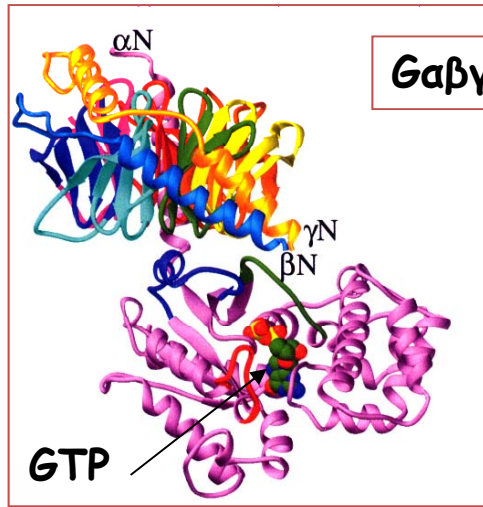
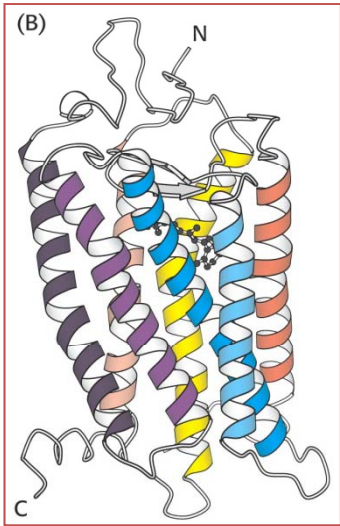
Η αδενυλοκυκλάση είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 120 kDa.



# ΑΔΕΝΥΛΙΚΗ ΚΥΚΛΑΣΗ: Ενεργοποίηση και Αναστολή



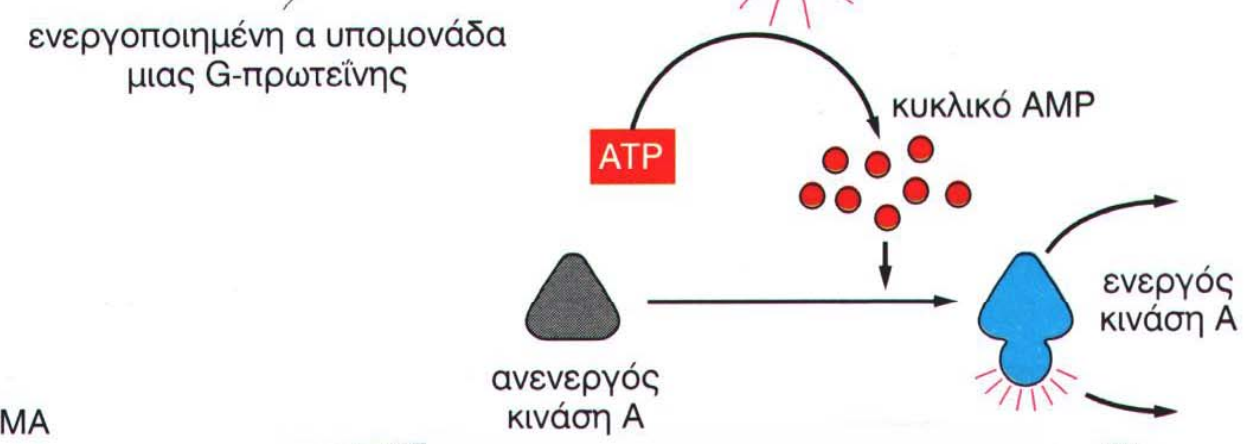
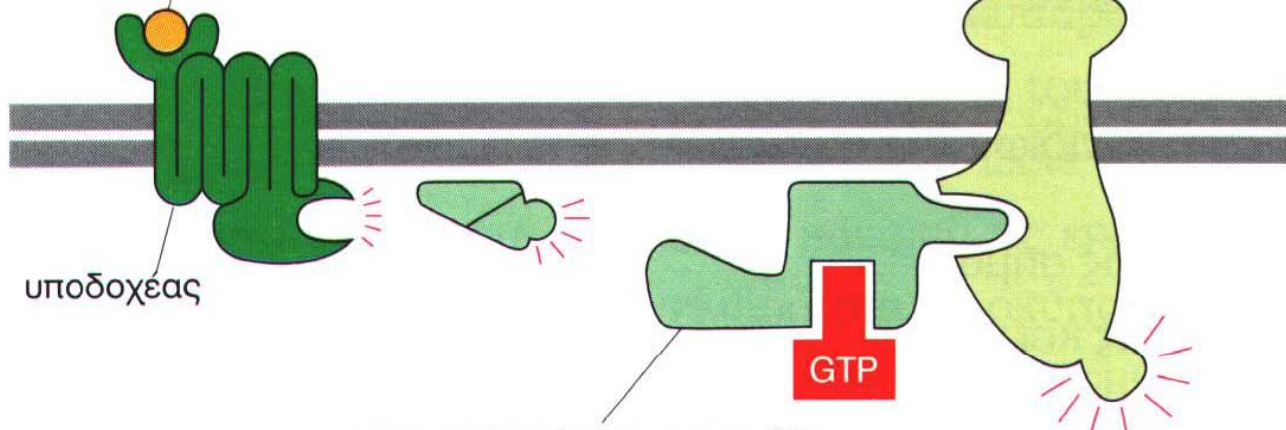
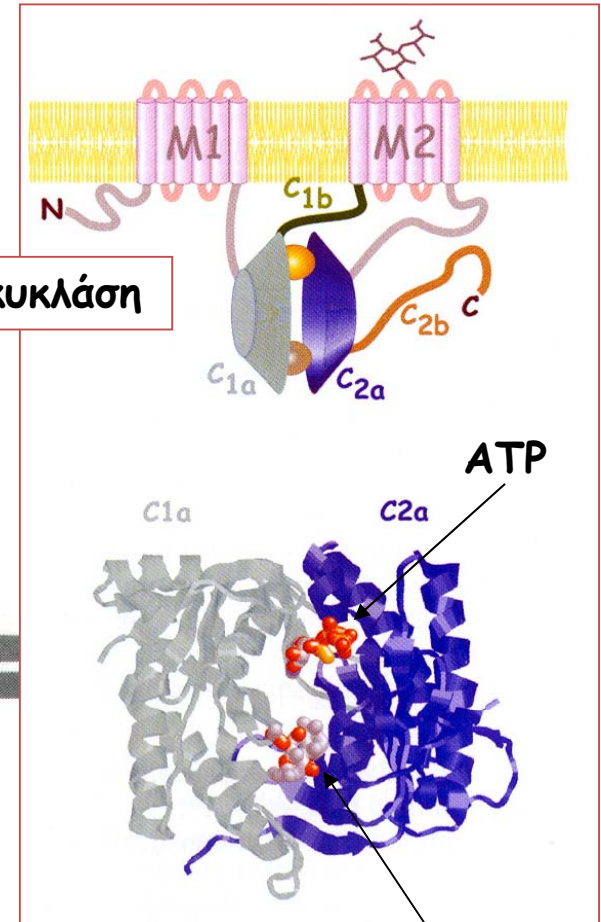




**Γαβγ-πρωτεΐνη**

**Αδενυλική κυκλάση**

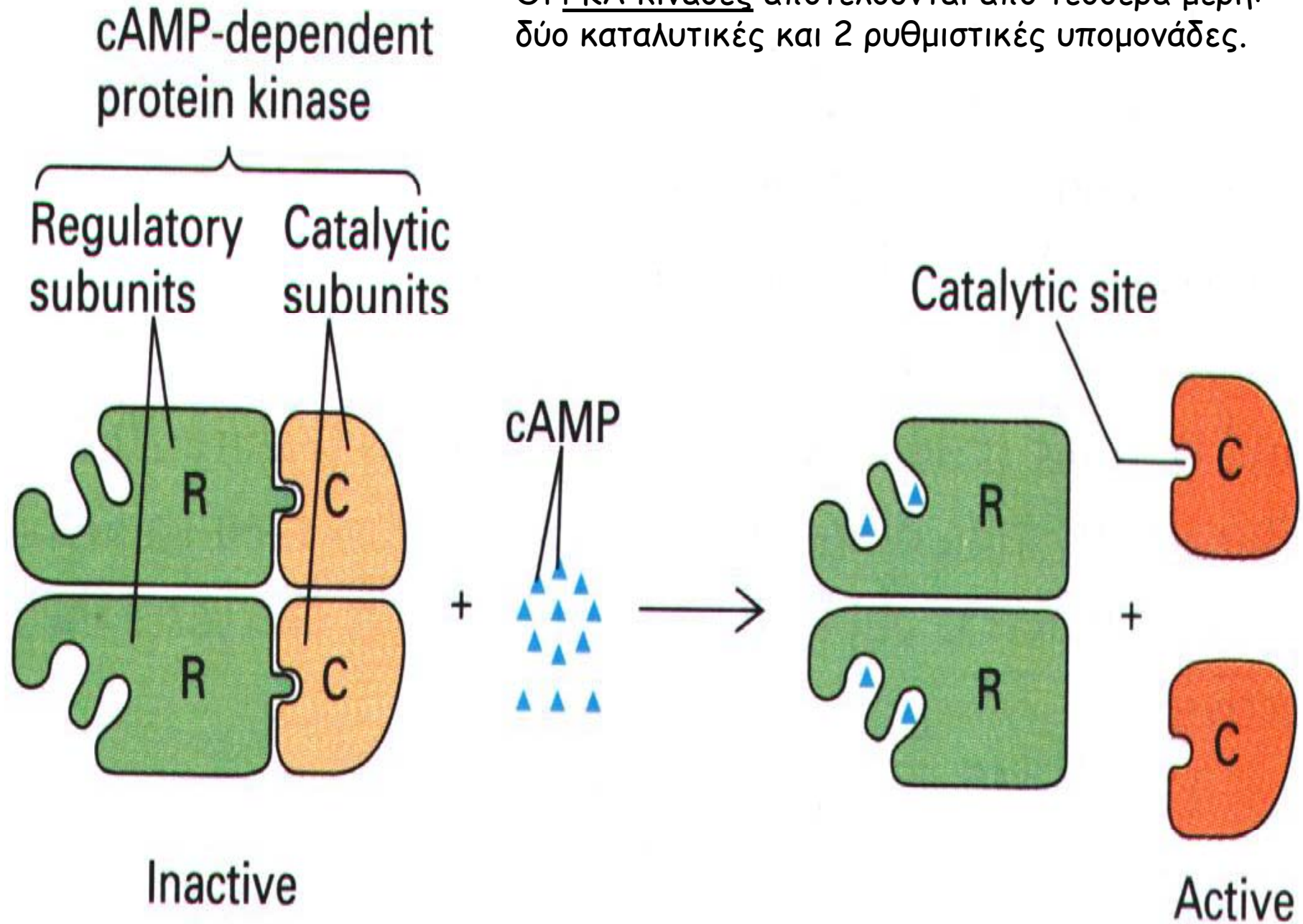
ενεργοποιημένη  
αδενυλική κυκλάση



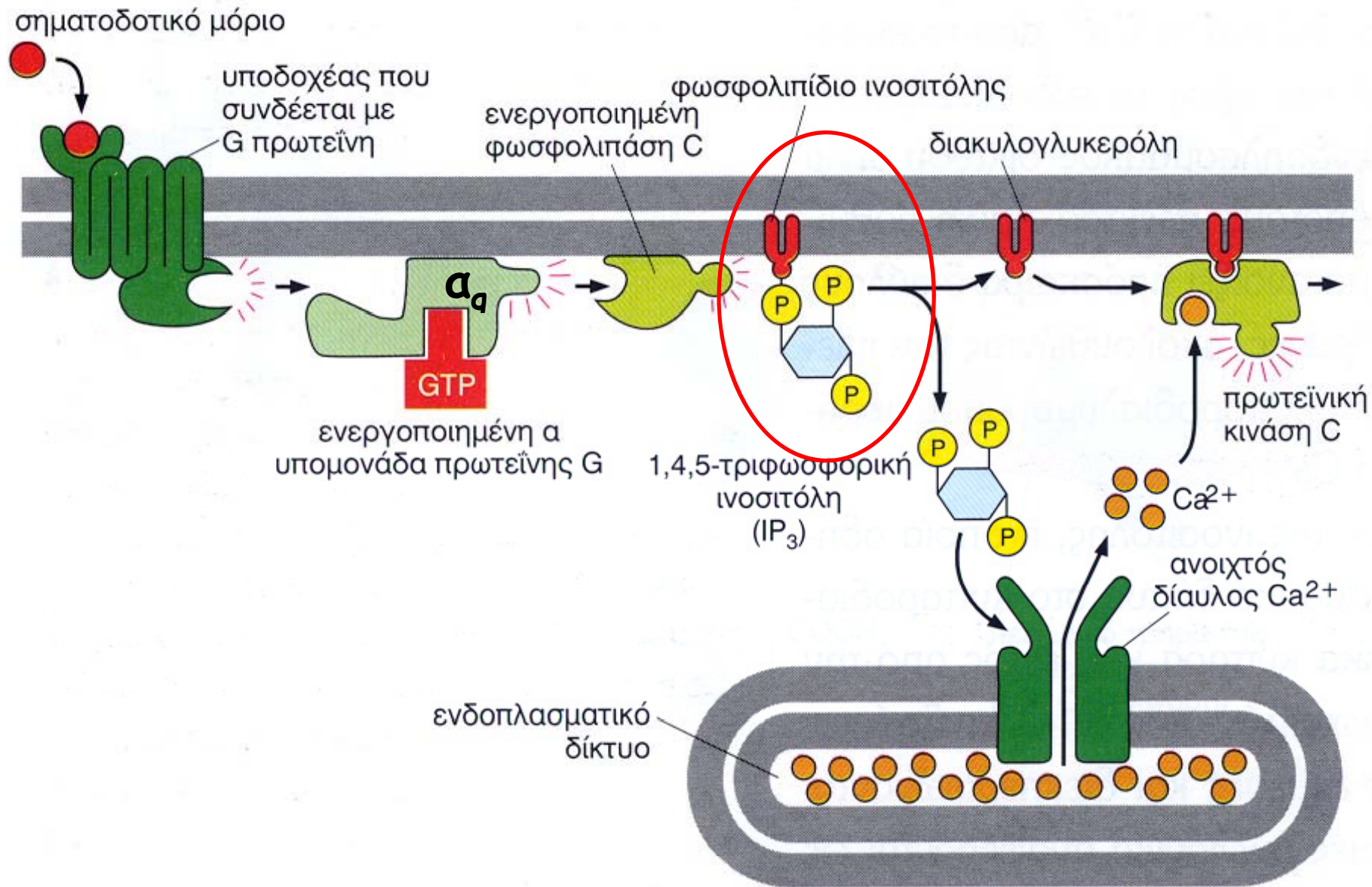
**ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΑΛΥΜΑ**



Οι PKA κινάσες αποτελούνται από τέσσερα μέρη:  
δύο καταλυτικές και 2 ρυθμιστικές υπομονάδες.



# Το μονοπάτι των φωσφατιδυλο-ινοσιτιδίων



Τα πολυφωσφο-ινοσιτίδια (PPI) της κυτταρικής μεμβράνης αποτελούν μόλις το 1% των φωσfolιπιδίων της μεμβράνης ενός ευκαριωτικού κυττάρου

Plasma membrane

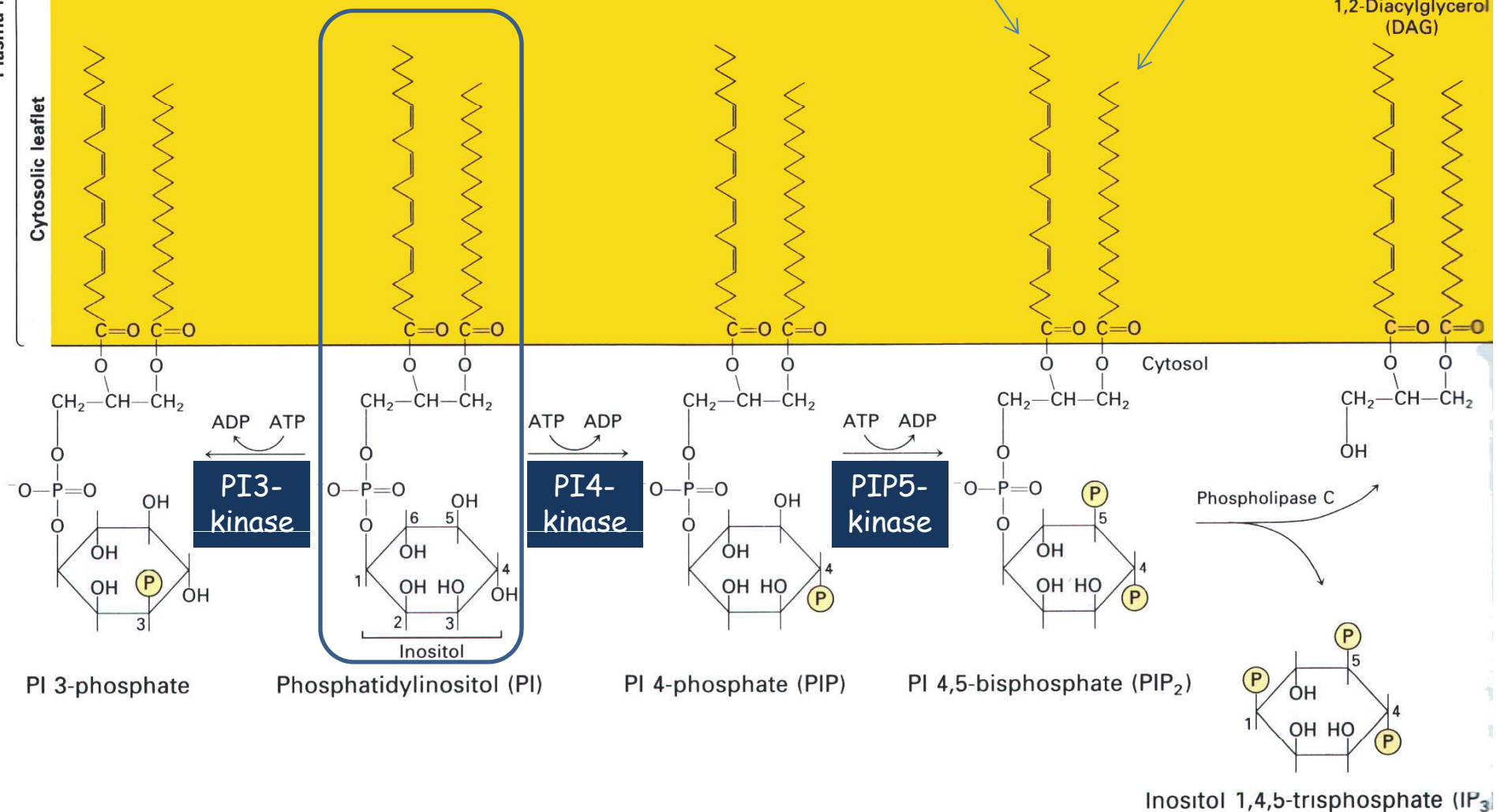
Exoplasmic leaflet

Cytosolic leaflet

R1: αραχιδονικό οξύ

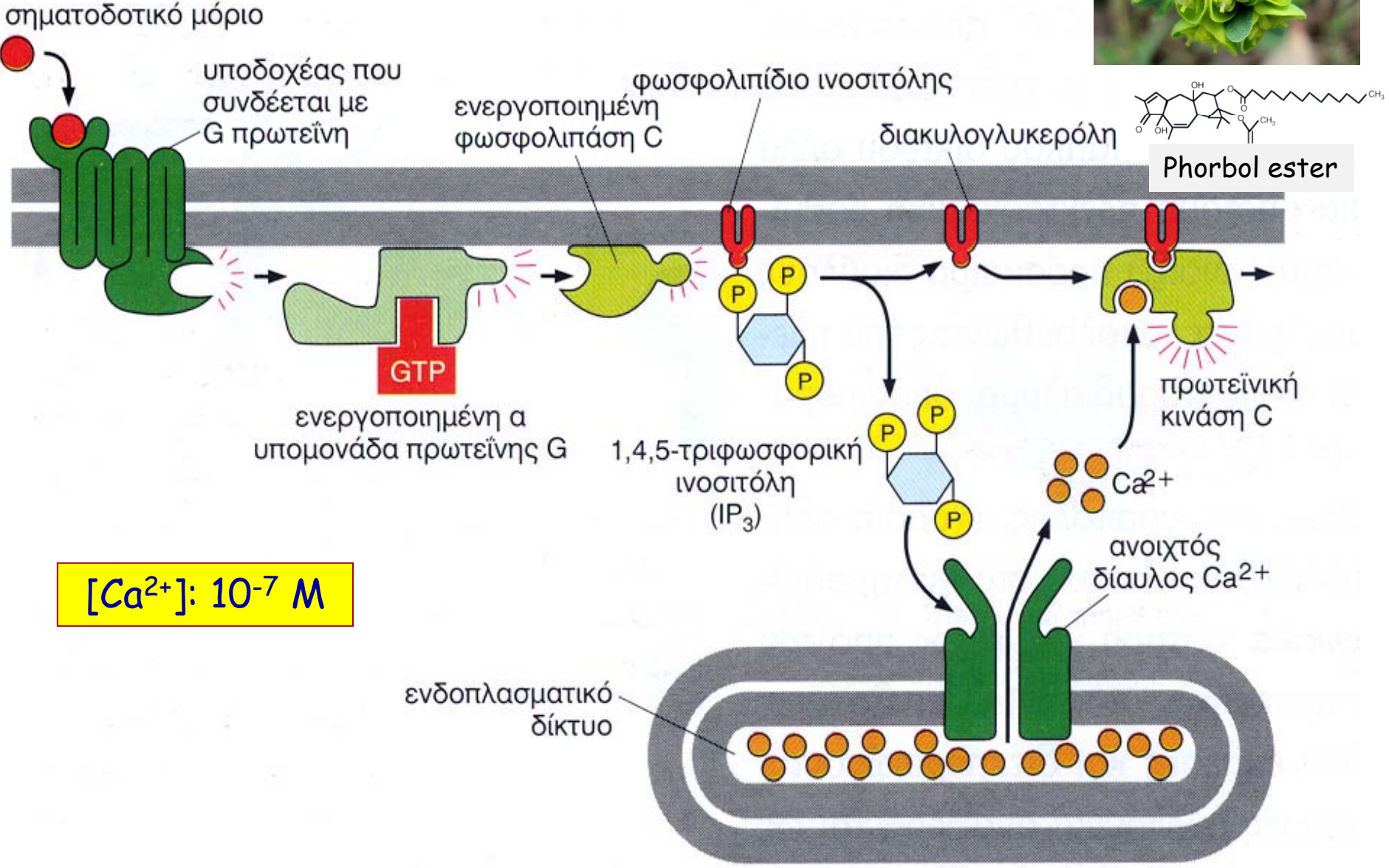
R2: στεαρικό οξύ

1,2-Diacylglycerol (DAG)

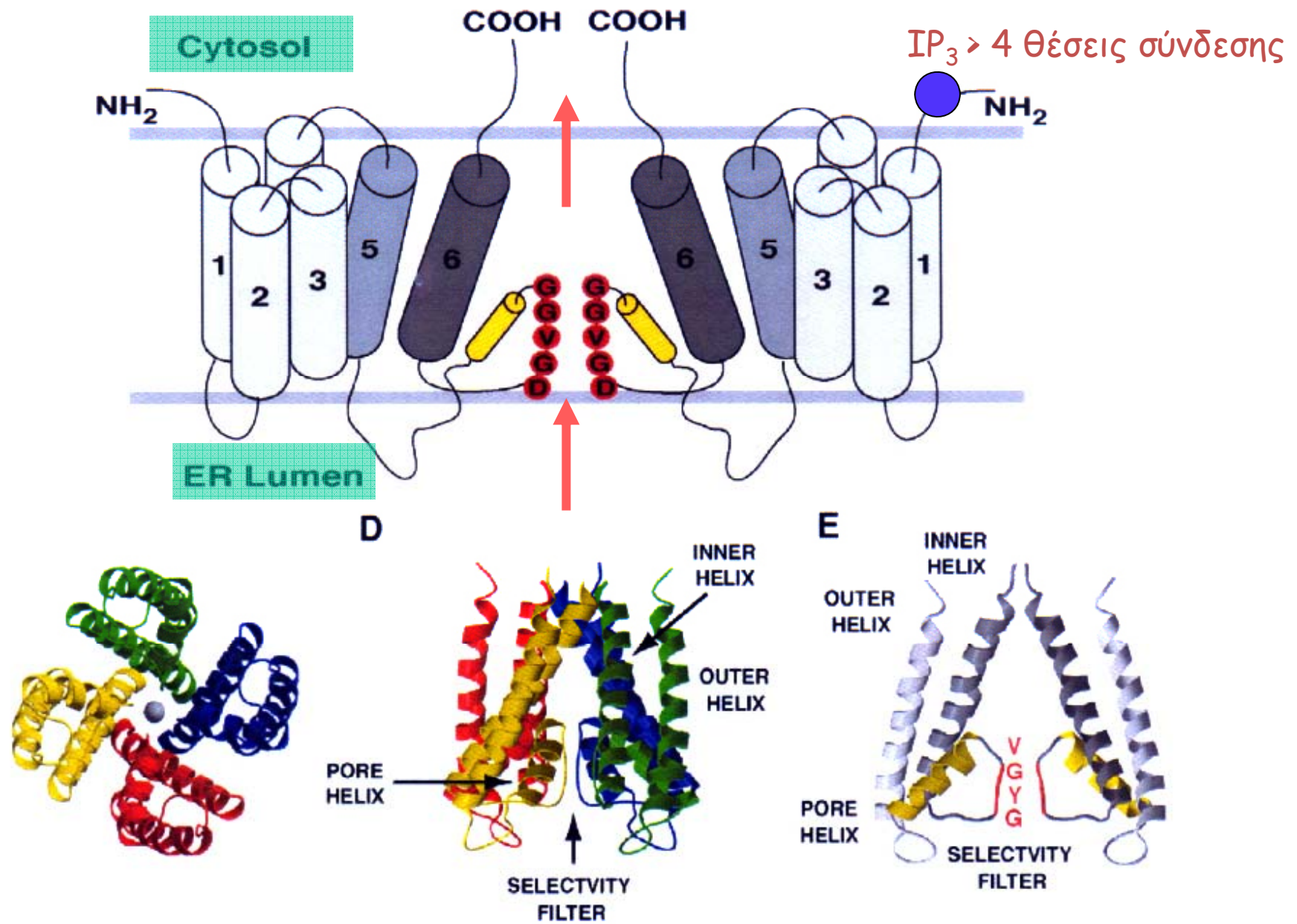




$[Ca^{2+}]: 10^{-3} M$

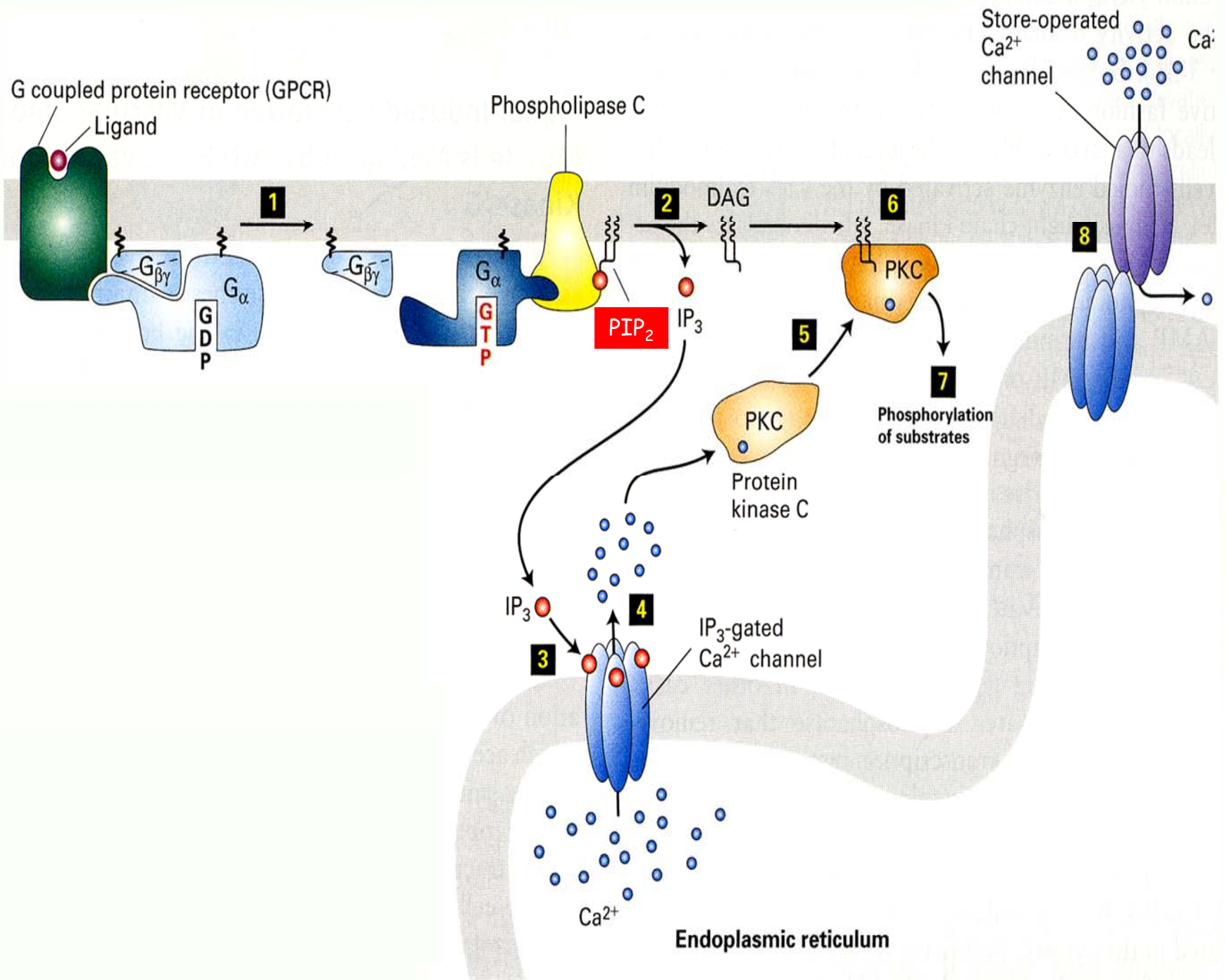


$[Ca^{2+}]: 10^{-7} M$



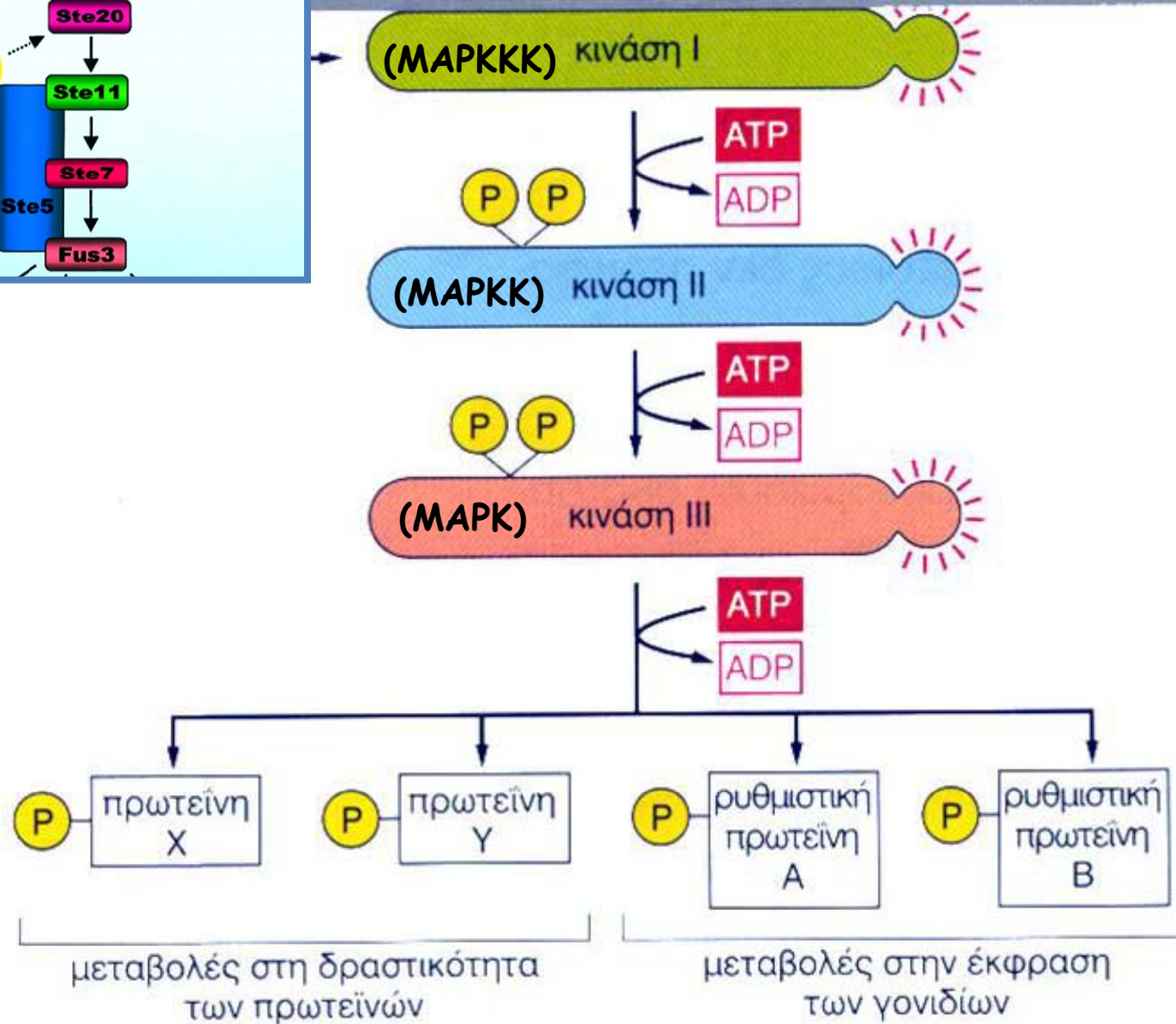
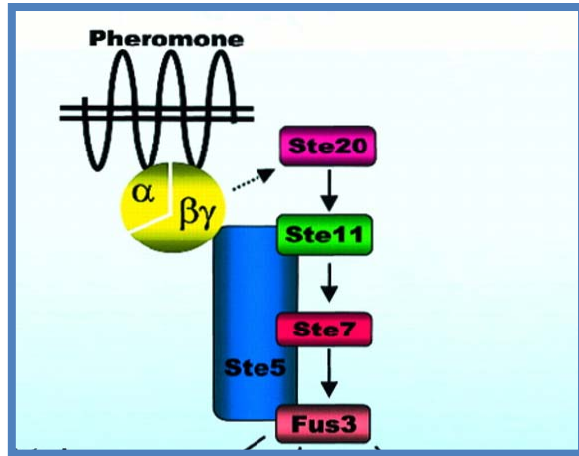
Από Bosanac et al, Structural insights into the regulatory mechanisms of IP<sub>3</sub> receptors, Biochimica et Biophysica Acta 2004, 1742, 89-102.





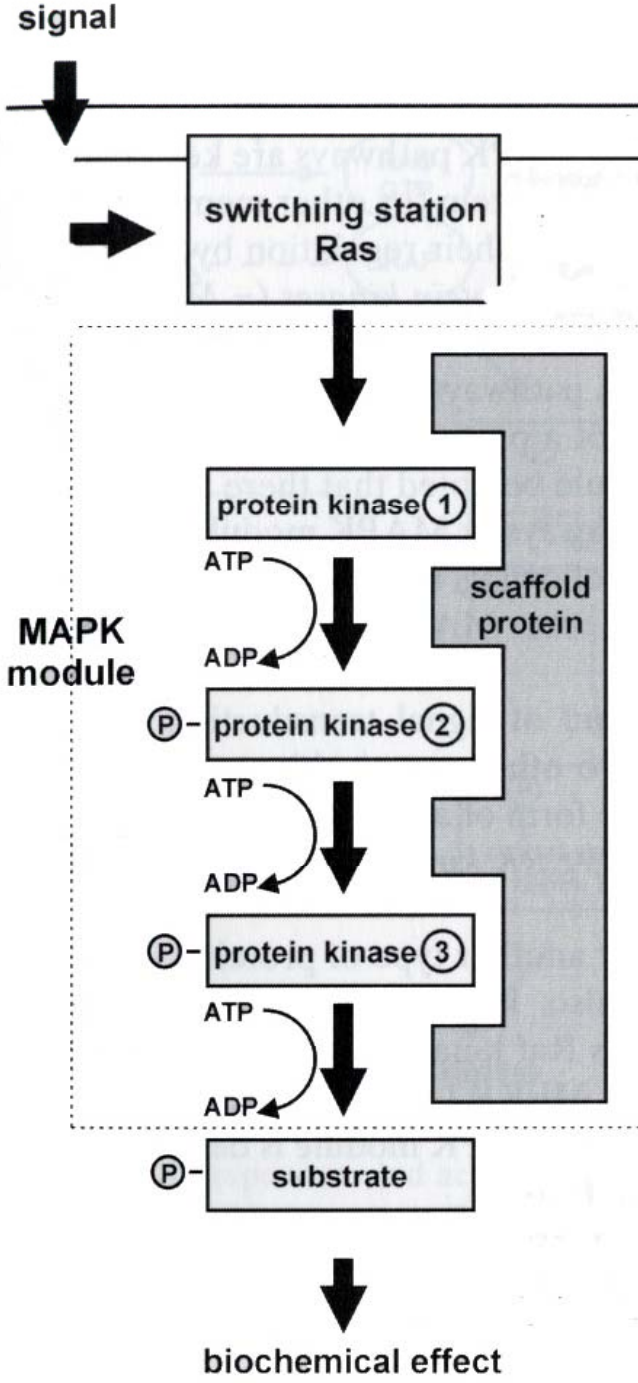


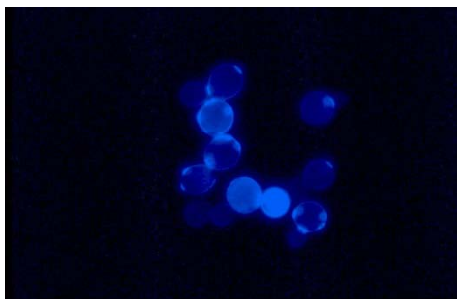
# Mitogen Activated Protein Kinases



**Πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο**

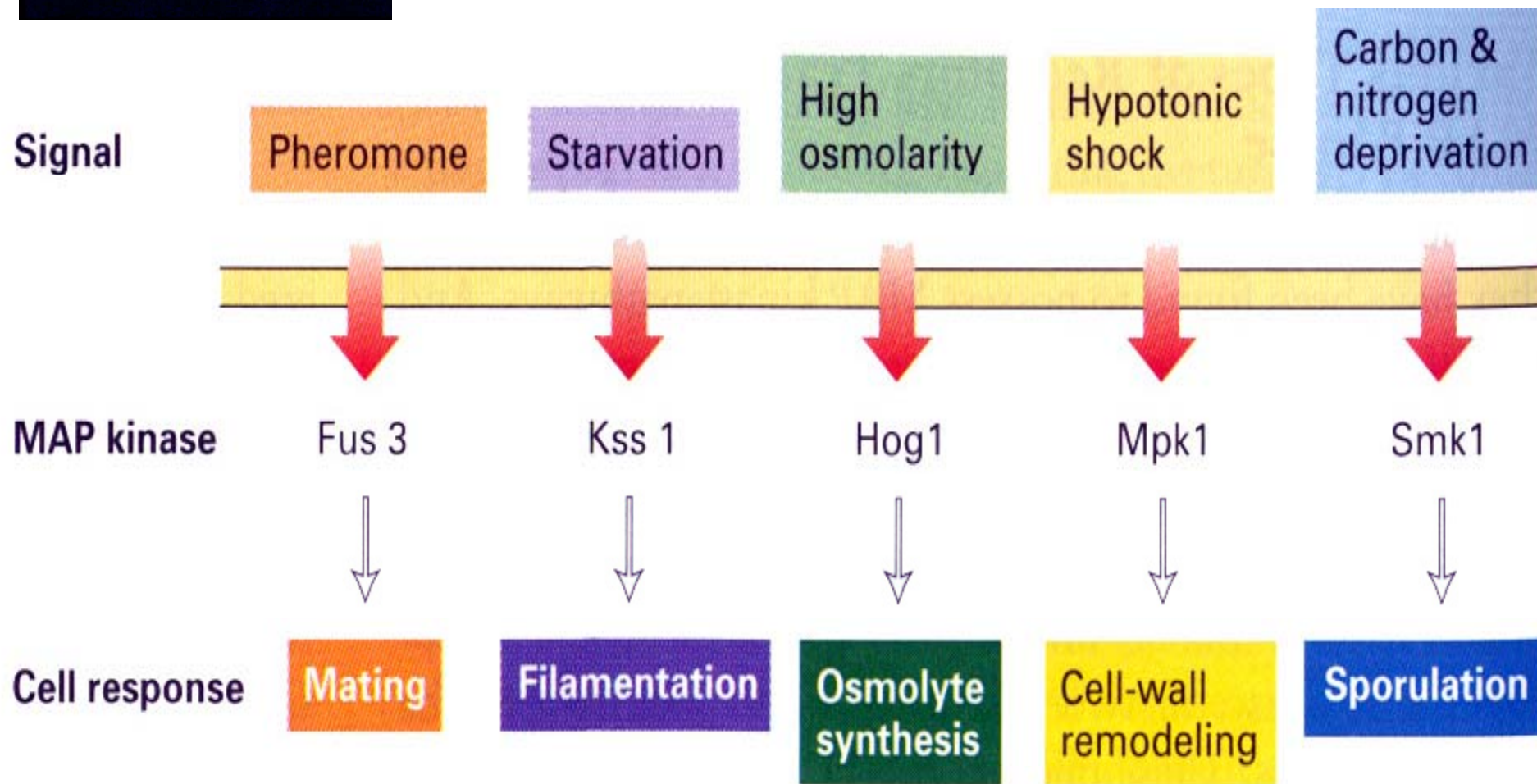
- 1. Διευκολύνει τη γρήγορη μεταφορά του σήματος
- 2. Πετυχαίνει μεγάλη εξειδίκευση



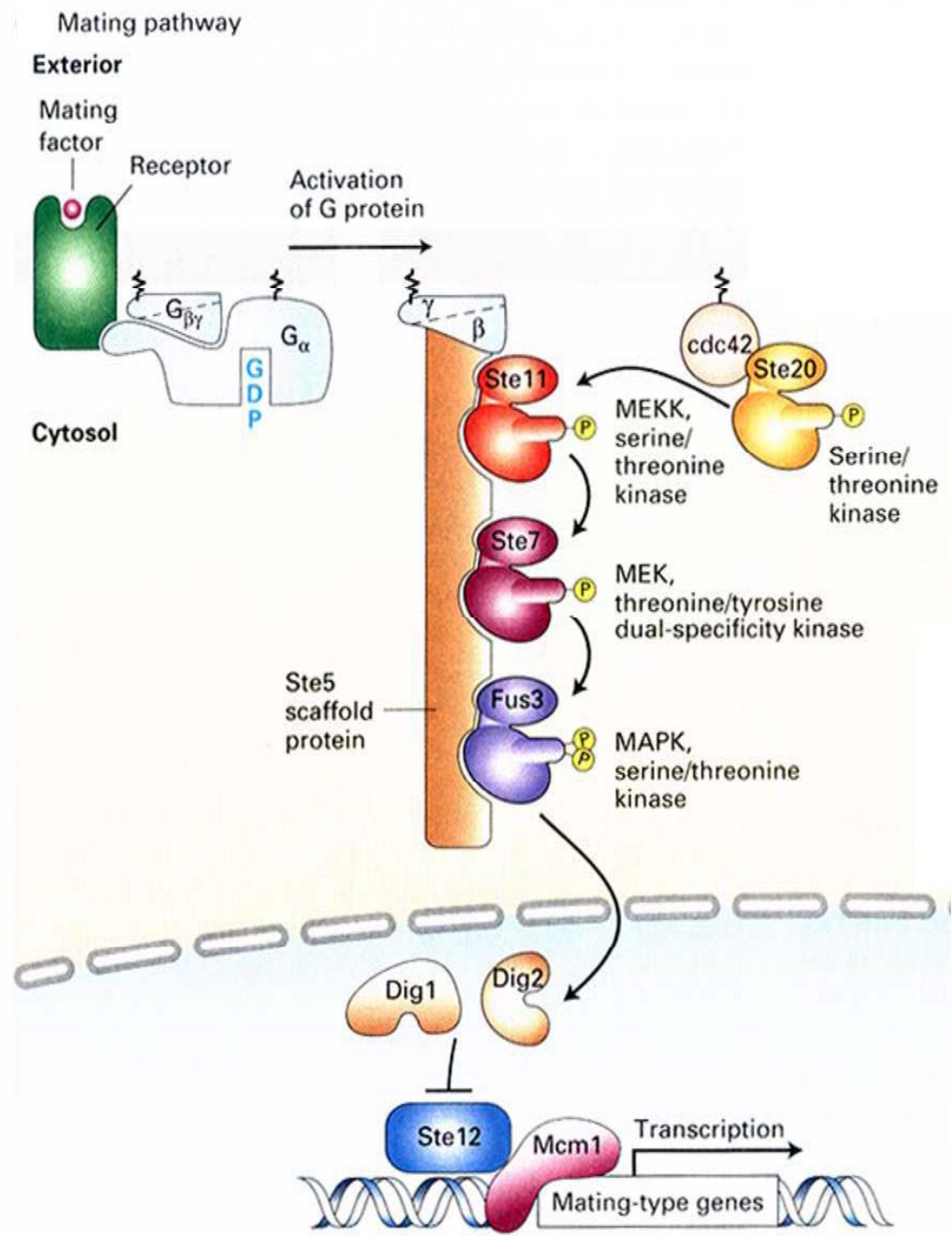
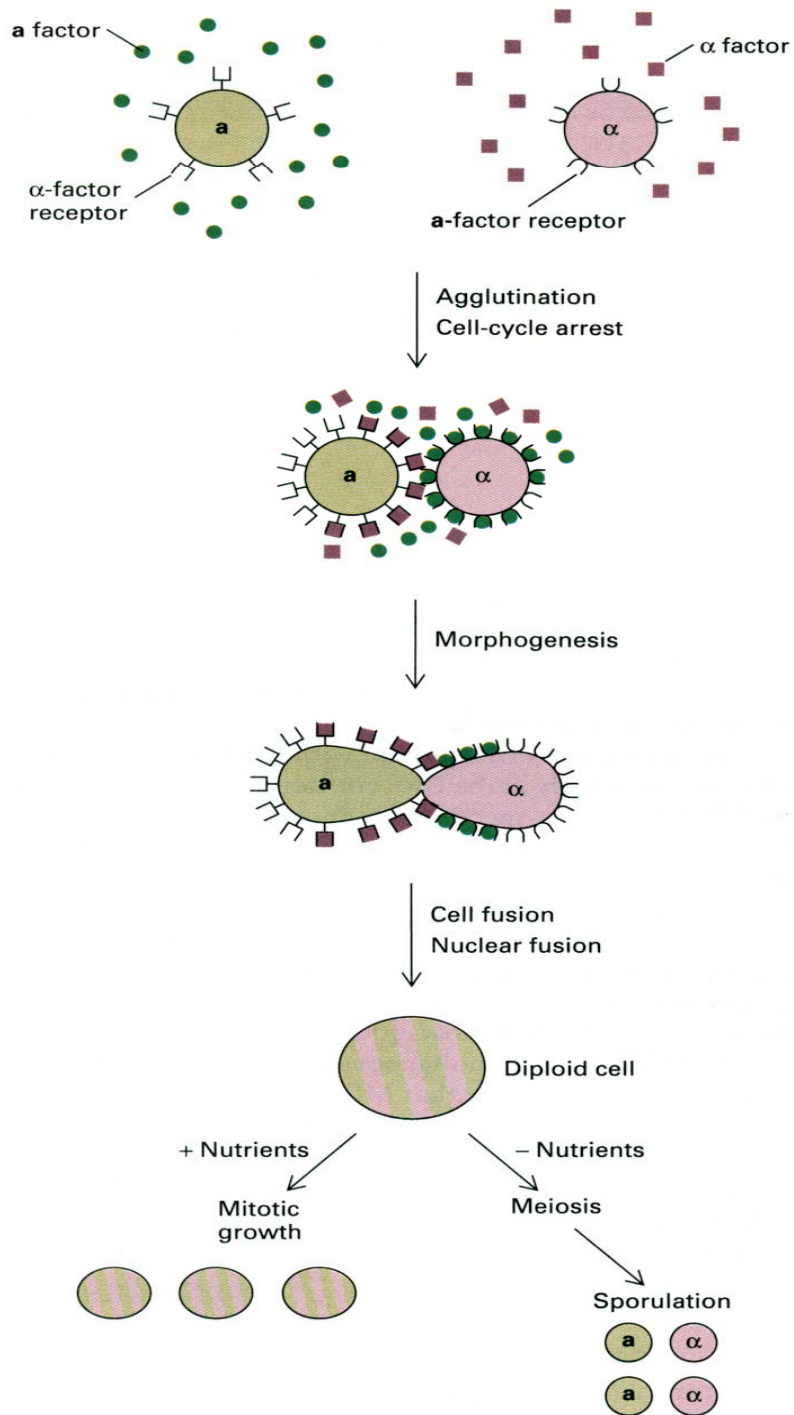


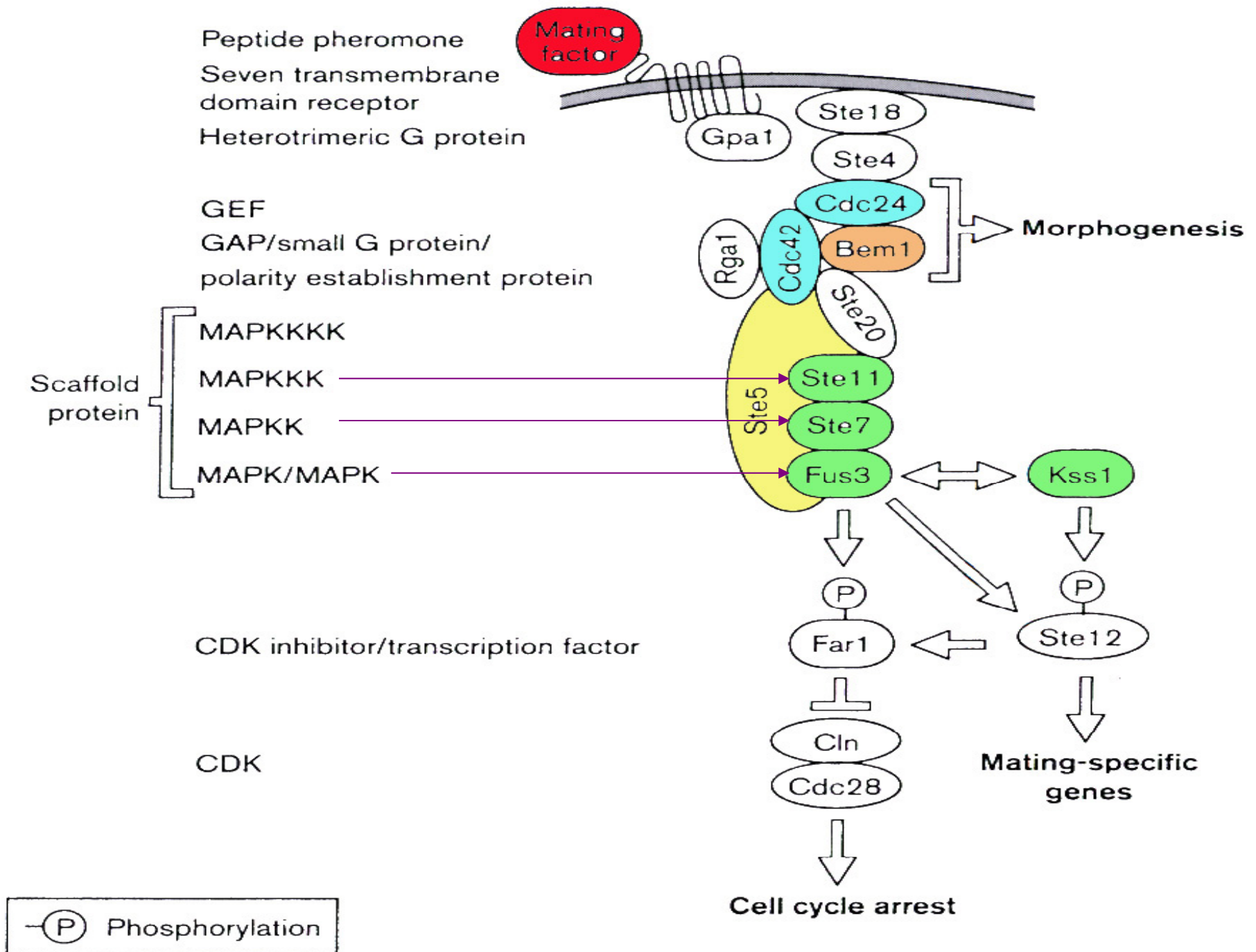
Η εξειδίκευση στη σηματοδότηση των MAPK στο ζυμομήκυτα *S. cerevisiae*

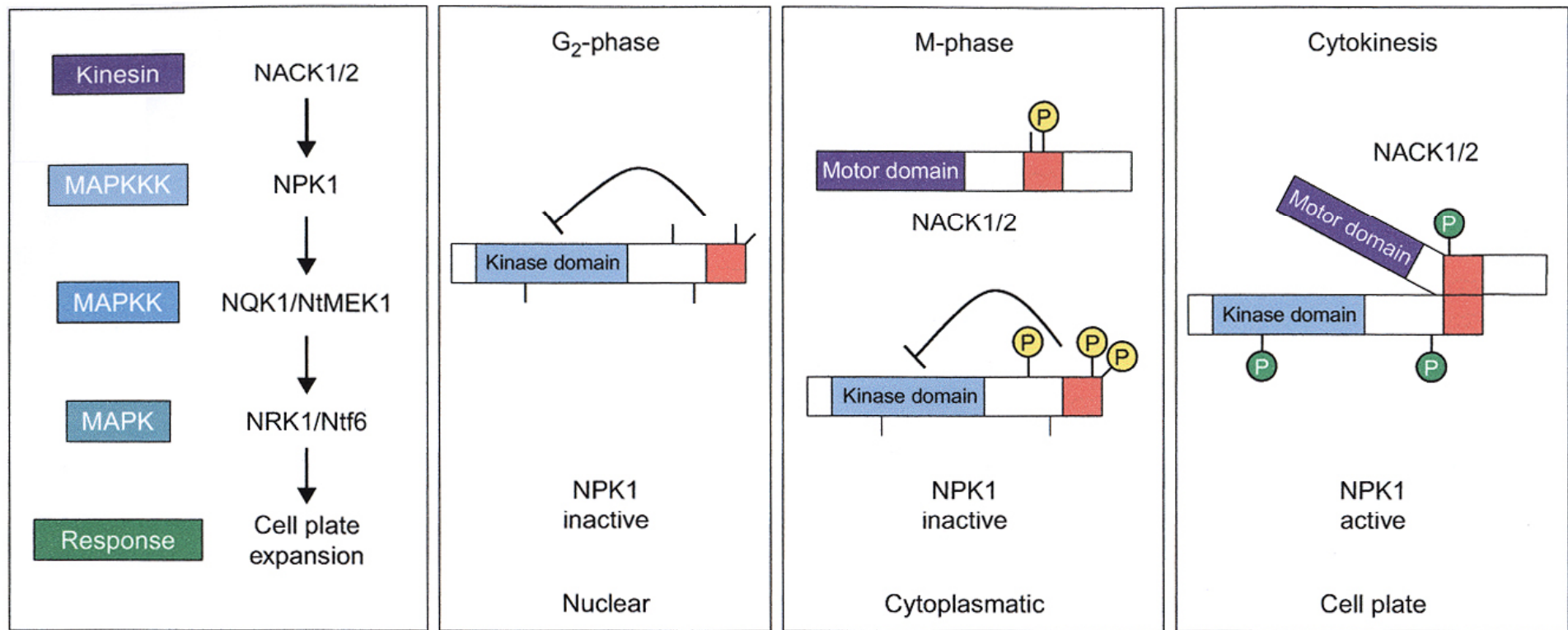
Στις ζύμες 5 διαφορετικά μονοπάτια MAPK ρυθμίζουν:











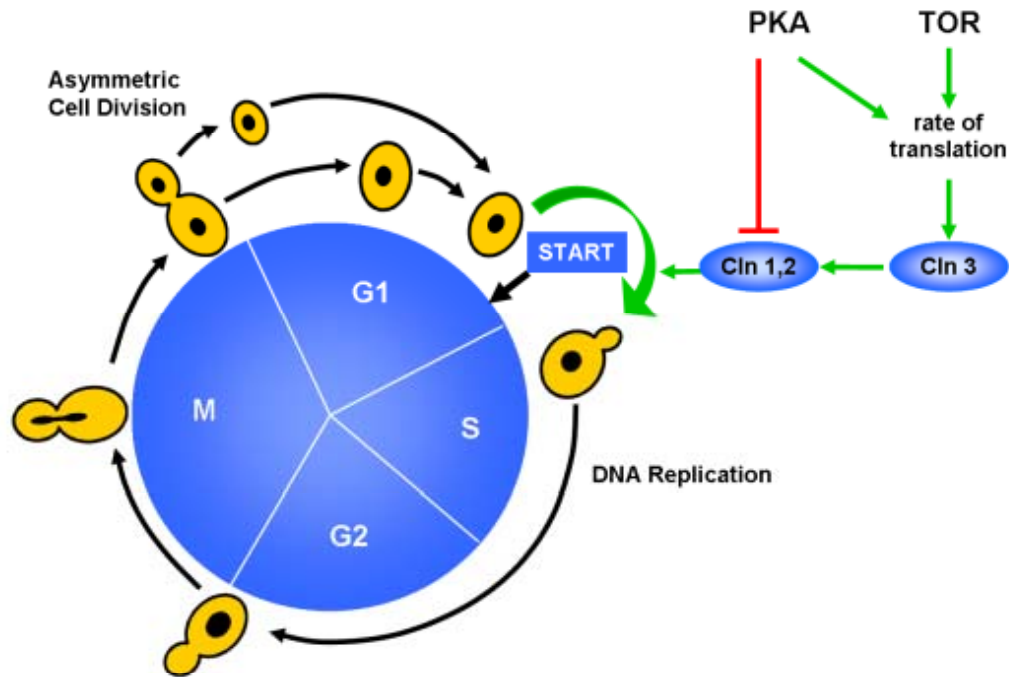
### Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την NPK1, μια MAPKKK

Η NPK1 βρίσκεται στη φάση G<sub>2</sub> στον πυρήνα, σε ανενεργό κατάσταση.

