

Κεφάλαιο 9

Ο κυτταρικός κύκλος

Γ. Ρήγας

Α. Αθανασίου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κάθε ζωντανός οργανισμός αποτελείται από μονάδες που ονομάζονται κύτταρα, τα οποία συγκροτούν ομάδες, τα όργανα, που με την σειρά τους σχηματίζουν μεγαλύτερες ομάδες, τους ιστούς. Προκειμένου να εξασφαλισθεί η ανάπτυξη του κυττάρου, και κατ' επέκταση του οργάνου, του ιστού και εν τέλει του οργανισμού, και η ομοιόστασή του, το κύτταρο αναπαράγει ένα πανομοιότυπο αντίγραφο του μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρικός κύκλος.

Ο κυτταρικός κύκλος θα πρέπει να γίνεται κάτω από αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς η έλλειψη των οποίων προδιαθέτει σε δημιουργία γενετικής αστάθειας με πιθανό επακόλουθο την προδιάθεση για δημιουργία κακοήθειας.

Ταυτόχρονα, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η συνέχισή του ή η διακοπή του, αποτελεί την αντίδραση του κυττάρου σε ποικίλα εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα (βλάβη του DNA ή διαφοροποίηση) που έχουν σαν αποτέλεσμα είτε την τροποποίηση του κυτταρικού κύκλου είτε την παραγωγή και απελευθέρωση συγκεκριμένων κυτταρικών προϊόντων (π.χ. πρωτεϊνών). Τα εξωτερικά ερεθίσματα (π.χ. μιτογόνα, αντιμικροβιακοί παράγοντες) κωδικοποιούν τις απαντήσεις των κυττάρων μέσω της επίδρασής τους σε συγκεκριμένους διαμεμβρανικούς κυτταρικούς υποδοχείς. Όταν το συγκεκριμένο μόριο προσκολληθεί στον ανάλογο υποδοχέα της κυτ-

ταρικής μεμβράνης συνήθως προκαλεί την φωσφορυλίωσή του είτε μέσω ενδογενούς υποδοχέα τυροσίνης-κινάσης είτε μέσω άλλου ενζυμικού συστήματος. Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός πολύπλοκου βιοχημικού μηχανισμού (RAS-RAF-MAD-kinase) που ως τελικό αποτέλεσμα έχει την παραγωγή συγκεκριμένης «απάντησης» του κυττάρου στο εξωγενές ερέθισμα που προκάλεσε την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποδοχέα. Η διαδικασία αυτή είναι αντικείμενο έρευνας προς την κατεύθυνση της σύνθεσης ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (π.χ. anti-EGFR, anti-HER2) που συνδεόμενα με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους απενεργοποιούν με τελικό αποτέλεσμα είτε την κυτταρική λύση είτε την προαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης (προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου).

ΦΑΣΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται φυσιολογικά από τέσσερις φάσεις:

1. *Φάση G₁* (gap 1, πρώτο χάσμα): στην διάρκεια της φάσης αυτής το κύτταρο υπόκειται σε πολύπλοκες βιοχημικές διαδικασίες που το προετοιμάζουν για την είσοδο του στην επόμενη φάση, εκκίνη της σύνθεσης του θυγατρικού DNA.

2. *Φάση S* (DNA synthesis, σύνθεση του DNA): στην διάρκεια της φάσης αυτής το DNA αντιγράφει με εξαιρετική ακρίβεια τον εαυτό του δημιουργώντας ένα

πανομοιότυπο αντίγραφο του (θυγατρικό DNA).

3. Φάση G_2 (gap 2, δεύτερο χάσμα): στην διάρκεια της φάσης αυτής το κύτταρο προετοιμάζεται για την είσοδό του στην επόμενη φάση, εκείνη της μίτωσης.

4. Φάση M (mitosis, μίτωση): το διπλασιασμένο DNA διαχωρίζομενο με ακρίβεια σε δύο ίσα μέρη συμπυκνώνεται σχηματίζοντας χρωμοσώματα ώστε καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα να διαθέτει πλήρες αντίγραφο του γενετικού υλικού του μητρικού κυττάρου.

Πλην των τεσσάρων φάσεων που αναφέραμε υπάρχει και η φάση G_0 (φάση ηρεμίας): το διαιρεμένο κύτταρο που προέκυψε από την μίτωση που μόλις ολοκληρώθηκε μπορεί, αντί της εισόδου στην φάση G_1 που το προπαρασκευάζει για άμεση νέα διαίρεση, να εισέλθει σε άλλοτε άλλης διάρκειας φάση ηρεμίας ανάλογα με τις συνθήκες και τις ανάγκες του οργάνου, του ιστού, ή του οργανισμού.

Η επιλογή εισόδου του κυττάρου στην G_0 αντί της G_1 καθορίζεται από ποικίλα εξωτερικά ερεθίσματα (επάρκεια ή έλλειψη εξωγενών μιτογόνων, αυξητικών ή άλλων παραγόντων). Ανά πάσα στιγμή και με την επίδραση των μεταβολών των ως άνω εξωτερικών ερεθισμάτων η φάση ηρεμίας (G_0) μετατρέπεται σε φάση G_1 , φάση δηλαδή προετοιμασίας του κυττάρου για διαίρεση. Το καθοριστικό σημείο μετάπτωσης από την φάση ηρεμίας (G_0) στην φάση G_1 ονομάζεται restriction point (R – περιοριστικό σημείο «επαναλειτουργίας»). Μετά την δίοδο από το σημείο R το κύτταρο δεν υπακούει πλέον στους εξωγενείς παράγοντες και η πορεία του διά του κυτταρικού κύκλου μέχρι την ολοκλήρωση της μίτωσης είναι προδιαγεγραμμένη.

