




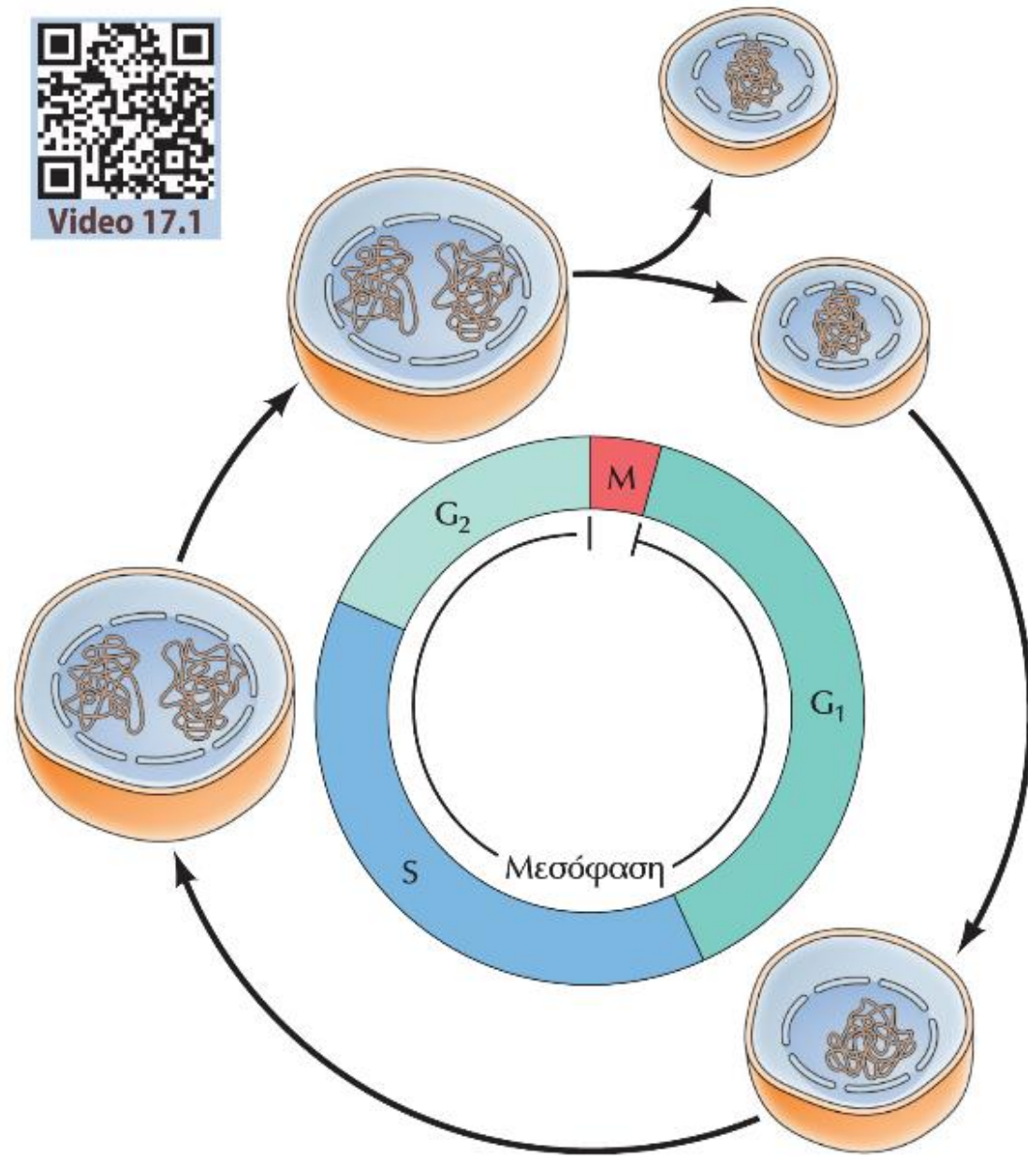
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Μάθημα 8^ο



Ρύθμιση του Κυτταρικού Κύκλου και Σηματοδοτικά Μονοπάτια στο Ευκαρυωτικό Κύτταρο

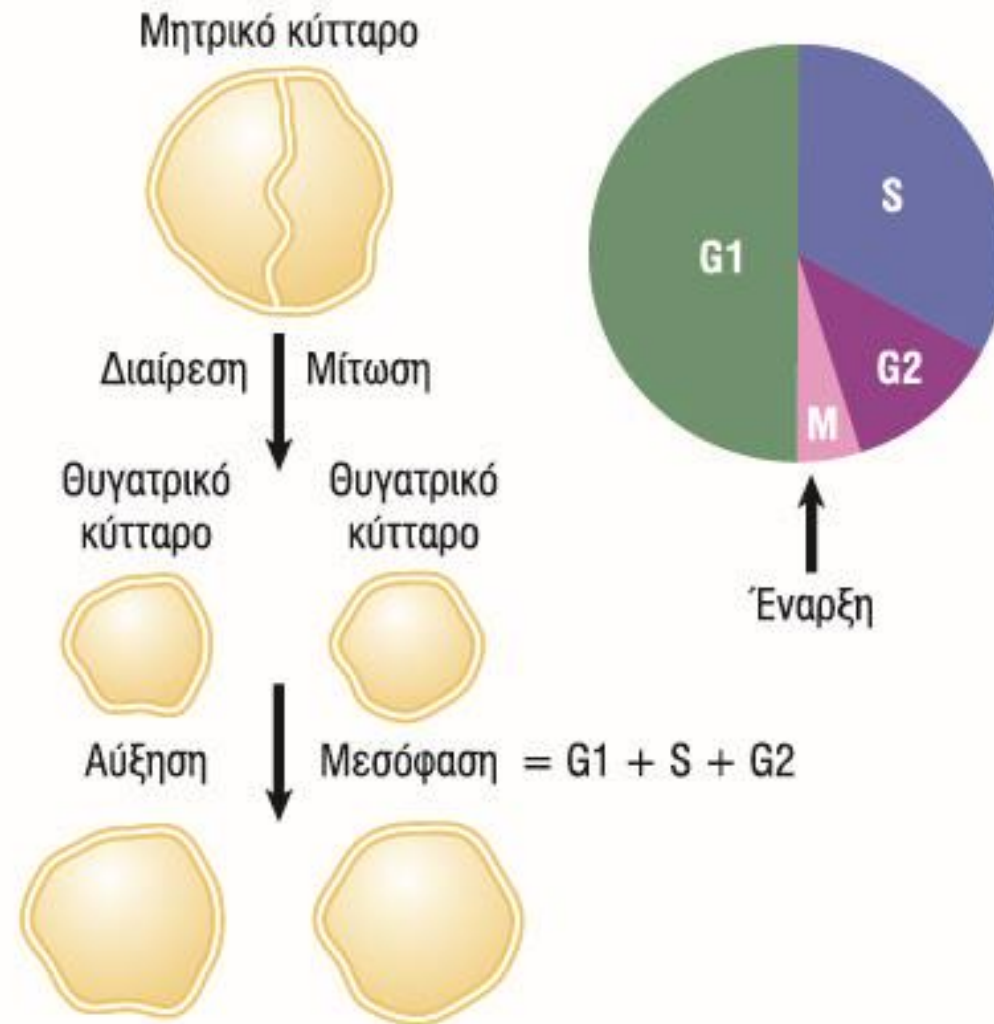
Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου



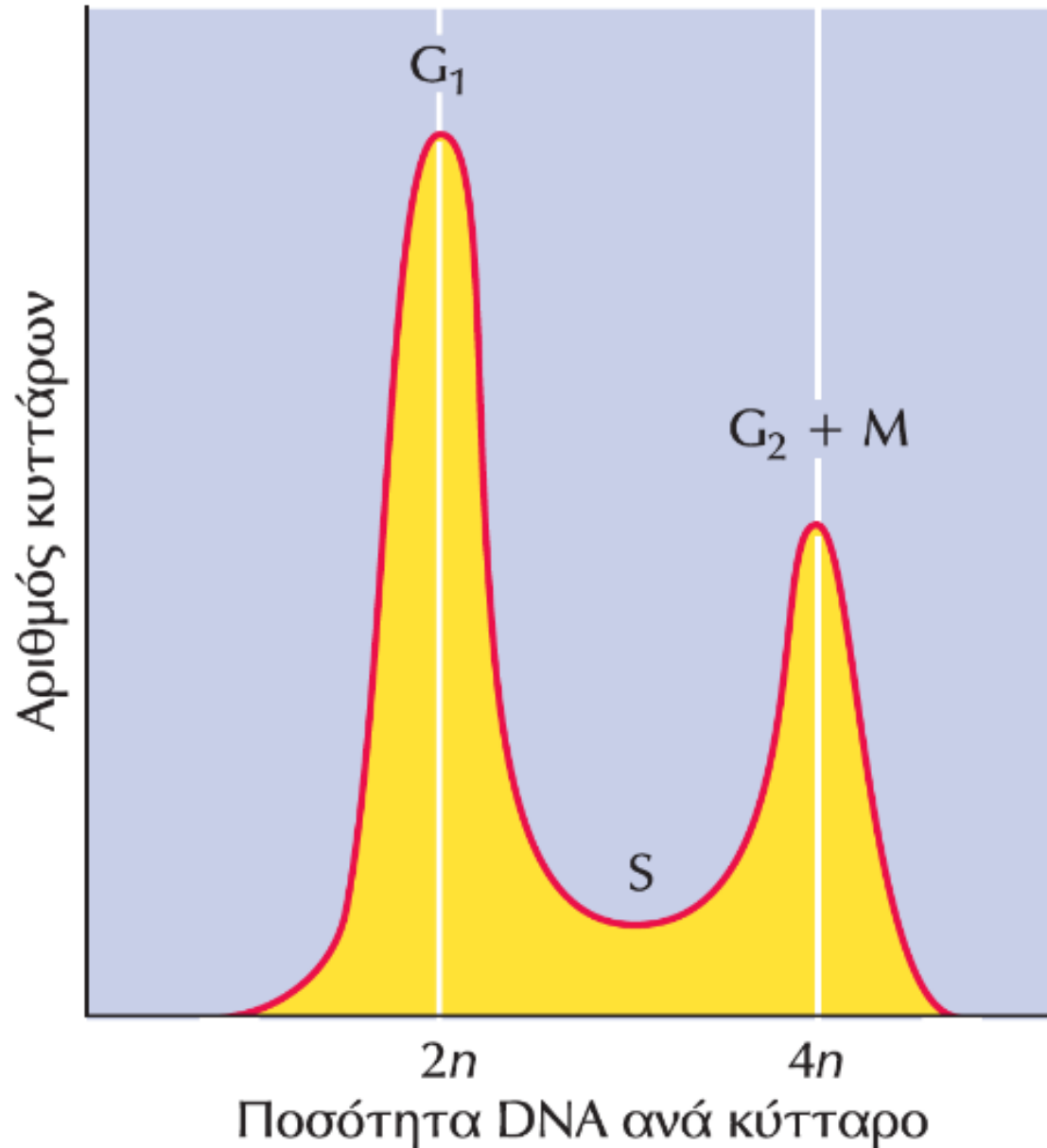
Ο κύκλος διαίρεσης των περισσότερων ευκαρυωτικών κυττάρων χωρίζεται σε 4 διακριτές φάσεις: την M, την G₁, την S και την G₂.