Όταν το κύτταρο εισέρχεται στη φάση M (μίτωση), η NPK1 μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα για να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων NACK1, λόγω όμως της έκφρασης της CDK φωσφορυλιώνεται και εμποδίζεται η σύνδεση.

Όταν κατά την κυτταροκίνηση η δράση της CDK ελαττώνεται, η NPK1 αποφωσφορυλιώνεται, αλληλεπιδρά με την NACK1 και ενεργοποιείται.

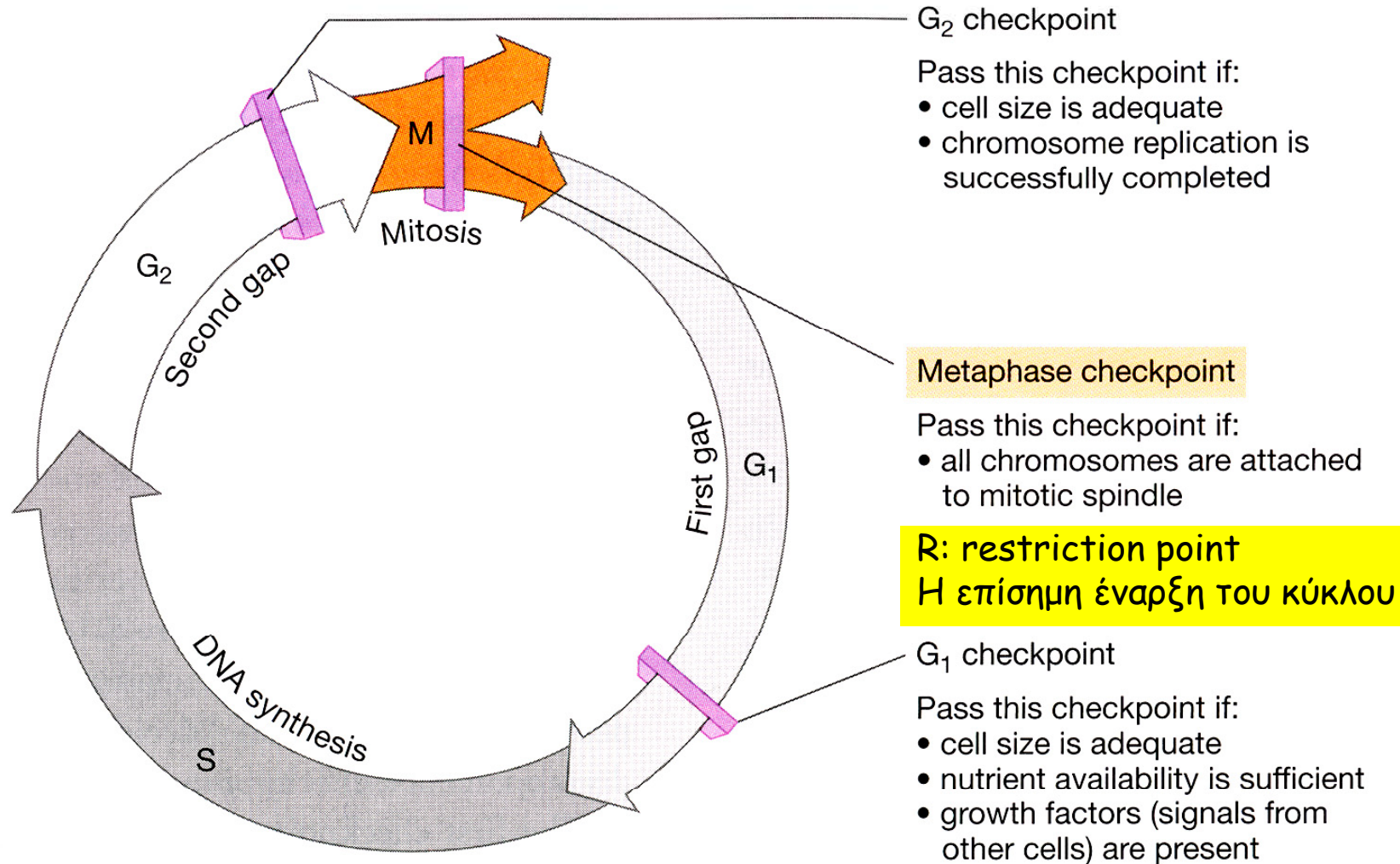




Εκτός από την απόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα, το σημείο START εμπλέκεται και στο **συντονισμό της κυτταρικής αύξησης με την αντιγραφή του DNA** και με την κυτταρική διαίρεση.

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

Ο πολλαπλασιασμός των περισσότερων ζωικών κυττάρων ρυθμίζεται με παρόμοιο τρόπο στη φάση  $G_1$  του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, ένα σημείο λήψης απόφασης προς το τέλος της φάσης  $G_1$ , το οποίο ονομάζεται **σημείο περιορισμού (restriction point)**, έχει στα ζωικά κύτταρα ανάλογη λειτουργία με αυτή του START στους ζυμομύκητες.



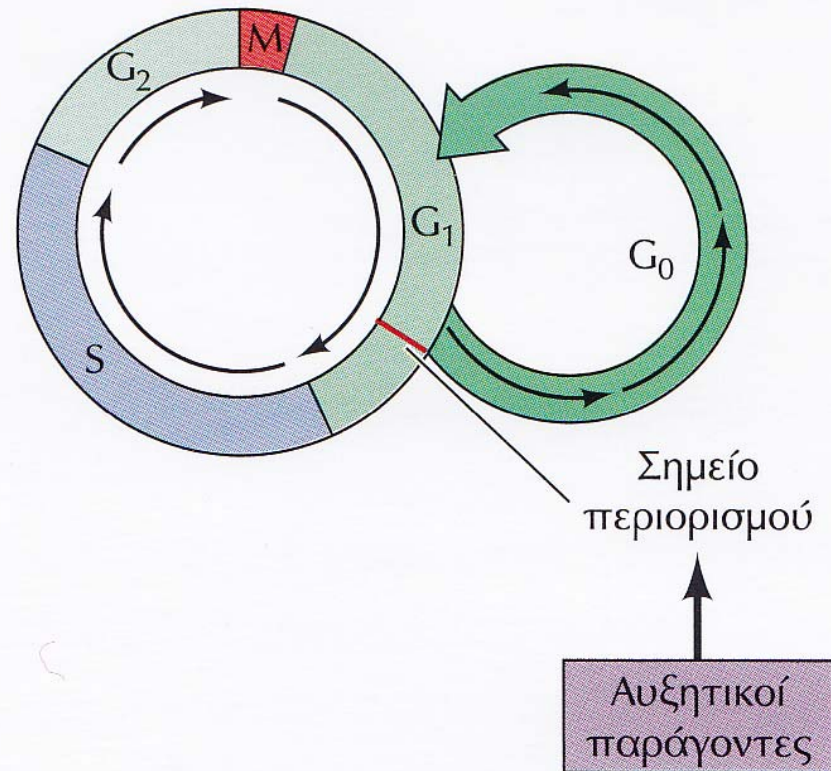
Σε αντίθεση με τους ζυμομύκητες, η πρόοδος του ζωικού κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται κυρίως από εξωκυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και όχι από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών.

Αν υπάρχουν οι κατάλληλοι αυξητικοί παράγοντες, τα κύτταρα διέρχονται από το σημείο περιορισμού και εισέρχονται στη φάση S.

Εφόσον το κύτταρο έχει περάσει το σημείο περιορισμού, είναι δεσμευμένο να διεξαγάγει τη φάση S και τον υπόλοιπο κυτταρικό κύκλο ακόμα και απουσία περαιτέρω διέγερσης από αυξητικούς παράγοντες.

Αντίθετα, αν οι κατάλληλοι αυξητικοί παράγοντες δεν είναι διαθέσιμοι στη φάση  $G_1$ , η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου σταματά στο σημείο περιορισμού.

Τα στάσιμα κύτταρα στη συνέχεια εισέρχονται σε ένα στάδιο ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου, τη φάση  $G_0$ .

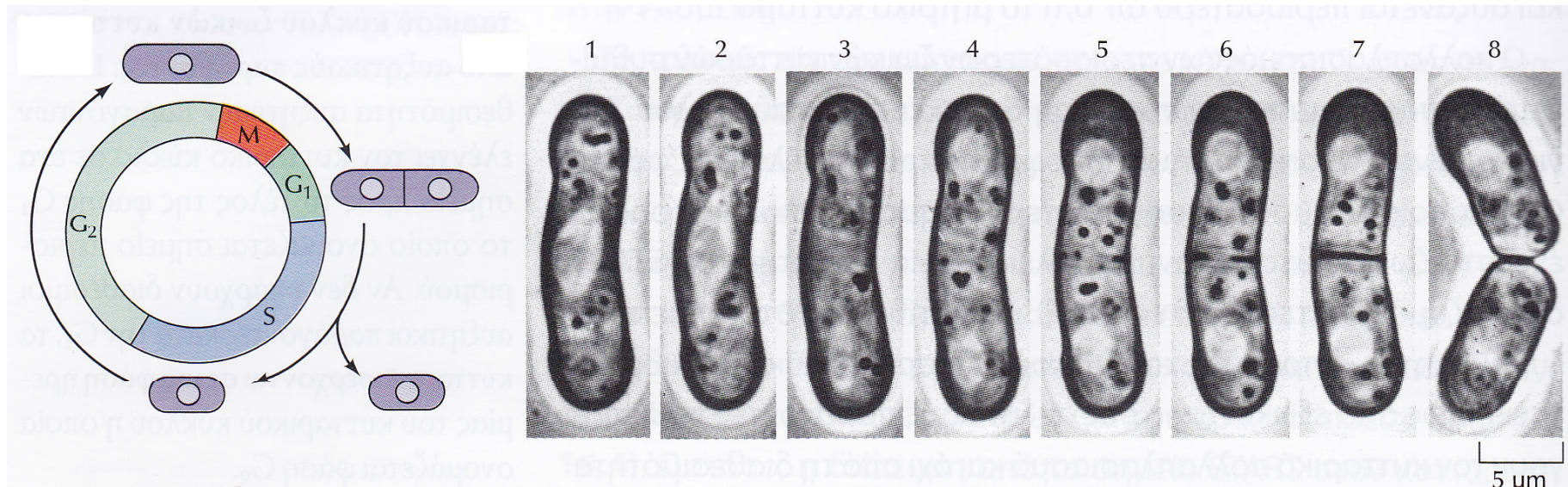


Για παράδειγμα, οι ινοβλάστες του δέρματος παραμένουν στη φάση  $G_0$  μέχρι να διεγερθούν και να αρχίσουν να διαιρούνται στην περίπτωση που χρειάζεται να επουλωθεί κάποιο τραύμα. Ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων επάγεται από τον αυξητικό παράγοντα αιμοπεταλίων (PDGF, Platelet-Derived Growth Factor), ο οποίος απελευθερώνεται από αιμοπετάλια κατά την πήξη του αίματος και σηματοδοτεί τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών στην περιοχή του τραυματισμένου ιστού.



## Ενώ ο πολλαπλασιασμός των περισσότερων κυττάρων ρυθμίζεται κυρίως στην $G_1$ , σε ορισμένες περιπτώσεις η ρύθμιση γίνεται στην $G_2$

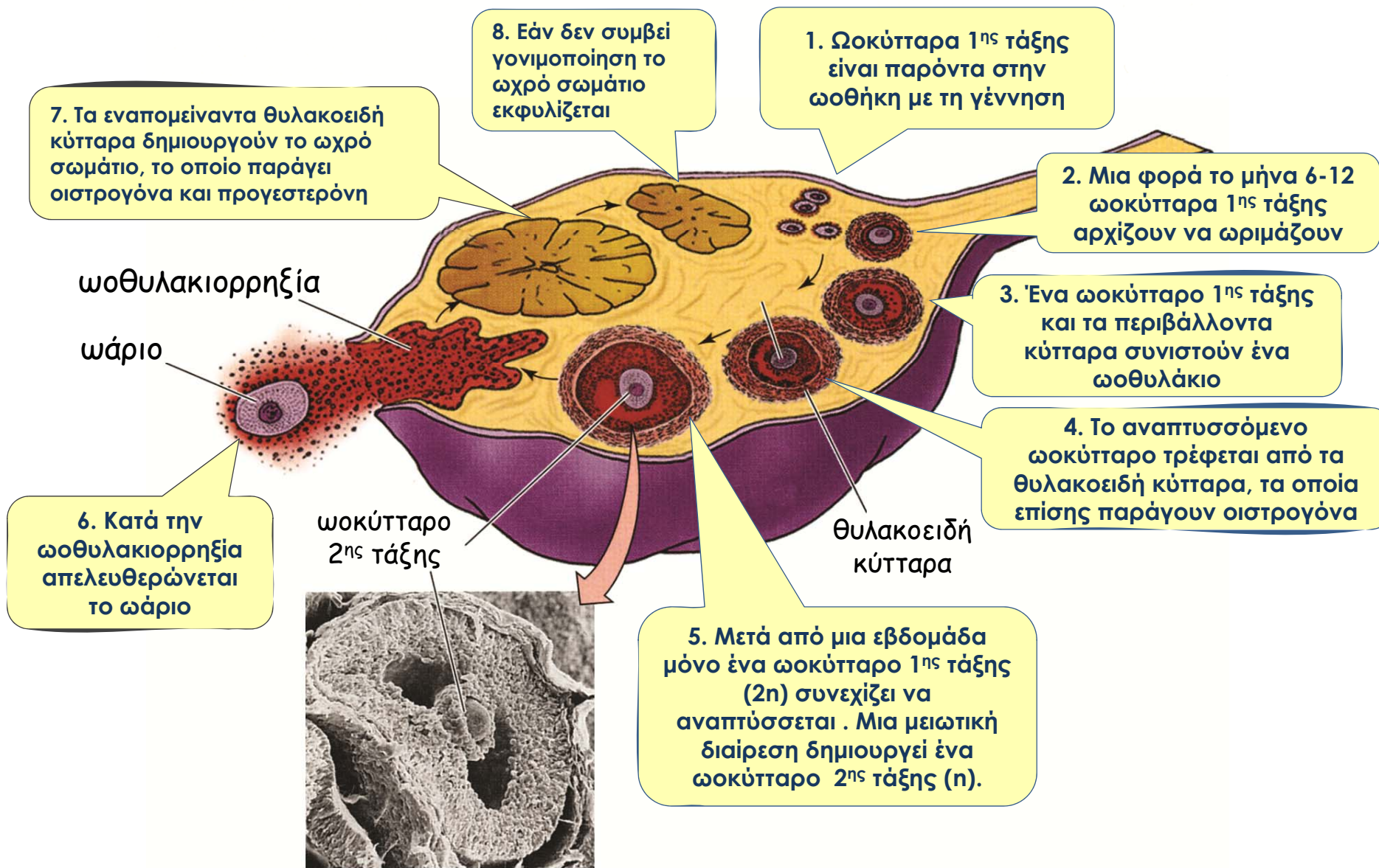
Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο κυτταρικός κύκλος του αναπαραγόμενου με διχοτόμηση μύκητα *Schizosaccharomyces pombe*. Σε αντίθεση με τον *Saccharomyces cerevisiae*, ο κυτταρικός κύκλος του *S. pombe* ρυθμίζεται στο σημείο μετάβασης από την  $G_2$  στην  $M$ . Αυτό είναι το κύριο σημείο ελέγχου του κυτταρικού μεγέθους και της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών.



Η κυτταροκίνηση συμβαίνει στη  $G_1$

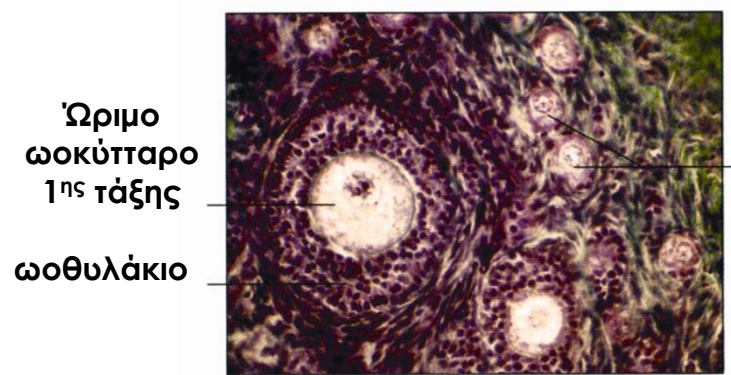
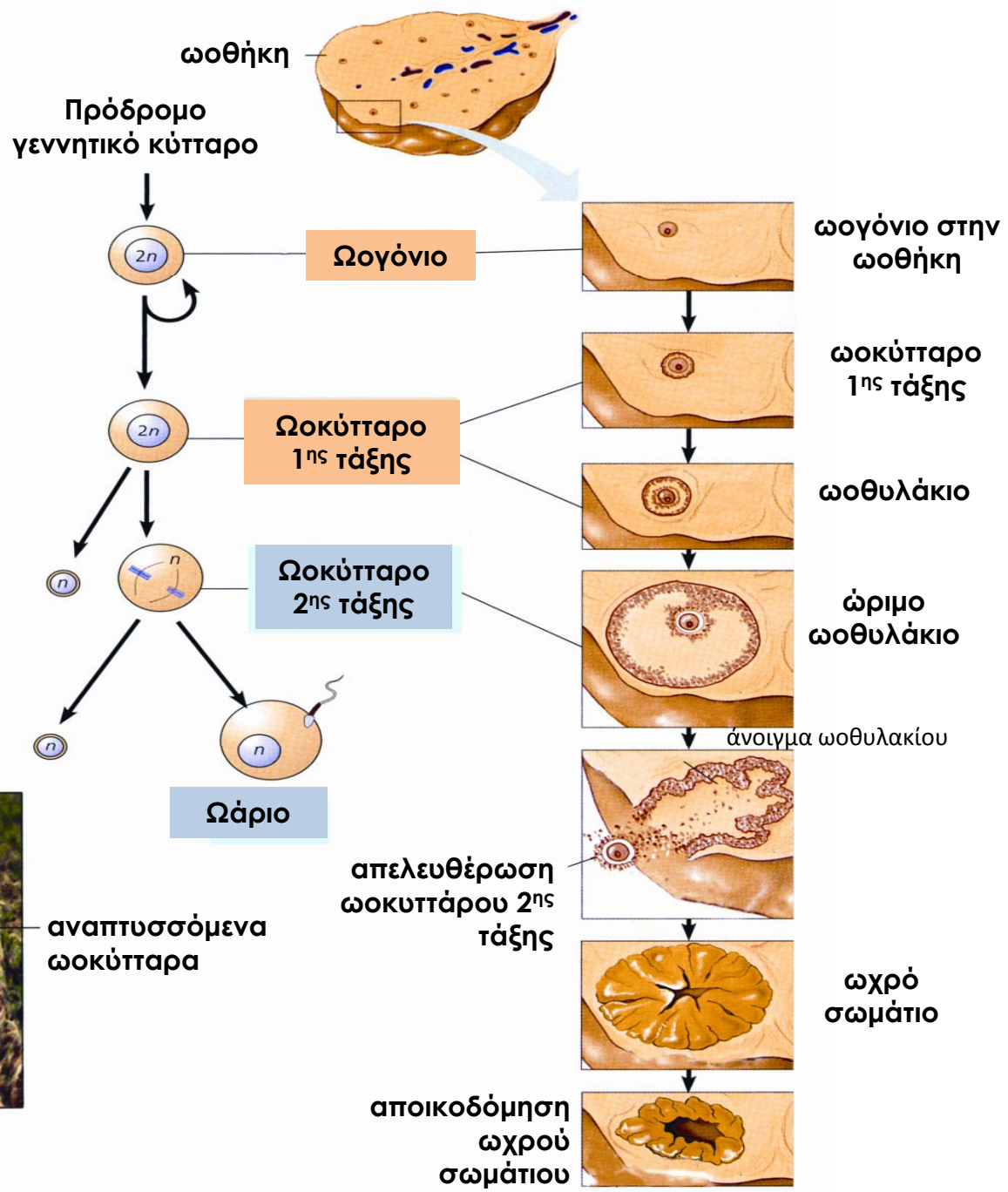
Στους ζωικούς οργανισμούς, το κλασικότερο παράδειγμα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στην  $G_2$  συναντάται στα ωκύτταρα. Τα ωκύτταρα των σπονδυλωτών μπορούν να παραμείνουν σε στάση στην  $G_2$  για μεγάλα χρονικά διαστήματα (αρκετές δεκαετίες στον άνθρωπο) μέχρι να πυροδοτηθεί η μετάβασή τους στη φάση M μετά από ορμονική διέγερση.

## ΕΝΑΡΞΗ





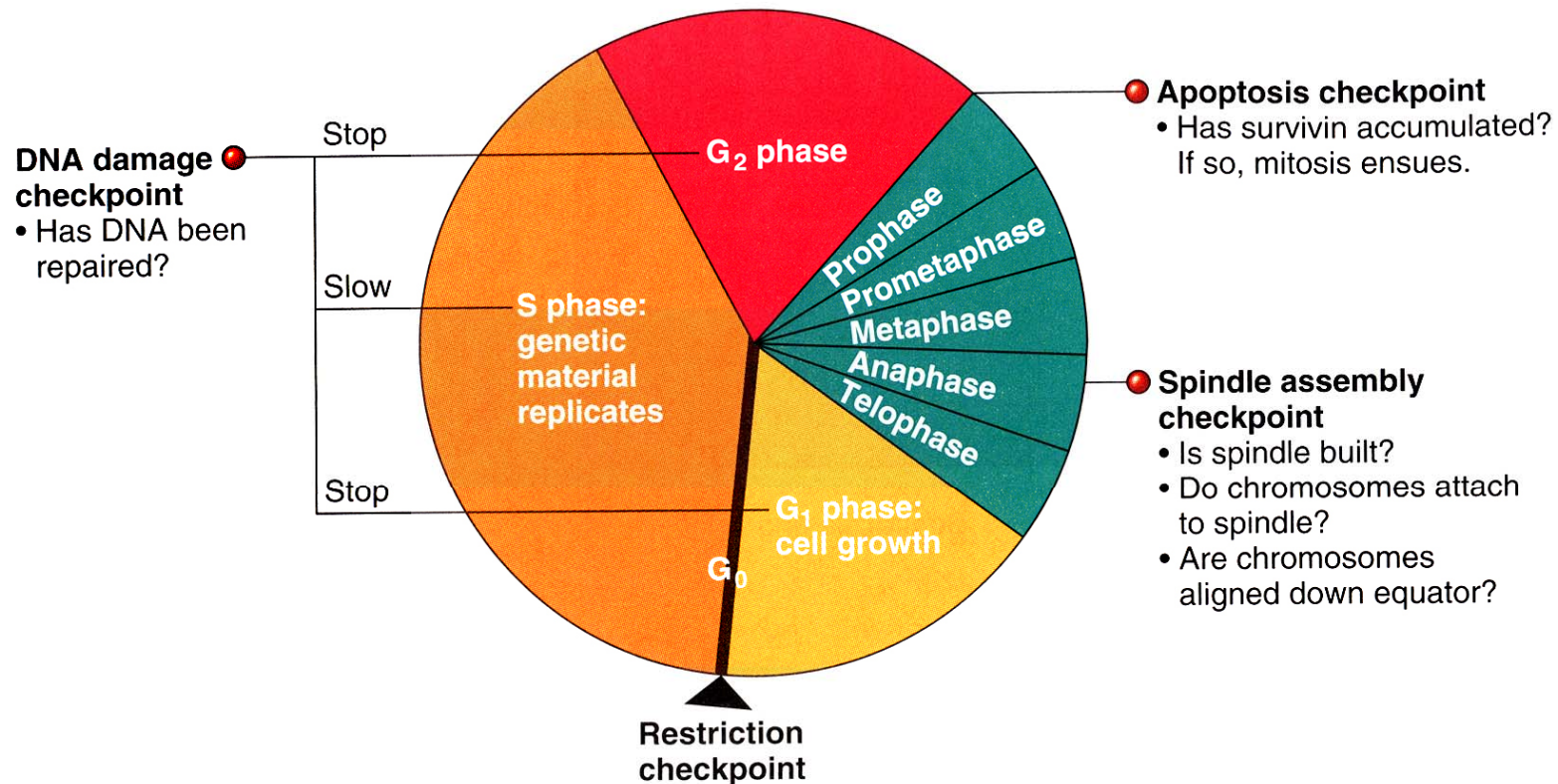
# Τα στάδια της ωγένεσης



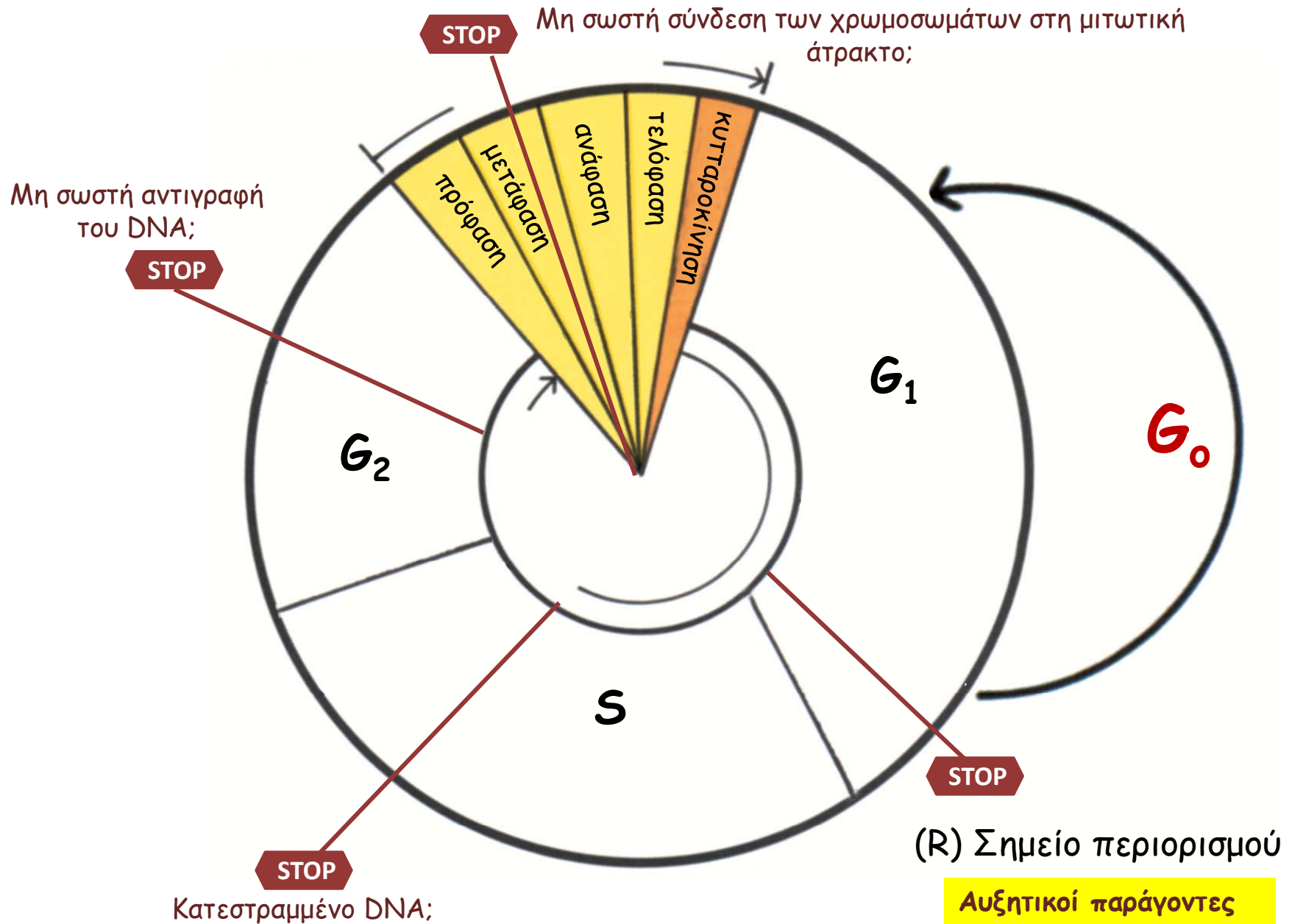


Οι μηχανισμοί ελέγχου που συζητήθηκαν ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ανάλογα με το κυτταρικό μέγεθος και ως απόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα, όπως είναι η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών και οι αυξητικοί παράγοντες.

Επιπλέον, τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά τα διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου πρέπει να συντονίζονται ώστε να διεξάγονται με τη σωστή σειρά. Για παράδειγμα, είναι ζωτικής σημασίας να μην ξεκινήσει η μίτωση πριν από την ολοκλήρωση της αντιγραφής του γονιδιώματος. Στην αντίθετη περίπτωση, η κυτταρική διαίρεση θα είχε καταστροφικές συνέπειες, αφού τα θυγατρικά κύτταρα δε θα κληρονομούσαν πλήρη αντίγραφα του γενετικού υλικού. Στα περισσότερα κύτταρα, ο συντονισμός μεταξύ των φάσεων του κυτταρικού κύκλου βασίζεται σε μια σειρά **από σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoints)** που εμποδίζουν την είσοδο στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου πριν από την ολοκλήρωση της φάσης που προηγείται.

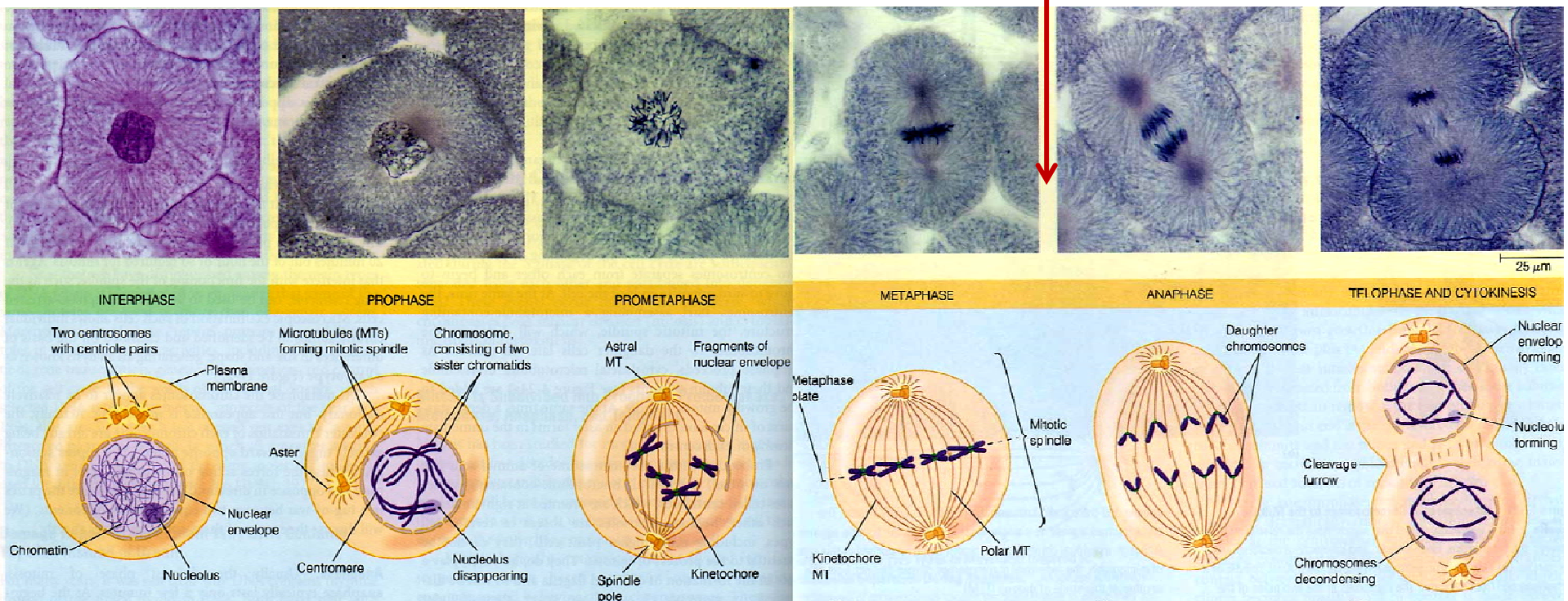


# Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου



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

## Metaphase - Anaphase transition: Σημείο ελέγχου συγκρότησης ατράκτου



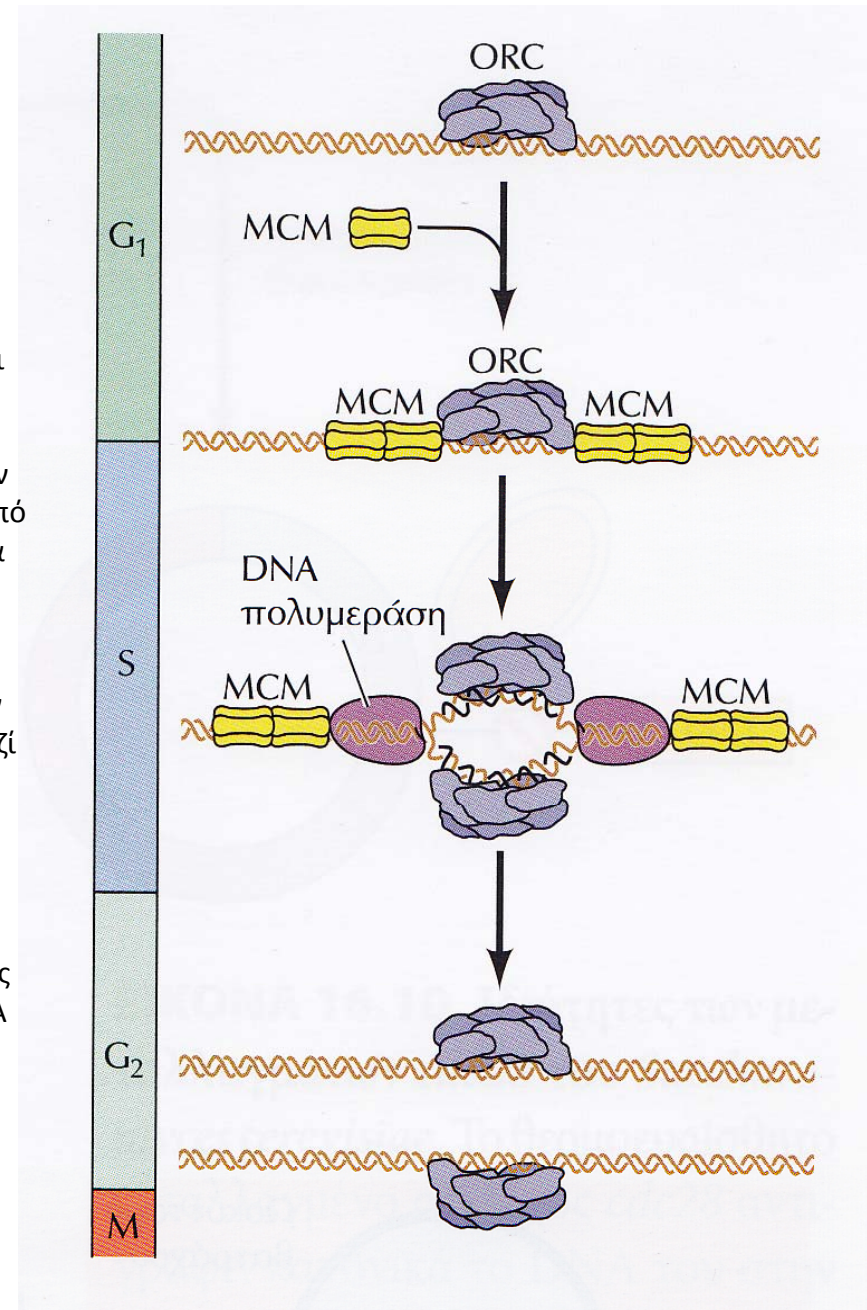


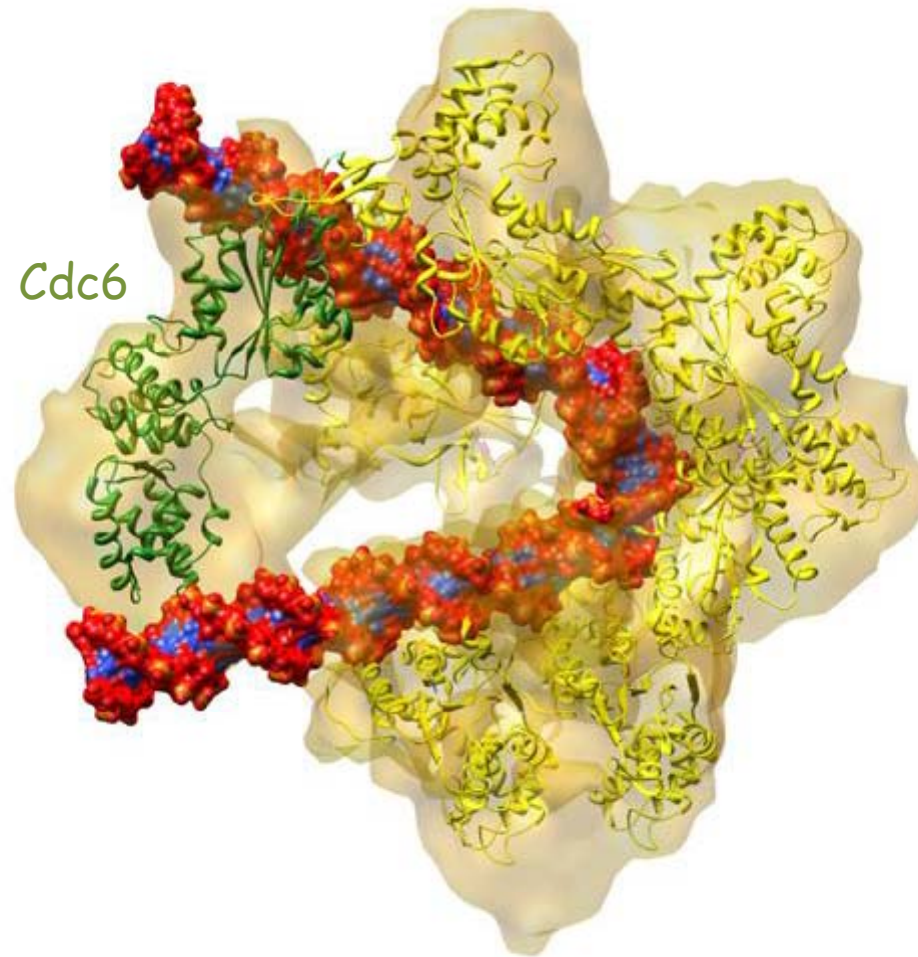
## Περιορισμός της αντιγραφής του DNA σε μία μόνο φορά ανά κυτταρικό κύκλο

Το σημείο ελέγχου στην  $G_2$  εμποδίζει την έναρξη της μίτωσης πριν από την ολοκλήρωση της φάσης S, διασφαλίζοντας ότι στα θυγατρικά κύτταρα θα διανεμηθεί πλήρως αντιγραμμένο DNA. Είναι εξίσου σημαντικό να διασφαλιστεί ότι το γονιδίωμα θα αντιγραφεί μόνο μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Επομένως, μετά την αντιγραφή ενός τμήματος DNA στη φάση S, ειδικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί εμποδίζουν την επανέναρξη της αντιγραφής του DNA μέχρι να ολοκληρωθεί ο κυτταρικός κύκλος και να έχει μεσολαβήσει η μίτωση.

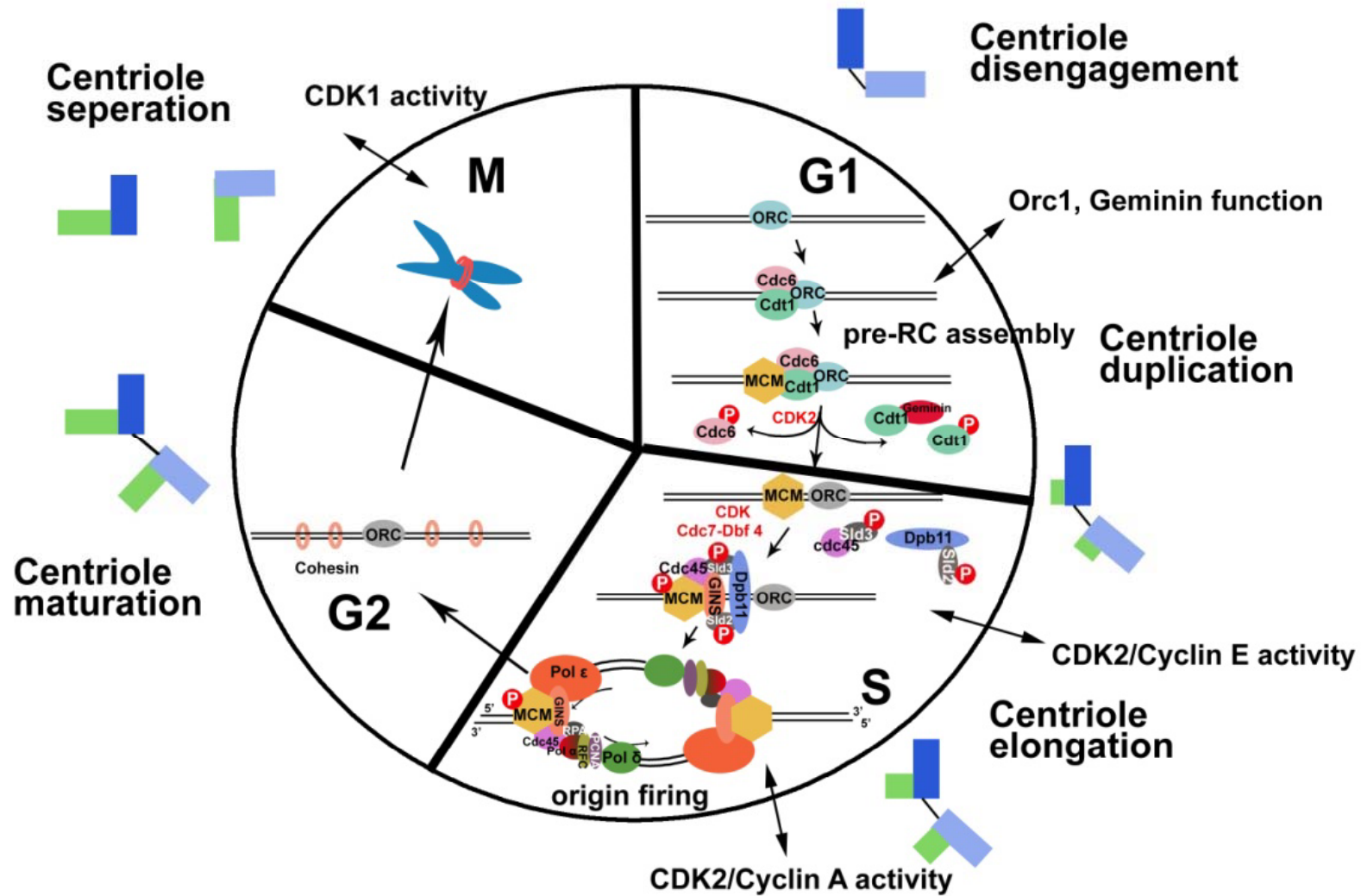
Τα κύτταρα των θηλαστικών χρησιμοποιούν χιλιάδες θέσεις έναρξης για την αντιγραφή του DNA τους. Συνεπώς, η έναρξη της αντιγραφής σε καθεμία από αυτές τις θέσεις έναρξης πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, ώστε κάθε τμήμα του γονιδιώματος να αντιγράφεται μόνο μία φορά κατά τη φάση S σε κάθε κυτταρικό κύκλο.

Στο μοριακό μηχανισμό που δεν επιτρέπει την αντιγραφή του DNA περισσότερες από μία φορές ανά κυτταρικό κύκλο εμπλέκεται η δράση των **ελικασών MCM** που προσδένονται στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής μαζί με το **πρωτεϊνικό σύμπλοκο αναγνώρισης της θέσης έναρξης της αντιγραφής -ORC, Origin Recognition Complex**. Οι πρωτεΐνες MCM ρυθμίζονται από «παράγοντες αδειοδότησης» (licensing factors) που επιτρέπουν την έναρξη της αντιγραφής. Η ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών MCM στο DNA ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα να προσδένονται σε θέσεις έναρξης της αντιγραφής μόνο κατά τη φάση  $G_1$  και να επιτρέπεται η έναρξη της αντιγραφής του DNA όταν το κύτταρο εισέρχεται στη φάση S. Αμέσως μετά την έναρξη της αντιγραφής, οι πρωτεΐνες MCM εκτοπίζονται από τις θέσεις έναρξης, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η επανέναρξη της αντιγραφής μέχρι το κύτταρο να περάσει από τη μίτωση και να εισέλθει στη φάση  $G_1$  του επόμενου κύκλου. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών MCM στο DNA κατά τις φάσεις S,  $G_2$  και M του κυτταρικού κύκλου παρεμποδίζεται από τη δράση πρωτεϊνικών κινασών που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.



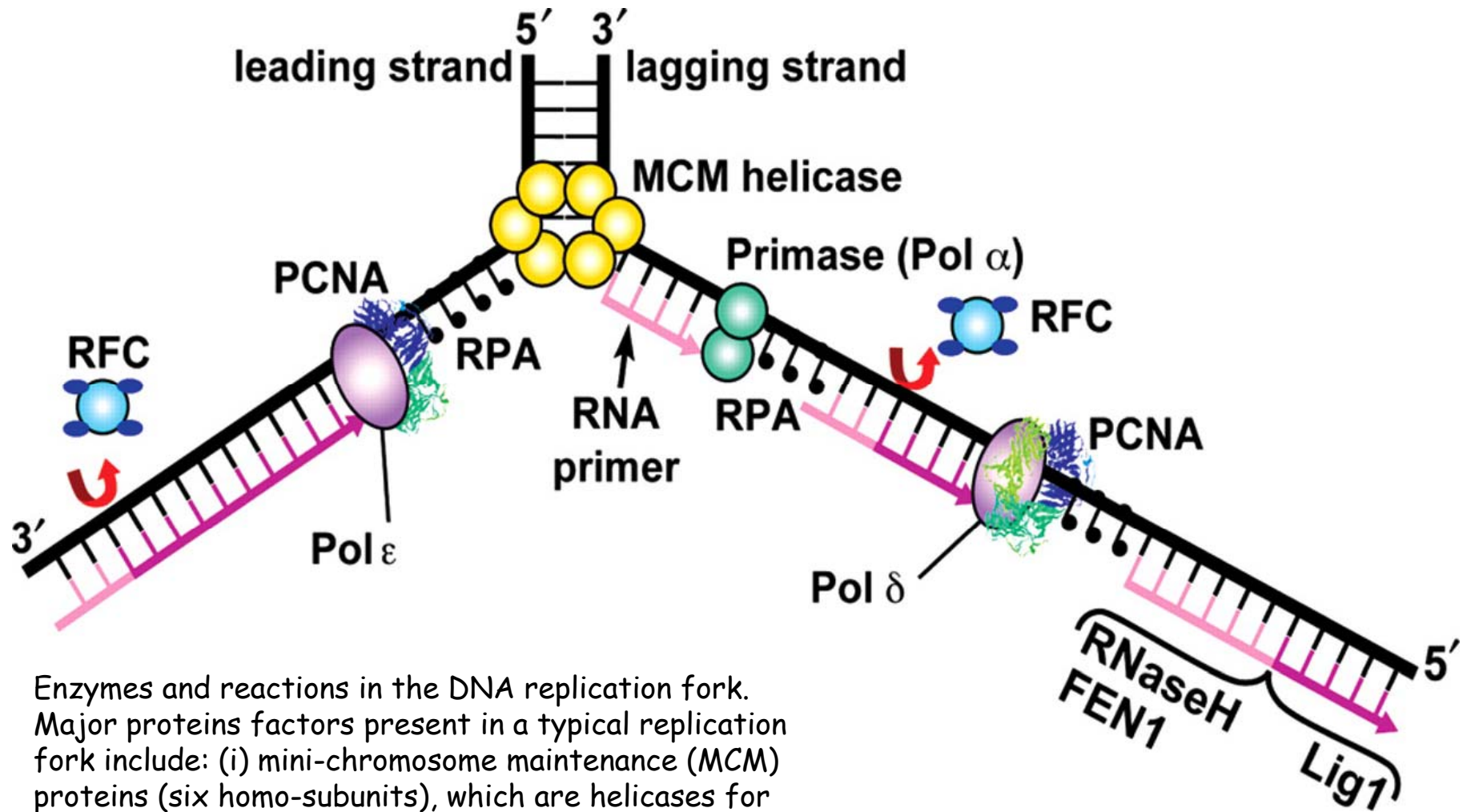


The DNA replication origin recognition complex (ORC) is a six-protein machine with a slightly twisted half-ring structure (yellow). ORC is proposed to wrap around and bend approximately 70 base pairs of double stranded DNA (red and blue). When a replication initiator Cdc6 (green) joins ORC, the partial ring is now complete and ready to load another protein onto the DNA. This last protein (not shown) is the enzyme that unwinds the double stranded DNA so each strand can be replicated.