Σε συγκεκριμένους ιστούς η φάση G_0 είναι μεγάλης σημασίας και το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων τους βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (π.χ. λεμφικός ιστός, σκελετικοί μύες, λιπώδης ιστός, νευρικός ιστός κ.ά.). Σε αρκετούς ιστούς, όπως στο λεμφικό, η φάση G_0 είναι αντιστρεπτή υπό την επίδραση των διεγερτικών παραγόντων που προαναφέραμε, ενώ σε άλλους, όπως οι σκελετικοί μύες και οι νευρώνες, είναι μη αντιστρεπτή.

Η όλη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου προκειμένου να διατηρήσει την ακρίβειά της και να εξασφαλίσει το τελειο αποτέλεσμα της υπόκειται σε πολλαπλά σημεία ελέγχου (check points) που βρίσκονται σε διάφορα χρονικά σημεία του κυτταρικού κύκλου και που, βάσει συγκεκριμένων ερεθισμάτων, επιτρέπουν την συνέχιση και ολοκλήρωση του κύκλου ή τον αναστέλλουν (σχήμα 1).

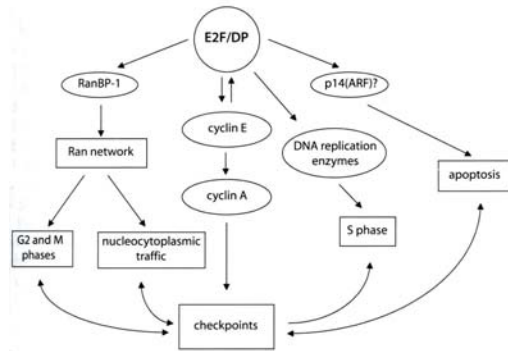
Η ρυθμιστική διαδικασία του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζεται μέσω:

- i. των κυκλικών, ετεροδιμερών συμπλεγμάτων πρωτεϊνών που διακρίνονται σε οικογένειες (D, E, A, B): κάθε οικογένεια κυκλικών έχει την ευθύνη ελέγχου διαφορετικής φάσης του κυτταρικού κύκλου,
- ii. των κυκλινο-εξαρτωμένων κινασών (CDK): κάθε κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση επάγει την δράση μίας κυκλίνης, και
- iii. των αναστολέων των συμπλεγμάτων κυκλικών – CDK (CKI, CDK inhibitors).

Διακρίνονται δύο οικογένειες CKI: α) η οικογένεια INK4 που περιλαμβάνει του αναστολείς p15, p16, p18, p19, και β) η οικογένεια CIP/KIP που περιλαμβάνει του αναστολείς p21, p27, p57.

Για να ξεκινήσει και ολοκληρωθεί η κάθε φάση του κύκλου θα πρέπει πρώτα να βεβαιωθεί ότι έχει ολοκληρωθεί επι-

τυχώς η προηγούμενη φάση. Τα σημεία ελέγχου ενεργοποιούνται από ποικιλία ενδογενών και εξωγενών παραγόντων (π.χ. ιοντίζουσα ακτινοβολία, διατροφικοί παράγοντες, θερμοκρασία, βλάβη του DNA, κ.ά.).



Σχήμα 1. Φάσεις κυτταρικού κύκλου και σημεία ελέγχου που οδηγούν στην ευόδωση ή την αναστολή/κατάργησή του.

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων που ευθύνονται για την παραγωγή των σημείων ελέγχου συμβάλλουν στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου που έχει υποστεί βλάβη οδηγώντας σε καρκινογένεση, και επηρεάζουν την ευαισθησία του κυττάρου, καρκινικού ή μη, στην κυτταροτοξική δράση εξωγενών παραγόντων όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία.

ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (CHECKPOINTS) ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

- Σημείο ελέγχου μεταξύ φάσεων G_1 και S .

Κατά την διάρκεια της μεταβάσεως από την φάση G_1 στην φάση S το σημείο ελέγχου συνίσταται στην ενεργοποίηση ή μη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου $p53$, και πιθανώς των συγγενών του γονιδίων $p63$ και $p73$, που λειτουργεί ως φραγμός στη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου με δύο τρόπους: 1) Βλάβη του DNA → Ενεργοποίηση του $p53$ → ενεργοποίηση του $p21^{WAF1/CIP1}$ που ανήκει

που ανήκει στην οικογένεια CIP/KIP των αναστολέων του συμπλέγματος κυκλίνης/CDK → αναστολή της δράσης του συμπλέγματος → αναχαίτιση (arrest) στην $G_1 \rightarrow S$. 2) Ενεργοποίηση μέσω του $p53$ της διαδικασίας απόπτωσης (του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου). Είναι άγνωστο ποιιά από τις δύο διαδικασίες θα ακολουθήσει το κάθε κύτταρο σε κάθε περίπτωση.

Σε περίπτωση μη φυσιολογικής δράσης του $p53$ λόγω μετάλλαξης του η καρκινογένεση προάγεται καθώς το κύτταρο με το προβληματικό DNA συνεχίζει να αυξάνεται λόγω της μη αναστολής του κυτταρικού κύκλου, και καθώς η διαδικασία της απόπτωσης απενεργοποιείται τα προβληματικά κύτταρα συνεχίζουν να πληθύνονται.

- Σημείο ελέγχου φάσης S .

Το γονίδιο ATM, το οποίο και μεταλλάσσεται στο Σύνδρομο Αταξίας-Τηλαγγειεκτασίας, φαίνεται ότι παίζει ρόλο σημείου ελέγχου στην φάση αυτή. Πρόκειται για μια πυρηνική και κυτταροπλασματική κινάση που προάγει την φωσφορυλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα σημεία ελέγχου της βλάβης και της επισκευής του DNA.