Η σχετική διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου που απεικονίζονται εδώ αφορά την περίπτωση κυττάρων θηλαστικών τα οποία διπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό.

Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου



Ποσότητα DNA ανά κύτταρο



Ενας πληθυσμός κυττάρων σημαίνεται με μια φθορίζουσα χρωστική που δεσμεύεται στο DNA. Στη συνέχεια, τα κύτταρα διέρχονται από έναν κυτταρομετρητή ροής, ο οποίος μετρά την ένταση φθορισμού κάθε κυττάρου χωριστά.

Τα δεδομένα αποτυπώνονται σε γράφημα που απεικονίζει τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με την ένταση φθορισμού, η οποία είναι ανάλογη με την ποσότητα του DNA που διαθέτουν.

Η κατανομή εμφανίζει δύο κορυφές, που αντιστοιχούν σε ποσότητα DNA $2n$ και $4n$, οι οποίες με τη σειρά τους αντιστοιχούν στις φάσεις G_1 και G_2/M του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα στη φάση S περιέχουν ποσότητα DNA μεταξύ $2n$ σε $4n$ και κατανέμονται ανάμεσα στις δύο αυτές κορυφές.

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος

(α) Η εξωκυτταρική επικράτεια του αυξητικού παράγοντα δεσμεύει τον αυξητικό παράγοντα (**GF**) μέσω ενός μηχανισμού κλειδιού - κλειδαριάς.

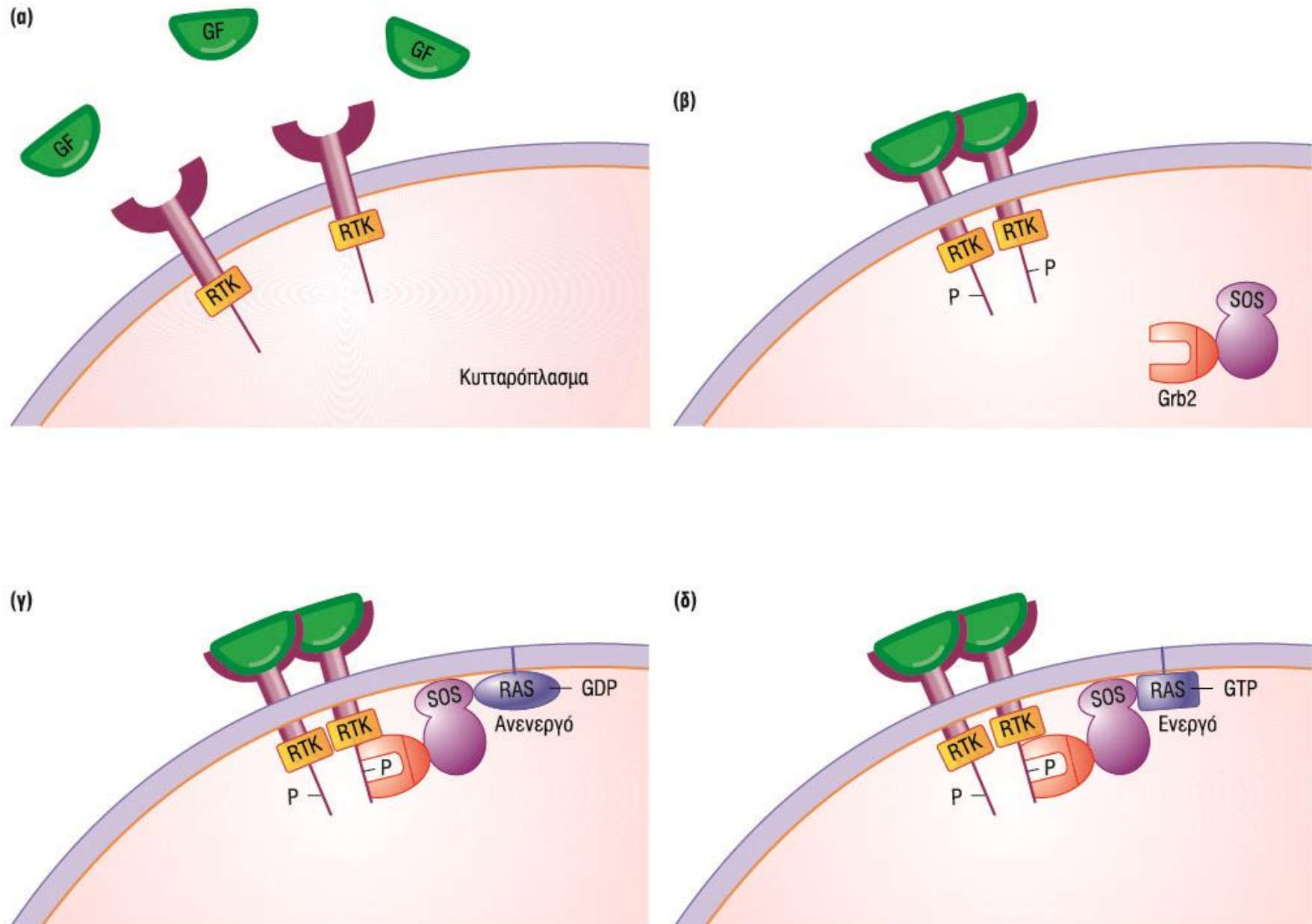
Η ενδοκυτταρική επικράτεια του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα περιέχει μια επικράτεια με ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης που ονομάζεται RTK (Receptor Tyrosine Kinase: υποδοχέας κινάσης τυροσίνης).

(β) Η πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα στον ομοειδή υποδοχέα του θα προκαλέσει το διμερισμό του υποδοχέα, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση κάθε κυτταροπλασματικής επικράτειας σε τυροσίνες. Τα κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης (Tyr-P) μπορούν να χρησιμεύσουν ως θέσεις πρόσδεσης για πρωτεΐνες όπως η **Grb2**, που απεικονίζεται.

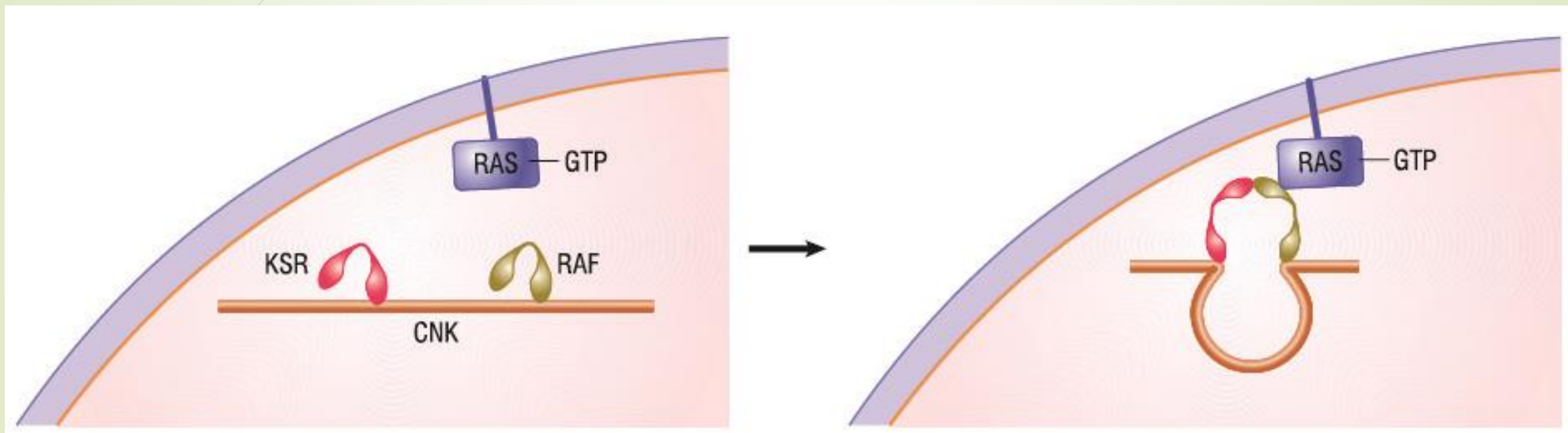
(γ) Η Grb2 προσδένεται σε Tyr-P, με αποτέλεσμα η παπρωτεΐνη προσδέτης της, η **SOS**, ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίου γουανοσίνης, να μεταφέρεται στη μεμβράνη ώστε να μπορεί να ενεργοποιεί το ανενεργό σύμπλοκο **RAS-GDP**.