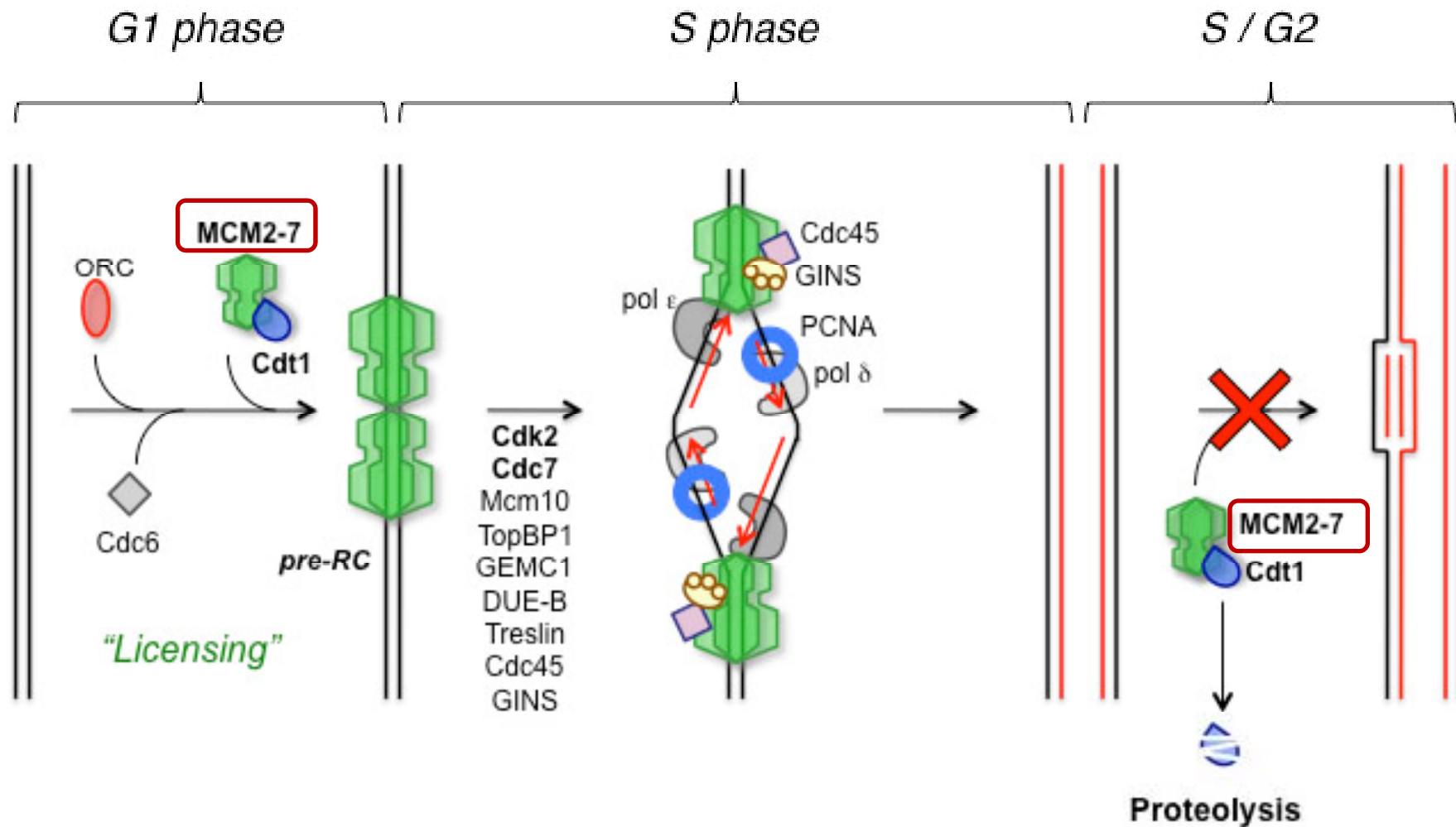


The DNA replication cycle. At the late M and G1 phases, ORC, Cdc6 and Cdt1 recruit MCM helicases to the replication origins to form pre-replication complex (pre-RC). **Once the pre-RC is assembled, the origin is licensed to replicate.** Upon entry into the S phase, Cdc45 and GINS are recruited to the replication origins dependent on Dpb11, sld2 and sld3 under the regulations of CDK2/cyclin E and Cdc7 kinases. The phosphorylated MCM2-7 helicase, together with Cdc45 and GINS, forms a CMG complex and functions to unwind the DNA replication origin site. Subsequently, Pol  $\epsilon$  and Pol  $\delta$  are recruited to the replication fork, and DNA replication initiates. The replicated DNA duplexes are held together by cohesin in the G2 phase and separate in mitosis.

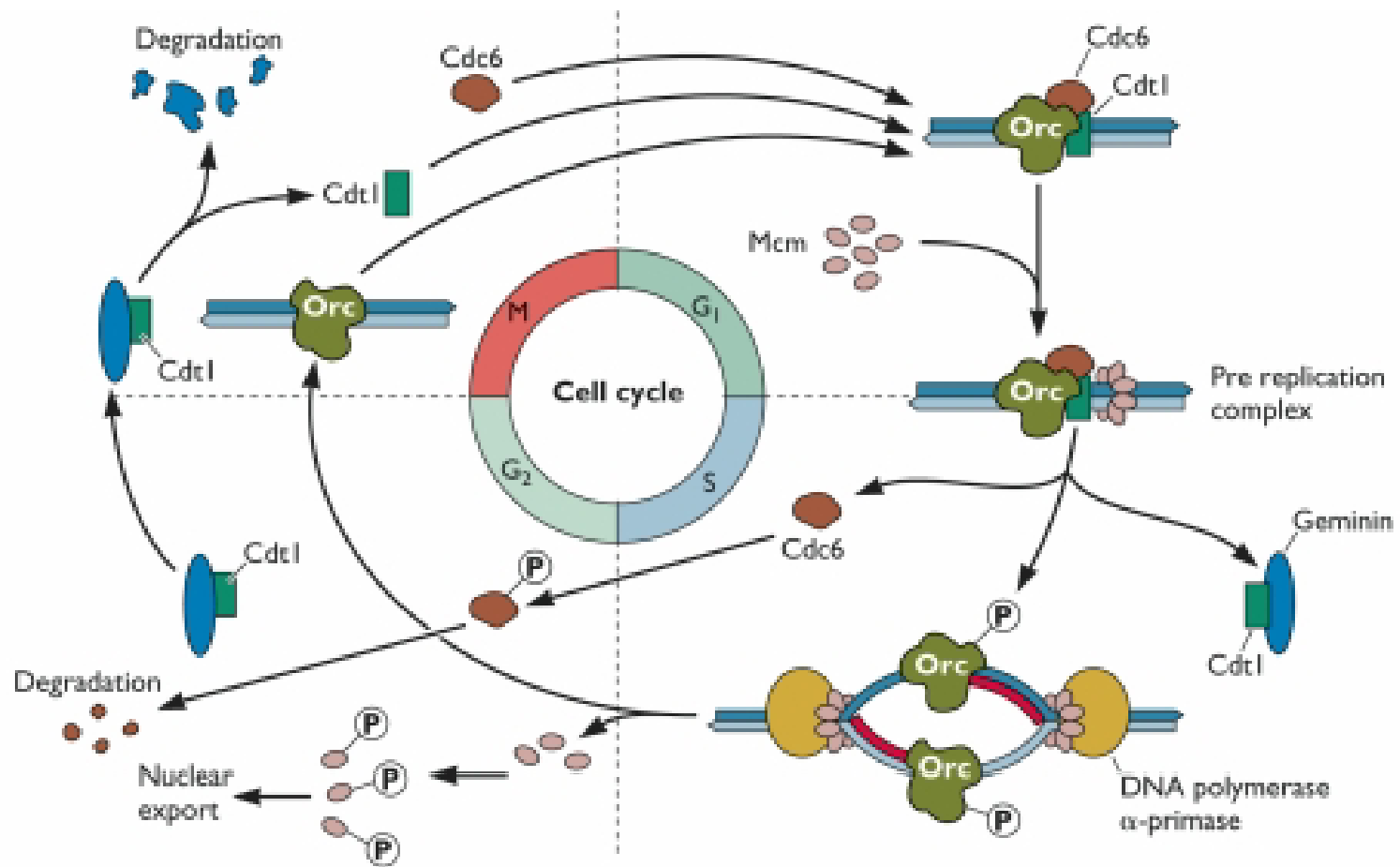




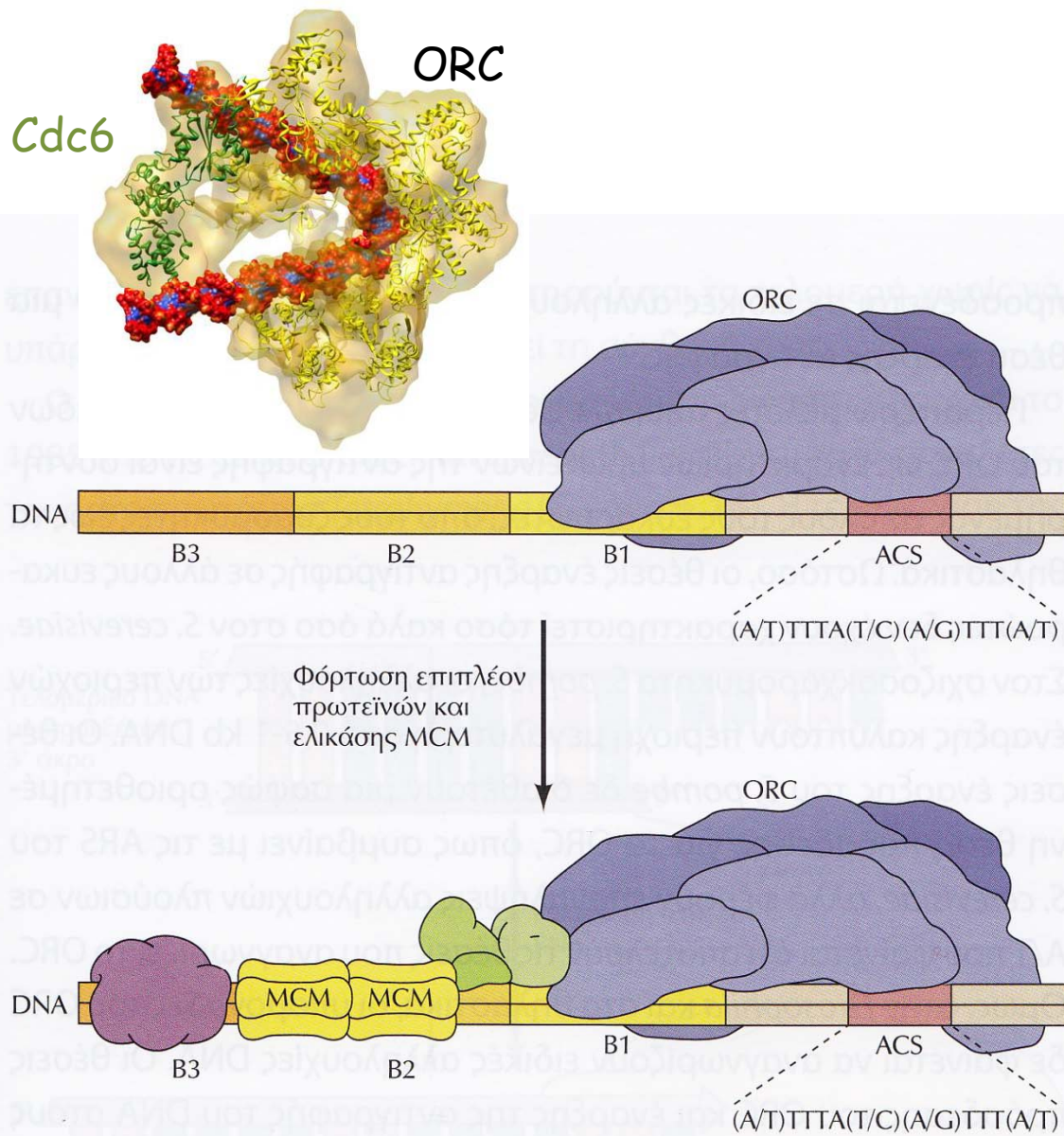
Enzymes and reactions in the DNA replication fork. Major proteins factors present in a typical replication fork include: (i) mini-chromosome maintenance (MCM) proteins (six homo-subunits), which are helicases for opening up the DNA duplex to initiate a DNA replication fork.....



Vertebrate cells initiate DNA replication from thousands of sites called origins of replication. At each origin, a pair of **MCM2-7 helicases** is recruited in the G1 phase of the cell cycle by ORC, Cdc6, and Cdt1 ("licensing"). In S phase, the **MCM helicases** are activated, leading to origin unwinding, assembly of two replisomes, and bi-directional DNA replication. To prevent re-replication, cells inhibit a second initiation event from origins that have already fired. In vertebrate cells, re-initiation is prevented by several mechanisms, including the destruction of Cdt1 by ubiquitin-mediated proteolysis as soon as cells enter S phase.

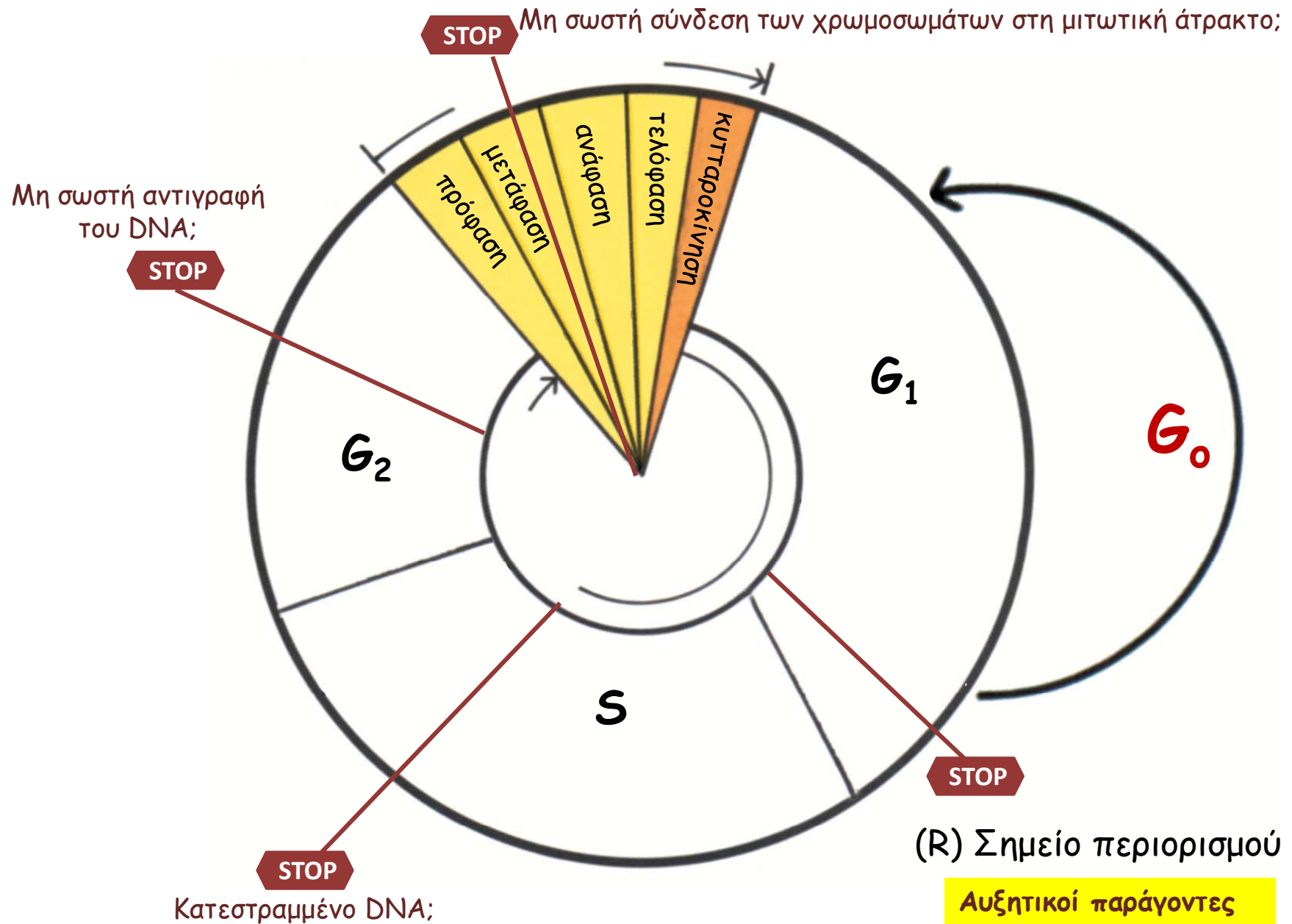




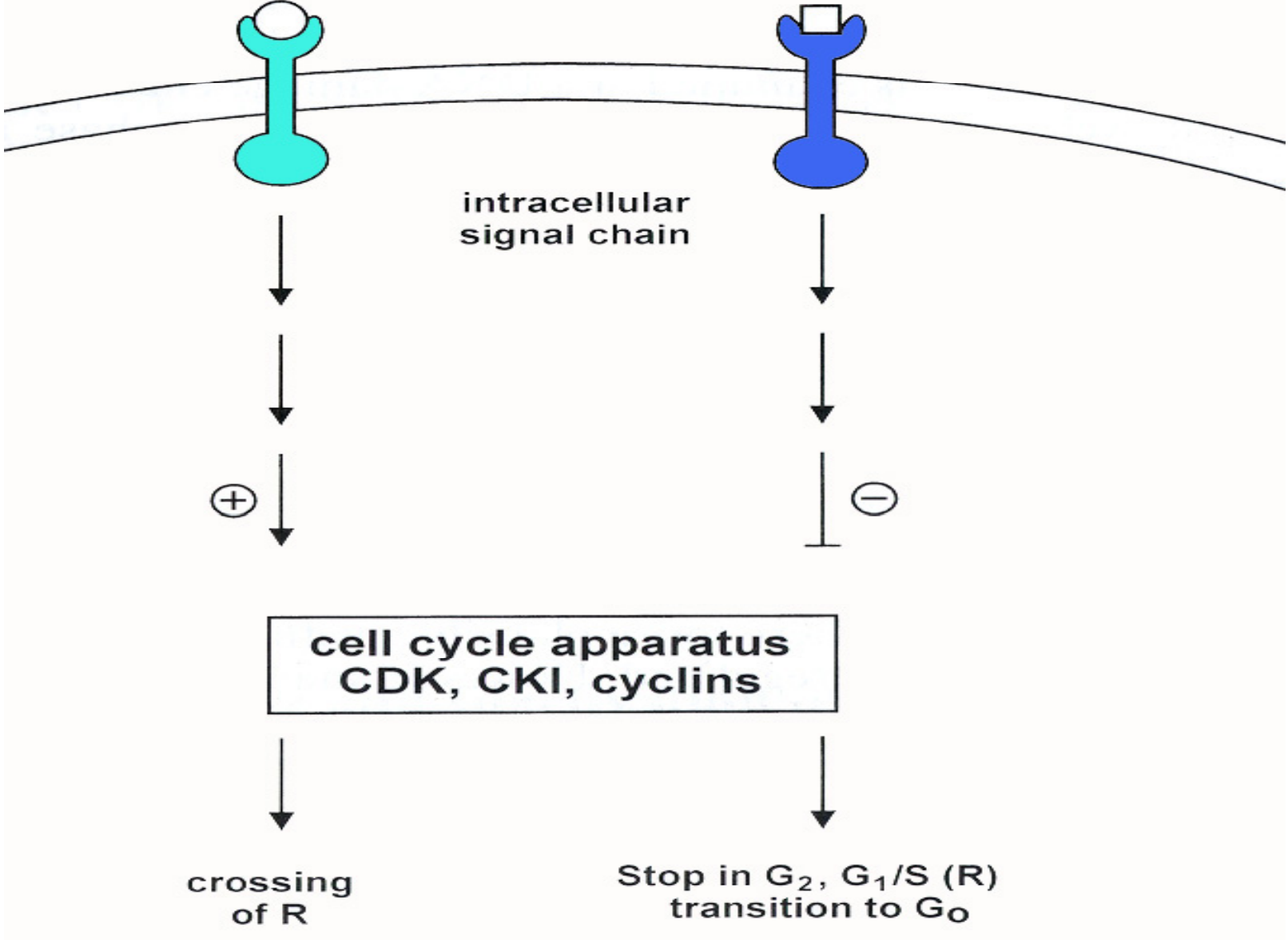


**ΕΙΚΟΝΑ 6.15** Ένα στοιχείο ARS στον σακχαρομύκητα. Κάθε στοιχείο ARS του *S. cerevisiae* διαθέτει μια συναινετική αλληλουχία 11 ζευγών βάσεων (την ACS) και τρία επιπρόσθετα στοιχεία (τα B1, B2 και B3) που συνεισφέρουν στη λειτουργία του ως θέσης έναρξης. Το σύμπλοκο αναγνώρισης της θέσης έναρξης της αντιγραφής (ORC) προσδένεται στην ACS και στο B1. Στη συνέχεια, το ORC στρατολογεί στη θέση έναρξης επιπρόσθετες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και την DNA ελικάση MCM.

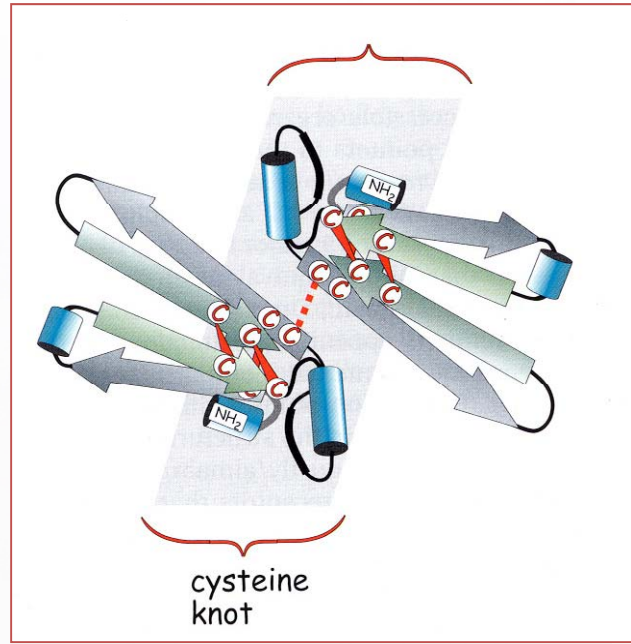
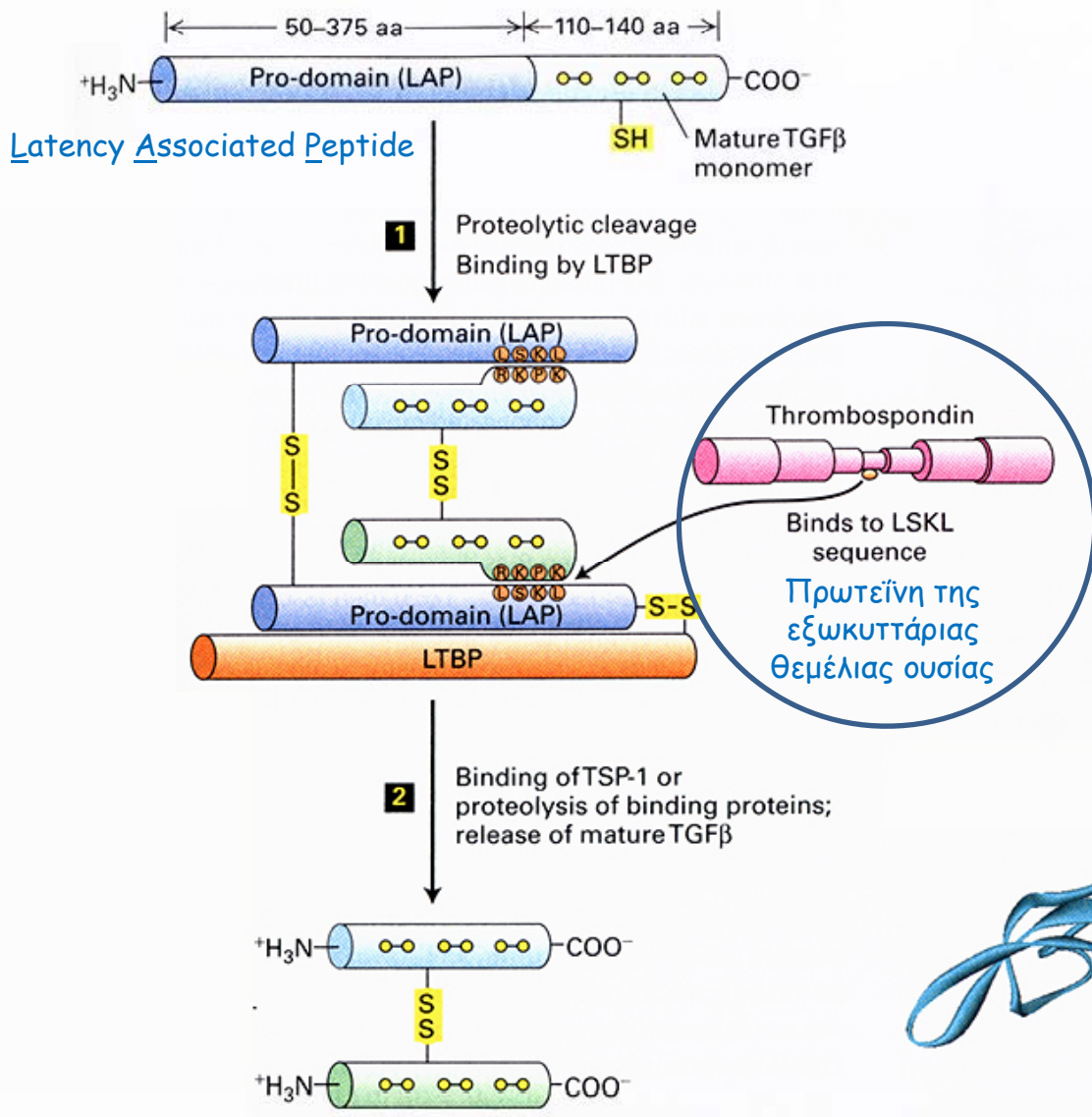
# Εξωκυτταρικός έλεγχος του κυτταρικού κύκλου



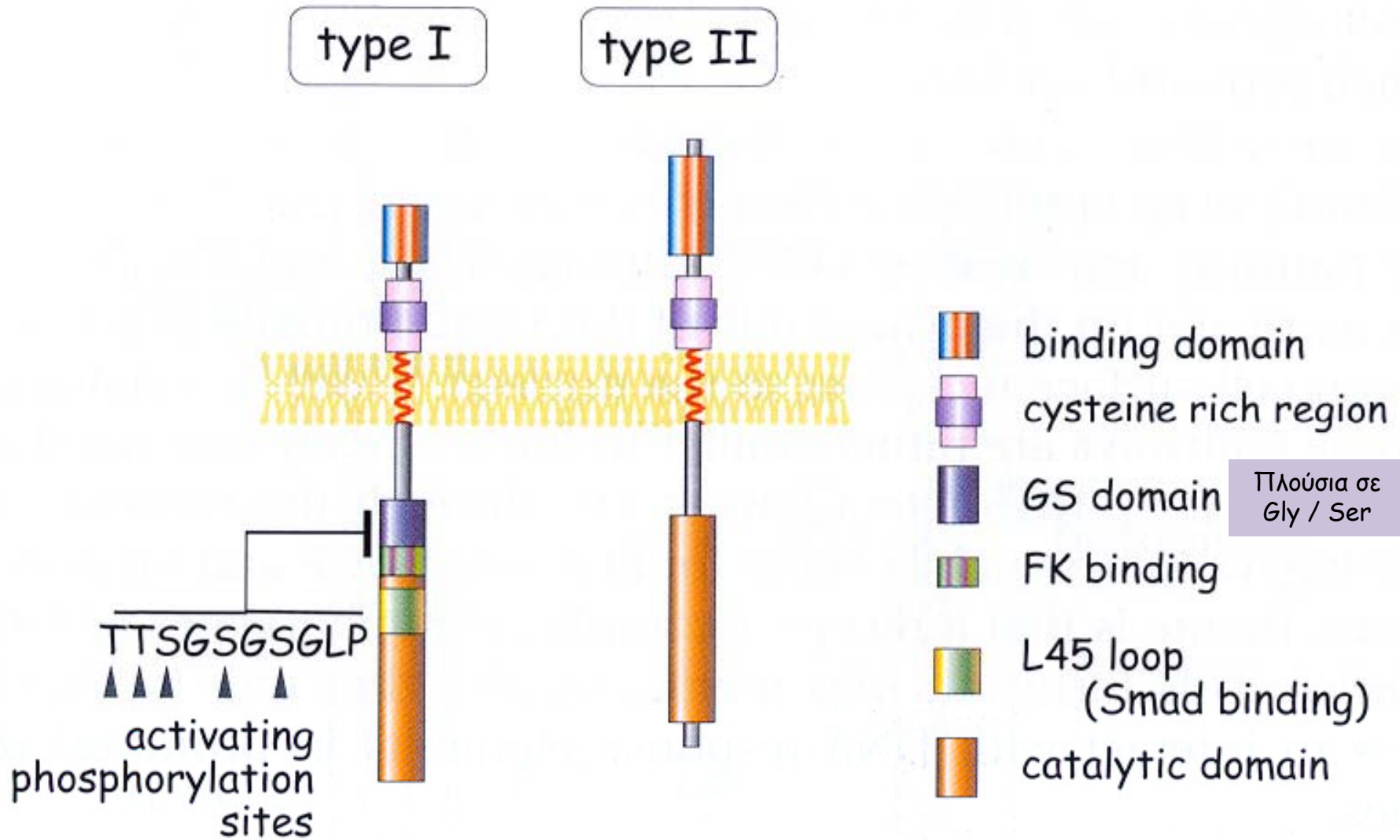
**cellular environment**  
mitogenic signal  
e. g. growth factors      antimitogenic signal,  
e. g. TGF- $\beta$ , cell damage

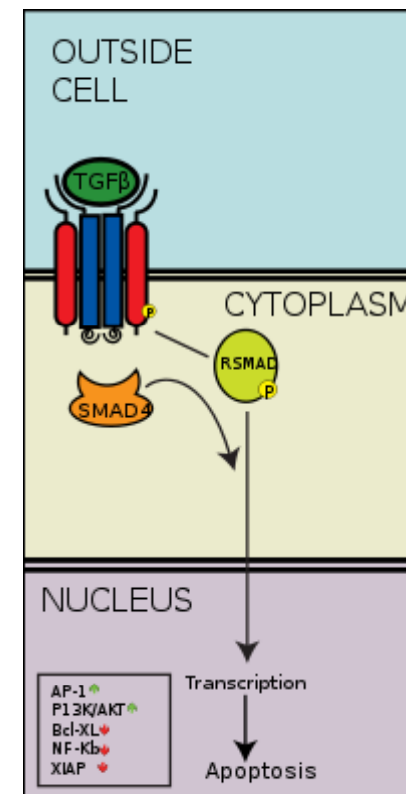
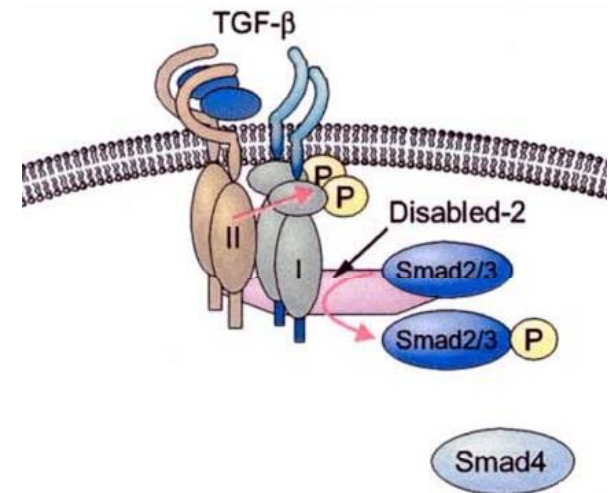
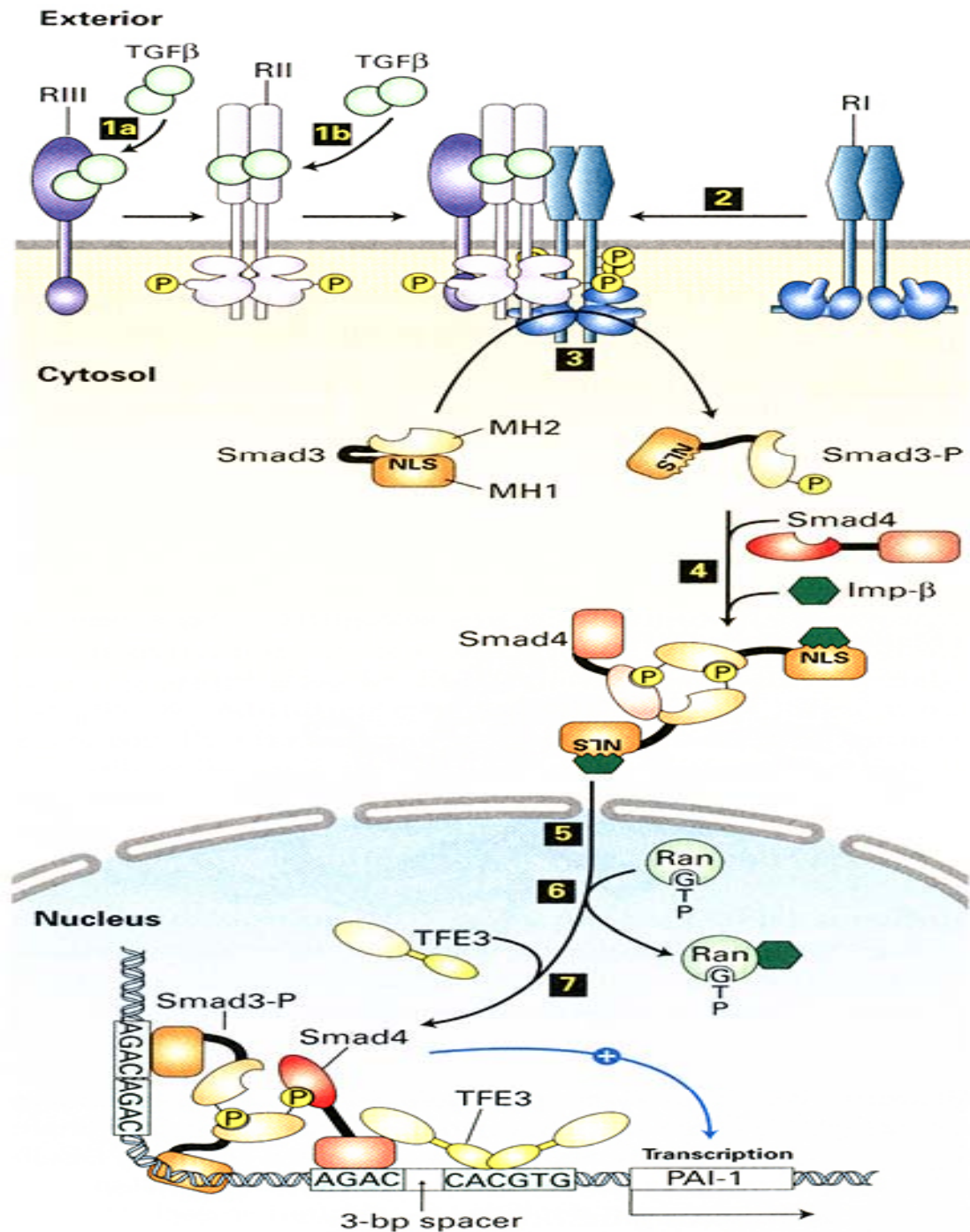




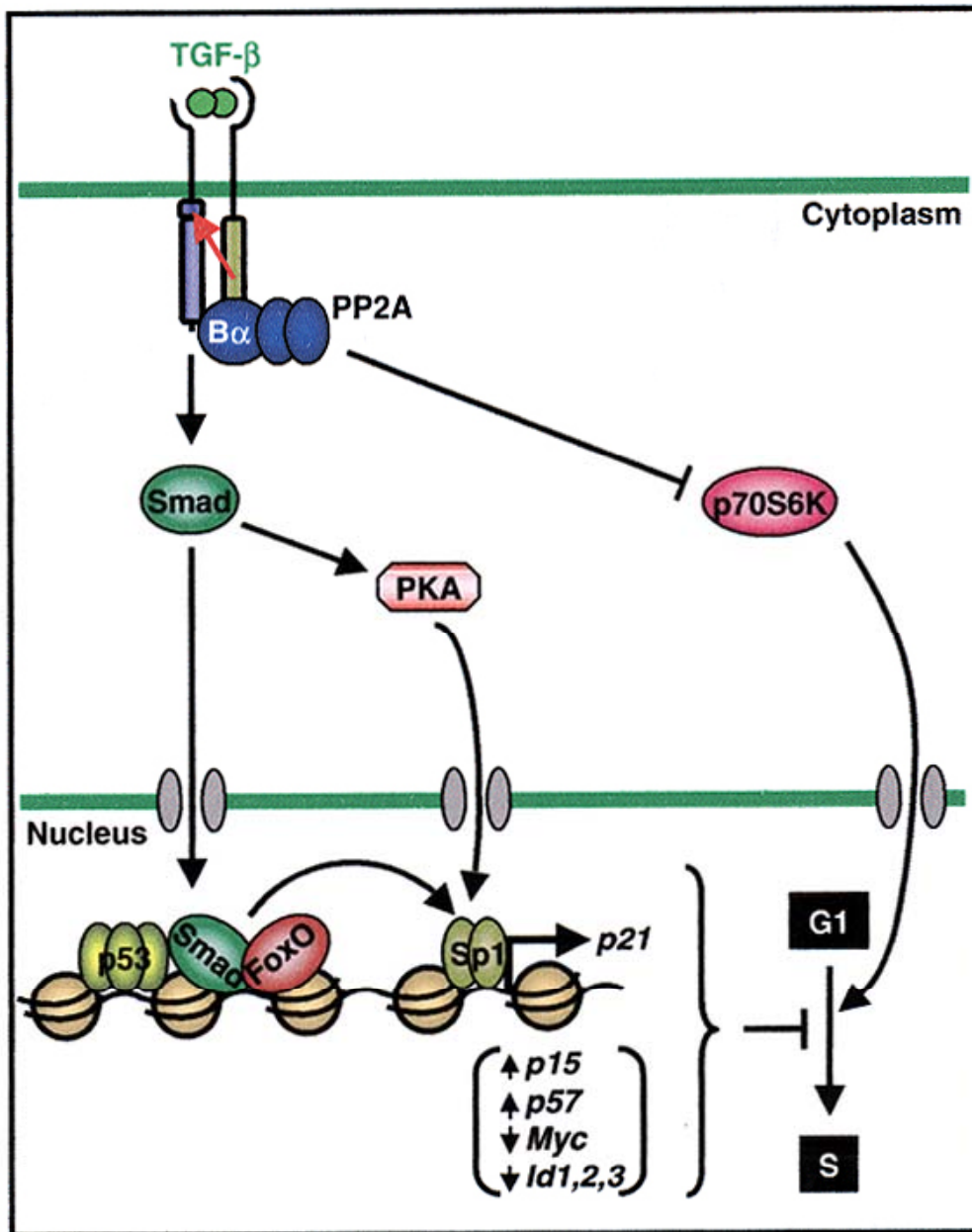


# Υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης Ser/Thr









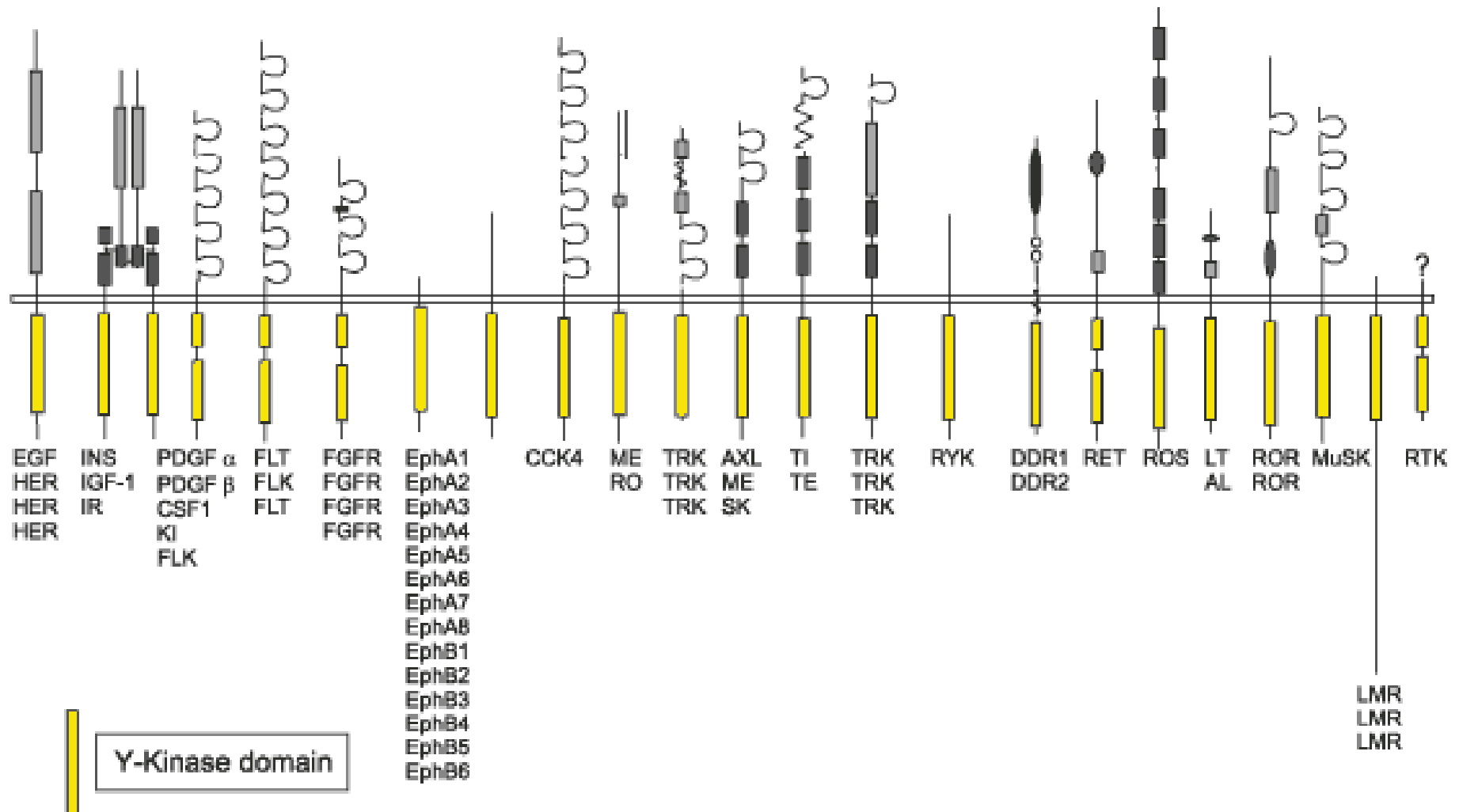
Ο TGFβ σταματά τον κυτταρικό κύκλο (εμποδίζει το πέρασμα από την G1 στην S) μέσω δύο μονοπατιών, Smad και non-Smad.

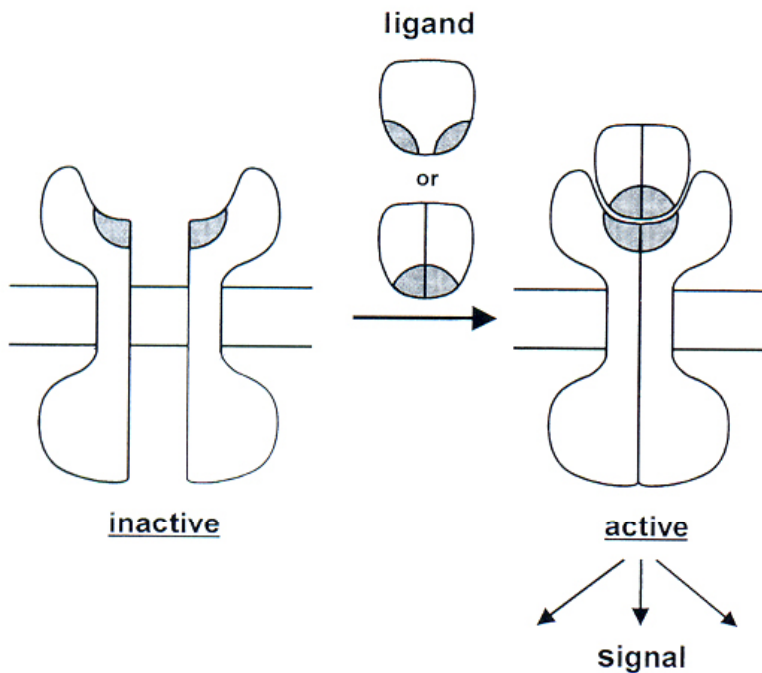
α/ Μέσω της ενεργοποίησης των Smad επηρεάζει, είτε άμεσα είτε μέσω της PKA, γονίδια που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο. Η σημαντικότερη δράση είναι η αναστολή του γονιδίου myc, και η ενεργοποίηση των γονιδίων p15 και p57, τα οποία αναστέλλουν το σύστημα κυκλίνη/κινάση που φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος.

β/ Μέσω της ενεργοποίησης της φωσφατάσης PP2A αναστέλλει την p70S6K, μια κινάση η οποία εισέρχεται στον πυρήνα και προωθεί τον κυτταρικό κύκλο από τη φάση G1 στην S. Η αναστολή της p70S6K σταματά τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G1.

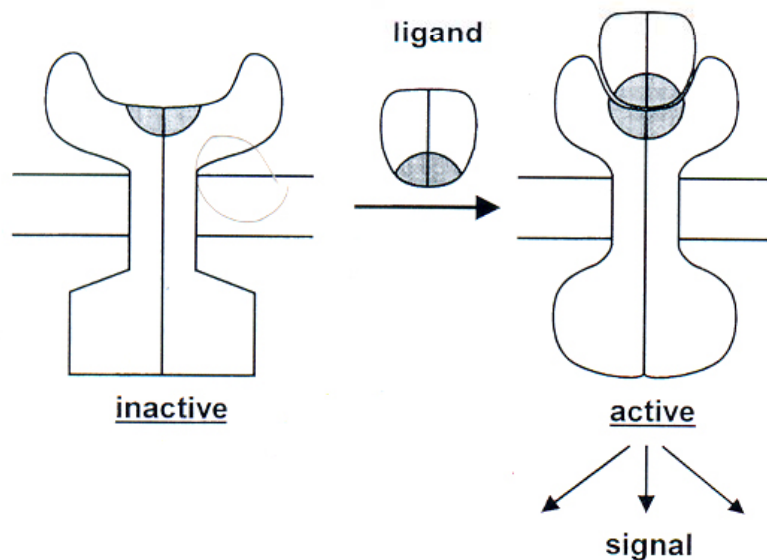
Από Moustakas A., Heldin C., *J. Cell Sci.* 2005, 118, 3573-3584.

# Αυξητικοί παράγοντες και Υποδοχείς με ενδογενή δράση κινάσης Tyr: Receptor Tyrosine kinase (RTK)





α) Ένας μονομερής ή διμερής προσδέτης με δύο θέσεις πρόσδεσης (bivalent ligand) επάγει το διμερισμό ενός υποδοχέα, ο οποίος απουσία του προσδέτη υπάρχει σε μονομερή μορφή.



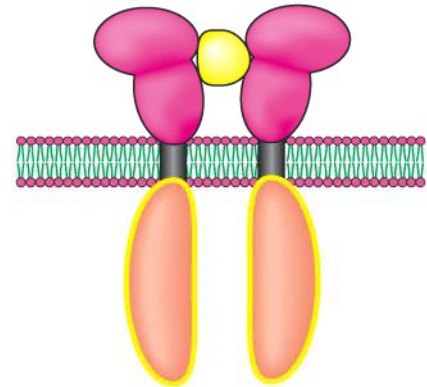
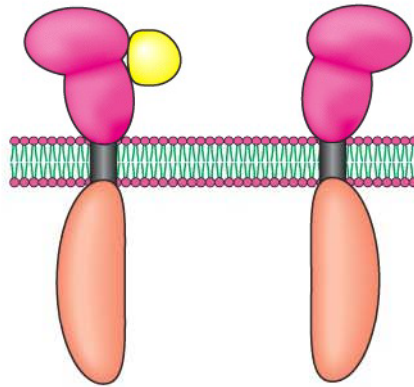
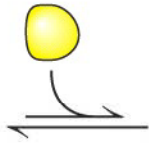
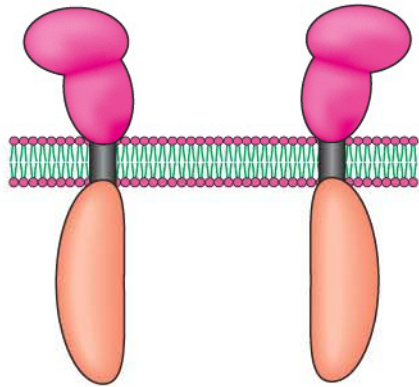
β) Ένας διμερής υποδοχέας ενεργοποιείται με τη σύνδεση του προσδέτη μέσω ενός αλλοστερικού μηχανισμού



(B)

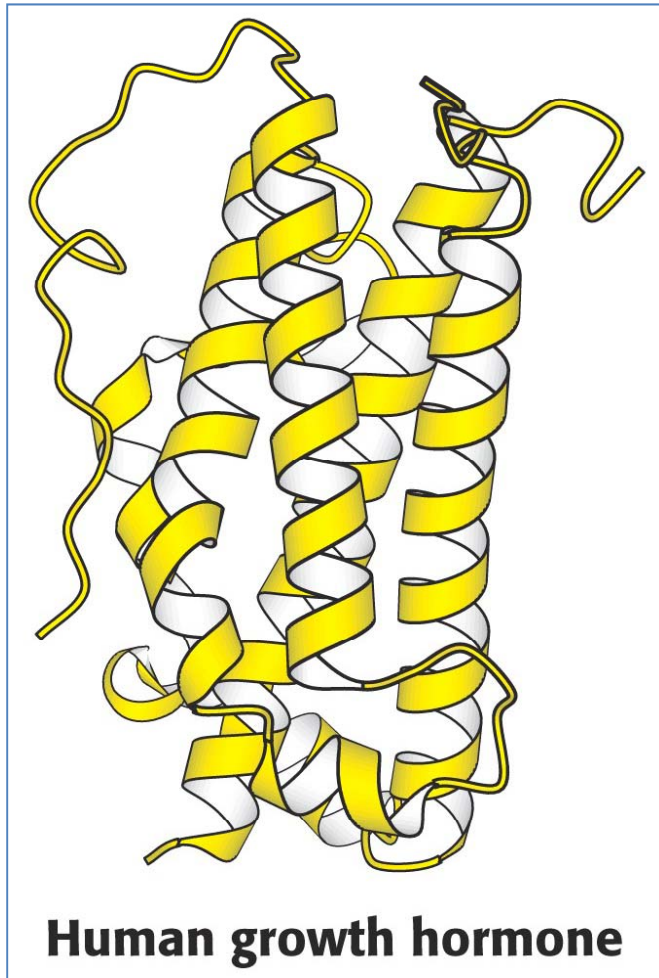
Extracellular domain

Growth hormone

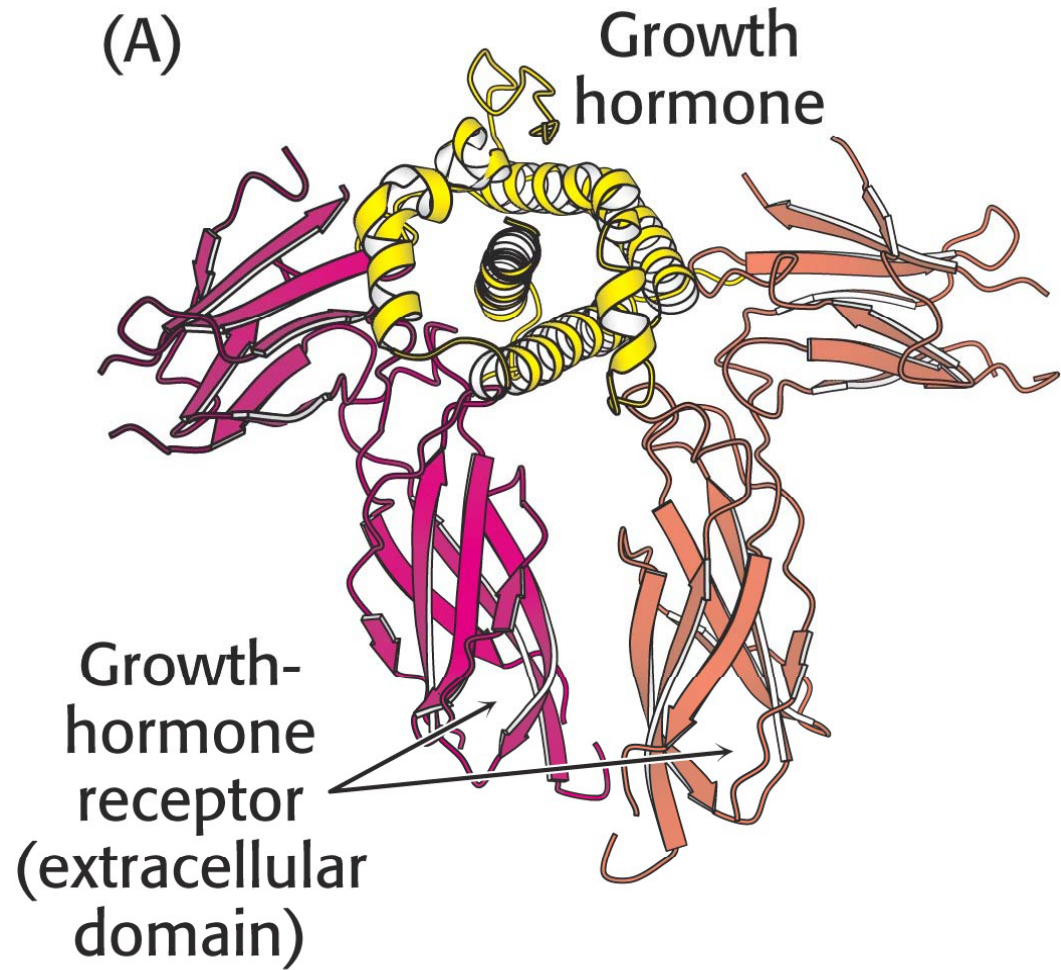


Intracellular domain

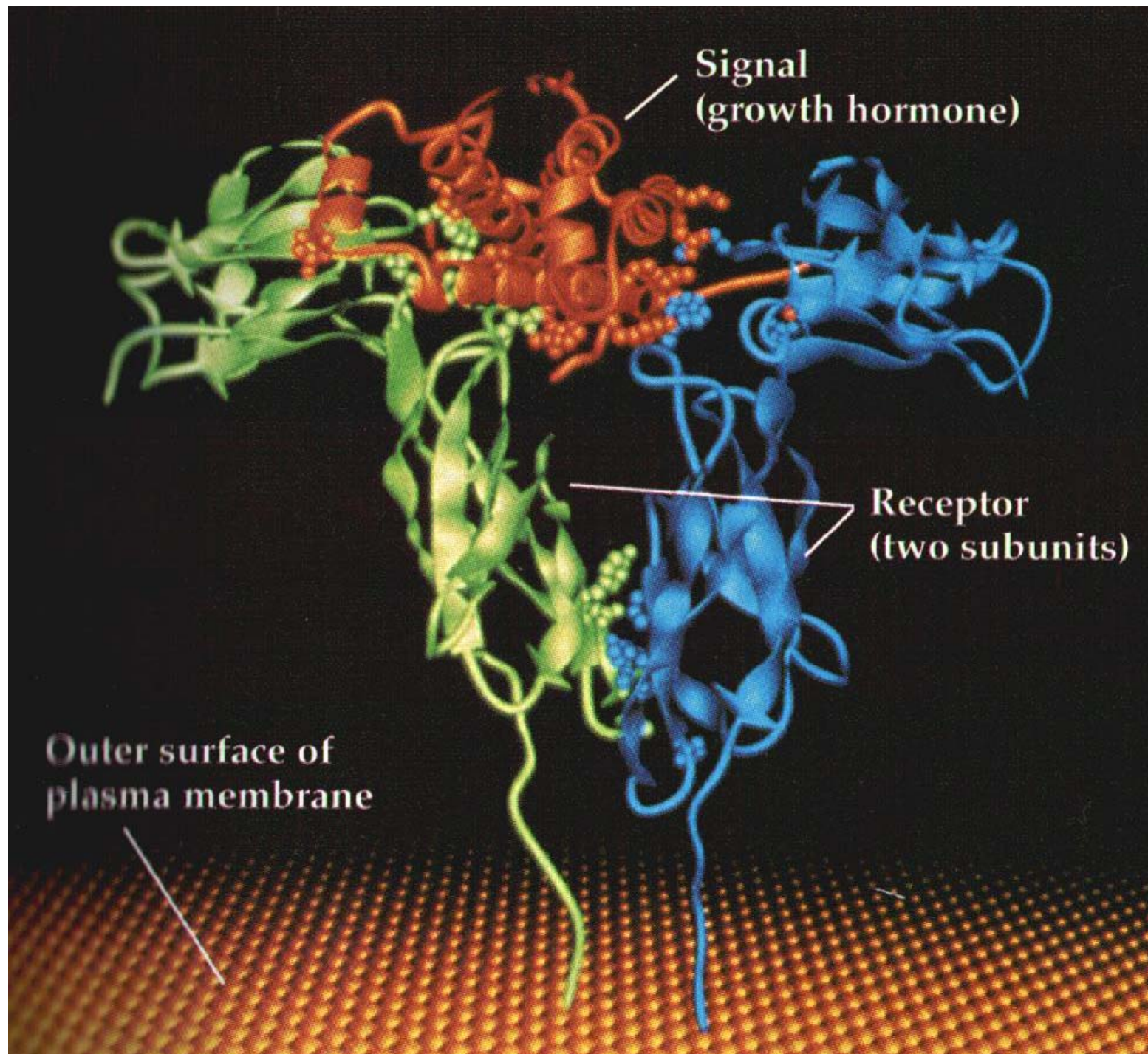
Dimerized receptor (activated)