- Σημείο ελέγχου μεταξύ φάσεων G_2 και M .

Σημαντικό ρόλο στην αναχαίτιση του κυτταρικού κύκλου κατά την μετάβαση από την φάση G_2 στην φάση M μετά από βλάβη του DNA παίζει η ενεργοποίηση του συμπλέγματος κυκλίνης B/CDK1 που υπό φυσιολογικές συνθήκες επιτρέπει στο κύτταρο να εισέλθει στη φάση της μίτωσης.

Συγκεκριμένα, η βλάβη του DNA προκαλεί: ενεργοποίηση της κινάσης $chk1$ → φωσφορυλίωση του $cdc25$, γεγονός απαραίτητο για την ενεργοποίηση του συ-

μπλέγματος cyclin B/CDK1 → αναχαίτιση του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποίηση της διαδικασίας αυτής αποτελεί κριτικής σημασίας παράγοντα της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων προς την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Στη διαδικασία αυτή έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται τα ακόλουθα γονίδια: RAD9, RAD17, RAD24, MEC1, MEC2 και MEC3.

- *Σημείο ελέγχου φάσης M.*

Η φάση της μίτωσης, όπου το κύτταρο διαιρείται σε δύο πανομοιότυπα κύτταρα, και το καθένα περιέχει το ένα από τα δύο πανομοιότυπα ζεύγη χρωμοσωμάτων που έχουν προκύψει από τον διπλασιασμό του DNA κατά την φάση S, ολοκληρώνεται σε τέσσερις διαδοχικές φάσεις:

- i. Πρόφαση
- ii. Μετάφαση
- iii. Ανάφαση
- iv. Τελόφαση.

Το σημείο ελέγχου για την φάση της μίτωσης βρίσκεται κατά την μετάβαση από την Μετάφαση στην Ανάφαση όπου τα χρωμοσώματα συνδέονται στην μιτωτική άτρακτο με σκοπό την σύνδεση όλων των ζευγών χρωμοσωμάτων σε ενιαίο σύνολο. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή είναι τα: MAD1, MAD2, MAD3, BUB1, BUB2, BUB3, και πιθανώς το p53. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών οδηγούν σε χρωσωμικές ανωμαλίες που είναι δυνατόν να προκαλέσουν καρκινογένεση.

- *Γήρανση του κυττάρου.*

Πρόκειται για ένα σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που διενεργείται μέσω της δράσης (ή μη δράσης) του ενζύμου τελομεράση.

Τα τελομερίδια (telomeres) είναι επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες που βρίσκονται στα άκρα όλων των γραμμικών

(linear) χρωμοσωμάτων. Με 46 χρωμοσώματα στο ανθρώπινο κύτταρο υπάρχουν 92 τελομερίδια, αποτελούμενα από χιλιάδες επαναλήψεις των 6 νουκλεοτιδίων TTAGGG.

Στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα παρατηρείται βαθμιαία βράχυνση των τελομεριδίων μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα την διαρκώς μειούμενη μέχρι κατάρρευσης ικανότητα των κυττάρων για διαίρεση. Έχει υποστηριχθεί ότι η διαδικασία αυτή είναι συνδεδεμένη με την φυσιολογική γήρανση (κυττάρου και οργανισμού).

Το ένζυμο τελομεράση είναι μία ριβονουκλεοπρωτεΐνη που συντηρεί το μήκος του τελομεριδίου συνθέτοντας τις τελομερικές DNA επαναλήψεις TTAGGG (μηχανισμός ανάστροφης αντιγραφής–reverse transcriptase) και προσθέτοντάς τες στην άκρη του τελομεριδίου.

Ενεργός τελομεράση (η ενεργός καταλυτική της υπομονάδα h-TERT) ανευρίσκεται σε φυσιολογικούς εμβρυικούς ιστούς και φυσιολογικά γεννητικά κύτταρα ενώ δεν είναι ανιχνεύσιμη σε φυσιολογικά σωματικά κύτταρα εκτός από τα φυσιολογικά κύτταρα ανανέωσης ιστών (αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, βασικά κύτταρα της επιδερμίδας, κύτταρα του ενδομητρίου, κύτταρα των κρυπών του εντέρου, κλπ). Επιπλέον, είναι παρούσα στα πλείστα των καρκινικών κυττάρων, προσφέροντάς τους ικανότητα για συνεχείς διαιρέσεις και «αθανασία».

ΕΠΙ ΜΕΡΟΥΣ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Η G₁ φάση → Μετάβαση στην φάση S

Όταν το κύτταρο εισέλθει στην φάση G₁ (μέση διάρκεια ≈ 10 ώρες), υπόκειται σε συγκεκριμένες βιοχημικές αλλαγές προκειμένου να προετοιμαστεί για την

είσοδο του στην φάση S. Κατά την διάρκεια της φάσης G₁, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το κύτταρο για να συνεχίσει την πορεία του προς την φάση S θα πρέπει κάτω από επίδραση επαρκούς ποσότητας ρυθμιστικών παραγόντων (εξωκυτταρίων ή και ενδοκυτταρίων) να διέλθει από το περιοριστικό σημείο (restriction point) που σηματοδοτεί την είσοδο στην φάση G₀, μετά από το οποίο η παρουσία των παραγόντων αυτών δεν κρίνεται απαραίτητη για την συνέχιση του κυτταρικού κύκλου.