(δ) Η SOS απομακρύνει το GDP, αντικαθιστώντας το με GTP, ενεργοποιώντας έτσι τη RAS. Το Ras-GTP είναι η ενεργή μορφή.

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος

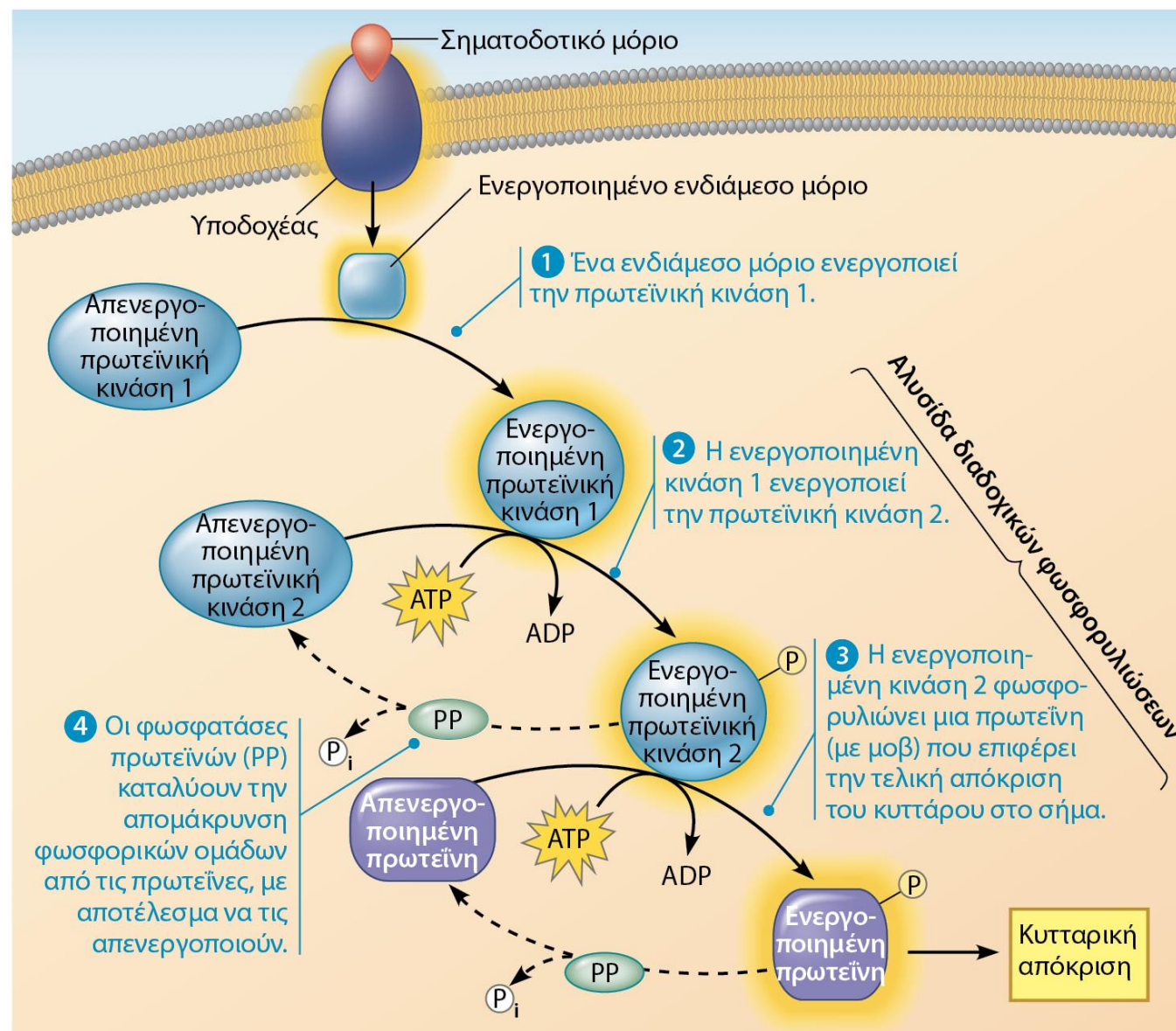


Η RAF στη μεμβράνη από την RAS-GTP



Η CNK (connector enhancer of KSR- συνδέτης του ενισχυτή της KSR) χρησιμεύει ως κρίωμα μοριακής πλατφόρμας, για την ενεργοποίηση της **RAF**, με τη μεσολάβηση της KSR, αφού στρατολογηθεί από το ενεργό σύμπλοκο RAS-GTP, στη μεμβράνη.

Αλυσίδα διαδοχικών φωσφορυλιώσεων-Cascade



Από το Ras στον Πυρήνα - Η Οδός MAPK/ERK

Κλιμακωτή Ενεργοποίηση (Cascade):

- ✓ Raf (MAPKKK) -> Φωσφορυλιώνει το MEK (MAPKK).
- ✓ MEK -> Φωσφορυλιώνει το ERK (MAPK).

Δράση στο Πυρήνα:

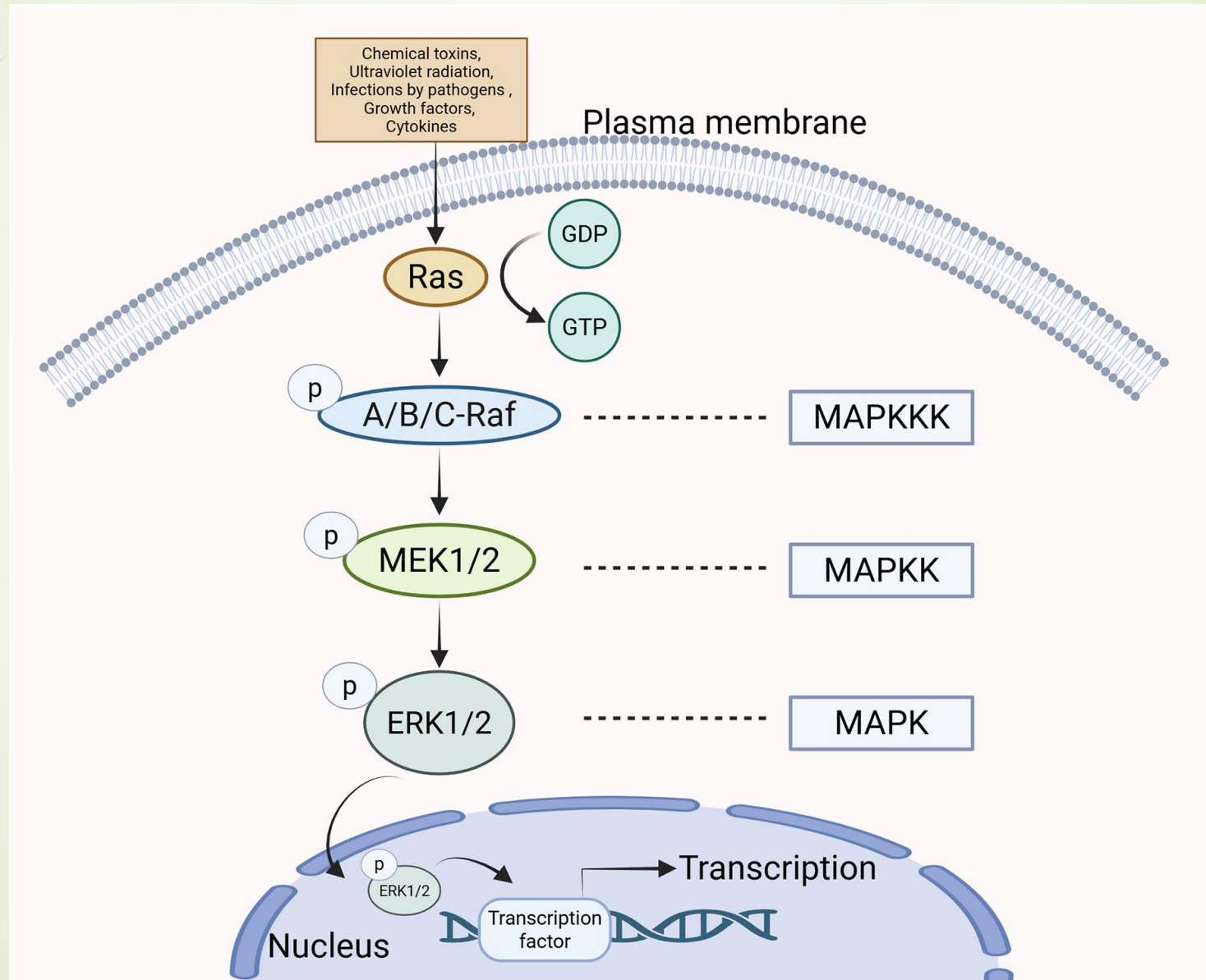
- ✓ Το ERK μεταβαίνει στον πυρήνα.
- ✓ Φωσφορυλιώνει παράγοντες μεταγραφής (π.χ. Myc, Fos).
- ✓ Αποτέλεσμα: Ενεργοποίηση γονιδίων για την πρόοδο του κύκλου (π.χ. Κυκλίνες D).