Η αυξητική ορμόνη είναι μια μονομερής πρωτεΐνη 217 αα που σχηματίζει δομή συμπαγούς δέσμης 4 ελίκων

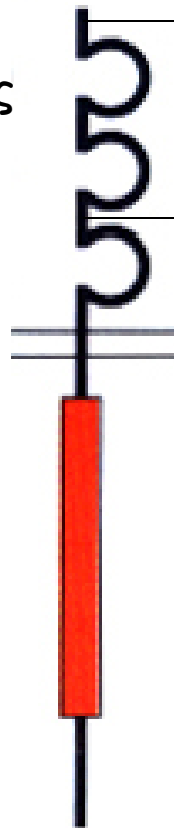








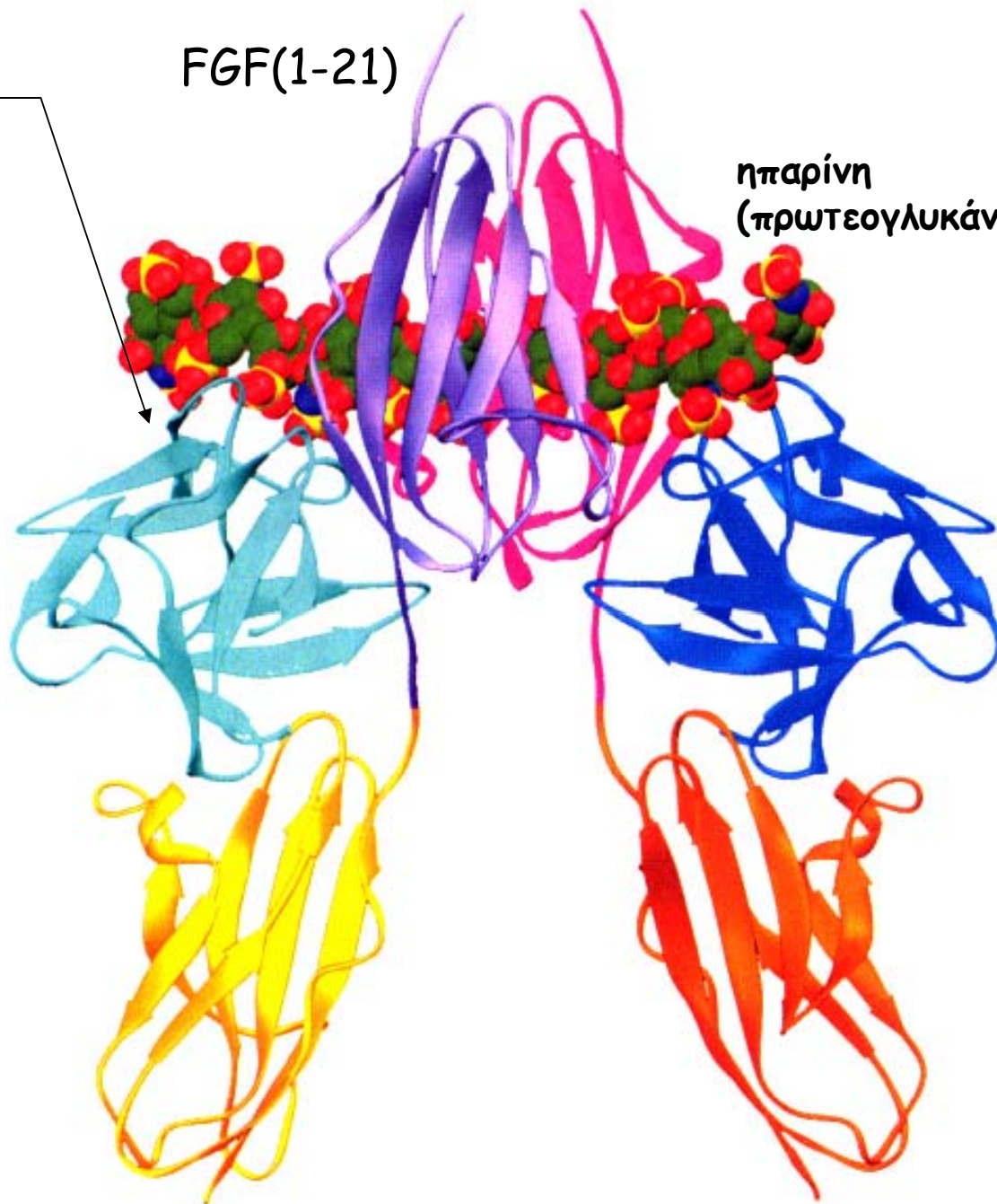
Περιοχές όμοιες  
των  
ανοσοσφαιρινών



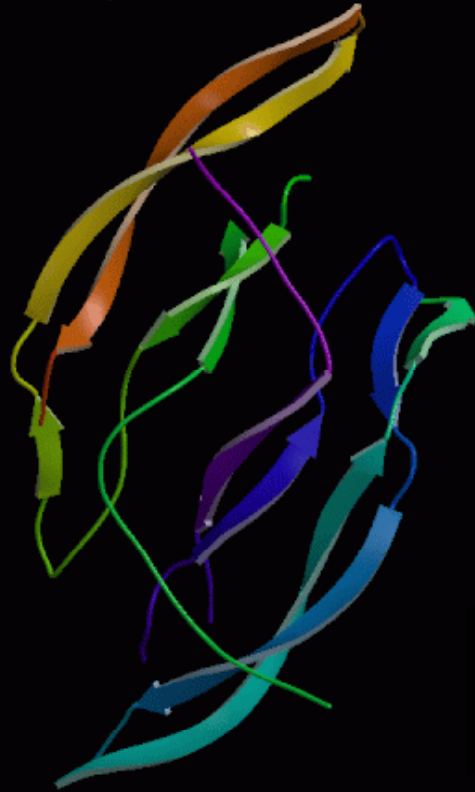
FGFR1  
FGFR2  
FGFR3  
FGFR4

FGF(1-21)

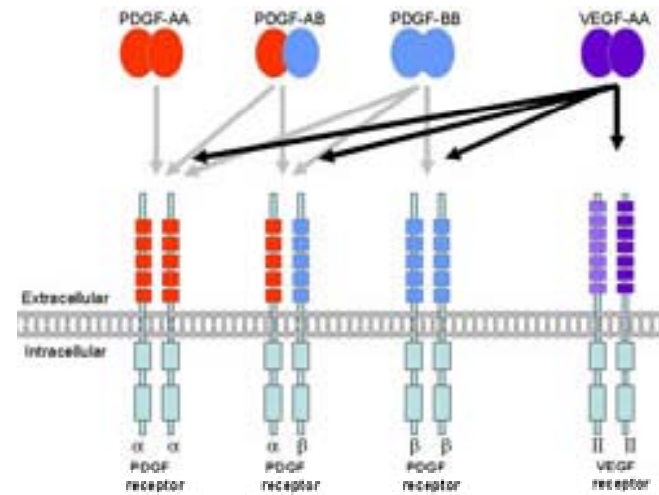
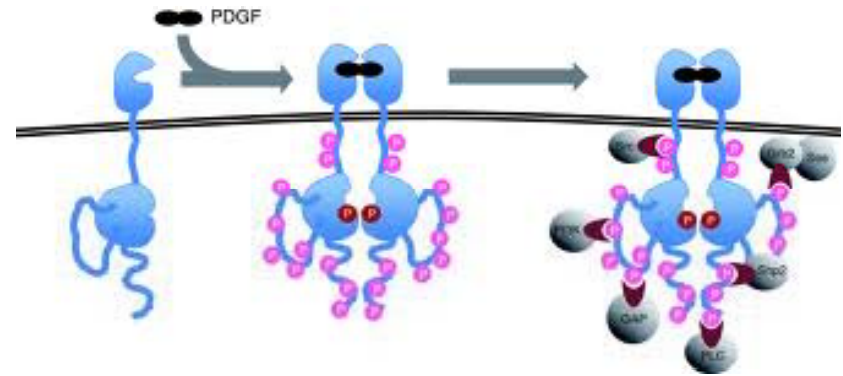
ηπαρίνη  
(πρωτεογλυκάνη)

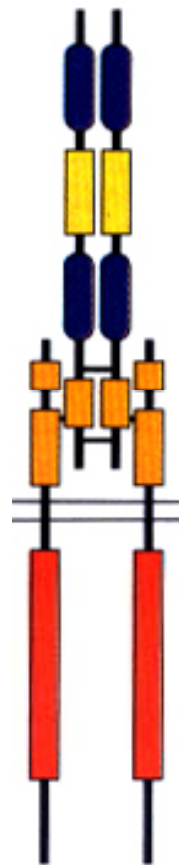


# Human PDGF (cystine knot dimerization domain)

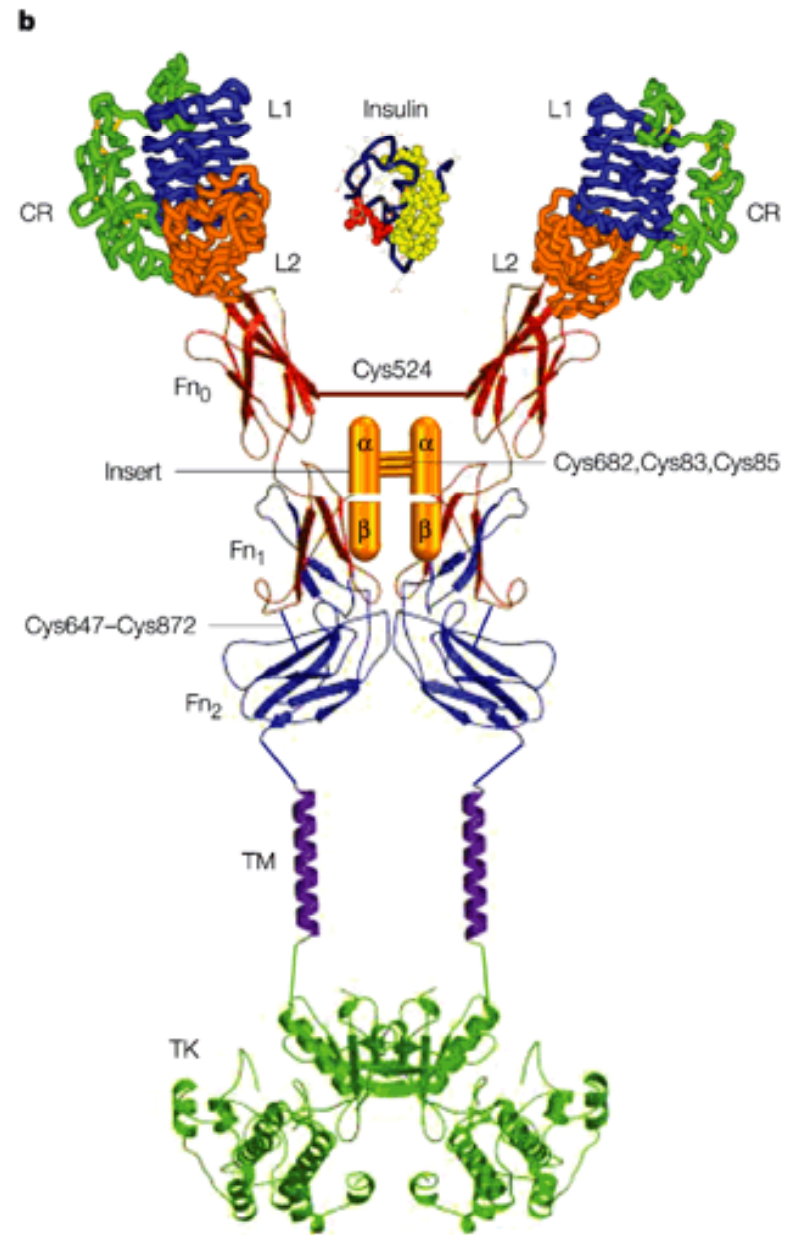
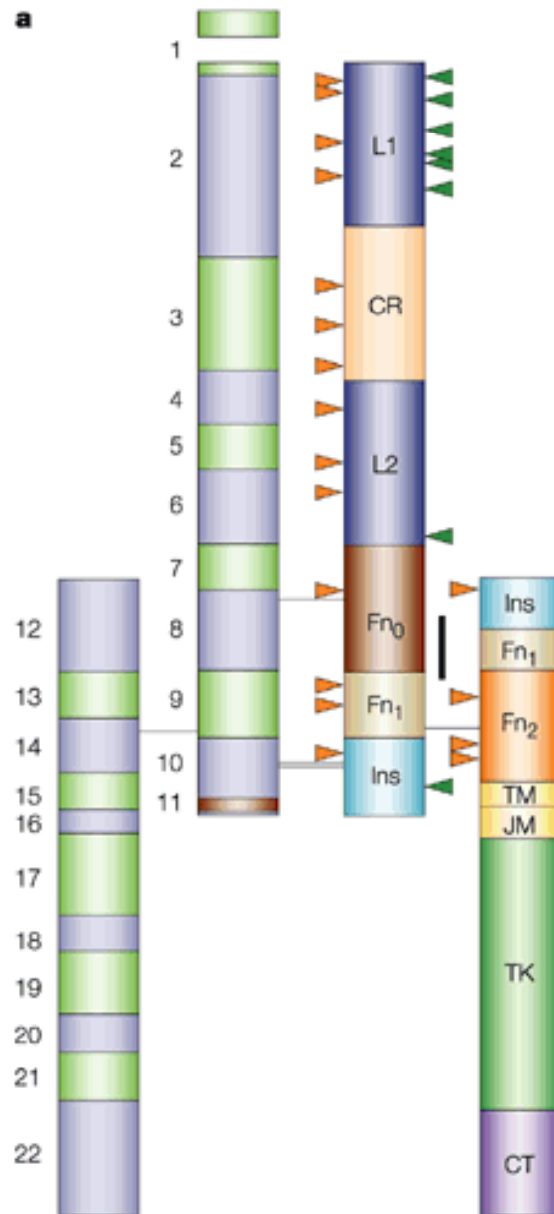


Web  
Cyto



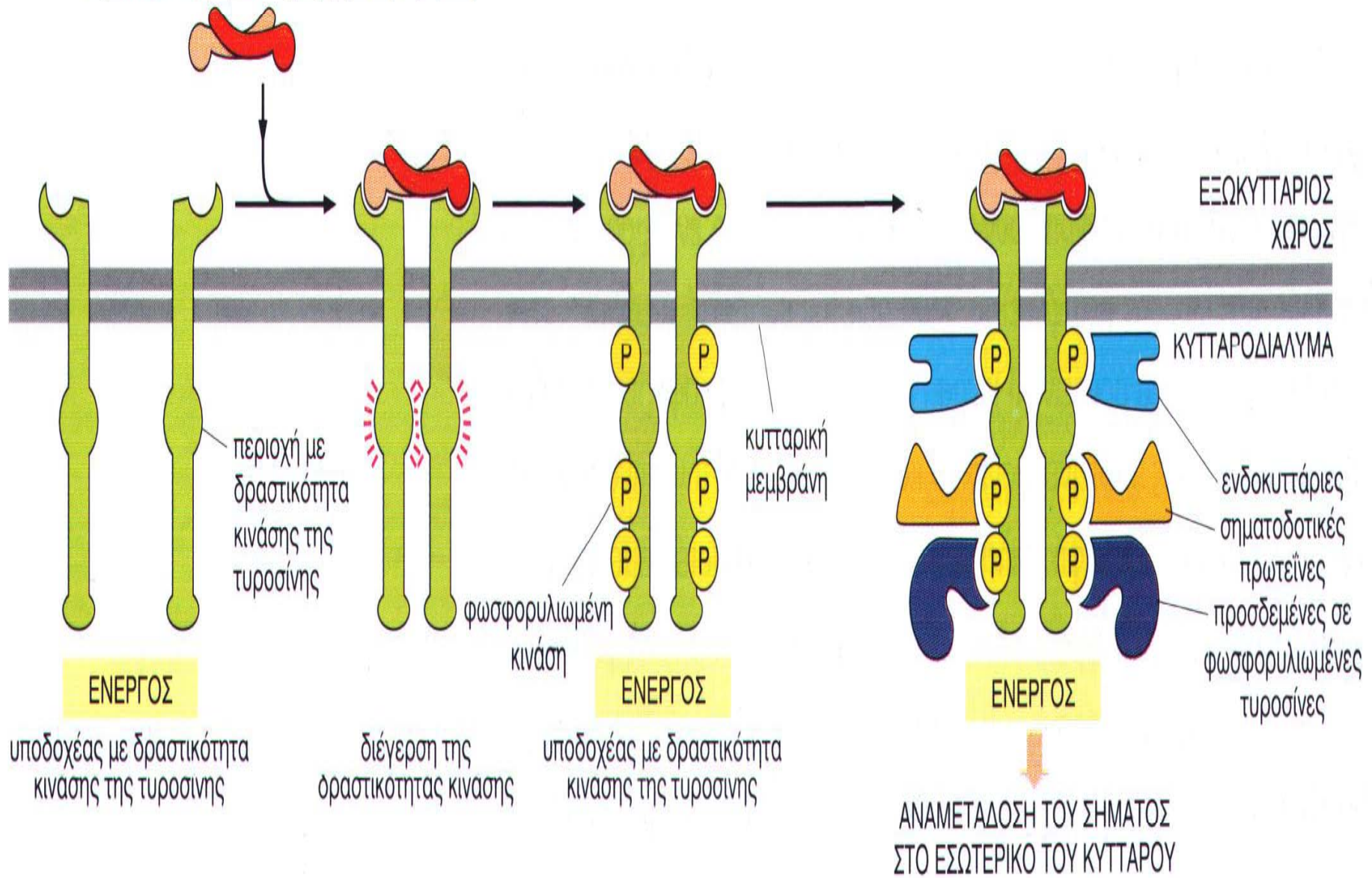


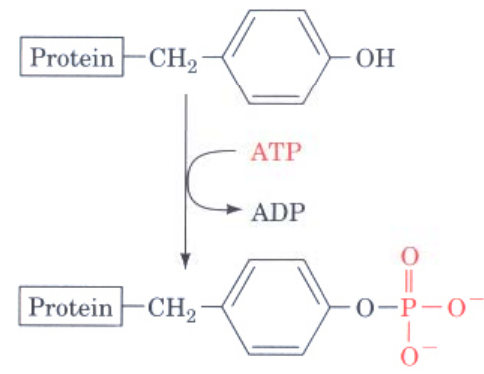
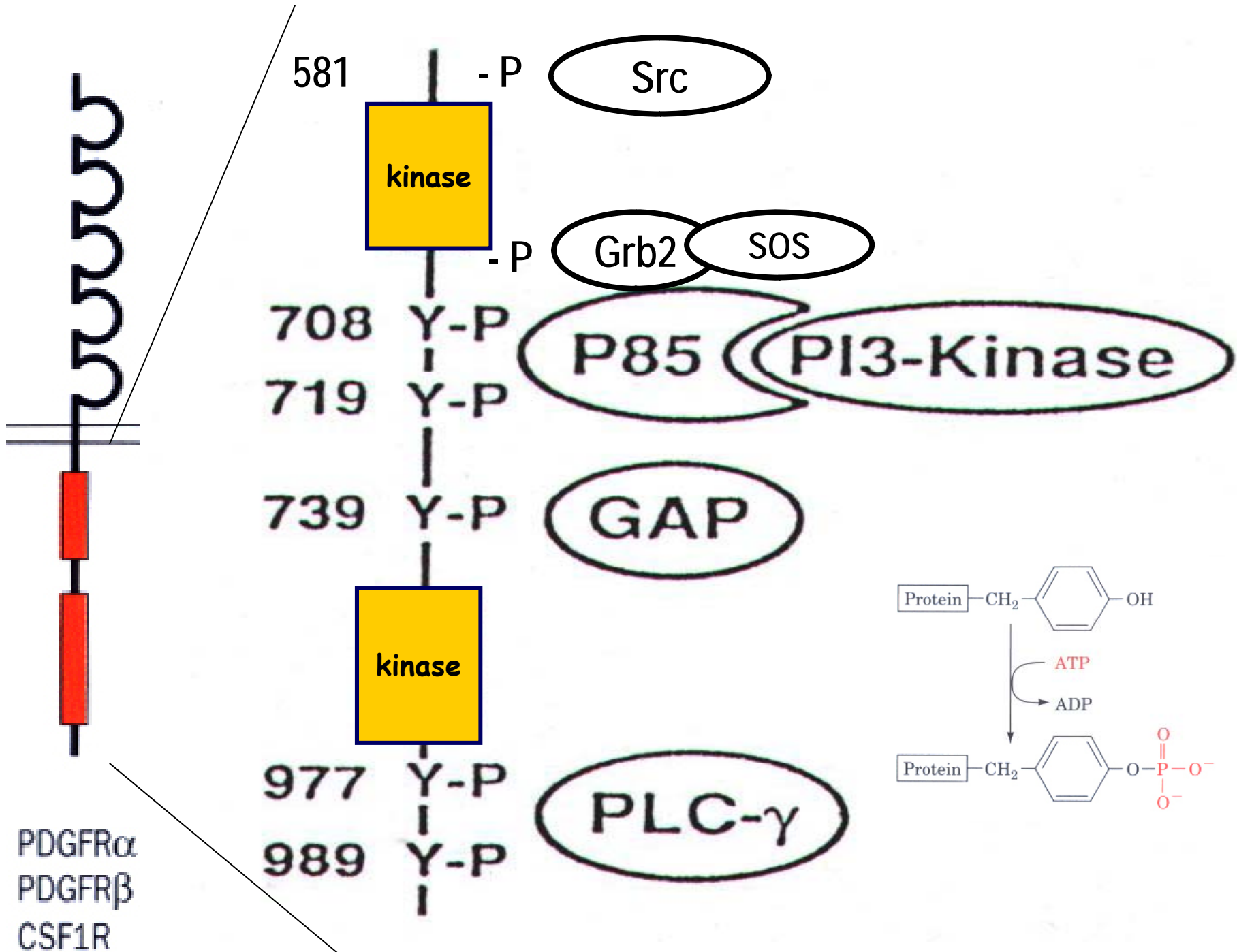
InsR  
IGF1R  
IRR

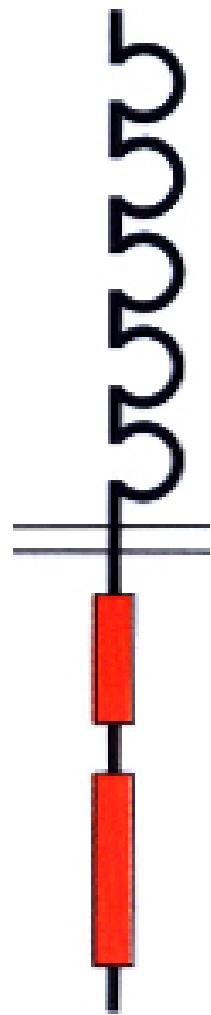




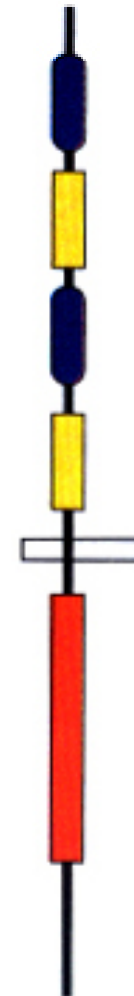
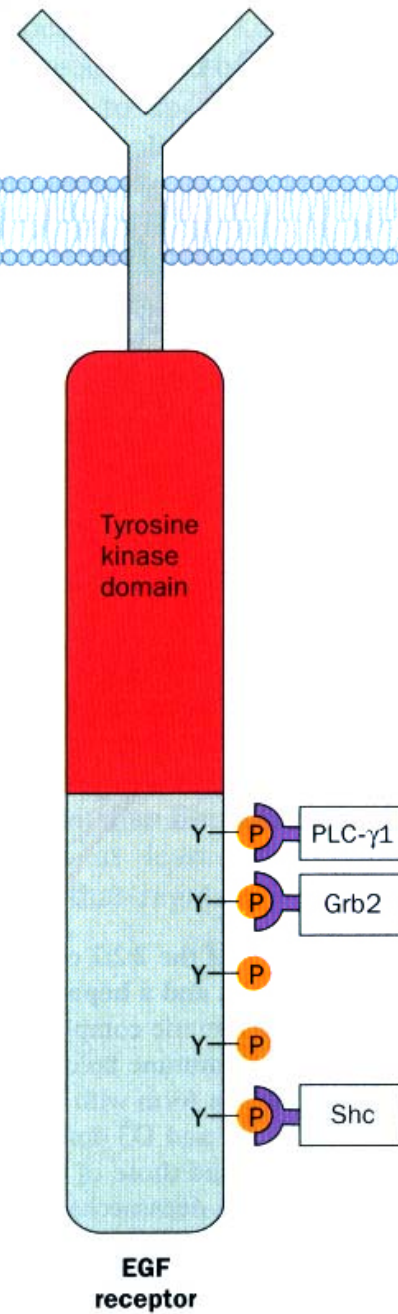
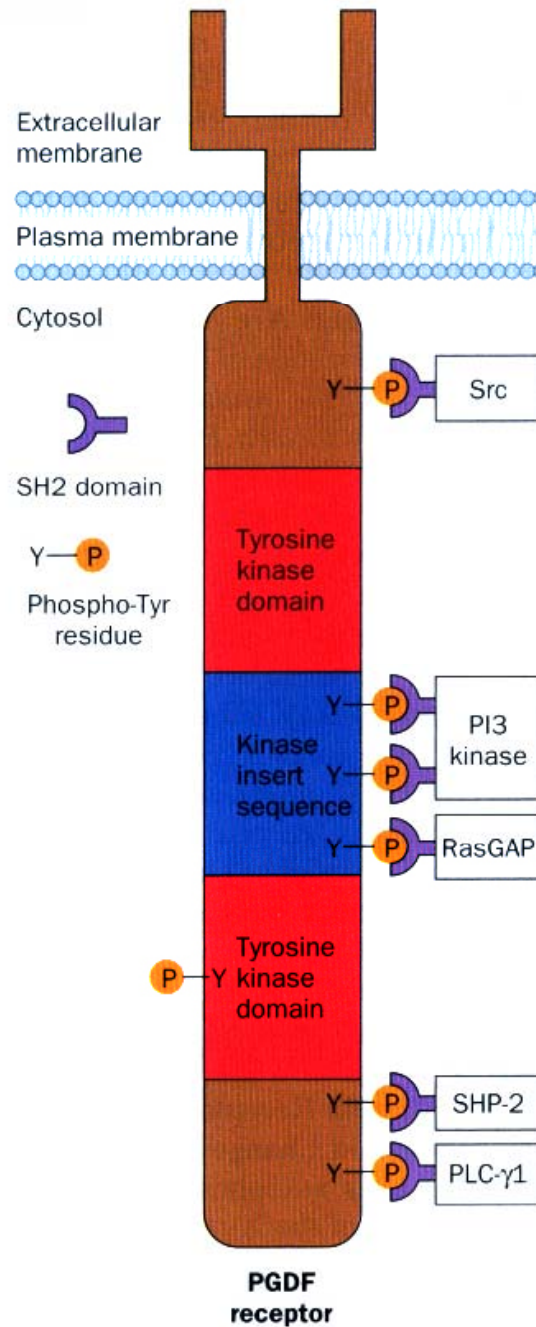
σηματοδοτικό μόριο στη μορφή ενός διμερούς





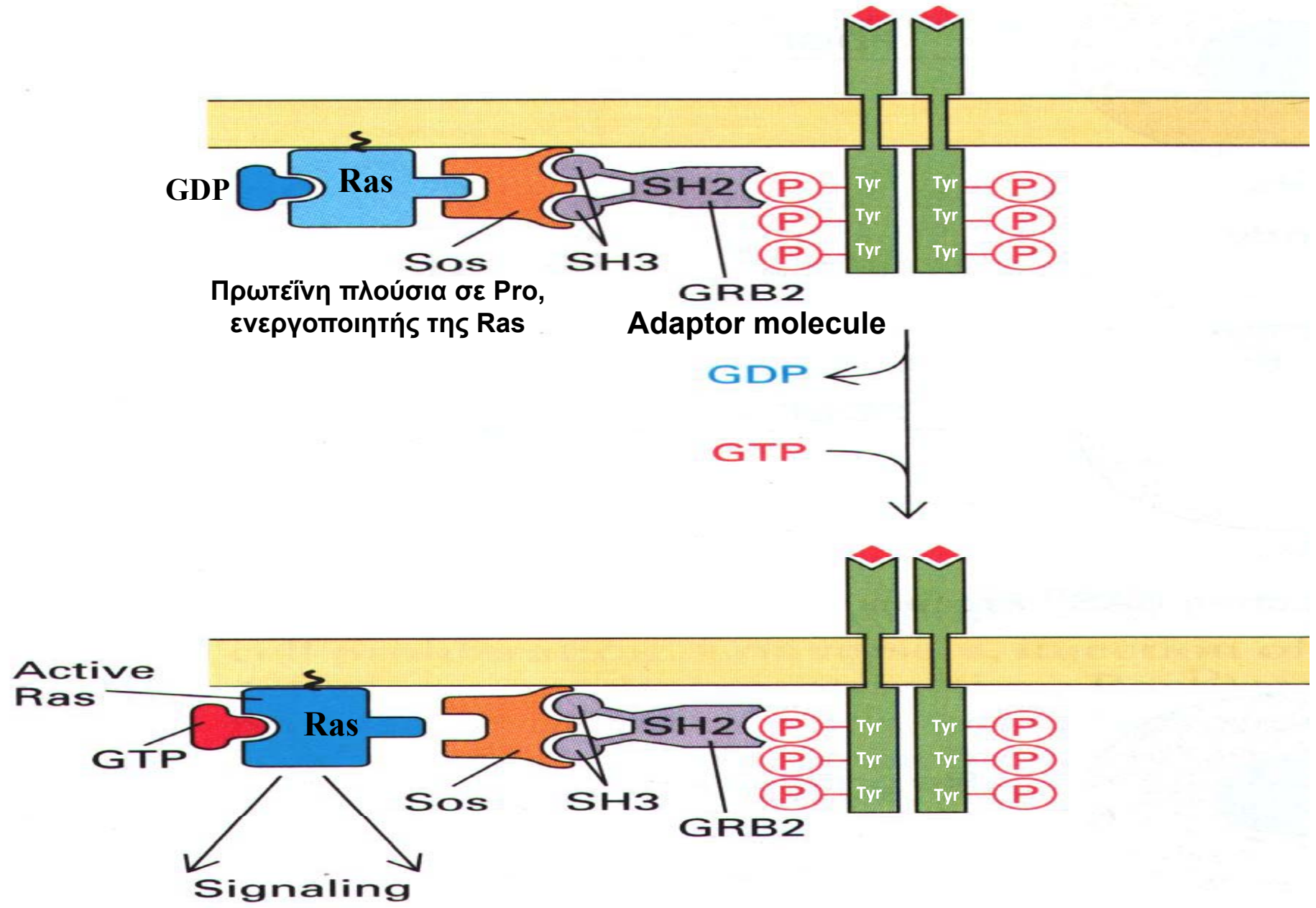


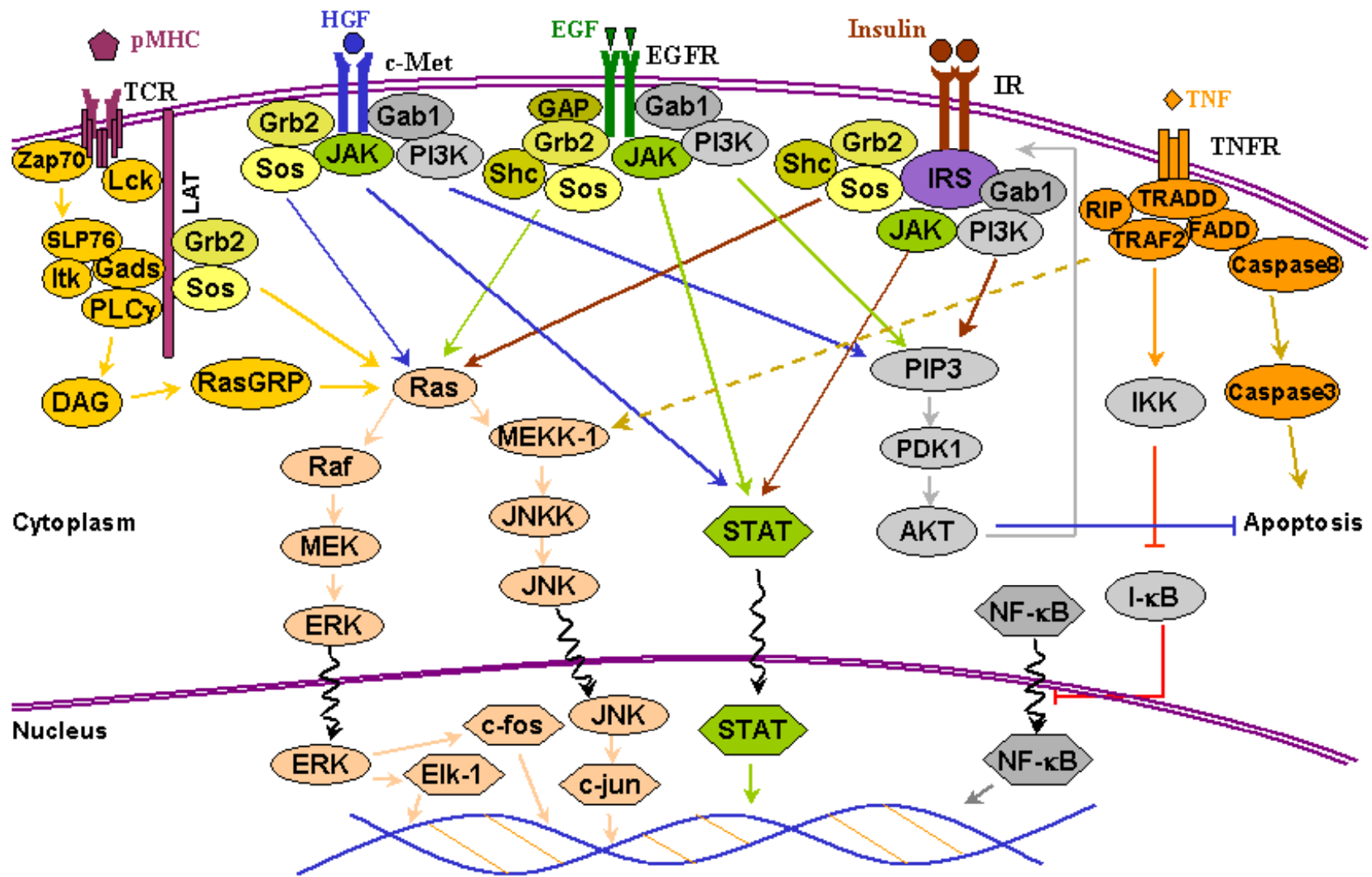
PDGFR $\alpha$   
 PDGFR $\beta$   
 CSF1R



EGFR  
 ErbB2  
 ErbB3  
 ErbB4





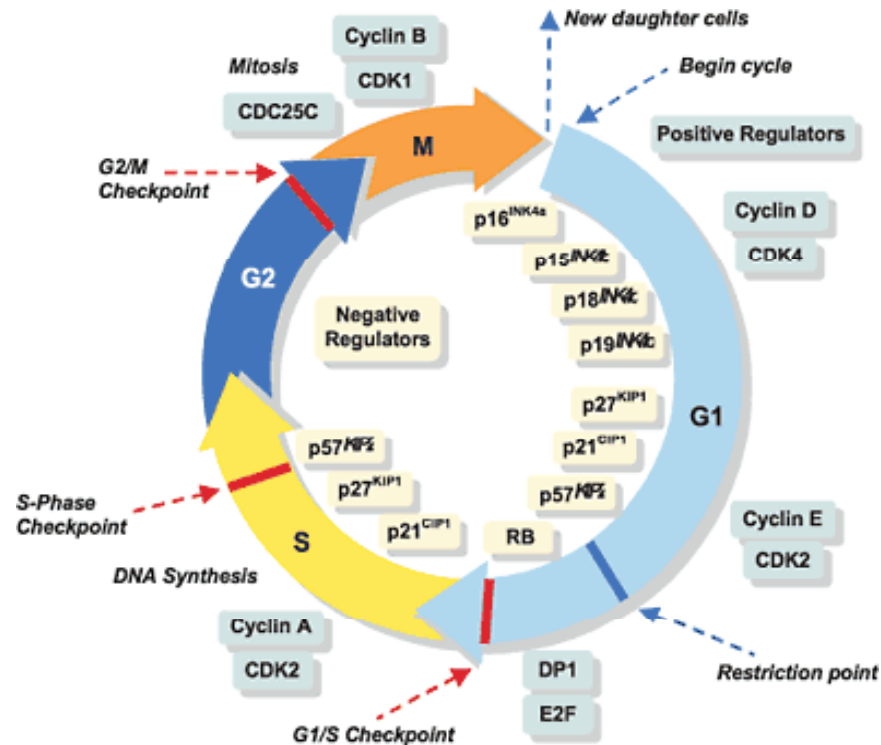


## Ρυθμιστές της Προόδου του Κυτταρικού Κύκλου

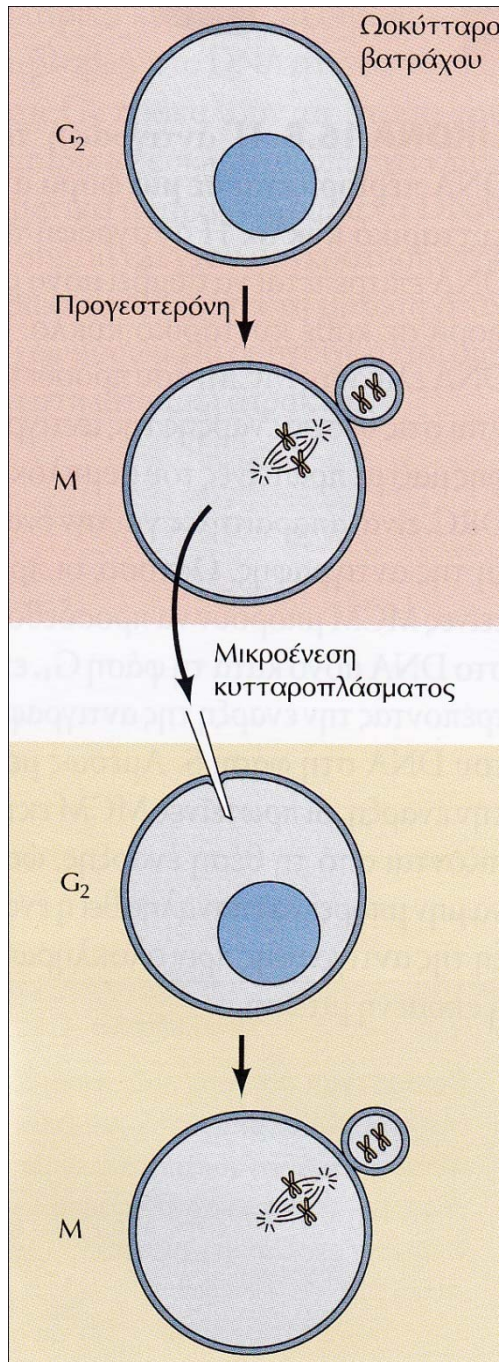
Οι γνώσεις μας για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου προέρχονται από την πειραματική ανάλυση οργανισμών τόσο ετερόκλητων, όπως είναι οι ζυμομύκητες, οι αχινοί, οι βάτραχοι και τα θηλαστικά.

Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από:

- Cyclins (A, B, E, D) εκφράζονται κυκλικά
- Cyclin-dependent protein kinases **CDK1 (CDC2) - CDK7** πάντοτε παρούσες
- Inhibitors of Cyclin-dependent protein kinases (CKIs)







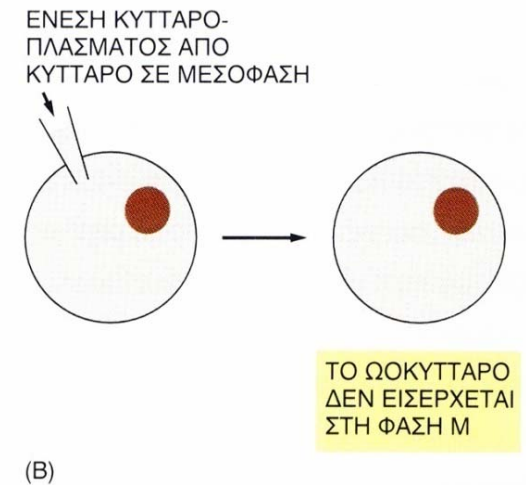
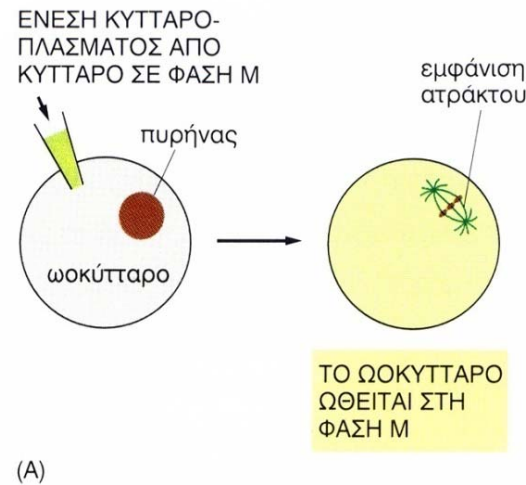
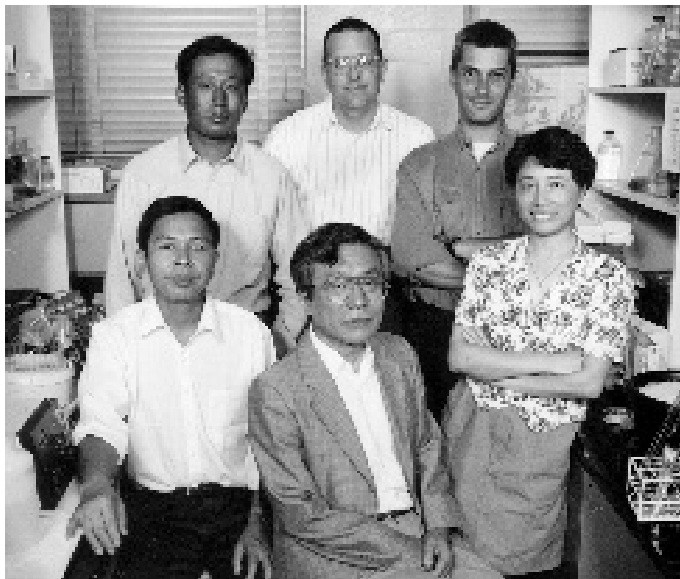
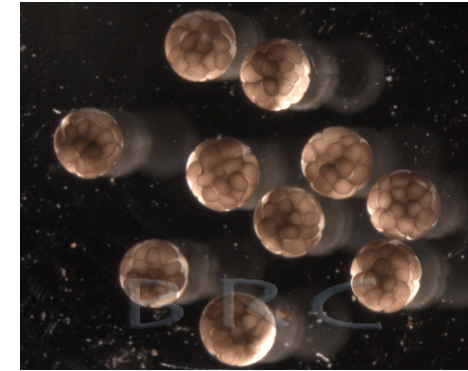
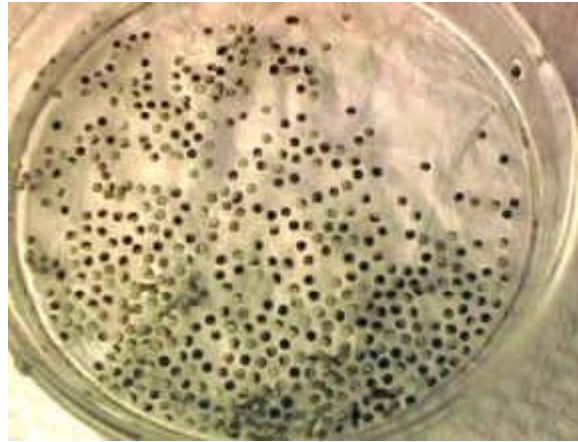
Τρεις διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις οδήγησαν στην ταυτοποίηση των ρυθμιστικών μορίων που κατευθύνουν τον κυτταρικό κύκλο.

**Η πρώτη προσέγγιση αφορούσε τη μελέτη ωοκυττάρων βατράχου.** Τα ωοκύτταρα αυτά παραμένουν σταματημένα στη φάση G<sub>2</sub> του κυτταρικού κύκλου μέχρι να πυροδοτηθεί, με ορμονική διέγερση, η είσοδός τους στη φάση M της μείωσης. Το 1971, δύο ομάδες ερευνητών (οι Yoshio Masui και Clement Markert και οι Dennis Smith και Robert Ecker) ανακάλυψαν, ανεξάρτητα η μία από την άλλη, ότι τα ωοκύτταρα που βρίσκονται σταματημένα στην G<sub>2</sub> μπορούσαν να διεγερθούν για να εισέλθουν στη φάση M με μικροένεση κυτταροπλάσματος από ωοκύτταρα που είχαν υποστεί ορμονική διέγερση. Ήταν λοιπόν προφανές ότι ένας παράγοντας από το κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων στα οποία είχε χορηγηθεί ορμόνη πυροδοτούσε τη μετάβαση από τη φάση G<sub>2</sub> στην M στα ωοκύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί σε ορμόνη. Επειδή η είσοδος των ωοκυττάρων στη μείωση αναφέρεται συχνά ως ωρίμανση του ωοκυττάρου, αυτός ο κυτταροπλασματικός παράγοντας ονομάστηκε παράγοντας προώθησης της ωρίμανσης (MPF, Maturation Promoting Factor).

Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η δράση του MPF δεν περιορίζεται στην είσοδο των ωοκυττάρων στη μείωση. Ο MPF βρίσκεται και στα σωματικά κύτταρα, όπου ευθύνεται για την επαγωγή της εισόδου στη φάση M του μιτωτικού κύκλου. Δηλαδή ο MPF δρα ως γενικός ρυθμιστής της μετάβασης από την G<sub>2</sub> στην M και η δράση του δεν περιορίζεται αποκλειστικά στα ωοκύτταρα.

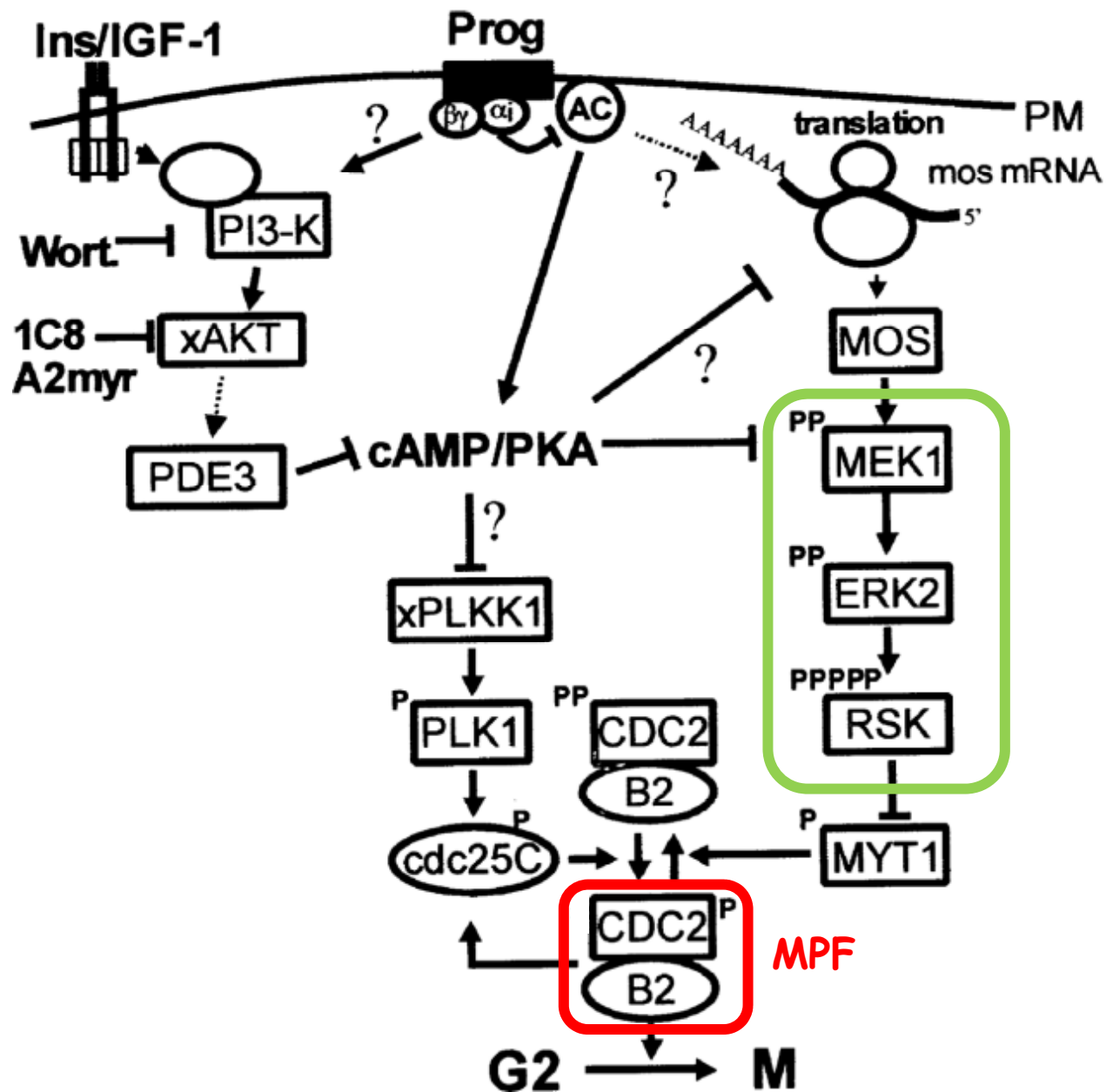


*Xenopus laevis*



Το 1971, ο Yoshio Masui ένεσε κυτταρόπλασμα ωκυττάρων σε μίτωση σε ωκύτταρα φάσης G2, και το 1988 απομόνωσε τον MPF

## Signal Transduction Pathways Regulated by Progesterone in Meiosis



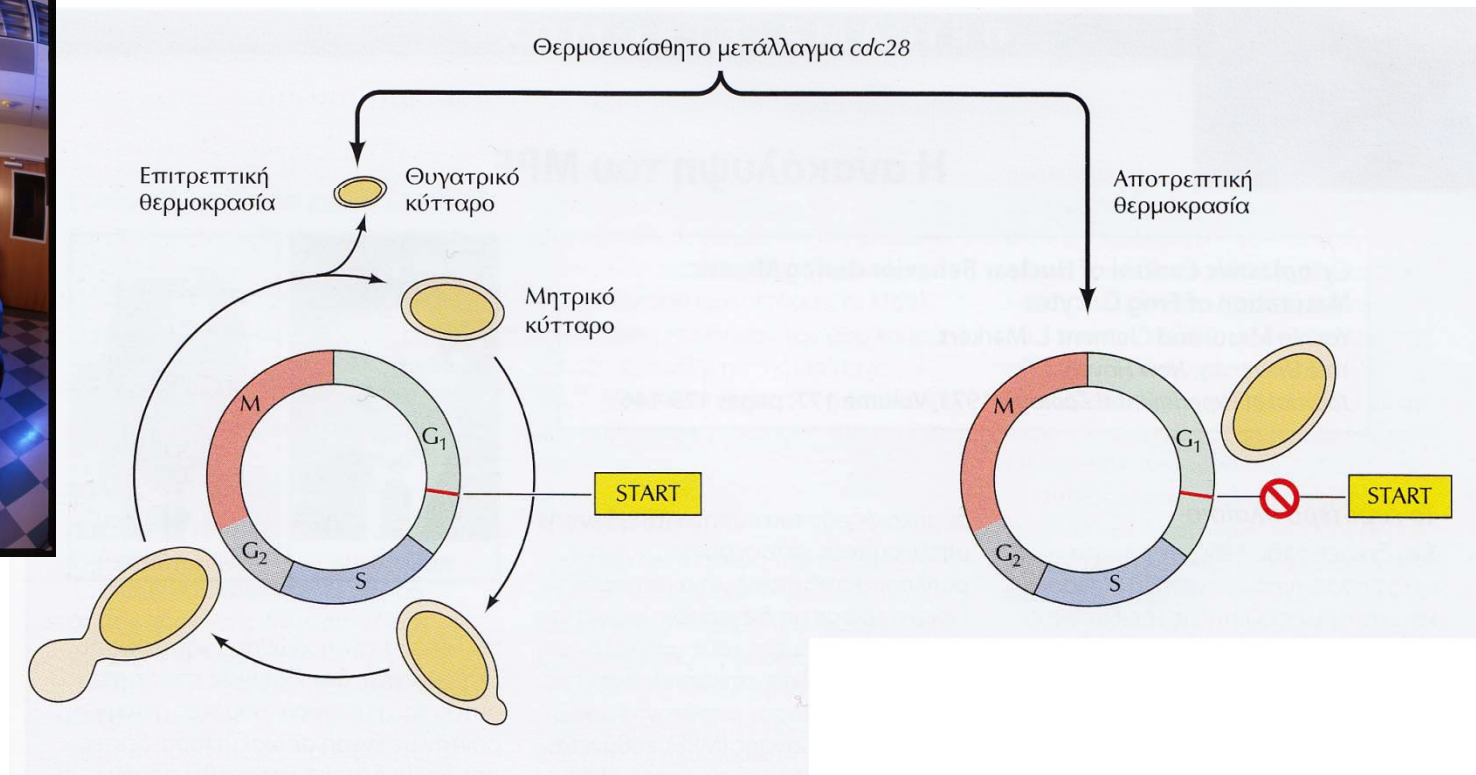


Η δεύτερη προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την κατανόηση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου αφορούσε τη γενετική ανάλυση ζυμομυκήτων, με πρωτοπόρους τον Lee Hartwell και τους συνεργάτες του στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Μελετώντας τον αναπαραγόμενο με εκβλάστηση *Saccharomyces cerevisiae*, ταυτοποίησε θερμοευαίσθητα μεταλλάγματα που παρουσίαζαν ελαττωματική πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των μεταλλαγμάτων ήταν ότι η ανάπτυξή τους σταματούσε σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου και γι' αυτό ονομάστηκαν μεταλλάγματα *cdc* (cell division cycle mutants: μεταλλάγματα του κύκλου της κυτταρικής διαίρεσης).