Για την διενέργεια και την ολοκλήρωση όλων των πολύπλοκων βιοχημικών διαδικασιών που συμβαίνουν στη φάση μετάβασης από την φάση G₁ στην φάση S κεντρικό ρόλο παίζει η πρωτεΐνη RB. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή είναι το πρώτο που ανακαλύφθηκε ότι αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο (ογκοκατασταλτικό γονίδιο) και σχετίζεται με το ρετινοβλάστωμα.

Για να φθάσουμε στην δράση της πρωτεΐνης RB έχουν προηγηθεί συγκεκριμένες διαδικασίες που ξεκινούν από την παρουσία και επίδραση αυξητικών παραγόντων, κάτω από την επίδραση των οποίων διεγείρονται συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων, οι κυκλίνες. Οι κυκλίνες συνιστούν μία οικογένεια που περιλαμβάνει τις:

Κυκλίνες D (D₁, D₂, D₃)

Κυκλίνη E

Κυκλίνη A

Κυκλίνη B

Η ενεργοποίηση των κυκλινών αυτών έχει σαν συνέπεια την αύξηση της ποσότητάς τους σε διάφορες χρονικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Στην φάση G₁ έχουμε αρχικά την αύξηση της παραγωγής και την ενεργοποίησή κατά πρώτον των κυκλινών της

ομάδος D και προς το τέλος της φάσης G₁ της ομάδος E των κυκλινών. Οι υπόλοιπες ομάδες παράγονται και ενεργοποιούνται αργότερα.

Η κατ' αρχάς ενεργοποίηση των κυκλινών της ομάδος D οδηγεί στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενδοκυτταρίων πρωτεϊνικών ενζύμων που ονομάζονται cdk (σερίνη-θειονίνη κινάσες), των οποίων η ενεργοποίηση πραγματοποιείται μέσω δομικών αλλαγών στο μόριό τους, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλέγματος κυκλίνης/cdk. Οι cdk είναι τουλάχιστον επτά και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την δομή, ως προς την λειτουργία (συνδέονται με διαφορετική οικογένεια κυκλινών η καθεμιά κλπ) και ως προς την σχέση τους με την καρκτινογένεση.

Στην φάση G₁ η αρχικά ενεργοποιούμενη κυκλίνη D συνδέεται και ενεργοποιεί τις ενζυμικές πρωτεΐνες cdk_{4,6}, και το σύμπλεγμα cyclin D_(1,2,3) που δημιουργείται ασκεί την δράση του φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη RB. Η πρωτεΐνη RB υπό φυσιολογικές συνθήκες σχηματίζει σύμπλοκο με ποικίλους αντιγραφικούς παράγοντες, ο σημαντικότερος των οποίων φαίνεται ότι είναι ο E2F-1. Η σύνδεση RB - E2F-1 δεν επιτρέπει την εκδήλωση της δράσης του E2F-1 που συνίσταται στην ενεργοποίηση άλλων γονιδίων και την προαγωγή της διαδικασίας του κυτταρικού κύκλου.

Με την διαδικασία αυτή η RB διακόπτει την κινητικότητα του κυττάρου μη επιτρέποντας την είσοδό του στην φάση S (ογκοκατασταλτική δράση του RB). Η φωσφορυλίωση του RB που διαμεσολαβείται από την δράση του συμπλέγματος cyclin/CDK οδηγεί στην απενεργοποίησή του ώστε ο αντιγραφικός παράγων E2F-1, και όσοι άλλοι παράγοντες

πιθανώς συμμετέχουν στη διαδικασία της αντιγραφής, ενεργοποιούν τα υπεύθυνα για την είσοδο του κυττάρου στην φάση S γονίδια.

Η δράση του συμπλέγματος cyclin/CDK υπόκειται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Ο σπουδαιότερος αυτών επιτελείται μέσω της δράσης των αναστολέων των κυκλινο-εξαρθώμενων κινασών (CDKs). Διακρίνονται σε δύο τάξεις: 1) την οικογένεια KIP (kinase inhibitory protein) που περιλαμβάνει τις p21^{WAF/CIP1}, p27^{KIP1}, και p57^{KIP2}. Οι αναστολείς αυτής της ομάδας μπορούν να συνδέονται και να αναστέλλουν την δράση όλων των συμπλεγμάτων cyclin/CDK.

2) την οικογένεια INK4 που περιλαμβάνει τις p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, και p19^{INK4d}. Οι πρωτεΐνες αυτές διαφέρουν από την προηγούμενη οικογένεια λόγω του ότι εμφανίζουν ειδικότητα ως προς την σύνδεσή τους με την κυκλίνη D.

Οι CDKs συνολικά αναστέλλουν την δράση του συμπλέγματος cyclin/cdk και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναχαίτιση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G₁, στην διαφοροποίηση του κυττάρου, στην γήρανσή του, και στην απάντησή του σε βλάβη του DNA.

Η φάση S

Στην διάρκεια αυτής της φάσης το κύτταρο διπλασιάζει το γενετικό του υλικό με την διαδικασία της αντιγραφής του DNA δημιουργώντας ένα ακριβές αντίγραφο του γενετικού υλικού ώστε κάθε θυγατρικό κύτταρο να έχει ένα χρωμόσωμα από τα δύο του κάθε ζεύγους που θα προκύψει από την φάση S.

Η διαδικασία της αντιγραφής του DNA ξεκινά από συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στην διπλή άλυσο του DNA και θα πρέπει να γίνει με απόλυτη ακρίβεια ούτως ώστε να μη

υπάρχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Ως γνωστόν, το DNA αποτελείται από διπλή έλικα και κατά την αντιγραφή του κάθε μιά από τις δύο έλικες χρησιμεύει ως πρότυπο (μήτρα) για την δημιουργία μιας πανοιότυπης θυγατρικής έλικας. Με τον τρόπο αυτό το κύτταρο επιταχύνει την διαδικασία της αντιγραφής του DNA. Τα ένζυμα που καταλύουν την διαδικασία αυτή είναι οι DNA-πολυμεράσες και έχουν περιγραφεί τρεις: α, δ, και ε. Ρόλος τους είναι η διασφάλιση ότι κάθε έλικα του DNA θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την δημιουργία ενός πανομοιότυπου αντιγράφου κάθε φορά.