Η Οδός ΜΑΡΚ/ΕΡΚ

ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase):

- Διέγερση: Μιτογόνα σήματα (αυξητικοί παράγοντες).
- Λειτουργία: **Επιβίωση, πολλαπλασιασμός.**
- Οδός: Ras → Raf → MEK → ERK.

Από το Ras στον Πυρήνα - Η Οδός MAPK/ERK

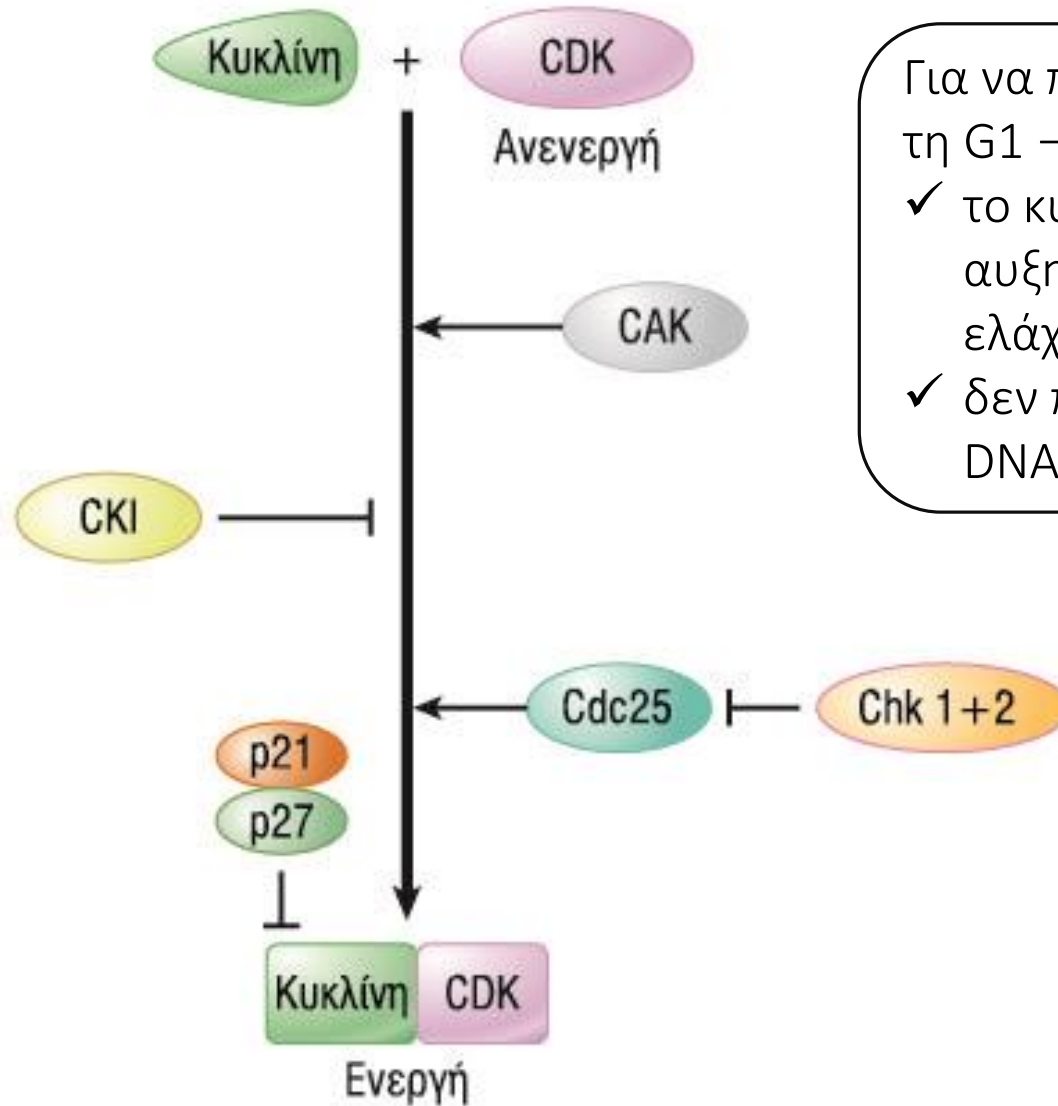


2. JNK (c-Jun N-terminal Kinase) & p38

JNK

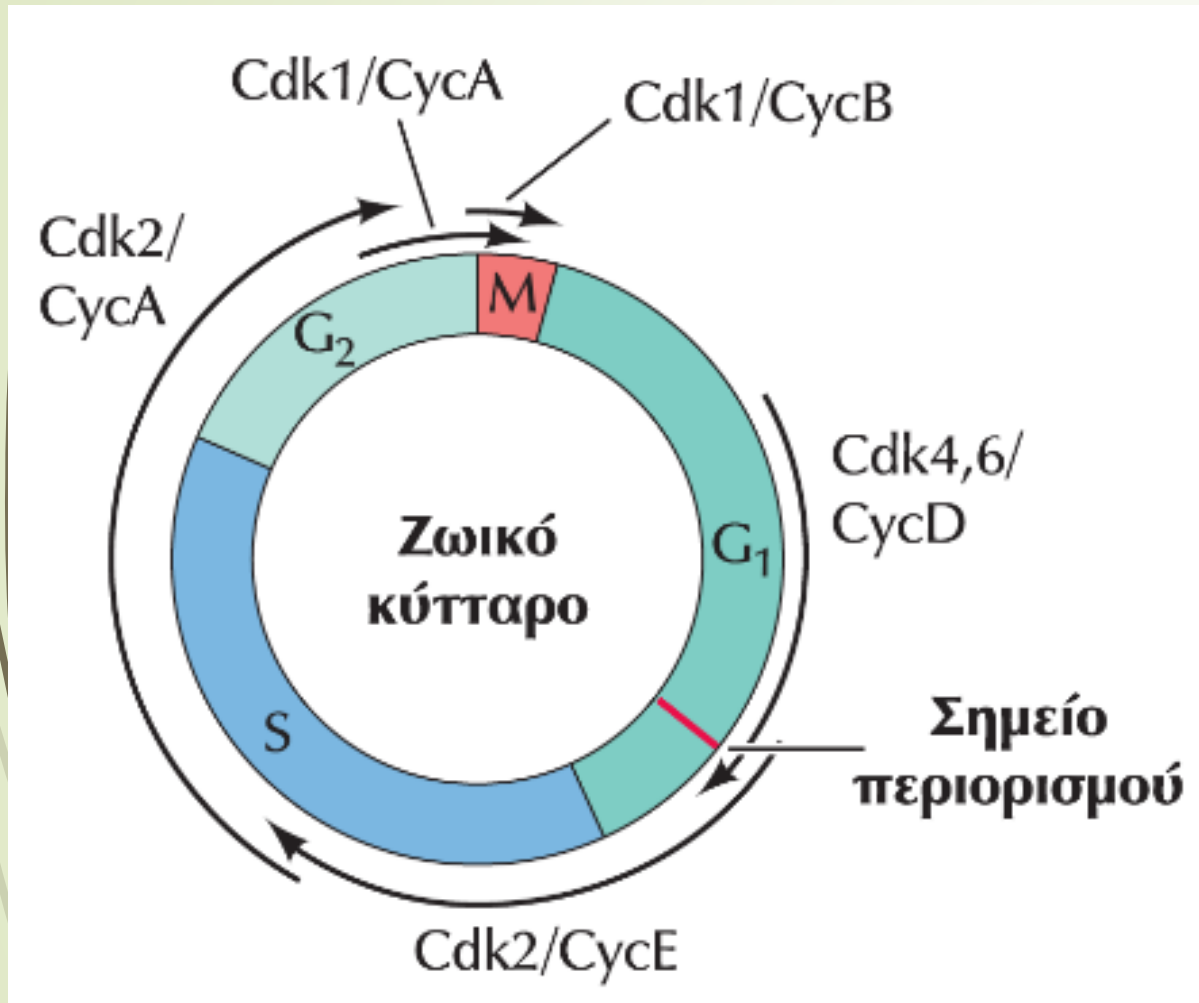
- Διέγερση: Στρες (UV, ακτίνες, ραδιενέργεια, φλεγμονή).
- Λειτουργία: **Απόπτωση, φλεγμονώδης απάντηση, διακοπή κυτταρικού κύκλου.**
- Σημασία: Συνδέουν το περιβαλλοντικό στρες με την απόφαση για κυτταρικό θάνατο.

Κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs: cyclin-dependent kinases)



Για να προχωρήσει ένα κύτταρο από τη G1 → S, πρέπει:

- ✓ το κύτταρο πρέπει να έχει αυξηθεί σε ένα συγκεκριμένο ελάχιστο μέγεθος
- ✓ δεν πρέπει να υπάρχει βλάβη στο DNA.



Σύμπλοκα κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.

Στα ζωικά κύτταρα:

- ✓ η διέλευση από το σημείο περιορισμού της G₁ ελέγχεται από σύμπλοκα των Cdk4 και Cdk6 με κυκλίνες τύπου D.
- ✓ Το σύμπλοκο Cdk2 / κυκλίνης E είναι απαραίτητο για τη μετάβαση από την G₁ στην S.
- ✓ Το σύμπλοκο Cdk2 / κυκλίνης A είναι στη συνέχεια απαραίτητο για την πρόοδο της φάσης S και της φάσης G₂.
- ✓ Τα σύμπλοκα Cdk1 / κυκλίνης A και Cdk1 / κυκλίνης B ρυθμίζουν τη μετάβαση από την G₂ στην M, καθώς και την πρόοδο της φάσης M.