Για παράδειγμα, σε ένα ιδιαίτερα σημαντικό μετάλλαγμα, το οποίο ονομάστηκε *cdc28*, ο κυτταρικός κύκλος σταματούσε στο σημείο START, υποδεικνύοντας ότι η **πρωτεΐνη Cdc28 ήταν απαραίτητη για τη διέλευση από το καθοριστικό αυτό ρυθμιστικό σημείο της G<sub>1</sub>**.

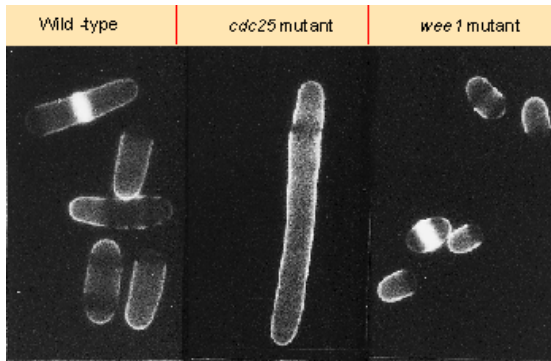


Lee Hartwell (1939-)  
Nobel 2001





Paul Nurse (1949-)  
Nobel 2001

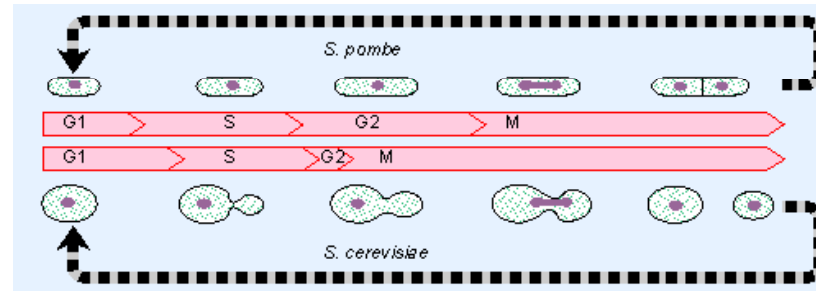


*S. pombe* cells are stained with calcofluor to identify the cell wall (surrounding the yeast cell) and the septum (which forms a central division when a cell is dividing). Wild-type cells double in length and then divide in half, but *cdc* mutants grow much longer, and *wee* mutants divide at a much smaller size.

Μια ομάδα παρόμοιων μεταλλάξεων του κυτταρικού κύκλου απομονώθηκε από τον Paul Nurse και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελετούσαν τον αναπαραγόμενο με διχοτόμηση μύκητα

*Schizosaccharomyces pombe*.

Στα μεταλλάγματα αυτά περιλαμβάνονταν το *cdc25*. Στα κύτταρα με τη μετάλλαξη *cdc25*, ο κυτταρικός κύκλος σταματούσε τόσο στην  $G_1$  όσο και στο σημείο μετάβασης από τη  $G_2$  στην  $M$ , το οποίο είναι το κύριο ρυθμιστικό σημείο στους ζυμομύκητες που αναπαράγονται με διχοτόμηση.



Συγκρίνοντας το γονίδιο *cdc28* του *S. Cerevisiae* με το *cdc25* του *S. pombe*, βρέθηκε ότι είναι λειτουργικά ομόλογα γονίδια, απαραίτητα τόσο για τη διέλευση από το START όσο και για την είσοδο στη μίτωση και στα δύο είδη ζυμομύκητα. Περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι τα ***cdc25* και *cdc28* κωδικοποιούν μια πρωτεϊνική κινάση**, γεγονός που αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη για τον κύριο ρόλο της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Επιπλέον, συγγενικά γονίδια ταυτοποιήθηκαν και σε άλλους ευκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Η πρωτεϊνική κινάση που κωδικοποιείται από τα γονίδια *cdc25* και *cdc28* είναι ένας ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου συντηρημένος σε όλους τους ευκαρυώτες, ο οποίος είναι γνωστός ως κινάση **Cdk1**.

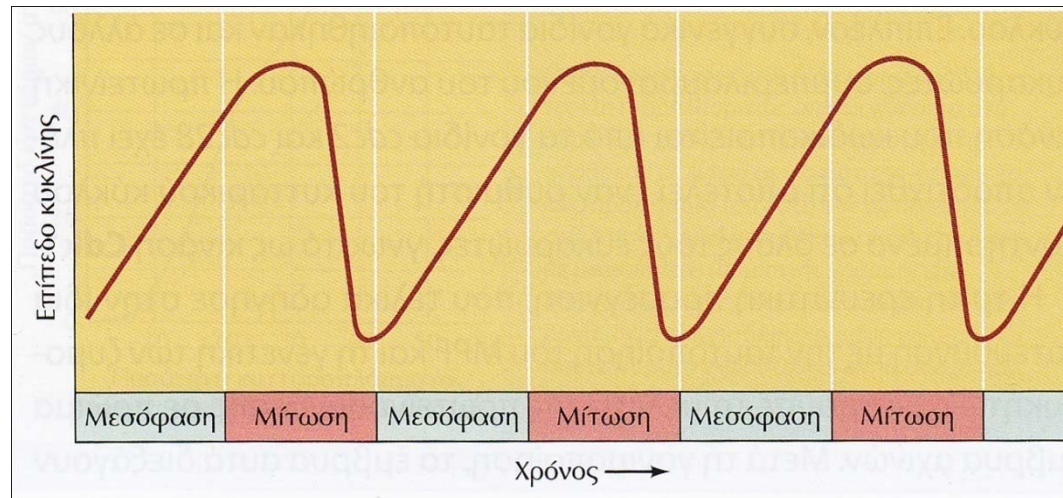
## Η τρίτη ερευνητική προσέγγιση που τελικά συνέκλιε με την ταυτοποίηση του MPF και τη γενετική των ζυμομυκήτων αφορούσε τη μελέτη της πρωτεϊνοσύνθεσης σε πρώιμα έμβρυα αχινών

Μετά τη γονιμοποίηση, τα έμβρυα αυτά διεξάγουν μια σειρά γρήγορων κυτταρικών διαιρέσεων. Η χρήση καταστολέων της πρωτεϊνοσύνθεσης αποκάλυψε το αξιοπερίεργο γεγονός ότι για την είσοδο στη φάση Μ αυτών των εμβρυϊκών κυτταρικών κύκλων είναι απαραίτητη η πρωτεϊνοσύνθεση.

Το 1983, ο Tim Hunt και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν δύο πρωτεΐνες που εμφάνιζαν ένα περιοδικό πρότυπο συσσώρευσης και αποικοδόμησης σε έμβρυα αχινών και στρειδιών. Αυτές οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της μεσόφασης και στη συνέχεια αποικοδομούνται ταχύτατα προς το τέλος κάθε μίτωσης. Ο Hunt ονόμασε τις πρωτεΐνες αυτού του τύπου **κυκλίνες (cyclins)**, και πιο συγκεκριμένα κυκλίνη Α και κυκλίνη Β. Διατύπωσε μάλιστα την υπόθεση ότι οι κυκλίνες λειτουργούν ως επαγωγείς της μίτωσης και ότι η περιοδική τους συσσώρευση και αποικοδόμηση ρυθμίζουν την είσοδο και την έξοδο από τη φάση Μ.



Tim Hunt (1943- )  
Nobel 2001



Η υπόθεσή του αυτή υποστηρίχτηκε άμεσα από την έρευνα της Joan Ruderman και των συνεργατών της το 1986, όταν παρατήρησαν ότι μια μικροένωση κυκλίνης Α σε ωκύτταρα βατράχου είναι επαρκής για να πυροδοτήσει τη μετάβαση από την  $G_2$  στην Μ.



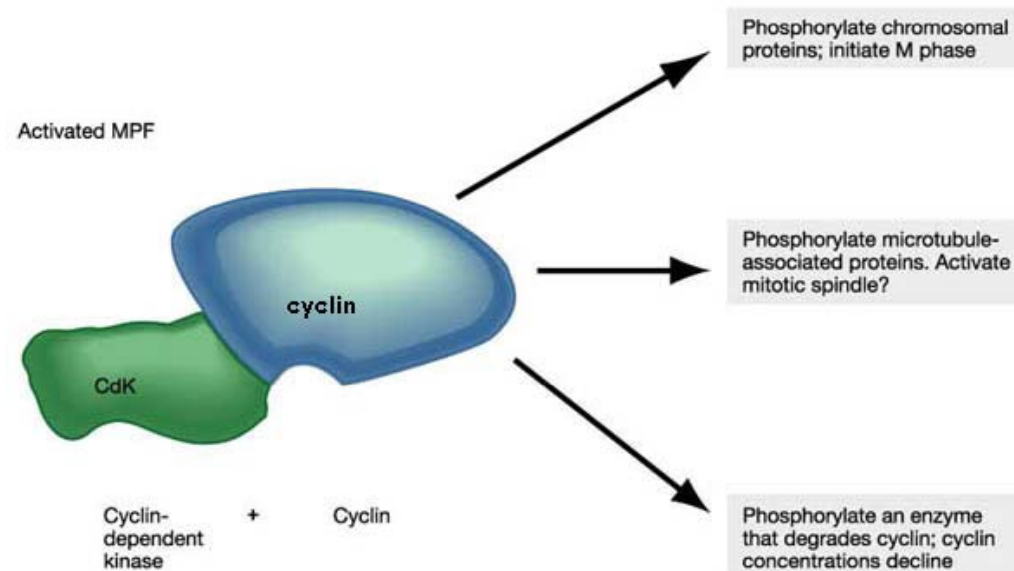


Αυτές οι τρεις ανεξάρτητες προσεγγίσεις οδηγήθηκαν σε σύγκλιση το 1988, όταν στο εργαστήριο του James Maller απομονώθηκε ο MPF από wάρια βατράχου.

Στη συνέχεια, με το μοριακό χαρακτηρισμό του MPF σε διάφορα εργαστήρια αποκαλύφθηκε ότι ο συντηρημένος αυτός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου αποτελείται από δύο υπομονάδες: τη **Cdk1** και την **κυκλίνη B**.

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

Activated cyclin-dependent kinase has an array of effects.



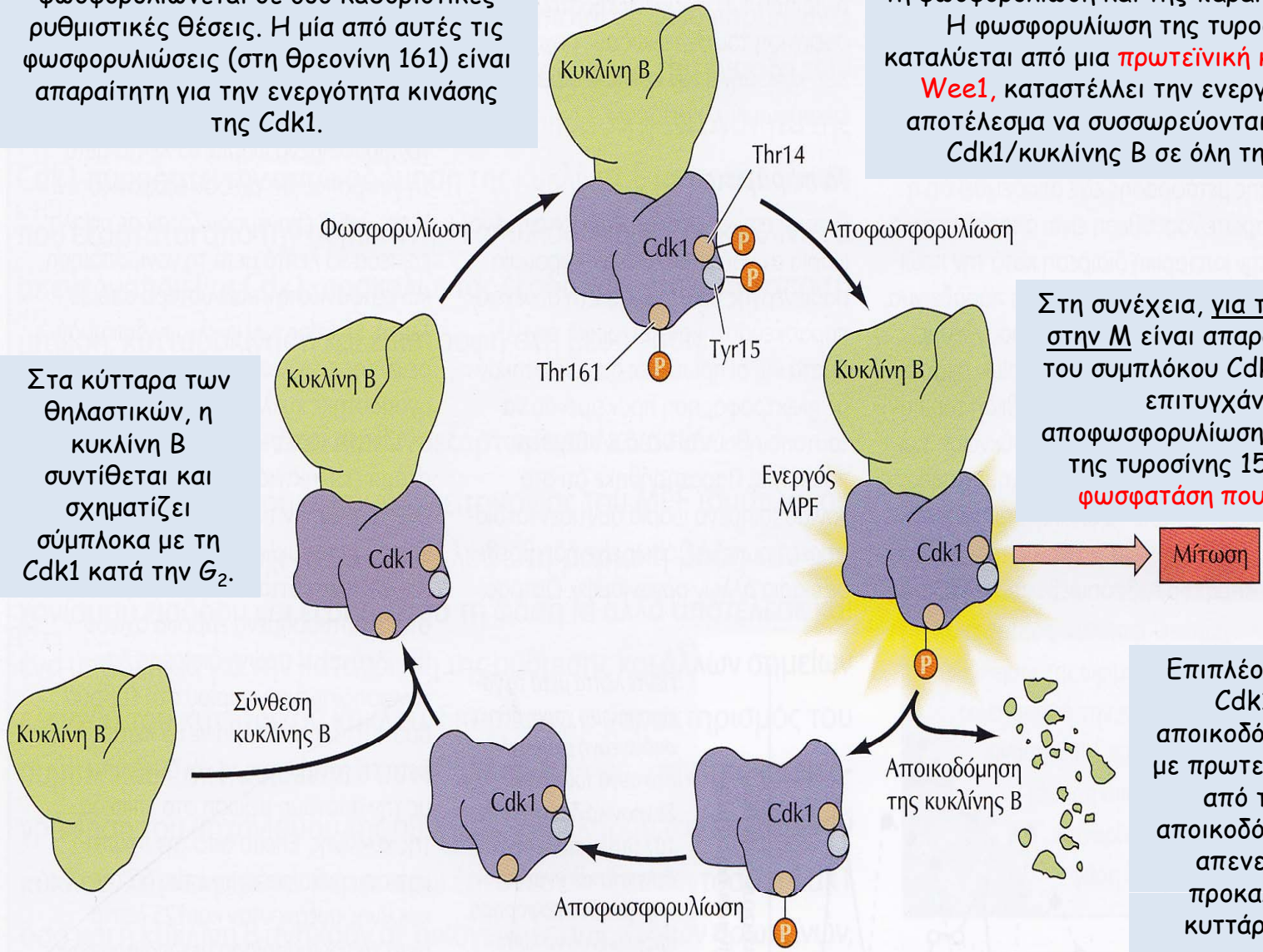
Καθώς σχηματίζονται τα σύμπλοκα, η Cdk1 φωσφορυλιώνεται σε δύο καθοριστικές ρυθμιστικές θέσεις. Η μία από αυτές τις φωσφορυλιώσεις (στη θρεονίνη 161) είναι απαραίτητη για την ενεργότητα κινάσης της Cdk1.

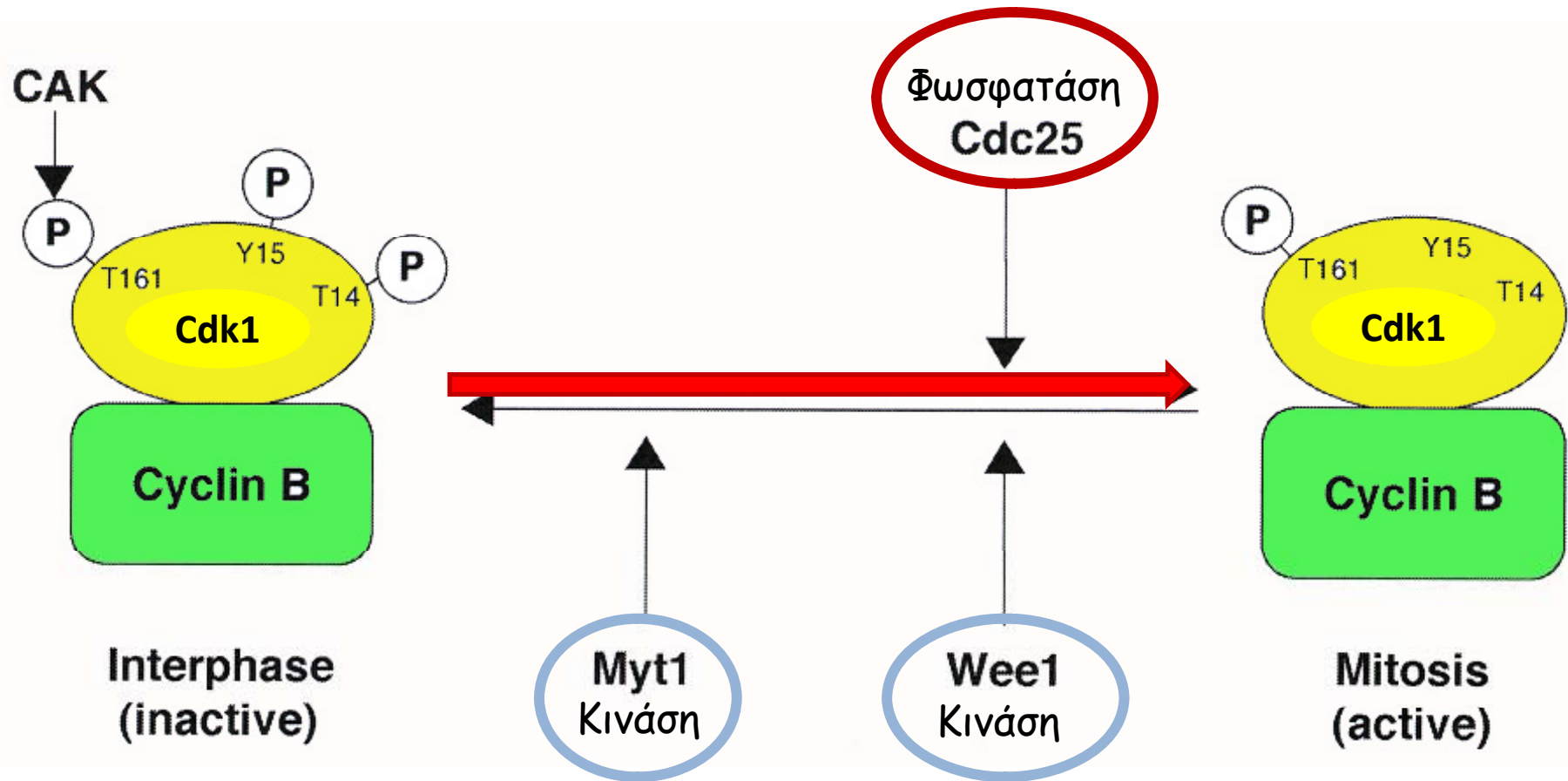
Η δεύτερη φωσφορυλίωση γίνεται στην τυροσίνη 15, και στα κύτταρα των σπονδυλωτών συνοδεύεται από τη φωσφορυλίωση και της παρακείμενης θρεονίνης 14. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης 15, η οποία καταλύεται από μια πρωτεϊνική κινάση που ονομάζεται **Wee1**, καταστέλλει την ενεργότητα της Cdk1, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται ανενεργά σύμπλοκα Cdk1/κυκλίνης B σε όλη τη διάρκεια της G<sub>2</sub>.

Στα κύτταρα των θηλαστικών, η κυκλίνη B συντίθεται και σχηματίζει σύμπλοκα με τη Cdk1 κατά την G<sub>2</sub>.

Στη συνέχεια, για τη μετάβαση από την G<sub>2</sub> στην M είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της αποφωσφορυλίωσης της θρεονίνης 14 και της τυροσίνης 15 από μια πρωτεϊνική φωσφατάση που ονομάζεται **Cdc25**.

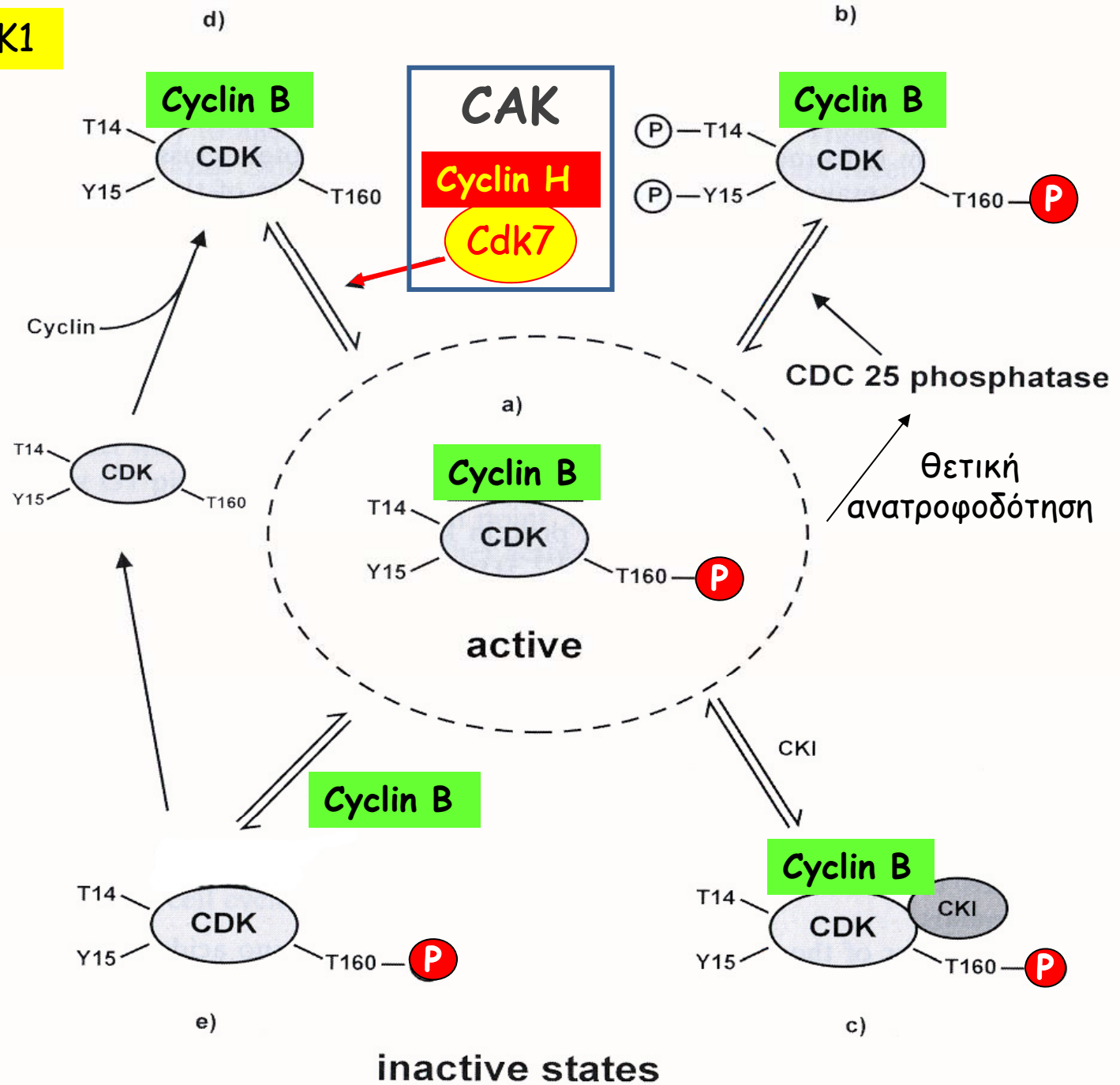
Επιπλέον, η ενεργότητα της Cdk1 πυροδοτεί την αποικοδόμηση της κυκλίνης B με πρωτεόλυση που εξαρτάται από την ουβικιτίνη. Η αποικοδόμηση της κυκλίνης B απενεργοποιεί τη Cdk1 προκαλώντας έξοδο του κυττάρου από τη μίτωση, κυτταροκίνηση και επιστροφή στη μεσόφαση



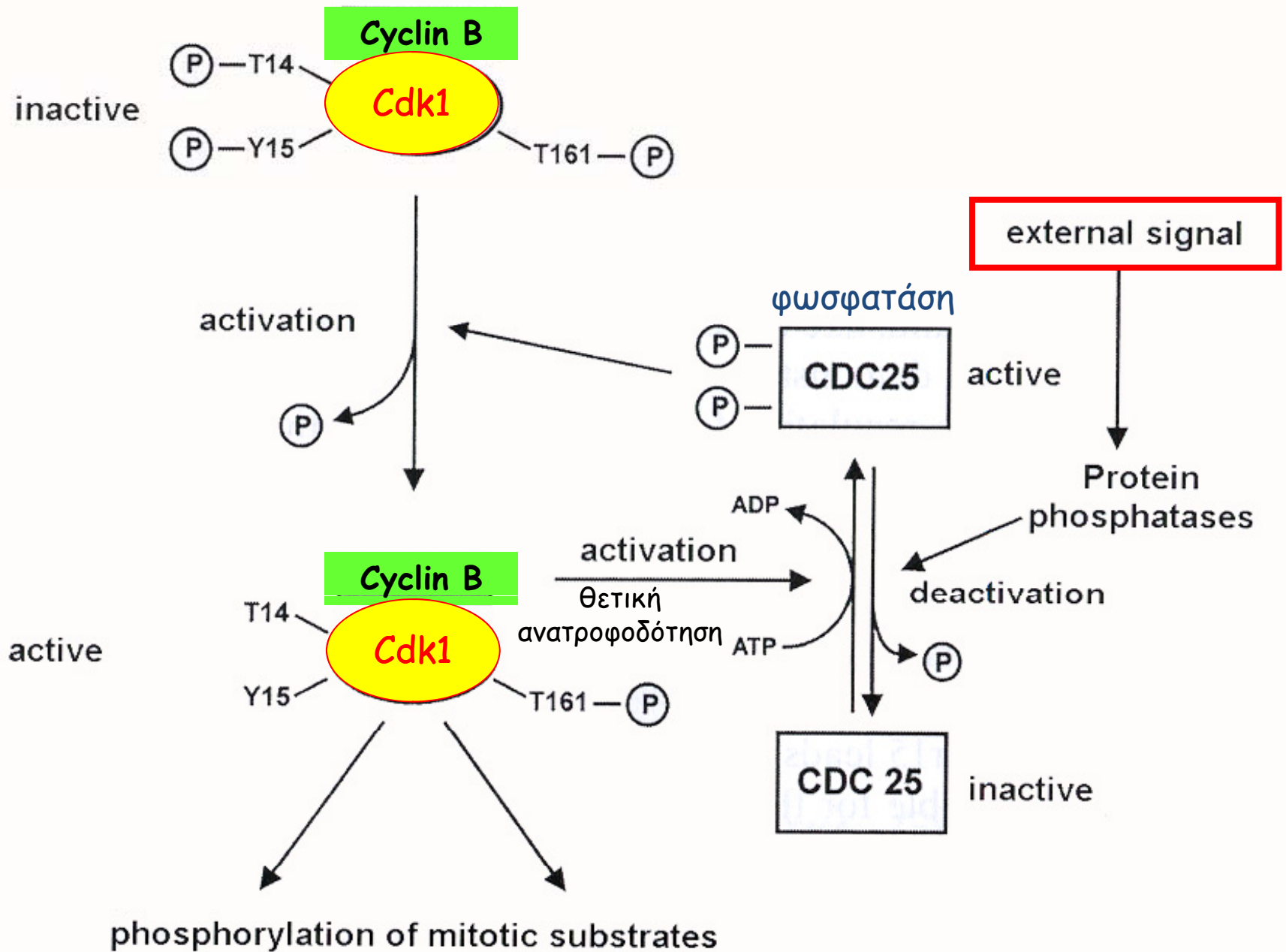




# Cyclin B- CDK1



# Η δράση και η ρύθμιση της φωσφατάσης CDC25



Η **Cdk1** ελέγχει τη διέλευση από το σημείο START, καθώς και την είσοδο στη μίτωση στους ζυμομύκητες

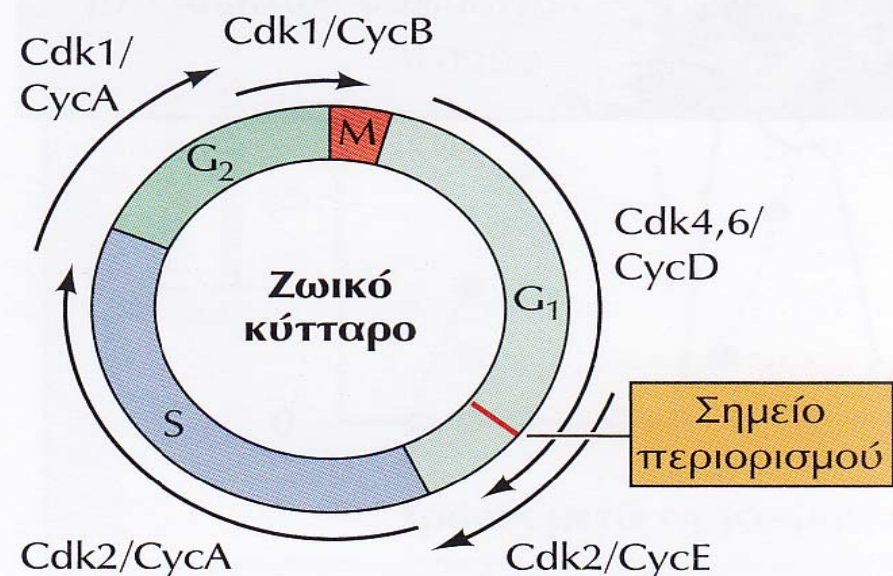
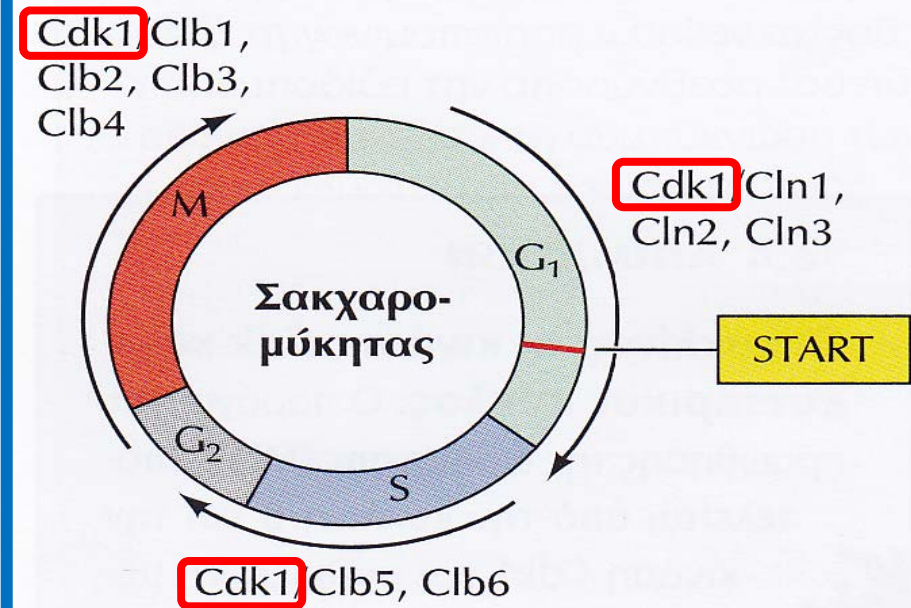
Για τον έλεγχο στα δύο αυτά σημεία η Cdk1 συνδέεται με διαφορετικές κυκλίνες:

- Η διέλευση από το σημείο **START** ελέγχεται από την Cdk1 σε συνδυασμό με μια κατηγορία κυκλινών, οι οποίες ονομάζονται **κυκλίνες της G<sub>1</sub>** ή **Cln** (Cln, Cyclins): Cln1, 2, 3.

- Η διέλευση από τη φάση **S** ελέγχεται από την Cdk1 σε συνδυασμό με κυκλίνες τύπου B: τις Clb5 και Clb6.

- Η μετάβαση από την **G<sub>2</sub>** στην **M** ελέγχεται από την Cdk1 σε σύμπλοκο με τις μιτωτικές κυκλίνες τύπου B: Clb1, Clb2, Clb3 και Clb4.

Η σύνδεση της Cdk1 με κυκλίνες τύπου B ή με κυκλίνες της G<sub>1</sub> καθορίζει ποιες πρωτεΐνες-υποστρώματα θα φωσφορυλιώσει η Cdk1.





Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο κυτταρικός κύκλος δε ρυθμίζεται μόνο από τις διάφορες κυκλίνες αλλά και από μια ποικιλία πρωτεϊνικών κινάσων που σχετίζονται με τη Cdk1, οι οποίες είναι γνωστές ως **κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cdk, Cyclin-dependent kinases)**

Τα μέλη της οικογένειας των Cdk συνδέονται με συγκεκριμένες κυκλίνες και δημιουργούν σύμπλοκα απαραίτητα για την προώθηση κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου:

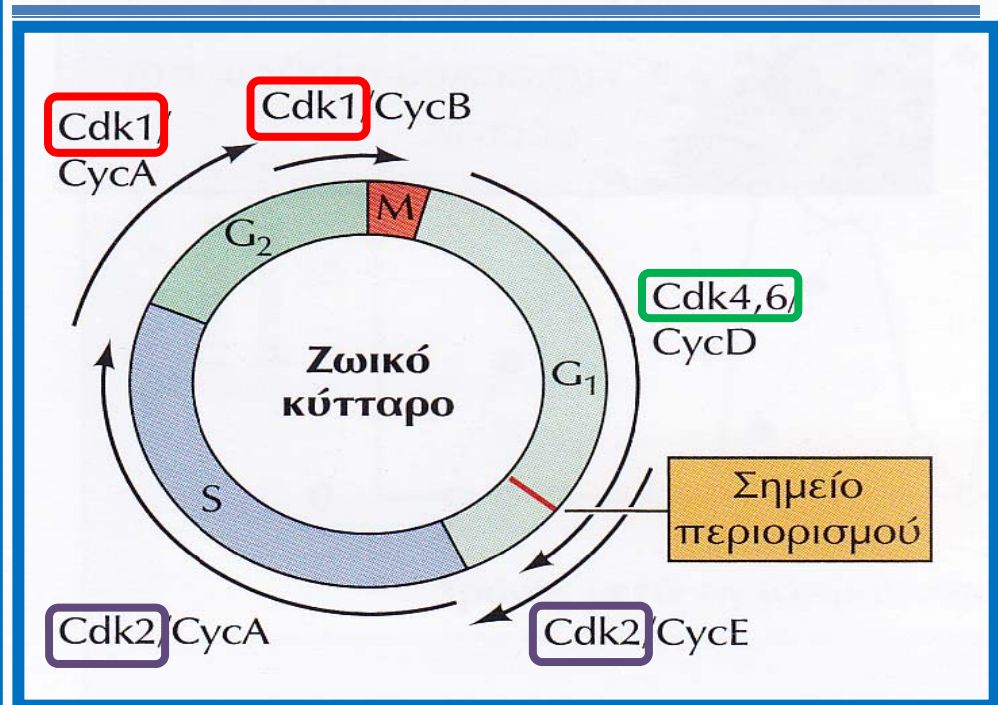
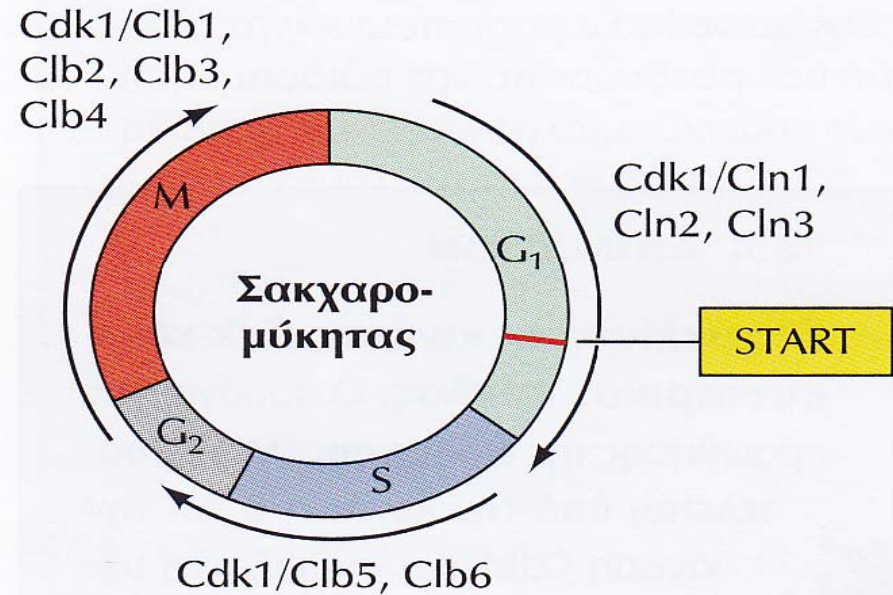
### Η μετάβαση από τη φάση G<sub>1</sub> στην S

ρυθμίζεται κυρίως από τις Cdk2, Cdk4 και Cdk6 σε σύμπλοκο με την κυκλίνη D ή με την κυκλίνη E. Τα σύμπλοκα των Cdk4 και Cdk6 με κυκλίνες τύπου D (κυκλίνες D1, D2 και D3)

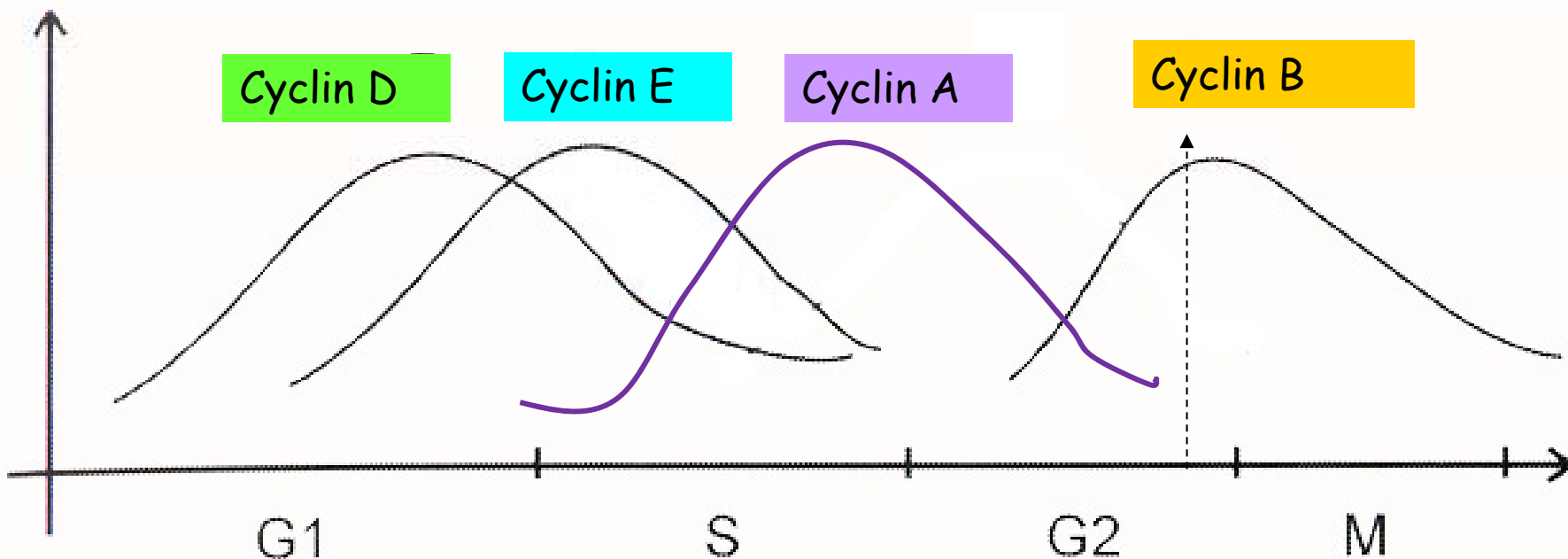
πρωταγωνιστούν στη διέλευση από το σημείο περιορισμού της G<sub>1</sub>.

Οι κυκλίνες τύπου E (E1 και E2) εκφράζονται αργότερα στην G<sub>1</sub> και τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E είναι απαραίτητα για τη μετάβαση από την G<sub>1</sub> στην S και για την έναρξη της σύνθεσης του DNA.

Σύμπλοκα της Cdk2 με κυκλίνες τύπου A (A1 και A2) δρουν **κατά τη διάρκεια της φάσης S**. Στη συνέχεια, η Cdk1 ρυθμίζει τη διέλευση από την S στην G<sub>2</sub> και **από την G<sub>2</sub> στην M** σε σύμπλοκο με κυκλίνες τύπου A και με κυκλίνες τύπου B (B1, B2 και B3) αντίστοιχα.



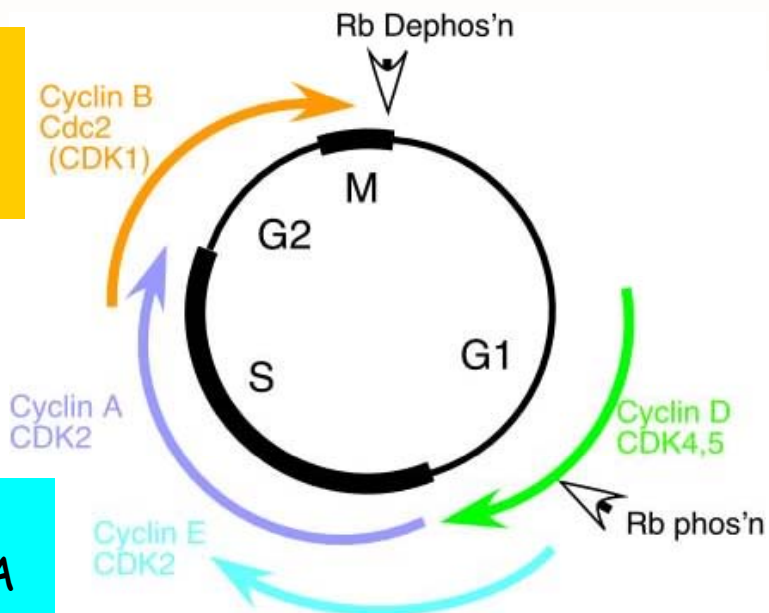
Αλλαγές στη συγκέντρωση των κυκλινών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου



Καθορίζει το χρόνο έναρξης της μίτωσης

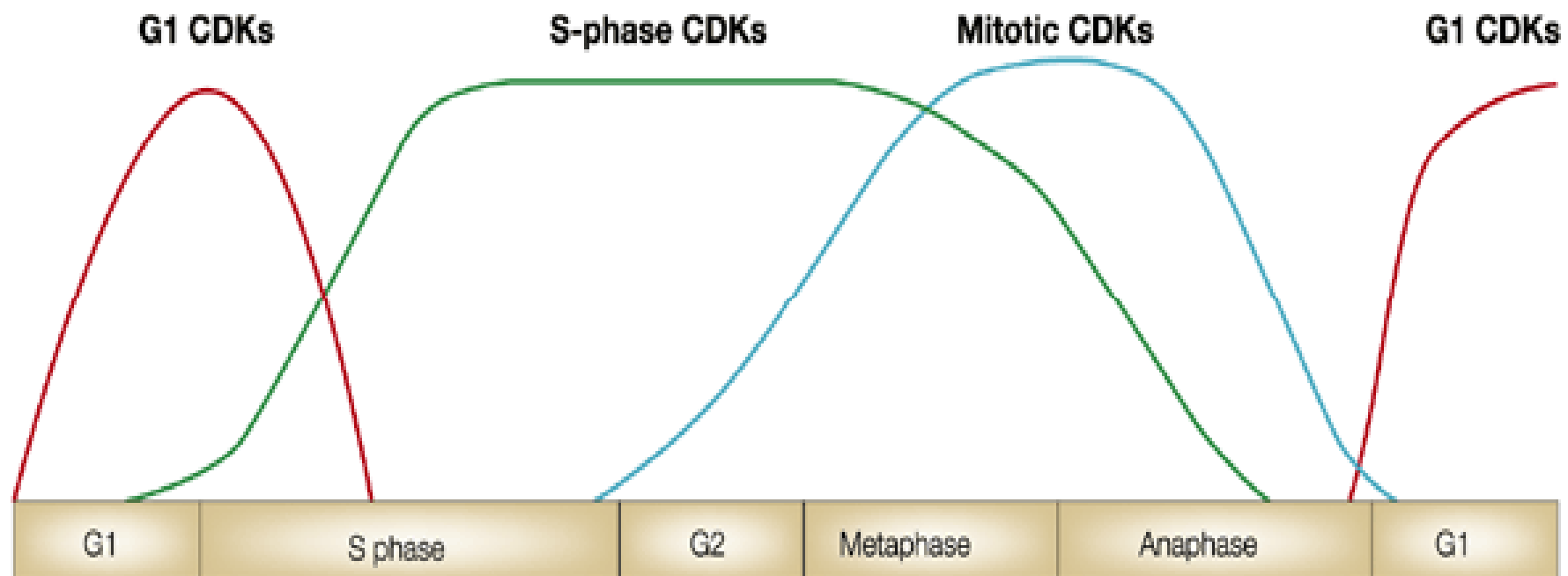
Καθοδηγεί το κύτταρο κατά τη φάση S

Προετοιμάζει το κύτταρο για την αντιγραφή του DNA



Καθοδηγεί το κύτταρο κατά τη φάση G1

	<b>G1 CDKs</b>	<b>S-phase CDKs</b>	<b>Mitotic CDKs</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Cln1, Cln, Cln3+Cdc28	Clb5, Clb6+Cdc28 (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4+Cdc28)	Clb1, Clb2, Clb3, Clb4+Cdc28 (Clb5, Clb6+Cdc28)
<i>S. pombe</i>	puc1+cdc2	cig1, cig2+cdc2 (cdc13+cdc2)	cdc13+cdc2
Higher eukaryotes	CycD1, CycD2, CycD3+Cdk4, Cdk6 CycE+Cdk2	CycE+Cdk2 (?) CycA+Cdk2/Cdk1	CycB1, CycB2, CycB3+Cdk1 CycA+Cdk2/Cdk1





Μολονότι τα διάφορα σύμπλοκα Cdk/κυκλίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες δρουν σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου, η μελέτη των Cdk και των κυκλινών σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια αποκάλυψε ένα εκπληκτικά υψηλό επίπεδο πλαστικότητας, καθώς σε μεταλλαγμένα ποντίκια, διαφορετικές κυκλίνες και Cdk μπορούν να αναπληρώσουν την απώλεια άλλων κυκλινών ή Cdk.

Η πιο εντυπωσιακή παρατήρηση αφορούσε **κύτταρα τα οποία στερούνταν όλες τις Cdk που δρουν κατά τη μεσόφαση** (Cdk2, Cdk4 και Cdk6), και κατά παράδοξο τρόπο **μπορούσαν να πολλαπλασιάζονται**.

Η ανάλυσή τους έδειξε ότι, **απουσία άλλων Cdk, η Cdk1 προσδένεται σε όλες τις κυκλίνες και ρυθμίζει όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου**. Αντίθετα, τα ποντίκια που στερούνται τη Cdk1 δεν μπορούν να αναπτυχθούν.

Επομένως, η Cdk1 είναι η μόνη απαραίτητη Cdk στα κύτταρα των θηλαστικών (όπως και στους ζυμομύκητες) και μπορεί να αντικαταστήσει όλες τις άλλες Cdk όταν απουσιάζουν.

# Η ενεργότητα των Cdk κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τέσσερις μοριακούς μηχανισμούς

1.

Το πρώτο επίπεδο ρύθμισης βασίζεται στη σύνδεση των Cdk με τις αντίστοιχες κυκλίνες τους. Κατά συνέπεια, ο σχηματισμός ειδικών συμπλόκων Cdk/κυκλίνης ρυθμίζεται από τη σύνθεση και την αποικοδόμηση των κυκλινών

2.

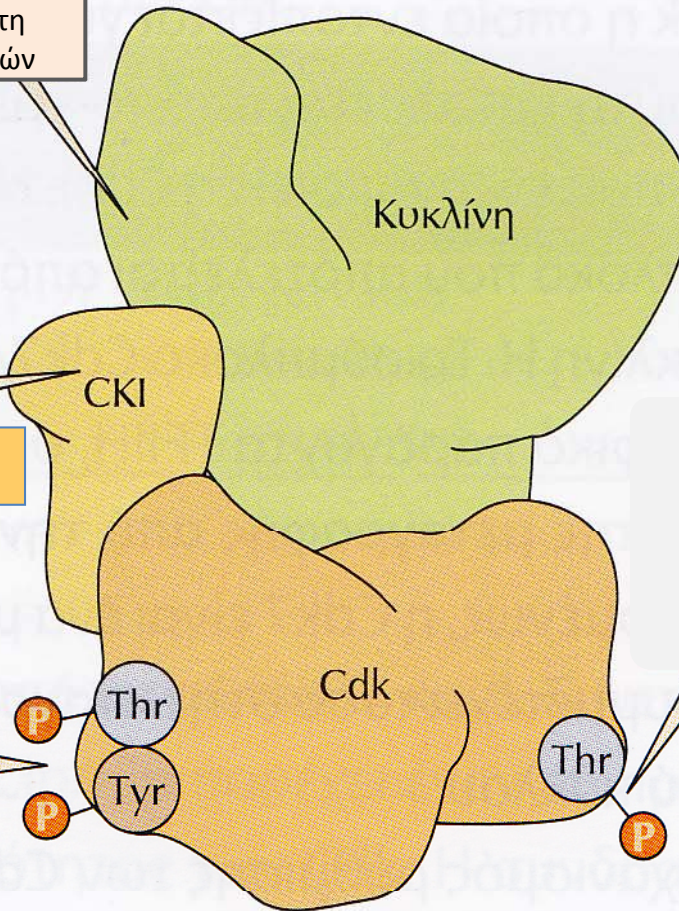
Ο δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης της ενεργοποίησης των συμπλόκων Cdk/κυκλίνης αφορά τη φωσφορυλίωση μιας συντηρημένης θρεονίνης των Cdk η οποία εντοπίζεται γύρω από τη θέση 160. Η φωσφορυλίωση αυτή καταλύεται από το ένζυμο **CAK** (Cdk-Activating Kinase). Το ένζυμο CAK είναι σύμπλοκο που αποτελείται από την κινάση Cdk7, και από την κυκλίνη H. Το σύμπλοκο **Cdk7/κυκλίνης H** συνδέεται και με τον μεταγραφικό παράγοντα TFIIH, ο οποίος είναι απαραίτητος για την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II. Επομένως, η Cdk7 είναι ένα μέλος της οικογένειας των Cdk το οποίο συμμετέχει τόσο στη μεταγραφή όσο και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

4.

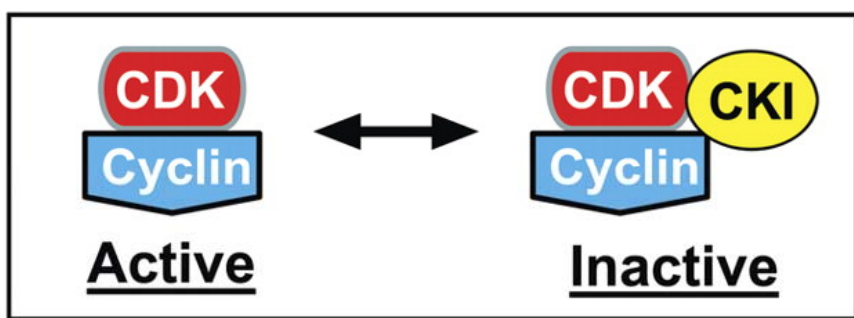
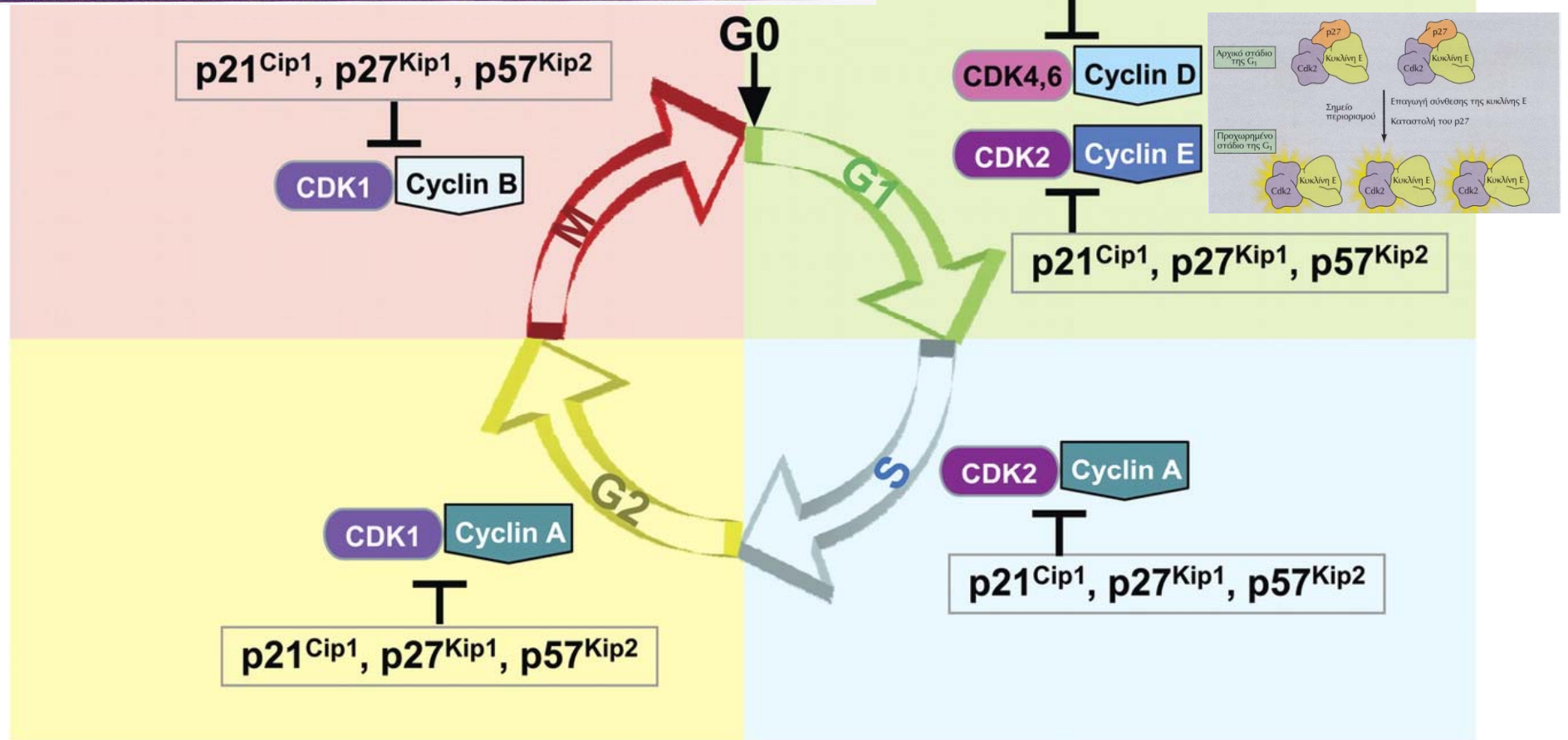
Η ενεργότητα των Cdk ρυθμίζεται επίσης από κατασταλτικές πρωτεΐνες, τους **αναστολείς των Cdk** (CKI, Cdk Inhibitors). Στα κύτταρα των θηλαστικών, δύο οικογένειες αναστολέων των Cdk ευθύνονται για τη ρύθμιση διαφορετικών Cdk.