Η διαδικασία της αντιγραφής του DNA δεν ξεκινά από ένα μοναδικό σημείο της έλικας αλλά από πολλά σημεία ταυτόχρονα. Με τον τρόπο αυτό το κύτταρο μειώνει σημαντικά τη διάρκεια της φάσης S καθώς, σε αντίθετη περίπτωση θα χρειαζόταν ένα περίπου μήνα για την ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA. Όπως ξετυλίγονται οι 2 έλικες του DNA, κάθε μιά χρησιμεύει ως πρότυπο για την δημιουργία ενός πανομοιότυπου αντιγράφου, δημιουργώντας έτσι το «Replication fork». Κάθε έλικα αντιγράφεται με κατεύθυνση από το 5' άκρο της προς το 3' άκρο της. Η μιά από τις δύο έλικες του DNA αντιγράφεται συνεχώς και η άλλη με διακοπές, όμως και οι δύο διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα. Πολλαπλές πρωτεΐνες φαίνεται ότι συμμετέχουν σ' αυτή την διαδικασία (DNA-πολυμεράσες, DNA-πριμάσες, κλπ).

Παρά τους πολύπλοκους μηχανισμούς από τους οποίους ελέγχεται η διαδικασία αντιγραφής του DNA, σφάλματα μπορούν να προκύψουν. Στην περίπτωση αυτή τα προβληματικά νουκλεοτίδια απομακρύνονται από το DNA μέσω της δράσεως των εξωνουκλεασών και πολυ-

μερασών. Πρόκειται για έναν από τους διορθωτικούς μηχανισμούς του DNA που εκδηλώνονται σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ανωμαλίες στους μηχανισμούς και τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκίνου.

Μίτωση

Κατά την διάρκεια της μίτωσης (μέση διάρκεια ≈ 1 ώρα) το κύτταρο με ήδη διπλασιασμένο το γενετικό του υλικό σε 2 πανομοιότυπα αντίγραφα είναι έτοιμο να δημιουργήσει δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα που το καθένα θα περιέχει το ένα από τα δύο ζεύγη ελίκων DNA που δημιουργήθηκαν στην φάση S. Πρόκειται για σημαντική διαδικασία όπου οποιαδήποτε ανωμαλία παρουσιαστεί κατά την διάρκειά της δεν μπορεί να επιδιορθωθεί.

Όπως όλες οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου, και η μίτωση υπόκειται σε ποικίλους και αυστηρούς μηχανισμούς ελέγχου με σκοπό να διασφαλισθεί η ακρίβεια της διαδικασίας. Η μίτωση ολοκληρώνεται σε 4 φάσεις, την πρόφαση, την μετάφαση, την ανάφαση, και την τελόφαση, και σε κάθε μιά επιτελούνται διαφορετικές διαδικασίες. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση καθώς τότε πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των χρωματίδων που θα λάβει το καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα. Έτσι τα πλέον σημαντικά σημεία του κύκλου είναι η είσοδος στην μίτωση, η μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση, και η έξοδος από την μίτωση.

Οι βιοχημικές αλλαγές που οδηγούν στην φάση M αρχίζουν με την ενεργοποίηση του MPF (Maturation ή Mitosis Promoting Factor) που ουσιαστικά είναι το σύμπλεγμα cyclin B/cdk1, αποκαλού-

μενο και cdc2. Για τον σκοπό αυτό αυξάνεται η παραγωγή και ελαττώνεται η αποδόμηση της κυκλίνης B που κορυφώνεται λίγο πριν την έναρξη της μίτωσης. Όπως συμβαίνει και με άλλους προαγωγούς (promoters) κυτταρικών διαδικασιών ο MPF τελεί υπό την διεγερτική ή ανασταλτική επίδραση ερεθισμάτων:

- i) APC/C (Anaphase Promoting Complex/cyclosome C). Όταν το σύμπλεγμα αυτό απενεργοποιηθεί προκαλείται ενεργοποίηση του MPF.
- ii) cdc25. Προκαλεί ενεργοποίηση του συμπλέγματος cyclinB/cdk1. Όταν το σύμπλεγμα αυτό ενεργοποιηθεί μέσω θετικού μηχανισμού ανατροφοδότησης (feed-back) προκαλεί αύξηση του cdc25 που ενεργοποιεί περαιτέρω το σύμπλεγμα.
- iii) PLKs (Polo like kinases). Έχουν πολλαπλούς ρόλους: α) ενεργοποίηση του MPF μέσω του cdc25. β) ταυτόχρονα όμως ο MPF προκαλεί και αυτός σε μεταγενέστερα στάδια της μίτωσης ενεργοποίηση των PLKs όταν ρυθμίζουν τις λειτουργίες της μιτωτικής ατράκτου (σχηματισμός της ατράκτου, διαχωρισμός των χρωματίδων, και πιθανώς κυτταρική διαίρεση). γ) ενεργοποίηση των APC/C κατά την μετάβαση από την μετάφαση προς την ανάφαση και κατά την έξοδο του κυττάρου από την διαδικασία της μίτωσης. Η ενεργοποίηση αυτή του APC/C προς το τέλος της μίτωσης προκαλεί μείωση του MPF ούτως ώστε διασφαλισθεί η λήξη της διαδικασίας της μίτωσης και το κύτταρο, εισερχόμενο σε φάση G₁, να αρχίσει να προετοιμάζεται για τον νέο κυτταρικό κύκλο.