Ο Επιτηρητής: p53 και η p21 (Checkpoint G1/S)

Το p53:

- Φυσιολογικά το p53 είναι ασταθές και διασπάται γρήγορα.
- Σε περίπτωση βλάβης DNA, ενεργοποιούνται κινάσες (ATM/ATR) που σταθεροποιούν το p53.

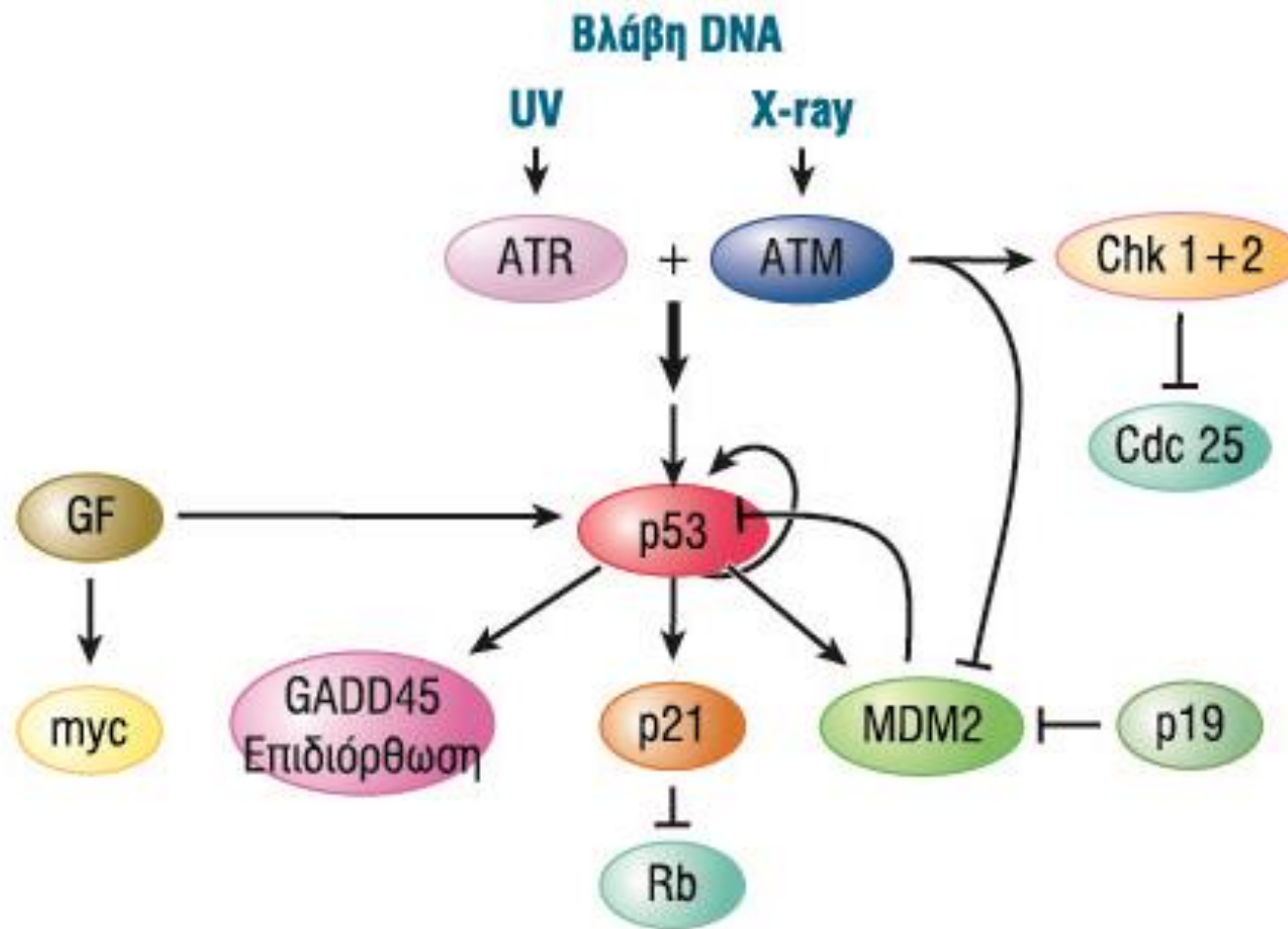
Το p21:

- Το p53 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας για το γονίδιο p21.
- Το p21 είναι ένας ανασταλτικός παράγοντας των CDK (CKI).

Ο Μηχανισμός:

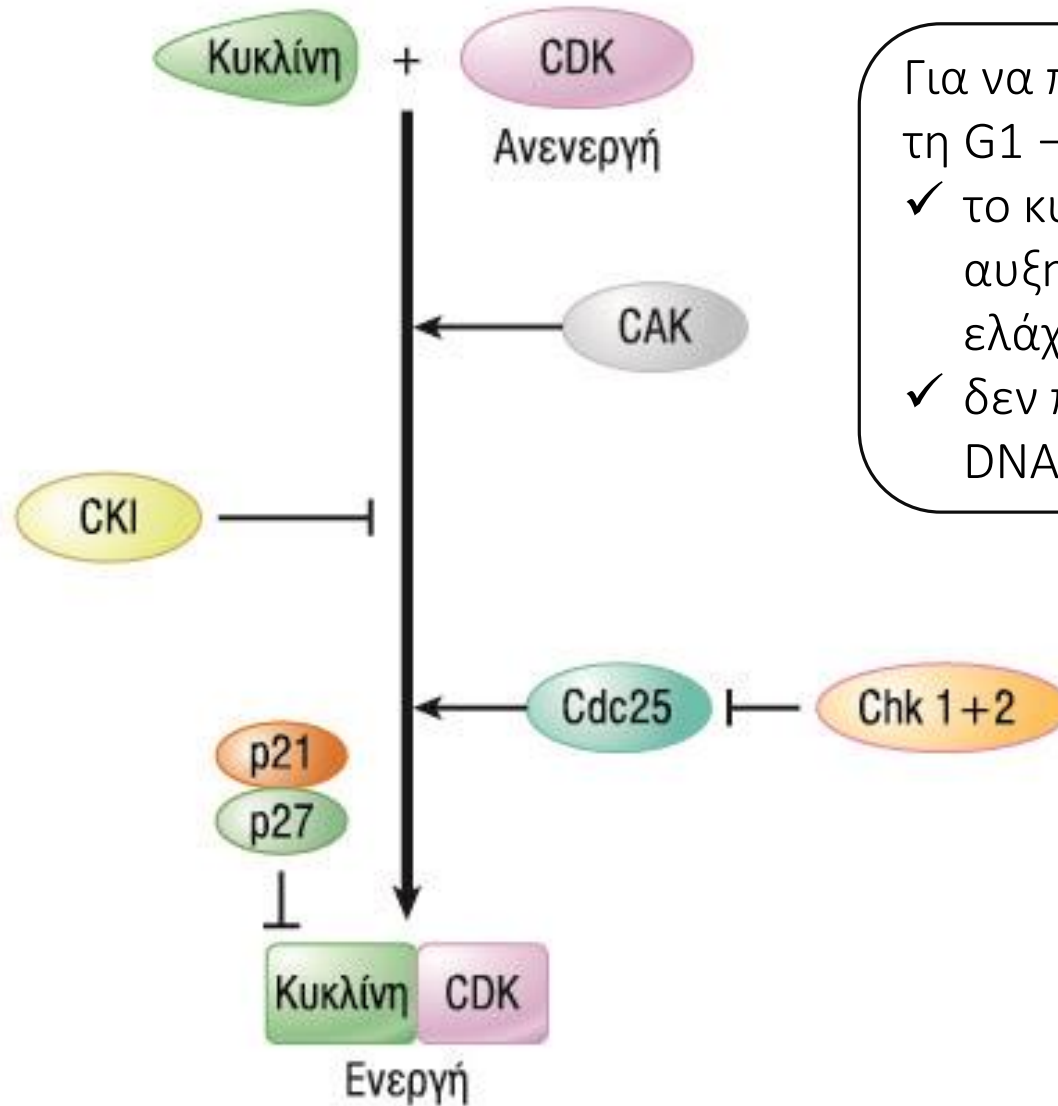
- Το p21 αναστέλλει τις Κυκλίνες E/A-CDK2.
- Σταματά η φωσφορύλιωση του pRB.
- Το pRB παραμένει ενεργό και κρατά το E2F δεσμευμένο.
- Αποτέλεσμα: **Σταμάτημα του κύκλου (G1 arrest) για επιδιόρθωση ή απόπτωση.**

Μονοπάτι μεταγωγής σήματος για βλάβη στο DNA



Rb= pRb = (Πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος)

Κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs: cyclin-dependent kinases)



Για να προχωρήσει ένα κύτταρο από τη G1 → S:

- ✓ το κύτταρο πρέπει να έχει αυξηθεί σε ένα συγκεκριμένο ελάχιστο μέγεθος
- ✓ δεν πρέπει να υπάρχει βλάβη στο DNA.

Το Σημείο Ελέγχου G1/S - pRB και E2F

Το "Φρένο": pRB (Retinoblastoma Protein):

- Στην ανενεργή (υπο-φωσφορυλιωμένη) μορφή του, το pRB συνδέεται και απενεργοποιεί τον παράγοντα μεταγραφής E2F.