3.

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



Οικογένεια Ink4 (p15, p16, p18, p19)	Cdk4 και Cdk6	G <sub>1</sub>
Οικογένεια Cip/Kip (p21, p27, p57)	Cdk2/κυκλίνη E	G <sub>1</sub>
	Cdk2/κυκλίνη A	S



Cip / Kip CKIs	Ink4	
p21 <sup>Cip1</sup>	p15 <sup>Ink4b</sup>	p16 <sup>Ink4a</sup>
p27 <sup>Kip1</sup>	p18 <sup>Ink4c</sup>	p19 <sup>Ink4d</sup>
p57 <sup>Kip2</sup>		



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

**Μέλη της οικογένειας Ink4** προσδένονται ειδικά στις Cdk4 και Cdk6 και τις καταστέλλουν, λειτουργώντας κατά συνέπεια ως καταστολείς της προόδου της G<sub>1</sub>.

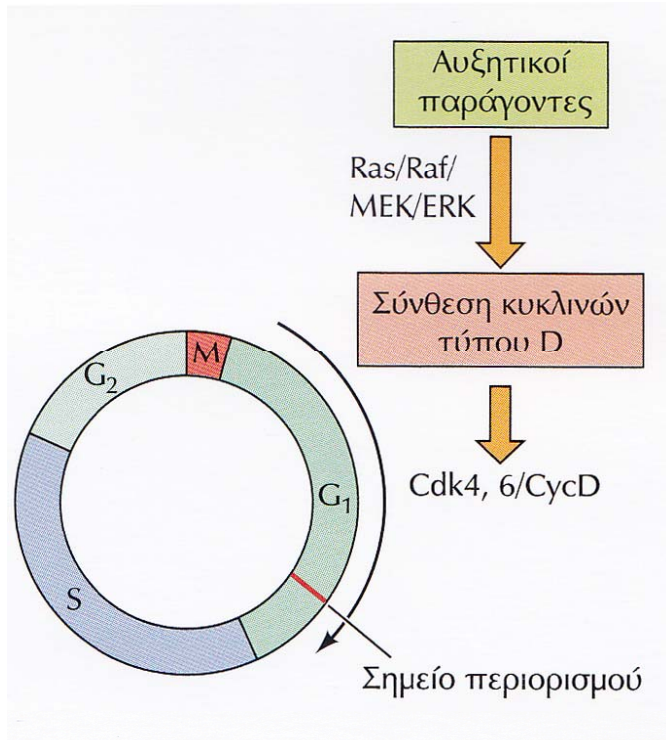
Αντίθετα, **μέλη της οικογένειας Cip/Kip** προσδένονται ταυτόχρονα τόσο σε κυκλίνες όσο και σε Cdk και μπορούν να καταστέλλουν την ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης των συμπλόκων κυκλίνης/Cdk.

Ωστόσο, οι πρωτεΐνες Cip/Kip επιδρούν στα διάφορα σύμπλοκα κυκλίνης/Cdk με διαφορετικό τρόπο:

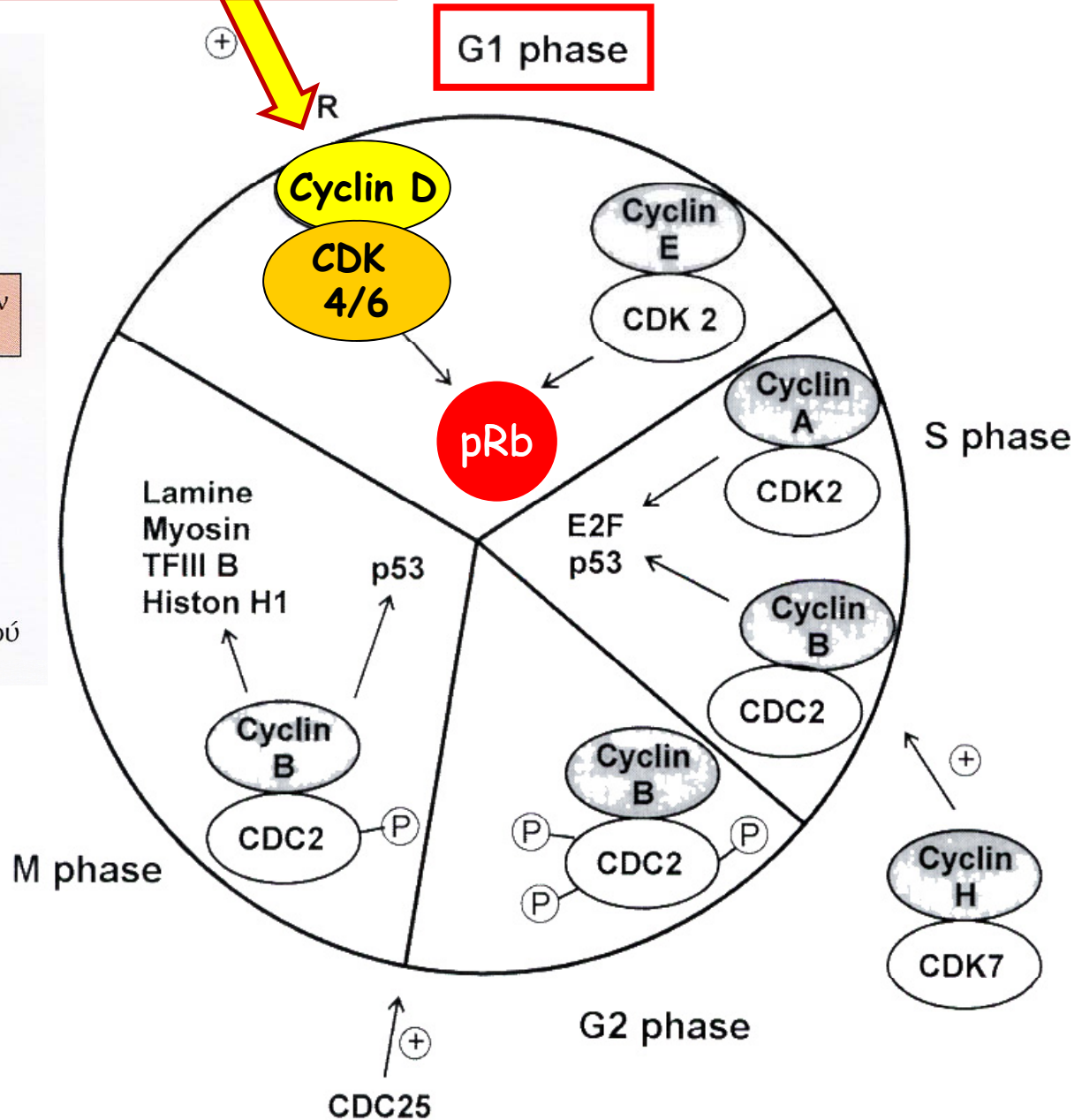
- Έχουν κατασταλτική επίδραση σε σύμπλοκα της Cdk2 με την κυκλίνη A ή με την κυκλίνη E, καταστέλλοντας επομένως την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσα από τις φάσεις G<sub>1</sub> και S.
- Διευκολύνουν το σχηματισμό συμπλόκων Cdk4 και Cdk6 με την κυκλίνη D, με συνέπεια να μην καταστέλλουν αλλά να διεγείρουν την ενεργότητα αυτών των Cdk.
- Διευκολύνουν το σχηματισμό συμπλόκων Cdk1/κυκλίνης B, ώστε κάτω από ορισμένες συνθήκες οι πρωτεΐνες Cip/Kip να επάγουν αντί να καταστέλλουν τη μετάβαση από την G<sub>2</sub> στην M.

Συνεπώς, ο έλεγχος που ασκείται από την Ink4 και τις πρωτεΐνες Cip/Kip παρέχει έναν επιπρόσθετο μηχανισμό της ενεργότητας των Cdk. Η συνδυασμένη δράση των πολλαπλών μηχανισμών ρύθμισης των Cdk ευθύνεται για τον έλεγχο της προόδου του κυτταρικού κύκλου σε συντονισμό τόσο με τα σημεία ελέγχου όσο και με τα διάφορα εξωκυτταρικά ερεθίσματα που επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

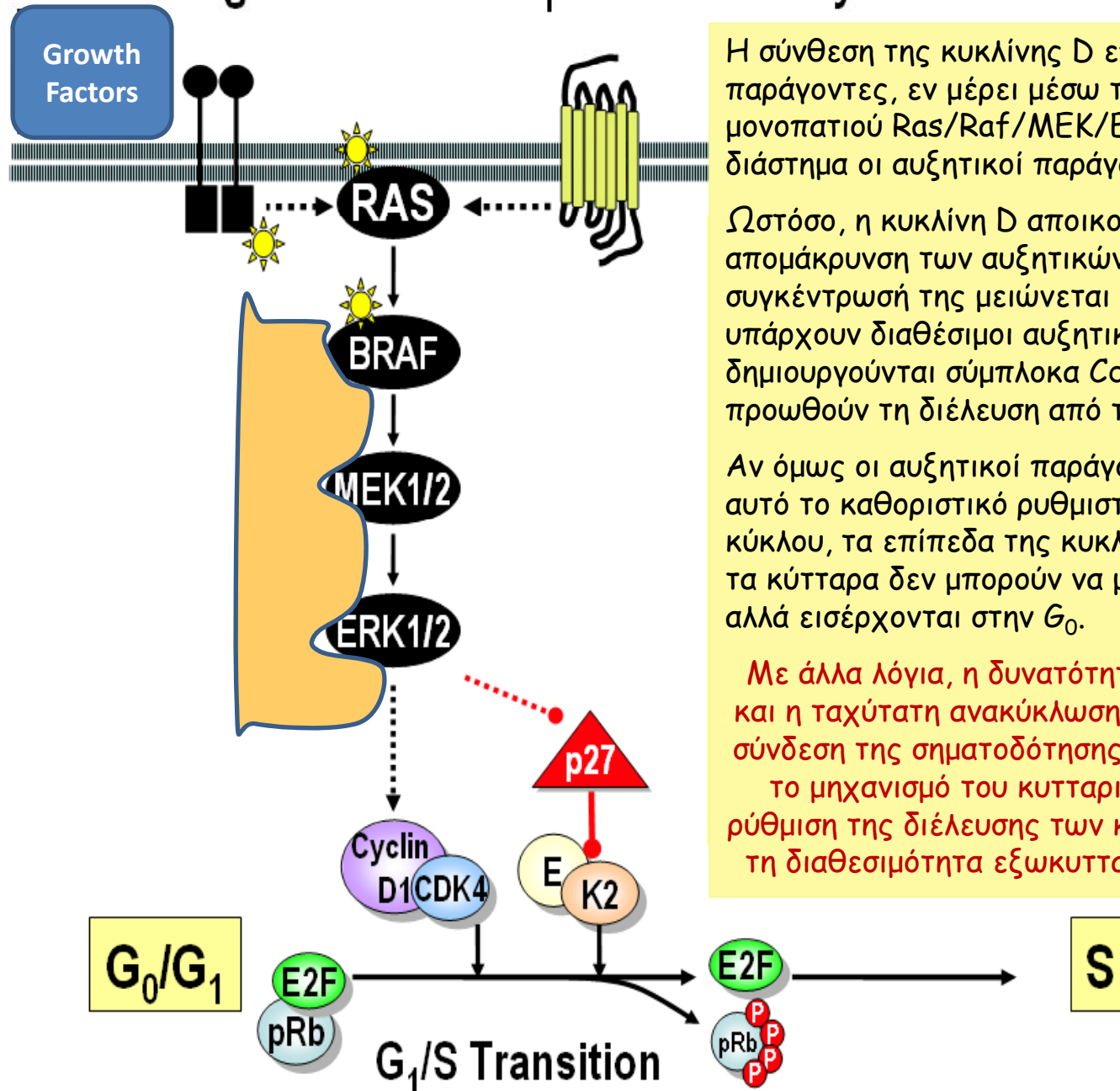
**Αυξητικοί παράγοντες,  
Θέσεις εστιακής προσκόλλησης**



Ένα καθοριστικό σημείο σύνδεσης της σηματοδότησης από αυξητικούς παράγοντες με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου αποτελούν οι κυκλίνες τύπου D



# Regulation of the G<sub>1</sub>/S Transition by the ERK1/2 Pathway



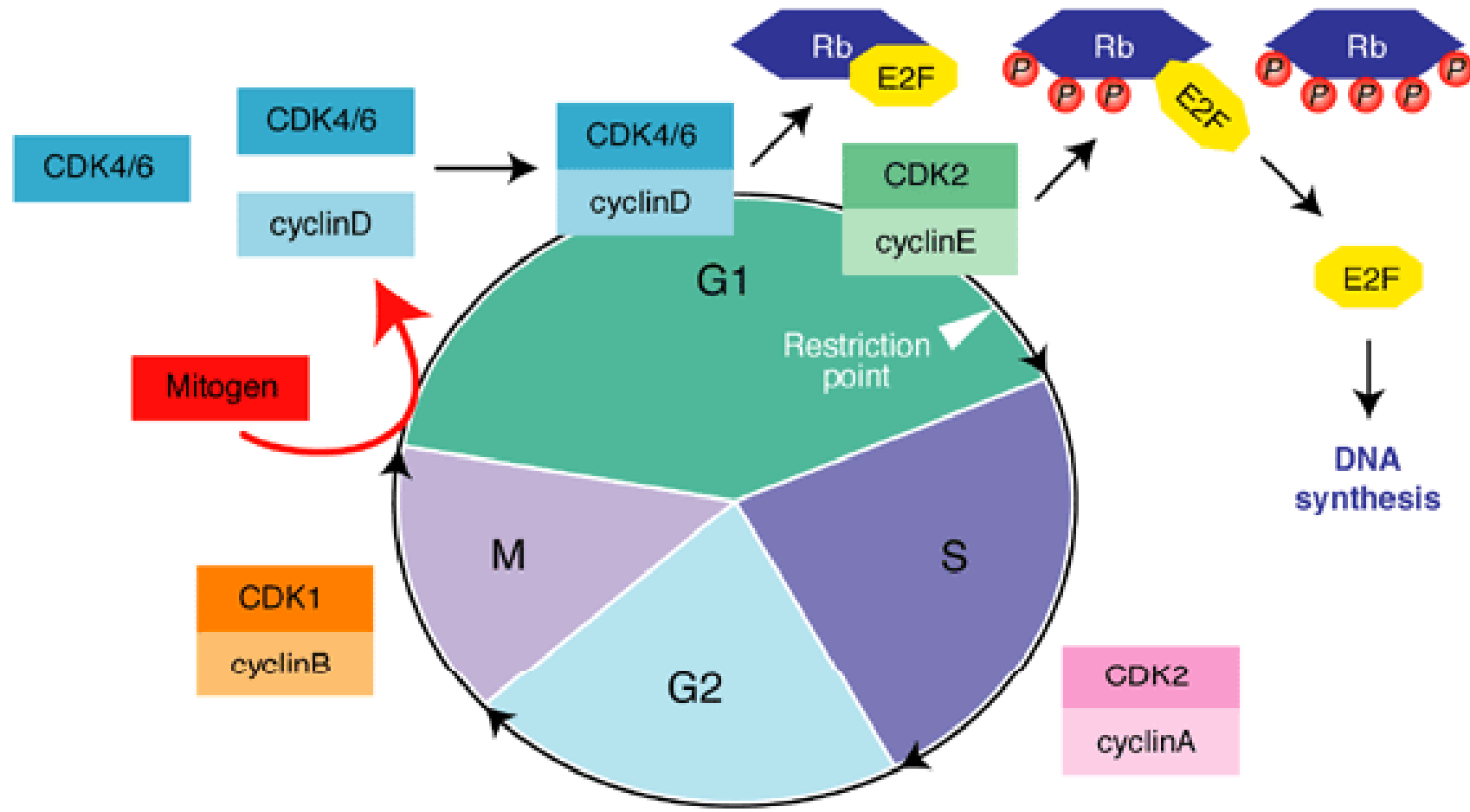
Η σύνθεση της κυκλίνης D επάγεται από αυξητικούς παράγοντες, εν μέρει μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK, και συνεχίζεται για όσο διάστημα οι αυξητικοί παράγοντες είναι διαθέσιμοι.

Ωστόσο, η κυκλίνη D αποικοδομείται ταχύτατα μετά την απομάκρυνση των αυξητικών παραγόντων και η συγκέντρωσή της μειώνεται ραγδαία. Επομένως, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμοι αυξητικοί παράγοντες κατά την G<sub>1</sub>, δημιουργούνται σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D τα οποία προωθούν τη διέλευση από το σημείο περιορισμού.

Αν όμως οι αυξητικοί παράγοντες απομακρυνθούν πριν από αυτό το καθοριστικό ρυθμιστικό σημείο του κυτταρικού κύκλου, τα επίπεδα της κυκλίνης D μειώνονται ταχύτατα και τα κύτταρα δεν μπορούν να μεταβούν από την G<sub>1</sub> στην S, αλλά εισέρχονται στην G<sub>0</sub>.

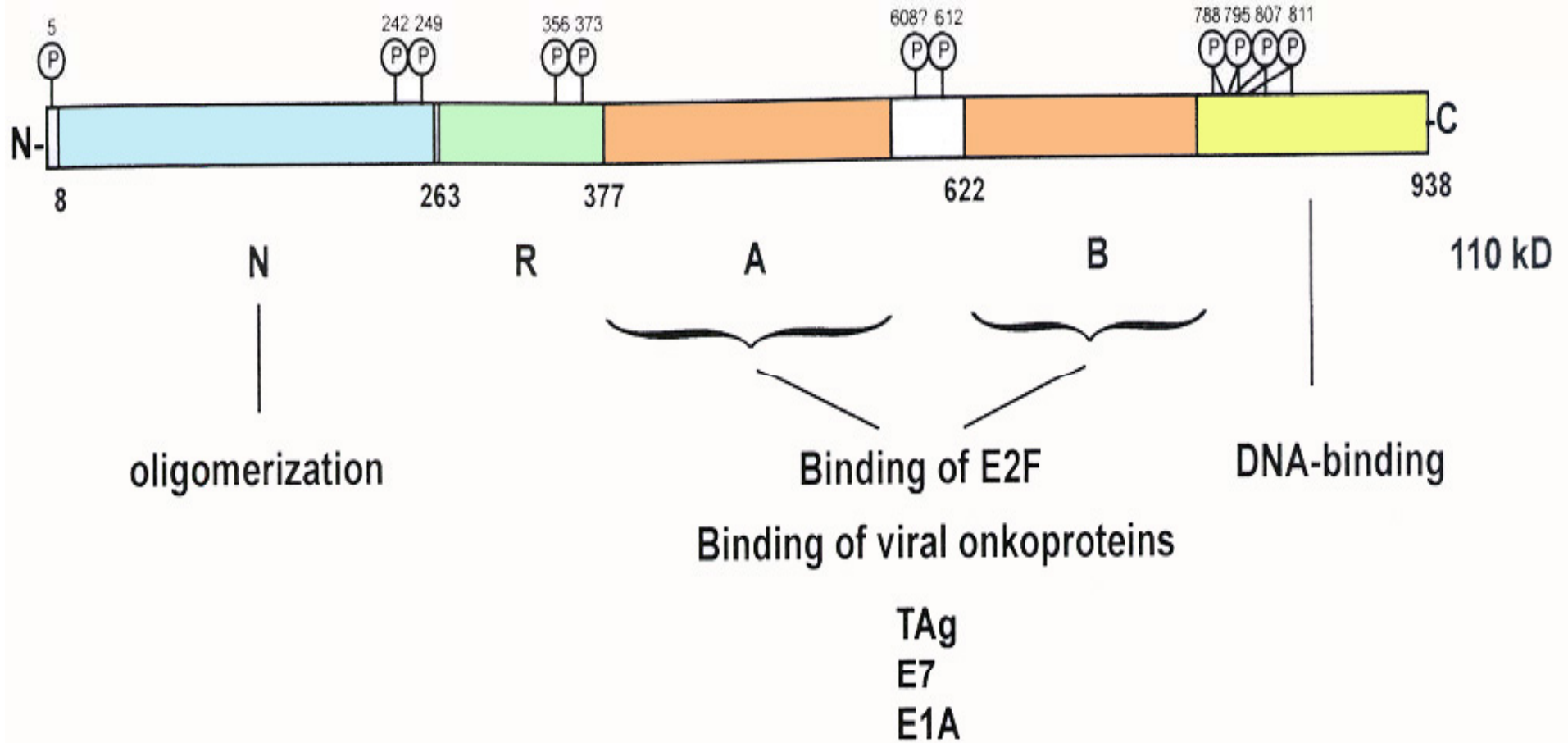
Με άλλα λόγια, η δυνατότητα επαγωγής της σύνθεσής της και η ταχύτατη ανακύκλωση της κυκλίνης D1 επιτρέπουν τη σύνδεση της σηματοδότησης από αυξητικούς παράγοντες με το μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου, επιτρέποντας τη ρύθμιση της διέλευσης των κυττάρων από την G<sub>1</sub> ανάλογα με τη διαθεσιμότητα εξωκυτταρικών αυξητικών παραγόντων.

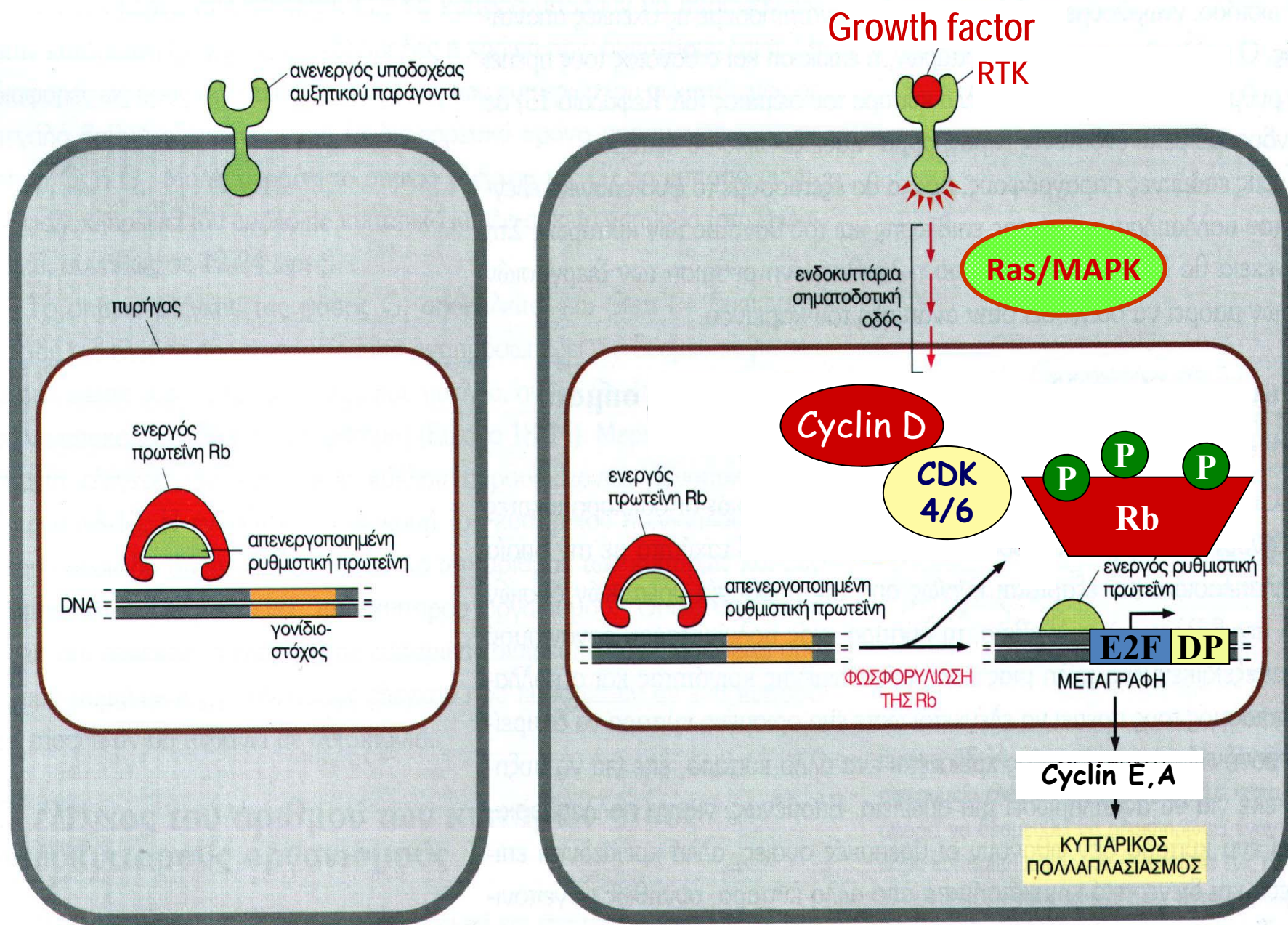




Mitogens drive cell cycle progression by induction of cyclinD and inactivation of the retinoblastoma (Rb) protein

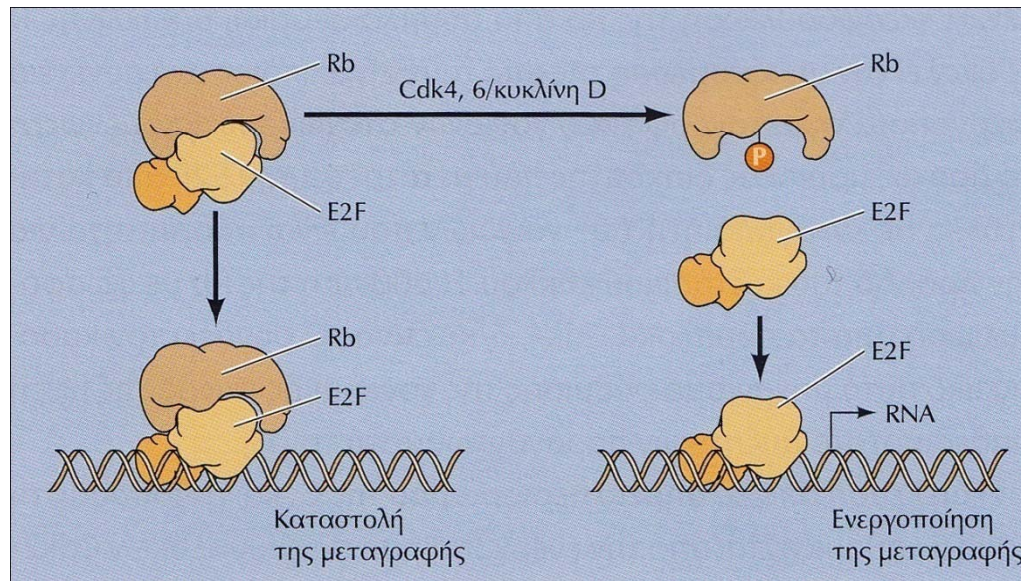
Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος: πυρηνική  
φωσφοπρωτεΐνη 100kD





Αρχή στις φάσης G1

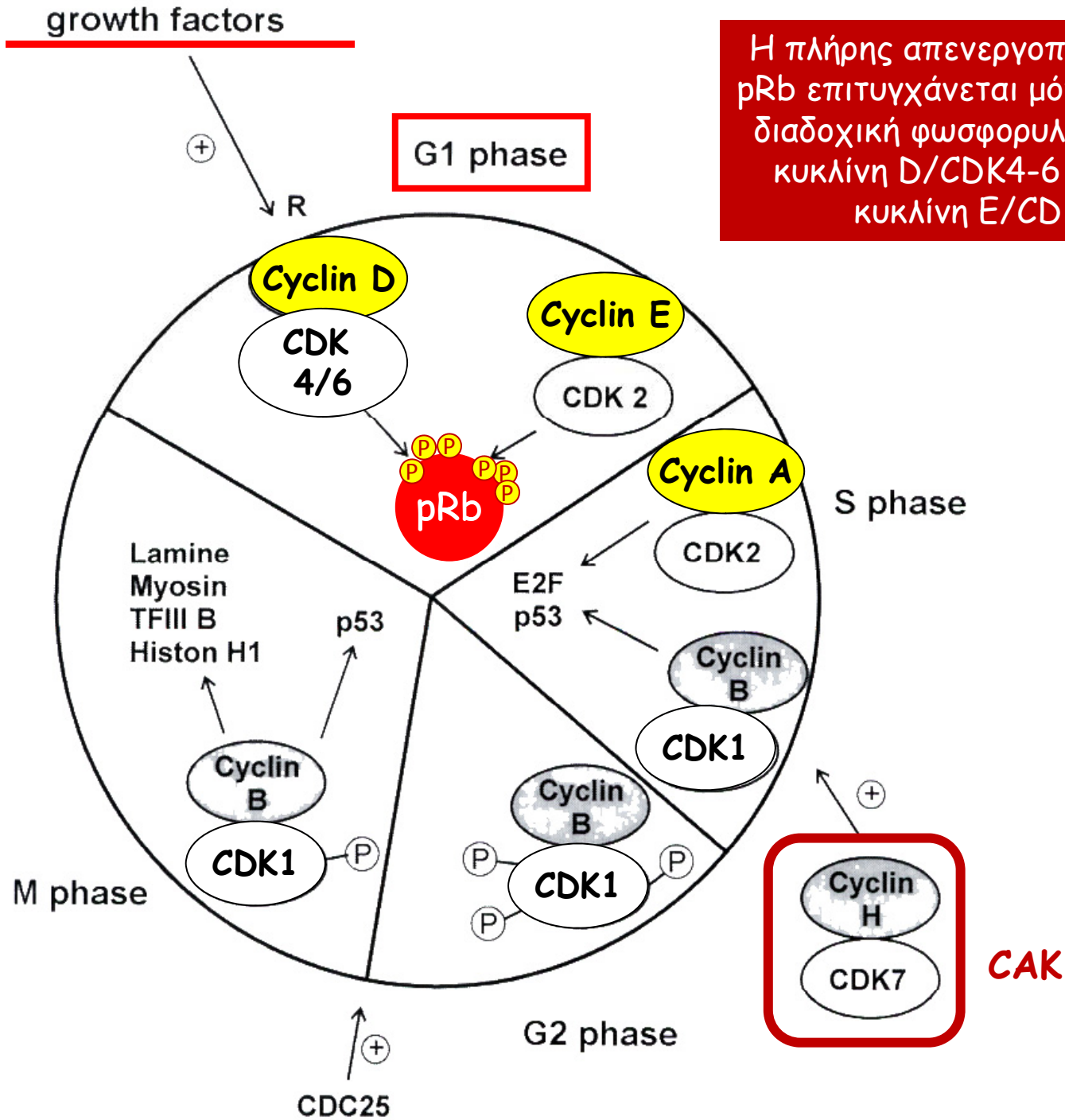




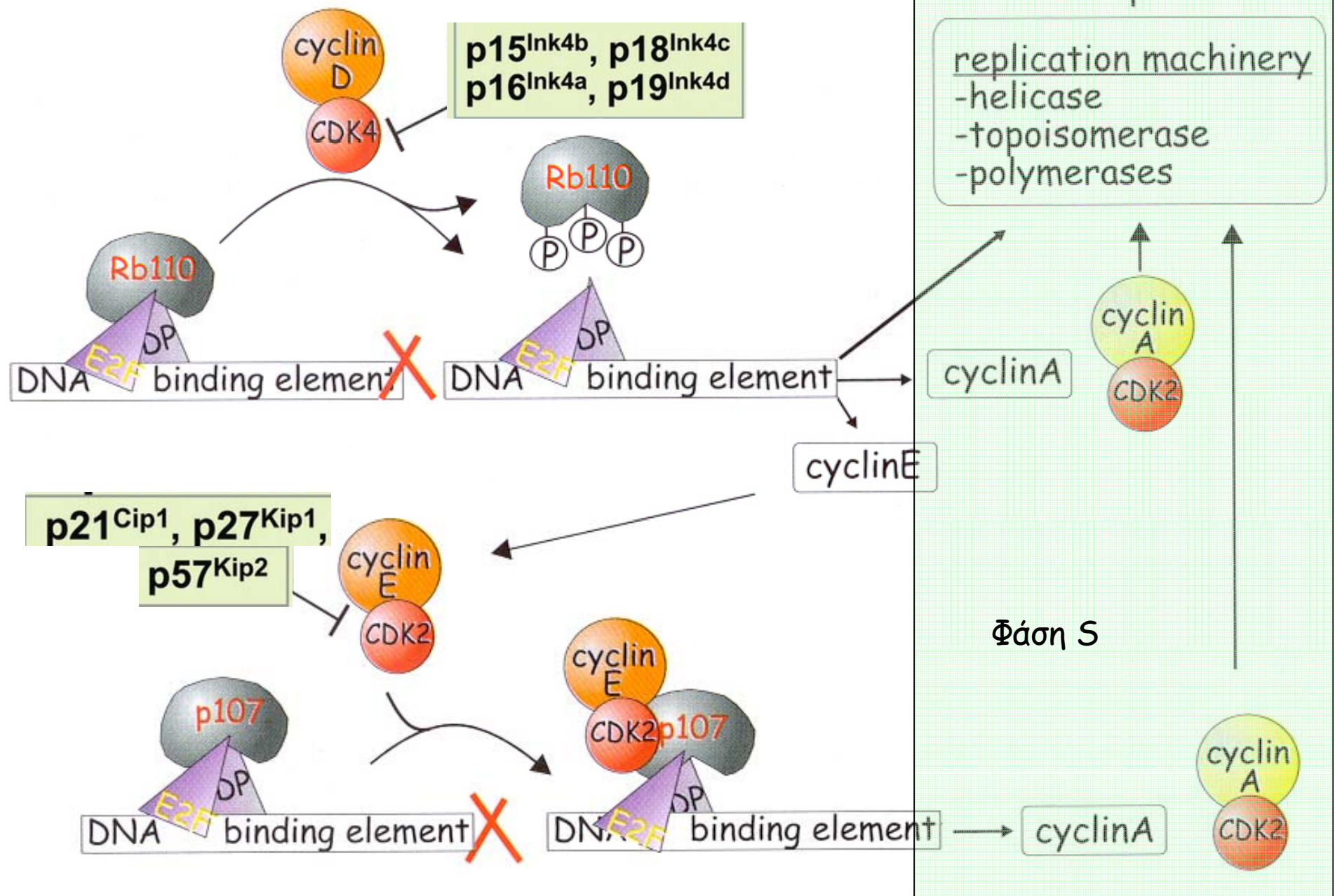
### Η ενεργότητα των πρωτεϊνών Rb ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Συγκεκριμένα, η Rb φωσφορυλιώνεται από σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D καθώς τα κύτταρα διέρχονται από το σημείο περιορισμού της  $G_1$ . Στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της (κατά την  $G_0$  ή νωρίς στην  $G_1$ ), η Rb προσδένεται σε **μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F**, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου που κωδικοποιεί την κυκλίνη E. Ο E2F μπορεί να προσδεθεί στις αλληλουχίες-στόχους του ανεξάρτητα από την παρουσία της Rb. Ωστόσο, η Rb δρα ως καταστολέας, και το σύμπλοκο Rb/E2F καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον E2F.

Η φωσφορυλίωση της Rb από σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D προκαλεί την αποδέσμευσή της από τον E2F, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. Επομένως, **η Rb δρα ως μοριακός διακόπτης που μετατρέπει τον E2F από καταστολέα σε ενεργοποιητή των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου**. Η ρύθμιση της Rb με φωσφορυλίωση από τα σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D συνδέει τον καθοριστικό αυτό μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης με τη διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων κατά την  $G_1$ .



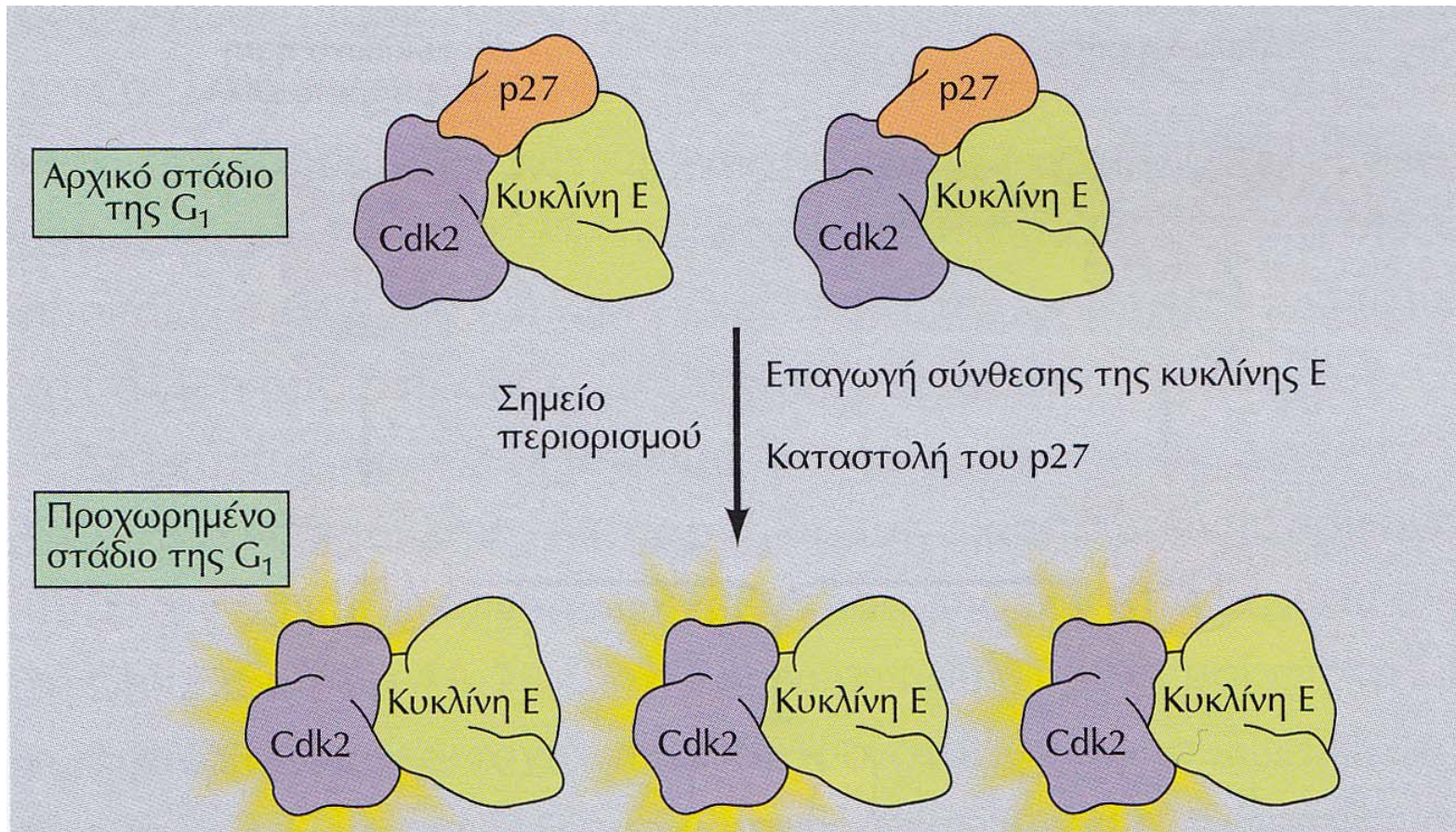
Η πλήρης απενεργοποίηση της pRb επιτυγχάνεται μόνο μετά τη διαδοχική φωσφορυλίωση από κυκλίνη D/CDK4-6 και από κυκλίνη E/CDK2



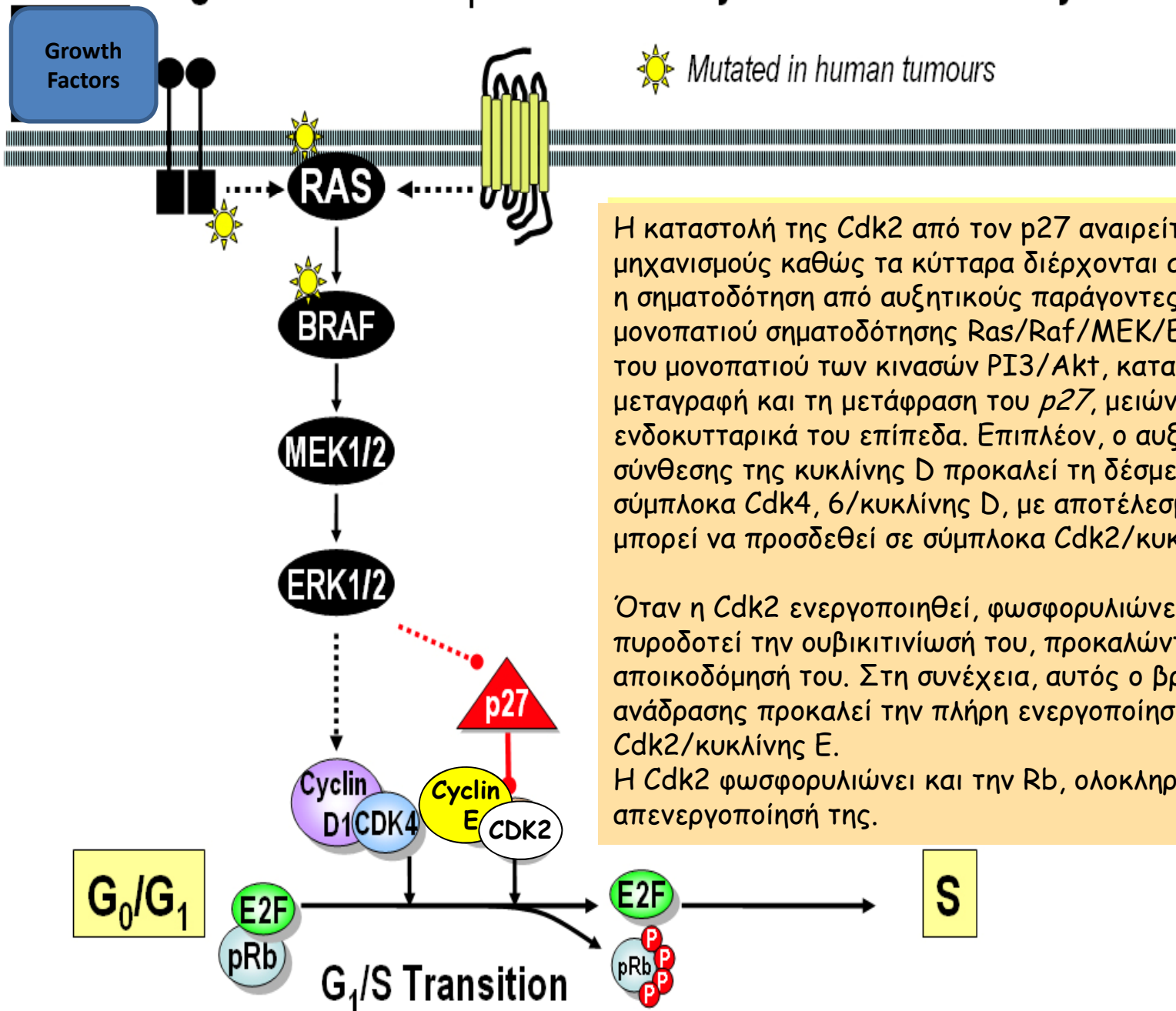


Η διέλευση από το σημείο περιορισμού της  $G_1$  και η είσοδος στη φάση  $S$  καθορίζονται από την ενεργοποίηση των συμπλόκων Cdk2/κυκλίνης E

Η ενεργότητα του συμπλόκου Cdk2/κυκλίνης E καταστέλλεται κατά την  $G_0$  ή νωρίς κατά τη φάση  $G_1$  από τον αναστολέα των Cdk, **p27**, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια Cip/Kip.



# Regulation of the G<sub>1</sub>/S Transition by the ERK1/2 Pathway

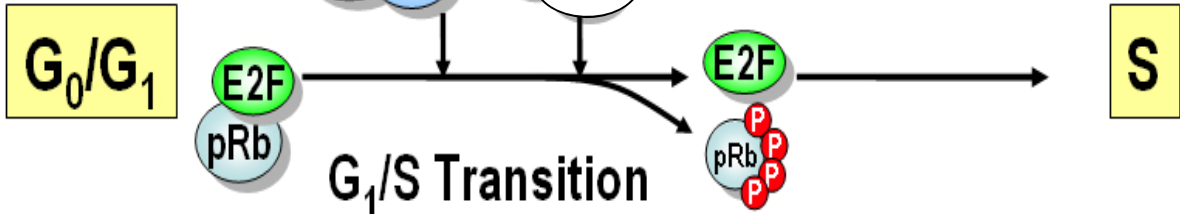


Mutated in human tumours

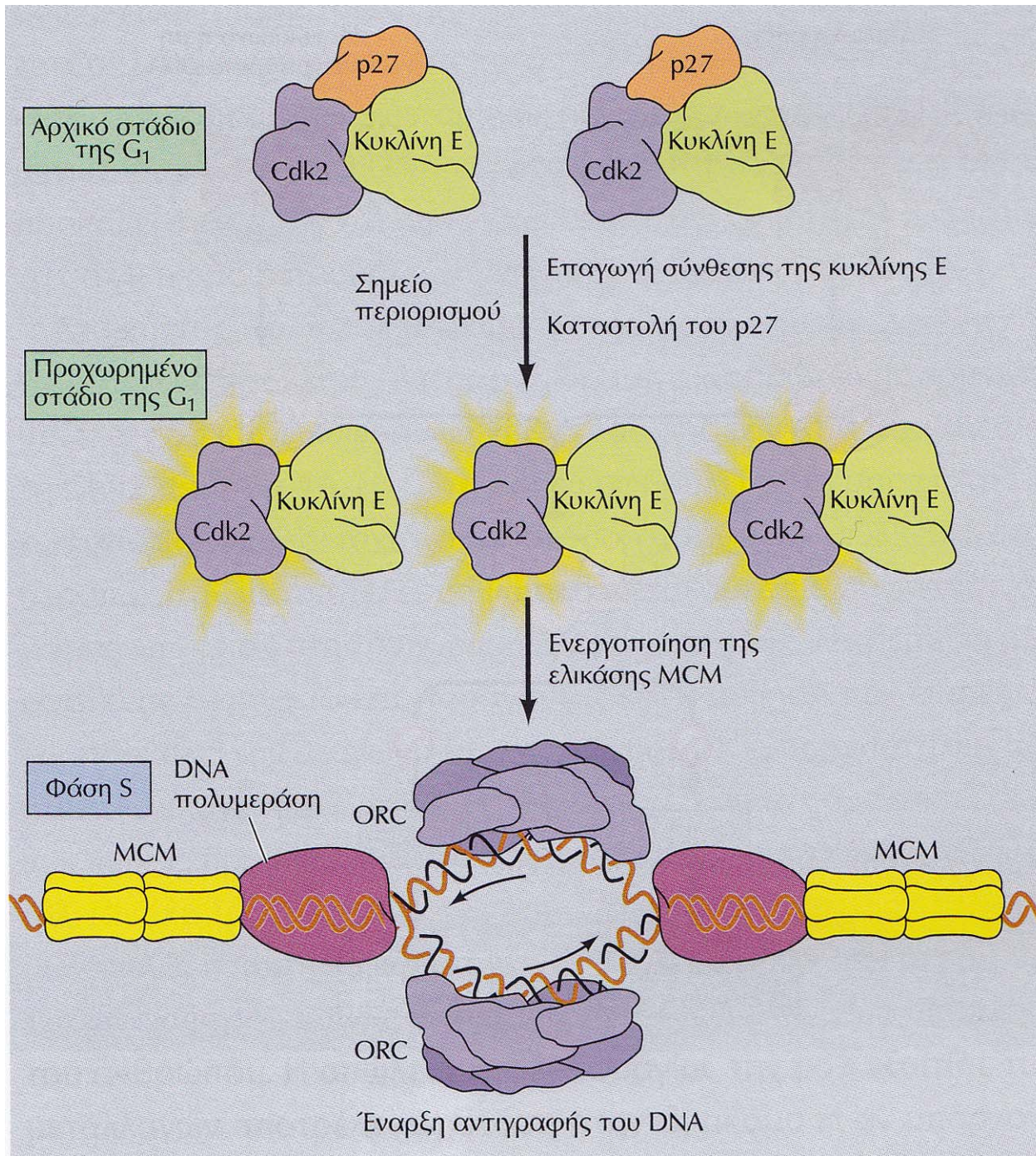
Η καταστολή της Cdk2 από τον p27 αναιρείται με πολλαπλούς μηχανισμούς καθώς τα κύτταρα διέρχονται από την G<sub>1</sub>. Πρώτον, η σηματοδότηση από αυξητικούς παράγοντες, τόσο μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης Ras/Raf/MEK/ERK όσο και μέσω του μονοπατιού των κινασών PI3/Akt, καταστέλλει τη μεταγραφή και τη μετάφραση του p27, μειώνοντας τα ενδοκυτταρικά του επίπεδα. Επιπλέον, ο αυξημένος ρυθμός σύνθεσης της κυκλίνης D προκαλεί τη δέσμευση του p27 σε σύμπλοκα Cdk4, 6/κυκλίνης D, με αποτέλεσμα ο p27 να μην μπορεί να προσδεθεί σε σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E.

Όταν η Cdk2 ενεργοποιηθεί, φωσφορυλιώνει τον p27 και πυροδοτεί την ουβικιτινίωσή του, προκαλώντας την πλήρη αποικοδόμησή του. Στη συνέχεια, αυτός ο βρόχος θετικής ανάδρασης προκαλεί την πλήρη ενεργοποίηση των συμπλόκων Cdk2/κυκλίνης E.

Η Cdk2 φωσφορυλιώνει και την Rb, ολοκληρώνοντας την απενεργοποίησή της.