Οι διαδικασίες που συντελούνται κατά

την διάρκεια της μίτωσης είναι οι εξής: α) Φάση Πρόφασης–Μετάφασης: συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, συναρμο-λόγηση της μιτωτικής ατράκτου, ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων, διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης. β) Φάση Ανάφασης–Τελόφασης: αποσυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, αποσυναρμο-λόγηση της μιτωτικής ατράκτου, δημιουργία πυρηνικής μεμβράνης, κυτκί-νηση (διαχωρισμός του κυττάρου σε δύο θυγατρικά κύτταρα).

ΓΟΝΙΔΙΑ

Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Πρόκειται για μέλη του γονιδιώματος του ανθρώπου τα οποία εμποδίζουν συγκεκριμένες κυτταρικές διαδικασίες που οδηγούν στην καρκινογένεση και στην δημιουργία του καρκινικού κυττάρου. Μεταξύ των αναγνωρισμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων εξέχουσα είναι η θέση του RB και του p53 (πίνακας 1).

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο RB είναι το πρώτο γονίδιο που ανακαλύφθηκε ότι έχει την συγκεκριμένη δράση. Η απενεργοποίησή του προδιαθέτει στην δημιουργία ρετινοβλαστώματος, οστεοσαρκώματος, και πιθανώς καρκίνου μαστού, ουροδόχου κύστης και πνεύμονα. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η ογκοκατασταλτική του δράση ασκείται μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 είναι το συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο στα καρκινικά κύτταρα (περισσότερο από 50% όλων των καρκίνων).

Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και το πρωτεϊνικό του προϊόν δεν είναι απαραίτητο για την ζωή του κυττάρου υπό φυσιολογικές συνθήκες. Όμως σε περι-

πτώσεις βλάβης του DNA είτε διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο μέσω της δράσης του στην πρωτεΐνη p21 είτε προάγει την διαδικασία της απόπτωσης. Χωρίς την δράση του p53 τα κύτταρα που έχουν υποστεί γενετικές βλάβες συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται, προ-διαθέτοντας σε καρκινογένεση.

Στην κατηγορία των ογκοκατασταλ-τικών γονιδίων ανήκουν και εκείνα των οποίων οι πρωτεΐνες συμμετέχουν στην διαδικασία επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Συγκεκριμένα σύνδρομα που σχετίζονται με ελαττωματική διαδικα-σία επιδιόρθωσης του DNA προδιαθέ-τουν σε καρκινογένεση. Στα σύνδρομα αυτά παρατηρούνται βλάβες σε συγκεκριμένα γονίδια που υπό φυσιολογικές συνθήκες λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά, π.χ. στο σύνδρομο Αταξίας – Τελαγγειεκτασίας το γονίδιο ATM με-ταλλάσσεται υπό φυσιολογικές συνθή-κες όταν αναγνωρίζεται βλάβη του DNA το πρωτεϊνικό προϊόν του κωδικοποιεί την ενεργοποίηση του p53.

Απενεργοποίηση των ογκοκατασταλ-τικών γονιδίων μπορεί να συμβεί μέσω μετάλλαξης. Για την έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης απαιτείται μεταλλαξιακή απενεργοποίηση και των δύο αλληλίων των γονιδίων (σχήμα 2).

Σε κάθε χρονική στιγμή ο αριθμός των κυττάρων είναι το αποτέλεσμα του α-ριθμού αυτών που γεννούνται μείον αυ-τών που πεθαίνουν.

Ο αριθμός των κυττάρων που γεννού-νται είναι η συνισταμένη της ευοδατικής δράσης των ογκογονιδίων μείον την α-νασταλτική δράση των ογκοκατασταλ-τικών γονιδίων.

Πίνακας 1. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Γονίδιο	Χρωμοσωμικός τύπος	Λειτουργία	Θέσεις ανάπτυξης καρκίνου
RB1	13q14.2	cell-cycle regulator	αμφιβληστροειδής, οστά, κύστη, μαστός, πάγκρεας
p53	17p13.1	genome-stability regulator	εγκέφαλος, μαστός, λευχαιμία, μαλακά μόρια
p16	9p21	cyclin dependant kinase inhibitor	εγκέφαλος, μελανοκύτταρα
p15	9p21	cyclin dependant kinase inhibitor	λευχαιμία
p18	1p32	cyclin dependant kinase inhibitor	οισοφάγος, πνεύμονας, κύστη, πάγκρεας
p21	6p21	cyclin dependant kinase inhibitor	προστάτης, πνεύμονας
E2F1	20q11	transcription factor	ερυθρολευχαιμία
BRCA1	17q21	transcription factor (?)	μαστός, ωθήκες
BRCA2	13q12-13	transcription factor (?)	μαστός, ωθήκες
WT1	11p13	transcription factor	νεφρός
VHL	3p25-26	modulator of RNA polymerase	νεφρός, ΚΝΣ
PTC1	9q22.3	transcription repressor	δέρμα
TGFβR1	9q33-34	TGF-β receptor	παχύ, αμφιβληστροειδής, ήπαρ, στομάχι
TGFβR2	3p21.3	TGF-β receptor	παχύ, αμφιβληστροειδής, ήπαρ, στομάχι
DPC4	18q21.1	TGF-β receptor	πάγκρεας, παχύ, κύστη, ήπαρ
CDH1	16q22.1	intercellular adhesion	μαστός, ωθήκες, ήπαρ, δέρμα, ενδομήτριο
APC	5q21	cell signalling	παχύ
MCC	5q21	(?)	παχύ
NF1	17q11.2	cell signalling	περιφερικό νευρικό σύστημα, δέρμα
NF2	22q12	cell signalling	ΚΝΣ
MSH2	2p22	mismatch repair protein	παχύ
MLH1	3p21.3	mismatch repair protein	παχύ
DCC	18q21	differentiation factor	παχύ
PTEN	10q23.3	protein/lipid phosphatase	εγκέφαλος, μελανοκύτταρα, προστάτης, θυρεοειδής, μαστός