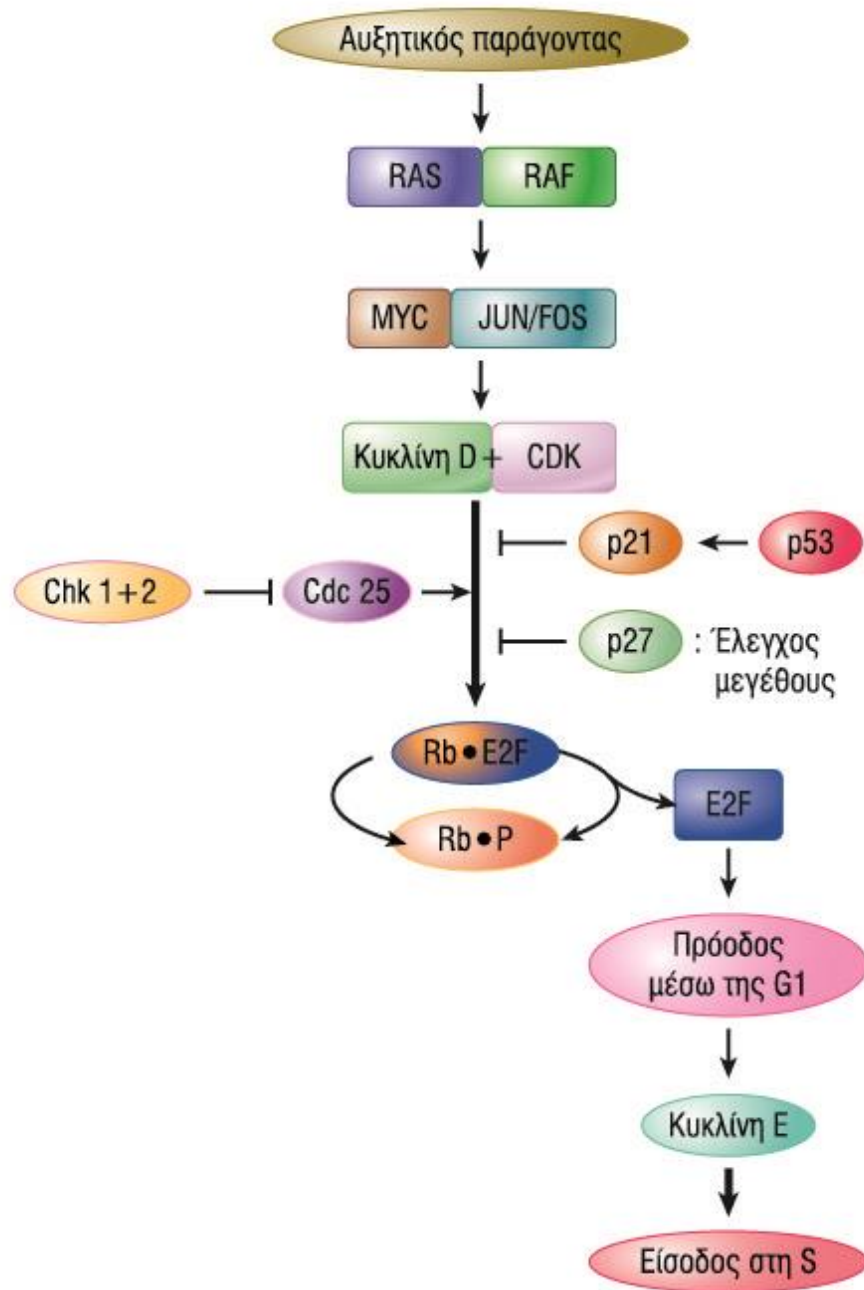
Η "Επιτάχυνση": Κυκλίνη D / CDK4-6:

- Το σήμα από το Ras/MAPK αυξάνει τα επίπεδα της Κυκλίνης D.
- Η Κυκλίνη D + CDK4/6 φωσφορυλιώνει το pRB.

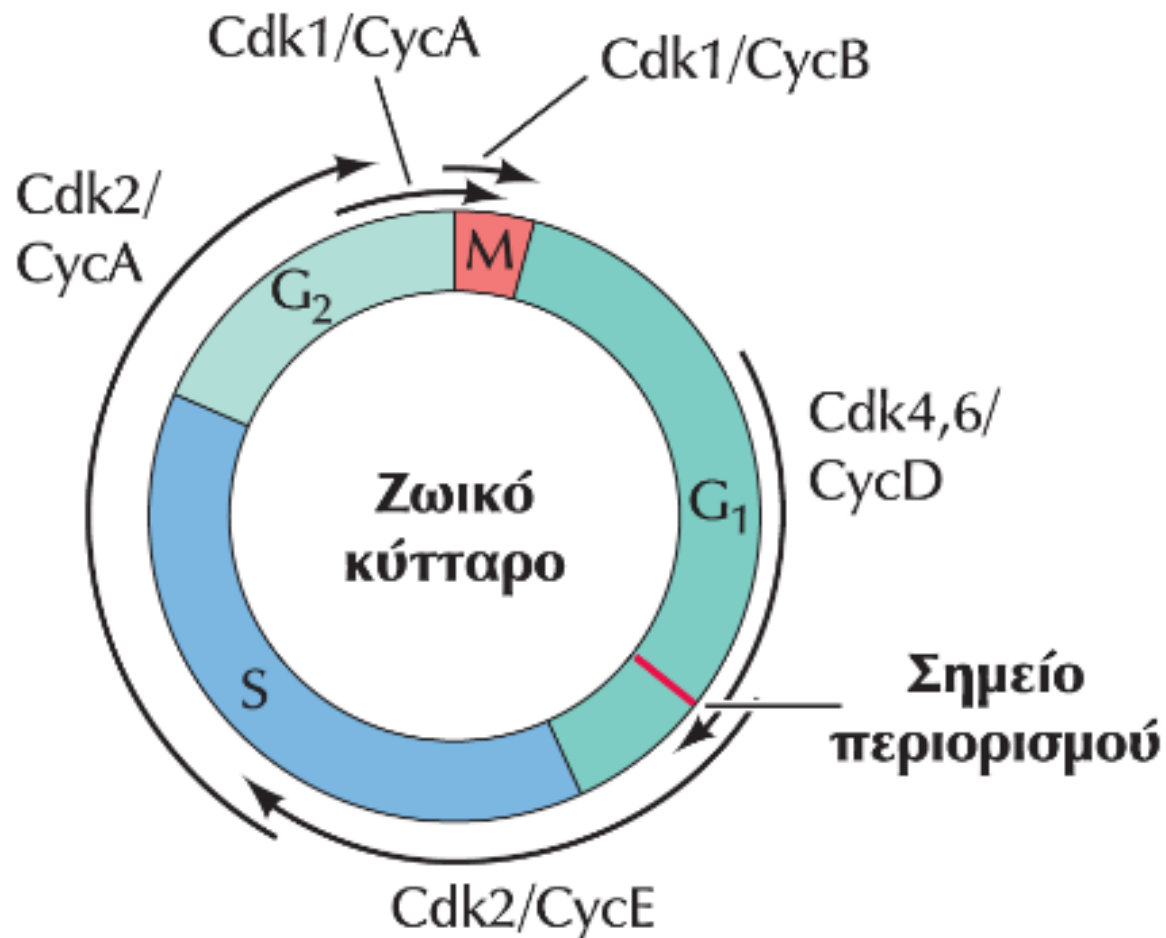
Απελευθέρωση E2F:

- Όταν το pRB υπερ-φωσφορυλιώνεται, αφήνει ελεύθερο το E2F.
- Το E2F ενεργοποιεί γονίδια απαραίτητα για την φάση S (π.χ. DNA πολυμεράσες, Κυκλίνη E).

Το Σημείο Ελέγχου G1/S - pRB και E2F



Σύμπλοκα κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.



Στα ζωικά κύτταρα:

- ✓ η διέλευση από το σημείο περιορισμού της G₁ ελέγχεται από σύμπλοκα των Cdk4 και Cdk6 με κυκλίνες τύπου D.
- ✓ Το σύμπλοκο Cdk2 / κυκλίνης E είναι απαραίτητο για τη μετάβαση από την G₁ στην S.
- ✓ Το σύμπλοκο Cdk2 / κυκλίνης A είναι στη συνέχεια απαραίτητο για την πρόοδο της φάσης S και της φάσης G₂.
- ✓ Τα σύμπλοκα Cdk1 / κυκλίνης A και Cdk1 / κυκλίνης B ρυθμίζουν τη μετάβαση από την G₂ στην M, καθώς και την πρόοδο της φάσης M.

Αναστολείς των Cdk

Καταστολέας	Cdk ή σύμπλοκο Cdk/κυκλίνης	Φάση του κυτταρικού κύκλου που καταστέλλεται
Οικογένεια Ink4 (p15, p16, p18, p19)	Cdk4 και Cdk6	G ₁
Οικογένεια Cip/Kip (p21, p27, p57)	Cdk2/κυκλίνη E Cdk2/κυκλίνη A	G ₁ S, G ₂

Η Οδός NF-κB: Ο κεντρικός ρυθμιστής της άμυνας και της φλεγμονής.

Στο Κυτταρόπλασμα (Ανενεργή μορφή):

Το NF-κB είναι δεσμευμένο με τον ανασταλτικό παράγοντα IκB.

Ενεργοποίηση:

- Σήματα (π.χ. TNF, IL-1, λιποπολυσακχαρίτες) ενεργοποιούν το ένζυμο IKK.
- Το IKK φωσφορυλιώνει το IκB.
- Το IκB υφίσταται αποικοδόμηση -ubiquitination & proteasome.