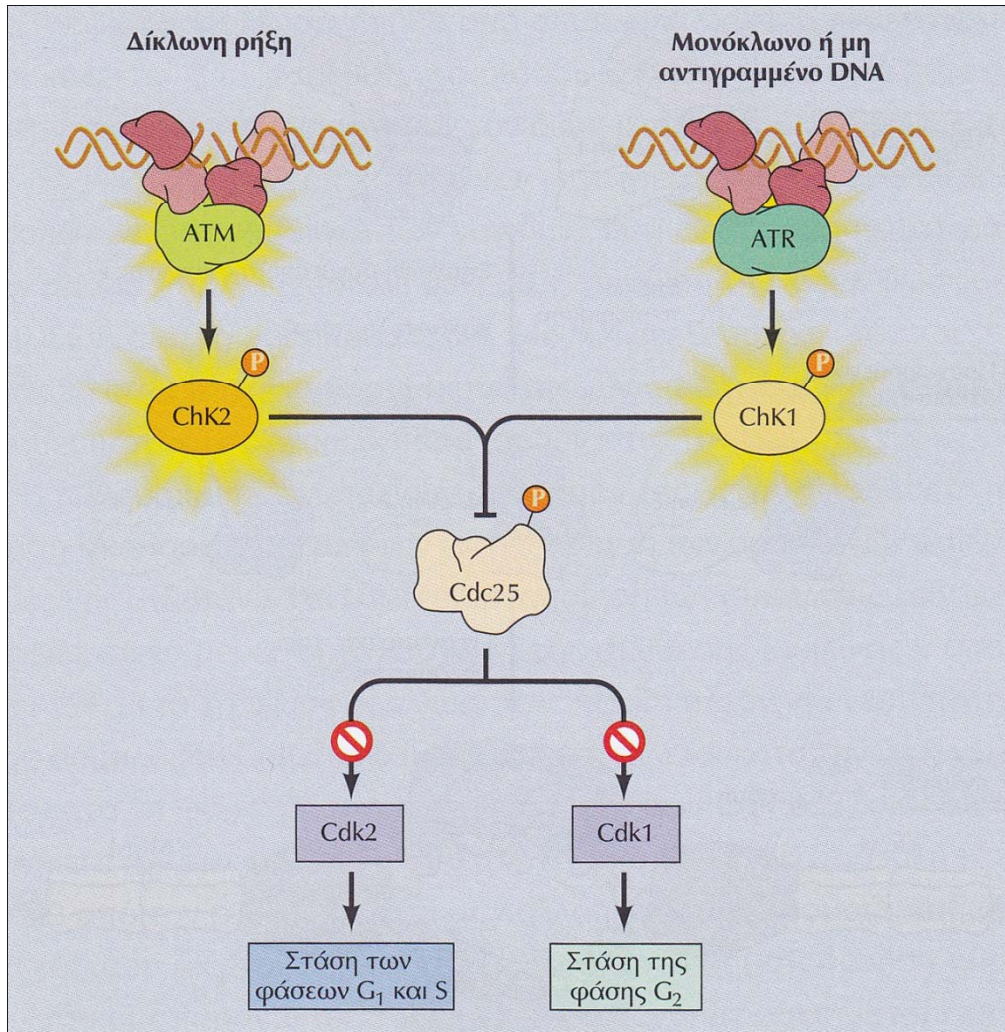


Τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E ενεργοποιούν τις ελικάσες MCM στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής προκαλώντας την έναρξη της σύνθεσης του DNA και την είσοδο στη φάση S



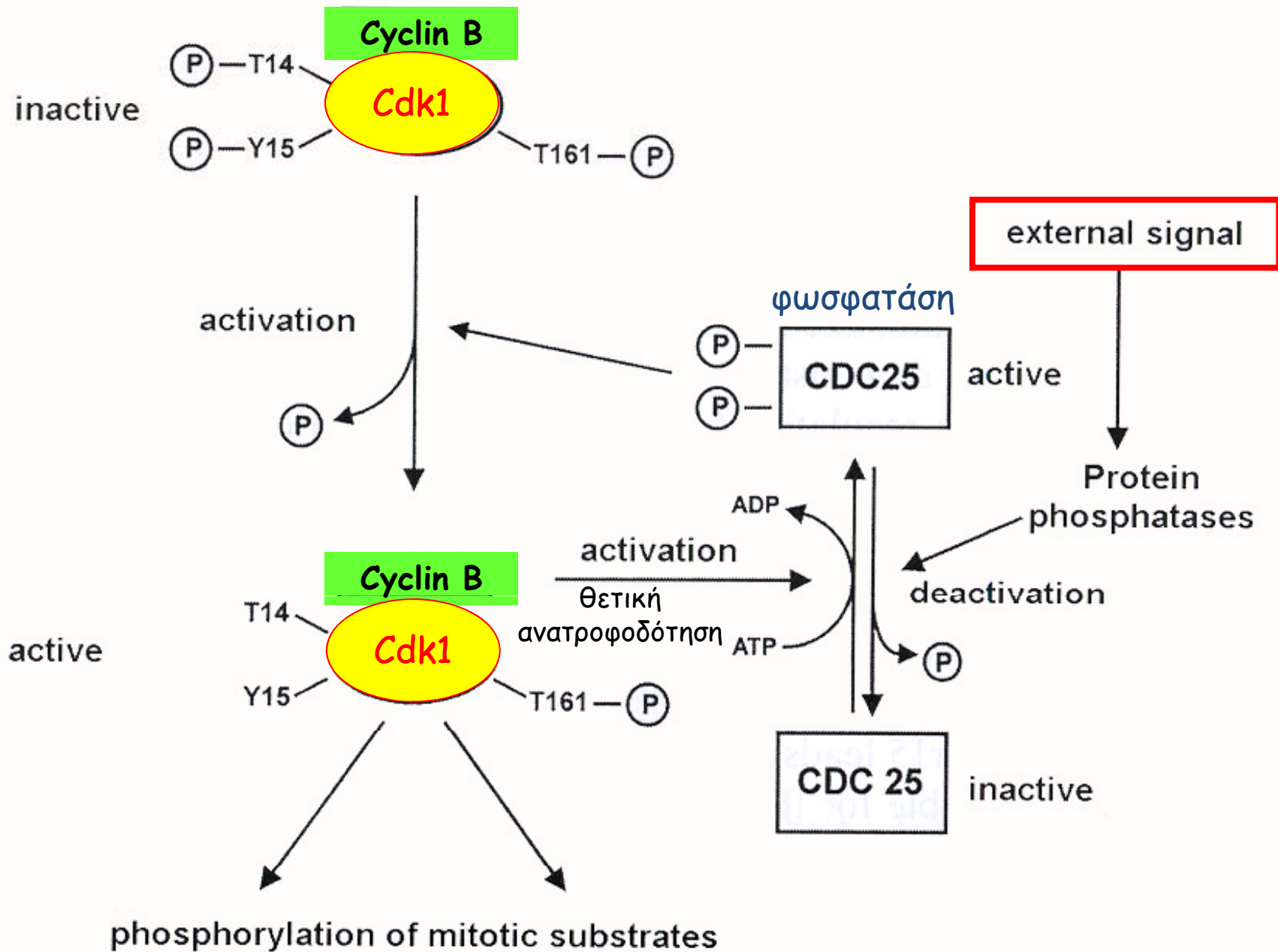


Η στάση του κυτταρικού κύκλου, προκαλείται από δύο συγγενικές πρωτεϊνικές κινάσες, τις **ATM** και **ATR**, οι οποίες ενεργοποιούνται ως απόκριση σε βλάβες στο DNA. Στη συνέχεια, οι ATM και ATR ενεργοποιούν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί σε κυτταρική στάση, αλλά και στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και, σε ορισμένες περιπτώσεις, σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τόσο η ATM όσο και η ATR είναι συστατικά πρωτεϊνικών συμπλόκων που αναγνωρίζουν, αντίστοιχα, βλάβες στο DNA και περιοχές του DNA στις οποίες δεν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή.

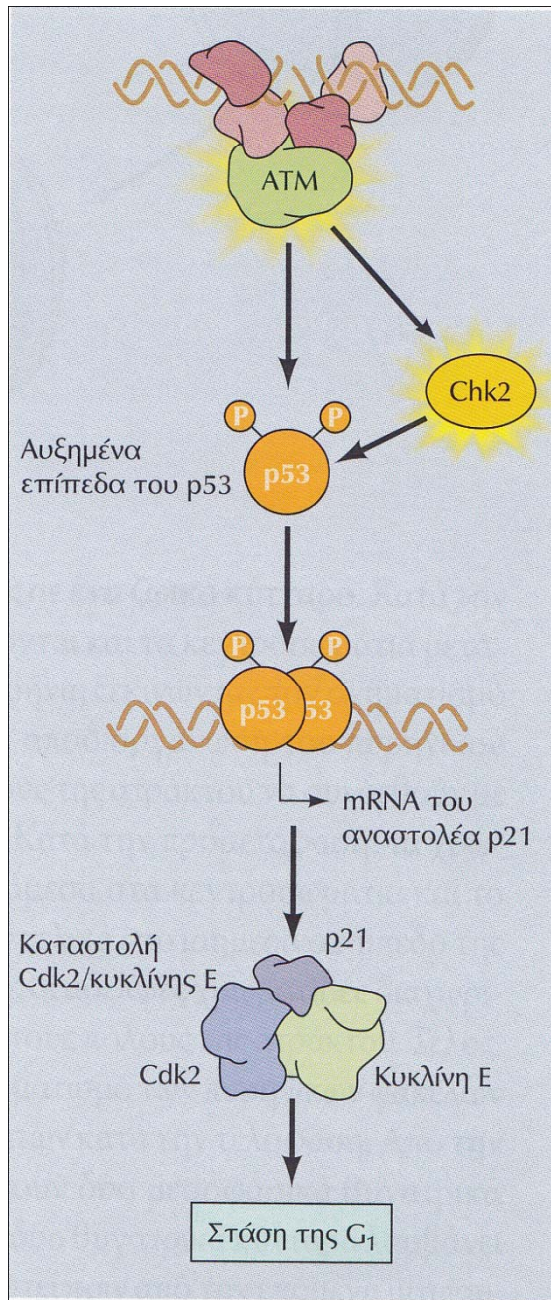


Η ATM ενεργοποιείται από θραύσεις του δίκλωνου DNA, ενώ η ATR ενεργοποιείται από μονόκλωνο ή μη αντιγραμμένο DNA. Όταν οι ATM και ATR ενεργοποιηθούν, φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις **κινάσες σημείου ελέγχου** (Chk, Checkpoint kinases) Chk2 και Chk1 αντίστοιχα. Οι Chk2 και Chk1 επάγουν στάση του κυτταρικού κύκλου φωσφορυλιώνοντας και καταστέλλοντας τις φωσφατάσες Cdc25 ή επάγοντας την αποικοδόμησή τους. Οι φωσφατάσες Cdc25 είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των κινάσων Cdk1 και Cdk2 καθώς αφαιρούν τις κατασταλτικές φωσφορυλιώσεις κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, οι βλάβες στο DNA καταστέλλουν τόσο τη Cdk2, η οποία προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στην G<sub>1</sub> και στην S, όσο και τη Cdk1, η οποία προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στην G<sub>2</sub>.

## Η δράση και η ρύθμιση της φωσφατάσης CDC25



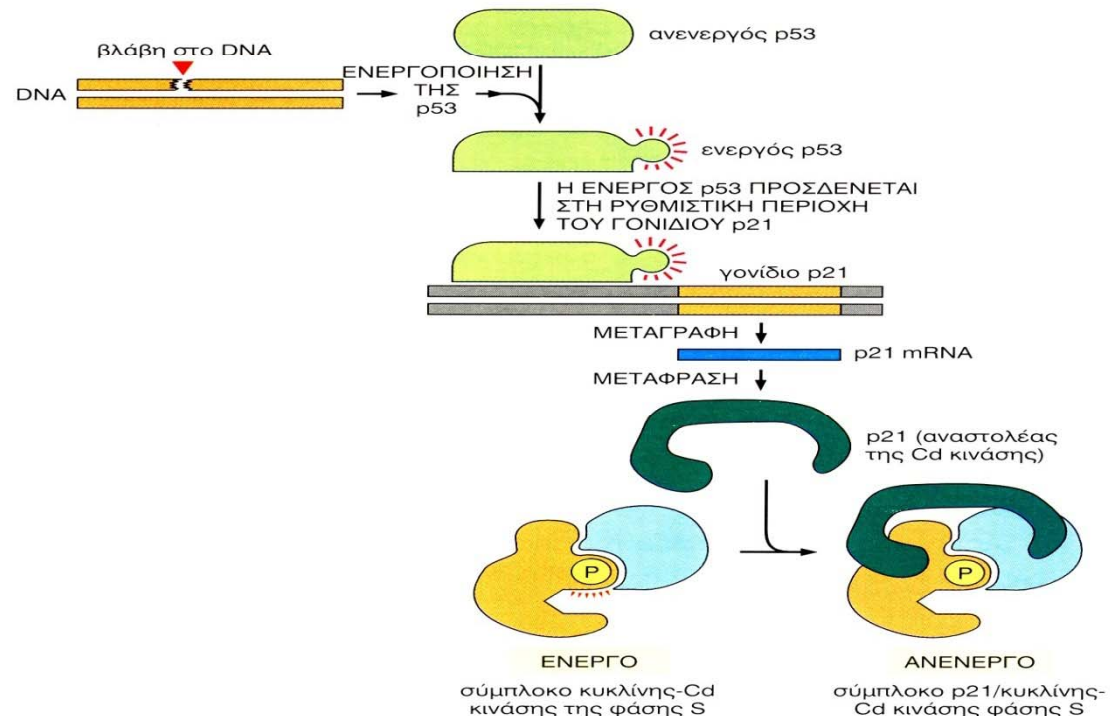


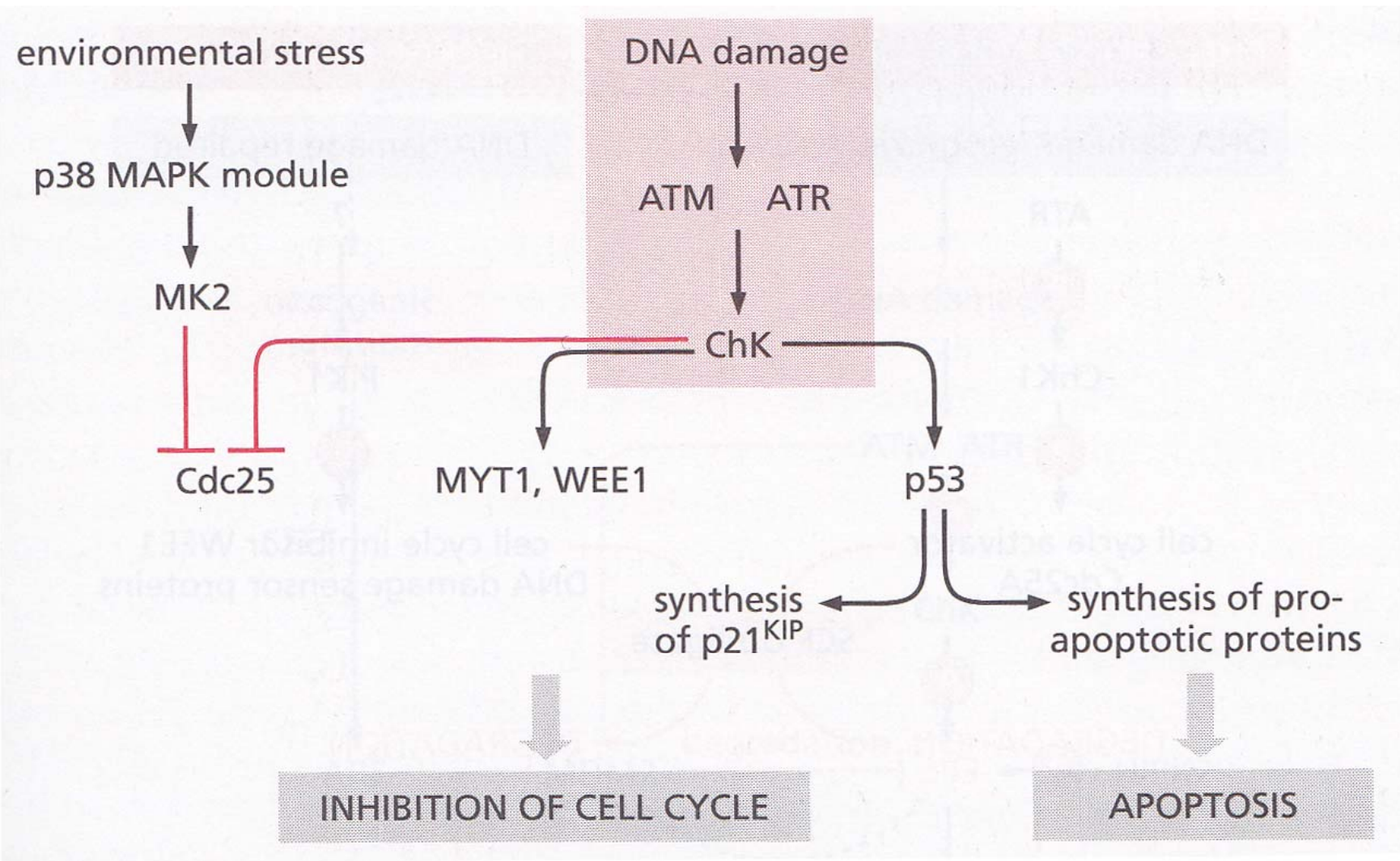


Στα κύτταρα των θηλαστικών, η στάση στο σημείο ελέγχου της  $G_1$  μπορεί να προκληθεί και από τη δράση μιας επιπλέον πρωτεΐνης που ονομάζεται **p53** και φωσφορυλιώνεται τόσο από την ATM όσο και από τη Chk2.

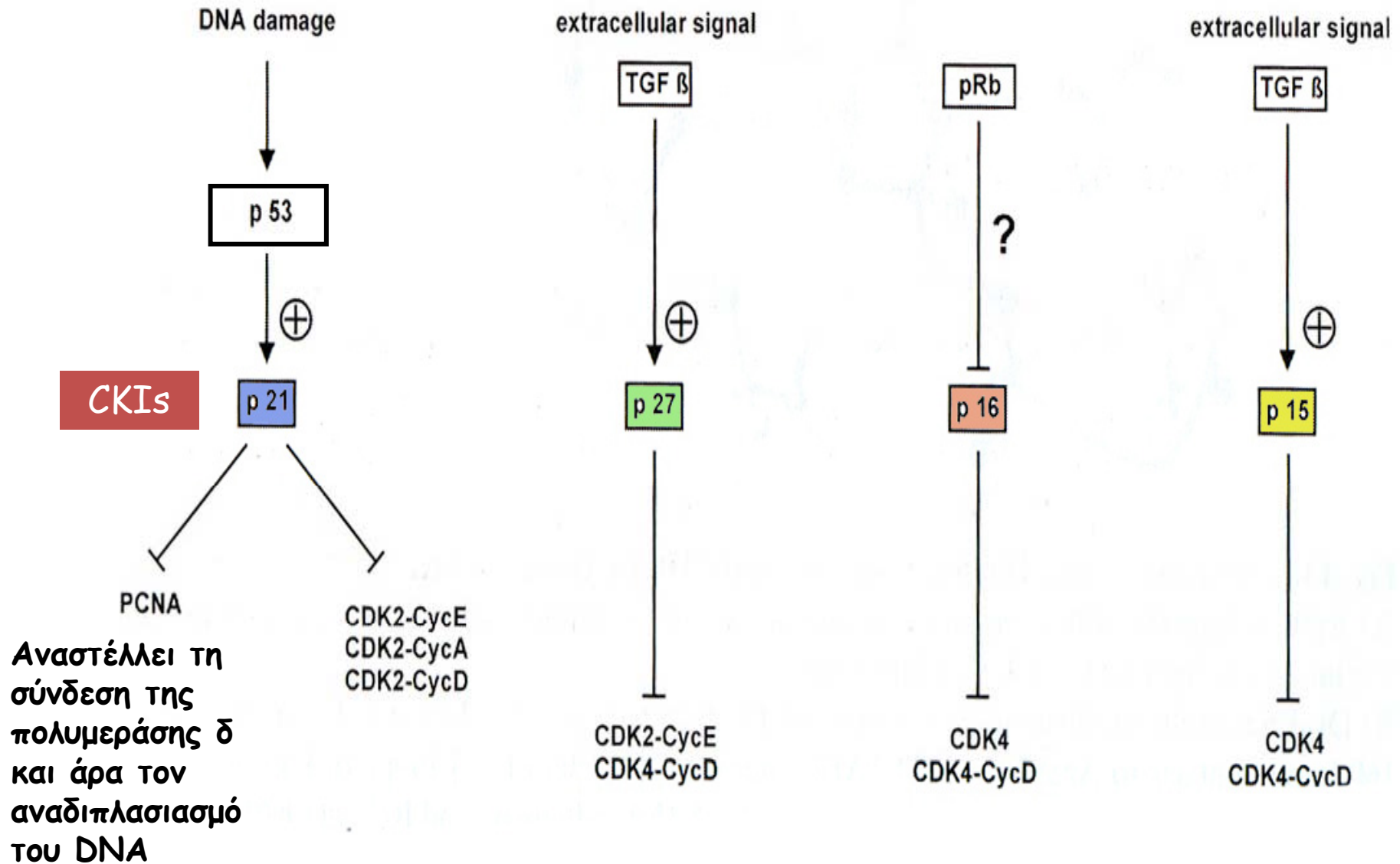
Η φωσφορυλίωση σταθεροποιεί την p53, η οποία σε αντίθετη περίπτωση αποικοδομείται ταχύτατα, οδηγώντας στην άμεση αύξηση των επιπέδων της p53 ως απάντηση σε κατεστραμμένο DNA.

Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που, όταν βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση, προκαλεί την επαγωγή της πρωτεΐνης p21, ενός αναστολέα των Cdk της οικογένειας Cip/Kip. Η p21 καταστέλλει τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E, προκαλώντας τη στάση του κυτταρικού κύκλου στην  $G_1$ .

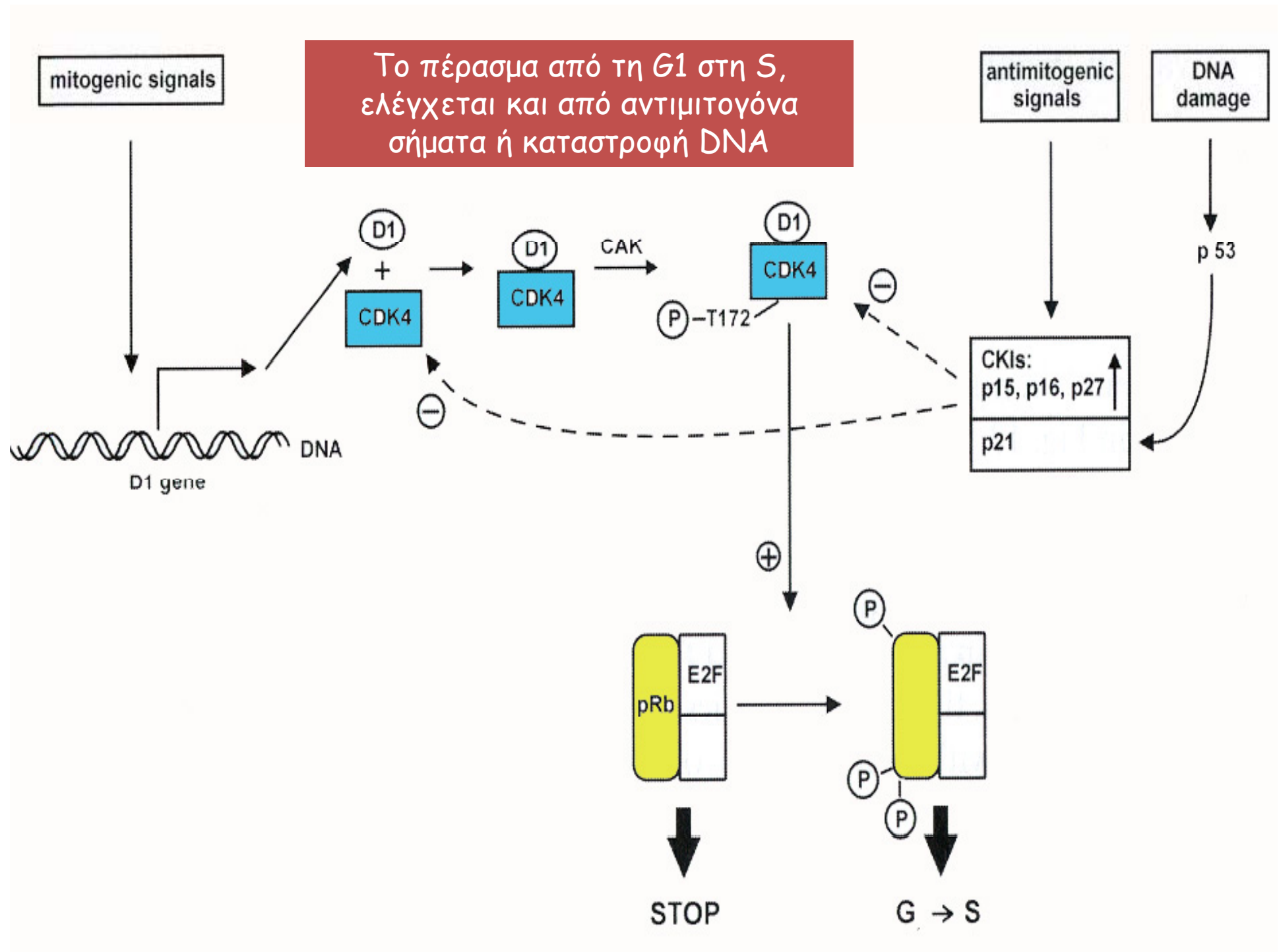




# Ρύθμιση και λειτουργία των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου

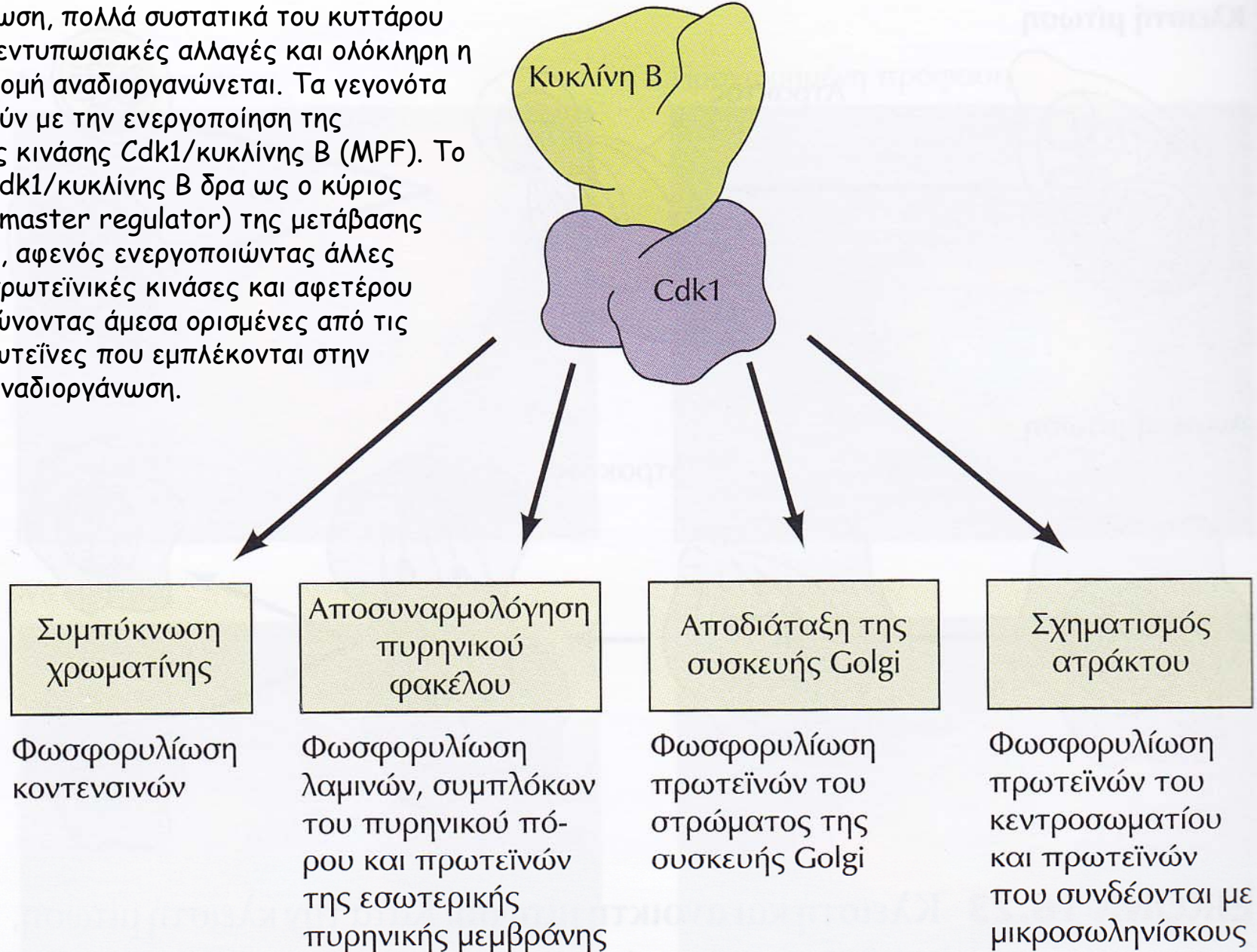






## Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B και η πρόοδος της μετάφασης

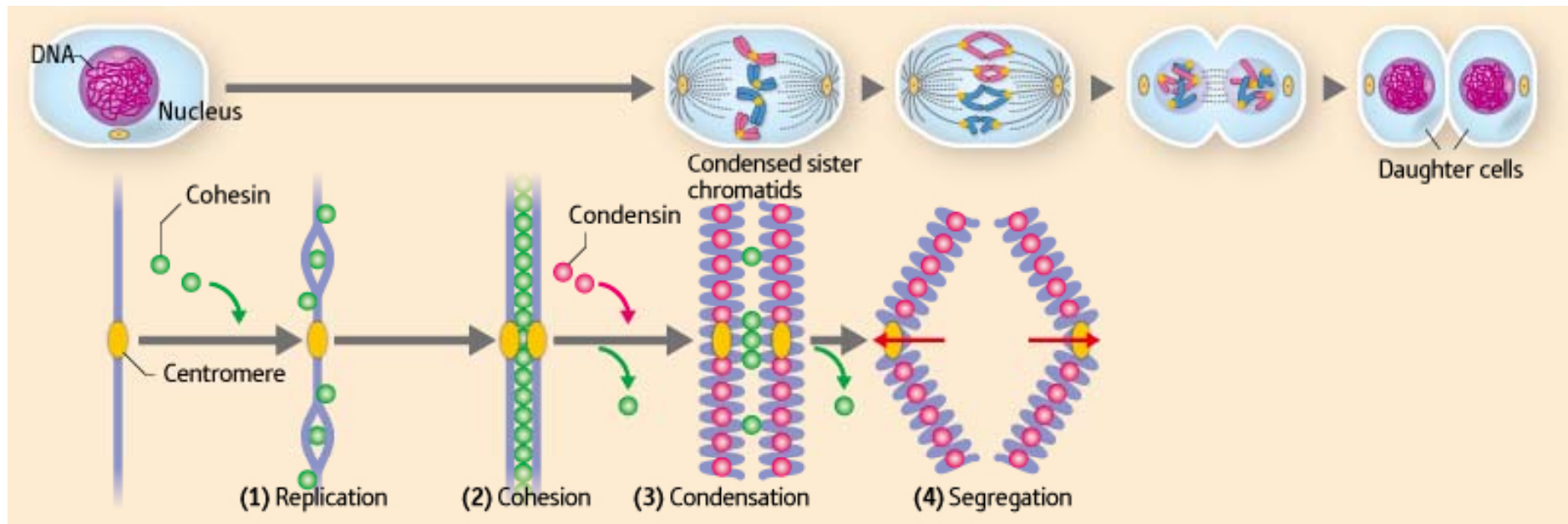
Κατά τη μίτωση, πολλά συστατικά του κυττάρου υφίστανται εντυπωσιακές αλλαγές και ολόκληρη η κυτταρική δομή αναδιοργανώνεται. Τα γεγονότα αυτά ξεκινούν με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης Cdk1/κυκλίνης B (MPF). Το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B δρα ως ο κύριος ρυθμιστής (master regulator) της μετάβασης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



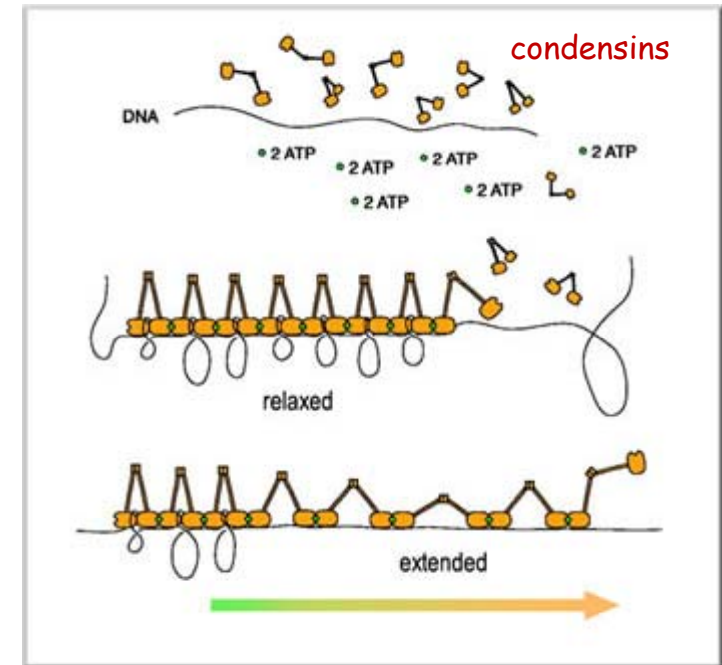
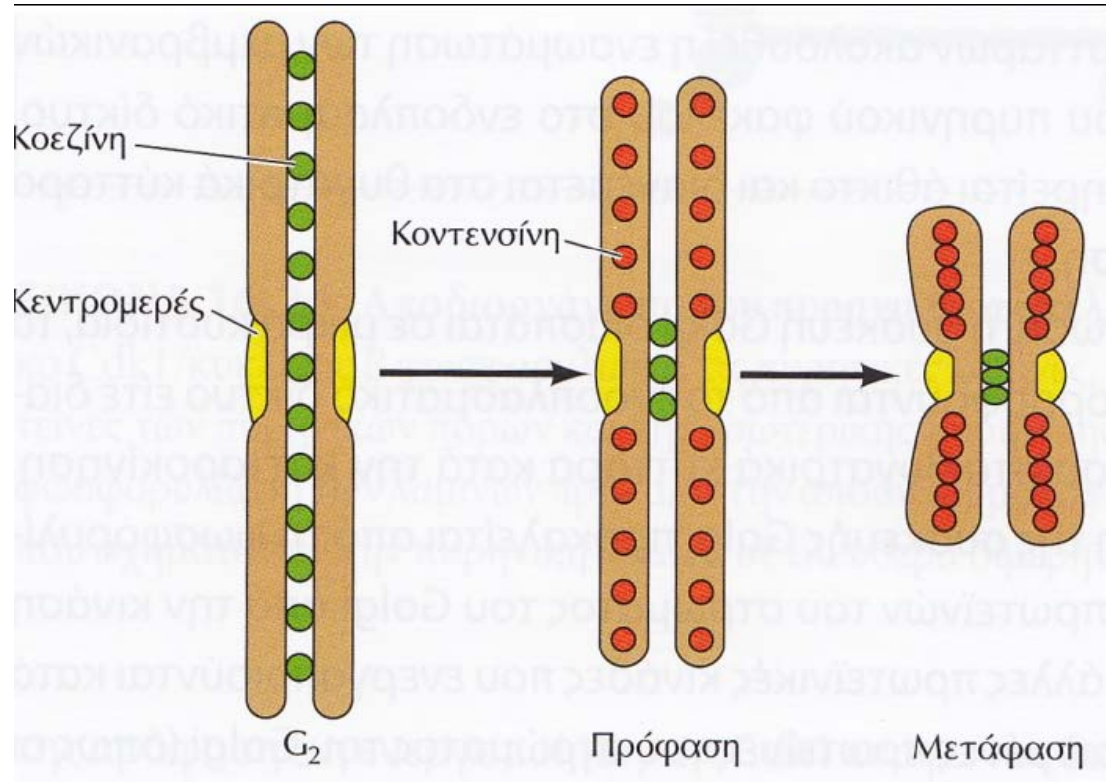
Η συμπίκνωση της μεσοφασικής χρωματίνης που οδηγεί στο σχηματισμό των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων των μιτωτικών κυττάρων είναι το σημαντικότερο φαινόμενο της μίτωσης, με καθοριστική σημασία για τη μετακίνηση των χρωμοσωμάτων κατά μήκος της μιτωτικής ατράκτου χωρίς να υποστούν θραύσεις ή να μπερδευτούν.

Κατά τον σχηματισμό των μεταφασικών χρωμοσωμάτων η χρωματίνη των μεσοφασικών πυρήνων καθίσταται σχεδόν 1.000 φορές πιο συμπυκνωμένη. Είναι τόσο υψηλός ο βαθμός συμπίκνωσης, που η χρωματίνη είναι αδύνατον να μεταγραφεί πλέον. Παρά τη θεμελιώδη σημασία αυτού του γεγονότος, δεν έχουμε κατανοήσει πλήρως ούτε τη δομή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων ούτε τον μοριακό μηχανισμό της συμπίκνωσης της χρωματίνης. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι η συμπίκνωση της χρωματίνης επιτυγχάνεται από σύμπλοκα πρωτεϊνών που ονομάζονται **κοντενσίνες** (condensins). Οι κοντενσίνες ανήκουν στην ομάδα των πρωτεϊνών «διατήρησης της δομής της χρωματίνης» (SMC, Structural Maintenance of Chromatin), που έχουν σημαντικούς ρόλους στην οργάνωση των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων.

Τόσο οι κοντενσίνες όσο και μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών SMC, οι **κοχεσίνες** (cohesins), συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση.

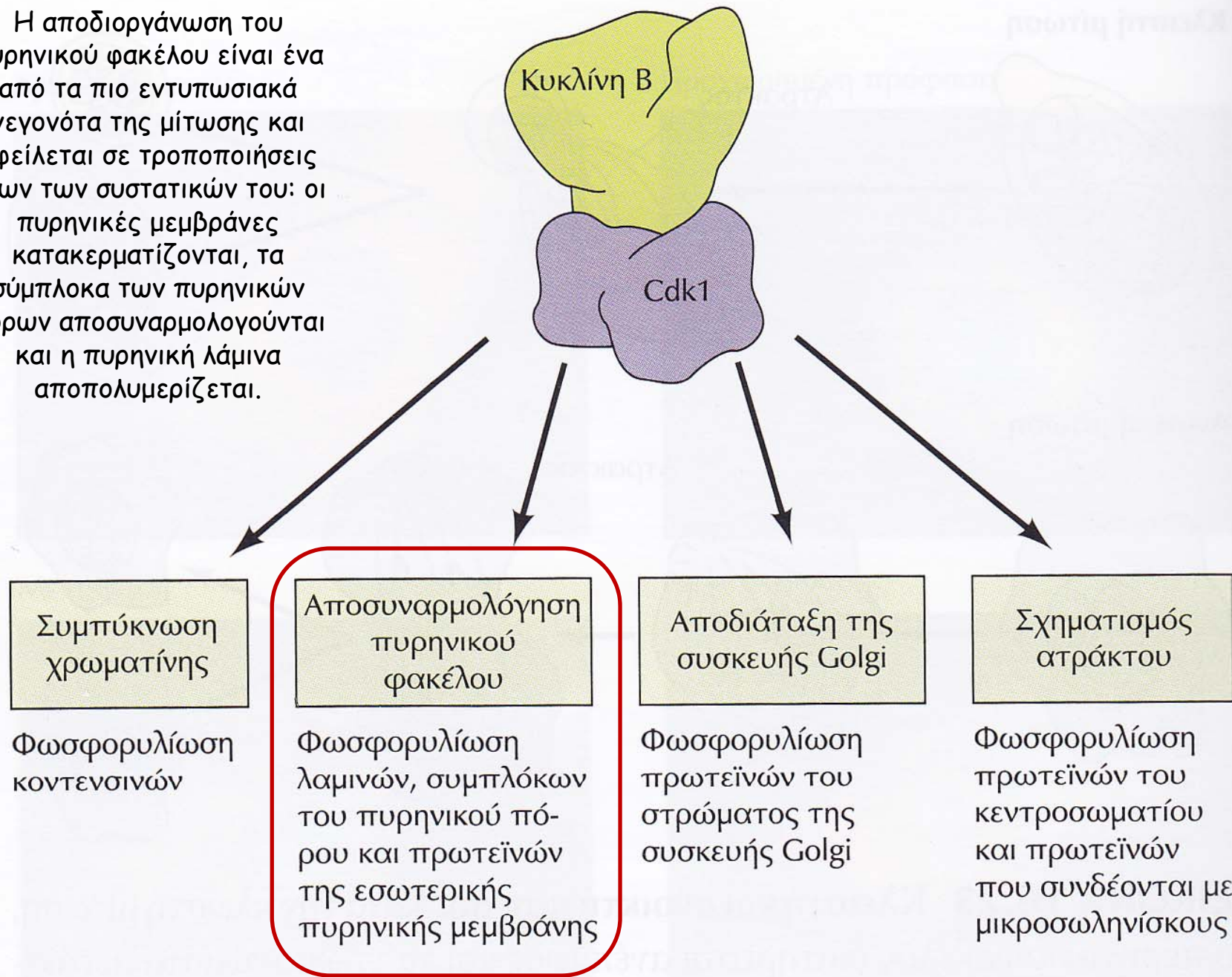






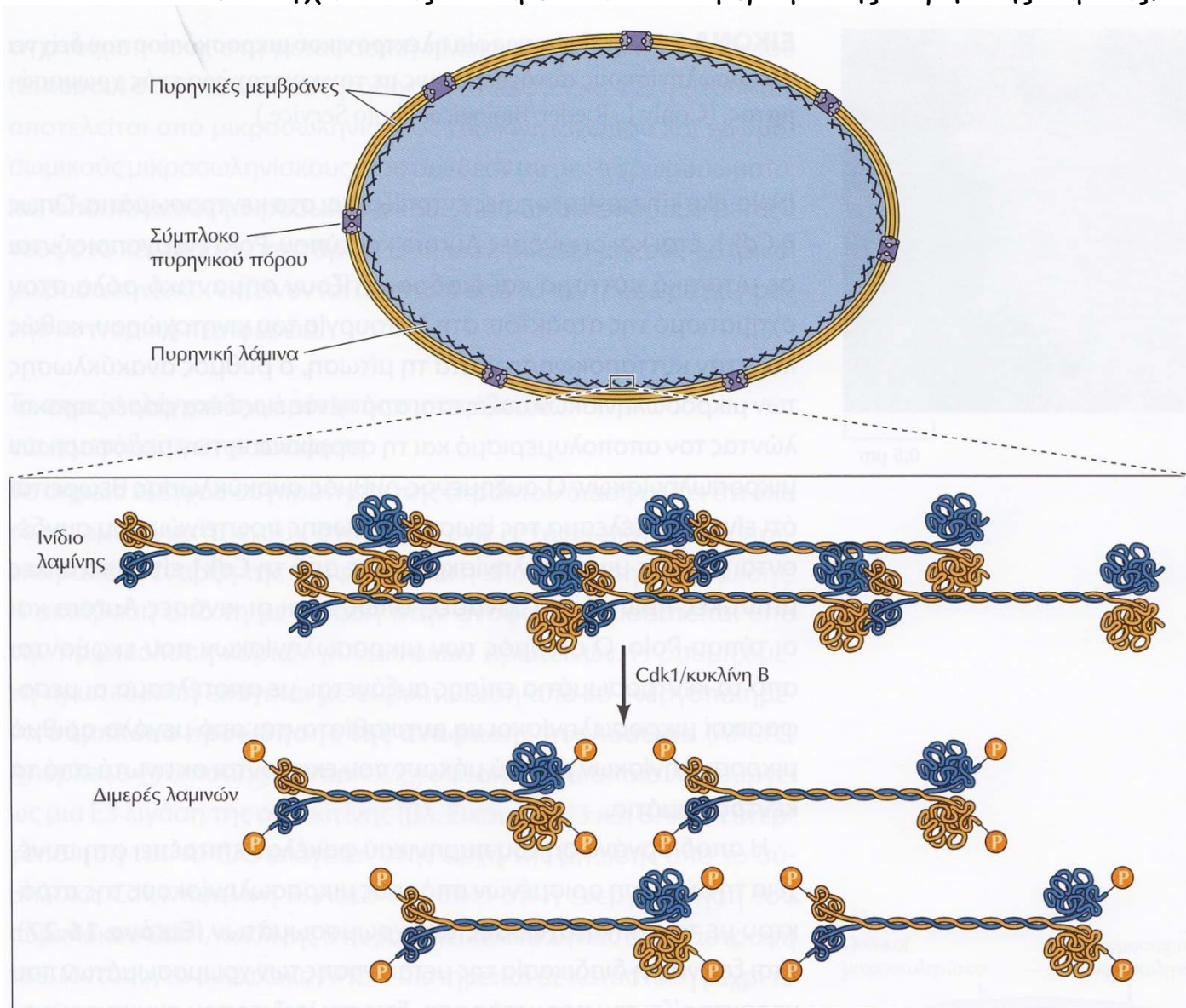
Οι κοεζίνες προσδέονται στο DNA κατά τη φάση S και διατηρούν τη σύνδεση μεταξύ των αδελφών χρωματίδων μετά την αντιγραφή του DNA. Καθώς το κύτταρο εισέρχεται στη φάση M, οι κοντενσίνες ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση από το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B. Στη συνέχεια, οι κοντενσίνες αντικαθιστούν τις κοεζίνες στο μεγαλύτερο μήκος του χρωμοσώματος, έτσι ώστε οι αδελφές χρωματίδες να παραμένουν συνδεδεμένες μόνο στο κεντρομερές. Επιπλέον, οι κοντενσίνες επάγουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης, οδηγώντας στο σχηματισμό των μεταφασικών χρωμοσωμάτων.

Η αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου είναι ένα από τα πιο εντυπωσιακά γεγονότα της μίτωσης και οφείλεται σε τροποποιήσεις όλων των συστατικών του: οι πυρηνικές μεμβράνες κατακερματίζονται, τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων αποσυναρμολογούνται και η πυρηνική λάμινα αποπολυμερίζεται.





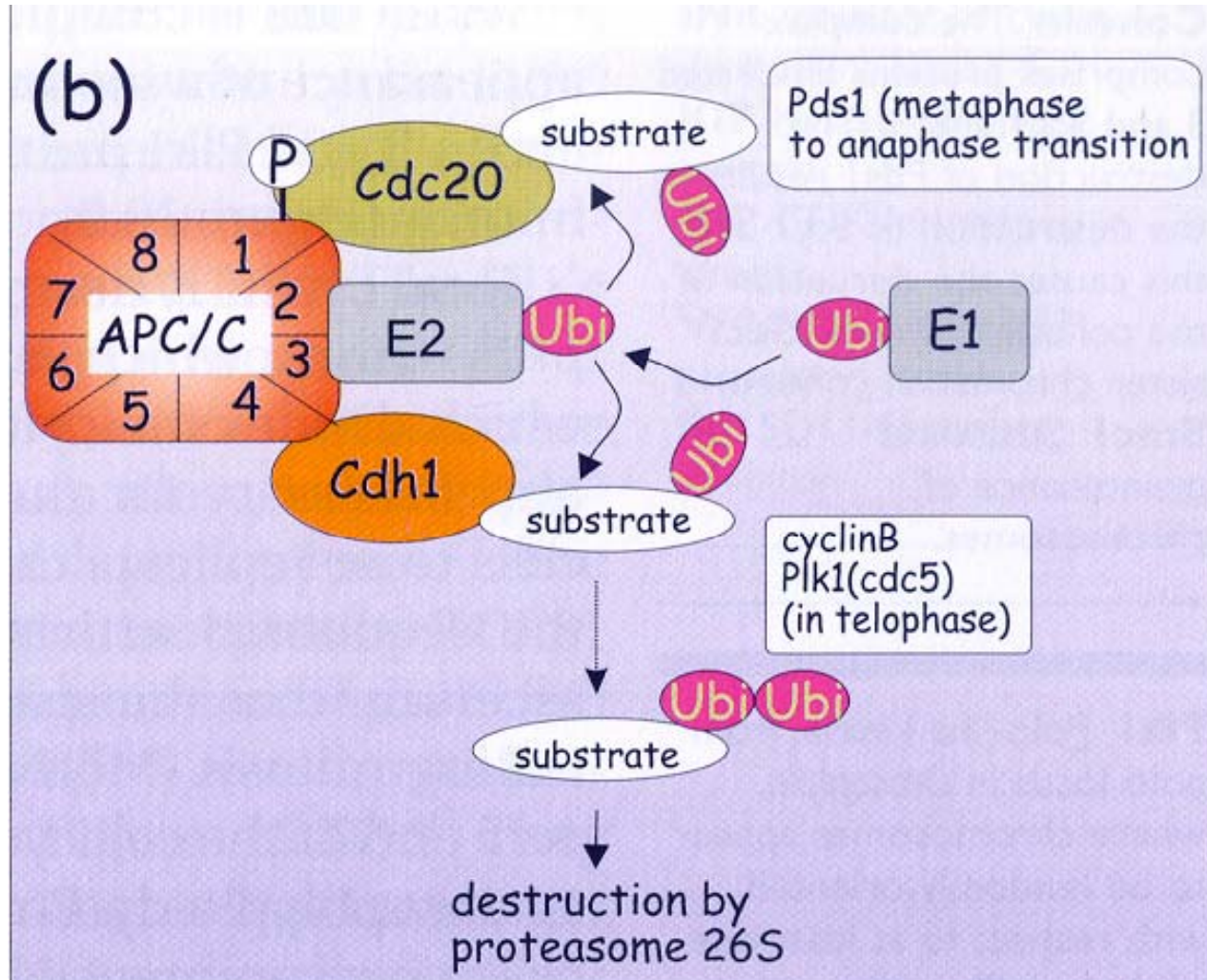
Ο αποπολυμερισμός της πυρηνικής λάμινας (του δικτύου των ινιδίων που πλαισιώνουν την εσωτερική πλευρά του πυρηνικού φακέλου) προκαλείται από τη φωσφορυλίωση των λαμινών από τη Cdk1. Η φωσφορυλίωση προκαλεί τη διάσπαση των ινιδίων της λάμινας σε ελεύθερα διμερή λαμινών, επιτυγχάνοντας τον άμεσο αποπολυμερισμό της πυρηνικής λάμινας.





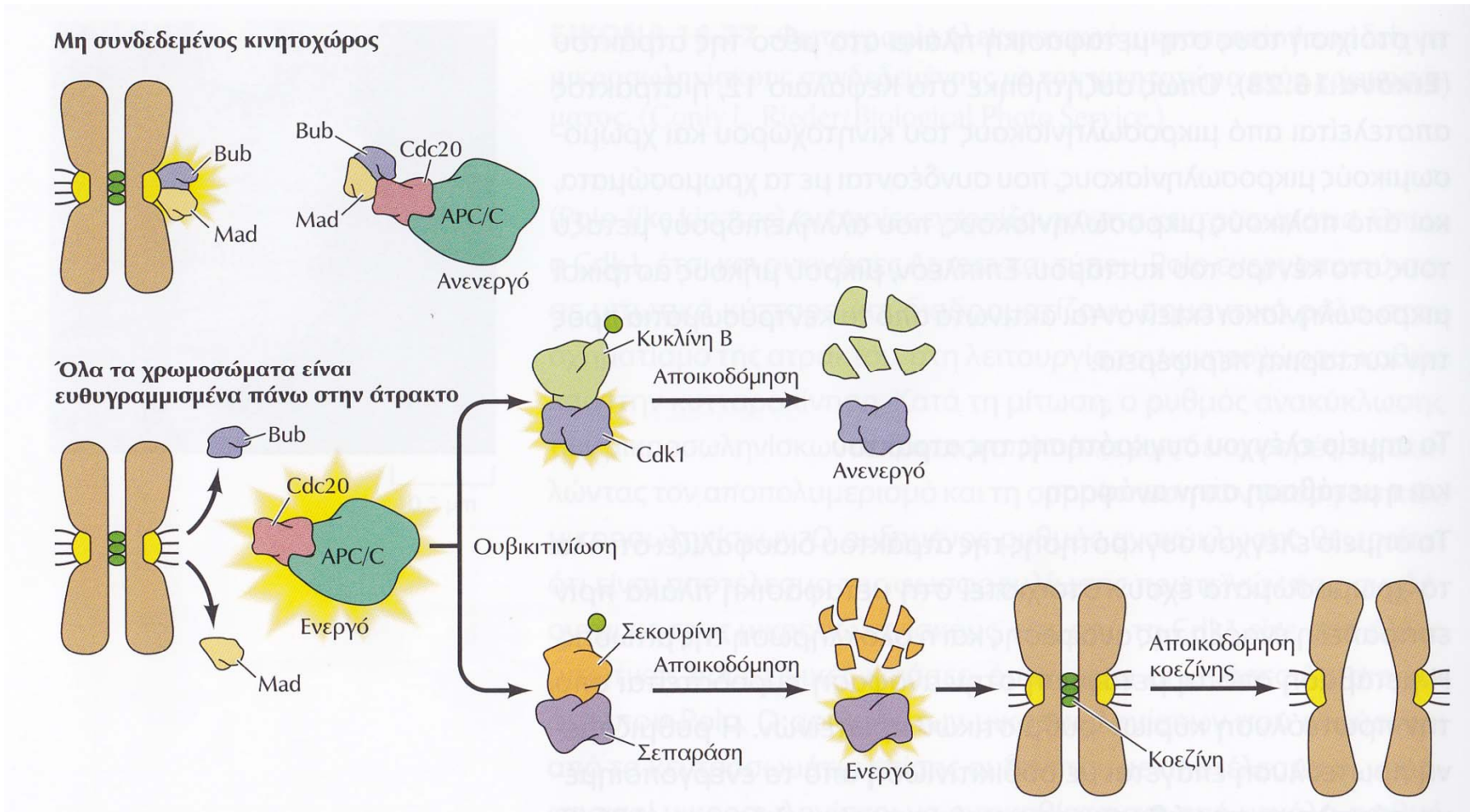
### Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου και η μετάβαση στην ανάφαση

Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου ελέγχει τη στοίχιση των χρωμοσωμάτων στη μεταφασική άτρακτο. Από τη στιγμή που θα ολοκληρωθεί, το κύτταρο μπορεί να προχωρήσει στην έναρξη της ανάφασης και στην ολοκλήρωση της μίτωσης. Για τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση είναι απαραίτητη η πρωτεόλυση μέσω ουβικιτινίωσης ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, από το ενεργοποιημένο **σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης/κυκλώσωμα** (APC/C, Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome), το οποίο λειτουργεί ως μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης.



Η ενεργοποίηση του APC/C επάγεται στην αρχή της μίτωσης. Αυτό σημαίνει ότι η ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk1/κυκλίνης B πυροδοτεί τελικά την αυτοκαταστροφή του. Ωστόσο, το σύμπλοκο APC/C διατηρείται σε καταστολή μέχρι το κύτταρο να περάσει το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου, σημείο στο οποίο η ενεργοποίηση του συστήματος ουβικιτινίωσης προκαλεί τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση και την ολοκλήρωση της μίτωσης.

Το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου έχει την εκπληκτική ικανότητα να παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του APC/C ακόμα κι αν ένα μόνο χρωμόσωμα δεν είναι στοιχισμένο. Η λειτουργία αυτού του σημείου ελέγχου βασίζεται σε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών (τις πρωτεΐνες Mad/Bub) που καταστέλλει την πρωτεΐνη Cdc20, η οποία είναι απαραίτητο συστατικό του APC/C.