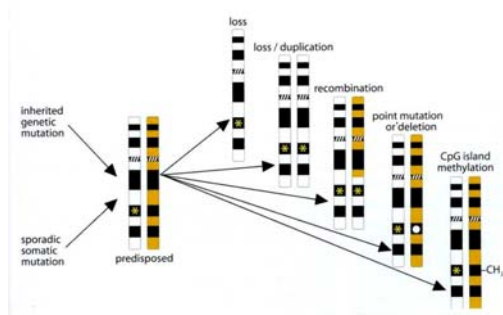
Ο αριθμός των κυττάρων που πεθαίνουν είναι η συνισταμένη της δράσης των γονιδίων που προάγουν την διαδικασία της απόπτωσης μείον την ανασταλτική δράση των αντιαποπτωτικών γονιδίων.

Ογκογονίδια

Στο φυσιολογικό γενετικό υλικό του

κυττάρου υπάρχουν γονίδια, καλούμενα πρωτο-ογκογονίδια, που με αυστηρό μηχανισμό ελέγχουν την φυσιολογική αύξηση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Κύριος ρόλος τους είναι η μεταφορά σημάτων από το εξωτερικό περιβάλλον στον πυρήνα του κυττάρου.

Η πρώτη παρατήρηση των ογκογονιδίων έγινε στους RNA (retro)-ιούς, το γενετικό υλικό των οποίων απεδείχθη ότι προκαλεί καρκινογένεση. Αργότερα τα ογκογονίδια αυτά συσχετίστηκαν με τα πρωτο-ογκογονίδια των φυσιολογικών κυττάρων.



Σχήμα 2. Χρωμοσωμικοί μηχανισμοί απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Αριστερά: η πρώτη μετάλλαξη (*) συμβαίνει σε ένα μονήρες σωματικό κύτταρο και καταλήγει σε σποραδική νόσο. Εναλλακτικά, μπορεί να συμβεί σε ένα γεννητικό κύτταρο (de novo μετάλλαξη) ή να κληρονομηθεί από ένα γονέα φορέα. Δεξιά: Η πρώτη μετάλλαξη μπορεί να απενεργοποιηθεί τελείως (από πάνω προς τα κάτω) με φυσική απάλειψη (deletion) ή ανασυνδυασμό (recombination) του φυσιολογικού χρωμοσώματος, από μία στοχευμένη δεύτερη μετάλλαξη ή απάλειψη του εναπομένου φυσιολογικού χρωμοσώματος ή με μεθυλίωση του προαγωγέα του φυσιολογικού χρωμοσώματος, οδηγώντας σε απώλεια της γονιδιακής έκφρασης.

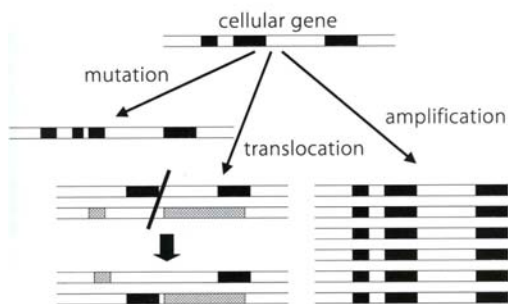
Τα φυσιολογικά πρωτο-ογκογονίδια υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπως π.χ. μετάλλαξη, απώλεια αλληλουχίας, ιογενή λοίμωξη, χρωμοσωμική μετάθεση, κ.ά., μετατρέπονται σε ογκογονίδια που δύνανται να επάγουν την καρκινογένεση.

Η ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια μπορεί να είναι:

1) ποιοτική: αλλαγές σε κωδικοποιημένες περιοχές (code regions) (σημειακές

μεταλλάξεις – point mutations).

2) ποσοτική: α) γονιδιακή υπερέκφραση (gene amplification): αύξηση του αριθμού των αντιγράφων ενός δεδομένου γονιδίου με συνέπεια την υπερέκφρασή του. β) χρωμοσωμική μετάθεση (σχήμα 3).



Σχήμα 3. Μοριακά μονοπάτια ενεργοποίησης ογκογονιδίων.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 100 περίπου ογκογονίδια, κυτταρικής και ιικής προέλευσης.

Η δράση τους εκδηλώνεται μέσω κυτταρικών διαμεσολαβητικών μονοπατιών, με τα οποία τα κύτταρα λαμβάνουν και επεξεργάζονται πληροφορίες και παράγουν βιολογική απάντηση. Στα διαμεσολαβητικά μονοπάτια περιλαμβάνονται εξωτερικά μηνύματα, υποδοχείς, διαμεσολαβητικές πρωτεΐνες, δεύτερα μηνύματα, πρωτεΐνες υπερέκφρασης, ενδογενείς ενεργοποιητές, κ.ά.

Σύμφωνα με την θεωρία της καρκινογένεσης των «πολλαπλών χτυπημάτων», τα ογκογονίδια προκειμένου να ασκήσουν τη δράση τους είναι πιθανό να πρέπει να δράσουν κατά ζεύγη, καθώς η δράση ενός μόνο ογκογονιδίου αρκεί μόνο για την αναστολή της διαδικασίας της απόπτωσης οπότε στη συνέχεια πρέπει να εκδηλωθεί η δράση του δεύτερου ογκογονιδίου ούτως ώστε το κύτταρο να εκδηλώσει καρκινικό φαινόμενο.