Στον πυρήνα:

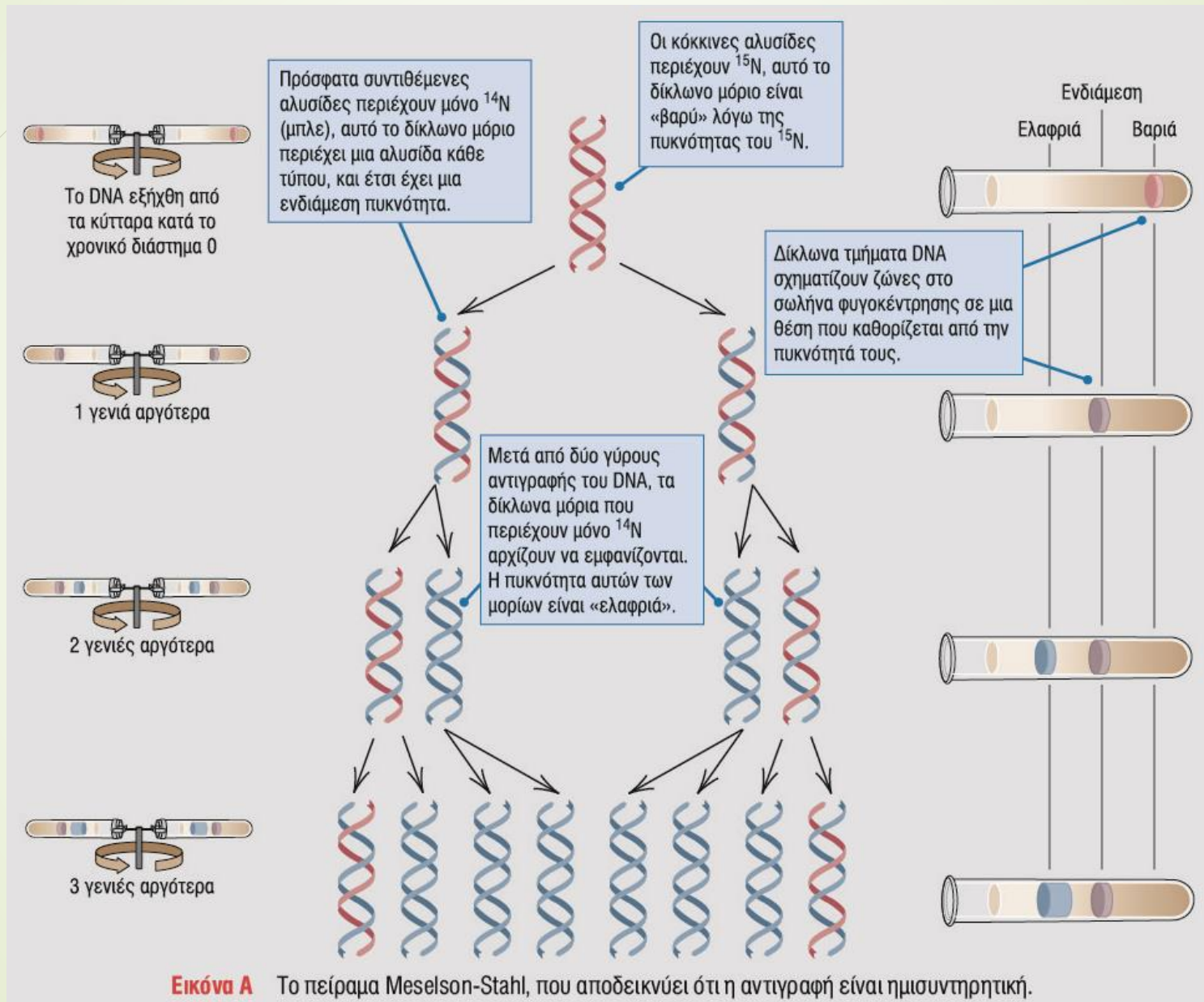
- Το ελεύθερο NF-κB μεταβαίνει στον πυρήνα.
- Ενεργοποιεί γονίδια για την **επιβίωση, φλεγμονή και πολλαπλασιασμό.**

Το NF-κB μπορεί να ενισχύσει την έκφραση της Κυκλίνης D1, προωθώντας τον κυτταρικό κύκλο.



Αντιγραφή DNA

Το πείραμα των Meselson-Stahl



Η μεθυλίωση της βακτηριακής αφετηρίας της αντιγραφής ρυθμίζει την έναρξη

- ✓ Η *oriC* περιέχει **11 επαναλήψεις GATCCTAG** που μεθυλιώνονται στην αδενίνη και στις δύο αλυσίδες.
- ✓ Η αντιγραφή δημιουργεί ημιμεθυλιωμένο DNA, το οποίο δεν μπορεί να ξεκινήσει την αντιγραφή.
- ✓ Υπάρχει καθυστέρηση 13 λεπτών προτού επαναμεθυλιωθούν οι επαναλήψεις του GATCCTAG.
- ✓ Η SeqA προσδένεται στο ημιμεθυλιωμένο DNA και απαιτείται για την καθυστέρηση της επανέναρξης της αντιγραφής.
- ✓ Τα συστήματα επιδιόρθωσης λαθών των μη ζευγαρωμένων βάσεων του DNA των προκαρυωτικών χρησιμοποιούν τη μεθυλίωση για να διακρίνουν τις πατρικές από τις θυγατρικές αλυσίδες μετά την αντιγραφή, προκειμένου να επιδιορθωθεί ειδικά η θυγατρική (νεοσυντιθέμενη) αλυσίδα.

Προ εκκίνηση & σχηματισμός συμπλόκου με διαδοχική σύνδεση πρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των αλυσίδων ξεκινά στην αφετηρία της αντιγραφής

Η αφετηρία έχει τρεις
επαναλήψεις 13 bp και
τέσσερις επαναλήψεις
9 bp



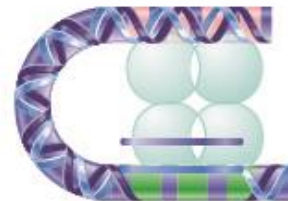
Μονομερή της DnaA
προσδένονται στις
επαναλήψεις 9 bp



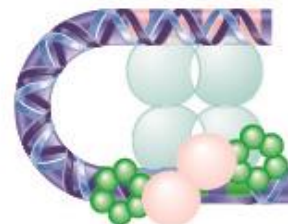
Η DnaA προσδέεται σε
επαναλήψεις 13 bp



Οι DNA αλυσίδες
διαχωρίζονται στις
επαναλήψεις 13 bp



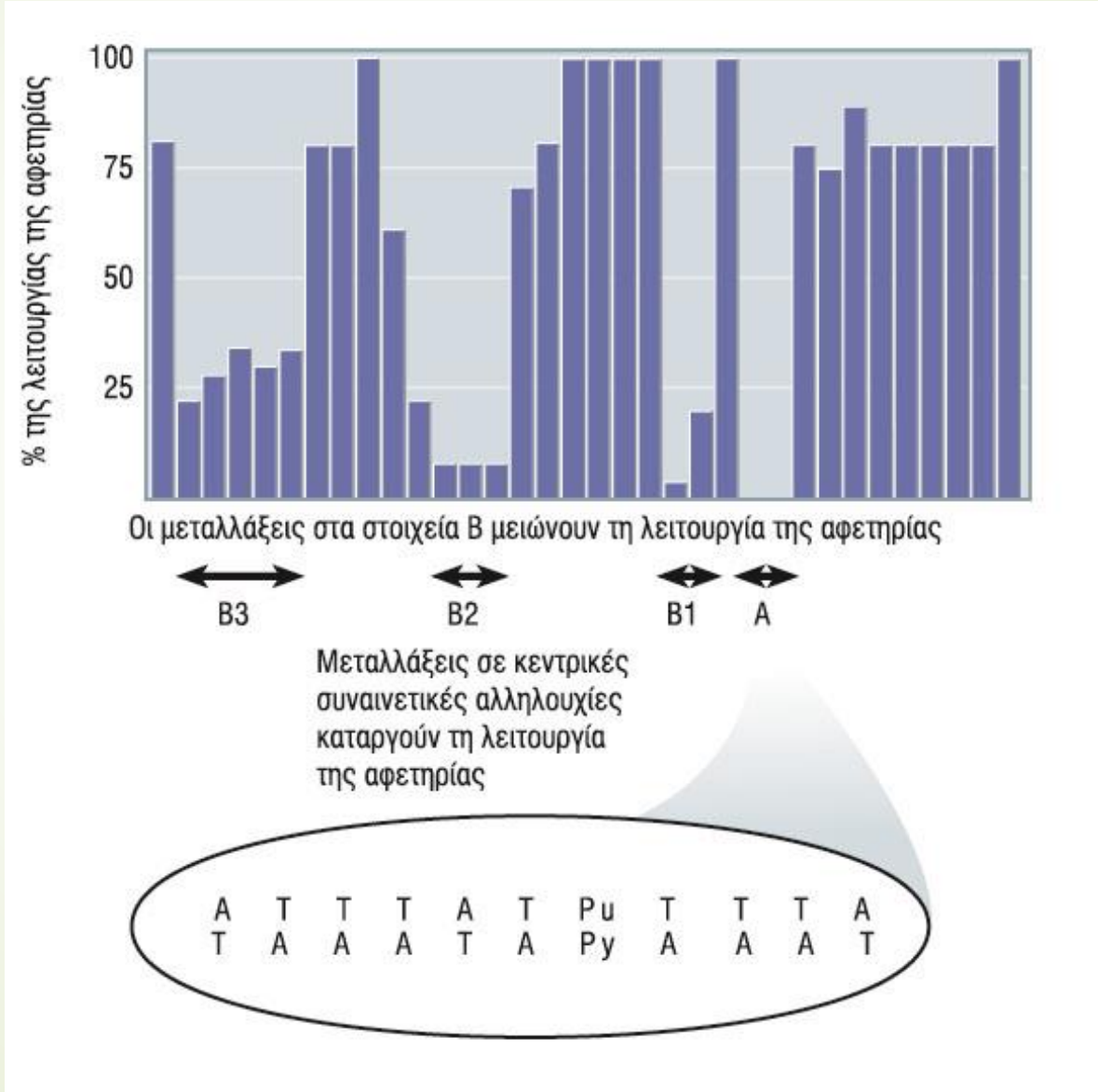
Οι DnaB / DnaC συνδέονται
στο σύμπλοκο, σχηματί-
ζοντας αντιγραφικές
διχάλες