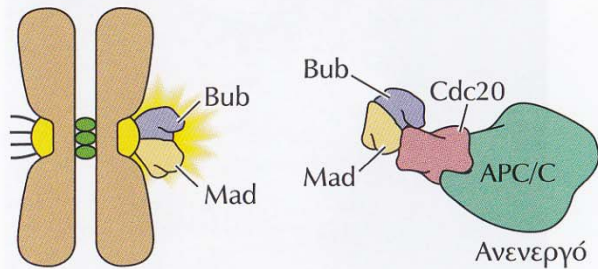




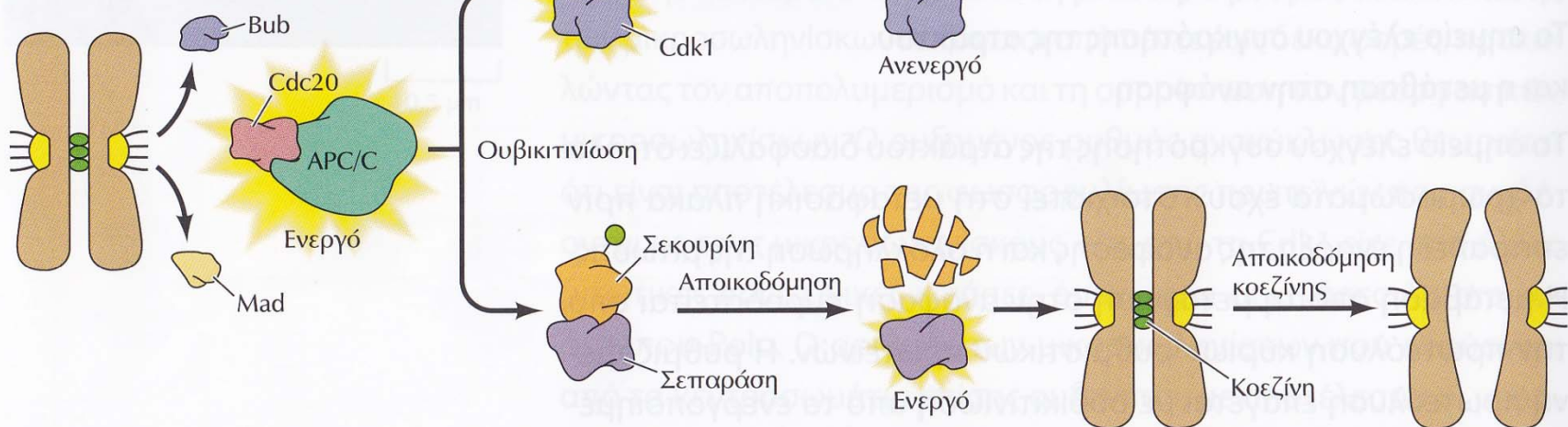
Οι πρωτεΐνες Mad/Bub συγκροτούνται σε ένα ενεργό σύμπλοκο σε όσους κινητοχώρους δεν έχουν συνδεθεί ακόμα με μικροσωληνίσκους. Όταν οι κινητοχώροι συνδεθούν με μικροσωληνίσκους, το σύμπλοκο Mad/Bub αποσυναρμολογείται και σταματά να καταστέλλει τη Cdc20, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το σύμπλοκο APC/C.

Η ενεργοποίηση του APC/C επάγει την ουβικιτινίωση και ακολούθως την αποικοδόμηση δύο σημαντικών πρωτεϊνών-στόχων. Η έναρξη της ανάφασης είναι αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης των κοχεσινών, οι οποίες συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες συνδεδεμένες καθώς στοιχίζονται στη μεταφασική πλάκα όταν βρίσκονται ευθυγραμμισμένες.

Μη συνδεδεμένος κινητοχώρος



Όλα τα χρωμοσώματα είναι ευθυγραμμισμένα πάνω στην άτρακτο



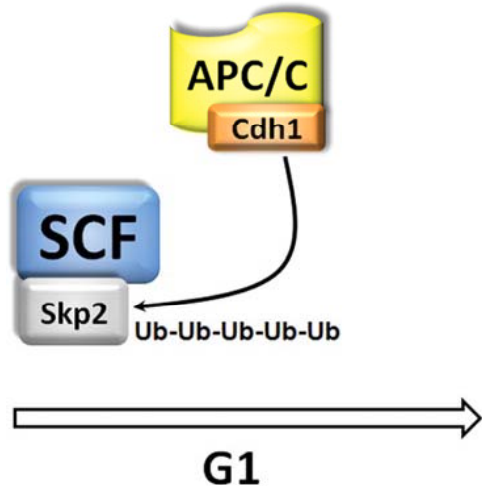


Η αποικοδόμηση των κοεζινών δεν καταλύεται άμεσα από το APC/C. Το APC/C διασπά μια πρωτεΐνη που ονομάζεται σεκουρίνη (securin), η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής μιας πρωτεάσης που ονομάζεται σεπαράση (separase).

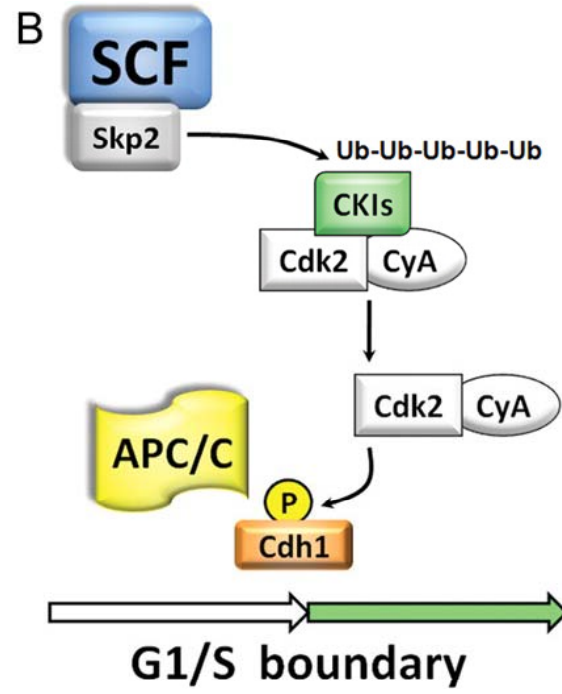
Η αποικοδόμηση της σεκουρίνης ενεργοποιεί τη σεπαράση, η οποία με τη σειρά της διασπά τις κοεζίνες. Η πέψη των κοεζινών προκαλεί την αποσύνδεση των αδελφών χρωματίδων, επιτρέποντάς τους να μετακινηθούν προς τους αντίθετους πόλους της ατράκτου. Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση είναι συνεπώς αποτέλεσμα της δράσης διαφόρων πρωτεϊνών-κινητήρων που συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου.



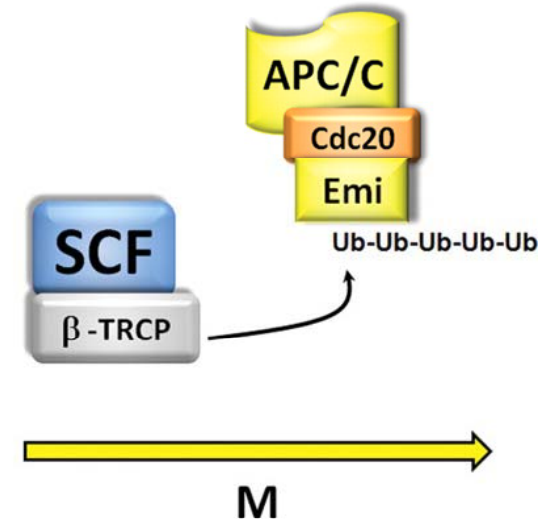
A



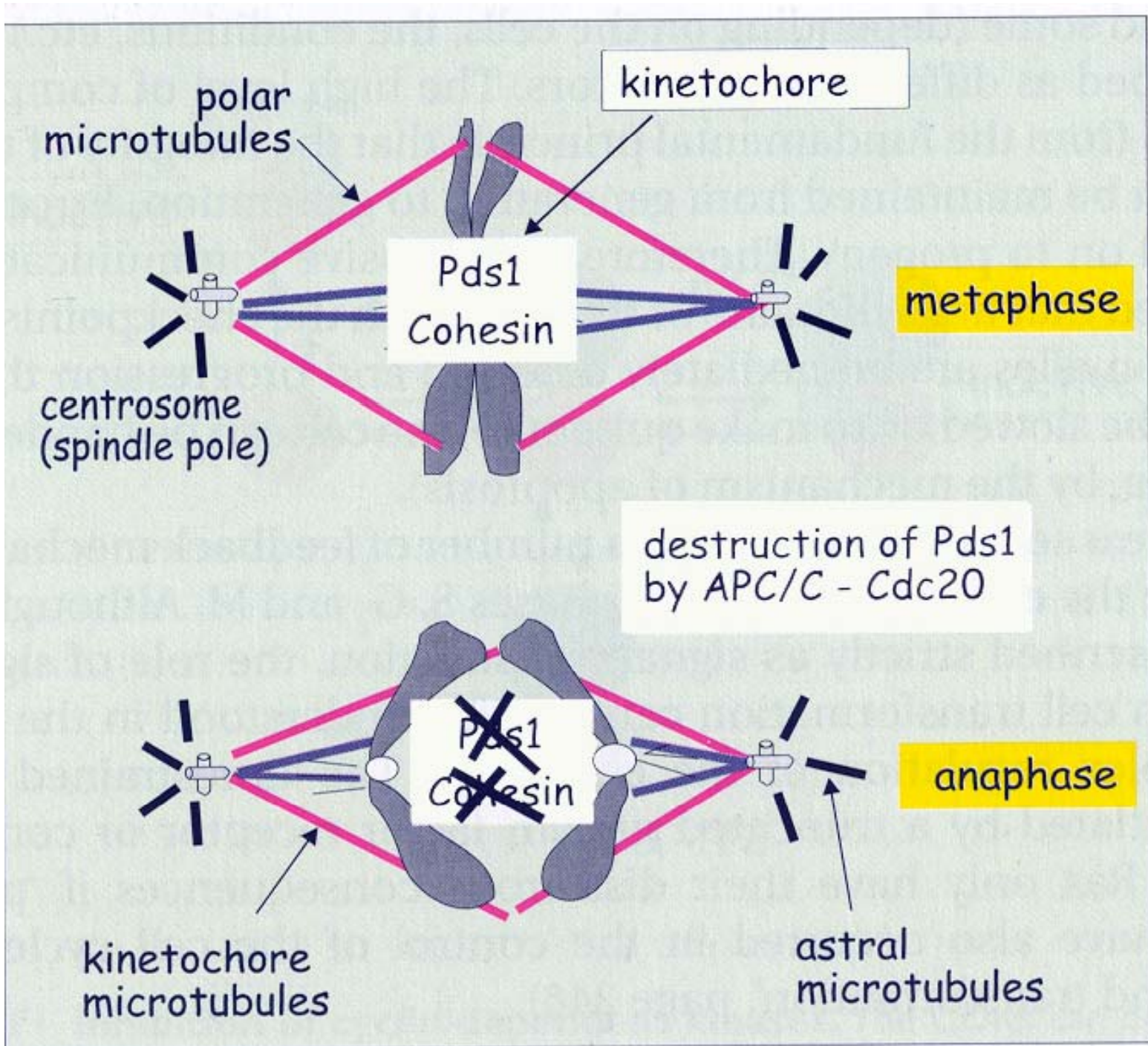
B

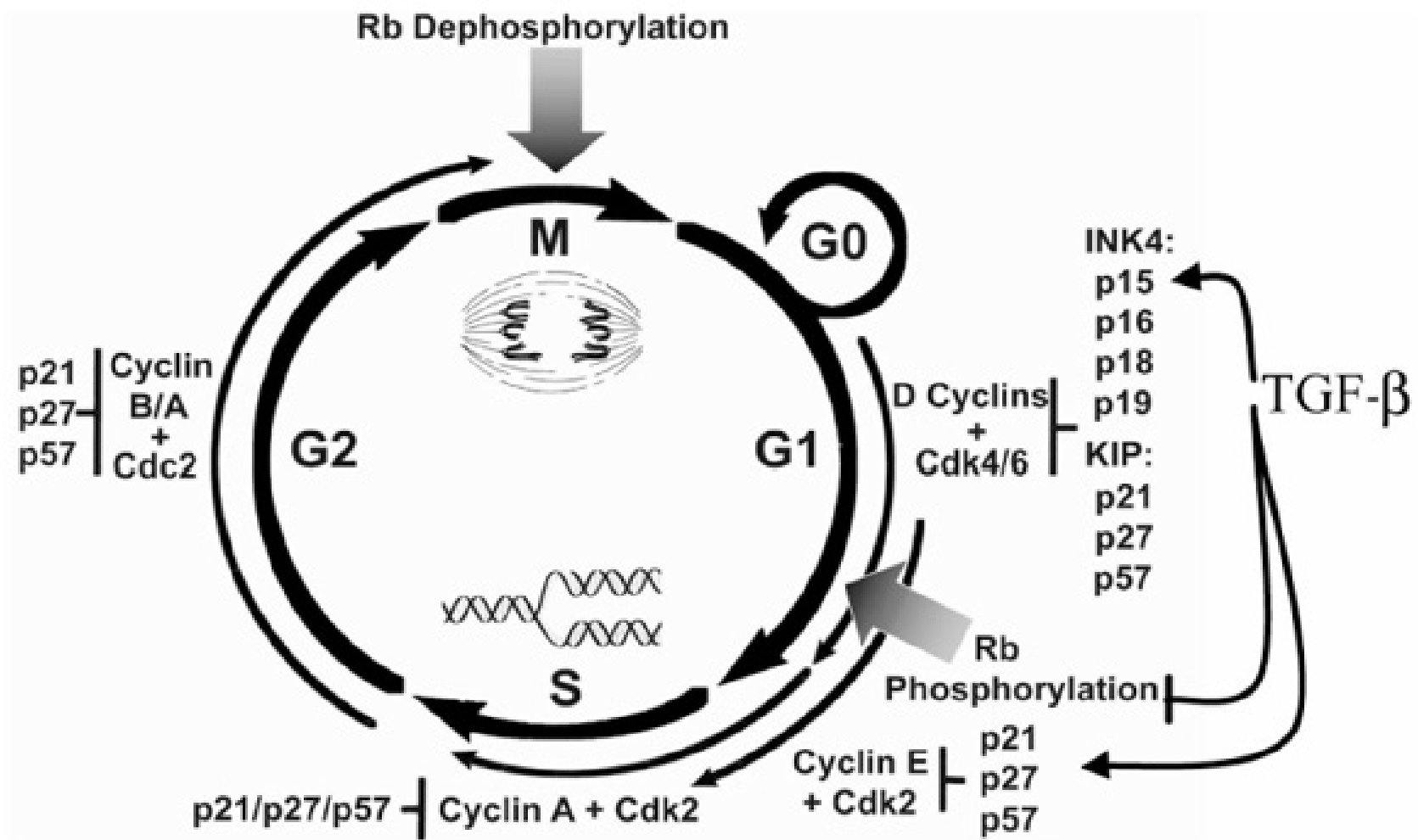


C



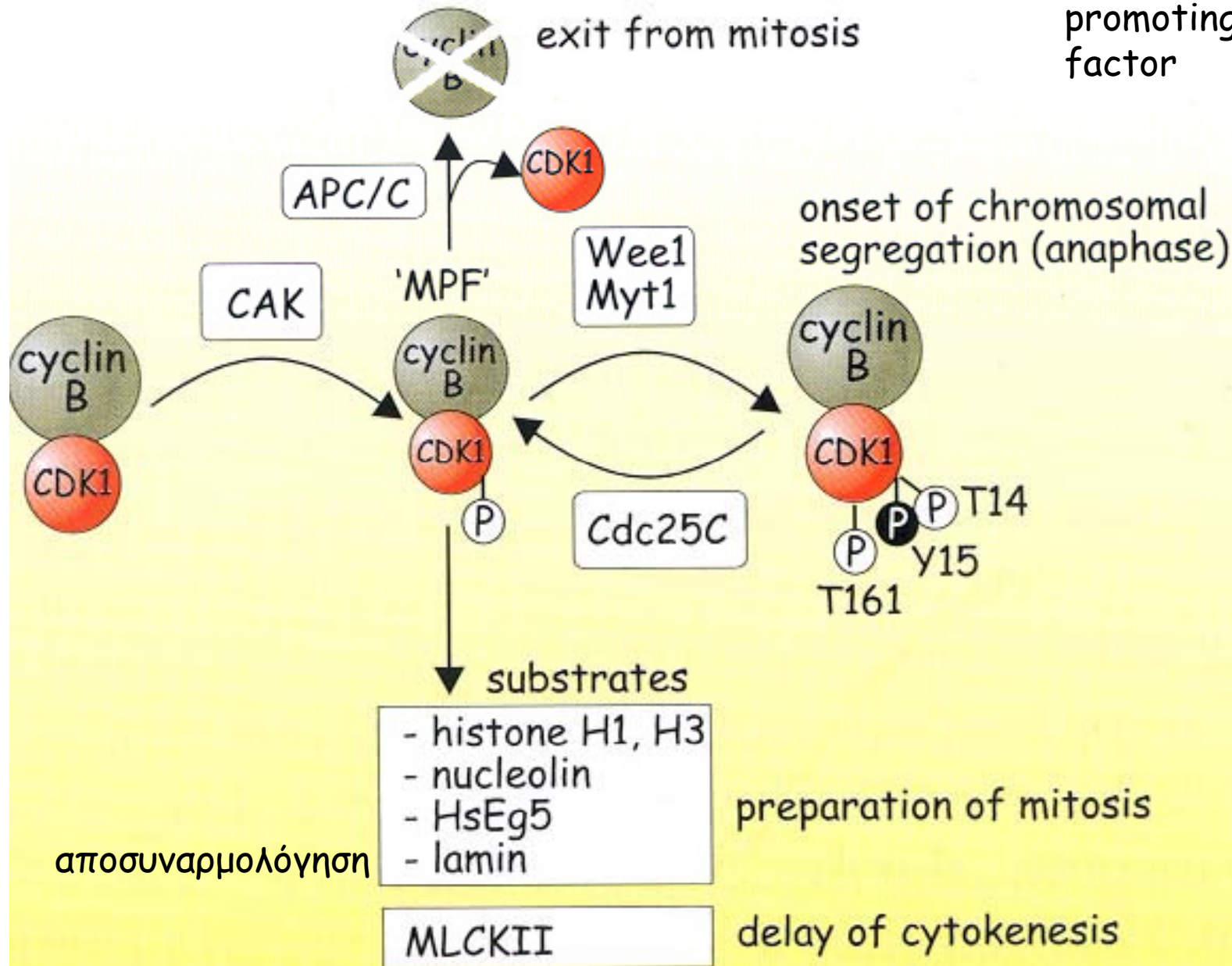




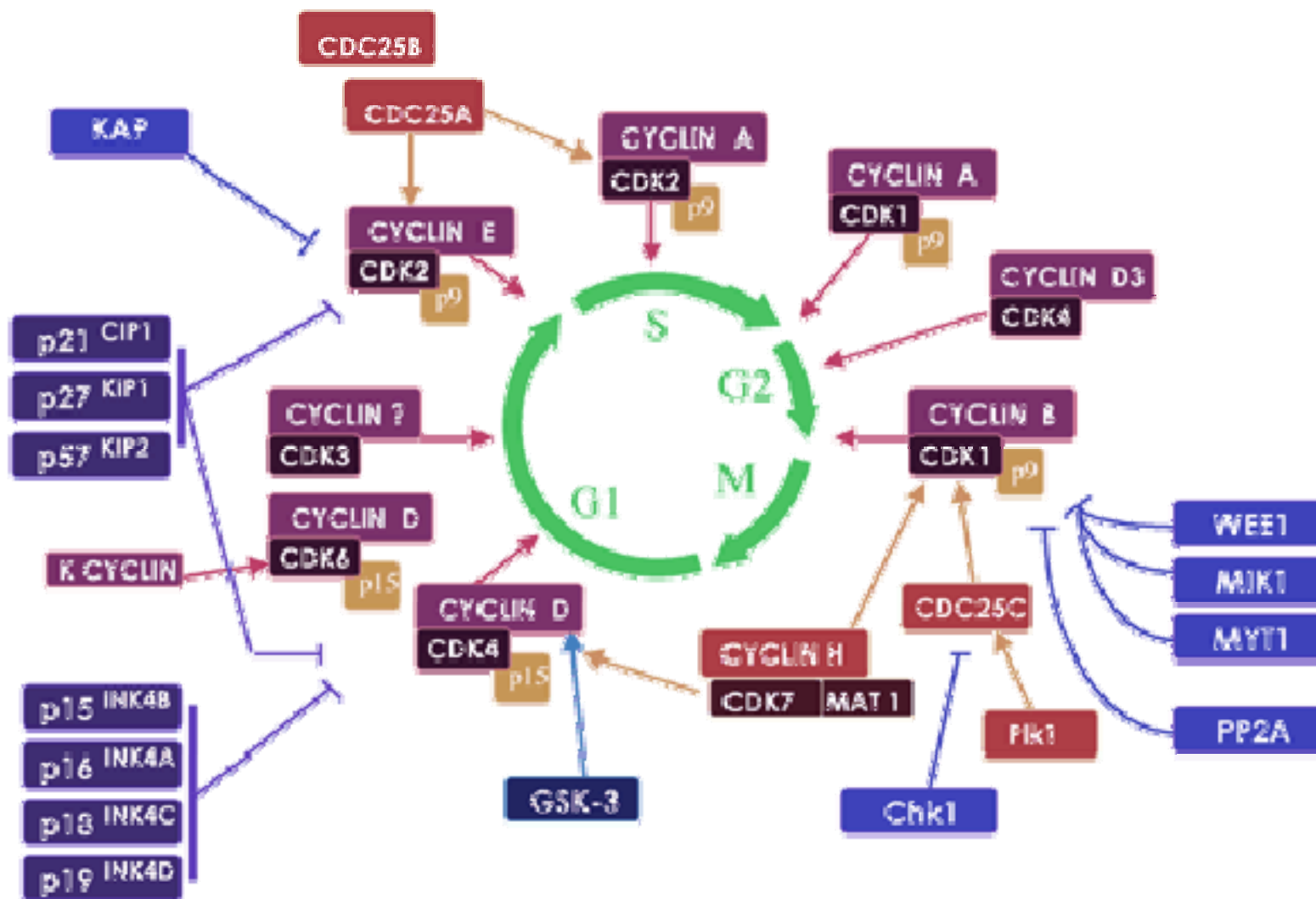


# Κυκλίνη Β και η προετοιμασία της μίτωσης

MPF: mitosis promoting factor



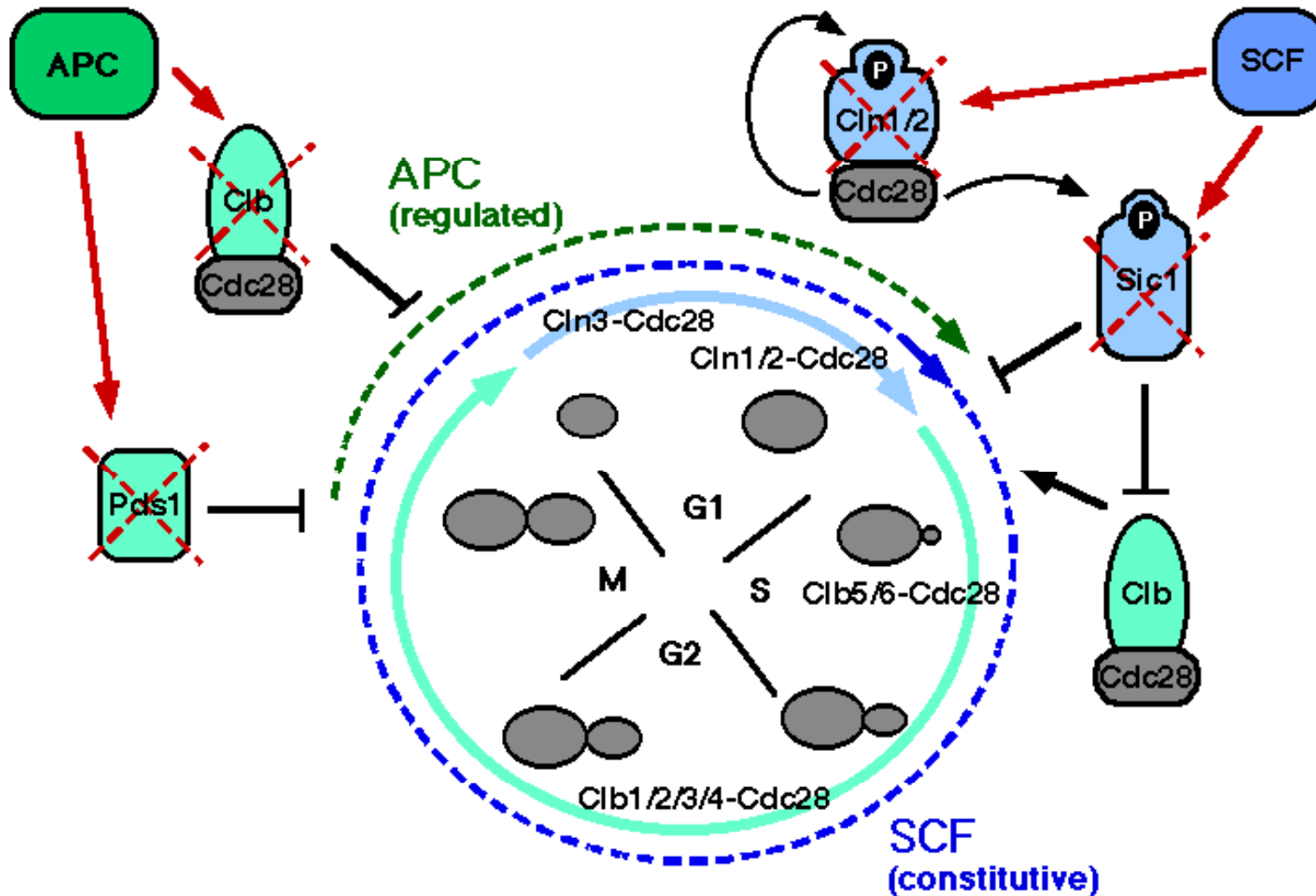


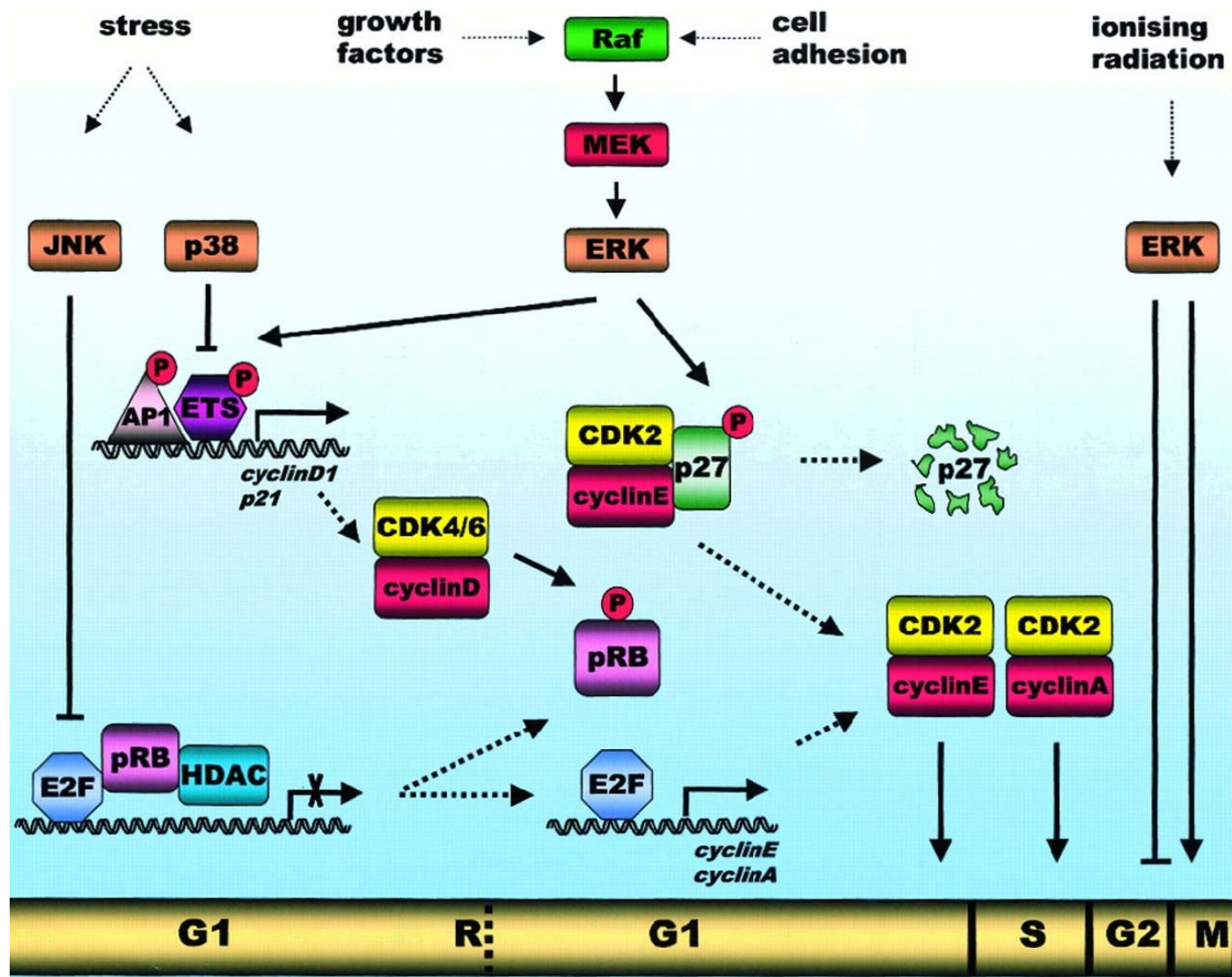


# Proteolytic Regulation of the Cell Cycle

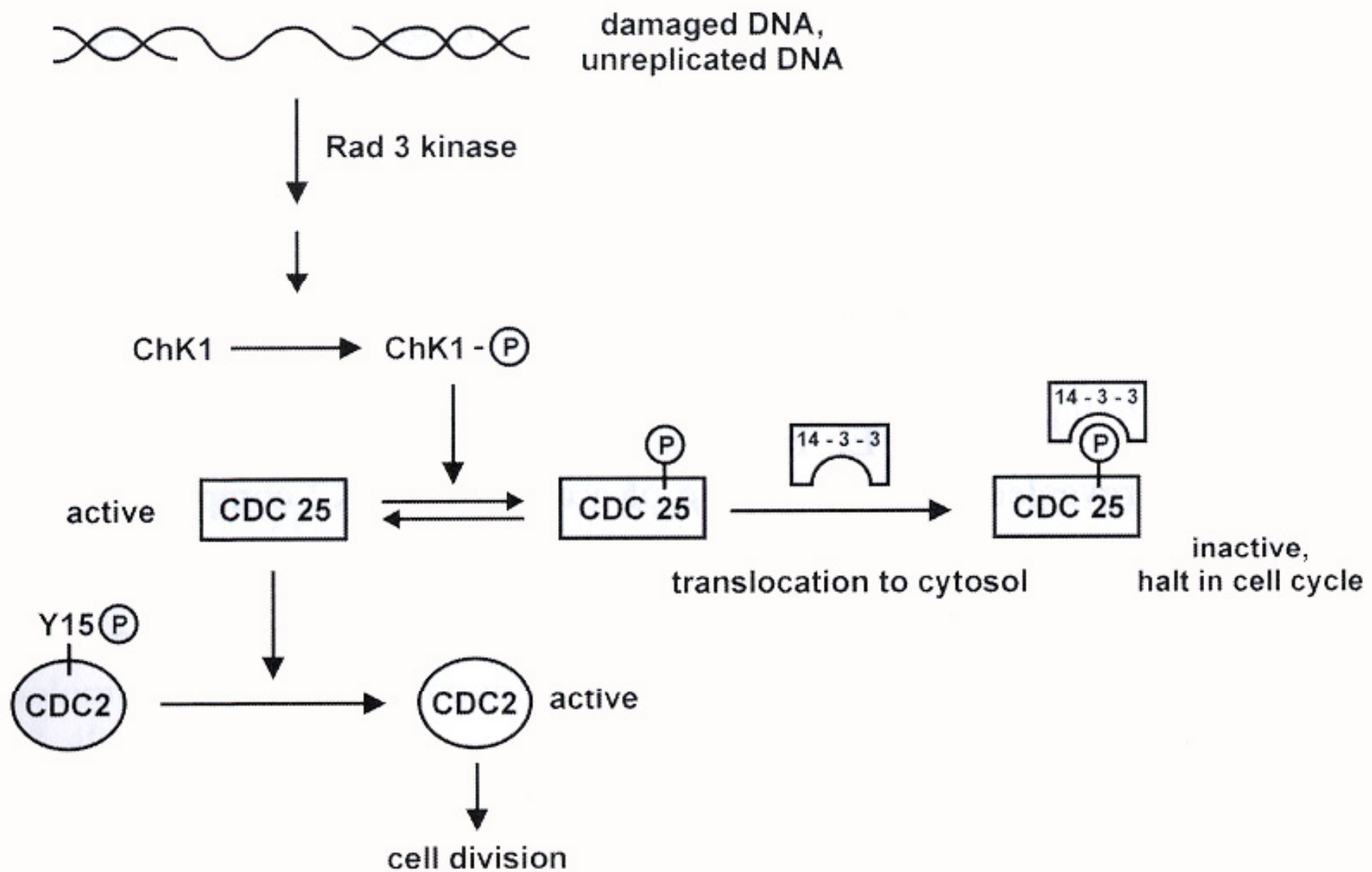
Anaphase Promoting Complex

SCF: ιδιοσυστάτα ενεργό. Δρα στα υποστρώματά του μόνο μετά από φωσφορυλίωση του υποστρώματος

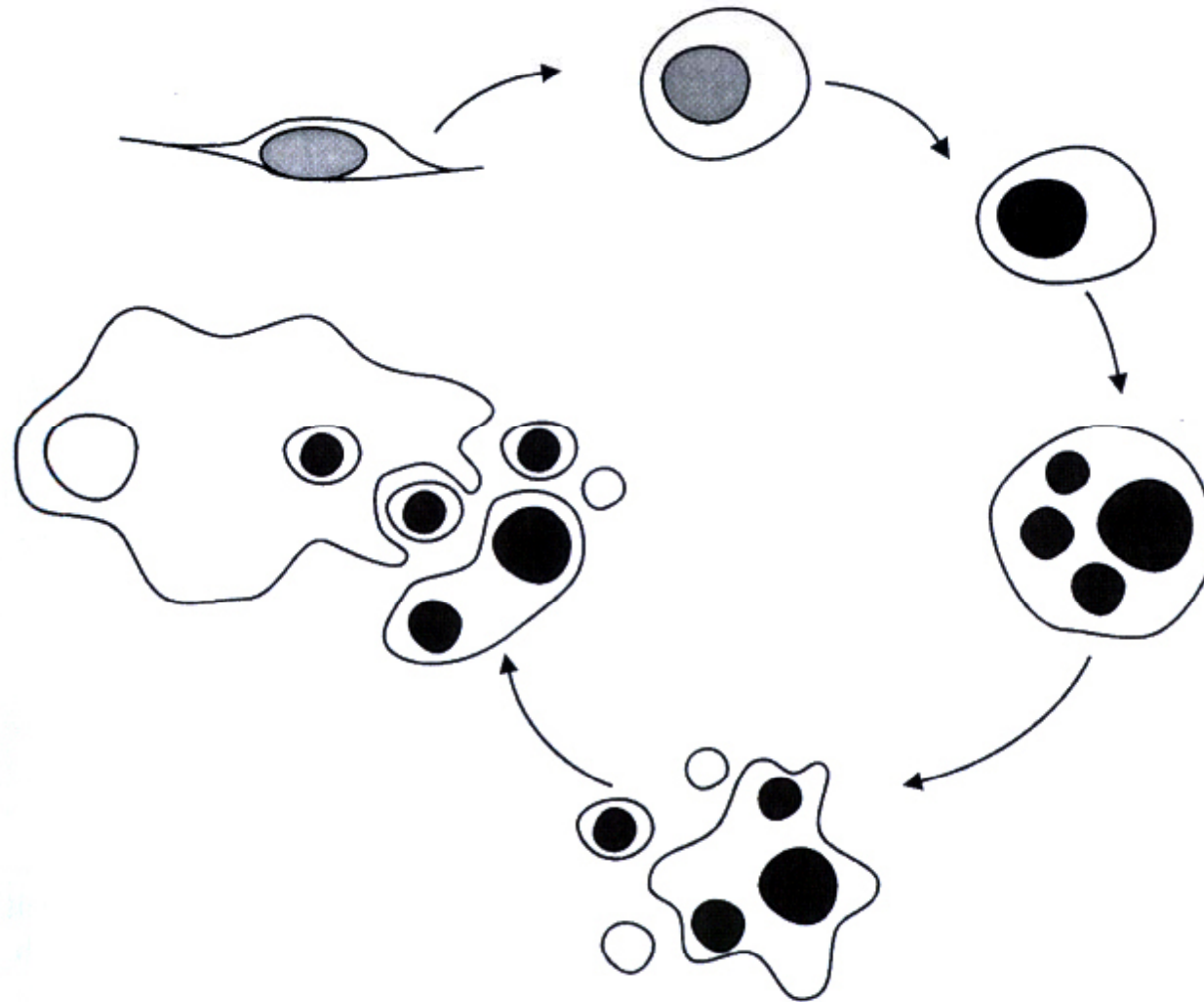








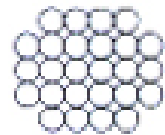
Απόπτωση: Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος



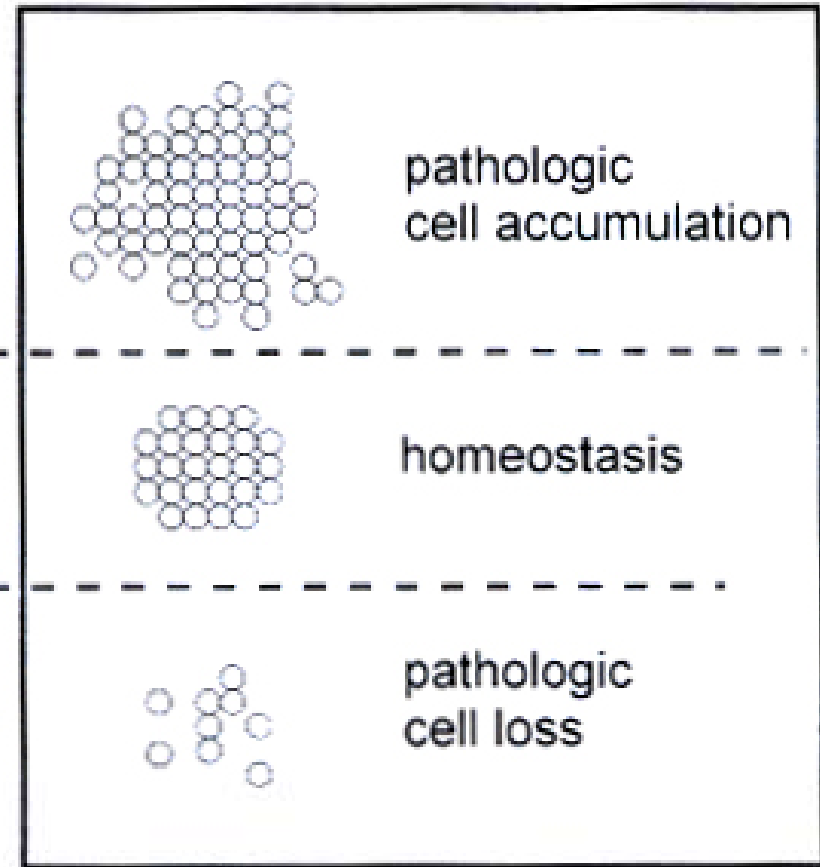
Όταν ένα κύτταρο προσκόλλησης δεχτεί ένα αποπτωτικό σήμα (α) αρχίζει να γίνεται κυκλικό (β) και το πυρηνικό DNA να συμπυκνώνεται (γ). Το DNA κατακερματίζεται και ο πυρήνας αρχίζει να σπάζει σε ξεχωριστά σώματα χρωματίνης (δ). Τελικά, το κύτταρο διαλύεται σε αρκετά κυστίδια (αποπτωτικά σώματα) (ε), τα οποία φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα.



Cell  
division



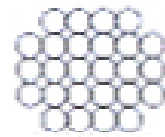
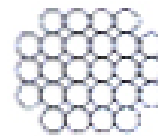
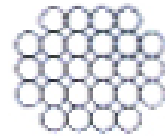
Cell  
death

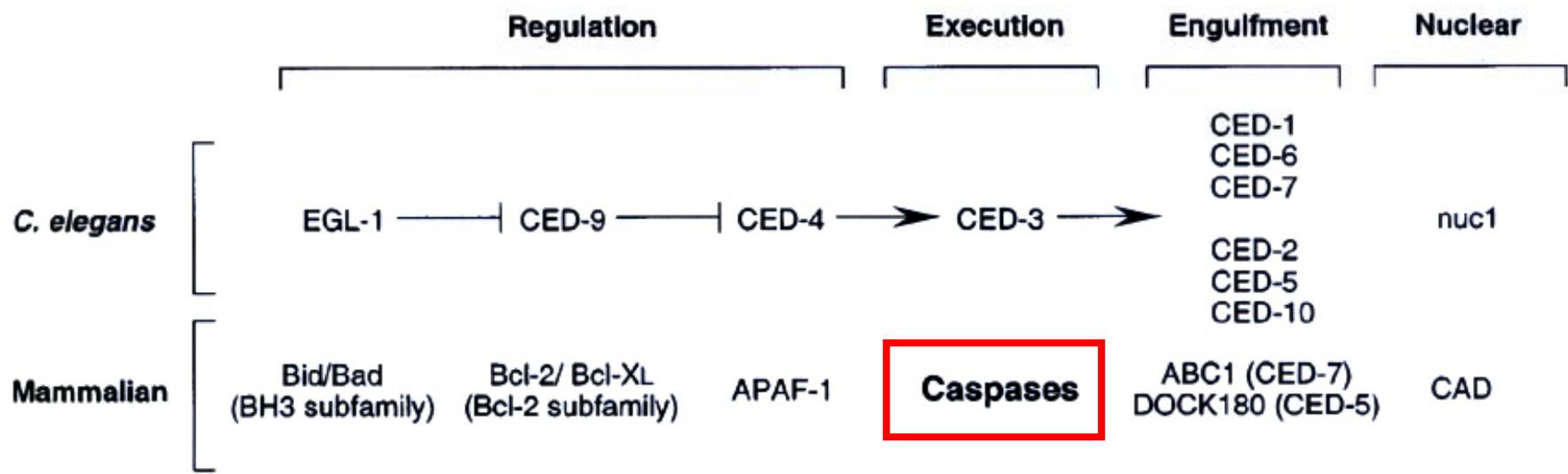
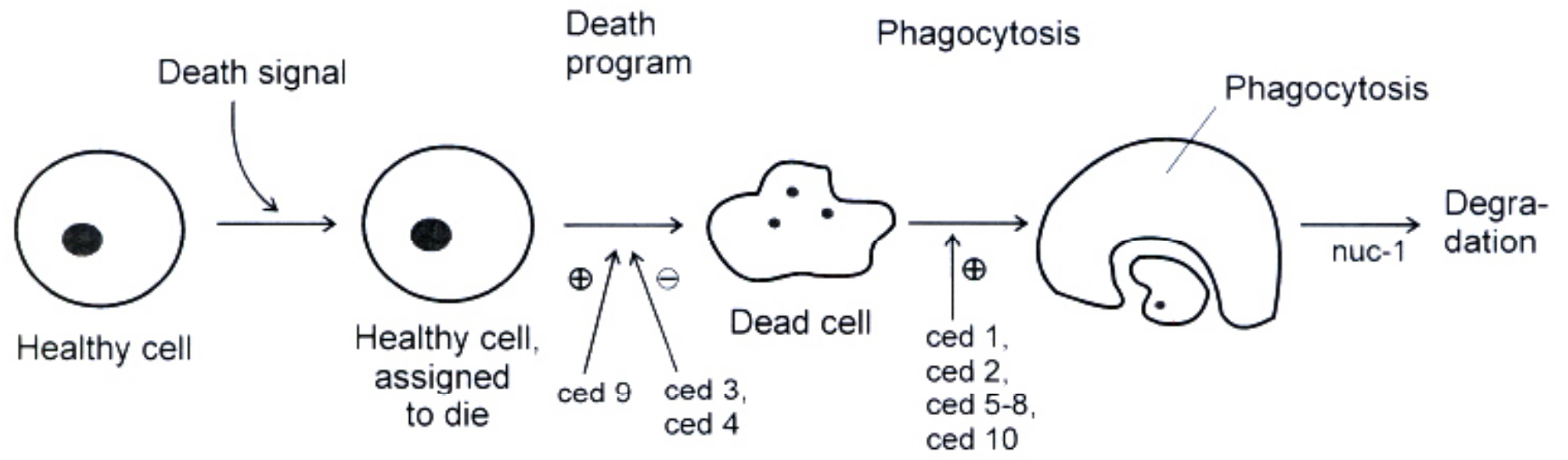


pathologic  
cell accumulation

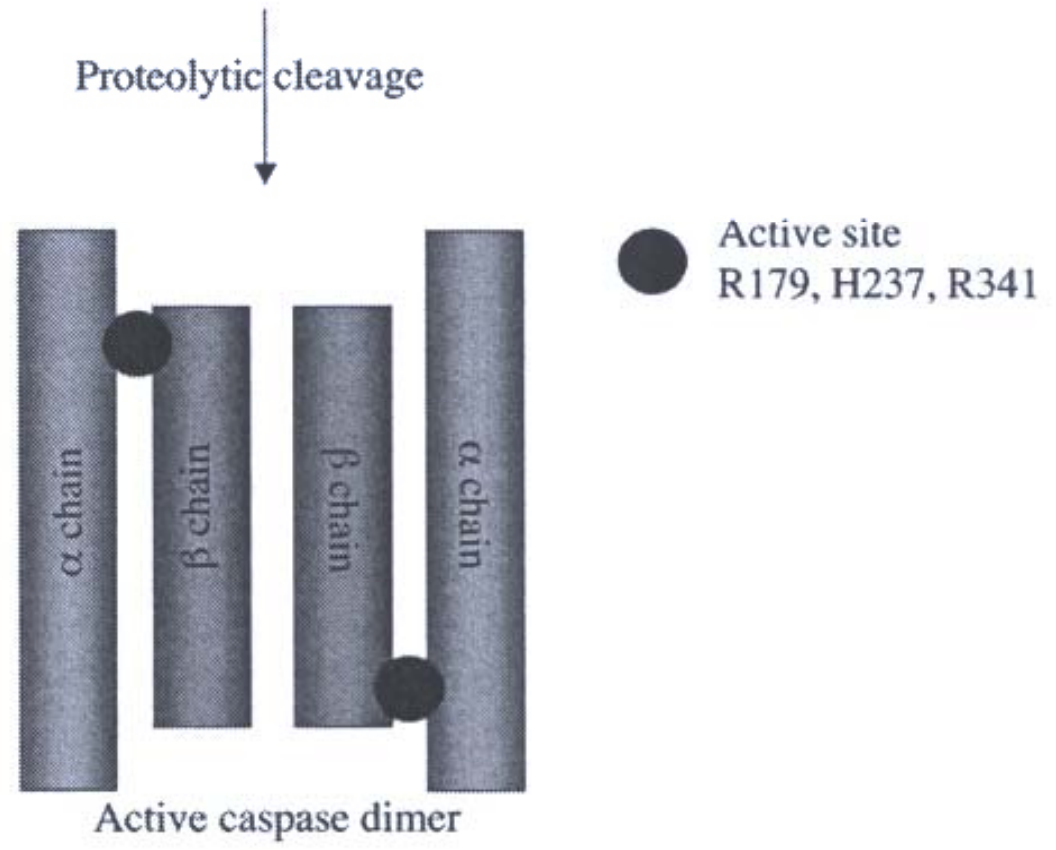
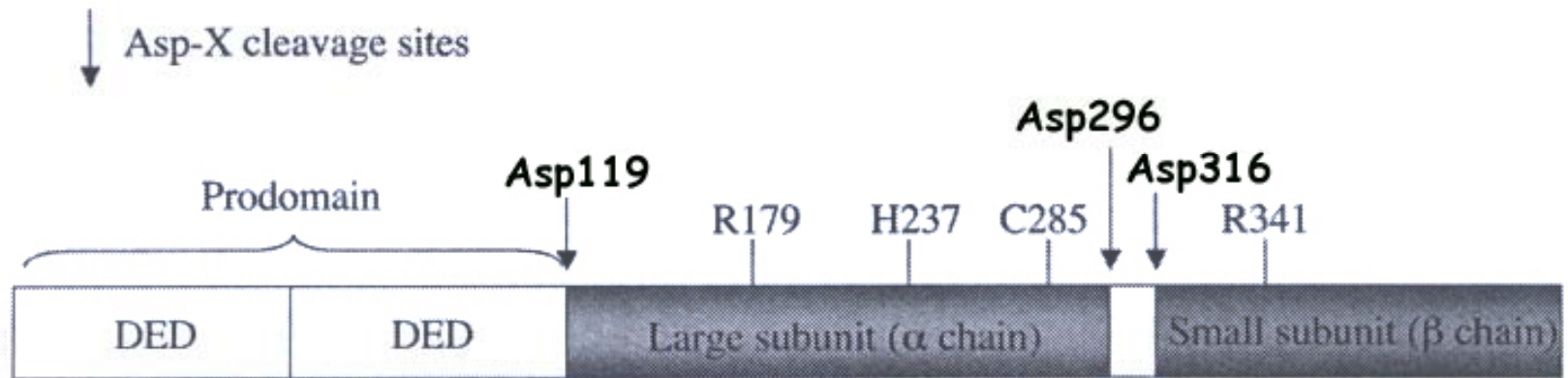
homeostasis

pathologic  
cell loss

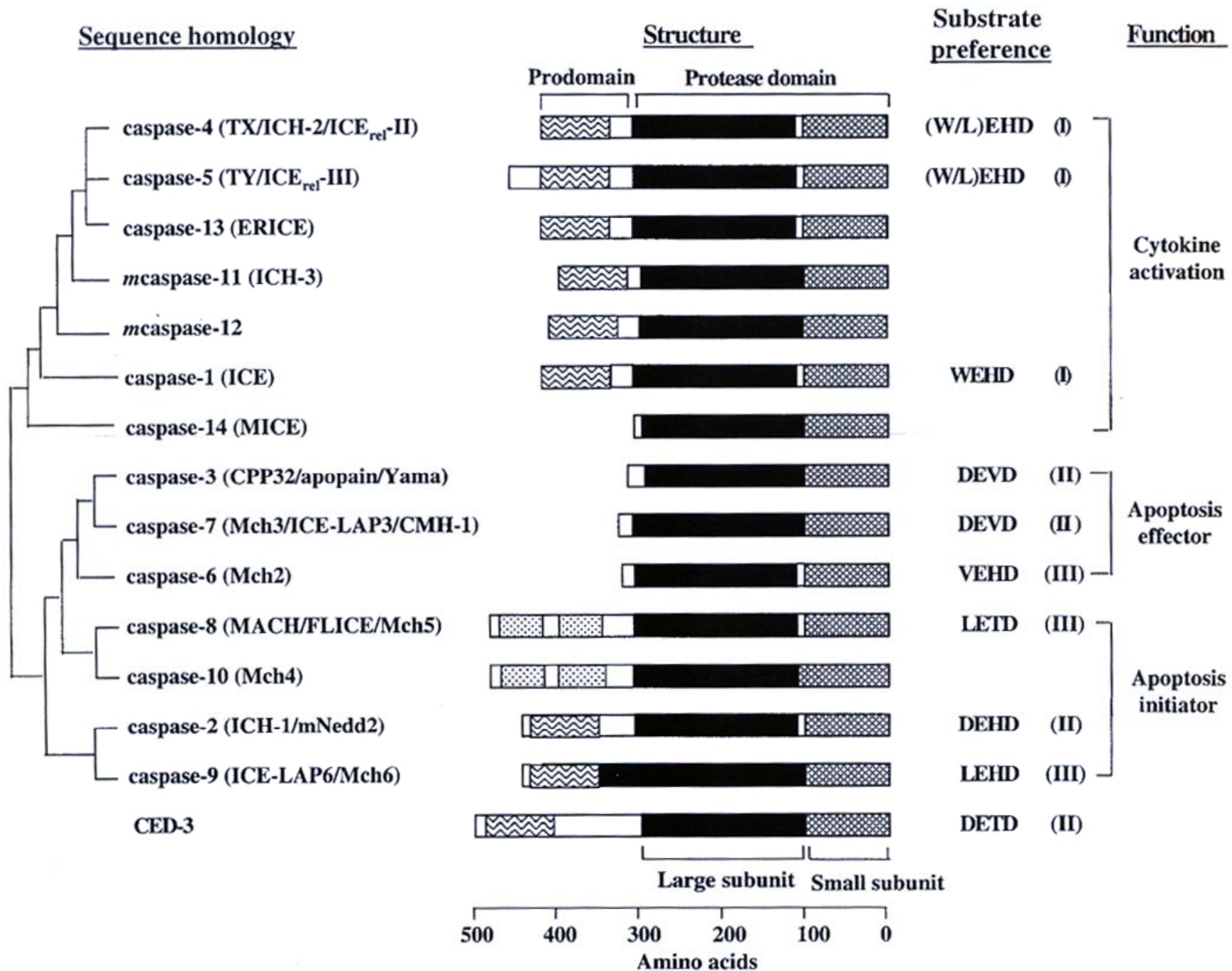




Οι κασπάσες χρησιμοποιούν ένα κατάλοιπο Cys στο ενεργό τους κέντρο και κόβουν το υπόστρωμα μετά από ένα κατάλοιπο Asp.







### Απενεργοποίηση πρωτεϊνών που προστατεύουν από την απόπτωση

- ICAD, αναστολέας DNAάσης (αναστολέας της DNAάσης που ενεργοποιείται από κασπάσες): Αναστολέας μιας DNAάσης που είναι υπεύθυνη για τον τεμαχισμό του DNA.
- Πρωτεΐνη Bcl-2: έχει μια κεντρική αντιαποπρωτική λειτουργία.

### Διάσπαση των κυτταρικών δομών

- Λαμίνες
- Αποδιάταξη κυτταροσκελετού: πηκτωλυματίνη, κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK), p21-ενεργοποιούμενη κινάση (PAK)

### Απενεργοποίηση της επιδιόρθωσης και σύνθεσης του DNA

- Πολυμεράση πολυ-ADP-ριβόζης
- Παράγοντας αντιγραφής C (RF-C)
- Πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από DNA

Κασπάσες έναρξης και  
κασπάσες τελεστές στην  
απόπτωση.

Ένα απαραίτητο μέρος του  
αποπτωτικού προγράμματος  
είναι ο καταρράκτης κασπασών.  
Η απόπτωση αρχίζει με  
πρωτεολυτική επεξεργασία  
μιας προκασπάσης έναρξης  
κάτω από την επίδραση μιας  
ποικιλίας σημάτων. Η ώριμη  
κασπάση έναρξης καταλύει την  
επεξεργασία μιας προκασπάσης  
τελεστή σε ενεργό ένζυμο, το  
οποίο διασπά συγκεκριμένα  
υποστρώματα και/ή  
ενεργοποιεί περαιτέρω  
προκασπάσες. Κατ'αυτόν τον  
τρόπο, οι κασπάσες μπορούν  
να ενεργοποιηθούν διαδοχικά  
σε έναν καταρράκτη  
πρωτεασών.