Κυτταρικός θάνατος και απόπτωση

Το κύτταρο πεθαίνει φυσιολογικά με ένα από τους ακόλουθους μηχανισμούς:

1) Μηχανισμός νέκρωσης κατά την διάρκεια της οποίας, συνεπεία κυτταρικής βλάβης, το κύτταρο διογκώνεται, λύεται, και τα συστατικά του διασπείρονται στον μεσοκυττάριο χώρο προκαλώντας φλεγμονώδη αντίδραση (παθητική και οξεία διαδικασία).

2) Μηχανισμός απόπτωσης ή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (ενεργητική διαδικασία). Η διαδικασία της απόπτωσης ενεργοποιείται όταν το φυσιολογικό κύτταρο υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη του DNA συνεπεία π.χ. χημικών καρκινογόνων, οξειδωτικού stress, ακτινοβολίας, προκειμένου να διακοπεί ο πολλαπλασιασμός του και η αντιγραφή ενός προβληματικού DNA, πράγμα που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεταλλάξεις (προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στην καρκινογένεση). Πρόκειται για πολύ σημαντική διεργασία για την φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων και την ομοίωση των ιστών.

Τα κύτταρα που έχουν υποστεί απόπτωση έχουν χαρακτηριστική εμφάνιση που είναι το αποτέλεσμα συγκεκριμένων διαδικασιών: συμπύκνωση της χρωματίνης, τεμαχισμός του πυρήνα, συρρίκνωση του κυττάρου, και απώλεια της επαφής με τα γειτονικά κύτταρα. Σαν αποτέλεσμα των διαδικασιών αυτών προκύπτουν συγκεκριμένοι σχηματισμοί (αποπτωτικά σωμάτια - apoptotic bodies) που στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται από τα γειτονικά φαγοκύτταρα οπότε και παρατηρείται ελάχιστη φλεγμονώδης αντίδραση. Σε ενδοκυττάριο επίπεδο, λόγω ενεργοποίησης ενδονουκλεασών, το DNA διασπάται σε μικρότερα

κομμάτια που δίνουν χαρακτηριστική εμφάνιση κατά την ηλεκτροφόρηση σε gel.

Η διαδικασία της απόπτωσης ενεργοποιείται από ποικιλία ερεθισμάτων όπως π.χ. ακτινοβολία, χημειοθεραπεία, ιογενείς λοιμώξεις κ.ά., που οδηγούν στην ενεργοποίηση του p53. Από κει ξεκινά ένα μονοπάτι ενεργοποίησης διάφορων πρωτεϊνών που είτε βρίσκονται στην μεμβράνη (π.χ. IGF-BP3 [Insulin-Like Growth Factor I-Binding Protein 3], και FAS/APO-1, Killer/DRS) με απευθείας δράση στα μιτοχόνδρια, είτε βρίσκονται ενδοκυττάρια και κωδικοποιούνται από το BAX και p53-Induced Gene 3-piG3, που εν τέλει ενεργοποιούν τα μιτοχόνδρια. Σαν συνέπεια της διέγερσης των μιτοχονδρίων απελευθερώνονται παράγοντες ενεργοποίησης της απόπτωσης (AIF) ή κυττόχρωμα C. Εν συνεχεία, το κυττόχρωμα C διεγείρει τις κασπάσες (caspases, οικογένεια ενδοκυτταρίων κυστεϊνικών πρωτεασών οι οποίες προκύπτουν από την διάσπαση προδρόμων μορφών) οι οποίες επάγουν τις μορφολογικές αλλαγές του κυττάρου που ήδη περιγράφηκαν προηγουμένως.

Όπως και ο κυτταρικός κύκλος έτσι και η διαδικασία της απόπτωσης υπόκεινται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι είτε την επάγουν είτε την αναστέλλουν.

Έχουν βρεθεί διάφορα πρωτεϊνικά προϊόντα ογκογονιδίων που δρουν ως αναστολείς της απόπτωσης (αρνητικοί ρυθμιστές). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πρωτεϊνικό παράγωγο του ογκογονιδίου BCL-2. Αυτές οι πρωτεΐνες σχηματίζουν είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή και η αναλογία ενεργοποιητών/αναστολέων της απόπτωσης καθορίζει αν θα ενεργοποιηθεί ή θα αναστα-

λεί η διαδικασία της απόπτωσης (π.χ. BAX/BAX→ενεργοποίηση της απόπτωσης, BCL2/BAX→αναστολή της απόπτωσης).

Πιθανώς όμως η αναστολή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων (π.χ. από την δράση του BCL2) είναι και ένας μηχανισμός αντίστασης στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που ο τρόπος δράσης τους είναι ακριβώς η επαγωγή της (όγκοι ανθεκτικοί στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα).

Τα διάφορα μονοπάτια της διαδικασίας της απόπτωσης έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας με σκοπό την ανεύρεση φαρμάκων που στοχεύουν στην προαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων.

ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. de Lange T. Activation of telomerase in human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2882
2. Dutta A, Bell SP. Initiation of DNA replication of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:293
3. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011
4. Laskey RA, Rairman MP, Blow JJ. S phase of the cell cycle. *Science* 1989;246:609
5. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453
6. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131
7. Nevins JR. E2F: A link between the Rb tumor suppressor gene and viral oncoproteins. *Science* 1992;258:424
8. Neufeld TP, Edgar BA. Connections between growth and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1998;8:784
9. Ohi R, Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:267
10. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672
11. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149
12. Zetterberg A, Larson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:835