Η μεθυλίωση της βακτηριακής αφετηρίας της αντιγραφής ρυθμίζει την έναρξη

- ✓ Η έναρξη στην *oriC* απαιτεί τη σταδιακή συναρμολόγηση ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου στη μεμβράνη.
- ✓ Η *oriC* πρέπει να μεθυλιωθεί πλήρως για να ξεκινήσει η αντιγραφή.
- ✓ Το DnaA-ATP προσδένεται σε σύντομες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και σχηματίζει ένα ολιγομερικό σύμπλοκο που αποδιατάσσει το DNA.
- ✓ Έξι μονομερή της DnaC δεσμεύουν κάθε εξαμερές της DnaB, και αυτό το σύμπλοκο δεσμεύει την αφετηρία της αντιγραφής.
- ✓ Ένα εξαμερές της DnaB σχηματίζει την αντιγραφική διχάλα. Απαιτούνται επίσης οι πρωτεΐνες γυράση και SSB.
- ✓ Η DnaG συνδέεται με το σύμπλοκο ελικάσης και δημιουργεί την αντιγραφική διχάλα.

ARS- autonomous replicative seq-αλληλουχία

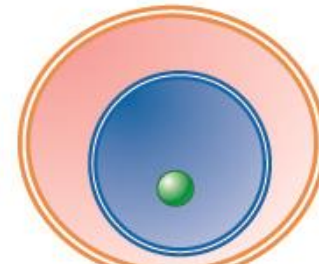


Οι αφετηρίες αντιγραφής προσδένονται στα ORC – origin recognition complex

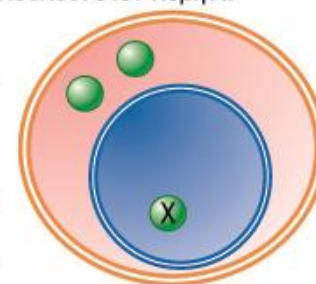
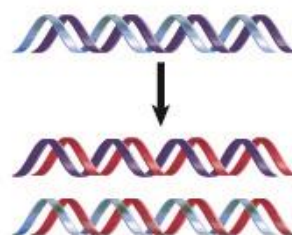
- ✓ Οι αφετηρίες της αντιγραφής στη *S. cerevisiae* είναι βραχείες αλληλουχίες πλούσιες σε A-T που έχουν μία σημαντική αλληλουχία 11 bp.
- ✓ Το ORC είναι ένα σύμπλοκο έξι πρωτεϊνών που προσδένει ένα ARS. Παραμένει προσδεδμεμένο σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αλλά ενεργοποιείται μόνο κατά τη φάση S.
- ✓ Συγγενή σύμπλοκα ORC βρίσκονται σε πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Ο παράγοντας
αδειοδότησης στον
πυρήνα
απενεργοποιείται μετά
την αντιγραφή.

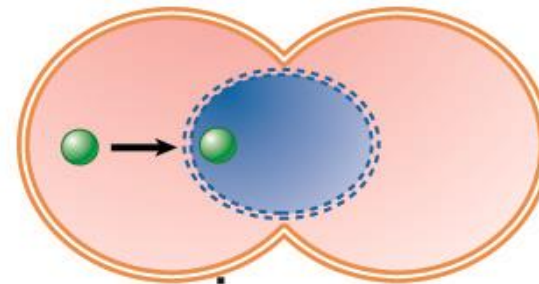
Πριν από την αντιγραφή, ο πυρήνας περιέχει ενεργό παράγοντα αδειοδότησης



Μετά την αντιγραφή, ο παράγοντας αδειοδότησης στον πυρήνα είναι αδρανής. Ο παράγοντας αδειοδότησης που βρίσκεται κυτταρόπλασμα δεν μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα

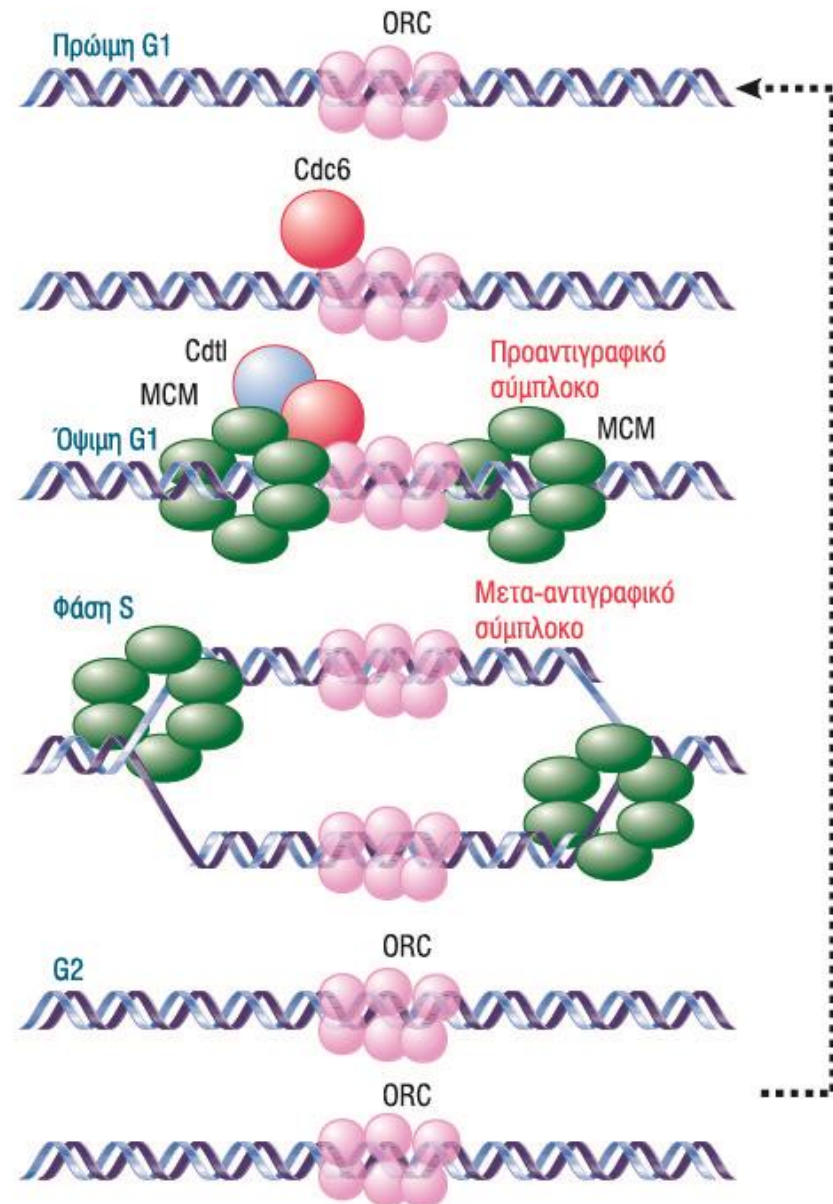


Διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης επιτρέπει τη σύνδεση του παράγοντα αδειοδότησης με το πυρηνικό υλικό



Η κυτταρική διαίρεση δημιουργεί θυγατρικούς πυρήνες ικανούς να υποστηρίξουν την αντιγραφή

Έναρξη της αντιγραφής στα ευκαρυωτικά



Ο παράγοντας της αδειοδότησης ελέγχει την επαναντιγραφή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

- ✓ Ο παράγοντας αδειοδότησης είναι απαραίτητος για την έναρξη της αντιγραφής σε κάθε αφετηρία.
- ✓ Ο παράγοντας αδειοδότησης υπάρχει στον πυρήνα πριν από την αντιγραφή, αλλά η έναρξη προκαλεί την απομάκρυνση, την απενεργοποίηση ή την αποδόμηση του.
- ✓ Η έναρξη ενός άλλου κύκλου αντιγραφής καθίσταται δυνατή μόνο αφού ο παράγοντας αδειοδότησης επανέλθει στον πυρήνα μετά από τη μίτωση.
- ✓ Το ORC είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που συνδέεται με την αφετηρία καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Ο παράγοντας της αδειοδότησης ελέγχει την επαναντιγραφή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

- ✓ Η πρωτεΐνη Cdc6 είναι μια ασταθής πρωτεΐνη που συντίθεται μόνο στη φάση G1.
- ✓ Οι Cdc6 και Cdt1 συνδέονται με το ORC και επιτρέπουν στις πρωτεΐνες MCM να προσδένονται.
- ✓ Όταν ξεκινά η αντιγραφή, οι Cdc6 και Cdt1 εκτοπίζονται και οι πρωτεΐνες MCM μετατρέπονται σε ενεργή ελικάση. Η αποικοδόμηση της Cdc6 αποτρέπει την επανέναρξη.